(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110546257 B
(45)授权公告日 2024.03.01

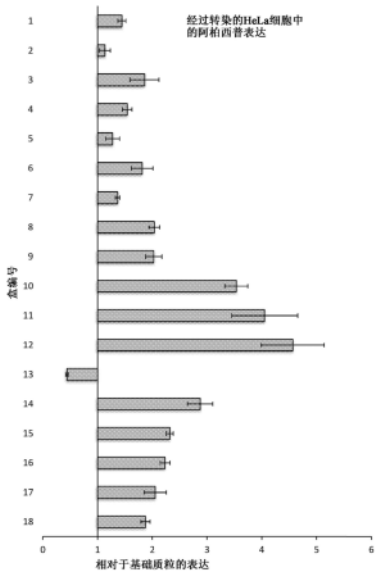
(21)申请号 201880025331.7
(22)申请日 2018.03.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110546257 A
(43)申请公布日 2019.12.06
(30)优先权数据
62/472,892 2017.03.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.10.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/022996 2018.03.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/170473 EN 2018.09.20
(73)专利权人 阿德夫拉姆生物技术股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 安娜希塔·喀拉瓦拉
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣
(51)Int.Cl.
C12N 15/00(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12N 15/14(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
(56)对比文件
US 2010120152 A1,2010.05.13
US 2016340691 A1,2016.11.24
JP 2016208845 A,2016.12.15
CN 101855233 A,2010.10.06
审查员 杨燕燕
权利要求书2页 说明书42页
序列表42页 附图11页

(54)发明名称

用于增强基因表达的组合物和方法

(57)摘要

本公开提供了用于在哺乳动物细胞中表达基因的多核苷酸盒、表达载体和方法。



CN 110546257 B

1.一种用于增强哺乳动物细胞中转基因表达的非天然存在的多核苷酸盒,其按5'到3'包括:

(a)第一增强子区,所述第一增强子区包括由SEQ ID NO:1组成的CMV序列或与其具有至少99%同一性的功能性CMV序列;

(b)启动子区,所述启动子区包括由SEQ ID NO:4组成的CMV序列或与其具有至少99%同一性的功能性CMV序列;

(c)5'UTR区,所述5'UTR区按5'到3'顺序包括由SEQ ID NO:11组成的TPL序列或与其具有至少99%同一性的功能性TPL序列以及由SEQ ID NO:12组成的eMLP序列或与其具有至少99%同一性的功能性eMLP序列;

(d)对分泌多肽进行编码的编码序列,其中所述编码序列可操作地连接到所述启动子区;

(e)第二增强子区,所述第二增强子区包括由SEQ ID NO:13组成的完整EES序列或与其具有至少99%同一性的功能性EES序列;以及

(f)由SEQ ID NO:14组成的人生长激素(HGH)多腺苷酸化位点或与其具有至少99%同一性的功能性HGH多腺苷酸化序列。

2.根据权利要求1所述的多核苷酸盒,其中所述盒不含RNA输出信号。

3.根据权利要求1所述的多核苷酸盒,其中所述(a)第一增强子区、(b)启动子区和(c)5'UTR区限定5'臂,所述(e)第二增强子区和(f)HGH多腺苷酸化位点限定3'臂。

4.根据权利要求3所述的多核苷酸盒,其中所述5'臂包含与SEQ ID NO:47具有至少99%同一性的序列。

5.根据权利要求3所述的多核苷酸盒,其中所述5'臂包含SEQ ID NO:47。

6.根据权利要求3所述的多核苷酸盒,其中所述3'臂包含与SEQ ID NO:48具有至少99%同一性的序列。

7.根据权利要求3所述的多核苷酸盒,其中所述3'臂包含SEQ ID NO:48。

8.根据权利要求4所述的多核苷酸盒,其中所述3'臂包含与SEQ ID NO:48具有至少99%同一性的序列。

9.根据权利要求5所述的多核苷酸盒,其中所述3'臂包含SEQ ID NO:48。

10.根据权利要求3所述的多核苷酸盒,其中所述5'臂包含与SEQ ID NO:47具有至少99%同一性的序列,所述3'臂包含与SEQ ID NO:48具有至少99%同一性的序列。

11.根据权利要求3所述的多核苷酸盒,其中所述5'臂包含SEQ ID NO:47,所述3'臂包含SEQ ID NO:48。

12.根据权利要求1-11任一项所述的多核苷酸盒,其进一步包含选自SEQ ID NO:76-80的序列或与选自SEQ ID NO:76-80的序列具有至少99%同一性的序列。

13.根据权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸盒,其进一步包含SEQ ID NO:76-80中的一个或多个。

14.根据权利要求1-11中任一项所述的多核苷酸盒,其进一步包括SEQ ID NO:76-80中的每一个。

15.根据前述权利要求中任一项所述的多核苷酸盒,其中所述分泌多肽为抗血管生成多肽。

16.根据前述权利要求中任一项所述的多核苷酸盒,其中所述分泌多肽选自阿柏西普(aflibercept)、可溶性fms样酪氨酸激酶-1(sFLT-1)和sFLT-1的VEGF结合片段。

17.根据前述权利要求中任一项所述的多核苷酸盒,其中所述分泌多肽为阿柏西普(aflibercept)。

18.一种重组病毒,其包括:

a)衣壳蛋白;以及

b)根据前述权利要求中任一项所述的多核苷酸盒。

19.根据权利要求18所述的重组病毒,其中所述重组病毒为重组腺相关病毒。

20.根据权利要求18所述的重组病毒,其中所述衣壳蛋白是AAV变体7m8衣壳蛋白或者源自于所述AAV变体7m8衣壳蛋白。

21.一种药物组合物,其包括根据权利要求18到20中任一项所述的重组病毒和药学上可接受的赋形剂。

22.如权利要求21所述的药物组合物,其中所述分泌多肽为阿柏西普(aflibercept)。

23.一种用根据权利要求1所述的多核苷酸盒转染或转导的分离的宿主细胞。

24.权利要求中1-17中任一项所述的多核苷酸盒在制备在哺乳动物细胞中表达转基因的方法中使用的药物中的用途,所述方法包括使一个或多个哺乳动物细胞与一定量的根据权利要求18到20中任一项所述的重组病毒接触,其中以一定水平在所述一个或多个哺乳动物细胞中表达所述分泌多肽,其表达水平是通过使所述细胞与包括对所述分泌多肽进行编码的参照盒的重组病毒接触所获得的水平的至少3倍,其中所述参照盒按5'到3'顺序包括SEQ ID NO:2所示的CMV增强子序列、SEQ ID NO:21所示的CMV启动子、SEQ ID NO:22所示的嵌合内含子、SEQ ID NO:23所示的5'UTR、对所述分泌多肽进行编码的编码序列、SEQ ID NO:25所示的3'UTR以及SEQ ID NO:26所示的SV40polyA序列。

25.权利要求中1-17中任一项所述的多核苷酸盒在制备用于治疗或预防有疾病治疗或预防需要的哺乳动物的疾病的药物中的用途。

26.根据权利要求25所述的用途,其中所述疾病为眼部疾病。

27.根据权利要求26所述的用途,其中所述药物被配制为用于眼内注射或玻璃体内注射。

28.根据权利要求27所述的用途,其中所述眼部疾病选自由脉络膜新血管形成和黄斑变性组成的组。

用于增强基因表达的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年3月17日提交的美国临时申请序列号62/472,892的权益,所述美国临时申请的全部公开内容通过引用并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供以代替纸质副本,并且在此通过引用并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称为AVBI_009_01WO_ST25.txt。所述文本文件为86KB,于2018年3月16日创建,并且通过EFS-Web以电子方式提交。

技术领域

[0005] 本发明涉及对病症的基因疗法。

背景技术

[0006] 一种有前途的治疗和预防遗传性疾病和其它病症的方法是用基因递送载体来递送治疗剂。病毒载体是高效的基因转移媒剂并且可以用作基因递送载体。具体地,基于腺相关病毒(AAV)的载体由于其病毒生命周期的非整合性质而是期望的载体。

[0007] 然而,在设计用于基因疗法的多核苷酸盒和表达载体方面仍存在许多挑战。一个重大挑战是在基因转移后获得转基因在靶细胞中的充分表达。在一些情况下,使用基因递送载体(例如,重组病毒)有效治疗疾病或遗传性病症可能取决于治疗性多肽的稳健表达和有效分泌。因此,能够从所靶向的(例如,所转导的)细胞驱动高水平的分泌性蛋白的表达盒可以是治疗有效性载体和成功的基因治疗方法的重要部分。因此,需要用于在哺乳动物细胞中表达基因的经过改进的方法和经过优化的核酸表达盒和载体。

[0008] 本发明满足了此需求。

发明内容

[0009] 本发明总体上涉及分子生物学和病毒学领域,并且具体地涉及基因表达盒和包括所述基因表达盒的用于将编码所选治疗构建体(例如,肽和多肽)的核酸片段递送到脊椎动物的所选细胞和组织的载体。这些基因构建体可用于开发基因递送载体,包含例如用于治疗哺乳动物以及具体地人类疾病、病症和功能障碍的单纯疱疹病毒(HSV)、腺病毒(AV)和AAV载体。

[0010] 更具体地说,本发明涉及用于通过真核细胞或哺乳动物细胞增强分泌性蛋白表达的基因表达盒,并且涉及制备和使用在研究和治疗应用两者中使用的这种盒的方法,包含但不限于治疗由有需要的受试者中一个或多个蛋白质功能的缺陷、缺乏或丧失引起的或与其相关的疾病或病症的方法。

[0011] 本发明的盒通常包含对在治疗人或非人动物受试者的医学病状中有效的多肽进行编码的核酸序列或转基因。在一些实施例中,所述多肽为分泌多肽。所述盒可以并入到病毒载体(如腺相关病毒(AAV)载体)中,然后可以将所述病毒载体施用于体外(例如,在细胞

培养物中)真核细胞或哺乳动物细胞或施用于患有医学病状或可能有发生所述医学病状风险的哺乳动物受试者。

[0012] 所公开的组合物可以用于各种研究、诊断和治疗方案中,包含预防和治疗人类疾病。例如,本发明的组合物可以用于治疗眼部疾病、血管生成依赖性疾病、响应于用血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂进行的治疗的疾病或用于酶替代疗法中,其中所述疾病由酶功能缺陷或丧失引起或与其相关。

[0013] 提供了用于制备多核苷酸表达盒和基因递送载体组合物(例如,病毒载体)的方法和组合物,所述基因递送载体组合物包括这些用于制备可用于动物以及具体地人类的疾病、病症和功能障碍的中心和所靶向基因疗法的药物的表达盒。

[0014] 本发明的实施例包括一种用于增强哺乳动物细胞中转基因表达的非天然存在的多核苷酸盒,所述非天然存在的多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区;(b)启动子区;(c)对多肽基因产物进行编码的编码序列;(d)第二增强子区;以及(e)多腺苷酸化位点。在一些实施例中,所述多核苷酸盒进一步包括位于所述第二增强子下游和所述多腺苷酸化位点上游的核糖核酸(RNA)输出信号。在一个实施例中,所述多核苷酸盒不含RNA输出信号。在更具体的形式中,所述盒不含处于所述第二增强子下游和所述多腺苷酸化位点上游的RNA输出信号。

[0015] 在又其它实施例中,所述多核苷酸盒进一步包括位于所述启动子下游和所述编码序列上游的内含子。

[0016] 在仍其它实施例中,所述多核苷酸盒进一步包括位于所述编码序列上游和所述启动子下游的5'非转译区(5'UTR)。

[0017] 在优选实施例中,所述多肽基因产物为分泌蛋白。

[0018] 本发明的多核苷酸盒包括位于启动子区上游的第一增强子区。在优选实施例中,所述第一增强子区包括巨细胞病毒(CMV)序列。在其它实施例中,所述第一增强子区包括延伸因子1α(EF1α)序列。在某些实施例中,所述第一增强子区包括与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性的序列。在某些实施例中,所述同一性为至少90%、至少95%或至少99%。

[0019] 本发明的多核苷酸盒包括启动子区,所述启动子区包括启动子序列或其功能性片段。在一些实施例中,所述启动子区对真核细胞或更具体地对哺乳动物细胞具有特异性。在一些实施例中,所述启动子区包括选自由以下组成的组的启动子序列:肌动蛋白启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、延伸因子1α(EF1α)启动子和甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)启动子。在优选实施例中,所述启动子区包括CMV启动子序列或EF1α启动子序列。在某些实施例中,所述启动子区包括与以下SEQ ID NO:3、4或96中的一个具有至少85%同一性的序列。在某些实施例中,所述同一性为至少90%、至少95%或至少99%。

[0020] 在一些实施例中,本发明的多核苷酸盒进一步包括处于所述启动子区下游的内含子区。在一些实施例中,所述内含子序列位于所述启动子下游和所述5'UTR上游。在一些实施例中,所述内含子区包括延伸因子1α(EF1α)、肌动蛋白或CMVc序列。在某些实施例中,所述内含子包括与以下SEQ ID NO:5、18或97中的一个具有至少85%同一性的序列。在某些实施例中,所述同一性为至少90%、至少95%或至少99%。

[0021] 本发明的多核苷酸盒包括所述编码序列的非转译区5',所述非转译区在本文中被称为5'UTR。在一些实施例中,所述5'UTR序列与所述启动子序列是异源的。所述5'UTR位于

所述启动子下游和所述编码序列上游。在一些这种实施例中,所述5'UTR包括选自由以下组成的组的序列:UTR1、UTR2、来自腺病毒主要晚期启动子(eMLP)的增强子元素以及来自腺病毒的三联前导序列(TPL序列)。在一些实施例中,所述5'UTR包括UTR1序列。在一个实施例中,所述5'UTR包括UTR2序列。在优选实施例中,所述5'UTR按5'到3'顺序包括TPL序列和eMLP序列。在一些实施例中,所述5'UTR不包括多核苷酸ATG。在某些实施例中,所述5'UTR包括与以下SEQ ID NO:6、11、12或19中的一个具有至少85%同一性的序列。在某些实施例中,所述同一性为至少90%、至少95%或至少99%。

[0022] 本发明的实施例包括用于增强转基因表达的多核苷酸盒。因此,本发明的多核苷酸盒包括编码序列,所述编码序列也被称为转基因。在一个具体实施例中,所述多核苷酸盒包括一个编码序列或一个转基因并且不包括两个或更多个转基因。所述转基因可以对治疗剂(如例如肽或多肽)进行编码。在优选实施例中,所述转基因对分泌多肽(其在本文也称为分泌性蛋白(secreted protein)或分泌蛋白(secretory protein))进行编码。可以由所述编码序列编码的分泌多肽的实例包含但不限于可溶性fms样酪氨酸激酶-1(也称为sFLT-1)、sFLT-1的VEGF结合片段、阿柏西普(aflibercept)和α-1抗胰蛋白酶或α_1-抗胰蛋白酶(A1AT)。在一些实施例中,所述分泌多肽是抗血管生成多肽或抗血管内皮生长因子(抗VEGF)多肽。

[0023] 相对于由参照盒在哺乳动物细胞中进行的转基因产物的表达,主题表达盒在哺乳动物细胞中提供了转基因产物(例如,多肽)的表达增强。在优选实施例中,相对于由参照盒在体内或体外真核细胞中进行的分泌蛋白的表达,主题表达盒在体内或体外(例如,在细胞培养物或组织外植体中)真核细胞中提供了分泌蛋白的表达增强。在一些方面,所述真核细胞为哺乳动物细胞。在仍进一步的方面,所述哺乳动物细胞为人细胞。

[0024] 在一些实施例中,由所述多核苷酸盒在哺乳动物细胞中进行的分泌多肽的表达是由参照盒在体外或体内哺乳动物细胞中进行的分泌多肽的表达的至少约2倍、3倍、5倍、9倍、10倍、20倍或50倍。

[0025] 在一些实施例中,由所述多核苷酸盒在哺乳动物细胞中获得的非分泌性多肽的表达水平与由参照盒在体外或体内哺乳动物细胞中获得的非分泌性多肽的表达水平大致相同、是所述表达水平的不到约1.5倍或是所述表达水平的不到约2倍。非分泌性多肽的一个非限制性实例是绿色荧光蛋白(GFP)。

[0026] 根据一些实施例,本文上下文所提及的所述参照盒(本文中也称为CMV参照对照盒)按5'到3'顺序包括CMV增强子序列(SEQ ID NO:2)、CMV启动子(SEQ ID NO:21)、嵌合内含子(SEQ ID NO:22)、5'UTR(SEQ ID NO:23)、对所述肽或多肽基因产物进行编码的编码序列、3'UTR(SEQ ID NO:25)和SV40polyA序列(SEQ ID NO:26)。

[0027] 根据具体实施例,在选自由HeLa细胞、HEK-293细胞和ARPE-19细胞组成的组的体外哺乳动物细胞中观察到肽或多肽的表达增强。在另一个实施例中,所述哺乳动物细胞包含在视网膜组织外植体中。

[0028] 在一些形式中,由多核苷酸盒在体外或体内(例如,受试者中)哺乳动物细胞中进行的分泌多肽的表达是在相同条件下由所述CMV参照对照盒在所述哺乳动物细胞中进行的所述分泌蛋白的表达的至少2倍、至少5倍、至少10倍或约5倍到约10倍,其中所述CMV参照对照盒按5'到3'顺序包括SEQ ID NO:2中所示的CMV增强子序列、SEQ ID NO:21中所示的CMV

启动子序列、SEQ ID NO:22中所示的嵌合内含子序列、SEQ ID NO:23中所示的5'UTR序列、对所述分泌多肽进行编码的编码序列、SEQ ID NO:25中所示的3'UTR序列以及SEQ ID NO:26中所示的SV40polyA序列。在一些实施例中,与由所述CMV参照对照盒在哺乳动物细胞中进行的所述蛋白质的表达相比,所述多核苷酸盒使所述哺乳动物细胞中的所述分泌蛋白的表达增加了至少2倍(2X)、5倍(5X)、10倍(10X)或约5倍到约10倍。在一个实施例中,相对于由所述CMV参照对照盒在经过转导的哺乳动物细胞中进行的所述蛋白质的表达,所述多核苷酸盒增强或增加了经过转导的哺乳动物细胞中的分泌性蛋白的表达。

[0029] 所述多核苷酸盒包括位于所述编码序列下游和所述多腺苷酸化信号序列上游的第二增强子区。当存在RNA输出信号序列时,所述第二增强子序列位于所述RNA输出信号上游(即,处于所述编码序列与所述RNA输出信号之间),并且所述RNA输出信号位于所述多腺苷酸化信号上游。在优选实施例中,所述第二增强子区包括选自由完整的表达增强子序列(EES)、410-564EES和511-810EES组成的组的EES。

[0030] 在一些实施例中,所述多核苷酸盒包括处于所述第二增强子下游和所述多腺苷酸化序列(其在本文中也称为polyA序列、polyA位点或多腺苷酸化区)上游的RNA输出信号。所述RNA输出信号可以包括选自由以下组成的组的序列:人乙型肝炎病毒转录后元件(HPRE)序列和土拨鼠肝炎病毒转录后元件(WPRE)序列。在某些实施例中,所述RNA输出信号包括与以下SEQ ID NO:8或17中的一个具有至少85%同一性的序列。在某些实施例中,所述同一性为至少90%、至少95%或至少99%。

[0031] 根据本发明的多核苷酸盒包括多腺苷酸化位点。所述多腺苷酸化位点可以位于所述第二增强子区下游或所述RNA输出区下游。在一些实施例中,所述多腺苷酸化区包括人生长激素(HGH或hGH)、牛生长激素(BGH或bGH)或β-珠蛋白(β珠蛋白)polyA序列。在某些实施例中,所述多腺苷酸化区包括与以下SEQ ID NO:9、14或20中的一个具有至少85%同一性的序列。在某些实施例中,所述同一性为至少90%、至少95%或至少99%。

[0032] 本发明的一些实施例涉及如通过细胞外环境中的蛋白质的量(例如,浓度或数量)所测量的,相对于由参照盒在哺乳动物细胞中进行的所述蛋白质的表达,用于增强或增加所述哺乳动物细胞的分泌蛋白表达的多核苷酸盒。可以通过例如免疫测定来测量样品中蛋白质的量。

[0033] 在一些实施例中,所述用于增强哺乳动物细胞中的转基因表达的多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括EF1α序列(SEQ ID NO:3);(c)内含子区,其包括EF1α序列(SEQ ID NO:5);(d)5'UTR区,其包括UTR2序列(SEQ ID NO:6);(e)对肽或多肽进行编码的编码序列;(f)第二增强子区,其包括511-810EES序列(SEQ ID NO:7);(g)WPRE RNA输出序列(SEQ ID NO:8);以及(h)BGH多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:9)。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:70-75的序列或与其具有至少85%同一性的序列。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的5'臂包括SEQ ID NO:45或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的3'臂包括SEQ ID NO:46或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。

[0034] 在其它实施例中,所述用于增强哺乳动物细胞中的转基因表达的多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括CMV

序列(SEQ ID NO:4);(c)5'UTR区,其按5'到3'顺序包括TPL序列和eMLP序列(分别为SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12);(d)对肽或多肽进行编码的编码序列;(e)第二增强子区,其包括完整的EES序列(SEQ ID NO:13);以及(f)HGH多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:14)。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:76-80的序列或与其具有至少85%同一性的序列。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的5'臂包括SEQ ID NO:47或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的3'臂包括SEQ ID NO:48或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。

[0035] 在其它实施例中,所述用于增强哺乳动物细胞中的转基因表达的多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:4);(c)5'UTR区,其按5'到3'顺序包括TPL序列和eMLP序列(分别为SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12);(e)对肽或多肽进行编码的编码序列;(f)第二增强子区,其包括410-564EES序列(SEQ ID NO:16);(g)HPRE RNA输出序列(SEQ ID NO:17);以及(h)BGH多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:9)。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:81-86的序列或与其具有至少85%同一性的序列。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的5'臂包括SEQ ID NO:49或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的3'臂包括SEQ ID NO:50或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。

[0036] 在其它实施例中,所述用于增强哺乳动物细胞中的转基因表达的多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括肌动蛋白序列(SEQ ID NO:96);(c)5'UTR,其包括eMLP序列(SEQ ID NO:12);(e)对肽或多肽进行编码的编码序列;(f)第二增强子区,其包括511-810EES序列(SEQ ID NO:7);(g)HPRE RNA输出序列(SEQ ID NO:17);以及(h)兔β珠蛋白多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:20)。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:87-91的序列或与其具有至少85%同一性的序列。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的5'臂包括SEQ ID NO:51或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的3'臂包括SEQ ID NO:52或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。

[0037] 在其它实施例中,所述用于增强哺乳动物细胞中的转基因表达的多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:4);(c)内含子区,其包括CMVc序列(SEQ ID NO:18);(d)5'UTR区,其包括UTR1序列(SEQ ID NO:19);(e)对肽或多肽进行编码的编码序列;(f)第二增强子区,其包括完整的EES序列(SEQ ID NO:13);(g)WPRE RNA输出序列(SEQ ID NO:8);以及(h)兔β珠蛋白多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:20)。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:92-95的序列或与其具有至少85%同一性的序列。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的5'臂包括SEQ ID NO:53或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的3'臂包括SEQ ID NO:54或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。

[0038] 在其它实施例中,所述用于增强哺乳动物细胞中的转基因表达的多核苷酸盒按5'

到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括肌动蛋白序列(SEQ ID NO:96);(c)内含子区,其包括鸡β-肌动蛋白序列(SEQ ID NO:97);(d)5'UTR区,其包括UTR1序列(SEQ ID NO:19);(e)对肽或多肽进行编码的编码序列;(f)第二增强子区,其包括410-564EES序列(SEQ ID NO:16);(g)HPRE RNA输出序列(SEQ ID NO:17);以及(h)BGH多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:9)。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:92-95的序列或与其具有至少85%同一性的序列。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的5'臂包括SEQ ID NO:39或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。在这些实施例中的某些实施例中,所述多核苷酸盒的3'臂包括SEQ ID NO:40或与其具有至少85%同一性的序列或者由其组成。

[0039] 在某些实施例中,所述多核苷酸盒按5'到3'顺序包括或基本上由以下组成:(a)5'臂;(b)对肽或多肽进行编码的编码序列;以及(c)3'臂。在这些实施例中的某些实施例中,所述5'臂包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59和61或与其具有至少85%同一性的序列,并且所述3'臂包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60和62或与其具有至少85%同一性的序列。在特定实施例中,所述5'臂和所述3'臂分别为SEQ ID NO:27和28、或SEQ ID NO:29和30、或SEQ ID NO:31和32、或SEQ ID NO:33和34、或SEQ ID NO:35和36、或SEQ ID NO:37和38、或SEQ ID NO:39和40、或SEQ ID NO:41和42、或SEQ ID NO:43和44、或SEQ ID NO:45和46、或SEQ ID NO:47和48、或SEQ ID NO:49和50、或SEQ ID NO:51和52、或SEQ ID NO:53和54、或SEQ ID NO:55和56、或SEQ ID NO:57和58、或SEQ ID NO:59和60、或SEQ ID NO:61和62。

[0040] 在本发明的优选形式中,由主题多核苷酸盒中的所述编码序列编码的所述肽或多肽是在所述细胞中表达其之后从所述细胞分泌或输出的肽或多肽。

[0041] 在本发明的一些方面,提供了基因递送载体,所述基因递送载体包括本发明的多核苷酸盒。在一些实施例中,所述基因递送载体为重组病毒,所述重组病毒包括:(a)衣壳蛋白;和(b)本发明的多核苷酸盒。在更具体的实施例中,所述重组病毒为重组腺相关病毒(AAV),其中所述重组腺相关病毒包括AAV衣壳蛋白和本发明的多核苷酸盒。在一些实施例中,所述AAV衣壳蛋白为野生型AAV衣壳蛋白。在其它实施例中,所述AAV衣壳蛋白为变体AAV衣壳蛋白,其中相对于亲本衣壳蛋白或源自于其的衣壳蛋白,所述变体衣壳蛋白含有一个或多个氨基酸的取代、缺失或插入。例如,在一个实施例中,将约5个到约11个氨基酸插入相对于对应的亲本AAV衣壳蛋白的VP1衣壳蛋白的GH环或环IV的插入位点中。合适的实例包含具有7m8变体衣壳蛋白的AAV变体衣壳或源自于AAV变体7m8衣壳蛋白的衣壳蛋白。在一个特定实例中,所述变体AAV包括AAV2.7m8衣壳蛋白。

[0042] 在本发明的一些方面,提供了药物组合物,所述药物组合物包括本发明的多核苷酸盒和药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中,所述药物组合物包括本发明的基因递送载体和药物赋形剂。

[0043] 一个实施例是一种用本发明的多核苷酸盒转染或转导的分离的宿主细胞。

[0044] 在本发明的一些方面,提供了用于在体外或体内哺乳动物细胞中表达转基因的方法,所述方法包括使一个或多个体内或体外哺乳动物细胞与一定量的本发明的多核苷酸盒、基因递送载体或药物组合物接触,其中以可检测的水平在所述一个或多个哺乳动物细

胞中表达所述转基因,或者更优选地,以一定水平在所述细胞或细胞培养物中表达所述转基因,其表达水平是在相同条件下(即,其它变量保持不变)测量的由参照CMV盒获得的水平的约2倍、5倍或10倍(即,与由所述参照CMV盒进行的转基因表达相比),所述参照CMV盒按5'到3'顺序包括CMV增强子序列(SEQ ID NO:2)、CMV启动子(SEQ ID NO:21)、嵌合内含子(SEQ ID NO:22)、5'UTR(SEQ ID NO:23)、所关注的所述转基因或编码序列、3'UTR(SEQ ID NO:25)以及SV40polyA序列(SEQ ID NO:26)。一些实施例提供了一种用于在体外或体内哺乳动物细胞中表达转基因的方法,所述方法包括使一个或多个体外或体内哺乳动物细胞与本发明的一定量的重组病毒接触,其中所述重组病毒包括根据本公开的多核苷酸盒。在优选实施例中,所述盒或转基因对分泌蛋白(本文也称为分泌多肽)进行编码,并且以一定水平在所述一个或多个哺乳动物细胞中表达所述分泌蛋白,其表达水平是通过使所述细胞与包括对相同蛋白质进行编码的CMV参照对照盒的重组病毒接触获得的水平的至少约2倍、5倍、10倍、5倍到10倍或大于20倍。在一些方面,使所述哺乳动物细胞与一定量的可有效改变所述细胞的一个或多个特性或可有效减少个体疾病的一个或多个体征或症状的多核苷酸盒、药物组合物或载体接触。

[0045] 在本发明的一些方面,提供了用于治疗或预防有疾病或病症治疗或预防需要的哺乳动物的疾病或病症的方法。在一些实施例中,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物,其中所述编码序列对治疗性基因产物进行编码。在一个实施例中,所述疾病为眼部疾病和/或与细胞蛋白产物的功能丧失或缺陷相关的疾病。在一个实施例中,所述眼部疾病与眼部新血管形成相关或由其引起。一个实施例是一种用于治疗有需要的哺乳动物的眼部疾病的方法,所述方法包括向有治疗需要的哺乳动物的眼睛施用治疗有效量的本发明的药物组合物。在更具体的实施例中,通过眼内注射或通过玻璃体内注射向有治疗需要的所述个体的眼睛施用治疗有效量的本发明的药物组合物。

[0046] 可以使用主题盒、组合物和方法的眼部疾病包含急性黄斑神经视网膜病变;白塞氏(Behcet's)病;脉络膜新血管形成;糖尿病性葡萄膜炎;组织胞浆菌病;黄斑变性,如急性黄斑变性、非渗出性年龄相关黄斑变性和渗出性年龄相关黄斑变性;水肿,如黄斑水肿、囊样黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;影响后眼位点或后眼位置的眼外伤;眼瘤;视网膜病症,如视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变(包含增殖性糖尿病视网膜病变)、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉闭塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜疾病等;交感性眼炎;伏格特-小柳-原田三氏(Vogt Koyanagi-Harada)(VKH)综合征;葡萄膜扩散;由眼部激光治疗引起或受其影响的后眼部病状;由光动力疗法引起或受其影响的后眼部病状;光凝、放射性视网膜病变;视网膜前膜病症;视网膜静脉分枝阻塞;前部缺血性视神经病变;非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍;视网膜劈裂症;色素性视网膜炎;青光眼;乌谢尔(Usher)综合征、锥杆营养不良;斯图加特氏(Stargardt)疾病(眼底黄色斑点症);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;莱伯氏(Leber)先天性黑内障;先天性静止性夜盲症;无脉络膜症;巴德-毕德氏(Bardet-Biedl)综合征;黄斑毛细血管扩张症;莱伯氏遗传性视神经病变;早产儿视网膜病;以及色觉病症,包含全色盲、红色盲、绿色盲和蓝色盲。

附图说明

[0047] 通过参考以下对说明性实施例进行阐述的详细说明,将获得对本发明的特征和优点的更好的理解,所述实施例中利用了本发明的原理,并且在附图中:

[0048] 图1示出了构建用于评估转基因表达的一系列多核苷酸盒。按5'到3'顺序从左到右列出了存在于每个盒中的调节元件和编码序列(即,基因)。盒由盒编号识别,例如,盒编号11可以称为盒编号11、盒11或简称为C11。

[0049] 图2示出了比较在转染到HeLa细胞中后由多核苷酸盒来进行的阿柏西普(分泌性蛋白)的表达的图表。所述表达水平相对于由图1中所描述的"基础质粒"获得的表达水平进行绘制。

[0050] 图3示出了在转导到HEK 293细胞中后由所选多核苷酸盒进行的阿柏西普(分泌性蛋白)的表达。

[0051] 图4A和4B示出了转导后一周(图4A)和两周(图4B)由所选多核苷酸盒在经过转导的猪视网膜外植体中进行的阿柏西普(分泌性蛋白)的表达。每个盒包装在7m8衣壳(AAV2的变体)中。用媒剂(仅缓冲液)非病毒对照物来确定与测定相关的背景信号。

[0052] 图5描绘了对由各个多核苷酸盒构建体(包含参照盒(CMV-sFLT1))在经过转染的ARPE-19细胞中进行的sFLT-1表达的比较。对在盒10、11和12中编码sFLT-1的序列进行密码子优化("CO")。基础质粒仅在普遍存在的启动子下具有密码子优化的sFLT1,而没有任何其它调节元件。

[0053] 图6描绘了对由各个构建体在经过转染的HEK293细胞中进行的sFLT-1表达的比较。

[0054] 图7描绘了对由各个构建体(包含参照盒(CMV-sFLT1))在经过转染的HeLa细胞中进行的sFLT-1表达的比较。

[0055] 图8示出了与由CMV参照对照盒进行的GFP表达以及与媒剂(仅缓冲液)对照物相比,由多核苷酸盒C7、C11和C13在经过转染的HeLa细胞中进行的绿色荧光蛋白(GFP)的表达。

[0056] 图9描绘了对由各个多核苷酸盒在经过转导的HEK293细胞中进行的sFLT-1表达的比较。数据表示在用7m8载体转导后三天细胞培养物上清液中sFLT-1的量。在每种情况下,载体包装指定的盒。将由盒C10和C11进行的sFLT-1的表达(如在细胞培养物上清液中测量的)与由CMV参照盒进行的sFLT-1的表达进行比较。用媒剂(仅缓冲液)对照物来确定背景信号。作为另外的对照,用含有CMV-sFLT1参照对照盒的重组AAV2载体来转导细胞。在第一次实验中,从盒11中分泌的sFLT1的量高于免疫测定的范围,因此必须进行进一步稀释和分析。

[0057] 图10A和10B示出了由所选多核苷酸盒在经过转导的猪视网膜外植体中进行的sFLT1的表达。在上清液(图10A)以及组织裂解物中测量sFLT1表达(图10B)。

[0058] 图11示出了含有盒11的重组质粒的一个说明性实施例。来自腺相关病毒血清型2(AAV2)的反向末端重复序列(ITR)侧接所述盒。

具体实施方式

[0059] 本公开提供了用于在细胞中表达基因的多核苷酸盒和表达载体。还提供了药物组

合物和使用任何组合物促进基因在细胞中(例如,在个体中)表达的方法以例如治疗或预防病症。通过阅读如将在下文中更全面地描述的组合物和方法的细节,本发明的这些和其它目的、优点和特征对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

[0060] 定义

[0061] "非天然存在的"多核苷酸盒是未在自然界中发现的一种盒。

[0062] 在本文中也称为"分泌性蛋白"的"分泌蛋白"或"分泌多肽"是由活细胞分泌或从活细胞输出的任何蛋白质。与当前描述的多核苷酸盒一起使用的分泌蛋白的一个非限制性实例是sFLT-1。

[0063] 术语"疾病"、"病症"和"医学病状"是同义词并且在本文中可互换使用。

[0064] 如本文所使用的,"载体"是指高分子或高分子的缔合,所述高分子或高分子的缔合包括多核苷酸或与所述多核苷酸相关并且可以用于介导向细胞递送所述多核苷酸。说明性载体包含例如质粒、病毒载体(即病毒,如腺相关病毒)、脂质体和其它基因递送媒剂。

[0065] 术语"AAV"是腺相关病毒的缩写,并且可以用于指病毒本身或其衍生物。所述术语涵盖所有亚型以及天然存在的和重组的形式,除非另有要求。术语"AAV"包含AAV 1型(AAV-1)、AAV 2型(AAV-2)、AAV 3型(AAV-3)、AAV 4型(AAV-4)、AAV 5型(AAV-5)、AAV 6型(AAV-6)、AAV 7型(AAV-7)、AAV 8型(AAV-8)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV以及绵羊AAV。"灵长类动物AAV"是指感染灵长类动物的AAV,"非灵长类动物AAV"是指感染非灵长类哺乳动物的AAV,"牛AAV"是指感染牛哺乳动物的AAV等。

[0066] "AAV病毒"或"AAV病毒颗粒"或"rAAV载体颗粒"是指由至少一种AAV衣壳蛋白(通常由野生型AAV的所有衣壳蛋白组成)和衣壳化多核苷酸构成的病毒颗粒。如果颗粒包括异源多核苷酸(即,除野生型AAV基因组以外的多核苷酸,如要递送到哺乳动物细胞的转基因),则其通常被称为重组AAV载体或rAAV。通常,异源多核苷酸侧接有AAV反向末端重复序列(ITR)。

[0067] 如本文所使用的,关于本发明的AAV病毒载体的术语"复制缺陷"意指AAV载体不能独立地复制和包装其基因组。例如,当受试者的细胞感染rAAV病毒粒子时,异源基因在受感染的细胞中表达,然而,由于受感染的细胞缺乏AAV rep和cap基因和辅助功能基因这一事实,rAAV不能进一步复制。

[0068] 如本文所使用的,"AAV变体"或"AAV突变体"是指由变体AAV衣壳蛋白构成的病毒颗粒,其中变体AAV衣壳蛋白包括至少一个相对于对应的亲本AAV衣壳蛋白的氨基酸差异(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),并且其中变体衣壳蛋白赋予视网膜细胞与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子的视网膜细胞的感染性相比增加的感染性,其中AAV衣壳蛋白不包括天然存在的AAV衣壳蛋白中存在的氨基酸序列。可以将本公开的多核苷酸表达盒包装在变体AAV颗粒中,以促进将盒递送到靶组织中的特定细胞类型(例如,视网膜细胞)。

[0069] 如本文所使用的,术语"基因"或"编码序列"是指对体外或体内基因产物进行编码的核苷酸序列。术语"转基因"是指通过载体递送到细胞中的编码序列或基因。编码序列或基因可以对肽或多肽分子进行编码。

[0070] 如本文所使用的,"治疗性基因"和"治疗性蛋白质"是指基因或蛋白质在表达时赋予其存在的细胞或组织或哺乳动物有益效果,所述基因或蛋白质在所述哺乳动物中表达。

有益效果的实例可以是减轻或改善病状或疾病的体征或症状、预防或抑制病状或疾病或赋予所期望的特征。治疗性基因和蛋白质包含纠正细胞或哺乳动物中的遗传缺陷的基因和蛋白质。

[0071] 本发明的多核苷酸盒、重组病毒或药物组合物的“治疗有效量”或“有效量”是足以导致受试者的疾病或医学病状的一个或多个体征或症状减轻的量，其中受试者可以是人或非人哺乳动物。

[0072] 如本文所使用的，术语“基因产物”是指多核苷酸序列(如肽或蛋白质)的所期望的表达产物。

[0073] 如本文所使用的，术语“多肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸聚合物。术语“肽”是指约50个或更少氨基酸的氨基酸聚合物。所述术语还涵盖如通过例如二硫键形成、糖基化、脂化或磷酸化已经修饰的氨基酸聚合物。在一些实例中，主题多肽可以具有大于50个氨基酸的长度。

[0074] “包括”意指所列元素是例如组合物、方法、试剂盒等中必需的，但是可以包含其它元素以在权利要求的范围内形成例如组合物、方法、试剂盒等。例如，“包括”对可操作地连接到启动子的治疗性多肽进行编码的基因的表达盒是可以包含除基因和启动子之外的其它元素(例如，多腺苷酸化序列、增强子元件、其它基因、连接子结构域等)的表达盒。

[0075] “基本上由……组成”意指对实质上不影响例如组合物、方法、试剂盒等的一个或多个基本和新颖特征的特定材料或步骤所描述的例如组合物、方法、试剂盒等的范围的限制。例如，“基本上由”对可操作地连接到启动子和多腺苷酸化序列的治疗性多肽进行编码的基因“组成”的表达盒可以包含另外的序列，例如，连接子序列，只要它们实质上不影响基因的转录或转译。作为另一个实例，“基本上由”叙述的序列“组成”的变体或突变体多肽片段具有所述序列的氨基酸序列在序列的边界处基于源自于的全长未处理多肽加上或减去约10个氨基酸残基，例如，比所述结合氨基酸残基少10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个残基或比所述结合氨基酸残基多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个残基。

[0076] “由……组成”意指从组合物、方法或试剂盒中排除未在权利要求中指定的任何元件、步骤或成分。例如，“由”对可操作地连接到启动子的治疗性多肽进行编码的基因和多腺苷酸化序列“组成”的表达盒仅由启动子、对治疗性多肽进行编码的多核苷酸序列以及多腺苷酸化序列组成。作为另一个实例，“由”叙述的序列“组成”的多肽仅含有所叙述的序列。

[0077] 如本文所使用的，“表达载体”涵盖包括对所关注的基因产物进行编码的主题多核苷酸盒的载体，例如，质粒、微环、病毒载体、脂质体等，并且用于将主题多核苷酸递送到预期的靶细胞。

[0078] 如本文所使用的，“启动子”涵盖引导RNA聚合酶结合并且由此促进RNA合成的DNA序列。启动子和对应的蛋白质或多肽表达可以是普遍存在的(意指在广泛的细胞、组织和物种中具有强活性)或细胞类型特异性的、组织特异性的或物种特异性的。启动子可以是“组成型的”(意指持续活性)或“诱导型的”(意指启动子可以通过生物因子或非生物因子的存在或不存在而活化或失活)。还包含在本发明的核酸构建体或载体中的是增强子序列，所述增强子序列可以或可以不与启动子序列邻接。增强子序列影响启动子依赖性基因表达，并且可以位于天然基因的5’区或3’区中。

[0079] 如本文所使用的,“增强子”涵盖刺激或抑制相邻基因转录的顺式作用元件。抑制转录的增强子也被称为“沉默子”。增强子可以以任一朝向在距编码序列和转录区下游的位置几千碱基对(kb)的距离上起作用(即,可以与编码序列相关)。

[0080] 如本文所使用的,“多腺苷酸化信号序列”涵盖核酸内切酶切割RNA转录物所需的识别区,其后是多腺苷酸化共有序列AATAAA。多腺苷酸化信号序列提供“polyA位点”,即RNA转录物上的位点,腺嘌呤残基将通过转录后多腺苷酸化作用添加到所述位点上。

[0081] 如本文所使用的,术语“可操作地连接”是指遗传元件(例如,启动子、增强子、终止信号序列、多腺苷酸化序列等)的并置,其中所述元件处于准许其以预期方式操作的关系中。例如,如果启动子帮助启动编码序列的转录,则启动子可操作地连接到编码区。只要保持这种功能关系,启动子与编码区之间就可能存在间插残基。

[0082] 如本文所使用的,术语“异源”是指源自与其进行比较的实体的其余部分的基因型不同的实体。例如,通过基因工程技术引入到源自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸是异源多核苷酸。作为另一个实例,从其天然编码序列中除去并可操作地连接到与天然未发现连接的编码序列的启动子是异源启动子。因此,例如,包含对异源基因产物进行编码的异源核酸的rAAV是包含通常不包含在天然存在的野生型AAV中的核酸的rAAV,并且经过编码的异源基因产物是通常不由天然存在的野生型AAV编码的基因产物。

[0083] 如本文所使用的,关于核苷酸分子或基因产物的术语“内源”是指核酸序列(例如,基因或遗传元件)或天然存在于宿主病毒或细胞中或与其相关的基因产物(例如,RNA、蛋白质)。

[0084] 如本文所使用的,术语“天然的”是指核苷酸序列(例如,基因)或存在于野生型病毒或细胞中的基因产物(例如,RNA、蛋白质)。

[0085] 如本文所使用的,术语“变体”是指参考多核苷酸或多肽序列的突变体,例如天然多核苷酸或多肽序列,即与参考多核苷酸或多肽序列具有小于100%的序列同一性。换句话说,多肽变体包括相对于参考多肽序列(例如,天然多肽序列)的至少一个氨基酸差异(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),并且多核苷酸变体包括相对于参考多核苷酸序列(例如,天然多核苷酸序列)的至少一个核苷酸或核苷差异(例如,核苷酸或核苷取代、插入或缺失)。

[0086] 如本文所使用的,术语“序列同一性”或“百分比同一性”是指当使用核苷酸序列比对程序比对时,两个或更多个多核苷酸之间的同一性程度;或当使用氨基酸序列比对程序比对时,两个或更多个多肽序列之间的同一性程度。类似地,当在两个或更多个核苷酸或氨基酸序列的上下文中使用时,术语“相同”或百分比“同一性”是指当出于最大对应性比较和比对时两个相同或具有特定百分比的氨基酸残基或核苷酸的序列,例如,如使用序列比较算法(例如,史密斯-沃特曼算法(Smith-Waterman algorithm)等)或通过目视检查测量的。例如,可以使用Needleman和Wunsch(1970,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,48:444-453)算法、使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,所述算法已并入GCG软件包中的GAP程序中。作为另一个实例,可以使用GCG软件包中的GAP程序、使用NWSgapdna.CMP矩阵以及40、50、60、70或80的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重来确定两个核苷酸序列之间的百分比同一性。一组特别优选的参数(除非另有说明,否则应使用的参数)是Blossum62

评分矩阵,空位罚分为12,空位延伸罚分为4,并且移码空位罚分为5。两个氨基酸或核苷酸序列之间的百分比同一性还可以使用E.Meyers和W.Miller(1989,《生物科学中的计算机应用(Cabios)》,4:11-17)的算法、使用PAM120权重残基表、12的空位长度罚分和4的空位罚分来确定,所述算法已并入ALIGN程序(版本2.0)中。本文描述的核酸和蛋白质序列可以用作“查询序列”以对公共数据库进行检索,从而例如鉴定其它家族成员或相关序列。可以使用Altschul等人(1990,《分子生物学杂志》,215:403-10)的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)来执行这种检索。可以用NBLAST程序(得分=100,字长=12)进行BLAST核苷酸检索,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序(得分=50,字长=3)执行BLAST蛋白质检索,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有空位的比对,可以利用如Altschul等人(1997,《核酸研究(Nucleic Acids Res)》,25:3389-3402)中所述的有空位的BLAST。当利用BLAST和有空位的BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0087] 如本文所使用的,术语“生物活性(biological activity)”和“生物活性(biologically active)”是指归因于细胞中的特定生物元素的活性。例如,“免疫球蛋白”、“抗体”或其片段或变体的“生物活性”是指结合抗原决定簇并且由此促进免疫功能的能力。作为另一个实例,多肽或其功能片段或变体的生物活性是指多肽或其功能片段或变体实现其例如结合、酶活性等的天然功能的能力。作为第三个实例,基因调节元件(例如,启动子、增强子、kozak序列等)的生物活性是指调节元件或其功能片段或变体分别调节其可操作地连接的基因的表达(即,促进、增强或活化其转译)的能力。

[0088] 如本文所使用的,术语“施用”或“引入”是指将重组蛋白表达的载体递送到细胞、受试者的细胞和/或器官或受试者。这种施用或引入可以发生在体内、体外或离体。可以通过转染将用于表达基因产物的载体引入到细胞中,这通常意味着通过物理手段(例如,磷酸钙转染、电穿孔、显微注射或脂质转染)将异源DNA插入到细胞中;或通过感染或转导,其通常是指通过感染剂(即病毒或病毒载体)将核酸分子引入到细胞中。

[0089] 通常,根据用于向细胞施用、引入或插入异源DNA(即载体)的方法,将细胞称为“转导的”、“感染的”、“转染的”或“转化的”。当通过病毒或病毒载体将DNA引入到细胞中时,用外源或异源DNA转导所述细胞。当通过非病毒方法将DNA引入到细胞中时,用外源或异源DNA转染所述细胞。非病毒方法包含化学方法(例如,脂质转染)和非化学方法。术语“转导的”和“感染的”在本文中可互换使用来指代已经从病毒或病毒载体接受异源DNA或异源多核苷酸的细胞。

[0090] 如本文所使用的,术语“宿主细胞”是指已经用载体转导、感染、转染或转化的细胞。载体可以是质粒、病毒颗粒、噬菌体等。培养条件(如温度、pH等)是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对于本领域技术人员而言将是显而易见的。应理解,术语“宿主细胞”是指原始转导、感染、转染或转化的细胞和其子代。

[0091] 术语“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指减轻疾病或病症的一个或多个体征或症状。

[0092] “眼部疾病”是指影响或涉及眼睛或眼睛的一个或多个部分或区的疾病、病痛或病状。因此,眼部疾病包含视网膜疾病或影响眼睛后部组织的光敏层的疾病。眼睛包含眼球以及构成眼球、眼周肌(如斜肌和直肌)和眼球内或眼球附近的视神经部分的组织和流体。

[0093] 组织“外植体”是已经从动物转移到营养培养基的组织块。

[0094] 术语“个体”、“宿主”、“受试者”和“患者”在本文中可互换使用并且是指哺乳动物，包含但不限于:人和非人灵长类动物,包含猿类和人类;哺乳类运动动物(例如,马);哺乳类农场动物(例如,绵羊、山羊等);哺乳类宠物(狗、猫等);以及啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)。

[0095] 下文描述了本发明的各种组合物和方法。尽管本文例示了特定组合物和方法,但是应当理解的是,众多替代性组合物和方法中的任何组合物和方法都适用并且适合于实践本发明。还应当理解,可以使用本领域的标准程序来对本发明的表达构建体和方法进行评估。

[0096] 除非另外指明,否则本发明的实践将采用细胞生物学、分子生物学(包含重组技术)、微生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述技术在本领域技术人员的范围内。这种技术在文献中有充分说明,如《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第二版(Sambrook等人,1989);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(M.J.Gait编辑,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.I.Freshney编辑,1987);《酶学方法(Methods in Enzymology)》(学术出版社公司(Academic Press,Inc.));《实验免疫学手册(Handbook of experimental immunology)》(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑);《哺乳动物细胞用基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)》(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);《当代分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology)》(F.M.Ausubel等人编辑,1987);《PCR:聚合酶链式反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)》(Mullis等人编辑,1994);以及《当代免疫学方案(Current Protocols in Immunology)》(J.E.Coligan等人编辑,1991),所述文献中的每一个文献通过引用明确地并入本文。

[0097] 以下参考用于说明的实例应用描述了本发明的若干方面。应当理解,阐述了许多具体细节、关系以及方法以提供对本发明的充分理解。然而,相关领域普通技术人员将很容易识别到,可以在不具有特定细节中的一个或多个的情况下或者可以用其它方法来实践本发明。本发明不受所说明的动作或事件的排序的限制,因为一些动作可以以不同的顺序和/或与其它动作或事件同时发生。此外,实施根据本发明的方法并不需要所有所说明的动作或事件。

[0098] 本文中所使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不旨在限制本发明。如本文所使用的,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”旨在也包含复数形式。此外,在具体实施方式和/或权利要求中所使用的术语“包含(including)”、“包含(include)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“具有(with)”或其变体的程度上,此类术语旨在是包含性的(以类似于术语“包括(comprising)”的方式)。

[0099] 术语“约(about)”或“大约(approximately)”意指由本领域普通技术人员确定的特定值在可接受的误差范围之内,这将部分地取决于所述值是如何测量或确定的,即受测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在1或大于1的标准偏差内。可替代地,“约”或“大约”可以意指给定值的高达20％、优选地高达10％、更优选地高达5％并且更优选地仍高达1％的范围。可替代地,特别是对于生物学系统或方法,所述术语可以意指处于某一值的数量级内,优选地在值的5倍内并且更优选地在2倍内。当在本申请和权利要求

中描述特定值时,除非另有说明,否则应当假设术语“约”意指在特定值的可接受误差范围内。

[0100] 本文所提及的所有出版物通过引用并入本文中,以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。应当理解,在存在矛盾的情况下,本公开取代所并入公开的任何公开内容。

[0101] 应进一步注意,权利要求可以撰写为排除任何任选的元素。因此,本声明旨在充当使用与权利要求要素的叙述有关的排他性术语如“单独”、“仅”等或使用“否定型”限制的前提基础。

[0102] 仅提供在本申请的提交日期之前的本文所讨论的出版物中的公开内容。本文中的任何内容均不应被理解为承认本发明不能由于现有发明而有权先于这种出版物。另外,所提供的公开日期可能与实际公开日期不同,实际公开日期可能需要独立地确定。

[0103] 除非另外指明,否则本文所使用的所有术语具有与其对于本领域技术人员而言应有的含义相同的含义,并且本发明的实践将采用微生物学的常规技术和重组DNA技术,所述技术在本领域技术人员的知识范围内。

[0104] 组合物

[0105] 在本公开的一些方面,提供了用于在一个或多个真核细胞中表达转基因的组合物。在一些方面,所述真核细胞是哺乳动物细胞。在一些方面,哺乳动物细胞是视网膜细胞,如视网膜神经节细胞、无长突细胞、水平细胞、双极细胞、感光细胞、视锥细胞、视杆细胞、Müller神经胶质细胞或视网膜色素上皮细胞。

[0106] 在本公开的一些实施例中,所述组合物是多核苷酸盒。“多核苷酸盒”是指包括两个或更多个功能性多核苷酸序列的通常彼此可操作地连接的多核苷酸序列,例如,调节元件、转译起始序列、编码序列、终止序列等。通常,主题多核苷酸序列由DNA构成。同样地,“用于在哺乳动物细胞中表达转基因的多核苷酸盒”是指促进在细胞中表达转基因的两个或更多个功能性多核苷酸序列(例如,启动子、增强子、5'UTR、转换起始序列、编码序列、终止序列等)的组合。

[0107] 例如,在一些实施例中,所述多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)任选地,第一增强子区;(b)启动子区,其中所述启动子区对真核细胞具有特异性;(c)对多肽基因产物进行编码的编码序列;(d)第二增强子区;以及(e)多腺苷酸化位点。在仍其它实施例中,所述多核苷酸盒进一步包括处于所述编码序列上游的5'非转译区(5'UTR)。在又其它实施例中,所述多核苷酸盒进一步包括处于所述启动子下游和所述编码序列上游的内含子区。在其它实施例中,所述多核苷酸盒进一步包括处于所述第二增强子下游和所述多腺苷酸化位点上游的RNA输出信号。关于本文所公开的多核苷酸盒,应理解,编码序列可操作地连接到所述盒中的表达控制序列。例如,编码序列可操作地连接到启动子区、一个或多个增强子区和多腺苷酸化位点。

[0108] 在一些实施例中,本公开的多核苷酸盒在哺乳动物细胞中提供了转基因的表达增强。在某些实施例中,本公开的多核苷酸盒内的两个或更多个功能性多核苷酸序列的布置在哺乳动物细胞中提供了转基因的表达增强。“增强的”是指携带本公开的多核苷酸盒的细胞相对于携带可操作地连接到可比较的调节元件的转基因的细胞中转基因的表达增加、加强或更强。换句话说,由本公开的多核苷酸盒进行的转基因表达相对于由不包括本公开的

一个或多个经过优化的元件的多核苷酸盒(即参照对照盒,如本文所述的CMV参照对照盒)的表达增加、增强或更强。在某些实施例中,表达增强特异于或限于一种或多种所期望的细胞类型。在一个实施例中,转基因对蛋白质进行编码,所述蛋白质由细胞分泌到细胞周围的水性环境中。

[0109] 例如,在包括本文公开的包括启动子的多核苷酸盒的细胞中转基因的表达可以比在携带可操作地连接到不同启动子的转基因的细胞中转基因的表达增强、加强或更强。作为另一个实例,在包括本文公开的包括增强子序列的多核苷酸盒的细胞中转基因的表达可以比在携带可操作地连接到不同增强子序列的转基因的细胞中转基因的表达增强、或增加、加强或更强。作为另一个实例,在包括本文公开的对5'UTR进行编码的多核苷酸盒的细胞中转基因的表达可以比在携带可操作地连接到不同5'UTR编码序列的转基因的细胞中转基因的表达增强、或增加、加强或更强。作为另一个实例,在包括本文公开的包括内含子的多核苷酸盒的细胞中转基因的表达可以比在携带可操作地连接到不同内含子序列的转基因的细胞中转基因的表达增强、或增加、加强或更强。在又另一个实例中,在包括本文公开的包括内含子的多核苷酸盒的细胞中转基因的表达可以比在携带可操作地连接到参照对照盒(如本文公开的CMV参照对照盒)的转基因的细胞中转基因的表达增强、或增加、加强或更强。

[0110] 在优选的实施例中,多核苷酸表达盒促进在一种或多种体外和体内特定细胞或组织类型中转基因的表达(或与参照盒相比更高水平的表达)。细胞类型的实例包含但不限于HeLa细胞、HEK-293细胞、ARPE-19细胞(人视网膜色素上皮细胞系)、视网膜神经节细胞、无长突细胞、水平细胞、双极细胞、感光细胞、视锥细胞、视杆细胞、Müller神经胶质细胞和视网膜色素上皮细胞。在另一个实施例中,在视网膜组织外植体的细胞中观察到表达增强。

[0111] 在一些实施例中,由所述多核苷酸盒在哺乳动物细胞中进行的分泌多肽的表达是由参照盒在体外或体内哺乳动物细胞中进行的分泌多肽的表达的至少约2倍、3倍、5倍、9倍、10倍、20倍或50倍。更一般地,所述分泌多肽的表达是由参照盒在哺乳动物细胞中进行的多肽的表达的2到10倍、5到10倍、9到10倍、至少2倍、至少5倍或至少10倍。换句话说,多核苷酸盒以一定水平在哺乳动物细胞培养物中表达分泌蛋白,其表达水平是由参照盒在哺乳动物细胞培养物中获得的表达水平的至少或大于2倍、5倍、10倍、50倍或约5倍到约10倍。

[0112] 在不希望受理论束缚的情况下,认为在细胞内或细胞外的细胞外环境(例如,培养上清液或组织基质)中的转基因的表达增强起因于细胞中基因产物的较快积聚或细胞中更稳定的基因产物。因此,可以以多种方式观察通过本公开的多核苷酸盒增强的转基因表达。例如,如果转基因可操作地连接到可比较的调节元件(如本文所述的CMV参照对照盒中的那些元件),则可以通过检测转基因的表达来观察表达增强,之后将检测比表达早(例如,比表达早7天、早2周、早3周、早4周、早8周、早12周或更长时间)的多核苷酸盒与细胞的接触。还可以观察到随着每个细胞的基因产物的量的增加而增强的表达。例如,每个哺乳动物细胞的基因产物的量可能增加2倍或更多,例如增加3倍或更多、增加4倍或更多、增加5倍或更多、或增加10倍或更多。还可以观察到随着哺乳动物细胞数量的增加而增强的表达,所述哺乳动物细胞表达由多核苷酸盒携带的转基因的可检测水平。例如,表达转基因的可检测水平的哺乳动物细胞的数量可能增加2倍或更多,例如增加3倍或更多、增加4倍或更多、增加5倍或更多、或增加10倍或更多。作为另一个实例,与常规多核苷酸盒相比,本发明的多核苷

酸可以促进更大百分比细胞中转基因的可检测水平;例如,当常规盒可以促进例如在某个区中小于5%的细胞中转基因表达的可检测水平时,本发明的多核苷酸促进在所述区中5%或更多细胞中表达的可检测水平;例如,接触的10%或更多、15%或更多、20%或更多、25%或更多、30%或更多、35%或更多、40%或更多、45%或更多,在某些情况下50%或更多、55%或更多;60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多(例如,80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多)的细胞将表达基因产物的可检测水平。还可以观察到随着细胞活力和/或功能的改变而增强的表达。

[0113] 本公开的多核苷酸盒通常包括启动子区。在某些实施例中,启动子区促进哺乳动物细胞中编码序列的表达。在某些情况下,启动子是普遍存在的启动子,即其是在广泛的细胞、组织和物种中具有活性的启动子。合适的实例包含肌动蛋白、巨细胞病毒(CMV)、延伸因子1α(EF1α)、以及甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH)启动子。

[0114] 在一些实施例中,多核苷酸包括一个或多个增强子。增强子是增强转录的核酸元件。在一些实施例中,多核苷酸盒包括处于编码序列上游的第一增强子和处于编码序列下游的第二增强子。合适的示例性增强剂包含但不限于EF1α、CMV、完整的EES或其部分,如410-564EES或511-810EES。EES(表达增强子序列)对应于人β-干扰素的人支架附着区或SAR(Agarwal,M等人(1998)“支架附着区介导的原发性T细胞中逆转录病毒载体表达的增强”《病毒学杂志(J.Virol.)》72(5):3720-3728)。在某些实施例中,上游增强剂包含但不限于EF1α或CMV。在某些实施例中,下游增强子包含但不限于完整表达增强子序列(完整EES)、410-564EES或511-810EES。

[0115] 在一些实施例中,主题多核苷酸盒包括对5'非转译区进行编码的序列,即对编码序列的非转译区5'进行编码的多核苷酸序列,也称为5'UTR。在一些实施例中,所述5'UTR不含多核苷酸ATG。合适的示例性5'UTR序列包含但不限于选自以下的序列:i)来自腺病毒的三联前导序列(TPL)(Logan,J等人(1984年6月)“腺病毒三联前导序列增强感染后期mRNA的转译(Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection)”,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》81:3655-3659);ii)来自腺病毒主要晚期启动子(eMLP)的增强子元件序列(Durocher,Y等人(2002)“通过瞬时转染悬浮生长人293-EBNA1细胞产生的高水平和高通量重组蛋白质(High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1cells)”,《核酸研究(Nucl.Acids.Res.》30(2):e9);(iii)UTR1;以及(iv)UTR2。在优选实施例中,所述5'UTR按5'到3'顺序包括TPL和eMLP序列。

[0116] 在一些实施例中,主题多核苷酸盒进一步包括内含子,所述内含子包括剪接供体/受体区。在一些实施例中,所述内含子位于启动子区的下游,并位于基因的转译起始序列的上游。内含子是DNA多核苷酸,其通过内含子剪接转录成RNA并在mRNA加工过程中被去除。含有内含子的多核苷酸盒的表达通常比不具有内含子的那些多核苷酸盒的表达高。内含子可以刺激的表达介于2倍与500倍之间(Buchman和Berg,1988,《分子细胞生物学(Mol Cell Bio)》,8(10):4395)。有效剪接的内含子含有前剪接供体、分支点和富Py区(Senapathy等人,1990;《酶学方法(Meth.Enzymol.)》183,252-78;Wu和Krainer,1999;《分子细胞生物学》,19(5):3225-36)。与处于3'末端处的内含子相比,5'内含子通常更有效(Huang和

Gorman,1990;《分子细胞生物学》,10:1805)。尽管已知内含子通常会增加基因表达水平,但给定cDNA的特异性增加(如果有的话)是经验性的,并且必须进行测试;例如,pSI载体中的嵌合内含子使CAT表达增加21倍,但荧光素酶表达仅增加3倍。示例性内含子序列包含但不限于来自肌动蛋白、延伸因子1α(EF1α)、来自腺病毒主要晚期启动子(eMLP)的增强子元件和CMVc的序列。

[0117] 待在细胞中表达的编码序列可以是任何多核苷酸序列,例如,对基因产物进行编码的基因或cDNA,例如多肽。编码序列可以与所述编码序列可操作地连接的启动子序列和/或5'UTR序列异源,即所述编码序列不与所述启动子或5'UTR天然可操作地缔合。可替代地,编码序列可以与所述编码序列可操作地连接的启动子序列和/或5'UTR序列内源,即所述编码序列天然与所述启动子或5'UTR缔合。基因产物可以内在地作用于哺乳动物细胞,或者其可以外在地起作用,例如,其可能是分泌性的。例如,当转基因是治疗性基因时,编码序列可以是对所期望的基因产物或其功能片段或变体进行编码的任何基因,所期望的基因产物或其功能片段或变体可以用作治疗疾病或病症的治疗剂。因此,多核苷酸盒中的编码序列可以对例如视蛋白或抑制VEGF的蛋白质进行编码,或者多核苷酸可以对有效减轻疾病的一个或多个体征或症状的蛋白质或酶进行编码。

[0118] 在各个优选的实施例中,转基因对从细胞分泌的肽或蛋白质进行编码。在一些实施例中,分泌性蛋白质是治疗性蛋白质或有效治疗受试者疾病的蛋白质。在一些实施例中,治疗性蛋白质是抗血管生成多肽或抑制新血管生长(血管生成)的多肽。在一些形式中,分泌性蛋白质是抗VEGF蛋白质或抑制血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白质。抗VEGF蛋白的实例包括兰尼单抗(ranibizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)和阿柏西普。抗VEGF多肽的另一个实例是可溶性fms样酪氨酸激酶-1(sFLT-1)。在其它情况下,分泌性蛋白质包括VEGF结合蛋白或其功能片段(如美国专利第5,712,380号、第5,861,484号以及第7,071,159号中公开的任何一种)或如例如美国专利第7,635,474号中公开的VEGF结合融合蛋白或由其组成。在一些形式中,分泌性蛋白质包括单链抗体(如例如单链抗VEGF抗体)或由其组成。根据一个实施例,转基因对sFLT-1进行编码,并且在更具体的实施例中,转基因对人sFLT-1进行编码。可替代地,转基因可以包括对sFLT-1的功能性VEGF结合片段进行编码的序列(Wiesmann等人,1997;《细胞(Cell)》,91:695-704)。根据另一个实施例,转基因对A1AT或α-1抗胰蛋白酶进行编码(Chiuchiolo等人,2013,24(4):161-173;Stoller和Aboussouan(2012)《美国呼吸与重症护理医学杂志(Am J Respir.Crit.Care Med.185(3):246-59),所述A1AT或α-1抗胰蛋白酶可以用于治疗与A1AT缺乏相关的疾病的方法中。

[0119] sFLT-1是VEGF受体FLT-1的可溶性截短形式,并且也被称为可溶性血管内皮生长因子受体-1(sVEGFR-1)。重组sFLT-1结合并抑制VEGF(Kendall和Thomas,1993;《美国国家科学院院刊》90(22):10705-10709)。在自然界中,重组sFLT-1通过替代性mRNA剪接而生成并且缺乏膜近端免疫球蛋白样结构域、跨膜区(transmembrane spanning region)和细胞内酪氨酸激酶结构域。如本文所描述的,"可溶性"FLT-1或sFLT-1是指FLT-1,所述FLT-1不限于细胞膜。未结合的sFLT-1可以在细胞外空间或溶液中自由扩散。

[0120] 在本发明的一个实施例中,对转基因编码序列进行修饰或"密码子优化",以通过用更频繁表示的密码子替换不频繁表示的密码子来增强表达。编码序列是对用于转译的氨基酸进行编码的mRNA序列的一部分。在转译过程中,61个三核苷酸密码子中的每个三核苷

酸密码子被转译成20个氨基酸中的一个氨基酸,从而导致遗传密码中的简并或冗余。然而,不同的细胞类型和不同的动物物种会利用在不同频率下对相同氨基酸进行编码的tRNA(各自携带反密码子)。当基因序列含有由对应tRNA不频繁表示的密码子时,核糖体转译机制可能会减慢,从而阻碍有效转译。可以通过特定物种的"密码子优化"来改进表达,其中改变编码序列以对相同的蛋白质序列进行编码,而利用高度表示和/或由高度表示的人蛋白质利用的密码子(Cid-Arregui等人,2003;《病毒学杂志》77:4928)。一方面,对编码序列进行优化以在灵长类动物中进行转译。在本发明的一个方面,对转基因的编码序列进行修饰以用灵长类动物中频繁表达的密码子替换哺乳动物或灵长类动物中不频繁表达的密码子。例如,在一些实施例中,由转基因编码的编码序列编码对多肽进行编码,所述多肽与由上文或在此所公开的序列编码的多肽具有至少85%的序列同一性,例如至少90%的序列同一性,例如至少95%的序列同一性、至少98%的同一性、至少99%的同一性,其中编码序列的至少一个密码子在人中具有比上文或在此所公开的序列中的对应密码子更高的tRNA频率。

[0121] 在一些实施例中,本发明的多核苷酸盒进一步包括RNA输出信号。RNA输出信号为增强来自细胞核的RNA的输出的顺式作用转录后调节元件。示例性RNA输出序列包含但不限于来自乙型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)和土拨鼠肝炎病毒转录后元件(WPRE)的序列(Higashimoto,T等人,"土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件减少来自逆转录病毒载体的通读转录(The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors)",《基因疗法(Gene Ther.)》,2007年9月,14(17):1298-1304)。

[0122] 在一些实施例中,本发明的多核苷酸盒进一步包括多腺苷酸化区。如本领域所理解的,RNA聚合酶II转录物通过切割和添加多腺苷酸化区而终止,所述多腺苷酸化区也可以称为poly(A)信号、poly(A)区或poly(A)尾部。polyA区含有多个连续的腺苷一磷酸,其通常具有基序AAUAAA的重复。已经鉴定出了几种有效的多腺苷酸化位点,包含来自SV40、牛生长激素、人生长激素和兔β珠蛋白的那些多腺苷酸化位点(Xu等人,2001;《基因(Gene)》272(1-2):149-156;Xu等人,2002;《控制释放期刊(J Control Rel.)》81(1-2):155-163)。用于在哺乳动物细胞中表达转基因的最有效的polyA信号可以取决于细胞类型和所关注的物种以及所使用的特定载体。在本发明的一些实施例中,多核苷酸盒包括选自由以下组成的组的polyA区:牛生长激素(BGH)、人生长激素(HGH)和β-珠蛋白(β珠蛋白)。

[0123] 如普通技术人员所理解的,可以对上文所提到的多核苷酸元件中的两种或更多种多核苷酸元件进行组合以产生本公开的多核苷酸盒。因此,例如,主题多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、CMV或EF1α启动子、任选地CMVc或EF1α内含子、UTR1、UTR2或TPL和eMLP 5'UTR、sFLT1的编码序列或分泌性多肽、完整的EES、410-564EES或511-810EES增强子、任选地HPRE或WPRE RNA输出序列以及BGH、HGH或β珠蛋白多腺苷酸化信号序列。

[0124] 另一个多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、CMV启动子、包括TPL序列和eMLP序列的5'UTR、对治疗剂(例如,治疗性多肽)进行编码的编码序列、全长EES增强子以及HGH polyA信号序列。在特定实施例中,编码序列对抗血管生成多肽进行编码。在特定实施例中,对编码序列进行密码子优化。在这些实施例中的某些实施例中,多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:76-80的序列。

[0125] 在又另一个实施例中,多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、CMV启动子、包括TPL序列和eMLP序列的5'UTR、对治疗剂进行编码的编码序列、410-564EES增强子、HPRE RNA输出区以及BGH多腺苷酸化信号。在特定实施例中,编码序列对抗血管生成多肽进行编码。在特定实施例中,对编码序列进行密码子优化。在这些实施例的某些实施例中,多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:81-86的序列。

[0126] 在仍另一个实施例中,多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、EF1α启动子、EF1α内含子、UTR2 5'UTR、对治疗剂进行编码的编码序列、511-810EES增强子、WPRE RNA输出区以及牛生长激素(BGH)多腺苷酸化信号。在特定实施例中,编码序列对抗血管生成多肽进行编码。在特定实施例中,对编码序列进行密码子优化。在这些实施例的某些实施例中,多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:70-75的序列。

[0127] 在又另一个实施例中,多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、CMV启动子、CMVc内含子、UTR1 5'UTR、对治疗剂进行编码的编码序列、全长EES增强子、WPRE RNA输出区以及β-珠蛋白(β珠蛋白)多腺苷酸化信号。在特定实施例中,编码序列对抗血管生成多肽进行编码。在特定实施例中,对编码序列进行密码子优化。在这些实施例的某些实施例中,多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:92-95的序列。

[0128] 在又另一个实施例中,多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、肌动蛋白启动子、eMLP内含子、对治疗剂进行编码的编码序列、511-810EES序列、HPRE RNA输出序列以及β珠蛋白多腺苷酸化信号。在特定实施例中,编码序列对抗血管生成多肽进行编码。在特定实施例中,对编码序列进行密码子优化。在这些实施例的某些实施例中,多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:87-91的序列。

[0129] 在又另一个实施例中,多核苷酸盒按5'到3'顺序可以包括处于可操作连接的CMV增强子、肌动蛋白启动子、鸡β-肌动蛋白内含子、UTR1 5'UTR、对治疗剂进行编码的编码序列、410-564EES序列、HPRE RNA输出序列以及BGH多腺苷酸化信号。在特定实施例中,编码序列对抗血管生成多肽进行编码。在特定实施例中,对编码序列进行密码子优化。在这些实施例的某些实施例中,多核苷酸盒包括一个或多个选自SEQ ID NO:92-95的序列。

[0130] 如本领域普通技术人员将认识到的,多核苷酸盒可以任选地含有其它元件,包含但不限于促进克隆的限制性位点和用于特定基因表达载体的调节元件。调节序列的实例包含AAV载体的ITR、质粒载体的细菌序列、噬菌体整合酶载体的attP位点或attB位点以及转座子的转座元件。

[0131] 如本文所公开的,在本发明的一些方面,主题多核苷酸盒用于将基因递送到动物细胞,例如以确定基因对细胞活力和/或功能的影响、治疗细胞病症等。因此,在本发明的一些方面,提供用于在哺乳动物细胞中表达转基因的组合物为基因递送载体,其中基因递送载体包括本公开的多核苷酸盒。

[0132] 本公开的基因递送载体涵盖用于将多核苷酸序列递送到哺乳动物细胞的任何方便的基因递送载体。例如,载体可以包括单链核酸或双链核酸,例如单链DNA或双链DNA。例如,基因递送载体可以是DNA,例如裸DNA,例如质粒或微环等。载体可以包括单链RNA或双链RNA,包含RNA的经过修饰的形式。在另一个实例中,基因递送载体可以是RNA,例如mRNA或经过修饰的mRNA。

[0133] 作为另一个实例,基因递送载体可以是源自于病毒的病毒载体,例如腺病毒、腺相

关病毒(AAV)、慢病毒、疱疹病毒、α病毒或逆转录病毒,例如莫洛尼(Moloney)鼠类白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠类肉瘤病毒(MoMSV)、哈维(Harvey)鼠类肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠类乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗里德(Friend)鼠类白血病病毒、鼠类干细胞病毒(MSCV)和劳斯氏(Rous)肉瘤病毒(RSV)或慢病毒。虽然下文更详细地描述涵盖腺相关病毒的用途的实施例,但是预期普通技术人员将认识到,本领域类似的知识和技能也可以应用于非AAV基因递送载体。参见例如,例如美国专利第7,585,676号和美国专利第8,900,858号中对逆转录病毒载体的讨论以及例如美国专利第7,858,367号中对腺病毒载体的讨论,所述美国专利的全部公开内容通过引用并入本文。

[0134] 在一些实施例中,基因递送载体为重组腺相关病毒(rAAV)。在这种实施例中,主题多核苷酸盒在5'和3'末端侧接有功能性AAV反向末端重复(ITR)序列。"功能性AAVITR序列"是指如预期的用于拯救、复制和包装AAV病毒粒子的ITR序列。因此,用于本发明的基因递送载体的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列并且可以通过核苷酸的插入、缺失或取代而改变,或者AAV ITR可以源自于若干AAV血清型中的任何AAV血清型,例如,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10。优选的AAV载体具有全部或部分缺失的野生型Rep基因和Cap基因,但是保留有功能性侧接ITR序列。在特定实施例中,AAV病毒载体为AAV2变体7m8。

[0135] 在一些实施例中,主题多核苷酸盒被衣壳化在AAV衣壳内,所述AAV衣壳可以源自于任何腺相关病毒血清型,包含但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10等,所述腺相关病毒血清型中的任何腺相关病毒血清型都可以充当基因传递载体。例如,AAV衣壳可以是野生型衣壳或天然衣壳。特别关注的野生型AAV衣壳包含AAV2、AAV5和AAV9。然而,与ITR一样,衣壳不需要具有野生型核苷酸序列,而是只要衣壳能够对哺乳动物细胞进行转导,就可以通过VP1、VP2或VP3序列中核苷酸的插入、缺失或取代相对于野生型序列而改变。换句话说,AAV衣壳可以是变体AAV衣壳,所述变体AAV衣壳包括相对于源自的亲本衣壳蛋白或AAV衣壳蛋白的一个或多个氨基酸取代、缺失或插入。特别关注的变体AAV包含美国专利9,193,956中所公开的那些变体AAV,所述美国专利的全部公开内容通过引用并入本文。在一些实施例中,变体AAV包括美国专利9,193,956中所公开的7m8变体衣壳蛋白(其在本文中可以称为AAV2.7m8或7m8.AAV2)。在其它实施例中,AAV包括在美国专利第9,233,131号中作为SEQ ID NO:42而提供的AAV2.5T衣壳蛋白或由其组成。在某些实施例中,AAV包括AAVShH10衣壳蛋白或AAV6衣壳蛋白。美国专利申请公开第20120164106号的图8A-8C示出了AAVShH10衣壳蛋白的氨基酸序列,所述AAVShH10衣壳蛋白的氨基酸序列也在以下中有所描述:Klimczak,R.R.等人,《公共科学图书馆期刊(PLOS One)》4(10):e7467(2009年10月14日)。

[0136] 优选地,rAAV为复制缺陷型的,因为AAV载体不能独立地对其基因组进行进一步复制和包装。例如,当用rAAV病毒粒子对视锥细胞进行转导时,基因在经过转导的视锥细胞中进行表达,然而,由于经过转导的视锥细胞缺乏AAV rep基因和cap基因以及辅助功能基因的事实,因此rAAV不能进行复制。

[0137] 可以使用标准方法来产生使本公开的多核苷酸盒衣壳化的基因递送载体(例如,rAAV病毒粒子)。例如,在rAAV病毒粒子的情况下,根据本发明的AAV表达载体可以引入到生

产细胞中,然后引入AAV辅助构建体,其中辅助构建体包含能够在生产细胞中进行表达的AAV编码区并且所述AAV编码区可对AAV载体中不存在的AAV辅助功能进行补充。然后将辅助病毒和/或另外的载体引入到生产细胞中,其中辅助病毒和/或另外的载体提供能够支持有效的rAAV病毒产生的辅助功能。然后,对生产细胞进行培养以产生rAAV。使用标准方法来执行这些步骤。通过本领域已知的标准技术使用AAV包装细胞和包装技术来制备使本发明的重组AAV载体衣壳化的复制缺陷型AAV病毒粒子。例如在以下中可以发现这些方法的实例:美国专利第5,436,146号;美国专利第5,753,500号、美国专利第6,040,183号、美国专利第6,093,570号和美国专利第6,548,286号,所述美国专利以全文引用的方式明确地并入本文中。Wang等人(US 2002/0168342)描述了用于包装的另外的组合物和方法,其也以全文引用的方式并入本文中。

[0138] 可以制备适合于对哺乳动物细胞进行有效转导的任何浓度的病毒颗粒,以在体外或体内接触哺乳动物细胞。例如,可以以每毫升10^8个或更多个载体基因组(vg/mL)的浓度来调配病毒颗粒,例如每毫升5×10^8个载体基因组;每毫升10^9个载体基因组;每毫升5×10^9个载体基因组、每毫升10^{10}个载体基因组、每毫升5×10^{10}个载体基因组;每毫升10^{11}个载体基因组;每毫升5×10^{11}个载体基因组;每毫升10^{12}个载体基因组;每毫升5×10^{12}个载体基因组;每毫升10^{13}个载体基因组;每毫升1.5×10^{13}个载体基因组;每毫升3×10^{13}个载体基因组;每毫升5×10^{13}个载体基因组;每毫升7.5×10^{13}个载体基因组;每毫升9×10^{13}个载体基因组;每毫升1×10^{14}个载体基因组、每毫升5×10^{14}个或更多个载体基因组,但是通常每毫升不超过1×10^{15}个载体基因组。类似地,可以向哺乳动物施用适合于提供适当的细胞转导以赋予期望的效果或治疗疾病的任何总数量的病毒颗粒。在各个优选实施例中,至少为10^8个;5×10^8个;10^9个;5×10^9个、10^{10}个、5×10^{10}个;10^{11}个;5×10^{11}个;10^{12}个;5×10^{12}个;10^{13}个;1.5×10^{13}个;3×10^{13}个;5×10^{13}个;7.5×10^{13}个;9×10^{13}个、1×10^{14}个或5×10^{14}个或更多个病毒颗粒,但是每只眼睛注射的病毒颗粒通常不超过1×10^{15}个。可以向哺乳动物或灵长类动物的眼睛施用任何合适数量的载体。在一个实施例中,所述方法包括单次施用;在其它实施例中,当主治临床医师认为合适时,可以随时间进行多次施用。

[0139] 可以将主题病毒载体调配成包括任何合适的单位剂量的载体的药物组合物,可以向受试者施用所述药物组合物以在受试者中产生变化或治疗受试者的疾病。在一些实施例中,单位剂量包括但不限于病毒载体的1×10^8个或更多个载体基因组,例如至少约1×10^9个、1×10^{10}个、1×10^{11}个、1×10^{12}个、1×10^{13}个、1×10^{14}个或至少约3×10^{14}个或更多个载体基因组,在某些情况下,至少约1×10^{14}个载体基因组,但是通常不超过4×10^{15}个载体基因组。在一些情况下,单位剂量包括最多约5×10^{15}个载体基因组,例如1×10^{14}个或5×10^{14}个或更少的载体基因组,例如1×10^{13}个、1×10^{12}个、1×10^{11}个、1×10^{10}个或1×10^9个或更少的载体基因组,在某些情况下,1×10^8个或更少的载体基因组,并且通常不少于1×10^8个载体基因组。在一些情况下,单位剂量包括1×10^{10}个到1×10^{11}个载体基因组。在一些情况下,单位剂量包括1×10^{10}个到3×10^{12}个载体基因组。在一些情况下,单位剂量包括1×10^9个到3×10^{13}个载体基因组。在一些情况下,单位剂量包括1×10^8个到3×10^{14}个载体基因组。在一些情况下,单位剂量包括约1×10^{10}个到约5×10^{14}个载体基因组。

[0140] 在一些情况下,可以使用感染复数(MOI)来测量药物组合物的单位剂量。MOI是指载体或病毒基因组与核酸可以递送到的细胞的比率或倍数。在一些情况下,MOI可以为1×

10^6个。在一些情况下,MOI可以为1×10^5-1×10^7个。在一些情况下,MOI可以为1×10^4-1×10^8个。在一些情况下,本公开的重组病毒至少为约1×10^1个、1×10^2个、1×10^3、1×10^4个、1×10^5个、1×10^6个、1×10^7个、1×10^8个、1×10^9个、1×10^{10}个、1×10^{11}个、1×10^{12}个、1×10^{13}个、1×10^{14}个、1×10^{15}个、1×10^{16}个、1×10^{17}和1×10^{18}个MOI。在一些情况下,本公开的重组病毒为1×10^8个到3×10^{14}个MOI。在一些情况下,本公开的重组病毒最多为约1×10^1个、1×10^2个、1×10^3、1×10^4个、1×10^5个、1×10^6个、1×10^7个、1×10^8个、1×10^9个、1×10^{10}个、1×10^{11}个、1×10^{12}个、1×10^{13}个、1×10^{14}个、1×10^{15}个、1×10^{16}个、1×10^{17}和1×10^{18}个MOI。

[0141] 在一些方面,药物组合物的量包括约1×10^8个到约1×10^{15}个重组病毒、约1×10^9个到约1×10^{14}个重组病毒、约1×10^{10}个到约1×10^{13}个重组病毒或约1×10^{11}个到约3×10^{12}个重组病毒。

[0142] 在制备主题rAAV组合物时,可以采用用于产生rAAV病毒粒子的任何宿主细胞,包含但不限于例如哺乳动物细胞(例如,293个细胞)、昆虫细胞(例如,SF9细胞)、微生物和酵母。宿主细胞也可以是包装细胞或生产细胞,在所述包装细胞中,AAV rep基因和cap基因稳定地维持在宿主细胞中,AAV载体基因组稳定地维持并包装在所述生产细胞中。示例性包装和生产细胞源自于SF-9、293、A549或HeLa细胞。使用本领域已知的标准技术来纯化和调配AAV载体。

[0143] 本发明包含药物组合物,所述药物组合物包括本文所描述的多核苷酸盒或基因递送载体以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。例如,一个实施例是包括重组病毒的药物组合物,所述重组病毒包括本公开的多核苷酸和药学上可接受的赋形剂。在具体实施例中,重组病毒为重组腺相关病毒(AAV)。主题多核苷酸盒或基因递送载体可以与可用于制备调配物的药学上可接受的载剂、稀释剂和试剂进行组合,所述调配物通常是安全、无毒且期望的并且包含供灵长类动物使用的可接受的赋形剂。这种赋形剂可以是固体、液体、半固体或气体(在气溶胶组合物的情况下)。这种载剂或稀释剂的实例包含但不限于水、盐水、林格氏(Ringer's)溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。补充性活性化合物也可以并入这些调配物中。用于调配物的溶液或悬浮液可以包含:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌化合物,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;洗涤剂,如防止聚集的吐温(Tween)20;以及用于调节张力的化合物,如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱(如盐酸或氢氧化钠)调节pH。在特定实施例中,药物组合物是无菌的。

[0144] 对于在体内接触视锥细胞的情况,可以将主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体视为适宜向眼睛递送。

[0145] 适合于在本发明中使用的药物组合物进一步包含无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。因此,药物组合物可以呈无菌可注射溶液的形式。对于静脉内施用,适合的载剂包含生理盐水、抑菌水或磷酸酯缓冲盐水(PBS)。在一些情况下,组合物是无菌的并且应该具有达到易于注射的程度的流动性。在某些实施例中,组合物在制造和储存的条件下是稳定的,并且抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载剂可以是例如溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及其适合的混合物。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散体的

情况下维持所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持恰当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现防止微生物的作用。在许多情况下,优选的是,在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可以通过在组合物中包含延缓吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现内部组合物的延长吸收。

[0146] 根据需要,可以通过将所需量的活性化合物与上文所列举的成分中的一种成分或其组合一起掺入适当溶剂中,随后通过过滤灭菌处理来制备无菌溶液。通常,通过将活性化合物掺入无菌媒剂中来制备分散液,所述无菌媒剂含有基础分散介质和来自上文所列举的那些成分的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,所述方法从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何另外所希望成分的粉末。

[0147] 在一个实施例中,所述组合物与将保护基因盒或表达载体免于从体内快速消除的载剂一起制备,如控制释放调配物,包含植入物和微囊化的递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这种调配物的方法对本领域技术人员而言将是显而易见的。所述材料还可以商购获得。也可以将脂质体悬浮液(包含用病毒抗原的单克隆抗体靶向感染细胞的脂质体)用作药学上可接受的载剂。可以根据本领域技术人员已知的方法来制备这些调配物,例如如在美国专利第4,522,811号中所描述的方法。

[0148] 特别有利的是以剂量单位形式调配口服、眼部或肠胃外组合物以便于施用和剂量统一。如本文所使用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗受试者的单一剂量的物理上离散的单位;每个单位均含有经过计算产生与所需药物载剂缔合的所希望的治疗效果的预定量的基因递送载体或多核苷酸盒。本发明的剂量单位形式的规格由基因递送载体、多核苷酸盒的独特特性以及要实现的特定治疗效果来决定。

[0149] 可以将药物组合物与施用说明书一起包含在容器、包装、或分配器(例如,注射器,例如预充式注射器)中。

[0150] “药学上可接受的赋形剂”是指对细胞或待施用于的受试者基本上无毒的材料、物质、稀释剂或载剂。也就是说,在基本上不会引起不希望的生物学效应或者不会以有害的方式与含有药学上可接受的赋形剂的组合物的其它组分中的任何组分相互作用的情况下,可以将药学上可接受的赋形剂掺入药物组合物中并且向细胞或患者施用。

[0151] 可以将主题多核苷酸盒或基因递送载体(例如,重组病毒(病毒粒子))掺入药物组合物中,以向哺乳动物患者施用,具体地灵长类动物以及更具体地是人类。可以以无毒、惰性、药学上可接受的水性载剂调配主题多核苷酸盒或基因递送载体(例如,病毒粒子),所述水性载剂的pH优选地处于3到8的范围内、更优选地处于6到8的范围内、或甚至更优选地处于7到8的范围内。这种无菌组合物将包括含有对治疗性分子进行编码的核酸的载体或病毒粒子,所述治疗性分子溶解于重构时具有可接受的pH值的水性缓冲液中。

[0152] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括与药学上可接受的载剂和/或赋形剂混合的治疗有效量的载体或病毒粒子,所述药学上可接受的载剂和/或赋形剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和任选地一种或多种其它药剂,如氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲剂、防腐剂、蛋白质和无机盐(如氯化钠)。示例性氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基

聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、葡聚糖、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人血清白蛋白、柠檬酸盐、乙酸盐、林格氏和汉克氏(Hank's)溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,此调配物可在4℃下稳定至少六个月。

[0153] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水和普通技术人员已知的其它缓冲液,如由Good等人,(1966)《生物化学(Biochemistry)》5(2):467-477所描述的那些缓冲液。所述缓冲液的pH值可以处于6.5到7.75,优选地7到7.5,并且最优选地7.2到7.4的范围内。药物组合物可以包括腺病毒或腺相关的腺病毒载体递送系统,所述系统含有本公开的多核苷酸盒。

[0154] 方法

[0155] 将本发明的基因表达盒在体内递送到选择的靶细胞并且在转导事件后在细胞中和在细胞外环境中获得治疗有效量的基因产物的能力对治疗许多不同的疾病可能是有益的,所述疾病包含那些依赖于新血管生长的疾病,其中治疗的目标可以是使靶细胞具备分泌治疗有效量的抗血管生成蛋白的能力。虽然不希望受任何理论的束缚,但是即使当基因递送载体仅能成功转导一部分靶细胞时,能够增强表达并且最终增强治疗性蛋白分泌的表达盒也可以有助于为患者提供临床上显著的益处。由经过转导的细胞进行的治疗性蛋白的高水平分泌可以帮助平衡用任何给定剂量或基因治疗轮次实现的感染性或转导效率。

[0156] 因此,在本文统称为"主题组合物"的主题多核苷酸盒和基因递送载体可用于在动物细胞中对转基因进行表达。例如,主题组合物可以用于研究,例如确定基因对细胞活力和/或功能的影响。作为另一个实例,可以在医药中使用主题组合物以例如治疗病症。本公开的方法和组合物可以用于治疗能够通过细胞的基因疗法至少部分解决的任何病状。细胞包含但不限于血液、眼睛、肝脏、肾脏、心脏、肌肉、胃、肠、胰腺和皮肤。

[0157] 因此,本发明提供了用于治疗或预防有需要的受试者的疾病或病症(例如,眼部疾病或病症)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包括对治疗性基因产物进行编码的本发明的多核苷酸盒的病毒载体或病毒粒子。在优选实施例中,治疗性基因产物为分泌多肽或在细胞中合成后从细胞中分泌或输出的蛋白质,并且多核苷酸盒按5'到3'顺序包括:(a)第一增强子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:1);(b)启动子区,其包括CMV序列(SEQ ID NO:4);(c)5'UTR区,其按5'到3'顺序包括TPL序列和eMLP序列(分别为SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12);(d)对肽或多肽进行编码的编码序列;(e)第二增强子区,其包括完整的EES序列(SEQ ID NO:13);以及(f)HGH多腺苷酸化位点(SEQ ID NO:14)。

[0158] 在相关实施例中,一些方法提供了在体外或体内细胞中对基因进行表达,所述方法包括使细胞与本公开的组合物接触。在一些实施例中,接触发生在体外。在一些实施例中,接触发生在体内,即,将主题组合物施用给受试者。可以通过静脉内注射或口服输注来胃肠外施用组合物。在某些实施例中,通过注射将所述组合物施用于眼睛,例如施用于视网膜、下视网膜或玻璃体。在某些实施例中,通过视网膜注射、下视网膜注射或玻璃体内注射来施用所述组合物。在某些实施例中,将所述组合物局部或直接施用于所关注的组织或器官,例如通过注射到肝脏中。

[0159] 受试者可以是哺乳动物,包含例如有特定疾病或病症治疗需要的人类受试者。

[0160] 对于哺乳动物细胞在体外与主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体接触的情况,细胞可以来自任何哺乳动物物种,例如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、沙鼠、松鼠)、兔、猫、犬、山羊、绵羊、猪、马、牛、灵长类动物、人类。细胞可以来自已建立的细胞系或者可以是原代细胞,其中"原代细胞"、"原代细胞系"和"原代培养物"在本文中可互换使用来指代源自于受试者的细胞和细胞培养物并且允许在体外生长培养物的有限数量的传代,即分裂。例如,原代培养物是可能已经传代0次、1次、2次、4次、5次、10次或15次但传代次数不足以经历危机阶段的培养物。通常,在体外维持本发明的原代细胞系少于10次传代。

[0161] 如果细胞为原代细胞,则可以通过任何方便的方法从哺乳动物中采集细胞,例如整个外植体、活组织检查等。可以用合适的溶液来分散或悬浮所采集的细胞。这种溶液通常将是平衡的盐溶液,例如生理盐水、PBS、汉克氏平衡盐溶液等,所述平衡的盐溶液方便地补充有以低浓度(通常为5-25mM)与可接受的缓冲液结合的胎牛血清或其它天然存在的因子。方便的缓冲液包含HEPES、磷酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液等。可以立即使用细胞或者可以将其储存、冷冻长时间段、解冻并且能够重复使用。在这种情况下,通常将细胞冷冻在10%的DMSO、50%的血清、40%的缓冲培养基或如本领域常用的一些其它这种溶液中,以在这种冷冻温度下保存细胞并且以如本领域通常已知的用于解冻冷冻培养细胞的方式来解冻。

[0162] 为了促进对转基因的表达,将主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体与细胞接触约30分钟到24小时或更久,例如1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、12小时、16小时、18小时、20小时、24小时等。可以一次或多次(例如,一次、两次、三次或多于三次)地向受试者细胞提供主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体,并且允许细胞在每次接触事件后(例如,16-24小时)与一种或多种药剂一起培育一定时间,在这之后用新鲜的培养基替换所述培养基并且对细胞进行进一步培养。接触细胞可以发生在任何培养基中以及在促进细胞存活的任何培养条件下。例如,细胞可以悬浮在任何适当的方便的营养培养基中,如伊思考夫氏(Iscove's)改良的DMEM或RPMI 1640,所述营养培养基补充有胎牛血清或热灭活的山羊血清(约5-10%)、L-谷氨酰胺、硫醇,特别是2-巯基乙醇和抗生素,例如青霉素和链霉素。培养物可以含有细胞响应的生长因子。如本文所限定的,生长因子是能够通过对跨膜受体的特异性作用而促进细胞在培养物或在完整组织中存活、生长和/或分化的分子。生长因子包含多肽因子和非多肽因子。

[0163] 通常,提供了有效量的主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体以在细胞中产生转基因表达。如本文其它地方所讨论的,可以根据经验容易地确定有效量,例如通过检测转基因产物的存在或水平、通过检测对细胞活力或功能的影响等。通常,相对于由参照或对照多核苷酸盒进行的表达,表达将增强2倍或更多倍,例如3倍、4倍或5倍或更多倍,在一些情况下,10倍、20倍或50倍或更多倍,例如100倍。出于比较目的的参照盒的一个实例是本文所描述的CMV参照对照盒。在具体实施例中,转基因对分泌蛋白进行编码,并且多核苷酸盒以一定水平在哺乳动物细胞中表达分泌蛋白,其表达水平是由CMV参照对照盒在哺乳动物细胞中进行的分泌蛋白的表达水平的至少2倍、5倍、10倍、5倍到10倍、5倍到15倍或10倍到15倍。根据一些实施例,当所述转基因是编码非分泌性蛋白的转基因时,本发明的多核苷酸盒以一定水平在哺乳动物细胞中表达非分泌性蛋白,其表达水平与由CMV参照

对照盒在哺乳动物细胞中进行的非分泌性蛋白的表达水平大致相同、处于其的10-20％内、低约1.5倍或低约2倍。可以通过免疫测定或抗原捕获测定来测量每个盒的分泌蛋白的表达水平,并且可以将所述表达水平表示为细胞外环境中每体积上清液(例如,细胞培养基或上清液)的蛋白质的量或浓度。

[0164] 用于测量生物或细胞样品中蛋白质的存在和数量(以及因此表达水平)的免疫测定法是本领域已知的(例如,Hage,D.S.(1999)“免疫测定(Immunoassays)”,《分析化学(Analytical Chemistry)》71(12):294-304;《免疫测定手册(The Immunoassay Handbook)》,第4版:David Wild(编辑)的配体结合、ELISA和相关技术的理论与应用,爱思唯尔科学出版社(Elsevier Science)(2013))。通常,免疫测定基于靶蛋白与特异性结合蛋白质的抗体或抗体片段之间的反应。可以在液相或固相系统中进行免疫测定,但是为了便于检测,固相可以是优选的。适合的免疫测定包含但不限于夹心和竞争测定、蛋白质印迹、ELISA(酶连接免疫吸附测定)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)等。生物样品可以是细胞培养基或上清液(在细胞未裂解的情况下取自培养物的样品)、细胞裂解物、全细胞、血液、血清、血浆或其它体液或组织。在一些实施例中,如当转基因是可选标记物时,通过将经过修饰的细胞与剩余群体分离,可以使细胞群富集包括主题多核苷酸盒的那些细胞群。可以通过适合于所用可选标记物的任何方便的分离技术进行分离。例如,如果转基因为荧光标记物,则可以通过荧光活化细胞分选来使细胞分离,而如果转基因为细胞表面标记物,则可以通过亲和分离技术将细胞与异质群体分离,例如磁分离、亲和层析、用附着到固体基质上的亲和试剂进行“淘选”或其它方便的技术。提供精确分离的技术包含荧光活化细胞分选仪,所述荧光活化细胞分选仪可以具有不同程度的复杂性,如多色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道等。可以通过采用与死细胞缔合的染料(例如,碘化丙锭)针对死细胞来选择细胞。可以采用对细胞活力不过度有害的任何技术。以此方式实现包括主题多核苷酸的细胞高度富集的细胞组合物。“高度富集”是指经过遗传修饰的细胞将为细胞组合物的70％或更多、75％或更多、80％或更多、85％或更多、90％或更多,例如细胞组合物的约95％或更多或98％或更多。

[0165] 对于细胞在体内与主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体接触的情况,受试者可以是任何哺乳动物,例如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、沙鼠)、兔、猫、犬、山羊、绵羊、猪、马、牛、人类或非人灵长类动物。

[0166] 本发明的方法和组合物可用于治疗能够通过细胞的基因疗法至少部分解决的任何病状。细胞包含但不限于血液、眼睛、肝脏、肾脏、心脏、肌肉、胃、肠、胰腺和皮肤。一个实施例是一种用于治疗有治疗需要的受试者的医学病状的方法,所述方法包括向受试者施用含有如本文所公开的多核苷酸盒的基因递送载体,其中所述盒对有效减轻医学病状的一个或多个体征或症状的多肽进行编码。在一些实施例中,所述医学病状为眼部疾病,所述基因递送载体为腺相关病毒,并且所述多肽为由所述载体转导的细胞分泌的多肽。在一个实施例中,分泌性蛋白会抑制VEGF信号传导。例如,分泌性蛋白可以是VEGF结合蛋白。在一些实施例中,眼部疾病是脉络膜新血管形成或黄斑变性。黄斑变性的具体形式可以包含急性黄斑变性、非渗出性年龄相关黄斑变性和渗出性年龄相关黄斑变性。可以通过任何合适的方式进行施用,包含例如眼部递送、玻璃体内注射、眼内注射、视网膜注射、下视网膜注射、肠胃外施用、静脉内注射或输注以及肝脏中注射。

[0167] 在一些实施例中,向有治疗需要的受试者的眼睛施用基因递送载体。在一些实施例中,通过眼内注射、通过玻璃体内注射或通过任何其它方便的施用模式或途径向受试者施用基因递送载体。在一些实施例中,受试者是患有黄斑变性或眼部新血管形成或可能有发生其的风险的人类受试者。

[0168] 在一些实施例中,主题方法产生治疗益处,例如预防病症发展、停止病症进展、逆转病症进展等。在一些实施例中,主题方法包括检测治疗益处是否实现的步骤。普通技术人员将理解,对治疗功效的这种测量将适用于被修饰的特定疾病,并且将认识到用于测量治疗功效的适当的检测方法。

[0169] 期望使用主题转基因获得的转基因表达是稳健的。因此,在一些情况下,通过测量治疗功效等,可以在施用后两个月或更短时间(例如,施用后4周、3周或2周或更短时间(例如,在施用主题组合物后1周))观察到转基因表达(例如,如通过测量基因产物的水平所检测到的)。期望转基因表达也会随着时间的推移而持续存在。因此,在一些情况下,通过测量治疗功效等,可以在施用主题组合物后2个月或更长时间(例如,4个月、6个月、8个月或10个月或更长时间,在一些情况下,1年或更长时间,例如,2年、3年、4年或5年,在某些情况下超过5年)观察到转基因表达(例如,如通过测量基因产物的水平所检测到的)。

[0170] 在某些实施例中,所述方法包括检测细胞中转基因表达的步骤,其中表达相对于由不包括本公开的一个或多个经过改进的元件的多核苷酸盒(即参照对照)进行的表达有所增强。通常,如通过例如早期检测、更高水平的基因产物、对细胞更强的功能性影响等证实的,相对于由参照(即,对照多核苷酸盒)进行的表达,表达将增强2倍或更多倍,例如3倍、4倍或5倍或更多倍,在一些情况下,10倍、20倍或50倍或更多倍(例如,100倍)。一方面,转基因对分泌多肽(如sFLT1)进行编码。

[0171] 通常,如果主题组合物为病毒(例如,包括本公开的多核苷酸盒的rAAV),则用于在受试者中实现变化或产生治疗效果的有效量将为约1×10^{8}个载体基因组或更多个,在一些情况下,1×10^{9}个、1×10^{10}个、1×10^{11}个、1×10^{12}或1×10^{13}个载体基因组或更多个,在某些情况下,1×10^{14}个载体基因组或更多个,并且通常不多于1×10^{16}个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为至多约1×10^{16}个载体基因组,例如1×10^{15}个载体基因组或更少,例如1×10^{13}个、1×10^{12}个、1×10^{11}个、1×10^{10}或1×10^{9}个载体基因组或更少,在某些情况下,1×10^{8}个载体基因组,并且通常不少于1×10^{8}个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为1×10^{10}个到1×10^{11}个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为1×10^{10}个到3×10^{12}个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为1×10^{9}个到3×10^{13}个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为1×10^{8}个到3×10^{14}个载体基因组。

[0172] 在一些情况下,可以使用感染复数(MOI)来测量待施用的药物组合物的量。在一些情况下,MOI可以指载体颗粒或病毒基因组与多核苷酸盒可以递送到的细胞的比率或倍数。在一些情况下,MOI可以为1×10^{6}个。在一些情况下,MOI可以为1×10^{5}个到1×10^{7}个。在一些情况下,MOI可以为1×10^{4}个到1×10^{8}个。在一些情况下,本公开的重组病毒为约1×10^{1}个、1×10^{2}个、1×10^{3}个、1×10^{4}个、1×10^{5}个、1×10^{6}个或1×10^{7}个MOI。

[0173] 在一些方面,药物组合物包括约1×10^{8}个到约1×10^{15}个重组病毒颗粒、约1×10^{9}个到约1×10^{14}个重组病毒颗粒、约1×10^{10}个到约1×10^{13}个重组病毒颗粒或约1×10^{11}个到

约3×10^{12}个重组病毒颗粒。

[0174] 单独剂量通常不小于对受试者产生可测量效果所需的量,并且可以基于主题组合物或其副产物的吸收、分布、代谢和排泄(“ADME”)的药代动力学和药理学来确定并且因此基于受试者内的组合物的处置来确定。这包含考虑施用途径和剂量。根据临床前测定、根据安全性和递增以及剂量范围试验、个体临床医师-患者关系以及体外和体内测定凭经验可以容易地确定有效剂量和/或剂量方案。

[0175] 本说明书中提及的所有以上美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、国外专利、国外专利申请以及非专利公开以全文引用的方式并入本文中。

[0176] 根据前文应当理解,尽管出于说明的目的已经在此描述了本发明的具体实施例,但是可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,除所附权利要求之外,本发明不受限制。

[0177] 实例

[0178] 提出以下实例以向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开内容和说明,并且以下实例不旨在限制诸位发明人视为其发明的范围,以下实例也不旨在表示以下实验是进行的所有实验或仅有的实验。虽然已经努力确保关于所使用数字(例如,量、温度等)的准确性,但是仍应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是重量平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是在大气压下或接近大气压。

[0179] 可以在这种标准教科书中找到分子生物化学和细胞生物化学方面的一般方法,如《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第3版(Sambrook等人,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)2001);《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)》,第4版(Ausubel等人编辑,约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons)1999));《蛋白质方法(Protein Methods)》(Bollag等人,约翰威利父子出版公司1996);《基因疗法的非病毒载体(Nonviral Vectors for Gene Therapy)》(Wagner等人编辑,学术出版社(Academic Press)1999);《病毒载体(Viral Vector)》(Kaplift和Loewy编辑,学术出版社1995);《免疫学方法手册(Immunology Methods Manual)》(I.Lefkovits编辑,学术出版社1997);以及《细胞和组织培养:生物技术实验室程序(Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology)》(Doyle和Griffiths,约翰威利父子出版公司1998),所述标准教科书的公开内容通过引用并入本文。本公开中提及的用于遗传操纵的试剂、克隆载体和试剂盒可从商业供应商处购得,如BioRad公司、Stratagene公司、Invitrogen公司、西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)和ClonTech公司。

[0180] 实例1

[0181] 多核苷酸表达盒的构建

[0182] 任何基因治疗方法开发中的重要考虑因素是用于递送基因的媒剂和一旦在细胞内就用于驱动转基因产生的表达盒。所述盒优选地是以足以为患者提供快速且持久的治疗益处的水平促进转基因的稳健表达的盒。为此,使用标准的重组DNA克隆技术产生了一系列含有调节元件和蛋白编码序列的各种组合和置换的多核苷酸表达盒(图1)。

[0183] 实例2

[0184] 重组质粒的构建

[0185] 使用常规DNA重组技术和克隆技术在大肠杆菌中构建和克隆包括候选多核苷酸盒中的每个候选多核苷酸盒和对阿柏西普进行编码的编码序列的重组质粒。如盒11的载体图中所示出的(图11),每个盒定位在腺相关病毒血清型2(AAV2)的反向末端重复序列(ITR)之间,以随后将盒转移到AAV基因组并制备重组AAV病毒粒子。

[0186] 如图11中所示出的,盒11按5'到3'顺序包含CMV增强子、CMV启动子、包括来自TPL和eMLP的序列的5'UTR、蛋白编码序列、完整的表达增强子序列(EES)和人生长激素多腺苷酸化信号序列(HGH polyA)。以类似的方式,盒12按5'到3'顺序包含CMV增强子、CMV启动子、TPL和eMLP 5'UTR序列、蛋白编码序列、表达增强子序列的410-564部分(410-564EES)、乙型肝炎病毒(HPRE)的顺式作用转录后调节元件和牛生长激素多腺苷酸化信号序列(BGH polyA)。如在这些研究中所使用的,表1、2、3、4和5中分别示出了盒10、11、12和14以及CMV参照对照盒的多核苷酸序列。从表格顶部开始并且持续到表格底部,ITR、调节元件和编码区被列出为其按5'到3顺序出现在质粒中。还构建了CMV参照盒(表5),并且在与本公开的其它所选盒的并排比较中对所述CMV参照盒进行测试。

[0187] 实例3

[0188] 体外经过转染的哺乳动物细胞中的蛋白质表达

[0189] 为了对每个盒的表达特性进行体外评估,使用FuGENE®6转染试剂(普洛麦格公司(Promega))将每个重组构建体转染到哺乳动物细胞中。在第一系列的实验中(图2),所述盒在转译时对从细胞分泌的蛋白质进行编码。转染后,将细胞培育48小时。然后对来自每种培养物的细胞培养物上清液进行取样并且通过免疫测定法对其进行测定以通过每种经过转染的细胞培养物评估分泌性蛋白的水平。图2示出了相对于图1中所描述的"基础质粒"盒的表达水平的盒C1-C18的表达水平。如图2中所示出的,对于用盒11和12转染的那些细胞,观察到了HeLa细胞的最高平均表达。

[0190] 实例4

[0191] 体外经过转导的哺乳动物细胞中的蛋白质表达

[0192] 基于图2中所示出的结果,选择五个盒(C7、C11、C12、C13和C14)进行进一步研究。进行实验以当通过重组腺相关病毒向体外哺乳动物细胞递送时比较由每个盒进行的分泌性蛋白的表达。将图2中示出的用于HeLa细胞研究的C7、C11、C12、C13和C14盒各自包装在AAV7m8衣壳内(Dalkara等人,《科学转化医学(Sci.Transl.Med.)》,2013,第5卷,第189期,189ra76)。在3×10^5个MOI下用每种重组AAV7m8载体转导HEK293细胞的单独培养物,并且然后培育所述单独培养物持续3天。培育后,从每种培养物中收集上清液,并且使用免疫测定法进行测定以测量在3天培育过程中每种培养物在上清液中的分泌性蛋白的数量。如在经过转染的HeLa细胞中(图2),对于用盒11和12转导的那些细胞,观察到了HEK293细胞中的最高表达(图3)。

[0193] 实例5

[0194] 经过转导的猪视网膜外植体培养物中的蛋白质表达

[0195] 在猪视网膜外植体培养物系统中进一步测试了图3所示出的用于研究的重组AAV2.7m8载体。猪视网膜具有与人类相似的解剖学和生理学特征,并且因此可以在临床前测试中充当合适的替代物。全层视网膜的外植体培养物保留了神经视网膜细胞间复杂的细胞内过程和通信,并且是AAV载体变体的靶组织验证中的有用模型。

[0196] 猪视网膜外植体的转导

[0197] 7m8.AAV2载体是变体AAV2载体,其能够比野生型AAV2更好地转导光受体(Dalkara等人,《科学转化医学》,“用于从玻璃体进行治疗性外层视网膜基因递送的新腺相关病毒的体内导向进化(In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous)”,2013,第5卷,第189期,189ra76)。在2×10^4个MOI下用7m8载体转导具有全层视网膜的猪视网膜外植体。在转导后一周和两周收集上清液,并且通过免疫测定法测量上清液中存在的分泌性蛋白的量。一式两份地进行实验(外植体1和2),并且图4示出了如通过培养物上清液中的蛋白质的量所测量的示出从每个经过转导的外植体表达和分泌的蛋白质的水平的结果,同时还示出了未经转导的“媒剂”对照外植体的背景水平。如图4中所示出的,此组盒的蛋白表达水平的趋势与观察到的体外经过转导的HEK293细胞的趋势相关(图3),其中盒11、12和14提供了三种最高表达水平并且盒7和13提供了最低表达水平。

[0198] 实例6

[0199] 体外经过转染的哺乳动物细胞中的SFLT-1的表达

[0200] 所关注的是研究所述盒关于其它蛋白质和其它哺乳动物细胞类型的表达特性。出于此目的,将两个其它蛋白质(sFLT-1和绿色荧光蛋白(GFP))的编码序列分别克隆到多核苷酸盒C10、C11和C12中。为了进行比较,还将编码sFLT1的序列分别克隆到基础质粒盒(图1)和CMV对照盒(“CMV-sFLT1”)中。如表5中所描述的,CMV-sFLT1对照构建体按5’到3’顺序包括CMV增强子序列(SEQ ID NO:2)、CMV启动子(SEQ ID NO:21)、嵌合内含子(SEQ ID NO:22)、5’UTR(SEQ ID NO:23)、对sFLT-1进行编码的编码序列(SEQ ID NO:24)、3’UTR(SEQ ID NO:25)和SV40polyA序列(SEQ ID NO:26)。除CMV-sFLT1对照构建体之外,对sFLT-1的编码序列(本文也称为sFLT1)进行密码子优化(CO),以在灵长类动物细胞中进行表达。

[0201] 将sFLT1编码载体转染到三个不同的细胞系中:视网膜色素上皮细胞系(ARPE19细胞)、HEK293细胞和HeLa细胞。使用FuGENE®6转染试剂进行转染。转染步骤后,将细胞培育48小时,并且使用来自R&D Systems公司的sFLT1ELISA试剂盒来测量细胞培养物上清液中存在的sFLT1蛋白的量。将在盒7、11或13的控制下对GFP进行编码的质粒转染到HeLa细胞中并且将其与在CMV启动子(如上所描述的,CMV-sFLT1)的控制下表达GFP的质粒进行比较。大约48小时后,细胞被胰蛋白酶化,并且通过流式细胞术(BD FACSCalibur™)评估每种培养物中的GFP阳性细胞的百分比。结果示出于图5-8中。通常,与其它测试的盒中的任何盒相比,在用盒11和12转染的细胞中观察到了sFLT1的最高表达(图5-7)。更具体地,由盒11在ARPE19细胞中进行的sFLT1表达($\bar{x}$ = 118,721 pg/mL)是由CMV-sFLT1对照盒在ARPE19细胞中进行的sFLT1表达($\bar{x}$ = 54268.53 pg/mL)的约2.2倍(或约2倍)(图5)。由盒11在HEK293细胞中进行的sFLT1表达($\bar{x}$ = 148985.40 pg/mL)是由CMV-sFLT1对照盒在HEK293细胞中进行的sFLT1表达($\bar{x}$ = 16525.9 pg/mL)的约9倍(图6)。由盒11在经过转染的HeLa细胞中进行的sFLT1表达($\bar{x}$ = 204957.57 pg/mL)是由CMV-sFLT1对照盒在HeLa细胞培养物中进行的sFLT1表达($\bar{x}$ = 22363.03 pg/mL)的约9倍(图7)。然而,令人惊讶的是,尽管由盒11表达的sFLT1的水平始终高于由其它测试的盒中的任何盒表达的sFLT1的水平并且显著高于由CMV-sFLT1对照盒在所测试的每个细胞系中表达的sFLT1的水平(图5-7),但是当编码序列

变为编码GFP的序列时,与CMV对照盒相比,盒11提供了每个细胞的类似水平的蛋白质。如图8中所示出的,当编码序列从编码sFLT1(分泌性蛋白)的序列变为编码GFP(非分泌性胞质蛋白)的序列时,先前在每个盒对sFLT1进行编码时观察到的由盒11和CMV-sFLT1在哺乳动物细胞中表达的蛋白质的量的倍数差异显著减小。基于这些意料之外的结果,与其它盒相比,据信盒11特别适合于对从细胞分泌的多肽进行表达。

[0202] 实例7

[0203] 经过转导的哺乳动物细胞中的sFLT-1表达

[0204] 在另外的研究中,将含有对人FLT-1进行编码的密码子优化的编码序列的C10和C11盒和对照CMV-sFLT-1盒包装在7m8衣壳中,以在各个盒构建体的控制下形成编码sFLT-1的重组7m8.AAV2病毒粒子。将CMV-sFLT1对照构建体也包装在野生型AAV2衣壳(AAV2-CMV-sFLT1)中。在1×105个MOI下用每个腺相关病毒构建体转导HEK293细胞。转导后三天,从每种培养物中收集上清液,并且使用sFLT-1ELISA试剂盒测定每种上清液样品中sFLT-1的浓度。如图9中所示出的,在用盒11(C11)转导的HEK293细胞中观察到最高表达。由盒11在经过转导的HEK293细胞中进行的sFLT-1表达是由对照CMV-sFLT1盒进行的sFLT-1表达的大约50倍(与718pg/mL相比,33661pg/mL)。图9右侧所示出的数据示出,必须对来自经过C11转导的细胞的上清液进行进一步稀释以使样品处于测定标准曲线的范围内。

[0205] 实例8

[0206] 经过转导的猪视网膜外植体中的sFLT-1表达

[0207] 为了比较sFLT-1视网膜组织的表达,用图9中所示出的重组AAV载体中的每个重组AAV载体对猪视网膜外植体进行转导。一式三份地进行实验并且在4×10^4个MOI下对每个外植体进行转导。转导后,每3天更换一次培养基。两周后,从每种外植体培养物中收集时间为3天的培养基,并且使用sFLT-1ELISA试剂盒评估培养基中来自每种培养物的sFLT-1的量。另外,对视网膜外植体进行裂解,并且通过ELISA来测定组织裂解物,以在细胞内对sFLT-1进行表达。结果示于图10中。如图10中所示出的,来自在盒11(7m8-C11-CO.sFLT)的控制下用编码sFLT-1的AAV2.7m8转导的外植体的上清液中的sFLT-1的量平均是在CMV盒(7m8-CMV-sFLT1)的控制下用编码sFLT-1的AAV2.7m8转导的外植体的上清液中的sFLT-1的量的大约60倍。来自各种外植体培养物的上清液中的sFLT-1的量的相对差异与在细胞内发现的sFLT-1蛋白的量的相对差异相关(图10;组织裂解物),这表明盒11促进了哺乳动物细胞中sFLT-1的更高表达,并且如图9和10中所示出的,与在用7m8-CMV-sFLT1对照盒和其它测试的编码sFLT-1的盒转导的细胞中和周围(即,细胞的细胞外环境中)观察到的sFLT-1的水平相比,由此促进细胞外培养基中经过转导的细胞外的更高水平的蛋白质的分泌。

[0208] 实例9

[0209] 经过转导的沙鼠眼睛中的阿柏西普表达

[0210] 在另外的研究中,在沙鼠体内对由沙盒C7、C11、C12、C13、C14驱动的阿柏西普表达进行比较。如实例4中所描述的,对AAV载体进行组装。另外,对含有表达密码子优化的阿柏西普的MNTC表达盒的AAV7m8衣壳进行组装。8只动物组成的组以2×10^{10}vg/眼的剂量接受双侧玻璃体内(IVT)注射以下中的任一媒剂:AAV.7m8-C7-Co-阿柏西普、AAV.7m8-C11-Co-阿柏西普、AAV.7m8-C12-Co-阿柏西普、AAV.7m8-C13-Co-阿柏西普或AAV.7m8-C14-Co-阿柏西普。在注射后8周和16周处死四只动物,解剖其(i)视网膜、(ii)玻璃体、(iii)视网膜/脉络

膜和(iv)虹膜/睫状体,并且对每只眼睛进行阿柏西普表达分析(每组每个时间点总共八只眼睛)。

[0211] 使用经过修饰的夹心型ELISA测量组织样品中游离的阿柏西普表达。具体地,用重组人VEGF蛋白来包被微量滴定板。在每个孔中培育蛋白质样品,随后对每个孔进行洗涤。洗涤后,向每个孔中加入与抗人IgG单克隆抗体缀合的辣根过氧化物酶(HRP)。将抗体结合到阿柏西普蛋白的Fc结构域,阿柏西普蛋白本身由结合到孔表面的VEGF捕获。培育后,对孔进行洗涤,并且通过加入鲁米诺(Luminol)来确定结合的酶活性,然后测量466nm处的光发射。

[0212] 从在8和16两个温和时间点处检查的组织样品中的每个组织样品中的每个构建体中对表达进行检测,并且所述表达在两个时间点处的每个构建体的玻璃体中达到最高。

[0213]

表 1：盒 10 的多核苷酸序列

元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
第一增强子	CMV	ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATG ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGC CCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCA	1
启动子	EF1α	GCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAG AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGT GATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGA GGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTA GTCGCCGTGAACGTTC	3
内含子	EF1α	GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTG GCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTT GAATTACTTCCACCTGGCTCCAGTACGTGATT CTTGATCCCGAGCTGGAGCCAGGGGCGGGCC TTGCGCTTTAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTT GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCT GTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTT AAAATTTTTGATGACGTGCTGCGACGCTTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCA GGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGC CCGCGGCCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCA GCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGA GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC GGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCG TGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTG CTCCAGGGGGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACA CAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCG TCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCG CCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTGGAGCTT TTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGG GGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAG TGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGC ACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGGCCTTT TTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTT CAG	5
5'UTR	UTR2	ACACCCAAGCTGTCTAGAGCCGCCACC	6

[0214]

表 1：盒 10 的多核苷酸序列			
元件	**来源**	**序列（5'到 3'）**	**SEQ ID NO:**
编码序列	所关注的基因	转基因	
第二增强子	511-810 EES	GGTTCCCTTTTATTTTTTACATATAAATATATTT CCCTGTTTTTCTAAAAAAGAAAAAGATCATCA TTTTCCCATTGTAAAATGCCATATTTTTTTCATA GGTCACTTACATATATCAATGGGTCTGTTTCTG AGCTCTACTCTATTTTATCAGCCTCACTGTCTA TCCCCACACATCTCATGCTTTGCTCTAAATCTT GATATTTAGTGGAACATTCTTTCCCATTTTGTT CTACAAGAATATTTTTGTTATTGTCTTTGGGCT TTCTATATACATTTTGAAATGAGGTTGACAAGT TA	7
RNA 输出	WPRE	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTT ACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTC TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAA CGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGC AACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCT GTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGC CTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGG CTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTC GGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCG CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACG TCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCC AGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGG CTCTGCGGCCTCTTCCGCCTCTTCGCCTTCGC CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGC CTCCCCGC	8
PolyA	BGH	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCG TGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGC ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCT GGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAATACAATAGCAGGCATGCTG GGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTG CTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGG	9

[0215]

表 2：盒 11 的多核苷酸序列			
元件	**来源**	**序列（5'到 3'）**	**SEQ ID NO:**
5'ITR	AAV	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGG GCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG	10

[0216]

表 2：盒 11 的多核苷酸序列			
元件	**来源**	**序列（5'到 3'）**	**SEQ ID NO:**
		AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC	
第一增强子	CMV	ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA	1
启动子	CMV	TGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG	4
5'UTR	TPL	CTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCAGCGGGTGGCGGTCGGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGTCTTGAGACGGCGGATGGTCGA	11
5'UTR	eMLP	CCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCG	12
编码序列	所关注的基因	转基因	
第二增强子	完整的 EES	CTGTTCTCATCACATCATATCAAGGTTATATACCATCAATATTGCCACAGATGTTACTTAGCCTTTTAATATTTCTCTAATTTAGTGTATATGCAATGATAGTTCTCTGATTTCTGAGATTGAGTTTCTCATGTGTAATGATTATTTAGAGTTTCTCTTTCATCTGTTCAAATTTTTGTCTAGTTTTATTTTTTACTGATTTGTAAGACTTCTTTTTATAATCTGCATATTACAA	13

[0217]

表 2：盒 11 的多核苷酸序列			
元件	**来源**	**序列（5'到 3'）**	**SEQ ID NO:**
		TTCTCTTTACTGGGGTGTTGCAAATATTTTCTG TCATTCTATGGCCTGACTTTTCTTAATGGTTTT TTAATTTTAAAAATAAGTCTTAATATTCATGCA ATCTAATTAACAATCTTTTCTTTGTGGTTAGGA CTTTGAGTCATAAGAAATTTTTCTCTACACTGA AGTCATGATGGCATGCTTCTATATTATTTTCTAA AAGATTTAAAGTTTTGCCTTCTCCATTTAGACT TATAATTCACTGGAATTTTTTTGTGTGTATGGTA TGACATATGGGTTCCCTTTTATTTTTTACATATA AATATATTTCCCTGTTTTTCTAAAAAAGAAAA AGATCATCATTTTCCCATTGTAAAATGCCATAT TTTTTTCATAGGTCACTTACATATATCAATGGG TCTGTTTCTGAGCTCTACTCTATTTTATCAGCC TCACTGTCTATCCCCACACATCTCATGCTTTGC TCTAAATCTTGATATTTAGTGGAACATTCTTTC CCATTTTGTTCTACAAGAATATTTTTGTTATTGT CTTTGGGCTTTCTATATACATTTTGAAATGAGG TTGACAAGTTA	
PolyA 序列	HGH	CTGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCC AGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTC CAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTA AGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTC TATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATG GAGCAAGGGGCCCAAGTTGGGAAGAAACCT GTAGGGCCTGC	14
3'ITR	AAV	GTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGA TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGC	15

[0218]

表 3：盒 12 的多核苷酸序列			
元件	**来源**	**序列（5'到 3'）**	**SEQ ID NO:**
第一增强子	CMV	ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATG ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGC CCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCA	1
启动子	CMV	TGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGG	4

[0219]

表 3：盒 12 的多核苷酸序列			
元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
		CGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCC AAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA AAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCA AATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC TATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG	
5'UTR	TPL	CTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGG CCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAAC TCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCTTGGATCGG AAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCC ACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACC GGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTA ACCAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCAC CGTGGCGGGCGGCAGCGGGTGGCGGTCGGGG TTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGATGTA ATTAAAGTAGGCGGTCTTGAGACGGCGGATG GTCGA	11
5'UTR	eMLP	CCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAA GCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGT TTCCAAAAACGAGGAGGATTTGATATTCACCT GGCCCG	12
编码序列	所关注的基因	转基因	
第二增强子	410-564 EES	GGCATGCTTCTATATTATTTTCTAAAAGATTTA AAGTTTTGCCTTCTCCATTTAGACTTATAATTC ACTGGAATTTTTTTGTGTGTATGGTATGACATA TGGGTTCCCTTTTATTTTTTACATATAAATATAT TTCCCTGTTTTTCTAAAAAAGA	16
RNA 输出	HPRE	ATAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTTTGTCAA CGAATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGCTGCCCC TTTTACGCAATGTGGATATCCTGCTTTAATGCC TTTATATGCATGTATACAAGCAAAACAGGCTTT TACTTTCTCGCCAACTTACAAGGCCTTTCTCA GTAAACAGTATATGACCCTTTACCCCGTTGCTC GGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTGTTTGCT GACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCAT AGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTGTGT CTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTA GCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGC AAACCTCATCGGGACCGACAATTCTGTCGTAC TCTCCCGCAAGTATACATCGTTTCCATGGCTGC TAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGG ACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAA TCCCGCGGACGACCCCTCCCGGGGCCGCTTG GGGCTCTACCGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTA CCGTCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACG CGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG	17

[0220]

表 3：盒 12 的多核苷酸序列			
元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
		GACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGT CGCATGGAGGCCACCGTGAACGCCCACCGGA ACCTGCCCAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTT GGACTTTCAGCAATGTCATC	
PolyA	BGH	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCG TGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGC ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCT GGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAATACAATAGCAGGCATGCTG GGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTG CTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGG	9

[0221]

表 4：盒 14 的多核苷酸序列			
元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
第一增强子	CMV	ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATG ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGC CCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCA	1
启动子	CMV	TGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGG CGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCC AAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA AAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCA AATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC TATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG	4
内含子	CMVc	GTAAGTCTGTTGACATGTATGTGATGTATACTA ACCTGCATGGGACGTGGATTTACTTGTGTATG TCAGATAGAGTAAAGATTAACTCTTGCATGTG AGCGGGGCATCGAGATAGCGATAAATGAGTCA GGAGGACGGATACTTATATGTGTTGTTATCCTC CTCTACAG	18
5'UTR	UTR1	AGCTTGCTTGTTCTTTTTGCAGAAGCTCAGAA TAAACGCTCAACTTTGGC	19
编码序列	所关注的基因	转基因	
第二增强子	完整的 EES	CTGTTCTCATCACATCATATCAAGGTTATATAC CATCAATATTGCCACAGATGTTACTTAGCCTTT TAATATTTCTCTAATTTAGTGTATATGCAATGAT	13

表 4：盒 14 的多核苷酸序列

元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
		AGTTCTCTGATTTCTGAGATTGAGTTTCTCATG TGTAATGATTATTTAGAGTTTCTCTTTCATCTGT TCAAATTTTTGTCTAGTTTTATTTTTTACTGATT TGTAAGACTTCTTTTTATAATCTGCATATTACAA TTCTCTTTACTGGGGTGTTGCAAATATTTTCTG TCATTCTATGGCCTGACTTTTCTTAATGGTTTT TTAATTTTAAAAATAAGTCTTAATATTCATGCA ATCTAATTAACAATCTTTTCTTTGTGGTTAGGA CTTTGAGTCATAAGAAATTTTTCTCTACACTGA AGTCATGATGGCATGCTTCTATATTATTTTCTAA AAGATTTAAAGTTTTGCCTTCTCCATTTAGACT TATAATTCACTGGAATTTTTTTGTGTGTATGGTA TGACATATGGGTTCCCTTTTATTTTTTACATATA AATATATTTCCCTGTTTTTCTAAAAAAGAAAA AGATCATCATTTTCCCATTGTAAAATGCCATAT TTTTTTCATAGGTCACTTACATATATCAATGGG TCTGTTTCTGAGCTCTACTCTATTTTATCAGCC TCACTGTCTATCCCCACACATCTCATGCTTTGC TCTAAATCTTGATATTTAGTGGAACATTCTTTC CCATTTTGTTCTACAAGAATATTTTTGTTATTGT CTTTGGGCTTTCTATATACATTTTGAAATGAGG TTGACAAGTTA	
RNA 输出	WPRE	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG ATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTT ACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTC TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAA CGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGC AACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCT GTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC CTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGC CTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGG CTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTC GGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCG CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACG TCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCC AGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGG CTCTGCGGCCTCTTCCGCCTCTTCGCCTTCGC CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGC CTCCCCGC	8
PolyA	兔 β-珠蛋白 polyA	TGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCG GAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAA CATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGC AACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACA AAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATG AAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCAT	20

[0222]

[0223]

表 4：盒 14 的多核苷酸序列			
元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
		AGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTT TATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACA TCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCC AGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTC ATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATC	

[0224]

表 5：CMV 参照对照盒的多核苷酸序列（CMV-sFLT1）			
元件	来源	序列（5'到 3'）	SEQ ID NO:
增强子	CMV	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTG GTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGG CCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATG TACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACC GCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATT AATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAAT GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA AGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATT GACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACT TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGC AGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT TGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCA AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAT AACC	2
启动子	CMV	CCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGC GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC	21
内含子	嵌合内含子	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAA GGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGA CAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCA CCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTT TCTCTCCACAG	22
5'UTR		GGGGCTCGGGTGCAGCGGCCAGCGGGCGC CTGGCGGCGAGGATTACCCGGGGAAGTGGT TGTCTCCTGGCTGGAGCCGCGAGACGGGCG CTCAGGGCGCGGGGCCGGCGGCGGCGAAC GAGAGGACGGACTCTGGCGGCCGGGTCTTT GGCCGCGGGGAGCGCGGGCACCGGGCGAG CAGGCCGCGTCGCGCTCACC	23

[0225]

表 5：CMV 参照对照盒的多核苷酸序列（CMV-sFLT1）			
元件	**来源**	**序列（5'到 3'）**	**SEQ ID NO:**
编码序列	sFLT-1	ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTG CTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCA CAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAAAGA TCCTGAACTGAGTTTAAAAGGCACCCAGCA CATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCT CCAATGCAGGGGGGAAGCAGCCCATAAATG GTCTTTGCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAG CGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCTG TGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTAC TTTAACCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCA CACTGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGCT GTACCTACTTCAAAGAAGAAGGAAACAGAA TCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGGT AGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCC CCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGG AGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCACC TAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCA CTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCA TAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCAT ATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCT TCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCA TTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGA CAAACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAA GCACACCACGCCCAGTCAAATTACTTAGAG GCCATACTCTTGTCCTCAATTGTACTGCTACC ACTCCCTTGAACACGAGAGTTCAAATGACC TGGAGTTACCCTGATGAAAAAAATAAGAGA GCTTCCGTAAGGCGACGAATTGACCAAAGC AATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCT TACTATTGACAAAATGCAGAACAAAGACAA AGGACTTTATACTTGTCGTGTAAGGAGTGGA CCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGC ATATATATGATAAAGCATTCATCACTGTGAAA CATCGAAAACAGCAGGTGCTTGAAACCGTA GCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTCTCTATGA AAGTGAAGGCATTTCCCTCGCCGGAAGTTG TATGGTTAAAAGATGGGTTACCTGCGACTGA GAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTAC TCGTTAATTATCAAGGACGTAACTGAAGAGG ATGCAGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCAT AAAACAGTCAAATGTGTTTAAAAACCTCAC TGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCAG ATTTACGAAAAGGCCGTGTCATCGTTTCCAG ACCCGGCTCTCTACCCACTGGGCAGCAGAC AAATCCTGACTTGTACCGCATATGGTATCCCT CAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCT GTAACCATAATCATTCCGAAGCAAGGTGTGA CTTTTGTTCCAATAATGAAGAGTCCTTTATCC	24

[0226]

表5：CMV参照对照盒的多核苷酸序列（CMV-sFLT1）			
元件	来源	序列（5'到3'）	SEQ ID NO:
		TGGATGCTGACAGCAACATGGGAAACAGAA TTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAAT AGAAGGAAAGAATAAGATGGCTAGCACCTT GGTTGTGGCTGACTCTAGAATTTCTGGAATC TACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGA CTGTGGGAAGAAACATAAGCTTTTATATCAC AGATGTGCCAAATGGGTTTCATGTTAACTTG GAAAAAATGCCGACGGAAGGAGAGGACCT GAAACTGTCTTGCACAGTTAACAAGTTCTTA TACAGAGACGTTACTTGGATTTTACTGCGGA CAGTTAATAACAGAACAATGCACTACAGTAT TAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGA GCACTCCATCACTCTTAATCTTACCATCATGA ATGTTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGC CTGCAGAGCCAGGAATGTATACACAGGGGA AGAAATCCTCCAGAAGAAAGAAATTACAAT CAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTG TTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCAC AAGGAATGATTGTACCACACAAAGTAATGTA AAACATTAA	
3'UTR		AGGACTCATTAAAAAGTAAC	25
PolyA	SV40	CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGG ACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAA ATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTG CTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAA CAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTA TGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGG TTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATG TGGTA	26

[0227] 如盒11所例示的,可以将来自AAV的反向末端重复(ITR)序列置于所述盒中的任何盒周围的侧接位置中,以便随后将盒转移到AAV基因组。Kozak序列(例如,GCCACC)可以出现在编码序列的起始密码子的5'处。CMV参照对照盒可以包括所关注的任何转基因。表5示出了一个说明性实施例,其中转基因对sFLT-1进行编码。

[0001] 序列表

[0002] <110> Keravala, Annahita

[0003] <120> 用于增强基因表达的组合物和方法

[0004] <130> AVBI-009/00US

[0005] <160> 97

[0006] <170> PatentIn版本3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 293

[0009] <212> DNA

[0010] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0011] <400> 1

[0012] acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 60

[0013] aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 120

[0014] gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtccgcc 180

[0015] ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 240

[0016] acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta cca 293

[0017] <210> 2

[0018] <211> 659

[0019] <212> DNA

[0020] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0021] <400> 2

[0022] tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

[0023] ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

[0024] aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

[0025] gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

[0026] gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

[0027] agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

[0028] ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

[0029] cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

[0030] gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540

[0031] caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600

[0032] caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacc 659

[0033] <210> 3

[0034] <211> 171

[0035] <212> DNA

[0036] <213> 智人(Homo sapiens)

[0037] <400> 3

[0038] gcacatcgcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga accggtgcct 60

[0039] agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgccttttc 120

[0040] ccgagggtgg gggagaaccg tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacgtt c 171

[0041] <210> 4

[0042] <211> 220

[0043] <212> DNA

[0044] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0045] <400> 4

[0046] tgctgatgcg gttttggcag tacaccaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat 60

[0047] ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg 120

[0048] actttccaaa atgtcgtaat aaccccgccc cgttgacgca aatgggcggt aggcgtgtac 180

[0049] ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg 220

[0050] <210> 5

[0051] <211> 923

[0052] <212> DNA

[0053] <213> 智人(Homo sapiens)

[0054] <400> 5

[0055] gtaagtgccg tgtgtggttc ccgcgggcct ggcctcttta cgggttatgg cccttgcgtg 60

[0056] ccttgaatta cttccacctg gctccagtac gtgattcttg atcccgagct ggagccaggg 120

[0057] gcgggccttg cgctttagga gcccccttcgc ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc 180

[0058] gctggggccg ccgcgtgcga atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgct gctttcgata 240

[0059] agtctctagc catttaaaat ttttgatgac gtgctgcgac gctttttttc tggcaagata 300

[0060] gtcttgtaaa tgcgggccag gatctgcaca ctggtatttc ggtttttggg cccgcggccg 360

[0061] gcgacggggc ccgtgcgtcc cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc 420

[0062] caccgagaat cggacggggg tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg 480

[0063] cgccgccgtg tatcgccccg ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt 540

[0064] gagcggaaag atggccgctt cccggccctg ctccaggggg ctcaaaatgg aggacgcggc 600

[0065] gctcgggaga gcgggcgggt gagtcaccca cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag 660

[0066] ccgtcgcttc atgtgactcc acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc gattagttct 720

[0067] ggagcttttg gagtacgtcg tctttaggtt gggggggaggg gttttatgcg atggagtttc 780

[0068] cccacactga gtgggtggag actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct 840

[0069] tggaatttgg ccttttgag tttggatctt ggttcattct caagcctcag acagtggttc 900

[0070] aaagtttttt tcttccattt cag 923

[0071] <210> 6

[0072] <211> 27

[0073] <212> DNA

[0074] <213> 智人(Homo sapiens)

[0075] <400> 6

[0076] acacccaagc tgtctagagc cgccacc 27

[0077] <210> 7

[0078] <211> 300

[0079] <212> DNA

[0080] <213> 智人(Homo sapiens)

[0081] <400> 7

[0082] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60

[0083] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120

[0084] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180

[0085] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240

[0086] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300

[0087] <210> 8

[0088] <211> 589

[0089] <212> DNA

[0090] <213> 土拨鼠肝炎病毒(Woodchuck hepatitis virus)

[0091] <400> 8

[0092] aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 60

[0093] ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120

[0094] atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg 180

[0095] tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240

[0096] ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt ccccctccct 300

[0097] attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg 360

[0098] ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc 420

[0099] gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 480

[0100] aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcctctt 540

[0101] cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgc 589

[0102] <210> 9

[0103] <211> 251

[0104] <212> DNA

[0105] <213> 牛(Bos taurus)

[0106] <400> 9

[0107] ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 60

[0108] tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 120

[0109] ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aatacaatag 180

[0110] caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat gggtacccag gtgctgaaga attgacccgg 240

[0111] ttcctcctgg g 251

[0112] <210> 10

[0113] <211> 127

[0114] <212> DNA

[0115] <213> 腺相关病毒2(Adeno-associated virus 2)

[0116] <400> 10

[0117] gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60

[0118] tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120

[0119] gggttcc 127

[0120] <210> 11

[0121] <211> 318

[0122] <212> DNA

[0123] <213> 人腺病毒2(Human adenovirus 2)

[0124] <400> 11

[0125] ctcactctct tccgcatcgc tgtctgcgag ggccagctgt tgggctcgcg gttgaggaca 60

[0126] aactcttcgc ggtctttcca gtactcttgg atcggaaacc cgtcggcctc cgaacggtac 120

[0127] tccgccaccg agggacctga gcgagtccgc atcgaccgga tcggaaaacc tctcgagaaa 180

[0128] ggcgtctaac cagtcacagt cgcaaggtag gctgagcacc gtggcgggcg gcagcgggtg 240

[0129] gcggtcgggg ttgtttctgg cggaggtgct gctgatgatg taattaaagt aggcggtctt 300

[0130] gagacggcgg atggtcga 318

[0131] <210> 12

[0132] <211> 102

[0133] <212> DNA

[0134] <213> 人腺病毒2(Human adenovirus 2)

[0135] <400> 12

[0136] ccagctgttg gggtgagtac tccctctcaa aagcgggcat tacttctgcg ctaagattgt 60

[0137] cagtttccaa aaacgaggag gatttgatat tcacctggcc cg 102

[0138] <210> 13

[0139] <211> 810

[0140] <212> DNA

[0141] <213> 智人(Homo sapiens)

[0142] <400> 13

[0143] ctgttctcat cacatcatat caaggttata taccatcaat attgccacag atgttactta 60

[0144] gccttttaat atttctctaa tttagtgtat atgcaatgat agttctctga tttctgagat 120

[0145] tgagtttctc atgtgtaatg attatttaga gtttctcttt catctgttca aatttttgtc 180

[0146] tagttttatt ttttactgat ttgtaagact tctttttata atctgcatat tacaattctc 240

[0147] tttactgggg tgttgcaaat attttctgtc attctatggc ctgacttttc ttaatggttt 300

[0148] tttaatttta aaaataagtc ttaatattca tgcaatctaa ttaacaatct tttctttgtg 360

[0149] gttaggactt tgagtcataa gaaatttttc tctacactga agtcatgatg gcatgcttct 420

[0150] atattatttt ctaaaagatt taaagttttg ccttctccat ttagacttat aattcactgg 480

[0151] aatttttttg tgtgtatggt atgacatatg ggttcccttt tatttttttac atataaatat 540

[0152] atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat 600

[0153] ttttttcata ggtcacttac atatatcaat gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta 660

[0154] tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg 720

[0155] gaacattctt tcccattttg ttctacaaga atatttttgt tattgtcttt gggctttcta 780

[0156] tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 810

[0157] <210> 14

[0158] <211> 202

[0159] <212> DNA

[0160] <213> 智人(Homo sapiens)

[0161] <400> 14

[0162] ctgcccgggt ggcatccctg tgacccctcc ccagtgcctc tcctggccct ggaagttgcc 60

[0163] actccagtgc ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt gcatcatttt gtctgactag 120

[0164] gtgtccttct ataatattat ggggtggagg ggggtggtat ggagcaaggg gcccaagttg 180

[0165] ggaagaaacc tgtagggcct gc 202

[0166] <210> 15

[0167] <211> 145

[0168] <212> DNA

[0169] <213> 腺相关病毒2(Adeno-associated virus 2)

[0170] <400> 15

[0171] gttaatcatt aactacaagg aacccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc 60

[0172] tcgctcgctc actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc 120

[0173] ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 145

[0174] <210> 16

[0175] <211> 155

[0176] <212> DNA

[0177] <213> 智人(Homo sapiens)

[0178] <400> 16

[0179] ggcatgcttc tatattattt tctaaaagat ttaaagtttt gccttctcca tttagactta 60

[0180] taattcactg gaatttttt gtgtgtatgg tatgacatat gggttccctt ttatttttta 120

[0181] catataaata tatttccctg tttttctaaa aaaga 155

[0182] <210> 17

[0183] <211> 726

[0184] <212> DNA

[0185] <213> 人乙型肝炎病毒(Human hepatitis B virus)

[0186] <400> 17

[0187] ataacaggcc tattgattgg aaagtttgtc aacgaattgt gggtcttttg gggtttgctg 60

[0188] ccccttttac gcaatgtgga tatcctgctt taatgccttt atatgcatgt atacaagcaa 120

[0189] aacaggcttt tactttctcg ccaacttaca aggcctttct cagtaaacag tatatgaccc 180

[0190] tttaccccgt tgctcggcaa cggcctggtc tgtgccaagt gtttgctgac gcaaccccca 240

[0191] ctggttgggg cttggccata ggccatcagc gcatgcgtgg aacctttgtg tctcctctgc 300

[0192] cgatccatac tgcggaactc ctagccgctt gttttgctcg cagcaggtct ggagcaaacc 360

[0193] tcatcgggac cgacaattct gtcgtactct cccgcaagta tacatcgttt ccatggctgc 420

[0194] taggctgtgc tgccaactgg atcctgcgcg ggacgtcctt tgtttacgtc ccgtcggcgc 480

[0195] tgaatcccgc ggacgacccc tcccggggcc gcttggggct ctaccgcccg cttctccgtc 540

[0196] tgccgtaccg tccgaccacg gggcgcacct ctctttacgc ggactccccg tctgtgcctt 600

[0197] ctcatctgcc ggaccgtgtg cacttcgctt cacctctgca cgtcgcatgg aggccaccgt 660

[0198] gaacgcccac cggaacctgc ccaaggtctt gcataagagg actcttggac tttcagcaat 720

[0199] gtcatc 726

[0200] <210> 18

[0201] <211> 170

[0202] <212> DNA

[0203] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0204] <400> 18

[0205] gtaagtctgt tgacatgtat gtgatgtata ctaacctgca tgggacgtgg atttacttgt 60

[0206] gtatgtcaga tagagtaaag attaactctt gcatgtgagc ggggcatcga gatagcgata 120

[0207] aatgagtcag gaggacggat acttatatgt gttgttatcc tcctctacag 170

[0208] <210> 19

[0209] <211> 50

[0210] <212> DNA

[0211] <213> 智人(Homo sapiens)

[0212] <400> 19

[0213] agcttgcttg ttctttttgc agaagctcag aataaacgct caactttggc 50

[0214] <210> 20

[0215] <211> 387

[0216] <212> DNA

[0217] <213> 穴兔(Oryctolagus cuniculus)

[0218] <400> 20

[0219] tggctaataa aggaaattta ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc 60

[0220] actcggaagg acatatggga gggcaaatca tttaaaacat cagaatgagt atttggttta 120

[0221] gagtttggca acatatgccc atatgctggc tgccatgaac aaaggttggc tataaagagg 180

[0222] tcatcagtat atgaaacagc cccctgctgt ccattcctta ttccatagaa aagccttgac 240

[0223] ttgaggttag atttttttta tattttgttt tgtgttattt ttttctttaa catccctaaa 300

[0224] attttcctta catgttttac tagccagatt tttcctcctc tcctgactac tcccagtcat 360

[0225] agctgtccct cttctcttat ggagatc 387

[0226] <210> 21

[0227] <211> 83

[0228] <212> DNA

[0229] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0230] <400> 21

[0231] ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 60

[0232] ctcgtttagt gaaccgtcag atc 83

[0233] <210> 22

[0234] <211> 133

[0235] <212> DNA

[0236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0237] <220>

[0238] <221>

[0239] <222>

[0240] <223> 合成构建体

[0241] <400> 22

[0242] gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60

[0243] cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120

[0244] tttctctcca cag 133

[0245] <210> 23

[0246] <211> 197

[0247] <212> DNA

[0248] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0249] <400> 23

[0250] ggggctcggg tgcagcggcc agcgggcgcc tggcggcgag gattacccgg ggaagtggtt 60

[0251] gtctcctggc tggagccgcg agacgggcgc tcagggcgcg gggccggcgg cggcgaacga 120

[0252] gaggacggac tctggcggcc gggtctttgg ccgcggggag cgcgggcacc gggcgagcag 180

[0253] gccgcgtcgc gctcacc 197

[0254] <210> 24

[0255] <211> 2064

[0256] <212> DNA

[0257] <213> 智人(Homo sapiens)

[0258] <400> 24

[0259] atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60

[0260] acaggatcta gttcaggttc aaaattaaaa gatcctgaac tgagtttaaa aggcacccag 120

[0261] cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaagc agcccataaa 180

[0262] tggtctttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcgaaaggc tgagcataac taaatctgcc 240

[0263] tgtggaagaa atggcaaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac 300

[0264] cacactggct tctacagctg caaatatcta gctgtaccta cttcaaagaa gaaggaaaca 360

[0265] gaatctgcaa tctatatatt tattagtgat acaggtagac ctttcgtaga gatgtacagt 420

[0266] gaaatccccg aaattataca catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgccgggtt 480

[0267] acgtcaccta acatcactgt tactttaaaa aagtttccac ttgacacttt gatccctgat 540

[0268] ggaaaacgca taatctggga cagtagaaag ggcttcatca tatcaaatgc aacgtacaaa 600

[0269] gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgtataa gacaaactat 660

[0270] ctcacacatc gacaaaccaa tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgcccagtc 720

[0271] aaattactta gaggccatac tcttgtcctc aattgtactg ctaccactcc cttgaacacg 780

[0272] agagttcaaa tgacctggag ttaccctgat gaaaaaaata agagagcttc cgtaaggcga 840

[0273] cgaattgacc aaagcaattc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa 900

[0274] atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgtcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa 960

[0275] tctgttaaca cctcagtgca tatatatgat aaagcattca tcactgtgaa acatcgaaaa 1020

[0276] cagcaggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggtcttacc ggctctctat gaaagtgaag 1080

[0277] gcatttccct cgccggaagt tgtatggtta aaagatgggt tacctgcgac tgagaaatct 1140

[0278] gctcgctatt tgactcgtgg ctactcgtta attatcaagg acgtaactga agaggatgca 1200

[0279] gggaattata caatcttgct gagcataaaa cagtcaaatg tgtttaaaaa cctcactgcc 1260

[0280] actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg ccgtgtcatc gtttccagac 1320

[0281] ccggctctct acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgcata tggtatccct 1380

[0282] caacctacaa tcaagtggtt ctggcacccc tgtaaccata atcattccga agcaaggtgt 1440

[0283] gacttttgtt ccaataatga agagtccttt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac 1500

[0284] agaattgaga gcatcactca gcgcatggca ataatagaag gaaagaataa gatggctagc 1560

[0285] accttggttg tggctgactc tagaatttct ggaatctaca tttgcatagc ttccaataaa 1620

[0286] gttgggactg tgggaagaaa cataagcttt tatatcacag atgtgccaaa tgggtttcat 1680

[0287] gttaacttgg aaaaaatgcc gacggaagga gaggacctga aactgtcttg cacagttaac 1740

[0288] aagttcttat acagagacgt tacttggatt ttactgcgga cagttaataa cagaacaatg 1800

[0289] cactacagta ttagcaagca aaaaatggcc atcactaagg agcactccat cactcttaat 1860

[0290] cttaccatca tgaatgtttc cctgcaagat tcaggcacct atgcctgcag agccaggaat 1920

[0291] gtatacacag gggaagaaat cctccagaag aaagaaatta caatcagagg tgagcactgc 1980

[0292] aacaaaaagg ctgttttctc tcggatctcc aaatttaaaa gcacaaggaa tgattgtacc 2040

[0293] acacaaagta atgtaaaaca ttaa 2064

[0294] <210> 25

[0295] <211> 20

[0296] <212> DNA

[0297] <213> 人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)

[0298] <400> 25

[0299] aggactcatt aaaaagtaac 20

[0300] <210> 26

[0301] <211> 222

[0302] <212> DNA

[0303] <213> 猿猴病毒40(Simian virus 40)

[0304] <400> 26

[0305] cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60

[0306] aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120

[0307] ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggagatgt 180

[0308] gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg ta 222

[0309] <210> 27

[0310] <211> 1075

[0311] <212> DNA

[0312] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0313] <220>

[0314] <221>

[0315] <222>

[0316] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒1完整5’

[0317] <400> 27

[0318] ctctggagac gcaacctttg gagctaagcc agcaatggta gagggaagat tctgcacgtc 60

[0319] ccttccaggc ggcctccccg tcaccacccc ccccaacccg ccccgaccgg agctgagagt 120

[0320] aattcataca aaaggactcg cccctgcctt ggggaatccc agggaccgtc gttaaactcc 180

[0321] cactaacgta gaacccagag atcgctgcgt tcccgccccc tcacccgccc gctctcgtca 240

[0322] tcactgaggt ggagaatagc atgcgtgagg ctccggtgcc cgtcagtggg cagagcgcac 300

[0323] atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc aattgaacgg gtgcctagag 360

[0324] aaggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc tttttcccga 420

[0325] gggtgggggа gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg aacgttcttt ttcgcaacgg 480

[0326] gtttgccgcc agaacacagc gtctcagggg agatctcgtt tagtgaaccg tcagatcctc 540

[0327] actctcttcc gcatcgctgt ctgcgagggc cagctgttgg gctcgcggtt gaggacaaac 600

[0328] tcttcgcggt ctttccagta ctcttggatc ggaaacccgt cggcctccga acggtactcc 660

[0329] gccaccgagg gacctgagcg agtccgcatc gaccggatcg gaaaacctct cgagaaaggc 720

[0330] gtctaaccag tcacagtcgc aaggtaggct gagcaccgtg gcgggcggca gcgggtggcg 780

[0331] gtcggggttg tttctggcgg aggtgctgct gatgatgtaa ttaaagtagg cggtcttgag 840

[0332] acggcggatg gtcgaggtga ggtgtggcag gcttgagatc cagctgttgg ggtgagtact 900

[0333] ccctctcaaa agcgggcatt acttctgcgc taagattgtc agtttccaaa aacgaggagg 960

[0334] atttgatatt cacctggccc gatctggcca tacacttgag tgacaatgac atccactttg 1020

[0335] cctttctctc cacaggtgtc cactcccagg tccaagttta aacgccgcca ccatg 1075

[0336] <210> 28

[0337] <211> 1768

[0338] <212> DNA

[0339] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0340] <220>

[0341] <221>

[0342] <222>

[0343] <223> 在实验室中制备—多核苷酸盒1完整3’

[0344] <400> 28

[0345] ctgttctcat cacatcatat caaggttata taccatcaat attgccacag atgttactta 60

[0346] gccttttaat atttctctaa tttagtgtat atgcaatgat agttctctga tttctgagat 120

[0347] tgagtttctc atgtgtaatg attatttaga gtttctcttt catctgttca aatttttgtc 180

[0348] tagttttatt ttttactgat ttgtaagact tctttttata atctgcatat tacaattctc 240

[0349] tttactgggg tgttgcaaat attttctgtc attctatggc ctgacttttc ttaatggttt 300

[0350] tttaatttta aaaataagtc ttaatattca tgcaatctaa ttaacaatct tttctttgtg 360

[0351] gttaggactt tgagtcataa gaaatttttc tctacactga agtcatgatg gcatgcttct 420

[0352] atattatttt ctaaaagatt taaagttttg ccttctccat ttagacttat aattcactgg 480

[0353] aatttttttg tgtgtatggt atgacatatg ggttcccttt tatttttttac atataaatat 540

[0354] atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat 600

[0355] ttttttcata ggtcacttac atatatcaat gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta 660

[0356] tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg 720

[0357] gaacattctt tcccattttg ttctacaaga atatttttgt tattgtcttt gggctttcta 780

[0358] tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta cctaggaaaa ctgtcttcat aacaggccta 840

[0359] ttgattggaa agtttgtcaa cgaattgtgg gtcttttggg gtttgctgcc ccttttacgc 900

[0360] aatgtggata tcctgcttta atgcctttat atgcatgtat acaagcaaaa caggctttta 960

[0361] ctttctcgcc aacttacaag gcctttctca gtaaacagta tatgaccctt taccccgttg 1020

[0362] ctcggcaacg gcctggtctg tgccaagtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggct 1080

[0363] tggccatagg ccatcagcgc atgcgtggaa cctttgtgtc tcctctgccg atccatactg 1140

[0364] cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca gcaggtctgg agcaaacctc atcgggaccg 1200

[0365] acaattctgt cgtactctcc cgcaagtata catcgtttcc atggctgcta ggctgtgctg 1260

[0366] ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg tttacgtccc gtcggcgctg aatcccgcgg 1320

[0367] acgacccctc ccggggccgc ttggggctct accgcccgct tctccgtctg ccgtaccgtc 1380

[0368] cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg actccccgtc tgtgccttct catctgccgg 1440

[0369] accgtgtgca cttcgcttca cctctgcacg tcgcatggag gccaccgtga acgcccaccg 1500

[0370] gaacctgccc aaggtcttgc ataagaggac tcttggactt tcagcaatgt catcctgccc 1560

[0371] gggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca 1620

[0372] gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc 1680

[0373] ttctataata ttatggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcccaa gttgggaaga 1740

[0374] aacctgtagg gcctgcgaag acagtcag 1768

[0375] <210> 29

[0376] <211> 1193

[0377] <212> DNA

[0378] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0379] <220>

[0380] <221>

[0381] <222>

[0382] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒2完整5’

[0383] <400> 29

[0384] ctctggagac ggcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg ggaggggtcg gcaattgaac 60

[0385] cggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg 120

[0386] ccttttccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca gtagtcgccg tgaacgttct 180

[0387] ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc gtgtgtggtt cccgcgggcc 240

[0388] tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt acttccacct ggctccagta 300

[0389] cgtgattctt gatcccgagc tggagccagg ggcgggcctt gcgctttagg agccccttcg 360

[0390] cctcgtgctt gagttgaggc ctggcctggg cgctggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg 420

[0391] caccttcgcg cctgtctcgc tgctttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga 480

[0392] cgtgctgcga cgcttttttt ctggcaagat agtcttgtaa atgcgggcca ggatctgcac 540

[0393] actggtattt cggtttttgg gcccgcggcc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca 600

[0394] tgttcggcga ggcggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa 660

[0395] gctggccggc ctgctctggt gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg 720

[0396] gcaaggctgg cccggtcggc accagttgcg tgagcggaaa gatggccgct tcccggccct 780

[0397] gctccagggg gctcaaaatg gaggacgcgg cgctcgggag agcgggcggg tgagtcaccc 840

[0398] acacaaagga aaagggcctt tccgtcctca gccgtcgctt catgtgactc cacggagtac 900

[0399] cgggcgccgt ccaggcacct cgattagttc tggagctttt ggagtacgtc gtctttaggt 960

[0400] tgggggggagg ggttttatgc gatggagttt ccccacactg agtgggtgga gactgaagtt 1020

[0401] aggccagctt ggcacttgat gtaattctcc ttggaatttg gccttttga gtttggatct 1080

[0402] tggttcattc tcaagcctca gacagtggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg 1140

[0403] tgaacacgtc tcaggggaga tctacaccca agctgtctag agccgccacc atg 1193

[0404] <210> 30

[0405] <211> 984

[0406] <212> DNA

[0407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0408] <220>

[0409] <221>

[0410] <222>

[0411] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒2完整3’

[0412] <400> 30

[0413] tgaggcatgc ttctatatta ttttctaaaa gatttaaagt tttgccttct ccatttagac 60

[0414] ttataattca ctggaatttt tttgtgtgta tggtatgaca tatgggttcc cttttatttt 120

[0415] ttacatataa atatatttcc ctgtttttct aaaaaagacc taggaaaact gtcttcataa 180

[0416] tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc 240

[0417] ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat 300

[0418] ggctttcatt ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg 360

[0419] gcccgttgtc aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg 420

[0420] ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat 480

[0421] tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgctgc tggacagggg ctcggctgtt 540

[0422] gggcactgac aattccgtgg tgttgtcggg gaaatcatcg tcctttcctt ggctgctcgc 600

[0423] ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa 660

[0424] tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcctcttcg 720

[0425] ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgcatc ctgcccgggt 780

[0426] ggcatccctg tgacccctcc ccagtgcctc tcctggccct ggaagttgcc actccagtgc 840

[0427] ccaccagcct tgtcctaata aaattaagtt gcatcatttt gtctgactag gtgtccttct 900

[0428] ataatattat ggggtggagg ggggtggtat ggagcaaggg gcccaagttg ggaagaaacc 960

[0429] tgtagggcct gcgaagacag tcag 984

[0430] <210> 31

[0431] <211> 1481

[0432] <212> DNA

[0433] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0434] <220>

[0435] <221>

[0436] <222>

[0437] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒3完整5’

[0438] <400> 31

[0439] ctctggagac gcaacctttg gagctaagcc agcaatggta gagggaagat tctgcacgtc 60

[0440] ccttccaggc ggcctccccg tcaccacccc ccccaacccg ccccgaccgg agctgagagt 120

[0441] aattcataca aaaggactcg cccctgcctt ggggaatccc agggaccgtc gttaaactcc 180

[0442] cactaacgta gaacccagag atcgctgcgt tcccgccccc tcacccgccc gctctcgtca 240

[0443] tcactgaggt ggagaatagc atgcgtgagg ctccggtgcc cgtcagtggg cagagcgcac 300

[0444] atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc aattgaacgg gtgcctagag 360

[0445] aaggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc tttttcccga 420

[0446] gggtgggggа gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg aacgttcttt ttcgcaacgg 480

[0447] gtttgccgcc agaacacagg taagtgccgt gtgtggttcc cgcgggcctg gcctctttac 540

[0448] gggttatggc ccttgcgtgc cttgaattac ttccacctgg ctccagtacg tgattcttga 600

[0449] tcccgagctg gagccagggg cgggccttgc gctttaggag ccccttcgcc tcgtgcttga 660

[0450] gttgaggcct ggcctgggcg ctggggccgc cgcgtgcgaa tctggtggca ccttcgcgcc 720

[0451] tgtctcgctg ctttcgataa gtctctagcc atttaaaatt tttgatgacg tgctgcgacg 780

[0452] ctttttttct ggcaagatag tcttgtaaat gcgggccagg atctgcacac tggtatttcg 840

[0453] gtttttgggc ccgcggccgg cgacggggcc cgtgcgtccc agcgcacatg ttcggcgagg 900

[0454] cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct 960

[0455] gctctggtgc ctggcctcgc gccgccgtgt atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc 1020

[0456] cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc tccagggggc 1080

[0457] tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcacccac acaaaggaaa 1140

[0458] agggcctttc cgtcctcagc cgtcgcttca tgtgactcca cggagtaccg ggcgccgtcc 1200

[0459] aggcacctcg attagttctg gagcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg 1260

[0460] ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg 1320

[0461] cacttgatgt aattctcctt ggaatttggc ctttttgagt ttggatcttg gttcattctc 1380

[0462] aagcctcaga cagtggttca aagtttttt cttccatttc aggtgtcgtg aacacgtctc 1440

[0463] aggggagatc tacacccaag ctgtctagag ccgccaccat g 1481

[0464] <210> 32

[0465] <211> 581

[0466] <212> DNA

[0467] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0468] <220>

[0469] <221>

[0470] <222>

[0471] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒3完整3’

[0472] <400> 32

[0473] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60

[0474] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120

[0475] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180

[0476] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240

[0477] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300

[0478] cctaggaaaa ctgtcttctt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt 360

[0479] gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 420

[0480] ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga 480

[0481] ggattgggaa tacaatagca ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg gtacccaggt 540

[0482] gctgaagaat tgacccggtt cctcctgggg aagacagtca g 581

[0483] <210> 33

[0484] <211> 1511

[0485] <212> DNA

[0486] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0487] <220>

[0488] <221>

[0489] <222>

[0490] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒4完整5’

[0491] <400> 33

[0492] ctctggagac gcaacctttg gagctaagcc agcaatggta gagggaagat tctgcacgtc 60

[0493] ccttccaggc ggcctccccg tcaccacccc ccccaacccg ccccgaccgg agctgagagt 120

[0494] aattcataca aaaggactcg cccctgcctt ggggaatccc agggaccgtc gttaaactcc 180

[0495] cactaacgta gaacccagag atcgctgcgt tcccgccccc tcacccgccc gctctcgtca 240

[0496] tcactgaggt ggagaatagc atgcgtgagg ctccggtgcc cgtcagtggg cagagcgcac 300

[0497] atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc aattgaacgg gtgcctagag 360

[0498] aaggtggcgc ggggtaaact gggaaagtga tgtcgtgtac tggctccgcc tttttcccga 420

[0499] gggtggggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg aacgttcttt ttcgcaacgg 480

[0500] gtttgccgcc agaacacagg taagtgccgt gtgtggttcc cgcgggcctg gcctctttac 540

[0501] gggttatggc ccttgcgtgc cttgaattac ttccacctgg ctccagtacg tgattcttga 600

[0502] tcccgagctg gagccagggg cgggccttgc gctttaggag ccccttcgcc tcgtgcttga 660

[0503] gttgaggcct ggcctgggcg ctggggccgc cgcgtgcgaa tctggtggca ccttcgcgcc 720

[0504] tgtctcgctg ctttcgataa gtctctagcc atttaaaatt tttgatgacg tgctgcgacg 780

[0505] ctttttttct ggcaagatag tcttgtaaat gcgggccagg atctgcacac tggtatttcg 840

[0506] gtttttgggc ccgcggccgg cgacggggcc cgtgcgtccc agcgcacatg ttcggcgagg 900

[0507] cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc tggccggcct 960

[0508] gctctggtgc ctggcctcgc gccgccgtgt atcgccccgc cctgggcggc aaggctggcc 1020

[0509] cggtcggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc tccaggggggc 1080

[0510] tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcacccac acaaaggaaa 1140

[0511] agggcctttc cgtcctcagc cgtcgcttca tgtgactcca cggagtaccg ggcgccgtcc 1200

[0512] aggcacctcg attagttctg gagcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg gggggagggg 1260

[0513] ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag gccagcttgg 1320

[0514] cacttgatgt aattctcctt ggaatttggc ctttttgagt ttggatcttg gttcattctc 1380

[0515] aagcctcaga cagtggttca aagtttttt cttccatttc aggtgtcgtg aacacgtctc 1440

[0516] aggggagatc tagcttgctt gttctttttg cagaagctca gaataaacgc tcaactttgg 1500

[0517] ccgccaccat g 1511

[0518] <210> 34

[0519] <211> 717

[0520] <212> DNA

[0521] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0522] <220>

[0523] <221>

[0524] <222>

[0525] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒4完整3’

[0526] <400> 34

[0527] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60

[0528] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120

[0529] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180

[0530] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240

[0531] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300

[0532] cctaggaaaa ctgtcttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg 360

[0533] gaatttttg tgtctctcac tcggaaggac atatgggagg gcaaatcatt taaaacatca 420

[0534] gaatgagtat ttggtttaga gtttggcaac atatgcccat atgctggctg ccatgaacaa 480

[0535] aggttggcta taaagaggtc atcagtatat gaaacagccc cctgctgtcc attccttatt 540

[0536] ccatagaaaa gccttgactt gaggttagat tttttttata ttttgttttg tgttatttt 600

[0537] ttctttaaca tccctaaaat tttccttaca tgttttacta gccagatttt tcctcctctc 660

[0538] ctgactactc ccagtcatag ctgtccctct tctcttatgg agatcgaaga cagtcag 717

[0539] <210> 35

[0540] <211> 928

[0541] <212> DNA

[0542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0543] <220>

[0544] <221>

[0545] <222>

[0546] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒5完整5’

[0547] <400> 35

[0548] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[0549] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[0550] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[0551] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[0552] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[0553] accaatgacg tcgaggagaa gttccccaac tttcccgcct ctcagccttt gaaagaaaga 360

[0554] aaggggaggg ggcaggccgc gtgcagccgc gagcggtgct gggctccggc tccaattccc 420

[0555] catctcagtc gttcccaaag tcctcctgtt tcatccaagc gtgtaagggt ccccgtcctt 480

[0556] gactccctag tgtcctgctg cccacagtcc agtcctggga accagcaccg atcacctccc 540

[0557] atcgggccaa tctcagtccc ttccccccta cgtcggggcc cacacgctcg gtgcgtgccc 600

[0558] agttgaacca ggcggctgcg gaaaaaaaaa agcggggaga aagtagggcc cggctactag 660

[0559] cggttttacg ggcgcacgta gctcaggcct caagaccttg ggctgggact ggctgagcct 720

[0560] ggcgggaggc ggggtccgag tcaccgcctg ccgccgcgcc cccggtttct ataaattgag 780

[0561] cccgcagcct cccgcttcgc tctctgctcc tcctgttcga cagtcagccg catcttcttt 840

[0562] tgcgtcgcca gcgtctcagg ggagatctag cttgcttgtt ctttttgcag aagctcagaa 900

[0563] taaacgctca actttggccg ccaccatg 928

[0564] <210> 36

[0565] <211> 1268

[0566] <212> DNA

[0567] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0568] <220>

[0569] <221>

[0570] <222>

[0571] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒5完整3’

[0572] <400> 36

[0573] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60

[0574] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120

[0575] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180

[0576] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240

[0577] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300

[0578] cctaggaaaa ctgtcttcat aacaggccta ttgattggaa agtttgtcaa cgaattgtgg 360

[0579] gtcttttggg gtttgctgcc ccttttacgc aatgtggata tcctgcttta atgcctttat 420

[0580] atgcatgtat acaagcaaaa caggctttta ctttctcgcc aacttacaag gcctttctca 480

[0581] gtaaacagta tatgaccctt taccccgttg ctcggcaacg gcctggtctg tgccaagtgt 540

[0582] ttgctgacgc aacccccact ggttggggct tggccatagg ccatcagcgc atgcgtggaa 600

[0583] cctttgtgtc tcctctgccg atccatactg cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca 660

[0584] gcaggtctgg agcaaacctc atcgggaccg acaattctgt cgtactctcc cgcaagtata 720

[0585] catcgtttcc atggctgcta ggctgtgctg ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg 780

[0586] tttacgtccc gtcggcgctg aatcccgcgg acgacccctc ccggggccgc ttggggctct 840

[0587] accgcccgct tctccgtctg ccgtaccgtc cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg 900

[0588] actccccgtc tgtgccttct catctgccgg accgtgtgca cttcgcttca cctctgcacg 960

[0589] tcgcatggag gccaccgtga acgcccaccg gaacctgccc aaggtcttgc ataagaggac 1020

[0590] tcttggactt tcagcaatgt catcctgccc gggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg 1080

[0591] cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta 1140

[0592] agttgcatca ttttgtctga ctaggtgtcc ttctataata ttatggggtg gaggggggtg 1200

[0593] gtatggagca aggggcccaa gttgggaaga aacctgtagg gcctgcgaag acagtcagac 1260

[0594] tgtcatta 1268

[0595] <210> 37

[0596] <211> 1427

[0597] <212> DNA

[0598] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0599] <220>

[0600] <221>

[0601] <222>

[0602] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒6完整5’

[0603] <400> 37

[0604] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[0605] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[0606] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[0607] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[0608] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[0609] accaatgacg tcgaggagaa gttccccaac tttcccgcct ctcagccttt gaaagaaaga 360

[0610] aaggggaggg ggcaggccgc gtgcagccgc gagcggtgct gggctccggc tccaattccc 420

[0611] catctcagtc gttcccaaag tcctcctgtt tcatccaagc gtgtaagggt ccccgtcctt 480

[0612] gactccctag tgtcctgctg cccacagtcc agtcctggga accagcaccg atcacctccc 540

[0613] atcgggccaa tctcagtccc ttccccccta cgtcggggcc cacacgctcg gtgcgtgccc 600

[0614] agttgaacca ggcggctgcg gaaaaaaaaa agcggggaga aagtagggcc cggctactag 660

[0615] cggttttacg ggcgcacgta gctcaggcct caagaccttg ggctgggact ggctgagcct 720

[0616] ggcgggaggc ggggtccgag tcaccgcctg ccgccgcgcc cccggtttct ataaattgag 780

[0617] cccgcagcct cccgcttcgc tctctgctcc tcctgttcga cagtcagccg catcttcttt 840

[0618] tgcgtcgcca gcgtctcagg ggagatctcg tttagtgaac cgtcagatcc tcactctctt 900

[0619] ccgcatcgct gtctgcgagg gccagctgtt gggctcgcgg ttgaggacaa actcttcgcg 960

[0620] gtctttccag tactcttgga tcggaaaccc gtcggcctcc gaacggtact ccgccaccga 1020

[0621] gggacctgag cgagtccgca tcgaccggat cggaaaacct ctcgagaaag gcgtctaacc 1080

[0622] agtcacagtc gcaaggtagg ctgagcaccg tggcgggcgg cagcgggtgg cggtcggggt 1140

[0623] tgtttctggc ggaggtgctg ctgatgatgt aattaaagta ggcggtcttg agacggcgga 1200

[0624] tggtcgaggt gaggtgtggc aggcttgaga tccagctgtt ggggtgagta ctccctctca 1260

[0625] aaagcgggca ttacttctgc gctaagattg tcagtttcca aaaacgagga ggatttgata 1320

[0626] ttcacctggc ccgatctggc catacacttg agtgacaatg acatccactt tgcctttctc 1380

[0627] tccacaggtg tccactccca ggtccaagtt taaacgccgc caccatg 1427

[0628] <210> 38

[0629] <211> 1169

[0630] <212> DNA

[0631] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0632] <220>

[0633] <221>

[0634] <222>

[0635] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒6完整3’

[0636] <400> 38

[0637] tgaggcatgc ttctatatta ttttctaaaa gatttaaagt tttgccttct ccatttagac 60

[0638] ttataattca ctggaatttt tttgtgtgta tggtatgaca tatgggttcc cttttatttt 120

[0639] ttacatataa atatatttcc ctgtttttct aaaaaagacc taggaaaact gtcttcataa 180

[0640] tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc 240

[0641] ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat 300

[0642] ggctttcatt ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg 360

[0643] gcccgttgtc aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg 420

[0644] ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat 480

[0645] tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgctgc tggacagggg ctcggctgtt 540

[0646] gggcactgac aattccgtgg tgttgtcggg gaaatcatcg tcctttcctt ggctgctcgc 600

[0647] ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa 660

[0648] tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcctcttcg 720

[0649] ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgcatc tggctaataa 780

[0650] aggaaattta ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagg 840

[0651] acatatggga gggcaaatca tttaaaacat cagaatgagt atttggttta gagtttggca 900

[0652] acatatgccc atatgctggc tgccatgaac aaaggttggc tataaagagg tcatcagtat 960

[0653] atgaaacagc cccctgctgt ccattcctta ttccatagaa aagccttgac ttgaggttag 1020

[0654] atttttttta tattttgttt tgtgttattt ttttctttaa catccctaaa attttcctta 1080

[0655] catgttttac tagccagatt tttcctcctc tcctgactac tcccagtcat agctgtccct 1140

[0656] cttctcttat ggagatcgaa gacagtcag 1169

[0657] <210> 39

[0658] <211> 1755

[0659] <212> DNA

[0660] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0661] <220>

[0662] <221>

[0663] <222>

[0664] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒7完整5’

[0665] <400> 39

[0666] ctctggagac gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 60

[0667] ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 120

[0668] cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 180

[0669] tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 240

[0670] tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 300

[0671] atcgctatta ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcactctccc catctccccc 360

[0672] ccctccccac ccccaatttt gtatttattt atttttaat tattttgtgc agcgatgggg 420
[0673] gcgggggggg gggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc 480
[0674] gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat 540
[0675] ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc 600
[0676] tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct 660
[0677] ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg 720
[0678] taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga 780
[0679] ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg 840
[0680] tgtgcgtggg gagcgccgcg tgcggctccg cgctgcccgg cggctgtgag cgctgcgggc 900
[0681] gcggcgcggg gctttgtgcg ctccgcagtg tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg 960
[0682] ccccgcggtg cgggggggcc tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg 1020
[0683] gggggtgagc agggggtgtg ggcgcgtcgg tcgggctgca acccccccctg caccccccctc 1080
[0684] cccgagttgc tgagcacggc ccggcttcgg gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgcgg 1140
[0685] ggctcgccgt gccgggcggg gggtggcggc aggtgggggt gccgggcggg gcggggccgc 1200
[0686] ctcgggccgg ggagggctcg ggggaggggc gcggcggccc ccggagcgcc ggcggctgtc 1260
[0687] gaggcgcggc gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac 1320
[0688] ttcctttgtc ccaaatctgt gcggagccga aatctgggag gcgccgccgc acccccctcta 1380
[0689] gcgggcgcgg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 1440
[0690] gtgcgtcgcc gcgccgccgt ccccttctcc ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg 1500
[0691] acggctgcct tcgggggggа cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1560
[0692] gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca 1620
[0693] acgtgctggt tattgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcggcttg atcgaagccg 1680
[0694] tctcagggga gatctagctt gcttgttctt tttgcagaag ctcagaataa acgctcaact 1740
[0695] ttggccgcca ccatg 1755
[0696] <210> 40
[0697] <211> 1165
[0698] <212> DNA
[0699] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0700] <220>
[0701] <221>
[0702] <222>
[0703] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒7完整3’
[0704] <400> 40
[0705] tgaggcatgc ttctatatta ttttctaaaa gatttaaagt tttgccttct ccatttagac 60
[0706] ttataattca ctggaatttt tttgtgtgta tggtatgaca tatgggttcc cttttatttt 120
[0707] ttacatataa atatatttcc ctgtttttct aaaaaagacc taggaaaact gtcttcataa 180
[0708] caggcctatt gattggaaag tttgtcaacg aattgtgggt cttttggggt ttgctgcccc 240
[0709] ttttacgcaa tgtggatatc ctgctttaat gcctttatat gcatgtatac aagcaaaaca 300
[0710] ggcttttact ttctcgccaa cttacaaggc ctttctcagt aaacagtata tgacccttta 360
[0711] ccccgttgct cggcaacggc ctggtctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa cccccactgg 420
[0712] ttggggcttg gccataggcc atcagcgcat gcgtggaacc tttgtgtctc ctctgccgat 480
[0713] ccatactgcg gaactcctag ccgcttgttt tgctcgcagc aggtctggag caaacctcat 540

[0714] cgggaccgac aattctgtcg tactctcccg caagtataca tcgtttccat ggctgctagg 600

[0715] ctgtgctgcc aactggatcc tgcgcgggac gtcctttgtt tacgtcccgt cggcgctgaa 660

[0716] tcccgcggac gacccctccc ggggccgctt ggggctctac cgcccgcttc tccgtctgcc 720

[0717] gtaccgtccg accacggggc gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctca 780

[0718] tctgccggac cgtgtgcact tcgcttcacc tctgcacgtc gcatggaggc caccgtgaac 840

[0719] gcccaccgga acctgcccaa ggtcttgcat aagaggactc ttggactttc agcaatgtca 900

[0720] tcttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 960

[0721] actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 1020

[0722] cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaatacaat 1080

[0723] agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgggtaccc aggtgctgaa gaattgaccc 1140

[0724] ggttcctcct ggggaagaca gtcag 1165

[0725] <210> 41

[0726] <211> 1159

[0727] <212> DNA

[0728] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0729] <220>

[0730] <221>

[0731] <222>

[0732] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒8完整5’

[0733] <400> 41

[0734] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[0735] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[0736] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[0737] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[0738] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[0739] accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca 360

[0740] cccccaattt tgtatttatt tatttttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcgggggggg 420

[0741] gggggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga 480

[0742] ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg 540

[0743] cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cggcgtctca ggggagatct 600

[0744] cgtttagtga accgtcagat cctcactctc ttccgcatcg ctgtctgcga gggccagctg 660

[0745] ttgggctcgc ggttgaggac aaactcttcg cggtctttcc agtactcttg gatcggaaac 720

[0746] ccgtcggcct ccgaacggta ctccgccacc gagggacctg agcgagtccg catcgaccgg 780

[0747] atcggaaaac ctctcgagaa aggcgtctaa ccagtcacag tcgcaaggta ggctgagcac 840

[0748] cgtggcgggc ggcagcgggt ggcggtcggg gttgtttctg gcggaggtgc tgctgatgat 900

[0749] gtaattaaag taggcggtct tgagacggcg gatggtcgag gtgaggtgtg gcaggcttga 960

[0750] gatccagctg ttggggtgag tactccctct caaaagcggg cattacttct gcgctaagat 1020

[0751] tgtcagtttc caaaaacgag gaggatttga tattcacctg gcccgatctg gccatacact 1080

[0752] tgagtgacaa tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc caggtccaag 1140

[0753] tttaaacgcc gccaccatg 1159

[0754] <210> 42

[0755] <211> 572

[0756] <212> DNA

[0757] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0758] <220>

[0759] <221>

[0760] <222>

[0761] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒8完整3’

[0762] <400> 42

[0763] ggcatgcttc tatattattt tctaaaagat ttaaagtttt gccttctcca tttagactta 60

[0764] taattcactg gaatttttt gtgtgtatgg tatgacatat gggttccctt ttatttttta 120

[0765] catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagacctag gaaaactgtc ttctggctaa 180

[0766] taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct ctcactcgga 240

[0767] aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttggt ttagagtttg 300

[0768] gcaacatatg cccatatgct ggctgccatg aacaaaggtt ggctataaag aggtcatcag 360

[0769] tatatgaaac agccccctgc tgtccattcc ttattccata gaaaagcctt gacttgaggt 420

[0770] tagatttttt ttatattttg ttttgtgtta ttttttttctt taacatccct aaaattttcc 480

[0771] ttacatgttt tactagccag atttttcctc ctctcctgac tactcccagt catagctgtc 540

[0772] cctcttctct tatggagatc gaagacagtc ag 572

[0773] <210> 43

[0774] <211> 1519

[0775] <212> DNA

[0776] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0777] <220>

[0778] <221>

[0779] <222>

[0780] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒9完整5’

[0781] <400> 43

[0782] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[0783] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[0784] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[0785] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[0786] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[0787] accagcacat cgcccacagt ccccgagaag ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt 360

[0788] gcctagagaa ggtggcgcgg ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt 420

[0789] tttcccgagg gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt 480

[0790] cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc 540

[0791] ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct ccagtacgtg 600

[0792] attcttgatc ccgagctgga gccaggggcg ggccttgcgc tttaggagcc ccttcgcctc 660

[0793] gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggtggcacc 720

[0794] ttcgcgcctg tctcgctgct ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacgtg 780

[0795] ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaggat ctgcacactg 840

[0796] gtatttcggt ttttgggccc gcggccggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt 900

[0797] cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg 960

[0798] gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcggcaa 1020
[0799] ggctggcccg gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc 1080
[0800] caggggctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac 1140
[0801] aaaggaaaag ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg 1200
[0802] cgccgtccag gcacctcgat tagttctgga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg 1260
[0803] gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc 1320
[0804] cagcttggca cttgatgtaa ttctccttgg aatttggcct ttttgagttt ggatcttggt 1380
[0805] tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcctgaa 1440
[0806] cacgtctcag gggagatcta gcttgcttgt tctttttgca gaagctcaga ataaacgctc 1500
[0807] aactttggcc gccaccatg 1519
[0808] <210> 44
[0809] <211> 387
[0810] <212> DNA
[0811] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0812] <220>
[0813] <221>
[0814] <222>
[0815] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒9完整3’
[0816] <400> 44
[0817] ggcatgcttc tatattattt tctaaaagat ttaaagtttt gccttctcca tttagactta 60
[0818] taattcactg gaatttttt gtgtgtatgg tatgacatat gggttccctt ttatttttta 120
[0819] catataaata tatttccctg tttttctaaa aaagacctag gaaaactgtc ttcctgcccg 180
[0820] ggtggcatcc ctgtgacccc tccccagtgc ctctcctggc cctggaagtt gccactccag 240
[0821] tgcccaccag ccttgtccta ataaaattaa gttgcatcat tttgtctgac taggtgtcct 300
[0822] tctataatat tatggggtgg agggggggtgg tatggagcaa ggggcccaag ttgggaagaa 360
[0823] acctgtaggg cctgcgaaga cagtcag 387
[0824] <210> 45
[0825] <211> 1489
[0826] <212> DNA
[0827] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0828] <220>
[0829] <221>
[0830] <222>
[0831] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒10完整5’
[0832] <400> 45
[0833] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
[0834] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120
[0835] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
[0836] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
[0837] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
[0838] accagcacat cgcccacagt ccccgagaag ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt 360
[0839] gcctagagaa ggtggcgcgg ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt 420

[0840] tttcccgagg gtgggggaga accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt 480
[0841] cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc 540
[0842] ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct tgaattactt ccacctggct ccagtacgtg 600
[0843] attcttgatc ccgagctgga gccaggggcg ggccttgcgc tttaggagcc ccttcgcctc 660
[0844] gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggtggcacc 720
[0845] ttcgcgcctg tctcgctgct ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacgtg 780
[0846] ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaggat ctgcacactg 840
[0847] gtatttcggt ttttgggccc gcggccggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt 900
[0848] cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg 960
[0849] gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcggcaa 1020
[0850] ggctggcccg gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctc 1080
[0851] caggggctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac 1140
[0852] aaaggaaaag ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg 1200
[0853] cgccgtccag gcacctcgat tagttctgga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg 1260
[0854] gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc 1320
[0855] cagcttggca cttgatgtaa ttctccttgg aatttggcct ttttgagttt ggatcttggt 1380
[0856] tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcctgaa 1440
[0857] cacgtctcag gggagatcta cacccaagct gtctagagcc gccaccatg 1489
[0858] <210> 46
[0859] <211> 1180
[0860] <212> DNA
[0861] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0862] <220>
[0863] <221>
[0864] <222>
[0865] <223> 在实验室中制备—多核苷酸盒10完整3’
[0866] <400> 46
[0867] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60
[0868] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120
[0869] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180
[0870] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240
[0871] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300
[0872] cctaggaaaa ctgtcttcat ataatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac 360
[0873] tggtattctt aactatgttg ctccttttac gctatgtgga tacgctgctt taatgccttt 420
[0874] gtatcatgct attgcttccc gtatggcttt cattttctcc tccttgtata aatcctggtt 480
[0875] gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccgt tgtcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcactgt 540
[0876] gtttgctgac gcaacccccа ctggttgggg cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg 600
[0877] gactttcgct ttccccctcc ctattgccac ggcggaactc atcgccgcct gccttgcccg 660
[0878] ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtggtgttgt cggggaaatc 720
[0879] atcgtccttt ccttggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt 780
[0880] ctgctacgtc ccttcggccc tcaatccagc ggaccttcct tcccgcggcc tgctgccggc 840
[0881] tctgcggcct cttccgcctc ttcgccttcg ccctcagacg agtcggatct ccctttgggc 900

[0882] cgcctccccg catcatcttg ccagccatct gttgtttgcc cctcccccgt gccttccttg 960

[0883] accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat 1020

[0884] tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag 1080

[0885] gattgggaat acaatagcag gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggg tacccaggtg 1140

[0886] ctgaagaatt gacccggttc ctcctgggga agacagtcag 1180

[0887] <210> 47

[0888] <211> 1172

[0889] <212> DNA

[0890] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0891] <220>

[0892] <221>

[0893] <222>

[0894] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒11完整5’

[0895] <400> 47

[0896] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[0897] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[0898] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[0899] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[0900] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[0901] accatgctga tgcggttttg gcagtacacc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg 360

[0902] ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa 420

[0903] cgggactttc caaaatgtcg taataacccc gccccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt 480

[0904] gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga 540

[0905] ggccatccac gctgttttga cctccatagt ggacaccggg accgatccag cctccgcgtc 600

[0906] tcaggggaga tctcgtttag tgaaccgtca gatcctcact ctcttccgca tcgctgtctg 660

[0907] cgagggccag ctgttgggct cgcggttgag gacaaactct tcgcggtctt tccagtactc 720

[0908] ttggatcgga aacccgtcgg cctccgaacg gtactccgcc accgagggac ctgagcgagt 780

[0909] ccgcatcgac cggatcggaa aacctctcga gaaaggcgtc taaccagtca cagtcgcaag 840

[0910] gtaggctgag caccgtggcg ggcggcagcg ggtggcggtc ggggttgttt ctggcggagg 900

[0911] tgctgctgat gatgtaatta aagtaggcgg tcttgagacg gcggatggtc gaggtgaggt 960

[0912] gtggcaggct tgagatccag ctgttggggt gagtactccc tctcaaaagc gggcattact 1020

[0913] tctgcgctaa gattgtcagt ttccaaaaac gaggaggatt tgatattcac ctggcccgat 1080

[0914] ctggccatac acttgagtga caatgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac 1140

[0915] tcccaggtcc aagtttaaac gccgccacca tg 1172

[0916] <210> 48

[0917] <211> 1043

[0918] <212> DNA

[0919] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0920] <220>

[0921] <221>

[0922] <222>

[0923] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒11完整3’

[0924] <400> 48

[0925] actgttctca tcacatcata tcaaggttat ataccatcaa tattgccaca gatgttactt 60

[0926] agccttttaa tatttctcta atttagtgta tatgcaatga tagttctctg atttctgaga 120

[0927] ttgagtttct catgtgtaat gattatttag agtttctctt tcatctgttc aaatttttgt 180

[0928] ctagttttat tttttactga tttgtaagac ttctttttat aatctgcata ttacaattct 240

[0929] ctttactggg gtgttgcaaa tattttctgt cattctatgg cctgactttt cttaatggtt 300

[0930] ttttaatttt aaaaataagt cttaatattc atgcaatcta attaacaatc ttttctttgt 360

[0931] ggttaggact ttgagtcata agaaattttt ctctacactg aagtcatgat ggcatgcttc 420

[0932] tatattattt tctaaaagat ttaaagtttt gccttctcca tttagactta taattcactg 480

[0933] gaatttttt gtgtgtatgg tatgacatat gggttccctt ttatttttta catataaata 540

[0934] tatttccctg tttttctaaa aaagaaaaag atcatcattt tcccattgta aaatgccata 600

[0935] ttttttttcat aggtcactta catatatcaa tgggtctgtt tctgagctct actctatttt 660

[0936] atcagcctca ctgtctatcc ccacacatct catgctttgc tctaaatctt gatatttagt 720

[0937] ggaacattct ttcccatttt gttctacaag aatatttttg ttattgtctt tgggctttct 780

[0938] atatacattt tgaaatgagg ttgacaagtt acctaggaaa actgtcttcc tgcccgggtg 840

[0939] gcatccctgt gacccctccc cagtgcctct cctggccctg gaagttgcca ctccagtgcc 900

[0940] caccagcctt gtcctaataa aattaagttg catcattttg tctgactagg tgtccttcta 960

[0941] taatattatg gggtggaggg gggtggtatg gagcaagggg cccaagttgg gaagaaacct 1020

[0942] gtagggcctg cgaagacagt cag 1043

[0943] <210> 49

[0944] <211> 1172

[0945] <212> DNA

[0946] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0947] <220>

[0948] <221>

[0949] <222>

[0950] <223> 在实验室中制备—多核苷酸盒12完整5’

[0951] <400> 49

[0952] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[0953] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[0954] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[0955] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[0956] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[0957] accatgctga tgcggttttg gcagtacacc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg 360

[0958] ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa 420

[0959] cgggactttc caaaatgtcg taataacccc gccccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt 480

[0960] gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga 540

[0961] ggccatccac gctgttttga cctccatagt ggacaccggg accgatccag cctccgcgtc 600

[0962] tcaggggaga tctcgtttag tgaaccgtca gatcctcact ctcttccgca tcgctgtctg 660

[0963] cgagggccag ctgttgggct cgcggttgag gacaaactct tcgcggtctt tccagtactc 720

[0964] ttggatcgga aacccgtcgg cctccgaacg gtactccgcc accgagggac ctgagcgagt 780

[0965] ccgcatcgac cggatcggaa aacctctcga gaaaggcgtc taaccagtca cagtcgcaag 840

[0966] gtaggctgag caccgtggcg ggcggcagcg ggtggcggtc ggggttgttt ctggcggagg 900

[0967] tgctgctgat gatgtaatta aagtaggcgg tcttgagacg gcggatggtc gaggtgaggt 960

[0968] gtggcaggct tgagatccag ctgttggggt gagtactccc tctcaaaagc gggcattact 1020

[0969] tctgcgctaa gattgtcagt ttccaaaaac gaggaggatt tgatattcac ctggcccgat 1080

[0970] ctggccatac acttgagtga caatgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac 1140

[0971] tcccaggtcc aagtttaaac gccgccacca tg 1172

[0972] <210> 50

[0973] <211> 1165

[0974] <212> DNA

[0975] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0976] <220>

[0977] <221>

[0978] <222>

[0979] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒12完整3’

[0980] <400> 50

[0981] tgaggcatgc ttctatatta ttttctaaaa gatttaaagt tttgccttct ccatttagac 60

[0982] ttataattca ctggaatttt tttgtgtgta tggtatgaca tatgggttcc cttttatttt 120

[0983] ttacatataa atatatttcc ctgtttttct aaaaaagacc taggaaaact gtcttcataa 180

[0984] caggcctatt gattggaaag tttgtcaacg aattgtgggt cttttggggt ttgctgcccc 240

[0985] ttttacgcaa tgtggatatc ctgctttaat gcctttatat gcatgtatac aagcaaaaca 300

[0986] ggcttttact ttctcgccaa cttacaaggc ctttctcagt aaacagtata tgacccttta 360

[0987] ccccgttgct cggcaacggc ctggtctgtg ccaagtgttt gctgacgcaa cccccactgg 420

[0988] ttggggcttg gccataggcc atcagcgcat gcgtggaacc tttgtgtctc ctctgccgat 480

[0989] ccatactgcg gaactcctag ccgcttgttt tgctcgcagc aggtctggag caaacctcat 540

[0990] cgggaccgac aattctgtcg tactctcccg caagtataca tcgtttccat ggctgctagg 600

[0991] ctgtgctgcc aactggatcc tgcgcgggac gtcctttgtt tacgtcccgt cggcgctgaa 660

[0992] tcccgcggac gacccctccc ggggccgctt ggggctctac cgcccgcttc tccgtctgcc 720

[0993] gtaccgtccg accacggggc gcacctctct ttacgcggac tccccgtctg tgccttctca 780

[0994] tctgccggac cgtgtgcact tcgcttcacc tctgcacgtc gcatggaggc caccgtgaac 840

[0995] gcccaccgga acctgcccaa ggtcttgcat aagaggactc ttggactttc agcaatgtca 900

[0996] tcttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 960

[0997] actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 1020

[0998] cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaatacaat 1080

[0999] agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgggtaccc aggtgctgaa gaattgaccc 1140

[1000] ggttcctcct ggggaagaca gtcag 1165

[1001] <210> 51

[1002] <211> 820

[1003] <212> DNA

[1004] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1005] <220>

[1006] <221>

[1007] <222>

[1008] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒13完整5’

[1009] <400> 51

[1010] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60

[1011] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[1012] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180

[1013] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240

[1014] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300

[1015] accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca 360

[1016] cccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcgggggg 420

[1017] gggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga 480

[1018] ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg 540

[1019] cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cggcgtctca ggggagatct 600

[1020] ggtgaggtgt ggcaggcttg agatccagct gttggggtga gtactccctc tcaaaagcgg 660

[1021] gcattacttc tgcgctaaga ttgtcagttt ccaaaaacga ggaggatttg atattcacct 720

[1022] ggcccgatct ggccatacac ttgagtgaca atgacatcca ctttgccttt ctctccacag 780

[1023] gtgtccactc ccaggtccaa gtttaaacgc cgccaccatg 820

[1024] <210> 52

[1025] <211> 1443

[1026] <212> DNA

[1027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1028] <220>

[1029] <221>

[1030] <222>

[1031] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒13完整3’

[1032] <400> 52

[1033] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60

[1034] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120

[1035] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180

[1036] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240

[1037] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300

[1038] cctaggaaaa ctgtcttcat aacaggccta ttgattggaa agtttgtcaa cgaattgtgg 360

[1039] gtcttttggg gtttgctgcc ccttttacgc aatgtggata tcctgcttta atgcctttat 420

[1040] atgcatgtat acaagcaaaa caggctttta ctttctcgcc aacttacaag gcctttctca 480

[1041] gtaaacagta tatgaccctt taccccgttg ctcggcaacg gcctggtctg tgccaagtgt 540

[1042] ttgctgacgc aacccccact ggttggggct tggccatagg ccatcagcgc atgcgtggaa 600

[1043] cctttgtgtc tcctctgccg atccatactg cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca 660

[1044] gcaggtctgg agcaaacctc atcgggaccg acaattctgt cgtactctcc cgcaagtata 720

[1045] catcgtttcc atggctgcta ggctgtgctg ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg 780

[1046] tttacgtccc gtcggcgctg aatcccgcgg acgacccctc ccggggccgc ttggggctct 840

[1047] accgcccgct tctccgtctg ccgtaccgtc cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg 900

[1048] actccccgtc tgtgccttct catctgccgg accgtgtgca cttcgcttca cctctgcacg 960

[1049] tcgcatggag gccaccgtga acgcccaccg gaacctgccc aaggtcttgc ataagaggac 1020

[1050] tcttggactt tcagcaatgt catctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt 1080
[1051] gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa 1140
[1052] acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc tggctgccat 1200
[1053] gaacaaaggt tggctataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg ctgtccattc 1260
[1054] cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagattttt tttatatttt gttttgtgtt 1320
[1055] attttttttct ttaacatccc taaaattttc cttacatgtt ttactagcca gatttttcct 1380
[1056] cctctcctga ctactcccag tcatagctgt ccctcttctc ttatggagat cgaagacagt 1440
[1057] cag 1443
[1058] <210> 53
[1059] <211> 920
[1060] <212> DNA
[1061] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1062] <220>
[1063] <221>
[1064] <222>
[1065] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒14完整5’
[1066] <400> 53
[1067] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
[1068] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120
[1069] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
[1070] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
[1071] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
[1072] accatgctga tgcggttttg gcagtacacc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg 360
[1073] ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa 420
[1074] cgggactttc caaaatgtcg taataacccc gccccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt 480
[1075] gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga 540
[1076] ggccatccac gctgttttga cctccatagt ggacaccggg accgatccag cctccgcggc 600
[1077] cgggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga gtgaccctgg cagaactcgg 660
[1078] taagtctgtt gacatgtatg tgatgtatac taacctgcat gggacgtgga tttacttgtg 720
[1079] tatgtcagat agagtaaaga ttaactcttg catgtgagcg gggcatcgag atagcgataa 780
[1080] atgagtcagg aggacggata cttatatgtg ttgttatcct cctctacagt caaacagatt 840
[1081] aagcgtctca ggggagatct agcttgcttg ttctttttgc agaagctcag aataaacgct 900
[1082] caactttggc cgccaccatg 920
[1083] <210> 54
[1084] <211> 1821
[1085] <212> DNA
[1086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1087] <220>
[1088] <221>
[1089] <222>
[1090] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒14完整3’
[1091] <400> 54

[1092] ctgttctcat cacatcatat caaggttata taccatcaat attgccacag atgttactta 60
[1093] gccttttaat atttctctaa tttagtgtat atgcaatgat agttctctga tttctgagat 120
[1094] tgagtttctc atgtgtaatg attatttaga gtttctcttt catctgttca aatttttgtc 180
[1095] tagttttatt ttttactgat ttgtaagact tctttttata atctgcatat tacaattctc 240
[1096] tttactgggg tgttgcaaat attttctgtc attctatggc ctgacttttc ttaatggttt 300
[1097] tttaatttta aaaataagtc ttaatattca tgcaatctaa ttaacaatct tttctttgtg 360
[1098] gttaggactt tgagtcataa gaaatttttc tctacactga agtcatgatg gcatgcttct 420
[1099] atattatttt ctaaaagatt taaagttttg ccttctccat ttagacttat aattcactgg 480
[1100] aatttttttg tgtgtatggt atgacatatg ggttcccttt tatttttttac atataaatat 540
[1101] atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat 600
[1102] ttttttcata ggtcacttac atatatcaat gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta 660
[1103] tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg 720
[1104] gaacattctt tcccattttg ttctacaaga atatttttgt tattgtcttt gggctttcta 780
[1105] tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta cctaggaaaa ctgtcttcat aatcaacctc 840
[1106] tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc 900
[1107] tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt atggctttca 960
[1108] ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg tggcccgttg 1020
[1109] tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca 1080
[1110] ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt ccccctccct attgccacgg 1140
[1111] cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggcactg 1200
[1112] acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg 1260
[1113] ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg 1320
[1114] accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcctctt cgccttcgcc 1380
[1115] ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgca tctggctaat aaaggaaatt 1440
[1116] tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcactcggaa ggacatatgg 1500
[1117] gagggcaaat catttaaaac atcagaatga gtatttggtt tagagtttgg caacatatgc 1560
[1118] ccatatgctg gctgccatga acaaaggttg gctataaaga ggtcatcagt atatgaaaca 1620
[1119] gccccctgct gtccattcct tattccatag aaaagccttg acttgaggtt agatttttt 1680
[1120] tatattttgt tttgtgttat ttttttcttt aacatcccta aaattttcct tacatgtttt 1740
[1121] actagccaga tttttcctcc tctcctgact actcccagtc atagctgtcc ctcttctctt 1800
[1122] atggagatcg aagacagtca g 1821
[1123] <210> 55
[1124] <211> 643
[1125] <212> DNA
[1126] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1127] <220>
[1128] <221>
[1129] <222>
[1130] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒15完整5’
[1131] <400> 55
[1132] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
[1133] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120

[1134] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
[1135] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
[1136] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
[1137] accatgctga tgcggttttg gcagtacacc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg 360
[1138] ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa 420
[1139] cgggactttc caaaatgtcg taataacccc gccccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt 480
[1140] gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga 540
[1141] ggccatccac gctgttttga cctccatagt ggacaccggg accgatccag cctccgcgtc 600
[1142] tcaggggaga tctacaccca agctgtctag agccgccacc atg 643
[1143] <210> 56
[1144] <211> 1953
[1145] <212> DNA
[1146] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1147] <220>
[1148] <221>
[1149] <222>
[1150] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒15完整3’
[1151] <400> 56
[1152] ctgttctcat cacatcatat caaggttata taccatcaat attgccacag atgttactta 60
[1153] gccttttaat atttctctaa tttagtgtat atgcaatgat agttctctga tttctgagat 120
[1154] tgagtttctc atgtgtaatg attatttaga gtttctcttt catctgttca aatttttgtc 180
[1155] tagttttatt ttttactgat ttgtaagact tctttttata atctgcatat tacaattctc 240
[1156] tttactgggg tgttgcaaat attttctgtc attctatggc ctgacttttc ttaatggttt 300
[1157] tttaatttta aaaataagtc ttaatattca tgcaatctaa ttaacaatct tttctttgtg 360
[1158] gttaggactt tgagtcataa gaaatttttc tctacactga agtcatgatg gcatgcttct 420
[1159] atattatttt ctaaaagatt taaagttttg ccttctccat ttagacttat aattcactgg 480
[1160] aatttttttg tgtgtatggt atgacatatg ggttcccttt tatttttttac atataaatat 540
[1161] atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat 600
[1162] ttttttcata ggtcacttac atatatcaat gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta 660
[1163] tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg 720
[1164] gaacattctt tcccattttg ttctacaaga atatttttgt tattgtcttt gggctttcta 780
[1165] tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta cctaggaaaa ctgtcttcat aacaggccta 840
[1166] ttgattggaa agtttgtcaa cgaattgtgg gtcttttggg gtttgctgcc ccttttacgc 900
[1167] aatgtggata tcctgcttta atgcctttat atgcatgtat acaagcaaaa caggctttta 960
[1168] ctttctcgcc aacttacaag gcctttctca gtaaacagta tatgaccctt taccccgttg 1020
[1169] ctcggcaacg gcctggtctg tgccaagtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggct 1080
[1170] tggccatagg ccatcagcgc atgcgtggaa cctttgtgtc tcctctgccg atccatactg 1140
[1171] cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca gcaggtctgg agcaaacctc atcgggaccg 1200
[1172] acaattctgt cgtactctcc cgcaagtata catcgtttcc atggctgcta ggctgtgctg 1260
[1173] ccaactggat cctgcgcggg acgtcctttg tttacgtccc gtcggcgctg aatcccgcgg 1320
[1174] acgacccctc ccggggccgc ttggggctct accgcccgct tctccgtctg ccgtaccgtc 1380
[1175] cgaccacggg gcgcacctct ctttacgcgg actccccgtc tgtgccttct catctgccgg 1440

[1176] accgtgtgca cttcgcttca cctctgcacg tcgcatggag gccaccgtga acgcccaccg 1500
[1177] gaacctgccc aaggtcttgc ataagaggac tcttggactt tcagcaatgt catctggcta 1560
[1178] ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg 1620
[1179] aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt 1680
[1180] ggcaacatat gcccatatgc tggctgccat gaacaaaggt tggctataaa gaggtcatca 1740
[1181] gtatatgaaa cagccccctg ctgtccattc cttattccat agaaaagcct tgacttgagg 1800
[1182] ttagattttt tttatatttt gttttgtgtt atttttttct ttaacatccc taaaattttc 1860
[1183] cttacatgtt ttactagcca gatttttcct cctctcctga ctactcccag tcatagctgt 1920
[1184] ccctcttctc ttatggagat cgaagacagt cag 1953
[1185] <210> 57
[1186] <211> 673
[1187] <212> DNA
[1188] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1189] <220>
[1190] <221>
[1191] <222>
[1192] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒16完整5’
[1193] <400> 57
[1194] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
[1195] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120
[1196] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
[1197] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
[1198] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
[1199] accatgctga tgcggttttg gcagtacacc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg 360
[1200] ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa 420
[1201] cgggactttc caaaatgtcg taataacccc gccccgttga cgcaaatggg cggtaggcgt 480
[1202] gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgcctggaga 540
[1203] ggccatccac gctgttttga cctccatagt ggacaccggg accgatccag cctccgcgtc 600
[1204] tcaggggaga tctagcttgc ttgttctttt tgcagaagct cagaataaac gctcaacttt 660
[1205] ggccgccacc atg 673
[1206] <210> 58
[1207] <211> 1690
[1208] <212> DNA
[1209] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1210] <220>
[1211] <221>
[1212] <222>
[1213] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒16完整3’
[1214] <400> 58
[1215] ctgttctcat cacatcatat caaggttata taccatcaat attgccacag atgttactta 60
[1216] gccttttaat atttctctaa tttagtgtat atgcaatgat agttctctga tttctgagat 120
[1217] tgagtttctc atgtgtaatg attatttaga gtttctcttt catctgttca aatttttgtc 180

[1218] tagttttatt ttttactgat ttgtaagact tctttttata atctgcatat tacaattctc 240
[1219] tttactgggg tgttgcaaat attttctgtc attctatggc ctgacttttc ttaatggttt 300
[1220] tttaatttta aaaataagtc ttaatattca tgcaatctaa ttaacaatct tttctttgtg 360
[1221] gttaggactt tgagtcataa gaaatttttc tctacactga agtcatgatg gcatgcttct 420
[1222] atattatttt ctaaaagatt taaagttttg ccttctccat ttagacttat aattcactgg 480
[1223] aatttttttg tgtgtatggt atgacatatg ggttcccttt tatttttttac atataaatat 540
[1224] atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat 600
[1225] ttttttcata ggtcacttac atatatcaat gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta 660
[1226] tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg 720
[1227] gaacattctt tcccattttg ttctacaaga atatttttgt tattgtcttt gggctttcta 780
[1228] tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta cctaggaaaa ctgtcttcat ataatcaacc 840
[1229] tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggtattctt aactatgttg ctccttttac 900
[1230] gctatgtgga tacgctgctt taatgccttt gtatcatgct attgcttccc gtatggcttt 960
[1231] cattttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccgt 1020
[1232] tgtcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcactgt gtttgctgac gcaaccccca ctggttgggg 1080
[1233] cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg gactttcgct ttccccctcc ctattgccac 1140
[1234] ggcggaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac 1200
[1235] tgacaattcc gtggtgttgt cggggaaatc atcgtccttt ccttggctgc tcgcctgtgt 1260
[1236] tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc ccttcggccc tcaatccagc 1320
[1237] ggaccttcct tcccgcggcc tgctgccggc tctgcggcct cttccgcctc ttcgccttcg 1380
[1238] ccctcagacg agtcggatct ccctttgggc cgcctccccg catcatcttg ccagccatct 1440
[1239] gttgtttgcc cctccccccgt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt 1500
[1240] tcctaataaa atgaggaaat tgcatcgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg 1560
[1241] ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaat acaatagcag gcatgctggg 1620
[1242] gatgcggtgg gctctatggg tacccaggtg ctgaagaatt gacccggttc ctcctgggga 1680
[1243] agacagtcag 1690
[1244] <210> 59
[1245] <211> 1126
[1246] <212> DNA
[1247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1248] <220>
[1249] <221>
[1250] <222>
[1251] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒17完整5’
[1252] <400> 59
[1253] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
[1254] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120
[1255] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
[1256] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
[1257] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
[1258] accaatgacg tcgaggagaa gttccccaac tttcccgcct ctcagccttt gaaagaaaga 360
[1259] aaggggaggg ggcaggccgc gtgcagccgc gagcggtgct gggctccggc tccaattccc 420

[1260] catctcagtc gttcccaaag tcctcctgtt tcatccaagc gtgtaagggt ccccgtcctt 480
[1261] gactccctag tgtcctgctg cccacagtcc agtcctggga accagcaccg atcacctccc 540
[1262] atcgggccaa tctcagtccc ttccccccta cgtcggggcc cacacgctcg gtgcgtgccc 600
[1263] agttgaacca ggcggctgcg gaaaaaaaaa agcggggaga aagtagggcc cggctactag 660
[1264] cggttttacg ggcgcacgta gctcaggcct caagaccttg ggctgggact ggctgagcct 720
[1265] ggcgggaggc ggggtccgag tcaccgcctg ccgccgcgcc cccggtttct ataaattgag 780
[1266] cccgcagcct cccgcttcgc tctctgctcc tcctgttcga cagtcagccg catcttcttt 840
[1267] tgcgtcgcca gcctggcaga actcggtaag tctgttgaca tgtatgtgat gtatactaac 900
[1268] ctgcatggga cgtggattta cttgtgtatg tcagatagag taaagattaa ctcttgcatg 960
[1269] tgagcggggc atcgagatag cgataaatga gtcaggagga cggatactta tatgtgttgt 1020
[1270] tatcctcctc tacagtcaaa cagattaagc gtctcagggg agatctagct tgcttgttct 1080
[1271] ttttgcagaa gctcagaata aacgctcaac tttggccgcc accatg 1126
[1272] <210> 60
[1273] <211> 1126
[1274] <212> DNA
[1275] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1276] <220>
[1277] <221>
[1278] <222>
[1279] <223> 在实验室中制备一多核苷酸盒17完整3’
[1280] <400> 60
[1281] ggttcccttt tatttttac atataaatat atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga 60
[1282] tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat ttttttcata ggtcacttac atatatcaat 120
[1283] gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc 180
[1284] atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg gaacattctt tcccattttg ttctacaaga 240
[1285] atatttttgt tattgtcttt gggctttcta tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta 300
[1286] cctaggaaaa ctgtcttcat aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg 360
[1287] gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt 420
[1288] atcatgctat tgcttcccgt atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc 480
[1289] tgtctcttta tgaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt 540
[1290] ttgctgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga 600
[1291] ctttcgcttt ccccctccct attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct 660
[1292] gctggacagg ggctcggctg ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat 720
[1293] cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct 780
[1294] gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc 840
[1295] tgcggcctct tccgcctctt cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg 900
[1296] cctccccgca tcctgcccgg gtggcatccc tgtgacccct ccccagtgcc tctcctggcc 960
[1297] ctggaagttg ccactccagt gcccaccagc cttgtcctaa taaaattaag ttgcatcatt 1020
[1298] ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atggggtgga ggggggtggt atggagcaag 1080
[1299] gggcccaagt tgggaagaaa cctgtagggc ctgcgaagac agtcag 1126
[1300] <210> 61
[1301] <211> 820

[1302] <212> DNA
[1303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1304] <220>
[1305] <221>
[1306] <222>
[1307] <223> 在实验室中制备—多核苷酸盒18完整5’
[1308] <400> 61
[1309] ctctggagac gacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgccca 60
[1310] ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt 120
[1311] caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 180
[1312] ccaagtccgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag 240
[1313] tacatgacct tacgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 300
[1314] accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca 360
[1315] cccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcgggggg 420
[1316] gggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga 480
[1317] ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg 540
[1318] cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cggcgtctca ggggagatct 600
[1319] ggtgaggtgt ggcaggcttg agatccagct gttggggtga gtactccctc tcaaaagcgg 660
[1320] gcattacttc tgcgctaaga ttgtcagttt ccaaaaacga ggaggatttg atattcacct 720
[1321] ggcccgatct ggccatacac ttgagtgaca atgacatcca ctttgccttt ctctccacag 780
[1322] gtgtccactc ccaggtccaa gtttaaacgc cgccaccatg 820
[1323] <210> 62
[1324] <211> 1091
[1325] <212> DNA
[1326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1327] <220>
[1328] <221>
[1329] <222>
[1330] <223> 在实验室中制备—多核苷酸盒18完整3’
[1331] <400> 62
[1332] ctgttctcat cacatcatat caaggttata taccatcaat attgccacag atgttactta 60
[1333] gccttttaat atttctctaa tttagtgtat atgcaatgat agttctctga tttctgagat 120
[1334] tgagtttctc atgtgtaatg attatttaga gtttctcttt catctgttca aatttttgtc 180
[1335] tagttttatt ttttactgat ttgtaagact tctttttata atctgcatat tacaattctc 240
[1336] tttactgggg tgttgcaaat attttctgtc attctatggc ctgacttttc ttaatggttt 300
[1337] tttaatttta aaaataagtc ttaatattca tgcaatctaa ttaacaatct tttctttgtg 360
[1338] gttaggactt tgagtcataa gaaatttttc tctacactga agtcatgatg gcatgcttct 420
[1339] atattatttt ctaaaagatt taaagttttg ccttctccat ttagacttat aattcactgg 480
[1340] aatttttttg tgtgtatggt atgacatatg ggttcccttt tatttttttac atataaatat 540
[1341] atttccctgt ttttctaaaa aagaaaaaga tcatcatttt cccattgtaa aatgccatat 600
[1342] ttttttcata ggtcacttac atatatcaat gggtctgttt ctgagctcta ctctatttta 660
[1343] tcagcctcac tgtctatccc cacacatctc atgctttgct ctaaatcttg atatttagtg 720

[1344] gaacattctt tcccattttg ttctacaaga atatttttgt tattgtcttt gggctttcta 780
[1345] tatacatttt gaaatgaggt tgacaagtta cctaggaaaa ctgtcttctt gccagccatc 840
[1346] tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct 900
[1347] ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg 960
[1348] gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa tacaatagca ggcatgctgg 1020
[1349] ggatgcggtg ggctctatgg gtacccaggt gctgaagaat tgacccggtt cctcctgggg 1080
[1350] aagacagtca g 1091
[1351] <210> 63
[1352] <400> 63
[1353] 000
[1354] <210> 64
[1355] <211> 151
[1356] <212> DNA
[1357] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1358] <220>
[1359] <221>
[1360] <222>
[1361] <223> 在实验室中制备一盒7增强子启动子接头
[1362] <400> 64
[1363] gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat 60
[1364] ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt cgaggtgagc cccacgttct gcttcactct 120
[1365] ccccatctcc ccccccctccc cacccccaat t 151
[1366] <210> 65
[1367] <211> 151
[1368] <212> DNA
[1369] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1370] <220>
[1371] <221>
[1372] <222>
[1373] <223> 在实验室中制备一盒7启动子内含子接头
[1374] <400> 65
[1375] tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg 60
[1376] cgcggcgggc gggagtcgct gcgcgctgcc ttcgccccgt gccccgctcc gccgccgcct 120
[1377] cgcgccgccc gccccggctc tgactgaccg c 151
[1378] <210> 66
[1379] <211> 86
[1380] <212> DNA
[1381] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1382] <220>
[1383] <221>
[1384] <222>
[1385] <223> 在实验室中制备一盒7内含子5'UTR接头

[1386] <400> 66

[1387] agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca ttttggcaaa gaattcggct 60

[1388] tgatcgaagc cgtctcaggg gagatc 86

[1389] <210> 67

[1390] <211> 41

[1391] <212> DNA

[1392] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1393] <220>

[1394] <221>

[1395] <222>

[1396] <223> 在实验室中制备一盒7 UTR Kozak接头

[1397] <400> 67

[1398] tttttgcaga agctcagaat aaacgctcaa ctttggccgc c 41

[1399] <210> 68

[1400] <211> 90

[1401] <212> DNA

[1402] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1403] <220>

[1404] <221>

[1405] <222>

[1406] <223> 在实验室中制备一盒7增强子RNA输出接头

[1407] <400> 68

[1408] ccctgttttt ctaaaaaaga cctaggaaaa ctgtcttcat aacaggccta ttgattggaa 60

[1409] agtttgtcaa cgaattgtgg gtcttttggg 90

[1410] <210> 69

[1411] <211> 90

[1412] <212> DNA

[1413] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1414] <220>

[1415] <221>

[1416] <222>

[1417] <223> 在实验室中制备一盒7 RNA输出PolyA接头

[1418] <400> 69

[1419] ccctgttttt ctaaaaaaga cctaggaaaa ctgtcttcat aacaggccta ttgattggaa 60

[1420] agtttgtcaa cgaattgtgg gtcttttggg 90

[1421] <210> 70

[1422] <211> 100

[1423] <212> DNA

[1424] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1425] <220>

[1426] <221>

[1427] <222>

[1428] <223> 在实验室中制备一盒10增强子启动子接头

[1429] <400> 70

[1430] cgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac cagcacatcg 60

[1431] cccacagtcc ccgagaagtt gggggggaggg gtcggcaatt 100

[1432] <210> 71

[1433] <211> 120

[1434] <212> DNA

[1435] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1436] <220>

[1437] <221>

[1438] <222>

[1439] <223> 在实验室中制备一盒10启动子内含子接头

[1440] <400> 71

[1441] gggtggggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg aacgttcttt ttcgcaacgg 60

[1442] gtttgccgcc agaacacagg taagtgccgt gtgtggttcc cgcgggcctg gcctctttac 120

[1443] <210> 72

[1444] <211> 55

[1445] <212> DNA

[1446] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1447] <220>

[1448] <221>

[1449] <222>

[1450] <223> 在实验室中制备一盒10内含子UTR

[1451] <400> 72

[1452] gacagtggtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcc tgaacacgtc tcagg 55

[1453] <210> 73

[1454] <211> 15

[1455] <212> DNA

[1456] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1457] <220>

[1458] <221>

[1459] <222>

[1460] <223> 在实验室中制备一盒10 UTR Kozak接头

[1461] <400> 73

[1462] agctgtctag agccg 15

[1463] <210> 74

[1464] <211> 146

[1465] <212> DNA

[1466] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1467] <220>

[1468] <221>

[1469] <222>

[1470] <223> 在实验室中制备一盒10增强子RNA输出接头

[1471] <400> 74

[1472] gtctttgggc tttctatata cattttgaaa tgaggttgac aagttaccta ggaaaactgt 60

[1473] cttcatataa tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact 120

[1474] atgttgctcc ttttacgcta tgtgga 146

[1475] <210> 75

[1476] <211> 98

[1477] <212> DNA

[1478] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1479] <220>

[1480] <221>

[1481] <222>

[1482] <223> 在实验室中制备一盒10 RNA输出PolyA接头

[1483] <400> 75

[1484] cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgcatca tcttgccagc 60

[1485] catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgacc 98

[1486] <210> 76

[1487] <211> 68

[1488] <212> DNA

[1489] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1490] <220>

[1491] <221>

[1492] <222>

[1493] <223> 在实验室中制备一盒11 TPL增强子接头

[1494] <400> 76

[1495] aggcggtctt gagacggcgg atggtcgagg tgaggtgtgg caggcttgag atccagctgt 60

[1496] tggggtga 68

[1497] <210> 77

[1498] <211> 129

[1499] <212> DNA

[1500] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1501] <220>

[1502] <221>

[1503] <222>

[1504] <223> 在实验室中制备一盒11启动子TPL接头

[1505] <400> 77

[1506] cgctgttttg acctccatag tggacaccgg gaccgatcca gcctccgcgt ctcaggggag 60

[1507] atctcgttta gtgaaccgtc agatcctcac tctcttccgc atcgctgtct gcgagggcca 120

[1508] gctgttggg 129

[1509] <210> 78

[1510] <211> 36

[1511] <212> DNA

[1512] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1513] <220>
[1514] <221>
[1515] <222>
[1516] <223> 在实验室中制备一盒11启动子内含子接头
[1517] <400> 78
[1518] ttgatattca cctggcccga tctggccata cacttg 36
[1519] <210> 79
[1520] <211> 22
[1521] <212> DNA
[1522] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1523] <220>
[1524] <221>
[1525] <222>
[1526] <223> 在实验室中制备一盒11 UTR Kozak接头
[1527] <400> 79
[1528] cccaggtcca agtttaaacg cc 22
[1529] <210> 80
[1530] <211> 77
[1531] <212> DNA
[1532] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1533] <220>
[1534] <221>
[1535] <222>
[1536] <223> 在实验室中制备一盒11增强子PolyA接头
[1537] <400> 80
[1538] tctttgggct ttctatatac attttgaaat gaggttgaca agttacctag gaaaactgtc 60
[1539] ttcctgcccg ggtggca 77
[1540] <210> 81
[1541] <211> 149
[1542] <212> DNA
[1543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1544] <220>
[1545] <221>
[1546] <222>
[1547] <223> 在实验室中制备一盒12启动子TPL接头
[1548] <400> 81
[1549] tcagatcgcc tggagaggcc atccacgctg ttttgacctc catagtggac accgggaccg 60
[1550] atccagcctc cgcgtctcag gggagatctc gtttagtgaa ccgtcagatc ctcactctct 120
[1551] tccgcatcgc tgtctgcgag ggccagctg 149
[1552] <210> 82
[1553] <211> 95

[1554] <212> DNA
[1555] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1556] <220>
[1557] <221>
[1558] <222>
[1559] <223> 在实验室中制备一盒12 TPL增强子接头
[1560] <400> 82
[1561] gatgtaatta aagtaggcgg tcttgagacg gcggatggtc gaggtgaggt gtggcaggct 60
[1562] tgagatccag ctgttggggt gagtactccc tctca 95
[1563] <210> 83
[1564] <211> 41
[1565] <212> DNA
[1566] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1567] <220>
[1568] <221>
[1569] <222>
[1570] <223> 在实验室中制备一盒12增强子内含子接头
[1571] <400> 83
[1572] gatttgatat tcacctggcc cgatctggcc atacacttga g 41
[1573] <210> 84
[1574] <211> 29
[1575] <212> DNA
[1576] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1577] <220>
[1578] <221>
[1579] <222>
[1580] <223> 在实验室中制备一盒12 UTR Kozak接头
[1581] <400> 84
[1582] tgtccactcc caggtccaag tttaaacgc 29
[1583] <210> 85
[1584] <211> 76
[1585] <212> DNA
[1586] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1587] <220>
[1588] <221>
[1589] <222>
[1590] <223> 在实验室中制备一盒12增强子RNA输出接头
[1591] <400> 85
[1592] tgtttttcta aaaaagacct aggaaaactg tcttcataac aggcctattg attggaaagt 60
[1593] ttgtcaacga attgtg 76
[1594] <210> 86
[1595] <211> 110

[1596] <212> DNA
[1597] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1598] <220>
[1599] <221>
[1600] <222>
[1601] <223> 在实验室中制备一盒12 RNA输出PolyA接头
[1602] <400> 86
[1603] aaggtcttgc ataagaggac tcttggactt tcagcaatgt catcttgcca gccatctgtt 60
[1604] gtttgcccct ccccccgtgcc ttccttgacc ctggaaggtg ccactcccac 110
[1605] <210> 87
[1606] <211> 110
[1607] <212> DNA
[1608] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1609] <220>
[1610] <221>
[1611] <222>
[1612] <223> 在实验室中制备一盒13启动子增强子接头
[1613] <400> 87
[1614] gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcggcgtct caggggagat ctggtgaggt 60
[1615] gtggcaggct tgagatccag ctgttggggt gagtactccc tctcaaaagc 110
[1616] <210> 88
[1617] <211> 44
[1618] <212> DNA
[1619] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1620] <220>
[1621] <221>
[1622] <222>
[1623] <223> 在实验室中制备一盒13增强子内含子接头
[1624] <400> 88
[1625] ggaggatttg atattcacct ggcccgatct ggccatacac ttga 44
[1626] <210> 89
[1627] <211> 49
[1628] <212> DNA
[1629] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1630] <220>
[1631] <221>
[1632] <222>
[1633] <223> 在实验室中制备一盒13内含子Kozak接头
[1634] <400> 89
[1635] cctttctctc cacaggtgtc cactcccagg tccaagttta aacgccgcc 49
[1636] <210> 90
[1637] <211> 129

[1638] <212> DNA
[1639] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1640] <220>
[1641] <221>
[1642] <222>
[1643] <223> 在实验室中制备一盒13增强子RNA输出接头
[1644] <400> 90
[1645] attgtctttg ggctttctat atacattttg aaatgaggtt gacaagttac ctaggaaaac 60
[1646] tgtcttcata acaggcctat tgattggaaa gtttgtcaac gaattgtggg tcttttgggg 120
[1647] tttgctgcc 129
[1648] <210> 91
[1649] <211> 110
[1650] <212> DNA
[1651] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1652] <220>
[1653] <221>
[1654] <222>
[1655] <223> 在实验室中制备一盒13 RNA输出PolyA接头
[1656] <400> 91
[1657] cctgcccaag gtcttgcata agaggactct tggactttca gcaatgtcat ctggctaata 60
[1658] aaggaaattt attttcattg caatagtgtg ttggaatttt ttgtgtctct 110
[1659] <210> 92
[1660] <211> 94
[1661] <212> DNA
[1662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1663] <220>
[1664] <221>
[1665] <222>
[1666] <223> 在实验室中制备一盒14启动子内含子接头
[1667] <400> 92
[1668] cggtgcattg gaacgcggat tccccgtgcc aagagtgacc ctggcagaac tcggtaagtc 60
[1669] tgttgacatg tatgtgatgt atactaacct gcat 94
[1670] <210> 93
[1671] <211> 112
[1672] <212> DNA
[1673] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1674] <220>
[1675] <221>
[1676] <222>
[1677] <223> 在实验室中制备一盒14内含子Kozak接头
[1678] <400> 93
[1679] acttatatgt gttgttatcc tcctctacag tcaaacagat taagcgtctc aggggagatc 60

[1680] tagcttgctt gttctttttg cagaagctca gaataaacgc tcaactttgg cc 112

[1681] <210> 94

[1682] <211> 99

[1683] <212> DNA

[1684] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1685] <220>

[1686] <221>

[1687] <222>

[1688] <223> 在实验室中制备一盒14增强子RNA输出接头

[1689] <400> 94

[1690] gctttctata tacattttga aatgaggttg acaagttacc taggaaaact gtcttcataa 60

[1691] tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactgg 99

[1692] <210> 95

[1693] <211> 100

[1694] <212> DNA

[1695] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[1696] <220>

[1697] <221>

[1698] <222>

[1699] <223> 在实验室中制备一盒14 RNA输出PolyA接头

[1700] <400> 95

[1701] cttcgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcatctggct 60

[1702] aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttggaa 100

[1703] <210> 96

[1704] <211> 280

[1705] <212> DNA

[1706] <213> 原鸡(Gallus gallus)

[1707] <400> 96

[1708] tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctccccat ctccccccccc tccccacccc 60

[1709] caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg gggggggggg 120

[1710] gggcgcgcgc caggcggggc ggggcggggc gaggggcggg gcggggcgag gcggagaggt 180

[1711] gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtttc cttttatggc gaggcggcgg 240

[1712] cggcggcggc cctataaaaa gcgaagcgcg cggcgggcgg 280

[1713] <210> 97

[1714] <211> 973

[1715] <212> DNA

[1716] <213> 原鸡(Gallus gallus)

[1717] <400> 97

[1718] ggagtcgctg cgcgctgcct tcgccccgtg ccccgctccg ccgccgcctc gcgccgcccg 60

[1719] ccccggctct gactgaccgc gttactccca caggtgagcg ggcgggacgg cccttctcct 120

[1720] ccgggctgta attagcgctt ggtttaatga cggcttgttt cttttctgtg gctgcgtgaa 180

[1721] agccttgagg ggctccggga gggccctttg tgcgggggggg agcggctcgg ggggtgcgtg 240

[1722] cgtgtgtgtg tgcgtgggga gcgccgcgtg cggctccgcg ctgcccggcg gctgtgagcg 300

[1723] ctgcgggcgc ggcgcggggc tttgtgcgct ccgcagtgtg cgcgagggga gcgcggccgg 360

[1724] gggcggtgcc ccgcggtgcg gggggggctg cgaggggaac aaaggctgcg tgcggggtgt 420

[1725] gtgcgtgggg gggtgagcag ggggtgtggg cgcgtcggtc gggctgcaac ccccccctgca 480

[1726] ccccccctccc cgagttgctg agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtacggggcg 540

[1727] tggcgcgggg ctcgccgtgc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc 600

[1728] ggggccgcct cgggccgggg agggctcggg ggaggggcgc ggcggccccc ggagcgccgg 660

[1729] cggctgtcga ggcgcggcga gccgcagcca ttgcctttta tggtaatcgt gcgagagggc 720

[1730] gcagggactt cctttgtccc aaatctgtgc ggagccgaaa tctgggaggc gccgccgcac 780

[1731] cccctctagc gggcgcgggg cgaagcggtg cggcgccggc aggaaggaaa tgggcgggga 840

[1732] gggccttcgt gcgtcgccgc gccgccgtcc ccttctccct ctccagcctc ggggctgtcc 900

[1733] gcgggggggac ggctgccttc gggggggacg gggcagggcg gggttcggct tctggcgtgt 960

[1734] gaccggcggc tct 973

多核苷酸盒构建体

盒编号	第一增强子	启动子	内含子	5`UTR		基因	第二增强子	RNA输出	polyA
1	EF1α	EF1a		TPL	eMLP	编码序列	完整的EES	HPRE	HGH
2		EF1a	EF1α	UTR2		编码序列	410-564 EES	WPRE	HGH
3	EF1α	EF1a	EF1α	UTR2		编码序列	511-810 EES		BGH
4	EF1α	EF1a	EF1α	UTR1		编码序列	511-810 EES		β珠蛋白
5	CMV	GAPDH		UTR1		编码序列	511-810 EES	HPRE	HGH
6	CMV	GAPDH		TPL	eMLP	编码序列	410-564 EES	WPRE	β珠蛋白
7	CMV	肌动蛋白	肌动蛋白	UTR1		编码序列	410-564 EES	HPRE	BGH
8	CMV	肌动蛋白	肌动蛋白	TPL	eMLP	编码序列	410-564 EES		β珠蛋白
9	CMV	EF1a	EF1α	UTR1		编码序列	410-564 EES		HGH
10	CMV	EF1a	EF1α	UTR2		编码序列	511-810 EES	WPRE	BGH
11	CMV	CMV		TPL	eMLP	编码序列	完整的EES		HGH
12	CMV	CMV		TPL	eMLP	编码序列	410-564 EES	HPRE	BGH
13	CMV	肌动蛋白			eMLP	编码序列	511-810 EES	HPRE	β珠蛋白
14	CMV	CMV	CMVc	UTR1		编码序列	完整的EES	WPRE	β珠蛋白
15	CMV	CMV		UTR2		编码序列	完整的EES	HPRE	β珠蛋白
16	CMV	CMV		UTR1		编码序列	完整的EES	WPRE	BGH
17	CMV	GAPDH	CMVc			编码序列	511-810 EES	WPRE	HGH
18	CMV	肌动蛋白			eMLP	编码序列	完整的EES		BGH
基础质粒	CMV	EF1α	EF1α			编码序列			Rb珠蛋白

图1

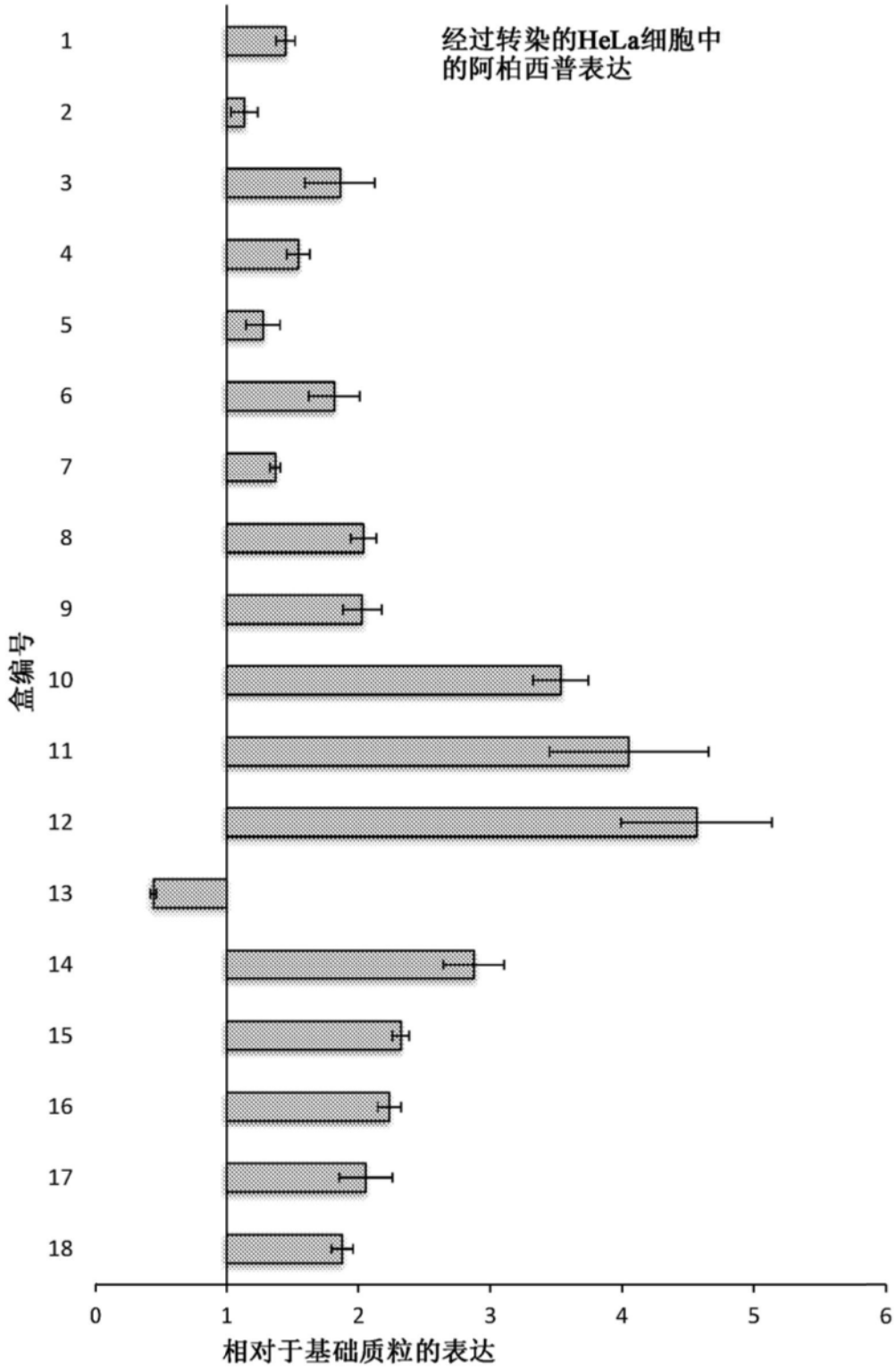

经过转染的HeLa细胞中
的阿柏西普表达
盒编号
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
0
1
2
3
4
5
6
相对于基础质粒的表达

图2

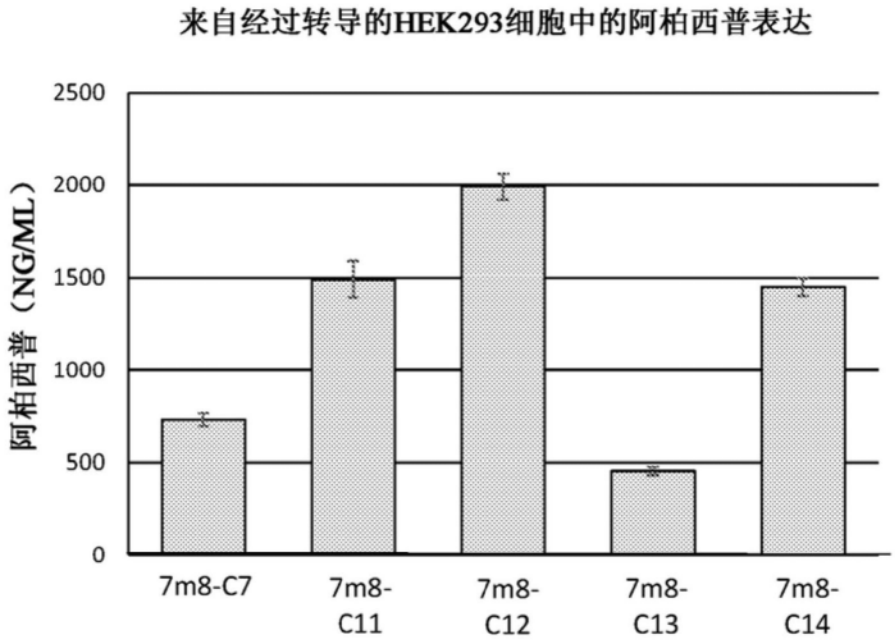

来自经过转导的HEK293细胞中的阿柏西普表达
阿柏西普（NG/ML）
2500
2000
1500
1000
500
0
7m8-C7
7m8-C11
7m8-C12
7m8-C13
7m8-C14

图3

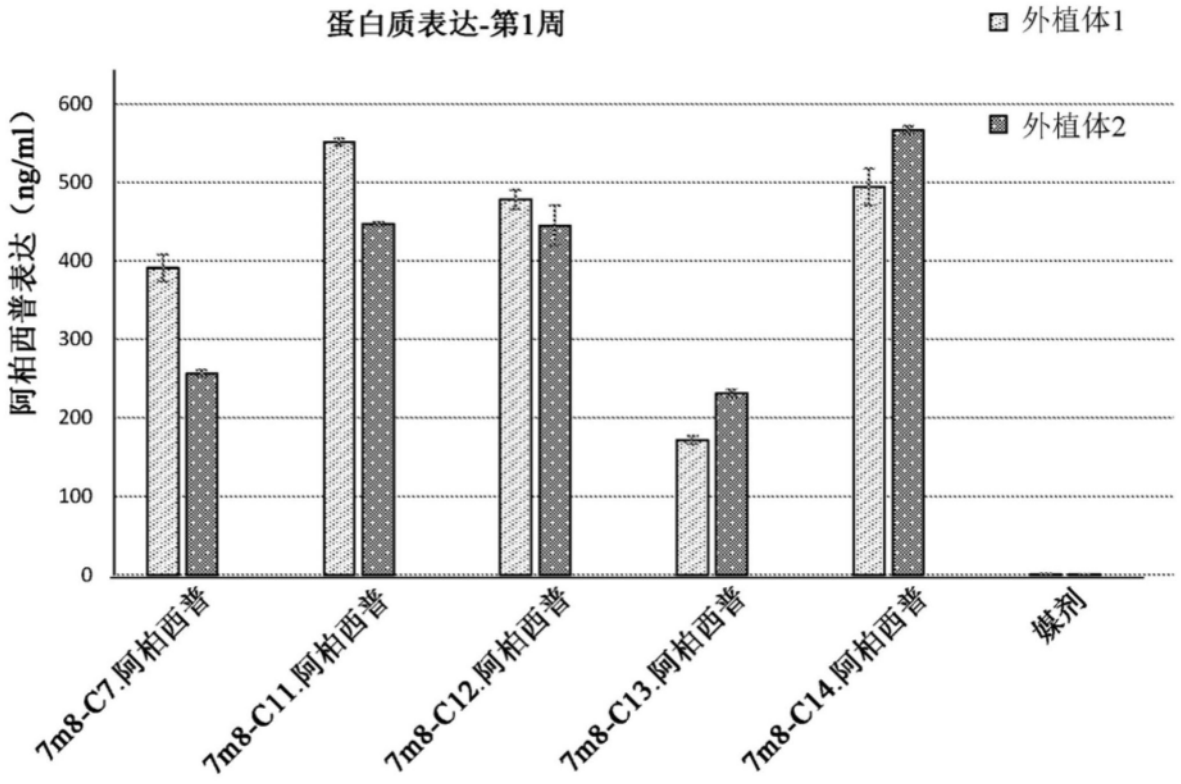

蛋白质表达-第1周
外植体1
外植体2
阿柏西普表达（ng/ml）
600
500
400
300
200
100
0
7m8-C7.阿柏西普
7m8-C11.阿柏西普
7m8-C12.阿柏西普
7m8-C13.阿柏西普
7m8-C14.阿柏西普
媒剂

图4A

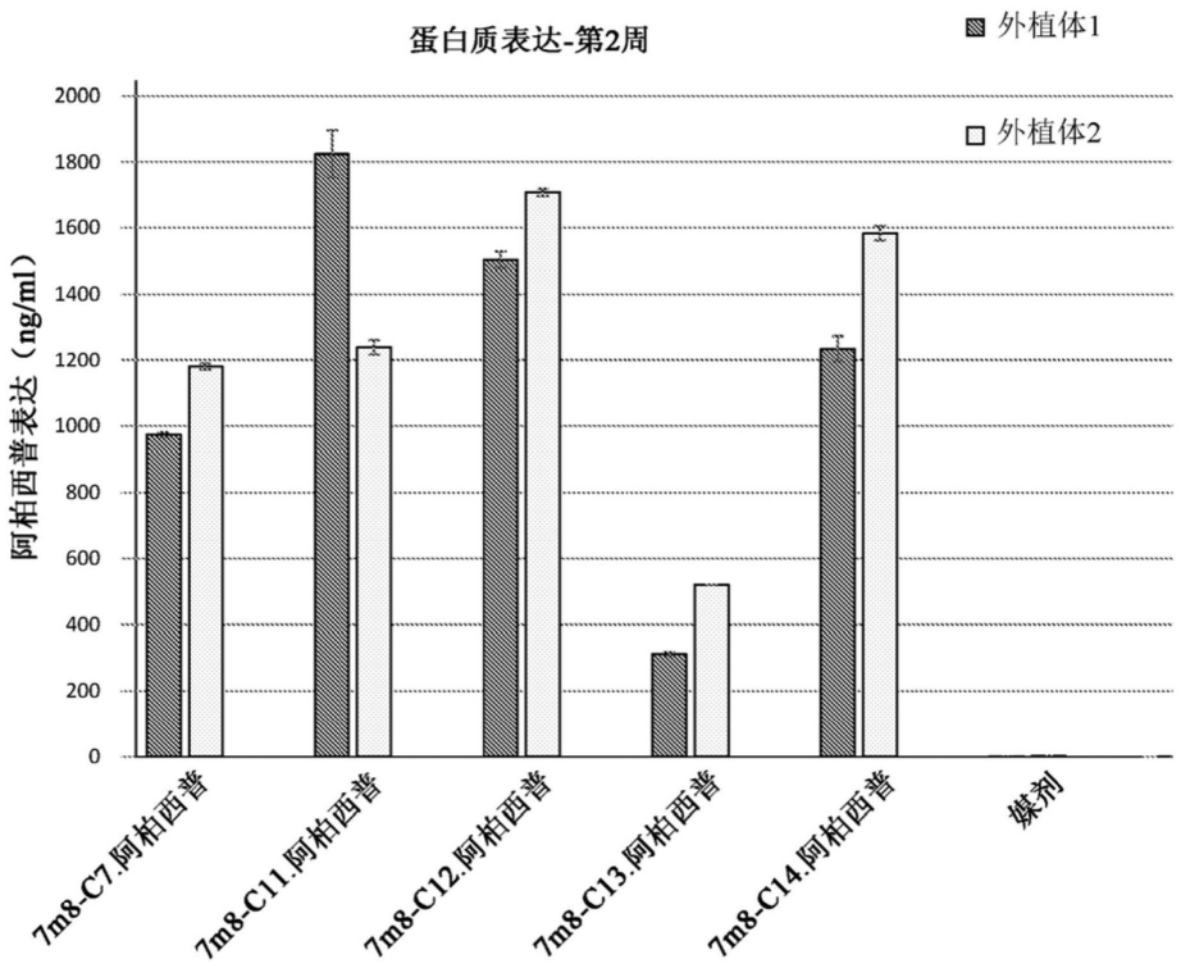

蛋白质表达-第2周
外植体1
外植体2
阿柏西普表达（ng/ml）
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
7m8-C7.阿柏西普
7m8-C11.阿柏西普
7m8-C12.阿柏西普
7m8-C13.阿柏西普
7m8-C14.阿柏西普
媒剂

图4B

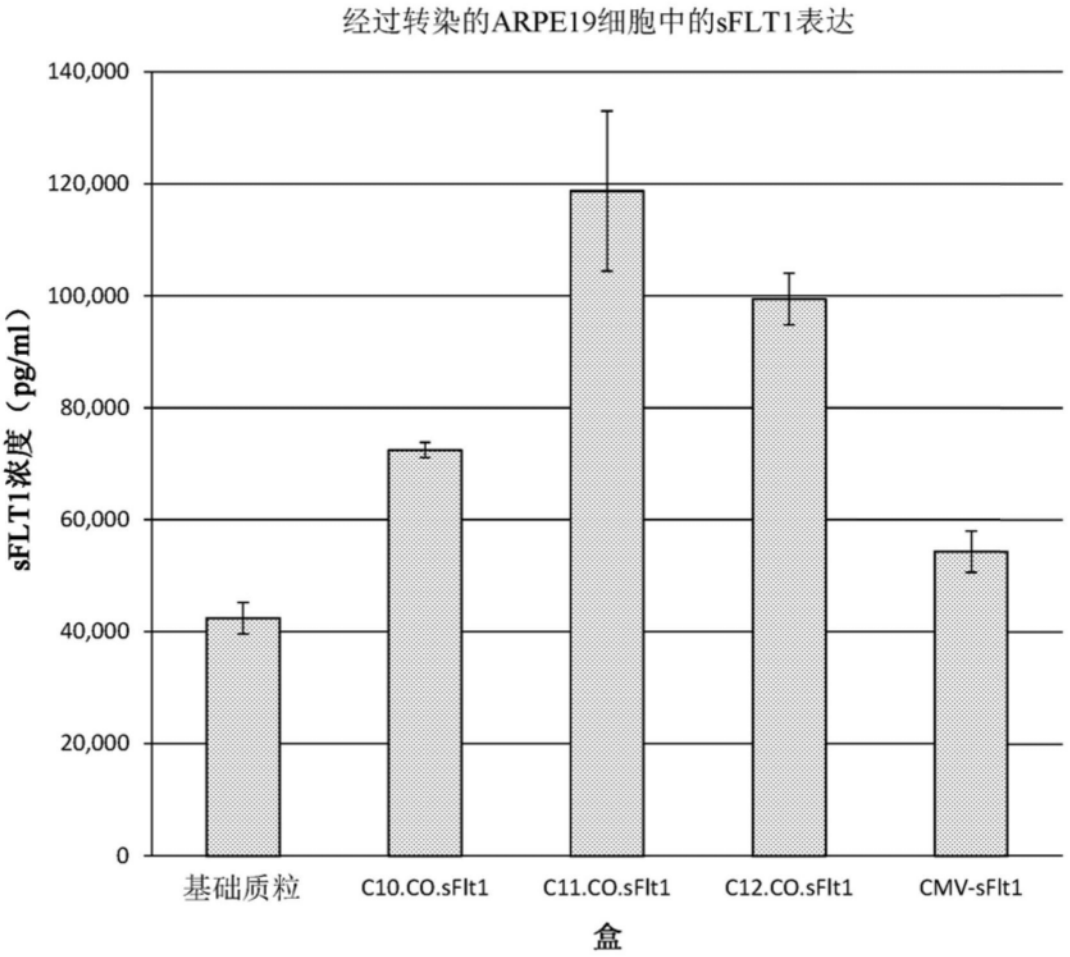

经过转染的ARPE19细胞中的sFLT1表达
sFLT1浓度（pg/ml）
140,000
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0
基础质粒
C10.CO.sFlt1
C11.CO.sFlt1
C12.CO.sFlt1
CMV-sFlt1
盒

图5

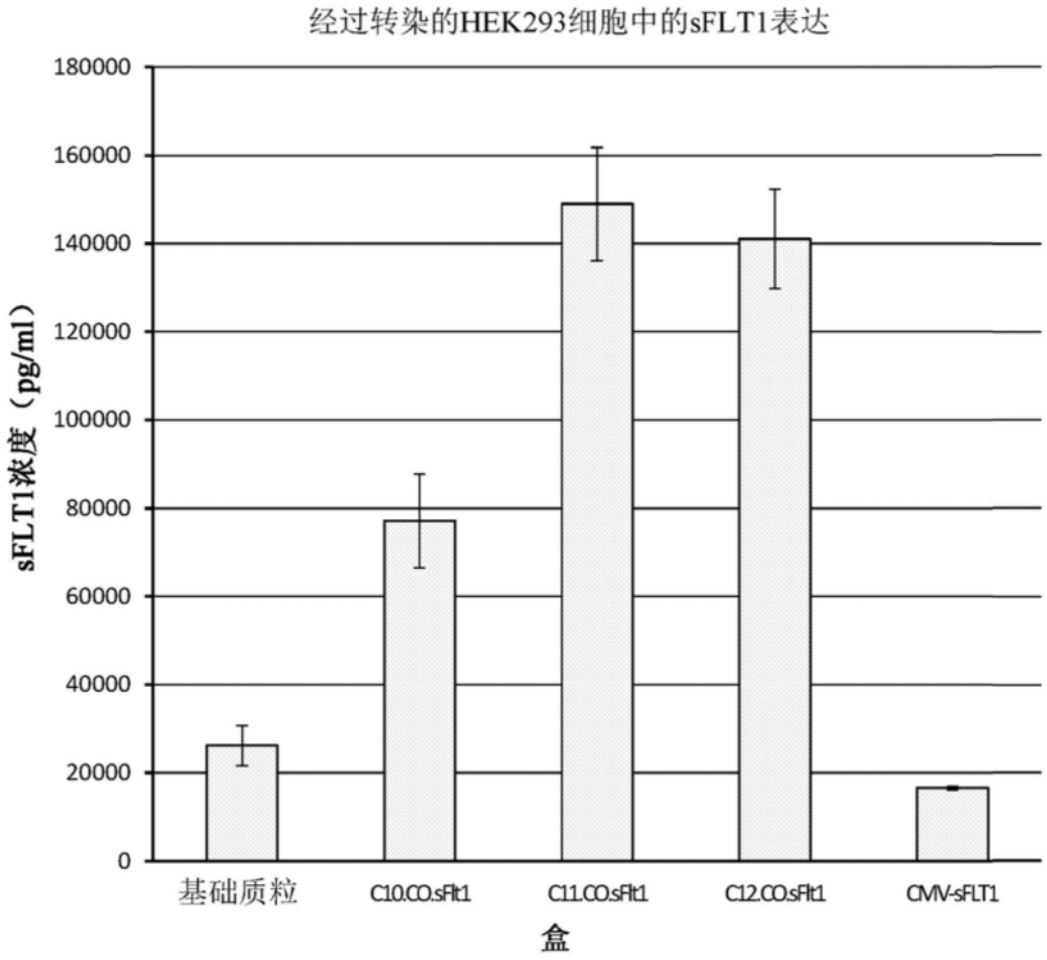

经过转染的HEK293细胞中的sFLT1表达
sFLT1浓度（pg/ml）
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
基础质粒
C10.CO.sFlt1
C11.CO.sFlt1
C12.CO.sFlt1
CMV-sFLT1
盒

图6

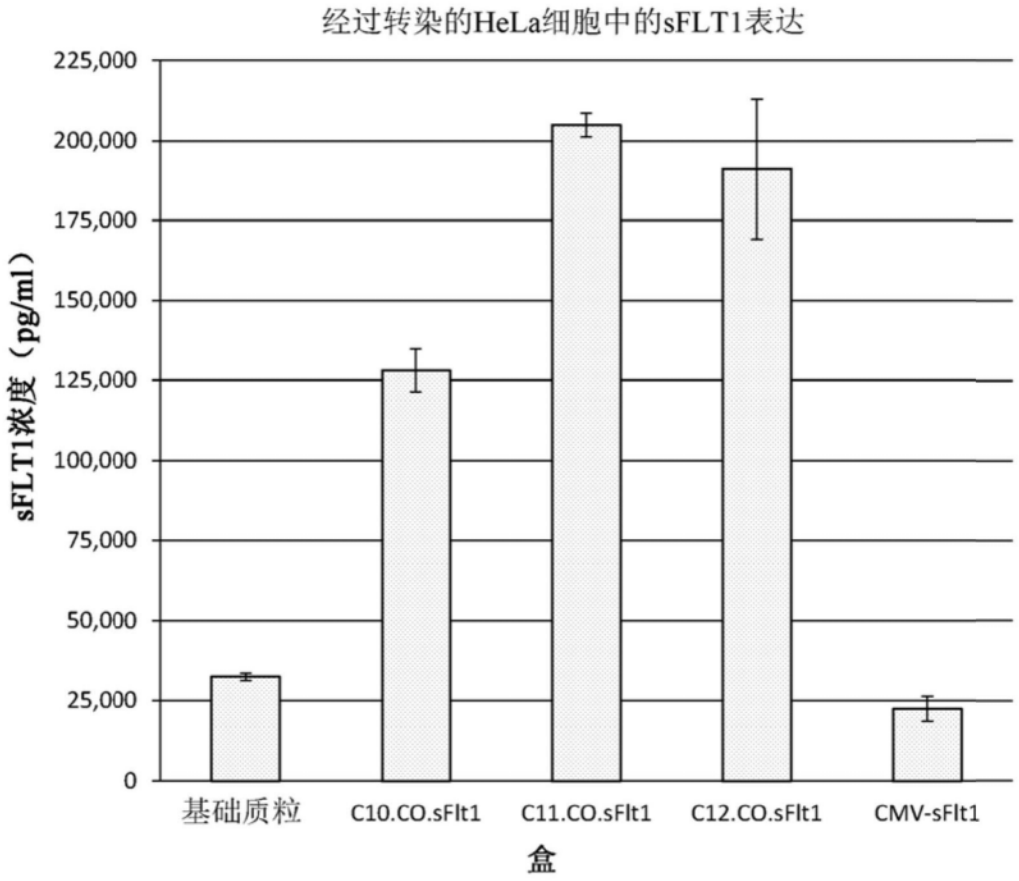

经过转染的HeLa细胞中的sFLT1表达
sFLT1浓度（pg/ml）
225,000
200,000
175,000
150,000
125,000
100,000
75,000
50,000
25,000
0
基础质粒
C10.CO.sFlt1
C11.CO.sFlt1
C12.CO.sFlt1
CMV-sFlt1
盒

图7

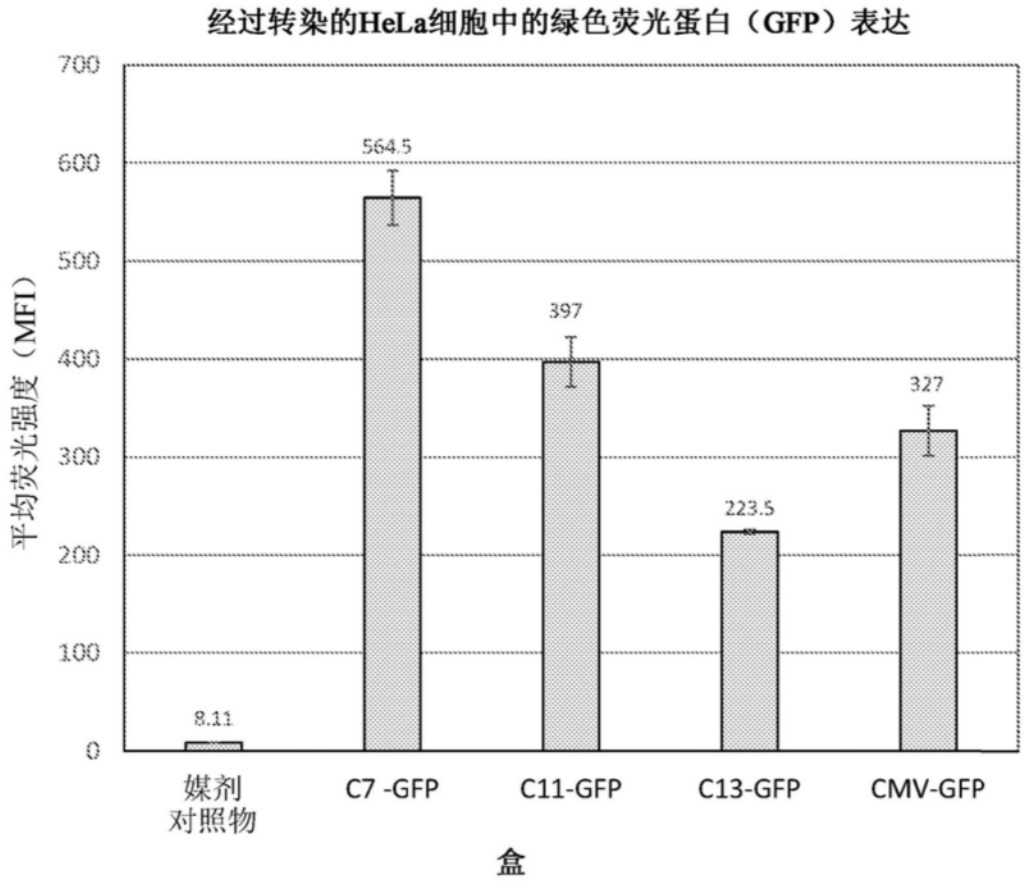

经过转染的HeLa细胞中的绿色荧光蛋白（GFP）表达
平均荧光强度（MFI）
700
600
500
400
300
200
100
0
564.5
397
327
223.5
8.11
媒剂
对照物
C7 -GFP
C11-GFP
C13-GFP
CMV-GFP
盒

图8

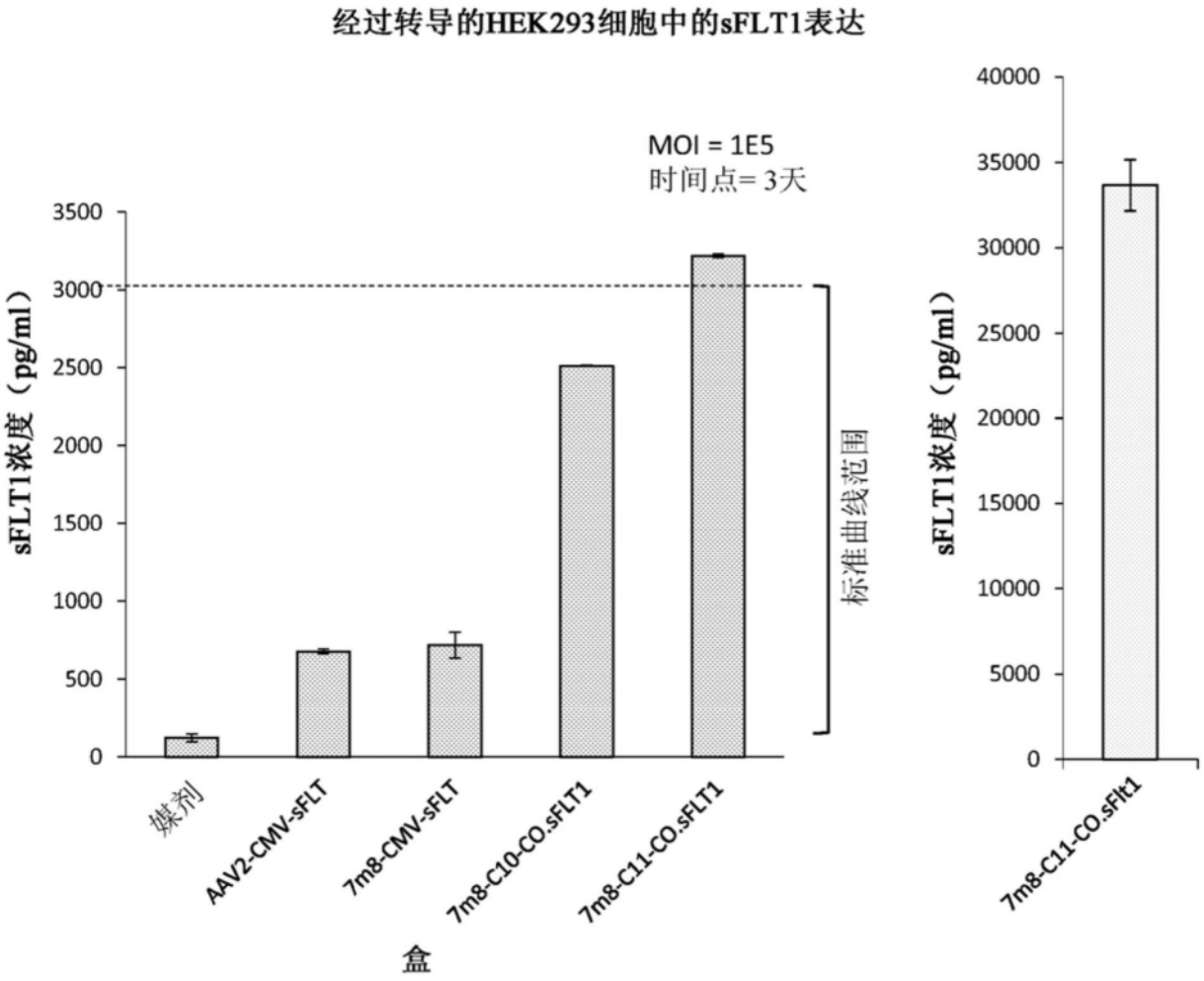

经过转导的HEK293细胞中的sFLT1表达
MOI = 1E5
时间点= 3天
sFLT1浓度（pg/ml）
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
标准曲线范围
媒剂
AAV2-CMV-sFLT
7m8-CMV-sFLT
7m8-C10-CO.sFLT1
7m8-C11-CO.sFLT1
盒
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
sFLT1浓度（pg/ml）
7m8-C11-CO.sFlt1

图9

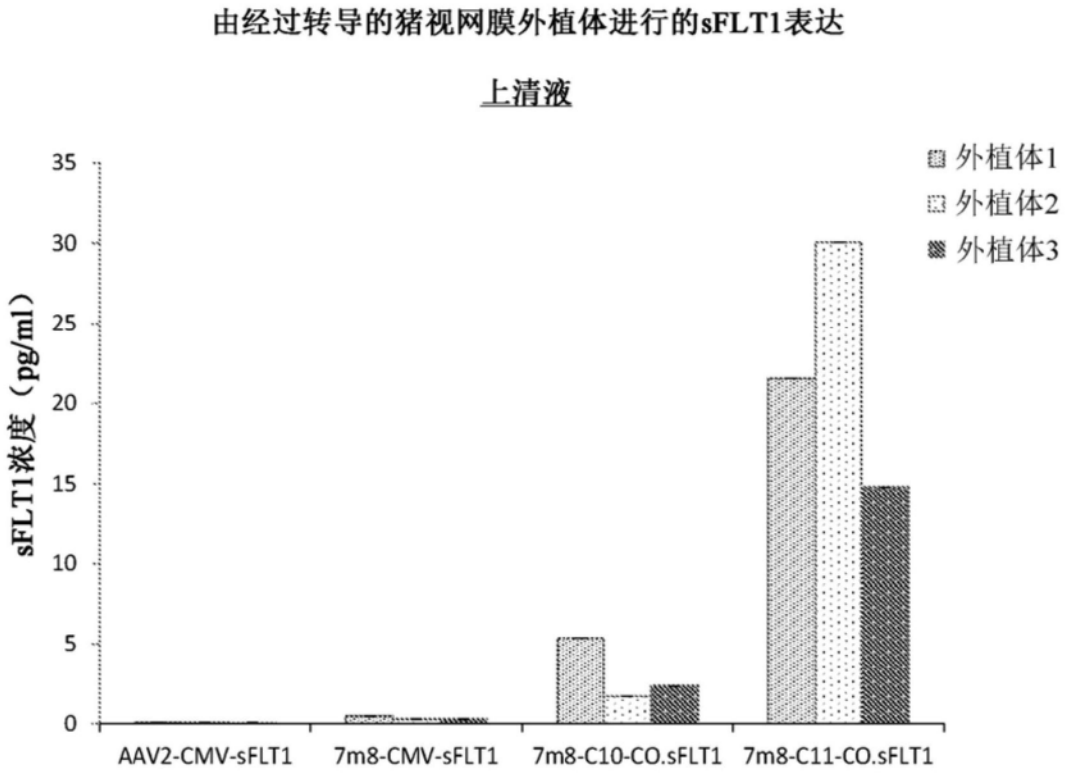

由经过转导的猪视网膜外植体进行的sFLT1表达
上清液
外植体1
外植体2
外植体3
sFLT1浓度（pg/ml）
35
30
25
20
15
10
5
0
AAV2-CMV-sFLT1
7m8-CMV-sFLT1
7m8-C10-CO.sFLT1
7m8-C11-CO.sFLT1

图10A

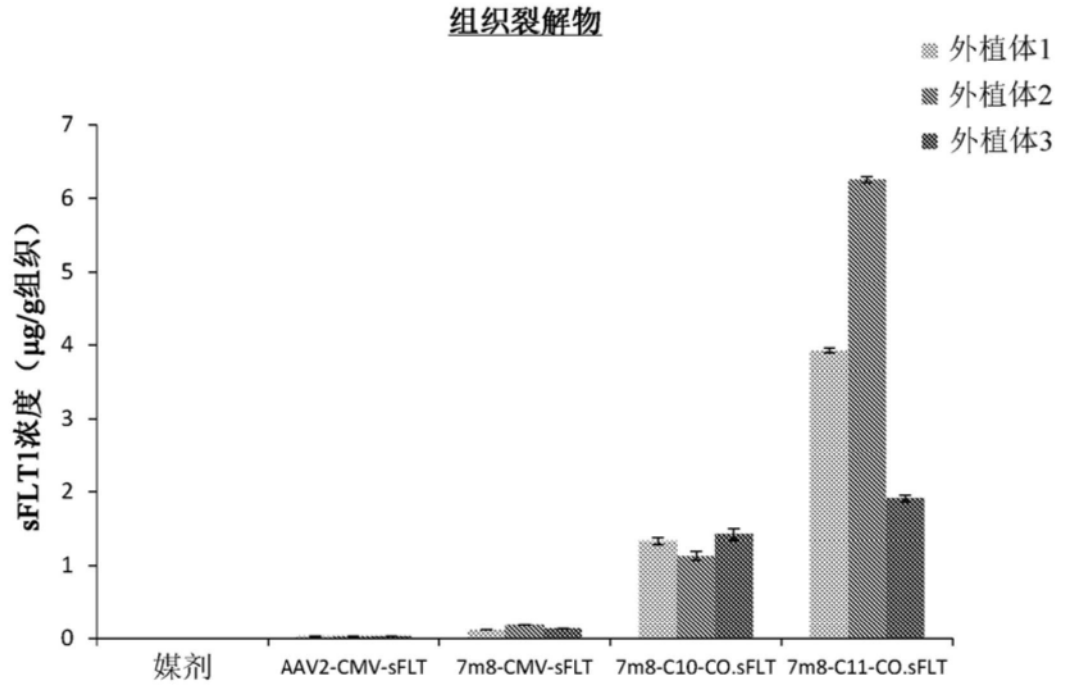

组织裂解物
外植体1
外植体2
外植体3
sFLT1浓度（μg/g组织）
7
6
5
4
3
2
1
0
媒剂
AAV2-CMV-sFLT
7m8-CMV-sFLT
7m8-C10-CO.sFLT
7m8-C11-CO.sFLT

图10B

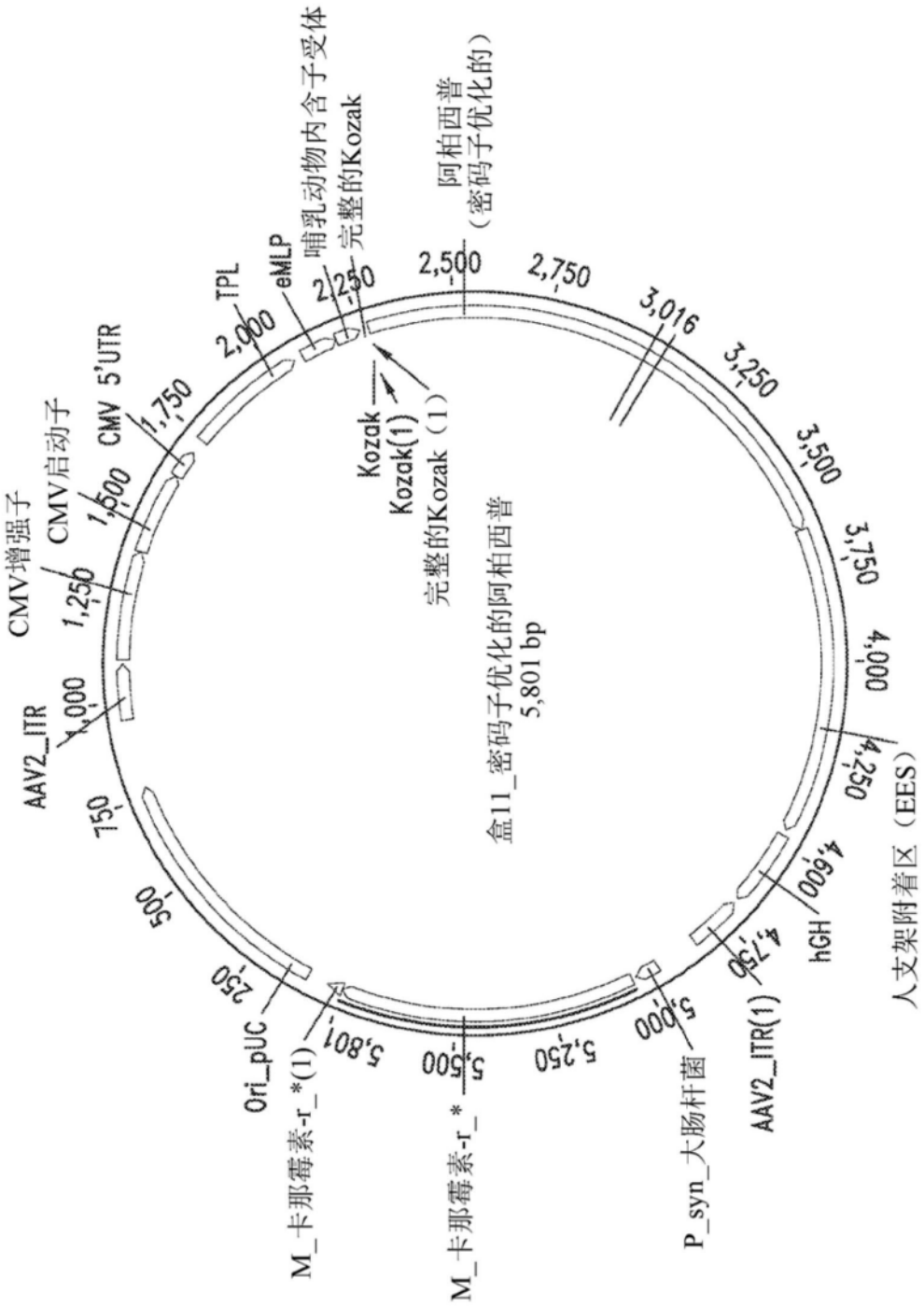

盒11_密码子优化的阿柏西普
5,801 bp
完整的Kozak
Kozak
Kozak(1)
阿柏西普
（密码子优化的）
哺乳动物内含子受体
完整的Kozak
eMLP
TPL
CMV 5'UTR
CMV启动子
CMV增强子
AAV2_ITR
Ori_pUC
M_卡那霉素-r_*(1)
M_卡那霉素-r_*
P_syn_大肠杆菌
AAV2_ITR(1)
hGH
人支架附着区（EES）

图11