



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105026554 B

(45)授权公告日 2020.08.11

(21)申请号 201480010987.3

(22)申请日 2014.03.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105026554 A

(43)申请公布日 2015.11.04

(30)优先权数据

61/788,724 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.08.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/025509 2014.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/151341 EN 2014.09.25

(73)专利权人 宾夕法尼亚大学托管会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 J·M·威尔森 B·L·哥达

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 沈端 陶家蓉

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

(续)

(56)对比文件

CN 102869779 A, 2013.01.09

Seth D. Hartung等. Correction of Metabolic, Craniofacial, and Neurologic Abnormalities in MPS I Mice Treated at Birth with Adeno-associated Virus Vector Transducing the Human A-L-Iduronidase Gene.《MOLECULAR THERAPY》.2004,第9卷(第6期),第866-875页.

登录号:NP_000194.2.alpha-L-iduronidase precursor[Homo sapiens].《GenBank》.2013,参见序列部分.

Monica Cardone等. Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery.《Human Molecular Genetics》.2006,第15卷(第7期),第1225-1236页. (续)

审查员 赵楠

权利要求书2页 说明书15页

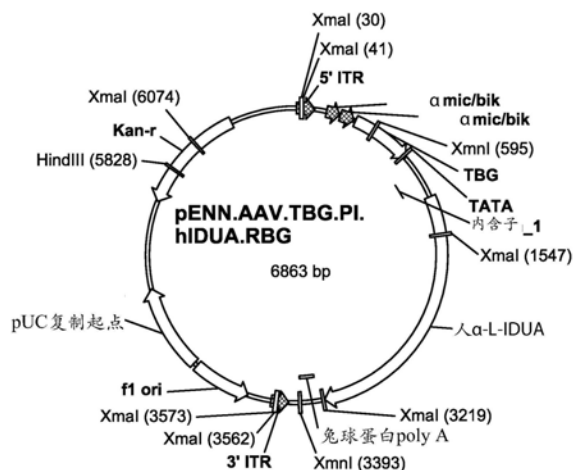
序列表37页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗MPS1的组合物和方法

(57)摘要

提供了一种载体,该载体具有表达盒,该表达盒含有hIDUA基因,该基因具有SEQ ID NO:1序列或编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的、与SEQ ID NO:1序列具有至少约95%一致性的序列。该载体可以是生产载体或rAAV8。还提供了包含这些载体的组合物和治疗MPS I以及和贺勒氏(Hurler)、贺勒-施艾氏(Hurler-Scheie)和施艾氏(Scheie)综合征相关的症状的方法。



[转续页]

[接上页]

(51)Int.Cl.

C12N 7/01(2006.01)

C12N 15/00(2006.01)

(56)对比文件

Francesca Bertolal等.IDUA Mutational Profiling of a Cohort of 102 European Patients with Mucopolysaccharidosis Type

I: Identification and Characterization of 35 Novel α -L-iduronidase (IDUA) Alleles. 《HUMAN MUTATION》.2011,第32卷第2189-2210 页.

登录号:NM_000203.3.Homo sapiens iduronidase,alpha-L-(IDUA),mRNA. 《GenBank》.2013,参见序列部分.

1. 一种携带表达盒的重组载体, 该表达盒包括人 α -L-艾杜糖苷酸酶基因, 该基因具有SEQ ID NO:1核苷酸序列, 其编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶, 其中所述表达盒进一步包括指导人 α -L-艾杜糖苷酸酶表达的调控序列, 所述调控序列包括肝脏特异性启动子。

2. 根据权利要求1所述的重组载体, 其中该启动子是TBG启动子。

3. 根据权利要求1所述的重组载体, 其中该载体进一步包括一个或多个增强子。

4. 根据权利要求3所述的重组载体, 其中这些增强子是相同或不同的。

5. 根据权利要求3所述的重组载体, 其中这些增强子选自下组, 该组由以下各项组成: 内含子、CMV增强子、和 α mic/bik增强子。

6. 根据权利要求5所述的重组载体, 其中所选择的增强子的多于一个拷贝存在于该载体中。

7. 根据权利要求6所述的重组载体, 其中该增强子的该多于一个拷贝串联定位。

8. 根据权利要求1所述的重组载体, 其中该表达盒进一步包括选自兔球蛋白poly A的poly A。

9. 根据权利要求1所述的重组载体, 其质粒具有SEQ ID NO:3的序列。

10. 一种重组腺相关病毒颗粒, 该颗粒具有AAV衣壳并且具有包装在其中的5'反向末端重复序列、在控制其表达的调节序列的控制下的人 α -L-艾杜糖苷酸酶基因、和AAV 3'反向末端重复序列, 其中所述人 α -L-艾杜糖苷酸酶基因具有在SEQ ID NO:1中示出的序列, 其编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶。

11. 根据权利要求10所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中经修饰的人 α -L-艾杜糖苷酸酶基因在肝脏特异性启动子的控制下进行表达。

12. 根据权利要求11所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中该启动子是TBG启动子。

13. 根据权利要求10所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中该载体进一步包括一个或多个增强子。

14. 根据权利要求13所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中这些增强子是相同或不同的。

15. 根据权利要求13所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中这些增强子选自下组, 该组由以下各项组成: 内含子、CMV增强子、和 α mic/bik增强子。

16. 根据权利要求15所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中所选择的增强子的多于一个拷贝存在于该载体中。

17. 根据权利要求16所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中该增强子的该多于一个拷贝串联定位。

18. 根据权利要求10所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中该重组腺相关病毒颗粒包括AAV衣壳, 该AAV衣壳选自AAV8和AAV9。

19. 根据权利要求18所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中该重组腺相关病毒是假型的。

20. 根据权利要求19所述的重组腺相关病毒颗粒, 其中这些反向末端重复序列来自AAV2。

21. 根据权利要求10所述的重组腺相关病毒颗粒, 其具有AAV8衣壳, 并且具有包装在其中的AAV2 5'反向末端重复序列、在控制其表达的调节序列的控制下的SEQ ID NO:1的人 α -L-艾杜糖苷酸酶基因、和AAV2的3'反向末端重复序列, 其中所述调节序列包含肝脏特异性的TBG启动子, 多于一个拷贝串联定位的 α mic/bik增强子, 内含子和polyA序列。

22.一种对于治疗I型粘多糖贮积症(MPS I)有用的组合物,该组合物包括根据权利要求10到21中任一项所述的重组腺相关病毒颗粒和药学上可接受的载体。

23.根据权利要求10到21中任一项所述的重组腺相关病毒颗粒在I型粘多糖贮积症治疗用药物的制备中的用途,所述药物包含有效量的所述重组腺相关病毒和药学上可接受的载体。

24.根据权利要求23所述的用途,其中所述药物配制用于静脉内递送。

25.根据权利要求23所述的用途,其中所述药物配制成含有 3×10^9 到 3×10^{13} 基因组拷贝的重组腺相关病毒颗粒/公斤。

用于治疗MPS1的组合物和方法

[0001] 发明背景

[0002] 粘多糖贮积症是由缺乏糖胺聚糖 (GAG) (也被称为粘多糖) 降解中涉及的特异性溶酶体酶引起的一组遗传性障碍。部分降解的GAG的累积引起对细胞、组织、和器官功能的干扰。随着时间, GAG在细胞、血液和结缔组织内累积, 造成越来越多的细胞和器官损伤。最严重的粘多糖贮积症 (MPS) 障碍MPS I是由酶 α -L-艾杜糖苷酸酶 (IDUA) 的缺乏引起的。这导致三种临床综合征, 按严重性的顺序为贺勒氏 (Hurler)、贺勒-施艾氏 (Hurler-Scheie) 和施艾氏 (Scheie) 综合征。每一种都是常染色体隐性遗传, 酶缺陷的程度与临床表型的严重性直接相关。

[0003] 已经报道IDUA基因为生产称为 α -L-艾杜糖苷酸酶的酶提供指示, 这种酶对于分解称为糖胺聚糖 (GAG) 的大的糖分子是必要的。具体地, 报道了 α -L-艾杜糖苷酸酶从被称为硫酸化 α -L-艾杜糖醛酸的分子中去除硫酸素 (sulfate), 硫酸素存在于被称为硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素两种GAG中。 α -L-艾杜糖苷酸酶位于溶酶体中, 溶酶体是细胞内消化和再循环不同种类的分子的隔室。已经发现IDUA基因中的多于100种突变引起I型粘多糖贮积症 (MPS I)。改变一个DNA结构单元 (核苷酸) 的突变是最常见的。引起MPS I的突变减少或完全消除 α -L-艾杜糖苷酸酶的功能。

[0004] 关于临床综合征, 目前对贺勒氏综合征的医疗标准是造血干细胞移植 (HSCT), 如骨髓移植 (BMT) 或脐带血移植 (UCBT)。要尽早并且在两岁前进行这一手术, 从而影响疾病的躯体和CNS两个方面。然而, 对于MPS I的HSCT仍然与大量发病和20%的死亡率相关。如果移植不是选项, 则可以开始酶替代疗法 (ERT), 该疗法需要为了患者的生命而每周输注酶。ERT不影响CNS疾病的进展, 但部分改善躯体表现。器官巨大症得到显著改善, 尽管疾病在骨骼系统、眼和心脏方面仅得到部分改善。患者可能需要手术来稳固臀部和膝盖并且来治疗腕管综合征和手指收缩。心脏疾病用药物治疗, 尽管最终可能需要手术。

[0005] 对于MPS I的ERT提供外源性酶来摄取到溶酶体中并且增加GAG的分解代谢。尽管溶酶体酶在内部起作用, 细胞表面甘露糖-6-磷酸受体能够结合、内化、和递送这些酶到溶酶体。重组IDUA (阿杜拉酶 (**Aldurazyme®**), 拜马林制药 (BioMarin)) 被FDA批准用于患有贺勒氏和贺勒-施艾氏形式的MPS I的患者和用于患有施艾氏形式的患者, 这些患者具有中等到严重的症状并且被示为改善了肺功能和行走能力。还观察到了ERT减少MPS I患者的肝脏肿大以及尿液中GAG的水平。然而, 因为静脉内的酶不容易穿过进入脑部, 所以目前ERT没有解决某些MPS I患者经历的神经症状。

[0006] ERT的并发症围绕对重组酶的免疫应答, 其范围可以从温和到全面过敏反应以及终生外周通路并发症如局部和全身感染。高达91%的接受阿杜拉酶的患者发展出了对酶的抗体, 尽管并不清楚它对疗效有多大影响。进一步地, ERT需要在医院环境下每周静脉内 (i.v.) 输注, 经3-8小时的时期给药, 这严重影响了患者的生活质量, 并且高昂的费用是卫生保健报销系统的主要压力。

[0007] 鉴于这些限制, 可以更有效地矫正与MPS I相关的发病的治疗仍然是未满足的医疗需求。

[0008] 发明概述

[0009] 在一个方面,本发明提供了表达盒,该表达盒包括人 α -L-艾杜糖苷酸酶(hIDUA)基因,该基因具有SEQ ID NO:1核苷酸序列或在人细胞中编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的、与SEQ ID NO:1具有至少约95%一致性的序列,其中所述表达盒进一步包括在人细胞中指导人 α -L-艾杜糖苷酸酶表达的调控序列,所述调控序列包括肝脏特异性启动子。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了包含该表达盒的载体。在一个实施例中,该表达盒位于cis质粒上。在另一个实施例中,该表达盒位于pENN.TBG.hIDUA.nRBG上。

[0011] 在还另一个方面,本发明提供了重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,该颗粒具有AAV衣壳并且具有包装在其中的左反向末端重复序列(ITR)、在控制其表达的调节序列的控制下的人 α -L-艾杜糖苷酸酶(hIDUA)基因、和AAV右ITR,其中所述hIDUA基因具有在SEQ ID NO:1(图1)中示出的序列或编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的、与SEQ ID NO:1示出的序列具有至少约95%一致性的序列。在一个实施例中,该功能性hIDUA基因在肝脏特异性启动子的控制下进行表达。这种启动子可以是甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子。

[0012] 在进一步的方面,本发明提供了重组腺相关病毒颗粒AAV2/8.TBG.hIDUA.co。

[0013] 在还另一个方面,本发明提供了对于治疗I型粘多糖贮积症(MPS I)有用的组合物,该组合物包括rAAV和药学上可接受的载体,该rAAV包括在此所述的表达盒。

[0014] 在仍另一个方面,本发明提供了用于治疗I型粘多糖贮积症的方法,该方法包括递送有效量的组合物,该组合物包括药学上可接受的载体和如在此所述的rAAV。

[0015] 在还另一个方面,本发明提供了用于治疗或改善贺勒氏、贺勒-施艾氏和/或施艾氏综合征的症状的方法。

[0016] 本发明的还有其他方面和优点将从本发明的详细描述中显而易见。

[0017] 附图简要说明

[0018] 图1A至1D提供了在此所述的pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.RGB质粒[SEQ ID NO:3]的序列,该序列包括功能性人IDUA基因的核酸序列。功能性IDUA的基因位于图1的位置1251-3213处,并且还在SEQ ID NO:1和2中提供了其编码的酶序列。进一步对序列进行注释以标识以下序列:amic/bik增强子、内含子1、兔球蛋白poly A、ITR、复制起点。

[0019] 图2提供了pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.RGB的环状图。

[0020] 发明详细说明

[0021] 在此所述的组合物提供了携带人IDUA基因的表达盒,该表达盒在人类受试者中表达治疗有效量的功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶。

[0022] 如在此所使用,“治疗有效量”指在靶细胞中递送和表达足以改善或治疗贺勒氏、贺勒-施艾氏和/或施艾氏综合征、和或MPS I症状的酶的量的组合物的量。“治疗”可以包括预防这些综合征(或MPS I)中的一种的症状的恶化并可能逆转其症状中的一种或多种。

[0023] 如在此所使用的“功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶”指人 α -L-艾杜糖苷酸酶的酶,该酶通常在未患有MPS1或相关综合征(如贺勒氏、贺勒-施艾氏和/或施艾氏综合征)的人中起作用。相反地,引起MPS1或这些综合征中的一种的人 α -L-艾杜糖苷酸酶的酶的变体被认为是非功能性的。在一个实施例中,功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶具有布雷默(Bremer)等人在以下文献中所描述的野生型人 α -L-艾杜糖苷酸酶的氨基酸序列:分子遗传学与新陈代谢(Mol.Genet.Metab.) 104(3):289-294(2011),NCBI参考序列NP_000194.2,重现在SEQ ID

N0:2 (653个氨基酸)中。然而,此序列的若干天然发生的功能多态性(变体)已被描述并可以涵盖在本发明的范围内。参考SEQ ID N0:2,这些变体包括在位置110处的N-键联糖基化[陈(Chen)等人,蛋白质组学研究杂志(J Proteome Res.),8:651-661(2009)],在氨基酸位置33处的从H到Q的改变[SEQ ID N0:7,VAR_003350;斯科特·HS(Scott,HS)等人,美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad.Sci),88:9695-9699(1991);斯科特·HS(Scott,HS)等人,基因组学(Genomics),12:1311-1313(1992);斯科特·HS(Scott,HS)等人,人类遗传学(Hum Genet),90:327-327(1992);贝尔托拉·F(Bertola F.)等人,人类突变,32:E2189-E2210(2011)],在氨基酸位置82处的H到Q的还原[SEQ ID N0:8,VAR_020976;斯科特·HS(Scott,HS)等,人类遗传学(Hum Genet),上文引用],在位置105处的从R到Q的改变[SEQ ID N0:9,VAR_003356;斯科特·HS(Scott,HS)等人,人类遗传学(Hum Genet),上文引用;贝尔托拉(Bertola)等人,上文引用],在位置116处的从G到R的改变[SEQ ID N0:12,VAR_003367],在位置279处的从V到A的改变[SEQ ID N0:11,VAR_003359],在位置346处的从L到R的改变[SEQ ID N0:12,VAR_017436,腾,YN(Teng,YN)等人,临床遗传学(Clin.Genet),57:131-136(2000)],在位置361处的从A到T的改变[SEQ ID N0:13,VAR_003364;斯科特·HS(Scott,HS)等人,人分子遗传学(Hum Mol Genet),2:1471-1473(1993);宇佳玲加姆(Yogalingam)等人,人类突变(Hum Mutat),24:199-207(2004);贝尔托拉(Bertola)等人,上文引用],在位置449处的从H到N的改变[SEQ ID N0:14,VAR_066228,贝尔托拉(Bertola)等人,上文引用],在位置454处的从V到I的改变[SEQ ID N0:15,VAR_003372,宇佳玲加姆(Yogalingam)等人,上文引用;贝尔托拉(Bertola)等人,上文引用],在位置591处的从A到T的改变[SEQ ID N0:16,VAR_0066231,贝尔托拉(Bertola)等人,上文引用],和在位置622处的从A到T的改变[SEQ ID N0:17,斯科特(Scott)等人,基因组学(Genomics),上文引用]。参见例如UniProtKB/Swiss-Prot;www.uniprot.org/uniprot/P35475。在另一个实施例中,功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶可以包括合成氨基酸序列,其中SEQ ID N0:2的前26个氨基酸的全部或一部分由异源前导肽所替代,这些氨基酸对应于前导(信号)肽。这个负责将酶通过其分泌路径转运出细胞进入循环的前导肽可以由另一种合适的前导肽所取代,例如,如来自白细胞介素-2(IL-2)或制瘤素的前导肽。优选合适的前导肽,但并不必需来自人。可以从<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/zhang270.htm>(将其通过引用结合在此)选择合适的前导肽,或可以使用多种用于在选择的蛋白中确定前导(信号)肽的计算程序来确定。尽管不受限制,这样的序列长度可以从约15到约50个氨基酸,或长度可以从约20到约28个氨基酸,或可以根据需要更长或更短。另外,至少一种体外测定已经被描述为对评估IDUA酶的酶活性是有用的[参见,例如,见卡其斯(Kakkis)等人,分子遗传学与新陈代谢(Mol.Genet.Metab.),2001年3月;72(3):199-208]。

[0024] 合适地,在此所述的组合物和方法不需要长期、重复每周注射治疗剂量。不希望被理论所限制,在此所述的方法被认为对于矫正除了与MPSI障碍相关的躯体症状之外的中枢神经系统表型是有用的。

[0025] 表达盒

[0026] 表达盒在最低限度上由基因及其调节序列构成。当该盒被设计成用于从重组腺相关病毒进行表达时,该表达盒进一步包含5'和3'AAV反向末端重复序列(ITR)。这些ITR可以是全长型,或这些ITR中之一或二者可以被截短。例如,可以将包含D序列缺失和末端解离位

点(trs)缺失的截短的5' ITR用于例如自我互补AAV。在一个实施例中,rAAV是假型的,即AAV衣壳来自与提供ITR的AAV不同来源的AAV。在一个实施例中,使用了AAV血清型2的ITR。然而,可以选择来自其他合适的来源的ITR。

[0027] 如在此所述,将携带功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶(hIDUA)基因的在指导功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的酶在细胞中表达的调节序列的控制下的表达盒递送给患有在此所述的病症中的一种的患者。

[0028] 该表达盒包含hIDUA基因,其特征在于具有SEQ ID NO:1核苷酸序列。这个序列由发明人所开发,具有与基因库(Genbank)中编码SEQ ID NO:2的公开基因序列NP000194.2约83%的一致性。在另一个实施例中,该表达盒包含hIDUA基因(其特征在于具有与SEQ ID NO:1具有至少约80%一致性的核苷酸序列)并且编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶。在另一个实施例中,该序列与SEQ ID NO:1具有至少约85%一致性或与SEQ ID NO:1具有至少约90%一致性并且编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶。在一个实施例中,该序列与SEQ ID NO:1具有至少约95%一致性、与SEQ ID NO:1具有至少约97%一致性、或与SEQ ID NO:1具有至少约99%一致性并且编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶。在一个实施例中,这涵盖了全长hIDUA基因,包括人 α -L-艾杜糖苷酸酶的前导肽序列(即,编码SEQ ID NO:2的约氨基酸26、或约氨基酸27到约氨基酸653),对应于SEQ ID NO:1的约1到约78。在另一个实施例中,hIDUA基因编码合成的功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的酶,该酶是包括与功能性 α -L-艾杜糖苷酸酶的酶的分泌部分融合的异源前导序列的合成肽,即,SEQ ID NO:2或在此指定的其功能性变体之一的约氨基酸27到约653。

[0029] 相对于序列的一致性 or 相似性在此处被定义为:在比对序列并且引入空位(如果需要的话)以实现最大序列一致性百分比之后,在候选序列中与在此所提供的肽和多肽区域相同(即,相同残基)或相似(即,基于共有侧链特性来自相同组的氨基酸残基,见下文)的氨基酸残基的百分比。百分比(%)一致性是两个多核苷酸或两个多肽之间的关系的度量,如通过分别比较其核苷酸或氨基酸序列所确定。通常,对有待比较的两条序列进行比对来给出序列之间的最大相关性。对两条序列的比对进行检查,并且确定给出两条序列之间的准确氨基酸或核苷酸对应关系的位置的数量,除以比对的总长度并乘以100来给出百分比一致性数字。这个百分比一致性数字可以根据有待比较的序列的全长来确定,这种方式对于高度同源的长度相同或非常相似的序列是特别合适的,或者根据较短定义长度来确定,这种方式对于长度不相等或具有较低同源水平的序列更合适。存在多种算法和基于其的计算机程序,这些在文献中是可用的和/或可公开或商业可得的以用于进行比对和百分比一致性。算法或程序的选择不是对本发明的限制。

[0030] 合适的比对程序的实例包括例如在Unix下并然后导入到Bioedit程序的软件CLUSTALW(霍尔·T.A. (Hall, T.A.) 1999, BioEdit:用于Windows 95/98/NT的用户友好的生物序列比对编辑器和分析程序(BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT), 核酸专题论文集系列(Nucl. Acids. Symp. Ser.), 41:95-98); 威斯康辛序列分析包(Wisconsin Sequence Analysis Package), 版本9.1(德弗罗·J. (Devereux J.) 等人, 核酸研究(Nucleic Acids Res.), 12:387-395, 1984, 可从美国威斯康辛州麦迪逊的遗传学计算机集团(Genetics Computer Group) 获得)。程序BESTFIT和GAP可以用于确定两个多核苷酸之间的百分比一致

性和两条多肽序列之间的百分比一致性。

[0031] 其他用于确定序列之间的一致性和/或相似性的程序包括例如,可从美国马里兰州贝塞斯达的国家生物技术信息中心(NCB,National Center for Biotechnology Information,Bethesda,Md.,USA)获得并可通过NCBI的主页(www.ncbi.nlm.nih.gov)访问的BLAST程序家族,GCG序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(版本2.0)。使用ALIGN程序以比较氨基酸序列时,能使用PAM120权重残基表,缺口长度罚分为12并且缺口罚分为4;以及FASTA(皮尔森·W.R.(Pearson W.R.)和李普曼·D.J.(Lipman D.J.),美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),85:2444-2448,1988,可获得为威斯康辛序列分析包的一部分)。SeqWeb软件(对于GCG威斯康辛包的基于网页的界面:Gap程序)。

[0032] 如贯穿本说明书及权利要求书所使用的,术语“包括”(comprising)和“包含”(including)是把其他组件、元件、整体、步骤等包括在内的。相反地,术语“组成”及其变体是将其他组件、元件、整体、步骤等排除在外的。除非另外规定,否则术语“约”涵盖了在±10%内并包括其的变化。

[0033] 在一个实施例中,该表达盒针对人肝脏定向表达而设计。因此,肝脏特异性启动子尤其特别适合于该表达盒。在一个实施例中,选择了甲状腺素结合球蛋白启动子。在一个实施例中,TBG启动子具有图1的核苷酸442到901的序列。可替代地,可以选择另一种肝脏特异性启动子。除其他之外,组织特异性启动子的实例针对肝脏和其他组织是众所周知的(白蛋白,宫武(Miyatake)等人,(1997),病毒学杂志(J.Virol.),71:5124-32;乙型肝炎病毒核心启动子,桑迪格(Sandig)等人,(1996),基因治疗(Gene Ther.),3:1002-9;甲胎蛋白(AFP),阿巴斯诺特(Arbuthnot)等人,(1996),人类基因治疗(Hum.Gene Ther.),7:1503-14),骨钙素(斯泰因(Stein)等人,(1997),分子生物学导报(Mol.Biol.Rep.),24:185-96);谷唾液酸蛋白(陈(Chen)等人,(1996),骨矿物质研究杂志(J.Bone Miner.Res.),11:654-64),淋巴球(CD2,汉萨尔(Hansal)等人,(1998),免疫学杂志(J.Immunol.),161:1063-8;免疫球蛋白重链;T细胞受体链),神经元(如神经元特异性烯醇化酶(NSE))启动子(安德森(Andersen)等人,(1993),细胞和分子神经生物学(Cell.Mol.Neurobiol.),13:503-15),神经微丝轻链基因(皮克利(Piccioli)等人,(1991),美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),88:5611-5),和神经元特异性vgf基因(皮克利(Piccioli)等人,(1995),神经元(Neuron),15:373-84)。可以选择其他启动子(非肝脏特异性的),但是包含其的表达盒可能不具有带有TBG或另一种肝脏特异性启动子的那些表达盒的全部优点。可替代地,可以选择可调节的启动子。例如,参见W0 2011/126808B2,通过引用结合在此。

[0034] 在一个实施例中,该表达盒包括一个或多个表达增强子。在一个实施例中,该表达盒包含两个或更多个表达增强子。这些增强子可以是相同的或可以各不相同。例如,增强子可以包括 α mic/bik增强子。这个增强子可以存在于互相邻近定位的两个拷贝中。可替代地,增强子的双拷贝可以由一个或多个序列分开。仍在另一个实施例中,该表达盒进一步包含内含子,例如普洛麦格(Promega)内含子。其他合适的内含子包括本领域已知的那些,例如,如在W0 2011/126808中所述。

[0035] 进一步地,本发明的表达盒具有合适的聚腺苷酸化信号。在一个实施例中,polyA序列是兔球蛋白poly A。在一个实施例中,polyA序列特征在于具有图1的nt 3261-3387。可替代地,另一种polyA(例如人生长激素(hGH)聚腺苷酸化序列)是SV40polyA,或合成polyA。

仍然地,其他常规调节元件可以另外地或任选地包括在表达盒中。

[0036] 在一个实施例中,将表达盒工程化到合适的载体上,例如,使用本领域技术人员已知的技术的质粒载体。任选地,本发明的组合物可以包含包括经修饰的人IDUA基因的第一表达盒和包括不同基因的第二表达盒。在仍另一个实施例中,可以从多于一个表达盒来表达功能性人IDUA,该多于一个表达盒可以位于多个载体上,例如,如在WO 2011/126808中所述。

[0037] 在一个实施例中,该表达盒由pENN.TBG.hIDUA.nRBG携带,该质粒用于生成携带该表达盒的重组腺相关病毒。

[0038] 生产AAV病毒颗粒

[0039] 在一个实施例中,本发明提供了重组腺相关病毒(rAAV)颗粒,该颗粒具有AAV衣壳并且具有包装在其中的5'反向末端重复序列(ITR)、在控制其表达的调节序列的控制下的人 α -L-艾杜糖苷酸酶(hIDUA)基因、和AAV 3' ITR,其中所述hIDUA基因具有在SEQ ID NO:1(图1)中示出的序列或编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的、与SEQ ID NO:1示出的序列具有至少约95%一致性的序列。一种特别期望的rAAV是AAV2/8.TBG.hIDUA.co。

[0040] 制备基于AAV的载体的方法是已知的。例如,见美国公开专利申请号2007/0036760(2007年2月15日),将其通过引用结合在此。使用AAV8的AAV衣壳尤其特别适合于在此所述的组合物和方法。在美国专利7,282,199 B2、US 7,790,449、和US 8,318,480中描述了AAV8序列和基于AAV8衣壳生成载体的方法,将这些文件通过引用结合在此。还特别适合于在本发明中使用的是AAV9衣壳。在美国专利7,906,111中描述了AAV9序列和基于AAV9衣壳生成载体的方法,将该文件通过引用结合在此。然而,还可以选择或生成其他AAV衣壳来在本发明中使用。在上文引用的美国专利7,282,199 B2、US 7,790,449、US 8,318,480、和美国专利7,906,111中提供了许多这样的AAV的序列,和/或这些序列可以从基因库(GenBank)获得。可以合成地或使用多种分子生物学和基因工程技术来容易地生成这些AAV衣壳中的任何的序列。合适的生产技术对于本领域技术人员是熟知的。例如,见萨姆布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),冷泉港出版社(冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约)。可替代地,寡核苷酸编码肽(例如,CDR)或这些肽自身可以例如由众所周知的固相肽合成法而合成生成(梅里菲尔德(Merrifield), (1962), 美国化学会志(J. Am. Chem. Soc.), 85:2149; 斯图尔特(Stewart) 和 杨(Young), 固相肽合成(弗里曼(Freeman), 旧金山, 1969) pp. 27-62)。还见D M·麦卡迪(D M McCarty) 等人,“自我互补重组腺相关病毒(scAAV)载体独立于DNA合成促进高效转导(Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis)”, 基因治疗(Gene Therapy), (2001年8月), 第8卷, 第16期, 第1248-1254页。在例如美国专利号6,596,535、7,125,717、和7,456,683中描述了自我互补AAV, 其中每篇都通过引用以其全文结合在此。这些和其他合适的生产方法在本领域技术人员的知识内并且不是对本发明的限制。

[0041] 可以使用已知的技术来生成在此所述的重组腺相关病毒(AAV)。这种方法涉及培养包含编码AAV衣壳的核酸序列的宿主细胞; 功能性rep基因; 在最低限度上由AAV反向末端重复序列(ITR) 和转基因构成的表达盒; 和足够的辅助功能以允许将该表达盒包装到AAV衣壳蛋白中。

[0042] 需要在宿主细胞中培养以在AAV衣壳中包装AAV表达盒的组件可以在相反侧提供给宿主细胞。可替代地,所需要的组件(例如,表达盒、rep序列、cap序列、和/或辅助功能)中的任何一种或多种可以由稳定的宿主细胞提供,该稳定的宿主细胞已使用本领域技术人员已知的方法而被工程化来包含所需要的组件中的一种或多种。最合适地,这样的稳定的宿主细胞将包含受诱导型启动子控制的所需要的一种或多种组件。然而,所需要的一种或多种组件可以受组成型启动子的控制。在此提供了合适的诱导型和组成型启动子的实例,在适合与转基因一起使用的调节元件的讨论中。在仍另一个替代方案中,所选择的稳定的宿主细胞可以包含受组成型启动子控制的所选择的一种或多种组件和受一种或多种诱导型启动子控制的其他所选择的一种或多种组件。例如,可以生成源自293细胞的稳定的宿主细胞(其包含受组成型启动子控制的E1辅助功能),但该宿主细胞包含受诱导型启动子控制的rep和/或cap蛋白。仍然地,可以由本领域技术人员生成其他稳定的宿主细胞。

[0043] 可以将生产本发明的rAAV所需的表达盒、rep序列、cap序列、和辅助功能以转移携带在其上的序列的任何遗传因子的形式递送到包装宿主细胞。可以用任何合适的方法(包括在此所述的那些)来递送所选择的遗传因子。用于构建本发明的任何实施例的方法对核酸操作技术人员是已知的并且包括基因工程、重组工程、和合成技术。例如,见萨姆布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),冷泉港出版社(冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约)。类似地,生成rAAV病毒体的方法是众所周知的并且对合适的方法的选择不是对本发明的限制。例如,见K·菲舍(K.Fisher)等人(1993),病毒学杂志(J. Virol.),70:520-532和美国专利号5,478,745。

[0044] 除非另外说明,在此所述的AAV ITR、和其他所选择的AAV组件可以容易地选自于任何AAV。可以使用本领域技术人员可获得的技术来容易地将这些ITR和其他AAV组件从AAV序列分离。这样的AAV可以从学术、商业、或公共来源(例如,美国种质保存中心,马纳萨斯,弗尼吉亚州)分离或获得。可替代地,参照公开序列(如在文献中或数据库(例如,基因库(GenBank®)、PubMed®等)中可获得的)通过合成或其他合适的手段可以获得AAV序列。

[0045] A、表达盒

[0046] 该表达盒如在此所定义。另外,如在此所述的表达盒和/或载体可以包含另外的转基因调节序列。该表达盒包装到衣壳蛋白中并且递送到所选择的宿主细胞。

[0047] 1. 转基因

[0048] 本发明可以包括多个转基因的使用。本领域技术人员可以容易地选择合适的转基因。对转基因的选择不认为是对本发明的限制。

[0049] 2. 调节元件

[0050] 除了以上针对表达盒所标识的主要元件,载体还包括常规控制元件,这些控制元件以如下方式可操作地连接到转基因:该方式允许其在受到质粒载体转染或受到本发明所生产的病毒的感染的细胞中转录、翻译和/或表达。如在此所使用,“可操作地连接的”序列包括与感兴趣的基因邻接的表达控制序列,和在相反侧或在远处起作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列两者。表达控制序列包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号例如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;以及当需要时,增强所编码产物的分泌的序列。大量表达控制序列(包括天然的、组成型、诱导型和/或组织特异性启动

子)是本领域已知的并且可以被利用。

[0051] 组成型启动子的实例包括但不限于逆转录病毒劳斯氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus) (RSV) LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地具有CMV增强子)[例如,见博沙特(Boshart)等人(1985),细胞(Cell),41:521-530]、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子、和EF1启动子[英杰公司(Invitrogen)]。诱导型启动子允许对基因表达的调节并且可以受到外源提供的化合物、环境因素(如温度)、或存在特异性生理状态(例如,急性期、细胞的特定分化状态、或仅在复制细胞时)的调节。诱导型启动子和诱导型系统可以从多种商业来源中获得,包括但不限于英杰公司(Invitrogen)、克罗泰克公司(Clontech)和阿瑞雅德公司(Ariad)。许多其他系统已被描述并且可以由本领域技术人员容易地选择。受到外源提供的化合物调节的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统[国际专利公开号W0 98/10088];昆虫蜕皮激素启动子[诺(No)等人(1996)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),93:3346-3351],四环素阻抑系统[哥森(Gossen)等人(1992)美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),89:5547-5551]、四环素诱导型系统[哥森(Gossen)等人(1995)科学(Science),268:1766-1769,还见哈维(Harvey)等人(1998)化学生物学目前观点(Curr.Opin.Chem.Biol.),2:512-518]、RU486诱导型系统[王(Wang)等人(1997)自然生物技术(Nat.Biotech),15:239-243和王(Wang)等人(1997)基因治疗(Gene Ther.),4:432-441]以及雷帕霉素诱导型系统[马加里(Magari)等人(1997),临床研究杂志(J.Clin.Invest),100:2865-2872],包括例如从阿瑞雅德公司(Ariad)可获得的阿金特(ArgentTM)系统。在本文中可能有用的其他类型的诱导型启动子是受具体生理状态(例如,温度、急性期、细胞的特定分化状态、或仅在复制细胞时)调节的那些。

[0052] 转基因的另一个实施例包括可操作地连接到组织特异性启动子上的基因。例如,如果希望在骨骼肌中表达,应当使用在肌肉中有活性的启动子。这些包括来自编码骨骼 β -肌动蛋白、肌球蛋白轻链2A、抗肌萎缩蛋白、肌间线蛋白、MHC、肌肉肌酸激酶的启动子、以及具有比天然存在的启动子更高活性的合成肌肉启动子(见李(Li)等人,(1999)自然生物技术(Nat.Biotech.),17:241-245)。除其他之外,组织特异性启动子的实例针对CNS/神经元是众所周知,包括例如,神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(安德森(Andersen)等人,(1993),细胞和分子神经生物学(Cell.Mol.Neurobiol.),13:503-15),神经微丝轻链基因(皮克利(Piccioli)等人,(1991),美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),88:5611-5),和神经元特异性vgf基因(皮克利(Piccioli)等人,(1995),神经元(Neuron),15:373-84)。在另一个实施例中,将使用针对转基因的天然启动子。当希望转基因的表达模仿天然表达的时候,可以优选天然启动子。当必须时序性或发育性地、或以组织特异性方式、或响应于特异性转录刺激调节转基因的表达时,可以使用天然启动子。在进一步实施例中,还可以使用其他天然表达控制元件(如增强子元件、聚腺苷酸化位点或Kozak共有序列)来模仿天然表达。

[0053] 为便于参考,转基因、启动子/增强子、以及5'和3'AAV ITR的组合在此被称为表达盒。具有本发明的教导,可以依靠常规技术对这样的表达盒进行设计。

[0054] 3.将表达盒递送到AAV包装宿主细胞

[0055] 可以在任何合适的载体上携带该表达盒,例如质粒,其被递送到宿主细胞。可以对在本发明中有用的质粒进行工程化,这样使得它们适合于复制并且任选地整合在原核细胞、哺乳动物细胞、或两者中。这些质粒(或携带表达盒的其他载体)包含允许表达盒在真核生物和/或原核生物中复制的序列和用于这些系统的选择标记。除其他之外,选择性标记或报告基因可以包括编码卡那霉素、遗传霉素、潮霉素或嘌呤霉素抗性的序列。质粒还可以包括某些选择性报告基因或标记基因,这些选择性报告基因或标记基因可以用于发出载体存在于细菌细胞中的信号,如氨苄青霉素抗性。质粒的其他组件可以包括复制起点和扩增子,如采用爱-巴核抗原病毒核抗原的扩增子系统。这个扩增子系统、或其他类似的扩增子组件允许细胞中的高拷贝附加型复制。优选地,携带表达盒的分子转染到细胞中,在该细胞中它可以短暂地存在。可替代地,可以稳定地将表达盒或染色体地或作为附加体整合到宿主细胞的基因组中。在某些实施例中,表达盒可以存在于多个拷贝中,任选地为头接头、头接尾、或尾接尾多联体。合适的转染技术是已知的并且可以被容易地利用来将表达盒递送到宿主细胞。

[0056] 一般地,当通过转染递送包括表达盒的载体时,将处于从约5 μ g到约100 μ g DNA、约10 μ g到约50 μ g DNA的量的载体递送至约 1×10^4 个细胞到约 1×10^{13} 个细胞、或约 1×10^5 个细胞。然而,将这样的因子如所选择的载体、递送方法和所选择的宿主细胞考虑在内,可以调整载体DNA相对于宿主细胞的量。

[0057] B、包装宿主细胞

[0058] 除了表达盒,宿主细胞包含驱动本发明的AAV衣壳蛋白在宿主细胞中表达的序列和与在表达盒中发现的AAV ITR的来源具有相同来源、或交叉补充来源的rep序列。为了包装本发明的rAAV,包装宿主细胞还需要辅助功能。这样的辅助功能在本领域是众所周知的并且将不在此进行重复。类似地,用于生产具有AAV衣壳的合适的载体的方法是已知的。[例如,见美国公开专利申请号US 2007/0036760]。

[0059] 编码在此所述的表达盒的rAAV的构建体同样可以悬浮在生理相容性载体中,可以给药到受试者。在一个实施例中,载体是单独的无菌盐水或任选地还有多种缓冲溶液中的任一种(例如,磷酸盐缓冲盐水)。其他示例性载体包括乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、右旋糖酐、琼脂、果胶、芝麻油、和水。对载体的选择不是对本发明的限制。

[0060] 任选地,本发明的组合物除了rAAV和一种或多种载体之外,还可以包含其他常规药物成分如防腐剂、或化学稳定剂。在一个实施例中,递送是通过静脉内递送。然而,仍然可以选择其他给药途径。可替代地或另外地,希望的话,可以组合给药途径。

[0061] 在一个实施例中,本发明包括冻干组合物,该冻干组合物包含如在此所述的rAAV、或冻干形式的rAAV混合物。任选地,一种或多种稳定剂或防腐剂存在于此组合物中。合适地,为了使用,将冻干组合物与合适的稀释剂(例如,无菌盐水或缓冲盐水)进行重组。

[0062] 病毒载体的剂量将主要取决于如正被治疗的病症、患者年龄、体重和健康等因素,并且因此在患者之间可以不同。例如,病毒载体的治疗有效剂量一般在从约0.1mL到约100mL、或约0.1mL到约10mL、或约0.1mL到约5mL、或约0.5mL到约1mL溶液的范围,该溶液包含浓度从约 3×10^9 到 3×10^{13} 的基因组病毒载体(颗粒)/mL的水悬浮剂。另一示例性剂量是每1kg约 3×10^9 到 3×10^{13} AAV基因组。一种合适的体积是约1mL。在另一个实施例中,rAAV构建体的治疗有效剂量在约0.001ng到约1000mg/70kg动物的范围中,其可以用单个剂量或一

系列的两个或更多剂量来递送。可以确定其他合适的剂量。可以调整剂量来平衡治疗益处和任何副作用,并且这样的剂量可以取决于采用重组载体进行的治疗应用而不同。

[0063] 治疗方法

[0064] 本发明的组合物避免了酶替代疗法的并发症,这些并发症与对重组酶的免疫应答相关,其范围可以从温和到全面过敏反应以及终生外周通路并发症如局部和全身感染。进一步地,与ERT相比,本发明的组合物不需要长期、重复每周注射。不希望被理论所限制,在此所述的肝脏定向治疗方法被认为对于通过提供高效、长期的由具有高转导效率的载体所提供的基因转移而矫正与MPSI障碍相关的中枢神经系统表型是有用的,可以提供连续、升高的循环IDUA水平,这提供了穿过血脑屏障的治疗手段。另外,AAV肝脏基因转移可以提供积极耐受性并阻止酶抗体生成。

[0065] 提供了用于治疗I型粘多糖贮积症的方法,该方法包括递送治疗有效量的在此所述的经修饰的hIDUA表达盒。还提供了用于治疗 and/或改善贺勒氏、贺勒-施艾氏和施艾氏综合征的症状的方法。

[0066] 在一个实施例中,rAAV是经静脉内递送的。

[0067] 在另一个实施例中,将约 3×10^9 到约 3×10^{12} 的量的rAAV递送给受试者。尽管预期单次给药rAAV是有效的,由于肝脏是再生器官,可以重复(例如,每季度、每两年、每年度)或如另外方式所需给药。任选地,考虑到受试者的年龄和容忍输注的能力,可以经分离的输注区段递送治疗有效量的初始剂量。然而,不需要全治疗剂量的重复每周注射,这为患者提供在舒适度和治疗结果两方面的优势。

[0068] 以下实例仅是说明性的并且不是对在此所述的发明的限制。

[0069] 实例1-转基因和载体生产

[0070] 合成了编码功能性人 α -L-艾杜糖苷酸酶的经修饰的核苷酸序列。所得序列尤其特别适合于人表达并且与功能性人IDUA基因(hIDUA;基因库(Genbank)NP000194.2)具有小于约90%的一致性。然后将所得转基因插入到质粒中,质粒包含使用工程化MluI和SalI位点包装到可从宾夕法尼亚大学载体核心(UPenn Vector Core)获得的AAV载体中所必需的顺式元件。基因表达由人甲状腺素结合球蛋白(TBG)所驱动[林Y(Hayashi Y),莫里·Y(Mori Y),詹森·OE(Janssen OE)等人,人甲状腺素结合球蛋白基因:全序列和转录调节(Human thyroxine-binding globulin gene:complete sequence and transcriptional regulation),分子内分泌学(Mol Endocrinol),1993;7:1049-1060]。所得质粒(如图2中所示)pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.RGB包含受包括肝脏特异性TBG启动子的表达控制序列控制的经修饰的hIDUA基因。质粒还包含AAV 25' ITR、 α mic/bic增强子的串联重复序列、TBG启动子、普洛麦格内含子序列、经修饰的人IDUA基因SEQ ID NO:1、兔球蛋白poly A、和AAV 2-3' ITR。

[0071] 进行了大规模载体制备,基本上如由洛克(Lock)等人所描述[重组腺相关病毒载体的规模化快速、简单、和通用制造(Rapid,simple,and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale),人类基因治疗(Hum Gene Ther),21(10):1259-1271.(2010)]。在包含HEK293细胞的75%的融合单层的10层细胞堆中进行了基于PEI的转染。对来自细胞堆的10L原种培养基进行澄清并然后由切向过滤进行浓缩。经碘克沙醇(Optiprep;西格玛化学公司(Sigma Chemical Co.)),圣路易斯,密苏里

州) 梯度对经浓缩后的澄清原种进行纯化。收集并合并可见污染蛋白带正下方的所有部分。对合并的部分在PBS/35mM的NaCl中进行渗滤并使用离心超滤(Amicon Ultra) 15自旋浓缩器(密理博公司(Millipore))进行浓缩。将甘油添加到渗滤后的浓缩产品达到最终5%并且对制剂进行等分并储存在-80℃下。所得载体在此被称为AAV8.TBG.hIDUA或AAV2/8.TBG.hIDUA。在某些位置,重组AAV颗粒被称作AAV8.TBG.hIDUAco或AAV2/8.TBG.hIDUAco。质粒还包含AAV 25' ITR、 α mic/bic增强子的串联重复序列、TBG启动子、普洛麦格内含子序列、经修饰的人IDUA基因SEQ ID NO:1、兔球蛋白poly A、和AAV 2-3' ITR。

[0072] 实例2-

[0073] A、基于细胞的测定

[0074] 将HEK 293细胞维持在生长培养基中,该生长培养基包含具有5%胎牛血清(FBS; XXX)、1%青霉素/链霉素(p/s;生命技术公司(Life Technologies™))的杜氏改良培养基(DMEM; Gibco®, 生命技术公司(Life Technologies™))。根据制造商的推荐使用Lipofectamine™ 2000(英杰公司(Invitrogen™), 生命技术公司(Life Technologies™))进行质粒DNA转染。简言之,将细胞以 5×10^5 细胞/孔的密度铺板于转染培养基(DMEM+5% FBS, 无p/s)中的6孔组织培养皿中并且允许其在5%CO₂中在37°下粘附过夜。第二天,检查细胞90%-95%融合并且更新培养基。将质粒DNA和脂质体转染(Lipofectamine™) 2000用Opti-MEM I®减血清培养基(无血清)稀释到最终比率1:2.5(DNA:Lipofectamine™ 2000)。在与DNA溶液进行混合前,将Lipofectamine™ 2000转染溶液在22℃下孵育五分钟。在添加到包含细胞和培养基的孔之前,将这个包含DNA:Lipofectamine™ 2000溶液的最终转染混合物进一步孵育20分钟(22℃)。模拟细胞不接受质粒DNA并且编码eGFP的质粒被用作转染对照。针对每个测试的构建体,对三个孔进行转染。在5%CO₂中在37°下孵育细胞;在四个小时后用生长培养基替换培养基。每个孔的内容物在72个小时后收获并且在4℃下以4000rpm收集15分钟。将细胞重新悬浮在100 μ l/孔的裂解缓冲液(0.2% Triton X-100, 0.9% NaCl, pH 4.0)中并且用涡旋冷冻/解冻三次。此外,在最终冷冻/解冻前,用Benzonase在37℃下对裂解物处理30分钟。以10000rpm(4℃)沉淀细胞碎片10分钟并且将最终澄清的细胞裂解物放到冰上并立即测定酶活性。

[0075] B、组织裂解和蛋白提取

[0076] 在一层干冰上在盒子中对冷冻的组织进行半解冻并且将小片湿组织切(约20mg、约10mg脾脏)到小培养皿中。然后将预处理过的组织浸没在2-ml具有1ml裂解缓冲液(0.2% Triton X-100, 0.9% NaCl, pH 4.0)和5mm钢珠的埃彭道夫离心管(eppendorph)中。在组织裂解器上以30Hz对样本进行匀浆2分钟。搅匀的样本以6000rpm简单旋转30秒并且移除了5mm钢珠。使用1-1/16"直径微号角用声处理对组织裂解物进行进一步破坏并且将其在-80℃下冷冻过夜。第二天在22℃下对处理过的样本进行解冻并且通过离心(10000rpm/10分钟/4℃)对其进行澄清。在测定前将来自脑部、或其他脂肪组织的漂浮脂质层吸出。然后将样本储存在湿冰上并立即测定酶活性。

[0077] C、蛋白估算

[0078] 遵循制造商规程,使用基于考马斯(Coomassie)的布拉福德(Bradford)测定法(赛默科技公司(Thermo Scientific))来估算总蛋白。简言之,使用牛血清白蛋白(BSA)设置标

准曲线来生成从1到25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的工作范围和无BSA的蛋白稀释缓冲液导致的空白。从1/300到1/1200来两倍稀释样本并且以1:1比率的稀释蛋白:布拉福德试剂在96孔平皿中进行混合。允许样本在22 $^{\circ}\text{C}$ 下平衡15分钟并且在读板机上以建议的595nm波长对吸光度值进行收集。使用标准曲线和空白校正将原始值转换成 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度。然后对微克数量进行转换并且以毫克进行报告。

[0079] D、酶活性测定

[0080] 根据先前公开的方法[卡其斯(Kakkis)等人,分子遗传学与新陈代谢(Mol.Genet.Metab.),2001年3月;72(3):199-208]将4-甲基伞形酮基 α -L-吡喃艾杜糖醛酸、环己基铵盐(4-MU-Ido;多伦多研究化学品公司(Toronto Research Chemicals,Inc.))用作底物对IDUA酶活性进行测定。简言之,用重蒸馏水(ddH₂O)和100 μl 100 μM 4-MU-Ido底物使5-15 μl 裂解物、或血清达到100 μl ,用反应缓冲液(0.1M乙酸钠pH 3.5,0.15M NaCl,0.05% Triton X-100)进行稀释,在丙烯酸甲酯比色皿(赛默科技公司(Thermo Scientific))中组合。在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中将反应孵育1-3小时并且以添加1x终止缓冲液(290mM甘氨酸,180mM碳酸钠,pH 10.5)结束。通过UV通道(Ex 365nm,Em 440-470nm)在QuantiFluorTM-ST(普洛麦格(Promega))上读出结果。原始荧光值被记录并且使用4-甲基伞形酮(M-5410;生物合成(Biosynth[®]))的已知量的标准曲线将其转换成nmol/ml/hr。将细胞和组织裂解物归一化成估算的蛋白值(nmol/mg/hr;见题为“蛋白估算”的方法章节)。

[0081] E、DNA提取和基因组拷贝分析

[0082] 使用Taqman PCR来确定二倍体细胞中的载体DNA负载。对于实时PCR进行的载体基因组的检测和量化,使用QIAamp DNA迷你试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)(凯杰公司(Qiagen),瓦伦西亚,加利福尼亚州,美国)从组织中提取总细胞DNA。引物和探针组被设计成用于靶向载体的nRBG polyA区域,使用如下序列;正向:GCCAAAAATTATGGGGACAT,反向:

[0083] ATTCCAACACACTATTGCAATG,探针:6FAM-ATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCT-TAMRA。用cis质粒建立用于载体基因组量化的标准曲线,cis质粒用于相应载体的生产。用TaqMan通用PCR预混合物(应用生物系统公司(Applied Biosystems),福斯特城,加利福尼亚州,美国)进行PCR,每次使用200ng总细胞DNA作为模板、300nM引物、和200nM探针。循环是50 $^{\circ}\text{C}$ 下2分钟,95 $^{\circ}\text{C}$ 下10分钟,40个95 $^{\circ}\text{C}$ 下15秒和60 $^{\circ}\text{C}$ 下1分钟的循环。

[0084] F、免疫印迹

[0085] 根据标准方法进行免疫印迹。简言之,使用了NuPAGE凝胶系统(生命技术公司(Life Technologies))、4%-12%bis-tris凝胶。在20V、30分钟后转移到PVDF膜。该单元(block)是T-PBS中的10%NFDM(过夜)。初级MAb是小鼠抗-人IDUA 1:300(1.5小时);在T-PBS中的1%NFDM。次级:HRP连接的兔抗-小鼠1:3000(1小时);在T-PBS中的1%NFDM。用SuperSignal West Dura chemiluminiscent底物(赛默科技公司(Thermo Scientific))进行检测,暴露在x射线胶片上30秒。

[0086] 实例3-小鼠和狗中的体内试验

[0087] 可以在狗中发现IDUA缺陷,允许了在大型动物中对疾病和疗法的研究。MPS I狗在IDUA基因中携带隐性(无效)突变,其中内含子1的供体剪切位点中的G>A突变在外显子-内含子连接处创造了过早的终止密码子[梅农(Menon)•K.P.,P.T.田(Tieu),和E.F.诺伊费尔德(Neufeld),犬科粘多糖贮积症I下的犬科IDUA基因和突变架构(Architecture of the

canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I), 基因组学 (Genomics), 1992.14 (3) :p.763-8.]. 狗中的疾病进程类似于贺勒-施艾氏综合征; 疾病表现包括显著的骨骼疾病, 包括胸廓变形。

[0088] 尿GAG分析是用于确定在临床环境中对MPS I的治疗的疗效的生化标记。

[0089] 通过石蜡切片的阿辛蓝 (pH 1) 染色剂在主要器官中评价了糖胺聚糖 (GAG) 的累积。细胞内未处理的GAG的累积在经甲苯胺蓝染色的来自嵌入塑料的组织的1 μ m薄切片上尤其是良好可视化的。嵌入环氧树脂的组织的薄切片 (1 μ m) 经甲苯胺蓝染色。这展示了包含储存材料的细胞 (“泡沫状的海绵细胞”)。

[0090] 用脑中的针对神经节苷脂GM3的抗体进行免疫组织化学。示出了神经元中异常的GM3储存。在狗中评价了皮质并且在小鼠中评价了皮质和下丘脑。用免疫荧光评价了肝脏中人IDUA的表达。

[0091] A、小鼠研究

[0092] 如在实例1中所述制备AAV8.TBG. 修饰的hIDUA。对小鼠 (约3个月大) 进行静脉内注射, 剂量为约 1×10^{11} GC、 3×10^{10} GC、 3×10^9 GC、 1×10^9 GC并且在注射后约2周进行评价。

[0093] 结果显示了在以 1×10^{11} 、 3×10^{10} 、和 3×10^9 给药的动物中, GAG染色减少或完全不存在。在这些动物中, 在薄切片中观察到储存损伤的减少或完全不存在。

[0094] 在以 1×10^9 给药的动物中, GAG储存看起来或多或少如在未被治疗的小鼠中那样, 并且储存损伤看起来或多或少如在未被治疗的小鼠中那样。

[0095] 对于GM3储存, 只对以 1×10^{11} GC和 3×10^{10} GC给药的动物进行了评价, 并且观察到了神经元中GM3储存的非常微弱的改善。

[0096] 在以 1×10^{11} GC给药的动物中观察到了IDUA的强表达 (100%肝细胞)。这随着剂量降低而下降, 在 1×10^9 GC的情况下仅有非常少的阳性肝细胞。

[0097] B、犬科研究

[0098] 如在实例1中所述制备AAV8.TBG. 修饰的hIDUA。对狗 (约8个月大) 进行静脉内注射, 剂量为约 1×10^{11} GC并且在注射后4个月后 (即, 1岁) 进行评价。

[0099] 此项研究示出了储存损伤的逆转。更具体地, 用阿辛蓝染色剂看到了所有主要器官中GAG储存的几乎完全清除。在心脏、肾脏或肝脏薄切片中没有观察到储存损伤。在神经元中观察到了GM3累积的减少或完全清除。在>95%的肝细胞中通过免疫荧光观察到了IDUA在肝脏中的表达。

[0100] 实例4-用AAV2/8.TBG.hIDUA对贺勒-施艾氏进行治疗

[0101] 将在贺勒-施艾氏患者中对AAV8介导的IDUA基因转移进行评价。受试者将接受单次载体输注到外周静脉中, 这基于临床前数据 (会导致酶的稳定产生, 其水平接近在正常受试者中获得的酶的水平)。试验可能涉及不同载体剂量, 例如, 3×10^{11} GC/kg; 1×10^{12} GC/kg; 3×10^{12} GC/kg并且请添加剂量范围。对疗效的最佳非侵入性的评估是尿GAG水平, 尿GAG水平在疾病状态下提高并且在ERT后被部分矫正。将通过测量血清IDUA确定转基因植入及其表达水平。还将在基因治疗前后测量尿GAG。

[0102] (序列表非关键词文字)

[0103] 针对包含在数字标识符<223>下的非关键词文字的序列提供了以下信息。

[0104]

SEQ ID NO: (包含非关键词文字)	在<223>下的非关键词文字
SEQ ID NO: 3	<220> <221>重复_区域 <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221>增强子 <222> (221)..(320) <223> α mic/bic <220> <221>增强子 <222> (327)..(426) <223> α mic/bic <220> <221>启动子 <222> (442)..(901) <223> TBG启动子 <220> <221> TATA信号 <222> (885)..(888) <220> <221>内含子 <222> (1027)..(1159) <223> 内含子1

[0105]

<p><220> <221> CDS <222> (1251)..(3212) <223> 人α-L-IDUE</p> <p><220> <221> polyA_信号 <222> (3261)..(3387)</p> <p><220> <221> 重复_区域 <222> (3476)..(3605) <223> 3' ITR (位于补体上)</p> <p><220> <221> 复制_起点 <222> (3782)..(4220) <223> fl\ori (位于补体上)</p> <p><220> <221> 复制_起点 <222> (4249)..(4891) <223> pUC\复制起点\</p> <p><220> <221> 尚未归类的特征 <222> (5566)..(6381) <223> 位于互补链上的卡那霉素抗性</p>
--

[0106] 以电子形式在此提交了标记为“Z6622PCT_ST25.txt”的序列表;这个序列表通过引用结合在此。所有在本申请中引用的公开文件、专利、以及专利申请(包括提交于2013年3月15日的优先权申请美国专利申请号61/788,724)都通过引用以其全文结合在此,如同各个单独的公开文件或专利申请被确切地并且单独地指明为通过引用而结合。虽然上述发明已经通过说明以及实例的方式出于清楚理解的目标相当详细地进行了描述,但是本领域技术人员就本发明的传授内容而言很容易清楚可以对其进行某些变化和修改而不偏离所附权利要求的精神或范围。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学托管会 (The Trustees of the University of Pennsylvania)

<120> 用于治疗MPS1的组合物和方法

<130> UPN-Z6622

<150> 61/788724

<151> 2013-03-15

<160> 17

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 1971

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1971)

<400> 1

atg cgg ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt 48
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ser
1 5 10 15

ctg ctg gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg 96
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

cat gtg gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg 144
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

[0001]

agc acc ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac 192
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

gtg ctg agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc gcc gtg 240
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

ccc cac aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg 288
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

gtg aca acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac ttc acc 336
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

cac ctg gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc 384
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

ggc ttc gag ctg atg ggc agc gcc agc ggc cac ttc acc gac ttc gag 432
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

gac aag cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc ctg gcc 480
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

aga cgg tac atc ggc aga tac gga ctg gcc cac gtg tcc aag tgg aac 528
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175

ttc gag aca tgg aac gag ccc gac cac cac gac ttc gac aac gtg tca 576
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

atg acc atg cag ggc ttt ctg aac tac tac gac gcc tgc tcc gag ggc 624
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205

[0002]	ctg aga gcc gcc agt cct gcc ctg aga ctg ggc gga ccc ggc gat agc Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser 210 215 220	672
	ttc cac acc ccc ccc aga agc ccc ctg agc tgg ggc ctg ctg aga cac Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His 225 230 235 240	720
	tgc cac gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc gag gcc ggc gtg cgg ctg Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu 245 250 255	768
	gac tac atc agc ctg cac cgg aag ggc gcc aga agc agc atc agc atc Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile 260 265 270	816
	ctg gaa cag gaa aag gtc gtc gcc cag cag atc cgg cag ctg ttc ccc Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro 275 280 285	864
	aag ttc gcc gac acc ccc atc tac aac gac gag gcc gac ccc ctg gtg Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val 290 295 300	912
	gga tgg tca ctg cct cag cct tgg aga gcc gac gtg acc tac gcc gct Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala 305 310 315 320	960
	atg gtg gtg aaa gtg atc gcc cag cat cag aac ctg ctg ctg gcc aac Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn 325 330 335	1008
	acc acc agc gcc ttc cct tac gcc ctg ctg agc aac gac aac gcc ttc Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe 340 345 350	1056
	ctg agc tac cac ccc cac ccc ttc gcc cag aga acc ctg acc gcc cgg Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg 355 360 365	1104
	ttc cag gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg aga aag Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys 370 375 380	1152
	ccc gtg ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag gaa cag Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln 385 390 395 400	1200
	ctg tgg gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His 405 410 415	1248
	aca gtg ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp 420 425 430	1296
	gct tgg cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala 435 440 445	1344
	cac ccc aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro 450 455 460	1392
	cca ggc cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu 465 470 475 480	1440
	tgc agc ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro 485 490 495	1488
	acc gcc gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala 500 505 510	1536

gct gcc cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro 515 520 525	1584
gct ctg aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro 530 535 540	1632
gag aag cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr 545 550 555 560	1680
cag ggc cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys 565 570 575	1728
tgc ctg tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr 580 585 590	1776
acc ccc gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser 595 600 605	1824
ccc gat aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp 610 615 620	1872
tac tgg gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu 625 630 635 640	1920
gtg ccc gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtc gac Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro Val Asp 645 650 655	1968
ccg Pro	1971

[0003]

<210> 2
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115	120	125
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu 130 135 140		
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala 145 150 155 160		
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn 165 170 175		
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser 180 185 190		
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly 195 200 205		
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser 210 215 220		
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His 225 230 235 240		
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu 245 250 255		
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile 260 265 270		
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro 275 280 285		
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val 290 295 300		
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala 305 310 315 320		
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn 325 330 335		
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe 340 345 350		
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg 355 360 365		
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys 370 375 380		
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln 385 390 395 400		
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His 405 410 415		
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp 420 425 430		

[0004]

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

[0005]

<210> 3
<211> 6863
<212> DNA
<213> 携带hIDUA的质粒

<220>
<221> 重复 区域
<222> (1)..(130)
<223> 5' ITR

<220>
<221> 增强子
<222> (221)..(320)
<223> α mic/bic

<220>
<221> 增强子
<222> (327)..(426)

	<223> Alpha mic/bik	
	<220>	
	<221> 启动子	
	<222> (442)..(901)	
	<223> TBG promoter	
	<220>	
	<221> TATA信号	
	<222> (885)..(888)	
	<220>	
	<221> 内含子	
	<222> (1027)..(1159)	
	<223> 内含子1	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1251)..(3212)	
	<223> 人 α -L-IDUE	
	<220>	
	<221> polyA信号	
	<222> (3261)..(3387)	
	<220>	
	<221> 重复 区域	
	<222> (3476)..(3605)	
	<223> 3' ITR (位于补体上)	
	<220>	
	<221> 复制 起点	
	<222> (3782)..(4220)	
	<223> fl\ori (位于补体上)	
	<220>	
[0006]	<221> 复制 起点	
	<222> (4249)..(4891)	
	<223> pUC\复制起点\	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (5566)..(6381)	
	<223> 位于互补链上的卡那霉素抗性	
	<400> 3	
	ctgcgcgtc gtcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt	60
	ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
	aggggttcct ttagttaa gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
	atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca	240
	gtcaaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataaat	300
	ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtca aaagtccaag	360
	tggcccttgg cagcatttac tctctctggt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaa	420
	cattccagat cggcgccgcc agggctggaa gctacctttg acatcatttc ctctgcgaat	480
	gcatgtataa ttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaa	540
	ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagttag aactttttcc	600
	tgtgcctct tgggtctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc	660
	agcatggaet taaaccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttggt ttacatgaag	720
	ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcattttttg ctttgttcct	780
	cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggtt	840
	aatttataac taagagtgtc ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga	900
	tgttgctttc tgagagacag ctttattgcg gtagtttata acagttaaat tgctaacgca	960

	gtcagtgcctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc gtgaggcact	1020
	gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg	1080
	tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac	1140
	tttgcccttc tctccacagg gtgccactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt	1200
	acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atg cgg Met Arg 1	1256
	ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt ctg ctg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu 5 10 15	1304
	gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg cat gtg Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val 20 25 30	1352
	gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg agc acc Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr 35 40 45 50	1400
	ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac gtg ctg Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu 55 60 65	1448
	agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg gcc gcc gtg ccc cac Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His 70 75 80	1496
	aga gcc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg gtg aca Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr 85 90 95	1544
[0007]	acc cgg gcc tcc acc gcc aga gcc ctg agc tac aac ttc acc cac ctg Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu 100 105 110	1592
	gac gcc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc gcc ttc Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe 115 120 125 130	1640
	gag ctg atg gcc agc gcc agc gcc cac ttc acc gac ttc gag gac aag Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys 135 140 145	1688
	cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc ctg gcc aga cgg Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg 150 155 160	1736
	tac atc gcc aga tac gga ctg gcc cac gtg tcc aag tgg aac ttc gag Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu 165 170 175	1784
	aca tgg aac gag ccc gac cac cac gac ttc gac aac gtg tca atg acc Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr 180 185 190	1832
	atg cag gcc ttt ctg aac tac tac gac gcc tgc tcc gag gcc ctg aga Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg 195 200 205 210	1880
	gcc gcc agt cct gcc ctg aga ctg gcc gga ccc gcc gat agc ttc cac Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His 215 220 225	1928
	acc ccc ccc aga agc ccc ctg agc tgg gcc ctg ctg aga cac tgc cac Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His 230 235 240	1976
	gac gcc acc aat ttc ttc acc gcc gag gcc gcc gtg cgg ctg gac tac Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr 245 250 255	2024
	atc agc ctg cac cgg aag gcc gcc aga agc agc atc agc atc ctg gaa	2072

[0008]	Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu 260 265 270	
	cag gaa aag gtc gtc gcc cag cag atc cgg cag ctg ttc ccc aag ttc Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe 275 280 285 290	2120
	gcc gac acc ccc atc tac aac gac gag gcc gac ccc ctg gtg gga tgg Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp 295 300 305	2168
	tca ctg cct cag cct tgg aga gcc gac gtg acc tac gcc gct atg gtg Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val 310 315 320	2216
	gtg aaa gtg atc gcc cag cat cag aac ctg ctg ctg gcc aac acc acc Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr 325 330 335	2264
	agc gcc ttc cct tac gcc ctg ctg agc aac gac aac gcc ttc ctg agc Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser 340 345 350	2312
	tac cac ccc cac ccc ttc gcc cag aga acc ctg acc gcc cgg ttc cag Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln 355 360 365 370	2360
	gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg aga aag ccc gtg Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val 375 380 385	2408
	ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag gaa cag ctg tgg Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp 390 395 400	2456
	gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat aca gtg Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val 405 410 415	2504
	ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat gct tgg Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp 420 425 430	2552
	cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc cac ccc Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro 435 440 445 450	2600
	aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca cca ggc Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly 455 460 465	2648
	cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg tgc agc Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser 470 475 480	2696
	ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc acc gcc Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala 485 490 495	2744
	gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct gct gcc Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala 500 505 510	2792
	cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc gct ctg Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu 515 520 525 530	2840
	aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc gag aag Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys 535 540 545	2888
	cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc cag ggc Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly 550 555 560	2936
	cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag tgc ctg Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu 565 570 575 580	2984

	565	570	575	
	tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac acc ccc Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro 580	585	590	3032
	gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc ccc gat Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp 595	600	605	3080
	aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac tac tgg Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp 615	620	625	3128
	gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa gtg ccc Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro 630	635	640	3176
	gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtcgacccgg Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro 645	650		3222
	gcggcctcga ggacggggtg aactacgcct gaggatccga tctttttccc tctgcaaaaa			3282
	attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggtataataa aggaaattta			3342
	ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagc aattcgttga			3402
	tctgaatttc gaccacccat aatacccat accctggtag ataagtagca tggcgggtta			3462
	atcattaact acaaggaacc cctagtgtat gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc			3522
	tcgctcactg aggcggggcg accaaagtc gccgcagcc cgggctttgc ccggcgggcc			3582
	tcagtgaagc agcgaagcgc cagcctaat taacctaat cactggccgt cgttttataa			3642
	cgctgtgact gggaataccc tggcgttacc caacttaac gccttgacgc acatccccct			3702
[0009]	ttcgccagct ggcgtaatat cgaagaggcc cgcaccgat gcccttccca acagttgcgc			3762
	agcctgaatg gcgaatggga cgcgcctgt agcggcgcat taagcgggc ggggtgtgtg			3822
	gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcgcgtcc tttcgtttc			3882
	ttcccttctt ttctgccac gttcgccgc tttccccgc aagctctaaa tcgggggctc			3942
	cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt			4002
	gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttgag			4062
	tccagttctt ttaatagtgg actcttgctt caaactggaa caaactcaa ccctatctcg			4122
	gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag			4182
	ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatca tgtgagcaaa aggccagcaa			4242
	aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct			4302
	gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggaactataa			4362
	agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgt ctctgttcc gaccctgccg			4422
	cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca			4482
	cgtgttaggt atctcagttc ggtgtaggtc gtctgctcca agctgggctg tgtgcacgaa			4542
	cccccgctt agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgcttga gtccaaccg			4602
	gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggtt acaggattag cagagcgagg			4662
	tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga			4722
	acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc			4782
	tcttgatccg gcaaaaaaac caccgtggt agcgggtggt ttttgtttg caagcagcag			4842
	attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac			4902

[0010]

```

gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggica tgagattatc aaaaaggatc 4962
ttcacctaga tctttttgat cctccggcgt tcagcctgtg ccacagccga caggatgggtg 5022
accaccattt gccccatata accgtcggta ctgatcccg cgtcaataaa ccgaaccgct 5082
acaccctgag catcaaaactc ttttatcagt tggatcatgt cggcgggtgc gcggccaaga 5142
cggtcgagct ttttaccag aatgacatca ctttctcca ctttcatcct cagcaaatcc 5202
agcccttccc gatctgttga actgccggat gccttgtcgg taaagatgcg gttagctttt 5262
accctgcat ctttgagcgc tgaggctgc ctctgaaga aggtgttgct gactcatacc 5322
aggcctgaat cgcgccatca tccagccaga aagtgagga gccacggtt atgagagctt 5382
tgtttaggt ggaccagttg gtgatttga acttttgctt tgccacggaa cggctcgcgt 5442
tgtcgggaag atgcgtgac tgatccttca actcagcaa agttcgattt attcaacaaa 5502
gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgt ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc 5562
tgattagaaa aactcatga gcatcaaat aaactgcaat ttattcatat caggattatc 5622
aataccatat tttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac cagggcagtt 5682
ccataggatg gcaagatcct ggtatcggc tcgattccg actcgtcca catcaatata 5742
acctattaat tcccctcgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac catgagtac 5802
gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt atgcatttct ttccagactt gttcaacagg 5862
ccagccatta cgtcgtcat caaaatcact cgcataacc aaaccgttat tcattcgtga 5922
ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgac gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat 5982
cgaatgcaac cggcgcagga aactgccag cgcataaca atattttcac ctgaatcagg 6042
atatttctt aatacctgga atgctgttt cccggggatc gcagtggta gtaacatgc 6102
atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcggaga ggcataaatt ccgtcagcca 6162
gtttagctc accatctcat ctgtaacatc attggcaacg ctaccttgc catgtttcag 6222
aaacaactct ggcgcatcgg gtttccata caatcgatag attgtcgac ctgattgccc 6282
gacattatcg cgagccatt tataccata taaatcagca tccatgttg aatttaatcg 6342
cggcctcgag caagacgtt cccgttgaat atggtcata acacccttg tattactgtt 6402
tatgtaagca gacagtttta ttgtcatga tgatatatt ttatcttgta caatgtaaca 6462
tcagagattt tgagacacca tttctttcc tcggttatcc cctgattctg tgataaccg 6522
tattaccgcc tttagtgag ctgataccgc tcgccgacg cgaacgaccg agcgacgca 6582
gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatcgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 6642
gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 6702
caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcacc caggctttac actttatgct 6762
tccgctcgt atgttgtgt gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta 6822
tgaccatgat tacgccagat ttaattaagg ctttaattag g 6863

```

<210> 4
<211> 653
<212> PRT
<213> 携带hIDUA的质粒
<400> 4

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

[0011]

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

	Met	Val	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	
					325					330						335	
	Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe	
				340					345						350		
	Leu	Ser	Tyr	His	Pro	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg	
			355					360					365				
	Phe	Gln	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	His	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys	
		370					375					380					
	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Gln	
	385					390					395					400	
	Leu	Trp	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	His	
				405						410					415		
	Thr	Val	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	His	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	
				420					425					430			
	Ala	Trp	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Arg	Ala	
			435					440					445				
	His	Pro	Asn	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Val	Pro	
		450					455					460					
[0012]	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	
	465				470						475					480	
	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro	
				485						490					495		
	Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala	
				500					505					510			
	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	
			515					520					525				
	Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	
		530					535					540					
	Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	
	545					550					555					560	
	Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys	
				565						570					575		
	Cys	Leu	Trp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Ala	Tyr	
			580						585					590			
	Thr	Pro	Val	Ser	Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Val	Phe	Ser	
			595					600					605				
	Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	
		610					615					620					

	Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu 625 630 635 640	
	Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro 645 650	
	<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> 合成的	
	<400> 5 gccaaaaatt atggggacat	20
	<210> 6 <211> 27 <212> DNA <213> 用于载体的nRBG polyA区域的探针	
	<400> 6 atgaagcccc ttgagcatct gacttct	27
	<210> 7 <211> 653 <212> PRT <213> 在氨基酸位置33处的从H到Q的hIDUA变体 [VAR_003350]	
	<400> 7 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser 1 5 10 15	
[0013]	Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val 20 25 30	
	Gln Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg 35 40 45	
	Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr 50 55 60	
	Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val 65 70 75 80	
	Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu 85 90 95	
	Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr 100 105 110	
	His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro 115 120 125	
	Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu 130 135 140	
	Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala 145 150 155 160	
	Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn 165 170 175	

[0014]

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

	485	490	495
	Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala 500	505	510
	Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro 515	520	525
	Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro 530	535	540
	Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr 545	550	555
	Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys 565	570	575
	Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr 580	585	590
	Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser 595	600	605
	Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp 610	615	620
	Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu 625	630	635
[0015]	Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro 645	650	
	<210> 8		
	<211> 653		
	<212> PRT		
	<213> hIDUA变体		
	<400> 8		
	Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser 1	5	10
	Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val 20	25	30
	His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg 35	40	45
	Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr 50	55	60
	Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val 65	70	75
	Pro Gln Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu 85	90	95
	Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr 100	105	110

[0016]

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

[0017]

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650
 <210> 9
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体
 <400> 9
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

[0018]

Ser	Thr	Gly	Phe	Cys	Pro	Pro	Leu	Pro	His	Ser	Gln	Ala	Asp	Gln	Tyr	
50						55					60					
Val	Leu	Ser	Trp	Asp	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Val	Gly	Ala	Val	
65					70					75					80	
Pro	His	Arg	Gly	Ile	Lys	Gln	Val	Arg	Thr	His	Trp	Leu	Leu	Glu	Leu	
				85					90					95		
Val	Thr	Thr	Arg	Gly	Ser	Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asn	Phe	Thr	
			100					105					110			
His	Leu	Asp	Gly	Tyr	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Gln	Leu	Leu	Pro	
		115					120					125				
Gly	Phe	Glu	Leu	Met	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	His	Phe	Thr	Asp	Phe	Glu	
	130					135					140					
Asp	Lys	Gln	Gln	Val	Phe	Glu	Trp	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	
145					150					155					160	
Arg	Arg	Tyr	Ile	Gly	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ala	His	Val	Ser	Lys	Trp	Asn	
				165					170					175		
Phe	Glu	Thr	Trp	Asn	Glu	Pro	Asp	His	His	Asp	Phe	Asp	Asn	Val	Ser	
			180					185					190			
Met	Thr	Met	Gln	Gly	Phe	Leu	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Cys	Ser	Glu	Gly	
		195					200					205				
Leu	Arg	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Asp	Ser	
	210					215					220					
Phe	His	Thr	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Trp	Gly	Leu	Leu	Arg	His	
225					230					235				240		
Cys	His	Asp	Gly	Thr	Asn	Phe	Phe	Thr	Gly	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	
				245					250					255		
Asp	Tyr	Ile	Ser	Leu	His	Arg	Lys	Gly	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Ile	
			260					265					270			
Leu	Glu	Gln	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Gln	Gln	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Pro	
	275						280					285				
Lys	Phe	Ala	Asp	Thr	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Val	
	290					295					300					
Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Gln	Pro	Trp	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Ala	
305					310					315				320		
Met	Val	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	
				325					330					335		
Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe	
			340					345					350			

[0019]

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 10
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体
 <400> 10
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110
 His Leu Asp Arg Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

[0020]

	Lys	Phe	Ala	Asp	Thr	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Val	
	290						295					300					
	Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Gln	Pro	Trp	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Ala	
	305					310					315					320	
	Met	Val	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	
					325					330						335	
	Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe	
				340					345					350			
	Leu	Ser	Tyr	His	Pro	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg	
			355					360					365				
	Phe	Gln	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	His	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys	
	370						375					380					
	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Gln	
	385					390					395					400	
	Leu	Trp	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	His	
					405					410						415	
	Thr	Val	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	His	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	
				420					425					430			
[0021]	Ala	Trp	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Arg	Ala	
			435					440					445				
	His	Pro	Asn	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Val	Pro	
			450				455					460					
	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	
	465					470					475					480	
	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro	
					485					490					495		
	Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala	
				500					505					510			
	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	
			515					520					525				
	Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	
			530				535					540					
	Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	
	545					550					555					560	
	Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys	
					565					570					575		
	Cys	Leu	Trp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Ala	Tyr	
				580					585					590			

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650
 <210> 11
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体
 <400> 11
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

[0022]

210	215	220
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His 225 230 235 240		
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu 245 250 255		
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile 260 265 270		
Leu Glu Gln Glu Lys Val Ala Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro 275 280 285		
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val 290 295 300		
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala 305 310 315 320		
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn 325 330 335		
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe 340 345 350		
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg 355 360 365		
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys 370 375 380		
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln 385 390 395 400		
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His 405 410 415		
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp 420 425 430		
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala 435 440 445		
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro 450 455 460		
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu 465 470 475 480		
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro 485 490 495		
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala 500 505 510		
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro 515 520 525		

[0023]

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650
 <210> 12
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体
 [0024]
 <400> 12
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Arg Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

[0025]

[0026]

450	455	460
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu 465	470	475 480
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro 485	490	495
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala 500	505	510
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro 515	520	525
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro 530	535	540
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr 545	550	555 560
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys 565	570	575
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr 580	585	590
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser 595	600	605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp 610	615	620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu 625	630	635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro 645	650	
<210> 13		
<211> 653		
<212> PRT		
<213> hIDUA变体		
<400> 13		
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala Ser 1	5	10 15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val 20	25	30
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg 35	40	45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr 50	55	60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val 65	70	75 80

	Pro	His	Arg	Gly	Ile	Lys	Gln	Val	Arg	Thr	His	Trp	Leu	Leu	Glu	Leu	
					85					90					95		
	Val	Thr	Thr	Arg	Gly	Ser	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asn	Phe	Thr	
				100					105					110			
	His	Leu	Asp	Gly	Tyr	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Gln	Leu	Leu	Pro	
			115					120					125				
	Gly	Phe	Glu	Leu	Met	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	His	Phe	Thr	Asp	Phe	Glu	
		130					135					140					
	Asp	Lys	Gln	Gln	Val	Phe	Glu	Trp	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	
	145				150					155						160	
	Arg	Arg	Tyr	Ile	Gly	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ala	His	Val	Ser	Lys	Trp	Asn	
				165					170						175		
	Phe	Glu	Thr	Trp	Asn	Glu	Pro	Asp	His	His	Asp	Phe	Asp	Asn	Val	Ser	
			180						185					190			
	Met	Thr	Met	Gln	Gly	Phe	Leu	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Cys	Ser	Glu	Gly	
			195					200					205				
	Leu	Arg	Ala	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Pro	Gly	Asp	Ser	
		210					215					220					
[0027]	Phe	His	Thr	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Trp	Gly	Leu	Leu	Arg	His	
	225					230					235				240		
	Cys	His	Asp	Gly	Thr	Asn	Phe	Phe	Thr	Gly	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	
				245						250					255		
	Asp	Tyr	Ile	Ser	Leu	His	Arg	Lys	Gly	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Ile	
			260						265					270			
	Leu	Glu	Gln	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Gln	Gln	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Pro	
		275						280					285				
	Lys	Phe	Ala	Asp	Thr	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Val	
		290					295					300					
	Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Gln	Pro	Trp	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Ala	
	305					310					315					320	
	Met	Val	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	
				325					330						335		
	Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe	
			340						345					350			
	Leu	Ser	Tyr	His	Pro	His	Pro	Phe	Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg	
		355						360					365				
	Phe	Gln	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	His	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys	
		370					375					380					

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650
 <210> 14
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体
 <400> 14
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

[0028]

[0029]

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

	Met	Val	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	
					325					330						335	
	Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe	
				340					345						350		
	Leu	Ser	Tyr	His	Pro	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg	
			355					360					365				
	Phe	Gln	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	His	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys	
		370					375					380					
	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Gln	
	385					390					395					400	
	Leu	Trp	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	His	
				405						410					415		
	Thr	Val	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	His	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	
				420					425					430			
	Ala	Trp	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Arg	Ala	
			435					440					445				
	Asn	Pro	Asn	Arg	Ser	Val	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Val	Pro	
		450					455					460					
[0030]	Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	
	465					470					475					480	
	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro	
					485					490					495		
	Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala	
				500					505					510			
	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	
			515					520					525				
	Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	
		530					535					540					
	Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	
	545					550					555					560	
	Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys	
				565						570					575		
	Cys	Leu	Trp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Ala	Tyr	
				580					585					590			
	Thr	Pro	Val	Ser	Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Val	Phe	Ser	
				595					600					605			
	Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	
		610					615					620					

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

 <210> 15
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体

 <400> 15

 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175

 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190

 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205

 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

[0031]

[0032]

Asp	Tyr	Ile	Ser	Leu	His	Arg	Lys	Gly	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Ile	260	265	270	
Leu	Glu	Gln	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Gln	Gln	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Pro	275	280	285	
Lys	Phe	Ala	Asp	Thr	Pro	Ile	Tyr	Asn	Asp	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Val	290	295	300	
Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Gln	Pro	Trp	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Ala	305	310	315	320
Met	Val	Val	Lys	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	325	330	335	
Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Pro	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Ala	Phe	340	345	350	
Leu	Ser	Tyr	His	Pro	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Thr	Ala	Arg	355	360	365	
Phe	Gln	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	His	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Lys	370	375	380	
Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Glu	Gln	385	390	395	400
Leu	Trp	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	His	405	410	415	
Thr	Val	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	His	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	420	425	430	
Ala	Trp	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Asp	Asp	Thr	Arg	Ala	435	440	445	
His	Pro	Asn	Arg	Ser	Ile	Ala	Val	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Val	Pro	450	455	460	
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	465	470	475	480
Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro	485	490	495	
Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala	500	505	510	
Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	515	520	525	
Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	530	535	540	
Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	545	550	555	560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640
 Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650
 <210> 16
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体
 <400> 16
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110
 His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

[0033]

[0034]

180	185	190
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu	Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly	
195	200	205
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser		
210	215	220
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His		
225	230	235
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu		
245	250	255
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile		
260	265	270
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro		
275	280	285
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val		
290	295	300
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala		
305	310	315
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn		
325	330	335
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe		
340	345	350
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg		
355	360	365
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys		
370	375	380
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln		
385	390	395
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His		
405	410	415
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp		
420	425	430
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala		
435	440	445
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro		
450	455	460
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu		
465	470	475
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro		
485	490	495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Thr Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605
 Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620
 Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

[0035] Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 17
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> hIDUA变体

<400> 17

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30
 His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45
 Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60
 Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80
 Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125
 Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175
 Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190
 Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205
 Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220
 Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240
 Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

[0036]

	420	425	430
	Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala 435 440 445		
	His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro 450 455 460		
	Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu 465 470 475 480		
	Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro 485 490 495		
	Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala 500 505 510		
	Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro 515 520 525		
[0037]	Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro 530 535 540		
	Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr 545 550 555 560		
	Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys 565 570 575		
	Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr 580 585 590		
	Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser 595 600 605		
	Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Thr Leu Asp 610 615 620		
	Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu 625 630 635 640		
	Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro 645 650		

pENN.AAV.TBG.PI.

6863 bp

DNA

环状

特征	位置/限定符
尚未归类的结构	补体(5566..6381) /vntifkey="88" /label=Kan-r
复制_起点	4249..4891 /vntifkey="33" /label=pUC\origin\of\replication
启动子	442..901 /vntifkey="29" /label=TBG
TATA_信号	885..888 /vntifkey="41" /label=TATA
增强子	221..320 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
增强子	327..426 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
内含子	1027..1159 /vntifkey="15" /label=Intron_1 /note="chimeric intron"
polyA_信号	3261..3387 /vntifkey="25" /label=Rabbit\globin\poly\A
重复_区域	1..130 /vntifkey="34" /label=5'\ITR
重复_区域	补体(3476..3605) /vntifkey="34" /label=3'\ITR
复制_起点	补体(3782..4220) /vntifkey="33" /label=f1\ori
CDS	1251..3212 /vntifkey="4" /label=Human\alpha-L-IDUA

图1A

碱基计数
起点

1584 a

1971 c

1702 g

1606 t

```

1 ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctcg ggcgaccttt
61 ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact
121 aggggttcct ttagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg
181 atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca
241 gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataaat
301 ctcaggagca caaacattcc agatccaggc taatttttaa aaagcagtc aaagtccaag
361 tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaa
421 cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctaccttg acatcatttc ctctgcgaat
481 gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaa
541 ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagtgag aactttttcc
601 tgctgcctct tgggtctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc
661 agcatggact taaaccctc cagctctgac aatcctcttt ctctttgtt ttacatgaag
721 ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcattttttg ctttgttcct
781 cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggtt
841 aatttataac taagagtgtc ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga
901 tgttgctttc tgagagacag ctttattgct gtagtttatc acagttaa at tgtaacgca
961 gtcagtgtct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtggct gtgaggcact
1021 gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg
1081 tgcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac
1141 tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt
1201 acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atgcggcccc
1261 tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagtct gctggctgcc cctctgtgg
1321 cccctgccga agccctcac ctggtgcatg tggatgccgc cagagccctg tggcctctgc
1381 ggagattctg gcggagcacc ggcttttgcc cccactgcc tcacagccag gccgaccagt
1441 acgtgctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctacgt gggcgccgtg cccacagag
1501 gcatcaaaca ggtgagaacc cactggctgc tggaaactgg gacaaccgg ggctccaccg
1561 gcagaggcct gagctacaac ttcaccacc tggacggcta cctggacctg ctgagagaga
1621 accagctgct gcccggttc gagctgatgg gcagcgccag cggccacttc accgacttcg
1681 aggacaagca gcaagtcttt gagtggaaagg acctggtgtc cagcctggcc agacggtaca
1741 tcggcagata cggactggcc cagtggtcca agtggaaact cgagacatgg aacgagcccc
1801 accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac tactacgacg
1861 cctgtccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actggcgga cccggcgata
1921 gcttccacac cccccaga agccccctga gctggggcct gctgagacac tgccacgacg
1981 gcaccaattt cttaccggc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc ctgcaccgga
2041 agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgcc cagcagatcc
2101 ggcagctgtt cccaagttc gccgacaccc ccatctacaa cgacgaggcc gacccctgg
2161 tgggatggtc actgctcag ccttgagag cgcagctgac ctacgccgt atggtgtga
2221 aagtgatcgc ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgcc ttcccttacg
2281 ccctgctgag caacgacaac gccttctga gctaccacc ccacccttc gccagagaa
2341 ccctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagacccc ccacgtgcag ctgctgagaa
2401 agcccgctgt gaccgctatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaacag ctgtgggccc
2461 aagtgtccca ggccggcacc gtgctggaca gcaatcatac agtgggctg ctggcctccg
2521 cccacagacc tcagggaccc gccgatgctt ggccggctgc cgtgctgatc tacgccagcg
2581 acgataccag agccacccc aacagatccg tggccgtgac cctgcggctg agaggcgtgc
2641 caccaggccc tggactggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg tgcagccccg
2701 acggcgaatg gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgcgagcag ttccggcgga
2761 tgagagccgc tgagatcct gtggctgctg ccctagacc tctgcctgct ggcggcagac

```

图1B

```

2821 tgaccctgag gcccgctctg agactgccta gtctgtctgt ggtgcacgtg tgcgccaggc
2881 ccgagaagcc tcccggccag gtgacaagac tgagagccct gcccctgacc cagggccagc
2941 tgggtgctggt gtggtccgat gagcacgtgg gcagcaagtg cctgtggacc tacgagatcc
3001 agttcagcca ggacggcaag gcctacaccc ccgtgtcccg gaagcccagc accttcaacc
3061 tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgtccggctc ttatagagtg cgggccctgg
3121 actactgggc cagaccgggc cctttcagcg acccctgtgc ctacctggaa gtgcccgtgc
3181 ctagaggccc ccctagcccc ggcaaccctt gagtcgaccc gggcgccctc gaggacgggg
3241 tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga
3301 agccccttga gcatctgact tctggctaatt aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt
3361 gttggaattt tttgtgtctc tactcggaa gcaattcgtt gatctgaatt tcgaccaccc
3421 ataataccca ttaccctggt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa
3481 cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccggg
3541 cgaccaaagg tcgcccagcg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagttag cgagcgagcg
3601 cgcagcctta attaacctaa ttcactggcc gtctgtttac aacgtcgtga ctgggaaaac
3661 cctggcgtaa cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ttggcgtaat
3721 agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg
3781 gacgcgcct gtacggcgcc attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc
3841 gctacacttg ccagcgccct agcgcgcgt cctttcgtt tcttcccttc ctttctcgcc
3901 acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt
3961 agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg
4021 ccctgcgcct gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt
4081 ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cgggtctatc ttttgattta
4141 taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt
4201 aacgcgaatt ttaacaaaat catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa
4261 aaggccgctg tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat
4321 cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
4381 cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttacccg atacctgtcc
4441 gcctttctcc cttcggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt
4501 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccagc
4561 cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg
4621 ccaactggcg cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg ggtgtctaca
4681 gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatctgc
4741 gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaaa
4801 accaccgctg gtacgggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa
4861 ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac
4921 tcacgttaag ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttttg
4981 atcctccggc gttcagcctg tgccacagcc gacaggatgg tgaccaccat ttgcccata
5041 tcaccgtcgg tactgatccc gtcgtcaata aaccgaaccg ctacaccctg agcatcaaac
5101 tcttttatca gttggatcat gtcggcggtg tcgcgcccaa gacggtcgag cttcttcacc
5161 agaatacat cacttcctc cacttcctc ctacgaaaat ccagcccttc ccgatctgtt
5221 gaactgcgg atgccttgtc ggtaaagatg cggttagctt ttacccttgc atctttgagc
5281 gctgaggtct gcctcgtgaa gaagggtgtt ctgactcata ccaggcctga atcgccccat
5341 catccagcca gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgtttag gtggaccagt
5401 tggatgattt gaacttttgc tttgccacgg aacggtctgc gttgtcggga agatgcgtga
5461 tctgatcctt caactcagca aaagtctgat ttattcaaca aagccgccgt cccgtcaagt
5521 cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaaccaat tctgattaga aaaactcatc
5581 gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa
5641 aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc

```

图1C

```

5701 ctggtatcgg tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc
5761 gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa
5821 tggcaaaagc ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc
5881 atcaaaatca ctgcgcatca ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgcct gagcgagacg
5941 aaatacgcgga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcgag
6001 gaacactgcc agcgcacatca caatatcttc acctgaatca ggatattctt ctaataacctg
6061 gaatgctgtt ttcccgggga tcgcagtggt gagtaacct gcacatcag gagtacggat
6121 aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc
6181 atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcac
6241 gggcttccca tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca
6301 tttataccca tataaatcag catccatgtt ggaatttaat cgcggcctcg agcaagacgt
6361 ttcccggtga atatggctca taacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt
6421 tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac
6481 catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg
6541 agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc
6601 ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctt tggccgattc attaatgcag
6661 ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag
6721 ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg
6781 tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccag
6841 atttaattaa ggccttaatt agg

```

图1D

