



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202216244 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：110125641

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 13 日

(51)Int. Cl.：

*A61P25/00 (2006.01)**C12N15/113 (2010.01)**C12N15/86 (2006.01)**C12N9/14 (2006.01)*

(30)優先權：2020/07/13

美國

63/051,336

2021/04/09

美國

63/173,045

(71)申請人：賓州大學委員會(美國) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (US)

美國

(72)發明人：威爾森 詹姆士 M WILSON, JAMES M. (US)；亨德勒 克里斯欽 HINDERER, CHRISTIAN (US)；沃克曼 艾倫 WORKMAN, EILEEN (US)

(74)代理人：王彥評；黃政誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：46 項 圖式數：15 共 276 頁

(54)名稱

有用於治療夏馬杜三氏病之組成物

(57)摘要

本文提供有用於治療具有 CMT2 的患者之 rAAV 及其它載體及組成物，其包含：(a)編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列。亦提供有用於治療具有 CMT2 的患者之 rAAV 及其它載體及組成物，其包含：(b)編碼至少一個對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性的 miRNA 的核酸序列，其中該 miRNA 可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列。又，提供含有該 hMfn2 編碼序列及該至少一個 miRNA 編碼序列兩者的組成物，其中該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列具有一序列，此一序列在該被編碼的 miRNA 之標靶部位不同於 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2。

Provided herein are rAAV and other vectors and compositions useful for treating a patient having CMT2 comprising: (a) a recombinant nucleic acid sequence encoding an engineered human mitofusin 2 coding sequence operably linked to regulatory sequences which direct expression thereof in a human target cell. Also provided are rAAV and other vectors and compositions useful for treating a patient having CMT2 comprising: (b) a nucleic acid sequence encoding at least one miRNA specific for an endogenous human mitofusin 2 sequence in a human CMT2A subject, wherein the miRNA is operably linked to regulatory sequences which direct expression thereof in the subject. Further provided are compositions containing both the hMfn2 coding sequence and the at least one miRNA coding sequence, wherein the human mitofusin 2 coding sequence has a sequence which differs from endogenous human mitofusin 2 in the CMT2A patient in the target site of the encoded miRNA.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

有用於治療夏馬杜三氏病之組成物

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS USEFUL FOR TREATMENT OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE

【中文】

本文提供有用於治療具有 CMT2 的患者之 rAAV 及其它載體及組成物，其包含：(a)編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列。亦提供有用於治療具有 CMT2 的患者之 rAAV 及其它載體及組成物，其包含：(b)編碼至少一個對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性的 miRNA 的核酸序列，其中該 miRNA 可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列。又，提供含有該 hMfn2 編碼序列及該至少一個 miRNA 編碼序列兩者的組成物，其中該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列具有一序列，此一序列在該被編碼的 miRNA 之標靶部位不同於 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2。

【 英文 】

Provided herein are rAAV and other vectors and compositions useful for treating a patient having CMT2 comprising: (a) a recombinant nucleic acid sequence encoding an engineered human mitofusin 2 coding sequence operably linked to regulatory sequences which direct expression thereof in a human target cell. Also provided are rAAV and other vectors and compositions useful for treating a patient having CMT2 comprising: (b) a nucleic acid sequence encoding at least one miRNA specific for an endogenous human mitofusin 2 sequence in a human CMT2A subject, wherein the miRNA is operably linked to regulatory sequences which direct expression thereof in the subject. Further provided are compositions containing both the hMfn2 coding sequence and the at least one miRNA coding sequence, wherein the human mitofusin 2 coding sequence has a sequence which differs from endogenous human mitofusin 2 in the CMT2A patient in the target site of the encoded miRNA.

【 指定代表圖 】

無。

【 代表圖之符號簡單說明 】

無。

【 特徵化學式 】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

有用於治療夏馬杜三氏病之組成物

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS USEFUL FOR TREATMENT OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE

【技術領域】

【0001】本文提供有用於治療具有 CMT2 的患者之 rAAV 及其它載體及組成物；又，提供含有 hMfn2 編碼序列及至少一個 miRNA 編碼序列兩者的組成物。

【先前技術】

【0002】夏馬杜三氏(CMT)神經病變(Charcot-Marie-Tooth (CMT) neuropathy)為於周圍神經中發現的遺傳病之一異質性群。CMT為一種影響兒童及成人兩者的常見疾病。夏馬杜三氏病(CMT)或遺傳性的運動及感覺神經病變(HMSN)係不為症候群之一部分的遺傳神經病變之最常用的名稱(Klein, C. J., Duan, X., Shy, M. E., 2013. Inherited neuropathies: Clinical overview and update. Muscle Nerve; Bassam, B., 2014. Charcot-Marie-Tooth Disease Variants—Classification, Clinical, and Genetic Features and Rational Diagnostic Evaluation. J. Clin. Neuromusc. Dis. 15, 117-128; Scherer, S. S., Shy, M. E., 2015. CMT Subtypes and Disease Burden in Patients Enrolled in the INC Natural History Study (6601) from 2009-2013. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 86, 873-878)。

【0003】CMT 神經病變之顯性遺傳的軸突形式(第 2 型 CMT 失調)具有正常或輕微的速度降低(具運動及感覺複合動作電位幅度降低)，且軸突喪失為生檢的神經中的主要發現。粒線體融合蛋白 2 (Mitofusin2) (MFN2)(為一種粒線體融合及沿軸突運輸所需的蛋白質)基因中的顯性突變，會引起 CMT2A (Zuchner, S., et al., , 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. Nat Genet 36, 449-451)。估計 CMT2A 引起所有 CMT 的多達 7%，且為第 2 型 CMT 的最常見形式(Fridman, V., et al., 2015. CMT Subtypes and Disease Burden in Patients Enrolled in the INC Natural History Study (6601) from 2009-2013. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 86, 873-878)。不同的 MFN2 突變會導致不同程度的神經病變。

【0004】大多數 MFN2 突變會導致嚴重的早發性軸突神經病變，且為原發突變(de novo mutation)。其它 MFN2 顯性突變導致較晚發作的輕度軸突神經病變(Lawson, V. H., et al, 2005. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. Neurology 65, 197-204；Chung, K. W., et al., 2006. Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. Brain 129, 2103-2118；Verhoeven, K., et al., 2006. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. Brain 129, 2093-2102；Feely, S. M. E., et al., 2011, MFN2

mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology* 76, 1690-1696)。更罕見地，隱性 MFN2 突變可能導致嚴重的早發性軸突神經病變。Mfn2 突變對背根神經節(DRG)中的下運動神經元(lower motor neuron)及初級感覺神經元(primary sensory neuron)具有選擇性毒性。

【0005】MFN2 中的一些顯性突變會產生脊髓病變或視神經萎縮；此等 CMT2 之複雜形式有時分別稱為 HMSN-V 及 HMSN-VI，但不僅係由 MFN2 突變所引起 (Scherer, S. S., et al., 2015. *Peripheral neuropathies in Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*, 5th ed. Elsevier, Philadelphia, pp. 1051-1074)。

【0006】哺乳動物具有兩個粒線體融合蛋白基因，Mfn1 及 Mfn2，此等具有不同但重疊的分布，其兩者皆可通過異側相互作用(trans-interaction)促進粒線體融合 (Chen, H., Chan, D. C., 2005. *Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. Hum. Mol. Genet.* 14, R283-R289)。MFN2 基因中幾乎所有的突變都會導致作為單點突變之胺基酸取代，包括但不限於 GTP 酶域 (Cartoni, R., Martinou, J. C., 2009. *Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. Exp. Neurol.* 218, 268-273)。因為 MFN2 的功能喪失突變亦導致嚴重的軸突神經病變 (Nicholson, G. A., et al, 2008. *Severe early-*

onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology* 70, 1678-1681), 並造成減少的粒線體融合 (Chen, H., Chan, D. C., 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14, R283-R289), 顯性 MFN2 突變可能對粒線體融合具有顯性負效應 (dominant-negative effect) (Detmer, S. A., Chan, D. C., 2007. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J. Cell Biol.* 176, 405-414 ; Baloh, R. H., et al., 2007. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27, 422-430 ; Misko, A., et al., 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30, 4232-4240 ; Misko, A. L., et al., 2012. Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neurosci* 32, 4145-4155)。

【0007】所需要的是有用於減輕 CMT2A 及相關病症的症狀、嚴重性及/或進展的治療。

【發明內容】

發明概要

【0008】本文提供病毒及非病毒載體及組成物，其有用於治療具有與人類粒線體融合蛋白 2 表現缺陷相關的症狀的患者及/或具有 CMT2A 的患者。

【0009】於某些具體實施例，提供包含 AAV 殼體及載體基因體之重組腺相關病毒(rAAV)。該 rAAV 包含：

(a)編碼人類粒線體融合蛋白 2 (human mitofusin 2)之經工程化的核酸序列；(b)位於(a)及(c)之間的間隔子(spacer)序列；(c)編碼至少一個 miRNA 序列的核酸序列，該 miRNA 序列對 CMT2 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 具有特異性，該核酸序列位於(a)及(b)之序列的 3'；及(c)可操作地連接至(a)及(c)的調節序列；其中(a)之該經工程化的核酸序列缺乏該被編碼的至少一個 miRNA 之標靶部位，因而防止該被編碼的 miRNA 靶向該經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列。於某些具體實施例，AAV 殼體係選自 AAV9、AAVhu68、AAV1 或 AAVrh91。於某些具體實施例，間隔子的長度為 75 個核苷酸至約 250 個核苷酸。於一態樣，提供一種載體，其包含經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列，該編碼序列可操作地連接至引導其在人類目標細胞中表現的調節序列。於某些具體實施例，提供一種載體，其包含編碼至少一個髮夾 miRNA 的核酸序列，其中該編碼的 miRNA 對人類受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 具有特異性，該核酸序列可操作地連接至引導其在受試者中表現的調節序列。於某些具體實施例，載體或其它組成物包含該經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列及該至少一個 miRNA 編碼序列兩者。於此種具體實施例，該經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列缺乏該至少一個 miRNA 之標靶部位，因而防止

該 miRNA 靶向該經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列。

【0010】於某些具體實施例，該載體為複製缺陷型病毒載體，其包含載體基因體，該載體基因體包含人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列、至少一個 miRNA 的編碼序列及調節序列。於某些具體實施例，病毒載體為具有 AAV 殼體之重組腺相關病毒(rAAV)顆粒，其具有包裝於其中的載體基因體。於某些具體實施例，AAV 殼體為 AAVhu68、AAV1 或 AAVrh91。

【0011】於某些具體實施例，提供一種載體，其包含經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列，該編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與其至少 90%相同的序列，但書為由該被編碼的 miRNA 所靶向的核酸序列係不同於內源性該人類粒線體融合蛋白 2 序列。

【0012】於某些具體實施例，提供一種載體，其包含核酸序列，該核酸序列包含至少一個 miRNA 編碼序列，該 miRNA 編碼序列包含下列之一或多者：(a)包含 SEQ ID NO: 15 的 miRNA 編碼序列(miR1693，64 nt)；(b)包含 SEQ ID NO: 15 的至少 60 個連續核苷酸的 miRNA 編碼序列；(c)包含與 SEQ ID NO: 15 具有至少 99%一致性的 miRNA 編碼序列，其包含與 SEQ ID NO: 15 的約核苷酸 6 至約核苷酸 26 (或 SEQ ID NO: 68)具有 100%一致性的序列；(d)包含下列之一或多者的 miRNA 編碼序列：

(i) TTGACGTCCAGAACCTGTTCT , SEQ ID NO: 27 ; (ii) AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG , SEQ ID NO: 28 ; (iii) TTCAGAAGTGGGCACTTAGAG , SEQ ID NO: 29 ; (iv) TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC , SEQ ID NO: 30 ; (v) CAAACTTGGTCTTCACTGCAG , SEQ ID NO: 31 ; (vi) AAACCTTGAGGACTACTGGAG , SEQ ID NO: 32 ; (vii) TAACCATGGAAACCATGAACT , SEQ ID NO: 33 ; (viii) ACAACAAGAATGCCCATGGAG , SEQ ID NO: 34 ; (ix) AAAGGTCCCAGACAGTTCCTG , SEQ ID NO: 35 ; (x) TGTTTCATGGCGGCAATTCCT , SEQ ID NO: 36 ; (xi) TGAGGTTGGCTATTGATTGAC , SEQ ID NO: 37 ; (xii) TTCTCACACAGTCAACACCTT , SEQ ID NO: 38 ; (xiii) TTTCTCGCAGTAAACCTGCT , SEQ ID NO: 39 ; (xiv) AGAAATGGAACTCAATGTCTT , SEQ ID NO: 40 ; (xv) TGAACAGGACATCACCTGTGA , SEQ ID NO: 41 ; (xvi) AATACAAGCAGGTATGTGAAC , SEQ ID NO: 42 ; (xvii) TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC , SEQ ID NO: 43 ; (xviii) TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA , SEQ ID NO: 44 ; (xix) TCTACCCGCAGGAAGCAATTG , SEQ ID NO: 45 ; 或 (xx) CTCCTTAGCAGACACAAAGAA , SEQ ID NO: 46 , 或 (i)至 (xx)之任一者的組合。於某些具體實施例，單個核酸分子包含該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列及該 miRNA 編碼序列兩者，且該核酸分子進一步包含在該 hMfn2 編碼序列及該至少一個 miRNA 的編碼序列之間的至少 75 個核苷酸的間隔子。於某些具體實施例，病毒載體為非病毒載體。

【0013】於某些具體實施例，組成物包含：編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列的重組核酸序列，其可操作地連接至引導其在人類目標細胞中表現的調節序列；及編碼至少一個對 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 具有特異性的 miRNA 的核酸序列，其可操作地連接至在受試者中引導其表現的調節序列；其中該經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列缺乏該被編碼的至少一個 miRNA 之標靶部位，因而防止該 miRNA 靶向該經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列。

【0014】於某些具體實施例，提供一種醫藥組成物，其包含載體、rAAV、或組成物，且包含醫藥上可接受的水性懸浮液、賦形劑、及/或稀釋劑。

【0015】於某些具體實施例，提供一種治療具有夏馬杜三氏(CMT)神經病變的患者之方法，其包含遞送有效量之載體、重組 AAV、或組成物至需要其之患者。於某些具體實施例，提供一種於具有夏馬杜三氏(CMT)神經病變的患者中減少神經病變之方法，其包含遞送有效量之載體、重組 AAV、或組成物至需要其之患者。於某些具體實施例，提供一種治療患者之方法，其中該方法另外包含與一或多種選自下列之協同療法(co-therapy)之組合：乙醯胺酚(acetaminophen)、非類固醇消炎藥(NSAIDs)、三環抗鬱劑或抗癲癇藥，如卡巴氮(carbamazepine)或加巴噴丁(gabapentin)。

【0016】於某些具體實施例，提供一種用以治療具有 CMT2A 之患者的組合方案，其包含共同投予：(a)編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之序列或與其至少 95%相同的序列，且其係由於在(b)之 miRNA 標靶序列中具有錯誤配對(mismatch)而不同於 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2；(b) 至少一個對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性的 miRNA，其中該 mRNA 可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列。

【0017】於某些具體實施例，提供一種治療具有 CMT2A 之患者的組合方案，其包含共同投予：(a)編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列經工程化成由於在(b)之 miRNA 標靶序列中具有錯誤配對而不同於 CMT2A 患者中內源性人類粒線體融合蛋白 2；(b)至少一個對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性的 miRNA，其中該 miRNA 可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列。於某些具體實施例，第一載體包含核酸(a)，及第二之不同載體包含至少一個 miRNA (b)。於某些具體實施例，第一載體及/或第二載體各自可為相同或不同的病毒載

體。於某些具體實施例，第一及/或第二載體為非病毒載體。

【0018】由下列本發明的詳細說明，此等及其它優點將為顯而易見的。

【圖式簡單說明】

【0019】

圖 1A 至 1B 說明粒線體融合蛋白 2 (Mfn2) miRNA 選擇(以各種 miRNA 減弱(knockdown)內源性 Mfn2)。圖 1A 說明在靜脈內遞送 AAV 媒介的 miRNA 遞送後，在 B6 小鼠的小鼠腦中，藉由 qPCR 測量的內源性 Mfn2 RNA 之減弱。圖 1B 說明在靜脈內遞送 AAV 媒介的 miRNA 遞送後，在 B6 小鼠的小鼠脊髓中，藉由 qPCR 測量的內源性 mfn2 RNA 之減弱。

圖 2A 至圖 2C 說明遞送包含 Mfn2 cDNA 轉基因(即，編碼 Mfn2 的經工程化的核酸序列)及 miR1518 的 AAV 載體後，Mfn2 RNA 倍數表現，其中 AAV 載體係以 3×10^{11} GC 之劑量而靜脈內投予小鼠。圖 2A 說明小鼠 Mfn (mMfn2) RNA 在脊髓中的倍數表現。圖 2B 說明大鼠 Mfn 經工程化的(rMfn2co) RNA 在脊髓中的倍數表現。圖 2C 說明 miR1518 RNA 在脊髓中的倍數表現。

圖 3 說明在 B104 大鼠細胞的 miRNA 處理之後測量粒線體融合蛋白 2 蛋白質的表現百分比的西方印漬術信號的繪圖定量。粒線體融合蛋白 2 表現係由相對於 β -肌動蛋白的裝載對照(loading control)之總百分比的計算值來繪圖。

圖 4 說明在 AAV 載體遞送經工程化的 rMfn2 cDNA 轉基因與 miR1518 之後，治療的小鼠脊髓中大鼠 Mfn2 (rMfn2) cDNA 表現之倍數表現的繪圖定量。

圖 5 說明在 AAV 載體遞送經工程化的 hMfn2 cDNA 轉基因與 miR1693 之後，治療的小鼠脊髓中人類 Mfn2 (hMfn2) cDNA 表現之倍數表現的繪圖定量。

圖 6A 及圖 6B 說明於小鼠靜脈內遞送後從 AAV 載體加工的成熟 miRNA 的總量。圖 6A 說明藉由使用 miR1518 引子的 qPCR 所測量的 miR1518 及 miR1693 的倍數表現。圖 6B 說明藉由使用 miR1693 引子的 qPCR 所測量的 miR1518 及 miR1693 的倍數表現。

圖 7 顯示以包含 CB7 啟動子的各種載體轉染後，Mfn2-null MEF 細胞株中 Mfn2 (表現自載體的 Mfn2)的表現水準；表現水準係作為在以下列轉染後測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2)表現的西方印漬術信號的繪圖定量來顯示：CB7.CI.hMfn2.GA.WPRE.RBG；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG。

圖 8 顯示以包含 CAG 啟動子的各種載體轉染後，Mfn2-null MEF 細胞株中 Mfn2 (表現自載體的 Mfn2)的表現水準；表現水準係作為在以下列轉染後測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2)表現的西方印漬術信號的繪圖定量來顯示：CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40。

圖 9A 及圖 9B 顯示以包含 CB7 或 CAG 任一啟動子的各種載體轉染後，HEK293 細胞株中 Mfn2 的表現水準。圖 9A 顯示以包含 CB7 啟動子的各種載體(CB7.CI.hMfn2.GA.WPRE.RBG；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG)轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的 HEK293 細胞中內源性 Mfn2 減弱。圖 9B 顯示以包含 CAG 啟動子的各種載體(CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40)轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的 HEK293 細胞中內源性 Mfn2 減弱。

圖 10 顯示以包含 CB7 啟動子的各種載體轉染後，HEK293 細胞株中 Mfn2(內源性 Mfn2 及表現自載體的 Mfn2)的表現水準；表現水準係作為在以下列轉染後測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2)表現的西方印漬術信號的繪圖定量來顯示：CB7.CI.hMfn2.GA.WPRE.RBG；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG。定量係繪圖為表現百分比；轉染效率被確定為約 95%。

圖 11 顯示以包含 CAG 啟動子的各種載體轉染後，HEK293 細胞株中 Mfn2(內源性 Mfn2 及表現自載體的 Mfn2)的表現水準；表現水準係作為在以下列轉染後測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2)表現的西方印漬術信號的繪圖定量來顯示：CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40 (p6168)；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40

(p6169) ; CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40 (p6170)。定量條繪圖為表現百分比；轉染效率被確定為約 95%。

圖 12A 至圖 12C 顯示以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的各種載體轉染後，藉由 qPCR 測量的於 Mfn2-null MEF 細胞株(ATCC；CRL-2933)中成熟 miRNA (miR1518 或 miR538)的表現水準。圖 12A 顯示在以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的載體轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的在 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miR1518 的表現水準的比較。圖 12B 顯示在以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的載體轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的在 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miR538 的表現水準的比較。圖 12C 顯示在以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的載體轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的在 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miR1518 及 miR538 的表現水準的比較。

圖 13A 至圖 13F 顯示小鼠模式的特性分析。圖 13A 顯示小鼠基因型的示意圖示。圖 13B 顯示小鼠表現型特性分析，其特徵在於藉由西方印漬術測量的腦中內源性及 FLAG 標籤的 MFN2 的相對表現水準。圖 13C 顯示小鼠表現型特性分析，其特徵在於藉由西方印漬術測量的脊髓中內源性及 FLAG 標籤的 MFN2 的相對表現水準。圖 13D 顯示 CMT2A 小鼠模式 (nTg、MFN2^{WT} 及 MFN2^{R49Q})中，小鼠的測量體重(g)。圖 13E 顯示藉由掉落時間(latency to fall)(秒)測量的小鼠表現型特性分

析。圖 13F 顯示藉由握力(g) 測量的小鼠表現型特性分析。

圖 14A 及圖 14B 顯示於 MFN2^{R94Q} 小鼠(研究組：G1-野生型(WT)小鼠，PBS；G2-MFN2^{R94Q} 小鼠，PBS；G3-MFN2^{R94Q} 小鼠，CB7.MFN2；G4-MFN2^{R94Q} 小鼠，CB7.MFN2.miR1518；G5-MFN2^{R94Q} 小鼠，CB7.MFN2.miR538；G6-MFN2^{R94Q} 小鼠，CAG.MFN2.miR1518；G7-MFN2^{R94Q} 小鼠，CAG.MFN2.miR538)的藥理研究結果。圖 14A 顯示在小鼠組 G1 至 G7 中測量的體重結果(繪圖為(g))。圖 14B 顯示在小鼠組 G1 至 G7 中測量的存活結果(繪圖為第 0 至 50 日的存活概率)。

圖 15 顯示 MFN2^{R94Q} 小鼠中藥理學研究的握力結果(繪圖為(kg))。

【實施方式】

發明詳細說明

【0020】本文提供序列、載體及組成物，用於對患者共同投予表現人類粒線體融合蛋白 2(或 hMfn2)蛋白質的核酸序列及編碼至少一個 miRNA 的核酸序列，該 miRNA 特異性地靶向患者之內源性人類粒線體融合蛋白 2 基因中的一部位，其標靶部位不存在於人類粒線體融合蛋白 2 經工程化的編碼序列上。適合地，該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列經工程化以移除該被編碼的 miRNA 之特異性標靶部位。本文提供新穎的經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列及新穎的 miRNA 序列。

此等可單獨使用或與彼此及/或其它治療劑組合使用，以治療 CMT2A。

【0021】如本文所使用，術語「內源性粒線體融合蛋白 2」係指於具有 CMT2A 的人類中編碼粒線體融合蛋白 2 蛋白質的粒線體融合蛋白 2 基因。具有 CMT2A 的患者可有許多誤義突變或對偶基因變異。亦參見 omim.org/allelicVariants/608507，其描述各種對偶基因的變異。體染色體顯性夏馬杜三氏 (CMT) 病第 2A2A 型 (CMT2A2A) 係由染色體 1p36.2 上 MFN2 基因 (608507) 中的異基因型組合的突變 (heterozygous mutation) 所引起。MFN2 基因中同基因型組合 (Homozygous) 或複合的異基因型組合的突變引起體染色體隱性的 CMT2A2B (617087)，一種具有發病較早之更嚴重的疾病。定位 (mapping) 至染色體 1p36.2 的 CMT2A 的另一種形式，CMT2A1 (118210)，係由 KIF1B 基因 (605995) 中的突變所引起。亦參見遺傳性的運動及感覺神經病變 VI (HMSN6；601152)，一種具有重疊 (overlapping) 特徵的對偶基因疾病。

【0022】該天然、功能性人類 Mfn2a 基因，如在沒有 CMT2A 的患者中內源性發現的，係再現於 SEQ ID NO: 18，且天然、功能性人類 Mf2A 蛋白質，係再現於 SEQ ID NO: 19。粒線體融合蛋白 2 係於多種類型的細胞及組織中製成，包括肌肉、脊髓、及神經，該神經將大腦及脊髓連接至肌肉及連接至檢測如觸覺、疼痛、熱及聲音之感覺的感覺細胞 (周圍神經)。或者，此基因可被

稱為：CMT2A2、CRPP1、KIAA0214、MARF、MFN2_Human 或粒線體組裝調節因子 (mitochondrial assembly regulatory factor)。參見 OMIM.ORG/entry/609260，2020 年 7 月 12 日存取。於某些具體實施例，與 SEQ ID NO: 19 的胺基酸序列具有小於 100%一致性的功能性 Mfn2 蛋白質可藉由本文提供的組成物遞送(例如，與 SEQ ID NO: 19 具有 97%至 100%一致性的 Mfn2)。於此種具體實施例，較佳為保留天然功能性人類 Mfn2 的酵素功能及結合功能。亦參見 UniProtKB-09140(例如，位置 305 及 307 的結合位被保留及/或位於核苷酸 106-111 及/或 258-261 的核苷酸結合位被保留)。

【0023】於一具體實施例，提供一種經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列，其具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與 SEQ ID NO: 11 約 90%、至少 95%相同、至少 97%相同、至少 98%相同、或 99%至 100%相同的序列，且其表現在非 CMT2A 患者中發現的人類粒線體融合蛋白 2 蛋白質。參見例如 SEQ ID NO: 19。亦參見 SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 4。

【0024】於某些具體實施例，提供一種經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列，其具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與其至少 80%相同的序列，但書為 SEQ ID NO: 11 之 nt 216 至 236 被保留(例如，100%相同、或至少 99%相同)，例如，當經工程化的編碼序列與 miR538 編碼序列共同投予時。

【0025】於某些具體實施例，提供一種經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列，其具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與其至少 80%相同的序列，但書為 SEQ ID NO: 11 之 nt 1371 至 1391 被保留(例如，100%相同、或至少 99%相同)，例如，當經工程化的編碼序列與 miR1518 編碼序列共同投予時。適合地，與 SEQ ID NO: 11 具有一致性的序列表現相同蛋白質。參見例如 SEQ ID NO: 19；SEQ ID NO: 2 及 SEQ ID NO: 4。

【0026】於一具體實施例，提供一種經工程化的粒線體融合蛋白 2 編碼序列，其具有 SEQ ID NO: 28 之核酸序列或與 SEQ ID NO: 24 至少 90%、至少 95%相同、至少 97%相同、至少 98%相同、至少 99%相同、及/或至少 99%至 100%相同的序列。

【0027】「5' UTR」位於基因產物編碼序列起始密碼子的上游。該 5' UTR 通常比 3' UTR 短。一般而言，5' UTR 長度為約 3 個核苷酸至約 200 個核苷酸，但可選擇為更長。

【0028】「3' UTR」位於基因產物編碼序列的下游，通常比 5' UTR 長。於某些具體實施例，3' UTR 長度為約 200 個核苷酸至約 800 個核苷酸，但可選擇為較長或較短。

【0029】如本文所使用，「miRNA」係指微小 RNA，其為小的非編碼 RNA 分子，其調節 mRNA 並停止 mRNA 被轉譯成蛋白質。一般而言，形成髮夾的 RNA 具有自互補(self-complementary)的「主幹-環圈(stem-

loop)」結構，其包括編碼具有雙鏈體的主幹部分的單一核酸，該雙鏈體包含藉由環圈序列連接至反義股(例如，引導股(guide strand))的正義股(例如，隨從股(passenger strand))。隨從股及引導股共有互補性。於一些具體實施例，隨從股及引導股共有 100%互補性。於一些具體實施例，隨從股及引導股共有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或至少 99%互補性。隨從股及引導股可能由於鹼基對錯誤配對而缺少互補性。於一些具體實施例，形成髮夾的 RNA 之隨從股及引導股具有至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、或至少 10 個錯誤配對。一般而言，主幹的前 2-8 個核苷酸(相對於環圈)被稱為「種子」殘基，在目標識別及結合中扮演重要角色。主幹的第一個殘基(相對於環圈)被稱為「錨」殘基。於一些具體實施例，形成髮夾的 RNA 在錨殘基處具有錯誤配對。如本文所使用，miRNA 含有「種子序列」，其為藉由互補鹼基配對而與 mRNA(例如，在內源性 hMfn2 中)特異性結合的核苷酸區域，導致 mRNA 的破壞或緘默化(silencing)。此種緘默化可能會造成內源性 hMfn2 的向下調節而不是完全消除。除非另有指明，術語「miRNA」涵括人工微小 RNA(amiRNA)，其為人工設計的。

【0030】「自互補核酸」係指由於核酸股中的核苷酸的互補性(例如鹼基配對)，而能夠與自身雜交(即，自身折疊)以形成單股雙鏈體結構的核酸。自互補核酸可

形成多種二級結構，如髮夾環圈、環圈、凸起(bulge)、連接點(junction)及內部凸起。某些自互補核酸(例如，miRNA 或 AmiRNA)會進行調節功能，如基因緘默化。

【 0031】 本文提供的該被編碼的 miRNA 已設計為特異性地靶向患有 CMT2A 的患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 基因。於某些具體實施例，miRNA 編碼序列包含下表 1 中的反義序列，SEQ ID NO: 27-46、68 及 89。

【 0032】 表 1

miR #	標靶 hMfn2 序列	SEQ ID NO:	miRNA 反義序列	SEQ ID NO:
538	AGAACAGGTTCTGGACGTCAA	47	TTGACGTCCAGAACCTGTTCT	27
874	CAACTCTAAGTGCCCACTTCT	48	AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG	28
877	CTCTAAGTGCCCACTTCTGAA	49	TTCAGAAAGTGGGCACTTAGAG	29
946	GCTGGACAGCTGGATTGACAA	50	TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC	30
1377	CTGCAGTGAAGACCAAGTTTG	51	CAAACCTGGTCTTCACTGCAG	31
1686	CTCCAGTAGTCCTCAAGGTTT	52	AAACCTTGAGGACTACTGGAG	32
2115	AGTTCATGGTTTCCATGGTTA	53	TAACCATGGAAACCATGAACT	33
2164	CTCCATGGGCATTCTTGTGT	54	ACAACAAGAATGCCCATGGAG	34
2390	CAGGAACTGTCTGGGACCTTT	55	AAAGGTCCCAGACAGTTCTTG	35
2457	AGGAAATTGCCGCCATGAACA	56	TGTTTCATGGCGGCAATTCCT	36
1693	AGTCCTCAAGGTTTATAAGAA	57	TTCTTATAAACCTTGAGGACT	68
	GTCAATCAATAGCCAACCTCA	58	TGAGGTTGGCTATTGATTGAC	37
	AAGGTGTTGACTGTGTGAGAA	59	TTCTCACACAGTCAACACCTT	38
	AGCAGGTTTACTGCGAGGAAA	60	TTTCCTCGCAGTAAACCTGCT	39
	AAGACATTGAGTTCCATTTCT	61	AGAAATGGAACCAATGTCTT	40
	TCACAGGTGATGTCCTGTTCA	62	TGAACAGGACATCACCTGTGA	41
	GTTACATACCTGCTTGTATT	63	AATACAAGCAGGTATGTGAAC	42
	GGCTCGGGAGCAGCAGGTTTA	64	TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC	43
	TGGGCTCTATGGCCTCCTCTA	65	TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA	44
	CAATTGCTTCCTGCGGGTAGA	66	TCTACCCGCAGGAAGCAATTG	45
	TTCTTTGTGTCTGCTAAGGAG	67	CTCCTTAGCAGACACAAAGAA	46

【0033】於某些具體實施例，種子序列與該表中描述的反義序列 100%相同。於某些具體實施例，種子序列位於成熟 miRNA (5'至 3')且一般起始於 miRNA 之 miRNA 正義股的 5'端起(正義(+))股的位置 2 至 7、2 至 8、或約 6 個核苷酸，儘管其長度可能更長。於某些具體實施例，種子序列的長度不少於 miRNA 序列的長度的約 30%，其長度可為至少 7 個核苷酸至約 28 個核苷酸、長度可為至少 8 個核苷酸至約 28 個核苷酸、長度可為 7 個核苷酸至 28 個核苷酸、8 個核苷酸至 18 個核苷酸、12 個核苷酸至 28 個核苷酸、約 20 個至約 26 個核苷酸、約 21 個核苷酸、約 24 個核苷酸、或約 26 個核苷酸。於本文提供之例中，miRNA 係以主幹-環圈 miRNA 前驅物序列的形式遞送，例如長度為約 50 至約 80 個核苷酸、或約 55 個核苷酸至約 70 個核苷酸、或長度為 60 至 65 個核苷酸。於某些具體實施例，此 miRNA 前驅物包含約 5 個核苷酸、約 21 個核苷酸種子序列、約 19 個核苷酸主幹環圈及約 19 個核苷酸正義序列，其中正義序列對應於具有一個或兩個錯誤配對的核苷酸的反義序列。適合的 miRNA 編碼序列之例為 SEQ ID NO: 15 之 miR1693 序列。於某些具體實施例，miRNA 編碼序列包含 SEQ ID NO: 15 (miR1693, 64 nt)；miRNA 編碼序列包含 SEQ ID NO: 15 之至少 60 個連續核苷酸；或 miRNA 編碼序列包含與 SEQ ID NO: 15 具有至少 99%一致性的序列，其包含與 SEQ ID NO: 15 之約核苷酸 6 至約核苷酸 26(或 SEQ ID NO: 68)具有 100%一致性的序

列。於某些具體實施例，上表之另一序列可於 SEQ ID NO: 15 之位置 6 至 26(或 SEQ ID NO: 68)被取代。於又另一具體實施例，SEQ ID NO: 15 之位置 6 至 26 被保留，且選擇替代序列用於主幹-環圈序列。於某些具體實施例，miRNA 編碼序列包含：SEQ ID NO: 16 (miR1518，59 nt)，包含與 SEQ ID NO: 16 具有至少 99%一致性的序列。於某些具體實施例，miRNA 編碼序列包含 SEQ ID NO: 89 (miR538，59 nt)、或一包含與 SEQ ID NO: 89 具有至少 99%一致性的序列。於某些具體實施例，選擇替代的主幹-環圈序列，其中主幹的反義股為 SEQ ID NO: 16 之 nt 6 至 26、或 SEQ ID NO: 89 之 nt 1 至 21，且其中環圈序列為 SEQ ID NO: 41 之 nt 27 至 45 或 SEQ ID NO: 89 之 nt 22 至 40。

【0034】於某些具體實施例，核酸分子(例如，表現匣或載體基因體)可含有多於一個 miRNA 編碼序列。如此可包含具有下列之一、二或更多個序列的 miRNA 編碼序列：(a)包含 SEQ ID NO: 15 (miR1693，64 nt)的 miRNA 編碼序列；(b)包含 SEQ ID NO: 15 的至少 60 個連續核苷酸的 miRNA 編碼序列；(c)包含與 SEQ ID NO: 15 具有至少 99%一致性的 miRNA 編碼序列，其包含與 SEQ ID NO: 15 之約核苷酸 6 至約核苷酸 26(或 SEQ ID NO: 68)具有 100%一致性的序列；及/或(d)包含下列之一或多者的 miRNA 編碼序列：

(i) TTGACGTCCAGAACCTGTTCT，SEQ ID NO: 27；(ii) AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG，SEQ ID NO:

28 ; (iii) TTCAGAAGTGGGCACTTAGAG , SEQ ID NO:
 29 ; (iv) TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC , SEQ ID NO:
 30 ; (v) CAAACTTGGTCTTCACTGCAG , SEQ ID NO:
 31 ; (vi) AAACCTTGAGGACTACTGGAG , SEQ ID NO:
 32 ; (vii) TAACCATGGAAACCATGAACT , SEQ ID NO:
 33 ; (viii) ACAACAAGAATGCCCATGGAG , SEQ ID NO:
 34 ; (ix) AAAGGTCCCAGACAGTTCCTG , SEQ ID NO:
 35 ; (x) TGTTTCATGGCGGCAATTTCTT , SEQ ID NO:
 36 ; (xi) TGAGGTTGGCTATTGATTGAC , SEQ ID NO:
 37 ; (xii) TTCTCACACAGTCAACACCTT , SEQ ID NO:
 38 ; (xiii) TTTCCTCGCAGTAAACCTGCT , SEQ ID NO:
 39 ; (xiv) AGAAATGGAACTCAATGTCTT , SEQ ID NO:
 40 ; (xv) TGAACAGGACATCACCTGTGA , SEQ ID NO:
 41 ; (xvi) AATACAAGCAGGTATGTGAAC , SEQ ID NO:
 42 ; (xvii) TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC , SEQ ID NO:
 43 ; (xviii) TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA , SEQ ID
 NO: 44 ; (xix) TCTACCCGCAGGAAGCAATTG , SEQ ID
 NO: 45 ; 或 (xx) CTCCTTAGCAGACACAAAGAA , SEQ
 ID NO: 46 , 或 (i)至 (xx)之任一者的組合。於某些具體實
 施例 , 核酸分子 (例如 , 表現匣或載體基因體)可含有一
 個、二個或更多個 SEQ ID NO: 16 (miR1518)之 miRNA
 編碼序列。於某些具體實施例 , 核酸分子 (例如 , 表現
 匣或載體基因體)可含有一個、二個或更多個 SEQ ID
 NO: 89 (miR538)之 miRNA 編碼序列。

【0035】如本文所使用，「miRNA 標靶序列」為位於 DNA 正向股(5'至 3')(例如，hMfn2 之正向股)上的序列且與 miRNA 序列(包括 miRNA 種子序列)至少部分互補。miRNA 標靶序列對於編碼的轉基因產物的非轉譯區為外源的，且被設計為在需要抑制轉基因表現的細胞中被 miRNA 所特異性地靶向。不欲受限於理論，因為 hMfn2 為一種普遍存在的蛋白質，且過度表現可能與毒性及/或其它負向副作用有關，miRNA 優先靶向內源性 hMfn2 基因，同時避免靶向被遞送至 CMT2A 患者的經工程化的 hMfn2 基因。更特別地，經由載體遞送的編碼 hMfn2 的序列被設計為在標靶部位含有改變的密碼子序列。

【0036】典型地，miRNA 標靶序列係長度為至少 7 個核苷酸至約 28 個核苷酸，長度為至少 8 個核苷酸至約 28 個核苷酸，長度為 7 個核苷酸至 28 個核苷酸、8 個核苷酸至 18 個核苷酸、12 個核苷酸至 28 個核苷酸，約 20 至 26 個核苷酸、約 22 個核苷酸、約 24 個核苷酸、或約 26 個核苷酸，且其含有至少一個連續區域(例如，7 或 8 個核苷酸)，其與 miRNA 種子序列互補。於某些具體實施例，標靶序列包含與 miRNA 種子序列具有精確互補性(100%)或部分互補性的序列，具有一些錯誤配對。於某些具體實施例，標靶序列包含至少 7 至 8 個核苷酸，其與 miRNA 種子序列 100%互補。於某些具體實施例，標靶序列由與 miRNA 種子序列 100%互補的序列所組成。於某些具體實施例，標靶序列含有與種子

序列 100%互補的序列之多個拷貝(例如，二或三個拷貝)。於某些具體實施例，100%互補的區域包含標靶序列長度的至少 30%。於某些具體實施例，標靶序列的其餘部分與 miRNA 具有至少約 80%至約 99%的互補性。於某些具體實施例，在含有 DNA 正向股的表現匣中，miRNA 標靶序列為 miRNA 的反向互補序列。

【0037】如此，本文提供的序列與 SEQ ID NO: 11 及 24 的 Mfn2 編碼序列 95%至 99.9%相同，且被設計以避免回復成構築體中選擇的 miRNA 所靶向的天然人類序列。

【0038】於某些具體實施例，miRNA 優先靶向內源性 hMfn2 基因，同時避免靶向經工程化的 hMfn2 基因，其中內源性 hMfn2 核酸序列為 SEQ ID NO: 18。於某些具體實施例，miRNA 編碼序列包含下列之一或多者：

- (i) TTGACGTCCAGAACCTGTTCT，SEQ ID NO: 27，靶向 SEQ ID NO: 18 之 nt 216-236；
- (ii) AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG，SEQ ID NO: 28，靶向 SEQ ID NO: 18 之 nt 552-572；
- (iii) TTCAGAAGTGGGCACTTAGAG，SEQ ID NO: 29，靶向 SEQ ID NO: 18 之 nt 555-575；
- (iv) TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC，SEQ ID NO: 30，靶向 SEQ ID NO: 18 之 nt 624-644；
- (v) CAAACTTGGTCTTCACTGCAG，SEQ ID NO: 31，靶向 SEQ ID NO: 18 之 nt 1055-1075；
- (vi) AAACCTTGAGGACTACTGGAG，SEQ ID NO: 32，靶向

SEQ ID NO: 18 之 nt 1364-1384 ; (vii)
 TAACCATGGAAACCATGAACT , SEQ ID NO: 33 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 1793-1813 ; (viii)
 ACAACAAGAATGCCCATGGAG , SEQ ID NO: 34 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 1842-1862 ; (ix)
 AAAGGTCCCAGACAGTTCCTG , SEQ ID NO: 35 , 靶向
 SEQ ID NO: 181 之 nt 2068-2088 ; (x)
 TGTTCATGGCGGCAATTTCTT , SEQ ID NO: 36 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 2135-2155 ; (xi)
 TGAGGTTGGCTATTGATTGAC , SEQ ID NO: 37 , 靶向
 5'UTR ; (xii) TTCTCACACAGTCAACACCTT , SEQ ID
 NO: 38 , 靶向 3'UTR ; (xiii)
 TTCCTCGCAGTAAACCTGCT , SEQ ID NO: 39 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 1157-1177 ; (xiv)
 AGAAATGGAACTCAATGTCTT , SEQ ID NO: 40 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 1616-1636 ; (xv)
 TGAACAGGACATCACCTGTGA , SEQ ID NO: 41 , 靶向
 3'UTR ; (xvi) AATACAAGCAGGTATGTGAAC , SEQ ID
 NO: 42 , 靶向 3'UTR ; (xvii)
 TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC , SEQ ID NO: 43 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 1146-1166 ; (xviii)
 TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA , SEQ ID NO: 44 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 1914-1934 ; (xix)
 TCTACCCGCAGGAAGCAATTG , SEQ ID NO: 45 , 靶向
 SEQ ID NO: 18 之 nt 390-410 ; 或 (xx)

CTCCTTAGCAGACACAAAGAA，SEQ ID NO: 46，靶向 SEQ ID NO: 18 之 nt 904-924。

【0039】於某些具體實施例，經工程化的 hMfn2 核酸序列為 SEQ ID NO: 11 或 24。於某些具體實施例，經工程化的 hMfn2 核酸序列為 SEQ ID NO: 18，其中核苷酸區域中存在 1、2、3、或 4 個核苷酸錯誤配對：(i) SEQ ID NO: 18 之 nt 216-236；(ii) SEQ ID NO: 18 之 nt 552-572；(iii) SEQ ID NO: 18 之 nt 555-575；(iv) SEQ ID NO: 18 之 nt 624-644；(v) SEQ ID NO: 18 之 nt 1055-1075；(vi) SEQ ID NO: 18 之 nt 1364-1384；(vii) SEQ ID NO: 18 之 nt 1793-1813；(viii) SEQ ID NO: 18 之 nt 1842-1862；(ix) SEQ ID NO: 18 之 nt 2068-2088；(x) SEQ ID NO: 18 之 nt 2135-2155；(xi) SEQ ID NO: 18 之 nt 1157-1177；(xii) SEQ ID NO: 18 之 nt 1616-1636；(xiii) SEQ ID NO: 18 之 nt 1146-1166；(xiv) SEQ ID NO: 18 之 nt 1914-1934；(xv) SEQ ID NO: 18 之 nt 390-410；或(xvi) SEQ ID NO: 18 之 nt 904-924。

【0040】於某些具體實施例，單一核酸(例如，表現匣或含有其之載體基因體)含有經工程化的 hMfn2 序列及至少一個 miRNA 編碼序列兩者，其中該 miRNA 特異性地靶向在該經工程化 hMfn2 序列中不存在的內源性人類 Mfn2 的序列。於某些具體實施例，人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列為至少一個 miRNA 之上游(5')且此二個元件被間隔子或連接子序列分開。於某些具體實施例，hMfn2 編碼序列的終止密碼子及最 5'的 miRNA 編碼序列

的起始之間至少有 75 個核苷酸。於某些具體實施例，間隔子為約 75 個核苷酸至約 300 個核苷酸、或約 75 個核苷酸至約 250 個核苷酸、或約 75 個核苷酸至約 200 個核苷酸、或約 75 個核苷酸至約 150 個核苷酸、或約 75 個核苷酸至約 100 個核苷酸、或約 80 個核苷酸至約 300 個核苷酸、或約 80 個核苷酸至約 250 個核苷酸、或約 80 個核苷酸至約 200 個核苷酸、或約 80 個核苷酸至約 150 個核苷酸、或約 80 個核苷酸至約 100 個核苷酸。可選擇地，經工程化的 hMfn2 編碼序列及至少一個 miRNA 編碼序列相隔約 75 個核苷酸。適合地，間隔子序列為非編碼序列，其缺少任何限制酶位。可選擇地，間隔子可包括一或多個內含子序列。於某些具體實施例，一或多個之 miRNA 序列可位於該內含子中。於某些具體實施例，連接子序列為 SEQ ID NO: 17。於某些具體實施例，連接子序列為 SEQ ID NO: 90。

【0041】於某些具體實施例，經工程化的 hMfn2 編碼序列及 miRNA 編碼序列係經由不同的核酸序列遞送，例如，二個以上的不同載體、包含一載體及一 LNP 的組合等。於某些具體實施例，兩種不同載體為 AAV 載體。於某些具體實施例，此等載體具有不同表現匣。於其它具體實施例，此等載體具有相同殼體。於其它具體實施例，載體具有不同具體實施例。於某些具體實施例，miRNA 編碼序列經由 LNP 或另一非病毒遞送系統遞送。於某些具體實施例，經工程化的 hMfn2 序列經由 LNP 或另一非病毒遞送系統遞送。於某些具體實施例，

使用二種以上的不同遞送系統(例如，病毒及非病毒、兩種不同的非病毒)之組合。於此等及其它具體實施例，二種以上的不同載體或其它遞送系統可實質上同時投予，或者此等系統之一或多個可於另一個之前遞送。於某些具體實施例，經工程化的 hMfn2 序列為 SEQ ID NO: 11、或與其 90%至 100%相同之序列，其編碼 mRNA，該 mRNA 不被與其共同投予的 miR 結合且編碼 hMfn2。於某些具體實施例，經工程化的 hMfn2 序列為 SEQ ID NO: 24、或與其 90%至 100%相同之序列，其編碼 mRNA，該 mRNA 不被與其共同投予的 miR 結合且編碼 hMfn2。於某些具體實施例，該 miR 為 miR538，具有 SEQ ID NO: 89 之序列，其靶向受試者中的內源性 hMfn2，但其不靶向經工程化的 hMfn2 cDNA 序列或經工程化的所編碼的 mRNA 序列。

【 0042 】如本文所使用，術語「AAV.hMfn2」或「rAAV.hMfn2」用於指一種重組腺相關病毒，其具有 AAV 衣殼，於衣殼中具有載體基因體，該載體基因體包含於調節序列控制下的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列(例如，cDNA)。如本文所使用，術語「AAV.hMfn2 miRXXX」或「rAAV.hMfn2.miRXXX」用於指一種重組腺相關病毒，其具有 AAV 衣殼，於衣殼中具有載體基因體，該載體基因體包含靶向內源性人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之 miR。

【 0043 】可指定特定的殼體類型，例如，AAV1.hMfn2 或 rAAV1.hMfn2，其係指具有 AAV1 殼體

之重組 AAV；AAVhu68.hMfn2 或 AAVhu68.Mfn2，其係指具有 AAVhu68 殼體之重組 AAV；AAVrh91.hMfn2 或 AAVrh91.Mfn2，其係指具有 AAVrh91 殼體之重組 AAV。

【0044】「重組 AAV」或「rAAV」為一種 DNA 酶抗性病毒顆粒，含有兩個元件，AAV 殼體及載體基因體，該載體基因體至少含有包裝在 AAV 殼體內的非 AAV 編碼序列。除非另有說明，否則此術語可與短語「rAAV 載體」互換使用。該 rAAV 為一種「複製缺陷型病毒」或「病毒載體」，因為其缺少任何功能性 AAV rep 基因或功能性 AAV cap 基因且不能產生子代。於某些具體實施例，唯一的 AAV 序列為 AAV 反向末端重複序列 (ITR)，通常位於載體基因體的 5' 及 3' 末端，以便使位於 ITR 之間的基因及調節序列包裝在 AAV 殼體內。一般而言，AAV 殼體係由 60 個殼體 (cap) 蛋白質次單元 VP1、VP2、及 VP3 所構成，彼等以二十面體對稱的方式排列，比例約為 1:1:10 至 1:1:20，取決於所選擇的 AAV。可選擇各種 AAV 作為如上述的 AAV 病毒載體殼體的來源。於一具體實施例，AAV 殼體為 AAV9 殼體或其經工程化的變異體。於某些具體實施例，變異體 AAV9 殼體為 AAV9.PhP.eB 殼體 (SEQ ID NO: 84 之核酸序列；SEQ ID NO: 85 之胺基酸序列)。於某些具體實施例，PhP.eB 殼體被選擇用於小鼠研究，且為人類中演化支 F 載體 (例如，AAVhu68) 的適合模式。於某些具體實施例，殼體蛋白質係藉由 rAAV 載體名稱中術語「AAV」後的數

字、或數字及字母的組合所指定。除非另有指明，本文所述的 AAV 殼體、ITR、及其它選擇的 AAV 組件可容易地選自任何 AAV，包括但不限於定義如下的 AAV：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37、AAVrh32.33、AAV8bp、AAV7M8 及 AAVAnc80、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh74、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAVhu68、及 AAV9 變異體(例如，2020 年 12 月 1 日申請之 US 臨時申請案 No. 63/119,863)，並未限制。參見例如 WO 2019/168961 及 WO 2019/169004，兩者關於具有減少的殼體脫醯胺的新穎 AAV 載體及其用途；US 公開專利申請案 No. 2007-0036760-A1；US 公開專利申請案 No. 2009-0197338-A1；EP 1310571。亦參見 WO 2003/042397 (AAV7 及其它猴 AAV)、US 專利 7790449 及 US 專利 7282199 (AAV8)、WO 2005/033321 及 US 7,906,111 (AAV9)、及 WO 2006/110689、及 WO 2003/042397 (rh.10)、WO 2005/033321、WO 2018/160582 (AAVhu68)，此等藉由引用併入本文。亦參見 WO 2019/168961 及 WO 2019/169004，描述此等及其它 AAV 殼體的脫醯胺概貌。其它適合的 AAV 可包括但不限於：AAVrh90 [2020 年 4 月 28 日申請之 PCT/US20/30273]、AAVrh91 [2020 年 4 月 28 日申請之 PCT/US20/30266、及 2020 年 11 月 4 日申請之 US 臨時

專利申請案 No. 63/109,734、及 2020 年 8 月 14 日申請之 US 臨時專利申請案 No. 63/065,616]、AAVrh92、AAVrh93、AAVrh91.93 [2020 年 4 月 28 日申請之 PCT/US20/30281]，此等藉由引用併入本文。其它適合的 AAV 包括 AAV3B 變異體，其描述於 2019 年 10 月 21 日申請之 US 臨時專利申請案 No. 62/924,112、及 2020 年 5 月 15 日申請之 US 臨時專利申請案 No. 63/025,753，描述 AAV3B.AR2.01、AAV3B.AR2.02、AAV3B.AR2.03、AAV3B.AR2.04、AAV3B.AR2.05、AAV3B.AR2.06、AAV3B.AR2.07、AAV3B.AR2.08、AAV3B.AR2.10、AAV3B.AR2.11、AAV3B.AR2.12、AAV3B.AR2.13、AAV3B.AR2.14、AAV3B.AR2.15、AAV3B.AR2.16、或 AAV3B.AR2.17，此等藉由引用併入本文。此等文獻亦描述可選擇用於生成 rAAV 的其它 AAV 殼體，並藉由引用併入。於自人類或非人類靈長類動物(NHP)所單離或經工程化且經充分特性分析的 AAV 中，人類 AAV2 為第一個被開發為基因轉移載體的 AAV；其已廣泛用於不同目標組織及動物模式中的有效基因轉移實驗。

【0045】如本文所使用，「載體基因體」係指包裝在形成病毒顆粒的微小病毒(例如，rAAV)殼體內部的核酸序列。此種核酸序列含有 AAV 反向末端重複序列(ITRs)。於本文之例中，載體基因體由 5'至 3'，最低限度含有 AAV 5' ITR、編碼序列(即，轉基因(一或多個))及 AAV 3' ITR。可選擇來自 AAV2 之 ITR，一種異於殼

體之不同來源 AAV，或可選擇除全長 ITR 以外者。於某些具體實施例，ITR 係來自與生產過程中提供 rep 功能的 AAV 或反式互補 AAV 相同的 AAV 來源。再者，可使用其它 ITR，例如，自互補(scAAV) ITRs。單股 AAV 及自互補(sc) AAV 二者皆包含於 rAAV。轉基因為一種核酸編碼序列，與載體序列異源，其編碼有興趣之多肽、蛋白質、功能性 RNA 分子(例如，miRNA、miRNA 抑制劑)或其它基因產物。該核酸編碼序列係以在目標組織的細胞中允許轉基因轉錄、轉譯及/或表現的方式與調節組件可操作地連接。載體基因體的適當組件係於本文中更詳細地討論。

【0046】於一例中，「載體基因體」由 5'至 3'，最低限度含有載體特異性序列、可操作地連接至調節控制序列之包含經工程化的人類 Mfn2 編碼序列的核酸序列及可選擇地包含靶向內源性 Mfn2 的 miRNA 序列之序列(該調節控制序列於目標細胞中引導此等之表現)，其中載體特異性序列可為末端重複序列，該末端重複序列特異性地包裝載體基因體至病毒載體殼體或套膜蛋白質中。例如，AAV 反向末端重複(inverted terminal repeats)用於包裝至 AAV 及某些其它微小病毒(parvovirus)殼體中。

【0047】於某些具體實施例，提供一組成物，其包含適合鞘內注射的水性液體及載體系群(stock)(例如，具有 AAV 殼體的 rAAV，其優先靶向中樞神經系統及/或背根神經節中的細胞(例如，CNS，包括例如神經細胞

(如錐狀細胞、浦金埃氏細胞(Purkinje's cell)、顆粒細胞、梭狀細胞及聯絡神經元細胞)及神經膠細胞(如星狀細胞、寡樹突細胞、小神經膠質細胞、及室管膜細胞)，其中具有經工程化的 hMfn2 編碼序列及/或至少一個對內源性 hMfn2 具有特異性的 miRNA 之載體，係用於遞送至中樞神經系統(CNS)。於某些具體實施例，調配包含一或多個如本文所述的載體的組成物用於枕骨下注射到腦大池內(intra-cisterna magna)。於某些具體實施例，組成物係經由電腦斷層造影-(CT-)rAAV 注射而投予。於某些具體實施例，組成物係使用歐氏貯存器(Ommaya reservoir)而投予。於某些具體實施例，投予患者單劑量的組成物。

【0048】如本文所使用，「表現匣」係指包含生物學上有用的核酸序列(例如，編碼蛋白質、酵素或其它有用的基因產物之基因 cDNA、mRNA 等)及與其可操作地連接的調節序列之核酸分子，該調節序列引導或調節核酸序列及其基因產物之轉錄、轉譯及/或表現。如本文所使用，「可操作地連接的」序列包括與核酸序列連續或不連續的調節序列、及在異側或同側核酸序列中作用的調節序列兩者。此種調節序列典型上包括例如：一或多個之啟動子、強化子、內含子、科札克序列(Kozak sequence)、多腺苷酸化(polyadenylation)序列、及 TATA 訊息。表現匣除了其它元件外，可含有基因序列之上游(相對於其為 5'側)的調節序列，例如，一或多個啟動子、強化子、內含子等；以及基因序列的下游(相對於

其為 3'側)的一或多個強化子或調節序列，例如，包含多腺苷酸化位之 3'未轉譯區(3' UTR)。於某些具體實施例，調節序列係可操作地連接至基因產物之核酸序列，其中該調節序列藉由插入的核酸序列(即，5'-未轉譯區(5'UTR))而與基因產物的核酸序列分開。於某些具體實施例，表現匣包含一或多種基因產物之核酸序列。於一些具體實施例，表現匣可為單順反子(monocistronic)或雙順反子(bicistronic)表現匣。於其它具體實施例，術語「轉基因」係指插入目標細胞的來自外源的一或多個 DNA 序列。

【0049】通常，此類可用於產生病毒載體且含有本文所述基因產物的編碼序列的表現匣，其兩側為病毒基因體的包裝訊息及其它表現控制序列(諸如本文所述者)。於某些具體實施例，載體基因體可含有二個以上的表現匣。

【0050】於某個具體實施例，表現匣包含 hMfn2 編碼序列(及/或靶向內源性 Mfn2 的 miRNA 序列)、啟動子，且可包括其之其它調節序列，其匣可被包裝至載體(例如，rAAV、慢病毒(lentivirus)、反轉錄病毒(retrovirus)等)中。

【0051】

AAV

重組微小病毒(parvovirus)特別適合作為治療 CMT2A 的載體。如本文所述，重組微小病毒可含有 AAV 殼體(或波卡病毒(bocavirus)殼體)。於某些具體實

施例，殼體靶向背根神經節中的細胞及/或下運動神經元及/或初級感覺神經元中的細胞。於某些具體實施例，本文提供的組成物可具有單一 rAAV 系群，其包含 rAAV，該 rAAV 包含經工程化的 hMfn2 及特異性地靶向內源性 hMfn2 的 miRNA 以便向下調節內源性 hMfn2 水準並減少任何與 hMfn2 過度表現有關的毒性。於其它具體實施例，rAAV 可包含 hMfn2 且可與包含向下調節內源性 hMfn2 之 miRNA 的不同載體共同投予。於其它具體實施例，rAAV 可包含至少一個 miRNA，該 miRNA 向下調節內源性 hMfn2，且第二載體(或其它組成物)遞送 hMfn2。

【0052】例如，使用來自演化支 F(例如，AAVhu68 或 AAV9)的 AAV 殼體所產生的載體可被使用以生產載體，該載體於 CNS 靶向並表現 hMfn2。或者，使用來自演化支 A(例如，AAV1、AAVrh91)的 AAV 殼體所產生的載體可被選擇。於再其它具體實施例，其它微小病毒或其它 AAV 病毒可為 AAV 殼體的適合來源。

【0053】AAV1 殼體係指具有 AAV vp1 蛋白質、AAV vp2 蛋白質及 AAV vp3 蛋白質的殼體。於特定的具體實施例中，AAV1 殼體包含預定比例約 1:1:10 之 AAV vp1 蛋白質、AAV vp2 蛋白質及 AAV vp3 蛋白質，組裝成全部 60 個 vp 蛋白質的 T1 二十面體殼體。AAV1 殼體能夠包裝基因體序列以形成 AAV 顆粒(例如，重組 AAV，其中基因體為載體基因體)。典型地，編碼最長的 vp 蛋白質(即 VP1)的殼體核酸序列，於具有 AAV1 殼體的 rAAV

生產期間係異側表現，被描述於例如 US 專利 6,759,237、US 專利 7,105,345、US 專利 7,186,552、US 專利 8,637,255、及 US 專利 9,567,607，此等藉由引用併入本文。亦參見 WO 2018/168961，其藉由引用併入本文。於某些具體實施例，AAAV1 的特徵在於 VP 同功型(isoform)之異質族群的殼體組成，根據使用質譜法確定的殼體中 VP 蛋白質的總量，該 VP 同功型係如 WO 2018/160582 中所定義的被脫醯胺化，藉由引用將其完整併入本文。於某些具體實施例，AAV 殼體在以下位置的一或多處並在以下提供的範圍內被修飾，如使用質譜法確定。適合的修飾包括在上述標識為脫醯胺化調節的段落中描述者，其藉由引用併入本文。於某些具體實施例，一或多個下列位置、或 N 後面的甘胺酸係如本文所述地被修飾。於某些具體實施例，構築 AAV1 突變體，其中位置 57、383、512 及/或 718 的 N 後的甘胺酸被保留(即，保持未經修飾)。於某些具體實施例，前一句中所述的四個位置的 NG 與原本序列一起保留。於某些具體實施例，將人工 NG 導入與 WO 2018/160582 中定義及識別的位置不同的位置，其藉由引用併入本文。

【0054】如本文所使用，AAVhu68 殼體係指如 WO 2018/160582 中所定義的殼體，其藉由引用併入本文。如本文所述，rAAVhu68 具有在生產系統中所生產的 rAAVhu68 殼體，該生產系統係自 AAVhu68 核酸而表現殼體。於某些具體實施例，AAVhu68 核酸序列為 SEQ ID NO: 81，編碼 SEQ ID NO 82 之胺基酸序列。於某些

具體實施例，AAVhu68 核酸序列為 SEQ ID NO: 83，編碼 SEQ ID NO: 82 之胺基酸序列。使用單個核酸序列 vp1 的生產所產生的 rAAVhu68 會產生 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質及 vp3 蛋白質的異質族群。此等亞群至少包括脫醯胺的天冬醯胺酸(N 或 Asn)殘基。例如，天冬醯胺酸-甘胺酸對中的天冬醯胺酸被高度脫醯胺。於某些具體實施例，vp2 及/或 vp3 蛋白質可被額外地或替代地從不同於 vp1 的核酸序列表現，例如，以改變所選擇的表現系統中 vp 蛋白質的比例。

【0055】包裝於 AAV 殼體中並遞送到宿主細胞的基因體序列通常最低限度係由轉基因及其調節序列以及 AAV 反向末端重複(ITR)所組成。單股 AAV 及自互補(sc)AAV 二者皆包含於 rAAV。轉基因為一種核酸編碼序列，與載體序列異源，其編碼有興趣之多肽、蛋白質、功能性 RNA 分子(例如，miRNA、miRNA 抑制劑)或其它基因產物。該核酸編碼序列係以在目標組織的細胞中允許轉基因轉錄、轉譯及/或表現的方式與調節組件可操作地連接。

【0056】載體的 AAV 序列通常包含同側作用(cis-acting) 5'及 3'反向末端重複序列(參見例如 B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990))。ITR 序列長度為約 145 bp。儘管允許對此等序列進行某種程度的輕微修飾，但較佳為實質上在分子中使用編碼 ITR 的整個序列。修飾此等 ITR 序列的能力係於本領域技術範圍內。(參見例如，如

Sambrook et al., “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); 及 K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1996)之文件)。本發明中所使用的此種分子之例為含有轉基因的「同側作用」質體，其中 5'及 3' AAV ITR 序列位於所選擇的轉基因序列及有關的調節元件之兩側。

【0057】ITR 為在載體生產過程中負責基因體的複製及包裝的遺傳元件，且為生成 rAAV 所需的唯一病毒同側元件。於一具體實施例，ITR 來自不同於提供殼體的 AAV。於較佳具體實施例，為了方便及加速監管批准，可使用來自 AAV2 之 ITR 序列、或其經刪除版 (Δ ITR)。然而，可選擇來自其它 AAV 來源的 ITR。於 ITR 之來源為來自 AAV2 且 AAV 殼體來自另一 AAV 來源時，生成的載體可稱為假型 (pseudotyped)。一般而言，AAV 載體基因體包含 AAV 5' ITR、編碼基因產物之核酸序列、及任何調節序列、以及 AAV 3' ITR。然而，此等元件之其它型態可為適合的。於一具體實施例，提供自互補 AAV。已描述 5'ITR 的縮短版，稱為 Δ ITR，其中刪除了 D 序列 (D-sequence) 及末端分割位 (terminal resolution site) (trs)。於某些具體實施例，載體基因體包括 130 個鹼基對之縮短的 AAV2 ITR，其中外部「a」元件被刪除。在使用內部 A 元件作為模板的載體 DNA 擴增過程中，縮短的 ITR 被回復為 145 個鹼基對的野生型長度。於其它具體實施例，使用全長 AAV 5' 及 3' ITR。

【0058】除了上述載體(例如，rAAV)的主要元件之外，載體亦包括必需的習用控制元件，其以允許轉基因在細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與轉基因可操作地連接。如本文所使用，術語「表現」或「基因表現」係指來自基因的信息被用於合成功能性基因產物的過程。基因產物可為蛋白質、肽、或核酸聚合物(如RNA、DNA或PNA)。

【0059】如本文所使用，術語「調節序列」或「表現控制序列」係指核酸序列，如起始序列、強化子序列、及啟動子序列，其誘導、抑制、或以其它方式控制與彼等可操作地連接的蛋白質編碼核酸序列的轉錄。調節控制元件通常含有啟動子序列作為表現控制序列之一部分，例如，位於所選擇的 5' ITR 序列及編碼序列之間。於特別理想的具體實施例，選擇用於中樞神經系統的組織特異性啟動子。例如，啟動子可為神經細胞啟動子，例如，gfaABC(1)D 啟動子(Addgene #50473)、或人類 Syn 啟動子(序列可由 Addgene 獲得，Ref. #50465)。

【0060】其它適合的啟動子可包括例如組成型啟動子(constitutive promoter)、可調節的啟動子[參見例如 WO 2011/126808 及 WO 2013/04943]、組織特異性啟動子或對生理提示有反應的啟動子可被用於本文所述的載體。啟動子可選自不同來源，例如，人類巨細胞病毒(CMV)立即早期強化子/啟動子、SV40 早期強化子/啟動子、JC 多瘤病毒(JC polymovirus)啟動子、髓鞘質鹼性

蛋白(MBP)或神經膠纖維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein)(GFAP)啟動子、單純疱疹病毒(HSV-1)潛伏相關啟動子(latency associated promoter)(LAP)、勞氏肉瘤病毒(rouse sarcoma virus)(RSV)末端長重複序列(LTR)啟動子、神經元特異性啟動子(NSE)、血小板衍生的生長因子(PDGF)啟動子、hSYN、黑色素凝集激素(melanin-concentrating hormone)(MCH)啟動子、CBA、基質金屬蛋白啟動子(matrix metalloprotein promoter)(MPP)、及雞 β -肌動蛋白啟動子。除了啟動子，載體可含有一或多個其它適當的轉錄起始、終止、強化子序列、有效的RNA加工訊息諸如剪接(splicing)及多腺苷酸化(polyA)訊息；穩定細胞質的mRNA之序列，例如WPRE；增強轉譯效率之序列(即，科札克共通序列(Kozak consensus sequence))；增強蛋白質穩定性之序列；及當需要時，增強所編碼的產物之分泌的序列。適合的強化子之例為CMV強化子。其它適合的強化子包括適合所欲目標組織適應症者。在一具體實施例，表現匣包含一或多個表現強化子。在一具體實施例，表現匣含二個以上的表現強化子。此等強化子可相同或可彼此不同。例如，強化子可包括CMV立即早期強化子。此強化子能夠以位置彼此相鄰的兩個拷貝的方式存在。或者，強化子的雙重拷貝可被一個或多個序列分開。於再另一具體實施例，表現匣進一步含有內含子，例如，雞 β -肌動蛋白內含子。其它適合的內含子包括本技術領域中已知者，例如，諸如WO 2011/126808所述者。適合的polyA序列

之例包括例如：SV40、SV50、牛生長激素(bGH)、人類生長激素、及合成的 polyA。於某些具體實施例，polyA 為 SV40 polyA。於某些具體實施例，polyA 為兔球蛋白 poly A (RBG)。可選擇地，可選擇一或多個序列以穩定 mRNA。此種序列之例為經修飾的 WPRE 序列，其可被工程化為 polyA 序列的上游及編碼序列的下游[參見例如 MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619。

【0061】於某些具體實施例，載體基因體包含組織特異性啟動子，其中該組織特異性啟動子為人類突觸蛋白(synapsin)啟動子。於某些具體實施例，人類突觸蛋白啟動子包含 SEQ ID NO: 6 之核酸序列。於某些具體實施例，載體基因體包含組成型啟動子，其中啟動子為 CB7 或 CAG 啟動子。於某些具體實施例，CB7 啟動子包含 SEQ ID NO: 86 之核酸序列。於某些具體實施例，CAG 啟動子包含 SEQ ID NO: 87 之核酸序列。

【0062】於一具體實施例，載體基因體包含：AAV 5' ITR、啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、包含其之人類 Mfn2 (hMfn2 或 huMfn2)之編碼序列、poly A、及 AAV 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體包含：AAV 5' ITR、啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、包含其之人類 Mfn2 之編碼序列、poly A、及 AAV 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體包含：AAV 5' ITR、啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、huMfn2 編碼序列、poly A、及 AAV 3' ITR。於某些

具體實施例，載體基因體包含：AAV2 5' ITR、EF1a 啟動子、可選擇的強化子、可選擇的啟動子、huMfn2、SV40 poly A、及 AAV2 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體為 AAV2 5' ITR、UbC 啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、huMfn2、SV40 poly A、及 AAV2 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、huMfn2、SV40 poly A、及 AAV2 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、huMfn2、兔 β 球蛋白 poly A、及 AAV2 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、經工程化的 huMfn2、連接子、靶向內源性 huMfn2 序列的 miR、兔 β 球蛋白 poly A、及 AAV2 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、經工程化的 huMfn2、連接子、miR1518 序列、兔 β 球蛋白 poly A、及 AAV2 3' ITR。於某些具體實施例，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、經工程化的 huMfn2、連接子、miR538、兔 β 球蛋白 poly A、及 AAV2 3' ITR。參見例如 SEQ ID NO: 1、3、69、71、73、75、77、及 79。huMfn2 編碼序列選自本說明書中定義者。參見例如 SEQ ID NO: 11 或與其 95%至 99.9%相同的序列、或者 SEQ ID NO: 11 或與其 95%至 99.9%相同的序列、或者如本文定義之其片段。對於本發明的某些具體實施例的載體基因體，可選擇載體基因體之其它元件或於此等序列上的變異。

【 0063 】

載體生產

於使用於生產 AAV 病毒載體(例如，重組 (r)AAV)，表現匣可被攜帶於任何適合的載體上，例如質體，其被遞送至包裝宿主細胞(packaging host cell)。有用於本發明之質體可經工程化而適合於原核細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞等中之活體外複製及包裝。適合的轉染技術及包裝宿主細胞為本技術領域中具有通常知識者已知及/或可輕易設計。

【 0064 】 表 2.

AAV 載體	SEQ ID NO (載體基因體)
Syn.PI.hMfn2eng.link.hMfn2.miR1693.WPRE.bGH	1
Syn.PI.rMfn2eng.link.rMfn2 miR1518 WPRE.BGH	3
CB7.CI.hMfn2.GA.RBG	79
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG	77
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG	75
CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40	73
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40	71
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40	69

【 0065 】 於某些具體實施例，生產質體包含用以包裝於殼體內的載體基因體，其包含：(a) 編碼人類線粒體融合蛋白 2 之經工程化的核酸序列；(b) 位於(a)及(c)之間の間隔子序列；(c) 至少一種對 CMT2 患者中的內源性人類線粒體融合蛋白 2 具有特異性的 miRNA 序列，該序列位於(a)及(b)之序列的 3'；(c) 可操作地連接至(a)及(c)的調節序列；其中(a)之經工程化的核酸序列缺乏至少一個 miRNA 之標靶部位，因而防止 miRNA 靶向

經工程化的人類線粒體融合蛋白 2 編碼序列。於某些具體實施例，生產質體包含載體基因體，該載體基因體包含編碼 SEQ ID NO: 75 之核酸序列。

【0066】生產及單離適合作為載體使用之 AAV 之方法為本技術領域已知。一般參見例如 Grieger & Samulski, 2005, “Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,” *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145 ; Buning et al., 2008, “Recent developments in adeno-associated virus vector technology,” *J. Gene Med.* 10:717-733 ; 及下列引述的參考文獻，其每一者藉由引用而完整併入本文。於將轉基因包裝到病毒粒子 (virion) 中，ITR 為與包含該表現匣的核酸分子相同的構築體中同側唯一需要的 AAV 組件。cap 及 rep 基因可以異側提供。

【0067】在一具體實施例，本文所述之表現匣被工程化至遺傳元件 (例如，穿梭質體 (shuttle plasmid)) 中，該遺傳元件將攜帶在其上的免疫球蛋白構築體序列轉移至包裝宿主細胞中以生產病毒載體。於一具體實施例，選擇的基因元件可藉由任何適合的方法而被遞送至 AAV 包裝細胞 (packaging cell)，包括轉染、電穿孔、微脂體遞送、膜融合技術、高速 DNA 被覆顆粒 (high velocity DNA-coated pellet)、病毒感染及原生質體 (protoplast) 融合。亦可製作穩定的 AAV 包裝細胞。或者，表現匣可用於產生 AAV 以外的病毒載體，或者用於活體外抗體混合

物之製造。用於製作此種構築體之方法為核酸操作領域中具有通常知識者所知悉，且包括基因工程、重組工程、及合成技術。參見例如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。

【0068】術語「AAV 中間體」或「AAV 載體中間體」係指缺少包裝在其中的所欲基因體序列的組裝的 rAAV 殼體。此等亦被稱為「空的(empty)」殼體。此種殼體可不含有表現匣的可檢測的基因體序列，或者僅含有不足以達成基因產物表現的部分包裝的基因體序列。此等空的殼體沒有將感興趣的基因轉移至宿主細胞的功能。

【0069】本文所述重組腺相關病毒(AAV)可使用已知技術生產。參見例如 WO 2003/042397；WO 2005/033321、WO 2006/110689；US 7588772 B2。此種方法涉及培養宿主細胞，其含有編碼 AAV 殼體蛋白質的核酸序列；功能性 rep 基因；如本文所述表現匣，兩側為 AAV 反向末端重複(ITR)及轉基因；及足夠的輔助功能，以允許將表現匣包裝至 AAV 殼體蛋白質中。本文亦提供宿主細胞，其含有編碼 AAV 殼體的核酸序列；功能性 rep 基因；如本文所述的載體基因體；及足夠的輔助功能，以允許將載體基因體包裝至 AAV 殼體蛋白質中。於一具體實施例，宿主細胞為 HEK 293 細胞。此等方法在 WO2017160360 A2 中有更詳細的描述，其藉由引用併入本文。生產殼體之方法、其編碼序列、及生產 rAAV

病毒載體之方法已被描述。參見例如 Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)及 US 2013/0045186A1。

【0070】於一具體實施例，提供有用於生產重組 AAV 之生產細胞培養物。此類細胞培養物含有在宿主細胞中表現 AAV 殼體蛋白質的核酸；適於包裝至 AAV 殼體中的核酸分子，例如含有 AAV ITR 及編碼基因產物的非 AAV 核酸序列的載體基因體，該非 AAV 核酸序列可操作地連接至引導產物在宿主細胞中表現的序列；以及足夠的 AAV rep 功能及腺病毒輔助者功能，以允許將核酸分子包裝至重組 AAV 殼體中。在一具體實施例，細胞培養物係由哺乳動物細胞(例如人類胚腎 293 細胞等)或昆蟲細胞(例如桿狀病毒(baculovirus))組成。

【0071】典型地，rep 功能來自與提供位於載體基因體兩側的 ITR 之 AAV 相同的 AAV 來源。於本文之例中，選擇 AAV2 ITR 並使用 AAV2 rep。可選擇地，可選擇其它 rep 序列或另一 rep 來源(及可選擇另一 ITR 來源)。例如，rep 可為但未限於：AAV1 rep 蛋白質、AAV2 rep 蛋白質；或 rep 78、rep 68、rep 52、rep 40、rep68/78 及 rep40/52；或其片段；或其它來源。可選擇地，rep 及 cap 序列位於細胞培養物中的相同遺傳元件上。在 rep 序列及 cap 基因之間可能有一個間隔子。此等 AAV 或突變體 AAV 殼體序列之任一者可於引導其在宿主細胞中表現的外源調節控制序列的控制下。

【0072】在一具體實施例，細胞在合適的細胞培養物(例如，HEK 293)細胞中製造。本文所述的基因療法載體的製備方法包括本領域眾所周知的方法，諸如用於生產基因療法載體的質體 DNA 的生產、載體的生產、及載體的純化。於一些具體實施例，基因療法載體為 AAV 載體，且所產生的質體為編碼 AAV 基因體及感興趣之基因的 AAV 同側質體、含有 AAV rep 及 cap 基因的 AAV 異側質體、及腺病毒輔助質體。載體產生製程可包括諸如細胞培養之起始、細胞繼代、細胞接種、以質體 DNA 轉染細胞、轉染後培養基交換為無血清培養基、及含有載體的細胞及培養基的收取之方法步驟。

【0073】於某些具體實施例，rAAV.hMfn2 之製造過程涉及以質體 DNA 短暫轉染 HEK293 細胞。藉由在 PALL iCELLis 生物反應器中的 PEI 媒介之三重轉染 HEK293 細胞而生產單批或多批次。隨後，藉由澄清、TFF、親和性層析及陰離子交換層析，在可能的一次性、封閉式生物處理系統中純化所收取的 AAV 材料。

【0074】所收取的含有載體的細胞及培養基在本文中稱為粗細胞收取物。於另一系統中，藉由以基於桿狀病毒的載體感染而將基因療法載體導入昆蟲細胞中。此等生產系統的綜述，一般參見例如 Zhang et al., 2009, “Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production,” Human Gene Therapy 20:922-929，其各自之內容藉由引用而完整併入本文。製造及使用此等之方法及其它 AAV

生產系統亦描述於下列 U.S.專利，其各自之內容藉由引用而完整併入本文：5,139,941；5,741,683；6,057,152；6,204,059；6,268,213；6,491,907；6,660,514；6,951,753；7,094,604；7,172,893；7,201,898；7,229,823；及7,439,065，其藉由引用併入本文。

【0075】粗細胞收取物之後可經歷另外的方法步驟，諸如載體收取物的濃縮、載體收取物的透析過濾、載體收取物的微流體化、載體收取物的核酸酶消化、微流體化中間體的過濾、藉由層析法的粗純化、藉由超高速離心的粗純化、藉由切向流過濾的緩衝液交換、及/或調配及過濾以製備大量載體。

【0076】使用高鹽濃度下的兩步驟親和性層析純化，接著使用陰離子交換樹脂層析，以純化載體藥物產物並移除空的殼體。在2016年12月9日申請的國際專利申請案 No. PCT/US2016/065970 中更詳細地描述此等方法，其藉由引用併入本文。AAV8 之純化方法，2016年12月9日申請的國際專利申請案 No. PCT/US2016/065976；及 rh10 之純化方法，2016年12月9日申請的國際專利申請案 No. PCT/US16/66013，標題為「Scalable Purification Method for AAVrh10」，亦於2015年12月11日申請；及 AAV1 之純化方法，2016年12月9日申請的國際專利申請案 No. PCT/US2016/065974，標題為「Scalable Purification Method for AAV1」，2015年12月11日申請，此等所有皆藉由引用併入本文。

【0077】為了計算空的(empty)及完整的(full)顆粒含量，將所選擇的樣品(例如，在本文的實施例中之碘克沙醇(iodixanol)梯度純化的製劑，其中 GC 的#=顆粒的#)的 VP3 帶(band)體積對裝載的 GC 顆粒作圖。所生成的線性方程式($y=mx+c$)係用於計算測試物品峰的帶體積中的顆粒數量。然後將每 20 μ L 裝載的顆粒數(pt)乘以 50，得到顆粒(pt)/mL。Pt/mL 除以 GC/mL，得到顆粒對基因體拷貝的比例(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL 得到空的 pt/mL。空的 pt/mL 除以 pt/mL 並 $\times 100$ ，得到空的顆粒的百分比。

【0078】一般而言，用於分析空殼體及具有包裝的基因體之 AAV 載體顆粒的方法為技術領域中已知，參見例如 Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330；Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128。為了測試變性的殼體，該方法包括對處理過的 AAV 系群(stock)進行 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳，該電泳由能夠分離三種殼體蛋白質的任何凝膠所組成，例如，在緩衝液中含有 3-8%的 Tris-乙酸鹽的梯度凝膠，然後運行凝膠直到分離樣品材料，然後將凝膠印漬到尼龍或硝化纖維素膜上，較佳為尼龍。然後將抗 AAV 殼體抗體使用作為結合至變性的殼體蛋白質的一級抗體，較佳為抗 AAV 殼體單株抗體，最佳為 B1 抗 AAV-2 單株抗體(Wobus et al., J. Virol. (2000) 74:9281-9293)。然後使用二級抗體，該二級抗體與一級抗體結合且含有用於檢測與一級抗體的結合的手段，更佳為含有與其共價鍵結的檢測分子的抗

IgG 抗體，最佳為與辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase) 共價鍵結的綿羊抗小鼠 IgG 抗體。使用檢測結合的方法，以半定量地確定一級抗體與二級抗體之間的結合，較佳為能夠檢測放射性同位素發射、電磁輻射或比色變化的檢測方法，最佳為化學發光檢測套組。例如，對於 SDS-PAGE，可從管柱流份中取樣品，並於含有還原劑 (例如 DTT) 的 SDS-PAGE 裝載緩衝液 (loading buffer) 中加熱，將殼體蛋白質於預鑄的梯度聚丙烯醯胺凝膠 (例如 Novex) 進行解析。可根據製造商的說明使用 SilverXpress (Invitrogen, CA) 進行銀染色或其它適合的染色方法 (即 SYPRO ruby 或考馬斯 (coomassie) 染色)。於一具體實施例，可藉由定量即時 PCR (Q-PCR) 測量管柱流份中的 AAV 載體基因體 (vg) 的濃度。稀釋樣品並以 DNase I (或其它合適的核酸酶) 消化以移除外源的 DNA。核酸酶失活後，使用引子及對引子之間的 DNA 序列具有特異性的 TaqMan™ 螢光探針進行進一步稀釋及擴增樣品。在 Applied Biosystems Prism 7700 序列檢測系統上測量每個樣品達到定義的螢光水準所需的循環數 (閾值循環，Ct)。使用含有與 AAV 載體中含的序列相同序列的質體 DNA，以於 Q-PCR 反應中生成標準曲線。從樣品獲得的循環閾值 (Ct) 數值係用於藉由將其標準化為質體標準曲線的 Ct 值來確定載體基因體效價 (titer)。亦可使用基於數位 PCR 的終點分析。

【0079】於一態樣，使用最適化的 q-PCR 方法，其利用廣效絲胺酸蛋白酶，例如蛋白酶 K (如可由 Qiagen

購得)。更具體而言，最適化的 qPCR 基因體效價分析除了於 DNase I 消化後，將樣品以蛋白酶 K 緩衝液稀釋並以蛋白酶 K 處理，然後進行熱失活之外，與標準分析相似。適合地，以與樣品量相等的量的蛋白酶 K 緩衝液稀釋樣品。蛋白酶 K 緩衝液可濃縮至 2 倍以上。通常，蛋白酶 K 處理為約 0.2mg/mL，但可於 0.1mg/mL 至約 1mg/mL 之間變化。該處理步驟通常於約 55°C 下進行約 15 分鐘，但可於較低溫度(例如約 37°C 至約 50°C)下進行較長時間(例如約 20 分鐘至約 30 分鐘)；或者於較高的溫度(例如，高至約 60°C)下進行較短的時間(例如，約 5 至 10 分鐘)。相似地，熱失活通常係於約 95°C 下約 15 分鐘，但溫度可降低(例如約 70 至約 90°C)且時間延長(例如約 20 分鐘至約 30 分鐘)。然後將樣品稀釋(例如 1000 倍)，並如標準分析中所述進行 TaqMan 分析。

【0080】另外或替代地，可使用液滴式數位 PCR (droplet digital PCR) (ddPCR)。例如，已描述一種藉由 ddPCR 確定單股及自互補的 AAV 載體基因體效價的方法。參見例如 M. Lock et al, *Hum Gene Therapy Methods*, *Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14。

【0081】簡而言之，用於從基因體缺陷的 AAV 中間體中分離具有包裝的基因體序列的 rAAV 顆粒的方法，涉及對包含重組 AAV 病毒顆粒及 AAV 殼體中間體的懸浮液進行快速高效液相層析，其中 AAV 病毒顆粒及 AAV 中間體結合至一種經平衡於高 pH 的強陰離子交換樹

脂，並經過鹽梯度，同時以約 260 及約 280 的紫外線吸光度來監測洗提物。可取決於所選擇的 AAV 而調整 pH 值。參見例如 WO2017/160360 (AAV9)、WO2017/100704 (AAVrh10)、WO 2017/100676 (例如，AAV8)、及 WO 2017/100674 (AAV1)，此等藉由引用併入本文。於此方法中，從 A260/A280 之比達到反曲點時洗提的流份中收集 AAV 完整的殼體。於一例中，對於親和性層析步驟，可將經透析過濾的產物應用於有效捕捉 AAV2 血清型的 Capture Select™ Poros- AAV2/9 親和性樹脂 (Life Technologies)。於此等離子條件下，顯著百分比之殘留的細胞 DNA 及蛋白質流過管柱，而 AAV 顆粒被有效捕獲。

【 0082 】

非 AAV 及非病毒載體

如本文使用的「載體」為一包含核酸序列之生物學或化學部分，其可被導入適當之複製或表現該核酸序列用的目標細胞中。載體之例包括但未限於重組病毒、質體、微脂體複合物 (Lipoplexes)、聚合物囊泡 (Polymersome)、聚合複合物 (Polyplexes)、樹枝狀聚合物 (dendrimer)、細胞穿透肽 (cell penetrating peptide) (CPP) 結合物、磁性顆粒、或奈米顆粒。於一具體實施例，載體為一種核酸分子，其中可插入外源的或異源的或經工程化的 hMfn2 編碼序列 (及/或至少一個 miRNA)，然後可將其導入適當的目標細胞。此種載體較佳具有一或多個複製起點、及重組 DNA 可被插入其中的一或多

個部位。載體通常具有可自未帶有載體的細胞中選擇帶有載體的細胞的手段，例如，彼等編碼抗藥性基因。通常的載體包括質體、病毒基因體、及「人工染色體」。本領域中具有通常知識者可使用載體之生產、製造、特性分析或定量之習用方法。

【0083】於一具體實施例，載體為非病毒質體，其包含其所描述的表現匣，例如，「裸露 DNA」、「裸露質體 DNA」、RNA、mRNA、shRNA、RNAi 等。可選擇地，經由適當裝置遞送質體或其它核酸序列，例如，經由電噴灑、電穿孔。於其它具體實施例，核酸分子與各種組成物及奈米顆粒偶合，包括例如，微胞(micelle)、微脂體(liposome)、陽離子性脂質-核酸組成物、多聚醣(poly-glycan)組成物、及其它聚合物、脂質及/或膽固醇系-核酸結合物、及其它構築體，如本文所述。參見例如 WO2014/089486 、 US 2018/0353616A1 、 US2013/0037977A1 、 WO2015/074085A1 、 US9670152B2、及 US 8,853,377B2、2011 年 3 月 21 日網路公開的 X. Su et al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787；WO2013/182683、WO 2010/053572 及 WO 2012/170930，此等全部藉由引用併入本文。

【0084】於某些具體實施例，非病毒載體用於遞送 miRNA 轉錄本，該 miRNA 轉錄本靶向內源性 hMfn2 之不存在於共同投予的經工程化的 hMfn2 序列的部位。於一些具體實施例，miRNA 以每劑量大於約 0.5 mg/kg 體重的 miRNA 的量遞送(例如，大於約 1.0 mg/kg、1.5

mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、4.0 mg/kg、5.0 mg/kg、6.0 mg/kg、7.0 mg/kg、8.0 mg/kg、9.0 mg/kg、或 10.0 mg/kg)。於一些具體實施例，miRNA 以每劑量約 0.1-100mg/kg 體重之範圍的 miRNA 的量遞送(例如，約 0.1-90 mg/kg、0.1-80 mg/kg、0.1-70 mg/kg、0.1-60 mg/kg、0.1-50 mg/kg、0.1-40 mg/kg、0.1-30 mg/kg、0.1-20 mg/kg、0.1-10 mg/kg)。於一些具體實施例，miRNA 以每劑量為下列的量或大於下列的量遞送：約 1 mg、5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg、60 mg、65 mg、70 mg、75 mg、80 mg、85 mg、90 mg、95 mg、100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、350 mg、400 mg、450 mg、或 500 mg。

【0085】於某些具體實施例，miRNA 轉錄本被包封於脂質奈米顆粒(LNP)中。如本文所使用，短語「脂質奈米顆粒」係指包含一種或多種脂質(例如，陽離子性脂質、非陽離子性脂質及 PEG 修飾的脂質)的轉移媒介物。較佳地，脂質奈米顆粒被調配以將一種或多種 miRNA 遞送至一種或多種目標細胞(例如，背根神經節、下運動神經元及/或上運動神經元、或於上述 CNS 所述的細胞類型)。適合的脂質之例包括例如磷脂醯基(phosphatidyl)化合物(例如，磷脂醯甘油、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、神經鞘脂、腦苷脂、及神經節苷脂)。亦考慮到聚合物作為轉移媒介物之使用，無論是單獨使用或是與其它轉移媒介物組合使

用。適合的聚合物可包括例如聚丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸烷酯、聚乳酸、聚乳酸-聚甘胺酸交酯共聚物、聚己內酯、葡聚醣、白蛋白、明膠、藻酸鹽、膠原蛋白、幾丁聚醣、環糊精、樹枝狀聚合物及聚乙亞胺。於一具體實施例，轉移媒介物之選擇係基於其促進 miRNA 轉染至目標細胞的能力。用於 miRNA 的有用脂質奈米顆粒包含陽離子性脂質，以包封及/或增強 miRNA 向目標細胞的遞送，該目標細胞將作為蛋白質生產的貯庫作用。如本文所使用，短語「陽離子性脂質」係指在選定的 pH、如生理 pH 下，帶有淨正電荷的多種脂質種類中的任一種。考慮的脂質奈米顆粒可藉由包括採用一種或多種陽離子性脂質、非陽離子性脂質及 PEG 修飾的脂質的不同比例的多成分脂質混合物而製備。文獻中已描述數種陽離子性脂質，其許多為市售的。參見例如 WO2014/089486、US 2018/0353616A1、及 US 8,853,377B2，此等藉由引用併入本文。於某些具體實施例，LNP 調配係使用常規程序進行，包含膽固醇、可離子化脂質、輔助脂質、PEG-脂質及聚合物，在被包封的 mRNA 周圍形成脂質雙層(Kowalski et al., 2019, Mol. Ther. 27(4):710-728)。於一些具體實施例，LNP 包含陽離子性脂質(即，N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、或 1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷(DOTAP))與輔助脂質 DOPE。於一些具體實施例，LNP 包含可離子化脂質 Dlin-MC3-DMA 可離子化脂質、或 哌 咛 二 酮 (diketopiperazine) 系 可 離 子 化 脂 質 (cKK-

E12)。於一些具體實施例，聚合物包含聚乙亞胺(PEI)、或聚(β -胺基)酯(PBAEs)。參見例如 WO2014/089486、US 2018/0353616A1、US2013/0037977A1、WO2015/074085A1、US9670152B2、及 US 8,853,377B2，此等藉由引用併入本文。

【0086】於某些具體實施例，本文所述載體為「複製缺陷型病毒」或「病毒載體」，係指合成或人工病毒顆粒，其中表現匣含有編碼經工程化的 hMfn2 及/或至少一個 miRNA 的核酸序列，該 miRNA 靶向內源性 hMfn2 之在經工程化的 hMfn2 序列上不存在的部位。複製缺陷型病毒無法產生子代病毒粒子，但保留感染目標細胞的能力。於一具體實施例，病毒載體之基因體不包括編碼複製所需酵素的基因(該基因體可被工程化為「無膽的(gutless)」-僅含有編碼 E2 的核酸序列，兩側為增幅及包裝人工基因體所需的訊號)，但可能在生產過程中提供此等基因。因此，由於除非存在複製所需的病毒酵素，否則子代病毒粒子的複製及感染不會發生，而被認為可安全地用於基因療法。

【0087】如本文所使用，重組病毒載體可為任何適合的複製缺陷型病毒載體，包括例如重組腺相關病毒(AAV)、腺病毒、波卡病毒、雜合 AAV/波卡病毒、單純疱疹病毒或慢病毒。

【0088】如本文所使用，術語「宿主細胞」可指其中產生載體(例如，重組 AAV)的包裝細胞株。宿主細胞可為原核或真核細胞(例如，人類、昆蟲、或酵母菌)，

其含有藉由任一手段而被導入細胞中的外源的或異源的 DNA，該手段例如為電穿孔、磷酸鈣沉澱、微注射、轉形、病毒感染、轉染、微脂體遞送、膜融合技術、高速 DNA 被覆顆粒、病毒感染及原生質體融合。宿主細胞之例可包括但不限於經單離的細胞、細胞培養物、大腸桿菌細胞、酵母菌細胞、人類細胞、非人類細胞、哺乳動物細胞、非哺乳動物細胞、昆蟲細胞、HEK-293 細胞、肝臟細胞、腎臟細胞、中樞神經系統細胞、神經元、神經膠細胞、或幹細胞。

【0089】如本文所使用，術語「目標細胞」係指欲在其中表現 hMfn2 及/或 miRNA 之任何目標細胞。於某些具體實施例，術語「目標細胞」意圖指待治療 CMT2A 的受試者之細胞。目標細胞之例包括但不限於中樞神經系統中的細胞。

【0090】

組成物

本文提供一組成物，其含有至少一包含 hMfn2.miR(例如，rAAV.hMfn2.miR 系群)的載體及/或至少一包含 miR 的載體及/或至少一包含系群的載體，且含有可選擇的載劑、賦形劑及/或防腐劑。

【0091】如本文所使用，rAAV 之「系群(stock)」係指一群 rAAV。儘管由於脫醯胺作用而彼等之殼體蛋白質具有異質性，但是系群中的 rAAV 被預期 5 共有相同的載體基因體。系群可包括具有殼體之 rAAV，該殼體具有例如所選擇的 AAV 殼體蛋白質及所選擇的生產系統

的異質性脫鹽胺樣式特徵。該系群可從單一生產系統生產，或從生產系統的多次運行中儲集。可選擇各種生產系統，包括但不限於本文所述者。

【0092】於某些具體實施例，組成物至少包含病毒系群，其為重組 AAV (rAAV)，適合用於單獨或與其它載體系群或組成物組合以治療 CMT2A。於某些具體實施例，組成物適合用於製備治療 CMT2A 的藥物。於某些具體實施例，組成物包含病毒系群，其為適合用於治療 CMT2A 之重組 AAV (rAAV)，該 rAAV 包含：(a)腺相關病毒殼體、及(b)包裝於 AAV 殼體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 之編碼序列、間隔子序列、至少一種 miRNA 的編碼序列(該 miRNA 特異性地靶向內源性人類粒線體融合蛋白之不存在於經工程化的人類粒線體融合蛋白編碼序列中的部位)、及引導所編碼的基因產物表現的調節序列。於某些具體實施例，組成物包含：獨立的載體系群，其包含 rAAV，該 rAAV 包含(a)腺相關病毒殼體、及(b)包裝於 AAV 殼體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 之編碼序列、及引導所編碼的基因產物表現的調節序列；及/或獨立的載體系群，其包含(a)腺相關病毒殼體、及(b)包裝於 AAV 殼體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、至少一種 miRNA 的編碼序列(該 miRNA 特異性地靶向內源性人類粒線體融合蛋白 2 之不存在於經工程化的人類粒線體融

合蛋白 2 編碼序列中的部位)、及引導所編碼的基因產物表現的調節序列。於某些具體實施例，載體基因體包含啟動子、強化子、內含子、人類 Mfn2 編碼序列、及多腺苷酸化訊號。於某些具體實施例，內含子由雞 β 肌動蛋白剪接供體及兔 β 剪接受體元件組成。於某些具體實施例，載體基因體進一步包含位於載體基因體所有元件兩側的 AAV2 5' ITR 及 AAV2 3' ITR。

【0093】 rAAV.hMfn2.miR (rAAV.hMfn2 或另一載體) 可被懸浮於生理學上相容的載劑以投予至人類 CMT2A 患者。於某些具體實施例，為了投予至人類患者，將載體適合地懸浮於水性溶液，該水性溶液含有鹽水、界面活性劑、及生理上可相容的鹽或鹽之混合物。適合地，調整此調配物至生理上可接受的 pH，例如，範圍為 pH 6 至 9、或 pH 6.5 至 7.5、pH 7.0 至 7.7、或 pH 7.2 至 7.8。由於腦脊髓液的 pH 為約 7.28 至約 7.32、或 pH 為 7.2 至 7.4，對於鞘內遞送，可能期望為在此範圍內的 pH；而對於靜脈內遞送，可能期望為約 pH 6.8 至約 7.2。然而，可選擇最廣範圍及此等子範圍內的其它 pH 用於其它遞送途徑。

【0094】 於某些具體實施例，調配物可含有不包含碳酸氫鈉的緩衝食鹽水溶液。此種調配物可含有於水中包含磷酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂及其混合物之一或多者的緩衝食鹽水溶液，諸如 Harvard 緩衝液(Harvard's buffer)。水溶液可進一步含有 Kolliphor® P188，一種由 BASF 販售的泊洛沙姆(poloxamer)，其之

前以商標名 Lutrol® F68 販賣。水溶液可具有 7.2 之 pH 或 7.4 之 pH。

【0095】於另一具體實施例，調配物可含有緩衝食鹽水溶液，該緩衝食鹽水溶液包含 1mM 磷酸鈉(Na_3PO_4)、150 mM 氯化鈉(NaCl)、3mM 氯化鉀(KCl)、1.4 mM 氯化鈣(CaCl_2)、0.8 mM 氯化鎂(MgCl_2)、及 0.001% Kolliphor® 188。參見例如 harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html。於某些具體實施例，較佳為 Harvard 緩衝液。

【0096】於其它具體實施例，調配物可含有一或多個滲透增強劑。適合的滲透增強劑之例可包括例如甘露醇、甘膽酸鈉、牛磺膽酸鈉、去氧膽酸鈉、水楊酸鈉、辛酸鈉、癸酸鈉、月桂硫酸鈉、聚氧乙烯-9-月桂醚或 EDTA。

【0097】於另一具體實施例，組成物包括載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑。鑑於轉移病毒所針對的適應症，本技術領域中具有通常知識者可容易地選擇適合的載劑。例如，一適合的載劑包括鹽水，其能以許多種緩衝溶液來調配(例如，磷酸鹽緩衝食鹽水)。其它示例性載劑包括無菌的鹽水、乳糖、蔗糖、磷酸鈣、明膠、葡聚糖、瓊脂、果膠、花生油、芝麻油、及水。緩衝液/載劑應包括防止 rAAV 黏附到輸液管上但不干擾活體內 rAAV 結合活性的成分。

【0098】可選擇地，除了載體(例如 rAAV)及載劑之外，組成物可含有其它習用的醫藥成分，諸如防腐劑、

或化學穩定劑。適合的示例性防腐劑包括氯丁醇、山梨酸鉀、山梨酸、二氧化硫、沒食子酸丙酯、對羥基苯甲酸酯類(parabens)、乙基香草醛、甘油、苯酚及對氯苯酚。適合的化學穩定劑包括明膠及白蛋白。

【0099】如本文所使用，「載劑」包括任何及所有的溶劑、分散介質、媒液、包衣、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑、緩衝液、載劑溶液、懸浮液、膠體等。此種用於醫藥活性物質的介質及藥劑的用途為本技術領域中所熟知。補充的活性成分亦可併入該組成物中。用語「醫藥上可接受」係指當投予至宿主時不會產生過敏或類似的不良反應的分子實體及組成物。遞送媒液諸如微脂體、奈米膠囊、微粒、微球、脂質顆粒、囊泡等，可用於將本發明之組成物導入適當的宿主細胞中。特別是，可將遞送轉基因的 rAAV 載體包封於脂質顆粒、微脂體、囊泡、奈米球或奈米顆粒等之任一者中來進行調配用於遞送。

【0100】於一具體實施例，組成物包括適於遞送至對象之最終調配物，例如，為緩衝至生理上可相容的 pH 及鹽濃度的水性液體懸浮液。可選擇地，調配物中存在一種或多種界面活性劑。於另一具體實施例，可將組成物作為濃縮物運輸，該濃縮物係進行稀釋以投予至對象。於其它具體實施例，組成物可被冷凍乾燥並在投予時復原。

【0101】適合的界面活性劑或界面活性劑的組合可選自無毒的非離子界面活性劑。於一具體實施例，選擇

末端為一級羥基的雙官能嵌段共聚物界面活性劑，例如，諸如 Pluronic® F68 [BASF]，亦稱為泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188)，其具有中性 pH，其平均分子量為 8400。可選擇其它界面活性劑及其它泊洛沙姆，即由一個聚氧伸丙基(聚(環氧丙烷))之中央疏水鏈及兩側的兩個聚氧伸乙基(聚(環氧乙烷))之親水鏈所構成的非離子三嵌段共聚物、SOLUTOL HS 15(聚乙二醇-15 羥基硬脂酸酯)、LABRASOL(聚聚乙二醇辛酸甘油酯(Polyoxy caprylic glyceride))、聚乙二醇 10 油基醚(polyoxy 10 oleyl ether)、TWEEN(聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯)、乙醇及聚乙二醇。於一具體實施例，調配物含有泊洛沙姆。此等共聚物通常以字母「P」(用於泊洛沙姆)跟三個數字命名：前兩個數字×100 給出聚氧伸丙基核心的近似分子量，最後一個數字×10 給出聚氧伸乙基含量百分比。於一具體實施例，選擇泊洛沙姆 188。界面活性劑能以高至懸浮液的約 0.0005%至約 0.001%之量存在。

【0102】以足夠的量投予載體以轉染細胞並提供基因轉移及表現之足夠的水準，以提供治療益處而沒有不適當的副作用，或具有醫學上可接受的生理作用，此可由醫學領域中具有通常知識者確定。可選擇地，可使用鞘內投予以外的途徑，諸如，例如直接遞送至所欲器官(例如，肝臟(可選擇地經由肝動脈)、肺臟、心臟、眼、腎臟)、口服、吸入、鼻內、氣管內、動脈內、眼內、靜脈內、肌內、皮下、皮內、及其它腸胃外投予途徑。若需要，可合併投予途徑。

【0103】載體的劑量將主要取決於諸如待治療的病況、患者的年齡、體重、及健康狀況之因子，因此於患者間可能會變化。例如，病毒載體之治療上有效的人類劑量，一般為範圍約 25 至約 1000 微升至約 100 mL 之溶液含有濃度約 1×10^9 至 1×10^{16} 的基因體病毒載體(以治療平均體重 70 kg 的受試者)，包括該範圍內的所有整數或分數量，且對於人類患者較佳為 1.0×10^{12} GC 至 1.0×10^{14} GC。於一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、或 9×10^9 GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、或 9×10^{10} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、或 9×10^{11} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、或 9×10^{12} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、或 9×10^{13} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、

7×10^{14} 、 8×10^{14} 、或 9×10^{14} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，調配組成物以使每劑含有至少 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、或 9×10^{15} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。於一具體實施例，對於人類應用，劑量範圍可為每劑 1×10^{10} 至約 1×10^{12} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。

【0104】於某些具體實施例，劑量為範圍約 1×10^9 GC/g 腦質量至約 1×10^{12} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為範圍約 1×10^{10} GC/g 腦質量至約 3.33×10^{11} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為範圍約 3.33×10^{11} GC/g 腦質量至約 1.1×10^{12} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為範圍約 1.1×10^{12} GC/g 腦質量至約 3.33×10^{13} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為低於 3.33×10^{11} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為低於 1.1×10^{12} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為低於 3.33×10^{13} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 1×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 2×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 2×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 3×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 4×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 5×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 6×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約 7×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約

8×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約
 9×10^{10} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約
 1×10^{11} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約
 2×10^{11} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約
 3×10^{11} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，劑量為約
 4×10^{11} GC/g 腦質量。於某些具體實施例，該劑量係以
rAAV 的約 1.44×10^{13} 至 4.33×10^{14} GC 範圍內的固定劑
量 (flat dose) 投予至人類。於某些具體實施例，該劑量
係以 rAAV 的約 1.44×10^{13} 至 2×10^{14} GC 範圍內的固定
劑量投予至人類。於某些具體實施例，該劑量係以
rAAV 的約 3×10^{13} 至 1×10^{14} GC 範圍內的固定劑量投予
至人類。於某些具體實施例，該劑量係以 rAAV 的約
 5×10^{13} 至 1×10^{14} GC 範圍內的固定劑量投予至人類。於
一些具體實施例，組成物可調配成劑量單位，以含有
AAV 的約 1×10^{13} 至 8×10^{14} GC 範圍內之 AAV 的量。於
一些具體實施例，組成物可調配成劑量單位，以含有
rAAV 的約 1.44×10^{13} 至 4.33×10^{14} GC 範圍內之 AAV 的
量。於一些具體實施例，組成物可調配成劑量單位，以
含有 rAAV 的約 3×10^{13} 至 1×10^{14} GC 範圍內之 AAV 的
量。於一些具體實施例，組成物可調配成劑量單位，以
含有 rAAV 的約 5×10^{13} 至 1×10^{14} GC 範圍內之 AAV 的
量。

【0105】 於某些具體實施例，該載體係以單劑投予
至受試者。於某些具體實施例，載體可經由多次注射
(例如 2 劑) 遞送。

【0106】將調整劑量以平衡治療益處與任何副作用，且此種劑量可依據採用重組載體的治療應用而變化。可監測轉基因之表現水準以確定產生病毒載體的劑量頻率，較佳為含有袖珍基因(minigene)的 AAV 載體。可選擇地，類似於為了治療目的所描述的劑量方案可被用於使用本文提供的組成物之免疫。

【0107】如本文所使用，術語「鞘內遞送」或「鞘內投予」係指經由注射至脊髓管、更具體而言為注射至蜘蛛膜下腔的投予途徑，以使其到達腦脊髓液(CSF)。鞘內遞送可包括腰椎穿刺、室內(包括腦室內(ICV))、枕骨下/腦池內穿刺、及/或 C1-2 穿刺。例如，可藉由腰椎穿刺手段而導入物質以在整個蜘蛛膜下腔擴散。於另一例，可注射至腦大池。

【0108】如本文所使用，術語「腦池內遞送」或「腦池內投予」係指直接進入腦大池小腦延髓之腦脊髓液中的投予途徑，更具體而言係經由枕骨下穿刺或藉由直接注射至腦大池，或者經由永久定位的管子。

【0109】包含本文所述用於抑制內源性 hMfn2(例如，在 CMT2A 患者中)的 miR 標靶序列的組成物，通常靶向中樞神經系統中的一種或多種不同細胞類型，包括但不限於神經元(包括例如下運動神經元及/或初級感覺神經元。此等可能包括例如錐狀細胞、浦金埃氏細胞、顆粒細胞、梭狀細胞及聯絡神經元細胞)。

【0110】

用途

本文提供的載體及組成物有用於治療患有夏馬杜三氏 (CMT) 失調、神經病變或與其有關的各種症狀的患者。提供治療具有 CMT2A 的患者之組合方案或共同療法。於某些具體實施例，此方案或共同療法包含共同投予：(a) 編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中該人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 15 之序列或與其至少 95% 相同的序列，且其由於在 (b) 之 miRNA 標靶序列中具有錯誤配對而不同於 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2；(b) 至少一個 miRNA 的編碼序列，該 miRNA 對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性，其中該 mRNA 可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列。

【0111】於某些具體實施例，此方案或共同療法包含共同投予：(a) 編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中該經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之序列或與其至少 95% 相同的序列，且其由於在 (b) 之 miRNA 標靶序列中具有錯誤配對而不同於 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2；及 (b) 至少一個 miRNA 的編碼序列，該 miRNA 對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性，其中

至少一個 miRNA 編碼序列可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列，且其中該至少一個 miRNA 編碼序列包含一或多個 miRNA 靶向序列的序列，其包含 SEQ ID NO: 89 (miR538, 59 nt)，或者 miRNA 包含為 SEQ ID NO: 27 之一或多個反義序列。

【0112】於某些具體實施例，此治療具有 CMT2A 的患者之方案或共同療法包含共同投予：(a) 編碼經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列的重組核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列經工程化為由於在(b)之 miRNA 標靶序列中具有錯誤配對而不同於 CMT2A 患者中內源性人類粒線體融合蛋白 2；及(b) 至少一個 miRNA 之編碼序列，該 miRNA 對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 序列具有特異性，其中該 miRNA 編碼序列可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列，且其中至少一個 miRNA 編碼序列具有下列之一或多個序列：包含 SEQ ID NO: 15 (miR1693, 64 nt)的 miRNA 編碼序列；包含 SEQ ID NO: 15 之至少 60 個連續核苷酸的 miRNA 編碼序列；包含與 SEQ ID NO: 15 具有至少 99%一致性的 miRNA 編碼序列，其包含與 SEQ ID NO: 15 之約核苷酸 6 至約核苷酸 26(或 SEQ ID NO: 68)具有 100%一致性的序列；或者包含下列之一或多者的 miRNA 編碼序列：

(i) TTGACGTCCAGAACCTGTTCT，SEQ ID NO: 27；(ii) AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG，SEQ ID NO:

28 ; (iii) TTCAGAAGTGGGCACTTAGAG , SEQ ID NO:
 29 ; (iv) TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC , SEQ ID NO:
 30 ; (v) CAAACTTGGTCTTCACTGCAG , SEQ ID NO:
 31 ; (vi) AAACCTTGAGGACTACTGGAG , SEQ ID NO:
 32 ; (vii) TAACCATGGAAACCATGAACT , SEQ ID NO:
 33 ; (viii) ACAACAAGAATGCCCATGGAG , SEQ ID NO:
 34 ; (ix) AAAGGTCCCAGACAGTTCCTG , SEQ ID NO:
 35 ; (x) TGTTTCATGGCGGCAATTTCTT , SEQ ID NO:
 36 ; (xi) TGAGGTTGGCTATTGATTGAC , SEQ ID NO:
 37 ; (xii) TTCTCACACAGTCAACACCTT , SEQ ID NO:
 38 ; (xiii) TTTCCTCGCAGTAAACCTGCT , SEQ ID NO:
 39 ; (xiv) AGAAATGGAACTCAATGTCTT , SEQ ID NO:
 40 ; (xv) TGAACAGGACATCACCTGTGA , SEQ ID NO:
 41 ; (xvi) AATACAAGCAGGTATGTGAAC , SEQ ID NO:
 42 ; (xvii) TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC , SEQ ID NO:
 43 ; (xviii) TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA , SEQ ID
 NO: 44 ; (xix) TCTACCCGCAGGAAGCAATTG , SEQ ID
 NO: 45 ; 或 (xx) CTCCTTAGCAGACACAAAGAA , SEQ
 ID NO: 46 , 或 (i)至 (xx)之任一者的組合。於某些具體實
 施例 , 第一載體包含核酸 (a) , 且第二之不同載體包含
 至少一個 miRNA (b) 。於某些具體實施例 , 第一載體為
 病毒載體及 / 或第二載體為病毒載體 , 且第一及第二病
 毒載體可來自相同病毒來源或可為不同。於某些具體實
 施例 , 第一載體為非病毒載體 , 第二載體為非病毒載
 體 , 且第一及第二載體可為相同組成物或可為不同。

【0113】於某些具體實施例，本文提供的載體及組成物有用於治療患有 Mfn2 誘導的脂肪瘤病的患者。於某些具體實施例，本文提供的載體及組成物有用於治療患有多發對稱性脂肪瘤病 (multiple symmetric lipomatosis) 的患者。多發對稱性脂肪瘤病係與 Mfn2 基因的罕見基因突變有關，其特徵為上半身脂肪組織大量沉積及堆積，手臂及腿部脂肪組織逐漸喪失 (Rocha, N., et al., Human biallelic MFN2 mutations induce mitochondrial dysfunction, upper body adipose hyperplasia, and suppression of leptin expression, eLife, 2017, 6:1-27, April 19, 2017)。於某些具體實施例，本文提供的載體及組成物有用於治療患有由於 Mfn2 缺乏之嚴重早發型神經病變的患者。於某些具體實施例，本文提供的載體及組成物有用於治療患有阿茲海默氏症 (AD)、帕金森氏症 (PD)、心肌病變、以及各種癌症中 Mfn2 相關的發病機制的患者。已證明 Mfn2 失調與 AD 及 PD 之間有暗示的關聯，例如，Mfn2 基因中的單核苷酸多型性與 AD 風險之間存在關聯 (Filadi, R., et al., Cell Death and Disease, 2018, 9:330)。

【0114】可選擇地，本文提供的載體及組成物可用於與一或多種選自下列的協同療法組合：乙醯胺酚、非類固醇消炎藥 (NSAIDs)、三環抗鬱劑或抗癲癇藥，如卡巴氮或加巴噴丁。於又其它具體實施例，載體可與涉及一種或多種類固醇 (例如強體松 (prednisone)) 的免疫調節方案組合遞送。

【0115】如本文所使用，術語電腦斷層造影(CT)係指放射線攝影術，其中藉由電腦自沿軸線製成的一系列平面截面影像而構築身體結構的三維影像。

【0116】當指核酸或其片段時，術語「實質上同源」或「實質上相似」係指在與另一核酸(或其互補股)的適當的核苷酸插入或刪除進行最佳比對時，於至少約95%至99%的比對序列中有核苷酸序列一致性。較佳地，該同源為全長序列、或其開讀框、或長度至少為15個核苷酸的其它適合的片段。本文描述適合的片段之例。

【0117】於核酸序列之上下文中，術語「序列一致性」、「序列一致性百分比」、或「百分比相同」係指兩個序列中當比對以獲得最大對應性時為相同的殘基。序列一致性比較之長度理想可為整個基因體之全長、基因編碼序列之全長、或至少約500至5000個核苷酸之片段。然而，較小片段中的一致性亦為理想，例如至少約9個核苷酸、通常至少約20至24個核苷酸、至少約28至32個核苷酸、至少約36個以上之核苷酸。相似地，可容易地確定整個蛋白質之全長、或其片段的胺基酸序列的「序列一致性百分比」。適合地，片段為至少約8個胺基酸長且可多至約700個胺基酸。本文描述適合的片段之例。

【0118】術語「高度保留」意指至少80%一致性，較佳為至少90%一致性，更佳為超過97%一致性。藉由使用本技術領域中具有通常知識者已知的演算法及電腦

程式，本技術領域中具有通常知識者可容易地確定一致性。

【0119】除非上限範圍另有說明，否則應理解，一致性百分比為最低一致性水準，涵括所有更高水準的一致性，多至與參考序列具有 100%一致性。除非另有說明，否則應理解，一致性百分比為最低一致性水準，涵括所有更高水準的一致性，多至與參考序列具有 100%一致性。例如，「95%一致性」及「至少 95%一致性」可交換地使用且包括與參考序列具有 95、96、97、98、99、多至 100%及其間的所有分數之一致性。

【0120】除非另有指明，數值將被理解為遵從常規的數學四捨五入規則。

【0121】一般而言，當提及兩個不同腺相關病毒之間的「一致性」、「同源性」、或「相似性」時，參照「比對」序列來確定「一致性」、「同源性」、或「相似性」。「比對」序列或「比對」係指多個核酸序列或蛋白質(胺基酸)序列，與參考序列相比，通常含有缺失或增加的鹼基或胺基酸的校正。在實施例中，使用公開的 AAV9 序列作為參考點進行 AAV 比對。使用多種公開或市售的多序列比對程式中的任何一種進行比對。此種程式之例包括：「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「MAP」、及「MEME」，此等可通過網際網路上的網站伺服器進行。此種程式之其它來源為本技術領域中具有通常知識者所知悉。或者，亦可使用 Vector NTI 應用程式。本領

域中亦有許多可用於測量核苷酸序列一致性的已知演算法，包括含於上述程式中者。作為另一例，可使用 GCG 版本 6.1 的程式 Fasta™，而比較多核苷酸序列。Fasta™ 提供查詢序列及檢索序列之間最佳重疊區域的比對及序列一致性百分比。例如，核酸序列之間的序列一致性百分比可使用 Fasta™ 及其如 GCG 版本 6.1 中所提供的內定參數(字長為 6，得分矩陣的 NOPAM 因子)而確定，其藉由引用併入本文。多序列比對程式亦可用於胺基酸序列，例如，「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及「Match-Box」程式。一般而言，儘管本技術領域中具有通常知識者可依需要改變此等設定，但此等程式之任一者皆可於內定設定下使用。或者，本技術領域中具有通常知識者可利用另一種演算法或電腦程式，該演算法或電腦程式至少提供如所引用的演算法及程式所提供的一致性或比對水準。參見例如 J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999)。

【0122】應注意的是，術語「一(a 或 an)」係指一個(種)或多個(種)。如此，術語「一」(a 或 an)、「一個(種)或以上」及「至少一個(種)」於本文中可互換使用。

【0123】詞語「包含」(comprise、comprises、及 comprising)被包括性地而不是排他性地解釋。詞語

「由...組成」(consist、consisting)及其變體被排他性地而不是包括性地解釋。儘管說明書中的多個具體實施例使用「包含」語句來呈現，但在其它情況下，相關具體實施例亦意圖使用「由...組成」或「實質上由...組成」語句來解釋及描述。

【0124】如本文所使用，除非另有指明，術語「約」意指與給定參考值間有 10% ($\pm 10\%$ ，例如， ± 1 、 ± 2 、 ± 3 、 ± 4 、 ± 5 、 ± 6 、 ± 7 、 ± 8 、 ± 9 、 ± 10 、或其兩者之間的值)的變動。

【0125】如本文所使用，「疾病」、「失調」及「病況」可互換使用，以表示對象的不正常狀態。

【0126】如本文所使用，術語「CMT2A 相關症狀」或「症狀」係指於 CMT2A 患者以及於 CMT2A 動物模式中發現的症狀。CMT 的早期症狀可能包括以下一種或多種：笨拙、由於無法抬起腳而導致輕微行走困難、腿部肌肉無力、疲勞、反射消失。CMT2A 的常見症狀包括足部畸形(非常高的足弓)、腳踝抬高困難(足下垂(foot drop))、腳趾捲曲(稱為鎚狀趾)、小腿肌肉喪失(導緻小腿變瘦)、腳或手的麻木或燒灼感、走路時「拍打」(走路時腳重重地撞在地板上)、臀部、腿或腳無力、腿及手痙攣、失去平衡、絆倒及摔倒、難以抓握物體以及打開罐子及瓶子、疼痛(神經痛及關節炎疼痛兩者)。CMT2A 的後期症狀可包括例如手臂及手部的類似症狀、脊柱彎曲(脊柱側彎)。CMT2A 的其它已報告/已知的症狀可包括例如言語及吞嚥困難、呼吸困難(尤其是平躺時)、聽力喪失、視力喪失、聲帶麻痺。

【0127】如本文所使用，「患者」或「受試者」意指用於臨床研究的雄性或雌性人類、狗及動物模式。於一具體實施例，此等方法及組成物之受試者為診斷具有 CMT2A 的人類。於某些具體實施例，此等方法及組成物之人類受試者為產前、新生兒、嬰兒、學步兒、學齡前、小學生、青少年、年輕成人或成人。於另一具體實施例，此等方法及組成物之受試者為兒科 CMT2A 患者。

【0128】如本文所使用，術語「治療水準」意指 Mfn2 活性為健康對照之至少約 5%、約 8%、約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 100%、高於 100%、約 2 倍、約 3 倍、或約 5 倍。用於測量 hMfn2 活性的適合分析為本領域已知。於一些具體實施例，一種或多種次單元蛋白質的此種治療水準可導致 CMT2A 相關症狀的緩解；逆轉某些 CMT2A 相關症狀及/或預防 CMT2A 相關某些症狀的進展；或其任何組合。於某些具體實施例，藉由本文提供的組成物及方案遞送的人類 Mfn2 具有功能性內源性野生型蛋白質的胺基酸序列。於某些具體實施例，該序列為 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列或與功能性人類 Mfn2 蛋白質具有約 95%至 100%一致性的功能性蛋白質。

【0129】術語「表現」在本文中以其最廣泛的含義使用，且包含 RNA 的產生或 RNA 及蛋白質的產生。關

於 RNA，術語「表現」或「轉譯」特別涉及肽或蛋白質的產生。表現可為短暫的或可為穩定的。

【0130】另外可選擇地，表現匣(及載體基因體)於 UTR 中可包含一或多個背根神經節(drg)-miRNA 靶向序列，例如，以降低 drg- 毒性及 / 或軸突病變(axonopathy)。參見例如 2019 年 12 月 20 日申請之 PCT/US2019/67872，且現已公開為 WO 2020/132455；2020 年 5 月 12 日申請之 US 臨時專利申請案 No. 63/023593 及 2020 年 6 月 12 日申請之 US 臨時專利申請案 No. 63/038488，所有皆標題為「Compositions for Drg-Specific Reduction of Transgene Expression」，此等完整併入本文。於一些具體實施例，表現匣可經由遺傳元件(例如，質體)遞送至包裝宿主細胞並包裝到病毒載體(例如，病毒顆粒)的殼體中。

【0131】如本文所使用，術語「可操作地連接」係指與有興趣的基因鄰接的表現控制序列、及以異側或以一距離地作用而控制有興趣的基因之表現控制序列兩者。

【0132】當使用於提及之蛋白質或核酸時，術語「異源的」表示該蛋白質或核酸包含在自然界中彼此之間沒有相同關係的兩個以上的序列或子序列。例如，通常重組產生的核酸，具有二個以上來自無關基因的序列，其排列以產生新的功能性核酸。例如，於一具體實施例，該核酸具有來自一個基因的啟動子，其被安排以引導來自不同基因的編碼序列的表現。如此，參照編碼序列，該啟動子為異源的。

【0133】如本文所使用，調節元件包含但有限於：啟動子；強化子；轉錄因子；轉錄終止子；有效的 RNA 加工訊號，如剪接及多腺苷酸化訊號 (polyA)；穩定細胞質 mRNA 的序列，例如土撥鼠肝炎病毒 (WHP) 轉錄後調節元件 (WPRE)；提高轉譯效率的序列 (即，科札克共通序列)。

【0134】本發明上下文中的術語「轉譯」係關於一個在核糖體的過程，其中 mRNA 股控制胺基酸序列的組裝以產生蛋白質或肽。

【0135】本文提供含有經工程化的 hMfn2 編碼序列的表現匣，例如，Syn.PI.hMfn2eng.link.hMfn2.miR1693.WPRE.bGH (SEQ ID NO: 1 之 nt 223 至 4455)；CB7.CI.hMfn2.GA.RBG (SEQ ID NO: 79 之 nt 259 至 4370)；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG (SEQ ID NO: 77 之 nt 259 至 4710)；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG (SEQ ID NO: 75 之 nt 259 至 4626)；CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40 (SEQ ID NO: 73 之 nt 192 至 4262)；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40 (SEQ ID NO: 71 之 nt 192 至 4474)；及 CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40 (SEQ ID NO: 69 之 nt 192 至 4474)。

【0136】本文提供含有經工程化的 rMfn2 編碼序列的表現匣，例如，Syn.PI.rMfn2eng.link.rMfn2 miR1518 WPRE.BGH (SEQ ID NO: 3 之 nt 223 至 4430)。

【0137】除非於本說明書中另有定義，否則本文所用的技術及科學術語具有與本領域中具有通常知識者及參照公開文本所通常理解的相同含義，公開文本為本領域中具有通常知識者提供了本申請案中所使用之許多術語的一般指引。

【0138】下列實施例僅為說明性的且未意圖限制本發明。

實施例

【0139】下列實施例為說明性且未意圖限制本發明。

【0140】夏馬杜三氏病神經病變第 2A 型(CMT2A)係由編碼粒線體融合蛋白 2 (Mfn2)的基因突變所引起，該粒線體融合蛋白 2 為一種粒線體融合及沿軸突運輸所需的蛋白質。在大多數情況下，CMT2A 係由以顯性負向方式作用的體染色體顯性誤義突變所引起。在極少數情況下，CMT2A 係由隱性功能喪失突變所引起。Mfn2 突變對背根神經節(DRG)中的下運動神經元及初級感覺神經元具有選擇性毒性。

【0141】開發一種基因療法，藉由過度表現 Mfn2 來恢復粒線體融合蛋白-2 的表現，以克服突變體 Mfn2 的顯性負向活性。AAV 基因治療技術用於將 Mfn2 表現匣轉移到神經元中。於一些具體實施例，Mfn2 表現匣含有經由連接子連結的 miRNA，其中 miRNA 經靶向以減弱(knock down)突變體(缺陷)Mfn2，以消除突變體 Mfn2 並提供正常的粒線體融合蛋白 2 蛋白質。治療物品的注

射係經由腦大池內(ICM)或靜脈內而遞送。AAV 的 ICM 遞送有效地靶向運動神經元及初級感覺神經元。使用具有經工程化的 Mfn2 基因之高度最適化用於在人類中表現的 Mfn2 表現匣，與具有高度改良的中樞神經系統(CNS)轉導的 AAV 殼體組合。

【 0142 】

實施例 1：CMT2A 載體策略

於 AAV 轉基因匣策略 1，吾人生產包含啟動子、內含子、經工程化的 Mfn2 cDNA 及 polyA 的 Mfn 表現匣。於 AAV 轉基因匣策略 2，吾人生產包含啟動子、內含子、經工程化的 Mfn2 cDNA 的 Mfn2 表現匣(其被工程化以最適化用於表現並對 miRNA 有抗性)、靶向內源性突變體 Mfn2 的 miRNA 及 polyA。此外，於 AAV 轉基因匣策略 2，鑑定一種用於在活體內有效表現 miRNA 及 cDNA 的構築體，其中該構築體包含突觸蛋白啟動子、cDNA(經工程化的 Mfn2)、連接子、miRNA(其中 miRNA 位於 cDNA 的 3'末端)、WRPE 強化子及 polyA(數據未顯示)。

【 0143 】為了減弱內源性 Mfn2 基因，檢查各種 miRNA 序列：檢查 miR238、miR1202、miR1518、及 miR2282 等，其未顯示數據。於西方印漬術分析，以活體外 Block-iT 質體(ThermoFisher)轉染大鼠 B104 細胞，該質體含有 CMV 啟動子、emGFP 轉基因、miRNA 的選殖位及 TK polyA。使用 Block-iT 線上軟體設計

miRNA。轉染細胞並以殺稻瘟菌素(blasticidin)來選擇表現。存活細胞大多為 GFP 陽性，可確定整體轉染效率。72 小時後收取 B104 細胞並準備用於西方印漬術分析。西方印漬術係以針對 Mfn2 的抗體及作為裝載對照 (loading control) 的 b-肌動蛋白進行探測。圖 1A 及圖 1B 說明在靜脈內投予 AAV 媒介的 miRNA 遞送後，在 B6 小鼠的小鼠腦(圖 1A)及脊髓(圖 1B)中，藉由 qPCR 測量的內源性 Mfn2 RNA 之減弱。在投予後第 14 日對小鼠進行屍體剖檢，然後收取腦及脊髓組織並均質化。從樣品中萃取 RNA 並用於 qPCR，該 qPCR 使用針對 Mfn2 的 TaqMan 引子。檢查四個治療組(每組 N=5)：PBS、AAV9.PHP.eB.CB7.miR_NT (未靶向，劑量為 3×10^{11} GC)、AAV9.PHP.eB.CB7.miR_1518 (劑量為 3×10^{11} GC)、及 AAV9.PHP.eB.CB7.miR_1202 (劑量為 3×10^{11} GC)。在檢查的序列中，miR1518 顯示內源性 Mfn2 的最佳減弱。

【0144】圖 2A 至圖 2C 說明遞送 AAV 載體後 Mfn2 RNA 倍數表現，該載體包含大鼠 Mfn2 (rMfn2) cDNA 轉基因及 mR1518，其中 AAV 載體以 3×10^{11} GC 之劑量而靜脈內投予小鼠。在投予後第 14 日對小鼠進行屍體剖檢，然後收取腦及脊髓組織並均質化。從樣品中萃取 RNA 並用於 qPCR，該 qPCR 使用針對 Mfn2 的 TaqMan 引子。檢查兩個治療組(每組 N=5)：PBS 及 AAV9.PHP.eB.CB7.miR_1518+rMfn2。

【 0145 】

實施例 2：包含經工程化 Mfn2 轉基因與 miRNA 之表現匣的 AAV 載體的小鼠研究

在最初的研究中，野生型小鼠係靜脈內注射 3×10^{11} GC 之 AAV 載體，該 AAV 載體包含經工程化的大鼠 Mfn2(rMfn2)cDNA 核酸序列(SEQ ID NO: 12)及 miRNA 1518 (SEQ ID NO: 16)。檢查四個治療組(每組 N=5)：PBS、AAV9-PHP.eB.CAG.rMfn2 opt.link.rMfn2miR1518.WPRE.SV40、AAV9-PHP.eB.CB7.CI.rMfn2 opt.link.rMfn2miR1518.rBG、及 AAV9-PHP.eB.hSyn.PI.rMfn2opt.link.rMfn2miR1518.WPRE.bGH(其中載體基因體為 SEQ ID NO: 3 者)。注射後 14 日犧牲小鼠。收取腦及脊髓並均質化。從樣品中萃取 RNA 並用於 qPCR，該 qPCR 使用針對大鼠 Mfn2 經工程化的 cDNA 的 TaqMan 引子。圖 4 說明在 AAV 載體遞送經工程化的 rMfn2 cDNA 轉基因與 miR1518 之後，治療的小鼠脊髓中大鼠 Mfn2 (rMfn2) cDNA 表現之倍數表現的繪圖定量。

【 0146 】在另一檢查，野生型小鼠係靜脈內注射 3×10^{11} GC 之 AAV 載體，該 AAV 載體包含經工程化的人類 Mfn2 (hMfn2) cDNA 核酸序列(SEQ ID NO: 11)及 miRNA1693 (SEQ ID NO: 15)。檢查四個治療組(每組 N=5)：PBS、AAV9-PHP.eB.CAG.hMfn2opt.link.hMfn2miR1693.WPRE.SV40、AAV9-PHP.eB.CB7.CI.hMfn2opt.link.hMfn2miR1693.rBG、AAV9-PHP.eB.hSyn.PI.hMfn2opt.link.hMfn2miR1693.WPRE.SV40 (其中載體基因體

為 SEQ ID NO: 1 者)。注射後 14 日犧牲小鼠。收取腦及脊髓並均質化。從樣品中萃取 RNA 並用於 qPCR，該 qPCR 使用針對人類 Mfn2 經工程化的 cDNA 的 TaqMan 引子。圖 5 說明在 AAV 載體遞送經工程化的 hMfn2 cDNA 轉基因與 miR1693 之後，治療的小鼠脊髓中人類 Mfn2 (hMfn2) cDNA 表現之倍數表現的繪圖定量。

【0147】於檢查人類及大鼠 Mfn2 表現的研究兩者中，在遞送的 AAV 載體中，檢查各種啟動子，例如 CB7、CAG 及神經元特異性人類突觸蛋白 (human synapsin) (hSyn)。包含 hSyn 啟動子的 AAV 載體在脊髓組織中表現出最高的 Mfn2 cDNA 倍數表現。

【0148】此外，使用建立的程序，檢查從 AAV 載體加工的成熟 miRNA 的總量，該程序揭示於 Chen et al., Real-time quantification of micr-RNAs by stem-loop RT-PCR, Nucleic Acid Research, 2005, 33 (20)。野生型小鼠係靜脈注射 3×10^{11} GC 之 AAV 載體或對照 PBS。治療組 1 的 AAV 基因體載體包含 hMfn2 與 miR1693 AAV 的表現匣 (SEQ ID NO: 1)，該表現匣進一步包含經工程化的人類 Mfn2 (hMfn2) cDNA 核酸序列 (SEQ ID NO: 11)，經由連接子 (SEQ ID NO: 17) 連結至 miRNA1693 (SEQ ID NO: 15)。治療組 2 的 AAV 載體包含 rMfn2 與 miR1518 的表現匣 (SEQ ID NO: 3)，進一步包含經工程化的大鼠 Mfn2 (rMfn2) cDNA 核酸序列 (SEQ ID NO: 12)，經由連接子 (SEQ ID NO: 17) 連結至 miRNA1518 (SEQ ID NO: 16)。治療後，於注射後 14 日犧牲小鼠。收取腦及脊髓

並均質化。從樣品中萃取 RNA 並用於訂製的 miRNA 分析。該訂製的 miRNA 分析由用於創造 cDNA 的訂製的主幹-環圈 RT 引子、以及用於擴增 miRNA 的訂製的小 RNA：主幹環圈 TaqMan 引子所組成。此分析測量從載體加工的成熟 miRNA 的總量。圖 6A 及圖 6B 說明於小鼠靜脈內遞送後從 AAV 載體加工的成熟 miRNA 的總量。

【0149】總而言之，hSyn 啟動子 (SEQ ID NO: 6) 似乎為最大脊髓表現的最佳啟動子。AAV 載體包含「連接」(對於「連接子」)，其為 cDNA 及 miRNA 之間的重要的間隔子，為適當的 miRNA 切除及 RNAi 加工所必需。由於易於選殖而嘗試較小的連接子但為無功能的。qPCR 分析暗示當與靶向內源性突變體 Mfn2 的 miRNA 共同遞送時，大鼠 Mfn2 及人類 Mfn2 之充分表現。

【0150】
實施例 3.AAV 載體在 HEK293 及 Mfn2-Null 細胞中的轉染效率

於此研究，吾人生產並檢查各種包含人類 Mfn2 經工程化的序列之轉基因的 AAV 載體，如下表 3 所列。

【0151】表 3

AAV 載體	SEQ ID NO (AAV 載體)
CB7.CI.hMfn2.GA.RBG	79
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG	77
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG	75
CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40	73
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40	71
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40	69

【0152】 Mfn2 Null MEF 為一種缺乏 Mfn2 的小鼠細胞株，用於檢測載體中 Mfn2 cDNA 的表現。此外，HEK293 細胞為一種表現 Mfn2 的人類細胞株，用於以上述的載體進行轉染。在轉染後，經由西方印漬術分析細胞溶胞產物的整體 Mfn 蛋白質表現，經由 qPCR 分析內源性 Mfn2 減弱，並經由 qPCR 分析 miRNA 的存在。以 Wes 平台進行西方印漬術定量。Mfn2-null MEF 細胞中 Mfn 表現的分析僅量化載體產生的 Mfn2 蛋白質，因為細胞株缺乏 Mfn2 表現。對於 qPCR miRNA 檢測分析，使用主幹-環圈引子進行成熟 miRNA 的反轉錄 (RT)，使用 TaqMan 探針組擴增成熟 miRNA 以顯示 miRNA 的表現及/或加工。對於用於測量內源性人類 Mfn2 減弱的 qPCR，使用 TaqMan 引子/探針組，其區分 HEK293 內源性 Mfn2 及載體 Mfn2。對於基於 Wes 的 Mfn2 蛋白質定量及使用對 Mfn2 抗體，該抗體與內源性及載體產生的 Mfn2 發生交叉反應，因此探測整體 Mfn2 過度表現。

【0153】圖 7 顯示以包含 CB7 啟動子的各種載體轉染後，Mfn2-null MEF 細胞株中 Mfn2 的表現水準。此外，圖 7 顯示在以下列轉染後，測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2) 表現的西方印漬術訊號的繪圖定量：
CB7.CI.hMfn2.GA.WPRE.RBG (p6165) ；
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG (p6166) ；
CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG (p6167)。定量係繪圖為表現百分比；藉由流式細胞術測量並藉由目視觀

察近似確定轉染效率為約 40%。對於探測 Mfn2 表現水準的西方印漬術(數據未顯示)，使用 b-肌動蛋白作為裝載對照(Mfn2：裝載 2 μ g；b-肌動蛋白：裝載 0.27 μ g；用於量化的曝光 4 秒)。

【0154】圖 8 顯示以包含 CAG 啟動子的各種載體轉染後，Mfn2-null MEF 細胞株中 Mfn2 的表現水準。此外，圖 8 顯示在以下列轉染後，測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2) 表現的西方印漬術訊號的繪圖定量：
CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40 (p6168) ；
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40 (p6169) ；
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40 (p6170) 。
定量係繪圖為表現百分比；藉由流式細胞術測量並藉由目視觀察近似確定轉染效率為約 40%。對於探測 Mfn2 表現水準的西方印漬術，使用 b-肌動蛋白作為裝載對照(Mfn2：裝載 2 μ g；b-肌動蛋白：裝載 0.27 μ g；用於量化的曝光 4 秒)。

【0155】圖 9A 及圖 9B 顯示以包含 CB7 或 CAG 任一啟動子的各種載體轉染後，HEK293 細胞株中 Mfn2 的表現水準。觀察到高轉染效率。圖 9A 顯示以包含 CB7 啟動子的各種載體 (CB7.CI.hMfn2.GA.WPRE.RBG (p6165)；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG (p6166)；CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG(p6167)) 轉染後，藉由 qPCR 的測量並繪圖為倍數表現之 HEK293 細胞中內源性 Mfn2 減弱。圖 9B 顯示以包含 CAG 啟動子的各種載體 (CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40 (p6168) ；

CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40 (p6169) ;
CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40 (p6170))
轉染後，藉由 qPCR 的測量並繪圖為倍數表現之 HEK293
細胞中內源性 Mfn2 減弱。

【0156】圖 10 顯示以包含 CB7 啟動子的各種載體轉
染後，HEK293 細胞株中 Mfn2(內源性 Mfn2 及由載體表
現的 Mfn2)的表現水準。此外，圖 10 顯示在以下列轉染
後，測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2)表現的西方印漬術訊
號的繪圖定量：CB7.CI.hMfn2.GA.WPRE.RBG
(p6165) ； CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.RBG
(p6166) ； CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG
(p6167)。定量係繪圖為表現百分比；轉染效率被確定
為約 95%。對於探測 Mfn2 表現水準的西方印漬術，使
用 b-肌動蛋白作為裝載對照(Mfn2：裝載 0.78 μ g；b-肌
動蛋白：裝載 0.78 μ g；用於量化的曝光 4 秒)。

【0157】圖 11 顯示以包含 CAG 啟動子的各種載體轉
染後，HEK293 細胞株中 Mfn2(內源性 Mfn2 及由載體表
現的 Mfn2)的表現水準。此外，圖 11 顯示在以下列轉染
後，測量粒線體融合蛋白-2 (Mfn2)表現的西方印漬術訊
號的繪圖定量：CAG.CI.hMfn2.GA.WPRE.SV40
(p6168)；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR1518.WPRE.SV40
(p6169)；CAG.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.WPRE.SV40
(p6170)。定量係繪圖為表現百分比；轉染效率被確定
為約 95%。對於探測 Mfn2 表現水準的西方印漬術，使
用 b-肌動蛋白作為裝載對照(Mfn2：裝載 0.78 μ g；b-肌
動蛋白：裝載 0.78 μ g；用於量化的曝光 4 秒)。

【0158】圖 12A 至圖 12C 顯示以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的各種載體轉染後，藉由 qPCR 測量的於 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miRNA (miR1518 或 MiR538) 的表現水準。圖 12A 顯示在以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的載體轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的在 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miR1518 的表現水準的比較。圖 12B 顯示在以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的載體轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的在 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miR538 的表現水準的比較。圖 12C 顯示在以包含 CB7 或 CAG 啟動子任一者的載體轉染後，藉由 qPCR 測量並繪圖成倍數表現的在 Mfn2-null MEF 細胞株中成熟 miR1518 及 miR538 的表現水準的比較。

【0159】

實施例 4. 於 MFN2^{R94Q} 小鼠 (C57BL/6J-Tg(Thy1-MFN2*))，一種夏馬杜三氏病第 2A 型模式) 中有效之基因療法載體

七 (7) 隻半合子的雄性 MFN2^{R94Q} 小鼠 (C57BL/6J-Tg(Thy1-MFN2*)) 44BalO/J，JAX 庫存 # 029745)、兩 (2) 隻雄性 C57BL/6J 小鼠 (JAX 庫存 # 000664)、及十八 (18) 隻雌性 C57BL/6J 小鼠 (JAX 庫存 # 000664) 被轉移至吾人於 Bar Harbor, ME 的活體內研究實驗室。小鼠被加上耳部切口用於鑑別，進行基因型確認，並以每籠 3 隻小鼠的密度 (兩隻雌性及一隻雄性) 飼養在單獨且主動通風的聚磺酸鹽籠中，並以 HEPA 過濾空氣。動物房完全用人

造螢光燈照明，具有受控的 12 小時光/暗週期(上午 6 點至下午 6 點光)。動物房的正常溫度及相對濕度範圍分別為 $22\pm4^{\circ}\text{C}$ 及 $50\pm15\%$ 。動物房設置為每小時 15 次空氣交換。隨意地提供酸化至 2.5 至 3.0 的 pH 之過濾的自來水、以及正常的嚙齒動物飼料。小鼠被用作種畜飼養，以在兩輪育種中增加研究群組為 10 隻雄性 C57BL/6J 小鼠及 60 隻雄性半合子 MFN2^{R⁹⁴Q} 小鼠。在 P0-P1，共有七十(70)隻小鼠被編入研究。

【 0160 】 表 4.

組	#小鼠	基因型	化合物	投劑時年齡	投劑途徑	投劑頻率	組織收集
1	10	WT	媒劑	P0-P1	ICV 注射	單劑	脊髓；脛神經
2	10	HEMI	媒劑				
3	10	HEMI	載體 1				
4	10	HEMI	載體 2				
5	10	HEMI	載體 3				
6	10	HEMI	載體 4				
7	10	HEMI	載體 5				
總計	70						

【 0161 】 圖 13A 至圖 13F 顯示小鼠模式的特性分析。圖 13A 顯示小鼠基因型的示意圖示。圖 13B 顯示小鼠表現型特性分析，其特徵在於藉由西方印漬術測量的腦中內源性及 FLAG 標籤的 MFN2 的相對表現水準。圖 13C 顯示小鼠表現型特性分析，其特徵在於藉由西方印漬術測量的脊髓中內源性及 FLAG 標籤的 MFN2 的相對表現水準。圖 13D 顯示 CMT2A 小鼠模式(nTg、MFN2^{WT}及 MFN2^{R⁴⁹Q})中，小鼠的測量體重(g)。圖 13E 顯示藉由掉落時間(latency to fall)(秒)測量的小鼠表現型特性分析。圖 13F 顯示藉由握力(g)測量的小鼠表現型特性分析。

【0162】於此研究，根據上表 4，藉由新生兒 ICV 注射，在 P0-P1 對小鼠投劑。每週測量小鼠體重。於 15-17 週齡，於每隻小鼠進行下列測試：滾輪運動測試 (rotarod test)、握力測試、視覺敏銳度測試 (visual acuity test)(視動反應 (optokinetic response))、選擇性程序 (optional procedure)。此外，進行複合肌肉動作電位 (CMAP) 測試。於 17-19 週齡，將小鼠屍體剖檢並收集下列組織：脊髓、脛神經。將收集的組織固定在 EM 固定劑並包埋於環氧樹脂中。從每個組織切下一個切片。切片以甲苯胺藍染色。掃描染色的載玻片。對於每個掃描切片，確定以下參數：軸突大小分布、軸突計數、軸突面積。然後對於每組繪圖為軸突面積分布。

【0163】在藥理學研究中，對於第一群組，每組使用 4-7 隻小鼠。此研究為一項盲測研究。簡而言之，投予候選 AAVhu68 載體的治療組中使用雄性 MFN2^{R94W} 小鼠。新生兒 ICV 注射用作投予途徑，雙側投予劑量為 3 μ L 的 7.5×10^{10} GC AAV 載體。每週測量重量。於 6 週時測量握力。圖 14A 及圖 14B 顯示於 MFN2^{R94Q} 小鼠 (研究組：G1-野生型 (WT) 小鼠，PBS；G2-MFN2^{R94Q} 小鼠，PBS；G3-MFN2^{R94Q} 小鼠，CB7.MFN2；G4-MFN2^{R94Q} 小鼠，CB7.MFN2.miR1518；G5-MFN2^{R94Q} 小鼠，CB7.MFN2.miR538；G6-MFN2^{R94Q} 小鼠，CAG.MFN2.miR1518；G7-MFN2^{R94Q} 小鼠，CAG.MFN2.miR538) 的前導藥理研究結果。圖 14A 顯示在小鼠組 G1 至 G7 中測量的體重結果 (繪圖為 (g))。圖

14B 顯示在小鼠組 G1 至 G7 中測量的存活結果(繪圖為第 0 至 50 日的存活概率)。圖 15 顯示 MFN2^{R94Q} 小鼠中前導藥理學研究的握力結果繪圖為(kg))。

【 0164 】

實施例 5.將 hMfn2 及靶向內源性 hMfn2 的 miR 共同投予之 AAV 載體

於此研究，經由腦大池內(ICM)注射，將 AAVhu68.CB7.CI.hMfn2.miR538.RBG(亦稱為 AAVhu68.CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG)載體投予恆河獼猴(*Rhesus Macaque*)(*Macaca mulatta*)或食蟹獼猴(*Cynomolgus Macaque*)(非人類靈長類動物(NHP))，利用腦脊髓液(CSF)以實現自單次注射的廣泛分布。

【 0165 】 試驗物。於此研究使用 AAVhu68.CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG。最終研究報告中將包括驗證試驗物的品質及純度的分析證書。

製備。在進行稀釋之前，由受過訓練的 GTP 人員執行及驗證試驗物稀釋的計算。於注射日由指定人員進行試驗物稀釋。由另外的指定人員驗證試驗物稀釋。將經稀釋的試驗物保持在濕冰上或在 2-8°C 多至 8 小時直到注射。

【 0166 】 歸檔樣品。試驗物及對照物的歸檔樣品由指定人員保留，並儲存於≤-60°C下。

【 0167 】 試驗物分析。指定人員負責確保試驗物符合釋出要求。由 Vector Core 提供分析證書以包含在研究記錄中。記錄所有結果。提供數據的副本以包含在研究筆記中。

【0168】未使用的試驗物。提供給 NPRP 人員的未使用的試驗物在返回歸檔之前儲存在濕冰上。歸檔樣品儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

【0169】試驗系統。於此研究中使用恆河獼猴 (*Macaca mulatta*) 或食蟹獼猴 (*Cynomolgus Macaque*)。

測試系統選擇的正當性判斷。此研究涉及用於 CNS 疾病的 miRNA 試驗物(載體)的腦大池內(ICM)遞送。NHP 中 CNS 的尺寸作為吾人臨床目標族群的代表性模式。此研究提供在恆河獼猴中 ICM 注射後試驗物的投予相關的藥物動力學及安全性的劑量及途徑的關鍵數據。於此研究，使用 2 隻動物。NHP 選自雄性或雌性，4-5 歲，約 3-10 公斤。

【0170】馴化期及照護。檢疫及馴化、動物飼養及照護均按照標準作業程序(SOP)程序進行。獼猴被關在 CTRB 的不銹鋼籠子中。由 DVR 人員提供飼養及照護。

【0171】對研究動物提供經認證的靈長類動物飲食 5048 或適用於非人類靈長類動物的類似飲食。水可取自自動給水系統，所有獼猴皆可隨意取水。由獸醫人員監測獼猴可能需要干預的任何情況。儘可能諮詢研究主持人以確定適當的行動方針。然而，於緊急情況(包括可能的安樂死)，由獸醫人員根據需要做出決定，並儘快通知研究主持人。提供食物獎勵、同種互動及操作性特徵(manipulanda)形式的豐富內容。動物被維持在由建築物自動化控制的 12 小時光/暗循環中。所欲的溫度範圍為 $64-84^{\circ}\text{F}$ ($18-29^{\circ}\text{C}$)。儘最大可能保持溫度在此範圍

內。所欲的濕度範圍為 30-70%。儘最大可能保持濕度在此範圍內。每隻獼猴先前已使用唯一的識別號進行識別，該識別號係由供應商紋在其胸前。兩隻動物皆包括於單一治療組中。

【0172】研究設計程序。於此研究中使用兩隻恆河獼猴。兩隻獼猴皆包括於單一治療組中。在第 0 日投劑前從所有獼猴收集基線血液樣品，包括 CSF、CBC、血清化學及基線生物標記(biomarker)評估。亦從每隻獼猴身上得到生命徵象。

【0173】於第 0 日，使獼猴鎮靜；在投予試驗物之前記錄體重及生命徵象。

【0174】對於試驗物(AAVhu68.CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG)投予，根據 SOP 對獼猴進行麻醉並投予適當的鎮痛劑。經由枕骨下穿刺進入腦大池將試驗物投劑至獼猴。於腦大池內(ICM)穿刺程序，將麻醉的獼猴從動物保定室轉移到手術室，並以側臥位放置在 X 射線台上，頭部向前彎曲以收集 CSF 並投劑到腦大池內。對注射部位無菌地進行準備。使用無菌技術，將 21-27 號、1-1.5 英寸昆克氏(Quincke)脊髓穿刺針(Becton Dickinson)推進枕骨下空間，直到觀察到 CSF 流動。在投劑前收集 1 mL CSF 用於基線分析。穿過的解剖結構包括皮膚、皮下脂肪、硬膜外腔、硬腦膜及寰枕筋膜。針頭指向大池更寬的上間隙，以避免血液污染及潛在的腦幹損傷。使用螢光鏡(OEC9800 C-Arm, GE)，通過脊髓腔攝影驗證針穿刺的正確位置。CSF 收集後，將小

口徑 T 型延長導管連結到脊髓穿刺針以促進碘苯六醇 (Iohexol)(商標名：Omnipaque 180 mg/mL, General Electric Healthcare)造影劑及試驗物的投予。通過導管及脊髓穿刺針投予最多 2 mL 之碘苯六醇。在經由 CSF 返回及藉由螢光透視檢查觀察針頭來驗證針頭位置後，將含有試驗物的注射器連結到含有試驗物的撓性接頭並以大約 2 mL/分鐘的速度注射。投予後，取下針頭，對穿刺部位施加直接壓力。獼猴接受 3×10^{13} GC (3.33×10^{11} GC/g 腦)劑量之試驗物 (AAVhu68.CB7.CI.hMfn2.GA.LINK.miR538.RBG)的 ICM 投予。每隻獼猴注射的總體積為 1.0 mL。劑量及體積記錄在研究記錄中。

【0175】對於觀察，在研究時間表(表 5)中列出的選定的時間點，監測獼猴的除了每日觀察之外的其它參數，包括但不限於生命徵象、臨床病理、血清及 CSF 的收集。

【0176】對於抽血，動物從周圍靜脈採血，用於一般安全研究小組，其包括：對 AAV 的中和抗體、血液學、臨床化學。採血程序依據 SOP 進行。收集另外的血液樣品以測量生物標記(藥效學標記)的變化。全血細胞計數、血清化學、生物標記、對 AAV 的中和抗體之抽血頻率係如研究步驟準則的研究時間表(表 5)中所定義。

【0177】對於抗體分析(對 AAV 的中和抗體、血清)，經由過紅頭管(帶或不帶有血清分離器)收集血液樣品(最多 2 mL)，使其凝結並離心。研究人員將血清分離。對於每個抗體時間點，血清被分成兩個單獨標記的

微量離心管(標識有研究編號、動物 ID、組編號、時間點、中和抗體及日期)，並儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

【0178】對於細胞計數及分類，將用於具有分類及血小板計數的全血細胞計數之血液樣品收集在經標識的紫頭管中(研究編號、動物 ID、組編號、時間點、CBC 及收集日期)，最多 2 mL 並儲存於 4°C 。血液隔夜被送到 Antech Diagnostics, Inc.(以用於紫頭管的冰袋)，用於血球計數，包括血小板計數及分類。分析下列參數：紅血球計數、血紅素、紅血球容積比、血小板計數、白血球計數、白血球分類、平均紅血球體積(MCV)、平均紅血球血紅素(MCH)、紅血球形態。

【0179】對於臨床化學，將血液樣品(最多 2 mL)收集在經標識的紅頭管中，使其凝結並離心。分離血清，放入經標識的微量離心管(研究編號、動物 ID、組編號、時間點、化學及收集日期)，並在冰袋上隔夜送至 Antech Diagnostics, Inc.用於分析。分析下列參數：鹼性磷酸酶、膽紅素(總量)、肌酸酐、 γ -麩胺醯轉胺酶、葡萄糖、血清丙胺酸胺基轉移酶、血清天冬胺酸胺基轉移酶、白蛋白、白蛋白/球蛋白比(計算值)、醛縮酶(aldehyde)、血尿素氮、鈣、氯、肌酸酐激酶及同功型、球蛋白(計算為總蛋白減去白蛋白=球蛋白)、乳酸脫氫酶、磷、無機物、鉀、鈉、總蛋白。

【0180】對於生物標記分析，經由紅頭管(帶或不帶有血清分離器)收集血液樣品(最多 2 mL)，使其凝結並離心。研究人員將血清單離。然後將血清分成 2 個單獨

標記的微量離心管(研究編號、動物 ID、組編號、時間點、血清生物標記及收集日期)。樣品儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

【 0181 】 對於 PBMC/ 組織淋巴細胞單離及 ELISPOT，將血液樣品(6-10 mL)收集到肝素鈉(綠頭管)中，並根據 SOP 單離 PBMC。採血管標識有研究編號、動物 ID、組編號、物種、時間點、PBMC 及收集日期。根據 SOP 從脾臟、肝臟及骨髓中收取淋巴細胞。根據 SOP 進行殼體及轉基因 T 細胞反應的 ELISPOT。

【 0182 】 對於 CSF 收集，最多收集 1 mL CSF 用於分析及生物標記評估。對於包括研究第 0 日在內的所有 CSF 收集時間點，根據 SOP 對獼猴進行麻醉，並從動物保定室轉移到手術室，在手術室將彼等以側臥位放置，頭部向前彎曲以收集 CSF。剃除後頭部及頸椎的毛。觸診顱骨後的枕骨隆凸及寰椎(C1)的椎翼。對注射部位無菌地進行準備。使用無菌技術，將 21-27 號、1-1.5 英寸昆克氏脊髓穿刺針(BD)或 21-27 號針推進腦大池，直到觀察到 CSF 流動。穿過的解剖結構包括皮膚、皮下脂肪、硬膜外腔、硬腦膜及寰枕筋膜。針頭指向大池更寬的上間隙，以避免血液污染及潛在的腦幹損傷。收集 CSF 後，取出針頭並對穿刺部位施加直接壓力。樣品收集在標識有研究編號、動物 ID、組編號、時間點、CSF 及收集日期的無菌 1.5 mL Eppendorf 管中。將樣品置於濕冰上，並立即予以等分用於 CSF 臨床病理學(血球計數及分類以及總蛋白定量)及 CSF 生物標記。以研究步驟準則的研究時間表(表 5)中列出的頻率收集 CSF。

【0183】對於 CSF 臨床病理學，將 CSF (0.5 mL) 予以等分至紫頭管中 (標識有研究編號、動物 ID、組編號、時間點、CSF 臨床路徑及收集日期)。隔夜 CSF 被送到 Antech Diagnostics, Inc. (在帶有冰袋的紫頭管中)，用於血球計數及分類以及總蛋白定量。

【0184】對於 CSF 生物標記，將收集在 2 個無菌 1.5 mL Eppendorf 管中的所有剩餘的 CSF (未用於 CSF 臨床路徑 - 最多 1 mL) 以 800g 離心 5 分鐘。研究人員將上清液單離並予以等分至冷凍小管中 (標識有研究編號、動物 ID、組編號、時間點、CSF 生物標記及收集日期)。於濕冰上運輸樣品。

【0185】此外，於選定進行監測的所有日期中，每隻獼猴皆被鎮靜、稱重並監測其呼吸及心率，並在採集任何血液樣品之前經由直腸溫度計測量體溫。用於 PBMC 單離的血液樣品係在室溫下運輸。其它樣品係於濕冰上運輸。

【0186】根據下表 5 中描述的時間表進行研究。

【 0187 】 表 5.

研究時間點	樣品/程序	N
研究第 0 天	體重、體溫、呼吸速率、心率	2
	生物標記(基線) (RC)	2
	CSF (基線) (CV + LT)	2
	神經學監測	2
	臨床路徑 (基線) (LT、RC)	2
	神經傳導速度測試	2
	抗體 (基線) (RC)	2
	免疫學 (基線) (PBMC) (GT)	2
	ICM 載體 3×10 ¹³ GC	2
研究第 7 日 (± 2 日)	體重、體溫、呼吸速率、心率	2
	生物標記 (RC)	2
	臨床路徑 (LT、RC)	2
研究第 14 日 (±2 日)	體重、體溫、呼吸速率、心率	2
	生物標記 (RC)	2
	CSF (CV + LT)	2
	臨床路徑 (LT、RC)	2
研究第 21 日 (±2 日)	體重、體溫、呼吸速率、心率	2
	生物標記 (RC)	2
	臨床路徑 (LT、RC)	2
研究第 28 日 (±2 日)	體重、體溫、呼吸速率、心率	2
	生物標記 (RC)	2
	臨床路徑 (LT、RC)	2
	神經學監測	2
	神經傳導速度測試	2
終點 第 35 日 (± 2 日)	體重、體溫、呼吸速率、心率	2
	神經學監測	2
	生物標記 (RC)	2
	CSF (CV + LT)	2
	臨床路徑 (LT、RC)	2
	抗體 (RC)	2
	免疫學 (PBMC) (GT)	2
	神經傳導速度測試	2
	屍體剖檢	2
	要採集的組織(附錄 A)	2

【0188】當對獼猴進行屍體剖檢時，根據 SOP 收集下表 6 中描述的組織。

【0189】表 6.在屍體剖檢時收集的組織，用於組織病理學及生物分布

器官	組織病理學		生物分布		淋巴細胞單離	
	Req.	Coll.	Req.	Coll.		
胸部紋身	√					
上行升主動脈(近端)	√		√			
骨髓，肋骨	√					
骨髓，股骨			√		√	
右腦半球 ^A	√					
額葉皮質 ^A			√			
頂葉皮質 ^A			√			
顳葉皮質 ^A			√			
枕葉皮質 ^A			√			
海馬迴 ^A			√			
小腦 ^A			√			
延腦 ^A			√			
腦神經 IX、X、XI	√ R&L					
背根神經節，頸椎 ^B	√		√			
背根神經節，胸椎 ^B	√		√			
背根神經節，腰椎 ^B	√		√			
副睪	√ 右		√ 左			
眼	√ 右		√ 左			
膽囊	√		√			
心臟 ^C	√		√ 左心室			
腎臟，右	√		√			
腎臟，左	√		√			
肝臟，左葉	√		√		√	
肝臟，右葉	√		√			
肺臟，左	√		√			
肺臟，右	√		√			

器官	組織病理學		生物分布		淋巴細胞單離	
	Req.	Coll.	Req.	Coll.		
淋巴結，深頸			√			
淋巴結，下頷	√		√			
淋巴結，腸繫膜	√		√			
肌肉，股四頭肌	√ 右		√ 左			
坐骨神經	√ R&L		√ 左			
脛神經	√ R&L		√ 左			
腓神經	√ R&L		√ 左			
近端正中神經	√ R&L		√ 左			
遠端正中神經	√ R&L					
橈神經	√ R&L		√ 左			
腓腸神經	√ R&L		√ 左			
尺神經	√ R&L		√ 左			
視神經(CN II)	√ 右		√ 左			
卵巢	√ 右		√ 左			
胰臟	√		√			
腦下垂體	√		√			
有乳腺的皮膚	√					
注射部位	√					
脊髓，頸椎 ^D	√		√			
脊髓，胸椎 ^D	√		√			
脊髓，腰椎 ^D	√		√			
脾臟	√		√		√	
睪丸	√ 右		√ 左			
胸腺	√		√			
甲狀腺(有副甲狀腺)	√ 右		√ 左			
三叉神經節	√ 右		√ 左 ^E			
肉眼病變(若有) ^F	√		√			

√=收集及處理組織用於指定的檢測，Req.=步驟準則要求，

Coll.=被收集，N/A=不適用

縮寫：L，左；R，右

A. 整個大腦將被收集起來，然後沿正中矢狀面分成兩半。整個右半腦將置於 10% 中性緩衝福爾馬林中，用於組織病理學檢查並依據「Pardo et al., 2012, Technical Guide for Nervous System Sampling of the Cynomolgus Monkey for General Toxicity Studies, Toxicologic Pathology 40: 624-636」進一步修剪及加工。用於生物分布的樣品將從左半球收集並儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

B. 至少 3 個頸椎、3 個胸椎及 3 個腰椎的背根神經節將被取樣並固定在三個組織盒中，用於組織病理學(頸椎、胸椎、腰椎)。此外，3 個對側頸椎背根神經節、3 個對側胸椎背根神經節及 3 個對側腰椎背根神經節將被採樣，並在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下冷凍，用於生物分布。

C. 心臟部分應包括左右心室(帶房室瓣)及室間隔(帶瓣膜)。

D. 每個脊髓將分為頸椎、胸椎及腰椎節段，分別標識為 C、T 或 L。每個脊髓節段將分為三個部分。該 3 個 C、T 或 L 部分將分別編號為 1-3。自每隻動物將產生總共 9 個脊髓切片，編號為 C1-3、T1-3 及 L1-3。自每個脊髓節段，第 1 切片(C1、T1、L1)將用於組織病理學分析。自每個脊髓節段，第 2 切片(C2、T2、L2)將用於生物分布分析(RNA 及蛋白質分析，2 管)。自每個脊髓節段，第 3 切片(C3、T3、L3)將被福爾馬林固定及石蠟包埋，用於 LCM。

E. 三叉神經部分將被收集用於可能的職業衛生暴露，並保存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

F.將不會收集組織病理學不適合的於屍體剖檢進行的肉眼觀察結果(例如，液體、纏結的毛、解剖部位缺失)。

【 0190 】

實驗評估：觀察

對於生存力檢查(籠內)，對獼猴藉由每日目視觀察一般外觀、毒性症狀(可能包括但不限於神經性症狀或嗜睡、痛苦及行為變化)進行監測。此係由人員根據SOP進行。獸醫及研究主持人會收到任何異常情況的通知。只有在獸醫及研究主持人批准後才能進行治療，除非在危及獼猴的緊急情況下、或若無法及時聯繫二級獸醫及研究主持人時人道地犧牲獼猴。

【 0191 】發現死亡或由於瀕死狀態而被安樂死的獼猴，係以與最終犧牲的獼猴相同的方式評估。將收集一套完整的組織並記錄任何肉眼病變。

【 0192 】此外，所有獼猴在每次麻醉時都要進行目視檢查。在屍體剖檢時，檢查獼猴的肉眼異常。記錄所有變化。獼猴在研究開始時、屍體剖檢時以及彼等被鎮靜的每個時間點進行稱重。

【 0193 】未監測食物消耗。對獼猴隨意地供給水，且給予含有豐富食物的標準飲食。

【 0194 】於選定的監測日期，根據SOP進行感覺神經傳導研究。

【 0195 】對於神經學檢查，在選定的監測日進行非人類靈長類動物神經學評估。神經學評估分為5個部

分：精神狀態、姿勢及步態、本體感覺、腦神經及脊髓反射。

【0196】對於死後分析，對所有獼猴進行大體死後檢查，包括在瀕死狀態下安樂死或發現死亡的獼猴。記錄所有異常觀察。

【0197】由於此研究需要對動物進行持續評估，因此屍體剖檢時間是在較晚的時間點確定的。任何意外死亡的動物都會儘快進行屍體剖檢。對於所有計劃外死亡，對完整列表的組織進行臨床病理學、廣泛的大體病理學及組織病理學，這些組織係在研究病理學家的裁量下收集。其它分析(免疫反應等)亦適當地被包括在內，以試圖確定可能的死因。如表 6 中所列，對所有動物收集組織。將不會收集組織病理學不適合的於屍體剖檢進行的大體觀察結果(例如，液體、纏結的毛、解剖部位缺失)。

【0198】存活到研究期結束的獼猴將被安樂死。首先將獼猴鎮靜，然後根據 SOP 實施安樂死。死亡係藉由沒有心跳及呼吸而確認。獼猴可能會被放血以幫助確保死亡。

【0199】所有組織均被保存，列於表 6 中。藉由放置在 10%中性緩衝福爾馬林中而將組織固定，用於石蠟包埋。用於組織病理學檢查的眼睛在石蠟包埋之前，在改良的戴維森氏溶液(modified Davidson's solution)中固定。

【0200】對於生物分布分析，將表 6 中每個組織的一切片儘快冷凍至 -80°C 。在研究主持人的裁量下，從組織中萃取 DNA，並根據 SOP 藉由定量 PCR 評估載體生物分布。

【0201】對於組織病理學分析，在研究主持人的裁量下，根據 SOP 對表 6 中的一個子集或所有組織以蘇木精及伊紅 (H&E) 染色。在研究病理學家的裁量下可採用另外的程序及/或其它染色以識別/闡明組織學特徵，並記錄在最終報告中。

【0202】隨著研究的進展及適當的研究偏向及/或修正的發布，可對本步驟準則進行更改。未經研究主持人同意，不對步驟準則進行任何變更。在研究主持人必須實施步驟準則變更的情況下，此類變更具有書面授權。所有步驟準則修改均由研究主持人簽署。在實施之前，任何影響動物福祉的修改都需要由 IACUC 批准。

【0203】所有記錄實驗細節、研究程序及觀察的數據皆被記錄並保存在研究活頁簿中。研究完成後，所有報告及原始數據皆保存在檔案中。保存的標本及組織被歸檔及儲存。研究主持人確定最終處置此等材料的需要。

【0204】所有記錄實驗細節、研究程序及觀察的數據皆被 GTP 人員記錄並保存在專用筆記本及研究活頁簿中。

【0205】
對屍體剖檢收集的組織進行的分析

研究結束後，對獼猴進行屍體剖檢並收取用於完整病理學的組織(屍體剖檢收集的組織列表參見表 6)。

【0206】對於組織病理學，在研究主持人的裁量下，對用於組織病理學收集所列表的組織的全部或子集進行蘇木精及伊紅(H&E)染色。根據組織病理學發現，可採用其它適當的染色。

【0207】對於 Mfn2 cDNA 及 miRNA 表現，處理保存在福馬林及石蠟包埋(FFPE)中的組織切片，並對運動神經元進行雷射捕獲顯微解剖。將從脊髓單離出的運動神經元進行 RNA 萃取並進行 qPCR，使用特定引子組以確定 Mfn2 減弱水準、Mfn2 cDNA 表現水準及 miRNA 表現水準。Mfn2 的減弱及 Mfn2 cDNA 的表現亦可藉由 qPCR 及西方印漬術在組織樣品溶胞產物中進行評估。Mfn2 的免疫組織化學可對腦及脊髓組織進行。簡而言之，將石蠟切片與針對 Mfn2 蛋白質的抗體一起培育。

【0208】對於生物分布，將表 6 中每個組織的一切片儘快冷凍至 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。在研究主持人的裁量下，從組織中萃取 DNA，並根據 SOP 藉由定量 PCR 評估載體生物分布。

【0209】對於組織淋巴細胞單離及 ELISPOT，在研究主持人的裁量下，從脾臟及骨髓中收取淋巴細胞，並根據 SOP 進行殼體及轉基因 T 細胞反應的 ELISPOT。

【0210】本說明書中列出的所有專利、專利公開案及其它出版物，以及序列表文件「20-9141PCT SeqListing_ST25」皆藉由引用併入本文。2020 年 7 月

13 日申請的 US 臨時專利申請案 No. 63/051,336 及 2021 年 4 月 9 日申請的 US 臨時專利申請案 No. 63/173,045 係藉由引用併入本文。儘管已經參考特定較佳具體實施例描述本發明，但應當理解，可於不脫離本發明的精神的情況下進行修改。此種修改意圖落入所附申請專利權利的範疇內。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 賓州大學委員會(The Trustees of The University of Pennsylvania)

<120> 有用於治療夏馬杜三氏病之組成物

<130> UPN-20-9141. PCT

<140> TW 110125641

<141> 2021-07-13

<150> US 63/051, 336

<151> 2020-07-13

<150> US 63/173, 045

<151> 2021-04-09

<160> 90

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 4585

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 載體基因體Syn. PI. hMfn2opt. link. hMfn2 miR1693. WPRE. bGH

<220>

<221> 重複區域(repeat_region)

<222> (1)..(141)

<223> 5' ITR

<220>

<221> 啟動子

<222> (223)..(682)

<223> 人類突觸蛋白(hSynapsin)

<220>

<221> 內含子

<222> (694)..(826)

<223> Promega嵌合內含子

<220>

<221> misc_signal

<222> (857)..(862)

<223> 科札克(Kozak)

<220>

<221> CDS

<222> (863)..(3136)

<223> 經工程化的人類Mfn2

<220>

<221> misc_feature

<222> (3134)..(3139)

<223> Dbl終止密碼子

<220>
<221> misc_feature
<222> (3140).. (3229)
<223> 連接子

<220>
<221> misc_binding
<222> (3230).. (3252)
<223> 5' 側

<220>
<221> misc_feature
<222> (3253).. (3316)
<223> hMfn2 miR1693

<220>
<221> misc_binding
<222> (3317).. (3360)
<223> 3' 側

<220>
<221> misc_feature
<222> (3463).. (4045)
<223> WRPE

<220>
<221> misc_feature
<222> (4410).. (4455)
<223> 額外的AAV序列

<220>
<221> 重複區域
<222> (4456).. (4585)
<223> 3' ITR

<400> 1
ccttaattag gctgcgcgct cgctcgcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgcac 60
gcccggggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccg gccatgctac ttatctacgt 180
agccatgctc taggaagatc ggaattcgcc cttaagctag actcgagctg cagagggccc 240
tgcgatatgag tgcaagtggg ttttaggacc aggatgaggc ggggtggggg tgcctacctg 300
acgaccgacc ccgaccact ggacaagcac ccaaccccca ttccccaat tgcgcatccc 360
ctatcagaga gggggagggg aaacaggatg cggcgaggcg cgtgcgcaact gccagcttca 420
gcaccgcgga cagtgccttc gccccgcctt ggcggcgcgc gccaccgccg cctcagcact 480
gaaggcgcgc tgacgtcact cgccggtccc ccgcaaactc cccttcccgg ccaccttggt 540
cgcggtccgcg ccgcccggg cccagccgga ccgcaccacg cgaggcgga gatagggggg 600
cacgggcgcg accatctgcg ctgcggcgcc ggcgactcag cgctgcctca gtctgcggtg 660

ggcagcggag gagtcgtgtc gtgcctgaga gcggtaagta tcaaggttac aagacaggtt	720
taaggagacc aatagaaact gggcttgtcg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag	780
gcacctattg gtcttactga catccacttt gcctttctct ccacagtacg tagaattcac	840
gcgtgctagc accggtgccca cc atg agc ctg ctg ttc agc cgg tgc aac agc Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser 1 5 10	892
atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc gaa gtg aac gcc Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala 15 20 25	940
tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac ggc atc Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile 30 35 40	988
ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc acc ttc ctg gaa Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu 45 50 55	1036
gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa cag Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln 60 65 70	1084
gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg ggc atc tct gaa Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu 75 80 85 90	1132
gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc ggc cgg acc agc Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser 95 100 105	1180
aac ggc aag agc acc gtg atc aat gcc atg ctg tgg gac aaa gtg ctg Asn Gly Lys Ser Thr Val Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu 110 115 120	1228
ccc tct gga atc ggc cac acc acc aac tgc ttt ctg aga gtg gaa ggc Pro Ser Gly Ile Gly His Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly 125 130 135	1276
acc gac ggc cac gag gca ttt ctg ctg aca gag ggc tcc gag gaa aag Thr Asp Gly His Glu Ala Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys 140 145 150	1324
cgg agc gcc aag aca gtg aac cag ctg gcc cat gct ctg cac cag gat Arg Ser Ala Lys Thr Val Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp 155 160 165 170	1372
aag cag ctg cat gcc gga agc ctg gtg tcc gtg atg tgg ccc aat agc Lys Gln Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser 175 180 185	1420
aag tgc cct ctg ctg aag gac gac ctg gtg ctg atg gat agc ccc ggg Lys Cys Pro Leu Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly	1468

				190				195				200								
atc Ile	gat Asp	gtg Val 205	acc Thr	acc Thr	gaa Glu	ctg Leu	gac Asp 210	agc Ser	tgg Trp	atc Ile	gac Asp	aag Lys 215	ttc Phe	tgc Cys	ctg Leu				1516	
gac Asp	gcc Ala 220	gac Asp	gtg Val	ttc Phe	gtg Val	ctg Leu 225	gtg Val	gcc Ala	aat Asn	agc Ser	gag Glu 230	agc Ser	acc Thr	ctg Leu	atg Met				1564	
cag Gln 235	acc Thr	gag Glu	aag Lys	cac His 240	ttt Phe	ttc Phe	cac His	aag Lys	gtg Val	tcc Ser 245	gag Glu	cgg Arg	ctg Leu	agc Ser	aga Arg 250				1612	
ccc Pro	aat Asn	atc Ile	ttt Phe 255	atc Ile	ctg Leu	aac Asn	aac Asn	aga Arg	tgg Trp 260	gac Asp	gcc Ala	agc Ser	gcc Ala	agc Ser 265	gag Glu				1660	
ccc Pro	gag Glu	tat Tyr 270	atg Met	gaa Glu	gaa Glu	gtg Val	cgg Arg 275	cgg Arg	cag Gln	cat His	atg Met	gaa Glu 280	cgg Arg	tgc Cys	aca Thr				1708	
tcc Ser	ttt Phe 285	ctg Leu	gtg Val	gac Asp	gag Glu	ctg Leu	ggc Gly 290	gtc Val	gtg Val	gat Asp	aga Arg	tct Ser 295	cag Gln	gcc Ala	ggc Gly				1756	
gac Asp	aga Arg 300	atc Ile	ttc Phe	ttt Phe	gtg Val	tcc Ser 305	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu	gtg Val	ctg Leu 310	aac Asn	gcc Ala	cgg Arg	att Ile				1804	
cag Gln 315	aaa Lys	gcc Ala	cag Gln	gga Gly 320	atg Met	cct Pro	gaa Glu	ggc Gly	gga Gly	ggt Gly 325	gca Ala	ctg Leu	gcc Ala	gag Glu	gga Gly 330				1852	
ttt Phe	caa Gln	gtg Val	cgg Arg 335	atg Met	ttc Phe	gag Glu	ttc Phe	cag Gln 340	aac Asn	ttc Phe	gag Glu	cgg Arg	aga Arg	ttc Phe 345	gag Glu				1900	
gag Glu	tgc Cys	atc Ile 350	agc Ser	cag Gln	agc Ser	gcc Ala	gtc Val	aag Lys 355	acc Thr	aag Lys	ttc Phe	gag Glu 360	cag Gln	cat His	acc Thr				1948	
gtg Val	ogg Arg 365	gcc Ala	aag Lys	cag Gln	att Ile	gcc Ala 370	gaa Glu	gcc Ala	gtc Val	aga Arg	ctg Leu 375	atc Ile	atg Met	gac Asp	agc Ser				1996	
ctg Leu	cat His 380	atg Met	gcc Ala	gcc Ala	aga Arg	gag Glu 385	cag Gln	cag Gln	gtc Val	tac Tyr 390	tgc Cys	gag Glu	gaa Glu	atg Met	cgg Arg				2044	
gaa Glu 395	gag Glu	aga Arg	cag Gln	gac Asp 400	cgg Arg	ctg Leu	aag Lys	ttc Phe	atc Ile 405	gac Asp	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	gaa Glu 410	ctg Leu				2092	
ctg Leu	gcc Ala	cag Gln	gac Asp 415	tac Tyr	aag Lys	ctg Leu	cgg Arg	atc Ile 420	aag Lys	cag Gln	atc Ile	acc Thr	gaa Glu 425	gag Glu	gtg Val				2140	

gaa Glu	aga Arg	cag Gln	gtg Val	tcc Ser	acc Thr	gct Ala	atg Met	gcc Ala	gag Glu	gaa Glu	atc Ile	aga Arg	cgg Arg	ctg Leu	agc Ser	2188
			430				435				440					
gtg Val	ctg Leu	gtc Val	gac Asp	gac Asp	tac Tyr	cag Gln	atg Met	gac Asp	ttt Phe	cac His	ccc Pro	tct Ser	cca Pro	gtg Val	gtg Val	2236
			445				450				455					
ctg Leu	aaa Lys	gtc Val	tac Tyr	aaa Lys	aac Asn	gag Glu	ctg Leu	cac His	cgg Arg	cac His	atc Ile	gag Glu	gaa Glu	ggc Gly	ctg Leu	2284
			460				465				470					
ggc Gly	aga Arg	aac Asn	atg Met	agc Ser	gac Asp	aga Arg	tgc Cys	agc Ser	acc Thr	gcc Ala	atc Ile	acc Thr	aat Asn	agc Ser	ctg Leu	2332
			475				480				485					490
cag Gln	acc Thr	atg Met	cag Gln	cag Gln	gac Asp	atg Met	atc Ile	gac Asp	ggc Gly	ctg Leu	aaa Lys	cct Pro	ctg Leu	ctg Leu	cct Pro	2380
			495				500				505					
gtg Val	tcc Ser	gtc Val	aga Arg	tcc Ser	cag Gln	atc Ile	gat Asp	atg Met	ctg Leu	gtg Val	ccc Pro	cgg Arg	cag Gln	tgc Cys	ttt Phe	2428
			510				515				520					
agc Ser	ctg Leu	aac Asn	tac Tyr	gac Asp	ctg Leu	aac Asn	tgc Cys	gac Asp	aag Lys	ctg Leu	tgc Cys	gcc Ala	gat Asp	ttc Phe	caa Gln	2476
			525				530				535					
gag Glu	gac Asp	atc Ile	gag Glu	ttt Phe	cac His	ttc Phe	agc Ser	ctc Leu	ggc Gly	tgg Trp	aca Thr	atg Met	ctg Leu	gtc Val	aac Asn	2524
			540				545				550					
aga Arg	ttt Phe	ctg Leu	ggc Gly	ccc Pro	aag Lys	aac Asn	agc Ser	aga Arg	cgg Arg	gcc Ala	ctg Leu	atg Met	ggc Gly	tac Tyr	aac Asn	2572
			555				560				565					570
gat Asp	cag Gln	gtg Val	cag Gln	agg Arg	ccc Pro	att Ile	cct Pro	ctg Leu	aca Thr	ccc Pro	gcc Ala	aat Asn	cct Pro	agc Ser	atg Met	2620
			575				580				585					
cct Pro	cca Pro	ctg Leu	cct Pro	cag Gln	ggc Gly	agc Ser	ctg Leu	aca Thr	caa Gln	gag Glu	gaa Glu	ttc Phe	atg Met	gtg Val	tct Ser	2668
			590				595				600					
atg Met	gtc Val	acc Thr	ggc Gly	ctg Leu	gcc Ala	agc Ser	ctg Leu	acc Thr	agc Ser	aga Arg	aca Thr	tct Ser	atg Met	ggc Gly	atc Ile	2716
			605				610				615					
ctg Leu	gtc Val	gtc Val	ggc Gly	ggc Gly	gtt Val	gtg Val	tgg Trp	aaa Lys	gct Ala	gtt Val	ggc Gly	tgg Trp	cgg Arg	ctg Leu	atc Ile	2764
			620				625				630					
gcc Ala	ctg Leu	agc Ser	ttt Phe	ggc Gly	ctg Leu	tat Tyr	ggc Gly	ctg Leu	ctg Leu	tac Tyr	gtg Val	tac Tyr	gag Glu	aga Arg	ctg Leu	2812
			635				640				645					650

acc tgg acc acc aag gcc aaa gag cgg gcc ttc aag cgg cag ttt gtg Thr Trp Thr Thr Lys Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val 655 660 665	2860
gaa cac gcc tcc gag aaa ctg cag ctg gtg atc agc tac acc ggc agc Glu His Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser 670 675 680	2908
aat tgc agc cac cag gtg cag caa gag ctg tcc gga aca ttc gcc cac Asn Cys Ser His Gln Val Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His 685 690 695	2956
ctg tgt cag cag gtc gac gtg acc aga gag aac ctg gaa caa gag atc Leu Cys Gln Gln Val Asp Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile 700 705 710	3004
gcc gcc atg aat aag aaa atc gag gtg ctc gac tcc ctg cag agc aag Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys 715 720 725 730	3052
gcc aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac agc gag ctg aat Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn 735 740 745	3100
atg ttc acc cac cag tac ctg cag cct agc cgc taa taatgtacaa Met Phe Thr His Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg 750 755	3146
gtaaagcgcc cgcaggcttg caccogtacc tttgggagcg cgcgccctcg tcgtgtcgtg	3206
acgtcaccgg ttctgtttgga tccctggagg cttgtctgaag gctgtatgct gttcttataa	3266
accttgagga ctgttttggc cactgactga cagtcctcag tttataagaa caggacacaa	3326
ggcctgttac tagcactcac atggaacaaa tggcccagat ctagggtggg gccacctgcc	3386
ggtaggtgtg cggtaggcctt ttctcgtcg caggacgcag ggttcggggc tagcttaagc	3446
ttctcgagat cgataatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtattc	3506
ttaactatgt tgcctctttt acgctatgtg gatacgtgc tttaatgcct ttgtatcatg	3566
ctattgcttc cgtatggct ttcatTTTTt cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc	3626
tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg	3686
acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtoa gctcctttcc gggactttcg	3746
ctttccccct ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga	3806
caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaaa tcatcgtcct	3866
ttccttggct gctcgctgt gttgccacct ggattctgog cgggacgccc ttctgctacg	3926
tcccttcggc cctcaatcca gcggaccttc cttcccgogg cctgctgccg gctctgcggc	3986
ctcttcgcgc tcttgcctt cgcctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc	4046

cgccctgctga tcgccctgag cctggccctg gtgaccaaca gccaggtgca attgctagag 4106
tcgactctag agcggcggcc taaggctoga ctagagctog ctgatcagcc tcgactgtgc 4166
cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccgt gccttccttg accctggaag 4226
gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcacat tgtctgagta 4286
ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg ggaggagacag caagggggag gattgggaag 4346
acaatagcag gcatgctggg gactcgagtt aagggcgaat tcccgataag gatcttccta 4406
gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaacccta 4466
gtgatggagt tggccactcc ctctctgogc gctcgcctgc tcaactgaggc ogggcgacca 4526
aaggctgccc gacgcccggg ctttgccggg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgag 4585

<210> 2
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115 120 125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg
370 375 380

Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro

565															570															575																													
Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Gly																																												
580															585															590																													
Ser	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Phe	Met	Val	Ser	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Ala																																												
595															600															605																													
Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Ile	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Val																																												
610															615															620																													
Val	Trp	Lys	Ala	Val	Gly	Trp	Arg	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu																																												
625															630															635															640														
Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Tyr	Glu	Arg	Leu	Thr	Trp	Thr	Thr	Lys	Ala																																												
645															650															655																													
Lys	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Arg	Gln	Phe	Val	Glu	His	Ala	Ser	Glu	Lys																																												
660															665															670																													
Leu	Gln	Leu	Val	Ile	Ser	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser	His	Gln	Val																																												
675															680															685																													
Gln	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	His	Leu	Cys	Gln	Gln	Val	Asp																																												
690															695															700																													
Val	Thr	Arg	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Ala	Met	Asn	Lys	Lys																																												
705															710															715															720														
Ile	Glu	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Gln	Ser	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Arg	Asn																																												
725															730															735																													
Lys	Ala	Gly	Trp	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu	Asn	Met	Phe	Thr	His	Gln	Tyr																																												
740															745															750																													
Leu	Gln	Pro	Ser	Arg																																																							
755																																																											

<210> 3
<211> 4560
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 載體基因體Syn. PI. rMnf2opt. link. rMfn2 miR1518 WPRE. BGH

<220>

<221> 重複區域

<222> (1)..(141)

<223> 5' ITR

<220>

<221> 啟動子

<222> (223)..(682)

<223> 人類突觸蛋白

<220>

<221> 內含子

<222> (694)..(826)

<223> Promega嵌合內含子

<220>

<221> CDS

<222> (863)..(3133)

<223> 經工程化的rMfn2

<220>

<221> misc_feature

<222> (3134)..(3139)

<223> Dbl終止密碼子

<220>

<221> misc_feature

<222> (3140)..(3229)

<223> 連接子

<220>

<221> misc_signal

<222> (3230)..(3252)

<223> 5' 側

<220>

<221> misc_feature

<222> (3253)..(3316)

<223> rMfn2 miR1518

<220>

<221> misc_signal

<222> (3317)..(3360)

<223> 3' 側

<220>

<221> 強化子

<222> (3457)..(4044)

<223> WRPE

<220>

<221> misc_feature

<222> (4385)..(4430)

<223> 額外的AAV序列

<220>
<221> 重複區域
<222> (4431).. (4560)
<223> 3' ITR

<400> 3	
ccttaattag gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgc	60
gcccgggcctt tgcccgggcg gccctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaacct gccatgctac ttatctacgt	180
agccatgctc taggaagatc ggaattcgcc cttaagctag actcgagctg cagagggccc	240
tgcgatatgag tgcaagtggg ttttaggacc aggatgaggc ggggtggggg tgcctacctg	300
acgaccgacc ccgaccact ggacaagcac ccaaccccca ttcccaaat tgcgcatccc	360
ctatcagaga gggggagggg aaacaggatg cggcgaggcg cgtgcgcaact gccagcttca	420
gcaccgcgga cagtgccttc gccccgcct ggccggcgcgc gccaccgcgc cctcagcact	480
gaaggcgcgc tgaogtcaact cgccggtccc ccgcaaactc cccttcccg ccaccttggt	540
cgcgctccgc ccgcccgcgg ccagccgga ccgcaccacg cgaggcgga gatagggggg	600
cacgggcgcg accatctgcg ctgcggcgcc ggcgactcag cgctgcctca gtctgcggtg	660
ggcagcggag gactcgtgtc gtgcctgaga gcggtaagta tcaaggttac aagacaggtt	720
taaggagacc aatagaaact gggcttgtcg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag	780
gcacctattg gtottactga catccacttt gcctttctct ccacagtaag tagaattcac	840
gcgtgctagc accggtgcca cc atg tct ctg ctg ttc agc cgg tgc aac agc	892
Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser	
1 5 10	
atc gtg acc gtg aag aaa gac aag agg cac atg gcc gaa gtg aac gcc	940
Ile Val Thr Val Lys Lys Asp Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala	
15 20 25	
tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac ggc atc	988
Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile	
30 35 40	
ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag tct gcc ggc ttc ctg gaa	1036
Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Gly Phe Leu Glu	
45 50 55	
gat acc cac aga aac acc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa cag	1084
Asp Thr His Arg Asn Thr Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln	
60 65 70	
gtg ctg gac gtg aag ggc tac ctg tct aaa gtg cgg ggc atc agc gag	1132
Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu	

75					80					85					90	
gtg	ctg	gct	aga	agg	cat	atg	aag	gtg	gcc	ttt	ttc	ggc	agg	acc	agc	1180
Val	Leu	Ala	Arg	Arg	His	Met	Lys	Val	Ala	Phe	Phe	Gly	Arg	Thr	Ser	
				95					100					105		
aac	ggc	aag	agc	acc	gtg	atc	aac	gcc	atg	ctg	tgg	gac	aaa	gtg	ctg	1228
Asn	Gly	Lys	Ser	Thr	Val	Ile	Asn	Ala	Met	Leu	Trp	Asp	Lys	Val	Leu	
			110					115					120			
cct	tct	ggc	atc	ggc	cac	acc	acc	aac	tgc	ttt	ctg	aga	gtc	ggc	ggc	1276
Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Cys	Phe	Leu	Arg	Val	Gly	Gly	
		125					130					135				
aca	gac	ggc	cac	gag	gct	ttt	ttg	ctg	acc	gag	ggc	tcc	gaa	gag	aag	1324
Thr	Asp	Gly	His	Glu	Ala	Phe	Leu	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Glu	Lys	
	140					145					150					
aaa	tcc	gtg	aaa	acc	gtg	aac	cag	ctg	gcc	cac	gct	ctg	cac	cag	gat	1372
Lys	Ser	Val	Lys	Thr	Val	Asn	Gln	Leu	Ala	His	Ala	Leu	His	Gln	Asp	
155					160					165					170	
gaa	caa	ctg	cac	gcc	gga	agc	ctg	gtg	tcc	gtg	atg	tgg	cct	aac	agc	1420
Glu	Gln	Leu	His	Ala	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Val	Met	Trp	Pro	Asn	Ser	
				175					180					185		
aag	tgc	cct	ctg	ctg	aag	gac	gac	ctg	gtg	ctg	atg	gac	tct	cct	gga	1468
Lys	Cys	Pro	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Met	Asp	Ser	Pro	Gly	
			190					195					200			
atc	gac	gtg	acc	act	gag	ctg	gac	agc	tgg	atc	gac	aag	ttc	tgc	ctg	1516
Ile	Asp	Val	Thr	Thr	Glu	Leu	Asp	Ser	Trp	Ile	Asp	Lys	Phe	Cys	Leu	
		205					210					215				
gac	gcc	gac	gtg	ttc	gtg	ctg	gtg	gct	aac	tct	gag	agc	acc	ctg	atg	1564
Asp	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Leu	Val	Ala	Asn	Ser	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	
	220					225					230					
cag	acc	gag	aag	cag	ttc	ttc	cac	aag	gtg	tcc	gag	agg	ctg	agc	agg	1612
Gln	Thr	Glu	Lys	Gln	Phe	Phe	His	Lys	Val	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Arg	
235					240					245					250	
ccc	aat	atc	ttt	atc	ctg	aac	aac	aga	tgg	gac	gcc	agc	gcc	agc	gag	1660
Pro	Asn	Ile	Phe	Ile	Leu	Asn	Asn	Arg	Trp	Asp	Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	
				255					260					265		
ccc	gag	tat	atg	gaa	gaa	gtg	cgg	agg	cag	cat	atg	gaa	agg	tgt	acc	1708
Pro	Glu	Tyr	Met	Glu	Glu	Val	Arg	Arg	Gln	His	Met	Glu	Arg	Cys	Thr	
			270					275					280			
agc	ttc	ctg	gtg	gac	gag	ctg	gga	gtc	gtg	gat	aga	gca	cag	gcc	ggc	1756
Ser	Phe	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Gly	Val	Val	Asp	Arg	Ala	Gln	Ala	Gly	
		285					290					295				
gac	aga	atc	ttc	ttc	gtg	tct	gcc	aaa	gag	gtg	ctg	agc	gcc	agg	gtg	1804
Asp	Arg	Ile	Phe	Phe	Val	Ser	Ala	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Arg	Val	
		300				305					310					

cag aaa gcc cag gga atg cct gaa ggc ggc gga gct ttg gcc gag gga Gln Lys Ala Gln Gly Met Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly 315 320 325 330	1852
ttt caa gtg cgg atg ttc gag ttc cag aac ttc gag cgg aga ttc gag Phe Gln Val Arg Met Phe Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu 335 340 345	1900
gaa tgc atc agc cag agc gcc gtc aag aca aag ttc gag cag cac aca Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr 350 355 360	1948
gtg cgg gcc aag cag atc gct gag gct gtg cgg ctg atc atg gac agc Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser 365 370 375	1996
ctg cat atc gcc gct caa gag cag agg gtg tac tgc ctg gaa atg cgg Leu His Ile Ala Ala Gln Glu Gln Arg Val Tyr Cys Leu Glu Met Arg 380 385 390	2044
gaa gag agg cag gac agg ctg aga ttc atc gac aag cag ctg gaa ctg Glu Glu Arg Gln Asp Arg Leu Arg Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu 395 400 405 410	2092
ctg gcc cag gac tac aag ctg agg atc aag cag atg acc gaa gag gtg Leu Ala Gln Asp Tyr Lys Leu Arg Ile Lys Gln Met Thr Glu Glu Val 415 420 425	2140
gaa aga cag gtg tcc acc gcc atg gcc gag gaa atc cgt aga ctg tct Glu Arg Gln Val Ser Thr Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser 430 435 440	2188
gtg ctg gtc gac gag tac cag atg gac ttt cac ccc tct cca gtg gtg Val Leu Val Asp Glu Tyr Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val 445 450 455	2236
ctg aag gtc tac aaa aac gag ctg cac agg cac atc gag gaa ggc ctg Leu Lys Val Tyr Lys Asn Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu 460 465 470	2284
ggc aga aac atg agc gac agg tgc tct acc gct atc gcc agc agc ctg Gly Arg Asn Met Ser Asp Arg Cys Ser Thr Ala Ile Ala Ser Ser Leu 475 480 485 490	2332
cag aca atg cag cag gac atg atc gac ggc ctg aag cct ctg ctg cct Gln Thr Met Gln Gln Asp Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro 495 500 505	2380
gtg tct gtg cgg aac cag atc gat atg ctg gtg ccc agg cag tgc ttc Val Ser Val Arg Asn Gln Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe 510 515 520	2428
tcc ctg tcc tac gac ctg aac tgc gac aag ctg tgt gcc gac ttc caa Ser Leu Ser Tyr Asp Leu Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln 525 530 535	2476

gag gac atc gag ttt cac ttc agc ctc ggc tgg aca atg ctg gtc aac Glu Asp Ile Glu Phe His Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn 540 545 550	2524
aga ttc ctg gga cct aag aac tcc aga cgg gcc ctg ctg gga tac aac Arg Phe Leu Gly Pro Lys Asn Ser Arg Arg Ala Leu Leu Gly Tyr Asn 555 560 565 570	2572
gat cag gtg caa agg ccc ctg cct ctg aca cca gct aac cct tct atg Asp Gln Val Gln Arg Pro Leu Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met 575 580 585	2620
cct cct ctg cct caa ggc tct ctg acc caa gag gaa ctg atg gtg tcc Pro Pro Leu Pro Gln Gly Ser Leu Thr Gln Glu Glu Leu Met Val Ser 590 595 600	2668
atg gtc aca ggc ctg gct tcc ctg acc agc aga acc tct atg ggc atc Met Val Thr Gly Leu Ala Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile 605 610 615	2716
ctg gtc gtc ggc gga gtt gtg tgg aaa gct gtt ggc tgg cgc ctg atc Leu Val Val Gly Gly Val Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile 620 625 630	2764
gcc ctg agc ttt gga ctg tac gga ctg ctg tac gtg tac gag aga ctg Ala Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu 635 640 645 650	2812
acc tgg acc acc agg gcc aaa gag agg gcc ttc aag agg cag ttc gtg Thr Trp Thr Thr Arg Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val 655 660 665	2860
gaa tac gcc tcc gag aaa ctg cag ctg att atc tcc tac acc ggc agc Glu Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Ile Ile Ser Tyr Thr Gly Ser 670 675 680	2908
aac tgc agc cac cag gtg cag caa gag ctg tct gga aca ttc gcc cac Asn Cys Ser His Gln Val Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His 685 690 695	2956
ctg tgc cag cag gtc gac atc acc aga gac aac ctg gaa caa gag atc Leu Cys Gln Gln Val Asp Ile Thr Arg Asp Asn Leu Glu Gln Glu Ile 700 705 710	3004
gcc gct atg aat aag aag gtg gaa gcc ctg gac tcc ctg cag agc aag Ala Ala Met Asn Lys Lys Val Glu Ala Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys 715 720 725 730	3052
gct aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac tcc gag ctg aat Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn 735 740 745	3100
atg ttt atc cac cag tac ctg cag cct agc cgc tgatgatgta caagtaaagc Met Phe Ile His Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg 750 755	3153
ggcgcgaagc ttgcacccgt acctttggga gcgcgcgcgc tcgtcgtgtc gtgacgtcac	3213

cogttctgtt ggatccctgg aggccttgctg aaggctgtat gctgttctta taaaccttga	3273
ggacagtttt ggccactgac tgactgtcct cagtttataa gaacaggaca caaggcctgt	3333
tactagcact cacatggaac aaatggccca gatctagggt ggggccacct gccggtaggt	3393
gtgoggtagg cttttctccg tcgcaggacg cagggttcgg gcctagcttc tcgagatcga	3453
taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta actatgttgc	3513
tccttttiacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta ttgcttcccg	3573
tatggctttc attttctcct ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt atgaggagtt	3633
gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgactgtg tttgctgaag caacccccac	3693
tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt tccccctccc	3753
tattgccacg gcggaactca tcgcgcctg ccttgcccg cgtctggacag gggctcggct	3813
gttgggcact gacaattccg tgggtttgtc ggggaaatca tcgtccttc cttggctgct	3873
cgctgtgtt gccacctgga ttctgcggg gacgcccttc tgctacgtcc cttcggccct	3933
caatccagcg gaccttcctt cccgcggcct gctgcgggt ctgcggcctc ttccgcgtct	3993
tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttggggc gcctccccgc ctgctgatcg	4053
ccttgagcct ggccctggtg accaacagcc aggtgcaatt gaagctttct agagtcgact	4113
agagctcgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc	4173
tccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtccttc ctaataaaat	4233
gaggaaattg catgcattg tctgagtagg tgtcattota ttctgggggg tggggtgggg	4293
caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga ctcgagttaa	4353
gggcgaattc ccgataagga tcttctaga gcatggctac gtagataagt agcatggcgg	4413
gttaatcatt aactacaagg aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc	4473
tcgctcgctc actgaggccg ggcgacaaaa ggtcgccga cggccgggct ttgcccgggc	4533
ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcag	4560

<210> 4
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4

Met	Ser	Leu	Leu	Phe	Ser	Arg	Cys	Asn	Ser	Ile	Val	Thr	Val	Lys	Lys	
1				5				10						15		
Asp	Lys	Arg	His	Met	Ala	Glu	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Leu	Lys	His	Phe	
			20					25					30			
Val	Thr	Ala	Lys	Lys	Lys	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Ala	
		35					40					45				
Tyr	Ile	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Asp	Thr	His	Arg	Asn	Thr	
	50					55					60					
Glu	Leu	Asp	Pro	Val	Thr	Thr	Glu	Glu	Gln	Val	Leu	Asp	Val	Lys	Gly	
65					70				75						80	
Tyr	Leu	Ser	Lys	Val	Arg	Gly	Ile	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Arg	Arg	His	
				85					90					95		
Met	Lys	Val	Ala	Phe	Phe	Gly	Arg	Thr	Ser	Asn	Gly	Lys	Ser	Thr	Val	
			100					105					110			
Ile	Asn	Ala	Met	Leu	Trp	Asp	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	His	
		115					120					125				
Thr	Thr	Asn	Cys	Phe	Leu	Arg	Val	Gly	Gly	Thr	Asp	Gly	His	Glu	Ala	
	130					135					140					
Phe	Leu	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Val	Lys	Thr	Val	
145					150					155					160	
Asn	Gln	Leu	Ala	His	Ala	Leu	His	Gln	Asp	Glu	Gln	Leu	His	Ala	Gly	
				165					170					175		
Ser	Leu	Val	Ser	Val	Met	Trp	Pro	Asn	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu	Leu	Lys	
			180					185					190			
Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Met	Asp	Ser	Pro	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Thr	Glu	
		195					200					205				
Leu	Asp	Ser	Trp	Ile	Asp	Lys	Phe	Cys	Leu	Asp	Ala	Asp	Val	Phe	Val	
	210					215					220					

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys Gln Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ala Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Ser Ala Arg Val Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Ile Ala Ala Gln
370 375 380

Glu Gln Arg Val Tyr Cys Leu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Arg Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Met Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Glu Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn

450					455					460					
Glu 465	Leu	His	Arg	His	Ile 470	Glu	Glu	Gly	Leu	Gly 475	Arg	Asn	Met	Ser	Asp 480
Arg	Cys	Ser	Thr	Ala 485	Ile	Ala	Ser	Ser	Leu 490	Gln	Thr	Met	Gln	Gln 495	Asp
Met	Ile	Asp	Gly 500	Leu	Lys	Pro	Leu	Leu 505	Pro	Val	Ser	Val	Arg 510	Asn	Gln
Ile	Asp	Met 515	Leu	Val	Pro	Arg	Gln 520	Cys	Phe	Ser	Leu	Ser 525	Tyr	Asp	Leu
Asn	Cys 530	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala 535	Asp	Phe	Gln	Glu	Asp 540	Ile	Glu	Phe	His
Phe 545	Ser	Leu	Gly	Trp	Thr 550	Met	Leu	Val	Asn	Arg 555	Phe	Leu	Gly	Pro	Lys 560
Asn	Ser	Arg	Arg	Ala 565	Leu	Leu	Gly	Tyr	Asn 570	Asp	Gln	Val	Gln	Arg 575	Pro
Leu	Pro	Leu	Thr 580	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser 585	Met	Pro	Pro	Leu	Pro 590	Gln	Gly
Ser	Leu	Thr 595	Gln	Glu	Glu	Leu	Met 600	Val	Ser	Met	Val	Thr 605	Gly	Leu	Ala
Ser	Leu 610	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser 615	Met	Gly	Ile	Leu	Val 620	Val	Gly	Gly	Val
Val 625	Trp	Lys	Ala	Val	Gly 630	Trp	Arg	Leu	Ile	Ala 635	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu 640
Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr 645	Val	Tyr	Glu	Arg	Leu 650	Thr	Trp	Thr	Thr	Arg 655	Ala
Lys	Glu	Arg	Ala 660	Phe	Lys	Arg	Gln	Phe 665	Val	Glu	Tyr	Ala	Ser 670	Glu	Lys
Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Tyr	Thr 680	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser 685	His	Gln	Val

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Ile Thr Arg Asp Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Val Glu Ala Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Ile His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

<210> 5
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5' ITR

<400> 5
ccttaattag gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgcg 60
gcccggggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
actccatcac taggggttcc t 141

<210> 6
<211> 460
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類突觸蛋白啟動子

<400> 6
tcgagctgca gaggggccctg cgtatgagtg caagtgggtt ttaggaccag gatgaggcgg 60
ggtgggggtg cctacctgac gaccgacccc gacccactgg acaagcacc aacccccatt 120
cccaaattg cgcacccct atcagagagg gggaggggaa acaggatgcg gcgaggcgcg 180
tgcgactgc cagcttcagc accgcggaca gtgccttcgc cccgcctgg cggcgcgcg 240
caccgccgcc tcagcactga aggcgcgctg acgtcactcg ccggtcccc gcaaactccc 300

cttcccggcc acccttggtcg cgtccgcgcc gccgccggcc cagccggacc gcaccacgcg 360
aggcgcgaga taggggggca cgggcgcgac catctgcgct gcggcgccgg cgactcagcg 420
ctgcctcagt ctgcggtggg cagcggagga gtcgtgtcgt 460

<210> 7
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Promega嵌合内含子

<400> 7
gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60
cagagaagac tcttgogttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120
tttctctcca cag 133

<210> 8
<211> 583
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WPRE

<400> 8
tcaacctctg gattacaaaa ttttgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc 60
ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgat 120
ggctttcatt ttctctctct tgtataaata ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg 180
gcccgttgct aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg 240
ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat 300
tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgtgc tggacagggg ctcggtgtt 360
gggcactgac aattccgtgg tgttgctggg gaaatcatcg tcctttcctt ggctgctcgc 420
ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gcccttctgc tacgtccctt cggccctcaa 480
tcacgcggac cttccttccc gcggcctgct gccggtctg cggcctcttc cgcgtcttcg 540
ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggcgcgc tcc 583

<210> 9
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	額外的AAV序列	
<400>	9	
catggctacg tagataagta gcatggcggg ttaatcatta actaca		46
<210>	10	
<211>	130	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3' ITR	
<400>	10	
aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg		60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccggg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc		120
gagcgcgag		130
<210>	11	
<211>	2274	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	編碼粒線體融合蛋白2蛋白質之人類Mfn2經工程化的核酸序列	
<400>	11	
atgagcctgc tgttcagccg gtgcaacagc atcgtgaccg tgaagaaaa caagcggcac		60
atggccgaag tgaacgcctc tccactgaag cacttcgtga ccgccaagaa gaagatcaac		120
ggcatcttcg agcagctggg cgcctacatc caagagagcg ccaccttcct ggaagatacc		180
tacagaaacg ccgagctgga ccccgtagcc acagaggaac aggtgctgga tgtgaagggc		240
tacctgagca aagtgcgggg catctctgaa gtgctggcca gacggcatat gaaggtggcc		300
tttttcggcc ggaccagcaa cggcaagagc accgtgatca atgccatgct gtgggacaaa		360
gtgctgccct ctggaatcgg ccacaccacc aactgctttc tgagagtgga aggcaccgac		420
ggccacgagg catttctgct gacagagggc tccgaggaaa agcggagcgc caagacagtg		480
aaccagctgg cccatgctct gcaccaggat aagcagctgc atgccggaag cctggtgtcc		540
gtgatgtggc ccaatagcaa gtgccctctg ctgaaggacg acctggtgct gatggatagc		600
ccggggatcg atgtgaccac cgaactggac agctggatcg acaagttctg cctggacgcc		660
gacgtgttcg tgctggtggc caatagcgag agcaccctga tgcagaccga gaagcacttt		720

ttccacaagg	tgtccgagcg	gctgagcaga	cccaatatct	ttatcctgaa	caacagatgg	780
gagccagcg	ccagcgagcc	cgagtatatg	gaagaagtgc	ggcggcagca	tatggaacgg	840
tgcacatcct	ttctgggtgga	cgagctgggc	gtcgtggata	gatctcaggc	cggcgacaga	900
atcttctttg	tgtccgccaa	agaggtgctg	aacgcccgga	ttcagaaagc	ccagggaatg	960
cctgaaggcg	gaggtgcact	ggccgaggga	tttcaagtgc	ggatgttcga	gttccagaac	1020
ttcgagcgga	gattcgagga	gtgcatcagc	cagagcgccg	tcaagaccaa	gttcgagcag	1080
cataccgtgc	gggccaagca	gattgccgaa	gccgtcagac	tgatcatgga	cagcctgcat	1140
atggccgccca	gagagcagca	ggtctactgc	gaggaaatgc	gggaagagag	acaggaccgg	1200
ctgaagttca	tcgacaagca	gctggaactg	ctggcccagg	actacaagct	gcggatcaag	1260
cagatcacccg	aagaggtgga	aagacaggtg	tccaccgcta	tggccgagga	aatcagacgg	1320
ctgagcgtgc	tggtcgacga	ctaccagatg	gactttcacc	cctctccagt	ggtgctgaaa	1380
gtctacaaaa	acgagctgca	ccggcacatc	gaggaaggcc	tgggcagaaa	catgagcgac	1440
agatgcagca	ccgccatcac	caatagcctg	cagaccatgc	agcaggacat	gatcgacggc	1500
ctgaaacctc	tgtgtcctgt	gtccgtcaga	tcccagatcg	atatgctggt	gccccggcag	1560
tgcttttagcc	tgaactacga	cctgaactgc	gacaagctgt	gcgccgattt	ccaagaggac	1620
atcgagtttc	acttcagcct	cggctggaca	atgctggtoa	acagatttct	gggccccaa	1680
aacagcagac	gggcctgat	gggctacaac	gatcaggtgc	agaggcccat	tcctctgaca	1740
cccgccaatc	ctagcatgcc	tccaactgct	cagggcagcc	tgacacaaga	ggaattcatg	1800
gtgtctatgg	tcaccggcct	ggccagcctg	accagcagaa	catctatggg	catcctggtc	1860
gtggcgggcg	ttgtgtggaa	agctgttggc	tggcggtga	tcgccctgag	ctttggcctg	1920
tatggcctgc	tgtacgtgta	cgagagactg	acctggacca	ccaaggccaa	agagcggggc	1980
ttcaagcggc	agtttgtgga	acacgcctcc	gagaaactgc	agctggtgat	cagctacacc	2040
ggcagcaatt	gcagccacca	ggtgcagcaa	gagctgtccg	gaacattcgc	ccacctgtgt	2100
cagcaggtcg	acgtgaccag	agagaacctg	gaacaagaga	tcgccgccat	gaataagaaa	2160
atcgaggtgc	tcgactccct	gcagagcaag	gccaagctgc	tgagaaacaa	ggccggctgg	2220
ctggacagcg	agctgaatat	gttcacccac	cagtacctgc	agcctagccg	ctaa	2274

<210> 12
<211> 2271
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 編碼粒線體融合蛋白2蛋白質的rMfn2經工程化的核酸序列

<400> 12	
atgtctctgc tgttcagccg gtgcaacagc atcgtgaccg tgaagaaaga caagaggcac	60
atggccgaag tgaacgcctc tccactgaag cacttcgtga ccgccaagaa gaagatcaac	120
ggcatcttcg agcagctggg cgctacatc caagagtctg cgggcttcct ggaagatacc	180
cacagaaaca ccgagctgga ccccgtagcc acagaggaac aggtgctgga cgtgaagggc	240
tacctgtcta aagtgcgggg catcagcgag gtgctggcta gaaggcatat gaaggtggcc	300
tttttcggca ggaccagcaa cggcaagagc accgtgatca acgcatgct gtgggacaaa	360
gtgctgcctt ctggcatcgg ccacaccacc aactgctttc tgagagtcgg cggcacagac	420
ggccacgagg cttttttgct gaccgagggc tccgaagaga agaaatccgt gaaaaccgtg	480
aaccagctgg cccacgctct gcaccaggat gaacaactgc acgccggaag cctggtgtcc	540
gtgatgtggc ctaacagcaa gtgcctcttg ctgaaggacg acctggtgct gatggactct	600
cctggaatcg acgtgaccac tgagctggac agctggatcg acaagttctg cctggacgcc	660
gaagtgttcg tgctggtggc taactctgag agcaccctga tgcagaccga gaagcagttc	720
ttccacaagg tgtccgagag gctgagcagg cccaatatct ttatcctgaa caacagatgg	780
gaagccagcg ccagcgagcc cgagtatatg gaagaagtgc ggaggcagca tatggaaagg	840
tgtaccagct tcctggtgga cgagctggga gtcgtggata gagcacaggc cggcgacaga	900
atcttcttcg tgtctgccaa agagggtctg agcggccagg tgcagaaagc ccagggaatg	960
cctgaaggcg gcggagcttt ggccgagggg tttcaagtgc ggatgttcga gttccagaac	1020
ttcgagcgga gattcgagga atgcatacgc cagagcgccg tcaagacaaa gttcgagcag	1080
cacacagtgc gggccaagca gatcgtgag gctgtgcggc tgatcatgga cagcctgcat	1140
atgccgctc aagagcagag ggtgtactgc ctggaaatgc gggaagagag gcaggacagg	1200
ctgagattca tcgacaagca gctggaactg ctggcccagg actacaagct gaggatcaag	1260
cagatgaccg aagaggtgga aagacaggtg tccaccgcca tggccgagga aatccgtaga	1320
ctgtctgtgc tggtcgacga gtaccagatg gactttcacc cctctccagt ggtgctgaag	1380
gtctacaaaa acgagctgca caggcacatc gaggaaggcc tgggcagaaa catgagcgac	1440
aggtgctcta ccgctatcgc cagcagcctg cagacaatgc agcaggacat gatcgacggc	1500

ctgaagcctc tgctgcctgt gtctgtgogg aaccagatcg atatgctggt gccagggcag 1560
tgctttctccc tgtcctacga cctgaactgc gacaagctgt gtgccgactt ccaagaggac 1620
atcgagtttc acttcagcct cggctggaca atgctggta acagattcct gggacctaaag 1680
aactccagac gggccctgct gggatacaac gatcagggtgc aaaggccctt gcctctgaca 1740
ccagctaacc cttctatgcc tcctctgctt caaggctctc tgaccaaga ggaactgatg 1800
gtgtccatgg tcacaggcct ggcttccttg accagcagaa cctctatggg catcctggtc 1860
gtcggcggag ttgtgtggaa agctgttggc tggcgctga tcgccctgag ctttggactg 1920
tacggactgc tgtacgtgta cgagagactg acctggacca ccagggccaa agagagggcc 1980
ttcaagaggc agttcgtgga atacgcctcc gagaaactgc agctgattat ctctacacc 2040
ggcagcaact gcagccacca ggtgcagcaa gagctgtctg gaacattcgc ccacctgtgc 2100
cagcaggtcg acatcaccag agacaacctg gaacaagaga tcgccgctat gaataagaag 2160
gtggaagccc tggactccct gcagagcaag gctaagctgc tgagaaacaa ggccggctgg 2220
ctggactccg agctgaatat gtttatccac cagtacctgc agcctagccg c 2271

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5' 側

<400> 13
ctggaggctt gctgaaggct gta 23

<210> 14
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3' 側

<400> 14
caggacacaa ggctgtttac tagcactcac atggaacaaa tggc 44

<210> 15
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223>	hMfn2 miR1693	
<400>	15	
	tgctgttctt ataaaccttg aggactgttt tggccactga ctgacagtcc tcagtttata	60
	agaa	64
<210>	16	
<211>	64	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	rMfn2 miR1518	
<400>	16	
	tgctgttctt ataaaccttg aggacagttt tggccactga ctgactgtcc tcagtttata	60
	agaa	64
<210>	17	
<211>	90	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	連接子	
<400>	17	
	tgtacaagta aagcgccgcg aggccttgca ccttacottt gggagcgcg gcctctgtcg	60
	tgctgtgacg tcacccgttc tgttgatcc	90
<210>	18	
<211>	2274	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	hMfn2內源性核酸序列	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1).. (2274)	
<400>	18	
	atg tcc ctg ctc ttc tct cga tgc aac tct atc gtc aca gtc aag aaa	48
	Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys	
	1 5 10 15	
	aat aag aga cac atg gct gag gtg aat gca tcc cca ctt aag cac ttt	96
	Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe	
	20 25 30	

gtc act gcc aag aag aag atc aat ggc att ttt gag cag ctg ggg gcc Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala 35 40 45	144
tac atc cag gag agc gcc acc ttc ctt gaa gac acg tac agg aat gca Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala 50 55 60	192
gaa ctg gac ccc gtt acc aca gaa gaa cag gtt ctg gac gtc aaa ggt Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly 65 70 75 80	240
tac cta tcc aaa gtg aga ggc atc agt gag gtg ctg gct cgg agg cac Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His 85 90 95	288
atg aaa gtg gct ttt ttt ggc cgg acg agc aat ggg aag agc acc gtg Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val 100 105 110	336
atc aat gcc atg ctc tgg gac aaa gtt ctg ccc tct ggg att ggc cac Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His 115 120 125	384
acc acc aat tgc ttc ctg cgg gta gag ggc aca gat ggc cat gag gcc Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala 130 135 140	432
ttt ctc ctt acc gag ggc tca gag gaa aag agg agt gcc aag act gtg Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val 145 150 155 160	480
aac cag ctg gcc cat gcc ctc cac cag gac aag cag ctc cat gcc ggc Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly 165 170 175	528
agc cta gtg agt gtg atg tgg ccc aac tct aag tgc cca ott ctg aag Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys 180 185 190	576
gat gac ctc gtt ttg atg gac agc cct ggt att gat gtc acc aca gag Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu 195 200 205	624
ctg gac agc tgg att gac aag ttt tgt ctg gat gct gat gtg ttt gtg Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val 210 215 220	672
ctg gtg gcc aac tca gag tcc acc ctg atg cag acg gaa aag cac ttc Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe 225 230 235 240	720
ttc cac aag gtg agt gag cgt ctc tcc cgg cca aac atc ttc atc ctg Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu 245 250 255	768

aac aac cgc tgg gat gca tct gcc tca gag ccc gag tac atg gag gag Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu 260 265 270	816
gtg cgg cgg cag cac atg gag cgt tgt acc agc ttc ctg gtg gat gag Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu 275 280 285	864
ctg ggc gtg gtg gat cga tcc cag gcc ggg gac cgc atc ttc ttt gtg Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val 290 295 300	912
tct gct aag gag gtg ctc aac gcc agg att cag aaa gcc cag ggc atg Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met 305 310 315 320	960
cct gaa gga ggg ggc gct ctc gca gaa ggc ttt caa gtg agg atg ttt Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe 325 330 335	1008
gag ttt cag aat ttt gag agg aga ttt gag gag tgc atc tcc cag tct Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser 340 345 350	1056
gca gtg aag acc aag ttt gag cag cac acg gtc cgg gcc aag cag att Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile 355 360 365	1104
gca gag gcg gtt cga ctc atc atg gac tcc ctg cac atg gcg gct cgg Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg 370 375 380	1152
gag cag cag gtt tac tgc gag gaa atg cgt gaa gag cgg caa gac cga Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg 385 390 395 400	1200
ctg aaa ttt att gac aaa cag ctg gag ctc ttg gct caa gac tat aag Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys 405 410 415	1248
ctg cga att aag cag att acg gag gaa gtg gag agg cag gtg tcg act Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr 420 425 430	1296
gca atg gcc gag gag atc agg cgc ctc tct gta ctg gtg gac gat tac Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr 435 440 445	1344
cag atg gac ttc cac cct tct cca gta gtc ctc aag gtt tat aag aat Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn 450 455 460	1392
gag ctg cac cgc cac ata gag gaa gga ctg ggt cga aac atg tct gac Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp 465 470 475 480	1440
cgc tgc tcc acg gcc atc acc aac tcc ctg cag acc atg cag cag gac	1488

Arg	Cys	Ser	Thr	Ala	Ile	Thr	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Met	Gln	Gln	Asp	
				485					490						495	
atg	ata	gat	ggc	ttg	aaa	ccc	ctc	ctt	cct	gtg	tct	gtg	cgg	agt	cag	1536
Met	Ile	Asp	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Ser	Val	Arg	Ser	Gln	
			500					505					510			
ata	gac	atg	ctg	gtc	cca	cgc	cag	tgc	ttc	tcc	ctc	aac	tat	gac	cta	1584
Ile	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Arg	Gln	Cys	Phe	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asp	Leu	
		515					520					525				
aac	tgt	gac	aag	ctg	tgt	gct	gac	ttc	cag	gaa	gac	att	gag	ttc	cat	1632
Asn	Cys	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala	Asp	Phe	Gln	Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	His	
	530					535					540					
ttc	tct	ctc	gga	tgg	acc	atg	ctg	gtg	aat	agg	ttc	ctg	ggc	ccc	aag	1680
Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Thr	Met	Leu	Val	Asn	Arg	Phe	Leu	Gly	Pro	Lys	
545					550				555						560	
aac	agc	cgt	cgg	gcc	ttg	atg	ggc	tac	aat	gac	cag	gtc	cag	cgt	ccc	1728
Asn	Ser	Arg	Arg	Ala	Leu	Met	Gly	Tyr	Asn	Asp	Gln	Val	Gln	Arg	Pro	
				565					570					575		
atc	cct	ctg	acg	cca	gcc	aac	ccc	agc	atg	ccc	cca	ctg	cca	cag	ggc	1776
Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Gly	
			580					585					590			
tgc	ctc	acc	cag	gag	gag	ttc	atg	gtt	tcc	atg	gtt	acc	ggc	ctg	gcc	1824
Ser	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Phe	Met	Val	Ser	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Ala	
		595					600					605				
tcc	ttg	aca	tcc	agg	acc	tcc	atg	ggc	att	ctt	gtt	gtt	gga	gga	gtg	1872
Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Ile	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Val	
	610					615					620					
gtg	tgg	aag	gca	gtg	ggc	tgg	cgg	ctc	att	gcc	ctc	tcc	ttt	ggg	ctc	1920
Val	Trp	Lys	Ala	Val	Gly	Trp	Arg	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu	
625					630				635						640	
tat	ggc	ctc	ctc	tac	gtc	tat	gag	cgt	ctg	acc	tgg	acc	acc	aag	gcc	1968
Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Tyr	Glu	Arg	Leu	Thr	Trp	Thr	Thr	Lys	Ala	
				645					650					655		
aag	gag	agg	gcc	ttc	aag	cgc	cag	ttt	gtg	gag	cat	gcc	agc	gag	aag	2016
Lys	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Arg	Gln	Phe	Val	Glu	His	Ala	Ser	Glu	Lys	
			660					665					670			
ctg	cag	ctt	gtc	atc	agc	tac	act	ggc	tcc	aac	tgc	agc	cac	caa	gtc	2064
Leu	Gln	Leu	Val	Ile	Ser	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser	His	Gln	Val	
		675					680					685				
cag	cag	gaa	ctg	tct	ggg	acc	ttt	gct	cat	ctg	tgt	cag	caa	gtt	gac	2112
Gln	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	His	Leu	Cys	Gln	Gln	Val	Asp	
	690					695					700					
gtc	acc	cgg	gag	aac	ctg	gag	cag	gaa	att	gcc	gcc	atg	aac	aag	aaa	2160
Val	Thr	Arg	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Ala	Met	Asn	Lys	Lys	

705

710

715

720

att gag gtt ctt gac tca ctt cag agc aaa gca aag ctg ctc agg aat
Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725730735

aaa gcc ggt tgg ttg gac agt gag ctc aac atg ttc aca cac cag tac
Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Thr His Gln Tyr
740745750

ctg cag ccc agc aga tag
Leu Gln Pro Ser Arg
755

220822562274

<210> 19
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
151015

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
202530

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
354045

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
505560

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65707580

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
859095

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100105110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115120125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile

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

Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala
595 600 605

Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val
610 615 620

Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Lys Ala
645 650 655

Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu His Ala Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Thr His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

<210> 20
<211> 2274
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> rMfn2内源性核酸序列

<220>
<221> CDS

<222> (1).. (2274)

<400> 20																		48
atg	tcc	ctg	ctc	ttt	tct	cga	tgc	aac	tcc	atc	gtc	acc	gtc	aag	aag			
Met	Ser	Leu	Leu	Phe	Ser	Arg	Cys	Asn	Ser	Ile	Val	Thr	Val	Lys	Lys			
1				5					10					15				
																		96
gat	aag	cga	cac	atg	gct	gag	gtg	aat	gct	tcc	cct	ctc	aag	cac	ttt			
Asp	Lys	Arg	His	Met	Ala	Glu	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Leu	Lys	His	Phe			
			20					25					30					
																		144
gtc	act	gcc	aag	aaa	aag	atc	aat	ggc	atc	ttt	gag	cag	ctg	ggg	gcc			
Val	Thr	Ala	Lys	Lys	Lys	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Ala			
		35					40					45						
																		192
tac	atc	caa	gag	agt	gcc	ggc	ttc	ctt	gaa	gac	acc	cac	agg	aat	aca			
Tyr	Ile	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Asp	Thr	His	Arg	Asn	Thr			
	50					55					60							
																		240
gaa	ctg	gac	cca	gtt	act	aca	gaa	gag	cag	gtc	ctg	gat	gtc	aaa	ggg			
Glu	Leu	Asp	Pro	Val	Thr	Thr	Glu	Glu	Gln	Val	Leu	Asp	Val	Lys	Gly			
65				70					75						80			
																		288
tac	ctg	tcc	aag	gtc	agg	gga	atc	agc	gag	gtg	ctg	gcc	agg	cgg	cac			
Tyr	Leu	Ser	Lys	Val	Arg	Gly	Ile	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Arg	Arg	His			
			85						90					95				
																		336
atg	aag	gtg	gct	ttt	ttt	ggc	cgg	acg	agc	aat	ggg	aag	agc	acc	gtg			
Met	Lys	Val	Ala	Phe	Phe	Gly	Arg	Thr	Ser	Asn	Gly	Lys	Ser	Thr	Val			
			100					105					110					
																		384
atc	aat	gcc	atg	ctt	tgg	gac	aaa	gtt	ctg	cca	tct	ggg	att	ggc	cac			
Ile	Asn	Ala	Met	Leu	Trp	Asp	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	His			
		115					120					125						
																		432
acc	acc	aat	tgc	ttc	ctg	cgg	gtt	ggg	ggc	acg	gat	ggc	cac	gag	gcc			
Thr	Thr	Asn	Cys	Phe	Leu	Arg	Val	Gly	Gly	Thr	Asp	Gly	His	Glu	Ala			
		130				135					140							
																		480
ttc	ctc	ctc	acg	gag	ggc	tca	gaa	gag	aag	aag	agt	gtc	aag	acc	gtg			
Phe	Leu	Leu	Thr	Glu	Gly	Ser	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Val	Lys	Thr	Val			
145				150					155						160			
																		528
aac	cag	cta	gcc	cat	gcc	ctc	cat	cag	gat	gag	cag	ctg	cat	gca	ggc			
Asn	Gln	Leu	Ala	His	Ala	Leu	His	Gln	Asp	Glu	Gln	Leu	His	Ala	Gly			
			165						170					175				
																		576
agc	ctg	gtg	agt	gtg	atg	tgg	ccc	aac	tcc	aag	tgt	cca	ctt	ctg	aag			
Ser	Leu	Val	Ser	Val	Met	Trp	Pro	Asn	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu	Leu	Lys			
			180					185					190					
																		624
gat	gac	ctc	gtg	ctg	atg	gac	agc	cct	ggg	atc	gat	gtc	acc	acg	gag			
Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Met	Asp	Ser	Pro	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Thr	Glu			
		195					200					205						
																		672
ctg	gac	agc	tgg	att	gat	aag	ttt	tgc	ctg	gat	gct	gat	gtg	ttt	gta			
Leu	Asp	Ser	Trp	Ile	Asp	Lys	Phe	Cys	Leu	Asp	Ala	Asp	Val	Phe	Val			

210					215					220										
ctg Leu 225	gtg Val	gcc Ala	aac Asn	tca Ser	gag Glu 230	tcc Ser	acg Thr	ctg Leu	atg Met	cag Gln 235	acg Thr	gag Glu	aag Lys	cag Gln	ttc Phe 240	720				
ttc Phe	cac His	aaa Lys	gtg Val	agt Ser 245	gag Glu	cgt Arg	ctc Leu	tcc Ser	cgg Arg 250	ccc Pro	aac Asn	atc Ile	ttc Phe 255	atc Ile	ctg Leu	768				
aac Asn	aac Asn	ogc Arg	tgg Trp 260	gat Asp	gcg Ala	tct Ser	gcc Ala	tcg Ser 265	gag Glu	cct Pro	gag Glu	tac Tyr	atg Met 270	gag Glu	gag Glu	816				
gtg Val	cgg Arg 275	ogg Arg	cag Gln	cac His	atg Met	gaa Glu	cgc Arg 280	tgc Cys	acc Thr	agc Ser	ttt Phe	ctg Leu 285	gtg Val	gat Asp	gag Glu	864				
cta Leu 290	ggc Gly	gtg Val	gtg Val	gat Asp	cga Arg 295	gct Ala	cag Gln	gcc Ala	ggg Gly	gac Asp	cgg Arg 300	atc Ile	ttc Phe	ttt Phe	gtg Val	912				
tct Ser 305	gcc Ala	aag Lys	gag Glu	gtg Val 310	ctc Leu	agt Ser	gcc Ala	agg Arg	gtc Val 315	cag Gln	aaa Lys	gcc Ala	cag Gln	ggc Gly	atg Met 320	960				
cca Pro	gaa Glu	gga Gly	ggt Gly 325	ggc Gly	gct Ala	ctt Leu	gca Ala	gaa Glu	ggt Gly 330	ttt Phe	caa Gln	gtg Val	agg Arg 335	atg Met	ttt Phe	1008				
gag Glu	ttt Phe	cag Gln	aat Asn 340	ttc Phe	gag Glu	agg Arg	cga Arg	ttt Phe 345	gag Glu	gag Glu	tgc Cys	att Ile 350	toc Ser	cag Gln	tct Ser	1056				
gca Ala	gta Val 355	aag Lys	acc Thr	aaa Lys	ttt Phe	gag Glu	cag Gln 360	cac His	aca Thr	gtc Val	cgg Arg 365	gcc Ala	aag Lys	cag Gln	att Ile	1104				
gca Ala 370	gag Glu	gcc Ala	gtc Val	cgt Arg	ctc Leu 375	atc Ile	atg Met	gat Asp	toc Ser	ctg Leu 380	cac His	att Ile	gog Ala	gct Ala	cag Gln	1152				
gag Glu 385	cag Gln	ogg Arg	gtt Val	tat Tyr	tgt Cys 390	ctt Leu	gaa Glu	atg Met	cgg Arg	gaa Glu 395	gag Glu	cgg Arg	caa Gln	gac Asp	cgg Arg 400	1200				
ctg Leu	aga Arg	ttc Phe	att Ile	gac Asp 405	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	gag Glu	ctc Leu 410	ctg Leu	gct Ala	caa Gln	gac Asp	tat Tyr 415	aag Lys	1248				
cta Leu	cgg Arg	att Ile 420	aag Lys	cag Gln	atg Met	aca Thr	gag Glu	gaa Glu 425	gtg Val	gaa Glu	agg Arg	cag Gln 430	gtg Val	tcc Ser	aca Thr	1296				
gcc Ala	atg Met 435	gct Ala	gaa Glu	gag Glu	atc Ile	agg Arg 440	cgc Arg	ctc Leu	tot Ser	gtg Val	ctg Leu 445	gtt Val	gac Asp	gag Glu	tac Tyr	1344				

cag atg gac ttt cac cca tcc cca gtt gtc ctc aag gtt tat aag aat Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn 450 455 460	1392
gaa ctg cac cgc cat ata gag gaa ggc ctg gga cga aac atg tct gac Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp 465 470 475 480	1440
cgc tgc tcc aca gcc att gcc agt tca ctg cag act atg cag caa gac Arg Cys Ser Thr Ala Ile Ala Ser Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp 485 490 495	1488
atg ata gac ggc ttg aag ccc ctt ctt cct gtg tct gtg cgg aat cag Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Asn Gln 500 505 510	1536
ata gac atg ctg gtc cct cga cag tgt ttc tcc ctc agc tat gac ctg Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Ser Tyr Asp Leu 515 520 525	1584
aac tgt gac aag ctg tgc gct gac ttt cag gag gac atc gaa ttc cat Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His 530 535 540	1632
ttc tcc ctt gga tgg act atg cta gtg aat agg ttc ctg ggc cct aag Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys 545 550 555 560	1680
aat agc cgg cgg gcc ttg ctg ggc tac aat gat cag gtt cag cgt cct Asn Ser Arg Arg Ala Leu Leu Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro 565 570 575	1728
ctc cct ctg aca cct gcc aac ccc agc atg cca ccc ttg cca cag ggc Leu Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met Pro Pro Leu Pro Gln Gly 580 585 590	1776
tcc ctc acc cag gag gag ctc atg gtc tcc atg gtt act ggc ctg gcc Ser Leu Thr Gln Glu Glu Leu Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala 595 600 605	1824
tct ctg act tcc agg acc tct atg ggc att ctc gtg gtc gga gga gtg Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val 610 615 620	1872
gtg tgg aag gca gtg ggc tgg aga ctc atc gcc ctc tcc ttt gga ctg Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu 625 630 635 640	1920
tat ggc ctc ctg tac gtg tat gag cgg ctg acc tgg acc acc aga gcc Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Arg Ala 645 650 655	1968
aag gag agg gcc ttc aag cgc cag ttt gtg gag tat gcc agt gag aag Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu Tyr Ala Ser Glu Lys 660 665 670	2016

ctg cag ctc att atc agt tat acc ggc tct aac tgc agc cac caa gtt
Leu Gln Leu Ile Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685 2064

cag caa gaa ttg tct ggg aca ttt gct cat ctg tgc cag caa gtt gac
Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700 2112

atc acc cgg gat aat ctg gag cag gaa att gct gcc atg aac aag aaa
Ile Thr Arg Asp Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 2160

gtt gag gct ctg gat tca ctt cag agc aaa gcc aaa ttg ctc agg aat
Val Glu Ala Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735 2208

aaa gct ggc tgg ttg gac agc gaa ctc aac atg ttc ata cac cag tac
Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Ile His Gln Tyr
740 745 750 2256

ctg cag ccc agc aga tag
Leu Gln Pro Ser Arg
755 2274

<210> 21
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asp Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Gly Phe Leu Glu Asp Thr His Arg Asn Thr
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115 120 125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Gly Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Lys Ser Val Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Glu Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys Gln Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ala Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Ser Ala Arg Val Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Ile Ala Ala Gln
370 375 380

Glu Gln Arg Val Tyr Cys Leu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Arg Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Met Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Glu Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Ala Ser Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Asn Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Ser Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Leu Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro
565 570 575

Leu Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met Pro Pro Leu Pro Gln Gly
580 585 590

Ser Leu Thr Gln Glu Glu Leu Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala
595 600 605

Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val
610 615 620

Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Arg Ala
645 650 655

Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu Tyr Ala Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Gln Leu Ile Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Ile Thr Arg Asp Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Val Glu Ala Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Ile His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

<210> 22

<211> 215
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> bGH polyA

<400> 22
gcctcgactg tgcctttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc 60
ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg 120
cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 180
gaggattggg aagacaatag caggcatgct gggga 215

<210> 23
<211> 232
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SV40 polyA

<400> 23
cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60
aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgott tatttgaac cattataagc 120
tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag 180
atgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat gtggtaaaaat cg 232

<210> 24
<211> 2315
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hMfn2經工程化的核酸序列V1

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2274)

<400> 24
gct agc acc ggt gcc acc atg agc ctg ctg ttc agc cgg tgc aac agc 48
Ala Ser Thr Gly Ala Thr Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser
1 5 10 15

atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc gaa gtg aac gcc 96
Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala
20 25 30

tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac ggc atc Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile 35 40 45	144
ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc acc ttc ctg gaa Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu 50 55 60	192
gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa cag Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln 65 70 75 80	240
gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg ggc atc tct gaa Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu 85 90 95	288
gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc ggc cgg acc agc Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser 100 105 110	336
aac ggc aag agc acc gtg atc aat gcc atg ctg tgg gac aaa gtg ctg Asn Gly Lys Ser Thr Val Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu 115 120 125	384
ccc tct gga atc ggc cac acc acc aac tgc ttt ctg aga gtg gaa ggc Pro Ser Gly Ile Gly His Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly 130 135 140	432
acc gac ggc cac gag gca ttt ctg ctg aca gag ggc tcc gag gaa aag Thr Asp Gly His Glu Ala Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys 145 150 155 160	480
cgg agc gcc aag aca gtg aac cag ctg gcc cat gct ctg cac cag gat Arg Ser Ala Lys Thr Val Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp 165 170 175	528
aag cag ctg cat gcc gga agc ctg gtg tcc gtg atg tgg ccc aat agc Lys Gln Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser 180 185 190	576
aag tgc cct ctg ctg aag gac gac ctg gtg ctg atg gat agc ccc ggg Lys Cys Pro Leu Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly 195 200 205	624
atc gat gtg acc acc gaa ctg gac agc tgg atc gac aag ttc tgc ctg Ile Asp Val Thr Thr Glu Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu 210 215 220	672
gac gcc gac gtg ttc gtg ctg gtg gcc aat agc gag agc acc ctg atg Asp Ala Asp Val Phe Val Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met 225 230 235 240	720
cag acc gag aag cac ttt ttc cac aag gtg tcc gag cgg ctg agc aga Gln Thr Glu Lys His Phe Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg 245 250 255	768
ccc aac aat ttt atc ctg aac aac aga tgg gac gcc agc gcc agc gag	816

Pro	Asn	Asn	Phe	Ile	Leu	Asn	Asn	Arg	Trp	Asp	Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	
			260					265					270			
ccc	gag	tat	atg	gaa	gaa	gtg	cgg	cgg	cag	cat	atg	gaa	cgg	tgc	aca	864
Pro	Glu	Tyr	Met	Glu	Glu	Val	Arg	Arg	Gln	His	Met	Glu	Arg	Cys	Thr	
		275					280					285				
tcc	ttt	ctg	gtg	gac	gag	ctg	ggc	gtc	gtg	gat	aga	tct	cag	gcc	ggc	912
Ser	Phe	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Gly	Val	Val	Asp	Arg	Ser	Gln	Ala	Gly	
	290					295					300					
gac	aga	atc	ttc	ttt	gtg	tcc	gcc	aaa	gag	gtg	ctg	aac	gcc	cgg	att	960
Asp	Arg	Ile	Phe	Phe	Val	Ser	Ala	Lys	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Arg	Ile	
305					310					315					320	
cag	aaa	gcc	cag	gga	atg	cct	gaa	ggc	gga	ggg	gca	ctg	gcc	gag	gga	1008
Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	
				325					330					335		
ttt	caa	gtg	cgg	atg	ttc	gag	ttc	cag	aac	ttc	gag	cgg	aga	ttc	gag	1056
Phe	Gln	Val	Arg	Met	Phe	Glu	Phe	Gln	Asn	Phe	Glu	Arg	Arg	Phe	Glu	
			340					345					350			
gaa	tgc	atc	agc	cag	agc	gcc	gtc	aag	acc	aag	ttt	gag	cag	cat	acc	1104
Glu	Cys	Ile	Ser	Gln	Ser	Ala	Val	Lys	Thr	Lys	Phe	Glu	Gln	His	Thr	
		355					360					365				
gtg	cgg	gcc	aag	cag	att	gcc	gaa	gcc	gtc	aga	ctg	atc	atg	gac	agc	1152
Val	Arg	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Ile	Met	Asp	Ser	
	370					375					380					
ctg	cat	atg	gcc	gcc	aga	gag	cag	cag	gtc	tac	tgc	gag	gaa	atg	cgg	1200
Leu	His	Met	Ala	Ala	Arg	Glu	Gln	Gln	Val	Tyr	Cys	Glu	Glu	Met	Arg	
385					390					395					400	
gaa	gag	aga	cag	gac	cgg	ctg	aag	ttc	atc	gac	aag	cag	ctg	gaa	ctg	1248
Glu	Glu	Arg	Gln	Asp	Arg	Leu	Lys	Phe	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Glu	Leu	
				405					410					415		
ctg	gcc	cag	gac	tac	aag	ctg	cgg	atc	aag	cag	atc	acc	gaa	gag	gtg	1296
Leu	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Thr	Glu	Glu	Val	
			420					425					430			
gaa	aga	cag	gtg	tcc	acc	gct	atg	gcc	gag	gaa	atc	aga	cgg	ctg	agc	1344
Glu	Arg	Gln	Val	Ser	Thr	Ala	Met	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Ser	
		435					440					445				
gtg	ctg	gtc	gac	gac	tac	cag	atg	gac	ttt	cac	ccc	tct	cca	gtg	gtg	1392
Val	Leu	Val	Asp	Asp	Tyr	Gln	Met	Asp	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Val	Val	
	450					455					460					
ctg	aag	gtc	tac	aag	aac	gag	ctg	cac	cgg	cac	atc	gag	gaa	ggc	ctg	1440
Leu	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Glu	Leu	His	Arg	His	Ile	Glu	Glu	Gly	Leu	
465					470				475						480	
ggc	aga	aac	atg	agc	gac	aga	tgc	agc	acc	gcc	atc	acc	aat	agc	ctg	1488
Gly	Arg	Asn	Met	Ser	Asp	Arg	Cys	Ser	Thr	Ala	Ile	Thr	Asn	Ser	Leu	

				485					490					495			
cag	acc	atg	cag	cag	gac	atg	atc	gac	ggc	ctg	aaa	cct	ctg	ctg	cct		1536
Gln	Thr	Met	Gln	Gln	Asp	Met	Ile	Asp	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Leu	Pro		
			500					505					510				
gtg	tcc	gtc	aga	tcc	cag	atc	gat	atg	ctg	gtg	ccc	cgg	cag	tgc	ttt		1584
Val	Ser	Val	Arg	Ser	Gln	Ile	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Arg	Gln	Cys	Phe		
		515					520					525					
agc	ctg	aac	tac	gac	ctg	aac	tgc	gac	aag	ctg	tgc	gcc	gat	ttc	caa		1632
Ser	Leu	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asn	Cys	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala	Asp	Phe	Gln		
		530				535					540						
gag	gac	atc	gag	ttt	cac	ttc	agc	ctc	ggc	tgg	aca	atg	ctg	gtc	aac		1680
Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	His	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Thr	Met	Leu	Val	Asn		
545					550					555					560		
aga	ttt	ctg	ggc	ccc	aag	aac	agc	aga	cgg	gcc	ctg	atg	ggc	tac	aac		1728
Arg	Phe	Leu	Gly	Pro	Lys	Asn	Ser	Arg	Arg	Ala	Leu	Met	Gly	Tyr	Asn		
				565					570					575			
gat	cag	gtg	cag	agg	ccc	att	cct	ctg	aca	ccc	gcc	aat	cct	agc	atg		1776
Asp	Gln	Val	Gln	Arg	Pro	Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser	Met		
			580					585					590				
cct	cca	ctg	cct	cag	ggc	agc	ctg	aca	caa	gag	gaa	ttc	atg	gtg	tct		1824
Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Phe	Met	Val	Ser		
		595					600					605					
atg	gtc	acc	ggc	ctg	gcc	agc	ctg	acc	agc	aga	aca	tct	atg	ggc	atc		1872
Met	Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Ile		
		610				615					620						
ctg	gtc	gtc	ggc	ggc	gtt	gtg	tgg	aaa	gct	gtt	ggc	tgg	cgg	ctg	atc		1920
Leu	Val	Val	Gly	Gly	Val	Val	Trp	Lys	Ala	Val	Gly	Trp	Arg	Leu	Ile		
625					630					635					640		
gcc	ctg	agc	ttt	ggc	ctg	tat	ggc	ctg	ctg	tac	gtg	tac	gag	aga	ctg		1968
Ala	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Tyr	Glu	Arg	Leu		
				645					650					655			
acc	tgg	acc	acc	aag	gcc	aaa	gag	cgg	gcc	ttc	aag	cgg	cag	ttt	gtg		2016
Thr	Trp	Thr	Thr	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Arg	Gln	Phe	Val		
			660					665					670				
gaa	cac	gcc	tcc	gag	aaa	ctg	cag	ctg	gtg	atc	agc	tac	acc	ggc	agc		2064
Glu	His	Ala	Ser	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Val	Ile	Ser	Tyr	Thr	Gly	Ser		
		675					680					685					
aat	tgc	agc	cac	cag	gtg	cag	caa	gag	ctg	tcc	gga	aca	ttc	gcc	cac		2112
Asn	Cys	Ser	His	Gln	Val	Gln	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	His		
		690				695					700						
ctg	tgt	cag	cag	gtc	gac	gtg	acc	aga	gag	aac	ctg	gaa	caa	gag	atc		2160
Leu	Cys	Gln	Gln	Val	Asp	Val	Thr	Arg	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile		
705					710					715					720		

gcc gcc atg aac aag aaa atc gag gtg ctc gac tcc ctg cag agc aag 2208
Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys
725 730 735

gcc aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac agc gag ctg aat 2256
Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn
740 745 750

atg ttc acc cac cag tac ctgcagccta gccgctaata atgtacagcg 2304
Met Phe Thr His Gln Tyr
755

gccgcaagct t 2315

<210> 25
<211> 758
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25

Ala Ser Thr Gly Ala Thr Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser
1 5 10 15

Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala
20 25 30

Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile
35 40 45

Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu
50 55 60

Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln
65 70 75 80

Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu
85 90 95

Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser
100 105 110

Asn Gly Lys Ser Thr Val Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu
115 120 125

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

Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr
355 360 365

Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser
370 375 380

Leu His Met Ala Ala Arg Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg
385 390 395 400

Glu Glu Arg Gln Asp Arg Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu
405 410 415

Leu Ala Gln Asp Tyr Lys Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val
420 425 430

Glu Arg Gln Val Ser Thr Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser
435 440 445

Val Leu Val Asp Asp Tyr Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val
450 455 460

Leu Lys Val Tyr Lys Asn Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu
465 470 475 480

Gly Arg Asn Met Ser Asp Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu
485 490 495

Gln Thr Met Gln Gln Asp Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro
500 505 510

Val Ser Val Arg Ser Gln Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe
515 520 525

Ser Leu Asn Tyr Asp Leu Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln
530 535 540

Glu Asp Ile Glu Phe His Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn
545 550 555 560

Arg Phe Leu Gly Pro Lys Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn
565 570 575

Asp Gln Val Gln Arg Pro Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met

580585590

Pro Pro Leu Pro Gln Gly Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser
595600605

Met Val Thr Gly Leu Ala Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile
610615620

Leu Val Val Gly Gly Val Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile
625630635640

Ala Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu
645650655

Thr Trp Thr Thr Lys Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val
660665670

Glu His Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser
675680685

Asn Cys Ser His Gln Val Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His
690695700

Leu Cys Gln Gln Val Asp Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile
705710715720

Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys
725730735

Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn
740745750

Met Phe Thr His Gln Tyr
755

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義序列

<400> 26
aaaccttgag gactactgga g

<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	27	
	ttgacgtcca gaacctgttc t	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	28	
	agaagtgggc acttagagtt g	21
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	29	
	ttcagaagtg ggcacttaga g	21
<210>	30	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	30	
	ttgtcaatcc agctgtccag c	21
<210>	31	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	

<400> 31	
caaacttggt cttcactgca g	21
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義序列	
<400> 32	
aaaccttgag gactactgga g	21
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義序列	
<400> 33	
taaccatgga aaccatgaac t	21
<210> 34	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義序列	
<400> 34	
acaacaagaa tgcccatgga g	21
<210> 35	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義序列	
<400> 35	
aaaggtccca gacagttcct g	21
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	反義序列	
<400>	36	
	tgttcatggc ggcaatttcc t	21
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	37	
	tgaggttggc tattgattga c	21
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	38	
	ttctcacaca gtcaacacct t	21
<210>	39	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	39	
	tttcctcgca gtaaacctgc t	21
<210>	40	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	40	
	agaaatggaa ctcaatgtct t	21
<210>	41	

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	41	
tgaacaggac atcacctgtg a		21
<210>	42	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	42	
aatacaagca ggtatgtgaa c		21
<210>	43	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	43	
taaacctgct gctcccgagc c		21
<210>	44	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	44	
tagaggaggc catagagccc a		21
<210>	45	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	45	
tctaccgcga ggaagcaatt g		21

<210>	46	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義序列	
<400>	46	
ctccttagca gacacaaaga a		21
<210>	47	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	47	
agaacaggtt ctggacgtca a		21
<210>	48	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	48	
caactctaag tgcccacttc t		21
<210>	49	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	49	
ctctaagtgc ccacttctga a		21
<210>	50	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	

<400> 50	
gctggacagc tggattgaca a	21
<210> 51	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 標靶hMfn2序列	
<400> 51	
ctgcagtgaa gaccaagttt g	21
<210> 52	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 標靶hMfn2序列	
<400> 52	
ctccagtagt cctcaaggtt t	21
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 標靶hMfn2序列	
<400> 53	
agttcatggt ttccatggtt a	21
<210> 54	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 標靶hMfn2序列	
<400> 54	
ctccatgggc attottgttg t	21
<210> 55	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	55	
	caggaactgt ctgggacctt t	21
<210>	56	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	56	
	aggaaattgc cgccatgaac a	21
<210>	57	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	57	
	agtctcaag gtttataaga a	21
<210>	58	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	58	
	gtcaatcaat agccaacctc a	21
<210>	59	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	59	
	aaggtgttga ctgtgtgaga a	21
<210>	60	

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	60	
	agcaggttta ctgcgaggaa a	21
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	61	
	aagacattga gttocatttc t	21
<210>	62	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	62	
	tcacaggtga tgtcctgttc a	21
<210>	63	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	63	
	gttcacatac ctgcttgtat t	21
<210>	64	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	64	
	ggctcgggag cagcaggttt a	21

<210>	65	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	65	
	tgggctctat ggcctcctct a	21
<210>	66	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	66	
	caattgcttc ctgogggtag a	21
<210>	67	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	標靶hMfn2序列	
<400>	67	
	ttcttttgtgt ctgctaagga g	21
<210>	68	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	miR1693 (21-mer)	
<400>	68	
	ttcttataaa ccttgaggac t	21
<210>	69	
<211>	4771	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	載體基因體CAG. CI. hMfn2. GA. link. miR538. WPRE. SV40	

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (1)..(188)
 <223> 5' ITR

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (192)..(1032)
 <223> CAG(CBA)

 <220>
 <221> 強化子
 <222> (194)..(436)
 <223> CMV強化子

 <220>
 <221> 啟動子
 <222> (439)..(720)
 <223> CB啟動子

 <220>
 <221> 內含子
 <222> (720)..(1127)
 <223> CAG中的雜合內含子

 <220>
 <221> 內含子
 <222> (720)..(950)
 <223> b-肌動蛋白內含子

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1158)..(1163)
 <223> 科札克

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1164)..(3437)
 <223> 經工程化的人類Mfn2

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1379)..(1399)
 <223> miR538 mut

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2534)..(2554)
 <223> 突變的miR1518

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3438)..(3519)
 <223> 連接子p4271

<220>
<221> misc_feature
<222> (3520).. (3547)
<223> miR538 AS

<220>
<221> misc_feature
<222> (3569).. (3587)
<223> 環圈

<220>
<221> misc_feature
<222> (3588).. (3606)
<223> miR538有義

<220>
<221> misc_feature
<222> (3607).. (3651)
<223> 3'側

<220>
<221> misc_feature
<222> (3678).. (4266)
<223> WRPE

<220>
<221> misc_feature
<222> (4355).. (4474)
<223> SV40 PA終止子

<220>
<221> 重複區域
<222> (4584).. (4771)
<223> 3' ITR

<400> 69
gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt 60
tggtgcgccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac 120
taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatctacgt agccatgctc 180
taggaagagt accattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 240
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 300
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgccct 360
ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 420
tagtcatcgc tattaccatg gtcgagggtga gccccacgtt ctgcttcaact ctccccatct 480
cccccccctc cccacccccca attttgtatt tatttatttt ttaattattt tgtgcagcga 540
tggggggcggg ggggggggggg gggcgcgcg caggcggggc ggggcggggc gaggggcggg 600
gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtttc 660

cttttatggc gaggcggcgg cggcggcggc cctataaaaa gcgaagcgcg cggcgggcgg	720
gagtcgtcgc gcgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgcgcctcgc cgcgcgccgc	780
cccggtctctg actgaccgcg ttactccac aggtgagcgg gcgggacggc ctttctcctc	840
cgggctgtaa ttagcgcttg gtttaatgac ggcttgtttc ttttctgtgg ctgcgtgaaa	900
gccttgaggg gctccgggag ggccctttgt gcggggggag cggctcgggg ctgtccgcgg	960
ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggg tcggcttctg gcgtgtgacc	1020
ggcggtctcta gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tctttttcct acagctcctg	1080
ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattgga tcccgtacga	1140
cgcgctgctag caccggtgcc acc atg agc ctg ctg ttc agc cgg tgc aac agc	1193
Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser	
1 5 10	
atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc gaa gtg aac gcc	1241
Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala	
15 20 25	
tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac ggc atc	1289
Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile	
30 35 40	
ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc acc ttc ctg gaa	1337
Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu	
45 50 55	
gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa cag	1385
Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln	
60 65 70	
gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg ggc atc tct gaa	1433
Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu	
75 80 85 90	
gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc ggc cgg acc agc	1481
Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser	
95 100 105	
aac ggc aag agc acc gtg atc aat gcc atg ctg tgg gac aaa gtg ctg	1529
Asn Gly Lys Ser Thr Val Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu	
110 115 120	
ccc tct gga atc ggc cac acc acc aac tgc ttt ctg aga gtg gaa ggc	1577
Pro Ser Gly Ile Gly His Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly	
125 130 135	
acc gac ggc cac gag gca ttt ctg ctg aca gag ggc tcc gag gaa aag	1625
Thr Asp Gly His Glu Ala Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys	
140 145 150	

cgg agc gcc aag aca gtg aac cag ctg gcc cat gct ctg cac cag gat Arg Ser Ala Lys Thr Val Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp 155 160 165 170	1673
aag cag ctg cat gcc gga agc ctg gtg tcc gtg atg tgg ccc aat agc Lys Gln Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser 175 180 185	1721
aag tgc cct ctg ctg aag gac gac ctg gtg ctg atg gat agc ccc ggg Lys Cys Pro Leu Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly 190 195 200	1769
atc gat gtg acc acc gaa ctg gac agc tgg atc gac aag ttc tgc ctg Ile Asp Val Thr Thr Glu Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu 205 210 215	1817
gac gcc gac gtg ttc gtg ctg gtg gcc aat agc gag agc acc ctg atg Asp Ala Asp Val Phe Val Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met 220 225 230	1865
cag acc gag aag cac ttt ttc cac aag gtg tcc gag cgg ctg agc aga Gln Thr Glu Lys His Phe Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg 235 240 245 250	1913
ccc aat atc ttt atc ctg aac aac aga tgg gac gcc agc gcc agc gag Pro Asn Ile Phe Ile Leu Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu 255 260 265	1961
ccc gag tat atg gaa gaa gtg cgg cgg cag cat atg gaa cgg tgc aca Pro Glu Tyr Met Glu Glu Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr 270 275 280	2009
tcc ttt ctg gtg gac gag ctg ggc gtc gtg gat aga tct cag gcc ggc Ser Phe Leu Val Asp Glu Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly 285 290 295	2057
gac aga atc ttc ttt gtg tcc gcc aaa gag gtg ctg aac gcc cgg att Asp Arg Ile Phe Phe Val Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile 300 305 310	2105
cag aaa gcc cag gga atg cct gaa ggc gga ggt gca ctg gcc gag gga Gln Lys Ala Gln Gly Met Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly 315 320 325 330	2153
ttt caa gtg cgg atg ttc gag ttc cag aac ttc gag cgg aga ttc gag Phe Gln Val Arg Met Phe Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu 335 340 345	2201
gag tgc atc agc cag agc gcc gtc aag acc aag ttc gag cag cat acc Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr 350 355 360	2249
gtg cgg gcc aag cag att gcc gaa gcc gtc aga ctg atc atg gac agc Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser 365 370 375	2297
ctg cat atg gcc gcc aga gag cag cag gtc tac tgc gag gaa atg cgg	2345

Leu	His	Met	Ala	Ala	Arg	Glu	Gln	Gln	Val	Tyr	Cys	Glu	Glu	Met	Arg	
380						385					390					
gaa	gag	aga	cag	gac	cgg	ctg	aag	ttc	atc	gac	aag	cag	ctg	gaa	ctg	2393
Glu	Glu	Arg	Gln	Asp	Arg	Leu	Lys	Phe	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Glu	Leu	
395					400					405					410	
ctg	gcc	cag	gac	tac	aag	ctg	cgg	atc	aag	cag	atc	acc	gaa	gag	gtg	2441
Leu	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Thr	Glu	Glu	Val	
				415					420						425	
gaa	aga	cag	gtg	tcc	acc	gct	atg	gcc	gag	gaa	atc	aga	cgg	ctg	agc	2489
Glu	Arg	Gln	Val	Ser	Thr	Ala	Met	Ala	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Leu	Ser	
			430					435					440			
gtg	ctg	gtc	gac	gac	tac	cag	atg	gac	ttt	cac	ccc	tct	cca	gtg	gtg	2537
Val	Leu	Val	Asp	Asp	Tyr	Gln	Met	Asp	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Val	Val	
		445					450					455				
ctg	aaa	gtc	tac	aaa	aac	gag	ctg	cac	cgg	cac	atc	gag	gaa	ggc	ctg	2585
Leu	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Glu	Leu	His	Arg	His	Ile	Glu	Glu	Gly	Leu	
	460					465					470					
ggc	aga	aac	atg	agc	gac	aga	tgc	agc	acc	gcc	atc	acc	aat	agc	ctg	2633
Gly	Arg	Asn	Met	Ser	Asp	Arg	Cys	Ser	Thr	Ala	Ile	Thr	Asn	Ser	Leu	
475					480					485					490	
cag	acc	atg	cag	cag	gac	atg	atc	gac	ggc	ctg	aaa	cct	ctg	ctg	cct	2681
Gln	Thr	Met	Gln	Gln	Asp	Met	Ile	Asp	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Leu	Pro	
				495					500						505	
gtg	tcc	gtc	aga	tcc	cag	atc	gat	atg	ctg	gtg	ccc	cgg	cag	tgc	ttt	2729
Val	Ser	Val	Arg	Ser	Gln	Ile	Asp	Met	Leu	Val	Pro	Arg	Gln	Cys	Phe	
			510					515					520			
agc	ctg	aac	tac	gac	ctg	aac	tgc	gac	aag	ctg	tgc	gcc	gat	ttc	caa	2777
Ser	Leu	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asn	Cys	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala	Asp	Phe	Gln	
		525					530					535				
gag	gac	atc	gag	ttt	cac	ttc	agc	ctc	ggc	tgg	aca	atg	ctg	gtc	aac	2825
Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	His	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Thr	Met	Leu	Val	Asn	
	540					545					550					
aga	ttt	ctg	ggc	ccc	aag	aac	agc	aga	cgg	gcc	ctg	atg	ggc	tac	aac	2873
Arg	Phe	Leu	Gly	Pro	Lys	Asn	Ser	Arg	Arg	Ala	Leu	Met	Gly	Tyr	Asn	
555					560					565					570	
gat	cag	gtg	cag	agg	ccc	att	cct	ctg	aca	ccc	gcc	aat	cct	agc	atg	2921
Asp	Gln	Val	Gln	Arg	Pro	Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser	Met	
				575					580						585	
cct	cca	ctg	cct	cag	ggc	agc	ctg	aca	caa	gag	gaa	ttc	atg	gtg	tct	2969
Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Phe	Met	Val	Ser	
			590					595					600			
atg	gtc	acc	ggc	ctg	gcc	agc	ctg	acc	agc	aga	aca	tct	atg	ggc	atc	3017
Met	Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Ile	

605	610	615	
ctg gtc gtc ggc ggc gtt gtg tgg aaa gct gtt ggc tgg cgg ctg atc Leu Val Val Gly Gly Val Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile 620 625 630			3065
gcc ctg agc ttt ggc ctg tat ggc ctg ctg tac gtg tac gag aga ctg Ala Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu 635 640 645 650			3113
acc tgg acc acc aag gcc aaa gag cgg gcc ttc aag cgg cag ttt gtg Thr Trp Thr Thr Lys Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val 655 660 665			3161
gaa cac gcc tcc gag aaa ctg cag ctg gtg atc agc tac acc ggc agc Glu His Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser 670 675 680			3209
aat tgc agc cac cag gtg cag caa gag ctg tcc gga aca ttc gcc cac Asn Cys Ser His Gln Val Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His 685 690 695			3257
ctg tgt cag cag gtc gac gtg acc aga gag aac ctg gaa caa gag atc Leu Cys Gln Gln Val Asp Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile 700 705 710			3305
gcc gcc atg aat aag aaa atc gag gtg ctc gac tcc ctg cag agc aag Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys 715 720 725 730			3353
gcc aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac agc gag ctg aat Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn 735 740 745			3401
atg ttc acc cac cag tac ctg cag cct agc cgc taa taaagcggcc Met Phe Thr His Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg 750 755			3447
gcaagcttgc acccgtaacct ttgggagcgc gcgccctcgt cgtgtcgtga cgtcaccgct			3507
tctgtttggat ccotggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg ttgacgtcca gaacctgttc			3567
tgttttggcc actgactgac agaacaggct ggacgtcaac aggacacaag gcctgttact			3627
agcactcaca tggaacaaat ggcccagatc ttaagcttct cgagatcgat aatcaacctc			3687
tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattottaa ctatgttgct ccttttacgc			3747
tatgttgata cgtgtcttta atgcctttgt atcatgotat tgcttcccgt atggctttca			3807
ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg tggcccgttg			3867
tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca			3927
ttgccaccac ctgtcagctc ctttcgggga ctttcgcttt cccctccct attgccacgg			3987
cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggcactg			4047

acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtccctttcc ttggctgctc gcctgtgttg 4107
ccacctggat tctgcggggg acgcccttct gctacgtccc ttcgccctc aatccagcgg 4167
accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt cgccttcgcc 4227
ctcagacgag tcggatctcc ctttgggcgc cctccccgcc tgctgatcgc cctgagcctg 4287
gccctggtga ccaacagcca ggtgcaattg ctagagtoga ctctagagcg gccgcttcga 4347
gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 4407
aaatgcctta tttgtgaaat ttgtgatgct attgccttat ttgtaaccat tataagctgc 4467
aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagatg 4527
tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtaaaatcga taaggatctt 4587
cctagagcat ggctacgtag ataagtagca tggcgggtta atcattaact acaaggaacc 4647
cctagtgatg gaggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggc 4707
accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcgggc tcagtgagcg agcgagcgcg 4767
cagc 4771

<210> 70
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 70

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115 120 125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg
370 375 380

Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His

530					535					540					
Phe 545	Ser	Leu	Gly	Trp	Thr 550	Met	Leu	Val	Asn	Arg 555	Phe	Leu	Gly	Pro	Lys 560
Asn	Ser	Arg	Arg	Ala 565	Leu	Met	Gly	Tyr	Asn 570	Asp	Gln	Val	Gln	Arg 575	Pro
Ile	Pro	Leu	Thr 580	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser 585	Met	Pro	Pro	Leu	Pro 590	Gln	Gly
Ser	Leu	Thr 595	Gln	Glu	Glu	Phe	Met 600	Val	Ser	Met	Val	Thr 605	Gly	Leu	Ala
Ser 610	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser 615	Met	Gly	Ile	Leu	Val 620	Val	Gly	Gly	Val
Val 625	Trp	Lys	Ala	Val	Gly 630	Trp	Arg	Leu	Ile	Ala 635	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu 640
Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr 645	Val	Tyr	Glu	Arg	Leu 650	Thr	Trp	Thr	Thr	Lys 655	Ala
Lys	Glu	Arg	Ala 660	Phe	Lys	Arg	Gln	Phe 665	Val	Glu	His	Ala	Ser 670	Glu	Lys
Leu	Gln	Leu 675	Val	Ile	Ser	Tyr	Thr 680	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser 685	His	Gln	Val
Gln 690	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr 695	Phe	Ala	His	Leu	Cys 700	Gln	Gln	Val	Asp
Val 705	Thr	Arg	Glu	Asn 710	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala 715	Ala	Met	Asn	Lys	Lys 720
Ile	Glu	Val	Leu	Asp 725	Ser	Leu	Gln	Ser	Lys 730	Ala	Lys	Leu	Leu	Arg 735	Asn
Lys	Ala	Gly	Trp 740	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu 745	Asn	Met	Phe	Thr	His 750	Gln	Tyr
Leu	Gln	Pro 755	Ser	Arg											

<210> 71
 <211> 4771
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 載體基因體CAG. CI. hMfn2. GA. link. miR1518. WPRE. SV40

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (1).. (188)
 <223> ITR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (192).. (1032)
 <223> CAG (CBA)

<220>
 <221> 強化子
 <222> (194).. (436)
 <223> CMV強化子

<220>
 <221> 啟動子
 <222> (439).. (720)
 <223> CB啟動子

<220>
 <221> 內含子
 <222> (720).. (1127)
 <223> CAG中的雜合內含子

<220>
 <221> 內含子
 <222> (720).. (950)
 <223> b-肌動蛋白內含子

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1158).. (1163)
 <223> 科札克

<220>
 <221> CDS
 <222> (1164).. (3437)
 <223> 最適化的人類Mfn2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1379).. (1399)
 <223> miR538 mut

<220>

- <221> misc_feature
- <222> (2534).. (2554)
- <223> 突變的miR 1518

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3438).. (3519)
- <223> 連接子p4271

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3520).. (3547)
- <223> 5' 側

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3569).. (3587)
- <223> 環圈

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3588).. (3606)
- <223> 大鼠 miR 1518有義

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3607).. (3651)
- <223> 3' 側

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3678).. (4266)
- <223> WRPE

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (4355).. (4474)
- <223> SV40 PA終止子

- <220>
- <221> 重複區域
- <222> (4584).. (4771)
- <223> ITR

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (35488).. (3568)
- <223> 大鼠 miR1518 AS

<400> 71
gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt 60
tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac 120
taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatctacgt agccatgctc 180
taggaagagt accattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 240

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	300
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgct	360
ggcattatgc ccagttacatg accttatggg acttttctac ttggcagtac atctacgtat	420
tagtcatcgc tattaccatg gtcgagggtga gccccacgtt ctgcttcaact ctccccatct	480
cccccccctc cccacccccca attttgtatt tatttatttt ttaattattt tgtgcagcga	540
tgggggctggg ggggggggggg gggcgcgcgcg caggcgggggc ggggcggggc gaggggctggg	600
gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtttc	660
cttttatggc gagggcgcgcg cggcggcggc cctataaaaa gcgaagcgcg cggcgggcgcg	720
gagtgcctgc gcgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgccgcctcg cgccgccgcg	780
cccggtcttg actgaccgcg ttactccac aggtgagcgg gcgggacggc ctttctctc	840
cggtctgtaa ttgagcgttg gtttaatgac ggcttgtttc ttttctgtgg ctgcgtgaaa	900
gccttgaggg gctccgggag ggccctttgt gcgggggggag cggctcgggg ctgtccgcgg	960
ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc	1020
ggcggtctta gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tctttttcct acagctcctg	1080
ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattgga tcccgtaga	1140
cgctgtctag caccggtgcc acc atg agc ctg ctg ttc agc cgg tgc aac agc	1193
Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser	
1 5 10	
atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc gaa gtg aac gcc	1241
Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala	
15 20 25	
tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac ggc atc	1289
Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile	
30 35 40	
ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc acc ttc ctg gaa	1337
Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu	
45 50 55	
gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa cag	1385
Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln	
60 65 70	
gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg ggc atc tct gaa	1433
Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu	
75 80 85 90	
gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc ggc cgg acc agc	1481
Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser	

				95				100				105							
aac Asn	ggc Gly	aag Lys	agc Ser 110	acc Thr	gtg Val	atc Ile	aat Asn	gcc Ala 115	atg Met	ctg Leu	tgg Trp	gac Asp	aaa Lys 120	gtg Val	ctg Leu	1529			
ccc Pro	tct Ser	gga Gly 125	atc Ile	ggc Gly	cac His	acc Thr 130	acc Asn	aac Asn	tgc Cys	ttt Phe	ctg Leu	aga Arg 135	gtg Val	gaa Glu	ggc Gly	1577			
acc Thr	gac Asp 140	ggc Gly	cac His	gag Glu	gca Ala	ttt Phe 145	ctg Leu	ctg Leu	aca Thr	gag Glu	ggc Gly 150	tcc Ser	gag Glu	gaa Glu	aag Lys	1625			
cgg Arg 155	agc Ser	gcc Ala	aag Lys	aca Thr 160	gtg Val 160	aac Asn	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala 165	cat His 165	gct Ala	ctg Leu	cac His	cag Gln	gat Asp 170	1673			
aag Lys	cag Gln	ctg Leu	cat His 175	gcc Ala	gga Gly	agc Ser	ctg Leu	gtg Val	tcc Ser 180	gtg Val	atg Met	tgg Trp	ccc Pro	aat Asn 185	agc Ser	1721			
aag Lys	tgc Cys	cct Pro 190	ctg Leu	ctg Leu	aag Lys	gac Asp	gac Asp	ctg Leu 195	gtg Val	ctg Leu	atg Met	gat Asp	agc Ser 200	ccc Pro	ggg Gly	1769			
atc Ile	gat Asp 205	gtg Val	acc Thr	acc Thr	gaa Glu	ctg Leu	gac Asp 210	agc Ser	tgg Trp	atc Ile	gac Asp	aag Lys 215	ttc Phe	tgc Cys	ctg Leu	1817			
gac Asp	gcc Ala 220	gac Asp	gtg Val	ttc Phe	gtg Val	ctg Leu 225	gtg Val	gcc Ala	aat Asn	agc Ser	gag Glu 230	agc Ser	acc Thr	ctg Leu	atg Met	1865			
cag Gln 235	acc Thr	gag Glu	aag Lys	cac His 240	ttt Phe 240	ttc Phe	cac His	aag Lys	gtg Val 245	tcc Ser	gag Glu	cgg Arg	ctg Leu	agc Ser	aga Arg 250	1913			
ccc Pro	aat Asn	atc Ile	ttt Phe 255	atc Ile	ctg Leu	aac Asn	aac Asn	aga Arg 260	tgg Trp	gac Asp	gcc Ala	agc Ser	gcc Ala 265	agc Ser	gag Glu	1961			
ccc Pro	gag Glu	tat Tyr 270	atg Met	gaa Glu	gaa Glu	gtg Val	cgg Arg 275	cgg Arg	cag Gln	cat His	atg Met	gaa Glu	cgg Arg 280	tgc Cys	aca Thr	2009			
tcc Ser	ttt Phe 285	ctg Leu	gtg Val	gac Asp	gag Glu	ctg Leu	ggc Gly 290	gtc Val	gtg Val	gat Asp	aga Arg	tct Ser 295	cag Gln	gcc Ala	ggc Gly	2057			
gac Asp	aga Arg 300	atc Ile	ttc Phe	ttt Phe	gtg Val	tcc Ser 305	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu	gtg Val	ctg Leu 310	aac Asn	gcc Ala	cgg Arg	att Ile	2105			
cag Gln 315	aaa Lys	gcc Ala	cag Gln	gga Gly 320	atg Met	cct Pro	gaa Glu	ggc Gly	gga Gly 325	ggt Gly	gca Ala	ctg Leu	gcc Ala	gag Glu	gga Gly 330	2153			

ttt caa gtg cgg atg ttc gag ttc cag aac ttc gag cgg aga ttc gag Phe Gln Val Arg Met Phe Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu 335 340 345	2201
gag tgc atc agc cag agc gcc gtc aag acc aag ttc gag cag cat acc Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr 350 355 360	2249
gtg cgg gcc aag cag att gcc gaa gcc gtc aga ctg atc atg gac agc Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser 365 370 375	2297
ctg cat atg gcc gcc aga gag cag cag gtc tac tgc gag gaa atg cgg Leu His Met Ala Ala Arg Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg 380 385 390	2345
gaa gag aga cag gac cgg ctg aag ttc atc gac aag cag ctg gaa ctg Glu Glu Arg Gln Asp Arg Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu 395 400 405 410	2393
ctg gcc cag gac tac aag ctg cgg atc aag cag atc acc gaa gag gtg Leu Ala Gln Asp Tyr Lys Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val 415 420 425	2441
gaa aga cag gtg tcc acc gct atg gcc gag gaa atc aga cgg ctg agc Glu Arg Gln Val Ser Thr Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser 430 435 440	2489
gtg ctg gtc gac gac tac cag atg gac ttt cac ccc tct cca gtg gtg Val Leu Val Asp Asp Tyr Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val 445 450 455	2537
ctg aaa gtc tac aaa aac gag ctg cac cgg cac atc gag gaa ggc ctg Leu Lys Val Tyr Lys Asn Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu 460 465 470	2585
ggc aga aac atg agc gac aga tgc agc acc gcc atc acc aat agc ctg Gly Arg Asn Met Ser Asp Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu 475 480 485 490	2633
cag acc atg cag cag gac atg atc gac ggc ctg aaa cct ctg ctg cct Gln Thr Met Gln Gln Asp Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro 495 500 505	2681
gtg tcc gtc aga tcc cag atc gat atg ctg gtg ccc cgg cag tgc ttt Val Ser Val Arg Ser Gln Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe 510 515 520	2729
agc ctg aac tac gac ctg aac tgc gac aag ctg tgc gcc gat ttc caa Ser Leu Asn Tyr Asp Leu Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln 525 530 535	2777
gag gac atc gag ttt cac ttc agc ctc ggc tgg aca atg ctg gtc aac Glu Asp Ile Glu Phe His Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn 540 545 550	2825

aga ttt ctg ggc ccc aag aac agc aga cgg gcc ctg atg ggc tac aac Arg Phe Leu Gly Pro Lys Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn 555 560 565 570	2873
gat cag gtg cag agg ccc att cct ctg aca ccc gcc aat cct agc atg Asp Gln Val Gln Arg Pro Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met 575 580 585	2921
cct cca ctg cct cag ggc agc ctg aca caa gag gaa ttc atg gtg tct Pro Pro Leu Pro Gln Gly Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser 590 595 600	2969
atg gtc acc ggc ctg gcc agc ctg acc agc aga aca tct atg ggc atc Met Val Thr Gly Leu Ala Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile 605 610 615	3017
ctg gtc gtc ggc ggc gtt gtg tgg aaa gct gtt gcc tgg cgg ctg atc Leu Val Val Gly Gly Val Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile 620 625 630	3065
gcc ctg agc ttt ggc ctg tat ggc ctg ctg tac gtg tac gag aga ctg Ala Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu 635 640 645 650	3113
acc tgg acc acc aag gcc aaa gag cgg gcc ttc aag cgg cag ttt gtg Thr Trp Thr Thr Lys Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val 655 660 665	3161
gaa cac gcc tcc gag aaa ctg cag ctg gtg atc agc tac acc ggc agc Glu His Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser 670 675 680	3209
aat tgc agc cac cag gtg cag caa gag ctg tcc gga aca ttc gcc cac Asn Cys Ser His Gln Val Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His 685 690 695	3257
ctg tgt cag cag gtc gac gtg acc aga gag aac ctg gaa caa gag atc Leu Cys Gln Gln Val Asp Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile 700 705 710	3305
gcc gcc atg aat aag aaa atc gag gtg ctc gac tcc ctg cag agc aag Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys 715 720 725 730	3353
gcc aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac agc gag ctg aat Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn 735 740 745	3401
atg ttc acc cac cag tac ctg cag cct agc cgc taa taaagcggcc Met Phe Thr His Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg 750 755	3447
gcaagcttgc acccgtaacct ttgggagcgc gcgccctcgt cgtgtcgtga cgtcaccgct	3507
tctgtttggat cccctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg ttcttataaa ccttgaggac	3567
agttttggcc actgactgac tgtcctcagt ttataagaac aggacacaag gcctgttact	3627

agcactcaca tggaacaaat ggcccagatc ttaagcttct cgagatcgat aatcaacctc 3687
tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc 3747
tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgat atggctttca 3807
ttttctcctc cttgtataaa tcttggttgc tgtctcttta tgaggagtgt tggcccggtg 3867
tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca 3927
ttgccaccac ctgtcagctc ctttcggga ctttcgttt cccctccct attgccacgg 3987
cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggcactg 4047
acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg 4107
ccacctggat tctgcgggg acgcccttct gctacgtccc ttcgccctc aatccagcgg 4167
accttcttc ccgcggcctg ctgcggctc tgcggctct tccggtctt cgccttcgcc 4227
ctcagacgag tcggatctcc ctttgggcgc cctcccgcgc tgctgatcgc cctgagcctg 4287
gccctggtga ccaacagcca ggtgcaattg ctagagtoga ctctagagcg gccgcttcga 4347
gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaaacca caactagaat gcagtgaaaa 4407
aatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc 4467
aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cttttatgt ttcaggttca gggggagatg 4527
tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtaaaatcga taaggatctt 4587
cctagagcat ggctacgtag ataagtagca tggcgggtta atcattaaat acaaggaacc 4647
cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgtctgc tcgctcactg aggcggggcg 4707
accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccggcgggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 4767
cagc 4771

<210> 72
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 72

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe

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

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg
370 375 380

Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro
565 570 575

Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met Pro Pro Leu Pro Gln Gly
580 585 590

Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala
595 600 605

Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val
610 615 620

Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Lys Ala
645 650 655

Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu His Ala Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Thr His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

<210> 73
<211> 4559
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 載體基因體CAG. CI. hMfn2. GA. WPRE. SV40

<220>
<221> 重複區域
<222> (1).. (188)
<223> ITR

<220>
<221> misc_feature
<222> (192).. (1032)
<223> CAG (CBA)

<220>
<221> 強化子
<222> (194).. (1032)
<223> CMV強化子

<220>
<221> 啟動子
<222> (439).. (720)
<223> CB啟動子

<220>
<221> 內含子
<222> (720).. (1127)
<223> CAG中的雜合內含子

<220>
<221> 內含子
<222> (720).. (950)
<223> b-肌動蛋白內含子

<220>
<221> misc_feature

<222> (1158).. (1163)
<223> 科札克

<220>
<221> CDS
<222> (1164).. (3437)
<223> 經工程化的人類Mfn2

<220>
<221> misc_feature
<222> (1379).. (1399)
<223> miR538 mut

<220>
<221> misc_feature
<222> (2534).. (2554)
<223> 突變的miR1518

<220>
<221> misc_feature
<222> (3466).. (4054)
<223> WRPE

<220>
<221> misc_feature
<222> (4143).. (4262)
<223> SV 40 PA終止子

<220>
<221> 複製起點
<222> (4372).. (4559)
<223> ITR

<400> 73
gctgcgcgct cgctcgcctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt 60
tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac 120
taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatctacgt agccatgctc 180
taggaagagt accattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 240
otttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 300
aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgccct 360
ggcatttatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 420
tagtcatcgc tattaccatg gtcgagggtga gccccacgtt ctgcttcaact ctccccatct 480
cccccccctc cccacccccca attttgtatt tatttatitt ttaattatit tgtgcagcga 540
tggggggcggg ggggggggggg gggcgcgcg caggcggggc ggggcggggc gaggggcggg 600
gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtittc 660
cttttatggc gaggcggcgg cggcggcggc cctataaaaa gcgaagcgcg cggcgggcgg 720

gagtcgtgc gcgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgccgcctcg cgccgccgcg	780
cccggtctctg actgaccgcg ttaactccac aggtgagcgg gcgggacggc ccttctcctc	840
cgggctgtaa ttagcgcttg gttaaataac ggcttgtttc ttttctgtgg ctgcgtgaaa	900
gccttgaggg gtcocgggag ggccctttgt gcggggggag cggctcgggg ctgtccgcgg	960
ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc	1020
ggcggtctcta gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tctttttcct acagctcctg	1080
ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattgga tcccgtacga	1140
cgcgctgctag caccggtgcc acc atg agc ctg ctg ttc agc cgg tgc aac agc	1193
Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser	
1 5 10	
atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc gaa gtg aac gcc	1241
Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala	
15 20 25	
tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac ggc atc	1289
Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile	
30 35 40	
ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc acc ttc ctg gaa	1337
Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu	
45 50 55	
gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa cag	1385
Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln	
60 65 70	
gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg ggc atc tct gaa	1433
Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu	
75 80 85 90	
gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc ggc cgg acc agc	1481
Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser	
95 100 105	
aac ggc aag agc acc gtg atc aat gcc atg ctg tgg gac aaa gtg ctg	1529
Asn Gly Lys Ser Thr Val Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu	
110 115 120	
ccc tct gga atc ggc cac acc acc aac tgc ttt ctg aga gtg gaa ggc	1577
Pro Ser Gly Ile Gly His Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly	
125 130 135	
acc gac ggc cac gag gca ttt ctg ctg aca gag ggc tcc gag gaa aag	1625
Thr Asp Gly His Glu Ala Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys	
140 145 150	
cgg agc gcc aag aca gtg aac cag ctg gcc cat gct ctg cac cag gat	1673
Arg Ser Ala Lys Thr Val Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp	

155		160		165		170	
aag cag ctg cat gcc gga agc ctg gtg tcc gtg atg tgg ccc aat agc	1721						
Lys Gln Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser							
175				180		185	
aag tgc cct ctg ctg aag gac gac ctg gtg ctg atg gat agc ccc ggg	1769						
Lys Cys Pro Leu Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly				195		200	
190							
atc gat gtg acc acc gaa ctg gac agc tgg atc gac aag ttc tgc ctg	1817						
Ile Asp Val Thr Thr Glu Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu				210		215	
205							
gac gcc gac gtg ttc gtg ctg gtg gcc aat agc gag agc acc ctg atg	1865						
Asp Ala Asp Val Phe Val Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met				225		230	
220							
cag acc gag aag cac ttt ttc cac aag gtg tcc gag cgg ctg agc aga	1913						
Gln Thr Glu Lys His Phe Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg				245		250	
235							
ccc aat atc ttt atc ctg aac aac aga tgg gac gcc agc gcc agc gag	1961						
Pro Asn Ile Phe Ile Leu Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu				260		265	
255							
ccc gag tat atg gaa gaa gtg cgg cgg cag cat atg gaa cgg tgc aca	2009						
Pro Glu Tyr Met Glu Glu Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr				275		280	
270							
tcc ttt ctg gtg gac gag ctg ggc gtc gtg gat aga tct cag gcc ggc	2057						
Ser Phe Leu Val Asp Glu Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly				290		295	
285							
gac aga atc ttc ttt gtg tcc gcc aaa gag gtg ctg aac gcc cgg att	2105						
Asp Arg Ile Phe Phe Val Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile				305		310	
300							
cag aaa gcc cag gga atg cct gaa ggc gga ggt gca ctg gcc gag gga	2153						
Gln Lys Ala Gln Gly Met Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly				320		325	
315							330
ttt caa gtg cgg atg ttc gag ttc cag aac ttc gag cgg aga ttc gag	2201						
Phe Gln Val Arg Met Phe Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu				340		345	
335							
gag tgc atc agc cag agc gcc gtc aag acc aag ttc gag cag cat acc	2249						
Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr				355		360	
350							
gtg cgg gcc aag cag att gcc gaa gcc gtc aga ctg atc atg gac agc	2297						
Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser				370		375	
365							
ctg cat atg gcc gcc aga gag cag cag gtc tac tgc gag gaa atg cgg	2345						
Leu His Met Ala Ala Arg Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg				385		390	
380							

gaa gag aga cag gac cgg ctg aag ttc atc gac aag cag ctg gaa ctg Glu Glu Arg Gln Asp Arg Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu 395 400 405 410	2393
ctg gcc cag gac tac aag ctg cgg atc aag cag atc acc gaa gag gtg Leu Ala Gln Asp Tyr Lys Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val 415 420 425	2441
gaa aga cag gtg tcc acc gct atg gcc gag gaa atc aga cgg ctg agc Glu Arg Gln Val Ser Thr Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser 430 435 440	2489
gtg ctg gtc gac gac tac cag atg gac ttt cac ccc tct cca gtg gtg Val Leu Val Asp Asp Tyr Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val 445 450 455	2537
ctg aaa gtc tac aaa aac gag ctg cac cgg cac atc gag gaa ggc ctg Leu Lys Val Tyr Lys Asn Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu 460 465 470	2585
ggc aga aac atg agc gac aga tgc agc acc gcc atc acc aat agc ctg Gly Arg Asn Met Ser Asp Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu 475 480 485 490	2633
cag acc atg cag cag gac atg atc gac ggc ctg aaa cct ctg ctg cct Gln Thr Met Gln Gln Asp Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro 495 500 505	2681
gtg tcc gtc aga tcc cag atc gat atg ctg gtg ccc cgg cag tgc ttt Val Ser Val Arg Ser Gln Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe 510 515 520	2729
agc ctg aac tac gac ctg aac tgc gac aag ctg tgc gcc gat ttc caa Ser Leu Asn Tyr Asp Leu Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln 525 530 535	2777
gag gac atc gag ttt cac ttc agc ctc ggc tgg aca atg ctg gtc aac Glu Asp Ile Glu Phe His Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn 540 545 550	2825
aga ttt ctg ggc ccc aag aac agc aga cgg gcc ctg atg ggc tac aac Arg Phe Leu Gly Pro Lys Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn 555 560 565 570	2873
gat cag gtg cag agg ccc att cct ctg aca ccc gcc aat cct agc atg Asp Gln Val Gln Arg Pro Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met 575 580 585	2921
cct cca ctg cct cag ggc agc ctg aca caa gag gaa ttc atg gtg tct Pro Pro Leu Pro Gln Gly Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser 590 595 600	2969
atg gtc acc ggc ctg gcc agc ctg acc agc aga aca tct atg ggc atc Met Val Thr Gly Leu Ala Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile 605 610 615	3017

ctg gtc gtc ggc ggc gtt gtg tgg aaa gct gtt ggc tgg cgg ctg atc Leu Val Val Gly Gly Val Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile 620 625 630	3065
gcc ctg agc ttt ggc ctg tat ggc ctg ctg tac gtg tac gag aga ctg Ala Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu 635 640 645 650	3113
acc tgg acc acc aag gcc aaa gag cgg gcc ttc aag cgg cag ttt gtg Thr Trp Thr Thr Lys Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val 655 660 665	3161
gaa cac gcc tcc gag aaa ctg cag ctg gtg atc agc tac acc ggc agc Glu His Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser 670 675 680	3209
aat tgc agc cac cag gtg cag caa gag ctg tcc gga aca ttc gcc cac Asn Cys Ser His Gln Val Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His 685 690 695	3257
ctg tgt cag cag gtc gac gtg acc aga gag aac ctg gaa caa gag atc Leu Cys Gln Gln Val Asp Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile 700 705 710	3305
gcc gcc atg aat aag aaa atc gag gtg ctc gac tcc ctg cag agc aag Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys 715 720 725 730	3353
gcc aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac agc gag ctg aat Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn 735 740 745	3401
atg ttc acc cac cag tac ctg cag cct agc cgc taa taatgtaatt Met Phe Thr His Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg 750 755	3447
aagcttctcg agatcgataa tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt	3507
attcttaact atgttgcctc ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat	3567
catgctattg cttcccgatg ggctttcatt ttctcctcct tgtataaata ctggttgctg	3627
tctctttatg aggagtgtg gccggtgtg aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt	3687
gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact	3747
ttcgctttcc ccctccctat tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgtgc	3807
tggacagggg ctgggctgtt gggcactgac aattccgtgg tgttgtcggg gaaatcatcg	3867
tcctttcctt ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gcccttctgc	3927
taagtccctt cggccctcaa tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg	3987
cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc	4047
tccccgcctg ctgatcgccc tgagcctggc cctggtgacc aacagccagg tgcaattgct	4107

agagtcgact ctagagcggc cgcttcgagc agacatgata agatacattg atgagtttgg 4167
acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 4227
tgctttatatt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 4287
ttttatgttt caggttcagg gggagatgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta 4347
caaatgtggt aaaatcgata aggatcttcc tagagcatgg ctacgtagat aagtagcatg 4407
gcggtttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc 4467
gcgctcgctc gctcactgag gccgggcgac caaaggtcgc ccgacgcccg ggctttgccc 4527
gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gc 4559

<210> 74
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 74

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His

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

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg
370 375 380

Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro
565 570 575

Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met Pro Pro Leu Pro Gln Gly
580 585 590

Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala
595 600 605

Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val
610 615 620

Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Lys Ala
645 650 655

Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu His Ala Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Thr His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

<210> 75
<211> 4821
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 載體基因體CB7. CI. hMfn2. GA. link. miR538. rBG

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (1)..(130)
 <223> ITR

 <220>
 <221> 強化子
 <222> (259)..(562)
 <223> CMV強化子

 <220>
 <221> 啟動子
 <222> (561)..(842)
 <223> CB7啟動子

 <220>
 <221> 內含子
 <222> (935)..(1907)
 <223> 雞 β -肌動蛋白內含子

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1953)..(1958)
 <223> 科札克

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1959)..(4232)
 <223> 經工程化的人類Mfn2

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2174)..(2194)
 <223> miR538 mut

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3329)..(3349)
 <223> miR1518

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4233)..(4314)
 <223> 連接子p5271

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4315)..(4342)
 <223> 5'側

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4343)..(4363)
 <223> miR538 AS

 <220>

<221> misc_feature
<222> (4364).. (4382)
<223> 環圈

<220>
<221> misc_feature
<222> (4383).. (4401)
<223> miR538有義

<220>
<221> misc_feature
<222> (4402).. (4446)
<223> 3' 側

<220>
<221> polyA訊息
<222> (4500).. (4626)
<223> 兔球蛋白poly A

<220>
<221> 重複區域
<222> (4692).. (4821)
<223> ITR

<400> 75
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
aggaagatct gatatacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 240
ccatatatg gaggttccgc ttacataact tacggtaaatt ggccgcctg gctgaccgcc 300
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 360
gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca 420
tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacgga aatggccgcg 480
ctggcattat gccagttaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 540
attagtcacg gctattacca tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctcccat 600
ctccccccc tccccacccc caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc 660
gatggggggcg gggggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg 720
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagtt 780
tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 840
gggagtcgct gcgcgctgcc ttgcgccgt gccccgctcc gccgccgct cgcgccgcc 900
gccccggctc tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcgggacg gcccttctcc 960

tccgggctgt aattagcgct tggtttaatg acggcttggt tcttttctgt ggctgcgtga	1020
aagccttagg gggctccggg agggcccttt gtgcgggggg agcggctcgg ggggtgcgtg	1080
cgtgtgtgtg tgcgtgggga gcgccgcgtg cggctccgag ctgcccgggc gctgtgagcg	1140
ctgcggggcg ggcgcggggc tttgtgcgt cgcagtggtg cgcgagggga gcgcggccgg	1200
gggcgggtgcc ccgcgggtgc gggggggctg cgaggggaac aaaggctgcg tgcgggggtg	1260
gtgcgtgggg gggtagagcag ggggtgtggg cgcgtcggtc gggctgcaac cccccctgca	1320
ccccctccc cgagtgtctg agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtacggggcg	1380
tggcgcgggg ctgcgcgtgc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc	1440
ggggccgcct cgggcggggg agggctcggg ggaggggcgc gcgggcccc ggagcgcggg	1500
cggtgttcca ggccgcggga gccgcagcca ttgcccttta tgtaatcgt gcgagagggc	1560
gcagggactt cctttgtccc aaatctgtgc ggagccgaaa tctgggaggc gccgccgcac	1620
ccctctagc gggcgcgggg cgaagcgggt cggcgcgggc aggaaggaaa tgggcggggg	1680
gggccttcgt gcgtgcgcgc gccgcgtcc cttctccct ctccagcctc ggggctgtcc	1740
gcggggggac ggctgccttc gggggggacg gggcaggggc gggttcgggt tctggcgtgt	1800
gaccggcggc tctagagcct ctgctaacca tgttcattgc ttcttctttt tctacagct	1860
cctgggcaac gtgtgtgta ttgtgtgtc tcattctttt ggcaaagaat tcacgcgtgc	1920
taggatcccg tacgaagcgt gctagcacc gtgccacc atg agc ctg ctg ttc agc	1976
Met Ser Leu Leu Phe Ser	
1 5	
cggtgc aac agc atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc	2024
Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala	
10 15 20	
gaa gtg aac gcc tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag	2072
Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys	
25 30 35	
atc aac ggc atc ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc	2120
Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala	
40 45 50	
acc ttc ctg gaa gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc	2168
Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr	
55 60 65 70	
aca gag gaa cag gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg	2216
Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg	
75 80 85	
ggc atc tct gaa gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc	2264

Gly	Ile	Ser	Glu	Val	Leu	Ala	Arg	Arg	His	Met	Lys	Val	Ala	Phe	Phe	
			90					95					100			
ggc	cgg	acc	agc	aac	ggc	aag	agc	acc	gtg	atc	aat	gcc	atg	ctg	tgg	2312
Gly	Arg	Thr	Ser	Asn	Gly	Lys	Ser	Thr	Val	Ile	Asn	Ala	Met	Leu	Trp	
		105					110					115				
gac	aaa	gtg	ctg	ccc	tct	gga	atc	ggc	cac	acc	acc	aac	tgc	ttt	ctg	2360
Asp	Lys	Val	Leu	Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Cys	Phe	Leu	
	120					125					130					
aga	gtg	gaa	ggc	acc	gac	ggc	cac	gag	gca	ttt	ctg	ctg	aca	gag	ggc	2408
Arg	Val	Glu	Gly	Thr	Asp	Gly	His	Glu	Ala	Phe	Leu	Leu	Thr	Glu	Gly	
	135				140					145					150	
tcc	gag	gaa	aag	cgg	agc	gcc	aag	aca	gtg	aac	cag	ctg	gcc	cat	gct	2456
Ser	Glu	Glu	Lys	Arg	Ser	Ala	Lys	Thr	Val	Asn	Gln	Leu	Ala	His	Ala	
			155						160					165		
ctg	cac	cag	gat	aag	cag	ctg	cat	gcc	gga	agc	ctg	gtg	tcc	gtg	atg	2504
Leu	His	Gln	Asp	Lys	Gln	Leu	His	Ala	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Val	Met	
			170					175					180			
tgg	ccc	aat	agc	aag	tgc	cct	ctg	ctg	aag	gac	gac	ctg	gtg	ctg	atg	2552
Trp	Pro	Asn	Ser	Lys	Cys	Pro	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Met	
		185					190					195				
gat	agc	ccc	ggg	atc	gat	gtg	acc	acc	gaa	ctg	gac	agc	tgg	atc	gac	2600
Asp	Ser	Pro	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Thr	Glu	Leu	Asp	Ser	Trp	Ile	Asp	
		200				205					210					
aag	ttc	tgc	ctg	gac	gcc	gac	gtg	ttc	gtg	ctg	gtg	gcc	aat	agc	gag	2648
Lys	Phe	Cys	Leu	Asp	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Leu	Val	Ala	Asn	Ser	Glu	
	215				220					225					230	
agc	acc	ctg	atg	cag	acc	gag	aag	cac	ttt	ttc	cac	aag	gtg	tcc	gag	2696
Ser	Thr	Leu	Met	Gln	Thr	Glu	Lys	His	Phe	Phe	His	Lys	Val	Ser	Glu	
				235					240					245		
cgg	ctg	agc	aga	ccc	aat	atc	ttt	atc	ctg	aac	aac	aga	tgg	gac	gcc	2744
Arg	Leu	Ser	Arg	Pro	Asn	Ile	Phe	Ile	Leu	Asn	Asn	Arg	Trp	Asp	Ala	
			250					255					260			
agc	gcc	agc	gag	ccc	gag	tat	atg	gaa	gaa	gtg	cgg	cgg	cag	cat	atg	2792
Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Glu	Tyr	Met	Glu	Glu	Val	Arg	Arg	Gln	His	Met	
		265					270					275				
gaa	cgg	tgc	aca	tcc	ttt	ctg	gtg	gac	gag	ctg	ggc	gtc	gtg	gat	aga	2840
Glu	Arg	Cys	Thr	Ser	Phe	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Gly	Val	Val	Asp	Arg	
		280				285					290					
tct	cag	gcc	ggc	gac	aga	atc	ttc	ttt	gtg	tcc	gcc	aaa	gag	gtg	ctg	2888
Ser	Gln	Ala	Gly	Asp	Arg	Ile	Phe	Phe	Val	Ser	Ala	Lys	Glu	Val	Leu	
	295				300					305					310	
aac	gcc	cgg	att	cag	aaa	gcc	cag	gga	atg	cct	gaa	ggc	gga	ggt	gca	2936
Asn	Ala	Arg	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Gly	Gly	Gly	Ala	

																315																	320																	325																																	
ctg	gcc	gag	gga	ttt	caa	gtg	cgg	atg	ttc	gag	ttc	cag	aac	ttc	gag	2984																																																																			
Leu	Ala	Glu	Gly	Phe	Gln	Val	Arg	Met	Phe	Glu	Phe	Gln	Asn	Phe	Glu																																																																				
																330																	335																	340																																	
cgg	aga	ttc	gag	gag	tgc	atc	agc	cag	agc	gcc	gtc	aag	acc	aag	ttc	3032																																																																			
Arg	Arg	Phe	Glu	Glu	Cys	Ile	Ser	Gln	Ser	Ala	Val	Lys	Thr	Lys	Phe																																																																				
																345																	350																	355																																	
gag	cag	cat	acc	gtg	cgg	gcc	aag	cag	att	gcc	gaa	gcc	gtc	aga	ctg	3080																																																																			
Glu	Gln	His	Thr	Val	Arg	Ala	Lys	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Arg	Leu																																																																				
																360																	365																	370																																	
atc	atg	gac	agc	ctg	cat	atg	gcc	gcc	aga	gag	cag	cag	gtc	tac	tgc	3128																																																																			
Ile	Met	Asp	Ser	Leu	His	Met	Ala	Ala	Arg	Glu	Gln	Gln	Val	Tyr	Cys																																																																				
																375																	380																	385																	390																
gag	gaa	atg	cgg	gaa	gag	aga	cag	gac	cgg	ctg	aag	ttc	atc	gac	aag	3176																																																																			
Glu	Glu	Met	Arg	Glu	Glu	Arg	Gln	Asp	Arg	Leu	Lys	Phe	Ile	Asp	Lys																																																																				
																395																	400																	405																																	
cag	ctg	gaa	ctg	ctg	gcc	cag	gac	tac	aag	ctg	cgg	atc	aag	cag	atc	3224																																																																			
Gln	Leu	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile																																																																				
																410																	415																	420																																	
acc	gaa	gag	gtg	gaa	aga	cag	gtg	tcc	acc	gct	atg	gcc	gag	gaa	atc	3272																																																																			
Thr	Glu	Glu	Val	Glu	Arg	Gln	Val	Ser	Thr	Ala	Met	Ala	Glu	Glu	Ile																																																																				
																425																	430																	435																																	
aga	cgg	ctg	agc	gtg	ctg	gtc	gac	gac	tac	cag	atg	gac	ttt	cac	ccc	3320																																																																			
Arg	Arg	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Asp	Asp	Tyr	Gln	Met	Asp	Phe	His	Pro																																																																				
																440																	445																	450																																	
tct	cca	gtg	gtg	ctg	aaa	gtc	tac	aaa	aac	gag	ctg	cac	cgg	cac	atc	3368																																																																			
Ser	Pro	Val	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Lys	Asn	Glu	Leu	His	Arg	His	Ile																																																																				
																455																	460																	465																	470																
gag	gaa	ggc	ctg	ggc	aga	aac	atg	agc	gac	aga	tgc	agc	acc	gcc	atc	3416																																																																			
Glu	Glu	Gly	Leu	Gly	Arg	Asn	Met	Ser	Asp	Arg	Cys	Ser	Thr	Ala	Ile																																																																				
																475																	480																	485																																	
acc	aat	agc	ctg	cag	acc	atg	cag	cag	gac	atg	atc	gac	ggc	ctg	aaa	3464																																																																			
Thr	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Met	Gln	Gln	Asp	Met	Ile	Asp	Gly	Leu	Lys																																																																				
																490																	495																	500																																	
cct	ctg	ctg	cct	gtg	tcc	gtc	aga	tcc	cag	atc	gat	atg	ctg	gtg	ccc	3512																																																																			
Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Ser	Val	Arg	Ser	Gln	Ile	Asp	Met	Leu	Val	Pro																																																																				
																505																	510																	515																																	
cgg	cag	tgc	ttt	agc	ctg	aac	tac	gac	ctg	aac	tgc	gac	aag	ctg	tgc	3560																																																																			
Arg	Gln	Cys	Phe	Ser	Leu	Asn	Tyr	Asp	Leu	Asn	Cys	Asp	Lys	Leu	Cys																																																																				
																520																	525																	530																																	
gcc	gat	ttc	caa	gag	gac	atc	gag	ttt	cac	ttc	agc	ctc	ggc	tgg	aca	3608																																																																			
Ala	Asp	Phe	Gln	Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	His	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Thr																																																																				
																535																	540																	545																	550																

atg Met	ctg Leu	gtc Val	aac Asn	aga Arg 555	ttt Phe	ctg Leu	ggc Gly	ccc Pro	aag Lys 560	aac Asn	agc Ser	aga Arg	cgg Arg	gcc Ala 565	ctg Leu	3656
atg Met	ggc Gly	tac Tyr	aac Asn 570	gat Asp	cag Gln	gtg Val	cag Gln	agg Arg 575	ccc Pro	att Ile	cct Pro	ctg Leu	aca Thr 580	ccc Pro	gcc Ala	3704
aat Asn	cct Pro	agc Ser 585	atg Met	cct Pro	cca Pro	ctg Leu	cct Pro 590	cag Gln	ggc Gly	agc Ser	ctg Leu	aca Thr 595	caa Gln	gag Glu	gaa Glu	3752
ttc Phe	atg Met 600	gtg Val	tct Ser	atg Met	gtc Val	acc Thr 605	ggc Gly	ctg Leu	gcc Ala	agc Ser	ctg Leu 610	acc Thr	agc Ser	aga Arg	aca Thr	3800
tct Ser 615	atg Met	ggc Gly	atc Ile	ctg Leu	gtc Val 620	gtc Val	ggc Gly	ggc Gly	gtt Val	gtg Val 625	tgg Trp	aaa Lys	gct Ala	gtt Val	ggc Gly 630	3848
tgg Trp	cgg Arg	ctg Leu	atc Ile	gcc Ala 635	ctg Leu	agc Ser	ttt Phe	ggc Gly	ctg Leu 640	tat Tyr	ggc Gly	ctg Leu	ctg Leu	tac Tyr 645	gtg Val	3896
tac Tyr	gag Glu	aga Arg	ctg Leu 650	acc Thr	tgg Trp	acc Thr	acc Thr	aag Lys 655	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu	cgg Arg	gcc Ala 660	ttc Phe	aag Lys	3944
cgg Arg	cag Gln	ttt Phe 665	gtg Val	gaa Glu	cac His	gcc Ala	tcc Ser 670	gag Glu	aaa Lys	ctg Leu	cag Gln	ctg Leu 675	gtg Val	atc Ile	agc Ser	3992
tac Tyr	acc Thr 680	ggc Gly	agc Ser	aat Asn	tgc Cys	agc Ser 685	cac His	cag Gln	gtg Val	cag Gln	caa Gln 690	gag Glu	ctg Leu	tcc Ser	gga Gly	4040
aca Thr 695	ttc Phe	gcc Ala	cac His	ctg Leu	tgt Cys 700	cag Gln	cag Gln	gtc Val	gac Asp	gtg Val 705	acc Thr	aga Arg	gag Glu	aac Asn	ctg Leu 710	4088
gaa Glu	caa Gln	gag Glu	atc Ile	gcc Ala 715	gcc Ala	atg Met	aat Asn	aag Lys	aaa Lys 720	atc Ile	gag Glu	gtg Val	ctc Leu	gac Asp 725	tcc Ser	4136
ctg Leu	cag Gln	agc Ser	aag Lys 730	gcc Ala	aag Lys	ctg Leu	ctg Leu	aga Arg 735	aac Asn	aag Lys	gcc Ala	ggc Gly	tgg Trp 740	ctg Leu	gac Asp	4184
agc Ser	gag Glu	ctg Leu 745	aat Asn	atg Met	ttc Phe	acc Thr	cac His 750	cag Gln	tac Tyr	ctg Leu	cag Gln	cct Pro 755	agc Ser	cgc Arg	taa	4232
taaagcggcc gcaagcttgc acccgtaacct ttgggagcgc gcgccctcgt cgtgtcgtga																4292
cgtcacccgt tctgttggat ccttgagggc ttgctgaagg ctgtatgctg ttgacgtcca																4352

gaacctgttc tgttttggcc actgactgac agaacaggct ggacgtcaac aggacacaag 4412
gcctgttact agcactcaca tggaacaaat ggcccagatc agctttctag agtcgaccgc 4472
ggcggcgggc gccgcctaag gctcgaggat ctttttccct ctgccaaaaa ttatggggac 4532
atcatgaagc cccttgagca tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca 4592
atagtgtgtt ggaatTTTTT gtgtctctca ctcgataag gatcttccta gagcatggct 4652
acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaacccta gtgatggagt 4712
tggcactcc ctctctgcgc gctcgctgc tcactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc 4772
gacgccggg ctttgcccg gccgcctcag tgagcgagc agcgcgag 4821

<210> 76
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 76

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115 120 125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg
370 375 380

Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro
565 570 575

Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met Pro Pro Leu Pro Gln Gly
580 585 590

Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala
595 600 605

Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val
610 615 620

Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Lys Ala
645 650 655

Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu His Ala Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Thr His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

- <210> 77
- <211> 4905
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 載體基因體CB7. CI. hMfn2. GA. link. miR1518. rBG

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (1)..(130)
 <223> ITR

 <220>
 <221> 強化子
 <222> (259)..(562)
 <223> CMV強化子

 <220>
 <221> 啟動子
 <222> (561)..(842)
 <223> CB7啟動子

 <220>
 <221> 內含子
 <222> (935)..(1907)
 <223> 雞 β -肌動蛋白內含子

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1953)..(1958)
 <223> 科札克

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1959)..(4232)
 <223> 經工程化的人類Mfn2

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2174)..(2194)
 <223> miR538 mut

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3329)..(3349)
 <223> 突變的miR 1518

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4233)..(4314)
 <223> 連接子p4271

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4315)..(4342)
 <223> 5' 側

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4343)..(4363)
 <223> 大鼠 miR1518 AS

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (4364).. (4382)
<223> 環圈

<220>
<221> misc_feature
<222> (4383).. (4401)
<223> 大鼠miR 1518有義

<220>
<221> misc_feature
<222> (4402).. (4446)
<223> 3'側

<220>
<221> polyA訊息
<222> (4584).. (4710)
<223> 兔球蛋白polyA

<220>
<221> 重複區域
<222> (4776).. (4905)
<223> ITR

<400> 77
ctgcgcgctc gctogctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtogcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccog ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
aggaagatct gatatcacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 240
cccatatatg gagtcccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgctg gctgaccgcc 300
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 360
gactttccat tgacgtcaat ggtgggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca 420
tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgaogtc aatgacgga aatggccgcg 480
ctggcattat gccagttaca tgacottatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 540
attagtcacg gctattacca tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctcccat 600
ctcccccccc tccccacccc caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc 660
gatggggggcg gggggggggg gggggcgcg cccaggcggg gcggggcggg gcgagggggc 720
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagt 780
tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 840
gggagtcgct gcgcgctgcc ttgcggcggt gcccgcctc gccgcccct cgcggcgccc 900
gccccggctc tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcgggacg gcccttctcc 960
tcggggctgt aattagcgct tggtttaatg acggcttggt tcttttctgt ggctgcgtga 1020

aagccttgag	gggctccggg	agggcccttt	gtgcgggggg	agcggctcgg	ggggtgcgtg	1080
cgtgtgtgtg	tgcgtgggga	gcgccgcgtg	cggctccgcg	ctgcccggcg	gctgtgagcg	1140
ctgcggggcg	ggcgcggggc	tttgtgcgt	ccgcagtgtg	cgcgagggga	gcgcggccgg	1200
gggcggtgcc	ccgcggtgcg	gggggggctg	cgaggggaac	aaaggctcgc	tgcggggtgt	1260
gtgcgtgggg	gggtgagcag	ggggtgtggg	cgcgtcggtc	gggctgcaac	ccccctgca	1320
ccccctccc	cgagttgctg	agcacggccc	ggcttcgggt	gcggggctcc	gtacggggcg	1380
tggcgcgggg	ctgcgcgtgc	cgggcggggg	gtggcggcag	gtgggggtgc	cgggcggggc	1440
ggggccgcct	cgggcggggg	agggctcggg	ggaggggcgc	ggcggccccc	ggagcgccgg	1500
cggctgtcga	ggcgcggcga	gccgcagcca	ttgcctttta	tggtaatcgt	gcgagagggc	1560
gcagggactt	cctttgtccc	aaatctgtgc	ggagccgaaa	tctgggaggc	gccgccgcac	1620
ccctctagc	gggcgcgggg	cgaagcggtg	cggcgccggc	aggaaggaaa	tgggcgggga	1680
gggccttcgt	gcgtgcgcgc	gccgccgtcc	ccttctccct	ctccagcctc	ggggctgtcc	1740
gcggggggac	ggctgccttc	gggggggacg	gggcagggcg	gggttcgggt	tctggcgtgt	1800
gaccggcggc	tctagagcct	ctgctaacca	tgttcatgcc	ttcttctttt	tcctacagct	1860
cctgggcaac	gtgctggtta	ttgtgctgtc	tcatcatttt	ggcaaagaat	tcacgcgtgc	1920
taggatcccg	tacgacgcgt	gctagcaccg	gtgccacc	atg agc ctg ctg ttc agc		1976
				Met Ser Leu Leu Phe Ser		
				1	5	
cgg tgc aac	agc atc gtg	acc gtg aag	aaa aac aag	cgg cac atg gcc		2024
Arg Cys Asn	Ser Ile Val	Thr Val Lys	Lys Lys Asn	Lys Arg His	Met Ala	
	10		15		20	
gaa gtg aac	gcc tct cca	ctg aag cac	ttc gtg acc	gcc aag aag aag		2072
Glu Val Asn	Ala Ser Pro	Leu Lys His	Phe Val Thr	Ala Lys Lys Lys		
	25		30		35	
atc aac ggc	atc ttc gag	cag ctg ggc	gcc tac atc	caa gag agc gcc		2120
Ile Asn Gly	Ile Phe Glu	Gln Leu Gly	Ala Tyr Ile	Gln Glu Ser Ala		
	40		45		50	
acc ttc ctg	gaa gat acc	tac aga aac	gcc gag ctg	gac ccc gtg acc		2168
Thr Phe Leu	Glu Asp Thr	Tyr Arg Asn	Ala Glu Leu	Asp Pro Val Thr		
	55		60		65	
aca gag gaa	cag gtg ctg	gat gtg aag	ggc tac ctg	agc aaa gtg cgg		2216
Thr Glu Glu	Gln Val Leu	Asp Val Lys	Gly Tyr Leu	Ser Lys Val Arg		
	75		80		85	
ggc atc tct	gaa gtg ctg	gcc aga cgg	cat atg aag	gtg gcc ttt ttc		2264
Gly Ile Ser	Glu Val Leu	Ala Arg Arg	His Met Lys	Val Ala Phe Phe		

90					95					100									
ggc Gly	cgg Arg	acc Thr 105	agc Ser	aac Asn	ggc Gly	aag Lys	agc Ser 110	acc Thr	gtg Val	atc Ile	aat Asn	gcc Ala 115	atg Met	ctg Leu	tgg Trp	2312			
gac Asp	aaa Lys 120	gtg Val	ctg Leu	ccc Pro	tct Ser	gga Gly 125	atc Ile	ggc Gly	cac His	acc Thr 130	acc Thr	aac Asn	tgc Cys	ttt Phe	ctg Leu	2360			
aga Arg 135	gtg Val	gaa Glu	ggc Gly	acc Thr	gac Asp 140	ggc Gly	cac His	gag Glu	gca Ala	ttt Phe 145	ctg Leu	ctg Leu	aca Thr	gag Glu	ggc Gly 150	2408			
tcc Ser	gag Glu	gaa Glu	aag Lys	cgg Arg 155	agc Ser	gcc Ala	aag Lys	aca Thr 160	gtg Val	aac Asn	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala	cat His 165	gct Ala	2456			
ctg Leu	cac His	cag Gln 170	gat Asp	aag Lys	cag Gln	ctg Leu	cat His	gcc Ala 175	gga Gly	agc Ser	ctg Leu	gtg Val	tcc Ser 180	gtg Val	atg Met	2504			
tgg Trp	ccc Pro 185	aat Asn	agc Ser	aag Lys	tgc Cys	cct Pro 190	ctg Leu	ctg Leu	aag Lys	gac Asp	gac Asp	ctg Leu 195	gtg Val	ctg Leu	atg Met	2552			
gat Asp	agc Ser 200	ccc Pro	ggg Gly	atc Ile	gat Asp 205	gtg Val	acc Thr	acc Thr	gaa Glu	ctg Leu	gac Asp 210	agc Ser	tgg Trp	atc Ile	gac Asp	2600			
aag Lys 215	ttc Phe	tgc Cys	ctg Leu	gac Asp	gcc Ala 220	gac Asp	gtg Val	ttc Phe	gtg Val	ctg Leu 225	gtg Val	gcc Ala	aat Asn	agc Ser	gag Glu 230	2648			
agc Ser	acc Thr	ctg Leu	atg Met	cag Gln 235	acc Thr	gag Glu	aag Lys	cac His 240	ttt Phe	ttc Phe	cac His	aag Lys	gtg Val	tcc Ser 245	gag Glu	2696			
cgg Arg	ctg Leu	agc Ser	aga Arg 250	ccc Pro	aat Asn	atc Ile	ttt Phe 255	atc Ile	ctg Leu	aac Asn	aac Asn	aga Arg 260	tgg Trp	gac Asp	gcc Ala	2744			
agc Ser	gcc Ala	agc Ser 265	gag Glu	ccc Pro	gag Glu	tat Tyr 270	atg Met	gaa Glu	gaa Glu	gtg Val	cgg Arg 275	cgg Arg	cag Gln	cat His	atg Met	2792			
gaa Glu	cgg Arg 280	tgc Cys	aca Thr	tcc Ser	ttt Phe	ctg Leu 285	gtg Val	gac Asp	gag Glu	ctg Leu	ggc Gly 290	gtc Val	gtg Val	gat Asp	aga Arg	2840			
tct Ser 295	cag Gln	gcc Ala	ggc Gly	gac Asp	aga Arg 300	atc Ile	ttc Phe	ttt Phe	gtg Val	tcc Ser 305	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu	gtg Val	ctg Leu 310	2888			
aac Asn	gcc Ala	cgg Arg	att Ile 315	cag Gln	aaa Lys	gcc Ala	cag Gln	gga Gly 320	atg Met	cct Pro	gaa Glu	ggc Gly	gga Gly 325	ggt Gly	gca Ala	2936			

ctg gcc gag gga ttt caa gtg cgg atg ttc gag ttc cag aac ttc gag Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe Glu Phe Gln Asn Phe Glu 330 335 340	2984
cgg aga ttc gag gag tgc atc agc cag agc gcc gtc aag acc aag ttc Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe 345 350 355	3032
gag cag cat acc gtg cgg gcc aag cag att gcc gaa gcc gtc aga ctg Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu 360 365 370	3080
atc atg gac agc ctg cat atg gcc gcc aga gag cag cag gtc tac tgc Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg Glu Gln Gln Val Tyr Cys 375 380 385 390	3128
gag gaa atg cgg gaa gag aga cag gac cgg ctg aag ttc atc gac aag Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg Leu Lys Phe Ile Asp Lys 395 400 405	3176
cag ctg gaa ctg ctg gcc cag gac tac aag ctg cgg atc aag cag atc Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys Leu Arg Ile Lys Gln Ile 410 415 420	3224
acc gaa gag gtg gaa aga cag gtg tcc acc gct atg gcc gag gaa atc Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr Ala Met Ala Glu Glu Ile 425 430 435	3272
aga cgg ctg agc gtg ctg gtc gac gac tac cag atg gac ttt cac ccc Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr Gln Met Asp Phe His Pro 440 445 450	3320
tct cca gtg gtg ctg aaa gtc tac aaa aac gag ctg cac cgg cac atc Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn Glu Leu His Arg His Ile 455 460 465 470	3368
gag gaa ggc ctg ggc aga aac atg agc gac aga tgc agc acc gcc atc Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp Arg Cys Ser Thr Ala Ile 475 480 485	3416
acc aat agc ctg cag acc atg cag cag gac atg atc gac ggc ctg aaa Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp Met Ile Asp Gly Leu Lys 490 495 500	3464
cct ctg ctg cct gtg tcc gtc aga tcc cag atc gat atg ctg gtg ccc Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln Ile Asp Met Leu Val Pro 505 510 515	3512
cgg cag tgc ttt agc ctg aac tac gac ctg aac tgc gac aag ctg tgc Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu Asn Cys Asp Lys Leu Cys 520 525 530	3560
gcc gat ttc caa gag gac atc gag ttt cac ttc agc ctc ggc tgg aca Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His Phe Ser Leu Gly Trp Thr 535 540 545 550	3608

atg Met	ctg Leu	gtc Val	aac Asn	aga Arg 555	ttt Phe	ctg Leu	ggc Gly	ccc Pro	aag Lys 560	aac Asn	agc Ser	aga Arg	cgg Arg	gcc Ala 565	ctg Leu	3656
atg Met	ggc Gly	tac Tyr	aac Asn 570	gat Asp	cag Gln	gtg Val	cag Gln	agg Arg 575	ccc Pro	att Ile	cct Pro	ctg Leu	aca Thr 580	ccc Pro	gcc Ala	3704
aat Asn	cct Pro	agc Ser 585	atg Met	cct Pro	cca Pro	ctg Leu	cct Pro 590	cag Gln	ggc Gly	agc Ser	ctg Leu	aca Thr 595	caa Gln	gag Glu	gaa Glu	3752
ttc Phe	atg Met 600	gtg Val	tct Ser	atg Met	gtc Val	acc Thr 605	ggc Gly	ctg Leu	gcc Ala	agc Ser	ctg Leu 610	acc Thr	agc Ser	aga Arg	aca Thr	3800
tct Ser 615	atg Met	ggc Gly	atc Ile	ctg Leu	gtc Val 620	gtc Val	ggc Gly	ggc Gly	gtt Val	gtg Val 625	tgg Trp	aaa Lys	gct Ala	gtt Val	ggc Gly 630	3848
tgg Trp	cgg Arg	ctg Leu	atc Ile	gcc Ala 635	ctg Leu	agc Ser	ttt Phe	ggc Gly	ctg Leu 640	tat Tyr	ggc Gly	ctg Leu	ctg Leu	tac Tyr 645	gtg Val	3896
tac Tyr	gag Glu	aga Arg	ctg Leu 650	acc Thr	tgg Trp	acc Thr	acc Thr	aag Lys 655	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu	cgg Arg	gcc Ala 660	ttc Phe	aag Lys	3944
cgg Arg	cag Gln	ttt Phe 665	gtg Val	gaa Glu	cac His	gcc Ala	tcc Ser 670	gag Glu	aaa Lys	ctg Leu	cag Gln	ctg Leu 675	gtg Val	atc Ile	agc Ser	3992
tac Tyr	acc Thr 680	ggc Gly	agc Ser	aat Asn	tgc Cys	agc Ser 685	cac His	cag Gln	gtg Val	cag Gln	caa Gln 690	gag Glu	ctg Leu	tcc Ser	gga Gly	4040
aca Thr 695	ttc Phe	gcc Ala	cac His	ctg Leu	tgt Cys 700	cag Gln	cag Gln	gtc Val	gac Asp	gtg Val 705	acc Thr	aga Arg	gag Glu	aac Asn	ctg Leu 710	4088
gaa Glu	caa Gln	gag Glu	atc Ile	gcc Ala 715	gcc Ala	atg Met	aat Asn	aag Lys	aaa Lys	atc Ile	gag Glu	gtg Val	ctc Leu	gac Asp 725	tcc Ser	4136
ctg Leu	cag Gln	agc Ser	aag Lys 730	gcc Ala	aag Lys	ctg Leu	ctg Leu	aga Arg 735	aac Asn	aag Lys	gcc Ala	ggc Gly	tgg Trp 740	ctg Leu	gac Asp	4184
agc Ser	gag Glu	ctg Leu 745	aat Asn	atg Met	ttc Phe	acc Thr	cac His 750	cag Gln	tac Tyr	ctg Leu	cag Gln	cct Pro 755	agc Ser	cgc Arg	taa	4232
taaagcggcc gcaagcttgc acccgtaacct ttgggagcgc gcgccctcgt cgtgtcgtga																4292
cgtcacccgt tctgtttggat ccttgagggc ttgctgaagg ctgtatgctg ttcttataaa																4352
ccttgaggac agttttggcc actgactgac tgtcctcagt ttataagaac aggacacaag																4412

gcctgttact agcactcaca tggaacaaat ggcccagatc tagggtgggg ccacctgccg 4472
gtaggtgtgc ggtaggcttt tctccgtcgc aggacgcagg gttcgggcct agagcttata 4532
gttaagcttt ctagagtoga cccgggcggc ggccggccgc taaggctoga ggatcttttt 4592
ccctctgcc aaaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac ttctggctaa 4652
taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct ctactcgga 4712
taaggatctt cctagagcat ggctacgtag ataagtagca tggcgggtta atcattaact 4772
acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg 4832
aggccggggc accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg 4892
agcgagcgcg cag 4905

<210> 78
<211> 757
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 78

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115 120 125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu
245 250 255

Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu
260 265 270

Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu
275 280 285

Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met
305 310 315 320

Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu Gly Phe Gln Val Arg Met Phe
325 330 335

Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser
340 345 350

Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile
355 360 365

Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp Ser Leu His Met Ala Ala Arg
370 375 380

Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg
385 390 395 400

Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu Leu Leu Ala Gln Asp Tyr Lys
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Gln Ile Thr Glu Glu Val Glu Arg Gln Val Ser Thr
420 425 430

Ala Met Ala Glu Glu Ile Arg Arg Leu Ser Val Leu Val Asp Asp Tyr
435 440 445

Gln Met Asp Phe His Pro Ser Pro Val Val Leu Lys Val Tyr Lys Asn
450 455 460

Glu Leu His Arg His Ile Glu Glu Gly Leu Gly Arg Asn Met Ser Asp
465 470 475 480

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro

565															570															575																													
Ile	Pro	Leu	Thr	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Gly																																												
580															585															590																													
Ser	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Phe	Met	Val	Ser	Met	Val	Thr	Gly	Leu	Ala																																												
595															600															605																													
Ser	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Ser	Met	Gly	Ile	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Val																																												
610															615															620																													
Val	Trp	Lys	Ala	Val	Gly	Trp	Arg	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu																																												
625															630															635															640														
Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Tyr	Glu	Arg	Leu	Thr	Trp	Thr	Thr	Lys	Ala																																												
645															650															655																													
Lys	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Arg	Gln	Phe	Val	Glu	His	Ala	Ser	Glu	Lys																																												
660															665															670																													
Leu	Gln	Leu	Val	Ile	Ser	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Ser	His	Gln	Val																																												
675															680															685																													
Gln	Gln	Glu	Leu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	His	Leu	Cys	Gln	Gln	Val	Asp																																												
690															695															700																													
Val	Thr	Arg	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Ala	Met	Asn	Lys	Lys																																												
705															710															715															720														
Ile	Glu	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Gln	Ser	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Arg	Asn																																												
725															730															735																													
Lys	Ala	Gly	Trp	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu	Asn	Met	Phe	Thr	His	Gln	Tyr																																												
740															745															750																													
Leu	Gln	Pro	Ser	Arg																																																							
755																																																											

<210> 79
<211> 4565
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 載體基因體CB7. CI. hMfn2. GA. rBG

<220>

<221> 複製起點

<222> (1).. (130)

<223> ITR

<220>

<221> 強化子

<222> (259).. (562)

<223> CMV強化子

<220>

<221> 啟動子

<222> (561).. (842)

<223> CB7啟動子

<220>

<221> TATA訊息

<222> (815).. (818)

<223> TATA訊息

<220>

<221> 內含子

<222> (935).. (1907)

<223> 雞 β -肌動蛋白內含子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1940).. (1948)

<223> 科札克

<220>

<221> CDS

<222> (1946).. (4219)

<223> 經工程化的人類Mfn2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2161).. (2181)

<223> miR538 mut

<220>

<221> misc_feature

<222> (3316).. (3336)

<223> 突變的miR1518

<220>

<221> polyA訊息

<222> (4244).. (4370)

<223> 兔球蛋白polyA

<220>

<221> 重複區域

<222> (4436).. (4565)

<223> ITR

<400> 79	
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctacgta gccatgctct	180
aggaagatct gatatacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag	240
cccatatatg gaggtcgcg ttacataact tacggtaaat ggccgcctg gctgaccgcc	300
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg	360
gactttccat tgacgtcaat gggtaggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca	420
tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgaogtc aatgacggta aatggccgcg	480
ctggcattat gccagtaga tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt	540
attagtcacg gctattacca tggtagaggt gagccccacg ttctgcttca ctctcccat	600
ctccccccc tccccacccc caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc	660
gatggggggc gggggggggg gggggcgogc gccaggcggg gcggggcggg gcgagggggc	720
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagt	780
tccttttatg gcgagggcg ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc	840
gggagtcgct gcgcgctgcc ttgcggcgt gcccgctcc gccggcgct cgcggcgccc	900
gccccggctc tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcggggacg gcccttctcc	960
tccgggctgt aattagcgt tggtttaatg acggcttgtt tcttttctgt ggctgcgtga	1020
aagccttagg gggctccggg agggcccttt gtgcgggggg agcggctcgg ggggtgcgtg	1080
cgtgtgtgtg tgctgggga gcgcgcgtg cggctccgcg ctgcccggcg gctgtgagcg	1140
ctgcggggcg ggcgcggggc tttgtgcgt ccgcagtgtg cgcgagggga gcgcggccgg	1200
gggcgggtgcc ccgcgggtgc gggggggctg cgaggggaac aaaggctgcg tgcgggggtg	1260
gtgcgtgggg gggtagcag ggggtgtggg cgcgtcggtc gggctgcaac cccccctgca	1320
ccccctccc cgagttgctg agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtacggggcg	1380
tggcgcgggg ctgcgcgtgc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc	1440
ggggccgcct cgggcggggg agggctcggg ggagggcgcg gccggccccc ggagcgccgg	1500
cggctgtcga ggcgcggcga gccgcagcca ttgcctttta tggtaatcgt gcgagagggc	1560
gcagggactt cctttgtccc aaatctgtgc ggagccgaaa tctgggaggc gccgccgcac	1620
cccccttagc gggcgcgggg cgaagcggtg cggcgccggc aggaaggaaa tgggcgggga	1680

gggccttcgt gcgtgcgcgc gccgccgtcc ccttctccct ctccagcctc ggggctgtcc	1740
gcgggggggac ggctgccttc ggggggggacg gggcagggcg gggttcggct tctggcgtgt	1800
gaccggcggc tctagagcct ctgctaacca tgttcatgcc ttcttctttt tctacagct	1860
cctgggcaac gtgctggtta ttgtgctgtc tcatcatitt ggcaaagaat tcacgcgtgc	1920
tagcaaggat ccaccggtcg ccacc atg agc ctg ctg ttc agc cgg tgc aac Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn 1 5	1972
agc atc gtg acc gtg aag aaa aac aag cgg cac atg gcc gaa gtg aac Ser Ile Val Thr Val Lys Lys Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn 10 15 20 25	2020
gcc tct cca ctg aag cac ttc gtg acc gcc aag aag aag atc aac gga Ala Ser Pro Leu Lys His Phe Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly 30 35 40	2068
atc ttc gag cag ctg ggc gcc tac atc caa gag agc gcc acc ttc ctg Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu 45 50 55	2116
gaa gat acc tac aga aac gcc gag ctg gac ccc gtg acc aca gag gaa Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu 60 65 70	2164
cag gtg ctg gat gtg aag ggc tac ctg agc aaa gtg cgg ggc atc tct Gln Val Leu Asp Val Lys Gly Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser 75 80 85	2212
gaa gtg ctg gcc aga cgg cat atg aag gtg gcc ttt ttc ggc cgg acc Glu Val Leu Ala Arg Arg His Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr 90 95 100 105	2260
agc aac ggc aag agc acc gtg atc aat gcc atg ctg tgg gac aaa gtg Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val 110 115 120	2308
ctg ccc tct gga atc ggc cac acc acc aac tgc ttt ctg aga gtg gaa Leu Pro Ser Gly Ile Gly His Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu 125 130 135	2356
ggc acc gac ggc cac gag gca ttt ctg ctg aca gag ggc tcc gag gaa Gly Thr Asp Gly His Glu Ala Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu 140 145 150	2404
aag cgg agc gcc aag aca gtg aac cag ctg gcc cat gct ctg cac cag Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln 155 160 165	2452
gat aag cag ctg cat gcc gga agc ctg gtg tcc gtg atg tgg ccc aat Asp Lys Gln Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn 170 175 180 185	2500

agc aag tgc cct ctg ctg aag gac gac ctg gtg ctg atg gat agc ccc Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro 190 195 200	2548
ggg atc gat gtg acc acc gaa ctg gac agc tgg atc gac aag ttc tgc Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys 205 210 215	2596
ctg gac gcc gac gtg ttc gtg ctg gtg gcc aat agc gag agc acc ctg Leu Asp Ala Asp Val Phe Val Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu 220 225 230	2644
atg cag acc gag aag cac ttt ttc cac aag gtg tcc gag cgg ctg agc Met Gln Thr Glu Lys His Phe Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser 235 240 245	2692
aga ccc aat atc ttt atc ctg aac aac aga tgg gac gcc agc gcc agc Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu Asn Asn Arg Trp Asp Ala Ser Ala Ser 250 255 260 265	2740
gag ccc gag tat atg gaa gaa gtg cgg cgg cag cat atg gaa cgg tgc Glu Pro Glu Tyr Met Glu Glu Val Arg Arg Gln His Met Glu Arg Cys 270 275 280	2788
aca tcc ttt ctg gtg gac gag ctg ggc gtc gtg gat aga tct cag gcc Thr Ser Phe Leu Val Asp Glu Leu Gly Val Val Asp Arg Ser Gln Ala 285 290 295	2836
ggc gac aga atc ttc ttt gtg tcc gcc aaa gag gtg ctg aac gcc cgg Gly Asp Arg Ile Phe Phe Val Ser Ala Lys Glu Val Leu Asn Ala Arg 300 305 310	2884
att cag aaa gcc cag gga atg cct gaa ggc gga ggt gca ctg gcc gag Ile Gln Lys Ala Gln Gly Met Pro Glu Gly Gly Gly Ala Leu Ala Glu 315 320 325	2932
gga ttt caa gtg cgg atg ttc gag ttc cag aac ttc gag cgg aga ttc Gly Phe Gln Val Arg Met Phe Glu Phe Gln Asn Phe Glu Arg Arg Phe 330 335 340 345	2980
gag gag tgc atc agc cag agc gcc gtc aag acc aag ttc gag cag cat Glu Glu Cys Ile Ser Gln Ser Ala Val Lys Thr Lys Phe Glu Gln His 350 355 360	3028
acc gtg cgg gcc aag cag att gcc gaa gcc gtc aga ctg atc atg gac Thr Val Arg Ala Lys Gln Ile Ala Glu Ala Val Arg Leu Ile Met Asp 365 370 375	3076
agc ctg cat atg gcc gcc aga gag cag cag gtc tac tgc gag gaa atg Ser Leu His Met Ala Ala Arg Glu Gln Gln Val Tyr Cys Glu Glu Met 380 385 390	3124
cgg gaa gag aga cag gac cgg ctg aag ttc atc gac aag cag ctg gaa Arg Glu Glu Arg Gln Asp Arg Leu Lys Phe Ile Asp Lys Gln Leu Glu 395 400 405	3172
ctg ctg gcc cag gac tac aag ctg cgg atc aag cag atc acc gaa gag	3220

Leu 410	Leu	Ala	Gln	Asp	Tyr 415	Lys	Leu	Arg	Ile	Lys 420	Gln	Ile	Thr	Glu	Glu 425	
gtg Val	gaa Glu	aga Arg	cag Gln	gtg Val	tcc Ser	acc Thr	gct Ala	atg Met	gcc Ala	gag Glu	gaa Glu	atc Ile	aga Arg	cgg Arg	ctg Leu	3268
			430					435						440		
agc Ser	gtg Val	ctg Leu	gtc Val	gac Asp	gac Asp	tac Tyr	cag Gln	atg Met	gac Asp	ttt Phe	cac His	ccc Pro	tct Ser	cca Pro	gtg Val	3316
			445					450					455			
gtg Val	ctg Leu	aaa Lys	gtc Val	tac Tyr	aaa Lys	aac Asn	gag Glu	ctg Leu	cac His	cgg Arg	cac His	atc Ile	gag Glu	gaa Glu	ggc Gly	3364
		460					465					470				
ctg Leu	ggc Gly	aga Arg	aac Asn	atg Met	agc Ser	gac Asp	aga Arg	tgc Cys	agc Ser	acc Thr	gcc Ala	atc Ile	acc Thr	aat Asn	agc Ser	3412
	475					480					485					
ctg Leu	cag Gln	acc Thr	atg Met	cag Gln	cag Gln	gac Asp	atg Met	atc Ile	gac Asp	ggc Gly	ctg Leu	aaa Lys	cct Pro	ctg Leu	ctg Leu	3460
	490				495					500				505		
cct Pro	gtg Val	tcc Ser	gtc Val	aga Arg	tcc Ser	cag Gln	atc Ile	gat Asp	atg Met	ctg Leu	gtg Val	ccc Pro	cgg Arg	cag Gln	tgc Cys	3508
			510						515					520		
ttt Phe	agc Ser	ctg Leu	aac Asn	tac Tyr	gac Asp	ctg Leu	aac Asn	tgc Cys	gac Asp	aag Lys	ctg Leu	tgc Cys	gcc Ala	gat Asp	ttc Phe	3556
			525					530					535			
caa Gln	gag Glu	gac Asp	atc Ile	gag Glu	ttt Phe	cac His	ttc Phe	agc Ser	ctc Leu	ggc Gly	tgg Trp	aca Thr	atg Met	ctg Leu	gtc Val	3604
		540					545					550				
aac Asn	aga Arg	ttt Phe	ctg Leu	ggc Gly	ccc Pro	aag Lys	aac Asn	agc Ser	aga Arg	cgg Arg	gcc Ala	ctg Leu	atg Met	ggc Gly	tac Tyr	3652
	555					560					565					
aac Asn	gat Asp	cag Gln	gtg Val	cag Gln	agg Arg	ccc Pro	att Ile	cct Pro	ctg Leu	aca Thr	ccc Pro	gcc Ala	aat Asn	cct Pro	agc Ser	3700
	570				575					580					585	
atg Met	cct Pro	cca Pro	ctg Leu	cct Pro	cag Gln	ggc Gly	agc Ser	ctg Leu	aca Thr	caa Gln	gag Glu	gaa Glu	ttc Phe	atg Met	gtg Val	3748
			590						595					600		
tct Ser	atg Met	gtc Val	acc Thr	ggc Gly	ctg Leu	gcc Ala	agc Ser	ctg Leu	acc Thr	agc Ser	aga Arg	aca Thr	tct Ser	atg Met	ggc Gly	3796
			605					610					615			
atc Ile	ctg Leu	gtc Val	gtc Val	ggc Gly	ggc Gly	gtt Val	gtg Val	tgg Trp	aaa Lys	gct Ala	gtt Val	ggc Gly	tgg Trp	cgg Arg	ctg Leu	3844
		620					625					630				
atc Ile	gcc Ala	ctg Leu	agc Ser	ttt Phe	ggc Gly	ctg Leu	tat Tyr	ggc Gly	ctg Leu	ctg Leu	tac Tyr	gtg Val	tac Tyr	gag Glu	aga Arg	3892

635	640	645	
ctg acc tgg acc acc aag gcc aaa gag cgg gcc ttc aag cgg cag ttt			3940
Leu Thr Trp Thr Thr Lys Ala Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe			
650	655	660	665
gtg gaa cac gcc tcc gag aaa ctg cag ctg gtg atc agc tac acc ggc			3988
Val Glu His Ala Ser Glu Lys Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly			
	670	675	680
agc aat tgc agc cac cag gtg cag caa gag ctg tcc gga aca ttc gcc			4036
Ser Asn Cys Ser His Gln Val Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala			
	685	690	695
cac ctg tgt cag cag gtc gac gtg acc aga gag aac ctg gaa caa gag			4084
His Leu Cys Gln Gln Val Asp Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu			
	700	705	710
atc gcc gcc atg aat aag aaa atc gag gtg ctc gac tcc ctg cag agc			4132
Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser			
	715	720	725
aag gcc aag ctg ctg aga aac aag gcc ggc tgg ctg gac agc gag ctg			4180
Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu			
	730	735	740
aat atg ttc acc cac cag tac ctg cag cct agc cgc taa taaagcggcc			4229
Asn Met Phe Thr His Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg			
	750	755	
gcctaaggct cgaggatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc			4289
ttgagcatct gaattctggc taataaagga aatttatctt cattgcaata gtgtgttgga			4349
atctttttgtg tctctcactc ggataaggat cttcctagag catggctaag tagataagta			4409
gcatggcggg ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttag ccactccctc			4469
tctgcgcgct cgtctgctca ctgaggcgg gcgaccaaag gtcgcccgcac gcccgggctt			4529
tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcag			4565

- <210> 80
- <211> 757
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成構築體
- <400> 80

Met Ser Leu Leu Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Val Thr Val Lys Lys
1 5 10 15

Asn Lys Arg His Met Ala Glu Val Asn Ala Ser Pro Leu Lys His Phe
20 25 30

Val Thr Ala Lys Lys Lys Ile Asn Gly Ile Phe Glu Gln Leu Gly Ala
35 40 45

Tyr Ile Gln Glu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Asn Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Pro Val Thr Thr Glu Glu Gln Val Leu Asp Val Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Ser Lys Val Arg Gly Ile Ser Glu Val Leu Ala Arg Arg His
85 90 95

Met Lys Val Ala Phe Phe Gly Arg Thr Ser Asn Gly Lys Ser Thr Val
100 105 110

Ile Asn Ala Met Leu Trp Asp Lys Val Leu Pro Ser Gly Ile Gly His
115 120 125

Thr Thr Asn Cys Phe Leu Arg Val Glu Gly Thr Asp Gly His Glu Ala
130 135 140

Phe Leu Leu Thr Glu Gly Ser Glu Glu Lys Arg Ser Ala Lys Thr Val
145 150 155 160

Asn Gln Leu Ala His Ala Leu His Gln Asp Lys Gln Leu His Ala Gly
165 170 175

Ser Leu Val Ser Val Met Trp Pro Asn Ser Lys Cys Pro Leu Leu Lys
180 185 190

Asp Asp Leu Val Leu Met Asp Ser Pro Gly Ile Asp Val Thr Thr Glu
195 200 205

Leu Asp Ser Trp Ile Asp Lys Phe Cys Leu Asp Ala Asp Val Phe Val
210 215 220

Leu Val Ala Asn Ser Glu Ser Thr Leu Met Gln Thr Glu Lys His Phe
225 230 235 240

Phe His Lys Val Ser Glu Arg Leu Ser Arg Pro Asn Ile Phe Ile Leu

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

Arg Cys Ser Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Gln Thr Met Gln Gln Asp
485 490 495

Met Ile Asp Gly Leu Lys Pro Leu Leu Pro Val Ser Val Arg Ser Gln
500 505 510

Ile Asp Met Leu Val Pro Arg Gln Cys Phe Ser Leu Asn Tyr Asp Leu
515 520 525

Asn Cys Asp Lys Leu Cys Ala Asp Phe Gln Glu Asp Ile Glu Phe His
530 535 540

Phe Ser Leu Gly Trp Thr Met Leu Val Asn Arg Phe Leu Gly Pro Lys
545 550 555 560

Asn Ser Arg Arg Ala Leu Met Gly Tyr Asn Asp Gln Val Gln Arg Pro
565 570 575

Ile Pro Leu Thr Pro Ala Asn Pro Ser Met Pro Pro Leu Pro Gln Gly
580 585 590

Ser Leu Thr Gln Glu Glu Phe Met Val Ser Met Val Thr Gly Leu Ala
595 600 605

Ser Leu Thr Ser Arg Thr Ser Met Gly Ile Leu Val Val Gly Gly Val
610 615 620

Val Trp Lys Ala Val Gly Trp Arg Leu Ile Ala Leu Ser Phe Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Gly Leu Leu Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Thr Trp Thr Thr Lys Ala
645 650 655

Lys Glu Arg Ala Phe Lys Arg Gln Phe Val Glu His Ala Ser Glu Lys
660 665 670

Leu Gln Leu Val Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Asn Cys Ser His Gln Val
675 680 685

Gln Gln Glu Leu Ser Gly Thr Phe Ala His Leu Cys Gln Gln Val Asp
690 695 700

Val Thr Arg Glu Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Met Asn Lys Lys
705 710 715 720

Ile Glu Val Leu Asp Ser Leu Gln Ser Lys Ala Lys Leu Leu Arg Asn
725 730 735

Lys Ala Gly Trp Leu Asp Ser Glu Leu Asn Met Phe Thr His Gln Tyr
740 745 750

Leu Gln Pro Ser Arg
755

<210> 81
<211> 2211
<212> DNA
<213> 腺相關病毒hu68

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2211)
<223> AAVhu68

<400> 81	
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt	48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser	
1 5 10 15	
gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc	96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro	
20 25 30	
aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg	144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro	
35 40 45	
ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg	192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro	
50 55 60	
gtc aac gaa gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac	240
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp	
65 70 75 80	
cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc	288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala	
85 90 95	
gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc	336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly	
100 105 110	

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro 115 120 125	384
ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg 130 135 140	432
cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gtg ggt att ggc Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly 145 150 155 160	480
aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr 165 170 175	528
ggc gac aca gag tca gtc ccc gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro 180 185 190	576
gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly 195 200 205	624
gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser 210 215 220	672
tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile 225 230 235 240	720
acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu 245 250 255	768
tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn 260 265 270	816
gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg 275 280 285	864
ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg caa aga ctc atc aac aac Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn 290 295 300	912
aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile 305 310 315 320	960
cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gct aat Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn 325 330 335	1008
aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc	1056

Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu	
			340					345					350			
cgc	tac	gtg	ctc	ggg	tgc	gct	cac	gag	ggc	tgc	ctc	cgc	cgc	ttc	cca	1104
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	
		355					360					365				
gcg	gac	gtt	ttc	atg	att	cct	cag	tac	ggg	tat	cta	acg	ctt	aat	gat	1152
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	
	370					375					380					
gga	agc	caa	gcc	gtg	ggt	cgt	tgc	tcc	ttt	tac	tgc	ctg	gaa	tat	ttc	1200
Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	
385					390					395					400	
cgc	tgc	caa	atg	cta	aga	acg	ggt	aac	aac	ttc	cag	ttc	agc	tac	gag	1248
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	
			405						410					415		
ttt	gag	aac	gta	cct	ttc	cat	agc	agc	tat	gct	cac	agc	caa	agc	ctg	1296
Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	
			420					425					430			
gac	cga	ctc	atg	aat	cca	ctc	atc	gac	caa	tac	ttg	tac	tat	ctc	tca	1344
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	
		435					440					445				
aag	act	att	aac	ggt	tct	gga	cag	aat	caa	caa	acg	cta	aaa	ttc	agt	1392
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser	
	450					455					460					
gtg	gcc	gga	ccc	agc	aac	atg	gct	gtc	cag	gga	aga	aac	tac	ata	cct	1440
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro	
465					470					475					480	
gga	ccc	agc	tac	cga	caa	caa	cgt	gtc	tca	acc	act	gtg	act	caa	aac	1488
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	
			485						490					495		
aac	aac	agc	gaa	ttt	gct	tgg	cct	gga	gct	tct	tct	tgg	gct	ctc	aat	1536
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	
			500					505					510			
gga	cgt	aat	agc	ttg	atg	aat	cct	gga	cct	gct	atg	gcc	agc	cac	aaa	1584
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
		515					520					525				
gaa	gga	gag	gac	cgt	ttc	ttt	cct	ttg	tct	gga	tct	tta	att	ttt	ggc	1632
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	
	530					535					540					
aaa	caa	gga	act	gga	aga	gac	aac	gtg	gat	gcg	gac	aaa	gtc	atg	ata	1680
Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	
545					550					555					560	
acc	aac	gaa	gaa	gaa	att	aaa	act	acc	aac	cca	gta	gca	acg	gag	tcc	1728
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	

	565					570					575					
tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag	1776															
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln																
	580					585					590					
acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag	1824															
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln																
	595					600					605					
gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac	1872															
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His																
	610					615					620					
acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg	1920															
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met																
	625					630					635					
aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg	1968															
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala																
	645					650					655					
gat cct cca acg gct ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc	2016															
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr																
	660					665					670					
cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag att gag tgg gag ctg cag	2064															
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln																
	675					680					685					
aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac	2112															
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn																
	690					695					700					
tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gtt	2160															
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val																
	705					710					715					
tat tct gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg	2208															
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu																
	725					730					735					
taa																2211

<210> 82
<211> 736
<212> PRT
<213> 腺相關病毒hu68

<400> 82

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	
				485					490					495		
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	
			500					505					510			
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
		515					520					525				
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	
	530					535					540					
Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	
545					550					555					560	
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	
				565					570					575		
Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	
			580					585					590			
Thr	Gly	Trp	Val	Gln	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	
		595					600					605				
Asp	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	
	610					615					620					
Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	
625					630					635					640	
Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	
				645					650					655		
Asp	Pro	Pro	Thr	Ala	Phe	Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	Ser	Phe	Ile	Thr	
			660					665					670			
Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln	
		675					680					685				
Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn	
	690					695					700					

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 83
<211> 2211
<212> DNA
<213> 腺相關病毒hu68

<400> 83
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctcagtga aggcattcgc 60
gagtgggtggg ctttgaaacc tggagccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120
aacgctcggg gtotttgtct tccgggttac aaataccttg gaccgggcaa cggactcgac 180
aagggggagc cggtaacga agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
cagcagctca aggcgggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgcgagttc 300
caggagcggc tcaaagaaga tacgtotitt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggg ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420
ggaaagaaga ggctgttaga gcagtctct caggaaccgg actcctccgt ggggtattggc 480
aaatcgggtg cacagccgc taaaaagaga ctcaatttgc gtcagactgg cgacacagag 540
tcagtccccg accctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct 600
ottacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcac 720
accaccagca ccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaata 780
tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgct acttcggcta cagcaccccc 840
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccaattct caccacgtga ctggcaaaga 900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgctaataa cttaccagc 1020
acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080
gagggctgcc tccgcctgtt cccagcggac gttttcatga ttctcagta tggatacctc 1140
acctgaacg acggcagtca ggcggtgggc cgtcatcct tctactgcct ggagtacttc 1200
ccttcgcaga tgctgaggac tggcaacaac ttccagttca gctacgagtt cgagaacgtc 1260
cctttccaca gcagctacgc ccacagccag agtttggacc gcttgatgaa ccctctgatc 1320

gaccagtacc tgtactacct gtcaaagacg atcaacgggt ctggccagaa ccagcagacg 1380
ctgaagttca gcgtggccgg gcctagcaac atggccgtcc agggcagaaa ctacatccct 1440
gggccagct accggcagca gagagtctca accactgtga ctcagaacaa caacagtgag 1500
ttgccttggc ctggcgccag ctcttgggcc ctcaacggcc gcaactcgt gatgaaccca 1560
ggcccagcca tggccagtca caaggagggc gaggaccgtt tcttcccttt gtctggctct 1620
ctgatcttgc gcaagcaggg gaccggcaga gacaactgg acgcgacaaa ggtcatgatc 1680
acgaacgagg aggagatcaa gaccaccaac cctgtggcaa ccgagtccta cggccagggtg 1740
gcaaccaacc accagagcgc ccaggcacag gcgcagactg gctgggtcca gaaccagggg 1800
atcctgcctg gcatgggtgtg gcaggaccgt gacgtgtacc tgcagggccc tatctgggca 1860
aagatccctc acaaggacgg caacttcac cttctcctc tgatgggcgg cttcggcattg 1920
aagcaccgc ctctcagat cctcatcaag aacactcgg tcccggcaga ccctccgacg 1980
gccttcaaca aggacaagct gaactcatt atcactcagt actccactgg ccaggtcagc 2040
gtggagatcg agtgggagct gcagaaggag aacagcaagc gttggaacc agagatccag 2100
tacacttcca actactacaa gtctaacaac gtggagtct cgtcaacac tgagggtgtg 2160
tacagtgagc ctgcacctat cggcaccogg tacctcacc gaaacttgtg a 2211

<210> 84
<211> 2229
<212> DNA
<213> 腺相關病毒PHP. eB

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2229)
<223> AAV-PHP. eB

<400> 84
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctt agt 48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
gaa gga att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc 96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct aga ggt ctt gtg ctt ccg 144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg 192

Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	
50						55					60					
gtc	aac	gca	gca	gac	gcg	gcg	gcc	ctc	gag	cac	gac	aaa	gcc	tac	gac	240
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	
65					70				75						80	
cag	cag	ctc	aag	gcc	gga	gac	aac	ccg	tac	ctc	aag	tac	aac	cac	gcc	288
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala	
				85					90					95		
gac	gcc	gag	ttc	cag	gag	cgg	ctc	aaa	gaa	gat	acg	tct	ttt	ggg	ggc	336
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	
			100					105					110			
aac	ctc	ggg	cga	gca	gtc	ttc	cag	gcc	aaa	aag	agg	ctt	ctt	gaa	cct	384
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Pro	
		115					120					125				
ctt	ggt	ctg	gtt	gag	gaa	gcg	gct	aag	acg	gct	cct	gga	aag	aag	agg	432
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	
	130					135					140					
cct	gta	gag	cag	tct	cct	cag	gaa	ccg	gac	tcc	tcc	gcg	ggt	att	ggc	480
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly	
145					150					155					160	
aaa	tcg	ggt	gca	cag	ccc	gct	aaa	aag	aga	ctc	aat	ttc	ggt	cag	act	528
Lys	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr	
				165					170					175		
ggc	gac	aca	gag	tca	gtc	cca	gac	cct	caa	cca	atc	gga	gaa	cct	ccc	576
Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro	
			180					185					190			
gca	gcc	ccc	tca	ggt	gtg	gga	tct	ctt	aca	atg	gct	tca	ggt	ggt	ggc	624
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	
		195					200					205				
gca	cca	gtg	gca	gac	aat	aac	gaa	ggt	gcc	gat	gga	gtg	ggt	agt	tcc	672
Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	
	210					215					220					
tcg	gga	aat	tgg	cat	tgc	gat	tcc	caa	tgg	ctg	ggg	gac	aga	gtc	atc	720
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	
225					230					235					240	
acc	acc	agc	acc	cga	acc	tgg	gcc	ctg	ccc	acc	tac	aac	aat	cac	ctc	768
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	
				245					250					255		
tac	aag	caa	atc	tcc	aac	agc	aca	tct	gga	gga	tct	tca	aat	gac	aac	816
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asp	Asn	
			260					265					270			
gcc	tac	ttc	ggc	tac	agc	acc	ccc	tgg	ggg	tat	ttt	gac	ttc	aac	aga	864
Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	

275				280				285								
ttc Phe	cac His 290	tgc Cys	cac His	ttc Phe	tca Ser	cca Pro 295	cgt Arg	gac Asp	tgg Trp	cag Gln	cga Arg 300	ctc Leu	atc Ile	aac Asn	aac Asn	912
aac Asn 305	tgg Trp	gga Gly	ttc Phe	cgg Arg	cct Pro 310	aag Lys	cga Arg	ctc Leu	aac Asn	ttc Phe 315	aag Lys	ctc Leu	ttt Phe	aac Asn	att Ile 320	960
cag Gln	gtc Val	aaa Lys	gag Glu	gtt Val 325	acg Thr	gac Asp	aac Asn	aat Asn	gga Gly 330	gtc Val	aag Lys	acc Thr	atc Ile	gcc Ala 335	aat Asn	1008
aac Asn	ctt Leu	acc Thr	agc Ser 340	acg Thr	gtc Val	cag Gln	gtc Val	ttc Phe 345	acg Thr	gac Asp	tca Ser	gac Asp	tat Tyr 350	cag Gln	ctc Leu	1056
cCG Pro	tac Tyr	gtg Val 355	ctc Leu	ggg Gly	tCG Ser	gct Ala 360	cac His	gag Glu	ggc Gly	tgc Cys	ctc Leu 365	cCG Pro	cCG Pro	ttc Phe	cca Pro	1104
gcg Ala 370	gac Asp	gtt Val	ttc Phe	atg Met	att Ile 375	cct Pro	cag Gln	tac Tyr	ggg Gly	tat Tyr 380	ctg Leu	acg Thr	ctt Leu	aat Asn	gat Asp	1152
gga Gly 385	agc Ser	cag Gln	gcc Ala	gtg Val 390	ggt Gly	cgt Arg	tCG Ser	tcc Ser	ttt Phe 395	tac Tyr	tgc Cys	ctg Leu	gaa Glu	tat Tyr	ttc Phe 400	1200
cCG Pro	tCG Ser	caa Gln	atg Met	cta Leu 405	aga Arg	acg Thr	ggt Gly	aac Asn	aac Asn 410	ttc Phe	cag Gln	ttc Phe	agc Ser	tac Tyr 415	gag Glu	1248
ttt Phe	gag Glu	aac Asn	gta Val 420	cct Pro	ttc Phe	cat His	agc Ser	agc Ser 425	tac Tyr	gct Ala	cac His	agc Ser	caa Gln 430	agc Ser	ctg Leu	1296
gac Asp	cga Arg	cta Leu 435	atg Met	aat Asn	cca Pro	ctc Leu	atc Ile 440	gac Asp	caa Gln	tac Tyr	ttg Leu 445	tac Tyr	tat Tyr	ctc Leu	tct Ser	1344
aga Arg 450	act Thr	att Ile	aac Asn	ggt Gly	tct Ser	gga Gly 455	cag Gln	aat Asn	caa Gln	caa Gln 460	acg Thr	cta Leu	aaa Lys	ttc Phe	agt Ser	1392
gtg Val 465	gcc Ala	gga Gly	ccc Pro	agc Ser	aac Asn 470	atg Met	gct Ala	gtc Val	cag Gln	gga Gly 475	aga Arg	aac Asn	tac Tyr	ata Ile	cct Pro 480	1440
gga Gly	ccc Pro	agc Ser	tac Tyr	cga Arg 485	caa Gln	caa Gln	cgt Arg	gtc Val	tca Ser 490	acc Thr	act Thr	gtg Val	act Thr	caa Gln 495	aac Asn	1488
aac Asn	aac Asn	agc Ser	gaa Glu 500	ttt Phe	gct Ala	tgg Trp	cct Pro	gga Gly 505	gct Ala	tct Ser	tct Ser	tgg Trp 510	gct Ala	ctc Leu	aat Asn	1536

gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc tct cac aaa Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys 515 520 525	1584
gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly 530 535 540	1632
aaa caa ggt act ggc aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile 545 550 555 560	1680
acc aac gaa gaa gaa att aaa act act aac ccg gta gca acg gag tcc Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser 565 570 575	1728
tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gat ggg act ttg gcg gtg Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Asp Gly Thr Leu Ala Val 580 585 590	1776
cct ttt aag gca cag gcg cag acc ggt tgg gtt caa aac caa gga ata Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile 595 600 605	1824
ott ccg ggt atg gtt tgg cag gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro 610 615 620	1872
att tgg gcc aaa att cct cac acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro 625 630 635 640	1920
ctg atg gga ggg ttt gga atg aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile 645 650 655	1968
aaa aac aca cct gta cct gcg gat cct cca acg gcc ttc aac aag gac Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp 660 665 670	2016
aag ctg aac tct ttc atc acc cag tat tct act ggt caa gtc agc gtg Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val 675 680 685	2064
gag atc gag tgg gag ctg cag aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro 690 695 700	2112
gag atc cag tac act tcc aac tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe 705 710 715 720	2160
gct gtt aat act gaa ggt gta tat agt gaa ccc cgc ccc att ggc acc Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr 725 730 735	2208

aga tac ctg act cgt aat ctg
Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
740

2229

<210> 85
<211> 743
<212> PRT
<213> 腺相關病毒PHP. eB

<400> 85

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro

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

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Asp Gly Thr Leu Ala Val
580 585 590

Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile
595 600 605

Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro
610 615 620

Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro
625 630 635 640

Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
645 650 655

Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp
660 665 670

Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val
675 680 685

Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro
690 695 700

Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr
725 730 735

Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
740

<210> 86
<211> 841
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CB7啟動子與CMV強化子

<400> 86
ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttcattga 60
cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat 120
atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgctg gcattatgcc 180
cagtacatga ctttatggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct 240
attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc cccccctcc 300
ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg 360
gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg 420
cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg 480
aggcggcggc ggcgggcgcc ctataaaaag cgaagcgcg cgcggggcggg agtcgctgcg 540
cgctgccttc gcccgtgcc ccgctcggc gccgcctgc gccgcccgc ccggctctga 600

ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat 660
tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg 720
ctccgggagg gccctttgtg cggggggagc ggctcggggc tgtccgcggg gggacggctg 780
ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg gcggctctag 840
a 841

<210> 87
<211> 841
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CAG啟動子

<400> 87
ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga 60
ogtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccaacttg cagtacatca agtgtatcat 120
atgccaagta cggcccttat tgacgtcaat gacggtaaat ggccgcctg gcattatgcc 180
cagtacatga ctttatggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct 240
attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tcccatctc ccccccctcc 300
ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg 360
gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg 420
cggagaggtg cggcggcgag caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg 480
aggcggcggc ggcgggcgcc ctataaaaag cgaagcgcg ggcgggcggg agtcgctgcg 540
cgctgccttc gcccggtgcc ccgctccgcc gccgcctgc gccgcccgc ccggctctga 600
ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat 660
tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg 720
ctccgggagg gccctttgtg cggggggagc ggctcggggc tgtccgcggg gggacggctg 780
ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg gcggctctag 840
a 841

<210> 88
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 兔β-球蛋白

<400> 88
gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact 60
tctggctaatt aaaggaaatt tatttttcatt gcaatagtggt gttggaattt tttgtgtctc 120
tcactcg 127

<210> 89
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miR1538

<400> 89
ttgacgtcca gaacctgttc tgttttggcc actgactgac agaacaggct ggacgtcaa 59

<210> 90
<211> 82
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 90
taaagcggcc gcaagcttgc acccgtaoct ttgggagcgc gcgccctcgt cgtgtcgtga 60
ogtcaccctg tctgttggat cc 82

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含 AAV 殼體及包裝於其中的載體基因體，其中該載體基因體包含：

(a)編碼人類粒線體融合蛋白 2 (human mitofusin 2) (hMfn2)之經工程化的核酸序列；

(b)位於(a)及(c)之間的間隔子(spacer)序列；

(c)至少一個 miRNA 編碼序列，其對 CMT2 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 核酸序列中之標靶部位具有特異性；

其中(a)之該經工程化的核酸序列缺乏(c)之至少一個 miRNA 之標靶部位，因而防止該至少一個 miRNA 靶向該經工程化的 hMfn2 編碼序列；及

(d)可操作地連接至(a)及(c)的調節序列，該調節序列引導此等於細胞中表現。

【請求項 2】如請求項 1 之 rAAV，其中該 AAV 殼體係選自 AAVrh91、AAV9、AAV9.PHP.eB、AAVhu68、或 AAV1 或。

【請求項 3】如請求項 1 或 2 之 rAAV，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與其至少 90%相同的序列。

【請求項 4】如請求項 1 至 3 中任一項之 rAAV，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與其至少約 80%相同的序列，其中 nt 216 至 236 及/或 nt 1371 至 1391 被保留。

【請求項 5】如請求項 1 至 4 中任一項之 rAAV，其中該至少一個 miRNA 包含 miRNA 靶向序列之一或多個序列，其包含 SEQ ID NO: 89 (miR538，59 nt)或與 SEQ ID NO: 89 至少 99%相同的序列，或者 miRNA 包含 AGAACAGGTTCTGGACGTCAA 之一或多個反義序列 SEQ ID NO: 27，其中該至少一個 miRNA 不結合至(a)之該經工程化的 hMfn2 編碼序列或其所編碼的傳訊 RNA (mRNA)。

【請求項 6】如請求項 1 至 4 中任一項之 rAAV，其中該至少一個 miRNA 編碼序列包含 miRNA 靶向序列之一或多個序列，其包含 SEQ ID NO: 15 (miR1693，64 nt)；miRNA 包含一或多個反義序列，該反義序列為 AAACCTTGAGGACTACTGGAG，SEQ ID NO: 32；或者 miRNA 靶向序列包含 SEQ ID NO: 16 (miR1518，59 nt)或與 SEQ ID NO: 16 具有至少 99%一致性的序列，其中該至少一個 miRNA 不結合至(a)之該經工程化的 hMfn2 編碼序列或其所編碼的 mRNA。

【請求項 7】如請求項 1 至 6 中任一項之 rAAV，其中該間隔子的長度為 75 個核苷酸至約 250 個核苷酸。

【請求項 8】如請求項 1 至 7 中任一項之 rAAV，其中該至少一個 miRNA 編碼序列相對於該經工程化的 hMfn2 編碼序列為 3'側。

【請求項 9】如請求項 1 至 7 中任一項之 rAAV，其中該至少一個 miRNA 編碼序列係位於內含子序列中。

【請求項 10】如請求項 1 至 9 中任一項之 rAAV，其中該至少一個 miRNA 編碼序列進一步包含多於一個 miRNA 編碼序列。

【請求項 11】如請求項 1 至 10 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體進一步包含組成型啟動子 (constitutive promoter)，可選擇地包含 CB7 啟動子或 CAG 啟動子。

【請求項 12】如請求項 1 至 10 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體進一步包含組織特異性啟動子，其為人類突觸蛋白 (human synapsin) (hSyn) 啟動子。

【請求項 13】一種載體，其包含：

(a) 編碼人類粒線體融合蛋白 2 (hMfn2) 之經工程化的核酸序列，其可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列；及/或

(b) 編碼至少一個形成髮夾的 miRNA 的核酸序列，該 miRNA 藉由特異性地靶向位於內源性人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列之 mRNA 上的一個部位而抑制內源性人類粒線體融合蛋白 2 的表現，該部位不存在於經工程化的 hMfn2 編碼序列中，其中該至少一個髮夾 miRNA 編碼序列可操作地連接至調節序列，該調節序列引導其在人類目標細胞中表現，因而防止該至少一個髮夾 miRNA 減少來自該經工程化的 hMfn2 編碼序列的表現，

其中 (a) 之該經工程化的 hMfn2 編碼序列缺乏由 (b) 所編碼的至少一個髮夾 miRNA 之標靶部位。

【請求項 14】如請求項 13 之載體，其中該載體為複製缺陷型病毒載體，其包含該經工程化的 hMfn2 編碼序列、該至少一個髮夾 miRNA 編碼序列、及該調節序列，該至少一個髮夾 miRNA 編碼序列為一或多個之 miRNA 編碼序列、或者一或多個人工 miRNA (A miRNA) 編碼序列。

【請求項 15】如請求項 14 之載體，其中該病毒載體為具有 AAV 殼體之重組腺相關病毒(rAAV)顆粒，其具有包裝於其中的載體基因體，該載體基因體包含該經工程化的 hMfn2 編碼序列、至少一個髮夾 miRNA 編碼序列、及該調節序列。

【請求項 16】如請求項 15 之載體，其中該 AAV 殼體係選自 AAVrh91、AAV9、AAV9.PHB.eB、AAVhu68、或 AAV1。

【請求項 17】如請求項 13 至 16 中任一項之載體，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核苷酸序列或與 SEQ ID NO: 11 至少 90%相同的序列。

【請求項 18】如請求項 13 至 17 中任一項之載體，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核苷酸序列或與 SEQ ID NO: 11 至少約 80%相同的序列，其中 nt 216 至 236 及/或 nt 1371 至 1391 被保留。

【請求項 19】如請求項 13 至 18 中任一項之載體，其中該至少一個髮夾 miRNA 為 miR538，其之編碼序列包含 SEQ ID NO: 89 之序列之核酸序列或與 SEQ ID NO: 89 至少 99%相同的序列，其中該至少一個髮夾 miRNA 不

結合至(a)之該經工程化的 hMfn2 編碼序列或其所編碼的 mRNA。

【請求項 20】如請求項 13 至 18 中任一項之載體，其中該至少一個髮夾 miRNA 編碼序列包含下列一或多個序列：

(a)SEQ ID NO: 15 (miR1693，64 nt)；

(b)SEQ ID NO: 15 之至少 60 個連續核苷酸；

(c)與 SEQ ID NO: 15 具有至少 99%一致性，其包含與 SEQ ID NO: 15 之約核苷酸 6 至約核苷酸 26 (或 SEQ ID NO: 68)具有 100%一致性的序列；

(d)一個髮夾 miRNA 編碼序列，其包含下列一或多個種子序列：

(i)TTGACGTCCAGAACCTGTTCT，SEQ ID NO: 27；

(ii)AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG，SEQ ID NO: 28；

(iii)TTCAGAAGTGGGCACTTAGAG，SEQ ID NO: 29；

(iv)TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC，SEQ ID NO: 30；

(v)CAAACCTTGGTCTTCACTGCAG，SEQ ID NO: 31；

(vi)AAACCTTGAGGACTACTGGAG，SEQ ID NO: 32；

(vii)TAACCATGGAAACCATGAACT , SEQ
ID NO: 33 ;

(viii)ACAACAAGAATGCCCATGGAG , SEQ
ID NO: 34 ;

(ix)AAAGGTCCCAGACAGTTCCTG , SEQ ID
NO: 35 ;

(x)TGTTTCATGGCGGCAATTCCT , SEQ ID
NO: 36 ;

(xi)TGAGGTTGGCTATTGATTGAC , SEQ ID
NO: 37 ;

(xii)TTCTCACACAGTCAACACCTT , SEQ ID
NO: 38 ;

(xiii)TTTCCTCGCAGTAAACCTGCT , SEQ
ID NO: 39 ;

(xiv)AGAAATGGAACTCAATGTCTT , SEQ
ID NO: 40 ;

(xv)TGAAACAGGACATCACCTGTGA , SEQ
ID NO: 41 ;

(xvi)AATACAAGCAGGTATGTGAAC , SEQ
ID NO: 42 ;

(xvii)TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC , SEQ
ID NO: 43 ;

(xviii)TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA , SEQ
ID NO: 44 ;

(xix)TCTACCCGCGCAGGAAGCAATTG , SEQ
ID NO: 45 ; 或

(xx)CTCCTTAGCAGACACAAAGAA , SEQ
ID NO: 46 , 或者(i)至(xx)之任一者之組合 ,

其中該髮夾 miRNA 不結合至該經工程化的 hMfn2
編碼序列或其所編碼的 mRNA 。

【請求項 21】如請求項 13 至 20 中任一項之載體，其包含該經工程化的 hMfn2 編碼序列及具有單一核酸分子之該至少一個 miRNA 編碼序列，且於該經工程化的 hMfn2 編碼序列與該至少一個 miRNA 編碼序列之間進一步包含至少 75 個核苷酸之間隔子。

【請求項 22】如請求項 13 至 21 中任一項之載體，其中該 miRNA 編碼序列相對於該經工程化的 hMfn2 編碼序列為 3'側。

【請求項 23】如請求項 13 至 21 中任一項之載體，其中該 miRNA 編碼序列係位於內含子序列中。

【請求項 24】如請求項 13 至 23 中任一項之載體，其進一步包含超過一個 miRNA 編碼序列。

【請求項 25】如請求項 13 至 24 中任一項之載體，其中該調節序列包含組成型啟動子，可選擇地包含 CB7 啟動子或 CAG 啟動子。

【請求項 26】如請求項 13 至 24 中任一項之載體，其中該調節序列包含神經元特異性啟動子，可選擇地包含人類突觸蛋白啟動子。

【請求項 27】如請求項 13 之載體，其中該載體為非病毒載體。

【請求項 28】如請求項 27 之載體，其中該至少一個非病毒載體為微脂體(liposome)。

【請求項 29】如請求項 13、14 或 17 至 26 中任一項之載體，其中該載體為無複製能力的重組病毒載體，選自重組微小病毒(parvovirus)、重組慢病毒(lentivirus)、或重組單純疱疹病毒(herpes simplex virus)。

【請求項 30】一種載體，其包含經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 (hMfn2)編碼序列，該編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列或與 SEQ ID NO: 11 至少 90%相同的序列，可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列。

【請求項 31】如請求項 30 之載體，其為複製缺陷型病毒載體，選自重組腺相關病毒、重組慢病毒、或重組單純疱疹病毒。

【請求項 32】如請求項 31 之載體，其中該病毒載體為具有 AAV 殼體之重組腺相關病毒(rAAV)顆粒，其具有包裝於其中的載體基因體，該載體基因體包含該經工程化的 hMfn2 編碼序列、及該調節序列。

【請求項 33】如請求項 32 之載體，其中該 AAV 殼體係選自 AAVrh91、AAV9、AAV9.PHP.eB、AAVhu68、或 AAV1。

【請求項 34】如請求項 13 至 17 中任一項之載體，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列且進一步包含 CB7 啟動子。

【請求項 35】如請求項 13 至 17 中任一項之載體，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列且進一步包含人類突觸蛋白(hSyn)啟動子。

【請求項 36】如請求項 13 至 17 中任一項之載體，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之核酸序列且進一步包含 CAG 啟動子。

【請求項 37】一種包含重組核酸序列及至少一個 miRNA 的組成物，該重組核酸序列包含經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 (hMfn2)編碼序列，該編碼序列可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，該 miRNA 對於夏馬杜三氏第 2A 型(CMT2A)患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 核酸序列中之標靶部位具有特異性，且可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列缺乏該至少一個 miRNA 之標靶部位，因而防止該 miRNA 靶向該經工程化的 Mfn2 編碼序列。

【請求項 38】一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 12 中任一項之 rAAV、如請求項 13 至 36 中任一項之載體、或如請求項 37 之組成物，且包含醫藥上可接受的水性懸浮液、賦形劑、及/或稀釋劑。

【請求項 39】一種適合用於治療具有夏馬杜三氏病第 2A 型(CMT2A)或神經病變的患者之如請求項 1 至 12 中任一項之重組 AAV、如請求項 13 至 36 中任一項之載體、或如請求項 37 之組成物。

【請求項 40】一種用於製備用於治療具有夏馬杜三氏病第 2A 型(CMT2A)或神經病變的患者之醫藥之如請求項 1 至 12 中任一項之重組 AAV、如請求項 13 至 36 中任一項之載體、或如請求項 37 之組成物。

【請求項 41】一種用於治療具有 CMT2A 之患者的組合方案，其包含共同投予：

(a)重組核酸序列，其包含經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 (hMfn2)編碼序列，該編碼序列可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列具有 SEQ ID NO: 11 之序列或與其至少 95%相同的序列，且該經工程化的 hMfn2 編碼序列係由於在(b)之 miRNA 標靶部位具有錯誤配對(mismatch)而與 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列不同；

(b)包含至少一個 miRNA 的編碼序列的核酸，該 miRNA 對人類 CMT2A 受試者中的內源性 hMfn2 編碼序列具有特異性，其中該 miRNA 編碼序列可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列，且其中該 miRNA 不結合至(a)之該經工程化的 hMfn2 編碼序列或其所編碼的 mRNA。

【請求項 42】如請求項 41 之組合方案，其中該 miRNA 編碼序列包含 SEQ ID NO: 89 或與 SEQ ID NO: 89 至少 99%相同。

【請求項 43】一種用於治療具有 CMT2A 之患者的組合方案，其包含共同投予：

(a)重組核酸序列，其包含經工程化的人類粒線體融合蛋白 2 (hMfn2)編碼序列，該編碼序列可操作地連接至引導其於人類目標細胞中表現的調節序列，其中該經工程化的 hMfn2 編碼序列被工程化為由於在(b)之 miRNA 標靶部位具有錯誤配對而與 CMT2A 患者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列不同；

(b)至少一個包含 miRNA 的核酸序列，該 miRNA 對人類 CMT2A 受試者中的內源性人類粒線體融合蛋白 2 編碼序列具有特異性，其中該 miRNA 編碼序列可操作地連接至引導其於受試者中表現的調節序列，且其中該至少一個 miRNA 具有下列一或多個序列：包含 SEQ ID NO: 15 (miR1693，64 nt)的 miRNA 編碼序列；包含 SEQ ID NO: 15 之至少 60 個連續核苷酸的 miRNA 編碼序列；包含與 SEQ ID NO: 15 具有至少 99%一致性的 miRNA 編碼序列，其包含與 SEQ ID NO: 15 之約核苷酸 6 至約核苷酸 26 (或 SEQ ID NO: 68)具有 100%一致性的序列；或包含下列之一或多者的 miRNA 編碼序列：

(i)TTGACGTCCAGAACCTGTTCT，SEQ ID NO: 27；

(ii)AGAAGTGGGCACTTAGAGTTG，SEQ ID NO: 28；

(iii)TTCAGAAGTGGGCACTTAGAG，SEQ ID NO: 29；

(iv)TTGTCAATCCAGCTGTCCAGC，SEQ ID NO: 30；

(v)CAAACCTTGGTCTTCACTGCAG , SEQ ID
NO: 31 ;

(vi)AAACCTTGAGGACTACTGGAG , SEQ ID
NO: 32 ;

(vii)TAACCATGGAAACCATGAACT , SEQ
ID NO: 33 ;

(viii)ACAACAAGAATGCCCATGGAG , SEQ
ID NO: 34 ;

(ix)AAAGGTCCCAGACAGTTCCTG , SEQ ID
NO: 35 ;

(x)TGTTTCATGGCGGCAATTCCT , SEQ ID
NO: 36 ;

(xi)TGAGGTTGGCTATTGATTGAC , SEQ ID
NO: 37 ;

(xii)TTCTCACACAGTCAACACCTT , SEQ ID
NO: 38 ;

(xiii)TTTCCTCGCAGTAAACCTGCT , SEQ
ID NO: 39 ;

(xiv)AGAAATGGAACTCAATGTCTT , SEQ
ID NO: 40 ;

(xiv)TGAACAGGACATCACCTGTGA , SEQ
ID NO: 41 ;

(xvi)AATACAAGCAGGTATGTGAAC , SEQ
ID NO: 42 ;

(xvii)TAAACCTGCTGCTCCCGAGCC , SEQ
ID NO: 43 ;

(xviii)TAGAGGAGGCCATAGAGCCCA , SEQ
ID NO: 44 ;

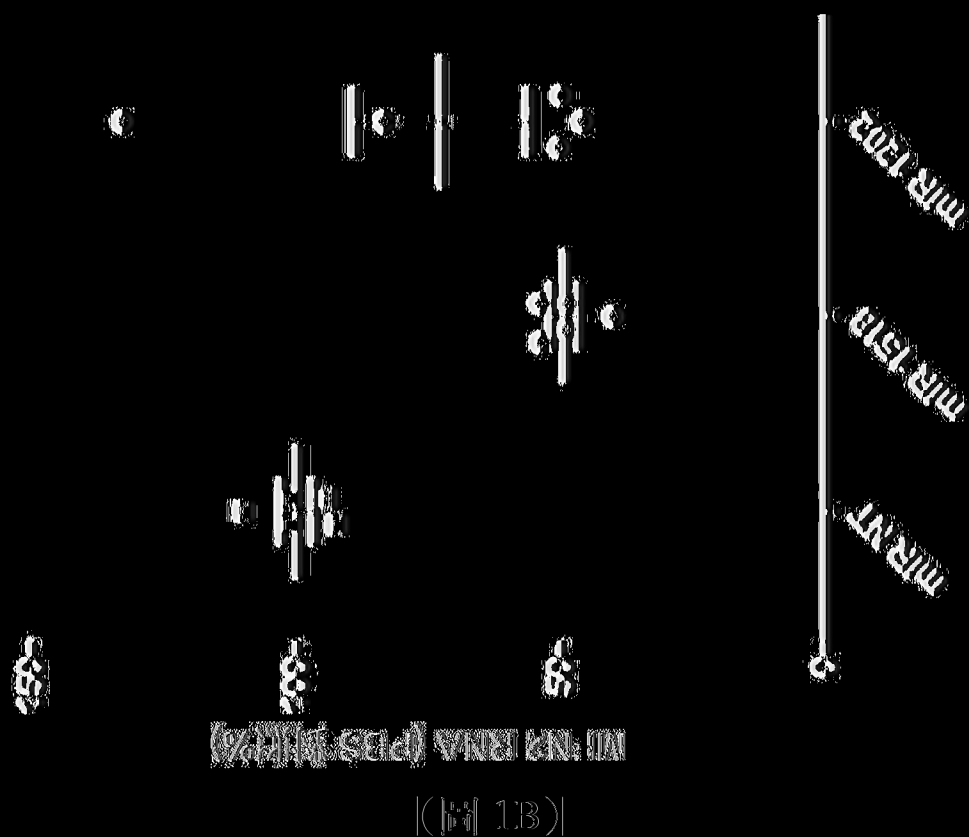
(xix)TCTACCCGCGAGGAAGCAATTG , SEQ
ID NO: 45 ; 或

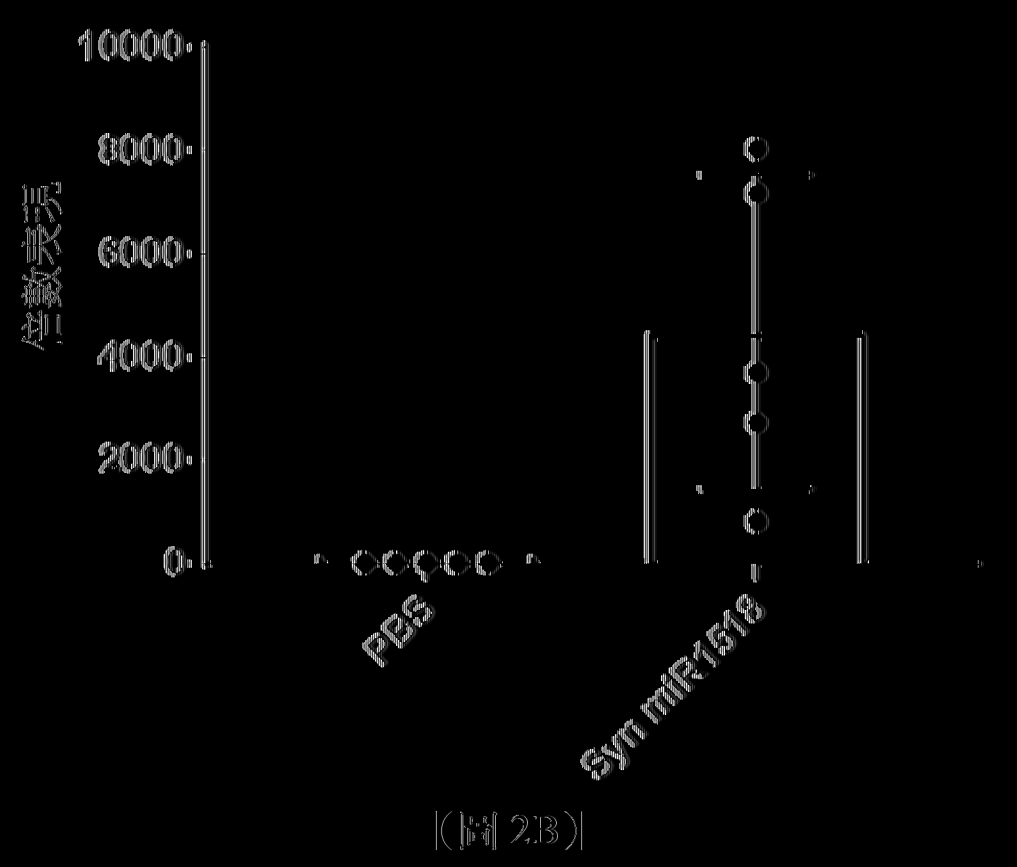
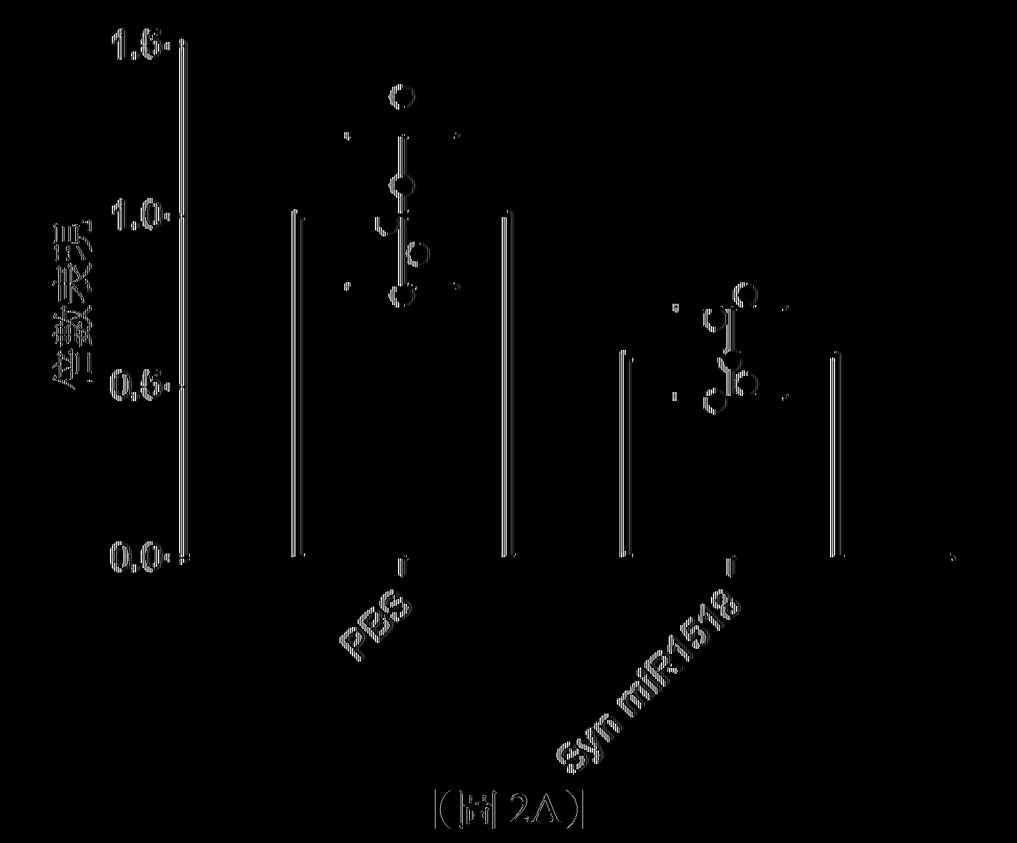
(xx)CTCCTTAGCAGACACAAAGAA , SEQ
ID NO: 46 , 或 (i)至 (xx)之任一者的組合。

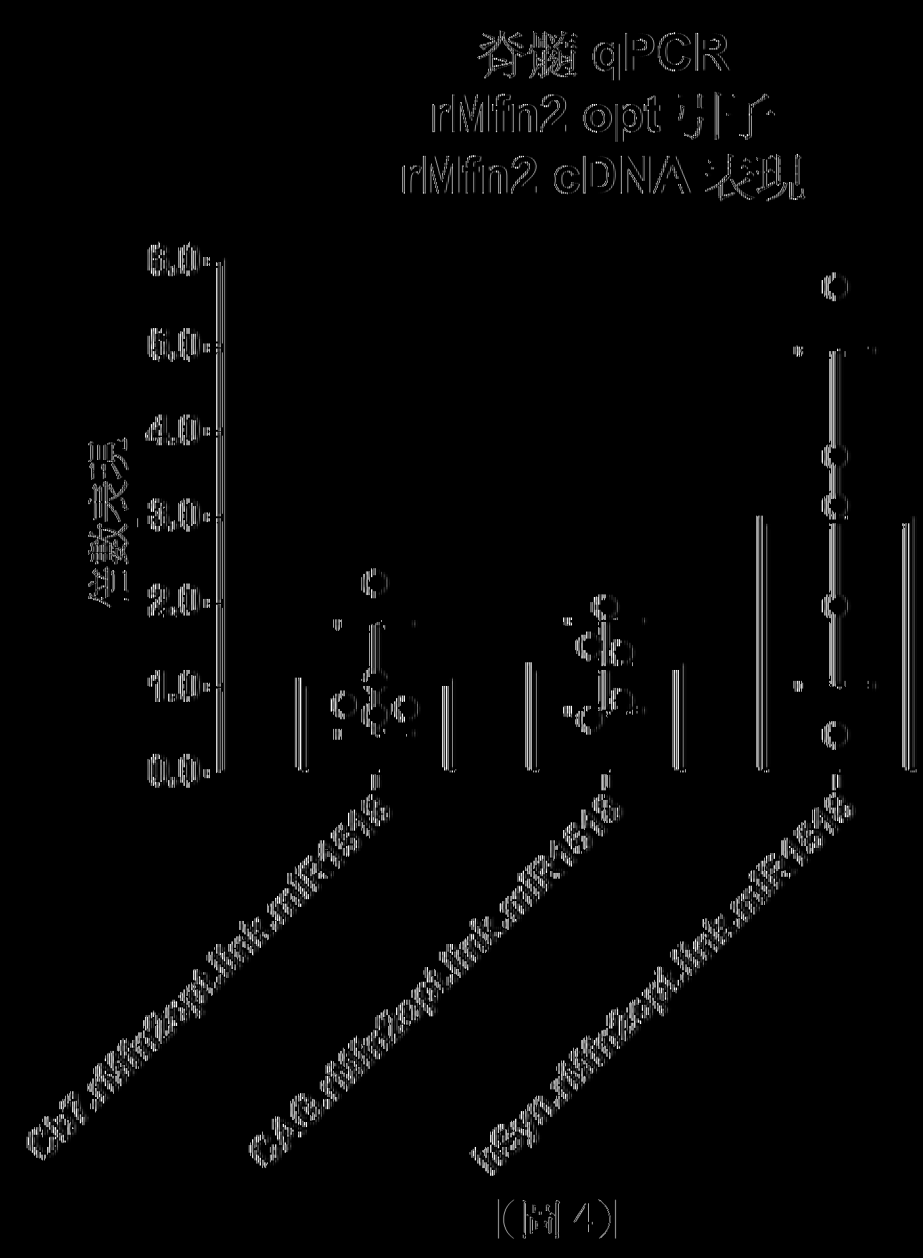
【請求項 44】如請求項 41 至 43 中任一項之組合方案，其中第一載體包含該核酸 (a)及第二之不同的載體包含至少一個 miRNA (b)。

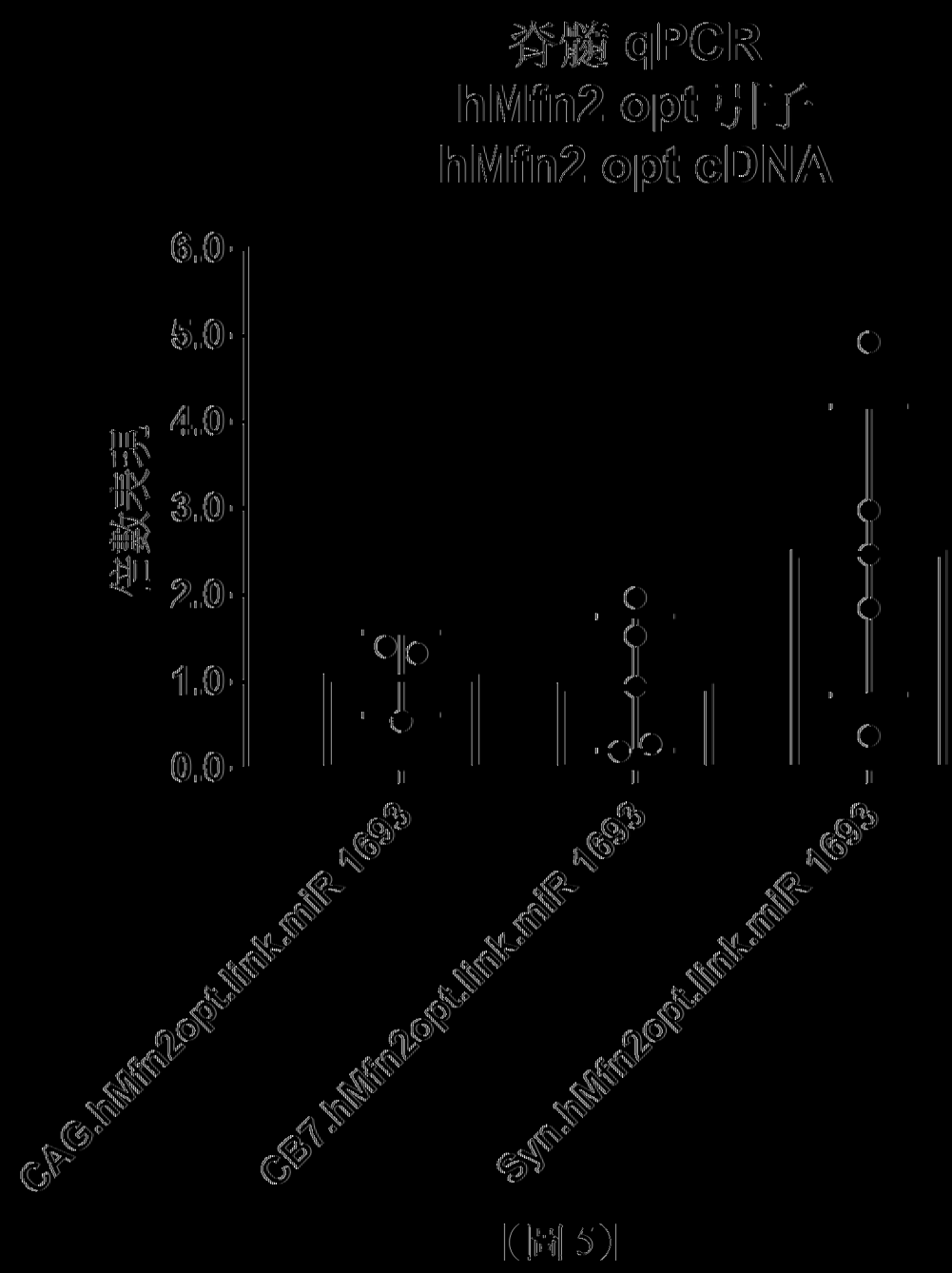
【請求項 45】如請求項 44 之組合方案，其中該第一載體為病毒載體及/或該第二載體為病毒載體，且該第一及該第二病毒載體可為來自相同病毒來源或可為不同。

【請求項 46】如請求項 44 或 45 之組合方案，其中該第一載體為非病毒載體，該第二載體為非病毒載體，且該第一及該第二載體可為相同組成物或可為不同。

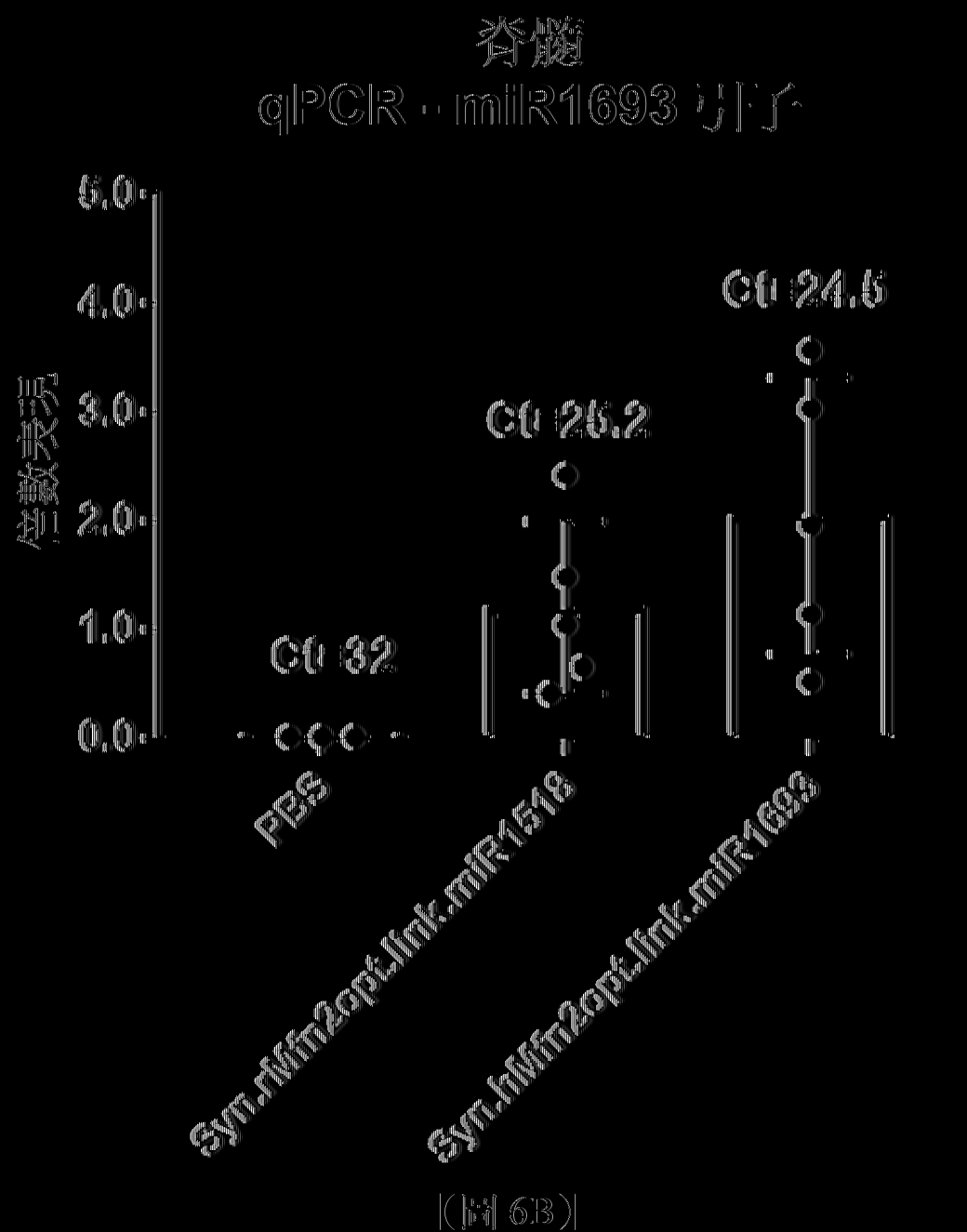








(圖 5)



合数表示法 (hmm?)

(V6 1.1)

大經傳染

pg165

pg166

pg167

合数表示法 (hmm?)

(1.1 9.3)

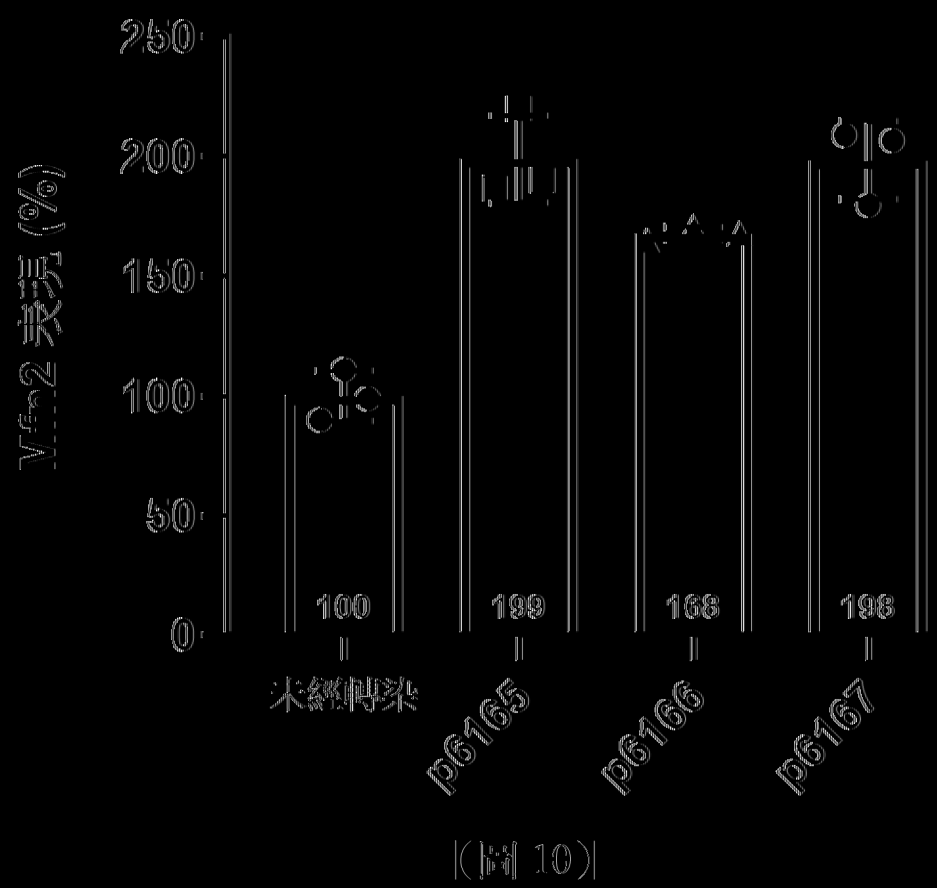
大經傳染

pg168

pg169

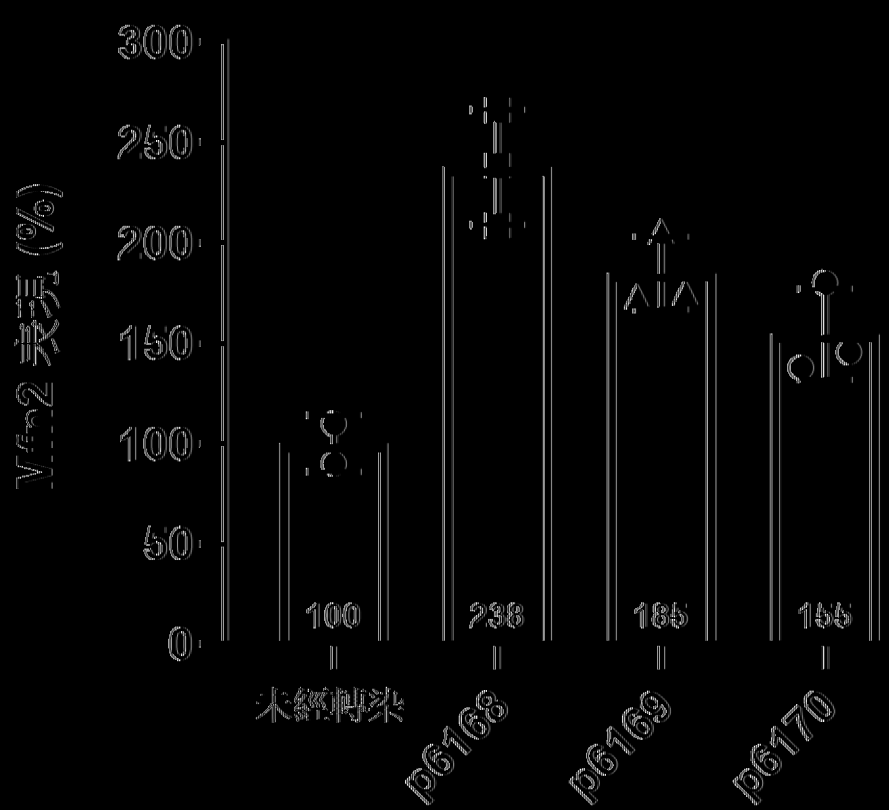
pg170

III: K293 轉染
新 Cb7 載體
Wcs 蛋白質定量



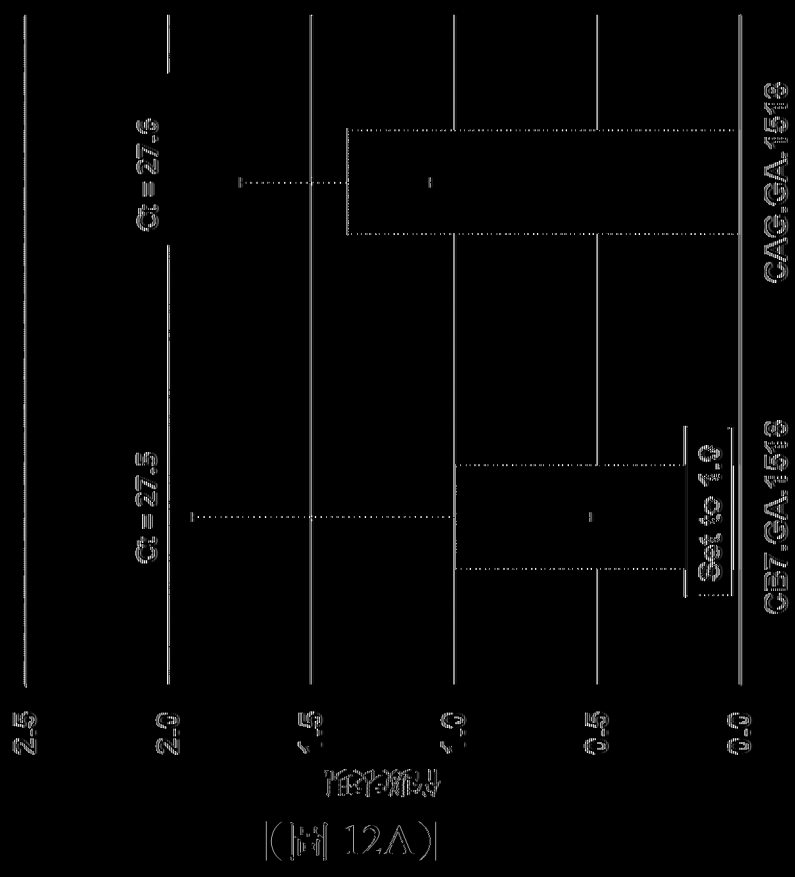
|(附 10)|

III HK293 轉染
新 CAG 載體
Wes 蛋白質定量



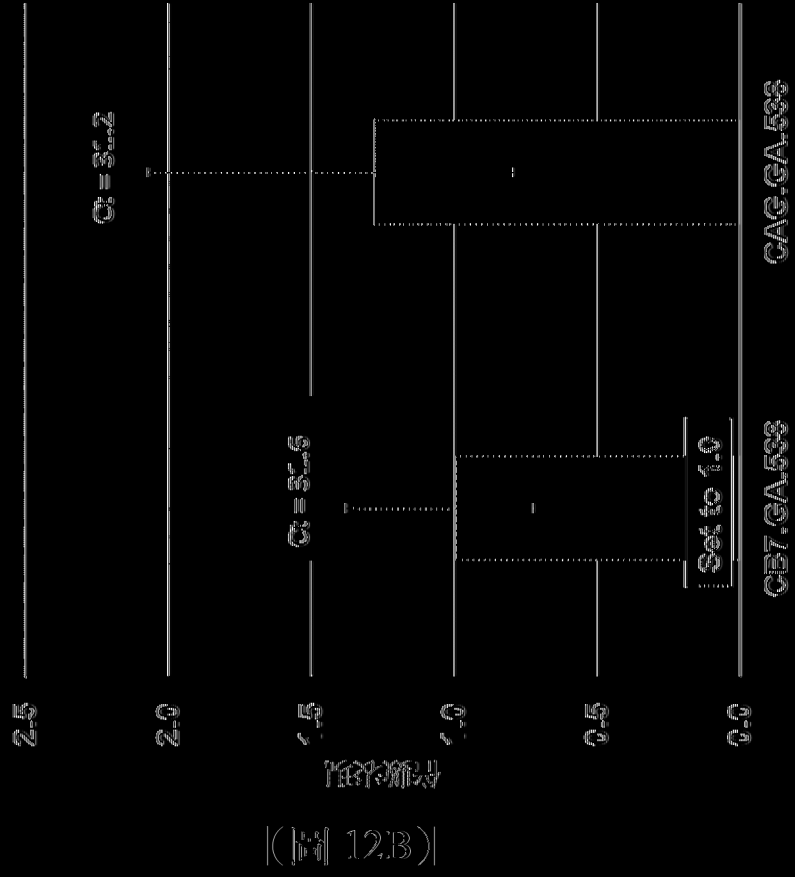
(圖 11)

成熟 miRNA 5'8 表現
Mm2-miR MEFs qPCR

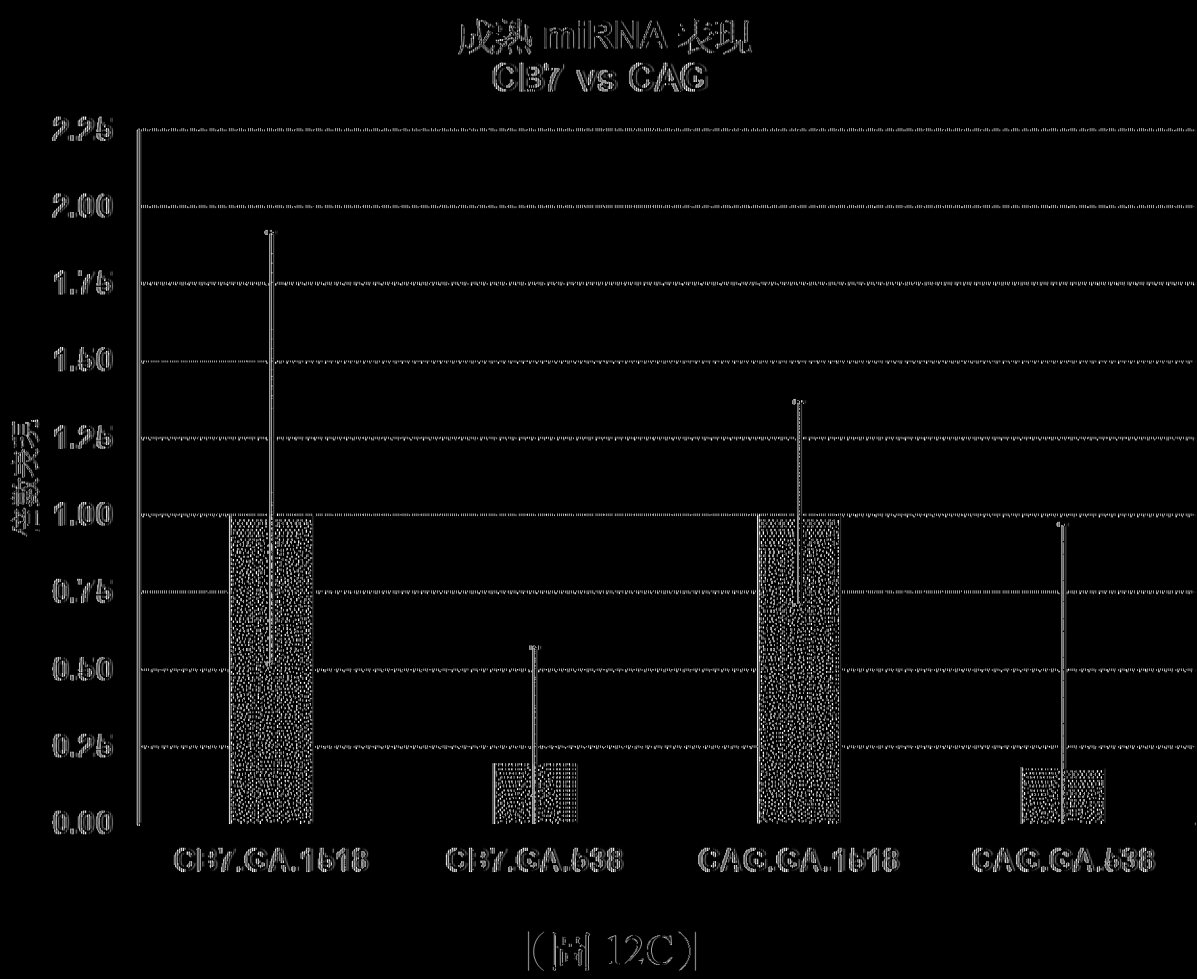


(Figure 12.A)

成熟 miRNA 538 表現
Mm2-miR MEFs qPCR

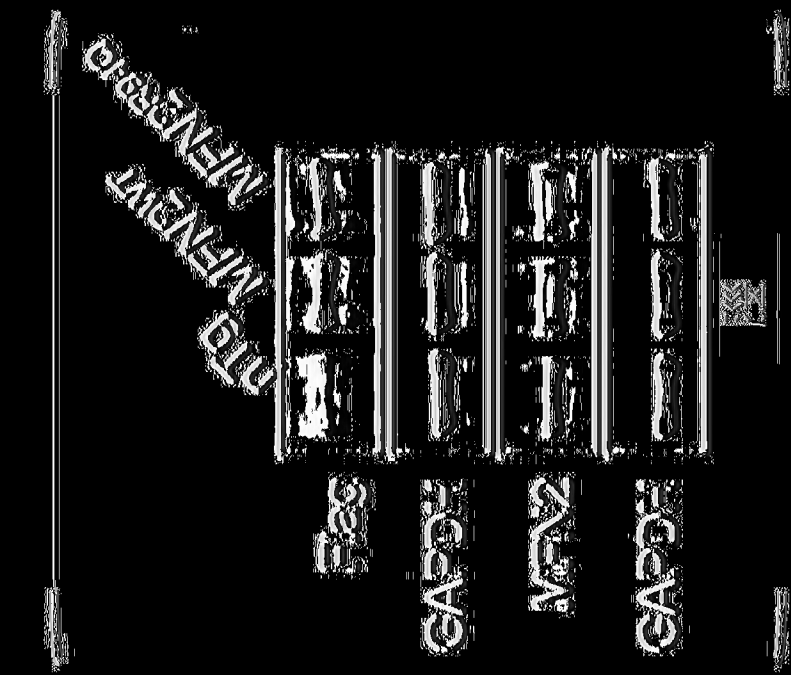


(Figure 12.B)

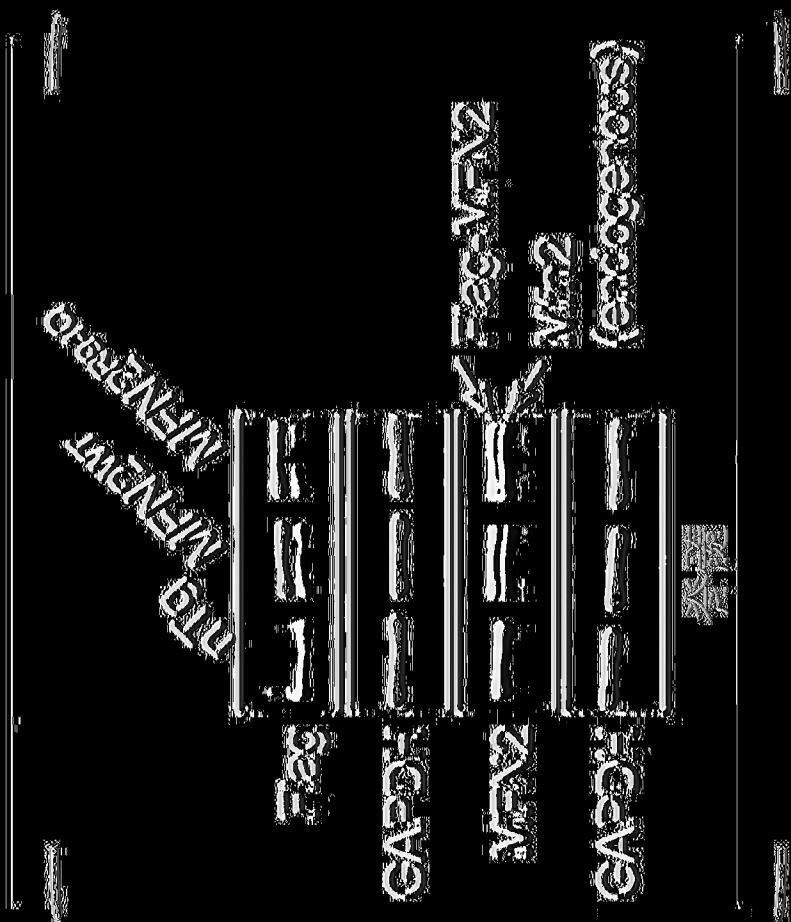




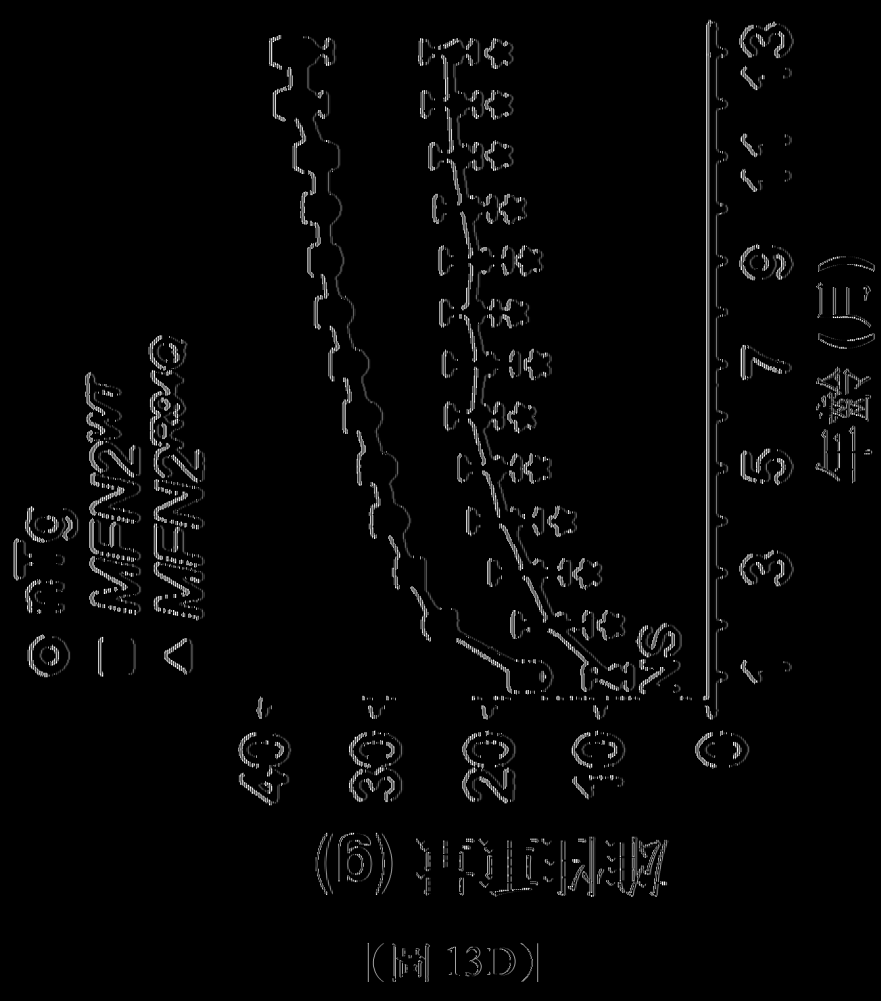
(13A)

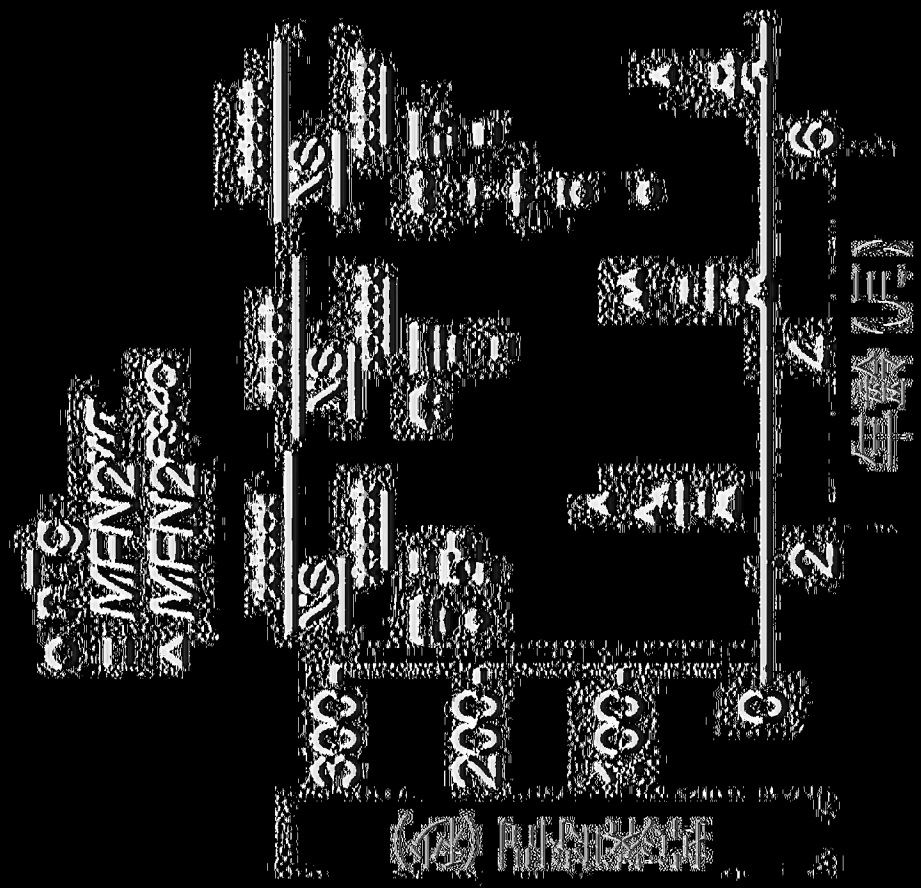


(Figure 13B)

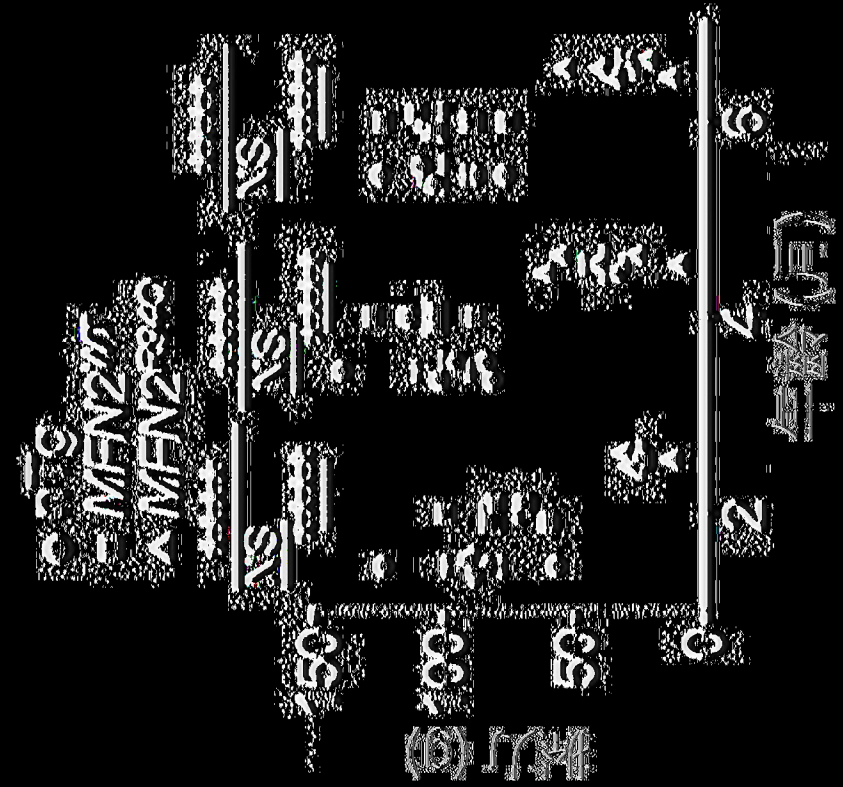


(Figure 13C)





(E) 13E



(F) 13F

