(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103492574 B
(45)授权公告日 2015.12.09

(21)申请号 201280019807.9
(22)申请日 2012.02.21
(30)优先权数据
61/445,449 2011.02.22 US
61/550,123 2011.10.21 US
61/598,728 2012.02.14 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.10.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/025970 2012.02.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/115980 EN 2012.08.30
(73)专利权人 加州理工学院
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 亚历杭德罗·本杰明·巴拉兹
大卫·巴尔的摩
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 李平 郑霞
(51)Int.Cl.
C12N 15/83(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
审查员 徐丹

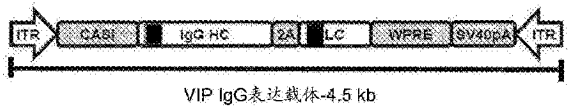
权利要求书4页 说明书42页
序列表57页 附图30页

(54)发明名称

使用腺相关病毒(AAV)载体递送蛋白

(57)摘要

本文公开了用于使用腺相关病毒(AAV)载体递送感兴趣的蛋白的组合物、系统和方法。公开了包括5'和3'反向重复序列(ITR)、启动子、用于多核苷酸的插入的限制性酶切位点和转录后调节元件的AAV载体。还公开了AAV载体用于表达中和抗体的用途。



VIP IgG表达载体-4.5 kb

CN 103492574 B

1. 一种病毒载体，包括：

腺相关病毒 (AAV) 的 5’末端反向重复序列 (ITR) 和 3’AAV ITR；

合成的启动子，其中所述合成的启动子是 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列；

所述合成的启动子下游的限制性酶切位点以允许编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸的插入，和

所述限制性酶切位点下游的转录后调节元件，

其中所述合成的启动子、所述限制性酶切位点和所述转录后调节元件位于所述 5’AAV ITR 的下游和所述 3’AAV ITR 的上游。

2. 根据权利要求 1 所述的病毒载体，还包括插入在所述限制性酶切位点并与所述合成的启动子可操作地连接的多核苷酸，其中所述多核苷酸包括感兴趣的蛋白的编码区。

3. 根据权利要求 2 所述的病毒载体，其中所述多核苷酸包括所述感兴趣的蛋白的所述编码区的直接上游的信号肽序列。

4. 根据权利要求 3 所述的病毒载体，其中所述信号肽选自由以下组成的组：干扰素的信号肽、人生长激素的信号肽、红细胞生成素 (EPO) 的信号肽、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 的信号肽、胰岛素的信号肽、和其任何组合。

5. 根据权利要求 1 所述的病毒载体，其中所述病毒载体包括与 Kozak 共有序列具有至少 70％、至少 80％、至少 90％序列同一性或更多的序列同一性的核苷酸序列。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的病毒载体，其中所述感兴趣的蛋白选自由以下组成的组：全长抗体、生长激素 (GH)、胰岛素样生长因子 (IGF)、G-CSF、红细胞生成素 (EPO)、胰岛素、抗体 Fab 片段、抗体 scFV 片段、血友病相关的凝血蛋白、抗肌萎缩蛋白、溶酶体酸性脂肪酶、苯丙氨酸羟化酶 (PAH)、和糖原贮积病相关的酶。

7. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的病毒载体，其中所述感兴趣的蛋白是病毒的中和抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的病毒载体，其中所述病毒的中和抗体是人类免疫缺陷病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、或流感病毒的中和抗体。

9. 根据权利要求 8 所述的病毒载体，其中所述 HIV 的中和抗体选自由以下组成的组：b12 抗 -HIV 抗体、2G12 抗 -HIV 抗体、4E10 抗 -HIV 抗体、和 2F5 抗 -HIV 抗体。

10. 根据权利要求 8 所述的病毒载体，其中所述 HCV 的中和抗体选自由以下组成的组：AR3A 抗 -HCV 抗体、AR3B 抗 -HCV 抗体、和 AR4A 抗 -HCV 抗体。

11. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的病毒载体，其中所述感兴趣的蛋白是疟疾的中和抗体。

12. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的病毒载体，其中所述转录后调节元件是病毒转录后调节元件。

13. 根据权利要求 12 所述的病毒载体，其中所述病毒转录后调节元件是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件 (WPRE)、乙型肝炎病毒转录后调节元件 (HBVPRE)、或 RNA 转运元件 (RTE)。

14. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的病毒载体，还包括所述转录后调节元件下游的转录终止区。

15. 根据权利要求 14 所述的病毒载体，所述转录终止区包括 SV40 晚期 poly(A) 序列、

兔 β-珠蛋白 poly(A) 序列、或牛生长激素 poly(A) 序列。

16. 根据权利要求 2 所述的病毒载体，其中所述多核苷酸包括免疫球蛋白的重链可变区的第一编码区和所述免疫球蛋白的轻链可变区的第二编码区。

17. 根据权利要求 16 所述的病毒载体，其中所述第一编码区和所述第二编码区被 2A 序列分开。

18. 根据权利要求 17 所述的病毒载体，其中所述 2A 序列是 F2A 序列。

19. 根据权利要求 16-18 中任一项所述的病毒载体，其中将所述第一编码区的 5' 与第一信号肽序列融合并将所述第二编码区的 5' 与第二信号肽序列融合。

20. 根据权利要求 19 所述的病毒载体，其中所述第一信号肽序列和所述第二信号肽序列是不同的。

21. 根据权利要求 1-5、16、17 或 18 中任一项所述的病毒载体，其中起始于所述 5' AAV ITR 并终止于所述 3' AAV ITR 的区是至少 2.5kb。

22. 包括合成的启动子和在受试对象中编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的重组腺相关病毒 (AAV) 在制备用于在所述受试对象体内产生所述感兴趣的蛋白的药剂中的用途，其中所述合成的启动子是 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列且所述编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列是至少 1.4kb。

23. 根据权利要求 22 所述的用途，其中所述感兴趣的蛋白是抗体。

24. 根据权利要求 23 所述的用途，其中所述抗体是全长抗体。

25. 根据权利要求 23 所述的用途，其中所述抗体选自由以下组成的组：b12 抗 -HIV 抗体、2G12 抗 -HIV 抗体、4E10 抗 -HIV 抗体、2F5 抗 -HIV 抗体、AR3A 抗 -HCV 抗体、AR3B 抗 -HCV 抗体、AR4A 抗 -HCV 抗体、和抗 - 疟疾抗体。

26. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的用途，其中所述感兴趣的蛋白在所述受试对象的血清中以至少 9 μg/ml 的量表达。

27. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的用途，其中所述感兴趣的蛋白在所述受试对象的血清中以至少 100 μg/ml 的量表达。

28. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的用途，其中所述感兴趣的蛋白在所述受试对象的血清中以至少 500 μg/ml 的量表达。

29. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的用途，其中所述重组 AAV 通过以下步骤产生：

提供具有病毒载体、用于产生生产性 AAV 感染的辅助功能、和 AAVcap 基因的包装细胞系，其中所述病毒载体包括 5'AAV 末端反向重复序列 (ITR)、3'AAV ITR 和编码所述感兴趣的蛋白的核苷酸序列；和

从所述包装细胞系的上清液中回收重组 AAV 病毒。

30. 根据权利要求 29 所述的用途，其中所述病毒载体是权利要求 1-21 中任一项所述的病毒载体。

31. 重组腺相关病毒 (AAV) 在制备用于减少或抑制受试对象中病毒感染风险的药剂中的用途，其中所述 AAV 包括编码所述病毒的中和抗体的核苷酸序列和合成的启动子，所述合成的启动子是 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列。

32. 第一重组腺相关病毒 (AAV) 和第二重组 AAV 在制备用于减少或抑制受试对象中病毒感染风险的药剂中的用途，其中所述第一重组 AAV 包括第一合成的启动子和编码所述病

毒的中和抗体的核苷酸序列，所述第一合成的启动子是SEQ ID NO:1的核苷酸序列，且其中所述第二重组AAV包括第二合成的启动子和编码所述病毒的第二中和抗体的核苷酸序列，所述第二合成的启动子是SEQ ID NO:1的核苷酸序列。

33.根据权利要求32所述的用途，其中所述受试对象是哺乳动物。

34.根据权利要求32所述的用途，其中所述受试对象是人。

35.根据权利要求32所述的用途，其中所述中和抗体是全长抗体。

36.根据权利要求32所述的用途，其中与没有用所述重组AAV处理的所述受试对象相比，所述药剂减少所述受试对象中的感染风险至少5倍。

37.根据权利要求36所述的用途，其中与没有用所述重组AAV处理的所述受试对象相比，所述药剂减少所述受试对象中的感染风险至少20倍。

38.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述药剂抑制所述受试对象中的病毒感染。

39.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述中和抗体在所述受试对象的血清中以至少9μg/ml的量表达。

40.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述中和抗体在所述受试对象的血清中以至少100μg/ml的量表达。

41.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述中和抗体在所述受试对象的血清中以至少500μg/ml的量表达。

42.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述病毒是人类免疫缺陷病毒(HIV)或丙型肝炎病毒(HCV)。

43.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述中和抗体选自由以下组成的组：b12抗-HIV抗体、2G12抗-HIV抗体、4E10抗-HIV抗体、2F5抗-HIV抗体、AR3A抗-HCV抗体、AR3B抗-HCV抗体、和AR4A抗-HCV抗体。

44.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述药剂用于肌内注射、阴道内注射、静脉注射、腹腔内注射、皮下注射、表皮给药、皮内给药、或鼻腔给药。

45.根据权利要求32-37中任一项所述的用途，其中所述药剂用于至多每年一次施用至所述受试对象。

46.根据权利要求45所述的用途，其中所述药剂用于至多每5年一次施用至所述受试对象。

47.根据权利要求45所述的用途，其中所述药剂用于至多每10年一次施用至所述受试对象。

48.一种生产重组腺相关病毒(AAV)的方法，包括：

提供具有病毒构建体、用于产生生产性AAV感染的辅助功能、和AAVcap基因的包装细胞系，所述病毒构建体包括合成的启动子、5'AAV末端反向重复序列(ITR)和3'AAV ITR，所述合成的启动子是SEQ ID NO:1的核苷酸序列；和

从所述包装细胞系的上清液中回收重组AAV病毒。

49.根据权利要求48所述的方法，其中所述AAV cap基因编码来自血清型1、血清型2、血清型4、血清型5、血清型6、血清型7、血清型8、或血清型9的衣壳。

50.根据权利要求48所述的方法，其中所述病毒构建体是权利要求1-21中任一项所述

的病毒载体。

51. 根据权利要求 48 或 49 所述的方法，其中所述重组 AAV 不是自身互补 AAV(scAAV)。

52. 一种分离的、合成的或重组的启动子多核苷酸，所述启动子多核苷酸是 SEQ ID NO:1 的核酸序列。

使用腺相关病毒(AAV)载体递送蛋白

[0001] 相关申请

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求以下的美国临时申请号的优先权:2011年2月22日提交的61/445,449;2011年10月21日提交的61/550,123;和2012年2月14日提交的61/598,728。这些优先权申请通过引用整体明确并入本文。

[0003] 关于联邦政府赞助R&D的声明

[0004] 本发明根据美国国立卫生研究院(the National Institutes of Health)授予的HHSN266200500035C,在政府的支持下完成的。政府在本发明中具有某些权利。

[0005] 序列表的引用

[0006] 本申请与电子格式的序列表一起提交。提供序列表作为2012年2月21日创建的、大小为148Kb、命名为SEQLISTING.TXT的文件。序列表的电子格式中的信息通过引用整体并入本文。

[0007] 背景

发明领域

[0008] 本申请一般涉及免疫学和基因递送领域。更具体地,本申请涉及用于生产感兴趣的蛋白诸如抗体的组合物、系统和方法。

[0009] 相关技术的描述

[0010] 尽管巨大的努力,至今还没有开发用于人类免疫缺陷病毒(HIV)的有效的疫苗。已鉴定出许多抗体为能够中和大部分循环的HIV毒株。尽管大量的努力集中在设计能够从头(de novo)诱发将针对相似表位的抗体的免疫原上,但传统的疫苗是否将能够诱发现有的广泛中和抗体的类似物仍然不清楚。作为免疫的替代,本文描述的载体介导的基因转移能够被用于设计现有的广泛中和抗体的分泌进入循环。

[0011] 现有的目标为生产遗传编码的治疗蛋白的方法仅导致有限水平的基因表达。例如,先前使用基于腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)的载体设计体液免疫的努力导致中度的抗体生产(Lewis等人,J.Virol.76:8769-8775(2002)),其随后通过使用替代的衣壳(Fang等人Nature Biotechnol.,23:584-590(2005))和以运载能力为代价的增加表达的自身互补AAV(scAAV)载体(McCarty.,Mol.Ther.,16:1648-1656(2008))被改进。近来,将scAAV载体用于由小的、人工融合的抗体片段组成的猿猴免疫缺陷病毒(SIV)-中和免疫粘附素的直接表达(Johnson等人,Nature Med.,15(8):901-906(2009))。然而,该预防的功效被针对免疫粘附素蛋白的内源免疫应答所限制。另外,现有的基于AAV方法的效力的缺乏可追溯到AAV载体无能力传递长度大于约4800碱基对的序列。Dong等人,Human Gene Therapy,7:2101-2112(1996)。AAV载体的该限制已使得难以设计包含编码治疗蛋白的基因和表达促进元件以允许用于特别是体内(in vivo)高水平生产的载体。因此,对能够有效表达基因的紧凑型载体和系统的开发具有迫切的需求。

[0012] 概述

[0013] 本文公开的一些实施方案提供了病毒载体,其中该病毒载体包括:腺相关病毒

(AAV)的5’末端反向重复序列(inverted terminal repeat,ITR)和3’AAV ITR;启动子;启动子下游的限制性酶切位点以允许编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸的插入,和限制性酶切位点下游的转录后调节元件,其中启动子、限制性酶切位点和转录后调节元件位于5’AAV ITR的下游和3’AAV ITR的上游。

[0014] 在一些实施方案中,该病毒载体还包括插入在限制性酶切位点并与启动子可操作地连接的多核苷酸,其中多核苷酸包括感兴趣的蛋白的编码区。

[0015] 在一些实施方案中,多核苷酸包括感兴趣的蛋白的编码区的直接上游的信号肽序列。在一些实施方案中,信号肽选自以下组成的组:干扰素的信号肽、人生长激素的信号肽、红细胞生成素(EPO)的信号肽、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的信号肽、胰岛素的信号肽、和其任何组合。

[0016] 在一些实施方案中,病毒载体包括与Kozak共有序列具有至少约70%、至少约80%、至少约90%序列同一性或更多的序列同一性的核苷酸序列。

[0017] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白选自以下组成的组:全长抗体、生长激素(GH)、胰岛素样生长因子(IGF)、G-CSF、红细胞生成素(EPO)、胰岛素、抗体Fab片段、抗体scFV片段、血友病相关的凝血蛋白、抗肌萎缩蛋白、溶酶体酸性脂肪酶、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、糖原贮积病相关的酶、和其任何变体。

[0018] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白是病毒的中和抗体。在一些实施方案中,病毒的中和抗体是人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、或流感病毒的中和抗体。在一些实施方案中,HIV的中和抗体选自以下组成的组:b12抗-HIV抗体、2G12抗-HIV抗体、4E10抗-HIV抗体、2F5抗-HIV抗体、和其任何变体。在一些实施方案中,HCV的中和抗体选自以下组成的组:AR3A抗-HCV抗体、AR3B抗-HCV抗体、AR4A抗-HCV抗体、和其任何变体。在一些实施方案中,流感病毒的中和抗体选自以下组成的组:F10抗-流感抗体、CR6261抗-流感抗体、FI6抗-流感抗体、TCN32抗-流感抗体、和其任何变体。

[0019] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白是疟疾的中和抗体。

[0020] 在一些实施方案中,启动子包括巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、鸡β-肌动蛋白(CAG)启动子、泛素C(UBC)启动子、或其任何变体。在一些实施方案中,启动子包括剪接供体、剪接受体、或其任何变体。在一些实施方案中,剪接供体包括与SEQ ID NO:5具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,剪接受体包括与SEQ ID NO:6具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,启动子包括与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,启动子包括与SEQ ID NO:2-4中任一个具有至少90%序列同一性的核苷酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,转录后调节元件是病毒转录后调节元件。在一些实施方案中,病毒转录后调节元件是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)、乙型肝炎病毒转录后调节元件(HBVPRE)、RNA转运元件(RNA transport element,RTE)、或其任何变体。

[0022] 在一些实施方案中,病毒载体还包括转录后调节元件下游的转录终止区。在一些实施方案中,转录终止区包括SV40晚期poly(A)序列、兔β-珠蛋白poly(A)序列、牛生长激素poly(A)序列、或其任何变体。

[0023] 在一些实施方案中,启动子包括内含子。在一些实施方案中,内含子是包括与SEQ ID NO:8具有至少90%序列同一性的核苷酸序列的合成的内含子。

[0024] 在一些实施方案中，多核苷酸包括免疫球蛋白的重链可变区的第一编码区和免疫球蛋白的轻链可变区的第二编码区。在一些实施方案中，第一编码区和第二编码区被 2A 序列分开。在一些实施方案中，2A 序列是 F2A 序列。

[0025] 在一些实施方案中，将第一编码区的 5’与第一信号肽序列融合并将第二编码区的 5’与第二信号肽序列融合。在一些实施方案中，第一信号肽序列和第二信号肽序列是不同的。

[0026] 在一些实施方案中，起始于 5’ ITR 并终止于 3’ ITR 的区是至少约 2.5kb。

[0027] 本文的一些实施方案提供了用于体内生产感兴趣的蛋白的方法，其中该方法包括：提供包括编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的重组腺相关病毒（AAV）；并将重组 AAV 施用至受试对象，据此重组 AAV 在受试对象中表达抗体，其中核苷酸是至少约 1.4kb。

[0028] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白是抗体。在一些实施方案中，抗体是全长抗体。在一些实施方案中，抗体选自以下组成的组：b12 抗 -HIV 抗体、2G12 抗 -HIV 抗体、4E10 抗 -HIV 抗体、2F5 抗 -HIV 抗体、F10 抗 - 流感抗体、FI6 抗 - 流感抗体、TCN32 流感抗体、CR6261 抗 - 流感抗体、AR3A 抗 -HCV 抗体、AR3B 抗 -HCV 抗体、AR4A 抗 -HCV 抗体、抗 - 疟疾抗体、和其任何变体。

[0029] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以至少约 9 μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以至少约 100 μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以至少约 500 μg/ml 的量表达。

[0030] 在一些实施方案中，通过以下步骤产生重组 AAV：提供具有病毒载体、用于产生生产性 AAV 感染的辅助功能、和 AAV cap 基因的包装细胞系，其中病毒载体包括 5’AAV 末端反向重复序列（ITR）、3’ AAV ITR 和编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列；和从包装细胞系的上清液中回收重组 AAV 病毒。

[0031] 在一些实施方案中，病毒载体是本文公开的任一病毒载体的病毒载体。

[0032] 本文公开的一些实施方案提供了用于减少或抑制受试对象中病毒感染风险的方法，其中该方法包括：提供包括编码病毒的中和抗体的核苷酸序列的重组腺相关病毒（AAV）；并将重组 AAV 施用至受试对象，据此重组 AAV 在受试对象中表达抗体。

[0033] 在一些实施方案中，该方法还包括提供包括编码病毒的第二中和抗体的核苷酸序列的第二重组 AAV。

[0034] 在一些实施方案中，受试对象是哺乳动物。在一些实施方案中，受试对象是人。

[0035] 在一些实施方案中，中和抗体是全长抗体。

[0036] 在一些实施方案中，与没有用病毒载体处理的受试对象相比，该方法减少受试对象中感染风险至少约 5 倍。在一些实施方案中，与没有用病毒载体处理的受试对象相比，该方法减少受试对象中感染风险至少约 20 倍。在一些实施方案中，该方法抑制受试对象中病毒感染。

[0037] 在一些实施方案中，抗体在受试对象的血清中以至少约 9 μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，抗体在受试对象的血清中以至少约 100 μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，抗体在受试对象的血清中以至少约 500 μg/ml 的量表达。

[0038] 在一些实施方案中，病毒是人类免疫缺陷病毒（HIV）、丙型肝炎病毒（HCV）、或流感病毒。

[0039] 在一些实施方案中，中和抗体选自以下组成的组：b12 抗 -HIV 抗体、2G12 抗 -HIV 抗体、4E10 抗 -HIV 抗体、2F5 抗 -HIV 抗体、F10 抗 - 流感抗体、CR6261 抗 - 流感抗体、TCN32 流感抗体、FI6 抗 - 流感抗体、AR3A 抗 -HCV 抗体、AR3B 抗 -HCV 抗体、AR4A 抗 -HCV 抗体、和其任何变体。

[0040] 在一些实施方案中，通过肌内注射、阴道内注射、静脉注射、腹腔内注射、皮下注射、表皮给药、皮内给药、或鼻腔给药将重组 AAV 施用至受试对象。

[0041] 在一些实施方案中，至多每年一次将重组 AAV 施用至受试对象。在一些实施方案中，至多每 5 年一次将重组 AAV 施用至受试对象。在一些实施方案中，至多每 10 年一次将重组 AAV 施用至受试对象。

[0042] 本文公开的一些实施方案提供了生产重组腺相关病毒（AAV）的方法，其中该方法包括：提供具有包括 5’AAV 末端反向重复序列（ITR）和 3’AAV ITR、用于产生生产性 AAV 感染的辅助功能、和 AAV cap 基因的病毒构建体的包装细胞系；和从包装细胞系的上清液中回收重组 AAV 病毒。

[0043] 在一些实施方案中，AAV cap 基因编码来自血清型 1、血清型 2、血清型 4、血清型 5、血清型 6、血清型 7、血清型 8、血清型 9 的衣壳、或其变体。

[0044] 在一些实施方案中，病毒构建体是本文公开的任何病毒载体。

[0045] 在一些实施方案中，重组 AAV 不是自身互补的 AAV（scAAV）。

[0046] 本文公开的一些实施方案提供了一种分离的、合成的或重组的多核苷酸，其中该多核苷酸包括：与 SEQ ID NO:1 具有至少约 90% 或更多的序列同一性的核酸序列。在一些实施方案中，多核苷酸包括选自 SEQ ID NO:2-4 的核苷酸序列。

[0047] 附图简述

[0048] 图 1A 是显示在肌内注射 2×10^{9}GC 的从一组启动子表达荧光素酶的 AAV2/8 载体后 15 周的荧光素酶活性的图（n=2）。图 1B 是组合 CMV 增强子和鸡 β - 肌动蛋白启动子、之后是位于泛素增强子区两侧的剪接供体（SD）和剪接受体（SA）的 CASI 启动子的实施方案的示意图展示。图 1C 是显示肌内注射 1×10^{9}GC 的编码由指示的启动子驱动的荧光素酶的 AAV2/8 后 8 周，与传统的 CMV 和 CAG 启动子相比，来自由 CASI 驱动的 AAV 载体的荧光素酶活性的图（n=2）。图 1D 是显示 CMV 驱动的具有或不具有 WPRE、由指示的聚腺苷酸化信号终止的 AAV 载体的施用后 6 周的荧光素酶活性的图（n=2）。图 1E 是用于抗体表达的表达盒的示意图展示，包括反向重复序列（ITR）、CASI 启动子、与被自加工（self-processing）2A 序列分开的 k 轻链连接的 IgG1 重链、用于改善表达的 WPRE、和 SV40 晚期 - 聚腺苷酸化信号。将抗体重链和轻链的 V- 区克隆入载体的以实心的方框指示的位置处。

[0049] 图 2 是本申请的范围内的 AAV 载体的实施方案的示意图展示。

[0050] 图 3A 是显示用携带具有包括弗林蛋白酶裂解位点的标准的或优化的 F2A 序列的以上显示的抗体转基因的载体转染后，通过 ELISA 比较抗体体外（in vitro）表达的柱形图。图 3B 是显示用携带具有天然的或人生长激素（HGH）衍生的融合至重链基因、轻链基因或两种基因的信号肽的 4E10 的载体转染之后，通过 ELISA 比较 4E10 抗体的体外表达的柱形图。图 3C 是显示用携带在标准表达盒中的或其中剪接供体和受体被突变以减少外来的剪接的可能的盒中的 4E10 的载体转染之后，通过 ELISA 比较 4E10 抗体的体外表达的柱形图。图 3D 是优化用于体外表达的示例性的 IgG1 转基因的示意图展示。突出的是重链和轻

链信号序列(“SS”)、F2A 自加工肽(“F2A”)和预测的剪接供体和受体位点(“重链恒定区”和“k 恒定”中的实线)。

[0051] 图 4A-D 显示 HIV 被从优化表达的转基因 :b12(图 4A)、2G12(图 4B)、4E10(图 4C)和 2F5 (图 4D)表达的抗体中和(n=3,RLU= 相对荧光素酶单位)。

[0052] 图 5A 显示肌内注射 1×10^{10}基因组拷贝的表达荧光素酶的 AAV2/8 后 15 周的代表性的 Rag2/γc 小鼠的 Xenogen 图像。图 5B 是显示通过接受 1×10^{10}或 1×10^{11}GC 的编码荧光素酶的 AAV2/8 的肌内注射的 Rag2 / γc / 小鼠的 Xenogen 成像的荧光素酶活性的定量说明长期剂量依赖性的表达的图(n=2)。图 5C 是显示循环中人 IgG 的浓度的图,如通过对取自肌内注射 1×10^{10}或 1×10^{11}GC 的表达 4E10-IgG1 的 AAV2/8 进入 Rag2 / γc / 小鼠后的血清样品的总的人 IgG ELISA 测量的(n=2)。

[0053] 图 6 是显示在免疫缺陷的 NOD/SCID/γc (NSG) Rag2/γc (Rag2)或免疫活性的 C57BL/6 (B6)和 Balb/C 小鼠中肌内注射产生 b12-IgG 的优化的表达载体的 1×10^{11}基因组拷贝后,通过 ELISA 定量人 IgG 的绘图(绘图显示平均值和标准误差,n=4)。

[0054] 图 7 是显示 HIV 攻击后 HuPBMC-NSG 人源化的小鼠中 CD4 细胞的消耗的图。

[0055] 图 8A 是显示循环中人 IgG 的浓度的图,如通过对取自肌内注射表达荧光素酶或 b12-IgG 的载体后 6 周的血清样品的 ELISA 测量的(ND,未检出)。图 8B 显示用 10ng p24NL4-3 腹腔内攻击进入 6 周前接受表达荧光素酶(左图)或 b12-IgG1 (右图)的 AAV2/8 载体的动物后的人源化的小鼠中 CD4T 细胞的消耗(n=6)。

[0056] 图 9 显示由不同的广泛中和 HIV 抗体介导的保护的比较。图 9A 显示循环中的抗体的浓度,如通过对取自肌内注射表达 4 种广泛中和 HIV 抗体的载体后的血清样品的总的人 IgG ELISA 测量的(n=8)。图 9B 显示用 5ng p24NL4-3 的静脉 HIV 攻击后的 4 种广泛中和 HIV 抗体在保护 huPBMC-NSG 人源化的小鼠免受 CD4 细胞消耗方面的相对效力的比较(n=8)。图 9C 显示取自攻击后 8 周的脾的切片的免疫组化染色检测的 HIV p24。箭头指示被列为 p24 表达阳性的细胞。比例尺,40mm。图 9D 显示指示被感染的动物的脾中的表达 p24 细胞的相对频率的脾的免疫组化染色的定量。ND,未检出。星号指示通过双侧 t 检验的来自荧光素酶对照小鼠对表达抗体的小鼠的显著差异的结果(n=4-6)**P,0.01,***P,0.0001。图 9A-B 显示平均值和标准误差均值(s.e.m.);图 9D 显示平均值和标准差(s.d.)。

[0057] 图 10 显示在 HIV 攻击之前总的人 IgG 和结合 gp120 的 IgG 的血清浓度。图 10A 是显示由移植细胞和 VIP 产生的总的人抗体浓度的图,如通过对取自肌内注射表达荧光素酶或 b12 抗体的载体后 5 周的和人 PBMC 的过继转移后 3 周的和 IV HIV 攻击之前的当天的血清样品的人 IgG ELISA 测量的(n=8)。图 10B 是显示使用 gp120 特异性的 ELISA 测量 HIV 特异性的抗体的浓度定量的相同时间点的抗体的浓度的图(n=8)。

[0058] 图 11 是显示 b12 抗体介导 CD4 细胞的保护随时间推移的图。作为 NL4-3 的剂量的静脉攻击的结果的在 huPBMC-NSG 人源化的小鼠中的 CD4 细胞消耗显示在最右边。表达荧光素酶的小鼠(左图)易于 CD4 细胞丧失,而表达 b12 的小鼠(右图)显示在所有剂量下被保护免受 HIV (n=8)。

[0059] 图 12A 是显示 b12 的表达随时间推移作为剂量的函数的绘图,如由对取自 AAV 施用后的血清样品的总的人 IgG ELISA 确定的(n=8)。接受表达荧光素酶载体的小鼠没有呈现出可检测的人抗体(n=12)。图 12B 是显示在攻击之前 1 天、人 PBMC 的过继转移后 3 周和

肌内注射指示剂量的 AAV 后 15 周的血清中 b12 的浓度的图，如通过 gp120 特异性的 ELISA 测量能够结合 HIV 的抗体的部分确定的(n=8-12)。图 12C 是显示在 HuPBMC-NSG 人源化的小鼠中的 CD4 细胞消耗作为用 10ng 的 NL4-3 静脉攻击进入表达一系列 b12 的动物的结果的绘图，显示保护免受感染必需的抗体的最小剂量。图 12A 和 12C 显示平均值和标准误差，且图 12B 显示个体动物和平均值(n=8-12)。

[0060] 图 13A 是显示 VRC01 的表达随时间推移作为剂量的函数的图，如由对取自 AAV 施用后的血清样品的总的人 IgG ELISA 确定的(n=8)。接受表达荧光素酶的载体的小鼠没有呈现出可检测的人抗体(n=12)。图 13B 是在攻击之前 1 天、人 PBMC 的过继转移后 3 周和肌内注射 AAV 的指示剂量后 15 周的血清中 VRC01 的浓度的图，如由 gp120 特异性的 ELISA 测量能够结合 HIV 的抗体的部分确定的(n=8-12)。图 13C 是显示作为用 10ng 的 NL4-3 静脉内攻击进入表达一系列 VRC01 的动物的结果的在 huPBMC-NSG 人源化的小鼠中的 CD4 细胞消耗的图，显示保护免受感染必需的抗体的最小剂量。图 13A 和 13C 显示平均值和标准误差，及图 13B 显示个体动物和平均值(n=8-12)。

[0061] 图 14 是显示在 Balb/C 小鼠中肌内注射 1×10^{11}基因组拷贝(GC)的表达未被修饰的 b12、F10、或 CR6261 抗体的重组 AAV 病毒后，由 ELISA 定量血清中人 IgG 的图(绘图显示平均值和标准误差，n=8)。

[0062] 图 15 显示被修饰的 F10 和 CR6261 抗体增加的表达。图 15A 是比较 b12 抗体和 F10 和 CR6261WT 序列，并与由 F10 或 CR6261 重链与 b12 轻链构成的嵌合构建体相比的柱形图。图 15B 是列出在 AAV 载体中使用的不同的被修饰的 b12 和 / 或 4E10 抗体轻链的表。图 15C 是比较由融合至 b12 和 / 或 4E10 抗体轻链序列的 F10VL 序列组成的 F10 抗体轻链变体的表达水平的柱形图。图 15D 是比较由融合至 b12 和 / 或 4E10 抗体轻链序列的 CR6261VL 序列组成的 CR6261 抗体轻链变体的表达水平的柱形图。

[0063] 图 16A 是显示在 Balb/C 小鼠中肌内注射 1×10^{11}GC 的产生 b12、F10、或 CR6261 抗体的优化表达载体后，由 ELISA 定量血清中人 IgG 的图(绘图显示平均值和标准误差，n=6)。图 16B 是显示取自被给予表达 b12、F10 或 CR6261 抗体的 VIP 的小鼠的血清的中和活性的绘图，如使用 GFP 报告测定针对 5 种流感毒株(PR/8、CA/09、SI/06、VN/04、JP/57)测量的。值根据导致 50% 的流感感染的中和的血清稀释倍数计算。虚线代表检验的最低稀释(20 倍)并将低于这个线的值从曲线拟合外推或沿着轴绘制以代表无可检测的中和活性。

[0064] 图 17A 是显示循环中人 IgG 的浓度的图，如通过取自肌内注射表达 b12、F10、或 CR6261 的载体后 5 周和在病毒攻击之前 2 天的血清样品中由总的人 IgG ELISA 测量的。图 17B 是显示在接受表达 VIP 对照(b12)或 F10-IgG 的动物中用 $1x10^{4}$PFU 的 CA/09 流感鼻内攻击后，在 Balb/C 小鼠中观察到的体重下降的图(n=8)。图 17C 是显示用 CA/09 攻击后 4 天的体重下降和 CR6261-IgG 浓度的相关性 d，用 $5x10^{4}$PFU 的 SI06 在接受表达 VIP 对照(b12)或 F10-IgG 的动物中鼻内攻击后，在 Balb/C 小鼠中观察到的体重下降的图(n=8)(Figure17C is a graph showing correlation of weight loss4days post challenge with CA/09and CR6261-IgG concentration.d,Weight loss observed in Balb/C mice following intranasal challenge with5x104PFU of SI06in animals that received VIP expressing control(b12)or F10-IgG(n=8))。图 17D 是显示 PR/8 的鼻内攻击后，表达 b12 和 F10 的 Balb/C 小鼠中的存活率的图。图 17E 是显示在接受表达 VIP 对照(b12)或 F10

的动物中用 1000PFU 的 PR/8 鼻内攻击后，在 Balb/C 小鼠中观察到的体重下降的图（n=8）。图 17F-G 是显示 5 种流感毒株（PR/8、CA/09、SI/06、VN/04、JP/57）的体外中和的绘图，如通过使用取自 CA/09（图 17F）或 SI06（图 17G）攻击后接受表达 b12、F10 或 CR6261 的重组 AAV 的动物的血清的 GFP 报告分析检测的。值根据导致 50% 的流感感染的中和的稀释倍数计算。虚线代表检验的最低稀释（20 倍稀释）并将低于这个线的值从曲线拟合外推或沿着轴绘制以代表无可检测的中和活性。

[0065] 图 18A 是显示在肌内注射 1×10^{11}GC 的表达荧光素酶的载体之后，由年幼（3 个月）的或年老（12 个月）的 NOD/SCID/γc$^{-/-}$ (NSG) 小鼠的 Xenogen 成像定量荧光素酶的表达的图（n=8）。图 18B 是显示在肌内注射 1×10^{11}GC 的表达 F10-IgG 的载体之后，通过年幼的（3 个月）或年老的（12 个月）NSG 小鼠的血清中的 ELISA 定量人 IgG 的图（n=8）。图 18C 是显示用 1000PFU 的 PR/8 流感鼻内攻击后接受表达荧光素酶或 F10-IgG 的重组 AAV 的 3 个月大的 NSG 小鼠的存活（左）和体重下降（右）的图（n=6-8）。图 18D 是显示用 1000PFU 的 PR/8 流感鼻内攻击后接受表达荧光素酶或 F10-IgG 的重组 AAV 的 12 个月大的 NSG 小鼠的存活（左）和体重下降（右）的图（n=4-6）。图 18E 显示取自用 1000PFU 的 PR/8 流感攻击后 5 天接受表达荧光素酶或 F10-IgG 的 VIP 的 3 个月大的 NSG 小鼠的代表性的肺切片的苏木精 - 伊红染色（比例尺 =100 微米）。图 18F 是显示由训练有素的病理学家量化的指示炎症的顺序分数（ordinal score）的绘图（0= 无炎症，5= 最大炎症）。图 18G 是显示肺组织中流感 RNA 的定量随着处死动物用于分析的时间而变化的绘图。

[0066] 图 19A 是实施例 12 中采用的低剂量粘膜 HIV 攻击方案的示意图展示。每周，从小鼠取血并随后通过接种物的非腐蚀性阴道内施用用 50ng JR-CSF 的 p24 攻击，如由实线箭头指示的。图 19B 是显示作为 HIV 感染的结果的循环中 CD4 细胞随时间推移的消耗的图，如通过流式细胞术测量的。图 19C 是显示 13 次阴道内攻击后在处死时的 HIV 血浆病毒载量的绘图，如通过 Abbott RealTime HIV-1Viral Load qPCR 测定测量的。这种测定的检测极限是 200 拷贝 /mL。在检测极限处绘制了不可检测的样品。

[0067] 图 20 是显示在施用表达 B12、AR3A 和 AR3B 抗体的重组 AAV 病毒之后，通过 ELISA 定量血清中人 IgG 的图。

[0068] 详述

[0069] 在下面的详述中，参考形成本文一部分的附图。在详述、附图、和权利要求书中描述的阐述性实施方案不是旨在限制。可利用其他实施方案并可作出其他改变，而不偏离此处呈现的主题的精神或范围。将容易理解的是本公开的各方面，如本文通常描述的，及附图中阐述的，在多种多样的不同的布局中可被排列、替换、组合、和设计，其所有的都明确地涉及并构成本公开内容的部分。

[0070] 本申请提供了可用于生产重组腺相关病毒（AAV）的病毒载体，和能够在合适的环境中表达一种或多种感兴趣的蛋白的重组 AAV，所述环境例如，在用重组 AAV 转染的细胞、组织、器官、或受试对象中。本文还公开了用于制造和使用重组 AAV 的方法。例如，可将重组 AAV 用于体内、离体（ex vivo）、或体外生产感兴趣的蛋白。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白的表达能够被用于诊断、预防、或治疗一种或多种疾病或障碍，诸如减少或抑制病毒感染的风险。

[0071] 在一些实施方案中，病毒载体包括 :AAV 的 5’末端反向重复序列（ITR）和 3’AAV

ITR、启动子、启动子下游的限制性酶切位点以允许编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸的插入、和限制性酶切位点下游的转录后调节元件，其中启动子、限制性酶切位点和转录后调节元件位于 5’ AAV ITR 的下游和 3’ AAV ITR 的上游。可将病毒载体用于，例如，表达一种或多种感兴趣的蛋白(例如，抗体)。例如，病毒载体可包括编码一种或多种抗 -HIV 抗体、抗 -HCV 抗体、抗 - 流感抗体、或其组合的多核苷酸。可将病毒载体用于，例如，为了诊断或治疗目的在受试对象中生产高水平的感兴趣的蛋白(例如，抗体)。

[0072] 定义

[0073] 除非另有定义，本文所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的意义。见，例如 Singleton 等人，Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第 2 版，J.Wiley&Sons(New York,N.Y.1994)；Sambrook 等人，Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Press(Cold Springs Harbor,N.Y.1989)。为了本发明的目的，下面定义了以下的术语。

[0074] 如本文所用的，术语“载体”指的是多核苷酸构建体，典型是被用于传递遗传物质至宿主细胞的质粒或病毒。载体可以是，例如，病毒、质粒、粘粒、或噬菌体。如本文所用的载体可由 DNA 或 RNA 构成。在一些实施方案中，载体由 DNA 构成。“表达载体”是当它存在于合适的环境时，能够指导由该载体携带的一个或多个基因编码的蛋白的表达的载体。载体优选能够自主复制。典型地，表达载体包括转录启动子、基因、和转录终止子。通常将基因表达放置在启动子的控制下，且基因被称为是“可操作地连接至”启动子。

[0075] 如本文所用的，将术语“可操作地连接”用于描述调节元件和基因或其编码区之间的连接。典型地，将基因表达放置在一个或多个调节元件的控制下，所述调节元件例如而不限于，组成型或诱导型启动子、组织特异性调节元件、和增强子。基因或编码区被称为是“可操作地连接至”或“操作地连接至”或“可操作地联合”调节元件，意味着该基因或编码区由该调节元件控制或影响。例如，如果启动子实现编码序列的转录或表达，则启动子可操作地连接至编码序列。

[0076] 如本文所用的术语“构建体”，指的是为了特定核苷酸序列的表达的目的被产生、或将在其他重组核苷酸序列的构建中被使用的重组核酸。

[0077] 如本文所用的术语“核酸”和“多核苷酸”是可互换的且指的是任何核酸，不论是由磷酸二酯键或被修饰的键诸如磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、羧酸甲酯、氨基乙酸酯(acetamidate)、氨基甲酸酯、硫醚、桥接的氨基磷酸酯、桥接的亚甲基膦酸酯、桥接的氨基磷酸酯、桥接的氨基磷酸酯、桥接的亚甲基膦酸酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、二硫代磷酸酯、桥接的硫代磷酸酯或磺内酯键、和此类键的组合构成的。术语“核酸”和“多核苷酸”还具体地包括由除了 5 个生物存在的碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)之外的碱基构成的核酸。

[0078] 术语“调节元件”和“表达控制元件”可互换地被使用并指的是能够在特定宿主生物体中影响可操作地连接的编码序列的表达的核酸分子。这些术语被广泛使用并覆盖促进或调节转录的所有元件，包括启动子、RNA 聚合酶和转录因子的基本互作所需的核心元件、上游元件、增强子、和应答元件(见，例如，Lewin，“Genes V”(Oxford University Press,Oxford)847-873 页)。原核生物中示例性的调节元件包括启动子、操纵基因序列和核糖体结合位点。在真核细胞中使用的调节元件可包括而不限于，转录和翻译控制序列，诸

如启动子、增强子、剪接信号、聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白降解信号、内部核糖体进入元件(IRES)、2A 序列、和类似的,其在宿主细胞中提供和/或调节编码序列的表达和/或编码的多肽的生产。

[0079] 如本文所用的,2A 序列或元件指的是在两个蛋白之间引入的作为接头的小肽,允许聚蛋白的自主核糖体内自加工(见,例如,de Felipe.Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004);deFelipe 等人 Traffic5:616-626(2004))。这些短肽允许多个蛋白从单个载体上共表达。许多 2A 元件是本领域已知的。可在本文公开的方法和体系中使用的 2A 序列的示例,不限制,包括来自口蹄疫病毒(F2A)、马鼻炎 A 病毒(E2A)、一点褐翅蛾(Thosea asigna)病毒(T2A)、和猪捷申病毒 -1 (P2A)的 2A 序列,如美国专利公布号 20070116690 中描述的。

[0080] 如本文所用的,术语“启动子”是允许结合 RNA 聚合酶并指导基因转录的核苷酸序列。典型地,启动子位于基因的 5’非编码区中,临近基因的转录起始位点。在转录起始中起作用的启动子内的序列元件通常特征为共有核苷酸序列。启动子的示例包括,但不限于,来自细菌、酵母、植物、病毒、和哺乳动物(包括人)的启动子。启动子可以是诱导型的、阻抑型的、和/或组成型的。诱导型启动子响应培养条件中的一些变化,诸如温度的变化,启动从在它们的控制下的 DNA 的增加的转录水平。

[0081] 如本文所用的,术语“增强子”指的是能够增加转录效率的调节元件的类型,无论增强子相对于转录起始位点的距离或方向。

[0082] 如本文所用的,术语“抗体”以最广义被使用并具体地覆盖人、非人(例如,鼠科动物)和人源化的单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们呈现所需的生物活性。可使用本文公开的系统和方法表达多种抗体。“抗体”和“免疫球蛋白”通常是异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每一条轻链通过二硫键连接至重链。二硫键的数目在不同的免疫球蛋白同种型的重链之间不同。每一条重链包括可变域(V_H)、之后的一些恒定域。每一条轻链包括在一端的可变域(V_L)和在它的另一端的恒定域。将轻链的恒定域与重链的第一恒定域对齐,并将轻链可变域与重链可变域对齐。尽管抗体呈现与特定抗原的结合特异性,免疫球蛋白包括抗体和缺少抗原特异性的其他抗体样分子。后一种的多肽,例如,由淋巴系统以低水平并由骨髓瘤以增加的水平生产。

[0083] 如本文所用的,术语“变体”指的是具有与参考多核苷酸(或多肽)基本上相似的序列的多核苷酸(或多肽)。在多核苷酸的情况下,与参考多核苷酸相比,变体可具有在 5’末端、3’末端、和/或一个或多个内部位点的一个或多个核苷酸的缺失、替换、添加。变体和参考多核苷酸之间的序列相似性和/或差异可使用本领域已知的常规技术检测,例如聚合酶链式反应(PCR)和杂交技术。变体多核苷酸还包括经合成衍生的多核苷酸,诸如例如通过使用定点诱变产生的多核苷酸。通常,多核苷酸的变体,包括,但不限于 DNA,可与参考多核苷酸具有至少约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更多的序列同一性,如通过由技术人员已知的序列比对程序确定的。在多肽的情况下,变体可具有与参考多肽相比的一个或多个氨基酸的缺失、替换、添加。变体和参考多肽之间的序列相似性和/或差异可使用本领域已知的常规技术检测,例如蛋白质印迹。通常,多肽的变体与参考多肽可具有至少约

60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更多的序列同一性，如通过由技术人员已知的序列比对程序确定的。

[0084] 如本文所用的，术语“转染”指的是将核酸引入宿主细胞内，诸如根据以下描述的通过将细胞与重组 AAV 病毒接触。

[0085] 如本文所用的，术语“转基因”指的是通过人为干涉整合进入靶细胞的一个或多个染色体的任何核苷酸或 DNA 序列。在一些实施方案中，转基因包括编码感兴趣的蛋白的多核苷酸。编码蛋白的多核苷酸通常操作地连接至可用于获得感兴趣的基因的所需表达的其他序列，诸如转录调节序列。在一些实施方案中，转基因可另外包括被用于标记其已整合入的染色体的核酸或其他分子。

[0086] 如本文所用的，“治疗”指的是响应由患者体现的或患者可能易感的疾病、障碍或生理状况作出的临床干预。治疗的目的包括，但不限于，缓和或预防症状、减缓或停止疾病、障碍、或状况的进展或恶化和 / 或缓解疾病、障碍或状况。“治疗（treatment）”指的是治疗性处理和预防或防治性措施的之一或两者。需要治疗的受试对象包括已被疾病或障碍或不想要的生理状况影响的受试对象和其中疾病或障碍或不想要的生理状况待被预防的受试对象。

[0087] 如本文所用的，术语“有效量”指的是足够实现有益的或令人满意的生物和 / 或临床结果的量。

[0088] 如本文所用的，“受试对象”指的是为处理、观察或实验的客体的动物。“动物”包括冷血和温血脊椎动物和无脊椎动物诸如鱼、贝类、爬行动物、和特别是哺乳动物。如本文所用的“哺乳动物”指的是属于哺乳纲（Mammalia）的个体并包括，但不限于，人、家养和农场动物、动物园动物、体育和宠物动物。哺乳动物的非限制性的示例包括小鼠、大鼠；兔；豚鼠；狗；猫；绵羊；山羊；牛；马；灵长类，诸如猴、黑猩猩和猿、和特别是人。在一些实施方案中，哺乳动物是人。然而，在一些实施方案中，哺乳动物不是人。

[0089] 腺相关病毒（AAV）载体

[0090] 腺相关病毒（AAV）是复制缺陷型细小病毒，其单链 DNA 基因组长度约 4.7kb，包括 145 个核苷酸的末端反向重复序列（ITR）。ITR 在 AAV 的 DNA 整合进入宿主细胞基因组中发挥作用。当 AAV 感染宿主细胞时，病毒基因组整合进入宿主的染色体，导致细胞的潜伏感染。在自然系统中，辅助病毒（例如，腺病毒或疱疹病毒）提供允许 AAV 病毒在被感染的细胞中生产的基因。在腺病毒的情况下，基因 E1A、E1B、E2A、E4 和 VA 提供辅助功能。当用辅助病毒感染时，AAV 前病毒被拯救并扩增，且 AAV 和腺病毒都被生产。在不具有 Rep 和 / 或 Cap 基因的重组 AAV 载体的情况中，AAV 可以是非整合的。

[0091] 提供了包括一个或多个感兴趣的蛋白的编码区的 AAV 载体，所述蛋白例如长度超过 500 个氨基酸的蛋白。AAV 载体可包括 AAV 的 5’ 末端反向重复序列（ITR）、3’ AAV ITR、启动子、和启动子下游的限制性酶切位点以允许编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸的插入，其中启动子和限制性酶切位点位于 5’ AAV ITR 的下游和 3’ AAV ITR 的上游。在一些实施方案中，重组 AAV 载体包括限制性酶切位点下游和 3’ AAV ITR 上游的转录后调节元件。在一些实施方案中，本文公开的 AAV 载体可被使用作为携带编码感兴趣的蛋白的转基因的 AAV 转移载体，用于产生能够在宿主细胞中表达感兴趣的蛋白的重组 AAV 病毒。

[0092] 可使用本领域众所周知的任何合适的遗传工程技术实现病毒载体的产生，所述技术包括而不限于，限制性内切酶消化、连接、转化、质粒纯化、和 DNA 测序的标准技术，例如在 Sambrook 等人(Molecular Cloning:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y. (1989))中描述的。

[0093] 病毒载体可合并来自任何已知生物体的基因组的序列。序列可以以它们的自然形式被合并或可以以任何方式被修饰以获得所需的活性。例如，序列可包括插入、缺失或替换。

[0094] 启动子

[0095] 在本文公开的病毒载体中，多种启动子可与包括感兴趣的蛋白的编码区的核酸可操作地连接。在一些实施方案中，启动子可驱动感兴趣的蛋白在用源自病毒载体的病毒感染的细胞中表达，所述细胞诸如靶细胞。启动子可以是天然存在的或非天然存在的。

[0096] 启动子的示例，包括，但不限于，病毒启动子、植物启动子和哺乳动物启动子。病毒启动子的示例包括，但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、CAG 启动子(其是 CMV 早期增强子元件和鸡 β-肌动蛋白启动子的组合，在 Alexopoulou 等人 BMC Cell Biology9:2,(2008) 中描述)、猿猴病毒 40 (SV40)启动子、在 Brisson 等人，Nature1984,310:511-514 中描述的花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S RNA 和 19S RNA 启动子、烟草花叶病毒(TMV)的外壳蛋白启动子、和其任何变体。植物启动子的示例包括，但不限于，热休克启动子，诸如在 Gurley 等人，Mol.Cell.Biol.1986,6:559-565 中描述的大豆 hsp17.5-E 或 hsp17.3-B，和其任何变体。哺乳动物启动子的示例包括，但不限于，人延伸因子 1α-亚基(EF1-1α)启动子、人泛素 C (UCB)启动子、小鼠磷酸甘油酸激酶 -1 (PGK)启动子、和其任何变体。

[0097] 在一些实施方案中，启动子是包括至少 CAG 启动子的部分的合成启动子。CAG 启动子的部分可包括与 SEQ ID NO:3 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。

[0098] 在一些实施方案中，启动子包括 CMV 增强子。在一些实施方案中，启动子包括 UBC 增强子。在一些实施方案中，启动子包括至少 CMV 增强子的部分。例如，CMV 增强子可包括与 SEQ ID NO:2 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。在一些实施方案中，启动子包括至少 UCB 增强子的部分。UCB 增强子可包括与 SEQ ID NO:4 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。

[0099] 在一些实施方案中，启动子是具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的合成的 CASI 启动子。合成的 CASI 启动子包含 CMV 增强子的部分、鸡 β-肌动蛋白启动子的部分、和 UBC 增强子的部分。在一些实施方案中，启动子可包括与 SEQ ID NO:1 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。在一些实施方案中，启动子包括与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同的核酸序列。在一些实施方案中，启动子包括与 SEQ ID NO:1 至少 95% 相同的核酸序列。在一些实施方案中，启动子包括 SEQ ID NO:1 的核酸序列。

[0100] 在一些实施方案中，载体可包括一个或多个内含子以促进 RNA 转录本在哺乳动物宿主细胞中的加工。此内含子的非限制性示例是兔 β-珠蛋白内含子。在一些实施方案中，

内含子是合成的内含子。例如，合成的内含子可包括与 SEQ ID NO:8 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。内含子在载体中的位置可以不同。在一些实施方案中，内含子位于启动子和限制性酶切位点之间。在一些实施方案中，内含子位于启动子内。在一些实施方案中，内含子包括 UCB 增强子。UCB 增强子可包括与 SEQ ID NO:4 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。

[0101] 在一些实施方案中，将启动子与编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸可操作地连接。在一些实施方案中，将启动子与编码感兴趣的抗体的重链和 / 或轻链(诸如抗体的重和轻可变区)的多核苷酸可操作地连接。在一些实施方案中，将启动子与编码感兴趣的抗体的重链和轻链的多核苷酸可操作地连接以允许重链和轻链基因的多顺反子表达。在一些实施方案中，2A 序列或 IRES 元件位于载体中重链可变区的编码区和轻链可变区的编码区之间以促进每一个亚基的等效表达。可选地，可将编码重链和轻链的多核苷酸每一个在合适的病毒载体中分别引入靶细胞。

[0102] 启动子的大小可不同。由于 AAV 的有限的包装能力，优选使用大小是小的、但是同时允许感兴趣的蛋白在宿主细胞中高水平生产的启动子。例如，在一些实施方案中启动子是至多约 1.5kb、至多约 1.4kb、至多约 1.35kb、至多约 1.3kb、至多约 1.25kb、至多约 1.2kb、至多约 1.15kb、至多约 1.1kb、至多约 1.05kb、至多约 1kb、至多约 800 碱基对、至多约 600 碱基对、至多约 400 碱基对、至多约 200 碱基对或至多约 100 碱基对。

[0103] 启动子的核苷酸序列还可被修饰用于改善表达效率。例如，启动子可包括一个或多个剪接供体、一个或多个剪接受体、和 / 或其组合。在一些实施方案中，启动子包括剪接供体和剪接受体。在一些实施方案中，启动子包括一个或多个剪接供体且不包含剪接受体。在一些实施方案中，启动子不包括剪接供体，且包括一个或多个剪接受体。例如，在一些实施方案中，剪接供体可包括与 SEQ ID NO:5 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。在一些实施方案中，剪接受体可包括与 SEQ ID NO:6 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。

[0104] 调节元件

[0105] 可将多种转录后调节元件用于病毒载体中，例如以增加感兴趣的蛋白在宿主细胞中的表达水平。在一些实施方案中，转录后调节元件可以是病毒转录后调节元件。病毒转录后调节元件的非限制性示例包括土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)、乙型肝炎病毒转录后调节元件(HBVPRE)、RNA 转运元件(RTE)、和其任何变体。WPRE 可包括与 SEQ ID NO:7 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核酸序列。RTE 可以是 rev 应答元件(RRE)，例如，慢病毒 RRE。非限制性的示例是牛免疫缺陷病毒 rev 应答元件(RRE)。在一些实施方案中，RTE 是组成型转运元件(CTE)。CTE 的示例包括，但不限于梅森 - 普菲策尔猴病毒(Mason-Pfizer Monkey Virus)CTE 和鸟类白血病病毒(Avian Leukemia Virus)CTE。

[0106] 本文描述的病毒载体可包括原核复制子(即，具有在原核宿主细胞中的指导重组 DNA 分子染色体外的自主复制和维持的能力的 DNA 序列)，诸如用其转化的细菌宿主细胞。此类复制子是本领域众所周知的。另外，包括原核复制子的载体还可包括其表达给予可检

测的标记诸如药物抗性的基因。典型的细菌药物抗性基因是给予对氨苄青霉素或四环素抗性的基因。

[0107] 在一些实施方案中，AAV 载体可包括用于真核细胞中有效的选择标记的基因，诸如药物抗性选择标记。这种选择标记基因可编码对于生长在选择培养基中的被转化的宿主细胞的存活或生长必要的因子。未用包含选择基因的载体转化的宿主细胞将不会在培养基中存活。典型的选择基因编码给予对抗生素或其他毒素的抗性、补充营养缺陷型的缺陷、或供给从培养基中扣留的关键营养元素的蛋白，所述抗生素或其他毒素例如，氨苄青霉素、新霉素、氨甲喋呤、卡那霉素、庆大霉素、Zeocin、或四环素。

[0108] 本文公开的病毒载体可包括多种调节元件，诸如转录起始区和 / 或转录终止区。转录终止区的示例包括，但不限于，聚腺苷酸化信号序列。聚腺苷酸化信号序列的示例包括，但不限于，牛生长激素(BGH)poly(A)、SV40 晚期 poly(A)、兔 β - 珠蛋白(RBG)poly(A)、胸苷激酶(TK)poly(A) 序列、和其任何变体。在一些实施方案中，转录后终止区位于转录后调节元件的下游。在一些实施方案中，转录后终止区是聚腺苷酸化信号序列。在一些实施方案中，转录后终止区是 SV40 晚期 poly(A) 序列。

[0109] 本文公开的病毒载体还可包括直接在启动子下游的限制性酶切位点之后的一个或多个 A 核苷酸，其中限制性酶切位点允许编码感兴趣的蛋白的多核苷酸的插入。例如，一个或多个 A 核苷酸在编码感兴趣的蛋白的多核苷酸插入载体后，直接位于感兴趣的蛋白的 TAA 终止密码子之后。在一些实施方案中，一个 A 核苷酸、两个 A 核苷酸、三个 A 核苷酸、或多个直接位于限制性酶切位点之后。在一些实施方案中，一个 A 核苷酸、两个 A 核苷酸、三个 A 核苷酸、或多个直接位于感兴趣的蛋白的 TAA 终止密码子之后。

[0110] 在一些实施方案中，病毒载体可包括使得载体适于在真核生物中复制和整合的另外的序列。在其他实施方案中，本文公开的病毒载体可包括使得载体适于在原核生物和真核生物中复制和整合的穿梭元件。在一些实施方案中，病毒载体可包括另外的转录和翻译起始序列，诸如启动子和增强子；和另外的转录和翻译终止子，诸如聚腺苷酸化信号。

[0111] 在一些实施方案中，病毒载体可包括允许，例如，从单个 mRNA 翻译多个蛋白的调节序列。此类调节序列的非限制性示例包括内部核糖体进入位点(IRES)和 2A 自加工序列。在一些实施方案中，2A 序列是来自口蹄疫病毒的 2A 肽位点(F2A 序列)。在一些实施方案中，F2A 序列具有标准的弗林蛋白酶裂解位点。例如，具有标准的弗林蛋白酶裂解位点的 F2A 序列可包括与 SEQ ID NO:9 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中，F2A 序列具有被修饰的弗林蛋白酶裂解位点。例如，具有被修饰的弗林蛋白酶裂解位点的 F2A 序列可包括与 SEQ ID NO:10 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。

[0112] 在一些实施方案中，病毒载体还可具有位于靠近启动子序列的一个或多个限制性酶切位点以提供编码一个或多个感兴趣的蛋白和其他蛋白的核酸序列的插入。

[0113] 感兴趣的蛋白

[0114] 如本文所用的，“感兴趣的蛋白”可以是任何蛋白，包括天然存在的和非天然存在的蛋白。在一些实施方案中，可将编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸插入本文公开的病毒载体中，其中多核苷酸与启动子可操作地连接。在某些情况下，启动子可驱动感兴趣

的蛋白在宿主细胞(例如,人肌细胞)中表达。

[0115] 感兴趣的蛋白的示例包括,但不限于,荧光素酶;荧光蛋白(例如,GFP);生长激素(GH)和其变体;胰岛素样生长因子(IGF)和其变体;粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和其变体;红细胞生成素(EPO)和其变体;胰岛素,诸如胰岛素原、前胰岛素原、胰岛素、胰岛素类似物、和类似的;抗体和其变体,诸如杂交抗体、嵌合抗体、人源化抗体、单克隆抗体;抗体的抗原结合片段(Fab 片段)、抗体的单链可变片段(scFV 片段);抗肌萎缩蛋白和其变体;凝血因子和其变体;囊性纤维化跨膜传导调节子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,CFTR)和其变体;和干扰素及其变体。

[0116] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白是治疗蛋白或其变体。治疗蛋白的非限制性示例包括血液因子,诸如 β-珠蛋白、血红蛋白、组织型纤溶酶原激活因子、和凝血因子(coagulation factor);集落刺激因子(CSF);白介素,诸如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9 等;生长因子,诸如角质形成细胞生长因子(KGF)、干细胞因子(SCF)、纤维母细胞生长因子(FGF,诸如碱性 FGF 和酸性 FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、骨形态发生蛋白(BMP)、表皮生长因子(EGF)、生长分化因子-9(GDF-9)、肝癌衍生生长因子(HDGF)、肌肉生长抑制素(GDF-8)、神经生长因子(NGF)、神经营养因子、血小板源生长因子(PDGF)、血小板生成素(TPO)、转化生长因子 α (TGF-α)、转化生长因子 β (TGF-β)、和类似的;可溶性受体,诸如可溶性 TNF-α 受体、可溶性 VEGF 受体、可溶性白介素受体(例如,可溶性 IL-1 受体和可溶性 II 型 IL-1 受体)、可溶性 γ/δT 细胞受体、可溶性受体的配体结合片段,和类似的;酶,诸如 α-葡萄糖苷酶、伊米苷酶、β-葡糖脑苷脂酶、和阿糖脑苷酶;酶激活因子,诸如组织型纤溶酶原激活因子;趋化因子,诸如 IP-10、γ 干扰素诱导的单核因子(Mig)、Groα/IL-8、RANTES、MIP-1α、MIP-1β、MCP-1、PF-4、和类似的;血管生成剂,诸如血管内皮生长因子(VEGF,例如,VEGF121、VEGF165、VEGF-C、VEGF-2)、转化生长因子-β、碱性成纤维细胞生长因子、胶质瘤源性生长因子、血管生成素、血管生成素-2;和类似的;抗血管生成剂,诸如可溶性 VEGF 受体;蛋白疫苗;神经活性肽,诸如神经生长因子(NGF)、缓激肽、缩胆囊素、胃泌素、促胰液素、催产素、促性腺激素释放激素、β-内啡肽、脑啡肽、P 物质、生长抑素、催乳素、甘丙肽、生长激素释放激素、铃蟾肽、强啡肽、华法林、神经降压肽、胃动素、促甲状腺素、神经肽 Y、黄体生成素、降钙素、胰岛素、胰高血糖素、血管升压素、血管紧张素 II、促甲状腺激素释放激素、血管活性肠肽、睡眠肽、和类似的;血栓溶解剂;心房钠尿肽;松弛素;胶质原纤维酸性蛋白;卵泡刺激素(FSH);人 α-1 抗胰蛋白酶;白血病抑制因子(LIF);转化生长因子(TGF);组织因子、黄体生成素;巨噬细胞活化因子;肿瘤坏死因子(TNF);嗜中性白细胞趋化因子(NCF);神经生长因子;组织金属蛋白酶抑制剂;血管活性肠肽;血管生成素;血管趋向肽(angiotropin);血纤蛋白;蛭素;IL-1 受体拮抗剂;和类似的。感兴趣的蛋白的一些其他非限制性示例包括睫状神经营养因子(CNTF);脑源性神经营养因子(BDNF);神经营养因子 3 和 4/5(NT-3 和 4/5);胶质细胞源性神经营养因子(GDNF);芳香氨基酸脱羧酶(AADC);血友病相关的凝血蛋白,诸如因子Ⅷ、因子 IX、因子 X;抗肌萎缩蛋白或 nini-抗肌萎缩蛋白;溶酶体酸性脂肪酶;苯丙氨酸羟化酶(PAH);糖原贮积病相关酶,诸如葡萄糖-6-磷酸酶、酸性麦芽糖酶、糖原脱支酶、肌糖原磷酸化酶、肝糖原磷酸化酶、肌肉磷酸果糖激酶、磷酸化酶激酶(例如 PHKA2)、葡萄糖转运蛋白(例如,GLUT2)、醛缩酶 A、β-烯醇酶、和糖原合成酶;溶酶体酶类(例如,β-N-乙

酰氨基己糖苷酶 A）；和其任何变体。

[0117] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白是蛋白的活性片段，所述蛋白诸如任何上述的蛋白。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白是包括两种或多种蛋白的一些或全部的融合蛋白。在一些实施方案中，融合蛋白可包括任何上述蛋白的全部或部分。

[0118] 在一些实施方案中，病毒载体包括多核苷酸，所述多核苷酸包括两种或多种感兴趣的蛋白的编码区。两种或多种感兴趣的蛋白可以是彼此相同的或不同的。在一些实施方案中，两种或多种感兴趣的蛋白是相关肽，例如用于相同病毒的中和抗体。

[0119] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白是多亚基蛋白。例如，感兴趣的蛋白可包括两个或多个亚基、或两个或多个独立的多肽链。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白可以是抗体。抗体的示例包括，但不限于，多种同种型的抗体（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、和 IgM）；通过由本领域技术人员已知的任何方式产生的单克隆抗体，包括单克隆抗体的抗原结合片段；人源化抗体；嵌合抗体；单链抗体；抗体片段诸如 Fv、F(ab')2、Fab'、Fab、Facb、scFv 和类似的；只要抗体能够结合抗原。在一些实施方案中，抗体是全长抗体。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白不是免疫粘附素。

[0120] 在一些实施方案中，抗体是抗 - 疟疾抗体。抗 - 疟疾的非限制性示例包括 2A10 抗 - 疟疾抗体和 2C11 抗 - 疟疾抗体。

[0121] 在一些实施方案中，抗体是病毒的中和抗体。例如，抗体可以是 HIV、HCV 或流感病毒的中和抗体。在一些实施方案中，抗体是中和抗 -HIV 抗体。在一些实施方案中，中和抗 -HIV 抗体可以是，例如，中和 HIV-1 的不同基因亚型的许多原代分离株的人单克隆中和抗体。

[0122] 在一些实施方案中，抗体是中和抗 -HCV 抗体。

[0123] 在一些实施方案中，抗体是中和抗 - 流感抗体。中和病毒抗体的非限制性示例包括 b12 抗 -HIV 抗体、2G12 抗 -HIV 抗体、4E10 抗 -HIV 抗体、2F5 抗 -HIV 抗体、VRC01 抗 -HIV 抗体、3BNC60 抗 -HIV 抗体、3BNC117 抗 -HIV 抗体、NIH45-46 抗 -HIV 抗体、NIH45-46W 抗 -HIV 抗体、VRC-PG04 抗 -HIV 抗体、VRC-CH31 抗 -HIV 抗体、PGT121 抗 -HIV 抗体、PGT128 抗 -HIV 抗体、F10 抗 - 流感抗体、CR6261 抗 - 流感抗体、TCN32 流感抗体、FI6 抗 - 流感抗体、FI6v3 抗 - 流感抗体、AR3A 抗 -HCV 抗体、AR3B 抗 -HCV 抗体、AR4A 抗 -HCV 抗体、和其任何变体。

[0124] 如本文描述的，编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列可被修饰以改善蛋白的表达效率。能够被用于改善本文的基因的转录和 / 或翻译的方法不具体限制。例如，核苷酸序列可被修饰以更好反映宿主密码子使用以提高宿主（例如，哺乳动物）中的基因表达（例如，蛋白生产）。作为修饰的另外的非限制示例，感兴趣的蛋白的核苷酸序列中的一个或多个剪接供体和 / 或剪接受体被修饰以减少外来剪接的可能性。

[0125] 感兴趣的蛋白可以是不同的长度。例如，感兴趣的蛋白的长度可以是至少约 200 个氨基酸、至少约 250 个氨基酸、至少约 300 个氨基酸、至少约 350 个氨基酸、至少约 400 个氨基酸、至少约 450 个氨基酸、至少约 500 个氨基酸、至少约 550 个氨基酸、至少约 600 个氨基酸、至少约 650 个氨基酸、至少约 700 个氨基酸、至少约 750 个氨基酸、至少约 800 个氨基酸、或更长。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白长度是至少约 480 个氨基酸。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白长度是至少约 500 个氨基酸。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白长度是约 750 个氨基酸。

[0126] 当要求在一个病毒载体中包括两种或多种感兴趣的蛋白、两个或多个单独的多肽链、或感兴趣的蛋白的两个或多个亚基的编码区时，第一个以外的每一个另外的编码区优选连接至促进蛋白在宿主细胞中共表达的元件，诸如内部核糖体进入序列（IRES）元件（美国专利号 4,937,190）、或 2A 元件。例如，IRES 或 2A 元件优选当单个载体包括编码多亚基蛋白的每一个亚基的序列时被使用。在感兴趣的蛋白是具有所需的特异性的免疫球蛋白的情况下，例如，第一编码区（编码免疫球蛋白的重链或轻链）位于启动子的下游。第二编码区（编码免疫球蛋白的剩余链）可位于第一编码区的下游，并可将 IRES 或 2A 元件放置在两个编码区之间，优选直接在第二编码区之前。IRES 或 2A 元件被包含在第一和第二基因的序列（分别编码重链和轻链）之间能够允许两个链在细胞中以约相同的水平从相同的启动子被表达。

[0127] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白包括两个或多个亚基，例如免疫球蛋白（Ig）。病毒载体可包括每一个亚基的编码区。例如，病毒载体可包括 Ig 重链（或 Ig 重链的可变区）的编码区和 Ig 轻链（或 Ig 轻链的可变区）的编码区两者。在一些实施方案中，载体包括抗体的重链可变区的第一编码区和抗体的轻链可变区的第二编码区。两个编码区可以例如被 2A 自加工序列分开以允许两个编码区的多顺反子转录。

[0128] 病毒载体可包括两种或多种感兴趣的蛋白的编码区。例如，病毒载体可包括第一感兴趣的蛋白的编码区和第二感兴趣的蛋白的编码区。第一感兴趣的蛋白和第二感兴趣的蛋白可以是相同的或不同的。在一些实施方案中，病毒载体可包括第三或第四感兴趣的蛋白的编码区。第三和第四感兴趣的蛋白可以是相同的或不同的。由一个病毒载体编码的两种或多种感兴趣的蛋白的总长可以不同。例如，两种或多种蛋白的总长可以是至少约 400 个氨基酸、至少约 450 个氨基酸、至少约 500 个氨基酸、至少约 550 个氨基酸、至少约 600 个氨基酸、至少约 650 个氨基酸、至少约 700 个氨基酸、至少约 750 个氨基酸、至少约 800 个氨基酸、或更长。

[0129] Kozak 共有序列、Kozak 共有区或 Kozak 序列，是已知作为在真核 mRNA 上存在的并具有共有区 (gcc)gccRccAUGG 的序列，其中 R 是起始密码子（AUG）上游三个碱基的嘌呤（腺嘌呤或鸟嘌呤），其之后是另外的“G”。在一些实施方案中，载体包括与 Kozak 共有序列具有至少约 70%、至少约 80%、至少约 90% 序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中，载体包括 Kozak 共有序列。在一些实施方案中，载体包括在插入载体的编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸之后的 Kozak 共有序列，例如，在启动子下游的限制性酶切位点处。例如，载体可包括 GCCGCCATG(SEQ ID NO:41) 的核苷酸序列，其中 ATG 是感兴趣的蛋白的起始密码子。在一些实施方案中，载体包括 GCGGCCGCCATG(SEQ ID NO:42) 的核苷酸序列，其中 ATG 是感兴趣的蛋白的起始密码子。

[0130] 如果有需要，可根据本领域技术人员已知的常规方法分离并纯化感兴趣的蛋白。例如，可制备表达宿主细胞的裂解物并可使用 HPLC、疏水相互作用色谱（HIC）、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、尺寸排阻色谱、超滤、凝胶电泳、亲和色谱、和 / 或其他纯化技术纯化裂解物。

[0131] 信号肽序列

[0132] 本文公开的病毒载体中可使用多种信号肽序列。信号肽序列可以是天然存在的或非天然存在的。

[0133] 在一些实施方案中，信号肽可提供从哺乳动物细胞中分泌。信号肽的示例包括，但不限于，HGH 的内源信号肽和其变体；干扰素的内源信号肽和其变体，包括 I、II 和 III 型干扰素的信号肽和其变体；和已知的细胞因子的内源信号肽和其变体，诸如红细胞生成素(EPO)、胰岛素、TGF-β1、TNF、IL1-α、和 IL1-β 的信号肽和其变体。在一些实施方案中，信号肽是被修饰的 HGH 信号肽。在一些实施方案中，编码信号肽的核苷酸序列包括与 SEQ ID NO:11 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中，编码信号肽的核苷酸序列包括与 SEQ ID NO:12 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。

[0134] 在一些实施方案中，可使用与感兴趣的蛋白不同的蛋白的信号肽。在一些实施方案中，使用感兴趣的蛋白的本身的信号肽。在某些情况下，可使用非天然存在的信号肽。

[0135] 典型地，载体中信号肽的核苷酸序列直接位于感兴趣的蛋白的编码区上游(例如，融合在感兴趣的蛋白的编码区的 5')。在病毒载体包含两种或多种感兴趣的蛋白的编码区的情况下，可将信号肽直接插入一个或多个编码区的上游。在一些实施方案中，每一个编码区具有融合在 5'末端的信号肽序列。添加至每一个编码区的信号肽序列可以是相同的或不同的。例如，当感兴趣的蛋白具有两个亚基时，病毒载体可包括一个亚基的编码区和另一个亚基的编码区，并可将信号肽序列直接插入任一个编码区或两个编码区的上游。作为另一个非限制性的示例，病毒载体可包括免疫球蛋白的重链可变区的编码区和免疫球蛋白的轻链可变区的编码区，并将每一个编码区在 5' 末端与信号肽序列融合。在一些实施方案中，两个信号肽序列是相同的。在一些实施方案中，两个信号肽序列是不同的。

[0136] 在一些实施方案中，在蛋白表达和 / 或分泌之后，信号肽可从前体蛋白裂解，产生成熟蛋白。

[0137] 在一些实施方案中，可将病毒载体中起始于 5'AAV ITR 并终止于 3'AAV ITR 的区递送至宿主细胞并整合进入宿主细胞基因组。该区的长度可以不同。例如，该区的长度可以是至少约 2kb、至少约 2.25kb、至少约 2.5kb、至少约 2.75kb、至少约 3kb、至少约 3.25kb、至少约 3.5kb、至少约 3.75kb、至少约 4kb、至少约 4.25kb、或至少约 4.5kb。在一些实施方案中，该区是至少约 2.5kb。在一些实施方案中，该区是约 4.5kb。在一些实施方案中，病毒载体不是自身互补的 AAV（scAAV）载体。

[0138] 如以上公开的，病毒载体可包括多种元件，例如，但不限于，启动子、编码感兴趣的蛋白的转基因、信号肽序列、转录后调节元件、转录终止元件、和允许多个蛋白从单个 mRNA 翻译的调节序列。技术人员将领会，病毒载体可包括这些元件的一个，或这些元件的两个或多个的任何组合。例如，病毒载体可包括至少一个元件或表 1 中列出的元件的组合。表 1 中使用的约定如下：

[0139] A= 启动子

[0140] B= 转基因

[0141] C= 信号肽序列

[0142] D= 转录后调节元件

[0143] E= 转录终止元件

[0144] F= 允许多个蛋白从单个 mRNA 翻译的调节序列

[0145] G=Kozak 共有序列

[0146] 表 1. 病毒载体的一些实施方案中包括的元件或元件的组合

[0147]

A	B	C	D	E
F	G	A+B	A+C	A+D
A+E	A+F	A+G	B+C	B+D
B+E	B+F	B+G	C+D	C+E
C+F	C+G	D+E	D+F	D+G
E+F	E+G	F+G	A+B+C	A+B+D
A+B+E	A+B+F	A+B+G	A+C+D	A+C+E
A+C+F	A+C+G	A+D+E	A+D+F	A+D+G
A+E+F	A+E+G	A+F+G	B+C+D	B+C+E
B+C+F	B+C+G	B+D+E	B+D+F	B+D+G
B+E+F	B+E+G	C+D+E	C+D+F	C+D+G
C+E+F	C+E+G	C+F+G	D+E+F	D+E+G
E+F+G	A+B+C+D	A+B+C+E	A+B+C+F	A+B+C+G
A+B+D+E	A+B+D+F	A+B+D+G	A+B+E+F	A+B+E+G
A+B+F+G	A+C+D+E	A+C+D+F	A+C+D+G	A+C+E+F
A+C+E+G	A+C+F+G	A+D+E+F	A+D+E+G	A+D+F+G
A+E+F+G	B+C+D+E	B+C+D+F	B+C+D+G	B+C+E+F
B+C+E+G	B+C+F+G	B+D+E+F	B+D+E+G	B+D+F+G
B+E+F+G	C+D+E+F	C+D+E+G	C+D+F+G	C+E+F+G
D+E+F+G	A+B+C+D+E	A+B+C+D+F	A+B+C+D+G	A+B+C+E+F
A+B+C+E+G	A+B+C+F+G	A+B+D+E+F	A+B+D+E+G	A+B+D+F+G
A+B+E+F+G	A+C+D+E+F	A+C+D+E+G	A+C+D+F+G	A+C+E+F+G

A+D+E+F+G	B+C+D+E+F	B+C+D+E+G	B+C+D+F+G	B+C+E+F+G
B+D+E+F+G	C+D+E+F+G	A+B+C+D+E+F	A+B+C+D+E+G	A+B+C+D+F+G
A+B+C+E+F+G	A+B+D+E+F+G	A+C+D+E+F+G	B+C+D+E+F+G	A+B+C+D+E+F+G

[0148] 如以上描述的，以上列出的每一个元件的核苷酸序列可被修饰以增加感兴趣的蛋白在宿主细胞中的表达效率。在一些实施方案中，其中多于一个转基因存在于病毒载体中，可使用能够促进转基因的共表达的序列。此序列的非限制性示例包括 IRES、2A 序列、和其变体。

[0149] 在 SEQ ID NO:13-30 中提供了 AAV 载体的非限制性示例序列。例如，在 SEQ ID NO:13 中列出包括 CMV 启动子、b12 抗 -HIV 抗体的编码序列和 SV40 晚期 poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:14 中列出包括 CASI 合成启动子、荧光素酶蛋白的编码序列、WPRE、和 SV40 晚期 poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:15 中列出包括 CASI 合成启动子、荧光素酶蛋白的编码序列、WPRE、和兔 β - 珠蛋白 (RBG) poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:16 中列出包括 CASI 合成启动子、荧光素酶蛋白的编码序列、WPRE、和牛生长激素 (BGH)poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:17 中列出包括 CASI 合成启动子、b12 抗 -HIV 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:18 中列出包括 CASI 合成启动子、4E10AB 抗 -HIV 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:19 中列出包括 CASI 合成启动子、2G12 抗 -HIV 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:20 中列出包括 CASI 合成启动子、2F5AB 抗 -HIV 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:21 中列出包括 CASI 合成启动子、b12 抗 -HIV 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:22 中列出包括 CASI 合成启动子、AR3 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:23 中列出包括 CASI 合成启动子、AR3 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:24 中列出包括 CASI 合成启动子、VRC01 抗 -HIV 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:25 中列出包括 CASI 合成启动子、TCN32 抗 - 流感抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:26 中列出包括 CASI 合成启动子、CR6261 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:27 中列出包括 CASI 合成启动子、F10 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:28 中列出包括 CASI 合成启动子、AR4 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:29 中列出包括 CASI 合成启动子、FI6 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列；在 SEQ ID NO:30 中列出包括 CASI 合成启动子、FI6 抗体的编码序列、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列。在一些实施方案中，抗体的编码序列是抗体的野生型编码序列的变体。作为另外的示例，在 SEQ ID NO:40 中列出包括 CASI 启动子、WPRE、和 SV40poly(A) 序列的 AAV 载体的核苷酸序列。技术人员将领会，以上描述的每一个病毒载体中，编码抗体的核苷酸序列可以用任何其他编码感兴趣的蛋白的核

酸序列替换，诸如任何其他编码抗体的核酸序列，例如任何已知的抗 -HIV、抗 -HCV、和 / 或抗 - 流感抗体。

[0150] 在一些实施方案中，AAV 载体包括与 SEQ ID NO:13-30 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中，AAV 载体包括与 SEQ ID NO:40 具有至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99%、或更多的序列同一性的核苷酸序列。

[0151] 在一些实施方案中，病毒载体包括 CMV 启动子和 SV40 晚期 poly(A) 序列。在一些实施方案中，AAV 载体包括 CASI 合成启动子、WPRE 和 SV40 晚期 poly(A) 序列。在一些实施方案中，AAV 载体包括 CASI 合成启动子、WPRE 和兔 β - 珠蛋白 (RBG)poly(A) 序列。在一些实施方案中，AAV 载体包括 CASI 合成启动子、WPRE 和牛生长激素 (BGH)poly(A) 序列。在一些实施方案中，AAV 载体包括。在一些实施方案中，病毒载体包括 CAG 启动子和 SV40 晚期 poly(A) 序列。在一些实施方案中，病毒载体包括 CAG 启动子、WPRE 和 SV40 晚期 poly(A) 序列。

[0152] 用于生产重组 AAV 的方法

[0153] 本申请提供了用于生产能够在宿主细胞中表达一个或多个感兴趣的蛋白的重组 AAV 的方法和材料。如本文描述的，本文公开的方法和材料允许感兴趣的蛋白的大量生产，所述感兴趣的蛋白例如，抗体，诸如全长抗体。

[0154] 在一些实施方案中，用于生产重组 AAV 的方法包括提供具有包括诸如本文描述的 AAV 的 5’末端反向重复序列 (ITR) 和 3’AAV ITR、用于产生生产性 AAV 感染的辅助功能、和 AAV cap 基因的病毒构建体的包装细胞系；和从包装细胞系的上清液中回收重组 AAV。可使用多种类型的细胞作为包装细胞系。例如，可使用的包装细胞系包括，但不限于，HEK293 细胞、HeLa 细胞、和 Vero 细胞，例如在美国专利公布号 20110201088 中公开的。

[0155] 在一些实施方案中，通过用于浓缩病毒的 PEG 沉淀处理包装细胞系的上清液。在一些实施方案中，沉淀在不超过约 4℃（例如约 3℃、约 2℃、约 1℃、或约 1℃）发生至少约 2 小时、至少约 3 小时、至少约 4 小时、至少约 6 小时、至少约 9 小时、至少约 12 小时、或至少约 24 小时。在一些实施方案中，通过低速离心及之后 CsCl 梯度将重组 AAV 从 PEG 沉淀的上清液中分离。低速离心可以以约 4000rpm、约 4500rpm、约 5000rpm、或约 6000rpm 持续约 20 分钟、约 30 分钟、约 40 分钟、约 50 分钟或约 60 分钟。在一些实施方案中，通过以约 5000rpm 持续约 30 分钟离心及之后 CsCl 梯度将重组 AAV 从 PEG 沉淀的上清液中分离。

[0156] 在一些实施方案中，病毒构建体还包括启动子和启动子下游的限制性酶切位点以允许编码一个或多个感兴趣的蛋白的多核苷酸的插入，其中启动子和限制性酶切位点位于 5’AAV ITR 的下游和 3’AAV ITR 的上游。在一些实施方案中，病毒构建体还包括限制性酶切位点下游和 3’AAV ITR 上游的转录后调节元件。在一些实施方案中，病毒构建体还包括插入在限制性酶切位点并与启动子可操作地连接的多核苷酸，其中多核苷酸包括感兴趣的蛋白的编码区。如技术人员将领会的，可将本申请公开的任一 AAV 载体在方法中作为生产重组 AAV 的病毒构建体使用。

[0157] 在一些实施方案中，辅助功能由一个或多个包括腺病毒辅助基因的辅助质粒或辅助病毒提供。腺病毒辅助基因的非限制性示例包括 E1A、E1B、E2A、E4 和 VA，其可以提供 AAV 包装的辅助功能。

[0158] 在一些实施方案中，AAV cap 基因存在于质粒中。质粒还可包括 AAV rep 基因。本申请涵盖，本文可使用来自任何 AAV 血清型（包括，但不限于，AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9，和其任何变体）的 cap 基因和 / 或 rep 基因以产生本文公开的重组 AAV 以表达一个或多个感兴趣的蛋白。在一些实施方案中，AAV cap 基因编码来自血清型 1、血清型 2、血清型 4、血清型 5、血清型 6、血清型 7、血清型 8、血清型 9 的衣壳、或其变体。

[0159] 在一些实施方案中，可用编码 AAV cap 基因的辅助质粒或辅助病毒、病毒构建体和质粒转染包装细胞系；并可在共转染后的不同时间点收集重组 AAV 病毒。例如，重组 AAV 病毒可在共转染后约 12 小时、约 24 小时、约 36 小时、约 48 小时、约 72 小时、约 96 小时、约 120 小时、或任何这些两个时间点之间的时间被收集。

[0160] AAV 的辅助病毒在本领域是已知的并包括，例如，来自腺病毒科（Adenoviridae）和疱疹病毒科（Herpesviridae）的病毒。AAV 的辅助病毒的示例包括，但不限于，美国公布号 20110201088 中描述的 SAdV-13 辅助质粒和 SAdV-13 样辅助病毒、辅助载体 pHELP（Applied Viromics）。技术人员将领会，本文可使用能够提供 AAV 足够的辅助功能的 AAV 的任何辅助病毒或辅助质粒。

[0161] 还可使用本领域已知的适于生产感染性重组 AAV 的任何常规方法生产本文公开的重组 AAV 病毒。在某些情况下，可通过稳定表达 AAV 颗粒生产必要的一些组分的细胞系生产重组 AAV。例如，包括 AAV rep 和 cap 基因、和选择标记诸如新霉素抗性基因的质粒（或多个质粒）可被整合进入细胞（包装细胞）的基因组。随后可用辅助病毒（例如，提供辅助功能的腺病毒）和包括 5’ 和 3’ AAV ITR 及编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的病毒载体一起共感染包装细胞系。此方法的优点是细胞是可选择的并适于重组 AAV 的大规模生产。作为另外的非限制性示例，可使用腺病毒或杆状病毒而非质粒以将 rep 和 cap 基因引入包装细胞。作为又另外的非限制性示例，包含 5’和 3’AAV ITR 的病毒载体和 rep-cap 基因都能够稳定整合入生产细胞的 DNA 中，并可由野生型腺病毒提供辅助功能以生产重组 AAV。

[0162] 在一些实施方案中，重组 AAV 不是自身互补的 AAV（scAAV）。

[0163] 如将被技术人员领会的，可将适于纯化 AAV 的任何常规方法用于本文描述的实施方案中以纯化重组 AAV。例如，可将重组体从包装细胞和 / 或包装细胞的上清液中分离和纯化。在一些实施方案中，可通过使用 CsCl 梯度的分离方法纯化 AAV。而且，美国专利公布号 20020136710 描述了用于纯化 AAV 的方法的另外的非限制性示例，其中使用包括固定有介导 AAV 吸附的人工受体或受体样分子的基质的固相支持体将 AAV 从样品中分离并纯化。

[0164] 病毒载体和重组 AAV 的应用

[0165] 可将本文公开的病毒载体用于产生表达感兴趣的蛋白的重组 AAV。由本文描述的方法和系统产生的重组 AAV 生产的蛋白具有多种多样的用途，例如，它们可在诸如诊断、治疗、研究、化合物筛选和药物发现的应用中是有用的。

[0166] 蛋白体外生产

[0167] 作为非限制性的示例，本文公开的重组 AAV 可被用于体外生产感兴趣的蛋白，例如，在细胞培养物中。作为一个非限制性的示例，在一些实施方案中，用于体外生产感兴趣的蛋白的方法，其中该方法包括提供包含编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的重组 AAV；并将重组 AAV 与细胞培养物中的细胞接触，据此重组 AAV 在细胞中表达感兴趣的蛋白。编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的大小可以不同。例如，核苷酸序列的长度可以是至少约 1.4kb、

至少约 1.5kb、至少约 1.6kb、至少约 1.7kb、至少约 1.8kb、至少约 2.0kb、至少约 2.2kb、至少约 2.4kb、至少约 2.6kb、至少约 2.8kb、至少约 3.0kb、至少约 3.2kb、至少约 3.4kb、或至少约 3.5kb。在一些实施方案中，核苷酸的长度是至少约 1.4kb。

[0168] 如以上公开的，感兴趣的蛋白不以任何方式被限制。例如，感兴趣的蛋白可以是抗体，例如病毒的中和抗体。此处公开的重组 AAV 可体外生产高水平的感兴趣的蛋白。

[0169] 在一些实施方案中，感兴趣的蛋白是荧光素酶或荧光蛋白（例如，GFP）。可将表达荧光蛋白的重组 AAV 用于用允许显现被感染的细胞的荧光标记细胞，所述被感染的细胞例如肌细胞。

[0170] 蛋白体内生产

[0171] 作为非限制性的示例，本文公开的重组 AAV 可被用于体内生产感兴趣的蛋白，例如，在动物诸如哺乳动物中。一些实施方案提供了用于体内生产感兴趣的蛋白的方法，其中该方法包括提供包含编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的重组 AAV；并对受试对象施用重组 AAV，据此重组 AAV 在受试对象中表达感兴趣的蛋白。在一些实施方案中，受试对象可以是非人哺乳动物，例如，猴、狗、猫、小鼠、或牛（cow）。编码感兴趣的蛋白的核苷酸序列的大小可以不同。例如，核苷酸序列的长度可以是至少约 1.4kb、至少约 1.5kb、至少约 1.6kb、至少约 1.7kb、至少约 1.8kb、至少约 2.0kb、至少约 2.2kb、至少约 2.4kb、至少约 2.6kb、至少约 2.8kb、至少约 3.0kb、至少约 3.2kb、至少约 3.4kb、或至少约 3.5kb。在一些实施方案中，核苷酸的长度是至少约 1.4kb。

[0172] 如以上公开的，感兴趣的蛋白不以任何方式被限制。例如，感兴趣的蛋白可以是抗体，例如病毒的中和抗体。此处公开的重组 AAV 可体内生产高水平的感兴趣的蛋白。例如，感兴趣的蛋白可在受试对象的血清中以至少约 9μg/ml、至少约 10μg/ml、至少约 50μg/ml、至少约 100μg/ml、至少约 200μg/ml、至少约 300μg/ml、至少约 400μg/ml、至少约 500μg/ml、至少约 600μg/ml、至少约 700μg/ml、至少约 800μg/ml、至少约 900μg/ml、或至少约 1000μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以约 9μg/ml、约 10μg/ml、约 50μg/ml、约 100μg/ml、约 200μg/ml、约 300μg/ml、约 400μg/ml、约 500μg/ml、约 600μg/ml、约 700μg/ml、约 800μg/ml、约 900μg/ml、约 1000μg/ml、约 1500μg/ml、约 2000μg/ml、约 2500μg/ml、或任何两个这些值之间的范围的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以至少约 9μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以至少约 100μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以至少约 500μg/ml 的量表达。

[0173] 我们或许还想要具有仅用于抗体在动物中一般表达的明确的支持 - 想要确定我们拥有一个很好的描述部分，并也许是关于表达水平的某事？我在思考我们可能想要拥有在动物中（以某个水平？）表达例如 HCV 或 HIV 或流感抗体的权利要求 - 不涉及治疗 - 仅使用特定的环境中表达（并可能以某个水平），如此它将很好的具有的涉及那个的特定描述。

[0174] 诊断应用

[0175] 在一些实施方案中，可将病毒载体用于产生表达在检测疾病或障碍和 / 或监测疾病或障碍的进展中有用的一个或多个感兴趣的蛋白的重组 AAV。如本文公开的，术语“诊断”指鉴定疾病或障碍的存在或不存在或性质。例如，当感兴趣的蛋白是抗体时，可使用重组 AAV 病毒检测抗原。与疾病或障碍相关的抗原（例如，抗原蛋白、抗原核酸序列、抗原肽、

抗原脂质、抗原碳水化合物、和抗原小分子）的检测提供了诊断疾病或障碍的手段。此诊断方法可被使用，例如，用于状况的早期诊断以确定受试对象是否易患疾病或障碍、以监测疾病或障碍的进展或治疗方案的进展、以评价疾病或障碍的严重程度、以预测疾病或障碍的结果和 / 或恢复前景，或以帮助确定适用于受试对象的治疗。可体外或体内进行检测。

[0176] 本文描述的实施方案中的诊断涉及的疾病包括，但不限于，其中抗原，诸如与疾病相关的抗原能够特异结合至感兴趣的抗体的任何疾病。例如，抗原可以是肿瘤抗原、病毒抗原、微生物抗原、过敏原、和自身抗原。在一些实施方案中，抗原是病毒抗原，诸如 HIV 抗原。在一些实施方案中，抗原是肿瘤相关抗原（TAA）。

[0177] 许多疾病的抗体是已知的并在本文可被用作感兴趣的蛋白。例如，可将抗 - 环瓜氨酸肽抗体（抗 -CCP2）用作感兴趣的蛋白以检测风湿性关节炎。

[0178] 在一些实施方案中，待被诊断的疾病是一种类型的肿瘤，诸如，例如，白血病、癌、淋巴瘤、星细胞瘤、肉瘤、及特别是尤因氏肉瘤（Ewing’s sarcoma）、神经胶质瘤、成视网膜细胞瘤、黑色素瘤、肾胚细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、宫颈癌、睾丸癌、肾细胞癌、和脑癌。

[0179] 在一些实施方案中，待被诊断的疾病与细胞内寄生物的感染相关。例如，细胞内寄生物可以是病毒，诸如，例如，腺病毒、巨细胞病毒、Epstein-Barr 病毒、单纯性疱疹病毒（HSV）、人类疱疹病毒 6、水痘带状疱疹病毒、肝炎病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、多瘤病毒、麻疹病毒、风疹病毒、人类免疫缺陷病毒（HIV）、或人类 T 细胞白血病病毒。在一些实施方案中，细胞内寄生物可以是细菌、原生动物、真菌、或朊病毒。更特别的是，细胞内寄生物可以是，例如，衣原体、李斯特菌属（Listeria）、沙门氏菌属（Salmonella）、军团菌属（Legionella）、布鲁氏菌属（Brucella）、柯克斯氏体属（Coxiella）、立克次氏体、分枝杆菌属（Mycobacterium）、利什曼原虫（Leishmania）、锥虫属（Trypanasoma）、弓形虫、和疟原虫。在一些实施方案中，疾病是疟疾。

[0180] 在一些实施方案中，检测受试对象中的疾病的方法包括选择待被检测的疾病的抗体，将包括抗体的编码区的多核苷酸插入本文公开的病毒载体中，从病毒载体产生重组 AAV，将重组 AAV 感染至受试对象，和基于抗体和其特异性抗原之间的特异性结合的存在或不存在确定受试对象中疾病的存在或不存在。

[0181] 抗体的许多其他用途在本领域是众所周知的，包括治疗、诊断、法医学、环境、和商业应用。例如，抗原可体外或体内地结合至感兴趣的抗体。因此，可将本文公开的方法用于检测法医 / 环境样品或组织 / 细胞中生物体和 / 或抗原（例如，多肽、碳水化合物、脂质或核酸）的存在。在一些实施方案中，该方法可用于生产能够允许酶的激活状态的检测的抗体。

[0182] 在一些实施方案中，该方法可被用于纯化蛋白，例如以实验室或工业规模。

[0183] 治疗应用

[0184] 可将本文描述的重组 AAV 和方法用于表达一种或多种治疗蛋白以预防或治疗受试对象中一种或多种疾病或障碍。

[0185] 可将本文描述的重组的 AAV 和方法用于抑制或减少多种病毒感染的风险。一些实施方案公开了用于减少或抑制受试对象中病毒感染风险的方法，其中该方法包括 ：提供包括编码病毒的中和抗体的核苷酸序列的重组 AAV ；并将重组 AAV 施用至受试对象，据此重组 AAV 在受试对象中表达抗体。重组 AAV 可产生高水平的病毒中和抗体。例如，在一些实施方

案中，重组 AAV 可在受试对象的血清中以至少约 9 μg/ml、至少约 10 μg/ml、至少约 50 μg/ml、至少约 100 μg/ml、至少约 200 μg/ml、至少约 300 μg/ml、至少约 400 μg/ml、至少约 500 μg/ml、至少约 600 μg/ml、至少约 700 μg/ml、至少约 800 μg/ml、至少约 900 μg/ml、或至少约 1000 μg/ml 的量表达病毒中和抗体。在一些实施方案中，病毒中和抗体在受试对象的血清中以约 9 μg/ml、约 10 μg/ml、约 50 μg/ml、约 100 μg/ml、约 200 μg/ml、约 300 μg/ml、约 400 μg/ml、约 500 μg/ml、约 600 μg/ml、约 700 μg/ml、约 800 μg/ml、约 900 μg/ml、约 1000 μg/ml、约 1500 μg/ml、约 2000 μg/ml、约 2500 μg/ml、或任何两个这些值之间的范围的量表达。

[0186] 与没有用病毒治疗的受试对象相比，本文公开的方法能够，例如，减少受试对象中的感染风险至少约 2 倍、至少约 3 倍、至少约 4 倍、至少约 5 倍、至少约 8 倍、至少约 10 倍、至少约 15 倍、至少约 20 倍、至少约 25 倍、或至少约 30 倍。在一些实施方案中，与没有用病毒治疗的受试对象相比，该方法可减少受试对象中感染风险约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 8 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍、约 25 倍、约 30 倍、或任何两个这些值之间的范围。在一些实施方案中，与没有用病毒治疗的受试对象相比，该方法减少使用病毒治疗的受试对象中感染风险至少约 5 倍。在一些实施方案中，与没有用病毒治疗的受试对象相比，该方法减少使用病毒治疗的受试对象中感染风险至少约 20 倍。在一些实施方案中，该方法阻止受试对象中发生病毒感染。在一些实施方案中，该方法抑制受试对象中的病毒感染。

[0187] 病毒感染的非限制性示例包括由选自以下的病毒造成的感染：腺病毒、α-病毒科(Alphaviridae)、虫媒病毒、星状病毒、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、丝状病毒科(Filoviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、α-疱疹病毒亚科(Alphaherpesvirinae)、β-疱疹病毒亚科(Betaherpesvirinae)、γ-疱疹病毒亚科(Gammaherpesvirinae)、诺沃克病毒、星状病毒科(Astroviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、副粘病毒、腮腺炎病毒属(Rubulavirus)、麻疹病毒属(Morbillivirus)、乳多空病毒科(Papovaviridae)、细小病毒科(Parvoviridae)、小 RNA 病毒科(Picornaviridae)、口蹄疫病毒科(Aphthoviridae)、心病毒科(Cardioviridae)、肠病毒科(Enteroviridae)、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒科(Rhinoviridae)、藻 DNA 病毒科(Phycodnaviridae)、痘病毒科(Poxviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、轮状病毒、逆转录病毒科(Retroviridae)、A 型逆转录病毒、免疫缺陷病毒、白血病病毒、禽肉瘤病毒、弹状病毒、风疹病毒科(Rubiviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、和其任何组合。病毒感染的非限制性示例包括人免疫缺陷病毒(HIV)感染、丙型肝炎病毒(HCV)感染、乙型肝炎病毒(HBC)感染、Epstein Barr 病毒感染、流感病毒感染、呼吸道合胞体病毒感染。在一些实施方案中，病毒感染是丙型肝炎病毒感染。在一些实施方案中，病毒感染是 HIV 感染。在一些实施方案中，病毒感染是流感感染。

[0188] 一些实施方案提供了减少已暴露于病毒的受试对象(例如，已接触到被病毒感染的另外的受试对象的受试对象)的病毒感染的风险的方法。一些实施方案提供了减少将暴露于病毒的受试对象(例如，将接触到被病毒感染的另外的受试对象的受试对象)的病毒感染的风险的方法。在一些实施方案中，提供了预防病毒感染的方法。

[0189] 本文描述的病毒载体、重组 AAV 和方法可被用于表达一种或多种治疗蛋白以治疗多种疾病。疾病的非限制性示例包括肿瘤诸如癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤；和自身免疫病诸如多发性硬化。癌的非限制性示例包括食管癌；肝细胞癌；基底细胞癌、鳞状细胞癌(各种组织)；膀胱癌，包括移行细胞癌；支气管癌；结肠癌；结肠直肠癌；胃癌；肺癌，包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌；肾上腺皮质癌；甲状腺癌；胰腺癌；乳腺癌；卵巢癌；前列腺癌；腺癌；汗腺癌；皮脂腺癌；乳头状癌；乳头状腺癌；囊腺癌；髓样癌；肾细胞癌；导管原位癌或胆管癌；绒毛膜癌；精原细胞瘤；胚胎性癌；肾胚细胞瘤；宫颈癌；子宫癌；睾丸癌；成骨细胞癌；上皮癌；和鼻咽癌。肉瘤的非限制性示例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、骨源性肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、和其他软组织肉瘤。实体瘤的非限制性示例包括神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、和成视网膜细胞瘤。白血病的非限制性示例包括慢性骨髓增生异常综合征；急性骨髓性白血病；慢性淋巴细胞白血病，包括 B- 细胞 CLL、T- 细胞 CLL 幼淋巴细胞白血病、和毛细胞白血病；和急性成淋巴细胞白血病。淋巴瘤的示例包括，但不限于，B- 细胞淋巴瘤，诸如 Burkitt 淋巴瘤、Hodgkin 淋巴瘤；和类似的。使用本文公开的 AAV 载体、重组病毒和方法能够治疗的疾病的其他非限制性示例包括遗传疾病，包括镰状细胞性贫血、囊性纤维化、溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺陷 1、泰 - 萨病(Tay-Sachs disease)、苯丙酮酸尿症、粘多糖贮积病、糖原贮积病(GSD，例如，GSD 型 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、和 XIV)、半乳糖血症、肌肉萎缩症(例如，杜氏肌肉萎缩症)、和血友病。

[0190] 感兴趣的蛋白在受试对象(例如，受试对象的血清)中表达的量可以不同。例如，在一些实施方案中，蛋白可在受试对象的血清中以至少约 9 μg/ml、至少约 10 μg/ml、至少约 50 μg/ml、至少约 100 μg/ml、至少约 200 μg/ml、至少约 300 μg/ml、至少约 400 μg/ml、至少约 500 μg/ml、至少约 600 μg/ml、至少约 700 μg/ml、至少约 800 μg/ml、至少约 900 μg/ml、或至少约 1000 μg/ml 的量表达。在一些实施方案中，感兴趣的蛋白在受试对象的血清中以约 9 μg/ml、约 10 μg/ml、约 50 μg/ml、约 100 μg/ml、约 200 μg/ml、约 300 μg/ml、约 400 μg/ml、约 500 μg/ml、约 600 μg/ml、约 700 μg/ml、约 800 μg/ml、约 900 μg/ml、约 1000 μg/ml、约 1500 μg/ml、约 2000 μg/ml、约 2500 μg/ml、或任何两个这些值之间的范围的量表达。技术人员将理解，用于本方法有效的所需的感兴趣的蛋白的表达水平可取决于非限制性因素诸如具体的感兴趣的蛋白和接受治疗的受试对象而不同，并可由技术人员使用本领域已知的常规方法容易确定蛋白的有效量而没有过度实验。

[0191] 技术人员将领会，可将一种或多种病毒载体和重组 AAV 一起用于本文描述的应用。例如，为了诊断和 / 或治疗的目的，可将表达不同的感兴趣的蛋白或感兴趣的蛋白的不同亚基的重组 AAV 病毒施用于相同的受试对象。在一些实施方案中，将重组病毒共施用至受试对象。在一些实施方案中，将重组病毒分别施用至受试对象。在一些实施方案中，可将表达第一感兴趣的蛋白的第一重组 AAV 和表达第二感兴趣的蛋白的第二重组 AAV 一起或分别施用至受试对象，其中第一感兴趣蛋白和第二感兴趣蛋白可以是相同的或不同的。在一些实施方案中，第一感兴趣蛋白是抗 -HIV 中和抗体且第二感兴趣蛋白是不同的抗 -HIV 中和抗体。在一些实施方案中，第一感兴趣蛋白是抗 - 流感中和抗体且第二感兴趣蛋白是不

同的抗－流感中和抗体。在一些实施方案中，可将表达感兴趣的蛋白的第一亚基的第一重组 AAV 和表达感兴趣的蛋白的第二亚基的第二重组 AAV 一起或分别施用至受试对象。

[0192] 药物组合物和给药方法

[0193] 本文还公开了包括本文公开的重组 AAV 病毒和药学上可接受的载体的药物组合物。组合物还可包括另外的成分诸如稀释剂、稳定剂、赋形剂、和佐剂。如本文所用的，“药学上可接受的”载体、赋形剂、稀释剂、佐剂、或稳定剂以采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或受试对象是无毒的（优选惰性的）或具有由熟练从业人员确定的可接受的毒性水平的那些。

[0194] 载体、稀释剂和佐剂可包括缓冲液诸如磷酸盐、柠檬酸盐、或其他有机酸；抗氧化剂诸如抗坏血酸；低分子量多肽（例如，少于约 10 个残基）；蛋白诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、或赖氨酸；单糖、双糖、和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂诸如 EDTA；糖醇诸如甘露醇或山梨醇；成盐平衡离子（counterions）诸如钠；和 / 或非离子型表面活性剂诸如 Tween™、Pluronics™或聚乙二醇（PEG）。在一些实施方案中，生理上可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。

[0195] 待施用的重组 AAV 病毒的滴度将取决于例如，具体的重组 AAV 病毒、给药方式、治疗目标、个体、和靶细胞类型而不同，并可通过本领域标准方法确定。

[0196] 如将对本领域技术人员明显的，待被施用的重组病毒的体内有用的剂量和具体的给药方式将取决于年龄、体重、痛苦的严重程度、和治疗的动物种类、所用的表达感兴趣的蛋白的具体的重组病毒、和采用重组病毒用于的特定用途而不同。有效剂量水平，即获得所需结果必需的剂量水平的确定，可由本领域技术人员使用常规药理方法实现。典型地，产品的人临床应用以较低的剂量水平开始，增加剂量水平直到获得预期效果。可选地，可使用体外可接受的研究以使用已建立的药理方法确立通过本发明方法鉴定的组合物的有用的剂量和给药途径。

[0197] 尽管将在不同药物（drug-by-drug）基础上确定确切的剂量，在大部分情况下，可作出一些关于剂量的概括。在一些实施方案中，通过以每 kg 受试对象的 $1x10^{11}$ 基因组拷贝（GC）的重组病毒和每 kg $1x10^{13}$ GC 之间的剂量注射至受试对象，例如在 $5x10^{11}$ GC/kg 和 $5x10^{12}$ GC/kg 之间，可施用表达感兴趣的蛋白的重组 AAV。

[0198] 可将本文公开的重组病毒施用至需要其的受试对象（例如，人）。不具体限制给药的途径。例如，可通过本领域标准的途径将重组病毒的治疗有效的量施用至受试对象。途径的非限制性示例包括肌内的、阴道内的、静脉内的、腹膜内的、皮下的、表皮的、皮内的、直肠的、眼内的、肺的、颅内的、骨内的、口内的、颊的、或鼻的。在一些实施方案中，通过肌内注射将重组病毒施用至受试对象。在一些实施方案中，通过阴道内注射将重组病毒施用于受试对象。在一些实施方案中，通过非肠道途径（例如，通过静脉内的、肌内的或皮下的注射）、通过表面划破（surface scarification）或通过接种到受试对象的体腔内将重组 AAV 施用至受试对象。给药途径和重组 AAV 病毒的 AAV 成分的血清型可由本领域技术人员考虑到被治疗的感染和 / 或疾病病情和待表达感兴趣的蛋白的靶细胞 / 组织容易确定。在一些实施方案中，将重组病毒施用于肌细胞。

[0199] 重组 AAV 病毒的实际施用可通过使用将运输重组 AAV 病毒进入受试对象的靶组织

内的任何物理方法实现。例如，可将重组 AAV 病毒注射进入肌肉、血流、和 / 或直接进入肝脏。重组 AAV 病毒的衣壳蛋白可被修饰以致重组 AAV 病毒靶向特定的感兴趣的靶组织诸如肌肉和阴道。可制备药物组合物作为注射剂型或作为局部剂型以通过经皮运输递送至肌肉。

[0200] 关于肌内注射，可采用佐剂诸如芝麻或花生油中的溶液或丙二醇的水溶液中的溶液、和无菌水溶液。如果需要的话，此类水溶液可被缓冲，并首先用生理盐水或葡萄糖使得液体稀释剂等渗。可在水与表面活性剂诸如羟丙纤维素适当混合中制备作为游离酸（DNA 含有酸性磷酸基团）或药学上可接受的盐的重组 AAV 病毒的溶液。还可在甘油、液态聚乙二醇及其混合物和油中制备重组 AAV 病毒的分散体。在储存和使用的一般条件下，这些制剂包含防止微生物生长的防腐剂。

[0201] 将被使用的重组病毒可以以液态或冷冻干燥形式（与一种或多种合适的防腐剂和 / 或在冷冻干燥过程中保护病毒的保护剂组合）被利用。关于基因治疗（例如，可通过特定的基因产物被改善的神经障碍），将表达治疗蛋白的重组病毒的治疗有效剂量施用至需要此治疗的宿主。本文公开的重组病毒在制造用于诱导宿主中的免疫力或提供基因治疗至宿主的药剂中的用途在本申请的范围内。

[0202] 在重组 AAV 病毒的人的剂量已对至少一些病症确立的情况下，可使用那些相同的剂量，或在确立的人的剂量的约 0.1% 和 500% 之间、更优选在约 25% 和 250% 之间的剂量。在没有人的剂量被确立的情况下，如对于新发现的药物组合物的情况，可从 ED_{50} 或 ID_{50} 值或源自体外或体内研究，如动物中的毒性研究和功效研究证明合格的其他合适的值推断合适的人的剂量。

[0203] 可在不同的时间点将重组 AAV 的治疗有效量施用至受试对象。例如，可在被病毒感染之前、期间、或之后将重组 AAV 施用至受试对象。还可在疾病（例如，癌症）发生之前、期间、或之后将重组 AAV 施用至受试对象。在一些实施方案中，在癌症缓解期将重组 AAV 施用至受试对象。在一些实施方案中，在被病毒感染之前施用重组 AAV 用于免疫预防。

[0204] 重组 AAV 病毒的给药频率可以不同。例如，可约每周一次、约每两周一次、约每月一次、约每六个月一次、约每年一次、约每两年一次、约每三年一次、约每四年一次、约每五年一次、约每六年一次、约每七年一次、约每八年一次、约每九年一次、约每十年一次、或约每十五年一次将重组 AAV 病毒施用至受试对象。在一些实施方案中，至多约每周一次、至多约每两周一次、至多约每月一次、至多约每六个月一次、至多约每年一次、至多约每两年一次、至多约每三年一次、至多约每四年一次、至多约每五年一次、至多约每六年一次、至多约每七年一次、至多约每八年一次、至多约每九年一次、至多约每十年一次、或至多约每十五年一次将重组 AAV 病毒施用至受试对象。

实施例

[0205] 在以下的实施例中更详细地公开了另外的实施方案，其不以任何方式意图限制权利要求的范围。

[0206] 实验材料与方法

[0207] 下面的实验材料和方法被用于以下描述的实施例 1-9。

[0208] AAV 定量和功能验证

[0209] 使用下面的一般程序通过qPCR定量纯化的AAV。将AAV的冷冻等份解冻并在包含10个单位的DNase I(Roche)的消化缓冲液中稀释10倍并在37℃孵育30分钟。将经DNase消化的病毒连续稀释并将5ml的每一种稀释液用于与PerfeCTa SYBR Green SuperMix,ROX(Quanta Biosciences)和针对CMV增强子(5'CMV:AACGCCAATAGGGACTTTCC(SEQ ID NO:31)和3'CMV:GGGCGTACTTGGCATATGAT(SEQ ID NO:32))或荧光素酶转基因(5'Luc:ACGTGCAAAAGAAGCTACCG(SEQ ID NO:33)和3'Luc:AATGGGAAGTCACGAAGGTG(SEQ ID NO:34))设计的引物的15μl qPCR反应中。将样品一式两份在Applied Biosystems7300实时PCRSystem上运行。使用以下的循环条件:50℃持续2分钟的一个循环、95℃持续10分钟的一个循环、95℃持续15秒的40个循环和60℃持续60秒。通过与使用以下产生的标准曲线比较来确定病毒滴度:用XhoI/NheI从pVIP荧光素酶表达载体切下的纯化的DNA片段或由先前针对DNA标准测定滴度的表达4E10抗体的纯化的AAV2/8组成的参考标准。

[0210] 为了验证每批被测定滴度的病毒的功能活性,使用293T细胞执行体外感染测定并在细胞悬浮液中测量抗体的浓度。在感染之前24小时,使用1ml培养基中的500K细胞接种12孔的平板。在感染之前2小时,用500μl每孔的新鲜培养基替换培养基。将每一个病毒的基因组拷贝(10^{11})添加至每一个孔中并允许感染6天。移出上清液并通过ELISA定量总的IgG的产量。

[0211] 小鼠品系

[0212] 从Jackson Laboratory获得免疫缺陷NOD/SCID/γc(NSG)、免疫活性的C57BL/6(B6)和Balb/C小鼠。从A.Berns获得免疫缺陷的Rag2/γc小鼠。

[0213] AAV肌内注射和生物发光成像

[0214] 将之前被测定滴度的病毒的等份在冰上缓慢解冻并在TFB2中稀释以获得40μl体积中预定的剂量。通过异氟烷吸入麻醉小鼠并用28G胰岛素注射器将单一的40μl注射剂施用进入腓肠肌。在载体施用之后的不同时间,小鼠被取血以确定血清中抗体浓度或使用Xenogen IVIS200Series成像系统(Caliper Lifesciences)被成像。为了成像,通过异氟烷吸入麻醉小鼠并通过腹膜内注射给予100μl的15mg ml^{-1}的D-荧光素(Gold Biotechnology)。在D-荧光素注射后5和10分钟之间拍摄图像。

[0215] 通过ELISA定量抗体产量

[0216] 关于总的人IgG的检测,用1μg每孔的山羊抗-人IgG-Fc抗体(Bethyl)包被ELISA板1小时。用TBS中1%BSA(KPL)封闭板至少2小时。将样品于室温在含有1%BSA(KPL)的TBST中孵育1小时,随后与HRP轭合的山羊抗-人k轻链抗体(Bethyl)一起孵育30分钟。用TMB Microwell Peroxidase Substrate System(KPL)检测样品。使用人参考血清(Human Reference Serum)(Lot3,Bethyl)或纯化的人IgG/Kappa(Bethyl)产生标准曲线。

[0217] 关于结合gp120的IgG的检测,用0.04-0.10μg每孔的HIV-1gp120MN蛋白(Protein Sciences)包被ELISA板1小时。用TBS中1%BSA(KPL)封闭板至少2小时。将样品于室温在含有1%BSA(KPL)的TBST中孵育1小时,随后与HRP轭合的山羊抗人IgG-Fc抗体(Bethyl)一起孵育30分钟。用TMB Microwell Peroxidase Substrate System(KPL)检测样品。使用适于样品的纯化的b12或VRC01蛋白产生标准曲线。

[0218] HIV病毒生产和滴度测定

[0219] 于37℃在5%CO_2的培养箱中，在补充10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合物(Mediatech)、1%谷氨酰胺(Mediatech)的DMEM培养基中维持293T细胞。在转染前3天，用25ml培养基中的3.75×10^6细胞接种两个15cm平板的每一个。转染前2小时，将培养基更换为15ml的新的培养基。根据制造商的说明，使用Trans-IT试剂(Mirus)转染40微克的编码HIV的感染性分子克隆的pNL4-3质粒36。转染后在24、48和72小时执行上清液收集并在每一次收获之后将15ml的新鲜培养基温和地添加回平板。使用0.45μm过滤器过滤合并的上清液以去除细胞碎片并等分用于在-80℃储存。使用Alliance HIV-1p24抗原ELISA试剂盒(Perkin-Elmer)，遵循制造商的说明定量HIV。

[0220] 体外HIV保护测定

[0221] 根据以下描述的典型的步骤执行荧光素酶报告细胞中的体外中和测定。于37℃在5%CO_2的培养箱中，在补充10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合物(Mediatech)、1%谷氨酰胺(Mediatech)的DMEM培养基中保持来自美国国立卫生研究院AIDS研究和参考试剂项目(National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program)的TZM-bl细胞。在测定之前，用胰蛋白酶消化、计数并以每毫升10^5个细胞的浓度在15ml的总体积中重悬TZM-bl细胞。将细胞与75μg ml^{-1}的DEAE-葡聚糖和如指示的不同浓度的每一种抗体一起混合并允许在病毒制备期间在冰上孵育。为制备病毒稀释液，将储存的NL4-3在生长培养基中稀释至250ng ml^{-1}并在测定板中顺序地4倍连续稀释。将100微升含有10,000细胞的与抗体预孵育的培养基添加至含有之前被稀释的病毒的孔中。感染被允许于37℃在5%CO_2的培养箱中进行48小时。在读板之前，将100ml的BriteLite试剂(Perkin Elmer)添加到每一个孔中，并将板在室温孵育2分钟。每一个孔的120微升随后被转移至不透明板并通过VICTOR3 (Wallac1420VICTOR3读板机，PerkinElmer)读取。

[0222] 用于体内攻击的人源化小鼠的产生

[0223] 基本上根据以下描述的步骤产生人源化的小鼠。从-80℃解冻人外周血单核细胞(AllCells)，于37℃在5%CO_2的培养箱中，在补充10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合物(Mediatech)、1%谷氨酰胺(Mediatech)、50μM的β-巯基乙醇、10mM的HEPES(Gibco)、13种非必需氨基酸(Gibco)、13丙酮酸钠(Gibco)的RPMI培养基中扩繁并用5μg ml^{-1}植物凝血素(Sigma)和10ng ml^{-1}的人IL-2 (Peprotech)刺激用于T细胞的扩繁。将细胞在使用之前扩繁7-13天。关于移植，将300ml体积的培养基中的2百万至4百万细胞腹膜内注射进入NSG小鼠。

[0224] HIV保护实验

[0225] 在HIV攻击前1天，来自每一只小鼠的血液样品经过用于抗体定量的ELISA和流式细胞术以确定基线CD4/CD8比率。第二天，通过100μl含有被在PBS中稀释的HIV的指定剂量的腹膜内或静脉内注射攻击小鼠。通过流式细胞术，被感染的小鼠经过每周血液取样以确定T细胞亚群中CD4与CD8细胞的比率。

[0226] 流式细胞术

[0227] 通过眼窝采血从小鼠取血液样品并在微型离心机中以1,150g离心5分钟以从细胞沉淀中分离血浆。将血浆移出并冷冻用于以后的分析并将细胞沉淀重悬在1.1ml的1×RBC裂解缓冲液(Biolegend)中并在冰上孵育至少10分钟以去除红细胞。在裂解之后，将样品于室温在微型离心机中以1,150g沉淀5分钟，并用补充2%胎牛血清(PBS1)

的 65μl 的包含 5μl 抗 - 人 CD3-FITC、5μl 抗 - 人 CD4-PE、5μl 抗 - 人 CD8a-APC 抗体(Biolegend)和 50μl 磷酸盐缓冲盐水的混合物染色。用 1ml PBS+ 冲洗样品并再次在微型离心机中以 1,150g 沉淀 5 分钟。将所沉淀的细胞重悬在 200μl 补充 2μg ml^{-1}的碘化丙啶(Invitrogen)的 PBS+ 中并在 FACSCalibur 流式细胞仪(Beckton-Dickinson)上分析。样品在确定该亚群中 CD4 与 CD8 细胞的比率之前首先通过 CD3 表达门控(gated)。将包含少于 20$CD3^+$事件的样品从分析中排除。

[0228] HIV p24 的组织学染色。

[0229] 在体内攻击实验结束时,将脾从小鼠中移出并浸入 10% 中性缓冲福尔马林中 24 小时。固定之后,将组织移出并放置在 70% 乙醇中直至标准的石蜡包埋和处理。随后取切片(4mm 厚)并执行免疫组化染色用于使用 Kal-1 小鼠单克隆抗体和标准的抗原修复技术检测 HIV-p24。由病理学家(D.S.R.)在 Olympus BX51 光学显微镜上检查载玻片并使用 SPOT Insight Digital Camera (Diagnostic Instruments)获得图像。

[0230] 实施例 1

[0231] 模块化(modular)AAV 转移载体的构建和克隆

[0232] 为了构建 AAV 转移载体,合成了编码在‘flip’方向的 145 对碱基对(bp)的源自 AAV2 的末端反向重复序列 1 (ITR1)和在‘flop’方向的侧翼为特定的限制性酶切位点的 ITR2 的寡核苷酸(Integrated DNA Technologies)并在连入 PBR322 质粒载体之前退火。随后,通过 PCR 扩增侧翼为兼容的位点的启动子、转基因和聚腺苷酸化信号并克隆在 ITR 之间,产生模块化的 AAV 转移载体,其中限制性酶切位点的独特组合在每个元件的侧翼。

[0233] 为了评价不同的启动子在肌肉表达中的表达潜力,构建了一系列携带由一组普遍存在的和组织特异性启动子驱动的荧光素酶基因的载体。通过单一的注射将这些载体肌内施用入腓肠肌并监测荧光素酶的表达以确定在该靶组织中每一个启动子的相对表达潜力。巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、嵌合的鸡 - β - 肌动蛋白(CAG)、和泛素 C (UBC)启动子提供了牢固的肌肉表达(图 1A)。

[0234] 产生了新的合成的 CASI 启动子(长度约 1.05kb)(图 1B)。CASI 启动子由巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)及其后的包含转录起始位点的鸡 - β - 肌动蛋白(CAG)启动子的片段组成。该融合体之后直接是利用在人泛素 C (UBC)启动子的增强区侧翼的共有剪接供体和剪接受体序列的合成设计的内含子。体内试验说明,CASI 启动子在肌肉中比 CAG 启动子相当高的活性,尽管 34% 更紧凑(图 1C)。随后将土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)并入 AAV 转移载体,其显著增强转基因的表达(图 1D)。

[0235] 还检查了源自肌肉的表达的不同的聚腺苷酸化信号的效率。SV40 晚期 poly(A)、兔 β - 珠蛋白(RBG)poly (A)和牛生长激素(BGH)poly (A)都说明了表达的类似水平(图 1D)。

[0236] 图 1E 显示编码 IgG1 支架的源自单克隆抗体的重链和轻链 V 区可被插入其中的优化的肌肉表达载体的部分的示意图。

[0237] 图 2 显示具有荧光素酶转基因插入的优化的肌肉表达载体的图的示意图展示。如在补充的图 2 中显示的,载体具有在每一个模块化元件侧翼的独特的限制性酶切位点(例如,XhoI、SpeI、NotI、BamHI、Acc65I、HindIII、和 NheI)。在该载体中,AAV 序列直接在 XhoI 限制性酶切位点之后开始于来自 AAV2 的 145bp 的“flip”- 末端反向重复序列(ITR),其

后是 SpeI 限制性酶切位点和 CASI 启动子。CASI 启动子之后是 NotI 限制性酶切位点和在 GCGGCCGC（SEQ ID NO:35）裂解位点的共有识别序列之后的一个另外 C 残基以在荧光素酶转基因的 ATG 之前模拟 Kozak 共有序列。转基因的 3'末端终止于 TAA 终止密码子，其后是一个另外的 A 残基，随后是 BamHI 位点。WPRE 元件在该限制性酶切位点之后并继续直至在 SV40 晚期聚腺苷酸化信号和 HindIII 限制性酶切位点之前的 Acc65I 限制性酶切位点。另外，第二个 145bp 的 AAV2 "flop"-ITR 位于 NheI 位点之前。

[0238] 实施例 2

[0239] 重组 AAV 病毒的生产和纯化

[0240] 根据下面描述的过程，从培养物上清液中生产并纯化重组 AAV 病毒。

[0241] 于 37℃在 5%CO_2的培养箱中，在补充 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素混合物（Mediatech）和 1% 谷氨酰胺（Mediatech）的 DMEM 培养基中维持 293T 细胞。在转染前 3 天，用 25ml 培养基中的 3.75×10^6细胞接种四个 15cm 平板的每一个。可选地，在转染当天之前四天可将 1.875×10^6个细胞涂布每一个平板（每种病毒涂布 7.5×10^6个细胞）。转染前 2 小时，将培养基更换为 15ml 的新鲜培养基。

[0242] 使用 BioT 转染试剂（Bioland Scientific）以 0.25:1:2 的比例将 AAV 转移载体与腺病毒辅助载体（pHELP（Applied Viromics）或 pAd-delta-F6）和表达 AAV 的 Rep 和 Cap 基因产物的辅助质粒（pAAV2/8SEED）一起共转染。每次转染所用的 DNA 的总量为 80μg。转染后 36、48、72、96、和 120 小时执行 5 次 AAV 病毒收集。关于每一个时间点，将培养基通过 0.2μm 过滤器过滤并将 15ml 的新鲜培养基温和添加至平板。

[0243] 在收集之后，将约 75ml 的 5×PEG 溶液（40% 聚乙二醇、2.5M NaCl）添加至收集的上清的总体积中（～ 300ml）并将病毒在冰上沉淀至少 2 小时。将沉淀的病毒以 7,277g 沉淀 30 分钟（Sorvall RC3B Plus,H-6000A 转子）并重悬在 1.37g ml^{-1}氯化铯中。将重悬的病毒均匀地分入两个 Quick-Seal 管子（Beckman）中并以 329,738g 在 20℃旋转 24 小时（Beckman Coulter,Optima LE-80K,70Ti 转子）。将 100-200ml 的部分收集在 96 孔平底组织培养平板中，并使用折光仪定量 5ml 的每个部分的折光率。将呈现在 1.3755 和 1.3655 之间的折光率的孔组合并使用 Test Formulation Buffer2（TFB2,100mM 柠檬酸钠，10mM Tris,pH8）稀释至 15ml 的终体积。将病毒装载到 100kDa 的 MWCO 离心过滤器（Millipore）上并经过在 4℃以 500g 的离心直至形成 1ml 的滞留物。随后将保留的病毒再次在 TFB2 中稀释至 15ml 的总体积并重复此过程以致病毒被冲洗 3 次。最终的保留体积在共 500-1000ml 之间，将其等分并储存在 - 80℃。

[0244] 实施例 3

[0245] 优化抗体转基因

[0246] 为了创建用于抗体表达的优化的骨架，将由 F2A 自加工肽序列分开的一些广泛中和 HIV 抗体的重链和轻链克隆入哺乳动物表达载体中的 CMV 启动子的控制下。用这些载体转染的 293T 细胞说明人 IgG 分泌进入培养物上清液中可被 ELISA 检测（图 3A）。为了改善表达，将 F2A 序列重新改造以更好的反映哺乳动物密码子利用并在 N- 末端并入弗林蛋白酶裂解位点用于优化加工。通过转染将具有优化的 F2A 序列（SEQ ID NO:9）的载体与具有标准 F2A 序列（SEQ ID NO:10）载体的比较显示具有优化的 F2A 序列的载体产生较高水平的所有 4 种被试验的抗体。

[0247] 为了改善抗体的分泌，用源自人生长激素（HGH）的密码子优化序列替换内源信号序列并创建4E10表达载体的版本，其中重链、轻链、或两条链由单独的HGH信号序列驱动并通过转染比较它们的表达。为了最小化载体中的重复序列，合成了两条HGH序列（SEQ ID NO:11和12），其具有不同的核苷酸序列但编码相同的氨基酸，并将每一条专门用于重链或轻链。在重链或轻链处用HGH序列替换内源信号序列导致较高水平的抗体产生，且两条链的信号序列的替换都产生了最好的结果（图3B）。

[0248] 为了去除编码抗体的转录本的不适当的剪接的潜力，将序列经过计算机模拟剪接预测并通过至位点的保守突变或，当这个不可能时，至附近序列的保守突变的使用去除所有潜在剪接供体和受体序列。当放置在这个剪接－优化的骨架中时观察到4E10抗体的改善的表达（图3C）。

[0249] 最终抗体转基因的结构示意图在图3D中显示。如图3D中显示的，抗体转基因由HGH信号序列、其之后的可交换的VH区、剪接优化的重链恒定区、连接至优化的融合至第二HGH信号序列的F2A肽的弗林蛋白酶裂解位点、可交换的VL区、和剪接优化的k轻链恒定区组成。

[0250] 为了确认以上描述的针对改善基因表达作出的优化没有影响抗体的中和效力，将一些被研究充分的广泛中和抗体（例如，b12、2G12、4E10、和2F5抗-HIV抗体）从优化的表达载体中表达。将产生的抗体纯化并使用TZM-bl荧光素酶报告细胞在体外保护测定中试验。将携带在HIV诱导转录元件控制下的荧光素酶基因的细胞（TZM-bl细胞）与每一种抗体的稀释液孵育，随后用递增量的HIV攻击。将细胞用不同浓度的抗体铺板，随后用递增滴度的NL4-3HIV毒株攻击。攻击之后两天，裂解细胞并在添加荧光素底物之后定量荧光素酶活性。在与先前确立的针对该毒株试验的所有四种抗体的IC_{50}和IC_{90}值充分相关的抗体浓度观察到TZM-bl细胞感染中强烈的减少（图4A-D）。

[0251] 实施例4

[0252] 抗体转基因的体内表达

[0253] 通过腓肠肌的单一注射，将具有来自血清型8的衣壳的表达由巨细胞病毒（CMV）启动子驱动的荧光素酶或4E10HIV中和抗体的重组AAV病毒施用至小鼠。在（图5A）中显示1×10^{10}基因组拷贝的表达荧光素酶的AAV2/8的肌内注射后15周的代表性的Rag2/γc小鼠的Xenogen图像。给药后一周内，荧光素酶或抗体基因表达是可检测的（分别为图5B和5C）。表达持续增加，在12-16周之后获得最大水平并随后在稳定用于64周研究的持续期间之前下降2-至3-倍。图5B-C显示抗体生产是剂量依赖性的并持续至少64周。

[0254] 将HIV中和b12抗体的重－链和轻－链可变区克隆入AAV转移载体，并生产重组AAV储备（stock）用于肌内施用1×10^{11}基因组拷贝进入两个免疫缺陷和两个免疫活性的小鼠品系中的腓肠肌中：NOD/SCID/γc（NSG）、Rag2/γc（RAG）、C57BL/6（B6）和Balb/C。小鼠以高于用非优化的载体获得的水平100倍的血清浓度生产编码的抗体，且该表达水平持续了至少52周（与图5C比较的图6）。在B6小鼠中，针对人b12-IgG产生非常有限的小鼠抗体，而Balb/C动物产生的可检测的抗转基因的小鼠抗体似乎没有影响人IgG水平。

[0255] 实施例5

[0256] 预防由HIV攻击造成的CD4细胞的丢失

[0257] HuPBMC-NSG人源化小鼠在用具有复制能力的HIV攻击之后呈现CD4细胞消耗

(20ng p24NL4-3,n=4,图 7)。使用该小鼠模型以试验本文描述的载体保护小鼠免受体内攻击的能力。

[0258] 将表达荧光素酶或 b12 抗体的重组 AAV 病毒施用至 NSG 小鼠,在 6 周内产生约 100 μg ml^{1}的稳定的血清 b12 抗体浓度(图 8A)。用扩繁的人外周血单核细胞(huPBMC)过继植入(adoptively populated)这些小鼠,其移植超过 2 周的时间。随后通过 HIV 的 NL4-3 毒株的腹膜内注射攻击小鼠。

[0259] 在 HIV 攻击之后,大部分表达荧光素酶的小鼠显示急剧的 CD4 细胞丢失而表达 b12 抗体的小鼠没有显示 CD4 细胞消耗(图 8B)。

[0260] 该实施例说明,表达抗 -HIV 抗体的重组 AAV 病毒能够保护小鼠免受由 HIV 感染造成的 CD4 细胞丢失。

[0261] 实施例 6

[0262] 使用不同的 HIV 中和抗体的保护

[0263] 为了比较不同的广泛中和 HIV 抗体的保护能力,分别产生表达 b12、2G12、4E10 和 2F5 的重组 AAV 病毒并施用至 NSG 小鼠。在施用之后 7 周,NSG 小鼠产生 20 - 250 μg ml^{1} 的所示的抗体(图 9A)。测量了每一种 HIV 抗体的体内血清浓度。结果显示在(图 3A)。

[0264] 用 huPBMC 过继植入被转导的小鼠,通过用 HIV 的静脉内注射攻击并每周取样以定量 CD4 细胞随时间推移的消耗(图 9B)。如图 9B 中显示的,表达 b12 的动物被完全保护免受感染,且表达 2G12、4E10 和 2F5 的动物被部分地保护。显示部分保护的组由具有推迟的 CD4 细胞消耗的动物和整个实验过程中保持高 CD4 细胞水平的动物组成。

[0265] 攻击后 8 周,杀死小鼠并将石蜡包埋的脾切片经过表达 HIV 的 p24 抗原的免疫组化染色以定量感染的程度(图 9C)。如在图 9D 中显示的,表达 b12 的小鼠不具有可检测的表达 p24 的细胞。

[0266] 实施例 7

[0267] 抗 -HIV 保护的牢固性的确定

[0268] 用 huPBMC 过继植入一大组表达 b12 抗体的小鼠。在攻击之前,所有小鼠表达高水平的人 IgG,推测由于移植人 B 细胞(图 10A),但只有接受表达 b12 载体的小鼠产生 gp120 特异性的 IgG,其达到 100 μg ml^{1} (图 10B)。

[0269] 模拟被感染的表达荧光素酶或 b12 的小鼠在整个实验过程中显示一致的高水平 CD4 细胞移植,显示转基因毒性没有造成 CD4 细胞丢失(图 11)。相比之下,表达荧光素酶的接受 1ng 的 HIV 的小鼠经历快速并大量的 CD4 细胞消耗。在较高剂量下,表达荧光素酶的小鼠中的感染变得更一致并导致在某些情况下 CD4 细胞的消耗在检测水平之下(25、125ng 剂量)。显著地,所有表达 b12 的小鼠显示保护免受 CD4 细胞丢失,尽管接受超过高于消耗 8 只对照动物中的 7 只所必需的 100 倍的 HIV 剂量(图 11)。

[0270] 该实施例显示,可使用本文公开的重组 AAV 病毒提供抗 HIV 感染的有效的且强大的免疫预防。

[0271] 实施例 8

[0272] b12 抗 -HIV 抗体的表达

[0273] 图 12A 是显示 b12 随时间推移的表达作为通过由取自 AAV 施用后的血清样品上的总的人 IgG ELISA 确定的剂量的函数的绘图(n=8)。接受表达荧光素酶的载体的小鼠没有

呈现可检测的人抗体(n=12)。图 12B 显示在攻击之前 1 天、人 PBMC 的过继转移后 3 周和由 gp120 特异性的 ELISA 测量能够结合 HIV 的抗体的部分确定的 AAV 的指示剂量的肌内注射后 15 周,血清中 b12 的浓度(n=8-12)。图 12C 显示 HuPBMC-NSG 人源化的小鼠中的 CD4 细胞消耗作为用 10ng 的 NL4-3 静脉攻击进入表达显示保护免受感染必要的抗体的最小剂量的一系列 b12 的动物的结果。图 12A 和 C 显示平均值和标准误差,绘图 b 显示个体动物和平均值(n=8-12)。

[0274] 实施例 9

[0275] b12 和 VRC01 抗体在抗 -HIV 保护中的比较

[0276] 在该实施例中,将 b12 抗体与被发现体外中和超过 90% 的循环的 HIV 毒株的抗 -HIV 抗体即 VRC01 抗体比较。将表达 b12 或 VRC01 的载体的渐减的剂量施用至 NSG 小鼠,并监测抗体随时间推移的表达。

[0277] 关于两个抗体,在被分析的所有时间点都观察到剂量依赖性的表达(图 12A 和图 13A)。用 huPBMC 过继植入以不同水平表达荧光素酶或抗体的小鼠。仅仅在攻击之前,gp120 特异性的酶联免疫吸附测定(ELISA)确认每一个组中的有效抗体浓度(图 12B 和图 13B)。在 10ng 的 HIV 的静脉攻击之后,监测 CD4 细胞以确定抗体浓度的影响。34 μg ml^{-1} 的平均 b12 浓度和 8.3 μg ml^{-1} 的 VRC01 浓度保护小鼠免受感染(图 12C 和图 13C)。表达 b12 和 VRC01 的较低浓度的组部分地被保护,一些动物显示无可检测的 CD4 细胞的丢失,其他呈现推迟的 CD4 细胞消耗。

[0278] 实施例 10

[0279] 保护免受流感感染

[0280] 在该实施例中,将本文公开的 AAV 载体用于产生表达抗 - 流感抗体的重组 AAV 病毒,并发现重组 AAV 病毒在保护小鼠免受流感病毒感染方面是有效的。

[0281] 实验材料与方法

[0282] 流感病毒产生和定量

[0283] 在该实施例中用于小鼠感染的所有流感病毒从 A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) 毒株获得它们的 6 个内部基因(PB2、PB1、PA、NP、M、和 NS)。HA 和 NA 基因源自下面 3 株毒株并给出以下的名称缩写 :

[0284] (1)PR8 :源自广泛使用的实验室适应的毒株 A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) 的 HA 和 NA。

[0285] (2)CA/09 :源自在 2009 年猪源 H1N1 流感在人中出现大流行期间早期分离的毒株 A/California/07/2009(H1N1) 的 HA 和 NA。

[0286] (3)SI/06 :源自人类季节性 H1N1 疫苗毒株 A/Solomon Islands/3/2006(H1N1) 的 HA 和 NA。

[0287] 使用 8 质粒双向反向遗传学系统产生流感病毒。简要地,在补充 10% 胎牛血清 (Omega Scientific)、100IU/mL 的青霉素(Mediatech)、100 μg/mL 链霉素(Mediatech)、和 1% 的 L- 谷氨酰胺(Mediatech)的 DMEM(Mediatech)中维持 293T 和 MDCK 细胞。用 250ng 的 8 种质粒的每一种共转染包含 293T 和 MDCK 细胞的共培养物的 6 孔组织培养皿(Corning)。在转染后 14 小时,吸出培养基,用 PBS 将细胞洗涤 1 次,并将加上 3 μg/mL 的 TPCK- 处理的胰蛋白酶(Sigma-Aldrich)的流感生长培养基添加至细胞。流感生长培养基由具有 0.01% 的

胎牛血清、0.3%的牛血清白蛋白(Invitrogen)、100IU/mL的青霉素、100μg/mL链霉素、和100μg/mL氯化钙的Opti-MEM I(Invitrogen)组成。72小时后,收集上清液并传代至包含加上3μg/mL胰蛋白酶的流感生长培养基中几乎汇合的MDCK细胞的15cm的皿(Corning)。72小时后,收获病毒上清液并在2,000xg离心5分钟。将病毒上清液移出并等分,并将等分部分在-80℃冷冻。

[0288] 噬菌斑测定

[0289] 使用Avicel微晶纤维素覆盖通过对MDCK细胞的噬菌斑测定定量流感病毒。简要地,将MDCK细胞接种进入6孔组织培养皿。当细胞是95%汇合时,将培养基移出并将病毒接种物的连续10倍稀释物添加至1ml流感生长培养基的终体积。40分钟后,通过抽吸将接种物移出并由4ml具有2.4%的Avicel微晶纤维素和3μg/ml的TPCK-处理的胰蛋白酶的流感生长培养基替代。平板在37℃静置生长3天。随后通过抽吸将覆盖移出,用PBS将细胞层冲洗2次,并将细胞用20%乙醇中的0.1%的结晶紫染色15分钟。随后通过抽吸将染色溶液移出,再次用PBS冲洗细胞,并将噬菌斑目视地计数以确定根据噬菌斑形成单位(PFU)的病毒滴度。

[0290] 小鼠品系

[0291] 从Jackson Laboratory(JAX)获得约4-5周大的免疫活性BALB/cJ(BALB/c)和免疫缺陷NOD/SCID/γ⁻/⁻(NSG)小鼠。对于包括年老的小鼠的实验,在流感攻击之前将这些动物饲养并安置在屏障(barrier)条件下一段时间。

[0292] 将流感中和抗体克隆进入AAV载体

[0293] 合成对应于不同流感抗体的重链和轻链可变区的序列(Integrated DNA Technologies)并克隆进入包含IgG1恒定区骨架的AAV转移载体中。在某些情况下,优化抗体基因以改善抗体的体内生产。

[0294] AAV生产并施用至小鼠

[0295] 根据下面描述的过程执行AAV生产和肌内注射。简要地,用80μg编码感兴趣的抗体的载体、pHELP(Applied Viromics)、和pAAV2/8SEED(University of Pennsylvania Vector Core)以0.25:1:2的比例转染$1.2\times10^8$293T细胞。随120小时过程的推移,收集上清液5次。通过PEG沉淀和氯化铯分级纯化病毒,随后渗滤、浓缩、和通过100k MWCO的离心过滤器(Millipore)缓冲液交换进入由100mM柠檬酸钠和10mM Tris pH8组成的缓冲液中,随后等分并储存在-80℃。为了定量等分部分,解冻病毒,用DNAse处理,并如之前描述的(13)通过qPCR测定滴度。简要地,使用从先前测定滴度的、纯化的、编码4E10抗体的AAV2/8产生的标准曲线,通过定量PCR确定病毒滴度。病毒等分部分的感染性通过转导293T细胞并通过ELISA定量细胞悬浮液中的抗体浓度体外确定。

[0296] 小鼠AAV转导和基因表达的定量

[0297] 在肌内注射之前,解冻重组AAV病毒并用缓冲液(100mM柠檬酸钠、10mM的Tris pH8)在40μL体积中稀释至指示的剂量。通过异氟烷吸入麻醉小鼠,并将病毒施用作为40uL的单一注射进入腓肠肌。

[0298] 基本上如先前描述的并带有以下修改,使用IVIS200仪器执行生物发光成像:在腹膜内注射1.5mg的D-荧光素(Gold Biotechnology)后10分钟拍摄生物发光图像。使用从纯化的人IgG/Kappa(Bethyl)产生的标准曲线通过执行ELISA确定小鼠血清中人IgG

的浓度。

[0299] 用流感攻击小鼠

[0300] 解冻流感病毒并在PBS中稀释以在20μL体积中递送指示的剂量。在接种之前，称重并通过腹膜内注射200μL的包含在PBS中被稀释的2mg氯胺酮和0.2mg甲苯噻嗪的混合物麻醉小鼠。通过用20μL的稀释的病毒、10μL每个鼻孔的鼻内接种用流感攻击小鼠。被感染的小鼠在每一天的相同时间被称重。

[0301] GFP流感病毒生产和定量

[0302] 根据在Bloom等人Science328:1272(2010)中描述的方法产生PB1flank-GFP流感病毒，其中GFP被包装在PB1区段中。如Bloom等人描述的，PB1flank-GFP病毒在反式(in trans)供给缺失的PB1蛋白的293T-CMV-PB1和MDCK-SIAT1-CMV-PB1细胞中生长并测定。使用8质粒双向反向遗传学系统产生PB1flank-GFP病毒，但用pHH-PB1flank-eGFP替代标准的PB1质粒。关于这些病毒，另外的5个内部基因(PB2、PA、NP、M、和NS)源自PR8毒株，如在小鼠感染中使用的病毒。除了具有来自PR8、CA/09、和SI/06的HA和NA的病毒，两个另外的病毒被用于这些测定：

[0303] (1)JP/57：源自来自亚洲流感大流行的早期毒株A/Japan/305/1957(H2N2)的HA和NA。

[0304] (2)Viet/04：来自高致病性禽流感毒株A/Vietnam/1203/2004(H5N1)的HA。该病毒的NA源自实验室适应的A/WSN/1933(H1N1)毒株。将多碱基裂解位点从HA去除。

[0305] 通过流式细胞术定量PB1flank-GFP病毒。以每孔1ml流感生长培养基中10^5个细胞将MDCK-SIAT1-CMV-PB1细胞接种到12孔的皿(Corning)中。接种后8小时，在培养基中将病毒1:10、1:100、和1:1000稀释。用50μL的这些稀释液的每一种感染孔。感染后16.5h通过与250uL的胰蛋白酶-EDTA(Invitrogen)一起孵育5分钟来收获细胞，通过抽吸去除胰蛋白酶，并重悬在250μL的补充2%胎牛血清和2μg/mL碘化丙啶(Invitrogen)的PBS中。将样品在FACSCalibur流式细胞仪(Beckton-Dickinson)上分析，并将具有GFP阳性细胞的百分比在0.3-3%之间的样品用于定量病毒滴度。从GFP阳性细胞的百分比、稀释因子、和每个孔10^5个细胞的总的计数计算滴度。

[0306] 中和测定

[0307] 使用PB1flank-GFP流感病毒和MDCK-SIAT1-CMV-PB1细胞执行中和测定。将40μL的流感生长培养基添加至平底96孔组织培养皿(Corning)的所有孔中，除了接受57μL培养基的A行。通过添加3μL的血清至A行中的57μL的流感生长培养基连续稀释小鼠血清样品，随后执行1:3连续稀释直到G行，导致起始稀释为1:20且最终稀释为$1:4.374\times10^4$。将PB1flank-GFP病毒的2×10^4感染性颗粒(由通过流式细胞术测定滴度所确定的)添加至20μL体积的流感生长培养基中的样品。将被稀释的血清和病毒的混合物于37℃在5%CO2培养箱中孵育1h。孵育之后，将20μL体积的流感生长培养基中的2×10^4的MDCK-SIAT1-CMV-PB1细胞添加至所有孔中，MOI为1。对每一种病毒包括：只有细胞的对照，其接受天然的BALB/c小鼠血清并不接受病毒，和病毒对照，其接受天然的BALB/c小鼠血清。将平板于37℃在5%CO_2培养箱中孵育18小时。孵育后，将40μL的PBS中的1.5%Triton X-100(Sigma-Aldrich)添加至每个孔以给出0.5%Triton X-100的终浓度，并将平板在室温孵育5分钟。将100μL的每一个样品转移入不透明的96孔平板(Corning)

中用于读取。使用被配置从顶部读取的具有 485nm 的激发、515nm 的发射、激发和发射的缝宽均为 12nm、增益设置为“最佳”、500 μs 的积分时间、及每个孔 5 次读取的 Safire2 平板读取器(Tecan)定量 GFP 荧光。从所有的读数减去来自只有细胞的对照的基线荧光。将样品归一化至病毒对照。

[0308] 组织学

[0309] 在体内攻击实验结束时,将肺从小鼠中移出并将该组织的一半浸入 10% 中性缓冲福尔马林中 24 小时。固定之后,将组织从福尔马林中移出并放置在 70% 乙醇中直至标准的石蜡包埋和处理。随后取 4 微米厚的切片,并执行苏木精 - 伊红染色(H&E)染色。由病理学家(D.S.R.)在 Olympus BX51 光学显微镜上检查载玻片并使用 SPOT Insight Digital Camera (Diagnostic Instruments)获得图像。炎症按以下评分 :0= 无至最小炎症 ;1= 细支气管中的偶尔浸润(少于 10% 的细支气管);2= 容易被鉴定的细支气管中的浸润(10-50% 的细支气管);3= 容易被鉴定的具有实质浸润的和 / 或早期片状纤维化的细支气管中的浸润 ;4=>50% 的具有浸润的细支气管、或 10-50% 的细支气管涉及具有细支气管中广泛坏死的上皮、血管坏死、或广泛纤维化。以盲式进行评分并对任何统计检验假定顺序尺度。

[0310] 通过 RT-qPCR 的相对病毒定量

[0311] 将肺组织在 100 μL 的 PBS 中匀质化。将 25 μL 的匀浆用于通过 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取 RNA。将纯化的 RNA 重悬在无核酸酶的水中,并将 RNA 浓度标准化为 150ng/μL。使用 qScript One-Step SYBR Green qRT-PCR Kit,Rox(Quanta Biosciences) 和针对 PR8M 和由小鼠核糖体蛋白 L32 组成的内源对照设计的引物执行实时 RT-qPCR。正向 -M:CAAGCAGCAGAGGCCATGGA(SEQ ID NO:36),反向 -M:GACCAGCACTGGAGCTAGGA(SEQ ID NO:37),正向 -L32:AAGCGAAACTGGCGGAAAC(SEQ ID NO:38),反向 -L32:TAACCGATGTTGGGCATCAG(SEQ ID NO:39)。使用 Turbo DNAse 试剂盒(Invitrogen)将样品用 DNAse 处理并在 ABI7300 实时 PCR System(Life Technologies) 上以以下的程序一式三份运行 :50℃持续 10 分钟、95℃持续 5 分钟、95℃持续 15 秒的 40 个循环和 55℃持续 30 秒,之后为溶解曲线分析。通过 L32 信号将每一个样品单独地归一化以解释输入 RNA 中的变化。

[0312] 抗 - 流感抗体的体内表达

[0313] 产生了表达未被修饰的全长 F10 或 CR6261 抗 - 流感抗体的重组 AAV 病毒。将 1×10^{11} 基因组拷贝(GC)的重组 AAV 病毒的单一肌内注射施用于 Balb/c 小鼠的腓肠肌中。每周获取血清样品并通过 ELISA 定量人 IgG (图 14)。观察到 b12 抗体超过 100 μg/mL 的显著表达。相比之下,F10 和 CR6261 抗体在一周时都显示约 1 μg/mL 的表达,在随后的时间点变得不可检测,随后在 7 周时缓慢上升至几微克每 mL。

[0314] 为了改善 F10 和 CR6251 抗体的体内表达,构建了嵌合抗体,其中用 b12 的轻链代替 F10 和 CR6251 抗体的每一种的轻链。在 293T 细胞转染之后,当与 b12 轻链配对时观察到两种抗体的实质上较高的表达,显示非天然的轻链改善了抗体表达(图 15A)。为了改善天然的轻链的表达,创建了一组包含源自 b12 或 4E10 抗体的轻链的 5’端和 3’端接合序列的被修饰的轻链可变区。所用的被修饰的轻链可变区在图 15B 中列出。在 293T 细胞转染后,包含来自 b12 和 4E10 的序列的 F10LO24 轻链呈现多达 12 倍更高的体外表达(图 15C])。同样地,包含具有来自 b12 抗体的序列的 CR6261LO13 轻链的构建体转染,呈现多达 20 倍更高

的体外表达(图 15D)。使用体外中和测定检测这些被修饰的抗体,且结果证实包含被修饰的轻链的抗体保持了它们中和流感的两条链的能力。鉴于对被修饰的轻链观察到的本质上改善的抗体表达,用 F10LO24 和 CR6261LO13 被修饰的序列实施所有后续实验并分别被称为 F10 和 CR6261。在 SEQ ID NO:40-43 中提供了所用的完整的可变区序列,包括嵌合轻链可变区。

[0315] 如图 16A 中显示的,$1x10^{11}$基因组拷贝(GC)的 AAV 的单一肌内注射进入 BALB/c 小鼠中在注射的一周内产生可检测的抗体。抗体的浓度短暂下降,随后在跨随后的 6-8 周增加,达到 50-200 μg/mL 之间的稳定水平,在 40 周研究期间保持。

[0316] 体外中和测定

[0317] 为了确定来自用重组 AAV 病毒处理的动物的血清的中和潜力的宽度,使用包含来自 3 个不同的 HA 亚型(H1、H2、和 H5)的 5 个不同的血凝素的 GFP 报告流感病毒粒子执行体外中和测定。如图 16B 中显示的,来自表达阴性对照抗体(b12,抗 HIV 抗体)的小鼠的血清没有显示对任何 5 株被检测的毒株的可观的中和。相比之下,来自接受表达 F10 或 CR6261 的重组 AAV 病毒的动物的血清显示中和所有 5 株毒株的显著的能力。

[0318] 体内保护

[0319] 为了确定重组 AAV 病毒保护小鼠免受流感感染的能力,将重组病毒施用至动物并允许抗体表达 5 周。仅仅在流感攻击之前,在小鼠的循环中观察到约 100-200 μg/mL 的 b12 和 F10 抗体和从 0.1 μg/mL 至 100 μg/mL 的范围的 CR6261 浓度的宽范围(图 17A)。在 CA/09 毒株的鼻内给药之后,在表达对照 b12 抗体的动物中观察到急剧下降的体重,但在表达 F10 抗体的小鼠中没有可观的下降(图 17B)。表达 CR6261 的小鼠显示与血清 IgG 浓度成反比的一定范围的体重下降,表明需要约 7.5 μg/mL 的该抗体的最小血清浓度以预防免受 CA/09 感染的疾病。

[0320] 为了检查 VIP 针对其他毒株的体内保护的能力,用 SI/06 毒株攻击表达 b12 对照或 F10 抗体的动物(图 17C)。表达对照抗体的小鼠呈现跨两周的时间的体重下降。相比之下,表达 F10 的小鼠在 SI/06 攻击之后不显示疾病的征象。

[0321] 为了确定 VIP 保护动物免受致死的流感攻击的能力,将 1000PFU 的小鼠致死的 PR/8 毒株鼻内施用至动物。表达 b12 对照的小鼠经历了急剧的体重下降并在 4 天内达到我们的研究的终点(图 17D-E)。相比之下,表达 F10 的小鼠没有显示显著的疾病征象或体重下降,说明用重组 AAV 病毒处理的动物被保护抗至少 3 株不同的流感毒株。

[0322] 为了确定 CA/09 和 SI/06 攻击对被流感攻击的小鼠的内源免疫应答的影响,使用中和测定分析了来自此类动物的血清样品。来自先前被攻击的表达对照 b12 抗体的小鼠的血清显示强的抗攻击毒株的中和活性,但没有抗异源毒株的可检测的活性(图 17F-G)。相比之下,用重组 AAV 病毒处理的表达 F10 或 CR6261 的小鼠继续显示抗所有被检测的毒株的广泛的血清中和活性。同样,尽管抗 PR8、VN/04 和 JP/57 的血清中和活性没有被 CA/09 或 SI/06 攻击差异影响,在用重组 AAV 病毒处理的小鼠中观察到针对攻击毒株的增强的血清中和活性(比较图 17F 和 17G)。这些结果表明,广泛中和抗体的表达保护抗疾病,但是仍然允许另外的、甚至更有效的、内源体液免疫的形成。

[0323] 该实施例显示,可使用本文公开的重组 AAV 病毒提供针对多种流感病毒造成的感染的有效的免疫预防。

[0324] 实施例 11

[0325] 保护年老的且免疫功能低下的动物免受流感感染

[0326] 产生表达来自 F10 和 CR6261 广泛中和流感抗体的可变区的重组 AAV 病毒。

[0327] 免疫缺陷的 NOD/SCID/γ⁻/⁻(NSG) 小鼠是完全缺少适应性免疫并呈现明显受损的先天免疫应答的小鼠。将表达 F10 和 CR6261 抗体的重组 AAV 病毒以 5×10^{12}GC 每 kg 的标准化的剂量施用至相对年幼的(14-19 周大)或高龄(46-55 周大)的 NSG 动物。使用 Xenogen 成像或 ELISA 定量超过 4 周的基因表达(分别为图 18A 和 18B)。两个动物组在所有时间点都显示非常相似的基因表达水平,表明年龄没有影响基于肌肉的来自 AAV 的基因表达的能力。为了确定体内抗体表达是否足够保护这些免疫功能低下的动物免受流感攻击,将 1000PFU 的致死的 PR8 毒株施用至年幼的和年老组的小鼠(分别为图 18C 和 18D)。

[0328] 在两种情况下,在表达荧光素酶的对照小鼠中观察到疾病和体重下降,其导致所有此类动物在研究过程的死亡。相比之下,表达 F10 的年幼的和年老的 NSG 动物完全被保护免受流感引起的体重下降,表明单独的 F10 抗体的这些浓度在不存在内源免疫应答时是足够保护小鼠的。为了进一步表征 F10 能够在 NSG 小鼠中预防疾病的程度,在整个研究期间处死动物并评分肺组织的组织学样品中的炎症水平。表达荧光素酶的被感染的小鼠显示感染后 5 天的大量的细支气管腔浸润(图 18E 左)。相比之下,被 F10 保护的动物显示非常低水平的炎症及与这些小鼠中本质上较低水平的病理学一致的清晰的细支气管(图 18E 右)。组织学样品中肺炎症随时间推移的评分显示动物在早期时间点呈现最严重的炎症(图 18F)。与荧光素酶对照小鼠相比,表达 F10 抗体的小鼠在被分析的所有时间点都呈现显著较少的炎症。

[0329] 为了直接定量重组 AAV 病毒控制病毒复制的能力,通过从处死时获得的肺组织中提取总 RNA 并通过定量 RT-PCR 测量病毒 RNA,我们确定 NSG 小鼠中病毒的量。如图 18G 中显示的,来自表达荧光素酶的小鼠的肺在整个实验过程中呈现高病毒载量。相比之下,在早期时间点被分析的表达 F10 的动物包含中等水平的随时间推移大幅度下降的病毒 RNA,作为在 F10 抗体存在时急剧减少的病毒复制的结果,尽管缺少内源适应性免疫。

[0330] 实施例 12

[0331] 保护骨肝胸腺(BLT)人源化的小鼠免受 HIV 感染

[0332] 骨肝胸腺(BLT)人源化的小鼠模型是用于预防阴道内 HIV 感染的充分建立的模型。通过胚胎组织的手术植入免疫缺陷的 NOD/SCID/γC(NSG) 接受者、之后通过造血干细胞的移植产生 BLT 人源化小鼠。这些被移植的细胞在小鼠中产生被训练的能够在 HIV 感染之后产生功能性免疫应答的免疫细胞的完整的所有组成成分。已发现 BLT 模型呈现粘膜组织包括阴道和结肠的显著的人细胞移植,并已显示在粘膜暴露于浓缩的 CCR5-tropic JR-CSF HIV 病毒之后支持 HIV 的传播。在这个实施例中,将 BLT 小鼠用于检测表达抗 -HIV 抗体的重组 AAV 病毒以预防 HIV 通过粘膜途径传播的能力。

[0333] 根据本文公开的方法产生表达 VRC01 抗 -HIV 抗体或荧光素酶蛋白的重组 AAV 病毒。为了检测 VRC01 抗体预防 HIV 在粘膜表面传播的效力,产生了一组 BLT 动物并将表达 VRC01 的重组 AAV 病毒施用至 BLT 小鼠以产生以 100μg/mL 的血清浓度表达 VRC01 中和抗体或荧光素酶蛋白作为阴性对照的动物。

[0334] 为了模拟人粘膜 HIV 传播的相对少见的性质,采用了未浓缩的 JR-CSF HIV 病毒

的每周非腐蚀性阴道施用的低剂量重复攻击方案。HIV 攻击方案的示意图展示在图 19A 中显示。在 14 周的期间中，将小鼠放血并随后用 50ng JR-CSF HIV 病毒的 p24 通过接种物的非腐蚀性的阴道内施用每周攻击。使用流式细胞术每周测量 CD4 细胞水平(图 19B)。如在图 17B 中显示的，相对于产生 VCR01 的动物，在表达荧光素酶的动物中具有中度的但统计显著的下降的 CD4+ 细胞水平。13 周的重复阴道 HIV 攻击之后，通过 Abbott RealTime HIV-1Viral Load qPCR 测定(该测定的检测限是 200 拷贝 /mL)测量了在处死时的 HIV 血清病毒载量。结果在图 19C 中显示，其显示当表达荧光素酶的所有动物变为被感染时，只有表达 VRC01 的 8 只小鼠中的 2 只显示病毒复制的显著证据。这些结果显示，表达抗 -HIV 抗体的重组 AAV 病毒能够预防 BLT 小鼠中的粘膜 HIV 传播。

[0335] 实施例 13

[0336] FVB 小鼠中丙型肝炎病毒(HCV)抗体的生产

[0337] 该实施例阐述，重组 AAV 病毒能够被用于体内生产高水平的 HCV 抗体。

[0338] 构建了包括 B12、AR3A 和 AR3B 抗体的编码序列的 AAV 载体。将 AAV 载体分别用于生产表达 B12、AR3A 和 AR3B 抗体的重组 AAV 病毒。将重组 AAV 病毒施用至 FVB 小鼠。每周测量动物血清中相应抗体的表达水平。将结果显示在图 20 中。如在图 20 中显示的，在动物中已经产生显著水平的 HCV 抗体。

[0339] 实施例 14

[0340] HIV 感染的预防

[0341] 该实施例阐述处于形成 HIV 感染风险的患者的免疫预防。

[0342] 使用包括编码抗 -HIV 中和抗体的多核苷酸的 AAV 转移载体产生重组 AAV。可使用任何已知的抗 -HIV 中和抗体，包括但不限于，b12 抗 -HIV 抗体、2G12 抗 -HIV 抗体、4E10 抗 -HIV 抗体、2F5 抗 -HIV 抗体、和其任何变体。例如，可使用具有 CASI 启动子、抗 -HIV 中和抗体的编码序列、WPRE 和 SV40poly(A) 序列的 AAV 转移载体。此类 AAV 转移载体的示例包括在 SEQ ID NO:17-21 和 24 中提供的载体。一名患者被鉴定为处于形成 HIV 感染的风险并被施用有效量的重组 AAV。通过肌内注射将重组 AAV 施用于患者。重组 AAV 在患者中表达抗 -HIV 抗体，因此减少患者形成 HIV 注射的风险。在患者被施用重组 AAV 之后的不同的时间点，可确定患者中的 HIV 病毒载量。可由技术人员基于一些因素包括，但不限于，施用的途径和患者 HIV 暴露的程度容易确定合适的剂量(即，抗 -HIV 抗体的表达水平)和治疗方案。通过观察与没有接受 AAV 治疗的患者相比降低 HIV 感染风险评价免疫预防的效力。

[0343] 实施例 15

[0344] 结肠癌的治疗

[0345] 该实施例阐述遭受或处于形成结肠癌风险的患者的治疗。

[0346] 使用包括编码 IMC-C225 抗体(Cetuximab™，表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体)的多核苷酸的 AAV 转移载体产生重组 AAV。例如，可将 IMC-C225 抗体的编码序列插入具有 CASI 启动子、WPRE 和 SV40poly(A) 序列的 AAV 转移载体中。鉴定了正遭受或处于形成结肠癌的风险的患者并施用有效量的重组 AAV。通过肌内注射将重组 AAV 施用至患者。重组 AAV 在患者中表达 IMC-C225 抗体，因此抑制癌症在患者中的发展。可由技术人员基于一些因素包括，但不限于，施用的途径和患者的疾病状态容易确定合适的剂量(即，IMC-C225 抗体的表达水平)和治疗方案。通过观察疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或减轻、和缓解来

评价疗效。

[0347] 实施例 16

[0348] HCV 感染的预防

[0349] 该实施例阐述处于形成 HCV 感染风险的患者的免疫预防。

[0350] 使用包括编码抗 -HCV 中和抗体的多核苷酸的 AAV 转移载体产生重组 AAV。可使用任何已知的抗 -HCV 中和抗体，包括但不限于，AR3A 抗 -HCV 抗体、AR3B 抗 -HCV 抗体、AR4A 抗 -HCV 抗体、和其任何变体。例如，可使用具有 CASI 启动子、抗 -HCV 中和抗体的编码序列、WPRE 和 SV40poly(A) 序列的 AAV 转移载体。此类 AAV 转移载体的示例包括在 SEQ ID NO:22、23 和 28 中提供的载体。

[0351] 患者被鉴定为处于形成 HCV 感染的风险并被施用有效量的重组 AAV。通过肌内注射将重组 AAV 施用于患者。重组 AAV 在患者中表达 AR3A 抗体，因此减少患者形成 HCV 注射的风险。可由技术人员基于一些因素包括，但不限于，施用的途径和患者 HCV 暴露的程度容易确定合适的剂量(即，抗 -HCV 抗体的表达水平)和治疗方案。在患者被施用重组 AAV 之后的不同的时间点，可确定患者中的 HCV 病毒载量。通过观察与没有接受 AAV 治疗的患者相比降低 HCV 感染风险来评价免疫预防的效力。

[0352] 实施例 17

[0353] 流感病毒感染的预防

[0354] 该实施例阐述处于形成流感病毒感染风险的患者的免疫预防。

[0355] 使用包括编码抗 - 流感中和抗体的多核苷酸的 AAV 转移载体产生重组 AAV。可使用任何已知的抗 - 流感中和抗体，包括但不限于，F10 抗 - 流感抗体、CR6261 抗 - 流感抗体、FI6 抗 - 流感抗体、TCN32 抗 - 流感抗体、和其任何变体。例如，可使用具有 CASI 启动子、抗 - 流感中和抗体的编码序列、WPRE 和 SV40poly(A) 序列的 AAV 转移载体。此类 AAV 转移载体的示例包括在 SEQ ID NO:25-27、29 和 30 中提供的载体。

[0356] 患者被鉴定为处于形成流感感染的风险并被施用有效量的重组 AAV。通过肌内注射将重组 AAV 施用于患者。重组 AAV 在患者中表达 F10 抗体，因此减少患者形成流感病毒注射的风险。可由技术人员基于一些因素包括，但不限于，施用的途径和患者的流感病毒暴露的程度容易确定合适的剂量(即，抗 - 流感中和抗体的表达水平)和治疗方案。在患者被施用重组 AAV 之后的不同的时间点，可确定患者中的流感病毒载量。通过观察与没有接受 AAV 治疗的患者相比降低流感感染风险来评价免疫预防的效力。

[0357] 在至少一些先前描述的实施方案中，一个实施方案中使用的一个或多个元素可互换地在另一个实施方案中被使用，除非此替换不是技术上可行的。将被本领域技术人员领会的是，可对以上描述的方法和结构进行多种其他的删减、添加与修改，而不偏离请求保护的主题的范围。所有的此类修改和改变旨在落入主题的范围内，如由所附权利要求书限定的。

[0358] 关于本文使用的基本上任何复数和 / 或单数术语，本领域技术人员可从复数理解为单数和 / 或从单数理解为复数，只要对上下文和 / 或申请是合适的。为清楚起见，可在本文清楚阐述多种单数 / 复数排列。

[0359] 将被本领域人员理解的是，一般而言，本文、及尤其是在所附权利要求书中使用的术语(例如，所附权利要求书的主体部分)通常预期作为“开放”术语(例如，术语“包括

(including)”应该被解读为“包括(including)但不限于”、术语“具有”应该被解读为“具有至少”、术语“包括(includes)”应该被解读为“包括(includes)但不限于”、等)。还将被本领域人员理解的是,如果意在引入的权利要求列举(recitation)的特定的数量,这样的意图将在权利要求中清楚地列举,且不存在此列举时无此意图存在。例如,作为帮助理解,以下所附权利要求书可包含引导的短语“至少一个”和“一个或多个”的使用以引入权利要求的列举。然而,此类短语的使用不应被解释为暗示由不定冠词“一个(a)”或“一个(an)”引入的权利要求列举将包含此引入的权利要求列举的任何特定权利要求限制到只包含一个此列举的实施方案,即使是当相同的权利要求包括引导的短语“一个或多个”或“至少一个”和不定冠词诸如“一个(a)”或“一个(an)”(例如,“一个(a)”和/或“一个(an)”应该被解释为意味着“至少一个”或“一个或多个”);同样适用于使用定冠词引入权利要求列举。另外,即使将特定数量的被引入的权利要求列举清楚地列举,本领域技术人员将认识到,此陈述应被解读为意味着至少的列举数量(例如,仅仅“两个列举”的列举,没有其他修饰的情况下,意味着至少两个列举、或两个或多个列举)。此外,在使用的类似于“至少一个A、B、和C,等”惯例的那些情况下,一般而言,此结构意在从本领域技术人员将理解该惯例的意义上讲(例如,“具有至少一个A、B、和C的系统”将包括但不限于具有单独的A、单独的B、单独的C、A和B一起、A和C一起、B和C一起、和/或A、B、和C一起的系统,等)。在使用了类似于“至少一个A、B、或C,等”惯例的那些情况下,一般而言,此结构意在从本领域技术人员将理解该惯例的意义上讲(例如,“具有至少一个A、B、或C的系统”将包括但不限于具有单独的A、单独的B、单独的C、A和B一起、A和C一起、B和C一起、和/或A、B、和C一起的系统,等)。将被本领域人员进一步理解的是,几乎任何代表两个或多个可选的术语的转折性词语和/或短语,不论在说明书、权利要求书、或附图中,应被理解为涉及包括一个术语、术语之一、和两个术语的可能性。例如,短语“A或B”将被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0360] 另外,当按照马库什组描述本公开内容的特征或方面时,本领域技术人员将认识到该公开内容还因此根据马库什组的任何单独的成员或成员亚组被描述。

[0361] 将被本领域技术人员理解的是,为了任何和所有目的,诸如根据提供书面说明,本文公开的所有范围还包含任何和所有可能的子范围和其子范围的组合。可将任何所列的范围容易认识作为充分描述并使得相同的范围能够被分解为至少相等的二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一、等。作为非限制性的示例,可将本文讨论的每一个范围容易分解为下部三分之一、中间三分之一和上部三分之一、等。如将被本领域技术人员理解的是,所有语言诸如“至多”、“至少”、“大于”、“少于”、和类似的包括列举的数量并指的是能够如以上讨论的被随后分解为子范围的范围。最后,如将被本领域技术人员理解的是,范围包括每一个单独的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组指的是具有1个、2个或3个物品的组。相似地,具有1-5个物品的组指的是具有1个、2个、3个、4个、或5个物品的组,等等。

[0362] 尽管本文已公开了不同的方面和实施方案,其他方面和实施方案将对本领域技术人员是明显的。本文公开的不同的方面和实施方案是为了阐述的目的且不意图限制,真实的范围和精神由下面的权利要求书指示。

[0001]

序列表

<110>加州理工学院
亚历杭德罗·本杰明·巴拉兹
大卫·巴尔的摩

<120> 使用腺相关病毒（AAV）载体递送蛋白

<130> CALTE.082WO

<150> 61/445,449
<151> 2011-02-22

<150> 61/550,123
<151> 2011-10-21

<150> 61/598,728
<151> 2012-02-14

<160> 42

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 1055
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CASI 启动子

<400> 1
ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc 60
ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca 120
ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta 180
tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta 240
tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat 300
cgctattacc atggtcgagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca tctccccccc 360
ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc 420
gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg 480
aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt tcctttatg 540
gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gggagtcgct 600
gcgcgctgcc ttcgccccgt gccccgctcc gccgccgcct cgcgccgccc gccccggctc 660

[0002]

tgactgaccg cgttactaaa acaggtaagt ccggcctccg cgccgggttt tggcgcctcc 720
cgcgggcgcc ccctcctca cggcgagcgc tgccacgtca gacgaagggc gcagcgagcg 780
tcctgatcct tccgcccgga cgctcaggac agcggcccgc tgctcataag actcggcctt 840
agaaccccag tatcagcaga aggacatttt aggacgggac ttgggtgact ctagggcact 900
ggttttcttt ccagagagcg gaacaggcga ggaaaagtag tcccttctcg gcgattctgc 960
ggagggatct ccgtggggcg gtgaacgccg atgatgcctc tactaaccat gttcatgttt 1020
tctttttttt tctacaggtc ctgggtgacg aacag 1055

<210> 2
<211> 311
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CMV 增强子

<400> 2
ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc 60
ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca 120
ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta 180
tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta 240
tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat 300
cgctattacc a 311

<210> 3
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鸡β-肌动蛋白片段

<400> 3
tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctccccat ctccccccct gcccaccccc 60
caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg gggggggggg 120
ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg 180
tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt cctttatgg cgaggcggcg 240
gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg ggagtcgctg cgcgctgcct 300
tcgccccgtg ccccgctccg ccgccgcctc gcgccgcccg ccccggctct gactgaccgc 360
gttact 366

<210> 4
<211> 303
<212> DNA

[0003]

<213> 人工序列

<220>
<223> UBC 增强子

<400> 4
ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg 60
ccacgtcaga cgaagggcgc agcgagcgtc ctgatccttc cgcccggacg ctcaggacag 120
cggcccgctg ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacattttag 180
gacgggactt gggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg 240
aaaagtagtc ccttctcggc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacgccgat 300
gat 303

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的剪接供体

<400> 5
aaaacaggta agtcc 15

<210> 6
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的剪接受体

<400> 6
gcctctacta accatgttca tgttttcttt ttttttctac aggtcctggg tgacgaacag 60

<210> 7
<211> 592
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> WPRE

[0004]

<400> 7
taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta actatgttgc 60
tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta ttgcttcccg 120
tatggctttc attttctcct ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt atgaggagtt 180
gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg tttgctgacg caacccccac 240
tggttgggge attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt tccccctccc 300
tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc tgctggacag gggctcggct 360
gttgggcact gacaattccg tggtgttgtc ggggaaatca tcgtccttte cttggctgct 420
cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc cttcggccct 480
caatccagcg gaccttcctt cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc ttccgcgtct 540
tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc ct 592

<210> 8
<211> 353
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的内含子

<400> 8
gtaagtccgg cctccgcgcc gggttttggc gcctcccgcg ggcgcccccc tcctcacggc 60
gagcgctgcc acgtcagacg aagggcgcag cgagcgtcct gatccttccg cccggacgct 120
caggacagcg gcccgctgct cataagactc ggccttagaa ccccagtatc agcagaagga 180
catttagga cgggacttgg gtgactctag ggcactggtt tctttccag agagcggaac 240
aggcgaggaa aagtagtccc ttctcggcga ttctgcggag ggatctccgt ggggcggtga 300
acgccgatga tgcctctact aaccatgttc atgttttctt ttttttttcta cag 353

<210> 9
<211> 84
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 标准的 F2A-标准的弗林蛋白酶裂解

<400> 9
cgggctaaga gagcaccggt gaaacagact ttgaattttg accttctcaa gttggcggga 60
gacgtggagt ccaacccagg gccc 84

<210> 10
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

[0005]

<220>
<223> 优化的 F2A-具有被修饰的弗林蛋白酶裂解位点

<400> 10
cgaaaaagaa gatcaggttc gggtgcgcca gtaaagcaga cattaaactt tgatttgctg 60
aaacttgcag gtgatgtaga gtcaaatcca ggtcca 96

<210> 11
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HGH 信号序列的变体

<400> 11
atggcgacgg gttcaagaac ttccctactt cttgcatttg gcctgctttg tttgccgtgg 60
ttacaggagg gctcggca 78

<210> 12
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HGH 信号序列的变体

<400> 12
atggcaacag ggagccgaac ctctctgctc cttgctttcg ggctcctttg cctaccgtgg 60
ctccaagagg gctcggca 78

<210> 13
<211> 5421
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CMV-B12AB-HA-SV40

<400> 13
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180

[0006]

atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc 480
agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca 540
ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta 600
acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa 660
gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc 720
tccatagaag acaccggcgg ccgccatggc gacgggttca agaacttccc tacttcttgc 780
atttggcctg ctttgtttgc cgtggttaca ggagggctcg gcacaggttc agctggttca 840
gtccggggct gaggtgaaga agcctggggc ctcagtgaag gtttcttgtc aggcttctgg 900
atacagattc agtaactttg ttattcattg ggtgcgccag gccccggac agaggtttga 960
gtggatggga tggatcaatc cttacaacgg aaacaaagaa ttttcagcga agttccagga 1020
cagagtcacc tttaccgcgg acacatccgc gaacacagcc tacatggagt tgaggagcct 1080
caggtctgca gacacggctg tttattattg tgcgagagtg gggccatata gttgggatga 1140
ttctccccag gacaattatt atatggacgt ctggggcaaa gggaccacgg tcatcgtgag 1200
ctcagccagc accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc 1260
tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt 1320
gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc 1380
ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca 1440
gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga 1500
gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg 1560
gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac 1620
ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa 1680
ctggtatgtt gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 1740
caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg 1800
caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat 1860
ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 1920
tgagctgacc aagaatcaag tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 1980
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 2040
cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctactcaaaa ctcaccgtgg acaagagcag 2100
gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 2160
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaaagggca aaacgttcgg gttcgggtgc 2220
gccagtaaag cagacattaa actttgattt gctgaaactt gcaggtgatg tagagtcaaa 2280
tccaggtcca atggcaacag ggagccgaac ctctctgctc cttgctttcg ggctcctttg 2340
cctaccgtgg ctccaagagg gctcggcaga gatcgttctc acgcagtctc caggcaccct 2400
gtctctgtct ccaggggaaa gagccacctt ctcctgtagg tccagtcaca gcattcgcag 2460
ccgccgcgta gcctggtacc agcacaaacc tggccaggct ccaaggctgg tcatacatgg 2520
tgtttccaat agggcctctg gcatctcaga caggttcagc ggcagtgggt ctgggacaga 2580
cttcactctc accatcacca gagtggagcc tgaagacttt gcactgtact actgtcaggt 2640
ctatggtgcc tcctcgtaca cttttggcca ggggaccaaa ctggagagga aacgtacggt 2700
ggccgctccc agcgtgttca tcttcctcc ctctgatgaa cagctgaaaa gcggaacagc 2760
cagcgtggtg tgtctgctga acaacttcta ccccagagaa gccaaagtgc agtggaaggt 2820

[0007]

ggacaacgcc ctgcagagcg gaaacagcca ggaaagcgtg acagagcagg attccaagga 2880
ttccacatac agcctgagca gcacactgac actgtccaag gccgactacg agaagcacaa 2940
ggtgtacgcc tgcgaagtga cacaccaggg actgtcctcc cctgtgacaa agagcttcaa 3000
cagaggagaa tgctaccctt acgacgtacc agactacgca taaaggatcc gaaggtacct 3060
tcgagcagac atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg 3120
aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa ccattataag 3180
ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga 3240
gatgtgggag gtttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa tcaagcttag 3300
gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc 3360
gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 3420
gcgcgcagag agggagtggc caagctagcg ggcgattaag gaaagggcta gatcattctt 3480
gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg 3540
tttcttagac gtcaggtggc actttcgggg gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat 3600
ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc 3660
aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct 3720
tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag 3780
atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc aacagcggta 3840
agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagttc 3900
tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtgttg acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca 3960
tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg 4020
atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg 4080
ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca 4140
tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa 4200
acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa 4260
ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata 4320
aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat 4380
ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc 4440
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata 4500
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt 4560
actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggtga 4620
agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag 4680
cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa 4740
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag 4800
agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 4860
ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 4920
acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 4980
ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 5040
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 5100
gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa 5160
gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc 5220
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 5280
caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct 5340
tttgctggcc ttttgctcac atgtaataaa cacacacaca ccaacaaccg tggttggttg 5400
ttgtgttggt ttattctcga g 5421

[0008]

<210> 14
<211> 5836
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-Luc2-W-SV40

<400> 14
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
tttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg aagatgccaa aaacattaag aagggcccag cgccattcta 1260
cccactcgaa gacgggaccg ccggcgagca gctgcacaaa gccatgaagc gctacgccct 1320
ggtgccccgc accatcgcct ttaccgacgc acatatcgag gtggacatta cctacgccga 1380
gtacttcgag atgagcgttc ggctggcaga agctatgaag cgctatgggc tgaatacaaa 1440
ccatcggatc gtggtgtgca gcgagaatag cttgcagttc ttcatgcccg tgttgggtgc 1500
cctgttcatc ggtgtggctg tggccccagc taacgacatc tacaacgagc gcgagctgct 1560
gaacagcatg ggcatcagcc agcccaccgt cgtattcgtg agcaagaaag ggctgcaaaa 1620
gatcctcaac gtgcaaaaga agctaccgat catacaaaag atcatcatca tggatagcaa 1680
gaccgactac cagggcttcc aaagcatgta caccttcgtg acttcccatt tgccacccgg 1740
cttcaacgag tacgacttcg tgcccgagag cttcgaccgg gacaaaacca tcgccctgat 1800
catgaacagt agtggcagta ccggattgcc caagggcgta gccctaccgc accgcaccgc 1860
ttgtgtccga ttcagtcatg cccgcgaccc catcttcggc aaccagatca tccccgacac 1920
cgctatcctc agcgtggtgc catttcacca cggcttcggc atgttcacca cgctgggcta 1980
cttgatctgc ggctttcggg tcgtgctcat gtaccgcttc gaggaggagc tattcttgcg 2040
cagcttgcaa gactataaga ttcaatctgc cctgctggtg cccacactat ttagcttctt 2100

[0009]

cgctaagagc actctcatcg acaagtacga cctaagcaac ttgcacgaga tcgccagcgg 2160
cggggcgccg ctcagcaagg aggtaggtga ggccgtggcc aaacgcttcc acctaccagg 2220
catccgccag ggctacggcc tgacagaaac aaccagcgcc attctgatca ccccccgaagg 2280
ggacgacaag cctggcgcag taggcaaggt ggtgcccttc ttcgaggcta aggtggtgga 2340
cttggacacc ggtaagacac tgggtgtgaa ccagcgcggc gagctgtgcg tccgtggccc 2400
catgatcatg agcggctacg ttaacaaccc cgaggctaca aacgctctca tcgacaagga 2460
cggctggctg cacagcggcg acatcgccta ctgggacgag gacgagcact tcttcatcgt 2520
ggaccggctg aagagcctga tcaaatacaa gggctaccag gtagccccag ccgaactgga 2580
gagcatcctg ctgcaacacc ccaacatctt cgacgccggg gtcgccggcc tgcccgacga 2640
cgatgccggc gagctgcccg ccgcagtcgt cgtgctggaa cacggtaaaa ccatgaccga 2700
gaaggagatc gtggactatg tggccagcca ggttacaacc gccaagaagc tgcgcggtgg 2760
tgttgtgttc gtggacgagg tgcctaaagg actgaccggc aagttggacg cccgcaagat 2820
ccgcgagatt ctcattaagg ccaagaaggg cggcaagatc gccgtgtaaa ggatcctaat 2880
caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct 2940
tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg 3000
gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 3060
cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 3120
tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt 3180
gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg 3240
ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc 3300
tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat 3360
ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcgc 3420
cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgcctgg taccttcgag 3480
cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 3540
aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 3600
ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggagatgt 3660
gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcaag cttaggaacc 3720
cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 3780
accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 3840
cagagaggga gtggccaagc tagcgggcga ttaaggaaag ggctagatca ttcttgaaga 3900
cgaaagggcc tcgtgatacg cctatttttа taggttaatg tcatgataat aatggtttct 3960
tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 4020
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 4080
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 4140
gcggcatttt gccttcctgt tttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 4200
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 4260
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 4320
tgtggcgcgg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 4380
tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 4440
atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 4500
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg ctttttgca caacatgggg 4560
gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 4620
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 4680
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 4740

[0010]

gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga 4800
gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 4860
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 4920
atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4980
tatatacttt agattgattt aaaacttcat tttaatttaa aaaggatcta ggtgaagatc 5040
ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 5100
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc 5160
tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 5220
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt 5280
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc 5340
gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 5400
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac ggggggttcg 5460
tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 5520
ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc 5580
agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 5640
agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg 5700
gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc 5760
tggccttttg ctcacatgta ataaacacac acacaccaac aaccgtggtt ggttgttgtg 5820
ttggtttatt ctcgag 5836

<210> 15
<211> 5730
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-Luc2-W-RBG

<400> 15
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccaaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcggggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960

[0011]

acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg aagatgccaa aaacattaag aagggcccag cgccattcta 1260
cccactcgaa gacgggaccg ccggcgagca gctgcacaaa gccatgaagc gctacgccct 1320
ggtgcccggc accatcgcct ttaccgacgc acatatcgag gtggacatta cctacgccga 1380
gtacttcgag atgagcgttc ggctggcaga agctatgaag cgctatgggc tgaatacaaa 1440
ccatcggatc gtggtgtgca gcgagaatag cttgcagttc ttcatgcccg tgttgggtgc 1500
cctgttcatc ggtgtggctg tggccccagc taacgacatc tacaacgagc gcgagctgct 1560
gaacagcatg ggcatcagcc agcccaccgt cgtattcgtg agcaagaaag ggctgcaaaa 1620
gatcctcaac gtgcaaaaga agctaccgat catacaaaag atcatcatca tggatagcaa 1680
gaccgactac cagggcttcc aaagcatgta caccttcgtg acttcccatt tgccacccgg 1740
cttcaacgag tacgacttcg tgcccgagag cttcgaccgg gacaaaacca tcgccctgat 1800
catgaacagt agtggcagta ccggattgcc caagggcgta gccctaccgc accgcaccgc 1860
ttgtgtccga ttcagtcatg cccgcgaccc catcttcggc aaccagatca tcccccgacac 1920
cgctatcctc agcgtggtgc catttcacca cggcttcggc atgttcacca cgctgggcta 1980
cttgatctgc ggctttcggg tcgtgctcat gtaccgcttc gaggaggagc tattcttgcg 2040
cagcttgcaa gactataaga ttcaatctgc cctgctggtg cccacactat ttagcttctt 2100
cgctaagagc actctcatcg acaagtacga cctaagcaac ttgcacgaga tcgccagcgg 2160
cggggcgccg ctcagcaagg aggtaggtga ggccgtggcc aaacgcttcc acctaccagg 2220
catccgccag ggctacggcc tgacagaaac aaccagcgcc attctgatca ccccccgaagg 2280
ggacgacaag cctggcgcag taggcaaggt ggtgcccttc ttcgaggcta aggtggtgga 2340
cttggacacc ggtaagacac tgggtgtgaa ccagcgcggc gagctgtgcg tccgtggccc 2400
catgatcatg agcggctacg ttaacaaccc cgaggctaca aacgctctca tcgacaagga 2460
cggctggctg cacagcggcg acatcgccta ctgggacgag gacgagcact tcttcatcgt 2520
ggaccggctg aagagcctga tcaaatacaa gggctaccag gtagccccag ccgaactgga 2580
gagcatcctg ctgcaacacc ccaacatctt cgacgccggg gtcgccggcc tgcccgacga 2640
cgatgccggc gagctgcccg ccgcagtcgt cgtgctggaa cacggtaaaa ccatgaccga 2700
gaaggagatc gtggactatg tggccagcca ggttacaacc gccaagaagc tgcgcggtgg 2760
tgttgtgttc gtggacgagg tgcctaaagg actgaccggc aagttggacg cccgcaagat 2820
ccgcgagatt ctcattaagg ccaagaaggg cggcaagatc gccgtgtaaa ggatcctaat 2880
caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct 2940
tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg 3000
gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 3060
cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 3120
tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc ctccctatt 3180
gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg 3240
ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc 3300
tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat 3360
ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcgc 3420
cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgcctgg taccgatctt 3480
tttcctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc 3540
taataaagga aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga atttttgtg tctctcactc 3600

[0012]

gaagcttagg aacccctagt gatggagttg gccactcccc ctctgcgcgc tcgctcgctc 3660
actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg 3720
agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aagctagcgg gcgattaagg aaagggctag 3780
atcattcttg aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga 3840
taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа 3900
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 3960
aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 4020
ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga 4080
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 4140
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt 4200
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa gagcaactcg 4260
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 4320
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 4380
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 4440
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 4500
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 4560
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 4620
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 4680
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 4740
atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 4800
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 4860
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 4920
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 4980
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 5040
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 5100
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 5160
caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 5220
cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 5280
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 5340
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 5400
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 5460
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 5520
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 5580
gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 5640
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgtaataaac acacacacac caacaaccgt 5700
ggttggttgt tgtgttggtt tattctcgag 5730

<210> 16
<211> 5818
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-Luc2-W-BGH

[0013]

<400> 16

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccaatttttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttccttttа tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttтt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg aagatgccaa aaacattaag aagggcccag cgccattcta 1260
cccactcgaa gacgggaccg ccggcgagca gctgcacaaa gccatgaagc gctacgccct 1320
ggtgcccggc accatcgcct ttaccgacgc acatatcgag gtggacatta cctacgccga 1380
gtacttcgag atgagcgttc ggctggcaga agctatgaag cgctatgggc tgaatacaaa 1440
ccatcggatc gtggtgtgca gcgagaatag cttgcagttc ttcatgcccg tgttgggtgc 1500
cctgttcatc ggtgtggctg tggccccagc taacgacatc tacaacgagc gcgagctgct 1560
gaacagcatg ggcatcagcc agcccaccgt cgtattcgtg agcaagaaag ggctgcaaaa 1620
gatcctcaac gtgcaaaaga agctaccgat catacaaaag atcatcatca tggatagcaa 1680
gaccgactac cagggcttcc aaagcatgta caccttcgtg acttcccatt tgccacccgg 1740
cttcaacgag tacgacttcg tgcccgagag cttcgaccgg gacaaaacca tcgccctgat 1800
catgaacagt agtggcagta ccggattgcc caagggcgta gccctaccgc accgcaccgc 1860
ttgtgtccga ttcagtcatg cccgcgaccc catcttcggc aaccagatca tccccgacac 1920
cgctatcctc agcgtggtgc catttcacca cggcttcggc atgttcacca cgctgggcta 1980
cttgatctgc ggcttcggg tcgtgctcat gtaccgcttc gaggaggagc tatttttgcg 2040
cagcttgcaa gactataaga ttcaatctgc cctgctggtg cccacactat ttagcttctt 2100
cgctaagagc actctcatcg acaagtacga cctaagcaac ttgcacgaga tcgccagcgg 2160
cggggcgccg ctcagcaagg aggtaggtga ggccgtggcc aaacgcttcc acctaccagg 2220
catccgccag ggctacggcc tgacagaaac aaccagcgcc attctgatca ccccccgaagg 2280
ggacgacaag cctggcgcag taggcaaggt ggtgcccttc ttcgaggcta aggtggtgga 2340
cttggacacc ggtaagacac tgggtgtgaa ccagcgcggc gagctgtgcg tccgtggccc 2400
catgatcatg agcggctacg ttaacaaccc cgaggctaca aacgctctca tcgacaagga 2460
cggctggctg cacagcggcg acatcgccta ctgggacgag gacgagcact tcttcatcgt 2520
ggaccggctg aagagcctga tcaaatacaa gggctaccag gtagccccag ccgaactgga 2580

[0014]

gagcatcctg ctgcaacacc ccaacatctt cgacgccggg gtcgccggcc tgcccgacga 2640
cgatgccggc gagctgcccg ccgcagtcgt cgtgctggaa cacggtaaaa ccatgaccga 2700
gaaggagatc gtggactatg tggccagcca ggttacaacc gccaagaagc tgcgcggtgg 2760
tgttgtgttc gtggacgagg tgcctaaagg actgaccggc aagttggacg cccgcaagat 2820
ccgcgagatt ctcattaagg ccaagaaggg cggcaagatc gccgtgtaaa ggatcctaat 2880
caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct 2940
tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg 3000
gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 3060
cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 3120
tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc ctccctatt 3180
gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg 3240
ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc 3300
tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat 3360
ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcgc 3420
cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgcctgg taccgcctcg 3480
actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttgccccc ccccgtgcc ttccttgacc 3540
ctggaaggtg ccactcccac tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt 3600
ctgagtaggt gtcattctat tctgggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 3660
tgggaagaca atagcaggca tgctggggaa agcttaggaa cccctagtga tggagttggc 3720
cactcccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg 3780
cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 3840
gctagcgggc gattaaggaa aggggctagat cattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata 3900
cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact 3960
tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaatata ttcaaatatg 4020
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt 4080
atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct 4140
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 4200
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 4260
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 4320
cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg 4380
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 4440
tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 4500
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 4560
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 4620
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 4680
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 4740
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 4800
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 4860
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 4920
tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 4980
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tccttttttga taatctcatg 5040
accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc 5100
aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 5160
ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag 5220

[0015]

gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgta gccgtagtta 5280
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 5340
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 5400
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg 5460
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 5520
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag 5580
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 5640
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 5700
aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg 5760
taataaacac acacacacca acaaccgtgg ttggttgttg tgttggttta ttctcgag 5818

<210> 17
<211> 6481
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CAS1-B12AB-HA-W-SV40

<400> 17
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcggggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcacaggtt cagctggttc agtccgggac 1320
tgaggtgaag aagcctgggg cctcagtgaa ggtttcttgt caggcttctg gatacagatt 1380
cagtaacttt gttattcatt gggtgcgcca ggccccccgga cagaggtttg agtggatggg 1440
atggatcaat ccttacaacg gaaacaaaga attttcagcg aagttccagg acagagtcac 1500

[0016]

ctttaccgcg gacacatccg cgaacacagc ctacatggag ttgaggagcc tcaggtctgc 1560
agacacggct gtttattatt gtgcgagagt ggggccatat agttgggatg attctcccca 1620
ggacaattat tatatggacg tctggggcaa agggaccacg gtcatcgtga gctcagccag 1680
caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac 1740
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa 1800
ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact 1860
ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat 1920
ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc 1980
ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 2040
agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt 2100
cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtatgt 2160
tgacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac 2220
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 2280
caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc 2340
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac 2400
caagaatcaa gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 2460
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 2520
ctccgacggc tccttcttcc tctactcaaa actcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 2580
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 2640
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaaagggc aaaacgttcg ggttcgggtg cgccagtaaa 2700
gcagacatta aactttgatt tgctgaaact tgcaggtgat gtagagtcaa atccaggtcc 2760
aatggcaaca gggagccgaa cctctctgct ccttgctttc gggctccttt gcctaccgtg 2820
gctccaagag ggctcggcag agatcgttct cacgcagtct ccaggcaccc tgtctctgtc 2880
tccaggggaa agagccacct tctcctgtag gtccagtcac agcattcgca gccgccgcgt 2940
agcctggtac cagcacaaac ctggccaggc tccaaggctg gtcatacatg gtgttccaa 3000
tagggcctct ggcatctcag acaggttcag cggcagtggg tctgggacag acttcactct 3060
caccatcacc agagtggagc ctgaagactt tgcactgtac tactgtcagg tctatggtgc 3120
ctcctcgtac acttttggcc aggggaccaa actggagagg aaacgtacgg tggccgctcc 3180
cagcgtgttc atcttcccgc cctctgatga acagctgaaa agcggaacag ccagcgtggt 3240
gtgtctgctg aacaacttct accccagaga agccaaagtg cagtggaagg tggacaacgc 3300
cctgcagagc ggaaacagcc aggaaagcgt gacagagcag gattccaagg attccacata 3360
cagcctgagc agcacactga cactgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc 3420
ctgcgaagtg acacaccagg gactgtcctc ccctgtgaca aagagcttca acagaggaga 3480
atgctaccct tacgacgtac cagactacgc ataaaggatc ctaatcaacc tctggattac 3540
aaaatttgtg aaagattgac tggtattctt aactatgttg ctccttttac gctatgtgga 3600
tacgctgctt taatgccttt gtatcatgct attgcttccc gtatggcttt cattttctcc 3660
tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccgt tgtcaggcaa 3720
cgtggcgtgg tgtgcactgt gtttgctgac gcaaccccca ctggttgggg cattgccacc 3780
acctgtcagc tcctttccgg gactttcgct ttccccctcc ctattgccac ggcggaactc 3840
atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc 3900
gtggtgttgt cggggaaatc atcgtccttt ccttggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg 3960
attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc ccttcggccc tcaatccagc ggaccttcct 4020
tcccgcggcc tgctgccggc tctgcggcct cttccgcgtc ttcgccttcg ccctcagacg 4080
agtcggatct ccctttgggc cgcctccccg cctggtacct tcgagcagac atgataagat 4140

[0017]

acattgatga gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg 4200
aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttaaca 4260
acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag gtttttaaa 4320
gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa tcaagcttag gaacccctag tgatggagtt 4380
ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg 4440
acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc 4500
caagctagcg ggcgattaag gaaagggcta gatcattctt gaagacgaaa gggcctcgtg 4560
atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc 4620
acttttcggg gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat 4680
atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag 4740
agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattcccc tttttgcggc attttgcctt 4800
cctgtttttg ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt 4860
gcacgagtgg gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc 4920
cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta 4980
tcccgtgttg acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac 5040
ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa 5100
ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg 5160
atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc 5220
cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg 5280
atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta 5340
gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg 5400
cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg 5460
tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc 5520
tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt 5580
gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt 5640
gatttaaaac ttcatttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc 5700
atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag 5760
atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa 5820
aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg 5880
aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag 5940
ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg 6000
ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga 6060
tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 6120
ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 6180
acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 6240
gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt 6300
cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg 6360
aaaaacgcca gcaacgcggc cttttacggt tcctggcctt tttgctggcc ttttgctcac 6420
atgtaataaa cacacacaca ccaacaaccg tggttggttg ttgtgttggt ttattctcga 6480
g 6481

<210> 18
<211> 6493
<212> DNA
<213> 人工序列

[0018]

<220>

<223> pAAVio-CASI-4E10AB-V5-W-SV40

<400> 18

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttccttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcagtgcag ctggtgcaga gcggagccga 1320
ggtgaagagg cccggcagca gcgtgaccgt gagctgcaag gccagcggcg gcagcttcag 1380
cacctacgcc ctgagctggg tgcggcaggc tcctggaagg ggcctcgaat ggatgggcgg 1440
cgtgatcccc ctgctgacca tcaccaacta cgcccccagg ttccagggcc ggatcaccat 1500
caccgccgac agaagcacca gcaccgccta cctggaactg aacagcctgc ggcccgagga 1560
caccgccgtg tactactgcg ccagagaggg caccaccggc tggggctggc tgggcaagcc 1620
catcggcgcc ttcgcccact ggggccaggg cacccctggtg accgtgtcca gcgccagcac 1680
caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc 1740
ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc 1800
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta 1860
ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg 1920
caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg 1980
tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt 2040
cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac 2100
atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtatgttga 2160
cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta 2220
ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa 2280
gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa 2340

[0019]

agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa 2400
gaatcaagtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga 2460
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 2520
cgacggctcc ttcttcctct actcaaaact caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 2580
gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 2640
cctctccctg tctccgggta aaagggcaaa acgttcgggt tcgggtgcgc cagtaaagca 2700
gacattaaac tttgatttgc tgaaacttgc aggtgatgta gagtcaaatc caggtccaat 2760
ggcaacaggg agccgaacct ctctgctcct tgctttcggg ctcctttgcc taccgtggct 2820
ccaagagggc tcggcagaga tcgtgctgac ccagagcccc ggcacccaga gcctgagccc 2880
tggcgagcgg gccaccctga gctgccgggc cagccagagc gtgggcaaca acaagctggc 2940
ctggtatcag cagagaccca gccaggcccc caggctgctg atctacggcg cctcctctag 3000
gcctagcggc gtggccgacc ggtttagcgg cagcggctcc ggcaccgact tcaccctgac 3060
catcagcccg ctggaacccg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcagt acggccagag 3120
cctgtccacc ttcggccagg gcaccaaggt ggaggtgaag cggaccgtgg ccgctcccag 3180
cgtgttcatc ttccctccct ctgatgaaca gctgaaaagc ggaacagcca cggtggtgtg 3240
tctgctgaac aacttctacc ccagagaagc caaagtgcag tggaaggtgg acaacgccct 3300
gcagagcgga aacagccagg aaagcgtgac agagcaggat tccaaggatt ccacatacag 3360
cctgagcagc acactgacac tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 3420
cgaagtgaca caccagggac tgtcctcccc tgtgacaaag agcttcaaca gaggagaatg 3480
cggcaagcct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct acgtaaagga tcctaatcaa 3540
cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtattc ttaactatgt tgctcctttt 3600
acgctatgtg gatacgctgc tttaatgcct ttgtatcatg ctattgcttc ccgtatggct 3660
ttcatttttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc tttatgagga gttgtggccc 3720
gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg acgcaacccc cactggttgg 3780
ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc gggactttcg ctttcccctc cctattgcc 3840
acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga caggggctcg gctgttgggc 3900
actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaaa tcatcgtcct ttccttggct gctcgcctgt 3960
gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg tcccttcggc cctcaatcca 4020
gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg gctctgcggc ctcttccgcg tcttcgcctt 4080
cgccctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc cgcctggtac cttcgagcag 4140
acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat 4200
gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata 4260
aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gagatgtggg 4320
aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtaa aatcaagctt aggaacccct 4380
agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc 4440
aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag 4500
agagggagtg gccaagctag cgggcgatta aggaaagggc tagatcattc ttgaagacga 4560
aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag 4620
acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa 4680
atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat 4740
tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg 4800
gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa 4860
gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt 4920
gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt 4980

[0020]

ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat 5040
tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg 5100
acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta 5160
cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat 5220
catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 5280
cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa 5340
ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 5400
ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 5460
ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt 5520
atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 5580
gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat 5640
atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 5700
tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 5760
cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 5820
ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 5880
actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 5940
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct 6000
ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 6060
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 6120
acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta 6180
tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 6240
gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 6300
cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg 6360
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg 6420
ccttttgctc acatgtaata aacacacaca caccaacaac cgtggttggt tgttgtgttg 6480
gtttattctc gag 6493

<210> 19
<211> 6469
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-2G12AB-Myc-W-SV40

<400> 19
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccttа tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagccccа 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccaaattttg tatttattta 540

[0021]

tttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggag gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcagaggtg caacttttag agtctggcgg 1320
cggcctggtc aaggcgggag gttccctcat actctcctgt ggagtctcta attttagaat 1380
ctctgcccat accatgaatt gggtccgccg ggttccaggg gggggggctgg agtgggtcgc 1440
ttccattagt acgagttcca cttatagaga ctatgcagac gctgtgaagg gccgattcac 1500
cgtttccaga gacgacctcg aagactttgt gtatttgcaa atgcacaaaa tgagagtcga 1560
agacacggct atttattact gcgccagaaa gggatctgac agactaagcg acaacgatcc 1620
ttttgatgcc tggggcccag ggacagtggt caccgtctct ccagccagca ccaagggccc 1680
atcggtcttc ccccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg 1740
ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct 1800
gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 1860
cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa 1920
tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 1980
tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt 2040
ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt 2100
ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtatgttg acggcgtgga 2160
ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt 2220
cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 2280
ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc 2340
ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaatcaagt 2400
cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 2460
caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc 2520
cttcttcctc tactcaaaac tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 2580
ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct 2640
gtctccgggt aaaagggcaa aacgttcggg ttcgggtgcg ccagtaaagc agacattaaa 2700
ctttgatttg ctgaaacttg caggtgatgt agagtcaaat ccaggtccaa tggcaacagg 2760
gagccgaacc tctctgctcc ttgctttcgg gctcctttgc ctaccgtggc tccaagaggg 2820
ctcggcagaa attgagctca cccagtctcc ttccaccctg tctgcatctg tcggagacac 2880
aatcaccatc acttgccggg ccagtcagag tattgaaacc tggttggcct ggtatcagca 2940
gaagccaggg aaagccccaa aactcctaat ctacaaggcg tctactttaa aaactggagt 3000
cccgtcaaga ttcagcggca gtggatctgg aacagagttc actcttacca tcagtggcct 3060
gcagttcgat gactttgcaa cttatcactg tcagcactat gctggttatt cagccacttt 3120
tggccaggga accagggtgg agatcaaacg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt 3180

[0022]

ccctccctct gatgaacagc tgaaaagcgg aacagccagc gtggtgtgtc tgctgaacaa 3240
cttctacccc agagaagcca aagtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggaaa 3300
cagccaggaa agcgtgacag agcaggattc caaggattcc acatacagcc tgagcagcac 3360
actgacactg tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgacaca 3420
ccagggactg tcctcccctg tgacaaagag cttcaacaga ggagaatgcg aacaaaaact 3480
catctcagaa gaggatctgt aaaggatcct aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa 3540
agattgactg gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta 3600
atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt atggctttca ttttctcctc cttgtataaa 3660
tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg 3720
tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc 3780
ctttccggga ctttcgcttt ccccctcccc attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc 3840
cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg 3900
gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg 3960
acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg 4020
ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc 4080
ctttgggccg cctccccgcc tggtaccttc gagcagacat gataagatac attgatgagt 4140
ttggacaaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg 4200
ctattgcttt atttgtaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca 4260
ttcattttat gtttcaggtt cagggggaga tgtgggaggt ttttaaagc aagtaaaacc 4320
tctacaaatg tggtaaaatc aagcttagga acccctagtg atggagttgg ccactcccta 4380
tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgac gcccgggctt 4440
tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca agctagcggg 4500
cgattaagga aagggctaga tcattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt 4560
ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga 4620
aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt tttaaatac attcaaatat gtatccgctc 4680
atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt 4740
caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct 4800
cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt 4860
tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt 4920
tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc ccgtgttgac 4980
gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac 5040
tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct 5100
gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg 5160
aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg 5220
gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca 5280
atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa 5340
caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt 5400
ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 5460
attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg 5520
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt 5580
aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 5640
catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atccttttttg ataatctcat gaccaaaatc 5700
ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 5760
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 5820

[0023]

ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc 5880
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 5940
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct 6000
gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat 6060
aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 6120
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa 6180
gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 6240
gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 6300
cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 6360
aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gtaataaaca 6420
cacacacacc aacaaccgtg gttggttgtt gtgttggttt attctcgag 6469

<210> 20
<211> 6502
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-2F5AB-T7-W-SV40

<400> 20
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttccttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttctttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttgccct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcacaccgg atcaccctga aagagagcgg 1320
ccctcccctg gtcaagccca cccagaccct gaccctgaca tgcagcttca gcggcttcag 1380
cctgagcgac ttcggcgtgg gcgtgggctg gatcaggcag ccccctggca aggccctgga 1440

[0024]

atggctggcc atcatctaca gcgacgacga caagcggtac agccccagcc tgaacacccg 1500
gctgaccatc accaaggaca ccagcaagaa ccaggtggtg ctggtgatga ccagagtgag 1560
ccccgtggac accgccacct acttttgcgc ccaccgcaga ggccccacca ccctgttcgg 1620
cgtgcccatc gccagaggcc ctgtgaacgc catggacgtg tggggccagg gcatcaccgt 1680
gaccatcagc agcacatcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa 1740
gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc 1800
ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt 1860
cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt 1920
gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa 1980
gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga 2040
actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat 2100
ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 2160
caagttcaac tggtatgttg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga 2220
ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg 2280
gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga 2340
gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc 2400
atcccgggat gagctgacca agaatcaagt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 2460
tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 2520
cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tactcaaaac tcaccgtgga 2580
caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca 2640
caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaagggcaa aacgttcggg 2700
ttcgggtgcg ccagtaaagc agacattaaa ctttgatttg ctgaaacttg caggtgatgt 2760
agagtcaaat ccaggtccaa tggcaacagg gagccgaacc tctctgctcc ttgctttcgg 2820
gctcctttgc ctaccgtggc tccaagaggg ctcggcagcc ctgcagctga cccagagccc 2880
cagcagccig agcgccagcg tgggcgaccg gatcaccatc acctgccggg ccagccaggg 2940
cgtgacaagc gccctggcct ggtacaggca gaagccccgc agccccccic agctgctgat 3000
ctacgacgcc agctccctgg aaagcggcgt gcccagccgg tttagcggca gcggctccgg 3060
caccgagttc accctgacca tcagcaccct gcggccccgag gacttcgcca cctactactg 3120
ccagcagctg cacttctacc cccacaccit tggcggcgga acccgggtgg acgtgcggag 3180
aaccgtggcc gctcccagcg tgttcatctt ccctccctct gatgaacagc tgaaaagcgg 3240
aacagccagc gtggtgtgtc tgctgaacaa cttctacccc agagaagcca aagtgcagtg 3300
gaaggtggac aacgccctgc agagcggaaa cagccaggaa agcgtgacag agcaggattc 3360
caaggattcc acatacagcc tgagcagcac actgacactg tccaaggccg actacgagaa 3420
gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggactg tcctcccctg tgacaaagag 3480
cttcaacaga ggagaatgca tggctagcat gactggtgga cagcaaatgg gttaaaggat 3540
cctaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt 3600
gctcctttta cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc 3660
cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag 3720
ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcactg tgtttgctga cgcaaccccc 3780
actggttggg gcattgccac caccigtcag ctcctttccg ggactttcgc tttccccctc 3840
cctattgcca cggcggaact catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac aggggctcgg 3900
ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaaat catcgtcctt tccttggctg 3960
ctcgcctgtg ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc 4020
ctcaatccag cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg ctctgcggcc tcttccgcgt 4080

[0025]

cttcgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcctggtacc 4140
ttcgagcaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt 4200
gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa 4260
gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg 4320
agatgtggga ggtttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtaaa atcaagctta 4380
ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc 4440
cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 4500
agcgcgcaga gagggagtgg ccaagctagc gggcgattaa ggaaagggct agatcattct 4560
tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg 4620
gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 4680
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 4740
caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc 4800
ttttttgcgg catttttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa 4860
gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt 4920
aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 4980
ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc 5040
atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg 5100
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg 5160
gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac 5220
atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 5280
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 5340
actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 5400
aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa 5460
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 5520
ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 5580
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt 5640
tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg 5700
aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 5760
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 5820
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 5880
gagctaccaa ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 5940
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac acttcaaga actctgtagc accgcctaca 6000
tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 6060
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 6120
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 6180
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta 6240
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 6300
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 6360
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 6420
ttttgctggc cttttgctca catgtaataa acacacacac accaacaacc gtggttggtt 6480
gttgtgttgg tttattctcg ag 6502

<210> 21
<211> 6450
<212> DNA

[0026]

<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-B12ABK-W-SV40

<400> 21
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 600
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 660
gagcggcgcg ctccgaaagt ttcctttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 720
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc 780
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactaa aacaggtaag 840
tccggcctcc gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcgggcgc ccccctcctc acggcgagcg 900
ctgccacgtc agacgaaggg cgcagcgagc gtcctgatcc ttccgcccgg acgctcagga 960
cagcggcccg ctgctcataa gactcggcct tagaacccca gtatcagcag aaggacattt 1020
taggacggga cttgggtgac tctagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg 1080
aggaaaagta gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc 1140
gatgatgcct ctactaacca tgttcatgtt ttcttttttt ttctacaggt cctgggtgac 1200
gaacaggcgg ccgccatggc gacgggttca agaacttccc tacttcttgc atttggcctg 1260
ctttgtttgc cgtggttaca ggagggctcg gcacaggttc agctggttca gtccggggct 1320
gaggtgaaga agcctggggc ctcagtgaag gtttcttgtc aggcttctgg atacagattc 1380
agtaactttg ttattcattg ggtgcgccag gccccggac agaggtttga gtggatggga 1440
tggatcaatc cttacaacgg aaacaaagaa ttttcagcga agttccagga cagagtcacc 1500
tttaccgcgg acacatccgc gaacacagcc tacatggagt tgaggagcct caggtctgca 1560
gacacggctg tttattattg tgcgagagtg gggccatata gttgggatga ttctcccccag 1620
gacaattatt atatggacgt ctggggcaaa gggaccacgg tcatcgtgag ctcagccagc 1680
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 1740
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 1800
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 1860
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacccca gacctacatc 1920
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 1980
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 2040
gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 2100
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtatgtt 2160
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 2220
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 2280

[0027]

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 2340
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 2400
aagaatcaag tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 2460
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 2520
tccgacggct ccttcttcct ctactcaaaa ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 2580
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 2640
agcctctccc tgtctccggg tcgaaaaaga agatcaggtt cgggtgcgcc agtaaagcag 2700
acattaaact ttgatttgct gaaacttgca ggtgatgtag agtcaaatcc aggtccaatg 2760
gcaacaggga gccgaacctc tctgctcctt gctttcgggc tcctttgcct accgtggctc 2820
caagagggct cggcagagat cgttctcacg cagtctccag gcaccctgtc tctgtctcca 2880
ggggaaagag ccaccttctc ctgtaggtcc agtcacagca ttcgcagccg ccgcgtagcc 2940
tggtaccagc acaaacctgg ccaggctcca aggctggtca tacatggtgt ttccaatagg 3000
gcctctggca tctcagacag gttcagcggc agtgggtctg ggacagactt cactctcacc 3060
atcaccagag tggagcctga agactttgca ctgtactact gtcaggtcta tggtgcctcc 3120
tcgtacactt ttggccaggg gaccaaactg gagaggaaac gtacggtggc cgctcccagc 3180
gtgttcatct tccctccctc tgatgaacag ctgaaaagcg gaacagccag cgtggtgtgt 3240
ctgctgaaca acttctaccc cagagaagcc aaagtgcagt ggaaggtgga caacgccctg 3300
cagagcggaa acagccagga aagcgtgaca gagcaggatt ccaaggattc cacatacagc 3360
ctgagcagca cactgacact gtccaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc 3420
gaagtgacac accagggact gtcctcccct gtgacaaaga gcttcaacag aggagaatgc 3480
taaaggatcc taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta 3540
actatgttgc tcctttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta 3600
ttgcttcccg tatggctttc attttctcct ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt 3660
atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg tttgctgacg 3720
caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg actttcgctt 3780
tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc tgctggacag 3840
gggctcggct gttgggcact gacaattccg tggtgttgtc ggggaaatca tcgtccttte 3900
cttggctgct cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc 3960
cttcggccct caatccagcg gaccttcctt cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc 4020
ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc 4080
ctggtacctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 4140
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac 4200
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 4260
tcaggggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat 4320
caagcttagg aacccctagt gatggagttg gccactcccc tctgcgcgcc tcgctcgctc 4380
actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg 4440
agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aagctagcgg gcgattaagg aaagggctag 4500
atcattcttg aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga 4560
taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccctа 4620
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 4680
aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 4740
ttattcccct ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga 4800
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 4860
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 4920

[0028]

ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa gagcaactcg 4980
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 5040
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 5100
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 5160
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 5220
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 5280
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 5340
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 5400
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 5460
atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 5520
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 5580
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 5640
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 5700
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 5760
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 5820
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 5880
caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 5940
cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 6000
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 6060
gaacgggggg ttcgtgcaca gcccccgct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 6120
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 6180
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 6240
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 6300
gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 6360
tcctggcctt ttgctggcct ttttgctcaca tgtaataaac acacacacac caacaaccgt 6420
ggttggttgt tgtgttggtt tattctcgag 6450

<210> 22
<211> 6456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-AR3AABK-W-SV40

<400> 22
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccaattttg tatttattta 540

[0029]

ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggag gggggcgcgg cgccaggcgg 600
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 660
gagcggcgcg ctccgaaagt ttcctttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 720
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc 780
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactaa aacaggtaag 840
tccggcctcc gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcgggcgc cccctcctc acggcgagcg 900
ctgccacgtc agacgaaggg cgcagcgagc gtcctgatcc ttccgcccgg acgctcagga 960
cagcggcccg ctgctcataa gactcggcct tagaacccca gtatcagcag aaggacattt 1020
taggacggga cttgggtgac tctagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg 1080
aggaaaagta gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc 1140
gatgatgcct ctactaacca tgttcatgtt ttcttttttt ttctacaggt cctgggtgac 1200
gaacaggcgg ccgccatggc gacgggttca agaacttccc tacttcttgc atttggcctg 1260
ctttgtttgc cgtggttaca ggagggctcg gcagaggttc agctgctcga gcagtctggg 1320
gctgaggtga agacgcctgg gtcctcggtg agggtctcct gcaggcctcc tggaggcaac 1380
ttcaacagtt atagtataaa ctgggtccga caggcccctg gacacggcct tgagtgggtg 1440
gggactttca tccctatgtt tggaacctca aagtacgcgc agaagtttca ggggagagtc 1500
acgattaccg cggacgggtc ctcgggcacc gcttacatgg acctgaacag cctgagatct 1560
gacgacacgg cctttttacta ctgtgtgcgt cctgaaacgc ccagatattg tagtggcggt 1620
ttctgctatg gtgaatttga caactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctctgcc 1680
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 1740
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 1800
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 1860
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 1920
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 1980
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 2040
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 2100
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtat 2160
gttgacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 2220
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 2280
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 2340
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 2400
accaagaatc aagtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 2460
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 2520
gactccgacg gctccttctt cctctactca aaactcaccg tggacaagag caggtggcag 2580
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2640
aagagcctct ccctgtctcc gggtcgaaaa agaagatcag gttcgggtgc gccagtaaag 2700
cagacattaa actttgattt gctgaaactt gcaggtgatg tagagtcaaa tccaggtcca 2760
atggcaacag ggagccgaac ctctctgctc cttgctttcg ggctcctttg cctaccgtgg 2820
ctccaagagg gctcggcaga gatcgagctc acactcacgc agtctccagg caccctgtct 2880
ttgtctccag gggaaagagc caccctctcc tgcagggcca gtcagagtgt tagcggcagc 2940
tacttagcct ggtaccagca gaaacctggc caggctccca ggctcctcat ctatggtgca 3000
tccaacaggg ccactggcat cccacacagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc 3060
actctcacca tcagcagact ggagcctgag gattttgcag tgtattactg tcagcagtat 3120
ggttcctcac cgacgttcgg ccaggggacc agggtggaca tcaaacgaac agtggccgct 3180

[0030]

cccagcgtgt tcatcttccc tccctctgat gaacagctga aaagcggaac agccagcgtg 3240
gtgtgtctgc tgaacaactt ctaccccaga gaagccaaag tgcagtggaa ggtggacaac 3300
gccctgcaga gcggaaacag ccaggaaagc gtgacagagc aggattccaa ggattccaca 3360
tacagcctga gcagcacact gacactgtcc aaggccgact acgagaagca caaggtgtac 3420
gcctgcgaag tgacacacca gggactgtcc tccccigtga caaagagctt caacagagga 3480
gaatgctaaa ggatcctaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta 3540
ttcttaacta tgttgctcct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc 3600
atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt 3660
ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg 3720
ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt 3780
tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct 3840
ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt 3900
cctttccttg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct 3960
acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc 4020
ggcctcttcc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct 4080
ccccgcctgg taccttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac 4140
aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 4200
tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt 4260
tcaggttcag ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg 4320
taaaatcaag cttaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc 4380
tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc 4440
tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaagc tagcgggcga ttaaggaaag 4500
ggctagatca ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg 4560
tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 4620
ccccctattg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 4680
cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 4740
tcgcccttat tcccttttit gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc 4800
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 4860
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 4920
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc 4980
aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag 5040
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga 5100
gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 5160
ctttttigca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga 5220
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 5280
tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 5340
ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 5400
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 5460
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 5520
tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 5580
tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 5640
aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 5700
tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 5760
tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 5820

[0031]

gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 5880
agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 5940
tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 6000
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt 6060
cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 6120
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 6180
acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg 6240
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 6300
ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 6360
tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgta ataaacacac acacaccaac 6420
aaccgtggtt ggttgttgtg ttggtttatt ctcgag 6456

<210> 23
<211> 6453
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-AR3BABK-W-SV40

<400> 23
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggcgcgg cgccaggcgg 600
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 660
gagcggcgcg ctccgaaagt ttcctttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 720
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc 780
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactaa aacaggtaag 840
tccggcctcc gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcgggcgc ccccctcctc acggcgagcg 900
ctgccacgtc agacgaaggg cgcagcgagc gtcctgatcc ttccgcccgg acgctcagga 960
cagcggcccg ctgctcataa gactcggcct tagaacccca gtatcagcag aaggacattt 1020
taggacggga cttgggtgac tctagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg 1080
aggaaaagta gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc 1140
gatgatgcct ctactaacca tgttcatgtt ttcttttttt ttctacaggt cctgggtgac 1200
gaacaggcgg ccgccatggc gacgggttca agaacttccc tacttcttgc atttggcctg 1260
ctttgtttgc cgtggttaca ggagggctcg gcagaggttc agctgctcga gcagtctggg 1320
cctgaggtga agaagcctgg gtcgtcggtg aaggtctcct gcaaggattc tggagacacc 1380
ttcaacgaac ctgtcacctg ggtgcgacag gccccttgga aaggccttga gtggatcgga 1440

[0032]

ggaatcatcc ctgcgtttgg tgtgacaaag tacgcacaga aattccaggg ccgagtcatc 1500
atttccgcgg acgcatctac ggccacggcc tatttggagc tgagcagtct gagatctgaa 1560
gacacggccg tctattactg tgcgaaagtt ggcctgcggg gcattgtaat ggttgggggc 1620
ctggcgatga actggctcga ccccctggggc cagggaaccc aagtcaccgt ctcctctgcc 1680
agcaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 1740
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 1800
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 1860
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 1920
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 1980
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 2040
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 2100
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtat 2160
gttgacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 2220
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 2280
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 2340
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 2400
accaagaatc aagtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 2460
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 2520
gactccgacg gctccttctt cctctactca aaactcaccg tggacaagag caggtggcag 2580
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2640
aagagcctct ccctgtctcc gggtcgaaaa agaagatcag gttcgggtgc gccagtaaag 2700
cagacattaa actttgattt gctgaaactt gcaggtgatg tagagtcaaa tccaggtcca 2760
atggcaacag ggagccgaac ctctctgctc cttgctttcg ggctcctttg cctaccgtgg 2820
ctccaagagg gctcggcaga gatcgagctc actcagtctc caggcaccct gtctttgtct 2880
ccaggggaaa gagccaccct ctcctgcagg gccagtcaga gtgttagcag cagctactta 2940
gcctggtacc agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcatccagc 3000
agggccactg gcatcccaga caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga cttcactctc 3060
accatcagca gactggagcc tgaagatttt gcagtgtatt actgtcagca gtatggtagc 3120
tcacctcaga cgttcggcca agggaccaag gtggaaatca aacgaacagt ggccgctccc 3180
agcgtgttca tcttcccgcc atctgatgaa cagctgaaaa gcggaacagc cagcgtggtg 3240
tgtctgctga acaacttcta ccccagagaa gccaaagtgc agtggaaggt ggacaacgcc 3300
ctgcagagcg gaaacagcca ggaaagcgtg acagagcagg attccaagga ttccacatac 3360
agcctgagca gcacactgac actgtccaag gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc 3420
tgcgaagtga cacaccaggg actgtcctcc cctgtgacaa agagcttcaa cagaggagaa 3480
tgctaaagga tcctaatcaa cctctggatt acaaaattig tgaaagattg actggtattc 3540
ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgctgc tttaatgcct ttgtatcatg 3600
ctattgcttc ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc 3660
tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg 3720
acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc gggactttcg 3780
ctttcccccc ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga 3840
caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaaa tcatcgtcct 3900
ttccttggct gctcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg 3960
tcccttcggc cctcaatcca gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg gctctgcggc 4020
ctcttccgcg tcttcgcctt cgccctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc 4080

[0033]

cgcctggtac cttcgagcag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac 4140
tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt 4200
aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca 4260
ggttcagggg gagatgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtaa 4320
aatcaagctt aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg 4380
ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca 4440
gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaagctag cgggcgatta aggaaagggc 4500
tagatcattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca 4560
tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc 4620
ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 4680
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 4740
cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 4800
tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 4860
tcaacagcgg taagatcctt gagagtttte gccccgaaga acgttttcca atgatgagca 4920
ctttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg caagagcaac 4980
tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa 5040
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 5100
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 5160
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 5220
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc 5280
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 5340
tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta 5400
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc 5460
cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 5520
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 5580
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 5640
ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 5700
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 5760
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 5820
tgccggatca agagctacca actcttttte cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 5880
taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 5940
caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata 6000
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 6060
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga 6120
gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 6180
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 6240
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 6300
tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 6360
ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgtaata aacacacaca caccaacaac 6420
cgtggttggt tgttgtgttg gtttattctc gag 6453

<210> 24
<211> 6418
<212> DNA
<213> 人工序列

[0034]

<220>

<223> pAAVio-CASI-VRC01ABK-W-SV40

<400> 24

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcacaggtg cagctggtgc agtctggagg 1320
tcagatgaag aagcctggcg agtcgatgag aatttcttgt cgggcttctg gatatgaatt 1380
tattgattgt acgctaaatt ggattcgtct ggccccggga aaaaggcctg agtggatggg 1440
atggctgaag cctcgggggg gggccgtcaa ctacgcacgt ccacttcagg gcagagtgac 1500
catgactcga gacgtttatt ccgacacagc ctttttggag ctgcgctcgt tgacagtaga 1560
cgacacggcc gtctactttt gtactagggg aaaaaactgt gattacaatt gggacttcga 1620
acactggggc cggggcaccc cggtcatcgt ctcatcaccg agcaccaagg gcccatcggt 1680
cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct 1740
ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag 1800
cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt 1860
ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacaa 1920
gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac 1980
atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc 2040
aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga 2100
cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtat gttgacggcg tggaggtgca 2160
taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt 2220
cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa 2280
caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga 2340

[0035]

accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaatc aagtcagcct 2400
gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg 2460
gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt 2520
cctctactca aaactcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg 2580
ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc 2640
gggtcgaaaa agaagatcag gttcgggtgc gccagtaaag cagacattaa actttgattt 2700
gctgaaactt gcaggtgatg tagagtcaaa tccaggtcca atggcaacag ggagccgaac 2760
ctctctgctc cttgctttcg ggctcctttg cctaccgtgg ctccaagagg gctcggcaga 2820
aattgtgttg acacagtctc caggcaccct gtctttgtct ccaggggaaa cagccatcat 2880
ctcttgtcgg accagtcagt atggttcctt agcctggtat caacagaggc ccggccaggc 2940
ccccaggctc gtcatctatt cgggctctac tcgggccgct ggcatcccag acaggttcag 3000
cggcagtcgg tgggggccag actacaatct caccatcagc aacctggagt cgggagattt 3060
tggtgtttat tattgccagc agtatgaatt ttttggccag gggaccaagg tccaggtcga 3120
cattaaacgt acggtggccg ctcccagcgt gttcatcttc cctcccctctg atgaacagct 3180
gaaaagcgga acagccagcg tggtgtgtct gctgaacaac ttctacccca gagaagccaa 3240
agtgcagtgg aaggtggaca acgccctgca gagcggaaac agccaggaaa gcgtgacaga 3300
gcaggattcc aaggattcca catacagcct gagcagcaca ctgacactgt ccaaggccga 3360
ctacgagaag cacaaggtgt acgcctgcga agtgacacac cagggactgt cctcccctgt 3420
gacaaagagc ttcaacagag gagaatgcta aaggatccta atcaacctct ggattacaaa 3480
atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc cttttacgct atgtggatac 3540
gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgta tggctttcat tttctcctcc 3600
ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagttgt ggcccgttgt caggcaacgt 3660
ggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacgca acccccactg gttggggcat tgccaccacc 3720
tgtcagctcc tttccgggac tttcgctttc cccctcccta ttgccacggc ggaactcatc 3780
gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt tgggcactga caattccgtg 3840
gtgttgtcgg ggaaatcatc gtcctttcct tggctgctcg cctgtgttgc cacctggatt 3900
ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcgga ccttccttcc 3960
cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgccc tcagacgagt 4020
cggatctccc tttgggccgc ctccccgcct ggtaccttcg agcagacatg ataagatacа 4080
ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa 4140
tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacaa gttaacaaca 4200
acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt ttttaaagca 4260
agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatca agcttaggaa ccctagtga tggagttggc 4320
cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg 4380
cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 4440
gctagcgggc gattaaggaa agggctagat cattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata 4500
cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact 4560
tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg 4620
tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt 4680
atgagtattc aacatttccg tgtcgcccct attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct 4740
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 4800
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 4860
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 4920
cgtgttgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg 4980

[0036]

gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 5040
tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 5100
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 5160
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 5220
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 5280
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 5340
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 5400
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 5460
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 5520
tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 5580
ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tccttttga taatctcatg 5640
accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc 5700
aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 5760
ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag 5820
gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgta gccgtagtta 5880
ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta 5940
ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 6000
ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt cgtgcacaca gcccagcttg 6060
gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg 6120
cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag 6180
cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc 6240
cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 6300
aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg 6360
taataaacac acacacacca acaaccgtgg ttggttgttg tgttggttta ttctcgag 6418

<210> 25
<211> 6427
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-TCN32OptABK-W-SV40

<400> 25
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660

[0037]

agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcacaagtt cagttgcagg agtcaggtcc 1320
gggattagtc aaaccttctg aaactctttc cctaacctgt accgtctcag gttcctctat 1380
ttcaaactac tattggagtt ggattagaca aagcccgggc aaagggctgg aatggatagg 1440
ttttatttat tacgggggaa atacaaaata taatccaagt ttgaaaagca gagttactat 1500
ttcccaagac acttcaaaaa gtcaagtttc acttacaatg agttcagtga cagcggctga 1560
aagtgcagtg tatttctgtg cgagagcaag ttgttcggga ggatattgta tattggacta 1620
ctggggtcag ggaactttag ttactgtgag ctcagccagc accaagggcc catcggtctt 1680
ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt 1740
caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg 1800
cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt 1860
gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc 1920
cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg 1980
cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa 2040
acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt 2100
gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtatgtt gacggcgtgg aggtgcataa 2160
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 2220
caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa 2280
agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc 2340
acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaatcaag tcagcctgac 2400
ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 2460
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct 2520
ctactcaaaa ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc 2580
cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg 2640
tcgaaaaaga agatcaggtt cgggtgcgcc agtaaagcag acattaaact ttgatttgct 2700
gaaacttgca ggtgatgtag agtcaaatcc aggtccaatg gcaacaggga gccgaaccta 2760
tctgctcctt gctttcgggc tcctttgcct accgtggctc caagagggct cggcagacat 2820
acaaatgaca caaagcccaa gttctctaag tgcatcagtg ggggatcgag tgacaattac 2880
ttgtagggct tcccagaaca tatacaaata cttaaactgg tatcaacaac gcccgggaaa 2940
agcaccaaag ggtcttattt ccgcggcttc aggcctgcag tctggcgtcc cttcccggtt 3000
ttctggctca ggctcaggca cggattttac tctgaccata acctctctac agccggagga 3060
ttttgcgact tattattgcc aacaatctta ctctcctcct ctcacatttg gtggtgggac 3120
gagggtagag attaaacgaa cagtggccgc tcccagcgtg ttcatcttcc ctcccctctga 3180
tgaacagctg aaaagcggaa cagccagcgt ggtgtgtctg ctgaacaact tctaccccag 3240
agaagccaaa gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag agcggaaaca gccaggaaag 3300

[0038]

cgtgacagag caggattcca aggattccac atacagcctg agcagcacac tgacactgtc 3360
caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa gtgacacacc agggactgtc 3420
ctcccctgtg acaaagagct tcaacagagg agaatgctaa aggatcctaa tcaacctctg 3480
gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc ttttacgcta 3540
tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat ggctttcatt 3600
ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg gcccgttgtc 3660
aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt 3720
gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc cctcccctat tgccacggcg 3780
gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgctgc tggacagggg ctcggctgtt gggcactgac 3840
aattccgtgg tgttgtcggg gaaatcatcg tcctttcctt ggctgctcgc ctgtgttgcc 3900
acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcggac 3960
cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgccct 4020
cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgcctg gtaccttcga gcagacatga 4080
taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 4140
tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 4200
ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagatg tgggaggttt 4260
tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtaaaatcaa gcttaggaac ccctagtgat 4320
ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt 4380
cgcccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg 4440
agtggccaag ctagcgggcg attaaggaaa gggctagatc attcttgaag acgaaagggc 4500
ctcgtgatac gcctatttttt ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca 4560
ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatttttt ctaaatacat 4620
tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa 4680
aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgcccttа ttccctttttt tgcggcattt 4740
tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 4800
ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt 4860
tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcacttttа aagttctgct atgtggcgcg 4920
gtattatccc gtgttgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 4980
aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 5040
agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg 5100
acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta 5160
actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 5220
accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 5280
actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 5340
cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 5400
cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 5460
gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag 5520
ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 5580
tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 5640
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 5700
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 5760
acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 5820
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 5880
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 5940

[0039]

atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 6000
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag 6060
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 6120
agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 6180
acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 6240
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 6300
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 6360
gctcacatgt aataaacaca cacacaccaa caaccgtggt tggttgttgt gttggtttat 6420
tctcgag 6427

<210> 26
<211> 6442
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-CR6261L013-W-SV40

<400> 26
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgaccttа tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagccccа 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccсaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttccttttа tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcggggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttтt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttgccct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcagaagtc caactcgtgg aatccggagc 1320
cgaggttaaa aagcccggct ccagcgtgaa agtctcttgc aaagcaagcg gtgggccgtt 1380
tcgatcatac gcgatatcat gggtccggca ggcacctgga caggggcccg aatggatggg 1440
aggcataatc ccaatctttg ggaccacgaa gtatgccccg aaattccagg gtagggtcac 1500
tatcaccgct gacgacttcg ccggaaccgt ctatatggaa ctttccagcc tgcgcagcga 1560

[0040]

ggacaccgca atgtattact gcgcaaaaca catgggatac caagtgagag agaccatgga 1620
tgtgtggggc aagggtacta ctgtgaccgt gagctcagcc agcaccaagg gcccatcggt 1680
cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct 1740
ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag 1800
cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt 1860
ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacaa 1920
gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac 1980
atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc 2040
aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga 2100
cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtat gttgacggcg tggaggtgca 2160
taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt 2220
cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa 2280
caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga 2340
accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaatc aagtcagcct 2400
gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg 2460
gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt 2520
cctctactca aaactcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg 2580
ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc 2640
gggtcgaaaa agaagatcag gttcgggtgc gccagtaaag cagacattaa actttgattt 2700
gctgaaactt gcaggtgatg tagagtcaaa tccaggtcca atggcaacag ggagccgaac 2760
ctctctgctc cttgctttcg ggctcctttg cctaccgtgg ctccaagagg gctcggcaga 2820
gatcgttctc acgcagtctc catccgtatc tgcagccccg ggacagaaag tgacaatttc 2880
atgctctggg tcctcatcca acatcggaaa tgactacgtt agttggtacc aacagctccc 2940
tgggaccgcg ccaaaactgc tgatttatga caacaacaag aggccaagtg gcatccccga 3000
caggttttcc ggctcaaagt ccggcactic agcaacactg ggcatcacgg gtctgcaaac 3060
aggcgatgag gcaaactact attgcgcaac ctgggacagg agaccgaccg cttatgttgt 3120
gttcggcggc gggactaagc tggagaggaa acgtacggtg gccgctccca gcgtgttcat 3180
cttccctccc tctgatgaac agctgaaaag cggaacagcc agcgtggtgt gtctgctgaa 3240
caacttctac cccagagaag ccaaagtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg 3300
aaacagccag gaaagcgtga cagagcagga ttccaaggat tccacataca gcctgagcag 3360
cacactgaca ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac 3420
acaccaggga ctgtcctccc ctgtgacaaa gagcttcaac agaggagaat gctaaaggat 3480
cctaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt 3540
gctcctttta cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc 3600
cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag 3660
ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcactg tgtttgctga cgcaaccccc 3720
actggttggg gcattgccac cacctgtcag ctcctttccg ggactttcgc tttccccctc 3780
cctattgcca cggcggaact catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac aggggctcgg 3840
ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaaat catcgtcctt tccttggctg 3900
ctcgcctgtg ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc 3960
ctcaatccag cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg ctctgcggcc tcttccgcgt 4020
cttcgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcctggtacc 4080
ttcgagcaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt 4140
gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa 4200

[0041]

gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg 4260
agatgtggga ggtttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtaaa atcaagctta 4320
ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc 4380
cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 4440
agcgcgcaga gagggagtgg ccaagctagc gggcgattaa ggaaagggct agatcattct 4500
tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg 4560
gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 4620
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 4680
caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc 4740
ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa 4800
gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt 4860
aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 4920
ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc 4980
atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg 5040
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg 5100
gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac 5160
atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 5220
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 5280
actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 5340
aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa 5400
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 5460
cccteccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 5520
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt 5580
tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg 5640
aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 5700
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 5760
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 5820
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 5880
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac acttcaaaga actctgtagc accgcctaca 5940
tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 6000
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 6060
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 6120
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta 6180
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 6240
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 6300
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 6360
ttttgctggc cttttgctca catgtaataa acacacacac accaacaacc gtggttggtt 6420
gttgtgttgg tttattctcg ag 6442

<210> 27

<211> 6451

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0042]

<223> pAAVio-CASI-F10L024-W-SV40

<400> 27

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttccttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcacaggtt cagcttgtcc aatcgggtgc 1320
ggaggtcaag aagccgggct catcagtcaa agtatcttgc acttcttctg aagttacgtt 1380
cagctctttc gctatatcgt gggtgagaca agcaccgggc cagggattag agtggttggg 1440
aggcatttca cctatgtttg gcactcctaa ttacgcacag aaatttcaag gcagggttac 1500
tatcacagcc gaccaatcca cacgaactgc atatatggac ttgcgaagtt tgaggtctga 1560
agacactgcg gtatattact gcgcccgaag tccttcatac atttgttcgg gaggtacttg 1620
cgtgtttgac cattggggtc agggaacttt agttactgtg agctcagcca gcaccaaggg 1680
cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1740
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1800
cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct 1860
cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1920
gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa 1980
aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct 2040
cttccccccа aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt 2100
ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtatg ttgacggcgt 2160
ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt 2220
ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa 2280
ggtctccaac aaagccctcc cagccccca cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca 2340
gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaatca 2400
agtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga 2460

[0043]

gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg 2520
ctccttcttc ctctactcaa aactcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt 2580
cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc 2640
cctgtctccg ggtcgaaaaa gaagatcagg ttcgggtgcg ccagtaaagc agacattaaa 2700
cttgatttg ctgaaacttg caggtgatgt agagtcaaat ccaggtccaa tggcaacagg 2760
gagccgaacc tctctgctcc ttgctttcgg gctcctttgc ctaccgtggc tccaagaggg 2820
ctcggcagag atcgttctca cgcagtctcc aggcaccctg tctctgtctc caggggaaag 2880
agccaccttc tcctgcacag gcaatagtaa taatgtgggg aatcagggag cagcatggtt 2940
acagcaacat caaggacatc ccccgaaact gctttcctat cgtaacaacg accgcccgtc 3000
gggaatctcg gaacgttttt ctgcgtcacg ttcaggcaac actgcctcgc tgactataac 3060
tggcttacag cctgaagacg aagcagacta ctattgttca acttgggatt cttctctgtc 3120
tgcggttgtg tttggcggcg gcacaaaagt ggaggtgaag cggaccgtgg ccgctcccag 3180
cgtgttcatc ttccctccct ctgatgaaca gctgaaaagc ggaacagcca gcgtggtgtg 3240
tctgctgaac aacttctacc ccagagaagc caaagtgcag tggaaggtgg acaacgccct 3300
gcagagcgga aacagccagg aaagcgtgac agagcaggat tccaaggatt ccacatacag 3360
cctgagcagc acactgacac tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 3420
cgaagtgaca caccagggac tgtcctcccc tgtgacaaag agcttcaaca gaggagaatg 3480
ctaaaggatc ctaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggtattctt 3540
aactatgttg ctccttttac gctatgtgga tacgctgctt taatgccttt gtatcatgct 3600
attgcttccc gtatggcttt cattttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt 3660
tatgaggagt tgtggcccgt tgtcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcactgt gtttgctgac 3720
gcaaccccca ctggttgggg cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg gactttcgct 3780
ttccccctcc ctattgccac ggcggaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca 3840
ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtggtgttgt cggggaaatc atcgtccttt 3900
ccttggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc 3960
ccttcggccc tcaatccagc ggaccttcct tcccgcggcc tgctgccggc tctgcggcct 4020
cttccgcgtc ttcgccttcg ccctcagacg agtcggatct ccctttgggc cgcctccccg 4080
cctggtacct tcgagcagac atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaacta 4140
gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa 4200
ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg 4260
ttcaggggga gatgtgggag gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa 4320
tcaagcttag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct 4380
cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt 4440
gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caagctagcg ggcgattaag gaaagggcta 4500
gatcattctt gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg 4560
ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaacccct 4620
atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga 4680
taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc 4740
cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcacccaga aacgctggtg 4800
aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 4860
aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact 4920
tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtgttg acgccgggca agagcaactc 4980
ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag 5040
catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat 5100

[0044]

aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt 5160
ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa 5220
gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc 5280
aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg 5340
gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt 5400
gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca 5460
gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat 5520
gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca 5580
gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg 5640
atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg 5700
ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcctttttt 5760
ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt ggtttgtttg 5820
ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 5880
ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 5940
ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 6000
tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 6060
tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 6120
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aagggagaaa ggcggacagg 6180
tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac 6240
gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 6300
tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 6360
ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgtaataaa cacacacaca ccaacaaccg 6420
tggttggttg ttgtgttggt ttattctcga g 6451

<210> 28
<211> 6502
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-AR4AABK-W-SV40

<400> 28
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720

[0045]

aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct ccccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttctttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccatgg cgacgggttc aagaacttcc ctacttcttg catttggcct 1260
gctttgtttg ccgtggttac aggagggctc ggcagaggtt cagctgctcg agcagtctgg 1320
gccagaggtg aaaaagcccg gggattctct gaggatctcc tgtaagatgt ctggagacag 1380
tttagtcacc acttggatcg gctgggtgcg ccagaagccc gggcaaggcc tggagtggat 1440
ggggatcatc aatcctggtg actcttctac caacatctat cctggtgact ctgccacgcg 1500
atatggcccg tccttccaag gccaggtcac catctcaatc gacaagtcca ccagcaccgc 1560
gtacctgcag tggaacaatg tgaaggcctc ggacaccggc atttattact gtgcgagaca 1620
tgtccccgta ccaatctccg ggacttttct ttggagagag cgggaaatgc atgatttcgg 1680
ctactttgac gactggggcc agggaaccct ggtcatcgtc tcctcagcca gcaccaaggg 1740
cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1800
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1860
cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct 1920
cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1980
gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa 2040
aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct 2100
cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt 2160
ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtatg ttgacggcgt 2220
ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt 2280
ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa 2340
ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca 2400
gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaatca 2460
agtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga 2520
gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg 2580
ctccttcttc ctctactcaa aactcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt 2640
cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc 2700
cctgtctccg ggtcgaaaaa gaagatcagg ttcgggtgcg ccagtaaagc agacattaaa 2760
ctttgatttg ctgaaacttg caggtgatgt agagtcaaat ccaggtccaa tggcaacagg 2820
gagccgaacc tctctgctcc ttgctttcgg gctcctttgc ctacgtggcc tccaagaggg 2880
ctcggcagag ctcacactca cgcagtctcc aggcaccctg tctttgtctc caggggaaag 2940
agccaccctc tcctgcaggg ccagtcagag tgttagcaac aactacttag cctggtacca 3000
gcagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccagca gggccactgg 3060
catcccagac aggttcagtg gcagtgggtc tgggacaggc ttcactctca tcatcagcag 3120
actggagcct gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag tatggtagct cttcgatcac 3180
cttcggccaa gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gccgctccca gcgtgttcat 3240
cttcctccc tctgatgaac agctgaaaag cggaacagcc agcgtggtgt gtctgctgaa 3300
caacttctac cccagagaag ccaaagtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg 3360

[0046]

aaacagccag gaaagcgtga cagagcagga ttccaaggat tccacataca gcctgagcag 3420
cacactgaca ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac 3480
acaccaggga ctgtcctccc ctgtgacaaa gagcttcaac agaggagaat gctaaaggat 3540
cctaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt 3600
gctccttita cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc 3660
cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag 3720
ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcactg tgtttgctga cgcaacccccc 3780
actggttggg gcattgccac cacctgtcag ctcctttccg ggactttcgc tttccccctc 3840
cctattgcca cggcggaact catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac aggggctcgg 3900
ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaaat catcgtcctt tccttggctg 3960
ctcgcctgtg ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc 4020
ctcaatccag cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg ctctgcggcc tcttccgcgt 4080
cttcgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcctggtacc 4140
ttcgagcaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt 4200
gaaaaaaatg ctttattigt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa 4260
gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg 4320
agatgtggga ggtttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtaaa atcaagctta 4380
ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc 4440
cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 4500
agcgcgcaga gagggagtgg ccaagctagc gggcgattaa ggaaagggct agatcattct 4560
tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg 4620
gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta 4680
tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 4740
caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc 4800
ttttttgcgg catttigcct tcctgttttt gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa 4860
gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt 4920
aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 4980
ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc 5040
atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg 5100
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg 5160
gccaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac 5220
atgggggatc atgtaacteg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca 5280
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 5340
actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 5400
aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa 5460
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 5520
cccteccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 5580
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt 5640
tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg 5700
aagatccttt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga 5760
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atccttttit tctgcgcgta 5820
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 5880
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 5940
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 6000

[0047]

tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 6060
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 6120
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 6180
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta 6240
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 6300
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 6360
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 6420
ttttgctggc cttttgctca catgtaataa acacacacac accaacaacc gtggttggtt 6480
gttgtgttgg tttattctcg ag 6502

<210> 29
<211> 6465
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-FI6ABK-W-SV40

<400> 29
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc ccaatttttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 600
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 660
gagcggcgcg ctccgaaagt ttcctttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 720
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc 780
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactaa aacaggtaag 840
tccggcctcc gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcgggcgc cccctcctc acggcgagcg 900
ctgccacgtc agacgaaggg cgcagcgagc gtcctgatcc ttccgcccgg acgctcagga 960
cagcggcccg ctgctcataa gactcggcct tagaacccca gtatcagcag aaggacattt 1020
taggacggga cttgggtgac tctagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg 1080
aggaaaagta gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc 1140
gatgatgcct ctactaacca tgttcatgtt ttcttttttt ttctacaggt cctgggtgac 1200
gaacaggcgg ccgccatggc gacgggttca agaacttccc tacttcttgc atttggcctg 1260
ctttgtttgc cgtggttaca ggagggctcg gcacaggttc agctggttca gtccgggggg 1320
ggtgtcgtcc aaccgggtag aagcctacgc ttatcctgtg tcgcctccgg tttcactttt 1380
tccacttacg ctatgcattg ggtcaggcaa gcccccggca gaggcttaga atgggtggct 1440
gtcatttcct acgacggcaa ttacaaatac tatgccgata gcgtaaaggg aaggtttagc 1500
atatcaaggg ataatagcaa taacactctg catctggaaa tgaacaccct acgcacagag 1560

[0048]

gacacagcac tctattattg tgcaaaggat tctcagctcc gttctctgct ctactttgag 1620
tggctctcac aagggtattt tgacccttgg ggacagggaa ctctcgtaac cgtgacctct 1680
gccagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 1740
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 1800
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 1860
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 1920
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 1980
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 2040
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 2100
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 2160
tatgttgacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 2220
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 2280
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 2340
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccccatc ccgggatgag 2400
ctgaccaaga atcaagtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 2460
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 2520
ctggactccg acggctcctt cttcctctac tcaaaactca ccgtggacaa gagcaggtgg 2580
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2640
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtcga aaaagaagat caggttcggg tgcgccagta 2700
aagcagacat taaactttga tttgctgaaa cttgcaggtg atgtagagtc aaatccaggt 2760
ccaatggcaa cagggagccg aacctctctg ctccttgctt tcgggctcct ttgcctaccg 2820
tggctccaag agggctcggc agacatacag atgacacagt cccctgacag tcttgcagtc 2880
tctctgggtg ctagagcaac tatcaactgt aaaagcagtc agtcagtaac ctttaactac 2940
aaaaactacc tagcgtggta tcagcaaaaa cccggtcagc cccccaaagt tttaatttat 3000
tgggcaagtg cgagagaaag tggtgtgcct gatagattca gcgggtcagg gtctggcaca 3060
gatttcactc tcacgatttc aagtttgcag gcagaggatg tcgccgttta ctactgccaa 3120
cagcactaca ggacaccccc caccttcggg caaggcacta aagtcgaaat caaacgtacg 3180
gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccct ccctctgatg aacagctgaa aagcggaaca 3240
gccagcgtgg tgtgtctgct gaacaacttc taccccagag aagccaaagt gcagtggaag 3300
gtggacaacg ccctgcagag cggaaacagc caggaaagcg tgacagagca ggattccaag 3360
gattccacat acagcctgag cagcacactg acactgtcca aggccgacta cgagaagcac 3420
aaggtgtacg cctgcgaagt gacacaccag ggactgtcct ccgctgtgac aaagagcttc 3480
aacagaggag aatgctaaag gatcctaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat 3540
tgactggtat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgct gctttaatgc 3600
ctttgtatca tgctattgct tcccgtatgg ctttcatttt ctcctccttg tataaatcct 3660
ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca 3720
ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt 3780
ccgggacttt cgctttcccc ctcoctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg 3840
cccgctgctg gacaggggct cggctgttgg gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga 3900
aatcatcgtc ctttccttgg ctgctcgcct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt 3960
ccttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggcctgctgc 4020
cggctctgcg gcctcttccg cgtcttcgcc ttcgccctca gacgagtcgg atctcccttt 4080
gggccgcctc cccgcctggt accttcgagc agacatgata agatacattg atgagtttgg 4140
acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 4200

[0049]

tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 4260
ttttatgttt caggttcagg gggagatgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta 4320
caaatgtggt aaaatcaagc ttaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 4380
cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc 4440
cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaagct agcgggcgat 4500
taaggaaagg gctagatcat tcttgaagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat 4560
aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg 4620
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 4680
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 4740
atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcatttttg ccttcctgtt tttgctcacc 4800
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca 4860
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttcc 4920
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt gttgacgccg 4980
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 5040
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 5100
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 5160
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 5220
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 5280
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 5340
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 5400
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 5460
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 5520
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 5580
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 5640
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 5700
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 5760
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5820
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5880
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5940
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 6000
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 6060
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 6120
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 6180
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 6240
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 6300
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 6360
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgtaa taaacacaca 6420
cacaccaaca accgtggttg gttgttgtgt tggtttattc tcgag 6465

<210> 30
<211> 6465
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0050]

<223> pAAVio-CASI-FI6v3ABK-W-SV40

<400> 30

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
ggccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 600
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 660
gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 720
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc 780
cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactaa aacaggtaag 840
tccggcctcc gcgccgggtt ttggcgcctc ccgcgggcgc cccctcctc acggcgagcg 900
ctgccacgtc agacgaaggg cgcagcgagc gtcctgatcc ttccgcccgg acgctcagga 960
cagcggcccg ctgctcataa gactcggcct tagaacccca gtatcagcag aaggacattt 1020
taggacggga cttgggtgac tctagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg 1080
aggaaaagta gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc 1140
gatgatgcct ctactaacca tgttcatgtt ttcttttttt ttctacaggt cctgggtgac 1200
gaacaggcgg ccgccatggc gacgggttca agaacttccc tacttcttgc atttggcctg 1260
ctttgtttgc cgtggttaca ggagggctcg gcacaggttc agctggtiga aagtgggggc 1320
ggagtggttc agcccggtag aagcctgcga ttatcttgtg ccgccagcgg ctttacattt 1380
agcacatacg caatgcactg ggttcggcaa gcacccggca aaggattgga gtgggtggca 1440
gtaattagtt atgacgctaa ctacaagtat tacgccgatt ccgtgaaggg aagatttacg 1500
attagcagag acaacagcaa gaatacattg tatctgcaaa tgaatagtct gcgtgcagag 1560
gatacagcag tctactattg tgccaaagac agccaactcc gtagcctgct atactttgag 1620
tggctttcgc agggatactt tgattattgg ggacagggca ctctggttac agtgagctca 1680
gccagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 1740
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 1800
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 1860
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 1920
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 1980
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 2040
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 2100
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 2160
tatgttgacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 2220
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 2280
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 2340
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 2400
ctgaccaaga atcaagtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 2460

[0051]

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 2520
ctggactccg acggctcctt cttcctctac tcaaaactca ccgtggacaa gagcaggtgg 2580
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2640
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtcga aaaagaagat caggttcggg tgcgccagta 2700
aagcagacat taaactttga tttgctgaaa cttgcaggtg atgtagagtc aaatccaggt 2760
ccaatggcaa cagggagccg aacctctctg ctccttgctt tcgggctcct ttgcctaccg 2820
tggctccaag agggctcggc agacatcgtg atgacacaaa gccccgatag ccttgccgtt 2880
agtttagggg aaagggcgac tatcaactgc aaatcttcac agtccgttac ctttaactac 2940
aagaactatc tcgcttggta tcagcaaaaa ccgggtcagc cacccaagtt gttgatttat 3000
tgggcatcaa caagagaaag tggtgtgcct gaccgttttt cagggtctgg ctctggaact 3060
gatttcacgc ttacaatcag ttcgcttcaa gccgaagatg tggctgtgta ttattgccaa 3120
cagcactata gaactcctcc cacttttggt caagggacaa aggtggagat taaacgtacg 3180
gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccct ccctctgatg aacagctgaa aagcggaaca 3240
gccagcgtgg tgtgtctgct gaacaacttc tacccccagag aagccaaagt gcagtggaag 3300
gtggacaacg ccctgcagag cggaaacagc caggaaagcg tgacagagca ggatccaag 3360
gattccacat acagcctgag cagcacactg acactgtcca aggccgacta cgagaagcac 3420
aaggtgtacg cctgcgaagt gacacaccag ggactgtcct ccccctgtgac aaagagcttc 3480
aacagaggag aatgctaaag gatcctaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat 3540
tgactggtat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgct gctttaatgc 3600
ctttgtatca tgctattgct tcccgtatgg ctttcatttt ctcctccttg tataaatcct 3660
ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca 3720
ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt 3780
ccgggacttt cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg 3840
cccgctgctg gacaggggct cggctgttgg gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga 3900
aatcatcgtc ctttccttgg ctgctcgccl gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt 3960
ccttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggcctgctgc 4020
cggctctgcg gcctcttccg cgtcttcgcc ttcgccctca gacgagtcgg atctcccttt 4080
gggccgcctc cccgcctggt accttcgagc agacatgata agatacattg atgagtttgg 4140
acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 4200
tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 4260
ttttatgttt caggttcagg gggagatgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta 4320
caaatgtggt aaaatcaagc ttaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 4380
cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc 4440
cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaagct agcgggcgat 4500
taaggaaagg gctagatcat tcttgaagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat 4560
aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcacttttcggggaaatg 4620
tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 4680
gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 4740
atttccgtgt cgcccttatt ccctttttttg cggcatttttg ccttcctgtt tttgctcacc 4800
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca 4860
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttttc 4920
caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt gttgacgccg 4980
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 5040
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 5100

[0052]

taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 5160
agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 5220
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 5280
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 5340
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 5400
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 5460
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 5520
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 5580
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 5640
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 5700
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 5760
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5820
cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5880
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5940
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 6000
ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 6060
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 6120
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 6180
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 6240
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 6300
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 6360
cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgtaa taaacacaca 6420
cacaccaaca accgtggttg gttgttgtgt tggtttattc tcgag 6465

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 31
aacgccaata gggactttcc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 32
gggcgtactt ggcatatgat 20

[0053]

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 33
acgtgcaaaa gaagctaccg 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 34
aatgggaagt cacgaaggtg 20

<210> 35
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 共有识别序列

<400> 35
gcggccgc 8

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 36
caagcagcag aggccatgga 20

[0054]

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 37
gaccagcact ggagctagga 20

<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 38
aagcgaaact ggcggaaac 19

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 39
taaccgatgt tgggcatcag 20

<210> 40
<211> 4183
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pAAVio-CASI-W-SV40

<400> 40
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

[0055]

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcctactag tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 180
atggccccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 240
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt 300
aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 360
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 420
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagccccca 480
cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctcccccacc cccaattttg tatttattta 540
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 600
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc 660
agagcggcgc gctccgaaag tttccttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata 720
aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 780
ccgccgcccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac cgcgttacta aaacaggtaa 840
gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg cccccctcct cacggcgagc 900
gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc cttccgcccg gacgctcagg 960
acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt 1020
ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct ttccagagag cggaacaggc 1080
gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat ctccgtgggg cggtgaacgc 1140
cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttttt tttctacagg tcctgggtga 1200
cgaacaggcg gccgccagga tcctaatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg 1260
actggtattc ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgctgc tttaatgcct 1320
ttgtatcatg ctattgcttc ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg 1380
ttgctgtctc tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact 1440
gtgtttgctg acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc 1500
gggactttcg ctttcccccct ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc 1560
cgctgctgga caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaaa 1620
tcatcgtcct ttccttggct gctcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc 1680
ttctgctacg tcccttcggc cctcaatcca gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg 1740
gctctgcggc ctcttccgcg tcttcgcctt cgccctcaga cgagtcggat ctcccctttgg 1800
gccgcctccc cgcctggtac cttcgagcag acatgataag atacattgat gagtttggac 1860
aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg 1920
ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 1980
ttatgtttca ggttcagggg gagatgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 2040
aatgtggtaa aatcaagctt aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg 2100
cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg 2160
ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaagctag cgggcgatta 2220
aggaaagggc tagatcattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag 2280
gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg 2340
cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 2400
caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat 2460
ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca 2520
gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc 2580
gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttte gccccgaaga acgttttcca 2640
atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgccggg 2700

[0056]

caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca 2760
gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 2820
accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 2880
ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 2940
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 3000
acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 3060
atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct 3120
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca 3180
gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 3240
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 3300
tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt 3360
taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa 3420
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 3480
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 3540
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 3600
agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 3660
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc 3720
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 3780
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 3840
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 3900
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 3960
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 4020
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 4080
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgtaata aacacacaca 4140
caccaacaac cgtggttggt tgttgtgttg gtttattctc gag 4183

<210> 41
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

<400> 41
gccgccatg 9

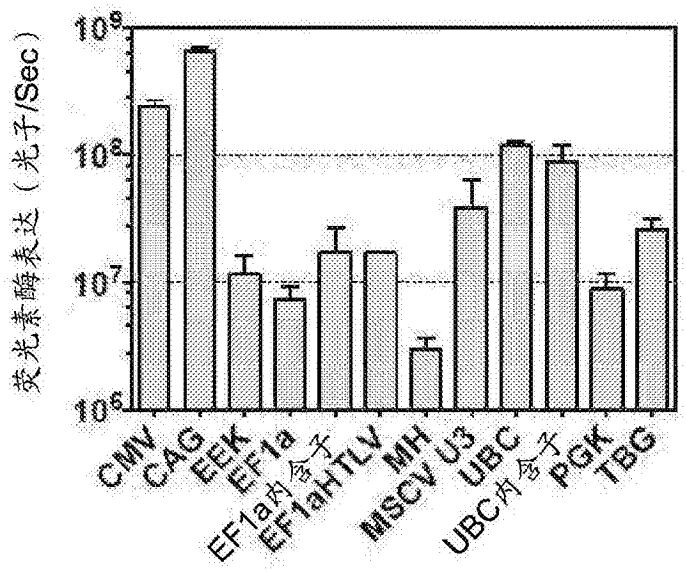
<210> 42
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的核酸

[0057]

<400> 42
gcggccgcca tg 12

A.


荧光素酶表达（光子/Sec）
10^9
10^8
10^7
10^6
CMV
CAG
EEK
EF1a
EF1a内含子
EF1aHTLV
MH
MSCV U3
UBC
UBC内含子
PGK
TBG

B.

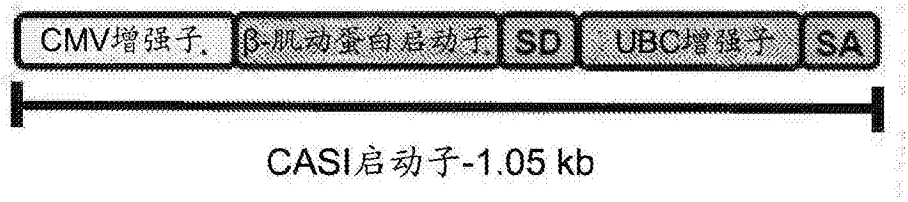
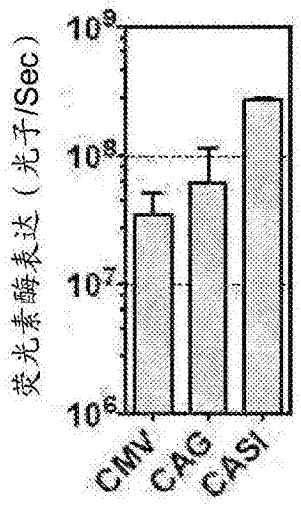
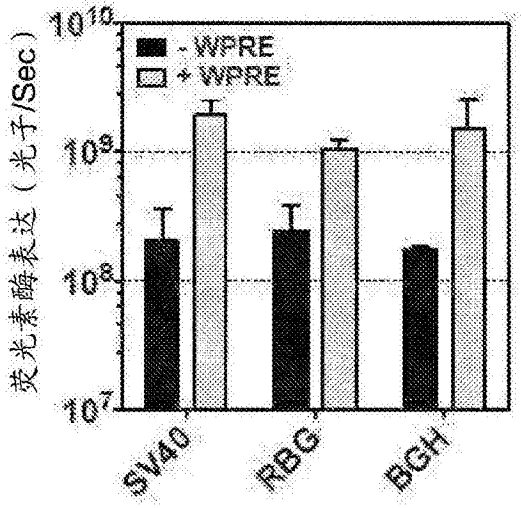

CMV增强子
β-肌动蛋白启动子
SD
UBC增强子
SA
CASI启动子-1.05 kb

图 1

C.


荧光素酶表达（光子/Sec）
10^9
10^8
10^7
10^6
CMV
CAG
CASI

D.


荧光素酶表达（光子/Sec）
10^{10}
10^9
10^8
10^7
- WPRE
+ WPRE
SV40
RBG
BGH

E.


ITR
CASI
IgG HC
2A
LC
WPRE
SV40pA
ITR
VIP IgG表达载体-4.5 kb

图 1（接上页）

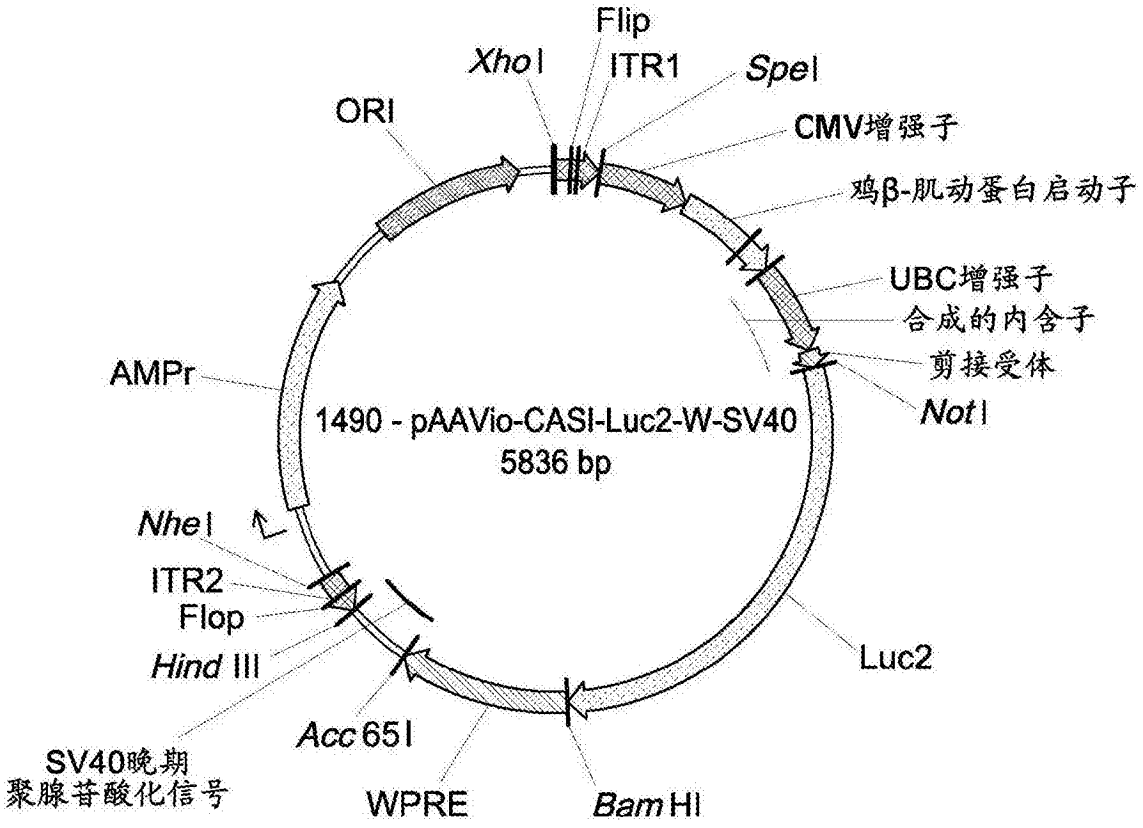

Flip
Xho I
ITR1
Spe I
ORI
CMV增强子
鸡β-肌动蛋白启动子
UBC增强子
合成的内含子
剪接受体
Not I
AMPr
1490 - pAAVio-CASI-Luc2-W-SV40
5836 bp
Nhe I
ITR2
Flop
Hind III
Luc2
Acc 65I
SV40晚期
聚腺苷酸化信号
WPRE
Bam HI

图 2

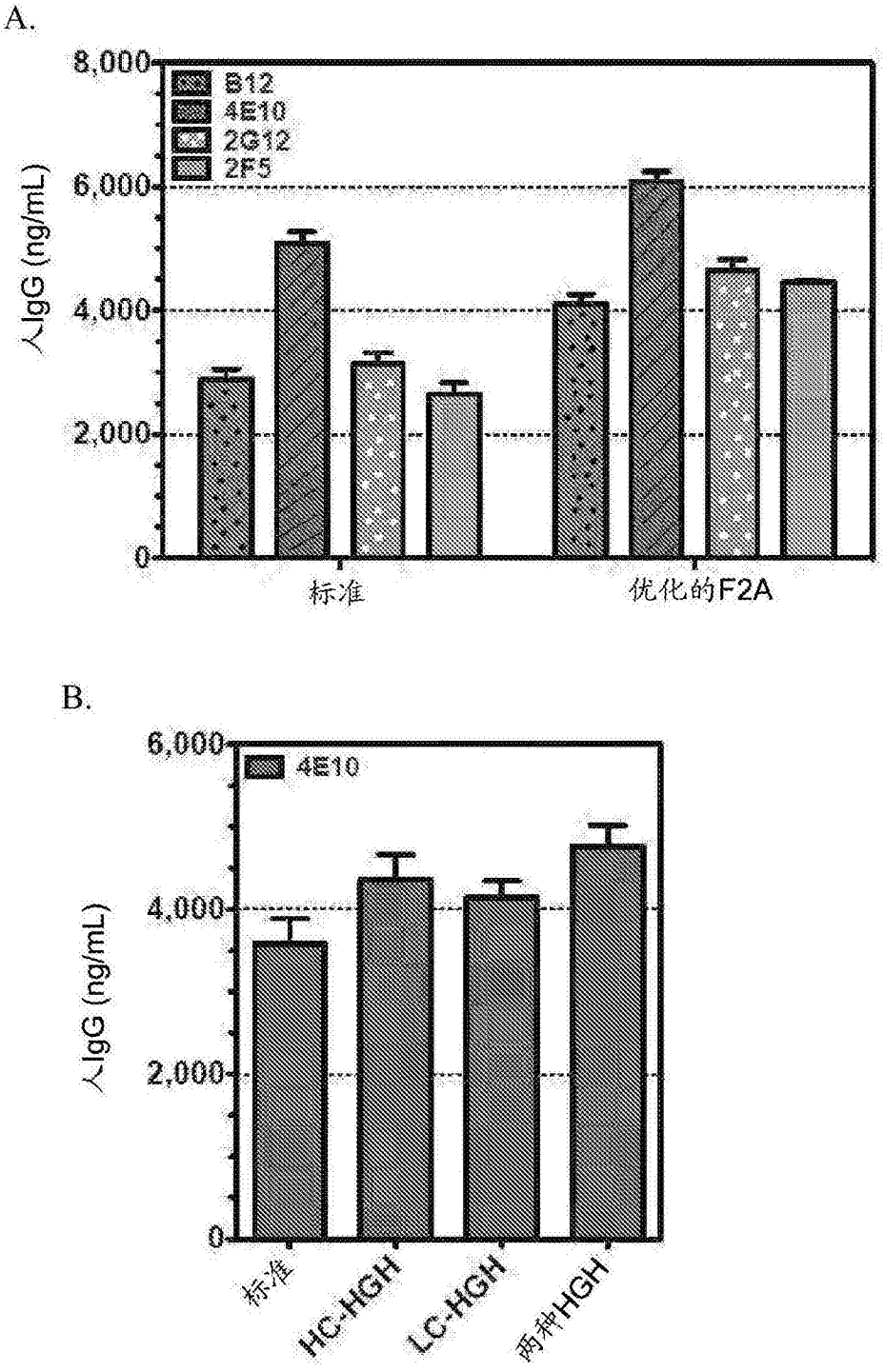
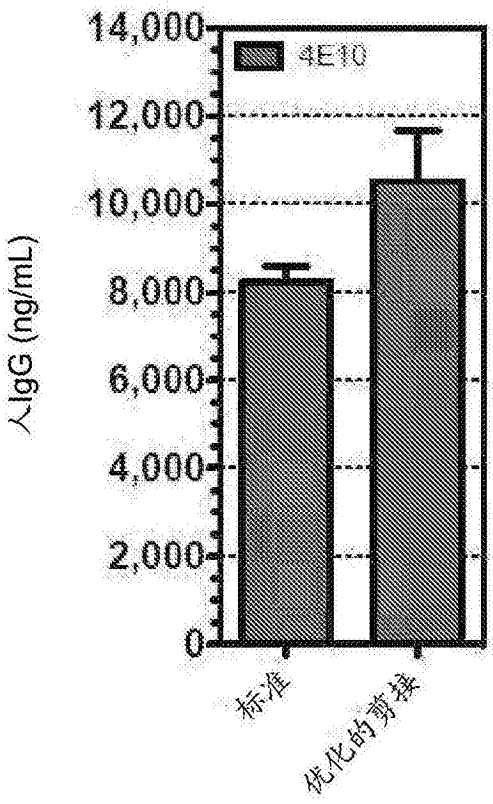

A.
8,000
6,000
4,000
2,000
0
人IgG (ng/mL)
B12
4E10
2G12
2F5
标准
优化的F2A
B.
6,000
4,000
2,000
0
人IgG (ng/mL)
4E10
标准
HC-HGH
LC-HGH
两种HGH

图 3

C.


14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
4E10
人IgG (ng/mL)
标准
优化的剪接

D.

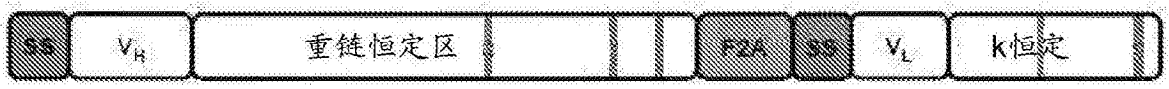
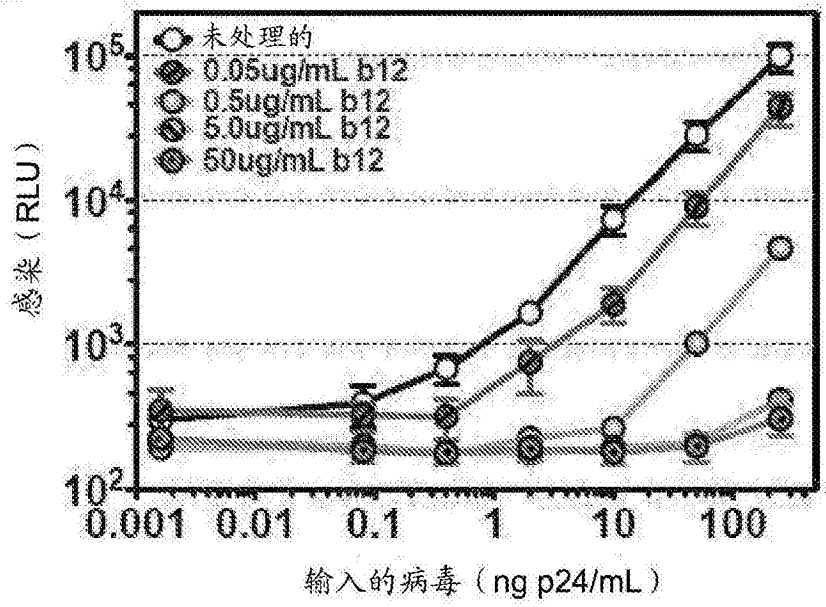

SS
V_H
重链恒定区
F2A
SS
V_L
k恒定

图 3（接上页）

A.


未处理的
0.05ug/mL b12
0.5ug/mL b12
5.0ug/mL b12
50ug/mL b12
感染（RLU）
10^5
10^4
10^3
10^2
0.001 0.01 0.1 1 10 100
输入的病毒（ng p24/mL）

B.

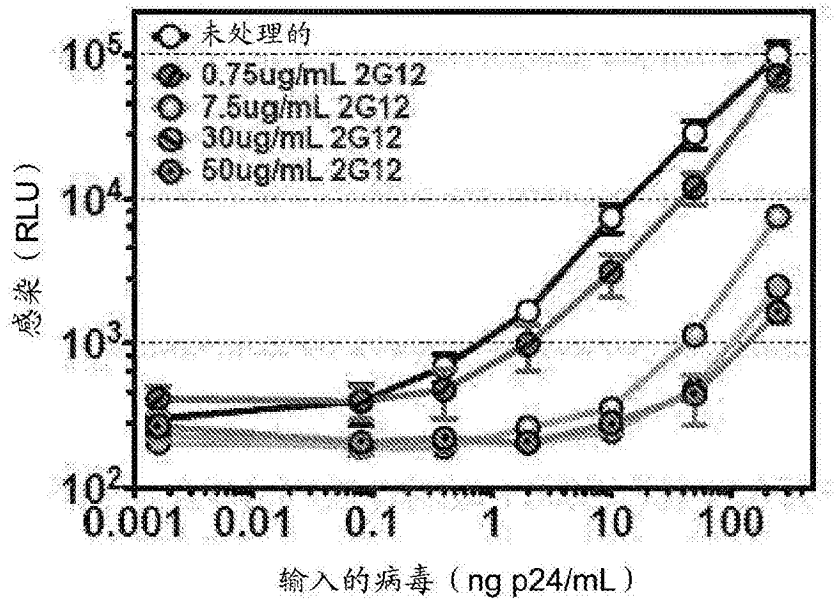
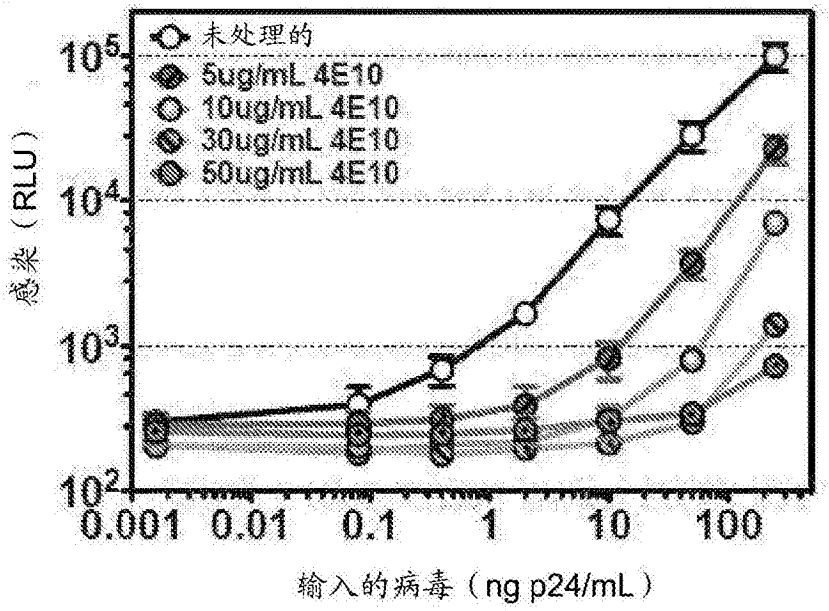

未处理的
0.75ug/mL 2G12
7.5ug/mL 2G12
30ug/mL 2G12
50ug/mL 2G12
感染（RLU）
10^5
10^4
10^3
10^2
0.001 0.01 0.1 1 10 100
输入的病毒（ng p24/mL）

图 4

C.


未处理的
5ug/mL 4E10
10ug/mL 4E10
30ug/mL 4E10
50ug/mL 4E10
感染（RLU）
10^5
10^4
10^3
10^2
0.001 0.01 0.1 1 10 100
输入的病毒（ng p24/mL）

D.

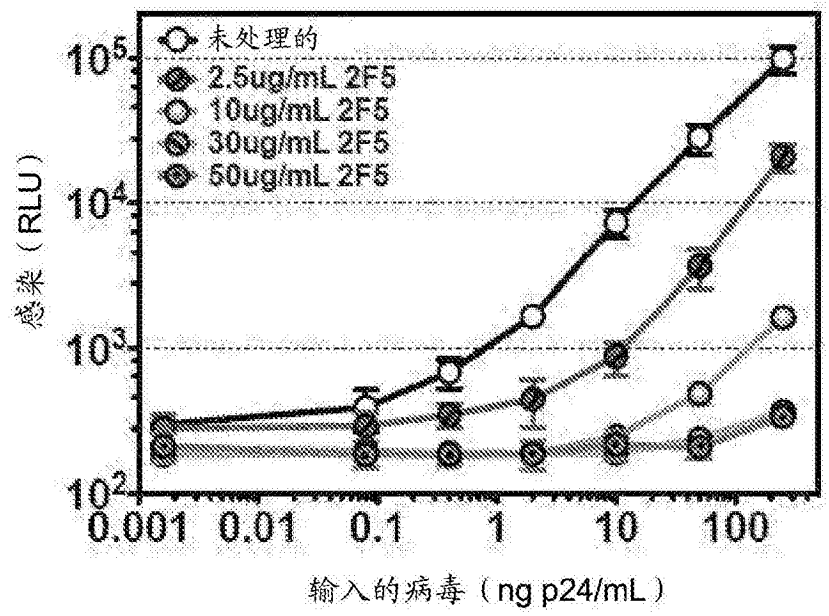

未处理的
2.5ug/mL 2F5
10ug/mL 2F5
30ug/mL 2F5
50ug/mL 2F5
感染（RLU）
10^5
10^4
10^3
10^2
0.001 0.01 0.1 1 10 100
输入的病毒（ng p24/mL）

图 4（接上页）

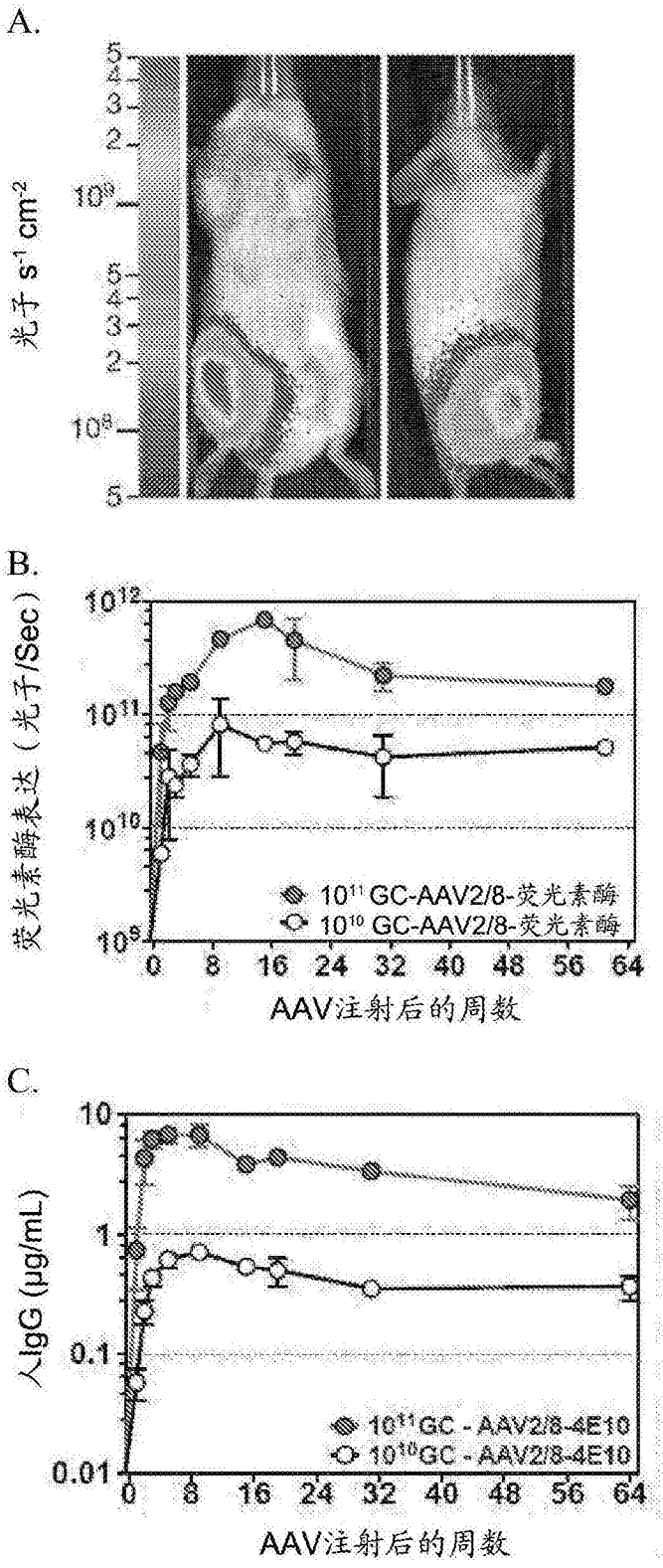

A.
光子 s-1 cm-2
B.
荧光素酶表达（光子/Sec）
10^11 GC-AAV2/8-荧光素酶
10^10 GC-AAV2/8-荧光素酶
AAV注射后的周数
C.
人IgG (μg/mL)
10^11 GC - AAV2/8-4E10
10^10 GC - AAV2/8-4E10
AAV注射后的周数

图 5

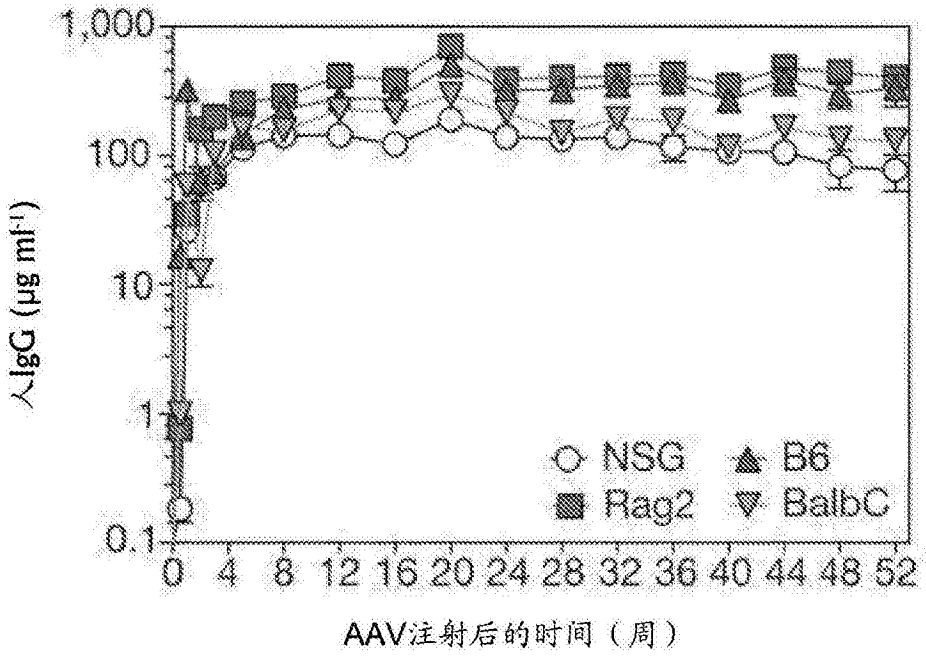

1,000
100
10
1
0.1
人IgG (μg ml-1)
NSG
B6
Rag2
BalbC
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52
AAV注射后的时间（周）

图 6

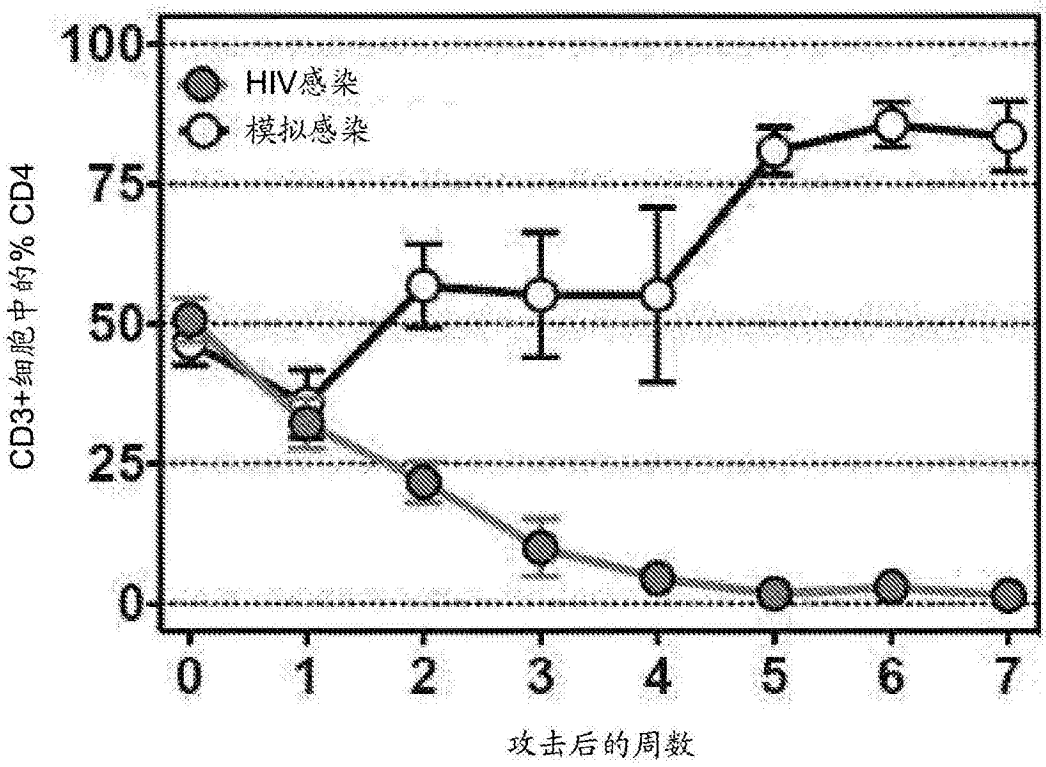

100
75
50
25
0
HIV感染
模拟感染
CD3+细胞中的% CD4
0 1 2 3 4 5 6 7
攻击后的周数

图 7

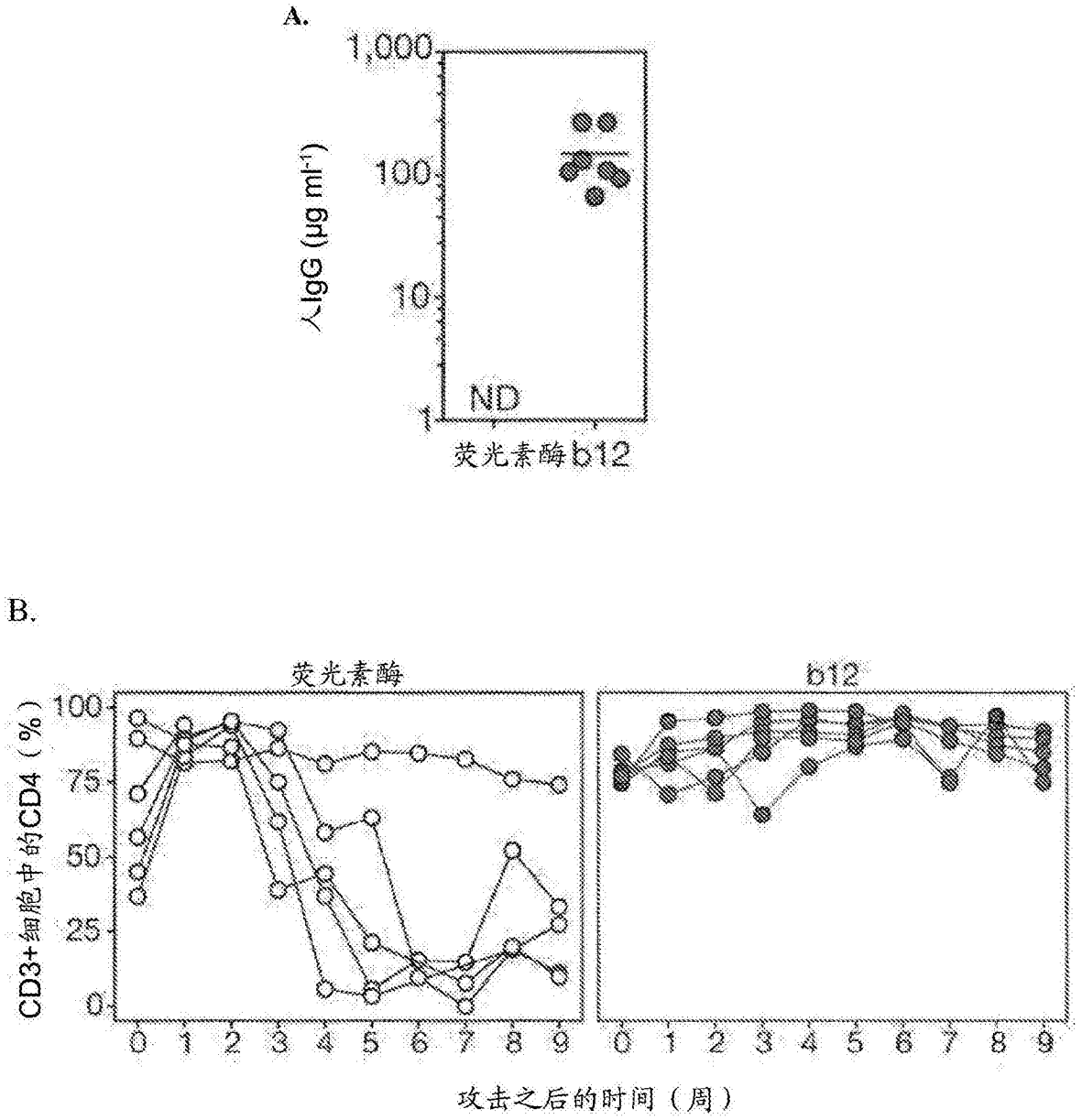

A.
1,000
100
10
1
ND
人IgG (μg ml-1)
荧光素酶b12
B.
荧光素酶
b12
CD3+细胞中的CD4（%）
100
75
50
25
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
攻击之后的时间（周）

图 8

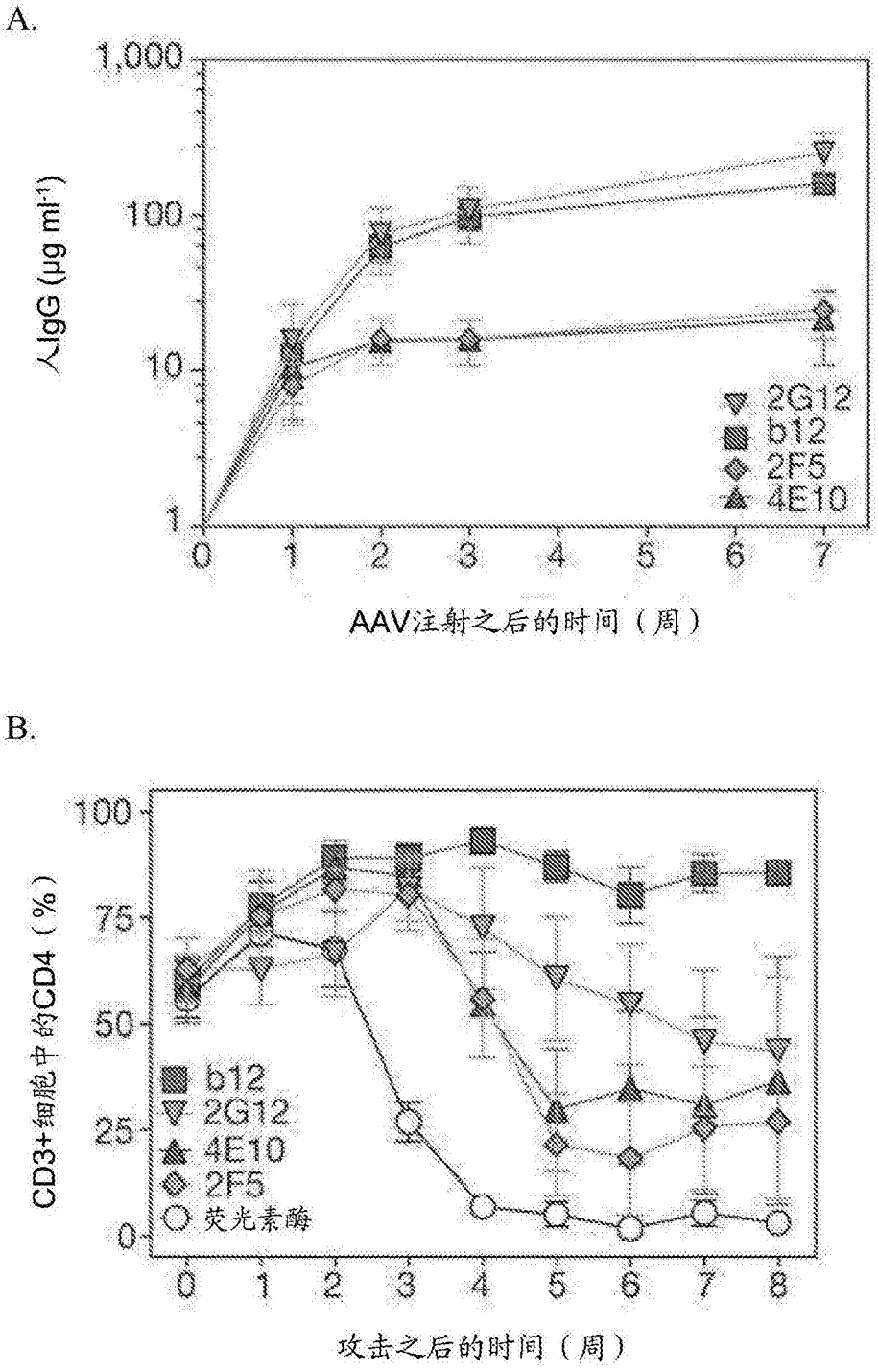
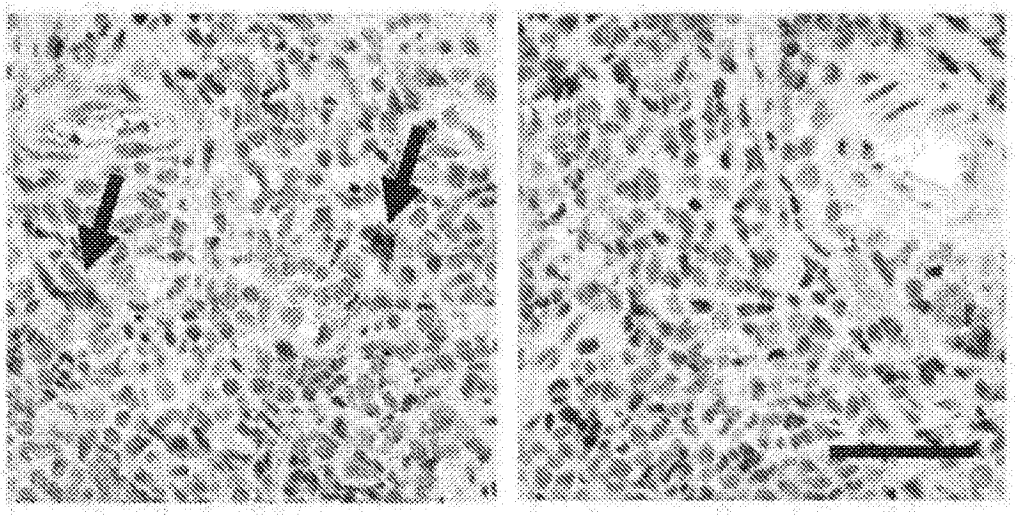

A.
1,000
100
10
1
人IgG (μg ml-1)
0 1 2 3 4 5 6 7
AAV注射之后的时间（周）
2G12
b12
2F5
4E10
B.
100
75
50
25
0
CD3+细胞中的CD4（%）
0 1 2 3 4 5 6 7 8
攻击之后的时间（周）
b12
2G12
4E10
2F5
荧光素酶

图 9

C.



D.

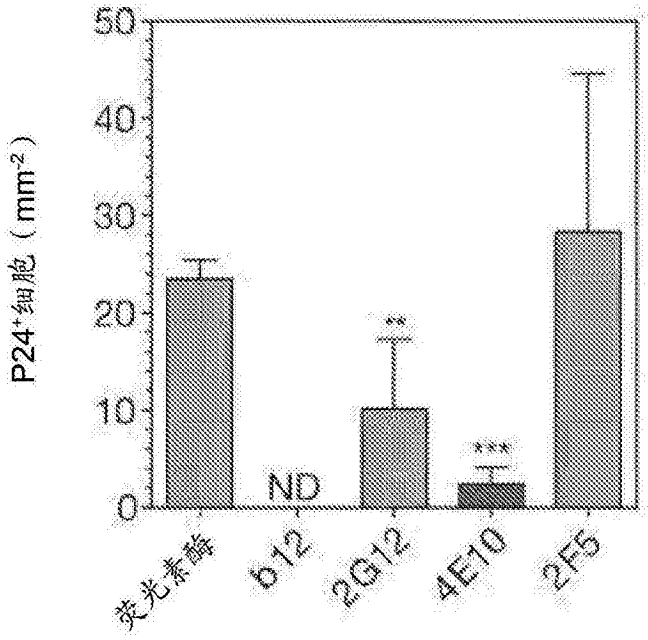
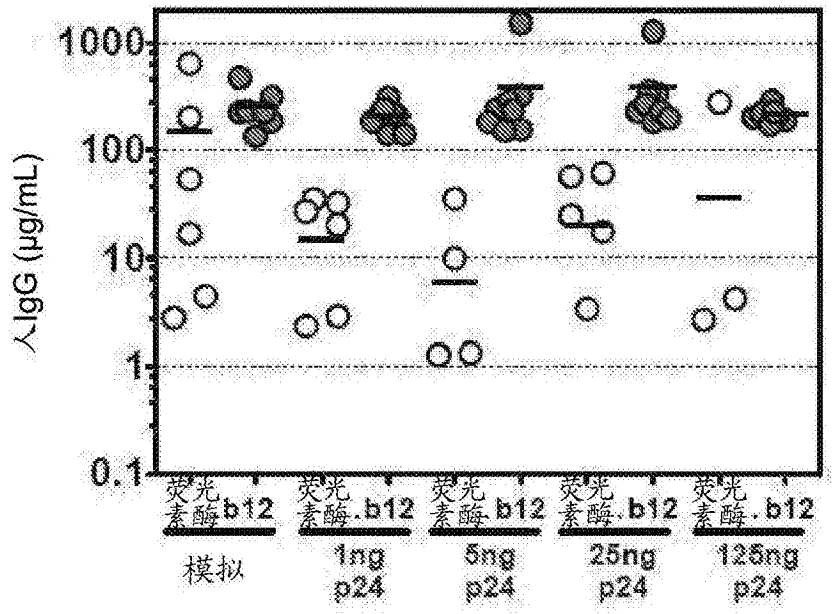


图 9（接上页）

A.


人IgG (μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
模拟
1ng p24
5ng p24
25ng p24
125ng p24

B.

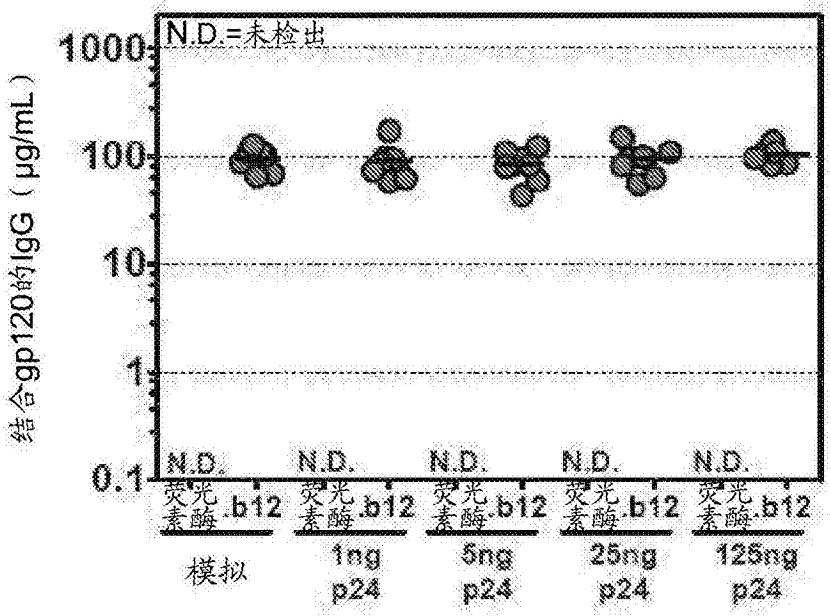

N.D.=未检出
结合gp120的IgG（μg/mL）
1000
100
10
1
0.1
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
荧光素酶.b12
模拟
1ng p24
5ng p24
25ng p24
125ng p24

图 10

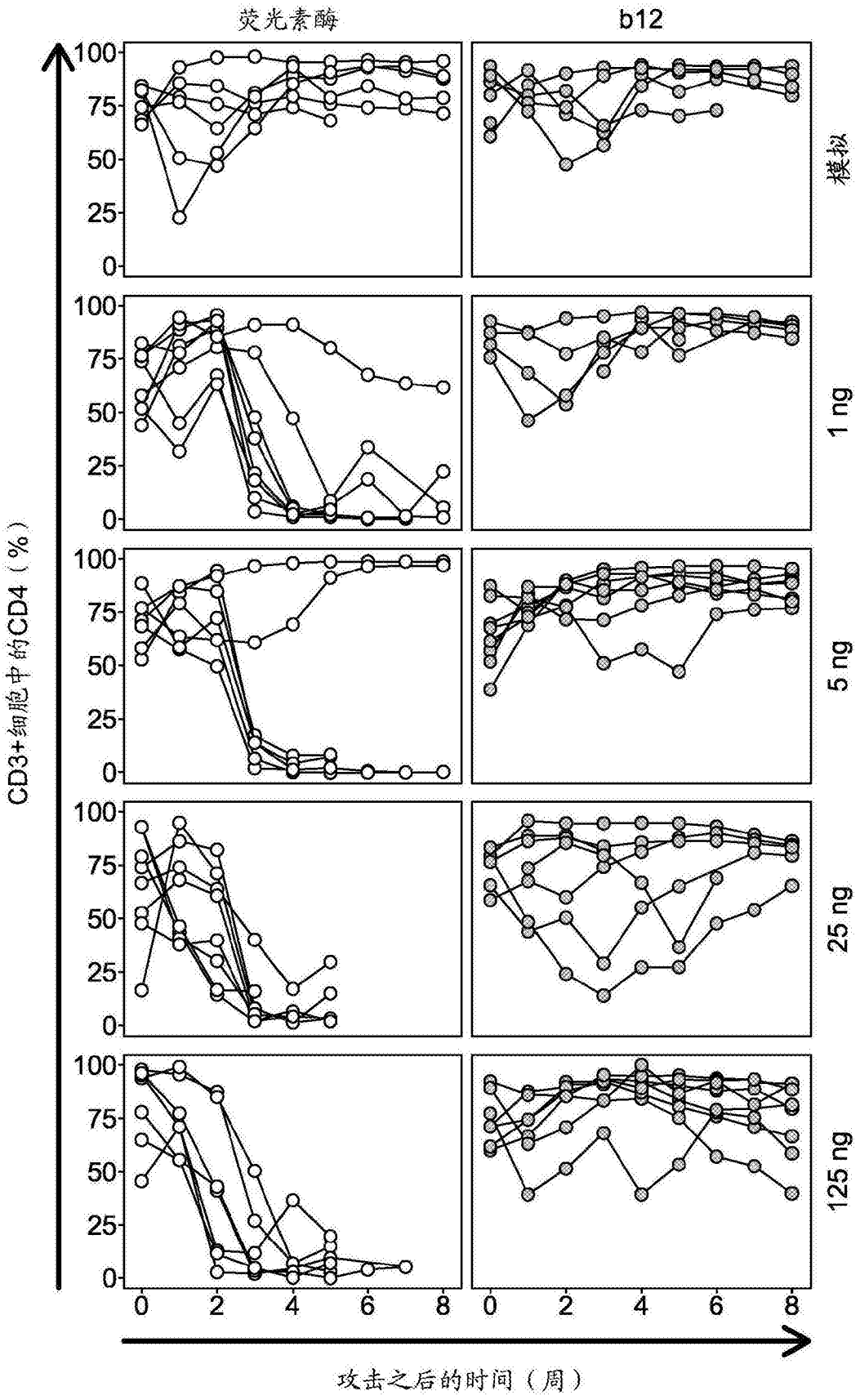
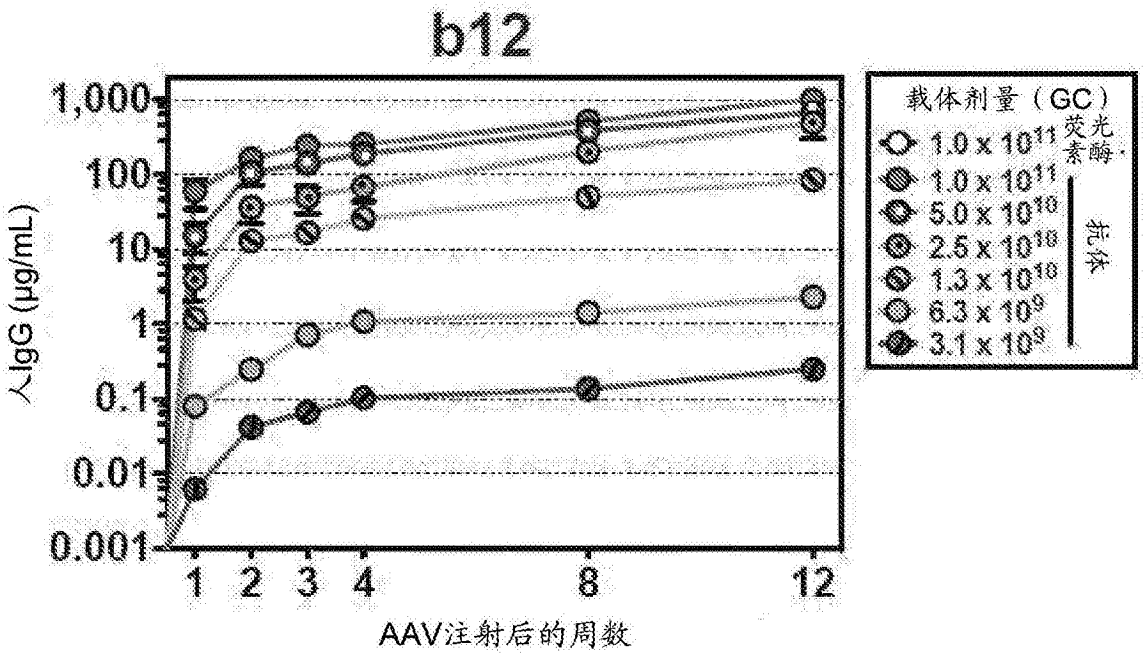

荧光素酶
b12
模拟
1 ng
5 ng
25 ng
125 ng
CD3+细胞中的CD4（%）
攻击之后的时间（周）
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8

图 11

A.


b12
1,000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
人IgG (μg/mL)
1 2 3 4 8 12
AAV注射后的周数
载体剂量（GC）
荧光素酶.
1.0 x 10^11
1.0 x 10^11
5.0 x 10^10
2.5 x 10^10
1.3 x 10^10
6.3 x 10^9
3.1 x 10^9
抗体

B.

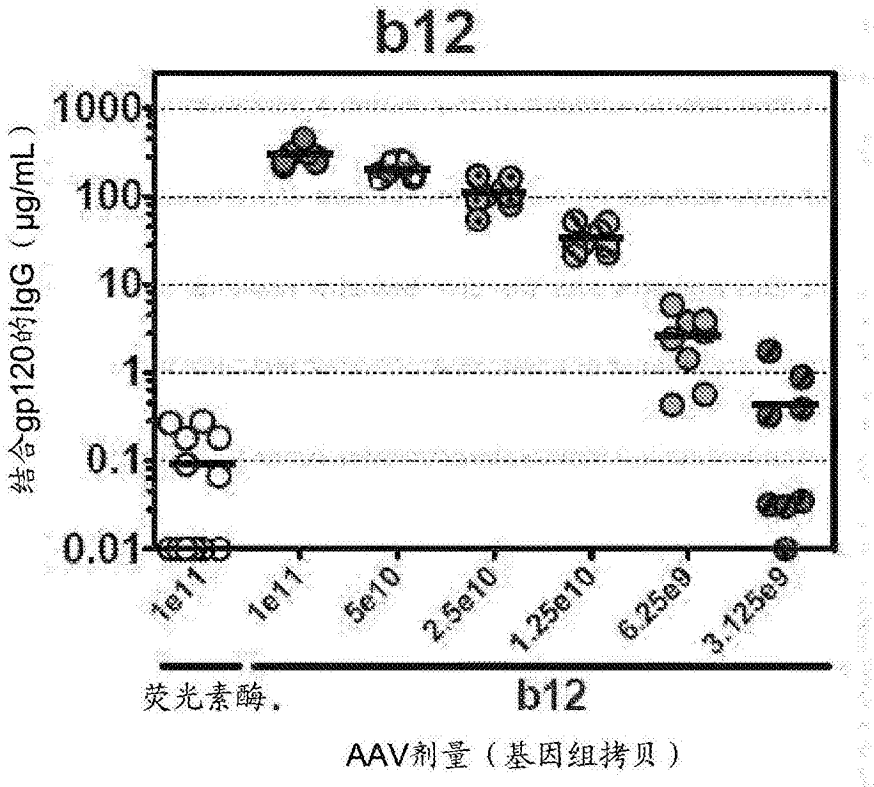

b12
1000
100
10
1
0.1
0.01
结合gp120的IgG（μg/mL）
1e11
1e11
5e10
2.5e10
1.25e10
6.25e9
3.125e9
荧光素酶.
b12
AAV剂量（基因组拷贝）

图 12

C.

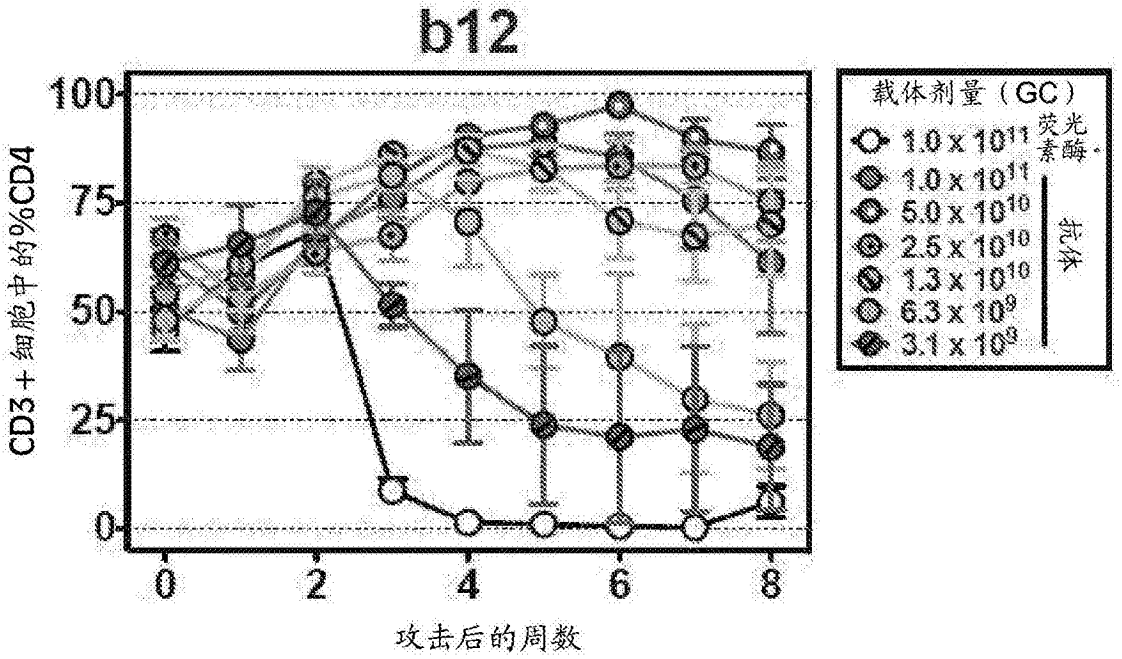
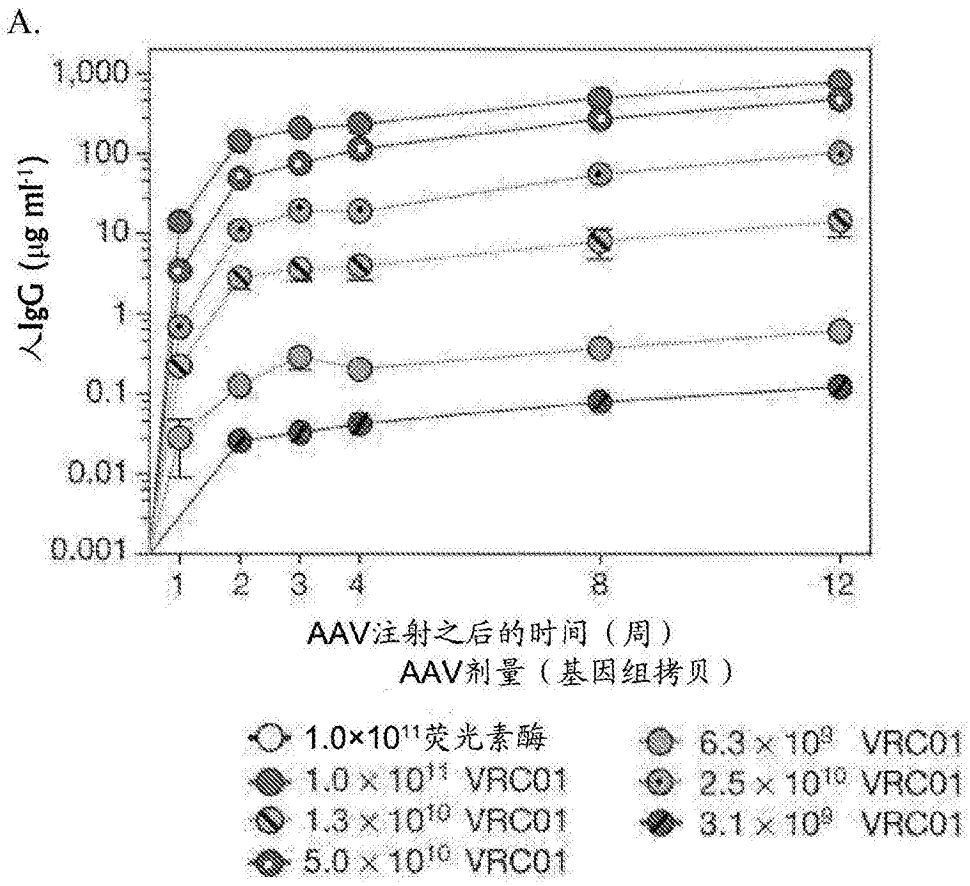

b12
CD3+细胞中的%CD4
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
攻击后的周数
载体剂量（GC）
1.0 x 10^11
1.0 x 10^11
5.0 x 10^10
2.5 x 10^10
1.3 x 10^10
6.3 x 10^9
3.1 x 10^9
荧光素酶
抗体

图 12（接上页）


A.
1,000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
人IgG (μg ml-1)
1
2
3
4
8
12
AAV注射之后的时间（周）
AAV剂量（基因组拷贝）
1.0×10^11荧光素酶
1.0 × 10^11 VRC01
1.3 × 10^10 VRC01
5.0 × 10^10 VRC01
6.3 × 10^9 VRC01
2.5 × 10^10 VRC01
3.1 × 10^9 VRC01

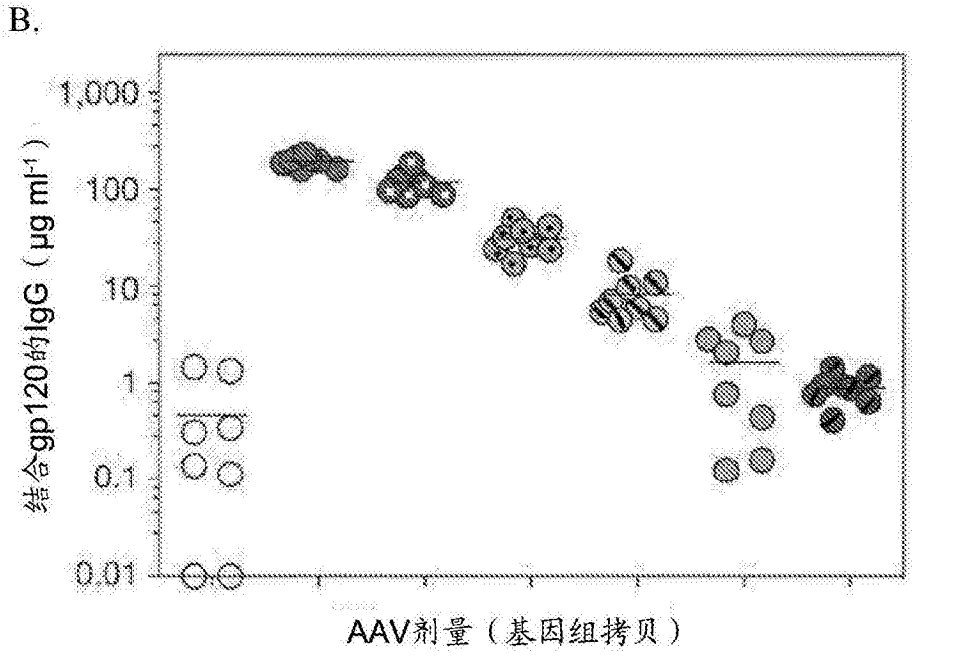

B.
1,000
100
10
1
0.1
0.01
结合gp120的IgG（μg ml-1）
AAV剂量（基因组拷贝）

图 13

C.

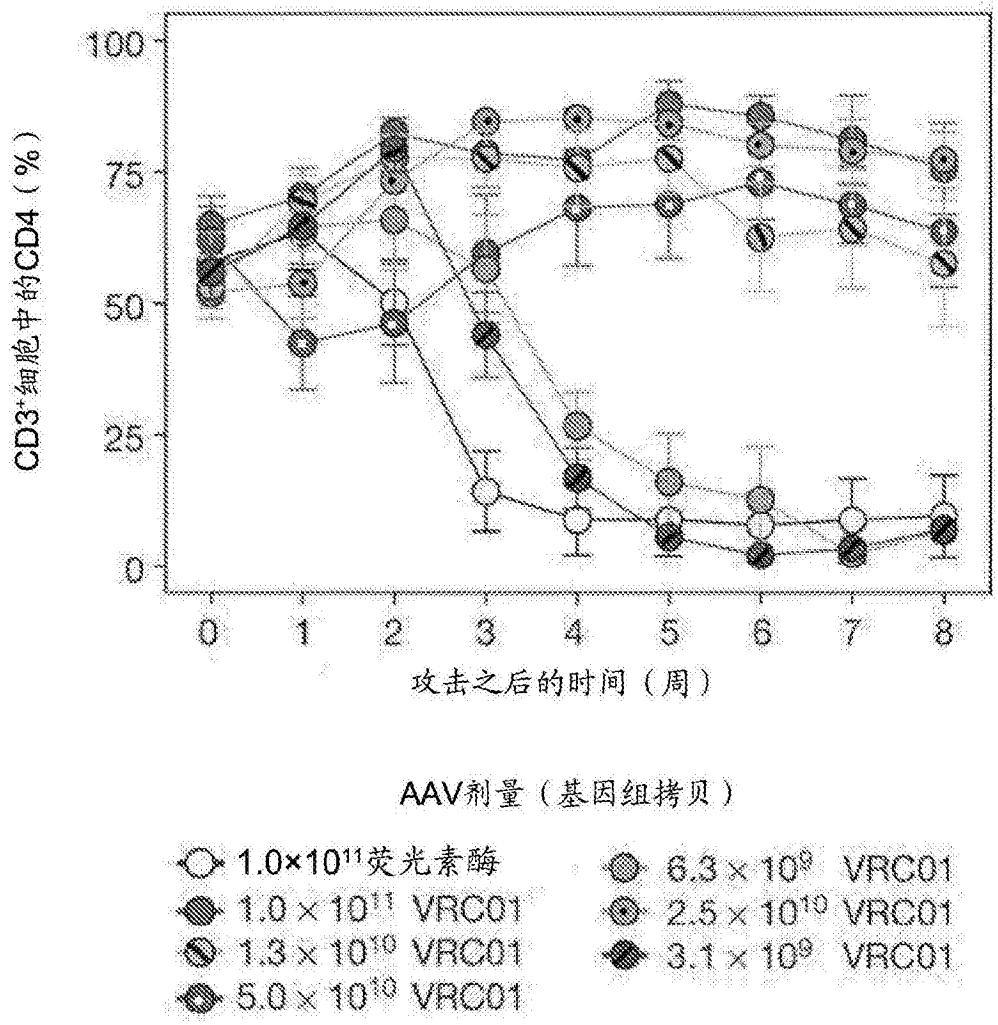

100
75
50
25
0
CD3+细胞中的CD4（%）
0 1 2 3 4 5 6 7 8
攻击之后的时间（周）
AAV剂量（基因组拷贝）
1.0×10^11荧光素酶
1.0 × 10^11 VRC01
1.3 × 10^10 VRC01
5.0 × 10^10 VRC01
6.3 × 10^9 VRC01
2.5 × 10^10 VRC01
3.1 × 10^9 VRC01

图 13（接上页）

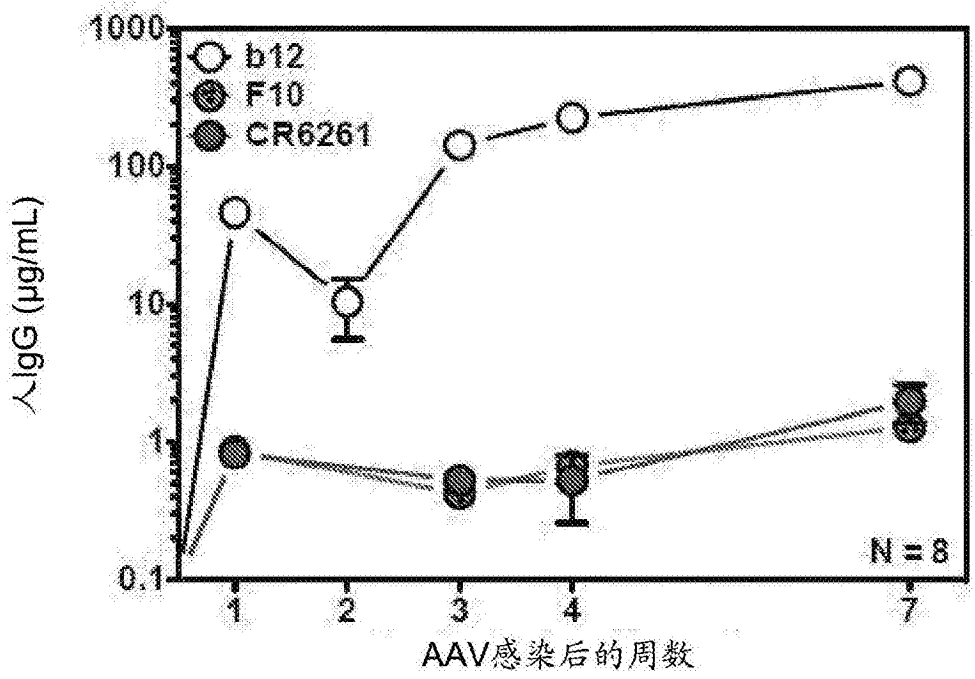
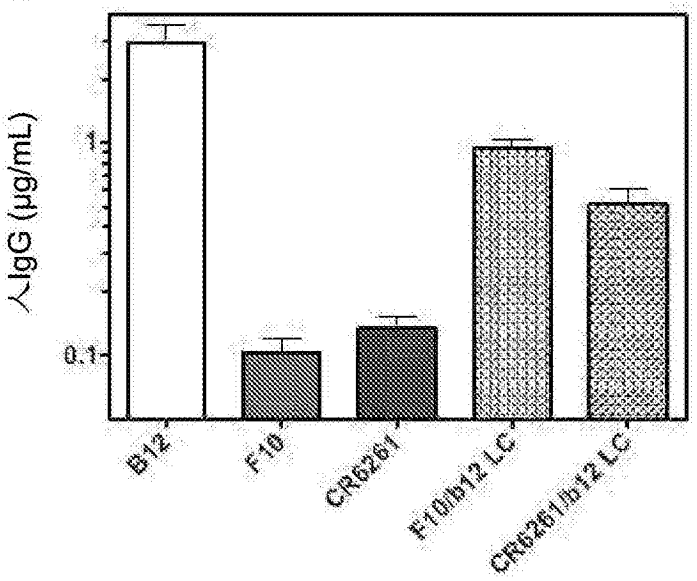


图 14

A.

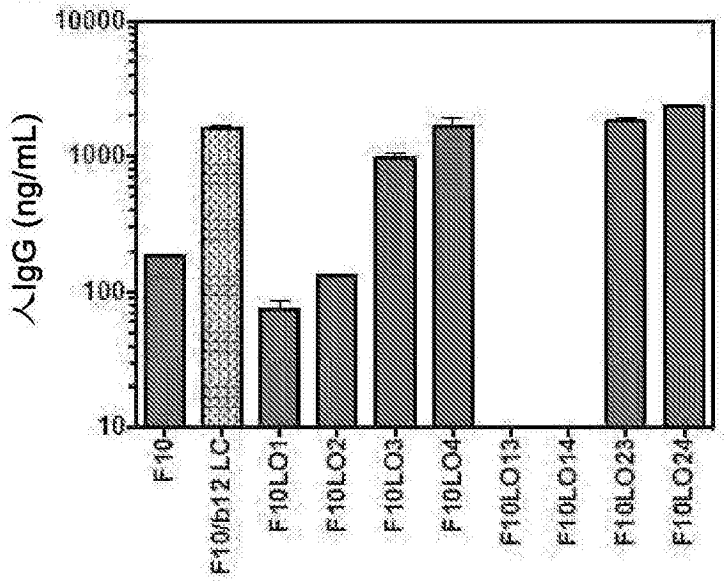


B.

缩写	替代的描述
LO1	5' b12 (6aa)
LO2	5' b12 (22aa)
LO3	3' b12 (6aa)
LO4	3' 4E10 (6aa)
LO13	5' b12 (6aa) + 3' b12 (6aa)
LO14	5' b12 (6aa) + 3' 4E10 (6aa)
LO23	5' b12 (22aa) + 3' b12 (6aa)
LO24	5' b12 (22aa) + 3' 4E10 (6aa)

图 15

C.


10000
1000
100
10
人IgG (ng/mL)
F10
F10/b12 LC
F10LO1
F10LO2
F10LO3
F10LO4
F10LO13
F10LO14
F10LO23
F10LO24

D.

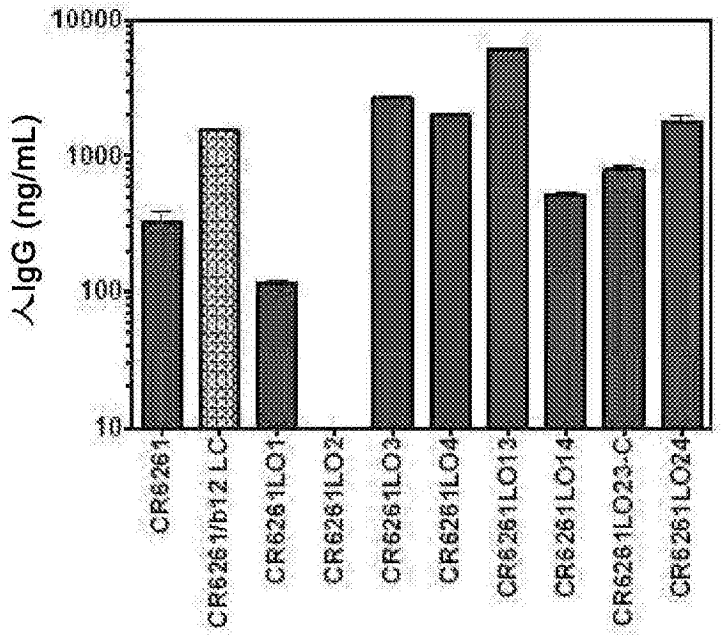
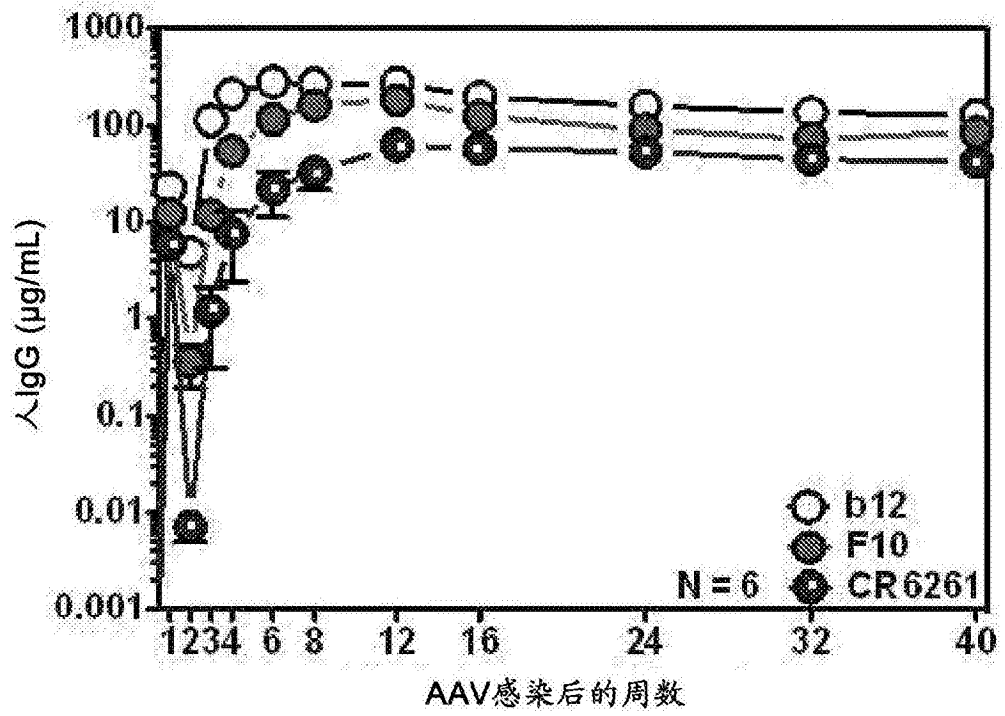

10000
1000
100
10
人IgG (ng/mL)
CR6261
CR6261/b12 LC
CR6261LO1
CR6261LO2
CR6261LO3
CR6261LO4
CR6261LO13
CR6261LO14
CR6261LO23-C
CR6261LO24

图 15（接上页）

A.


1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
人IgG (μg/mL)
b12
F10
CR6261
N = 6
1 2 3 4 6 8 12 16 24 32 40
AAV感染后的周数

B.

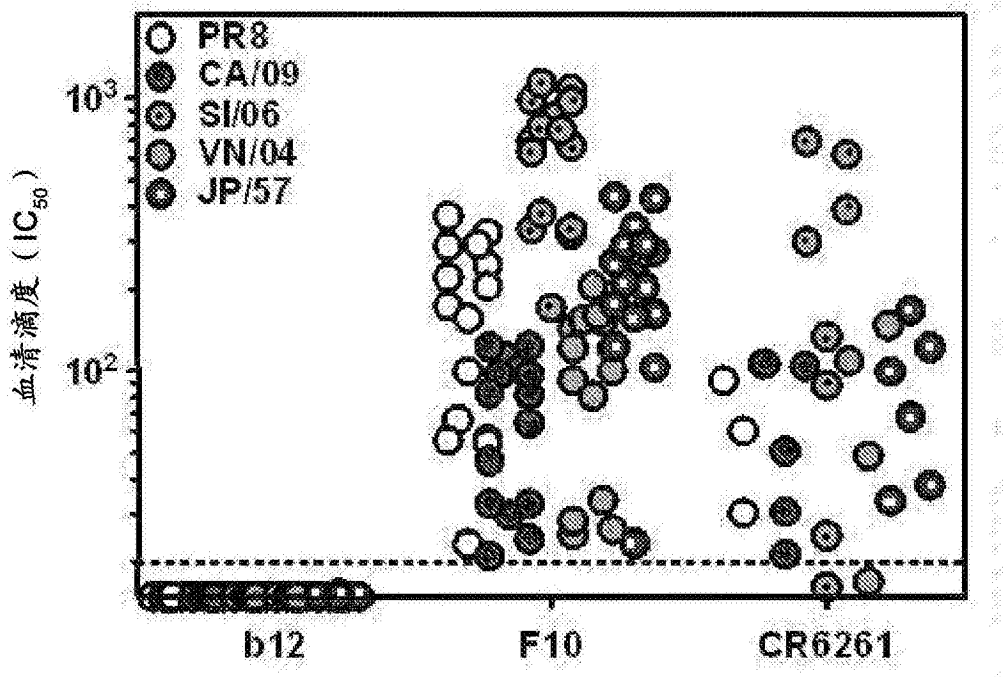

PR8
CA/09
SI/06
VN/04
JP/57
10^3
10^2
血清滴度（IC_{50}）
b12
F10
CR6261

图 16

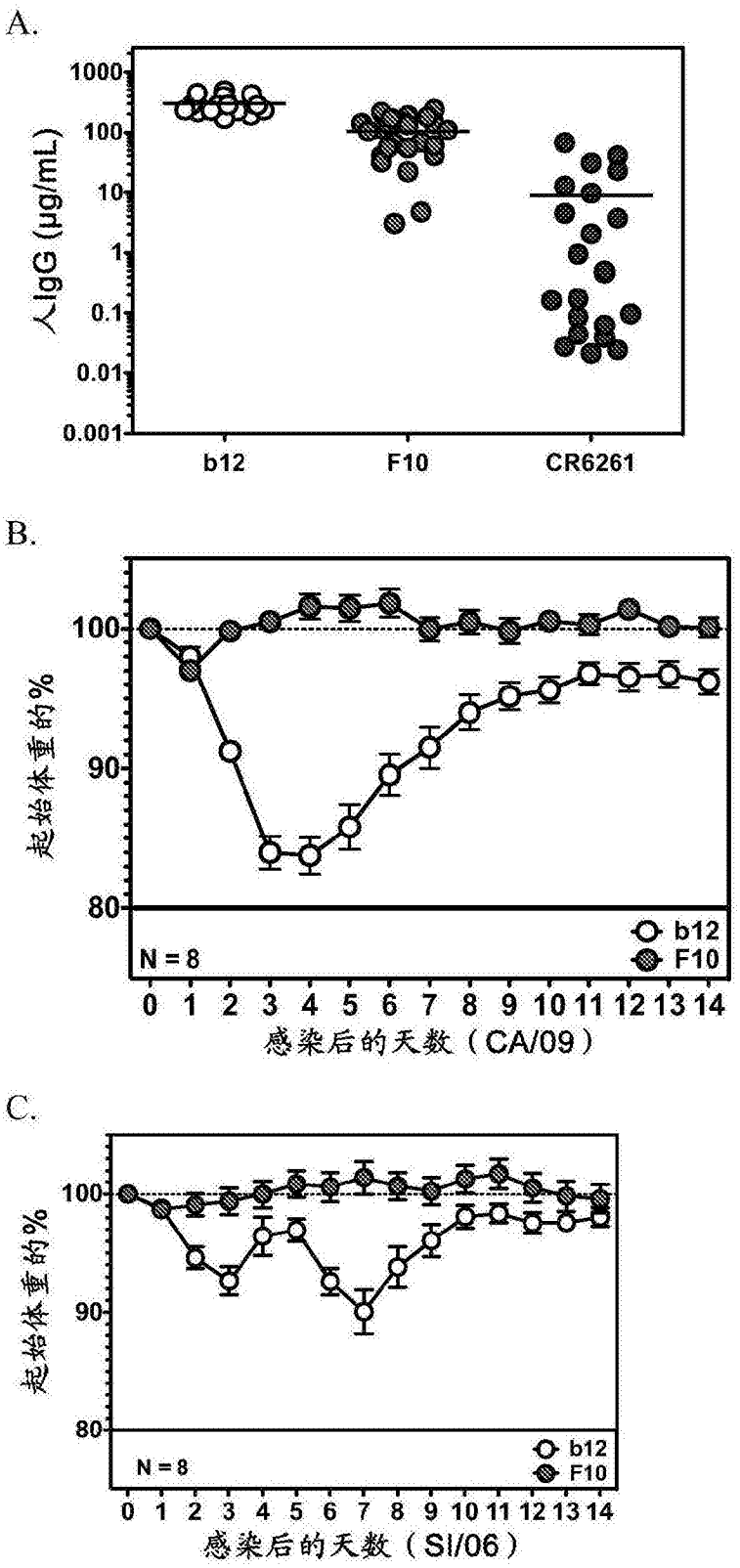
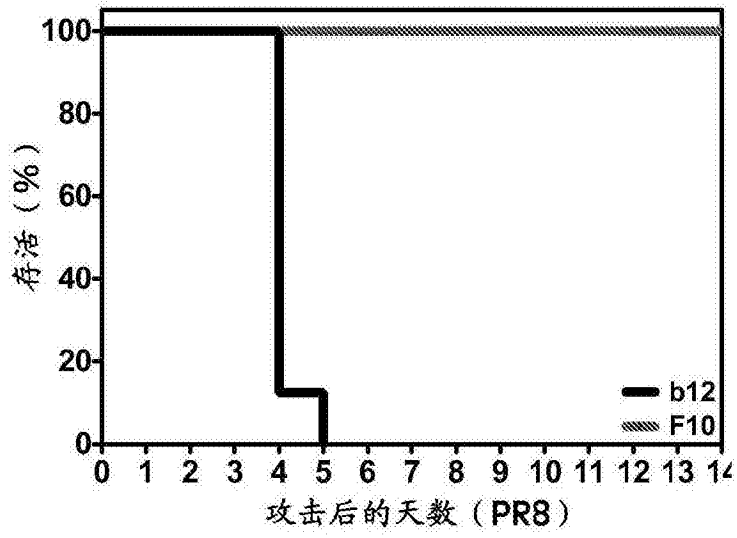

A.
人IgG (μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
b12
F10
CR6261
B.
起始体重的%
100
90
80
N = 8
b12
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
感染后的天数（CA/09）
C.
起始体重的%
100
90
80
N = 8
b12
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
感染后的天数（SI/06）

图 17

D.


100
80
60
40
20
0
存活（%）
b12
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
攻击后的天数（PR8）

E.

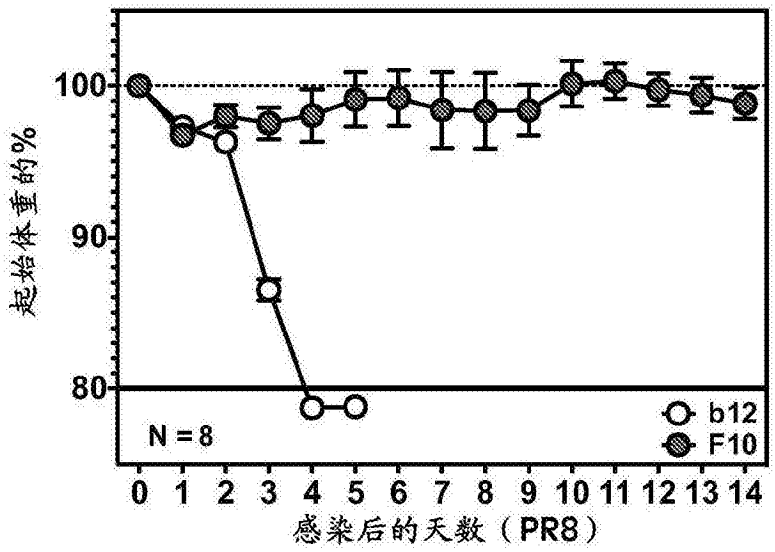
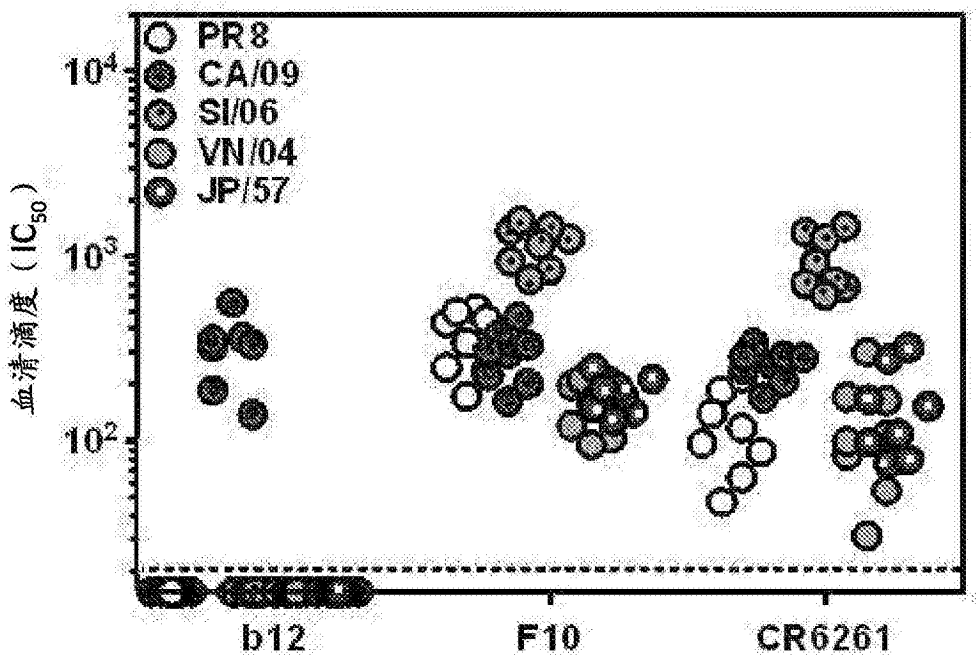

100
90
80
起始体重的%
N = 8
b12
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
感染后的天数（PR8）

图 17（接上页）

F.


PR8
CA/09
SI/06
VN/04
JP/57
10^4
10^3
10^2
血清滴度（IC_{50}）
b12
F10
CR6261

G.

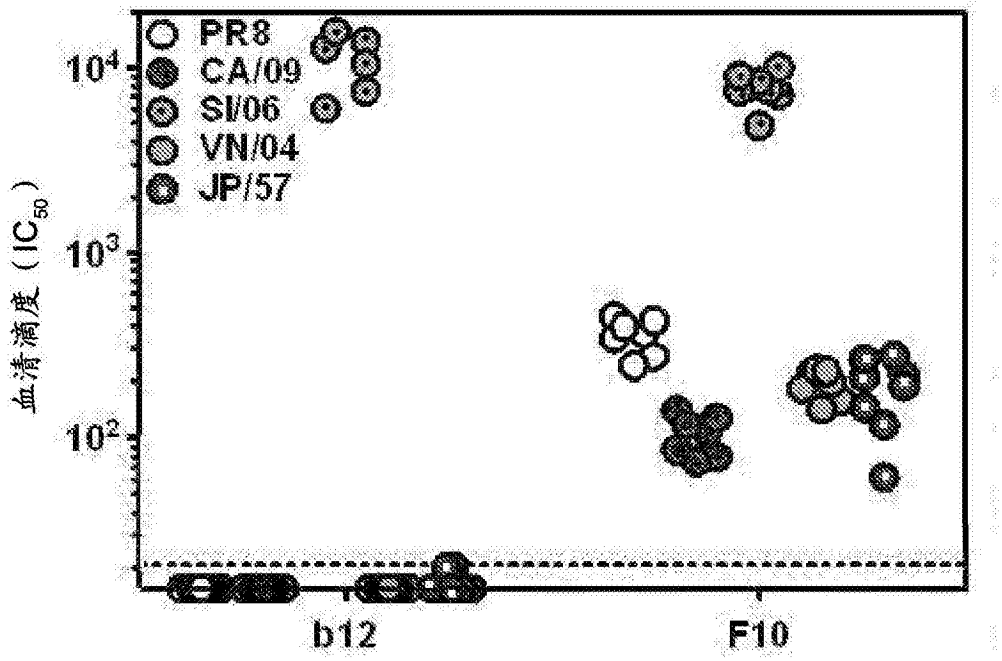

PR8
CA/09
SI/06
VN/04
JP/57
10^4
10^3
10^2
血清滴度（IC_{50}）
b12
F10

图 17（接上页）

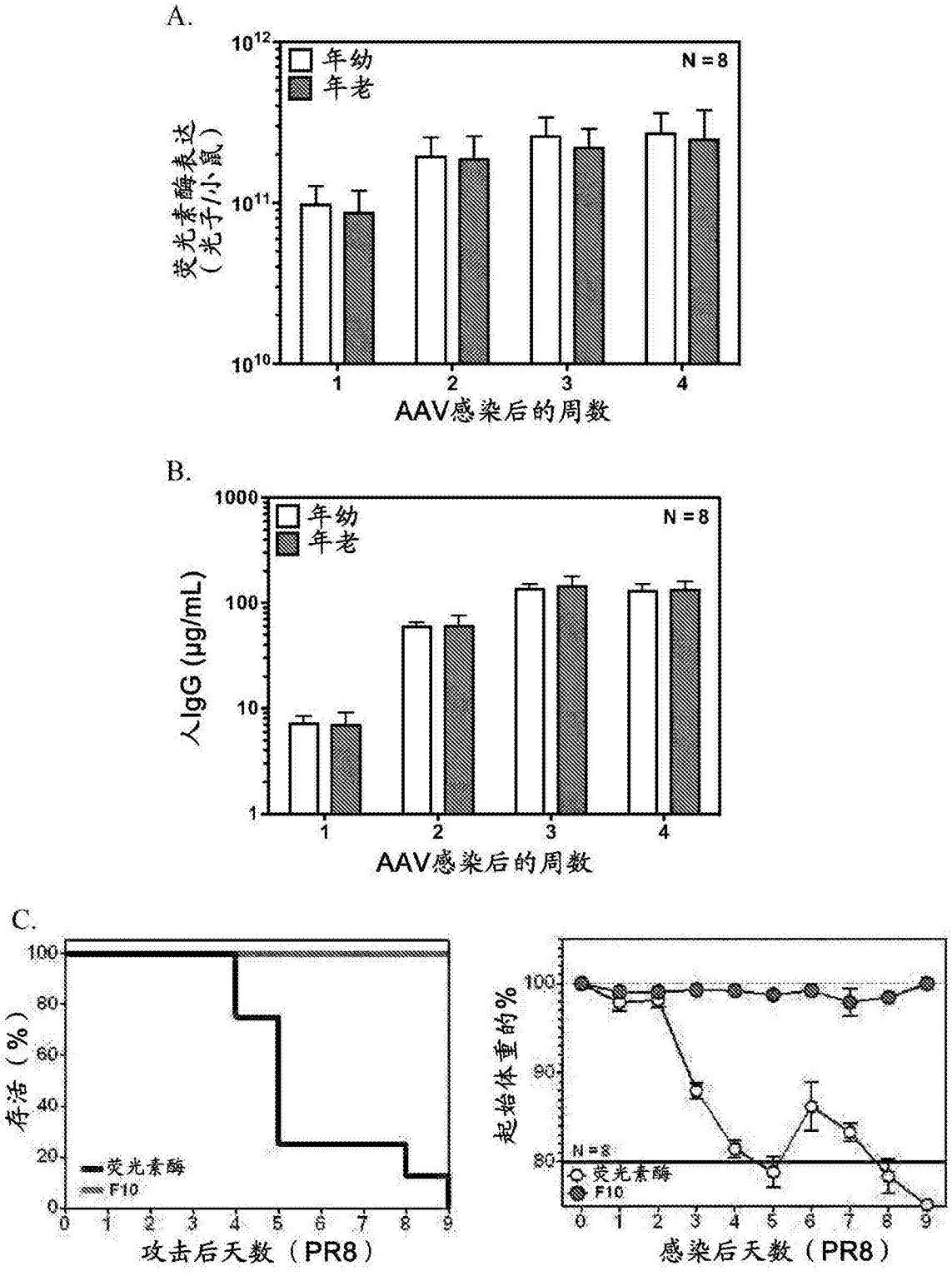
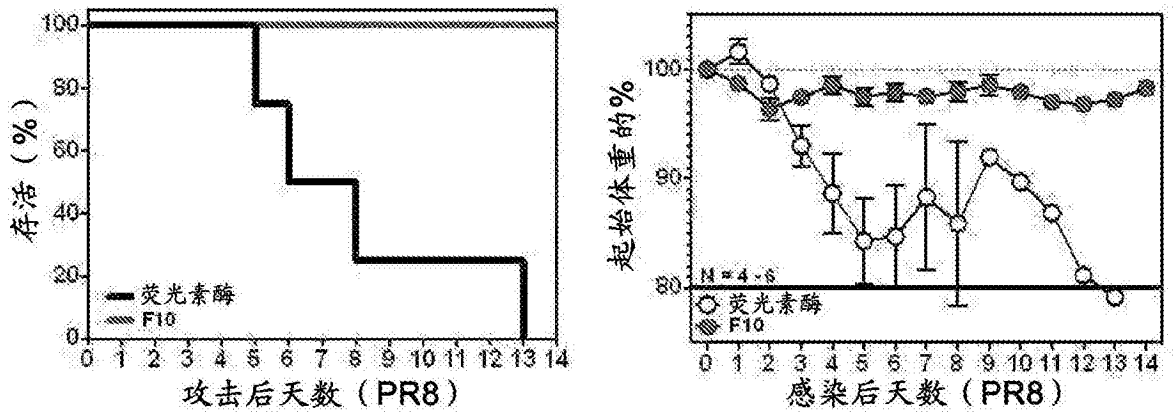

A.
年幼
年老
N = 8
荧光素酶表达（光子/小鼠）
AAV感染后的周数
B.
年幼
年老
N = 8
人IgG (μg/mL)
AAV感染后的周数
C.
存活（%）
荧光素酶
F10
攻击后天数（PR8）
起始体重的%
N = 8
荧光素酶
F10
感染后天数（PR8）

图 18

D.



E.

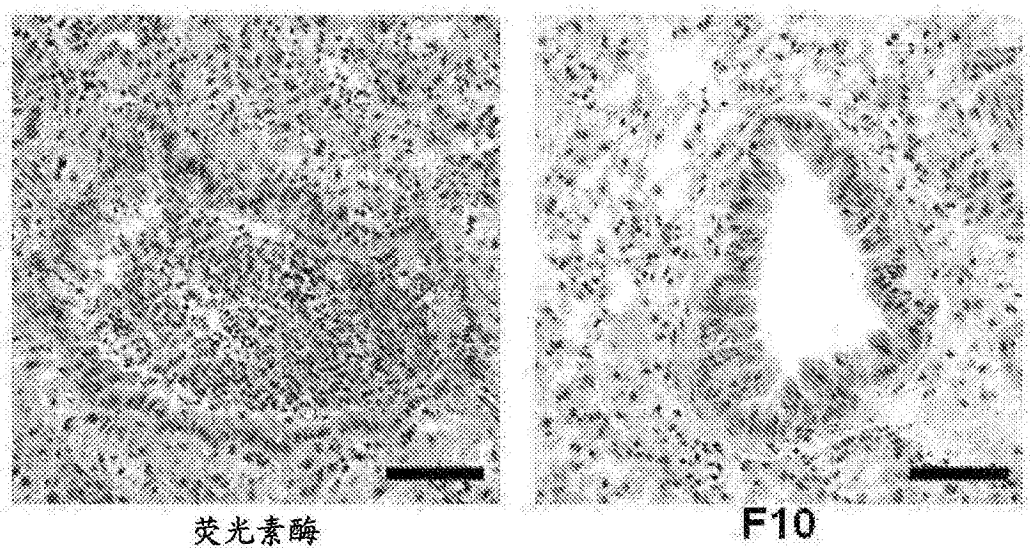
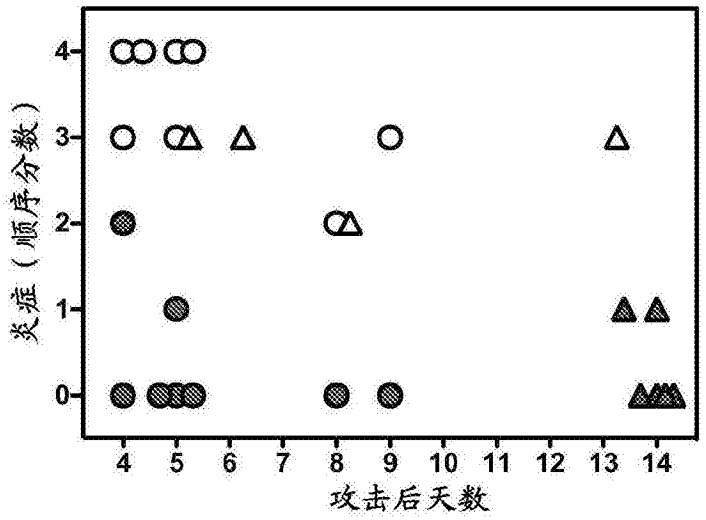


图 18（接上页）

F.


炎症（顺序分数）
0
1
2
3
4
4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
攻击后天数

G.

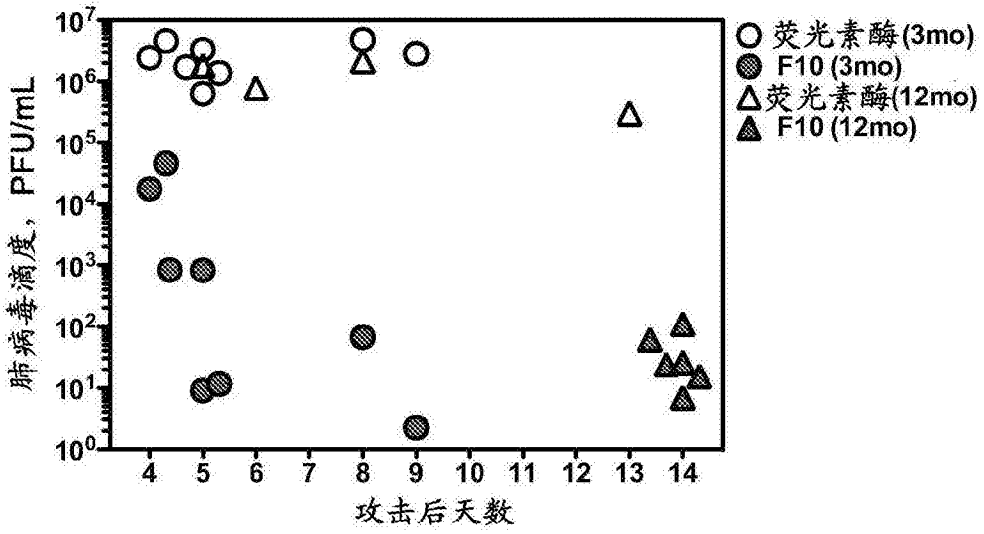
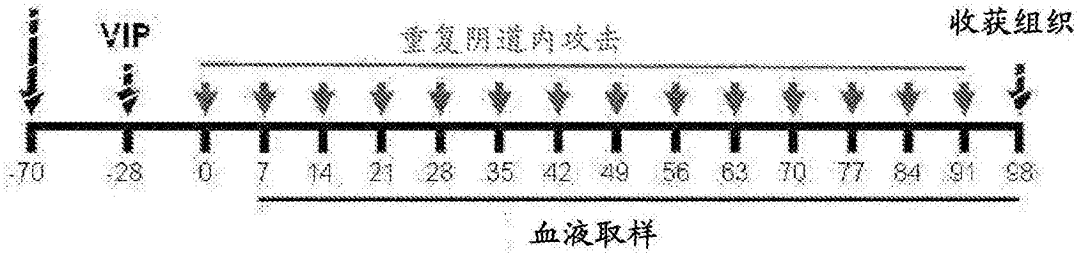

肺病毒滴度，PFU/mL
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
攻击后天数
荧光素酶(3mo)
F10 (3mo)
荧光素酶(12mo)
F10 (12mo)

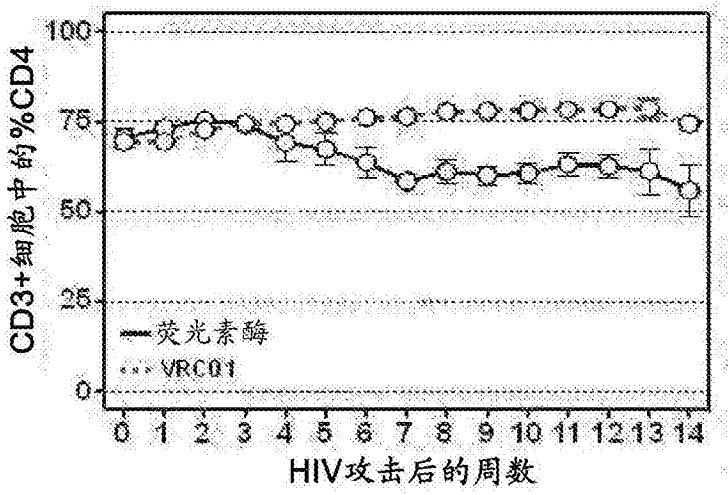
图 18（接上页）

A.

手术植入BLT组织



B.



C.

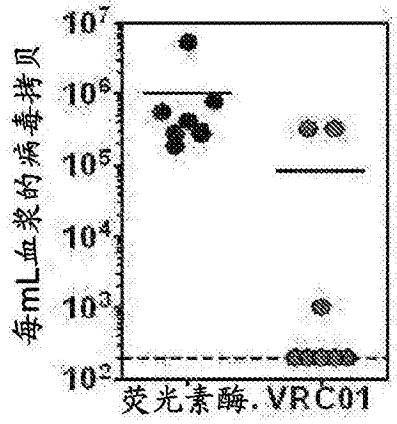


图 19

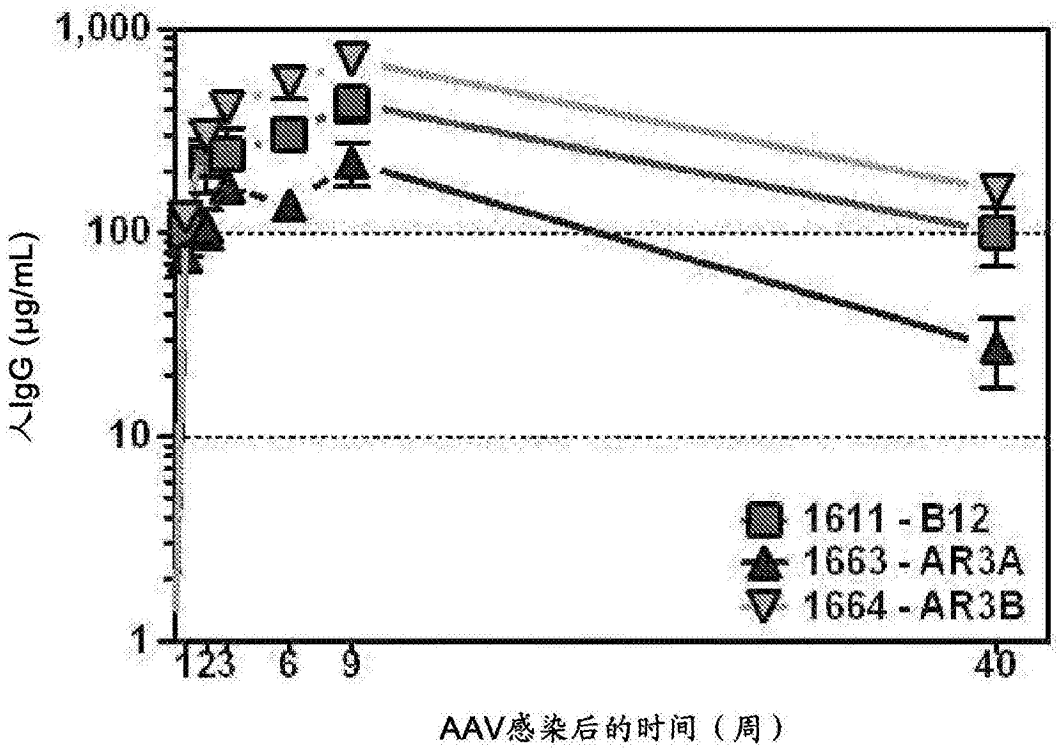

1,000
100
10
1
人IgG (μg/mL)
1611 - B12
1663 - AR3A
1664 - AR3B
1
2
3
6
9
40
AAV感染后的时间（周）

图 20