202223095

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202223095 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：110121557 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/86 (2006.01)* *C12N7/00 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P31/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/06/12 美國 63/038,483
2021/02/08 美國 63/146,963

(71)申請人：美商旗艦先鋒創新公司 (美國) FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS V, INC. (US)
美國

(72)發明人：李伯 凱文 詹姆斯 LEBO, KEVIN JAMES (US)；德拉葛瑞夫 賽門 DELAGRAVE, SIMON (US)；納彎達 達南傑 馬尼克拉爾 NAWANDAR, DHANANJAY MANIKLAL (IN)；廷波納 喬瑟夫 路易斯 TIMPONA, JOSEPH LOUIS (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：26 共 533 頁

(54)名稱

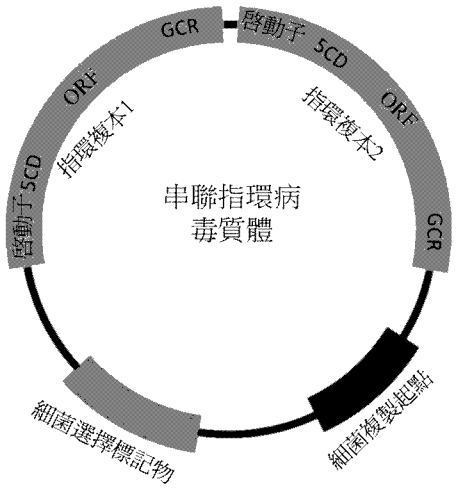
串聯指環病毒構築體

(57)摘要

本發明大體上關於用於製造指環載體(anellovector)之組合物及其用途。例如，本文中之方法可包含提供核酸構築體，該核酸構築體包含串聯排列之編碼外源性效應子之第一指環病毒(Anellovirus)基因體及第二指環病毒基因體或其片段。在一些實施例中，該核酸構築體造成產生包含編碼外源性效應子之指環病毒遺傳元件包封於蛋白質外部中的指環載體。

This invention relates generally to compositions for making anellovectors and uses thereof. For instance, a method herein can comprise providing a nucleic acid construct that comprises a first Anellovirus genome encoding an exogenous effector and a second Anellovirus genome or fragment thereof, arranged in tandem. In some embodiments, the nucleic acid contruct results in production of an anellovector comprising an Anellovirusgenetic element encoding the exogenous effector, enclosed in a proteinaceous exterior.

指定代表圖：


GCR
啓動子
5CD
ORF
GCR
細菌複製起點
細菌選擇標記物
啓動子
5CD
ORF
指環複本1
指環複本2
串聯指環病
毒質體

【圖1A】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

串聯指環病毒構築體

【英文發明名稱】

TANDEM ANELLOVIRUS CONSTRUCTS

【中文】

本發明大體上關於用於製造指環載體(anellovector)之組合物及其用途。例如，本文中之方法可包含提供核酸構築體，該核酸構築體包含串聯排列之編碼外源性效應子之第一指環病毒(Anellovirus)基因體及第二指環病毒基因體或其片段。在一些實施例中，該核酸構築體造成產生包含編碼外源性效應子之指環病毒遺傳元件包封於蛋白質外部中的指環載體。

【英文】

This invention relates generally to compositions for making anellovectors and uses thereof. For instance, a method herein can comprise providing a nucleic acid construct that comprises a first Anellovirus genome encoding an exogenous effector and a second Anellovirus genome or fragment thereof, arranged in tandem. In some embodiments, the nucleic acid contruct results in production of an anellovector comprising an *Anellovirus* genetic element encoding the exogenous effector, enclosed in a proteinaceous exterior.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

串聯指環病毒構築體

【英文發明名稱】

TANDEM ANELLOVIRUS CONSTRUCTS

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 持續需要開發用於製造適合之載體以向患者遞送治療效應子的組合物及方法。病毒載體之產生一般涉及將遺傳元件包封在蛋白質外部中。遺傳元件之產生可例如藉由首先產生包含主鏈及所需遺傳元件序列之質體來實現。隨後，主鏈序列可藉由在活體外環化(IVC)過程中進行核酸內切酶裂解接著接合來移除。然而，IVC有時對於大規模製程為不合需要的。此項技術中需要生產用於包封於蛋白質外部中之遺傳元件的新穎方法。

【發明內容】

【0002】 本發明提供用於產生指環載體(例如合成指環載體)之核酸構築體，該指環載體可以用作遞送媒劑，例如用於遞送遺傳物質、用於遞送效應子(例如有效負載)或用於遞送治療劑或治療效應子至真核細胞(例如人類細胞或人類組織)。一般而言，本文所描述之核酸構築體包含串聯排列之遺傳元件序列(例如突變體指環病毒基因體)之第一複本及遺傳元件序列(例如指環病毒基因體或其片段)之第二複本之至少一部分。具有此類結構之核酸構築體在本文中一般稱為串聯構築體。此類串聯構築體用於製造指環載體遺傳元件。在一些情況下，遺傳元件序列之第一複本及遺傳元

件序列之第二複本可彼此緊鄰於核酸構築體上。在其他情況下，遺傳元件序列之第一複本及遺傳元件序列之第二複本可例如藉由間隔序列分開。在一些實施例中，遺傳元件序列之第二複本或其部分包含上游複製促進序列(uRFS)，例如如本文中所描述。在一些實施例中，遺傳元件序列之第二複本或其部分包含下游複製促進序列(dRFS)，例如如本文中所描述。在一些實施例中，uRFS及/或dRFS包含複製起點(ORI) (例如哺乳動物ORI或昆蟲ORI)或其部分。在一些實施例中，uRFS及/或dRFS不包含複製起點。在一些實施例中，uRFS及/或dRFS包含髮夾環(例如在5' UTR中)。在一些實施例中，串聯構築體產生的遺傳元件水準高於不具有遺傳元件之第二複本或其部分的其他類似構築體。不受理論束縛，本文所描述之串聯構築體可藉由滾環複製進行複製。在一些實施例中，串聯構築體包含一或多個密碼子最佳化之開讀框(例如編碼指環病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3之序列，其中序列經密碼子最佳化，例如用於在哺乳動物細胞中表現)。

【0003】 指環載體(例如使用如本文所描述之串聯構築體產生)一般包含囊封於蛋白質外部(例如包含指環病毒衣殼蛋白例如指環病毒ORF1蛋白或由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽的蛋白質外部)之遺傳元件(例如包含或編碼效應子之遺傳元件，例如外源性或內源性效應子，例如治療效應子)，該指環載體能夠將遺傳元件引入至細胞(例如哺乳動物細胞，例如人類細胞)中。在一些實施例中，指環載體為包含蛋白質外部之感染性媒劑或粒子，該蛋白質外部包含由指環病毒ORF1核酸(例如甲型細環病毒屬(*Alphatorquevirus*)、乙型細環病毒屬(*Betatorquevirus*)或丙型細環病毒屬(*Gammatorquevirus*)之ORF1核酸，例如甲型細環病毒屬分枝系1、甲型

細環病毒屬分枝系2、甲型細環病毒屬分枝系3、甲型細環病毒屬分枝系4、甲型細環病毒屬分枝系5、甲型細環病毒屬分枝系6或甲型細環病毒屬分枝系7之ORF1)編碼的多肽。本發明之指環載體的遺傳元件通常為環形及/或單股DNA分子(例如，環形及單股)，且一般包括與包封其之蛋白質外部結合的蛋白質結合序列或與其連接之多肽，其可促進將遺傳元件包封在蛋白質外部內及/或相對於蛋白質外部內之其他核酸富集遺傳元件。在一些實施例中，如本文所描述，使用串聯構築體產生指環載體之遺傳元件。

【0004】 在一些情況下，使用遺傳元件構築體(例如如本文所描述之串聯構築體)提供遺傳元件。在一些情況下，串聯構築體可包括遺傳元件之序列之第一複本及遺傳元件之序列之第二複本或其部分(例如uRFS或dRFS)。應理解，第二複本可為第一複本之相同複本或其部分，或可包含一或多個序列差異，例如取代。在一些情況下，遺傳元件序列之第二複本或其部分(例如uRFS)相對於遺傳元件序列之第一複本定位於5'。在一些情況下，遺傳元件序列之第二複本或其部分(例如dRFS)相對於遺傳元件序列之第一複本定位於3'。在一些情況下，遺傳元件序列之第二複本或其部分及遺傳元件序列之第一複本彼此緊鄰於串聯構築體上。在一些情況下，遺傳元件序列之第二複本或其部分及遺傳元件序列之第一複本可例如藉由間隔序列分開。在一些情況下，遺傳元件構築體為環形或線性的。在一些情況下，遺傳元件為環形的。在一些情況下，遺傳元件為單股的。在一些情況下，遺傳元件為DNA。在一些實施例中，適用於包封在蛋白質外部中之遺傳元件可經由遺傳元件序列之第一複本之滾環複製產生。

【0005】 在一些情況下，遺傳元件包含或編碼效應子(例如核酸效應

子，諸如非編碼RNA，或多肽效應子，例如蛋白質)，其可在細胞中表現。在一些實施例中，效應子係治療劑或治療效應子，例如如本文所描述。在一些實施例中，效應子為內源性效應子或外源性效應子，例如針對野生型指環病毒或目標細胞。在一些實施例中，效應子針對野生型指環病毒或目標細胞為外源性的。在一些實施例中，指環載體可藉由接觸細胞且將編碼效應子之遺傳元件引入細胞中而將效應子遞送至細胞中，使得效應子係由細胞製成或表現。在某些情況下，效應子係內源性效應子(例如針對目標細胞為內源性的，但例如藉由指環載體以增加的量提供)。在其他情況下，效應子係外源性效應子。在一些情況下，效應子可調節細胞功能或調節細胞中靶分子之活性或水準。例如，效應子可降低細胞中靶蛋白之水準(例如，如PCT/US19/65995之實例3及4中所描述)。在另一實例中，指環載體可活體內遞送及表現效應子，例如外源性蛋白質(例如，如實例15及19中所描述)。指環載體可用於例如將遺傳物質遞送至目標細胞、組織或個體；將效應子遞送至目標細胞、組織或個體；或用於治療疾病及病症，例如藉由遞送可作為治療劑操作之效應子至所需細胞、組織或個體。

【0006】 在一些實施例中，本文所描述之串聯構築體可以用於在例如宿主細胞中產生合成指環載體之遺傳元件。合成指環載體與野生型病毒相比具有至少一個結構差異(例如野生型指環病毒，例如本文所描述)，例如相對於野生型病毒的缺失、插入、取代、修飾(例如酶修飾)。一般而言，合成指環載體包括包封於蛋白質外部內之外源性遺傳元件，其可用於將遺傳元件或其中(例如多肽或核酸效應子)所編碼之效應子(例如外源性效應子或內源性效應子)遞送至真核(例如人類)細胞中。在實施例中，指環載體不引起可偵測及/或非所需免疫或炎症反應，例如不會引起炎症分

子標記物(例如TNF-α、IL-6、IL-12、IFN)以及B細胞反應(例如反應性或中和抗體)中超過1%、5%、10%、15%之增加，例如指環載體可基本上對目標細胞、組織或個體無免疫原性。

【0007】 在一些實施例中，本文所描述之串聯構築體可用於產生指環載體之遺傳元件，其包含：(i)包含啟動子元件及編碼效應子(例如內源性或外源性效應子)之序列的遺傳元件，及蛋白質結合序列(例如外部蛋白質結合序列，例如封裝信號)；及(ii)蛋白質外部；其中遺傳元件包封於蛋白質外部(例如衣殼)內；且其中指環載體能夠將遺傳元件遞送至真核(例如哺乳動物，例如人類)細胞中。在一些實施例中，遺傳元件為單股及/或環形DNA。替代地或組合地，遺傳元件具有以下特性之一者、兩者、三者或全部：為環形，為單股，以小於進入細胞之遺傳元件的約0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合至細胞之基因體中，及/或以每個基因體小於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30個複本整合至目標細胞之基因體中。在一些實施例中，整合頻率藉由對自游離載體分離之基因體DNA的定量凝膠純化分析法來測定，例如Wang等人(2004，*Gene Therapy* 11: 711-721，以全文引用的方式併入本文中)。在一些實施例中，遺傳元件包封於蛋白質外部內。在一些實施例中，指環載體能夠將遺傳元件遞送至真核細胞中。在一些實施例中，遺傳元件包含核酸序列(例如，300-4000個核苷酸之間、例如300-3500個核苷酸之間、300-3000個核苷酸之間、300-2500個核苷酸之間、300-2000個核苷酸之間、300-1500個核苷酸之間的核酸序列)，該核酸序列與野生型指環病毒之序列(如本文所描述的野生型細環病毒(Torque Teno virus，TTV)、小細環病毒(Torque Teno mini virus，

TTMV)或TTMDV序列，例如如本文所描述之野生型指環病毒序列)具有至少75% (例如至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列一致性。在一些實施例中，遺傳元件包含核酸序列(例如至少300個核苷酸、500個核苷酸、1000個核苷酸、1500個核苷酸、2000個核苷酸、2500個核苷酸、3000個核苷酸或更多之核酸序列)，該核酸序列與野生型指環病毒之序列(例如如本文所描述之野生型指環病毒序列)具有至少75% (例如至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列一致性。在一些實施例中，核酸序列經密碼子最佳化，例如用於在哺乳動物(例如人類)細胞中表現。在一些實施例中，核酸序列中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之密碼子經密碼子最佳化，例如用於在哺乳動物(例如人類)細胞中表現。

【0008】 在一些實施例中，本文所描述之串聯構築體可以用於產生感染性(例如針對人類細胞)指環載體、媒劑或粒子之遺傳元件，該指環載體、媒劑或粒子包含衣殼(例如包含指環病毒ORF，例如ORF1，多肽之衣殼)，該衣殼囊封包含結合至衣殼之蛋白質結合序列及編碼治療性效應子之異源(針對指環病毒)序列的遺傳元件。在實施例中，指環載體能夠將遺傳元件遞送至哺乳動物，例如人類細胞中。在一些實施例中，遺傳元件與野生型指環病毒基因體序列具有小於約6% (例如小於10%、9.5%、8%、7%、6%、5.5%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%或更低)的一致性。在一些實施例中，遺傳元件與野生型指環病毒基因體序列具有不超過1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%或6%

的一致性。在一些實施例中，遺傳元件與野生型指環病毒具有至少約2%至至少約5.5% (例如2%至5%、3%至5%、4%至5%)的一致性。在一些實施例中，遺傳元件具有大於約2000、3000、4000、4500或5000個核苷酸之非病毒序列(例如非指環病毒基因體序列)。在一些實施例中，遺傳元件具有大於約2000至5000、2500至4500、3000至4500、2500至4500、3500或4000、4500個(例如約3000至4500個之間)非病毒序列(例如非指環病毒基因體序列)之核苷酸。在一些實施例中，遺傳元件為單股，環形DNA。替代地或組合地，遺傳元件具有以下特性之一者、兩者、三者或全部：為環形，為單股，以小於進入細胞之遺傳元件的約0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合至細胞之基因體中，及/或以每個基因體小於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30個複本整合至目標細胞之基因體中，或以小於進入細胞之遺傳元件的約0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合(例如相對於細胞裂解物之遺傳元件序列，藉由比較整合至基因體DNA中的頻率)。在一些實施例中，整合頻率藉由對自游離載體分離之基因體DNA的定量凝膠純化分析法來測定，例如Wang等人(2004，*Gene Therapy* 11: 711-721，以全文引用的方式併入本文中)。

【0009】 在一些實施例中，如本文所描述之指環病毒或指環載體可用作有效遞送媒劑，用於將試劑，諸如本文所描述之效應子引入至目標細胞，例如待治療性或預防性治療之個體中的目標細胞。

【0010】 在一些實施例中，本文所描述之串聯構築體可以用於產生包含蛋白質外部之指環載體的遺傳元件，該蛋白質外部包含多肽(例如合

成多肽，例如ORF1分子)，該多肽包含(例如串聯)：

(i)包含富含精胺酸之區之第一區，例如至少約40個胺基酸之序列，該序列包含至少60%、70%或80%鹼性殘基(例如精胺酸、離胺酸或其組合)，

(ii)包含果凍卷域(jelly-roll domain)之第二區，例如包含至少6條β股之序列，

(iii)包含本文所描述之N22域序列之第三區，

(iv)包含本文所描述之指環病毒ORF1 C端域(CTD)序列之第四區，及

(v)視情況，其中多肽具有與野生型指環病毒ORF1蛋白質具有小於100%、99%、98%、95%、90%、85%、80%的序列一致性的胺基酸序列，例如如本文所描述。

【0011】 在一態樣中，本發明之特徵在於經分離之核酸分子(例如核酸構築體，例如串聯構築體)，其包含遺傳元件之序列，該遺傳元件包含可操作地連接於編碼效應子(例如有效負載)及外部蛋白質結合序列之序列的啟動子元件。在一些實施例中，外部蛋白質結合序列包括與指環病毒之5'UTR序列具有至少75% (至少80%、85%、90%、95%、97%、100%)一致性的序列，例如如本文所揭示。在實施例中，遺傳元件為單股DNA，為環形，以小於進入細胞之遺傳元件的約0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合，及/或以每個基因體小於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30個複本整合至目標細胞之基因體中，或以小於進入細胞之遺傳元件的約0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合。

在一些實施例中，整合頻率藉由對自游離載體分離之基因體DNA的定量凝膠純化分析法來測定，例如Wang等人(2004，*Gene Therapy* 11: 711-721，以全文引用的方式併入本文中)。在實施例中，效應子不來源於TTV且不為SV40-miR-S1。在實施例中，核酸分子不包含TTMV-LY2之聚核苷酸序列。在實施例中，啟動子元件能夠導引效應子在真核(例如哺乳動物，例如人類)細胞中之表現。

【0012】 在一些實施例中，核酸分子為環形的。在一些實施例中，核酸分子為線性的。在一些實施例中，本文所描述之核酸分子包含一或多個經修飾之核苷酸(例如鹼基修飾、糖修飾或主鏈修飾)。

【0013】 在一些實施例中，核酸分子包含編碼ORF1分子(例如指環病毒ORF1蛋白質，例如如本文所描述)之序列。在一些實施例中，核酸分子包含編碼ORF2分子(例如指環病毒ORF2蛋白質，例如如本文所描述)之序列。在一些實施例中，核酸分子包含編碼ORF3分子(例如指環病毒ORF3蛋白質，例如如本文所描述)之序列。在一態樣中，本發明之特徵在於包含以下一者、兩者或三者之遺傳元件：(i)啟動子元件及編碼效應子(例如外源性或內源性效應子)之序列；(ii)至少72個連續核苷酸(例如至少72、73、74、75、76、77、78、79、80、90、100或150個核苷酸)，其與野生型指環病毒序列具有至少75% (例如至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列一致性；或至少100 (例如至少300、500、1000、1500)個連續核苷酸，其與野生型指環病毒序列具有至少72% (例如至少72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列

一致性；及(iii)蛋白質結合序列，例如外部蛋白質結合序列，且其中該核酸構築體為單股DNA；且其中該核酸構築體為環形，以小於進入細胞之遺傳元件的約0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合，及/或以每個基因體小於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30個複本整合至目標細胞之基因體中。在一些實施例中，編碼效應子(例如外源性或內源性效應子，例如如本文所描述)之遺傳元件經密碼子最佳化。在一些實施例中，遺傳元件為環形。在一些實施例中，遺傳元件為線性的。在一些實施例中，本文所描述之遺傳元件包含一或多個經修飾之核苷酸(例如鹼基修飾、糖修飾或主鏈修飾)。在一些實施例中，遺傳元件包含編碼ORF1分子(例如指環病毒ORF1蛋白質，例如如本文所描述)之序列。在一些實施例中，遺傳元件包含編碼ORF2分子(例如指環病毒ORF2蛋白質，例如如本文所描述)之序列。在一些實施例中，遺傳元件包含編碼ORF3分子(例如指環病毒ORF3蛋白質，例如如本文所描述)之序列。

【0014】 在一態樣中，本發明之特徵在於包含如本文所描述之串聯構築體之宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞包含：(a)核酸分子，其包含編碼ORF1分子、ORF2分子或ORF3分子中之一或多者的序列(例如，編碼本文所描述之指環病毒ORF1多肽的序列)，例如其中該核酸分子為質體，為病毒核酸，或整合至染色體中；及(b)遺傳元件，其中遺傳元件包含(i)可操作地連接至編碼效應子(例如外源性效應子或內源性效應子)之核酸序列(例如DNA序列)的啟動子元件及(ii)結合(a)之多肽的蛋白質結合序列，其中視情況地，該遺傳元件不編碼ORF1多肽(例如ORF1蛋白質)。例如，宿主細胞包含順式(相同核酸分子之兩部分)或反式(不同核酸分子之

每一部分)之(a)及(b)。在實施例中，(b)之遺傳元件為環形，單股DNA。在一些實施例中，宿主細胞為製造細胞株，例如如本文所描述。在一些實施例中，宿主細胞為黏附的或懸浮的，或兩者。在一些實施例中，宿主細胞或輔助細胞在微載體中生長。在一些實施例中，宿主細胞或輔助細胞與cGMP製造實踐相容。在一些實施例中，宿主細胞或輔助細胞在適合於促進細胞生長之培養基中生長。在某些實施例中，在宿主細胞或輔助細胞已充分生長(例如生長至適當細胞密度)後，培養基可與適合於宿主細胞或輔助細胞產生指環載體之培養基進行交換。

【0015】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種醫藥組合物，其包含如本文所描述之指環載體(例如合成指環載體)。在實施例中，醫藥組合物進一步包含醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在實施例中，醫藥組合物包含單位劑量，該單位劑量包含每公斤目標個體之約10^5-10^{14} (例如約10^6-10^{13}、10^7-10^{12}、10^8-10^{11}或10^9-10^{10})基因體當量之指環載體。在一些實施例中，包含製劑之醫藥組合物在可接受之時間段及溫度內將為穩定的，及/或與所需投與途徑及/或此投與途徑將需要之任何裝置相容，例如針或注射器。在一些實施例中，醫藥組合物經調配而以單次劑量或多次劑量投與。在一些實施例中，醫藥組合物在投與部位調配，例如由醫療專家調配。在一些實施例中，醫藥組合物包含所需濃度之指環載體基因體或基因體當量(例如如每體積之基因體數目所定義)。

【0016】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種治療個體之疾病或病症之方法，該方法包含向個體投與指環載體，例如合成指環載體，例如如本文所描述。

【0017】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種向細胞、組織或個體

遞送效應子或有效負載(例如內源性或外源性效應子)之方法，該方法包含向個體投與指環載體，例如合成指環載體，例如如本文所描述，其中該指環載體包含編碼效應子之核酸序列。在實施例中，有效負載為核酸。在實施例中，有效負載為多肽。

【0018】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種將指環載體遞送至細胞之方法，其包含使指環載體，例如合成指環載體，例如如本文所描述，與細胞，例如真核細胞，例如哺乳動物細胞，例如活體內或離體接觸。

【0019】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種製造指環載體，例如合成指環載體之方法。該方法包括：

(a)提供宿主細胞，其包含：

(i)第一核酸分子，其包含例如如本文所描述之指環載體之遺傳元件的核酸序列之第一複本，及指環載體之遺傳元件的核酸序列之第二複本，或其部分(例如uRFS或dRFS)；及

(ii)第二核酸分子，其編碼指環病毒ORF1多肽，或選自ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2的胺基酸序列中的一或多者，例如如本文所描述，或與其具有至少70% (例如至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列一致性的胺基酸序列；及

(b)在適於複製(例如，滾環複製)遺傳元件之核酸序列之第一複本的條件下培育宿主細胞，由此產生遺傳元件；及

視情況(c)在適於遺傳元件包封在蛋白質外部(例如，包含由第二核酸分子編碼之多肽)中的條件下培育宿主細胞。

【0020】 在一些實施例中，第一核酸分子與第二核酸分子彼此連接

(例如在本文所描述之核酸構築體中，例如以順式連接)。在一些實施例中，第一核酸分子與第二核酸分子為分離的(例如以反式)。在一些實施例中，第一核酸分子為質體、黏質體、桿狀病毒質體、微型環或人造染色體。在一些實施例中，第二核酸分子為質體、黏質體、桿狀病毒質體、微型環或人造染色體。在一些實施例中，第二核酸分子整合至宿主細胞之基因體中。

【0021】 在一些實施例中，方法在步驟(a)之前進一步包括將第一核酸分子及/或第二核酸分子引入至宿主細胞中。在一些實施例中，在第一核酸分子之前、與其並行或在其之後將第二核酸分子引入宿主細胞中。在其他實施例中，第二核酸分子整合至宿主細胞之基因體中。在一些實施例中，第二核酸分子為輔助構築體、輔助病毒或其他輔助載體或包含輔助構築體、輔助病毒或其他輔助載體或為輔助構築體、輔助病毒或其他輔助載體之一部分。

【0022】 在另一態樣中，本發明之特徵在於一種製造指環載體組合物之方法，其包含例如，(a)、(b)及(c)全部中之一或多者：

a)提供宿主細胞，其包含例如表現指環載體(例如合成指環載體，例如如本文所描述)之一或多種組分(例如所有組分)；

b)在適合於自該宿主細胞產生指環載體製劑之條件下培養宿主細胞，其中製劑之指環載體包含囊封遺傳元件(例如如本文所描述)之蛋白質外部(例如包含指環載體ORF1多肽)，藉此製備指環載體製劑；及

視情況，c)調配指環載體製劑，例如呈適於向個體投與之醫藥組合物形式。

【0023】 例如，此製造方法中提供之宿主細胞包含：(a)核酸分子，

其包含編碼本文所描述之指環病毒ORF1多肽的序列，其中該核酸為質體，為病毒核酸或基因體，或整合至輔助細胞染色體中；及(b)串聯構築體，其能夠產生遺傳元件，其中該遺傳元件包含(i)可操作地連接至編碼效應子(例如外源性效應子或內源性效應子)之核酸序列(例如DNA序列)的啟動子元件及(ii)結合(a)之多肽的蛋白質結合序列(例如封裝序列)，其中宿主細胞包含順式或反式之(a)及(b)。在實施例中，(b)之遺傳元件為環形，單股DNA。在一些實施例中，宿主細胞為製造細胞株。

【0024】 在一些實施例中，在生產時(例如藉由短暫轉染)將指環載體之組分引入宿主細胞中。在一些實施例中，宿主細胞穩定表現指環載體之組分(例如其中編碼指環載體之組分的一或多種核酸例如藉由穩定轉染引入宿主細胞或其祖細胞中)。

【0025】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種製造指環載體組合物之方法，其包含：a)提供複數個本文所描述之指環載體或本文所描述之指環載體製劑；及b)調配指環載體或其製劑，例如調配為適用於向個體投與之醫藥組合物。

【0026】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種製造宿主細胞，例如第一宿主細胞或生產細胞(例如，如PCT/US19/65995之圖12中所示)，例如包含指環載體之第一宿主細胞群體之方法，該方法包含將能夠產生遺傳元件(例如，如本文中所描述)之串聯構築體引入至宿主細胞且在適合於產生指環載體之條件下培養宿主細胞。在實施例中，該方法進一步包含向宿主細胞中引入輔助物，例如輔助病毒。在實施例中，引入包含具有指環載體之經轉染(例如化學轉染)或電穿孔的宿主細胞。

【0027】 在一態樣中，本發明提供一種製造指環載體之方法，其包

含提供宿主細胞，例如第一宿主細胞或生產細胞(例如PCT/US19/65995之圖12中所示)，該宿主細胞包含例如如本文所描述之指環載體且自宿主細胞純化指環載體。在一些實施例中，在提供步驟之前，該方法進一步包含使宿主細胞與串聯構築體或例如如本文所描述之指環載體接觸，且在適用於產生指環載體之條件下培育宿主細胞。在實施例中，宿主細胞為上述製備宿主細胞之方法中所描述之第一宿主細胞或生產細胞。在實施例中，自宿主細胞純化指環載體包含裂解宿主細胞。

【0028】 在一些實施例中，方法進一步包含使由第一宿主細胞或生產細胞產生之指環載體與第二宿主細胞(例如容許細胞(例如PCT/US19/65995之圖12中所示)，例如第二宿主細胞群體)接觸的第二步驟。在一些實施例中，方法進一步包含在適用於產生指環載體的條件下培育第二宿主細胞。在一些實施例中，方法進一步包含自第二宿主細胞純化指環載體，例如藉此產生指環載體種子群體。在實施例中，自第二宿主細胞群體產生之指環載體比第一宿主細胞群體產生之指環載體多至少約2至100倍。在實施例中，自第二宿主細胞純化指環載體溶解包含裂解第二宿主細胞。在一些實施例中，方法進一步包含使由第二宿主細胞產生之指環載體與第三宿主細胞(例如容許細胞(例如PCT/US19/65995之圖12中所示)，例如第三宿主細胞群體)接觸的第二步驟。在一些實施例中，方法進一步包含在適用於產生指環載體的條件下培育第三宿主細胞。在一些實施例中，方法進一步包含自第三宿主細胞純化指環載體，例如藉此產生指環載體儲備群體。在實施例中，自第三宿主細胞純化指環載體包含裂解第三宿主細胞。在實施例中，自第三宿主細胞群體產生之指環載體比第二宿主細胞群體產生之指環載體多至少約2至100倍。

【0029】 在一些實施例中，宿主細胞在適合於促進細胞生長之培養基中生長。在某些實施例中，在宿主細胞已充分生長(例如生長至適當細胞密度)後，培養基可與適合於宿主細胞或輔助細胞產生指環載體之培養基進行交換。在一些實施例中，在與第二宿主細胞接觸之前，由宿主細胞產生的指環載體與宿主細胞分離(例如藉由裂解宿主細胞)。在一些實施例中，宿主細胞產生的指環載體不經中間純化步驟而與第二宿主細胞接觸。

【0030】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種製造醫藥指環載體製劑之方法。該方法包含(a)製造如本文所描述之指環載體製劑；(b)評估製劑(例如醫藥指環載體製劑、指環載體種子群體或指環載體儲備群體)的一或多個醫藥品質控制參數例如標識、純度、效價、效能(例如以基因體當量/指環載體粒子計)；及/或核酸序列，例如自由指環載體所包含之遺傳元件及(c)配製用於醫藥用途之製劑，以滿足預定準則的評估，例如滿足醫藥規範。在一些實施例中，評估標識包含評估(例如確認)指環載體之遺傳元件的序列，例如編碼效應子之序列。在一些實施例中，評估純度包含評估雜質之量，該雜質如以下：例如黴漿菌、內毒素、宿主細胞核酸(例如宿主細胞DNA及/或宿主細胞RNA)、生物衍生之過程雜質(例如血清白蛋白或胰蛋白酶)、複製勝任試劑(RCA)，例如複製勝任型病毒或不合需要之指環載體(例如除所需指環載體外之指環載體)、例如如本文所描述之合成指環載體)、游離病毒衣殼蛋白、偶然性物質及聚集物。在一些實施例中，評估效價包含評估製劑中功能性指環載體相對於非功能性指環載體(例如感染性相對於非感染性)之比率(例如如藉由HPLC所評估)。在一些實施例中，評估效能包含評估製劑中可偵測的指環載體功能(例如其中編碼之效應子的表現及/或功能或基因體當量)之水準。

【0031】 在實施例中，經調配之製劑基本上不含病原體、宿主細胞污染物或雜質；具有預定水準之非感染性粒子或具有非感染性粒子:感染性粒子之預定比率(例如<300:1、<200:1、<100:1或<50:1)。在一些實施例中，可在單一批次中產生多個指環載體。在實施例中，可評估批次中產生之指環載體之水準(例如單獨或一起)。

【0032】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種宿主細胞，其包含：

(i)第一核酸分子，其包含如本文所描述之串聯構築體，及

(ii)視情況，第二核酸分子，其編碼選自ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2的胺基酸序列中的一或多者，例如如本文所描述，或與其具有至少約70% (例如至少約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列一致性的胺基酸序列。

【0033】 在一態樣中，本發明之特徵在於一種反應混合物，其包含本文所描述之指環載體及輔助病毒，其中該輔助病毒包含編碼外部蛋白質(例如能夠結合至外部蛋白質結合序列之外部蛋白質及視情況脂質包膜)之聚核苷酸、編碼複製蛋白質(例如聚合酶)之聚核苷酸或其任何組合。

【0034】 在一些實施例中，指環載體(例如合成指環載體)經分離，例如自宿主細胞分離及/或自溶液中之其他成分(例如上清液)分離。在一些實施例中，指環載體(例如合成指環載體)例如自溶液(例如上清液)純化。在一些實施例中，相對於溶液中之其他成分，指環載體在溶液中富集。

【0035】 在前述指環載體、組合物或方法中之任一者之一些實施例中，提供指環載體包含自包含產生指環載體細胞之組合物分離(例如採集)指環載體，例如如本文所描述。在其他實施例中，提供指環載體包含例如自第三方獲得指環載體或其製劑。

【0036】 在前述指環載體、組合物或方法中之任一者之一些實施例中，遺傳元件包含指環載體基因體，例如如根據本文所描述之方法鑑別。在實施例中，指環載體基因體包含TTV-tth8核酸序列，例如TTV-tth8核酸，例如具有TTV-tth8核酸序列之核苷酸3436-3707中之至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的缺失。在實施例中，指環載體基因體包含TTMV-LY2核酸序列，例如TTMV-LY2核酸序列，例如具有TTMV-LY2核酸序列之核苷酸574-1371、1432-2210、574-2210及/或2610-2809中之至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的缺失。在實施例中，遺傳元件能夠自複製及/或自我擴增。在實施例中，遺傳元件不能夠自我複製及/或自我擴增。在實施例中，遺傳元件能夠反式複製及/或擴增，例如在輔助物，例如輔助病毒存在下。

【0037】 前述指環載體、組合物或方法中之任一者之額外特徵包括以下所列舉實施例中之一或多者。

【0038】 熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗即可確定本文所描述之本發明特定實施例的許多等效物。此類等效物意欲由以下列舉之實施例涵蓋。

【0039】

列舉之實施例

【0040】 1. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)第一指環病毒基因體，視情況突變體，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒基因體或其片段(例如，包含其約10-20、20-30、30-

40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-125、125-150、150-175、175-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800、1800-2000、2000-2200、2200-2400、2400-2600、2600-2700、2700-2800、2800-2900或2900-3000個連續核苷酸)，其與該第一指環病毒基因體串聯置放；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列；且

視情況其中：(i)該第一指環病毒基因體相對於該第二指環病毒基因體或其片段定位於5'，或(ii)該第一指環病毒基因體相對於該第二指環病毒基因體或其片段定位於3'。

【0041】 2. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)指環病毒遺傳元件區，其包含：

i)第一指環病毒上游複製促進序列(uRFS)，例如5' UTR；

ii)可操作地連接於編碼外源性效應子之序列的啟動子；

iii)第一指環病毒下游複製促進序列(dRFS)，例如3' UTR；及

b)第二指環病毒uRFS (例如5' UTR)或第二指環病毒dRFS (例如3' UTR)；及

c)視情況，位於該指環病毒遺傳元件區與(b)之間的間隔序列。

【0042】 3. 如實施例1或2之核酸構築體，其進一步包含d)適用於複製核酸構築體，例如質體主鏈或桿狀病毒質體主鏈之主鏈區域。

【0043】 4. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS結合至指環病毒Rep蛋白質。

【0044】 5. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS包含複製起點

(ORI)。

【0045】 6. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS不包含複製起點。

【0046】 7. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS包含髮夾環(例如在5' UTR中)。

【0047】 8. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS與dRFS一起包含指環病毒Rep置換位點。

【0048】 9. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS與dRFS一起包含指環病毒Rep結合位點。

【0049】 10. 如實施例2之核酸構築體，其中該uRFS與dRFS一起包含指環病毒Rep複製起始位點。

【0050】 11. 如實施例1或2之核酸構築體，其中當該核酸構築體在允許複製之條件下引入至宿主細胞中時，觀測到該遺傳元件之水準高於主鏈，例如至少以下之比率：3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、100:1、500:1、1000:1、5000:1、10,000:1、100,000:1或1,000,000:1。

【0051】 12. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第一uRFS與該第二uRFS具有相同序列。

【0052】 13. 如實施例1至11中任一項之核酸構築體，其中該第一uRFS與該第二uRFS具有不同序列。

【0053】 14. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體包含不超過一個dRFS。

【0054】 15. 如實施例1至13中任一項之核酸構築體，其中該第

一dRFS與該第二dRFS具有相同序列。

【0055】 16. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體包含不超過一個uRFS。

【0056】 17. 如前述實施例中任一項之核酸，其中該uRFS或dRFS包含全長指環病毒遺傳元件。

【0057】 18. 如前述實施例中任一項之核酸，其中該uRFS或dRFS包含部分指環病毒遺傳元件。

【0058】 19. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0059】 20. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3及3' UTR序列。

【0060】 21. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2及ORF3序列。

【0061】 22. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子及ORF2-2序列。

【0062】 23. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2及內含子序列。

【0063】 24. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)及ORF2序列。

【0064】 25. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)。

【0065】 26. 如實施例19至25中任一項之核酸，其中該dRFS包含5' UTR，該5' UTR包含複製起點。

【0066】 27. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含富含GC之區序列。

【0067】 28. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含3' UTR及富含GC之區序列。

【0068】 29. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0069】 30. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0070】 31. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0071】 32. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0072】 33. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該dRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環及/或複製起點)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0073】 34. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環及/或複製起點)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0074】 35. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0075】 36. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS

包含內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0076】 37. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0077】 38. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含ORF3、3' UTR及富含GC之區序列。

【0078】 39. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含3' UTR及富含GC之區序列。

【0079】 40. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含富含GC之區序列。

【0080】 41. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環)。

【0081】 42. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環)及ORF2序列。

【0082】 43. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2及內含子序列。

【0083】 44. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子及ORF2-2序列。

【0084】 45. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2及ORF3序列。

【0085】 46. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS不包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3及3' UTR序列。

【0086】 47. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列，且該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)。

【0087】 48. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列，且該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)及ORF2序列。

【0088】 49. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列，且該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2及內含子序列。

【0089】 50. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列，且該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子及ORF2-2序列。

【0090】 51. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列，且該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2及ORF3序列。

【0091】 52. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3、3' UTR及富含GC之區序列，且該dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)、ORF2、內含子、ORF2-2、ORF3及3' UTR序列。

【0092】 53. 如實施例41至52中任一項之核酸構築體，其中該uRFS之該5' UTR包含複製起點。

【0093】 54. 如實施例41至52中任一項之核酸構築體，其中該uRFS之該5' UTR不包含複製起點。

【0094】 55. 如實施例41至54中任一項之核酸構築體，其中該dRFS之該5' UTR包含複製起點。

【0095】 56. 如實施例41至54中任一項之核酸構築體，其中該dRFS之該5' UTR不包含複製起點。

【0096】 57. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該uRFS包 含100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400、1400-1500、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、1900-2000、2000-2200、2200-2400、2400-2500、2500-2600、2600-2800或2800-3000 kb之例如如本文所描述之遺傳元件序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。

【0097】 58. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中dRFS包含100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400、1400-1500、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、1900-2000、2000-2200、2200-2400、2400-2500、2500-2600、2600-2800或2800-3000 kb之例如如本文所描述之遺傳元件序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一

致性的序列。

【0098】 59. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)第一指環病毒遺傳元件區，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒遺傳元件區或其片段；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列。

【0099】 60. 如實施例59之核酸構築體，其進一步包含d)主鏈區，例如其中該主鏈區適用於在細菌、哺乳動物細胞或昆蟲細胞中複製DNA構築體。

【0100】 61. 如實施例59之核酸構築體，其中該核酸構築體按順序包含：

該遺傳元件區，其包含指環病毒遺傳元件之序列，

視情況，該間隔序列；

該指環載體串聯區；及

該主鏈區。

【0101】 62. 如實施例59之核酸構築體，其中該核酸構築體按順序包含：

該指環載體串聯區；及

視情況，該間隔序列；

該遺傳元件區，其包含指環載體遺傳元件之序列，

該主鏈區。

【0102】 63. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體包含不超過一個編碼該外源性效應子之序列複本。

【0103】 64. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該構築

體具有小於約10 kb (例如，小於約9 kb、8 kb、7 kb、6 kb、5 kb、4 kb或3kb)之長度，其不包括主鏈區之長度。

【0104】 65. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體包含不超過一個該遺傳元件區之全長複本。

【0105】 66. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該串聯區之長度小於2800、2700、2600、2500、2000、1500、1000、900、800、700、600或500個核苷酸。

【0106】 67. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該遺傳元件包含來自指環病毒的序列(例如5' UTR、3' UTR或富含GC之區序列)，例如表A1、B1或C1中之任一者，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。

【0107】 68. 如實施例67之核酸構築體，其中該指環病毒為人類指環病毒。

【0108】 69. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該遺傳元件能夠在人類細胞中複製。

【0109】 70. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該遺傳元件不編碼以下中之一或多者：例如所有ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1及ORF1/2。

【0110】 71. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體為雙股DNA。

【0111】 72. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體為單股DNA。

【0112】 73. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸

構築體為環形的。

【0113】 74. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體為質體或病毒載體，例如桿狀病毒載體。

【0114】 75. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該主鏈區足以用於在細菌、哺乳動物細胞或昆蟲細胞中複製核酸構築體。

【0115】 76. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該主鏈區包含5' UTR (例如包含髮夾環及/或複製起點(ORI))及選擇標記物(例如陽性選擇標記物(例如抗性標記物)、陰性選擇標記物或螢光標記物)中之一或兩者。

【0116】 77. 如實施例76之核酸構築體，其中該ORI為細菌ORI、病毒ORI、哺乳動物ORI或昆蟲ORI。

【0117】 78. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該間隔序列長度為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多個胺基酸，或長度在1-5、5-10、10-15或15-20個胺基酸之間。

【0118】 79. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第一遺傳元件區包含來自本文所描述之指環病毒的TATA盒、起始元件、加帽位點、轉錄起始位點、5' UTR保守域、ORF1編碼序列、ORF1/1編碼序列、ORF1/2編碼序列，ORF2編碼序列、ORF2/2編碼序列、ORF2/3編碼序列、ORF2/3t編碼序列、三個開讀框區、聚(A)信號及/或富含GC之區中之一或多種(例如如表A1-M1中所列之任一者)，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0119】 80. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第二遺傳元件區或其片段，或該串聯區包含來自本文所描述之指環病毒的TATA盒、起始元件、加帽位點、轉錄起始位點、5' UTR保守域、ORF1編碼序列、ORF1/1編碼序列、ORF1/2編碼序列，ORF2編碼序列、ORF2/2編碼序列、ORF2/3編碼序列、ORF2/3t編碼序列、三個開讀框區、聚(A)信號及/或富含GC之區中之一或多種(例如如表A1-M1中所列之任一者)，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0120】 81. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第一遺傳元件區包含指環病毒基因體序列(例如如本文所描述，例如如表A1-M1中所列之任一者)或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0121】 82. 如實施例81之核酸構築體，其進一步包含該指環病毒基因體序列或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列的至少一個額外複本(例如總共2、3、4、5或6個複本)。

【0122】 83. 如實施例81之核酸構築體，其進一步包含不同指環病毒基因體序列(例如如本文所描述，例如如表A1-M1中所列之任一者)或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列的至少一個複本(例如總共1、2、3、4、5或6個複本)。

【0123】 84. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第一遺傳元件區及/或該第二遺傳元件區或其片段或串聯區包含與來自本文所

描述之指環病毒之5' UTR核苷酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列(例如如表A1-M1中所列之任一者)。

【0124】 85. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第一遺傳元件區及/或該第二遺傳元件區或其片段或串聯區包含該核酸序列之至少10、15、20、25、30、31、32、33、34、35或36個連續核苷酸：

(i) CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGC (SEQ ID NO: 160)；

(ii) GCGCTX$_1$CGCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 164)，其中X$_1$係選自T、G或A；

(iii) GCGCTTCGCGCGCCGCCCACTAGGGGGCGTTGCGCG (SEQ ID NO: 165)；

(iv) GCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGCGCAATGCG (SEQ ID NO: 166)；

(v) GCGCTGCGCGCGCGGCCCCCGGGGGAGGCATTGCCT (SEQ ID NO: 167)；

(vi) GCGCTGCGCGCGCGCCGGGGGGGCGCCAGCGCCC (SEQ ID NO: 168)；

(vii) GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGCTCCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 169)；

(viii) GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 170)；

(ix) GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC

(SEQ ID NO: 171)；或

(x) GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGCTCTGCCCCCCC (SEQ ID NO: 172)；

或與其具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列。

【0125】 86. 如前述實施例中任一項之核酸構築體，其中該第一遺傳元件區及/或該第二遺傳元件區或其片段或串聯區包含至少20、25、30、31、32、33、34、35或36個具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%或80.6%之GC含量的連續核苷酸。

【0126】 87. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)突變型或野生型指環病毒基因體(視情況包含編碼外源性效應子之序列)；

b)指環病毒基因體之片段，與(a)之指環病毒基因體串聯置放；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列。

【0127】 88. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)指環病毒遺傳元件區(視情況包含編碼外源性效應子之序列)；

b)指環病毒遺傳元件區之片段；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列。

【0128】 89. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)指環病毒遺傳元件區，其包含：

i)第一指環病毒上游複製促進序列(uRFS)，例如5' UTR；

ii)視情況可操作地連接於編碼外源性效應子之序列的啟動子；

iii)第一指環病毒下游複製促進序列(dRFS)，例如3' UTR；及

b)第二指環病毒uRFS (例如5' UTR)或第二指環病毒dRFS (例如3' UTR)；及

c)視情況，位於該指環病毒遺傳元件區與(b)之間的間隔序列，

其中該核酸構築體不包含該指環病毒遺傳元件區之兩個全長複本。

【0129】 90. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)指環病毒遺傳元件區，其包含：

i)第一指環病毒上游複製促進序列(uRFS)，例如5' UTR；

ii)視情況可操作地連接於編碼外源性效應子之序列的啟動子；

iii)第一指環病毒下游複製促進序列(dRFS)，例如3' UTR；及

b)第二指環病毒uRFS (例如5' UTR)或第二指環病毒dRFS (例如3' UTR)，其中該第二指環病毒uRFS不為該指環病毒遺傳元件區之全長複本的一部分；及

c)視情況，位於該指環病毒遺傳元件區與(b)之間的間隔序列。

【0130】 91. 一種細胞，其包含如前述實施例中任一項之核酸構築體。

【0131】 92. 如實施例91之細胞，其中該細胞為細菌細胞、哺乳動物細胞或昆蟲細胞。

【0132】 93. 一種反應混合物，其包含如前述實施例中任一項之核酸構築體及細胞。

【0133】 94. 一種包含細胞及核酸(例如DNA)構築體之反應混合物，該構築體包含：

a)第一指環病毒基因體，視情況突變體，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒基因體或其片段，其與該第一指環病毒基因體串聯置放；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列。

【0134】 95. 一種包含細胞及核酸(例如DNA)構築體之反應混合物，該構築體包含：

a)第一指環病毒遺傳元件區，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒遺傳元件區或其片段；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列。

【0135】 96. 一種包含細胞及核酸(例如DNA)構築體之反應混合物，該構築體包含：

a)指環病毒遺傳元件區，其包含：

i)第一指環病毒上游複製促進序列(uRFS)，例如5' UTR；

ii)可操作地連接於編碼外源性效應子之序列的啟動子；

iii)第一指環病毒下游複製促進序列(dRFS)，例如3' UTR；及

b)第二指環病毒uRFS (例如5' UTR)或第二指環病毒dRFS (例如3' UTR)；及

c)視情況，位於該指環病毒遺傳元件區與(b)之間的間隔序列。

【0136】 97. 如實施例93至96中任一項之反應混合物，其中該細胞為細菌細胞、哺乳動物細胞或昆蟲細胞。

【0137】 98. 如實施例93至97中任一項之反應混合物，其中該細胞包含該核酸構築體。

【0138】 99. 一種製造包含如前述實施例中任一項之核酸構築體的組合物的方法，其包含：

a)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

b)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸，藉此產生複數個該核酸構築體之複本；

藉此製造包含該核酸構築體之組合物。

【0139】 100. 如實施例99之方法，其進一步包含：

c)自該細胞分離該核酸構築體之該複數個複本。

【0140】 101. 一種製造指環載體遺傳元件之方法，其包含：

a)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

b)使細胞(例如哺乳動物宿主細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體之該指環病毒遺傳元件複製或擴增之條件下接觸；

藉此製造該指環載體遺傳元件。

【0141】 102. 如實施例101之方法，其進一步包含：

c)在允許該擴增之指環病毒遺傳元件包封於該細胞中之蛋白質外部的條件下培育該細胞。

【0142】 103. 一種製造包含包封於蛋白質外部之遺傳元件的指環載體之方法，其包含：

a)提供細胞(例如哺乳動物宿主細胞)，其包含如前述實施例中任一項之核酸構築體及該指環病毒遺傳元件之一或多個複本(例如其中該指環病毒遺傳元件自該核酸構築體擴增)；

b)在允許該指環病毒遺傳元件包封於該細胞中之蛋白質外部的條件下培育該細胞；

藉此製造該指環載體。

【0143】 104. 如實施例102或103之方法，其中該蛋白質外部以順式或反式提供。

【0144】 105. 如實施例102至104中任一項之方法，其中包封於該蛋白質外部中之該指環病毒遺傳元件形成感染性粒子，例如病毒粒子。

【0145】 106. 一種製造包含包封於蛋白質外部之遺傳元件的指環載體之方法，其包含：

a)提供包含指環病毒遺傳元件之MOLT-4細胞；

b)在允許該指環病毒遺傳元件包封於該細胞中之蛋白質外部的條件下培育該細胞；

藉此製造該指環載體。

【0146】 107. 一種包含複數個核酸(例如DNA)構築體之組合物，其中該等核酸構築體各自包含：

a)第一指環病毒基因體，視情況突變體，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒基因體或其片段，其與該第一指環病毒基因體串聯置放；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列；且

其中該組合物藉由包含以下之方法製備：

i)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

ii)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸。

【0147】 108. 一種包含複數個核酸(例如DNA)構築體之組合物，其

中該等核酸構築體各自包含：

a)第一指環病毒遺傳元件區，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒遺傳元件區或其片段；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列；且

其中該組合物藉由包含以下之方法製備：

i)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

ii)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸。

【0148】 109. 一種包含複數個核酸(例如DNA)構築體之組合物，其中該等核酸構築體各自包含：

a)指環病毒遺傳元件區，其包含：

i)第一指環病毒上游複製促進序列(uRFS)，例如5' UTR；

ii)可操作地連接於編碼外源性效應子之序列的啟動子；

iii)第一指環病毒下游複製促進序列(dRFS)，例如3' UTR；及

b)第二指環病毒uRFS (例如5' UTR)或第二指環病毒dRFS (例如3' UTR)；及

c)視情況，位於該指環病毒遺傳元件區與(b)之間的間隔序列；且

其中該組合物藉由包含以下之方法製備：

i)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

ii)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸。

【0149】 110. 一種向細胞遞送外源性效應子之方法，該方法包含：

向該細胞中引入核酸構築體，該核酸構築體包含：

a)第一指環病毒基因體，視情況突變體，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒基因體或其片段，其與該第一指環病毒基因體串聯置放；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列；且

在適用於表現該外源性效應子之條件下培育該細胞；

其中該核酸構築體係藉由包含以下之方法產生：

i)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

ii)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸。

【0150】 111. 一種向細胞遞送外源性效應子之方法，該方法包含：

向該細胞中引入核酸構築體，該核酸構築體包含：

a)第一指環病毒遺傳元件區，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒遺傳元件區或其片段；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列；且

在適用於表現該外源性效應子之條件下培育該細胞；

其中該組合物藉由包含以下之方法製備：

i)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

ii)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸。

【0151】 112. 一種向細胞遞送外源性效應子之方法，該方法包

含：

向該細胞中引入核酸構築體，該核酸構築體包含：

a)指環病毒遺傳元件區，其包含：

i)第一指環病毒上游複製促進序列(uRFS)，例如5' UTR；

ii)可操作地連接於編碼外源性效應子之序列的啟動子；

iii)第一指環病毒下游複製促進序列(dRFS)，例如3' UTR；及

b)第二指環病毒uRFS (例如5' UTR)或第二指環病毒dRFS (例如3' UTR)；及

c)視情況，位於該指環病毒遺傳元件區與(b)之間的間隔序列；且

在適用於表現該外源性效應子之條件下培育該細胞；

其中該組合物藉由包含以下之方法製備：

i)提供如前述實施例中任一項之核酸構築體；及

ii)使細胞(例如細菌細胞)與該核酸構築體在允許該核酸構築體在該細胞中複製之條件下接觸。

【0152】 113. 一種將指環病毒遺傳元件區整合至細胞之基因體中之方法，該方法包含：

(a)使該細胞與如前述實施例中任一項之核酸構築體接觸，

其中該核酸構築體包含側接有5'同源區及3'同源區之指環病毒遺傳元件區，且

其中該5'同源區及該3'同源區與該細胞之基因體中之至少9個核苷酸(例如至少9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個核苷酸)之核酸序列具有至少90%序列一致性(例如至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性)；及

(b)在適用於將該指環病毒遺傳元件區整合至該細胞之該基因體中之條件下培育該細胞。

【0153】 114. 一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)第一指環病毒基因體，視情況其中該第一指環病毒基因體包含相對於野生型指環病毒基因體序列的突變，

b)與該第一指環病毒基因體串聯置放的第二指環病毒基因體，視情況其中該第二指環病毒基因體包含相對於野生型指環病毒基因體序列的突變；及

c)視情況，位於(a)與(b)之間的間隔序列；且

其中該第一或第二指環病毒基因體包含編碼外源性效應子之序列。

【0154】 115. 如實施例114之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體包含編碼指環病毒ORF1、ORF2及/或ORF2/3及/或富含GC之區的一或多個序列。

【0155】 116. 如實施例114之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體包含編碼指環病毒ORF1、ORF2及/或ORF2/3及/或富含GC之區的一或多個序列。

【0156】 117. 一種核酸(例如DNA)構築體，其按5'至3'之順序包含：

a)第一指環病毒基因體，其包含編碼外源性效應子之序列，視情況其中該第一指環病毒基因體包含相對於野生型指環病毒基因體序列的突變，

b)視情況，間隔序列，及

c)與該第一指環病毒基因體串聯置放的第二指環病毒基因體，視情況其中該第二指環病毒基因體包含相對於野生型指環病毒基因體序列的突

變；

視情況其中序列包含該外源性效應子，該外源性效應子之長度為約50-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-950、950-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800、1800-2000、2000-2200或2200-2400個核苷酸(例如長度為約986個核苷酸)。

【0157】 118. 如實施例117之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體：

(i)不包含指環病毒ORF2基因，

(ii)不包含指環病毒ORF2/3基因之第一外顯子，及/或

(iii)包含經截短之指環病毒ORF1基因。

【0158】 119. 如實施例117之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體：

(i)包含經截短之指環病毒ORF2基因，

(ii)包含指環病毒ORF2/3基因之經截短之第一外顯子，及/或

(iii)包含經截短之指環病毒ORF1基因。

【0159】 120. 如實施例118或119之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因之5'端(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0160】 121. 如實施例118或119之核酸構築體，其中該截短發生

在該指環病毒ORF1基因內(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0161】 122. 如實施例117之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體：

(i)不包含指環病毒ORF2/3基因之第二外顯子或包含指環病毒ORF2/3基因之經截短之第二外顯子，

(ii)不包含富含GC之區或包含經截短之富含GC之區，及/或

(iii)包含經截短之指環病毒ORF1基因。

【0162】 123. 如實施例122之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因內(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0163】 124. 如實施例122之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因之3'端(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0164】 125. 如實施例117至124中任一項之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體之指環病毒ORF1、ORF2及/或ORF2/3基因之一或多者(例如1、2或3者)不編碼功能蛋白(例如其中該指環病毒ORF1、ORF2及/或ORF2/3基因之一或多者(例如1、2或3者)包含不活化突變，例如過早終止密碼子突變、框移突變或更改或刪除起始密碼子的突變)。

【0165】 126. 如實施例117至125中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體進一步包含編碼外源性效應子之序列；

視情況其中序列包含該外源性效應子，該外源性效應子之長度為約50-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-950、950-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800、1800-2000、2000-2200或2200-2400個核苷酸(例如長度為約986個核苷酸)。

【0166】 127. 一種核酸(例如DNA)構築體，其按5'至3'之順序包含：

a)第一指環病毒基因體，視情況其中該第一指環病毒基因體包含相對於野生型指環病毒基因體序列的突變，

b)視情況，間隔序列，及

c)與該第一指環病毒基因體串聯置放的第二指環病毒基因體，其中該第二指環病毒基因體包含編碼外源性效應子之序列，視情況其中該第二指環病毒基因體包含相對於野生型指環病毒基因體序列的突變；

視情況其中序列包含該外源性效應子，該外源性效應子之長度為約50-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-950、950-1000、1000-1100、1100-1200、

1200-1400、1400-1600、1600-1800、1800-2000、2000-2200或2200-2400個核苷酸(例如長度為約986個核苷酸)。

【0167】 128. 如實施例127之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體：

(i)不包含指環病毒ORF2基因，

(ii)不包含指環病毒ORF2/3基因之第一外顯子，及/或

(iii)包含經截短之指環病毒ORF1基因。

【0168】 129. 如實施例127之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體：

(i)包含經截短之指環病毒ORF2基因，

(ii)包含指環病毒ORF2/3基因之經截短之第一外顯子，及/或

(iii)包含經截短之指環病毒ORF1基因。

【0169】 130. 如實施例128或129之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因之5'端(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0170】 131. 如實施例128或129之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因內(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、

1600-1800或1800-2000經截短)。

【0171】 132. 如實施例127之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體：

(i)不包含指環病毒ORF2/3基因之第二外顯子或包含指環病毒ORF2/3基因之經截短之第二外顯子，

(ii)不包含富含GC之區或包含經截短之富含GC之區，及/或

(iii)包含經截短之指環病毒ORF1基因。

【0172】 133. 如實施例132之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因內(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0173】 134. 如實施例132之核酸構築體，其中該截短發生在該指環病毒ORF1基因之3'端(例如其中該指環病毒ORF1基因之約5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800或1800-2000經截短)。

【0174】 135. 如實施例127至134中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體之指環病毒ORF1、ORF2及/或ORF2/3基因之一或多者(例如1、2或3者)不編碼功能蛋白(例如其中該指環病毒ORF1、ORF2及/或ORF2/3基因之一或多者(例如1、2或3者)包含不活化突變，例如過早終

止密碼子突變、框移突變或更改或刪除起始密碼子的突變)。

【0175】 136. 如實施例127至135中任一項之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體進一步包含編碼外源性效應子之序列；

視情況其中序列包含該外源性效應子，該外源性效應子之長度為約50-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-950、950-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1400、1400-1600、1600-1800、1800-2000、2000-2200或2200-2400個核苷酸(例如長度為約986個核苷酸)。

【0176】 137. 如實施例117至136中任一項之核酸構築體，其中核酸構築體進一步包含以下中之一或多者(例如1、2或3者)：啟動子(例如SV40啟動子)、Kozak序列及/或多腺苷酸(poly-A)序列(例如SV40多腺苷酸序列)，例如在編碼外源性效應子之序列中。

【0177】 138. 如實施例117至137中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體進一步包含細菌複製起點。

【0178】 139. 如實施例117至138中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體進一步包含可選標記物(例如抗性基因，例如抗生素抗性基因，例如大觀黴素(spectinomycin)抗性基因)。

【0179】 140. 如實施例114至139中任一項之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體包含核酸序列，該核酸序列與野生型指環病毒(例如如本文所描述)之該基因體序列或與長度至少為50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900或3000個核苷酸的其連續部分(例如野

生型指環病毒基因體之元件，例如如本文所描述)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0180】 141. 如實施例114至139中任一項之核酸構築體，其中該第一指環病毒基因體包含核酸序列，該核酸序列與野生型指環病毒(例如如本文所描述)之該基因體序列或與長度至少為約50-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400、1400-1500、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、1900-2000、2000-2100、2100-2200、2200-2300、2300-2400、2400-2500、2500-2600、2600-2700、2700-2800、2800-2900或2900-3000個核苷酸的其連續部分(例如野生型指環病毒基因體之元件，例如如本文所描述)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0181】 142. 如實施例114至140中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體包含核酸序列，該核酸序列與野生型指環病毒(例如如本文所描述)之該基因體序列或與長度至少為50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900或3000個核苷酸的其連續部分(例如野生型指環病毒基因體之元件，例如如本文所描述)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0182】 143. 如實施例114至141中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體包含核酸序列，該核酸序列與野生型指環病毒(例如如本文所描述)之該基因體序列或與長度至少為約50-100、100-200、200-

300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400、1400-1500、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、1900-2000、2000-2100、2100-2200、2200-2300、2300-2400、2400-2500、2500-2600、2600-2700、2700-2800、2800-2900或2900-3000個核苷酸的其連續部分(例如野生型指環病毒基因體之元件，例如如本文所描述)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0183】 144. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之核苷酸1-2812或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之3'。

【0184】 145. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之核苷酸1-2583或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之3'。

【0185】 146. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之核苷酸1-2264或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性

之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之3'。

【0186】 147. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之核苷酸1-723或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之3'。

【0187】 148. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該5'最多723-2264、2264-2583或2583-2812個核苷酸或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之3'。

【0188】 149. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該5'最多700-800、800-1000、1000-1500、1500-2000、2000-2500或2500-2900個核苷酸或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之3'。

【0189】 150. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該3'最多2712個核苷酸(例如核苷酸267至2979)或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之5'。

【0190】 151. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該3'最多2556個核苷酸(例如核苷酸423至2979)或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之5'。

【0191】 152. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該3'最多2256個核苷酸(例如核苷酸723至2979)或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之5'。

【0192】 153. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該3'最多706個核苷酸(例如核苷酸2273至2979)或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之5'。

【0193】 153. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該3'最多706-2256、2256-2556或2556-2712個核苷酸或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之5'。

【0194】 154. 如實施例114至143中任一項之核酸構築體，其中：

該第一指環病毒基因體編碼外源性效應子，且

該第二指環病毒基因體為包含指環病毒基因體(例如環2)之該3'最多700-800、800-1000、1000-1500、1500-2000、2000-2500或2500-2800個核苷酸或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之序列的經截短基因體；

其中該第二指環病毒基因體為該第一指環病毒基因體之5'。

【0195】 155. 如技術方案114至154中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體編碼ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2中之一或多者。

【0196】 156. 一種製造包含包封於蛋白質外部之遺傳元件的指環載體之方法，該方法包含：

a)提供細胞(例如哺乳動物宿主細胞，例如MOLT-4細胞)，其包含如實施例114至155中任一項之核酸構築體及該指環病毒遺傳元件之一或多個複本(例如其中該指環病毒遺傳元件自該核酸構築體擴增)；

b)在允許該指環病毒遺傳元件包封於該細胞中之蛋白質外部(例如包含指環病毒ORF1分子)的條件下培育該細胞；

藉此製造該指環載體。

【0197】 157. 如實施例156之方法，其中該蛋白質外部以順式或反式提供。

【0198】 158. 如實施例156或157之方法，其中包封於該蛋白質外部中之該指環病毒遺傳元件形成感染性粒子，例如病毒粒子。

【0199】 159. 如實施例156至158中任一項之方法，其在步驟a)之前進一步包含用該核酸構築體轉染該細胞。

【0200】 160. 如實施例156至159中任一項之方法，其在步驟b)之後進一步包含裂解該細胞。

【0201】 161. 如實施例160之方法，其進一步包含用核酸酶(benzonase)處理該細胞裂解物(例如100 U/ml核酸酶，例如約60、70、80、90、100、110或120分鐘，例如在室溫下)，其視情況進一步包含澄清該細胞裂解物及/或等密度離心。

【0202】 162. 如實施例160或161之方法，其進一步包含分級該溶解物且收集含有該指環載體之溶離份。

【0203】 163. 如實施例156至162中任一項之方法，其中該等指環載體能夠感染細胞(例如哺乳動物細胞，例如人類細胞)。

【0204】 164. 一種向細胞遞送外源性效應子之方法，該方法包含向該細胞中引入藉由如實施例99至106或156至163中任一項之方法製備之指環載體且在適用於表現該外源性效應子之條件下培育該細胞。

【0205】 本發明之其他特徵、目標及優點將自實施方式及圖式及自申請專利範圍顯而易知。

【0206】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解相同之含義。本文所提及之

所有公開案、專利申請案、專利及其他參考案均以全文引用的方式併入本文中。另外，該等材料、方法及實例僅為說明性的且不意欲為限制性的。

【圖式簡單說明】

【0207】

圖1A至圖1C為展示串聯指環病毒質體可增加指環病毒產生之一系列圖式。(A)例示性串聯指環病毒質體之質體圖。(B)用串聯指環病毒質體轉染MOLT-4細胞引起野生型大小的指環病毒基因體之回收。(C) MOLT-4細胞中產生之來自串聯指環病毒質體的指環病毒基因體以經衣殼化病毒粒子的密度遷移。GCR =富含GC之區。細菌SM =細菌選擇標記物。細菌ori =細菌複製起點。ORF =開讀框。Prom. =啟動子。5CD = 5'非轉譯區保守域。

圖2A至圖2E為展示基於環2基因體之例示性串聯構築體的一系列圖式。(A)串聯構築體包含遺傳元件之第一複本及位於相對於第一複本之3'處的遺傳元件之完整或部分第二複本。各連續構築體包括第二複本之3'端的更大截斷。構築體可包括促進下游複製之序列(dRFS)，例如包含如所指示之5CD (5' UTR保守域)。(B)串聯構築體包含遺傳元件之第一複本及位於相對於第一複本之5'處的遺傳元件之完整或部分第二複本。各連續構築體包括第二複本之5'端的更大截斷。(C)串聯構築體包含遺傳元件之部分第一複本(例如，包含uRFS)及位於相對於第一複本之5'處的遺傳元件之部分第二複本(例如，包含dRFS)。各連續構築體包括第一複本之5'端的更大截斷及第二複本之3'端的更大比例。(D)對自經2A及2B中所示之構築體轉染的MOLT-4細胞收穫的總DNA之南方墨點法證實野生型長度指環病毒基因體之回收。(E)來自CsCl密度梯度之指環病毒基因體的DNA酶保護

qPCR證實在具有2A及2B中所示之構築體的MOLT-4細胞中產生的指環病毒基因體之外殼。

圖2F為展示來自經包括在環1主鏈之第一複本中編碼序列(該序列編碼eGFP-ORF1融合蛋白質)之串聯環1構築體的多種環1構築體(如所指示)轉染之Jurkat細胞的全長環1 ORF1 mRNA的長RNA讀數的一系列圖式。

圖2G為展示偵測已藉由核轉染引入環2串聯構築體中之MOLT-4細胞的ORF1蛋白質表現之一系列圖式。

圖2H為展示包含串聯配置之兩個環2基因體之例示性桿狀病毒構築體的圖式。

圖2I為展示經由桿狀病毒將串聯環2基因體遞送至Sf9細胞之一系列圖式。

圖3描繪編碼TTMiniV之LY1菌株的康黴素載體(「指環載體1」)之示意圖。

圖4描繪編碼TTMiniV之LY2菌株的康黴素載體(「指環載體2」)之示意圖。

圖5描繪293T及A549細胞中之合成指環載體的轉染效率。

圖6A及6B描繪用以繪示合成指環載體對293T細胞之成功感染的定量PCR結果。

圖7A及7B描繪用以繪示合成指環載體對A549細胞之成功感染的定量PCR結果。

圖8A及8B描繪用以繪示合成指環載體對Raji細胞之成功感染的定量PCR結果。

圖9A及9B描繪用以繪示合成指環載體對Jurkat細胞之成功感染的定

量PCR結果。

圖10A及10B描繪用以繪示合成指環載體對Chang細胞之成功感染的定量PCR結果。

圖11為展示用於產生指環載體(例如，如本文所述之複製勝任型或複製缺陷型指環載體)之例示性工作流的示意圖。

圖12為展示在經指定質體轉染之HEK293T細胞中miR-625表現之倍數變化的圖式。

圖13為展示用編碼靶向n-myc相互作用蛋白質(NMI)之miRNA的指環載體感染Raji B細胞之圖式。展示在用編碼NMI miRNA之指環載體感染Raji B細胞(箭頭)或對照細胞之後偵測到的指環載體之基因體等效物的定量。

圖14為展示用編碼靶向n-myc相互作用蛋白質(NMI)之miRNA的指環載體感染Raji B細胞之圖式。西方墨點法展示編碼針對NMI之miRNA的指環載體降低Raji B細胞之NMI蛋白質表現，而經缺乏miRNA之指環載體感染的Raji B細胞展現出與對照相當的NMI蛋白質表現。

圖15為展示在用包含編碼內源性miRNA之序列的指環載體及其中缺失編碼內源性miRNA之序列的對應指環載體感染之後在宿主細胞中產生的指環載體粒子之定量的一系列圖式。

圖16A至圖16B為展示用於產生表現奈米-螢光素酶之指環載體(A)及用於轉染細胞之一系列指環載體/質體組合(B)的構築體之一系列圖式。

圖17A至圖17C為展示在注射指環載體之小鼠中之奈米-螢光素酶表現的一系列圖式。(A)在注射之後第0-9天時小鼠之奈米-螢光素酶表現。(B)注射如所指示之各種指環載體/質體構築體組合的小鼠中之奈米-螢光

素酶表現。(C)在注射後小鼠中偵測到的奈米-螢光素酶發光之定量。A組接受TTMV-LY2載體+奈米-螢光素酶。B組接受奈米-螢光素酶蛋白質及TTMV-LY2 ORF。

圖18A為展示TTMV-LY2質體pVL46-063及pVL46-240之環化的凝膠電泳成像。

圖18B為展示如由尺寸排阻層析法(SEC)確定之線性及環形TTMV-LY2構築體之複本數的層析圖。

圖18C為展示指環病毒ORF1分子之域及待用來自不同指環病毒之高變域置換之高變區的示意圖。

圖18D為展示ORF1之域及將用來自非指環病毒源之所關注之蛋白質或肽(POI)置換的高變區的示意圖。

圖19為展示經工程化以含有編碼人類紅血球生成素(hEpo)之序列的基於tth8或LY2之指環載體可將功能性轉殖基因遞送至哺乳動物細胞的圖式。

圖20A及20B為展示在靜脈內注射之後七天向小鼠投與之工程化指環載體為可偵測的一系列圖式。

圖21為展示在靜脈內投與編碼hGH之工程化指環載體之後七天在全血之細胞級分中偵測到hGH mRNA的圖式。

圖22為展示活體外環化(IVC) TTV-tth8基因體(IVC TTV-tth8)與質體中之TTV-tth8基因體相比在HEK293T細胞中之預期密度下產生TTV-tth8基因體複本之能力的圖式。

圖23為展示活體外環化(IVC) LY2基因體(WT LY2 IVC)及質體中之野生型LY2基因體(WT LY2質體)在Jurkat細胞中之預期密度下產生LY2基

因體複本之能力的一系列圖式。

圖24A至圖24B為展示各自包含野生型環2基因體之兩個複本的例示性串聯構築體之一系列圖式。在第一構築體中，環2基因體之複本均為野生型序列。在剩餘構築體中，環2基因體之一個複本為野生型，且環2基因體之另一複本包含插入型奈米-螢光素酶匣。藉由使起始密碼子突變以使具有奈米-螢光素酶匣之環2基因體的複本進一步突變以基因敲除ORF之基因表現，使得僅環2基因體之野生型複本能夠實現ORF基因表現。

圖25為展示藉由等密度超速離心證實自經串聯構築體轉染之MOLT-4細胞拯救環2粒子之代表性資料的圖式。以黑色描繪每份之密度，且以灰色展示每份之受DNA酶保護之環2效價。

圖26A至圖26B為展示使用(A) qPCR、西方墨點法及庫馬斯染色；及(B)穿透電子顯微術(TEM)分析之經純化環2粒子之表徵的一系列圖式。

【0208】 當結合附圖閱讀時，將更好地理解本發明之實施例的以下詳細描述。出於說明本發明之目的，在圖式中展示目前例示之實施例。然而，應理解，本發明不限於圖式中所示實施例之精確佈置及工具。

【實施方式】

相關申請案之交互參照

【0209】 本申請案主張2020年6月12日申請之美國臨時申請案第63/038,483號及2021年2月8日申請之美國臨時申請案第63/146,963號的權益。前述申請案之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0210】

定義

將關於特定實施例及參考某些圖式描述本發明，但本發明不限於

此，而僅僅受申請專利範圍限制。除非另外指明，否則如下文所闡述之術語一般應按其常識來理解。

【0211】 當術語「包含(comprising)」用於本發明說明書及申請專利範圍時，不排除其他要素。出於本發明之目，認為術語「由……組成(consist of)」為術語「包含(comprise of)」之一較佳實施例。若下文中將群組定義為包含至少某一數目之實施例，則此亦理解為揭示較佳僅由此等實施例組成之群組。

【0212】 除非另外具體規定，否則若在提及單數名詞時使用不定冠詞或定冠詞，例如「一(a/an)」或「該(the)」，則其包括複數個該名詞。

【0213】 措辭「用於治療、調節等的化合物、組合物、產物等」應理解為係指適用於治療、調節等指示目的之化合物、組合物、產物等本身。措辭「用於治療、調節等的化合物、組合物、產物等」另外揭示，作為一實施例，此類化合物、組合物、產物等用於治療、調節等。

【0214】 措辭「用於……之化合物、組合物、產物等」、「化合物、組合物、產物等在製造用於……之藥物、醫藥組合物、獸醫組合物、診斷組合物等中的用途」或「用作藥劑……之化合物、組合物、產物等」指示此類化合物、組合物、產物等將待用於可在人類或動物體上實施之治療方法中。其被視為實施例之等效揭示內容及關於治療方法之申請專利範圍等。若實施例或技術方案因此係指「用於治療疑似患有疾病之人類或動物的化合物」，則此亦被視為揭示「化合物在製造用於治療疑似患有疾病之人類或動物之藥劑中之用途」或「藉由向疑似患有疾病之人類或動物投與化合物進行治療之方法」。措辭「用於治療、調節等的化合物、組合物、產物等」應理解為係指適用於治療、調節等指示目的之化合物、組合物、

產物等本身。

【0215】 若在下文中將術語、值、數目等之實例提供於括弧中，則此應理解為括弧中提及之實例可構成實施例之指示。例如，若其陳述為「在實施例中，核酸分子包含與表1之編碼指環病毒ORF1的核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列(例如，表1之核酸序列的核苷酸571-2613)」，則隨後一些實施例係關於包含與表1之核酸序列的核苷酸571-2613具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列的核酸分子。

【0216】 如本文所用，術語「擴增」係指核酸分子或其部分之複製以產生核酸分子或其部分之一或多個其他複本(例如遺傳元件或遺傳元件區)。在一些實施例中，擴增引起核酸序列部分複製。在一些實施例中，經由滾環複製進行擴增。

【0217】 如本文所用，術語「指環載體」係指包含包封於蛋白質外部之遺傳元件(例如環形DNA)的媒劑，例如遺傳元件基本上免於被蛋白質外部之DNA酶I消化。如本文所用，「合成指環載體」通常係指非天然產生之指環載體，例如具有相對於野生型病毒(例如如本文所描述之野生型指環病毒)不同的序列。在一些實施例中，合成指環載體經工程改造或重組，例如包含相對於野生型病毒基因體(例如如本文所描述之野生型指環病毒基因體)包含差異或修飾的遺傳元件。在一些實施例中，包封於蛋白質外部內涵蓋由蛋白質外部進行之100%覆蓋以及小於100%覆蓋，例如95%、90%、85%、80%、70%、60%、50%或更小覆蓋。例如，只要遺傳元件保留在蛋白質外部或免於被DNA酶I消化，例如在進入宿主細胞之

前，則蛋白質外部中可存在間隙或不連續性(例如使蛋白質外部對水、離子、肽或小分子可透)。在一些實施例中，指環載體經純化，例如其與其原始來源分離及/或基本上不含(>50%、>60%、>70%、>80%、>90%)其他組分。在一些實施例中，指環載體能夠將遺傳元件引入目標細胞中(例如經由感染)。在一些實施例中，指環載體為感染性合成指環病毒病毒粒子。

【0218】 如本文所用，術語「抗體分子」係指一種蛋白質，例如包含至少一個免疫球蛋白可變域序列的免疫球蛋白鏈或其片段。術語「抗體分子」涵蓋全長抗體及抗體片段(例如scFv)。在一個實施例中，抗體分子為多特異性抗體分子，例如該抗體分子包含複數個免疫球蛋白可變域序列，其中該複數個中之第一免疫球蛋白可變域序列對第一抗原決定基具有結合特異性且該複數個中之第二免疫球蛋白可變域序列對第二抗原決定基具有結合特異性。在實施例中，多特異性抗體分子為雙特異性抗體分子。雙特異性抗體分子之一般特徵為對於第一抗原決定基具有結合特異性之第一免疫球蛋白可變域序列及對於第二抗原決定基具有結合特異性之第二免疫球蛋白可變域序列。

【0219】 如本文所用，「下游複製促進序列(dRFS)」係指遺傳元件之序列的片段(例如如本文中所描述)，其在定位於遺傳元件序列之下游(例如遺傳元件相對於dRFS為5')時，與不存在dRFS的情況下另外類似遺傳元件序列相比，增加遺傳元件序列之複製。一般而言，所得複製股為可包封於蛋白質外部以形成指環載體(例如如本文所描述)之功能性遺傳元件。在一些實施例中，dRFS包含Rep蛋白質(例如指環病毒Rep蛋白質)之置換位點。在一些實施例中，dRFS包含指環病毒3' UTR序列或其片段或

與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在一些實施例中，dRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)。在一些實施例中，dRFS包含複製起點。

【0220】 如本文所用，「上游複製促進序列(uRFS)」係指遺傳元件之序列的片段(例如如本文中所描述)，其在定位於遺傳元件序列之上游(例如遺傳元件相對於uRFS為3')時，與不存在uRFS的情況下另外類似遺傳元件序列相比，增加遺傳元件序列之複製。一般而言，所得複製股為可包封於蛋白質外部以形成指環載體(例如如本文所描述)之功能性遺傳元件。在一些實施例中，uRFS包含Rep蛋白質(例如指環病毒Rep蛋白質)之結合及/或識別位點。在一些實施例中，uRFS包含指環病毒5' UTR序列或其片段或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在一些實施例中，uRFS包含5' UTR (例如包含髮夾環)。在一些實施例中，uRFS包含複製起點。

【0221】 如本文所用，「編碼」之核酸係指編碼胺基酸序列或功能性聚核苷酸(例如非編碼RNA，例如siRNA或miRNA)的核酸序列。

【0222】 如本文所用，「外源性」試劑(例如效應子、核酸(例如RNA)、基因、有效負載、蛋白質)係指不包含或不由相應野生型病毒(例如如本文所描述之指環病毒)編碼的試劑。在一些實施例中，外源性試劑並非天然存在，諸如具有相對於天然存在之蛋白質或核酸改變(例如藉由插入、缺失或取代)之序列的蛋白質或核酸。在一些實施例中，外源性試劑並不天然存在於宿主細胞中。在一些實施例中，外源性試劑天然存在於宿主細胞中但對於病毒為外源性的。在一些實施例中，外源性試劑天然存在於宿主細胞中，但不以所需水準或以所需時間存在。

【0223】 如本文所用之關於另一試劑或元件(例如效應子、核酸序列、胺基酸序列)的「異源」試劑或元件(例如效應子、核酸序列、胺基酸序列)係指例如在野生型病毒(例如指環病毒)中未天然發現於一起的試劑或元件。在一些實施例中，異源核酸序列可如天然存在之核酸序列(例如指環病毒中天然存在之序列)存在於相同核酸中。在一些實施例中，異源試劑或元件相對於指環病毒為外源性的，其中指環載體之其他元件(例如剩餘部分)係基於該指環病毒。

【0224】 如本文中所用，術語「遺傳元件」係指包封於或可包封於(例如免於被DNA酶I消化)蛋白質外部內，例如以形成如本文中所描述之指環載體的核酸分子。應理解，遺傳元件可以裸DNA形式產生且視情況進一步組裝成蛋白質外部。亦應理解，指環載體可將其遺傳元件插入細胞中，使得遺傳元件存在於細胞中且蛋白質外部不一定進入細胞。

【0225】 如本文所用，「遺傳元件構築體」係指包含至少一個(例如兩個)遺傳元件序列或其片段之核酸構築體(例如質體、桿狀病毒質體、黏質體或微型環)。在一些實施例中，如本文所描述之串聯構築體為包含兩個或更多個串聯排列(例如如本文所描述)之遺傳元件序列或其片段的遺傳元件構築體。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含至少一個全長遺傳元件序列。在一些實施例中，遺傳元件包含全長遺傳元件序列及部分遺傳元件序列。在一些實施例中，遺傳元件包含兩個或更多個部分遺傳元件序列(例如以5'至3'之順序，5'截短之遺傳元件序列與3'截短之遺傳元件序列串聯排列，例如如PCT/US19/65995之圖2C中所示)。

【0226】 如本文所用，術語「遺傳元件區」係指包含遺傳元件之序列的構築體區。在一些實施例中，遺傳元件區包含與野生型指環病毒序列

或其片段具有足夠一致性之序列，以由蛋白質外部包封，藉此形成指環載體(例如與野生型指環病毒序列或其片段具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列)。在實施例中，遺傳元件區包含蛋白質結合序列，例如如本文所描述(例如如本文所描述之5' UTR、3' UTR及/或富含GC之區，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列)。在一些實施例中，遺傳元件區可進行滾環複製。在一些實施例中，遺傳元件區包含uRFS。在一些實施例中，遺傳元件區包含dRFS。在一些實施例中，遺傳元件包含Rep蛋白質結合位點。在一些實施例中，遺傳元件包含Rep蛋白質置換位點。在一些實施例中，包含遺傳元件區之構築體不包封於蛋白質外部中，但由構築體產生之遺傳元件可包封於蛋白質外部中。在一些實施例中，包含遺傳元件區之構築體進一步包含第二uRFS或第二dRFS。在一些實施例中，包含遺傳元件區之構築體進一步包含載體主鏈。

【0227】 如本文所用，當相對於基因體(例如指環病毒基因體)或其片段使用時，術語「突變體」係指相對於對應的野生型指環病毒序列具有至少一種變化的序列。在一些實施例中，突變體基因體或其片段包含相對於對應的野生型指環病毒序列的至少一種單核苷酸多型性、添加、缺失或框移。在一些實施例中，突變體基因體或其片段包含相對於對應野生型指環病毒序列的至少一個指環病毒ORF (例如ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1及/或ORF1/2中之一或多者)的缺失。在一些實施例中，突變體基因體或其片段包含相對於對應野生型指環病毒序列的所有指環病毒ORF (例如所有ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1及ORF1/2)

的缺失。在一些實施例中，突變體基因體或其片段包含相對於對應野生型指環病毒序列的至少一個指環病毒非編碼區(例如5' UTR、3' UTR及/或富含GC之區中之一或多者)的缺失。在一些實施例中，突變體基因體或其片段包含或編碼外源性效應子。

【0228】 如本文所用，術語「ORF1分子」係指具有指環病毒ORF1蛋白質(例如如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質)或其功能片段之活性及/或結構特徵的多肽。在一些情況下，ORF1分子可以包含以下一或多者(例如1、2、3或4者)：包含至少60%鹼性殘基(例如至少60%精胺酸殘基)之第一區、包含至少約六條β股之第二區(例如至少4、5、6、7、8、9、10、11或12條β股)、包含指環病毒N22域(例如如本文所描述，例如如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質的N22域)之結構或活性的第三域、及/或包含指環病毒C端域(CTD) (例如如本文所描述，例如如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質的CTD)之結構或活性的第四域。在一些情況中，ORF1分子以N端至C端之順序包含第一、第二、第三及第四區。在一些實施例中，指環載體包含ORF1分子，該ORF1分子以N端至C端之順序包含第一、第二、第三及第四區。在一些情況下，ORF1分子可包含由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽。在一些實施例中，ORF1分子可進一步包含異源序列，例如高變區(HVR)，例如來自指環病毒ORF1蛋白質之HVR，例如如本文所描述。如本文所用，「指環病毒ORF1蛋白質」係指由指環病毒基因體(例如野生型指環病毒基因體，例如如本文所描述)編碼之ORF1蛋白質。

【0229】 如本文所用，術語「ORF2分子」係指具有指環病毒ORF2蛋白質(例如如本文所描述之指環病毒ORF2蛋白質)或其功能片段之活性

及/或結構特徵的多肽。如本文所用，「指環病毒ORF2蛋白質」係指由指環病毒基因體(例如野生型指環病毒基因體，例如如本文所描述)編碼之ORF2蛋白質。

【0230】 如本文所用，術語「蛋白質外部」係指主要為(例如>50%、>60%、>70%、>80%、>90%)蛋白質之外部組分。

【0231】 如本文所用，術語「調控核酸」係指修飾編碼表現產物之DNA序列的表現(例如轉錄及/或轉譯)的核酸序列。在實施例中，表現產物包含RNA或蛋白質。

【0232】 如本文所用，術語「調控序列」係指修飾靶基因產物之轉錄的核酸序列。在一些實施例中，調控序列為啟動子或強化子。

【0233】 如本文所用，術語「Rep」或「複製蛋白」係指促進病毒基因體複製之蛋白質，例如病毒蛋白。在一些實施例中，複製蛋白為指環病毒Rep蛋白質。

【0234】 如本文所用，術語「Rep結合位點」係指由Rep蛋白質(例如指環病毒Rep蛋白質)識別且結合之核酸分子內之核酸序列。在一些實施例中，Rep結合位點包含5' UTR (例如包含髮夾環)。在一些實施例中，Rep結合位點包含複製起點(ORI)。

【0235】 如本文所用，術語「Rep置換位點」係指核酸分子內之核酸序列，其能夠引起與核酸分子相關聯(例如結合至)之Rep蛋白質(例如指環病毒Rep蛋白質)以在到達Rep置換位點後釋放核酸分子。在一些實施例中，Rep置換位點包含5' UTR (例如包含髮夾環)。在一些實施例中，Rep置換位點包含複製起點(ORI)。

【0236】 如本文所用，「基本上非病原性」生物體、粒子或組分係

指不會例如在宿主生物體(例如哺乳動物，例如人類)中引起或誘導不可接受之疾病或病原性病況之生物體、粒子(例如病毒或指環載體，例如如本文所描述)或其組分。在一些實施例中，向個體投與指環載體可引起作為護理標準之一部分可接受的輕微反應或副作用。

【0237】 如本文所用，術語「非病原性」係指例如在宿主生物體(例如哺乳動物，例如人類)中不會引起或誘導不可接受之疾病或病原性病況的生物體或其組分。

【0238】 如本文所用，「基本上非整合型」遺傳元件係指一種遺傳元件，例如病毒或指環載體中之遺傳元件，例如如本文所描述，其中進入宿主細胞(例如真核細胞)或生物體(例如哺乳動物，例如人類)中之小於約0.01%、0.05%、0.1%、0.5%或1%之遺傳元件整合至基因體中。在一些實施例中，遺傳元件不會以可偵測方式整合至例如宿主細胞之基因體中。在一些實施例中，可使用如本文中所描述之技術，例如核酸定序、PCR偵測及/或核酸雜交來偵測遺傳元件至基因體中之整合。在一些實施例中，整合頻率藉由對自游離載體分離之基因體DNA的定量凝膠純化分析法來測定，例如Wang等人(2004，*Gene Therapy* 11: 711-721，以全文引用的方式併入本文中)。

【0239】 如本文所用，「基本上非免疫原性」生物體、粒子或組分係指不會例如在宿主組織或生物體(例如哺乳動物，例如人類)中引起或誘導非所需或非靶向之免疫反應的生物體、粒子(例如病毒或指環載體，例如如本文所描述)或其組分。在實施例中，基本上非免疫原性生物體、粒子或組分不產生臨床上顯著之免疫反應。在實施例中，基本上非免疫原性指環載體不產生針對蛋白質的臨床上顯著之免疫反應，該蛋白質包含胺基

酸序列或由指環病毒或指環載體遺傳元件之核酸序列編碼。在實施例中，免疫反應(例如非所需或非靶向免疫反應)係藉由分析個體中之抗體(例如中和抗體)的存在或水準(例如抗指環載體抗體之存在或水準，例如針對如本文所描述之指環載體之抗體的存在或水準)來偵測，例如根據Tsuda等人中所描述之抗TTV抗體偵測方法(1999; *J. Virol. Methods* 77: 199-206；以引用之方式併入本文中)及/或Kakkola等人中所描述之用於測定抗TTV IgG水準之方法(2008; *Virology* 382: 182-189；以引用之方式併入本文中)。針對指環病毒或基於指環載體之抗體(例如中和抗體)亦可藉由此項技術中用於偵測抗病毒抗體之方法來偵測，例如用偵測抗AAV抗體之方法，例如如Calcedo等人所描述(2013; *Front. Immunol.* 4(341): 1-7；以引用之方式併入本文中)。

【0240】 如本文所用之「子序列」係指分別包含於較大核酸序列或胺基酸序列中的核酸序列或胺基酸序列。在一些情況下，子序列可以包含較大序列之域或功能片段。在一些情況下，子序列可以包含當與較大序列分離時能夠形成二級及/或三級結構之較大序列的片段，當與較大序列之其餘部分存在時該較大序列的片段類似於由子序列形成之二級及/或三級結構。在一些情況下，子序列可經另一序列置換(例如，包含外源性序列之子序列或與較大序列之其餘部分異源的序列，例如來自不同指環病毒之對應子序列)。

【0241】 本發明大體上關於指環載體，例如合成指環載體，及其用途。本發明提供指環載體、包含指環載體之組合物及製造或使用指環載體之方法。指環載體通常可用作遞送媒劑，例如用於將治療劑遞送至真核細胞。一般而言，指環載體將包括遺傳元件，該遺傳元件包含包封於蛋白質

外部內之核酸序列(例如編碼效應子，例如外源性效應子或內源性效應子)。指環載體可包括相對於指環病毒序列(例如如本文所描述)之一或多個序列缺失(例如如本文所描述之區或域)。指環載體可用作基本上非免疫原性媒劑，用於將遺傳元件或其中編碼之效應子(例如多肽或核酸效應子，例如如本文所描述)遞送至真核細胞中，例如用於治療包含該等細胞之個體之疾病或病症。

【0242】

目錄

I.用於製造指環載體之組合物及方法

A.指環載體之組分及組裝

i.用於組裝指環載體之ORF1分子

ii.用於組裝指環載體之ORF2分子

B.遺傳元件構築體

i.質體

ii.環形核酸構築體

iii.活體外環化

iv.順式/反式構築體

v.表現卡匣

vi.遺傳元件構築體之設計及產生

C.效應子

D.宿主細胞

i.將遺傳元件引入宿主細胞中

ii.提供呈順式或反式之指環病毒蛋白質的方法

iii.輔助物

iv.例示性細胞類型

E.培養條件

F.收集

G.富集及純化

II.指環載體

A.指環病毒

B. ORF1分子

C. ORF2分子

D.遺傳元件

E.蛋白質結合序列

F. 5' UTR區

G.富含GC之區

H.效應子

I.調控序列

J.複製蛋白質

K.其他序列

L.蛋白質外部

III.核酸構築體

IV.組合物

V.宿主細胞

VI.使用方法

VII.投與/遞送

【0243】

I.用於製造指環載體之組合物及方法

在一些態樣中，本發明提供可用於產生例如如本文所描述之指環載體的核酸串聯構築體。串聯構築體一般包含第一遺傳元件區，其在不連接至核酸構築體之其餘部分及/或轉化成環形單股DNA分子時，可包封於蛋白質外部內，藉此產生指環載體。串聯構築體可進一步包含第二遺傳元件區或其部分。在一些實施例中，本文所描述之串聯構築體可用於產生適用於例如藉由滾環擴增而在蛋白質外部(例如包含由ORF1核酸編碼之多肽)中進行包封之遺傳元件。在一些實施例中，適用於包封在蛋白質外部中之遺傳元件經由第一遺傳元件區之滾環擴增產生。

【0244】 在一些實施例中，串聯構築體為包含遺傳元件序列之第一複本(例如遺傳元件區)及遺傳元件序列之第二複本之至少一部分(例如包含uRFS或dRFS)的核酸構築體。在一些實施例中，第二複本包含遺傳元件之完整序列。在一些實施例中，第二複本包含遺傳元件之部分序列(例如至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%之遺傳元件序列，例如來自遺傳元件序列之5'端或3'端)。在一些實施例中，第一複本之遺傳元件序列及第二複本之遺傳元件序列係或衍生自相同遺傳元件序列(例如相同指環病毒序列)。在一些實施例中，第一複本之遺傳元件序列及第二複本之遺傳元件序列係或衍生自不同遺傳元件序列(例如來自不同指環病毒之序列)。在一些實施例中，遺傳元件序列之第一複本及遺傳元件序列之第二複本彼此緊鄰地位於核酸構築體上。在其他實施例中，遺傳元件序列之第一複本及遺傳元件序列之第二複本可例如藉由間隔區分開。在一些實施例

中，遺傳元件序列之第二複本或其部分(例如包含uRFS)相對於遺傳元件序列之第一複本定位於5'。在一些實施例中，遺傳元件序列之第二複本或其部分(例如包含dRFS)相對於遺傳元件序列之第一複本定位於3'。

【0245】 不希望受理論所束縛，滾環擴增可經由Rep蛋白質結合至Rep結合位點(例如包含5' UTR，例如包含髮夾環及/或複製起點，例如如本文所描述)而發生，該結合位點相對於第一遺傳元件區(例如在第二遺傳元件區中，例如在uRFS或dRFS中)定位於5' (或在5'區內)。Rep蛋白質可接著繼續通過第一遺傳元件區，引起遺傳元件之合成。在一些實施例中，第二遺傳元件區或其部分相對於第一遺傳元件區定位於3'。在不希望受理論束縛之情況下，經考慮Rep蛋白質可在到達3'定位之第二遺傳元件區之後，例如在到達第二遺傳元件區中之Rep結合位點(例如5' UTR、髮夾環及/或第二遺傳元件序列中之複製起點)之後自串聯構築體脫離，藉此釋放經合成之遺傳元件。所釋放之遺傳元件可接著環化且接著包封於蛋白質外部內以形成指環載體。

【0246】

指環載體之組分及組裝

本文中之組合物及方法可用於產生指環載體。如本文所描述，指環載體一般包含包封於蛋白質外部(例如包含由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽，例如如本文所描述)內之遺傳元件(例如單股環形DNA分子，例如包含如本文所描述之5' UTR區)。在一些實施例中，遺傳元件包含一或多個編碼指環病毒ORF (例如指環病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2中之一或多者)之序列。如本文所用，指環病毒ORF或ORF分子(例如指環病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或

ORF1/2)包括多肽，該多肽包含與對應指環病毒ORF序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，例如如PCT/US2018/037379或PCT/US19/65995中所描述(其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。在實施例中，遺傳元件包含編碼指環病毒ORF1或其剪接變異體或功能片段的序列(例如果凍卷區，例如如本文所描述)。在一些實施例中，蛋白質外部包含由指環病毒ORF1核酸(例如指環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段)編碼之多肽。

【0247】 在一些實施例中，藉由在蛋白質外部(例如如本文所描述)內包封遺傳元件(例如如本文所描述)來組裝指環載體。在一些實施例中，遺傳元件包封於宿主細胞中之蛋白質外部內(例如如本文所描述)。在一些實施例中，宿主細胞表現蛋白質外部所包含之一或多種多肽(例如由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽，例如ORF1分子)。例如，在一些實施例中，宿主細胞包含編碼指環病毒ORF1分子之核酸序列，例如指環病毒ORF1多肽之剪接變異體或功能片段(例如野生型指環病毒ORF1蛋白質或由野生型指環病毒ORF1核酸編碼之多肽，例如如本文所描述)。在實施例中，編碼指環病毒ORF1分子之核酸序列包含於核酸構築體(例如質體、病毒載體、病毒、微型環、桿狀病毒質體或人造染色體)中，該核酸構築體包含於宿主細胞中。在實施例中，編碼指環病毒ORF1分子之核酸序列整合至宿主細胞之基因體中。

【0248】 在一些實施例中，宿主細胞包含遺傳元件及/或包含遺傳元件之序列的核酸構築體。在一些實施例中，核酸構築體係選自質體、病毒核酸、微型環、桿狀病毒質體或人造染色體。在一些實施例中，遺傳元件

自核酸構築體切除，且視情況自雙股形式轉化成單股形式(例如藉由變性)。在一些實施例中，遺傳元件由基於核酸構築體中之模板序列之聚合酶產生。在一些實施例中，聚合酶產生遺傳元件序列之單股複本，其可視情況環化以形成如本文所描述之遺傳元件。在其他實施例中，核酸構築體為藉由活體外環化遺傳元件之核酸序列產生之雙股微型環。在實施例中，將經活體外環化(IVC)之微型環引入至宿主細胞中，在宿主細胞中其轉化為適用於包封於蛋白質外部中之單股遺傳元件，如本文所描述。

【0249】

例如用於組裝指環載體之ORF1分子

指環載體可例如藉由將遺傳元件包封在蛋白質外部內而製得。指環載體之蛋白質外部一般包含由指環病毒ORF1核酸(例如指環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段，例如如本文所描述)編碼之多肽。在一些實施例中，ORF1分子可包含以下中之一或多者：包含富含精胺酸之區之第一區，例如具有至少60%鹼性殘基(例如至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%鹼性殘基；例如60%-90%、60%-80%、70%-90%或70-80%之間的鹼性殘基)之區，及包含果凍卷域之第二域，例如至少六條β股(例如4、5、6、7、8、9、10、11或12條β股)。在實施例中，蛋白質外部包含指環病毒ORF1富含精胺酸之區、果凍卷區、N22域、高變區及/或C端域中之一或多者(例如1、2、3、4或全部5者)。在一些實施例中，蛋白質外部包含指環病毒ORF1果凍卷區(例如如本文所描述)。在一些實施例中，蛋白質外部包含指環病毒ORF1精胺酸富含區(例如如本文所描述)。在一些實施例中，蛋白質外部包含指環病毒ORF1 N22域(例如如本文所描述)。在一些實施例中，蛋白質外部包含指環病毒高變

區(例如如本文所描述)。在一些實施例中，蛋白質外部包含指環病毒ORF1 C端域(例如如本文所描述)。

【0250】在一些實施例中，指環載體包含ORF1分子及/或編碼ORF1分子之核酸。一般而言，ORF1分子包含具有指環病毒ORF1蛋白質(例如如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質)或其功能片段之結構特徵及/或活性的多肽。在一些實施例中，ORF1分子包含相對於指環病毒ORF1蛋白質(例如如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質)之截短。在一些實施例中，ORF1分子經截短指環病毒ORF1蛋白質之至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650或700個胺基酸。在一些實施例中，ORF1分子包含與例如如本文所描述之甲型細環病毒屬、乙型細環病毒屬或丙型細環病毒屬ORF1蛋白質具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列。ORF1分子通常可結合至核酸分子，諸如DNA (例如遺傳元件，例如如本文所描述)。在一些實施例中，ORF1分子定位至細胞核。在某些實施例中，ORF1分子定位至細胞核仁。

【0251】不希望受理論所束縛，ORF1分子可能能夠結合至其他ORF1分子，例如以形成蛋白質外部(例如如本文所描述)。此類ORF1分子可描述為能夠形成衣殼。在一些實施例中，蛋白質外部可包封核酸分子(例如如本文中所描述之遺傳元件，例如使用如本文中所描述之串聯構築體產生)。在一些實施例中，複數個ORF1分子可形成多聚體，例如以產生蛋白質外部。在一些實施例中，多聚體可為均多聚體。在其他實施例中，多聚體可為雜多聚體。

【0252】

例如用於組裝指環載體之ORF2分子

使用本文所描述之組合物或方法產生指環載體可涉及表現指環病毒ORF2分子(例如如本文所描述)或其剪接變異體或功能片段。在一些實施例中，指環載體包含ORF2分子或其剪接變異體或功能片段，及/或編碼ORF2分子或其剪接變異體或功能片段之核酸。在一些實施例中，指環載體不包含ORF2分子或其剪接變異體或功能片段，及/或編碼ORF2分子或其剪接變異體或功能片段之核酸。在一些實施例中，產生指環載體包含表現ORF2分子或其剪接變異體或功能片段，但ORF2分子不併入至指環載體中。

【0253】

例如用於組裝指環載體之遺傳元件構築體

如本文所描述之指環載體之遺傳元件可由包含遺傳元件區及視情況存在之其他序列(諸如載體主鏈)之遺傳元件構築體產生。一般而言，遺傳元件構築體包含指環病毒5' UTR (例如如本文所描述)。遺傳元件構築體可為適用於將遺傳元件之序列遞送至宿主細胞中之任何核酸構築體，其中遺傳元件可包封於蛋白質外部內。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含啟動子。在一些實施例中，遺傳元件構築體為線性核酸分子。在一些實施例中，遺傳元件構築體為環形核酸分子(例如質體、桿狀病毒質體或微型環，例如如本文所描述)。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含桿狀病毒序列(例如使得包含遺傳元件構築體之昆蟲細胞可產生包含遺傳元件構築體之遺傳元件序列或其片段的桿狀病毒)。在一些實施例中，遺傳元件構築體可為雙股的。在其他實施例中，遺傳元件為單股的。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含DNA。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含

RNA。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含一或多個經修飾之核苷酸。

【0254】 在一些實施例中，遺傳元件構築體包含遺傳元件序列之一個複本。在一些實施例中，遺傳元件包含遺傳元件序列之複數個複本(例如遺傳元件序列之兩個複本)。在一些實施例中，遺傳元件包含遺傳元件序列之一個全長複本及至少一個部分遺傳元件序列。在一些實施例中，遺傳元件序列(例如全長及/或部分遺傳元件序列)之兩個複本串聯定位於遺傳元件構築體(例如如本文所描述)內。

【0255】 在一些態樣中，本發明提供一種複製及繁殖如本文所描述之指環載體之方法(例如在細胞培養系統中)，其可包含以下步驟中之一或多者：(a)將遺傳元件(例如線性化)引入(例如轉染)至對指環載體感染敏感之細胞株中；(b)收集細胞且視情況分離展示遺傳元件存在之細胞；(c)培養步驟(b)中獲得之細胞(例如持續至少三天，諸如至少一週或更久)，其取決於實驗條件及基因表現；及(d)收集步驟(c)之細胞，例如如本文所描述。

【0256】

質體

在一些實施例中，遺傳元件構築體為質體。質體將一般包含如本文所描述之遺傳元件之序列以及適用於在宿主細胞中複製之複製起點(例如細菌細胞中複製之細菌複製起點)及可選標記物(例如抗生素抗性基因)。在一些實施例中，遺傳元件之序列可自質體切除。在一些實施例中，質體能夠在細菌細胞中複製。在一些實施例中，質體能夠在哺乳動物細胞(例如人類細胞)中複製。在一些實施例中，質體之長度為至少300、400、

500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000或5000 bp。在一些實施例中，質體之長度為小於600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000或10,000 bp。在一些實施例中，質體之長度在300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1500、1500-2000、2000-2500、2500-3000、3000-4000或4000-5000 bp之間。在一些實施例中，遺傳元件可自質體切除(例如藉由活體外環化)，例如以形成微型環，例如如本文所描述。在實施例中，遺傳元件之切除將遺傳元件序列與質體主鏈分開(例如將遺傳元件與細菌主鏈分開)。

【0257】

小環形核酸構築體

在一些實施例中，遺傳元件構築體為環形核酸構築體，例如缺乏主鏈(例如缺乏細菌複製起點及/或可選標記物)。在實施例中，遺傳元件為雙股環形核酸構築體。在實施例中，雙股環形核酸構築體係藉由活體外環化(IVC)產生，例如如本文所描述。在實施例中，雙股環形核酸構築體可引入至宿主細胞中，在其中其可轉化為或用作用於產生單股環形遺傳元件之模板，例如如本文所描述。在一些實施例中，環形核酸構築體不包含質體主鏈或其功能片段。在一些實施例中，環形核酸構築體之長度為至少2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400或4500 bp。在一些實施例中，環形核酸構築體之長度為小於2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、

4600、4700、4800、4900、5000、5500或6000 bp。在一些實施例中，環形核酸構築體之長度在2000-2100、2100-2200、2200-2300、2300-2400、2400-2500、2500-2600、2600-2700、2700-2800、2800-2900、2900-3000、3000-3100、3100-3200、3200-3300、3300-3400、3400-3500、3500-3600、3600-3700、3700-3800、3800-3900、3900-4000、4000-4100、4100-4200、4200-4300、4300-4400或4400-4500 bp之間。在一些實施例中，環形核酸構築體為微型環。

【0258】

活體外環化

在一些情況下，待封裝至蛋白質外部中之遺傳元件為單股環形DNA。在一些情況下，遺傳元件可經由具有除單股環形DNA以外之形式的遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。例如，遺傳元件構築體可為雙股環形DNA。雙股環形DNA隨後可在宿主細胞(例如包含適用於滾環複製之酶的宿主細胞，例如指環病毒Rep蛋白質，例如Rep68/78、Rep60、RepA、RepB、Pre、MobM、TraX、TrwC、Mob02281、Mob02282、NikB、ORF50240、NikK、TecH、OrfJ或TraI，例如如Wawrzyniak等人, 2017, *Front. Microbio*l. 8: 2353中所描述；其就所列酶而言以引用之方式併入本文中)中轉化為單股環形DNA。在一些實施例中，雙股環形DNA係藉由活體外環化(IVC)產生，例如如實例20中所描述。

【0259】 一般而言，活體外環化DNA構築體可藉由消化包含待封裝之遺傳元件之序列的質體產生，使得遺傳元件序列作為線性DNA分子切除。所得線性DNA可接著例如使用DNA連接酶連接，以形成雙股環形DNA。在一些情況下，藉由活體外環化產生之雙股環形DNA可進行例如

如本文所描述之滾環複製。不希望受理論所束縛，經考慮活體外環化產生可在無進一步修飾之情況下進行滾環複製之雙股DNA構築體，由此能夠產生具有適合待封裝於指環載體中之尺寸的單股環形DNA，例如如本文所描述。在一些實施例中，雙股DNA構築體小於質體(例如細菌質體)。在一些實施例中，雙股DNA構築體自質體(例如細菌質體)切除且接著例如藉由活體外環化而進行環化。

【0260】

順式/反式構築體

在一些實施例中，如本文所描述之遺傳元件構築體包含一或多個編碼一或多個指環病毒ORF之序列，例如蛋白質外部組分(例如由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽，例如如本文所描述)。例如，遺傳元件構築體可包含編碼指環病毒ORF1分子之核酸序列。此類遺傳元件構築體可適於以順式將遺傳元件及指環病毒ORF引入至宿主細胞中。在其他實施例中，如本文所描述之遺傳元件構築體不包含編碼一或多個指環病毒ORF之序列，例如蛋白質外部組分(例如由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽，例如如本文所描述)。例如，遺傳元件構築體可不包含編碼指環病毒ORF1分子之核酸序列。此類遺傳元件構築體可適用於將遺傳元件引入至宿主細胞中，其中一或多個指環病毒ORF以反式提供(例如經由引入編碼指環病毒ORF中之一或多者的第二核酸構築體，或經由整合至宿主細胞之基因體中的指環病毒ORF卡匣)。

【0261】在一些實施例中，遺傳元件構築體包含編碼指環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段的序列(例如果凍卷區，例如如本文所描述)。在實施例中，不包含遺傳元件序列之遺傳元件部分包含編碼指

環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段之序列(例如在包含啟動子及編碼指環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段之序列的卡匣中)。在其他實施例中，包含遺傳元件序列之構築體部分包含編碼指環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段之序列(例如果凍卷，例如如本文所描述)。在實施例中，將此類遺傳元件包封於蛋白質外部(例如如本文所描述)中產生複製勝任型指環載體(例如在感染細胞時，使得細胞能夠產生指環載體之另外複本而不需將其他核酸構築體(例如編碼如本文所描述之一或多個指環病毒ORF)引入至細胞中的指環載體)。

【0262】 在其他實施例中，遺傳元件不包含編碼指環病毒ORF1分子或其剪接變異體或功能片段的序列(例如果凍卷區，例如如本文所描述)。在實施例中，將此類遺傳元件包封於蛋白質外部(例如如本文所描述)中產生複製缺陷型指環載體(例如在感染細胞後不能使感染細胞產生額外指環載體之指環載體，例如在不存在一或多種額外構築體，例如編碼如本文所描述之一或多個指環病毒ORF的情況下)。

【0263】

表現卡匣

在一些實施例中，遺傳元件構築體包含一或多個用於表現多肽或非編碼RNA (例如miRNA或siRNA)的卡匣。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含用於表現效應子(例如外源性或內源性效應子)，例如如本文所描述之多肽或非編碼RNA的卡匣。在一些實施例中，遺傳元件構築體包含用於表現指環病毒蛋白質(例如指環病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2或其功能片段)的卡匣。在一些實施例中，表現卡匣可位於遺傳元件序列內。在實施例中，效應子之表現卡匣位於遺傳

元件序列內。在實施例中，指環病毒蛋白質之表現卡匣位於遺傳元件序列內。在其他實施例中，表現卡匣位於遺傳元件序列之外的遺傳元件構築體內的位置(例如主鏈中)。在實施例中，指環病毒蛋白質之表現卡匣位於遺傳元件序列之外的遺傳元件構築體內的位置(例如主鏈中)。

【0264】 多肽表現卡匣一般包含啟動子及編碼多肽之編碼序列，該多肽例如效應子(例如如本文所描述之外源性或內源性效應子)或指環病毒蛋白(例如編碼指環病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2或其功能片段的序列)。可包括於多肽表現卡匣中(例如以驅動多肽表現)之例示性啟動子包括但不限於組成性啟動子(例如CMV、RSV、PGK、EF1a或SV40)、細胞或組織特異性啟動子(例如骨骼α-肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白輕鏈2A啟動子、肌縮蛋白啟動子、肌肉肌酸激酶啟動子、肝白蛋白啟動子、B型肝炎病毒核心啟動子、骨鈣化素啟動子、骨唾液蛋白啟動子、CD2啟動子、免疫球蛋白重鏈啟動子、T細胞受體a鏈啟動子、神經元特異性烯醇化酶(NSE)啟動子或神經絲輕鏈啟動子)及誘導性啟動子(例如鋅誘導性綿羊金屬硫蛋白(MT)啟動子；地塞米松(Dex)誘導性小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)啟動子；T7聚合酶啟動子系統、四環素抑制性系統、四環素誘導性系統、RU486誘導性系統、雷帕黴素誘導性系統)，例如如本文所描述。在一些實施例中，表現卡匣進一步包含強化子，例如如本文所描述。

【0265】

遺傳元件構築體之設計及產生

各種方法可用於合成遺傳元件構築體。例如，遺傳元件構築體序列可分成更易於合成之較小重疊片段(例如在約100 bp至約10 kb區段或個別

ORF範圍內)。此等DNA區段由一組重疊單股寡核苷酸合成。接著將所得重疊合成子組裝成較大DNA片段，例如遺傳元件構築體。區段或ORF可例如藉由活體外再結合或5'及3'末端處之獨特限制位點組裝成遺傳元件構築體，以實現連接。

【0266】 遺傳元件構築體可由設計演算法合成，該演算法將構築體序列解析為寡核苷酸長度的片段，產生適用於合成之設計條件，其考慮序列空間之複雜性。隨後在基於半導體之高密度晶片上化學合成寡核苷酸，其中每個晶片合成超過200,000個個別寡核苷酸。用諸如BioFab®之組裝技術組裝寡核苷酸，以自較小寡核苷酸建構較長DNA區段。此係以並行方式進行，因此一次性建構數百至數千個合成DNA區段。

【0267】 各遺傳元件構築體或遺傳元件構築體區段可經序列驗證。在一些實施例中，RNA或DNA之高通量定序可使用允許監測生物過程(例如miRNA表現或對偶基因變化性(SNP偵測)之AnyDot.chips (Genovoxx, Germany)進行。其他高通量定序系統包括Venter, J.等人, Science 2001年2月16日；Adams, M.等人, Science 2000年3月24日；及M. J, Levene等人, Science 299:682-686, 2003年1月以及美國公開申請案第20030044781號及第2006/0078937號中所揭示之彼等定序系統。總體而言，此類系統涉及經由在核酸分子上量測之聚合反應藉由暫時添加鹼基來定序具有複數個鹼基之靶核酸分子，亦即，即時追蹤核酸聚合酶在待定序之模板核酸分子上的活性。在一些實施例中，進行霰彈槍定序(shotgun sequencing)。

【0268】 遺傳元件構築體可經設計以使得用於複製或封裝之因子可相對於遺傳元件以順式或反式提供。例如，當以順式供應時，遺傳元件可以包含編碼指環病毒ORF1、ORF1/1 、ORF1/2 、ORF2、ORF2/2 、

ORF2/3或ORF2t/3的一或多個基因，例如如本文所描述。在一些實施例中，複製及/或封裝信號可併入至遺傳元件中，例如以誘導擴增及/或囊封。在一些實施例中，將效應子插入至基因體中之特定位點中。在一些實施例中，一或多個病毒ORF經效應子置換。

【0269】 在另一實例中，當複製或封裝因子以反式提供時，遺傳元件可缺乏編碼指環病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3中之一或多者的基因，例如如本文所描述；此一或多種蛋白質可例如由另一核酸，例如輔助核酸供應。在一些實施例中，最小順式信號(例如5' UTR及/或富含GC之區)存在於遺傳元件中。在一些實施例中，遺傳元件不編碼複製或封裝因子(例如，複製酶及/或衣殼蛋白)。在一些實施例中，此類因子可由一或多種輔助核酸(例如輔助病毒核酸、輔助質體或整合至宿主細胞基因體中之輔助核酸)供應。在一些實施例中，輔助核酸表現足以誘導擴增及/或封裝之蛋白質及/或RNA，但可能缺乏其自身的封裝信號。在一些實施例中，將遺傳元件及輔助核酸引入至宿主細胞中(例如同時或分開)，引起遺傳元件之擴增及/或封裝，但不引起輔助核酸之擴增及/或封裝。

【0270】 在一些實施例中，可使用電腦輔助設計工具設計遺傳元件構築體。

【0271】 製造構築體之一般方法描述於例如Khudyakov及Fields, *Artificial DNA: Methods and Applications*, CRC Press (2002)；Zhao, *Synthetic Biology: Tools and Applications*, (第一版), Academic Press (2013)；及Egli及Herdewijn, *Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids*, (第一版), Wiley-VCH (2012)中。

【0272】

效應子

本文所描述之組合物及方法可用於產生包含編碼效應子(例如外源性效應子或內源性效應子)之序列的指環載體之遺傳元件，例如如本文所描述。在一些情況下，效應子可為內源性效應子或外源性效應子。在一些實施例中，效應子係治療性效應子。在一些實施例中，效應子包含多肽(例如治療性多肽或肽，例如如本文所描述)。在一些實施例中，效應子包含非編碼RNA (例如miRNA、siRNA、shRNA、mRNA、lncRNA、RNA、DNA、反義RNA或gRNA)。在一些實施例中，效應子包含例如如本文所描述之調控核酸。

【0273】 在一些實施例中，效應子編碼序列可例如在非編碼區處插入至遺傳元件中，例如安置於遺傳元件之開讀框之3'及富含GC之區之5'的非編碼區域、在TATA盒上游之5'非編碼區中、在5' UTR中、在多腺苷酸信號下游之3'非編碼區中或在富含GC之區上游。在一些實施例中，效應子編碼序列可插入至遺傳元件中，例如編碼序列中(例如編碼指環病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3之序列中，例如如本文所描述)。在一些實施例中，效應子編碼序列替代開讀框之全部或一部分。在一些實施例中，遺傳元件包含可操作地連接於效應子編碼序列之調控序列(例如啟動子或強化子，例如如本文所描述)。

【0274】 在一些實施例中，包含效應子之遺傳元件例如藉由滾環複製安置於其上之遺傳元件序列而自如本文所描述之遺傳元件構築體(例如串聯構築體)產生。在一些實施例中，串聯構築體恰好包含效應子編碼序列之一個複本。在一些實施例中，串聯構築體包含效應子編碼序列之兩個

或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個)複本。在一些實施例中，串聯構築體包含效應子編碼序列之一個全長複本及效應子編碼序列之至少一個(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9個或更多個)部分複本(例如，包含效應子編碼序列之5'截短或3'截短之部分複本)。

【0275】

宿主細胞

本文所描述之指環載體可以在例如宿主細胞中產生。一般而言，提供包含指環載體遺傳元件及指環載體蛋白質外部組分(例如由指環病毒ORF1核酸或指環病毒ORF1分子編碼之多肽)的宿主細胞。接著在適用於將遺傳元件包封於蛋白質外部內之條件(例如如本文所描述之培養條件)下培育宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞在適用於將指環載體自宿主細胞釋放至例如周圍上清液中之條件下進一步培育。在一些實施例中，裂解宿主細胞以自細胞裂解物收集指環載體。在一些實施例中，可將指環載體引入生長至高細胞密度的宿主細胞株中。

【0276】

將遺傳元件引入宿主細胞中

遺傳元件或核酸構築體包含遺傳元件之序列，可引入至宿主細胞中。在一些實施例中，將遺傳元件本身引入至宿主細胞中。在一些實施例中，將包含遺傳元件(例如如本文所描述)之序列的遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。遺傳元件或遺傳元件構築體可例如使用此項技術中已知之方法引入至宿主細胞中。例如，可藉由轉染(例如穩定轉染或短暫轉染)將遺傳元件或遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。在實施例中，藉由脂染胺(lipofectamine)轉染將遺傳元件或遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。在

實施例中，藉由磷酸鈣轉染將遺傳元件或遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。在一些實施例中，遺傳元件或遺傳元件構築體藉由電穿孔引入至宿主細胞中。在一些實施例中，使用基因槍將遺傳元件或遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。在一些實施例中，遺傳元件或遺傳元件構築體藉由核轉染引入至宿主細胞中。在一些實施例中，藉由PEI轉染將遺傳元件或遺傳元件構築體引入至宿主細胞中。在一些實施例中，藉由使宿主細胞與包含遺傳元件之指環載體接觸而將遺傳元件引入至宿主細胞中。

【0277】 在實施例中，一旦引入至宿主細胞中遺傳元件構築體便能夠複製。在實施例中，一旦引入至宿主細胞中遺傳元件可自遺傳元件構築體中產生。在一些實施例中，遺傳元件藉由聚合酶，例如使用遺傳元件構築體作為模板在宿主細胞中產生。

【0278】 在一些實施例中，將遺傳元件或包含遺傳元件之載體引入(例如轉染)至表現病毒聚合酶蛋白質之細胞株中，以實現指環載體之表現。為此目的，表現指環載體聚合酶蛋白質之細胞株可用作適當宿主細胞。宿主細胞可類似地經工程改造以提供其他病毒功能或額外功能。

【0279】 為製備本文揭示之指環載體，可使用遺傳元件構築體轉染提供複製及生產所需之指環載體蛋白質及功能的細胞。或者，細胞可用提供指環載體蛋白質及功能之第二構築體(例如病毒)轉染，在藉由本文揭示之該遺傳元件或包含該遺傳元件之載體轉染之前、期間或之後。在一些實施例中，第二構築體可適用於補充產生不完全病毒粒子。第二構築體(例如病毒)可具有條件性生長缺陷，諸如宿主範圍限制或溫度敏感度，例如其允許轉染病毒之後續選擇。在一些實施例中，第二構築體可提供宿主細胞所利用之一或多種複製蛋白質以達成指環載體之表現。在一些實施例

中，宿主細胞可經編碼病毒蛋白質(諸如一或多種複製蛋白質)之載體轉染。在一些實施例中，第二構築體包含抗病毒敏感度。

【0280】 在一些情況下，使用此項技術中已知之技術，本文所揭示之遺傳元件或包含遺傳元件之載體可複製且產生於指環載體中。例如，各種病毒培養方法描述於例如美國專利第4,650,764號；美國專利第5,166,057號；美國專利第5,854,037號；歐洲專利公開案EP 0702085A1；美國專利申請案序列號09/152,845；國際專利公開案PCT WO97/12032；WO96/34625；歐洲專利公開案EP-A780475；WO 99/02657；WO 98/53078；WO 98/02530；WO 99/15672；WO 98/13501；WO 97/06270；及EPO 780 47SA1中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0281】

提供呈順式或反式之指環病毒蛋白質的方法

在一些實施例(例如本文所描述之順式實施例)中，遺傳元件構築體進一步包含一或多個表現卡匣，該表現卡匣包含指環病毒ORF (例如指環病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2，或其功能片段)之編碼序列。在實施例中，遺傳元件構築體包含含有指環病毒ORF1或其剪接變異體或功能片段之編碼序列之表現卡匣。包含效應子以及一或多個指環病毒ORF之表現卡匣的此類遺傳元件構築體可引入至宿主細胞中。在一些情況下，包含此類遺傳元件構築體之宿主細胞能夠產生用於蛋白質外部及用於包封遺傳元件於蛋白質外部內之遺傳元件及組分，而無需另外核酸構築體或將表現卡匣整合至宿主細胞基因體中。換言之，此類遺傳元件構築體可用於宿主細胞中之順式指環載體產生方法，例如本文所描述。

【0282】 在一些實施例(例如本文所描述之反式實施例)中，遺傳元

件不包含表現卡匣，該表現卡匣包含一或多個指環病毒ORF (例如指環病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2，或其功能片段)之編碼序列。在實施例中，遺傳元件構築體不包含表現卡匣，該表現卡匣包含指環病毒ORF1或其剪接變異體或功能片段之編碼序列。包含效應子之表現卡匣但缺乏一或多個指環病毒ORF (例如指環病毒ORF1或其剪接變異體或功能片段)之表現卡匣的此類遺傳元件構築體可引入至宿主細胞中。在一些情況下，包含此類遺傳元件構築體之宿主細胞可能需要額外核酸構築體或將表現卡匣整合至宿主細胞基因體中以用於產生指環載體之一或多種組分(例如蛋白質外部蛋白質)。在一些實施例中，包含此類遺傳元件構築體之宿主細胞不能在缺乏編碼指環病毒ORF1分子之額外核酸構築體之情況下在蛋白質外部內包封遺傳元件。換言之，例如如本文所描述，此類遺傳元件構築體可用於宿主細胞中之反式指環載體產生方法。

【0283】

輔助物

在一些實施例中，輔助構築體引入至宿主細胞(例如包含如本文所描述之遺傳元件構築體或遺傳元件的宿主細胞)中。在一些實施例中，輔助構築體在引入遺傳元件構築體之前引入至宿主細胞中。在一些實施例中，在引入遺傳元件構築體的同時，將輔助構築體引入至宿主細胞中。在一些實施例中，輔助構築體在引入遺傳元件構築體之後引入至宿主細胞中。

【0284】

例示性細胞類型

適用於產生指環載體之例示性宿主細胞包括(但不限於)哺乳動物細胞及昆蟲細胞。在一些實施例中，宿主細胞為人類細胞或細胞株。在一些實

施例中，細胞為免疫細胞或細胞株，例如T細胞或細胞株、癌細胞株、肝細胞或細胞株、神經元、神經膠質細胞、皮膚細胞、上皮細胞、間質細胞、血細胞、內皮細胞、眼細胞、胃腸道細胞、祖細胞、前驅細胞、幹細胞、肺細胞、心臟細胞或肌肉細胞。在一些實施例中，宿主細胞為動物細胞(例如小鼠細胞、大鼠細胞、兔細胞、倉鼠細胞或昆蟲細胞)。

【0285】 在一些實施例中，宿主細胞為淋巴細胞。在一些實施例中，宿主細胞為T細胞或永生化T細胞。在實施例中，宿主細胞為Jurkat細胞。在實施例中，宿主細胞為MOLT細胞(例如MOLT-4或MOLT-3細胞)。在實施例中，宿主細胞為MOLT-4細胞。在實施例中，宿主細胞為MOLT-3細胞。在一些實施例中，宿主細胞為急性淋巴母細胞白血病(acute lymphoblastic leukemia，ALL)細胞，例如MOLT細胞，例如MOLT-4或MOLT-3細胞。在一些實施例中，宿主細胞為B細胞或永生化B細胞。在一些實施例中，宿主細胞包含遺傳元件構築體，例如串聯構築體(例如如本文所描述)。

【0286】 在一些實施例中，宿主細胞為MOLT細胞(例如MOLT-4或MOLT-3細胞)。

【0287】 在一些實施例中，宿主細胞為急性淋巴母細胞白血病(ALL)細胞，例如MOLT細胞，例如MOLT-4或MOLT-3細胞。

【0288】 在一態樣中，本發明提供一種製造包含包封於蛋白質外部之遺傳元件的指環載體之方法，該方法包含提供包含指環載體遺傳元件之MOLT-4細胞及在允許指環載體遺傳元件變為包封於MOLT-4細胞中之蛋白質外部之條件下培育MOLT-4細胞。在一些實施例中，MOLT-4細胞進一步包含一或多種形成蛋白質外部之部分或全部之指環病毒蛋白質(例如

指環病毒ORF1分子)。在一些實施例中，在MOLT-4細胞中，例如自遺傳元件構築體(例如如本文所描述)產生指環載體遺傳元件。在一些實施例中，遺傳元件構築體為串聯構築體(例如如本文所描述)。在一些實施例中，遺傳元件構築體不為串聯構築體(例如如本文所描述)。在一些實施例中，該方法進一步包含將指環載體遺傳元件構築體引入至MOLT-4細胞中。

【0289】 在一態樣中，本發明提供一種製造包含包封於蛋白質外部之遺傳元件的指環載體之方法，該方法包含提供包含指環載體遺傳元件之MOLT-3細胞及在允許指環載體遺傳元件變為包封於MOLT-3細胞中之蛋白質外部之條件下培育MOLT-3細胞。在一些實施例中，MOLT-3細胞進一步包含一或多種形成蛋白質外部之部分或全部之指環病毒蛋白質(例如指環病毒ORF1分子)。在一些實施例中，在MOLT-3細胞中，例如自遺傳元件構築體(例如如本文所描述)產生指環載體遺傳元件。在一些實施例中，遺傳元件構築體為串聯構築體(例如如本文所描述)。在一些實施例中，遺傳元件構築體不為串聯構築體(例如如本文所描述)。在一些實施例中，該方法進一步包含將指環載體遺傳元件構築體引入至MOLT-3細胞中。

【0290】 在實施例中，宿主細胞為HEK293T細胞、HEK293F細胞、A549細胞、Jurkat細胞、Raji氏細胞、Chang氏細胞、HeLa細胞、Phoenix細胞、MRC-5細胞、NCI-H292細胞或Wi38細胞。在一些實施例中，宿主細胞為非人類靈長類細胞(例如Vero細胞、CV-1細胞或LLCMK2細胞)。在一些實施例中，宿主細胞為鼠類細胞(例如McCoy細胞)。在一些實施例中，宿主細胞為倉鼠細胞(例如CHO細胞或BHK 21細胞)。在一

些實施例中，宿主細胞為MARC-145、MDBK、RK-13或EEL細胞。在一些實施例中，宿主細胞為上皮細胞(例如上皮譜系之細胞株)。

【0291】 在一些實施例中，指環載體在連續動物細胞株(例如可連續繁殖之永生化細胞株)中培養。根據本發明之一個實施例，細胞株可包括豬細胞株。在本發明之上下文中設想之細胞株包括永生化豬細胞株，諸如(但不限於)豬腎上皮細胞株PK-15及SK、單骨髓細胞株3D4/31及睪丸細胞株ST。

【0292】

培養條件

包含遺傳元件及蛋白質外部組分之宿主細胞可在適用於遺傳元件包封在蛋白質外部內之條件下培育，藉此產生指環載體。適合之培養條件包括例如實例9、10、12至16或20中之任一者中所描述之彼等條件。在一些實施例中，宿主細胞在液體培養基(例如，格里斯氏補充(Grace's Supplemented) (TNM-FH)、IPL-41、TC-100、施奈德果蠅(Schneider's Drosophila)、SF-900 II SFM或EXPRESS-FIVE™ SFM)中培育。在一些實施例中，宿主細胞在黏附培養物中培育。在一些實施例中，宿主細胞在懸浮培養物中培育。在一些實施例中，宿主細胞在管、瓶、微載體或燒瓶中培育。在一些實施例中，宿主細胞在培養皿或孔(例如板上之孔)中培育。在一些實施例中，在適合於宿主細胞增殖之條件下培育宿主細胞。在一些實施例中，在適合於宿主細胞之條件下培育宿主細胞以將其中產生之指環載體釋放至周圍上清液中。

【0293】 根據本發明之含有指環載體之細胞培養物的產生可以不同規模(例如在燒瓶、滾瓶或生物反應器中)進行。用於培養待感染細胞之培

養基一般包含細胞存活率所需之標準營養物，但亦可包含視細胞類型而定之額外營養物。視情況，培養基可不含蛋白質及/或不含血清。視細胞類型而定，細胞可在懸浮液中或在受質上培養。在一些實施例中，不同培養基用於宿主細胞之生長及用於指環載體之產生。

【0294】

收集

可例如根據此項技術中已知之方法收集由宿主細胞產生之指環載體。例如，培養物中由宿主細胞釋放至周圍上清液中的指環載體可自上清液收集(例如如[實例9]中所描述)。在一些實施例中，上清液自宿主細胞分離以獲得指環載體。在一些實施例中，在收集之前或期間裂解宿主細胞。在一些實施例中，自宿主細胞裂解物收集指環載體(例如如[實例15]中所描述)。在一些實施例中，自宿主細胞裂解物及上清液兩者收集指環載體。在一些實施例中，指環載體之純化及分離係根據病毒生產中已知之方法進行，例如如Rinaldi等人, DNA Vaccines: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology),第3版. 2014, Humana Press中所描述，以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，在用醫藥賦形劑調配之前，可基於生理學特性，例如離子交換層析或切向流過濾，藉由分離溶質來收集及/或純化指環載體。

【0295】

富集及純化

可純化及/或富集收集之指環載體，例如以產生指環載體製劑。在一些實施例中，所收集之指環載體與存在於收集溶液中之其他成分或污染物分離，例如使用此項技術中已知用於純化病毒粒子之方法(例如藉由沈

積、層析及/或超過濾進行純化)。在一些實施例中，純化步驟包含自製劑中移除血清、宿主細胞DNA、宿主細胞蛋白質、缺乏遺傳元件之粒子及/或酚紅中之一或多者。在一些實施例中，所收集之指環載體相對於收穫溶液中存在之其他成分或污染物富集，例如使用此項技術中已知用於富集病毒粒子之方法。

【0296】 在一些實施例中，所得製劑或包含製劑之醫藥組合物在可接受之時間段及溫度內將為穩定的，及/或與所需投與途徑及/或此投與途徑將需要之任何裝置相容，例如針或注射器。

【0297】

II.指環載體

在一些態樣中，本文所描述之本發明包含使用及製造指環載體、指環載體製劑及治療性組合物之組合物及方法。在一些實施例中，使用如本文所描述之串聯構築體製備指環載體。在某些實施例中，指環載體之遺傳元件在一些實施例中，指環載體包含一或多種核酸或多肽，其包含基於指環病毒(例如如本文所描述之指環病毒)或其片段或部分，或其他基本上非病原性病毒，例如共生病毒(symbiotic virus)、共生病毒(commensal virus)、天然病毒之序列、結構及/或功能。在一些實施例中，基於指環病毒之指環載體包含至少一個外源性針對指環病毒為外源性之元件，例如外源性效應子或編碼安置於指環載體之遺傳元件內之外源性效應子的核酸序列。在一些實施例中，基於指環病毒之指環載體包含至少一個與來自指環病毒之另一元件異源的元件，例如與另一連接核酸序列，諸如啟動子元件異源之效應子編碼核酸序列。在一些實施例中，指環載體包含遺傳元件(例如環形DNA，例如單股DNA)，其包含相對於遺傳元件及/或蛋白質外

部之其餘部分異源的至少一個元件(例如編碼效應子之外源性元件，例如如本文所描述)。指環載體可為用於有效負載至宿主(例如人類)中之遞送媒劑(例如基本上非病原性遞送媒劑)。在一些實施例中，指環載體能夠在真核細胞，例如哺乳動物細胞，例如人類細胞中複製。在一些實施例中，指環載體在哺乳動物(例如人類)細胞中為基本上非病原性的及/或基本上非整合。在一些實施例中，指環載體在哺乳動物(例如人類)中基本上為非免疫原性的。在一些實施例中，指環載體為複製缺陷型的。在一些實施例中，指環載體為複製勝任型的。

【0298】 在一些實施例中，指環載體包含curon或其組分(例如遺傳元件，例如包含編碼效應子之序列及/或蛋白質外部)，例如如PCT申請案第PCT/US2018/037379中所描述，其以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，指環載體包含指環載體或其組分(例如遺傳元件，例如包含編碼效應子之序列及/或蛋白質外部)，例如如PCT申請案第PCT/US19/65995中所描述，其以全文引用之方式併入本文中。

【0299】 在一態樣中，本發明包括一種指環載體，其包含(i)遺傳元件，該遺傳元件包含啟動子元件、編碼效應子(例如內源性效應子或外源性效應子，例如有效負載)之序列及蛋白質結合序列(例如外部蛋白質結合序列，例如封裝信號)，其中該遺傳元件為單股DNA，且具有以下特性中之一或兩者：為環形及/或以小於進入細胞之遺傳元件的約0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合至真核細胞之基因體中；及(ii)蛋白質外部；其中該遺傳元件包封在該蛋白質外部內；且其中該指環載體能夠將該遺傳元件遞送至真核細胞中。

【0300】 在本文所描述之指環載體之一些實施例中，遺傳元件以小

於進入細胞之遺傳元件的約0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%之頻率整合。在一些實施例中，來自投與至個體之複數個指環載體的小於約0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%或5%的遺傳元件將整合至個體之一或多種宿主細胞之基因體中。在一些實施例中，例如如本文所描述之指環載體群體之遺傳元件以小於可比AAV病毒群體之頻率的頻率，例如以比可比AAV病毒群體低約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或以上的頻率，整合至宿主細胞之基因體中。

【0301】 在一態樣中，本發明包括一種指環載體，其包含：(i)遺傳元件，該遺傳元件包含啟動子元件、編碼效應子(例如內源性效應子或外源性效應子，例如有效負載)之序列及蛋白質結合序列(例如外部蛋白質結合序列)，其中該遺傳元件與野生型指環病毒序列(例如野生型細環病毒(TTV)、小細環病毒(TTMV)或TTMDV序列，例如如本文所描述之野生型指環病毒序列)具有至少75% (例如至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的序列一致性；及(ii)蛋白質外部；其中該遺傳元件包封在該蛋白質外部內；且其中該指環載體能夠將該遺傳元件遞送至真核細胞中。

【0302】 在一個態樣中，本發明包括一種指環載體，其包含：

a)遺傳元件，其包含(i)編碼外部蛋白質(例如非病原性外部蛋白質)之序列、(ii)將遺傳元件結合至非病原性外部蛋白質之外部蛋白質結合序列及(iii)編碼效應子(例如內源性或外源性效應子)之序列；及

b)與遺傳元件相關聯之外部蛋白質，例如封閉或包封該遺傳元件。

【0303】 在一些實施例中，指環載體包括來自非封閉、環形、單股

DNA病毒(或與非封閉、環形、單股DNA病毒具有>70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、100%同源性)之序列或表現產物。動物環形單股DNA病毒一般係指單股DNA (ssDNA)病毒之子組，其感染真核非植物宿主且具有環形基因體。因此，動物環形ssDNA病毒可與感染原核生物之ssDNA病毒(亦即微小噬菌體科(Microviridae)及絲狀噬菌體科(Inoviridae))及感染植物之ssDNA病毒(亦即雙生病毒科(Geminiviridae)及矮化病毒科(Nanoviridae))區分。其亦可與感染非植物真核生物之線性ssDNA病毒(亦即小病毒科(Parvoviridiae))區分。

【0304】 在一些實施例中，指環載體例如短暫或長期地調節宿主細胞功能。在某些實施例中，細胞功能經穩定改變，諸如調節持續至少約1小時至約30天，或至少約2小時、6小時、12小時、18小時、24小時、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、60天或更長時間或其間的任何時間。在某些實施例中，細胞功能短暫改變，例如諸如調節持續不超過約30分鐘至約7天，或不超過約1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、24小時、36小時、48小時、60小時、72小時、4天、5天、6天、7天或其間的任何時間。

【0305】 在一些實施例中，遺傳元件包含啟動子元件。在實施例中，啟動子元件係選自RNA聚合酶II依賴性啟動子、RNA聚合酶III依賴性啟動子、PGK啟動子、CMV啟動子、EF-1α啟動子、SV40啟動子、

CAGG啟動子或UBC啟動子、TTV病毒啟動子、組織特異性U6 (pollIII)、具有活化子蛋白之上游DNA發光位點之最小CMV啟動子(TetR-VP16、Gal4-VP16、dCas9-VP16等)。在實施例中，啟動子元件包含TATA盒。在實施例中，啟動子元件為野生型指環病毒內源性的，例如如本文所描述。

【0306】 在一些實施例中，遺傳元件包含以下特徵中之一或多者：單股、環形、負股及/或DNA。在實施例中，遺傳元件包含游離基因體。在一些實施例中，不包括效應子之遺傳元件部分具有約2.5-5 kb (例如約2.8-4 kb、約2.8-3.2 kb、約3.6-3.9 kb或約2.8-2.9 kb)、小於約5 kb (例如，小於約2.9 kb、3.2 kb、3.6 kb、3.9 kb或4 kb)或至少100個核苷酸(例如至少1 kb)之組合尺寸。

【0307】 如本文所描述之指環載體、包含指環載體之組合物、使用此類指環載體之方法等，在一些情況下，部分基於實例不同效應子，例如miRNA (例如針對IFN或miR-625)、shRNA等及蛋白質結合序列，例如將結合至衣殼蛋白(如Q99153)之DNA序列與蛋白質外部結合，例如於Arch Virol (2007) 152: 1961-1975中所揭示之衣殼，以產生指環載體，其可接著用於將效應子遞送至細胞(例如動物細胞，例如人類細胞或非人類動物細胞，諸如豬或小鼠細胞)中。在實施例中，效應子可沉默因子(諸如干擾素)之表現。實例進一步描述可如何藉由將效應子插入至衍生自例如指環病毒之序列中來製備指環載體。基於此等實例，下文描述涵蓋實例中所考慮之特定發現及組合之各種變化形式。例如，熟習此項技術者將自實例理解，特定miRNA僅用作效應子之一個實例且其他效應子可為例如其他調控核酸或治療性肽。類似地，實施例中所用之特定衣殼可經下文所描述之

基本上非病原性蛋白質置換。實例中所描述之特定指環病毒序列亦可經下文所描述之指環病毒序列置換。此等考慮因素類似地適用於蛋白質結合序列、諸如啟動子之調控序列及其類似者。獨立於此，熟習此項技術者將尤其考慮與實例密切相關之此類實施例。

【0308】 在一些實施例中，將指環載體或包含於指環載體中之遺傳元件引入至細胞(例如人類細胞)中。在一些實施例中，例如在指環載體或遺傳元件已引入至細胞中之後，例如由指環載體之遺傳元件編碼之效應子(例如RNA，例如miRNA)在細胞(例如人類細胞)中表現。在實施例中，將指環載體或包含於其中之遺傳元件引入至細胞中以調節(例如增加或降低)細胞中之靶分子(例如靶核酸，例如RNA或靶多肽)之水準，例如藉由改變細胞之靶分子的表現量。在實施例中，將指環載體或包含於其中之遺傳元件引入以降低細胞所產生之干擾素水準。在實施例中，將指環載體或包含於其中之遺傳元件引入至細胞中以調節細胞之功能。在實施例中，將指環載體或包含於其中之遺傳元件引入至細胞中以調節(例如增加或降低)細胞之存活率。在實施例中，將指環載體或包含於其中之遺傳元件引入至細胞中以降低細胞(例如癌細胞)之存活率。

【0309】 在一些實施例中，本文所描述之指環載體(例如合成指環載體)誘導小於70%之抗體發病率(例如小於約60%、50%、40%、30%、20%或10%抗體發病率)。在實施例中，抗體發病率係根據此項技術中已知之方法測定。在實施例中，抗體發病率係藉由偵測生物樣品中針對指環病毒(例如如本文所描述)之抗體或基於指環載體之抗體來測定，例如根據Tsuda等人(1999; *J. Virol. Methods* 77: 199-206；以引用之方式併入本文中)所描述之抗TTV抗體偵測方法，及/或根據Kakkola等人(2008; *Virology*

382: 182-189；以引用之方式併入本文中)所描述之用於測定抗TTV IgG血清陽性率之方法。針對指環病毒或基於指環載體之抗體亦可藉由此項技術中用於偵測抗病毒抗體之方法來偵測，例如用偵測抗AAV抗體之方法，例如如Calcedo等人所描述(2013; *Front. Immunol.* 4(341): 1-7；以引用之方式併入本文中)。

【0310】 在一些實施例中，複製缺失型、複製缺陷型或複製不勝任型遺傳元件不編碼複製遺傳元件所需之所有必需機構或組分。在一些實施例中，複製缺陷型遺傳元件不編碼複製因子。在一些實施例中，複製缺陷型遺傳元件不編碼一或多個ORF (例如ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3，例如如本文所描述)。在一些實施例中，不由遺傳元件編碼之機構或組分可以反式提供(例如使用輔助物，例如輔助病毒或輔助質體，或在包含宿主細胞之核酸中編碼，例如整合至宿主細胞之基因體中)，例如使得遺傳元件可在以反式提供之機構或組分存在下經歷複製。

【0311】 在一些實施例中，封裝缺失型、封裝缺陷型或封裝不勝任型遺傳元件無法封裝至蛋白質外部(例如其中蛋白質外部包含衣殼或其部分，例如包含由ORF1核酸編碼之多肽，例如如本文所描述)。在一些實施例中，相比於野生型指環病毒(例如如本文所描述)，封裝缺失型遺傳元件以小於10% (例如小於10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%或0.001%)之效率封裝至蛋白質外部中。在一些實施例中，封裝缺失型遺傳元件即使在准許封裝野生型指環病毒(例如如本文所描述)之遺傳元件的因子(例如ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3)存在下亦無法封裝至蛋白質外部

中。在一些實施例中，相比於野生型指環病毒(例如如本文所描述)，即使在准許封裝野生型指環病毒(例如如本文所描述)之遺傳元件的因子(例如ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3)存　在下，封裝缺失型遺傳元件以小於10% (例如小於10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%或0.001%)之效率封裝至蛋白質外部中。

【0312】 在一些實施例中，封裝勝任型遺傳元件可封裝至蛋白質外部(例如其中蛋白質外部包含衣殼或其部分，例如包含由ORF1核酸編碼之多肽，例如如本文所描述)中。在一些實施例中，相比於野生型指環病毒(例如如本文所描述)，封裝勝任型遺傳元件以至少20% (例如至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更高)之效率封裝至蛋白質外部中。在一些實施例中，封裝勝任型遺傳元件在准許封裝野生型指環病毒(例如如本文所描述)之遺傳元件的因子(例如ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3)存在下可封裝至蛋白質外部中。在一些實施例中，相比於野生型指環病毒(例如如本文所描述)，在准許封裝野生型指環病毒(例如如本文所描述)之遺傳元件的因子(例如ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3)存在下，封裝勝任型遺傳元件以至少20% (例如至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更高)之效率封裝至蛋白質外部中。

【0313】

指環病毒

在一些實施例中，例如如本文所描述之指環載體包含衍生自指環病毒之序列或表現產物。在一些實施例中，指環載體包括相對於指環病毒為外源性的一或多種序列或表現產物。在一些實施例中，指環載體包括相對於指環病毒為內源性的一或多種序列或表現產物。在一些實施例中，指環載體包括相對於指環載體中之一或多種其他序列或表現產物為異源的一或多種序列或表現產物。指環病毒一般具有帶負極性之單股環形DNA基因體。指環病毒通常不與任何人類疾病相關聯。然而，將指環病毒感染與人類疾病關聯起來的嘗試被以下各者混淆：對照組群體中無症狀指環病毒病毒血症之高發病率、指環病毒病毒家族內之顯著基因體多樣性、歷史上無法在活體外繁殖該病原體以及缺乏指環病毒疾病動物模型(Yzebe等人, Panminerva Med. (2002) 44:167-177；Biagini, P., Vet. Microbiol. (2004) 98:95-101)。

【0314】 指環病毒通常藉由口鼻或糞口感染、母嬰及/或子宮內傳播來傳播(Gerner等人, Ped. Infect. Dis. J. (2000) 19:1074-1077)。在一些情況下，感染者之特徵可為長期(數月至數年)的指環病毒病毒血症。人類可經超過一個基因組或菌株共感染(Saback等人, Scad. J. Infect. Dis. (2001) 33:121-125)。有跡象表明此等基因組可在感染人類體內重組(Rey等人, Infect. (2003) 31:226-233)。已在若干組織，諸如肝臟、周邊血液單核球及骨髓中發現雙股同功型(複製型)中間物(Kikuchi等人, J. Med. Virol. (2000) 61:165-170；Okamoto等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2002) 270:657-662；Rodriguez-lnigo等人, Am. J. Pathol. (2000) 156:1227-1234)。

【0315】 在一些實施例中，遺傳元件包含核苷酸序列，該核苷酸序

列編碼胺基酸序列或其功能片段，或與本文所描述之胺基酸序列中之任一者(例如指環病毒胺基酸序列)具有至少約60%、70% 80%、85%、90% 95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0316】在一些實施例中，如本文所描述之指環載體包含一或多個核酸分子(例如如本文所描述之遺傳元件)，其包含與例如如本文所描述之指環病毒序列或其片段具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0317】在一些實施例中，如本文所描述之指環載體包含一或多個核酸分子(例如如本文所描述之遺傳元件)，其包含與以下中之一或多者具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列：指環病毒之TATA盒、加帽位點、起始元件、轉錄起始位點、5' UTR保守域、ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3、三個開讀框區、聚(A)信號、富含GC之區或其任何組合，例如如本文所描述。在一些實施例中，核酸分子包含編碼衣殼蛋白之序列，該衣殼蛋白例如本文所描述之任一指環病毒的ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3序列。在實施例中，核酸分子包含編碼衣殼蛋白之序列，該衣殼蛋白包含與指環病毒ORF1蛋白質(或其剪接變異體或功能片段)具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列或由指環病毒ORF1核酸編碼之多肽。

【0318】在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒ORF1核酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含

與表A1之指環病毒ORF1/1核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒ORF1/2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒ORF2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒ORF2/2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒ORF2/3核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒ORF2t/3核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒TATA盒核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒起始元件核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒轉錄起始位點核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒5' UTR保守域核苷酸序列具有至少約70%、

75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒三個開讀框區核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒聚(A)信號核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表A1之指環病毒富含GC之核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。

【0319】在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒ORF1核酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒ORF1/1核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒ORF1/2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒ORF2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒ORF2/2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒ORF2/3核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、

96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒TATA盒核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒起始元件核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒轉錄起始位點核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒5' UTR保守域核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒三個開讀框區核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒聚(A)信號核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表B1之指環病毒富含GC之核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。

【0320】 在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒ORF1核酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒ORF1/1核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒ORF1/2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒ORF2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒ORF2/2核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒ORF2/3核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒TAIP核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒TATA盒核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒起始元件核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒轉錄起始位點核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒5' UTR保守域核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的

核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒三個開讀框區核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒聚(A)信號核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。在實施例中，核酸分子包含與表C1之指環病毒富含GC之核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核酸序列。

【0321】 在一些實施例中，遺傳元件包含核苷酸序列，該核苷酸序列編碼胺基酸序列或其功能片段，或與本文所描述之胺基酸序列中之任一者(例如指環病毒胺基酸序列)具有至少約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0322】 在一些實施例中，如本文所描述之指環載體包含一或多個核酸分子(例如如本文所描述之遺傳元件)，其包含與例如如本文所描述之指環病毒序列或其片段具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。在實施例中，指環載體包含選自以下之核酸序列：表A1-M2中之任一者中所示之序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。在實施例中，指環載體包含多肽，該多肽包含如表A2-M2中之任一者中所示之序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0323】 在一些實施例中，如本文所描述之指環載體包含一或多個

核酸分子(例如如本文所描述之遺傳元件)，其包含與以下中之一或多者具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列：本文所描述之指環病毒(例如如由表A-M中之任一者所列之序列註釋或編碼之指環病毒序列)之TATA盒、加帽位點、起始元件、轉錄起始位點、5' UTR保守域、ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3、三個開讀框區、聚(A)信號、富含GC之區或其任何組合。在一些實施例中，核酸分子包含編碼衣殼蛋白之序列，例如本文所描述之任一指環病毒(例如如由表A-M中之任一者中所列之序列註釋或編碼的指環病毒序列)之ORF1、ORF1/1、ORF1/2，ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3序列。在實施例中，核酸分子包含編碼衣殼蛋白之序列，該衣殼蛋白包含與指環病毒ORF1或ORF2蛋白質(例如表A2-M2中之任一者中所示之ORF1或ORF2胺基酸序列，或由表A1-M1中之任一者中所示之核酸序列編碼的ORF1或ORF2胺基酸序列)具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。在實施例中，核酸分子包含編碼衣殼蛋白之序列，該衣殼蛋白包含與指環病毒ORF1蛋白質(例如表A2-M2中之任一者中所示之ORF1胺基酸序列，或由表A1-M1中之任一者中所示之核酸序列編碼的ORF1胺基酸序列)具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。

【0324】 在一些實施例中，如本文所描述之指環載體為嵌合指環載體。在一些實施例中，嵌合指環載體進一步包含一或多種來自除指環病毒以外之病毒的元件、多肽或核酸。

【0325】 在實施例中，嵌合指環載體包含複數個多肽(例如指環病毒

ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3)，該等多肽包含來自複數個不同指環病毒(例如如本文所描述)之序列。例如，嵌合指環載體可包含來自一種指環病毒之ORF1分子(例如環1 ORF1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性的ORF1分子)，及來自不同指環病毒之ORF2分子(例如環2 ORF2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性的ORF2分子)。在另一實例中，嵌合指環載體可包含來自一種指環病毒之第一ORF1分子(例如環1 ORF1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性的ORF1分子)，及來自不同指環病毒之第二ORF1分子(例如環2 ORF1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性的ORF1分子)。

【0326】 在一些實施例中，指環載體包含嵌合多肽(例如指環病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3)，例如包含來自指環病毒(例如如本文所描述)之至少一部分及來自不同病毒(例如如本文所描述)之至少一部分。

【0327】 在一些實施例中，指環載體包含嵌合多肽(例如指環病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3)，例如包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之至少一部分及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之至少一部分。在實施例中，指環載體包含嵌合ORF1分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之ORF1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF1分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF1分子的至少一部分。在實施例中，嵌合ORF1分子包含來自一種指環病毒之ORF1果凍卷域，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列，及來自不同指環病毒之ORF1胺基酸子序列(例如如本文所描述)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，嵌合ORF1分子包含來自一種指環病毒之ORF1富含精胺酸之區，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列，及來自不同指環病毒之ORF1胺基酸子序列(例如如本文所描述)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，嵌合ORF1分子包含來自一種指環病毒之ORF1高變域，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列，及來自不同指環病毒之ORF1胺基酸子序列(例如如本文所描述)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，嵌合ORF1分子包含來自一種指環病毒之ORF1 N22域，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列，及來自不同指環病毒之ORF1胺基酸子序列(例如如本文所描述)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，嵌合ORF1分子包含來自一種指環病毒之ORF1 C端域，或與其具有至少75%、80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列，及來自不同指環病毒之ORF1胺基酸子序列(例如如本文所描述)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。

【0328】 在實施例中，指環載體包含嵌合ORF1/1分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之ORF1/1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF1/1分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF1/1分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF1/1分子的至少一部分。在實施例中，指環載體包含嵌合ORF1/2分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之ORF1/2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF1/2分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF1/2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF1/2分子的至少一部分。在實施例中，指環載體包含嵌合ORF2分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2分子的至少一部分。在實施例中，指環載體包含嵌合ORF2/2分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之

ORF2/2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2/2分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2/2分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2/2分子的至少一部分。在實施例中，指環載體包含嵌合ORF2/3分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2/3分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2/3分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2/3分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2/3分子的至少一部分。在實施例中，指環載體包含嵌合ORF2T/3分子，該分子包含來自一種指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2T/3分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2T/3分子的至少一部分，及來自不同指環病毒(例如如本文所描述)之ORF2T/3分子，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性之ORF2T/3分子的至少一部分。

【0329】 其中所包含之序列或子序列可用於本文所描述之組合物及方法中(例如以形成指環載體之遺傳元件或作為串聯構築體中之遺傳元件序列，例如如本文所描述)之其他例示性指環病毒基因體描述於例如PCT申請案第PCT/US2018/037379號及PCT/US19/65995號(以全文引用之方式併入本文中)中。在一些實施例中，例示性指環病毒序列包含如以引用之方式併入本文中之PCT/US19/65995之表A1、A3、A5、A7、A9、

A11、B1-B5、1、3、5、7、9、11、13、15或17中之任一者中所列的核酸序列。在一些實施例中，例示性指環病毒序列包含以引用之方式併入本文中之PCT/US19/65995之表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中之任一者中所列的胺基酸序列。在一些實施例中，例示性指環病毒序列包含ORF1分子序列或編碼其之核酸序列，例如如以引用之方式併入本文中之PCT/US19/65995之表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10或37A-37C中之任一者中所列。

表A1.例示性指環病毒核酸序列(甲型細環病毒屬，分枝系3)

名稱	環1
屬/分枝系	甲型細環病毒屬，分枝系3
寄存編號	AJ620231.1

完整序列：3753 bp

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
TGCTACGTCACTAACCCACGTGTCCTCTACAGGCCAATCGCAGTCTATGT
CGTGCACTTCCTGGGCATGGTCTACATAATTATATAAATGCTTGCACTTC
CGAATGGCTGAGTTTTTGCTGCCCGTCCGCGGAGAGGAGCCACGGCAGGG
GATCCGAACGTCCTGAGGGCGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAG
TCAAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCTTTGGGCAAGGCTCTT
AAAAATGCACTTTTCTCGAATAAGCAGAAAGAAAAGGAAAGTGCTACTGC
TTTGCGTGCCAGCAGCTAAGAAAAAACCAACTGCTATGAGCTTCTGGAAA
CCTCCGGTACACAATGTCACGGGGATCCAACGCATGTGGTATGAGTCCTT
TCACCGTGGCCACGCTTCTTTTTGTGGTTGTGGGAATCCTATACTTCACA
TTACTGCACTTGCTGAAACATATGGCCATCCAACAGGCCCGAGACCTTCT
GGGCCACCGGGAGTAGACCCCAACCCCCACATCCGTAGAGCCAGGCCTGC
CCCGGCCGCTCCGGAGCCCTCACAGGTTGATTCGAGACCAGCCCTGACAT
GGCATGGGGATGGTGGAAGCGACGGAGGCGCTGGTGGTTCCGGAAGCGGT
GGACCCGTGGCAGACTTCGCAGACGATGGCCTCGATCAGCTCGTCGCCGC
CCTAGACGACGAAGAGTAAGGAGGCGCAGACGGTGGAGGAGGGGGAGACG
AAAAACAAGGACTTACAGACGCAGGAGACGCTTTAGACGCAGGGGACGAA
AAGCAAAACTTATAATAAAACTGTGGCAACCTGCAGTAATTAAAAGATGC
AGAATAAAGGGATACATACCACTGATTATAAGTGGGAACGGTACCTTTGC
```

CACAAACTTTACCAGTCACATAAATGACAGAATAATGAAAGGCCCCTTCG
GGGGAGGACACAGCACTATGAGGTTCAGCCTCTACATTTTGTTTGAGGAG
CACCTCAGACACATGAACTTCTGGACCAGAAGCAACGATAACCTAGAGCT
AACCAGATACTTGGGGGCTTCAGTAAAAATATACAGGCACCCAGACCAAG
ACTTTATAGTAATATACAACAGAAGAACCCCTCTAGGAGGCAACATCTAC
ACAGCACCCTCTCTACACCCAGGCAATGCCATTTTAGCAAAACACAAAAT
ATTAGTACCAAGTTTACAGACAAGACCAAAGGGTAGAAAAGCAATTAGAC
TAAGAATAGCACCCCCCACACTCTTTACAGACAAGTGGTACTTTCAAAAG
GACATAGCCGACCTCACCCTTTTCAACATCATGGCAGTTGAGGCTGACTT
GCGGTTTCCGTTCTGCTCACCACAAACTGACAACACTTGCATCAGCTTCC
AGGTCCTTAGTTCCGTTTACAACAACTACCTCAGTATTAATACCTTTAAT
AATGACAACTCAGACTCAAAGTTAAAAGAATTTTTAAATAAAGCATTTCC
AACAACAGGCACAAAAGGAACAAGTTTAAATGCACTAAATACATTTAGAA
CAGAAGGATGCATAAGTCACCCACAACTAAAAAAACCAAACCCACAAATA
AACAAACCATTAGAGTCACAATACTTTGCACCTTTAGATGCCCTCTGGGG
AGACCCCATATACTATAATGATCTAAATGAAAACAAAAGTTTGAACGATA
TCATTGAGAAAATACTAATAAAAAACATGATTACATACCATGCAAAACTA
AGAGAATTTCCAAATTCATACCAAGGAAACAAGGCCTTTTGCCACCTAAC
AGGCATATACAGCCCACCATACCTAAACCAAGGCAGAATATCTCCAGAAA
TATTTGGACTGTACACAGAAATAATTTACAACCCTTACACAGACAAAGGA
ACTGGAAACAAAGTATGGATGGACCCACTAACTAAAGAGAACAACATATA
TAAAGAAGGACAGAGCAAATGCCTACTGACTGACATGCCCCTATGGACTT
TACTTTTTGGATATACAGACTGGTGTAAAAAGGACACTAATAACTGGGAC
TTACCACTAAACTACAGACTAGTACTAATATGCCCTTATACCTTTCCAAA
ATTGTACAATGAAAAAGTAAAAGACTATGGGTACATCCCGTACTCCTACA
AATTCGGAGCGGGTCAGATGCCAGACGGCAGCAACTACATACCCTTTCAG
TTTAGAGCAAAGTGGTACCCCACAGTACTACACCAGCAACAGGTAATGGA
GGACATAAGCAGGAGCGGGCCCTTTGCACCTAAGGTAGAAAAACCAAGCA
CTCAGCTGGTAATGAAGTACTGTTTTAACTTTAACTGGGGCGGTAACCCT
ATCATTGAACAGATTGTTAAAGACCCCAGCTTCCAGCCCACCTATGAAAT
ACCCGGTACCGGTAACATCCCTAGAAGAATACAAGTCATCGACCCGCGGG
TCCTGGGACCGCACTACTCGTTCCGGTCATGGGACATGCGCAGACACACA
TTTAGCAGAGCAAGTATTAAGAGAGTGTCAGAACAACAAGAAACTTCTGA
CCTTGTATTCTCAGGCCCAAAAAAGCCTCGGGTCGACATCCCAAAACAAG
AAACCCAAGAAGAAAGCTCACATTCACTCCAAAGAGAATCGAGACCGTGG
GAGACCGAGGAAGAAAGCGAGACAGAAGCCCTCTCGCAAGAGAGCCAAGA
GGTCCCCTTCCAACAGCAGTTGCAGCAGCAGTACCAAGAGCAGCTCAAGC
TCAGACAGGGAATCAAAGTCCTCTTCGAGCAGCTCATAAGGACCCAACAA
GGGGTCCATGTAAACCCATGCCTACGGTAGGTCCCAGGCAGTGGCTGTTT

CCAGAGAGAAAGCCAGCCCCAGCTCCTAGCAGTGGAGACTGGGCCATGGA
GTTTCTCGCAGCAAAAATATTTGATAGGCCAGTTAGAAGCAACCTTAAAG
ATACCCCTTACTACCCATATGTTAAAAACCAATACAATGTCTACTTTGAC
CTTAAATTTGAATAAACAGCAGCTTCAAACTTGCAAGGCCGTGGGAGTTT
CACTGGTCGGTGTCTACCTCTAAAGGTCACTAAGCACTCCGAGCGTAAGC
GAGGAGTGCGACCCTCCCCCCTGGAACAACTTCTTCGGAGTCCGGCGCTA
CGCCTTCGGCTGCGCCGGACACCTCAGACCCCCCCTCCACCCGAAACGCT
TGCGCGTTTCGGACCTTCGGCGTCGGGGGGGTCGGGAGCTTTATTAAACG
GACTCCGAAGTGCTCTTGGACACTGAGGGGGTGAACAGCAACGAAAGTGA
GTGGGGCCAGACTTCGCCATAAGGCCTTTATCTTCTTGCCATTTGTCAGT
GTCCGGGGTCGCCATAGGCTTCGGGCTCGTTTTTAGGCCTTCCGGACTAC
AAAAATCGCCATTTTGGTGACGTCACGGCCGCCATCTTAAGTAGTTGAGG
CGGACGGTGGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACTCAAAA
TGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAAAGGTTACAGCCGCCATGTTAAAACA
CGTGACGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGACACAAGATGGCCGACT
TCCTTCCTCTTTTTCAAAAAAAAGCGGAAGTGCCGCCGCGGCGGCGGGGG
GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGCGCCCCCCCCC
GCGCATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGCCCCCC
CCG (SEQ ID NO: 16)

註釋：

假定域	*鹼基範圍*
TATA盒	83 - 88
加帽位點	104 - 111
轉錄起始位點	111
5' UTR保守域	170 - 240
ORF2	336 - 719
ORF2/2	336 - 715 ; 2363 - 2789
ORF2/3	336 - 715 ; 2565 - 3015
ORF2t/3	336 - 388 ; 2565 - 3015
ORF1	599 - 2830
ORF1/1	599 - 715 ; 2363 - 2830
ORF1/2	599 - 715 ; 2565 - 2789
三個開讀框區	2551 - 2786
聚(A)信號	3011 - 3016
富含GC之區	3632 - 3753

表A2.例示性指環病毒胺基酸序列(甲型細環病毒屬，分枝系3)

環1 (甲型細環病毒屬分枝系3)	
ORF2	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGH

	PTGPRPSGPPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDG GAGGSGSGGPVADFADDGLDQLVAALDDEE (SEQ ID NO: 17)
ORF2/2	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGH PTGPRPSGPPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDG GAGGSGSGGPVADFADDGLDQLVAALDDEELLKTPASSPPMKYPVPVT SLEEYKSSTRGSWDRTTRSGHGTCADTHLAEQVLRECQNNKKLLTLYS QAQKSLGSTSQNKKPKKKAHIHSKENRDRGRPRKKARQKPSRKRAKR SPSNSSCSSSTKSSSSSDRESKSSSSSS (SEQ ID NO: 18)
ORF2/3	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGH PTGPRPSGPPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDG GAGGSGSGGPVADFADDGLDQLVAALDDEEPKKASGRHPKTRNPRRKL TFTPKRIETVGDRGRKRDRSPLAREPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQ SPLRAAHKDPTRGPCKPMPTVGPRQWLFPERKPAPAPSSGDWAMEFLA AKIFDRPVRSNLKDTPYYPYVKNQYNVYFDLKFE (SEQ ID NO: 19)
ORF2t/3	MSFWKPPVHNVTGIQRMWPKKASGRHPKTRNPRRKLTFTPKRIETVGD RGRKRDRSPLAREPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQSPLRAAHKDPT RGPCKPMPTVGPRQWLFPERKPAPAPSSGDWAMEFLAAKIFDRPVRSN LKDTPYYPYVKNQYNVYFDLKFE (SEQ ID NO: 20)
ORF1	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVRRRRR WRRGRRKTRTYRRRRRFRRRGRKAKLIIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIIS GNGTFATNFTSHINDRIMKGPFGGGHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTR SNDNLELTRYLGASVKIYRHPDQDFIVIYNRRTPLGGNIYTAPSLHPGNA ILAKHKILVPSLQTRPKGRKAIRLRIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTLFNIM AVEADLRFPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSINTFNNDNSDSKLKEF LNKAFPTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHPQLKKPNPQINKPLESQYFAP LDALWGDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMITYHAKLREFPNSYQGN KAFCHLTGIYSPPYLNQGRISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPL TKENNIYKEGQSKCLLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRL VLICPYTFPKLYNEKVKDYGYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKW YPTVLHQQQVMEDISRSGPFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFNWGGNPIIEQ IVKDPSFQPTYEIPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFRSWDMRRHTFSRAS IKRVSEQQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESSHSLQRESRPWETEEE SETEALSQESQEVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHV NPCLR (SEQ ID NO: 21)
ORF1/1	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRIVKDPSF QPTYEIPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFRSWDMRRHTFSRASIKRVSE QQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESSHSLQRESRPWETEEESETEAL SQESQEVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCLR (SEQ ID NO: 22)

ORF1/2	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRAQKSLG STSQNKKPKKKAHIHSKENRDRGRPRKKARQKPSRKRAKRSPSNSSCS SSTKSSSSSDRESKSSSSSS (SEQ ID NO: 23)

表B1.例示性指環病毒核酸序列(乙型細環病毒屬)

名稱	環2
屬/分枝系	乙型細環病毒屬
寄存編號	JX134045.1

完整序列：2797 bp

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
TAATAAATATTCAACAGGAAAACCACCTAATTTAAATTGCCGACCACAAA
CCGTCACTTAGTTCCCCTTTTTGCAACAACTTCTGCTTTTTTCCAACTGC
CGGAAAACCACATAATTTGCATGGCTAACCACAAACTGATATGCTAATTA
ACTTCCACAAAACAACTTCCCCTTTTAAAACCACACCTACAAATTAATTA
TTAAACACAGTCACATCCTGGGAGGTACTACCACACTATAATACCAAGTG
CACTTCCGAATGGCTGAGTTTATGCCGCTAGACGGAGAACGCATCAGTTA
CTGACTGCGGACTGAACTTGGGCGGGTGCCGAAGGTGAGTGAAACCACCG
AAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGTTCAGTCTAGCGGAACGGGCAAGAAA
CTTAAAATTATTTTATTTTTCAGATGAGCGACTGCTTTAAACCAACATGC
TACAACAACAAAACAAAGCAAACTCACTGGATTAATAACCTGCATTTAAC
CCACGACCTGATCTGCTTCTGCCCAACACCAACTAGACACTTATTACTAG
CTTTAGCAGAACAACAAGAAACAATTGAAGTGTCTAAACAAGAAAAAGAA
AAAATAACAAGATGCCTTATTACTACAGAAGAAGACGGTACAACTACAGA
CGTCCTAGATGGTATGGACGAGGTTGGATTAGACGCCCTTTTCGCAGAAG
ATTTCGAAGAAAAAGAAGGGTAAGACCTACTTATACTACTATTCCTCTAA
AGCAATGGCAACCGCCATATAAAAGAACATGCTATATAAAAGGACAAGAC
TGTTTAATATACTATAGCAACTTAAGACTGGGAATGAATAGTACAATGTA
TGAAAAAAGTATTGTACCTGTACATTGGCCGGGAGGGGGTTCTTTTTCTG
TAAGCATGTTAACTTTAGATGCCTTGTATGATATACATAAACTTTGTAGA
AACTGGTGGACATCCACAAACCAAGACTTACCACTAGTAAGATATAAAGG
ATGCAAAATAACATTTTATCAAAGCACATTTACAGACTACATAGTAAGAA
TACATACAGAACTACCAGCTAACAGTAACAAACTAACATACCCAAACACA
CATCCACTAATGATGATGATGTCTAAGTACAAACACATTATACCTAGTAG
ACAAACAAGAAGAAAAAAGAAACCATACACAAAAATATTTGTAAAACCAC
CTCCGCAATTTGAAAACAAATGGTACTTTGCTACAGACCTCTACAAAATT
CCATTACTACAAATACACTGCACAGCATGCAACTTACAAAACCCATTTGT
AAAACCAGACAAATTATCAAACAATGTTACATTATGGTCACTAAACACCA
TAAGCATACAAAATAGAAACATGTCAGTGGATCAAGGACAATCATGGCCA
TTTAAAATACTAGGAACACAAAGCTTTTATTTTTACTTTTACACCGGAGC
AAACCTACCAGGTGACACAACACAAATACCAGTAGCAGACCTATTACCAC
TAACAAACCCAAGAATAAACAGACCAGGACAATCACTAAATGAGGCAAAA
ATTACAGACCATATTACTTTCACAGAATACAAAAACAAATTTACAAATTA
TTGGGGTAACCCATTTAATAAACACATTCAAGAACACCTAGATATGATAC
TATACTCACTAAAAAGTCCAGAAGCAATAAAAAACGAATGGACAACAGAA
AACATGAAATGGAACCAATTAAACAATGCAGGAACAATGGCATTAACACC
ATTTAACGAGCCAATATTCACACAAATACAATATAACCCAGATAGAGACA
```

CAGGAGAAGACACTCAATTATACCTACTCTCTAACGCTACAGGAACAGGA
TGGGACCCACCAGGAATTCCAGAATTAATACTAGAAGGATTTCCACTATG
GTTAATATATTGGGGATTTGCAGACTTTCAAAAAAACCTAAAAAAAGTAA
CAAACATAGACACAAATTACATGTTAGTAGCAAAAACAAAATTTACACAA
AAACCTGGCACATTCTACTTAGTAATACTAAATGACACCTTTGTAGAAGG
CAATAGCCCATATGAAAAACAACCTTTACCTGAAGACAACATTAAATGGT
ACCCACAAGTACAATACCAATTAGAAGCACAAAACAAACTACTACAAACT
GGGCCATTTACACCAAACATACAAGGACAACTATCAGACAATATATCAAT
GTTTTATAAATTTTACTTTAAATGGGGAGGAAGCCCACCAAAAGCAATTA
ATGTTGAAAATCCTGCCCACCAGATTCAATATCCCATACCCCGTAACGAG
CATGAAACAACTTCGTTACAGAGTCCAGGGGAAGCCCCAGAATCCATCTT
ATACTCCTTCGACTATAGACACGGGAACTACACAACAACAGCTTTGTCAC
GAATTAGCCAAGACTGGGCACTTAAAGACACTGTTTCTAAAATTACAGAG
CCAGATCGACAGCAACTGCTCAAACAAGCCCTCGAATGCCTGCAAATCTC
GGAAGAAACGCAGGAGAAAAAAGAAAAAGAAGTACAGCAGCTCATCAGCA
ACCTCAGACAGCAGCAGCAGCTGTACAGAGAGCGAATAATATCATTATTA
AAGGACCAATAACTTTTAACTGTGTAAAAAAGGTGAAATTGTTTGATGAT
AAACCAAAAAACCGTAGATTTACACCTGAGGAATTTGAAACTGAGTTACA
AATAGCAAAATGGTTAAAGAGACCCCCAAGATCCTTTGTAAATGATCCTC
CCTTTTACCCATGGTTACCACCTGAACCTGTTGTAAACTTTAAGCTTAAT
TTTACTGAATAAAGGCCAGCATTAATTCACTTAAGGAGTCTGTTTATTTA
AGTTAAACCTTAATAAACGGTCACCGCCTCCCTAATACGCAGGCGCAGAA
AGGGGGCTCCGCCCCCTTTAACCCCCAGGGGGCTCCGCCCCCTGAAACCC
CCAAGGGGGCTACGCCCCCTTACACCCCC (SEQ ID NO: 54)

註釋：

假定域	*鹼基範圍*
TATA盒	237- 243
加帽位點	260 - 267
轉錄起始位點	267
5' UTR保守域	323 - 393
ORF2	424 - 723
ORF2/2	424 - 719 ; 2274 - 2589
ORF2/3	424 - 719 ; 2449 - 2812
ORF1	612 - 2612
ORF1/1	612 - 719 ; 2274 - 2612
ORF1/2	612 - 719 ; 2449 - 2589
三個開讀框區	2441 - 2586
聚(A)信號	2808 - 2813
富含GC之區	2868 - 2929

表B2.例示性指環病毒胺基酸序列(乙型細環病毒屬)

環2 (乙型細環病毒屬)	
ORF2	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQE TIEVSKQEKEKITRCLITTEEDGTTTDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEG (SEQ ID NO: 55)
ORF2/2	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQE TIEVSKQEKEKITRCLITTEEDGTTTDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEG FNIPYPVTSMKQLRYRVQGKPQNPSYTPSTIDTGTTQQQLCHELAKTGHL KTLFLKLQSQIDSNCSNKPSNACKSRKKRRRKKKKKYSSSSATSDSSSSC TESE (SEQ ID NO: 56)
ORF2/3	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQE TIEVSKQEKEKITRCLITTEEDGTTTDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEG ARSTATAQTSPRMPANLGRNAGEKRKRSTAAHQQPQTAAAAVQRANNIII KGPITFNCVKKVKLFDDKPKNRRFTPEEFETELQIAKWLKRPPRSFVNDP PFYPWLPPEPVVNFKLNFTE (SEQ ID NO: 57)
ORF1	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVRPTYTTIPLKQ WQPPYKRTCYIKGQDCLIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVPVHWPGGGSFSV SMLTLDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKITFYQSTFTDYIVRI HTELPANSNKLTYPNTHPLMMMMSKYKHIIPSRQTRRKKKPYTKIFVKPP PQFENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNPFVKPDKLSNNVTLWSLNTI SIQNRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDTTQIPVADLLPL TNPRINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEHLDMIL YSLKSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAGTMALTPFNEPIFTQIQYNPDRD TGEDTQLYLLSNATGTGWDPPGIPELILEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKV TNIDTNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKW YPQVQYQLEAQNKLLQTGPFTPNIQGQLSDNISMFYKFYFKWGGSPPKA INVENPAHQIQYPIPRNEHETTSLQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSR ISQDWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQEKKEKEVQQLISN LRQQQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 58)
ORF1/1	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRIQYPIPRNEHETT SLQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSRISQDWALKDTVSKITEPDRQQ LLKQALECLQISEETQEKKEKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 59)
ORF1/2	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRSQIDSNCSNKPSN ACKSRKKRRRKKKKKYSSSSATSDSSSSCTESE (SEQ ID NO: 60)

表C1.例示性指環病毒核酸序列(丙型細環病毒屬)

名稱 環4

屬/分枝系 丙型細環病毒屬

寄存編號

完整序列：3176 bp

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
TAAAATGGCGGGAGCCAATCATTTTATACTTTCACTTTCCAATTAAAAAT
GGCCACGTCACAAACAAGGGGTGGAGCCATTTAAACTATATAACTAAGTG
GGGTGGCGAATGGCTGAGTTTACCCCGCTAGACGGTGCAGGGACCGGATC
GAGCGCAGCGAGGAGGTCCCCGGCTGCCCATGGGCGGGAGCCGAGGTGAG
TGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCTAGCGGAA
CGGGCAAGAAACTTAAAACAATATTTGTTTTACAGATGGTTAGTATATCC
TCAAGTGATTTTTTTAAGAAAACGAAATTTAATGAGGAGACGCAGAACCA
AGTATGGATGTCTCAAATTGCTGACTCTCATGATAATATCTGCAGTTGCT
GGCATCCATTTGCTCACCTTCTTGCTTCCATATTTCCTCCTGGCCACAAA
GATCGTGATCTTACTATTAACCAAATTCTTCTAAGAGATTATAAAGAAAA
ATGCCATTCTGGTGGAGAAGAAGGAGAAAATTCTGGACCAACAACAGGTT
TAATTACACCAAAAGAAGAAGATATAGAAAAAGATGGCCCAGAAGGCGCC
GCAGAAGAAGACCATACAGACGCCCTGTTCGCCGCCGCCGTAGAAAACTT
CGAAAGGTAAAGAGAAAAAAAAAATCTTTAATTGTTAGACAATGGCAACC
AGACAGTATAAGAACTTGTAAAATTATAGGACAGTCAGCTATAGTTGTTG
GGGCTGAAGGAAAGCAAATGTACTGTTATACTGTCAATAAGTTAATTAAT
GTGCCCCCAAAAACACCATATGGGGGAGGCTTTGGAGTAGACCAATACAC
ACTGAAATACTTATATGAAGAATACAGATTTGCACAAAACATTTGGACAC
AATCTAATGTACTGAAAGACTTATGCAGATACATAAATGTTAAGCTAATA
TTCTACAGAGACAACAAAACAGACTTTGTCCTTTCCTATGACAGAAACCC
ACCTTTTCAACTAACAAAATTTACATACCCAGGAGCACACCCACAACAAA
TCATGCTTCAAAAACACCACAAATTCATACTATCACAAATGACAAAGCCT
AATGGAAGACTAACAAAAAAACTCAAAATTAAACCTCCTAAACAAATGCT
TTCTAAATGGTTCTTTTCAAAACAATTCTGTAAATACCCTTTACTATCTC
TTAAAGCTTCTGCACTAGACCTTAGGCACTCTTACCTAGGCTGCTGTAAT
GAAAATCCACAGGTATTTTTTTATTATTTAAACCATGGATACTACACAAT
AACAAACTGGGGAGCACAATCCTCAACAGCATACAGACCTAACTCCAAGG
TGACAGACACAACATACTACAGATACAAAAATGACAGAAAAAATATTAAC
ATTAAAAGCCATGAATACGAAAAAAGTATATCATATGAAAACGGTTATTT
TCAATCTAGTTTCTTACAAACACAGTGCATATATACCAGTGAGCGTGGTG
AAGCCTGTATAGCAGAAAAACCACTAGGAATAGCTATTTACAATCCAGTA
```

AAAGACAATGGAGATGGTAATATGATATACCTTGTAAGCACTCTAGCAAA
CACTTGGGACCAGCCTCCAAAAGACAGTGCTATTTTAATACAAGGAGTAC
CCATATGGCTAGGCTTATTTGGATATTTAGACTACTGTAGACAAATTAAA
GCTGACAAAACATGGCTAGACAGTCATGTACTAGTAATTCAAAGTCCTGC
TATTTTTACTTACCCAAATCCAGGAGCAGGCAAATGGTATTGTCCACTAT
CACAAAGTTTTATAAATGGCAATGGTCCGTTTAATCAACCACCTACACTG
CTACAAAAAGCAAAGTGGTTTCCACAAATACAATACCAACAAGAAATTAT
TAATAGCTTTGTAGAATCAGGACCATTTGTTCCCAAATATGCAAATCAAA
CTGAAAGCAACTGGGAACTAAAATATAAATATGTTTTTACATTTAAGTGG
GGTGGACCACAATTCCATGAACCAGAAATTGCTGACCCTAGCAAACAAGA
GCAGTATGATGTCCCCGATACTTTCTACCAAACAATACAAATTGAAGATC
CAGAAGGACAAGACCCCAGATCTCTCATCCATGATTGGGACTACAGACGA
GGCTTTATTAAAGAAAGATCTCTTAAAAGAATGTCAACTTACTTCTCAAC
TCATACAGATCAGCAAGCAACTTCAGAGGAAGACATTCCCAAAAAGAAAA
AGAGAATTGGACCCCAACTCACAGTCCCACAACAAAAAGAAGAGGAGACA
CTGTCATGTCTCCTCTCTCTCTGCAAAAAAGATACCTTCCAAGAAACAGA
GACACAAGAAGACCTCCAGCAGCTCATCAAGCAGCAGCAGGAGCAGCAGC
TCCTCCTCAAGAGAAACATCCTCCAGCTCATCCACAAACTAAAAGAGAAT
CAACAAATGCTTCAGCTTCACACAGGCATGTTACCTTAACCAGATTTAAA
CCTGGATTTGAAGAGCAAACAGAGAGAGAATTAGCAATTATATTTCATAG
GCCCCCTAGAACCTACAAAGAGGACCTTCCATTCTATCCCTGGCTACCAC
CTGCACCCCTTGTACAATTTAACCTTAACTTCAAAGGCTAGGCCAACAAT
GTACACTTAGTAAAGCATGTTTATTAAAGCACAACCCCCAAAATAAATGT
AAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAATTGCAAAAATTCGGCGCT
CGCGCGCATGTGCGCCTCTGGCGCAAATCACGCAACGCTCGCGCGCCCGC
GTATGTCTCTTTACCACGCACCTAGATTGGGGTGCGCGCGCTAGCGCGCG
CACCCCAATGCGCCCCGCCCTCGTTCCGACCCGCTTGCGCGGGTCGGACC
ACTTCGGGCTCGGGGGGGCGCGCCTGCGGCGCTTTTTTACTAAACAGACT
CCGAGCCGCCATTTGGCCCCCTAAGCTCCGCCCCCCTCATGAATATTCAT
AAAGGAAACCACATAATTAGAATTGCCGACCACAAACTGCCATATGCTAA
TTAGTTCCCCTTTTACAAAGTAAAAGGGGAAGTGAACATAGCCCCACACC
CGCAGGGGCAAGGCCCCGCACCCCTACGTCACTAACCACGCCCCCGCCGC
CATCTTGGGTGCGGCAGGGCGGGGGC (SEQ ID NO: 886)

註釋：

假定域	*鹼基範圍*
TATA盒	87- 93
加帽位點	110 - 117
轉錄起始位點	117

5' UTR保守域	185 - 254
ORF2	286 - 660
ORF2/2	286 - 656 ; 1998 - 2442
ORF2/3	286 - 656 ; 2209 - 2641
TAIP	385 - 484
ORF1	501 - 2489
ORF1/1	501 - 656 ; 1998 - 2489
ORF1/2	501 - 656 ; 2209 - 2442
三個開讀框區	2209 - 2439
聚(A)信號	2672 - 2678
富含GC之區	3076 - 3176

表C2.例示性指環病毒胺基酸序列(丙型細環病毒屬)

環4 (丙型細環病毒屬)	
ORF2	MVSISSSDFFKKTKFNEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIF PPGHKDRDLTINQILLR DYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPEGAAEEDHTDALFAA AVENFER (SEQ ID NO: 887)
ORF2/2	MVSISSSDFFKKTKFNEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIF PPGHKDRDLTINQILLRDYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDG PEGAAEEDHTDALFAAAVENFESGVDHNSMNQKLLTLANKSSMMSPILS TKQYKLKIQKDKTPDLSSMIGTTDEALLKKDLLKECQLTSQLIQISKQLQ RKTFPKRKRELDPNSQSHNKKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSS SSSSRSSSSSSRETSSSSSTN (SEQ ID NO: 888)
ORF2/3	MVSISSSDFFKKTKFNEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIF PPGHKDRDLTINQILLRDYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDG PEGAAEEDHTDALFAAAVENFERSASNFRGRHSQKEKENWTPTHSPTTK RRGDTVMSPLSLQKRYLPRNRDTRRPPAAHQAAAGAAAPPQEKHPPAHP QTKRESTNASASHRHVTLTRFKPGFEEQTERELAIIFHRPPRTYKEDLPFY PWLPPAPLVQFNLNFKG (SEQ ID NO: 889)
TAIP	MRRRRTKYGCLKLLTLMIISAVAGIHLLTFLLPYFLLATKIVILLLTKFF (SEQ ID NO: 890)
ORF1	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRR RKLRKVKRKKKSLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVN KLINVPPKTPYGGGFGVDQYTLKYLYEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYI NVKLIFYRDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILS QMTKPNGRLTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHS YLGCCNENPQVFFYYLNHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYYRY KNDRKNINIKSHEYEKSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAEKPLGI

	AIYNPVKDNGDGNMIYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLGLFGYL DYCRQIKADKTWLDSHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSFINGNGP FNQPPTLLQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTESNWELKYK YVFTFKWGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIH DWDYRRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQ QKEEETLSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLI HKLKENQQMLQLHTGMLP (SEQ ID NO: 891)
ORF1/1	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRR RKLRKWGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIH DWDYRRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQ QKEEETLSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLI HKLKENQQMLQLHTGMLP (SEQ ID NO: 892)
ORF1/2	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRR RKLRKISKQLQRKTFPKRKR ELDPNSQSHNKKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSSSSSSRSSSSS SRETSSSSSTN (SEQ ID NO: 893)

【0330】在一些實施例中，指環載體包含核酸，其包含以全文引用之方式併入本文中之PCT申請案第PCT/US2018/037379號中所列之序列。在一些實施例中，指環載體包含多肽，其包含以全文引用之方式併入本文中之PCT申請案第PCT/US2018/037379號中所列之序列。在一些實施例中，指環載體包含核酸，其包含以全文引用之方式併入本文中之PCT申請案第PCT/US19/65995號中所列之序列。在一些實施例中，指環載體包含多肽，其包含以全文引用之方式併入本文中之PCT申請案第PCT/US19/65995號中所列之序列。

【0331】

ORF1分子

在一些實施例中，指環載體包含ORF1分子及/或編碼ORF1分子之核酸。一般而言，ORF1分子包含具有指環病毒ORF1蛋白質(例如如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質)之結構特徵及/或活性的多肽。在一些實施例中，ORF1分子包含相對於指環病毒ORF1蛋白質(例如如本文所描述之

指環病毒ORF1蛋白質)之截短。ORF1分子可能能夠結合至其他ORF1分子，例如以形成蛋白質外部(例如如本文所描述)，例如衣殼。在一些實施例中，蛋白質外部可包封核酸分子(例如，如本文中所描述之遺傳元件)。在一些實施例中，複數個ORF1分子可形成多聚體，例如以形成蛋白質外部。在一些實施例中，多聚體可為均多聚體。在其他實施例中，多聚體可為雜多聚體。

【0332】 在一些實施例中，ORF1分子可包含以下中之一或多者：包含富含精胺酸之區之第一區，例如具有至少60%鹼性殘基(例如至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%鹼性殘基；例如60%-90%、60%-80%、70%-90%或70-80%之間的鹼性殘基)之區，及包含果凍卷域之第二域，例如至少六條β股(例如4、5、6、7、8、9、10、11或12條β股)。

【0333】

富含精胺酸之區

富含精胺酸之區與本文所描述之富含精胺酸之區序列或包含至少60%、70%或80%鹼性殘基(例如精胺酸、離胺酸或其組合)之至少約40個胺基酸的序列具有至少70% (例如至少約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列一致性。

【0334】

果凍卷域

果凍卷域或區包含多肽(例如包含於較大多肽中之域或區) (例如由其組成)，該多肽包含以下特徵中之一或多者(例如1、2或3者)：

(i)果凍卷域之胺基酸中之至少30% (例如至少30%、35%、40%、

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或更多)為一或多個β片之一部分；

(ii)果凍卷域之二級結構包含至少四條(例如至少4、5、6、7、8、9、10、11或12條) β股；及/或

(iii)果凍卷域之三級結構包含至少兩個(例如至少2、3或4個) β片；及/或

(iv)果凍卷域包含至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1之β片與α螺旋之比。

【0335】 在某些實施例中，果凍卷域包含兩個β片。

【0336】 在某些實施例中，β片中之一或多者(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10者)包含約八條(例如4、5、6、7、8、9、10、11或12條) β股。在某些實施例中，β片中之一或多者(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10者)包含八條β股。在某些實施例中，β片中之一或多者(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10者)包含七條β股。在某些實施例中，β片中之一或多者(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10者)包含六條β股。在某些實施例中，β片中之一或多者(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10者)包含五條β股。在某些實施例中，β片中之一或多者(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10者)包含四條β股。

【0337】 在一些實施例中，果凍卷域包含與第二β片呈反平行定向之第一β片。在某些實施例中，第一β片包含約四條(例如3、4、5或6條) β股。在某些實施例中，第二β片包含約四條(例如3、4、5或6條) β股。在實施例中，第一及第二β片總共包含約八條(例如6、7、8、9、10、11或12條) β股。

【0338】 在某些實施例中，果凍卷域為衣殼蛋白(例如如本文所描述之ORF1分子)之組分。在某些實施例中，果凍卷域具有自組裝活性。在一些實施例中，包含果凍卷域之多肽結合至包含果凍卷域之多肽的另一複本。在一些實施例中，第一多肽之果凍卷域結合於多肽之第二複本之果凍卷域。

【0339】

N22域

ORF1分子亦可包括包含指環病毒N22域(例如如本文所描述，例如來自如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質的N22域)之結構或活性的第三區，及/或包含指環病毒C端域(CTD) (例如如本文所描述，例如來自如本文所描述之指環病毒ORF1蛋白質的CTD)之結構或活性的第四區。在一些實施例中，ORF1分子以N端至C端之順序包含第一、第二、第三及第四區。

【0340】

高變區(HVR)

在一些實施例中，ORF1分子可進一步包含高變區(HVR)，例如來自指環病毒ORF1蛋白質之HVR，例如如本文所描述。在一些實施例中，HVR位於第二區與第三區之間。在一些實施例中，HVR包含至少約55個(例如至少約45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或65個)胺基酸(例如約45-160、50-160、55-160、60-160、45-150、50-150、55-150、60-150、45-140、50-140、55-140或60-140個胺基酸)。

【0341】

例示性ORF1序列

例示性指環病毒ORF1胺基酸序列及例示性ORF1域之序列提供於下表中。在一些實施例中，本文所描述之多肽(例如ORF1分子)包含與一或多個指環病毒ORF1子序列(例如如表N-Z中之任一者中所描述)具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之指環載體包含ORF1分子，其包含與一或多個指環病毒ORF1子序列(例如如表N-Z中之任一者中所描述)具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，本文所描述之指環載體包含核酸分子(例如遺傳元件)，該核酸分子編碼ORF1分子，該ORF1分子包含與一或多個指環病毒ORF1子序列(例如如表N-Z中之任一者中所描述)具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。

【0342】 在一些實施例中，一或多個指環病毒ORF1子序列包含以下中之一或多者：富含精胺酸(Arg)之域、果凍卷域、高變區(HVR)、N22域或C端域(CTD) (例如如表N-Z中之任一者中所列)或與其具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列。在一些實施例中，ORF1分子包含來自不同指環病毒之複數個子序列(例如選自表N-Z中所列之甲型細環病毒屬分枝系1-7子序列的ORF1子序列之任何組合)。在實施例中，ORF1分子包含以下中之一或多者：富含Arg之域、果凍卷域、N22域及來自一種指環病毒之CTD及來自另一種指環病毒之HVR。在實施例中，ORF1分子包含以下中之一或多者：果凍卷域、HVR、N22域及來自一種指環病毒之CTD及來自另一種指環病毒之富含Arg之域。在實施例中，ORF1分子包含以下中之一或多者：富含Arg之

域、HVR、N22域及來自一種指環病毒之CTD及來自另一種指環病毒之果凍卷域。在實施例中，ORF1分子包含以下中之一或多者：富含Arg之域、果凍卷域、HVR及來自一種指環病毒之CTD及來自另一種指環病毒之N22域。在實施例中，ORF1分子包含以下中之一或多者：富含Arg之域、果凍卷域、HVR及來自一種指環病毒之N22域及來自另一種指環病毒之CTD。

【0343】 其中之ORF1分子或其剪接變異體或功能片段可用於本文所描述之組合物及方法中(例如以形成指環載體之蛋白質外部，例如藉由包封遺傳元件)之其他例示性指環病毒基因體描述於例如PCT申請案第PCT/US2018/037379號及PCT/US19/65995號(以全文引用之方式併入本文中)中。

表N.例示性指環病毒ORF1胺基酸子序列(甲型細環病毒屬，分枝系3)

名稱	環1
屬/分枝系	甲型細環病毒屬，分枝系3
寄存編號	AJ620231.1
蛋白質寄存編號	CAF05750.1

完整序列： 743 AA

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVRRRRRWRRGR
RKTRTYRRRRRFRRRGRKAKLIIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTF
ATNFTSHINDRIMKGPFGGGHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSNDNLE
LTRYLGASVKIYRHPDQDFIVIYNRRTPLGGNIYTAPSLHPGNAILAKHK
ILVPSLQTRPKGRKAIRLRIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTLFNIMAVEAD
LRFPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSINTFNNDNSDSKLKEFLNKAF
PTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHPQLKKPNPQINKPLESQYFAPLDALW
GDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMITYHAKLREFPNSYQGNKAFCHL
TGIYSPPYLNQGRISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNI
YKEGQSKCLLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFP
KLYNEKVKDYGYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKWYPTVLHQQQVM
```

EDISRSGPFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFNWGGNPIIEQIVKDPSFQPTYE
IPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFRSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETS
DLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESSHSLQRESRPWETEEESETEALSQESQ
EVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCLR
(SEQ ID NO: 185)

註釋：

假定域	*AA範圍*
富含Arg之區	1 - 68
果凍卷域	69 - 280
高變區	281 - 413
N22	414 - 579
C端域	580 - 743

表O.例示性指環病毒ORF1胺基酸子序列(甲型細環病毒屬，分枝系3)

環1 ORF1 (甲型細環病毒屬分枝系3)	
富含Arg之區	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVR RRRRWRRGRRKTRTYRRRRRFRRRGRK (SEQ ID NO: 186)
果凍卷域	AKLIIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTFATNFTSHINDRIMKGP FGGGHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSNDNLELTRYLGASVKI YRHPDQDFIVIYNRRTPLGGNIYTAPSLHPGNAILAKHKILVPSLQ TRPKGRKAIRLRIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTLFNIMAVEADLR FPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSI (SEQ ID NO: 187)
高變域	NTFNNDNSDSKLKEFLNKAFPTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHP QLKKPNPQINKPLESQYFAPLDALWGDPIYYNDLNENKSLNDIIE KILIKNMITYHAKLREFPNSYQGNKAFCHLTGIYSPPYLNQGR (SEQ ID NO: 188)
N22	ISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNIYKEGQSKC LLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFPKL YNEKVKDYGYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKWYPTVLH QQQVMEDISRSGPFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFN (SEQ ID NO: 189)
C端域	WGGNPIIEQIVKDPSFQPTYEIPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFR SWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQE ESSHSLQRESRPWETEEESETEALSQESQEVPFQQQLQQQYQEQL KLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCLR (SEQ ID NO: 190)

表P.例示性指環病毒ORF1胺基酸子序列(乙型細環病毒屬)

名稱	環2
屬/分枝系	乙型細環病毒屬
寄存編號	JX134045.1
蛋白質寄存編號	AGG91484.1

完整序列：666 AA

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVRPTYTTIPLKQWQ
PPYKRTCYIKGQDCLIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVPVHWPGGGSFSVSML
TLDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKITFYQSTFTDYIVRIHTE
LPANSNKLTYPNTHPLMMMMSKYKHIIPSRQTRRKKKPYTKIFVKPPPQF
ENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNPFVKPDKLSNNVTLWSLNTISIQ
NRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDTTQIPVADLLPLTNP
RINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEHLDMILYSL
KSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAGTMALTPFNEPIFTQIQYNPDRDTGED
TQLYLLSNATGTGWDPPGIPELILEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNID
TNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQV
QYQLEAQNKLLQTGPFTPNIQGQLSDNISMFYKFYFKWGGSPPKAINVEN
PAHQIQYPIPRNEHETTSLQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSRISQ
DWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQEKKEKEVQQLISNLRQ
QQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 215)
```

註釋：

假定域	*AA範圍*
富含Arg之區	1 - 38
果凍卷域	39 - 246
高變區	247 - 374
N22	375 - 537
C端域	538 - 666

表Q.例示性指環病毒ORF1胺基酸子序列(乙型細環病毒屬)

環2 ORF1 (乙型細環病毒屬)	
富含Arg之區	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVR (SEQ ID NO: 216)
果凍卷域	PTYTTIPLKQWQPPYKRTCYIKGQDCLIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVP VHWPGGGSFSVSMLTLDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCK ITFYQSTFTDYIVRIHTELPANSNKLTYPNTHPLMMMMSKYKHIIPSR QTRRKKKPYTKIFVKPPPQFENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNP FVKPDKLSNNVTLWSLNT (SEQ ID NO: 217)
高變域	ISIQNRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDTTQIPVADL LPLTNPRINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEH LDMILYSLKSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAG (SEQ ID NO: 218)
N22	TMALTPFNEPIFTQIQYNPDRDTGEDTQLYLLSNATGTGWDPPGIPELI LEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNIDTNYMLVAKTKFTQKPGTFYL VILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQVQYQLEAQNKLLQTGPFT PNIQGQLSDNISMFYKFYFK (SEQ ID NO: 219)
C端域	WGGSPPKAINVENPAHQIQYPIPRNEHETTSLQSPGEAPESILYSFDYR HGNYTTTALSRISQDWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQ EKKEKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 220)

表R.例示性指環病毒ORF1胺基酸子序列(丙型細環病毒屬)

名稱 環4

屬/分枝系 丙型細環病毒屬

寄存編號

蛋白質寄存編號

完整序列：662 AA

```
1         10         20         30         40         50
|         |          |          |          |          |
MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRKL
RKVKRKKKSLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLIN
VPPKTPYGGGFGVDQYTLKYLYEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLI
FYRDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKP
NGRLTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCN
ENPQVFFYYLNHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYYRYKNDRKNIN
IKSHEYEKSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAEKPLGIAIYNPV
KDNGDGNMIYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLGLFGYLDYCRQIK
ADKTWLDSHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSFINGNGPFNQPPTL
LQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTESNWELKYKYVFTFKW
```

GGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDYRR
GFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEET
LSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLIHKLKEN
QQMLQLHTGMLP (SEQ ID NO: 925)

註釋：

假定域	*AA範圍*
富含Arg之區	1 - 58
果凍卷域	59 - 260
高變區	261 - 339
N22	340 - 499
C端域	500 - 662

表S.例示性指環病毒ORF1胺基酸子序列(丙型細環病毒屬)

環4 (丙型細環病毒屬)	
富含Arg之區	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPV RRRRRKLRKVKRKKK (SEQ ID NO: 926)
果凍卷域	SLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLINVPPK TPYGGGFGVDQYTLKYLYEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKL IFYRDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILS QMTKPNGRLTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALD LRHSYLGCCNENPQVFFYYL (SEQ ID NO: 927)
高變域	NHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYYRYKNDRKNINIKSHE YEKSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAE (SEQ ID NO: 928)
N22	KPLGIAIYNPVKDNGDGNMIYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPI WLGLFGYLDYCRQIKADKTWLDSHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWY CPLSQSFINGNGPFNQPPTLLQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFV PKYANQTESNWELKYKYVFTFK (SEQ ID NO: 929)
C端域	WGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHD WDYRRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLT VPQQKEEETLSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLL KRNILQLIHKLKENQQMLQLHTGMLP (SEQ ID NO: 930)

【0344】 在一些實施例中，第一區可結合至核酸分子(例如DNA)。在一些實施例中，鹼性殘基係選自精胺酸、組胺酸或離胺酸或其組合。在一些實施例中，第一區包含至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%精胺酸殘基(例如60%-90%、60%-80%、70%-90%或

70%-80%精胺酸殘基)。在一些實施例中，第一區包含約30-120個胺基酸(例如約40-120、40-100、40-90、40-80、40-70、50-100、50-90、50-80、50-70、60-100、60-90或60-80個胺基酸)。在一些實施例中，第一區包含病毒ORF1富含精胺酸之區(例如來自指環病毒ORF1蛋白質之富含精胺酸之區，例如如本文所描述)的結構或活性。在一些實施例中，第一區包含核定位信號。

【0345】 在一些實施例中，第二區包含果凍卷域，例如病毒ORF1果凍卷域(例如來自指環病毒ORF1蛋白質之果凍卷域，例如如本文所描述)的結構或活性。在一些實施例中，第二區能夠結合至另一ORF1分子之第二區，例如以形成蛋白質外部(例如衣殼)或其一部分。

【0346】 在一些實施例中，第四區暴露於蛋白質外部(例如包含ORF1分子之多聚體的蛋白質外部，例如如本文所描述)之表面上。

【0347】 在一些實施例中，第一區、第二區、第三區、第四區及/或HVR各自包含少於四個(例如0、1、2或3個) β片。

【0348】 在一些實施例中，第一區、第二區、第三區、第四區及/或HVR中之一或多者可由異源胺基酸序列(例如來自異源ORF1分子之對應區域)替換。在一些實施例中，異源胺基酸序列具有所需功能性，例如如本文所描述。

【0349】 在一些實施例中，ORF1分子包含複數個保守模體(例如，包含約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100或更多個胺基酸的模體) (例如，如PCT/US19/65995之圖34中所示)。在一些實施例中，保守模體可展示與一或多種野生型指環病毒分枝系(例如甲型細環病毒屬，

分枝系1；甲型細環病毒屬，分枝系2；甲型細環病毒屬，分枝系3；甲型細環病毒屬，分枝系4；甲型細環病毒屬，分枝系5；甲型細環病毒屬，分枝系6；甲型細環病毒屬，分枝系7；乙型細環病毒屬；及/或丙型細環病毒屬)之ORF1蛋白質的60、70、80、85、90、95或100%序列一致性。在實施例中，保守模體各自之長度為在1-1000個之間的(例如5-10、5-15、5-20、10-15、10-20、15-20、5-50、5-100、10-50、10-100、10-1000、50-100、50-1000或100-1000個)胺基酸。在某些實施例中，保守模體由ORF1分子之序列的約2-4% (例如約1-8%、1-6%、1-5%、1-4%、2-8%、2-6%、2-5%或2-4%)組成，且各自展示出與野生型指環病毒分枝系之ORF1蛋白質中之對應模體的100%序列一致性。在某些實施例中，保守模體由ORF1分子之序列的約5-10% (例如約1-20%、1-10%、5-20%或5-10%)組成，且各自展示出與野生型指環病毒分枝系之ORF1蛋白質中之對應模體的80%序列一致性。在某些實施例中，保守模體由ORF1分子之序列的約10-50% (例如約10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、20-40%、20-50%或30-50%)組成，且各自展示出與野生型指環病毒分枝系之ORF1蛋白質中之對應模體的60%序列一致性。在一些實施例中，保守模體包含一或多個如表19中所列之胺基酸序列。

【0350】 在一些實施例中，ORF1分子相對於野生型ORF1蛋白質包含至少一個差異(例如突變、化學修飾或表觀遺傳改變)，例如如本文所描述。

【0351】

N22域中之保守ORF1模體

在一些實施例中，本文所描述之多肽(例如ORF1分子)包含胺基酸序

列YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)，其中X^{n}為任何n個胺基酸之連續序列。例如，X^{2}指示任何兩個胺基酸之連續序列。在一些實施例中，YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)包含於ORF1分子之N22域內，例如如本文所描述。在一些實施例中，本文所描述之遺傳元件包含編碼胺基酸序列YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)之核酸序列(例如編碼ORF1分子之核酸序列，例如如本文所描述)，其中X^{n}為任何n個胺基酸之連續序列。

【0352】 在一些實施例中，多肽(例如ORF1分子)包含保守二級結構，例如側接及/或包含YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)模體之一部分，例如在N22域中。在一些實施例中，保守二級結構包含第一β股及/或第二β股。在一些實施例中，第一β股之長度為約5-6個(例如3、4、5、6、7或8個)胺基酸。在一些實施例中，第一β股包含在YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)模體之N端的酪胺酸(Y)殘基。在一些實施例中，YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)模體包含無規捲曲(例如約8-9個胺基酸之無規捲曲)。在一些實施例中，第二β股之長度為約7-8個(例如5、6、7、8、9或10個)胺基酸。在一些實施例中，第二β股包含在YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)模體之C端的天冬醯胺(N)殘基。

【0353】 例示性YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)模體側接二級結構描述於PCT/US19/65995之實例47及圖48中；該案以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，ORF1分子包含區，該區包含PCT/US19/65995之圖48中所示之一或多個(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或全部)二級結構元件(例如β股)。在一些實施例中，ORF1分子包含區，該區包含PCT/US19/65995之圖48中所示之一或多個(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或全部)二級結構元件(例如β股)，側接

YNPX^{2}DXGX^{2}N (SEQ ID NO: 829)模體(例如如本文所描述)。

【0354】

ORF1果凍卷域中之保守二級結構模體

在一些實施例中，本文所描述之多肽(例如ORF1分子)包含指環病毒ORF1蛋白質(例如如本文所描述)所包含之一或多個二級結構元件。在一些實施例中，ORF1分子包含指環病毒ORF1蛋白質之果凍卷域所包含之一或多個二級結構元件(例如如本文所描述)。通常，ORF1果凍卷域包含二級結構，該二級結構按N端至C端方向之順序包含第一β股、第二β股、第一α螺旋、第三β股、第四β股、第五β股、第二α螺旋、第六β股、第七β股、第八β股及第九β股。在一些實施例中，ORF1分子包含二級結構，該二級結構按N端至C端方向之順序包含第一β股、第二β股、第一α螺旋、第三β股、第四β股、第五β股、第二α螺旋、第六β股、第七β股、第八β股及/或第九β股。

【0355】 在一些實施例中，一對保守二級結構元件(亦即β股及/或α螺旋)由間隙胺基酸序列隔開，例如包含無規捲曲序列、β股或α螺旋或其組合。保守二級結構元件之間的間隙胺基酸序列可包含例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個或更多個胺基酸。在一些實施例中，ORF1分子可進一步包含一或多個額外β股及/或α螺旋(例如在果凍卷域中)。在一些實施例中，可組合連續β股或連續α螺旋。在一些實施例中，第一β股及第二β股包含於較大β股中。在一些實施例中，第三β股及第四β股包含於較大β股中。在一些實施例中，第四β股及第五β股包含於較大β股中。在一些實施例中，第六β股及第七β股包含於較大β股

中。在一些實施例中，第七β股及第八β股包含於較大β股中。在一些實施例中，第八β股及第九β股包含於較大β股中。

【0356】在一些實施例中，第一β股之長度為約5-7個(例如3、4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸。在一些實施例中，第二β股之長度為約15-16個(例如13、14、15、16、17、18或19個)胺基酸。在一些實施例中，第一α螺旋之長度為約15-17個(例如13、14、15、16、17、18、19或20個)胺基酸。在一些實施例中，第三β股之長度為約3-4個(例如1、2、3、4、5或6個)胺基酸。在一些實施例中，第四β股之長度為約10-11個(例如8、9、10、11、12或13個)胺基酸。在一些實施例中，第五β股之長度為約6-7個(例如4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸。在一些實施例中，第二α螺旋之長度為約8-14個(例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17個)胺基酸。在一些實施例中，第二α螺旋可分解為兩個較小α螺旋(例如由無規捲曲序列分隔開)。在一些實施例中，兩個較小α螺旋中之每一者之長度為約4-6個(例如2、3、4、5、6、7或8個)胺基酸。在一些實施例中，第六β股之長度為約4-5個(例如，2、3、4、5、6或7個)胺基酸。在一些實施例中，第七β股之長度為約5-6個(例如3、4、5、6、7、8或9個)胺基酸。在一些實施例中，第八β股之長度為約7-9個(例如5、6、7、8、9、10、11、12或13個)胺基酸。在一些實施例中，第九β股之長度為約5-7個(例如，3、4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸。

【0357】例示性果凍卷域二級結構描述於PCT/US19/65995之實例47及圖47中。在一些實施例中，ORF1分子包含區，該區包含PCT/US19/65995之圖47中所示之果凍卷域二級結構中之任一者的一或多個(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或全部)二級結構元件(例如β

股及/或α螺旋)。

【0358】

共有ORF1域序列

在一些實施例中，例如如本文所描述之ORF1分子包含果凍卷域、N22域及/或C端域(CTD)中之一或多者。在一些實施例中，果凍卷域包含具有如本文所描述之果凍卷域共有序列的胺基酸序列(例如如表37A-37C中之任一者中所列)。在一些實施例中，N22域包含具有如本文所描述之N22域共有序列的胺基酸序列(例如如表37A-37C中之任一者中所列)。在一些實施例中，CTD域包含具有如本文所描述之CTD域共有序列的胺基酸序列(例如如表37A-37C中之任一者中所列)。在一些實施例中，呈型式「(X_{a-b})」的表37A-37C中之任一者中所列之胺基酸包含一系列連續胺基酸，其中該系列包含至少a個且至多b個胺基酸。在某些實施例中，該系列中之所有胺基酸均相同。在其他實施例中，該系列包含至少兩個(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21個)不同胺基酸。

表37A.甲型細環病毒屬ORF1域共有序列

域	序列	SEQ ID NO:
果凍卷	LVLTQWQPNTVRRCYIRGYLPLIICGEN(X_{0-3})TTSRNYATHS DDTIQKGPFGGGMSTTTFSLRVLYDEYQRFMNRWTYSNED LDLARYLGCKFTFYRHPDXDFIVQYNTNPPFKDTKLTAPSIH P(X_{1-5})GMLMLSKRKILIPSLKTRPKGKHYVKVRIGPPKLFED KWYTQSDLCDVPLVXLYATAADLQHPFGSPQTDNPCVTFQ VLGSXYNKHLSISP； 其中X =任何胺基酸。	227
N22	SNFEFPGAYTDITYNPLTDKGVGNMVWIQYLTKPDTIXDKT QS(X_{0-3})KCLIEDLPLWAALYGYVDFCEKETGDSAIIXNXGRV LIRCPYTKPPLYDKT(X_{0-4})NKGFVPYSTNFGNGKMPGGSGY	228

	VPIYWRARWYPTLFHQKEVLEDIVQSGPFAYKDEKPSTQLV MKYCFNFN； 其中X =任何胺基酸。	
CTD	WGGNPISQQVVRNPCKDSG(X_{0-3})SGXGRQPRSVQVVDPKY MGPEYTFHSWDWRRGLFGEKAIKRMSEQPTDDEIFTGGXP KRPRRDPPTXQXPEE(X_{1-4})QKESSSFR(X_{2-14})PWESSSQEXE SESQEEEE(X_{0-30})EQTVQQQLRQQLREQRRLRVQLQLLFQQ LLKT(X_{0-4})QAGLHINPLLLSQA(X_{0-40})*； 其中X =任何胺基酸。	229

表37B.乙型細環病毒屬ORF1域共有序列

域	序列	SEQ ID NO:
果凍卷	LKQWQPSTIRKCKIKGYLPLFQCGKGRISNNYTQYKESI VPHHEPGGGGWSIQQFTLGALYEEHLKLRNWWTKSN DGLPLVRYLGCTIKLYRSEDTDYIVTYQRCYPMTATKLT YLSTQPSRMLMNKHKIIVPSKXT(X_{1-4})NKKKKPYKKIF IKPPSQMQNKWYFQQDIANTPLLQLTXTACSLDRMYLS SDSISNNITFTSLNTNFFQNPNFQ； 其中X =任何胺基酸。	230
N22	(X_{4-10})TPLYFECRYNPFKDKGTGNKVYLVSNN(X_{1-8})TGW DPPTDPDLIIEGFPLWLLLWGWLDWQKKLGKIQNIDTD YILVIQSXYYIPP(X_{1-3})KLPYYVPLDXD(X_{0-2})FLHGRSPY (X_{3-16})PSDKQHWHPKVRFQXETINNIALTGPGTPKLPNQ KSIQAHMKYKFYFK； 其中X =任何胺基酸。	231
CTD	WGGCPAPMETITDPCKQPKYPIPNNLLQTTSLQXPTTPI ETYLYKFDERRGLLTKKAAKRIKKDXTTETTLFTDTGX XTSTTLPTXXQTETTQEEXTSEEE(X_{0-5})ETLLQQLQQLR RKQKQLRXRILQLLQLLXLL(X_{0-26})*； 其中X =任何胺基酸。	232

表37C.丙型細環病毒屬ORF1域共有序列

域	序列	SEQ ID NO:
果凍卷	TIPLKQWQPESIRKCKIKGYGTLVLGAEGRQFYCYTNE KDEYTPPKAPGGGGFGVELFSLEYLYEQWKARNNIWT KSNXYKDLCRYTGCKITFYRHPTTDFIVXYSRQPPFEID KXTYMXXHPQXLLLRKHKKIILSKATNPKGKLKKKIKI KPPKQMLNKWFFQKQFAXYGLVQLQAAACBLRYPRL GCCNENRLITLYYLN； 其中X =任何胺基酸。	233
N22	LPIVVARYNPAXDTGKGNKXWLXSTLNGSXWAPPTTD KDLIIEGLPLWLALYGYWSYJKKVKKDKGILQSHMFVV KSPAIQPLXTATTQXTFYPXIDNSFIQGKXPYDEPJTXNQ KKLWYPTLEHQQETINAIVESGPYVPKLDNQKNSTWE LXYXYTFYFK； 其中X =任何胺基酸。	234
CTD	WGGPQIPDQPVEDPKXQGTYPVPDTXQQTIQIXNPLKQ KPETMFHDWDYRRGIITSTALKRMQENLETDSSFXSDS EETP(X_{0-2})KKKKRLTXELPXPQEETEEIQSCLLSLCEEST CQEE(X_{1-6})ENLQQLIHQQQQQQQQLKHNILKLLSDLKZ KQRLLQLQTGILE(X_{1-10})*； 其中X =任何胺基酸。	235

【0359】在一些實施例中，果凍卷域包含如表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10或37A-37C中之任一者中所列之果凍卷域胺基酸序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，N22域包含如表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10或37A-37C中之任一者中所列之N22域胺基酸序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，

CTD域包含如表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10或37A-37C中之任一者中所列之CTD域胺基酸序列，或與其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。

【0360】

鑑別ORF1蛋白質序列

在一些實施例中，可自指環病毒之基因體(例如經鑑別之假定指環病毒基因體，例如藉由核酸定序技術，例如深度定序技術)鑑別指環病毒ORF1蛋白質序列或編碼ORF1蛋白質之核酸序列。在一些實施例中，ORF1蛋白質序列係藉由以下選擇標準中之一或多者(例如1、2或全部3者)鑑別：

【0361】*(i)長度選擇：*蛋白質序列(例如符合下文(ii)或(iii)中所描述之準則的假定指環病毒ORF1序列)可對於大於約600個胺基酸殘基之彼等進行大小選擇，以鑑別假定指環病毒ORF1蛋白質。在一些實施例中，指環病毒ORF1蛋白質序列之長度為至少約600、650、700、750、800、850、900、950或1000個胺基酸殘基。在一些實施例中，甲型細環病毒屬ORF1蛋白質序列之長度為至少約700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、900或1000個胺基酸殘基。在一些實施例中，乙型細環病毒屬ORF1蛋白質序列之長度為至少約650、660、670、680、690、700、750、800、900或1000個胺基酸殘基。在一些實施例中，丙型細環病毒屬ORF1蛋白質序列之長度為至少約650、660、670、680、690、700、750、800、900或1000個胺基酸殘基。在一些實施例中，編碼指環病毒ORF1蛋白質之核酸序列的長度為至少約1800、1900、

2000、2100、2200、2300、2400或2500個核苷酸。在一些實施例中，編碼甲型細環病毒屬ORF1蛋白質序列之核酸序列的長度為至少約2100、2150、2200、2250、2300、2400或2500個核苷酸。在一些實施例中，編碼乙型細環病毒屬ORF1蛋白質序列之核酸序列的長度為至少約1900、1950、2000、2500、2100、2150、2200、2250、2300、2400或2500或1000個核苷酸。在一些實施例中，編碼丙型細環病毒屬ORF1蛋白質序列之核酸序列的長度為至少約1900、1950、2000、2500、2100、2150、2200、2250、2300、2400或2500或1000個核苷酸。

【0362】*(ii) ORF1模體之存在：*蛋白質序列(例如符合以上(i)或以下(iii)中所描述之準則的假定指環病毒ORF1序列)可經過濾以鑑別在上文所描述之N22域中含有保守ORF1模體之彼等蛋白質序列。在一些實施例中，假定指環病毒ORF1序列包含序列YNPXXDXGXXN。在一些實施例中，假定指環病毒ORF1序列包含序列Y[NCS]P*XX*D*X*[GASKR]*XX*[NTSVAK]。

【0363】*(iii)富含精胺酸之區之存在：*蛋白質序列(例如符合以上(i)及/或(iii)中所描述之準則的假定指環病毒ORF1序列)可對於包括富含精胺酸之區(例如如本文所描述)之彼等進行過濾。在一些實施例中，假定指環病毒ORF1序列包含至少約30、35、40、45、50、55、60、65或70個胺基酸之連續序列，其包含至少30%（例如至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%)精胺酸殘基。在一些實施例中，假定指環病毒ORF1序列包含約35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-65或65-70個胺基酸之連續序列，其包含至少30%（例如至少約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%)精胺酸殘基。在一些實施例中，富含精胺酸之區

位於假定指環病毒ORF1蛋白質之起始密碼子下游至少約30、40、50、60、70或80個胺基酸處。在一些實施例中，富含精胺酸之區位於假定指環病毒ORF1蛋白質之起始密碼子下游至少約50個胺基酸處。

【0364】

ORF2分子

在一些實施例中，指環載體包含ORF2分子及/或編碼ORF2分子之核酸。一般而言，ORF2分子包含具有指環病毒ORF2蛋白質(例如如本文所描述之指環病毒ORF2蛋白質，例如如表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中之任一者中所列)或其功能片段之結構特徵及/或活性的多肽。在一些實施例中，ORF2分子包含與表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中之任一者中所示之指環病毒ORF2蛋白質序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列。

【0365】 在一些實施例中，ORF2分子包含與甲型細環病毒屬、乙型細環病毒屬或丙型細環病毒屬ORF2蛋白質具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，ORF2分子(例如與甲型細環病毒屬ORF2蛋白質具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之ORF2分子)的長度為250個或更少胺基酸(例如約150-200個胺基酸)。在一些實施例中，ORF2分子(例如與乙型細環病毒屬ORF2蛋白質具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之ORF2分子)的長度為約50-150個胺基酸。在一些實施例中，ORF2分子(例

如與丙型細環病毒屬ORF2蛋白質具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之ORF2分子)的長度為約100-200個胺基酸(例如約100-150個胺基酸)。在一些實施例中，ORF2分子包含螺旋-轉角-螺旋模體(例如包含兩個側接轉角區之α螺旋的螺旋-轉角-螺旋模體)。在一些實施例中，ORF2分子不包含TTV分離株TA278或TTV分離株SANBAN之ORF2蛋白質的胺基酸序列。在一些實施例中，ORF2分子具有蛋白質磷酸酶活性。在一些實施例中，相對於野生型ORF2蛋白質，例如如本文所描述(例如如表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中之任一者中所示)，ORF2分子包含至少一個差異(例如突變、化學修飾或表觀遺傳改變)。

【0366】

保守ORF2模體

在一些實施例中，本文所描述之多肽(例如ORF2分子)包含胺基酸序列[W/F]X^7HX^3CX^1CX^5H (SEQ ID NO: 949)，其中X^n為任何n個胺基酸之連續序列。在實施例中，X^7指示任何七個胺基酸之連續序列。在實施例中，X^3指示任何三個胺基酸之連續序列。在實施例中，X^1指示任何單一胺基酸。在實施例中，X^5指示任何五個胺基酸之連續序列。在一些實施例中，[W/F]可為色胺酸或苯丙胺酸。在一些實施例中，[W/F]X^7HX^3CX^1CX^5H (SEQ ID NO: 949)包含於ORF2分子之N22域內，例如如本文所描述。在一些實施例中，本文所描述之遺傳元件包含編碼胺基酸序列[W/F]X^7HX^3CX^1CX^5H (SEQ ID NO: 949)之核酸序列(例如編碼ORF2分子之核酸序列，例如如本文所描述)，其中X^n為任何n個胺基酸之連續序列。

【0367】

遺傳元件

在一些實施例中，指環載體包含遺傳元件。在一些實施例中，遺傳元件具有以下特徵中之一或多者：與宿主細胞之基因體基本上不整合，為游離型核酸，為單股DNA，為環形，為約1至10 kb，存在於細胞核內，可與內源性蛋白結合，產生靶向宿主或目標細胞之基因、活性或功能的效應子，諸如多肽或核酸(例如RNA、iRNA、微小RNA)。在一個實施例中，遺傳元件為基本上非整合DNA。在一些實施例中，遺傳元件包含封裝信號，例如結合衣殼蛋白之序列。在一些實施例中，在封裝或衣殼結合序列之外，遺傳元件與野生型指環病毒核酸序列具有小於70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%序列一致性，例如與指環病毒核酸序列(例如如本文所描述)具有小於70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%序列一致性。在一些實施例中，在封裝或衣殼結合序列之外，遺傳元件具有小於500、450、400、350、300、250、200、150或100個連續核苷酸，該等連續核苷酸與指環病毒核酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。在某些實施例中，遺傳元件為環形單股DNA，其包含啟動子序列、編碼治療效應子之序列及衣殼結合蛋白。

【0368】 在一些實施例中，遺傳元件之長度為小於20 kb (例如小於約19 kb、18 kb、17 kb、16 kb、15 kb、14 kb、13 kb、12 kb、11 kb、10 kb、9 kb、8 kb、7 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb或更小)。在一些實施例中，遺傳元件之長度獨立或另外地為大於1000 b (例如至少約1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb、1.5 kb、1.6 kb、1.7 kb、1.8

kb、1.9 kb、2 kb、2.1 kb、2.2 kb、2.3 kb、2.4 kb、2.5 kb、2.6 kb、2.7 kb、2.8 kb、2.9 kb、3 kb、3.1 kb、3.2 kb、3.3 kb、3.4 kb、3.5 kb、3.6 kb、3.7 kb、3.8 kb、3.9 kb、4 kb、4.1 kb、4.2 kb、4.3 kb、4.4 kb、4.5 kb、4.6 kb、4.7 kb、4.8 kb、4.9 kb、5 kb或更大)。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約2.5-4.6 kb、2.8-4.0 kb、3.0-3.8 kb或3.2-3.7 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約1.5-2.0 kb、1.5-2.5 kb、1.5-3.0 kb、1.5-3.5 kb、1.5-3.8 kb、1.5-3.9 kb、1.5-4.0 kb、1.5-4.5 kb或1.5-5.0 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約2.0-2.5 kb、2.0-3.0 kb、2.0-3.5 kb、2.0-3.8 kb、2.0-3.9 kb、2.0-4.0 kb、2.0-4.5 kb或2.0-5.0 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約2.5-3.0 kb、2.5-3.5 kb、2.5-3.8 kb、2.5-3.9 kb、2.5-4.0 kb、2.5-4.5 kb或2.5-5.0 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約3.0-5.0 kb、3.5-5.0 kb、4.0-5.0 kb或4.5-5.0 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約1.5-2.0 kb、2.0-2.5 kb、2.5-3.0 kb、3.0-3.5 kb、3.1-3.6 kb、3.2-3.7 kb、3.3-3.8 kb、3.4-3.9 kb、3.5-4.0 kb、4.0-4.5 kb或4.5-5.0 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約3.6-3.9 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約2.8-2.9 kb。在一些實施例中，遺傳元件之長度為約2.0-3.2 kb。

【0369】 在一些實施例中，遺傳元件包含本文所描述之特徵中之一或多者，例如編碼基本上非病原性蛋白之序列、蛋白結合序列、編碼調節調控核酸之一或多個序列、一或多個調控序列、編碼複製蛋白之一或多個序列及其他序列。

【0370】 在實施例中，遺傳元件由雙股環形DNA產生(例如由活體外環化產生)。在一些實施例中，遺傳元件藉由自雙股環形DNA滾環複製

而產生。在實施例中，滾環複製發生在細胞(例如宿主細胞，例如哺乳動物細胞，例如人類細胞，例如HEK293T細胞、A549細胞或Jurkat細胞)中。在實施例中，遺傳元件可藉由在細胞中滾環複製以指數方式擴增。在實施例中，遺傳元件可藉由在細胞中滾環複製以線性方式擴增。在實施例中，雙股環形DNA或遺傳元件能夠藉由細胞中之滾環複製產生原始量的至少2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍、128倍、256倍、518倍、1024倍或更多倍。在實施例中，將雙股環形DNA引入至細胞中，例如如本文所描述。

【0371】 在一些實施例中，雙股環形DNA及/或遺傳元件不包含一或多個細菌質體元件(例如細菌複製起點或可選標記物，例如細菌抗性基因)。在一些實施例中，雙股環形DNA及/或遺傳元件不包含細菌質體主鏈。

【0372】 在一個實施例中，本發明包括一種遺傳元件，其包含編碼以下各者之核酸序列(例如DNA序列)：(i)基本上非病原性外部蛋白質；(ii)將遺傳元件結合至基本上非病原性外部蛋白質之外部蛋白質結合序列；及(iii)調控核酸。在此類實施例中，遺傳元件可包含一或多個與天然病毒序列(例如天然指環病毒序列，例如如本文所描述)之核苷酸序列中之任一者具有至少約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%核苷酸序列一致性的序列。

【0373】

蛋白質結合序列

許多病毒採用之策略為病毒衣殼蛋白識別其基因體中之特異性蛋白質結合序列。例如，在具有未分段基因體之病毒(諸如酵母之L-A病毒)

中，在基因體之5'端處存在二級結構(莖-環)及特定序列，兩者均用於結合病毒衣殼蛋白。然而，具有分段基因體之病毒，諸如呼腸孤病毒科(*Reoviridae*)、正黏液病毒科(*Orthomyxoviridae*) (流感)、布尼亞病毒(*Bunyaviruses*)及沙狀病毒科(*Arenaviruses*)需要包裝基因體區段中之每一者。一些病毒利用區段之互補區以幫助病毒包括各基因體分子中之一者。其他病毒對不同區段中之每一者具有特異性結合位點。參見例如Curr Opin Struct Biol. 2010 Feb; 20(1): 114-120；及Journal of Virology (2003), 77(24), 13036-13041。

【0374】 在一些實施例中，遺傳元件編碼結合至基本上非病原性蛋白質之蛋白質結合序列。在一些實施例中，蛋白質結合序列有助於將遺傳元件封裝至蛋白質外部中。在一些實施例中，蛋白質結合序列特異性結合基本上非病原性蛋白質之富含精胺酸之區。在一些實施例中，遺傳元件包含如PCT/US19/65995之實例8中所描述之蛋白質結合序列。

【0375】 在一些實施例中，遺傳元件包含與指環病毒序列之5' UTR保守域或富含GC之域具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的蛋白質結合序列，例如如本文所描述。

【0376】 在實施例中，蛋白質結合序列與指環病毒5' UTR保守域核苷酸序列具有至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性，例如如本文所描述。

【0377】

5' UTR區

在一些實施例中，如本文所描述之核酸分子(例如遺傳元件、遺傳元

件構築體或遺傳元件區)包含5' UTR序列，例如如本文所描述之5' UTR保守域序列(例如在表A1、B1或C1中之任一者中)，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。

【0378】在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGGGX$_1$CAGTCT，或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGGGX$_1$CAGTCT，或相對於其具有不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸差異(例如取代、缺失或添加)的核酸序列。在實施例中，X_1為A。在實施例中，X_1不存在。

【0379】在一些實施例中，5' UTR序列包含甲型細環病毒屬(例如環1)之5' UTR之核酸序列，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，5' UTR序列包含表A1中所列之5' UTR保守域的核酸序列，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表A1中所列之5' UTR保守域具有至少95%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表A1中所列之5' UTR保守域具有至少95.775%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表A1中所列之5' UTR保守域具有至少97%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表A1中所列之5' UTR保守域具有至少97.183%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列

AGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGC，或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGC，或相對於其具有不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸差異(例如取代、缺失或添加)的核酸序列。

【0380】 在一些實施例中，5' UTR序列包含乙型細環病毒屬(例如環2)之5' UTR的核酸序列，或與其具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，5' UTR序列包含表B1中所列之5' UTR保守域的核酸序列，或與其具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少85%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少87%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少87.324%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少88%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少88.732%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少91%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少91.549%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含

與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少92%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少92.958%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少94%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少94.366%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少95%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少95.775%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少97%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表B1中所列之5' UTR保守域具有至少97.183%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGATCAGTCT，或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGATCAGTCT，或相對於其具有不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸差異(例如取代、缺失或添加)的核酸序列。

【0381】 在一些實施例中，5' UTR序列包含丙型細環病毒屬(例如環4)之5' UTR的核酸序列，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的序列。在實施例中，5' UTR序列包含表C1中所列之5' UTR保守域的核酸序列，或與其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的

序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表C1中所列之5' UTR保守域具有至少97%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，核酸分子包含與表C1中所列之5' UTR保守域具有至少97.183%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCT，或與其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的核酸序列。在一些實施例中，5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCT，或相對於其具有不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸差異(例如取代、缺失或添加)的核酸序列。

【0382】 在一些實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與指環病毒5' UTR序列(例如表38中所示之核酸序列)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在一些實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含表38中所示之共有5' UTR序列的核酸序列，其中X_1、X_2、X_3、X_4及X_5各自獨立地為任何核苷酸，例如其中X_1=G或T，X_2=C或A，X_3=G或A，X_4=T或C，且X_5=A、C或T)。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之共有5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之例示性TTV 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例

如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之TTV-CT30F 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之TTV-HD23a 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之TTV-JA20 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之TTV-TJN02 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之TTV-tth8 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。

【0383】 在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬共有5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系1 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系2 5' UTR序

列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系3 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系4 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系5 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系6 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表38中所示之甲型細環病毒屬分枝系7 5' UTR序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。

表38.來自指環病毒之例示性5' UTR序列

來源	序列	SEQ ID NO:
共有	CGGGTGCCGX$_1$AGGTGAGTTTACACACCGX$_2$AGTCAAGGGGCAATTCGGGCTCX$_3$GGACTGGCCGGGCX$_4$X$_5$TGGG X$_1$ = G或T X$_2$ = C或A X$_3$ = G或A	105

	X_4 = T或C X_5 = A、C或T	
例示性TTV序列	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTWTGGG	106
TTV-CT30F	CGGGTGCCGTAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTATGGG	107
TTV-HD23a	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCCCTGGG	108
TTV-JA20	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTTTGGG	109
TTV-TJN02	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTATGGG	110
TTV-tth8	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCTTTGGG	111
甲型細環病毒屬共有5' UTR	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGC X_1X_2TGGG；其中X_1包含T或C，且其中X_2包含A、C或T。	112
甲型細環病毒屬分枝系1 5' UTR (例如TTV-CT30F)	CGGGTGCCGTAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTATGGG	113
甲型細環病毒屬分枝系2 5' UTR (例如TTV-P13-1)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCCCGGG	114
甲型細環病毒屬分枝系3 5' UTR (例如TTV-tth8)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCTTTGGG	115
甲型細環病毒屬分枝系4 5' UTR (例如TTV-HD20a)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGAGGCCGGGCCATGGG	116
甲型細環病毒屬分枝系5 5' UTR (例如TTV-16)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCCCCGGG	117
甲型細環病毒屬分枝系6 5' UTR (例如TTV-TJN02)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTATGGG	118
甲型細環病毒屬分枝系7 5' UTR (例如TTV-HD16d)	CGGGTGCCGAAGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAG GGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCTATGGG	119

【0384】

鑑別5' UTR序列

在一些實施例中，可在指環病毒之基因體(例如經鑑別之假定指環病毒基因體，例如藉由核酸定序技術，例如深度定序技術)內鑑別指環病毒5' UTR序列。在一些實施例中，藉由以下步驟中之一或兩者鑑別指環病毒5' UTR序列：

【0385】 *(i)鑑別環化接合點：*在一些實施例中，5' UTR將位於全長環化指環病毒基因體之環化接合點附近。可例如藉由鑑別序列之重疊區來鑑別環化接合點。在一些實施例中，序列之重疊區可自序列修整以產生已環化之全長指環病毒基因體序列。在一些實施例中，基因體序列以此方式使用軟體環化。不希望受理論所束縛，計算環化基因體可使得序列之起始位置在非生物中定向。序列內之地標可用於在恰當方向上重新定向序列。例如，地標序列可包括與如本文所描述之指環病毒基因體內之一或多個元件(例如指環病毒之TATA盒、加帽位點、起始元件、轉錄起始位點、5' UTR保守域、ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3、三個開讀框區、聚(A)信號或富含GC之區中之一或多者，例如如本文所描述)具有實質性同源性的序列。

【0386】 *(ii)鑑別5' UTR序列：*一旦已獲得假定指環病毒基因體序列，則可將序列(或其部分，例如長度為約40-50、50-60、60-70、70-80、80-90或90-100個核苷酸)與一或多個指環病毒5' UTR序列(例如如本文所描述)相比，以鑑別與其具有實質性同源性之序列。在一些實施例中，假定指環病毒5' UTR區與如本文所描述之指環病毒5' UTR序列具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%序列一致性。

【0387】

富含GC之區

在一些實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之核酸序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在一些實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之富含GC之序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。

【0388】 在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之36個核苷酸之富含GC之序列(例如36個核苷酸之共有富含GC之區序列1、36個核苷酸之共有富含GC之區序列2、TTV分枝系1 36個核苷酸之區、TTV分枝系3 36個核苷酸之區、TTV分枝系3分離株GH1 36個核苷酸之區、TTV分枝系3 sle1932 36個核苷酸之區、TTV分枝系4 ctdc002 36個核苷酸之區、TTV分枝系5 36個核苷酸之區、TTV分枝系6 36個核苷酸之區或TTV分枝系7 36個核苷酸之區)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含一核酸序列，該核酸序列包含如表39中所示之36個核苷酸之富含GC之序列(例如36個核苷酸之共有富含GC之區序列1、36個核苷酸之共有富含GC之區序列2、TTV分枝系1 36個核苷酸之區、TTV分枝系3 36個核苷酸之區、TTV分枝系3分離株GH1 36個核苷酸之區、TTV分枝系3 sle1932 36個核苷酸之區、TTV分枝系4 ctdc002 36個核苷酸之區、TTV

分枝系5 36個核苷酸之區、TTV分枝系6 36個核苷酸之區或TTV分枝系7 36個核苷酸之區)的至少10、15、20、25、30、31、32、33、34、35或36個連續核苷酸。

【0389】 在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與甲型細環病毒屬富含GC之區序列具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列，該甲型細環病毒屬富含GC之區序列例如選自TTV-CT30F、TTV-P13-1、TTV-tth8、TTV-HD20a、TTV-16、TTV-TJN02或TTV-HD16d，例如如表39中所列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含一核酸序列，該核酸序列包含具有甲型細環病毒屬富含GC之區序列之至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、104、105、108、110、111、115、120、122、130、140、145、150、155或156個連續核苷酸，該甲型細環病毒屬富含GC之區域序列例如選自TTV-CT30F、TTV-P13-1、TTV-tth8、TTV-HD20a、TTV-16、TTV-TJN02或TTV-HD16d，例如如表39中所列。

【0390】 在實施例中，36個核苷酸之富含GC之序列係選自：

(i) CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGC (SEQ ID NO: 160)；

(ii) GCGCTX$_1$CGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 164)，其中X$_1$係選自T、G或A；

(iii) GCGCTTCGCGCGCCGCCCACTAGGGGGCGTTGCGCG (SEQ ID NO: 165)；

(iv) GCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGCGCAATGCG

(SEQ ID NO: 166)；

(v) GCGCTGCGCGCGCGGCCCCCGGGGGGAGGCATTGCCT (SEQ ID NO: 167)；

(vi) GCGCTGCGCGCGCGCCGGGGGGGGCGCCAGCGCCC (SEQ ID NO: 168)；

(vii) GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGGCTCCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 169)；

(viii) GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 170)；

(ix) GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO: 171)；或

(x) GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGGCTCTGCCCCCCC (SEQ ID NO: 172)。

【0391】在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含核酸序列CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGC (SEQ ID NO: 160)。

【0392】在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含表39中所示之共有富含GC之序列的核酸序列，其中X_1、X_4、X_5、X_6、X_7、X_{12}、X_{13}、X_{14}、X_{15}、X_{20}、X_{21}、X_{22}、X_{26}、X_{29}、X_{30}及X_{33}各自獨立地為任何核苷酸，且其中X_2、X_3、X_8、X_9、X_{10}、X_{11}、X_{16}、X_{17}、X_{18}、X_{19}、X_{23}、X_{24}、X_{25}、X_{27}、X_{28}、X_{31}、X_{32}及X_{34}各自獨立地不存在或為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1至X_{34}中之一或多者(例如全部)各自獨立地為表39中所指定之核苷酸(或不存在)。在實施例中，遺傳

元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之例示性TTV富含GC之序列(例如完整序列、片段1、片段2、片段3或其任何組合，例如按順序之片段1-3)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含一核酸序列，該核酸序列與表39中所示之TTV-CT30F富含GC之序列(例如完整序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、片段7、片段8或其任何組合，例如按順序之片段1-7)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之TTV-HD23a富含GC之序列(例如完整序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6或其任何組合，例如按順序之片段1-6)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之TTV-JA20富含GC之序列(例如完整序列、片段1、片段2或其任何組合，例如按順序之片段1及2)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之TTV-TJN02富含GC之序列(例如完整序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、片段7、片段8或其任何組合，例如按順序之片段1-8)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之TTV-tth8富含

GC之序列(例如完整序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、片段7、片段8、片段9或其任何組合，例如按順序之片段1-6)具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之片段7具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之片段8具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。在實施例中，遺傳元件(例如遺傳元件之蛋白質結合序列)包含與表39中所示之片段9具有至少約75% (例如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)一致性的核酸序列。

表39.來自指環病毒之例示性富含GC之序列

來源	**序列**	**SEQ ID NO:**
共有	CGGCGGX$_1$GGX$_2$GX$_3$X$_4$X$_5$CGCGCTX$_6$CGCGCGCX$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$CX$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$GGGGX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$X$_{18}$X$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$GCX$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$CCCCCCCX$_{26}$CGCGCATX$_{27}$X$_{28}$GCX$_{29}$CGGGX$_{30}$CCCCCCCCCX$_{31}$X$_{32}$X$_{33}$GGGGGGCTCCGX$_{34}$CCCCCCGGCCCCCC X$_1$ = G或C X$_2$ = G、C或不存在 X$_3$ = C或不存在 X$_4$ = G或C X$_5$ = G或C X$_6$ = T、G或A X$_7$ = G或C X$_8$ = G或不存在 X$_9$ = C或不存在	120

		X_{10} = C或不存在 X_{11} = G、A或不存在 X_{12} = G或C X_{13} = C或T X_{14} = G或A X_{15} = G或A X_{16} = A、G、T或不存在 X_{17} = G、C或不存在 X_{18} = G、C或不存在 X_{19} = C、A或不存在 X_{20} = C或A X_{21} = T或A X_{22} = G或C X_{23} = G、T或不存在 X_{24} = C或不存在 X_{25} = G、C或不存在 X_{26} = G或C X_{27} = G或不存在 X_{28} = C或不存在 X_{29} = G或A X_{30} = G或T X_{31} = C、T或不存在 X_{32} = G、C、A或不存在 X_{33} = G或C X_{34} = C或不存在	
例示性TTV序列	完整序列	GCCGCCGCGGCGGCGGSGGNGNSGCGCGCTDCGCGC GCSNNNCRCCRGGGGGNNNNCWGCSNCNCCCCCCC CCGCGCATGCGCGGGKCCCCCCCCCCNNCGGGGGGCT CCGCCCCCCGGCCCCCCCCCGTGCTAAACCCACCGC GCATGCGCGACCACGCCCCCGCCGCC	121
	片段1	GCCGCCGCGGCGGCGGSGGNGNSGCGCGCTDCGCGC GCSNNNCRCCRGGGGGNNNNCWGCSNCNCCCCCCC CCGCGCAT	122
	片段2	GCGCGGGKCCCCCCCCCCNNCGGGGGGCTCCG	123
	片段3	CCCCCCGGCCCCCCCCCCGTGCTAAACCCACCGCGCA TGCGCGACCACGCCCCCGCCGCC	124
TTV-CT30F	完整序列	GCGGCGG-GGGGGCG-GCCGCG- TTCGCGCGCCGCCCACCAGGGGGTG--CTGCG- CGCCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCCC--	125

		GGGGGGGCTCCGCCCCCCCGGCCCCCCCCCGTGCTA AACCCACCGCGCATGCGCGACCACGCCCCCGCCGCC	
	片段1	GCGGCGG	126
	片段2	GGGGGCG	127
	片段3	GCCGCG	128
	片段4	TTCGCGCGCCGCCCACCAGGGGGTG	129
	片段5	CTGCG	130
	片段6	CGCCCCCCCCCGCGCAT	131
	片段7	GCGCGGGGCCCCCCCCC	132
	片段8	GGGGGGGCTCCGCCCCCCCGGCCCCCCCCCGTGCTA AACCCACCGCGCATGCGCGACCACGCCCCCGCCGCC	133
TTV-HD23a	完整序列	CGGCGGCGGCGGCG-CGCGCGCTGCGCGCGCG---CGCCGGGGGGGCGCCAGCG-CCCCCCCCCCCGCGCAT GCACGGGTCCCCCCCCCCCACGGGGGGCTCCG CCCCCCGGCCCCCCCCC	134
	片段1	CGGCGGCGGCGGCG	135
	片段2	CGCGCGCTGCGCGCGCG	136
	片段3	CGCCGGGGGGGCGCCAGCG	137
	片段4	CCCCCCCCCCCGCGCAT	138
	片段5	GCACGGGTCCCCCCCCCCCACGGGGGGCTCCG	139
	片段6	CCCCCCGGCCCCCCCCC	140
TTV-JA20	完整序列	CCGTCGGCGGGGGGGCCGCGCGCTGCGCGCGCGGC CC-CCGGGGGAGGCACAGCCTCCCCCCCCCGCGCGCATG CGCGCGGGTCCCCCCCCCCTCCGGGGGGCTCCGCCCC CCGGCCCCCCCC	141
	片段1	CCGTCGGCGGGGGGGCCGCGCGCTGCGCGCGCGGC CC	142
	片段2	CCGGGGGAGGCACAGCCTCCCCCCCCCGCGCGCATG CGCGCGGGTCCCCCCCCCCTCCGGGGGGCTCCGCCCC CCGGCCCCCCCC	143
TTV-TJN02	完整序列	CGGCGGCGGCG-CGCGCGCTACGCGCGCG---CGCCGGGGGGG----CTGCCGC-CCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCCCC-GCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGCCCCCC	144
	片段1	CGGCGGCGGCG	145
	片段2	CGCGCGCTACGCGCGCG	146
	片段3	CGCCGGGGGG	147

	片段4	CTGCCGC	148
	片段5	CCCCCCCCCGCGCAT	149
	片段6	GCGCGGGGCCCCCCCCC	150
	片段7	GCGGGGGGCTCCG	151
	片段8	CCCCCCGGCCCCCC	152
TTV-tth8	完整序列	GCCGCCGCGGCGGCGGGGG-GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGCG---CCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCCCC-GCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGCCCCCCCCG	153
	片段1	GCCGCCGCGGCGGCGGGGG	154
	片段2	GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGCG	155
	片段3	CCCCCCCCCGCGCAT	156
	片段4	GCGCGGGGCCCCCCCCC	157
	片段5	GCGGGGGGCTCCG	158
	片段6	CCCCCCGGCCCCCCCCG	159
	片段7	CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGC	160
	片段8	CCGCCATCTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGTGGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACTCAAAATGGTGG	161
	片段9	CTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGTGGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACTCAAAATGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAAAGGTTACAGCCGCCATGTTAAAACACGTGACGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGACACAAGATGGCCGACTTCCTTCC	162
額外富含GC之序列	36個核苷酸之共有富含GC之區序列1	CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGC	163
	36個核苷酸之區共有序列2	GCGCTX$_1$CGCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC，其中X$_1$係選自T、G或A	164
	TTV分枝系1 36個核苷酸之區	GCGCTTCGCGCGCCGCCCACTAGGGGGCGTTGCGCG	165
	TTV分枝系3 36個核苷酸之區	GCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGCGCAATGCG	166
	TTV分枝系3分離株GH1 36個核苷酸之區	GCGCTGCGCGCGCGGCCCCCGGGGGGAGGCATTGCCT	167
	TTV分枝系3	GCGCTGCGCGCGCGCCGGGGGGGCGCCAGCGCC	168

	sle1932 36個核苷酸之區	C	
	TTV分枝系4 ctdc002 36個核苷酸之區	GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGCTCCGCCCCCCC	169
	TTV分枝系5 36個核苷酸之區	GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC	170
	TTV分枝系6 36個核苷酸之區	GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC	171
	TTV分枝系7 36個核苷酸之區	GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGCTCTGCCCCCCC	172
額外甲型細環病毒屬富含GC之區序列	TTV-CT30F	GCGGCGGGGGGGCGGCCGCGTTCGCGCGCCGCCCA CCAGGGGGTGCTGCGCGCCCCCCCCCGCGCATGCGC GGGGCCCCCCCCCGGGGGGGCTCCGCCCCCCCGGCC CCCCCCCGTGCTAAACCCACCGCGCATGCGCGACCA CGCCCCCGCCGCC	801
	TTV-P13-1	CCGAGCGTTAGCGAGGAGTGCGACCCTACCCCCTGG GCCCACTTCTTCGGAGCCGCGCGCTACGCCTTCGGCT GCGCGCGGCACCTCAGACCCCCGCTCGTGCTGACAC GCTTGCGCGTGTCAGACCACTTCGGGCTCGCGGGGG TCGGG	802
	TTV-tth8	GCCGCCGCGGCGGCGGGGGGCGGCGCGCTGCGCGC GCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGCGCCCCCCCCCGC GCATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCGCC CCCCGGCCCCCCCCG	803
	TTV-HD20a	CGGCCCAGCGGCGGCGCGCGCGCTTCGCGCGCGCGC CGGGGGGCTCCGCCCCCCCCCGCGCATGCGCGGGGC CCCCCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGTCCCCCC CCG	804
	TTV-16	CGGCCGTGCGGCGGCGCGCGCGCTTCGCGCGCGCGC CGGGGGCTGCCGCCCCCCCCCCGCGCATGCGCGCGGG GCCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGCCCCC CCCCCCG	805
	TTV-TJN02	CGGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGCGCCGGG GGGCTGCCGCCCCCCCCCCGCGCATGCGCGGGGCCC CCCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGCCCCCC	806
	TTV-HD16d	GGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGCGCCGGGG AGCTCTGCCCCCCCCCGCGCATGCGCGCGGGTCCCC CCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGTCCCCCCCCC	807

		G	

【0393】

效應子

在一些實施例中，遺傳元件可包括一或多個編碼效應子，例如功能性效應子，例如內源性效應子或外源性效應子，例如治療多肽或核酸，例如細胞毒性或細胞溶解RNA或蛋白質的序列。在一些實施例中，功能性核酸為非編碼RNA。在一些實施例中，功能性核酸為編碼RNA。效應子可調節生物活性，例如增加或減少酶活性、基因表現、細胞傳訊及細胞或器官功能。效應子活性亦可包括結合調節蛋白以調節調節子之活性，諸如轉錄或轉譯。效應子活性亦可包括活化子或抑制子功能。舉例而言，效應子可藉由觸發酶中受質親和力的增加來誘導酶活性，例如果糖2,6-雙磷酸活化磷酸果糖激酶1且增加響應於胰島素之糖酵解速率。在另一實例中，效應子可抑制受質與受體結合且抑制其活化，例如納曲酮(naltrexone)及那若松(naloxone)在不活化類鴉片受體之情況下結合類鴉片受體且阻斷該等受體結合類鴉片之能力。效應子活性亦可包括調節蛋白質穩定性/降解及/或轉錄本穩定性/降解。舉例而言，蛋白質可經靶向以藉由多肽輔因子泛素降解至蛋白質上，以標記蛋白質用於降解。在另一實例中，效應子藉由阻斷酶活性位點來抑制酶活性，例如甲胺喋呤為四氫葉酸之結構類似物，該四氫葉酸為酶二氫葉酸還原酶之輔酶，與二氫葉酸還原酶之結合比天然受質更緊密1000倍，且抑制核苷酸鹼基合成。

【0394】在一些實施例中，編碼效應子之序列為遺傳元件之一部分，例如其可插入如本文所述之插入位點處。在實施例中，編碼效應子之序列在非編碼區處插入至遺傳元件中，例如安置於遺傳元件之開讀框之3'及富含GC之區之5'的非編碼區、在TATA盒上游之5'非編碼區中、在5'

UTR中、在聚A訊號下游之3'非編碼區中或在富含GC之區上游。在實施例中，編碼效應子之序列在例如本文所述之TTV-tth8質體之約核苷酸3588處，或在例如本文所述之TTMV-LY2質體之約核苷酸2843處插入至遺傳元件中。在實施例中，編碼效應子之序列在例如本文所述之TTV-tth8質體之核苷酸336-3015處或其內，或在例如本文所述之TTV-LY2質體之核苷酸242-2812處或其內插入至遺傳元件中。在一些實施例中，編碼效應子之序列替代開讀框(例如如本文所述之ORF，例如ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3)之部分或全部。

【0395】 在一些實施例中，編碼效應子之序列包含100-2000、100-1000、100-500、100-200、200-2000、200-1000、200-500、500-1000、500-2000或1000-2000個核苷酸。在一些實施例中，效應子為例如本文所述之核酸或蛋白質有效負載。

【0396】

調節核酸

在一些實施例中，效應子為調節核酸。調節核酸修飾內源性基因及/或外源性基因之表現。在一個實施例中，調節核酸靶向宿主基因。調節核酸可包括(但不限於)與內源性基因雜交之核酸(例如本文其他地方所述之miRNA、siRNA、mRNA、lncRNA、RNA、DNA、反義RNA、gRNA)、與諸如病毒DNA或RNA之外源性核酸雜交之核酸、與RNA雜交之核酸、干擾基因轉錄之核酸、干擾RNA轉譯之核酸、使RNA穩定或使RNA不穩定諸如經由靶向降解之核酸及調節DNA或RNA結合因子之核酸。在實施例中，調節核酸編碼miRNA。在一些實施例中，調節核酸對野生型指環病毒為內源性的。在一些實施例中，調節核酸對野生型指環病

毒為外源性的。

【0397】 在一些實施例中，調節核酸包含通常含有5-500個鹼基對之RNA或RNA樣結構(視特定RNA結構而定，例如miRNA 5-30 bp、lncRNA 200-500 bp)，且可具有與細胞內表現之目標基因中之編碼序列或編碼細胞內表現之目標基因之序列一致(或互補)或幾乎一致(或大體上互補)的核鹼基序列。

【0398】 在一些實施例中，調節核酸包含核酸序列，例如嚮導RNA(gRNA)。在一些實施例中，DNA靶向部分包含嚮導RNA或編碼嚮導RNA之核酸。gRNA短合成RNA由與不完全效應部分結合所必需的「骨架」序列及使用者定義之基因體目標之約20個核苷酸靶向序列構成。實際上，嚮導RNA序列通常經設計以具有17-24個核苷酸之間(例如19、20或21個核苷酸)的長度且與所靶向之核酸序列互補。常規gRNA產生器及演算法可購得，用於設計有效嚮導RNA。亦使用嵌合「單嚮導RNA」(「sgRNA」)實現基因編輯，該單嚮導RNA為模擬天然存在之crRNA-tracrRNA複合物且含有tracrRNA (用於結合核酸酶)及至少一種crRNA (以將核酸酶導引至經靶向以進行編輯之序列)的經工程化(合成)之單RNA分子。亦已證明經化學修飾之sgRNA在基因體編輯中有效；參見例如Hendel等人(2015) Nature Biotechnol., 985-991。

【0399】 調節核酸包含識別特異性DNA序列(例如鄰近於基因之啟動子、強化子、緘默子或抑制子或在其內之序列)的gRNA。

【0400】 某些調節核酸可經由RNA干擾(RNAi)之生物過程抑制基因表現。RNAi分子包含RNA或RNA樣結構，該等結構通常含有15-50個鹼基對(諸如約18-25個鹼基對)且具有與細胞內所表現之目標基因中之編

碼序列一致(互補)或幾乎一致(大體上互補)的核鹼基序列。RNAi分子包括(但不限於)：短干擾RNA (siRNA)、雙股RNA (dsRNA)、微小RNA (miRNA)、短髮夾RNA (shRNA)、部分雙螺旋體(meroduplex)及切丁酶(dicer)受質(美國專利第8,084,599號、第8,349,809號及第8,513,207號)。

【0401】 長非編碼RNA (lncRNA)被定義為長於100個核苷酸之非蛋白質編碼轉錄本。此略微任意之限制將lncRNA與小調節RNA (諸如微小RNA (miRNA)、短干擾RNA (siRNA)及其他短RNA)區分開來。一般而言，大部分(約78%)之lncRNA的特徵在於具有組織特異性。在與附近蛋白質編碼基因相反之方向上轉錄之發散lncRNA (佔哺乳動物基因體中總lncRNA之顯著比例約20%)可能調節附近基因之轉錄。

【0402】 遺傳元件可編碼具有與內源性基因或基因產物(例如mRNA)之全部或片段大體上互補或完全互補之序列的調節核酸。調節核酸可與內含子與外顯子之間的邊界處之序列互補，以防止特定基因之新產生的細胞核RNA轉錄本成熟為mRNA以便轉錄。與特定基因互補之調節核酸可與該基因之mRNA雜交且防止其轉譯。反義調節核酸可為DNA、RNA或其衍生物或混成物。

【0403】 雜交至所關注轉錄本之調節核酸的長度可為5至30個核苷酸之間，約10至30個核苷酸之間，或約11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個或更多個核苷酸。調節核酸與所靶向轉錄本之一致性程度應為至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

【0404】 遺傳元件可編碼調節核酸，例如與目標基因之約5至約25個連續核苷酸一致的微小RNA (miRNA)分子。在一些實施例中，miRNA

序列靶向mRNA且以二核苷酸AA開始，包含約30-70% (約30-60%、約40-60%或約45-55%)之GC含量，且與欲引入之哺乳動物基因體中除目標以外之任何核苷酸序列不具有高比例一致性，例如如藉由標準BLAST搜尋所確定。

【0405】 siRNA及shRNA類似內源性微小RNA (miRNA)基因之加工路徑中之中間物(Bartel, Cell 116:281-297, 2004)。在一些實施例中，siRNA可充當miRNA且反之亦然(Zeng等人, Mol Cell 9:1327-1333, 2002；Doench等人, Genes Dev 17:438-442, 2003)。微小RNA，如siRNA，使用RISC下調目標基因，但不同於siRNA，大部分動物miRNA不使mRNA裂解。實際上，miRNA經由轉譯遏制或聚A移除及mRNA降解來減少蛋白質輸出(Wu等人, Proc Natl Acad Sci USA 103:4034-4039, 2006)。已知的miRNA結合位點在mRNA 3' UTR內；miRNA似乎靶向與來自miRNA之5'端之核苷酸2-8幾乎完全互補的位點(Rajewsky, Nat Genet 38增刊:S8-13, 2006; Lim等人., Nature 433:769-773, 2005)。此區稱為種子區。因為siRNA與miRNA可互換，所以外源性siRNA下調具有與siRNA之種子互補性的mRNA(Birmingham等人., Nat Methods 3:199-204, 2006。3' UTR內之多個目標位點產生更強下調(Doench等人., Genes Dev 17:438-442, 2003)。

【0406】 已知miRNA序列之清單可見於諸如以下之研究組織所維護之資料庫中：Wellcome Trust Sanger Institute、Penn Center for Bioinformatics、Memorial Sloan Kettering Cancer Center及European Molecule Biology Laboratory等。已知的有效siRNA序列及同源結合位點亦充分呈現於相關文獻中。RNAi分子容易藉由此項技術中已知之技術設

計及產生。另外，存在增加發現有效及特定序列模體之機率的計算工具(Lagana等人., Methods Mol. Bio., 2015, 1269:393-412)。

【0407】 調節核酸可調節由基因編碼之RNA的表現。因為多個基因可彼此共享一定程度之序列同源性，所以在一些實施例中，調節核酸可經設計以靶向具有足夠序列同源性之一類基因。在一些實施例中，調節核酸可含有與在不同基因目標中共有或特定基因目標所獨有之序列互補的序列。在一些實施例中，調節核酸可經設計以靶向在若干基因之間具有同源性的RNA序列之保守區，藉此靶向基因家族中之若干基因(例如不同基因同功型、剪接變異體、突變體基因等)。在一些實施例中，調節核酸可經設計以靶向為單個基因之特定RNA序列所獨有的序列。

【0408】 在一些實施例中，遺傳元件可包括一或多個編碼調節一或多個基因之表現的調節核酸的序列。

【0409】 在一個實施例中，本文別處所述之gRNA用作用於基因編輯之CRISPR系統的一部分。出於基因編輯之目的，指環載體可經設計以包括與期望目標DNA序列對應之一個或多個嚮導RNA序列；參見例如Cong等人. (2013) Science, 339:819-823; Ran等人. (2013) Nature Protocols, 8:2281 – 2308。gRNA序列之至少約16或17個核苷酸通常允許發生Cas9介導之DNA裂解；對於Cpf1，需要gRNA序列之至少約16個核苷酸來實現可偵測DNA裂解。

【0410】

治療效應子(例如肽或多肽)

在一些實施例中，遺傳元件包含治療性表現序列，例如編碼治療性肽或多肽之序列，例如胞內肽或胞內多肽、分泌型多肽或蛋白質替代療

法。在一些實施例中，遺傳元件包括編碼蛋白質(例如治療性蛋白質)之序列。治療性蛋白質之一些實例可包括(但不限於)激素、細胞介素、酶、抗體(例如編碼至少重鏈或輕鏈之一種或複數種多肽)、轉錄因子、受體(例如膜受體)、配位體、膜轉運體、分泌型蛋白質、肽、載體蛋白質、結構蛋白質、核酸酶或其組分。

【0411】 在一些實施例中，遺傳元件包括編碼肽(例如治療性肽)之序列。肽可為線性的或具分支的。肽之長度為約5至約500個胺基酸、約15至約400個胺基酸、約20至約325個胺基酸、約25至約250個胺基酸、約50至約200個胺基酸，或其間的任何範圍。

【0412】 在一些實施例中，由治療性表現序列編碼之多肽可為以上任一者之功能性變異體或其片段，例如與揭示於本文表中之蛋白質序列參照其UniProt ID具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%一致性的蛋白質。

【0413】 在一些實施例中，治療性表現序列可編碼結合以上任一者之抗體或抗體片段，例如針對與揭示於本文表中之蛋白質序列參照其UniProt ID具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%一致性的蛋白質的抗體。術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現出所需抗原結合活性。「抗體片段」係指包括至少一個重鏈或輕鏈且結合抗原之分子。抗體片段之實例包括(但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$；雙功能抗體(diabodies)；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0414】

例示性胞內多肽效應子

在一些實施例中，效應子包含細胞溶質多肽或細胞溶質肽。在一些實施例中，效應子包含細胞溶質肽，其為DPP-4抑制劑、GLP-1傳訊之活化劑或嗜中性球彈性蛋白酶之抑制劑。在一些實施例中，效應子增加生長因子或其受體(例如FGF受體，例如FGFR3)之含量或活性。在一些實施例中，效應子包含n-myc相互作用蛋白質活性之抑制劑(例如n-myc相互作用蛋白質抑制劑)；EGFR活性之抑制劑(例如EGFR抑制劑)；IDH1及/或IDH2活性之抑制劑(例如IDH1抑制劑及/或IDH2抑制劑)；LRP5及/或DKK2活性之抑制劑(例如LRP5及/或DKK2抑制劑)；KRAS活性之抑制劑；HTT活性之活化劑；或DPP-4活性之抑制劑(例如DPP-4抑制劑)。

【0415】 在一些實施例中，效應子包含調節性胞內多肽。在一些實施例中，調節性胞內多肽結合一或多個對目標細胞為內源性的分子(例如蛋白質或核酸)。在一些實施例中，調節性胞內多肽增加一或多個對目標細胞為內源性的分子(例如蛋白質或核酸)的含量或活性。在一些實施例中，調節性胞內多肽減小一或多個對目標細胞為內源性的分子(例如蛋白質或核酸)的含量或活性。

【0416】

例示性分泌型多肽效應子

例示性分泌型治療劑描述於本文中，例如下表中。

表50.例示性細胞介素及細胞介素受體

細胞介素	細胞介素受體	Entrez基因ID	UniProt ID
IL-1α、IL-1β或其雜二聚體	IL-1 1型受體、IL-1 2型受體	3552、3553	P01583、P01584

IL-1Ra	IL-1 1型受體、IL-1 2型受體	3454、3455	P17181、P48551
IL-2	IL-2R	3558	P60568
IL-3	IL-3受體α + β c (CD131)	3562	P08700
IL-4	IL-4R I型、IL-4R II型	3565	P05112
IL-5	IL-5R	3567	P05113
IL-6	IL-6R (sIL-6R) gp130	3569	P05231
IL-7	IL-7R及sIL-7R	3574	P13232
IL-8	CXCR1及CXCR2	3576	P10145
IL-9	IL-9R	3578	P15248
IL-10	IL-10R1/IL-10R2複合物	3586	P22301
IL-11	IL-11Rα 1 gp130	3589	P20809
IL-12 (例如p35、p40或其雜二聚體)	IL-12Rβ1及IL-12Rβ2	3593、3592	P29459、P29460
IL-13	IL-13R1α1及IL-13R1α2	3596	P35225
IL-14	IL-14R	30685	P40222
IL-15	IL-15R	3600	P40933
IL-16	CD4	3603	Q14005
IL-17A	IL-17RA	3605	Q16552
IL-17B	IL-17RB	27190	Q9UHF5
IL-17C	IL-17RA至IL-17RE	27189	Q9P0M4
e	SEF	53342	Q8TAD2
IL-17F	IL-17RA、IL-17RC	112744	Q96PD4
IL-18	IL-18受體	3606	Q14116
IL-19	IL-20R1/IL-20R2	29949	Q9UHD0
IL-20	L-20R1/IL-20R2及IL-22R1/ IL-20R2	50604	Q9NYY1
IL-21	IL-21R	59067	Q9HBE4
IL-22	IL-22R	50616	Q9GZX6
IL-23 (例如p19、p40或其雜二聚體)	IL-23R	51561	Q9NPF7
IL-24	IL-20R1/IL-20R2及IL-22R1/ IL-20R2	11009	Q13007
IL-25	IL-17RA及IL-17RB	64806	Q9H293
IL-26	IL-10R2鏈及IL-20R1鏈	55801	Q9NPH9
IL-27 (例如p28、EBI3或其雜二聚體)	WSX-1及gp130	246778	Q8NEV9

IL-28A、IL-28B及IL29	IL-28R1/IL-10R2	282617、282618	Q8IZI9、Q8IU54
IL-30	IL6R/gp130	246778	Q8NEV9
IL-31	IL-31RA/OSMRβ	386653	Q6EBC2
IL-32		9235	P24001
IL-33	ST2	90865	O95760
IL-34	群落刺激因子1受體	146433	Q6ZMJ4
IL-35 (例如p35、EBI3或其雜二聚體)	IL-12Rβ2/gp130；IL-12Rβ2/IL-12Rβ2；gp130/gp130	10148	Q14213
IL-36	IL-36Ra	27179	Q9UHA7
IL-37	IL-18Rα及IL-18BP	27178	Q9NZH6
IL-38	IL-1R1、IL-36R	84639	Q8WWZ1
IFN-α	IFNAR	3454	P17181
IFN-β	IFNAR	3454	P17181
IFN-γ	IFNGR1/IFNGR2	3459	P15260
TGF-β	TβR-I及TβR-II	7046、7048	P36897、P37173
TNF-α	TNFR1、TNFR2	7132、7133	P19438、P20333

【0417】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含表50之細胞介素或其功能變異體，例如同源物(例如直系同源物或旁系同源物)或其片段。在一些實施例中，本文所述之效應子包含與參考其UniProt ID在表50中所列之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，功能性變異體以比在相同條件下相應野生型細胞介素對相同受體之Kd高或低不超過10%、20%、30%、40%或50%之Kd結合至相應細胞介素受體。在一些實施例中，效應子包含融合蛋白質，其包含第一區(例如表50之細胞介素多肽或功能性變異體或其片段)及第二異源區。在一些實施例中，第一區為表50之第一細胞介素多肽。在一些實施例中，第二區為表50之第二細胞介素多肽，其中第一及第二細胞介素多肽在野生型細胞中彼此形成細胞介素雜二聚體。在一些實施例中，表50之多肽或其功能變異體包含訊號序列，例如對效應子而言為內源性之訊號序列，或異源訊號序列。在一些實施例中，編碼表50

之細胞介素的指環載體或其功能變異體用於治療本文所述之疾病或病症。

【0418】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含結合表50之細胞介素的抗體分子(例如scFv)。在一些實施例中，本文所述之效應子包含結合表50之細胞介素受體的抗體分子(例如scFv)。在一些實施例中，抗體分子包含訊號序列。

【0419】 例示性細胞介素及細胞介素受體描述於例如Akdis等人,「Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β, and TNF-α: Receptors, functions, and roles in diseases」October 2016第138卷,第4期,第984-1010頁中，其以全文引用之方式併入本文中，包括其中之表I。

表51.例示性多肽激素及受體

激素	受體	Entrez基因ID	UniProt ID
利尿鈉肽，例如心房利尿鈉肽(ANP)	NPRA、NPRB、NPRC	4878	P01160
腦尿鈉肽(BNP)	NPRA、NPRB	4879	P16860
C型利尿鈉肽(CNP)	NPRB	4880	P23582
生長激素(GH)	GHR	2690	P10912
人類生長激素(hGH)	hGH受體(人類GHR)	2690	P10912
促乳素(PRL)	PRLR	5617	P01236
甲狀腺刺激激素(TSH)	TSH受體	7253	P16473
促腎上腺皮質激素(ACTH)	ACTH受體	5443	P01189
促卵泡激素(FSH)	FSHR	2492	P23945
促黃體生成激素(LH)	LHR	3973	P22888
抗利尿激素(ADH)	血管加壓素受體，例如V2；AVPR1A；AVPR1B；AVPR3；AVPR2	554	P30518
催產素	OXTR	5020	P01178
降鈣素	降鈣素受體(CT)	796	P01258
副甲狀腺激素(PTH)	PTH1R及PTH2R	5741	P01270
胰島素	胰島素受體(IR)	3630	P01308
升糖素	升糖素受體	2641	P01275

【0420】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含表51之激素或其功能變異體，例如同源物(例如直系同源物或旁系同源物)或其片段。在一些實施例中，本文所述之效應子包含與參考其UniProt ID在表51中所列之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，功能變異體以比在相同條件下相應野生型激素對相同受體之Kd高不超過10%、20%、30%、40%或50%之Kd結合至相應受體。在一些實施例中，表51之多肽或其功能變異體包含訊號序列，例如對效應子而言為內源性之訊號序列，或異源訊號序列。在一些實施例中，編碼表51之激素的指環載體或其功能變異體用於治療本文所述之疾病或病症。

【0421】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含結合表51之激素的抗體分子(例如scFv)。在一些實施例中，本文所述之效應子包含結合表51之激素受體的抗體分子(例如scFv)。在一些實施例中，抗體分子包含訊號序列。

表52.例示性生長因子

生長因子		**Entrez基因ID**	**UniProt ID**
PDGF家族			
PDGF (例如PDGF-1、PDGF-2或其雜二聚體)	PDGF受體，例如PDGFRα、PDGFRβ	5156	P16234
CSF-1	CSF1R	1435	P09603
SCF	CD117	3815	P10721
VEGF家族			
VEGF (例如同功型VEGF 121、VEGF 165、VEGF 189及VEGF 206)	VEGFR-1、VEGFR-2	2321	P17948
VEGF-B	VEGFR-1	2321	P17949
VEGF-C	VEGFR-2及VEGFR -3	2324	P35916
PlGF	VEGFR-1	5281	Q07326
EGF家族			

EGF	EGFR	1950	P01133
TGF-α	EGFR	7039	P01135
雙調蛋白	EGFR	374	P15514
HB-EGF	EGFR	1839	Q99075
β細胞調節素	EGFR、ErbB-4	685	P35070
表皮調節素	EGFR、ErbB-4	2069	O14944
調蛋白	EGFR、ErbB-4	3084	Q02297
FGF家族			
FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9	FGFR1、FGFR2、FGFR3及FGFR4	2246、2247、2248、2249、2250、2251、2252、2253、2254	P05230、P09038、P11487、P08620、P12034、P10767、P21781、P55075、P31371
胰島素家族			
胰島素	IR	3630	P01308
IGF-I	IGF-I受體、IGF-II受體	3479	P05019
IGF-II	IGF-II受體	3481	P01344
HGF家族			
HGF	MET受體	3082	P14210
MSP	RON	4485	P26927
神經滋養素家族			
NGF	LNGFR、trkA	4803	P01138
BDNF	trkB	627	P23560
NT-3	trkA、trkB、trkC	4908	P20783
NT-4	trkA、trkB	4909	P34130
NT-5	trkA、trkB	4909	P34130
血管生成素家族			
ANGPT1	HPK-6/TEK	284	Q15389
ANGPT2	HPK-6/TEK	285	O15123
ANGPT3	HPK-6/TEK	9068	O95841
ANGPT4	HPK-6/TEK	51378	Q9Y264

【0422】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含表52之生長因子或其功能變異體，例如同源物(例如直系同源物或旁系同源物)或其片段。在一些實施例中，本文所述之效應子包含與參考其UniProt ID在表52中所列之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、

99%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，功能變異體以比在相同條件下相應野生型生長因子對相同受體之Kd高不超過10%、20%、30%、40%或50%之Kd結合至相應受體。在一些實施例中，表52之多肽或其功能變異體包含訊號序列，例如對效應子而言為內源性之訊號序列，或異源訊號序列。在一些實施例中，編碼表52之生長因子的指環載體或其功能變異體用於治療本文所述之疾病或病症。

【0423】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含結合表52之生長因子的抗體分子(例如scFv)。在一些實施例中，本文所述之效應子包含結合表52之生長因子受體的抗體分子(例如scFv)。在一些實施例中，抗體分子包含訊號序列。

【0424】 例示性生長因子及生長因子受體描述於例如Bafico等人，「Classification of Growth Factors and Their Receptors」 Holland-Frei Cancer Medicine.第6版中，其以全文引用之方式併入本文中。

表53.凝結相關因子

效應子	病症	Entrez基因ID	UniProt ID
因子I (血纖維蛋白原)	無纖維蛋白原血症	2243、2266、2244	P02671、P02679、P02675
因子II	因子II缺乏症	2147	P00734
因子IX	B型血友病	2158	P00740
因子V	奧倫氏病(Owren's disease)	2153	P12259
因子VIII	A型血友病	2157	P00451
因子X	斯圖亞特因子缺乏症(Stuart-Prower Factor Deficiency)	2159	P00742
因子XI	C型血友病	2160	P03951
因子XIII	纖維蛋白穩定因子缺乏症	2162、2165	P00488、P05160
vWF	馮威里氏病(von Willebrand disease)	7450	P04275

【0425】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含表53之多肽或其功能變異體，例如同源物(例如直系同源物或旁系同源物)或其片段。在一些實施例中，本文所述之效應子包含與參考其UniProt ID在表53中所列之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，功能變異體催化與相應野生型蛋白質相同的反應，例如以比野生型蛋白質低不少於10%、20%、30%、40%或50%之速率。在一些實施例中，表53之多肽或其功能變異體包含訊號序列，例如對效應子而言為內源性之訊號序列，或異源訊號序列。在一些實施例中，編碼表53之多肽的指環載體或其功能變異體用於治療表53之疾病或病症。

【0426】

例示性蛋白質替代治療劑

例示性蛋白質替代治療劑描述於本文中，例如下表中。

表54.例示性酶效應子及對應病症

效應子	缺乏症	Entrez基因ID	UniProt ID
3-甲基巴豆醯基-CoA羧化酶	3-甲基巴豆醯基-CoA羧化酶缺乏症	56922、64087	Q96RQ3、Q9HCC0
乙醯基-CoA-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶	黏多糖病MPS III (聖菲利柏氏症候群(Sanfilippo's syndrome)) III-C型	138050	Q68CP4
ADAMTS13	血栓性血小板減少性紫癜	11093	Q76LX8
腺嘌呤磷酸核糖轉移酶	腺嘌呤磷酸核糖轉移酶缺乏症	353	P07741
腺苷去胺酶	腺苷去胺酶缺乏症	100	P00813
ADP-核糖蛋白質水解酶	麩胺醯基核糖-5-磷酸貯積病	26119、54936	Q5SW96、Q9NX46
α葡糖苷酶	2型肝糖貯積病(龐貝氏病(Pompe's disease))	2548	P10253
精胺酸酶	家族性高精胺酸血症	383、384	P05089、P78540
芳基硫酸酯酶A	異染性腦白質營養不良	410	P15289
組織蛋白酶K	密骨發育障礙	1513	P43235

神經醯胺酶	法伯氏病(Farber's disease) (脂肪肉芽腫病)	125981、340485、55331	Q8TDN7、Q5QJU3、Q9NUN7
胱硫醚B合成酶	高胱胺酸尿	875	P35520
多萜醇-P-甘露糖合成酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ie	8813、54344	O60762、Q9P2X0
多萜醇-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-多萜醇葡萄糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ic	84920	Q5BKT4
多萜醇-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-多萜醇甘露糖基轉移酶	先天性N-糖基化障礙CDG Id	10195	Q92685
多萜醇基-P-葡萄糖:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-多萜醇基-α-3-葡萄糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ih	79053	Q9BVK2
多萜醇基-P-甘露糖:Man-7-GlcNAc-2-PP-多萜醇基-α-6-甘露糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ig	79087	Q9BV10
因子II	因子II缺乏症	2147	P00734
因子IX	B型血友病	2158	P00740
因子V	奧倫氏病(Owren's disease)	2153	P12259
因子VIII	A型血友病	2157	P00451
因子X	斯圖亞特因子缺乏症(Stuart-Prower Factor Deficiency)	2159	P00742
因子XI	C型血友病	2160	P03951
因子XIII	纖維蛋白穩定因子缺乏症	2162、2165	P00488、P05160
半乳胺糖-6-硫酸酯硫酸酯酶	黏多糖病MPS IV (莫奎歐氏症候群(Morquio's syndrome)) IV-A型	2588	P34059
半乳糖基神經醯胺β-半乳糖苷酶	克拉伯氏病(Krabbe's disease)	2581	P54803
神經節苷脂β-半乳糖苷酶	全身性GM1神經節苷脂貯積病	2720	P16278
神經節苷脂β-半乳糖苷酶	GM2神經節苷脂貯積病	2720	P16278
神經節苷脂β-半乳糖苷酶	I型神經鞘脂貯積症	2720	P16278
神經節苷脂β-半乳糖苷酶	II型神經鞘脂貯積症(幼年型)	2720	P16278
神經節苷脂β-半乳糖苷酶	III型神經鞘脂貯積症(成人型)	2720	P16278
葡糖苷酶I	先天性N-糖基化障礙CDG IIb	2548	P10253
葡糖神經醯胺β-葡糖苷酶	高歇氏病(Gaucher's disease)	2629	P04062
乙醯肝素-S-硫酸酯硫酸醯胺酶	黏多糖病MPS III (聖菲利柏氏症候群) III-A型	6448	P51688
尿黑酸氧化酶	黑尿症	3081	Q93099

玻尿酸酶	黏多糖病MPS IX (玻尿酸酶缺乏症)	3373、8692、8372、23553	Q12794、Q12891、O43820、Q2M3T9
艾杜糖醛硫酸酯硫酸酯酶	黏多糖病MPS II (亨特氏症候群(Hunter's syndrome))	3423	P22304
卵磷脂-膽固醇醯基轉移酶(LCAT)	完全LCAT缺乏症、魚眼病、動脈粥樣硬化、高膽固醇血症	3931	606967
離胺酸氧化酶	戊二酸血症I型	4015	P28300
溶酶體酸性脂肪酶	膽甾醇酯貯積病(CESD)	3988	P38571
溶酶體酸性脂肪酶	溶酶體酸性脂肪酶缺乏症	3988	P38571
溶酶體酸性脂肪酶	沃爾曼氏病(Wolman's disease)	3988	P38571
溶酶體胃酶抑素不敏感性肽酶	幼兒型蠟樣脂褐質沈積症(CLN2、詹-比二氏病(Jansky-Bielschowsky disease))	1200	O14773
甘露糖(Man)磷酸酯(P)異構酶	先天性N-糖基化障礙CDG Ib	4351	P34949
甘露糖基-α-1,6-醣蛋白-β-1,2-N-乙醯葡糖胺基轉移酶	先天性N-糖基化障礙CDG IIa	4247	Q10469
金屬蛋白酶-2	溫徹斯特症候群(Winchester syndrome)	4313	P08253
甲基丙二醯基-CoA變位酶	甲基丙二酸血症(維生素b12無反應型)	4594	P22033
N-乙醯基半乳糖胺α-4-硫酸酯硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶B)	黏多糖病MPS VI (馬洛特-拉米症候群(Maroteaux-Lamy syndrome))	411	P15848
N-乙醯基-D-胺基葡糖苷酶	黏多糖病MPS III (聖菲利柏氏症候群(Sanfilippo's syndrome)) III-B型	4669	P54802
N-乙醯基-胺基半乳糖苷酶	I型辛德勒氏病(Schindler's disease) (嬰兒嚴重型)	4668	P17050
N-乙醯基-胺基半乳糖苷酶	II型辛德勒氏病(神琦病(Kanzaki disease)，成年發作型)	4668	P17050
N-乙醯基-胺基半乳糖苷酶	III型辛德勒氏病(中間型)	4668	P17050
N-乙醯基-葡萄糖胺-6-硫酸酯硫酸酯酶	黏多糖病MPS III (聖菲利柏氏症候群) III-D型	2799	P15586
N-乙醯基葡糖胺基-1-磷酸轉移酶	黏脂貯積症ML III (假賀勒氏多種營養不良(pseudo-Hurler's polydystrophy))	79158	Q3T906
N-乙醯基葡糖胺基-1-磷酸轉移酶催化次單元	黏脂貯積症ML II (I細胞病)	79158	Q3T906

N-乙醯基葡糖胺基-1-磷酸轉移酶，受質識別次單元	黏脂貯積症ML III (假賀勒氏多種營養不良) III-C型	84572	Q9UJJ9
N-天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶	天冬胺醯葡萄糖胺尿症	175	P20933
神經胺糖酸苷酶1 (唾液酸酶)	唾液腺病	4758	Q99519
軟脂醯基-蛋白質硫酯酶-1	成人型蠟樣脂褐質沈積症 (CLN4、庫夫斯病 (Kufs'disease))	5538	P50897
軟脂醯基-蛋白質硫酯酶-1	嬰兒型蠟樣脂褐質沈積症 (CLN1、桑塔沃里-哈爾蒂亞病(Santavuori-Haltia disease))	5538	P50897
苯丙胺酸羥化酶	苯酮尿症	5053	P00439
磷酸甘露糖酶-2	先天性N-糖基化障礙CDG Ia (僅神經及神經-多內臟型)	5373	O15305
膽色素原去胺酶	急性間歇卟啉症	3145	P08397
嘌呤核苷磷酸化酶	嘌呤核苷磷酸化酶缺乏症	4860	P00491
嘧啶5'核苷酸酶	溶血性貧血及/或嘧啶5'核苷酸酶缺乏症	51251	Q9H0P0
神經磷脂酶	尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease) A型	6609	P17405
神經磷脂酶	尼曼-匹克病B型	6609	P17405
固醇27-羥化酶	腦腱黃瘤病(膽甾醇脂沈積症)	1593	Q02318
胸苷磷酸化酶	粒線體神經胃腸道腦肌病 (MNGIE)	1890	P19971
三己糖神經醯胺α-半乳糖苷酶	法布立氏病(Fabry's disease)	2717	P06280
酪胺酸酶，例如OCA1	白化病，例如眼白化病	7299	P14679
UDP-GlcNAc:多萜醇基-PNAcGlc磷酸轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ij	1798	Q9H3H5
UDP-N-乙醯基葡糖胺-2-表異構酶/N-乙醯甘露糖胺激酶，唾液酸轉運蛋白(sialin)	法國型涎尿(Sialuria French type)	10020	Q9Y223
尿酸酶	萊尼症候群(Lesch-Nyhan syndrome)、痛風	391051	No protein
二磷酸尿苷葡萄糖醛酸轉移酶(例如UGT1A1)	克果-納傑氏症候群(Crigler-Najjar syndrome)	54658	P22309
α-1,2-甘露糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Il (608776)	79796	Q9H6U8
α-1,2-甘露糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙，I型(前高基體醣基化缺陷)	79796	Q9H6U8
α-1,3-甘露糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ii	440138	Q2TAA5

α-D-甘露糖苷酶	α-甘露糖苷貯積病I型(重度)或II型(輕度)	10195	Q92685
α-L-岩藻糖苷酶	岩藻糖苷貯積症	4123	Q9NTJ4
α-l-艾杜糖苷	黏多糖病MPS I H/S (賀勒-沙伊侯症群(Hurler-Scheie syndrome))	2517	P04066
α-l-艾杜糖苷	黏多糖病MPS I-H (賀勒氏症候群)	3425	P35475
α-l-艾杜糖苷	黏多糖病MPS I-S (施艾氏症候群(Scheie's syndrome))	3425	P35475
β-1,4-半乳糖苷基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG IId	3425	P35475
β-1,4-甘露糖基轉移酶	先天性N-醣基化障礙CDG Ik	2683	P15291
β-D-甘露糖苷酶	β-甘露糖苷貯積病	56052	Q9BT22
β-半乳糖苷酶	黏多糖病MPS IV (莫奎歐氏症候群) IV-B型	4126	O00462
β-葡萄糖醛酸苷酶	黏多糖病MPS VII (斯利症候群(Sly's syndrome))	2720	P16278
β-己糖苷酶A	泰-薩克斯病(Tay-Sachs disease)	2990	P08236
β-己糖苷酶B	桑德霍夫氏病(Sandhoff's disease)	3073	P06865

【0427】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含表54之酶或其功能變異體，例如同源物(例如直系同源物或旁系同源物)或其片段。在一些實施例中，本文所述之效應子包含與參考其UniProt ID在表54中所列之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，功能變異體催化與相應野生型蛋白質相同的反應，例如以比野生型蛋白質低不少於10%、20%、30%、40%或50%之速率。在一些實施例中，編碼表54之酶的指環載體或其功能變異體用於治療表54之疾病或病症。在一些實施例中，指環載體用於將葡萄糖醛酸苷轉移酶或其功能變異體遞送至目標細胞，例如肝細胞。在一些實施例中，指環載體用於將OCA1或其功能變異體遞送至目標細胞，例如視網膜細胞。

表55.例示性非酶效應子及相應病症

效應子	病症	Entrez基因ID	UniProt ID
存活運動神經元蛋白質(SMN)	脊髓性肌萎縮	6606	Q16637
肌縮蛋白或微肌縮蛋白	肌肉萎縮症(例如杜氏肌肉萎縮(Duchenne muscular dystrophy)或貝氏肌肉萎縮(Becker muscular dystrophy))	1756	P11532
補體蛋白，例如補體因子C1	補體因子I缺乏症	3426	P05156
補體因子H	非典型性溶血性尿毒症症候群	3075	P08603
胱胺酸素(溶酶體胱胺酸轉運體)	胱胺酸症	1497	O60931
附睾分泌蛋白質1(HE1；NPC2蛋白質)	尼曼-匹克病C2型	10577	P61916
GDP-岩藻糖轉運體-1	先天性N-糖基化障礙CDG IIc(拉瑪-哈薩隆症候群(Rambam-Hasharon syndrome))	55343	Q96A29
GM2活化蛋白質	GM2活化蛋白質缺乏症(泰-薩克斯病AB變異體，GM2A)	2760	Q17900
溶酶體跨膜CLN3蛋白質	幼年型蠟樣脂褐質沈積症(CLN3、巴氏病(Batten disease)、沃格特-施皮耳麥耶病(Vogt-Spielmeyer disease))	1207	Q13286
溶酶體跨膜CLN5蛋白質	幼兒型蠟樣脂褐質沈積症變異體，芬蘭型(CLN5)	1203	O75503
Na磷酸協同轉運蛋白，唾液酸轉運蛋白	嬰兒唾液酸貯積病	26503	Q9NRA2
Na磷酸協同轉運蛋白，唾液酸轉運蛋白	芬蘭型涎尿(薩拉病(Salla disease))	26503	Q9NRA2
NPC1蛋白質	尼曼-匹克病C1型/D型	4864	O15118
寡聚高基體複合物-7	先天性N-醣基化障礙CDG IIe	91949	P83436
鞘脂激活蛋白原	鞘脂激活蛋白原缺乏症	5660	P07602
保護性蛋白質/組織蛋白酶A (PPCA)	半乳糖唾液酸貯積症(戈德堡症候群(Goldberg's syndrome)、神經胺糖酸苷酶與β-半乳糖苷酶組合缺乏症)	5476	P10619
與甘露糖-P-多萜醇利用有關之蛋白質	先天性N-醣基化障礙CDG If	9526	O75352
鞘脂激活蛋白B	鞘脂激活蛋白B缺乏症(硫苷脂活化子缺乏症)	5660	P07602
鞘脂激活蛋白C	鞘脂激活蛋白C缺乏症(高歇氏活化子缺乏症(Gaucher's activator deficiency))	5660	P07602

硫酸酯酶修飾因子-1	黏硫脂病(多硫酸酯酶缺乏症)	285362	Q8NBK3
跨膜CLN6蛋白質	幼兒型蠟樣脂褐質沈積症變異體(CLN6)	54982	Q9NWW5
跨膜CLN8蛋白質	蠟樣脂褐質沈積症進展性癲癇症伴智力障礙	2055	Q9UBY8
vWF	馮威里氏病(von Willebrand disease)	7450	P04275
因子I (血纖維蛋白原)	無纖維蛋白原血症	2243、2244、2266	P02671、P02675、P02679
紅血球生成素(hEPO)			

【0428】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含紅血球生成素(EPO)，例如人類紅血球生成素(hEPO)或其功能變異體。在一些實施例中，編碼紅血球生成素之指環載體或其功能變異體用於刺激紅血球生成。在一些實施例中，編碼紅血球生成素之指環載體或其功能變異體用於治療疾病或病症，例如貧血。在一些實施例中，指環載體用於將EPO或其功能變異體遞送至目標細胞，例如紅血球。

【0429】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含表55之多肽或其功能變異體，例如同源物(例如直系同源物或旁系同源物)或其片段。在一些實施例中，本文所述之效應子包含與參考其UniProt ID在表55中所列之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，編碼表55之多肽的指環載體或其功能變異體用於治療表55之疾病或病症。在一些實施例中，指環載體用於將SMN或其功能變異體遞送至目標細胞，例如脊髓及/或運動神經元之細胞。在一些實施例中，指環載體用於將微肌縮蛋白遞送至目標細胞，例如肌細胞。

【0430】 例示性微肌縮蛋白描述於Duan, 「Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy.」 Mol Ther. 2018 Oct 3;26(10):2337-2356. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.07.011. Epub

2018 Jul 17中。

【0431】 在一些實施例中，本文所述之效應子包含凝結因子，例如本文之表54或表55中所列之凝結因子。在一些實施例中，本文所述之效應子包含當突變時引起溶酶體貯積病之蛋白質，例如本文之表54或表55中所列之蛋白質。在一些實施例中，本文所述之效應子包含轉運蛋白，例如本文之表55中所列之轉運蛋白。

【0432】 在一些實施例中，野生型蛋白質之功能性變異體包含具有野生型蛋白質之一或多種活性的蛋白質，例如功能性變異體催化與相應野生型蛋白質相同的反應，例如以比野生型蛋白質低不少於10%、20%、30%、40%或50%之速率。在一些實施例中，功能性變異體以比在相同條件下相應野生型蛋白質對相同結合搭配物之Kd高不超過10%、20%、30%、40%或50%之Kd結合至由野生型蛋白質結合之相同結合搭配物。在一些實施例中，功能性變異體之多肽序列與野生型多肽具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。在一些實施例中，功能性變異體包含相應野生型蛋白質之同源物(例如，直系同源物或旁系同源物)。在一些實施例中，功能性變異體為融合蛋白質。在一些實施例中，融合包含與相應野生型蛋白質具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%之一致性的第一區及第二異源區。在一些實施例中，功能性變異體包含或由相應野生型蛋白質之片段組成。

【0433】

再生、修復及纖維化因子

本文所述之治療性多肽亦包括例如如表56中所揭示之生長因子，或

其功能變異體，例如與藉由參考UniProt ID而揭示於表56中之蛋白質序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%一致性的蛋白質。亦包括針對此類生長因子之抗體或其片段，或促進再生及修復之miRNA。

表56. 例示性再生、修復及纖維化因子

目標	基因寄存編號	蛋白質寄存編號
VEGF-A	NG_008732	NP_001165094
NRG-1	NG_012005	NP_001153471
FGF2	NG_029067	NP_001348594
FGF1	基因ID：2246	NP_001341882
miR-199-3p	MIMAT0000232	
miR-590-3p	MIMAT0004801	
mi-17-92	MI0000071	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732113/figure/F1/
miR-222	MI0000299	
miR-302-367	MIR302A及MIR367	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400607/

【0434】

轉型因子

本文所述之治療性多肽亦包括轉型因子，例如將纖維母細胞轉型成分化細胞之蛋白質因子，例如如表57中所揭示之因子，或其功能變異體，例如與藉由參考UniProt ID而揭示於表57中之蛋白質序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%一致性的蛋白質。

表57.例示性轉型因子

目標	病症	基因寄存編號	蛋白質寄存編號
MESP1	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：55897	EAX02066
ETS2	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：2114	NP_005230
HAND2	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：9464	NP_068808
MYOCARDIN	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：93649	NP_001139784
ESRRA	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：2101	AAH92470
miR-1	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	MI0000651	n/a
miR-133	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	MI0000450	n/a
TGFb	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：7040	NP_000651.3
WNT	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：7471	NP_005421
JAK	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：3716	NP_001308784
NOTCH	藉由纖維母細胞轉型之器官修復	基因ID：4851	XP_011517019

【0435】

刺激細胞再生之蛋白質

本文所述之治療性多肽亦包括刺激細胞再生之蛋白質，例如如表58中所揭示之蛋白質，或其功能變異體，例如與藉由參考UniProt ID而揭示於表58中之蛋白質序列具有至少80%、85%、90%、95%、96、97%、98%、99%一致性的蛋白質。

表58.刺激細胞再生之例示性蛋白質

目標	基因寄存編號	蛋白質寄存編號
MST1	NG_016454	NP_066278

STK30	基因ID：26448	NP_036103
MST2	基因ID：6788	NP_006272
SAV1	基因ID：60485	NP_068590
LATS1	基因ID：9113	NP_004681
LATS2	基因ID：26524	NP_055387
YAP1	NG_029530	NP_001123617
CDKN2b	NG_023297	NP_004927
CDKN2a	NG_007485	NP_478102

【0436】

STING調節物效應子

在一些實施例中，本文所述之分泌性效應子調節STING/cGAS傳訊。在一些實施例中，STING調節物為多肽，例如病毒多肽或其功能變異體。舉例而言，效應子可包含描述於Maringer等人. 「Message in a bottle: lessons learned from antagonism of STING signalling during RNA virus infection」 Cytokine & Growth Factor Reviews第25卷,第6期, 2014年12月,第669-679頁中之STING調節物(例如抑制劑)，該等內容以全文引用的方式併入本文中。額外STING調節物(例如活化劑)描述於例如Wang等人. 「STING activator c-di-GMP enhances the anti-tumor effects of peptide vaccines in melanoma-bearing mice.」 Cancer Immunol Immunother. 2015 Aug;64(8):1057-66. doi: 10.1007/s00262-015-1713-5. Epub 2015 May 19; Bose 「cGAS/STING Pathway in Cancer: Jekyll and Hyde Story of Cancer Immune Response」 Int J Mol Sci. 2017 Nov; 18(11): 2456；及Fu等人. 「STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade」 Sci Transl Med. 2015 Apr 15; 7(283): 283ra52中，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0437】 肽之一些實例包括(但不限於)螢光標籤或標記物、抗原、

肽治療劑、來自天然生物活性肽之合成性或模擬肽、促效性或拮抗性肽、抗微生物肽、靶向或細胞毒性肽、降解或自毀肽及降解或自毀肽。本文所述之適用於本發明之肽亦包括抗原結合肽，例如抗原結合抗體或抗體樣片段，諸如單鏈抗體、奈米抗體(參見例如Steeland等人. 2016. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. Drug Discov Today: 21(7):1076-113)。此類抗原結合肽可結合細胞溶質抗原、細胞核抗原或細胞器內抗原。

【0438】 在一些實施例中，遺傳元件包含編碼小肽、肽模擬物(例如，類肽)、胺基酸及胺基酸類似物之序列。此類治療劑通常具有每莫耳低於約5,000公克之分子量、每莫耳低於約2,000公克之分子量、每莫耳低於約1,000公克之分子量、每莫耳低於約500公克之分子量及此類化合物之鹽、酯及其他醫藥學上可接受之形式。此類治療劑可包括(但不限於)神經傳遞素、激素、藥物、毒素、病毒或微生物粒子、合成分子及其促效劑或拮抗劑。

【0439】 在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體包括連接至能夠靶向特定位置、組織或細胞之配位體的多肽。

【0440】

基因編輯組分

指環載體之遺傳元件可包括編碼基因編輯系統之組分的一或多個基因。例示性基因編輯系統包括成簇規律間隔短回文重複序列(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat，CRISPR)系統、鋅指核酸酶(zinc finger nucleases，ZFN)及基於類轉錄活化因子效應子之核酸酶(Transcription Activator-Like Effector-based Nucleases，TALEN)。基於

ZFN、TALEN及CRISPR之方法描述於例如Gaj等人. Trends Biotechnol. 31.7(2013):397-405中；基因編輯之CRISPR方法描述於例如Guan等人., Application of CRISPR-Cas system in gene therapy: Pre-clinical progress in animal model. DNA Repair 2016 Oct;46:1-8. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.07.004; Zheng等人., Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. BioTechniques,第57卷,第3號, September 2014,第115-124頁中。

【0441】 CRISPR系統為最初在細菌及古菌中發現的適應性防禦系統。CRISPR系統使用稱為CRISPR相關性或「Cas」核酸內切酶(例如，Cas9或Cpf1)的RNA引導之核酸酶來裂解外來DNA。在典型CRISPR/Cas系統中，核酸內切酶係藉由靶向單股或雙股DNA序列之序列特定性非編碼「嚮導RNA」指向目標核苷酸序列(例如，待進行序列編輯之基因體中的位點)。已鑑別出三類(I-III) CRISPR系統。II類CRISPR系統使用單一Cas核酸內切酶(而非多個Cas蛋白質)。一個II類CRISPR系統包括II型Cas核酸內切酶，諸如Cas9、CRISPR RNA (「crRNA」)及反式活化crRNA (「tracrRNA」)。crRNA含有「嚮導RNA」，通常約20個核苷酸RNA序列對應於目標DNA序列。crRNA亦含有結合至tracrRNA以形成由核糖核酸酶III裂解之部分雙股結構的區，產生crRNA/tracrRNA混成物。crRNA/tracrRNA混成物隨後引導Cas9核酸內切酶識別及裂解目標DNA序列。目標DNA序列通常必須鄰近於對指定Cas核酸內切酶具有特異性之「原間隔序列相鄰模體」(「PAM」)；然而，PAM序列出現在整個給定基因體中。

【0442】 在一些實施例中，指環載體包括CRISPR核酸內切酶之基

因。舉例而言，自多種原核物種鑑別之一些CRISPR核酸內切酶具有不同PAM序列要求；PAM序列之實例包括5'-NGG (化膿性鏈球菌)、5'-NNAGAA (嗜熱鏈球菌CRISPR1)、5'-NGGNG (嗜熱鏈球菌CRISPR3)及5'-NNNGATT (腦膜炎雙球菌)。一些核酸內切酶，例如Cas9核酸內切酶係與富含G之PAM位點，例如5'-NGG相關，且在PAM位點之上游(5')的3個核苷酸位置處執行目標DNA之平端裂解。另一II類CRISPR系統包括V型核酸內切酶Cpf1，其小於Cas9；實例包括AsCpf1 (來自胺基酸球菌屬物種)及LbCpf1 (來自毛螺菌科物種)。Cpf1核酸內切酶係與富含T之PAM位點，例如5'-TTN相關。Cpf1亦可識別5'-CTA PAM模體。Cpf1藉由以下裂解目標DNA：引入具有4-或5-核苷酸5'突出物之偏移或交錯雙股斷裂，例如使用位於編碼股上之PAM位點下游(3')的18個核苷酸及互補股上之PAM位點下游23個核苷酸的5-核苷酸偏移或交錯切口裂解目標DNA；由此類偏移裂解產生之5-核苷酸突出物使得藉由同源重組之DNA插入與藉由平端裂解的DNA插入相比具有更精確的基因體編輯。參見例如Zetsche等人. (2015) Cell, 163:759 - 771。

【0443】 多種CRISPR相關(Cas)基因可包括於指環載體中。基因之特定實例為編碼來自包括Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Cpf1、C2C1或C2C3之II類系統之Cas蛋白質的彼等基因。在一些實施例中，指環載體包括編碼Cas蛋白質，例如Cas9蛋白質之基因，可來自多種原核物種中之任一者。在一些實施例中，指環載體包括編碼特定Cas蛋白質，例如特定Cas9蛋白質之基因，經選擇以識別特定原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。在一些實施例中，指環載體包括編碼兩個或更多個不同Cas蛋白質或兩個或更多個Cas蛋白質之

核酸，可引入至細胞、受精卵、胚胎或動物中，例如以允許識別及修飾包含相同、類似或不同PAM模體之位點。在一些實施例中，指環載體包括編碼具有去活化核酸酶，例如核酸酶缺失型Cas9之經修飾Cas蛋白質的基因。

【0444】 儘管野生型Cas9蛋白質在由gRNA靶向之特定DNA序列處產生雙股斷裂(DSB)，但已知具有經修飾功能之多種CRISPR核酸內切酶，例如：Cas核酸內切酶之「切口酶」版本(例如Cas9)產生僅單股斷裂；無催化活性Cas核酸內切酶，例如Cas9 (「dCas9」)不切割目標DNA。編碼dCas9之基因可與編碼效應子域之基因稠合以抑制(CRISPRi)或活化(CRISPRa)目標基因之表現。舉例而言，基因可使用轉錄緘默子(例如，KRAB域)或轉錄活化因子(例如，dCas9-VP64融合物)編碼Cas9融合物。可包括編碼稠合至FokI核酸酶之無催化活性Cas9 (dCas9)的基因(「dCas9-FokI」)以產生在與兩個gRNA同源之目標序列處的DSB。參見例如揭示於Addgene repository (Addgene, 75 Sidney St., Suite 550A, Cambridge, MA 02139; addgene.org/crispr/)且公開可購自其中之許多CRISPR/Cas9質體。引入兩個單獨雙股斷裂(各自藉由單獨嚮導RNA引導)之「雙切口酶」Cas9描述為藉由Ran等人. (2013) Cell, 154:1380 - 1389達成之更精確的基因體編輯。

【0445】 用於編輯真核生物之基因的CRISPR技術揭示於美國專利申請案公開案2016/0138008A1及US2015/0344912A1中，及美國專利8,697,359、8,771,945、8,945,839、8,999,641、8,993,233、8,895,308、8,865,406、8,889,418、8,871,445、8,889,356、8,932,814、8,795,965及8,906,616中。Cpf1核酸內切酶及相應嚮導RNA及PAM位點揭示於美國專

利申請公開案2016/0208243 A1中。

【0446】 在一些實施例中，指環載體包含編碼本文所述之多肽，例如經靶向核酸酶，例如Cas9，例如野生型Cas9、切口酶Cas9 (例如，Cas9 D10A)、死亡Cas9 (dCas9)、eSpCas9、Cpf1、C2C1或C2C3及gRNA的基因。編碼核酸酶及gRNA之基因的選擇係藉由經靶向突變是否為核苷酸之缺失、取代或添加，例如使核苷酸缺失、取代或添加至靶向序列來確定。編碼無催化活性核酸內切酶之基因，例如與(一或多個)效應子域(例如VP64)之所有或一部分(例如，生物活性部分)繫留之死亡Cas9 (dCas9，例如D10A；H840A)產生可調節一或多個目標核酸序列之活性及/或表現的嵌合蛋白質。

【0447】 在一些實施例中，指環載體包括編碼dCas9與一或多個效應子域(例如，全長野生型效應子域或其片段或變異體，例如其生物活性部分)之所有或一部分之融合物的基因以產生適用於本文所述之方法的嵌合蛋白。因此，在一些實施例中，指環載體包括編碼dCas9甲基化酶融合物之基因。在其他一些實施例中，指環載體包括編碼與位點特異性gRNA之dCas9-酶融合物的基因以靶向內源性基因。

【0448】 在其他態樣中，指環載體包括編碼與dCas9稠合之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多個效應子域(所有或生物活性部分)的基因。

【0449】

調節序列

在一些實施例中，遺傳元件包含可操作地連接至編碼效應子之序列的調節序列，例如啟動子或強化子。

【0450】 在一些實施例中，啟動子包括與編碼表現產物之DNA序列相鄰定位的DNA序列。啟動子可以操作方式連接於相鄰DNA序列。相比於不存在啟動子時表現產物之量，啟動子通常增加自DNA序列表現之產物的量。來自一個生物體之啟動子可用於增強來自來源於另一生物體之DNA序列的產物表現。舉例而言，脊椎動物啟動子可用於在脊椎動物中表現水母GFP。另外，一個啟動子元件可增加以串聯方式附接之多個DNA序列所表現之產物的量。因此，一個啟動子元件可增強一或多種產物之表現。多個啟動子元件為一般熟習此項技術者熟知的。

【0451】 在一個實施例中，需要高水準組成性表現。此類啟動子之實例包括(但不限於)反轉錄病毒勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus，RSV)長末端重複序列(LTR)啟動子/強化子、細胞巨大病毒(CMV)即刻早期啟動子/強化子(參見例如Boshart等人, Cell, 41:521-530 (1985))、SV40啟動子、二氫葉酸還原酶啟動子、細胞質.β.-肌動蛋白啟動子及磷酸甘油激酶(PGK)啟動子。

【0452】 在另一實施例中，可能需要誘導性啟動子。誘導性啟動子為由外源性地提供之化合物調節之彼等啟動子，例如以順式或反式提供，包括但不限於鋅誘導性綿羊金屬硫蛋白(MT)啟動子；地塞米松(Dex)誘導性小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)啟動子；T7聚合酶啟動子系統(WO 98/10088)；四環素抑制性系統(Gossen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992))；四環素誘導性系統(Gossen等人, Science, 268:1766-1769 (1995)；亦參見Harvey等人, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998))；RU486誘導性系統(Wang等人, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)及Wang等人, Gene Ther., 4:432-441 (1997)]；及雷帕黴素誘導

性系統(Magari等人, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)；Rivera等人, Nat. Medicine. 2:1028-1032 (1996))。在此情形下可適用之其他類型之誘導性啟動子為藉由特定生理狀態，例如溫度、急性期或僅在複製細胞中調節之啟動子。

【0453】 在一些實施例中，使用所關注之基因或核酸序列之天然啟動子。當期望基因或核酸序列之表現應模擬天然表現時，可使用天然啟動子。當基因或其他核酸序列之表現必須在時間上或發展上，或以組織特異性方式，或回應於特定轉錄刺激進行調節時，可使用天然啟動子。在另一實施例中，其他天然表現控制元件，諸如強化子元件、聚腺苷酸化位點或Kozak共有序列，亦可用於模擬天然表現。

【0454】 在一些實施例中，遺傳元件包含可操作地連接至組織特異性啟動子的基因。例如，若期望骨胳肌肉中之表現，則可使用在肌肉中有活性之啟動子。此等啟動子包括來自編碼骨骼α-肌動蛋白、肌凝蛋白輕鏈2A、肌縮蛋白、肌肉肌酸激酶之基因的啟動子，以及具有高於天然存在之啟動子之活性的合成肌肉啟動子。參見Li等人, Nat. Biotech., 17:241-245 (1999)。組織特異性啟動子之實例為吾人所知：肝白蛋白，Miyatake等人J. Virol., 71:5124-32 (1997)；B型肝炎病毒核心啟動子，Sandig等人, Gene Ther. 3:1002-9 (1996)；α-胎蛋白(AFP)，Arbuthnot等人, Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)]；骨(骨鈣化素，Stein等人, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)；骨唾液蛋白，Chen等人, J. Bone Miner. Res. 11:654-64 (1996))；淋巴細胞(CD2，Hansal等人, J. Immunol., 161:1063-8 (1998)；免疫球蛋白重鏈；T細胞受體a鏈)；神經元(神經元特異性烯醇化酶(NSE)啟動子，Andersen等人Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15

(1993)；神經絲輕鏈基因，Piccioli等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)；神經元特異性vgf基因，Piccioli等人, Neuron, 15:373-84 (1995)]；以及其他。

【0455】 遺傳元件可包括強化子，例如與編碼基因之DNA序列相鄰定位的DNA序列。強化子元件通常位於啟動子元件上游或可位於編碼DNA序列(例如，轉錄或轉譯至一或多種產物中之DNA序列)下游或其內。因此，強化子元件可位於編碼產物之DNA序列上游或下游之100個鹼基對、200個鹼基對或300個或更多個鹼基對處。增強子元件可將自DNA序列表現之重組產物的量增加至高於由啟動子元件提供之增加的表現。多個增強子元件可易於供一般熟習此項技術者使用。

【0456】 在一些實施例中，遺傳元件包含一或多個側接編碼本文所述之表現產物之序列的反向末端重複序列(ITR)。在一些實施例中，遺傳元件包含一或多個側接編碼本文所述之表現產物之序列的長末端重複序列(LTR)。可使用之啟動子序列的實例包括但不限於猿猴病毒40 (SV40)早期啟動子、小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺乏病毒(HIV)長末端重複序列(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽類白血病病毒啟動子、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)即刻早期啟動子及勞氏肉瘤病毒啟動子。

【0457】

複製蛋白質

在一些實施例中，指環載體，例如合成指環載體之遺傳元件可包括編碼一或多個複製蛋白質之序列。在一些實施例中，指環載體可藉由滾環複製方法複製，例如前導股及滯後股之合成為非偶聯的。在此類實施例中，指環載體包含三個元件額外元件：i)編碼起始蛋白之基因，ii)雙股起

點，及iii)單股起點。包含複製蛋白之滾環複製(RCR)蛋白複合物結合至前導股且使複製起點不穩定。RCR複合物裂解基因體以產生游離3'OH末端。細胞DNA聚合酶自游離3'OH末端起始病毒DNA複製。在基因體已複製後，RCR複合物共價閉合環。此引起正環形單股親體DNA分子及由負親體股及新合成之正股構成之環形雙股DNA分子的釋放。單股DNA分子可經衣殼化或參與第二輪複製。參見例如Virology Journal 2009, 6:60 doi:10.1186/1743-422X-6-60。

【0458】 遺傳元件可包含編碼聚合酶，例如RNA聚合酶或DNA聚合酶之序列。

【0459】

其他序列

在一些實施例中，遺傳元件進一步包括編碼產物(例如核糖核酸酶、編碼蛋白質之治療mRNA、外源性基因)之核酸。

【0460】 在一些實施例中，遺傳元件包括一或多個影響以下之序列：物種及/或組織及/或細胞向性(例如衣殼蛋白序列)、感染性(例如衣殼蛋白序列)、免疫抑制/活化(例如調節核酸)、病毒基因體結合及/或封裝、免疫逃避(非免疫原性及/或耐受性)、藥物動力學、內吞作用及/或細胞附著、核進入、細胞內調節及定位、胞外分泌調節、繁殖及宿主或宿主細胞中指環載體之核酸保護。

【0461】 在一些實施例中，遺傳元件可包含包括DNA、RNA或人工核酸之其他序列。其他序列可包括(但不限於)基因體DNA、cDNA或編碼tRNA、mRNA、rRNA、miRNA、gRNA、siRNA或其他RNAi分子之序列。在一個實施例中，遺傳元件包括編碼siRNA以靶向與調節核酸相同之

基因表現產物之不同基因座的序列。在一個實施例中，遺傳元件包括編碼siRNA以靶向與調節核酸不同之基因表現產物的序列。

【0462】 在一些實施例中，遺傳元件進一步包含以下序列中之一或多者：編碼一或多個miRNA之序列、編碼一或多個複製蛋白質之序列、編碼外源性基因之序列、編碼治療劑之序列、調節序列(例如啟動子、強化子)、編碼一或多個靶向內源性基因(siRNA、lncRNA、shRNA)之調節序列的序列以及編碼治療性mRNA或蛋白質之序列。

【0463】 其他序列之長度可為約2至約5000 nts、約10至約100 nts、約50至約150 nts、約100至約200 nts、約150至約250 nts、約200至約300 nts、約250至約350 nts、約300至約500 nts、約10至約1000 nts、約50至約1000 nts、約100至約1000 nts、約1000至約2000 nts、約2000至約3000 nts、約3000至約4000 nts、約4000至約5000 nts，或其間任何範圍。

【0464】

經編碼基因

舉例而言，遺傳元件可包括與傳訊生化途徑相關之基因，例如傳訊生化途徑相關基因或聚核苷酸。實例包括疾病相關基因或聚核苷酸。「疾病相關」基因或聚核苷酸係指相比於非疾病對照之組織或細胞，在衍生自受疾病影響之組織的細胞中以異常含量或以異常形式產生轉錄或轉譯產物的任何基因或聚核苷酸。其可為以異常高含量表現之基因；其可為以異常低含量表現之基因，其中改變之表現與疾病之出現及/或進展相關。疾病相關基因亦指具有直接負責或與負責疾病病因之基因處於連鎖不平衡的突變或遺傳變異的基因。

【0465】 疾病相關基因及聚核苷酸之實例係購自McKusick-Nathans

Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.)及National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)。疾病相關基因及聚核苷酸之實例列於美國專利第8,697,359號之表A及B中，該專利以全文引用之方式併入本文中。疾病特定資訊可獲自McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.)及National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)。傳訊生化途徑相關基因及聚核苷酸之實例列於美國專利第8,697,359號之表A-C中，該專利以全文引用之方式併入本文中。

【0466】 此外，遺傳元件可編碼靶向部分，如本文他處所述。此可例如藉由插入編碼糖、醣脂或蛋白質，諸如抗體之聚核苷酸來達成。熟習此項技術者已知用於產生靶向部分之額外方法。

【0467】

病毒序列

在一些實施例中，遺傳元件包含至少一個病毒序列。在一些實施例中，序列與一或多個來自單股DNA病毒，例如指環病毒(Anellovirus)、雙DNA病毒(Bidnavirus)、環狀病毒(Circovirus)、雙生病毒(Geminivirus)、基因體病毒(Genomovirus)、絲狀病毒(Inovirus)、微小病毒(Microvirus)、矮化病毒(Nanovirus)、小病毒(Parvovirus)及螺旋病毒(Spiravirus)的序列具有同源性或一致性。在一些實施例中，序列與一或多個來自雙股DNA病毒，例如腺病毒(Adenovirus)、壺腹病毒(Ampullavirus)、囊泡病毒(Ascovirus)、非洲豬瘟病毒(Asfarvirus)、桿狀病毒(Baculovirus)、微小紡錘形噬菌體屬(Fusellovirus)、球狀病毒

(Globulovirus)、滴狀病毒(Guttavirus)、肥大唾腺炎病毒(Hytrosavirus)、疱疹病毒(Herpesvirus)、虹彩病毒(Iridovirus)、脂毛病毒(Lipothrixvirus)、線極病毒(Nimavirus)及痘病毒(Poxvirus)的序列具有同源性或一致性。在一些實施例中，序列與一或多個來自RNA病毒，例如α病毒(Alphavirus)、真菌傳棒狀病毒(Furovirus)、肝炎病毒(Hepatitis virus)、大麥病毒(Hordeivirus)、菸草花葉病毒(Tobamovirus)、菸草脆裂病毒(Tobravirus)、三角病毒(Tricornavirus)、風疹病毒(Rubivirus)、雙RNA病毒(Birnavirus)、囊狀病毒(Cystovirus)、分病毒(Partitivirus)及里奧病毒(Reovirus)的序列具有同源性或一致性。

【0468】在一些實施例中，遺傳元件可以包含一或多個來自非致病性病毒，例如共生性病毒，例如共生病毒，例如天然病毒，例如指環病毒之序列。命名法之近期變化將能夠感染人類細胞之三種指環病毒分類為病毒之指環病毒科的甲型細環病毒(TT)、乙型細環病毒(TTM)及丙型細環病毒(TTMD)屬。迄今，指環病毒尚未與任何人類疾病相關聯。在一些實施例中，遺傳元件可包含與細環病毒(Torque Teno Virus，TT)，一種具有環形、反義基因體之無包膜、單股DNA病毒具有同源性或一致性的序列。在一些實施例中，遺傳元件可包含與SEN病毒、哨兵病毒(Sentinel virus)、TTV樣微型病毒及TT病毒具有同源性或一致性之序列。已描述不同類型之TT病毒，包括TT病毒基因型6、TT病毒組、TTV樣病毒DXL1及TTV樣病毒DXL2。在一些實施例中，遺傳元件可包含與以下具有同源性或一致性之序列：較小病毒細環樣微型病毒(TTM)，或基因體大小介於TTV與TTMV之間的第三病毒，稱為細環樣中型病毒(TTMD)。在一些實施例中，遺傳元件可包含一或多個來自非致病性病毒之序列或序列片段，

其與本文所述之核苷酸序列中之任一者具有至少約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%核苷酸序列一致性。

【0469】在一些實施例中，遺傳元件可包含一或多個來自基本上非致病性病毒之序列或序列片段，其與本文，例如表41中所述之核苷酸序列中之任一者具有至少約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%核苷酸序列一致性。

表41：指環病毒及其序列之實例

寄存編號及相關序列資訊可在www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/獲得，如2018年12月11日參考。

寄存編號	描述
AB017613.1	細環病毒16 DNA，完全基因體，分離株：TUS01
AB026345.1	ORF1及ORF2之TT病毒基因，完全cd，分離株：TRM1
AB026346.1	ORF1及ORF2之TT病毒基因，完全cd，分離株：TK16
AB026347.1	ORF1及ORF2之TT病毒基因，完全cd，分離株：TP1-3
AB028669.1	ORF1及ORF2之TT病毒基因，完全基因體，分離株：TJN02
AB030487.1	pORF2a、pORF2b、pORF1之TT病毒基因，完全cd，純系：JaCHCTC19
AB030488.1	pORF2a、pORF2b、pORF1之TT病毒基因，完全cd，純系：JaBD89
AB030489.1	pORF2a、pORF2b、pORF1之TT病毒基因，完全cd，純系：JaBD98
AB038340.1	ORF2、ORF1、ORF3之TT病毒基因，完全cd
AB038622.1	ORF2、ORF1、ORF3之TT病毒基因，完全cd，分離株：TTVyon-LC011
AB038623.1	ORF2、ORF1、ORF3之TT病毒基因，完全cd，分離株：TTVyon-KC186
AB038624.1	ORF2、ORF1、ORF3之TT病毒基因，完全cd，分離株：TTVyon-KC197
AB041821.1	VP1之TT病毒mRNA，完全cd
AB050448.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4之細環病毒基因，完全cd，分離株：TYM9
AB060592.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4之細環病毒基因，純系：SAa-39
AB060593.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4之細環病毒基因，完全cd，純系：SAa-38
AB060595.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4之TT病毒基因，完全cd，純系：SAj-30
AB060596.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4之TT病毒基因，完全cd，純系：SAf-09
AB064596.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：CT25F
AB064597.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：CT30F
AB064599.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：JT03F
AB064600.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：JT05F
AB064601.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：JT14F

AB064602.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：JT19F
AB064603.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：JT41F
AB064604.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：CT39F
AB064606.1	細環病毒DNA，完全基因體，分離株：JT33F
AB290918.1	細環中型病毒1 DNA，完全基因體，分離株：MD1-073
AF079173.1	TT病毒菌株TTVCHN1，完全基因體
AF116842.1	TT病毒菌株BDH1，完全基因體
AF122914.3	TT病毒分離株JA20，完全基因體
AF122917.1	TT病毒分離株JA4，完全基因體
AF122919.1	TT病毒分離株JA10未知基因
AF129887.1	TT病毒TTVCHN2，完全基因體
AF247137.1	TT病毒分離株TUPB，完全基因體
AF254410.1	TT病毒ORF2蛋白質及ORF1蛋白質基因，完全cd
AF298585.1	TT病毒拋光分離株P/1C1，完全基因體
AF315076.1	TTV樣病毒DXL1未知基因
AF315077.1	TTV樣病毒DXL2未知基因
AF345521.1	TT病毒分離株TCHN-G1 Orf2及Orf1基因，完全cd
AF345522.1	TT病毒分離株TCHN-E Orf2及Orf1基因，完全cd
AF345525.1	TT病毒分離株TCHN-D2 Orf2及Orf1基因，完全cd
AF345527.1	TT病毒分離株TCHN-C2 Orf2及Orf1基因，完全cd
AF345528.1	TT病毒分離株TCHN-F Orf2及Orf1基因，完全cd
AF345529.1	TT病毒分離株TCHN-G2 Orf2及Orf1基因，完全cd
AF371370.1	TT病毒ORF1、ORF3及ORF2基因，完全cd
AJ620212.1	細環病毒，分離株tth6，完全基因體
AJ620213.1	細環病毒，分離株tth10，完全基因體
AJ620214.1	細環病毒，分離株tth11g2，完全基因體
AJ620215.1	細環病毒，分離株tth18，完全基因體
AJ620216.1	細環病毒，分離株tth20，完全基因體
AJ620217.1	細環病毒，分離株tth21，完全基因體
AJ620218.1	細環病毒，分離株tth3，完全基因體
AJ620219.1	細環病毒，分離株tth9，完全基因體
AJ620220.1	細環病毒，分離株tth16，完全基因體
AJ620221.1	細環病毒，分離株tth17，完全基因體
AJ620222.1	細環病毒，分離株tth25，完全基因體
AJ620223.1	細環病毒，分離株tth26，完全基因體
AJ620224.1	細環病毒，分離株tth27，完全基因體
AJ620225.1	細環病毒，分離株tth31，完全基因體
AJ620226.1	細環病毒，分離株tth4，完全基因體

AJ620227.1	細環病毒，分離株tth5，完全基因體
AJ620228.1	細環病毒，分離株tth14，完全基因體
AJ620229.1	細環病毒，分離株tth29，完全基因體
AJ620230.1	細環病毒，分離株tth7，完全基因體
AJ620231.1	細環病毒，分離株tth8，完全基因體
AJ620232.1	細環病毒，分離株tth13，完全基因體
AJ620233.1	細環病毒，分離株tth19，完全基因體
AJ620234.1	細環病毒，分離株tth22g4，完全基因體
AJ620235.1	細環病毒，分離株tth23，完全基因體
AM711976.1	TT病毒sle1957完全基因體
AM712003.1	TT病毒sle1931完全基因體
AM712004.1	TT病毒sle1932完全基因體
AM712030.1	TT病毒sle2057完全基因體
AM712031.1	TT病毒sle2058完全基因體
AM712032.1	TT病毒sle2072完全基因體
AM712033.1	TT病毒sle2061完全基因體
AM712034.1	TT病毒sle2065完全基因體
AY026465.1	TT病毒分離株L01 ORF2及ORF1基因，完全cd
AY026466.1	TT病毒分離株L02 ORF2及ORF1基因，完全cd
DQ003341.1	細環病毒純系P2-9-02 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A)及ORF1B (ORF1B)基因，完全cd
DQ003342.1	細環病毒純系P2-9-07 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A)及ORF1B (ORF1B)基因，完全cd
DQ003343.1	細環病毒純系P2-9-08 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A)及ORF1B (ORF1B)基因，完全cd
DQ003344.1	細環病毒純系P2-9-16 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A)及ORF1B (ORF1B)基因，完全cd
DQ186994.1	細環病毒純系P601 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ186995.1	細環病毒純系P605 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ186996.1	細環病毒純系BM1A-02 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ186997.1	細環病毒純系BM1A-09 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ186998.1	細環病毒純系BM1A-13 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ186999.1	細環病毒純系BM1B-05 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ187000.1	細環病毒純系BM1B-07 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ187001.1	細環病毒純系BM1B-11 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ187002.1	細環病毒純系BM1B-14 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ187003.1	細環病毒純系BM1B-08 ORF2 (ORF2)基因，完全cd；及非功能性ORF1 (ORF1)基因，完全序列

DQ187004.1	細環病毒純系BM1C-16 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ187005.1	細環病毒純系BM1C-10 ORF2 (ORF2)及ORF1 (ORF1)基因，完全cd
DQ187007.1	細環病毒純系BM2C-25 ORF2 (ORF2)基因，完全cd；及非功能性ORF1 (ORF1)基因，完全序列
DQ361268.1	細環病毒分離株ViPi04 ORF1基因，完全cd
EF538879.1	細環病毒分離株CSC5 ORF2及ORF1基因，完全cd
EU305675.1	細環病毒分離株LTT7 ORF1基因，完全cd
EU305676.1	細環病毒分離株LTT10 ORF1基因，完全cd
EU889253.1	細環病毒分離株ViPi08非功能性ORF1基因，完全序列
FJ392105.1	細環病毒分離株TW53A25 ORF2基因，部分cd；及ORF1基因，完全cd
FJ392107.1	細環病毒分離株TW53A27 ORF2基因，部分cd；及ORF1基因，完全cd
FJ392108.1	細環病毒分離株TW53A29 ORF2基因，部分cd；及ORF1基因，完全cd
FJ392111.1	細環病毒分離株TW53A35 ORF2基因，部分cd；及ORF1基因，完全cd
FJ392112.1	細環病毒分離株TW53A39 ORF2基因，部分cd；及ORF1基因，完全cd
FJ392113.1	細環病毒分離株TW53A26 ORF2基因，完全cd；及非功能性ORF1基因，完全序列
FJ392114.1	細環病毒分離株TW53A30 ORF2及ORF1基因，完全cd
FJ392115.1	細環病毒分離株TW53A31 ORF2及ORF1基因，完全cd
FJ392117.1	細環病毒分離株TW53A37 ORF1基因，完全cd
FJ426280.1	細環病毒菌株SIA109，完全基因體
FR751500.1	細環病毒完全基因體，分離株TTV-HD23a (rheu215)
GU797360.1	細環病毒純系8-17，完全基因體
HC742700.1	來自專利WO2010044889之序列7
HC742710.1	來自專利WO2010044889之序列17
JX134044.1	TTV樣微型病毒分離株TTMV_LY1，完全基因體
JX134045.1	TTV樣微型病毒分離株TTMV_LY2，完全基因體
KU243129.1	TTV樣微型病毒分離株TTMV-204，完全基因體
KY856742.1	TTV樣微型病毒分離株zhenjiang，完全基因體
LC381845.1	細環病毒人類/日本/KS025/2016 DNA，完全基因體
MH648892.1	指環病毒物種分離株ctdc048，完全基因體
MH648893.1	指環病毒物種分離株ctdh007，完全基因體
MH648897.1	指環病毒物種分離株ctcb038，完全基因體
MH648900.1	指環病毒物種分離株ctfc019，完全基因體
MH648901.1	指環病毒物種分離株ctbb022，完全基因體
MH648907.1	指環病毒物種分離株ctcf040，完全基因體
MH648911.1	指環病毒物種分離株cthi018，完全基因體
MH648912.1	指環病毒物種分離株ctea38，完全基因體
MH648913.1	指環病毒物種分離株ctbg006，完全基因體

MH648916.1	指環病毒物種分離株ctbg020，完全基因體
MH648925.1	指環病毒物種分離株ctci019，完全基因體
MH648932.1	指環病毒物種分離株ctid031，完全基因體
MH648946.1	指環病毒物種分離株ctdb017，完全基因體
MH648957.1	指環病毒物種分離株ctch017，完全基因體
MH648958.1	指環病毒物種分離株ctbh011，完全基因體
MH648959.1	指環病毒物種分離株ctbc020，完全基因體
MH648962.1	指環病毒物種分離株ctif015，完全基因體
MH648966.1	指環病毒物種分離株ctei055，完全基因體
MH648969.1	指環病毒物種分離株ctjg000，完全基因體
MH648976.1	指環病毒物種分離株ctcj064，完全基因體
MH648977.1	指環病毒物種分離株ctbj022，完全基因體
MH648982.1	指環病毒物種分離株ctbf014，完全基因體
MH648983.1	指環病毒物種分離株ctbd027，完全基因體
MH648985.1	指環病毒物種分離株ctch016，完全基因體
MH648986.1	指環病毒物種分離株ctbd020，完全基因體
MH648989.1	指環病毒物種分離株ctga035，完全基因體
MH648990.1	指環病毒物種分離株cthf001，完全基因體
MH648995.1	指環病毒物種分離株ctbd067，完全基因體
MH648997.1	指環病毒物種分離株ctce026，完全基因體
MH648999.1	指環病毒物種分離株ctfb058，完全基因體
MH649002.1	指環病毒物種分離株ctjj046，完全基因體
MH649006.1	指環病毒物種分離株ctcf030，完全基因體
MH649008.1	指環病毒物種分離株ctbg025，完全基因體
MH649011.1	指環病毒物種分離株ctbh052，完全基因體
MH649014.1	指環病毒物種分離株ctba003，完全基因體
MH649017.1	指環病毒物種分離株ctbb016，完全基因體
MH649022.1	指環病毒物種分離株ctch023，完全基因體
MH649023.1	指環病毒物種分離株ctbd051，完全基因體
MH649028.1	指環病毒物種分離株ctbf9，完全基因體
MH649038.1	指環病毒物種分離株ctbi030，完全基因體
MH649039.1	指環病毒物種分離株ctca057，完全基因體
MH649040.1	指環病毒物種分離株ctch033，完全基因體
MH649042.1	指環病毒物種分離株ctjd005，完全基因體
MH649045.1	指環病毒物種分離株ctdc021，完全基因體
MH649051.1	指環病毒物種分離株ctdg044，完全基因體
MH649056.1	指環病毒物種分離株ctcc062，完全基因體
MH649061.1	指環病毒物種分離株ctid009，完全基因體

MH649062.1	指環病毒物種分離株ctdc018，完全基因體
MH649063.1	指環病毒物種分離株ctbf012，完全基因體
MH649068.1	指環病毒物種分離株ctcc066，完全基因體
MH649070.1	指環病毒物種分離株ctda011，完全基因體
MH649077.1	指環病毒物種分離株ctbh034，完全基因體
MH649083.1	指環病毒物種分離株ctdg028，完全基因體
MH649084.1	指環病毒物種分離株ctii061，完全基因體
MH649085.1	指環病毒物種分離株cteh021，完全基因體
MH649092.1	指環病毒物種分離株ctbg012，完全基因體
MH649101.1	指環病毒物種分離株ctif053，完全基因體
MH649104.1	指環病毒物種分離株ctei657，完全基因體
MH649106.1	指環病毒物種分離株ctca015，完全基因體
MH649114.1	指環病毒物種分離株ctbf050，完全基因體
MH649122.1	指環病毒物種分離株ctdc002，完全基因體
MH649125.1	指環病毒物種分離株ctbb15，完全基因體
MH649127.1	指環病毒物種分離株ctba013，完全基因體
MH649137.1	指環病毒物種分離株ctbb000，完全基因體
MH649141.1	指環病毒物種分離株ctbc019，完全基因體
MH649142.1	指環病毒物種分離株ctid026，完全基因體
MH649144.1	指環病毒物種分離株ctfj004，完全基因體
MH649152.1	指環病毒物種分離株ctcj13，完全基因體
MH649156.1	指環病毒物種分離株ctci006，完全基因體
MH649157.1	指環病毒物種分離株ctbd025，完全基因體
MH649158.1	指環病毒物種分離株ctbf005，完全基因體
MH649161.1	指環病毒物種分離株ctcf045，完全基因體
MH649165.1	指環病毒物種分離株ctcc29，完全基因體
MH649169.1	指環病毒物種分離株ctib021，完全基因體
MH649172.1	指環病毒物種分離株ctbh857，完全基因體
MH649174.1	指環病毒物種分離株ctbj049，完全基因體
MH649178.1	指環病毒物種分離株ctfc006，完全基因體
MH649179.1	指環病毒物種分離株ctbe000，完全基因體
MH649183.1	指環病毒物種分離株ctbb031，完全基因體
MH649186.1	指環病毒物種分離株ctcb33，完全基因體
MH649189.1	指環病毒物種分離株ctcc12，完全基因體
MH649196.1	指環病毒物種分離株ctci060，完全基因體
MH649199.1	指環病毒物種分離株ctbb017，完全基因體
MH649203.1	指環病毒物種分離株cthc018，完全基因體
MH649204.1	指環病毒物種分離株ctbj003，完全基因體

MH649206.1	指環病毒物種分離株ctbg010，完全基因體
MH649208.1	指環病毒物種分離株ctid008，完全基因體
MH649209.1	指環病毒物種分離株ctbg056，完全基因體
MH649210.1	指環病毒物種分離株ctda001，完全基因體
MH649212.1	指環病毒物種分離株ctcf004，完全基因體
MH649217.1	指環病毒物種分離株ctbe029，完全基因體
MH649223.1	指環病毒物種分離株ctci016，完全基因體
MH649224.1	指環病毒物種分離株ctce11，完全基因體
MH649228.1	指環病毒物種分離株ctcf013，完全基因體
MH649229.1	指環病毒物種分離株ctcb036，完全基因體
MH649241.1	指環病毒物種分離株ctda027，完全基因體
MH649242.1	指環病毒物種分離株ctbf003，完全基因體
MH649254.1	指環病毒物種分離株ctjb007，完全基因體
MH649255.1	指環病毒物種分離株ctbb023，完全基因體
MH649256.1	指環病毒物種分離株ctca002，完全基因體
MH649258.1	指環病毒物種分離株ctcg010，完全基因體
MH649263.1	指環病毒物種分離株ctgh3，完全基因體
MK012439.1	指環病毒物種分離株cthe000，完全基因體
MK012440.1	指環病毒物種分離株ctjd008，完全基因體
MK012448.1	指環病毒物種分離株ctch012，完全基因體
MK012457.1	指環病毒物種分離株ctda009，完全基因體
MK012458.1	指環病毒物種分離株ctcd015，完全基因體
MK012485.1	指環病毒物種分離株ctfd011，完全基因體
MK012489.1	指環病毒物種分離株ctba003，完全基因體
MK012492.1	指環病毒物種分離株ctbb005，完全基因體
MK012493.1	指環病毒物種分離株ctcj014，完全基因體
MK012500.1	指環病毒物種分離株ctcb001，完全基因體
MK012504.1	指環病毒物種分離株ctcj010，完全基因體
MK012516.1	指環病毒物種分離株ctcf003，完全基因體
NC_038336.1	細環病毒5分離株TCHN-C1 Orf2及Orf1基因，完全cd
NC_038338.1	細環病毒11分離株TCHN-D1 Orf2及Orf1基因，完全cd
NC_038339.1	細環病毒13分離株TCHN-A Orf2及Orf1基因，完全cd
NC_038340.1	細環病毒20 ORF4、ORF3、ORF2、ORF1基因，完全cd，純系：SAa-10
NC_038341.1	細環病毒21分離株TCHN-B ORF2及ORF1基因，完全cd
NC_038342.1	細環病毒23 ORF2、ORF1基因，完全cd，分離株：s-TTV CH65-2
NC_038343.1	細環病毒24 ORF4、ORF3、ORF2、ORF1基因，完全cd，純系：SAa-01
NC_038344.1	細環病毒29 ORF2、ORF1、ORF3基因，完全cd，分離株：TTVyon-KC009

NC_038345.1	細環微型病毒10分離株LIL-y1 ORF2、ORF1、ORF3及ORF4基因，完全cd
NC_038346.1	細環微型病毒11分離株LIL-y2 ORF2、ORF1及ORF3基因，完全cd
NC_038347.1	細環微型病毒12分離株LIL-y3 ORF2、ORF1、ORF3及ORF4基因，完全cd
NC_038350.1	細環中型病毒3分離株2PoSMA ORF2及ORF1基因，完全cd
NC_038351.1	細環中型病毒4分離株6PoSMA ORF2、ORF1及ORF3基因，完全cd
NC_038352.1	細環中型病毒5 DNA，完全基因體，分離株：MDJHem2
NC_038353.1	細環中型病毒6 DNA，完全基因體，分離株：MDJHem3-1
NC_038354.1	細環中型病毒7 DNA，完全基因體，分離株：MDJHem3-2
NC_038355.1	細環中型病毒8 DNA，完全基因體，分離株：MDJN1
NC_038356.1	細環中型病毒9 DNA，完全基因體，分離株：MDJN2
NC_038357.1	細環中型病毒10 DNA，完全基因體，分離株：MDJN14
NC_038358.1	細環中型病毒11 DNA，完全基因體，分離株：MDJN47
NC_038359.1	細環中型病毒12 DNA，完全基因體，分離株：MDJN51
NC_038360.1	細環中型病毒13 DNA，完全基因體，分離株：MDJN69
NC_038361.1	細環中型病毒14 DNA，完全基因體，分離株：MDJN97
NC_038362.1	細環中型病毒15 DNA，完全基因體，分離株：Pt-TTMDV210

【0470】 在一些實施例中，遺傳元件包含與來自以下之一或多個序列具有同源性或一致性的一或多個序列：一或多個非指環病毒，例如腺病毒、疱疹病毒、痘病毒、痘瘡病毒、SV40、乳頭狀瘤病毒；RNA病毒，諸如反轉錄病毒，例如慢病毒；單股RNA病毒，例如肝炎病毒；或雙股RNA病毒，例如輪狀病毒。在一些實施例中，由於缺乏重組反轉錄病毒，因此可提供輔助以產生感染性粒子。此類輔助可例如藉由使用輔助細胞株來提供，該等輔助細胞株含有在LTR內之調節序列控制下編碼反轉錄病毒之所有結構基因的質體。適合於複製本文所述之指環載體的細胞株包括此項技術中已知之細胞株，例如A549細胞，其可如本文所述地修飾。該遺傳元件可另外含有編碼可選標記之基因，以使得可鑑別所需遺傳元件。

【0471】 在一些實施例中，遺傳元件包括非靜默突變，例如在編碼多肽中產生胺基酸差異之鹼基取代、缺失或添加，只要序列保持與由第一

核苷酸序列編碼之多肽至少約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或以其他方式適用於實踐本發明。就此而言，可進行通常認為不使總體蛋白質功能不活化的某些保守胺基酸取代，諸如關於帶正電胺基酸(且反之亦然)：離胺酸、精胺酸及組胺酸；關於帶負電胺基酸(且反之亦然)：天冬胺酸及麩胺酸；以及關於帶中性電荷之某些胺基酸群組(且在所有情況下，亦反之亦然)：(1)丙胺酸及絲胺酸，(2)天冬醯胺、麩醯胺酸及組胺酸，(3)半胱胺酸及絲胺酸，(4)甘胺酸及脯胺酸，(5)異白胺酸、白胺酸及纈胺酸，(6)甲硫胺酸、白胺酸及異白胺酸，(7)苯丙胺酸、甲硫胺酸、白胺酸及酪胺酸，(8)絲胺酸及蘇胺酸，(9)色胺酸及酪胺酸，以及(10)例如酪胺酸、色胺酸及苯丙胺酸。可根據物理特性及對二級與三級蛋白質結構的影響來對胺基酸進行分類。保守取代在此項技術中公認為一個胺基酸取代具有類似特性之另一胺基酸。

【0472】 具有相同或指定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基的兩個或更多個核酸或多肽序列之一致性(例如在指定區域上之約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性，當在比較窗或指示區域上比較及比對最大一致性時)可使用BLAST或BLAST 2.0序列比較演算法在下文所述之預設參數下，或藉由手動比對及目視檢查來量測(參見例如NCBI網站www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/或其類似者)。一致性亦可指或可應用於測試序列之互補序列。一致性亦包括具有缺失及/或添加之序列以及具有取代之彼等者。如本文所述，演算法考慮空隙及其類似物。一致性可存在於以下之區域上：長度為至少約10個胺基酸或核苷酸、長度為約15個胺基酸或核苷酸、長度為約20個胺基酸或核苷酸、長度為約25個胺基酸或

核苷酸、長度為約30個胺基酸或核苷酸、長度為約35個胺基酸或核苷酸、長度為約40個胺基酸或核苷酸、長度為約45個胺基酸或核苷酸、長度為約50個胺基酸或核苷酸或更多個胺基酸或核苷酸。由於遺傳密碼簡併，因此同源核苷酸序列可包括任意數目個靜默鹼基變化，亦即仍然編碼相同胺基酸的核苷酸取代。

【0473】

蛋白質外部

在一些實施例中，指環載體，例如合成指環載體，包含包封遺傳元件之蛋白質外部。蛋白質外部可包含未能在哺乳動物中引發非所需免疫反應之實質上非致病性外部蛋白質。指環載體之蛋白質外部通常包含可自裝配成構成蛋白質外部之二十面體結構的實質上非致病性蛋白質。

【0474】 在一些實施例中，蛋白質外部蛋白質由指環載體之遺傳元件的序列(例如，與遺傳元件呈順式)編碼。在其他實施例中，蛋白質外部蛋白質由與指環載體之遺傳元件分離的核酸(例如，與遺傳元件呈反式)編碼。

【0475】 在一些實施例中，蛋白質，例如實質上非致病性蛋白質及/或蛋白質外部蛋白質，包含一或多個醣基化胺基酸，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個。

【0476】 在一些實施例中，蛋白質，例如實質上非致病性蛋白質及/或蛋白質外部蛋白質，包含至少一個親水性DNA-結合區、富含精胺酸之區、富含蘇胺酸之區、富含麩醯胺之區、N端聚精胺酸序列、可變區、C端聚麩醯胺酸/麩胺酸序列及一或多個二硫橋鍵。

【0477】 在一些實施例中，蛋白質為衣殼蛋白，例如具有以下之序

列：與由編碼本文所述之衣殼蛋白，例如指環病毒ORF1分子及/或衣殼蛋白序列，例如如本文所述，的核苷酸序列中之任一者編碼之蛋白質具有至少　約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一些實施例中，蛋白質或衣殼蛋白之功能片段由與指環病毒ORF1核酸，例如如本文所述，具有至少約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的核苷酸序列編碼。

【0478】 在一些實施例中，指環載體包含編碼衣殼蛋白或衣殼蛋白之功能片段之核苷酸序列，或與如本文所述之指環病毒ORF1分子具有至少　約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的序列。

【0479】 在一些實施例中，具有較低序列一致性之胺基酸的範圍可提供本文所述之特性及細胞/組織/物種特定性(例如趨向性)之差異中之一或多者。

【0480】 在一些實施例中，指環載體缺乏蛋白質外部之脂質。在一些實施例中，指環載體缺乏脂質雙層，例如病毒包封。在一些實施例中，指環載體之內部完全由蛋白質外部覆蓋(例如，100%覆蓋)。在一些實施例中，指環載體之內部低於100%由蛋白質外部覆蓋，例如95%、90%、85%、80%、70%、60%、50%或更低覆蓋。在一些實施例中，蛋白質外部包含間隔或不連續處，例如允許對水、離子、肽或小分子之滲透性，只要遺傳元件保留於指環載體中。

【0481】 在一些實施例中，蛋白質外部包含一或多種蛋白質或多肽，該等蛋白質或多肽特異地識別及/或結合宿主細胞，例如互補蛋白質

或多肽，以介導遺傳元件進入宿主細胞中。

【0482】 在一些實施例中，蛋白質外部包含以下中之一或多者：富含精胺酸之區、果凍卷區、N22域、高變區及/或C端域，例如ORF1分子，例如如本文所述。在一些實施例中，蛋白質外部包含以下中之一或多者：一或多個醣基化蛋白質、親水性DNA-結合區、富含精胺酸之區、富含蘇胺酸之區、富含麩醯胺之區、N端聚精胺酸序列、可變區、C端聚麩醯胺酸/麩胺酸序列及一或多個二硫橋鍵。舉例而言，蛋白質外部包含由指環病毒ORF1核酸，例如如本文所述，編碼之蛋白質。

【0483】 在一些實施例中，蛋白質外部包含以下特徵中之一或多者：二十面體對稱性，識別及/或結合與一或多個宿主細胞分子相互作用之分子以介導進入宿主細胞中，缺乏脂質分子，缺乏碳水化合物，pH及溫度穩定性，耐清潔性，及在宿主中為實質上非免疫原性或非致病性的。

【0484】

III.核酸構築體

本文所述之遺傳元件可包括於核酸構築體(例如，串聯構築體，例如如本文所述)中。

【0485】 在一個態樣中，本發明包括包含含有以下之遺傳元件的核酸遺傳元件構築體(例如串聯構築體)：(i)編碼非致病性外部蛋白質(例如，指環病毒ORF1分子或剪接變異體或其功能片段)之序列，(ii)將遺傳元件結合至非致病性外部蛋白質之外部蛋白質結合序列，及(iii)編碼效應子之序列。在一些實施例中，遺傳元件構築體進一步包含遺傳元件之第二複本或其片段(例如，包含uRFS或dRFS，例如如本文所述)。

【0486】 遺傳元件或遺傳元件內之序列中之任一者可使用任何適合

之方法得到。各種重組方法為此項技術中已知的，諸如使用標準技術自攜帶病毒序列之細胞中篩選庫、自已知包括序列之核酸構築體中衍生該等序列或自含有該等序列之細胞及組織中直接分離。替代地或組合地，遺傳元件之一部分或所有可以合成方式產生，而非選殖。

【0487】 在一些實施例中，核酸構築體包括調節元件、與目標基因同源之核酸序列及用於在活細胞內及/或當胞內分子存在於目標細胞內時引起報導分子之表現的各種報導子構築體。

【0488】 報導基因用於識別潛在經轉染細胞及評估調節序列功能。一般而言，報導基因為接受者生物體或組織中不存在或表現且編碼表現藉由一些可易於偵測之特性(例如，酶促活性)體現之多肽的基因。在DNA已引入接受者細胞中之後的適合時間分析報導基因之表現。適合報導基因可包括編碼螢光素酶、β-半乳糖苷酶、氯黴素乙醯基轉移酶、分泌鹼性磷酸酶之基因或綠色螢光蛋白基因(例如Ui-Tei等人, 2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適合的表現系統已熟知且可使用已知技術製備或商業購買。一般而言，具有展現出報導基因之最高表現水準之最小5'側接區的構築體識別為啟動子。此類啟動子區可連接至報導基因且用於評估試劑之調節啟動子驅動之轉錄能力。

【0489】 在一些實施例中，核酸構築體在宿主細胞中為實質上非致病性及/或實質上非整合的，或在宿主中為實質上非免疫原性的。

【0490】 在一些實施例中，核酸構築體係呈足以調節表現型、病毒含量、基因表現、與其他病毒之競爭、疾病病狀等中之一或多者的量，至少 約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或 更多。

【0491】

IV.組合物

本文所述之指環載體亦可包括於具有醫藥賦形劑，例如如本文所述，之醫藥組合物中。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}或10^{15}個指環載體。在一些實施例中，醫藥組合物包含約10^5-10^{15}、10^5-10^{10}或10^{10}-10^{15}個指環載體。在一些實施例中，醫藥組合物包含約10^8 (例如，約10^5、10^6、10^7、10^8、10^9或10^{10})個基因體當量/mL之指環載體。在一些實施例中，醫藥組合物包含10^5-10^{10}、10^6-10^{10}、10^7-10^{10}、10^8-10^{10}、10^9-10^{10}、10^5-10^6、10^5-10^7、10^5-10^8、10^5-10^9、10^5-10^{11}、10^5-10^{12}、10^5-10^{13}、10^5-10^{14}、10^5-10^{15}或10^{10}-10^{15}個基因體當量/mL之指環載體，例如根據如PCT/US19/65995之實例18之方法所確定。在一些實施例中，醫藥組合物包含足以將每個細胞包含於指環載體中之至少1、2、5、或10、100、500、1000、2000、5000、8,000、1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7或更多個遺傳元件的複本遞送至真核細胞群體的指環載體。在一些實施例中，醫藥組合物包含足以將每個細胞包含於指環載體中之至少約1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、 或約1×10^4-1×10^5、1×10^4-1×10^6、1×10^4-1×10^7、1×10^5-1×10^6、1×10^5-1×10^7或1×10^6-1×10^7個遺傳元件的複本遞送至真核細胞群體的指環載體。

【0492】在一些實施例中，醫藥組合物具有以下特徵中之一或多者：醫藥組合物符合醫藥或良好作業規範(GMP)標準；醫藥組合物根據良好作業規範(GMP)製得；醫藥組合物具有低於預定參考值之病原體含量，例如實質上不含病原體；醫藥組合物具有低於預訂參考值之污染物含量，

例如實質上不含污染物；或醫藥組合物具有較低免疫原性或實質上無免疫原性，例如如本文所述。

【0493】 在一些實施例中，醫藥組合物包含低於臨限量之一或多個污染物。醫藥組合物中宜排除或降至最低之例示性污染物包括(但不限於)宿主細胞核酸(例如，宿主細胞DNA及/或宿主細胞RNA)、動物衍生之組分(例如，血清白蛋白或胰蛋白酶)、複製勝任型病毒、無感染性粒子、無病毒衣殼蛋白、外源物質及凝集物。在實施例中，該污染物為宿主細胞DNA。在實施例中，該組合物包含每劑量低於約10 ng之宿主細胞DNA。在實施例中，組合物中之宿主細胞DNA之含量藉由過濾及/或酶降解宿主細胞DNA而降低。在實施例中，醫藥組合物由低於10重量% (例如，低於約10重量%、5重量%、4重量%、3重量%、2重量%、1重量%、0.5重量%、或0.1重量%)之污染物組成。

【0494】 在一個態樣中，本文所述之本發明包括醫藥組合物，其包含：a)包含遺傳元件之指環載體，該遺傳元件包含(i)編碼非致病性外部蛋白質之序列，(ii)將遺傳元件結合至非致病性外部蛋白質之外部蛋白質結合序列，及(iii)編碼調節核酸之序列；及與遺傳元件相關(例如，包封或包裹該遺傳元件)之蛋白質外部；及b)醫藥賦形劑。

【0495】

囊泡

在一些實施例中，組合物進一步包含載體組分，例如微粒、脂質體、囊泡或外泌體。在一些實施例中，脂質體包含由圍繞內部水性隔室之單層或多層脂質雙層及相對不可滲透之外部親脂性磷脂雙層構成的球狀囊泡結構。脂質體可為陰離子型、中性或陽離子型的。脂質體具有生物相容

性，無毒性，可遞送親水性及親脂性藥物分子，保護其負荷不被血漿酶降解，且將其負載轉運穿過生物膜(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery,第2011卷, 文章標識469679,第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679)。

【0496】囊泡可由數種不同類型之脂質製成；然而，磷脂最常用於產生脂質體作為藥物載劑。劑量可包含但不限於單獨的DOTMA、DOTAP、DOTIM、DDAB，或連同膽固醇產生DOTMA及膽固醇、DOTAP及膽固醇、DOTIM及膽固醇以及DDAB及膽固醇。用於製備多層囊泡脂質之方法為此項技術中已知的(參見例如美國專利第6,693,086號，其關於多層囊泡脂質製備之教示內容以引用的方式併入本文中)。雖然當脂質膜與水溶液混合時，囊泡形成可為自發的，但其亦可藉由使用均質機、音波處理器或擠出設備以震盪形式施加力來加快(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery,第2011卷, 文章標識469679, 第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679)。擠壓脂質可藉由擠壓穿過尺寸減小之過濾器來製備，如Templeton等人, Nature Biotech, 15:647-652, 1997中所述，其中與擠壓脂質製備有關之教示內容以引用之方式併入本文中。

【0497】如本文所述，可將添加劑添加至囊泡中以修改其結構及/或特性。舉例而言，可將膽固醇或神經鞘磷脂中之任一者添加至混合物中以幫助使結構穩定及防止內部負荷洩漏。此外，囊泡可由氫化卵磷脂醯膽鹼或卵磷脂醯膽鹼、膽固醇及磷酸二鯨蠟酯製備。(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery,第2011卷, 文章標識469679,第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679)。此外，囊泡可在合成期間或之後

經表面修飾以包括與受體細胞上之反應性基團互補的反應性基團。此類反應性基團包括但不限於順丁烯二醯亞胺基。舉例而言，可合成囊泡以包括順丁烯二醯亞胺結合磷脂，諸如但不限於DSPE-MaL-PEG2000。

【0498】 囊泡調配物可主要包含天然磷脂及脂質，諸如1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷脂醯膽鹼(DSPC)、神經鞘磷脂、卵磷脂醯膽鹼及單唾液酸神經節苷脂。由磷脂組成之調配物僅在血漿中不穩定。然而，用膽固醇操縱脂質膜減少經囊封負荷之快速釋放或1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)增加穩定性(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery,第2011卷, 文章標識469679,第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679)。

【0499】 在實施例中，脂質可用於形成脂質微粒。脂質包括(但不限於) DLin-KC2-DMA4、C12-200及共脂質二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(disteroylphosphatidyl choline)、膽固醇及PEG-DMG可使用自發性囊泡形成程序調配(參見例如Novobrantseva, Molecular Therapy-Nucleic Acids (2012) 1, e4; doi:10.1038/mtna.2011.3)。組分莫耳比可為約50/10/38.5/1.5 (DLin-KC2-DMA或C12-200/二硬脂醯基磷脂醯膽鹼/膽固醇/PEG-DMG)。Tekmira在美國及海外具有約95個專利系列，涉及脂質微粒及脂質微粒調配物之各種態樣(參見例如美國專利第7,982,027；7,799,565；8,058,069；8,283,333；7,901,708；7,745,651；7,803,397；8,101,741；8,188,263；7,915,399；8,236,943及7,838,658號，及歐洲專利第1766035；1519714；1781593及1664316號)，其皆可用於及/或適用於本發明。

【0500】 在一些實施例中，微粒包含呈隨機方式配置之一或多個經

固化聚合物。微粒可為可生物降解。可使用例如此項技術中已知之方法合成可生物降解之微粒，包括(但不限於)溶劑蒸發、熱熔微囊封裝、溶劑移除及噴霧乾燥。用於合成微粒之例示性方法係由Bershteyn等人, Soft Matter 4:1787-1787, 2008及在US 2008/0014144 A1中描述，其與微粒合成相關之特定教示內容以引用的方式併入本文中。

【0501】 可用以形成可生物降解微粒之例示性合成聚合物包括(不限於)脂族聚酯、聚(乳酸) (PLA)、聚(乙醇酸) (PGA)、乳酸與乙醇酸之共聚物(PLGA)、聚己內酯(PCL)、聚酸酐、聚(鄰)酯、聚胺基甲酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)及聚(丙交酯-共-己內酯)、及天然聚合物，諸如白蛋白、海藻酸鹽及其他多醣，包括聚葡萄糖及纖維素、膠原蛋白、其化學衍生物，包括化學基團之取代、添加，諸如烷基、伸烷基、羥基化、氧化、及藉由熟習此項技術者常規進行之其他改質)、白蛋白及其他親水性蛋白質、玉米蛋白及其他醇溶蛋白及疏水性蛋白，其共聚物及混合物。一般而言，此等材料藉由酶水解或暴露於水、藉由表面或整體侵蝕而降解。

【0502】 微粒之直徑範圍介於0.1-1000微米(μm)。在一些實施例中，其直徑之大小範圍為1-750 μm，或50-500 μm，或100-250 μm。在一些實施例中，其直徑之大小範圍為50-1000 μm、50-750 μm、50-500 μm或50-250 μm。在一些實施例中，其直徑之大小範圍為.05-1000 μm、10-1000 μm、100-1000 μm或500-1000 μm。在一些實施例中，其直徑為約0.5 μm、約10 μm、約50 μm、約100 μm、約200 μm、約300 μm、約350 μm、約400 μm、約450 μm、約500 μm、約550 μm、約600 μm、約650 μm、約700 μm、約750 μm、約800 μm、約850 μm、約900 μm、約950 μm或約1000 μm。如在微粒直徑之情形下所用，術語「約」意謂所陳述

之絕對值+/-5%。

【0503】 在一些實施例中，配位體經由存在於粒子表面上且存在於所連接之配位體上的功能性化學基團(羧酸、醛類、胺硫氫基及羥基)與微粒之表面共軛。功能性可藉由例如在微粒之乳液製備期間將穩定劑併入功能性化學基團引入至微粒中。

【0504】 將官能基引入至微粒之另一實例為在粒子製備後期間藉由使粒子及配位體與均雙官能或異雙官能交聯劑直接交聯來進行。此程序可使用適合之化學及一類交聯劑(如下文更詳細地論述之CDI、EDAC、戊二醛等)或在製備之後經由粒子表面之化學改質將配位體耦接至粒子表面的任何其他交聯劑。此亦包括兩親媒性分子，諸如脂肪酸、脂質或功能性穩定劑藉此可被動地吸附且接著至粒子表面，藉此引入用於繫留至配位體之功能性端基的方法。

【0505】 在一些實施例中，微粒可經合成以在其外部表面上包含一或多個靶向基團以靶向特定細胞或組織類型(例如心肌細胞)。此等靶向基團包括(但不限於)受體、配位體、抗體及其類似基團。此等靶向基團結合在細胞表面上之其搭配物。在一些實施例中，微粒將整合至包含細胞表面之脂質雙層中且使粒線體遞送至細胞。

【0506】 微粒亦可包含在其最外表面上之脂質雙層。此雙層可由一或多種相同或不同類型之脂質構成。實例包括(但不限於)磷脂，諸如磷酸膽鹼及磷脂醯肌醇。特定實例包括(但不限於) DMPC、DOPC、DSPC及各種其他脂質，諸如本文針對脂質體所述之脂質。

【0507】 在一些實施例中，載劑包含奈米粒子，例如如本文所述。

【0508】 在一些實施例中，本文所述之囊泡或微粒係用診斷劑功能

化。診斷劑之實例包括(但不限於)用於正電子發射斷層攝影術(PET)、電腦輔助斷層攝影術(CAT)、單光子發射電腦斷層攝影術、x射線、螢光檢查及磁共振成像(MRI)之可商購的成像劑；及造影劑。適用作MRI中之造影劑之適合的材料之實例包括釓螯合物，以及鐵、鎂、錳、銅及鉻。

【0509】

載體

本文所述之組合物(例如，醫藥組合物)可包含用載劑調配及/或在載劑中遞送。在一個態樣中，本發明包括一種包含含有(例如，囊封)本文所述之組合物(例如，本文所述之指環載體、指環病毒或遺傳元件)之載劑(例如，囊泡、脂質體、脂質奈米粒子、外泌體、紅血球、外泌體(例如，哺乳動物或植物外泌體)、融質體)的組合物，例如醫藥組合物。

【0510】 在一些實施例中，本文所述之組合物及系統可在脂質體或其他類似囊泡中調配。通常，脂質體為由圍繞內部水性區室之單層或多層脂質雙層及相對不可滲透之外部親脂性磷脂雙層構成的球狀囊泡結構。脂質體可為陰離子型、中性或陽離子型的。脂質體通常具有以下特徵中之一或多個(例如全部)：生物相容性、無毒性、可遞送親水性及親油性藥物分子二者、可保護其負荷免於受血漿酶降解，且可將其負載轉運穿過生物膜及血腦障壁(BBB) (參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery, 第2011卷, 文章標識469679,第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679; and Zylberberg & Matosevic. 2016. Drug Delivery, 23:9, 3319-3329, doi: 10.1080/10717544.2016.1177136)。

【0511】 囊泡可由數種不同類型之脂質製成；然而，磷脂最常用於產生脂質體作為藥物載劑。用於製備多層囊泡脂質之方法為已知的(參見

例如美國專利第6,693,086號，其關於多層囊泡脂質製備之教示內容以引用的方式併入本文中)。雖然當脂質膜與水溶液混合時，囊泡形成可為自發的，但其亦可藉由使用均質機、音波處理器或擠出設備以震盪形式施加力來加快(關於綜述，參見例如Spuch及Navarro, Journal of Drug Delivery, 第2011卷, 文章標識469679,第12頁, 2011. doi:10.1155/2011/469679)。擠壓脂質可藉由擠壓穿過尺寸減小之過濾器來製備，如Templeton等人, Nature Biotech, 15:647-652, 1997中所述。

【0512】 脂質奈米粒子(LNP)為向本文所述之醫藥組合物提供生物相容及可生物降解的遞送系統的載劑之另一實例。參見例如Gordillo-Galeano等人. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 第133卷, 2018年12月, 第285-308頁。奈米結構脂質載劑(NLC)為保留SLN特徵、改善藥物穩定性及負載能力且防止藥物滲漏之經修飾固體脂質奈米粒子(SLN)。聚合物奈米粒子(PNP)為藥物遞送之重要組成部分。此等奈米粒子可有效地將藥物遞送引導至特定目標，且改進藥物穩定性及受控藥物釋放。亦可採用脂質-聚合物奈米粒子(PLN)，其為組合脂質體及聚合物之一種新型載劑。此等奈米粒子具有PNP及脂質體之互補優點。PLN由核殼結構構成；聚合物核提供穩定結構，且磷脂殼提供良好生物相容性。因此，兩種組分增加藥物囊封效率，促進表面修飾，且防止水溶性藥物滲漏。關於評述，參見例如Li等人2017, Nanomaterials 7, 122; doi:10.3390/nano7060122。

【0513】 胞外體亦可用作本文所述之組合物及系統的藥物遞送媒劑。關於評述，參見Ha等人2016年7月. Acta Pharmaceutica Sinica B.第6卷, 第4期,第287-296頁；doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001。

【0514】 活體外分化之紅血球亦可用作本文所述之組合物的載劑。參見例如WO2015073587；WO2017123646；WO2017123644；WO2018102740；wO2016183482；WO2015153102；WO2018151829；WO2018009838；Shi等人2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136；美國專利9,644,180；Huang等人2017. Nature Communications 8: 423；Shi等人2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136。

【0515】 例如如WO2018208728中所述之融質體組合物亦可用作載劑以遞送本文所述之組合物。

【0516】

膜穿透多肽

在一些實施例中，組合物進一步包含膜穿透多肽(MPP)，以攜帶組分進入細胞中或穿過膜，例如細胞或細胞核膜。能夠促進將物質轉運穿過膜之膜穿透多肽包括(但不限於)細胞穿透肽(CPP)(參見例如美國專利第8,603,966號)、用於植物胞內遞送之融合肽(參見例如Ng等人., PLoS One, 2016, 11:e0154081)、蛋白質轉導域、特洛伊(Trojan)肽及膜移位訊號(MTS) (參見例如Tung等人., Advanced Drug Delivery Reviews 55:281-294 (2003))。一些MPP富含具有帶正電側鏈之胺基酸，諸如精胺酸。

【0517】 膜穿透多肽具有誘導組分之膜穿透及允許在全身性投與時在多個組織之細胞內巨分子活體內移位的能力。膜穿透多肽亦可指當在適當條件下與細胞接觸時以遠大於被動擴散所能達到的量自外部環境進入胞內環境，包括細胞質、細胞器(諸如粒線體)或細胞核的肽。

【0518】 轉運穿過膜之組分可以可逆或不可逆方式連接至膜穿透多肽。連接子可為化學鍵，例如一或多個共價鍵或非共價鍵。在一些實施例

中，連接子為肽連接子。此類連接子可介於2-30個胺基酸之間或更長。連接子包括可撓性、剛性或可裂解連接子。

【0519】

組合

在一個態樣中，本文所述之指環載體或包含指環載體之組合物亦可包括一或多個異源部分。在一個態樣中，本文所述之指環載體或包含指環載體之組合物亦可包括融合物中之一或多個異源部分。在一些實施例中，異源部分可與遺傳元件連接。在一些實施例中，異源部分可包封於蛋白質外部作為指環載體之一部分。在一些實施例中，異源部分可與指環載體一起投與。

【0520】 在一個態樣中，本發明包括細胞或組織，其包含本文所述之指環載體及異源部分中之任一者。

【0521】 在另一態樣中，本發明包括一種醫藥組合物，其包含本文所述之指環載體及異源部分。

【0522】 在一些實施例中，異源部分可為病毒(例如，效應子(例如，藥物、小分子)、靶向劑(例如，DNA靶向劑、抗體、受體配位體)、標籤(例如，螢光團、感光劑，諸如KillerRed)或本文所述之編輯或靶向部分。在一些實施例中，本文所述之膜易位多肽連接至一或多個異源部分。在一個實施例中，異源部分為小分子(例如，肽模擬物或分子量低於2000道爾頓之小有機分子)、肽或多肽(例如，抗體或其抗原結合片段)、奈米粒子、適體或藥劑。

【0523】

病毒

在一些實施例中，指環載體或組合物(例如，如本文所述)可進一步包含來自除指環病毒以外之病毒的一或多個組分或元件(例如核酸或多肽)，例如作為異源部分，例如單股DNA病毒，例如雙DNA病毒、環狀病毒、雙生病毒、基因體病毒、絲狀病毒、微小病毒、矮化病毒、小病毒及螺旋病毒。在一些實施例中，該組合物可進一步包含雙股DNA病毒，例如腺病毒(Adenovirus)、壺腹病毒(Ampullavirus)、囊泡病毒(Ascovirus)、非洲豬瘟病毒(Asfarvirus)、桿狀病毒(Baculovirus)、微小紡錘形噬菌體屬(Fusellovirus)、球狀病毒(Globulovirus)、滴狀病毒(Guttavirus)、肥大唾腺炎病毒(Hytrosavirus)、疱疹病毒(Herpesvirus)、虹彩病毒(Iridovirus)、脂毛病毒(Lipothrixvirus)、線極病毒(Nimavirus)及痘病毒(Poxvirus)。在一些實施例中，該組合物可進一步包含RNA病毒，例如α病毒(Alphavirus)、真菌傳棒狀病毒(Furovirus)、肝炎病毒(Hepatitis virus)、大麥病毒(Hordeivirus)、菸草花葉病毒(Tobamovirus)、菸草脆裂病毒(Tobravirus)、三角病毒(Tricornavirus)、風疹病毒(Rubivirus)、雙RNA病毒(Birnavirus)、囊狀病毒(Cystovirus)、分病毒(Partitivirus)及里奧病毒(Reovirus)。在一些實施例中，指環載體係與作為異源部分之病毒一起投與。

【0524】在一些實施例中，異源部分可包含非致病性，例如共生性、共生、天然病毒。在一些實施例中，非致病性病毒為一或多個指環病毒，例如甲型細環病毒(Alphatorquevirus)(TT)、乙型細環病毒(Betatorquevirus)(TTM)及丙型細環病毒(Gammatorquevirus)(TTMD)。在一些實施例中，指環病毒可包括細環病毒(TT)、SEN病毒、哨兵病毒、TTV樣微型病毒、TT病毒、TT病毒基因型6、TT病毒組、TTV樣病毒

DXL1、TTV樣病毒DXL2、細環樣微型病毒(TTM)或細環樣中型病毒(TTMD)。在一些實施例中，非致病性病毒包含與本文所述之核苷酸序列中之任一者具有至少約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%核苷酸序列一致性的一或多個序列。

【0525】 在一些實施例中，異源部分可包含鑑別為在個體中缺乏之一或多個病毒。舉例而言，可向鑑別為具有缺乏之個體投與包含指環載體及在該個體中不平衡或具有不同於參考值，例如健康個體之比率的一或多個病毒組分或病毒之組合物。

【0526】 在一些實施例中，異源部分可包含一或多個非指環病毒，例如腺病毒、疱疹病毒、痘病毒、痘瘡病毒、SV40、乳頭狀瘤病毒；RNA病毒，諸如反轉錄病毒，例如慢病毒；單股RNA病毒，例如肝炎病毒；或雙股RNA病毒，例如輪狀病毒。在一些實施例中，指環載體或病毒為缺乏的，或需要幫助以便產生感染性粒子。此類幫助可例如藉由使用輔助細胞株來提供，該等輔助細胞株含有在LTR內之調節序列控制下編碼複製缺陷性指環載體或病毒之結構基因中之一或多者(例如全部)的核酸，例如整合至基因體中之質體或DNA。適合於複製本文所述之指環載體的細胞株包括此項技術中已知之細胞株，例如A549細胞，其可如本文所述地修飾。

【0527】

靶向部分

在一些實施例中，本文所述之該組合物或指環載體可進一步包含靶向部分，例如特異性結合至存在於目標細胞上之所關注分子的靶向部分。靶向部分可調節所關注分子或細胞之特定功能，調節特定分子(例如，

酶、蛋白質或核酸)，例如路徑中之所關注分子下游的特定分子，或特異性結合至目標以定位指環載體或遺傳元件。舉例而言，靶向部分可包括與所關注之特定分子相互作用以提高、降低或以其他方式調節其功能的治療劑。

【0528】

標記或監測部分

在一些實施例中，本文所述之該組合物或指環載體可進一步包含用以標記或監測本文所述之指環載體或遺傳元件的標籤。標記或監測部分可藉由化學藥劑或酶裂解，諸如蛋白分解或內含肽剪接移除。親和標籤可適用於使用親和技術純化經標記多肽。一些實例包括幾丁質結合蛋白質(CBP)、麥芽糖結合蛋白質(MBP)、麩胱甘肽-S-轉移酶(GST)及聚(His)標籤。溶解標籤可適用於輔助在伴隨蛋白缺失型物種，諸如大腸桿菌，中表現之重組蛋白質以幫助蛋白質之恰當摺疊且阻止其沈澱。一些實例包括硫化還原蛋白(TRX)及聚(NANP)。標記或監測部分可包括光敏感型標籤，例如螢光。螢光標記可用於觀測。GFP及其變異體為常用作螢光標籤之一些實例。蛋白質標籤可允許發生特異性酶修飾(諸如藉由生物素接合酶進行之生物素標記)或化學修飾(諸如與FlAsH-EDT2反應以便螢光成像)。通常合併標記或監測部分，以便將蛋白質連接至多個其他組分。標記或監測部分亦可藉由特異性蛋白分解或酶裂解(例如藉由TEV蛋白酶、凝血酶、Xa因子或腸肽酶)移除。

【0529】

奈米粒子

在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體可進一步包含奈米

粒子。奈米粒子包括尺寸在約1與約1000奈米之間、尺寸在約1與約500奈米之間、尺寸在約1與約100 nm之間、尺寸在約50 nm與約300 nm之間、尺寸在約75 nm與約200 nm之間、尺寸在約100 nm與約200 nm之間及其間任何範圍的無機材料。奈米粒子通常具有奈米尺度尺寸之複合結構。在一些實施例中，奈米粒子通常為球面的，但取決於金屬奈米粒子組合物，不同形態為可能的。與奈米粒子之外部環境接觸的奈米粒子之部分通常鑑別為奈米粒子之表面。在本文所述之奈米粒子中，尺寸限制可限於二維，且因此，奈米粒子包括直徑為約1至約1000 nm之複合結構，其中特定直徑取決於金屬奈米粒子組合物及根據實驗設計之奈米粒子的預期用途。舉例而言，用於治療性應用之奈米粒子通常具有約200 nm或更低之尺寸。

【0530】 奈米粒子之額外所需特性，諸如表面電荷及空間穩定性，亦可鑒於所關注之特定應用而變化。諸如癌症治療之臨床應用中可能需要的例示性特性描述於Davis等人, Nature 2008第7卷, 第771-782頁; Duncan, Nature 2006第6卷, 第688-701頁; 及Allen, Nature 2002第2卷，第750-763頁中，其各自以全文引用的方式併入本文中。在閱讀本發明時，額外特性可藉由熟習此項技術者鑑別。奈米粒子尺寸及特性可藉由此項技術中已知之技術來偵測。用以偵檢粒子尺寸之例示性技術包括(但不限於)動態光散射(DLS)及多種顯微法，諸如穿透電子顯微法(TEM)及原子力顯微法(AFM)。用於偵測粒子形態之例示性技術包括(但不限於) TEM及AFM。用於偵測奈米粒子之表面電荷的例示性技術包括(但不限於) ζ電位方法。適合於偵測其他化學特性之額外技術包含^{1}H、^{11}B及^{13}C及^{19}F NMR、UV/Vis及紅外線/拉曼光譜及螢光光譜(在奈米粒子與螢光標記組合使用時)及可藉由熟習此項技術者鑑別之額外技術。

【0531】

小分子

在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體可進一步包含小分子。小分子部分包括(但不限於)小肽、肽模擬物(例如類肽)、胺基酸、胺基酸類似物、合成聚核苷酸、聚核苷酸類似物、核苷酸、核苷酸類似物、通常具有低於約5,000公克/莫耳之分子量的有機及無機化合物(包括異質性及/或有機金屬化合物)，例如具有低於約2,000公克/莫耳之分子量的有機或無機化合物，例如具有低於約1,000公克/莫耳之分子量的有機或無機化合物，例如具有低於約500公克/莫耳之分子量的有機或無機化合物，及此類化合物之鹽、酯及其他醫藥學上可接受之形式。小分子可包括(但不限於)神經傳遞素、激素、藥物、毒素、病毒或微生物粒子、合成分子及促效劑或拮抗劑。

【0532】 適合之小分子的實例包括描述於「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Goodman and Gilman, McGraw-Hill, New York, N.Y., (1996), Ninth edition, under the sections: Drugs Acting at Synaptic and Neuroeffector Junctional Sites; Drugs Acting on the Central Nervous System; Autacoids: Drug Therapy of Inflammation; Water, Salts and Ions; Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism; Cardiovascular Drugs; Drugs Affecting Gastrointestinal Function; Drugs Affecting Uterine Motility; Chemotherapy of Parasitic Infections; Chemotherapy of Microbial Diseases; Chemotherapy of Neoplastic Diseases; Drugs Used for Immunosuppression; Drugs Acting on Blood-Forming organs; Hormones and Hormone Antagonists; Vitamins,

Dermatology; and Toxicology中之彼等小分子，所有以引用的方式併入本文中。小分子之一些實例包括(但不限於)肮病毒藥物，諸如他克莫司、泛蛋白連接酶或HECT接合酶抑制劑，諸如海克林(heclin)；組蛋白修飾藥物，諸如丁酸鈉；酶抑制劑，諸如5-氮雜-胞苷；蒽環黴素，諸如小紅莓；β-內醯胺，諸如青黴素；抗菌劑；化學治療劑；抗病毒劑；來自其他生物體之調節劑，諸如VP64；及具有不充分生物可用性之藥物，諸如具有缺失型藥物動力學之化學治療劑。

【0533】在一些實施例中，小分子為表觀遺傳調節劑，例如de Groote等人. Nuc. Acids Res. (2012):1-18中所述之彼等。例示性小分子表觀遺傳調節劑描述於例如Lu等人. J. Biomolecular Screening 17.5(2012):555-71中，例如表1或2中，以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑包含伏立諾他(vorinostat)或羅米地辛(romidepsin)。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑包含I、II、III及/或IV類組蛋白脫乙醯基酶(HDAC)抑制劑。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑包含SirTI之活化劑。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑包含山竹醇(Garcinol)、Lys-CoA、C646、(+)-JQI、I-BET、BICI、MS120、DZNep、UNC0321、EPZ004777、AZ505、AMI-I、吡唑醯胺7b、苯并[d]咪唑17b、醯基化二胺苯碸衍生物(例如PRMTI)、甲基司他(methylstat)、4,4'-二羧基-2,2'-聯吡啶、SID 85736331、氧肟酸鹽類似物8、丹尼賽普羅米(tanylcypromie)、雙胍及二胍多元胺類似物、UNC669、維達紮(Vidaza)、地西他濱(decitabine)、苯丁酸鈉(SDB)、類脂酸(LA)、槲皮素、丙戊酸、肼酞嗪(hydralazine)、複方新諾明(bactrim)、綠茶提取物(例如，表沒食子兒茶素沒食子酸酯(EGCG))、薑

黃素(curcumin)、蘿蔔硫素(sulforphane)及/或大蒜素/二烯丙基二硫化物。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑抑制DNA甲基化，例如為DNA甲基轉移酶之抑制劑(例如為5-氮胞苷及/或地西他濱)。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑調節組蛋白修飾，例如組蛋白乙醯化、組蛋白甲基化、組蛋白類泛素化及/或組蛋白磷酸化。在一些實施例中，表觀遺傳調節劑為組蛋白脫乙醯基酶之抑制劑(例如，為伏立諾他及/或曲古黴素A(trichostatin A))。

【0534】 在一些實施例中，小分子為醫藥活性劑。在一個實施例中，小分子為代謝活性或組分之抑制劑。適用類別之醫藥活性劑包括(但不限於)抗生素、消炎藥、血管生成或血管活性劑、生長因子及化學治療性(抗贅生性)劑(例如腫瘤抑制劑)。可使用來自本文所述之類別及實例或來自(Orme-Johnson 2007, Methods Cell Biol. 2007;80:813-26)之一個分子或分子的組合。在一個實施例中，本發明包括包含抗生素、消炎藥、血管生成或血管活性劑、生長因子或化學治療劑之組合物。

【0535】

肽或蛋白質

在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體可進一步包含肽或蛋白質。肽部分可包括(但不限於)肽配位體或抗體片段(例如結合受體，諸如胞外受體之抗體片段)、神經肽、激素肽、肽藥物、毒性肽、病毒或微生物肽、合成肽及促效性或拮抗性肽。

【0536】 肽部分可為線性的或分支的。肽之長度為約5至約200個胺基酸、約15至約150個胺基酸、約20至約125個胺基酸、約25至約100個胺基酸或其間任何範圍。

【0537】 肽之一些實例包括(但不限於)螢光標籤或標記物、抗原、抗體、抗體片段(諸如單域抗體)、配位體及受體(諸如類升糖素肽-1 (GLP-1)、GLP-2受體2、膽囊收縮素B (CCKB)及生長抑素受體)、肽治療劑(諸如結合至特定細胞表面受體，諸如G蛋白偶聯受體(GPCR)或離子通道之彼等)、來自天然生物活性肽之合成性或模擬肽、抗微生物肽、成孔肽、靶向腫瘤或細胞毒性肽及降解或自毀壞肽(諸如誘導細胞凋亡之肽訊號或感光劑肽)。

【0538】 本文所述之適用於本發明之肽亦包括小抗原結合肽，例如抗原結合抗體或抗體樣片段，諸如單鏈抗體、奈米抗體(參見例如Steeland等人. 2016. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. Drug Discov Today: 21(7):1076-113)。此類小抗原結合肽可結合細胞溶質抗原、細胞核抗原或細胞器內抗原。

【0539】 在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體包括連接至能夠靶向特定位置、組織或細胞之配位體的多肽。

【0540】

寡核苷酸適體

在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體可進一步包含寡核苷酸適體。適體部分為寡核苷酸或肽適體。寡核苷酸適體為單股DNA或RNA (ssDNA或ssRNA)分子，其可結合至包括具有高親和力及特異性之蛋白質及肽的預先選擇目標。

【0541】 寡核苷酸適體為可經由重複數輪之活體外選擇或同等方法，SELEX (指數富集的配位體系統進化)工程化以便結合於諸如小分子、蛋白質、核酸及甚至細胞、組織及生物體之多種分子目標的核酸物

種。適體提供辨別性分子識別，且可由化學合成產生。另外，適體可具有所需儲存特性，且在治療性應用中引發極少免疫原性或無免疫原性。

【0542】 DNA及RNA適體兩者可對各種目標展現出穩固的結合親和力。舉例而言，已選擇DNA及RNA適體用於t溶菌酶、凝血酶、人類免疫不全病毒反式作用反應元件(HIV TAR) (參見en.wikipedia.org/wiki/Aptamer - cite_note-10)、氯化血紅素、干擾素γ、血管內皮生長因子(VEGF)、前列腺特異性抗原(PSA)、多巴胺及非典型致癌基因、熱休克因子1 (HSF1)。

【0543】

肽適體

在一些實施例中，本文所述之組合物或指環載體可進一步包含肽適體。肽適體具有一個(或多個)短不同肽域，包括具有較低分子量12-14 kDa之肽。肽適體可經設計以特異性結合且干擾細胞內之蛋白質-蛋白質相互作用。

【0544】 肽適體為經選擇或工程化以結合特定目標分子之人工蛋白質。此等蛋白質包括可變序列之一或多個肽環。其通常自組合庫分離，且通常隨後藉由定向突變或數輪可變區突變誘發及選擇來改進。肽適體可活體內結合細胞蛋白質目標且發揮生物效應，包括干擾其經靶向分子與其他蛋白質之正常蛋白質相互作用。特定言之，針對連接至轉錄因子活化域之目標蛋白質篩選連接至轉錄因子結合域之不同肽適體環。經由此選擇策略將肽適體活體內結合至其目標係偵測為下游酵母菌標記基因之表現。此類實驗鑑別由適體結合之特定蛋白質及因適體破壞引起之蛋白質相互作用，以產生表現型。另外，用適當功能性部分衍生之肽適體可引起其目標蛋白

質之特異性轉譯後修飾，或改變目標之亞細胞定位。

【0545】 肽適體亦可活體外識別目標。其已發現代替生物感測器中之抗體使用且用於偵測來自含有無活性及活性蛋白質形式兩者之群體的蛋白質之活性同功型。稱為蝌蚪之衍生物，其中肽適體「頭部」經共價連接至特異性序列雙股DNA「尾部」，允許藉由其DNA尾部之PCR (使用例如定量即時聚合酶鏈反應)在混合物中定量稀有的目標分子。

【0546】 可使用不同系統選擇肽適體，但當前酵母雙雜交系統使用最多。肽適體亦可選自藉由噬菌體呈現及其他表面呈現技術，諸如mRNA呈現、核糖體呈現、細菌呈現及酵母呈現構築之組合肽庫。此等實驗程序亦稱為生物淘洗(biopannings)。在自生物淘洗獲得之肽中，可將模擬表位(mimotope)視為一種肽適體。自組合肽庫淘洗之所有肽已儲存於名為MimoDB之特殊資料庫中。

【0547】

V.宿主細胞

本發明進一步係針對一種包含本文所述之指環載體的宿主或宿主細胞。在一些實施例中，宿主或宿主細胞為植物、昆蟲、細菌、真菌、脊椎動物、哺乳動物(例如人類)或其他生物體或細胞。在某些實施例中，如本文所確認，提供的指環載體感染一系列不同宿主細胞。目標宿主細胞包括中胚層、內胚層或外胚層來源之細胞。目標宿主細胞包括例如上皮細胞、肌肉細胞、白血球(例如淋巴球)、腎臟組織細胞、肺組織細胞。

【0548】 在一些實施例中，指環載體在宿主中為實質上非免疫原性的。指環載體或遺傳元件未藉由宿主之免疫系統產生非所需實質性反應。一些免疫反應包括但不限於體液免疫反應(例如抗原特異性抗體之產生)及

細胞介導之免疫反應(例如淋巴細胞增殖)。

【0549】 在一些實施例中，宿主或宿主細胞與指環載體接觸(例如感染)。在一些實施例中，宿主為哺乳動物，諸如人類。宿主中之指環載體的量可在投與之後在任何時間量測。在某些實施例中，確定指環載體在培養物中生長之時程。

【0550】 在一些實施例中，指環載體，例如如本文所述之指環載體為可遺傳的。在一些實施例中，指環載體在流體及/或細胞中自母體至兒童線性地傳輸。在一些實施例中，來自原始宿主細胞之子細胞包含指環載體。在一些實施例中，母體以至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%之效率，或自宿主細胞至子細胞之至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%之傳輸效率將指環載體傳輸至兒童。在一些實施例中，宿主細胞中之指環載體在減數分裂期間具有25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%之傳輸效率。在一些實施例中，宿主細胞中之指環載體在有絲分裂期間具有至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%之傳輸效率。在一些實施例中，細胞中之指環載體具有約10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-99%之間或其間之任何百分比的傳輸效率。

【0551】 在一些實施例中，指環載體，例如指環載體在宿主細胞內複製。在一個實施例中，指環載體能夠在哺乳動物細胞，例如人類細胞中複製。在其他實施例中，指環載體為複製缺失型或複製非勝任型。

【0552】 雖然在一些實施例中，指環載體在宿主細胞中複製，但指

環載體未例如與宿主之染色體一起整合至宿主之基因體中。在一些實施例中，指環載體例如與宿主之染色體具有可忽略的重組頻率。在一些實施例中，指環載體例如與宿主之染色體的重組頻率例如低於約1.0 cM/Mb、0.9 cM/Mb、0.8 cM/Mb、0.7 cM/Mb、0.6 cM/Mb、0.5 cM/Mb、0.4 cM/Mb、0.3 cM/Mb、0.2 cM/Mb、0.1 cM/Mb或更低。

【0553】

VI.使用方法

本文所述之指環載體及包含指環載體的組合物可用於治療例如有需要之個體(例如哺乳動物個體，例如人類個體)之病症、疾病或病狀的方法中。投與本文所述之醫藥組合物可例如藉助於非經腸(包括靜脈內、瘤內、腹膜內、肌肉內、腔內及皮下)投與。指環載體可單獨投與或調配為醫藥組合物。

【0554】 指環載體可呈單位劑量組合物形式投與，諸如單位劑量非經腸組合物。此類組合物通常藉由摻合來製備，且可適合地經調適用於非經腸投與。此類組合物可例如呈可注射及可輸注溶液或懸浮液或栓劑或氣溶膠形式。

【0555】 在一些實施例中，投與指環載體或包含該指環載體，例如如本文所述，之組合物可使得將包含指環載體之遺傳元件遞送至目標細胞，例如個體之目標細胞。

【0556】 本文所述之指環載體或其組合物，例如包含效應子(例如，內源性或外源性效應子)，可用於將效應子遞送至細胞、組織或個體。在一些實施例中，指環載體或其組合物用於將效應子遞送至骨髓、血液、心臟GI或皮膚。藉由投與本文所述之指環載體組合物遞送效應子可調節(例

如增加或降低)細胞、組織或個體之非編碼RNA或多肽的表現量。以此方式調節表現量可引起使效應子遞送至細胞中之功能活性改變。在一些實施例中，經調節功能活性在本質上可為酶促、結構或調節性的。

【0557】 在一些實施例中，指環載體或其複本可在遞送至細胞中之後24小時(例如，1天、2天、3天、4天、5天、6天、1週、2週、3週、4週、30天或1個月)在細胞中偵測到。在實施例中，指環載體或其組合物介導對目標細胞之作用，且該作用持續至少1、2、3、4、5、6或7天，2、3或4週，或1、2、3、6或12個月。在一些實施例中(例如，其中該指環載體或其組合物包含編碼外源性蛋白質之遺傳元件)，該作用持續低於1、2、3、4、5、6或7天，2、3或4週，或1、2、3、6或12個月。

【0558】 可用本文所述之指環載體或包含指環載體之組合物處理的疾病、病症及病狀的實例包括(但不限於)：免疫病症、干擾素病變(例如，I型干擾素病變)、傳染病、發炎性病症、自體免疫病狀、癌症(例如，實體腫瘤，例如肺癌；非小細胞肺癌，例如表現對mIR-625反應之基因，例如凋亡蛋白酶-3的腫瘤)及腸胃疾病。在一些實施例中，指環載體調節(例如增加或降低)與指環載體接觸之細胞中之活性或功能。在一些實施例中，指環載體調節(例如增加或降低)與指環載體接觸之細胞中之分子(例如核酸或蛋白質)的含量或活性。在一些實施例中，指環載體減小與指環載體接觸之細胞(例如癌細胞)的成活力，例如至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高。在一些實施例中，指環載體包含降低與指環載體接觸之細胞(例如癌細胞)的成活力，例如至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高的效應子，例如miRNA，例如miR-625。在一些

實施例中，指環載體例如藉由增加凋亡蛋白酶-3活性來增加與指環載體接觸之細胞(例如癌細胞)的細胞凋亡，例如至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高。在一些實施例中，指環載體包含例如藉由增加凋亡蛋白酶-3活性來增加與指環載體接觸之細胞(例如癌細胞)的細胞凋亡，例如至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高的效應子，例如miRNA，例如miR-625。

【0559】

VII.投與/遞送

該組合物(例如，包含如本文所述之指環載體的醫藥組合物)可經調配以包括醫藥學上可接受之賦形劑。醫藥組合物可視情況包含一或多個額外活性物質，例如治療性及/或預防性活性物質。本發明之醫藥組合物可為無菌及/或不含熱原質的。在調配及/或製造藥劑中之一般考慮因素可見於例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy第21版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (以引用之方式併入本文中)中。

【0560】 儘管描述本文所提供之醫藥組合物主要針對適用於向人類投與之醫藥組合物，但熟習此項技術者應理解，此類組合物一般適用於向任何其他動物投與，例如向非人類動物，例如非人類哺乳動物投與。預期投與醫藥組合物之個體包括(但不限於)人類及/或其他靈長類動物；哺乳動物，包括商業相關之哺乳動物，諸如牛、豬、馬、羊、貓、狗、小鼠及/或大鼠；及/或鳥類，包括商業相關之鳥類，諸如家禽、雞、鴨、鵝及/或火雞。

【0561】 本文所述之醫藥組合物的調配物可藉由藥理學技術中已知

或此後研發之任何方法來製備。一般而言，此類製備方法包括使活性成分與賦形劑及/或一或多種其他附屬成分結合，且隨後必要時及/或需要時將產物分割、成型及/或封裝之步驟。

【0562】 在一個態樣中，本發明提供一種向個體遞送指環載體之方法。該方法包括向個體投與包含如本文所述之指環載體的醫藥組合物。在一些實施例中，所投與之指環載體在個體中複製(例如，成為個體之病毒組的一部分)。

【0563】 醫藥組合物可包括野生型或天然病毒元件及/或經修飾病毒元件。指環載體可包括一或多個指環病毒序列(例如，核酸序列或編碼其胺基酸序列之核酸序列)或與其具有至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%核苷酸序列一致性的序列。指環載體可包含含有與一或多個指環病毒序列(例如，指環病毒ORF1核酸序列)具有至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%序列一致性之核酸序列的核酸分子。指環載體可包含編碼與指環病毒胺基酸序列(例如，指環病毒ORF1分子之胺基酸序列)具有至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%序列一致性之胺基酸序列的核酸分子。指環載體可包含含有與指環病毒胺基酸序列(例如，指環病毒ORF1分子之胺基酸序列)具有至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%序列一致性之胺基酸序列的多肽。

【0564】 在一些實施例中，指環載體足以增加(刺激)內源性基因及蛋白質表現，例如與參考，例如健康對照相比，增加至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。在某些實施

例中，指環載體足以降低(抑制)內源性基因及蛋白質表現，例如與參考，例如健康對照相比，降低至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。

【0565】 在一些實施例中，指環載體抑制/增強宿主或宿主細胞中之一或多種病毒特性，例如趨向性、感染性、免疫抑止/活化，例如與參考，例如健康對照相比，至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。

【0566】 在一些實施例中，向個體投與進一步包含未在病毒遺傳資訊中表示之一或多個病毒株的醫藥組合物。

【0567】 在一些實施例中，包含本文所述之指環載體的醫藥組合物以足以調節病毒感染之劑量及時間投與。病毒感染之一些非限制性實例包括腺相關病毒、愛知病毒(Aichi virus)、澳大利亞蝙蝠狂犬病毒、BK多瘤病毒、班納病毒(Banna virus)、巴馬森林病毒(Barmah Forest virus)、布尼安維拉病毒(Bunyamwera virus)、拉克羅斯布尼亞病毒(Bunyavirus La Crosse)、雪足野兔布尼亞病毒(Bunyavirus snowshoe hare)、獼猴疱疹病毒、金迪普拉病毒(Chandipura virus)、屈公病毒、科薩奇病毒A、牛痘病毒、柯薩奇病毒、克里米亞-岡果出血熱病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、登革熱病毒、多理病毒(Dhori virus)、達格畢病毒(Dugbe virus)、杜文海格病毒(Duvenhage virus)、東部馬腦炎病毒、埃博拉病毒、埃可病毒、腦心肌炎病毒、埃-巴二氏病毒、歐洲蝙蝠狂犬病毒、GB病毒C/G型肝炎病毒、漢坦病毒(Hantaan virus)、亨德拉病毒(Hendra virus)、A型肝炎病毒、B型肝炎病毒、C型肝炎病毒、E型肝炎病毒、D型肝炎病毒、馬痘病毒、人類腺病毒、人類星狀病毒、人類冠狀病

毒、人類巨細胞病毒、人類腸病毒68、人類腸病毒70、人類疱疹病毒1、人類疱疹病毒2、人類疱疹病毒6、人類疱疹病毒7、人類疱疹病毒8、人類免疫不全病毒、人類乳頭狀瘤病毒1、人類乳頭狀瘤病毒2、人類乳頭狀瘤病毒16、人類乳頭狀瘤病毒18、人類副流感、人類小病毒B19、人類呼吸道融合性病毒、人類鼻病毒、人類SARS冠狀病毒、人類唾液逆轉錄病毒、人類T-嗜淋巴細胞病毒、人類環曲病毒、A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒、伊斯法罕病毒(Isfahan virus)、JC多瘤病毒、日本腦炎病毒、胡寧沙粒狀病毒、KI多瘤病毒、庫京病毒(Kunjin virus)、拉各斯蝙蝠病毒(Lagos bat virus)、維多利亞湖馬爾堡病毒(Lake Victoria marburgvirus)、蘭加特病毒(Langat virus)、拉沙病毒(Lassa virus)、洛茲達雷病毒(Lordsdale virus)、跳躍病病毒(Louping ill virus)、淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus)、馬丘波病毒(Machupo virus)、馬雅羅病毒(Mayaro virus)、MER冠狀病毒、麻疹病毒、門哥腦心肌炎病毒(Mengo encephalomyocarditis virus)、梅克爾細胞多瘤病毒(Merkel cell polyomavirus)、莫科拉病毒(Mokola virus)、傳染性軟疣病毒、猴痘病毒、腮腺炎病毒、墨萊溪谷腦炎病毒(Murray valley encephalitis virus)、紐約病毒、立百病毒(Nipah virus)、諾沃克病毒(Norwalk virus)、奧尼永-尼永病毒(O'nyong-nyong virus)、羊傳染性膿皰病毒(Orf virus)、奧羅普切病毒(Oropouche virus)、皮欽德病毒(Pichinde virus)、脊髓灰白質炎病毒、龐塔托魯白蛉熱病毒(Punta toro phlebovirus)、撲嗎拉病毒(Puumala virus)、狂犬病病毒、東非瑞夫特河谷羊熱病病毒(Rift valley fever virus)、羅沙病毒A、羅斯河病毒(Ross river virus)、輪狀病毒A、輪狀病毒B、輪狀病毒C、德國麻疹病毒

(Rubella virus)、鷺山病毒(Sagiyama virus)、薩利病毒A、沙繩熱西西里島病毒(Sandfly fever sicilian virus)、紮幌樣病毒(Sapporo virus)、勝利基森林病毒(Semliki forest virus)、漢城病毒(Seoul virus)、猿猴多泡病毒、猿猴病毒5、辛得比斯病毒(Sindbis virus)、南安普頓病毒(Southampton virus)、聖路易腦炎病毒(St. louis encephalitis virus)、蜱媒波瓦桑病毒(Tick-borne powassan virus)、細環病毒、托斯卡納病毒(Toscana virus)、尤庫尼米病毒(Uukuniemi virus)、痘瘡病毒、水痘-帶狀疱疹病毒(Varicella-zoster virus)、天花病毒、委內瑞拉馬腦炎病毒、水泡性口炎病毒、西部馬腦炎病毒、WU多瘤病毒、西尼羅河病毒、亞巴猴腫瘤病毒(Yaba monkey tumor virus)、亞巴樣疾病病毒(Yaba-like disease virus)、黃熱病病毒及茲卡病毒(Zika Virus)。在某些實施例中，指環載體足以勝過及/或取代已存在於個體中之病毒，例如與參考相比至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。在某些實施例中，指環載體足以與慢性或急性病毒感染競爭。在某些實施例中，可預防性投與指環載體以保護免於病毒感染(例如前病毒)。在一些實施例中，指環載體之量足以調節(例如，表現型、病毒含量、基因表現、與其他病毒競爭、疾病病狀等，至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多)。在一些實施例中，其治療、治療及同源詞包含個體之醫療管理(例如，藉由投與指環載體，例如如本文所述製得之指環載體)，例如意欲改善、改進、穩定、預防或治癒疾病、病理性病狀或病症。在一些實施例中，治療包含積極治療(針對改善疾病、病理性病狀或病症之治療)；病因治療(針對相關疾病、病理性病狀或病症之病因的治療)；姑息性治療(經設計用於緩解症狀之治療)；預防性治療

(針對預防、最小化或部分或完全抑制相關疾病、病理性病狀或病症之發展的治療)；及/或支持性治療(用於補充另一療法之治療)。

【0568】 本文引用之所有參考文獻及出版物以引用的方式併入本文中。

【0569】 提供以下實例以進一步說明本發明之一些實施例，但不意欲限制本發明之範疇；藉由其例示性性質，應瞭解，可替代地使用熟習此項技術者已知之其他程序、方法或技術。

【0570】

實例

目錄

實例1：指環病毒基因體之串聯複本

實例2：來自串聯指環載體構築體之指環載體的有效複製

實例3：例示性串聯指環載體構築體設計

實例4：來自哺乳動物細胞中之串聯指環病毒構築體之基因的轉錄

實例5：由哺乳動物細胞中之串聯指環病毒構築體產生之ORF1及ORF2蛋白質

實例6：串聯指環載體之感染性的評定

實例7：串聯指環病毒基因體經由桿狀病毒遞送至Sf9昆蟲細胞中

實例8：合成性指環載體之製備

實例9：指環載體之組裝及感染

實例10：指環載體之選擇

實例11：複製缺陷型指環載體及輔助病毒

實例12：複製勝任型指環載體之製造方法

實例13：複製缺陷型指環載體之製造方法

實例14：使用懸浮液細胞產生指環載體

實例15：利用指環載體在小鼠中表現外源性蛋白質

實例16：表現外源性微小RNA序列之指環載體的功能性作用

實例17：用以表現外源性非編碼RNA之指環載體的製備及產生

實例18：來自指環載體之內源性miRNA的表現及內源性miRNA之缺失

實例19：活體內外源性蛋白質之指環載體遞送

實例20：活體外環化指環病毒基因體

實例21：產生含有具有來自不同細環病毒菌株之高變域的嵌合ORF1的指環載體

實例22：產生含有非TTV蛋白質/肽而非高變域之嵌合ORF1

實例23：基於tth8及LY2之指環載體各自成功地將EPO基因轉導至肺癌細胞中

實例24：在靜脈內(i.v.)投與之後可活體內偵測到具有治療性轉殖基因之指環載體

實例25：活體外環化基因體作為用於活體外產生指環載體之輸入材料

【0571】

實例1：指環病毒基因體之串聯複本

此實例描述攜帶單一指環病毒基因體之兩個複本的基於質體之表現載體，該等複本以串聯配置使得上游基因體之富含GC區接近下游基因體之5'區(圖1A)。

【0572】在一些實施例中，指環病毒可經由滾環複製，其中複製酶(Rep)蛋白質結合至在指環病毒Rep結合位點處之基因體(例如，如本文所述，例如包含5' UTR，例如包含髮夾環及/或複製起點)，且起始環周圍的DNA合成。對於質體主鏈中所含之指環病毒基因體，此通常包含比原生病毒基因體長的完整質體長度的複製，或產生包含具有最小主鏈之基因體之較小環之質體的重組。因此，質體之病毒複製可能為低效的。為了改進病毒基因體複製效率，質體經TTMV-LY2之串聯複本工程化。在不希望受理論束縛的情況下，此等質體可呈現指環病毒基因體之環形排列，使得不管Rep蛋白質結合之位置如何，其將能夠驅使病毒基因體之複製自上游指環病毒Rep結合位點至下游指環病毒Rep取代位點(例如，包含5' UTR，例如包含髮夾環及/或複製起點，例如如本文所述)。

【0573】串聯TTMV-LY2經由黃金-門控組裝(Golden-gate assembly)來組裝，同時將基因體之兩個複本併入主鏈中且在基因體之間不留額外核苷酸。串聯TTMV-LY2質體包含指環病毒基因體之兩個相同複本，開始於第一5'NCR至第一富含GC之區，且隨即為第二5'NCR至第二富含GC之區(圖1A)。質體亦包含具有細菌源及可選標記物之細菌主鏈。

【0574】攜帶TTMV-LY2之串聯複本的質體經由核轉染轉染至MOLT-4細胞中。具有TTMV-LY2基因體之單個複本的質體類似地轉染為對照。培育細胞四天，隨後收集細胞集結粒。各細胞集結粒之部分用於南方印跡(Southern blotting)。使用Qiagen DNeasy血液及組織套組自細胞分離總DNA。使用限制性核酸內切酶在10 μg各總DNA樣品上進行四個替代性消化，該等酶消化對TTMV-LY2基因體及質體具有不同作用之基因體DNA：一個消化未在未切割基因體或質體內切割；第二消化在細菌主

鏈，但並非指環病毒基因體內之單一處切割；第三消化在TTMV-LY2基因體內，但並非細菌主鏈內之單一基因座處切割；且最終消化在TTMV-LY2基因體及未在細菌主鏈內切割，但亦包括將消化在細菌中產生之僅輸入質體DNA且未在哺乳動物細胞中複製之DNA內切割的對甲基化敏感之DpnI酶。消化在1xTAE中在0.5V/cm下在7 mm厚的1%瓊脂糖凝膠上進行3小時。隨後處理凝膠以使DNA脫嘌呤化且變性。隨後經由毛細管轉移使DNA轉移至帶正電荷之耐綸膜隔夜。經由紫外光使DNA交聯至膜。隨後用針對TTMV-LY2基因體之經無規六聚體產生的片段探測墨點，將生物素-dUTP併入至探針中。使用抗生蛋白鏈菌素-共軛之IRDye-800偵測探針，且在LiCor Odyssey成像劑上成像。

【0575】 南方印跡證實，串聯TTMV-LY2質體能夠複製野生型尺寸之環形雙股指環病毒基因體(圖1B)。對於攜帶TTMV-LY2基因體之單個複本的質體，觀測到4與10 kb之間的未切割超螺旋DNA (泳道1)，當在質體主鏈內(泳道2)或在TTMV-LY2基因體(泳道3)內切割時，其經線性化至5.1 kb。未自具有TTMV-LY2基因體之單個複本的質體中觀測到與經回收野生型長度TTMV-LY2基因體(環形或線性)一致之譜段。具有單個複本之整個質體未在MOLT-4細胞中複製，如藉由經線性化質體之DpnI-抗性之複本消化(泳道4)所觀測。然而，未自單個複本之TTMV-LY2質體回收野生型長度基因體。

【0576】 對於攜帶TTMV-LY2基因體之串聯複本的質體，觀測到4與10 kb之間的超螺旋質體(泳道5)，當在質體主鏈內(泳道6)切割時，其經線性化至8.8 kb。重要的是，自未切割及主鏈切口泳道中觀測到與雙股DNA TTMV-LY2基因體之單個複本一致的約1.8 kb波段，與野生型

TTMV-LY2基因體之回收(泳道5及6)一致。此在用TTMV-LY2基因體內切割之酶消化時，1.8 kb譜段經與經線性化TTMV-LY2基因體DNA (泳道7)一致之3.0 kb譜段置換。此經線性化TTMV-LY2基因體譜帶為DpnI抗性的，表明其在哺乳動物細胞內複製，而非經由串聯DNA之重組產生(泳道8)。連同此等資料證實，野生型長度TTMV-LY2基因體係自MOLT-4細胞中之串聯TTMV-LY2質體回收。

【0577】 經串聯TTMV-LY2質體轉染之額外細胞集結粒在0.5%曲拉通(Triton)存在下藉由冷凍/解凍溶解，隨後在線性CsCl梯度上操作，以自未封裝DNA中分離病毒粒子。級分係獲自線性梯度，且使用塔克曼探針對TTMV-LY2基因體序列進行qPCR。在1.30與1.35 g/cm^3之間的CsCl密度下觀測到TTMV-LY2基因體之峰，其中預期發現指環病毒大小的粒子(圖1C)。此指定MOLT-4細胞中產生之TTMV-LY2基因體成功地封裝至病毒粒子中。總體而言，此等資料證實，經工程化串聯指環病毒基因體可增加病毒基因體複製且可用作用於增加指環病毒產生之策略。

【0578】

實例2：來自串聯指環載體構築體之指環載體的有效複製

在此實例中，分析串聯指環載體在哺乳動物宿主細胞，諸如HEK293或MOLT-4細胞中之擴增。建構串聯指環載體構築體以包括指環病毒基因體之兩個全長複本(例如，環1、環2或環4，例如如本文所述)。基因體之各複本按5'至3'之次序包括：包含高度保守域之5'非編碼區、包含取代原生指環病毒開讀框之負荷序列的區及包含富含GC之區的3' UTR。第一基因體複本之3'端與第二基因體複本之5'端在無介入核苷酸之情況下彼此直接相連。

【0579】 簡言之，藉由PEI轉染劑或核轉染將構築體引入至HEK293或MOLT-4細胞中。反式複製及封裝元件，包括指環病毒ORF1，係由不同質體以反式形式提供。在37℃下培育經轉染細胞持續四天。藉由qPCR及南方墨點法來量測指環病毒基因體之複製。對於陰性對照，包括攜帶指環載體之單個複本的質體及不含反式元件之串聯指環載體。

【0580】

實例3：例示性串聯指環載體構築體設計

在下文所述之實例中，測試用於串聯指環病毒之多個例示性構築體設計在MOLT-4宿主細胞中進行滾環擴增的能力。在不希望受理論束縛的情況下，指環病毒滾環擴增經考慮在複製酶結合位點(例如，5' UTR，例如包含髮夾環及/或複製起點)處開始及結束。在環化單個指環病毒基因體中，相同複製酶-結合位點可充當起始及終止位點兩者。串聯指環病毒，以及此實例中所述之替代性設計，將此類複製酶-結合位點定位於待複製之基因體兩端處，使得基因體如同經環化單個複本基因體一般有效地操作。

【0581】

具有3'端上之部分指環病毒基因體的構築體

在此實例中，設計例示性串聯指環載體，其中指環病毒基因體之全長複本位於相對於部分指環病毒基因體之5'。如圖2A中所繪示，第一替代性構築體(pRTx-843)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著為由5'NCR、包含病毒開讀框之全集的區及缺乏富含GC之區的3'NCR組成的部分指環病毒基因體。如圖2A中所繪示，第二替代性構築體(pRTx-844)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著

為由5'NCR及來自環2之核苷酸1至2812的包含病毒開讀框之全集的區組成的部分指環病毒基因體。如圖2A中所繪示，第三替代性構築體(pRTx-845)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著為由來自環2之核苷酸1至2583的5'NCR及包含病毒開讀框之僅一部分的區組成的部分指環病毒基因體。如圖2A中所繪示，第四替代性構築體(pRTx-846)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著為由來自環2之核苷酸1至2264的5'NCR及包含病毒開讀框之僅一部分的區組成的部分指環病毒基因體。如圖2A中所繪示，第五替代性構築體(pRTx-847)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著為由來自環2之核苷酸1至723的5'NCR及包含病毒開讀框之僅一部分的區組成的部分指環病毒基因體。如圖2A中所繪示，第六替代性構築體(pRTx-848)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著為由來自環2之核苷酸1至423的5'NCR組成的部分指環病毒基因體。如圖2A中所繪示，第七替代性構築體(pRTx-849)按5'至3'之次序包含指環病毒基因體(環2)之全長複本，接著為由來自環2之核苷酸1至267的5'NCR一部分組成的部分指環病毒基因體。

【0582】 簡言之，藉由核轉染將串聯構築體中之每一者引入至MOLT-4細胞中。用於滾環擴增之複製酶蛋白質係由完全病毒基因體以順式形式提供。ORF1蛋白質係由完全病毒基因體以順式形式提供。

【0583】 具有兩個完整基因體之全長串聯環2構築體(pVL46-257)係用作用於病毒複製及封裝之陽性對照。對於陰性對照，使用攜帶環2基因體之單個複本的質體(pVL46-240)。在37℃下培育經轉染細胞持續4天，隨後收穫細胞用於南方墨點法及qPCR分析。對於南方墨點法，使用

Qiagen DNeasy血液及組織套組自細胞分離總DNA，且10 μg總DNA經在質體主鏈中切割一次之酶及用以消化在細菌中產生之任何輸入DNA的DpnI消化。消化在1xTAE中在0.5V/cm下在7 mm厚的1%瓊脂糖凝膠上進行3小時。隨後處理凝膠以使DNA脫嘌呤化且變性。隨後經由毛細管轉移使DNA轉移至帶正電荷之耐綸膜隔夜。經由紫外光使DNA交聯至膜。隨後用針對TTMV-LY2基因體之經無規六聚體產生的片段探測墨點，將生物素-dUTP併入至探針中。使用抗生蛋白鏈菌素-共軛之IRDye-800偵測探針，且在LiCor Odyssey成像劑上成像。應注意，未藉由南方墨點法測試來自質體pRTx-845之樣品。對於pRTx-843及844，但並非對於pRTx-846-849，觀測到經複製環形雙股DNA環2基因體之回收(圖2D)。對於pRTx-843、844及848亦觀測到質體DNA之複製，類似於針對單個複本基因體質體所觀測到的複製。

【0584】 使用冷凍/解凍及0.5%曲拉通來溶解額外細胞集結粒。溶解物通過氯化銫階段梯度且收集含指環病毒之級分。藉由受DNA酶保護之qPCR來量測指環病毒基因體之複製。如由完整串聯pRTx-257所觀測，pRTx-843-846產生類似含量之環2病毒基因體/細胞，表明成功產生經衣殼化病毒(圖2E)。pRTx-847亦產生受保護之基因體，儘管低於針對完整串聯所觀測到的，而pRTx-848及849未藉由qPCR測試。

【0585】

具有5'端上之部分指環病毒基因體的構築體

在此實例中，設計例示性串聯指環載體，其中指環病毒基因體之全長複本位於相對於部分指環病毒基因體之3'。如圖2B中所繪示，測試一系列構築體，使用以下部分環2基因體，接著全長環2基因體：pRTx-836，

其中部分指環病毒基因體由高度保守5'NCR域、指環病毒開讀框之全集及包括富含GC之區的3'NCR組成(環2核苷酸267至2979)；pRTx-837，其中部分指環病毒基因體由指環病毒開讀框之全集及包括富含GC之區的3'NCR組成(環2核苷酸423至2979)；pRTx-838，其中部分指環病毒基因體由指環病毒開讀框之一部分及包括富含GC之區的3'NCR組成(環2核苷酸723至2979)；pRTx-839，其中部分指環病毒基因體由指環病毒開讀框之一部分及包括富含GC之區的3'NCR組成(環2核苷酸2273至2979)；pRTx-840，其中部分指環病毒基因體由指環病毒開讀框之一部分及包括富含GC之區的3'NCR組成(環2核苷酸2452至2979)；pRTx-841，其中部分指環病毒基因體由包括富含GC之區的3'NCR組成(環2核苷酸2812至2979)；及pRTx-842，其中部分指環病毒基因體由富含GC之區(環2核苷酸2867至2979)組成。

【0586】簡言之，藉由核轉染將串聯構築體中之每一者引入至MOLT-4細胞中。用於滾環擴增之複製酶蛋白質係由完全病毒基因體以順式形式提供。ORF1蛋白質係由完全病毒基因體以順式形式提供。具有兩個完整基因體之全長串聯環2構築體(pVL46-257)係用作用於病毒複製及封裝之陽性對照。對於陰性對照，使用攜帶環2基因體之單個複本的質體(pVL46-240)。在37℃下培育經轉染細胞持續4天，隨後收穫細胞用於南方墨點法及qPCR分析。對於南方墨點法，使用Qiagen DNeasy血液及組織套組自細胞分離總DNA，且10 μg總DNA經在質體主鏈中切割一次之酶及消化在細菌中產生之任何輸入DNA的DpnI消化。消化在1xTAE中在0.5V/cm下在7 mm厚的1%瓊脂糖凝膠上進行3小時。隨後處理凝膠以使DNA脫嘌呤化且變性。隨後經由毛細管轉移使DNA轉移至帶正電荷之耐

綸膜隔夜。經由紫外光使DNA交聯至膜。隨後用針對TTMV-LY2基因體之經無規六聚體產生的片段探測墨點，將生物素-dUTP併入至探針中。使用抗生蛋白鏈菌素-共軛之IRDye-800偵測探針，且在LiCor Odyssey成像劑上成像。對於pRTx-836至839，但並非對於pRTx-840-842，觀測到經複製環形雙股DNA環2基因體之回收(圖2D)。

【0587】使用冷凍/解凍及0.5%曲拉通來溶解額外細胞集結粒。溶解物通過氯化銫階段梯度且收集含指環病毒之級分。藉由受DNA酶保護之qPCR來量測指環病毒基因體之複製。如由完整串聯pRTx-257所觀測，pRTx-836-840產生類似含量之環2病毒基因體/細胞，表明成功產生經衣殼化病毒(圖2E)。對於pRTx-841及842，極少觀測到甚至未觀測到受保護之病毒基因體。

【0588】

具有兩個部分指環病毒基因體之構築體

在此實例中，例示性串聯指環載體經設計以包含指環病毒基因體之兩個部分複本，該等複本經配置以使得其充分模擬串聯結構之結構以允許有效的滾環擴增。六個此類排列展示於圖2C中：排列1，其自5'至3'包含：在5'NCR保守區起始之部分環2基因體，其具有完整環2開讀框及具有富含GC之區的3'NCR (環2核苷酸267至2979)，接著具有5'NCR及高度保守區之部分環2基因體(環2核苷酸1至423)；排列2，其自5'至3'包含：在完整環2開讀框處起始之部分環2基因體及具有富含GC之區的3'NCR (環2核苷酸423至2979)，接著具有5'NCR以及高度保守區之部分環2基因體及開讀框之一部分(環2核苷酸1至723)；排列3，其自5'至3'包含：在環2開讀框之一部分處起始之部分環2基因體及具有富含GC之區的3'NCR (環2核苷酸

723至2979)，接著具有5'NCR之部分環2基因體及指環病毒開讀框之一部分(環2核苷酸1至2273)；排列4，其自5'至3'包含：在部分環2開讀框處起始之部分環2基因體及具有富含GC之區的3'NCR (環2核苷酸2273至2979)，接著具有5'NCR之部分環2基因體及指環病毒開讀框之一部分(環2核苷酸1至2452)；排列5，其自5'至3'包含：在部分環2開讀框處起始之部分環2基因體及具有富含GC之區的3'NCR (環2核苷酸2452至2979)，接著具有5'NCR之部分環2基因體及完整環2開讀框(環2核苷酸1至2812)；及排列6，其自5'至3'包含：在具有富含GC之區的3'NCR處起始之部分環2基因體(環2核苷酸2812至2979)，接著具有5'NCR之部分環2基因體及完整環2開讀框及不含富含GC之區的3'NCR (環2核苷酸1至2867)。

【0589】 簡言之，藉由核轉染將串聯構築體中之每一者引入至MOLT-4細胞中。用於滾環擴增及病毒封裝之蛋白質，包括Rep因子及環2 ORF1，由其他質體以反式形式提供。經轉染細胞在37℃下培育4天。藉由qPCR及南方墨點法來量測指環病毒基因體之複製。具有兩個完整基因體之全長串聯環2構築體(pVL46-257)係用作用於病毒複製及封裝之陽性對照。對於陰性對照，使用攜帶環2基因體之單個複本的質體(pVL46-240)。

【0590】

實例4：來自哺乳動物細胞中之串聯指環病毒構築體之基因的轉錄

在此實例中，基於作為主鏈之環1產生一系列指環載體構築體(如圖2F中所指示)。構築體包括包含編碼eGFP-ORF1融合蛋白質(經密碼子最佳化)之環1序列及串聯環1序列的串聯構築體。隨後使構築體轉染至Jurkat細胞中。隨後藉由對長RNA讀數定序來評定指環病毒(環1) ORF1之轉

錄。

【0591】 如圖2F中所繪示，與經替代性構築體轉染之Jurkat細胞相比，在經基於環1之串聯GFP構築體轉染的Jurkat細胞中偵測到更大數量之全長環1 ORF1轉錄本。

【0592】

實例5：由哺乳動物細胞中之串聯指環病毒構築體產生之ORF1及ORF2蛋白質

在此實例中，基於作為主鏈之指環病毒環2，產生一系列指環載體構築體(如圖2G中所指示)。構築體包括串聯構築體，其包含以串聯方式之第一環2序列及第二環2序列。使構築體核轉染至MOLT4細胞(人類T淋巴母細胞細胞株)中，且隨後藉由西方墨點法偵測環2 ORF1蛋白質。簡言之，1E07 MOLT4細胞經25 μg含有串聯環2基因體(Rep)之質體或含有149 bp之環2基因體的陰性對照質體核轉染。將經核轉染樣品中之每一者接種於25 mL生長介質(RPMI+10% FBS+0.01% Polyaxmer+1 mM丙酮酸鈉)中。核轉染後第1天至第3天每日自各樣品粒化1 mL培養物。藉由使細胞再懸浮於50 ul溶解緩衝液(0.5%曲拉通、300 mM NaCl、50 mM Tris，pH 8.0)中，接著2輪冷凍解凍來溶解粒化細胞。隨後藉由在10,000xg下自旋30分鐘使溶解物澄清。20 ul澄清溶解物用於西方墨點法分析，以藉由使用針對環2 ORF1產生之兩個兔多株抗體的混合物偵測環2 ORF1蛋白質。

【0593】 如圖2G中所繪示，在核轉染之後第2天及第3天，在經基於環2之串聯GFP構築體核轉染之MOLT-4細胞中偵測到環2 ORF1蛋白質。

【0594】

實例6：串聯指環載體之感染性的評定

在此實例中，產生作為囊封編碼外源性基因之遺傳元件的蛋白質外部之串聯指環載體。產生串聯指環載體，例如如實例1-4中之任一者中所述。簡言之，宿主細胞經串聯指環載體DNA轉染，且在適用於複製串聯指環載體遺傳元件之條件下培育，且封裝於蛋白質外部內。隨後自培養物中分離經囊封指環載體，例如如本文所述。隨後在適用於感染細胞之條件下使指環載體與細胞(例如，MOLT-4或Jurkat細胞)接觸。

【0595】 感染性可例如使用定量即時PCR (qPCR)偵測經感染細胞中之指環病毒核酸來評定。舉例而言，可收穫經感染細胞用於DNA，且隨後使用對指環病毒特異性序列具有特異性之引物進行qPCR。對例如GAPDH之基因體DNA序列具有特異性之引物的qPCR可用於標準化。qPCR可用於根據所偵測之指環病毒DNA之基因體當量來定量感染性。

【0596】 或者，感染性可藉由偵測外源性基因之表現或外源性基因之下游活性評定。舉例而言，可例如藉由偵測螢光或藉由使用鑑別標記物之抗體的免疫分析偵測外源性螢光標記物，諸如GFP或奈米-螢光素酶。

【0597】

實例7：串聯指環病毒基因體經由桿狀病毒遞送至Sf9昆蟲細胞中

在此實例中，製備攜帶環2基因體之串聯複本的桿狀病毒且將其遞送至Sf9細胞。串聯環2基因體如上文所述組裝。全長環2基因體經由PCR添加IIS類限制位點來擴增，且經由黃金-門控組裝插入至具有細菌複製起點及可選標記物之質體主鏈中。所得質體包含彼此緊接且無介入核苷酸之兩個完全環2基因體，配置為自5'非編碼區至富含GC之區的第一基因體，接著5'非編碼區至富含GC之區的第二基因體。基因體對藉由質體主鏈中之AsiSI及PacI限制酶位點側接。

【0598】 為了將串聯環2基因體插入至桿狀病毒中，首先組裝經修飾pFastBac。經修飾pFastBac已移除昆蟲-細胞啟動子，且啟動子及標準多選殖位點經含有AsiSI及PacI位點之定製多選殖位點替換。經由用AsiSI及PacI消化，接著接合使串聯環2基因體構築體選殖至pFastBac質體中。最終pFastBac-串聯環2質體包含Tn7L重組序列、串聯環2基因體、健大黴素抗性基因及Tn7R重組序列，接著為具有細菌複製起點及安比西林抗性標記物之質體主鏈(圖2H)。藉由定序及PCR產物分析確認包括串聯環2基因體。pFastBac用於產生攜帶串聯環2基因體之穿梭載體，接著產生如上文所述之桿狀病毒。

【0599】 攜帶串聯環2基因體之桿狀病毒用於在1之MOI下感染Sf9細胞。另外，使樣品包括於經單獨環2 ORF1表現桿狀病毒感染，或經環2串聯基因體桿狀病毒及環2 ORF1表現桿狀病毒共感染的Sf9細胞中。在3天之後，藉由離心使Sf9細胞粒化。使用Qiagen DNeasy血液及組織套組收穫總DNA。10 μg總DNA經Esp3I限制酶消化，其在緊密側接串聯環2基因體之桿狀病毒內切割(參見圖2I)。經消化DNA在瓊脂糖凝膠上操作。隨後使DNA化學變性且脫嘌呤化，且藉由毛細管轉移轉移至帶正電荷之耐綸膜。使DNA UV交聯至膜，隨後與針對環2基因體設計之含生物素的探針雜交。使用抗生蛋白鏈菌素-IRDye800偵測探針，且在LiCor Odyssey成像劑上成像。

【0600】 在經串聯環2桿狀病毒感染之所有樣品中觀測到與串聯環2基因體尺寸一致之譜帶，表明將串聯環2基因體成功遞送至Sf9細胞(圖2I)。另外，觀測到與自桿狀病毒分離之環2基因體之單個複本一致的譜帶，表明一些DNA重組在桿狀病毒產生期間出現，引起在桿狀病毒群體

之一部分中環2基因體的一個複本損失。約50%之桿狀病毒顯示單個複本環2基因體而非串聯複本。未自桿狀病毒偵測到環形環2基因體(與引入至MOLT-4細胞中之串聯環2構築體相比，在該等細胞中偵測到環形單個複本dsDNA基因體；圖2I)。然而，此重組未抑制串聯基因體複本成功遞送至SF9細胞。

【0601】

實例8：合成性指環載體之製備

此實例表明合成指環載體之活體外產生。

【0602】 將來自TTMiniV之LY1及LY2菌株的EcoRV限制酶位點之間的DNA序列(Eur Respir J. 2013 Aug;42(2):470-9)選殖至康黴素載體(整合DNA技術)中。在實例6及7中，基於來自TTMiniV之LY1及LY2菌株的DNA序列之所得遺傳元件構築體分別被稱為指環載體1 (Anello 1)及指環載體2 (Anello 2)。使經選殖構築體轉移至10-β勝任型大腸桿菌中(New England Biolabs Inc.)，接著根據製造商的方案進行質體純化(Qiagen)。

【0603】 DNA構築體(圖3及圖4)在37℃下經EcoRV限制消化物線性化6小時，得到含有TTMiniV基因體且不包含細菌主鏈元件(諸如複製起點及可選標記物)之雙股線性DNA片段。此繼之以瓊脂糖凝膠電泳，刪除TTMiniV基因體片段之恰當尺寸的DNA譜帶(2.9千鹼基對)，及根據製造商的方案使用凝膠提取套組(Qiagen)對來自所切除之瓊脂糖譜帶的DNA凝膠純化。

【0604】

實例9：指環載體之組裝及感染

此實例表明使用如實例5中所述之合成DNA序列成功活體外產生感染

性指環載體。

【0605】 使用脂質轉染劑(Thermo Fisher Scientific)將雙股線性化凝膠純化的指環病毒基因體DNA (實例5中所得)轉染至在完整質體中或以經線性化形式之HEK293T細胞(人類胚胎腎細胞株)或A549細胞(人類肺癌細胞株)中。使用6 μg質體或1.5 μg經線性化指環病毒基因體DNA來轉染T25燒瓶中70%匯合的細胞。包括於指環載體中之缺乏病毒序列的空載體主鏈係用作陰性對照。轉染後六小時，用PBS洗滌細胞兩次，且使其在37℃及5%二氧化碳下在新鮮生長介質中生長。由IDT合成編碼人類EF1α啟動子接著YFP基因之DNA序列。此DNA序列鈍端接合至選殖載體(Thermo Fisher Scientific)。所得載體用作對照以評定轉染效率。轉染後72小時使用細胞成像系統(Thermo Fisher Scientific)偵測YFP。HEK293T及A549細胞之轉染效率分別計算為85%及40% (圖5)。

【0606】 轉染後96小時收穫經指環載體轉染之293T及A549細胞的上清液。所收穫之上清液在4℃下在2000 rpm下短暫離心10分鐘以移除任何細胞碎片。所收穫之上清液中之每一者分別用於感染在24孔盤中70%匯合的新293T及A549細胞。在37℃及5%二氧化碳下培育24小時之後，洗掉上清液，接著洗滌PBS兩次，且用新鮮生長介質置換。在37℃及5%二氧化碳下再培育此等細胞48小時之後，單獨地收穫細胞用於基因體DNA提取。根據製造商的方案，使用基因體DNA提取套組(Thermo Fisher Scientific)收穫來自樣品中之每一者的基因體DNA。

【0607】 為了確認藉由活體外產生之指環載體對293T及A549細胞之成功感染，使用對乙型細環病毒或LY2特異性序列具有特異性之引物，將如本文所述收穫之100 ng基因體DNA用於執行定量聚合酶鏈反應

(qPCR)。按照製造商的方案，將SYBR綠色試劑(Thermo Fisher Scientific)用於執行qPCR。對GAPDH之基因體DNA序列具有特異性之引物的qPCR用於標準化。所使用之所有引物的序列列於表42中。

表42：

	引子序列(5' > 3')	
目標	**正向**	**反向**
乙型細環病毒	ATTCGAATGGCTGAGTTTATGC (SEQ ID NO: 690)	CCTTGACTACGGTGGTTTCAC (SEQ ID NO: 693)
LY2 TTMiniV菌株	CACGAATTAGCCAAGACTGGGCAC (SEQ ID NO: 691)	TGCAGGCATTCGAGGGCTTGTT (SEQ ID NO: 694)
GAPDH	GCTCCCACTCCTGATTTCTG (SEQ ID NO: 692)	TTTAACCCCCTAGTCCCAGG (SEQ ID NO: 695)

【0608】 如圖6A、6B、7A及7B中所描繪之qPCR結果中所示，活體外產生及如實例中所述之指環載體為感染性的。

【0609】

實例10：指環載體之選擇

此實例表明活體外產生之合成指環載體感染多種組織來源之細胞株的能力。

【0610】 在37℃及5%二氧化碳下在24孔盤之各孔中將具有感染性TTMiniV指環載體之上清液(描述於實例5中)與70%匯合的293T、A549、Jurkat (急性T細胞白血病細胞株)、Raji (伯基特氏淋巴瘤B細胞株)及Chang細胞株一起培育。用PBS洗滌細胞兩次，感染後24小時，接著用新鮮生長介質置換。隨後再次在37℃及5%二氧化碳下再培育細胞48小時，接著收穫用於基因體DNA提取。根據製造商的方案，使用基因體DNA提取套組(Thermo Fisher Scientific)收穫來自樣品中之每一者的基因體DNA。

【0611】 為了確認藉由先前實例中產生之指環載體對此等細胞株之成功感染，使用對乙型細環病毒或LY2特異性序列具有特異性之引物，將如本文所述收穫之100 ng基因體DNA用於執行定量聚合酶鏈反應(qPCR)。按照製造商的方案，將SYBR綠色試劑(Thermo Fisher Scientific)用於執行qPCR。對GAPDH之基因體DNA序列具有特異性之引物的qPCR用於標準化。所使用之所有引物的序列列於表42中。

【0612】 如圖6A-10B中所描繪之qPCR結果中所示，活體外產生之指環載體不僅具有感染性，其亦能夠感染多種細胞株，包括上皮細胞、肺組織細胞、肝臟細胞、癌細胞、淋巴球、淋巴母細胞、T細胞、B細胞及腎細胞之實例。亦觀測到合成指環載體能夠感染HepG2細胞(肝臟細胞株)，使得相對於對照增加超過100倍。

【0613】

實例11：複製缺陷型指環載體

為了複製及封裝指環載體，一些元件可以反式形式提供。此等包括引導或支持DNA複製或封裝之蛋白質或非編碼RNA。在某些情況下，反式元件可自指環載體(諸如病毒、質體)之來源替代物或自細胞基因體提供。

【0614】 其他元件通常以順式形式提供。此等元件可為例如充當複製起點(例如以允許擴增指環載體DNA)或封裝訊號(例如以結合至蛋白質以將基因體負載至衣殼中)之指環載體DNA中之序列或結構。通常，複製缺失型病毒或指環載體將缺失此等元件中之一或多者，使得即使以反式形式提供其他元件，DNA仍不能封裝至感染性病毒粒子或指環載體中。

【0615】 複製缺陷型病毒可適用於例如控制相同細胞中之指環載體

(例如，複製缺陷型或封裝缺陷型指環載體)的複製。在某些情況下，複製缺陷型病毒將缺乏順式複製或封裝元件，但表現反式元件，諸如蛋白質及非編碼RNA。通常，治療性指環載體將缺乏此等反式元件中之一些或所有，且因此將無法自行複製，但將保留順式元件。在共轉染/感染至細胞中時，複製缺陷型病毒將驅動指環載體之擴增及封裝。因此，所收集之封裝粒子將僅由治療性指環載體構成，而不受病毒污染，從而提供反式元件。

【0616】 為了產生複製缺陷型指環載體，移除指環病毒之非編碼區中之保守元件。詳言之，將分別及一起測試保守5' UTR域及富含GC之域的缺失。預期兩種元件對於病毒複製或封裝而言為重要的。另外，將在整個非編碼區上進行缺失系列以鑑別先前未知的所關注區。

【0617】 複製元件之成功缺失將引起細胞內之指環載體DNA擴增降低，例如藉由qPCR所量測，但將支持一些感染性指環載體產生，例如如藉由經感染細胞上之分析所監測，該等分析可包括qPCR、西方墨點法、螢光分析或發光分析中之任一者或全部。封裝元件之成功缺失將不破壞指環載體DNA擴增，因此藉由qPCR在經轉染細胞中將觀測到指環載體DNA之增加。然而，指環載體基因體將未囊封，因此未觀測到感染性指環載體產生。

【0618】

實例12：複製勝任型指環載體之製造方法

此實例描述一種用於回收且按比例增大複製勝任型指環載體之產生的方法。當指環載體在其基因體中編碼所有所需遺傳元件及在細胞中複製所需的ORF時，指環載體為複製勝任型。由於此等指環載體在其複製中為

非缺陷性的，所以其不需要反式提供的補充活性。然而，其可能需要輔助活性，諸如轉錄增強子(例如丁酸鈉)或病毒轉錄因子(例如腺病毒E1、E2、E4、VA；HSV Vp16即刻早期蛋白質)。

【0619】 在此實例中，將編碼呈線性或環形形式之合成指環載體的完整序列的雙股DNA藉由化學轉染引入至T75燒瓶中之5E+05黏附哺乳動物細胞中，或藉由電穿孔引入至懸浮液中之5E+05細胞中。在最佳時間段(例如，轉染後3-7天)之後，藉由將細胞刮至上清液培養基中來收集細胞及上清液。將諸如膽鹽之溫和清潔劑添加至最終濃度為0.5%，且在37℃下培育30分鐘。將氯化鈣及氯化鎂添加至最終濃度分別為0.5mM及2.5mM。添加核酸內切酶(例如DNA酶I，核酸酶)，且在25-37℃下培育0.5-4小時。使指環載體懸浮液在1000×g下在4℃下離心10分鐘。將澄清上清液轉移至新套管，且用低溫保護性緩衝劑(亦稱為穩定性緩衝劑) 1:1稀釋，且必要時儲存於-80℃下。此產生指環載體之0代(P0)。為了使清潔劑濃度低於待在經培養細胞上使用之安全限制，取決於指環載體效價，使此接種物在無血清培養基(SFM)中稀釋至少100倍或更高。

【0620】 使T225燒瓶中之新鮮哺乳動物細胞單層與足以覆蓋培養物表面之最小體積重疊，且在37℃及5%二氧化碳下在平緩擺動下培育90分鐘。用於此步驟之哺乳動物細胞可能或可能不與P0回收所用之細胞類型相同。在此培育之後，接種物經40 ml無血清、無動物來源之培養基置換。使細胞在37℃及5%二氧化碳下培育3-7天。添加先前使用之相同溫和清潔劑的4 mL 10×溶液以達成0.5%之最終清潔劑濃度，且隨後在輕微攪拌下在37℃下培育混合物30分鐘。添加核酸內切酶，且在25-37℃下培育0.5-4小時。隨後收集培養基且在4℃下在1000×g下離心10分鐘。使澄清上清液

與40 mL穩定緩衝劑混合，且儲存於-80℃下。此產生種子儲備液或指環載體之1代(P1)。

【0621】 取決於儲備液之效價，其在SFM中稀釋不低於100倍，且添加至在所需尺寸之多層燒瓶上生長的細胞。感染倍率(MOI)及培育時間以較小標度最佳化以確保最大指環載體產生。收穫後，可隨後純化指環載體且視需要濃縮。展示工作流(例如此實例如中所述)之示意圖提供於圖11中。

【0622】

實例13：複製缺陷型指環載體之製造方法

此實例描述一種用於回收且按比例增大複製缺陷型指環載體之產生的方法。

【0623】 指環載體可藉由參與複製之一或多個ORF (例如，ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3及/或ORF2t/3)的缺失呈現複製缺陷型。複製缺陷型指環載體可生長於補充細胞株中。此類細胞株構成性地表現促進指環載體生長但在指環載體之基因體中為缺失的或無功能性的組分。

【0624】 在一個實例中，將參與指環載體傳播之任何ORF的序列選殖至適用於產生編碼選擇標記物之穩定的細胞株之慢病毒表現系統中，且如本文所述產生慢病毒載體。能夠支持指環載體傳播之哺乳動物細胞株經此慢病毒載體感染，且藉由選擇標記物(例如嘌呤黴素或任何其他抗生素)經受選擇性壓力以選擇已穩定整合之經選殖ORF的細胞群體。一旦此細胞株經表徵且檢定以補充工程化指環載體中之缺陷且因此支持此類指環載體之生長及傳播，則其擴增且儲備於低溫儲存器中。在此等細胞之擴增及維

持期間，將選擇抗生素添加至培養基中以維持選擇性壓力。一旦將指環載體引入至此等細胞中，則可保留選擇抗生素。

【0625】 當建立此細胞株時，進行複製缺陷型指環載體之生長及產生，例如實例15如中所述。

【0626】

實例14：使用懸浮液細胞產生指環載體

此實例描述懸浮液中細胞之指環載體的產生。

【0627】 在此實例中，使經調適以在懸浮液條件中生長之A549或293T生產者細胞株在37℃及5%二氧化碳下在WAVE生物反應袋中在無動物組分及無抗生素懸浮液培養基(Thermo Fisher Scientific)中生長。以1×10^6個活細胞/毫升接種之此等細胞在當前良好作業規範(cGMP)下使用脂染胺2000 (Thermo Fisher Scientific)用包含指環載體序列之質體以及適合封裝指環載體(例如，在複製缺陷型指環載體之情況下，例如實例16如中所述)或其所需的任何補充質體轉染。補充質體可在一些情況下編碼已自指環載體基因體(例如基於之指環載體基因體，例如指環病毒基因體，例如如本文所述)刪除，但適合複製及封裝指環載體或其所需的病毒蛋白質。使經轉染細胞在WAVE生物反應袋中生長且在以下時間點收穫上清液：轉染後48、72及96小時。使用離心自各樣品之細胞集結粒分離上清液。隨後使用離子交換層析法自收穫的上清液及溶解的細胞集結粒純化經封裝指環載體粒子。

【0628】 可例如以下確定指環載體之經純化製劑中之基因體等效物：藉由使用經純化製劑之小等分試樣以使用病毒基因體提取套組(Qiagen)收穫指環載體基因體，接著使用針對指環載體DNA序列，例如如

實例18中所述，靶向之引物及探針進行qPCR。

【0629】 可藉由製備經純化製劑之連續稀釋液以感染新A549細胞來定量經純化製劑中之指環載體的感染性。轉染後72小時收穫此等細胞，接著使用對指環載體DNA序列具有特異性之引物及探針在基因體DNA上進行qPCR分析。

【0630】

實例15：利用指環載體在小鼠中表現外源性蛋白質

此實例描述其中細環微型病毒(TTMV)基因體經工程化以在小鼠中表現螢火蟲螢光素酶蛋白質之指環載體的用途。

【0631】 將編碼編碼螢火蟲-螢光素酶基因之經工程化TTMV之DNA序列的質體藉由化學轉染引入至A549細胞(人類肺癌細胞株)中。18 μg質體DNA用於轉染在10 cm組織培養盤中70%匯合的細胞。缺乏TTMV序列之空載體主鏈用作陰性對照。轉染後五小時，用PBS洗滌細胞兩次，且使其在37℃及5%二氧化碳下在新鮮生長介質中生長。

【0632】 轉染後96小時收穫經轉染A549細胞，以及其上清液。在37℃下用0.5%去氧膽酸鹽(重量/體積)處理所收穫之物質1小時，接著核酸內切酶處理。使用離子交換層析法自此溶解物純化指環載體粒子。為了確定指環載體濃度，使指環載體儲備液之樣品穿過病毒DNA純化套組，且使用針對指環載體DNA序列靶向之引物及探針藉由qPCR來量測基因體等效物/mL。

【0633】 經由多種注射途徑(例如靜脈內、腹膜內、皮下、肌肉內)在8-10週齡小鼠中進行1×磷酸鹽緩衝鹽水中之指環載體的基因體等效物之劑量-範圍。注射後3、7、10及15天，在各動物上進行腹側及背側生物發

光成像。成像藉由根據製造商的方案將螢光素酶受質(Perkin-Elmer)在指定時間點時腹膜內添加至各動物，接著活體內成像進行。

【0634】

實例16：表現外源性微小RNA序列之指環載體的功能性作用

此實例表明使用原生啟動子自指環載體基因體成功表現外源性miRNA (miR-625)。

【0635】 在24孔盤中將500 ng以下質體DNA轉染至HEK293T細胞之60%匯合的孔中：

i)空質體主鏈

ii)含有TTV-tth8基因體之質體，其中基因敲除(KO)內源性miRNA

iii) TTV-tth8，其中內源性miRNA經非靶向加擾miRNA置換

iv) TTV-tth8，其中內源性miRNA序列經編碼miR-625之miRNA置換

【0636】 轉染後72小時，使用Qiagen miRNeasy套組自經轉染細胞中收穫總miRNA，接著使用miRNA Script RT II套組進行反轉錄。使用應特異性地偵測miRNA-625或RNU6小RNA之引子在反轉錄DNA上進行定量PCR。RNU6小RNA用作管家基因，且資料繪製於圖12中作為相對於空載體之倍數變化。如圖12中所繪示，miR-625指環載體引起miR-625之表現增加約100倍，而未偵測到空載體、miR-基因敲除(KO)及加擾的miR之訊號。

【0637】

實例17：用以表現外源性非編碼RNA之指環載體的製備及產生

此實例描述用以表現外源性小非編碼RNA之指環載體的合成及產生。

【0638】 將來自TTV之tth8菌株的DNA序列(Jelcic等人, Journal of Virology, 2004)合成且選殖至含有細菌複製起點及細菌抗生素抗性基因之載體中。在此載體中，編碼TTV miRNA髮夾之DNA序列經替換為編碼外源性小非編碼RNA，諸如miRNA或shRNA之DNA序列。隨後使經工程化構築體轉移至電勝任型細菌中，接著根據製造商的方案使用質體純化套組進行質體分離。

【0639】 將編碼外源性小非編碼RNA之指環載體DNA轉染至真核生產者細胞株中以產生指環載體粒子。在轉染後不同時間點收穫含有指環載體粒子之經轉染細胞的上清液。來自過濾上清液或純化後之指環載體粒子用於下游應用，例如如本文所述。

【0640】

實例18：來自指環載體之內源性miRNA的表現及內源性miRNA之缺失

在一個實例中，將包含其中TTV-tth8基因體經實例27中所述之富含GC之區中的缺失修飾之經修飾TTV-tth8基因體的指環載體用於感染培養物中之Raji B細胞。此等指環載體包含編碼TTV-tth8指環病毒(其為靶向編碼n-myc相互作用蛋白質(NMI)之mRNA的miRNA)之內源性有效負載的序列，且由將包含指環病毒基因體之質體引入至宿主細胞中產生。NMI在JAK/STAT路徑之下游操作以調節各種胞內訊號之轉錄，包括經干擾素刺激之基因、增殖及生長基因及發炎反應之介體。如圖13中所繪示，在目標Raji B細胞中偵測到病毒基因體。亦在與對照細胞相比之目標Raji B細胞中觀測到NMI之成功阻斷基因表現(圖14)。與對照細胞相比，包含針對NMI之miRNA的指環載體誘導NMI蛋白質含量降低超過75%。此實例表明，具有原生指環病毒miRNA之指環載體可阻斷宿主細胞中之目標分子

的基因表現。

【0641】 在另一實例中，缺失基於指環病毒之指環載體的內源性miRNA。隨後將所得指環載體(Δ miR)與宿主細胞一起培育。隨後將Δ miR指環載體遺傳元件之基因體等效物與其中保留內源性miRNA之相應指環載體的基因體等效物進行比較。如圖15中所繪示，在與針對其中仍存在內源性miRNA之指環載體基因體所觀測到的含量相當的含量下之細胞中偵測到其中缺失內源性miRNA之指環載體基因體。此實例表明，基於指環病毒之指環載體的內源性miRNA可經突變或完全缺失，且仍可在目標細胞中偵測到指環載體基因體。

【0642】

實例19：活體內外源性蛋白質之指環載體遞送

此實例表明在投與之後指環載體之活體內效應功能(例如蛋白質之表現)。

【0643】 製備包含編碼奈米-螢光素酶(nLuc)之轉殖基因的指環載體(圖16A至圖16B)。簡言之，經攜帶TTMV-LY2非編碼區及nLuc表現匣之雙股DNA質體轉染至HEK293T細胞以及編碼完整TTMV-LY2基因體之雙股DNA質體中以充當反式複製及封裝因子。在轉染之後，培育細胞以允許指環載體產生，且收穫指環載體物質且經由核酸酶處理、超過濾/透濾及無菌過濾進行富集。額外HEK293T細胞經攜帶nLuc表現匣及TTMV-LY2 ORF轉染匣但缺乏複製及封裝必需之非編碼域的非複製DNA質體轉染，以充當「非病毒」陰性對照。根據與指環載體物質相同的方案製備非病毒樣品。

【0644】 向三個健康小鼠組肌肉內投與指環載體製劑，且藉由IVIS

Lumina成像(Bruker)歷經九天進行監測(圖17A)。作為非病毒對照，向三隻額外小鼠投與非複製製劑(圖17B)。第0天向左後腿投與25 μL指環載體之注射液或非病毒製劑，且在第4天向右後腿重新投與(參見圖17A及17B中之箭頭)。在IVIS成像9天之後，在用與非病毒製劑(圖17B)相比之指環載體製劑(圖17A)注射的小鼠中觀測到nLuc發光訊號出現更多，其與在活體內指環載體轉導之後的反式基因表現一致。

【0645】

實例20：活體外環化指環病毒基因體

此實例描述包含具有最小非病毒DNA之環形雙股指環病毒基因體DNA的構築體。此等環形病毒基因體更密切地匹配在野生型指環病毒複製期間發現的雙股DNA中間物。在引入至細胞中時，具有最小非病毒DNA之此類環形雙股指環病毒基因體DNA可經受滾環複製以產生例如本文所述之遺傳元件。

【0646】 在一個實例中，攜帶TTV-tth8變異體及TTMV-LY2之質體經鑑別側接基因體DNA之位點的限制性核酸內切酶消化。隨後使所得經線性化基因體接合以形成環形DNA。此等接合反應在變化的DNA濃度下進行，以使分子內接合最佳化。將接合之環直接轉染至哺乳動物細胞中，或藉由用限制性核酸內切酶消化以裂解質體主鏈且用核酸外切酶消化以降解線性DNA來進一步處理，以移除非環形基因體DNA。對於TTV-tth8，*Xma*I核酸內切酶用於使DNA線性化；接合的環含有在富含GC之區與5'非編碼區之間的53 bp非病毒DNA。對於TTMV-LY2，使用IIS型限制酶*Esp3I*，得到不含非病毒DNA之病毒基因體DNA環。此方案改編自先前公開之TTV-tth8環化(Kincaid等人., 2013, PLoS Pathogens 9(12):

e1003818)。為了證實指環病毒產生之改進，將經環化TTV-tth8及TTMV-LY2轉染至HEK293T細胞中。在培育7天之後，溶解細胞，且進行qPCR以比較環化與基於質體之指環病毒基因體之間的指環病毒基因體之含量。增加含量之指環病毒基因體顯示，病毒DNA之環化為適用於增加指環病毒產生之策略。

【0647】在另一實例中，TTMV-LY2質體(pVL46-240)及TTMV-LY2-nLuc分別經Esp3I或EcoRV-HF線性化。在電溶離或Qiagen管柱純化且用T4 DNA接合酶接合之前，在1%瓊脂糖凝膠上純化經消化質體。在轉染之前在100 kDa UF/DF膜上濃縮經環化DNA。如18A圖中所繪示，環化藉由凝膠電泳確認。在用脂染胺2000進行脂質體轉染之前，以3×10^4個細胞/cm^2使用HEK293T接種T-225燒瓶。在燒瓶接種後一天，共轉染九微克經環化TTMV-LY2 DNA及50 μg經環化TTMV-LY2-nLuc。作為比較，額外T-225燒瓶經50 μg線性化TTMV-LY2及50 μg線性化TTMV-LY2-nLuc共轉染。

【0648】在曲拉通X-100收穫緩衝劑中收穫細胞之前，進行指環載體產生持續八天。通常，指環載體可例如藉由宿主細胞之溶解、溶解物之澄清、過濾及層析進行富集。在此實例中，所收穫之細胞在氯化鈉調節及1.2 μm/0.45 μm正常流動過濾之前經核酸酶處理。濃縮澄清的收穫物，且在750 kDa MWCO mPES中空纖維膜上緩衝交換至PBS中。TFF保留物在負載於PBS中之預先平衡的Sephacryl S-500 HR SEC管柱上之前使用0.45 μm過濾器進行過濾。指環載體在30 cm/hr下在SEC管柱中處理。收集個別級分，且藉由qPCR分析病毒基因體複本數及轉殖基因複本數，如圖18B中所繪示。在SEC層析圖之空隙體積(級分7)開始觀測到病毒基因體及轉

殖基因複本。在級分15處觀測到殘餘質體峰。TTMV-LY2基因體及TTMV-LY2-nLuc轉殖基因之複本數與使用在級分7-級分10處之環化輸入DNA產生的指環載體良好一致，表明含有nLuc轉殖基因之封裝的指環載體。合併SEC級分且使用100 kDa MWCO PVDF膜濃縮，且隨後在活體內投與之前0.2 μm過濾。

【0649】 在與經線性化指環載體DNA相比時，輸入指環載體DNA之環化引起在整個純化過程中受核酸酶保護之基因體的回收百分比增加三倍，表明使用如表46中所示之環化輸入指環載體DNA具有改進的製造效率。

表46.純化過程產率

步驟	經線性化TTMV-LY2		經環化TTMV-LY2	
	總病毒基因體複本	**總nLuc轉殖基因基因體複本**	**總病毒基因體複本**	**總nLuc轉殖基因基因體複本**
收穫預先核酸酶	2.78E+12	2.17E+12	1.04E+11	4.39E+11
澄清的收穫物	9.96E+09	5.48E+09	6.55E+08	9.81E+08
TFF	1.01E+10	7.66E+09	2.58E+08	3.56E+08
SEC	3.18E+07	8.73E+06	9.16E+06	7.75E+06
UF/DF	8.82E+06	3.25E+06	1.78E+06	2.73E+06
無菌過濾	5.60E+06	2.64E+06	8.66E+05	1.63E+06
純化過程產率(%)	0.0002%	0.0001%	0.0006%	0.0004%

【0650】

實例21：產生含有具有來自不同細環病毒菌株之高變域的嵌合ORF1的指環載體

此實例描述ORF1之高變區的域交換以產生含有以下之嵌合指環載體：富含ORF1精胺酸之區、果凍卷域、N22及一個TTV菌株之C端域，及來自不同TTV菌株之ORF1蛋白質的高變域。

【0651】 已將乙型細環病毒之全長基因體LY2菌株選殖至表現載體

中用於在哺乳動物細胞中表現。此基因體經突變以移除LY2之高變域，且將其用遠親乙型細環病毒之高變域置換(圖18C)。隨後使含有具有交換高變域(pTTMV-LY2-HVRa-z)之LY2基因體的質體線性化，且使用先前公開之方法(Kincaid等人, PLoS Pathogens 2013)環化。使HEK293T細胞經環化基因體轉染，且培育5-7天以允許指環載體產生。在培育期之後，藉由梯度超速離心自經轉染細胞之上清液及細胞集結粒純化指環載體。

【0652】 為了確定嵌合指環載體是否仍具有感染性，將分離的病毒粒子添加至未感染細胞中。培育細胞5-7天以允許病毒複製。在培育之後，嵌合指環載體建立感染之能力係藉由免疫螢光、西方墨點法及qPCR監測。嵌合病毒之結構完整性藉由陰性染色及低溫電子顯微法評定。可進一步測試嵌合指環載體活體內感染細胞之能力。建立經由高變域交換實現產生功能性嵌合指環載體之能力可允許病毒之工程化以改變趨向性且潛在地避開免疫偵測。

【0653】

實例22：產生含有非TTV蛋白質/肽而非高變域之嵌合ORF1

此實例描述用其他所關注之蛋白質或肽替代ORF1之高變區以產生含有以下之嵌合ORF1蛋白質：富含精胺酸之區、果凍卷域、N22及一個TTV菌株之C端域，及非TTV蛋白質/肽而非高變域。

【0654】 如實例B中所示，LY2之高變域自基因體中缺失且可將所關注之蛋白質或肽插入至此區域中(圖18D)。可引入至此區域中之序列類型的實例包括(但不限於)親和標籤、抗體之單鏈可變區(scFv)及抗原肽。如實例B中所述使質體中之經突變基因體(pTTMV-LY2-ΔHVR-POI)線性化且環化。經環化基因體轉染至HEK293T細胞中且培育5-7天。在培育之

後，適當時經由超速離心及/或親和性層析法自上清液及細胞集結粒純化含有POI之嵌合指環載體。

【0655】 使用多種技術評定產生含有POI之功能性嵌合指環載體的能力。首先，將經純化病毒添加至未感染細胞，以確定嵌合指環載體是否可將有效負載複製及/或遞送至未處理細胞。另外，使用電子顯微法評定嵌合指環載體之結構完整性。對於具有活體外功能性之嵌合指環載體，亦評定活體內複製/遞送有效負載的能力。

【0656】

實例23：基於tth8及LY2之指環載體各自成功地將EPO基因轉導至肺癌細胞中

在此實例中，使用攜載紅血球生成素基因(EPO)之兩個不同指環載體轉導非小細胞肺癌株(EKVX)。指環載體係藉由如本文所述之活體外環化來產生，且包括基於LY2或tth8主鏈之兩種類型的指環載體。LY2-EPO及tth8-EPO指環載體中之每一者包括遺傳元件，其分別包括編碼EPO之匣及LY2或tth8基因體之非編碼區(5' UTR，富含GC之區)，但未包括指環病毒ORF，例如實例39如中所述。使細胞接種經純化指環載體或陽性對照(在較高劑量或與指環載體相同之劑量下的AAV2-EPO)且培育7天。指環病毒ORF以反式形式提供於單獨活體外環化DNA中。接種後3、5.5及7天對培養物上清液取樣且使用商業ELISA套組進行分析以偵測EPO。LY2-EPO及tth8-EPO指環載體均成功地轉導細胞，顯示出與未處理(陰性)對照細胞相比顯著更高的EPO效價(在所有時間點$P<0.013$)(圖19)。

【0657】

實例24：在靜脈內(i.v.)投與之後可活體內偵測到具有治療性轉殖基因之

指環載體

在此實例中，在靜脈內(i.v.)投與之後活體內偵測到編碼人類生長激素(hGH)之指環載體。基於LY2主鏈及編碼外源性hGH (LY2-hGH)之複製缺陷型指環載體係由如本文所述之活體外環化來產生。LY2-hGH指環載體之遺傳元件包括LY2非編碼區(5' UTR，富含GC之區)及編碼hGH之匣，但未包括指環病毒ORF，例如如實例39中所述。向小鼠靜脈內投與LY2-hGH指環載體。指環病毒ORF以反式形式提供於單獨活體外環化DNA中。簡言之，在第0天靜脈內注射指環載體(LY2-hGH)或PBS (n=4隻小鼠/組)。以每隻小鼠4.66E+07指環載體基因體向獨立動物組投與指環載體。

【0658】 在第一實例中，偵測指環載體病毒基因體DNA複本。在第7天，收集血液及血漿，且藉由qPCR分析hGH DNA擴增子。在活體內感染後7天之後，LY2-hGH指環載體存在於全血之細胞級分中(圖20A)。此外，血漿中不存在指環載體顯示此等指環載體無法活體內複製(圖20B)。

【0659】 在第二實例中，在活體內轉導之後偵測到hGH mRNA轉錄本。在第7天，收集血液且藉由qRT-PCR分析hGH mRNA轉錄本擴增子。GAPDH用作對照管家基因。在全血之細胞級分中量測hGH mRNA轉錄本。活體內偵測來自經指環載體編碼之轉殖基因的mRNA(圖21)。

【0660】

實例25：活體外環化基因體作為用於活體外產生指環載體之輸入材料

此實例表明，作為如本文所述之指環載體遺傳元件的活體外環化(IVC)雙股指環病毒DNA在質體中比指環病毒基因體DNA更穩固，得到預期密度之經封裝指環載體基因體。

【0661】 在T75燒瓶中之1.2E+07 HEK293T細胞(人類胚胎腎細胞

株)經11.25 ug (i)活體外環化雙股TTV-tth8基因體(IVC TTV-tth8)、(ii)質體主鏈中之TTV-tth8基因體，或(iii)含有僅TTV-tth8 (非複製TTV-tth8)之ORF1序列的質體轉染。轉染後7天收穫細胞，用0.1%曲拉通溶解，且用100單位/mL核酸酶處理。溶解物用於氯化銫密度分析；量測密度且對各級分之氯化銫線性梯度進行TTV-tth8複本定量。如圖22中所繪示，與TTV-tth8質體相比，IVC TTV-tth8在1.33之預期密度下產生顯著更多的病毒基因體複本。

【0662】 1E+07 Jurkat細胞(人類T淋巴球細胞株)經活體外環化LY2基因體(LY2 IVC)或質體中之LY2基因體核轉染。轉染後4天收穫細胞且使用含有0.5%曲拉通及300 mM氯化鈉之緩衝劑溶解，接著進行兩輪瞬時冷凍解凍。溶解物用100單位/ml核酸酶處理，接著進行氯化銫密度分析。對各級分之氯化銫線性梯度進行密度量測及LY2基因體定量。如圖23中所繪示，Jurkat細胞中之活體外環化LY2基因體的轉染與含有LY2基因體之質體的轉染相比引起在預期密度處之尖峰，其在圖23中未顯示出可偵測之峰。

【0663】

實例26：環2串聯指環載體構築體之設計及構築

此實例描述適用於拯救環2指環載體之例示性串聯構築體的設計。簡言之，設計及構築包含以串聯方式之頭部至尾部的野生型環2基因體之兩個複本的質體構築體。質體亦編碼細菌複製起點及大觀黴素抗性基因以在大腸桿菌細胞中傳播。亦設計及構築此等質體之十六個衍生物，其中在串聯質體之第一複本或第二複本中之每300個鹼基對之後，環2基因體之986個鹼基對經nLuc匣置換(如圖24A-24B中所繪示之示意圖)。986個鹼基對

nLuc匣由以下組成：SV40啟動子、kozak序列、針對奈米螢光素酶基因之編碼序列及SV40聚A序列。含有「nLuc匣」之基因體複本中之ORF的表現係藉由使其起始密碼子突變而基因敲除，而串聯之其他複本仍表現所有ORF。選殖後，此等構築體在已經工程化以分離含有重複元件之質體的大腸桿菌細胞中傳播(新英格蘭生物實驗室)。使用無核酸內切酶之質體提取套組(Qiagen)提取質體。

【0664】

實例27：使用串聯構築體進行之環2指環載體的回收

此實例描述在MOLT4細胞中使用串聯構築體之重組環2指環載體的回收。

【0665】 將100 μg實例26中所述之串聯質體中之每一者獨立地轉染至1E7 MOLT4細胞中。將經轉染MOLT4細胞以4E5/mL接種於其完全生長介質(含有10% FBS、100 mM丙酮酸鈉及0.01% Pluronic之RPMI)中，且在具有5%二氧化碳之37℃培育箱中在125 RPM下震盪來培養。轉染後四天，收穫細胞作為集結粒，且丟棄生長培養基。使細胞集結粒再懸浮於含有0.5%曲拉通-X100、50 mM Tris pH 8.0及300-mM氯化鈉之溶解緩衝液中。藉由兩輪冷凍解凍溶解細胞，接著在室溫下用100 U/ml核酸酶處理90分鐘。隨後在4℃下藉由在10,000xg下自旋30分鐘使經核酸酶處理之溶解物澄清。使澄清溶解物經受等密度離心。等密度離心後，自管之頂部收集1 mL級分。分析所收集之級分中之每一者的密度，且進行qPCR分析以定量受DNA酶保護之nLuc複本。環2指環載體之封裝係基於在環2粒子之預期密度下的效價以及使用含有環2指環載體之此等級分來測試活體外轉導來確定。能夠拯救指環載體之串聯構築體藉由製備額外突變體進一步最佳

化。

【0666】

實例28：使用串聯構築體在MOLT4細胞中之環2粒子的拯救

此實例描述使用串聯構築體之野生型環2粒子的成功拯救，如由等密度離心所確定。

【0667】 使2E9 MOLT4細胞經2 mg含有以串聯方式之頭部至尾部的環2基因體的質體轉染。在具有5%二氧化碳之37℃培育箱中在100 RPM震盪下將經轉染細胞以4E5個細胞/毫升接種於其完全生長介質(含有10% FBS、100 mM丙酮酸鈉及0.01% Pluronic之RPMI)中。轉染後4天收穫經轉染細胞作為集結粒。使細胞再懸浮於再懸浮緩衝劑(50 mM Tris pH 8.0，100 mM氯化鈉)中且使用微流化床在10,000 PSI下進行溶解。將溶解細胞在室溫下用100 U/ml核酸酶處理90分鐘，接著在室溫下用0.5%曲拉通-X100處理45分鐘。藉由在10,000xg下自旋30分鐘使經清潔劑之溶解物澄清且分級。使澄清的溶解物經受等密度超速離心。自旋後，自管之頂部收集1 mL級分。分析級分中之每一者的密度，且藉由qPCR進行環2病毒基因體之DNA酶抗性定量。用於等密度超速離心之代表性資料展示於圖25中。

【0668】

實例29：MOLT4細胞中產生之環2粒子的純化

此實例描述使用實例28中所述之串聯質體構築體在MOLT4細胞中拯救之環2粒子的純化。

【0669】 將含有環2粒子之實例28中產生的級分合併在一起。為了進一步層析純化，選擇Cellufine Max DexS Hbp吸附劑及Mustang Q陰離

子交換過濾器，因為其產生良好純化及回收。50 mL (1.6 x 25cm) Cellufine Max DexS Hbp管柱如下運作：使管柱在50 mM tris pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.01% Tween 80中平衡。使用平衡緩衝液將池1:1稀釋(以調節pH值及導電性)且負載到管柱上。在負載之後，使用平衡緩衝液將管柱洗滌至A280基線，且用2.5M NaCl溶離所結合之蛋白質。環2粒子含於經過級分之流體中。此級分使用1/10體積1M tris pH 9.0進行pH調節，且經由先前在50 mM tris pH 9.0+0.01% Tween 80中平衡之Mustang Q XT過濾器(3 mL吸附劑當量)負載。負載後，使管柱洗滌至A280基線，且用1M NaCl溶離產物。使用Microsep-10離心式濃縮器使級分濃縮10-100x，且藉由SDS-PAGE、西方墨點法、qPCR及EM分析最終池(圖26A-26B)。

【序列表】

<110> 美商旗艦先鋒創新公司(FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS V, INC.)

<120> 串聯指環病毒構築體

<130> V2057-7011TW

<140> TW 110121557
<141> 2021-06-11

<150> US 63/146,963
<151> 2021-02-08

<150> US 63/038,483
<151> 2020-06-12

<160> 953

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<400> 1
000

<210> 2

<400> 2
000

<210> 3

<400> 3
000

<210> 4

<400> 4
000

<210> 5

<400> 5
000

<210> 6

<400> 6
000

<210> 7

<400> 7
000

<210> 8

<400> 8
000

<210> 9

<400> 9
000

<210> 10

<400> 10
000

<210> 11

<400> 11
000

<210> 12

<400> 12
000

<210> 13

<400> 13
000

<210> 14

<400> 14
000

<210> 15

<400> 15
000

<210> 16
<211> 3753
<212> DNA
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 16
tgctacgtca ctaacccacg tgtcctctac aggccaatcg cagtctatgt cgtgcacttc 60

ctgggcatgg tctacataat tatataaatg cttgcacttc cgaatggctg agtttttgct 120

gcccgtccgc ggagaggagc cacggcaggg gatccgaacg tcctgagggc gggtgccgga 180

ggtgagttta cacaccgaag tcaaggggca attcgggctc aggactggcc gggctttggg 240

caaggctctt aaaaatgcac ttttctcgaa taagcagaaa gaaaaggaaa gtgctactgc 300

tttgcgtgcc agcagctaag aaaaaaccaa ctgctatgag cttctggaaa cctccggtac 360

acaatgtcac ggggatccaa cgcatgtggt atgagtcctt tcaccgtggc cacgcttctt 420

tttgtggttg tgggaatcct atacttcaca ttactgcact tgctgaaaca tatggccatc 480

caacaggccc gagaccttct gggccaccgg gagtagaccc caacccccac atccgtagag 540

ccaggcctgc cccggccgct ccggagccct cacaggttga ttcgagacca gccctgacat 600

ggcatgggga tggtggaagc gacggaggcg ctggtggttc cggaagcggt ggacccgtgg 660

cagacttcgc agacgatggc ctcgatcagc tcgtcgccgc cctagacgac gaagagtaag 720

gaggcgcaga cggtggagga gggggagacg aaaaacaagg acttacagac gcaggagacg 780

ctttagacgc aggggacgaa aagcaaaact tataataaaa ctgtggcaac ctgcagtaat 840

taaaagatgc agaataaagg gatacatacc actgattata agtgggaacg gtacctttgc 900

cacaaacttt accagtcaca taaatgacag aataatgaaa ggccccttcg ggggaggaca 960

cagcactatg aggttcagcc tctacatttt gtttgaggag cacctcagac acatgaactt 1020

ctggaccaga agcaacgata acctagagct aaccagatac ttgggggctt cagtaaaaat 1080

atacaggcac ccagaccaag actttatagt aatatacaac agaagaaccc ctctaggagg 1140

caacatctac acagcaccct ctctacaccc aggcaatgcc attttagcaa aacacaaaat 1200

attagtacca agtttacaga caagaccaaa gggtagaaaa gcaattagac taagaatagc 1260

acccccccaca ctctttacag acaagtggta ctttcaaaag gacatagccg acctcaccct 1320

tttcaacatc atggcagttg aggctgactt gcggtttccg ttctgctcac cacaaactga 1380

caacacttgc atcagcttcc aggtccttag ttccgtttac aacaactacc tcagtattaa 1440

taccttttaat aatgacaact cagactcaaa gttaaaagaa tttttaaata aagcatttcc 1500

aacaacaggc acaaaaggaa caagtttaaa tgcactaaat acatttagaa cagaaggatg 1560

cataagtcac ccacaactaa aaaaaccaaa cccacaaata aacaaaccat tagagtcaca 1620

atactttgca cctttagatg ccctctgggg agaccccata tactataatg atctaaatga 1680

aaacaaaagt ttgaacgata tcattgagaa aatactaata aaaaacatga ttacatacca 1740

tgcaaaacta agagaatttc caaattcata ccaaggaaac aaggcctttt gccacctaac 1800

aggcatatac agcccaccat acctaaacca aggcagaata tctccagaaa tatttggact 1860

gtacacagaa ataatttaca acccttacac agacaaagga actggaaaca aagtatggat 1920

ggacccacta actaaagaga acaacatata taaagaagga cagagcaaat gcctactgac 1980

tgacatgccc ctatggactt tacttttttgg atatacagac tggtgtaaaa aggacactaa 2040

taactgggac ttaccactaa actacagact agtactaata tgcccttata cctttccaaa 2100

attgtacaat gaaaaagtaa aagactatgg gtacatcccg tactcctaca aattcggagc 2160

gggtcagatg ccagacggca gcaactacat acccctttcag tttagagcaa agtggtaccc 2220

cacagtacta caccagcaac aggtaatgga ggacataagc aggagcgggc cctttgcacc 2280

taaggtagaa aaaccaagca ctcagctggt aatgaagtac tgttttaact ttaactgggg 2340

cggtaaccct atcattgaac agattgttaa agaccccagc ttccagccca cctatgaaat 2400

acccggtacc ggtaacatcc ctagaagaat acaagtcatc gacccgcggg tcctgggacc 2460

gcactactcg ttccggtcat gggacatgcg cagacacaca tttagcagag caagtattaa 2520

gagagtgtca gaacaacaag aaacttctga ccttgtattc tcaggcccaa aaaagcctcg 2580

ggtcgacatc ccaaaacaag aaacccaaga agaaagctca cattcactcc aaagagaatc 2640

gagaccgtgg gagaccgagg aagaaagcga gacagaagcc ctctcgcaag agagccaaga 2700

ggtccccttc caacagcagt tgcagcagca gtaccaagag cagctcaagc tcagacaggg 2760

aatcaaagtc ctcttcgagc agctcataag gacccaacaa ggggtccatg taaacccatg 2820

cctacggtag gtcccaggca gtggctgttt ccagagagaa agccagcccc agctcctagc 2880

agtggagact gggccatgga gtttctcgca gcaaaaatat ttgataggcc agttagaagc 2940

aaccttaaag atacccctta ctacccatat gttaaaaacc aatacaatgt ctactttgac 3000

cttaaatttg aataaacagc agcttcaaac ttgcaaggcc gtgggagttt cactggtcgg 3060

tgtctacctc taaaggtcac taagcactcc gagcgtaagc gaggagtgcg accctccccc 3120

ctggaacaac ttcttcggag tccggcgcta cgccttcggc tgcgccggac acctcagacc 3180

ccccctccac ccgaaacgct tgcgcgtttc ggaccttcgg cgtcgggggg gtcgggagct 3240

ttattaaacg gactccgaag tgctcttgga cactgagggg gtgaacagca acgaaagtga 3300

gtggggccag acttcgccat aaggccttta tcttcttgcc atttgtcagt gtccggggtc 3360

gccataggct tcgggctcgt ttttaggcct tccggactac aaaaatcgcc attttggtga 3420

cgtcacggcc gccatcttaa gtagttgagg cggacggtgg cgtgagttca aaggtcacca 3480

tcagccacac ctactcaaaa tggtggacaa tttcttccgg gtcaaaggtt acagccgcca 3540

tgttaaaaca cgtgacgtat gacgtcacgg ccgccatttt gtgacacaag atggccgact 3600

tccttcctct ttttcaaaaa aaagcggaag tgccgccgcg gcggcggggg gcggcgcgct 3660

gcgcgcgccg cccagtaggg ggagccatgc gccccccccc gcgcatgcgc ggggcccccc 3720

cccgcggggg gctccgcccc ccggcccccc ccg 3753

<210> 17
<211> 127
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 17
Met Ser Phe Trp Lys Pro Pro Val His Asn Val Thr Gly Ile Gln Arg
1 5 10 15

Met Trp Tyr Glu Ser Phe His Arg Gly His Ala Ser Phe Cys Gly Cys
20 25 30

Gly Asn Pro Ile Leu His Ile Thr Ala Leu Ala Glu Thr Tyr Gly His
35 40 45

Pro Thr Gly Pro Arg Pro Ser Gly Pro Pro Gly Val Asp Pro Asn Pro
50 55 60

His Ile Arg Arg Ala Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Val Asp Ser Arg Pro Ala Leu Thr Trp His Gly Asp Gly Gly Ser Asp
85 90 95

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Pro Val Ala Asp Phe Ala
100 105 110

Asp Asp Gly Leu Asp Gln Leu Val Ala Ala Leu Asp Asp Glu Glu
115 120 125

<210> 18
<211> 268
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 18
Met Ser Phe Trp Lys Pro Pro Val His Asn Val Thr Gly Ile Gln Arg
1 5 10 15

Met Trp Tyr Glu Ser Phe His Arg Gly His Ala Ser Phe Cys Gly Cys
20 25 30

Gly Asn Pro Ile Leu His Ile Thr Ala Leu Ala Glu Thr Tyr Gly His
35 40 45

```
Pro Thr Gly Pro Arg Pro Ser Gly Pro Pro Gly Val Asp Pro Asn Pro
    50                  55                  60

His Ile Arg Arg Ala Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Glu Pro Ser Gln
65                  70                  75                  80

Val Asp Ser Arg Pro Ala Leu Thr Trp His Gly Asp Gly Gly Ser Asp
                85                  90                  95

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Pro Val Ala Asp Phe Ala
            100                 105                 110

Asp Asp Gly Leu Asp Gln Leu Val Ala Ala Leu Asp Asp Glu Glu Leu
        115                 120                 125

Leu Lys Thr Pro Ala Ser Ser Pro Pro Met Lys Tyr Pro Val Pro Val
    130                 135                 140

Thr Ser Leu Glu Glu Tyr Lys Ser Ser Thr Arg Gly Ser Trp Asp Arg
145                 150                 155                 160

Thr Thr Arg Ser Gly His Gly Thr Cys Ala Asp Thr His Leu Ala Glu
                165                 170                 175

Gln Val Leu Arg Glu Cys Gln Asn Asn Lys Lys Leu Leu Thr Leu Tyr
            180                 185                 190

Ser Gln Ala Gln Lys Ser Leu Gly Ser Thr Ser Gln Asn Lys Lys Pro
        195                 200                 205

Lys Lys Lys Ala His Ile His Ser Lys Glu Asn Arg Asp Arg Gly Arg
    210                 215                 220

Pro Arg Lys Lys Ala Arg Gln Lys Pro Ser Arg Lys Arg Ala Lys Arg
225                 230                 235                 240

Ser Pro Ser Asn Ser Ser Cys Ser Ser Ser Thr Lys Ser Ser Ser Ser
```

245 250 255

Ser Asp Arg Glu Ser Lys Ser Ser Ser Ser Ser Ser
260 265

<210> 19
<211> 276
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 19
Met Ser Phe Trp Lys Pro Pro Val His Asn Val Thr Gly Ile Gln Arg
1 5 10 15

Met Trp Tyr Glu Ser Phe His Arg Gly His Ala Ser Phe Cys Gly Cys
20 25 30

Gly Asn Pro Ile Leu His Ile Thr Ala Leu Ala Glu Thr Tyr Gly His
35 40 45

Pro Thr Gly Pro Arg Pro Ser Gly Pro Pro Gly Val Asp Pro Asn Pro
50 55 60

His Ile Arg Arg Ala Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Val Asp Ser Arg Pro Ala Leu Thr Trp His Gly Asp Gly Gly Ser Asp
85 90 95

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Pro Val Ala Asp Phe Ala
100 105 110

Asp Asp Gly Leu Asp Gln Leu Val Ala Ala Leu Asp Asp Glu Glu Pro
115 120 125

Lys Lys Ala Ser Gly Arg His Pro Lys Thr Arg Asn Pro Arg Arg Lys
130 135 140

Leu Thr Phe Thr Pro Lys Arg Ile Glu Thr Val Gly Asp Arg Gly Arg

145 150 155 160

Lys Arg Asp Arg Ser Pro Leu Ala Arg Glu Pro Arg Gly Pro Leu Pro
165 170 175

Thr Ala Val Ala Ala Ala Val Pro Arg Ala Ala Gln Ala Gln Thr Gly
180 185 190

Asn Gln Ser Pro Leu Arg Ala Ala His Lys Asp Pro Thr Arg Gly Pro
195 200 205

Cys Lys Pro Met Pro Thr Val Gly Pro Arg Gln Trp Leu Phe Pro Glu
210 215 220

Arg Lys Pro Ala Pro Ala Pro Ser Ser Gly Asp Trp Ala Met Glu Phe
225 230 235 240

Leu Ala Ala Lys Ile Phe Asp Arg Pro Val Arg Ser Asn Leu Lys Asp
245 250 255

Thr Pro Tyr Tyr Pro Tyr Val Lys Asn Gln Tyr Asn Val Tyr Phe Asp
260 265 270

Leu Lys Phe Glu
275

<210> 20
<211> 167
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 20
Met Ser Phe Trp Lys Pro Pro Val His Asn Val Thr Gly Ile Gln Arg
1 5 10 15

Met Trp Pro Lys Lys Ala Ser Gly Arg His Pro Lys Thr Arg Asn Pro
20 25 30

Arg Arg Lys Leu Thr Phe Thr Pro Lys Arg Ile Glu Thr Val Gly Asp

35 40 45

Arg Gly Arg Lys Arg Asp Arg Ser Pro Leu Ala Arg Glu Pro Arg Gly
50 55 60

Pro Leu Pro Thr Ala Val Ala Ala Ala Val Pro Arg Ala Ala Gln Ala
65 70 75 80

Gln Thr Gly Asn Gln Ser Pro Leu Arg Ala Ala His Lys Asp Pro Thr
85 90 95

Arg Gly Pro Cys Lys Pro Met Pro Thr Val Gly Pro Arg Gln Trp Leu
100 105 110

Phe Pro Glu Arg Lys Pro Ala Pro Ala Pro Ser Ser Gly Asp Trp Ala
115 120 125

Met Glu Phe Leu Ala Ala Lys Ile Phe Asp Arg Pro Val Arg Ser Asn
130 135 140

Leu Lys Asp Thr Pro Tyr Tyr Pro Tyr Val Lys Asn Gln Tyr Asn Val
145 150 155 160

Tyr Phe Asp Leu Lys Phe Glu
165

<210> 21
<211> 743
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 21
Met Ala Trp Gly Trp Trp Lys Arg Arg Arg Arg Trp Trp Phe Arg Lys
1 5 10 15

Arg Trp Thr Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Trp Pro Arg Ser Ala Arg
20 25 30

Arg Arg Pro Arg Arg Arg Arg Val Arg Arg Arg Arg Arg Trp Arg Arg

35 40 45

Gly Arg Arg Lys Thr Arg Thr Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Phe Arg Arg
50 55 60

Arg Gly Arg Lys Ala Lys Leu Ile Ile Lys Leu Trp Gln Pro Ala Val
65 70 75 80

Ile Lys Arg Cys Arg Ile Lys Gly Tyr Ile Pro Leu Ile Ile Ser Gly
85 90 95

Asn Gly Thr Phe Ala Thr Asn Phe Thr Ser His Ile Asn Asp Arg Ile
100 105 110

Met Lys Gly Pro Phe Gly Gly Gly His Ser Thr Met Arg Phe Ser Leu
115 120 125

Tyr Ile Leu Phe Glu Glu His Leu Arg His Met Asn Phe Trp Thr Arg
130 135 140

Ser Asn Asp Asn Leu Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Gly Ala Ser Val Lys
145 150 155 160

Ile Tyr Arg His Pro Asp Gln Asp Phe Ile Val Ile Tyr Asn Arg Arg
165 170 175

Thr Pro Leu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Pro Ser Leu His Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ile Leu Ala Lys His Lys Ile Leu Val Pro Ser Leu Gln Thr
195 200 205

Arg Pro Lys Gly Arg Lys Ala Ile Arg Leu Arg Ile Ala Pro Pro Thr
210 215 220

Leu Phe Thr Asp Lys Trp Tyr Phe Gln Lys Asp Ile Ala Asp Leu Thr
225 230 235 240

Leu Phe Asn Ile Met Ala Val Glu Ala Asp Leu Arg Phe Pro Phe Cys
245 250 255

Ser Pro Gln Thr Asp Asn Thr Cys Ile Ser Phe Gln Val Leu Ser Ser
260 265 270

Val Tyr Asn Asn Tyr Leu Ser Ile Asn Thr Phe Asn Asn Asp Asn Ser
275 280 285

Asp Ser Lys Leu Lys Glu Phe Leu Asn Lys Ala Phe Pro Thr Thr Gly
290 295 300

Thr Lys Gly Thr Ser Leu Asn Ala Leu Asn Thr Phe Arg Thr Glu Gly
305 310 315 320

Cys Ile Ser His Pro Gln Leu Lys Lys Pro Asn Pro Gln Ile Asn Lys
325 330 335

Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Phe Ala Pro Leu Asp Ala Leu Trp Gly Asp
340 345 350

Pro Ile Tyr Tyr Asn Asp Leu Asn Glu Asn Lys Ser Leu Asn Asp Ile
355 360 365

Ile Glu Lys Ile Leu Ile Lys Asn Met Ile Thr Tyr His Ala Lys Leu
370 375 380

Arg Glu Phe Pro Asn Ser Tyr Gln Gly Asn Lys Ala Phe Cys His Leu
385 390 395 400

Thr Gly Ile Tyr Ser Pro Pro Tyr Leu Asn Gln Gly Arg Ile Ser Pro
405 410 415

Glu Ile Phe Gly Leu Tyr Thr Glu Ile Ile Tyr Asn Pro Tyr Thr Asp
420 425 430

Lys Gly Thr Gly Asn Lys Val Trp Met Asp Pro Leu Thr Lys Glu Asn

435 440 445

Asn Ile Tyr Lys Glu Gly Gln Ser Lys Cys Leu Leu Thr Asp Met Pro
450 455 460

Leu Trp Thr Leu Leu Phe Gly Tyr Thr Asp Trp Cys Lys Lys Asp Thr
465 470 475 480

Asn Asn Trp Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Arg Leu Val Leu Ile Cys Pro
485 490 495

Tyr Thr Phe Pro Lys Leu Tyr Asn Glu Lys Val Lys Asp Tyr Gly Tyr
500 505 510

Ile Pro Tyr Ser Tyr Lys Phe Gly Ala Gly Gln Met Pro Asp Gly Ser
515 520 525

Asn Tyr Ile Pro Phe Gln Phe Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Thr Val Leu
530 535 540

His Gln Gln Gln Val Met Glu Asp Ile Ser Arg Ser Gly Pro Phe Ala
545 550 555 560

Pro Lys Val Glu Lys Pro Ser Thr Gln Leu Val Met Lys Tyr Cys Phe
565 570 575

Asn Phe Asn Trp Gly Gly Asn Pro Ile Ile Glu Gln Ile Val Lys Asp
580 585 590

Pro Ser Phe Gln Pro Thr Tyr Glu Ile Pro Gly Thr Gly Asn Ile Pro
595 600 605

Arg Arg Ile Gln Val Ile Asp Pro Arg Val Leu Gly Pro His Tyr Ser
610 615 620

Phe Arg Ser Trp Asp Met Arg Arg His Thr Phe Ser Arg Ala Ser Ile
625 630 635 640

Lys Arg Val Ser Glu Gln Gln Glu Thr Ser Asp Leu Val Phe Ser Gly
645 650 655

Pro Lys Lys Pro Arg Val Asp Ile Pro Lys Gln Glu Thr Gln Glu Glu
660 665 670

Ser Ser His Ser Leu Gln Arg Glu Ser Arg Pro Trp Glu Thr Glu Glu
675 680 685

Glu Ser Glu Thr Glu Ala Leu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Val Pro Phe
690 695 700

Gln Gln Gln Leu Gln Gln Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Lys Leu Arg Gln
705 710 715 720

Gly Ile Lys Val Leu Phe Glu Gln Leu Ile Arg Thr Gln Gln Gly Val
725 730 735

His Val Asn Pro Cys Leu Arg
740

<210> 22
<211> 194
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 22
Met Ala Trp Gly Trp Trp Lys Arg Arg Arg Arg Trp Trp Phe Arg Lys
1 5 10 15

Arg Trp Thr Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Trp Pro Arg Ser Ala Arg
20 25 30

Arg Arg Pro Arg Arg Arg Arg Ile Val Lys Asp Pro Ser Phe Gln Pro
35 40 45

Thr Tyr Glu Ile Pro Gly Thr Gly Asn Ile Pro Arg Arg Ile Gln Val
50 55 60

Ile Asp Pro Arg Val Leu Gly Pro His Tyr Ser Phe Arg Ser Trp Asp
65 70 75 80

Met Arg Arg His Thr Phe Ser Arg Ala Ser Ile Lys Arg Val Ser Glu
85 90 95

Gln Gln Glu Thr Ser Asp Leu Val Phe Ser Gly Pro Lys Lys Pro Arg
100 105 110

Val Asp Ile Pro Lys Gln Glu Thr Gln Glu Glu Ser Ser His Ser Leu
115 120 125

Gln Arg Glu Ser Arg Pro Trp Glu Thr Glu Glu Glu Ser Glu Thr Glu
130 135 140

Ala Leu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Val Pro Phe Gln Gln Gln Leu Gln
145 150 155 160

Gln Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Lys Leu Arg Gln Gly Ile Lys Val Leu
165 170 175

Phe Glu Gln Leu Ile Arg Thr Gln Gln Gly Val His Val Asn Pro Cys
180 185 190

Leu Arg

<210> 23
<211> 113
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 23
Met Ala Trp Gly Trp Trp Lys Arg Arg Arg Arg Trp Trp Phe Arg Lys
1 5 10 15

Arg Trp Thr Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Trp Pro Arg Ser Ala Arg
20 25 30

Arg Arg Pro Arg Arg Arg Arg Ala Gln Lys Ser Leu Gly Ser Thr Ser
35 40 45

Gln Asn Lys Lys Pro Lys Lys Lys Ala His Ile His Ser Lys Glu Asn
50 55 60

Arg Asp Arg Gly Arg Pro Arg Lys Lys Ala Arg Gln Lys Pro Ser Arg
65 70 75 80

Lys Arg Ala Lys Arg Ser Pro Ser Asn Ser Ser Cys Ser Ser Ser Thr
85 90 95

Lys Ser Ser Ser Ser Ser Asp Arg Glu Ser Lys Ser Ser Ser Ser Ser
100 105 110

Ser

<210> 24

<400> 24
000

<210> 25

<400> 25
000

<210> 26

<400> 26
000

<210> 27

<400> 27
000

<210> 28

<400> 28
000

<210> 29

<400> 29
000

<210> 30

<400> 30
000

<210> 31

<400> 31
000

<210> 32

<400> 32
000

<210> 33

<400> 33
000

<210> 34

<400> 34
000

<210> 35

<400> 35
000

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<400> 37
000

<210> 38

<400> 38
000

<210> 39

<400> 39
000

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41

<400> 41
000

<210> 42

<400> 42
000

<210> 43

<400> 43
000

<210> 44

<400> 44
000

<210> 45

<400> 45
000

<210> 46

<400> 46
000

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48

<400> 48
000

<210> 49

<400> 49
000

<210> 50

<400> 50
000

<210> 51

<400> 51
000

<210> 52

<400> 52
000

<210> 53

<400> 53
000

<210> 54
<211> 2979
<212> DNA
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 54
taataaatat tcaacaggaa aaccacctaa tttaaattgc cgaccacaaa ccgtcactta 60

gttccccttt ttgcaacaac ttctgctttt ttccaactgc cggaaaacca cataatttgc 120

atggctaacc acaaactgat atgctaatta acttccacaa aacaacttcc ccttttaaaa 180

ccacacctac aaattaatta ttaaacacag tcacatcctg ggaggtacta ccacactata 240

ataccaagtg cacttccgaa tggctgagtt tatgccgcta gacggagaac gcatcagtta 300

ctgactgcgg actgaacttg ggcgggtgcc gaaggtgagt gaaaccaccg aagtcaaggg 360

gcaattcggg ctagttcagt ctagcggaac gggcaagaaa cttaaaatta ttttatttt 420

cagatgagcg actgctttaa accaacatgc tacaacaaca aaacaaagca aactcactgg 480

attaataacc tgcatttaac ccacgacctg atctgcttct gcccaacacc aactagacac 540

ttattactag ctttagcaga acaacaagaa acaattgaag tgtctaaaca agaaaaagaa 600

aaaataacaa gatgccttat tactacagaa gaagacggta caactacaga cgtcctagat 660

ggtatggacg aggttggatt agacgccctt ttcgcagaag atttcgaaga aaaagaaggg 720

taagacctac ttatactact attcctctaa agcaatggca accgccatat aaaagaacat 780

gctatataaa aggacaagac tgtttaatat actatagcaa cttaagactg ggaatgaata 840

gtacaatgta tgaaaaaagt attgtacctg tacattggcc gggaggggggt tctttttctg 900

taagcatgtt aactttagat gccttgtatg atatacataa actttgtaga aactggtgga 960

catccacaaa ccaagactta ccactagtaa gatataaagg atgcaaaata acattttatc 1020

aaagcacatt tacagactac atagtaagaa tacatacaga actaccagct aacagtaaca 1080

aactaacata cccaaacaca catccactaa tgatgatgat gtctaagtac aaacacatta 1140

tacctagtag acaaacaaga agaaaaaaga aaccatacac aaaaatattt gtaaaaccac 1200

ctccgcaatt tgaaaacaaa tggtactttg ctacagacct ctacaaaatt ccattactac 1260

aaatacactg cacagcatgc aacttacaaa acccatttgt aaaaccagac aaattatcaa 1320

acaatgttac attatggtca ctaaacacca taagcataca aaatagaaac atgtcagtgg 1380

atcaaggaca atcatggcca tttaaaatac taggaacaca aagcttttat ttttactttt 1440

acaccggagc aaacctacca ggtgacacaa cacaaatacc agtagcagac ctattaccac 1500

taacaaaccc aagaataaac agaccaggac aatcactaaa tgaggcaaaa attacagacc 1560

atattacttt cacagaatac aaaaacaaat ttacaaatta ttggggtaac ccatttaata 1620

aacacattca agaacaccta gatatgatac tatactcact aaaaagtcca gaagcaataa 1680

aaaacgaatg gacaacagaa aacatgaaat ggaaccaatt aaacaatgca ggaacaatgg 1740

cattaacacc atttaacgag ccaatattca cacaaataca atataaccca gatagagaca 1800

caggagaaga cactcaatta tacctactct ctaacgctac aggaacagga tgggacccac 1860

caggaattcc agaattaata ctagaaggat ttccactatg gttaatatat tggggatttg 1920

cagactttca aaaaaaccta aaaaaagtaa caaacataga cacaaattac atgttagtag 1980

caaaaacaaa atttacacaa aaacctggca cattctactt agtaatacta aatgacacct 2040

ttgtagaagg caatagccca tatgaaaaac aacctttacc tgaagacaac attaaatggt 2100

acccacaagt acaataccaa ttagaagcac aaaacaaact actacaaact gggccattta 2160

caccaaacat acaaggacaa ctatcagaca atatatcaat gttttataaa ttttacttta 2220

aatggggagg aagcccacca aaagcaatta atgttgaaaa tcctgcccac cagattcaat 2280

atcccatacc ccgtaacgag catgaaacaa cttcgttaca gagtccaggg gaagccccag 2340

aatccatctt atactccttc gactatagac acgggaacta cacaacaaca gctttgtcac 2400

gaattagcca agactgggca cttaaagaca ctgtttctaa aattacagag ccagatcgac 2460

agcaactgct caaacaagcc ctcgaatgcc tgcaaatctc ggaagaaacg caggagaaaa 2520

aagaaaaaga agtacagcag ctcatcagca acctcagaca gcagcagcag ctgtacagag 2580

agcgaataat atcattatta aaggaccaat aacttttaac tgtgtaaaaa aggtgaaatt 2640

gtttgatgat aaaccaaaaa accgtagatt tacacctgag gaatttgaaa ctgagttaca 2700

aatagcaaaa tggttaaaga gacccccaag atcctttgta aatgatcctc ccttttaccc 2760

atggttacca cctgaacctg ttgtaaactt taagcttaat tttactgaat aaaggccagc 2820

attaattcac ttaaggagtc tgtttattta agttaaacct taataaacgg tcaccgcctc 2880

cctaatacgc aggcgcagaa agggggctcc gccccctta accccccaggg ggctccgccc 2940

cctgaaaccc ccaaggggggc tacgcccccct tacaccccc 2979

<210> 55
<211> 99
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 55
Met Ser Asp Cys Phe Lys Pro Thr Cys Tyr Asn Asn Lys Thr Lys Gln
1 5 10 15

Thr His Trp Ile Asn Asn Leu His Leu Thr His Asp Leu Ile Cys Phe
20 25 30

Cys Pro Thr Pro Thr Arg His Leu Leu Leu Ala Leu Ala Glu Gln Gln
35 40 45

Glu Thr Ile Glu Val Ser Lys Gln Glu Lys Glu Lys Ile Thr Arg Cys
50 55 60

Leu Ile Thr Thr Glu Glu Asp Gly Thr Thr Thr Asp Val Leu Asp Gly
65 70 75 80

Met Asp Glu Val Gly Leu Asp Ala Leu Phe Ala Glu Asp Phe Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Gly

<210> 56
<211> 203
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 56

```
Met Ser Asp Cys Phe Lys Pro Thr Cys Tyr Asn Asn Lys Thr Lys Gln
1               5                  10                  15

Thr His Trp Ile Asn Asn Leu His Leu Thr His Asp Leu Ile Cys Phe
            20                  25                  30

Cys Pro Thr Pro Thr Arg His Leu Leu Leu Ala Leu Ala Glu Gln Gln
        35                  40                  45

Glu Thr Ile Glu Val Ser Lys Gln Glu Lys Glu Lys Ile Thr Arg Cys
    50                  55                  60

Leu Ile Thr Thr Glu Glu Asp Gly Thr Thr Thr Asp Val Leu Asp Gly
65                  70                  75                  80

Met Asp Glu Val Gly Leu Asp Ala Leu Phe Ala Glu Asp Phe Glu Glu
                85                  90                  95

Lys Glu Gly Phe Asn Ile Pro Tyr Pro Val Thr Ser Met Lys Gln Leu
            100                 105                 110

Arg Tyr Arg Val Gln Gly Lys Pro Gln Asn Pro Ser Tyr Thr Pro Ser
        115                 120                 125

Thr Ile Asp Thr Gly Thr Thr Gln Gln Gln Leu Cys His Glu Leu Ala
    130                 135                 140

Lys Thr Gly His Leu Lys Thr Leu Phe Leu Lys Leu Gln Ser Gln Ile
145                 150                 155                 160

Asp Ser Asn Cys Ser Asn Lys Pro Ser Asn Ala Cys Lys Ser Arg Lys
                165                 170                 175

Lys Arg Arg Arg Lys Lys Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Ser Ala Thr
            180                 185                 190
```

Ser Asp Ser Ser Ser Ser Cys Thr Glu Ser Glu
195 200

<210> 57
<211> 219
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 57
Met Ser Asp Cys Phe Lys Pro Thr Cys Tyr Asn Asn Lys Thr Lys Gln
1 5 10 15

Thr His Trp Ile Asn Asn Leu His Leu Thr His Asp Leu Ile Cys Phe
20 25 30

Cys Pro Thr Pro Thr Arg His Leu Leu Leu Ala Leu Ala Glu Gln Gln
35 40 45

Glu Thr Ile Glu Val Ser Lys Gln Glu Lys Glu Lys Ile Thr Arg Cys
50 55 60

Leu Ile Thr Thr Glu Glu Asp Gly Thr Thr Thr Asp Val Leu Asp Gly
65 70 75 80

Met Asp Glu Val Gly Leu Asp Ala Leu Phe Ala Glu Asp Phe Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Gly Ala Arg Ser Thr Ala Thr Ala Gln Thr Ser Pro Arg Met
100 105 110

Pro Ala Asn Leu Gly Arg Asn Ala Gly Glu Lys Arg Lys Arg Ser Thr
115 120 125

Ala Ala His Gln Gln Pro Gln Thr Ala Ala Ala Ala Val Gln Arg Ala
130 135 140

Asn Asn Ile Ile Ile Lys Gly Pro Ile Thr Phe Asn Cys Val Lys Lys
145 150 155 160

Val Lys Leu Phe Asp Asp Lys Pro Lys Asn Arg Arg Phe Thr Pro Glu
165 170 175

Glu Phe Glu Thr Glu Leu Gln Ile Ala Lys Trp Leu Lys Arg Pro Pro
180 185 190

Arg Ser Phe Val Asn Asp Pro Pro Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Pro Glu
195 200 205

Pro Val Val Asn Phe Lys Leu Asn Phe Thr Glu
210 215

<210> 58
<211> 666
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 58
Met Pro Tyr Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Tyr Asn Tyr Arg Arg Pro Arg
1 5 10 15

Trp Tyr Gly Arg Gly Trp Ile Arg Arg Pro Phe Arg Arg Arg Phe Arg
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Val Arg Pro Thr Tyr Thr Thr Ile Pro Leu Lys Gln
35 40 45

Trp Gln Pro Pro Tyr Lys Arg Thr Cys Tyr Ile Lys Gly Gln Asp Cys
50 55 60

Leu Ile Tyr Tyr Ser Asn Leu Arg Leu Gly Met Asn Ser Thr Met Tyr
65 70 75 80

Glu Lys Ser Ile Val Pro Val His Trp Pro Gly Gly Gly Ser Phe Ser
85 90 95

Val Ser Met Leu Thr Leu Asp Ala Leu Tyr Asp Ile His Lys Leu Cys
100 105 110

```
Arg Asn Trp Trp Thr Ser Thr Asn Gln Asp Leu Pro Leu Val Arg Tyr
        115                 120                 125

Lys Gly Cys Lys Ile Thr Phe Tyr Gln Ser Thr Phe Thr Asp Tyr Ile
    130                 135                 140

Val Arg Ile His Thr Glu Leu Pro Ala Asn Ser Asn Lys Leu Thr Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Asn Thr His Pro Leu Met Met Met Met Ser Lys Tyr Lys His Ile
                165                 170                 175

Ile Pro Ser Arg Gln Thr Arg Arg Lys Lys Lys Pro Tyr Thr Lys Ile
            180                 185                 190

Phe Val Lys Pro Pro Pro Gln Phe Glu Asn Lys Trp Tyr Phe Ala Thr
        195                 200                 205

Asp Leu Tyr Lys Ile Pro Leu Leu Gln Ile His Cys Thr Ala Cys Asn
    210                 215                 220

Leu Gln Asn Pro Phe Val Lys Pro Asp Lys Leu Ser Asn Asn Val Thr
225                 230                 235                 240

Leu Trp Ser Leu Asn Thr Ile Ser Ile Gln Asn Arg Asn Met Ser Val
                245                 250                 255

Asp Gln Gly Gln Ser Trp Pro Phe Lys Ile Leu Gly Thr Gln Ser Phe
            260                 265                 270

Tyr Phe Tyr Phe Tyr Thr Gly Ala Asn Leu Pro Gly Asp Thr Thr Gln
        275                 280                 285

Ile Pro Val Ala Asp Leu Leu Pro Leu Thr Asn Pro Arg Ile Asn Arg
    290                 295                 300

Pro Gly Gln Ser Leu Asn Glu Ala Lys Ile Thr Asp His Ile Thr Phe
305                 310                 315                 320
```

Thr Glu Tyr Lys Asn Lys Phe Thr Asn Tyr Trp Gly Asn Pro Phe Asn
325 330 335

Lys His Ile Gln Glu His Leu Asp Met Ile Leu Tyr Ser Leu Lys Ser
340 345 350

Pro Glu Ala Ile Lys Asn Glu Trp Thr Thr Glu Asn Met Lys Trp Asn
355 360 365

Gln Leu Asn Asn Ala Gly Thr Met Ala Leu Thr Pro Phe Asn Glu Pro
370 375 380

Ile Phe Thr Gln Ile Gln Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Thr Gly Glu Asp
385 390 395 400

Thr Gln Leu Tyr Leu Leu Ser Asn Ala Thr Gly Thr Gly Trp Asp Pro
405 410 415

Pro Gly Ile Pro Glu Leu Ile Leu Glu Gly Phe Pro Leu Trp Leu Ile
420 425 430

Tyr Trp Gly Phe Ala Asp Phe Gln Lys Asn Leu Lys Lys Val Thr Asn
435 440 445

Ile Asp Thr Asn Tyr Met Leu Val Ala Lys Thr Lys Phe Thr Gln Lys
450 455 460

Pro Gly Thr Phe Tyr Leu Val Ile Leu Asn Asp Thr Phe Val Glu Gly
465 470 475 480

Asn Ser Pro Tyr Glu Lys Gln Pro Leu Pro Glu Asp Asn Ile Lys Trp
485 490 495

Tyr Pro Gln Val Gln Tyr Gln Leu Glu Ala Gln Asn Lys Leu Leu Gln
500 505 510

Thr Gly Pro Phe Thr Pro Asn Ile Gln Gly Gln Leu Ser Asp Asn Ile
515 520 525

Ser Met Phe Tyr Lys Phe Tyr Phe Lys Trp Gly Gly Ser Pro Pro Lys
530 535 540

Ala Ile Asn Val Glu Asn Pro Ala His Gln Ile Gln Tyr Pro Ile Pro
545 550 555 560

Arg Asn Glu His Glu Thr Thr Ser Leu Gln Ser Pro Gly Glu Ala Pro
565 570 575

Glu Ser Ile Leu Tyr Ser Phe Asp Tyr Arg His Gly Asn Tyr Thr Thr
580 585 590

Thr Ala Leu Ser Arg Ile Ser Gln Asp Trp Ala Leu Lys Asp Thr Val
595 600 605

Ser Lys Ile Thr Glu Pro Asp Arg Gln Gln Leu Leu Lys Gln Ala Leu
610 615 620

Glu Cys Leu Gln Ile Ser Glu Glu Thr Gln Glu Lys Lys Glu Lys Glu
625 630 635 640

Val Gln Gln Leu Ile Ser Asn Leu Arg Gln Gln Gln Gln Leu Tyr Arg
645 650 655

Glu Arg Ile Ile Ser Leu Leu Lys Asp Gln
660 665

<210> 59
<211> 148
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 59
Met Pro Tyr Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Tyr Asn Tyr Arg Arg Pro Arg
1 5 10 15

Trp Tyr Gly Arg Gly Trp Ile Arg Arg Pro Phe Arg Arg Arg Phe Arg
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Ile Gln Tyr Pro Ile Pro Arg Asn Glu His Glu Thr
35 40 45

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

Phe Asp Tyr Arg His Gly Asn Tyr Thr Thr Thr Ala Leu Ser Arg Ile
65 70 75 80

Ser Gln Asp Trp Ala Leu Lys Asp Thr Val Ser Lys Ile Thr Glu Pro
85 90 95

Asp Arg Gln Gln Leu Leu Lys Gln Ala Leu Glu Cys Leu Gln Ile Ser
100 105 110

Glu Glu Thr Gln Glu Lys Lys Glu Lys Glu Val Gln Gln Leu Ile Ser
115 120 125

Asn Leu Arg Gln Gln Gln Gln Leu Tyr Arg Glu Arg Ile Ile Ser Leu
130 135 140

Leu Lys Asp Gln
145

<210> 60
<211> 82
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 60
Met Pro Tyr Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Tyr Asn Tyr Arg Arg Pro Arg
1 5 10 15

Trp Tyr Gly Arg Gly Trp Ile Arg Arg Pro Phe Arg Arg Arg Phe Arg
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Ser Gln Ile Asp Ser Asn Cys Ser Asn Lys Pro Ser
35 40 45

Asn Ala Cys Lys Ser Arg Lys Lys Arg Arg Arg Lys Lys Lys Lys Lys
50 55 60

Tyr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Asp Ser Ser Ser Ser Cys Thr Glu
65 70 75 80

Ser Glu

<210> 61

<400> 61
000

<210> 62

<400> 62
000

<210> 63

<400> 63
000

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<400> 65
000

<210> 66

<400> 66
000

<210> 67

<400> 67
000

<210> 68

<400> 68
000

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<400> 70
000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72

<400> 72
000

<210> 73

<400> 73
000

<210> 74

<400> 74
000

<210> 75

<400> 75
000

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<400> 80
000

<210> 81

<400> 81
000

<210> 82

<400> 82
000

<210> 83

<400> 83
000

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87

<400> 87
000

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89

<400> 89
000

<210> 90

<400> 90
000

<210> 91

<400> 91
000

<210> 92

<400> 92
000

<210> 93

<400> 93
000

<210> 94

<400> 94
000

<210> 95

<400> 95
000

<210> 96

<400> 96
000

<210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

<210> 99

<400> 99
000

<210> 100

<400> 100
000

<210> 101

<400> 101
000

<210> 102

<400> 102
000

<210> 103

<400> 103
000

<210> 104

<400> 104
000

<210> 105
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 105
cgggtgccgk aggtgagttt acacaccgma gtcaaggggc aattcgggct crggactggc 60

cgggcyhtgg g 71

<210> 106
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 106
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctwtgg g 71

<210> 107
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 107
cgggtgccgt aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctatgg g 71

<210> 108
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 108
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggccctgg g 71

<210> 109
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 109
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctttgg g 71

<210> 110
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 110
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctatgg g 71

<210> 111
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 111
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgaa gtcaaggggc aattcgggct caggactggc 60

cgggctttgg g 71

<210> 112
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 112
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggcyhtgg g 71

<210> 113
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 113
cgggtgccgt aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctatgg g 71

<210> 114
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 114
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggcccggg 70

<210> 115
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 115
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgaa gtcaaggggc aattcgggct caggactggc 60

cgggctttgg g 71

<210> 116
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 116
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggaggccg 60

ggccatggg 69

<210> 117
<211> 71

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 117
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggccccgg g 71

<210> 118
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 118
cgggtgccgg aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctatgg g 71

<210> 119
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 119
cgggtgccga aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 60

cgggctatgg g 71

<210> 120
<211> 117
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<220>

<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(32)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(46)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(71)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(90)
<223> 可能存在或可能不存在

<220>
<221> misc_feature
<222> (103)..(103)
<223> 可能存在或可能不存在

<400> 120
cggcggsggs gcsscgcgct dcgcgcgcsg cccrsyrggg grdssmmwgc skcsccccccc 60

cscgcgcatg cgcrcgggkc ccccccccyv sgggggggctc cgcccccccg gccccccc 117

<210> 121
<211> 169
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(42)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (53)..(56)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (62)..(62)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (64)..(64)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (97)..(98)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<400> 121
gccgccgcgg cggcggsggn gnsgcgcgct dcgcgcgcsn nncrccrggg ggnnnncwgc 60

sncncccccc cccgcgcatg cgcgggkccc ccccccnncg gggggctccg ccccccggcc 120

cccccccgtg ctaaacccac cgcgcatgcg cgaccacgcc cccgccgcc 169

<210> 122
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (20)..(20)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (40)..(42)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (53)..(56)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (62)..(62)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (64)..(64)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<400> 122
gccgccgcgg cggcggsggn gnsgcgcgct dcgcgcgcsn nncrccrggg ggnnnncwgc 60

sncncccccc cccgcgcat 79

<210> 123
<211> 31
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(19)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<400> 123
gcgcgggkcc cccccccnnc ggggggctcc g 31

<210> 124
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 124
cccccggcc cccccccgtg ctaaacccac cgcgcatgcg cgaccacgcc cccgccgcc 59

<210> 125
<211> 156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 125
gcggcgggggg ggcggccgcg ttcgcgcgcc gcccaccagg gggtgctgcg cgccccccccc 60

cgcgcatgcg cggggcccccc ccccgggggg gctccgcccc cccggcccccc ccccgtgcta 120

aacccaccgc gcatgcgcga ccacgccccc gccgcc 156

<210> 126
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 126
gcggcgg 7

<210> 127
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 127
ggggggcg 7

<210> 128
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 128
gccgcg 6

<210> 129
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 129
ttcgcgcgcc gcccaccagg gggtg 25

<210> 130
<211> 5
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 130

ctgcg 5

<210> 131
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 131
cgcccccccc cgcgcat 17

<210> 132
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 132
gcgcggggcc ccccccc 17

<210> 133
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 133
gggggggctc cgcccccccg gccccccccc gtgctaaacc caccgcgcat gcgcgaccac 60

gcccccgccg cc 72

<210> 134
<211> 115
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 134

cggcggcggc ggcgcgcgcg ctgcgcgcgc gcgccggggg ggcgccagcg ccccccccc 60

cgcgcatgca cgggtccccc cccccacggg gggctccgcc ccccggcccc ccccc 115

<210> 135
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 135
cggcggcggc ggcg 14

<210> 136
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 136
cgcgcgctgc gcgcgcg 17

<210> 137
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 137
cgccgggggg gcgccagcg 19

<210> 138
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 138

ccccccccccc cgcgcat 17

<210> 139
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 139
gcacgggtcc ccccccccac gggggggctcc g 31

<210> 140
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 140
ccccccggcc ccccccc 17

<210> 141
<211> 121
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 141
ccgtcggcgg gggggccgcg cgctgcgcgc gcggcccccg ggggaggcac agcctccccc 60

ccccgcgcgc atgcgcgcgg gtcccccccc ctccgggggg ctccgccccc cggcccccccc 120

c 121

<210> 142
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 142
ccgtcggcgg gggggccgcg cgctgcgcgc gcggccc 37

<210> 143
<211> 84
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 143
ccgggggagg cacagcctcc ccccccccgcg cgcatgcgcg cgggtccccc cccctccggg 60

gggctccgcc ccccggcccc cccc 84

<210> 144
<211> 104
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 144
cggcggcggc gcgcgcgcta cgcgcgcgcg ccgggggggct gccgcccccc ccccgcgcat 60

gcgcggggcc ccccccccgcg gggggctccg cccccccggcc cccc 104

<210> 145
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 145
cggcggcggc g 11

<210> 146
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 146
cgcgcgctac gcgcgcg 17

<210> 147
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 147
cgccgggggg 10

<210> 148
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 148
ctgccgc 7

<210> 149
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 149
ccccccccg cgcat 15

<210> 150
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 150
gcgcggggcc ccccccc 17

<210> 151
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 151
gcgggggggct ccg 13

<210> 152
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 152
ccccccggcc cccc 14

<210> 153
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 153
gccgccgcgg cggcgggggg cggcgcgctg cgcgcgccgc ccagtagggg gagccatgcg 60

ccccccccgg cgcatgcgcg gggcccccgc ccgcgggggg ctccgccccc cggccccccc 120

cg 122

<210> 154
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 154
gccgccgcgg cggcgggggg 19

<210> 155
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 155
gcggcgcgct gcgcgcgccg cccagtaggg ggagccatgc g 41

<210> 156
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 156
ccccccccg cgcat 15

<210> 157
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 157
gcgcggggcc ccccccc 17

<210> 158
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 158
gcgggggggct ccg 13

<210> 159
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 159
ccccccggcc ccccccg 17

<210> 160
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 160
cgcgctgcgc gcgccgccca gtaggggggag ccatgc 36

<210> 161
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 161
ccgccatctt aagtagttga ggcggacggt ggcgtgagtt caaaggtcac catcagccac 60

acctactcaa aatggtgg 78

<210> 162
<211> 172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 162
cttaagtagt tgaggcggac ggtggcgtga gttcaaaggt caccatcagc cacacctact 60

caaaatggtg gacaatttct tccgggtcaa aggttacagc cgccatgtta aaacacgtga 120

cgtatgacgt cacggccgcc attttgtgac acaagatggc cgacttcctt cc 172

<210> 163
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 163
cgcgctgcgc gcgccgccca gtaggggggag ccatgc 36

<210> 164
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 164
gcgctdcgcg cgcgcgccgg ggggctgcgc cccccc 36

<210> 165
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 165
gcgcttcgcg cgccgcccac taggggggcgt tgcgcg 36

<210> 166
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 166
gcgctgcgcg cgccgcccag tagggggcgc aatgcg 36

<210> 167
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 167
gcgctgcgcg cgcggccccc gggggaggca ttgcct 36

<210> 168
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 168
gcgctgcgcg cgcgcgccgg gggggcgcca gcgccc 36

<210> 169
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 169
gcgcttcgcg cgcgcgccgg ggggctccgc cccccc 36

<210> 170
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 170
gcgcttcgcg cgcgcgccgg ggggctgcgc cccccc 36

<210> 171
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 171
gcgctacgcg cgcgcgccgg ggggctgcgc cccccc 36

<210> 172
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 172
gcgctacgcg cgcgcgccgg ggggctctgc cccccc 36

<210> 173

<400> 173
000

<210> 174

<400> 174
000

<210> 175

<400> 175
000

<210> 176

<400> 176

000

<210> 177

<400> 177
000

<210> 178

<400> 178
000

<210> 179

<400> 179
000

<210> 180

<400> 180
000

<210> 181

<400> 181
000

<210> 182

<400> 182
000

<210> 183

<400> 183
000

<210> 184

<400> 184
000

<210> 185
<211> 743
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 185

```
Met Ala Trp Gly Trp Trp Lys Arg Arg Arg Arg Trp Trp Phe Arg Lys
1               5                  10                  15

Arg Trp Thr Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Trp Pro Arg Ser Ala Arg
            20                  25                  30

Arg Arg Pro Arg Arg Arg Arg Val Arg Arg Arg Arg Arg Trp Arg Arg
        35                  40                  45

Gly Arg Arg Lys Thr Arg Thr Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Phe Arg Arg
    50                  55                  60

Arg Gly Arg Lys Ala Lys Leu Ile Ile Lys Leu Trp Gln Pro Ala Val
65                  70                  75                  80

Ile Lys Arg Cys Arg Ile Lys Gly Tyr Ile Pro Leu Ile Ile Ser Gly
                85                  90                  95

Asn Gly Thr Phe Ala Thr Asn Phe Thr Ser His Ile Asn Asp Arg Ile
            100                 105                 110

Met Lys Gly Pro Phe Gly Gly Gly His Ser Thr Met Arg Phe Ser Leu
        115                 120                 125

Tyr Ile Leu Phe Glu Glu His Leu Arg His Met Asn Phe Trp Thr Arg
    130                 135                 140

Ser Asn Asp Asn Leu Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Gly Ala Ser Val Lys
145                 150                 155                 160

Ile Tyr Arg His Pro Asp Gln Asp Phe Ile Val Ile Tyr Asn Arg Arg
                165                 170                 175
```

Thr Pro Leu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Pro Ser Leu His Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ile Leu Ala Lys His Lys Ile Leu Val Pro Ser Leu Gln Thr
195 200 205

Arg Pro Lys Gly Arg Lys Ala Ile Arg Leu Arg Ile Ala Pro Pro Thr
210 215 220

Leu Phe Thr Asp Lys Trp Tyr Phe Gln Lys Asp Ile Ala Asp Leu Thr
225 230 235 240

Leu Phe Asn Ile Met Ala Val Glu Ala Asp Leu Arg Phe Pro Phe Cys
245 250 255

Ser Pro Gln Thr Asp Asn Thr Cys Ile Ser Phe Gln Val Leu Ser Ser
260 265 270

Val Tyr Asn Asn Tyr Leu Ser Ile Asn Thr Phe Asn Asn Asp Asn Ser
275 280 285

Asp Ser Lys Leu Lys Glu Phe Leu Asn Lys Ala Phe Pro Thr Thr Gly
290 295 300

Thr Lys Gly Thr Ser Leu Asn Ala Leu Asn Thr Phe Arg Thr Glu Gly
305 310 315 320

Cys Ile Ser His Pro Gln Leu Lys Lys Pro Asn Pro Gln Ile Asn Lys
325 330 335

Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Phe Ala Pro Leu Asp Ala Leu Trp Gly Asp
340 345 350

Pro Ile Tyr Tyr Asn Asp Leu Asn Glu Asn Lys Ser Leu Asn Asp Ile
355 360 365

Ile Glu Lys Ile Leu Ile Lys Asn Met Ile Thr Tyr His Ala Lys Leu

370 375 380

Arg Glu Phe Pro Asn Ser Tyr Gln Gly Asn Lys Ala Phe Cys His Leu
385 390 395 400

Thr Gly Ile Tyr Ser Pro Pro Tyr Leu Asn Gln Gly Arg Ile Ser Pro
405 410 415

Glu Ile Phe Gly Leu Tyr Thr Glu Ile Ile Tyr Asn Pro Tyr Thr Asp
420 425 430

Lys Gly Thr Gly Asn Lys Val Trp Met Asp Pro Leu Thr Lys Glu Asn
435 440 445

Asn Ile Tyr Lys Glu Gly Gln Ser Lys Cys Leu Leu Thr Asp Met Pro
450 455 460

Leu Trp Thr Leu Leu Phe Gly Tyr Thr Asp Trp Cys Lys Lys Asp Thr
465 470 475 480

Asn Asn Trp Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Arg Leu Val Leu Ile Cys Pro
485 490 495

Tyr Thr Phe Pro Lys Leu Tyr Asn Glu Lys Val Lys Asp Tyr Gly Tyr
500 505 510

Ile Pro Tyr Ser Tyr Lys Phe Gly Ala Gly Gln Met Pro Asp Gly Ser
515 520 525

Asn Tyr Ile Pro Phe Gln Phe Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Thr Val Leu
530 535 540

His Gln Gln Gln Val Met Glu Asp Ile Ser Arg Ser Gly Pro Phe Ala
545 550 555 560

Pro Lys Val Glu Lys Pro Ser Thr Gln Leu Val Met Lys Tyr Cys Phe
565 570 575

```
Asn Phe Asn Trp Gly Gly Asn Pro Ile Ile Glu Gln Ile Val Lys Asp
            580                 585                 590

Pro Ser Phe Gln Pro Thr Tyr Glu Ile Pro Gly Thr Gly Asn Ile Pro
        595                 600                 605

Arg Arg Ile Gln Val Ile Asp Pro Arg Val Leu Gly Pro His Tyr Ser
    610                 615                 620

Phe Arg Ser Trp Asp Met Arg Arg His Thr Phe Ser Arg Ala Ser Ile
625                 630                 635                 640

Lys Arg Val Ser Glu Gln Gln Glu Thr Ser Asp Leu Val Phe Ser Gly
                645                 650                 655

Pro Lys Lys Pro Arg Val Asp Ile Pro Lys Gln Glu Thr Gln Glu Glu
            660                 665                 670

Ser Ser His Ser Leu Gln Arg Glu Ser Arg Pro Trp Glu Thr Glu Glu
        675                 680                 685

Glu Ser Glu Thr Glu Ala Leu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Val Pro Phe
    690                 695                 700

Gln Gln Gln Leu Gln Gln Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Lys Leu Arg Gln
705                 710                 715                 720

Gly Ile Lys Val Leu Phe Glu Gln Leu Ile Arg Thr Gln Gln Gly Val
                725                 730                 735

His Val Asn Pro Cys Leu Arg
            740
```

<210> 186
<211> 68
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 186
Met Ala Trp Gly Trp Trp Lys Arg Arg Arg Arg Trp Trp Phe Arg Lys
1 5 10 15

Arg Trp Thr Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Trp Pro Arg Ser Ala Arg
20 25 30

Arg Arg Pro Arg Arg Arg Arg Val Arg Arg Arg Arg Arg Trp Arg Arg
35 40 45

Gly Arg Arg Lys Thr Arg Thr Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Phe Arg Arg
50 55 60

Arg Gly Arg Lys
65

<210> 187
<211> 212
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 187
Ala Lys Leu Ile Ile Lys Leu Trp Gln Pro Ala Val Ile Lys Arg Cys
1 5 10 15

Arg Ile Lys Gly Tyr Ile Pro Leu Ile Ile Ser Gly Asn Gly Thr Phe
20 25 30

Ala Thr Asn Phe Thr Ser His Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Gly Pro
35 40 45

Phe Gly Gly Gly His Ser Thr Met Arg Phe Ser Leu Tyr Ile Leu Phe
50 55 60

Glu Glu His Leu Arg His Met Asn Phe Trp Thr Arg Ser Asn Asp Asn
65 70 75 80

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

Pro Asp Gln Asp Phe Ile Val Ile Tyr Asn Arg Arg Thr Pro Leu Gly
100 105 110

Gly Asn Ile Tyr Thr Ala Pro Ser Leu His Pro Gly Asn Ala Ile Leu
115 120 125

Ala Lys His Lys Ile Leu Val Pro Ser Leu Gln Thr Arg Pro Lys Gly
130 135 140

Arg Lys Ala Ile Arg Leu Arg Ile Ala Pro Pro Thr Leu Phe Thr Asp
145 150 155 160

Lys Trp Tyr Phe Gln Lys Asp Ile Ala Asp Leu Thr Leu Phe Asn Ile
165 170 175

Met Ala Val Glu Ala Asp Leu Arg Phe Pro Phe Cys Ser Pro Gln Thr
180 185 190

Asp Asn Thr Cys Ile Ser Phe Gln Val Leu Ser Ser Val Tyr Asn Asn
195 200 205

Tyr Leu Ser Ile
210

<210> 188
<211> 133
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 188
Asn Thr Phe Asn Asn Asp Asn Ser Asp Ser Lys Leu Lys Glu Phe Leu
1 5 10 15

Asn Lys Ala Phe Pro Thr Thr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Leu Asn Ala
20 25 30

Leu Asn Thr Phe Arg Thr Glu Gly Cys Ile Ser His Pro Gln Leu Lys
35 40 45

Lys Pro Asn Pro Gln Ile Asn Lys Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Phe Ala
50 55 60

Pro Leu Asp Ala Leu Trp Gly Asp Pro Ile Tyr Tyr Asn Asp Leu Asn
65 70 75 80

Glu Asn Lys Ser Leu Asn Asp Ile Ile Glu Lys Ile Leu Ile Lys Asn
85 90 95

Met Ile Thr Tyr His Ala Lys Leu Arg Glu Phe Pro Asn Ser Tyr Gln
100 105 110

Gly Asn Lys Ala Phe Cys His Leu Thr Gly Ile Tyr Ser Pro Pro Tyr
115 120 125

Leu Asn Gln Gly Arg
130

<210> 189
<211> 166
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 189
Ile Ser Pro Glu Ile Phe Gly Leu Tyr Thr Glu Ile Ile Tyr Asn Pro
1 5 10 15

Tyr Thr Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Val Trp Met Asp Pro Leu Thr
20 25 30

Lys Glu Asn Asn Ile Tyr Lys Glu Gly Gln Ser Lys Cys Leu Leu Thr
35 40 45

Asp Met Pro Leu Trp Thr Leu Leu Phe Gly Tyr Thr Asp Trp Cys Lys
50 55 60

Lys Asp Thr Asn Asn Trp Asp Leu Pro Leu Asn Tyr Arg Leu Val Leu
65 70 75 80

Ile Cys Pro Tyr Thr Phe Pro Lys Leu Tyr Asn Glu Lys Val Lys Asp
85 90 95

Tyr Gly Tyr Ile Pro Tyr Ser Tyr Lys Phe Gly Ala Gly Gln Met Pro
100 105 110

Asp Gly Ser Asn Tyr Ile Pro Phe Gln Phe Arg Ala Lys Trp Tyr Pro
115 120 125

Thr Val Leu His Gln Gln Gln Val Met Glu Asp Ile Ser Arg Ser Gly
130 135 140

Pro Phe Ala Pro Lys Val Glu Lys Pro Ser Thr Gln Leu Val Met Lys
145 150 155 160

Tyr Cys Phe Asn Phe Asn
165

<210> 190
<211> 164
<212> PRT
<213> 甲型細環病毒屬

<400> 190
Trp Gly Gly Asn Pro Ile Ile Glu Gln Ile Val Lys Asp Pro Ser Phe
1 5 10 15

Gln Pro Thr Tyr Glu Ile Pro Gly Thr Gly Asn Ile Pro Arg Arg Ile
20 25 30

Gln Val Ile Asp Pro Arg Val Leu Gly Pro His Tyr Ser Phe Arg Ser
35 40 45

Trp Asp Met Arg Arg His Thr Phe Ser Arg Ala Ser Ile Lys Arg Val
50 55 60

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

Pro Arg Val Asp Ile Pro Lys Gln Glu Thr Gln Glu Glu Ser Ser His
85 90 95

Ser Leu Gln Arg Glu Ser Arg Pro Trp Glu Thr Glu Glu Glu Ser Glu
100 105 110

Thr Glu Ala Leu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Val Pro Phe Gln Gln Gln
115 120 125

Leu Gln Gln Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Lys Leu Arg Gln Gly Ile Lys
130 135 140

Val Leu Phe Glu Gln Leu Ile Arg Thr Gln Gln Gly Val His Val Asn
145 150 155 160

Pro Cys Leu Arg

<210> 191

<400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

<210> 200

<400> 200
000

<210> 201

<400> 201
000

<210> 202

<400> 202
000

<210> 203

<400> 203

000

<210> 204

<400> 204
000

<210> 205

<400> 205
000

<210> 206

<400> 206
000

<210> 207

<400> 207
000

<210> 208

<400> 208
000

<210> 209

<400> 209
000

<210> 210

<400> 210
000

<210> 211

<400> 211
000

<210> 212

<400> 212
000

<210> 213

<400> 213
000

<210> 214

<400> 214
000

<210> 215
<211> 666
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 215

```
Met Pro Tyr Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Tyr Asn Tyr Arg Arg Pro Arg
1               5                  10                  15

Trp Tyr Gly Arg Gly Trp Ile Arg Arg Pro Phe Arg Arg Arg Phe Arg
            20                  25                  30

Arg Lys Arg Arg Val Arg Pro Thr Tyr Thr Thr Ile Pro Leu Lys Gln
        35                  40                  45

Trp Gln Pro Pro Tyr Lys Arg Thr Cys Tyr Ile Lys Gly Gln Asp Cys
    50                  55                  60

Leu Ile Tyr Tyr Ser Asn Leu Arg Leu Gly Met Asn Ser Thr Met Tyr
65                  70                  75                  80

Glu Lys Ser Ile Val Pro Val His Trp Pro Gly Gly Gly Ser Phe Ser
                85                  90                  95

Val Ser Met Leu Thr Leu Asp Ala Leu Tyr Asp Ile His Lys Leu Cys
```

100 105 110

Arg Asn Trp Trp Thr Ser Thr Asn Gln Asp Leu Pro Leu Val Arg Tyr
115 120 125

Lys Gly Cys Lys Ile Thr Phe Tyr Gln Ser Thr Phe Thr Asp Tyr Ile
130 135 140

Val Arg Ile His Thr Glu Leu Pro Ala Asn Ser Asn Lys Leu Thr Tyr
145 150 155 160

Pro Asn Thr His Pro Leu Met Met Met Met Ser Lys Tyr Lys His Ile
165 170 175

Ile Pro Ser Arg Gln Thr Arg Arg Lys Lys Lys Pro Tyr Thr Lys Ile
180 185 190

Phe Val Lys Pro Pro Pro Gln Phe Glu Asn Lys Trp Tyr Phe Ala Thr
195 200 205

Asp Leu Tyr Lys Ile Pro Leu Leu Gln Ile His Cys Thr Ala Cys Asn
210 215 220

Leu Gln Asn Pro Phe Val Lys Pro Asp Lys Leu Ser Asn Asn Val Thr
225 230 235 240

Leu Trp Ser Leu Asn Thr Ile Ser Ile Gln Asn Arg Asn Met Ser Val
245 250 255

Asp Gln Gly Gln Ser Trp Pro Phe Lys Ile Leu Gly Thr Gln Ser Phe
260 265 270

Tyr Phe Tyr Phe Tyr Thr Gly Ala Asn Leu Pro Gly Asp Thr Thr Gln
275 280 285

Ile Pro Val Ala Asp Leu Leu Pro Leu Thr Asn Pro Arg Ile Asn Arg
290 295 300

Pro Gly Gln Ser Leu Asn Glu Ala Lys Ile Thr Asp His Ile Thr Phe
305 310 315 320

Thr Glu Tyr Lys Asn Lys Phe Thr Asn Tyr Trp Gly Asn Pro Phe Asn
325 330 335

Lys His Ile Gln Glu His Leu Asp Met Ile Leu Tyr Ser Leu Lys Ser
340 345 350

Pro Glu Ala Ile Lys Asn Glu Trp Thr Thr Glu Asn Met Lys Trp Asn
355 360 365

Gln Leu Asn Asn Ala Gly Thr Met Ala Leu Thr Pro Phe Asn Glu Pro
370 375 380

Ile Phe Thr Gln Ile Gln Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Thr Gly Glu Asp
385 390 395 400

Thr Gln Leu Tyr Leu Leu Ser Asn Ala Thr Gly Thr Gly Trp Asp Pro
405 410 415

Pro Gly Ile Pro Glu Leu Ile Leu Glu Gly Phe Pro Leu Trp Leu Ile
420 425 430

Tyr Trp Gly Phe Ala Asp Phe Gln Lys Asn Leu Lys Lys Val Thr Asn
435 440 445

Ile Asp Thr Asn Tyr Met Leu Val Ala Lys Thr Lys Phe Thr Gln Lys
450 455 460

Pro Gly Thr Phe Tyr Leu Val Ile Leu Asn Asp Thr Phe Val Glu Gly
465 470 475 480

Asn Ser Pro Tyr Glu Lys Gln Pro Leu Pro Glu Asp Asn Ile Lys Trp
485 490 495

Tyr Pro Gln Val Gln Tyr Gln Leu Glu Ala Gln Asn Lys Leu Leu Gln

500 505 510

Thr Gly Pro Phe Thr Pro Asn Ile Gln Gly Gln Leu Ser Asp Asn Ile
515 520 525

Ser Met Phe Tyr Lys Phe Tyr Phe Lys Trp Gly Gly Ser Pro Pro Lys
530 535 540

Ala Ile Asn Val Glu Asn Pro Ala His Gln Ile Gln Tyr Pro Ile Pro
545 550 555 560

Arg Asn Glu His Glu Thr Thr Ser Leu Gln Ser Pro Gly Glu Ala Pro
565 570 575

Glu Ser Ile Leu Tyr Ser Phe Asp Tyr Arg His Gly Asn Tyr Thr Thr
580 585 590

Thr Ala Leu Ser Arg Ile Ser Gln Asp Trp Ala Leu Lys Asp Thr Val
595 600 605

Ser Lys Ile Thr Glu Pro Asp Arg Gln Gln Leu Leu Lys Gln Ala Leu
610 615 620

Glu Cys Leu Gln Ile Ser Glu Glu Thr Gln Glu Lys Lys Glu Lys Glu
625 630 635 640

Val Gln Gln Leu Ile Ser Asn Leu Arg Gln Gln Gln Gln Leu Tyr Arg
645 650 655

Glu Arg Ile Ile Ser Leu Leu Lys Asp Gln
660 665

<210> 216
<211> 38
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 216
Met Pro Tyr Tyr Tyr Arg Arg Arg Arg Tyr Asn Tyr Arg Arg Pro Arg

1 5 10 15

Trp Tyr Gly Arg Gly Trp Ile Arg Arg Pro Phe Arg Arg Arg Phe Arg
20 25 30

Arg Lys Arg Arg Val Arg
35

<210> 217
<211> 208
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 217
Pro Thr Tyr Thr Thr Ile Pro Leu Lys Gln Trp Gln Pro Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Arg Thr Cys Tyr Ile Lys Gly Gln Asp Cys Leu Ile Tyr Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Arg Leu Gly Met Asn Ser Thr Met Tyr Glu Lys Ser Ile Val Pro
35 40 45

Val His Trp Pro Gly Gly Gly Ser Phe Ser Val Ser Met Leu Thr Leu
50 55 60

Asp Ala Leu Tyr Asp Ile His Lys Leu Cys Arg Asn Trp Trp Thr Ser
65 70 75 80

Thr Asn Gln Asp Leu Pro Leu Val Arg Tyr Lys Gly Cys Lys Ile Thr
85 90 95

Phe Tyr Gln Ser Thr Phe Thr Asp Tyr Ile Val Arg Ile His Thr Glu
100 105 110

Leu Pro Ala Asn Ser Asn Lys Leu Thr Tyr Pro Asn Thr His Pro Leu
115 120 125

Met Met Met Met Ser Lys Tyr Lys His Ile Ile Pro Ser Arg Gln Thr

130 135 140

Arg Arg Lys Lys Lys Pro Tyr Thr Lys Ile Phe Val Lys Pro Pro Pro
145 150 155 160

Gln Phe Glu Asn Lys Trp Tyr Phe Ala Thr Asp Leu Tyr Lys Ile Pro
165 170 175

Leu Leu Gln Ile His Cys Thr Ala Cys Asn Leu Gln Asn Pro Phe Val
180 185 190

Lys Pro Asp Lys Leu Ser Asn Asn Val Thr Leu Trp Ser Leu Asn Thr
195 200 205

<210> 218
<211> 128
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 218
Ile Ser Ile Gln Asn Arg Asn Met Ser Val Asp Gln Gly Gln Ser Trp
1 5 10 15

Pro Phe Lys Ile Leu Gly Thr Gln Ser Phe Tyr Phe Tyr Phe Tyr Thr
20 25 30

Gly Ala Asn Leu Pro Gly Asp Thr Thr Gln Ile Pro Val Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Pro Leu Thr Asn Pro Arg Ile Asn Arg Pro Gly Gln Ser Leu Asn
50 55 60

Glu Ala Lys Ile Thr Asp His Ile Thr Phe Thr Glu Tyr Lys Asn Lys
65 70 75 80

Phe Thr Asn Tyr Trp Gly Asn Pro Phe Asn Lys His Ile Gln Glu His
85 90 95

Leu Asp Met Ile Leu Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Glu Ala Ile Lys Asn

100 105 110

Glu Trp Thr Thr Glu Asn Met Lys Trp Asn Gln Leu Asn Asn Ala Gly
115 120 125

<210> 219
<211> 163
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 219
Thr Met Ala Leu Thr Pro Phe Asn Glu Pro Ile Phe Thr Gln Ile Gln
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Asp Arg Asp Thr Gly Glu Asp Thr Gln Leu Tyr Leu Leu
20 25 30

Ser Asn Ala Thr Gly Thr Gly Trp Asp Pro Pro Gly Ile Pro Glu Leu
35 40 45

Ile Leu Glu Gly Phe Pro Leu Trp Leu Ile Tyr Trp Gly Phe Ala Asp
50 55 60

Phe Gln Lys Asn Leu Lys Lys Val Thr Asn Ile Asp Thr Asn Tyr Met
65 70 75 80

Leu Val Ala Lys Thr Lys Phe Thr Gln Lys Pro Gly Thr Phe Tyr Leu
85 90 95

Val Ile Leu Asn Asp Thr Phe Val Glu Gly Asn Ser Pro Tyr Glu Lys
100 105 110

Gln Pro Leu Pro Glu Asp Asn Ile Lys Trp Tyr Pro Gln Val Gln Tyr
115 120 125

Gln Leu Glu Ala Gln Asn Lys Leu Leu Gln Thr Gly Pro Phe Thr Pro
130 135 140

Asn Ile Gln Gly Gln Leu Ser Asp Asn Ile Ser Met Phe Tyr Lys Phe

145 150 155 160

Tyr Phe Lys

<210> 220
<211> 129
<212> PRT
<213> 乙型細環病毒屬

<400> 220
Trp Gly Gly Ser Pro Pro Lys Ala Ile Asn Val Glu Asn Pro Ala His
1 5 10 15

Gln Ile Gln Tyr Pro Ile Pro Arg Asn Glu His Glu Thr Thr Ser Leu
20 25 30

Gln Ser Pro Gly Glu Ala Pro Glu Ser Ile Leu Tyr Ser Phe Asp Tyr
35 40 45

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

Trp Ala Leu Lys Asp Thr Val Ser Lys Ile Thr Glu Pro Asp Arg Gln
65 70 75 80

Gln Leu Leu Lys Gln Ala Leu Glu Cys Leu Gln Ile Ser Glu Glu Thr
85 90 95

Gln Glu Lys Lys Glu Lys Glu Val Gln Gln Leu Ile Ser Asn Leu Arg
100 105 110

Gln Gln Gln Gln Leu Tyr Arg Glu Arg Ile Ile Ser Leu Leu Lys Asp
115 120 125

Gln

<210> 221

<400> 221
000

<210> 222

<400> 222
000

<210> 223

<400> 223
000

<210> 224

<400> 224
000

<210> 225

<400> 225
000

<210> 226

<400> 226
000

<210> 227
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(31)
<223> 任何胺基酸

<220>

<221> SITE
<222> (29)..(31)
<223> 此區域可能包括0-3個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (100)..(100)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(129)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (125)..(129)
<223> 此區域可能包括1-5個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (181)..(181)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (211)..(211)
<223> 任何胺基酸

<400> 227

```
Leu Val Leu Thr Gln Trp Gln Pro Asn Thr Val Arg Arg Cys Tyr Ile
1               5                  10                  15


Arg Gly Tyr Leu Pro Leu Ile Ile Cys Gly Glu Asn Xaa Xaa Xaa Thr
            20                  25                  30


Thr Ser Arg Asn Tyr Ala Thr His Ser Asp Asp Thr Ile Gln Lys Gly
        35                  40                  45


Pro Phe Gly Gly Gly Met Ser Thr Thr Thr Phe Ser Leu Arg Val Leu
    50                  55                  60


Tyr Asp Glu Tyr Gln Arg Phe Met Asn Arg Trp Thr Tyr Ser Asn Glu
65                  70                  75                  80
```

Asp Leu Asp Leu Ala Arg Tyr Leu Gly Cys Lys Phe Thr Phe Tyr Arg
85 90 95

His Pro Asp Xaa Asp Phe Ile Val Gln Tyr Asn Thr Asn Pro Pro Phe
100 105 110

Lys Asp Thr Lys Leu Thr Ala Pro Ser Ile His Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Gly Met Leu Met Leu Ser Lys Arg Lys Ile Leu Ile Pro Ser Leu
130 135 140

Lys Thr Arg Pro Lys Gly Lys His Tyr Val Lys Val Arg Ile Gly Pro
145 150 155 160

Pro Lys Leu Phe Glu Asp Lys Trp Tyr Thr Gln Ser Asp Leu Cys Asp
165 170 175

Val Pro Leu Val Xaa Leu Tyr Ala Thr Ala Ala Asp Leu Gln His Pro
180 185 190

Phe Gly Ser Pro Gln Thr Asp Asn Pro Cys Val Thr Phe Gln Val Leu
195 200 205

Gly Ser Xaa Tyr Asn Lys His Leu Ser Ile Ser Pro
210 215 220

<210> 228
<211> 172
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(38)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(46)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (44)..(46)
<223> 此區域可能包括0-3個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (77)..(77)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (79)..(79)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (98)..(101)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (98)..(101)
<223> 此區域可能包括0-4個殘基

<400> 228
Ser Asn Phe Glu Phe Pro Gly Ala Tyr Thr Asp Ile Thr Tyr Asn Pro
1 5 10 15

Leu Thr Asp Lys Gly Val Gly Asn Met Val Trp Ile Gln Tyr Leu Thr
20 25 30

Lys Pro Asp Thr Ile Xaa Asp Lys Thr Gln Ser Xaa Xaa Xaa Lys Cys
35 40 45

Leu Ile Glu Asp Leu Pro Leu Trp Ala Ala Leu Tyr Gly Tyr Val Asp
50 55 60

Phe Cys Glu Lys Glu Thr Gly Asp Ser Ala Ile Ile Xaa Asn Xaa Gly
65 70 75 80

Arg Val Leu Ile Arg Cys Pro Tyr Thr Lys Pro Pro Leu Tyr Asp Lys
85 90 95

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Lys Gly Phe Val Pro Tyr Ser Thr Asn Phe
100 105 110

Gly Asn Gly Lys Met Pro Gly Gly Ser Gly Tyr Val Pro Ile Tyr Trp
115 120 125

Arg Ala Arg Trp Tyr Pro Thr Leu Phe His Gln Lys Glu Val Leu Glu
130 135 140

Asp Ile Val Gln Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Lys Asp Glu Lys Pro Ser
145 150 155 160

Thr Gln Leu Val Met Lys Tyr Cys Phe Asn Phe Asn
165 170

<210> 229
<211> 258
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(22)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (20)..(22)
<223> 此區域可能包括0-3個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES
<222> (78)..(78)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (89)..(89)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (91)..(91)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (95)..(98)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (95)..(98)
<223> 此區域可能包括1-4個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (107)..(120)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (107)..(120)
<223> 此區域可能包括2-14個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (129)..(129)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (139)..(168)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (139)..(168)
<223> 此區域可能包括0-30個殘基

<220>

<221> MOD_RES
<222> (201)..(204)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (201)..(204)
<223> 此區域可能包括0-4個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (219)..(258)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (219)..(258)
<223> 此區域可能包括0-40個殘基

<400> 229

```
Trp Gly Gly Asn Pro Ile Ser Gln Gln Val Val Arg Asn Pro Cys Lys
1               5                  10                  15

Asp Ser Gly Xaa Xaa Xaa Ser Gly Xaa Gly Arg Gln Pro Arg Ser Val
            20                  25                  30

Gln Val Val Asp Pro Lys Tyr Met Gly Pro Glu Tyr Thr Phe His Ser
        35                  40                  45

Trp Asp Trp Arg Arg Gly Leu Phe Gly Glu Lys Ala Ile Lys Arg Met
    50                  55                  60

Ser Glu Gln Pro Thr Asp Asp Glu Ile Phe Thr Gly Gly Xaa Pro Lys
65                  70                  75                  80

Arg Pro Arg Arg Asp Pro Pro Thr Xaa Gln Xaa Pro Glu Glu Xaa Xaa
                85                  90                  95

Xaa Xaa Gln Lys Glu Ser Ser Ser Phe Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            100                 105                 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Trp Glu Ser Ser Ser Gln Glu
        115                 120                 125
```

Xaa Glu Ser Glu Ser Gln Glu Glu Glu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
130 135 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145 150 155 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Gln Thr Val Gln Gln Gln Leu
165 170 175

Arg Gln Gln Leu Arg Glu Gln Arg Arg Leu Arg Val Gln Leu Gln Leu
180 185 190

Leu Phe Gln Gln Leu Leu Lys Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Ala Gly Leu
195 200 205

His Ile Asn Pro Leu Leu Leu Ser Gln Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
210 215 220

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
225 230 235 240

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
245 250 255

Xaa Xaa

<210> 230
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (136)..(136)

<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (138)..(141)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (138)..(141)
<223> 此區域可能包括1-4個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (179)..(179)
<223> 任何胺基酸

<400> 230

```
Leu Lys Gln Trp Gln Pro Ser Thr Ile Arg Lys Cys Lys Ile Lys Gly
1               5                  10                  15

Tyr Leu Pro Leu Phe Gln Cys Gly Lys Gly Arg Ile Ser Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Thr Gln Tyr Lys Glu Ser Ile Val Pro His His Glu Pro Gly Gly Gly
        35                  40                  45

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

Leu Lys Leu Arg Asn Trp Trp Thr Lys Ser Asn Asp Gly Leu Pro Leu
65                  70                  75                  80

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

Asp Tyr Ile Val Thr Tyr Gln Arg Cys Tyr Pro Met Thr Ala Thr Lys
            100                 105                 110

Leu Thr Tyr Leu Ser Thr Gln Pro Ser Arg Met Leu Met Asn Lys His
        115                 120                 125
```

Lys Ile Ile Val Pro Ser Lys Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Lys Lys
130 135 140

Lys Lys Pro Tyr Lys Lys Ile Phe Ile Lys Pro Pro Ser Gln Met Gln
145 150 155 160

Asn Lys Trp Tyr Phe Gln Gln Asp Ile Ala Asn Thr Pro Leu Leu Gln
165 170 175

Leu Thr Xaa Thr Ala Cys Ser Leu Asp Arg Met Tyr Leu Ser Ser Asp
180 185 190

Ser Ile Ser Asn Asn Ile Thr Phe Thr Ser Leu Asn Thr Asn Phe Phe
195 200 205

Gln Asn Pro Asn Phe Gln
210

<210> 231
<211> 187
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(10)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(10)
<223> 此區域可能包括4-10個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (38)..(45)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE

<222> (38)..(45)
<223> 此區域可能包括1-8個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (94)..(94)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (100)..(102)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (100)..(102)
<223> 此區域可能包括1-3個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (112)..(112)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (114)..(115)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (114)..(115)
<223> 此區域可能包括0-2個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (124)..(139)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (124)..(139)
<223> 此區域可能包括3-16個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (154)..(154)
<223> 任何胺基酸

<400> 231
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Pro Leu Tyr Phe Glu

1 5 10 15

Cys Arg Tyr Asn Pro Phe Lys Asp Lys Gly Thr Gly Asn Lys Val Tyr
20 25 30

Leu Val Ser Asn Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gly Trp
35 40 45

Asp Pro Pro Thr Asp Pro Asp Leu Ile Ile Glu Gly Phe Pro Leu Trp
50 55 60

Leu Leu Leu Trp Gly Trp Leu Asp Trp Gln Lys Lys Leu Gly Lys Ile
65 70 75 80

Gln Asn Ile Asp Thr Asp Tyr Ile Leu Val Ile Gln Ser Xaa Tyr Tyr
85 90 95

Ile Pro Pro Xaa Xaa Xaa Lys Leu Pro Tyr Tyr Val Pro Leu Asp Xaa
100 105 110

Asp Xaa Xaa Phe Leu His Gly Arg Ser Pro Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
115 120 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Ser Asp Lys Gln
130 135 140

His Trp His Pro Lys Val Arg Phe Gln Xaa Glu Thr Ile Asn Asn Ile
145 150 155 160

Ala Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Lys Leu Pro Asn Gln Lys Ser Ile
165 170 175

Gln Ala His Met Lys Tyr Lys Phe Tyr Phe Lys
180 185

<210> 232
<211> 163
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (65)..(65)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (77)..(78)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (86)..(87)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (96)..(96)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (102)..(106)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (102)..(106)
<223> 此區域可能包括0-5個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (135)..(135)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (138)..(163)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (138)..(163)
<223> 此區域可能包括0-26個殘基

<400> 232

```
Trp Gly Gly Cys Pro Ala Pro Met Glu Thr Ile Thr Asp Pro Cys Lys
1               5                  10                  15

Gln Pro Lys Tyr Pro Ile Pro Asn Asn Leu Leu Gln Thr Thr Ser Leu
            20                  25                  30

Gln Xaa Pro Thr Thr Pro Ile Glu Thr Tyr Leu Tyr Lys Phe Asp Glu
        35                  40                  45

Arg Arg Gly Leu Leu Thr Lys Lys Ala Ala Lys Arg Ile Lys Lys Asp
    50                  55                  60

Xaa Thr Thr Glu Thr Thr Leu Phe Thr Asp Thr Gly Xaa Xaa Thr Ser
65                  70                  75                  80

Thr Thr Leu Pro Thr Xaa Xaa Gln Thr Glu Thr Thr Gln Glu Glu Xaa
                85                  90                  95

Thr Ser Glu Glu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Thr Leu Leu Gln Gln
            100                 105                 110

Leu Gln Gln Leu Arg Arg Lys Gln Lys Gln Leu Arg Xaa Arg Ile Leu
        115                 120                 125

Gln Leu Leu Gln Leu Leu Xaa Leu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    130                 135                 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
145                 150                 155                 160
```

Xaa Xaa Xaa

<210> 233
<211> 203
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (79)..(79)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (104)..(104)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (116)..(116)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (120)..(121)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (170)..(170)
<223> 任何胺基酸

<400> 233
Thr Ile Pro Leu Lys Gln Trp Gln Pro Glu Ser Ile Arg Lys Cys Lys
1 5 10 15

Ile Lys Gly Tyr Gly Thr Leu Val Leu Gly Ala Glu Gly Arg Gln Phe
20 25 30

Tyr Cys Tyr Thr Asn Glu Lys Asp Glu Tyr Thr Pro Pro Lys Ala Pro
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Phe Gly Val Glu Leu Phe Ser Leu Glu Tyr Leu Tyr
50 55 60

Glu Gln Trp Lys Ala Arg Asn Asn Ile Trp Thr Lys Ser Asn Xaa Tyr
65 70 75 80

Lys Asp Leu Cys Arg Tyr Thr Gly Cys Lys Ile Thr Phe Tyr Arg His
85 90 95

Pro Thr Thr Asp Phe Ile Val Xaa Tyr Ser Arg Gln Pro Pro Phe Glu
100 105 110

Ile Asp Lys Xaa Thr Tyr Met Xaa Xaa His Pro Gln Xaa Leu Leu Leu
115 120 125

Arg Lys His Lys Lys Ile Ile Leu Ser Lys Ala Thr Asn Pro Lys Gly
130 135 140

Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Ile Lys Pro Pro Lys Gln Met Leu Asn
145 150 155 160

Lys Trp Phe Phe Gln Lys Gln Phe Ala Xaa Tyr Gly Leu Val Gln Leu
165 170 175

Gln Ala Ala Ala Cys Asx Leu Arg Tyr Pro Arg Leu Gly Cys Cys Asn
180 185 190

Glu Asn Arg Leu Ile Thr Leu Tyr Tyr Leu Asn
195 200

<210> 234
<211> 162

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (58)..(58)
<223> I或L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (84)..(84)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (90)..(90)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (95)..(95)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (105)..(105)

<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (111)..(111)
<223> I或L

<220>
<221> MOD_RES
<222> (113)..(113)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (154)..(154)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (156)..(156)
<223> 任何胺基酸

<400> 234

```
Leu Pro Ile Val Val Ala Arg Tyr Asn Pro Ala Xaa Asp Thr Gly Lys
1               5                   10                  15


Gly Asn Lys Xaa Trp Leu Xaa Ser Thr Leu Asn Gly Ser Xaa Trp Ala
            20                  25                  30


Pro Pro Thr Thr Asp Lys Asp Leu Ile Ile Glu Gly Leu Pro Leu Trp
        35                  40                  45


Leu Ala Leu Tyr Gly Tyr Trp Ser Tyr Xaa Lys Lys Val Lys Lys Asp
    50                  55                  60


Lys Gly Ile Leu Gln Ser His Met Phe Val Val Lys Ser Pro Ala Ile
65                  70                  75                  80


Gln Pro Leu Xaa Thr Ala Thr Thr Gln Xaa Thr Phe Tyr Pro Xaa Ile
                85                  90                  95


Asp Asn Ser Phe Ile Gln Gly Lys Xaa Pro Tyr Asp Glu Pro Xaa Thr
            100                 105                 110
```

Xaa Asn Gln Lys Lys Leu Trp Tyr Pro Thr Leu Glu His Gln Gln Glu
115 120 125

Thr Ile Asn Ala Ile Val Glu Ser Gly Pro Tyr Val Pro Lys Leu Asp
130 135 140

Asn Gln Lys Asn Ser Thr Trp Glu Leu Xaa Tyr Xaa Tyr Thr Phe Tyr
145 150 155 160

Phe Lys

<210> 235
<211> 177
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (73)..(73)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (81)..(82)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (81)..(82)
<223> 此區域可能包括0-2個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (90)..(90)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (94)..(94)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (119)..(124)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (119)..(124)
<223> 此區域可能包括1-6個殘基

<220>
<221> MOD_RES
<222> (168)..(177)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> SITE
<222> (168)..(177)
<223> 此區域可能包括1-10個殘基

<400> 235
Trp Gly Gly Pro Gln Ile Pro Asp Gln Pro Val Glu Asp Pro Lys Xaa
1 5 10 15

Gln Gly Thr Tyr Pro Val Pro Asp Thr Xaa Gln Gln Thr Ile Gln Ile
20 25 30

Xaa Asn Pro Leu Lys Gln Lys Pro Glu Thr Met Phe His Asp Trp Asp
35 40 45

Tyr Arg Arg Gly Ile Ile Thr Ser Thr Ala Leu Lys Arg Met Gln Glu

50 55 60

Asn Leu Glu Thr Asp Ser Ser Phe Xaa Ser Asp Ser Glu Glu Thr Pro
65 70 75 80

Xaa Xaa Lys Lys Lys Lys Arg Leu Thr Xaa Glu Leu Pro Xaa Pro Gln
85 90 95

Glu Glu Thr Glu Glu Ile Gln Ser Cys Leu Leu Ser Leu Cys Glu Glu
100 105 110

Ser Thr Cys Gln Glu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Asn Leu Gln
115 120 125

Gln Leu Ile His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Lys His Asn
130 135 140

Ile Leu Lys Leu Leu Ser Asp Leu Lys Glx Lys Gln Arg Leu Leu Gln
145 150 155 160

Leu Gln Thr Gly Ile Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
165 170 175

Xaa

<210> 236

<400> 236
000

<210> 237

<400> 237
000

<210> 238

<400> 238

000

<210> 239

<400> 239
000

<210> 240

<400> 240
000

<210> 241

<400> 241
000

<210> 242

<400> 242
000

<210> 243

<400> 243
000

<210> 244

<400> 244
000

<210> 245

<400> 245
000

<210> 246

<400> 246
000

<210> 247

<400> 247
000

<210> 248

<400> 248
000

<210> 249

<400> 249
000

<210> 250

<400> 250
000

<210> 251

<400> 251
000

<210> 252

<400> 252
000

<210> 253

<400> 253
000

<210> 254

<400> 254
000

<210> 255

<400> 255
000

<210> 256

<400> 256
000

<210> 257

<400> 257
000

<210> 258

<400> 258
000

<210> 259

<400> 259
000

<210> 260

<400> 260
000

<210> 261

<400> 261
000

<210> 262

<400> 262
000

<210> 263

<400> 263

000

<210> 264

<400> 264
000

<210> 265

<400> 265
000

<210> 266

<400> 266
000

<210> 267

<400> 267
000

<210> 268

<400> 268
000

<210> 269

<400> 269
000

<210> 270

<400> 270
000

<210> 271

<400> 271
000

<210> 272

<400> 272
000

<210> 273

<400> 273
000

<210> 274

<400> 274
000

<210> 275

<400> 275
000

<210> 276

<400> 276
000

<210> 277

<400> 277
000

<210> 278

<400> 278
000

<210> 279

<400> 279
000

<210> 280

<400> 280
000

<210> 281

<400> 281
000

<210> 282

<400> 282
000

<210> 283

<400> 283
000

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288

<400> 288

000

<210> 289

<400> 289
000

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291
000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296

<400> 296
000

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300

<400> 300
000

<210> 301

<400> 301
000

<210> 302

<400> 302
000

<210> 303

<400> 303
000

<210> 304

<400> 304
000

<210> 305

<400> 305
000

<210> 306

<400> 306
000

<210> 307

<400> 307
000

<210> 308

<400> 308
000

<210> 309

<400> 309
000

<210> 310

<400> 310
000

<210> 311

<400> 311
000

<210> 312

<400> 312
000

<210> 313

<400> 313

000

<210> 314

<400> 314
000

<210> 315

<400> 315
000

<210> 316

<400> 316
000

<210> 317

<400> 317
000

<210> 318

<400> 318
000

<210> 319

<400> 319
000

<210> 320

<400> 320
000

<210> 321

<400> 321
000

<210> 322

<400> 322
000

<210> 323

<400> 323
000

<210> 324

<400> 324
000

<210> 325

<400> 325
000

<210> 326

<400> 326
000

<210> 327

<400> 327
000

<210> 328

<400> 328
000

<210> 329

<400> 329
000

<210> 330

<400> 330
000

<210> 331

<400> 331
000

<210> 332

<400> 332
000

<210> 333

<400> 333
000

<210> 334

<400> 334
000

<210> 335

<400> 335
000

<210> 336

<400> 336
000

<210> 337

<400> 337
000

<210> 338

<400> 338

000

<210> 339

<400> 339
000

<210> 340

<400> 340
000

<210> 341

<400> 341
000

<210> 342

<400> 342
000

<210> 343

<400> 343
000

<210> 344

<400> 344
000

<210> 345

<400> 345
000

<210> 346

<400> 346
000

<210> 347

<400> 347
000

<210> 348

<400> 348
000

<210> 349

<400> 349
000

<210> 350

<400> 350
000

<210> 351

<400> 351
000

<210> 352

<400> 352
000

<210> 353

<400> 353
000

<210> 354

<400> 354
000

<210> 355

<400> 355
000

<210> 356

<400> 356
000

<210> 357

<400> 357
000

<210> 358

<400> 358
000

<210> 359

<400> 359
000

<210> 360

<400> 360
000

<210> 361

<400> 361
000

<210> 362

<400> 362
000

<210> 363

<400> 363

000

<210> 364

<400> 364
000

<210> 365

<400> 365
000

<210> 366

<400> 366
000

<210> 367

<400> 367
000

<210> 368

<400> 368
000

<210> 369

<400> 369
000

<210> 370

<400> 370
000

<210> 371

<400> 371
000

<210> 372

<400> 372
000

<210> 373

<400> 373
000

<210> 374

<400> 374
000

<210> 375

<400> 375
000

<210> 376

<400> 376
000

<210> 377

<400> 377
000

<210> 378

<400> 378
000

<210> 379

<400> 379
000

<210> 380

<400> 380
000

<210> 381

<400> 381
000

<210> 382

<400> 382
000

<210> 383

<400> 383
000

<210> 384

<400> 384
000

<210> 385

<400> 385
000

<210> 386

<400> 386
000

<210> 387

<400> 387
000

<210> 388

<400> 388

000

<210> 389

<400> 389
000

<210> 390

<400> 390
000

<210> 391

<400> 391
000

<210> 392

<400> 392
000

<210> 393

<400> 393
000

<210> 394

<400> 394
000

<210> 395

<400> 395
000

<210> 396

<400> 396
000

<210> 397

<400> 397
000

<210> 398

<400> 398
000

<210> 399

<400> 399
000

<210> 400

<400> 400
000

<210> 401

<400> 401
000

<210> 402

<400> 402
000

<210> 403

<400> 403
000

<210> 404

<400> 404
000

<210> 405

<400> 405
000

<210> 406

<400> 406
000

<210> 407

<400> 407
000

<210> 408

<400> 408
000

<210> 409

<400> 409
000

<210> 410

<400> 410
000

<210> 411

<400> 411
000

<210> 412

<400> 412
000

<210> 413

<400> 413

000

<210> 414

<400> 414
000

<210> 415

<400> 415
000

<210> 416

<400> 416
000

<210> 417

<400> 417
000

<210> 418

<400> 418
000

<210> 419

<400> 419
000

<210> 420

<400> 420
000

<210> 421

<400> 421
000

<210> 422

<400> 422
000

<210> 423

<400> 423
000

<210> 424

<400> 424
000

<210> 425

<400> 425
000

<210> 426

<400> 426
000

<210> 427

<400> 427
000

<210> 428

<400> 428
000

<210> 429

<400> 429
000

<210> 430

<400> 430
000

<210> 431

<400> 431
000

<210> 432

<400> 432
000

<210> 433

<400> 433
000

<210> 434

<400> 434
000

<210> 435

<400> 435
000

<210> 436

<400> 436
000

<210> 437

<400> 437
000

<210> 438

<400> 438

000

<210> 439

<400> 439
000

<210> 440

<400> 440
000

<210> 441

<400> 441
000

<210> 442

<400> 442
000

<210> 443

<400> 443
000

<210> 444

<400> 444
000

<210> 445

<400> 445
000

<210> 446

<400> 446
000

<210> 447

<400> 447
000

<210> 448

<400> 448
000

<210> 449

<400> 449
000

<210> 450

<400> 450
000

<210> 451

<400> 451
000

<210> 452

<400> 452
000

<210> 453

<400> 453
000

<210> 454

<400> 454
000

<210> 455

<400> 455
000

<210> 456

<400> 456
000

<210> 457

<400> 457
000

<210> 458

<400> 458
000

<210> 459

<400> 459
000

<210> 460

<400> 460
000

<210> 461

<400> 461
000

<210> 462

<400> 462
000

<210> 463

<400> 463

000

<210> 464

<400> 464
000

<210> 465

<400> 465
000

<210> 466

<400> 466
000

<210> 467

<400> 467
000

<210> 468

<400> 468
000

<210> 469

<400> 469
000

<210> 470

<400> 470
000

<210> 471

<400> 471
000

<210> 472

<400> 472
000

<210> 473

<400> 473
000

<210> 474

<400> 474
000

<210> 475

<400> 475
000

<210> 476

<400> 476
000

<210> 477

<400> 477
000

<210> 478

<400> 478
000

<210> 479

<400> 479
000

<210> 480

<400> 480
000

<210> 481

<400> 481
000

<210> 482

<400> 482
000

<210> 483

<400> 483
000

<210> 484

<400> 484
000

<210> 485

<400> 485
000

<210> 486

<400> 486
000

<210> 487

<400> 487
000

<210> 488

<400> 488

000

<210> 489

<400> 489
000

<210> 490

<400> 490
000

<210> 491

<400> 491
000

<210> 492

<400> 492
000

<210> 493

<400> 493
000

<210> 494

<400> 494
000

<210> 495

<400> 495
000

<210> 496

<400> 496
000

<210> 497

<400> 497
000

<210> 498

<400> 498
000

<210> 499

<400> 499
000

<210> 500

<400> 500
000

<210> 501

<400> 501
000

<210> 502

<400> 502
000

<210> 503

<400> 503
000

<210> 504

<400> 504
000

<210> 505

<400> 505
000

<210> 506

<400> 506
000

<210> 507

<400> 507
000

<210> 508

<400> 508
000

<210> 509

<400> 509
000

<210> 510

<400> 510
000

<210> 511

<400> 511
000

<210> 512

<400> 512
000

<210> 513

<400> 513

000

<210> 514

<400> 514
000

<210> 515

<400> 515
000

<210> 516

<400> 516
000

<210> 517

<400> 517
000

<210> 518

<400> 518
000

<210> 519

<400> 519
000

<210> 520

<400> 520
000

<210> 521

<400> 521
000

<210> 522

<400> 522
000

<210> 523

<400> 523
000

<210> 524

<400> 524
000

<210> 525

<400> 525
000

<210> 526

<400> 526
000

<210> 527

<400> 527
000

<210> 528

<400> 528
000

<210> 529

<400> 529
000

<210> 530

<400> 530
000

<210> 531

<400> 531
000

<210> 532

<400> 532
000

<210> 533

<400> 533
000

<210> 534

<400> 534
000

<210> 535

<400> 535
000

<210> 536

<400> 536
000

<210> 537

<400> 537
000

<210> 538

<400> 538

000

<210> 539

<400> 539
000

<210> 540

<400> 540
000

<210> 541

<400> 541
000

<210> 542

<400> 542
000

<210> 543

<400> 543
000

<210> 544

<400> 544
000

<210> 545

<400> 545
000

<210> 546

<400> 546
000

<210> 547

<400> 547
000

<210> 548

<400> 548
000

<210> 549

<400> 549
000

<210> 550

<400> 550
000

<210> 551

<400> 551
000

<210> 552

<400> 552
000

<210> 553

<400> 553
000

<210> 554

<400> 554
000

<210> 555

<400> 555
000

<210> 556

<400> 556
000

<210> 557

<400> 557
000

<210> 558

<400> 558
000

<210> 559

<400> 559
000

<210> 560

<400> 560
000

<210> 561

<400> 561
000

<210> 562

<400> 562
000

<210> 563

<400> 563

000

<210> 564

<400> 564
000

<210> 565

<400> 565
000

<210> 566

<400> 566
000

<210> 567

<400> 567
000

<210> 568

<400> 568
000

<210> 569

<400> 569
000

<210> 570

<400> 570
000

<210> 571

<400> 571
000

<210> 572

<400> 572
000

<210> 573

<400> 573
000

<210> 574

<400> 574
000

<210> 575

<400> 575
000

<210> 576

<400> 576
000

<210> 577

<400> 577
000

<210> 578

<400> 578
000

<210> 579

<400> 579
000

<210> 580

<400> 580
000

<210> 581

<400> 581
000

<210> 582

<400> 582
000

<210> 583

<400> 583
000

<210> 584

<400> 584
000

<210> 585

<400> 585
000

<210> 586

<400> 586
000

<210> 587

<400> 587
000

<210> 588

<400> 588

000

<210> 589

<400> 589
000

<210> 590

<400> 590
000

<210> 591

<400> 591
000

<210> 592

<400> 592
000

<210> 593

<400> 593
000

<210> 594

<400> 594
000

<210> 595

<400> 595
000

<210> 596

<400> 596
000

<210> 597

<400> 597
000

<210> 598

<400> 598
000

<210> 599

<400> 599
000

<210> 600

<400> 600
000

<210> 601

<400> 601
000

<210> 602

<400> 602
000

<210> 603

<400> 603
000

<210> 604

<400> 604
000

<210> 605

<400> 605
000

<210> 606

<400> 606
000

<210> 607

<400> 607
000

<210> 608

<400> 608
000

<210> 609

<400> 609
000

<210> 610

<400> 610
000

<210> 611

<400> 611
000

<210> 612

<400> 612
000

<210> 613

<400> 613

000

<210> 614

<400> 614
000

<210> 615

<400> 615
000

<210> 616

<400> 616
000

<210> 617

<400> 617
000

<210> 618

<400> 618
000

<210> 619

<400> 619
000

<210> 620

<400> 620
000

<210> 621

<400> 621
000

<210> 622

<400> 622
000

<210> 623

<400> 623
000

<210> 624

<400> 624
000

<210> 625

<400> 625
000

<210> 626

<400> 626
000

<210> 627

<400> 627
000

<210> 628

<400> 628
000

<210> 629

<400> 629
000

<210> 630

<400> 630
000

<210> 631

<400> 631
000

<210> 632

<400> 632
000

<210> 633

<400> 633
000

<210> 634

<400> 634
000

<210> 635

<400> 635
000

<210> 636

<400> 636
000

<210> 637

<400> 637
000

<210> 638

<400> 638

000

<210> 639

<400> 639
000

<210> 640

<400> 640
000

<210> 641

<400> 641
000

<210> 642

<400> 642
000

<210> 643

<400> 643
000

<210> 644

<400> 644
000

<210> 645

<400> 645
000

<210> 646

<400> 646
000

<210> 647

<400> 647
000

<210> 648

<400> 648
000

<210> 649

<400> 649
000

<210> 650

<400> 650
000

<210> 651

<400> 651
000

<210> 652

<400> 652
000

<210> 653

<400> 653
000

<210> 654

<400> 654
000

<210> 655

<400> 655
000

<210> 656

<400> 656
000

<210> 657

<400> 657
000

<210> 658

<400> 658
000

<210> 659

<400> 659
000

<210> 660

<400> 660
000

<210> 661

<400> 661
000

<210> 662

<400> 662
000

<210> 663

<400> 663

000

<210> 664

<400> 664
000

<210> 665

<400> 665
000

<210> 666

<400> 666
000

<210> 667

<400> 667
000

<210> 668

<400> 668
000

<210> 669

<400> 669
000

<210> 670

<400> 670
000

<210> 671

<400> 671
000

<210> 672

<400> 672
000

<210> 673

<400> 673
000

<210> 674

<400> 674
000

<210> 675

<400> 675
000

<210> 676

<400> 676
000

<210> 677

<400> 677
000

<210> 678

<400> 678
000

<210> 679

<400> 679
000

<210> 680

<400> 680
000

<210> 681

<400> 681
000

<210> 682

<400> 682
000

<210> 683

<400> 683
000

<210> 684

<400> 684
000

<210> 685

<400> 685
000

<210> 686

<400> 686
000

<210> 687

<400> 687
000

<210> 688

<400> 688

000

<210> 689

<400> 689
000

<210> 690
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 690
attcgaatgg ctgagtttat gc 22

<210> 691
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 691
cacgaattag ccaagactgg gcac 24

<210> 692
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 692
gctcccactc ctgatttctg 20

<210> 693
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 693
ccttgactac ggtggtttca c 21

<210> 694
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 694
tgcaggcatt cgagggcttg tt 22

<210> 695
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 695
tttaaccccc tagtcccagg 20

<210> 696

<400> 696
000

<210> 697

<400> 697
000

<210> 698

<400> 698
000

<210> 699

<400> 699
000

<210> 700

<400> 700
000

<210> 701

<400> 701
000

<210> 702

<400> 702
000

<210> 703

<400> 703
000

<210> 704

<400> 704
000

<210> 705

<400> 705
000

<210> 706

<400> 706
000

<210> 707

<400> 707

000

<210> 708

<400> 708
000

<210> 709

<400> 709
000

<210> 710

<400> 710
000

<210> 711

<400> 711
000

<210> 712

<400> 712
000

<210> 713

<400> 713
000

<210> 714

<400> 714
000

<210> 715

<400> 715
000

<210> 716

<400> 716
000

<210> 717

<400> 717
000

<210> 718

<400> 718
000

<210> 719

<400> 719
000

<210> 720

<400> 720
000

<210> 721

<400> 721
000

<210> 722

<400> 722
000

<210> 723

<400> 723
000

<210> 724

<400> 724
000

<210> 725

<400> 725
000

<210> 726

<400> 726
000

<210> 727

<400> 727
000

<210> 728

<400> 728
000

<210> 729

<400> 729
000

<210> 730

<400> 730
000

<210> 731

<400> 731
000

<210> 732

<400> 732

000

<210> 733

<400> 733
000

<210> 734

<400> 734
000

<210> 735

<400> 735
000

<210> 736

<400> 736
000

<210> 737

<400> 737
000

<210> 738

<400> 738
000

<210> 739

<400> 739
000

<210> 740

<400> 740
000

<210> 741

<400> 741
000

<210> 742

<400> 742
000

<210> 743

<400> 743
000

<210> 744

<400> 744
000

<210> 745

<400> 745
000

<210> 746

<400> 746
000

<210> 747

<400> 747
000

<210> 748

<400> 748
000

<210> 749

<400> 749
000

<210> 750

<400> 750
000

<210> 751

<400> 751
000

<210> 752

<400> 752
000

<210> 753

<400> 753
000

<210> 754

<400> 754
000

<210> 755

<400> 755
000

<210> 756

<400> 756
000

<210> 757

<400> 757

000

<210> 758

<400> 758
000

<210> 759

<400> 759
000

<210> 760

<400> 760
000

<210> 761

<400> 761
000

<210> 762

<400> 762
000

<210> 763

<400> 763
000

<210> 764

<400> 764
000

<210> 765

<400> 765
000

<210> 766

<400> 766
000

<210> 767

<400> 767
000

<210> 768

<400> 768
000

<210> 769

<400> 769
000

<210> 770

<400> 770
000

<210> 771

<400> 771
000

<210> 772

<400> 772
000

<210> 773

<400> 773
000

<210> 774

<400> 774
000

<210> 775

<400> 775
000

<210> 776

<400> 776
000

<210> 777

<400> 777
000

<210> 778

<400> 778
000

<210> 779

<400> 779
000

<210> 780

<400> 780
000

<210> 781

<400> 781
000

<210> 782

<400> 782

000

<210> 783

<400> 783
000

<210> 784

<400> 784
000

<210> 785

<400> 785
000

<210> 786

<400> 786
000

<210> 787

<400> 787
000

<210> 788

<400> 788
000

<210> 789

<400> 789
000

<210> 790

<400> 790
000

<210> 791

<400> 791
000

<210> 792

<400> 792
000

<210> 793

<400> 793
000

<210> 794

<400> 794
000

<210> 795

<400> 795
000

<210> 796

<400> 796
000

<210> 797

<400> 797
000

<210> 798

<400> 798
000

<210> 799

<400> 799
000

<210> 800

<400> 800
000

<210> 801
<211> 156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 801
gcggcgggggg ggcggccgcg ttcgcgcgcc gcccaccagg gggtgctgcg cgccccccccc 60

cgcgcatgcg cggggccccc ccccgggggg gctccgcccc cccggccccc ccccgtgcta 120

aacccaccgc gcatgcgcga ccacgccccc gccgcc 156

<210> 802
<211> 150
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 802
ccgagcgtta gcgaggagtg cgaccctacc ccctgggccc acttcttcgg agccgcgcgc 60

tacgccttcg gctgcgcgcg gcacctcaga cccccgctcg tgctgacacg cttgcgcgtg 120

tcagaccact tcgggctcgc gggggtcggg 150

<210> 803
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 803
gccgccgcgg cggcgggggg cggcgcgctg cgcgcgccgc ccagtagggg gagccatgcg 60

ccccccccgg cgcatgcgcg gggccccccc ccgcgggggg ctccgccccc cggccccccc 120

cg 122

<210> 804
<211> 111
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 804
cggcccagcg gcggcgcgcg cgcttcgcgc gcgcgccggg gggctccgcc cccccccgcg 60

catgcgcggg gccccccccc gcgggggggct ccgccccccg gtcccccccc g 111

<210> 805
<211> 115
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 805
cggccgtgcg gcggcgcgcg cgcttcgcgc gcgcgccggg ggctgccgcc cccccccgcg 60

catgcgcgcg gggccccccc ccgcgggggg ctccgccccc cggccccccc ccccg 115

<210> 806
<211> 104
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 806
cggcggcggc gcgcgcgcta cgcgcgcgcg ccgggggggct gccgcccccc ccccgcgcat 60

gcgcggggcc ccccccccgcg gggggctccg ccccccggcc cccc 104

<210> 807
<211> 108
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 807
ggcggcggcg cgcgcgctac gcgcgcgcgc cggggagctc tgcccccccc cgcgcatgcg 60

cgcgggtccc ccccccgcgg ggggctccgc ccccggtcc ccccccg 108

<210> 808

<400> 808
000

<210> 809

<400> 809
000

<210> 810

<400> 810
000

<210> 811

<400> 811
000

<210> 812

<400> 812
000

<210> 813

<400> 813
000

<210> 814

<400> 814
000

<210> 815

<400> 815
000

<210> 816

<400> 816
000

<210> 817

<400> 817
000

<210> 818

<400> 818
000

<210> 819

<400> 819
000

<210> 820

<400> 820
000

<210> 821

<400> 821
000

<210> 822

<400> 822
000

<210> 823

<400> 823
000

<210> 824

<400> 824
000

<210> 825

<400> 825
000

<210> 826

<400> 826
000

<210> 827

<400> 827
000

<210> 828

<400> 828
000

<210> 829
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(5)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(10)
<223> 任何胺基酸

<400> 829
Tyr Asn Pro Xaa Xaa Asp Xaa Gly Xaa Xaa Asn
1 5 10

<210> 830

<400> 830
000

<210> 831

<400> 831
000

<210> 832

<400> 832
000

<210> 833

<400> 833
000

<210> 834

<400> 834
000

<210> 835

<400> 835
000

<210> 836

<400> 836
000

<210> 837

<400> 837
000

<210> 838

<400> 838
000

<210> 839

<400> 839
000

<210> 840

<400> 840
000

<210> 841

<400> 841
000

<210> 842

<400> 842
000

<210> 843

<400> 843
000

<210> 844

<400> 844
000

<210> 845

<400> 845
000

<210> 846

<400> 846
000

<210> 847

<400> 847
000

<210> 848

<400> 848
000

<210> 849

<400> 849
000

<210> 850

<400> 850
000

<210> 851

<400> 851
000

<210> 852

<400> 852
000

<210> 853

<400> 853
000

<210> 854

<400> 854
000

<210> 855

<400> 855
000

<210> 856

<400> 856
000

<210> 857

<400> 857
000

<210> 858

<400> 858
000

<210> 859

<400> 859
000

<210> 860

<400> 860
000

<210> 861

<400> 861
000

<210> 862

<400> 862
000

<210> 863

<400> 863
000

<210> 864

<400> 864
000

<210> 865

<400> 865
000

<210> 866

<400> 866
000

<210> 867

<400> 867
000

<210> 868

<400> 868
000

<210> 869

<400> 869
000

<210> 870

<400> 870
000

<210> 871

<400> 871
000

<210> 872

<400> 872
000

<210> 873

<400> 873
000

<210> 874

<400> 874
000

<210> 875

<400> 875
000

<210> 876

<400> 876
000

<210> 877

<400> 877
000

<210> 878

<400> 878
000

<210> 879

<400> 879
000

<210> 880

<400> 880
000

<210> 881

<400> 881
000

<210> 882

<400> 882
000

<210> 883

<400> 883
000

<210> 884

<400> 884
000

<210> 885

<400> 885
000

<210> 886
<211> 3176
<212> DNA
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 886
taaaatggcg ggagccaatc attttatact ttcactttcc aattaaaaat ggccacgtca 60

caaacaaggg gtggagccat ttaaactata taactaagtg gggtggcgaa tggctgagtt 120

taccccgcta gacggtgcag ggaccggatc gagcgcagcg aggaggtccc cggctgccca 180

tgggcgggag ccgaggtgag tgaaaccacc gaggtctagg ggcaattcgg gctagggcag 240

tctagcggaa cgggcaagaa acttaaaaca atatttgttt tacagatggt tagtatatcc 300

tcaagtgatt tttttaagaa aacgaaattt aatgaggaga cgcagaacca agtatggatg 360

tctcaaattg ctgactctca tgataatatc tgcagttgct ggcatccatt tgctcacctt 420

cttgcttcca tatttcctcc tggccacaaa gatcgtgatc ttactattaa ccaaattctt 480

ctaagagatt ataaagaaaa atgccattct ggtggagaag aaggagaaaa ttctggacca 540

acaacaggtt taattacacc aaaagaagaa gatatagaaa aagatggccc agaaggcgcc 600

gcagaagaag accatacaga cgccctgttc gccgccgccg tagaaaactt cgaaaggtaa 660

agagaaaaaa aaaatcttta attgttagac aatggcaacc agacagtata agaacttgta 720

aaattatagg acagtcagct atagttgttg gggctgaagg aaagcaaatg tactgttata 780

ctgtcaataa gttaattaat gtgcccccaa aaacaccata tgggggaggc tttggagtag 840

accaatacac actgaaatac ttatatgaag aatacagatt tgcacaaaac atttggacac 900

aatctaatgt actgaaagac ttatgcagat acataaatgt taagctaata ttctacagag 960

acaacaaaac agactttgtc ctttcctatg acagaaaccc acctttcaa ctaacaaaat 1020

ttacataccc aggagcacac ccacaacaaa tcatgcttca aaaacaccac aaattcatac 1080

tatcacaaat gacaaagcct aatggaagac taacaaaaaa actcaaaatt aaacctccta 1140

aacaaatgct ttctaaatgg ttcttttcaa aacaattctg taaataccct ttactatctc 1200

ttaaagcttc tgcactagac cttaggcact cttacctagg ctgctgtaat gaaaatccac 1260

aggtattttt ttattattta aaccatggat actacacaat aacaaactgg ggagcacaat 1320

cctcaacagc atacagacct aactccaagg tgacagacac aacatactac agatacaaaa 1380

atgacagaaa aaatattaac attaaaagcc atgaatacga aaaaagtata tcatatgaaa 1440

acggttattt tcaatctagt ttcttacaaa cacagtgcat atataccagt gagcgtggtg 1500

aagcctgtat agcagaaaaa ccactaggaa tagctattta caatccagta aaagacaatg 1560

gagatggtaa tatgatatac cttgtaagca ctctagcaaa cacttgggac cagcctccaa 1620

aagacagtgc tattttaata caaggagtac ccatatggct aggcttattt ggatatttag 1680

actactgtag acaaattaaa gctgacaaaa catggctaga cagtcatgta ctagtaattc 1740

aaagtcctgc tatttttact tacccaaatc caggagcagg caaatggtat tgtccactat 1800

cacaaagttt tataaatggc aatggtccgt ttaatcaacc acctacactg ctacaaaaag 1860

caaagtggtt tccacaaata caataccaac aagaaattat taatagcttt gtagaatcag 1920

gaccatttgt tcccaaatat gcaaatcaaa ctgaaagcaa ctgggaacta aaatataaat 1980

atgtttttac atttaagtgg ggtggaccac aattccatga accagaaatt gctgacccta 2040

gcaaacaaga gcagtatgat gtccccgata ctttctacca aacaatacaa attgaagatc 2100

cagaaggaca agaccccaga tctctcatcc atgattggga ctacagacga ggctttatta 2160

aagaaagatc tcttaaaaga atgtcaactt acttctcaac tcatacagat cagcaagcaa 2220

cttcagagga agacattccc aaaaagaaaa agagaattgg accccaactc acagtcccac 2280

aacaaaaaga agaggagaca ctgtcatgtc tcctctctct ctgcaaaaaa gataccttcc 2340

aagaaacaga gacacaagaa gacctccagc agctcatcaa gcagcagcag gagcagcagc 2400

tcctcctcaa gagaaacatc ctccagctca tccacaaact aaaagagaat caacaaatgc 2460

ttcagcttca cacaggcatg ttaccttaac cagatttaaa cctggatttg aagagcaaac 2520

agagagagaa ttagcaatta tatttcatag gccccctaga acctacaaag aggaccttcc 2580

attctatccc tggctaccac ctgcacccct tgtacaattt aaccttaact tcaaaggcta 2640

ggccaacaat gtacacttag taaagcatgt ttattaaagc acaaccccca aaataaatgt 2700

aaaaataaaa aaaaaaaaaa aaaaataaaa aattgcaaaa attcggcgct cgcgcgcatg 2760

tgcgcctctg gcgcaaatca cgcaacgctc gcgcgcccgc gtatgtctct ttaccacgca 2820

cctagattgg ggtgcgcgcg ctagcgcgcg caccccaatg cgccccgccc tcgttccgac 2880

ccgcttgcgc gggtcggacc acttcgggct cgggggggcg cgcctgcggc gctttttac 2940

taaacagact ccgagccgcc atttggcccc ctaagctccg ccccccctcat gaatattcat 3000

aaaggaaacc acataattag aattgccgac cacaaactgc catatgctaa ttagttcccc 3060

ttttacaaag taaaagggga agtgaacata gccccacacc cgcaggggca aggccccgca 3120

cccctacgtc actaaccacg cccccgccgc catcttgggt gcggcagggc gggggc 3176

<210> 887
<211> 124
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 887
Met Val Ser Ile Ser Ser Ser Asp Phe Phe Lys Lys Thr Lys Phe Asn
1 5 10 15

Glu Glu Thr Gln Asn Gln Val Trp Met Ser Gln Ile Ala Asp Ser His
20 25 30

Asp Asn Ile Cys Ser Cys Trp His Pro Phe Ala His Leu Leu Ala Ser
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Gly His Lys Asp Arg Asp Leu Thr Ile Asn Gln Ile
50 55 60

Leu Leu Arg Asp Tyr Lys Glu Lys Cys His Ser Gly Gly Glu Glu Gly
65 70 75 80

Glu Asn Ser Gly Pro Thr Thr Gly Leu Ile Thr Pro Lys Glu Glu Asp
85 90 95

Ile Glu Lys Asp Gly Pro Glu Gly Ala Ala Glu Glu Asp His Thr Asp

100 105 110

Ala Leu Phe Ala Ala Ala Val Glu Asn Phe Glu Arg
115 120

<210> 888
<211> 271
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 888
Met Val Ser Ile Ser Ser Ser Asp Phe Phe Lys Lys Thr Lys Phe Asn
1 5 10 15

Glu Glu Thr Gln Asn Gln Val Trp Met Ser Gln Ile Ala Asp Ser His
20 25 30

Asp Asn Ile Cys Ser Cys Trp His Pro Phe Ala His Leu Leu Ala Ser
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Gly His Lys Asp Arg Asp Leu Thr Ile Asn Gln Ile
50 55 60

Leu Leu Arg Asp Tyr Lys Glu Lys Cys His Ser Gly Gly Glu Glu Gly
65 70 75 80

Glu Asn Ser Gly Pro Thr Thr Gly Leu Ile Thr Pro Lys Glu Glu Asp
85 90 95

Ile Glu Lys Asp Gly Pro Glu Gly Ala Ala Glu Glu Asp His Thr Asp
100 105 110

Ala Leu Phe Ala Ala Ala Val Glu Asn Phe Glu Ser Gly Val Asp His
115 120 125

Asn Ser Met Asn Gln Lys Leu Leu Thr Leu Ala Asn Lys Ser Ser Met
130 135 140

Met Ser Pro Ile Leu Ser Thr Lys Gln Tyr Lys Leu Lys Ile Gln Lys

145 150 155 160

Asp Lys Thr Pro Asp Leu Ser Ser Met Ile Gly Thr Thr Asp Glu Ala
165 170 175

Leu Leu Lys Lys Asp Leu Leu Lys Glu Cys Gln Leu Thr Ser Gln Leu
180 185 190

Ile Gln Ile Ser Lys Gln Leu Gln Arg Lys Thr Phe Pro Lys Arg Lys
195 200 205

Arg Glu Leu Asp Pro Asn Ser Gln Ser His Asn Lys Lys Lys Arg Arg
210 215 220

His Cys His Val Ser Ser Leu Ser Ala Lys Lys Ile Pro Ser Lys Lys
225 230 235 240

Gln Arg His Lys Lys Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser
245 250 255

Ser Ser Ser Ser Ser Arg Glu Thr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Asn
260 265 270

<210> 889
<211> 267
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 889
Met Val Ser Ile Ser Ser Ser Asp Phe Phe Lys Lys Thr Lys Phe Asn
1 5 10 15

Glu Glu Thr Gln Asn Gln Val Trp Met Ser Gln Ile Ala Asp Ser His
20 25 30

Asp Asn Ile Cys Ser Cys Trp His Pro Phe Ala His Leu Leu Ala Ser
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Gly His Lys Asp Arg Asp Leu Thr Ile Asn Gln Ile

50 55 60

Leu Leu Arg Asp Tyr Lys Glu Lys Cys His Ser Gly Gly Glu Glu Gly
65 70 75 80

Glu Asn Ser Gly Pro Thr Thr Gly Leu Ile Thr Pro Lys Glu Glu Asp
85 90 95

Ile Glu Lys Asp Gly Pro Glu Gly Ala Ala Glu Glu Asp His Thr Asp
100 105 110

Ala Leu Phe Ala Ala Ala Val Glu Asn Phe Glu Arg Ser Ala Ser Asn
115 120 125

Phe Arg Gly Arg His Ser Gln Lys Glu Lys Glu Asn Trp Thr Pro Thr
130 135 140

His Ser Pro Thr Thr Lys Arg Arg Gly Asp Thr Val Met Ser Pro Leu
145 150 155 160

Ser Leu Gln Lys Arg Tyr Leu Pro Arg Asn Arg Asp Thr Arg Arg Pro
165 170 175

Pro Ala Ala His Gln Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Pro Pro Gln Glu
180 185 190

Lys His Pro Pro Ala His Pro Gln Thr Lys Arg Glu Ser Thr Asn Ala
195 200 205

Ser Ala Ser His Arg His Val Thr Leu Thr Arg Phe Lys Pro Gly Phe
210 215 220

Glu Glu Gln Thr Glu Arg Glu Leu Ala Ile Ile Phe His Arg Pro Pro
225 230 235 240

Arg Thr Tyr Lys Glu Asp Leu Pro Phe Tyr Pro Trp Leu Pro Pro Ala
245 250 255

Pro Leu Val Gln Phe Asn Leu Asn Phe Lys Gly
260 265

<210> 890
<211> 50
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 890
Met Arg Arg Arg Arg Thr Lys Tyr Gly Cys Leu Lys Leu Leu Thr Leu
1 5 10 15

Met Ile Ile Ser Ala Val Ala Gly Ile His Leu Leu Thr Phe Leu Leu
20 25 30

Pro Tyr Phe Leu Leu Ala Thr Lys Ile Val Ile Leu Leu Leu Thr Lys
35 40 45

Phe Phe
50

<210> 891
<211> 662
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 891
Met Pro Phe Trp Trp Arg Arg Arg Arg Lys Phe Trp Thr Asn Asn Arg
1 5 10 15

Phe Asn Tyr Thr Lys Arg Arg Arg Tyr Arg Lys Arg Trp Pro Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Lys Leu Arg Lys Val Lys Arg Lys Lys Lys Ser Leu Ile Val Arg Gln
50 55 60

Trp Gln Pro Asp Ser Ile Arg Thr Cys Lys Ile Ile Gly Gln Ser Ala

65 70 75 80

Ile Val Val Gly Ala Glu Gly Lys Gln Met Tyr Cys Tyr Thr Val Asn
85 90 95

Lys Leu Ile Asn Val Pro Pro Lys Thr Pro Tyr Gly Gly Gly Phe Gly
100 105 110

Val Asp Gln Tyr Thr Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Glu Tyr Arg Phe Ala
115 120 125

Gln Asn Ile Trp Thr Gln Ser Asn Val Leu Lys Asp Leu Cys Arg Tyr
130 135 140

Ile Asn Val Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Asp Phe Val
145 150 155 160

Leu Ser Tyr Asp Arg Asn Pro Pro Phe Gln Leu Thr Lys Phe Thr Tyr
165 170 175

Pro Gly Ala His Pro Gln Gln Ile Met Leu Gln Lys His His Lys Phe
180 185 190

Ile Leu Ser Gln Met Thr Lys Pro Asn Gly Arg Leu Thr Lys Lys Leu
195 200 205

Lys Ile Lys Pro Pro Lys Gln Met Leu Ser Lys Trp Phe Phe Ser Lys
210 215 220

Gln Phe Cys Lys Tyr Pro Leu Leu Ser Leu Lys Ala Ser Ala Leu Asp
225 230 235 240

Leu Arg His Ser Tyr Leu Gly Cys Cys Asn Glu Asn Pro Gln Val Phe
245 250 255

Phe Tyr Tyr Leu Asn His Gly Tyr Tyr Thr Ile Thr Asn Trp Gly Ala
260 265 270

Gln Ser Ser Thr Ala Tyr Arg Pro Asn Ser Lys Val Thr Asp Thr Thr
275 280 285

Tyr Tyr Arg Tyr Lys Asn Asp Arg Lys Asn Ile Asn Ile Lys Ser His
290 295 300

Glu Tyr Glu Lys Ser Ile Ser Tyr Glu Asn Gly Tyr Phe Gln Ser Ser
305 310 315 320

Phe Leu Gln Thr Gln Cys Ile Tyr Thr Ser Glu Arg Gly Glu Ala Cys
325 330 335

Ile Ala Glu Lys Pro Leu Gly Ile Ala Ile Tyr Asn Pro Val Lys Asp
340 345 350

Asn Gly Asp Gly Asn Met Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Ala Asn Thr
355 360 365

Trp Asp Gln Pro Pro Lys Asp Ser Ala Ile Leu Ile Gln Gly Val Pro
370 375 380

Ile Trp Leu Gly Leu Phe Gly Tyr Leu Asp Tyr Cys Arg Gln Ile Lys
385 390 395 400

Ala Asp Lys Thr Trp Leu Asp Ser His Val Leu Val Ile Gln Ser Pro
405 410 415

Ala Ile Phe Thr Tyr Pro Asn Pro Gly Ala Gly Lys Trp Tyr Cys Pro
420 425 430

Leu Ser Gln Ser Phe Ile Asn Gly Asn Gly Pro Phe Asn Gln Pro Pro
435 440 445

Thr Leu Leu Gln Lys Ala Lys Trp Phe Pro Gln Ile Gln Tyr Gln Gln
450 455 460

Glu Ile Ile Asn Ser Phe Val Glu Ser Gly Pro Phe Val Pro Lys Tyr

465 470 475 480

Ala Asn Gln Thr Glu Ser Asn Trp Glu Leu Lys Tyr Lys Tyr Val Phe
485 490 495

Thr Phe Lys Trp Gly Gly Pro Gln Phe His Glu Pro Glu Ile Ala Asp
500 505 510

Pro Ser Lys Gln Glu Gln Tyr Asp Val Pro Asp Thr Phe Tyr Gln Thr
515 520 525

Ile Gln Ile Glu Asp Pro Glu Gly Gln Asp Pro Arg Ser Leu Ile His
530 535 540

Asp Trp Asp Tyr Arg Arg Gly Phe Ile Lys Glu Arg Ser Leu Lys Arg
545 550 555 560

Met Ser Thr Tyr Phe Ser Thr His Thr Asp Gln Gln Ala Thr Ser Glu
565 570 575

Glu Asp Ile Pro Lys Lys Lys Lys Arg Ile Gly Pro Gln Leu Thr Val
580 585 590

Pro Gln Gln Lys Glu Glu Glu Thr Leu Ser Cys Leu Leu Ser Leu Cys
595 600 605

Lys Lys Asp Thr Phe Gln Glu Thr Glu Thr Gln Glu Asp Leu Gln Gln
610 615 620

Leu Ile Lys Gln Gln Gln Glu Gln Gln Leu Leu Leu Lys Arg Asn Ile
625 630 635 640

Leu Gln Leu Ile His Lys Leu Lys Glu Asn Gln Gln Met Leu Gln Leu
645 650 655

His Thr Gly Met Leu Pro
660

<210> 892
<211> 215
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 892

```
Met Pro Phe Trp Trp Arg Arg Arg Arg Lys Phe Trp Thr Asn Asn Arg
1               5                  10                  15

Phe Asn Tyr Thr Lys Arg Arg Arg Tyr Arg Lys Arg Trp Pro Arg Arg
            20                  25                  30

Arg Arg Arg Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
        35                  40                  45

Lys Leu Arg Lys Trp Gly Gly Pro Gln Phe His Glu Pro Glu Ile Ala
    50                  55                  60

Asp Pro Ser Lys Gln Glu Gln Tyr Asp Val Pro Asp Thr Phe Tyr Gln
65                  70                  75                  80

Thr Ile Gln Ile Glu Asp Pro Glu Gly Gln Asp Pro Arg Ser Leu Ile
                85                  90                  95

His Asp Trp Asp Tyr Arg Arg Gly Phe Ile Lys Glu Arg Ser Leu Lys
            100                 105                 110

Arg Met Ser Thr Tyr Phe Ser Thr His Thr Asp Gln Gln Ala Thr Ser
        115                 120                 125

Glu Glu Asp Ile Pro Lys Lys Lys Lys Arg Ile Gly Pro Gln Leu Thr
    130                 135                 140

Val Pro Gln Gln Lys Glu Glu Glu Thr Leu Ser Cys Leu Leu Ser Leu
145                 150                 155                 160

Cys Lys Lys Asp Thr Phe Gln Glu Thr Glu Thr Gln Glu Asp Leu Gln
                165                 170                 175
```

Gln Leu Ile Lys Gln Gln Gln Glu Gln Gln Leu Leu Leu Lys Arg Asn
180 185 190

Ile Leu Gln Leu Ile His Lys Leu Lys Glu Asn Gln Gln Met Leu Gln
195 200 205

Leu His Thr Gly Met Leu Pro
210 215

<210> 893
<211> 129
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 893
Met Pro Phe Trp Trp Arg Arg Arg Arg Lys Phe Trp Thr Asn Asn Arg
1 5 10 15

Phe Asn Tyr Thr Lys Arg Arg Arg Tyr Arg Lys Arg Trp Pro Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Lys Leu Arg Lys Ile Ser Lys Gln Leu Gln Arg Lys Thr Phe Pro Lys
50 55 60

Arg Lys Arg Glu Leu Asp Pro Asn Ser Gln Ser His Asn Lys Lys Lys
65 70 75 80

Arg Arg His Cys His Val Ser Ser Leu Ser Ala Lys Lys Ile Pro Ser
85 90 95

Lys Lys Gln Arg His Lys Lys Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
100 105 110

Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Glu Thr Ser Ser Ser Ser Ser Thr
115 120 125

Asn

<210> 894

<400> 894
000

<210> 895

<400> 895
000

<210> 896

<400> 896
000

<210> 897

<400> 897
000

<210> 898

<400> 898
000

<210> 899

<400> 899
000

<210> 900

<400> 900
000

<210> 901

<400> 901

000

<210> 902

<400> 902
000

<210> 903

<400> 903
000

<210> 904

<400> 904
000

<210> 905

<400> 905
000

<210> 906

<400> 906
000

<210> 907

<400> 907
000

<210> 908

<400> 908
000

<210> 909

<400> 909
000

<210> 910

<400> 910
000

<210> 911

<400> 911
000

<210> 912

<400> 912
000

<210> 913

<400> 913
000

<210> 914

<400> 914
000

<210> 915

<400> 915
000

<210> 916

<400> 916
000

<210> 917

<400> 917
000

<210> 918

<400> 918
000

<210> 919

<400> 919
000

<210> 920

<400> 920
000

<210> 921

<400> 921
000

<210> 922

<400> 922
000

<210> 923

<400> 923
000

<210> 924

<400> 924
000

<210> 925
<211> 662
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 925
Met Pro Phe Trp Trp Arg Arg Arg Arg Lys Phe Trp Thr Asn Asn Arg
1 5 10 15

```
Phe Asn Tyr Thr Lys Arg Arg Arg Tyr Arg Lys Arg Trp Pro Arg Arg
            20                  25                  30

Arg Arg Arg Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
        35                  40                  45

Lys Leu Arg Lys Val Lys Arg Lys Lys Lys Ser Leu Ile Val Arg Gln
    50                  55                  60

Trp Gln Pro Asp Ser Ile Arg Thr Cys Lys Ile Ile Gly Gln Ser Ala
65                  70                  75                  80

Ile Val Val Gly Ala Glu Gly Lys Gln Met Tyr Cys Tyr Thr Val Asn
                85                  90                  95

Lys Leu Ile Asn Val Pro Pro Lys Thr Pro Tyr Gly Gly Gly Phe Gly
            100                 105                 110

Val Asp Gln Tyr Thr Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Glu Tyr Arg Phe Ala
        115                 120                 125

Gln Asn Ile Trp Thr Gln Ser Asn Val Leu Lys Asp Leu Cys Arg Tyr
    130                 135                 140

Ile Asn Val Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Asp Phe Val
145                 150                 155                 160

Leu Ser Tyr Asp Arg Asn Pro Pro Phe Gln Leu Thr Lys Phe Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Gly Ala His Pro Gln Gln Ile Met Leu Gln Lys His His Lys Phe
            180                 185                 190

Ile Leu Ser Gln Met Thr Lys Pro Asn Gly Arg Leu Thr Lys Lys Leu
        195                 200                 205

Lys Ile Lys Pro Pro Lys Gln Met Leu Ser Lys Trp Phe Phe Ser Lys
```

210 215 220

Gln Phe Cys Lys Tyr Pro Leu Leu Ser Leu Lys Ala Ser Ala Leu Asp
225 230 235 240

Leu Arg His Ser Tyr Leu Gly Cys Cys Asn Glu Asn Pro Gln Val Phe
245 250 255

Phe Tyr Tyr Leu Asn His Gly Tyr Tyr Thr Ile Thr Asn Trp Gly Ala
260 265 270

Gln Ser Ser Thr Ala Tyr Arg Pro Asn Ser Lys Val Thr Asp Thr Thr
275 280 285

Tyr Tyr Arg Tyr Lys Asn Asp Arg Lys Asn Ile Asn Ile Lys Ser His
290 295 300

Glu Tyr Glu Lys Ser Ile Ser Tyr Glu Asn Gly Tyr Phe Gln Ser Ser
305 310 315 320

Phe Leu Gln Thr Gln Cys Ile Tyr Thr Ser Glu Arg Gly Glu Ala Cys
325 330 335

Ile Ala Glu Lys Pro Leu Gly Ile Ala Ile Tyr Asn Pro Val Lys Asp
340 345 350

Asn Gly Asp Gly Asn Met Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Ala Asn Thr
355 360 365

Trp Asp Gln Pro Pro Lys Asp Ser Ala Ile Leu Ile Gln Gly Val Pro
370 375 380

Ile Trp Leu Gly Leu Phe Gly Tyr Leu Asp Tyr Cys Arg Gln Ile Lys
385 390 395 400

Ala Asp Lys Thr Trp Leu Asp Ser His Val Leu Val Ile Gln Ser Pro
405 410 415

Ala Ile Phe Thr Tyr Pro Asn Pro Gly Ala Gly Lys Trp Tyr Cys Pro
420 425 430

Leu Ser Gln Ser Phe Ile Asn Gly Asn Gly Pro Phe Asn Gln Pro Pro
435 440 445

Thr Leu Leu Gln Lys Ala Lys Trp Phe Pro Gln Ile Gln Tyr Gln Gln
450 455 460

Glu Ile Ile Asn Ser Phe Val Glu Ser Gly Pro Phe Val Pro Lys Tyr
465 470 475 480

Ala Asn Gln Thr Glu Ser Asn Trp Glu Leu Lys Tyr Lys Tyr Val Phe
485 490 495

Thr Phe Lys Trp Gly Gly Pro Gln Phe His Glu Pro Glu Ile Ala Asp
500 505 510

Pro Ser Lys Gln Glu Gln Tyr Asp Val Pro Asp Thr Phe Tyr Gln Thr
515 520 525

Ile Gln Ile Glu Asp Pro Glu Gly Gln Asp Pro Arg Ser Leu Ile His
530 535 540

Asp Trp Asp Tyr Arg Arg Gly Phe Ile Lys Glu Arg Ser Leu Lys Arg
545 550 555 560

Met Ser Thr Tyr Phe Ser Thr His Thr Asp Gln Gln Ala Thr Ser Glu
565 570 575

Glu Asp Ile Pro Lys Lys Lys Lys Arg Ile Gly Pro Gln Leu Thr Val
580 585 590

Pro Gln Gln Lys Glu Glu Glu Thr Leu Ser Cys Leu Leu Ser Leu Cys
595 600 605

Lys Lys Asp Thr Phe Gln Glu Thr Glu Thr Gln Glu Asp Leu Gln Gln

610 615 620

Leu Ile Lys Gln Gln Gln Glu Gln Gln Leu Leu Leu Lys Arg Asn Ile
625 630 635 640

Leu Gln Leu Ile His Lys Leu Lys Glu Asn Gln Gln Met Leu Gln Leu
645 650 655

His Thr Gly Met Leu Pro
660

<210> 926
<211> 58
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 926
Met Pro Phe Trp Trp Arg Arg Arg Arg Lys Phe Trp Thr Asn Asn Arg
1 5 10 15

Phe Asn Tyr Thr Lys Arg Arg Arg Tyr Arg Lys Arg Trp Pro Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Lys Leu Arg Lys Val Lys Arg Lys Lys Lys
50 55

<210> 927
<211> 202
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 927
Ser Leu Ile Val Arg Gln Trp Gln Pro Asp Ser Ile Arg Thr Cys Lys
1 5 10 15

Ile Ile Gly Gln Ser Ala Ile Val Val Gly Ala Glu Gly Lys Gln Met
20 25 30

Tyr Cys Tyr Thr Val Asn Lys Leu Ile Asn Val Pro Pro Lys Thr Pro
35 40 45

Tyr Gly Gly Gly Phe Gly Val Asp Gln Tyr Thr Leu Lys Tyr Leu Tyr
50 55 60

Glu Glu Tyr Arg Phe Ala Gln Asn Ile Trp Thr Gln Ser Asn Val Leu
65 70 75 80

Lys Asp Leu Cys Arg Tyr Ile Asn Val Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Asp
85 90 95

Asn Lys Thr Asp Phe Val Leu Ser Tyr Asp Arg Asn Pro Pro Phe Gln
100 105 110

Leu Thr Lys Phe Thr Tyr Pro Gly Ala His Pro Gln Gln Ile Met Leu
115 120 125

Gln Lys His His Lys Phe Ile Leu Ser Gln Met Thr Lys Pro Asn Gly
130 135 140

Arg Leu Thr Lys Lys Leu Lys Ile Lys Pro Pro Lys Gln Met Leu Ser
145 150 155 160

Lys Trp Phe Phe Ser Lys Gln Phe Cys Lys Tyr Pro Leu Leu Ser Leu
165 170 175

Lys Ala Ser Ala Leu Asp Leu Arg His Ser Tyr Leu Gly Cys Cys Asn
180 185 190

Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Tyr Tyr Leu
195 200

<210> 928
<211> 79
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 928
Asn His Gly Tyr Tyr Thr Ile Thr Asn Trp Gly Ala Gln Ser Ser Thr
1 5 10 15

Ala Tyr Arg Pro Asn Ser Lys Val Thr Asp Thr Thr Tyr Tyr Arg Tyr
20 25 30

Lys Asn Asp Arg Lys Asn Ile Asn Ile Lys Ser His Glu Tyr Glu Lys
35 40 45

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

Gln Cys Ile Tyr Thr Ser Glu Arg Gly Glu Ala Cys Ile Ala Glu
65 70 75

<210> 929
<211> 160
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 929
Lys Pro Leu Gly Ile Ala Ile Tyr Asn Pro Val Lys Asp Asn Gly Asp
1 5 10 15

Gly Asn Met Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Ala Asn Thr Trp Asp Gln
20 25 30

Pro Pro Lys Asp Ser Ala Ile Leu Ile Gln Gly Val Pro Ile Trp Leu
35 40 45

Gly Leu Phe Gly Tyr Leu Asp Tyr Cys Arg Gln Ile Lys Ala Asp Lys
50 55 60

Thr Trp Leu Asp Ser His Val Leu Val Ile Gln Ser Pro Ala Ile Phe
65 70 75 80

Thr Tyr Pro Asn Pro Gly Ala Gly Lys Trp Tyr Cys Pro Leu Ser Gln
85 90 95

Ser Phe Ile Asn Gly Asn Gly Pro Phe Asn Gln Pro Pro Thr Leu Leu
100 105 110

Gln Lys Ala Lys Trp Phe Pro Gln Ile Gln Tyr Gln Gln Glu Ile Ile
115 120 125

Asn Ser Phe Val Glu Ser Gly Pro Phe Val Pro Lys Tyr Ala Asn Gln
130 135 140

Thr Glu Ser Asn Trp Glu Leu Lys Tyr Lys Tyr Val Phe Thr Phe Lys
145 150 155 160

<210> 930
<211> 163
<212> PRT
<213> 丙型細環病毒屬

<400> 930
Trp Gly Gly Pro Gln Phe His Glu Pro Glu Ile Ala Asp Pro Ser Lys
1 5 10 15

Gln Glu Gln Tyr Asp Val Pro Asp Thr Phe Tyr Gln Thr Ile Gln Ile
20 25 30

Glu Asp Pro Glu Gly Gln Asp Pro Arg Ser Leu Ile His Asp Trp Asp
35 40 45

Tyr Arg Arg Gly Phe Ile Lys Glu Arg Ser Leu Lys Arg Met Ser Thr
50 55 60

Tyr Phe Ser Thr His Thr Asp Gln Gln Ala Thr Ser Glu Glu Asp Ile
65 70 75 80

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

Lys Glu Glu Glu Thr Leu Ser Cys Leu Leu Ser Leu Cys Lys Lys Asp
100 105 110

Thr Phe Gln Glu Thr Glu Thr Gln Glu Asp Leu Gln Gln Leu Ile Lys
115 120 125

Gln Gln Gln Glu Gln Gln Leu Leu Leu Lys Arg Asn Ile Leu Gln Leu
130 135 140

Ile His Lys Leu Lys Glu Asn Gln Gln Met Leu Gln Leu His Thr Gly
145 150 155 160

Met Leu Pro

<210> 931

<400> 931
000

<210> 932

<400> 932
000

<210> 933

<400> 933
000

<210> 934

<400> 934
000

<210> 935

<400> 935
000

<210> 936

<400> 936

000

<210> 937

<400> 937
000

<210> 938

<400> 938
000

<210> 939

<400> 939
000

<210> 940

<400> 940
000

<210> 941

<400> 941
000

<210> 942

<400> 942
000

<210> 943

<400> 943
000

<210> 944

<400> 944
000

<210> 945

<400> 945
000

<210> 946

<400> 946
000

<210> 947

<400> 947
000

<210> 948

<400> 948
000

<210> 949
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> W或F

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(8)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(12)
<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(20)
<223> 任何胺基酸

<400> 949
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa His
20

<210> 950
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (45)..(45)
<223> a、c、t、g、未知物或其他

<220>
<223> 關於取代及較佳實施例之詳細描述，請參見申請的說明書

<400> 950
aggtgagtga aaccaccgaa gtcaaggggc aattcgggct agggncagtc t 51

<210> 951
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 951
aggtgagttt acacaccgca gtcaaggggc aattcgggct cgggactggc 50

<210> 952
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 952
aggtgagtga aaccaccgaa gtcaaggggc aattcgggct agatcagtct 50

<210> 953
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 953
aggtgagtga aaccaccgag gtctaggggc aattcgggct agggcagtct 50

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種核酸(例如DNA)構築體，其包含：

a)第一指環病毒(*Anellovirus*)基因體，其包含編碼外源性效應子之序列；

b)第二指環病毒基因體或其片段，其與該第一指環病毒基因體串聯置放；及

c)視情況，間隔序列位於(a)與(b)之間。

【請求項2】

如前述請求項中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體或其片段之長度小於2800、2700、2600、2500、2000、1500、1000、900、800、700、600或500個核苷酸。

【請求項3】

如前述請求項中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體或其片段位於該第一指環病毒基因體之3'。

【請求項4】

如前述請求項中任一項之核酸構築體，其中該第二指環病毒基因體或其片段位於該第一指環病毒基因體之5'。

【請求項5】

如前述請求項中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體包含該間隔序列。

【請求項6】

如請求項5之核酸構築體，其中該間隔序列長度為1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多個胺基酸，或長度在1至5、5至10、10至15或15至20個胺基酸之間。

【請求項7】

如前述請求項中任一項之核酸構築體，其中該核酸構築體不包含該間隔序列。

【請求項8】

一種製造包含遺傳元件包封於蛋白質外部中之指環載體之方法，其包含：

a)提供細胞(例如哺乳動物宿主細胞)，其包含如前述實施例中任一項之核酸構築體及該指環病毒遺傳元件之一或多個複本(例如其中該指環病毒遺傳元件係自該核酸構築體擴增)；

b)該細胞在允許該指環病毒遺傳元件於該細胞中包封於蛋白質外部中的條件下培育；

藉此製造該指環載體。

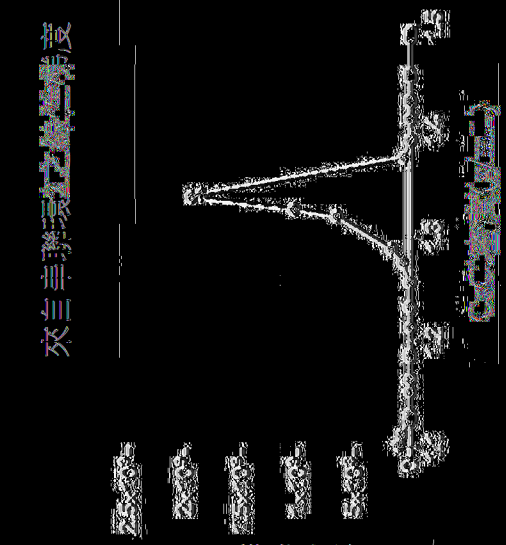
【請求項9】

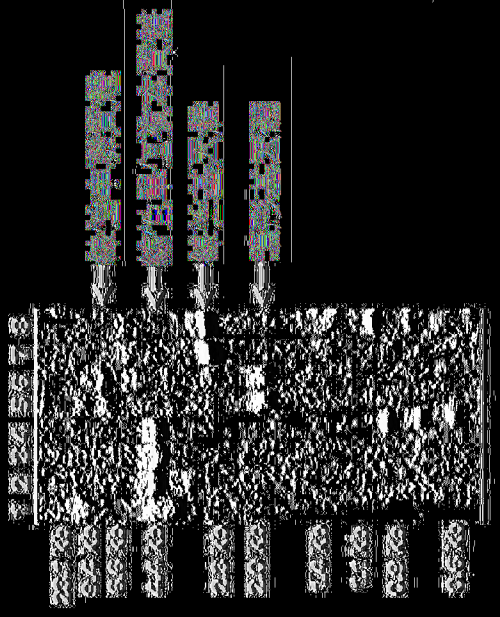
一種細胞，其包含如請求項1至7中任一項之核酸構築體。

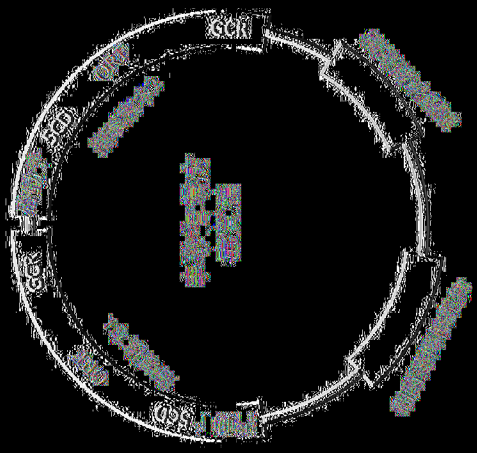
【請求項10】

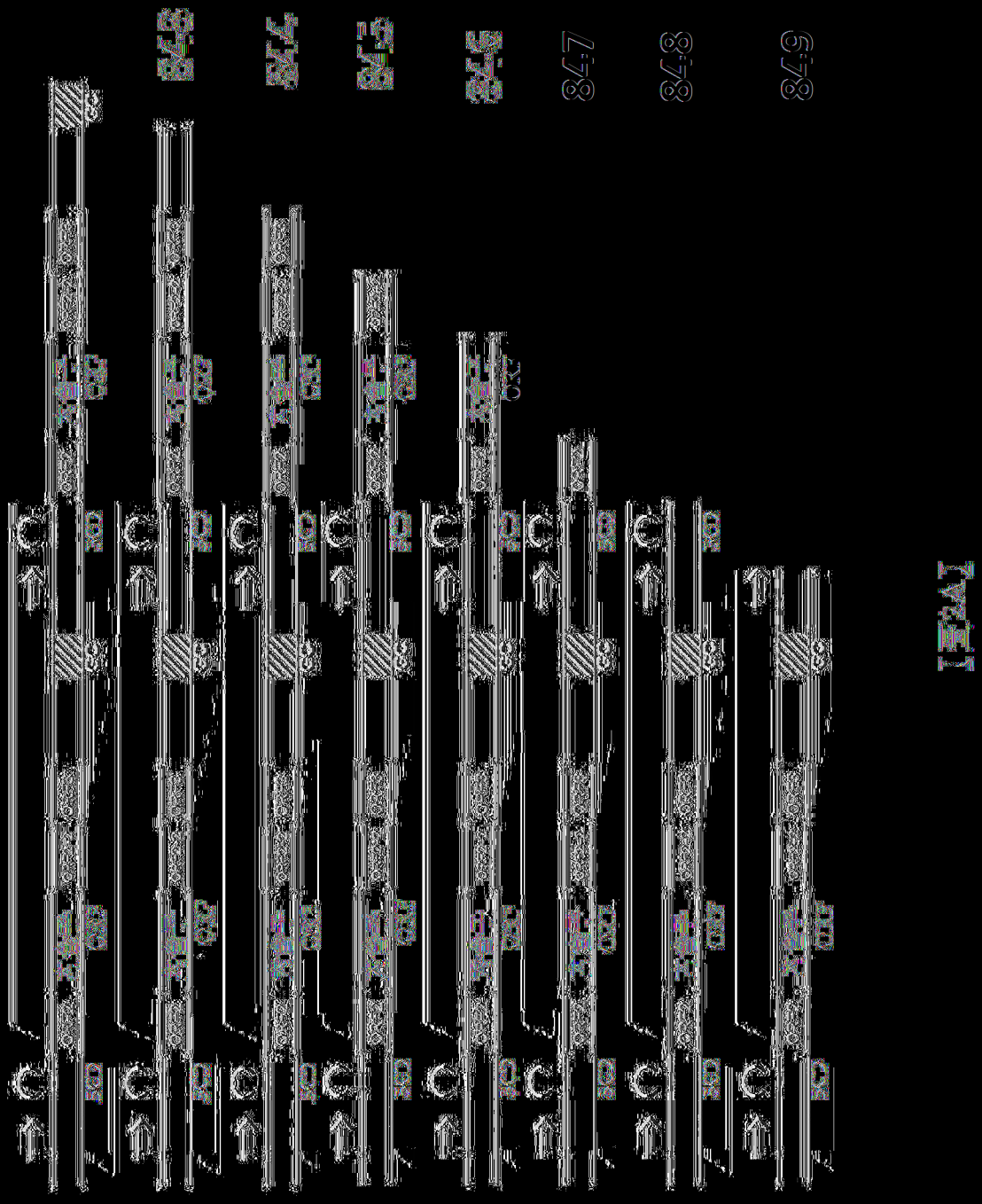
一種遞送外源性效應子至細胞之方法，該方法包含將藉由如請求項8之方法製備之指環載體引入該細胞中且該細胞在適於表現該外源性效應子之條件下培育。

(發明圖式)



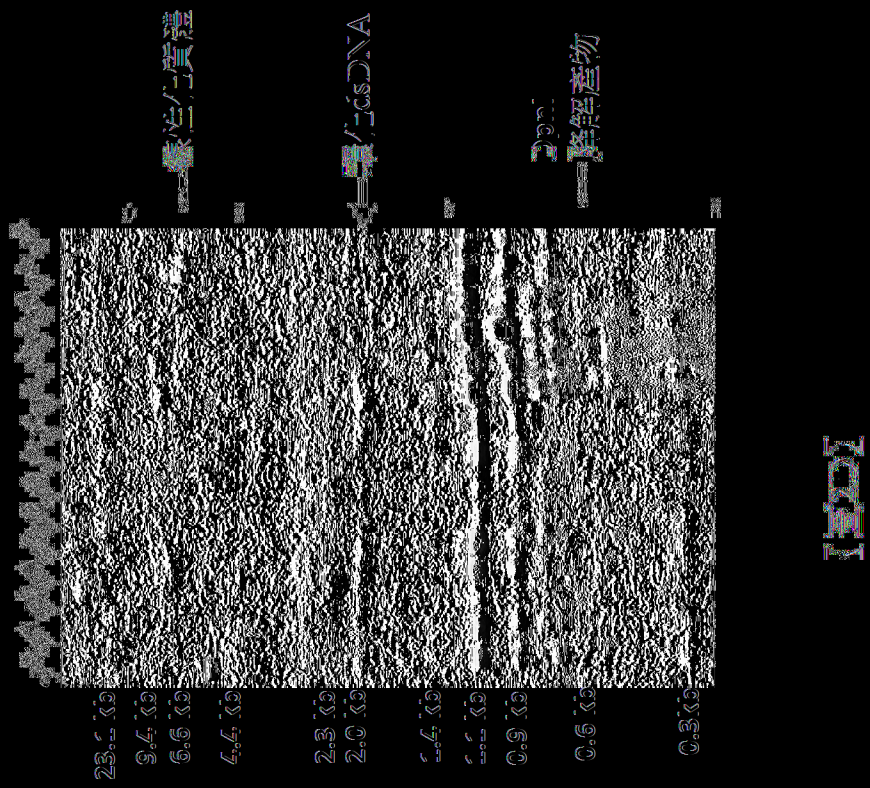





S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
20
3

836
837
838
839
840
841
842

圖1
圖2
圖3
圖4
圖5
圖6
圖7



第二圖

第三圖

圖（二）

第一張圖式
第二張圖式
第三張圖式
第四張圖式
第五張圖式
第六張圖式
圖式次頁

第一張圖式
第二張圖式
圖式次頁

第三張圖式之一
第三張圖式之二

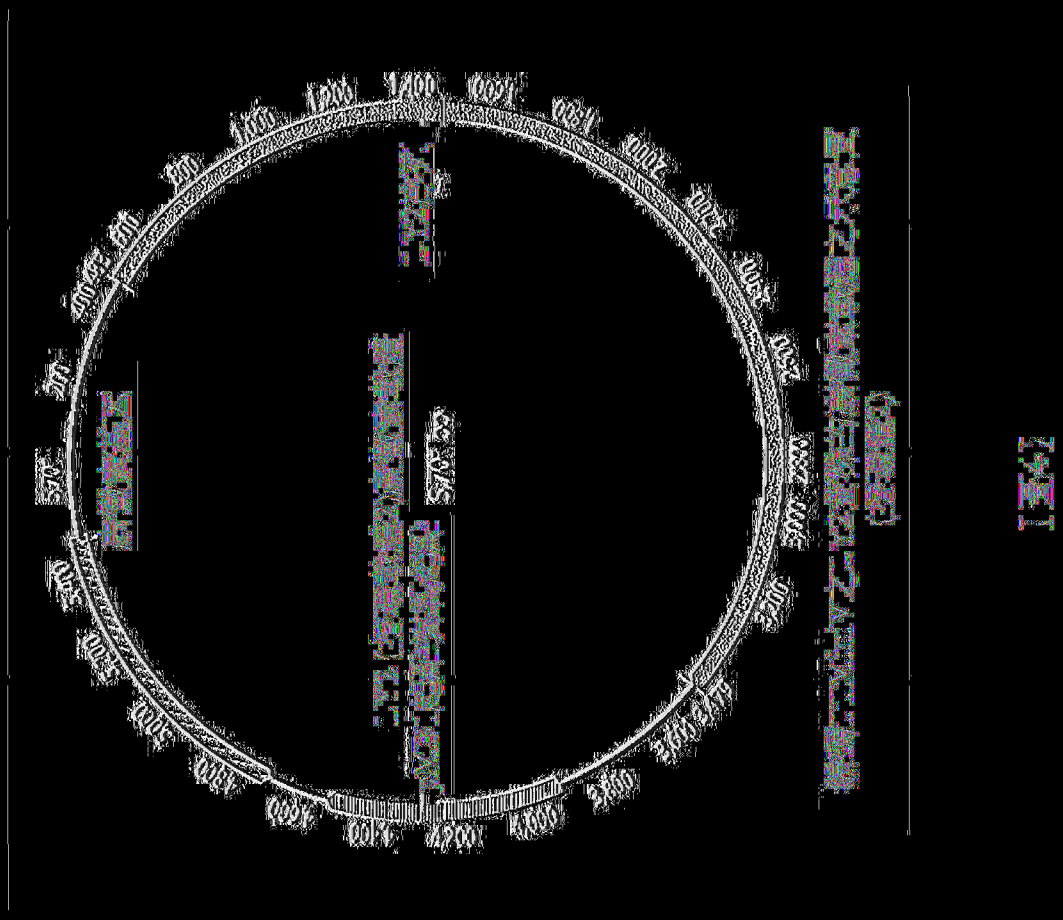


圖5
AS/40
203
實施例(VOC：含量高)
%-抗菌率

第1圖
第2圖
第1圖
第2圖
第1圖
第2圖

圖 1
感測台座：V2
感測台座：2937
A549
2937
A549

圖：乙型流感病毒感染肺癌細胞：A549
293
A549
（圖7A）

【圖3】

圖式：

A549 肺癌之決賽
293T 腎癌之決賽
A549 肺癌之決賽
(圖3)

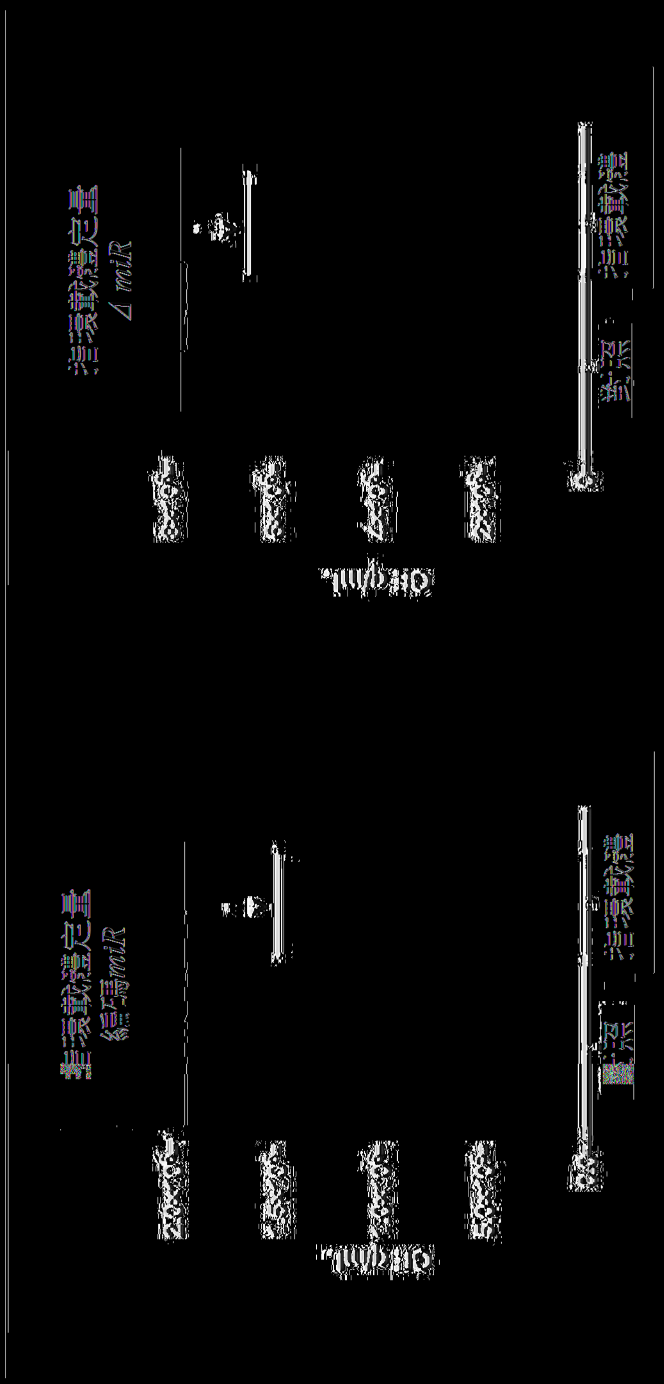
圖 2
圖 1
圖 3
圖 4
圖 5
圖 6
圖 7
圖 8
圖 9
圖 10
圖 11
圖 12
圖 13
圖 14
圖 15
圖 16
圖 17
圖 18
圖 19
圖 20
圖 21
圖 22
圖

2500
2000
1500
1000
500
0
A549 細胞之探針
293T 細胞之探針
(a.u.)

開始
接收客戶端連線請求(S1)
產生對應該客戶端之執行緒
(S2)
執行緒開始執行。
(S3)
執行緒接收客戶端傳送之
資料。
(S4)
執行緒判斷所接收之資料
是否為結束連線之指令。
(S5)
是
否
執行緒結束連線。
(S6)
執行緒處理所接收之資料。
(S7)
執行緒傳送處理結果給客
戶端。
(S8)
結束

圖 1

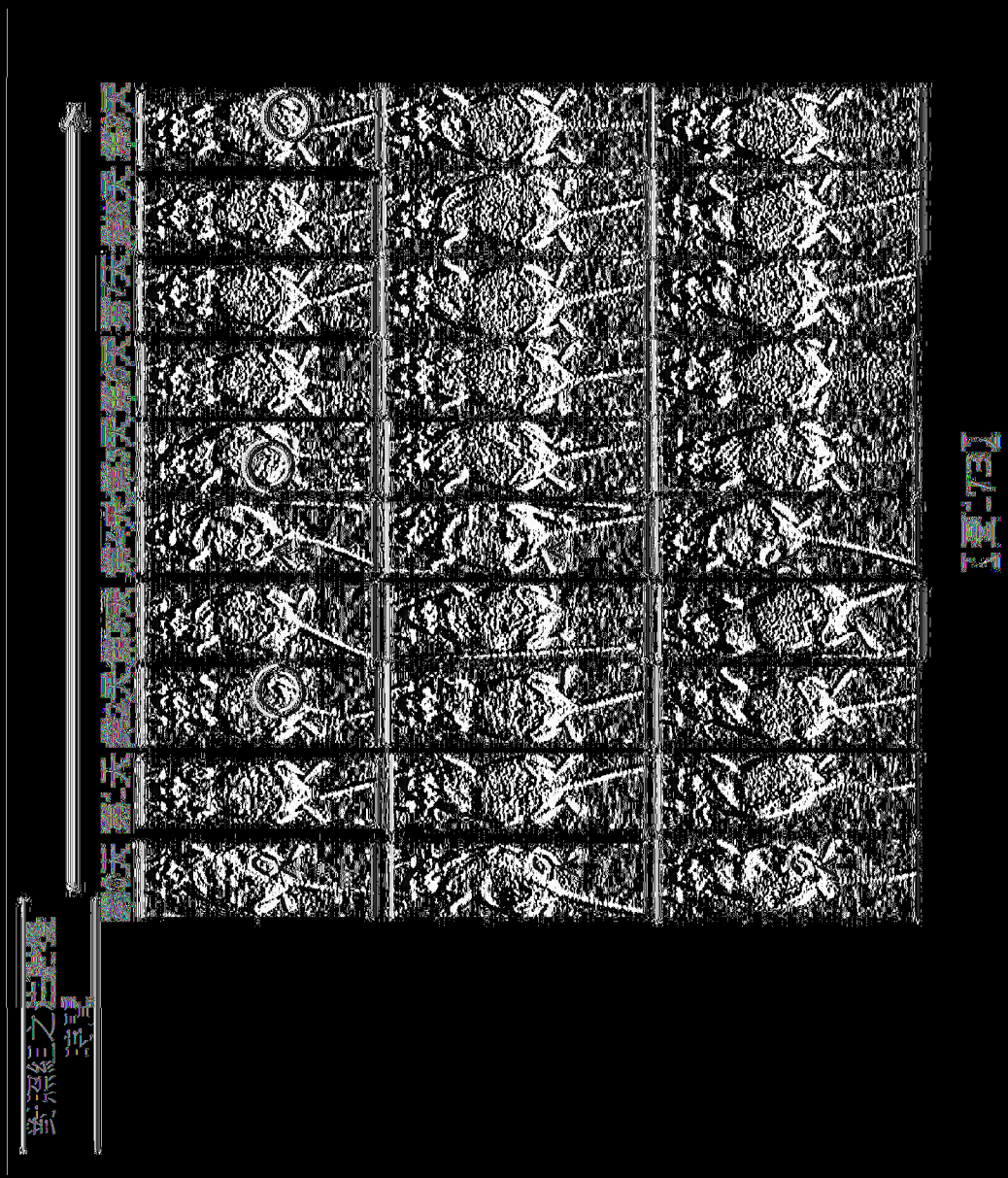
第一導電層
第一絕緣層
第二導電層
第二絕緣層
第三導電層
第三絕緣層
第四導電層
第四絕緣層
第五導電層
第五絕緣層
第六導電層
第六絕緣層
第七導電層
第七絕緣層
第八導電層
第八絕緣層
第九導電層
第九絕緣層
第十導電層
第十絕緣層
第十一導電層
第十一絕緣層
第十二導電層
第十二絕緣層
第十三導電層
第十三絕緣層
第十四導電層
第十四絕緣層
第十五導電層
第十五絕緣層
第十六導電層
第十六絕緣層
第十七導電層
第十七絕緣層
第十八導電層
第十八絕緣層
第十九導電層
第十九絕緣層
第二十導電層
第二十絕緣層
第二十一導電層
第二十一絕緣層
第二十二導電層
第二十二絕緣層
第二十三導電層
第二十三絕緣層
第二十四導電層
第二十四絕緣層
第二十五導電層
第二十五絕緣層
第二十六導電層
第二十六絕緣層
第二十七導電層
第二十七絕緣層
第二十八導電層
第二十八絕緣層
第二十九導電層
第二十九絕緣層
第三十導電層
第三十絕緣層
第三十一導電層
第三十一絕緣層
第三十二導電層
第三十二絕緣層
第三十三導電層
第三十三絕緣層
第三十四導電層
第三十四絕緣層
第三十五導電層
第三十五絕緣層
第三十六導電層
第三十六絕緣層
第三十七導電層
第三十七絕緣層
第三十八導電層
第三十八絕緣層
第三十九導電層
第三十九絕緣層
第四十導電層
第四十絕緣層
第四十一導電層
第四十一絕緣層
第四十二導電層
第四十二絕緣層
第四十三導電層
第四十三絕緣層
第四十四導電層
第四十四絕緣層
第四十五導電層
第四十五絕緣層
第四十六導電層
第四十六絕緣層
第四十七導電層
第四十七絕緣層
第四十八導電層
第四十八絕緣層
第四十九導電層
第四十九絕緣層
第五十導電層
第五十絕緣層
第五十一導電層
第五十一絕緣層
第五十二導電層
第五十二絕緣層
第五十三導電層
第五十三絕緣層
第五十四導電層
第五十四絕緣層
第五十五導電層
第五十五絕緣層
第五十六導電層
第五十六絕緣層
第五十七導電層
第五十七絕緣層
第五十八導電層
第五十八絕緣層
第五十九導電層
第五十九絕緣層
第六十導電層
第六十絕緣層
第六十一導電層
第六十一絕緣層
第六十二導電層
第六十二絕緣層
第六十三導電層
第六十三絕緣層
第六十四導電層
第六十四絕緣層
第六十五導電層
第六十五絕緣層
第六十六導電層
第六十六絕緣層
第六十七導電層
第六十七絕緣層
第六十八導電層
第六十八絕緣層
第六十九導電層
第六十九絕緣層
第七十導電層
第七十絕緣層
第七十一導電層
第七十一絕緣層
第七十二導電層
第七十二絕緣層
第七十三導電層
第七十三絕緣層
第七十四導電層
第七十四絕緣層
第七十五導電層
第七十五絕緣層
第七十六導電層
第七十六絕緣層
第七十七導電層
第七十七絕緣層
第七十八導電層
第七十八絕緣層
第七十九導電層
第七十九絕緣層
第八十導電層
第八十絕緣層
第八十一導電層
第八十一絕緣層
第八十二導電層
第八十二絕緣層
第八十三導電層
第八十三絕緣層
第八十四導電層
第八十四絕緣層
第八十五導電層
第八十五絕緣層
第八十六導電層
第八十六絕緣層
第八十七導電層
第八十七絕緣層
第八十八導電層
第八十八絕緣層
第八十九導電層
第八十九絕緣層
第九十導電層
第九十絕緣層
第九十一導電層
第九十一絕緣層
第九十二導電層
第九十二絕緣層
第九十三導電層
第九十三絕緣層
第九十四導電層
第九十四絕緣層
第九十五導電層
第九十五絕緣層
第九十六導電層
第九十六絕緣層
第九十七導電層
第九十七絕緣層
第九十八導電層
第九十八絕緣層
第九十九導電層
第九十九絕緣層
第一百導電層
第一百絕緣層
第一百一導電層
第一百一絕緣層
第一百二導電層
第一百二絕緣層
第一百三導電層
第一百三絕緣層
第一百四導電層
第一百四絕緣層
第一百五導電層
第一百五絕緣層
第一百六導電層
第一百六絕緣層
第一百七導電層
第一百七絕緣層
第一百八導電層
第一百八絕緣層
第一百九導電層
第一百九絕緣層
第一百十導電層
第一百十絕緣層
第一百十一導電層
第一百十一絕緣層
第一百十二導電層
第一百十二絕緣層
第一百十三導電層
第一百十三絕緣層
第一百十四導電層
第一百十四絕緣層
第一百十五導電層
第一百十五絕緣層
第一百十六導電層
第一百十六絕緣層
第一百十七導電層
第一百十七絕緣層
第一百十八導電層
第一百十八絕緣層
第一百十九導電層
第一百十九絕緣層
第一百二十導電層
第一百二十絕緣層
第一百二十一導電層
第一百二十一絕緣層
第一百二十二導電層
第一百二十二絕緣層
第一百二十三導電層
第一百二十三絕緣層
第一百二十四導電層
第一百二十四絕緣層
第一百二十五導電層
第一百二十五絕緣層
第一百二十六導電層
第一百二十六絕緣層
第一百二十七導電層
第一百二十七絕緣層
第一百二十八導電層
第一百二十八絕緣層
第一百二十九導電層
第一百二十九絕緣層
第一百三十導電層
第一百三十絕緣層
第一百三十一導電層
第一百三十一絕緣層
第一百三十二導電層
第一百三十二絕緣層
第一百三十三導電層
第一百三十三絕緣層
第一百三十四導電層
第一百三十四絕緣層
第一百三十五導電層
第一百三十五絕緣層
第一百三十六導電層
第一百三十六絕緣層
第一百三十七導電層
第一百三十七絕緣層
第一百三十八導電層
第一百三十八絕緣層
第一百三十九導電層
第一百三十九絕緣層
第一百四十導電層
第一百四十絕緣層
第一百四十一導電層
第一百四十一絕緣層
第一百四十二導電層
第一百四十二絕緣層
第一百四十三導電層
第一百四十三絕緣層
第一百四十四導電層
第一百四十四絕緣層
第一百四十五導電層
第一百四十五絕緣層
第一百四十六導電層
第一百四十六絕緣層
第一百四十七導電層
第一百四十七絕緣層
第一百四十八導電層
第一百四十八絕緣層
第一百四十九導電層
第一百四十九絕緣層
第一百五十導電層
第一百五十絕緣層
第一百五十一導電層
第一百五十一絕緣層
第一百五十二導電層
第一百五十二絕緣層
第一百五十三導電層
第一百五十三絕緣層
第一百五十四導電層
第一百五十四絕緣層
第一百五十五導電層
第一百五十五絕緣層
第一百五十六導電層
第一百五十六絕緣層
第一百五十七導電層
第一百五十七絕緣層
第一百五十八導電層
第一百五十八絕緣層
第一百五十九導電層
第一百五十九絕緣層
第一百六十導電層
第一百六十絕緣層
第一百六十一導電層
第一百六十一絕緣層
第一百六十二導電層
第一百六十二絕緣層
第一百六十三導電層
第一百六十三絕緣層
第一百六十四導電層
第一百六十四絕緣層
第一百六十五導電層
第一百六十五絕緣層
第一百六十六導電層
第一百六十六絕緣層
第一百六十七導電層
第一百六十七絕緣層
第一百六十八導電層
第一百六十八絕緣層
第一百六十九導電層
第一百六十九絕緣層
第一百七十導電層
第一百七十絕緣層
第一百七十一導電層
第一百七十一絕緣層
第一百七十二導電層
第一百七十二絕緣層
第一百七十三導電層
第一百七十三絕緣層
第一百七十四導電層
第一百七十四絕緣層
第一百七十五導電層
第一百七十五絕緣層
第一百七十六導電層
第一百七十六絕緣層
第一百七十七導電層
第一百七十七絕緣層
第一百七十八導電層
第一百七十八絕緣層
第一百七十九導電層
第一百七十九絕緣層
第一百八十導電層
第一百八十絕緣層
第一百八十一導電層
第一百八十一絕緣層
第一百八十二導電層
第一百八十二絕緣層
第一百八十三導電層
第一百八十三絕緣層
第一百八十四導電層
第一百八十四絕緣層
第一百八十五導電層
第一百八十五絕緣層
第一百八十六導電層
第一百八十六絕緣層
第一百八十七導電層
第一百八十七絕緣層
第一百八十八導電層
第一百八十八絕緣層
第一百八十九導電層
第一百八十九絕緣層
第一百九十導電層
第一百九十絕緣層
第一百九十一導電層
第一百九十一絕緣層
第一百九十二導電層
第一百九十二絕緣層
第一百九十三導電層
第一百九十三絕緣層
第一百九十四導電層
第一百九十四絕緣層
第一百九十五導電層
第一百九十五絕緣層
第一百九十六導電層
第一百九十六絕緣層
第一百九十七導電層
第一百九十七絕緣層
第一百九十八導電層
第一百九十八絕緣層
第一百九十九導電層
第一百九十九絕緣層
第二百導電層
第二百絕緣層
第二百一導電層
第二百一絕緣層
第二百二導電層
第二百二絕緣層
第二百三導電層
第二百三絕緣層
第二百四導電層
第二百四絕緣層
第二百五導電層
第二百五絕緣層
第二百六導電層
第二百六絕緣層
第二百七導電層
第二百七絕緣層
第二百八導電層
第二百八絕緣層
第二百九導電層
第二百九絕緣層
第三百導電層
第三百絕緣層
第三百一導電層
第三百一絕緣層
第三百二導電層
第三百二絕緣層
第三百三導電層
第三百三絕緣層
第三百四導電層
第三百四絕緣層
第三百五導電層
第三百五絕緣層
第三百六導電層
第三百六絕緣層
第三百七導電層
第三百七絕緣層
第三百八導電層
第三百八絕緣層
第三百九導電層
第三百九絕緣層
第四百導電層
第四百絕緣層
第四百一導電層
第四百一絕緣層
第四百二導電層
第四百二絕緣層
第四百三導電層
第四百三絕緣層
第四百四導電層
第四百四絕緣層
第四百五導電層
第四百五絕緣層
第四百六導電層
第四百六絕緣層
第四百七導電層
第四百七絕緣層
第四百八導電層
第四百八絕緣層
第四百九導電層
第四百九絕緣層
第五百導電層
第五百絕緣層
第五百一導電層
第五百一絕緣層
第五百二導電層
第五百二絕緣層
第五百三導電層
第五百三絕緣層
第五百四導電層
第五百四絕緣層
第五百五導電層
第五百五絕緣層
第五百六導電層
第五百六絕緣層
第五百七導電層
第五百七絕緣層
第五百八導電層
第五百八絕緣層
第五百九導電層
第五百九絕緣層
第六百導電層
第六百絕緣層
第六百一導電層
第六百一絕緣層
第六百二導電層
第六百二絕緣層
第六百三導電層
第六百三絕緣層
第六百四導電層
第六百四絕緣層
第六百五導電層
第六百五絕緣層
第六百六導電層
第六百六絕緣層
第六百七導電層
第六百七絕緣層
第六百八導電層
第六百八絕緣層
第六百九導電層
第六百九絕緣層
第七百導電層
第七百絕緣層
第七百一導電層
第七百一絕緣層
第七百二導電層
第七百二絕緣層
第七百三導電層
第七百三絕緣層
第七百四導電層
第七百四絕緣層
第七百五導電層
第七百五絕緣層
第七百六導電層
第七百六絕緣層
第七百七導電層
第七百七絕緣層
第七百八導電層
第七百八絕緣層
第七百九導電層
第七百九絕緣層
第八百導電層
第八百絕緣層
第八百一導電層
第八百一絕緣層
第八百二導電層
第八百二絕緣層
第八百三導電層
第八百三絕緣層
第八百四導電層
第八百四絕緣層
第八百五導電層
第八百五絕緣層
第八百六導電層
第八百六絕緣層
第八百七導電層
第八百七絕緣層
第八百八導電層
第八百八絕緣層
第八百九導電層
第八百九絕緣層
第九百導電層
第九百絕緣層
第九百一導電層
第九百一絕緣層
第九百二導電層
第九百二絕緣層
第九百三導電層
第九百三絕緣層
第九百四導電層
第九百四絕緣層
第九百五導電層
第九百五絕緣層
第九百六導電層
第九百六絕緣層
第九百七導電層
第九百七絕緣層
第九百八導電層
第九百八絕緣層
第九百九導電層
第九百九絕緣層
第一千導電層
第一千絕緣層
第一千一導電層
第一千一絕緣層
第一千二導電層
第一千二絕緣層
第一千三導電層
第一千三絕緣層
第一千四導電層
第一千四絕緣層
第一千五導電層
第一千五絕緣層
第一千六導電層
第一千六絕緣層
第一千七導電層
第一千七絕緣層
第一千八導電層
第一千八絕緣層
第一千九導電層
第一千九絕緣層
第二千導電層
第二千絕緣層
第二千一導電層
第二千一絕緣層
第二千二導電層
第二千二絕緣層
第二千三導電層
第二千三絕緣層
第二千四導電層
第二千四絕緣層
第二千五導電層
第二千五絕緣層
第二千六導電層
第二千六絕緣層
第二千七導電層
第二千七絕緣層
第二千八導電層
第二千八絕緣層
第二千九導電層
第二千九絕緣層
第三千導電層
第三千絕緣層
第三千一導電層
第三千一絕緣層
第三千二導電層
第三千二絕緣層
第三千三導電層
第三千三絕緣層
第三千四導電層
第三千四絕緣層
第三千五導電層
第三千五絕緣層
第三千六導電層
第三千六絕緣層
第三千七導電層
第三千七絕緣層
第三千八導電層
第三千八絕緣層
第三千九導電層
第三千九絕緣層
第四千導電層
第四千絕緣層
第四千一導電層
第四千一絕緣層
第四千二導電層
第四千二絕緣層
第四千三導電層
第四千三絕緣層
第四千四導電層
第四千四絕緣層
第四千五導電層
第四千五絕緣層
第四千六導電層
第四千六絕緣層
第四千七導電層
第四千七絕緣層
第四千八導電層
第四千八絕緣層
第四千九導電層
第四千九絕緣層
第五千導電層
第五千絕緣層
第五千一導電層
第五千一絕緣層
第五千二導電層
第五千二絕緣層
第五千三導電層
第五千三絕緣層
第五千四導電層
第五千四絕緣層
第五千五導電層
第五千五絕緣層
第五千六導電層
第五千六絕緣層
第五千七導電層
第五千七絕緣層
第五千八導電層
第五千八絕緣層
第五千九導電層
第五千九絕緣層
第六千導電層
第六千絕緣層
第六千一導電層
第六千一絕緣層
第六千二導電層
第六千二絕緣層
第六千三導電層
第六千三絕緣層
第六千四導電層
第六千四絕緣層
第六千五導電層
第六千五絕緣層
第六千六導電層
第六千六絕緣層
第六千七導電層
第六千七絕緣層
第六千八導電層
第六千八絕緣層
第六千九導電層
第六千九絕緣層
第七千導電層
第七千絕緣層
第七千一導電層
第七千一絕緣層
第七千二導電層
第七千二絕緣層
第七千三導電層
第七千三絕緣層
第七千四導電層
第七千四絕緣層
第七千五導電層
第七千五絕緣層
第七千六導電層
第七千六絕緣層
第七千七導電層
第七千七絕緣層
第七千八導電層
第七千八絕緣層
第七千九導電層
第七千九絕緣層
第八千導電層
第八千絕緣層
第八千一導電層
第八千一絕緣層
第八千二導電層
第八千二絕緣層
第八千三導電層
第八千三絕緣層
第八千四導電層
第八千四絕緣層
第八千五導電層
第八千五絕緣層
第八千六導電層
第八千六絕緣層
第八千七導電層
第八千七絕緣層
第八千八導電層
第八千八絕緣層
第八千九導電層
第八千九絕緣層
第九千導電層
第九千絕緣層
第九千一導電層
第九千一絕緣層
第九千二導電層
第九千二絕緣層
第九千三導電層
第九千三絕緣層
第九千四導電層
第九千四絕緣層
第九千五導電層
第九千五絕緣層
第九千六導電層
第九千六絕緣層
第九千七導電層
第九千七絕緣層
第九千八導電層
第九千八絕緣層
第九千九導電層
第九千九絕緣層
第一萬導電層
第一萬絕緣層
第一萬一導電層
第一萬一絕緣層
第一萬二導電層
第一萬二絕緣層
第一萬三導電層
第一萬三絕緣層
第一萬四導電層
第一萬四絕緣層
第一萬五導電層
第一萬五絕緣層
第一萬六導電層
第一萬六絕緣層
第一萬七導電層
第一萬七絕緣層
第一萬八導電層
第一萬八絕緣層
第一萬九導電層
第一萬九絕緣層
第二萬導電層
第二萬絕緣層
第二萬一導電層
第二萬一絕緣層
第二萬二導電層
第二萬二絕緣層
第二萬三導電層
第二萬三絕緣層
第二萬四導電層
第二萬四絕緣層
第二萬五導電層
第二萬五絕緣層
第二萬六導電層
第二萬六絕緣層
第二萬七導電層
第二萬七絕緣層
第二萬八導電層
第二萬八絕緣層
第二萬九導電層
第二萬九絕緣層
第三萬導電層
第三萬絕緣層
第三萬一導電層
第三萬一絕緣層
第三萬二導電層
第三萬二絕緣層
第三萬三導電層
第三萬三絕緣層
第三萬四導電層
第三萬四絕緣層
第三萬五導電層
第三萬五絕緣層
第三萬六導電層
第三萬六絕緣層
第三萬七導電層
第三萬七絕緣層
第三萬八導電層
第三萬八絕緣層
第三萬九導電層
第三萬九絕緣層
第四萬導電層
第四萬絕緣層
第四萬一導電層
第四萬一絕緣層
第四萬二導電層
第四萬二絕緣層
第四萬三導電層
第四萬三絕緣層
第四萬四導電層
第四萬四絕緣層
第四萬五導電層
第四萬五絕緣層
第四萬六導電層
第四萬六絕緣層
第四萬七導電層
第四萬七絕緣層
第四萬八導電層
第四萬八絕緣層
第四萬九導電層
第四萬九絕緣層
第五萬導電層
第五萬絕緣層
第五萬一導電層
第五萬一絕緣層
第五萬二導電層
第五萬二絕緣層
第五萬三導電層
第五萬三絕緣層
第五萬四導電層
第五萬四絕緣層
第五萬五導電層
第五萬五絕緣層
第五萬六導電層
第五萬六絕緣層
第五萬七導電層
第五萬七絕緣層
第五萬八導電層
第五萬八絕緣層
第五萬九導電層
第五萬九絕緣層
第六萬導電層
第六萬絕緣層
第六萬一導電層
第六萬一絕緣層
第六萬二導電層
第六萬二絕緣層
第六萬三導電層
第六萬三絕緣層
第六萬四導電層
第六萬四絕緣層
第六萬五導電層
第六萬五絕緣層
第六萬六導電層
第六萬六絕緣層
第六萬七導電層
第六萬七絕緣層
第六萬八導電層
第六萬八絕緣層
第六萬九導電層
第六萬九絕緣層
第七萬導電層
第七萬絕緣層
第七萬一導電層
第七萬一絕緣層
第七萬二導電層
第七萬二絕緣層
第七萬三導電層
第七萬三絕緣層
第七萬四導電層
第七萬四絕緣層
第七萬五導電層
第七萬五絕緣層
第七萬六導電層
第七萬六絕緣層
第七萬七導電層
第七萬七絕緣層
第七萬八導電層
第七萬八絕緣層
第七萬九導電層
第七萬九絕緣層
第八萬導電層
第八萬絕緣層
第八萬一導電層
第八萬一絕緣層
第八萬二導電層
第八萬二絕緣層
第八萬三導電層
第八萬三絕緣層
第八萬四導電層
第八萬四絕緣層
第八萬五導電層
第八萬五絕緣層
第八萬六導電層
第八萬六絕緣層
第八萬七導電層
第八萬七絕緣層
第八萬八導電層
第八萬八絕緣層
第八萬九導電層
第八萬九絕緣層
第九萬導電層
第九萬絕緣層
第九萬一導電層
第九萬一絕緣層
第九萬二導電層
第九萬二絕緣層
第九萬三導電層
第九萬三絕緣層
第九萬四導電層
第九萬四絕緣層
第九萬五導電層
第九萬五絕緣層
第九萬六導電層
第九萬六絕緣層
第九萬七導電層
第九萬七絕緣層
第九萬八導電層
第九萬八絕緣層
第九萬九導電層
第九萬九絕緣層
第十萬導電層
第十萬絕緣層
第十萬一導電層
第十萬一絕緣層
第十萬二導電層
第十萬二絕緣層
第十萬三導電層
第十萬三絕緣層
第十萬四導電層
第十萬四絕緣層
第十萬五導電層
第十萬五絕緣層
第十萬六導電層
第十萬六絕緣層
第十萬七導電層
第十萬七絕緣層
第十萬八導電層
第十萬八絕緣層
第十萬九導電層
第十萬九絕緣層
第十一萬導電層
第十一萬絕緣層
第十一萬一導電層
第十一萬一絕緣層
第十一萬二導電層
第十一萬二絕緣層
第十一萬三導電層
第十一萬三絕緣層
第十一萬四導電層
第十一萬四絕緣層
第十一萬五導電層
第十一萬五絕緣層
第十一萬六導電層
第十一萬六絕緣層
第十一萬七導電層
第十一萬七絕緣層
第十一萬八導電層
第十一萬八絕緣層
第十一萬九導電層
第十一萬九絕緣層
第十二萬導電層
第十二萬絕緣層
第十二萬一導電層
第十二萬一絕緣層
第十二萬二導電層
第十二萬二絕緣層
第十二萬三導電層
第十二萬三絕緣層
第十二萬四導電層
第十二萬四絕緣層
第十二萬五導電層
第十二萬五絕緣層
第十二萬六導電層
第十二萬六絕緣層
第十二萬七導電層
第十二萬七絕緣層
第十二萬八導電層
第十二萬八絕緣層
第十二萬九導電層
第十二萬九絕緣層
第十三萬導電層
第十三萬絕緣層
第十三萬一導電層
第十三萬一絕緣層
第十三萬二導電層
第十三萬二絕緣層
第十三萬三導電層
第十三萬三絕緣層
第十三萬四導電層
第十三萬四絕緣層
第十三萬五導電層
第十三萬五絕緣層
第十三萬六導電層
第十三萬六絕緣層
第十三萬七導電層
第十三萬七絕緣層
第十三萬八導電層
第十三萬八絕緣層
第十三萬九導電層
第十三萬九絕緣層
第十四萬導電層
第十四萬絕緣層
第十四萬一導電層
第十四萬一絕緣層
第十四萬二導電層
第十四萬二絕緣層
第十四萬三導電層
第十四萬三絕緣層
第十四萬四導電層
第十四萬四絕緣層
第十四萬五導電層
第十四萬五絕緣層
第十四萬六導電層
第十四萬六絕緣層
第十四萬七導電層
第十四萬七絕緣層
第十四萬八導電層
第十四萬八絕緣層
第十四萬九導電層
第十四萬九絕緣層
第十五萬導電層
第十五萬絕緣層
第十五萬一導電層
第十五萬一絕緣層
第十五萬二導電層
第十五萬二絕緣層
第十五萬三導電層
第十五萬三絕緣層
第十五萬四導電層
第十五萬四絕緣層
第十五萬五導電層
第十五萬五絕緣層
第十五萬六導電層
第十五萬六絕緣層
第十五萬七導電層
第十五萬七絕緣層
第十五萬八導電層
第十五萬八絕緣層
第十五萬九導電層
第十五萬九絕緣層
第十六萬導電層
第十六萬絕緣層
第十六萬一導電層
第十六萬一絕緣層
第十六萬二導電層
第十六萬二絕緣層
第十六萬三導電層
第十六萬三絕緣層
第十六萬四導電層
第十六萬四絕緣層
第十六萬五導電層
第十六萬五絕緣層
第十六萬六導電層
第十六萬六絕緣層
第十六萬七導電層
第十六萬七絕緣層
第十六萬八導電層
第十六萬八絕緣層
第十六萬九導電層
第十六萬九絕緣層
第十七萬導電層
第十七萬絕緣層
第十七萬一導電層
第十七萬一絕緣層
第十七萬二導電層
第十七萬二絕緣層
第十七萬三導電層
第十七萬三絕緣層
第十七萬四導電層
第十七萬四絕緣層
第十七萬五導電層
第十七萬五絕緣層
第十七萬六導電層
第十七萬六絕緣層
第十七萬七導電層
第十七萬七絕緣層
第十七萬八導電層
第十七萬八絕緣層
第十七萬九導電層
第十七萬九絕緣層
第十八萬導電層
第十八萬絕緣層
第十八萬一導電層
第十八萬一絕緣層
第十八萬二導電層
第十八萬二絕緣層
第十八萬三導電層
第十八萬三絕緣層
第十八萬四導電層
第十八萬四絕緣層
第十八萬五導電層
第十八萬五絕緣層
第十八萬六導電層
第十八萬六絕緣層
第十八萬七導電層
第十八萬七絕緣層
第十八萬八導電層
第十八萬八絕緣層
第十八萬九導電層
第十八萬九絕緣層
第十九萬導電層
第十九萬絕緣層
第十九萬一導電層
第十九萬一絕緣層
第十九萬二導電層
第十九萬二絕緣層
第十九萬三導電層
第十九萬三絕緣層
第十九萬四導電層
第十九萬四絕緣層
第十九萬五導電層
第十九萬五絕緣層
第十九萬六導電層
第十九萬六絕緣層
第十九萬七導電層
第十九萬七絕緣層
第十九萬八導電層
第十九萬八絕緣層
第十九萬九導電層
第十九萬九絕緣層
第二十萬導電層
第二十萬絕緣層
第二十萬一導電層
第二十萬一絕緣層
第二十萬二導電層
第二十萬二絕緣層
第二十萬三導電層
第二十萬三絕緣層
第二十萬四導電層
第二十萬四絕緣層
第二十萬五導電層
第二十萬五絕緣層
第二十萬六導電層
第二十萬六絕緣層
第二十萬七導電層
第二十萬七絕緣層
第二十萬八導電層
第二十萬八絕緣層
第二十萬九導電層
第二十萬九絕緣層
第二十一萬導電層
第二十一萬絕緣層
第二十一萬一導電層
第二十一萬一絕緣層
第二十一萬二導電層
第二十一萬二絕緣層
第二十一萬三導電層
第二十一萬三絕緣層
第二十一萬四導電層
第二十一萬四絕緣層
第二十一萬五導電層
第二十一萬五絕緣層
第二十一萬六導電層
第二十一萬六絕緣層
第二十一萬七導電層
第二十一萬七絕緣層
第二十一萬八導電層
第二十一萬八絕緣層
第二十一萬九導電層
第二十一萬九絕緣層
第二十二萬導電層
第二十二萬絕緣層
第二十二萬一導電層
第二十二萬一絕緣層
第二十二萬二導電層
第二十二萬二絕緣層
第二十二萬三導電層
第二十二萬三絕緣層
第二十二萬四導電層
第二十二萬四絕緣層
第二十二萬五導電層
第二十二萬五絕緣層
第二十二萬六導電層
第二十二萬六絕緣層
第二十二萬七導電層
第二十二萬七絕緣層
第二十二萬八導電層
第二十二萬八絕緣層
第二十二萬九導電層
第二十二萬九絕緣層
第二十三萬導電層
第二十三萬絕緣層
第二十三萬一導電層
第二十三萬一絕緣層
第二十三萬二導電層
第二十三萬二絕緣層
第二十三萬三導電層
第二十三萬三絕緣層
第二十三萬四導電層
第二十三萬四絕緣層
第二十三萬五導電層
第二十三萬五絕緣層
第二十三萬六導電層
第二十三萬六絕緣層
第二十三萬七導電層
第二十三萬七絕緣層
第二十三萬八導電層
第二十三萬八絕緣層
第二十三萬九導電層
第二十三萬九絕緣層
第二十四萬導電層
第二十四萬絕緣層
第二十四萬一導電層
第二十四萬一絕緣層
第二十四萬二導電層
第二十四萬二絕緣層
第二十四萬三導電層
第二十四萬三絕緣層
第二十四萬四導電層
第二十四萬四絕緣層
第二十四萬五導電層
第二十四萬五絕緣層
第二十四萬六導電層
第二十四萬六絕緣層
第二十四萬七導電層
第二十四萬七絕緣層
第二十四萬八導電層
第二十四萬八絕緣層
第二十四萬九導電層
第二十四萬九絕緣層
第二十五萬導電層
第二十五萬絕緣層
第二十五萬一導電層
第二十五萬一絕緣層
第二十五萬二導電層
第二十五萬二絕緣層
第二十五萬三導電層
第二十五萬三絕緣層
第二十五萬四導電層
第二十五萬四絕緣層
第二十五萬五導電層
第二十五萬五絕緣層
第二十五萬六導電層
第二十五萬六絕緣層
第二十五萬七導電層
第二十五萬七絕緣層
第二十五萬八導電層
第二十五萬八絕緣層
第二十五萬九導電層
第二十五萬九絕緣層
第二十六萬導電層
第二十六萬絕緣層
第二十六萬一導電層
第二十六萬一絕緣層
第二十六萬二導電層
第二十六萬二絕緣層
第二十六萬三導電層
第二十六萬三絕緣層
第二十六萬四導電層
第二十六萬四絕緣層
第二十六萬五導電層
第二十六萬五絕緣層
第二十六萬六導電層
第二十六萬六絕緣層
第二十六萬七導電層
第二十六萬七絕緣層
第二十六萬八導電層
第二十六萬八絕緣層
第二十六萬九導電層
第二十六萬九絕緣層
第二十七萬導電層
第二十七萬絕緣層
第二十七萬一導電層
第二十七萬一絕緣層
第二十七萬二導電層
第二十七萬二絕緣層
第二十七萬三導電層
第二十七萬三絕緣層
第二十七萬四導電層
第二十七萬四絕緣層
第二十七萬五導電層
第二十七萬五絕緣層
第二十七萬六導電層
第二十七萬六絕緣層
第二十七萬七導電層
第二十七萬七絕緣層
第二十七萬八導電層
第二十七萬八絕緣層
第二十七萬九導電層
第二十七萬九絕緣層
第二十八萬導電層
第二十八萬絕緣層
第二十八萬一導電層
第二十八萬一絕緣層
第二十八萬二導電層
第二十八萬二絕緣層
第二十八萬三導電層
第二十八萬三絕緣層
第二十八萬四導電層
第二十八萬四絕緣層
第二十八萬五導電層
第二十八萬五絕緣層
第二十八萬六導電層
第二十八萬六絕緣層
第二十八萬七導電層
第二十八萬七絕緣層
第二十八萬八導電層
第二十八萬八絕緣層
第二十八萬九導電層
第二十八萬九絕緣層
第二十九萬導電層
第二十九萬絕緣層
第二十九萬一導電層
第二十九萬一絕緣層
第二十九萬二導電層
第二十九萬二絕緣層
第二十九萬三導電層
第二十九萬三絕緣層
第二十九萬四導電層
第二十九萬四絕緣層
第二十九萬五導電層
第二十九萬五絕緣層
第二十九萬六導電層
第二十九萬六絕緣層
第二十九萬七導電層
第二十九萬七絕緣層
第二十九萬八導電層
第二十九萬八絕緣層
第二十九萬九導電層
第二十九萬九絕緣層
第三十萬導電層
第三十萬絕緣層
第三十萬一導電層
第三十萬一絕緣層
第三十萬二導電層
第三十萬二絕緣層
第三十萬三導電層
第三十萬三絕緣層
第三十萬四導電層
第三十萬四絕緣層
第三十萬五導電層
第三十萬五絕緣層
第三十萬六導電層
第三十萬六絕緣層
第三十萬七導電層
第三十萬七絕緣層
第三十萬八導電層
第三十萬八絕緣層
第三十萬九導電層
第三十萬九絕緣層
第三十一萬導電層
第三十一萬絕緣層
第三十一萬一導電層
第三十一萬一絕緣層
第三十一萬二導電層
第三十一萬二絕緣層
第三十一萬三導電層
第三十一萬三絕緣層
第三十一萬四導電層
第三十一萬四絕緣層
第三十一萬五導電層
第三十一萬五絕緣層
第三十一萬六導電層
第三十一萬六絕緣層
第三十一萬七導電層
第三十一萬七絕緣層
第三十一萬八導電層
第三十一萬八絕緣層
第三十一萬九導電層
第三十一萬九絕緣層
第三十二萬導電層
第三十二萬絕緣層
第三十二萬一導電層
第三十二萬一絕緣層
第三十二萬二導電層
第三十二萬二絕緣層
第三十二萬三導電層
第三十二萬三絕緣層
第三十二萬四導電層
第三十二萬四絕緣層
第三十二萬五導電層
第三十二萬五絕緣層
第三十二萬六導電層
第三十二萬六絕緣層
第三十二萬七導電層
第三十二萬七絕緣層
第三十二萬八導電層
第三十二萬八絕緣層
第三十二萬九導電層
第三十二萬九絕緣層
第三十三萬導電層
第三十三萬絕緣層
第三十三萬一導電層
第三十三萬一絕緣層
第三十三萬二導電層
第三十三萬二絕緣層
第三十三萬三導電層
第三十三萬三絕緣層
第三十三萬四導電層
第三十三萬四絕緣層
第三十三萬五導電層
第三十三萬五絕緣層
第三十三萬六導電層
第三十三萬六絕緣層
第三十三萬七導電層
第三十三萬七絕緣層
第三十三萬八導電層
第三十三萬八絕緣層
第三十三萬九導電層
第三十三萬九絕緣層
第三十四萬導電層
第三十四萬絕緣層
第三十四萬一導電層
第三十四萬一絕緣層
第三十四萬二導電層
第三十四萬二絕緣層
第三十四萬三導電層
第三十四萬三絕緣層
第三十四萬四導電層
第三十四萬四絕緣層
第三十四萬五導電層
第三十四萬五絕緣層
第三十四萬六導電層
第三十四萬六絕緣層
第三十四萬七導電層
第三十四萬七絕緣層
第三十四萬八導電層
第三十四萬八絕緣層
第三十四萬九導電層
第三十四萬九絕緣層
第三十五萬導電層
第三十五萬絕緣層
第三十五萬一導電層
第三十五萬一絕緣層
第三十五萬二導電層
第三十五萬二絕緣層
第三十五萬三導電層
第三十五萬三絕緣層
第三十五萬四導電層
第三十五萬四絕緣層
第三十五萬五導電層
第三十五萬五絕緣層
第三十五萬六導電層
第三十五萬六絕緣層
第三十五萬七導電層
第三十五萬七絕緣層
第三十五萬八導電層
第三十五萬八絕緣層
第三十五萬九導電層
第三十五萬九絕緣層
第三十六萬導電層
第三十六萬絕緣層
第三十六萬一導電層
第三十六萬一絕緣層
第三十六萬二導電層
第三十六萬二絕緣層
第三十六萬三導電層
第三十六萬三絕緣層
第三十六萬四導電層
第三十六萬四絕緣層
第三十六萬五導電層
第三十六萬五絕緣層
第三十六萬六導電層
第三十六萬六絕緣層
第三十六萬七導電層
第三十六萬七絕緣層
第三十六萬八導電層
第三十六萬八絕緣層
第三十六萬九導電層
第三十六萬九絕緣層
第三十七萬導電層
第三十七萬絕緣層
第三十七萬一導電層
第三十七萬一絕緣層
第三十七萬二導電層
第三十七萬二絕緣層
第三十七萬三導電層
第三十七萬三絕緣層
第三十七萬四導電層
第三十七萬四絕緣層
第三十七萬五導電層
第三十七萬五絕緣層
第三十七萬六導電層
第三十七萬六絕緣層
第三十七萬七導電層
第三十七萬七絕緣層
第三十七萬八導電層
第三十七萬八絕緣層
第三十七萬九導電層
第三十七萬九絕緣層
第三十八萬導電層
第三十八萬絕緣層
第三十八萬一導電層
第三十八萬一絕緣層
第三十八萬二導電層
第三十八萬二絕緣層
第三十八萬三導電層
第三十八萬三絕緣層
第三十八萬四導電層
第三十八萬四絕緣層
第三十八萬五導電層
第三十八萬五絕緣層
第三十八萬六導電層
第三十八萬六絕緣層
第三十八萬七導電層
第三十八萬七絕緣層
第三十八萬八導電層
第三十八萬八絕緣層
第三十八萬九導電層
第三十八萬九絕緣層
第三十九萬導電層
第三十九萬絕緣層
第三十九萬一導電層
第三十九萬一絕緣層
第三十九萬二導電層
第三十九萬二絕緣層
第三十九萬三導電層
第三十九萬三絕緣層
第三十九萬四導電層
第三十九萬四絕緣層
第三十九萬五導電層
第三十九萬五絕緣層
第三十九萬六導電層
第三十九萬六絕緣層
第三十九萬七導電層
第三十九萬七絕緣層
第三十九萬八導電層
第三十九萬八絕緣層
第三十九萬九導電層
第三十九萬九絕緣層
第四十萬導電層
第四十萬絕緣層
第四十萬一導電層
第四十萬一絕緣層
第四十萬二導電層
第四十萬二絕緣層
第四十萬三導電層
第四十萬三絕緣層
第四十萬四導電層
第四十萬四絕緣層
第四十萬五導電層
第四十萬五絕緣層
第四十萬六導電層
第四十萬六絕緣層
第四十萬七導電層
第四十萬七絕緣層
第四十萬八導電層
第四十萬八絕緣層
第四十萬九導電層
第四十萬九絕緣層
第四十一萬導電層
第四十一萬絕緣層
第四十一萬一導電層
第四十一萬一絕緣層
第四十一萬二導電層
第四十一萬二絕緣層
第四十一萬三導電層
第四十一萬三絕緣層
第四十一萬四導電層
第四十一萬四絕緣層
第四十一萬五導電層
第四十一萬五絕緣層
第四十一萬六導電層
第四十一萬六絕緣層
第四十一萬七導電層
第四十一萬七絕緣層
第四十一萬八導電層
第四十一萬八絕緣層



【圖5】

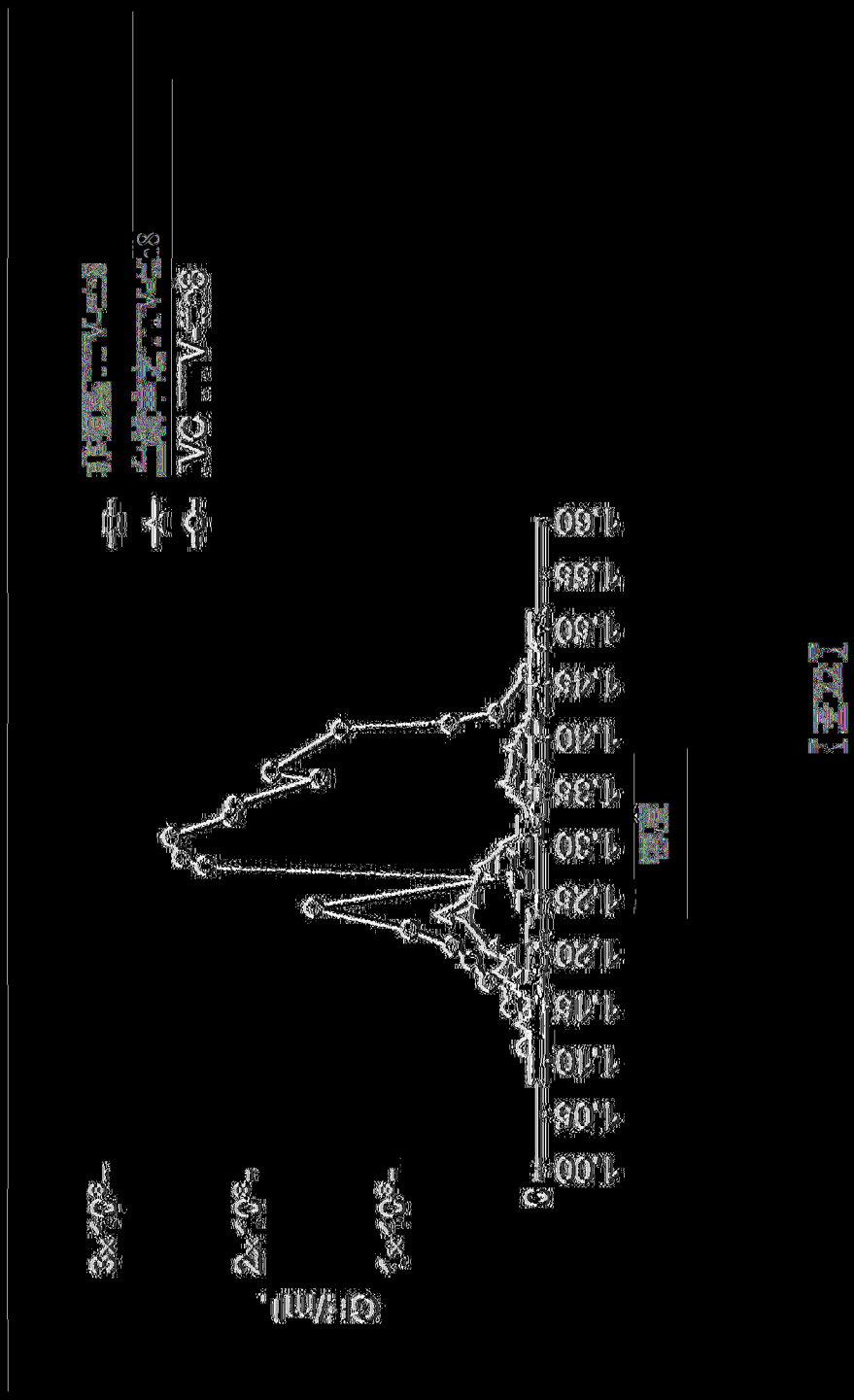
溶離層析

FMS 晶片
Lipo-mate
Lipo-mate
第2組馬達
(未連線)
第1組馬達
(未連線)
電池
(63)



發光
(次/秒/mm²)
發光
(次/秒/mm²)

mRNA
5'
3'
Seq1
Seq2
Seq3
Seq4
Seq5
Seq6



圖式

〔第2A圖〕

含DNA酶K溶液(vg/mL)

