



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117980489 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 03

(21) 申请号 202280059234.6

(22) 申请日 2022.07.13

(30) 优先权数据

63/221883 2021.07.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2022/056458 2022.07.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/285987 EN 2023.01.19

(71) 申请人 梅里特斯英国第二有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 A·乔治亚迪斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 李波 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书2页 说明书45页

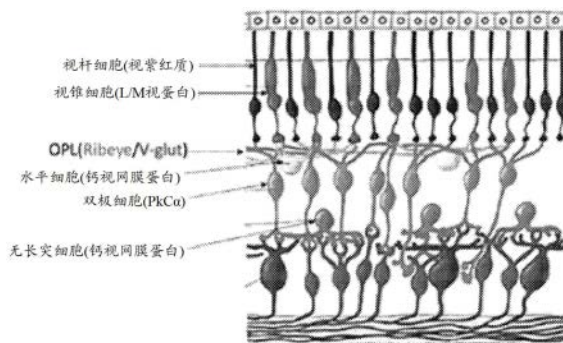
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

RETGC基因疗法

(57) 摘要

本文提供了用于表达视网膜鸟苷酸环化酶1 (RetGC1) 的表达构建体、病毒基因组和载体,以及包含本文公开的载体的药物组合物。还提供了使用本文公开的表达构建体和载体的方法,包括治疗有需要的受试者的视网膜疾病的方法,其中所述视网膜疾病与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体。



1. 一种表达构建体,所述表达构建体包含:
 - (a) 赋予在感光细胞中表达的启动子序列,和
 - (b) 编码视网膜鸟苷酸环化酶1(RetGC1)的核酸序列;其中所述核酸序列与所述启动子可操作地连接。
2. 如权利要求1所述的表达构建体,其中所述启动子序列是视紫红质激酶(RK)或巨细胞病毒(CMV)启动子序列。
3. 如权利要求2所述的表达构建体,其中所述启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少90%同一的序列。
4. 如权利要求3所述的表达构建体,其中所述启动子序列包含SEQ ID NO:7。
5. 如权利要求2所述的表达构建体,其中所述启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少90%同一的序列。
6. 如权利要求5所述的表达构建体,其中所述启动子序列包含SEQ ID NO:8。
7. 如前述权利要求中任一项所述的表达构建体,其中所述表达构建体还包含转录后调控元件。
8. 如权利要求7所述的表达构建体,其中所述转录后调控元件包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。
9. 如权利要求7所述的表达构建体,其中所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少90%同一的序列。
10. 如权利要求9所述的表达构建体,其中所述转录后调控元件包含SEQ ID NO:10。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的表达构建体,其中编码所述RetGC1的所述核酸序列是野生型RetGC1基因。
12. 如权利要求1-10中任一项所述的表达构建体,其中编码所述RetGC1的所述核酸序列是密码子优化的序列。
13. 如权利要求1-10中任一项所述的表达构建体,其中编码所述RetGC1的所述核酸序列包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14至少90%同一的序列。
14. 如权利要求13所述的表达构建体,其中编码所述RetGC1的所述核酸序列包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14。
15. 如权利要求1-10中任一项所述的表达构建体,其中编码所述RetGC1的所述核酸序列编码蛋白质,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:12至少90%同一的序列。
16. 如权利要求15所述的表达构建体,其中编码所述RetGC1的所述核酸序列编码包含SEQ ID NO:12的蛋白质。
17. 如前述权利要求中任一项所述的表达构建体,其中所述表达构建体还包含聚腺苷酸化信号。
18. 如权利要求17所述的表达构建体,其中所述聚腺苷酸化信号包含牛生长激素聚腺苷酸化(BGH-polyA)信号。
19. 如权利要求17所述的表达构建体,其中所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少90%同一的序列。
20. 如权利要求19所述的表达构建体,其中所述聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:11。
21. 如前述权利要求中任一项所述的表达构建体,其中所述表达构建体包含与选自由

SEQ ID NO:1-4组成的组的序列至少90%同一的序列。

22. 如权利要求21所述的表达构建体,其中所述表达构建体包含选自由SEQ ID NO:1-4组成的组的序列。

23. 一种载体,所述载体包含如前述权利要求中任一项所述的表达构建体。

24. 如权利要求23所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

25. 如权利要求24所述的载体,其中所述载体是腺相关病毒(AAV)载体。

26. 如权利要求25所述的载体,其中所述载体包含源自AAV血清型AAV2的基因组。

27. 如权利要求25或26中任一项所述的载体,其中所述载体包含源自AAV7m8的衣壳。

28. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求23-27中任一项所述的载体和药学上可接受的载剂。

29. 一种用于治疗有需要的受试者的视网膜疾病的方法,其中所述视网膜疾病与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求23-27中任一项所述的载体或如权利要求28所述的药物组合物。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述视网膜疾病是视锥视杆营养不良(CRD)或莱伯氏先天性黑朦1型(LCA1)。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述视网膜疾病是LCA1。

32. 一种增加有需要的受试者中视杆cGMP特异性3',5'-环状磷酸二酯酶亚基 β (PDE6 β)表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求23-27中任一项所述的载体或如权利要求28所述的药物组合物。

33. 一种增加有需要的受试者的光感受器中的环状单磷酸鸟苷(cGMP)水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用如权利要求23-27中任一项所述的载体或如权利要求28所述的药物组合物。

34. 如权利要求29-33中任一项所述的方法,其中所述载体或所述药物组合物是通过眼内注射施用。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述载体或所述药物组合物被注射到所述受试者的中央视网膜中。

RETGC基因疗法

发明领域

[0001] 本公开总体上涉及分子生物学和医学领域。更具体地,本公开提供了用于治疗视网膜疾病的基因疗法的组合物和方法。

背景技术

[0002] 视网膜鸟苷酸环化酶 (RetGC) 位于光感受器外节的圆盘膜中,并且是光感受器生理学中的关键酶之一,在哺乳动物视杆和视锥中产生光转导的第二信使环状单磷酸鸟苷 (cGMP)。在光感受器激发和恢复过程中,两种RetGC同工酶RetGC1和RetGC2(也分别称为GC-E和GC-F或ROSGC1和ROSGC2) 受到通过鸟苷酸环化酶激活蛋白 (GCAP) 介导的钙反馈的严格调控。

[0003] 编码RetGC的基因GUCY2D中超过100个突变已知导致两种主要疾病:常染色体隐性莱伯氏先天性黑朦1型 (arLCA或LCA1) 或常染色体显性视锥视杆营养不良 (adCRD)。在CRD中,变性始于视锥细胞,并且由于未受影响的视网膜黄斑中高度存在视锥细胞而导致中心视野丧失。当视杆细胞变性跟着视锥细胞变性时,CRD可导致完全失明。LCA1表型显得甚至更加严重,在生命早期出现光感受器功能丧失和失明。

[0004] 因此,迫切需要用于治疗与GUCY2D突变相关的视网膜疾病(包括但不限于LCA1和CRD)的新疗法。

发明内容

[0005] 在一方面,本公开提供了一种表达构建体,所述表达构建体包含:(a) 赋予在感光细胞中表达的启动子序列,和(b) 编码视网膜鸟苷酸环化酶1 (RetGC1) 的核酸序列,其中所述核酸序列可操作地连接至启动子。

[0006] 在一个实施方案中,启动子序列是视紫红质激酶 (RK) 或巨细胞病毒 (CMV) 启动子序列。

[0007] 在一个实施方案中,启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少90%同一的序列。在一个实施方案中,启动子序列包含SEQ ID NO:7。

[0008] 在一个实施方案中,启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少90%同一的序列。在一个实施方案中,启动子序列包含SEQ ID NO:8。

[0009] 在一个实施方案中,表达构建体还包含转录后调控元件。在一个实施方案中,转录后调控包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPRE)。在一个实施方案中,转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少90%同一的序列。在一个实施方案中,转录后调控元件包含SEQ ID NO:10。

[0010] 在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列是来自野生型RetGC1 (GUCY2D) 基因的编码序列 (cds)。在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列是密码子优化的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸

序列包含与SEQ ID NO:13至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:14至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列编码蛋白质,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:12至少90%同一的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列编码包含SEQ ID NO:12的蛋白质。

[0011] 在一个实施方案中,表达构建体还包含聚腺苷酸化信号。在实施方案中,聚腺苷酸化信号包含牛生长激素聚腺苷酸化(BGH-polyA)信号。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少90%同一的序列。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:11。

[0012] 在一些实施方案中,表达构建体包含与选自SEQ ID NO:1-4组成的组的序列至少90%同一的序列。在一些实施方案中,表达构建体包含选自SEQ ID NO:1-4组成的组的序列。

[0013] 在一方面,提供了一种包含本文公开的表达构建体的载体。在实施方案中,载体是病毒载体。在一个实施方案中,载体是腺相关病毒(AAV)载体。在一个实施方案中,载体包含源自AAV血清型AAV2的基因组。在一个实施方案中,载体包含源自AAV7m8的衣壳。

[0014] 在一方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文公开的载体和药学上可接受的载剂(carrier)。

[0015] 在一方面,提供了一种用于治疗有需要的受试者的视网膜疾病的方法,其中所述视网膜疾病与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体或药物组合物。在一些实施方案中,视网膜疾病是视锥视杆营养不良(CRD)或莱伯氏先天性黑朦1型(LCA1)。在一个实施方案中,视网膜疾病是LCA1。

[0016] 在一方面,提供了一种增加有需要的受试者中视杆cGMP特异性3',5'-环状磷酸二酯酶亚基 β (PDE6 β)表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体或药物组合物。

[0017] 在一方面,提供了一种增加有需要的受试者的光感受器中的环状单磷酸鸟苷(cGMP)水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体或药物组合物。

[0018] 在实施方案中,载体或药物组合物是通过眼内注射施用。在实施方案中,载体或药物组合物被注射到受试者的中央视网膜中。

附图说明

[0019] 图1示出显示细胞层的人类视网膜的示意图。

[0020] 图2示出第20周的野生型(WT)和RetGC KO iPSC视网膜类器官。顶行:明场图像显示在WT和RetGC KO两者中在外周边缘处具有外节“刷状边界”的整个类器官。中间行:视锥和视杆外节和内节用视锥视蛋白和视紫红质染色。外丛状层(OPL)和内丛状层(IPL)中的突触用Ribeye和VGlut染色。双极细胞和无长突/神经节细胞用PKCa和钙视网膜蛋白染色。RetGC在WT中定位于光感受器外节,并且在RetGC KO类器官中不存在。

[0021] 图3示出对照和RetGC KO类器官中从第40天至第220天整个WT和RetGC Ko类器官中的总蛋白质表达(蛋白质印迹)(针对 β 微管蛋白归一化)。

[0022] 图4示出包装到AAV 7m8衣壳中的四个转基因盒的设计。RK和CMV启动子与WT GUCY2D基因整合,带有或不带有WPRE元件和牛生长激素聚腺苷酸化(BGH-polyA)信号。

[0023] 图5示出WT和转导的RetGC KO类器官中的PDE6染色强度。用视紫红质和PDE6 β 染色的视网膜类器官外节的代表性图像。

[0024] 图6示出视紫红质阳性外节内PDE6 β 染色强度的定量免疫荧光。每个点代表单个类器官的平铺扫描。染色强度表示为在同一块上加工、染色和成像的WT类器官的百分比。

[0025] 图7示出用7m8载体转导后确定视网膜类器官中RetGC和 β 微管蛋白(管家)的蛋白质表达的蛋白质印迹的结果。显示的是RetGC相对于 β 微管蛋白的蛋白质印迹信号的比率计量光密度测定定量。

[0026] 图8示出通过FRET测定对cGMP浓度[nM]的定量。将吸光度读数针对总蛋白质量[ug]归一化。将WT对比RetGC敲除(未转导的NT)类器官与用四种载体转导的类器官进行比较(对于每个实验组,n=7个胚状体(EB))。

具体实施方式

[0027] 本文提供了用于表达视网膜鸟苷酸环化酶1(RetGC1)的表达构建体、病毒基因组和载体,以及使用所述表达构建体、病毒基因组和载体来治疗与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关的视网膜疾病的方法。

[0028] RetGC

[0029] RetGC催化光感受器的视杆和视锥中cGMP的合成。因此,RetGC通过在视觉周期过程中介导cGMP补充而在光转导中发挥重要作用。

[0030] 在光感受器激发和恢复过程中,两种RetGC同工酶RetGC1和RetGC2(也分别称为GC-E和GC-F或ROSGC1和ROSGC2)受到通过鸟苷酸环化酶激活蛋白(GCAP)介导的钙反馈的严格调控。

[0031] RetGC1的作用是在光暴露后补充cGMP水平。在黑暗中,cGMP水平维持在稳定速率,从而保持cGMP门控通道开放并通过允许内向电流流入来维持细胞的部分去极化。暴露于光导致cGMP水解和通道关闭,从而促进细胞内Ca²⁺急剧下降和细胞超极化。在低Ca²⁺浓度下,鸟苷酸环化酶激活蛋白(GCAP)刺激GC1活性,导致cGMP合成、通道重新开放和暗态恢复。

[0032] 当可见光子通过外节时,它被嵌入外节膜中的视蛋白捕获。第二信使cGMP是视觉周期的信号传导步骤中的主要组分。其在外节的细胞质中的合成和降解的平衡控制视觉周期的信号传导步骤。它是通过RetGC所催化的反应由GTP生成的。cGMP与允许Ca²⁺离子流入的通道结合。在光转导时,cGMP被PDE6水解为GMP,导致cGMP通道关闭。这抑制Ca²⁺的流入,当Ca²⁺被冲出圆盘膜时,其浓度降低。

[0033] 在光转导周期中,光子被视杆中的视紫红质和视锥中的视锥视蛋白吸收,其中11-顺式视网膜被转化为全反式视网膜。全反式视网膜激活G蛋白转导蛋白的 α 亚基,并且GDP在所述过程中转化为GTP。所生成的GTP然后激活磷酸二酯酶6(PDE6)的 γ 亚基,从而允许其抑制cGMP产生。这导致cGMP门控通道关闭,并且因此阻止钙离子的流入。暗态下的GCAP与钙离子结合,从而阻止它们与RetGC缔合。在光状态下从GCAP释放Ca²⁺允许GCAP结合RetGC并产生cGMP。与此平行的是,全反式通过经由视紫红质激酶磷酸化并与抑制蛋白结合而失活。G蛋白转导蛋白结合的GTP再次转化为GDP。随后整个周期本身重复。

[0034] RetGC1在人类中由基因GUCY2D编码,并且在小鼠中由基因Gucy2e编码。RetGC2在人类中由基因GUCY2F编码。

[0035] 编码RetGC1的GUCY2D基因中的突变导致人的严重视网膜疾病,冰球主要是常染色体显性视锥视杆营养不良(adCRD)或常染色体隐性莱伯氏先天性黑朦1型(arLCA)。在CRD中,变性始于视锥细胞,并且由于未受影响的视网膜黄斑中高度存在视锥细胞而导致中心视野丧失。当视杆细胞变性跟着视锥细胞变性时,CRD可导致完全失明。LCA1表型显得甚至更加严重,在生命早期出现光感受器功能丧失和失明。另一种参与LCA(12型)发病机制的基因是编码视网膜变性3(RD3)蛋白的rd3,其是GCAP介导的RetGC1激活的有效抑制因子并且参与RetGC1从光感受器的内节至外节的运输。

[0036] 总共描述了144个不同的GUCY2D突变。大多数(127个突变)导致受影响患者中的LCA表型。虽然LCA相关突变通常是隐性的和无效的(主要是移码突变、无义突变和剪接突变),并且可影响RetGC酶的所有结构域,但CRD突变主要是显性错义突变,并且聚集在“热点区域”,所述热点区域对应于E837与T849之间位置处的二聚化结构域。

[0037] LCA1患者在出生后第一年内就诊,并且通常被描述为视力下降、视网膜电图(ERG)反应减少或无法记录、眼球震颤、数码眼体征和眼底明显正常。关于与这种疾病相关的光感受器变性程度的报道一直是相互矛盾的。对两个死后视网膜(一个26周龄的早产流产者和一个12岁的供体)的组织病理学分析揭示了视杆和视锥两者中光感受器变性的迹象。使用最先进的活体成像(即光学相干断层扫描)的稍后研究揭示了在53岁的患者中没有明显的变性。最新的研究表明,尽管存在高度视觉障碍,但LCA1患者仍保留正常的光感受器层状结构,除了中心凹锥体外节异常以及在患者中的中心凹锥体丢失。

[0038] 在CRD中,视杆细胞功能异常的严重程度低于视锥细胞功能异常的严重程度,并且可在疾病过程中比视锥细胞功能障碍更晚检测到。通过电生理学评估确定诊断;功能结果取决于疾病的阶段和个体的年龄。周围以及中央视野丧失的表现可能加强视锥视杆营养不良的诊断。

[0039] 表达构建体

[0040] 在一方面,提供了一种表达构建体,所述表达构建体包含:(a)赋予在感光细胞中表达的启动子序列,和(b)编码视网膜鸟苷酸环化酶(RetGC1)的核酸序列,其中所述核酸序列可操作地连接至启动子。如本文所用,“可操作地连接”是指与RetGC1的编码序列(cds)邻接的表达控制序列(例如,启动子)和以反式或相距一定距离起作用以控制RetGC1的表达的表达控制序列。表达控制序列包括适当转录起始序列、终止序列、启动子序列和增强子序列;高效RNA加工信号,诸如剪接信号和聚腺苷酸化信号;使细胞质mRNA稳定的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;和在需要时增强蛋白质加工和/或分泌的序列。

[0041] 大量的表达控制序列(例如天然的、组成型的、诱导型的和/或组织特异性的)是本领域已知的,并且可用于驱动RetGC1(GUCY2D)转基因的表达,这取决于所需表达的类型。对于真核细胞,表达控制序列通常包括启动子、增强子以及可包括剪接供体和受体位点的聚腺苷酸化序列。聚腺苷酸化序列通常插入在编码RetGC1的序列之后和3' ITR序列之前。可用于本文公开的方法中的rAAV的另一种调控组分是内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列可用于从单个基因转录物产生多于一个多肽。IRES(或其他合适的序列)用于产生含有多于一

条多肽链的蛋白质,或用于从同一细胞或在同一细胞内表达两种不同的蛋白质。示例性 IRES 是脊髓灰质炎病毒内部核糖体进入序列,其支持光感受器、RPE 和神经节细胞中的转基因表达。优选地, IRES 位于 rAAV 载体中编码 RetGC1 的序列的 3'。

[0042] 在一个实施方案中,启动子序列包含视紫红质激酶 (RK) 启动子序列。在实施方案中,启动子序列包含与 SEQ ID NO:7 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,启动子序列包含 SEQ ID NO:7。

[0043] 在一个实施方案中,启动子序列包含巨细胞病毒 (CMV) 启动子序列。在实施方案中,启动子序列包含与 SEQ ID NO:8 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,启动子序列包含 SEQ ID NO:8。

[0044] 在一些实施方案中,启动子对感光细胞具有特异性,即启动子在感光细胞中具有活性,但在其他细胞类型中具有降低的活性或没有活性。

[0045] 在一个实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列是来自野生型 RetGC1 (GUCY2D) 基因的编码序列。在一个实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列是密码子优化的序列。在一些实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列包含与 SEQ ID NO:9 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列包含 SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列包含与 SEQ ID NO:13 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列包含 SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列包含与 SEQ ID NO:14 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列包含 SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列编码蛋白质,所述蛋白质包含与 SEQ ID NO:12 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一些实施方案中,编码 RetGC1 的核酸序列编码包含 SEQ ID NO:12 的蛋白质。

[0046] 在一个实施方案中,表达构建体包含转录后调控元件。在一个实施方案中,表达构建体包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPRE)。在一些实施方案中,转录后调控元件包含与 SEQ ID NO:10 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,转录后调控元件包含 SEQ ID NO:10。

[0047] 在一个实施方案中,表达构建体包含聚腺苷酸化信号。在一个实施方案中,表达构建体包含牛生长激素聚腺苷酸化 (BGH-polyA) 信号。在一些实施方案中,聚腺苷酸化信号包含与 SEQ ID NO:11 至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的序列。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号包含 SEQ ID NO:11。

[0048] 在一个实施方案中,表达构建体包含含有一个或多个反向末端重复序列 (ITR) 的

核酸。在一个实施方案中, ITR序列源自AAV血清型2。在一个实施方案中, 5' ITR序列包含与SEQ ID NO:5至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中, 5' ITR序列包含SEQ ID NO:5。在一个实施方案中, 3' ITR序列包含与SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中, 3' ITR序列包含SEQ ID NO:6。

[0049] 载体

[0050] 在一方面, 提供了重组载体及其用于将转基因或表达构建体引入细胞中的用途。在一些实施方案中, 重组载体包含重组DNA构建体, 所述重组DNA构建体包含额外DNA元件, 所述额外DNA元件包括提供DNA在宿主细胞中的复制和靶基因在靶细胞中以适当水平表达的DNA片段。普通技术人员理解表达控制序列(启动子、增强子等)是基于其促进靶基因在靶细胞中的表达的能力来选择的。如本文所用, “载体”是指包含待在体外或体内递送至宿主细胞中的多核苷酸的媒介物。载体的非限制性实例包括重组质粒、酵母人工染色体(YAC)、微型染色体、DNA微环或病毒(包括病毒来源的序列)。载体还可指包含待在体外或体内递送至宿主细胞中的核酸的病毒粒子。在一些实施方案中, 载体是指包含重组病毒基因组的病毒粒子, 其中所述病毒基因组包含一个或多个ITR和转基因。

[0051] 在一个实施方案中, 重组载体是病毒载体或多个病毒载体的组合。

[0052] 在一方面, 提供了包含本文公开的任何表达构建体的载体。

[0053] 在一方面, 提供了包含核酸的载体, 所述核酸包含(a) 赋予在感光细胞中表达的启动子序列, 和(b) 编码RetGC1的核酸序列, 其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子。

[0054] 在一个实施方案中, 启动子序列包含RK启动子序列。在一些实施方案中, 启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中, 启动子序列包含SEQ ID NO:7。

[0055] 在一个实施方案中, 启动子序列包含CMV启动子序列。在一些实施方案中, 启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中, 启动子序列包含SEQ ID NO:8。

[0056] 在一些实施方案中, 启动子对感光细胞具有特异性。

[0057] 在一个实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列是来自野生型RetGC1(GUCY2D)基因的编码序列。在一个实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列是密码子优化的序列。在一些实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9。在一些实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:13至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:13。在一些实施方案中, 编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、至少

91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列编码蛋白质,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列编码包含SEQ ID NO:12的蛋白质。

[0058] 在一个实施方案中,载体包含含有转录后调控元件的核酸。在一个实施方案中,载体包含含有WPRE的核酸。在一些实施方案中,转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,转录后调控元件包含SEQ ID NO:10。

[0059] 在一个实施方案中,载体包含含有聚腺苷酸化信号的核酸。在一个实施方案中,载体包含含有BGH-polyA信号的核酸。在一些实施方案中,聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:11。

[0060] 在一个实施方案中,载体包含含有一个或多个反向末端重复序列(ITR)的核酸。在一个实施方案中,ITR序列源自AAV血清型2。在一个实施方案中,5' ITR序列包含与SEQ ID NO:5至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,5' ITR序列包含SEQ ID NO:5。在一个实施方案中,3' ITR序列包含与SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,3' ITR序列包含SEQ ID NO:6。

[0061] 在一些实施方案中,载体包含核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO:1-4的序列中的任一个至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,载体包含核酸,所述核酸包含选自由SEQ ID NO:1-4组成的组的序列。

[0062] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0063] (a) 包含RK启动子序列的启动子序列;

[0064] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0065] (c) WPRE;

[0066] (d) BGH-polyA信号;以及

[0067] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,载体组包含两个ITR序列。

[0068] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0069] (a) 包含CMV启动子序列的启动子序列;

[0070] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0071] (c) WPRE;

[0072] (d) BGH-polyA信号;以及

[0073] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0074] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0075] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0076] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0077] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0078] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0079] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0080] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0081] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0082] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0083] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0084] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0085] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0086] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0087] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0088] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0089] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少

85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列；

[0090] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0091] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0092] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0093] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0094] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0095] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0096] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0097] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0098] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0099] (a) 包含SEQ ID NO:7的启动子序列;

[0100] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14;

[0101] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;

[0102] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及

[0103] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0104] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0105] (a) 包含SEQ ID NO:8的启动子序列;

[0106] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14;

[0107] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;

[0108] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及

[0109] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。

[0110] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0111] (a) 包含SEQ ID NO:7的启动子序列;

[0112] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含SEQ ID NO:12,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

- [0113] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;
- [0114] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及
- [0115] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。
- [0116] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的载体,所述核酸包含以下中的一者或多者:
- [0117] (a) 包含SEQ ID NO:8的启动子序列;
- [0118] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含SEQ ID NO:12,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;
- [0119] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;
- [0120] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及
- [0121] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,核酸包含两个ITR序列。
- [0122] 病毒载体
- [0123] 用于在靶细胞、组织或生物体中表达靶基因的病毒载体是本领域已知的,并且包括例如AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、痘病毒载体、杆状病毒载体、单纯疱疹病毒载体病毒载体、痘苗病毒载体或合成病毒载体(例如,嵌合病毒、花叶病毒或假型化病毒、和/或含有外来蛋白质、合成聚合物、纳米粒子或小分子的病毒)。
- [0124] AAV载体
- [0125] 腺相关病毒(AAV)是小型单链DNA病毒,其需要辅助病毒来促进有效复制。AAV的4.7kb基因组的特征在于两个反向末端重复序列(ITR)和两个开放阅读框,其分别编码Rep蛋白和Cap蛋白。Rep阅读框编码分子量为78kD、68kD、52kD和40kD的四种蛋白质。这些蛋白质的功能主要是调控AAV复制以及将AAV挽救并整合到宿主细胞的染色体中。Cap阅读框编码分子量为85kD(VP 1)、72kD(VP2)和61kD(VP3)的三种结构蛋白,它们形成病毒粒子衣壳。AAV病毒粒子中80%以上的总蛋白质包含VP3。5'和3'末端的rep和cap开放阅读框两侧是约145bp长的反向末端重复序列(ITR)。两个ITR是AAV复制、挽救、包装和AAV基因组整合所必需的唯一顺式元件。整个rep和cap结构域可被切除并用治疗性或报告基因转基因置换。
- [0126] 重组腺相关病毒“rAAV”载体包括原子任何腺相关病毒血清型的任何载体。rAAV载体可具有全部或部分缺失的AAV野生型基因中的一个或多个,优选为Rep和/或Cap基因,但保留功能性侧接ITR序列。
- [0127] 在一些实施方案中,病毒载体是rAAV病毒粒子,其包含rAAV基因组和一种或多种衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV基因组包含本文公开的表达盒。
- [0128] 在一些实施方案中,本文公开的病毒载体包含核酸,所述核酸包含分别位于编码RetGC1的序列的5'和3'的AAV 5' ITR和3' ITR。然而,在某些实施方案中,可能需要核酸含有串联排列的5' ITR和3' ITR序列,例如5'至3'或头对尾或呈另一种替代构型。在其他实施方案中,可能需要核酸含有ITR的多个拷贝或具有位于编码RetGC1的序列的5'和3'两者的5' ITR(或相反,3' ITR)。ITR序列可位于紧邻异源分子的上游和/或下游,或者可存在插入序列。ITR无需为野生型核苷酸序列,并且可改变(例如通过核苷酸的插入、缺失或取代),只要序列提供功能性挽救、复制以及包装即可。ITR可选自AAV2,或选自其他AAV血清型,如本文所述。
- [0129] 在一些实施方案中,病毒载体是AAV载体,诸如AAV1(即,含有AAV1 ITR和AAV1衣壳蛋白的AAV)、AAV2(即,含有AAV2 ITR和AAV2衣壳蛋白的AAV)、AAV3(即,含有AAV3 ITR和

AAV3衣壳蛋白的AAV)、AAV4(即,含有AAV4 ITR和AAV4衣壳蛋白的AAV)、AAV5(即,含有AAV5 ITR和AAV5衣壳蛋白的AAV)、AAV6(即,含有AAV6 ITR和AAV6衣壳蛋白AAV)、AAV7(,即含有AAV7 ITR和AAV7衣壳蛋白的AAV)、AAV8(即,含有AAV8ITR和AAV8衣壳蛋白的AAV)、AAV9(即,含有AAV9 ITR和AAV9衣壳蛋白的AAV)、AAVrh74(即,含有AAVrh74 ITR和AAVrh74衣壳蛋白的AAV)、AAVrh.8(即,含有AAVrh.8ITR和AAVrh.8衣壳蛋白的AAV)或AAVrh.10(即,含有AAVrh.10ITR和AAVrh.10衣壳蛋白的AAV)。

[0130] 在一些实施方案中,病毒载体是假型化AAV载体,其含有来自一种AAV血清型的ITR和来自不同AAV血清型的衣壳蛋白。在一些实施方案中,假型化AAV是AAV2/9(即,含有AAV2 ITR和AAV9衣壳蛋白的AAV)。在一些实施方案中,假型化AAV是AAV2/10(即,含有AAV2 ITR和AAV10衣壳蛋白的AAV)。

[0131] 在一些实施方案中,假型化AAV是AAV2/7m8(即,含有AAV2ITR和AAV7m8衣壳蛋白的AAV)。

[0132] 在一些实施方案中,AAV载体含有重组衣壳蛋白,诸如含有来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh74、AAVrh.8或AAVrh.10的衣壳蛋白中的一种或多种的嵌合体的衣壳蛋白。在实施方案中,衣壳是变体AAV衣壳,诸如AAV2变体rAAV2-retro(来自以引用的方式并入本文中的WO 2017/218842的SEQ ID NO:44)。

[0133] 在一方面,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含(a)赋予在感光细胞中表达的启动子序列,和(b)编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子。

[0134] 在一个实施方案中,启动子序列包含RK启动子序列。在一些实施方案中,启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,启动子序列包含SEQ ID NO:7。

[0135] 在一个实施方案中,启动子序列包含CMV启动子序列。在一些实施方案中,启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,启动子序列包含SEQ ID NO:8。

[0136] 在一些实施方案中,启动子对感光细胞具有特异性。

[0137] 在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列是来自野生型RetGC1(GUCY2D)基因的编码序列。在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列是密码子优化的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:13至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:14。在一些实施方

案中,编码RetGC1的核酸序列编码蛋白质,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,编码RetGC1的核酸序列编码包含SEQ ID NO:12的蛋白质。

[0138] 在一个实施方案中,病毒基因组包含含有转录后调控元件的核酸。在一个实施方案中,病毒基因组包含含有WPRE的核酸。在一些实施方案中,转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,转录后调控元件包含SEQ ID NO:10。

[0139] 在一个实施方案中,病毒基因组包含含有聚腺苷酸化信号的核酸。在一个实施方案中,病毒基因组包含含有BGH-polyA信号的核酸。在一些实施方案中,聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,聚腺苷酸化信号包含SEQ ID NO:11。

[0140] 在一方面,病毒基因组包含含有一个或多个反向末端重复序列(ITR)的核酸。在一个实施方案中,ITR序列源自AAV血清型2。在一个实施方案中,5' ITR序列包含与SEQ ID NO:5至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,5' ITR序列包含SEQ ID NO:5。在一个实施方案中,3' ITR序列包含与SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一个实施方案中,3' ITR序列包含SEQ ID NO:6。

[0141] 在一些实施方案中,病毒基因组包含核酸,所述核酸包含与SEQ ID NO:1-4的序列中的任一个至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列。在一些实施方案中,病毒基因组包含核酸,所述核酸包含选自由SEQ ID NO:1-4组成的组的序列。

[0142] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0143] (a) 包含RK启动子序列的启动子序列;

[0144] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0145] (c) WPRE;

[0146] (d) BGH-polyA信号;以及

[0147] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0148] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0149] (a) 包含CMV启动子序列的启动子序列;

[0150] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0151] (c) WPRE;

[0152] (d) BGH-polyA信号;以及

[0153] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0154] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0155] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0156] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0157] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0158] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0159] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0160] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0161] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0162] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0163] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0164] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0165] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0166] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0167] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:7至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0168] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、

至少97%、至少98%或至少99%同一的序列,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0169] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0170] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0171] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0172] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0173] (a) 启动子序列,所述启动子序列包含与SEQ ID NO:8至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0174] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含与SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0175] (c) 转录后调控元件,所述转录后调控元件包含与SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;

[0176] (d) 聚腺苷酸化信号,所述聚腺苷酸化信号包含与SEQ ID NO:11至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的序列;以及

[0177] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0178] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0179] (a) 包含SEQ ID NO:7的启动子序列;

[0180] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14;

[0181] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;

[0182] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及

[0183] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0184] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0185] (a) 包含SEQ ID NO:8的启动子序列;

[0186] (b) 编码RetGC1的核酸序列,其中编码RetGC1的核酸序列可操作地连接至启动子,并且其中编码RetGC1的核酸序列包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14;

[0187] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;

[0188] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及

[0189] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0190] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0191] (a) 包含SEQ ID NO:7的启动子序列;

[0192] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含SEQ ID NO:12,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0193] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;

[0194] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及

[0195] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0196] 在一个实施方案中,提供了包含核酸的病毒基因组,所述核酸包含以下中的一者或多者:

[0197] (a) 包含SEQ ID NO:8的启动子序列;

[0198] (b) 编码RetGC1蛋白的核酸序列,其中所述RetGC1蛋白包含SEQ ID NO:12,并且其中编码RetGC1蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子;

[0199] (c) 包含SEQ ID NO:10的转录后调控元件;

[0200] (d) 包含序列SEQ ID NO:11的聚腺苷酸化信号;以及

[0201] (e) 一个或多个ITR。在一些实施方案中,病毒基因组包含两个ITR序列。

[0202] 其他病毒载体包括腺病毒(AV)载体,例如基于人类2型腺病毒和人类5型腺病毒的那些,其已通过E1和E3区中的缺失而变为复制缺陷型。可将转录盒插入E1区中,从而产生重组E1/E3缺失AV载体。腺病毒载体还包括辅助物依赖性高容量腺病毒载体(也称为高容量“无内脏”或“去内脏”载体),所述载体不含病毒编码序列。这些载体含有病毒DNA复制和包装所需的顺式作用元件,主要为反向末端重复序列(ITR)和包装信号(CY)。这些辅助物依赖性AV载体基因组具有携带从几百个碱基对至约36kb的外来DNA的潜力。

[0203] 或者,可使用诸如慢病毒载体的其他系统。基于慢病毒的系统可转导非分裂以及分裂细胞,使它们可用于靶向例如CNS的非分裂细胞的应用。慢病毒载体来源于人类免疫缺陷病毒,并且像所述病毒一样,整合至宿主基因组中,从而提供非常长期的基因表达的潜力。

[0204] 还可使用例如阳离子脂质、聚合物或两者作为载剂通过非病毒载体系统将携带含有表达盒的靶基因的包括质粒、YAC、微型染色体以及微环的多核苷酸引入细胞或生物体中。还可使用共轭聚L-赖氨酸(PLL)聚合物和聚乙烯亚胺(PEI)聚合物系统来将载体递送至细胞。针对细胞培养物与生物体,用于将载体递送至细胞的其他方法包括流体力学注射和电穿孔以及使用超声波。关于用于基因递送的病毒和非病毒递送系统的综述,参见以引用的方式并入本文的Nayerossadat,N.等人(Adv Biomed Res.2012;1:27)。

[0205] rAAV病毒粒子产生

[0206] 本文公开的rAAV病毒体可使用本文描述的材料和方法以及本领域技术人员已知的材料和方法来构建和产生。用于构建本公开的任何实施方案的此类工程化方法是核酸操作技术人员已知的,并且包括遗传工程化、重组工程化和合成技术。参见例如,Sambrook等人,“Molecular Cloning.A Laboratory Manual”,第2版,Cold Spring Harbor

Laboratory, New York (1989) 和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989); 以及国际专利公布号 W0 95/13598。此外, 适合于在腺病毒衣壳中产生 rAAV 盒的方法已在美国专利号 5,856,152 和 5,871,982 中进行了描述。

[0207] 简言之, 为了将 rAAV 基因组包装到 rAAV 病毒粒子中, 使用了宿主细胞, 所述宿主细胞含有表达 AAV rep 和 AAV cap 或其功能片段所必需的序列以及 AAV 生产所需的辅助基因。AAV rep 和 cap 序列获自如本文鉴定的 AAV 来源。AAV rep 和 cap 序列可以本领域技术人员已知的任何方式引入宿主细胞中, 包括但不限于转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速 DNA 包衣微丸、病毒感染和原生质体融合。在一个实施方案中, rep 和 cap 序列可通过一种或多种核酸分子转染至宿主细胞中并作为附加体稳定存在于细胞中。在另一个实施方案中, rep 和 cap 序列稳定整合到细胞的基因组中。另一个实施方案具有在宿主细胞中瞬时表达的 rep 和 cap 序列。例如, 用于这种转染的有用核酸分子从 5' 至 3' 包含启动子、插入启动子与 rep 基因序列起始位点之间的任选间隔区、AAV rep 基因序列和 AAV cap 基因序列。

[0208] 可在单个载体上提供 rep 和 cap 序列以及它们的表达控制序列, 或者可在其自己的载体上提供每个序列。优选地, rep 和 cap 序列被提供在同一载体上。或者, rep 和 cap 序列可提供在含有待引入宿主细胞中的其他 DNA 序列的载体上。优选地, 用于这种构建体中的启动子可以是本领域技术人员已知的任何合适的组成型、诱导型或天然启动子。提供 rep 和 cap 蛋白的分子可呈将这些组分转移至宿主细胞中的任何形式。理想地, 这种分子呈质粒形式, 其可含有其他非病毒序列, 诸如标记基因的序列。这种分子不含 AAV ITR, 并且通常不含 AAV 包装序列。为了避免同源重组的发生, 这种质粒中避免了其他病毒序列, 特别是腺病毒序列。理想地构建这种质粒以使其可稳定地转染至细胞中。

[0209] 尽管提供 rep 和 cap 的分子可瞬时转染至宿主细胞中, 但优选用在宿主细胞中表达功能性 rep/cap 蛋白所必需的序列稳定地转化宿主细胞, 例如作为附加体或通过整合至宿主细胞的染色体中。取决于控制这种稳定转染的宿主细胞的表达的启动子, rep/cap 蛋白可瞬时表达 (例如, 通过使用诱导型启动子)。

[0210] 用于构建本公开的实施方案的方法是常规遗传工程化或重组工程化技术, 诸如上述参考文献中描述的那些。例如, 可根据制造商的说明书, 使用磷酸钙法 (Clontech) 或 Effectene 试剂 (Qiagen, Valencia, Calif.) 利用三重转染方法来产生 rAAV。还参见 Herzog 等人, 1999, *Nature Medic.*, 5(1):56-63, 对于以下实施例中使用的方法, 采用具有转基因的质粒 (一种含有 AAV rep 和 cap 的辅助质粒), 以及提供 E2A、E4orf6 和 VA 的腺病毒辅助功能的质粒。虽然本说明书提供了具体构建体的说明性实例, 但使用本文提供的信息, 本领域技术人员可使用间隔区、启动子和其他元件 (包括至少一个翻译起始点和终止信号以及任选添加聚腺苷酸化位点) 的选择来选择和设计其他合适的构建体。

[0211] 然后通过培养含有如本文所述的 rAAV 病毒的宿主细胞来产生 rAAV 病毒粒子, 所述宿主细胞含有待包装至 rAAV 病毒粒子中的 rAAV 基因组、在指导其表达的调控序列控制下的 AAV rep 序列和 AAV cap 序列。合适的病毒辅助基因, 例如腺病毒 E2A、E4orf6 和 VA 以及其他可能的辅助基因, 可以本领域已知的多种方式提供至培养物, 优选提供在单独的质粒上。此后, 在不存在污染性辅助病毒或野生型 AAV 的情况下, 从细胞或细胞培养物中分离指导 RetGC1 转基因表达的重组 AAV 病毒粒子。

[0212] RetGC1转基因的表达可以本领域已知的方式测量。例如,可在体外感染靶细胞,并通过DNA印迹或定量聚合酶链反应(PCR)来监测细胞中转基因的拷贝数。RNA表达水平可通过RNA印迹或定量逆转录酶(RT)-PCR来监测;并且蛋白质表达水平可通过蛋白质印迹、免疫组织化学、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或通过下面实施例中详述的具体方法来监测。

[0213] 药物组合物

[0214] 本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含本文公开的任何载体和药学上可接受的赋形剂。

[0215] 优选通过常规方法评估包含编码RetGC1的基因的rAAV的污染,然后将其配制成适合于储存和/或施用于患者的药物组合物。

[0216] 本文公开的载体的配制涉及使用药学上和/或生理学上可接受的媒介物或载剂,特别是适合于视网膜下注射的媒介物或载剂,诸如缓冲盐水或其他缓冲剂,例如HEPES,以将pH维持在适当的生理水平。

[0217] 本公开的载体可被配制成药物组合物。除了载体之外,这些组合物还可包含药学上和/或生理学上可接受的赋形剂、载剂、缓冲剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂或本领域技术人员熟知的其他添加剂。此类材料应该是无毒的并且不应干扰活性成分的功效。载剂或其他材料的精确性质可由技术人员根据施用途径来确定。药物组合物通常呈液体形式。液体药物组合物通常包含液体载剂,诸如水、石油、动物油或植物油、矿物油或合成油。另外的载剂提供于以引用的方式并入本文的国际专利公布号WO 00/15822中。可包含生理盐水溶液、氯化镁、右旋糖或其他糖溶液或二醇类如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。在一些情况下,可使用表面活性剂,诸如普朗尼克酸(PF68)0.001%。在一些情况下,使用林格氏注射液、乳酸林格氏注射液或哈特曼氏溶液。根据需要,可包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0218] 对于延迟释放,载体可包含在被配制用于缓慢释放的药物组合物中,诸如根据本领域已知的方法在由生物相容性聚合物形成的微胶囊中或在脂质体载剂系统中。

[0219] 如果要长期保存载体,则可在存在甘油的情况下冷冻。

[0220] 治疗方法

[0221] 本文提供了一种治疗有需要的受试者的视网膜疾病的方法,其中所述视网膜疾病与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体。本文还提供了一种治疗有需要的受试者的视网膜疾病的方法,其中所述视网膜疾病与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关,所述方法包括向所述受试者施用包含本文公开的载体的药物组合物。本文提供了用于治疗有需要的受试者的视网膜疾病的方法中的载体,其中所述视网膜疾病与GUCY2D基因中的一个或多个突变相关。在一些实施方案中,受试者携带GUCY2D基因中的突变。

[0222] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。如本文所用的术语“哺乳动物”旨在包括但不限于人、实验室动物、家养宠物和农场动物。哺乳动物包括但不限于人或非人哺乳动物,诸如牛、马、犬、绵羊或猫等。个体和患者也是本文的受试者。

[0223] 如本文所用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中目标是为了减慢(减少)不希望的生理疾患、病症或疾

病,或为了获得有益或所需的临床结果。出于本公开的目的,有益或所需的临床结果包括但不限于:症状的减轻;疾患、病症或疾病的程度减小;疾患、病症或疾病的状态稳定(即,没有恶化);疾患、病症或疾病的发作延迟或疾患、病症或疾病的进展减慢;疾患、病症或疾病状态的一种或多种症状的改善(amelioration);以及疾患、病症或疾病的缓解(无论部分还是全部)或增强或改善。治疗包括引发临床上显著的反应,而无过度水平的副作用。治疗还包括与不接受治疗情况下的预期存活期相比存活期延长。术语“预防(prevent)”、“预防(prevention)”等是指在明显的疾病或病症发作之前起作用,以防止疾病或病症发展或使疾病或病症的程度最小化,或减缓其发展过程。

[0224] 在一些实施方案中,治疗成功通过以下一项或多项来测量:视敏度、视网膜电图(ERG)反应、眼球震颤减少、数码眼体征的变化以及组织病理学分析或光学相干断层扫描。

[0225] 在一些实施方案中,视网膜疾病是视锥视杆营养不良(CRD)或莱伯氏先天性黑朦1型(LCA1)。在一个实施方案中,视网膜疾病是LCA1。在一个实施方案中,视网膜疾病是CRD。

[0226] 在一方面,提供了一种方法,所述方法包括:

[0227] (a) 确定受试者是否携带GUCY2D基因中的突变;以及

[0228] (b) 如果所述受试者携带GUCY2D基因中的突变,则向所述受试者施用包含本文公开的载体的药物组合物。

[0229] 施用途径和方法

[0230] 在一些实施方案中,本文公开的载体或药物组合物是通过眼内注射施用。在一些实施方案中,本文公开的载体或药物组合物是通过直接视网膜、视网膜下或玻璃体内注射施用。在一些实施方案中,本文公开的载体或药物组合物被施用至受试者的中央视网膜。

[0231] 本公开载体的剂量可根据各种参数来确定,特别是根据待治疗患者的年龄、体重和状况、具体的眼部病症以及所述疾病(如果进行性)发展的程度、施用途径以及所需的方案来确定。再次,医生将能够确定任何特定患者所需的施用途径和剂量。携带在启动子序列控制下编码RetGC1的核酸序列的rAAV的有效量理想地在约 1×10^9 至 2×10^{12} 个rAAV基因组颗粒之间或在 1×10^{10} 至 2×10^{11} 个基因组颗粒之间。基因组颗粒在本文中被定义为含有单链DNA分子的AAV衣壳,可用序列特异性方法(诸如实时PCR)对其进行定量。在一些实施方案中,以约150至约800 μ l之间的体积提供约 1×10^9 至 2×10^{12} 个rAAV基因组颗粒。在一些实施方案中,以约250至约500 μ l之间的体积提供约 1×10^{10} 至 2×10^{11} 个rAAV基因组颗粒。主治医师可选择这些范围内的其他剂量。

[0232] 剂量可作为单次剂量提供,但可对另一只眼睛重复,或者在载体可能由于某种原因(诸如手术并发症)没有靶向视网膜的正确区域的情况下重复。治疗优选地是对每只眼睛进行单一永久性治疗,但是可以考虑重复注射,例如在未来几年和/或用不同的AAV血清型。因此,可能需要施用本文公开的药物组合物的多个“加强”剂量。例如,根据转基因在眼部靶细胞内的持续时间,可以6个月间隔或在第一次施用后每年递送加强剂量。此类加强剂量及其需要可由主治医师使用例如本领域已知的视网膜和视觉功能测试以及视觉行为测试来监测。其他类似的测试可用于确定所治疗受试者随时间推移的状态。主治医师可选择适当的测试。或者,本文公开的方法还可涉及在单次或多次感染中注射更大量的含载体溶液,以允许视觉功能水平接近在野生型视网膜中发现的水平。

[0233] 额外方法

[0234] 在一方面,提供了一种增加有需要的受试者中视杆cGMP特异性3',5'-环状磷酸二酯酶亚基 β (PDE6 β)表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体。在一方面,提供了一种增加细胞中视杆cGMP特异性3',5'-环状磷酸二酯酶亚基 β (PDE6 β)表达的方法,所述方法包括使所述细胞与本文公开的载体接触。

[0235] 在一方面,提供了一种增加有需要的受试者的光感受器中的cGMP水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文公开的载体。在一方面,提供了一种增加细胞中的光感受器中的cGMP水平的方法,所述方法包括使所述细胞与本文公开的载体接触。

[0236] 制品和药盒

[0237] 还提供了用于本文所述的方法中的药盒和制品。在多个方面,药盒包含合适包装中的本文所述的组合物(例如,用于递送RetGC1编码转基因的组合物)。用于本文所述的组合物(诸如用于注射的眼用组合物)的合适包装是本领域已知的,并且包括例如小瓶(诸如密封小瓶)、器皿、安瓿、瓶、广口瓶、软包装(例如密封聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。可进一步对这些制品进行灭菌和/或密封。

[0238] 还提供了包含本文所述的组合物的药盒。这些药盒还可包含关于使用组合物的方法(诸如本文所述的用途)的说明书。本文所述的药盒还可包括从商业和用户观点来看理想的其他材料,包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器以及带有用于执行组合物的施用或执行如本文所述的任何方法的说明书的包装插页。例如,在一些实施方案中,药盒包含用于在靶细胞中表达RetGC1编码转基因的rAAV、适合注射的药学上可接受的载剂、以及以下中的一种或多种:缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和带有执行注射的说明书的包装插页。

[0239] 应理解,本发明不限于所描述的特定分子、组合物、方法或方案,因为这些可以变化。与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料可用于实施或测试本发明的实施方案。还应理解,本说明书中本发明的公开内容包括此类特定特征的所有可能组合。例如,在本发明的特定方面或实施方案或特定权利要求的上下文中公开了特定特征的情况下,所述特征也可以在可能的程度上与本发明的其他特定方面和实施方案组合使用和/或在本发明的其他特定方面和实施方案的上下文中使用,并且通常在本发明中使用。

[0240] 在本文中提及包括两个或更多个定义的步骤的方法的情况下,定义的步骤可以以任何顺序或同时进行(除非上下文排除该可能性),并且所述方法可以包括在任何定义的步骤之前,在两个定义的步骤之间或在所有定义的步骤之后进行的一个或多个其他步骤(除非上下文排除那些可能性)。

[0241] 所有其他引用的专利和申请通过引用整体并入本文。此外,在以引用的方式并入本文中的参考文献中的术语的定义和使用与本文中提供的这个术语的定义不一致或相矛盾时,以本文中提供的这个术语的定义为准并且参考文献中的这个术语的定义不再适用。

[0242] 为了便于更好地理解本发明,给出具体实施方案的以下实施例。以下实施例不应理解为限制或限定本发明的整个范围。

[0243] 实施例

[0244] 实施例1:作为与GUCY2D中的突变相关的视网膜疾病的体外疾病模型的RetGC敲除(KO)类器官的产生

[0245] 为了生成RetGC KO类器官,在发育过程中的若干时间点收获了野生型(WT)视网膜类器官。分别在视网膜类器官发育期间的不同时间点通过qPCR和蛋白质印迹/免疫荧光测

量GUCY2D mRNA和RetGC蛋白水平以及视网膜特异性标志物。使用附加型重编程因子和CRISPR/CAS9对WT人成纤维细胞进行重编程和基因编辑以缺失GUCY2D-RetGC。KO诱导性多能干细胞(iPSC)克隆与其未经编辑的(WT)同基因对照系一起分化为视网膜类器官。验证了在发育的预期时间点光感受器标记物的存在和RetGC蛋白的不存在。

[0246] RetGC蛋白易位至哺乳动物视网膜中的光感受器外节。通过免疫荧光,可在WT类器官的外节结构中检测到RetGC蛋白,其中其与视紫红质共定位。通过免疫荧光和蛋白质印迹证实了成熟RetGC KO类器官中RetGC蛋白的丢失。GUCY2D(RetGC)mRNA也显著减少。

[0247] 除了外节中RetGC的丢失外,还发现RetGC KO类器官外节中的光转导蛋白磷酸二酯酶6- β (PDE6 β)减少。PDE6 β 在光转导周期中具有中心作用。在光刺激下,cGMP被PDE6 β 水解为GMP,导致外节圆盘中的cGMP通道关闭,从而导致感光细胞超极化。

[0248] RetGC KO类器官的上述特性表明,这些类器官可用作体外疾病模型来测试RetGC病毒载体恢复蛋白质水平的功效。

[0249] 实施例2:RetGC KO类器官的表征

[0250] RetGC KO和WT视网膜类器官是使用既定的分化方案从人诱导性多能细胞(hiPSC)中生成的。分化方案产生在第140天(20周)时“成熟”并且可用于AAV转导实验中的视网膜类器官。成熟视网膜类器官可在培养物中维持长达300天(43周),而没有形态学上可区分的变性迹象。

[0251] 人类神经视网膜由多层神经细胞构成,包括水平细胞、双极细胞、无长突细胞、米勒神经胶质细胞和神经节细胞、感光细胞、视网膜色素上皮细胞(图1)。体外生成的类器官反映了神经视网膜的层状形态,其中上述视网膜细胞类型排列在其适当的层中并连接在两个突触层中。

[0252] 使用免疫荧光、蛋白质印迹和qPCR技术对WT和RetGC KO类器官进行表征。视网膜中不同细胞类型的相关标记物用于鉴定和说明WT和RetGC KO细胞系两者中体内人视网膜与视网膜类器官之间视网膜形态的相似性。图2示出视锥和视杆光感受器的LM视蛋白和视紫红质、外丛状层中的突触的Ribeye和V Glut、双极细胞、水平细胞和无长突细胞的PKC α 和钙网膜蛋白的冷冻切片和免疫染色图像。明场图像描绘具有可见“刷状边界”(其是光感受器外节)的成熟类器官。图3中的图表显示视网膜类器官发育过程中(第40天至第220天)RetGC蛋白表达的分析。相对于WT,RetGC KO类器官中的RetGC蛋白水平显著降低。

[0253] 实施例3:设计载体以恢复KO类器官中的RetGC表达

[0254] 如图4所示设计了包含四种不同表达构建体之一的病毒载体。表达构建体具有两个不同的启动子:RK(源自对光感受器具有特异性的光感受器特异性视紫红质激酶启动子)和CMV(源自巨细胞病毒)。一些表达构建体还含有土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。所有病毒基因组均包装至7m8衣壳中。

[0255] WT和RetGC KO视网膜类器官在从第140天至第204天范围内的年龄用四种不同的病毒载体进行转导,并在收获和分析之前孵育21天。使用免疫荧光、蛋白质印迹、qPCR和cGMP FRET测定对经转导的类器官进行了评估。

[0256] 如通过总RetGC蛋白定量(蛋白质印迹)和mRNA(qPCR)所测定,所有四种AAV 7m8载体均成功转导了人类光感受器并驱动RetGC KO视网膜类器官中的RetGC蛋白表达。由7m8 CMV-RetGC和7m8RK-RetGC递送的转基因RetGC可通过免疫荧光在光感受器外节的正确细胞

内区室中检测到。

[0257] 实施例4: AAV载体驱动的RetGC表达恢复光感受器外节中的PDE6 β 表达

[0258] 图5示出WT、未转导的视网膜类器官和病毒载体转导的视网膜类器官中PDE6 β 的免疫染色。PDE6 β 与视紫红质蛋白共染色,以确定所有类器官中外节的存在,并描绘与WT对照相比,未转导对照中PDE6 β 蛋白的减少程度。用病毒载体转导后,验证了PDE6 β 蛋白的恢复。

[0259] 相对于WT对照视网膜类器官,未转导的RetGC KO的PDE6 β 染色强度显著降低, $p < 0.005$ (单因素ANOVA检验与Kruskal-Wallis检验一起应用以进行多重比较)。在多个WT、RetGC KO和转导的类器官中对视紫红质阳性外节中的染色强度进行定量。在已经用7m8-CMV-RetGC和7m8-RK-RetGC处理的类器官中,PDE6 β 表达恢复至接近WT水平。7m8-CMV-RetGC-WPRE和7m8-RK-RetGC-WPRE与KO相比显示出改善,但未达到与其他两种载体相同的水平(图6和表1)。

[0260] 表1. 外节中PDE6 β 表达的恢复。SD=标准偏差。对于每个载体 $n=4$ 。

载体	PDE6 β 与 WT 相比 [%]	PDE6 β 与 WT 相比 [SD, %]
[0261] 7m8-CMV-RetGC	73	22.0
7m8-RK-RetGC	75	25.7
7m8-CMV-RetGC-WPRE	44	19.5
7m8-RK-RetGC-WPRE	43	13.0

[0262] 实施例5: AAV载体驱动的RetGC表达恢复RetGC蛋白水平

[0263] 通过蛋白质印迹测定RetGC蛋白水平。如图7所示,相对于未转导的EB,在用载体7m8-CMV-RetGC (WT的30%)、7m8-CMV-WPRE-RetGC (WT的47%) 和7m8-RK-RetGC (WT的27%) 转导的EB中RetGC表达较高。对于每个实验组,收获并加工两个样品以进行蛋白质表达分析。

[0264] 实施例6: AAV载体驱动的RetGC表达恢复光刺激后类器官中的总cGMP水平

[0265] 为了测量RetGC活性,使用用钜穴状化合物(供体)标记的特异性抗体和用d2试剂(受体)标记的cGMP以竞争测定形式进行cGMP的定量测量。检测原理是基于HTRF®技术。当染料非常接近时,用光源(激光或闪光灯)激发供体触发朝向受体的荧光共振能量转移(FRET),所述受体进而在特定波长(665nm)处发荧光。样品中存在的cGMP与两种缀合物之间的结合竞争,并且由此阻止FRET的发生。特异性信号与cGMP浓度成反比。

[0266] 将用7m8载体转导和未转导的WT和KO类器官暴露于光/暗循环以诱导cGMP的产生。所使用的光刺激方案包括5分钟的白光刺激和5分钟的黑暗,然后解剖类器官以分离光感受器。如研究方案中所描述,在IBMX (PDE抑制剂)存在下在红光下解剖并裂解样品。所述测定确定相对于标准曲线的cGMP [nM] 浓度,并将获得的值根据每个样品的总蛋白质质量 [ug] 进行归一化。进行统计分析以评估与未转导KO对照 (NT) 相比样品之间的统计差异。

[0267] 如图8中的图表所示,RetGC KO类器官 (NT) 在光刺激后cGMP水平显著降低 (WT的20%)。转导后,在用载体7m8-CMV-GUCY2D (WT的+76%, $p=0.0043$) 和7m8-RK-GUCY2D (WT的+37%, $p=0.0494$) 转导的KO RetGC-GUCY2D类器官中发现cGMP的统计上显著的增加)。用携

带WPRE元件的CMV和RK载体两者转导导致cGMP增加,所述增加虽然没有统计学意义,但平均值与WT样品中发现的平均值相当。所述图表显示每组用3或4个转导类器官进行的两个独立实验获得的结果(图8)。总cGMP水平达到和超过WT水平的观察结果证明了这些上述载体在光敏感人光感受器情况下的功能效力。

[0268] 序列概述

[0269]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
1	AAVs s-RK- hGUC Y2D- WPR E(mut 6)	AAV2 5' ITR: 1-141 bp RK: 169-62 0 bp Kozak: 813-81 8 bp hGUC Y2D [来自	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCTTCTAGACAACTTT GTATAGAAAAGTTGTGTAGTTAATGATTAAC CCGCCATGCTACTTATCTACGTACATTTATAT TGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGA CATTGATTATTGACTAGAATTCGCTAGCAAG ATCCAAGCTCAGATCTCGATCGAGTTGGGCC CCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTTCTCAG GGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGGAGGAAG GGGCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCA AGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTCTAGCAC

SEQ ID NO	名称	描述	序列
		NM_00180.4 的 cds]: 819-41 30 bp WPRE mut6: 4131-4 719 bp BGH pA: 4774-4 981 bp AAV2 3' ITR: 4989-5 129 bp	CTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCCGTGACC CCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGTGTGTCAG CCCCAGTCTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCC CCAGGAACCCCTCGACAGGGCCCGGTCTCTCT CGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGG CCAAGGGCCCTCGATCGAGGAACTGAAAAA CCAGAAAGTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTT GTCTTTTATTTAGGTCCCAGGATCCGGTGGTG GTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGAT GTTGCCTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTG TTAATTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC CCGCGGCCGCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTGCCACCATGACCGCCTGCGCCCGCCGAG CGGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGG TCCCAGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCCGC CTCCCCCGGGCCCTGCCCGGCTCCCGTCTCT GCTGCTCCTGCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCC TCTCCGCGTGTTCACGGTGGGGGTCCTGGG CCCCTGGGCTTGCACCCCATCTTCTCTCGGG CTCGCCCGGACCTGGCCGCCCGCCTGGCCGC CGCCCGCCTGAACCGCGACCCCGGCCTGGCA GGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGCGCTGCTGC CCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTCGCTGGG GGCCGTGTCCTCCGCGCTGGCCCGCGTGTGC GGCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGCCT GCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGC CGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCC TGGACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCT GCCGTGACCCCGCCGCGGATGCCCTCTACG CCCTGCTTCGCGCATTCGGCTGGGCGCGCGT GGCCCTGGTACCGCCCCCAGGACCTGTGG GTGGAGGCGGGACGCTCACTGTCCACGGCAC TCAGGGCCCGGGGCTGCTGTCGCCTCCGT GACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTCTGGA GCCCGGAGGCCCTGAGGAAGGTTCCGGGAC GGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATCATGGTGA TGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAGGAGCA GCGCTACCTCCTGGAGGCCGAGAGGAGCTG GGCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCTGCTG CTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCCCCA GGCCCGGAGGCCTTGGCCGCACTCGCCAACA GCTCCCAGCTTCGCAGGGCCCACGATGCCGT GCTCACCTCACGCGCCACTGTCCCTCTGAA GGCAGCGTGTGGACAGCCTGCGCAGGGCTC AAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCTCAA TCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGACCA TCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGG

[0270]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			CGTGCCAGAAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGG CAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCGC CACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCT GCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCC CATTCTGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCGGG AGACCGGCTTTTTTGCCACATACATGCTGGAT CCTGCCCGGGGCTCCTTCTCCTCCGCCGTAC CCGGATGCACTTCCCGCGTGGGGGATCAGCA CCCGGACCTGACCCCTCGTGTGGTTCGATC CAAACAACATCTGCGGTGGAGGACTGGAGCC GGGCCTCGTCTTCTTGGCTTCTCCTGGTGG TTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCCTTCTGGC CCATTATGTGAGGCACCGGCTACTTCACATG CAAATGGTCTCCGGCCCCAACAAAGATCATCC TGACCGTGGACGACATCACCTTTCTCCACCC ACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTGGCCAG GGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCGCAGCA TGTGACGACATTCGACGCGGCCCCAGCCAACA CTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAG GGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCAG GGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAAC CAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTC CGGCATGAGAACGTGGCCCTTACCTGGGGC TTTTCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGC GGCCCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTC TCAGAGCACTGCACGCGGGGCTCTTTCAGG ACCTCCTCGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGA CTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACC TTATCAAGGAATAAAGGTATCTGCACCATCG AGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAGTCACGG AACTGCATAGTGGATGGCAGATTCGTACTCA AGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTGCT GGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCC AGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCCG GAGCTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCC GGGGAACGCTGGCCGGCGACGTCTTLAGCTT GGCCATCATCATGCAAGAAGTAGTGTGCCGC AGTGCCCCTTATGCCATGCTGGAGCTCACTC CCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGCAGGAGCC CCCCTCCACTGTGTCCGCCCTTGGTGTCCATG GACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCTCCTGA TGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGGAAC TTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCT GTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGAC GAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGA TCCGGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGG

[0271]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			AAAAGCAGAAGACAGACCGGCTGCTTACAC AGATGCTGCCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTT GAAGACGGGGACACCAGTGGAGCCCGAGTA CTTTGAGCAAGTGACACTGTACTTTAGTGAC ATTGTGGGCTTCACCACCATCTCTGCCATGA GTGAGCCCATTGAGGTTGTGGACCTGCTCAA CGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCATTG GTTCCACGATGTCTACAAGGTGGAGACAAT AGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGGGGCTG CCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGGCA GAGATCGCCAACATGTCACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCATAT GCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGC CTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGG TGGGCCTCACCATGCCGCGGTACTGCCTGTTT GGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATGG AGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGT GAACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCT CTGGACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAG GCCGCACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCG AGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGG CTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGCCTGAC CTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCATCA GCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGACG GAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAGTT CTCTTGAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTT GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTT AATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTA TGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCC TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC CGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACT GTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGG GCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGC GGAATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCCTGCTG TGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACA ATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTC CTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGT CCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTT CCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTT CCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC GGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCACCC AGCTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGA GCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCG

[0272]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			TGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC ACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTG CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG GGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCAT GCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGAT GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G
2	AAVs s-RK- GUC Y2D	AAV2 5' ITR: 1-141 bp RK: 169-62 0 bp Kozak: 813-81 8 bp hGUC Y2D [来自 NM_00 0180.4 的 cds]: 819-41 30 bp BGH pA: 4185-4 392 bp AAV2 3' ITR: 4400-4 540 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTT GTATAGAAAAGTTGTGTAGTTAATGATTAAC CCGCCATGCTACTTATCTACGTACATTTATAT TGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGA CATTGATTATTGACTAGAATTCGCTAGCAAG ATCCAAGCTCAGATCTCGATCGAGTTGGGCC CCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTTCTCAG GGGAAAAGTGAGGGCGGCCCTTGGAGGAAG GGGCCGGGCAGAAATGATCTAATCGGATTCCA AGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTTCTAGCAC CTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCTCCGTGACC CCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTGTCAG CCCCGGTCTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCC CCAGGAACCCTCGACAGGGCCCCGGTCTCTCT CGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGG CCAAGGGCCCTCGATCGAGGAAGTGAAGAAA CCAGAAAGTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTT GTCTTTTATTTAGGTCCCAGGATCCGGTGGTG GTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGAT GTTGCCTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTG TACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC CCGCGGCCGCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAG GCTGCCACCATGACCGCTGCGCCCGCCGAG CGGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGG TCCCGCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCCGC CTCCCCCGGGCCCTGCCCGGCTCCCGTCTCT GCTGCTCCTGCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCC TCTCCGCCGTGTTACGGTGGGGGTCTGGG CCCCTGGGCTTGCACCCCATCTTCTCTCGGG CTCGCCCGGACCTGGCCGCCCGCCTGGCCGC CGCCCGCCTGAACCGCGACCCCGGCCTGGCA GGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGCGCTGCTGC

[0273]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			CCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTCGCTGGG GGCCGTGTCCTCCGCGCTGGCCCGCGTGTGCG GGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGGCCT GCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGC CGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCC TGGACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCCCCT GCCGTGACCCCGCCGCGGATGCCCTCTACG CCCTGCTTCGCGCATTCCGGCTGGGCGCGCGT GGCCCTGGTCACCGCCCCCAGGACCTGTGG GTGGAGGCGGGACGCTCACTGTCCACGGCAC TCAGGGCCCCGGGGCCTGCCTGTCCGCTCCGT GACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTCTGGA GCCCGGGAGGCCCTGAGGAAGGTTCCGGGAC GGGCCCAGGGTCACAGCAGTGATCATGGTGA TGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAGGAGCA GCGCTACCTCCTGGAGGCCGCAGAGGAGCTG GGCCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCTGCC CTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCCCCA GGCCCGGAGGCCTTGGCCGCACTCGCCAACA GCTCCCAGCTTCGCAGGGCCCACGATGCCGT GCTCACCCCTCACGCGCCACTGTCCCTCTGAA GGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAGGGCTC AAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCTCAA TCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCACCA TCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGG CGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTGG CAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCG CACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTCT GCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCCC CATTCTGTGCTGCTAGACACGGACGCGGGCGG AGACCGGCTTTTTTGCCACATACATGCTGGAT CCTGCCCGGGGCTCCTTCTCCTCCGCGGTAC CCGGATGCACTTCCCGCGTGGGGGATCAGCA CCCGGACCTGACCCCTCGTGCTGGTTCGATC CAAACAACATCTGCGGTGGAGGACTGGAGCC GGGCCTCGTCTTTCTTGGCTTCTCCTGGTGG TTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCCTTCTGGC CCATTATGTGAGGCACCGGCTACTTCACATG CAAATGGTCTCCGGCCCCAACAAAGATCATCC TGACCGTGGACGACATCACCTTTCTCCACCC ACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTGGCCCAG GGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCGCAGCA TGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGCCAACA CTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGAG GGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATCCAG GGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAAC CAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTC

[0274]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			CGGCATGAGAACGTGGCCCTCTACCTGGGGC TTTTCCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGC GGCCCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTC TCAGAGCACTGCACGCGGGGCTCTCTTCAGG ACCTCCTCGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGA CTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGACC TTATCAAGGGAATAAGGTATCTGCACCATCG AGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAGTCACGG AACTGCATAGTGGATGGCAGATTCGTA CTCA AGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTGCT GGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCC AGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCCG GAGCTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCC GGGGAACGCTGGCCGGCGACGTCTTTAGCTT GGCCATCATCATGCAAGAAGTAGTGTGCCGC AGTGCCCCTTATGCCATGCTGGAGCTCACTC CCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGC GGAGCC CCCCTCCACTGTGTTCGGCCCTTGGTGTCCATG GACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCTCCTGA TGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGGAAC TTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCT GTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGAC GAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGA TCCGGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGG AAAAGCAGAAGACAGACCGGCTGCTTACAC AGATGCTGCCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTT GAAGACGGGGACACCAGTGGAGCCCGAGTA CTTTGAGCAAGTGACACTGTACTTTAGTGAC ATTGTGGGCTTCACCACCATCTCTGCCATGA GTGAGCCCATTGAGGTTGTGGACCTGCTCAA CGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCATTG GTTCCCACGATGTCTACAAGGTGGAGACAAT AGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGGGGCTG CCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGGCA GAGATCGCCAACATGTC ACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCATAT GCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGC CTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGG TGGGCCTCACCATGCCGCGGTA CTGCCTGTTT GGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATGG AGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGT GAACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCT CTGGACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAG GCCGCACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCG AGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGG CTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGCCTGAC

[0275]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			CTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCATCA GCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGACG GAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAGTT CTCTTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGG GAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGAC TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTT GCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA GGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAA TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGA ATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGA ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGCTGCCTGCAGG
3	AAVs s-CMV V-hG UCY2 D-WPRE(mut6)	AAV2 5' ITR: 1-141 bp CMV: 169-75 7 bp Kozak: 782-78 7 bp hGUC Y2D [来自 NM_00 0180.4 的 cds]: 788-40 99 bp WPRE(mut6): 4100-4 688 bp BGH pA: 4743-4 950 bp AAV2 3' ITR:	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGC GCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAAAC TCCATCACTAGGGGTTCCCTTCTAGACAACCTT GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAAT CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT TTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGG GAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTG AACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTGCCACCATGACCGCCTGCGCCCGCCG AGCGGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGC GGTCCCGCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCC GCCTCCCCGGGCCCTGCCCGGCTCCCGCT CCTGCTGCTCCTGCTTCTGCTGCAGCCCCCG

[0276]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
		4958-5 098 bp	CCCTCTCCGCCGTGTTACGGTGGGGGTCCT GGGCCCCTGGGCTTGCACCCATCTTCTCTC GGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCCCGCCTGGC CGCCGCCCGCCTGAACCGCGACCCCGGCCTG GCAGGCGGTCCCCGCTTCGAGGTAGCGCTGC TGCCCAGACCTTGCCGGACGCCGGGCTCGCT GGGGGCCGTGTCTCCGCGCTGGCCCGCGTG TCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGG CCTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGA AGCCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGC CCCTGGACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCC CCTGCCGTGACCCCGCCGCGGATGCCCTCT ACGCCCTGCTTCGCGCATTCCGGCTGGGCGCG CGTGGCCCTGGTCACCGCCCCCAGGACCTG TGGGTGGAGGCGGGACGCTACTGTCCACGG CACTCAGGGCCCCGGGGCCTGCCTGTCGCCTC CGTGACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTCT GGAGCCCAGGAGGCCCTGAGGAAGGTTTCGG GACGGGCCAGGGTCACAGCAGTGATCATGG TGATGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAGGA GCAGCGCTACCTCCTGGAGGCCGCAGAGGAG CTGGGCCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCCT GCCCTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCCC CAGGCCCGGAGGCCTTGGCCGCACTCGCCAA CAGCTCCCAGCTTCGCAGGGCCCCACGATGCC GTGCTCACCTCACGCGCCACTGTCCCTCTGA AGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAGGGCT CAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCTCA ATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCACC ATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGG GCGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTG GCAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCG CCACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTC TGCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCC CCATTCGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCGG GAGACCGGCTTTTTGCCACATACATGCTGGA TCCTGCCCCGGGGCTCCTTCTCTCCGCCGGTA CCCGGATGCACTTCCCAGCTGGGGGATCAGC ACCCGGACCTGACCCCTCGTGCTGGTTCGAT CCAAACAACATCTGCGGTGGAGGACTGGAGC CGGGCCTCGTCTTTCTTGCTTCCCTCCTGGTG GTTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCCTTCCCTGG CCCATTATGTGAGGCACCGGCTACTTCACAT GCAAATGGTCTCCGGCCCCAACAAAGATCATC CTGACCGTGACGACATCACCTTTCTCCACC CACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTGGCCCA GGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCGCAGC

[0277]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			ATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGCCAAC ACTTGGACAGCCCAACATTGGTGTCTATGA GGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCCA GGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAA CCAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCT CCGGCATGAGAACGTGGCCCTTACCTGGGG CTTTTCCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTG CGGCCCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGT CTCAGAGCACTGCACGCGGGGCTCTTTCAG GACCTCCTCGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGG ACTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGAC CTTATCAAGGGAATAAGGTATCTGCACCATC GAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAGTCACG GAACTGCATAGTGGATGGCAGATTTCGTA AAGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTGC TGGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCC CAGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCC GGAGCTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGC CGGGGAACGCTGGCCGGCGACGTCTTTAGCT TGGCCATCATCATGCAAGAAGTAGTGTGCCG CAGTGCCCCTTATGCCATGCTGGAGCTCACT CCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGC GGAGC CCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGTGTCCAT GGACCAGGCACCTGTTCGAGTGTATCCTCTG ATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGGAA CTTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCT GTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGAC GAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGA TCCGGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGG AAAAGCAGAAGACAGACCGGCTGCTTACAC AGATGCTGCCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTT GAAGACGGGGACACCAGTGGAGCCCGAGTA CTTTGAGCAAGTGACACTGTACTTTAGTGAC ATTGTGGGCTTACCACCATCTCTGCCATGA GTGAGCCATTGAGGTTGTGGACCTGCTCAA CGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCATTG GTTCCCACGATGTCTACAAGGTGGAGACAAT AGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGGGGCTG CCCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGGCA GAGATCGCCAACATGTC ACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCATAT GCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGC CTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGG TGGGCCTACCATGCCCGGCTACTGCCTGTTT GGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATGG AGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGT

[0278]

[0279]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			GAACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCT CTGGACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAG GCCGCACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCG AGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGG CTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGCCTGAC CTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCATCA GCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGACG GAAGCTGGAGAAGGCGCGGCCGGGCCAGTT CTCTTGAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTT GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTT GCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTT AATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTA TGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCC TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC CGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACT GTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGG GCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGC GGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGC TGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACA ATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTC CTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT GGATTCTGCGCGGGACGTCCCTTCTGCTACGT CCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTT CCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTT CCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC GGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCACCC AGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCCTAGA GCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCG TGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC ACTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTG CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTATTCTATT CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG GGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCAT GCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGAT GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G
4	AAVs s-CM V- hGUC Y2D	AAV2 5' ITR: 1-141 bp CMV: 169-75	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTGC GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCTTCTAGACAACTTT GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAAT

SEQ ID NO	名称	描述	序列
		7 bp Kozak: 782-78 7 bp hGUC Y2D [来自 NM_00 0180.4 的 cds]: 788-40 99 bp BGH pA: 4154-4 361 bp AAV2 3' ITR: 4369-4 509 bp	CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT TTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGG GAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGAC TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAT GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTG AACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTGCCACCATGACCGCCTGCGCCCGCCG AGCGGGTGGGCTTCCGGACCCCGGGCTCTGC GGTCCCGCGTGGTGGGCTCCGTCCCTGCCCC GCCTCCCCCGGGCCCTGCCCGGGCTCCCGCT CCTGCTGCTCCTGCTTCTGCTGCAGCCCCCG CCCTCTCCGCGGTGTTACGGTGGGGGTCTCT GGGCCCTGGGCTTGCGACCCCATCTTCTCTC GGGCTCGCCCGGACCTGGCCGCCCGCCTGGC CGCCGCCCGCCTGAACCGCGACCCCGGCCTG GCAGGCGGTCCCGCTTCGAGGTAGCGCTGC TGCCCGAGCCTTGCCGGACGCCGGGCTCGCT GGGGGCCGTGTCTCCGCGCTGGCCCGCGTG TCGGGCCTCGTGGGTCCGGTGAACCCTGCGG CCTGCCGGCCAGCCGAGCTGCTCGCCGAAGA AGCCGGGATCGCGCTGGTGCCCTGGGGCTGC CCCTGGACGCAGGCGGAGGGCACCACGGCC CCTGCCGTGACCCCGCCGCGGATGCCCTCT ACGCCCTGCTTCGCGCATTCGGCTGGGCGCG CGTGGCCCTGGTCACCGCCCCCAGGACCTG TGGGTGGAGGCGGGACGCTCACTGTCCACGG CACTCAGGGCCCCGGGGCCTGCCTGTCGCCTC CGTGACTTCCATGGAGCCCTTGGACCTGTCT GGAGCCCCGGGAGGCCCTGAGGAAGGTTCCGG GACGGGCCAGGGTACAGCAGTGATCATGG TGATGCACTCGGTGCTGCTGGGTGGCGAGGA GCAGCGCTACCTCCTGGAGGCCGCAGAGGAG CTGGGCCTGACCGATGGCTCCCTGGTCTTCTC GCCCTTCGACACGATCCACTACGCCTTGTCCC

[0280]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			CAGGCCCCGGAGGCCTTGGCCGCACTCGCCAA CAGCTCCCAGCTTCGCAGGGCCACGATGCC GTGCTCACCTCACGCGCCACTGTCCCTCTGA AGGCAGCGTGCTGGACAGCCTGCGCAGGGCT CAAGAGCGCCGCGAGCTGCCCTCTGACCTCA ATCTGCAGCAGGTCTCCCCACTCTTTGGCACC ATCTATGACGCGGTCTTCTTGCTGGCAAGGG GCGTGGCAGAAGCGCGGGCTGCCGCAGGTG GCAGATGGGTGTCCGGAGCAGCTGTGGCCCCG CCACATCCGGGATGCGCAGGTCCCTGGCTTC TGCGGGGACCTAGGAGGAGACGAGGAGCCC CCATTCGTGCTGCTAGACACGGACGCGGCGG GAGACCGGCTTTTTGCCACATACATGCTGGA TCCTGCCCCGGGGCTCCTTCCTCTCCGCCGTA CCCGGATGCACTTCCC GCGTGGGGGATCAGC ACCCGGACCTGACCCCTCGTGCTGGTTCGAT CCAAACAACATCTGCGGTGGAGGACTGGAGC CGGGCCTCGTCTTTCTTGCTTCCTCCTGGTG GTTGGGATGGGGCTGGCTGGGGCCTTCCTGG CCCATTATGTGAGGCACCGGCTACTTCACAT GCAAATGGTCTCCGGCCCCAACAAAGATCATC CTGACCGTGGACGACATCACCTTTCTCCACC CACATGGGGGCACCTCTCGAAAGGTGGCCCA GGGGAGTCGATCAAGTCTGGGTGCCCGCAGC ATGTCAGACATTCGCAGCGGCCCCAGCCAAC ACTTGGACAGCCCCAACATTGGTGTCTATGA GGGAGACAGGGTTTGGCTGAAGAAATTCCCA GGGGATCAGCACATAGCTATCCGCCAGCAA CCAAGACGGCCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCT CCGGCATGAGAACGTGGCCCTTACCTGGGG CTTTTCTGGCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTG CGGCCCTCTGGGAGGGCAACCTGGCTGTGGT CTCAGAGCACTGCACGCGGGGCTCTCTTCAG GACCTCCTCGCTCAGAGAGAAATAAAGCTGG ACTGGATGTTCAAGTCCTCCCTCCTGCTGGAC CTTATCAAGGGAATAAGGTATCTGCACCATC GAGGCGTGGCTCATGGGCGGCTGAAGTCACG GAACTGCATAGTGGATGGCAGATTCGTA AAGATCACTGACCACGGCCACGGGAGACTGC TGGAAGCACAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCC CAGAGCGGAGGACCAGCTGTGGACAGCCCC GGAGCTGCTTAGGGACCCAGCCCTGGAGCGC CGGGGAACGCTGGCCGGCGACGTCTTTAGCT TGGCCATCATCATGCAAGAAGTAGTGTGCCG CAGTGCCCTTATGCCATGCTGGAGCTCACT CCCGAGGAAGTGGTGCAGAGGGTGC GGAGC CCCCCTCCACTGTGTCGGCCCTTGGTGTCCAT

[0281]

[0282]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			GGACCAGGCACCTGTCGAGTGTATCCTCCTG ATGAAGCAGTGCTGGGCAGAGCAGCCGAA CTTCGGCCCTCCATGGACCACACCTTCGACCT GTTCAAGAACATCAACAAGGGCCGGAAGAC GAACATCATTGACTCGATGCTTCGGATGCTG GAGCAGTACTCTAGTAACCTGGAGGATCTGA TCCGGGAGCGCACGGAGGAGCTGGAGCTGG AAAAGCAGAAGACAGACCGGCTGCTTACAC AGATGCTGCCTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTT GAAGACGGGGACACCAGTGGAGCCCAGTA CTTTGAGCAAGTGACACTGTACTTTAGTGAC ATTGTGGGCTTCACCACCATCTCTGCCATGA GTGAGCCATTGAGGTTGTGGACCTGCTCAA CGATCTCTACACACTCTTTGATGCCATCATTG GTTCCCACGATGTCTACAAGGTGGAGACAAT AGGGGACGCCTATATGGTGGCCTCGGGGCTG CCCCAGCGGAATGGGCAGCGACACGCGGCA GAGATCGCCAACATGTCACTGGACATCCTCA GTGCCGTGGGCACTTTCCGCATGCGCCATAT GCCTGAGGTTCCCGTGCGCATCCGCATAGGC CTGCACTCGGGTCCATGCGTGGCAGGCGTGG TGGGCCTCACCATGCCGCGGTA CTGCTGTTT GGGGACACGGTCAACACCGCCTCGCGCATGG AGTCCACCGGGCTGCCTTACCGCATCCACGT GAACTTGAGCACTGTGGGGATTCTCCGTGCT CTGGACTCGGGCTACCAGGTGGAGCTGCGAG GCCGCACGGAGCTGAAGGGCAAGGGCGCCG AGGACACTTTCTGGCTAGTGGGCAGACGCGG CTTCAACAAGCCCATCCCCAAACCGCCTGAC CTGCAACCGGGGTCCAGCAACCACGGCATCA GCCTGCAGGAGATCCCACCCGAGCGGCGACG GAAGCTGGAGAAGGCGCGGCGGGCCAGTT CTCTTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGG GAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGAC TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTT GCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA GGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAA TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGA ATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGA ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG CAGCTGCCTGCAGG
5	AAV	141 bp	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC

SEQ ID NO	名称	描述	序列
	2 5' ITR		TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG GGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC TCCATCACTAGGGGTTCCT
6	AAV 2 3' ITR	141 bp	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC GCGCAGCTGCCTGCAGG
7	RK 启动子		TGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTA TCTACGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAAC ATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTA GAATTCGCTAGCAAGATCCAAGCTCAGATCT CGATCGAGTTGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGT TGTTTGTCTTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCG GCCCCTTGAGGAAGGGGCCGGGCAGAATG ATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGAT TGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCCTA AGCGTCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAG CCTGGTGTGTGTCAGCCCCGGTCTCCAGG GGCTTCCAGTGGTCCCAGGAACCCTCGAC AGGGCCCCGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCA GGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCCCTCGAT CGAGGAACTGAAAAAC
8	CMV 启动子		TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGT TACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCC AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAG TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC GGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCA CCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCCG TAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGC GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC
9	hGUC Y2D [来自 NM_0		ATGACCGCCTGCGCCCCGCCGAGCGGGTGGG CTTCCGGACCCCGGGCTCTGCGGTCCCGCGT GGTGGGCTCCGTCCCTGCCCGCCTCCCCCG GGCCCTGCCCGGGCTCCCGCTCCTGCTGCTCC

[0283]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
	00180 .4 的 cds]		TGCTTCTGCTGCAGCCCCCGCCCTCTCCGCC GTGTTACAGGTGGGGGTCCTGGGCCCTGGG CTTGCGACCCCATCTTCTCTCGGGCTCGCCCG GACCTGGCCGCCCGCCTGGCCGCCGCCGCC TGAACCGCGACCCCGGCCTGGCAGGCGGTCC CCGCTTCGAGGTAGCGCTGCTGCCCGAGCCT TGCCGGACGCCGGGCTCGCTGGGGGCCGTGT CCTCCGCGCTGGCCCGCGTGTGCGGCCTCGT GGGTCCGGTGAACCCTGCGGCCTGCCGGCCA GCCGAGCTGCTCGCCGAAGAAGCCGGGATCG CGCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCTGGACGCA GGCGGAGGGCACACGGCCCTGCCGTGACC CCCGCCGCGGATGCCCTCTACGCCCTGCTTC GCGCATTCGGCTGGGCGCGCGTGGCCCTGGT CACCGCCCCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCG GGACGCTCACTGTCCACGGCACTCAGGGCCC GGGGCTGCCTGTGCGCTCCGTGACTTCCAT GGAGCCCTTGACCTGTCTGGAGCCCGGGAG GCCCTGAGGAAGGTTTCGGGACGGGCCAGG GTCACAGCAGTGATCATGGTGATGCACTCGG TGCTGCTGGGTGGCGAGGAGCAGCGCTACCT CCTGGAGGCCGCAGAGGAGCTGGGCCTGACC GATGGCTCCCTGGTCTTCTGCCCCTTCGACAC GATCCACTACGCCTTGTCCCCAGGCCCGGAG GCCTTGGCCGCACTCGCCAACAGCTCCCAGC TTCGCAGGGCCCACGATGCCGTGCTCACCT CACGCGCCACTGTCCCTCTGAAGGCAGCGTG CTGGACAGCCTGCGCAGGGCTCAAGAGCGCC GCGAGCTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGCA GGTCTCCCCACTCTTTGGCACCATCTATGACG CGGTCTTCTTGCTGGCAAGGGGCGTGGCAGA AGCGCGGGCTGCCGCAGGTGGCAGATGGGT GTCCGGAGCAGCTGTGGCCCGCCACATCCGG GATGCGCAGGTCCCTGGCTTCTGCGGGGACC TAGGAGGAGACGAGGAGCCCCATTCGTGCT GCTAGACACGGACGCGGGCGGGAGACCGGCT TTTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCCGG GGCTCCTTCTCTCCGCCGGTACCCGGATGC ACTTCCC GCGTGGGGGATCAGCACCCGGACC TGACCCTCGTGCTGGTTCGATCAAACAAC ATCTGCGGTGGAGGACTGGAGCCGGCCTCG TCTTTCTGGCTTCTCCTGGTGGTTGGGATG GGGCTGGCTGGGGCCTTCTGGCCATTATG TGAGGCACCGGCTACTTCACATGCAAATGGT CTCCGGCCCCAACAAAGATCATCCTGACCGTG GACGACATCACCTTTCTCCACCCACATGGGG GCACCTCTCGAAAGGTGGCCAGGGGAGTCG

[0284]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			ATCAAGTCTGGGTGCCCGCAGCATGTCAGAC ATTCGCAGCGGCCCCAGCCAACACTTGGACA GCCCCAACATTGGTGTCTATGAGGGAGACAG GGTTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGATCAG CACATAGCTATCCGCCCAGCAACCAAGACGG CCTTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCCGGCATGA GAACGTGGCCCTTACCTGGGGCTTTTCCTG GCTCGGGGAGCAGAAGGCCCTGCGGCCCTCT GGGAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCA CTGCACGCGGGGCTCTCTCAGGACCTCCTC GCTCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGT TCAAGTCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAG GGAATAAGGTATCTGCACCATCGAGGCGTGG CTCATGGGCGGCTGAAGTCACGGAACCTGCAT AGTGGATGGCAGATTCGTACTCAAGATCACT GACCACGGCCACGGGAGACTGCTGGAAGCA CAGAAGGTGCTACCGGAGCCTCCCAGAGCGG AGGACCAGCTGTGGACAGCCCCGGAGCTGCT TAGGGACCCAGCCCTGGAGCGCCGGGGAAC GCTGGCCGGCGACGTCTTTAGCTTGGCCATC ATCATGCAAGAAGTAGTGTGCCCGAGTGCCC CTTATGCCATGCTGGAGCTCACTCCCGAGGA AGTGGTGCAGAGGGTGC GGAGCCCCCTCCA CTGTGTCCGCCCTTGGTGTCCATGGACCAGG CACCTGTGCGAGTGTATCCTCCTGATGAAGCA GTGCTGGGCAGAGCAGCCGGAACCTCGGCC TCCATGGACCACACCTTCGACCTGTTCAAGA ACATCAACAAGGGCCGGAAGACGAACATCA TTGACTCGATGCTTCGGATGCTGGAGCAGTA CTCTAGTAACCTGGAGGATCTGATCCGGGAG CGCACGGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAG AAGACAGACCGGCTGCTTACACAGATGCTGC CTCCGTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACGGG GACACCAGTGGAGCCCGAGTACTTTGAGCAA GTGACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTT CACCACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCATT GAGGTTGTGGACCTGCTCAACGATCTCTACA CACTCTTTGATGCCATCATTGGTTCCACGAT GTCTACAAGGTGGAGACAATAGGGGACGCCT ATATGGTGGCCTCGGGGCTGCCCCAGCGGAA TGGGCAGCGACACGCGGCAGAGATCGCCAA CATGTCACTGGACATCCTCAGTGCCGTGGGC ACTTTCCGCATGCGCCATATGCCTGAGGTTCC CGTGCGCATCCGCATAGGCCTGCACTCGGGT CCATGCGTGGCAGGCGTGGTGGGCCTACCA TGCCGCGGTA CTGCCTGTTTGGGGACACGGT CAACACCGCCTCGCGCATGGAGTCCACCGGG

[0285]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			CTGCCTTACCGCATCCACGTGAACTTGAGCA CTGTGGGGATTCTCCGTGCTCTGGACTCGGG CTACCAGGTGGAGCTGCGAGGCCGCACGGA GCTGAAGGGCAAGGGCGCCGAGGACACTTTC TGGCTAGTGGGCAGACGCGGCTTCAACAAGC CCATCCCCAAACCGCCTGACCTGCAACCGGG GTCCAGCAACCACGGCATCAGCCTGCAGGAG ATCCCACCCGAGCGGCGACGGAAGCTGGAG AAGGCGCGGCCGGGCCAGTTCTCTTGA
10	WPRE (mut6)		AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA GATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCT TTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCC TTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTT TCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTG CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGT CAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTT GCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTG CCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTC GCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGA ACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCG TGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCT TGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCG GCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCG GCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTTTCGCGT CTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTC CCTTGGGCCCGCTCCCCGC
11	BGH pA		CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT TGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA AGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAA ATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTCTGAGTAG GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAG AATAGCAGGCATGCTGGGGA
12	hRetG C1 [NM_000180.4]		MTACARRAGGLPDPGLCGPAWWAPSLPRLPR ALPRLPLLLLLLLLQPPALSAVFTVGVLPWAC DPIFSRARPDLAARLAAARLNDRPGLAGGPRFE VALLPEPCRTPGSLGAVSSALARVSGLVGPVNP AACRPAELLAEEAGIALVPWGCPWTQAEGTTA PAVTPAADALYALLRAFGWARVALVTAPQDL WVEAGRSLSTALRARGLPVASVTSMEPLDLSG AREALRKVRDGPRVTAVIMVMHSVLLGGEEQ RYLLEAAEELGLTDGSLVFLPFDTIHYALSPGPE ALAALANSSQLRRAHDAVLTLTRHCPSEGSVL DSLRRAQERRELPDLNLQQVSPLFGTIYDAVF LLARGVAEARAAAGGRWVSGAAVARHIRDAQ

[0286]

[0287]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			VPGFCGDLGGDEEPPFVLLDTDAAGDRLFATY MLDPARGSFLSAGTRMHFPRGGSAPGPDPCSW FDPNNICGGGLEPGLVFLGFLLVVGMGLAGAF LAHYVRHRLHMQMVSGPNKIIITVDDITFLHP HGGTSRKVAQGSRSSLGARSMSDIRSGPSQHL DSPNIGVYEGDRVWLKKFPGDQHIAIRPATKTA FSKLQELRHENVALYLGLFLARGAEGPAALWE GNLAVVSEHCTRGSLLQDLAQAQREIKLDWMFKS SLLDLIKGIRYLHHRGVAHGRLKSRNCIVDGR FVLKITDHGHGRLLEAQKVLPEPPRAEDQLWT APELLRDPALERRGTLAGDVFSLAIIHQEVVCR SAPYAMLELTPPEVVQVRSPPLCRPLVSMD QAPVECILLMKQCWAEQPELRPSMDHTFDLFK NINKGRKTNIIIDSMRLMLEQYSSNLEDLIRERTE ELELEKQKTDRLLTQMLPPSVAEALKTGTPVEP EYFEQVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLND LYTLFDAIIGSHDVYK VETIGDAYMVASGLPQR NGQRHAAEIANMSLDILSAVGTFRMRHMPEVP VRIRIGLHSGPCVAGVVGLTMPRYCLFGDTVN TASMESTGLPYRIHVNLSTVGILRALDSGYQV ELRGRTELKKGGAEDTFWLVGRRGFNKPIPKP PDLQPGSSNHGISLQEIPPERRRKLEKARPGQFS
13	hGUC Y2D (密码子优化序列的实施例 1)		ATGACAGCCTGTGCCAGGAGAGCTGGTGGGC TTCCTGACCCTGGGCTCTGTGGTCCAGCTTGG TGGGCTCCCTCCCTGCCAGACTCCCCAGGG CCCTGCCAGGCTCCCTCTCCTGCTGCTCCTG CTTCTGCTGCAGCCCCCTGCCCTCAGTGCAGT GTTCACTGTGGGGGTCCTGGGCCCTGGGCT TGTGACCCCATCTTCTCTAGGGCTAGACCTG ACCTGGCTGCCAGGCTGGCTGCAGCCAGGCT GAACAGGGACCCTGGCCTGGCAGGGGGTCCC AGGTTTGAGGTAGCCCTGCTGCCAGAGCCTT GCAGGACACCAGGCTCCCTGGGGGCAGTGTC CTCTGCCCTGGCCAGAGTGTGAGGCCTAGTG GGTCCCTGTGAACCCTGCAGCCTGCAGACCAG CAGAGCTGCTGGCTGAAGAAGCTGGGATAGC ACTGGTGCCCTGGGGCTGCCCTGGACTCAG GCTGAGGGCACCACAGCCCCTGCAGTGACCC CAGCTGCAGATGCCCTCTATGCCCTGCTTAG AGCATTGCTGGGCCAGAGTGGCCCTGGTC ACTGCCCTCAGGACCTGTGGGTGGAGGCAG GAAGGTCAGTCCACAGCACTCAGGGCCAG AGGCCTGCCTGTGGCCTCTGTGACTTCCATG GAGCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCAGAGAGG CCCTGAGGAAGGTTAGAGATGGGCCAGGGT CACAGCAGTGATCATGGTGATGCACAGTGTG CTGCTGGGTGGAGAGGAGCAGAGGTACCTCC

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			TGGAGGCTGCAGAGGAGCTGGGCCTGACAG ATGGCTCCCTGGTCTTCCTGCCCTTTGACACC ATCCACTATGCCTTGTCCCCAGGCCAGAGG CTTGGCTGCACTAGCCAACAGCTCCCAGCT TAGAAGGGCCCATGATGCAGTGCTCACCTC ACCAGACACTGTCCCTCTGAAGGCTCAGTGC TGGACAGCCTGAGAAGGGCTCAAGAGAGGA GAGAGCTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGCA GGTCTCCCCACTCTTTGGCACCATCTATGATG CTGTCTTCTTGCTGGCAAGGGGAGTGGCAGA AGCCAGAGCTGCTGCAGGTGGCAGATGGGTG TCAGGAGCAGCTGTGGCCAGGCACATCAGGG ATGCCCAGGTCCCTGGCTTCTGTGGGGACCT AGGAGGAGATGAGGAGCCCCATTTGTGCTG CTAGACACAGATGCTGCAGGAGACAGGCTTT TTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCAGGGG CTCCTTCCTCAGTGCAGGTACCAGGATGCAC TTCCAAGAGGGGGATCAGCACCTGGACCTG ACCCCAGCTGCTGGTTTGATCCAAACAACAT CTGTGGTGGAGGACTGGAGCCTGGCCTTGTC TTTCTTGGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGG GCTGGCTGGGGCCTTCCTGGCCCATTATGTG AGGCACAGGCTACTTCACATGCAAATGGTCT CAGGCCCAACAAGATCATCCTGACTGTGGA TGACATCACCTTCTCCACCCACATGGGGGC ACCTCTAGAAAGGTGGCCAGGGGAGTAGAT CAAGTCTGGGTGCCAGGAGCATGTCAGACAT TAGGTCTGGCCCCAGCCAACACTTGGACAGC CCAACATTGGTGTCTATGAGGGAGACAGGG TTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGATCAGCA CATAGCTATCAGGCCAGCAACCAAGACAGCC TTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCAGGCATGAGA ATGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTTCTGGCT AGGGGAGCAGAAGGCCCTGCAGCCCTCTGG GAGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCACT GCACCAGGGGCTCTTTCAGGACCTCCTTGC TCAGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGTTT AAGTCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGG GAATAAGGTATCTGCACCATAGGGGAGTGGC TCATGGGAGACTGAAGTCAAGAACTGCATA GTGGATGGCAGATTTGTA CTCAAGATCACTG ACCATGGCCATGGGAGACTGCTGGAAGCACA GAAGGTGCTACCTGAGCCTCCCAGAGCTGAG GACCAGCTGTGGACAGCCCCTGAGCTGCTTA GGGACCCAGCCCTGGAGAGGAGAGGAACCC TGGCAGGAGATGTCTTTAGCTTGGCCATCAT CATGCAAGAAGTAGTGTGCAGAAGTGCCCT

[0288]

[0289]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			TATGCCATGCTGGAGCTCACTCCTGAGGAAG TGGTGCAGAGGGTGAGAAGTCCCCCTCCACT GTGTAGGCCCTTGGTGTCCATGGACCAGGCA CCTGTTGAGTGTATCCTCCTGATGAAGCAGT GCTGGGCAGAGCAGCCTGAACTTAGACCCTC CATGGACCACACCTTTGACCTGTTCAAGAAC ATCAACAAGGGCAGGAAGACCAACATCATT GACTCAATGCTTAGAATGCTGGAGCAGTACT CTAGTAACCTGGAGGATCTGATCAGGGAGAG GACAGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGAA GACAGACAGACTGCTTACACAGATGCTGCCT CCTTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACAGGGA CACCAGTGGAGCCTGAGTACTTTGAGCAAGT GACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTC ACCACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTG AGGTTGTGGACCTGCTCAATGATCTCTACAC ACTCTTTGATGCCATCATTGGTTCCCATGATG TCTACAAGGTGGAGACAATAGGGGATGCCTA TATGGTGGCCTCTGGGCTGCCCCAGAGGAAT GGGCAGAGGCATGCTGCAGAGATTGCCAAC ATGTCACTGGACATCCTCAGTGCTGTGGGCA CTTTCAGGATGAGGCATATGCCTGAGGTTCC AGTGAGGATCAGAATAGGCCTGCACAGTGGT CCATGTGTGGCAGGGGTGGTGGGCCTCACCA TGCCCAGGTAAGTGCCTGTTTGGGGACACAGT CAACACTGCCAGTAGAATGGAGTCCACTGGG CTGCCTTACAGAATCCATGTGAACTTGAGCA CTGTGGGGATTCTCAGGGCTCTGGACAGTGG CTACCAGGTGGAGCTGAGGGGCAGGACTGA GCTGAAGGGCAAGGGGGCAGAGGACACTTT CTGGCTAGTGGGCAGAAGAGGCTTCAACAAG CCCATCCCCAAACCCCTGACCTGCAACCAG GGTCCAGCAACCATGGCATCAGCCTGCAGGA GATCCCACCTGAGAGAAGGAGAAAGCTGGA GAAGGCCAGGCCAGGCCAGTTCTCTTGA
14	hGUC Y2D (密码子优先序列的实施例 2)		ATGACAGCCTGTGCCAGAAGGGCAGGTGGG CTTCCAGACCCAGGGCTCTGTGGTCTGCTTG GTGGGCTCCCTCCCTGCCAGACTCCCCAGA GCCCTGCCAGGCTCCCCCTCCTGCTGCTCCT GCTTCTGCTGCAGCCCCCAGCCCTCAGTGCT GTGTTACAGTGGGGGTCCTGGGCCCTGGG CTTGTGACCCCATCTTCTCTAGGGCTAGGCCT GACCTGGCAGCCAGGCTGGCAGCTGCCAGAC TGAACAGGGACCCTGGCCTGGCAGGAGGTCC CAGGTTTGTAGGTAGCTCTGCTGCCAGAGCCT TGCAGAACACCTGGCAGTCTGGGGGCTGTGT CCAGTGCCTGGCCAGAGTGTGAGGCTTGGT

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			GGGTCCTGTGAACCCTGCAGCCTGCAGACCA GCTGAGCTGCTGGCTGAAGAAGCTGGGATTG CTCTGGTGCCCTGGGGCTGCCCTGGACCCA GGCTGAGGGCACCACAGCCCCTGCTGTGACC CCAGCTGCAGATGCCCTCTATGCCCTGCTTA GGGCATTGGCTGGGCCAGGGTGGCCCTGGT CACAGCACCCAGGACCTGTGGGTGGAGGCT GGAAGGTCACCTGTCCACTGCACTCAGGGCCA GGGGCCTGCCTGTGGCCTCAGTGACTIONCAT GGAGCCCTTGGACCTGTCTGGAGCCAGGGAG GCCCTGAGGAAGGTTAGAGATGGGCCCCAGG GTCACAGCAGTGATCATGGTGATGCACAGTG TGCTGCTGGGTGGTGAGGAGCAGAGGTACCT CCTGGAGGCTGCAGAGGAGCTGGGCCTGACA GATGGCTCCCTGGTCTTCCTGCCCTTTGACAC CATCCACTATGCCTTGTCCCAGGCCCTGAG GCCTTGGCTGCACTGGCCAACAGCTCCCAGC TTAGAAGGGCCCATGATGCTGTGCTCACCT CACTAGACACTGTCCCTCTGAAGGCAGTGTG CTGGACAGCCTGAGAAGGGCTCAAGAGAGA AGGGAGCTGCCCTCTGACCTCAATCTGCAGC AGGTCTCCCCACTCTTTGGCACCATCTATGAT GCTGTCTTCTTGCTGGCAAGGGGTGTGGCAG AAGCCAGAGCTGCTGCAGGTGGCAGATGGGT GTCTGGAGCAGCTGTGGCCAGGCACATCAGG GATGCACAGGTCCCTGGCTTCTGTGGGGACT TGGGAGGAGATGAGGAGCCCCATTTGTGCT GCTGGACACAGATGCTGCAGGAGACAGACTT TTTGCCACATACATGCTGGATCCTGCCAGGG GCTCCTTCCTCTCTGCTGGTACCAGAATGCAC TTCCCTAGAGGGGGATCAGCACCTGGACCTG ACCCCTCATGCTGGTTTGATCCAAACAACAT CTGTGGTGGAGGACTGGAGCCAGGCCTTGTC TTTCTTGGCTTCCTCCTGGTGGTTGGGATGGG GCTGGCTGGGGCCTTCCTGGCCCATTATGTG AGGCACAGGTTGCTTCACATGCAAATGGTCT CAGGCCCCAACAAAGATCATCCTGACTGTGGA TGACATCACCTTCTCCACCCACATGGGGGC ACCTCTAGAAAGGTGGCCCAGGGGAGTAGAT CAAGTCTGGGTGCCAGAAGCATGTCAGACAT TAGGAGTGGCCCCAGCCAACACTTGGACAGC CCAACATTGGTGTCTATGAGGGAGACAGGG TTTGGCTGAAGAAATTCCCAGGGGATCAGCA CATAGCTATCAGACCAGCAACCAAGACTGCC TTCTCCAAGCTCCAGGAGCTCAGACATGAGA ATGTGGCCCTCTACCTGGGGCTTTTCTGGCT AGGGGAGCAGAAGGCCCTGCTGCCCTCTGGG

[0290]

SEQ ID NO	名称	描述	序列
			AGGGCAACCTGGCTGTGGTCTCAGAGCACTG CACTAGAGGCTCTCTTCAGGACCTCCTTGCTC AGAGAGAAATAAAGCTGGACTGGATGTTCA AGTCCTCCCTCCTGCTGGACCTTATCAAGGG AATAAGGTATCTGCACCATAGGGGTGTGGCT CATGGGAGGCTGAAGTCAAGAACTGCATA GTGGATGGCAGATTTGTA CTCAAGATCACTG ACCATGGCCATGGGAGACTGCTGGAAGCACA GAAGGTGCTGCCAGAGCCTCCCAGAGCAGA GGACCAGCTGTGGACAGCCCCTGAGCTGCTT AGGGACCCAGCCCTGGAGAGAAGGGGAACA CTGGCTGGAGATGTCTTTAGCTTGCCATCAT CATGCAAGAAGTAGTGTGCAGGAGTGCCCT TATGCCATGCTGGAGCTCACTCCAGAGGAAG TGGTGCAGAGGGTGAGAAGCCCACCTCCACT GTGTAGACCCTTGGTGTCCATGGACCAGGCA CCTGTGGAGTGTATCCTCCTGATGAAGCAGT GCTGGGCAGAGCAGCCTGAACTTAGGCCCTC CATGGACCACACCTTTGACCTGTTCAAGAAC ATCAACAAGGGCAGAAAGACCAACATCATT GACTCAATGCTTAGAATGCTGGAGCAGTACT CTAGTAACCTGGAGGATCTGATCAGGGAGAG GACTGAGGAGCTGGAGCTGGAAAAGCAGAA GACAGACAGACTGCTTACACAGATGCTGCCT CCCTCTGTGGCTGAGGCCTTGAAGACAGGGA CACCAGTGGAGCCTGAGTACTTTGAGCAAGT GACACTGTACTTTAGTGACATTGTGGGCTTC ACCACCATCTCTGCCATGAGTGAGCCCATTG AGGTTGTGGACCTGCTCAATGATCTCTACAC ACTCTTTGATGCCATCATTGGTTCCCATGATG TCTACAAGGTGGAGACAATAGGGGATGCCTA TATGGTGGCCTCTGGGCTGCCCCAGAGGAAT GGGCAGAGGCATGCTGCAGAGATTGCCAAC ATGTC ACTGGACATCCTCAGTGCTGTGGGCA CTTTCAGGATGAGACATATGCCTGAGGTTCC TGTGAGGATCAGGATAGGCCTGCACTCTGGT CCATGTGTGGCAGGAGTGGTGGGCCTCACCA TGCCTAGATACTGCCTGTTTGGGGACACAGT CAACACAGCCTCCAGGATGGAGTCCACAGGG CTGCCTTACAGGATCCATGTGAACTTGAGCA CTGTGGGGATTCTCAGGGCTCTGGACTCAGG CTACCAGGTGGAGCTGAGGGGCAGGACTGA GCTGAAGGGCAAGGGAGCTGAGGACACTTTC TGGCTTGTGGGCAGAAGGGGCTTCAACAAGC CCATCCCCAAACCACCTGACCTGCAACCAGG GTCCAGCAACCATGGCATCAGCCTGCAGGAG ATCCCACCTGAGAGGAGAAGGAAGCTGGAG

[0291]

[0292]	SEQ ID NO	名称	描述	序列
				AAGGCAAGGCCAGGCCAGTTCTCTTGA

[0293] 虽然本发明的上述书面说明书使得本领域普通技术人员能够制造和使用目前认为是其最佳模式的那些,但是本领域普通技术人员将理解和领会本文具体实施方案、方法和实施例的变化、组合和等效物的存在。

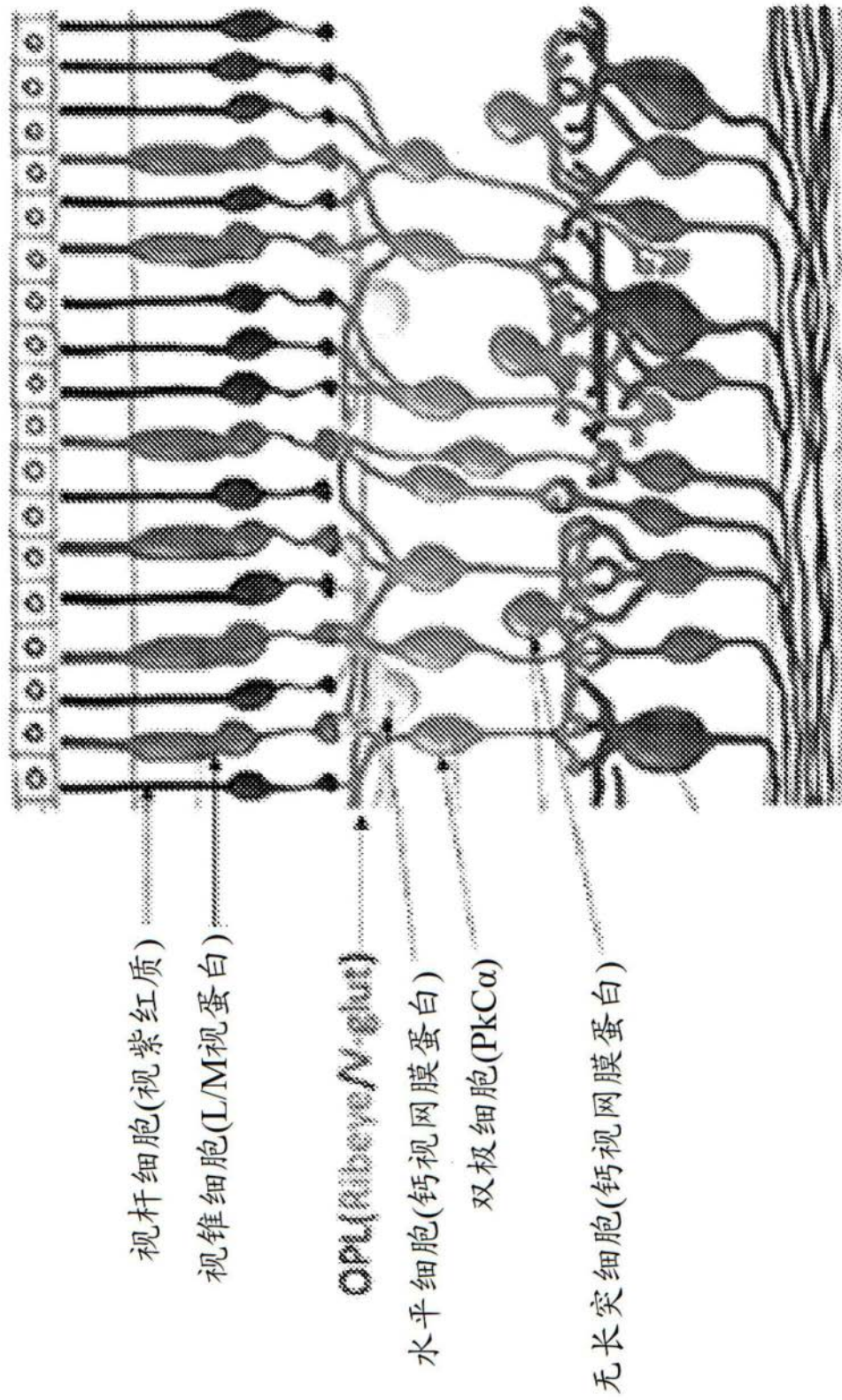


图1

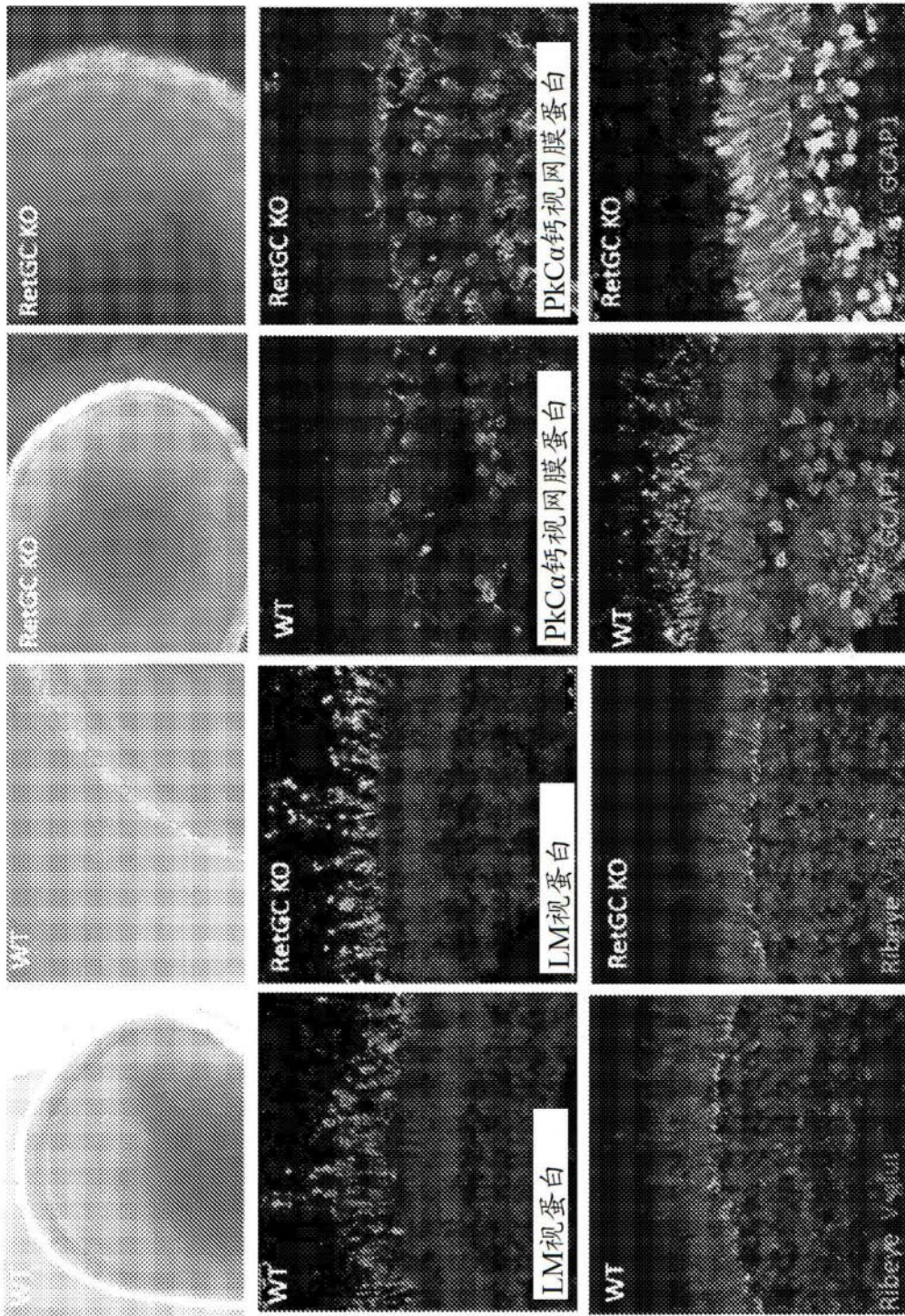


图2

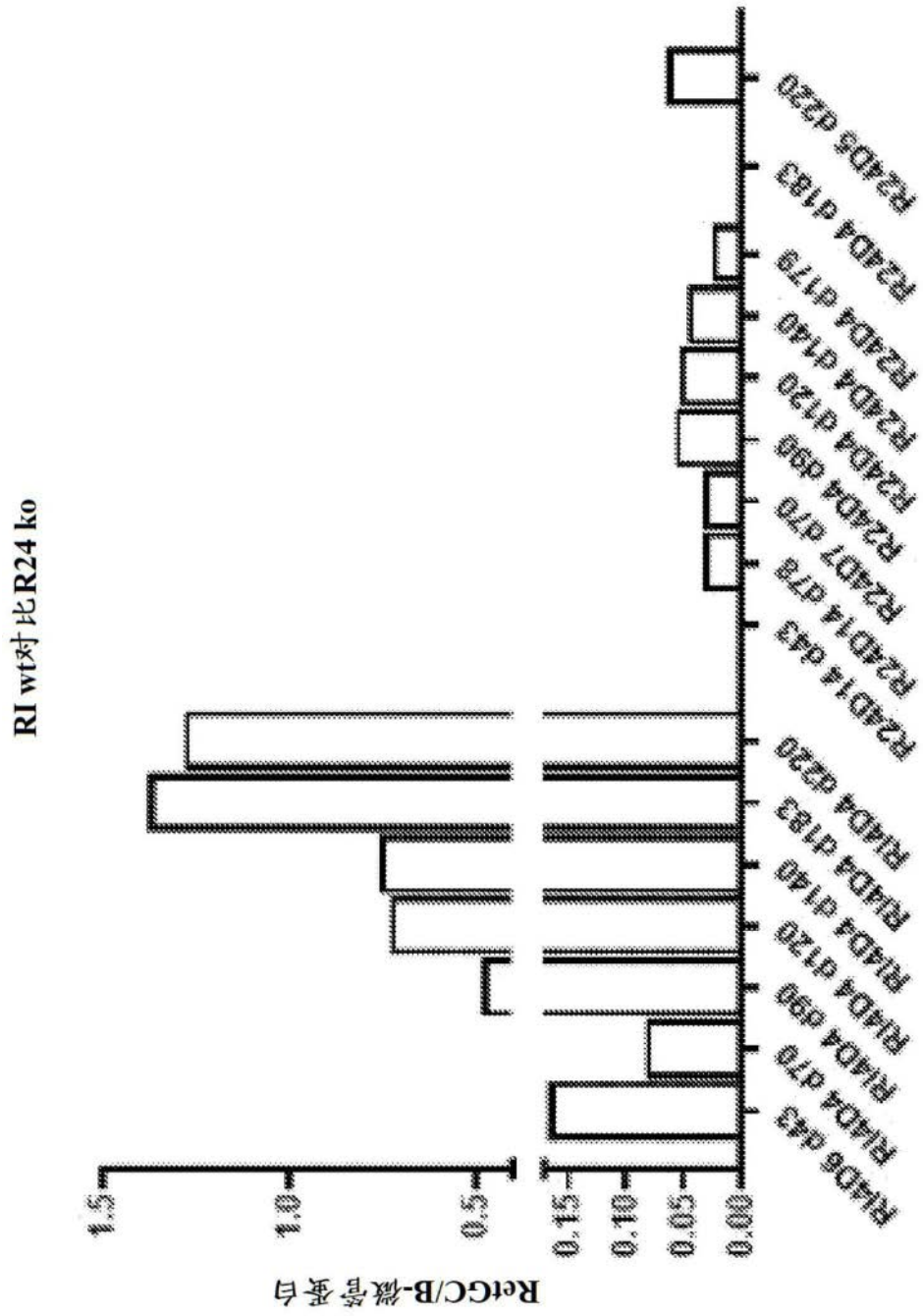


图3

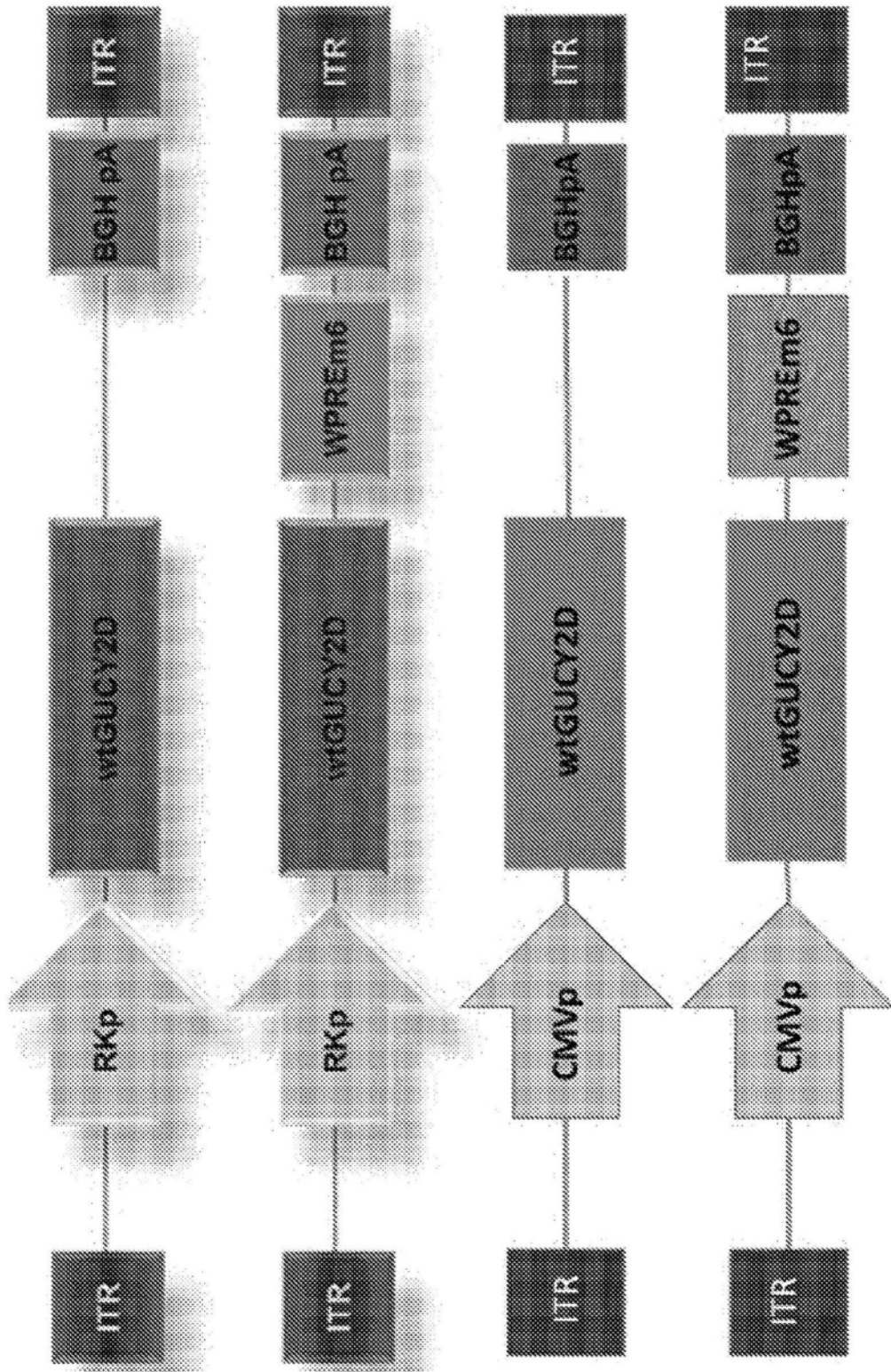


图4

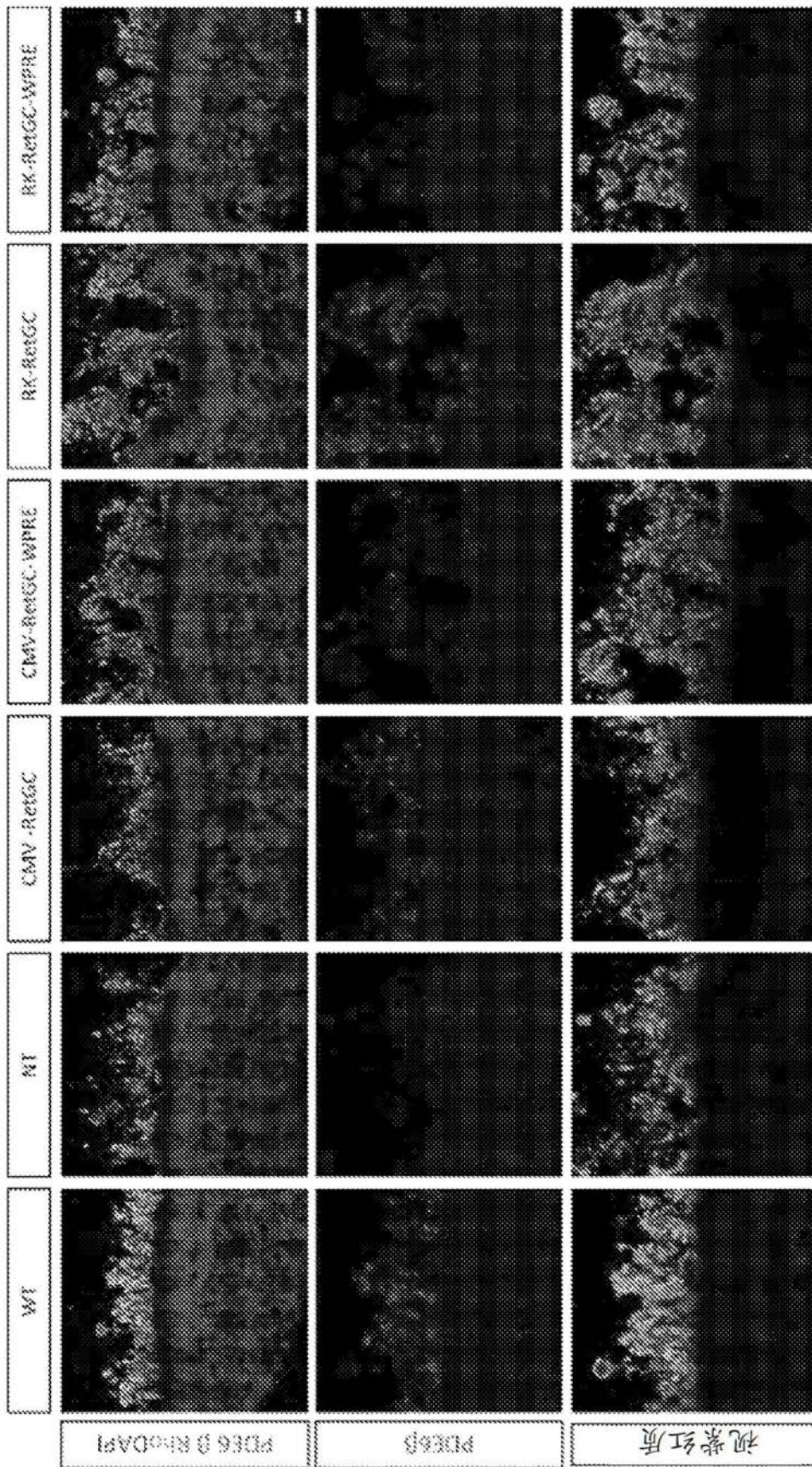


图5

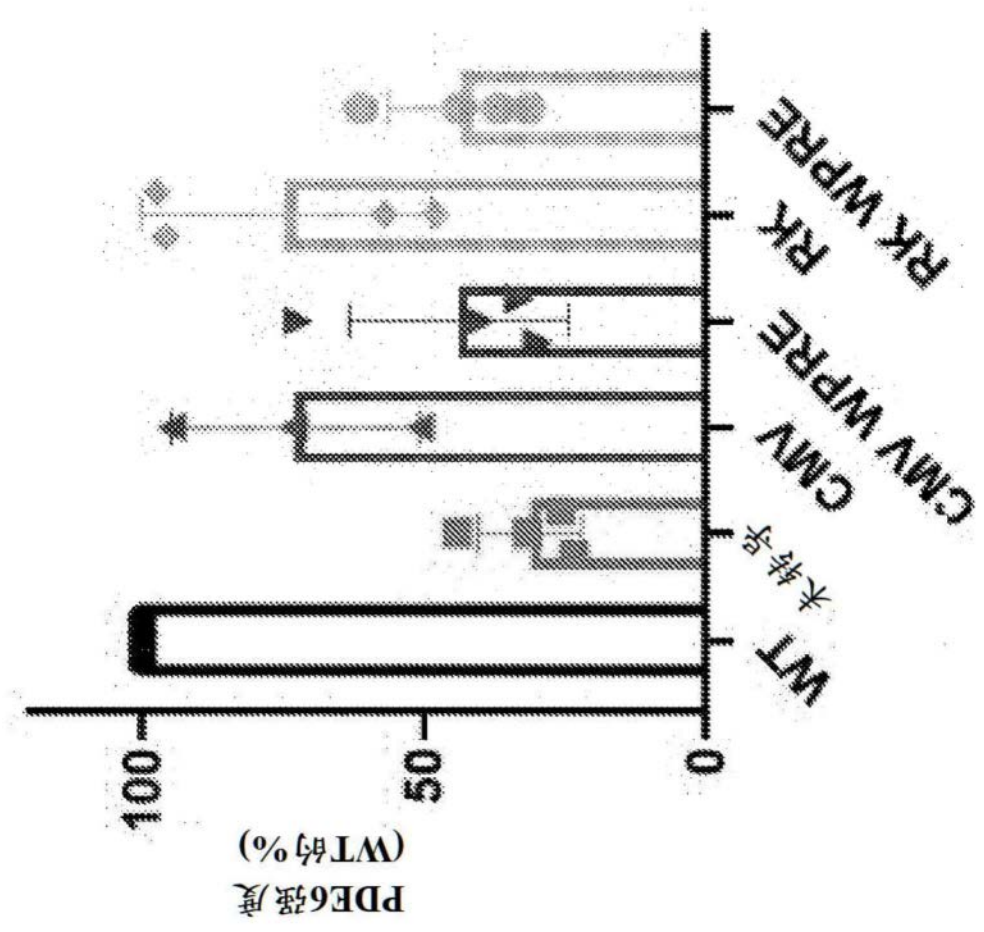


图6

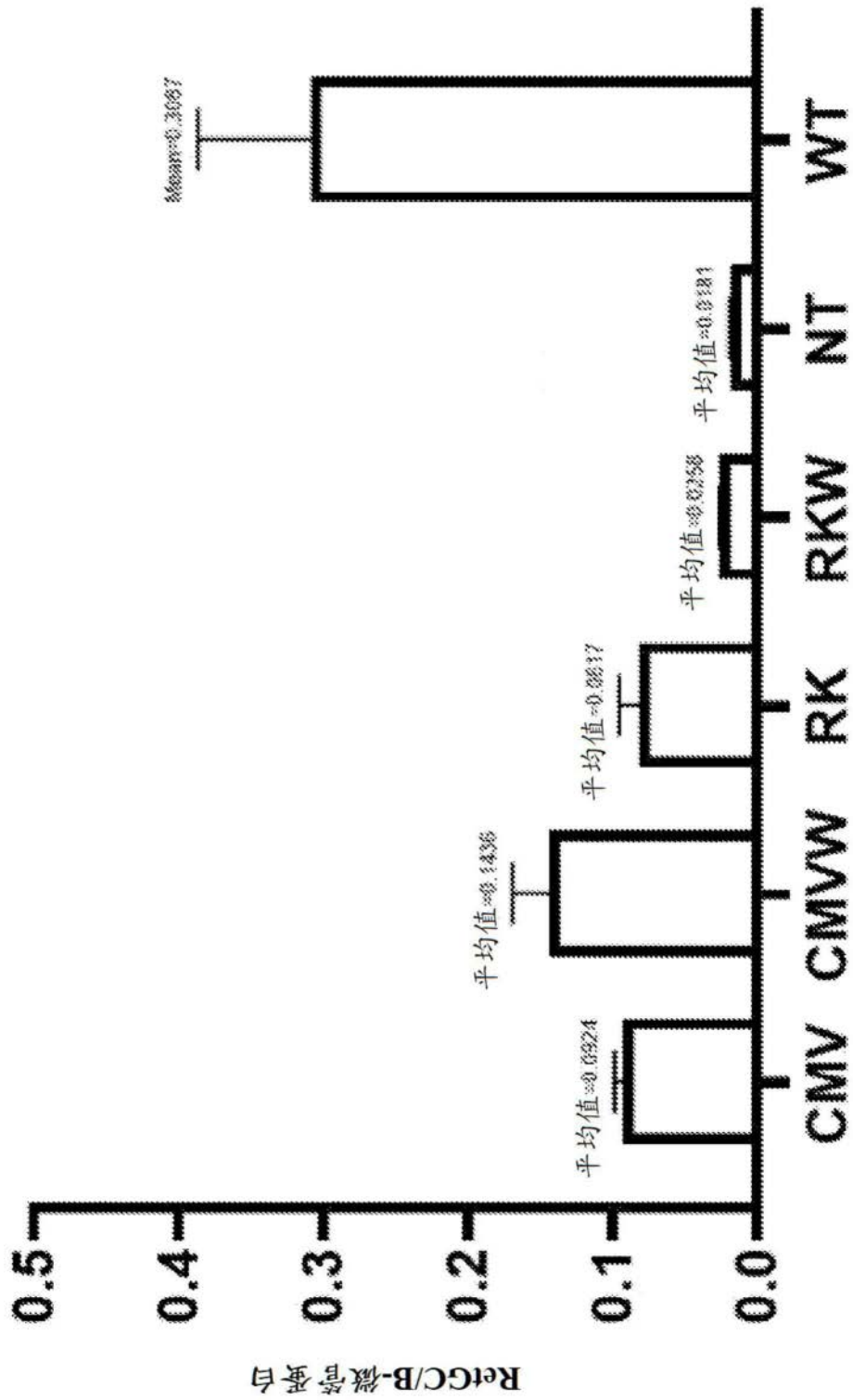


图7

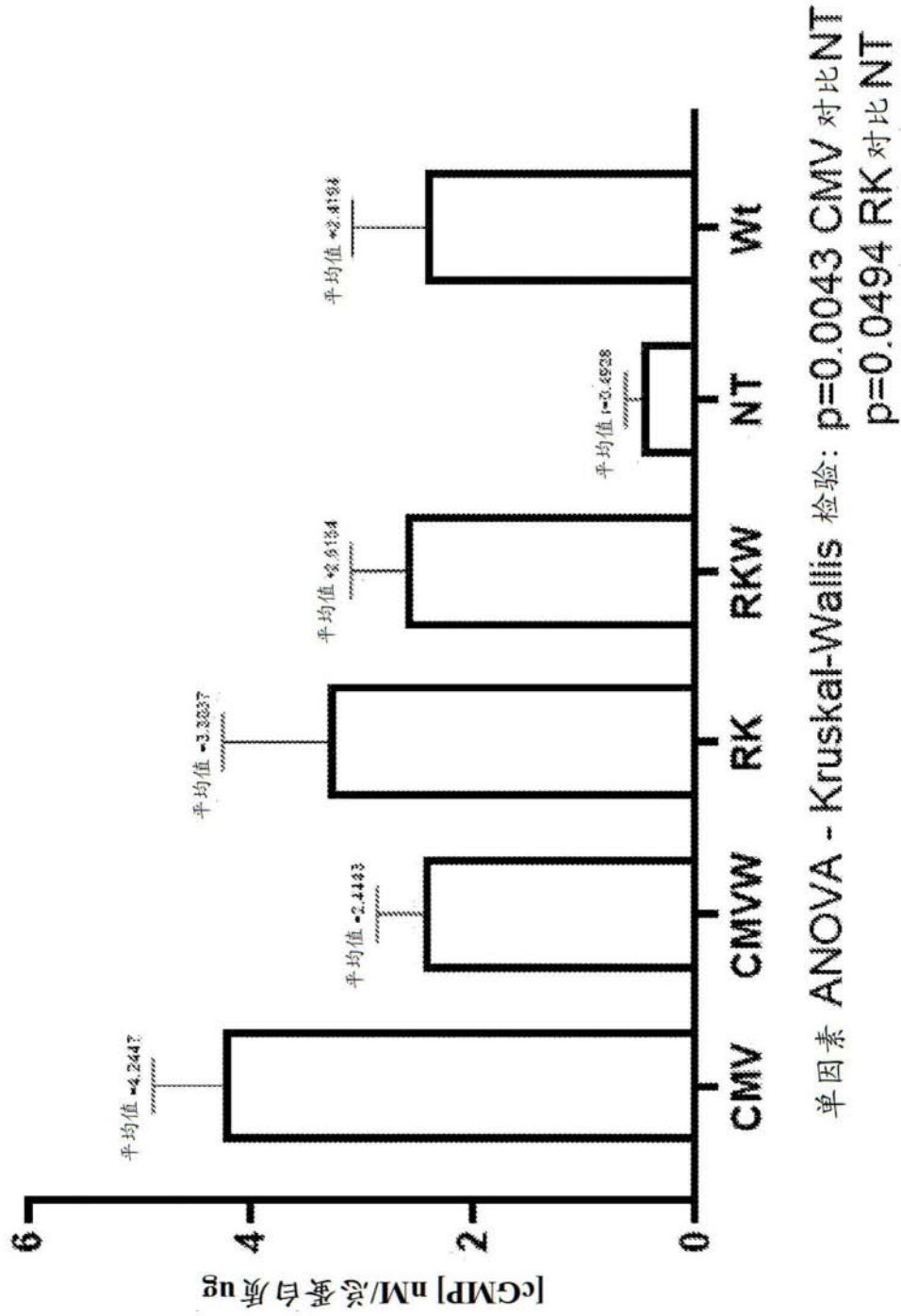


图8