



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111433368 A

(43)申请公布日 2020.07.17

(21)申请号 201880077904.0

(22)申请日 2018.10.02

(30)优先权数据

62/566,979 2017.10.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/053919 2018.10.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/070674 EN 2019.04.11

(71)申请人 美国基因技术国际有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 T·拉胡森 C·D·保扎

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖 陈扬扬

(51)Int.Cl.

C12N 15/86(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

C12N 15/67(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

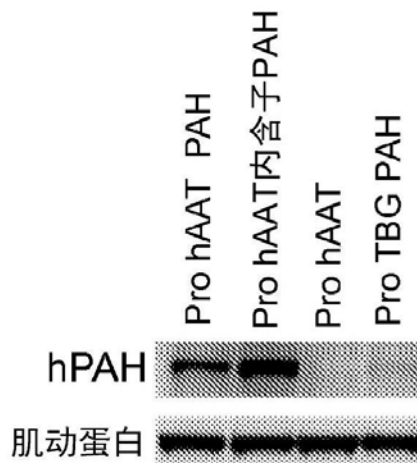
权利要求书2页 说明书57页 附图17页

(54)发明名称

具有启动子和增强子组合的载体用于治疗
苯丙酮尿症

(57)摘要

公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该慢病毒载体系统包括治疗载体。该慢病毒载体系统产生慢病毒颗粒,用于上调患有苯丙酮尿症(PKU)的对象细胞中PAH表达。



1. 一种包含治疗性载物部分的病毒载体,其中,所述治疗性载物部分包含:
PAH序列或其变体;
启动子;和
肝特异性增强子,
其中所述PAH序列或其变体由所述启动子和肝特异性增强子操作性地控制。
2. 如权利要求1所述的病毒载体,其中,所述肝特异性增强子包含凝血酶原增强子。
3. 如权利要求2所述的病毒载体,其中,所述启动子包含肝特异性启动子。
4. 如权利要求3所述的病毒载体,其中,所述肝特异性启动子包含hAAT启动子。
5. 如权利要求1所述的病毒载体,其中,所述PAH序列或其变体被截短。
6. 如权利要求5所述的病毒载体,其中,所述PAH序列或其变体被截短部分是所述PAH序列或其变体的3'非翻译区(UTR)。
7. 如权利要求1所述的病毒载体,其中,所述治疗性载物部分还包含β珠蛋白内含子。
8. 如权利要求1所述的病毒载体,其中,所述治疗性载物部分还包含至少一个肝细胞核因子结合位点。
9. 如权利要求8所述的病毒载体,其中,所述至少一个肝细胞核因子结合位点置于所述凝血酶原增强子的上游。
10. 如权利要求8所述的病毒载体,其中,所述至少一个肝细胞核因子结合位点置于所述凝血酶原增强子的下游。
11. 如权利要求1所述的病毒载体,其中,所述PAH序列或其变体包含与SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%百分比相同性的序列。
12. 如权利要求11所述的病毒载体,其中,所述PAH序列或其变体包含SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。
13. 如权利要求2所述的慢病毒载体,其中,所述凝血酶原增强子包含与SEQ ID NO:5具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%百分比相同性的序列。
14. 如权利要求2所述的病毒载体,其中,所述凝血酶原增强子的序列包含SEQ ID NO:5。
15. 如权利要求4所述的病毒载体,其中,所述hAAT启动子的序列包含SEQ ID NO:6。
16. 如权利要求5所述的病毒载体,其中,所述β珠蛋白内含子的序列包含SEQ ID NO:7或8。
17. 如权利要求6所述的病毒载体,其中,所述肝细胞核因子结合位点的序列包含SEQ ID NO:9-12中的任一项。
18. 如权利要求1所述的病毒载体,其中,所述治疗性载物部分还包含至少一种小RNA序列,其能够结合至少一种预定互补mRNA序列。
19. 如权利要求18所述的病毒载体,其中,所述至少一种小RNA序列靶向含有全长UTR的互补mRNA序列。
20. 如权利要求18所述的病毒载体,其中,所述至少一种预定互补mRNA序列是PAH mRNA序列。
21. 如权利要求18所述的病毒载体,其中,所述至少一种小RNA序列包含shRNA。

22. 如权利要求18所述的病毒载体,其中,所述至少一种小RNA序列受控于第一启动子,而所述PAH序列或其变体受控于第二启动子。

23. 如权利要求20所述的病毒载体,其中,所述第一启动子包含H1启动子。

24. 如权利要求20所述的病毒载体,其中,所述第二启动子包含肝特异性启动子。

25. 如权利要求24所述的病毒载体,其中,所述肝特异性启动子包含hAAT启动子。

26. 如权利要求18所述的病毒载体,其中,所述至少一种小RNA序列包含与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%百分比相同性的序列。

27. 如权利要求21所述的病毒载体,其中,所述至少一种小RNA序列包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14。

28. 如权利要求1所述的病毒载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

29. 一种能够感染靶细胞的慢病毒颗粒,所述慢病毒颗粒包含:

针对感染所述靶细胞优化的包膜蛋白;和

如权利要求1所述的病毒载体。

30. 如权利要求29所述的慢病毒颗粒,其中,所述靶细胞是肝细胞,肌肉细胞,上皮细胞,内皮细胞,神经细胞,神经内分泌细胞,内分泌细胞,淋巴细胞,骨髓细胞,存在于实体器官的细胞,或造血谱系,造血干细胞或前体造血干细胞的细胞。

31. 一种治疗对象中PKU的方法,所述方法包括向所述对象给予治疗有效量的权利要求29或30所述的慢病毒颗粒。

32. 一种预防对象中PKU的方法,所述方法包括向所述对象给予治疗有效量的权利要求29或30所述的慢病毒颗粒。

33. 如权利要求31或32所述的方法,其还包括诊断对象中与PKU表型相关联的PKU基因型。

34. 如权利要求31或32所述的方法,其中,所述对象在子宫内。

35. 如权利要求33所述的方法,其中,所述诊断发生在所述对象的产前筛查期间。

36. 如权利要求33所述的方法,其中所述诊断发生在体外。

37. 如权利要求31或32所述的方法,其中,所述治疗有效量的慢病毒颗粒包含多个单一剂量的慢病毒颗粒。

38. 如权利要求31或32所述的方法,其中,所述治疗有效量的慢病毒颗粒包含单一剂量的慢病毒颗粒。

具有启动子和增强子组合的载体用于治疗苯丙酮尿症

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年10月2日提交的标题为“具有启动子和增强子组合的载体用于治疗苯丙酮尿症 (VECTORS WITH PROMOTER AND ENHANCER COMBINATIONS FOR TREATING PHENYLKETONURIA)”的美国临时专利申请号62/566,979的优先权,其公开内容通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开的方面涉及用于治疗苯丙酮尿症 (PKU) 的基因药物。更具体地,本公开的方面涉及慢病毒载体,包括含有PAH的慢病毒载体,所述慢病毒载体的表达通过各种启动子和增强子组合控制。

[0004] 背景

[0005] 苯丙酮尿症 (PKU) 指这样的疾病的异质性组,如果不进行治疗,其可以导致受影响儿童的生长发育受损,智力障碍,癫痫和行为问题。高苯丙氨酸血症导致智力障碍的机制反映了高剂量苯丙氨酸令人惊讶的毒性,并且涉及神经系统组织的髓鞘过少或脱髓鞘。在北美洲,PKU的平均报告发病率为每12,000人中有1人,对男性和女性的影响相同。该疾病最常见于欧洲或美洲原住民血统的人,并在地中海东部地区达到更高的水平。

[0006] 已在出生后一个月内证实了PKU患者的神经变化,而成年PKU患者的磁共振成像 (MRI) 显示了大脑中的白质病灶。这些病灶的大小和数量与血液苯丙氨酸浓度直接相关。相较于对照对象,患有PKU的青少年和成年人的认知特征 (cognitive profile) 可能包括IQ、处理速度、运动控制和抑制能力显著降低,以及注意力测试的表现降低。

[0007] 大多数的PKU由肝苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 缺乏所导致。PAH是一种多聚体肝酶,其在分子氧和催化量的四氢生物蝶呤 (BH_4) (它的非蛋白质辅因子) 的情况下催化苯丙氨酸 (Phe) 羟基化为酪氨酸 (Tyr)。在没有表达足够PAH的情况下,血液中的苯丙氨酸水平升高,导致高苯丙氨酸血症以及对PKU患者的有害副作用。PAH活性降低或缺失可能会导致缺乏酪氨酸及其下游产物,包括黑色素,1-甲状腺素和儿茶酚胺神经递质,其包括多巴胺。

[0008] PKU可能由PAH中的突变和/或PAH辅因子 (即 BH_4) 合成或再生中的缺陷所导致。值得注意的是,已经证明多种PAH突变将影响内质网中的蛋白质折叠,由于蛋白质结构中减弱或在很大程度上消除酶催化活性的小缺失 (13%) 和错义突变 (63%),这将导致降解和/或聚合加速。

[0009] 通常,根据血浆Phe水平,对Phe的饮食耐受性以及治疗的潜在反应性,使用三个主要表型组对PKU进行分类。这些组包括经典PKU ($Phe > 1200 \mu M$),非典型或轻度PKU (Phe为 $600-1200 \mu M$) 和永久性轻度高苯丙氨酸血症 (HPA, $Phe 120-600 \mu M$)。

[0010] PKU的检测依赖于通用新生儿筛查 (NBS)。在美国所有50个州中都必须进行的筛查中,测试收集自后脚跟 (heel stick) 的一滴血液的苯丙氨酸水平。

[0011] 当前,对Phe和 BH_4 补充的终生饮食限制是对PKU仅有的两种可用治疗选择,其中早期治疗干预对于确保受影响婴儿的最佳临床结局而言至关重要。然而,昂贵的药物和特殊

的低蛋白食品给患者带来沉重负担,尤其是在私人健康保险未完全涵盖这些产品的情况下,其可能导致营养不良,社会心理或神经认知并发症。此外,BH₄疗法主要对于与BH₄生物合成缺陷相关的轻度高苯丙氨酸血症有效,然而仅有20-30%的轻度或经典PKU患者对此有反应。因此,迫切需要的新PKU治疗方式,以替代繁重的Phe限制饮食。因此,需要开发一种用于治疗苯丙酮尿症的替代方法。

[0012] 基因药物有可能有效治疗PKU。出于疾病治疗或预防目的,基因药物可能涉及传递和表达遗传构建体。基因构建体的表达可以通过各种启动子、增强子和/或其组合来调节。

发明内容

[0013] 在本公开的方面之中,病毒载体包含治疗性载物部分,其中治疗性载物部分包含PAH序列或其变体,启动子,肝特异性增强子,其中所述PAH序列或其变体由启动子和肝特异性增强子操作性地控制。

[0014] 在实施方式中,肝特异性增强子包含凝血酶原增强子。在实施方式中,启动子是肝特异性启动子。在实施方式中,肝特异性启动子包含hAAT启动子。在实施方式中,治疗性载物部分还包含β珠蛋白内含子。在实施方式中,治疗性载物部分还包含至少一个肝细胞核因子结合位点。在实施方式中,至少一个肝细胞核因子结合位点置于凝血酶原增强子的上游。在实施方式中,至少一个肝细胞核因子结合位点置于凝血酶原增强子的下游。

[0015] 一些实施方式中,PAH序列或其变体被截短。在实施方式中,被截短的PAH序列或其变体的部分是PAH序列或其变体的3'非翻译区(UTR)。

[0016] 一些实施方式中,PAH序列或其变体包含与下述序列具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%百分比相同性的序列:

[0017] ATGTCCACTGCGGTCCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGGAACTCTCTGACTTTGGACAGGAAACAAGCTATATTGAAGACAACCTGCAATCAAAATGGTGCCATATCACTGATCTTCTCACTCAAAGAAGAAGTTGGTGCATTGCCAAAGTATTGCGCTTATTTGAGGAGAATGATGTAAACCTGACCCACATTGAATCTAGACCTTCTCGTTTAAAGAAAGATGAGTATGAATTTTTCACCCATTTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACAAACATCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACTGTCCATGAGCTTTCACGAGATAAGAAGAAAGACACAGTGCCCTGGTTCCCAAGAACCATTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCGGAACTGGATGCTGACCACCCTGGTTTTAAAGATCCTGTGTACCGTGCAAGACGGAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTACAACCTACCGCCATGGGCAGCCCATCCCTCGAGTGGAATACATGGAGGAAGAAAAGAAAACATGGGGCACAGTGTTCAAGACTCTGAAGTCCTTGATATAAAACCATGCTTGCTATGAGTACAATCACATTTTCCACTTCTTGAAAAGTACTGTGGCTTCCATGAAGATAACATTCCCCAGCTGGAAGACGTTTCTCAATTCCTGCAGACTTGCACTGGTTTCCGCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTTTCCTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTTCCGAGTCTTCCACTGCACACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCATGTATACCCCCGAACCTGACATCTGCCATGAGCTGTTGGGACATGTGCCCTTGTTTTTCAGATCGCAGCTTTGCCAGTTTTCCAGGAAATTGGCCTTGCTCTCTGGGTGCACCTGATGAATACATTGAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTTACTGTGGAGTTTGGGCTCTGCAAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATATGGTGCTGGGCTCCTGTCATCCTTTGGTGAATTACAGTACTGCTTATCAGAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGGAGAAGACAGCCATCCAAAATTACACTGTACGGAGTTCCAGCCCCTGTATTACGTGGCAGAGAGTTTTAATGATGCCAAGGAGAAAGTAAGGAACCTTGTGCCACAATACCTCGGCCCTTCTCAGTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATTGAGGTCTTGGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTTGGCTGATTCCATTAACAGTGAAATTGGAATCCTTTGCAGTGCCCTCCAGAAAATAAAGTAA

(SEQ ID NO:1) ;

[0018] ATGAGTACGGCTGTGCTCGAGAATCCAGGTTTGGGCCGAAAGCTGTCTGATTTTGGACAGGAGACATC
TTATATTGAAGACAACCTGCAACCAGAATGGTGCATATCCCTTATTTTTTCTCTGAAAGAAGAAGTAGGTGCGCTG
GCAAAGGTCTTGCGGCTGTTTGAAGAGAACGATGTTAATCTTACTCATATTGAGTCCAGACCATCACGGCTGAAAA
AAGACGAGTACGAATTTTTTACTCACTTGGACAAACGAAGCTTGCCGGCTCTTACTAATATCATTAAGATCCTCCG
GCATGACATAGGGGCGACAGTGCATGAGCTTCAAGGGATAAAAAAGAAAGATACCGTCCCCTGGTTTCCAAGGACC
ATACAAGAACTCGACCGATTTCGCGAACAGATCCTTTCATATGGTGCTGAGTTGGATGCTGACCACCCCGGCTTCA
AAGACCCGGTCTACCGAGCGCGGCGGAAACAATTTGCTGACATCGCATACAATTACAGGCATGGCCAGCCAATTCC
TAGAGTAGAATACATGGAAGAAGAGAAAAAACCTGGGGTACCGTCTTCAAGACGCTGAAATCATTGTATAAACT
CATGCATGTTACGAATATAACCATATTTTTCCGTTGCTCGAGAAATATTGCGGGTTCACGAAGATAACATCCCAC
AACTCGAGGATGTATCTCAGTTCCTCCAGACCTGTACGGGGTTTCGACTTAGGCCTGTCGCGGGTTTGCTCAGTTC
TCGAGACTTCTGGGTGGATTGGCGTTTCGGGTATTCCATTGCACGCAGTATATCCGACACGGAAGTAAGCCAATG
TACACGCCAGAACCCGATATCTGTCACGAATTGCTTGGACACGTTTCTCTGTTTTCTGATCGATCATTGCTCAGT
TTTCACAGGAAATCGGCCTGGCATCTTTGGGAGCGCCGGATGAATATATTGAGAAGCTCGCTACAATTTACTGGTT
CACGGTAGAATTTGGGTGTGCAAGCAGGGTGATAGTATTAAGCATAACGGTGCGGGATTGCTGTCCTCATTGCGG
GAGCTTCAGTATTGCCTGTCCGAGAAACCCAAGCTGTTGCCGTTGGAATTGGAAAAAACCGCTATCCAAAATTACA
CAGTAACGGAGTTCCAACCTTTGTACTACGTAGCCGAGTCATTTAACGATGCAAAGGAGAAGGTCAGAAATTTGCG
TGCGACGATACCCAGACCGTTCTCAGTAAGGTACGATCCTTACACTCAGAGGATTGAAGTCCTGGATAATACGCAA
CAGCTCAAGATCCTGGCAGACTCCATAAATTCTGAAATCGGCATCTTGTGTTTCAGCACTGCAAAAGATAAAATAA

(SEQ ID NO:2) ;

[0019] AGCCATGGACAGAATGTGGTCTGTCAGCTGTGAATCTGTTGATGGAGATCCAACCTATTTCTTTCATCA
GAAAAAGTCCGAAAAGCAAACCTTAATTTGAAATAACAGCCTTAAATCCTTTACAAGATGGAGAAACAACAATAA
GTCAAAATAATCTGAAATGACAGGATATGAGTACATACTCAAGAGCATAATGGTAAATCTTTTGGGGTCATCTTG
ATTTAGAGATGATAATCCCATACTCTCAATTGAGTTAAATCAGTAATCTGTGCGATTTTCATCAAGATTAATTA
TTTGGGACCTGCTTCATTCAAGCTTCATATATGCTTTGCAGAGAACTCATAAAGGAGCATATAAGGCTAAATGTAA
AACCCAAGACTGTCATTAGAATTGAATTATTGGGCTTAATATAAATCGTAACCTATGAAGTTTATTTTTTATTTTA
GTTAACTATGATTCCAATTACTACTTTGTTATTGTACCTAAGTAAATTTTCTTTAAGTCAGAAGCCCATTAAATA
GTTACAAGCATTGAACTTCTTTAGTATTATTAATATAAAAAACATTTTGTATGTTTTATTGTAATCATAAATAC
TGCTGTATAAGGTAATAAACTCTGCACCTAATCCCCATAACTTCCAGTATCATTTTCCAATTAATTATCAAGTCT
GTTTTGGGAAACACTTTGAGGACATTTATGATGCAGCAGATGTTGACTAAAGGCTTGGTTGGTAGATATTCAGGAA
ATGTTCACTGAATAAATAAGTAAATACATTATTGAAAAGCAAATCTGTATAAATGTGAAATTTTTATTTGTATTAG
TAATAAAACATTAGTAGTTTAAACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGACTCTAGATT (SEQ ID

NO:3) ;或

[0020] AGCCATGGACAGAATGTGGTCTGTCAGCTGTGAATCTGTTGATGGAGATCCAACCTATTTCTTTCATCA
GAAAAAGTCCGAAAAGCAAACCTTAATTTGAAATAACAGCCTTAAATCCTTTACAAGATGGAGAAACAACAATAA
GTCAAAATAATCTGAAATGACAGGATATGAGTACATACTCAAGAGCATAATGGTAAATCTTTTGGGGTCATCTTG
ATTTAGAGATGATAATCCCATACTCTCAATTGAGTTAAATCAGTAATCTGTGCGATTTTCATCAAGATTA (SEQ ID

NO:4) 。

[0021] 一些实施方式中,PAH序列或其变体包含:SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:

3;或SEQ ID NO:4。

[0022] 一些实施方式中,凝血酶原增强子包含与下述序列具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%百分比相同性的序列:

[0023] GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAG (SEQ ID NO:5)。

[0024] 在实施方式中,凝血酶原增强子包含SEQ ID NO:5。

[0025] 在实施方式中,hAAT启动子序列包含SEQ ID NO:6。在实施方式中, β 珠蛋白内含子的序列包含SEQ ID NO:7或8中的任一项。在实施方式中,肝细胞核因子结合位点的序列包含SEQ ID NO:9-12中的任一项。

[0026] 在实施方式中,治疗性载体部分还包含至少一种小RNA序列,其能够结合至少一种预定互补mRNA序列。在实施方式中,至少一种小RNA序列靶向含有全长UTR的互补mRNA序列。在实施方式中,至少一种预定互补mRNA序列是PAH mRNA序列。在实施方式中,至少一种小RNA序列抑制内源性PAH的产生。在实施方式中,至少一种小RNA序列包含shRNA。在实施方式中,至少一种小RNA序列受控于第一启动子,而PAH序列或其变体受控于第二启动子。在实施方式中,第一启动子包含H1启动子。在实施方式中,第二启动子包含肝特异性启动子。在实施方式中,肝特异性启动子包含hAAT启动子。一些实施方式中,至少一种小RNA序列包含与下述序列具有至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%百分比相同性的序列:

[0027] TCGCATTTTCATCAAGATTAATCTCGAGATTAATCTTGATGAAATGCGATTTTT (SEQ ID NO:13); 或

[0028] ACTCATAAAGGAGCATATAAGCTCGAGCTTATATGCTCCTTTATGAGTTTTTT (SEQ ID NO:14)。

[0029] 在实施方式中,至少一种小RNA序列包含SEQ ID NO:13;或SEQ ID NO:14。

[0030] 一些实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。在实施方式中,病毒载体是AAV载体。

[0031] 在本公开的方面之中,能够感染靶细胞的慢病毒颗粒包含针对感染靶细胞优化的包膜蛋白,和根据本公开实施方式中任一项的病毒载体。在实施方式中,靶细胞是肝细胞,肌肉细胞,上皮细胞,内皮细胞,神经细胞,神经内分泌细胞,内分泌细胞,淋巴细胞,骨髓细胞,存在于实体器官的细胞,或造血谱系,造血干细胞或前体造血干细胞的细胞。

[0032] 在本公开的方面之中,公开了治疗对象中PKU的方法。该方法包括向对象给予治疗有效量本文所述的慢病毒颗粒。在本公开的方面之中,预防对象中PKU的方法包括向对象给予治疗有效量本文所述的慢病毒颗粒。在实施方式中,该方法还包括诊断对象中与PKU表型相关联的PKU基因型。在实施方式中,对象在子宫内。在实施方式中,诊断发生在对象的产前筛查期间。在实施方式中,诊断发生在体外。在实施方式中,治疗有效量的慢病毒颗粒包含多个单一剂量的慢病毒颗粒。在实施方式中,治疗有效量的慢病毒颗粒包含单一剂量的慢病毒颗粒。

附图说明

[0033] 图1显示环化形式的3-载体慢病毒载体系统示例。

[0034] 图2显示环化形式的4-载体慢病毒载体系统示例。

[0035] 图3显示8个慢病毒载体示例的线性图谱,所述慢病毒载体示例包含凝血酶原增强

子和hAAT启动子的变异以调节PAH表达。

[0036] 图4A和4B显示(图4A) Hepa1-6和(图4B) 293T细胞中使用具有或不具有3'UTR的不同增强子元件比较PAH水平的免疫印迹数据。

[0037] 图5A-5C显示Hepa1-6细胞中使用或不使用(图5A) 兔β珠蛋白内含子、(图5B) 密码子优化的PAH序列以及(图5C) 在上游或下游具有HNF1或HNF1/4结合位点的凝血酶原增强子比较PAH水平的免疫印迹数据。

[0038] 图6显示使用慢病毒载体转导的Hepa1-6细胞中的PAH RNA表达,所述慢病毒载体经由凝血酶原增强子中的变化表达PAH。

[0039] 图7显示Hepa1-6细胞中使用抗-α1胰蛋白酶(hAAT)或甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子比较PAH表达水平的免疫印迹数据。

[0040] 图8A和8B显示Hepa1-6细胞(图8A)或Hep3B细胞(图8B)中使用或不使用兔或人β珠蛋白内含子比较PAH水平的免疫印迹数据。

[0041] 图9显示人原代肝细胞中使用表达PAH的慢病毒载体的PAH表达的免疫印迹数据。

[0042] 图10A-10C显示通过检测(图10A和10C)细胞培养基或(图10B) Hepa1-6细胞裂解物中苯丙氨酸水平确定的PAH活性,所述Hepa1-6细胞经表达PAH的慢病毒载体转导并经墨蝶呤(BH4辅因子前体)处理。

[0043] 图11显示使用包含PAH的慢病毒载体处理后的Pah^{enu2}小鼠血液中Phe水平降低。

[0044] 图12显示了通过LV-Pro-hAAT-PAH的血液苯丙氨酸抑制。

[0045] 图13A-13D显示在293细胞中使用各种DJ或AAV/2血清型载体AAV递送的PAH表达后的PAH蛋白表达(图13A)和PAH RNA表达(13D);还在递送AAV/DJ载体(图13B)和AAV/2载体(图13C)后,分析了PAH蛋白表达的倍数变化。

[0046] 图14显示使用针对PKU的LV-Pro-hAAT-PAH慢病毒载体疗法处理的新生enu2/enu2小鼠中的Phe水平降低。

[0047] 图15显示了来自Hep3B细胞的数据,其显示了以慢病毒载体处理后的PAH表达,所述慢病毒载体编码凝血酶原-hAAT-PAH-PAH shRNA序列#1(SEQ ID NO:13)或凝血酶原-hAAT-PAH-PAH shRNA序列#2(SEQ ID NO:14),其各自靶向内源性Pah基因所表达的mRNA的3'UTR并抑制PAH蛋白的表达。

具体实施方式

[0048] 概述

[0049] 本公开涉及治疗载体以及递送同一载体至细胞。在实施方式中,治疗载体包含PAH序列或其变体和肝特异性增强子。在实施方式中,治疗载体还包含调节宿主(即,内源性)PAH蛋白表达的小RNA。

[0050] 定义和解释

[0051] 除非另作说明,本公开所用的科技术语将具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。此外,除非另有说明,单数术语包括复数含意且复数术语包括单数含意。通常,本文中细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质及核酸化学及杂交中使用的命名和技术是本领域公知且常用的。除非另有说明,本公开的方法和技术总体遵循如本领域熟知并如各种通识或专题参考文献中所述的常规方法进行,本文全文多处引用并论

及此类参考文献。参见例如：Sambrook J.和Russell D.《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第三版,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.), (2000);Ausubel等,《精编分子生物学方案：现行分子生物学方案的方法纲要》(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology),Wiley,John&Sons出版公司(2002);Harlow和Lane,《使用抗体：实验室手册》(Using Antibodies:A Laboratory Manual);纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(1998);和Coligan等,《精编蛋白质科学方案》(Short Protocols in Protein Science),威利约翰父子出版公司(Wiley,John&Sons)(2003)。各种酶促反应或纯化技术按照生产商的说明如本领域常规实践或本文所述进行。本文所述分析化学、合成有机化学以及医学和药理学化学中使用的命名以及实验室方法和技术是本领域公知且常用的。

[0052] 如说明书和所附权利要求所用,单数形式“一”和“这一”可互换使用并包括复数形式并符合每种含义,除非文本中另有明确指示。本文中,“和/或”表示并涵盖列出的一个或多个事项的任意及所有可能以及按照或选(“或”)解释时组合的缺失。

[0053] 所有数字标记,例如pH,温度,时间,浓度和分子量,包括范围,都是近似值,其以0.1的增量变化(+)或(-)。应理解,尽管并非均为明示,所有指定数值之前都有“约”。“约”在诸如“X+0.1”或“X-0.1”这样“X”的微小改变之外还包括精确的“X”值。还应理解,尽管并非均为明示,本文述及的试剂仅仅是示例性的,其等同物是本领域所知的。

[0054] 本文中,“约”是本领域普通技术人员所理解的并会视其使用所在的上下文而存在一定程度的差异。如果该词的用意结合其使用所在上下文对于本领域普通技术人员来说仍不清楚,则“约”意味某特定项的至多正负10%。

[0055] 术语“给予”或“施用”活性剂应理解为向需要治疗的对象提供活性剂,其形式为可以治疗有用形式和治疗有效量引入该个体的形式。

[0056] 如本文所用,术语“包括”或“包含”意在表示所述组合物和方法包括所提及的要素,但并不排除其它要素。当用以定义组合物和方法时,“基本由……组成”应表示排除对于该组合物和方法具有任何基本意义的其它要素。“由……组成”表示排除多于所要求保护的组合物的其它成分的微量元素和基本方法步骤。通过各个这些转换术语定义的实施方式在本发明范围内。因此,意图是所述方法和组合物可以包括另外的步骤和组分(包含)或者可选地包括不重要的步骤和组合物(基本上由……组成)或者仅包括所述方法步骤或组合物(由...组成)。

[0057] 如本文所用,“表达”、“表达的”或“编码”指多核苷酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。表达可以包括真核细胞中的mRNA剪接或其他形式的转录后修饰或翻译后修饰。

[0058] 本文所用术语“腺相关病毒载体”指腺相关病毒的运载体或转运体。术语“腺相关病毒载体”在本文中还可以称之为“AAV载体”。

[0059] 本文所用术语“腺相关病毒”指这样的小病毒,其产生轻度免疫应答,能够整合进入宿主细胞基因组,并且不具有病原性。

[0060] 本文所用术语“AAV/DJ”(本文也称之为“AAV-DJ”)是工程改造自不同AAV血清型的AAV载体的血清型,其介导比野生型AAV血清型更高的转导和感染率。

[0061] 本文所用术语“AAV2” (本文也称之为“AAV/2”或“AAV-2”) 是天然产生的AAV血清型。

[0062] 本文所用术语“AAV-Pro-hAAT-PAH”指包含凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列的AAV载体。

[0063] 本文所用缩写“ApoE增强子”指载脂蛋白E增强子。

[0064] 本文所用术语“基因药物”或“遗传药物”通常指聚焦于遗传靶标以治疗临床疾病或表现的治疗剂或治疗策略。术语“基因药物”涵盖基因疗法等。

[0065] 本文所用缩写“hAAT”指hAAT启动子。

[0066] 本文所用术语“hAAT-hPAH-3' UTR₂₈₉”在本文中还可以称之为U₂₈₉,或者通常称之为转基因表达的截短hPAH 3' UTR,或者通常称之为截短3' UTR。

[0067] 本文所用术语“肝细胞核因子”指主要在肝脏中表达转录因子。肝细胞核因子的类型包括但不限于,肝细胞核因子1,肝细胞核因子2,肝细胞核因子3和肝细胞核因子4。

[0068] 本文所用缩写“HNF”指肝细胞核因子。相应地,HNF1指肝细胞核因子1,HNF2指肝细胞核因子2,HNF3指肝细胞核因子3,和HNF4指肝细胞核因子4。

[0069] 本文所用短语“HNF结合位点”指HNF转录因子可以结合的DNA区域。相应地,HNF1结合位点是HNF1可以结合的DNA区域,而HNF4结合位点是HNF4可以结合的DNA区域。

[0070] 本文所用术语“个体”、“对象”和“患者”可互换使用,并且指任何个体哺乳动物对象,例如,鼠,猪,牛,犬科,猫科,马,非人灵长类动物或人灵长类动物。

[0071] 本文所用短语“兔β珠蛋白内含子”指兔β珠蛋白基因内的核酸片段,该片段在RNA成熟期间被剪接掉,并且不编码蛋白质。

[0072] 本文所用短语“人β珠蛋白内含子”指人β珠蛋白基因内的核酸片段,该片段在RNA成熟期间被剪接掉,并且不编码蛋白质。

[0073] 本文所用术语“LV”通常指“慢病毒”。作为非限制性的示例,述及“LV-PAH”指代含有PAH序列并表达PAH的慢病毒。

[0074] 本文所用术语“LV-Pro-hAAT-PAH”指包含凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列的慢病毒。LV-Pro-hAAT-PAH载体还称之为AGT323载体。

[0075] 本文所用术语“LV-HNF-Pro-hAAT-PAH”指包含HNF结合位点、凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列的慢病毒。

[0076] 本文所用术语“LV-Pro-内含子-PAH”指包含凝血酶原增强子、内含子和PAH序列的慢病毒,其中所述内含子是人β珠蛋白内含子。

[0077] 本文所用术语“LV-Pro-hAAT”指包含凝血酶原增强子和hAAT启动子的慢病毒。

[0078] 本文所用术语“LV-Pro-TBG-PAH”指包含凝血酶原增强子、甲状腺素结合球蛋白和PAH序列的慢病毒。

[0079] 本文所用术语“LV-ApoE-hAAT-PAH-UTR”指包含载脂蛋白E增强子、hAAT启动子、PAH序列和基因的非翻译区的慢病毒,其中非翻译区是PAH基因的3' UTR。

[0080] 本文所用术语“LV-Pro-hAAT-PAH-shPAH”指包含凝血酶原增强子、hAAT启动子、PAH序列和shPAH序列的慢病毒。

[0081] 本文中,“包装细胞系”指可用于表达慢病毒颗粒的任何细胞系。

[0082] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,本文所用术语“百分比相同性”是

指,当进行比较并以最大对应性比对时,两个或更多个具有相同的核苷酸或氨基酸残基的特定百分比的序列或子序列,如使用下述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或本领域技术人员可用的其他算法)或通过视觉检查所测量。根据应用,“百分比相同性”可以存在于比较序列的某区域,例如功能域,或者存在于比较的两个序列的全长上。对于序列比较,一般将一条序列作为参比序列,测试序列则与之比较。使用序列比较算法时,将测试序列和参比序列输入计算机,视必要指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对于参比序列的序列相同性百分数。

[0083] 本文中所用的术语“药学上可接受的”是指合理医疗判断范围内的这些化合物、材料、组合物和/或剂型,其适用于接触人体和动物的组织、器官和/或体液而不会产生过度毒性、刺激性、过敏反应或与合理的效益/风险比相适应的其它问题或并发症。

[0084] 本文中,“药学上可接受的运载体”表示并包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。该组合物可包括药学上可接受的盐,例如酸加成盐或碱加成盐(参见例如Berge等(1977) J.Pharm.Sci.66:1-19)。

[0085] 术语“苯丙氨酸羟化酶”在本文中还可以称之为PAH。术语苯丙氨酸羟化酶包括所有野生型和变体PAH序列,包括核苷酸和肽序列。出于非限制性的目的,术语苯丙氨酸羟化酶包括SEQ ID NO:1-4,并且还包括与其具有至少约80%相同性的变体。人PAH还可以指hPAH。人PAH还可以称之为hPAH。

[0086] 本文所用术语“野生型hPAH”还可以称之为内源性PAH或“全长PAH”。

[0087] 本文所用术语“苯丙酮尿症”在本文中还称之为“PKU”,其指苯丙氨酸羟化酶的慢性缺乏,以及与之相关的所有症状,包括轻度和经典形式的疾病。因此,“苯丙酮尿症”的治疗可以包括治疗与PKU相关的所有或一些症状。

[0088] 本文所用术语“凝血酶原增强子”是凝血酶原基因上可以被蛋白质结合的区域,其导致凝血酶原基因的转录。

[0089] 本文所用缩写“Pro”指凝血酶原增强子。

[0090] 本文中,“小RNA”指非编码RNA,长度通常约200个核苷酸或更短,且具有沉默或干扰功能。在其他实施方式中,小RNA长度为约175个核苷酸或更短,约150个核苷酸或更短,约125个核苷酸或更短,约100个核苷酸或更短,或约75个核苷酸或更短。此类RNA包括微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)和短发卡RNA(shRNA)。本公开的“小RNA”应能够抑制或敲减靶基因的基因表达,通常通过会导致靶基因mRNA破坏的途径。

[0091] 本文所用术语“shPAH”指靶向PAH的小发夹RNA。

[0092] 本文所用缩写“lncRNA”指长非编码RNA。

[0093] 本文中,“SEQ ID NO”与“序列ID No”同义。

[0094] 本文所用术语“甲状腺素结合球蛋白”是在血流中负责携带甲状腺激素的转运蛋白。本文所用缩写“TBG”指甲状腺素结合球蛋白。

[0095] 本文中,“治疗有效量”指在合适的组合物中、在合适的剂型中、就治疗或避免给定异常、损伤、疾病或病症的患者中所见症状、进展或并发症发生而言足够量的本文活性剂。“治疗有效量”取决于患者病症状态或其严重程度、所治疗对象的年龄、体重等。治疗有效量可以根据许多因素中的任何一种而变化,包括例如给药途径,对象的状况,以及本领域技术人员理解的其他因素。

[0096] 如本文所用,术语“治疗载体”包括但不限于,慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体。此外,如本文所用并述及慢病毒载体系统,术语“载体”是术语“质粒”的同义词。例如,3-载体和4-载体系统(其包括2-载体和3-载体包装系统)还可以称之为3-质粒和4-质粒系统。

[0097] 本文所用术语“处理”或“治疗”一般指试图改变接受治疗的对象的自然进程的干预,并且可以用于预防进行或在临床病理过程中进行。理想的效果包括但不限于避免疾病的发生或复发,缓解症状,遏制、减少或抑制疾病的各种直接或间接病理后果,改善或平息疾病状态,以及引起缓解或改善预后。

[0098] 述及“治疗/处理”旨在靶向疾病状态并对其进行对抗,即改善或预防疾病状态。因此,特定治疗/处理将取决于待靶向的疾病状态以及药物治疗和治疗方法的当前或未来状态。治疗可能具有相关的毒性。

[0099] 本文所用术语“截短的”在本文中还可称之为“缩短的”或“不具有……的”。

[0100] 本文所用术语“UTR”指代这样的基因区域,其是基因编码区的5'或3'。

[0101] 本文所用术语“3'UTR”是基因编码区的3'的“UTR”。

[0102] 本文所用术语“变体”在本文中还可称之为类似物或变异。变体指对核苷酸序列的任何取代、缺失或添加。

[0103] 本文所考虑的是,用于比较的序列的最佳对齐可以例如采用Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 的局部同源算法、采用Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 的同源性比对算法、采用Pearson&Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的相似度检索法、采用这些算法的计算机运行(威斯康星遗传软件软件包7.0版中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA(遗传计算机集团,美国威斯康星州麦迪逊市科学路(Science Drive) 575))或通过目测检查(总体见Ausubel等,见前文)来进行。

[0104] 适用于确定序列相同性百分比和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其在Altschul等, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) 中描述。进行BLAST分析的软件可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得。

[0105] 本文中的核酸和蛋白质序列还可以用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,例如由此鉴定相关序列。这类搜索可使用Altschul等, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)来运行。可用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索(得分=100,字长=12)来获取与本文中核酸分子同源的核苷酸序列。可用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索(得分=50,字长=3)来获取与本文中蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得缺口比对以用于比较目的,可如Altschul等, 1997, Nucleic Acids Res., 25(17):3389-3402所述利用缺口BLAST。利用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用各程序(如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0106] 公开的实施方式和各方面的描述

[0107] 在本公开的方面之中,病毒载体包含治疗性载物部分,其中治疗性载物部分包含PAH序列或其变体,启动子,肝特异性增强子,其中所述PAH序列或其变体由启动子和肝特异性增强子操作性地控制。

[0108] 在实施方式中,肝特异性增强子包含凝血酶原增强子。在实施方式中,启动子是肝特异性启动子。在实施方式中,肝特异性启动子包含hAAT启动子。在实施方式中,治疗性载物部分还包含β珠蛋白内含子。在实施方式中,治疗性载物部分还包含至少一个肝细胞核因

子结合位点。在实施方式中,至少一个肝细胞核因子结合位点置于凝血酶原增强子的上游。在实施方式中,至少一个肝细胞核因子结合位点置于凝血酶原增强子的下游。

[0109] 在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列(LV-Pro-hAAT-PAH)。在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含HNF结合位点、凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列(LV-HNF-Pro-hAAT-PAH)。在实施方式中,HNF结合位点是HNF1或HNF1/4结合位点。在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含凝血酶原增强子、hAAT启动子、内含子和PAH序列(LV-Pro-内含子-PAH)。在实施方式中,内含子是兔珠蛋白内含子。在实施方式中,内含子是人珠蛋白内含子。在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含凝血酶原增强子和hAAT启动子(LV-Pro-hAAT)。在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含凝血酶原增强子、甲状腺素结合球蛋白和PAH序列(LV-Pro-TBG-PAH)。在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含ApoE增强子、hAAT启动子、PAH序列和PAH的3' UTR

[0110] (LV-ApoE-hAAT-PAH-UTR)。

[0111] 一些实施方式中,PAH序列或其变体被截短。在实施方式中,被截短的PAH序列或其变体的部分是PAH序列或其变体的3'非翻译区(UTR)。

[0112] 在实施方式中,3'UTR处的PAH截短防止某些调节RNA与3'UTR的结合。在实施方式中,调节RNA是lncRNA。在实施方式中,调节RNA是微小RNA。在实施方式中,调节RNA是piRNA。在实施方式中,调节RNA是shRNA。在实施方式中,调节RNA是长度为19-25个核苷酸的siRNA。在实施方式中,调节RNA是小RNA序列,其包含与SEQ ID NO:13或14具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更高百分比相同性的序列。

[0113] 在实施方式中,PAH序列包含SEQ ID NO:1。在实施方式中,PAH序列包含密码子优化的PAH序列(SEQ ID NO:2)。在实施方式中,PAH序列或其变体包含截短的3' UTR(289个核苷酸)(SEQ ID NO:4)。在实施方式中,PAH序列或其变体包含5' UTR(897个核苷酸)(SEQ ID NO:3)。

[0114] 在实施方式中,PAH序列或其变体包含与SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的序列。

[0115] 在实施方式中,可以制备针对任何上述序列的变体。一些实施方式中,PAH序列或其变体包含:SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:2;SEQ ID NO:3;或SEQ ID NO:4。

[0116] 在实施方式中,凝血酶原增强子包含与SEQ ID NO:5具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的序列。

[0117] 在实施方式中,可以制备针对上述序列的变体。在实施方式中,凝血酶原增强子序列包含SEQ ID NO:5。

[0118] 在实施方式中,hAAT启动子序列包含SEQ ID NO:6。在实施方式中, β 珠蛋白内含子的序列包含SEQ ID NO:7或8中的任一项。在实施方式中,肝细胞核因子结合位点的序列包含SEQ ID NO:9-12中的任一项。

[0119] 在实施方式中,治疗性载体部分还包含至少一种小RNA序列,其能够结合至少一种预定互补mRNA序列。在实施方式中,至少一种小RNA序列靶向含有全长UTR的互补mRNA序列。在实施方式中,至少一种预定互补mRNA序列是PAH mRNA序列。在实施方式中,至少一种小RNA序列包含shRNA。在实施方式中,至少一种小RNA序列受控于第一启动子,而PAH序列或其变体受控于第二启动子。在实施方式中,第一启动子包含H1启动子。在实施方式中,第二启动子包含肝特异性启动子。在实施方式中,肝特异性启动子包含hAAT启动子。在另一方面中,至少一种小RNA序列包含与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更多百分比相同性的序列。

[0120] 在实施方式中,可以制备针对任何上述序列的变体。在实施方式中,至少一种小RNA序列包含SEQ ID NO:13;或SEQ ID NO:14。

[0121] 在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含凝血酶原增强子、hAAT启动子、PAH序列和靶向内源性PAH的shRNA (LV-Pro-hAAT-PAH-shPAH)。在实施方式中,shRNA靶向内源性PAH的3' UTR。在实施方式中,shPAH序列包含SEQ ID NO:13。在实施方式中,shPAH序列包含SEQ ID NO:14。

[0122] 在本公开的方面之中,能够感染靶细胞的慢病毒颗粒包含针对感染靶细胞优化的包膜蛋白,和本文所述的任一种病毒载体。在实施方式中,靶细胞是肝细胞,肌肉细胞,上皮细胞,内皮细胞,神经细胞,神经内分泌细胞,内分泌细胞,淋巴细胞,骨髓细胞,存在于实体器官的细胞,或造血谱系,造血干细胞或前体造血干细胞的细胞。

[0123] 在本公开的方面之中,治疗对象中PKU的方法包括向对象给予治疗有效量本文所公开的任一种慢病毒颗粒。在本公开的方面之中,预防对象中PKU的方法包括向对象给予治疗有效量本文所公开的任一种慢病毒颗粒。在本公开的另一个方面中,公开了治疗有效量本文所公开的任一种慢病毒颗粒用于治疗对象中PKU的用途。在实施方式中,该方法还包括诊断对象中与PKU表型相关联的PKU基因型。在实施方式中,对象在子宫内。在实施方式中,诊断发生在对象的产前筛查期间或在父母的遗传筛查之后。在实施方式中,诊断发生在体外。在实施方式中,治疗有效量的慢病毒颗粒包含多个单一剂量的慢病毒颗粒。在实施方式中,治疗有效量的慢病毒颗粒包含单一剂量的慢病毒颗粒。

[0124] 在公开的方面之中,提供了治疗对象中PKU的方法,其包括使用治疗有效量包含外源性PAH的慢病毒载体治疗具有突变形式的PAH的对象。在实施方式中,对象是哺乳动物。在实施方式中,哺乳动物是人。在实施方式中,哺乳动物是啮齿动物。在实施方式中,啮齿动物是小鼠或大鼠。在实施方式中,哺乳动物是猪。

[0125] 在实施方式中,使用慢病毒载体治疗对象。在实施方式中,慢病毒载体包含PAH序列或其变体。在实施方式中,PAH序列是本文所述PAH序列或变体中的任一种。

[0126] 在实施方式中,慢病毒载体是包含本文所述PAH序列或变体的慢病毒载体中的任一种。在实施方式中,包含PAH的慢病毒载体是如图1和2所示表达PAH的慢病毒载体。在实施方式中,包含PAH的慢病毒载体是如图3所示表达PAH的慢病毒载体。

[0127] 在实施方式中,病毒载体包含凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列(在本文中称之为LV-Pro-hAAT-PAH或AGT323)。在实施方式中,凝血酶原增强子序列是本文所述凝血酶原序列或变体中的任一种。在实施方式中,hAAT启动子是本文所述hAAT启动子序列或

变体中的任一种。在实施方式中,PAH序列是本文所述PAH序列或变体中的任一项。

[0128] 在实施方式中,慢病毒载体包含整合慢病毒载体。在实施方式中,整合慢病毒载体衍生自慢病毒载体系统。在实施方式中,慢病毒载体系统包含单独的质粒,其编码rev基因和env基因。在实施方式中,整合慢病毒载体衍生自3-载体慢病毒系统。在实施方式中,3-载体慢病毒系统在图1中示出。在实施方式中,整合慢病毒载体衍生自4-载体慢病毒系统。在实施方式中,4-载体慢病毒载体系统在图2中示出。

[0129] 在实施方式中,使用腺相关病毒(AAV)载体治疗对象。在实施方式中,AAV载体包括本文所公开的AAV载体中的任一种。在实施方式中,AAV载体包含PAH序列或其变体。在实施方式中,PAH序列是本文所述PAH序列或变体中的任一种。

[0130] 在实施方式中,注射是皮内注射。在实施方式中,注射是肌肉内注射。在实施方式中,注射是皮下注射。在实施方式中,注射是静脉内注射。

[0131] 在实施方式中,本文所示方法还包括在使用慢病毒颗粒治疗对象之前产生特定效价的整合慢病毒载体。特定效价在测试系统中确定,其利用体外慢病毒载体转导以及细胞靶标,然后通过定量PCR分析转导细胞的染色体DNA以测量转导细胞的频率以及各细胞整合载体拷贝数的数量。效价表示为使用适当体积的慢病毒载体转导进入适当数目的细胞所导致的整合拷贝数的数量。在实施方式中,效价为 1×10^5 至 1×10^{15} 整合载体拷贝,例如, 1×10^7 至 1×10^{13} 整合载体拷贝,或 1×10^9 至 1×10^{11} 整合载体拷贝。在实施方式中,效价是 1×10^{10} 整合载体拷贝。

[0132] 在实施方式中,产生特定效价的整合慢病毒载体包括向一种或多种细胞添加载体系统。在实施方式中,一种或多种细胞是细胞系。在实施方式中,细胞系是293T细胞系。在实施方式中,细胞系是HeLa细胞系。在实施方式中,细胞系是CHO细胞系。在实施方式中,细胞系是Hep3B细胞系。本领域技术人员将理解的是,在其他实施方式中,细胞系可以是本领域已知的任何合适的细胞系。

[0133] 在实施方式中,方法还包括在注射包含PAH的慢病毒载体后测量血液中的Phe水平。

[0134] 在本公开的方面之中,使用AAV递送的表达系统在细胞中表达人PAH。在实施方式中,使用AAV-2血清型。在实施方式中,使用AAV-DJ血清型。在实施方式中,AAV载体包含GFP。在实施方式中,AAV载体可以代表任何血清型或者可以产生自旨在改善人肝细胞转导的重组DNA或其他合成方法。

[0135] 在实施方式中,将人PAH导入AAV载体。在实施方式中,将凝血酶原增强子导入AAV载体。在实施方式中,将hAAT启动子导入AAV载体。在实施方式中,将兔珠蛋白内含子导入AAV载体。在实施方式中,将人PAH、凝血酶原增强子、hAAT启动子和兔珠蛋白内含子中的任一种或多种导入AAV载体。在实施方式中,病毒载体包含凝血酶原增强子、hAAT启动子和PAH序列(AAV-Pro-hAAT-PAH;AGT323)。

[0136] 在实施方式中,凝血酶原增强子序列是本文所公开的凝血酶原序列或变体中的任一项。在实施方式中,PAH序列是本文所述PAH序列或变体中的任一种。在实施方式中,hAAT序列是本文所公开的hAAT序列或变体中的任一种。在实施方式中,内含子序列是本文所公开的内含子序列或变体中的任一种。

[0137] 在本公开的方面之中,慢病毒载体疗法被用于治疗具有突变PAH基因的对象。在实

施方式中,对象是人。在其他实施方式中,如本文以实验方式显示,对象是源自Pah突变小鼠系的新生小鼠。在实施方式中,突变小鼠系是Pah^{enu1}。在实施方式中,突变小鼠系是Pah^{enu2}。在实施方式中,突变小鼠系是Pah^{enu3}。

[0138] 在实施方式中,慢病毒载体中的PAH序列是本文所述的任何PAH序列或变体并包括www.biopku.org中PAHvdb、BIODEF、BIOPKU、JAKE或PNDdb数据库中的那些。

[0139] 在实施方式中,慢病毒载体包含整合慢病毒载体。在实施方式中,整合慢病毒载体衍生自慢病毒载体系统。在实施方式中,慢病毒载体系统包含单独的质粒,其编码rev基因和包膜基因。在实施方式中,整合慢病毒载体衍生自3-载体慢病毒系统。在实施方式中,3-载体慢病毒系统在图1中示出。在实施方式中,整合慢病毒载体衍生自4-载体慢病毒系统。在实施方式中,4-载体慢病毒载体系统在图2中示出。

[0140] 在本公开的方面之中,含有shRNA和PAH的细胞中的慢病毒表达抑制内源性PAH的表达,但是并不抑制表达自慢病毒载体的外源性PAH的表达。

[0141] 在实施方式中,含有shRNA和PAH的慢病毒在对象体内表达,如本文所述。在实施方式中,对象是哺乳动物。在实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0142] 在实施方式中,含有shRNA和PAH的慢病毒体外或离体表达。在实施方式中,慢病毒体外表达,例如,在细胞系中。在实施方式中,细胞系是本文所述的任何细胞系或者相关技术领域普通技术人员所知晓的那些。在实施方式中,细胞系是Hep3B细胞系。

[0143] 在实施方式中,提供了慢病毒载体,其包含凝血酶原增强子、hAAT启动子、PAH序列和靶向内源性PAH的shRNA(任选地,在本文中称之为LV-Pro-hAAT-PAH-shPAH)。在实施方式中,shRNA靶向内源性PAH的3' UTR。

[0144] 在实施方式中,凝血酶原增强子序列包含本文所公开的凝血酶原序列或变体中的任一项。在实施方式中,hAAT启动子包含本文所公开的hAAT启动子序列或变体中的任一种。在实施方式中,PAH序列包含本文所述PAH序列或变体中的任一种。在实施方式中,慢病毒载体中的shRNA序列包含SEQ ID NO:13。在实施方式中,慢病毒载体中的shRNA序列包含SEQ ID NO:14。

[0145] 本文所述发明的其他方法和优点根据下述详细说明并结合附图将变得显而易见,其举例说明本发明的各方面说明。

[0146] 苯丙酮尿症

[0147] 据信PKU是由PAH中的突变和/或PAH辅因子(即BH₄)合成或再生中的缺陷所导致。值得注意的是,已经证明多种PAH突变将影响内质网中的蛋白质折叠,由于蛋白质结构中减弱或在很大程度上消除酶催化活性的小缺失(13%)和错义突变(63%),这将导致降解和/或聚合加速。由于存在可能影响PAH功能的许多突变,因此,用于治疗PKU的一种有效治疗方法将需要解决异常PAH以及可以给予替代PAH的方式。

[0148] 通常,根据诊断时测量的Phe水平,对Phe的饮食耐受性以及治疗的潜在反应性,将PKU分为三个主要表型组。这些组包括经典PKU(Phe>1200μM),非典型或轻度PKU(Phe为600-1200μM)和永久性轻度高苯丙氨酸血症(HPA,Phe 120-600μM)。

[0149] PKU的检测依赖于通用新生儿筛查(NBS)。在美国所有50个州中都必须进行且在大多数发达国家经常使用的筛查中,测试收集自后脚跟(heel stick)的一滴血液的苯丙氨酸水平。

[0150] 基因药物

[0151] 基因药物包括出于疾病治疗和预防的目的用于递送基因构建体至宿主细胞的病毒载体。

[0152] 基因构建体可以包括但不限于,修正或补足现有缺陷的功能性基因或基因的部分,编码调节性蛋白的DNA序列,编码调节性RNA分子的DNA序列,所述调节性RNA分子包括反义,短发夹RNA,短同源RNA,长非编码RNA,小干扰RNA等,以及编码旨在竞争重要的细胞因子以改变疾病状态的RNA或蛋白质的诱饵序列(decoy sequence)。基因药物涉及递送这些治疗性基因构建体至靶细胞以提供特定疾病的治疗或缓解。

[0153] 通过向肝脏体内传递功能性PAH基因应当能重建PAH活性,从而导致正常清除血液中的Phe,因此消除了对于饮食限制或频繁的酶替代疗法的需求。通过针对内源性PAH的shRNA的靶向应当可以改善这种治疗方法的效果。在本公开的方面之中,如果已经鉴定出胎儿处于对PKU基因型的风险中,那么也可以在子宫内递送功能性PAH基因或其变体。在实施方式中,可以执行诊断步骤以确定胎儿是否处于PKU表型的风险。如果诊断步骤确定胎儿处于PKU表型的风险中,那么可以使用本文详述的遗传药物治疗胎儿。治疗可以在子宫内或体外进行。

[0154] 治疗载体

[0155] 根据本文多个方面和实施方式,慢病毒病毒体(颗粒)由编码病毒体(病毒颗粒)生产必需病毒蛋白的载体系统表达。在各种实施方式中,提供了含有编码慢病毒Pol蛋白的核酸序列的一种载体用于逆转录和整合,任选地与启动子连接。另一些实施方式中,Pol蛋白由多载体表达。在其他实施方式中,提供了含有编码慢病毒Gag蛋白的核酸序列的载体用于形成病毒衣壳,任选地与启动子连接。在实施方式中,该gag核酸序列与至少部分pol核酸序列分开位于另一载体上。

[0156] 可以对本文所述载体进行各种修饰用于产生进一步将得到野生型回复体的可能性降至最低的颗粒。这些修饰包括但不限于LTR的U3区缺失,tat缺失和基质(MA)缺失。在实施方式中,一个或多个gag、pol和env载体不含称为慢病毒包装序列的包装慢病毒RNA的慢病毒基因组核苷酸。

[0157] 形成颗粒的载体优选不含表达包膜蛋白的慢病毒基因组核酸序列。优选地,采用含有与启动子操作性连接的包膜蛋白编码核酸序列的另外的载体。该env载体也不含慢病毒包装序列。在一个实施方式中,env核酸序列编码慢病毒包膜蛋白。

[0158] 另一个实施方式中,包膜蛋白不来自慢病毒,而是来自其他病毒。所得颗粒称为假型颗粒。通过适当选择包膜蛋白几乎可以感染任何细胞。例如,可以采用编码靶向内吞区室的包膜蛋白的env基因,例如下述病毒的基因:流感病毒,VSV-G或来自人或非人棒状病毒分离株的相似包膜蛋白, α 病毒(西门利克森林病毒,辛德毕斯病毒),沙粒病毒(淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒),黄病毒(蜱传脑炎病毒,登革热病毒,丙型肝炎病毒,GB病毒),弹状病毒(水泡性口炎病毒,狂犬病病毒),副粘病毒(腮腺炎或麻疹)和正粘病毒(流感病毒)。可优选采用的其他包膜包括来自猫科动物白血病毒和猫科动物内源性逆转录病毒,Moloney白血病毒如MLV-E,MLV-A,长臂猿白血病毒GALV,和狒狒内源性逆转录病毒的包膜。当宿主细胞是原代细胞时特别优选后者的包膜蛋白。可以根据所需的宿主细胞选择其他包膜蛋白。

[0159] 本文所提供的慢病毒载体通常包括至少一种辅助质粒,其包含gag、pol或rev基因

中的至少一种。可以在单独质粒上提供gag,pol和rev基因中的每一个,或者可以在同一质粒上一起提供一个或多个基因。实施方式之一中,gag,pol和rev基因位于同一质粒上(例如图1)。另一些实施方式中,gag和pol基因在第一质粒上,rev基因在第二质粒上(例如图2)。因此,3-载体和4-载体系统均可用于生产慢病毒,如本文所述。在实施方式中,治疗载体,至少一种包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞,例如,包装细胞系中。包装细胞系的非限制性例子是293T/17HEK细胞系。当治疗载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染到包装细胞系中时,最终生产出慢病毒颗粒。

[0160] 另一方面公开了用于表达慢病毒颗粒的慢病毒载体系统。该系统包括如本文所述的慢病毒载体;用于表达包膜蛋白的包膜质粒,所述包膜蛋白针对感染细胞优化;和用于表达gag,pol和rev基因的至少一种辅助质粒,其中当慢病毒载体、包膜质粒和至少一种辅助质粒转染进入包装细胞系时,慢病毒颗粒由包装细胞系产生,其中慢病毒颗粒能够抑制产生PAH和/或抑制内源性PAH的表达。

[0161] 在另一方面,在本文中亦称为治疗载体的慢病毒载体包含下述元件:杂合5'长末端重复(RSV/5'LTR)(SEQ ID NO:15-16),Psi序列(RNA包装位点)(SEQ ID NO:17),RRE(Rev-应答元件)(SEQ ID NO:18),cPPT(聚嘌呤区)(SEQ ID NO:19),抗 α 胰蛋白酶启动子(hAAT)(SEQ ID NO:6),苯丙氨酸羟化酶(PAH)(SEQ ID NO:1-4),土拨鼠转录后调节元件(WPRE)(SEQ ID NO:20),和 Δ U3 3'LTR(SEQ ID NO:21)。在实施方式中,在本文中亦称为治疗载体的慢病毒载体包含下述元件:杂合5'长末端重复(RSV/5'LTR)(SEQ ID NO:15-16),Psi序列(RNA包装位点)(SEQ ID NO:17),RRE(Rev-应答元件)(SEQ ID NO:18),cPPT(聚嘌呤区)(SEQ ID NO:19),H1启动子(SEQ ID NO:22),PAH shRNA(SEQ ID NO:1-4),抗 α 胰蛋白酶启动子(hAAT)(SEQ ID NO:6),PAH shRNA(SEQ ID NO:1-4),土拨鼠转录后调节元件(WPRE)(SEQ ID NO:20),和 Δ U3 3'LTR(SEQ ID NO:21)。在实施方式中,可用通过取代、缺失、添加或突变的序列变异来修饰本文的序列参考本。

[0162] 在另一方面中,辅助质粒包含下述元件:CMV增强子/鸡 β 肌动蛋白增强子(SEQ ID NO:23);HIV组件gag(SEQ ID NO:24);HIV组件pol(SEQ ID NO:25);HIV Int(SEQ ID NO:26);HIV RRE(SEQ ID NO:27);和HIV Rev(SEQ ID NO:28)。另一方面,可以修饰辅助质粒以包括用于表达gag和pol基因的第一辅助质粒,和用于表达rev基因的另外的第二质粒。在实施方式中,可用通过取代、缺失、添加或突变的序列变异来修饰本文的序列参考本。

[0163] 在另一方面中,包膜质粒包含下述元件:RNA聚合酶II启动子(CMV)(SEQ ID NO:29)和疱疹性口炎病毒G糖蛋白(VSV-G)(SEQ ID NO:30)。在实施方式中,可用通过取代、缺失、添加或突变的序列变异来修饰本文的序列参考本。

[0164] 在多个方面中,通过在不丧失载体功能的情况下取代、添加、减去或突变多个元件来修饰用于慢病毒包装的质粒。例如但不限于,下述元件可替换包装系统所在质粒中的类似元件:延长因子-1(EF-1),磷酸甘油酸激酶(PGK)和泛素C(UbC)启动子可替换CMV或CAG启动子。SV40多聚A和bGH多聚A可取代兔 β 珠蛋白多聚A。辅助质粒中的HIV序列可以构建自不同的HIV株或进化枝。VSV-G糖蛋白可来自人内源性逆转录病毒的膜糖蛋白替代,包括HERV-W,狨猴内源性逆转录BaEV,猫科动物内源性病毒(RD114),长臂猿白血病病毒(GALV),狂犬病病毒(FUG),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),甲型鸡瘟病毒(FPV),罗斯河 α 病毒(RRV),鼠白血病病毒10A1(MLV)或埃博拉病毒(EboV)。

[0165] 多种慢病毒包装系统可以商业获得(例如,来自马里兰州罗克维尔的OriGene技术公司的Lenti-vpak包装试剂盒),并且也可以如本文所述进行设计。此外,替代或修改慢病毒包装系统的各个方面以改善任意数量的相关因素(包括慢病毒颗粒的生产效率)属于相关领域技术人员的技能范围之内。

[0166] 在另一方面中,可以使用腺相关病毒(AAV)载体。在实施方式中,AAV载体是AAV-DJ血清型。在实施方式中,AAV载体是血清型1-11中的任一种。在实施方式中,AAV血清型是AAV-2。在实施方式中,AAV载体是经工程改造用于最佳转导人肝细胞的非天然类型。

[0167] AAV载体构建。在公开的方面中,将PAH编码序列(SEQ ID NO:1-4)和凝血酶原增强子(SEQ ID NO:5)以及hAAT启动子(SEQ ID NO:6)插入pAAV质粒(细胞生物实验室公司(Cell Biolabs),加利福尼亚州圣地亚哥)。通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成PAH编码序列,其两侧为EcoRI和SalI限制性位点。使用EcoRI和SalI酶消化pAAV质粒和PAH序列并连接到一起。通过测序验证PAH序列的插入。然后,通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成凝血酶原增强子和hAAT启动子,其两侧为MluI和EcoRI限制性位点。使用MluI和EcoRI酶消化含有PAH编码序列和凝血酶原增强子/hAAT启动子序列的pAAV质粒并连接到一起。通过测序验证凝血酶原增强子/hAAT启动子序列的插入。

[0168] 此外,用于表达PAH的代表性AAV质粒系统可以包含AAV辅助质粒、AAV质粒和AAV Rev/Cap质粒。AAV辅助质粒可以包含左ITR(SEQ ID NO:31),凝血酶原增强子(SEQ ID NO:5),人抗 α 胰蛋白酶启动子(SEQ ID NO:6),PAH元件(SEQ ID NO:1-4),多聚A元件(SEQ ID NO:32)和右ITR(SEQ ID NO:33)。AAV质粒可以包含合适的启动子元件(SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:29),E2A元件(SEQ ID NO:34),E4元件(SEQ ID NO:35),VA RNA元件(SEQ ID NO:36),和多聚A元件(SEQ ID NO:32)。AAV Rep/Cap质粒可以包含合适的启动子元件,Rep元件(SEQ ID NO:37),Cap元件(SEQ ID NO:38),和多聚A元件(SEQ ID NO:32)。

[0169] 在实施方式中,提供了AAV/DJ质粒,其包含凝血酶原增强子和PAH序列(AAV/DJ-Pro-PAH)。在实施方式中,提供了AAV/DJ质粒,其包含凝血酶原增强子、内含子和PAH序列(AAV/DJ-Pro-内含子-PAH)。在实施方式中,内含子是人 β 珠蛋白内含子。在实施方式中,内含子是兔 β 珠蛋白内含子。在实施方式中,提供了AAV/DJ质粒,其包含GFP(AAV/DJ-GFP)。

[0170] 在实施方式中,提供了AAV2质粒,其包含凝血酶原增强子和PAH序列(AAV2-Pro-PAH)。在实施方式中,提供了AAV2质粒,其包含凝血酶原增强子、内含子和PAH序列(AAV2-Pro-内含子-PAH)。在实施方式中,内含子是人 β 珠蛋白内含子。在实施方式中,内含子是兔 β 珠蛋白内含子。在实施方式中,提供了AAV2,其包含GFP(AAV2-GFP)。

[0171] 在实施方式中,本文所公开的任何AAV载体可以包含表达调节RNA的序列。在实施方式中,调节RNA是lncRNA。在实施方式中,调节RNA是微小RNA。在实施方式中,调节RNA是piRNA。在实施方式中,调节RNA是shRNA。在实施方式中,调节RNA是小RNA序列,其包含与SEQ ID NO:13或14具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%或更高百分比相同性的序列。

[0172] AAV颗粒的产生。将AAV-PAH质粒与质粒pAAV-RC2(细胞生物实验室公司)和pHelper(细胞生物实验室公司)组合。pAAV-RC2质粒含有Rep和AAV-2衣壳基因,pHelper含有腺病毒E2A,E4和VA基因。AAV衣壳由AAV-8(SEQ ID NO:39)或AAV-DJ(SEQ ID NO:40)序列

组成。为了产生AAV颗粒,将这些质粒以1:1:1的比例(pAAV-shFDPS:pAAV-RC2:pHelper)转染到293T细胞中。为了转染150mm培养皿(BD Falcon公司)中的细胞,将10微克每种质粒一起加入1ml DMEM中。在另一个试管中,将60微升转染试剂PEI(1微克/ml)(Polysciences公司)加入1ml DMEM中。将两个试管混合在一起并孵育15分钟。然后将转染混合物加入细胞中,并在3天后收集细胞。通过在干冰/异丙醇中冷冻/解冻裂解来裂解细胞。将Benzonase核酸酶(西格玛公司(Sigma))在37摄氏度下加入细胞裂解物中持续30分钟。然后通过4摄氏度下以12,000rpm离心15分钟沉淀细胞碎片。收集上清液,然后加入靶细胞中。

[0173] 剂量和剂型

[0174] 所公开的载体组合物允许感兴趣的基因或序列的短期、中期或长期表达以及所公开载体的附加型维持。因此,给药方案可以根据所治疗的病症和给药方法而不同。

[0175] 在实施方式中,可以不同剂量向需要的对象给予载体组合物。具体来说,可给对象给予约 $\geq 10^6$ 个感染剂量(平均需要1剂量来转导1个靶细胞)。更具体地,可给对象给予约 $\geq 10^7$ 、约 $\geq 10^8$ 、约 $\geq 10^9$ 、约 $\geq 10^{10}$ 、约 $\geq 10^{11}$ 、或约 $\geq 10^{12}$ 个感染剂量/千克体重,或以上数值之间任意数量的剂量。剂量的上限将针对每种疾病指征来确定,并且将取决于每个单独产品或产品批次的毒性/安全性概况。

[0176] 另外,本公开的载体组合物可以定期给予,例如一天一次或两次,或任何其他合适时间段。例如,可以按照每周一次、隔周一次、三周一次、每月一次、隔月一次、每三个月一次、每六个月一次、每九个月一次、每年一次,每十八个月一次、每两年一次、每三十个月一次、或每三年一次向有需要的对象给予载体组合物。

[0177] 在实施方式中,所公开的载体组合物以药物组合物的形式给药。在实施方式中,药物组合物可以配制成多种剂型,包括但不限于用于临床的鼻、肺、口服、局部外用(topical)或肠胃外剂型。各种剂型都可包含各种增溶剂、崩解剂、表面活性剂、填充剂、增稠剂、粘合剂、稀释剂如润湿剂或其它药学上可接受的赋形剂。药物组合物也可以配制用于注射、吸入、输注或皮内暴露。例如,可注射制剂可将本文所公开的载体包含在合适pH和张力下的水性或非水性溶液中。

[0178] 所公开的载体组合物可以使用引导注射经由直接注射到肝脏中来给予对象。在一些实施方式中,载体可以全身给予,经由动脉或静脉循环。在一些实施方式中,载体组合物可以通过引导插管给予紧邻肝脏(包括脾脏和胰腺)周围的组织。在一些实施方式中,载体组合物可以通过注射到门静脉或门静脉窦中来递送,并且可以通过注射到脐静脉中来递送。

[0179] 本文所述载体组合物可以采用各种药学上可接受的方法给药,例如鼻内、口颊、舌下、口服、直肠、眼、胃肠外(静脉内、皮内、肌肉内、皮下、腹膜内)、经肺、阴道内、局部(locally)给药、局部外用(topically)、划开后局部外用、经粘膜给予、通过气溶胶、含于半固介质如琼脂糖或明胶中或通过口颊喷剂或鼻喷剂给药。

[0180] 此外,本文所述载体组合物可以配制成任何药学上可接受的剂型,例如固体剂型,片剂,丸剂,锭剂,胶囊,液体分散体,凝胶,气溶胶,肺气雾剂,鼻气雾剂,软膏,乳膏,半-固体剂型,溶液,乳剂和悬混剂。此外,药物组合物可以是控释制剂、缓释制剂、速释制剂,或以上之任意组合。并且,药物组合物可以是透皮递送系统。

[0181] 一些实施方式中,药物组合物可以配制成口服给药的固体剂型,而固体剂型可以

是粉末、颗粒剂、胶囊、片剂或丸剂。一些实施方式中,固体剂型可包括一种或多种赋形剂,例如碳酸钙、淀粉、蔗糖、乳糖、微晶纤维素或明胶。此外,固体剂型在赋形剂外还可包括润滑剂,例如滑石或硬脂酸镁。在一些实施方式中,口服剂型可以是立即释放或调节释放形式。释放调节型剂型包括控释或延长释放、肠释放等。调节释放型剂型中使用的赋形剂是本领域普通技术人员公知的。

[0182] 在实施方式中,药物组合物可以配制成舌下或口含剂型。这样的剂型包括经舌下给药的舌下片剂或溶液组合物和放置在脸颊和牙龈之间的口颊片剂。

[0183] 在实施方式中,药物组合物可以配制成鼻腔剂型。本公开的这类剂型包括用于鼻腔递送的溶液、悬混剂和凝胶组合物。

[0184] 在实施方式中,药物组合物可以配制成用于口服给药的液体剂型,例如悬浮液,乳液或糖浆。在实施方式中,液体剂型在常用的简单稀释剂如水和液体石蜡之外还可包括各种赋形剂,如保湿剂、甜味剂、芳香剂或防腐剂。在实施方式中,可将组合物配制成适合向儿科患者给药。

[0185] 一些实施方式中,药物组合物可以配制成胃肠外给药剂型,例如无菌水性溶液、悬混剂、乳剂、非水溶液或栓剂。在实施方式中,溶液或悬浮液可包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油或可注射的酯如油酸乙酯。

[0186] 药物组合物的剂量可根据患者的体重、年龄、性别、给药时间和方式、排泄率(excretion rate)和疾病的严重程度而不同。

[0187] 一些实施方式中,PKU的治疗是用针或血管内插管将本文所公开载体构建体向肝脏内直接引导注射来实现。在实施方式中,采用静脉或动脉插管或注射、皮内递送、肌内递送或向肝脏附近引流器官(drainage organ)内注射将载体组合物给予脑脊髓液、血液或淋巴循环中。

[0188] 给出以下实施例以说明本发明的方面。然而应该理解的是本发明不局限于这些实施例中所述具体病症或细节。本文引用的所有印刷出版物均通过引用具体纳入本文。

[0189] 实施例

[0190] 实施例1. 慢病毒载体系统的开发

[0191] 开发了慢病毒载体系统,如图1(环化形式)所总结。在293T/17HEK细胞(购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),弗吉尼亚州玛纳萨斯)中,在用治疗载体、包膜质粒和辅助质粒转染后,生产慢病毒颗粒。293T/17HEK细胞(由其生产功能性病毒颗粒)的转染使用聚(乙烯亚胺)(PEI)来提高质粒DNA的摄取效率。先将质粒和DNA按照3:1(PEI比DNA的质量比)的比例分别加入不含血清的培养基中。2-3天后,收集细胞培养基,通过高速离心和/或过滤然后阴离子交换色谱纯化慢病毒颗粒。慢病毒颗粒的浓度可以用转导单位/ml(TU/ml)表示。如下确定TU:测定培养液中的HIV p24水平(p24蛋白包含于慢病毒颗粒内),定量PCR测定每个转导细胞的病毒DNA拷贝数,或通过感染细胞和采用光学手段(如果载体编码荧光素酶或荧光蛋白标志物)。

[0192] 如上所述,设计了一种3-载体系统(即,其包含2-载体慢病毒包装系统)用于生产慢病毒颗粒。3-载体系统的示意图如图1所示。简而言之,并参照图1,最上方的载体是辅助质粒,此例中包含Rev。图1中部的载体是包膜质粒。最下面的载体是治疗载体,如文中所述。

[0193] 参照图1,辅助+Rev质粒包含:CMV增强子以及鸡β肌动蛋白启动子(SEQ ID NO:

23);鸡β肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:41);HIV Gag(SEQ ID NO:24);HIV Pol(SEQ ID NO:25);HIV整合酶(SEQ ID NO:26);HIV RRE(SEQ ID NO:27);HIV Rev(SEQ ID NO:28);和兔β珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:42)。

[0194] 包膜质粒包含CMV启动子(SEQ ID NO:29);β珠蛋白内含子(SEQ ID NO:7或8);VSV-G包膜糖蛋白(SEQ ID NO:30);和兔β珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:42)。

[0195] 公开了3-载体系统的合成,所述3-载体细胞包含由辅助质粒(+Rev)和包膜质粒组成的2-载体慢病毒包装系统。

[0196] 材料和方法:

[0197] 辅助质粒的构建:辅助质粒的构建先从pNL4-3 HIV质粒(美国国立卫生研究院艾滋病试剂计划(NIH Aids Reagent Program))PCR扩增含有Gag、Pol和整合酶基因的DNA片段。设计引物以用EcoRI和NotI限制性位点扩增片段,其可用于插入pCDNA3质粒(英杰公司(Invitrogen))中的相同位点。正向引物是(5'-TAAGCAGAATTCATGAATTTGCCAGGAAGAT-3')(SEQ ID NO:43),而反向引物是

[0198] (5'-CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT-3')(SEQ ID NO:44)。

[0199] Gag、Pol、整合酶片段的序列如下所示:

[0200] GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGT
AAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCT
GTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTG
TACCAGTAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAAGC
ATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACT
CCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAA
CTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACT
GGATGTGGGCGATGCATATTTTTTCAAGTTCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGT
ATAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATAT
TCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA
TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG
AGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTATGAACTCCATC
CTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGT
GGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACC
AAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAAGTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAG
AACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATG
GACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACT
AATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTA
AATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGA
GTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAA
ACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGAC
AAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTC
GGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAA
TCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACACA

AAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAAT
AGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTAACCTACCACCT
GTAGTAGCAAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACT
GTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAG
TGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAATTAGCAGGA
AGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGT
GGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGA
ATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATC
CACAATTTTTAAAGAAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACA
TACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCC
AGTTTGGAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAA
GTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTA
GACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID NO:45)。

[0201] 然后,由Eurofins Genomics公司合成含有Rev、Rev和兔β珠蛋白多聚A序列及两侧XbaI和XmaI限制性位点的DNA片段。然后将该DNA片段在XbaI和XmaI限制性位点插入质粒。该DNA序列如下所示:

[0202] TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCT
TCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGA
GAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGC
CTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAATTCTGGGACGCAGGGGT
GGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCTT
TGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTG
TCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCT
GGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTT
TCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATT
TTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAC
ATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAA
GAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTTCCTTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGAT
TTTTTTTATATTTGTTTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGA
TTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCA
AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
CGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAA
CTCCGCCCATCCCCCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTT
TGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAA
AGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCGGG
(SEQ ID NO:46)。

[0203] 最后,用CAG启动子(CMV增强子,鸡β肌动蛋白启动子加鸡β肌动蛋白内含子序列)

替换pCDNA3.1的CMV启动子。由Eurofins Genomics公司合成含有CAG增强子/启动子/内含子序列及两侧MluI和EcoRI限制性位点的DNA片段。然后将DNA片段在MluI和EcoRI限制性位点处插入质粒。该DNA序列如下所示：

[0204] ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGACGCGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGCGCCCCGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGCGCGAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCTCGCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGAATTC (SEQ ID NO:47)。

[0205] 构建VSV-G包膜质粒：

[0206] 由Eurofins Genomics公司合成两侧带有EcoRI限制性位点的疱疹性口炎印第安纳病毒糖蛋白 (VSV-G) 序列。然后将该DNA片段在EcoRI限制性位点处插入pCDNA3.1质粒 (英杰公司)，并用CMV特异性引物测序确定方向正确。

[0207] 该DNA序列如下所示：

[0208] ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTTCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAATTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTGATTACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACT

TTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGTTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAATACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTGGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTGTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGAAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTGA (SEQ ID NO:30)。

[0209] 还用本文所述的方法和材料设计并生产了4-载体系统,其包含3-载体慢病毒包装系统。4-载体系统的示意图如图2所示。简而言之,并参照图2,最上方的载体是辅助质粒,此例中不含Rev。第二载体是独立的Rev质粒。第三载体是包膜质粒。最下面的载体是治疗载体,如文中所述。

[0210] 参照图2,辅助质粒包含:CMV增强子和鸡 β 肌动蛋白启动子(SEQ ID NO:23);鸡 β 肌动蛋白内含子(SEQ ID NO:41);HIV Gag(SEQ ID NO:24);HIV Pol(SEQ ID NO:25);HIV整合酶(SEQ ID NO:26);HIV RRE(SEQ ID NO:27);和兔 β 珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:42)。

[0211] Rev质粒包含RSV启动子和HIV Rev(SEQ ID NO:48);以及兔 β 珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:42)。

[0212] 包膜质粒包含CMV启动子(SEQ ID NO:29); β 珠蛋白内含子(SEQ ID NO:7或8);VSV-G包膜糖蛋白(SEQ ID NO:30);和兔 β 珠蛋白多聚A(SEQ ID NO:42)。

[0213] 在一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体A中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体B中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体C中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体D中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体E中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体F中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体G中所示的所有元件。在另一个方面中,表达PAH的治疗性慢病毒载体包括图3载体H中所示的所有元件。

[0214] 公开了4-载体系统的合成,所述4-载体系统包含由辅助质粒、Rev质粒和包膜质粒组成的3-载体慢病毒包装系统。

[0215] 材料和方法:

[0216] 无Rev辅助质粒的构建:

[0217] 通过插入含有RRE和兔 β 珠蛋白多聚A序列的DNA片段构建不含Rev的辅助质粒。该序列由Eurofins Genomics公司合成,两侧为XbaI和XmaI限制性位点。然后将RRE/兔多聚A β 珠蛋白序列在XbaI和XmaI限制性位点处插入辅助质粒。

[0218] 该DNA序列如下所示:

[0219] TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCT
TCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGA
GAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGC
CTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGT
GGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCTCT
TGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTG
TCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCT
GGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTT
TCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATT
TTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAC
ATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAA
GAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGAT
TTTTTTTATATTTTGTGTTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGA
TTTTTCTCTCTCTCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCA
AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAG
CCGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC
CGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAA
CTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTT
TGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAA
AGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCGGG
(SEQ ID NO:46)。

[0220] Rev质粒的构建：

[0221] 由Eurofins Genomics公司将RSV启动子和HIV Rev序列合成成为单个DNA片段，两侧为MfeI和XbaI限制性位点。然后将该DNA片段在MfeI和XbaI限制性位点处插入pCDNA3.1质粒(英杰公司)中，以RSV启动子替换CMV启动子。该DNA序列如下所示：

[0222] CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGG
GGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGAAATGTAG
TCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGC
ACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACATG
GATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCAT
TTGACCATTACACCATTTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC
ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCT
CCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAA
GCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG
ACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTA
CCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTC
AAATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA (SEQ ID NO:48)。

[0223] 用于包装系统的质粒可以用类似的元件修饰，并且任选地，可以去除内含子序列

而不丢失载体功能。例如,下述元件可替换包装系统中类似的元件:

[0224] 启动子:延长因子-1 (EF-1) (SEQ ID NO:49),磷酸甘油酸激酶 (PGK) (SEQ ID NO:50) 和泛素C (UbC) (SEQ ID NO:51) 可替换CMV (SEQ ID NO:29) 或CMV增强子/鸡β肌动蛋白启动子 (SEQ ID NO:23)。这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0225] 多聚A序列:SV40多聚A (SEQ ID NO:52) 和bGH多聚A (SEQ ID NO:53) 可替换兔β珠蛋白多聚A (SEQ ID NO:42)。这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0226] HIV Gag、Pol和整合酶序列:辅助质粒中的HIV序列可由不同的HIV株或进化枝构建。例如,可用Ba1株的HIV Gag (SEQ ID NO:24),HIV Pol (SEQ ID NO:25) 和HIV Int (SEQ ID NO:26) 替换辅助质粒/加Rev的辅助质粒中的gag、pol和int序列,如本文所述。这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0227] 包膜:可用下述病毒的膜糖蛋白替换VSV-G糖蛋白:猫科动物内源性病毒 (RD114) (SEQ ID NO:54),长臂猿白血病病毒 (GALV) (SEQ ID NO:55),狂犬病病毒 (FUG) (SEQ ID NO:56),淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) (SEQ ID NO:57),甲型鸡瘟病毒 (FPV) (SEQ ID NO:58),罗斯河α病毒 (RRV) (SEQ ID NO:59),鼠白血病病毒10A1 (MLV) (SEQ ID NO:60) 或埃博拉病毒 (EboV) (SEQ ID NO:61)。这些包膜的序列详见本文序列部分。此外,这些序列还可以通过添加、取代、缺失或突变进一步改变。

[0228] 总之,可以对3-载体对比4-载体系统进行如下所述的比较和对比。3-载体慢病毒系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag、Pol、整合酶、RRE和Rev;2.包膜质粒:VSV-G包膜;和3.治疗载体:RSV、5' LTR、Psi包装信号、RRE、cPPT、凝血酶原增强子、α1抗-胰蛋白酶增强子、苯丙氨酸羟化酶、WPPE和3' Δ LTR。4-载体慢病毒系统包含:1.辅助质粒:HIV Gag、Pol、整合酶和RRE;2.Rev质粒:Rev;3.包膜质粒:VSV-G包膜;和4.治疗载体:RSV、5' LTR、Psi包装信号、RRE、cPPT、凝血酶原增强子、α1抗-胰蛋白酶增强子、苯丙氨酸羟化酶、WPPE和3' Δ LTR。与上述元件相对应的序列详见序列列表部分。

[0229] 实施例2.治疗载体

[0230] 例如,已经如图3所示设计和开发了示例性治疗载体。

[0231] 首先参照图3的载体A,从左到右关键遗传元件如下所示:杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR),Psi序列 (RNA包装位点),RRE (Rev-应答元件),cPPT (聚嘌呤区),凝血酶原增强子,hAAT启动子,PAH序列,包括PAH序列和其变体,如本文所详述,土拨鼠转录后调节元件 (WPPE),和在U3区域具有缺失的LTR。

[0232] 然后参照图3的载体B,从左到右关键遗传元件如下所示:杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR),Psi序列 (RNA包装位点),RRE (Rev-应答元件),cPPT (聚嘌呤区),位于凝血酶原增强子上游的HNF1 (肝细胞核因子) 结合位点,hAAT启动子,PAH序列,包括PAH序列和其变体,如本文所详述,土拨鼠转录后调节元件 (WPPE),和在U3区域具有缺失的LTR。

[0233] 然后参照图3的载体C,从左到右关键遗传元件如下所示:杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR),Psi序列 (RNA包装位点),RRE (Rev-应答元件),cPPT (聚嘌呤区),位于凝血酶原增强子上游的HNF1/4 (肝细胞核因子) 结合位点,hAAT启动子,PAH序列,包括PAH序列和其变体,如本文所详述,土拨鼠转录后调节元件 (WPPE),和在U3区域具有缺失的LTR。

[0234] 然后参照图3的载体D,从左到右关键遗传元件如下所示:杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR),Psi序列 (RNA包装位点),RRE (Rev-应答元件),cPPT (聚嘌呤区),凝血酶原增强子,

HNF1 (肝细胞核因子), hAAT启动子, PAH序列, 包括PAH序列和其变体, 如本文所详述, 土拨鼠转录后调节元件 (WPRES), 和在U3区域具有缺失的LTR。

[0235] 然后参照图3的载体E, 从左到右关键遗传元件如下所示: 杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR), Psi序列 (RNA包装位点), RRE (Rev-应答元件), cPPT (聚嘌呤区), 凝血酶原增强子, HNF1/4 (肝细胞核因子), hAAT启动子, PAH序列, 包括PAH序列和其变体, 如本文所详述, 土拨鼠转录后调节元件 (WPRES), 和在U3区域具有缺失的LTR。

[0236] 然后参照图3的载体F, 从左到右关键遗传元件如下所示: 杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR), Psi序列 (RNA包装位点), RRE (Rev-应答元件), cPPT (聚嘌呤区), 位于凝血酶原增强子上游的5个HNF1 (肝细胞核因子) 结合位点, hAAT启动子, PAH序列, 包括PAH序列和其变体, 如本文所详述, 土拨鼠转录后调节元件 (WPRES), 和在U3区域具有缺失的LTR。

[0237] 然后参照图3的载体G, 从左到右关键遗传元件如下所示: 杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR), Psi序列 (RNA包装位点), RRE (Rev-应答元件), cPPT (聚嘌呤区), 位于凝血酶原增强子上游的3个HNF1/HNF4 (肝细胞核因子) 结合位点, hAAT启动子, PAH序列, 包括PAH序列和其变体, 如本文所详述, 土拨鼠转录后调节元件 (WPRES), 和在U3区域具有缺失的LTR。

[0238] 首先参照图3的载体H, 从左到右关键遗传元件如下所示: 杂交5' 长末端重复 (RSV/LTR), Psi序列 (RNA包装位点), RRE (Rev-应答元件), cPPT (聚嘌呤区), 凝血酶原增强子, hAAT启动子, 兔β珠蛋白内含子, PAH序列, 包括PAH序列和其变体, 如本文所详述, 土拨鼠转录后调节元件 (WPRES), 和在U3区域具有缺失的LTR。

[0239] 为了产生图3概述的载体, 采用本文所述以及其他为本领域技术人员所知晓的方法和材料。

[0240] 抑制性RNA设计: 将智人 (*Homo sapiens*) 苯丙氨酸羟化酶 (PAH) (NM_000277.1) mRNA用于搜寻潜在shRNA候选物以敲减人细胞中的PAH水平。潜在的RNA shRNA序列选自通过siRNA或shRNA设计程序所选择的候选物, 例如来自Broad研究所 (Broad Institute) 主办的GPP网页门户 (GPP Web Portal, portals.broadinstitute.org/gpp/public/) 或来自赛默飞世尔科学公司 (Thermo Scientific) 的BLOCK-iT RNAi设计器 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaidesigner/>)。将单独选择的shRNA序列插入慢病毒载体, 紧邻RNA聚合酶III启动子如H1 (SEQ ID NO:22) 的3', 以调节shRNA表达。用这些慢病毒shRNA构建体转导细胞并测定特定mRNA水平的变化。

[0241] 载体构建: 对于PAH shRNA, 通过Eurofins MWG操纵子合成含有BamHI和EcoRI限制性位点的寡核苷酸序列。将重叠的有义和反义寡核苷酸序列混合并在从70摄氏度冷却至室温的过程中退火。使用限制性酶BamHI和EcoRI在37摄氏度消化慢病毒载体1小时。琼脂糖凝胶电泳纯化经消化的慢病毒载体, 并用赛默科技的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取经消化的慢病毒载体。测定DNA浓度, 并混合载体与寡核苷酸 (3:1比例), 退火, 然后连接。用T4 DNA连接酶在室温下进行连接反应30分钟。将2.5微升的连接混合物加入25微升的STBL3感受态细菌细胞中。42摄氏度热激完成转化。将细菌细胞涂布在含有氨苄青霉素的琼脂平板上, 回收抗药性菌落 (表明存在氨苄青霉素抗性质粒), 然后在LB肉汤中扩增。为了确认寡核苷酸序列的插入, 用赛默科技的迷你DNA制备试剂盒 (DNA mini prep kit) 从收获的细菌培养物中提取质粒DNA。采用shRNA表达调控启动子特异性引物进行DNA测序来确认shRNA序列在慢病毒载体中的插入。使用以下靶序列测定例举的shRNA序列对PAH的敲低:

[0242] PAH shRNA序列#1:

[0243] TCGCATTTTCATCAAGATTAATCTCGAGATTAATCTTGATGAAATGCGATTTTT (SEQ ID NO:13)

[0244] PAH shRNA序列#2:

[0245] ACTCATAAAGGAGCATATAAGCTCGAGCTTATATGCTCCTTTATGAGTTTTTT (SEQ ID NO:14)

[0246] 实施例3.肝特异性凝血酶原增强子/hAAT启动子

[0247] 使用慢病毒载体转导Hepal-6小鼠肝癌细胞,所述慢病毒载体包含肝特异性凝血酶原增强子(SEQ ID NO:5),和人 α -1抗胰蛋白酶启动子(SEQ ID NO:6)。所得DNA序列如下所示:

[0248] GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGAAGCTGTACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT (SEQ ID NO:63)。这些感染的结果在本文其他实施例中详述。

[0249] 实施例4.hAAT启动子以及凝血酶原增强子和肝细胞核因子(HNF)结合位点

[0250] 使用慢病毒载体转导Hepal-6小鼠肝癌细胞,所述慢病毒载体包含肝特异性凝血酶原增强子(SEQ ID NO:5),人 α -1抗胰蛋白酶启动子(SEQ ID NO:6)和一个或多个肝细胞核因子(HNF)结合位点。所得DNA序列如下所示,其包含5个HNF1结合位点(用下划线指示):

[0251] GTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACATC
GATGCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGT
ACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCT
AAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAG
CCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGG
CGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATAT
TCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAG
CTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT (SEQ ID NO:64)。所得DNA序列如下所示,其包含3
个HNF1/HNF4结合位点(HNF1用下划线指示;HNF4用黑体指示):

[0252] GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTGT
ACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAATCGATGC
GAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCTACTTA
GACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAG
GAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCC
AGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCA

CCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTT
CGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGGCA
GCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGC
[0253] TCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCC
CGTTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGGCCCTG
TCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAAT (SEQ ID

NO:65)。来自这些载体的PAH表达在本文其他实施方式中详述。

[0254] 实施例5. 针对PAH的材料和方法

[0255] 智人苯丙氨酸羟化酶 (hPAH) mRNA的序列 (Gen Bank:NM_000277.1) 由Eurofins Genomics公司 (肯塔基州路易斯维尔) 化学合成,并在基因的远端和近端具有EcoRI和SalI限制性酶位点。将使用EcoRI和SalI限制性酶处理的hPAH在杂合启动子的控制下连接到pCDH慢病毒质粒 (系统生物学公司 (System Biosciences), 加利福尼亚州帕洛阿尔托) 中,所述杂合启动子包含部分ApoE (NM_000001.11, U35114.1) 或凝血酶原 (AF478696.1) 和hAAT (HG98385.1) 基因座控制区。此外,合成人PAH以包含3'非翻译区 (UTR) 的289个核苷酸。

[0256] 使用限制性酶BamHI和EcoRI (NEB公司, 马萨诸塞州伊普斯威奇) 在37摄氏度消化慢病毒载体和hPAH序列2小时。琼脂糖凝胶电泳纯化经消化的慢病毒载体,并用赛默飞世尔公司 (ThermoFisher, 马萨诸塞州沃尔瑟姆) 的DNA凝胶提取试剂盒从凝胶中提取经消化的慢病毒载体。确定DNA浓度,然后使用3:1插入物与载体的比例和PAH序列 (hPAH) 混合。使用T4 DNA连接酶 (NEB公司) 在室温下将混合物连接连接30分钟。将2.5微升的连接混合物加入25微升的STBL3感受态细菌细胞 (赛默飞世尔公司) 中。在42摄氏度下进行热激来进行转化。将细菌细胞划线接种在含有氨苄青霉素的琼脂平板上,然后菌落在LB肉汤中扩增。为了确认PAH序列的插入,使用赛默飞世尔公司迷你DNA制备试剂盒 (DNA mini prep kit) 由收获的细菌培养物中提取质粒DNA。通过DNA测序验证慢病毒载体 (LV) 中的PAH序列插入。然后,通过Eurofins Genomics公司合成ApoE增强子/hAAT启动子或凝血酶原增强子/hAAT启动子序列,其具有ClaI和EcoRI限制性位点。使用ClaI和EcoRI酶消化含有PAH编码序列和杂合启动子的慢病毒载体并连接到一起。通过DNA测序验证包含杂合启动子的质粒。然后将包含hPAH和杂合启动子序列的慢病毒载体用于包装慢病毒颗粒以测试它们在转导细胞中表达PAH的能力。使用慢病毒转导哺乳动物细胞。3天后收集细胞,并通过针对PAH表达的免疫印迹分析蛋白质。

[0257] hPAH序列的修饰:

[0258] 纳入hPAH序列的多种修饰以改善由ApoE增强子/hAAT启动子所调节的细胞表达水平。首先,将hPAH 3'非翻译区 (UTR) 的289个核苷酸插入PAH编码区之后和mRNA末端之前。这产生了LV-ApoE/hAAT-hPAH-UTR。

[0259] 然后,肝特异性ApoE增强子与肝特异性凝血酶原增强子交换。使用ApoE或凝血酶原增强子/hAAT启动子之一与hPAH编码序列和UTR的289个核苷酸的组合分析PAH表达。然后,使用凝血酶原增强子/hAAT启动子以及不具有UTR区的hPAH编码序列评估PAH表达。凝血酶原增强子/hAAT启动子的组合排除了对于UTR区的需求,如ApoE增强子/hAAT启动子组合所需。因此,凝血酶原增强子/hAAT启动子组合可以肝特异性方式调节高水平的PAH表达,并

且不需要UTR区。对于理解肝特异性调节元件调节hPAH基因方面这一重要的进展能够生成构建体用于在肝组织中特异性表达,同时仍能实现hPAH的高水平生产。在苯丙酮尿症的遗传药物中,限制转基因对于肝细胞的表达是载体安全性和靶标特异性的重要考虑因素。

[0260] 实施例6.Hepa1-6细胞和293T细胞中具有凝血酶原增强子的变体且具有或不具有3'UTR区的慢病毒传递的hPAH表达

[0261] 该实施例说明,相较于ApoE增强子,使用含有hAAT启动子与凝血酶原增强子组合的慢病毒载体,Hepa1-6癌细胞和293T人胚胎肾细胞中人PAH的表达增加,分别如图4A和4B所示。当凝血酶原增强子与hAAT启动子组合时,hPAH表达不需要3'UTR。实际上,3'UTR降低包含凝血酶原的载体中的PAH表达,分别如图4A和4B所示。该实施例还说明,表达肝细胞核因子1和4(HNF1/4)结合位点与凝血酶原增强子组合的慢病毒载体增加Hepa1-6细胞和293T细胞中的PAH蛋白水平,分别如图4A和4B所示。

[0262] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH、凝血酶原和ApoE增强子和hAAT启动子,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导Hepa1-6小鼠肝癌细胞或293T人胚胎肾细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),弗吉尼亚州马纳萨斯)。该慢病毒载体纳入了具有或不具有其3'UTR的人PAH基因。此外,这些构建体中的hPAH表达由hAAT启动子驱动,所述hAAT启动子包含肝特异性凝血酶原或ApoE增强子。使用慢病毒颗粒转导细胞,并在3天后通过针对hPAH表达的免疫印迹分析蛋白质。人PAH的相对表达通过使用抗-PAH抗体(阿柏堪穆公司(Abcam),马萨诸塞州坎布里奇)的免疫印迹检测,并将抗-β肌动蛋白抗体(西格玛密理博公司(SigmaMillipore),南卡罗来纳州哥伦比亚市)用于加载对照。

[0263] 如图4A和4B所示,比较了6个组:单独包含Hepa 1-6细胞或293T细胞的对照(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区的慢病毒载体(泳道2),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH的慢病毒载体,其在凝血酶原增强子上游包含5X HNF1结合位点(泳道3),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH的慢病毒载体,其在凝血酶原增强子上游包含3X HNF1和3X HNF4结合位点(泳道4),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达具有3'UTR的hPAH的慢病毒载体(泳道5),和通过ApoE增强子/hAAT启动子表达具有3'UTR的hPAH的慢病毒载体(泳道6)。图4A和4B证明了,相较于ApoE增强子,当凝血酶原增强子与hAAT启动子组合时,Hepa1-6癌细胞和293T细胞中PAH表达增加。此外,当载体中包含凝血酶原增强子时,hPAH表达不需要PAH 3'UTR。

[0264] 实施例7.Hepa1-6细胞中使用内含子序列、密码子优化的PAH序列以及凝血酶原增强子,其包含HNF-1或HNF1/4结合位点的慢病毒递送表达hPAH

[0265] 该实施例说明使用含有hAAT启动子与凝血酶原增强子和兔β珠蛋白内含子序列组合的慢病毒载体,Hepa1-6癌细胞中人PAH的表达增加,如图5A所示。当内含子序列反向插入时,hPAH不表达。在图5B中,这表明密码子优化形式的hPAH编码序列表达少于非密码子优化的hPAH编码区序列。该实施例还说明,表达肝细胞核因子-1和-4(HNF1和HNF1/4)结合位点与凝血酶原增强子组合的慢病毒载体增加Hepa1-6细胞中的hPAH蛋白水平,如图5C所示。

[0266] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH(经优化的和未经优化的)、凝血酶原增强子、hAAT启动子和兔β珠蛋白序列,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导Hepa1-6小鼠肝癌细

胞(美国典型培养物保藏中心,弗吉尼亚州马纳萨斯)。该慢病毒载体纳入了人PAH基因,其具有或不具有兔 β 珠蛋白内含子。此外,这些构建体中的hPAH表达由hAAT启动子驱动,所述hAAT启动子包含肝特异性凝血酶原增强子以及凝血酶原增强子上游或下游的HNF1或HNF1/4结合位点。使用慢病毒颗粒转导细胞,并在3天后通过针对PAH表达的免疫印迹分析蛋白质。人PAH的相对表达通过使用抗-PAH抗体(阿柏堪穆公司,马萨诸塞州坎布里奇)的免疫印迹检测,并将抗- β 肌动蛋白抗体(西格玛密理博公司,南卡罗来纳州哥伦比亚市)用于加载对照。

[0267] 如图5A所示,比较了4个组:单独包含Hepa 1-6细胞的对照(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区的慢病毒载体(泳道2),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH并包含正向兔 β 珠蛋白内含子的慢病毒载体(泳道3),和通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH并包含反向兔 β 珠蛋白内含子的慢病毒载体(泳道4)。如图5B所示,比较了3个组:单独包含Hepa 1-6细胞的对照(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子仅表达hPAH编码区的慢病毒载体(泳道2和3),和通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达经密码子优化的hPAH序列的慢病毒载体(图4)。如图5C所示,比较了6个组:单独包含Hepa 1-6细胞的对照(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子仅表达hPAH编码区的慢病毒载体(泳道2和3),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH且包含兔 β 珠蛋白内含子的慢病毒载体(泳道4),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子上游的HNF1结合位点表达hPAH的慢病毒载体(泳道5),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子下游的HNF1结合位点表达hPAH的慢病毒载体(泳道6),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子上游的HNF1/4结合位点表达hPAH的慢病毒载体(泳道7),和通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子下游的HNF1/4结合位点表达hPAH的慢病毒载体(泳道8)。图5A-5C证明了当将兔 β 珠蛋白内含子序列添加到hPAH编码序列上游时,Hepa1-6癌细胞中的hPAH表达增加。此外,经密码子优化的hPAH编码序列表达小于未经密码子优化的序列。最终,相较于仅包含凝血酶原增强子/hAAT启动子的慢病毒载体,将HNF1或HNF1/4结合位点添加到凝血酶原上游而非下游增加hPAH的表达。

[0268] 实施例8.Hepa1-6细胞中使用hAAT启动子以及凝血酶原增强子,其包含HNF-1和HNF1/4结合位点的慢病毒递送表达hPAH RNA

[0269] 如图6所示,该实施例说明使用含有hAAT启动子与凝血酶原增强子和针对HNF1和HNF1/4的结合位点组合的慢病毒载体以感染复数(MOI)为1和5转导的Hepa1-6癌细胞中人PAH RNA的表达增加。

[0270] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH、凝血酶原和hAAT启动子,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导Hepa1-6小鼠肝癌细胞(美国典型培养物保藏中心,弗吉尼亚州马纳萨斯)。慢病毒载体纳入人PAH基因。此外,这些构建体中的hPAH表达由hAAT启动子驱动,所述hAAT启动子包含肝特异性凝血酶原增强子以及上游HNF1或HNF1/4结合位点。使用慢病毒颗粒转导细胞,并在3天后,用RNeasy试剂盒(凯杰公司(Qiagen),马里兰州德国镇)提取RNA并使用TaqMan探针

[0271] (5'-TCGTGAAAGCTCATGGACAGTGGC-3') (SEQ ID NO:66) 以及针对hPAH引物组Fwd: 5'-AGATCTTGAGGCATGACATTGG-3' (SEQ ID NO:67) 和Rev:5'-GTCCAGCTCTGAATGGTTCTT-3'

(SEQ ID NO:68)通过qPCR分析。使用肌动蛋白探针(5'-AGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3')(SEQ ID NO:69)和引物组(Fwd:5'-GGACCTGACTGACTACCTCAT-3'(SEQ ID NO:70)和Rev:5'-CGTAGCACAGCTTCTCCTTAAT-3')(SEQ ID NO:71)将总RNA(100ng)标准化。

[0272] 如图6所示,比较了4个组:单独包含Hepa 1-6细胞的对照(柱1),以1MOI(柱2)和5MOI(柱5)通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区的慢病毒载体,以1MOI(柱3)和5MOI(柱6)通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子上游的HNF1结合位点表达hPAH的慢病毒载体,和以1MOI(柱4)和5MOI(柱7)通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子上游的HNF1/4结合位点表达hPAH的慢病毒载体。图6证明使用通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH的载体使PAH RNA表达由1增加至4.7pg(1-5MOI)。当凝血酶原增强子上游包括HNF1结合位点时,由2.3增加至10.7pg(1-5MOI),而当凝血酶原增强子上游插入HNF1/4结合位点时,由3增加至17.8pg(1-5MOI)。

[0273] 实施例9.Hepa1-6细胞中使用凝血酶原增强子以及hAAT或甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子之一的慢病毒递送表达hPAH

[0274] 该实施例说明,相较于TBG启动子(SEQ ID NO:62),使用含有凝血酶原增强子与hAAT启动子组合的慢病毒载体,Hepa1-6癌细胞中人PAH的表达增加,如图7所示。

[0275] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH、凝血酶原以及hAAT和TBG启动子,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导Hepa1-6小鼠肝癌细胞(美国典型培养物保藏中心,弗吉尼亚州马纳萨斯)。慢病毒载体纳入人PAH基因。此外,这些构建体中的hPAH表达由肝特异性hAAT或TBG启动子驱动。使用慢病毒颗粒转导细胞,并在3天后通过针对PAH表达的免疫印迹分析蛋白质。人PAH的相对表达通过使用抗-PAH抗体(阿柏堪穆公司(Abcam),马萨诸塞州坎布里奇)的免疫印迹检测,并将抗-β肌动蛋白抗体(西格玛密理博公司(SigmaMillipore),南卡罗来纳州哥伦比亚市)用于加载对照。

[0276] 如图7所示,比较了4个组:通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区的慢病毒载体(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH并包含兔β珠蛋白内含子的慢病毒载体(泳道2),具有慢病毒载体的对照,所述慢病毒载体仅包含凝血酶原增强子/hAAT启动子(泳道3),和通过凝血酶原增强子/TBG启动子表达hPAH的慢病毒载体(泳道4)。图7证明了,相较于TBG启动子,当凝血酶原增强子与hAAT启动子组合时,Hepa1-6癌细胞中的PAH表达显著增加。

[0277] 实施例10.Hepa1-6细胞或Hep3B细胞中使用PAH基因上游的兔或人β珠蛋白内含子序列之一的慢病毒递送表达hPAH

[0278] 该实施例说明使用包含凝血酶原增强子与hAAT启动子或兔或人β珠蛋白内含子序列之一组合的慢病毒载体,Hepa1-6和Hep3B癌细胞中人PAH的表达用人β珠蛋白内含子时不增加,如图8A和8B所示。

[0279] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH、凝血酶原增强子、hAAT启动子和兔或人β珠蛋白内含子,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导Hepa1-6小鼠肝癌细胞或Hep3B人肝细胞性癌细胞(美国典型培养物保藏中心,弗吉尼亚州马纳萨斯)。慢病毒载体纳入人PAH基因。此外,这些构建体中的hPAH表达由肝特异性hAAT启动子,以及兔或人β珠蛋白内含子之

一驱动。使用慢病毒颗粒转导细胞,并在3天后通过针对PAH表达的免疫印迹分析蛋白质。人PAH的相对表达通过使用抗-PAH抗体(阿柏堪穆公司(Abcam),马萨诸塞州坎布里奇)的免疫印迹检测,并将抗-β肌动蛋白抗体(西格玛密理博公司(SigmaMillipore),南卡罗来纳州哥伦比亚市)用于加载对照。

[0280] 如图8A和8B所示,比较了4个组:无慢病毒(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH的慢病毒载体(泳道2),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子和兔β珠蛋白内含子序列表达hPAH的慢病毒载体(泳道3),和通过凝血酶原增强子/hAAT启动子和人β珠蛋白内含子表达hPAH的慢病毒载体(泳道4)。图8A和8B证明使用凝血酶原增强子和hAAT启动子增加Hepa1-6和Hep3B癌细胞中的PAH表达。添加兔β珠蛋白内含子改善Hepa1-6细胞中的表达,但是不改善Hep3B中的表达。人β珠蛋白内含子不改善Hepa1-6和Hep3B中的表达。

[0281] 实施例11. 原代人肝细胞中使用凝血酶原增强子/hAAT启动子的慢病毒递送表达hPAH

[0282] 该实施例说明使用含有凝血酶原增强子与hAAT启动子组合的慢病毒载体显著增加原代人肝细胞中人PAH的表达,如图9所示。

[0283] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH、凝血酶原和ApoE增强子和hAAT启动子,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导原代人肝细胞(三角研究实验室公司(Triangle Research Labs),北卡罗莱纳州)。该慢病毒载体纳入人PAH的编码序列或编码序列和3' UTR。此外,这些构建体中的hPAH表达由肝特异性凝血酶原或ApoE增强子和hAAT启动子驱动。使用慢病毒颗粒转导细胞,并在4天后通过针对PAH表达的免疫印迹分析蛋白质。人PAH的相对表达通过使用抗-PAH抗体(阿柏堪穆公司,马萨诸塞州坎布里奇)的免疫印迹检测,并将抗-β肌动蛋白抗体(西格玛密理博公司,南卡罗来纳州哥伦比亚市)用于加载对照。

[0284] 如图9所示,比较了5个组:具有慢病毒载体的对照,所述慢病毒载体仅包含凝血酶原增强子/hAAT启动子(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区的慢病毒载体(泳道2),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子上游的5X HNF1结合位点表达hPAH的慢病毒载体(泳道3),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH并包含兔β珠蛋白内含子的慢病毒载体(泳道4),和通过ApoE/hAAT启动子表达具有3'UTR的hPAH的慢病毒载体(泳道5)。图9证明了,相较于ApoE增强子,当凝血酶原增强子与hAAT启动子组合时,原代人肝细胞中的PAH表达增加。此外,在hPAH编码序列上游包含兔β珠蛋白内含子序列增强hPAH表达。

[0285] 实施例12. Hepa1-6细胞中慢病毒递送的hPAH的酶促活性

[0286] 该实施例说明当hPAH在Hepa1-6细胞中表达时,慢病毒递送的人PAH具有酶促活性,这表现为细胞培养基和细胞裂解物中苯丙氨酸(Phe)水平降低,分别如图10A和10C以及10B所示。Hepa1-6细胞中的PAH活性需要辅因子BH4的前体——墨蝶呤(sepiapterin)。

[0287] 合成人PAH、凝血酶原和ApoE增强子、hAAT启动子和兔β珠蛋白内含子,并插入慢病毒载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的慢病毒载体用于转导Hepa1-6小鼠肝癌细胞(美国典型培养物保藏中心,弗吉尼亚州马纳萨斯)。慢病毒载体纳入人PAH的编码序列。此外,这些构建体中的hPAH表达由肝特异性凝血酶原增强子/hAAT启动子驱动并包含兔β珠蛋白内含子序列。使用慢病毒颗粒转导细胞并在4天后使用苯丙氨酸试

验试剂盒(西格玛密理博公司,南卡罗来纳州哥伦比亚市)由细胞培养基或细胞裂解物测量苯丙氨酸水平。

[0288] 如图10A和10B所示,比较了来自图10A中的细胞培养基或图10B中的细胞裂解物的4个组:具有慢病毒载体的对照,所述慢病毒载体仅含有不具有墨蝶呤(柱1)或具有墨蝶呤(柱3)的凝血酶原增强子/hAAT启动子,通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区并包含不具有墨蝶呤(柱2)或具有墨蝶呤(柱4)的兔 β 珠蛋白内含子序列的慢病毒载体。如图10C所示,比较了来自细胞培养基的10个组:具有慢病毒载体的对照,所述慢病毒载体仅包含不具有墨蝶呤(柱1)或具有墨蝶呤(柱6)的凝血酶原增强子/hAAT启动子,通过不具有墨蝶呤(柱2)或具有墨蝶呤(柱7)的凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH编码区的慢病毒载体,通过不具有墨蝶呤(柱3)或具有墨蝶呤(柱8)的凝血酶原增强子/hAAT启动子以及凝血酶原增强子上游的5X HNF1结合位点表达hPAH的慢病毒载体,通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH并包含不具有墨蝶呤(柱4)或具有墨蝶呤(柱9)的兔 β 珠蛋白内含子的慢病毒载体,通过不具有墨蝶呤(柱5)或具有墨蝶呤(柱10)的ApoE增强子/hAAT启动子表达具有3'UTR的hPAH编码区的慢病毒载体。图10A和10B显示hPAH在墨蝶呤存在的情况下在Hepa1-6中具有酶促活性。如图10A所示,使用表达hPAH的慢病毒载体转导的Hepa1-6细胞中细胞培养基苯丙氨酸水平降低了38%。在细胞裂解物中,使用表达hPAH的慢病毒载体转导的Hepa1-6细胞中苯丙氨酸水平降低了88%,如图10B所示。图10C显示hPAH在包含不同肝特异性启动子元件的载体中具有酶促活性。使用含有凝血酶原增强子/hAAT启动子和hPAH的载体,Phe水平降低了41%,使用含有凝血酶原增强子/hAAT启动子和hPAH上游的5X HNF1结合位点的载体,Phe水平降低了43%,使用含有凝血酶原增强子/hAAT启动子(包含兔 β 珠蛋白内含子)和hPAH的载体,Phe水平降低了48%,而使用含有ApoE增强子/hAAT启动子和hPAH(包含3'UTR)的载体,Phe水平降低了36%。

[0289] 实施例13.慢病毒递送的PAH降低PAH突变小鼠中的血液苯丙氨酸水平

[0290] 该实施例说明慢病毒递送的PAH降低Pah^{enu2}突变小鼠血液中的苯丙氨酸水平。Shedlovsky等(人苯丙酮尿症的小鼠模型(Mouse Models of Human Phenylketonuria), Genetics 134:1205-1210 (1993年8月))中描述和表征了Pah^{enu2}突变小鼠,其全部内容通过引用纳入本文。Pah^{enu2}突变小鼠(n=4)通过尾静脉注射150 μ l体积的LV-Pro-hAAT-PAH (AGT323)载体。对照处理动物通过尾静脉注射不含慢病毒载体的盐水。LV-Pro-hAAT-PAH (AGT323)的效价为 1×10^{10} ,如通过qPCR检测转导的293T细胞中整合的载体拷贝所确定。在注射时,小鼠为6-8周龄。注射载体之前(T=0)以及注射后1和2周收集血液。

[0291] 为了测量苯丙氨酸水平,通过面静脉收集血液。使用柳叶刀刺穿脸颊,在血清试管中收集400 μ l全血。将血液静置一小时,然后将试管离心。在顶层分离血浆/血清并收集。然后将血浆冷冻,直至在临床氨基酸分析仪上对其进行分析。

[0292] LV-Pro-hAAT-PAH (AGT323)载体的引入在注射后1周和2周导致血苯丙氨酸水平降低。如表1和图11所示,1周和2周时间点的血液苯丙氨酸平均微摩尔水平分别为1674.7和1890。这相较于对照处理小鼠约2400和2500之间的平均微摩尔血液苯丙氨酸水平(表1和图11)。

[0293] 此外,引入LV-Pro-hAAT-PAH (AGT 323)载体导致肝细胞的遗传修饰。对于尸检期间收集的肝的载体拷贝数研究表明在这些研究中慢病毒载体拷贝数约为0.2/细胞。如图12

所示,肝脏中载体拷贝数增加与苯丙氨酸水平降低之间存在大致的线性关系(皮尔逊乘积相关系数(Pearson product correlation coefficient)=-0.326)。

[0294] 血液苯丙氨酸水平降低>20%将为患有苯丙酮尿症疾病的人患者提供治疗益处,可能将其诊断由经典PKU转变为轻度苯丙氨酸血症。

[0295] 表1

[0296] 幼年enu2小鼠中通过尾静脉注射AGT323的血液苯丙氨酸抑制

	对照小鼠 (n=6)	对照 第 1 周	对照 第 2 周	处理小鼠 (n=12)	处理的/ 第 1 周	处理的/ 第 2 周
[0297]	小鼠 1	2943*	2165	小鼠 7	1863	1448
	小鼠 2	2305	2155	小鼠 8	1489	1412
	小鼠 3	2275	2480	小鼠 9	1473	1741
	小鼠 4	2756	2432	小鼠 10	1910	1999
	小鼠 5	2263	2701	小鼠 11	1606	1753
	小鼠 6	2483	2477	小鼠 12	1851	2337
				小鼠 13	1187	1065
[0298]				小鼠 14	2042	2266
				小鼠 15	1841	2174
				小鼠 16	1532	1498
				小鼠 17	1768	1758
				小鼠 18	1534	1534
	平均值	2504.2	2401.7		1674.7	1890
	平均值的标准偏差	230.2	161.1		204.5	299.1

[0299] *血液[Phe]以微摩尔/L

[0300] 实施例14. HEK293T细胞中使用DJ或AAV2血清型的AAV递送的hPAH表达

[0301] 该实施例说明人PAH在具有AAV载体的HEK293T细胞中表达,所述AAV载体包含凝血酶原增强子与hAAT启动子组合,并且具有或不具有兔β珠蛋白内含子。

[0302] 通过Eurofins Genomics公司(肯塔基州路易斯维尔)合成人PAH、凝血酶原增强子、hAAT启动子和兔β珠蛋白内含子,并插入AAV载体。通过DNA测序验证序列的插入。然后将包含验证的hPAH序列的AAV载体用于转导HEK293T细胞(美国典型培养物保藏中心,弗吉尼亚州马纳萨斯)。如本文所公开的,AAV载体纳入人PAH基因。此外,这些构建体中的hPAH表达由肝特异性hAAT启动子以及兔β珠蛋白内含子驱动。使用AAV颗粒转导细胞,并在3天后通过针对PAH表达的免疫印迹或qPCR分析蛋白质或RNA。人PAH蛋白的表达通过使用抗-PAH抗体(阿柏堪穆公司,马萨诸塞州坎布里奇)的免疫印迹检测,并将抗-β肌动蛋白抗体(西格玛密理博公司,南卡罗来纳州哥伦比亚市)用于加载对照。使用TaqMan Fam-标记的探针(SEQ ID NO:66)和PAH引物(Fwd:SEQ ID NO:67;Rev:SEQ ID NO:68)通过qPCR检测PAH RNA表达。

[0303] 图13A显示了6个组的比较:AAV/DJ-GFP载体(泳道1),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH的AAV/DJ载体(泳道2),通过凝血酶原增强子/hAAT启动子和兔β珠蛋白内

含子序列表达hPAH的AAV/DJ载体(泳道3), AAV2-GFP载体(泳道4), 通过凝血酶原增强子/hAAT启动子表达hPAH的AAV2载体(泳道5), 通过凝血酶原增强子/hAAT启动子和兔β珠蛋白内含子序列表达hPAH的AAV2载体(泳道6)。

[0304] 图13B和13C显示图13A中PAH条带暴露增加后的印迹。增加暴露, 从而使条带密度处于通过定量成像分析的范围。相对于显示使用AAV/DJ血清型载体处理的印迹, 显示使用AAV/2血清型载体处理的印迹的原始条带强度低很多。因此, 相对于AAV/DJ血清型印迹, AAV/2血清型印迹需要更长的曝光时间, 以便进行PAH蛋白的定量测量。

[0305] 定量成像的结果显示, 使用包含兔β珠蛋白内含子的AAV/DJ载体或缺少兔β珠蛋白内含子的AAV/DJ载体, PAH蛋白表达增加了2倍(图13B; 条带下的数字显示相对倍数增加)。使用具有兔β珠蛋白内含子的AAV/2载体抑制了PAH的表达, 而使用不具有兔β珠蛋白内含子的AAV2载体导致PAH升高50倍(图13C; 条带下的数字显示相对倍数增加)。比较AAV血清型之间的PAH表达发现, 相对于使用AAV2 PAH载体, 使用AAV/DJ PAH载体导致PAH蛋白较高的表达。

[0306] 图13D证明, 相较于AAV2 PAH载体, AAV/DJ PAH载体的PAH RNA表达更高, 并且具有或没有兔β珠蛋白内含子的情况下也存在相似的表达。

[0307] 实施例15. 新生enu2/enu2小鼠中PKU的慢病毒载体疗法

[0308] 新生enu2/enu2小鼠(出生后第3天)通过直接注射入肝脏中用10μl载体储液LV-Pro-hAAT-PAH处理。未处理的动物接受无载体的生理盐水(假对照)。载体储液在无菌盐水中约为 5×10^8 转导单位/mL(在HEK293细胞中测量), 最终剂量为约 5×10^6 转导单位/小鼠(约 10^9 转导单位/kg)。

[0309] 如表2和图14所示, 相对于未处理的enu2/enu2小鼠(2063+/-185), LV-Pro-hAAT-PAH处理的enu2/enu2小鼠(1390+/-127)中的血液苯丙氨酸水平的微摩尔浓度显著降低。

[0310] 表2

[0311]	血液 Phe(+/- 平均值的标准误差)	野生型 (n=7)	enu2/enu2 处理的 (n=5)	enu2/enu2 未处理的 (n=10)
		60.7 +/- 3.4	1390 +/- 127	2063 +/- 185
[0312]	处理的相对未处理的		未配对 t 检验 P = 0.032	
			血液[Phe]平均值之间的差异) 674 +/- 280	

[0313] 实施例16. 表达靶向PAH基因3' UTR的shPAH并不抑制Hep3B细胞中通过LV-H1-shPAH-凝血酶原-hAAT-hPAH的PAH表达

[0314] 该实施例说明shPAH在Hep3B细胞中并不抑制来自慢病毒载体LV-Pro-hAAT-PAH-shPAH序列#1 (SEQ ID NO:13) 或慢病毒载体LV-Pro-hAAT-PAH-shPAH#2 (SEQ ID NO:14) 的PAH表达。

[0315] 合成本文公开的人PAH并将其插入包含PAH shRNA序列#1 (SEQ ID NO:13) 或PAH shRNA序列#2 (SEQ ID NO:14) 的慢病毒载体中。通过DNA测序验证序列的插入。然后将单独含有PAH或与PAH shRNA序列#1 (SEQ ID NO:13) 或PAH shRNA序列#2 (SEQ ID NO:14) 组合的慢病毒载体用于转导人Hep3B细胞 (购自美国典型培养物保藏中心, 弗吉尼亚州玛纳萨斯)。使用慢病毒颗粒转导细胞, 并在3天后通过针对PAH表达的western印迹分析蛋白质。人PAH的相对表达通过免疫印迹检测, 其使用抗-PAH抗体 (阿柏堪穆公司), 和加载对照 β -肌动蛋白。hPAH表达由凝血酶原增强子和hAAT启动子驱动。在各种情况下, 慢病毒载体纳入人PAH基因和PAH shRNA序列#1 (SEQ ID NO:13) 或PAH shRNA序列#2 (SEQ ID NO:14)。慢病毒载体 (LV) 中shRNA序列的插入通过这样的DNA测序验证, 所述DNA测序使用与启动子互补的引物以调节shPAH-2表达。在这一情况中, H1启动子用于调节PAH shRNA表达。shPAH (PAH shRNA序列#1 (SEQ ID NO:13) 或PAH shRNA序列#2 (SEQ ID NO:14)) 的靶序列在PAH 3' UTR中, 其不存在于LV-PAH载体。

[0316] 如图15所示, PAH shRNA序列#1 (SEQ ID NO:13) 或PAH shRNA序列#2 (SEQ ID NO:14) 均未抑制源自慢病毒的PAH表达。

[0317] 序列表

[0318]

SEQ ID NO:	说明	序列
1	PAH	ATGTCCACTGCGGTCCTGGAAAACCCAGGCTTGGGCAGGAAACTCT CTGACTTTGGACAGGAAACAAGCTATATTGAAGACAACCTGCAATCA AAATGGTGCCATATCACTGATCTTCTCACTCAAAGAAGAAGTTGGTG CATTGGCCAAAGTATTGCGCTTATTTGAGGAGAATGATGTAAACCTG ACCCACATTGAATCTAGACCTTCTCGTTTAAAGAAAGATGAGTATGA ATTTTTCACCCATTTGGATAAACGTAGCCTGCCTGCTCTGACAAACA TCATCAAGATCTTGAGGCATGACATTGGTGCCACTGTCCATGAGCTT TCACGAGATAAGAAGAAAGACACAGTGCCCTGGTTCCCAAGAACCA TTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCAATCAGATTCTCAGCTATGGAGCG GAACTGGATGCTGACCACCCTGGTTTTAAAGATCCTGTGTACCGTGC AAGACGGAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTACAACCTACCGCCATGGG CAGCCCATCCCTCGAGTGGAATACATGGAGGAAGAAAAGAAAACAT GGGGCACAGTGTTCAAGACTCTGAAGTCCTTGATAAAAACCCATGCT TGCTATGAGTACAATCACATTTTTCCACTTCTTGAAAAGTACTGTGG CTTCATGAAGATAACATTCCCCAGCTGGAAGACGTTTCTCAATTCC TGCAGACTTGCACTGGTTTTCCGCTCCGACCTGTGGCTGGCCTGCTTT CCTCTCGGGATTTCTTGGGTGGCCTGGCCTCCGAGTCTTCCACTGCA CACAGTACATCAGACATGGATCCAAGCCCCGTATACCCCCGAACCT GACATCTGCCATGAGCTGTTGGGACATGTGCCCTGTGTTTCAGATCG CAGCTTTGCCAGTTTCCCAGGAAATTGGCCTTGCTCTCTGGGTG CACCTGATGAATACATTGAAAAGCTCGCCACAATTTACTGGTTTACT GTGGAGTTTGGGCTCTGCAAACAAGGAGACTCCATAAAGGCATATG GTGCTGGGCTCCTGTCATCCTTTGGTGAATTACAGTACTGCTTATCA GAGAAGCCAAAGCTTCTCCCCCTGGAGCTGGAGAAGACAGCCATCC AAAATTACACTGTCACGGAGTCCAGCCCCTGTATTACGTGGCAGAG AGTTTTAATGATGCCAAGGAGAAAAGTAAGGAACCTTGTGCCACAA TACCTCGGCCCTTCTCAGTTCGCTACGACCCATACACCCAAAGGATT GAGGTCTTGGACAATACCCAGCAGCTTAAGATTTTGGCTGATTCCAT TAACAGTGAAATTGGAATCCTTTGCAGTGCCCTCCAGAAAATAAAGT AA
2	密码子优化的 PAH (Opt2)	ATGAGTACGGCTGTGCTCGAGAATCCAGGTTTGGGCCGAAAGCTGT CTGATTTTGGACAGGAGACATCTTATATTGAAGACAACCTGCAACCAG AATGGTGCGATATCCCTTATTTTTTCTCTGAAAGAAGAAGTAGGTGC GCTGGCAAAGGTCTTGCGGCTGTTTGAAGAGAACGATGTTAATCTTA CTCATATTGAGTCCAGACCATCACGGCTGAAAAAAGACGAGTACGA ATTTTTTACTCACTTGGACAAACGAAGCTTGCCGGCTCTTACTAATA TCATTAAAGATCCTCCGGCATGACATAGGGGCGACAGTGCATGAGCTT TCAAGGGATAAAAAGAAAGATACCGTCCCCTGGTTTCCAAGGACCA TACAAGAACTCGACCGATTTCGCGAACCAGATCCTTTCATATGGTGCT GAGTTGGATGCTGACCACCCCGGCTTCAAAGACCCGGTCTACCGAG CGCGGCGGAAACAATTTGCTGACATCGCATAACAATTACAGGCATGG CCAGCCAATTCCTAGAGTAGAATACATGGAAGAAGAGAAAAAAACC TGGGGTACCGTCTTCAAGACGCTGAAATCATTGTATAAAACTCATGC ATGTTACGAATATAACCATATTTTTCCGTTGCTCGAGAAATATTGCG GGTTCACGAAGATAACATCCCACAACCTCGAGGATGTATCTCAGTTC CTCCAGACCTGTACGGGGTTTCGACTTAGGCCTGTGCGGGGTTTGT CAGTTCTCGAGACTTCCTGGGTGGATTGGCGTTTCGGGTATTCCATT GCACGCAGTATATCCGACACGGAAGTAAGCCAATGTACACGCCAGA ACCCGATATCTGTCACGAATTGCTTGGACACGTTCTCTGTTTTCTGA

[0319]

		TCGATCATTGCTCAGTTCCTTCACAGGAAATCGGCCTGGCATCTTTGGG GAGCGCCGGATGAATATATTGAGAAGCTCGCTACAATTTACTGGTTC ACGGTAGAATTTGGGTTGTGCAAGCAGGGTGATAGTATTAAGCAT ACGGTGCGGGATTGCTGTCTCATTTCGGGGAGCTTCAGTATTGCCTG TCCGAGAAACCCAAGCTGTTGCCGTTGGAATTGGAAAAACCGCTA TCCAAAATTACACAGTAACGGAGTTCCAACCTTTGTACTACGTAGCC GAGTCATTTAACGATGCAAAGGAGAAGGTCAGAAATTTTGCTGCGA CGATACCCAGACCGTTCTCAGTAAGGTACGATCCTTACACTCAGAGG ATTGAAGTCTTGATAATACGCAACAGCTCAAGATCCTGGCAGACT CCATAAATTCTGAAATCGGCATCTTGTGTTACAGCACTGCAAAAGATA AAATAA
3	PAH 3'UTR 序列 (897 个 核苷酸)	AGCCATGGACAGAATGTGGTCTGTCAGCTGTGAATCTGTTGATGGAG ATCCAACATTTTCTTTCATCAGAAAAAGTCCGAAAAGCAAACCTTAA TTTGAAATAACAGCCTTAAATCCTTTACAAGATGGAGAAACAACAA ATAAGTCAAAATAATCTGAAATGACAGGATATGAGTACATACTCAA GAGCATAATGGTAAATCTTTTGGGGTCATCTTTGATTTAGAGATGAT AATCCCATACTCTCAATTGAGTTAAATCAGTAATCTGTCGCATTTCA TCAAGATTAATTAATAATTTGGGACCTGCTTCATTCAAGCTTCATATA TGCTTTGCAGAGAACTCATAAAGGAGCATATAAGGCTAAATGTAAA ACCCAAGACTGTCAATTAGAATTGAATTATTGGGCTTAATATAAATCG TAACCTATGAAGTTTATTTTTTATTTTAGTTAACTATGATTCCAATTA CTACTTTGTTATTGTACCTAAGTAAATTTTCTTTAAGTCAGAAGCCCCA TTAAAATAGTTACAAGCATTGAACCTTCTTTAGTATTATTAATATA AAAACATTTTGTATGTTTATTGTAATCATAAATACTGCTGTATAAG GTAATAAAACTCTGCACCTAATCCCCATAACTCCAGTATCATTTTC CAATTAATTATCAAGTCTGTTTTGGGAAACACTTTGAGGACATTTAT GATGCAGCAGATGTTGACTAAAGGCTTGGTTGGTAGATATTCAGGA AATGTTCACTGAATAAATAAGTAAATACATTATTGAAAAGCAAATCT GTATAAATGTGAAATTTTTATTTGTATTAGTAATAAAACATTAGTAG TTTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGACT CTAGATT
4	PAH 3'UTR 序列 (289 个 核苷酸)	AGCCATGGACAGAATGTGGTCTGTCAGCTGTGAATCTGTTGATGGAG ATCCAACATTTTCTTTCATCAGAAAAAGTCCGAAAAGCAAACCTTAA TTTGAAATAACAGCCTTAAATCCTTTACAAGATGGAGAAACAACAA ATAAGTCAAAATAATCTGAAATGACAGGATATGAGTACATACTCAA GAGCATAATGGTAAATCTTTTGGGGTCATCTTTGATTTAGAGATGAT AATCCCATACTCTCAATTGAGTTAAATCAGTAATCTGTCGCATTTCA TCAAGATTA
5	凝血酶原增 强子(Pro)	GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAG
6	人 α -1 抗胰蛋 白酶启动子 (hAAT)	GATCTTGCTACCAGTGGAAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAG CAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAC GCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAG GTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCC AGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCC AGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTG GTTAATATTACACAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTG CTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCAC CACCCTGACCTGGGACAGTGAAT
7	兔 β 珠蛋白内 含子	GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAAA TTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGTGTTGTTTGAAT GGGAAGATGTCCCTTGATACCATGGACCCTCATGATAATTTTGT TCTTTCACCTTCTACTCTGTTGACAACCATTTGTCTCCTCTTATTTCTT TTCATTTCTGTAACCTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTTGTAACG

[0320]

		AATTTTTAAATTCACCTTTTGTATTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCACCTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATTTGACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAAATTTCTGGCTGGCGTGGAAATATTTCTTATTGGTAGAAACAACCTACACCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTCTTCTCTACAG
8	人 β 珠蛋白内含子	GGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAAATTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCACTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAATATTTCTGCATATAAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAG
9	1X 肝细胞核因子 1 (1XHNF1)	GTTAATCATTAAC
10	5X 肝细胞核因子 1 (5XHNF1)	GTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAACGTTAATCATTAAC
11	1X 肝细胞核因子 1/4 (1XHNF1/4)	GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACA
12	3X 肝细胞核因子 1/4 (3XHNF1/4)	GTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTGACTTTGGTACAGTTAATCATTAACGCTTGTACTTTGGTACA
13	PAH shRNA 序列 #1	TCGCATTTTCATCAAGATTAATCTCGAGATTAATCTTGATGAAATGCGATTTTT
14	PAH shRNA 序列 #2	ACTCATAAAGGAGCATATAAGCTCGAGCTTATATGCTCCTTTATGAGTTTTT
15	劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTAAAGTGCTAGCTCGATACAATAAACG
16	5'长末端重复 (LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
17	Psi 包装信号	TACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAG
18	Rev 反应元件 (RRE)	AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTC

[0321]

19	中心聚嘌呤区(cPPT)	TTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAGAATTACAA AAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTA
20	长 WPRE 序列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCT TTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGT ATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTC AGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCAC TGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCG CTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTG CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGGTG GTGTTGTGCGGGGAAATCATCGTCTTTTCCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTT GCCACCTGGATTCTGCGCGGGAGCGTCCTTCTGCTACGTCCTTCGGC CCTCAATCCAGCGACCTTCCCTCCCGCGCCTGCTGCCGCTCTGC GGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC CTTTGGGCGCCTCCCCGCCT
21	ΔU3 3'LTR	TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTGCT TGTAAGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTC TGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTT GAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAATACTCTAGCAG TAGTAGTTCATGTCA
22	H1 启动子	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTG TCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGAT GGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTGCG CTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTT GGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTT
23	CMV 增强子/ 鸡 β 肌动蛋白 启动子	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGC TGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGG ACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGC AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATTGGGTGAGGTGAG CCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCTCCCCACCCCC AATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGTGCGAGCGATGGGGGC GGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGG GGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGA GCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGCG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG
24	HIV Gag	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGAT GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAAT TAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGT TAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTG GGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAATTTAGAT CATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATA GAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAG CAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACA GGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACA TCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAATTTAAAT GCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTACGCCAGAAGTGA TACCCATGTTTTAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTA AACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA TGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGT GCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAA

[0322]

		CCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAAGTACTAGTACCCTTCAGGAAC AAATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT CTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGAATG TATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAAC CCTTTAGAGACTATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGCCGAG CAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTTGG TCCAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAGCATTGGG ACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTG GGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCC AAGTAACAAATCCAGCTACCATAATGATACAGAAAGGCAATTTTAG GAACCAAAGAAAGACTGTAAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGG CACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGA AATGTGGAAAGGAAGGACACCAAAATGAAAGATTGTACTGAGAGAC AGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCC AGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAA GAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGC AGGAGCCGATAGACAAGGAAGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCA CTCTTTGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAA
25	HIV Pol	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTG GAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAAT CTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCT GTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTT AAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGC CAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGA AAAAAATAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAA GGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAATCCATACAATACTCCAG TATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGT AGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTT CAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAG TAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGAT AAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAA TGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGA TGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCT TAGAGCCTTTTAGAAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATAC ATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAATAAGGGCAGCATA GAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGATT TACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTTTGG ATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGT GCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTA GTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAG TAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACAGA AGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAA CAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCA TCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAAT GGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGG AAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACACTAATGATGTGAAACAA TTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAAGCATAGTAATAT GGGGAAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACATG GGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCCTGAG TGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTT AGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGG GCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGT ACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCA GAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTTCGGGAT TAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCAT TCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATA

[0323]

		ATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTAC CAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGGTTGGT CAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA
26	HIV Int	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATC ACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTA GTAGCAAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAG GGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCA GCTAGATTGTACACATTTAGAAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTC ATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAAGTAATTCCAGCAGAGAC AGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAAATTAGCAGGAAGATGG CCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTA CTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATT TGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGA ATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGA ACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTA AAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACA AATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGA GATCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAGGTGAAG GGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAAG AAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAACACAGATGGCAGG TGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA
27	HIV RRE	AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGG GCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTC TGGTATAGTGACGACGACGACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCG CAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA GGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTC CT
28	HIV Rev	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAGTCTCAAGGCA GTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAG AGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGC ACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACC GCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTG GGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTAC AATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
29	CMV 启动子	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAT TAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTC AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA TGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTT GACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAG TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA GGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTT ACTG
30	VSV-G 包膜 糖蛋白	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGC AAGTTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAACTGGAAAA ATGTTCCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATT GGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAA GAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTTCATGCTTCCA AATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATA

[0324]

		ACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGA AAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTC CCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGT GATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAG GAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTA CATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATA AGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCACC TTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCA CAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGC CTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCA GGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAG ATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGA CCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGAT TATTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCC AATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAA CCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAG ACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAAT GGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGAT GACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTC TGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACAT GGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTT CGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATG AGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAATCCAATCGAG CTTGTAAGAAGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGTCTATTGCCTCTTT TTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGTTCTCCGAGT TGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAG ATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGTGA
31	左 ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGC AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTT CCT
32	多聚 A	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTCTCTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC
33	右 ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCA GG
34	E2A	TTAAAAGTCGAAGGGGTCTCGCGCTCGTCTGTTGTGCGCCGCGCTGG GGAGGGCCACGTTGCGGAACTGGTACTTGGGCTGCCACTTGAATC GGGGATCACCAGTTTGGGCACTGGGGTCTCGGGGAAGGTCTCGCTC CACATGCGCCGGCTCATCTGCAGGGCGCCAGCATGTCAGGCGCGG AGATCTTGAAATCGCAGTTGGGGCCGTTGCTCTGCGCGCGCGAGTTG CGGTACACTGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGACTGGGGTACT TCACACTAGCCAGCACGCTCTTGTCGCTGATCTGATCCTTGTCAGG TCCTCGGCGTTGCTCAGGCCGAACGGGGTCACTTGCACAGCTGGCG GCCCAGGAAGGGCACGCTCTGAGGCTTGTGGTTACACTCGCAGTGC ACGGGCATCAGCATCATCCCCGCGCCGCGCTGCATATTCGGGTAGA GGGCCTTGACGAAGGCCGCGATCTGCTTGAAAGCTTGCTGGGCCTTG GCCCCCTCGCTGAAAAACAGGCCGCAGCTCTTCCCGCTGAACTGATT ATCCCGCACCCGGCATCATGGACGCAGCAGCGCGCGTCATGGCTG GTCAGTTGCACCACGCTCCGTCCCCAGCGGTTCTGGGTCACCTTGGC CTTGCTGGGTTGCTCCTTCAGCGCACGCTGCCCGTTCTCACTGGTCAC

[0325]

		ATCCATCTCCACCACGTGGTCTTGTGGATCATCACCGTCCCATGCA GACACTTGAGCTGGCCTTCCACCTCGGTGCAGCCGTGGTCCCACAGG GCACTGCCGGTGCACCTCCAGTTCTTGTGCGGATCCCGCTGTGGCT GAAGATGTAACCTTGCAACAGGCGACCCATGATGGTGCTAAAGCTC TTCTGGGTGGTGAAGGTCAGTTGCAGACCGCGGGCCTCCTCGTTTAT CCAGGTCTGGCACATCTTTTGGGAAGATCTCGGTCTGCTCGGGCATGA GCTTGTAAGCATCGCGCAGGCCGCTGTCGACGCGGTAGCGTTCCATC AGCACATTCATGGTATCCATGCCCTTCTCCCAGGACGAGACCAGAGG CAGACTCAGGGGGTTGCGCACGTTTACAGGACACCGGGGGTTCGCGGGC TCGACGATGCGTTTTCGCTCCTTGCCTTCTTCAACAGAACCGGCGG CTGGCTGAATCCCACCTCCACGATCACGGCTTCTTCTGGGGCATCT CTTCGTCTGGGTCTACCTTGGTCACATGCTTGGTCTTTCTGGCTTGCT TCTTTTGGAGGGCTGTCCACGGGGACACGCTCCTCCTCGGAAGAC CCGGATCCCACCCGCTGATACTTTCGGCGCTTGGTTGGCAGAGGAGG TGGCGGCGAGGGGCTCCTCTCTGCTCCGGCGGATAGCGCGCTGAA CCGTGGCCCCGGGGCGGAGTGGCCTCTCGGTCCATGAACCGGCGCA CGTCTGACTGCCGCCGGCCAT
35	E4	TCATGTATCTTTATTGATTTTACACCAGCACGGGTAGTCAGTCTCCC ACCACCAGCCCATTTCACAGTGTAACAATTCTCTCAGCACGGGTGG CCTTAAATAGGGCAATATTCTGATTAGTGCGGGAACCTGGACTTGGGG TCTATAATCCACACAGTTTCTTGGCGAGCCAAACGGGGGTTCGGTGAT TGAGATGAAGCCGCTCCTCTGAAAAGTCATCCAAGCGAGCCTCACAG TCCAAGGTCACAGTATTATGATAATCTGCATGATCACAATCGGGCAA CAGGGGATGTTGTTTCAGTCAGTGAAGCCCTGGTTTCTTCATCAGATC GTGGTAAACGGGCCCTGCGATATGGATGATGGCGGAGCGAGCTGGA TTGAATCTCGGTTTGCAT
36	VA RNA	AGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTGGTGGATAAATTCGCAAGGGTATCA TGGCGGACGACCGGGGTTCGAGCCCCGATCCGGCCGTCCGCCGTG ATCCATGCGGTTACCGCCCGGTGTCGAACCCAGGTGTGCGACGTCA GACAACGGGGGAGTGCTCCTTT
37	AAV2 Rep	ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTC TGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCA CCAAAGCCCCGAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGC TTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGG AGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAA GCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGT ACAACCACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAGCGCTTAAAGAAGATAC GTCTTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAG AGGGTTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGC TCCGGGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAA GATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCC CAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAACATA TACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAG GGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATT CCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTG GGCCCTGCCCACCTACAACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCC AATCAGGAGCCTCGAACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCT TGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTACCACG TGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGACCCAAG AGACTCAACTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTACGCA GAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTT CAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGTCCCGTACGTCCTCGGCTC GGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCACAGCAGACGTCTTCATGG TGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGT AGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCTTCTCAGATGCT

[0326]

		<p> GCGTACCGGAAACAACCTTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGACGTTTC CTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATG AATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAAACAC TCCAAGTGGAACCACCACGCAGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCG GAGCGAGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCTTGACC CTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAAC AACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATG GCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCCGCCATGGCAAGCCACAA GGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTCATCTTTG GGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCA GATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACG GAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGAC AAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCAT GGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCATCTGGGCA AAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCTCCCTCATGGG TGGATTTCGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAACA CCCCAGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGCAAAGTTT GCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGAT CGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGA AATTCAGTACACTTCCAATAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTTA CTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAGAGCCTCGCCCCATTGGCACC AGATACCTGACTCGTAATCTGTAA </p>
38	AAV2 Cap	<p> ATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGA CGAGCATCTGCCCGCATTTCTGACAGCTTTGTGAAGTGGGTGGCCG AGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCT GATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGAC TTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCGGAGGCCCTTTT CTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGC TCGTGGAAACCACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTTGGGACGTTTCTG AGTCAGATTTCGCGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGGATCG AGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAATGG CGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAAT TACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAA TATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAAC GGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTCGACGACGAGGAGCA GAACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGA TCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCCGGGTGGCTCGTGG ACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGC CTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAAATCA AGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAAC CGCCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCC AGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCA ATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCA AGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGAC CAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCG TAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAG ATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGG AGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCA GAAATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTC ACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACCTAACGA CCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAA CTCACCCGCGCTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGG AAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGT GGAGCATGAATTTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCC GCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGT CAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTA </p>

[0327]

		CGCAGACAGGTACCAAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAAT CTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTC AAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTC CCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAGGCGTATCAG AAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTG CACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTG ACAATAA
39	AAV8 Cap	ATGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCG CCGACGGAGTGGGTAGTTCCTCGGGAATTTGGCATTGCGATTCCACA TGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCC TGCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAATCTCCAACGGGAC ATCGGGAGGAGCCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACC CCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCACCA CGTGA CTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCA AGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTAC GCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACC ATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGG CTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTCA TGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCAGGCC GTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCTTCGCAGAT GCTGAGAACCGGCAACAACCTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGGACG TGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCGGCTG ATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCA AACAAACAGGAGGCACGGCAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAGCCAA GGTGGGCCTAATAACAATGGCCAATCAGGCAAAGAATGGCTGCCAG GACCCTGTTACCGCCAACAACGCGTCTCAACGACAACCGGGCAAAA CAACAATAGCAACTTTGCCTGGACTGCTGGGACCAATAACCATCTGA ATGGAAGAAATTCATTGGCTAATCCTGGCATCGCTATGGCAACACAC AAAGACGACGAGGAGCGTTTTTTTTCCAGTAACGGGATCCTGATTTT TGGCAAACAAAATGCTGCCAGAGACAATGCGGATTACAGCGATGTC ATGCTCACCAGCGAGGAAGAAATCAAAACCACTAACCCGTGTGGCTA CAGAGGAATACGGTATCGTGGCAGATAACTTGCAGCAGCAAAACAC GGCTCCTCAAATTGGAAGTGTCAACAGCCAGGGGGCCTTACCCGGT ATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCCTGTTGG CCAAGATTCTTCACACGACGGCAACTTCCACCCGTCTCCGCTGATG GGCGGCTTTGGCCTGAAACATCCTCCGCCTCAGATCCTGATCAAGAA CACGCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGC TGAATCTTTCATCACGCAATACAGCACCGGACAGGTACGCGTGA AATTGAATGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCC GAGATCCAGTACACCTCCAACCTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTT TGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCATTGGCA CCCGTTACCTACCCGTAATCTGTAA
40	AAV DJ Cap	ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTC TGAAGGAATAAGACAGTGGTGAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCA CCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGC TTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACGGACTCGACAAGGG AGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCGCGGCCCTCGAGCACGACAAA GCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGT ACAACCACGCCGACGCCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATAC GTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAG AGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGC TCCTGGAAAGAAGAGGCCTGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAA GATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTCCCAGACCCT CAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCT TACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAG

[0328]

		GGCGCCGACGGAGTGGGTAAATTCCTCGGGAAATTGGCATTGCGATT CCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTG GGCCCTGCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACA GCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTTCGGCTACAGC ACCCCTGGGGGTATTTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTTTCA CCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGC CCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGT CACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGC ACCATCCAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCT CGGCTCTGCCCACCAGGGCTGCCTGCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGT TCATGATTCCCCAGTACGGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCAG GCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCCTGGAATACTTTCCTTCGCA GATGCTGAGAACCGGCAACAACCTTCCAGTTTACTTACACCTTCGAGG ACGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCCCACAGCCAGAGCTTGGACCG GCTGATGAATCCTCTGATTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGA CTCAAACAACAGGAGGCACGACAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAG CCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCAAAGAAGTGGCTG CCAGGACCTGTACCAGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGG ATAACAACAACAGTGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA CCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGGCCCGGCCATGGCA AGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCAGAGCGGGGTTCT TCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGGACATTGA AAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCC GTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGG CAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTT CCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCCA TCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTACCCCTCTCCC CTCATGGGTGGATTTCGGACTTAAACACCCTCCGCTCAGATCCTGAT CAAGAACACGCCTGTACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGT CAAAGCTGAACTCTTTCATACCCAGTATTCTACTGGCCAAAGTCAGC GTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAGCGCTGG AACCCCGAGATCCAGTACACCTCCAACTACTACAAATCTACAAGTGT GGACTTTGCTGTTAATACAGAAGGCGTGTACTCTGAACCCCGCCCCA TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAA
41	鸡β肌动蛋白 内含子	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCCGCTC GCGCCGCCCCCGGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTT TAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGG GCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGC GTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGCTGC CCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGT GCGGGGGGGTGCAGGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGC GTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCCGGGCTGTAAC CCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTC GGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCG GGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCG CCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGA GCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTT ATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCT GGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTTAGCGGG CGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCGGGG AGGGCCTTCGTGCGTGCCTGCGCGCCGCGCCGTCCCTTCTCCATCTCCAG CCTCGGGGCTGCCGAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGG CAGGGCGGGGTTCCGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGG
42	兔β珠蛋白多	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCC

[0329]

	聚 A	TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCA ATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGG GAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTAGAGTT TGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTAT AAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTA TTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTGT TTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTT TACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTG TCCCTCTTCTCTTATGAAGATC
43	引物	TAAGCAGAATTCATGAATTTGCCAGGAAGAT
44	引物	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT
45	Gag、Pol、整合酶片段	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAACCAAAAATGATAGGGG GAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATA GAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTA CACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGC ACTTTAAATTTTCCCATTAGTCTCTATTGAGACTGTACCAGTAAATTT AAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACA GAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATAC TCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAA TTAGTAGATTTTCAAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGA AGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAA TCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTTCAGTTCCTT AGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAA ACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACA GGGATGGAAGGATCACCAGCAATATTCAGTGTAGCATGACAAAA ATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCA ATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGC ATAGAACA AAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGG ATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTT GGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAAT TAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAA AGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACA GAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAA AACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACC CATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGGCAAGGCC AATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAA AGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACTAATGATGTGAAA CAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAA TATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAAC ATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTT GAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCA GTTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGAT GGGGCAGCCAATAGGGAACTAAATAGGAAAAGCAGGATATGTA ACTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAA ATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCTG GGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAATATGCATTGGGAA TCATTCAAGCACAAACAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCA AATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGG GTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAAT TGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAATAGAT AAGGCCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCA ATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGT AGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGA

[0330]

		CAAGTAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTT AGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATAT ATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCA TACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTAC ATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATC CCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAA AATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCA GTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGA TTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAAC AGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAA AATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAG GACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGAGTAGTAATACA AGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGAT CATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCA AGTAGACAGGATGAGGATTAA
46	DNA 片段	TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATC AGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCC CAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAG GTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATC CTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCT ACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAA CTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTC CTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAA TGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAG CAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGT TGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCT GGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTT CCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTG ACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTG GAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATC ATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATAT GCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCAT CAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATCCATAGAAA AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTGTATTT TTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGA TTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCT TATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTC ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTC AGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAG CAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCG CCCAGTTCGGCCCATTTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT TATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACT TGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA AATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG
47	DNA 片段	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA GCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCG CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGAC GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT GGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG

[0331]

		<p>GCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGA GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCC ACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGAT GGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCA ATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGT CGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCC GCCCCCCCCGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGG CGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATG ACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCC GGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCG TGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGG GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCG TGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGG GGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGG GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTGTAACCCCC CCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTG CGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGG GGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCG GGCCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTA ATCGTGCGAGAGGGGCGAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCG AGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTTAGCGGGCGCGG GCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGC CTTCGTGCGTGC CGCGCCCGCCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG GGCTGCCGCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGC GGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGGAATTC</p>
48	RSV 启动子 和 HIV Rev	<p>CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAG GGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTAGGA GTCCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGAAA TGTAAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATG AGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGATGCC GATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGCA ACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATT GCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCA TTTGACCATTACACATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTT TAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC CTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAG CGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA GAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAA CCCACCTCCAATCCCAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGT GAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCC TCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGG ATTGTGGAACCTCTGGGACGCGAGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATT GGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCT AGA</p>
49	延长因子-1 α (EF1- α) 启 动子	<p>CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA TAAGTGACAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCC GCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCC TCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCTTGAATTACTTCCACGCCCC TGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGG GTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCTCGTG</p>

[0332]

		CTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAAT CTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGC CATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGA TAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTT TTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATG TTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCC GCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCA CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG GGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTG AGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCT TCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGAGGTACGTCTGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGT TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTT GAGTTTGGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGA
50	启动子; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCGCAGG GACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGCGCCGA CCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTTCGCAGCGTCACCCGGA TCTTCGCCGCTACCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTCTGCTCCG CCCCTAAGTCGGGAAGGTTTCTTGCGGTTTCGCGCGTGCCTGGACGTG ACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAG CGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCATGGGCTGTGGCCA ATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAG GGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTT CCTGCCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGT CGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG
51	启动子; UbC	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGA GCGCTGCCACGTCTAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTTCTTGATCCTTC CGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCC TTAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGG GTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGA GGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGG GCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCGCCGTTGTCAC GCTAGTTCCGTCGACCGGGATTGGGTGCGGGTCTGTTTGTGG ATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCG GGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGG AGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCC TGAAGTGGGGGTTGGGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGA GTCTTGAATGGAAGACGCTTGTAAAGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAA ACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGG CCTTCGCTAATGCGGGAAGGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGG CACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACT CGGGTTTGTGCTCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTG GGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCTCGTCGTGTCGTGA CGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCG GTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGACGAGCGAGGGTTCCGG CCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGACCTCTGGTGA GGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCCGTTTTATGTAC CTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTTGAAGTATGCGCTCGG GGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCACCTTTTGAAGTGT AATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTAGTAAA
52	多聚 A; SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAA ATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT CCAAACTCATCAATGTATCTTATCA

[0333]

53	多聚 A; bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
54	包膜; RD114	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGCCTAATAATAGT TCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGCAAGGCTATCGCATTAGTACAA AAACAACATGGTAAACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCAGGTATCCG AGGCCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAACCTGCCCAGGCAAGAC GGCCTACTTAATGACCAACCAAAAATGGAAATGCAGAGTCACTCCA AAAAATCTCACCCCTAGCGGGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCTGT ACACTTTCCAGGACTCGATGCACAGTTCTTGTATATACTGAATACCGG CAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACACGGCCACCTTGCTTA AAATACGGTCTGGGAGCCTCAACGAGGTACAGATATTACAAAACCC CAATCAGCTCCTACAGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAGCCCCG TTTGCTGGAGTGCCACAGCCCCCATCCATATCTCCGATGGTGGAGGA CCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGACAGTCCAAAAAAGGCTAGAAC AAATTCATAAGGCTATGCATCCTGAACTTCAATACCACCCCTTAGCC CTGCCCCAAAGTCAGAGATGACCTTAGCCTTGATGCACGGACTTTTGA TATCCTGAATACCACTTTTAGGTTACTCCAGATGTCCAATTTTAGCCT TGCCCAAGATTGTTGGCTCTGTTTAAACTAGGTACCCCTACCCCTC TTGCGATACCCACTCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTCCCTAG CGAATGCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCCTCTTGGTTCAACCGATG CAGTTCTCCAACCTCGTCTGTTTATCTTCCCCTTTCATTAACGATACG GAACAAATAGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAACTGCACCTCTGT AGCCAATGTCAGTAGTCCTTTATGTGCCCTAAACGGGTGAGTCTTCC TCTGTGGAATAACATGGCATAACCTATTTACCCCAAACTGGACA GGACTTTGCGTCCAAGCCTCCCTCCTCCCCGACATTGACATCATCCC GGGGGATGAGCCAGTCCCCATTCCCTGCCATTGATCATTATATACATA GACCTAAACGAGCTGTACAGTTCATCCCTTTACTAGCTGGACTGGGA ATCACCGCAGCATTACACACCGGAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCCGT CACCCAGTATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATGTCCAAG TCTTATCCGGTACCATAACAAGATTTACAAGACCAGGTAGACTCGTTA GCTGAAGTAGTTCTCCAAAATAGGAGGGGACTGGACCTACTAACGG CAGAACAAGGAGGAATTTGTTTAGCCTTACAAGAAAAATGTGTGTTT TATGCTAACCAAGTCAGGAATTGTGAGAAACAAAATAAGAACCCTAC AAGAAGAATTACAAAAACGCAGGGAAAGCCTGGCATCCAACCCCTCT CTGGACCGGGCTGCAGGGCTTTCTTCCGTACCTCCTACCTCTCCTGG GACCCCTACTCACCTCCTACTCATACTAACCATTGGGCCATGCGTT TTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCA GGCTCTGGTTTTGACTCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGT ACGAGCCATGA
55	包膜; GALV	ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTTCGGCACCAGATGAGTCC TGGGAGCTGGAAGAGACTGATCATCCTCTTAAGCTGCGTATTCGGAG ACGGCAAAACGAGTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGAC CCTCACCTGGCAGGTACTGTCCCAAACCTGGGGACGTTGTCTGGGACA AAAAGGCAGTCCAGCCCCCTTGGACTTGGTGGCCCTCTCTTACACCT GATGTATGTGCCCTGGCGGCCGGTCTTGAGTCTGGGATATCCCGGG ATCCGATGTATCGTCTCTAAAAGAGTTAGACCTCCTGATTACAGACT ATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGGGAGCCATAGGGTGCAG CTACCCTCGGGCTAGGACCAGGATGGCAAATTCCCCCTTCTACGTGT GTCCCCGAGCTGGCCGAACCCATTGAGAAGCTAGGAGGTGTGGGGG GCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTTGTGAGACCACGGGT ACCGTTTATTGGCAACCCAAGTCCTCATGGGACCTCATAACTGTAAA ATGGGACCAAAATGTGAAATGGGAGCAAAAATTTCAAAGTGTGAA CAAACCGGCTGGTGTAAACCCCTCAAGATAGACTTCACAGAAAAAG

[0334]

		GAAAACTCTCCAGAGATTGGATAACGGAAAAAACCTGGGAATTAAG GTTCTATGTATATGGACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAG AGGTCACTAACATGCCGTTGTGGCAGTGGGCCAGACCCTGTCCCT GCGGAACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCCCTACTCTCCCTCTCTCCC ACGGAAAGCGCCGCCACCCCTCTACCCCCGGCGGCTAGTGAGCAA ACCCTGCGGTGCATGGAGAACTGTTACCCTAAACTCTCCGCTCC CACCAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTTGTGCAGGGGGCCTTCCTAA CCTTGAATGCTACCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTTGCTGGCTCTGT TTGGGCATGAGCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTTCAGGAGA GGTCGCTTATACCTCCAACCATAACCCGATGCCACTGGGGGGCCCAAG GAAAGCTTACCCTCACTGAGGTCTCCGGACTCGGGTCATGCATAGGG AAGGTGCCTCTTACCCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCCAT CAATTCCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCTCAAACCATAGCT GGTGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACCCCTGCCTCTCCACCTCAGTT TTAAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGTCCAGGTCCAGCTGATCCCCCG CATCTATTACCATCTGAAGAAACCTTGTTACAAGCCTATGACAAAT CACCCCCCAGGTTTAAAGAGAGCCTGCCTCACTTACCCTAGCTGTC TTCCTGGGGTTAGGGATTGCGGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGC CCTAATTAAGGGGCCATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCCAGCCTC CAAATCGCCATTGACGCTGACCTCCGGGGCCCTTCAGGACTCAATCAG CAAGCTAGAGGACTCACTGACTTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAA ATAGGAGAGGCCTTGACTTACTATTCCTTAAAGAAGGAGGCCTCTGC GCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGTTTTTATGTAGACCACTCAGGTGC AGTACGAGACTCCATGAAAAAACTTAAAGAAAGACTAGATAAAAGA CAGTTAGAGCGCCAGAAAAACCAAACTGGTATGAAGGGTGGTTCA ATAACCTCCCTTGGTTTACTACCCTACTATCAACCATCGCTGGGCC CTATTGCTCCTCCTTTTGTACTCACTCTTGGGCCCTGCATCATCAAT AAATTAATCCAATTCATCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTTT AGTCCTTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACGAGGAAAACCTT TAA
56	包膜; FUG	ATGGTTCCGCAGGTTCTTTTGTGTGACTCCTTCTGGGTTTTTCGTTGT GTTTCGGGAAGTTCCCATTTACACGATACCAGACGAACCTTGGTCCC TGGAGCCCTATTGACATACACCATCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGT TGTGGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGG AACTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGACCGGTTTAC TTGCACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTG GTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTTCGCCCCACCCCA GACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCCA GATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATAACCCGACTACCACTGGCTT CGAACTGTAAGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCAAG TGTGACAGATTTGGACCCATATGACAAATCCCTTCACTCAAGGGTCT TCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAACGGTGTCTCTACCTACTGC TCAACTAACCATGATTACACCATTTGGATGCCCCGAGAATCCGAGACC AAGGACACCTTGTGACATTTTACCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCA TCCAACGGGAACAAGACTTGCGGCTTTGTGGATGAAAGAGGCCTGT ATAAGTCTCTAAAAGGAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTT GGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTGCGGATGCAAAACATCAG ATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCAGTTGGTGAATTTGCACGAC TTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTTAA GAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACC AAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACCTTGTCCC AGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAG GCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATCCC CTCAAAAGGGTGTGTTTGAAGTTGGAGGAAGGTGCCATCCTCATGTG AACGGGGTGTGTTTCAATGGTATAATATTAGGGCCTGACGACCATGT CCTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGT

[0335]

		<p>TGTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCCTGGCAGACCCT TCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTTGTTGAAGT TCACCTCCCCGATGTGTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTC TCCCGAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGGCCATGAT TGGCCTGGTGTGATATTTTCCCTAATGACATGGTGCAGAGTTGGTA TCCATCTTTGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTAT ACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA</p>
57	包膜; LCMV	<p>ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCTCACATCATCGA TGAGGTGATCAACATTGTCTATTATTGTGCTTATCGTGATCACGGGTA TCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTGTGGGATATTTCGATTGATC AGTTTCCTACTTCTGGCTGGCAGGTCTGTGGCATGTACGGTCTTAA GGGACCCGACATTTACAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAG TTTGATATGTACATCTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTCCAGC CAACAACCTCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTAGAAT TGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAACCTTTTGCAATCTG ACCTCTGCCTTCAACAAAAAGACCTTTGACCACACACTCATGAGTAT AGTTTCGAGCCTACACCTCAGTATCAGAGGGAACCTCCAATAAAG GCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACCTT GACATTCTCAGATCGACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCCTTC AGAGGTAGAGTCCTAGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGGGAAAT ACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCAAGACCAC CTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACCTGATTATACAAAATAGA ACCTGGGAAAACCACTGCACATATGCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAG GATTCTCCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAGACTAG CGGGCACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGGGTGGAGAAT CCAGGTGGTTATTGCCTGACCAATGGATGATTCTTGCTGCAGAGCT TAAGTGTTTCGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAATCAT GATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGACTAATTGACTACAACAAGGC TGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCTTGCACTTAT TCAAAACAACAGTGAATTCTTTGATTTCAGATCAACTACTGATGAGG AACCCTTGAGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGCAATTACTCAAA GTTTTGGTACCTAGAACATGCAAGACCGGCGAAACTAGTGTCCTCC AAGTGCTGGCTTGTACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCACTT CAGTGATCAAATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTACAGAGATG TTGAGGAAGGATTACATAAAGAGGCAGGGGAGTACCCCTAGCAT TGATGGACCTTCTGATGTTTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCT TCCTGCACCTTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAAGGTGG CTCATGTCAAAGCCACACCGATTAAACCAACAAAGGAATTTGTAGTT GTGGTGCATTTAAGGTGCCTGGTGTA AAAAACCGTCTGGAAAAGACG CTGA</p>
58	包膜; FPV	<p>ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTGTGGCAGTCATCCCCAC AAATGCAGACAAAATTTGTCTTGGACATCATGCTGTATCAAATGGCA CCAAAGTAAACACACTCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTGTCAATGC AACGGAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATTTGCTCAAAA GGGAAAAGAACCACTGATCTTGGCCAATGCGGACTGTTAGGGACCA TTACCGGACCACCTCAATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGAT CTAATAATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTTGTACCCGGGGA AGTTTGTTAATGAAGAGGCATTGCGACAAATCCTCAGAGGATCAGG TGGGATTGACAAAGAAACAATGGGATTCACATATAGTGGAATAAGG ACCAACGGAACAACCTAGTGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCATTCT ATGCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAGACAATGCTGCTTTTC CCACAAATGACAAAATCATACAAAAACACAAGGAGAGAATCAGCTC TGATAGTCTGGGGAATCCACCATTGAGGATCAACCACCGAACAGAC CAAATATATGGGAGTGGAAATAAACTGATAACAGTCGGGAGTTCC AAATATCATCAATCTTTTGTGCCGAGTCCAGGAACACGACCGCAGAT AAATGGCCAGTCCGGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATC</p>

[0336]

		CCAATGATACAGTTACTTTTATGTTTCAATGGGGCTTTCATAGCTCCA AATCGTGCCAGCTTCTTGAGGGGAAAGTCCATGGGGATCCAGAGCG ATGTGCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGG AGGGACTATAACAAGCAGATTGCCTTTTCAAAACATCAATAGCAGA GCAGTTGGCAAATGCCAAGATATGTAAACAGGAAAGTTTATTAT TGGCAACTGGGATGAAGAACGTTCCCGAACCTTCCAAAAAAGGAA AAAAAGAGGCCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAAAATGGTT GGGAAAGTCTGGTCGACGGGTGGTACGGTTTCAGGCATCAGAATGC ACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAGACTACAAAAGCACCCAATCGGC AATTGATCAGATAACCGGAAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACC AACCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCAGTGGGTGGAAA AGCAGATTGGCAATTTAATTAAGTGGACCAAGAGCTCCATCACAGA AGTATGGTCTTACAATGCTGAACCTCTTGTGGCAATGGAAAACCGC AACTATTGATTTGGCTGATTGAGAGATGAACAAGCTGTATGAGCGA GTGAGGAAACAATTAAGGGGAAAATGCTGAAGAGGATGGCACTGGTT GCTTTGAAATTTTTCATAAATGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATA AGGAACAATACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGATGC AAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTGAGTAGTGGCTACAA AGATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGCTTTTTGCTTCT TGCCATTGCAATGGGCCTTGTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACA TGCGGTGCACTATTTGTATATAA
59	包膜; RRV	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACTAGACCATACCT AGCACATTGCGCCGATTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATAGCCAG TTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGCATGCTTAA GATCCAAGTCTCCGCCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCAC GCCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTCATGATGTTTCAGGAATC TAAGAGAGATTTCCTTGAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATAC ATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAGGCGA CTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATTTCGCACGTGAAGGCAT GTAAGGTCCAATACAAGCACAATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAA GTTCGTGGTTAGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCAT ACCAGCTGACAACGGCTCCACCGACGAGGAGATTGACATGCATAC ACCGCCAGATATACCGGATCGCACCCCTGCTATCACAGACGGCGGGC AACGTCAAAATAACAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAAGTGT CCTGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGACAAGACCAT CAACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTGCCGTACCAGCCAT GACAAATGGCAATTTACCTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGAC AGCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTAACGTCA CCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCCTGAGATTACACCCAGATCATCCGACGCTCTTCTC CTATAGGAGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGACGGAAGAAGGGATTG AGTACCAGTGGGGCAACAACCCGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACT GACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTAG TACTATTATGGACTATACCCCGCCGCCACTATTGCCGAGTATCCGG GGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAACTCTGGCGGCCACATGCTGCATGC TGGCCACCGCGAGGAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCC AGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCTGCGCACCG AGGGCGAATGCA
60	包膜; MLV 10A1	ATGGAAGGTCCAGCGTTCTCAAAACCCCTTAAAGATAAGATTAACC CGTGGAAGTCCCTTAATGGTCATGGGGGTCTATTTAAGAGTAGGGATG GCAGAGAGCCCCCATCAGGTCTTTAATGTAACCTGGAGAGTCACCA ACCTGATGACTGGGCGTACCGCCAATGCCACCTCCCTTTTAGGAACT GTACAAGATGCCTTCCCAAGATTATATTTTGATCTATGTGATCTGGT CGGAGAAGAGTGGGACCCCTCAGACCAGGAACCATATGTCGGGTAT GGCTGCAAAATACCCCGAGGGAGAAAGCGGACCCGGACTTTTGACT

[0337]

		<p>TTTACGTGTGCCCTGGGCATACCGTAAAATCGGGGTGTGGGGGGCC AAGAGAGGGCTACTGTGGTGAATGGGGTTGTGAAACCACCGGACAG GCTTACTGGAAGCCACATCATCATGGGACCTAATCTCCCTTAAGCG CGGTAAACACCCCTGGGACACGGGATGCTCCAAAATGGCTTGTGGC CCCTGCTACGACCTCTCCAAAGTATCCAATTCCTTCCAAGGGGCTAC TCGAGGGGGCAGATGCAACCCTCTAGTCCTAGAATTCAGTGATGCA GGAAAAAAGGCTAATTGGGACGGGCCCAAATCGTGGGGACTGAGAC TGTACCGGACAGGAACAGATCCTATTACCATGTTCTCCCTGACCCGC CAGGTCTCAATATAGGGCCCCGCATCCCCATTGGGCCTAATCCCGT GATCACTGGTCAACTACCCCCCTCCCGACCCGTGCAGATCAGGCTCC CCAGGCCTCCTCAGCCTCCTCCTACAGGCGCAGCCTCTATAGTCCCT GAGACTGCCCCACCTTCTCAACAACCTGGGACGGGAGACAGGCTGC TAAACCTGGTAGAAGGAGCCTATCAGGCGCTTAACCTCACCATTCCC GACAAGACCCAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTCGGGACCTCCTTA TTACGAAGGAGTAGCGGTCGTGGGCACTTATACCAATCATTCTACCG CCCCGGCCAGCTGTACGGCCACTTCCCAACATAAGCTTACCCTATCT GAAGTGACAGGACAGGGCCTATGCATGGGAGCACTACCTAAAACCTC ACCAGGCCTTATGTAACACCACCCAAAGTGCCGGCTCAGGATCCTAC TACCTTGACAGACCCGCTGGAACAATGTGGGCTTGTAGCACTGGATT GACTCCCTGCTTGTCCACCACGATGCTCAATCTAACACAGACTATT GTGTATTAGTTGAGCTCTGGCCAGAATAATTTACCACTCCCCCGAT TATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCGTACCAATATAAGAGGGAGC CAGTATCGTTGACCCTGGCCCTTCTGCTAGGAGGATTAACCATGGGA GGGATTGCAGCTGGAATAGGGACGGGGACCCTGCCCTAATCAAAA CCCAGCAGTTTGAGCAGCTTCACGCCGCTATCCAGACAGACCTCAAC GAAGTCGAAAAATCAATTACCAACCTAGAAAAGTCACTGACCTCGT TGTCTGAAGTAGTCCTACAGAACCGAAGAGGCCTAGATTTGCTCTTC CTAAAAGAGGGAGGTCTCTGCGCAGCCCTAAAAGAAGAATGTTGTT TTTATGCAGACCACACGGGACTAGTGAGAGACAGCATGGCCAAACT AAGGGAAAGGCTTAATCAGAGACAAAACTATTTGAGTCAGGCCAA GGTTGGTTTGAAGGGCAGTTTAATAGATCCCCCTGGTTTACCACCTT AATCTCCACCATCATGGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTACT CTTTGGACCCTGCATTCTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACA GGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTGTACTCAACAATATCACCAG CTAAAACCTATAGAGTACGAGCCATGA</p>
61	包膜；埃博拉病毒（Ebola）	<p>ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAG GACATCATTCTTTCTTTGGGTAAATTATCCTTTTCCAAAGAACATTTTC CATCCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCACATTACAGGTTAGTGATG TCGACAAACTGGTTTGGCGTGACAACTGTATCCACAAATCAATTG AGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACG TGCCATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCACCA AAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAACTGCTACA ATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGC GCCAGACGGGATTTCGGGGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAA GTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCACAAAG AGGGTGCTTTCTTCTGTATGACCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACC GAGGAACGACTTTCGCTGAAGGTGTCGTTGCATTTCTGATACTGCC CAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCGG TCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATT AGATATCAAGCTACCGGTTTTTGAACCAATGAGACAGAGTATTTGTT CGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTCACAC CACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAA AAGGAGCAATACCACGGGAAAACTAATTTGGAAGGTCAACCCCGAA ATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAACTAAAAAAA CTCACTAGAAAAATTCGCAGTGAAGAGTTGTCCTTTCACAGCTGTAT CAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAGAGTCCGGCGCGAACTTC</p>

[0338]

		<p>TTCCGACCCAGGGACCAACAACAACACTGAAGACCACAAAATCATG GCTTCAGAAAAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGGAA GGGAAGCTGCAGTGTGCGATCTGACAACCCCTTGCCACAATCTCCACG AGTCCTCAACCCCCACAACCAACCAGGTCCGGACAACAGCACCC ACAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTT GAACAACATCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACAGCCTCCGACA CTCCCCCGCCACGACCGCAGCCGACCCCTAAAAGCAGAGAACAC CAACACGAGCAAGGGTACCGACCTCCTGGACCCCGCCACCACAACA AGTCCCCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACACTCATC ACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCAGCAGCGGGAAGCTAGGCTT AATTACCAATACTATTGCTGGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGGG AGGAGAGCTCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCA ACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAATC GGACTGGCCTGGATACCATATTTTCGGGCCAGCAGCCGAGGGAATTT ACATAGAGGGGCTGATGCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTT GAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTGTTCTTG AGAGCCACAACCGAGCTACGCACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGC AATTGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTTTGG GACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAGAACATAAC AGACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTGATAAAACCCCTTC CGGACCAGGGGGACAATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAAT GGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGTTATC GCTTTATTCTGTATATGCAAATTTGTCTTTTAG</p>
62	甲状腺素结 合球蛋白启 动子 (TBG)	<p>CTTCTCTTTTGTGTTTACATGAAGGGTCTGGCAGCCAAAGCAATCAC TCAAAGTTCAAACCTTATCATTTTTTGTCTTGTCTCTTGCCCTTGG TTTTGTACATCAGCTTTGAAAATACCATCCCAGGGTTAATGCTGGGG TTAATTTATAACTAAGAGTGCTCTAGTTTGAATACAGGACATGCT ATAAAAATGGAAAGATGTTGCTTTCTGAG</p>
63	DNA 片段, 其 包含凝血酶 原增强子和 人 α -1 抗-胰蛋 白酶启动子	<p>GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATCTTGCTACCAG TGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTA AGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACC TTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTT TCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCG GGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCC CTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGTTAATATTACCA GCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACG AGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGG GACAGTGAAT</p>
64	DNA 片段, 其 包含凝血酶 原增强子, 人 α -1 抗-胰蛋白 酶启动子, 和 5 个 HNF1 结 合位点	<p>GTTAATCATTAAACGTTAATCATTAAACGTTAATCATTAAACGTTAATCA TTAACGTTAATCATTAACATCGATGCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTG TTCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCTACTTAGACTAATATTTGCCTTGG GTACTGCAAACAGGAAATGGGGGAGGGACAGGAGTAGGGCGGAGG GTAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTC CCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGA CGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCA GTGGAAGCTGTACACTGCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGC GGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTC CGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTACCAGCAGCCTCCCCCG TTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCT GTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT</p>

[0339]

65	DNA 片段, 其包含凝血酶原增强子, 人 α -1 抗-胰蛋白酶启动子, 和 3 个 HNF1/HNF4 结合位点	GTTAATCATTAAACGCTTGTACTTTGGTACAGTTAATCATTAAACGCTTG TACTTTGGTACAGTTAATCATTAAACGCTTGTACTTTGGTACAATCGAT GCGAGAACTTGTGCCTCCCCGTGTTCCCTGCTCTTTGTCCCTCTGTCCT ACTTAGACTAATATTTGCCTTGGGTACTGCAAACAGGAAATGGGGG AGGGACAGGAGTAGGGCGGAGGGTAGCCCGGGGATTCTGCAGTGA GAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACT CACGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGC CAGGTACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTG CCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCA GCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACC TTGGTTAATATTACACAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCA CTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGG CACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT
66	Taqman 探针	TCGTGAAAGCTCATGGACAGTGGC
67	Taqman 正向引物	AGATCTTGAGGCATGACATTGG
68	Taqman 反向引物	GTCCAGCTCTTGAATGGTTCTT
69	肌动蛋白探针	AGCGGGAAATCGTGCGTGAC
70	肌动蛋白正向引物	GGACCTGACTGACTACCTCAT
71	肌动蛋白反向引物	CGTAGCACAGCTTCTCCTTAAT

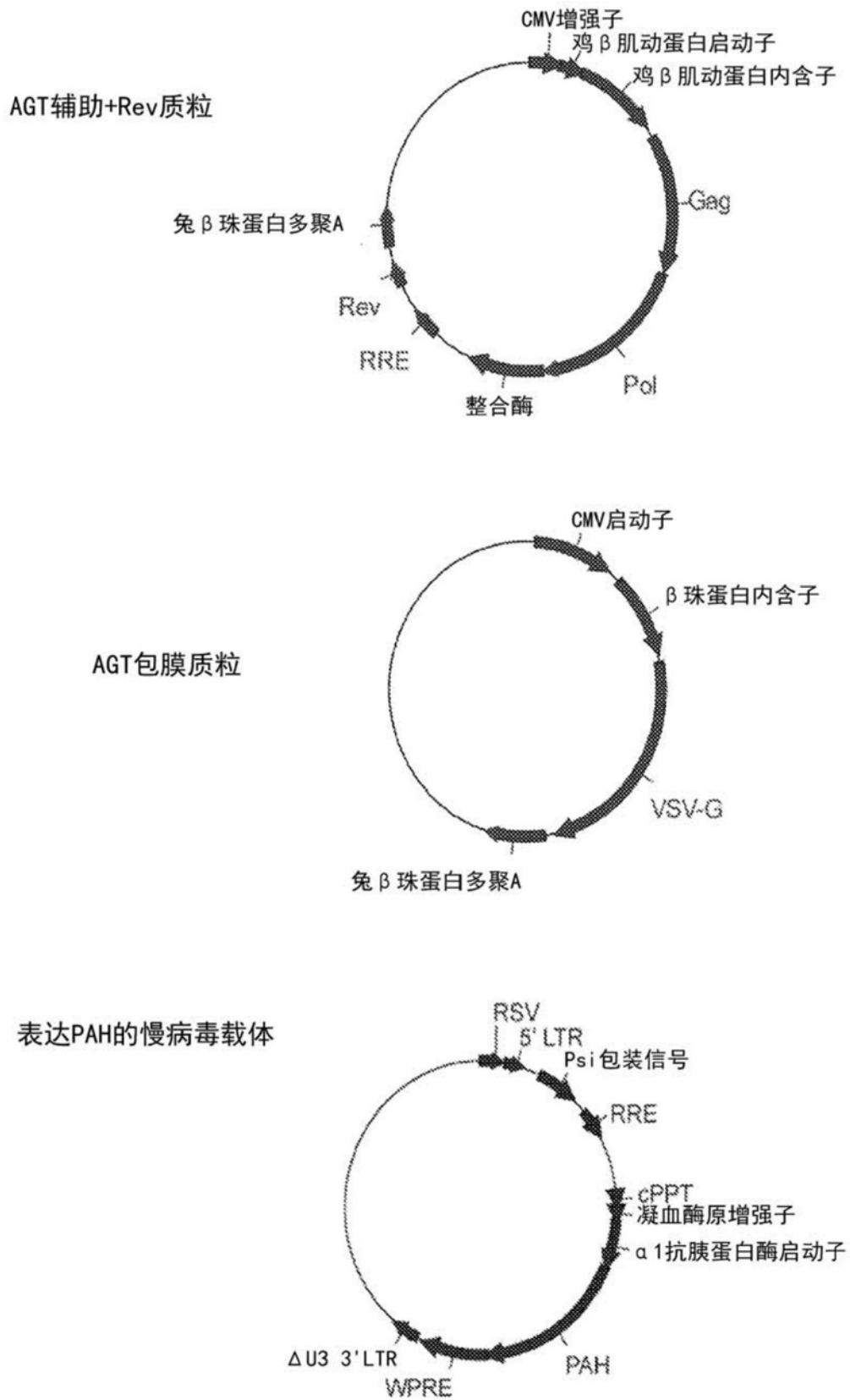


图1

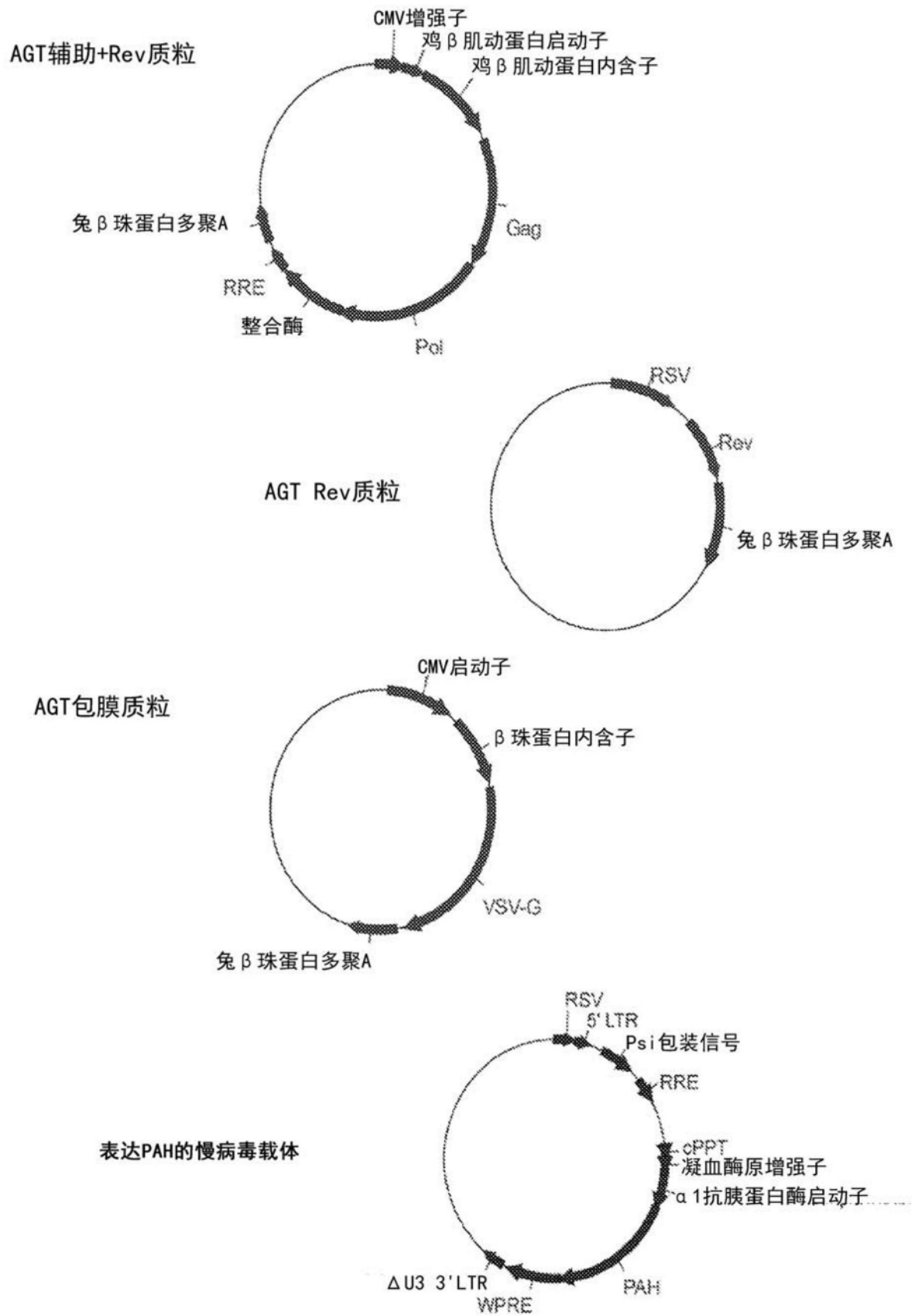


图2

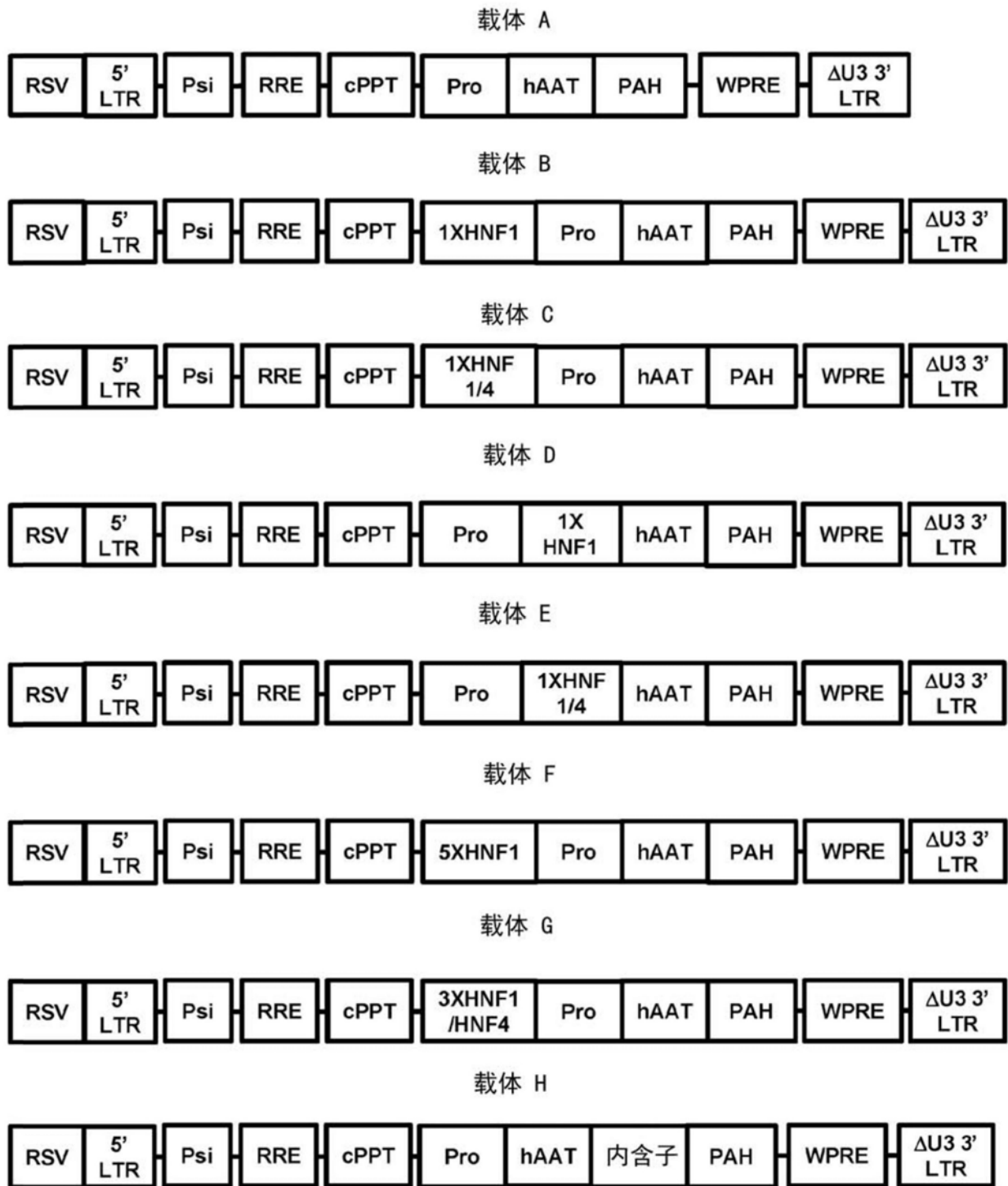


图3

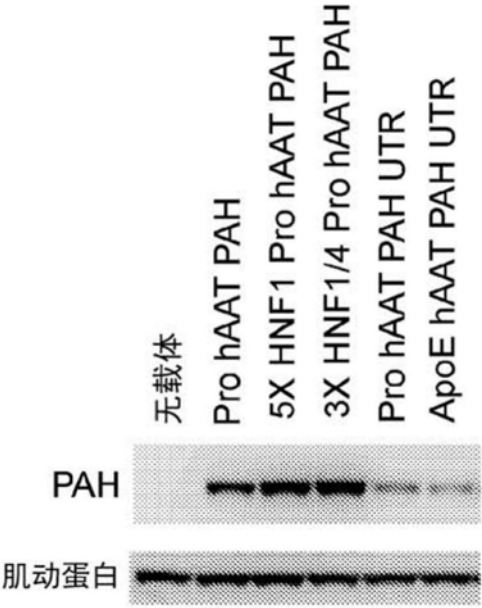


图4A



图4B

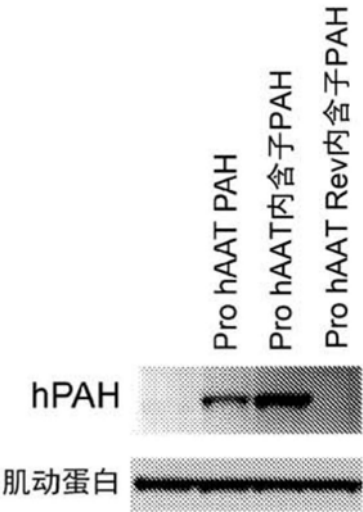


图5A

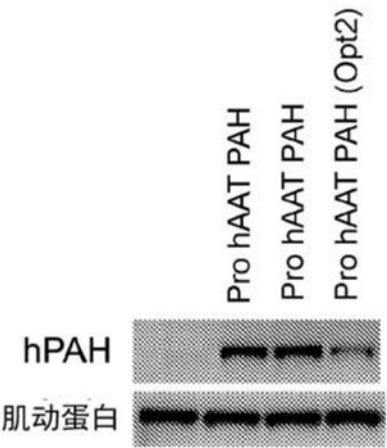


图5B

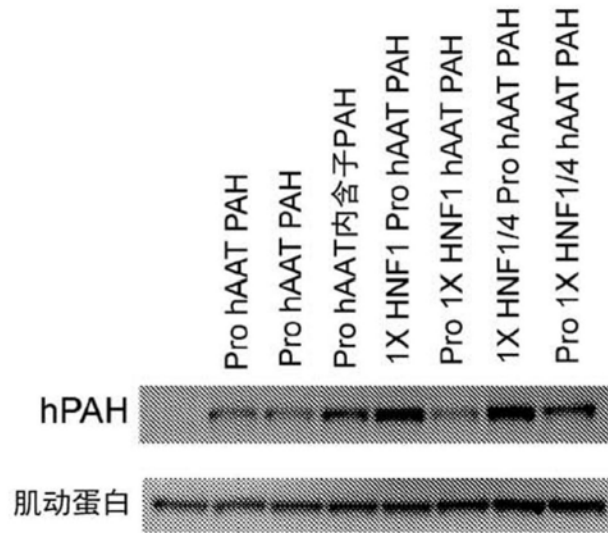


图5C

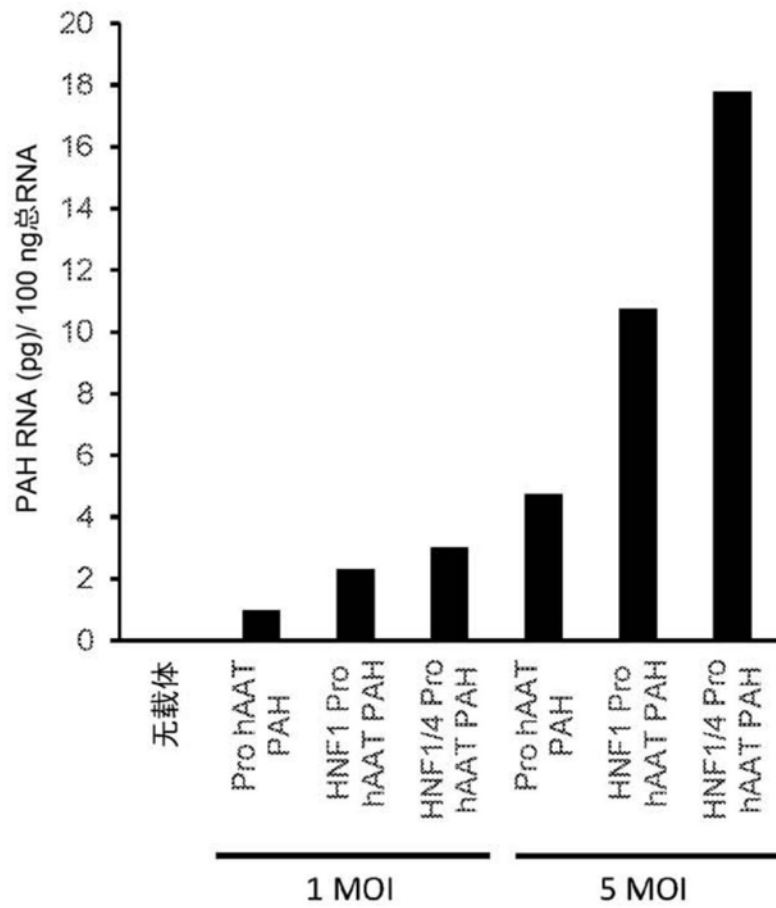


图6

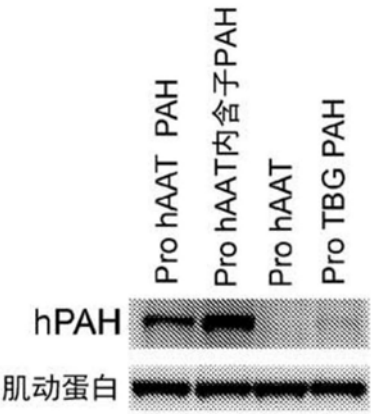


图7



图8A

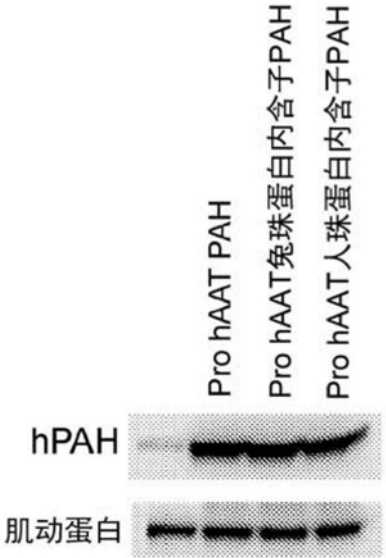


图8B

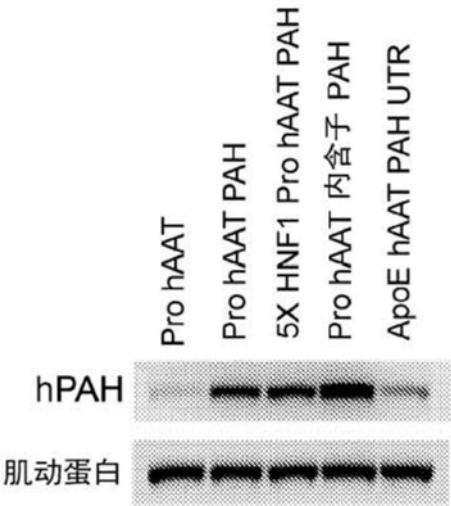


图9

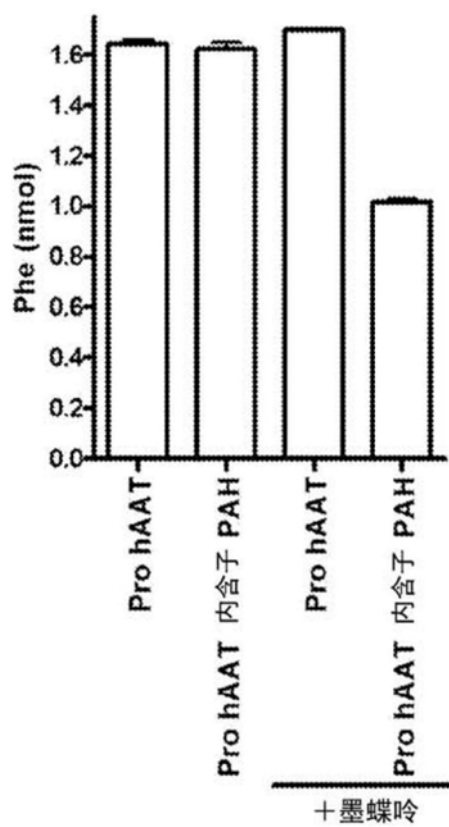


图10A

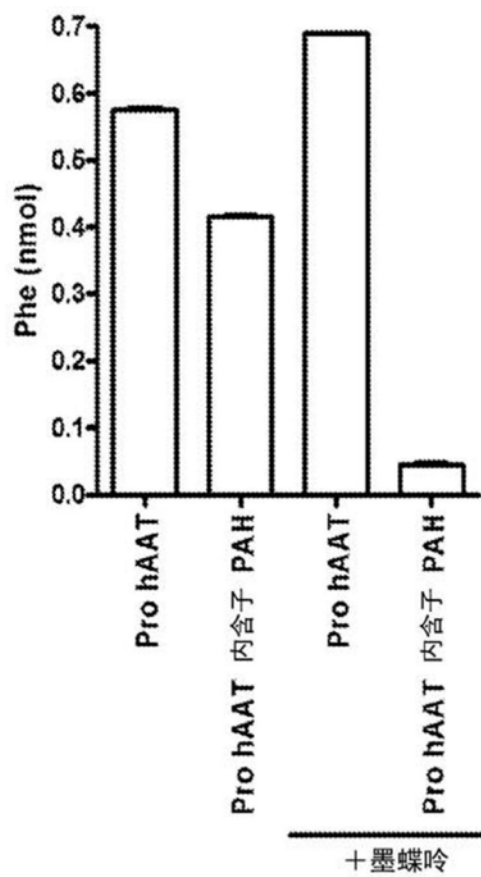


图10B

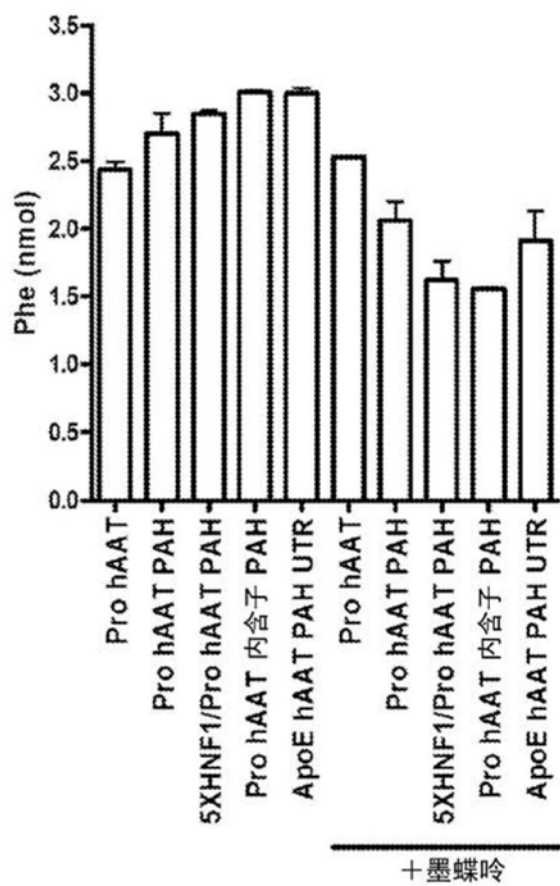


图10C

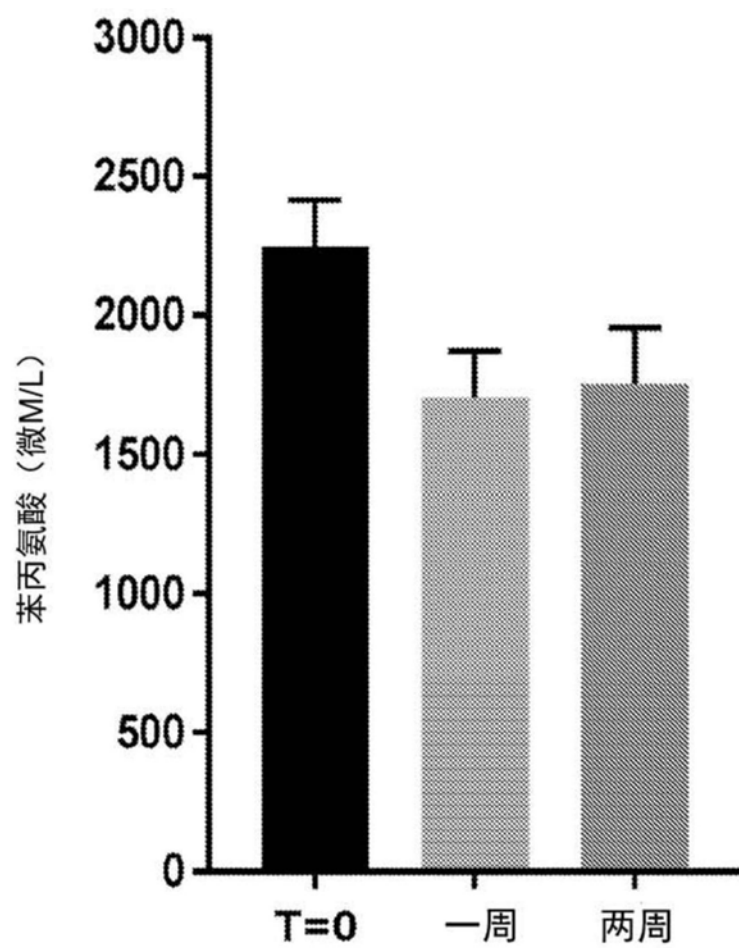


图11

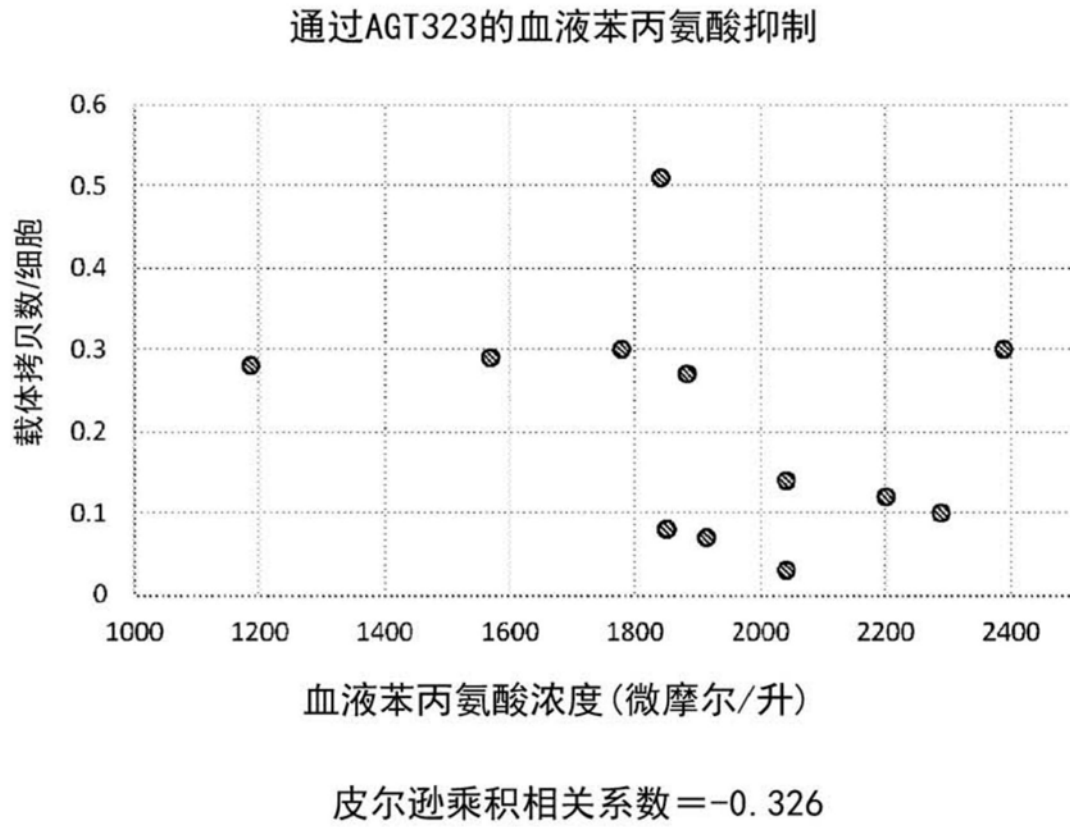


图12

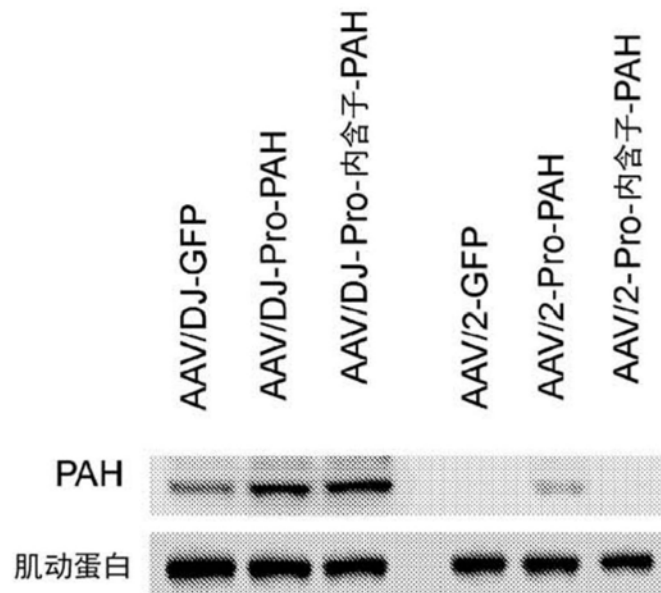


图13A

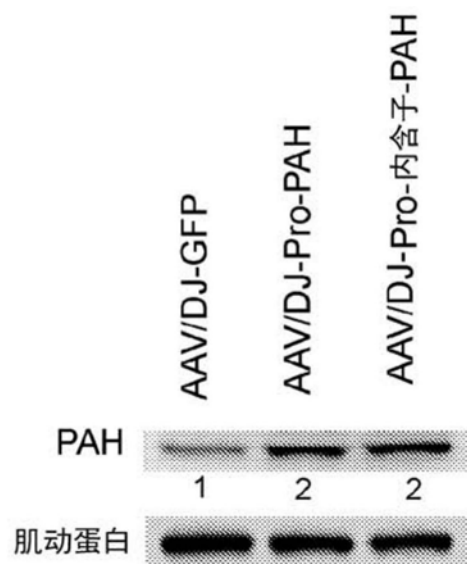


图13B

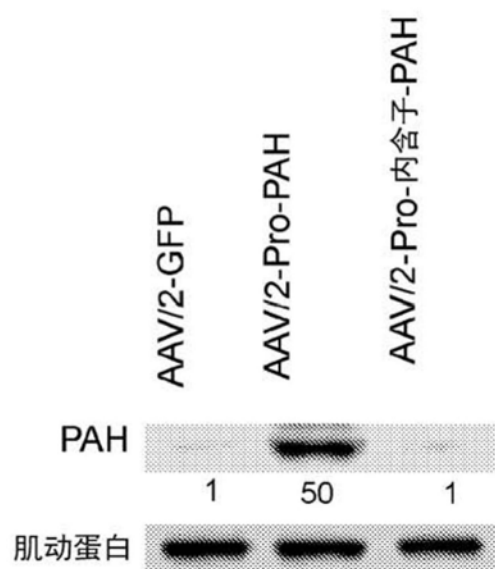


图13C

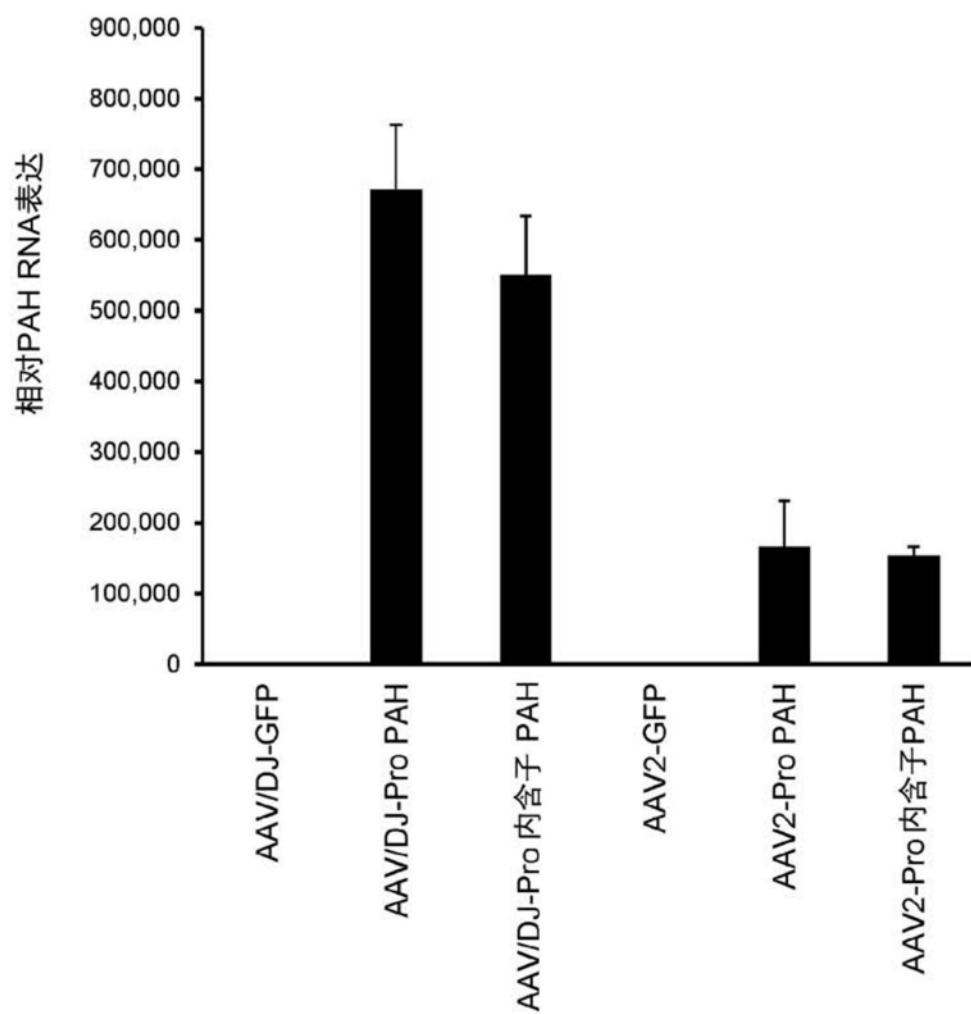


图13D

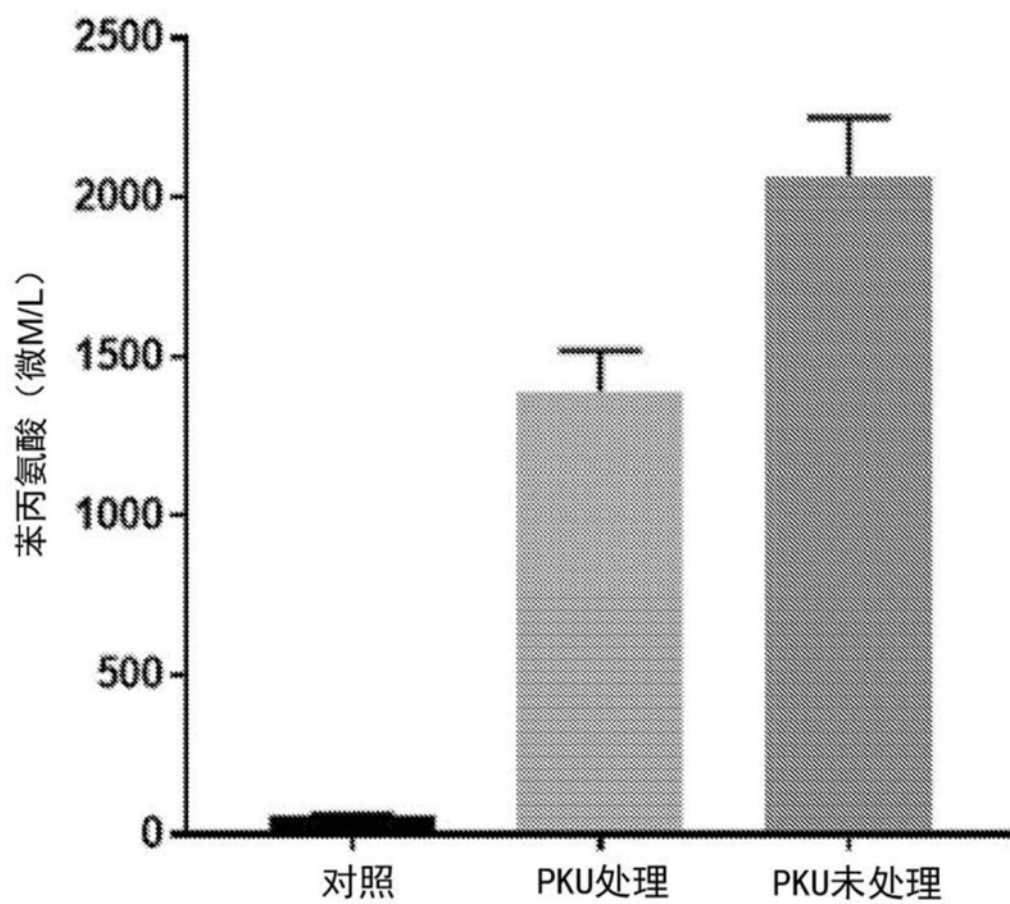


图14



图15