



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113453699 A

(43) 申请公布日 2021. 09. 28

(21) 申请号 202080014652.4

(22) 申请日 2020.01.03

(30) 优先权数据

62/788,504 2019.01.04 US

62/895,135 2019.09.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/012237 2020.01.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/142725 EN 2020.07.09

(71) 申请人 昂克诺斯公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 洛伦娜·勒纳

爱德华·M·肯尼迪

米切尔·H·菲尼尔

克里斯托夫·奎瓦

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 35/768 (2015.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

权利要求书10页 说明书74页

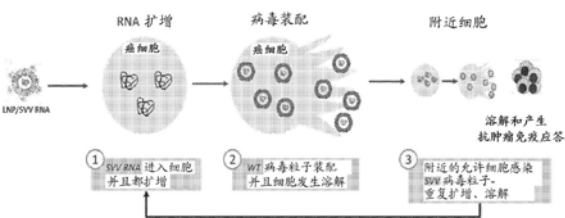
序列表94页 附图50页

(54) 发明名称

包封的RNA多核苷酸及使用方法

(57) 摘要

本公开涉及编码溶瘤病毒的重组RNA分子。本公开还涉及所述重组RNA分子的包封和所述重组RNA分子和/或颗粒用于治疗 and 预防癌症的用途。



1. 一种脂质纳米颗粒 (LNP), 所述脂质纳米颗粒包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组。
2. 如权利要求1所述的LNP, 其中所述溶瘤病毒是单链RNA (ssRNA) 病毒。
3. 如权利要求1所述的LNP, 其中所述溶瘤病毒是正义 (+) - 义 ssRNA病毒。
4. 如权利要求3所述的LNP, 其中所述 (+) - 义 ssRNA病毒选自表1中所列出的那些病毒。
5. 如权利要求3所述的LNP, 其中所述 (+) - 义 ssRNA病毒是小核糖核酸病毒。
6. 如权利要求5所述的LNP, 其中所述小核糖核酸病毒是塞内加谷病毒 (SVV) 或柯萨奇病毒。
7. 如权利要求6所述的LNP, 其中所述SVV是选自野生型SVV-A (SEQ ID NO:1)、S177A-SVVA突变体 (SEQ ID NO:2)、SVV-IR2突变体 (SEQ ID NO:3) 和SVV-IR2-S177A突变体 (SEQ ID NO:4) 的SVV-A。
8. 如权利要求6所述的LNP, 其中所述柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。
9. 如权利要求6所述的LNP, 其中所述柯萨奇病毒是包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的LNP, 其中所述LNP递送至细胞引起所述细胞产生病毒颗粒, 并且其中所述病毒颗粒是感染性的和溶解性的。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的LNP, 其中所述合成RNA病毒基因组还包含编码外源有效负载蛋白的异源多核苷酸。
12. 如权利要求1-10中任一项所述的LNP, 所述LNP还包含编码外源有效负载蛋白的重组RNA分子。
13. 如权利要求11或12所述的LNP, 其中所述外源有效负载蛋白是荧光蛋白、酶蛋白、细胞因子、趋化因子、能够结合于细胞表面受体的抗原结合分子或细胞表面受体的配体。
14. 如权利要求13所述的LNP, 其中所述细胞因子选自IL-12、GM-CSF、IL-18、IL-2和IL-36 γ 。
15. 如权利要求13所述的LNP, 其中所述细胞表面受体的配体是Flt3配体或TNFSF14。
16. 如权利要求13所述的LNP, 其中所述趋化因子选自CXCL10、CCL4、CCL21和CCL5。
17. 如权利要求13所述的LNP, 其中所述抗原结合分子能够结合于并且抑制免疫检查点受体。
18. 如权利要求17所述的LNP, 其中所述免疫检查点受体是PD-1。
19. 如权利要求13所述的LNP, 其中所述抗原结合分子能够结合于肿瘤抗原。
20. 如权利要求19所述的LNP, 其中所述抗原结合分子是双特异性T细胞衔接分子 (BiTE) 或双特异性轻T细胞衔接分子 (LiTE)。
21. 如权利要求19或20所述的LNP, 其中所述肿瘤抗原是DLL3或EpCAM。
22. 如权利要求1-18中任一项所述的LNP, 其中所述合成RNA病毒基因组和/或所述重组RNA分子包含微小RNA (miRNA) 靶序列 (miR-TS) 盒, 其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列。
23. 如权利要求22所述的LNP, 其中所述一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。
24. 如权利要求23所述的LNP, 其中所述miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷

贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷贝。

25. 如权利要求23所述的LNP, 其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。

26. 如权利要求23所述的LNP, 其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。

27. 如权利要求23所述的LNP, 其中所述miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的LNP, 其中所述LNP包含阳离子型脂质、一种或多种辅助脂质和磷脂-聚合物缀合物。

29. 如权利要求28所述的LNP, 其中所述阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、**COATSOME®** SS-LC (原名: SS-18/4PE-13)、**COATSOME®** SS-EC (原名: SS-33/4PE-15)、**COATSOME®** SS-0C、**COATSOME®** SS-0P、9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L-319)或N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)。

30. 如权利要求28或29所述的LNP, 其中所述辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC); 1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE); 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC); 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE); 和胆固醇。

31. 如权利要求28所述的LNP, 其中所述阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP), 并且其中所述中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

32. 如权利要求28-30中任一项所述的LNP, 其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG); 1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇(DPG-PEG); 1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG); 1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG); 1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG); 和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

33. 如权利要求28-32中任一项所述的LNP, 其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K); 1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K); 1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K); 1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K); 1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K); 和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。

34. 如权利要求28所述的LNP, 其中所述阳离子型脂质包含**COATSOME®** SS-0C, 其中所述一种或多种辅助脂质包含胆固醇(Chol)和DSPC, 并且其中所述磷脂-聚合物缀合物包含DPG-PEG2000。

35. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-0C: DSPC: Chol: DPG-PEG2K (占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D, 其中A=40%-60%, B=10%-25%, C=20%-30%, 和D=0%-3%并

且其中A+B+C+D=100%。

36. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D, 其中A=45%-50%, B=20%-25%, C=25%-30%, 和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。

37. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

38. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D, 其中A=40%-60%, B=10%-30%, C=20%-45%, 和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

39. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D, 其中A=40%-60%, B=10%-30%, C=25%-45%, 和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

40. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D, 其中A=45%-55%, B=10%-20%, C=30%-40%, 和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

41. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D, 其中A=45%-50%, B=10%-15%, C=35%-40%, 和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

42. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是49:11:38.5:1.5。

43. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D, 其中A=45%-65%, B=5%-20%, C=20%-45%, 和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

44. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D, 其中A=50%-60%, B=5%-15%, C=30%-45%, 和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

45. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D, 其中A=55%-60%, B=5%-15%, C=30%-40%, 和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

46. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D, 其中A=55%-60%, B=5%-10%, C=30%-35%, 和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

47. 如权利要求34所述的LNP, 其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是58:7:33.5:1.5。

48. 如权利要求1-42中任一项所述的LNP, 其中所述LNP包含选自表5的脂质制剂。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的LNP, 其中透明质酸缀合于所述LNP的表面。

50. 一种治疗性组合物, 所述治疗性组合物包含多个根据权利要求1-49中任一项所述的脂质纳米颗粒。

51. 如权利要求50所述的治疗性组合物, 其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约

500nm、约150nm至约500nm、约200nm至约500nm、约300nm至约500nm、约350nm至约500nm、约400nm至约500nm、约425nm至约500nm、约450nm至约500nm或约475nm至约500nm。

52. 如权利要求50所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约120nm。

53. 如权利要求50所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。

54. 如权利要求50所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约100nm。

55. 如权利要求50-54中任一项所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约40mV至约-40mV、约20mV至约-20mV、约10mV至约-10mV、约5mV至约-5mV或约20mV至约-40mV之间。

56. 如权利要求50-54中任一项所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位小于约-20mV、小于约-30mV、小于约-35mV或小于约-40mV。

57. 如权利要求56所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约-50mV至约-20mV、约-40mV至约-20mV或约-30 mV至约-20mV之间。

58. 如权利要求56或57所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位为约-30mV、约-31mV、约-32mV、约-33mV、约-34mV、约-35mV、约-36mV、约-37mV、约-38mV、约-39mV或约-40mV。

59. 如权利要求50-58中任一项所述的治疗性组合物,其中向受试者施用所述治疗性组合物将所述重组RNA多核苷酸递送至所述受试者的靶细胞,并且其中所述重组RNA多核苷酸产生能够溶解所述受试者的所述靶细胞的感染性溶瘤病毒。

60. 如权利要求59所述的治疗性组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内或肿瘤内递送。

61. 如权利要求59所述的治疗性组合物,其中所述靶细胞是癌细胞。

62. 一种抑制有需要的受试者中癌性肿瘤的生长方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用根据权利要求50-61中任一项所述的治疗性组合物,其中所述组合物的施用抑制所述肿瘤的生长。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述施用是肿瘤内或静脉内的。

64. 如权利要求62或63所述的方法,其中所述癌症是肺癌、肝癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、胃癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、髓母细胞瘤或黑色素瘤。

65. 如权利要求62-64中任一项所述的方法,其中所述癌症是神经内分泌癌症。

66. 一种重组RNA分子,所述重组RNA分子包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组。

67. 如权利要求66所述的重组RNA分子,其中所编码的溶瘤病毒是单链RNA(ssRNA)病毒。

68. 如权利要求67所述的重组RNA分子,其中所述ssRNA病毒是正义((+)-义)或负义((-)-义)ssRNA病毒。

69. 如权利要求68所述的重组RNA分子,其中所述(+)-义ssRNA病毒是小核糖核酸病毒。

70. 如权利要求69所述的重组RNA分子,其中所述小核糖核酸病毒是塞内加谷病毒(SVV)或柯萨奇病毒。

71. 如权利要求70所述的重组RNA分子,其中所述SVV是选自野生型SVV-A (SEQ ID NO:

1)、S177A-SVVA突变体(SEQ ID NO:2)、SVV-IR2突变体(SEQ ID NO:3)或SVV-IR2-S177A(SEQ ID NO:4)的SVV-A。

72.如权利要求70所述的重组RNA分子,其中所述柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。

73.如权利要求70所述的重组RNA分子,其中所述柯萨奇病毒是包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。

74.如权利要求66-73中任一项所述的重组RNA分子,所述重组RNA分子还包含被插入编码所述溶瘤病毒的所述多核苷酸序列中的微小RNA(miRNA)靶序列(miR-TS)盒,其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列,并且其中细胞中一种或多种相应miRNA的表达抑制所述细胞中所编码的病毒的复制。

75.如权利要求74所述的重组RNA分子,其中所述一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。

76.如权利要求75所述的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷贝。

77.如权利要求75所述的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。

78.如权利要求75所述的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。

79.如权利要求75所述的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。

80.如权利要求66-79中任一项所述的重组RNA分子,其中所述重组RNA分子在通过非病毒性递送媒介物引入细胞中时能够产生具有复制能力的溶瘤病毒。

81.如权利要求80所述的重组RNA分子,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

82.如权利要求81所述的重组RNA分子,其中所述细胞是哺乳动物受试者中存在的哺乳动物细胞。

83.如权利要求66-82中任一项所述的重组RNA分子,其中所述具有复制能力的病毒选自由以下组成的组:柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、塞内加谷病毒、拉沙病毒、鼠白血病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、新城疫病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒和马拉巴病毒。

84.如权利要求74所述的重组RNA分子,其中所述一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。

85.如权利要求84所述的重组RNA分子,其中所述一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种非必需基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。

86.如权利要求66-85中任一项所述的重组RNA分子,其中所述重组RNA分子被插入核酸载体中。

87.如权利要求141所述的重组RNA分子,其中所述核酸载体是复制子。

88.如权利要求66-87中任一项所述的重组RNA分子,其中所述合成RNA病毒基因组还包含编码外源有效负载蛋白的异源多核苷酸。

89.如权利要求88所述的重组RNA分子,其中所述外源有效负载蛋白是荧光蛋白、酶蛋白、细胞因子、趋化因子、能够结合于细胞表面受体的抗原结合分子或能够结合于细胞表面受体的配体。

90. 如权利要求89所述的重组RNA分子,其中所述细胞因子选自IL-12、GM-CSF、IL-18、IL-2和IL-36 γ 。

91. 如权利要求89所述的重组RNA分子,其中所述细胞表面受体的配体是Flt3配体或TNFSF14。

92. 如权利要求89所述的重组RNA分子,其中所述趋化因子选自CXCL10、CCL4、CCL21和CCL5。

93. 如权利要求89所述的重组RNA分子,其中所述抗原结合分子能够结合于并且抑制免疫检查点受体。

94. 如权利要求93所述的重组RNA分子,其中所述免疫检查点受体是PD-1。

95. 如权利要求89所述的重组RNA分子,其中所述抗原结合分子能够结合于肿瘤抗原。

96. 如权利要求95所述的重组RNA分子,其中所述抗原结合分子是双特异性T细胞衔接分子(BiTE)或双特异性轻T细胞衔接分子(LiTE)。

97. 如权利要求95或96所述的重组RNA分子,其中所述肿瘤抗原是DLL3或EpCAM。

98. 一种重组DNA分子,所述重组DNA分子从5'至3'包含启动子序列、5'接合裂解序列、编码如权利要求66-97中任一项所述的重组RNA分子的多核苷酸序列和3'接合裂解序列。

99. 如权利要求98所述的重组DNA分子,其中所述启动子序列是T7启动子序列。

100. 如权利要求98或99所述的重组DNA分子,其中所述5'接合裂解序列是核酶序列并且所述3'接合裂解序列是核酶序列。

101. 如权利要求100所述的重组DNA分子,其中所述5'核酶序列是锤头状核酶序列并且其中所述3'核酶序列是肝炎 δ 病毒核酶序列。

102. 如权利要求98或99所述的重组DNA分子,其中所述5'接合裂解序列是核酶序列并且所述3'接合裂解序列是限制酶识别序列。

103. 如权利要求102所述的重组DNA分子,其中所述5'核酶序列是锤头状核酶序列、手枪状核酶序列或修饰的手枪状核酶序列。

104. 如权利要求102或103所述的重组DNA分子,其中3'限制酶识别序列是IIS型限制酶识别序列。

105. 如权利要求104所述的重组DNA分子,其中所述IIS型识别序列是SapI识别序列。

106. 如权利要求98或99所述的重组DNA分子,其中所述5'接合裂解序列是RNaseH引物结合序列并且所述3'接合裂解序列是限制酶识别序列。

107. 一种产生如权利要求66-97中任一项所述的重组RNA分子的方法,所述方法包括体外转录如权利要求98-106中任一项所述的DNA分子以及纯化所得到的重组RNA分子。

108. 如权利要求107所述的方法,其中所述重组RNA分子包含由合成RNA病毒基因组编码的溶瘤病毒天然的5'末端和3'末端。

109. 一种组合物,所述组合物包含有效量的如权利要求66-97中任一项所述的重组RNA分子和适合于施用至哺乳动物受试者的载体。

110. 一种颗粒,所述颗粒包含如权利要求66-97中任一项所述的重组RNA分子。

111. 如权利要求110所述的颗粒,其中所述颗粒是生物可降解的。

112. 如权利要求111所述的颗粒,其中所述颗粒选自由纳米颗粒、外泌体、脂质体和脂质体复合物组成的组。

113. 如权利要求112所述的颗粒,其中所述外泌体是源自于完整外泌体或空外泌体的修饰外泌体。

114. 如权利要求112所述的颗粒,其中所述纳米颗粒是包含阳离子型脂质、一种或多种辅助脂质和磷脂-聚合物缀合物的脂质纳米颗粒(LNP)。

115. 如权利要求114所述的颗粒,其中所述阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA(MC3)、**COATSOME®** SS-LC(原名:SS-18/4PE-13)、**COATSOME®** SS-EC(原名:SS-33/4PE-15)、**COATSOME®** SS-OC、**COATSOME®** SS-OP、9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L-319)或N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)。

116. 如权利要求114或115所述的颗粒,其中所述辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);和胆固醇。

117. 如权利要求114所述的颗粒,其中所述阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中所述中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

118. 如权利要求114-116中任一项所述的颗粒,其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇(DPG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

119. 如权利要求114-118中任一项所述的颗粒,其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。

120. 如权利要求114所述的颗粒,其中所述阳离子型脂质包含**COATSOME®** SS-OC,其中所述一种或多种辅助脂质包含胆固醇(Chol)和DSPC,并且其中所述磷脂-聚合物缀合物包含DPG-PEG2000。

121. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-25%,C=20%-30%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

122. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=20%-25%,C=25%-30%,和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。

123. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的

百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

124. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

125. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=25%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

126. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-55%,B=10%-20%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

127. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=10%-15%,C=35%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

128. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是49:11:38.5:1.5。

129. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-65%,B=5%-20%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

130. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=50%-60%,B=5%-15%,C=30%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

131. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-15%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

132. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-10%,C=30%-35%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

133. 如权利要求120所述的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是58:7:33.5:1.5。

134. 如权利要求110-133中任一项所述的颗粒,其中所述LNP包含选自表5的脂质制剂。

135. 如权利要求114所述的颗粒,其中所述阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中所述中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

136. 如权利要求114或135所述的颗粒,所述颗粒还包含磷脂-聚合物缀合物,其中所述磷脂-聚合物缀合物是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚(乙二醇)(DSPE-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

137. 如权利要求110-136中任一项所述的颗粒,其中透明质酸缀合于所述LNP的表面。

138. 如权利要求110-136中任一项所述的颗粒,所述颗粒还包含编码有效负载分子的第二重组RNA分子。

139. 如权利要求138所述的颗粒,其中所述第二重组RNA分子是复制子。

140. 一种治疗性组合物,所述治疗性组合物包含多个根据权利要求114-139中任一项所述的脂质纳米颗粒。

141. 如权利要求140所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约500nm、约150nm至约500nm、约200nm至约500nm、约300nm至约500nm、约350nm至约500nm、约400nm至约500nm、约425nm至约500nm、约450nm至约500nm或约475nm至约500nm。

142. 如权利要求140所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约120nm。

143. 如权利要求140所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。

144. 如权利要求140所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约100nm。

145. 如权利要求140-144中任一项所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约20mV至约-20mV、约10mV至约-10mV、约5mV至约-5mV或约20mV至约-40mV之间。

146. 如权利要求140-144中任一项所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位小于约-20mV、小于约-30mV、小于约-35mV或小于约-40mV。

147. 如权利要求146所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约-50mV至约-20mV、约-40mV至约-20mV或约-30mV至约-20mV之间。

148. 如权利要求141或146所述的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位为约-30mV、约-31mV、约-32mV、约-33mV、约-34mV、约-35mV、约-36mV、约-37mV、约-38mV、约-39mV或约-40mV。

149. 如权利要求140-148中任一项所述的治疗性组合物,其中向受试者递送所述组合物将所包封的重组RNA分子递送至靶细胞,并且其中所包封的重组RNA分子产生能够溶解所述靶细胞的感染性病毒。

150. 如权利要求149所述的治疗性组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内或肿瘤内递送。

151. 如权利要求150所述的治疗性组合物,其中所述靶细胞是癌细胞。

152. 一种无机颗粒,所述无机颗粒包含如权利要求66-97中任一项所述的重组多核苷酸。

153. 如权利要求152所述的无机颗粒,其中所述无机颗粒选自由以下组成的组:金纳米颗粒(GNP)、金纳米棒(GNR)、磁性纳米颗粒(MNP)、磁性纳米管(MNT)、碳纳米角(CNH)、碳富勒烯、碳纳米管(CNT)、磷酸钙纳米颗粒(CPNP)、介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN)、二氧化硅纳米管(SNT)或星形中空二氧化硅纳米颗粒(SHNP)。

154. 如权利要求150所述的无机颗粒,所述无机颗粒还包含编码有效负载分子的第二重组RNA分子。

155. 如权利要求154所述的颗粒,其中所述第二重组RNA分子是复制子。

156. 一种组合物,所述组合物包含如权利要求152-155中任一项所述的无机颗粒,其中所述颗粒的平均直径小于约500nm,介于约50nm与500nm之间,介于约250nm与约500nm之间,或为约350nm。

157. 一种杀死癌细胞的方法,所述方法包括使所述癌细胞暴露于如权利要求1-49、

110-139或152-155中任一项所述的颗粒、如权利要求66-97中任一项所述的重组RNA分子或其组合物,所述暴露在足以将所述颗粒经细胞内递送至所述癌细胞的条件下,其中由所封装的多核苷酸产生的具有复制能力的病毒导致所述癌细胞的杀死。

158.如权利要求157所述的方法,其中所述具有复制能力的病毒不在非癌细胞中产生。

159.如权利要求157或158所述的方法,其中所述方法在体内、体外或离体进行。

160.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向罹患所述癌症的受试者施用有效量的如权利要求1-49、110-139或152-155中任一项所述的颗粒、如权利要求66-97中任一项所述的重组RNA分子或其组合物。

161.如权利要求160所述的方法,其中所述颗粒或其组合物经静脉内、鼻内、呈吸入剂施用,或直接注射至肿瘤中。

162.如权利要求160或161所述的方法,其中所述颗粒或其组合物重复施用至所述受试者。

163.如权利要求160-162中任一项所述的方法,其中所述受试者是小鼠、大鼠、兔、猫、狗、马、非人灵长类动物或人。

164.如权利要求160-163中任一项所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠直肠癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、头颈癌、甲状腺癌、恶性胶质瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、肉瘤、神经母细胞瘤、神经内分泌癌症、横纹肌肉瘤、髓母细胞瘤、膀胱癌和边缘区淋巴瘤(MZL)。

165.如权利要求164所述的方法,其中所述肺癌是小细胞肺癌或非小细胞肺癌。

166.如权利要求164所述的方法,其中所述肝癌是肝细胞癌(HCC)。

167.如权利要求164所述的方法,其中所述前列腺癌是治疗突发性神经内分泌前列腺癌。

168.如权利要求150-167中任一项所述的方法,其中所述癌症是神经内分泌癌症。

包封的RNA多核苷酸及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年1月4日提交的美国临时申请No.62/788,504和2019年9月3日提交的美国临时申请No.62/895,135的优先权,所述临时申请的内容各以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 关于以电子方式递交的文本文件的描述

[0004] 与此一道以电子方式递交的文本文件的内容以引用的方式整体并入本文中。序列表的计算机可读格式副本(文件名:ONCR-015_01W0_SeqList_ST25.txt,记录日期:2020年1月2日,文件大小:265千字节)。

技术领域

[0005] 本公开总体上涉及免疫学、炎症和癌症治疗领域。更具体地说,本公开涉及颗粒包封的病毒基因组。本公开还涉及例如癌症的增生性疾病的治疗和预防。

背景技术

[0006] 溶瘤病毒是具有复制能力的病毒,其具有能够感染并溶解肿瘤细胞的溶菌生命周期(lytic life-cycle)。直接肿瘤细胞溶解不仅导致细胞死亡,而且还导致针对由局部抗原呈递细胞吸收并呈递的肿瘤抗原的适应性免疫应答的产生。因此,溶瘤病毒通过直接细胞溶解和促进能够在病毒清除后维持抗肿瘤应答的抗原特异性适应性应答来对抗肿瘤细胞的生长。

[0007] 但是,具有复制能力的病毒的临床使用带来了一些挑战。通常,病毒暴露会激活先天免疫途径,从而导致广泛的非特异性炎症反应。如果患者以前未曾暴露于该病毒,则这种初始的先天免疫应答可导致适应性抗病毒应答的发展和中和抗体的产生。如果患者以前曾暴露于该病毒,则现有的中和抗病毒抗体可以阻止所需的溶解作用。在两种情况下,中和抗体的存在不仅阻止靶细胞的病毒溶解,而且使病毒治疗剂的重新施用无效。这些因素限制了病毒治疗剂在转移性癌症治疗中的应用,因为天然存在的抗病毒应答阻碍了治疗此类癌症所需的反复全身施用的功效。即使没有这类障碍,随后在未患病的细胞中进行病毒复制也会导致对周围细胞和组织的实质性疾病外附带损害。

[0008] 在本领域中与具有复制能力的病毒的治疗用途有关的组合物和方法仍然存在长期未满足的需求。本公开提供了这样的组合物和方法更多。

发明内容

[0009] 在一些实施方案中,本公开提供了一种脂质纳米颗粒(LNP),所述脂质纳米颗粒包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组。在一些实施方案中,溶瘤病毒是单链RNA(ssRNA)病毒。在一些实施方案中,溶瘤病毒是正义((+)-义)ssRNA病毒。在一些实施方案中,(+)-义ssRNA病毒选自表1中所列出的那些病毒。在一些实施方案中,(+)-义ssRNA病毒是小核糖核酸病毒。在一些实施方案中,小核糖核酸病毒是塞内加谷病毒(Seneca Valley Virus,SVV)

或柯萨奇病毒(Coxsackievirus)。在一些实施方案中,SVV是选自野生型SVV-A (SEQ ID NO: 1)、S177A-SVVA突变体 (SEQ ID NO:2)、SVV-IR2突变体 (SEQ ID NO:3) 和SVV-IR2-S177A突变体 (SEQ ID NO:4) 的SVV-A。在一些实施方案中,柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。在一些实施方案中,柯萨奇病毒是包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。

[0010] 在一些实施方案中,LNP递送至细胞引起所述细胞产生病毒颗粒,并且其中所述病毒颗粒是感染性的和溶解性的。在一些实施方案中,所编码的溶瘤病毒能够减小远离LNP施用至受试者的部位的肿瘤的尺寸。

[0011] 在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组还包含编码外源有效负载蛋白的异源多核苷酸。在一些实施方案中,LNP还包含编码外源有效负载蛋白的重组RNA分子。在一些实施方案中,外源有效负载蛋白是荧光蛋白、酶蛋白、细胞因子、趋化因子、能够结合于细胞表面受体的抗原结合分子或细胞表面受体的配体。在一些实施方案中,细胞因子选自IL-12、GM-CSF、IL-18、IL-2和IL-36 γ 。在一些实施方案中,细胞表面受体的配体是Flt3配体或TNFSF14。在一些实施方案中,趋化因子选自CXCL10、CCL4、CCL21和CCL5。在一些实施方案中,抗原结合分子能够结合于并且抑制免疫检查点受体。在一些实施方案中,免疫检查点受体是PD-1。在一些实施方案中,抗原结合分子能够结合于肿瘤抗原。在一些实施方案中,抗原结合分子是双特异性T细胞衔接分子 (BiTE) 或双特异性轻T细胞衔接分子 (LiTE)。在一些实施方案中,肿瘤抗原是DLL3或EpCAM。

[0012] 在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组和/或重组RNA分子包含微小RNA (miRNA) 靶序列 (miR-TS) 盒,其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列。在一些实施方案中,一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。

[0013] 在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质、一种或多种辅助脂质和磷脂-聚合物缀合物。在一些实施方案中,阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、**COATSOME®** SS-LC (原名:SS-18/4PE-13)、**COATSOME®** SS-EC (原名:SS-33/4PE-15)、**COATSOME®** SS-OC、**COATSOME®** SS-OP、9-((4-二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基) 酯(L-319) 或N-(2,3-二油酰基氧基) 丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)。在一些实施方案中,辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);和胆固醇。

[0014] 在一些实施方案中,阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE) 或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0015] 在一些实施方案中,磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸

乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇(DPG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。在一些实施方案中,磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。

[0016] 在一些实施方案中,阳离子型脂质包含COATSOME®SS-0C,其中一种或多种辅助脂质包含胆固醇(Chol)和DSPC,并且其中磷脂-聚合物缀合物包含DPG-PEG2000。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-25%,C=20%-30%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=20%-25%,C=25%-30%,和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

[0017] 在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=25%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-55%,B=10%-20%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=10%-15%,C=35%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是49:11:38.5:1.5。

[0018] 在一些实施方案中,LNP包含SS-0C、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-65%,B=5%-20%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-0C、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=50%-60%,B=5%-15%,C=30%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-0C、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-15%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-0C、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-0C:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-10%,C=30%-35%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方

案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是58:7:33.5:1.5。

[0019] 在一些实施方案中,LNP包含选自表5的脂质制剂。

[0020] 在一些实施方案中,透明质酸缀合于LNP的表面。

[0021] 在一些实施方案中,本公开提供了一种治疗性组合物,所述治疗性组合物包含多个本文所述的脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约50nm至约500nm、约150nm至约500nm、约200nm至约500nm、约300nm至约500nm、约350nm至约500nm、约400nm至约500nm、约425nm至约500nm、约450nm至约500nm或约475nm至约500nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约50nm至约120nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约100nm。

[0022] 在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位介于约40mV至约-40mV、约20mV至约-20mV、约10mV至约-10mV、约5mV至约-5mV或约20mV至约-40mV之间。在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位小于约-20mV、小于约-30mV、小于约-35mV或小于约-40mV。在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位介于约-50mV至约-20mV、约-40mV至约-20mV或约-30mV至约-20mV之间。在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位为约-30mV、约-31mV、约-32mV、约-33mV、约-34mV、约-35mV、约-36mV、约-37mV、约-38mV、约-39mV或约-40mV。

[0023] 在一些实施方案中,向受试者施用治疗性组合物将重组RNA多核苷酸递送至受试者的靶细胞,并且其中重组RNA多核苷酸产生能够溶解受试者的靶细胞的感染性溶瘤病毒。在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。

[0024] 在一些实施方案中,组合物被配制用于静脉内或肿瘤内递送。

[0025] 在一些实施方案中,本公开提供了一种抑制有需要的受试者中癌性肿瘤的生长的方法,所述方法包括施用本文所述的治疗性组合物至有需要的受试者,其中组合物的施用抑制肿瘤的生长。在一些实施方案中,施用是肿瘤内或静脉内的。在一些实施方案中,癌症是肺癌、肝癌、前列腺癌、膀胱癌或黑色素瘤。

[0026] 在一些实施方案中,本公开提供了一种重组RNA分子,所述重组RNA分子包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组。在一些实施方案中,所编码的溶瘤病毒是单链RNA(ssRNA)病毒。在一些实施方案中,ssRNA病毒是正义(+)-义或负义(-)-义ssRNA病毒。在一些实施方案中,(+)-义ssRNA病毒是小核糖核酸病毒。在一些实施方案中,小核糖核酸病毒是塞内加谷病毒(SVV)或柯萨奇病毒。在一些实施方案中,SVV是选自野生型SVV-A(SEQ ID NO:1)、S177A-SVVA突变体(SEQ ID NO:2)、SVV-IR2突变体(SEQ ID NO:3)或SVV-IR2-S177A(SEQ ID NO:4)的SVV-A。在一些实施方案中,柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。在一些实施方案中,柯萨奇病毒是包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。

[0027] 在一些实施方案中,重组RNA分子还包含被插入编码溶瘤病毒的多核苷酸序列中的微小RNA(miRNA)靶序列(miR-TS)盒,其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列,并且其中细胞中一种或多种相应miRNA的表达抑制细胞中所编码的病毒的复制。在一些实施方案中,一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷

贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。在一些实施方案中,一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种非必需基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。在一些实施方案中,一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'或3'。

[0028] 在一些实施方案中,重组RNA分子在通过非病毒性递送媒介物引入细胞中时能够产生具有复制能力的溶瘤病毒。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物受试者中存在的哺乳动物细胞。

[0029] 在一些实施方案中,具有复制能力的病毒选自由以下组成的组:柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、塞内加谷病毒、拉沙病毒、鼠白血病病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、新城疫病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒和马拉巴病毒。在一些实施方案中,具有复制能力的病毒选自表1所列出的那些病毒。

[0030] 在一些实施方案中,重组RNA分子被插入核酸载体中。在一些实施方案中,核酸载体是复制子。

[0031] 在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组还包含编码外源有效负载蛋白的异源多核苷酸。在一些实施方案中,外源有效负载蛋白是荧光蛋白、酶蛋白、细胞因子、趋化因子、能够结合于细胞表面受体的抗原结合分子或能够结合于细胞表面受体的配体。在一些实施方案中,细胞因子选自IL-12、GM-CSF、IL-18、IL-2和IL-36 γ 。在一些实施方案中,细胞表面受体的配体是F1t3配体或TNFSF14。在一些实施方案中,趋化因子选自CXCL10、CCL4、CCL21和CCL5。在一些实施方案中,抗原结合分子能够结合于并且抑制免疫检查点受体。在一些实施方案中,免疫检查点受体是PD-1。在一些实施方案中,抗原结合分子能够结合于肿瘤抗原。在一些实施方案中,抗原结合分子是双特异性T细胞衔接分子(BiTE)或双特异性轻T细胞衔接分子(LiTE)。在一些实施方案中,肿瘤抗原是DLL3或EpCAM。

[0032] 在一些实施方案中,本公开提供了一种重组DNA分子,所述重组DNA分子从5'至3'包含启动子序列、5'接合裂解序列、编码本文所述的重组RNA分子的多核苷酸序列和3'接合裂解序列。在一些实施方案中,启动子序列是T7启动子序列。

[0033] 在一些实施方案中,5'接合裂解序列是核酶序列并且3'接合裂解序列是核酶序列。在一些实施方案中,5'核酶序列是锤头状核酶序列并且其中3'核酶序列是肝炎 δ 病毒核酶序列。在一些实施方案中,5'接合裂解序列是核酶序列并且3'接合裂解序列是限制酶识别序列。在一些实施方案中,5'核酶序列是锤头状核酶序列、手枪状核酶序列或修饰的手枪状核酶序列。在一些实施方案中,3'限制酶识别序列是IIS型限制酶识别序列。在一些实施方案中,IIS型识别序列是SapI识别序列。在一些实施方案中,5'接合裂解序列是RNAseH引物结合序列并且3'接合裂解序列是限制酶识别序列。

[0034] 在一些实施方案中,本公开提供了产生本文所述的重组RNA分子的方法,所述方法包括体外转录本文所述的DNA分子以及纯化所得到的重组RNA分子。在一些实施方案中,重

组RNA分子包含由合成RNA病毒基因组编码的溶瘤病毒天然的5'末端和3'末端。

[0035] 在一些实施方案中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含有效量的本文所述的重组RNA分子和适合于施用至哺乳动物受试者的载体。

[0036] 在一些实施方案中,本公开提供了一种颗粒,所述颗粒包含本文所述的重组RNA分子。在一些实施方案中,颗粒是生物可降解的。在一些实施方案中,颗粒选自纳米颗粒、外泌体、脂质体和脂质体复合物组成的组。在一些实施方案中,外泌体是源自于完整外泌体或空外泌体的修饰外泌体。在一些实施方案中,纳米颗粒是包含阳离子型脂质、一种或多种辅助脂质和磷脂-聚合物缀合物的脂质纳米颗粒(LNP)。

[0037] 在一些实施方案中,阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA(MC3)、**COATSOME®** SS-LC(原名:SS-18/4PE-13)、**COATSOME®** SS-EC(原名:SS-33/4PE-15)、**COATSOME®** SS-OC、**COATSOME®** SS-OP、9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L-319)或N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)。在一些实施方案中,辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);和胆固醇。在一些实施方案中,阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0038] 在一些实施方案中,磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇(DPG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

[0039] 在一些实施方案中,磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。

[0040] 在一些实施方案中,阳离子型脂质包含**COATSOME®** SS-OC,其中一种或多种辅助脂质包含胆固醇(Chol)和DSPC,并且其中磷脂-聚合物缀合物包含DPG-PEG2000。

[0041] 在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-25%,C=20%-30%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=20%-25%,C=25%-30%,和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

[0042] 在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比

率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=25%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-55%,B=10%-20%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=10%-15%,C=35%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是49:11:38.5:1.5。在一些实施方案中,LNP包含选自表5的脂质制剂。

[0043] 在一些实施方案中,阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一些实施方案中,颗粒还包含磷脂-聚合物缀合物,其中磷脂-聚合物缀合物是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚(乙二醇)(DSPE-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

[0044] 在一些实施方案中,透明质酸缀合于LNP的表面。

[0045] 在一些实施方案中,颗粒还包含编码有效负载分子的第二重组RNA分子。在一些实施方案中,第二重组RNA分子是复制子。

[0046] 在一些实施方案中,本公开提供了一种治疗性组合物,所述治疗性组合物包含多个本文所述的脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约50nm至约500nm、约150nm至约500nm、约200nm至约500nm、约300nm至约500nm、约350nm至约500nm、约400nm至约500nm、约425nm至约500nm、约450nm至约500nm或约475nm至约500nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约50nm至约120nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约100nm。

[0047] 在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位介于约20mV至约-20mV、约10mV至约-10mV、约5mV至约-5mV或约20mV至约-40mV之间。在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位小于约-20mV、小于约-30mV、小于约-35mV或小于约-40mV。在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位介于约-50mV至约-20mV、约-40mV至约-20mV或约-30mV至约-20mV之间。在一些实施方案中,多个LNP的平均 ζ -电位为约-30mV、约-31mV、约-32mV、约-33mV、约-34mV、约-35mV、约-36mV、约-37mV、约-38mV、约-39mV或约-40mV。

[0048] 在一些实施方案中,向受试者递送组合物将所包封的重组RNA分子递送至靶细胞,并且其中所包封的重组RNA分子产生能够溶解靶细胞的感染性病毒。在一些实施方案中,组合物被配制用于静脉内或肿瘤内递送。在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。

[0049] 在一些实施方案中,本公开提供了一种无机颗粒,所述无机颗粒包含本文所述的重组多核苷酸。在一些实施方案中,无机颗粒选自由以下组成的组:金纳米颗粒(GNP)、金纳米棒(GNR)、磁性纳米颗粒(MNP)、磁性纳米管(MNT)、碳纳米角(CNH)、碳富勒烯、碳纳米管(CNT)、磷酸钙纳米颗粒(CPNP)、介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN)、二氧化硅纳米管(SNT)或星形中空二氧化硅纳米颗粒(SHNP)。在一些实施方案中,无机颗粒还包含编码有效负载分子

的第二重组RNA分子。在一些实施方案中,第二重组RNA分子是复制子。

[0050] 在一些实施方案中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含本文所述的无机颗粒,其中颗粒的平均直径小于约500nm,介于约50nm与500nm之间,介于约250nm与约500nm之间,或为约350nm。在一些实施方案中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含本文所述的无机颗粒,其中颗粒的平均直径为约50nm至约120nm。在一些实施方案中,颗粒的平均直径为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。在一些实施方案中,多个LNP的平均尺寸为约100nm。

[0051] 在一些实施方案中,本公开提供了一种杀死癌细胞的方法,所述方法包括使所述癌细胞暴露于本文所述的颗粒、本文所述的重组RNA分子或其组合物,所述暴露在足以将颗粒经细胞内递送至癌细胞的条件下,其中由所包封的多核苷酸产生的具有复制能力的病毒导致癌细胞的杀死。在一些实施方案中,具有复制能力的病毒不在非癌细胞中产生。在一些实施方案中,方法在体内、体外或离体进行。

[0052] 在一些实施方案中,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向罹患所述癌症的受试者施用有效量的本文所述的颗粒、本文所述的重组RNA分子或其组合物。在一些实施方案中,颗粒或其组合物经静脉内、鼻内、呈吸入剂施用,或直接注射至肿瘤中。在一些实施方案中,颗粒或其组合物重复施用至受试者。在一些实施方案中,受试者是小鼠、大鼠、兔、猫、狗、马、非人灵长类动物或人。

[0053] 在一些实施方案中,癌症选自肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠直肠癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、头颈癌、甲状腺癌、恶性胶质瘤、胶质母细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、肉瘤和边缘区淋巴瘤(MZL)。在一些实施方案中,肺癌是小细胞肺癌或非小细胞肺癌。在一些实施方案中,肝癌是肝细胞癌(HCC)。在一些实施方案中,前列腺癌是治疗突发性神经内分泌前列腺癌。在一些实施方案中,膀胱癌、胰腺癌和胃癌是神经内分泌亚型。

附图说明

[0054] 图1A-图1B展示了包含SVV基因组的RNA分子的产生和SVV的病毒溶解。

[0055] 图2展示了用SVV+ssRNA/LNP处理后成功的RNA递送和功能性病毒产生。

[0056] 图3A-图3D展示了脂质纳米颗粒组成的变化会改变粒度和/或RNA截留百分比。

[0057] 图4A-图4B展示了SVV+ssRNA/LNP在H1299肿瘤模型中的功效。图4A展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS或SVV+ssRNA/LNP(制剂ID:70001-5.C)后的肿瘤体积。图4B展示了用PBS或SVV+ssRNA/LNP(制剂ID:70001-5.C)静脉内处理的H1299荷瘤小鼠的体重测量值。

[0058] 图5A-图5B展示了静脉内给与SVV+ssRNA/LNP后感染性SVV从肿瘤中恢复。

[0059] 图6A-图6D展示了SVV/LNP制剂70009-1.C、70009-2.C和70009-3.C在H1299肿瘤模型中的功效。图6A展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内给与PBS、SVV-Neg/LNP(制剂ID:70009-1.C)、SVV/LNP(制剂ID:70009-2.C)或SVV-S177A/LNP(制剂ID:70009-3.C)后的肿瘤体积。图6B展示了用PBS、SVV-Neg/LNP(制剂ID:70009-1.C)、SVV/LNP(制剂ID:70009-2.C)或SVV-S177A/LNP(制剂ID:70009-3.C)静脉内处理的H1299荷瘤小鼠的体重测量值。图6C-图6D展示了从用PBS、SVV-Neg/LNP(制剂ID:70009-1.C)、SVV/LNP(制剂ID:70009-2.C)或SVV-S177A/LNP(制剂ID:70009-3.C)处理的H1299荷瘤小鼠分离的肿瘤(图6C)或肝脏(图6D)组

织中的SVV复制。

[0060] 图7展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS或SVV-WT RNA脂质纳米颗粒(制剂ID: 70053-1-1.C、70053-2-2.C、70059-1-3.C和70059-2-4.C)后的肿瘤体积。

[0061] 图8展示了H82荷瘤小鼠在静脉内施用PBS或SVV-WT(制剂ID:70087-1.C)RNA脂质纳米颗粒或瘤内施用与Lipofectamine一起配制的SVV-WT后的肿瘤体积。

[0062] 图9A-图9D展示了SVV/LNP制剂70077-3.C、70077-4.C、70077-8.C、70077-10.C和70077-11.C在H1299肿瘤模型中的功效。图9A展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS或SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:70077-3.C、70077-4.C、70077-8.C、70077-10.C和70077-11.C)后的肿瘤体积。图9B展示了用PBS或SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:70077-3.C、70077-4.C、70077-8.C、70077-10.C和70077-11.C)静脉内处理的H1299荷瘤小鼠的体重测量值。图9C展示了用PBS或SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:70077-3.C、70077-4.C、70077-8.C、70077-10.C和70077-11.C)静脉内处理的H1299荷瘤小鼠的血清天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)。图9D展示了从用PBS或SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:70077-3.C、70077-4.C、70077-8.C、70077-10.C和70077-11.C)静脉内处理的H1299荷瘤小鼠分离的肿瘤组织中的SVV复制。

[0063] 图10展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS或SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:70087-1.C、70087-2.C、70087-3.C和70087-4.C)后的肿瘤体积。

[0064] 图11展示了从用SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:80010-1.C、80010-2.C、80010-3.C、80010-4.C和80010-5.C)静脉内处理的H1299荷瘤小鼠分离的肿瘤组织中的SVV复制。

[0065] 图12展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS或SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:80033-1.C、80033-2.C和80033-3.C)后的肿瘤体积。

[0066] 图13A-图13C展示了SVV/LNP制剂80059-1.C和80059-2.C在H446肿瘤模型中的功效。图13A展示了H446荷瘤小鼠在静脉内施用PBS、SVV-Neg LNP(制剂ID:80059-1.C)或SVV-S177A LNP(制剂ID:80059-2.C)后的肿瘤体积。图13B展示了用PBS、SVV-Neg LNP(制剂ID:80059-1.C)或SVV-S177A LNP(制剂ID:80059-2.C)静脉内处理的H446荷瘤小鼠的体重测量值。图13C展示了从用PBS、SVV-Neg LNP(制剂ID:80059-1.C)或SVV-S177A LNP(制剂ID:80059-2.C)静脉内处理的H446荷瘤小鼠分离的肿瘤组织中的SVV复制。

[0067] 图14展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS、SVV-WT LNP(制剂ID:80130-1.C)或SVV-IR2 LNP(制剂ID:80130-2.C)后的肿瘤体积。

[0068] 图15展示了从用PBS、SVV-WT LNP(制剂ID:80130-1.C)或SVV-IR2 LNP(制剂ID:80130-2)静脉内处理的NIE-115荷瘤小鼠分离的肿瘤组织中的SVV复制。

[0069] 图16A-图16B展示了在用抗SVV多克隆抗体处理后对SVV介导的H446细胞溶解的抑制。

[0070] 图17展示了H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS、SVV病毒或SVV-WT LNP(制剂ID:80139-1.C)和腹膜内施用兔血清或抗SVV多克隆抗体后的肿瘤体积。

[0071] 图18展示了SK-MEL-28荷瘤小鼠在瘤内施用PBS或CVA21-WT LNP(制剂ID:70032-6C)或静脉内施用CVA21-WT LNP后的肿瘤体积。

[0072] 图19展示了使用3'SapI限制酶识别位点为小核糖核酸病毒产生可靠的3'端的体

外转录方法的概览。

[0073] 图20展示了使用5' DNA引物和RNaseH酶为小核糖核酸病毒产生可靠的5'端的RNaseH方法。

[0074] 图21示出了具有5' RNaseH引物结合位点和3' SapI限制位点的消化RNA的引物延伸分析。

[0075] 图22展示了为小核糖核酸病毒产生可靠的5'端的核酶方法。

[0076] 图23A-图23B展示了用于产生离散5'端的锤头状核酶。图E-1展示了最小锤头状核酶(HHR)的结构模型,它在箭头处的5'端退火和裂解。图E-2展示了带有稳定茎I(STBL)以在箭头处使5'端裂解的核酶的结构模型。

[0077] 图24A-图24B展示了用于产生离散5'端的手枪状核酶。图F-1展示了野生型手枪状核酶特征的示意图。图F-2展示了由mFOLD建模的来自多粘类芽孢杆菌(P. Polymyxa)的手枪状核酶,其中添加了一个四环以融合P3链。虚线框是经过诱变以在病毒序列的背景中保留核酶折叠的区域。虚线框中所示的“GUC”序列突变为“UCA”以产生手枪1,并将“GUC”序列突变为“TTA”以产生手枪2。

[0078] 图25证明手枪1核酶在体外转录过程中引起完全裂解。

[0079] 图26示出了在体外转录过程中所有核酶的引物延伸分析。

[0080] 图27展示了负链RNA的检测,证实与使用5'锤头状核酶的构建体相比,手枪1核酶引起从RNA模板更快启动SVV复制。

[0081] 图28展示了与用5'锤头状核酶产生的构建体相比,用5'手枪1核酶和3' SapI限制位点产生的合成RNA SVV基因组的体内功效增加。H1299荷瘤小鼠在静脉内施用PBS、SVV-HHR LNP(制剂ID:80130-1.C)或SVV-PR LNP(制剂ID:80130-3.C)后的肿瘤体积。

[0082] 图29A-图29B展示了使用修饰的核糖核苷酸的SVV RNA的体外转录(图29A)和包含修饰的核苷酸的SVV RNA基因组的病毒复制(图29B)。

[0083] 图30展示了SVV和编码各种有效负载分子的SVV从SVV病毒基因组的病毒复制(IC50曲线)。

[0084] 图31A-图31B展示了编码IL-36 γ 的SVV-RNA基因组在H1299肿瘤模型中的功效。图31A展示了处理后的肿瘤生长。图31B展示了肿瘤组织中的IL-36 γ 表达。

[0085] 图32A-图32B展示了从RNA多核苷酸产生感染性CVA21病毒。图32A展示了5' UTR序列对从RNA多核苷酸产生感染性CVA21的影响。图32B展示了从包含SEQ ID NO:26的5' UTR的RNA多核苷酸产生感染性CVA21。

[0086] 图33展示了LNP/SVV RNA组成和作用模式的示意图。全身施用LNP/SVV-RNA,SVV-RNA基因组被递送到允许的肿瘤细胞中,在那里它们复制并产生SVV病毒粒子。SVV感染扩散到邻近的肿瘤细胞,引发溶瘤和抗病毒免疫应答。

[0087] 图34展示了SVV-RNA和Neg-RNA的体外转录过程。SVV-RNA通过5'和3'核酶(Rib)的自催化裂解产生了具有复制所需的离散5'和3'端的SVV-RNA。相比之下,Neg-RNA构建体缺乏核酶序列,不能复制和产生病毒粒子。

[0088] 图35展示了使用接合裂解序列从基因组转录物中去除非病毒RNA多核苷酸以保持病毒的天然5'和3'离散末端的一般示意图。

具体实施方式

[0089] 本领域需要如下病毒疗法,其在中和抗体的存在下是有效的,能够重复全身性使用并且其复制仅限于患病细胞,从而最大化治疗功效,同时最大程度地减少对正常的非癌细胞的附带损害。本公开克服了这些障碍,并提供了具有复制能力的病毒基因组,所述多核苷酸可以包封在例如脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒或外泌体的非免疫原性颗粒中。在一些实施方案中,颗粒还包封编码有效负载分子的多核苷酸。在一些实施方案中,本公开提供了具有复制能力的病毒基因组,以及用于治疗 and 预防增生性疾病和病症(例如癌症)的方法。本公开使得能够全身递送适于治疗广泛的增生性疾病(例如癌症)的安全有效的重组多核苷酸载体。

[0090] 本文所使用的章节标题仅出于组织性目的并且不应被解释为限制所描述的主题。本文引用的所有文献或文献的一部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,出于任何目的明确地以引入的方式整体并入本文中。如果一个或多个所并入的文献或文献的一些部分定义的术语与本申请中该术语的定义相矛盾,则以本申请中出现的定义为准。然而,本文所引用的任何参考文献、文章、公布、专利、专利公布和专利申请的提及,并不也不应被视为承认或任何形式的建议,它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0091] 定义

[0092] 在本描述中,除非另有指示,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围均应理解为包括所述范围内的任何整数的值,以及在适当情况下,其分数(例如整数的十分之一和百分之一)。应当理解,除非另外指示,否则本文所用的术语“一(a/an)”是指所列举的组分中的“一种或多种”。替代方案(例如“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。如本文所用,术语“包括”和“包含”同义使用。如本文所用,“多个”可以指一种或多种组分(例如一种或多种miRNA靶序列)。在本申请中,除非另外说明,否则使用“或”意指“和/或”。

[0093] 如本申请中所用,术语“约”和“大约”作为等同物使用。本申请中使用的带或不带约/大约的任何数字旨在涵盖相关领域的普通技术人员所理解的任何正常波动。在某些实施方案中,除非另有说明或从上下文中另外明显看出(除非该数字超过可能值的100%),否则术语“大约”或“约”是指在任一方向上(大于或小于)落入所说明的参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的值的范围。

[0094] “降低”或“减少”是指与参考值相比,特定值降低或减少至少5%,例如5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。特定值的降低或减少也可以表示为与参考值相比值的倍数变化,例如与参考值相比降低至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、500倍、1000倍或更多倍。

[0095] “增加”是指与参考值相比,特定值增加至少5%,例如5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。特定值的增加也可以表

示为与参考值相比值的倍数变化,例如与参考值的水平相比增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、500倍、1000倍或更多倍。

[0096] 术语“序列同一性”是指两个多核苷酸或多肽序列之间相同且处于相对位置处的碱基或氨基酸的百分比。因此,一个多核苷酸或多肽序列与另一多核苷酸或多肽序列相比具有一定百分比的序列同一性。为了进行序列比较,通常将一个序列用作参考序列,测试序列将与之进行比较。术语“参考序列”是指测试序列进行比较的分子。

[0097] “互补”是指在两个包含天然或非天然存在的(例如,如上所述修饰的)碱基(核苷酸)或其类似物的序列之间通过碱基堆积和特定氢键合而配对的能力。例如,如果核酸的一个位置处的碱基能够与靶标的相应位置处的碱基氢键合,则认为所述碱基在该位置处彼此互补。核酸可包含通用碱,或惰性无碱基间隔子,它们对氢键合不提供正的或负的贡献。碱基配对可以包括规范的沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base pairing)和非沃森-克里克碱基配对(例如,摆动碱基配对(Wobble base pairing)和胡斯坦碱基配对(Hoogsteen base pairing))。应当理解,对于互补碱基配对,腺苷型碱基(A)与胸苷型碱基(T)或尿嘧啶型碱基(U)互补,胞嘧啶型碱基(C)与鸟苷型碱基(G)互补,并且例如3-硝基吡咯或5-硝基吡咯之类的通用碱基可以与任何A、C、U或T杂交并认为是互补的。Nichols等人, *Nature*, 1994; 369: 492-493和Loakes等人, *Nucleic Acids Res.*, 1994; 22: 4039-4043。肌苷(I)在本领域中也被认为是通用碱基,并且被认为与任何A、C、U或T互补。参见Watkins和SantaLucia, *Nucl. Acids Research*, 2005; 33 (19): 6258-6267。

[0098] “表达盒”或“表达构建体”是指可操作地连接于启动子的多核苷酸序列。“可操作地连接”是指一种并置关系,其中所描述的组件处于允许它们以其预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子影响多核苷酸序列的转录或表达,则将其可操作地连接于多核苷酸序列。

[0099] 术语“受试者”包括动物,例如哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是灵长类动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,受试者是牲畜,例如牛、绵羊、山羊、母牛、猪等;或驯养的动物,例如狗和猫。在一些实施方案中(例如,特别是在研究背景下),受试者是啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)、兔子、灵长类动物或猪,例如近交系猪等。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0100] “施用”在本文中是指将剂或组合物引入受试者中。

[0101] 如本文所用,“治疗”是指将剂或组合物递送至受试者以影响生理结果。在一些实施方案中,治疗是指治疗哺乳动物,例如人的疾病,包括(a)抑制疾病,即阻止疾病的发展或预防疾病的进展;(b)减轻疾病,即引起疾病状态的消退;以及(c)治愈疾病。

[0102] 术语“有效量”是指剂或组合物引起特定生理作用所需的最小量(例如,增加、激活和/或增强特定的生理效果所需的量)。特定剂的有效量可以根据剂的性质以多种方式表示,例如质量/体积、细胞数目/体积、颗粒/体积、(剂的质量)/(受试者的质量)、细胞数目/(受试者的质量)或颗粒/(受试者的质量)。特定剂的有效量也可以表示为半最大有效浓度(EC₅₀),其是指引起特定生理反应幅度介于参考水平与最大反应水平中间的剂的浓度。

[0103] 细胞“群体”是指大于1的任意细胞数目,但优选至少 1×10^3 个细胞、至少 1×10^4 个细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 1×10^7 个细胞、至少 1×10^8 个细胞、至少1

$\times 10^9$ 个细胞、至少 1×10^{10} 个细胞或更多个细胞。细胞群体可以指体外群体(例如,培养中的细胞群体)或体内群体(例如,存在于特定组织中的细胞群体)。

[0104] “效应子功能”是指与针对靶细胞或靶抗原的免疫应答的产生、维持和/或增强相关的免疫细胞功能。

[0105] 术语“微小RNA”、“miRNA”和“miR”在本文中可互换使用,是指长度约21-25个核苷酸的小型非编码内源RNA,其可以通过指导其靶信使RNA(mRNA)进行降解或翻译抑制来调节基因表达。

[0106] 如本文所用,术语“组合物”是指本文所述的重组RNA分子或颗粒包封的重组RNA分子,其能够被施用或递送至受试者或细胞。

[0107] 短语“药学上可接受的”在本文中用以指在合理的医学判断范围内,适合与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0108] 如本文所用,“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已被美国食品药品监督管理局(the United States Food and Drug Administration)批准为可用于人和/或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增香剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂和/或乳化剂。

[0109] 术语“具有复制能力的病毒基因组”是指编码病毒复制和感染性病毒颗粒产生所必需的所有病毒基因的病毒基因组。

[0110] 术语“溶瘤病毒”是指已被修饰成或天然地优先感染癌细胞的病毒。

[0111] 术语“载体”在本文中用以指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子。

[0112] 分子和细胞生物化学中的通用方法可以在标准教科书中找到,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(Sambrook等人,HaRBor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology,第4版(Ausubel等人编辑,John Wiley&Sons 1999);Protein Methods(Bollag等人,John Wiley&Sons 1996);Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner等人编辑,Academic Press 1999);Viral Vectors(Kaplift和Loewy编辑,Academic Press 1995);Immunology Methods Manual(I.Lefkovits编辑,Academic Press 1997);以及Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle和Griffiths,John Wiley&Sons 1998),其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0113] 合成RNA病毒基因组

[0114] 在一些实施方案中,本公开提供了一种重组RNA分子,所述重组RNA分子编码溶瘤病毒(例如RNA基因组)。此类重组RNA分子在本文中称为“合成病毒基因组”或“合成RNA病毒基因组”。在这类实施方案中,合成RNA病毒基因组在通过非病毒性递送媒介物引入细胞中时能够产生感染性的溶解病毒,并且不需要额外的外源基因或蛋白质存在于细胞中即可复制并产生感染性病毒。而是,宿主细胞中的内源翻译机制介导病毒蛋白自合成RNA病毒基因组的表达。然后所表达的病毒蛋白介导病毒复制和装配成包含RNA病毒基因组的感染性病毒颗粒(可能包含衣壳蛋白、包膜蛋白和/或膜蛋白)。这样,本文所述的RNA多核苷酸(即,合成RNA病毒基因组)在引入细胞中时产生能够感染另一宿主细胞的病毒。参见图33中的示意图。

[0115] 在一些实施方案中,合成病毒基因组作为重组核糖核酸(RNA)(即,合成RNA病毒基因组)提供。在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含一种或多种核酸类似物。核酸类似物的实例包括2'-O-甲基取代的RNA、2'-O-甲氧基-乙基碱基、2'氟碱基、锁核酸(LNA)、非锁核酸(UNA)、桥接核酸(BNA)、吗啉核酸和肽核酸(PNA)。在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组是复制子、编码转基因的RNA病毒基因组、mRNA分子或环状RNA分子(circRNA)。在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含单链RNA(ssRNA)病毒基因组。在一些实施方案中,单链基因组可以是正义或负义基因组。

[0116] 在一些实施方案中,重组RNA分子是环状RNA分子(circRNA)。circRNA分子缺乏外切核酸酶介导的降解所需的游离末端,从而延长了RNA分子的半衰期,并随着时间的推移实现更稳定的蛋白质产生(参见例如Wesselhoeft等人,Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells.Nature Communications.(2018)9:2629)。为了从circRNA分子产生功能性RNA病毒,有必要在细胞内“打破”环状构建体,以便可以产生具有适当3'和5'天然末端的线性RNA基因组。因此,在一些实施方案中,编码溶瘤病毒的重组RNA分子作为circRNA分子提供并且还包含促进细胞内circRNA分子线性化的一个或多个额外的RNA序列。这种额外的RNA序列的实例包括siRNA靶位点、miRNA靶位点和向导RNA靶位点。相应的siRNA、miRNA或gRNA可以与circRNA分子一起配制。或者,可以基于同源miRNA在靶细胞中的表达来选择miRNA靶位点,使得circRNA分子的裂解和编码的溶瘤病毒的初始表达限于表达特定miRNA的靶细胞。

[0117] 本文所述的合成RNA病毒基因组编码溶瘤病毒。溶瘤病毒的实例是本领域已知的,包括但不限于小核糖核酸病毒(例如柯萨奇病毒)、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、水疱性口腔炎病毒、正粘病毒和马拉巴病毒(maraba virus)。

[0118] 在一些实施方案中,由合成RNA病毒基因组编码的溶瘤病毒是小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)中的任何病毒,例如柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒(包括嵌合脊髓灰质炎病毒,例如PVS-RIP0和其它嵌合小核糖核酸病毒)或塞内加谷病毒,或来自各种小核糖核酸病毒的嵌合来源的任何病毒;沙粒病毒科(Arenaviridae)中的任何病毒,例如拉沙病毒(lassa virus);反转录病毒科(Retroviridae)中的任何病毒,例如鼠白血病病毒;正粘病毒科(Orthomyxoviridae)中的任何病毒,例如甲型流感病毒;副粘病毒科(Paramyxoviridae),例如新城疫病毒(Newcastle disease virus)或麻疹病毒;呼肠孤病毒科(Reoviridae)中的任何病毒,例如哺乳动物的正呼肠孤病毒属(orthoreovirus);披膜病毒科(Togaviridae)中的任何病毒,例如辛德毕斯病毒(sindbis virus);或弹状病毒科(Rhabdoviridae)中的任何病毒,例如水疱性口腔炎病毒(VSV)或马拉巴病毒。

[0119] 正义单链RNA病毒

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码单链RNA(ssRNA)病毒基因组。在一些实施方案中,ssRNA病毒为正义ssRNA(+义ssRNA)病毒。示例性+义ssRNA病毒包括小核糖核酸病毒科(例如柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒和塞内加谷病毒(SVV),包括SVV-A)、冠状病毒科(Coronaviridae)(例如 α 冠状病毒属(Alphacoronavirus),例如HCoV-229E和HCoV-NL63; β 冠状病毒属(Betacoronavirus),例如HCoV-HKU1、HCoV-OC3和MERS-CoV)、反转录病毒科(例如鼠白血病病毒)和披膜病毒科(例如辛德毕斯病毒)的成员。正义ssRNA病毒的其它示例性属和种示于下表1中。

[0121] 表1:正义ssRNA病毒

<u>科/亚科</u>	<u>属</u>	<u>自然宿主</u>	<u>物种</u>
[0122] 小核糖核酸病毒科	心病毒 (Cardiovirus)	人	
	科萨病毒 (Cosavirus)	人	
	肠病毒	人	柯萨奇病毒
		人	脊髓灰质炎病毒
	肝病毒	人	
	嶠病毒(Kobuvirus)	人	
	副肠孤病毒 (Parechovirus)	人	
	玫瑰病毒 (Rosavirus)	人	
	唾液病毒 (Salivirus)	人	
	帕斯病毒 (Pasivirus)	猪	
	塞内加病毒	猪	塞内加谷病

[0123]

	(Senecavirus)		毒 A
杯状病毒科 (Caliciviridae)	札幌病毒 (Sapovirus)	人	
	诺如病毒 (Norovirus)	人	
	纽布病毒 (Nebovirus)	牛	
	水泡疹病毒 (Vesivirus)	猫科/猪	
肝病毒科	正戊肝病毒 (Orthohepevirus)		
星状病毒科 (Astroviridae)	乳腺病毒	人	
	星状病毒	鸟类	
黄病毒科	肝炎病毒 (Hepacivirus)	人	
	黄病毒(Flavivirus)	节肢动物	
	佩吉病毒 (Pegivirus)		
	瘟病毒(Pestivirus)	哺乳动物	
冠状病毒科/冠状病毒亚科	α 冠状病毒		HCoV-229E HCoV-NL63
	β 冠状病毒		HCoV-HKU 1
			HCoV-OC3
			MERS-CoV
	δ 冠状病毒		
	γ 冠状病毒		
冠状病毒科/环曲病毒亚科(Torovirinae)	白鳊鱼病毒 (Bafinivirus)		
	环曲病毒		
反转录病毒科	γ 反转录病毒		鼠白血病毒 毒
披膜病毒科	甲病毒		辛德毕斯病 毒

[0124] 在一些实施方案中,本文所述的重组RNA分子编码选自柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒和塞内加谷病毒(SVV)的小核糖核酸病毒。在一些实施方案中,本文所述的重组RNA分子编码柯萨奇病毒。在这个实施方案的一些方面,重组RNA分子编码柯萨奇病毒并且包含SEQ ID NO:26的5'UTR序列(参见例如Brown等人,Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related

in the Noncapsid Coding Region. *Journal of Virology*, (2003) 77:16, 第8973-8984页. GenBank登录号AF546702)。在这种实施方案中,与其它先前描述的5'UTR序列相比,SEQ ID NO:26的5'UTR序列出乎意料地增加功能性柯萨奇病毒的产生(参见例如Newcombe等人, *Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses* *Journal of General Virology* (2003), 84, 3041-3050. GenBank登录号AF465515)。在这个实施方案的一些方面,重组RNA分子编码柯萨奇病毒并且包含SEQ ID NO:27的序列。

[0125] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码柯萨奇病毒。在一些实施方案中,柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。GenBank参考号M33854.1 (CVB3)、GenBank参考号KT161266.1 (CVA21) 和GenBank参考号D00627.1 (CVA9) 中提供了示例性柯萨奇病毒的核酸序列。在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码塞内加谷病毒(SVV)。在一些实施方案中,SVV选自野生型SVV(例如SVV-A, SEQ ID NO:1, GenBank参考号MF893200.1) 或突变体SVV(例如SVV-177A-SEQ ID NO:2、SVV-IR2-SEQ ID NO:3或SVV-S177A-IR2-SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码嵌合小核糖核酸病毒(例如编码包含一个源自于第一小核糖核酸病毒的部分(例如衣壳蛋白或IRES)和另一个源自于第二小核糖核酸病毒的部分和另一个源自于第二小核糖核酸病毒的部分(非结构性基因,例如蛋白酶或聚合酶)的病毒)。在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码嵌合SVV。在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组编码嵌合柯萨奇病毒。

[0126] 在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含微小RNA(miRNA)靶序列(miR-TS)盒,其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列,并且其中细胞中一种或多种对应miRNA的表达抑制编码的溶瘤病毒在细胞中的复制。在一些实施方案中,一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。

[0127] 在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含一个或多个miR-TS盒,所述miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含一个或多个miR-TS盒,所述miR-TS盒被并入一种或多种非必需基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含一个或多个miR-TS盒,所述miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'或3'。

[0128] 在一些实施方案中,合成RNA病毒基因组包含编码有效负载分子的异源多核苷酸。在这种实施方案中,合成RNA病毒基因组驱动感染性溶瘤病毒的产生以及有效负载分子的表达。在这种实施方案中,有效负载分子的表达可以增加溶瘤病毒的治疗功效。在一些实施方案中,有效负载分子选自IL-12(例如编码IL-12的SVV基因组,例如SEQ ID NO:8)、GM-CSF

(例如编码GMCSF的SVV基因组,例如SEQ ID NO:7)、CXCL10(例如编码CXCL10的SVV基因组,例如SEQ ID NO:10)、IL-36 γ (例如编码IL-36 γ 的SVV基因组,例如SEQ ID NO:11)、CCL21(例如编码CCL21的SVV基因组)、IL-18(例如编码IL-18的SVV基因组)、IL-2(例如编码IL-2的SVV基因组)、CCL4(例如编码CCL4的SVV基因组)、CCL5(例如编码CCL5的SVV基因组)、抗CD3-抗FAP BiTE(例如编码抗CD3-抗FAP BiTE的SVV基因组,例如SEQ ID NO:9)、结合DLL3的抗原结合分子或结合EpCAM的抗原结合分子。参见实施例23和24。以下提供了适用于这些实施方案的有效负载分子类型的进一步描述。

[0129] 产生重组RNA病毒基因组的方法

[0130] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组是使用一种或多种包含编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸的DNA载体模板在体外产生的。术语“载体”在本文中用以指能够转移、编码或转运另一核酸分子的核酸分子。所转移的核酸一般被插入载体核酸分子中。载体可以包括引导细胞中的自主复制的序列和/或可以包括足以允许整合至宿主细胞DNA中的序列。在一些实施方案中,本文所述的编码溶瘤病毒的重组RNA分子是使用一种或多种病毒载体产生的。

[0131] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组是通过在体外将编码重组RNA分子的多核苷酸引入(例如借助于转染、转导、电穿孔等)至合适的宿主细胞中产生的。合适的宿主细胞包括昆虫和哺乳动物细胞系。将宿主细胞培养适当量的时间以允许多核苷酸的表达和合成RNA病毒基因组的产生。然后从宿主细胞分离合成RNA病毒基因组并且配制用于治疗用途(例如包封在颗粒中)。图34中展示了用3'和5'核酶在体外合成RNA病毒基因组的示意图。相同示意图适用于使用接合裂解序列的其它组合合成RNA病毒基因组。

[0132] 在一些实施方案中,包含本文所述的合成RNA病毒基因组的重组RNA分子需要病毒天然的离散5'和3'末端。由T7 RNA聚合酶在体外或由哺乳动物RNA Pol II产生的RNA转录物含有哺乳动物5'和3'UTR,不含产生感染性RNA病毒所需的离散的天然末端。举例来说,T7 RNA聚合酶需要模板多核苷酸的5'末端上的鸟苷残基以起始转录。然而,SVV从其5'末端上的尿苷残基开始。因此,必须去除SVV转录物的体外转录所需要的T7前导序列,以产生功能性感染性SVV产生所需的天然5'SVV端。因此,在一些实施方案中,适用于产生本文所述的合成RNA病毒基因组的多核苷酸需要能够产生病毒天然的离散5'和3'末端的另外的非病毒性5'和3'序列。这种序列在本文中称为接合裂解序列(JCS)。在一些实施方案中,接合裂解序列用于使T7 RNA聚合酶或Pol II编码的RNA转录物在病毒RNA与哺乳动物mRNA序列的接合点处裂解,以便从转录物除去非病毒RNA多核苷酸,从而维持病毒的内源5'和3'离散末端(参见图35中所示的示意图)。在一些实施方案中,接合裂解序列用以在编码合成病毒基因组的DNA质粒线性化期间产生适当的末端(例如在质粒模板线性化时和在合成RNA基因组在体外转录之前使用3'限制酶识别序列产生适当的3'末端)。

[0133] 可以通过多种方法实现接合裂解序列的性质和从病毒基因组转录物中去除非病毒RNA。例如,在一些实施方案中,接合裂解序列是RNA干扰(RNAi)分子的靶标。如本文所用,“RNA干扰分子”是指通过内源基因沉默途径(例如切丁酶和RNA诱导沉默复合物(RISC))介导靶mRNA序列的降解的RNA多核苷酸。示例性RNA干扰剂包括微小RNA(miRNA)、人工miRNA(amiRNA)、短发夹RNA(shRNA)和小干扰RNA(siRNA)。此外,当前在本领域已知或将来定义的用于在特定位点裂解RNA转录物的任何系统均可用于产生病毒天然的离散末端。

[0134] 在一些实施方案中, RNAi 分子是 miRNA。miRNA 是指天然存在的长度为约 18-25 个核苷酸的小的非编码 RNA 分子, 其与靶 mRNA 序列至少部分互补。在动物中, miRNA 的基因被转录成初级 miRNA (pri-miRNA), 后者是双链的, 并形成茎环结构。然后, 在核中通过包含 2 类 RNase III Drosha 和微处理亚基 DCGR8 的微处理复合物将 Pri-miRNA 裂解, 形成 70-100 个核苷酸的前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 形成发夹结构, 并被转运至细胞质, 在这里被 RNase III 酶 Dicer 加工成约 18-25 个核苷酸的 miRNA 双链体。尽管双链体的任一链都可能充当功能性 miRNA, 但通常会降解 miRNA 的一条链, 仅将一条链加载到 Argonaute (AGO) 核酸酶上, 以产生效应子 RNA 诱导沉默复合物 (RISC), 其中 miRNA 和其 mRNA 靶标相互作用 (Wahid 等人, 1803:11, 2010, 1231-1243)。在一些实施方案中, 5' 和/或 3' 接合裂解序列是 miRNA 靶序列。

[0135] 在一些实施方案中, RNAi 分子是源自 Pol II 转录物中嵌入的合成 miRNA 的人工 miRNA (amiRNA)。(参见例如 Liu 等人, *Nucleic Acids Res* (2008) 36:9; 2811-2834; Zeng 等人, *Molecular Cell* (2002), 9; 1327-1333; Fellman 等人, *Cell Reports* (2013) 5; 1704-1713)。在一些实施方案中, 5' 和/或 3' 接合裂解序列是 amiRNA 靶序列。

[0136] 在一些实施方案中, RNAi 分子是 siRNA 分子。siRNA 是指长度通常约为 21-23 个核苷酸的双链 RNA 分子。双链体 siRNA 分子在细胞质中进行加工, 与称为 RNA 诱导沉默复合物 (RISC) 的多蛋白复合物缔合, 在此过程中, 从双链体中酶切“乘客”有义链。然后, 通过序列互补性, 激活的 RISC 中所含的反义“向导”链将 RISC 导向相应的 mRNA, 而 AGO 核酸酶切割靶 mRNA, 从而导致特定的基因沉默。在一些实施方案中, siRNA 分子源自 shRNA 分子。shRNA 是长度为约 50-70 个核苷酸的单链人工 RNA 分子, 其形成茎环结构。通过用质粒或病毒载体引入编码 shRNA 的 DNA 多核苷酸来实现 shRNA 在细胞中的表达。然后将 shRNA 转录成模仿 pre-miRNA 茎环结构的产物, 并在核输出后, 发夹经 Dicer 加工形成双链体 siRNA 分子, 然后被 RISC 进一步加工以介导靶基因沉默。在一些实施方案中, 5' 和/或 3' 接合裂解序列是 siRNA 靶序列。

[0137] 在一些实施方案中, 接合裂解序列是向导 RNA (gRNA) 靶序列。在这样的实施方案中, 可以设计 gRNA 并将其与具有 RNase 活性的 Cas 核酸内切酶 (例如, Cas13) 一起引入, 以在精确的接合位点介导病毒基因组转录物的裂解。在一些实施方案中, 5' 和/或 3' 接合裂解序列是 gRNA 靶序列。

[0138] 在一些实施方案中, 接合裂解序列是 pri-miRNA 编码序列。在编码病毒基因组 (即, 重组 RNA 分子) 的多核苷酸转录后, 这些序列形成 pri-miRNA 茎环结构, 然后在细胞核中被 Drosha 裂解, 以在精确的接合位点裂解转录物。在一些实施方案中, 5' 和/或 3' 接合裂解序列是 pri-mRNA 靶序列。

[0139] 在一些实施方案中, 接合裂解序列是促进通过核糖核酸内切酶 RNaseH 进行裂解的引物结合序列。在这种实施方案中, 与 5' 和/或 3' 接合裂解序列退火的引物连同 RNaseH 酶一起被加入至体外反应。RNaseH 特异性地使与 DNA 杂交的 RNA 的磷酸二酯键水解, 因此使得合成 RNA 基因组中间体在精确的接合裂解序列处裂解, 从而产生所需的 5' 和 3' 天然末端。

[0140] 在一些实施方案中, 接合裂解序列是限制酶识别位点并且引起在质粒模板线性化对比用 T7 RNA 聚合酶合成 RNA 期间产生病毒转录产物的离散末端。在一些实施方案中, 接合裂解序列是 IIS 型限制酶识别位点。IIS 型限制酶包含一组特定酶, 其识别不对称的 DNA 序列

并在其识别序列外界定的距离处,通常在1至20个核苷酸内裂解。示例性IIS型限制酶包括AclI、AlwI、BaeI、BbsI、BbvI、BccI、BceAI、BcgI、BciVI、BcoDI、BfuAI、BmrI、BpmI、BpuEI、BsaI、BsaXI、BseRI、BsgI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BsmI、BspCNI、BspMI、BspQI、BsrDI、BsrI、BtgZI、BtsCI、BstI、CaspCI、EarI、EciI、Esp3I、FauI、FokI、HgaI、HphI、HpyAV、MboII、MlyI、MmeI、MnlI、NmeAIII、PleI、SapI和SfaNI。本领域中已知这些IIS型限制酶的识别序列。参见位于neb.com/tools-and-resources/selection-charts/type-iis-restriction-enzymes的New England Biolabs网址。在一些实施方案中,接合裂解序列是SapI限制酶识别位点。

[0141] 在一些实施方案中,接合裂解序列是核酶编码序列,并介导合成RNA基因组中间物的自裂解以产生最终合成病毒RNA基因组所需的天然离散5'和3'末端,以及后续病毒性RNA病毒的产生。示例性核酶包括锤头状核酶(例如图23中所示的锤头状核酶)、Varkud卫星(VS)核酶、发夹状核酶、GIR1分支核酶、glmS核酶、绕线核酶(twister ribozyme)、绕线姐妹核酶(twister sister ribozyme)、手枪状核酶(例如图24中所示的手枪1和手枪2)、斧状核酶和肝炎病毒核酶。在一些实施方案中,5'和/或3'接合裂解序列是核酶编码序列。

[0142] 在一些实施方案中,接合裂解序列是编码配体诱导的自裂解核酶的序列,称为“适体酶”。适体酶是含有对配体具有特异性的整合适体结构域的核酶序列。配体与适体结构域的结合触发了核酶的酶活性的激活,从而导致RNA转录物的裂解。示例性适体酶包括茶碱依赖性的适体酶(例如,与茶碱依赖性的适体连接的锤头状核酶,描述于Auslander等人,Mol Biosyst. (2010) 6,807-814)、四环素依赖性的适体酶(例如与Tet依赖性的适体连接的锤头状核酶,描述于Zhong等人,eLife 2016;5:e18858 DOI:10.7554/eLife.18858;Win和Smolke,PNAS (2007) 104;14283-14288;Whittmann和Suess,Mol Biosyst (2011) 7;2419-2427;Xiao等人,Chem&Biol (2008) 15;125-1137;以及Beilstein等人,ACS Syn Biol (2015) 4;526-534)、鸟嘌呤依赖性的适体酶(例如,与鸟嘌呤依赖性的适体连接的锤头状核酶,描述于Nomura等人,Chem Commun., (2012) 48 (57);7215-7217)。在一些实施方案中,5'和/或3'接合裂解序列是适体酶编码序列。

[0143] 在一些实施方案中,接合裂解序列是RNAi分子(例如siRNA分子、shRNA分子、miRNA分子或amiRNA分子)、gRNA分子或RNaseH引物的靶序列。在这样的实施方案中,接合裂解序列与RNAi分子、gRNA分子或引物分子的序列至少部分互补。用于比较和确定序列同一性百分比和互补性百分比的序列比对方法是本领域众所周知的。可以通过例如以下来进行序列的最佳比对以进行比较:Needleman和Wunsch的同源性比对算法,(1970) J.Mol.Biol.48:443;通过Pearson和Lipman的相似性搜索方法,(1988) Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444;通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI);手动比对和目视检查(参见例如Brent等人,(2003) Current Protocols in Molecular Biology);使用本领域已知的算法,包括BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等人,(1977) Nuc.Acids Res.25:3389-3402和Altschul等人,(1990) J.Mol.Biol.215:403-410。可通过国家生物技术信息中心(the National Center for Biotechnology Information)公开获得进行BLAST分析的软件。

[0144] 在一些实施方案中,5'接合裂解序列和3'接合裂解序列来自同一组(例如,均为RNAi靶序列,均为核酶编码序列等)。例如,在一些实施方案中,接合裂解序列是RNAi靶序列

(例如, siRNA、shRNA、amiRNA或miRNA靶序列), 并掺入编码病毒基因组(例如重组RNA分子)的多核苷酸的5'和3'末端。在这样的实施方案中, 5'和3'RNAi靶序列可以相同(即, 相同siRNA、amiRNA或miRNA的靶标)或不同(即, 5'序列是一种siRNA、shmiRNA或miRNA的靶标, 而3'序列是另一种siRNA、amiRNA或miRNA的靶标)。在一些实施方案中, 接合裂解序列是向导RNA靶序列, 并掺入编码病毒基因组(例如重组RNA分子)的多核苷酸的5'和3'末端。在这样的实施方案中, 5'和3'gRNA靶序列可以相同(即, 相同gRNA的靶标)或不同(即, 5'序列是一种gRNA的靶标, 而3'序列是另一种gRNA的靶标)。在一些实施方案中, 接合裂解序列是pri-mRNA编码序列, 并掺入编码病毒基因组(例如重组RNA分子)的多核苷酸的5'和3'末端。在一些实施方案中, 接合裂解序列是核酶编码序列, 并掺入编码病毒基因组(例如重组RNA分子)的多核苷酸的5'和3'末端临近处。

[0145] 在一些实施方案中, 5'接头裂解序列和3'接头裂解序列来自相同组, 但是是不同的变体或类型。例如, 在一些实施方案中, 5'和3'接合裂解序列可以是RNAi分子的靶序列, 其中5'接合裂解序列是siRNA靶序列, 而3'接合裂解序列是miRNA靶序列(或反之亦然)。在一些实施方案中, 5'和3'接合裂解序列可以是核酶编码序列, 其中5'接合裂解序列是锤头状核酶编码序列, 而3'接合裂解序列是肝炎δ病毒核酶编码序列。

[0146] 在一些实施方案中, 5'接合裂解序列和3'接合裂解序列是不同类型。举例来说, 在一些实施方案中, 5'接合裂解序列是RNAi靶序列(例如siRNA、amiRNA或miRNA靶序列), 而3'接合裂解序列是核酶序列、适体酶序列、pri-miRNA序列或gRNA靶序列。在一些实施方案中, 5'接合裂解序列是核酶序列, 而3'接合裂解序列是RNAi靶序列(例如siRNA、amiRNA或miRNA靶序列)、适体酶序列、pri-miRNA编码序列或gRNA靶序列。在一些实施方案中, 5'接合裂解序列是适体酶序列, 而3'接合裂解序列是RNAi靶序列(例如siRNA、amiRNA或miRNA靶序列)、核酶序列、pri-miRNA序列或gRNA靶序列。在一些实施方案中, 5'接合裂解序列是pri-miRNA序列, 而3'接合裂解序列是RNAi靶序列(例如siRNA、amiRNA或miRNA靶序列)、核酶序列、适体酶序列或gRNA靶序列。在一些实施方案中, 5'接合裂解序列是gRNA靶序列, 而3'接合裂解序列是RNAi靶序列(例如siRNA、amiRNA或miRNA靶序列)、核酶序列、pri-miRNA序列或适体酶序列。

[0147] 接合裂解序列相对于编码合成病毒基因组的多核苷酸的示例性排列在下表A和B中示出。

[0148] 表A: 对称接合裂解序列(JSC)排列

[0149]	5'	<u>JCS</u>		<u>JCS</u>	3'
		siRNA TS	合成基因组	siRNA TS	
		miR TS	合成基因组	miR TS	
		AmiR TS	合成基因组	AmiR TS	

[0150]

5'	<u>JCS</u>		<u>JCS</u>	3'
	gRNA TS	合成基因组	gRNA TS	
	pri-miR	合成基因组	pri-miR	
	核酶	合成基因组	核酶	
	适体酶	合成基因组	适体酶	
	RNaseH 引物 TS	合成基因组	RNaseH 引物 TS	

[0151] 表B: 不对称JCS排列

[0152]

5'	<u>JCS</u>		<u>JCS</u>	3'
	siRNA TS	合成基因组	miR TS	
	siRNA TS	合成基因组	AmiR TS	
	siRNA TS	合成基因组	gRNA TS	
	siRNA TS	合成基因组	pri-miR	
	siRNA TS	合成基因组	核酶	
	siRNA TS	合成基因组	适体酶	
	siRNA TS	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	siRNA TS	合成基因组	Restr Enz RS	
	miR TS	合成基因组	siRNA TS	
	miR TS	合成基因组	AmiR TS	
	miR TS	合成基因组	gRNA TS	
	miR TS	合成基因组	pri-miR	
	miR TS	合成基因组	核酶	
	miR TS	合成基因组	适体酶	
	miR TS	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	miR TS	合成基因组	Restr Enz RS	
	AmiR TS	合成基因组	siRNA TS	
	AmiR TS	合成基因组	miR TS	
	AmiR TS	合成基因组	gRNA TS	
	AmiR TS	合成基因组	pri-miR	
	AmiR TS	合成基因组	核酶	
	AmiR TS	合成基因组	适体酶	
	AmiR TS	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	AmiR TS	合成基因组	Restr Enz RS	

[0153]

5'	JCS		JCS	3'
	gRNA TS	合成基因组	siRNA TS	
	gRNA TS	合成基因组	miR TS	
	gRNA TS	合成基因组	AmiR TS	
	gRNA TS	合成基因组	pri-miR	
	gRNA TS	合成基因组	核酶	
	gRNA TS	合成基因组	适体酶	
	gRNA TS	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	gRNA TS	合成基因组	Restr Enz RS	
	pri-miR	合成基因组	siRNA TS	
	pri-miR	合成基因组	miR TS	
	pri-miR	合成基因组	AmiR TS	
	pri-miR	合成基因组	gRNA TS	
	pri-miR	合成基因组	核酶	
	pri-miR	合成基因组	适体酶	
	pri-miR	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	pri-miR	合成基因组	Restr Enz RS	
	核酶	合成基因组	siRNA TS	
	核酶	合成基因组	miR TS	
	核酶	合成基因组	AmiR TS	
	核酶	合成基因组	gRNA TS	
	核酶	合成基因组	pri-miR	
	核酶	合成基因组	适体酶	
	核酶	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	核酶	合成基因组	Restr Enz RS	
	适体酶	合成基因组	siRNA TS	
	适体酶	合成基因组	miR TS	
	适体酶	合成基因组	AmiR TS	
	适体酶	合成基因组	gRNA TS	
	适体酶	合成基因组	pri-miR	
	适体酶	合成基因组	核酶	
	适体酶	合成基因组	RNaseH 引物 TS	
	适体酶	合成基因组	Restr Enz RS	
	RNaseH 引物	合成基因组	siRNA TS	

[0154]	5'	JCS		JCS	3'
		TS			
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	miR TS	
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	AmiR TS	
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	gRNA TS	
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	pri-miR	
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	核酶	
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	适体酶	
		RNaseH 引物 TS	合成基因组	Restr Enz RS	

[0155] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组通过体外RNA转录在体外产生(参见图35中的示意图)。然后纯化合成RNA病毒基因组并且配制用于治疗用途(例如包封至脂质纳米颗粒中)。在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii) 5'核酶序列;(iii) 编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸;以及(iv) 3'核酶序列。在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii) 5'锤头状核酶序列(例如野生型HHR或修饰的HHR,例如图23中所提供);(iii) 编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸;以及(iv) 3'肝炎δ病毒核酶序列。

[0156] 在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii) 5'锤头状核酶序列(例如野生型HHR或修饰的HHR,例如图23中所提供);(iii) 编码野生型SVV-A基因组的多核苷酸;以及(iv) 3'肝炎δ病毒核酶序列。在一些实施方案中,DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:12至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中,DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:12或由其组成。在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii) 5'锤头状核酶序列(例如野生型HHR或修饰的HHR,例如图23中所提供);(iii) 编码SVVA-S177A基因组的多核苷酸;以及(iv) 3'肝炎δ病毒核酶序列。在一些实施方案中,DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:13至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中,DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:13或由其组成。

[0157] 在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii) 5'锤头状核酶序列(例如野生型HHR或修饰的HHR,例如图23中所提供);(iii) 编码SVVA-IR2基因组的多核苷酸;以及(iv) 3'肝炎δ病毒核酶序列。在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii) 5'锤头状核酶序列(例如野生型HHR或修饰的HHR,例如图23中所提供);(iii) 编码SVVA-IR2-S77A基因组的多核苷酸;以及(iv) 3'肝炎δ病毒核酶序列。

[0158] 在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i) 启动子序列(例如T7聚合酶启

动子); (ii) 5'核酶序列; (iii) 编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'锤头状核酶序列 (例如野生型HHR或修饰的HHR, 例如图23中所提供); (iii) 编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。

[0159] 在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'锤头状核酶序列 (例如野生型HHR或修饰的HHR, 例如图23中所提供); (iii) 编码野生型SVVA基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:18至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:18或由其组成。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'锤头状核酶序列 (例如野生型HHR或修饰的HHR, 例如图23中所提供); (iii) 编码SVVA-S177A基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'锤头状核酶序列 (例如野生型HHR或修饰的HHR, 例如图23中所提供); (iii) 编码SVVA-IR2基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'锤头状核酶序列 (例如野生型HHR或修饰的HHR, 例如图23中所提供); (iii) 编码SVVA-S177A-IR2基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。

[0160] 在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'手枪状核酶序列 (例如图24中所示的手枪1或手枪2核酶序列); (iii) 编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'手枪1核酶序列; (iii) 编码野生型SVV基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:14至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) a 5'手枪2核酶序列; (iii) 编码野生型SVV基因组的多核苷酸; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:15至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:15或由其组成。

[0161] 在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'手枪1核酶序列; (iii) 编码的多核苷酸SVV-S177A基因组; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'手枪1核酶序列; (iii) 编码的多核苷酸SVV-IR2基因组; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:16至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:16或由其组成。在一些实施方案中, DNA多核苷酸从5'至3'包含: (i) 启动子序列 (例如T7聚合酶启动子); (ii) 5'手枪1核酶序列; (iii) 编码的多核苷酸SVV-IR2-S177A基因组; 以及 (iv) 3'SapI限制酶识别位点。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含与SEQ ID NO:17至少95%、96%、97%、98%或99%同一的核酸序列。在一些实施方案中, DNA多核苷酸包含SEQ ID NO:17或由其组成。

[0162] 在一些实施方案中,DNA多核苷酸从5'至3'包含:(i)启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii)5'RNAseH引物结合位点;(iii)编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸;以及(iv)3'限制酶识别位点。在一些实施方案中,DNA载体包含从5'至3'包含以下的多核苷酸:(i)启动子序列(例如T7聚合酶启动子);(ii)5'RNAseH引物结合位点;(iii)编码合成RNA病毒基因组的多核苷酸;以及(iv)3'SapI限制酶识别位点。

[0163] 包含合成RNA基因组的颗粒

[0164] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA基因组被包封在“颗粒”中。如本文所用,颗粒是指物质的非组织来源的组合物,例如脂质体、脂质体复合物、纳米颗粒、纳米胶囊、微粒、微球体、脂质颗粒、外泌体、囊泡等。在某些实施方案中,颗粒是非蛋白质的和非免疫原性的。在这样的实施方案中,本文所述的合成RNA基因组的包封允许在不诱发全身性的抗病毒免疫应答下递送病毒基因组并且减轻中和抗病毒抗体的作用。此外,本文所述的合成RNA基因组的包封保护基因组避免降解,并促进其引入至靶宿主细胞中。在这样的实施方案中,本公开提供了一种纳米颗粒,所述纳米颗粒包含本文所述的合成RNA基因组。在一些实施方案中,纳米颗粒是脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,纳米颗粒还包含编码有效负载分子的第二RNA分子。

[0165] 在一些实施方案中,颗粒在受试者中是生物可降解的。在这样的实施方案中,可以向受试者施用多剂颗粒,颗粒不会在受试者中累积。合适颗粒的实例包括聚苯乙烯颗粒、聚(乳酸-共-乙醇酸)PLGA颗粒、基于多肽的阳离子聚合物颗粒、环糊精颗粒、壳聚糖颗粒、基于脂质的颗粒、聚(β -氨基酯)颗粒、低分子量聚乙烯亚胺颗粒、聚磷酸酯颗粒、二硫化物交联的聚合物颗粒、聚酰胺胺颗粒、聚乙烯亚胺(PEI)颗粒和PLURIONICS稳定的聚硫化丙烯颗粒。

[0166] 在一些实施方案中,本文所述的多核苷酸包封在无机颗粒中。在一些实施方案中,无机颗粒是金纳米颗粒(GNP)、金纳米棒(GNR)、磁性纳米颗粒(MNP)、磁性纳米管(MNT)、碳纳米角(CNH)、碳富勒烯、碳纳米管(CNT)、磷酸钙纳米颗粒(CPNP)、介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN)、二氧化硅纳米管(SNT)或星形中空二氧化硅纳米颗粒(SHNP)。

[0167] 优选地,本文所述的颗粒是纳米尺寸的,以提高溶解度,避免由体内聚集引起的可能的并发症并促进胞饮作用。在一些实施方案中,颗粒的平均直径约小于约1000nm。在一些实施方案中,颗粒的平均直径小于约500nm。在一些实施方案中,颗粒的平均直径介于约30nm与约100nm之间、介于约50nm与约100nm之间或介于约75nm与约100nm之间。在一些实施方案中,颗粒的平均直径介于约30nm与约75nm之间或约30nm与约50nm之间。在一些实施方案中,颗粒的平均直径介于约100nm与约500nm之间。在一些实施方案中,颗粒的平均直径介于约200nm与400nm之间。在一些实施方案中,颗粒的平均尺为约350nm。

[0168] 外泌体

[0169] 在一些实施方案中,本文所述的合成RNA基因组包封在外泌体中。外泌体是内吞起源的小膜囊泡,在多囊泡体与亲本细胞(例如,释放外泌体的细胞,在本文中也称为供体细胞)的质膜融合后释放到细胞外环境中。外泌体的表面包含源自亲本细胞的细胞膜的脂质双层,并且还可包含在亲本细胞表面表达的膜蛋白。在一些实施方案中,外泌体还可含有来自亲本细胞的胞液。外泌体由许多不同的细胞类型产生,包括上皮细胞、B和T淋巴细胞、肥大细胞(MC)和树突状细胞(DC),并已在血浆、尿液、支气管肺泡灌洗液、肠上皮细胞和肿瘤

组织中鉴定出。由于外泌体的组成取决于其源自的亲本细胞类型,因此不存在“外泌体特异性”蛋白。但是,许多外泌体包含与亲本细胞中外泌体源自于的胞内囊泡相关的蛋白质(例如,与内体和溶酶体相关和/或由内体和溶酶体表达)。例如,外泌体可以富含抗原呈递分子,例如主要组织相容性复合物I和II(MHC-I和MHC-II)、四跨膜蛋白(例如CD63)、几种热休克蛋白、细胞骨架成分(例如肌动蛋白和微管蛋白)、参与细胞内膜融合的蛋白质、细胞间相互作用(例如CD54)、信号转导蛋白和胞浆酶。

[0170] 外泌体可以通过外泌体膜与靶细胞的质膜融合来介导细胞蛋白从一个细胞(例如,亲本细胞)转移到靶细胞或受体细胞。这样,修饰被外泌体包封的物质提供了一种机制,通过该机制可以将外源性剂(例如本文所述的多核苷酸)引入靶细胞。已经被修饰成含有一种或多种外源剂的外泌体(例如,本文所述的多核苷酸)在本文中称为“修饰的外泌体”。在一些实施方案中,通过将外源剂(例如,本文所述的多核苷酸)引入亲本细胞中来产生修饰的外泌体。在这样的实施方案中,将外源核酸引入产生外泌体的亲本细胞中,从而将外源核酸本身或外源核酸的转录物掺入由亲本细胞产生的修饰的外泌体中。可以通过本领域已知的方法,例如转导、转染、转化和/或显微注射外源核酸,将外源核酸引入亲本细胞。

[0171] 在一些实施方案中,通过直接将本文所述的合成RNA基因组引入外泌体中来产生修饰的外泌体。在一些实施方案中,本文所述的合成RNA基因组引入完整外泌体中。“完整外泌体”是指包含源自产生外泌体的亲本细胞的蛋白质和/或遗传物质的外泌体。获得完整外泌体的方法是本领域已知的(参见例如Alvarez-Erviti L.等人,Nat Biotechnol.2011年4月;29(4):34-5;Ohno S等人,Mol Ther 2013年1月;21(1):185-91;以及EP专利公布No.2010663)。

[0172] 在特定实施方案中,将合成RNA基因组引入空外泌体中。“空外泌体”是指缺乏源自亲本细胞的蛋白质和/或遗传物质(例如DNA或RNA)的外泌体。产生空外泌体(例如,缺乏亲本细胞来源的遗传物质)的方法是本领域已知的,包括紫外线暴露、介导核酸负载到外泌体中的内源蛋白质的突变/缺失,以及对外泌体膜中的开孔进行电穿孔和化学处理,以使内源遗传物质通过开孔从外泌体中出来。在一些实施方案中,通过用pH为约9至约14的水溶液处理来打开外泌体以获得外泌体膜,除去囊泡内组分(例如,囊泡内蛋白质和/或核酸),并重新装配外泌体膜以形成空外泌体,从而产生空外泌体。在一些实施方案中,囊泡内组分(例如,囊泡内蛋白质和/或核酸)通过超速离心或密度梯度超速离心来除去。在一些实施方案中,通过超声处理、机械振动、通过多孔膜的挤出、电流或这些技术中的一种或多种的组合来重新装配膜。在特定实施方案中,通过超声处理将膜重新装配。

[0173] 在一些实施方案中,可以使用常规的分子生物学技术,如体外转化、转染和/或显微注射,实现完整或空外泌体负载本文所述的合成RNA基因组以产生修饰的外泌体。在一些实施方案中,外源剂(例如本文所述的多核苷酸)通过电穿孔直接引入至完整或空外泌体中。在一些实施方案中,外源剂(例如本文所述的多核苷酸)通过脂质体转染(例如转染)直接引入至完整或空外泌体中。适用于产生根据本公开的外泌体的脂质体转染试剂盒在本领域中是已知的并且是可商购(例如,来自Roche的FuGENE® HD转染试剂,和来自Invitrogen的LIPOFECTAMINE™ 2000)。在一些实施方案中,外源剂(例如本文所述的多核苷酸)通过使用热休克进行转化直接引入至完整或空外泌体中。在这样的实施方案中,从亲本细胞分离的外泌体在二价阳离子如Ca²⁺(CaCl₂中)的存在下冷却以透化外泌体膜。然后可以

将外泌体与外源核酸一起孵育并短暂加热休克(例如,在42℃孵育30-120秒)。在特定实施方案中,通过在除去囊泡内组分后将剂与外泌体膜混合或共孵育,可以实现空外泌体负载外源剂(例如本文所述的多核苷酸)。从外泌体膜重新装配的修饰的外泌体将因此将外源剂掺入囊泡内空间。产生外泌体包封的核酸的其它方法是本领域已知的(参见例如美国专利号9,889,210;9,629,929;以及9,085,778;国际PCT公布No.WO 2017/161010和WO 2018/039119)。

[0174] 可以从许多不同的亲本细胞,包括细胞系、骨髓来源的细胞和源自初代患者样品的细胞中获得外泌体。可以通过本领域已知的方法从亲本细胞培养物的上清液中分离出从亲本细胞释放的外泌体。例如,外泌体的物理性质可用于将它们与介质或其它原材料分离,包括基于电荷(例如电泳分离)、尺寸(例如过滤、分子筛等)、密度(例如常规或梯度离心)和斯韦德贝里常数(Svedberg constant)(例如,在有或没有外力作用下的沉降等)分离。替代地或另外地,分离可以基于一种或多种生物学特性,并且包括可以采用表面标记的方法(例如,用于沉淀、与固相的可逆结合、FACS分离、特异性配体结合、非特异性配体结合等)。外泌体表面蛋白的分析可以通过流式细胞术,使用针对外泌体相关蛋白(例如CD63)的荧光标记的抗体来确定。用于表征外泌体的其它标记在国际PCT公布No.WO 2017/161010中进行了描述。在进一步预期的方法中,外泌体也可以使用化学方法和/或物理方法融合,包括PEG诱导的融合和/或超声融合。

[0175] 在一些实施方案中,可以使用尺寸排阻色谱法分离外泌体。在一些实施方案中,如本领域通常已知的,外泌体可以在色谱法分离之后,通过离心技术分离(一种或多种色谱分离级分)进一步分离。在一些实施方案中,外泌体的分离可涉及方法的组合,所述方法包括但不限于如先前所述的差速离心(参见Raposo, G.等人, J. Exp. Med. 183, 1161-1172 (1996))、超速离心、基于尺寸的膜过滤、浓缩和/或速率区带离心。

[0176] 在一些实施方案中,外泌体膜包含磷脂、糖脂、脂肪酸、鞘脂、磷酸甘油酯、固醇、胆固醇和磷脂酰丝氨酸中的一种或多种。另外,膜可包含一种或多种多肽和一种或多种多糖,例如聚糖。示例性的外泌体膜组合物和用于改变一种或多种膜组分的相对量的方法描述于国际PCT公布No.WO 2018/039119。

[0177] 在一些实施方案中,颗粒是外泌体并且具有介于约30nm与约100nm之间、介于约30nm与约200nm之间或介于约30nm与约500nm之间的直径。在一些实施方案中,颗粒是外泌体并且具有介于约10nm与约100nm之间、介于约20nm与约100nm之间、介于约30nm与约100nm之间、介于约40nm与约100nm之间、介于约50nm与约100nm之间、介于约60nm与约100nm之间、介于约70nm与约100nm之间、介于约80nm与约100nm之间、介于约90nm与约100nm之间、介于约100nm与约200nm之间、介于约100nm与约150nm之间、介于约150nm与约200nm之间、介于约100nm与约250nm之间、介于约250nm与约500nm之间或介于约10nm与约1000nm之间的直径。在一些实施方案中,颗粒是外泌体并且具有介于约20nm与300nm之间、介于约40nm与200nm之间、介于约20nm与250nm之间、介于约30nm与150nm之间或介于约30nm与100nm之间的直径。

[0178] 脂质纳米颗粒

[0179] 在某些实施方案中,本文所述的合成RNA病毒基因组包封在脂质纳米颗粒(LNP)中。在某些实施方案中,LNP包含一种或多种脂质,例如甘油三酯(例如三硬脂酸甘油酯)、甘

油二酯(例如山嵛酸甘油酯)、甘油单酯(例如单硬脂酸甘油酯)、脂肪酸(例如硬脂酸)、类固醇(例如胆固醇)和蜡(例如棕榈酸十六烷酯)。在一些实施方案中,LNP包含一种或多种阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质。在一些实施方案中,LNP包含一种或多种阳离子型脂质、胆固醇和一种或多种中性脂质。

[0180] 阳离子型脂质是指在选定的pH值(例如生理pH值)下带有净正电荷的多种脂质中的任何一种。这类脂质包括但不限于1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、二-十八烷基二甲基铵(DODMA)、二硬脂基二甲基铵(DSDMA)、N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);N-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB);N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)和N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。例如,在低于生理pH值的条件下具有正电荷的阳离子型脂质包括但不限于DODAP、DODMA和DMDMA。在一些实施方案中,阳离子型脂质包含C₁₈烷基链、头基与烷基链之间的醚键以及0至3个双键。这样的脂质包括例如DSDMA、DLinDMA、DLenDMA和DODMA。阳离子型脂质可以包含醚键和pH可滴定的头基。这样的脂质包括例如DODMA。另外的阳离子型脂质描述于以引用的方式并入本文中的美国专利No.7,745,651、5,208,036、5,264,618、5,279,833、5,283,185、5,753,613和5,785,992中。

[0181] 在一些实施方案中,阳离子型脂质包含可质子化的叔胺头基。这样的脂质在本文中称为可电离的脂质。可电离的脂质是指包含可电离的胺头基且典型地包含小于约7的pKa的脂质种类。因此,在酸性pH的环境中,可电离的胺头基被质子化,使得可电离的脂质优先与带负电荷的分子(例如核酸,例如本文所述的重组多核苷酸)相互作用,从而促进纳米颗粒的装配和包封。因此,在一些实施方案中,可电离的脂质可以增加核酸在脂质纳米颗粒中的负载。在pH值大于约7(例如约7.4的生理pH值)的环境中,可电离的脂质包含中性电荷。当包含可离子的脂质的颗粒被吸收到体内的低pH环境(例如pH<7)时,可电离的脂质再次质子化并与阴离子内体膜缔合,从而促进了被颗粒包封的内容物的释放。在一些实施方案中,LNP包含可电离的脂质,例如7.SS可裂解的和pH响应性脂质样物质(例如**COATSOME®**SS系列)。适用于本公开内容的制剂和方法的阳离子型或可电离的脂质的另外的实例描述于例如W02018089540A1、W02017049245A2、US20150174261、US2014308304、US2015376115、W0201/199952和W02016/176330中。

[0182] 在一些实施方案中,阳离子型脂质是选自阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA(MC3)、**COATSOME®**SS-LC(原名:SS-18/4PE-13)、**COATSOME®**SS-EC(原名:SS-33/4PE-15)、**COATSOME®**SS-OC、**COATSOME®**SS-OP、9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L-319)或N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)的可电离的脂质。在一些实施方案中,阳离子型可电离的脂质是DLin-MC3-DMA(MC3)。在一些实施方案中,阳离子型可电离的脂质是**COATSOME®**SS-LC。在一些实施方案中,阳离子型可电离的脂质是**COATSOME®**SS-EC。在一些实施方案中,阳离子型可电离的脂质是**COATSOME®**SS-OC。在一些实施方案中,阳离子型可电离的脂质是**COATSOME®**SS-OP。在一些实施方案中,阳离子型可

电离的脂质是L-319。在一些实施方案中,阳离子型可电离的脂质是DOTAP。

[0183] 在一些实施方案中,LNP包含一种或多种非阳离子型辅助脂质(中性脂质)。示例性的中性辅助脂质包括(1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺)(DLPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DiPPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、神经酰胺、鞘磷脂和胆固醇。在一些实施方案中,一种或多种辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);和胆固醇。在一些实施方案中,LNP包含DSPC。在一些实施方案中,LNP包含DOPC。在一些实施方案中,LNP包含DLPE。在一些实施方案中,LNP包含DOPE。

[0184] 还考虑本文所述的脂质体和药物组合物中聚乙二醇(PEG)修饰的磷脂和衍生的脂质,例如衍生的神经酰胺(PEG-CER)的使用和包括,包括N-辛酰基-鞘氨醇-1-[琥珀酰基(甲氧基聚乙二醇)-2000](C8PEG-2000神经酰胺),优选与本文公开的一种或多种化合物和脂质组合。

[0185] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒还可包含一种或多种PEG修饰的脂质,所述脂质包含共价连接至包含一个或多个C6-C20烷基的脂质的长度高达5kDa的聚(乙)二醇链。在一些实施方案中,LNP还包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚(乙二醇)(DSPE-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。在一些实施方案中,LNP还包含选自以下的PEG修饰的脂质:1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。在一些实施方案中,LNP还包含DSPE-PEG5K。在一些实施方案中,LNP还包含DPG-PEG2K。在一些实施方案中,LNP还包含DSG-PEG2K。在一些实施方案中,LNP还包含DMG-PEG2K。在一些实施方案中,LNP还包含DSG-PEG5K。在一些实施方案中,LNP还包含DMG-PEG5K。在一些实施方案中,PEG修饰的脂质占脂质纳米颗粒中总脂质含量的约0.1%至约1%。在一些实施方案中,PEG修饰的脂质占脂质纳米颗粒中总脂质含量的约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.5%、约2.0%、约2.5%或约3.0%。

[0186] 在一些实施方案中,脂质用可裂解的PEG脂质修饰。具有可裂解键的PEG衍生物的实例包括用肽键修饰的那些(Kulkarni等人(2014).Mmp-9responsive PEG cleavable nanovesicles for efficient delivery of chemotherapeutics to pancreatic cancer.Mol Pharmaceutics11:2390-9;Lin等人(2015).Drug/dye-loaded, multifunctional peg-chitosan-iron oxide nanocomposites for methotrexate synergistically self-targeted cancer therapy and dual model imaging.ACS Appl

Mater Interfaces 7:11908-20.)、二硫键(Yan等人(2014).A method to accelerate the gelation of disulfide-crosslinked hydrogels.Chin J Polym Sci33:118-27;Wu和Yan(2015).Copper nanopowder catalyzed cross-coupling of diaryl disulfides with aryl iodides in PEG-400.Synlett26:537-42)、乙烯醚键、胺键(Kelly等人(2016).Polymeric prodrug combination to exploit the therapeutic potential of antimicrobial peptides against cancer cells.Org Biomol Chem 14:9278-86.)以及酯键(Xu等人(2008).Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives.J Control Release130:238-45)。亦参见Fang等人,(2017)Cleavable PEGylation:a strategy for overcoming the“PEG dilemma”in efficient drug delivery.Drug Delivery 24:2,22-32。

[0187] 在一些实施方案中,PEG脂质是活化PEG脂质。示例性活化PEG脂质包括PEG-NH₂、PEG-MAL、PEG-NHS和PEG-ALD。这种官能化PEG脂质可用于将靶向部分缀合至脂质纳米颗粒以将颗粒引导至特定的靶细胞或组织(例如通过连接抗原结合分子、肽、聚糖等)。

[0188] 在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是DOTAP。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是DLin-MC3-DMA(MC3)。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是**COATSOME®**SS-EC。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是**COATSOME®**SS-LC。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是**COATSOME®**SS-OC。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是**COATSOME®**SS-OP。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中阳离子型脂质是L-319。

[0189] 在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中一种或多种辅助脂质包含胆固醇。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中一种或多种辅助脂质包含DLPE。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中一种或多种辅助脂质包含DSPC。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中一种或多种辅助脂质包含DOPE。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和一种或多种辅助脂质,其中一种或多种辅助脂质包含DOPC。

[0190] 在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和至少两种辅助脂质,其中阳离子型脂质是DOTAP,并且至少两种辅助脂质包含胆固醇和DLPE。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和至少两种辅助脂质,其中阳离子型脂质是MC3,并且至少两种辅助脂质包含胆固醇和DSPC。在一些实施方案中,至少两种辅助脂质包含胆固醇和DOPE。在一些实施方案中,至少两种辅助脂质包含胆固醇和DSPC。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和至少三种辅助脂质,其中阳离子型脂质是DOTAP,并且至少三种辅助脂质包含胆固醇、DLPE和DSPE。在一些实施方案中,LNP包含阳离子型脂质和至少三种辅助脂质,其中阳离子型脂质是MC3,并且至少三种辅助脂质包含胆固醇、DSPC和DMG。在一些实施方案中,至少三种辅助脂质包含胆固醇、DOPE和DSPE。在一些实施方案中,至少三种辅助脂质包含胆固醇、DSPC和DMG。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇和DLPE。在一些实施方案中,LNP包含MC3、胆固醇和DSPC。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇和DOPE。在一些实施方案中,LNP包含

DOTAP、胆固醇、DLPE和DSPE。在一些实施方案中,LNP包含MC3、胆固醇、DSPC和DMG。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇、DLPE和DSPE-PEG。在一些实施方案中,LNP包含MC3、胆固醇、DSPC和DMG-PEG。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇、DOPE和DSPE。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇、DOPE和DSPE-PEG。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇和DPG-PEG (例如DPG-PEG2K)。

[0191] 在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇(Chol)和DLPE,其中DOTAP:Chol:DLPE的比率(占总脂质含量的百分比)约为50:35:15。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇(Chol)和DLPE,其中DOTAP:Chol:DOPE的比率(占总脂质含量的百分比)约为50:35:15。在一些实施方案中,LNP包含DOTAP、胆固醇(Chol)、DLPE、DSPE-PEG,其中DOTP:Chol:DLPE的比率(占总脂质含量的百分比)约为50:35:15并且其中颗粒包含约0.2%DSPE-PEG。在一些实施方案中,LNP包含MC3、胆固醇(Chol)、DSPC和DMG-PEG,其中MC3:Chol:DSPC:DMG-PEG的比率(占总脂质含量的百分比)约为49:38.5:11:1.5。

[0192] 在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-25%,C=20%-30%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=20%-25%,C=25%-30%,和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

[0193] 在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=25%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-55%,B=10%-20%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=10%-15%,C=35%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:11:38.5:1.5。

[0194] 在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-65%,B=5%-20%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇(Chol)和DPG-PEG2K,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=50%-60%,B=5%-15%,C=30%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。在一些实施方案中,LNP包含SS-OC、DSPC、胆固醇

(Chol) 和 DPG-PEG2K, 其中 SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2K (占总脂质含量的百分比) 的比率是约 A:B:C:D, 其中 A=55%-60%, B=5%-15%, C=30%-40%, 和 D=1%-2% 并且其中 A+B+C+D=100%。在一些实施方案中, LNP 包含 SS-OC、DSPC、胆固醇 (Chol) 和 DPG-PEG2K, 其中 SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2K (占总脂质含量的百分比) 的比率是约 A:B:C:D, 其中 A=55%-60%, B=5%-10%, C=30%-35%, 和 D=1%-2% 并且其中 A+B+C+D=100%。在一些实施方案中, LNP 包含 SS-OC、DSPC、胆固醇 (Chol) 和 DPG-PEG2K, 其中 SS-OC: DSPC: Chol: DPG-PEG2K (占总脂质含量的百分比) 的比率是约 58:7:33.5:1.5。

[0195] 在一些实施方案中, 纳米颗粒用糖胺聚糖 (GAG) 包被, 以调节或促进靶细胞对纳米颗粒的吸收 (图2)。GAG 可以是肝素/硫酸肝素、硫酸软骨素/硫酸皮肤素、硫酸角蛋白或透明质酸 (HA)。在一个特定的实施方案中, 纳米颗粒的表面用 HA 包被并且靶向该等颗粒以供肿瘤细胞吸收。在一些实施方案中, 脂质纳米颗粒被精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽 (RGD肽) 包被 (参见 Ruoslahti, *Advanced Materials*, 24, 2012, 3747-3756; 及 Bellis 等人, *Biomaterials*, 32 (18), 2011, 4205-4210)。

[0196] 在一些实施方案中, LNP 的平均尺寸为约 50nm 至约 500nm。举例来说, 在一些实施方案中, LNP 的平均尺寸为约 50nm 至约 200nm、约 100nm 至约 200nm、约 150nm 至约 200nm、约 50nm 至约 150nm、约 100nm 至约 150nm、约 150nm 至约 500nm、约 200nm 至约 500nm、约 300nm 至约 500nm、约 350nm 至约 500nm、约 400nm 至约 500nm、约 425nm 至约 500nm、约 450nm 至约 500nm 或约 475nm 至约 500nm。在一些实施方案中, 多个 LNP 的平均尺寸为约 50nm 至约 120nm。在一些实施方案中, 多个 LNP 的平均尺寸为约 50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm 或约 120nm。在一些实施方案中, 多个 LNP 的平均尺寸为约 100nm。

[0197] 在一些实施方案中, LNP 具有中性电荷 (例如平均 ζ -电位介于约 0mV 与 1mV 之间)。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 40mV 与约 -40mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 40mV 与约 0mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 35mV 与约 0mV、约 30mV 与约 0mV、约 25mV 至约 0mV、约 20mV 至约 0mV、约 15mV 至约 0mV、约 10mV 至约 0mV 或约 5mV 至约 0mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 20mV 与约 -40mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 20mV 与约 -20mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 10mV 与约 -20mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位介于约 10mV 与约 -10mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ -电位为约 10mV、约 9mV、约 8mV、约 7mV、约 6mV、约 5mV、约 4mV、约 3mV、约 2mV、约 1mV、约 0mV、约 -1mV、约 -2mV、约 -3mV、约 -4mV、约 -5mV、约 -6mV、约 -7mV、约 -8mV、约 -9mV、约 -9mV 或约 -10mV。

[0198] 在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ 电位介于约 0mV 与 -20mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ 电位小于约 -20mV。举例来说, 在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ 电位少于约少于约 -30mV、少于约 35mV 或少于约 -40mV。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ 电位介于约 -50mV 至约 -20mV、约 -40mV 至约 -20mV 或约 -30mV 至约 -20mV 之间。在一些实施方案中, LNP 的平均 ζ 电位为约 0mV、约 -1mV、约 -2mV、约 -3mV、约 -4mV、约 -5mV、约 -6mV、约 -7mV、约 -8mV、约 -9mV、约 -10mV、约 -11mV、约 -12mV、约 -13mV、约 -14mV、约 -15mV、约 -16mV、约 -17mV、约 -18mV、约 -19mV、约 -20mV、约 -21mV、约 -22mV、约 -23mV、约 -24mV、约 -25mV、约 -26mV、约 -27mV、约 -28mV、约 -29mV、约 -30mV、约 -31mV、约 -32mV、约 -33mV、约 -34mV、约 -35mV、约 -36mV、约 -37mV、约 -38mV、约 -39mV 或约 -40mV。

[0199] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含本文所述的重组核酸分子,并且脂质(L)与核酸(N)的比率为约3:1(L:N)。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含本文所述的重组核酸分子并且包含约4:1、约5:1、约6:1、约7:1、约8:1、约9:1或约10:1的L:N比率。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含本文所述的重组核酸分子并且包含约7:1的L:N比率。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含本文所述的重组核酸分子并且包含约4.5:1、约4.6:1、约4.7:1、约4.8:1、约4.9:1、约5:1、约5.1:1、约5.2:1、约5.3:1、约5.4:1或约5.5:1的L:N比率。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含本文所述的重组核酸分子并且包含约6.5:1、6.6:1、6.7:1、6.8:1、6.9:1、7:1、7.1:1、7.2:1、7.3:1、7.4:1和7.5:1的L:N比率。

[0200] 在一些实施方案中,LNP包含选自表5中列出的制剂之一的脂质制剂。

[0201] 在一些实施方案中,LNP包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组,其中所编码的溶瘤病毒能够减小远离LNP施用至受试者的部位的肿瘤的尺寸。举例来说,如本文提供的实施例中所证明,本文所述的LNP的静脉内施用引起肿瘤组织中的病毒复制和肿瘤尺寸的减小。这些数据表明本公开的LNP能够定位至远离LNP施用部位的肿瘤或癌组织。这种作用使得本文所述的LNP包封的溶瘤病毒能够用于治疗不容易接近,因此不宜肿瘤内递送治疗的肿瘤。

[0202] 有效负载分子

[0203] 在一些实施方案中,颗粒包含合成RNA病毒基因组并且还包含编码有效负载分子的重组RNA多核苷酸。在一些实施方案中,颗粒是脂质纳米颗粒并且包含合成RNA病毒基因组并且还包含编码有效负载分子的重组RNA多核苷酸。在一些实施方案中,一种或多种miRNA靶序列掺入编码有效负载分子的RNA多核苷酸的3'或5'UTR中。在一些实施方案中,一种或多种miRNA靶序列插入编码有效负载分子的多核苷酸中。在这样的实施方案中,有效负载的翻译和随后的表达在表达相应miRNA的细胞中不发生或基本上不减少。在一些实施方案中,编码有效负载分子的重组RNA多核苷酸是复制子。

[0204] 在一些实施方案中,有效负载是细胞毒性肽。如本文所用,“细胞毒性肽”是指当在宿主细胞中表达时能够诱导细胞死亡,和/或当宿主细胞分泌时,能够诱导邻近细胞的细胞死亡的蛋白质。在一些实施方案中,细胞毒性肽是胱天蛋白酶、p53、白喉毒素(DT)、假单胞菌外毒素A(PEA)、I型核酶失活蛋白(RIP)(例如肥皂草素(saporin)和白树毒素(gelonin))、II型RIP(例如蓖麻毒素)、志贺样毒素1(Stt1)、光敏活性氧(例如杀手红)。在某些实施方案中,细胞毒性肽由通过细胞凋亡引起细胞死亡的自杀基因,例如胱天蛋白酶基因编码。

[0205] 在一些实施方案中,有效负载是免疫调节肽。如本文所用,“免疫调节肽”是能够调节(例如,激活或抑制)特定免疫受体和/或通路的肽。在一些实施方案中,免疫调节肽可作用于任何哺乳动物细胞,包括免疫细胞、组织细胞和基质细胞。在一个优选的实施方案中,免疫调节肽作用于免疫细胞,例如T细胞、NK细胞、NKT T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞或嗜酸性粒细胞。示例性免疫调节肽包括抗原结合分子如抗体或其抗原结合片段、细胞因子、趋化因子、可溶性受体、细胞表面受体配体、二分肽和酶。

[0206] 在一些实施方案中,有效负载是细胞因子,例如IL-1、IL-12、IL-15、IL-18、IL-36 γ 、TNF α 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 或TNFSF14。在一些实施方案中,有效负载是趋化因子,如CXCL10、CXCL9、CCL21、CCL4或CCL5。在一些实施方案中,有效负载是细胞表面受体的配体,

例如NKG2D配体、神经纤毛蛋白配体、Flt3配体、CD47配体(例如SIRP1 α)。在一些实施方案中,有效负载是可溶性受体,例如可溶性细胞因子受体(例如IL-13R、TGF β R1、TGF β R2、IL-35R、IL-15R、IL-2R、IL-12R和干扰素受体)或可溶性先天免疫受体(例如Toll样受体、补体受体等)。在一些实施方案中,有效负载是参与细胞内RNA和/或DNA感应的蛋白质的显性激动剂突变体(例如STING、RIG-1或MDA-5的显性激动剂突变体)。

[0207] 在一些实施方案中,有效负载是抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段(例如单链可变片段(scFv)、F(ab)等)。在一些实施方案中,抗原结合分子特异性结合细胞表面受体,例如免疫检查点受体(例如PD-1、PD-L1和CTLA4)或参与细胞生长和活化的其它细胞表面受体(例如OX40、CD200R、CD47、CSF1R、41BB、CD40和NKG2D)。

[0208] 在一些实施方案中,有效负载分子是蝎多肽,例如氯毒素(chlorotoxin)、BmKn-2、新普拉丁(neopladine)1、新普拉丁2和莫瑞泊林(mauriporin)。在一些实施方案中,有效负载分子是蛇多肽,例如蛇毒解聚素(contortrostatin)、载脂蛋白-I(apoxin-I)、矛头蝮蛇毒素(bothropstoxin)-I、BJcuL、OHAP-1、蛇毒蛋白(rhodostomin)、drCT-1、CTX-III、B1L和ACTX-6。在一些实施方案中,有效负载分子是蜘蛛多肽,例如拉塔蛋白(latarcin)和透明质酸酶。在一些实施方案中,有效负载分子是蜜蜂多肽,例如蜂毒素(melittin)和蜂毒明肽(apamin)。在一些实施方案中,有效负载分子是蛙多肽,例如PsT-1、PdT-1和PdT-2。

[0209] 在一些实施方案中,有效负载分子是酶。在一些实施方案中,酶能够通过改变细胞外基质来调节肿瘤微环境。在这样的实施方案中,酶可以包括但不限于基质金属蛋白酶(例如MMP9)、胶原酶、透明质酸酶、明胶酶或弹性蛋白酶。在一些实施方案中,酶是基因导向性酶前药疗法(GDEPT)系统的一部分,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、羧肽酶G2、嘌呤核苷磷酸化酶或细胞色素P450。在一些实施方案中,酶能够诱导或激活靶细胞(例如,胱天蛋白酶)中的细胞死亡通路。在一些实施方案中,酶能够降解细胞外代谢物或信息(例如精氨酸酶或15-羟前列腺素脱氢酶)。

[0210] 在一些实施方案中,有效负载分子是二分肽。如本文所用,“二分肽”是指由能够结合在非癌性效应细胞上表达的细胞表面抗原的第一结构域和能够结合由靶细胞(例如癌细胞、肿瘤细胞或不同类型的效应细胞)表达的细胞表面抗原的第二结构域构成的多聚体蛋白。在一些实施方案中,二分多肽的单个多肽结构域可包含抗体或其结合片段(例如单链可变片段(scFv)或的F(ab))、纳米抗体、双功能抗体、柔性抗体、DOCK-AND-LOCKTM抗体或单克隆抗独特型抗体(mAb2)。在一些实施方案中,二分多肽的结构可以是双重可变结构域抗体(DVD-IgTM)、Tandab[®]、双特异性T细胞衔接蛋白(BiTETM)、DuoBody[®]或双重亲和力重靶向(DART)多肽。在一些实施方案中,二分多肽是BiTE,并且包含特异性结合于表3和/或4中所示的抗原的结构域。下表2中示出示例性BiTE。

[0211] 表2:临床前和临床研究中使用的经过验证的BiTE

[0212]

靶标	名称	目标疾病	临床状况	参考文献
CD19	博纳吐单抗 (Blinatumomab)/M T-103/MEDI-538	NHL、ALL	I/II/III 期	1、2、3、4、 5、6
EpCAM	MT110	实体瘤	I 期	7、8、9、10
CEA	MT111/MEDI-565	胃肠道腺癌	I 期	11、12
PSMA	BAY2010112/AM G112	前列腺癌	I 期	13
CD33	AMG330	AML	临床前	14、15
EGFR	C-BiTE 和 P-BiTE 抗体	结肠直肠癌	临床前	16
Her2	FynomAb、 COVA420、 HER2-BsAb	乳腺癌和胃 癌	临床前	17、18
EphA2	bscEphA2xCD3	多发性实体 瘤	临床前	19
MCSP	MCSP-BiTE	黑色素瘤	临床前	20
ADAM 17	A300E	前列腺癌	临床前	21
PSCA	CD3-PSCA(MB1)	前列腺癌	临床前	22
17-A1	CD3/17-1A-双特异 性	结肠直肠癌	临床前	23
NKG2D	scFv-NKG2D、	多发性实体	临床前	24、25

[0213]

靶标	名称	目标疾病	临床状况	参考文献
配体	huNKG2D-OKT3	和液体瘤		
DLL3	AMG757	小细胞肺癌	临床	26

[0214] 在一些实施方案中,在效应细胞上表达的细胞表面抗原选自下表3。在一些实施方案中,在肿瘤细胞或效应细胞上表达的细胞表面抗原选自下表4。在一些实施方案中,在肿瘤细胞上表达的细胞表面抗原是肿瘤抗原。在一些实施方案中,肿瘤抗原选自CD19、EpCAM、CEA、PSMA、CD33、EGFR、Her2、EphA2、MCSP、ADAM17、PSCA、17-A1、NKG2D配体、CSF1R、FAP、GD2、DLL3或神经纤毛蛋白(neuropilin)。在一些实施方案中,肿瘤抗原选自表4中列出的那些。

[0215] 表3:示例性效应细胞靶抗原

[0216]

T 细胞		NKT 细胞	NK 细胞	其它
CD3	CD30	CD3	CD16	CD48
CD3 γ	CD38	CD3 γ	CD94/NKG2 (例如 NKG2D)	LIGHT
CD3 δ	CD40	CD3 δ	NKp30	CD44
CD3 ϵ	CD57	CD3 ϵ	NKp44	CD45
CD3 ξ	CD69	CD3 ξ	NKp46	IL-1R2
CD2	CD70	不变 TCR	KARs	IL-1R α
CD4	CD73			IL-1R α 2
CD5	CD81			IL-13R α 2
CD6	CD82			IL-15Ra
CD7	CD96			CCR5
CD8	CD134			CCR8
CD16	CD137			
CD25	CD152			
CD27	CD278			
CD28				

[0217]

表4: 示例性靶细胞抗原

[0218]

靶细胞抗原			
8H9	CRISP3	Lewis-Y	Fas

[0219]

靶细胞抗原			
GnT-V、 β1,6-N	DC-SIGN	LIV-1 (SLC39A6)	SOX2
AFP	DHFR	生存蛋白 (Livin)	STEAP1
ART1	EGP40	LAMP1	SLITRK6
ART4	EZH2	MAGEA3	NaPi2a
ABCG2	EpCAM	MAGEA4	SOX1
B7-H3	EphA2	MAGEB6	SOX11
B7-H4	EphA2/Eck	MAGEA1	SPANXA1
B7-H6	EGFRvIII	MART-1	SART-1
BCMA	E-钙粘蛋白	MCSP	SSX4
B-细胞周期 蛋白	EGP2	MME	SSX5
BMI1	ETA	间皮素(MSLN)	生存素
CA-125	ERBB3	MAPK1	SSX2
钙粘蛋白	ERBB3/4	MUC16	TAG72
CABYR	ERBB4	MUC1	TEM1
CTAG2	EPO	MRP-3	TEM8
CA6	F3	MyoD-1	TSGA10
CAIX	FAR	NCAM	TSSK6
CEA	FBP	结合素(nectin) 4	甲状腺球蛋白
CEACAM5	FTHL17	巢蛋白	转铁蛋白受体
CEACAM6	胎儿 AchR	NEP	TACSTD2 (TROP2)
Cav-1	FAP	NY-ESO-1	TMEM97
CD10	FGFR3	hHLA-A	TRP-2
CD117	FR-a	H60	TULP2
CD123	Fra-1/Fosl 1	OLIG2	TROP2
CD133	GAGE1	5T4	酪氨酸酶
CD138	GD2	p53	TRP1
CD15	GD3	P-钙粘蛋白	UPAR
CD171	Glil	PB	VEGF
CD19	GP100	P-糖蛋白	VEGF 受体
CD20	GPA33	PMCT (SLC13A5)	VEGFR2
CD21		PRAME	BRAF
CD22	磷脂酰肌醇蛋白 聚糖(Glypican)-3	PROX1	WT-1

靶细胞抗原			
CD30	HIV gp120	PSA	XAGE2
CD33	HLA-A	PSCA	ZNF165
CD37	HLA-A2	PSMA	$\alpha_v\beta_6$ 整合素
CD38	HLA-AI	PSC1	β -连环蛋白
CD44v6	HLA-B	PVRL4	组织蛋白酶 B
CD44v7/8	HLA-C	Ras	CSAG2
CD74	HMW-MAA	ROR1	CTAG2
Cd79b	Her2/Neu	SART2	EGFR
CD124 (IL-4R)	Her3	SART3	EGP40
[0220] CDH3	u70/80	纤连蛋白的癌 胚变体	EZH2
Ki-67	LICAM	肌腱蛋白	HIV sp120
CSPG4	ULBP1	LICAM	κ 轻链
CALLA	ULBP2	Rae-1 α	LDHC
CSAG2	ULBP3		TRP-1
COX-2	ULBP6	Rae-1 β	Fas-L
λ	MICA	Rae-1 δ	DLL3
LAYN	MICB	Rae-1 γ	
LeuM-1	Her3	PDGF	
KDR	EGF		
CD47	SIRP1 α		

[0221] 治疗性组合物和使用方法

[0222] 本公开的一个方面涉及包含本文所述的重组RNA的治疗性组合物或包含本文所述的重组RNA的颗粒,以及治疗癌症的方法。可以以适合所需递送途径的任何方式配制本文所述的组合物。通常,制剂包括所有生理上可接受的组合物,包括其衍生物或前药、溶剂化物、立体异构体、外消旋体或互变异构体,以及任何药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。

[0223] 如本文所用,“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已被美国食品药品监督管理局批准为可用于人或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增香剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性的药学上可接受的载体包括但不限于糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动植物脂肪、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及药物制剂中使用的任何其它相容物质。

[0224] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐两者。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基一起形成),并用无机酸形成,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷

酸等;并且用有机酸形成,例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰胺基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环己氨磺酸、十二烷基磺酸、乙-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖酸、龙胆酸、葡萄糖庚酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸(pamoic acid)、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。由游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下胺的盐:伯胺、仲胺和叔胺;取代胺,包括天然存在的取代胺;环胺和碱性离子交换树脂,例如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、地阿诺(deanol)、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、苄乙苄胺(benethamine)、苄星、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、缓血酸胺、嘌呤、嘧啶、N-乙基嘧啶、多胺树脂等。特别优选的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0225] 本公开提供了杀死癌细胞或靶细胞的方法,该方法包括在足以将组合物经细胞内递送至癌细胞的条件下,将细胞暴露于本文所述的RNA多核苷酸或颗粒或其组合物。如本文所用,“癌细胞”或“靶细胞”是指被选择用本文所述的多核苷酸或颗粒或本文所述的组合物治疗或施用的哺乳动物细胞。如本文所用,“杀死癌细胞”具体是指通过细胞凋亡或坏死引起的癌细胞死亡。癌细胞的杀死可以通过本领域已知的方法来确定,所述方法包括但不限于肿瘤尺寸测量、细胞计数和流式细胞术,以检测细胞死亡标志物如膜联蛋白V和掺入碘化丙啶。

[0226] 本公开还提供了一种在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,其中将有效量的本文所述的治疗性组合物施用于该受试者。施用途径自然会随所治疗疾病的位置和性质而变化,并且可以包括例如皮内、透皮、皮下、肠胃外、经鼻、静脉内、肌内、鼻内、皮下、经皮、经气管内、腹膜内、肿瘤内、灌注、灌洗、直接注射和口服。包封的本文所述的多核苷酸组合物特别适用于治疗转移癌,其中可能需要全身性施用以递送组合物至多个器官和/或细胞类型。因此,在特定的实施方案中,本文所述的组合物是全身施用的。

[0227] 本文可互换使用的“有效量”或“有效剂量”是指本文所述的组合物改善或补救疾病或病症的症状的量和/或剂量。改善是疾病或病症或者疾病或病症的症状的任何改善或补救。所述改善是可观察到的或可测量的改善,或者可以是受试者的总体幸福感的改善。因此,本领域技术人员意识到治疗可以改善疾病状况,但是可能不能完全治愈该疾病。受试者的改善可能包括但不限于减少肿瘤负担、减少肿瘤细胞增殖、增加肿瘤细胞死亡、激活免疫通路、增加肿瘤进展时间、减少癌症疼痛、增加生存率或改善生活质量。

[0228] 在一些实施方案中,可以通过施用单剂量本文所述的组合物来实现有效剂量的施用。如本文所用,“剂量”是指一次递送的组合物的量。在一些实施方案中,重组RNA分子的剂量作为50%组织培养感染剂量(TCID₅₀)来测量。在一些实施方案中,TCID₅₀为至少约10³-10⁹TCID₅₀/mL,例如至少约10³TCID₅₀/mL、约10⁴TCID₅₀/mL、约10⁵TCID₅₀/mL、约10⁶TCID₅₀/mL、

约 10^7 TCID₅₀/mL、约 10^8 TCID₅₀/mL或约 10^9 TCID₅₀/mL。在一些实施方案中,可以通过给定体积中的颗粒数目(例如,颗粒/毫升)来测量剂量。在一些实施方案中,可以通过每个颗粒中存在的本文所述的RNA多核苷酸的基因组拷贝数进一步细化剂量(例如,颗粒数目/毫升,其中每个颗粒包含多核苷酸的至少一个基因组拷贝)。在一些实施方案中,有效剂量的递送可能需要施用多剂本文所述的组合物。这样,有效剂量的施用可能需要施用至少2剂、3剂、4剂、5剂、6剂、7剂、8剂、9剂、10剂、20剂、30剂、40剂、50剂或更多剂的本文所述的组合物。

[0229] 在施用多剂本文所述的组合物的实施方案中,每剂无需由相同的参与者施用和/或在相同的地理位置施用。此外,可以根据预定时间表来给药。例如,预定的给药方案可以包含每天、每隔一天、每周、每两周、每月、每两个月、每年、每半年一次等施用本文所述的组合物的剂量。可以根据给定患者的需要调整预定的给药方案(例如,可以增加或减少组合物的施用量)和/或可以增加或减少剂量的频率,和/或可以增加或减少总施用剂量次数)。

[0230] 如本文所用,“预防(prevention)”或“预防(prophylaxis)”是指完全预防疾病症状、延迟疾病症状发作或减轻随后发展的疾病症状的严重性。

[0231] 本文所用的术语“受试者”或“患者”是指根据本文所述的方法施用本文所述的组合物的任何哺乳动物受试者。在一个具体的实施方案中,本公开的方法用于治疗人类受试者。本公开的方法还可用于治疗非人灵长类动物(例如猴子、狒狒和黑猩猩)、小鼠、大鼠、牛、马、猫、狗、猪、兔子、山羊、鹿、绵羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、仓鼠、蝙蝠、鸟类(例如鸡、火鸡和鸭)、鱼类和爬行动物。

[0232] 本文中的“癌症”是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长不受调控为特征的生理疾患。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤(包括脂肪肉瘤、成骨肉瘤、血管肉瘤、内皮细胞肉瘤、平滑肌肉肉瘤、脊索瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内膜上皮肉瘤、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤和软骨肉瘤)、神经内分泌瘤、间皮瘤、滑膜瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、腺癌、黑色素瘤和白血病或淋巴样恶性病。这类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌);肺癌,包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌、小细胞肺癌瘤;腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃癌(包括胃肠道癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆道肿瘤、尤因氏肿瘤(Ewing's tumor)、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、威尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、睾丸肿瘤、肺癌瘤、膀胱癌瘤、上皮癌瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、骨髓增生异常疾病、重链病、神经内分泌肿瘤、神经鞘瘤和其它癌以及头颈癌。在一些实施方案中,癌症是神经内分泌癌。此外,良性(即非癌性)过度增生性疾病、病症和疾患,包括良性前列腺肥大(BPH)、脑膜瘤、神经鞘瘤、神经纤维瘤病、瘢痕、肌瘤和子宫肌瘤等也可以使用本文公开的公开内容进行治疗。

[0233] 其它编号实施方案

[0234] 本发明的其它编号实施方案如下:

[0235] 实施方案1:一种脂质纳米颗粒(LNP),所述脂质纳米颗粒包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组。

[0236] 实施方案2:实施方案1的LNP,其中所述溶瘤病毒是单链RNA(ssRNA)病毒。

[0237] 实施方案3:实施方案1的LNP,其中所述溶瘤病毒是正义((+)-义)ssRNA病毒。

[0238] 实施方案4:实施方案3的LNP,其中所述(+)-义ssRNA病毒是小核糖核酸病毒。

[0239] 实施方案5:实施方案4的LNP,其中所述小核糖核酸病毒是塞内加谷病毒(SVV)或柯萨奇病毒。

[0240] 实施方案6:实施方案5的LNP,其中所述SVV是选自野生型SVV-A(SEQ ID NO:1)、S177A-SVVA突变体(SEQ ID NO:2)、SVV-IR2突变体(SEQ ID NO:3)和SVV-IR2-S177A突变体(SEQ ID NO:4)的SVV-A。

[0241] 实施方案7:实施方案5的LNP,其中所述柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。

[0242] 实施方案8:实施方案5的LNP,其中所述柯萨奇病毒是包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。

[0243] 实施方案9:实施方案1-8中的任一项的LNP,其中使所述LNP与细胞接触引起所述细胞产生病毒颗粒,并且其中所述病毒颗粒是感染性的和溶解性的。

[0244] 实施方案10:实施方案1-9中的任一项的LNP,其中所述合成RNA病毒基因组还包含编码外源有效负载蛋白的异源多核苷酸。

[0245] 实施方案11:实施方案1-9中的任一项的LNP,所述LNP还包含编码外源有效负载蛋白的重组RNA分子。

[0246] 实施方案12:实施方案10或11的LNP,其中所述外源有效负载蛋白是荧光蛋白、酶蛋白、细胞因子、趋化因子、能够结合于细胞表面受体的抗原结合分子或细胞表面受体的配体。

[0247] 实施方案13:实施方案12的LNP,其中所述细胞因子选自IL-12、GM-CSF、IL-18、IL-2和IL-36 γ 。

[0248] 实施方案14:实施方案12的LNP,其中所述细胞表面受体的配体是F1t3配体或TNFSF14。

[0249] 实施方案15:实施方案12的LNP,其中所述趋化因子选自CXCL10、CCL4、CCL21和CCL5。

[0250] 实施方案16:实施方案12的LNP,其中所述抗原结合分子能够结合于并且抑制免疫检查点受体。

[0251] 实施方案17:实施方案16的LNP,其中所述免疫检查点受体是PD-1。

[0252] 实施方案18:实施方案12的LNP,其中所述抗原结合分子能够结合于肿瘤抗原。

[0253] 实施方案19:实施方案18的LNP,其中所述抗原结合分子是双特异性T细胞衔接分子(BiTE)或双特异性轻T细胞衔接分子(LiTE)。

[0254] 实施方案20:实施方案18或19的LNP,其中所述肿瘤抗原是DLL3或EpCAM。

[0255] 实施方案21:实施方案1-20中的任一项的LNP,其中所述合成RNA病毒基因组和/或所述重组RNA分子包含微小RNA(miRNA)靶序列(miR-TS)盒,其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列。

[0256] 实施方案22:实施方案21的LNP,其中所述一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、

miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。

[0257] 实施方案23:实施方案22的LNP,其中所述miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷贝。

[0258] 实施方案24:实施方案22的LNP,其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。

[0259] 实施方案25:实施方案22的LNP,其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。

[0260] 实施方案26:实施方案22的LNP,其中所述miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。

[0261] 实施方案27:实施方案1-26中的任一项的LNP,其中所述LNP包含阳离子型脂质、一种或多种辅助脂质和磷脂-聚合物缀合物。

[0262] 实施方案28:实施方案27的LNP,其中所述阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA (MC3)、**COATSOME®** SS-LC (原名:SS-18/4PE-13)、**COATSOME®** SS-EC (原名:SS-33/4PE-15)、**COATSOME®** SS-OC、**COATSOME®** SS-OP、9-((4-二甲氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L-319)或N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)。

[0263] 实施方案29:实施方案27或28的LNP,其中所述辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);和胆固醇。

[0264] 实施方案30:实施方案27的LNP,其中所述阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中所述中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0265] 实施方案31:实施方案27-30中的任一项的LNP,其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇(DPG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

[0266] 实施方案32:实施方案27-31中的任一项的LNP,其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。

[0267] 实施方案33:实施方案27的LNP,其中所述阳离子型脂质包含**COATSOME®** SS-OC,其中所述一种或多种辅助脂质包含胆固醇(Chol)和DSPC,并且其中所述磷脂-聚合物缀合物包含DPG-PEG2000。

[0268] 实施方案34:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-25%,C=20%-30%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0269] 实施方案35:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=20%-25%,C=25%-30%,和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。

[0270] 实施方案36:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

[0271] 实施方案37:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0272] 实施方案37A:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=25%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0273] 实施方案37B:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-55%,B=10%-20%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0274] 实施方案38:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=10%-15%,C=35%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0275] 实施方案39:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是49:11:38.5:1.5。

[0276] 实施方案39A:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-65%,B=5%-20%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0277] 实施方案39B:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=50%-60%,B=5%-15%,C=30%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0278] 实施方案39C:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-15%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0279] 实施方案39D:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-10%,C=30%-35%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0280] 实施方案39E:实施方案33的LNP,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是58:7:33.5:1.5。

[0281] 实施方案40:实施方案1-39E中的任一项的LNP,其中所述LNP包含选自表5的脂质制剂。

[0282] 实施方案41:实施方案1-40中的任一项的LNP,其中透明质酸缀合于所述LNP的表

面。

[0283] 实施方案42:一种治疗性组合物,所述治疗性组合物包含多个根据权利要求1-41中的任一项的脂质纳米颗粒。

[0284] 实施方案43:实施方案42的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约500nm、约150nm至约500nm、约200nm至约500nm、约300nm至约500nm、约350nm至约500nm、约400nm至约500nm、约425nm至约500nm、约450nm至约500nm或约475nm至约500nm。

[0285] 实施方案43A:实施方案42的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约120nm。

[0286] 实施方案43B:实施方案42的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。

[0287] 实施方案43C:实施方案42的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约100nm。

[0288] 实施方案44:实施方案42-43C中的任一项的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约40mV至约-40mV、20mV至约-20mV、约10mV至约-10mV、约5mV至约-5mV或约20mV至约-40mV之间。

[0289] 实施方案45:实施方案42-43C中的任一项的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位小于约-20mV、小于约-30mV、小于约-35mV或小于约-40mV。

[0290] 实施方案46:实施方案45的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约-50mV至约-20mV、约-40mV至约-20mV或约-30mV至约-20mV之间。

[0291] 实施方案47:实施方案45或46的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位为约-30mV、约-31mV、约-32mV、约-33mV、约-34mV、约-35mV、约-36mV、约-37mV、约-38mV、约-39mV或约-40mV。

[0292] 实施方案48:实施方案42-47中的任一项的治疗性组合物,其中向受试者施用所述治疗性组合物将所述重组RNA多核苷酸递送至所述受试者的靶细胞,并且其中所述重组RNA多核苷酸产生能够溶解所述受试者的所述靶细胞的感染性溶瘤病毒。

[0293] 实施方案49:实施方案48的治疗性组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内或肿瘤内递送。

[0294] 实施方案50:实施方案48的治疗性组合物,其中所述靶细胞是癌细胞。

[0295] 实施方案51:一种抑制有需要的受试者中癌性肿瘤的生长方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用根据权利要求42-50中的任一项的治疗性组合物,其中所述组合物的施用抑制所述肿瘤的生长。

[0296] 实施方案52:实施方案51的方法,其中所述施用是肿瘤内或静脉内的。

[0297] 实施方案53:实施方案51或52的方法,其中所述癌症是肺癌、肝癌、黑色素瘤、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、髓母细胞瘤或膀胱癌。

[0298] 实施方案53A:实施方案51-53中的任一项的方法,其中所述癌症是神经内分泌癌症。

[0299] 实施方案54:一种重组RNA分子,所述重组RNA分子包含编码溶瘤病毒的合成RNA病毒基因组。

[0300] 实施方案55:实施方案54的重组RNA分子,其中所编码的溶瘤病毒是单链RNA

(ssRNA) 病毒

[0301] 实施方案56:实施方案55的重组RNA分子,其中所述ssRNA病毒是正义((+)-义)或负义((-)-义)ssRNA病毒。

[0302] 实施方案57:实施方案56的重组RNA分子,其中所述(+)-义ssRNA病毒是小核糖核酸病毒。

[0303] 实施方案58:实施方案57的重组RNA分子,其中所述小核糖核酸病毒是塞内加谷病毒(SVV)或柯萨奇病毒。

[0304] 实施方案59:实施方案58的重组RNA分子,其中所述SVV是选自野生型SVV-A (SEQ ID NO:1)、S177A-SVVA突变体 (SEQ ID NO:2)、SVV-IR2突变体 (SEQ ID NO:3) 或SVV-IR2-S177A (SEQ ID NO:4) 的SVV-A。

[0305] 实施方案60:实施方案58的重组RNA分子,其中所述柯萨奇病毒选自CVB3、CVA21和CVA9。

[0306] 实施方案61:实施方案58的重组RNA分子,其中所述柯萨奇病毒是包含SEQ ID NO:27的修饰的CVA21病毒。

[0307] 实施方案62:实施方案54-61中的任一项的重组RNA分子,其中所述重组RNA分子在通过非病毒性递送媒介物引入细胞中时能够产生感染性溶解病毒。

[0308] 实施方案63:实施方案54-62中的任一项的重组RNA分子,所述重组RNA分子还包含被插入编码所述溶瘤病毒的所述多核苷酸序列中的微小RNA(miRNA)靶序列(miR-TS)盒,其中所述miR-TS盒包含一种或多种miRNA靶序列,并且其中细胞中一种或多种相应miRNA的表达抑制所述细胞中所编码的病毒的复制。

[0309] 实施方案64:实施方案63的重组RNA分子,其中所述一种或多种miRNA选自miR-124、miR-1、miR-143、miR-128、miR-219、miR-219a、miR-122、miR-204、miR-217、miR-137和miR-126。

[0310] 实施方案65:实施方案64的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-124靶序列的一个或多个拷贝、miR-1靶序列的一个或多个拷贝和miR-143靶序列的一个或多个拷贝。

[0311] 实施方案66:实施方案64的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-219a靶序列的一个或多个拷贝和miR-122靶序列的一个或多个拷贝。

[0312] 实施方案67:实施方案64的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-128靶序列的一个或多个拷贝、miR-204靶序列的一个或多个拷贝和miR-219靶序列的一个或多个拷贝。

[0313] 实施方案68:实施方案64的重组RNA分子,其中所述miR-TS盒包含miR-217靶序列的一个或多个拷贝、miR-137靶序列的一个或多个拷贝和miR-126靶序列的一个或多个拷贝。

[0314] 实施方案69:实施方案54-68中的任一项的重组RNA分子,其中所述重组RNA分子在通过非病毒性递送媒介物引入细胞中时能够产生具有复制能力的溶瘤病毒。

[0315] 实施方案70:实施方案69的重组RNA分子,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0316] 实施方案71:实施方案70的重组RNA分子,其中所述细胞是哺乳动物受试者中存在的哺乳动物细胞。

[0317] 实施方案72:实施方案54-71中的任一项的重组RNA分子,其中所述具有复制能力的病毒选自自由以下组成的组:柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、塞内加谷病毒、拉沙病毒、鼠白血病病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、新城疫病毒、麻疹病毒、辛德毕斯病毒和马拉巴病毒。

[0318] 实施方案72A:实施方案54-71中的任一项的重组RNA分子,其中所述具有复制能力的病毒选自表1中所列出的那些病毒。

[0319] 实施方案73:实施方案63的重组RNA分子,其中所述一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。

[0320] 实施方案74:实施方案63的重组RNA分子,其中所述一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种非必需基因的5'非翻译区(UTR)或3'UTR中。

[0321] 实施方案74A:实施方案63的重组RNA分子,其中所述一个或多个miR-TS盒被并入一种或多种必需病毒基因的5'或3'。

[0322] 实施方案75:实施方案54-74A中的任一项的重组RNA分子,其中所述重组RNA分子被插入核酸载体中。

[0323] 实施方案76:实施方案75的重组RNA分子,其中所述核酸载体是复制子。

[0324] 实施方案77:实施方案54-76中的任一项的重组RNA分子,其中所述合成RNA病毒基因组还包含编码外源有效负载蛋白的异源多核苷酸。

[0325] 实施方案78:实施方案77的重组RNA分子,其中所述外源有效负载蛋白是荧光蛋白、酶蛋白、细胞因子、趋化因子、能够结合于细胞表面受体的抗原结合分子或能够结合于细胞表面受体的配体。

[0326] 实施方案79:实施方案78的重组RNA分子,其中所述细胞因子选自IL-12、GM-CSF、IL-18、IL-2和IL-36 γ 。

[0327] 实施方案80:实施方案78的重组RNA分子,其中所述细胞表面受体的配体是F1t3配体或TNFSF14。

[0328] 实施方案81:实施方案78的重组RNA分子,其中所述趋化因子选自CXCL10、CCL4、CCL21和CCL5。

[0329] 实施方案82:实施方案78的重组RNA分子,其中所述抗原结合分子能够结合于并且抑制免疫检查点受体。

[0330] 实施方案83:实施方案82的重组RNA分子,其中所述免疫检查点受体是PD-1。

[0331] 实施方案84:实施方案78的重组RNA分子,其中所述抗原结合分子能够结合于肿瘤抗原。

[0332] 实施方案85:实施方案84的重组RNA分子,其中所述抗原结合分子是双特异性T细胞衔接分子(BiTE)或双特异性轻T细胞衔接分子(LiTE)。

[0333] 实施方案86:实施方案84或85的重组RNA分子,其中所述肿瘤抗原是DLL3或EpCAM。

[0334] 实施方案87:一种重组DNA分子,所述重组DNA分子从5'至3'包含启动子序列、5'接合裂解序列、编码实施方案54-86中的任一项的重组RNA分子的多核苷酸序列和3'接合裂解序列。

[0335] 实施方案88:实施方案87的重组DNA分子,其中所述启动子序列是T7启动子序列。

[0336] 实施方案89:实施方案87或88的重组DNA分子,其中所述5'接合裂解序列是核酶序

列并且所述3'接合裂解序列是核酶序列。

[0337] 实施方案90:实施方案89的重组DNA分子,其中所述5'核酶序列是锤头状核酶序列并且其中所述3'核酶序列是肝炎δ病毒核酶序列。

[0338] 实施方案91:实施方案87或88的重组DNA分子,其中所述5'接合裂解序列是核酶序列并且所述3'接合裂解序列是限制酶识别序列。

[0339] 实施方案92:实施方案91的重组DNA分子,其中所述5'核酶序列是锤头状核酶序列、手枪状核酶序列或修饰的手枪状核酶序列。

[0340] 实施方案93:实施方案91或92的重组DNA分子,其中3'限制酶识别序列是IIS型限制酶识别序列。

[0341] 实施方案94:实施方案93的重组DNA分子,其中所述IIS型识别序列是SapI识别序列。

[0342] 实施方案95:实施方案87或88的重组DNA分子,其中所述5'接合裂解序列是RNAseH引物结合序列并且所述3'接合裂解序列是限制酶识别序列。

[0343] 实施方案96:一种产生实施方案54-86中的任一项的重组RNA分子的方法,所述方法包括体外转录实施方案87-95中的任一项的DNA分子以及纯化所得到的重组RNA分子。

[0344] 实施方案98:实施方案96的方法,其中所述重组RNA分子包含由合成RNA病毒基因组编码的溶瘤病毒天然的5'末端和3'末端。

[0345] 实施方案99:一种组合物,所述组合物包含有效量的实施方案54-86中的任一项的重组RNA分子和适合于施用至哺乳动物受试者的载体。

[0346] 实施方案100:一种颗粒,所述颗粒包含实施方案54-86中的任一项的重组RNA分子。

[0347] 实施方案101:实施方案100的颗粒,其中所述颗粒是生物可降解的。

[0348] 实施方案102:实施方案101的颗粒,其中所述颗粒选自由纳米颗粒、外泌体、脂质体和脂质体复合物组成的组。

[0349] 实施方案103:实施方案102的颗粒,其中所述外泌体是源自于完整外泌体或空外泌体的修饰外泌体。

[0350] 实施方案104:实施方案102的颗粒,其中所述纳米颗粒是包含阳离子型脂质、一种或多种辅助脂质和磷脂-聚合物缀合物的脂质纳米颗粒(LNP)。

[0351] 实施方案105:实施方案104的颗粒,其中所述阳离子型脂质选自DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA(MC3)、**COATSOME®SS-LC**(原名:SS-18/4PE-13)、**COATSOME®SS-EC**(原名:SS-33/4PE-15)、**COATSOME®SS-OC**、**COATSOME®SS-OP**、9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L-319)或N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)。

[0352] 实施方案106:实施方案104或105的颗粒,其中所述辅助脂质选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);和胆固醇。

[0353] 实施方案107:实施方案104的颗粒,其中所述阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中所述中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇

胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0354] 实施方案108:实施方案104-106中的任一项的颗粒,其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇(DPG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯(DMG-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

[0355] 实施方案109:实施方案104-108中的任一项的颗粒,其中所述磷脂-聚合物缀合物选自1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DSG-PEG5K);1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-5000(DMG-PEG5K);和1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。

[0356] 实施方案110:实施方案104的颗粒,其中所述阳离子型脂质包含COATSOME® SS-OC,其中所述一种或多种辅助脂质包含胆固醇(Chol)和DSPC,并且其中所述磷脂-聚合物缀合物包含DPG-PEG2000。

[0357] 实施方案111:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-25%,C=20%-30%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0358] 实施方案112:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=20%-25%,C=25%-30%,和D=0%-1%并且其中A+B+C+D=100%。

[0359] 实施方案113:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约49:22:28.5:0.5。

[0360] 实施方案114:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0361] 实施方案114A:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=40%-60%,B=10%-30%,C=25%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0362] 实施方案114B:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-55%,B=10%-20%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0363] 实施方案115:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是A:B:C:D,其中A=45%-50%,B=10%-15%,C=35%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0364] 实施方案116:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是49:11:38.5:1.5。

[0365] 实施方案116A:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=45%-65%,B=5%-20%,C=20%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0366] 实施方案116B:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=50%-60%,B=5%-15%,C=30%-45%,和D=0%-3%并且其中A+B+C+D=100%。

[0367] 实施方案116C:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-15%,C=30%-40%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0368] 实施方案116D:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是约A:B:C:D,其中A=55%-60%,B=5%-10%,C=30%-35%,和D=1%-2%并且其中A+B+C+D=100%。

[0369] 实施方案116E:实施方案110的颗粒,其中SS-OC:DSPC:Chol:DPG-PEG2K(占总脂质含量的百分比)的比率是58:7:33.5:1.5。

[0370] 实施方案117:实施方案100-116E中的任一项的颗粒,其中所述LNP包含选自表5的脂质制剂。

[0371] 实施方案118:实施方案104的颗粒,其中所述阳离子型脂质是1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),并且其中所述中性脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0372] 实施方案119:实施方案104或118的颗粒,所述颗粒还包含磷脂-聚合物缀合物,其中所述磷脂-聚合物缀合物是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚(乙二醇)(DSPE-PEG)或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](DSPE-PEG-胺)。

[0373] 实施方案120:实施方案104-119中的任一项的颗粒,其中透明质酸缀合于所述LNP的表面。

[0374] 实施方案121:实施方案104-119中的任一项的颗粒,所述颗粒还包含编码有效负载分子的第二重组RNA分子。

[0375] 实施方案122:实施方案121的颗粒,其中所述第二重组RNA分子是复制子。

[0376] 实施方案123:实施方案122的颗粒,其中所述第二重组RNA分子是 α 病毒复制子。

[0377] 实施方案124:一种治疗性组合物,所述治疗性组合物包含多个根据权利要求104-123中的任一项的脂质纳米颗粒。

[0378] 实施方案125:实施方案124的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约500nm、约150nm至约500nm、约200nm至约500nm、约300nm至约500nm、约350nm至约500nm、约400nm至约500nm、约425nm至约500nm、约450nm至约500nm或约475nm至约500nm。

[0379] 实施方案125A:实施方案124的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm至约120nm。

[0380] 实施方案125B:实施方案124的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm或约120nm。

[0381] 实施方案125C:实施方案124的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均尺寸为约

100nm。

[0382] 实施方案126:实施方案124-125C中的任一项的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约40mV至约-40mV、约20mV至约-20mV、约10mV至约-10mV、约5mV至约-5mV或约20mV至约-40mV之间。

[0383] 实施方案127:实施方案124-125C中的任一项的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位小于约-20mV、小于约-30mV、小于约-35mV或小于约-40mV。

[0384] 实施方案128:实施方案124-125C中的任一项的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位介于约-50mV至约-20mV、约-40mV至约-20mV或约-30mV至约-20mV之间。

[0385] 实施方案129:实施方案124-125C中的任一项的治疗性组合物,其中所述多个LNP的平均 ζ -电位为约-30mV、约-31mV、约-32mV、约-33mV、约-34mV、约-35mV、约-36mV、约-37mV、约-38mV、约-39mV或约-40mV。

[0386] 实施方案130:实施方案124-129中的任一项的治疗性组合物,其中向受试者递送所述组合物将所包封的重组RNA分子递送至靶细胞,并且其中所包封的重组RNA分子产生能够溶解所述靶细胞的感染性病毒。

[0387] 实施方案131:实施方案130的治疗性组合物,其中所述组合物被配制用于静脉内或肿瘤内递送。

[0388] 实施方案132:实施方案131的治疗性组合物,其中所述靶细胞是癌细胞。

[0389] 实施方案133:一种无机颗粒,所述无机颗粒包含实施方案54-86中的任一项的重组多核苷酸。

[0390] 实施方案134:实施方案133的无机颗粒,其中所述无机颗粒选自由以下组成的组:金纳米颗粒(GNP)、金纳米棒(GNR)、磁性纳米颗粒(MNP)、磁性纳米管(MNT)、碳纳米角(CNH)、碳富勒烯、碳纳米管(CNT)、磷酸钙纳米颗粒(CPNP)、介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN)、二氧化硅纳米管(SNT)或星形中空二氧化硅纳米颗粒(SHNP)。

[0391] 实施方案135:实施方案133的无机颗粒,所述无机颗粒还包含编码有效负载分子的第二重组RNA分子。

[0392] 实施方案136:实施方案135的颗粒,其中所述第二重组RNA分子是复制子。

[0393] 实施方案137:一种组合物,所述组合物包含实施方案133-136中的任一项的无机颗粒,其中所述颗粒的平均直径小于约500nm,介于约50nm与约500nm之间,介于约250nm与约500nm之间,或为约350nm。

[0394] 实施方案138:一种杀死癌细胞的方法,所述方法包括使所述癌细胞暴露于实施方案1-41、100-123或133-136中的任一项的颗粒、实施方案54-86中的任一项的重组RNA分子或其组合物,所述暴露在足以将所述颗粒经细胞内递送至所述癌细胞的条件下,其中由所包封的多核苷酸产生的具有复制能力的病毒导致所述癌细胞的杀死。

[0395] 实施方案139:实施方案138的方法,其中所述具有复制能力的病毒不在非癌细胞中产生。

[0396] 实施方案140:实施方案138或139的方法,其中所述方法在体内、体外或离体进行。

[0397] 实施方案141:一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向罹患所述癌症的受试者施用有效量的实施方案1-41、100-123或133-136中的任一项的颗粒、实施方案54-86中的任一项的重组RNA分子或其组合物。

[0398] 实施方案142:实施方案141的方法,其中所述颗粒或其组合物经静脉内、鼻内、呈吸入剂施用,或直接注射至肿瘤中。

[0399] 实施方案143:实施方案141或142的方法,其中所述颗粒或其组合物重复施用至所述受试者。

[0400] 实施方案144:实施方案141-143中的任一项的方法,其中所述受试者是小鼠、大鼠、兔、猫、狗、马、非人灵长类动物或人。

[0401] 实施方案145:实施方案141-144中的任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠直肠癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、头颈癌、甲状腺癌、恶性胶质瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、肉瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、髓母细胞瘤、膀胱癌和边缘区淋巴瘤(MZL)。

[0402] 实施方案146:实施方案145的方法,其中所述肺癌是小细胞肺癌或非小细胞肺癌。

[0403] 实施方案147:实施方案145的方法,其中所述肝癌是肝细胞癌(HCC)。

[0404] 实施方案148:实施方案145的方法,其中所述前列腺癌是治疗突发性神经内分泌前列腺癌。

[0405] 实施方案148A:实施方案141-148中的任一项的方法,其中所述癌症是神经内分泌癌症。

[0406] 实施例

[0407] 给出以下实施例是为了说明本公开的各种实施方案,并不意味着以任何方式限制本公开。本发明的实施例;目前与本文所述的方法一起代表了优选的实施方案;是示例性的;并且不意图限制本公开的范围。本领域技术人员将想到其中的改变和包含在由权利要求书的范围所限定的本公开的精神内的其它用途。

[0408] 实施例1:从重组RNA分子产生感染性小核糖核酸病毒

[0409] 进行实验以评估从重组RNA分子产生感染性SVV病毒的能力。简单地说,包含SVV病毒基因组的RNA多核苷酸是通过体外T7转录产生的,并将293T细胞用1 μ g SVV RNA构建体在Lipofectamine RNAiMax中转染4小时,洗涤细胞,并将完全培养基添加到每个孔中。72小时后从转染的293T收集上清液,用0.45 μ M过滤器进行针筒式过滤并在NCI-H1299细胞上连续稀释。48小时后,从NCI-H1299培养物中去除上清液,并用结晶紫染色细胞以评估病毒感染性。如图1B所示,包含SVV-WT基因组的RNA分子产生活性溶解病毒。

[0410] 此外,72小时后收集用1 μ g SVV-WT RNA脂质、SVV-WT质粒DNA或SVV阴性pDNA对照物处理的NCI-H1299细胞的上清液,并在未感染的NCI-H1299细胞上连续稀释。根据标准方案进行细胞活力测定。如图2所示,SVV-WT RNA/LNP能够产生感染性病毒,引起体外肿瘤细胞溶解。

[0411] 实施例2:用于静脉内递送编码SVV的RNA的脂质纳米颗粒的配制

[0412] 包含SVV基因组的重组RNA分子被配制在脂质纳米颗粒中,用于体内递送RNA。

[0413] 脂质纳米颗粒产生:以下脂质用于脂质纳米颗粒的配制:

[0414] (a) D-Lin-MC3-DMA (MC3);

[0415] (b) N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);

[0416] (c) **COATSOME®**SS-LC(原名:SS-18/4PE-13);

- [0417] (d) **COATSOME®** SS-EC (原名:SS-33/4PE-15) ;
- [0418] (e) **COATSOME®** SS-0C;
- [0419] (f) **COATSOME®** SS-0P;
- [0420] (g) 二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L-319)
- [0421] (h) 胆固醇;
- [0422] (i) 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC);
- [0423] (j) 1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);
- [0424] (k) 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC);
- [0425] (l) 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE);
- [0426] (m) 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-5000](DSPE-PEG5K);
- [0427] (n) 1,2-二棕榈酰基-rac-甘油甲氧基聚乙二醇-2000(DPG-PEG2K);
- [0428] (o) 1,2-二硬脂酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DSG-PEG2K);以及
- [0429] (p) 1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油基-3-甲基聚氧乙烯-2000(DMG-PEG2K)。
- [0430] 在乙醇中以下表5所示的各种比率制备脂质。然后使用微流体微混合物(Precision NanoSystems,Vancouver,BC)以2mL/min(乙醇、脂质混合物为0.5mL/min,并且水性缓冲液、RNA为1.5mL/min)的组合流速产生RNA脂质纳米颗粒。用含有Ca和Mg的PBS通过切向流过滤来洗涤得到的颗粒。示例性SVV LNP制剂提供于表5中。除非另有指示,否则每个包装的RNA基因组均从包含5'锤头状核酶和3'肝炎δ核酶的IVT模板产生。
- [0431] 表5. 示例性SVV RNA脂质纳米颗粒

[0432]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
70001-5C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70009-1.C	SVV-Nc	PB, pH	MC3	胆固醇	DSPC	DSPE-PEG5	7

[0433]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
	g*	5.8	(49%)	(39.8%)	(11%)	K (0.2%)	
70009-2.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70009-3.C	SVV-S1 77A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70032-1.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70032-2.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (38.5%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (1.5%)	7
70032-3.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	5
70032-4.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	3
70032-5.C	SVV-W T	PB, pH 7.4	DOTA P (50%)	胆固醇 (34.8%)	DLPE (15%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	5.3 3
70032-6.C	CVA21	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70041-2.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-EC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70041-3.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70041-4.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70046-4.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-EC (56%)	胆固醇 (28.0%)	DOP C (9%)	DSG-PEG5 K (7%)	9
70046-5.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (56%)	胆固醇 (28.0%)	DOP C (9%)	DSG-PEG5 K (7%)	9
70046-6.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-OC (56%)	胆固醇 (28.0%)	DOP C (9%)	DSG-PEG5 K (7%)	9
70053-1.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70053-2.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70059-1.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-EC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70059-2.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-EC (49%)	胆固醇 (39.5%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.5%)	7
70059-3.C	SVV-W	MB, pH	SS-EC	胆固醇	DSPC	DSPE-PEG5	7

[0434]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
	T	3.0	(49%)	(39.0%)	(11%)	K (1.0%)	
70065-2.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.5%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (0.5%)	7
70065-3.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.0%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (1.0%)	7
70065-4.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (38.5%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (1.5%)	7
70065-5.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.5%)	DSPC (11%)	DMG-PEG5 K (0.5%)	7
70065-6.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.0%)	DSPC (11%)	DMG-PEG5 K (1.0%)	7
70070-1.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70070-4.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (0.2%)	7
70070-5.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (38.0%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (2.0%)	7
70070-6.C	SVV-W T	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (35.0%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (5.0%)	7
70077-3.C	SVV-S1 77A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70077-4.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70077-5.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (48.5%)	DSPC (2%)	DSG-PEG2 K (0.5%)	7
70077-6.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (48.0%)	DSPC (2%)	DPG-PEG2 K (1.0%)	7
70077-7.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (47.0%)	DSPC (2%)	DMG-PEG2 K (2.0%)	7
70077-8.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (38.5%)	DSPC (12%)	DMG-PEG2 K (0.5%)	7
70077-9.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (37.0%)	DSPC (12%)	DSG-PEG2 K (2.0%)	7
70077-10. C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7

[0435]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
70077-11.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.0%)	DSPC (22%)	DMG-PEG2 K (1.0%)	7
70087-1.C	SVV-S1 77A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70087-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (11%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
70087-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (11%)	DSG-PEG2 K (0.5%)	7
70087-4.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2 K (0.5%)	7
70087-5.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (27.0%)	DSPC (11%)	DPG-PEG2 K (1.5%)	7
80010-1.C	SVV-S1 77A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
80010-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80010-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DMG-PEG2 K (0.5%)	7
80010-4.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DSG-PEG2 K (0.5%)	7
80010-5.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.0%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (1.0%)	7
80016-1.C	SVV-S1 77A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
80016-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	MC3 (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80016-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (26.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	5.5
80016-6.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80016-7.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (27.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (1.5%)	7
80016-9.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	L-319 (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DMG-PEG2 K (0.2%)	7
80016-10.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	L-319 (49%)	胆固醇 (27.5%)	DSPC (22%)	DMG-PEG2 K (1.5%)	7
80016-11.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	L-319 (49%)	胆固醇 (26.5%)	DSPC (22%)	DMG-PEG2 K (2.5%)	7
80033-1.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80033-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7

[0436]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
80033-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OP (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80048-1.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (35.5%)	DSPC (15%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	9
80048-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	5
80048-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (21.5%)	DSPC (29%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80048-4.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (21.5%)	DOPE (29%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	5
80048-5.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DOPE (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	9
80048-6.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (35.5%)	DOPE (15%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80048-7.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (35.5%)	DLPE (15%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	5
80048-8.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DLPE (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80048-9.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (21.5%)	DLPE (29%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	9
80059.1.C	SVV-Neg [*]	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DLPE (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80059-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DLPE (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80130-1.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80130-2.C	SVV-IR ES2	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80130-3.C	SVV-W T 手枪 1/ SapI	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7
80139-1.C	SVV-W T	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2 K (0.5%)	7

[0437] *SVV-neg构建体由不含核酶的IVT模板产生

[0438] 脂质纳米颗粒的物理特性分析:表5中的脂质纳米颗粒的物理特性在切向流过滤之前和之后进行评估。使用Malvern Nano-ZS ζ 粒度仪 (Malvern Instruments有限公司, Worcestershire, UK) 通过光散射测定粒度分布和 ζ 电位。尺寸测量在pH 7.4的HBS中进行, 并且 ζ 电位测量在pH 7.4的0.01M HBS中进行。通过Ribogreen测定法测量RNA截留百分比。对显示超过80%的RNA截留的脂质纳米颗粒进行体内测试。

[0439] 各种脂质纳米颗粒制剂的物理特性示于下表6中。

[0440] 表6. SVV RNA脂质纳米颗粒的物理特性

[0441]

制剂 ID	RNA	Z-平均值 (d.nm)	PdI	ZP (mV)	EE (%)
70001-5.C	SVV-WT	145	0.17	0.2	
70009-1.C	SVV-Neg	207	0.09	-0.7	
70009-2.C	SVV-WT	226	0.10	-2.8	
70009-3.C	SVV-S177A	232	0.13	-1.9	
70032-1.C	SVV-WT	148	0.15	1.4	
70032-2.C	SVV-WT	99	0.36	1.4	
70032-3.C	SVV-WT	169	0.14	-1.6	
70032-4.C	SVV-WT	208	0.07	2.0	
70032-5.C	SVV-WT	383	0.22	-8.8	
70032-6.C	CVA21	189	0.25	-1.0	
70041-2.C	SVV-WT	104	0.06	-2.1	
70041-3.C	SVV-WT	124	0.05	0.5	
70041-4.C	SVV-WT	134	0.04	-1.9	
70046-4.C	SVV-WT	235	0.10	-1.0	
70046-5.C	SVV-WT	127	0.05	-3.0	
70046-6.C	SVV-WT	131	0.07	-0.9	
70053-1.C	SVV-WT	216	0.10	-0.4	
70053-2.C	SVV-WT	141	0.10	-13.6	
70059-1.C	SVV-WT	166	0.22	-1.8	81
70059-2.C	SVV-WT	116	0.24	-1.4	92
70059-3.C	SVV-WT	133	0.22	-1.2	88
70065-2.C	SVV-WT	153	0.21	-0.8	84
70065-3.C	SVV-WT	181	0.23	0.0	62
70065-4.C	SVV-WT	197	0.34	-2.0	44
70065-5.C	SVV-WT	158	0.13	-1.3	30
70065-6.C	SVV-WT	144	0.15	-3.0	32
70070-1.C	SVV-WT	237	0.10	-0.8	80
70070-4.C	SVV-WT	442	0.22	0.0	87
70070-5.C	SVV-WT	132	0.29	-0.4	92

[0442]

制剂 ID	RNA	Z-平均值 (d.nm)	PdI	ZP (mV)	EE (%)
70070-6.C	SVV-WT	87	0.18	0.0	68
70077-3.C	SVV-S177A	222	0.13	-1.6	93
70077-4.C	SVV-S177A	160	0.06	-3.8	82
70077-5.C	SVV-S177A	292	0.19	-25.4	39
70077-6.C	SVV-S177A	205	0.09	-12.3	45
70077-7.C	SVV-S177A	133	0.08	-7.5	41
70077-8.C	SVV-S177A	158	0.10	-5.0	90
70077-9.C	SVV-S177A	128	0.12	-2.4	79
70077-10.C	SVV-S177A	110	0.14	-3.9	97
70077-11.C	SVV-S177A	132	0.19	-5.2	83
70087-1.C	SVV-S177A	224	0.14	-13.2	87
70087-2.C	SVV-S177A	154	0.08	-15.6	86
70087-3.C	SVV-S177A	149	0.03	-10.0	88
70087-4.C	SVV-S177A	145	0.08	-5.4	89
70087-5.C	SVV-S177A	148	0.05	-2.6	68
80010-1.C	SVV-S177A	235	0.09	-2.7	82
80010-2.C	SVV-S177A	91	0.05	-4.6	93
80010-3.C	SVV-S177A	93	0.11	-8.6	92
80010-4.C	SVV-S177A	110	0.03	-4.2	94
80010-5.C	SVV-S177A	99	0.09	-4.1	95
80016-1.C	SVV-S177A	231.5	0.12	-2.2	91
80016-2.C	SVV-S177A	131.0	0.18	-6.5	96
80016-3.C	SVV-S177A	84.7	0.14	-13.4	83
80016-6.C	SVV-S177A	94.9	0.14	-12.1	93
80016-7.C	SVV-S177A	92.1	0.18	-19.6	92
80016-9.C	SVV-S177A	155.0	0.17	-9.4	22
80016-10.C	SVV-S177A	108.6	0.19	-9.2	34
80016-11.C	SVV-S177A	123.8	0.18	-8.9	19
80033-1.C	SVV-S177A	115	0.22	-14.3	88
80033-2.C	SVV-S177A	143	0.23	-15.9	92
80033-3.C	SVV-S177A	105	0.22	-12.5	95
80048-1.C	SVV-S177A	106.4	0.13	-15.7	90
80048-2.C	SVV-S177A	96.4	0.15	-19.4	89
80048-3.C	SVV-S177A	99.9	0.20	-6.5	95
80048-4.C	SVV-S177A	219.2	0.11	-6.3	29
80048-5.C	SVV-S177A	257.0	0.09	-2.9	20
80048-6.C	SVV-S177A	257.7	0.12	-6.6	28
80048-7.C	SVV-S177A	186.1	0.14	-7.9	61

[0443]

制剂 ID	RNA	Z-平均值 (d.nm)	PdI	ZP (mV)	EE (%)
80048-8.C	SVV-S177A	172.1	0.20	-6.7	72
80048-9.C	SVV-S177A	153.9	0.22	-5.4	84
80059.1.C	SVV-Neg	84.39	0.12	-7.7	91
80059-2.C	SVV-S177A	84.33	0.11	-8.3	93
80130-1.C	SVV-WT	98.8	0.15	2.7	97
80130-2.C	SVV-IRES2	91.9	0.12	2.8	98
80130-3.C	SVV-手枪 1/ SapI	112.6	0.21	8.3	98
80139-1.C	SVV-WT	111.5	0.22	1.6	95

[0444] 如图3A-图3D和表6所示,脂质组成和脂质比例的变化会改变纳米颗粒的大小和/或RNA截留。在下面描述的实施例4-18中对显示超过80%的RNA截留的脂质纳米颗粒进行了体内测试。

[0445] 实施例3:包含编码SVV的RNA的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒并抑制肿瘤生长

[0446] 进行实验以确定包含SVV-WT RNA的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒以抑制小鼠肿瘤生长的能力。

[0447] 如实施例3中所述进行SVV RNA脂质纳米颗粒产生、配制和物理特性分析,并总结在下表7中。

[0448] 表7.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

[0449]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂 质(%)	PEG 化 的脂质 (%)	N:P
70001-5C	SVV-WT	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PE G5K (0.2%)	7

[0450] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞悬浮在0.1mL无血清DPBS和Matrigel (1:1v/v) 中并经皮下接种在8周龄雌性无胸腺裸小鼠(Charles River Laboratories)的右侧腰窝中。小鼠被随机分配到实验组中,当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 (120-180 mm^3 范围) 时开始处理。

[0451] 在第1天和第8天静脉内施用两剂含有SVV-WT RNA的脂质纳米颗粒(每剂5 μg)。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。在第16天,收获肿瘤用于评估感染性病毒。

[0452] 如图4A所示,与用PBS处理的小鼠相比,用SVV-WT脂质纳米颗粒处理的小鼠显示肿瘤生长显著降低(双向RM ANOVA, $p < 0.0001$)。此外,如图4B所示,用SVV-WT脂质纳米颗粒处理不影响体重,这表明了脂质纳米颗粒在静脉内施用时无毒的。图5A和图5B展示了静脉内给与SVV-WT脂质纳米颗粒后感染性SVV从肿瘤中恢复。

[0453] 实施例4:包含功能获得型编码SVV的RNA的颗粒抑制肿瘤生长

[0454] 进行实验以确定包含具有功能获得型突变的编码SVV的RNA分子(SVV-S177A)的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒以抑制小鼠肿瘤生长的能力。

[0455] 如实施例3中所述进行SVV RNA脂质纳米颗粒产生、配制和物理特性分析,并总结在下表8中。

[0456] 表8.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N: P
[0457] 70009-1.C	SVV-Neg	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70009-2.C	SVV-WT	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7
70009-3.C	SVV-S177A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5 K (0.2%)	7

[0458] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例3中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下接种在8周龄雌性无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。小鼠被随机分配到4个实验组中: (i) 仅PBS; (ii) SVV-阴性 (SVV-Neg, 制剂ID: 70009-1.C); (iii) SVV (野生型, 制剂ID: 70009-2.C) 和 (iv) SVV-S177A (制剂ID: 70009-3.C)。SVV-Neg脂质纳米颗粒由无法复制的RNA分子构成,但大小与SVV-WT和SVV-S177A RNA相似。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 时,在第1天静脉内施用脂质纳米颗粒 (每剂 $5\mu\text{g}$),然后在第6天、第11天和第16天进行另外的处理。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。在第22天,处死小鼠,并收获肿瘤和肝脏组织,以通过使用qRT-PCR测量负链SVV RNA (复制SVV的替代标记) 的存在来确定复制的感染性病毒的存在。

[0459] 如图6A所示,与用SVV-Neg脂质纳米颗粒或PBS处理的小鼠相比,用SVV-WT或SVV-S177A脂质纳米颗粒处理的小鼠显著抑制肿瘤生长 ($p < 0.05$, 双向ANOVA)。在整个研究过程中,施用SVV脂质纳米颗粒对体重的影响最小 (图6B),这表明包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒是无毒并且耐受良好的。

[0460] 在用包含SVV-WT或SVV-S177A RNA分子的脂质纳米颗粒处理的小鼠的肿瘤组织中检测到SVV的主动复制 (图6C)。重要的是,在任何处理组的肝脏组织中都没有发生主动病毒复制,包括接受了能够在肿瘤组织中产生感染性病毒的脂质纳米颗粒的小鼠 (图6D)。

[0461] 实施例5: 包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长

[0462] 进行实验以确定包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒和抑制肿瘤生长的能力。

[0463] 实施例2和下表9中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和物理特性分析。

[0464] 表9.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

[0465]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
70053-1.C	SVV-WT	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG 5K (0.2%)	7
70053-2.C	SVV-WT	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG 5K (0.2%)	7
70059-1.C	SVV-WT	MB, pH 3.0	SS-EC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG 5K (0.2%)	7
70059-2.C	SVV-WT	MB, pH 3.0	SS-EC (49%)	胆固醇 (39.5%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG 5K (0.5%)	7

[0466] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个H1299细胞经皮下接种于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 时,在第1天和第6天向小鼠静脉内施用两剂 $5\mu\text{g}$ 的包含MC-3、SS-LC或SS-EC可电离的脂质的SVV脂质纳米颗粒(制剂示于上表9中)。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。在第12天,收获肿瘤组织,并使用qRT-PCR分析负链SVV RNA(复制SVV的替代标记)的存在。

[0467] 如图7所示,与用PBS处理的小鼠相比,用基于MC3的脂质纳米颗粒(制剂ID:70053-1.C)处理的小鼠表现出显著的肿瘤生长抑制(F检验以比较方差,** $p < 0.01$)。然而,基于SS-LC或基于SS-EC的脂质纳米颗粒(制剂ID:70053-2.C、70059-1.C或70059-2.C)对肿瘤生长没有抑制作用。这些数据表明,基于MC3的脂质纳米颗粒将编码SVV的RNA分子递送至肿瘤组织,引起感染性病毒的产生和体内肿瘤溶解。

[0468] 实施例6:包含编码SVV的RNA的脂质纳米颗粒在小细胞肺癌中的体内功效

[0469] 进行实验以确定包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒和抑制小细胞肺癌(SCLC)生长的能力。

[0470] 实施例2和下表10中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和物理特性分析。

[0471] 表10.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

[0472]

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
70087-1.C	SVV-S 177A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5K (0.2%)	7

[0473] 使用H82异种移植模型测试编码SVV的RNA脂质纳米颗粒对SCLC的体内功效。简单地说,将NCI-H82细胞(1×10^6 个细胞/ 0.1mL 于1:1无血清PBS与Matrigel®的混合物中)经皮下接种在8周龄雌性无胸腺裸小鼠(Charles River Laboratories)的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 ($120\text{-}180\text{mm}^3$ 范围)时,小鼠开始处理,并且在第1天、第6天、第11天和第16天静脉内施用 $10\mu\text{g}$ SVV-WT脂质纳米颗粒(制剂ID:70087-1C),或第1天和第4天内施用与Lipofectamine RNAiMax(阳性对照物)一起配制的 $1\mu\text{g}$ SVV-WT RNA。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。

[0474] 如图8所示,与用PBS处理的小鼠相比,用SVV-WT脂质纳米颗粒或Lipofectamine配制的SVV-WT RNA处理的小鼠显示出显著的肿瘤生长抑制(双向ANOVA $p < 0.05$)。这些结果表明,静脉内施用包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒或瘤内施用Lipofectamine配制的编码SVV的RNA分子可有效启动肿瘤组织中的病毒复制,引起肿瘤细胞溶解。

[0475] 实施例7:脂质组成的变化会改变编码SVV的RNA纳米颗粒的抗肿瘤活性

[0476] 进行实验以确定包含编码SVV的RNA分子的纳米颗粒的脂质组成是否影响体内病毒复制和抗肿瘤活性。

[0477] 实施例2和下表11中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和物理特性分析。

[0478] 表11.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

[0479]

制剂 ID	RNA	可电离的脂质	胆固醇	辅助脂质	PEG 化的脂质 (%)	N:P
70077-3.C	SVV-S1 77A	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PE G5K (0.2%)	7
70077-4.C	SVV-S1 77A	SS-OC (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PE G5K (0.2%)	7
70077-8.C	SVV-S1 77A	SS-OC (49%)	胆固醇 (38.5%)	DSPC (12%)	DMG-PE G2K (0.5%)	7
70077-10. C	SVV-S1 77A	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
70077-11. C	SVV-S1 77A	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.0%)	DSPC (22%)	DMG-PE G2K (1.0%)	7

[0480] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下接种于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 时,在第1天和第6天向小鼠静脉内施用 $5\mu\text{g}$ 脂质纳米颗粒(制剂示于上表11中)。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。在第12天,收获肿瘤组织,并使用qRT-PCR分析负链SVV RNA(复制SVV的替代标记)的存在。

[0481] 如图9A所示,与用PBS处理的小鼠相比用基于MC3和基于OC的脂质纳米颗粒(制剂ID:70077-3.C、70077-4.C、70077-8.C、70077-10.C和70077-11.C)处理的小鼠显著抑制肿瘤生长(双向ANOVA,图基多重比较检验(Tukey's multiple comparison test),****:对比PBS, $p < 0.0001$)。来自用不同脂质纳米颗粒制剂处理的小鼠的肿瘤组织显示存在负链SVV RNA,这证实静脉内施用SVV-WT RNA脂质纳米颗粒诱导肿瘤组织中的病毒复制(图9D)。基于MC3的脂质纳米颗粒导致体重减轻和肝酶AST和ALT增加,而基于OC的脂质纳米颗粒不影响这些参数(图9B和图9C)。总的来说,这些数据表明基于OC的脂质纳米颗粒制剂显著抑制肿瘤生长,并且在小鼠中具有良好的耐受性。

[0482] 实施例8:PEG组成改变脂质纳米颗粒的抗肿瘤活性

[0483] 进行实验以确定包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒的PEG组成是否影响体内病毒复制和抗肿瘤活性。

[0484] 实施例2和下表12中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和物理特性分析。

[0485] 表12.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

	制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
[0486]	70087-1.C	SVV-S 177A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PEG5K (0.2%)	7
	70087-2.C	SVV-S 177A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (11%)	DPG-PEG2K (0.5%)	7
	70087-3.C	SVV-S 177A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (11%)	DSG-PEG2K (0.5%)	7
	70087-4.C	SVV-S 177A	MB, pH 3.0	SS-OC (60%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (11%)	DMG-PEG2K (0.5%)	7

[0487] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下接种于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 时,在第1天、第6天、第11天和第16天向小鼠静脉内施用两剂包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒(每剂 $5\mu\text{g}$)。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。

[0488] 如图10所示,与用PBS处理的小鼠相比,用制剂70087-1.C和70087-4.C(表12)处理的小鼠表现出显著的肿瘤生长抑制(双向ANOVA,图基多重比较检验,对比PBS,****: $p < 0.0001$,和***: $p < 0.001$)。制剂70087-2.C和70087-3.C与70087-4.C的不同之处仅在于制剂中使用的PEG化脂质的类型不同(表12)。这些发现表明PEG化脂质的类型可以对编码SVV的RNA纳米颗粒的抗肿瘤活性产生显著影响。

[0489] 实施例9:PEG组成改变基于OC的脂质纳米颗粒的抗肿瘤活性

[0490] 进行实验以确定包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒的PEG组成是否影响体内病毒复制和抗肿瘤活性。

[0491] 实施例2和下表13中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和物理特性分析。

[0492] 表13.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

	制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
[0493]	80010-1.C	SVV-S1 77A	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-PE G5K (0.2%)	7
	80010-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
	80010-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DMG-PE G2K (0.5%)	7
	80010-4.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DSG-PEG 2K (0.5%)	7
	80010-5.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.0%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (1.0%)	7

[0494] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下施用于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 时,向小鼠静脉内施用 $5\mu\text{g}$ 含有DSPE-PEG5K或DPG-、DMG-或DSG-PEG2K(制剂示于表13中)的SVV RNA脂质纳米颗粒。处理后72小时从小鼠中收集肿瘤组织,并使用qRT-PCR分析负链SVV RNA(复制SVV的替代标记)的存在。

[0495] 如图11所示,制剂中使用的PEG类型可以改变纳米颗粒将SVV基因组有效递送至肿瘤组织的能力。用制剂80010-2.C、80010-3.C和80010-4.C处理的小鼠的肿瘤显示出更多数目的SVV负(-)链或SVV复制。制剂80010-2.C、80010-3.C、80010-4.C和80010-5.C的不同之处仅在于制剂中使用的脂质-PEG的类型和百分比。这表明PEG类型的选择和使用的百分比会对这些纳米颗粒的生物活性产生重大影响。

[0496] 实施例10:可电离的脂质的组成改变脂质纳米颗粒的抗肿瘤活性

[0497] 进行实验以确定可电离的脂质的组成是否影响包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒在体内的抗肿瘤活性。

[0498] 实施例2和下表14中描述脂质纳米颗粒的产生、配制和SVV RNA脂质纳米颗粒的物理特性分析。

[0499] 表14.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

	制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
[0500]	80033-1.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
	80033-2.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
	80033-3.C	SVV-S1 77A	MB, pH 3.0	SS-OP (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7

[0501] 使用H1299异种移植模型评估SVV RNA纳米颗粒的可电离的脂质的组成抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下施用于

无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约150mm³时,在研究的第1天和第8天向小鼠静脉内施用1mg/kg包含SS-OC(制剂ID:80033-1.C)、SS-LC(制剂ID:80033-2.C)或SS-OP(制剂ID:80033-3.C)可电离的脂质的SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。

[0502] 如图12所示,与用PBS或基于SS-LC的脂质纳米颗粒处理的小鼠相比用基于SS-OC或基于SS-OP的脂质纳米颗粒处理的小鼠显示显著的肿瘤生长抑制(双向ANOVA,图基多重比较检验,对比PBS,*p<0.05,**p<0.001)。这些结果表明可电离的脂质的组成影响体内SVV RNA脂质纳米颗粒的抗肿瘤活性。

[0503] 实施例11:包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒在小细胞肺癌中的体内功效

[0504] 进行实验以确定包含编码SVV的RNA分子的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒和抑制小细胞肺癌(SCLC)生长的能力。

[0505] 实施例2和下表15中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和物理特性分析。

[0506] 表15.SVV-RNA脂质纳米颗粒制剂

	制剂ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质(%)	胆固醇(%)	辅助脂质(%)	PEG化的脂质(%)	N:P
[0507]	80059-1.C	SVV-Neg	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DLPE (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
	80059-2.C	SVV-S177A	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DLPE (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7

[0508] 使用H446异种移植模型测试编码SVV的RNA脂质纳米颗粒对SCLC的体内功效。简单地说,将NCI-H446细胞(5×10⁶个细胞/0.1mL于1:1无血清PBS与Matrigel®的混合物中)经皮下接种在8周龄雌性无胸腺裸小鼠(Charles River Laboratories)的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约150mm³(120-180mm³范围)时,在第1天、第8天和第15天向小鼠静脉内施用1mg/kg SVV-Neg(制剂ID:80059-1.C)或SVV-S177A(制剂ID:80059-2.C)RNA脂质纳米颗粒或PBS。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。在第22天,收获肿瘤,并使用qRT-PCR分析负链SVV RNA(复制SVV的替代标记)的存在。

[0509] 如图13A所示,与用SVV-Neg脂质纳米颗粒或PBS处理的小鼠相比,用SVV-S177A脂质纳米颗粒处理的小鼠表现出显著的肿瘤生长抑制(双向ANOVA,p<0.001)。重要的是,编码SVV的RNA脂质纳米颗粒的静脉内施用对体重没有影响,这表明这些剂无毒并且耐受性良好(图13B)。来自用SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒处理的小鼠的肿瘤组织显示存在负链SVV RNA,这表明静脉内施用SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒诱导肿瘤组织中的病毒复制(图13C)。这些结果表明,SVV-S177A RNA脂质纳米颗粒的全身施用引起体内SCLC细胞的SVV复制和溶解。

[0510] 实施例12:SVV-IRES2 RNA脂质纳米颗粒对肿瘤生长的体内功效

[0511] 进行实验以确定含有SVV-IRES2 RNA的脂质纳米颗粒是否可以抑制体内肿瘤生长。

[0512] 实施例2和下表16中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和分析。

[0513] 表16.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

	制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
[0514]	80130-1.C	SVV-WT	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
	80130-2.C	SVV-IRES2	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7

[0515] 使用H1299异种移植模型评估SVV-WT和SVV-IRES2脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下施用于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 时,向小鼠静脉内施用 0.2mg/kg 含有SVV-WT(制剂ID:80130-1.C)或SVV-IRES2(制剂ID:80130-2.C)RNA分子的脂质纳米颗粒(第1天)。在研究的第8天施用后续剂量的PBS或脂质纳米颗粒。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。

[0516] 如图14所示,与用PBS处理的小鼠相比,用SVV-WT RNA或SVV-IRES2 RNA脂质纳米颗粒处理的小鼠表现出显著更低的肿瘤负荷(双向ANOVA,图基多重比较检验,*** $p < 0.0001$)。这些结果表明,含有SVV-WT或SVV-IRES2 RNA分子的脂质纳米颗粒在体内表现出抗肿瘤活性,其中SVV-IRES2表现出最好的抗肿瘤作用。

[0517] 实施例13:含有编码SVV IRES2的RNA分子的脂质纳米颗粒能够在神经母细胞瘤肿瘤中复制

[0518] 进行实验以确定SVV-WT和SVV-IRES2 RNA脂质纳米颗粒在体内复制的能力。

[0519] 实施例2和下表17中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和分析。

[0520] 表17.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

	制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
[0521]	80130-1.C	SVV-WT	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
	80130-2.C	SVV-IRES2	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7

[0522] 使用N1E-115异种移植模型评估SVV-WT和SVV-IRES2脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力。简单地说,将N1E-115细胞(5×10^5 个细胞/ 0.1mL 于1:1无血清DPBS与Matrigel的混合物中)经皮下接种在8周龄雌性A/J小鼠(Charles River Laboratories)的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 ($120\text{--}180\text{mm}^3$ 范围)时,向小鼠静脉内施用 0.4mg/kg SVV-WT(制剂ID:80130-1.C)或SVV-IRES2(制剂ID:80130-2.C)RNA脂质纳米颗粒(第1天)。在脂质纳米颗粒处理后96小时从小鼠中收获肿瘤,并使用qRT-PCR分析负链SVV RNA(复制SVV的替代标记)的存在。

[0523] 如图15所示,与PBS对照物相比,施用SVV-WT或SVV-IRES2RNA脂质纳米颗粒的小鼠显示出高10-1000倍的负链SVV RNA水平。值得注意的是,与施用SVV-WT RNA脂质纳米颗粒的小鼠相比,来自用SVV-IRES2脂质纳米颗粒处理的小鼠的大部分肿瘤组织表现出更高水平的SVV复制。这些结果表明SVV-WT或SVV-IRES2 RNA脂质纳米颗粒的全身施用引起体内神

经母细胞瘤肿瘤中的SVV复制。

[0524] 实施例14:产生针对SVV的中和兔多克隆抗体

[0525] 兔多克隆抗体是通过用SVV病毒粒子对兔进行免疫接种而产生的。ELISA证实免疫兔血清中存在抗SVV抗体(数据未显示)。

[0526] 为了确定抗SVV抗体是否能抑制细胞溶解,将SVV病毒(1×10^6 TCID₅₀/mL)和抗SVV抗体的系列稀释液(1:2)在H446细胞上孵育。H446细胞的溶解活性通过CellTiter-Glo®计算。图16A展示了在稀释度高达1:320下SVV被兔多克隆抗体中和。

[0527] 为了确定兔抗SVV多克隆抗体的1:100稀释液的有效性,将不同浓度的SVV病毒和稀释的SVV抗体(1:100)在H446细胞上孵育。如图16B所示,测试所有剂量的SVV病毒,范围从 10^2 至 10^7 TCID₅₀/mL,被抗SVV抗体的1:100稀释液中和。1组、2组和3组是抗体稀释液的生物学重复。

[0528] 实施例15:SVV-RNA脂质纳米颗粒在中和血清存在下表现出抗肿瘤活性

[0529] 在体内存在SVV中和抗体的情况下测试SVV RNA脂质纳米颗粒。

[0530] 实施例14中描述抗SVV多克隆抗体的产生和测试。实施例2和下表18中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和分析。

[0531] 表18.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
80139-1.C	SVV-WT	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG2K (0.5%)	7

[0533] 使用H1299异种移植模型评估抗SVV抗体抑制由SVV RNA脂质纳米颗粒诱导的肿瘤细胞溶解的能力,如在实施例4中进一步描述。简单地说,向负载H1299肿瘤的裸小鼠(n=8只小鼠/组)静脉内施用100μL SVV-RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:80139-1.C)或SVV病毒粒子,并经腹膜内注射未处理兔血清(阴性对照物)或抗SVV多克隆抗体。荷瘤小鼠在研究的第0天和第7天接受两剂抗体,并在研究的第1天和第8天接受两剂SVV病毒粒子或SVV RNA脂质纳米颗粒。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。处理组在下表19中示出。

[0534] 表19:实验处理组

处理	SVV 剂量	SVV-RNA LNP 制剂	抗体 剂量	抗体批次
PBS + 兔血清	--	--	1.5 mg	47-41-052316
SVV-病毒 + 兔血清	1×10^6 TCID ₅₀ /mL	--	1.5 mg	47-41-052316
SVV-病毒 + aSVV 抗体	1×10^6 TCID ₅₀ /mL	--	1.5 mg	1906102.IP
SVV-WT/LNP	1 mg/kg	80139-1.C	1.5 mg	47-41-052316

	处理	SVV 剂量	SVV-RNA LNP 制剂	抗体 剂量	抗体批次
[0536]	+ 兔血清				
	SVV-WT/LNP + aSVV 抗体	1 mg/kg	80139-1.C	1.5 mg	1906102.IP

[0537] 如图17所示,用未处理兔血清免疫接种的SVV病毒粒子处理的小鼠显示出显著的肿瘤生长抑制(双向ANOVA,图基多重比较检验,**** $p < 0.0001$)。相比之下,向SVV病毒粒子处理的小鼠施用SVV中和抗体完全阻断SVV的抗肿瘤活性。向用SVV RNA脂质纳米颗粒处理的小鼠施用SVV中和抗体(或未处理兔血清)不会影响SVV RNA脂质纳米颗粒的抗肿瘤活性。SVV RNA脂质纳米颗粒处理显著抑制用SVV中和血清处理的小鼠的肿瘤生长(双向ANOVA,图基多重比较检验,**** $p < 0.0001$)。因此,与SVV病毒粒子不同,SVV RNA脂质纳米颗粒的抗肿瘤活性不受循环中中和抗体存在的影响。

[0538] 实施例16:CVA21编码RNA脂质纳米颗粒在黑素瘤中的体内功效

[0539] 进行实验以确定包含编码CVA21的RNA分子的脂质纳米颗粒在体内产生感染性病毒和抑制黑色素瘤肿瘤生长的能力。实施例2和下表20中描述CVA21 RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和分析。

[0540] 表20.CVA21脂质纳米颗粒的制剂

	制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离 的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂 质(%)	PEG 化 的脂质 (%)	N:P
[0541]	70032- 6.C	CVA2 1	PB, pH 5.8	MC3 (49%)	胆固醇 (39.8%)	DSPC (11%)	DSPE-P EG5K (0.2%)	7

[0542] 使用SK-MEL28异种移植模型评估CVA21 RNA脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力。简单地说,将SK-MEL28细胞(1×10^6 个细胞/0.1mL于1:1无血清PBS与Matrigel®的混合物中)经皮下接种在8周龄雌性无胸腺裸小鼠(Charles River Laboratories)的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约 150mm^3 ($120-180\text{mm}^3$ 范围)时,向小鼠瘤内施用PBS或与Lipofectamine RNAiMax一起配制的编码CVA21的RNA($1\mu\text{g}$),或静脉内施用编码CVA21的RNA脂质纳米颗粒(制剂ID:70032-6C, $5\mu\text{g}$)。在第1天和第5天,小鼠接受瘤内处理,或在第1天、第6天、第11天和第16天接受静脉内处理。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。

[0543] 如图18所示,与用PBS处理的小鼠相比,用包含CVA21 RNA分子的LNP进行静脉内处理或用与Lipofectamine一起配制的CVA21-RNA分子进行肿瘤内处理可防止荷瘤小鼠的肿瘤生长(双向ANOVA, $p < 0.0001$)。总的来说,这些结果表明包含CVA21 RNA分子的脂质纳米颗粒是治疗黑色素瘤的有效治疗策略。

[0544] 实施例17:生成SVV的离散3'端的策略

[0545] 如上所述,本文所述的合成基因组需要病毒天然的离散3'和5'末端,以便从合成基因组产生具有复制能力和感染性的病毒。由T7RNA聚合酶在体外产生的RNA转录物含有哺乳动物5'和3'UTR,因此不含产生感染性ssRNA病毒所需的离散的天然末端。

[0546] 采用使用3'限制酶识别序列的策略来产生感染性SVV所需的离散3'末端。SapI限制酶识别序列插入DNA模板的3'末端。SapI在其识别位点的5'裂解以产生适当长度的聚胸苷序列,从而产生病毒天然的离散病毒聚腺苷酸化位点。这个过程如图19所示。

[0547] 实施例18:用于产生SVV的离散5'端的RNaseH策略

[0548] 采用RNaseH策略产生SVV天然的离散5'端。T7 RNA聚合酶需要5'末端上的鸟苷残基。然而,SVV的5'端以尿苷残基开头。因此,必须去除T7前导序列以产生病毒的可靠端。描绘的图20是体外转录(IVT)和5'前导序列加工方法的图。IVT模板描绘在顶部,得到的RNA转录物在中间示出。然后将这个SVV+ssRNA转录物与互补的dsDNA核苷酸(虚线框)退火,并用RNaseH水解该部分。带有正确的5'端的最终病毒ssRNA产物展示在底部。

[0549] RNaseH工程转录物的正确加工通过引物延伸分析进行评估。将RNA转录物用RNaseH处理或不消化。然后将互补的荧光引物添加到消化和未消化的样品中并退火,然后通过Superscript IV逆转录酶延伸。然后将产物在TBE UREA丙烯酰胺凝胶上解析。预期条带如下:未消化 ≥ 150 bp和消化=100bp。如图21所示,该策略引起约90%RNA被正确加工,如在RNaseH存在下消化条带的增加所说明。

[0550] 该策略与实施例19中描述的3'限制酶策略相结合,产生具有产生感染性SVV所需的离散5'和3'端的最终合成SVV基因组。

[0551] 实施例19:用于产生SVV的离散5'端的核酶策略

[0552] 采用核酶策略产生SVV天然的离散5'端。该方法的示意图示于图22中,其展示了使小核糖核酸病毒5'端裂解的核酶的设计。所描绘的两种核酶是锤头状核酶和手枪状核酶,但在这种情况下,可以采用多种其它核酶进行特异性裂解。

[0553] 用于在该策略中实施的锤头状和手枪状核酶的修改分别示于图23和图24。退火并使SVV 5'端裂解的最小锤头状核酶(HHR)的结构模型示于图23A中(该核酶在箭头指示的位点使5'端裂解)。具有用于裂解SVV 5'端的稳定茎I(STBL)的锤头状核酶的结构模型示于图23B(该核酶在箭头指示的位点处使5'末端裂解)。图24A展示了在野生(手枪WT)中发现的手枪状核酶特征的示意图。图24B展示了由mFOLD建模的来自多粘类芽孢杆菌的手枪状核酶,其中添加了一个四环以融合P3链。虚线框中的核酸经过诱变以在病毒序列的背景中保留核酶折叠。虚线框中所示的WT“GUC”序列突变为“UCA”以产生手枪1,并将“GUC”序列突变为“TTA”以产生手枪2。

[0554] 评估4种核酶(HHR、STBL、手枪1和手枪2)在IVT过程中介导裂解的能力。将IVT模板用HpaI线性化,在未切割的情况下产生150nt流走物,以及在核酶裂解的情况下约90和约60nt的2个裂解片段,以便在IVT过程之后给出核酶效率的读数。如图25所示,在与核酶构建体的所有反应中都存在三个条带。两个锤头状核酶裂解效率为约40-60%(STBL-泳道3和HHR-泳道4)。泳道5中的手枪1核酶在凝胶上没有可见的未切割产物。泳道6中的手枪2核酶在凝胶上具有约5%的可见的未裂解的产物。使用引物延伸分析获得类似的结果(图26)。引物延伸产物在TBE UREA丙烯酰胺凝胶上解析。预期条带是;未消化 ≥ 150 bp(见泳道7的150bp的SVV-Neg参考条带)和消化=80bp。手枪1引起完全裂解,这可以通过泳道10中没有上部条带来证明。

[0555] 这些结果表明所有四种核酶都能够介导IVT转录物的裂解。然而,手枪1和手枪2核酶更有效,其中手枪1最有效的,并且在IVT过程中介导完全裂解。

[0556] 实施例20:5'核酶和3'限制酶工程化的SVV基因组的体外功能

[0557] 进行一项体外测定以评估SVV基因组的功能,该基因组被工程化化成具有5'核酶序列和3'SapI限制酶识别位点。以下IVT模板用于产生合成SVV基因组:

[0558] (a) 5'HHR序列和3'SapI识别序列

[0559] (b) 5'手枪1序列和3'SapI识别序列

[0560] H1299细胞使用Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) 和1 μ g IVT产生的RNA转染。使用来自Qiagen的250 μ L QIAzol试剂在12小时、24小时和36小时从NCI-H1299细胞中提取总RNA。由该RNA产生cDNA并用负链特异性Taqman测定进行分析。将NCI-H1299细胞用固定量的所指示的IVT产生的RNA转染。随着时间的推移,对该RNA产生的cDNA进行绝对qRT-PCR。在手枪1-SapI构建体中,来自H1299细胞的SVV启动的早期动力学大大增强(图27)。

[0561] 实施例21:手枪/SapI SVV RNA脂质纳米颗粒对肿瘤生长的体内功效

[0562] 进行实验以确定含有SVV-手枪/SapI RNA分子的脂质纳米颗粒是否可在体内抑制肿瘤生长。

[0563] 实施例2和下表21中描述SVV RNA脂质纳米颗粒的产生、配制和分析。

[0564] 表21.SVV RNA脂质纳米颗粒制剂

制剂 ID	RNA	缓冲液	可电离的脂质 (%)	胆固醇 (%)	辅助脂质 (%)	PEG 化的脂质 (%)	N:P
[0565] 80130-1.C	SVV-W T (HHR/HDV)	MB, pH 3.0	SS-OC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7
80130-3.C	SVV-W T (SapI/ 手枪)	MB, pH 3.0	SS-LC (49%)	胆固醇 (28.5%)	DSPC (22%)	DPG-PEG 2K (0.5%)	7

[0566] 使用H1299异种移植模型评估SVV-HHR-HDV和SVV-手枪/SapI脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下施用于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约150mm³时,向小鼠静脉内施用0.2mg/kg含有SVV-HHR/HDV (制剂ID:80130-1.C) 或SVV-手枪/SapI (制剂ID:80130-3.C) RNA分子的脂质纳米颗粒(第1天)。在研究的第8天施用后续剂量的PBS或脂质纳米颗粒。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。

[0567] 如图28所示,与用PBS处理的小鼠相比,用SVV-HHR-HDV RNA或SVV-手枪/SapI RNA脂质纳米颗粒处理的小鼠显著抑制肿瘤生长(双向ANOVA,图基多重比较检验,***p<0.0001)。此外,与SVV-HHR RNA脂质纳米颗粒相比,用SVV-手枪/SapI RNA脂质纳米颗粒处理更有效地抑制肿瘤生长方面(双向ANOVA,图基多重比较检验,##p<0.01)。

[0568] 实施例22:在修饰的核糖核苷酸下的SVV-RNA的体外合成

[0569] 进行实验以评估在修饰的核糖核苷酸下体外合成SVV-RNA以增强RNA稳定性的可能性。在没有或有修饰的核糖核苷酸的情况下体外合成编码mCherry (基因表达和病毒复制的标记,SVV-mCherry) 的SVV正义RNA(图29A)。将体外合成的RNA与RNAiMax (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA) 一起配制并转染到NCI-H1299人肺癌细胞中4小时,然后洗涤

细胞并加入新鲜培养基,历时72小时。红色荧光蛋白mCherry的存在(在图29B中显示为较浅的阴影)用作病毒复制的替代物。

[0570] 如图29A所示,在 Ψ -UTP或5-m-CTP下SVV-mCherry-RNA的合成是有效的。当两种修饰的核糖核苷酸组合时,没有产生RNA。这表明多个修饰的核糖核苷酸的存在不支持SVV-RNA的IVT。SVV- Ψ -UTP RNA或SVV-5-m-CTP RNA的转染不致使病毒复制(图29B)。病毒RNA二级结构是支持病毒复制的关键,在SVV的情况下,使用修饰的核糖核苷酸可以改变RNA的天然二级构象,防止病毒复制。

[0571] 实施例23:从SVV基因组表达有效负载分子

[0572] 进行实验以评估是否可以从SVV病毒基因组表达编码有效负载分子的多核苷酸。将mCherry、nanoLuciferase、CXCL10、IL-12、GM-CSF和FAP-CD3 BiTE每一者的表达盒插入到编码SVV基因组的质粒中。将H1299细胞用0.015 μ mol质粒转染,收集上清液并过滤以收集病毒颗粒。将过滤的上清液转移到H446培养物中并评估感染性。如图30所示,每种有效负载工程化病毒都能够感染H446细胞,尽管具有不同程度的功效。每个构建体的IC₅₀提供在下表22中。这些数据表明,SVV可以被设计成表达各种有效负载分子,以提高病毒的治疗功效。

[0573] 表22:SVV-有效负载构建体的质粒长度和IC₅₀

构建体	SEQ ID	质粒长度 (bp)	有效负载 (bp)	IC ₅₀
NEP-BV-SVV-阴性		9729		>1e-01
NEP-BV-SVV-NEG mCherry		10485	756	>1e-01
NEP-BV-SVV-WT		9865		8.03E-09
[0574] NEP-BV-SVV-mCherry	19	10621	756	1.09E-06
NEP-BV-SVV-m_scIL-12	22	11583	1718	4.43E-01
NEP-BV-SVV-mCXCL10	24	10213	348	8.55E-05
NEP-BV-SVV-mFAP-CD3 BITE	23	11460	1595	>1e-01
NEP-BV-SVV-nLuc	20	10432	567	2.36E-05
NEP-BV-SVV-mGM-CSF	21	10288	423	>1e-01

[0575] 实施例24:编码SVV的有效负载RNA脂质纳米颗粒对肿瘤组织中肿瘤生长和有效负载表达的体内功效

[0576] 进行实验以确定含有SVV-有效负载RNA的脂质纳米颗粒是否可以抑制体内肿瘤生长并评估肿瘤组织中的有效负载表达。

[0577] 在实施例2以及下表23和24中描述SVV-Neg、SVV-WT和SVV-IL-36 γ RNA (SEQ ID NO:11) 脂质纳米颗粒的产生、配制和分析。

[0578] 表23:制剂的脂质组成

[0579]

制剂	RNA	N/P 比率	缓冲 液	可电 离的 脂质	%	Chol %	辅助 脂质	%	PEG	%
8011 6-3.C	SVV- Neg	7	PB, pH 5.8	OC	49%	28.5 %	DSP C	22%	DPG- PEG2 K	0.5%

[0580]

8011 6-4.C	SVV- WT	7	PB, pH 5.8	OC	49%	28.5 %	DSP C	22%	DPG- PEG2 K	0.5%
8011 6-5.C	SVV- IL-36 γ	7	PB, pH 5.8	OC	49%	28.5 %	DSP C	22%	DPG- PEG2 K	0.5%

[0581] 表24:制剂的物理特性

[0582]

制剂	RNA	Z-平均值 (d.nm)	PdI	ZP (mV)	%EE
80116-3.C	SVV-Neg	117	0.19	-1.9	94
80116-4.C	SVV-WT	112	0.16	-1.4	93
80116-5.C	SVV-IL-36 γ	120	0.27	0.4	94

[0583] 使用H1299异种移植模型评估SVV-WT+SVV-Neg和SVV-WT+SVV-IL-36 γ 脂质纳米颗粒抑制肿瘤生长的能力,如实施例4中进一步描述。简单地说,将 5×10^6 个NCI-H1299细胞经皮下施用于无胸腺裸小鼠的右侧腰窝中。当肿瘤尺寸中位数达到约150mm³时,向小鼠静脉内施用0.2mg/kg含有SVV-WT+SVV-Neg (制剂ID:比率1:1的80116-3.C+80116-4.C混合物)或SVV-WT+SVV-IL-36 γ (制剂ID:比率1:1的80116-4.C+80116-5.C混合物) RNA分子的脂质纳米颗粒(第1天)。在研究的第8天施用后续剂量的PBS或脂质纳米颗粒。使用电子卡尺每周测量肿瘤体积3次。研究在第10天终止,收集肿瘤用于有效负载表达分析。

[0584] 如图31A所示,与用PBS处理的小鼠相比,用SVV-WT+SVV-Neg或SVV-WT+SVV-IL-36 γ RNA脂质纳米颗粒处理的小鼠表现出显著较低的肿瘤负荷(双向ANOVA,图基多重比较检验,***p<0.0001)。这些结果表明含有SVV-WT+SVV-IL-36 γ RNA分子的脂质纳米颗粒在体内表现出抗肿瘤活性。

[0585] 对在研究结束时收集的肿瘤组织进行加工以产生肿瘤溶解物。IL36 γ 水平由Elisa (R&D系统,DY2320-05)测定。如图31B所示,在用SVV-WT+SVV-IL36 γ RNA脂质纳米颗粒处理的小鼠中检测到人IL-36 γ 。这些结果表明,含有SVV-IL-36 γ RNA分子的脂质纳米颗粒支持病毒基因组中编码的转基因在肿瘤组织中的表达。

[0586] 实施例25:编码柯萨奇病毒的RNA分子的优化

[0587] 进行实验以评估从重组RNA分子产生感染性柯萨奇病毒A21 (CVA21) 的能力。简单地说,包含CVA21病毒基因组的RNA多核苷酸是基于先前描述的CVA21基因组序列(参见Newcombe等人,Cell ular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses Journal of General Virology (2003), 84, 3041-3050. GenBank登录号AF465515)通过T7转录在体外产生的。将SK-MEL-28细胞用1 μ g CVA21 RNA构建体在

Lipofectamine RNAiMax中转染4小时,此时洗涤孔并将完全培养基添加到每个孔中。48小时后,从SK-ME L-28培养物中去除上清液,并用结晶紫染色细胞以评估病毒感染性。如图32A(左图)所示,包含Newcombe CVA21序列(CVA21 WT)的RNA分子不产生活性溶解病毒(由未溶解的SK-MEL-28细胞的结晶紫染色指示)。

[0588] 令人惊讶的是,从重组RNA分子产生感染性CVA21需要改变5'UTR。如图32A(右图)所示,Brown等人描述的5'UTR序列(Journal of Virology, (2003) 77:16,第8973-8984号.GenBank登录号AF546702)掺入Newcombe描述的CVA21基因组序列中(CVA21-Brown)引起感染性CVA21病毒的产生和病毒细胞溶解,这由多个独立克隆中缺乏结晶紫染色所指示。72小时后从经两种不同的CVA21-Brown克隆转染的SK-MEL-28细胞收集上清液,并用注射器用0.45μM过滤器进行针筒式过滤并连续稀释到新鲜的SK-MEL-28细胞上。48小时后,从SK-MEL-28培养物中去除上清液,并用结晶紫染色细胞以评估病毒感染性。如图32B所示,包含Brown 5'UTR序列(UTR序列-SEQ ID NO:26,修饰的CVA21序列-SEQ ID NO:27)的编码CVA21的RNA分子引起感染性CVA21的产生和释放到转染细胞的上清液中,这由单独上清液介导细胞溶解的能力指示。

[0589] 以引用的方式并入

[0590] 本文中引用的所有参考文献、文章、公布、专利、专利公布和专利申请均以引用的方式整体并入本文中以达成所有目的。然而,对本文中引用的任何参考文献、文章、公布、专利、专利公布和专利申请的提及,并不也不应被视为承认或任何形式的建议,它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0591] 尽管本文已经示出并描述了本公开的优选实施方案;但是本领域的技术人员显而易见的是,只是以示例的方式提供这类实施方案。在不脱离本公开的情况下,本领域的技术人员现在将想到许多变化、改变和替代。应当理解,在实践本公开中可以采用本文所述的本公开的实施方案的各种替代方案。意图以下权利要求书界定本公开的范围,并且由此涵盖在这些权利要求书范围内的方法和结构和它们的等同物。

序列表

<110> 昂克诺斯公司 (Oncorus, Inc.)

<120> 包封的RNA多核苷酸及使用方法

<130> ONCR-015/01W0 324865-2145

<150> 62/788,504

<151> 2019-01-04

<150> 62/895,135

<151> 2019-11-03

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7310

<212> RNA

<213> 塞内加病毒A (Senecavirus A)

<400> 1

```

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
ugcggcuccg auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caccuaccaa 180
uguuaauuggu guggucugcg aguucua gcc uacucguuuc ucccccgacc auucacucac 240
ccacgaaaag uguguuguaa ccauaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccucuccuag uaagggaacc 420
gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
acaugguucu ccccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
ggugggggcau gaccccuagc auagcgcgcu acagcgggaa cuguagcuag gccuagcgu 600
gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguucuaua gguagcacau 660
acaaaauaugc agaacucuca uuuuucuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaauug uguuuacgau 780
ucgucuauc auuuggagau acugaaccua cagggu meta uugaaauuuu aaggucuuuc 840
aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacaucgu guacgaacua 900
cagggu meta uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uaaugguaac 960
augaccuuca auuacuacgc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcggau uagcgggucu ccucacaaau 1080
uucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
aacucugcug aucgagucac aacgcaaacg gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gacccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
agcacagauc aaccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320
aauuuugga caaaagcugu aaaaaccuuc uuuuuucagg ccgucggcu ucccggugcc 1380

```

uuucugucua	ggcagggagg	ccucaacgga	ggggccuua	cagcuacccu	acauagacac	1440
uuuuugauga	agugcgggug	gcaggugcag	guccaaugua	auuugacaca	auuccaccaa	1500
ggcgcucuu	uuguugccau	gguuccugaa	accacccuug	augucaagcc	cgacgguaag	1560
gcaaagagcu	uacaggagcu	gaaugaagaa	cagugggugg	aaaugucuga	cgauuaccgg	1620
accgggaaaa	acaugccuuu	ucagucucu	ggcacauacu	aucggcccc	uaacuggacu	1680
ugggguccca	auuucaucaa	ccccuaucaa	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggu	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggaccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaauu	acauuuucug	uaaggccuac	aagucccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaaccc	ucccugacga	cacugucccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauuaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcuuacc	cacucucaug	gcauuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauauugucc	cuacguugcc	guucccacc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagauccc	gucuaucaga	acaccucggu	uggcgccauc	2280
aguucaaaau	ucgccaauua	ccgugggugu	auccaaauc	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaauu	ccugcucucg	uaauucucc	caaauggaac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauagc	gugcacauac	ucuauuuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuu	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauiacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuauuguu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggaug	augguuacuu	uugucuucug	acccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuugc	uaacacuua	3000
cuggacuua	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuacuggg	3180
cgcacucccc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaaggua	cuuucgugcu	ccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgucgg	gggggggcuu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuauuuacg	ccuuugucc	ccguccuau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuucgc	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaauu	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccugcu	ucugacaacc	cauuuugga	guuucuugaa	3540
gcagaaaaug	aucuagucac	ucuggccucu	cucuggaaga	uggugcacuc	uguucaacag	3600
accuggagaa	aguaugugaa	gaacgaugau	uuuuggccca	auuuacucag	cgagcuagug	3660
ggggaaggcu	cugucgccuu	ggccgccacg	cuauccaacc	aagcuucagu	aaaggcucu	3720

uggggccugc acuuucucuc ucggggggcuc aauiacacug acuuuuacuc uuucugaua 3780
 gagaaaugcu cuaguuuuuu uaccguagaa ccaccuccuc caccagcuga aaaccugaug 3840
 accaagcccu cagugaaguc gaaaauccga aaacuguuua agaugcaagg acccauggac 3900
 aaagucaaaag acuggaacca aaugcugcc ggcuugaaga auuuucaauu uguucgugac 3960
 cuagucaaaag agggugucga uggcugcag gccuggauca acaaagagaa agccagcccu 4020
 guccuccagu accaguugga gaugaagaag cucggggccug uggccuuggc ucaugacgu 4080
 uucauggcug guuccgggccc ccucuuagc gacgaccaga uugaauaccu ccagaaccuc 4140
 aaaucucuuug ccuuaacacu ggggaagacu aauiuggccc aaagucucac cacuauauc 4200
 aaugccaaac aaaguucagc ccaacgaguu gaacccguug uggugguccu uagaggcaag 4260
 ccgggaugcg gcaagagcuu ggccucucag uugauugccc aggcuguguc caagcgccuc 4320
 uauggcucucc aaaguguaua uuucuuuccc ccagauccag auuuucucga uggauacaaa 4380
 ggacaguucg ugaccuugau ggaugauuuug ggacaaaacc cggauggaca agauuucucc 4440
 accuuuuguc agaugguguc gaccgccccaa uuucucucca acauggcgga ccuugcagag 4500
 aaagggcguc ccuuuaccuc caaucucauc auugcaacua caaauucucc ccacuucagu 4560
 ccugucacca uugcugaucc uuucgaguc ucucgccgua ucaacuacga ucugacucua 4620
 gaaguaucug aggccuacaa gaaacacaca cggcugaauu uugacuuggc uuucaggcgc 4680
 acagacgccc ccccauuua uccuuuugcu gcccauguc ccuuugugga cguagcugug 4740
 cgcuucaaaa auggucacca gaauuuaau cuccuagagu uggucgauuc cauuguaca 4800
 gacauucgag ccaagcaaca aggugcccga acaugcaga cucugguucu acagagcccc 4860
 aacgagaaug augacacccc cgucgacgag gcguugggua gaguucucuc ccccgucgcg 4920
 gucgaugagg cgcuuugcga ccucacucca gagggcgacc cgguuggccg uuuggcuaau 4980
 cuugccaagc uaggucuuuc ccuagcugcg gucaccucug gucugauaau cuuggcagug 5040
 ggacucuaa gguacuucuc uggcucugau gcagaccaag aagaaacaga aagugaggga 5100
 ucugucaagg caccagagag cgaaaugcu uaugacggcc cgaagaaaaa cucuaagccc 5160
 ccuggagcac ucucucucau ggaaaugcaa cagcccaacg uggacauggg cuuagaggcu 5220
 gcggucgcua agaaaguggu cgucuccauu accuucaugg uuuccaacag accuucuggg 5280
 cuuacacagu ccgcucuuu ggugaccggc cggaccuucc uaucaauga acauacaugg 5340
 uccaaucccu ccuggaccag cuucacaauc cgcggugagg uacacacucg ugaugagccc 5400
 uucaaacgg uucauuucac ucaccacggu auuccacag aucugaugau gguacgucuc 5460
 ggaccgggca auucuuucc uaacaauca gacaaguug gacuugacca gaugccggca 5520
 cgcaacucc gugugguugg cguuucgucc aguacaggaa acuuucuuu cucuggaaau 5580
 uuucccgga uuguugauuc caucaccucu gaacaaggaa cuuacgaag acucuuuagg 5640
 uacaggguaga cgaccuacaa aggauggugc ggucggccc uggucuguga ggccgguggc 5700
 guccgacgca ucauuggccu gcauucugcu ggcgccgccc guaucggcg cgggaccuau 5760
 aucucaaau uaggacuaau caaagcccug aaacaccucg gugaaccuu ggccacaug 5820
 caaggacuga ugacugaau agagccugga aucaccguac auguaccccg gaaauccaaa 5880
 uuagagaaaga cgaccgcaca cgcgguguac aaaccggagu uugagccugc uguguuguca 5940
 aaauuugauc ccagacugaa caaggauguu gacuuggaug aaguaauug gucuaaacac 6000
 acugccaau ucccuuacca accuccuuug uuucacacau acaugucaga guacgcucau 6060

cgagucuuuc ccuucuuuggg gaaagacaau gacauucuga ccgucaaaga agcaauucug 6120
 ggcauccccc gacuagaccc cauggauccc cacacagcuc cgggucugcc uuacgccauc 6180
 aacggccuuc gacguacuga ucucgucgau uuugugaacg guacaguaga ugcggcgcug 6240
 gcuguacaaa uccagaaaau cuuagacggg gacuacucug accaugucuu ccaaacuuiu 6300
 cugaaaagau agaucagacc cucagagaaa guccgagcgg gaaaaacccg cauuguugau 6360
 gugcccuccc uggcgcauug cauugugggc agaauuguugc uggggcgcuu ugcugccaag 6420
 uuucaauccc auccuggcuu ucuccucggc ucugcuauug ggucugaccc ugauguuuuc 6480
 uggaccguca uaggggcuca acucgagggg agaaagaaca cguaugacgu ggacuacagu 6540
 gccuuugacu cuucacacgg cacuggcucc uucgagggc ucaucucuca uuuuuuaccc 6600
 guggacaaug guuuuagccc ugcgcuggga ccguauucua gaucccuggc ugucucggug 6660
 cacgcuuacg gcgagcgucg caucaagauu accgguggcc uccccuccgg uuugccgcg 6720
 accagccugc ugaacacagu gcucaacaau gugaucuaa ggacugcucu ggcauugacu 6780
 uacaaggaa uugaauauga caugguugau aucaucgccu acggugacga ccuucugguu 6840
 ggcacggauu acgaucugga cuucaaugag guggcacgac gcgcugccaa guugggguau 6900
 aagaugacuc cugccaacaa gguuucuguc uuccuccga cuuccucucu uuccgaugcu 6960
 guuuuuucaa agcgcaaaau cguccaaaac aacgacggcu uauacaaacc aguuauugau 7020
 uuaaagaauu uggaagccau gcucuccuac uucaaaccag gaacacuacu cgagaagcug 7080
 caaucuguuu cuauguuggc ucaacauucu ggaaaagaag aaauaugau agaugcac 7140
 ccuucgcug acuacggugc cguaccgagu cacgaguacc ugcaggcaag auggagggcc 7200
 uuuguugacu gaccagaua gcccaggcg cuucggugcu gccggcgauu cugggagaac 7260
 ucagucggaa cagaaaaggg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7310

<210> 2

<211> 7310

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 塞内加病毒A S177A突变体

<400> 2

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgac ccaaaccggc caccuaccaa 180
 uguuauuggu guggucugcg aguucuaagc uacucguuuc uccccgacc auucacucac 240
 ccacgaaaag uguguuguaa ccuaaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcuua accacaugcu guuaguccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccuuccuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu cccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcau gacccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguucuaa gguagcacau 660

acaaauaugc	agaacucuca	uuuuuuuuuc	gauacagccu	cuggcaccuu	ugaagaugua	720
accggaacaa	aagucaagau	cguugaauac	cccagaucgg	ugaacaauagg	uguuuacgau	780
ucgucuacuc	auuuggagau	acugaaccua	cagggugaaa	uugaaauuuu	aaggucuuuc	840
aaugaauacc	aaauucgcgc	cgccaaacaa	caacucggac	uggacaucgu	guacgaacua	900
caggguaaag	uucagacaac	gucaaagaau	gauuuugauu	cccugggcaa	uaaugguaac	960
augaccuuca	auuacuacgc	aaacacuuau	cagaauucag	uagacuucuc	gaccuccucg	1020
ucggcgucag	gcgccggacc	ugggaacucu	cggggcggau	uagcgggucu	ccucacaaa	1080
uucaguggaa	ucuugaaccc	ucuuggcuac	cucaaagauc	acaacaccga	agaaauggaa	1140
aacucugcug	aucgagucac	aacgcaaacg	gcgggcaaca	cugccauaaa	cacgcaauca	1200
ucauuggggug	uguugugugc	cuacguugaa	gacccgacca	aaucugauc	uccguccagc	1260
agcacagauc	aacccaccac	cacuuucacu	gccaucgaca	ggugguacac	uggacgucuc	1320
aauuucugga	caaaaagcugu	aaaaaccuuc	ucuuuucagg	ccgucccgcu	ucccgugucc	1380
uuucugucua	ggcagggagg	ccucaacgga	ggggccuuca	cagcuaccu	acauagacac	1440
uuuuugauga	agugcgggug	gcaggugcag	guccaaugua	auuugacaca	auuccaccaa	1500
ggcgucucuu	uuuugccau	gguuuccugaa	accacccuug	augucaagcc	cgacgguaag	1560
gcaaagagcu	uacaggagcu	gaaugaagaa	cagugggugg	aaaugucuga	cgauuaccgg	1620
accgggaaaa	acaugccuuu	ucaggcgcuu	ggcacauacu	aucggccccc	uaacuggacu	1680
ugggguccca	auuucaucaa	ccccuaucaa	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggg	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggacccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaauu	acauuuucug	uaaggccuac	aaguccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaaccc	ucccugacga	cacuguccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauuaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcuuacc	cacucucaug	gcuuuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauauugccc	cuacguugcc	guucccaccc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagauc	gucuaucaga	acaccucggg	uggcgccauc	2280
aguucaaaau	ucgccaauua	ccgugggugu	auccaaauca	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaaaau	ccugcucucg	uauucucucc	caaauuggaac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauuca	gugcacauac	ucuauuuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuca	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauuacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuauugugu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggcu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggaug	augguuacuu	uugucuuucg	accccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuuuc	uaacacuuca	3000

cuggacuuca auuuuuauag cuuggccugu uuacuuacu uuagaucgga ccuugagguu 3060
 acgguggucu cacuagagcc ggaucuggaa uuugcuguag ggugguuucc uucuggcagu 3120
 gaauaccagg cuuccagcuu ugucuacgac cagcugcaug ugcccuucca cuuuacuggg 3180
 cgcacucucc gcgcuuucgc uagcaagggg gggaagguaa cuuucgugcu ccuuggaac 3240
 ucugucucgu cugugcucucc cgugcgcugg gggggggcuu ccaagcucuc uucugcuacg 3300
 cggggucuaac cggcgcaugc ugauuggggg acuaauuacg ccuuuguccc ccguccaaau 3360
 gagaagaaaa gcaccgcugu aaaacacgug gccguguaca uucgguaaca gaacgcacgu 3420
 gccuggugcc ccagcaugcu uccuuucgc agcuacaagc agaagaugcu gaugcaauu 3480
 ggcgaauacg agaccaaucc cgggccugcu ucugacaacc caauuuugga guuucuugaa 3540
 gcagaaaaug aucuagucac ucuggccucu cucuggaaga uggugcacuc uguucaacag 3600
 accuggagaa aguaugugaa gaacgaugau uuuuggccca auuuacucag cgagcuagug 3660
 ggggaaggcu cugucgccuu ggccgccacg cuauccaacc aagcuucagu aaaggcucu 3720
 uugggccugc acuuucucuc ucgggggcuc aaauacacug acuuuuacuc uuucugaua 3780
 gagaaugcu cuaguuuuuu uaccguagaa ccaccuccuc caccagcuga aaaccugaug 3840
 accaagcccu cagugaaguc gaaauuccga aaacuguuua agaugcaagg acccauggac 3900
 aaagucuaag acuggaacca aaugcugcc ggcuugaaga auuuucaauu uguucgugac 3960
 cuagucuaag agggugucga uuggcugcag gccuggauca acaaagagaa agccagcccu 4020
 guccuccagu accaguugga gaugaagaag cucgggccug uggccuuggc ucaugacgu 4080
 uucauggcug guuccgggcc ccucuuuagc gacgaccaga uugaauaccu ccagaaccuc 4140
 aaauucuuug ccuaacacu ggggaagacu aaauuggccc aaagucucac cacuaugauc 4200
 aaugccaaac aaaguucagc ccaacgaguu gaacccguug uggugguccu uagaggcaag 4260
 ccgggaugcg gcaagagcuu ggccucucag uugauugccc aggcuguguc caagcgccuc 4320
 uauggcuccc aaaguguaua uuucuuuccc ccagauccag auuucuuuugc uggauacaaa 4380
 ggacaguucg ugaccuugau ggauuuuug ggacaaaacc cggauggaca agauuucucc 4440
 accuuuuguc agaugguguc gaccgccccaa uuucucccca acauggcgga ccuugcagag 4500
 aaaggcguc ccuuuaccuc caucucucuc auugcaacua caauucuccc ccacuucagu 4560
 ccugucacca uugcugaucc uucugcaguc ucucgccgua ucaacuacga ucugacucua 4620
 gaaguauucg aggccuacaa gaaacacaca cggcugaauu uugacuuggc uuucaggcgc 4680
 acagacgccc cccccaauua uccuuuugcu gccaugucg ccuuugugga cguagcugug 4740
 cgcuucaaaa auggucacca gaauuuuaau cuccuagagu uggucgauuc cauuuguaca 4800
 gacauucgag ccaagcaaca aggugcccga acaugcaga cucugguucu acagagcccc 4860
 aacgagaauug augacacccc cgucgacgag gcguugggua gaguucucuc ccccgucgag 4920
 gucgaugagg cgcuuugcga ccucacucca gaggccgacc cgguuggccg uuuggcuauu 4980
 cuugccaagc uaggucuuug ccuagcugcg guacccccg gucugauaau cuuggcagug 5040
 ggacucuaa gguacuucuc uggcucugau gcagaccaag aagaaacaga aagugaggga 5100
 ucugucaagg caccagagg cgaaaaugcu uaugacggcc cgaagaaaaa cucuaagccc 5160
 ccuggagcac ucucucucau ggaaauugaa cagcccaacg uggacauggg cuuugaggcu 5220
 gcggucgcu agaaaguggu cgucuccauu accuucaugg uucccaacag accuucuggg 5280
 cuuacacagu ccgcucuuu ggugaccggc cggaccuucc uauucaauga acauacaugg 5340

uccaaucuccu ccuggaccag cuucacaauc cgcggugagg uacacacucg ugaugagccc 5400
 uucaaacggg uucauuucac ucaccacggu auucccacag aucugaugau gguacgucuc 5460
 ggaccgggca auucuuuccc uaacaauua gacaaguug gacuugacca gaugccggca 5520
 cgcaacuccc gugugguugg cguuucgucc aguuaaggaa acuucuuuu cucuggaaa 5580
 uuccucggau uuguugauuc caucaccucu gaacaaggaa cuuacgcaag acucuuuagg 5640
 uacaggguga cgaccuacaa aggauggugc ggcucggccc uggucuguga ggccgguggc 5700
 guccgacgca ucauuggccu gcauucugcu ggcgccgccg guaucggcgc cgggaccuau 5760
 aucuacaaaau uaggacuauu caaagcccug aaacaccucg gugaaccuuu ggccacaaug 5820
 caaggacuga ugacugaaau agagccugga aucaccguac auguacccc gaaauccaaa 5880
 uugagaaaaga cgaccgcaca cgcgguguac aaaccggagu uugagccugc uguguuguca 5940
 aaaaauugauc ccagacugaa caaggauguu gacuuggaug aaguaauuug gucuaaacac 6000
 acugccaaug ucccuuacca accuccuuug uucuacacau acaugucaga guacgcucau 6060
 cgagucuuuc ccuucuuugg gaaagacaau gacauucuga ccgucaaaga agcaauucug 6120
 ggcauucccg gacuagaccc cauggauccc cacacagcuc cgggucugcc uuacgccauc 6180
 aacggccuuc gacguacuga ucucgucgau uuugugaacg guacaguaga ugcggcgcug 6240
 gcuguacaaa uccagaaaau cuuagacggu gacuacucug accaugucu ccaaacuuiu 6300
 cugaaagaug agaucagacc cucagagaaa guccgagcgg gaaaaacccg cauuguugau 6360
 gugccuccc uggcgcauug cauugugggc agaauguugc uugggcgcuu ugcugccaag 6420
 uucaauccc auccuggcuu ucuccucggc ucugcuaucg ggucugaccc ugauguuuuc 6480
 uggaccguca uaggggcuca acucgagggg agaaagaaca cguaugacgu ggacuacagu 6540
 gccuuugacu cuucacacgg cacuggcucc uucgaggcuc ucaucucuca cuuuuucacc 6600
 guggacaaug guuuuagccc ugcgcuggga ccguaucuca gauccucggc ugucucggug 6660
 cacgcuuacg gcgagcguug caucaagaau accgguggcc ucccucggg uugugccgcg 6720
 accagccugc ugaacacagu gcucaacaau gugaucuca ggacugcucu ggcauugacu 6780
 uacaaggaa uugaauauga caugguugau aucaucgccu acggugacga ccuucugguu 6840
 ggcacggauu acgaucugga cuucaaugag guggcacgac gcgcugccaa guuggggau 6900
 aagaugacuc cugccaacaa gguuucuguc uuuccuccga cuuccucucu uuccgaugcu 6960
 guuuuucuaa agcgcaaaau cguccaaaac aacgacggcu uauacaaacc aguuauggau 7020
 uuaaagaauu uggaagccau gcucuccuac uucaaaccag gaacacuacu cgagaagcug 7080
 caaucuguuu cuauguuggc ucaacauucu ggaaaagaag aaauaugau agaugcac 7140
 cccuucgcug acuacggugc cguaccgagu cacgaguacc ugcaggcaag auggagggcc 7200
 uuguucgacu gaccagaua gccaaggcg cuucggugcu gccggcgauu cugggagAAC 7260
 ucagucggaa cagaaaaggg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7310

<210> 3

<211> 7312

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 寨内加病毒A IR2突变体

<400> 3

```

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
ccggcugugu uugcuagagg cacagaggag caacauccaa ccugcuuuug uggggaacgg 120
ugcggcucca auuccugcg cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caucuacaa 180
ugcuauuggu guggucugcg aguucuaagc uacucguuuc uccccuauuc auucacucac 240
gcacaaaaaag uguguuguaa cuacaagauu uagcccucac acgggaugug ugauaaccgc 300
aagacugacu caagcgcgga aagcgcugua accgcaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
gagauggcua uccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccucuccuag uaagggaacc 420
gagaggccuu cuugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugauugcuac caccaugagu 480
acaugguucu cccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
gguggggc au gaurcccccua gcauagcgag cuacagcggg aacuguagcu aggccuagc 600
gugccuugga uacugccuga uagggcgacg gccuagucgu gucgguuua uagguagcac 660
auacaaaauu gcagaacucu cauuuuucuu ucgauacagc cucuggcacc uuugaagaug 720
uaaccggaac aaaagucaag aucguugaau accccagauc ggugaacaau gguguuuacg 780
auucgucua ucauuuggag auacugaacc uacagggu gaauugaaau uuaaggucuu 840
ucaaugaaua ccaauuucgc gccgccaac acaacucgg acuggacauc guguaacgaac 900
uacaggguua uguucagaca acgucaaaga augauuuuga uucccguggc aaauauggua 960
acaugaccuu caauuacuac gcaaacacuu aucagaauuc aguagacuuc ucgaccuccu 1020
cgucggcguc aggcgccgga ccugggaacu cucggggcg gguagcgggu cuccucacaa 1080
auuucagugg aaucuuagaac ccucuuuggcu accucaaaga ucacaacacc gaagaaaugg 1140
aaaacucugc ugaucgaguc acaacgcaa cgcggggcaa cacugccaua aacacgcau 1200
caucauuggg uguguugugu gccuacguug aagaccgcac caaauugau ccuccgucca 1260
gcagcacaga ucaaccacc accacuuuca cugccaucga caggugguac acuggacguc 1320
ucaauucuu gacaaaagcu guaaaaaccu ucucuuuua ggccgucccg cuucccgug 1380
ccuuucuguc uaggcaggga ggccucaacg gaggggccuu cacagcuacc cuacauagac 1440
acuuuuugau gaagugcggg uggcaggugc agguccaug uauuuugaca caauuccacc 1500
aaggcgcucu ccuuguugc augguuccug aaaccacccu ugaugucaag ccgacggua 1560
aggcaaagag cuuacaggag cugaaugaag aacagugggu ggaaugucu gacgauuacc 1620
ggaccgggaa aaacaugccu uuucagucuc uggcacaua cuaucggccc ccuaacugga 1680
cuuggggucc caauuuauc aaccccuauc aaguaacggu uuucccacac caauuucuga 1740
acgcgagaac cucuaccucg guagacauaa acguccaua caucggggag acccccacgc 1800
aauccucaga gacacagaac uccuggaccc uccucguuau ggugcucguu cccuagacu 1860
auaaggaagg agccacaacu gaccagaaa uuacauuuuc uguaaggccu acaaguccu 1920
acucaaugg gcuucgcaac cgcuacacgg ccgggacgga cgaagaacag gggcccauuc 1980
cuacggcacc cagagaaaau ucgcuuaugu uuucucuaac ccuccugac gacacugucc 2040
cugcuuacgg gaauugcg uacccucug ucauuuaccu ccugggugaa auuaccgacc 2100
uuuugcaacu ggcccgaaua cccacucuca uggcauuuga gcgggugccu gaaccgugc 2160
cugccucaga cacauaugug cccuacguug ccguuccac ccaguucgau gacaggccuc 2220
ucaucuccuu cccgaucacc cuuucagauc ccgucuauc gaacaccug guuggcgcca 2280

```

ucaguucaaa	uuucgccaau	uaccgugggu	guauccaaau	cacucugaca	uuuuguggac	2340
ccaugauggc	gagagggaaa	uuccugcucu	cguauucucc	cccaaugga	acgcaaccac	2400
agacucuuuc	cgaagcuau	cagugcacau	acucuauuug	ggacauaggc	uugaacucua	2460
guuggaccuu	cgucgucccc	uacaucucgc	ccagugacua	ccgugaaacu	cgagccauua	2520
ccaacucggg	uuacuccgcu	gaugguuggu	uuagccugca	caaguugacc	aaaauuacuc	2580
uaccaccuga	cuguccgcaa	agucccugca	uucucuuuuu	cguucucgcu	ggugaggauu	2640
acacucuccg	ucucuccguu	gauuguaau	cuuccuau	guuccacucc	accgacaacg	2700
ccgagaccgg	gguuauugag	gcggguaaca	cugacaccga	uuucucuggu	gaacuggcgg	2760
cuccuggcuc	uaaccacacu	aaugucaagu	uccuguuuga	ucgaucucga	uuauugaau	2820
uaaucaaggu	acuggagaag	gacgccguuu	ucccccgccc	uuucccuaca	caagaaggug	2880
cgcagcagga	ugaugguuac	uuuugucuu	ugaccccccg	cccaacaguc	gcuucccgac	2940
ccgccacucg	uuucggccug	uacgccaauc	cguccggcag	ugguguucuu	gcuaacacuu	3000
cacuggacuu	cauuuuuuau	agcuuggccu	guuucacua	cuuuagaucg	gaccuugagg	3060
uuacgguggu	cucacuagag	ccggauucg	aaauugcugu	agggugguuu	ccuucuggca	3120
gugaauacca	ggcuuccagc	uuugucucg	accagcugca	ugugcccuuc	cacuuuacug	3180
ggcgcacucc	ccgcgcuuuc	gcuagcaagg	gugggaaggu	aucuuucgug	cucccuugga	3240
acucugucuc	gucugugcuc	cccugucgcu	gggggggggc	uuccaagcuc	ucuuucgcu	3300
cgcggggucu	accggcgcau	gcugauuggg	ggacuauuu	cgccuuuguc	ccccguccua	3360
augagaagaa	aagcaccgcu	guaaaacacg	uggccgugua	cauucgguac	aagaacgcac	3420
gugccuggug	ccccagcaug	cuucccuuuc	gcagcuacaa	gcagaagau	cugaugcaau	3480
cuggcgauau	cgagaccaau	cccgggccug	cuucugacaa	cccauuuug	gaguuuucug	3540
aagcagaaaa	ugaucuaguc	acucuggccu	cucucuggaa	gauggugcac	ucuguucaac	3600
agaccuggag	aaaguaugug	aagaacgaug	auuuuuggcc	cauuuuacuc	agcgagcuag	3660
ugggggaagg	cucugucgcc	uuggccgcca	cgcuauccaa	ccaagcuuca	guaaaggcuc	3720
uuuugggccu	gcacuuucuc	ucucgggggc	ucaauuacac	ugacuuuuac	ucuuuacuga	3780
uagagaaaug	cucuaguuu	uuuaccguag	aaccaccucc	uccaccagcu	gaaaaccuga	3840
ugaccaagcc	cucagugaag	ucgaaauucc	gaaaacuguu	uaagaugcaa	ggacccaugg	3900
acaaagucua	agacuggaac	caaauagcug	ccggcuugaa	gaauuuucaa	uuuguucgug	3960
accuagucua	agaggugguc	gauuggcugc	aggccuggau	caacaaagag	aaagccagcc	4020
cuguccucca	guaccaguug	gagaugaaga	agcucgggcc	uguggccuug	gcucaugacg	4080
cuuucauggc	ugguuccggg	ccccucuuu	gcgacgacca	gauugaauac	cuccagaacc	4140
ucaaauucuc	ugcccuuaca	cuggggaaga	cuaauuuggc	ccaaagucuc	accacuaua	4200
ucaaugccaa	acaaaguuca	gccaacgag	uugaaccgcu	uguggugguc	cuuagaggca	4260
agccgggaug	cggcaagagc	uuggccucua	cguugauugc	ccaggcugug	uccaagcgcc	4320
ucuauggcuc	ccaaagugua	uaauucucuc	ccccagauc	agaauucuc	gauggauaca	4380
aaggacaguu	cugagccuug	auggaugauu	ugggacaaaa	cccggauuga	caagauuucu	4440
ccaccuuuug	ucagauggug	ucgaccgccc	aaauucucc	caacauggcg	gaccuugcag	4500
agaaagggcg	ucccuuuacc	uccaaucuca	ucauugcaac	uacaaaucuc	ccccacuua	4560
guccugucac	cauugcugau	ccuucugcag	ucucucgccg	uaucaacuac	gaucugacuc	4620

uagaaguauc	ugaggccuac	aagaaacaca	cacggcugaa	uuuugacuug	gcuuucaggc	4680
gcacagacgc	cccccccauu	uauccuuuug	cugcccaugu	gccccuuugug	gacguagcug	4740
ugcgcuucaa	aaauggucac	cagaauuuua	aucuccuaga	guuggucgau	uccauuugua	4800
cagacauucg	agccaagcaa	caaggugccc	gaaacaugca	gacucugguu	cuacagagcc	4860
ccaacgagaa	ugaugacacc	cccgucgacg	aggcguuggg	uagaguucuc	ucccccgcug	4920
cggucgauga	ggcgcuuguc	gaccucacuc	cagaggccga	cccggguuggc	cguuuggcua	4980
uucuugccaa	gcuaggucuu	gcccua gcug	cggucacccc	uggucugaua	aucuuggcag	5040
ugggacucua	cagguacuuc	ucuggcucug	augcagacca	agaagaaaca	gaaagugagg	5100
gaucugucua	ggcaccacag	agcgaaaaug	cuuaugacgg	cccgaagaaa	aacucuaagc	5160
ccccuggagc	acucucucuc	auggaaaugc	aacagcccaa	cguggacaug	ggcuuugagg	5220
cugcgguugc	uaagaaaagug	gucgucccca	uuaccuucau	gguucccaac	agaccuucug	5280
ggcuuacaca	guccgcucuc	cuggugaccg	gccggaccuu	ccuaaucaau	gaacauacau	5340
gguccaaucc	cuccuggacc	agcuucacaa	uccgcgguga	gguacacacu	cgugaugagc	5400
ccuuccaaac	gguucauuuc	acucaccacg	guauucccac	agaucugaug	augguacguc	5460
ucggaccggg	caauucuuuc	ccuaacaau	uagacaaguu	uggacuugac	cagaugccgg	5520
cacgcaacuc	ccgugugguu	ggcguuucgu	ccaguuaagg	aaacuucuc	uucucuggaa	5580
auuuccucgg	auuuguugau	uccaucaccu	cugaacaagg	aacuuacgca	agacucuuua	5640
gguacagggg	gacgaccuac	aaaggauugu	gcggcucggc	ccuggucugu	gaggccggug	5700
gcguccgacg	caucauuggc	cugcauucug	cuggcgccgc	cgguaucggc	gccgggaccu	5760
auaucucaa	auuaggacua	aucaaagccc	ugaaacaccu	cggugaaccu	uuggccacaa	5820
ugcaaggacu	gaugacugaa	uuagagccug	gaauaccgu	acauguaccc	cggaauucca	5880
aaauagagaaa	gacgaccgca	cacgcggugu	acaaaccgga	guuugagccu	gcuguguugu	5940
caaaaauuga	ucccagacug	aacaaggau	uugacuugga	ugaaguaauu	uggucuaaac	6000
acacugccaa	ugucccuuac	caaccuccuu	uguucuaac	auacauguca	gaguacgcuc	6060
aucgagucuu	cuccuucuu	gggaaagaca	augacauucu	gaccgucaa	gaagcaauuc	6120
ugggcauucc	cggacuagac	cccuauggau	cccacacagc	uccgggucug	ccuacgccca	6180
ucaacggccu	ucgacguacu	gaucucgucg	auuuugugaa	cgguaacagua	gaugcggcgc	6240
uggcuguuaca	aauccagaaa	uucuuagacg	gugacuacuc	ugaccauguc	uuccaaacuu	6300
uucugaaaaga	ugagaucaga	cccucagaga	aaguccgagc	gggaaaaacc	cgcauuguug	6360
augugcccuc	ccuggcgcau	ugcauugugg	gcagaauugu	gcuugggcgc	uuugcugcca	6420
aguuucaau	ccauccuggc	uuucuccucg	gcucugcuau	cgggucugac	ccugauguuu	6480
ucuggaccgu	cauaggggcu	caacucgagg	ggagaaagaa	cacguaugac	guggacuaca	6540
gugccuuuga	cucuuacac	ggcacuggcu	ccuucgaggc	ucucaucucu	cacuuuuuca	6600
ccguggacaa	ugguuuuagc	ccugcgucgg	gaccguauuc	cagaucccug	gcugucucgg	6660
ugcacgcuuu	cggcgagcgu	cgcaucaaga	uuaccggugg	ccuccccucc	gguugugccg	6720
cgaccagccu	gcugaacaca	gugcucaaca	augugaucuu	caggacugcu	cuggcauuga	6780
cuuacaagga	auuuugaauu	gacaugguug	auaucaucgc	cuacggugac	gaccuucugg	6840
uuggcacgga	uuacgaucug	gacuucuuug	agguggcacg	acgcgcugcc	aaguuggggg	6900
auaagaugac	uccugccaac	aaggguucug	ucuucccucc	gacuuccucu	cuuuccgaug	6960

cuguuuuucu aaagcgcaaa uucguccaaa acaacgacgg cuuauacaaa ccaguuauagg 7020
 auuuuaagaa uuuggaagcc augcucuccu acuucaaacc aggaacacua cucgagaagc 7080
 ugcaaucugu uucuauguug gcucaacauu cuggaaaaga agaauaugau agauugaugc 7140
 accccuucgc ugacuacggu gccguaccga gucacgagua ccugcaggca agauggaggg 7200
 ccuuguucga cugaccacaga uagcccaagg cgcuuaggug cugccggcga uucugggaga 7260
 acucagucgg aacagaaaaag ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 7312

<210> 4

<211> 7313

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 塞内加病毒A S177A IR2突变体

<400> 4

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagaggag caacauccaa ccugcuuuug uggggaacgg 120
 ugcggcucca auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgac ccaaaccggc caucuaccaa 180
 ugcuaauuggu guggucugcg aguucuaagg uacucguuuc ucccuaauuc auucacucac 240
 gcacaaaaag uguguuguaa cuacaagauu uagcccucac acgggaugug ugauaaccgc 300
 aagacugacu caagcgcgga aagcgcuqua accgcaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
 gagauggcua uccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccuuccuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cuugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugauugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu cccucucga cccaggacu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcau gaucuccua gcuaagcgag cuacagcggg aacuguagcu aggccuagc 600
 gugccuugga uacugccuga uaggcgacg gccuagucgu gucgguucua uagguagcac 660
 auacaaaauu gcagaacucu cauuuuucuu ucgauacagc cucuggcacc uuugaagaug 720
 uaaccggaac aaaagucaag aucguugaau accccagauc ggugaacaau gguguuuacg 780
 auucgucua ucauuuggag auacugaacc uacaggguaga aaauugaaau uuaaggucuu 840
 ucaaugaaau ccaauucgc gccgccaac aacaacucgg acuggacauc guguaacgaac 900
 uacaggguua uguucagaca acgucaaaga augauuuuga uucccguggc aaauauggua 960
 acaugaccuu caauuacua gcaaacacuu aucagaauuc aguagacuuc ucgaccuccu 1020
 cgucggcguc aggcgccgga ccugggaacu cucggggcgg auuagcgggu cuccucacaa 1080
 auuucagugg aaucuuagaac ccucuuggcu accucaaaga ucacaacacc gaagaaaugg 1140
 aaaacucugc ugaucgaguc acaacgcaaa cggcgggcaa cacugccaau aacacgcaau 1200
 caucauuggg uguguugugu gccuacguug aagaccgcac caauucugau ccuccgucca 1260
 gcagcacaga ucaaccacc accacuuuca cugccaucga caggugguac acuggacguc 1320
 ucaauucuuug gacaaaagcu guaaaaaccu ucucuuuuaa ggccgucccg cuucccggu 1380
 ccuuucuguc uaggcaggga ggccucaacg gaggggccuu cacagcuacc cuacauagac 1440
 acuuuuugau gaagugcggg uggcaggugc agguccaau uaauugaca caauuccacc 1500
 aaggcgcucu ccuuguugcc augguuccug aaaccacccu ugaugucaag ccgacggua 1560

aggcaaagag cuuacaggag cugaaugaag aacagugggu ggaaaugucu gacgauuacc 1620
 ggaccgggaa aaacaugccu uuucaggcgc uuggcacaua cuaucggccc ccuaacugga 1680
 cuuggggucc caauuucauc aaccccuauc aaguaacggu uuucccacac caaaauucuga 1740
 acgcgagAAC cucuaccucg guagacauaa acgucccaua caucggggag acccccacgc 1800
 aauccucaga gacacagaac uccuggaccc uccucguuau ggugcucguu ccccuagacu 1860
 auaaggaagg agccacaacu gaccagaaa uuacauuuuc uguaaggccu acaaguccu 1920
 acuucaaugg gcuucgcaac cgcuaacagg ccgggacgga cgaagaacag gggcccauuc 1980
 cuacggcacc cagagaaaau ucgcuuauug uucucucaac ccucccugac gacacugucc 2040
 cugcuuacgg gaaugugcgu accccuccug ucaauuaccu cccuggugaa auaacggacc 2100
 uuugcaacu ggcccgcaua cccacucuca uggcauuuga gcgggugccu gaaccgugc 2160
 cugccucaga cacauaugug cccuacguug ccguuccac ccaguucgau gacaggccuc 2220
 ucaucuccuu cccgaucacc cuuucagauc ccgucuauc gaacaccug guuggcgcca 2280
 ucagucaaa uuucgccaau uaccgugggu guauccaaau cacucugaca uuuguggac 2340
 ccaugauggc gagaggaaa uuccugcucu cguauucucc cccaaugga acgcaaccac 2400
 agacucuuuc cgaagcuau cagugcaca acucuaauug ggacauaggc uugaacucua 2460
 guuggaccuu cgucgucccc uacaucucgc ccagugacua ccgugaaacu cgagccauua 2520
 ccaacucggu uuacuccgcu gaugguuggu uuagccugca caaguugacc aaaauuacuc 2580
 uaccaccuga cuguccgcaa agucccugca uucucuuuuu cgcuucugcu ggugaggauu 2640
 acacucuccg ucucuccguu gauuguaaau cuuccuauug guuccacucc accgacaacg 2700
 ccgagaccgg gguuauugag gcggguaaca cugacaccga uuucucuggu gaacuggcgg 2760
 cuccuggcuc uaaccacacu aaugucaagu uccuguuuga ucgaucugca uuauugaau 2820
 uaaucaaggu acuggagaag gacgccguuu uccccgcc cccuuccuaca caagaaggug 2880
 cgcagcagga ugaugguuac uuugucuuu ugaccccccg cccaacaguc gcuucccgac 2940
 ccgccacucg uuucggccug uacgccaau cguccggcag ugguguucuu gcuaacacuu 3000
 cacuggacuu caauuuuuau agcuuggccu guuucacuuu cuuuagaucg gaccuugagg 3060
 uuacgguggu cucacuagag ccggaucugg aaauugcugu agggugguuu ccuucuggca 3120
 gugaauacca ggcuuccagc uuugucucag accagcugca ugugcccuuc cacuuuacug 3180
 ggcgcacucc ccgcgcuuuc gcuagcaagg gugggaaggu aucuuucgug cucccuugga 3240
 acucugucuc gucugugcuc cccgugcgc gggggggggc uucaagcuc ucuucugcua 3300
 cgcggggucu accggcgcau gcugauuggg ggacuauuuu cgccuuuguc cccguccua 3360
 augagaagaa aagcaccgcu guaaaacacg uggccgugua cauucgguac aagaacgcac 3420
 gugccuggug cccagcaug cuuccuuuuc gcagcuacaa gcagaagau cugaugcaau 3480
 cuggcgauau cgagaccaau cccgggcccug cuucugacaa cccaauuuug gaguuucuu 3540
 aagcagaaaa ugaucuaug acucuggccu cucucuggaa gauggugcac ucuguucaac 3600
 agaccuggag aaaguaugug aagaacgaug auuuuuggcc caauuacuc agcgagcuag 3660
 ugggggaagg cucugucgcc uuggccgcca cgcuaucua ccaagcuca guaaaggcuc 3720
 uuugggccu gcacuuucuc ucucgggggc ucauuacac ugacuuuac ucuuacuga 3780
 uagagaaau cucuaguuu uuuaaccguag aaccaccucc uccaccagcu gaaaaccuga 3840
 ugaccaagcc cucagugaag ucgaaauucc gaaaacuguu uaagaugcaa ggaccaugg 3900

acaaagucua	agacuggaac	caaauagcug	ccggcuugaa	gaauuuucua	uuuguucgug	3960
accuagucua	agaggugguc	gauuggcugc	aggccuggau	caacaaagag	aaagccagcc	4020
cuguccucca	guaccaguug	gagaugaaga	agcucgggccc	uguggccuug	gcucaugacg	4080
cuuucauggc	ugguuccggg	ccccucua	gcgacgacca	gauugaauac	cuccagaacc	4140
ucaaauucuc	ugcccuaaca	cuggggaaga	cuaauuuggc	ccaaagucuc	accacuauga	4200
ucaauugccaa	acaaaguuca	gcccacagag	uugaacccgu	uguggugguc	cuuagaggca	4260
agccgggaug	cggcaagagc	uuggccucua	cguugauugc	ccaggcugug	uccaagcgcc	4320
ucuauggcuc	ccaaagugua	uauucucuu	ccccagaucc	agauuucuu	gauggauaca	4380
aaggacaguu	cgugaccuug	auggaugauu	ugggacaaaa	cccggauugga	caagauuucu	4440
ccaccuuuug	ucagauggug	ucgaccgccc	aaauucucucc	caacauggcg	gaccuugcag	4500
agaaaggcg	uccuuuacc	uccaauucua	ucauugcaac	uacaaauuc	ccccacuua	4560
guccugucac	cauugcugau	ccuucugcag	ucucucgccc	uaucaacuac	gaucugacuc	4620
uagaaguau	ugaggccuac	aagaaacaca	cacggcugaa	uuuugacuug	gcuuucaggc	4680
gcacagacgc	ccccccauu	uaucuuuug	cugcccangu	gcccuuugug	gacguagcug	4740
ugcgcuucua	aaauggucac	cagaauuuua	aucuccuaga	guuggucgau	uccauuugua	4800
cagacauucg	agccaagcaa	caaggugccc	gaaacaugca	gacucugguu	cuacagagcc	4860
ccaacgagaa	ugaugacacc	cccgucgacg	aggcguggg	uagaguucuc	ucccccgcug	4920
cggucgauga	ggcgcuuguc	gaccucacuc	cagaggccga	cccggguuggc	cguuuggcua	4980
uuucugccaa	gcuaggucuu	gcccuaugcug	cggucacccc	uggucugaua	aucuuggcag	5040
ugggacucua	cagguacuuc	ucuggcucug	augcagacca	agaagaaaca	gaaagugagg	5100
gaucugucua	ggcaccagc	agcgaauuug	cuaugacgg	cccgaagaaa	aacucuaagc	5160
ccccuggagc	acucucucuc	auggaaugc	aacagcccaa	cguggacaug	ggcuuugagg	5220
cugcgguccg	uaagaaagug	gucgucccca	uuaccuucuu	gguucccaac	agaccuucug	5280
ggcuuacaca	guccgcucuc	cuggugaccg	gccggaccuu	ccuaaucaau	gaacauacau	5340
gguccaaucc	cuccuggacc	agcuucacaa	uccgcgguga	gguacacacu	cgugaugagc	5400
ccuuccaaac	gguucauuuc	acucaccacg	guauucccac	agauucugaug	augguacguc	5460
ucggaccggg	caauucuuuc	ccuaacaau	uagacaaguu	uggacuugac	cagaugccgg	5520
cacgcaacuc	ccgugugguu	ggcguuucgu	ccaguucagg	aaacuucuu	uucucuggaa	5580
auuuccucgg	auuuguugau	uccaucaccu	cugaacaagg	aacuuacgca	agacucuuua	5640
gguacagggg	gacgaccuac	aaaggauuggu	gcggcucggc	ccuggucugu	gaggccggug	5700
gcguccgacg	caucauuggc	cugcauucug	cuggcgccgc	cgguaucggc	gccgggaccu	5760
auaucuacaa	auuaggacua	aucaaagccc	ugaaacaccu	cggugaaccu	uuggccacaa	5820
ugcaaggacu	gaugacugaa	uuagagccug	gaauccaccg	acauguaccc	cggaaaucca	5880
aaugagaaaa	gacgaccgca	cacgcggugu	acaaaccgga	guuugagccu	gcuguguugu	5940
caaaaauuga	ucccagacug	aacaaggau	uugacuugga	ugaaguaau	uggucuaaac	6000
acacugccaa	ugucccuuac	caaccuccuu	uguucuaac	auacaugua	gaguacgcuc	6060
aucgagucuu	cuccuucuu	gggaaagaca	augacauuc	gaccgucaaa	gaagcaauuc	6120
ugggcauccc	cggacuagac	cccuaugau	cccacacagc	uccgggucug	ccuacgccca	6180
ucaacggccu	ucgacguacu	gaucucgucg	auuuugugaa	cgguaacagua	gaugcggcgc	6240

uggcuguaca aauccagaaa uucuuagacg gugacuacuc ugaccauguc uuccaaacuu 6300
 uucugaaaga ugagaucaga cccucagaga aaguccgagc gggaaaaacc cgcauuguug 6360
 augugcccuc ccuggcgcau ugcauugugg gcagaauguu gcuugggcgc uuugcugcca 6420
 aguuaaauuc ccauccuggc uuucuccucg gcucugcuau cgggucugac ccugauguuu 6480
 ucuggaccgu cauaggggcu caacucgagg ggagaaagaa cacguaugac guggacuaca 6540
 gugccuuuga cucuucacac ggcacuggcu ccuucgaggc ucucaucucu cacuuuuuca 6600
 ccguggacaa ugguuuuagc ccugcgcugg gaccguauuc cagaucccug gcugucucgg 6660
 ugcacgcuaa cggcgagcgu cgcaucaaga uuaccggugg ccuccccucc gguugugccg 6720
 cgaccagccu gcugaacaca gugcucaaca augugaucan caggacugcu cuggcauuga 6780
 cuuacaagga auuuugaauu gacaugguug auaucaucgc cuacggugac gaccuucugg 6840
 uuggcacgga uuacgaucug gacuucuaug agguggcacg acgcgcugcc aaguuggggg 6900
 auaagaugac uccugccaac aaggguuucg ucuucccucc gacuuccucu cuuuccgaug 6960
 cuguuuuuuc aaagcgcaaa uucguccaaa acaacgacgg cuuauacaaa ccaguuaugg 7020
 auuuuaagaa uuuggaagcc augcucuccu acuucaaacc aggaacacua cucgagaagc 7080
 ugcaaucugu uucuauguug gcucaacauu cuggaaaaga agaauaugau agauugaugc 7140
 accccuucgc ugacuacggu gccguaccga gucacgagua ccugcaggca agauggaggg 7200
 ccuuguucga cugaccaga uagcccaagg cgcuuaggug cugccggcga uucugggaga 7260
 acucagucgg aacagaaaag ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 7313

<210> 5

<211> 8066

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-mCherry构建体

<400> 5

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcg cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuaauuggu guggucugcg aguucuaagc uacucguuuc uccccgacc auucacucac 240
 ccacgaaaag uguguuguaa ccuaaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcugca ccuccuuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu cccucucgga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcua gaccccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguuucuaa gguagcaca 660
 acaaaauaugc agaacucuca uuuuuuuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucuacuc auuuggagau acugaaccua caggguagaa uugaaaauuu aaggucuuuc 840

aaugaauacc	aaauucgcgc	cgccaaacaa	caacucggac	uggacaucgu	guacgaacua	900
caggguaaug	uucagacaac	gucaaagaau	gauuuugauu	cccguggcaa	uaaugguaac	960
augaccuuca	auuacuacgc	aaacacuuau	cagaauucag	uagacuucuc	gaccuccucg	1020
ucggcgucag	gcgccggacc	ugggaacucu	cgggcgggau	uagcgggucu	ccucacaaa	1080
uucaguggaa	ucuugaaccc	ucuuggcuac	cucaaagauc	acaacaccga	agaaauggaa	1140
aacucugcug	aucgagucac	aacgcaaacg	gcgggcaaca	cugccauaaa	cacgcaauca	1200
ucauugggug	uguugugugc	cuacguugaa	gacccgacca	aaucugaucc	uccguccagc	1260
agcacagauc	aacccaccac	cacuucacuc	gccaucgaca	ggugguacac	uggacgucuc	1320
aauuucugga	caaaaagcugu	aaaaaccuuc	ucuuuucagg	ccgucccgcu	ucccgugucc	1380
uuucugucua	ggcagggagg	ccucaacgga	ggggccuuca	cagcuacccu	acauagacac	1440
uuuuugauga	agugcgggug	gcaggugcag	guccaaugua	auuugacaca	auuccaccaa	1500
ggcgucucuc	uuguugccau	gguuccugaa	accacccuug	augucaagcc	cgacgguaag	1560
gcaaagagcu	uacaggagcu	gaaugaagaa	cagugggugg	aaaugucuga	cgauuaccgg	1620
accgggaaaa	acaugccuuu	ucagucucuu	ggcacauacu	aucggcccc	uaacuggacu	1680
ugggguccca	auuucaucaa	ccccuaucaa	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggu	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggacccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaaau	acauuuucug	uaaggccuac	aagucccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaaccc	ucccugacga	cacugucccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauiaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcuuacc	cacucucaug	gcauuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauauugucc	cuacguugcc	guucccaccc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagaucuu	gucuaucaga	acaccuggu	uggcgccauc	2280
aguucaaaau	ucgccaauua	ccgugggugu	auccaaaaua	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaaaau	ccugcucucg	uauiucuccc	caaauggaac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauagc	gugcacauac	ucuauuuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuca	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauiacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuiuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuauuguu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcgccu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaaggua	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggaug	augguuacuu	uugucuuucg	acccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuuucg	uaacacuua	3000
cuggacuua	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuuacuggg	3180

cgcacucucc gcgcuuucgc uagcaaggggu gggaaggua cuuucgugcu cccuuggaac 3240
 ucugucucgu cugugcucucc cgugcgcugg gggggggcuu ccaagcucuc uucugcuacg 3300
 cggggucuaac cggcgcaugc ugauuggggg acuauuuacg ccuuuguccc ccguccuaau 3360
 gagaagaaaa gcaccgcugu aaaacacgug gccguguaca uucgguacaa gaacgcacgu 3420
 gccuggugcc ccagcaugcu ucccuuucgc agcuacaagc agaagaugcu gaugcaau cu 3480
 ggcgauauucg agaccaaucc cggggccgagc aagggcgagg aggauaau cu ggccaucauc 3540
 aaggaguuca ugcgcuucaa ggugcacau gagggcuccg ugaacggcca cgaguucgag 3600
 aucgagggcg agggcgaggg ccgccccuac gagggcaccc agaccgcca gcugaaggug 3660
 accaagggug gccccucg ccuucgccug gacauccugu cccucaguu cauguacggc 3720
 uccaaggccu acgugaagca ccccgccgac aucccgacu acuugaagcu guccuucucc 3780
 gagggcuuca agugggagcg cgugaugaac uucgaggacg gcggcguggu gaccgugacc 3840
 caggacuccu cccugcagga cggcgaguuc aucuacaagg ugaagcugcg cggcaccaac 3900
 uuccccuccg acggccccgu aaugcagaag aagaccaug gcugggaggc cuccuccgag 3960
 cggauguacc ccgaggacgg cggccugaag ggcgagauc agcagaggcu gaagcugaag 4020
 gacggcggcc acuacgacgc ugaggucaag accaccuaca aggccaagaa gcccgucag 4080
 cugcccgcg ccuacaacgu caacaucaag uuggacauca ccuccacaa cgaggacuac 4140
 accaucgugg aacaguacga acgcgccgag ggccgccacu ccaccggcg cauggacgag 4200
 cuguacaagg agggcagagg aagucugcua acaugcggug acgucgagga gaauccggg 4260
 ccugcuucug acaaccaau uuuggaguu cuugaagcag aaaaugacu agucacucug 4320
 gccucucucu ggaagauggu gcacucugu caacagaccu ggagaaagua ugugaagaac 4380
 gaugauuuuu ggcccaauu acucagcgag cuaguggggg aaggcucugu cgccuuggcc 4440
 gccacgcua ccaaccaagc uucaguaaag gcucuuuugg gccugcacuu ucucucucgg 4500
 gggcucaau acacugacu uuacucuuu cugauagaga aaugcucuag uuucuuuacc 4560
 guagaaccac cuccuccacc agcugaaaac cugaugacca agccucagu gaagucgaaa 4620
 uuccgaaaac uguuuagau gcaaggacc auggacaaag ucaaagacug gaaccaaaua 4680
 gcugccggcu ugaagaauu ucaauuugu cgugaccuag ucaaagaggu ggucgauugg 4740
 cugcaggccu ggaucaacaa agagaaagcc agccugucc uccaguacca guuggagaug 4800
 aagaagcucg ggccuguggc cuuggcucu gacgcuuuca uggcugguuc cgggcccccu 4860
 cuuagcgacg accagauuga auaccuccag aaccucaa cuuugcccu aacacugggg 4920
 aagacuaau ugccccaaag ucucaccacu augaucaug ccaaacaag uucagcccaa 4980
 cgaguugaac ccguuguggu gguccuuaga ggcaagccgg gaugcgga gagcuuggcc 5040
 ucuacguuga uugcccaggc uguguccaag cgccucuaug gcucccaaag uguauauucu 5100
 cuuuccccag auccagauu cuucgaugga uacaaaggac aguucgugac cuugauggau 5160
 gauuugggac aaaacccgga uggacaagau uuuccaccu uuugucagau ggugucgacc 5220
 gcccuaauu uccccaacau ggcggaaccu gcagagaaag ggcguccuu uaccuccaau 5280
 cucaucauug caacuacaaa ucucuccac uucaguccug ucaccuugc ugauccuucu 5340
 gcagucucuc gccguaucaa cuacgaucug acucuagaag uaucugaggc cuacaagaaa 5400
 cacacacggc ugaauuuuga cuuggcuuuc aggcgcacag acgcccccc cauuuauccu 5460
 uuugcugccc augugcccu uguggacgua gcugugcgcu ucaaaaagg ucaccagaau 5520

uuuaaucucc	uagaguuggu	cgauuccauu	uguacagaca	uucgagccaa	gcaacaaggu	5580
gcccgaaca	ugcagacucu	gguuuacag	agccccaacg	agaaugauga	cacccccguc	5640
gacgaggcgu	uggguagagu	ucucucuccc	gcugcggucg	augaggcgcu	ugucgaccuc	5700
acuccagagg	ccgacccggu	uggccguuug	gcuauucuug	ccaagcuagg	ucuugcccua	5760
gcugcgguca	ccccuggucu	gauaauucuug	gcagugggac	ucuacaggua	cuucucuggc	5820
ucugaugcag	accaagaaga	aacagaaagu	gagggauucg	ucaaggcacc	caggagcgaa	5880
aaugcuuaug	acggcccgaa	gaaaaacucu	aagccccug	gagcacucuc	ucucauggaa	5940
augcaacagc	ccaacgugga	caugggcuuu	gaggcugcgg	ucgcuaagaa	aguggucguc	6000
cccauuaccu	ucaugguucc	caacagaccu	ucugggcuua	cacaguccgc	ucuucuggug	6060
accggccgga	ccuuccuaau	caaugaacau	acauggucca	aucccuccug	gaccagcuuc	6120
acaauccgcg	gugagguaca	cacucgugau	gagcccuucc	aaacgguuca	uuucacucac	6180
cacgguaauuc	ccacagauc	gaugauggua	cgucucggac	cgggcaauuc	uuucccuaac	6240
aaucuagaca	aguuuaggacu	ugaccagaug	ccggcacgca	acucccgugu	gguuggcguu	6300
ucguccaguu	acggaaacuu	cuucuuucuc	ggaaaauucc	ucggauuugu	ugauuccauc	6360
accucugaac	aaggaacuua	cgcaagacuc	uuuagguaca	gggugacgac	cuacaaagga	6420
uggugcggcu	cggcccuggu	cugugaggcc	gguggcgucc	gacgcaucau	uggccugcau	6480
ucugcuggcg	ccgccggua	cggcgccggg	accuauaucu	caaaaauagg	acuaaucaaa	6540
gcccugaaac	accucgguga	accuuuggcc	acaaugcaag	gacugaugac	ugaauuagag	6600
ccuggaauca	ccguacaugu	accccggaaa	uccaaaauuga	gaaagacgac	cgcacacgcg	6660
guguacaaac	cggaguuuuga	gccugcugug	uugucaaaau	uugaucccag	acugaacaag	6720
gauguugacu	uggaugaaggu	aaauuggucu	aaacacacug	ccaauguccc	uuaccaaccu	6780
ccuuuguucu	acacauacau	gucagaguac	gcucaucgag	ucuucuccuu	cuuggggaaa	6840
gacaaugaca	uucugaccgu	caaagaagca	auucugggca	uccccggacu	agaccccaug	6900
gaucacccaca	cagcuccggg	ucugccuuac	gccaucaacg	gccuucgacg	uacugaucuc	6960
gucgauuuug	ugaacgguac	aguagaugcg	gcgcuggcug	uacaaaacca	gaaaauucuua	7020
gacggugacu	acucugacca	ugucuuccaa	acuuuucuga	aagaugagau	cagaccucu	7080
gagaaaagucc	gagcgggaaa	aacccgcauu	guugaugugc	ccucccuggc	gcauugcauu	7140
gugggcagaa	uguugcuugg	gcgcuuugcu	gccaauguuc	aaucccaucc	uggcuuucuc	7200
cucggcucug	cuaucggguc	ugaccucgau	guuuucugga	ccgucauagg	ggcucaacuc	7260
gaggggagaa	agaacacgua	ugacguggac	uacagugccu	uugacucuu	acacggcacu	7320
ggcuccuucg	aggcucucau	cucucacuuu	uucaccgugg	acaauugguu	uagcccugcg	7380
cugggaccgu	aucucagauc	ccuggcuguc	ucggugcacg	cuuacggcga	gcgucgcauc	7440
aagauuaccg	guggccuccc	cuccgguuugu	gccgcgacca	gccugcugaa	cacagugcuc	7500
aacaauguga	ucaucaggac	ugcucuggca	uugacuua	aggaauuuga	auaugacaug	7560
guugauauca	ucgccuacgg	ugacgaccuu	cugguuggca	cggauuacga	ucuggacuuc	7620
aaugaggugg	cacgacgcgc	ugccaaguug	ggguauaaga	ugacuccugc	caacaagggg	7680
ucugucuucc	cuccgacuuc	cucucuuucc	gaugcuguuu	uucuaaagcg	caaaucguc	7740
caaaacaacg	acggcuuaua	caaaccagu	auggaauuaa	agaauuugga	agccaugcuc	7800
uccuacuua	aaccaggaac	acuacucgag	aagcugcaau	cuguuucuau	guuggcucaa	7860

cauucuggaa aagaagaaua ugauagauug augcaccccu ucgcugacua cggugccgua 7920
 ccgagucacg aguaccugca ggcaagaugg agggccuugu ucgacugacc cagauagccc 7980
 aaggcgcuuc ggugcugccg gcgauucugg gagaacucag ucggaacaga aaagggaana 8040
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 8066

<210> 6

<211> 7992

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-nLuc构建体

<400> 6

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuuccg auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuaauuggu guggucugcg aguucuaagg uacucguuuc ucccccgacc auucacucac 240
 ccacgaaaag uguguuguaa ccuaaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcuqua accacaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccucuccuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu ccccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 ggugggggcau gaccccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguuuuaa gguagcacau 660
 acaaaauagc agaacucua uuuuuuuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucuauc auuuggagau acugaaccua caggguagaa uugaaauuuu aaggucuuuc 840
 aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacaucgu guacgaacua 900
 caggguuaug uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uaaugguaac 960
 augaccuua auuacuacgc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
 ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcgga uagcgggucu ccucacaaau 1080
 uucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
 aacucugcug aucgagucac aacgcaaacg gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
 ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gacccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
 agcacagauc aacccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320
 aaauucugga caaaagcugu aaaaaccuuc uuuuuucagg ccgucuccgu ucccggugcc 1380
 uuucugucua ggcaggagg ccucaacgga ggggcccua cagcuaccu acauagacac 1440
 uuuuugauga agugcgggug gcaggugcag guccaugua auuugacaca auuccacaa 1500
 ggcgcucuu uuguugccau gguuccugaa accaccuuug augucaagcc cgacgguaag 1560
 gcaaagagcu uacaggagcu gaaugaagaa cagugggugg aaaugucuga cgauuaccgg 1620
 accgggaaaa acaugccuuu ucagucucuu ggcacauacu aucggcccc uaacuggacu 1680

ugggguccca	auuucaucaa	ccccuaucaa	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggu	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggacccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaauu	acauuuucug	uaaggccuac	aagucccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaaccc	ucccugacga	cacugucccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauuaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcauacc	cacucucaug	gcuuuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauaugugcc	cuacguugcc	guucccaccc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagaucuu	gucuauacga	acaccucggu	uggcgccauc	2280
aguucaaaau	ucgccaauua	ccguggggugu	auccaaauca	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaaaau	ccugcucucg	uaauucuccc	caaauaggac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauuca	gugcacauac	ucuaauuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuca	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauiacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuauuguu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcgggcu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaaggua	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggaug	augguuacuu	uugucuuucg	accccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuugc	uaacacuuca	3000
cuggacuua	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggauucggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuacuggg	3180
cgcacucccc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaaggua	cuuucgugcu	ccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgcugg	ggggggggcu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuaauuacg	ccuuuguccc	ccguccuaau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuucgc	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaauuc	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccgaug	gucuucacac	ucgaagauuu	cguuggggac	3540
uggcgacaga	cagccggcu	caaccuggac	caaguccuug	aacaggagg	uguguccagu	3600
uuguuucaga	aucucggggu	guccguaacu	ccgauccaaa	ggauuguccu	gagcggugaa	3660
aaugggcuga	agaucgacau	ccaugucauc	aucccguaug	aaggucugag	cggcgaccaa	3720
augggccaga	ucgaaaaau	uuuuuaggug	guguaccucg	uggaugauca	ucacuuuaag	3780
gugaucucgc	acuauggcac	acugguaau	gacggggua	cgccgaacau	gaucgacuau	3840
uucggacggc	cguaugaagg	caucgccgug	uucgacggca	aaaagaucac	uguaacaggg	3900
accugugga	acggcaacaa	aauiuucgac	gagcgccuga	ucaaccccga	cggcuccucg	3960
cuguuccgag	uaaccaucaa	cggagugacc	ggcuggcggc	ugugcgaacg	cauucuggcg	4020

gagggcagag	gaagucugcu	aacaugcggu	gacgucgagg	agaaucccgg	gccugcuucu	4080
gacaacccaa	uuuuggaguu	ucuugaagca	gaaaauauc	uagucacucu	ggccucucuc	4140
uggaagaugg	ugcacucugu	ucaacagacc	uggagaaagu	augugaagaa	cgaugauuuu	4200
uggcccaauu	uacucagcga	gcuagugggg	gaaggcucug	ucgccuuggc	cgccacgcua	4260
uccaaccaag	cuucaguaaa	ggcucuuuug	ggccugcacu	uucucucucg	ggggcucaau	4320
uacacugacu	uuuacucuuu	acugauagag	aaaugcucua	guuucuuuac	cguagaacca	4380
ccuccuccac	cagcugaaaa	ccugaugacc	aagcccucag	ugaagucgaa	auuccgaaaa	4440
cuguuuuaga	ugcaaggacc	cauggacaaa	gucaaagacu	ggaaccaaau	agcugccggc	4500
uugaagaauu	uucaauuugu	ucgugaccua	gucaaagagg	uggucgauug	gcugcaggcc	4560
uggaucaaca	aagagaaaagc	cagcccuguc	cuccaguacc	aguuggagau	gaagaagcuc	4620
gggccugugg	ccuuggcuca	ugacgcuuuc	auggcugguu	ccgggcccc	ucuuagcgac	4680
gaccagauug	aauaccucca	gaaccucaa	ucucuugccc	uaacacuggg	gaagacuaau	4740
uuggcccaaa	gucucaccac	uaugaucaau	gccaaacaaa	guucagccca	acgaguugaa	4800
cccguugugg	ugguccuuag	aggcaagccg	ggaugcggca	agagcuuggc	cucuacguug	4860
auugcccagg	cuguguccaa	gcgccucua	ggcucccaaa	guguauauuc	ucuuccccca	4920
gauccagauu	ucuuugaugg	auacaaagga	caguucguga	ccuugaugga	ugauuuggga	4980
caaaacccgg	auaggacaaga	uuucuccacc	uuuugucaga	uggugucgac	cgcccaauuu	5040
cuccccaaca	uggcggaccu	ugcagagaaa	gggcgucccu	uuaccuccaa	ucucaucauu	5100
gcaacuacaa	aucuccccca	cuucaguccu	gucaccuug	cugauccuuc	ugcagucucu	5160
cgccguauca	acuacgaucu	gacucuagaa	guaucugagg	ccuacaagaa	acacacacgg	5220
cugaauuuug	acuuggcuuu	caggcgcaca	gacgcccccc	ccauuuaucc	uuuugcugcc	5280
caugugcccu	uuugggacgu	agcugugcgc	uucaaaaau	gucaccagaa	uuuuauucuc	5340
cuagaguugg	ucgauuccau	uuquacagac	auucgagcca	agcaacaagg	ugcccgaac	5400
augcagacuc	ugguucuaca	gagccccaac	gagaauaug	acacccccgu	cgacgaggcg	5460
uuggguagag	uucucucccc	cgcugcgguc	gaugaggcgc	uugucgaccu	cacuccagag	5520
gccgacccgg	uuggccguuu	ggcuauucuu	gccaaagcuag	gucuugcccu	agcugcgguc	5580
accccugguc	ugauaaucuu	ggcaguggga	cucuacaggu	acuucucugg	cucugaugca	5640
gaccaagaag	aaacagaaaag	ugagggauuc	gucaaggcac	ccaggagcga	aaaugcuuau	5700
gacggcccg	agaaaaacuc	uaagcccccu	ggagcacucu	cucucaugga	aaugcaacag	5760
cccaacgugg	acaugggcuu	ugaggcugcg	gucgcuaaga	aaguggucgu	ccccauuacc	5820
uucaugguuc	ccaacagacc	uucugggcuu	acacaguccg	cucuucuggu	gaccggccgg	5880
accuuccuaa	ucaauagaaca	uacauggucc	aaucccuccu	ggaccagcuu	cacaauccgc	5940
ggugagguac	acacucguga	ugagcccuuc	caaacgguu	auuucacuca	ccacgguauu	6000
cccacagauc	ugaugauggu	acgucucgga	ccgggcaauu	cuuucccuua	caaucuagac	6060
aaguuuggac	uugaccagau	gccggcacgc	aacucccgug	ugguuggcgu	uucguccagu	6120
uacggaaacu	ucuuucucuc	uggaaaauuc	cucggauuug	uugauuccau	caccucugaa	6180
caaggaacuu	acgcaagacu	cuuuagguac	aggugacga	ccuacaaagg	auggugcggc	6240
ucggcccugg	ucugugaggc	cgguggcguc	cgacgcauca	uuggccugca	uucugcuggc	6300
gccgccggua	ucggcgccgg	gaccuauauc	ucaaaaauag	gacuaaucaa	agcccugaaa	6360

caccucggug aaccuuuggc cacaaugcaa ggacugauga cugaauuaga gccuggauc 6420
 accguacaug uaccccgga auctaaauug agaaagacga ccgcacacgc gguguacaaa 6480
 ccggaguug agccugcugu guugucaaaa uuugauccca gacugaacaa ggauguugac 6540
 uuggaugaag uaaauugguc uaaacacacu gccaaugucc cuuaccaacc uccuuuguuc 6600
 uacacauaca ugucagagua cgcucaucga gucuucuccu ucuuggggaa agacaaugac 6660
 auucugaccg ucaaagaagc aaauucuggc aucccggaac uagaccccau ggaucacac 6720
 acagcuccgg gucugccuua cgccaucaac ggccuucgac guacugaucu cgucgaucuu 6780
 gugaacggua caguagaugc ggcgugggcu guacaaaucc agaaauucuu agacggugac 6840
 uacucugacc augucuuuca aacuuuucug aaagaugaga ucagaccuc agagaaaguc 6900
 cgagcgggaa aaacccgcau uguugaugug ccucuccug cgcauugcau ugugggcaga 6960
 auguugcuug ggcgcuuugc ugccaaguuu caaucccauc cuggcuuucu ccucggcucu 7020
 gcuaucgggu cugacccuga uguuuucugg accgucuaug gggcucaacu cgaggggaga 7080
 aagaacacgu augacgugga cuacagugcc uuugacucuu cacacggcac uggcuccuuc 7140
 gaggcucuca ucucucacuu uuucaccgug gacaauuguu uuagcccugc gcugggaccg 7200
 uaucucagau ccucggcugu cucggugcac gcuuacggcg agcgucgcau caagauuacc 7260
 gguggccucc ccuccgguuug ugccgcgacc agccugcuga acacagugcu caacaugug 7320
 aucaucagga cugcucuggc auugacuuac aaggaauuug aauaugacau gguugauuc 7380
 aucgccuacg gugacgaccu ucugguuggc acggauuacg aucuggacu caaugaggug 7440
 gcacgacgcg cugccaaguu gggguauaag augacuccug ccaacaaggg uucugucuuc 7500
 ccuccgacu ccucucuuuc cgaugcuguu uuucuaaagc gcaauuucgu ccaaaacaac 7560
 gacggcuuau acaaaccagu uauggauua aagaauuug aagccaugcu cuccuacuuc 7620
 aaaccaggaa cacuacucga gaagcugcaa ucuguuucua uguuggcuca acauucugga 7680
 aaagaagaau augauagaau gaugcaccac uucgucgacu acggugccgu accgagucac 7740
 gaguaccugc aggcaagaug gagggccuug uucgacugac ccagauagcc caaggcgcuu 7800
 cggugcugcc ggcgauucug ggagaacuca gucggaacag aaaagggaaa aaaaaaaaaa 7860
 aaaaaaaaaa aaaaaaaggc cggcaugguc ccagccuccu cgucggcgcc ggcugggcaa 7920
 caugcuucgg cauggcgaau gggacgcggc cgcucgaguc uagaggggccc guuuaaaccc 7980
 gcugaucagc cu 7992

<210> 7

<211> 7786

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-GMCSF构建体

<400> 7

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcg cgccaaaggu guuagcgac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuauuggu guggucugcg aguucagcc uacucguuuc uccccgacc auucacucac 240

ccacgaaaag uguguuguaa ccuaaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuaguccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga cccuccuuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu ccccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcau gaccccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguuuaua gguagcacau 660
 acaaaauagc agaacucuca uuuuuuuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucuauc auuuggagau acugaaccua caggguagaa uugaaauuu aaggucuuuc 840
 aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacaucgu guacgaacua 900
 caggguaaug uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uaauagguaac 960
 augaccuua auuacuagc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
 ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcgga uagcgggucu ccucacaaau 1080
 uucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
 aacucugcug aucgagucac aacgcaaacg gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
 ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gaccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
 agcacagauc aaccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320
 aaauucugga caaaagcugu aaaaaccuuc ucuuuucagg ccgucgccu ucccggugcc 1380
 uuucugucua ggcaggagg ccucaacgga ggggccuua cagcuaccu acauagacac 1440
 uuuuugauga agugcgggug gcaggugcag guccaugua auuugacaca auuccacaa 1500
 ggcgcucuu ucguugccau gguuccugaa accaccuug augucaagcc cgacgguaag 1560
 gcaaagagcu uacaggagcu gaaugaagaa cagugggugg aaaugucuga cgauuaccgg 1620
 accgggaaaa acaugccuu ucagucucu ggcacauacu aucggcccc uaacuggacu 1680
 ugggguccca auuucacaa cccuauca gaaacgguu ucccacacca aaucugaac 1740
 gcgagaaccu cuaccucggu agacauaaac guccauaca ucggggagac cccacgcaa 1800
 uccucagaga cacagaacuc cuggaccuc cucguuauug ugcucguucc ccuagacuau 1860
 aaggaaggag ccacaacuga cccagaaauu acauuuucug uaaggccuac aaguccuac 1920
 uucaaugggc uucgcaaccg cuacacggc gggacggacg aagaacagg gccauuccu 1980
 acggcaccca gagaaaauuc gcuuauguuu cucucaacce uccugacga cacuguccu 2040
 gcuuacggga augugcguac cccuccuguc aaauaccucc cuggugaaau aaccgaccu 2100
 uugcaacugg cccgcauacc cacucucaug gcauuugagc gggugccuga acccgugcu 2160
 gccucagaca cauaugugc cuacguugc guuuccacc aguuugauga caggccucuc 2220
 aucuccuucc cgauacccu uucagaucg gucuauca acaccuggu uggcgccauc 2280
 aguucaaaau ucgccaauua ccgugggugu auccaaauca cucugacau uuguggacc 2340
 augauggcga gagggaaaau ccugcucucg uauucuccc caaauggaac gcaaccacag 2400
 acucuuuccg aagcuauca gugcacauac ucuauuugg acauaggcu gaacucuagu 2460
 uggaccuucg ucgucccuca caucucgccc agugacuacc gugaaacuc agccauuacc 2520
 aacucgguu acuccgcuga ugguugguu agccugcaca aguugaccaa aauiacucua 2580

ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuaugugu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggcu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggaug	augguuacuu	uugucuucug	accccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuugc	uaacacuuca	3000
cuggacuuca	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuuacuggg	3180
cgcacucccc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaagguaa	cuuucgugcu	cccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgucgg	ggggggggcuu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuaauuacg	ccuuuguccc	ccguccuaau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuuucg	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaaucu	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccgaug	uggcuccaaa	accugcucuu	ccucggaauu	3540
gucguguacu	cccuguccgc	uccuacuaga	agcccaauca	caguaacaag	accuuggaaa	3600
cacguggaag	cuauaaaaga	agcccugaac	cugcuugacg	auaugcccgu	aaccucgaau	3660
gaagaaguug	aaguuguaag	caacgaauuu	uccuuaaga	aacucacaug	ugugcaaacc	3720
cggcugaaaa	uauuuagaaca	aggacugaga	ggaaauuuua	cuaaacuuua	aggcgcacuu	3780
aaauagacug	cuucuuauua	ccagacuuaa	ugccccccua	caccagaaac	cgauugcgaa	3840
acccaaguga	cuaccuaugc	cgacuuaa	gauuccuuga	aaacguuccu	uacugauuaa	3900
cccuuugaau	gcaaaaaacc	uggacagaaa	gagggcagag	gaagucugcu	aacaugcggu	3960
gacgucgagg	agaaucccg	gccugcuucu	gacaacccaa	uuuuggaguu	ucuugaagca	4020
gaaaaugauc	uagucacucu	ggccucucuc	uggaagaugg	ugcacucugu	ucaacagacc	4080
uggagaaagu	augugaagaa	cgaugauuuu	uggcccaauu	uacucagcga	gcuagugggg	4140
gaaggcucug	ucgccuuggc	cgccacgcua	uccaaccaag	cuucaguaaa	ggcucuuuug	4200
ggccugcacu	uucucucucg	ggggcucaau	uacacugacu	uuuacucuuu	acugauagag	4260
aaaugcucua	guuuuuuac	cguagaacca	ccuccuccac	cagcugaaaa	ccugaugacc	4320
aagcccucag	ugaagucgaa	auuccgaaaa	cuguuuuaga	ugcaaggacc	cauggacaaa	4380
gucaaagacu	ggaaccaaau	agcugccggc	uugaagaauu	uucaauuugu	ucgugaccua	4440
gucaaagagg	uggucgauug	gcugcaggcc	uggaucaaca	aagagaaagc	cagcccuguc	4500
cuccaguacc	aguuggagau	gaagaagcuc	gggccugugg	ccuuggcuca	ugacgcuuuc	4560
auggcugguu	ccgggcccc	ucuuagcgac	gaccagauug	aauaccucca	gaaccucaa	4620
ucucuugccc	uaacacuggg	gaagacuauu	uuggcccaaa	gucucaccac	uaugaucaau	4680
gccaaacaaa	guucagccca	acgaguugaa	cccguugugg	ugguccuuag	aggcaagccg	4740
ggaugcggca	agagcuuggc	cucuacguug	auugcccagg	cuguguccaa	gcgccucua	4800
ggcucccaaa	guguauauuc	ucuuccccca	gauccagauu	ucuuugaugg	auacaaagga	4860
caguucguga	ccuugaugga	ugauuuggga	caaaacccgg	auggacaaga	uuuccuccacc	4920

```

uuuugucaga uggugucgac cgcccauuu cucccaaca uggcggaccu ugcagagaaa 4980
gggcgucccu uuaccuccaa ucucaucau gcaacuacaa aucucccca cuucaguccu 5040
gucaccauug cugauccuuc ugcagucucu cgccguauca acuacgauc gacucuagaa 5100
guaucugagg ccuacaagaa acacacacgg cugaauuuug acuuggcuuu caggcgcaca 5160
gacgcccccc ccauuuaucc uuuugcugcc caugugcccu uuguggacgu agcugugcgc 5220
uucaaaaaug gucaccagaa uuuuaaucuc cuagaguugg ucgauuccau uuguacagac 5280
auucgagcca agcaacaagg ugcccgaac augcagacuc ugguucuaca gagccccaac 5340
gagaauaug acacccccgu cgacgaggcg uuggguagag uucucucccc cgcugcgguc 5400
gaugaggcgc uugucgaccu cacuccagag gccgaccggg uggccguuu ggcuauucuu 5460
gccaagcuag gucuugcccu agcugcgguc acccuggcuc ugauaauuu ggaguggga 5520
cucuacaggu acuuucucug cucugaugca gaccaagaag aaacagaaag ugagggauc 5580
gucaaggcac ccaggagcga aaaugcuuau gacggcccg aaaaaacuc uaagccccc 5640
ggagcacucu cucucaugga aaugcaacag cccaacgugg acaugggcuu ugaggcugcg 5700
gucgcuaaga aaguggucgu ccccauuacc uucaugguuc ccaacagacc uucugggcuu 5760
acacaguccg cucuucuggu gaccggccgg accuuccuaa ucaaugaaca ucauggucc 5820
aaucccuccu ggaccagcuu cacaauccgc ggugagguac acacucguga ugagcccuuc 5880
caaacggguu auuuacacua ccacgguaui cccacagauc ugaugauggu acgucucgga 5940
ccgggcaauu cuuucccuua caaucuagac aaguuggac uugaccagau gccggcacgc 6000
aacucccgug uggguuggcu uucguccagu uacggaaacu ucuucucuc uggaauuuc 6060
cucggauuug uugauuccau caccucugaa caaggaacu acgcaagacu cuuagguac 6120
aggguagcga ccuacaaagg augguccggc ucggcccug ucugugaggc cggugcgcuc 6180
cgacgcauca uggccugca uucugcuggc gccgccgua ucggcgccgg gaccuauauc 6240
ucaaaauuag gacuaaucaa agcccugaaa caccucggug aaccuuuggc cacaugcaa 6300
ggacugauga cugaauuaga gccuggaau accguacaug uaccccgga auccaaauug 6360
agaaagacga ccgcacacgc ggguacaaa ccggaguuu agccugcugu guugucaaaa 6420
uuugauccka gacugaacaa ggauguugac uuggaugaag uauuuugguc uaaacacacu 6480
gccaauugcc cuuaccaacc uccuuuguuc uacacauaca ugucagagua cgcucaucga 6540
gucuucuccu ucuuggggaa agacaauag auucugaccg ucaaagaagc aaucugggc 6600
auccccggac uagaccccau ggauccecc acagcuccgg gucugccuua cgccaucaac 6660
ggccuucgac guacugauc cguugauuuu gugaacggua caguagaugc ggcgucggcu 6720
guacaaaucc agaaaauuu agacggugac uacucugacc augucuucca aacuuuucug 6780
aaagaugaga ucagaccuc agagaaaguc cgagcgggaa aaaccgcga uguugaugug 6840
cccucccugg cgcauugcau ugugggcaga auguugcuug ggcgcuuugc ugccaaguuu 6900
cauucccauc cuggcuuuu ccucggcucu gcuauccggg cugaccuga uguuuucugg 6960
accgucauag gggcucaacu cgaggggaga aagaacacgu augacgugga cuacagugcc 7020
uuugacucuu cacacggcac uggcuccuuc gaggcucua ucucucacu uuucaccgug 7080
gacaaugguu uuagcccugc gcugggaccg uaucucagau ccuggcugu cucggugcac 7140
gcuuacggcg agcugcgau caagauuacc gguggcucc ccuccgguug ugccgcgacc 7200
agccugcuga acacagugcu caacaauug aucaucagga cugcucuggc auugacuac 7260

```

aaggaauuug aaauugacau gguugauauc aucgccuacg gugacgaccu ucugguuggc 7320
 acggauuacg aucuggacuu caaugaggug gcacgacgcg cugccaaguu gggguauaag 7380
 augacuccug ccaacaaggg uucugucuuc ccuccgacuu ccucucuuc cgaugcuguu 7440
 uuucuaaagc gcaauuucgu ccaaaacaac gacggcuuau acaaaccagu uauggauua 7500
 aagaauuugg aagccaugcu cuccuacuuc aaaccaggaa cacuacucga gaagcugcaa 7560
 ucuguuucua uguuuggcua acauucugga aaagaagaau augauagauu gaugcacccc 7620
 uucgcugacu acggugccgu accgagucac gaguaccugc aggcaaug augggccuug 7680
 uucgacugac ccagauagcc caaggcgcuu cggugcugcc ggcgauucug ggagaacuca 7740
 gucggaaacag aaaaggga aaiaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaa 7786

<210> 8

<211> 8993

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV IL-12构建体

<400> 8

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcg cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuauuggu guggucugcg aguucuaagc uacucguuuc uccccgacc auucacucac 240
 ccacgaaaag uguguuguaa ccauaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccucuccuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu cccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcua gaccccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuagcgu 600
 gccuuggaua cugccuguaa gggcgacggc cuagucgugu cgguuuuaa gguagcaca 660
 acaaaauagc agaacucua uuuuucuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucuauc auuuggagau acugaaccua caggguuaa uugaaauuuu aaggucuuuc 840
 aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacaucgu guacgaacua 900
 caggguuaug uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uaaugguaac 960
 augaccuua auuacuacgc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
 ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcgga uagcgggucu ccucacaaau 1080
 uucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
 aacucugcug aucgagucac aacgcaaagc gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
 ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gacccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
 agcacagauc aaccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320
 aaauucugga caaaagcugu aaaaaccuuc ucuuuucagg ccgucccgcu ucccggugcc 1380

uuucugucua	ggcagggagg	ccucaacgga	ggggccuua	cagcuacccu	acauagacac	1440
uuuuugauga	agugcgggug	gcaggugcag	guccaaugua	auuugacaca	auuccaccaa	1500
ggcgcucuu	uuguugccau	gguuccugaa	accacccuug	augucaagcc	cgacgguaag	1560
gcaaagagcu	uacaggagcu	gaaugaagaa	cagugggugg	aaaugucuga	cgauuaccgg	1620
accgggaaaa	acaugccuuu	ucagucucuu	ggcacauacu	aucggcccc	uaacuggacu	1680
ugggguccca	auuucaucaa	ccccuaucaa	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggu	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggaccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaauu	acauuuucug	uaaggccuac	aagucccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaaccc	ucccugacga	cacugucccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauiaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcuuacc	cacucucaug	gcauuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauauugucc	cuacguugcc	guucccacc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagauccc	gucuaucaga	acaccucggu	uggcgccauc	2280
aguucaaaau	ucgccaauua	ccgugggugu	auccaaauc	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaauu	ccugcucucg	uauiuccccc	caaauggaac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauagc	gugcacauac	ucuauuuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuu	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauiacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuauuguu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggau	augguuacuu	uugucuuucg	acccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuuucg	uaacacuuca	3000
cuggacuua	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acggugguc	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuacuggg	3180
cgcacucucc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaaggua	cuuucgugcu	ccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgucgg	gggggggcuu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuauuuacg	ccuuuguccc	ccguccuau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuuucg	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaau	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccgaug	uguccucaga	agcuaaccau	cuccugguu	3540
gccaucguuu	ugcugguguc	uccacucaug	gccauguggg	agcuggagaa	agacguuuau	3600
guuguagagg	uggacuggac	ucccgaucc	ccuggagaaa	cagugaaccu	caccugugac	3660
acgccugaag	aagaugacau	caccuggacc	ucagaccaga	gacauggagu	cauaggcucu	3720

ggaaagaccc ugaccaucac ugucaaagag uuucuagaug cuggccagua caccugccac 3780
 aaaggaggcg agacucugag ccacucacau cugcugcucc acaagaagga aaauggaauu 3840
 ugguccacug aaauuuuaaa aaauuucaaa aacaagacuu uccugaagug ugaagcacca 3900
 aauuacuccg gacgguuacac gugcucaugg cuggugcaaa gaaacaugga cuugaaguuc 3960
 aacaucaaga gcaguagcag uuccccugac ucucgggcag ugacaugugg aauggcgucu 4020
 cugucugcag agaaggucac acuggaccaa agggacuaug agaaguauuc aguguccugc 4080
 caggaggauug ucaccugccc aacugccgag gagaccucg ccauugaacu ggcguuggaa 4140
 gcacggcagc agaauaaaaua ugagaacuac agcaccagcu ucuucaucag ggacaucauc 4200
 aaaccagacc cgcccaagaa cuugcagaug aagccuuuga agaacucaca gguggagguc 4260
 agcugggagu acccugacuc cuggagcacu ccccauuccu acuucuccu caaguucuuu 4320
 guucgaaucc agcgcaagaa agaaaagauug aaggagacag aggaggggug uaaccagaaa 4380
 ggugcguucc ucguagagaa gacaucuacc gaaguccaau gcaaaggcgg gaaugucugc 4440
 gugcaagcuc aggaucgcuu uuacaauucc ucgucagca agugggcaug uguucccugc 4500
 aggguccgau ccggaggugg cgguucuggc gguggaggga gcggaggcgg aggaucaagg 4560
 gucauuccag ucucuggacc ugccaggugu cuuagccagu cccgaaaccu gcugaagacc 4620
 acagaugaca uggugaagac ggccagagaa aaacugaaac auuauuccug cacugcugaa 4680
 gacaucgauc augaagacau cacacgggac caaaccagca cauugaagac cuguuuacca 4740
 cuggaacuac acaagaacga gaguugccug gcuacuagag agacuucuc cacaacaaga 4800
 gggagcugcc ugccccaca gaagacgucu uugaugauga ccugugccu ugguagcauc 4860
 uaugaggacu ugaagaugua ccagacagag uuccaggcca ucaacgcagc acuucagaau 4920
 cacaaccauc agcagaucuu ucuagacaag ggcaugcugg uggccaucga ugagcugaug 4980
 cagucucuga aucauaaugg cgagacucug cgccagaaac cuccuguggg agaagcagac 5040
 ccuuacagag ugaaaaugaa gcucugcauc cugcuucacg ccuucagcac ccgcgucgug 5100
 accaucaaca gggugauggg cuaucugagc uccgccgagg gcagaggaag ucugcuaaca 5160
 ugcggugacg ucgaggagaa ucccgggccu gcuucugaca acccaauuuu ggaguucuu 5220
 gaagcagaaa augaucuagu cacucuggcc ucucucugga agauggugca cucuguucaa 5280
 cagaccugga gaaaguaugu gaagaacgau gauuuuuggc ccaauuuacu cagcgagcua 5340
 gugggggaag gcucugucgc cuuggccgcc acgcuaucca accaagcuuc aguaaaggcu 5400
 cuuuugggcc ugcacuuucu cucucggggg cucaauuaca cugacuuuuu cucuuuacug 5460
 auagagaaaau gcucuaguuu cuuuaccgua gaaccaccuc cuccaccagc ugaaaaccug 5520
 augaccaagc ccucagugaa gucgaauuuc cgaaaacugu uuaagaugca aggacccaug 5580
 gacaaaguca aagacuggaa ccaauuagcu gccggcuuga agaauuuuca auuuguucgu 5640
 gaccuaguca aagagguggu cgauuggcug caggccugga ucaacaaaga gaaagccagc 5700
 ccuguccucc aguaccaguu ggagaugaag aagcucgggc cuguggccuu ggcucaugac 5760
 gcuuucaugg cugguuccgg gccccucuu agcgacgacc agauugaaua ccuccagaac 5820
 cucaauucuc uugcccuac acuggggaag acuaauuugg cccaaagucu caccacuaug 5880
 aucaaugcca aacaaaguuc agcccaacga guugaacccg uuuggguggu ccuuagaggc 5940
 aagccgggau gcggcaagag cuuggccucu acguugauug ccaggcugu guccaagcgc 6000
 cucuauggcu cccaaagugu auauucucu ccccagauc cagaauucuu cgauggauac 6060

aaaggacagu	ucgugaccuu	gauggaugau	uugggacaaa	acccggaugg	acaagauuuc	6120
uccaccuuuu	gucagauggu	gucgaccgcc	caauuucucc	ccaacauggc	ggaccuugca	6180
gagaaagggc	gucccuuuac	cuccaauuc	aucauugcaa	cuacaaaucu	ccccacuuuc	6240
aguccuguca	ccauugcuga	uccuucugca	gucucucgcc	guaucacua	cgaucugacu	6300
cuagaaguau	cugaggccua	caagaaacac	acacggcuga	auuuugacuu	ggcuuucagg	6360
cgcacagacg	cccccccau	uuauccuuuu	gcugcccaug	ugcccuuugu	ggacguagcu	6420
gugcgcuuca	aaaaugguca	ccagaauuuu	aaucuccuag	aguuggucga	uuccauuugu	6480
acagacauuc	gagccaagca	acaaggugcc	cgaacaugc	agacucuggu	ucuacagagc	6540
cccaacgaga	augaugacac	ccccgucgac	gaggcguugg	guagaguucu	cucccccgcu	6600
gcggucgaug	aggcgcuuugu	cgaccucacu	ccagaggccg	acccgguugg	ccguuuggcu	6660
auucuuugcca	agcuaggucu	ugcccuagcu	gcggucaccc	cuggucugau	aaucuuugca	6720
gugggacucu	acagguacuu	cucuggcucu	gaugcagacc	aagaagaaac	agaaagugag	6780
ggaucuguca	aggcacccag	gagcgaaaau	gcuuaugacg	gcccgaagaa	aaacucuaag	6840
ccccuaggag	cacucucucu	cauggaaaug	caacagccca	acguggacau	gggcuuugag	6900
gcugcggucg	cuaagaaaagu	ggucgucccc	auuaccuica	ugguucccaa	cagaccuucu	6960
gggcuuacac	aguccgcucu	ucuggugacc	ggccggaccu	uccuaaucaa	ugaacauaca	7020
ugguccaauc	ccuccuggac	cagcuucaca	auccgcggug	agguacacac	ucgugaugag	7080
cccuuccaaa	cgguucauuu	cacucaccac	gguauuccca	cagaucugau	gaugguacgu	7140
cucggaccgg	gcaauucuuu	ccuaacaau	cuagacaagu	uuggacuuga	ccagaugccg	7200
gcacgcaacu	cccuguggu	uggcguuucg	uccaguuacg	gaaacuucuu	cuucucugga	7260
aaauuccucg	gauuuguuga	uuccaucacc	ucugaacaag	gaacuacgc	aagacucuuu	7320
agguacaggg	ugacgaccua	caaaggauug	ugcggcucgg	cccuggucug	ugaggccggu	7380
ggcguccgac	gcaucauugg	ccugcauucu	gcuggcgccg	ccgguaucgg	cgccgggacc	7440
uauaucucaa	aaauaggacu	aaucaaagcc	cugaaacacc	ucggugaacc	uuuggccaca	7500
augcaaggac	ugaugacuga	auuagagccu	ggaauaccgc	uacauguacc	ccgaaaaucc	7560
aaauugagaa	agacgaccgc	acacgcggug	uacaaaccgg	aguuuagacc	ugcuguguug	7620
ucaaaaauuug	aucccagacu	gaacaaggau	guugacuugg	augaaguaau	uuggucuaaa	7680
cacacugcca	augucccuua	ccaaccuccu	uuguucuaca	cauacauguc	agaguacgcu	7740
caucgagucu	ucuccuucuu	ggggaagac	aaugacauuc	ugaccgucaa	agaagcauuu	7800
cugggcaucc	ccggacuaga	ccccauggau	ccccacacag	cuccgggucu	gccuuacgcc	7860
aucaacggcc	uucgacguac	ugaucucguc	gauuuuguga	acgguacagu	agaugcggcg	7920
cuggcuguac	aaauccagaa	auucuuagac	ggugacuacu	cugaccaugu	cuuccaaacu	7980
uuucugaaaag	augagaucag	accucagag	aaaguccgag	cgggaaaaac	ccgcauuguu	8040
gaugugcccu	cccuggcgca	uugcauugug	ggcagaauug	ugcuugggcg	cuuugcugcc	8100
aaguuucaau	cccauccugg	cuuucuccuc	ggcucugcua	ucgggucuga	cccugauguu	8160
uuucggaccg	ucauaggggc	ucaacucgag	gggagaaaga	acacguauga	cugggacuac	8220
agugccuuug	acucuuacac	cggcacuggc	uccuucgagg	cucucaucuc	ucacuuuuuc	8280
accguggaca	augguuuuag	cccugcgcug	ggaccguauc	ucagaucucc	ggcugucucg	8340
gugcacgcuu	acggcgagcg	ucgcaucaag	auuaccggug	gccuccccuc	cgguuugucc	8400

gcgaccagcc ugcugaacac agugcucaac aaugugauca ucaggacugc ucuggcrauug 8460
 acuuacaagg aauuugaaua ugacaugguu gauaucaucg ccuacgguga cgaccuucug 8520
 guuggcacgg auuacgaucu ggacuucuuu gagguaggac gacgcgcugc caaguugggg 8580
 uauaagauga cuccugccaa caaggguucu gucuucccuc cgacuuccuc ucuuuccgau 8640
 gcuguuuuuc uaaagcgcaa auucguccaa aacaacgacg gcuuauacaa accaguuuug 8700
 gauuuuuaaga auuuggaagc caugcucucc uacuucuuu caggaacacu acucgagaag 8760
 cugcaaucug uuucuauguu ggcucaacau ucuggaaaag aagaauauga uagauugaug 8820
 caccuccuucg cugacuacgg ugccguaccg agucacgagu accugcaggc aagauggagg 8880
 gccuuguucg acugacccag auagcccaag gcgcuucggg gcugccggcg auucugggag 8940
 aacucagucg gaacagaaaaa gggaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 8993

<210> 9

<211> 8905

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV mFAP-CD3 BiTE构建体

<400> 9

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuauuggu guggucugcg aguucuaagg uacucguuuc ucccccgacc auucacucac 240
 ccacgaaaag uguguuguaa ccuaaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccuuccuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu cccucucgga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 ggugggggcau gaccccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguucuaa gguagcacau 660
 acaaaauagc agaacucuca uuuuucuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucuauc auuuggagau acugaaccua caggguagaa uugaaaauuu aaggucuuuc 840
 aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacauugu guacgaacua 900
 caggguaaug uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uaaugguaac 960
 augaccuua auuacuacgc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
 ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcgga uagcggguu ccucacaaau 1080
 uuucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
 aacucugcug aucgagucac aacgcaaacg gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
 ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gaccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
 agcacagauc aaccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320

aaauucuugga	caaaagcugu	aaaaaccuuc	ucuuuucagg	ccgucccgcu	ucccgugucc	1380
uuucugucua	ggcagggagg	ccucaacgga	ggggccuuca	cagcuacccu	acauagacac	1440
uuuuugauga	agugcgggug	gcaggugcag	guccaaugua	auuugacaca	auuccaccaa	1500
ggcgcucuuc	uuguugccau	gguuccugaa	accacccuug	augucaagcc	cgacgguaag	1560
gcaaagagcu	uacaggagcu	gaaugaagaa	cagugggugg	aaaugucuga	cgauuaccgg	1620
accgggaaaa	acaugccuuu	ucagucucu	ggcacauacu	aucggcccc	uaacuggacu	1680
ugggguccca	auuucacaa	ccccuaucaa	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggu	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggaccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaauu	acauuuucug	uaaggccuac	aagucccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaacc	ucccugacga	cacugucccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauiaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcuuacc	cacucucaug	gcauuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauauugucc	cuacguugcc	guucccacc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagauccc	gucuaucaga	acaccuggu	uggcgccauc	2280
aguucacuuu	ucgccaauua	ccgugggugu	auccaaauca	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaaaau	ccugcucucg	uauucucucc	caaauggaac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauagc	gugcacauac	ucuaauuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuca	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauiacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuaugugu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggcu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggaug	augguuacuu	uugucuucug	acccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuugc	uaacacuuca	3000
cuggacuuca	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuuacuggg	3180
cgcacucccc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaaggua	cuuucgugcu	ccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgcugg	gggggggcuu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuauuuacg	ccuuuguccc	ccguccaaau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuucgc	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaauuc	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccgaug	guuuugcuug	ugaccagccu	ccugcucugu	3540
gaacugccuc	auccugcauu	ccuguugauc	ccacaggugc	agcuccagca	gaguggcgca	3600
gagcucgcuc	gcccaggcgc	uucugugaau	cugaguugua	aggccuccgg	auauacuuuu	3660

acgaacaacg gcaucaacug gcugaagcag cggaccggcc agggccugga guggaucggc 3720
 gaaauauacc cccgguccac aaacacucuc uauaacgaga aguuuaaggg caaagcaacu 3780
 cugaccgcgg acagguccuc uaacacagcc uauauggagc ugagaagcuu gacgagugag 3840
 gacuccgcug ucuaauuuug cgcccgaacu cugaccgcuc cuuuugcuuu uuggggccag 3900
 ggcacgcucg ugaccguaag ugcgggcucc acuagcgguu ccggcaaacc uggcagcgga 3960
 gaaggcagca ccaaagggca gaucguccug acgcagucuc cagccaucau gagcgccuca 4020
 cccggcgaaa aggugaccau gaccugcuca gccucuucug gugugaauuu caugcacugg 4080
 uaccagcaaa aaagugggac cucccuuaaa agguggaucu ucgauaccag caaacuggcu 4140
 ucuggcguuc ccgcaagguu uagcggcucu gguuccggca caucauacag ccugacgauc 4200
 agcagcaugg aggcagaaga cgcagcuacc uauuacugcc agcaauggag cuuaaaccca 4260
 ccuacuuucg gaggaggaac aaagcuggaa auaaaaagag gugguggugg aucagaggug 4320
 cagcuggugg agucuggggg aggcuuuggug cagccuggaa aguccugaa acucuccugu 4380
 gaggccucug gauucaccuu cagcggcuau ggcaugcacu ggguccgcca ggcuccaggg 4440
 agggggcugg agucggucgc auacauuacu aguaguagua uuaauaucaa auaugcugac 4500
 gcugugaaaag gccgguuac cgucuccaga gacaaucca agaacuacu guuuuacaa 4560
 augaacaauu ucaagucuga ggacacagcc auguacuacu gugcaagau cgacugggac 4620
 aaaaauuacu ggggccaaagg aaccaugguc accgucuccu cagguggugg uggaucaggu 4680
 ggaggcggaa guggaggugg cggauccgac auccagauga ccagucucc aucaucacug 4740
 ccugccuccc ugggagacag agucacuauc aaauugucagg ccagucagga cauuagcaau 4800
 uauuuuacu gguaccagca gaaaccaggg aaagcuccua agcuccugau cuauuauaca 4860
 aaauaaauugg cagauggagu ccacaucaagg uucaguggca gugguucugg gagagauucu 4920
 ucuuucacua ucagcagccu ggaauccgaa gauauuggau cuuauuacug ucaacaguau 4980
 uauaacuauc cguggacguu cggaccuggc accaagcugg aaaucaaacg gcaccaccau 5040
 cauccaccag agggcagagg aagucugcua acaugcggug acgucgagga gaaucccggg 5100
 ccugcuucug acaaccaau uuuggaguuu cuugaagcag aaaugaucu agucacucug 5160
 gccucucucu ggaagauggu gcacucuguu caacagaccu ggagaaagua ugugaagaac 5220
 gaugauuuuu ggcccaauuu acucagcgag cuaguggggg aaggcucugu cgccuuggcc 5280
 gccacgcua ccaaccaagc uucaguuaag gcucuuuugg gccugcacuu ucucucucgg 5340
 gggcucauu aacugacuuu uacucuuuac ugauagagaa augcucuagu uucuuuaccg 5400
 uagaaccacc uccuccacca gcugaaaacc ugaugacca gccucagug aagucgaaau 5460
 uccgaaaacu guuuagaug caaggacca uggacaaagu caaagacugg aaccaaauag 5520
 cugccggcuu gaagaauuuu caauuuguuc gugaccuagu caaagaggug gucgauuggc 5580
 ugcaggccug gaucaacaaa gagaaagcca gccuguccu ccaguaccag uuggagauga 5640
 agaagcucgg gccuguggcc uuggcucaug acgcuuucuu ggcugguucc gggcccccuc 5700
 uuagcgacga ccagauugaa uaccuccaga accucaaauc ucuugcccu acacugggga 5760
 agacuaauuu ggcccaaagu cucaccacua ugaucuaugc caaacaagu ucagcccaac 5820
 gaguugaacc cguuguggug guccuuagag gcaagccggg augcggcaag agcuuggccu 5880
 cuacguugau ugcccaggcu guguccaagc gccucuaugg cucccaaagu guauauucuc 5940
 uucucccaga uccagauuuc uucgauggau acaaaggaca guucgugacc uugauggaug 6000

auuugggaca	aaacccggau	ggacaagauu	ucuccaccuu	uugucagaug	gugucgaccg	6060
cccaauuucu	ccccaacaug	gcggaccuug	cagagaaagg	gcgucccuuu	accuccaauc	6120
ucaucauugc	aacuacaaau	cucucccacu	ucaguccugu	caccauugcu	gauccuucug	6180
cagucucucg	ccguaucaac	uacgaucuga	cucuagaagu	aucugaggcc	uacaagaaac	6240
acacacggcu	gaauuuugac	uuggcuuuc	ggcgcacaga	cgcaccccc	auuuauccuu	6300
uugcugccca	ugugcccuuu	guggacguag	cugugcgcuu	caaaauggu	caccagaauu	6360
uuauucuccu	agaguugguc	gauuccauuu	guacagacau	ucgagccaag	caacaaggug	6420
cccgaacau	gcagacucug	guucuacaga	gccccaacga	gaaugaugac	acccccgucg	6480
acgaggcggu	ggguagaguu	cucucucccg	cugcggucga	ugaggcgcuu	gucgaccuca	6540
cuccagaggc	cgacccgggu	ggccguuugg	cuauucuuug	caagcuaggu	cuugcccuag	6600
cugcggucac	cccuggucug	auaaucuuug	cagugggacu	cuacagguac	uucucuggcu	6660
cugaugcaga	ccaagaagaa	acagaaagug	agggaucugu	caaggcacc	aggagcgaaa	6720
augcuuauga	cggcccgaag	aaaaacucua	agccccugg	agcacucucu	cucauggaaa	6780
ugcaacagcc	caacguggac	augggcuuug	aggcugcggu	cgcuaagaaa	guggucgucc	6840
ccauuaccuu	caugguucc	aacagaccuu	cugggcuuac	acaguccgu	cuucugguga	6900
ccggccggac	cuuccuaa	aaugaacaua	caugguccaa	ucccuccugg	accagcuuca	6960
caauccgcgg	ugagguacac	acucgugaug	agcccuucca	aacgguucau	uucacucacc	7020
acgguaaucc	cacagaucug	augaugguac	gucucggacc	gggcaauucu	uucccuaaca	7080
aucuagacaa	guuuggacuu	gaccagaugc	cggcacgcaa	cucccgugug	guuggcguuu	7140
cguccaguuu	cggaaacuuc	uuuuucucug	gaaauuuccu	cggauuuguu	gauuccauca	7200
ccucugaaca	aggaacuuc	gcaagacucu	uuagguacag	ggugacgacc	uacaaaggau	7260
ggugcggcuc	ggcccugguc	ugugaggccg	guggcguccg	acgcaucauu	ggccugcauu	7320
cugcugggcg	cgccgguauc	ggcgccggga	ccuauaucuc	aaaauuagga	cuaaucaag	7380
cccugaaaca	ccucggugaa	ccuuuggcca	caaugcaagg	acugaugacu	gaauuagagc	7440
cuggaaucac	cguacaugua	ccccggaaa	ccaaauugag	aaagacgacc	gcacacgcgg	7500
uguacaaacc	ggaguuuag	ccugcugugu	ugucaaaauu	ugaucccaga	cugaacaagg	7560
auguugacuu	ggaugaagua	auuuggucua	aacacacugc	caaugucccu	uaccaaccuc	7620
cuuuguucua	cacauacaug	ucagaguacg	cucaucgagu	cuucuccuuc	uuggggaaag	7680
acaauagacau	ucugaccguc	aaagaagcaa	uucugggcau	ccccggacua	gaccccaugg	7740
auccccacac	agcuccgggu	cugccuuacg	ccaucaacgg	ccuucgacgu	acugaucucg	7800
ucgauuuugu	gaacggua	guagaugcgg	cgcuggcugu	acaaauccag	aaauucuuag	7860
acggugacua	cucugaccau	gucuucaaaa	uuuuucugaa	agaugagauc	agaccucag	7920
agaaaguccg	agcgggaaaa	acccgcuuug	uugaugugcc	cucccuggcg	cauugcauug	7980
ugggcagaau	guugcuuggg	cgcuuugcug	ccaaguuuca	aucccauccu	ggcuuucucc	8040
ucggcucugc	uaucgggucu	gacccugaug	uuuucuggac	cgucauaggg	gcucaacucg	8100
aggggagaaa	gaacacguau	gacguggacu	acagugccuu	ugacucuuca	cacggcacug	8160
gcuccuucga	ggcucucauc	ucucacuuuu	ucaccgugga	caaugguuuu	agcccugcgc	8220
ugggaccgua	ucucagauc	cuggcugucu	cggugcacgc	uuacggcgag	cgucgcauca	8280
agauuaccgg	uggccucccc	uccgguuug	ccgcgaccag	ccugcugaac	acagugcuca	8340

acaaugugau caucaggacu gcucuggcau ugacuuacaa ggaauuugaa uaugacaugg 8400
 uugauaucau cgccuacggu gacgaccuuc ugguuggcac ggauuacgau cuggacuuca 8460
 augagguggc acgacgcgcu gccaauguug gguauaagau gacuccugcc aacaaggguu 8520
 cugucuuccc uccgacuucc ucucuuccg augcuguuuu ucuaaagcgc aaauucgucc 8580
 aaaacaacga cggcuuauac aaaccaguua uggauuuaaa gaauuuggaa gccaugcucu 8640
 ccuacuucua accaggaaca cuacucgaga agcugcaauc uguuucuaug uggcucaac 8700
 auucuggaaa agaagaauau gauagauuga ugcacccuu cgugacuac ggugccguac 8760
 cgagucacga guaccugcag gcaagaugga gggccuuguu cgacugaccc agauagccca 8820
 aggcgcuuucg gugcugccgg cgauucuggg agaacucagu cggaacagaa aagggaaaaa 8880
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 8905

<210> 10

<211> 7658

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV CXCL10构建体

<400> 10

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uuccccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgcac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuauuggu guggucugcg aguucuaagg uacucguuuc uccccgacc auucacucac 240
 ccacgaaaag uguguuguaa ccuaaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuagucccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccuccuuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu ccccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcau gaccccuagc auagcgagcu acagcgggaa cuguagcuag gccuuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguucuaa gguagcacau 660
 acaaaauagc agaacucuca uuuuucuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucuauc auuuggagau acugaaccua caggguugaa uugaaaauuu aaggucuuuc 840
 aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacaucgu guacgaacua 900
 caggguaaug uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uaaugguaac 960
 augaccuua auuacuacgc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
 ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcgga uagcgggucu ccucacaaau 1080
 uuucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
 aacucugcug aucgagucac aacgcaaacg gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
 ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gaccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
 agcacagauc aaccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320

aaauucuugga	caaaagcugu	aaaaaccuuc	ucuuuucagg	ccgucccgcu	ucccgugucc	1380
uuucugucua	ggcagggagg	ccucaacgga	ggggccuua	cagcuacccu	acauagacac	1440
uuuuugauga	agugcgggug	gcaggugcag	guccaaugua	auuugacaca	auuccaccaa	1500
ggcgcucuuc	uuguugccau	gguuccugaa	accacccuug	augucaagcc	cgacgguaag	1560
gcaaagagcu	uacaggagcu	gaaugaagaa	cagugggugg	aaaugucuga	cgauuaccgg	1620
accgggaaaa	acaugccuuu	ucagucucu	ggcacauacu	aucggcccc	uaacuggacu	1680
ugggguccca	auuucacaa	ccccuauca	guaacgguuu	ucccacacca	aaucugaac	1740
gcgagaaccu	cuaccucggu	agacauaaac	gucccauaca	ucggggagac	ccccacgcaa	1800
uccucagaga	cacagaacuc	cuggaccuc	cucguuaugg	ugcucguucc	ccuagacuau	1860
aaggaaggag	ccacaacuga	cccagaaauu	acauuuucug	uaaggccuac	aagucccuac	1920
uucaaugggc	uucgcaaccg	cuacacggcc	gggacggacg	aagaacaggg	gcccauuccu	1980
acggcaccca	gagaaaauuc	gcuuauguuu	cucucaacc	ucccugacga	cacugucccu	2040
gcuuacggga	augugcguac	cccuccuguc	aauiaccucc	cuggugaaau	aaccgaccuu	2100
uugcaacugg	cccgcuuacc	cacucucaug	gcauuugagc	gggugccuga	acccgugccu	2160
gccucagaca	cauauugucc	cuacguugcc	guucccacc	aguucgauga	caggccucuc	2220
aucuccuucc	cgaucacccu	uucagauccc	gucuaucaga	acaccuggu	uggcgccauc	2280
aguucaaaau	ucgccaauua	ccgugggugu	auccaaauca	cucugacauu	uuguggaccc	2340
augauggcga	gagggaaaau	ccugcucucg	uauucucucc	caaauggaac	gcaaccacag	2400
acucuuuccg	aagcuauagc	gugcacauac	ucuaauuggg	acauaggcuu	gaacucuagu	2460
uggaccuucg	ucgucccuua	caucucgccc	agugacuacc	gugaaacucg	agccauuacc	2520
aacucgguuu	acuccgcuga	ugguugguuu	agccugcaca	aguugaccaa	aauiacucua	2580
ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuauuguu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggcu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggau	augguuacuu	uugucuuucg	acccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuuucg	uaacacuua	3000
cuggacuua	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuaacg	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuuacuggg	3180
cgcacucucc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaaggua	cuuucgugcu	ccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgcugg	gggggggcuu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuauuuacg	ccuuuguccc	ccguccuau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuuucg	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaauu	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccgaug	aaccaagug	cugccgucuu	uuucugccuc	3540
auccugcugg	gucugagugg	gacucaaggg	aucccucucg	caaggacggu	ccgcugcaac	3600
ugcauccaua	ucgaugacgg	gccagugaga	augagggcc	uagggaagcu	ugaaaauauc	3660

ccugcgagcc uauccugccc acguguugag aucauugcca cgaugaaaaa gaaugaugag 3720
 cagagauguc ugaauccgga aucuaagacc aucaagaauu uaaugaaagc guuuagccaa 3780
 aaaaggucua aaagggcucc ugagggcaga ggaagucugc uaacaugcgg ugacgucgag 3840
 gagaaucccc ggccugcuuc ugacaaccca auuuuggagu uucuugaagc agaaaaugau 3900
 cuagucacuc ugGCCUCUCU cuggaagaug gUGCACUCUG uucaacagac cuggagaaag 3960
 uaugugaaga acgaugauuu uuggcccaau uuacucagcg agcuaguggg ggaaggcucu 4020
 gucgccuugg ccgccacgcu auccaaccaa gcuucaguaa aggcucuuuu gggccugcac 4080
 uuucucucuc gggggcucua uuacacugac uuuuacucuu uacugauaga gaaugcucu 4140
 aguuccuuua ccguagaacc accuccucca ccagcugaaa accugaugac caagcccua 4200
 gugaagucga aaauccgaaa acuguuuuag augcaaggac ccauggacaa agucaaagac 4260
 uggaacaaaa uagcugccgg cuugaagaau uucaauuug uucgugaccu agucaaagag 4320
 guggucgauu ggcugcaggc cuggaucaac aaagagaaag ccagcccugu ccuccaguac 4380
 caguuggaga ugaagaagcu cgggccugug gccuuggcuc augacgcuu cauggcuggu 4440
 uccgggcccc cucuuagcga cgaccagauu gaauaccucc agaaccuaa aucucuugcc 4500
 cuaacacugg ggaagacuaa uuuggcccaa agucucacca cuaugaucaa ugccaaacaa 4560
 aguucagccc aacgaguuga acccgguugug gugguccuaa gaggcaagcc gggaugcggc 4620
 aagagcuugg ccucucaguu gauugcccag gcugugucca agcgccucua uggcucccaa 4680
 aguguauauu cucuucccc agauccagau uucuuugaug gauacaaagg acaguucgug 4740
 accuugaugg augauuuggg acaaaacccg gauggacaag auuuccucc cuuuugucag 4800
 auggugucga ccgcccuaau ucuccccaac auggcggacc uugcagagaa agggcguccc 4860
 uuuaaccucca aucucaucau ugcaacuaca aaucucuccc acucagucc ugucaccau 4920
 gcugauccuu cugcagucuc ucgccguuac aacuacgauc ugacucuaga aguaucugag 4980
 gccuacaaga aacacacacg gcugaauuuu gacuuggcuu ucaggcgcac agacgcccc 5040
 cccauuuauc cuuuugcugc ccaugugccc uuuguggacg uagcugugcg cuucaaaaau 5100
 ggucaccaga auuuuaauu ccuagaguug gucgauucca uuuguacaga cauucgagcc 5160
 aagcaacaag gugcccgaag caugcagacu cugguucua acagcccaa cgagaaugau 5220
 gacacccccg ucgacgaggc guuggguaga guucucuccc ccgcugcggu cgaugaggcg 5280
 cuugucgacc ucacuccaga ggccgacccg guuggccguu ugguauuuc ugccaagcua 5340
 ggucuuugccc uagcugcggu caccucuggu cugauaauc uggcaguggg acucacagag 5400
 uacuucucug gcucugaugc agaccaagaa gaaacagaaa gugagggauc ugucaaggca 5460
 cccaggagcg aaaaugcuua ugacggcccc aagaaaaacu cuaagcccc uggagcacuc 5520
 ucucucaugg aaauucaaca gccaacgug gacauggguu uugaggcugc ggucgcuaag 5580
 aaaguggucg uccccauuac cuucaugguu cccaacagac cuucuggguu uacacagucc 5640
 gcucuuucug ugaccggccc gaccuuccua aucaaugaac auacaugguc caauccucc 5700
 uggaccagcu ucacaauccg cggugaggua cacacucgug augagccuu ccaaacgguu 5760
 cauuucacuc accacggua ucccacagau cugaugaugg uacgucugc accgggcaau 5820
 ucuuucccua acaaucuaga caaguuuuga cuugaccaga ugccggcacg caacucccg 5880
 gugguuggcg uuucguccag uuacggaaac uucuuucuu cuggaaaauu ccucggauuu 5940
 guugaaucca ucaccucuga acaaggaacu uacgcaagac uuuuaggua caggguagcg 6000

accuacaaag gauggugcgg cucggcccug gucugugagg ccgguggcgu ccgacgcauc 6060
 auuggccugc auucugcugg cgccgccggg aucggcgccg ggaccuauau cucaaaaaua 6120
 ggacuaauca aagcccugaa acaccucggg gaaccuuugg ccacaaugca aggacugaug 6180
 acugaauuag agccuggaau caccguacau guaccccgga aauccaaaau gagaaagacg 6240
 accgcacacg cgguguacaa accggaguuu gagccugcug uguugucaaa auuugaucucc 6300
 agacugaaca aggauguuga cuuggaugaa guaaauuggu cuaaacacac ugccaauguc 6360
 ccuuaccaac cuccuuuguu cuacacauac augucagagu acgcucaucg agucuucucc 6420
 uucuuugggga aagacaauga cauucugacc gucaaagaag caauucuggg cauccccgga 6480
 cuagacccca uggaucacca cacagcuccg ggucugccuu acgccaucaa cggccuucga 6540
 cguacugauc ucgucgauuu ugugaacggg acaguagaug cggcgucggc uguacaaauc 6600
 cagaaaauuc uagacgguga cuacucugac caugucuucc aaacuuuucu gaaagaugag 6660
 aucagacccu cagagaaaagu ccgagcggga aaaaccgcga uuguugaugu gcccuuccug 6720
 gcgcuuugca uugugggcag aauguugcuu gggcgcuuug cugccaaguu ucaaucccau 6780
 ccuggcuuuc uccucggcuc ugcuauccgg ucugaccug auguuuucug gaccgucuaa 6840
 ggggcucaac ucgaggggag aaagaacacg uaugacgugg acuacagugc cuuugacucu 6900
 ucacacggca cuggcuccuu cgaggcucuc aucucucacu uuucaccgu ggacaauggu 6960
 uuugacccug cgcugggacc guaucucaga uccucggcug ucucggugca cgcuuacggc 7020
 gagcgucgca ucaagauuac cgguggccuc ccuuccgguu gugccgcgac cagccugcug 7080
 aacacagugc ucaacaauu gaucacagag acugcucugg cauugacuua caaggaauuu 7140
 gaauaugaca ugguugauau caucgccuac ggugacgacc uucugguugg cacggauuac 7200
 gaucuggacu ucaaugaggu ggcacgacgc gcugccaagu ugggguauaa gaugacuccu 7260
 gccacaagg guucugucuu ccuuccgacu uccucucuuu ccgaugcugu uuucuaaag 7320
 cgcaaaauucg uccaaaacaa cgacggcuua uacaaaccag uuauggauuu aaagaauuug 7380
 gaagccaugc ucuccuacuu caaaccagga acacuacucg agaagcugca aucuguuucu 7440
 auguuggcuc aacauucugg aaaagaagaa uaugauagau ugaugacccc cuucgcugac 7500
 uacggugccg uaccgaguca cgaguaccug caggcaagau ggagggccuu guucgacuga 7560
 ccagauagc ccaaggcgcg ucggugcugc cggcgauucu gggagaacuc agucggaaca 7620
 gaaaaggga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 7658

<210> 11

<211> 7871

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-hIL36构建体

<400> 11

uuugaaaugg ggggcugggc ccugaugccc aguccuuccu uucccuucc gggggguuaa 60
 ccggcugugu uugcuagagg cacagagggg caacauccaa ccugcuuug cggggaacgg 120
 ugcggcuccg auuccugcgu cgccaaaggu guuagcgac ccaaacggcg caccuaccaa 180
 uguuauuggu guggucugcg aguucuaagc uacucguuuc ucccccgacc auucacucac 240

ccacgaaaag uguguuguaa ccauaagauu uaacccccgc acgggaugug cgauaaccgu 300
 aagacuggcu caagcgcgga aagcgcugua accacaugcu guuaguccu uuauggcugc 360
 aagauggcua cccaccucgg aucacugaac uggagcucga ccucuccuag uaagggaacc 420
 gagaggccuu cgugcaacaa gcuccgacac agaguccacg ugacugcuac caccaugagu 480
 acaugguucu ccccucucga cccaggacuu cuuuuugaau auccacggcu cgauccagag 540
 gguggggcau gaccccuagc auagcgcgcu acagcgggaa cuguagcuag gccuuagcgu 600
 gccuuggaua cugccugaua gggcgacggc cuagucgugu cgguuuaua gguagcacau 660
 acaaaauagc agaacucuca uuuuuuuuuc gauacagccu cuggcaccuu ugaagaugua 720
 accggaacaa aagucaagau cguugaauac cccagaucgg ugaacaugg uguuuacgau 780
 ucgucucuc auuuggagau acugaaccua caggguagaa uugaaaauuu aaggucuuuc 840
 aaugaauacc aaauucgcgc cgccaaacaa caacucggac uggacaucgu guacgaacua 900
 caggguaaug uucagacaac gucaaagaau gauuuugauu cccguggcaa uauggguaac 960
 augaccuua auuacucagc aaacacuuau cagaauucag uagacuucuc gaccuccucg 1020
 ucggcgucag gcgccggacc ugggaacucu cggggcgga uagcgggucu ccucacaaau 1080
 uucaguggaa ucuugaaccc ucuuggcuac cucaaagauc acaacaccga agaaauggaa 1140
 aacucugcug aucgagucac aacgcaaacg gcgggcaaca cugccauaaa cacgcaauca 1200
 ucauugggug uguugugugc cuacguugaa gaccgacca aaucugauc uccguccagc 1260
 agcacagauc aaccaccac cacuuucacu gccaucgaca ggugguacac uggacgucuc 1320
 aaauucugga caaaagcugu aaaaaccuuc ucuuuucagg ccgucccgcu ucccggugcc 1380
 uuucugucua ggcaggagg ccucaacgga ggggccuua cagcuaccu acauagacac 1440
 uuuuugauga agugcgggug gcaggugcag gucceaugua auuugacaca auuccacaa 1500
 ggcgcucuu ucguugccau gguuccugaa accaccuug augucaagcc cgacgguaag 1560
 gcaaagagcu uacaggagcu gaaugaagaa cagugggugg aaaugucuga cgauuaccgg 1620
 accgggaaaa acaugccuu ucagucucu ggcacauacu aucggcccc uaacuggacu 1680
 ugggguccca auuucacaa cccuauca gaaacgguu ucccacacca aaucugaac 1740
 gcgagaaccu cuaccucggu agacauaaac gucccauaca ucggggagac cccacgcaa 1800
 uccucagaga cacagaacuc cuggaccuc cucguuauug ugcucguucc ccuagacuau 1860
 aaggaaggag ccacaacuga cccagaaauu acauuuucug uaaggccuac aaguccuac 1920
 uucaaugggc uucgcaaccg cuacacggc gggacggacg aagaacagg gccauuccu 1980
 acggcaccca gagaaaauuc gcuaauguuu cucucaacce uccugacga cacuguccu 2040
 gcuuacggga augugcguac ccucuccugc aaauaccucc cuggugaaau aaccgaccuu 2100
 uugcaacugg cccgcauacc cacucucaug gcauuugagc gggugccuga acccgugccu 2160
 gccucagaca cauaugugc cuacguugc guuuccacc aguucgauga caggccucuc 2220
 aucuccuucc cgauacccu uucagaucg gucuauca acaccuggu uggcgccauc 2280
 aguucaaaau ucgccaauua ccgugggugu auccaaauca cucugacau uuguggacc 2340
 augauggcga gagggaaaau ccugcucucg uauucucucc caaauggaac gcaaccacag 2400
 acucuuuccg aagcuauca ggcacauac ucuauuugg acauaggcu gaacucuagu 2460
 uggaccuucg ucgucccuca caucucgccc agugacuacc gugaaacuc agccauuacc 2520
 aacucgguu acuccgcuga ugguugguu agccugcaca aguugaccaa aauiacucua 2580

ccaccugacu	guccgcaaag	ucccugcauu	cucuuuuucg	cuucugcugg	ugaggauuac	2640
acucuccguc	uccccguuga	uuguaauccu	uccuaugugu	uccacuccac	cgacaacgcc	2700
gagaccgggg	uuauugaggc	ggguaacacu	gacaccgauu	ucucugguga	acuggcggcu	2760
ccuggcucua	accacacuaa	ugucaaguuc	cuguuugauc	gaucucgauu	auugaaugua	2820
aucaagguac	uggagaagga	cgccguuuuc	ccccgcccuu	ucccuacaca	agaaggugcg	2880
cagcaggau	augguuacuu	uugucuucug	accccccgcc	caacagucgc	uucccgaccc	2940
gccacucguu	ucggccugua	cgccaauccg	uccggcagug	guguucuugc	uaacacuuca	3000
cuggacuua	auuuuuauag	cuuggccugu	uucacuuacu	uuagaucgga	ccuugagguu	3060
acgguggucu	cacuagagcc	ggaucuggaa	uuugcuguag	ggugguuucc	uucuggcagu	3120
gaauaccagg	cuuccagcuu	ugucuacgac	cagcugcaug	ugcccuucca	cuuuacuggg	3180
cgcacucccc	gcgcuuucgc	uagcaagggu	gggaaggua	cuuucgugcu	cccuuggaac	3240
ucugucucgu	cugugcuccc	cgugcgcugg	gggggggcuu	ccaagcucuc	uucugcuacg	3300
cggggucua	cggcgcaugc	ugauuggggg	acuauuuacg	ccuuuguccc	ccguccuaau	3360
gagaagaaaa	gcaccgcugu	aaaacacgug	gccguguaca	uucgguacaa	gaacgcacgu	3420
gccuggugcc	ccagcaugcu	ucccuuuucg	agcuacaagc	agaagaugcu	gaugcaaucu	3480
ggcgauaucg	agaccaaucc	cgggccgaug	agaggcacuc	caggagacgc	ugauggugga	3540
ggaagggccg	ucuaucaauc	aauguguaaa	ccuauuacug	ggacuauuaa	ugauuugaau	3600
cagcaagugu	ggacccuua	gggucagaac	cuuguggcag	uuccacgaag	ugacagugug	3660
accccaguca	cuguugcugu	uaucaaugc	aaguauccag	aggcucuuga	gcaaggcaga	3720
ggggauccca	uuuauuuggg	aauccagaau	ccagaaaugu	guuuguauug	ugagaagguu	3780
ggagaacagc	ccacauugca	gcuaaaaagag	cagaagauc	uggaucugua	uggccaaccc	3840
gagcccguga	aaccuuuccu	uuucuaaccgu	gccaagacug	guaggaccuc	caccuuugag	3900
ucuguggccu	ucccgacug	guucauugcc	uccuccaaga	gagaccagcc	caucauucug	3960
acuucagaac	uugggaaguc	auacaacacu	gccuuugaau	uaauauaaa	ugacgagggc	4020
agaggaaguc	ugcuacaug	cggugacguc	gaggagaau	ccgggccugc	uucugacaac	4080
ccaauuuugg	aguuuuuga	agcagaaaau	gaucuaguc	cucuggccuc	ucucuggaag	4140
auggugcacu	cuguucaaca	gaccuggaga	aaguauguga	agaacgauga	uuuuuggccc	4200
aauuuacuca	gcgagcuagu	gggggaaggc	ucugucgccu	uggccgccac	gcuauccaac	4260
caagcuucag	uaaaggcucu	uuugggccug	cacuuucucu	cucgggggcu	cauuuacacu	4320
gacuuuuacu	cuuuacugau	agagaaaugc	ucuaguuuuc	uuaccguaga	accaccuccu	4380
ccaccagcug	aaaaccugau	gaccaagccc	ucagugaagu	cgaaaauccg	aaaacuguuu	4440
aagaugcaag	gaccuagga	caaagucaaa	gacuggaacc	aaauagcugc	cggcuugaag	4500
aauuuucuu	uuguucguga	ccuagucaaa	gagguggucg	auuggcugca	ggccuggauc	4560
aacaaagaga	aagccagccc	uguccuccag	uaccaguugg	agaugaagaa	gcucgggccu	4620
guggccuugg	cucaugacgc	uuucauggcu	gguuccgggc	ccccucuua	cgacgaccag	4680
auugaauacc	uccagaaccu	caauucucu	gcccuacac	uggggaagac	uaauuuggcc	4740
caaagucuca	ccacuaugau	caaugccaaa	caaaguucag	cccaacgagu	ugaacccguu	4800
gugguggucc	uuagaggcaa	gccgggaugc	ggcaagagcu	uggccucuac	guugauugcc	4860
caggcugugu	ccaagcgccu	cuauggcucc	caaaguguau	auucucuucc	cccagaacca	4920

gauuucuuucg auggauacaa aggacaguuc gugaccuuga uggaugauuu gggacaaaac 4980
 ccggauggac aagauuucuc caccuuuuugu cagauggugu cgaccgcca auuucucucc 5040
 aacauggcgg accuugcaga gaaagggcgu cccuuuaccu ccaaucucau cauugcaacu 5100
 acaaaucucc cccacuucag uccugucacc auugcugauc cuucugcagu cucucgccgu 5160
 aucaacuacg aucugacucu agaaguaucu gaggccuaca agaaacacac acggcugaau 5220
 uuugacuugg cuuucaggcg cacagacgcc ccccccuuu auccuuuugc ugcccagug 5280
 cccuuugugg acguagcugu gcgcuucaaa aauggucacc agaauuuuaa ucuccuagag 5340
 uuggucgauu ccauuuguac agacauucga gccaaagcaac aaggugcccg aaacaugcag 5400
 acucugguuc uacagagccc caacgagaau gaugacaccc ccgucgacga ggcguugggu 5460
 agaguucucu ccccccgcugc ggucgaugag gcgcuuuguc accucacucc agaggccgac 5520
 ccgguuggcc guuuggcuau ucuugccaag cuaggucuug cccuagcugc ggucaccccu 5580
 ggucugauaa ucuuggcagu gggacucuac agguacuucu cuggcucuga ugcagaccaa 5640
 gaagaaacag aaagugaggg aucugucaag gcaccagga gcgaaaugc uuauagcggc 5700
 ccgaagaaaa acucuaagcc cccuggagca cucucucuca uggaaaugca acagcccaac 5760
 guggacaugg gcuuugaggc ugcggucgcu aagaaagugg ucgucccau uaccuucag 5820
 guucccaaca gaccuucugg gcuuacacag uccgcucuuc uggugaccgg ccggaccuuc 5880
 cuaaucaaug aacauacaug guccaauccc uccuggacca gcuucacaau ccgcggugag 5940
 guacacacuc gugaugagcc cuuccaaacg guucauuuca cucaccacgg uauucccaca 6000
 gaucugauga ugguacgucu cggaccgggc aaauuuuucc cuaacaauu agacaaguuu 6060
 ggacuugacc agauggccggc acgcaacucc cgugugguug gcguuucguc caguucacga 6120
 aacuuucucu ucucuggaaa uuuccucgga uuuguugauu ccauaccuc ugaacaagga 6180
 acuuacgcaa gacucuuuag guacagggug acgaccuaca aaggauggug cggcucggcc 6240
 cuggucugug aggccggugg cguccgacgc aucauuggcc ugcauucugc uggcgccgcc 6300
 gguaucggcg ccgggaccua uaucuacaaa uuaggacuaa ucaaagcccu gaaacaccuc 6360
 ggugaaccuu ugccacaaau gcaaggacug augacugaau uagagccugg aaucaccgua 6420
 cauguacccc ggaaauccaa auugagaaag acgaccgcac acgcggugua caaaccggag 6480
 uuugagccug cuguguuguc aaaauuugau cccagacuga acaaggauu ugacuuggau 6540
 gaaguaauuu ggucuaaaca cacugccaau guccuuuacc aaccuccuuu guucuacaca 6600
 uacaugucag aguacgcuca ucgagucuuc uccuucuuug ggaaagacaa ugacauucug 6660
 accgucaaag aagcaauucu gggcauuccc ggacuagacc ccauggaucc ccacacagcu 6720
 ccgggucugc cuuacgccau caacggccuu cgacguacug aucucgucga uuugugaac 6780
 gguacaguag augcggcgcg ggcuuacaa auccagaaau ucuuagacgg ugacuacucu 6840
 gaccaugucu uccaaacuuu ucugaaagau gagaucagac ccucagagaa aguccgagcg 6900
 ggaaaaaccc gcauuguuga ugugccucc cuggcgcuu gcauuguggg cagaauug 6960
 cuugggcgcg uuugcuccaa guuucaaucc cauccugcu uuuccucgg cucugcuau 7020
 gggucugacc cugauguuu cuggaccguc auaggggcuc aacucgaggg gagaaagaac 7080
 acguaugacg uggacuacag ugccuuugac ucuucacac gcacuggcuc cuucgaggu 7140
 cucaucucuc acuuuuucac cguggacaau gguuuuagcc cugcgcuggg accguaucuc 7200
 agaucccugg cugucucggu gcacgcuuac ggcgagcguc gcaucaagau uaccgguggc 7260

cucuccuccg guugugccgc gaccagccug cugaacacag ugcucaacaa ugugaucauc 7320
aggacugcuc uggcauugac uuacaaggaa uuugaauaug acaugguuga uaucaucgcc 7380
uacggugacg accuucuggu uggcacggau uacgaucugg acuucaauga gguggcacga 7440
cgcgcugcca aguuggggua uaagaugacu ccugccaaca agggguucugu cuucccuccg 7500
acuuccucuc uuuccgaugc uguuuuucua aagcgcaau ucguccaaaa caacgacggc 7560
uuauacaaac caguuaugga uuuaaagaau uuggaagcca ugcucuccua cuucaaacca 7620
ggaacacuauc ucgagaagcu gcaaucuguu ucuauguugg cucaacauuc uggaaaagaa 7680
gaauaugaua gauugaugca ccccuucgcu gacuacggug ccguaccgag ucacgaguac 7740
cugcaggcaa gauggagggc cuuguucgac ugaccagau agcccaaggc gcuucggugc 7800
ugccggcgau ucugggagaa cucagucgga acagaaaagg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7860
aaaaaaaaa a 7871

<210> 12

<211> 7540

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV IVT模板 - 5' HHR和3' HDV

<400> 12

ttatcgaat taatacgact cactatagg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
gcttggtacc ttatcaaact gatgagtcg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
aatggggggc tgggccctga tgcccagtc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacggtgcgg 240
ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
ttggtgtggt ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
tggctcaagc gcggaaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
ggctacccac ctcggatcac tgaactggag ctgcaccctc cttagtaagg gaaccgagag 540
gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
gttctccccct ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
ggcatgacct ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcggtt ctataggtag cacatacaaa 780
tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
aacaaaagtc aagatcggtg aataccccag atcgggtgaac aatggtgttt acgattcgtc 900
tactcatTTG gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccg ggcaataatg gtaacatgac 1080
cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa ttcagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctcctca caaatttcag 1200
tggaatcttg aaccctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260

tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
 ggggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagaccc gaccaaattc gatcctccgt ccagcagcac 1380
 agatcaaccc accaccactt tctactgcat cgacaggtgg tacactggac gtctcaattc 1440
 ttggacaaaa gctgtaaaaa ctttctcttt tcaggccgtc ccgcttcccc gtgcctttct 1500
 gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
 gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
 tcttcttggt gccatgggtc ctgaaaccac cttgatgtc aagccccgac gtaaggcaaa 1680
 gagcttacag gagctgaatg aagaacagtg ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
 gaaaaacatg ctttttcagt ctcttggcac atactatcgg ccccctaact ggacttgggg 1800
 tcccaatttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
 aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
 agagacacag aactcctgga cctcctcgt tatggtgctc gtcccttag actataagga 1980
 aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
 tgggcttcgc aaccgctaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcccc ttctacggc 2100
 acccagagaa aattcgctta tgtttctctc aacctccct gacgacactg tccctgctta 2160
 cgggaatgtg cgtaccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
 actggccgc ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccg tgctgcctc 2280
 agacacatat gtgccctacg ttgccgttc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
 cttcccgatc acctttcag atcccgctc tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
 aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
 ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtatc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
 ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
 ctctcgtcgc cctacatct cggccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
 ggtttactcc gctgatggtt ggtttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
 tgactgtccg caaagtccct gcattctctt tttcgcttct gctggtgagg attacactct 2760
 ccgtctcccc gttgattgta atccttccta tgtgttcac tccaccgaca acgccgagac 2820
 cgggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
 ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
 ggtactggag aaggacgccg ttttccccg cctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
 ggatgatggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
 tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgt cttgctaaca cttcactgga 3120
 cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggaccttg aggttacggt 3180
 ggtctcacta gagccggatc tggaatttgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240
 ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgcc ttccacttta ctgggcgcac 3300
 tccccgcgt ttcgctagca aggttgggaa ggtatcttct gtctccctt ggaactctgt 3360
 ctgctctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
 tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgtc ctaatgagaa 3480
 gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
 gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600

tatcgagacc aatccccgggc ctgcttctga caaccaatt ttggagtttc ttgaagcaga 3660
 aaatgatcta gtcactctgg cctctctctg gaagatgggtg cactctgttc aacagacctg 3720
 gagaaagtat gtgaagaacg atgatttttg gcccaattta ctcagcgagc tagtggggga 3780
 aggctctgtc gccttggccg ccacgctatc caaccaagct tcagtaaagg ctcttttggg 3840
 cctgcacttt ctctctcggg ggctcaatta cactgacttt tactctttac tgatagagaa 3900
 atgctctagt ttctttaccg tagaaccacc tcctccacca gctgaaaacc tgatgaccaa 3960
 gccctcagtg aagtcgaaat tccgaaaact gttaagatg caaggacca tggacaaagt 4020
 caaagactgg aaccaaatac ctgccggctt gaagaatttt caatttggtc gtgacctagt 4080
 caaagagggtg gtcgattggc tgcaggcctg gatcaacaaa gagaaagcca gccctgtcct 4140
 ccagtaccag ttggagatga agaagctcgg gcctgtggcc ttggctcatg acgctttcat 4200
 ggctggttcc gggccccctc ttagcgacga ccagattgaa tacctccaga acctcaaate 4260
 tcttgcccta aactgggga agactaattt ggcccaaagt ctcaccacta tgatcaatgc 4320
 caaacaaggt tcagcccaac gagttgaacc cgttggtgtg gtccttagag gcaagccggg 4380
 atgcggcaag agcttggcct ctacgttgat tgcccaggct gtgtccaagc gcctctatgg 4440
 ctcccaaagt gtatattctc ttccccaga tccagatttc ttcgatgatg acaaggaca 4500
 gttcgtgacc ttgatggatg atttgggaca aaaccggat ggacaagatt tctccacctt 4560
 ttgtcagatg gtgtcgaccg cccaatttct cccaacatg gcggacctg cagagaaagg 4620
 gcgtcccttt acctccaatc tcatcattgc aactacaaat ctccccact tcagtctgt 4680
 caccattgct gatccttctg cagtctctcg ccgtatcaac tacgatctga ctctagaagt 4740
 atctgaggcc tacaagaaac acacacggct gaattttgac ttggctttca ggcgcacaga 4800
 cgccccccc atttatcctt ttgtgcca tgtgcccttt gtggacgtag ctgtgcgctt 4860
 caaaaatggc caccagaatt ttaatctcct agagttggc gattccattt gtacagacat 4920
 tcgagccaag caacaagggt cccgaaacat gcagactctg gttctacaga gcccacga 4980
 gaatgatgac acccccgtcg acgaggcggt gggtagagtt ctctccccg ctgcggctga 5040
 tgaggcgctt gtcgacctca ctccagaggc cgaccgggtt ggccgtttg ctattcttgc 5100
 caagctaggt cttgccctag ctgcggtcac ccctggtctg ataactttg cagtgggact 5160
 ctacaggtac ttctctggct ctgatgcaga ccaagaagaa acagaaagtg agggatctgt 5220
 caaggcacc aggagcgaaa atgcttatga cggcccgaag aaaaactcta agccccctgg 5280
 agcactctct ctcatggaaa tgcaacagcc caacgtggac atgggctttg aggctgcgt 5340
 cgctaagaaa gtggtcgtcc ccattacctt catggttccc aacagacctt ctgggcttac 5400
 acagtccgct cttctggtga ccggccggac ctctctaate aatgaacata catggtccaa 5460
 tccctcctgg accagcttca caatccgcgg tgaggtagac actcgtgatg agcccttcca 5520
 aacggttcat ttactcacc acggtattcc cacagatctg atgatggtac gtctcggacc 5580
 gggcaattct ttccctaaca atctagacaa gtttgactt gaccagatgc cggcacgcaa 5640
 ctcccgtgtg gttggcggtt cgtccagtta cggaacttc ttcttctctg gaaatttct 5700
 cggatttggt gattccatca cctctgaaca aggaacttac gcaagactct ttaggtacag 5760
 ggtgacgacc taaaaggat ggtgcggctc ggccctggtc tgtgaggccg gtggcgctccg 5820
 acgcatcatt ggctgcatt ctgctggcgc cgccggtatc ggcgccggga cctatatctc 5880
 aaaattagga ctaatcaaag ccctgaaaca cctcggtgaa cctttggcca caatgcaagg 5940

actgatgact gaattagagc ctggaatcac cgtacatgta ccccggaat ccaaattgag 6000
 aaagacgacc gcacacgcgg tgtacaaacc ggagtttgag cctgctgtgt tgtcaaaatt 6060
 tgatcccaga ctgaacaagg atgttgactt ggatgaagta atttggtcta aacacactgc 6120
 caatgtccct taccaacctc ctttgttcta cacatacatg tcagagtacg ctcatcgagt 6180
 cttctccttc ttggggaaag acaatgacat tctgaccgtc aaagaagcaa ttctgggcat 6240
 ccccggaacta gaccccatgg atccccacac agctccgggt ctgccttacg ccatcaacgg 6300
 ccttcgacgt actgatctcg tcgattttgt gaacgggtaca gtagatgcgg cgctggctgt 6360
 acaaatccag aaattcttag acggtgacta ctctgacat gtcttccaaa cttttctgaa 6420
 agatgagatc agacctcag agaaagtccg agcgggaaaa acccgcatg ttgatgtgcc 6480
 ctccctggcg cattgcattg tgggcagaat gttgcttggg cgctttgctg ccaagtttca 6540
 atccccatct ggctttctcc tcggtctctg tatcggtct gacctgatg ttttctggac 6600
 cgtcataggg gctcaactcg aggggagaaa gaacacgtat gacgtggact acagtgcctt 6660
 tgactcttca cacggcactg gctccttcca ggctctcctc tctcactttt tcaccgtgga 6720
 caatggtttt agccctgcgc tgggaccgta tctcagatcc ctggctgtct cggtgcacgc 6780
 ttacggcgag cgtcgcacat agattaccgg tggcctcccc tccggttggt ccgcgaccag 6840
 cctgctgaac acagtgtca acaatgtgat catcaggact gctctggcat tgacttaca 6900
 ggaatttgaa tatgacatgg ttgatatcat cgcctacgtg gacgacctc tggttggcac 6960
 ggattacgat ctggacttca atgaggtggc acgacgcgt gccagttgg ggtataagat 7020
 gactcctgcc aacaagggtt ctgtcttccc tccgacttcc tctctttccg atgctgtttt 7080
 tctaaagcgc aaattcgtcc aaaacaacga cggcttatac aaaccagtta tggatttaaa 7140
 gaatttgga gccatgctct cctacttcaa accaggaaca ctactcgaga agctgcaatc 7200
 tgtttctatg ttggctcaac attctggaaa agaagaatat gatagattga tgcacccctt 7260
 cgctgactac ggtgccgtac cgagtcacga gtacctgcag gcaagatgga gggccttggt 7320
 cgactgaccc agatagccca aggcgcttcg gtgctgccgg cgattctggg agaactcagt 7380
 cggaacagaa aagggaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaggccg gcatggtccc 7440
 agcctcctcg ctggcgccgg ctgggcaaca tgcttcggca tggcgaatgg gacgcggccg 7500
 ctcgagtcta gagggcccgt ttaaaccgc tgatcagcct 7540

<210> 13

<211> 7540

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-177A突变体IVT模板 - 5' HHR和3' HDV

<400> 13

ttatcgaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
 gcttggtacc ttatcaaact gatgagtcgg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
 aatggggggc tgggccctga tgcccagtc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
 tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgccggg aacggtgcgg 240
 ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300

```

ttggtgtggt ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcacccacg 360
aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
tggtctcaagc gcggaaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
ggctacccac ctcggatcac tgaactggag ctcgaccctc cttagtaagg gaaccgagag 540
gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
gttctccctc ctcgacccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
ggcatgaccc ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcgggt ctataggtag cacatacaaa 780
tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
aacaaaagtc aagatcggtg aataccccag atcgggtgaac aatgggtgtt acgattcgtc 900
tactcatTTG gagatactga acctacaggg tgaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccg ggcaataatg gtaacatgac 1080
cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa ttcagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctctca caaatttcag 1200
tggaatcttg aacctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
gggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagacct gaccaaactc gatcctccgt ccagcagcac 1380
agatcaaccc accaccactt tctactgcat cgacaggtgg tactactggac gtctcaattc 1440
ttggacaaaa gctgtaaaaa cttctctttt tcaggccgtc ccgcttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttctgtgt gccatggttc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccagc gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagt ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ccttttcagg cgcttggcac atactatcgg ccccctaact ggacttgggg 1800
tcccaatttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
aggagccaca actgacccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
tggtgcttcg aaccgtaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcca ttctacggc 2100
accagagaaa aattcgctta tgtttctctc aacctccct gacgacactg tccctgctta 2160
cgggaatgtg cgtacccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
actggcccg c ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccgg tgctgcctc 2280
agacacatat gtgccctacg ttgccgttc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
cttcccgatc accttttcag atcccgctta tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtattc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640

```

```

ggtttactcc gctgatggtt ggtttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
tgactgtccg caaagtccct gcattctctt tttcgcttct gctggtgagg attacactct 2760
ccgtctcccc gttgattgta atccttccta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
cggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
ggtactggag aaggacgccg ttttcccccg ccctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
ggatgatggg tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gacccgccac 3060
tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgtt cttgctaaca cttcactgga 3120
cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggaccttg aggttacggt 3180
ggtctcacta gagccggatc tggaatttgc tgtaggggtg tttccttctg gcagtgaata 3240
ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgcc ttcacttta ctgggcgcac 3300
tccccgcgt ttcgctagca aggttgggaa ggtatcttct gtgtccctt ggaactctgt 3360
ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgtc ctaatgagaa 3480
gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
tatcgagacc aatcccgggc ctgcttctga caaccaatt ttggagtctt ttgaagcaga 3660
aaatgatcta gtcactctgg cctctctctg gaagatgggt cactctgttc aacagacctg 3720
gagaaagtat gtgaagaacg atgatttttg gcccaattta ctcagcgagc tagtggggga 3780
aggctctgtc gccttggccg ccacgctatc caaccaagct tcagtaaagg ctcttttggg 3840
cctgcacttt ctctctcggg ggctcaatta cactgacttt tactctttac tgatagagaa 3900
atgctctagt ttctttaccg tagaaccacc tcctccacca gctgaaaacc tgatgaccaa 3960
gccctcagtg aagtcgaaat tccgaaaact gtttaagatg caaggacca tggacaaagt 4020
caaagactgg aaccaaatac ctgccggctt gaagaatttt caatttgctt gtgacctagt 4080
caaagagggt gtcgattggc tgcaggcctg gatcaacaaa gagaaagcca gccctgtcct 4140
ccagtaccag ttggagatga agaagctcgg gcctgtggcc ttggctcatg acgctttcat 4200
ggctggttcc gggccccctc ttagcgacga ccagattgaa tacctccaga acctcaaac 4260
tcttgcccta aactgggga agactaattt ggcccaaagt ctcaccacta tgatcaatgc 4320
caaacaaagt tcagcccaac gagttgaacc cgttgtgggt gtccttagag gcaagccggg 4380
atgcggcaag agcttggcct ctacgttgat tgcccaggct gtgtccaagc gcctctatgg 4440
ctcccaaagt gtatattctc tttccccaga tccagatttc ttcgatggat acaaaggaca 4500
gttcgtgacc ttgatggatg atttgggaca aaaccggat ggacaagatt tctccacctt 4560
ttgtcagatg gtgtcgaccg cccaatttct cccaacatg gcggaccttg cagagaaagg 4620
gcgtcccttt acctccaac tcattcattgc aactacaaat ctccccact tcagtctgt 4680
caccattgct gatccttctg cagtctctcg ccgtatcaac tacgatctga ctctagaagt 4740
atctgaggcc tacaagaaac acacacggct gaattttgac ttggctttca ggcgcacaga 4800
cgcccccccc atttatcctt ttgtgceca tgtgcccttt gtggacgtag ctgtgcgctt 4860
caaaaatggg caccagaatt ttaatctcct agagttgggt gattccattt gtacagacat 4920
tcgagccaag caacaagggt ccgaaacat gcagactctg gttctacaga gcccacga 4980

```

gaatgatgac acccccgtcg acgaggcggtt gggtagagtt ctctcccccg ctgcgggtcga 5040
 tgaggcgctt gtcgacctca ctccagaggc cgaccgcgtt ggccgtttgg ctattcttgc 5100
 caagctaggt cttgccctag ctgcggtcac ccctggctctg ataatcttgg cagtgggact 5160
 ctacaggtag ttctctggct ctgatgcaga ccaagaagaa acagaaagtg agggatctgt 5220
 caaggcacc aggagcgaaa atgcttatga cggcccgaag aaaaactcta agccccctgg 5280
 agcactctct ctcatggaaa tgcaacagcc caacgtggac atgggctttg aggctgcggt 5340
 cgctaagaaa gtggtcgtcc ccattacctt catggttccc aacagacctt ctgggcttac 5400
 acagtccgct cttctgggtga ccggccggac cttcctaate aatgaacata catggtccaa 5460
 tccctcctgg accagcttca caatccgcgg tgaggtagac actcgtgatg agcccttcca 5520
 aacggttcat ttactcacc acggtattcc cacagatctg atgatggtac gtctcggacc 5580
 gggcaattct ttccctaaca atctagacaa gtttggaact gaccagatgc cggcacgcaa 5640
 ctcccgtgtg gttggcggtt cgtccagtta cggaaacttc ttcttctctg gaaatttctt 5700
 cggatttgtt gattccatca cctctgaaca aggaacttac gcaagactct ttaggtacag 5760
 ggtgacgacc taaaaggat ggtgcggctc ggccctggtc tgtgaggccg gtggcgctccg 5820
 acgcatcatt ggctgcatt ctgctggcgc cgccggtatc ggccgaggga cctatatctc 5880
 aaaattagga ctaatcaaag ccctgaaaca cctcggtgaa cctttggcca caatgcaagg 5940
 actgatgact gaattagagc ctggaatcac cgtacatgta ccccggaat ccaatttag 6000
 aaagacgacc gcacacgcgg tgtacaaacc ggagtttgag cctgctgtgt tgtcaaaatt 6060
 tgatcccaga ctgaacaagg atgttgactt ggatgaagta atttggtcta aacacactgc 6120
 caatgtccct taccaacctc ctttgttcta cacatacatg tcagagtacg ctcatcgagt 6180
 cttctccttc ttggggaaag acaatgacat tctgaccgtc aaagaagcaa ttctgggcat 6240
 ccccgacta gaccccatgg atccccacac agctccgggt ctgccttacg ccatcaacgg 6300
 ccttcgacgt actgatctcg tcgattttgt gaacggtaca gtagatgcgg cgctggctgt 6360
 acaaatccag aaattcttag acggtgacta ctctgacctt gtcttccaaa cttttctgaa 6420
 agatgagatc agaccctcag agaaagtccg agcgggaaaa acccgcatg ttgatgtgcc 6480
 ctccctggcg cattgcattg tgggcagaat gttgcttggg cgctttgctg ccaagtttca 6540
 atcccatcct ggctttctcc tcggctctgc tatcggtctt gacctgatg ttttctggac 6600
 cgtcataggg gctcaactcg aggggagaaa gaacacgtat gacgtggact acagtgcctt 6660
 tgactcttca cacggcactg gctccttca ggctctcacc tctactttt tcaccgtgga 6720
 caatgggttt agccctgcgc tgggaccgta tctcagatcc ctggctgtct cggtcacgc 6780
 ttacggcgag cgtcgcacat agattaccgg tggcctcccc tccggttgtg ccgcgaccag 6840
 cctgctgaac acagtgtcga acaatgtgat catcaggact gctctggcat tgacttaca 6900
 ggaatttgaa tatgacatgg ttgatattcat cgcctacggt gacgacctt tggttggcac 6960
 ggattacgat ctggacttca atgaggtggc acgacgcgt gccaaagtgg ggtataagat 7020
 gactcctgcc aacaagggtt ctgtcttccc tccgacttcc tctctttccg atgctgtttt 7080
 tctaaagcgc aaattcgtcc aaaacaacga cggcttatac aaaccagtta tggatttaaa 7140
 gaatttggaa gccatgctct cctacttcaa accaggaaca ctactcgaga agctgcaatc 7200
 tgtttctatg ttggctcaac attctgaaa agaagaatat gatagattga tgcaccctt 7260
 cgctgactac ggtgccgtac cgagtcacga gtacctgcag gcaagatgga gggccttgtt 7320

cgactgaccc agatagccca aggcgcttcg gtgctgccgg cgattctggg agaactcagt 7380
 cggaacagaa aagggaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaggccg gcatggtccc 7440
 agcctcctcg ctggcgccgg ctgggcaaca tgcttcggca tggcgaatgg gacgcggccg 7500
 ctcgagtcta gagggcccgt ttaaaccgc tgatcagcct 7540

<210> 14

<211> 7455

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-WT IVT模板 - 5'手枪1和3' SapI

<400> 14

ttatcgaat taatacgact cactataggg cgtcatagta ggaagtattg ggttggaag 60
 aacttatcgt ggactcgtct gagcgagtat aaacagtcaa ttaagctcag agcgttcacc 120
 ggggaaattc ggtgaggttt gaaatggggg gctgggccct gatgccagat ccttcctttc 180
 cccttcgagg ggggttaaccg gctgtgtttg ctagaggcac agaggggcaa catccaacct 240
 gcttttgccg ggaacgggtgc ggctccgatt cctgcgtcgc caaaggtgtt agcgcaccca 300
 aacggcgcac ctaccaatgt tattggtgtg gtctgcgagt tctagcctac tcgtttctcc 360
 cccgaccatt cactcaccca cgaaaagtgt gttgtaacca taagatttaa ccccgccacg 420
 ggatgtgcga taaccgtaag actggctcaa gcgcggaaag cgctgtaacc acatgctgtt 480
 agtcccttta tggctgcaag atggctaccc acctcgatc actgaactgg agctcgaccc 540
 tccttagtaa gggaaccgag aggccttcgt gcaacaagct ccgacacaga gtccacgtga 600
 ctgctaccac catgagtaca tggttctccc ctctcgaccc aggacttctt tttgaatata 660
 cacggctcga tccagagggt ggggcatgac ccctagcata gcgagctaca gcgggaactg 720
 tagctaggcc ttagcgtgcc ttggatactg cctgataggg cgacggccta gtcgtgtcgg 780
 ttctatagggt agcacataca aatatgcaga actctcattt ttctttcgat acagcctctg 840
 gcacctttga agatgtaacc ggaacaaaag tcaagatcgt tgaatacccc agatcgggtga 900
 acaatggtgt ttacgattcg tctactcatt tggagatact gaacctacag ggtgaaattg 960
 aaatttttaag gtctttcaat gaataccaaa ttgcgcgcgc caaacaacaa ctcggaactg 1020
 acatcgtgta cgaactacag ggtaatgttc agacaacgtc aaagaatgat tttgattccc 1080
 gtggcaataa tggtaacatg accttcaatt actacgaaa cacttatcag aattcagtag 1140
 acttctcgac ctctcgtcg gcgtcaggcg ccggacctgg gaactctcgg ggccgattag 1200
 cgggtctcct cacaaatttc agtggaatct tgaacctct tggctacctc aaagatcaca 1260
 acaccgaaga aatggaaaac tctgctgac gagtcacaac gcaaacggcg ggcaacactg 1320
 ccataaacac gcaatcatca ttgggtgtgt tgtgtgccta cgttgaagac ccgaccaa 1380
 ctgatcctcc gtccagcagc acagatcaac ccaccaccac tttcactgcc atcgacaggt 1440
 ggtacactgg acgtctcaat tcttgacaaa aagctgtaaa aaccttctct tttcaggccg 1500
 tcccgttcc cgggtgcctt ctgtctaggc agggaggcct caacggaggg gccttcacag 1560
 ctaccctaca tagacacttt ttgatgaagt gcgggtggca ggtgcaggtc caatgtaatt 1620
 tgacacaatt ccaccaaggc gctctccttg ttgccatggt tcctgaaacc acccttgatg 1680

tcaagcccga cggtaaggca aagagcttac aggagctgaa tgaagaacag tgggtggaaa 1740
 tgtctgacga ttaccggacc gggaaaaaca tgccttttca gtctcttggc acatactatc 1800
 ggccccctaa ctggacttgg ggtcccaatt tcatcaaccc ctatcaagta acggttttcc 1860
 cacaccaaatt tctgaacgcg agaacctcta cctcggtaga cataaacgtc ccatacatcg 1920
 gggagacccc cacgcaatcc tcagagacac agaactcctg gaccctcctc gttatggtgc 1980
 tcgttccccct agactataag gaaggagcca caactgaccc agaaattaca ttttctgtaa 2040
 ggccctacaag tccctacttc aatgggcttc gcaaccgcta cacggccggg acggacgaag 2100
 aacaggggcc cattcctacg gcacccagag aaaattcgtt tatgtttctc tcaaccctcc 2160
 ctgacgacac tgccctgtct tacgggaatg tgcgtacccc tcctgtcaat tacctccctg 2220
 gtgaaataac cgaccttttg caactggccc gcataccac tctcatggca tttagcgagg 2280
 tgccctgaacc cgtgcctgcc tcagacacat atgtgcccta cgttgccgtt cccaccagt 2340
 tcgatgacag gcctctcatc tccttcccga tcaccttctc agatcccgtc tatcagaaca 2400
 ccttggttgg cgccatcagt tcaaatttcg ccaattaccg tgggtgtatc caaatcactc 2460
 tgacattttg tggacccatg atggcgagag ggaaattcct gctctcgtat tctcccccaa 2520
 atggaacgca accacagact ctttccgaag ctatgcagtg cacatactct atttgggaca 2580
 taggcttgaa ctctagttag accttcgtcg tcccctacat ctgcccagtg gactaccgtg 2640
 aaactcgagc cattaccaac tcggtttact ccgctgatgg ttggttttagc ctgcacaagt 2700
 tgacaaaaat tactctacca cctgactgtc cgcaaagtcc ctgcattctc tttttcgctt 2760
 ctgctggtga ggattacact ctccgtctcc ccgttgattg taatccttcc tatgtgttcc 2820
 actccaccga caacgccgag accgggggta ttgaggcggg taacactgac accgatttct 2880
 ctggtgaact ggcggtcctt ggctctaacc aactaatgt caagttcctg ttgatcgat 2940
 ctcgattatt gaatgtaatc aaggtagtgg agaaggacgc cgttttcccc cgccctttcc 3000
 ctacacaaga aggtgcgcag caggatgatg gttacttttg tcttctgacc ccccgcccaa 3060
 cagtcgcttc ccgacccgcc actcgtttcg gcctgtacgc caatccgtcc ggcagtgggtg 3120
 ttcttgctaa cacttcactg gacttcaatt tttatagctt ggccctgtttc acttacttta 3180
 gatcggacct tgaggttacg gtggtctcac tagagccgga tctggaattt gctgtagggt 3240
 ggtttccttc tggcagtga taccaggtt ccagctttgt ctacgaccag ctgcatgtgc 3300
 ccttccactt tactgggcgc actccccgcg ctttcgctag caagggtggg aaggtatctt 3360
 tcgtgctccc ttggaactct gtctcgtctg tgctccccgt gcgctggggg ggggcttcca 3420
 agctctcttc tgctacgcgg ggtctaccgg cgcattgtga ttgggggact atttacgcct 3480
 ttgtcccccg tcctaataag aagaaaagca ccgctgtaaa acacgtggcc gtgtacattc 3540
 ggtacaagaa cgcacgtgcc tgggtcccca gcatgttcc ctttcgcagc tacaagcaga 3600
 agatgctgat gcaatctggc gatatcgaga ccaatcccgg gcctgcttct gacaacccaa 3660
 ttttgaggtt tcttgaagca gaaaatgatc tagtcaactc ggctctctc tggaagatgg 3720
 tgcactctgt tcaacagacc tggagaaagt atgtgaagaa cgatgatttt tggcccaatt 3780
 tactcagcga gctagtgggg gaaggtctct tcgcttggc cgccacgcta tccaaccaag 3840
 cttcagtaaa ggctcttttg ggctgcact ttctctctcg ggggtcaat tacactgact 3900
 ttactcttt actgatagag aaatgctcta gtttctttac cgtagaacca cctcctccac 3960
 cagctgaaaa cctgatgacc aagccctcag tgaagtcgaa attccgaaaa ctgtttaaga 4020

tgcaaggacc catggacaaa gtcaaagact ggaaccaa at agctgccggc ttgaagaatt 4080
ttcaatttgt tcgtgaccta gtcaaagagg tggctgattg gctgcaggcc tggatcaaca 4140
aagagaaagc cagccctgtc ctccagtacc agttggagat gaagaagctc gggcctgtgg 4200
ccttggctca tgacgctttc atggctgggt ccggggcccc tcttagcgac gaccagattg 4260
aatacctcca gaacctcaaa tctcttgccc taacactggg gaagactaat ttggcccaaa 4320
gtctcaccac tatgatcaat gccaaacaaa gttagccca acgagttgaa cccgttgtgg 4380
tggtccttag aggcaagccg ggatgcggca agagcttggc ctctacgttg attgccagg 4440
ctgtgtccaa gcgcctctat ggctcccaaa gtgtatattc tcttcccca gatccagatt 4500
tcttcgatgg atacaaagga cagttcgtga cttgatgga tgatttggga caaaaccgg 4560
atggacaaga tttctccacc tttgtcaga tgggtgcgac cgcccaattt ctcccaaca 4620
tggcggacct tgcaagaaaa gggcgctcct ttacctcaa tctcatcatt gcaactacaa 4680
atctcccca cttcagtcct gtcaccattg ctgatectt tgcagtctct cgccgtatca 4740
actacgatct gactctagaa gtatctgagg cctacaagaa acacacacgg ctgaattttg 4800
acttggcttt caggcgcaaa gacgcccc ccatttatcc ttttctgcc catgtgccct 4860
ttgtggacgt agctgtgcgc ttcaaaaatg gtcaccagaa ttttaatctc ctagagttgg 4920
tcgattccat ttgtacagac attcgagcca agcaacaagg tgcccgaaac atgcagactc 4980
tggttctaca gagcccaaac gagaatgatg acacccccgt cgacgaggcg ttgggtagag 5040
ttctctcccc cgctgcggtc gatgaggcgc ttgtcgacct cactccagag gccgaccgg 5100
ttggccgttt ggctattctt gccaaagctag gtcttgccct agctgcggtc acccctggtc 5160
tgataatctt ggcagtggga ctctacaggt acttctctgg ctctgatgca gaccaagaag 5220
aaacagaaag tgagggatct gtcaaggcac ccaggagcga aatgcttat gacggccga 5280
agaaaaactc taagccccct ggagcactct ctctcatgga aatgcaacag cccaacgtgg 5340
acatgggctt tgaggctgcg gtcgctaaga aagtggctgt cccattacc ttcatggttc 5400
ccaacagacc ttctgggctt acacagtccg ctctctggt gaccggccgg accttctaa 5460
tcaatgaaca tacatgggtc aatccctcct ggaccagctt cacaatccgc ggtgaggtac 5520
acactcgtga tgagccctc caaacggtt atttactca ccacggtatt cccacagatc 5580
tgatgatggt acgtctcgga ccgggcaatt ctttccctaa caatctagac aagtttggac 5640
ttgaccagat gccggcacgc aactcccggt tgggtggcgt ttcgtccagt tacggaaact 5700
tcttcttctc tggaatttc ctcggatttg ttgattccat cacctctgaa caaggaactt 5760
acgcaagact ctttaggtac aggtgacga cctacaaagg atggtgcggc tcggccctgg 5820
tctgtgaggc cgggtggcgc cgacgcatca ttggcctgca ttctgctggc gccgccggtg 5880
tcggcgccgg gacctatct tcaaaattag gactaatcaa agccctgaaa cacctcggtg 5940
aacctttggc cacaatgcaa ggactgatga ctgaattaga gcctggaatc accgtacatg 6000
taccgccgaa atccaaattg agaaagacga ccgcacacgc ggtgtacaaa ccggagtttg 6060
agcctgctgt gttgtcaaaa tttgatccca gactgaacaa ggatgttgac ttggatgaag 6120
taatttggtc taaacacact gccaatgtcc cttaccaacc tcctttgttc tacacataca 6180
tgtcagagta cgctcatcga gtcttctcct tcttggggaa agacaatgac attctgaccg 6240
tcaagaagc aattctgggc atccccggac tagaccccat ggatccccac acagctccgg 6300
gtctgcctta cgccatcaac ggccttcgac gtactgatct cgtcgatttt gtgaacggtg 6360

cagtagatgc ggcgctggct gtacaaatcc agaaattctt agacggtgac tactctgacc 6420
 atgtcttcca aacttttctg aaagatgaga tcagaccctc agagaaagtc cgagcgggaa 6480
 aaacccgcat tgttgatgtg ccctccctgg cgcatgcat tgtgggcaga atgttgcttg 6540
 ggcgctttgc tgccaagttt caatcccatc ctggctttct cctcggctct gctatcgggt 6600
 ctgaccctga tgttttctgg accgtcatag gggctcaact cgaggggaga aagaacacgt 6660
 atgacgtgga ctacagtgcc tttgactctt cacacggcac tggctccttc gaggctctca 6720
 tctctcactt tttcaccgtg gacaatggtt ttagccctgc gctgggaccg tatctcagat 6780
 ccctggctgt ctcggtgcac gcttacggcg agcgtcgcat caagattacc ggtggcctcc 6840
 cctccggttg tgccgcgacc agcctgctga acacagtgt caacaatgtg atcatcagga 6900
 ctgctctggc attgacttac aaggaatttg aatatgacat ggttgatata atcgccctacg 6960
 gtgacgacct tctggttgga acggattacg atctggactt caatgaggtg gcacgacgag 7020
 ctgccaagtt ggggtataag atgactcctg ccaacaaggg ttctgtcttc cctccgactt 7080
 cctctctttc cgatgctgtt tttctaaagc gcaaattcgt ccaaaacaac gacggcttat 7140
 acaaaccagt tatggattta aagaatttgg aagccatgct ctctacttc aaaccaggaa 7200
 cactactcga gaagctgcaa tctgtttcta tgttggtcga acattctgga aaagaagaat 7260
 atgatagatt gatgcacccc ttcgtgact acggtgccgt accgagtcac gagtacctgc 7320
 aggcaagatg gagggccttg ttcgactgac ccagatagcc caaggcgctt cggtgctgcc 7380
 ggcgattctg ggagaactca gtcggaacag aaaagggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7440
 aaaaaaaga agagc 7455

<210> 15

<211> 7455

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV手枪2-SapI IVT模板

<400> 15

ttatcgaaat taatacgact cactataggg cgtcatagta ggaagtattg ggttggaag 60
 aacttatcgt ggactcgtct gagcgagtat aaacagtcaa ttaagctcag agcggtcacc 120
 ggggaaattc ggtgaggttt gaaatggggg gctgggccct gatgccagat ccttcctttc 180
 cccttccggg gggtaaccg gctgtgtttg ctagaggcac agaggggcaa catccaacct 240
 gcttttgcgg ggaacggtgc ggctccgatt cctgcgtcgc caaaggtgtt agcgcaccca 300
 aacggcgcac ctaccaatgt tattggtgtg gtctgcgagt tctagcctac tcgtttctcc 360
 cccgaccatt cactcaccca cgaaaagtgt gttgtaacca taagatttaa cccccgcacg 420
 ggatgtgcga taaccgtaag actggtcaa gcgcggaaag cgctgtaacc acatgctgtt 480
 agtcccttta tggctgcaag atggctaccc acctcgatc actgaactgg agctcgaccc 540
 tccttagtaa gggaaccgag aggccttcgt gcaacaagct ccgacacaga gtccacgtga 600
 ctgctaccac catgagtaca tggttctccc ctctcgaccc aggacttctt tttgaatata 660
 cacggctcga tccagagggt ggggcatgac ccctagcata gcgagctaca gcgggaactg 720
 tagctaggcc ttagcgtgcc ttggatactg cctgataggg cgacggccta gtcgtgtcgg 780

```

ttctataggt agcacataca aatatgcaga actctcattt ttctttcgat acagcctctg 840
gcacctttga agatgtaacc ggaacaaaag tcaagatcgt tgaatacccc agatcggtga 900
acaatgggtgt ttacgattcg tctactcatt tggagatact gaacctacag ggtgaaattg 960
aaatttttaag gtctttcaat gaataccaaa ttcgcgccgc caaacaacaa ctcgactgg 1020
acatcgtgta cgaactacag ggtaatgttc agacaacgtc aaagaatgat tttgattccc 1080
gtggcaataa tggtaacatg accttcaatt actacgcaa cacttatcag aattcagtag 1140
acttctcgac ctctctgctg gcgtcaggcg ccggacctgg gaactctcgg ggcggattag 1200
cgggtctcct cacaaaattc agtggaatct tgaacctctt tggctacctc aaagatcaca 1260
acaccgaaga aatggaaaaac tctgctgatac gagtcacaac gcaaacggcg ggcaacactg 1320
ccataaacac gcaatcatca ttgggtgtgt tgtgtgccta cgttgaagac ccgaccaa 1380
ctgatcctcc gtccagcagc acagatcaac ccaccaccac tttcactgcc atcgacaggt 1440
ggtacactgg acgtctcaat tcttggacaa aagctgtaaa aaccttctct tttcaggccg 1500
tcccgttcc cgggtgccttt ctgtctagcg agggaggcct caacggaggg gccttcacag 1560
ctaccctaca tagacacttt ttgatgaagt gcgggtggca ggtgcaggtc caatgtaatt 1620
tgacacaatt ccaccaaggc gctctccttg ttgccatggt tcctgaaacc accttgatg 1680
tcaagcccga cggtaaaggc aagagcttac aggagctgaa tgaagaacag tgggtgaaa 1740
tgtctgacga ttaccggacc gggaaaaaca tgccttttca gtctcttggc acatactatc 1800
ggccccctaa ctggacttgg ggtcccaatt tcatcaacce ctatcaagta acggttttcc 1860
cacaccaa 1920
tctgaacgcg agaactcta cctcggtaga cataaacgtc ccatacatcg 1920
gggagacccc cacgcaatcc tcagagacac agaactcctg gacctctctc gttatggtgc 1980
tcgttcccct agactataag gaaggagcca caactgacce agaaattaca ttttctgtaa 2040
ggcctacaag tccctacttc aatgggcttc gcaaccgcta cacggccggg acggacgaag 2100
aacaggggcc cattcctacg gcaccagag aaaattegct tatgtttctc tcaacctcc 2160
ctgacgacac tgtccctgct tacgggaatg tgcgtacccc tcctgtcaat tacctccctg 2220
gtgaaataac cgaccttttg caactggccc gcataccac tctcatggca tttgagcggg 2280
tgcctgaacc cgtgcctgcc tcagacacat atgtgcccta cgttgccgtt cccaccag 2340
tcgatgacag gcctctcatc tccttcccga tcacctttc agatcccgtc tatcagaaca 2400
ccctgggttg cgccatcagt tcaaatttcg ccaattaccg tgggtgtatc caaatcactc 2460
tgacattttg tggaccatg atggcgagag ggaaattcct gctctcgat tctccccaa 2520
atggaacgca accacagact ctttccgaag ctatgcagt cacatactct atttgggaca 2580
taggcttgaa ctctagtttg accttcgtcg tcccctacat ctgcccag gactaccgtg 2640
aaactcgagc cattaccaac tcggtttact ccgtgatgg ttggtttagc ctgcacaagt 2700
tgacaaaaat tactctacca cctgactgtc cgcaaagtc ctgcattctc ttttctgctt 2760
ctgctgggtg ggattacact ctccgtctcc ccgttgattg taatccttcc tatgtgttcc 2820
actccaccga caacgccgag accgggggta ttgaggcggg taacactgac accgatttct 2880
ctgggtgaact ggcggtcctt ggctctaacc aactaatgt caagtctctg tttgatcgat 2940
ctcgattatt gaatgtaatc aaggtactgg agaaggacgc cgttttcccc cgcccttctc 3000
ctacacaaga aggtgcgcag caggatgatg gttacttttg tcttctgacc ccccgccaa 3060
cagtcgcttc ccgaccgcc actcgtttcg gcctgtacgc caatccgtcc ggcagtgggtg 3120

```

```

ttcttgctaa cacttcactg gacttcaatt tttatagctt ggctgtttc acttacttta 3180
gatcggaacct tgaggttacg gtggtctcac tagagccgga tctggaatth gctgtagggt 3240
ggtttccttc tggcagtgaa taccaggctt ccagctttgt ctacgaccag ctgcatgtgc 3300
ccttccactt tactgggcgc actccccgcg ctttcgctag caagggtggg aaggtatctt 3360
tcgtgctccc ttggaactct gtctcgtctg tgctccccgt gcgctggggg ggggcttcca 3420
agctctcttc tgctacgcgg ggtctaccgg cgcattgctga ttgggggact atttacgcct 3480
ttgtcccccg tcctaattgag aagaaaagca ccgctgtaaa acacgtggcc gtgtacattc 3540
ggtacaagaa cgcacgtgcc tggtgcccca gcatgcttcc ctttcgcagc tacaagcaga 3600
agatgctgat gcaatctggc gatatcgaga ccaatcccg gcctgcttct gacaacccaa 3660
ttttggagtt tcttgaagca gaaaatgatc tagtactctt ggctctctc tggaagatgg 3720
tgactctgt tcaacagacc tggagaaagt atgtgaagaa cgatgatttt tggcccaatt 3780
tactcagcga gctagtgggg gaaggtctct tcgcttggc cgccacgcta tccaaccaag 3840
cttcagtaaa ggctcttttg ggctgcact ttctctctcg ggggctcaat tacttgact 3900
tttactcttt actgatagag aaatgctcta gtttctttac cgtagaacca cctcctccac 3960
cagctgaaaa cctgatgacc aagccctcag tgaagtcaa attccgaaaa ctgtttaaga 4020
tgcaaggacc catggacaaa gtcaaagact ggaaccaaatt agctgccggc ttgaagaatt 4080
ttcaattttg tcgtgacct gtcaaagagg tggctgattg gctgcaggcc tggatcaaca 4140
aagagaaagc cagccctgtc ctccagtacc agttggagat gaagaagctc gggcctgtgg 4200
ccttggtcga tgacgcttct atggctggtt ccggggcccc tcttagcgac gaccagattg 4260
aatacctcca gaacctcaaa tctcttgccc taacactggg gaagactaat ttggcccaaa 4320
gtctcaccac tatgatcaat gccaaacaaa gttcagccca acgagttgaa cccgttgtgg 4380
tggctccttag aggcaagccg ggatgcggca agagcttggc ctctacgttg attgcccagg 4440
ctgtgtccaa gcgcctctat ggctcccaaa gtgtatatte tcttccccca gatccagatt 4500
tcttcgatgg atacaaagga cagttcgtga ccttgatgga tgatttggga caaaaccgg 4560
atggacaaga tttctccacc tttgtcaga tgggtgctgac cgcccaattt ctcccccaaca 4620
tggcggacct tgcaagaaaa gggcgtccct ttacctcaa tctcatcatt gcaactacaa 4680
atctccccca cttcagtcct gtcaccattg ctgaccttc tgcagtctct cgccgtatca 4740
actacgatct gactctagaa gtatctgagg cctacaagaa acacacacgg ctgaattttg 4800
acttggtctt caggcgcaaa gacgcccccc cttttatcc ttttgctgcc catgtgccct 4860
ttgtggacgt agctgtgcgc ttcaaaaatg gtcaccagaa ttttaattct ctagagttgg 4920
tcgattccat ttgtacagac attcgagcca agcaacaagg tgcccgaac atgcagactc 4980
tggttctaca gagccccaac gagaatgatg acacccccgt cgacgaggcg ttgggttagag 5040
ttctctcccc cgctgcggtc gatgaggcgc ttgtcgacct cactccagag gccgaccgg 5100
ttggccggtt ggctattctt gccaaagtag gtcttgccct agctgcggtc acccctggtc 5160
tgataatctt ggcagtggga ctctacaggt acttctctgg ctctgatgca gaccaagaag 5220
aaacagaaag tgagggatct gtcaaggcac ccaggagcga aatgcttat gacggccga 5280
agaaaaactc taagccccct ggagcactct ctctcatgga aatgcaacag cccaacgtgg 5340
acatgggctt tgaggctgcg gtcgctaaga aagtggctgt cccattacc ttcatggttc 5400
ccaacagacc ttctgggctt acacagtccg ctctctggt gaccggccgg accttctaa 5460

```

```

tcaatgaaca tacatggtcc aatccctcct ggaccagctt cacaatccgc ggtgaggtac 5520
acactcgtga tgagcccttc caaacggttc atttactca ccacggtatt cccacagatc 5580
tgatgatggc acgtctcggc cggggcaatt ctttcctaa caatctagac aagtttggac 5640
ttgaccagat gccggcacgc aactcccgtg tggttggcgt ttcgtccagt tacggaaact 5700
tcttcttctc tggaaatttc ctcggatttg ttgattccat cacctctgaa caaggaactt 5760
acgcaagact ctttaggtac agggtgacga cctacaaagg atggtgcggc tcggccctgg 5820
tctgtgaggc cgggtggcgtc cgacgcatca ttggcctgca ttctgctggc gccgccgcta 5880
tcggcgccgg gacctatata tcaaaattag gactaatcaa agccctgaaa cacctcgggtg 5940
aacctttggc cacaatgcaa ggactgatga ctgaattaga gcctggaatc accgtacatg 6000
taccgccgaa atccaaattg agaaagacga ccgcacacgc ggtgtacaaa ccggagtttg 6060
agcctgctgt gttgtcaaaa tttgatccca gactgaacaa ggatgttgac ttggatgaag 6120
taatttggtc taaacacact gccaatgtcc cttaccaacc tcctttgttc tacacataca 6180
tgtcagagta cgctcatcga gtcttctcct tcttggggaa agacaatgac attctgaccg 6240
tcaaagaagc aattctgggc atccccggac tagaccccat ggatccccac acagctccgg 6300
gtctgcctta cgccatcaac ggcttctgac gtactgatct cgtcgatttt gtgaacgcta 6360
cagtagatgc ggcgctggct gtacaaatcc agaaattctt agacggtgac tactctgacc 6420
atgtcttcca aacttttctg aaagatgaga tcagaccctc agagaaagtc cgagcgggaa 6480
aaaccgcgat tgttgatgtg ccctccctgg cgcattgcat tgtgggcaga atgttgcttg 6540
ggcgctttgc tgccaagttt caatcccatc ctggctttct cctcggtctt gctatcgggt 6600
ctgaccctga tgttttctgg accgtcatag gggctcaact cgaggggaga aagaacacgt 6660
atgacgtgga ctacagtgcc tttgactctt cacacggcac tggctccttc gaggtcttca 6720
tctctcactt tttcacctg gacaatggtt ttagccctgc gctgggaccg tatctcagat 6780
ccctggctgt ctcggtgcac gcttacggcg agcgtcgcat caagattacc ggtggcctcc 6840
cctccggttg tgccgcgacc agcctgctga acacagtgt caacaatgtg atcatcagga 6900
ctgctctggc attgacttac aaggaatttg aatatgacat ggttgatata atcgcttacg 6960
gtgacgacct tctggttggc acggattacg atctggactt caatgaggtg gcacgacgcg 7020
ctgccaagtt ggggtataag atgactcctg ccaacaaggg ttctgtcttc cctccgactt 7080
cctctctttc cgatgctgtt tttctaaagc gcaaatcgt ccaaaacaac gacggcttat 7140
acaaaccagt tatggattta aagaatttgg aagccatgct ctctacttc aaaccaggaa 7200
cactactcga gaagctgcaa tctgtttcta tgttggtcga acattctgga aaagaagaat 7260
atgatagatt gatgcacccc ttcgctgact acggtgccgt accgagtcac gagtacctgc 7320
aggcaagatg gagggccttg ttcgactgac ccagatagcc caaggcgctt cgggtgctgcc 7380
ggcgattctg ggagaaactca gtcggaacag aaaagggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7440
aaaaaaaaaga agagc 7455

```

<210> 16

<211> 7457

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-IR2-手枪1-SapI IVT模板

<400> 16

```

ttatcgaaat taatacgact cactataggg cgtcatagta ggaagtattg ggttggaag 60
aacttatcgt ggactcgtct gagcgagtat aaacagtcaa ttaagctcag agcggtcacc 120
ggggaaattc ggtgaggttt gaaatggggg gctgggccct gatgccagct ccttcctttc 180
cccttcgagg gggttaaccg gctgtgtttg ctagaggcac agaggagcaa catccaacct 240
gcttttgtgg ggaacgggtgc ggctccaatt cctgcgtcgc caaagggtgtt agcgcaccca 300
aacggcgcat ctaccaatgc tattggtgtg gtctgcgagt tctagcctac tcgtttctcc 360
cctattcatt cactcacgca caaaaagtgt gttgtaacta caagatttag ccctcacacg 420
ggatgtgtga taaccgcaag actgactcaa gcgcggaaag cgctgtaacc gcatgctgtt 480
agtcccttta tggtgcgag atggtatcc acctcggatc actgaactgg agctcgacct 540
tccttagtaa gggaaccgag aggccttctt gcaacaagct ccgacacaga gtccacgtga 600
ttgctaccac catgagtaca tggttctccc ctctcgacct aggacttctt tttgaatata 660
cacggctcga tccagagggt ggggcatgat cccctagca tagcgagcta cagcggaac 720
ttagctagg ccttagcgtg ccttggtatc tgctgatag ggcgacggcc tagtcgtgtc 780
ggttctatag gtagcacata caaatatgca gaactctcat ttttctttcg atacagcctc 840
tggcaccttt gaagatgtaa ccggaacaaa agtcaagatc gttgaatacc ccagatcggt 900
gaacaatggt gtttacgatt cgtctactca tttggagata ctgaacctac aggggtgaaat 960
tgaaatttta aggtctttca atgaatacca aattcgcgcc gccaaacaac aactcggact 1020
ggacatcgtg tacgaactac agggtaatgt tcagacaacg tcaaagaatg attttgattc 1080
ccgtggcaat aatggtaaca tgacctcaa ttactacgca aacacttata agaattcagt 1140
agacttctcg acctcctcgt cggcgtcagg cgccggacct gggaactctc ggggcggatt 1200
agcgggtctc ctcaaaaatt tcagtggaaat cttgaacctt cttggctacc tcaaagatca 1260
caacaccgaa gaaatggaaa actctgctga tcgagtcaca acgcaaacgg cgggcaacac 1320
tgccataaac acgcaatcat cattgggtgt gttgtgtgcc tacgttgaag acccgacaa 1380
atctgacatc cgtccagca gcacagatca acccaccacc actttcactg ccatcgacag 1440
gtggtacact ggacgtctca attcttggtc aaaagctgta aaaaccttct cttttcaggc 1500
cgtcccgtt cccggtgcct ttctgtctag gcaggaggc ctcaacggag gggccttcac 1560
agctacccta catagacact tttgatgaa gtgcgggtgg caggtgcagg tccaatgtaa 1620
tttgacacaa ttccaccaag gcgtctctct tgttgccatg gttcctgaaa ccacccttga 1680
tgtcaagccc gacggttaagg caaagagctt acaggagctg aatgaagaac agtgggtgga 1740
aatgtctgac gattaccgga ccgggaaaaa catgcctttt cagtctcttg gcacatacta 1800
tcggccccct aactggactt ggggtcccaa tttcatcaac ccctatcaag taacggtttt 1860
cccacaccaa attctgaacg cgagaacctc tacctcggtg gacataaacg tccatacat 1920
cggggagacc cccacgcaat cctcagagac acagaactcc tggacctcc tcgttatggt 1980
gctcgttccc ctagactata aggaaggagc cacaactgac ccagaaatta cattttctgt 2040
aaggcctaca agtccctact tcaatgggtc tcgcaaccgc tacacggccg ggacggacga 2100
agaacagggg cccattccta cggcaccag agaaaattcg cttatgtttc tctcaacctt 2160
ccctgacgac actgtccctg cttacgggaa tgtgcgtacc cctcctgtca attacctccc 2220

```

```

tggtgaaata accgaccttt tgcaactggc ccgcataccc actctcatgg catttgagcg 2280
gggtgcctgaa cccgtgcctg cctcagacac atatgtgccc tacgttgccg ttcccaccca 2340
gttcgatgac aggcctctca tctccttccc gatcaccctt tcagatcccc tctatcagaa 2400
caccctgggtt ggcgccatca gttcaaattt cgccaattac cgtgggtgta tccaaatcac 2460
tctgacattt tgtggaccca tgatggcgag agggaaattc ctgctctcgt attctccccc 2520
aaatggaacg caaccacaga ctctttccga agctatgcag tgcacatact ctatttggga 2580
cataggcttg aactctagtt ggaccttcgt cgtcccctac atctcgccca gtgactaccg 2640
tgaaactcga gccattacca actcggttta ctccgctgat ggttggttta gcctgcacaa 2700
gttgacaaaa attactctac cacctgactg tccgcaaagt ccctgcattc tctttttcgc 2760
ttctgctggg gaggattaca ctctccgtct ccccgttgat tgtaatcctt cctatgtgtt 2820
ccactccacc gacaacgccg agaccggggt tattgaggcg ggtaacactg acaccgattt 2880
ctctggtgaa ctggcggtc ctggtcteta ccacactaat gtcaagtcc tgtttgatcg 2940
atctcgatta ttgaatgtaa tcaaggtact ggagaaggac gccgttttcc cccgcccttt 3000
ccctacacaa gaagggtcgc agcaggatga tggttacttt tgtcttctga cccccgcgc 3060
aacagtcgct tcccgacctg ccactcgttt cggcctgtac gccaatccgt ccggcagtg 3120
tgttcttgct aacacttcac tggacttcaa tttttatagc ttggcctgtt tcacttactt 3180
tagatcggac cttgaggtta cgggtgtctc actagagccg gatctggaat ttgctgtagg 3240
gtggtttcct tctggcagtg aataccaggc ttccagcttt gtctacgacc agctgcatgt 3300
gcccttcac tttactgggc gcactccccg cgctttcgt agcaagggtg ggaaggatat 3360
tttcgtgctc ccttggaaact ctgtctcgtc tgtctcccc gtgcgctggg ggggggcttc 3420
caagctctct tctgctacgc ggggtctacc ggcgcatgct gattggggga ctatttacgc 3480
ctttgtcccc cgtcctaata agaagaaaag caccgctgta aaacacgtgg ccgtgtacat 3540
tcggtacaag aacgcacgtg cctgggtgcc cagcatgctt ccctttcgca gctacaagca 3600
gaagatgctg atgcaatctg gcgatatcga gaccaatccc gggcctgctt ctgacaacce 3660
aattttggag tttcttgaag cagaaaatga tctagtcact ctggcctctc tctggaagat 3720
gggtgcactct gttcaacaga cctggagaaa gtatgtgaag aacgatgatt tttggcccaa 3780
tttactcagc gagctagtgg gggaaggctc tgtcgccctg gccgccacgc tatccaacca 3840
agcttcagta aaggctcttt tgggcctgca ctttctctct cgggggctca attacactga 3900
cttttactct ttactgatag agaaatgctc tagtttcttt accgtagaac cacctcctcc 3960
accagctgaa aacctgatga ccaagccctc agtgaagtcg aaattccgaa aactgtttta 4020
gatgcaagga cccatggaca aagtcaaaga ctggaaccaa atagctgccg gcttgaagaa 4080
ttttcaattt gttcgtgacc tagtcaaaga ggtggtcgat tggctgcagg cctggatcaa 4140
caaagagaaa gccagccctg tcctccagta ccagttggag atgaagaagc tcgggcctgt 4200
ggccttggct catgacgctt tcatggtggt ttccgggccc cctcttagcg acgaccagat 4260
tgaataacct cagaacctca aatctcttgc cctaacactg gggaagacta atttggccca 4320
aagtctcacc actatgatca atgcaaaca aagttcagcc caacgagttg aaccggttgt 4380
gggtggtcct agaggcaagc cgggatgcgg caagagcttg gcctctacgt tgattgcccc 4440
ggctgtgtcc aagcgctct atggctccca aagtgtatat tctcttcccc cagatccaga 4500
tttcttcgat ggatacaaag gacagttcgt gaccttgatg gatgatttgg gacaaaacce 4560

```

```

ggatggacaa gatttctcca ccttttgtca gatggtgtcg accgccaat ttctcccaa 4620
catggcggac cttgcagaga aaggcgctcc ctttacctcc aatctcatca ttgcaactac 4680
aaatctcccc cacttcagtc ctgtcaccat tgctgacctt tctgcagtct ctgccgtat 4740
caactacgat ctgactctag aagtatctga ggcctacaag aaacacacac ggctgaattt 4800
tgacttggct ttcaggcgca cagacgcccc cccatttat ccttttgctg cccatgtgcc 4860
ctttgtggac gtagctgtgc gcttcaaaaa tggtcaccag aattttaatc tcctagagtt 4920
ggtcgattcc atttgtacag acattcgagc caagcaacaa ggtgcccga acatgcagac 4980
tctggttcta cagagcccca acgagaatga tgacaccccc gtcgacgagg cgttgggtag 5040
agttctctcc cccgctgcgg tcgatgaggc gcttgtcgac ctactccag aggccgacct 5100
ggttggccgt ttggctattc ttgccaagct aggtcttgcc ctagctgcgg tcacccttg 5160
tctgataatc ttggcagtgg gactctacag gtacttctct ggctctgatg cagaccaaga 5220
agaaacagaa agtgagggat ctgtcaaggc acccaggagc gaaaatgctt atgacggccc 5280
gaagaaaaac tctaagcccc ctggagcact ctctctcatg gaaatgcaac agcccaacgt 5340
ggacatgggc tttgaggctg cggtcgctaa gaaagtggc gtccccatta cttcatggt 5400
tccaacaga ccttctgggc ttacacagtc cgctctctg gtgaccggc ggaccttct 5460
aatcaatgaa catacatggt ccaatccctc ctggaccagc ttcacaatcc gcggtgaggt 5520
acacactcgt gatgagccct tccaaacggt tcatttact caccacgta tcccacaga 5580
tctgatgatg gtacgtctcg gaccgggcaa ttctttccct acaatctag acaagtttg 5640
acttgaccag atgccggcac gcaactcccg tgtggttggc gtttcgtcca gttacgaaa 5700
cttcttcttc tctggaaatt tcctcggatt tgttgattcc atcacctctg aacaaggaac 5760
ttacgcaaga ctctttaggt acagggtgac gacctacaaa ggatggtgcg gctcggccct 5820
ggtctgtgag gccggtggcg tccgacgcat cattggcctg cattctgctg gcgccgccg 5880
tatcggcgcc gggacctata tctcaaaatt aggactaat aaagccctga aacacctcg 5940
tgaacctttg gccacaatgc aaggactgat gactgaatta gagcctggaa tcaccgtaca 6000
tgtaccccg aaatccaaat tgagaaagac gaccgcacac gcggtgtaca aaccggagtt 6060
tgagcctgct gtgtgtcaa aatttgatcc cagactgaac aaggatgttg acttgatga 6120
agtaattttg tctaaacaca ctgccaatgt cccttaccia cctcctttgt tctacacata 6180
catgtcagag tacgctcatc gagtcttctc cttcttgggg aaagacaatg acattctgac 6240
cgtcaaagaa gcaattctgg gcatccccgg actagacccc atggatcccc acacagctcc 6300
gggtctgcct tacgccatca acggccttcg acgtactgat ctctcgatt ttgtgaacgg 6360
tacagtagat gcggcgctgg ctgtacaaat ccagaaatc ttagacggtg actactctga 6420
ccatgtcttc caaacttttc tgaaagatga gatcagaccc tcagagaaag tccgagcggg 6480
aaaaacccgc attgttgatg tgccctccct ggcgcatgac attgtgggca gaatgttgct 6540
tgggcgcttt gctgccaagt ttcaatccca tcttgcttt ctctcggct ctgctatcgg 6600
gtctgaccct gatgttttct ggaccgtcat aggggtcaa ctcgaggga gaaagaacac 6660
gtatgacgtg gactacagt cctttgactc ttcacacggc actggctcct tcgagctct 6720
catctctcac tttttcaccg tggacaatgg ttttagccct gcgctgggac cgtatctcag 6780
atccctggct gtctcggtgc acgcttacgg cgagcgtcgc atcaagatta ccggtggcct 6840
ccctccgggt tgtgccgca ccagcctgct gaacacagt ctcaacaatg tgatcatcag 6900

```

gactgctctg gcattgactt acaaggaatt tgaatatgac atggttgata tcatcgccta 6960
 cggtgacgac cttctggttg gcacggatta cgatctggac ttcaatgagg tggcacgacg 7020
 cgctgccaag ttgggggtata agatgactcc tgccaacaag ggttctgtct tccctccgac 7080
 ttctctctctt tccgatgctg tttttctaaa gcgcaaattc gtccaaaaca acgacggctt 7140
 atacaaacca gttatggatt taaagaattt ggaagccatg ctctcctact tcaaaccagg 7200
 aacactactc gagaagctgc aatctgtttc tatgttggct caacattctg gaaaagaaga 7260
 atatgataga ttgatgcacc ctttcgctga ctacggtgcc gtaccgagtc acgagtacct 7320
 gcaggcaaga tggagggcct tgttcgactg acccagatag cccaaggcgc ttcggtgctg 7380
 ccggcgattc tgggagaact cagtcggaac agaaaaggga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7440
 aaaaaaaaaa gaagagc 7457

<210> 17

<211> 7457

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-IR2-S177A-手枪1-SapI IVT模板

<400> 17

ttatcgaaat taatacgact cactataggg cgtcatagta ggaagtattg ggttggaag 60
 aacttatcgt ggactcgtct gagcgagtat aaacagtcaa ttaagctcag agcggttacc 120
 ggggaaattc ggtgaggttt gaaatggggg gctgggcctt gatgccagtc ctttcctttc 180
 ccttccggg ggggttaaccg gctgtgtttg ctagaggcac agaggagcaa catccaacct 240
 gcttttgtgg ggaacggtgc ggctccaatt cctgcgtcgc caaaggtgtt agcgcacca 300
 aacggcgcac ctaccaatgc tattggtgtg gtctgcgagt tctagcctac tcgtttctcc 360
 cctattcatt cactcacgca caaaaagtgt gttgtaacta caagatttag ccctcacacg 420
 ggatgtgtga taaccgcaag actgactcaa gcgcggaaag cgctgtaacc gcatgctgtt 480
 agtcccttta tggctgcgag atggctatcc acctcggatc actgaactgg agctcgacct 540
 tccttagtaa gggaaccgag aggcttctt gcaacaagct ccgacacaga gtccacgtga 600
 ttgctaccac catgagtaca tggttctccc ctctcgacct aggacttctt tttgaatatc 660
 cacggctcga tccagagggt ggggcatgat cccctagca tagcgagcta cagcggaac 720
 tgtagctagg ccttagcgtg ccttggtatg tgctgtagg ggcgacggcc tagtcgtgtc 780
 ggttctatag gtagcacata caaatatgca gaactctcat ttttctttcg atacagcctc 840
 tggcaccttt gaagatgtaa ccggaacaaa agtcaagatc gttgaatacc ccagatcggt 900
 gaacaatggt gtttacgatt cgtctactca tttggagata ctgaacctac aggggtgaaat 960
 tgaaatttta aggtctttca atgaatacca aattcgcgc gccaaacaac aactcggact 1020
 ggacatcgtg tacgaactac agggtaatgt tcagacaacg tcaaagaatg attttgattc 1080
 ccgtggcaat aatggtaaca tgaccttcaa ttactacgca aacacttata agaattcagt 1140
 agacttctcg acctcctcgt cggcgtcagg cgccggacct gggaactctc ggggcggatt 1200
 agcgggtctc ctcaaaaatt tcagtggaaat cttgaacctt cttggctacc tcaaagatca 1260
 caacaccgaa gaaatggaaa actctgctga tcgagtcaca acgcaaacgg cgggcaacac 1320

```

tgccataaac acgcaatcat cattgggtgt gttgtgtgcc tacgttgaag acccgaccaa 1380
atctgatcct ccgccagca gcacagatca acccaccacc actttcactg ccatcgacag 1440
gtggtacact ggacgtctca attcttggac aaaagctgta aaaaccttct cttttcaggc 1500
cgccccgctt cccgggtgcct ttctgtctag gcaggaggag ctcaacggag gggccttcac 1560
agctacccta catagacact ttttgatgaa gtgcgggtgg caggtgcagg tccaatgtaa 1620
tttgacacaa ttccaccaag gcgctctcct tgttgccatg gttcctgaaa ccaccctga 1680
tgtcaagccc gacggttaagg caaagagctt acaggagctg aatgaagaac agtgggtgga 1740
aatgtctgac gattaccgga ccgggaaaaa catgcctttt caggcgcttg gcacatacta 1800
tcggccccct aactggactt ggggtcccaa tttcatcaac ccctatcaag taacggtttt 1860
cccacaccaa attctgaacg cgagaacctc tacctcggtg gacataaacg tcccatacat 1920
cggggagacc cccacgcaat cctcagagac acagaactcc tggacctcc tcgttatggt 1980
gctcgttccc ctagactata aggaaggagc cacaactgac ccagaaatta cattttctgt 2040
aaggcctaca agtccctact tcaatgggct tcgcaaccgc tacacggccg ggacggacga 2100
agaacagggg cccattccta cggcaccag agaaaattcg cttatgtttc tctcaacct 2160
ccctgacgac actgtccctg cttacgggaa tgtgcgtacc cctcctgtca attacctccc 2220
tggtgaaata accgaccttt tgcaactggc ccgcataccc actctcatgg catttgagcg 2280
gggtgcctgaa cccgtgcctg cctcagacac atatgtgccc tacgttgccg ttcccaccca 2340
gttcgatgac aggcctctca tctccttccc gatcaccctt tcagatcccg tctatcagaa 2400
caccctgggtt ggcgccatca gttcaaattt cgccaattac cgtgggtgta tccaaatcac 2460
tctgacattt tgtggacca tgatggcgag agggaaattc ctgctctcgt attctcccc 2520
aaatggaacg caaccacaga ctctttccga agctatgcag tgcacatact ctatttgga 2580
cataggcttg aactctagtt ggaccttctg cgtcccctac atctcgccca gtgactaccg 2640
tgaaactcga gccattacca actcgggtta ctccgctgat ggttggttta gcctgcacaa 2700
gttgacacaaa attactctac cacctgactg tccgcaaagt ccctgcattc tctttttcgc 2760
ttctgctggt gaggattaca ctctccgtct ccccgttgat tgtaatcctt cctatgtgtt 2820
ccactccacc gacaacgccg agaccggggt tattgaggcg gtaaacactg acaccgattt 2880
ctctggtgaa ctggcggctc ctggctctaa ccacactaat gtcaagtcc tgtttgatcg 2940
atctcgatta ttgaatgtaa tcaaggtagt ggagaaggac gccgttttcc cccgcccttt 3000
ccctacacaa gaagggtgcg agcaggatga tggttacttt tgtcttctga cccccgccc 3060
aacagtcgct tcccgaccgg ccaactcgtt cggcctgtac gccaatccgt ccggcagtg 3120
tgttcttgct aacacttcac tggacttcaa tttttatagc ttggcctgtt tcacttactt 3180
tagatcgac cttgaggta cgggtgtctc actagagccg gatctggaat ttgctgtagg 3240
gtggtttcct tctggcagtg aataccaggc ttccagcttt gtctacgacc agctgcatgt 3300
gcccttcac tttactgggc gcactccccg cgctttcgt agcaagggtg ggaaggatat 3360
tttcgtgctc ccttgaact ctgtctcgtc tgtgtcccc gtgcgctggg ggggggcttc 3420
caagctctct tctgctacgc ggggtctacc ggcgcatgct gattggggga ctatttacgc 3480
ctttgtcccc cgtcctaata agaagaaaag caccgctgta aaacacgtgg ccgtgtacat 3540
tcggtacaag aacgcacgtg cctgggtgcc cagcatgctt ccctttcgca gctacaagca 3600
gaagatgctg atgcaatctg gcgatatcga gaccaatccc gggcctgctt ctgacaaccc 3660

```

```

aattttggag tttcttgaag cagaaaatga tctagtcact ctggcctctc tctggaagat 3720
ggtgcactct gttcaacaga cctggagaaa gtatgtgaag aacgatgatt tttggcccaa 3780
tttactcagc gagctagtgg gggaaggctc tgtcgccttg gccgccacgc tatccaacca 3840
agcttcagta aaggctcttt tgggcctgca ctttctctct cgggggctca attacactga 3900
cttttactct ttactgatag agaaatgctc tagtttcttt accgtagaac cacctcctcc 3960
accagctgaa aacctgatga ccaagccctc agtgaagtcg aaattccgaa aactgtttaa 4020
gatgcaagga cccatggaca aagtcaaaga ctggaaccaa atagctgccg gcttgaagaa 4080
ttttcaattt gttcgtgacc tagtcaaaga ggtggtcgat tggctgcagg cctggatcaa 4140
caaagagaaa gccagccctg tcctccagta ccagttggag atgaagaagc tcgggcctgt 4200
ggccttggct catgacgctt tcatggctgg ttccggggcc cctcttagcg acgaccagat 4260
tgaatacctc cagaacctca aatctcttgc cctaactg gggaagacta atttggccca 4320
aagtctcacc actatgatca atgcaaaca aagttcagcc caacgagttg aaccggttgt 4380
ggtggtcctt agaggcaagc cgggatgcgg caagagcttg gcctctacgt tgattgcccc 4440
ggctgtgtcc aagcgctct atggtccca aagtgtatat tctcttcccc cagatccaga 4500
tttcttcgat ggatacaaag gacagttcgt gaccttgatg gatgatttgg gacaaaaccc 4560
ggatggacaa gatttctcca cttttgtca gatggtgtcg accgccaat ttctcccaa 4620
catggcggac cttgcagaga aaggcgctcc ctttacctc aatctcatca ttgcaactac 4680
aaatctcccc cacttcagtc ctgtcaccat tgctgacct tctgcagtct ctcgccgtat 4740
caactacgat ctgactctag aagtatctga ggcctacaag aaacacacac ggctgaattt 4800
tgacttggct ttcaggcgca cagacgcccc cccatttat cttttgtcg cccatgtgcc 4860
ctttgtggac gtagctgtgc gcttcaaaaa tggtcaccag aattttaatc tcctagagtt 4920
ggtcgattcc atttgtacag acattcgagc caagcaacaa ggtgcccga acatgcagac 4980
tctggttcta cagagcccca acgagaatga tgacaccccc gtcgacgagg cgttgggtag 5040
agttctctcc cccgctgcgg tcgatgaggc gcttgtcgac ctactccag aggccgacct 5100
ggttggccgt ttggctattc ttgccaagct aggtcttgcc ctagctgcgg tcacccttg 5160
tctgataatc ttggcagtgg gactctacag gtacttctct ggctctgatg cagaccaaga 5220
agaaacagaa agtgagggat ctgtcaaggc acccaggagc gaaaatgctt atgacggccc 5280
gaagaaaaac tctaagcccc ctggagcact ctctctcatg gaaatgcaac agcccaacgt 5340
ggacatgggc tttgaggtg cggtcgctaa gaaagtggtc gtccccatta cttcatggt 5400
tcccaacaga cttcttgggc ttacacagtc cgctctctg gtgaccggcc ggaccttct 5460
aatcaatgaa catacatggt ccaatccctc ctggaccagc ttcacaatcc gcggtgaggt 5520
acacactcgt gatgagccct tccaaacggt tcatttact caccacggtt tccccacaga 5580
tctgatgatg gtacgtctcg gaccgggcaa ttctttccct aacaatctag acaagtttgg 5640
acttgaccag atgccggcac gcaactcccg tgtggttggc gtttcgtcca gttacggaaa 5700
cttcttcttc tctggaaatt tcctcggatt tgttgattcc atcacctctg aacaaggaa 5760
ttacgcaaga ctctttaggt acagggtgac gacctacaaa ggatggtgcg gctcgccct 5820
ggtctgtgag gccggtggcg tccgacgcat cattggcctg cattctgctg gcgccgccg 5880
tatcggcgcc gggacctata tctcaaaatt aggactaatc aaagccctga aacacctcgg 5940
tgaacctttg gccacaatgc aaggactgat gactgaatta gagcctggaa tcaccgtaca 6000

```

tgtacccccg aaatccaaat tgagaaagac gaccgcacac gcggtgtaca aaccggagtt 6060
 tgagcctgct gtgttgtcaa aatttgatcc cagactgaac aaggatgttg acttgatga 6120
 agtaatttgg tctaaacaca ctgccaatgt cccttaccaa cctcctttgt tctacacata 6180
 catgtcagag tacgctcatc gagtcttctc cttcttgggg aaagacaatg acattctgac 6240
 cgtcaaagaa gcaattctgg gcatccccgg actagacccc atggatcccc acacagctcc 6300
 gggctctgcct tacgccatca acggccttcg acgtactgat ctgctcgatt ttgtgaacgg 6360
 tacagtagat gcggcgctgg ctgtacaaat ccagaaattc ttagacgggtg actactctga 6420
 ccatgtcttc caaacttttc tgaaagatga gatcagaccc tcagagaaag tccgagcggg 6480
 aaaaacccgc attgttgatg tgccctccct ggcgcatgtg attgtgggca gaatgttgct 6540
 tgggcgcttt gctgccaagt ttcaatccca tectggcttt ctctcggct ctgctatcgg 6600
 gtctgaccct gatgttttct ggaccgtcat aggggctcaa ctcgagggga gaaagaacac 6660
 gtatgacgtg gactacagt cctttgactc ttcacacggc actggctcct tcgaggctct 6720
 catctctcac tttttaccg tggacaatgg ttttagccct gcgctgggac cgtatctcag 6780
 atccctggct gtctcggtgc acgcttacgg cgagcgtcgc atcaagatta ccggtggcct 6840
 cccctccggt tgtgccgga ccagcctgct gaacacagt ctcaacaatg tgatcatcag 6900
 gactgctctg gcattgactt acaaggaatt tgaatatgac atggttgata tcatcgccta 6960
 cggtgacgac cttctggtg gcacggatta cgatctggac ttcaatgagg tggcacgacg 7020
 cgctgccaag ttgggggtata agatgactcc tgccaacaag ggttctgtct tccctccgac 7080
 ttctctctt tccgatgctg tttttctaaa gcgcaaatc gtccaaaaca acgacggctt 7140
 atacaaacca gttatggatt taaagaattt ggaagccatg ctctcctact tcaaaccagg 7200
 aacactactc gagaagctgc aatctgttct tatgttggt caacattctg gaaaagaaga 7260
 atatgataga ttgatgcacc cttcgtga ctacgggtgc gtaccgagtc acgagtacct 7320
 gcaggcaaga tggagggcct tgttcgactg acccagatag cccaaggcgc ttcggtgctg 7380
 ccggcgattc tgggagaact cagtcggaac agaaaaggga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7440
 aaaaaaaaaa gaagagc 7457

<210> 18

<211> 7445

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-HHRS-SapI IVT模板

<400> 18

ttatcgaat taatacgact cactataggg cgtcatagta ggaagtattg ggttggaag 60
 aacttatcgt tggtagctta ccatttcaaa ctgatgagtc cgtgaggacg aaacgagtaa 120
 gctcgtcttt gaaatggggg gctgggccct gatgccagtc ctttctttc ccttccggg 180
 gggttaaccg gctgtgtttg ctagaggcac agaggggcaa catccaacct gcttttgagg 240
 ggaacgggtg ggctccgatt cctgcgtcgc caaagtggt agcgcaccca aacggcgac 300
 ctaccaatgt tattggtgtg gtctgcgagt tctagcctac tcgtttctcc ccgaccatt 360
 cactcaccca cgaaaagtgt gttgtaacca taagatttaa ccccgacg ggatgtgcga 420

```

taaccgtaag actggctcaa gcgcggaaag cgctgtaacc acatgctgtt agtcccttta 480
tggctgcaag atggctaccc acctcgatc actgaactgg agctcgaccc tccttagtaa 540
gggaaccgag aggccttcgt gcaacaagct ccgacacaga gtccacgtga ctgctaccac 600
catgagtaca tggttctccc ctctcgaccc aggacttctt tttgaatata cagggtctga 660
tccagagggt ggggcatgac ccctagcata gcgagctaca gcgggaactg tagctaggcc 720
ttagcgtgcc ttggatactg cctgataggg cgacggccta gtcgtgtcgg ttctataggt 780
agcacatata aatatgcaga actctcattt ttctttcgat acagcctctg gcacctttga 840
agatgtaacc ggaacaaaaag tcaagatcgt tgaatacccc agatcgggtga acaatgggtg 900
ttacgattcg tctactcatt tggagatact gaacctacag ggtgaaattg aaatttttaag 960
gtctttcaat gaataccaaa ttcgcgccgc caaacaacaa ctcgactgg acatcgtgta 1020
cgaactacag ggtaatgttc agacaacgtc aaagaatgat tttgattccc gtggcaataa 1080
tggtaacatg accttcaatt actacgcaa cacttatcag aattcagtag acttctcgac 1140
ctcctcgtcg gcgtcaggcg ccggacctgg gaactctcgg ggcgattag cgggtctcct 1200
cacaaatttc agtggaatct tgaacctctt tggtacctc aaagatcaca acaccgaaga 1260
aatggaaaac tctgctgac gagtcacaac gcaaacggcg ggcaacactg ccataaacac 1320
gcaatcatca ttgggtgtgt tgtgtgccta cgttgaagac ccgaccaa atctgacctcc 1380
gtccagcagc acagatcaac ccaccaccac ttctactgcc atcgacaggt ggtacactgg 1440
acgtctcaat tcttggacaa aagctgtaaa aaccttctct tttcaggccg tcccgcttcc 1500
cgggtgccttt ctgtctaggc agggaggcct caacggaggg gccttcacag ctaccctaca 1560
tagacacttt ttgatgaagt gcgggtggca ggtgcaggtc caatgtaatt tgacacaatt 1620
ccaccaaggc gctctccttg ttgccatggt tcctgaaacc acccttgatg tcaagccga 1680
cggtaaggca aagagcttac aggagctgaa tgaagaacag tgggtgga aa tgtctgacga 1740
ttaccggacc gggaaaaaca tgccttttca gtctcttggc acatactatc ggccccctaa 1800
ctggacttgg ggtcccaatt tcatcaacc ctatcaagta acggttttcc cacaccaaat 1860
tctgaacgcg agaacctcta cctcggtaga cataaacgtc ccatacatcg gggagacccc 1920
cacgcaatcc tcagagacac agaactcctg gacctcctc gttatggtgc tcgttcccct 1980
agactataag gaaggagcca caactgaccc agaaattaca ttttctgtaa ggcctacaag 2040
tccctacttc aatgggcttc gcaaccgta cacggccggg acggacgaag aacaggggcc 2100
cattcctacg gcacccagag aaaattcgtt tatgtttctc tcaacctcc ctgacgacac 2160
tgtccctgct tacgggaatg tgcgtacccc tctgtcaat tacctccctg gtgaaataac 2220
cgaccttttg caactggccc gcataccac tctcatggca tttgagcggg tgcctgaacc 2280
cgtgcctgcc tcagacacat atgtgccta cgttgccgtt cccaccagt tcgatgacag 2340
gcctctcatc tccttcccga tcacctttc agatcccgtc tatcagaaca ccctggttgg 2400
cgccatcagt tcaaatttcg ccaattaccg tgggtgtatc caaatcactc tgacattttg 2460
tggacccatg atggcgagag ggaaattcct gctctcgtat tctccccc aa atggaacgca 2520
accacagact ctttccgaag ctatgcagt cacatactct atttgggaca taggcttgaa 2580
ctctagttag accttcgtcg tcccctacat ctgcgccagt gactaccgtg aaactcgagc 2640
cattaccaac tcggtttact ccgctgatgg ttggttttag ctgcacaagt tgacaaaaat 2700
tactctacca cctgactgtc cgcaaagtcc ctgcattctc tttttcgctt ctgctggtga 2760

```

```

ggattacact ctccgtctcc ccgttgattg taatccttcc tatgtgttcc actccaccga 2820
caacgccgag accgggggta ttgaggcggg taacactgac accgatttct ctggtgaact 2880
ggcggctcct ggctctaacc aactaatgt caagttcctg tttgatcgat ctcgattatt 2940
gaatgtaatc aaggfactgg agaaggacgc cgttttcccc cgccctttcc ctacacaaga 3000
aggtgcgcag caggatgatg gttacttttg tcttctgacc ccccgcccaa cagtcgcttc 3060
ccgacccgcc actcgtttcg gcctgtacgc caatccgtcc ggccagtggg ttcttgctaa 3120
cacttcactg gacttcaatt tttatagctt ggctgtttc attacttta gatcgacct 3180
tgaggttacg gtggtctcac tagagccgga tctggaattt gctgtagggg ggtttccttc 3240
tggcagtga taccaggctt ccagctttgt ctacgaccag ctgcatgtgc cttccactt 3300
tactgggcgc actccccgcg ctttcgctag caagggtggg aaggatatct tcgtgctccc 3360
ttggaactct gtctcgtctg tgcctcccgt gcgctggggg ggggcttcca agctctcttc 3420
tgctacgcgg ggtctaccgg cgcatgtga ttgggggact atttacgcct ttgtcccccg 3480
tcctaagag aagaaaagca ccgctgtaaa acacgtggcc gtgtacattc ggtacaagaa 3540
cgcacgtgcc tggtgcccca gcatgttcc ctttcgcagc tacaagcaga agatgctgat 3600
gcaatctggc gatatcgaga ccaatcccgg gcctgttct gacaaccaa ttttgagtt 3660
tcttgaagca gaaaatgatc tagtactct ggctctctc tggaagatgg tgcactctgt 3720
tcaacagacc tggagaaaag atgtgaagaa cgatgatttt tggcccaatt tactcagcga 3780
gctagtgggg gaaggctctg tcgccttggc cgccacgcta tccaaccaag cttcagtaaa 3840
ggctcttttg ggctgcact ttctctctcg ggggtcaat tacactgact tttactcttt 3900
actgatagag aaatgctcta gtttctttac cgtagaacca cctcctccac cagctgaaaa 3960
cctgatgacc aagccctcag tgaagtcgaa attccgaaaa ctgtttaaga tgcaaggacc 4020
catggacaaa gtcaaagact ggaaccaa at agctgccggc ttgaagaatt ttcaatttgt 4080
tcgtgacctg gtcaaagagg tggctgattg gctgcaggcc tggatcaaca aagagaaagc 4140
cagccctgtc ctccagtacc agttggagat gaagaagctc gggcctgtgg ctttggtca 4200
tgacgctttc atggctgggt ccgggcccc tcttagcgac gaccagattg aatacctcca 4260
gaacctcaaa tctcttgccc taacactggg gaagactaat ttggcccaa gtctcaccac 4320
tatgatcaat gccaaacaaa gttcagccca acgagttgaa cccgttgttg tggctcttag 4380
aggcaagccg ggatgcggca agagcttggc ctctacgttg attgccagg ctgtgtccaa 4440
gcgcctctat ggctcccaaa gtgtatattc tcttcccca gatccagatt tcttcgatgg 4500
atacaaagga cagttcgtga ccttgatgga tgatttgga caaaaccgg atggacaaga 4560
tttctccacc ttttgtcaga tgggtgctgac cgcccaattt ctcccaaca tggcgacct 4620
tgcagagaaa gggcgtccct ttacctcaa tctcatcatt gcaactaaa atctcccca 4680
cttcagtcct gtcaccattg ctgatcttc tgcagtctct cgccgtatca actacgatct 4740
gactctagaa gtatctgagg cctacaagaa acacacacgg ctgaattttg acttggttt 4800
caggcgcaca gacgcccccc ccatttatcc ttttgctgcc catgtgccct ttgtggacgt 4860
agctgtgcgc ttcaaaaatg gtcaccagaa ttttaatctc ctagagttgg tcgattccat 4920
ttgtacagac attcgagcca agcaacaagg tgcccgaaac atgcagactc tggttctaca 4980
gagcccaaac gagaatgatg acacccccgt cgacgaggcg ttgggtagag ttctctcccc 5040
cgctgcggtc gatgaggcgc ttgtcgacct cactccagag gccgaccgg ttggccgttt 5100

```

```

ggctattctt gccaaagctag gtcttgcctt agctgcggtc acccctggtc tgataatctt 5160
ggcagtggga ctctacaggt acttctctgg ctctgatgca gaccaagaag aaacagaaag 5220
tgagggatct gtcaaggcac ccaggagcga aaatgcttat gacggcccga agaaaaactc 5280
taagccccct ggagcactct ctctcatgga aatgcaacag cccaacgtgg acatgggctt 5340
tgaggctgcg gtcgctaaga aagtggtcgt cccattacc ttcatggttc ccaacagacc 5400
ttctgggctt acacagtccg ctctcctggg gaccggccgg accttcctaa tcaatgaaca 5460
tacetgggtc aatccccctt ggaccagctt cacaatccgc ggtgaggtac acactcgtga 5520
tgagcccttc caaacgggtt atttcaactc ccacgggtatt cccacagatc tgatgatggt 5580
acgtctcggg cggggcaatt ctttccttaa caatctagac aagtttggac ttgaccagat 5640
gccggcacgc aactcccggt tggttggcgt ttctgtccagt tacggaaact tcttcttctc 5700
tggaattttc ctcggtttg ttgattccat cacctctgaa caaggaactt acgcaagact 5760
cttttaggtac aggttgacga cctacaaagg atggtgcggc tcggccctgg tctgtgaggc 5820
cgggtggcgt cgacgcacga ttggcctgca ttctgtctgg gccgccggtg tcggcgccgg 5880
gacctatata tcaaaattag gactaatcaa agccctgaaa cacctcgggt aacctttggc 5940
cacaatgcaa ggactgatga ctgaattaga gcctggaatc accgtacatg taccgccgaa 6000
atccaaattg agaaagacga ccgcacacgc ggtgtacaaa ccggagtgtg agcctgctgt 6060
gttgtcaaaa tttgatccca gactgaacaa ggatgttgac ttggatgaag taatttggtc 6120
taaacacact gccaatgtcc cttaccaacc tcctttgttc tacacataca tgtcagagta 6180
cgctcatcga gtcttctcct tcttggggaa agacaatgac attctgaccg tcaagaagc 6240
aattctgggc atccccggac tagaccccat ggatccccac acagctccgg gtctgcctta 6300
cgccatcaac ggcttctgac gtactgatct cgtcgatttt gtgaacggtg cagtagatgc 6360
ggcgctggct gtacaaatcc agaaattctt agacgggtgac tactctgacc atgtcttcca 6420
aacttttctg aaagatgaga tcagaccctc agagaaagtc cgagcgggaa aaaccgcgat 6480
tgttgatgtg cctccctgg cgcatgcat tgtgggcaga atgttgcttg ggcgctttgc 6540
tgccaagtgt caatcccatc ctggctttct cctcggtctt gctatcgggt ctgaccctga 6600
tgttttctgg accgtcatag gggctcaact cgaggggaga aagaacacgt atgacgtgga 6660
ctacagtgcc tttgactctt cacacggcac tggctccttc gaggtctctc tctctcactt 6720
tttcaccgtg gacaatggtt ttagccctgc gctgggaccg tatctcagat ccctggctgt 6780
ctcggtgcac gcttacggcg agcgtcgcat caagattacc ggtggcctcc cctccggttg 6840
tgccgcgacc agcctgctga acacagtgtt caacaatgtg atcatcagga ctgctctggc 6900
attgacttac aaggaatttg aatatgacat ggttgatata atcgctacg gtgacgacct 6960
tctggttggc acggttacg atctggactt caatgaggtg gcacgacgc ctgccaagtt 7020
gggtataaag atgactcctg ccaacaaggg ttctgtcttc cctccgactt cctctctttc 7080
cgatgctgtt tttctaaagc gcaaattcgt ccaaacaac gacggcttat acaaccagt 7140
tatggattta aagaatttgg aagccatgct ctctacttc aaaccaggaa cactactcga 7200
gaagctgcaa tctgtttcta tgttggtcga acattctgga aaagaagaat atgatagatt 7260
gatgcacccc ttcgtgact acggtgccgt accgagtcac gactacctgc aggcaagatg 7320
gagggccttg ttcgactgac ccagatagcc caaggcgctt cgggtgctgc ggcgattctg 7380
ggagaactca gtcggaacag aaaagggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga 7440

```

agagc 7445

<210> 19

<211> 8296

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-mCherry IVT模板

<400> 19

```

ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
gcttgggtacc ttatcaaaact gatgagtccg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
aatggggggc tgggccctga tgcccagtc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacggtgcgg 240
ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
ttgggtgtgt ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
tggctcaagc gcgaaaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctgcaccctc cttagtaagg gaaccgagag 540
gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
gttctcccct ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggtcgcgatc cagagggtgg 660
ggcatgaccc ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcggtt ctataggtag cacatacaaa 780
tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
aacaaaagtc aagatcgttg aataccccag atcgggtgaac aatggtgttt acgattcgtc 900
tactcatttg gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccggt ggcaataatg gtaacatgac 1080
cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa tttagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctcctca caaatctcag 1200
tggaatcttg aacctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caaactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
gggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagacct gaccaaactc gatcctccgt ccagcagcac 1380
agatcaaccc accaccactt tcaactgcat cgacaggtgg tacactggac gtctcaattc 1440
ttggacaaaa gctgtaaaaa cttctctttt tcaggccgtc ccgttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttcttgtt gccatggttc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccgacg gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagtg ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ccttttcagt ctcttggcac atactatcgg ccccctaact ggacttgggg 1800
tccaatttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860

```

aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
 agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
 aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
 tgggcttcgc aaccgctaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcca ttcctacggc 2100
 acccagagaa aattcgctta tgtttctctc aaccctccct gacgacactg tccctgctta 2160
 cgggaatgtg cgtacccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
 actggcccg ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccg tgcctgcctc 2280
 agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
 cttcccgatc accctttcag atcccgtcta tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
 aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
 ggcgagagg aaattcctgc tctcgtatc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
 ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
 cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtg ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
 ggtttactcc gctgatggtt ggtttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
 tgactgtccg caaagtcctt gcattctctt tttcgttctt gctggtgagg attacactct 2760
 ccgtctcccc gttgattgta atccttcta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
 cgggggtatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
 ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
 ggtactggag aaggacgccg ttttccccg ccctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
 ggatgatggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
 tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgtt cttgctaaca cttactgga 3120
 cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggacctg aggttacggt 3180
 ggtctcacta gagccgcatc tggaaattgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240
 ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgccc ttccacttta ctgggcgcac 3300
 tccccgcgct ttcgctagca aggtgaggaa ggtatcttct gtgctccctt ggaactctgt 3360
 ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
 tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgtc ctaatgagaa 3480
 gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggcctg gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
 gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
 tatcgagacc aatcccgggc cgagcaaggc cgaggaggat aacatggcca tcatcaagga 3660
 gttcatgcgc ttcaaggtgc acatggaggc ctccgtgaac ggccacgagt tcgagatcga 3720
 gggcgagggc gagggccgcc cctacgaggc caccagacc gccaagctga aggtgaccaa 3780
 ggggtggccc ctgcccttcg cctgggacat cctgtccct cagttcatgt acggctccaa 3840
 ggcttacgtg aagcaccgcc cggacatccc cgactacttg aagctgtcct tccccaggg 3900
 cttcaagtgg gagcgcgtga tgaacttcca ggacggcggc gtggtgaccg tgaccagga 3960
 ctctccctg caggacggcg agttcatcta caaggtgaag ctgcgcggca ccaacttccc 4020
 ctccgacggc cccgtaatgc agaagaagac catgggctgg gaggcctcct ccgagcggat 4080
 gtaccccgag gacggcgccc tgaaggcgga gatcaagcag aggctgaagc tgaaggacgg 4140
 cggccactac gacgctgagg tcaagaccac ctacaaggcc aagaagcccg tgcagctgcc 4200

cggcgcctac aacgtcaaca tcaagttgga catcacctcc cacaacgagg actacaccat 4260
 cgtggaacag tacgaacgcg ccgagggccg ccactccacc ggcggcatgg acgagctgta 4320
 caaggagggc agaggaagtc tgctaacatg cggtgacgtc gaggagaatc ccgggcctgc 4380
 ttctgacaac ccaatttttg agtttcttga agcagaaaat gatctagtca ctctggcctc 4440
 tctctggaag atggtgcact ctgttcaaca gacctggaga aagtatgtga agaacgatga 4500
 tttttggccc aatttactca gcgagctagt gggggaaggc tctgtcgcct tggccgccac 4560
 gctatccaac caagcttcag taaaggctct tttgggcctg cactttctct ctcgggggct 4620
 caattacact gacttttact ctttactgat agagaaatgc tctagtttct ttaccgtaga 4680
 accacctcct ccaccagctg aaaacctgat gaccaagccc tcagtgaagt cgaaattccg 4740
 aaaactgttt aagatgcaag gacctatgga caaagtcaaa gactggaacc aaatagctgc 4800
 cggcttgaag aattttcaat ttgttcgtga ctagtcaaa gaggtggctg attggctgca 4860
 ggcctggatc aacaaagaga aagccagccc tgtctccag taccagttgg agatgaagaa 4920
 gctcgggcct gtggccttgg ctcatgacgc tttcatggct ggttccgggc cccctcttag 4980
 cgacgaccag attgaatacc tccagaacct caaatctctt gccctaacac tggggaagac 5040
 taatttggcc caaagtctca ccactatgat caatgccaaa caaagttcag cccaacgagt 5100
 tgaacccgtt gtggtggtcc ttagaggcaa gccgggatgc ggcaagagct tggcctctac 5160
 gttgattgcc caggctgtgt ccaagcgcct ctatggctcc caaagtgtat attctcttcc 5220
 cccagatcca gatttcttcg atggatacaa aggacagttc gtgaccttga tggatgattt 5280
 gggacaaaac ccgatggac aagatttctc cacttttgt cagatggtgt cgaccgcca 5340
 atttctcccc aacatggcgg acctgcaga gaaaggcgt ccctttacct ccaatctcat 5400
 cattgcaact acaaatctcc ccacttcag tctgtcacc attgctgatc cttctgcagt 5460
 ctctcgccgt atcaactacg atctgactct agaagtatct gaggcctaca agaaacacac 5520
 acggctgaat ttgacttgg ctttcaggcg cacagacgcc ccccccattt atccttttgc 5580
 tgcccatgtg ccctttgtgg acgtagctgt gcgcttcaaa aatggtcacc agaattttaa 5640
 tctcctagag ttggtcgatt ccatttgtac agacattcga gccaagcaac aaggtgccc 5700
 aaacatgcag actctggttc tacagagccc caacgagaat gatgacacc ccgtcgacga 5760
 ggcgttgggt agagtctct cccccgtgc ggtcgatgag gcgcttgctg acctactcc 5820
 agaggccgac ccggttggcc gtttggctat tcttgccaag ctaggtcttg ccctagctgc 5880
 ggtcacccct ggtctgataa tcttggcagt gggactctac aggtacttct ctggctctga 5940
 tgcagaccaa gaagaaacag aaagtgaggg atctgtcaag gcaccagga gcgaaaatgc 6000
 ttatgacggc ccgaagaaaa actctaagcc ccctggagca ctctctctca tggaaatgca 6060
 acagcccaac gtggacatgg gctttgaggg tgcggtcgct aagaaagtgg tcgtcccat 6120
 taccttcatg gttcccaaca gacttcttgg gcttacacag tccgctcttc tggtgaccgg 6180
 ccggaccttc ctaatcaatg aacatacatg gtccaatccc tcttgacca gcttcacaat 6240
 ccgcggtgag gtacacactc gtgatgagcc cttccaaacg gttcatttca ctcaccacgg 6300
 tattcccaca gatctgatga tggtagctct cggaccgggc aattctttcc ctaacaatct 6360
 agacaagttt ggacttgacc agatgccggc acgcaactcc cgtgtggttg gcgtttcgtc 6420
 cagttacgga aacttcttct tctctgaaa tttctcggga tttgttgatt ccatcacctc 6480
 tgaacaagga acttacgcaa gactctttag gtacagggtg acgacctaca aaggatggtg 6540

cggctcggcc ctggctctgtg aggccggtgg cgtccgacgc atcattggcc tgcattctgc 6600
 tggcgccgcc ggtatcggcg ccgggacctat tatctcaaaa ttaggactaa tcaaagccct 6660
 gaaacacctc ggtgaacctt tggccacaat gcaaggactg atgactgaat tagagcctgg 6720
 aatcacccgta catgtacccc ggaaatccaa attgagaaag acgaccgcac acgcggtgta 6780
 caaaccggag tttgagcctg ctgtgtttgc aaaatttgat cccagactga acaaggatgt 6840
 tgacttggat gaagtaattt ggtctaaaca cactgccaat gtcccttacc aacctccttt 6900
 gttctacaca tacatgtcag agtacgtca tcgagtcttc tccttcttgg ggaaagacaa 6960
 tgacattctg accgtcaaaag aagcaattct gggcatcccc ggactagacc ccatggatcc 7020
 ccacacagct ccgggtctgc cttacgccat caacggcctt cgacgtactg atctcgtcga 7080
 ttttgtgaac ggtacagtag atgcggcgct ggctgtacaa atccagaaat tcttagacgg 7140
 tgactactct gaccatgtct tccaaacttt tctgaaagat gagatcagac cctcagagaa 7200
 agtccgagcg ggaaaaaccc gcattgttga tgtgccctcc ctggcgcatc gcattgtggg 7260
 cagaatgttg cttgggcgct ttgttgccaa gtttcaatcc catcctggct ttctcctcgg 7320
 ctctgctatc ggggtctgacc ctgatgtttt ctggaccgtc ataggggctc aactcgaggg 7380
 gagaaagaac acgtatgacg tggactacag tgcctttgac tcttcacacg gcaactggctc 7440
 cttcgaggct ctcatctctc actttttcac cgtggacaat ggtttttagcc ctgcgctggg 7500
 accgtatctc agatccctgg ctgtctcggt gcacgcttac ggcgagcgtc gcatcaagat 7560
 taccggtggc ctccccctcg gttgtgccgc gaccagcctg ctgaacacag tgctcaacaa 7620
 tgtgatcatc aggactgctc tggcattgac ttacaaggaa tttgaatatg acatggttga 7680
 tatcatcgcc tacggtgacg accttctggt tggcacggat tacgatctgg acttcaatga 7740
 ggtggcacga cgcgctgcca agttggggta taagatgact cctgccaaca agggttctgt 7800
 cttccctccg acttcctctc tttccgatgc tgtttttcta aagcgcaaat tcgtccaaaa 7860
 caacgacggc ttatacaaac cagttatgga tttaaagaat ttggaagcca tgctctccta 7920
 cttcaaacca ggaacactac tcgagaagct gcaatctggt tctatgttgg ctcaacattc 7980
 tggaaaagaa gaatatgata gattgatgca ccccttcgct gactacggtg ccgtaccgag 8040
 tcacgagtac ctgcaggcaa gatggagggc cttgttcgac tgaccagat agcccaaggc 8100
 gcttcggtgc tgccggcgat tctgggagaa ctcagtcgga acagaaaagg gaaaaaaaaa 8160
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aggccggcat ggtcccagcc tcctcgctgg cgccggtgg 8220
 gcaacatgct tcggcatggc gaatgggacg cggccgctcg agtctagagg gcccgtttaa 8280
 acccgctgat cagcct 8296
 <210> 20
 <211> 8107
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> SVV-nLuc IVT模板
 <400> 20
 ttatcgaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaaacttaa 60
 gcttgggtacc ttatcaaact gatgagtccg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120

```

aatggggggc tgggccctga tgcccagttc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
tgtgttttgc agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacggtgcgg 240
ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
ttggtgtggt ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
tggtctcaagc gcggaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctcgaccctc cttagtaagg gaaccgagag 540
gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
gttctccct ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
ggcatgaccc ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcggtt ctataggtag cacatacaa 780
tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
aacaaaagtc aagatcgttg aataccccag atcggatgaac aatggtgttt acgattcgtc 900
tactcatTTG gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccggt ggcaataatg gtaacatgac 1080
cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa tttagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctcctca caaatttcag 1200
tggaatcttg aacctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
gggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagacc gaccaaact gatcctcctg ccagcagcac 1380
agatcaaccc accaccactt tcttgccat cgacaggtgg tacttgagc gtctcaattc 1440
ttggacaaaa gctgtaaaaa cttctctttt tcaggccgtc ccgcttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggg cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttcttggt gccatggttc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccgcg gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagt ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ctttttcagt ctcttggcac atactatcgg cccctaact ggacttgggg 1800
tccaattttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
agagacacag aactcctgga cctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
tggtcttcgc aaccgtaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcccc ttctacggc 2100
accagagaaa aattcgctta tgtttctctc aacctccct gacgacactg tccctgctta 2160
cgggaatgtg cgtaccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
actggccgc ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccg tgctgcctc 2280
agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
cttcccgatc accttttcag atcccgtcta tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460

```

```

ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtattc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
ttccgaagct atgcagtgcata cactactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
ggttttactcc gctgatgggt ggtttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
tgactgtccg caaagtccct gcattctctt tttcgcttct gctggtgagg attacactct 2760
ccgtctcccc gttgattgta atccttcccta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
cggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
ggtactggag aaggacgccg ttttccccg ccctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
ggatgatgggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgtt cttgctaaca cttcactgga 3120
cttcaatfff tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggaccttg aggttacggt 3180
ggtctcacta gagccggatc tggaaattgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240
ccaggttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgcc ttccacttta ctgggcgcac 3300
tccccgcgtc ttcgctagca aggttgggaa ggtatctttc gtgctccctt ggaactctgt 3360
ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgtc ctaatgagaa 3480
gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
tatcgagacc aatcccgggc cgatggtctt cactctgaa gatttcgttg gggactggcg 3660
acagacagcc ggctacaacc tggaccaagt ccttgaacag ggaggtgtgt ccagtttgtt 3720
tcagaatctc ggggtgtccg taactccgat ccaaaggatt gtcctgagcg gtgaaaatgg 3780
gctgaagatc gacatccatg tcatcatccc gtatgaaggt ctgagcggcg accaaatggg 3840
ccagatcgaa aaaatffffa aggtggtgta ccctgtggat gatcatcact ttaaggtgat 3900
cctgcactat ggcacactgg taatcgacgg ggttacgccg aacatgatcg actatttcgg 3960
acggccgtat gaaggcatcg ccgtgttcga cggcaaaaag atcactgtaa cagggacct 4020
gtggaacggc aaaaaatta tcgacgagcg cctgatcaac cccgacggct ccctgctgtt 4080
ccgagtaacc atcaacggag tgaccggctg gcggctgtgc gaacgcattc tggcggaggg 4140
cagaggaagt ctgctaacat gcggtgacgt cgaggagaat cccgggcctg cttctgacaa 4200
cccaatffff gagtttcttg aagcagaaaa tgatctagtc actctggcct ctctctggaa 4260
gatggtgcac tctgttcaac agacctggag aaagtatgtg aagaacgatg atttttggcc 4320
caatttactc agcgagctag tgggggaagg ctctgtcgcc ttggccgcca cgctatccaa 4380
ccaagcttca gtaaaggctc ttttgggcct gcactttctc tctcgggggc tcaattacac 4440
tgacttttac tctttactga tagagaaatg ctctagtttc tttaccgtag aaccacctcc 4500
tccaccagct gaaaacctga tgaccaagcc ctcatgaa tcgaaattcc gaaaactgtt 4560
taagatgcaa ggacccatgg acaaagtcaa agactggaac caaatagctg ccggttgaa 4620
gaatfffcaa tttgttcgtg acctagtcaa agaggtggtc gattggctgc aggcctggat 4680
caacaaagag aaagccagcc ctgtcctcca gtaccagttg gagatgaaga agctcgggcc 4740
tgtggccttg gctcatgacg ctttcatggc tggttccggg cccctcttta gcgacacca 4800

```

gattgaatac ctccagaacc tcaaattctct tgccctaaca ctggggaaga ctaatttggc 4860
 ccaaagtctc accactatga tcaatgccaa acaaagttca gcccaacgag ttgaaccctg 4920
 tgtggtggc cttagaggca agccgggatg cggcaagagc ttggcctcta cgttgattgc 4980
 ccaggctgtg tccaagcgcc tctatggctc ccaaagtgtg tattctcttc cccagatcc 5040
 agattttctc gatggataca aaggacagtt cgtgaccttg atggatgatt tgggacaaaa 5100
 cccggatgga caagatttct ccaccttttg tcagatgggtg tcgaccgccc aattttctcc 5160
 caacatggcg gaccttgacg agaaagggcg tccctttacc tccaatctca tcattgcaac 5220
 tacaaatctc cccacttca gtccgtgcac cattgtgat cttctgcag tctctcgccg 5280
 tatcaactac gatctgactc tagaagtatc tgaggcctac aagaaacaca cacggctgaa 5340
 ttttgacttg gctttcaggc gcacagacgc cccccctt tctcttttg ctgcccattg 5400
 gccctttgtg gacgtagctg tgcgcttcaa aaatggctac cagaatttta atctcctaga 5460
 gttggctgat tccatttcta cagacattcg agccaagcaa caagtgccc gaaacatgca 5520
 gactctggtt ctacagagcc ccaacgagaa tgatgacacc cccgtcgacg aggcgttggg 5580
 tagagttctc tccccgctg cggctgatga ggcgcttgct gacctactc cagaggccga 5640
 cccggttggc cgtttggcta ttcttgccaa gctaggtctt gccctagctg cggtcacccc 5700
 tggcttgata atcttggcag tgggactcta caggtacttc tctggctctg atgcagacca 5760
 agaagaaaca gaaagtgagg gatctgtcaa ggcacccagg agcgaaaatg cttatgacgg 5820
 cccgaagaaa aactctaagc cccctggagc actctctctc atggaaatgc aacagcccaa 5880
 cgtggacatg ggctttgagg ctgcggtcgc taagaaagtg gtcgtcccca ttaccttcat 5940
 ggttcccaac agaccttctg ggcttacaca gtccgctctt ctggtgaccg gccggacctt 6000
 cctaatacat gaacatacat ggtccaatcc ctcttgacc agcttcacaa tccgcggtga 6060
 ggtacacact cgtgatgagc ccttccaaac ggttcatttc actcaccacg gtattccac 6120
 agatctgatg atggtacgtc tcggaccggg caattcttct cctaacaatc tagacaagtt 6180
 tggacttgac cagatgccgg cacgcaactc ccgtgtggtt ggcgtttcgt ccagttacgg 6240
 aaacttcttc ttctctggaa atttctcgg atttgttgat tccatcacct ctgaacaagg 6300
 aacttacgca agactcttta ggtacagggt gacgacctac aaaggatggt gcggctcggc 6360
 cctggtctgt gaggccggtg gcgtccgacg catcattggc ctgcattctg ctggcgccgc 6420
 cggtatcggc gccgggacct atatctcaaa attaggacta atcaaagccc tgaaacacct 6480
 cggatgaacct ttggccacaa tgcaaggact gatgactgaa ttagagcctg gaatcacctg 6540
 acatgtaccc cggaaatcca aattgagaaa gacgaccgca cacgcggtgt acaaaccgga 6600
 gtttgagcct gctgtgttgt caaaatttga tcccagactg aacaaggatg ttgacttgga 6660
 tgaagtaatt tggctctaac aactgccaa tgcctcttac caacctctt tgttctacac 6720
 atacatgtca gactacgtc atcgagtctt ctcttcttg gggaaagaca atgacattct 6780
 gaccgtcaaa gaagcaattc tgggcatccc cggactagac cccatggatc cccacacagc 6840
 tccgggtctg ccttacgcca tcaacggcct tcgacgtact gatctcgctg attttgtgaa 6900
 cggtagacgt gatgcggcgc tggtgtgaca aatccagaaa ttcttagacg gtgactactc 6960
 tgaccatgtc ttccaaactt ttctgaaaga tgagatcaga ccctcagaga aagtccgagc 7020
 gggaaaaacc cgcatgttg atgtgcctc cctggcgcat tgcattgtgg gcagaatgtt 7080
 gcttgggcgc tttgctgcca agtttcaatc ccatcctggc tttctctcgt gctctgctat 7140

cgggtctgac cctgatgttt tctggaccgt cataggggct caactcgagg ggagaaagaa 7200
 cacgtatgac gtggactaca gtgcctttga ctcttcacac ggcaactggct ccttcgaggc 7260
 tctcatctct cactttttca ccgtggacaa tggttttagc cctgcgctgg gaccgtatct 7320
 cagatccctg gctgtctcgg tgcacgctta cggcgagcgt cgcacatcaaga ttaccgggtg 7380
 cctccccctc gggtgtgccg cgaccagcct gctgaacaca gtgctcaaca atgtgatcat 7440
 caggactgct ctggcattga cttacaagga atttgaatat gacatggttg atatcatcgc 7500
 ctacgggtgac gaccttctgg ttggcacgga ttacgatctg gacttcaatg aggtggcacg 7560
 acgcgctgcc aagttgggggt ataagatgac tcctgccaac aagggttctg tcttccctcc 7620
 gacttcctct ctttccgatg ctgtttttct aaagcgcaaa ttcgtccaaa acaacgacgg 7680
 cttatacaaaa ccagttatgg atttaaagaa tttggaagcc atgctctcct acttcaaacc 7740
 aggaacacta ctcgagaagc tgcaatctgt ttctatgttg gctcaacatt ctggaaaaga 7800
 agaatatgat agattgatgc accccttcgc tgactacggt gccgtaccga gtcacgagta 7860
 cctgcaggca agatggaggg ccttgttcga ctgaccaga tagcccaagg cgcttcggtg 7920
 ctgccggcga ttctgggaga actcagtcgg aacagaaaag ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7980
 aaaaaaaaaa aaggccggca tgggtcccgc ctctctcgtg gcgccggctg ggcaacatgc 8040
 ttcggcatgg cgaatgggac gcggccgctc gagtctagag ggcccgttta aaccgcgtga 8100
 tcagcct 8107

<210> 21

<211> 8017

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-GMCSF IVT模板

<400> 21

ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
 gcttgggtacc ttatcaaact gatgagtcg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
 aatggggggc tggggccctga tgcccagtc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
 tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacgggtcgg 240
 ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
 ttgggtgtgt ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
 aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgagata accgtaagac 420
 tggctcaagc gcggaaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
 ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctgcacctc cttagtaagg gaaccgagag 540
 gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
 gttctcccc ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
 ggcatgacct ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
 ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcgggt ctataggtag cacatacaaa 780
 tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
 aacaaaagtc aagatcgttg aataccccag atcggatgaac aatggtgttt acgattcgtc 900

tactcatttg gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
 ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
 taatgttcag acaacgtcaa agaattgattt tgattcccggt ggcaataatg gtaacatgac 1080
 cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa tttagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
 gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctcctca caaatttcag 1200
 tggaatcttg aaccctcttg gctacctcaa agatcacaa accgaagaaa tggaaaactc 1260
 tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
 ggggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagacct gaccaaactt gatcctccgt ccagcagcac 1380
 agatcaaccc accaccactt tcaactgcat cgacaggtgg tacactggac gtctcaattc 1440
 ttggacaaaa gctgtaaaaa ctttctcttt tcaggccgtc ccgcttcccg gtgcctttct 1500
 gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
 gatgaagtgc ggggtggcagg tgcagggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
 tcttcttgtt gccatgggtc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccgacg gtaaggcaaa 1680
 gagcttacag gagctgaatg aagaacagtg ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
 gaaaaacatg ctttttcagt ctcttggcac atactatcgg ccccttaact ggacttgggg 1800
 tccaatttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
 aacctctacc tcgtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
 agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
 aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
 tgggcttcgc aaccgctaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcccc ttcctacggc 2100
 acccagagaa aattcgctta tgtttctctc aaccctccct gacgacactg tccctgctta 2160
 cgggaatgtg cgtaccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
 actggccgc ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccg tgctgcctc 2280
 agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
 cttcccgatc acctttcag atcccgctc tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
 aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
 ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtattc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
 ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
 cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
 ggtttactcc gctgatggtt ggttttagct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
 tgactgtccg caaagtccct gcattctctt ttctgcttct gctgggtgagg attacactct 2760
 ccgtctcccc gttgattgta atccttcta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
 cggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
 ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
 ggtactggag aaggacgccg ttttccccg ccttttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
 ggatgatggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
 tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgt cttgctaaca cttactgga 3120
 cttcaatttt tatagcttg cctgtttcac ttactttaga tcggacctg aggttacggt 3180
 ggtctcacta gagccgcatc tggaatttgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240

ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgccc ttccacttta ctgggcgcac 3300
 tccccgcgct ttcgctagca aggggtgggaa ggtatctttc gtgctccctt ggaactctgt 3360
 ctctgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
 tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtcccccgtc ctaatgagaa 3480
 gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
 gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
 tatcgagacc aatccccgggc cgatgtggct ccaaaacctg ctcttcctcg gaattgtcgt 3660
 gtactccctg tccgctccta ctagaagccc aatcacagta acaagacctt ggaaacacgt 3720
 ggaagctata aaagaagccc tgaacctgct tgacgatatg cccgtaacct tgaatgaaga 3780
 agttgaagtt gtaagcaacg aattttcctt caagaaactc acatgtgtgc aaacccggct 3840
 gaaaatatatt gaacaaggac tgagaggaaa ttttactaaa cttaaaggcg cacttaatat 3900
 gactgcttct tattaccaga cttattgccc ccctacacca gaaaccgatt gcgaaaccca 3960
 agtgactacc tatgccgact ttatcgattc cttgaaaacg ttccttactg atataccctt 4020
 tgaatgcaaa aaacctggac agaaagaggg cagaggaagt ctgctaacat gcggtgacgt 4080
 cgaggagaat cccgggcctg cttctgacaa cccaattttg gagtttcttg aagcagaaaa 4140
 tgatctagtc actctggcct ctctctggaa gatggtgcac tctgttcaac agacctggag 4200
 aaagtatgtg aagaacgatg atttttggcc caatttactc agcgagctag tgggggaagg 4260
 ctctgtcgcc ttggccgcca cgctatccaa ccaagcttca gtaaaggctc ttttgggcct 4320
 gcactttctc tctcgggggc tcaattacac tgacttttac tctttactga tagagaaatg 4380
 ctctagtttc tttaccgtag aaccacctcc tccaccagct gaaaacctga tgaccaagcc 4440
 ctcagtgaag tcgaaattcc gaaaactgtt taagatgcaa ggacctatgg acaaagtcaa 4500
 agactggaac caaatagctg ccggcttgaa gaattttcaa tttgttcgtg acctagtcaa 4560
 agagggtggc gattggctgc aggctggat caacaaagag aaagccagcc ctgtcctcca 4620
 gtaccagttg gagatgaaga agctcgggcc tgtggccttg gctcatgacg ctttcatggc 4680
 tggttccggg cccctctta gcgacgacca gattgaatac ctccagaacc tcaaatctct 4740
 tgccctaaca ctggggaaga ctaatttggc ccaaagtctc accactatga tcaatgcca 4800
 acaaagttca gccaacgag ttgaacctgt tgtggtggc cttagaggca agccgggatg 4860
 cggcaagagc ttggcctcta cgttgattgc ccaggtgtg tccaagcgcc tctatggctc 4920
 ccaaagtgtg tattctcttc cccagatcc agatttcttc gatggataca aaggacagtt 4980
 cgtgaccttg atggatgatt tgggacaaaa cccgatgga caagatttct ccaccttttg 5040
 tcagatgggtg tcgaccgccc aatttctccc caacatggcg gaccttgacg agaaagggcg 5100
 tccctttacc tccaatctca tcattgcaac tacaaatctc cccacttca gtctgtcac 5160
 cattgctgat cttctgcag tctctcgccg tatcaactac gatctgactc tagaagtatc 5220
 tgaggcctac aagaaacaca cacggtgaa ttttgacttg gctttcaggc gcacagacgc 5280
 cccccccatt tatccttttg ctgcccattg gccctttgtg gacgtagctg tgcgttcaa 5340
 aaatgggtcac cagaatttta atctcctaga gttggtcgat tccatttgta cagacattcg 5400
 agccaagcaa caagtgccc gaaacatgca gactctggtt ctacagagcc ccaacgagaa 5460
 tgatgacacc cccgtcgacg aggcgttggg tagagttctc tcccccgctg cggtcgatga 5520
 ggcgcttgtc gacctcactc cagaggccga cccggttggc cgtttggtta ttcttgccaa 5580

gctaggtcctt gccctagctg cggtcacccc tggctctgata atcttggcag tgggactcta 5640
caggtacttc tctggctctg atgcagacca agaagaaaca gaaagtgagg gatctgtcaa 5700
ggcaccacagg agcgaaaatg cttatgacgg cccgaagaaa aactctaagc cccctggagc 5760
actctctctc atggaaatgc aacagcccaa cgtggacatg ggctttgagg ctgcggtcgc 5820
taagaaagtg gtcgtcccca ttaccttcat ggttcccaac agaccttctg ggcttacaca 5880
gtccgctcctt ctggtgaccg gccggacctt cctaatacat gaacatacat ggtccaatcc 5940
ctcctggacc agcttcacaa tccgcggtga ggtacacact cgtgatgagc ctttccaaac 6000
ggttcatctt actcaccacg gtattccac agatctgatg atggtacgtc tcggaccggg 6060
caattctttc cctaacaatc tagacaagtt tggacttgac cagatgccgg cagcaactc 6120
ccgtgtggtt ggcgtttcgt ccagttacgg aaacttcttc ttctctggaa atttcctcgg 6180
atgtgttgat tccatcacct ctgaacaagg aacttacgca agactcttta ggtacagggt 6240
gacgacctac aaaggatggt gcggtcggc cctggctctgt gaggccggtg gcgtccgacg 6300
catcattggc ctgcattctg ctggcggcgc cggtatcggc gccgggacct atatctcaa 6360
attaggacta atcaaagccc tgaaacacct cggatgaacct ttggccacaa tgcaaggact 6420
gatgactgaa ttagagcctg gaatcacctg acatgtaccc cggaaatcca aattgagaaa 6480
gacgaccgca cagcgggtgt acaaaccgga gtttgagcct gctgtgttgt caaaatttga 6540
tcccagactg aacaaggatg ttgacttgga tgaagtaatt tggctctaac aactgcca 6600
tgtcccttac caacctcctt tgttctacac atacatgtca gactacgtc atcgagtctt 6660
ctccttcttg gggaaagaca atgacattct gaccgtcaa gaagcaattc tgggcatccc 6720
cggactagac cccatggatc cccacacagc tccgggtctg ccttacgcca tcaacggcct 6780
tcgacgtact gatctcgtc attttgtgaa cggtagagta gatgcggcgc tggctgtaca 6840
aatccagaaa ttcttagacg gtgactactc tgacctgtc ttccaaactt ttctgaaaga 6900
tgagatcaga cctcagaga aagtcgagc gggaaaaacc cgcattgttg atgtgccctc 6960
cctggcgcct tgcatgttg gcagaatgtt gcttgggcgc tttgctgcca agtttcaatc 7020
ccatcctggc tttctcctc gctctgctat cgggtctgac cctgatgtt tctggaccgt 7080
cataggggct caactcgagg ggagaaagaa cacgtatgac gtggactaca gtgcctttga 7140
ctcttcacac ggcactggct ccttcgaggc tctcatctc cactttttca ccgtggacaa 7200
tggtttttagc cctgcgctgg gaccgtatct cagatccctg gctgtctcgg tgcacgtta 7260
cggcgagcgt cgcatacaaa ttaccggtg cctccctcc ggttgtgccg cgaccagcct 7320
gctgaacaca gtgtcaaca atgtgatcat caggactgtc ctggcattga cttacaagga 7380
atgtgaatat gacatggtt atatcatcgc ctacggtgac gaccttctgg ttggcacgga 7440
ttacgatctg gacttcaatg aggtggcagc acgcgtgcc aagttgggg ataagatgac 7500
tcctgccaac aagggttctg tcttccctc gacttctct ctttccgatg ctgtttttct 7560
aaagcgcaaa ttcgtccaaa acaacgacgg cttatacaaa ccagttatgg atttaagaa 7620
tttggagacc atgtctcct acttcaaacc aggaacacta ctcgagaagc tgcaatctgt 7680
ttctatgttg gctcaacatt ctggaaaaga agaataatgat agattgatgc acccttcgc 7740
tgactacggg gccgtaccga gtcacagta cctgcaggca agatggagg ccttgttcga 7800
ctgaccaga tagcccaagg cgcttcggtg ctgccggcga ttctgggaga actcagtcgg 7860
aacagaaaag ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaggccggca tggctccagc 7920

ctcctcgctg gcgccggtg ggcaacatgc ttcggcatgg cgaatgggac gcggccgctc 7980
gagtctagag ggcccgttta aaccgctga tcagcct 8017

<210> 22

<211> 9258

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-mIL-12 IVT模板

<400> 22

ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
gcttgggtacc ttatcaaaact gatgagtccg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
aatggggggc tgggccctga tgcccagtc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgccggg aacggtgcgg 240
ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
ttgggtgtgt ctgctgagtc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgata accgtaagac 420
tggctcaagc gcggaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctgcacctc cttagtaagg gaaccgagag 540
gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
gttctcccct ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
ggcatgacc ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcgggt ctataggtag cacatacaaa 780
tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc accttgaag atgtaaccgg 840
aacaaaagtc aagatcgtt aataccccag atcgggtgaac aatggtgtt acgattcgtc 900
tactcatTTG gagatactga acctacagg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacagg 1020
taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccgt ggcaataatg gtaacatgac 1080
cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa tttagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
gtcaggcgcc ggacctgga actctcggg cggattagcg ggtctcctca caaatttcag 1200
tggaatcttg aaccctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caaactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
gggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagacc gaccaaactc gatcctccgt ccagcagcac 1380
agatcaaccc accaccactt tcaactgcat cgacaggtgg tacttggtac gtctcaattc 1440
ttggacaaaa gctgtaaaaa cttctctttt tcaggccgtc ccgttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttcttggt gccatggttc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccgacg gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagt ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ctttttcagt ctcttggcac atactatcgg ccccctaact ggacttgggg 1800

tcccaatttc atcaaccctc atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
 aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
 agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
 aggagccaca actgaccagc aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
 tgggcttcgc aaccgctaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcccc ttcctacggc 2100
 acccagagaa aattcgctta tgtttctctc aaccctccct gacgacactg tccctgctta 2160
 cgggaatgtg cgtacccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
 actggcccg c ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccgc tgcctgcctc 2280
 agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
 cttcccgatc accctttcag atcccgtcta tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
 aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
 ggcgagagg aaattcctgc tctcgtatc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
 ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
 cttcgtcgtc ccctacatct cggccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
 ggtttactcc gctgatggtt ggttttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
 tgactgtccg caaagtccct gcattctctt tttcgttctt gctggtgagg attacactct 2760
 ccgtctcccc gttgattgta atccttccca tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
 cgggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
 ctctaaccac actaatgtca agttcctggt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
 ggtactggag aaggacgccg ttttcccccg ccctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
 ggatgatggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgttccc gaccgccac 3060
 tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgtt cttgctaaca cttactgga 3120
 cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggacctg aggttacggt 3180
 ggtctcacta gagccggatc tggaaattgc tgtaggggtg tttccttctg gcagtgaata 3240
 ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgccc ttccacttta ctgggcgcac 3300
 tccccgcgct ttcgctagca aggggtgggaa ggtatctttc gtgctccctt ggaactctgt 3360
 ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
 tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgctc ctaatgagaa 3480
 gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
 gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
 tatcgagacc aatcccgggc cgatgtgtcc tcagaagcta accatctcct ggtttgccat 3660
 cgttttgctg gtgtctccac tcatggccat gtgggagctg gagaaagacg tttatgttgt 3720
 agaggtggac tggactcccg atgcccctgg agaaacagtg aacctcacct gtgacacgcc 3780
 tgaagaagat gacatcacct ggacctcaga ccagagacat ggagtcata gctctggaaa 3840
 gacctgacc atcactgtca aagagtttct agatgctggc cagtacacct gccacaaagg 3900
 aggcgagact ctgagccact cacatctgct gctccacaag aaggaaaatg gaatttggtc 3960
 cactgaaatt ttaaaaaatt tcaaaaacaa gactttcctg aagtgtgaag caccaaatta 4020
 ctccggacgg ttacagtgt catggctggt gcaaagaaac atggacttga agttcaacat 4080
 caagagcagt agcagttccc ctgactctcg ggcagtgaca tgtggaatgg cgtctctgtc 4140

```

tgcagagaag gtcacactgg accaaaggga ctatgagaag tattcagtgt cctgccagga 4200
ggatgtcacc tgcccaactg ccgaggagac cctgcccatt gaactggcgt tggaagcacg 4260
gcagcagaat aaatatgaga actacagcac cagcttcttc atcagggaca tcatcaaacc 4320
agacccgccc aagaacttgc agatgaagcc tttgaagaac tcacaggtgg aggtcagctg 4380
ggagtaccct gactcctgga gcactcccca ttctacttc tccctcaagt tctttgttcg 4440
aatccagcgc aagaaagaaa agatgaagga gacagaggag ggggtgtaacc agaaaggtgc 4500
gttcctcgta gagaagacat ctaccgaagt ccaatgcaaa ggcgggaatg tctgcgtgca 4560
agctcaggat cgctattaca attcctcgtg cagcaagtgg gcatgtgttc cctgcagggt 4620
ccgatccgga ggtggcggtt ctggcggtgg agggagcgga ggcggaggat caagggtcat 4680
tccagtctct ggacctgcca ggtgtcttag ccagtccga aacctgctga agaccacaga 4740
tgacatggtg aagacggcca gagaaaaact gaaacattat tctgcactg ctgaagacat 4800
cgatcatgaa gacatcacac gggaccaaac cagcacattg aagacctgtt taccactgga 4860
actacacaag aacgagagtt gcctggttac tagagagact tcttcacaa caagagggag 4920
ctgcctgccc ccacagaaga cgtctttgat gatgacctg tgccttggtg gcatctatga 4980
ggacttgaag atgtaccaga cagagttcca ggccatcaac gcagcacttc agaatcaca 5040
ccatcagcag atcattctag acaagggcag gctggtggcc atcgatgagc tgatgcagtc 5100
tctgaatcat aatggcgaga ctctgcgcca gaaacctct gtgggagaag cagacctta 5160
cagagtgaag atgaagctct gcatcctgct tcacgccttc agcaccgcg tcgtgaccat 5220
caacagggtg atgggctatc tgagctccgc cgagggcaga ggaagtctgc taacatgcgg 5280
tgacgtcgag gagaatcccg ggcctgcttc tgacaacca attttgagat ttcttgaagc 5340
agaaaatgat ctagtcactc tggcctctct ctggaagatg gtgcactctg ttcaacagac 5400
ctggagaaag tatgtgaaga acgatgattt ttggcccaat ttactcagcg agctagtggg 5460
ggaaggctct gtcgccttgg ccgccacgct atccaacca gcttcagtaa aggctctttt 5520
gggcctgcac tttctctctc gggggctcaa ttacactgac ttttactctt tactgataga 5580
gaaatgctct agtttcttta ccgtagaacc acctctcca ccagctgaaa acctgatgac 5640
caagccctca gtgaagtcga aattccgaaa actgtttaag atgcaaggac ccatggacaa 5700
agtcaaagac tggaaccaa tagctgccgg ctggaagaat tttcaatttg ttcgtgacct 5760
agtcaaagag gtggtcgatt ggctgcaggc ctggatcaac aaagagaaag ccagccctgt 5820
cctccagtac cagttggaga tgaagaagct cgggcctgtg gccttggtc atgacgttt 5880
catggctggt tccgggcccc ctcttagcga cgaccagatt gaatacctcc agaacctcaa 5940
atctcttgcc ctaacactgg ggaagactaa tttggcccaa agtctcacca ctatgatcaa 6000
tgccaaacaa agttcagccc aacgagttga acccgttgtg gtggtcctta gaggcaagcc 6060
gggatgcggc aagagcttgg cctctacgtt gattgcccag gctgtgtcca agcgcctcta 6120
tggtcccaa agtgtatatt ctcttcccc agatccagat ttcttcgatg gatacaaagg 6180
acagttcgtg acctgatgg atgatttggg aaaaaaccg gatggacaag atttctccac 6240
cttttgtcag atggtgtcga ccgccaatt tctcccaac atggcgacc ttgcagagaa 6300
agggcgtccc ttacctcca atctcatcat tgcaactaca aatctcccc acttcagtcc 6360
tgtcaccatt gctgacctt ctgcagtctc tcgccgtatc aactacgatc tgactctaga 6420
agtatctgag gcctacaaga aacacacacg gctgaatttt gacttggtt tcaggcgcac 6480

```

agacgcccc cccatttatc cttttgctgc ccatgtgccc tttgtggacg tagctgtgcg 6540
cttcaaaaat ggtcaccaga attttaatct cctagagttg gtcgattcca tttgtacaga 6600
cattcgagcc aagcaacaag gtgcccgaag catgcagact ctggttctac agagcccca 6660
cgagaatgat gacacccccg tcgacgagcg gttgggtaga gttctctccc ccgctgcggt 6720
cgatgaggcg cttgtcgacc tcactccaga ggccgacccg gttggccggt tggctattct 6780
tgccaagcta ggtcttgccc tagctgcggt caccctggt ctgataatct tggcagtggg 6840
actctacagg tacttctctg gctctgatgc agaccaagaa gaaacagaaa gtgagggatc 6900
tgtcaaggca cccaggagcg aaaatgctta tgacggcccc aagaaaaact ctaagcccc 6960
tggagcactc tctctcatgg aaatgcaaca gccaacgtg gacatgggct ttgaggctgc 7020
ggtcgctaag aaagtggctg tccccattac cttcatggtt cccaacagac cttctgggct 7080
tacacagtcc gctcttctgg tgaccggccg gaccttcta atcaatgaac atacatggct 7140
caatccctcc tggaccagct tcacaatccg cggtgaggtg cacactcgtg atgagccctt 7200
ccaaacggtt catttcaact accacggtat tcccacagat ctgatgatgg tacgtctcgg 7260
accgggcaat tctttcccta acaatctaga caagtttggg cttgaccaga tgccggcacg 7320
caactcccgt gtggttggcg tttcgtccag ttacggaaac ttcttcttct ctggaaattt 7380
cctcggattt gttgattcca tcacctctga acaaggaact tacgcaagac tcttttaggt 7440
cagggtgacg acctacaaag gatggtgcgg ctcgccctg gtctgtgagg ccggtggcgt 7500
ccgacgcac attggcctgc attctgctgg cgccgccggt atcggcgccg ggacctatat 7560
ctcaaaaatta ggactaatca aagccctgaa acacctcgtg gaacctttgg ccacaatgca 7620
aggactgatg actgaattag agcctggaat caccgtacat gtaccccgga aatccaaatt 7680
gagaaagacg accgcacacg cggtgtacaa accggagttt gagcctgctg tgttgtcaaa 7740
atttgatccc agactgaaca aggatgttga cttggatgaa gtaatttggt ctaaacacac 7800
tgccaatgtc ccttaccac ctcctttgtt ctacacatac atgtcagagt acgctcatcg 7860
agtcttctcc ttcttgggga aagacaatga cattctgacc gtcaaagaag caattctggg 7920
catccccgga ctagacccca tggatcccca cacagctccg ggtctgcctt acgccatcaa 7980
cgcccttcga cgtactgatc tcgtcgattt tgtgaacggt acagtagatg cggcgctggc 8040
tgtacaaatc cagaaattct tagacggtga ctactctgac catgtcttcc aaacttttct 8100
gaaagatgag atcagaccct cagagaaagt ccgagcgga aaaaccgca ttgttgatgt 8160
gccctccctg gcgcattgca ttgtgggcag aatgttgctt gggcgctttg ctgccaagtt 8220
tcaatcccat cctggcttct tctcggctc tgctatcggg tctgacctg atgttttctg 8280
gaccgtcata ggggctcaac tcgaggggag aaagaacacg tatgacgtgg actacagtgc 8340
ctttgactct tcacacggca ctggtctctt cgaggtctct atctctcact ttttcaccgt 8400
ggacaatggt tttagccctg cgctgggacc gtatctcaga tccctggctg tctcggtgca 8460
cgcttacggc gagcgtcgca tcaagattac cggtggcctc ccctccggtt gtgccgcgac 8520
cagcctgctg aacacagtgc tcaacaatgt gatcatcagg actgctctgg cattgactta 8580
caaggaattt gaatatgaca tggttgatat catcgctac ggtgacgacc ttctggttgg 8640
cacggattac gatctggact tcaatgaggt ggcacgacg gctgccaagt tggggtataa 8700
gatgactcct gccaaacaag gttctgtctt ccctccgact tctctctttt ccgatgctgt 8760
ttttctaaag cgcaaatctg tccaaaacaa cgacggctta tacaaccag ttatggattt 8820

aaagaatttg gaagccatgc tctcctactt caaaccagga acactactcg agaagctgca 8880
 atctgtttct atgttggctc aacattctgg aaaagaagaa tatgatagat tgatgcaccc 8940
 cttcgctgac tacgggtgccg taccgagtca cgagtacctg caggcaagat ggagggcctt 9000
 gttcgactga cccagatagc ccaaggcgct tcgggtgctgc cggcgattct gggagaactc 9060
 agtcggaaca gaaaaggga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagg ccggcatggt 9120
 cccagcctcc tcgctggcgc cggctgggca acatgcttcg gcatggcgaa tgggacgcgg 9180
 ccgctcgagt ctagagggcc cgtttaaac cgcggccgct cgagtctaga gggcccgttt 9240
 aaacccgctg atcagcct 9258

<210> 23

<211> 9135

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-mFap-BiTE IVT模板

<400> 23

ttatcgaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
 gcttgggtacc ttatcaaact gatgagtccg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
 aatggggggc tgggccctga tgcccagtcc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
 tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacggtgcgg 240
 ctccgattcc tgcgtcgcca aagggtgtag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
 ttgggtgtgg ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
 aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
 tggctcaagc gcggaaagcg ctgtaaccac atgctgtag tccctttatg gctgcaagat 480
 ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctcgaccctc cttagtaagg gaaccgagag 540
 gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
 gttctccct ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
 ggcatgacct ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
 ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcggtt ctataggtag cacatacaa 780
 tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc accttgaag atgtaaccgg 840
 aacaaaagtc aagatcggtg aataccccag atcgggtgaac aatgggtgtt acgattcgctc 900
 tactcatTTG gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
 ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
 taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccggt ggcaataatg gtaacatgac 1080
 cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa ttcagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
 gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctctca caaatttcag 1200
 tggaatcttg aaccctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
 tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
 ggggtgtgtt tgtgcctacg ttgaagacct gaccaaactc gatcctccgt ccagcagcac 1380
 agatcaaccc accaccactt tcaactgcat cgacaggtgg tacactggac gtctcaattc 1440

```

ttggacaaaa gctgtaaaaa ctttctcttt tcaggccgtc ccgcttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcagggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttcttggt gccatgggtc ctgaaaccac cttgatgtc aagccccgac gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagt ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ctttttcagt ctcttggcac atactatcgg cccctaact ggacttgggg 1800
tcccaatttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cttacaagtc cttacttcaa 2040
tgggcttcgc aaccgtaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcca ttctacggc 2100
accagagaaa aattcgctta tgtttctctc aacctccct gagcactg tccctgctta 2160
cgggaatgtg cgtaccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
actggcccg ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccg tgctgcctc 2280
agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
cttcccgatc acctttcag atcccgctta tcagaacacc ctggttgcg ccatcagttc 2400
aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtattc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
ggtttactcc gctgatggtt ggtttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
tgactgtccg caaagtcctt gcattctctt tttcgcttct gctggtgagg attacactct 2760
ccgtctcccc gttgattgta atccttcta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
cgggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
ggtactggag aaggacgccg ttttccccg cctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
ggatgatggt tacttttgc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccg cagtgggtgt cttgctaaca cttactgga 3120
cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggaccttg aggttacggt 3180
ggtctcacta gagccggtc tggaatttgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240
ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcattgtccc ttccacttta ctgggcgcac 3300
tccccgcgt ttcgctagca aggttgggaa ggtatcttct gtgtccctt ggaactctgt 3360
ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgct ctaatgagaa 3480
gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
tatcgagacc aatcccgggc cgatggtttt gcttgtgacc agcctcctgc tctgtgaact 3660
gcctcatcct gcattcctgt tgatcccaca ggtgcagctc cagcagagtg gcgcagagct 3720
cgctcgccca ggcgcttctg tgaatctgag ttgtaaggcc tccgatata cttttacgaa 3780

```

caacggcatc aactggctga agcagcggac cggccagggc ctggagtgga tcggcgaaat 3840
 atacccccgg tccacaaaca ctctctataa cgagaagttt aagggcaaag caactctgac 3900
 cgcgacaggg tcctctaaca cagcctatat ggagctgaga agcttgacga gtgaggactc 3960
 cgctgtctat ttttgcgccc gaactctgac cgctcctttt gctttttggg gccagggcac 4020
 gctcgtgacc gtaagtgcgg gctccactag cggttccggc aaacctggca gcggagaagg 4080
 cagcaccaaaa gggcagatcg tcctgacgca gtctccagcc atcatgagcg cctcacccgg 4140
 cgaaaagggtg accatgacct gctcagcctc ttctgggtgtg aatttcatgc actggtacca 4200
 gcaaaaaagt gggacctccc ctaaaagggtg gatcttcgat accagcaaac tggcttctgg 4260
 cggtcccgca aggttttagcg gctctggttc cggcacatca tacagcctga cgatcagcag 4320
 catggaggca gaagacgcag ctacctatta ctgccagcaa tggagcttta acccacctac 4380
 tttcggagga ggaacaaaagc tggaaataaa aagaggtggt ggtggatcag aggtgcagct 4440
 ggtggagtct gggggagget tgggtgcagcc tggaaagtcc ctgaaactct cctgtgaggc 4500
 ctctggattc accttcagcg gctatggcat gcactgggtc cgccaggctc cagggagggg 4560
 gctggagtcg gtcgcataca ttactagtag tagtattaat atcaaatatg ctgacgctgt 4620
 gaaaggccgg ttcaccgtct ccagagacaa tgccaagaac ttactgtttc tacaatatgaa 4680
 cattctcaag tctgaggaca cagccatgta ctactgtgca agattcgact gggacaaaaa 4740
 ttactggggc caaggaacca tggtcaccgt ctctcaggt ggtggtggat caggtggagg 4800
 cggaagtgga ggtggcggat ccgacatcca gatgaccag tctccatcat cactgcctgc 4860
 ctccctggga gacagagtca ctatcaattg tcaggccagt caggacatta gcaattattt 4920
 aaactggtac cagcagaaac cagggaaagc tcctaagctc ctgatctatt atacaaataa 4980
 attggcagat ggagtcccat caaggttcag tggcagtggg tctgggagag attcttcttt 5040
 cactatcagc agcctggaat ccgaagatat tggatcttat tactgtcaac agtattataa 5100
 ctatccgtgg acgttcggac ctggcaccaa gctggaaatc aaacggcacc accatcatca 5160
 ccacgagggc agaggaagtc tgctaacatg cggtgacgtc gaggagaatc ccgggcctgc 5220
 ttctgacaac ccaattttgg agtttcttga agcagaaaat gatctagtca ctctggcctc 5280
 tctctggaag atggtgcact ctgttcaaca gacctggaga aagtatgtga agaacgatga 5340
 tttttggccc aatttactca gcgagctagt gggggaaggc tctgtcgcct tggccgccac 5400
 gctatccaac caagcttcag taaaggtctt tttgggcctg cactttctct ctcgggggct 5460
 caattaactg acttttactc tttactgata gagaaatget ctagtttctt taccgtagaa 5520
 ccacctctc caccagctga aaacctgatg accaagccct cagtgaagtc gaaattccga 5580
 aaactgttta agatgcaagg acctatggac aaagtcaaag actggaacca aatagctgcc 5640
 ggcttgaaga attttcaatt tgttcgtgac ctagtcaaag aggtggtcga ttggctgcag 5700
 gcctggatca acaaagagaa agccagccct gtctccagt accagttgga gatgaagaag 5760
 ctcgggcctg tggccttggc tcatgacget ttcatggctg gttccgggcc ccctcttagc 5820
 gacgaccaga ttgaatacct ccagaacctc aaatctcttg ccctaacact ggggaagact 5880
 aatttggccc aaagtctcac cactatgatc aatgccaaac aaagttcagc ccaacgagtt 5940
 gaaccggttg tgggtgtcct tagaggcaag ccgggatgag gcaagagctt ggctcttacg 6000
 ttgattgccc aggtgtgtc caagcgctc tatggctccc aaagtgtata ttctcttccc 6060
 ccagatccag atttcttcca tggatacaaa ggacagttcg tgaccttgat ggatgatttg 6120

ggacaaaacc cggatggaca agatttctcc accttttgtc agatggtgtc gaccgccc aa 6180
tttctcccca acatggcgga ccttgacagag aaagggcgtc cctttacctc caatctcatc 6240
attgcaacta caaatctccc ccacttcagt cctgtcacca ttgctgatcc ttctgcagtc 6300
tctcgccgta tcaactacga tctgactcta gaagtatctg aggcctacaa gaaacacaca 6360
cggctgaatt ttgacttggc tttcaggcgc acagacgccc ccccatatta tccttttgtc 6420
gcccattgtc cctttgtgga cgtagctgtg cgcttcaaaa atggtcacca gaattttaat 6480
ctcctagagt tggctgattc catttgtaca gacattcgag ccaagcaaca aggtgcccga 6540
aacatgcaga ctctggttct acagagcccc aacgagaatg atgacacccc cgtcgacgag 6600
gcgttgggta gagttctctc ccccgtgcg gtcgatgagg cgcttgtcga cctcactcca 6660
gaggccgacc cggttggccg tttggctatt cttgccaagc taggtcttgc cctagctgcg 6720
gtcacccctg gtctgataat cttggcagtg ggactctaca ggtacttctc tggctctgat 6780
gcagaccaag aagaaacaga aagtgaggga tctgtcaagg caccagagg cgaaaatgct 6840
tatgacggcc cgaagaaaaa ctctaagccc cctggagcac tctctctcat ggaaatgcaa 6900
cagcccaacg tggacatggg ctttgaggct gcggtcgcta agaaagtggc cgtccccatt 6960
accttcatgg ttcccaacag accttctggg cttacacagt ccgctcttct ggtgaccggc 7020
cggaccttcc taatcaatga acatacatgg tccaatccct cctggaccag cttcacaatc 7080
cgcggtgagg tacacactcg tgatgagccc ttccaaacgg ttcatttcac tcaccacggt 7140
attcccacag atctgatgat ggtacgtctc ggaccgggca attctttccc taacaatcta 7200
gacaagtttg gacttgacca gatgccggca cgcaactccc gtgtggttgg cgtttcgtcc 7260
agttacggaa acttcttctt ctctggaaat ttctcggat ttgttgattc catcacctct 7320
gaacaaggaa cttacgcaag actctttagg tacagggtga cgacctacaa aggatggtgc 7380
ggctcggccc tggctctgtg ggccggtggc gtccgacgca tcattggcct gcattctgct 7440
ggcgccgccc gtatcggcgc cgggacctat atctcaaaa taggactaat caaagccctg 7500
aaacacctcg gtgaaccttt ggccacaatg caaggactga tgactgaatt agagcctgga 7560
atcacctgac atgtacccc gaaatccaaa ttgagaaaga cgaccgcaca cgcggtgtac 7620
aaaccggagt ttgagcctgc tgtgttgc aaatttgatc ccagactgaa caaggatgtt 7680
gacttgatg aagtaatttg gtctaaacac actgccaatg tcccttacca acctccttg 7740
ttctacacat acatgtcaga gtacgtcat cgagtcttct cttcttggg gaaagacaat 7800
gacattctga ccgtcaaaga agcaattctg ggcaccccc gactagacc catggatccc 7860
cacacagctc cgggtctgcc ttacgccatc aacggccttc gacgtactga tctcgtcgat 7920
tttgtgaacg gtacagtaga tgcggcgtg gctgtacaaa tccagaaatt cttagacggt 7980
gactactctg accatgtctt ccaaactttt ctgaaagatg agatcagacc ctgagagaaa 8040
gtccgagcgg gaaaaacccg cattgttgat gtgccctccc tggcgcatg cattgtgggc 8100
agaatgttgc ttgggcgctt tgetgccaag tttcaatccc atcctggctt tctcctcggc 8160
tctgctatcg ggtctgacct tgatgttttc tggaccgtca taggggtc actcgagggg 8220
agaaagaaca cgtatgacgt ggactacagt gcctttgact cttcacacgg cactggtcc 8280
ttcgaggctc tcatctctca ctttttcacc gtggacaatg gttttagccc tgcgctggga 8340
ccgtatctca gatccctggc tgtctcggtg cacgcttac gcgagcgtc catcaagatt 8400
accggtggcc tcccctccgg ttgtgccgcg accagcctgc tgaacacagt gctcaacaat 8460

gtgatcatca ggactgctct ggcattgact tacaaggaat ttgaatatga catggttgat 8520
 atcatcgccct acggtgacga ccttctgggtt ggcacggatt acgatctgga cttcaatgag 8580
 gtggcacgac gcgctgccaa gttgggggtat aagatgactc ctgccaacaa gggttctgtc 8640
 ttccctccga cttcctctct ttccgatgct gtttttctaa agcgcaaatt cgtccaaaac 8700
 aacgacggct tatacaaacc agttatggat ttaaagaatt tggaagccat gctctcctac 8760
 ttcaaaccag gaacactact cgagaagctg caatctgttt ctatgttggc tcaacattct 8820
 ggaaaagaag aatatgatag attgatgcac cccttcgctg actacgggtgc cgtaccgagt 8880
 cacgagtacc tgcaggcaag atggagggcc ttgttcgact gaccagata gcccaaggcg 8940
 cttcgggtgct gccggcgatt ctgggagaac tcagtcggaa cagaaaaggg aaaaaaaaaa 9000
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ggccggcatg gtcccagcct cctcgctggc gccggctggg 9060
 caacatgctt cggcatggcg aatgggacgc ggccgctcga gtctagaggg cccgttttaa 9120
 cccgctgac agcct 9135

<210> 24

<211> 7888

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-CXCL10 IVT模板

<400> 24

ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
 gcttgggtacc ttatcaaact gatgagtcg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
 aatggggggc tgggccctga tgcccagtc ttcttttccc cttccggggg gttaaccggc 180
 tgtgtttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacggtgcgg 240
 ctccgattcc tgcgtcgcca aagggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
 ttgggtgtggc ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
 aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
 tggctcaagc gcggaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
 ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctcgaccctc cttagtaagg gaaccgagag 540
 gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
 gttctccct ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
 ggcatgaccc ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
 ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcggtt ctataggtag cacatacaa 780
 tatgcagaac tctcattttt ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
 aacaaaagtc aagatcggtg aataccccag atcggatgaac aatgggtgttt acgattcgctc 900
 tactcatttg gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
 ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
 taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccggt ggcaataatg gtaacatgac 1080
 cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa ttcatgtagc ttctcgacct cctcgtcggc 1140
 gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctcctca caaatttcag 1200

```

tggaatcttg aacctctctg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
gggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagaccc gaccaaactc gatcctccgt ccagcagcac 1380
agatcaaccc accaccactt tctactgccat cgacaggtgg tacactggac gtctcaattc 1440
ttggacaaaa gctgtaaaaa ctttctcttt tcaggccgtc ccgcttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttcttggt gccatgggtc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccgcag gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagtg ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ccttttcagt ctcttggcac atactatcgg cccctaact ggacttgggg 1800
tcccaatttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
tggtcttcgc aaccgctaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcccc ttcctacggc 2100
accagagaaa aattcgctta tgtttctctc aacctccct gacgacactg tccctgctta 2160
cgggaatgtg cgtaccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220
actggcccg ataccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaaccg tgctgcctc 2280
agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
cttcccgatc accctttcag atcccgctc tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
aaatttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtattc tccccaaat ggaacgcaac cacagactct 2520
ttccgaagct atgcagtga catactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
ggtttactcc gctgatgggt ggtttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
tgactgtccg caaagtccct gcattctctt tttcgcttct gctggtgagg attacactct 2760
ccgtctcccc gttgattgta atccttcta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
cggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
ggtactggag aaggacgccg ttttccccg cctttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
ggatgatgggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccg cagtgggtgt cttgctaaca cttactgga 3120
cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggaccttg aggttacgggt 3180
ggtctcacta gagccggatc tggaatttgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240
ccaggttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgcc ttccacttta ctgggcgcac 3300
tccccgcgt ttcgctagca aggttgggaa ggtatcttct gtgctccctt ggaactctgt 3360
ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtccccgct ctaatgagaa 3480
gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaac cacgtgcctg 3540

```

gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
tatcgagacc aatcccgggc cgatgaaccc aagtgtctgcc gtcattttct gcctcatcct 3660
gctgggtctg agtgggactc aagggatccc tctcgcaagg acggtccgct gcaactgcat 3720
ccatatcgat gacgggccag tgagaatgag ggccataggg aagcttgaaa tcatccctgc 3780
gagcctatcc tgcccacgtg ttgagatcat tgccacgatg aaaaagaatg atgagcagag 3840
atgtctgaat ccggaatcta agaccatcaa gaatttaatg aaagcgttta gccaaaaaag 3900
gtctaaaagg gctcctgagg gcagaggaag tctgctaaca tgcggtgacg tcgaggagaa 3960
tcccgggcct gcttctgaca acccaatttt ggagtttctt gaagcagaaa atgatctagt 4020
cactctggcc tctctctgga agatggtgca ctctgttcaa cagacctgga gaaagtatgt 4080
gaagaacgat gatttttggc ccaatttact cagcgagcta gtgggggaag gctctgtcgc 4140
cttggccgcc acgctatcca accaagcttc agtaaaggct cttttgggcc tgcactttct 4200
ctctcggggg ctcaattaca ctgactttta ctctttactg atagagaaat gctctagttt 4260
ctttaccgta gaaccacctc ctccaccagc tgaaaacctg atgaccaagc cctcagtga 4320
gtcgaaattc cgaaaactgt ttaagatgca aggacccatg gacaaagtca aagactggaa 4380
ccaaatagct gccggcttga agaattttca atttggtcgt gacctagtca aagaggtggt 4440
cgattggctg caggcctgga tcaacaaaga gaaagccagc cctgtcctcc agtaccagtt 4500
ggagatgaag aagctcgggc ctgtggcctt ggctcatgac gctttcatgg ctggttccgg 4560
gccccctctt agcgacgacc agattgaata cctccagaac ctcaaattctc ttgccctaac 4620
actggggaag actaatttgg cccaaagtct caccactatg atcaatgcca aacaaagtctc 4680
agcccaacga gttgaaccgc ttgtggtggt ccttagaggc aagccgggat gcggcaagag 4740
cttgccctct acgttgattg cccaggctgt gtccaagcgc ctctatggct cccaaagtgt 4800
atattctctt ccccagatc cagatttctt cgatggatac aaaggacagt tcgtgacctt 4860
gatggatgat ttgggacaaa acccgatgg acaagattc tccacctttt gtcagatggt 4920
gtcgaccgcc caatttctcc ccaacatggc ggaccttgca gagaaagggc gtccctttac 4980
ctccaattctc atcattgcaa ctacaaatct ccccacttc agtcctgtca ccattgctga 5040
tccttctgca gtctctgcc gtatcaacta cgatctgact ctagaagtat ctgaggccta 5100
caagaaacac acacggctga attttgactt ggctttcagg cgcacagacg cccccccat 5160
ttatcctttt gctgcccagtg tgccctttgt ggacgtagct gtgcgcttca aaaatggtca 5220
ccagaatttt aatctcctag agttggtcga ttccatttgt acagacattc gagccaagca 5280
acaaggtgcc cgaaacatgc agactctggt tctacagagc cccaacgaga atgatgacac 5340
ccccgtcgac gaggcgttgg gtagagttct ctccccgct gcggtcgatg aggcgcttgt 5400
cgacctcact ccagaggccg acccggttgg ccgtttggct attcttgcca agctaggtct 5460
tgccctagct gcggtcaccc ctggtctgat aatcttggca gtgggactct acaggtactt 5520
ctctggctct gatgcagacc aagaagaaac agaaagttag ggatctgtca aggcacccag 5580
gagcgaaaat gcttatgacg gcccgaagaa aaactctaag cccctggag cactctctct 5640
catggaaatg caacagccca acgtggacat gggctttgag gctgcggtcg ctaagaaagt 5700
ggtcgtcccc attaccttca tggttcccaa cagaccttct gggcttacac agtccgctct 5760
tctggtgacc ggccggacct tcctaataca tgaacataca tgggtccaatc cctcctggac 5820
cagcttcaca atccgcggtg aggtacacac tcgtgatgag cccttccaaa cggttcattt 5880

cactcaccac ggtattccca cagatctgat gatggtacgt ctcggaccgg gcaattcttt 5940
 ccctaacaat ctagacaagt ttggacttga ccagatgccg gcacgcaact cccgtgtggt 6000
 tggcgtttcg tccagttacg gaaacttctt cttctctgga aatttcctcg gatttgttga 6060
 ttccatcacc tctgaacaag gaacttacgc aagactcttt aggtacaggg tgacgacctt 6120
 caaaggatgg tgcggctcgg ccctgggtctg tgaggccggg ggcgctccgac gcatcattgg 6180
 cctgcattct gctggcgccg ccggtatcgg cgccggggacc tatactctcaa aattaggact 6240
 aatcaaagcc ctgaaacacc tcggtgaacc tttggccaca atgcaaggac tgatgactga 6300
 attagagcct ggaatcaccg tacatgtacc ccggaaatcc aaattgagaa agacgaccgc 6360
 acacgcggtg tacaaaaccg agtttgagcc tgctgtgttg tcaaaatttg atcccagact 6420
 gaacaaggat gttgacttgg atgaagtaat ttggtctaaa cacactgcca atgtccctta 6480
 ccaacctcct ttgttctaca catacatgtc agagtacgt catcgagtct tctccttctt 6540
 ggggaaaagac aatgacattc tgaccgtcaa agaagcaatt ctgggcatcc ccggactaga 6600
 ccccatggat ccccacacag ctccgggtct gccttacgcc atcaacggcc ttcgacgtac 6660
 tgatctcgtc gattttgtga acggtacagt agatgcggcg ctggctgtac aaatccagaa 6720
 attcttagac ggtgactact ctgacctagt cttccaaact tttctgaaag atgagatcag 6780
 accctcagag aaagtccgag cgggaaaaac ccgcattgtt gatgtgccct ccctggcgca 6840
 ttgcattgtg ggcagaatgt tgcttgggcg ctttgcgtcc aagtttcaat cccatcctgg 6900
 ctttctcctc ggctctgcta tcgggtctga ccctgatgtt ttctggaccg tcataggggc 6960
 tcaactcgag gggagaaaaga acacgtatga cgtggactac agtgcctttg actcttcaca 7020
 cggcactggc tccttcgagg ctctcatctc tcactttttc accgtggaca atggtttttag 7080
 ccctgcgctg ggaccgtatc tcagatccct ggctgtctcg gtgcacgctt acggcgagcg 7140
 tcgcatcaag attaccggtg gcctcccctc cggttgtgcc gcgaccagcc tgctgaacac 7200
 agtgcctaac aatgtgatca tcaggactgc tctggcattg acttacaagg aatttgaata 7260
 tgacatgggt gatatcatcg cctacgggtg cgaccttctg gttggcacgg attacgatct 7320
 ggacttcaat gaggtggcac gacgcgctgc caagttgggg tataagatga ctctgcca 7380
 caagggttct gtcttccctc cgacttctc tctttccgat gctgtttttc taaagcgcaa 7440
 attcgctcaa aacaacgacg gcttatacaa accagttatg gatttaaaga atttggaagc 7500
 catgctctcc tacttcaaac caggaacact actcgagaag ctgcaatctg tttctatgtt 7560
 ggctcaacat tctgaaaaag aagaatatga tagattgatg cacccttcg ctgactacgg 7620
 tgccgtaccg agtcacgagt acctgcaggc aagatggagg gccttgttcg actgaccag 7680
 atagcccaag gcgcttcggt gctgccggcg attctgggag aactcagtcg gaacagaaaa 7740
 gggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaggccggc atggtcccag cctcctcgct 7800
 ggcgccggct gggcaacatg cttcggcatg gcgaatggga cgcggccgct cgagtctaga 7860
 gggcccgttt aaacccgctg atcagcct 7888

<210> 25

<211> 8101

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> SVV-hIL36 IVT模板

<400> 25

```

ttatcgaaat taatacgact cactataggg agaccaagc tggctagcgt ttaaacttaa 60
gcttgggtacc ttatcaaact gatgagtcg tgaggacgaa acgagtaagc tcgtctttga 120
aatggggggc tgggccctga tgcccagtc ttcctttccc cttccggggg gttaaccggc 180
tgtgttttgct agaggcacag aggggcaaca tccaacctgc ttttgcgggg aacggtgcgg 240
ctccgattcc tgcgtcgcca aaggtgttag cgcacccaaa cggcgcacct accaatgtta 300
ttgggtgtggt ctgcgagttc tagcctactc gtttctcccc cgaccattca ctcaccacg 360
aaaagtgtgt tgtaaccata agatttaacc cccgcacggg atgtgcgata accgtaagac 420
tggtcaagc gcgaaaagcg ctgtaaccac atgctgttag tccctttatg gctgcaagat 480
ggctaccac ctcggatcac tgaactggag ctgcacctc cttagtaagg gaaccgagag 540
gccttcgtgc aacaagctcc gacacagagt ccacgtgact gctaccacca tgagtacatg 600
gttctccctc ctcgaccag gacttctttt tgaatatcca cggctcgatc cagagggtgg 660
ggcatgacct ctagcatagc gagctacagc gggaactgta gctaggcctt agcgtgcctt 720
ggatactgcc tgatagggcg acggcctagt cgtgtcggtt ctataggtag cacatacaa 780
tatgcagaac tctcatTTTT ctttcgatac agcctctggc acctttgaag atgtaaccgg 840
aacaaaagtc aagatcgttg aataccccag atcggatgaac aatggtgttt acgattcgtc 900
tactcatttg gagatactga acctacaggg tgaaattgaa attttaaggt ctttcaatga 960
ataccaaatt cgcgccgcca aacaacaact cggactggac atcgtgtacg aactacaggg 1020
taatgttcag acaacgtcaa agaattgatt tgattcccggt ggcaataatg gtaacatgac 1080
cttcaattac tacgcaaaca cttatcagaa ttcagtagac ttctcgacct cctcgtcggc 1140
gtcaggcgcc ggacctggga actctcgggg cggattagcg ggtctcctca caaatttcag 1200
tggaatcttg aacctcttg gctacctcaa agatcacaac accgaagaaa tggaaaactc 1260
tgctgatcga gtcacaacgc aaacggcggg caacactgcc ataaacacgc aatcatcatt 1320
gggtgtgttg tgtgcctacg ttgaagacct gaccaaactc gatcctccgt ccagcagcac 1380
agatcaacct accaccactt tctactgcat cgacaggtag tacactggac gtctcaattc 1440
ttggacaaaa gctgtaaaaa ctttctcttt tcaggccgtc ccgcttcccg gtgcctttct 1500
gtctaggcag ggaggcctca acggaggggc cttcacagct accctacata gacacttttt 1560
gatgaagtgc ggggtggcagg tgcaggtcca atgtaatttg acacaattcc accaaggcgc 1620
tcttcttggt gccatggttc ctgaaaccac cttgatgtc aagcccagc gtaaggcaaa 1680
gagcttacag gagctgaatg aagaacagtg ggtggaaatg tctgacgatt accggaccgg 1740
gaaaaacatg ccttttcagt ctcttggcac atactatcgg ccccttaact ggacttgggg 1800
tccaattttc atcaaccctt atcaagtaac ggttttccca caccaaattc tgaacgcgag 1860
aacctctacc tcggtagaca taaacgtccc atacatcggg gagaccccca cgcaatcctc 1920
agagacacag aactcctgga ccctcctcgt tatggtgctc gttcccctag actataagga 1980
aggagccaca actgaccag aaattacatt ttctgtaagg cctacaagtc cctacttcaa 2040
tggtcttcgc aaccgtaca cggccgggac ggacgaagaa caggggcccc ttctacggc 2100
accagagaaa aattcgctta tgtttctctc aacctcctt gacgacactg tccctgctta 2160
cgggaatgtg cgtaccctc ctgtcaatta cctccctggt gaaataaccg accttttgca 2220

```

```

actggccccgc atacccactc tcatggcatt tgagcgggtg cctgaacccg tgcctgcctc 2280
agacacatat gtgccctacg ttgccgttcc caccagttc gatgacaggc ctctcatctc 2340
cttccccgatc accctttcag atccccgtcta tcagaacacc ctggttggcg ccatcagttc 2400
aaattttcgcc aattaccgtg ggtgtatcca aatcactctg acattttgtg gacctatgat 2460
ggcgagaggg aaattcctgc tctcgtattc tcccccaat ggaacgcaac cacagactct 2520
ttccgaagct atgcagtgcata cactctat ttgggacata ggcttgaact ctagttggac 2580
cttcgtcgtc ccctacatct cgcccagtga ctaccgtgaa actcgagcca ttaccaactc 2640
ggtttactcc gctgatggtt ggttttagcct gcacaagttg accaaaatta ctctaccacc 2700
tgactgtccg caaagtcctt gcattctctt tttcgttctt gctggtgagg attacactct 2760
ccgtctcccc gttgattgta atccttcta tgtgttccac tccaccgaca acgccgagac 2820
cggggttatt gaggcgggta aactgacac cgatttctct ggtgaactgg cggctcctgg 2880
ctctaaccac actaatgtca agttcctgtt tgatcgatct cgattattga atgtaatcaa 2940
ggtactggag aaggacgccg ttttcccccg ccttttccct acacaagaag gtgcgcagca 3000
ggatgatggt tacttttgtc ttctgacccc ccgccaaca gtcgcttccc gaccgccac 3060
tcgtttcggc ctgtacgcca atccgtccgg cagtgggtgt cttgctaaca cttactgga 3120
cttcaatttt tatagcttgg cctgtttcac ttactttaga tcggaccttg aggttacggt 3180
ggtctcacta gagccgatc tggaatttgc tgtagggtgg tttccttctg gcagtgaata 3240
ccaggcttcc agctttgtct acgaccagct gcatgtgcc ttcacttta ctgggcgcac 3300
tccccgcgt ttcgctagca aggttgggaa ggtatcttct gtgtccctt ggaactctgt 3360
ctcgtctgtg ctccccgtgc gctggggggg ggcttccaag ctctcttctg ctacgcgggg 3420
tctaccggcg catgctgatt gggggactat ttacgccttt gtcccccgtc ctaatgagaa 3480
gaaaagcacc gctgtaaaac acgtggccgt gtacattcgg tacaagaacg cacgtgcctg 3540
gtgccccagc atgcttccct ttcgcagcta caagcagaag atgctgatgc aatctggcga 3600
tatcgagacc aatcccgggc cgatgagagg cactccagga gacgctgatg gtggaggaag 3660
ggccgtctat caatcaatgt gtaaacctat tactgggact attaattgatt tgaatcagca 3720
agtgtggacc cttcagggtc agaaccttgt ggcagttcca cgaagtgaca gtgtgacccc 3780
agtcaactgtt gctgttatca catgcaagta tccagaggct cttgagcaag gcagagggga 3840
tcccatttat ttgggaatcc agaatccaga aatgtgtttg tattgtgaga aggttgaga 3900
acagcccaca ttgcagctaa aagagcagaa gatcatggat ctgtatggcc aaccgagcc 3960
cgtgaaaacc ttccttttct accgtgccaa gactggtagg acctccacc ttgagtctgt 4020
ggccttcccc gactggttca ttgctctctc caagagagac cagcccatca ttctgacttc 4080
agaacttggg aagtcataca aactgcctt tgaattaaat ataaatgacg agggcagagg 4140
aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcccggg cctgcttctg acaaccaat 4200
tttgagttt cttgaagcag aaaatgatct agtcaactct gcctctctct ggaagatggt 4260
gcactctgtt caacagacct ggagaaagta tgtgaagaac gatgattttt ggcccaattt 4320
actcagcgag ctagtggggg aaggtctgtt cgcttggcc gccacgctat ccaaccaagc 4380
ttcagtaaag gctcttttgg gcctgcactt tctctctcgg gggctcaatt aactgactt 4440
ttactcttta ctgatagaga aatgctctag tttctttacc gtagaaccac ctctccacc 4500
agctgaaaac ctgatgacca agccctcagt gaagtcgaaa ttccgaaaac tgtttaagat 4560

```

gcaaggaccc atggacaaag tcaaagactg gaaccaaata gctgccggct tgaagaattt 4620
tcaatttggt cgtgacctag tcaaagaggt ggtcgattgg ctgcaggcct ggatcaacaa 4680
agagaaagcc agccctgtcc tccagtacca gttggagatg aagaagctcg ggcctgtggc 4740
cttggctcat gacgctttca tggctggttc cgggccccct cttagcgacg accagattga 4800
atacctccag aacctcaaat ctcttgccct aacactgggg aagactaatt tggcccaaag 4860
tctcaccact atgatcaatg ccaaacaaag ttcagcccaa cgagttgaac ccgttgtggt 4920
ggtccttaga ggcaagccgg gatgcggcaa gagcttggcc tctacgttga ttgccaggc 4980
tgtgtccaag cgctctatg gtccccaaag tgtatattct cttccccag atccagattt 5040
cttcgatgga taaaaaggac agttcgtgac cttgatggat gatttgggac aaaaccgga 5100
tggaagaat ttctccacct tttgtcagat ggtgtcgacc gccaatttc tccccacat 5160
ggcggacctt gcagagaaaag ggcgtccctt tacctccaat ctcatcattg caactacaaa 5220
tctccccac ttcagtcttg tcaccattgc tgatccttct gcagtctctc gccgtatcaa 5280
ctacgatctg actctagaag tatctgaggc ctacaagaaa cacacacggc tgaattttga 5340
cttggctttc aggcgcacag acgccccccc catttatect tttgctgcc atgtgccctt 5400
tgtggacgta gctgtgcgct tcaaaaatgg tcaccagaat tttaatctcc tagagttggt 5460
cgattccatt tgtacagaca ttcgagccaa gcaacaaggt gcccgaaaca tgcagactct 5520
ggttctacag agccccaacg agaatgatga ccccccgct gacgaggcgt tgggtagagt 5580
tctctcccc gctgcggtcg atgaggcgct tgtcgacctc actccagagg ccgaccggt 5640
tgcccgtttg gctattcttg ccaagctagg tcttgcccta gctgcggtca cccctggtct 5700
gataatcttg gcagtgggac tctacaggta cttctctggc tctgatgcag accaagaaga 5760
aacagaaagt gagggatctg tcaaggcacc caggagcgaa aatgcttatg acggcccgaa 5820
gaaaaactct aagccccctg gagcactctc tctcatggaa atgcaacagc ccaacgtgga 5880
catgggcttt gaggctgcgg tcgctaagaa agtggtcgct ccctattact tcatggttcc 5940
caacagacct tctgggctta cacagtccgc tcttctggtg accggccgga ccttccta 6000
caatgaacat acatggtcca atccctcctg gaccagcttc acaatccgcg gtgaggtaca 6060
cactcgtgat gagcccttcc aaacggttca tttcactcac cacggtattc ccacagatct 6120
gatgatggta cgtctcggac cgggcaattc tttccctaac aatctagaca agtttggact 6180
tgaccagatg ccggcacgca actcccgtgt ggttggcggt tcgtccagtt acggaaactt 6240
cttcttctct ggaaatttcc tcggatttgt tgattccatc acctctgaac aaggaactta 6300
cgcaagactc tttaggtaca gggtgacgac ctacaaagga tgggtcggct cggccctggt 6360
ctgtgaggcc ggtggcgctc gacgcatcat tggcctgcat tctgctggcg ccgccggtat 6420
cggcgccggg acctatatct caaaattagg actaatcaaa gccctgaaac acctcggtga 6480
acctttggcc acaatgcaag gactgatgac tgaattagag cctggaatca ccgtacatgt 6540
accccggaat tccaaattga gaaagacgac cgcacacgcg gtgtacaaac cggagtttga 6600
gcctgctgtg ttgtcaaaat ttgatcccag actgaacaag gatgttgact tggatgaagt 6660
aatttgggtc aaacacactg ccaatgtccc ttaccaacct ctttgttct acacatacat 6720
gtcagagtac gctcatcgag tcttctcctt cttggggaaa gacaatgaca ttctgaccgt 6780
caaagaagca attctgggca tccccggact agaccccatg gatccccaca cagctccggg 6840
tctgccttac gccatcaacg gccttcgacg tactgatctc gtcgattttg tgaacggtac 6900

agtagatgcg gcgctggctg tacaaatcca gaaattctta gacggtgact actctgacca 6960
 tgtcttccaa acttttctga aagatgagat cagaccctca gagaaagtcc gagcgggaaa 7020
 aacccgcatt gttgatgtgc cctccctggc gcattgcatt gtgggcagaa tgttgcttgg 7080
 gcgctttgct gccaagtttc aatcccatcc tggctttctc ctcggtcttg ctatcgggtc 7140
 tgaccctgat gttttctgga ccgtcatagg ggctcaactc gaggggagaa agaacacgta 7200
 tgacgtggac tacagtgcct ttgactcttc acacggcact ggctccttcg aggctctcat 7260
 ctctcacttt ttcaccgtgg acaatggttt tagccctgcg ctgggaccgt atctcagatc 7320
 cctggctgtc tcggtgcacg cttacggcga gcgtcgcac aagattaccg gtggcctccc 7380
 ctccggttgt gccgcgacca gcctgctgaa cacagtgtc aacaatgtga tcatcaggac 7440
 tgctctggca ttgacttaca aggaatttga atatgacatg gttgatata tgcctacgg 7500
 tgacgacctt ctggttggca cggattacga tctggacttc aatgaggtgg cagcagcgc 7560
 tgccaagttg gggataaaga tgactcctgc caacaagggt tctgtcttcc ctccgacttc 7620
 ctctctttcc gatgctgttt ttctaaagcg caaattcgtc caaaacaacg acggcttata 7680
 caaaccagtt atggatttaa agaatttggga agccatgtc tcctacttca aaccaggaac 7740
 actactcgag aagctgcaat ctgtttctat gttggctcaa cattctggaa aagaagaata 7800
 tgatagattg atgcaccctc tcgtgacta cggtgccgta ccgagtcacg agtacctgca 7860
 ggcaagatgg agggccttgt tcgactgacc cagatagccc aaggcgcttc ggtgctgccg 7920
 gcgattctgg gagaactcag tcggaacaga aaaggga aaa aaaaaaaa 7980
 aaaaaaggcc ggcatgttcc cagcctctc gctggcgccg gctgggcaac atgcttcggc 8040
 atggcgaatg ggacgcggcc gctcgagtct agagggccg tttaaaccg ctgatcagcc 8100

t 8101

<210> 26

<211> 713

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 修饰的CVA21 5' UTR

<400> 26

ttaaaacagc tctggggttg ttcccacccc agaggccac gtggcggcta gtactctggt 60
 attacgttac ctttgtacgc ctgttttcta tcccttcccc cgtaacttta gaagcttata 120
 aaaagttcaa tagcaggggt acaaaccagt acctctacga acaagcactt ctgtttcccc 180
 ggtgatata catagactgt acccacggc aaaagtgatt gatccgttat ccgcttgagt 240
 acttcgagaa gcctagtata accttgaat cttcgatgcg ttgcgctcaa cactctgccc 300
 cgagtgtagc ttaggtgat gactctgggc actccccacc ggcgacggtg gccaggtg 360
 cgttggcggc ctacccatgg ctgatgccgt gggacgctag ttgtgaacaa ggtgtgaaga 420
 gcctattgag ctactcaaga gtcctccggc ccctgaatgc ggctaatect aaccacggag 480
 caaccgtca caaccagtg agtaggttgt cgtaatgcgt aagtctgttg cggaaccgac 540
 tactttgggt gtccgtgttt ccctttatat tcatactggc tgcttatggt gacaatttac 600
 aaattgttac catatagcta ttggattggc caccagtat tgtgcaatat atttgagtgt 660

ttctttcata agccttatta acatcacatt tttaatcaca ataaacagtg caa 713

<210> 27

<211> 7435

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 修饰的CVA21

<400> 27

ttaaaacagc tctggggttg ttcccacccc agaggccac gtggcggcta gtactctggt 60
 attacgttac ctttgtacgc ctgttttgta tcccttcccc cgtaacttta gaagcttata 120
 aaaagttcaa tagcaggggt acaaaccagt acctctacga acaagcactt ctgtttcccc 180
 ggtgatata catagactgt acccacggtc aaaagtgatt gatccgttat ccgcttgagt 240
 acttcgagaa gcctagtata accttggaat cttcgatgcg ttgcgctcaa cactctgccc 300
 cgagtgtagc ttaggctgat gagtctgggc actccccacc ggcgacggtg gccaggtg 360
 cgttggcggc ctacccatgg ctgatgccgt gggacgctag ttgtgaacaa ggtgtgaaga 420
 gcctattgag ctactcaaga gtccctccggc ccctgaatgc ggctaatact aaccacggag 480
 caaccgtca caaccagtg agtaggttgt cgtaatgcgt aagtctgttg cggaaccgac 540
 tactttgggt gtccgtgttt ccctttatat tcatactggc tgcttatggt gacaatttac 600
 aaattgttac catatagcta ttggattggc caccagtat tgtgcaatat atttgagtgt 660
 ttctttcata agccttatta acatcacatt tttaatcaca ataaacagtg caaatggggg 720
 ctcaagtttc aacgcaaaag accggtgcgc acgagaatca aaacgtggca gccaatggat 780
 ccaccattaa ttacactact atcaactatt acaaagacag tgcgagtaat tccgctacta 840
 gacaagacct ctccaagat ccatcaaaat tcacagaacc ggttaaggac ttaatgttga 900
 aaacagcacc agctctaaac tcgcctaacg tggaagcatg tgggtacagt gaccgtgtga 960
 ggcaaatcac tttaggcaac tcgactatta ctacacaaga agcagccaat gctattgttg 1020
 cttacgggtga atggcccact tacataaatg attcagaagc taatccggta gatgcacca 1080
 ctgagccaga cgtagtagc aaccggtttt acaccctaga atcggtgtct tggaagacca 1140
 cttcaagggg atggtggttg aagttaccag attgtttgaa ggacatggga atgtttggtc 1200
 agaatatgta ctatcactac ttggggcgct ctggttacac cattcatgtc cagtgcacac 1260
 cttcaaaatt tcaccaaggg gcgttaggag tttttctgat accagagttt gtcattggctt 1320
 gcaacactga gagtaaaacg tcatacgttt catacatcaa tgcaaatcct ggtgagagag 1380
 gcggtgagtt tacgaacacc tacaatccgt caaatacaga cgccagttag ggcagaaagt 1440
 ttgcagcatt ggattatttg ctgggttctg gtgttctagc aggaaacgcc tttgtgtacc 1500
 cgcaccagat catcaaccta cgtaccaaca acagtgcac aattgtggtg ccatacgtaa 1560
 actcacttgt gattgattgt atggcaaac acaataactg gggcattgtc atattaccac 1620
 tggcaccctt ggcttttgcc gcaacatcgt caccacaggt gcctattaca gtgaccattg 1680
 caccatgtg tacagaattc aatgggttga gaaacatcac cgtcccagta catcaagggt 1740
 tgccgacaat gaacacacct ggttccaatc aattccttac atctgatgac ttccagtcgc 1800
 cctgtgcctt acctaatatt gatgttactc caccaatata cataccggg gaagtaaaga 1860

atatgatgga actagctgaa attgacacat tgatcccaat gaacgcagtg gacgggaagg 1920
tgaacacaat ggagatgtat caaataccat tgaatgacaa tttgagcaag gcacctatat 1980
tctgtttatc cctatcacct gcttctgata aacgactgag ccgcaccatg ttgggtgaaa 2040
tcctaaatta ttacacccat tggacggggt ccatcagggt cacctttcta ttttgtggta 2100
gtatgatggc cactggtaaa ctgctcctca gctattcccc accgggagct aaaccaccaa 2160
ccaatcgcaa ggatgcaatg ctaggcacac acatcatctg ggacctaggg ttacaatcca 2220
gttgttccat ggttgaccg tggatctcca acacagtgt cagacgggtg gcacgtgatg 2280
acttactga gggcggattt ataacttgct tctatcaaac tagaattgtg gtacctgctt 2340
caacccctac cagtatgttc atgttaggct ttgttagtgc gtgtccagac ttcagtgtca 2400
gactgcttag ggacactccc catattagtc aatcgaaact aataggacgt acacaaggca 2460
ttgaagacct cattgacaca gcgataaaga atgccttaag agtgtcccaa ccaccctcga 2520
cccagtcaac tgaagcaact agtggagtga atagccagga ggtgccagct ctaactgctg 2580
tggaacagg agcatctggt caagcaatcc ccagtgatgt ggtggaaact aggcacgtgg 2640
taaattacaa aaccaggctt gaatcgtgtc ttgagtcatt ctttgggaga gctgcgtgtg 2700
tcacaatcct atccttgacc aactcctcca agagcggaga ggagaaaaag catttcaaca 2760
tatggaatat tacatacacc gacactgtcc agttacgcag aaaattagag tttttcacgt 2820
attccagggt tgatcttgaa atgacttttg tattcacaga gaactatcct agtacagcca 2880
gtggagaagt gcgaaaccag gtgtaccaga tcatgtatat tccaccaggg gcaccccgcc 2940
catcatcctg ggatgactac acatggcaat cctcttcaaa cccttccatc ttctacatgt 3000
atggaaatgc acctccacgg atgtcaattc cttacgtagg gattgccaat gcctattcac 3060
acttctacga tggctttgca cgggtgccac ttgagggtga gaacaccgat gctggcgaca 3120
cgttttacgg tttagtgtcc ataaatgatt ttggagtttt agcagttaga gcagtaaacc 3180
gcagtaatcc acatacaata cacacatctg tgagagtgt catgaaacca aaacacattc 3240
ggtgttggtg ccccagacct cctcgagctg tattatacag gggagaggga gtggacatga 3300
tatccagtgc aattctacct ctgaccaagg tagactcaat taccactttt gggtttggtc 3360
atcagaacaa agcagtgtac gttgccggtt acaagatttg caactaccac ctagcaaccc 3420
caagtgatca cttgaatgca attagtatgt tatgggacag ggatttaatg gtggtggaat 3480
ctagagccca gggaactgat accatcgcca gatgtagtgt caggtgtgga gtttactatt 3540
gtgaatctag gaggaagtac taccctgtca cttttactgg cccaacgttt cgattcatgg 3600
aagcaaacga ctactatcca gcaagatacc agtctcatat gctgataggg tgcggatttg 3660
cagaacccgg ggactgcggt gggatactga ggtgcactca tggggtaatt ggtatcatta 3720
ctgcaggagg tgaaggggta gtagcctttg ctgacattag agacctctgg gtgtatgaag 3780
aggaggccat ggaacaggga ataacaagct acatcgaatc tctcggcaca gcctttggcg 3840
cagggttcac ccacacaatc agtgagaaag tgactgaatt gacaacaatg gttaccagca 3900
ctatcacaga aaaactactg aaaaacttgg tgaaaatagt gtcggctcta gtgattgttg 3960
tgagaaatta tgaggacact accacgatcc ttgcaacact agcactactc ggggtgtgata 4020
tatctccttg gcaatggttg aagaagaagg catgtgactt actagagatt ctttatgtga 4080
tgcgccaagg tgatgggtgg atgaagaaat tcacagaggc gtgcaatgca gctaaaggct 4140
tagagtggat tagcaacaaa atttccaagt ttatagattg gttgaagtgt aaaattatcc 4200

cagacgctaa ggacaaggtg gaattttctca ccaagttgaa acagctagac atgttggaag 4260
atcaaattgc aaccatccac caatcttgcc ccagccaaga acaacaagag attcttttca 4320
acaatgtgag atggctagca gtccagtccc gtcggtttgc accattatac gctgtggagg 4380
cacgccgaat taacaaaatg gagagcacia taaacaatta tatacagttc aagagcaaac 4440
accgtattga accagtatgt atgctcattc atgggtcacc agggacgggt aaatctatag 4500
ctacttcatt aataggtaga gcaatagcag agaaggaaag cacatcagtc tattcaatgc 4560
cacctgaccc atctcacttt gatggctata aacaacaagg ggtagtatt atggacgacc 4620
taaaccaaaa ccccgatggt atggacatga aactgttttg ccaaattggt tcaacagtgg 4680
agttttattcc tccaatggcc tcattagagg agaaggcat tttgtttaca tctgattatg 4740
tcctggcttc taccaactct cattcaattg taccaccac agtggctcac agtgatgcct 4800
taaccagacg atttgcattt gatgtggagg ttacacgat gtctgaacat tcagtcaaag 4860
gcaaaactgaa tatggccacg gccactcaat tgtgtaagga ttgtccaaca cctgcaaatt 4920
ttaaaaagtg ttgccctctc gtttgtggaa aggccttgca attaatggac aggtacacca 4980
gacaaaggtt cactgtagat gagattacca cattaatcat gaatgagaaa aacagaaggg 5040
ccaatatcgg caattgcatg gaagccttgt ttcaaggacc attaatgtat aaagatttga 5100
agatcgatgt gaagacagtt cccccctg agtgcacag tgattttgta caagcagtgg 5160
attctcaaga ggtagggat tactgtgaga agaaaggctg gatcgtaac gttactagcc 5220
agattcaact agaaaggaac atcaataggg ccatgactat actccaagct gttaccacat 5280
tcgcagcagt cgcaggagta gtgtatgtaa tgtacaaact cttcgccggt caacagggtg 5340
catacactgg ctgccaac aaaaaacca atgtccctac tatcagagtc gctaaagtcc 5400
aggggccagg atttgactac gcagtggcaa tggcaaaaag aaacatagtt actgcaacca 5460
ccaccaaggg tgaatttacc atgctagggg tgcataata ttagcaata ttgccaaccc 5520
atgccgctcc aggagaaacc attattattg atgggaaaga agtagagatc ctagatgcca 5580
gagccttaga agatcaagcg ggaaccaatc ttgagatcac cattattact ctaaaaagaa 5640
atgagaagtt tagagacatc agatcacata ttcccacca aattactgaa actaacgatg 5700
gagtgttgat cgtgaacact agcaagtacc ccaatatgta tgtccccgtt ggtgctgtga 5760
ccgaacaggg atatcttaat ctcatgggac gtcaaactgc tcgcacttta atgtacaact 5820
ttccaacaag ggcaggccag tgcggaggaa tcatcacttg tactggcaaa gtcattggga 5880
tgcatgttgg cgggaacggt tcacatgggt ttgcagcagc cctcaagcga tcatacttca 5940
ctcaaaaatca gggcgaaaatc cagtggatga ggtcatcaaa agaagtgggg taccacatta 6000
taaagtcccc atccaagaca aagttagaac ccagtgtttt ccactatgtt tttgaagggtg 6060
ttaaggaacc agctgtactc actaagaatg accccagact aaaaacagat tttgaagaag 6120
ccatcttttc taaatatgtg gggaacaaaa ttactgaagt ggacgagtag atgaaagaag 6180
cagtggatca ctatgcagga cagttaatgt cactggatat caacacagaa cagatgtgcc 6240
tgaggatgc catgtacggc accgatggtc ttgaggccct ggatcttagc actagtgtg 6300
gatatcctta tgttgcaatg gggaaaaaga aaagagacat tctagataaa cagaccagag 6360
atactaagga gatgcagaga cttttagata cctatggaat caatctacca ttagtcacgt 6420
acgtgaaaga tgaactcagg tcaaagacta aagtgaaca aggaaagtca agattgattg 6480
aagcttccag ccttaatgat tcagttgcaa tgagaatggc ctttggcaat ctttacgcag 6540

ctttccacaa gaatccaggt gtggtgacag gatcagcagt tggttgtgac ccagatttgt 6600
tttggagtaa gataccagtg ctaatggaag aaaaactctt cgcttttgac tacacagggt 6660
atgatgcctc actcagccct gcttggtttg aagctcttaa aatgggtgta gaaaaaattg 6720
gatttggcag tagagtagac tatatagact acctgaacca ctctcaccac ctttacaaaa 6780
acaagactta ttgtgtcaaa ggcggcatgc catccggctg ctctggcacc tcaattttca 6840
actcaatgat taacaacctg atcattagga cgcttttact gagaacctac aagggcatag 6900
acttggacca tttaaaaatg attgcctatg gtgatgacgt gatagcttcc taccctcatg 6960
aggttgacgc tagtctccta gcccaatcag gaaaagacta tggactaacc atgactccag 7020
cagataaatc agtaaccttt gaaacagtca catggggagaa tgtaacattt ctgaaaagat 7080
ttttcagagc agatgagaag tatccattcc tgggtgcatcc agtgatgcca atgaaagaaa 7140
ttcacgaatc aatcagatgg accaaggacc ctagaaacac acaggatcac gtacgctcgt 7200
tgtgcctatt agcttggcac aacgggtgaag aagaatacaa taaattttta gctaaaatca 7260
gaagtgtgcc aatcggaaga gctttattgc tcccagagta ctctacattg taccgccgat 7320
ggctcgactc attttagtaa ccctacctca gtcggattgg attgggttat actgtttag 7380
gggtaaatth ttctttaatt cgagagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 7435

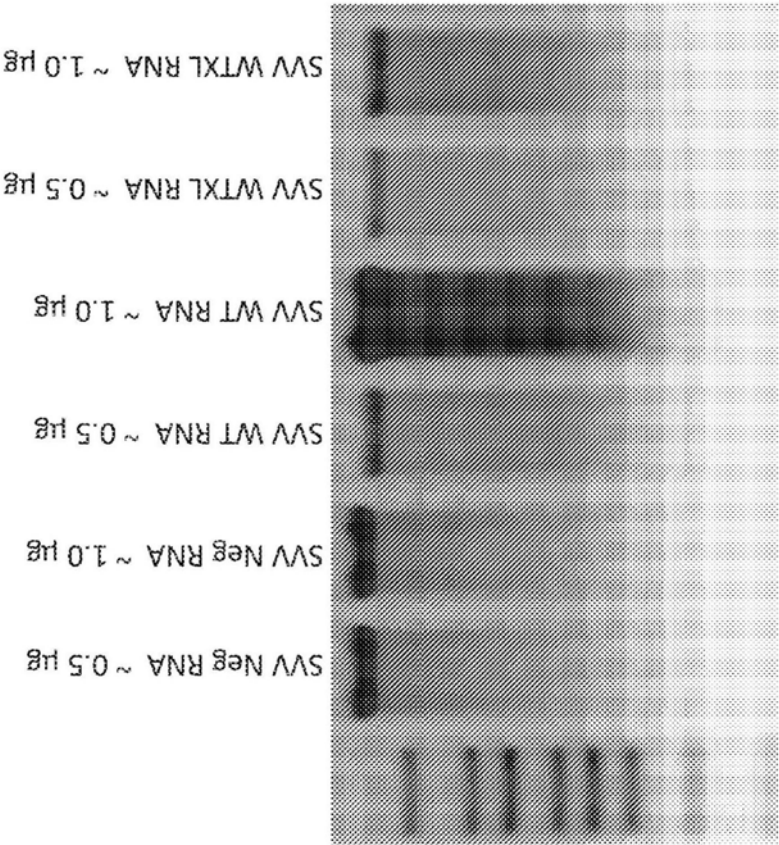


图1A

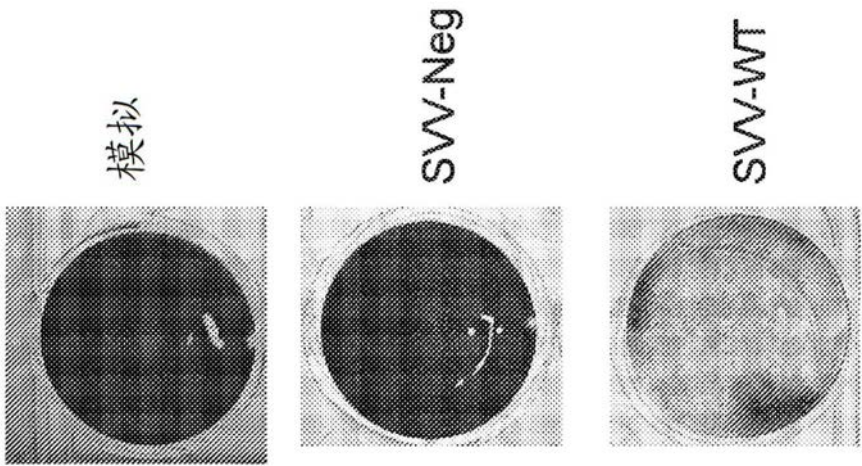


图1B

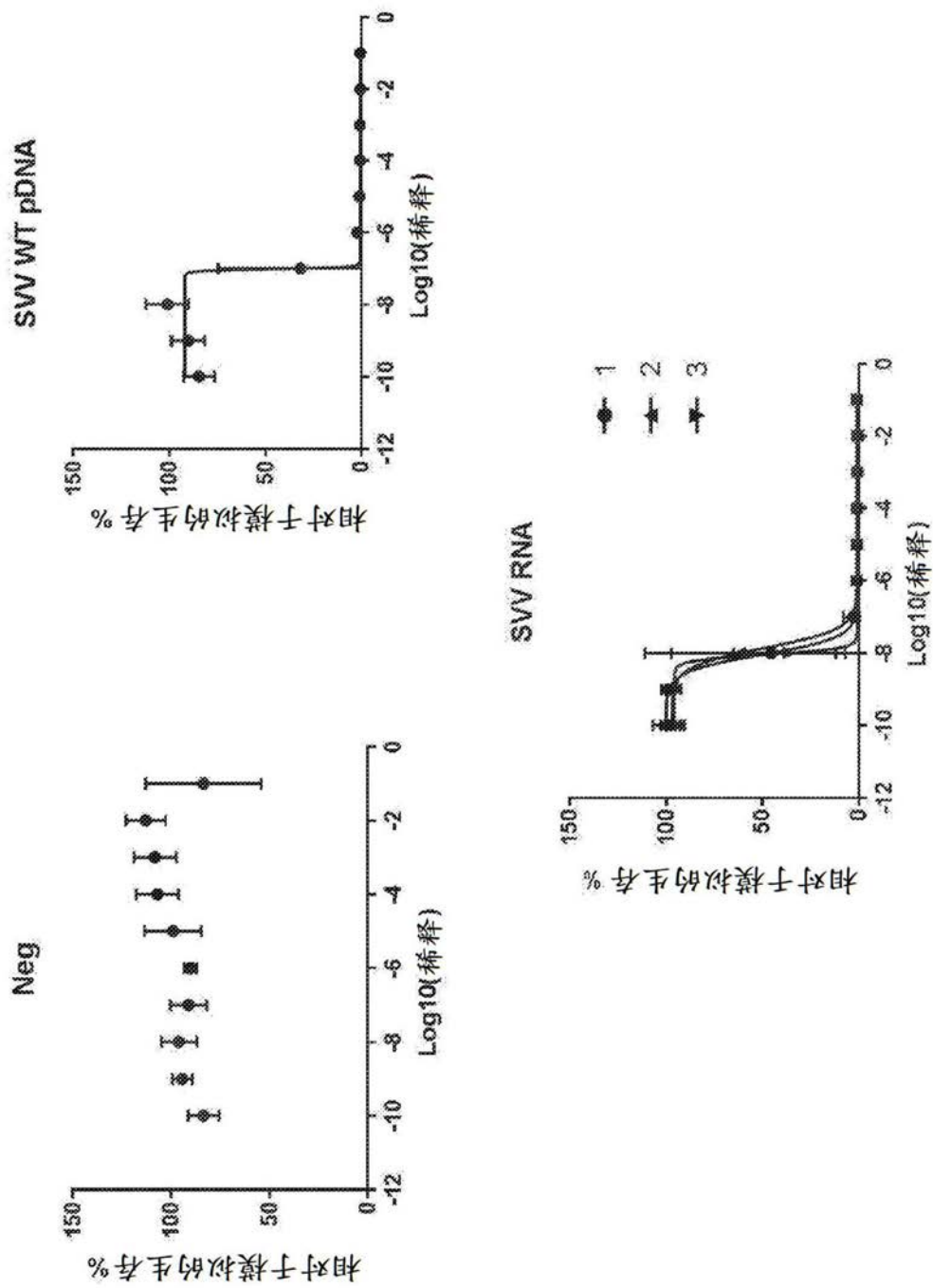


图2

制剂	RNA	N/P 比率	缓冲液	脂质组成							物理表征		
				可电离的 脂质	%	Chol%	辅助 脂质	%	PEG	%	Z-平均值 (d.nm)	pdl	ZP (mV)
70032-1.C	SVV-WT- RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	148	0.15	1.4
70032-2.C	SVV-WT- RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	38.5%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	1.5%	99	0.36	1.4
70032-3.C	SVV-WT- RNA	5	PB, pH 5.8	MC3	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	169	0.14	-1.6
70032-4.C	SVV-WT- RNA	3	PB, pH 5.8	MC3	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	208	0.07	2.0
70032-5.D	SVV-WT- RNA	5.33	PB, pH 7.4	DOTAP	50%	34.8%	DLPE	15%	DSPE-PEG5K	0.2%	383	0.22	-8.8
70041-2.C	SVV-WT- RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-EC	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	104	0.06	-2.1
70041-3.C	SVV-WT- RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	124	0.05	0.5
70041-4.C	SVV-WT- RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-OC	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	134	0.04	-1.9
70046-4	SVV-WT- RNA	9	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-EC	56%	28%	DOPC	9%	DSG-PEG5K	7%	235	0.10	-1.0
70046-5	SVV-WT- RNA	9	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	56%	28%	DOPC	9%	DSG-PEG5K	7%	127	0.05	-3.0
70046-6	SVV-WT- RNA	9	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-OC	56%	28%	DOPC	9%	DSG-PEG5K	7%	131	0.07	-0.9

图3A

制剂	RNA	N/P 比率	缓冲液	脂质组成							物理表征			%EE
				可电离的 脂质	%	Chol%	辅助 脂质	%	PEG	%	Z-平均值 (d.nm)	Pdl	ZP (mV)	
70059-1	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-EC	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	166	0.22	-1.8	80.82
70059-2	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-EC	49%	39.5%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.5%	116	0.24	-1.4	92.33
70059-3	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-EC	49%	39%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	1%	133	0.22	-1.2	88.06
70065-2.C	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	49%	39.5%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	0.5%	153	0.21	-0.8	84%
70065-3.C	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	49%	39%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	1%	181	0.23	0	62%
70065-4.C	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	49%	38.5%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	1.5%	197	0.34	-2	44%
70065-5.C	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	49%	39.5%	DSPC	11%	DMG-PEG5K	0.5%	158	0.13	-1.3	30%
70065-6.C	SVV-WT-RNA	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	SS-LC	49%	39%	DSPC	11%	DMG-PEG5K	1%	144	0.15	-3	32%
70070-1.C	SVV-WT-RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE-PEG5K	0.2%	237	0.10	-0.8	80
70070-4.C	SVV-WT-RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	39.8%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	0.2%	442	0.22	0.0	87
70070-5.C	SVV-WT-RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	38%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	2%	132	0.29	-0.4	92
70070-6.C	SVV-WT-RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	35%	DSPC	11%	DMG-PEG2K	5%	87	0.18	0.0	68

图3B

制剂	RNA	N/P 比率	缓冲液	脂质组成							物理表征			%EE
				可电离的 脂质	%	Chol%	辅助 脂质	%	PEG	%	Z-平均值 (d.nm)	Pdi	ZP (mV)	
80016-1.C	SVV-S177- RNA	7	PB, pH 5.8	MC3	49%	39.8%	DSPC	11%	DSPE- PEG5K	0.2%	231.5	0.12	-2.2	91%
80016-2.C	SVV-S177- RNA	7	MB, pH 3.0	MC3	49%	28.5%	DSPC	22%	DPG- PEG2K	0.5%	131.0	0.18	-6.5	96%
80016-3.C	SVV-S177- RNA	5.5	MB, pH 3.0	OC	49%	26.5%	DSPC	22%	DPG- PEG2K	0.5%	84.7	0.14	-13.4	83%
80016-6.C	SVV-S177- RNA	7	MB, pH 3.0	OC	49%	28.5%	DSPC	22%	DPG- PEG2K	0.5%	94.9	0.14	-12.1	93%
80016-7.C	SVV-S177- RNA	7	MB, pH 3.0	OC	49%	27.5%	DSPC	22%	DPG- PEG2K	1.5%	92.1	0.18	-19.6	92%
80016-9.C	SVV-S177- RNA	7	MB, pH 3.0	L-319	49%	28.5%	DSPC	22%	DMG- PEG2K	0.2%	155.0	0.17	-9.4	22%
80016-10.C	SVV-S177- RNA	7	MB, pH 3.0	L-319	49%	27.5%	DSPC	22%	DMG- PEG2K	1.5%	108.6	0.19	-9.2	34%
80016-11.C	SVV-S177- RNA	7	MB, pH 3.0	L-319	49%	26.5%	DSPC	22%	DMG- PEG2K	2.5%	123.8	0.18	-8.9	19%

图3C

制剂	RNA	N/P 比率	缓冲液	脂质组成							ζ 粒度仪数据			%EE
				可电离的 脂质	%	Chol%	辅助 脂质	%	PEG	%	Z- 平均值 (d.nm)	Pdl	ZP (mV)	
80048-1.C	SVV- S177A	9	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	35.5%	DSPC	15%	DPG- PEG2K	0.5%	106.4	0.133	-15.7	90%
80048-2.C	SVV- S177A	5	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	28.5%	DSPC	22%	DPG- PEG2K	0.5%	96.4	0.145	-19.4	89%
80048-3.C	SVV- S177A	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	21.5%	DSPC	29%	DPG- PEG2K	0.5%	99.9	0.196	-6.5	95%
80048-4.C	SVV- S177A	5	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	21.5%	DOPE	29%	DPG- PEG2K	0.5%	219.2	0.110	-6.3	29%
80048-5.C	SVV- S177A	9	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	28.5%	DOPE	22%	DPG- PEG2K	0.5%	257.0	0.093	-2.9	20%
80048-6.C	SVV- S177A	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	35.5%	DOPE	15%	DPG- PEG2K	0.5%	257.7	0.119	-6.6	28%
80048-7.C	SVV- S177A	5	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	35.5%	DLPE	15%	DPG- PEG2K	0.5%	186.1	0.143	-7.9	61%
80048-8.C	SVV- S177A	7	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	28.5%	DLPE	22%	DPG- PEG2K	0.5%	172.1	0.197	-6.7	72%
80048-9.C	SVV- S177A	9	苹果酸缓冲液, pH3.0	OC	49%	21.5%	DLPE	29%	DPG- PEG2K	0.5%	153.9	0.216	-5.4	84%

图3D

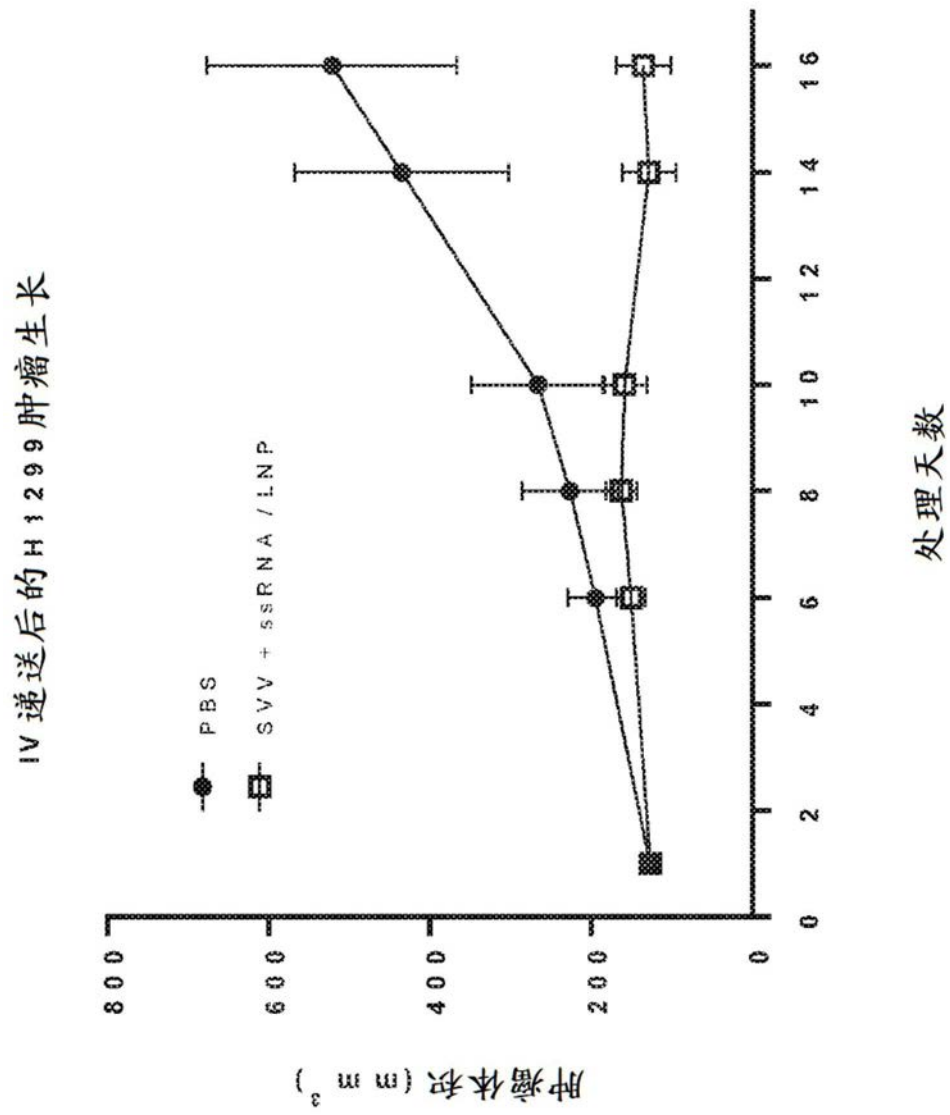


图4A

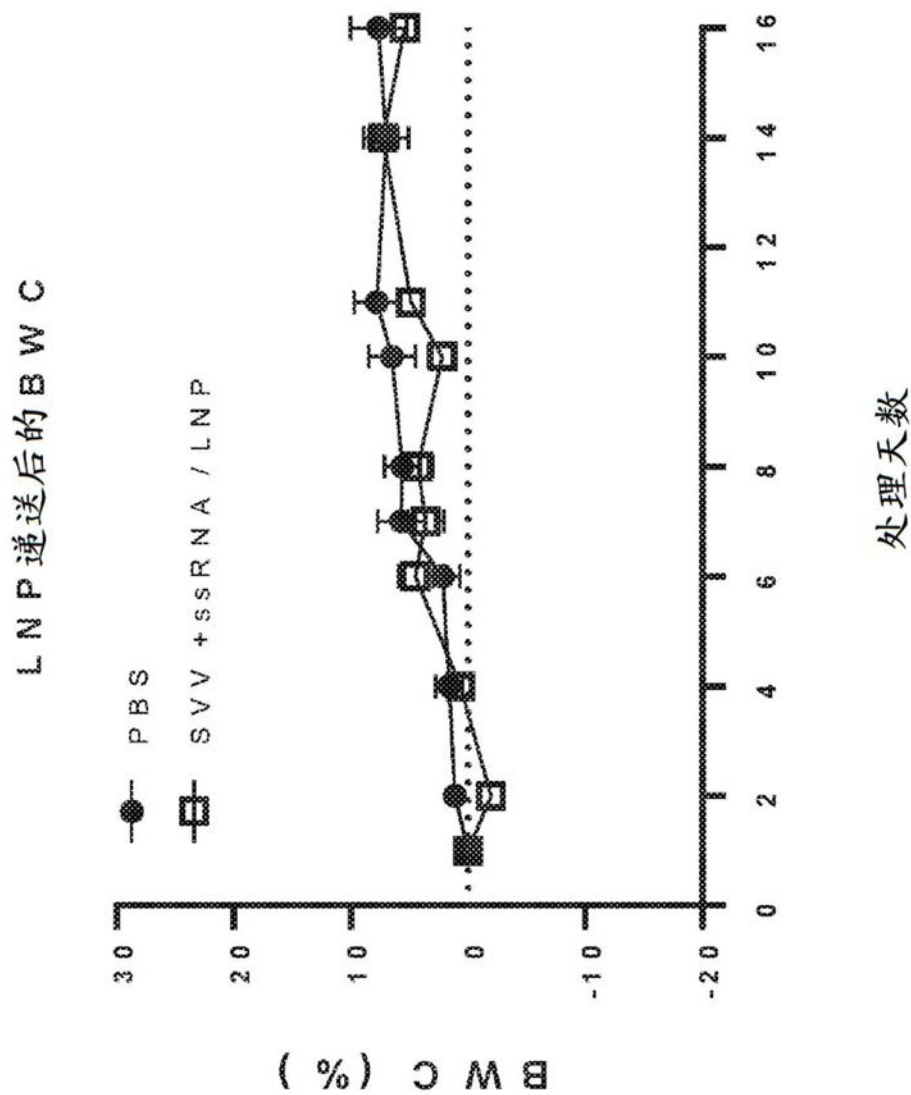


图4B

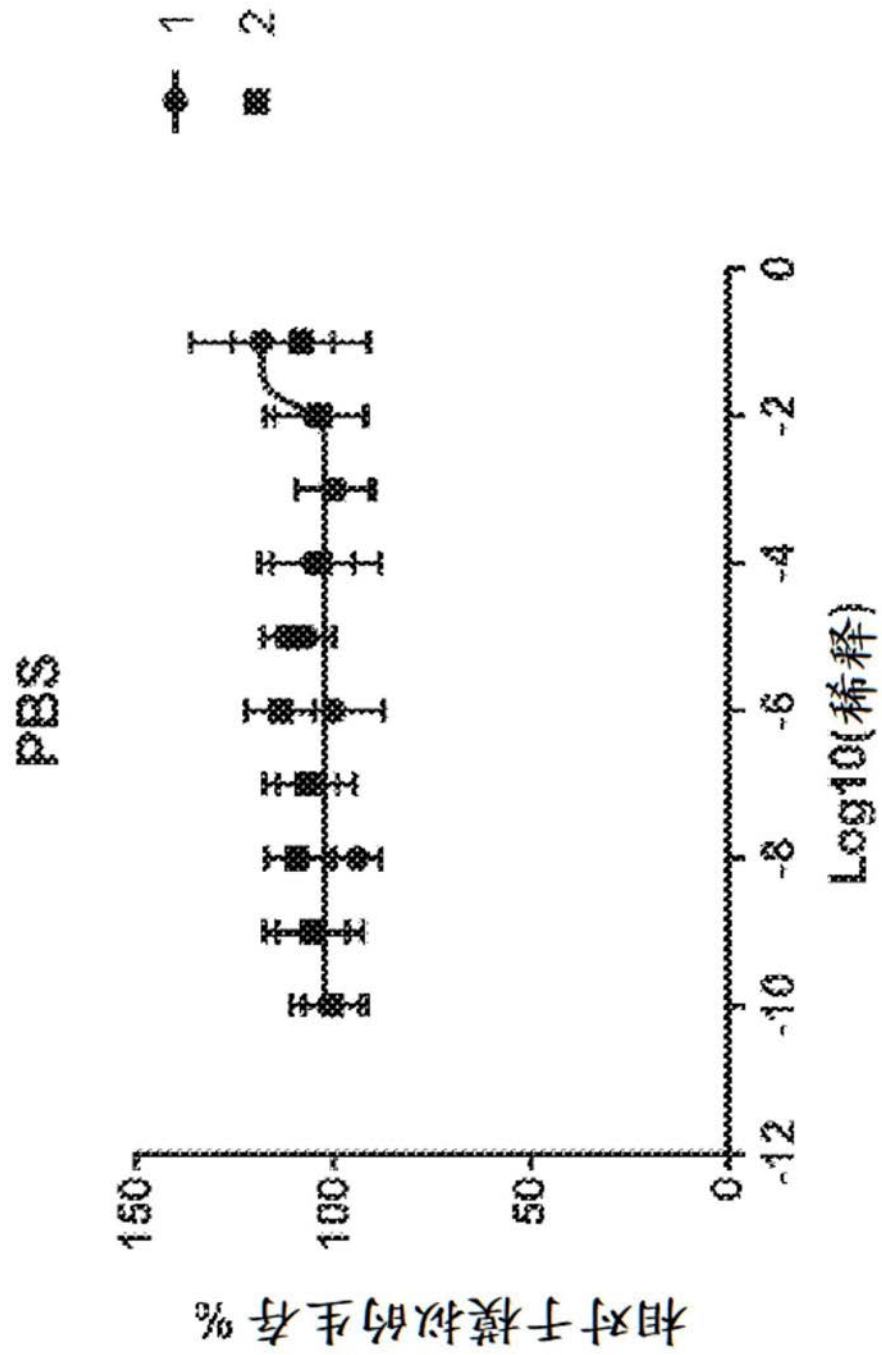


图5A

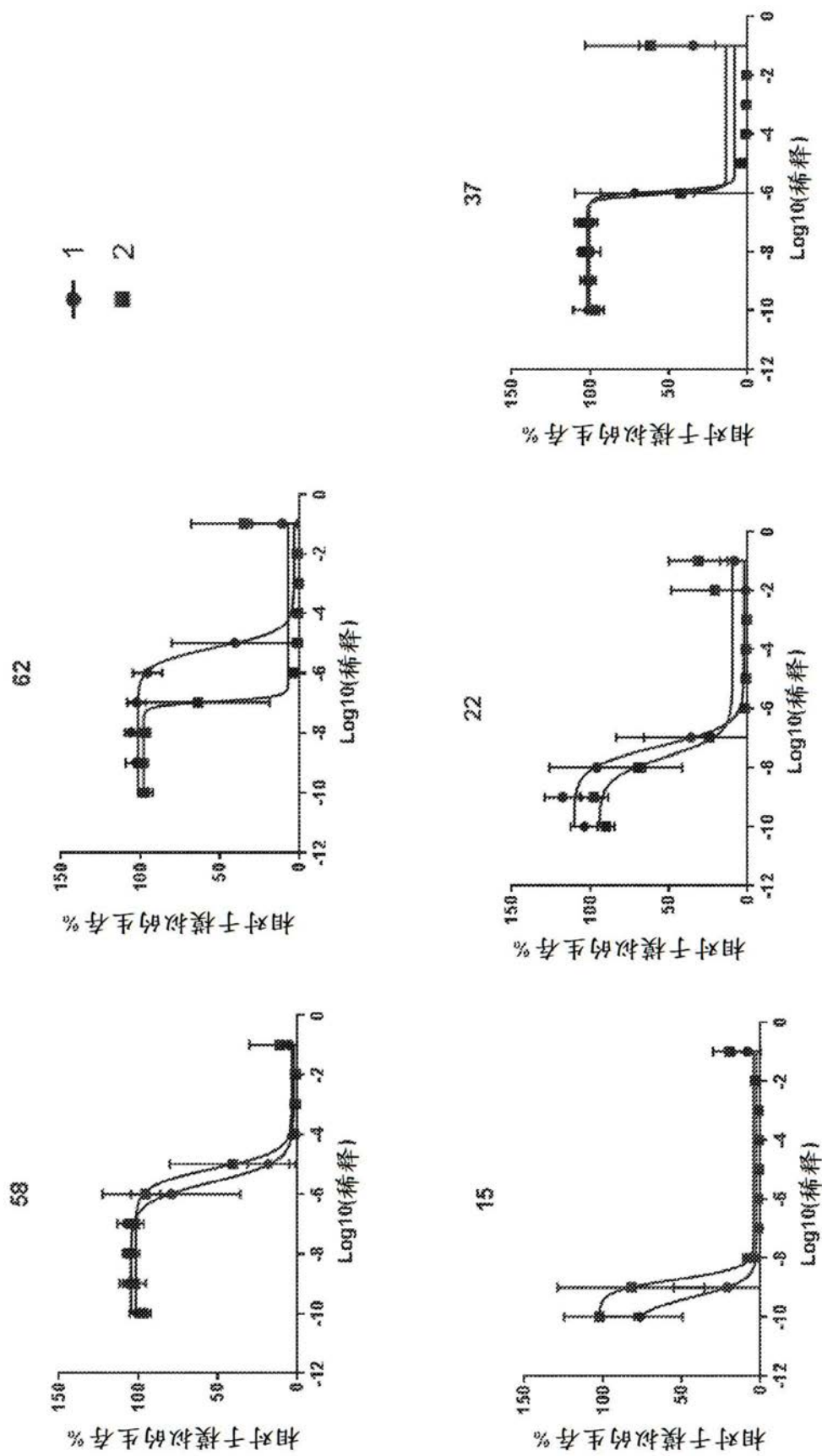


图5B

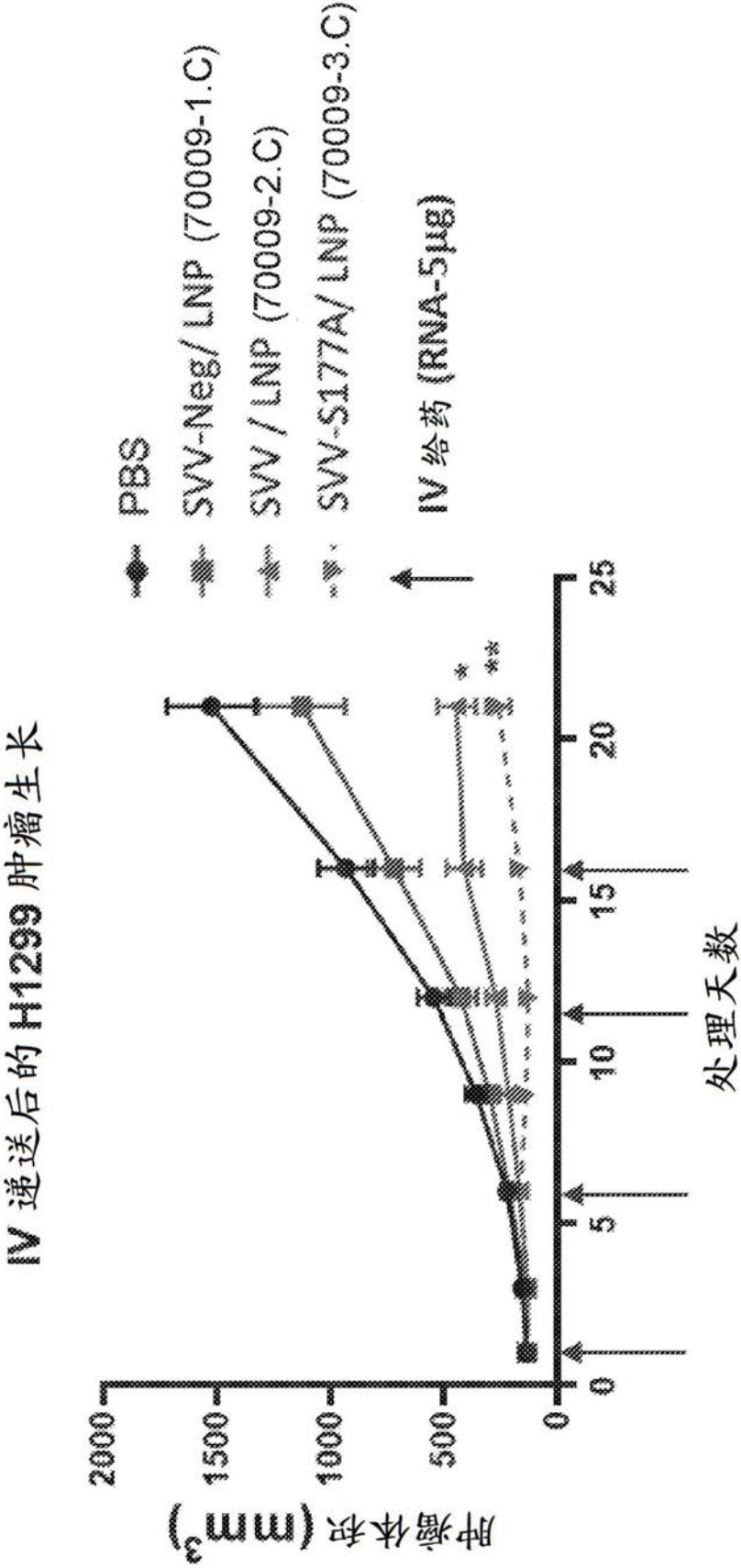


图6A

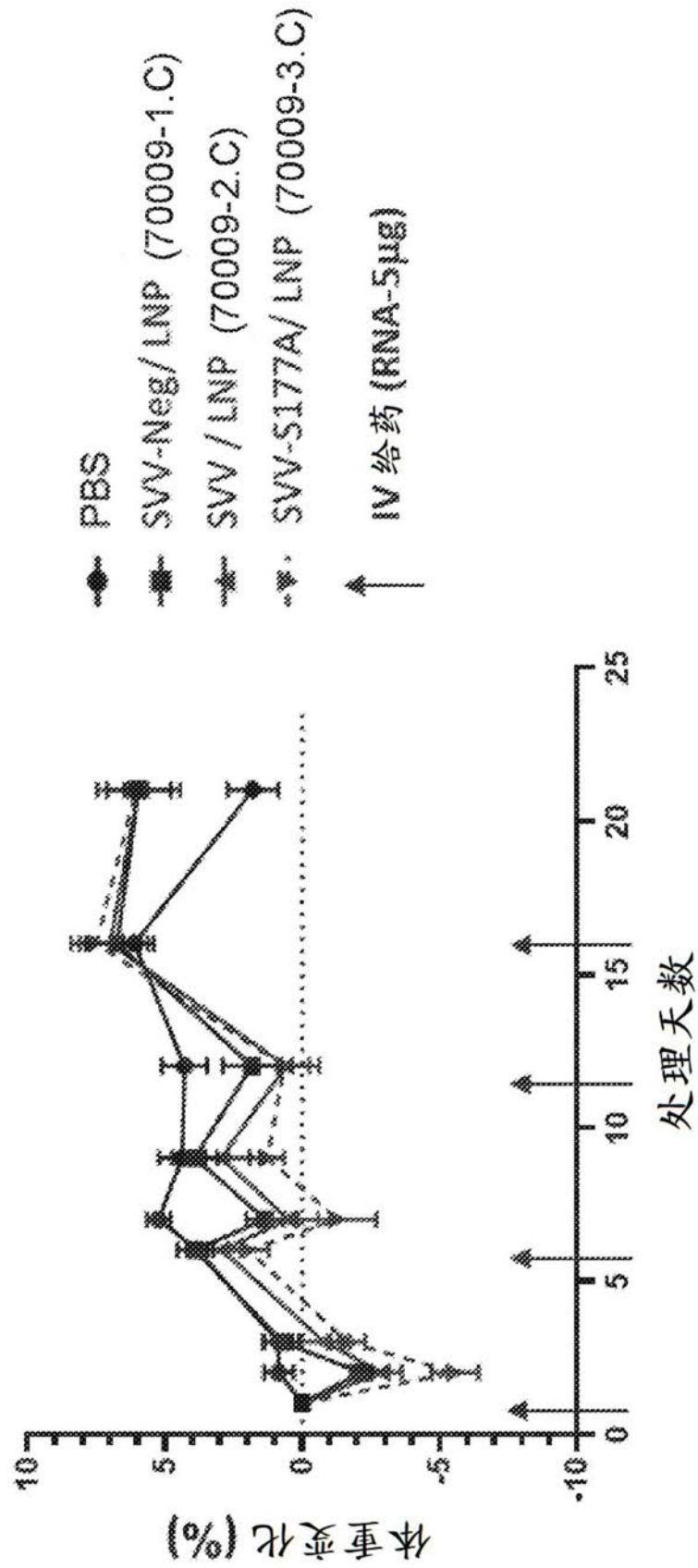


图6B

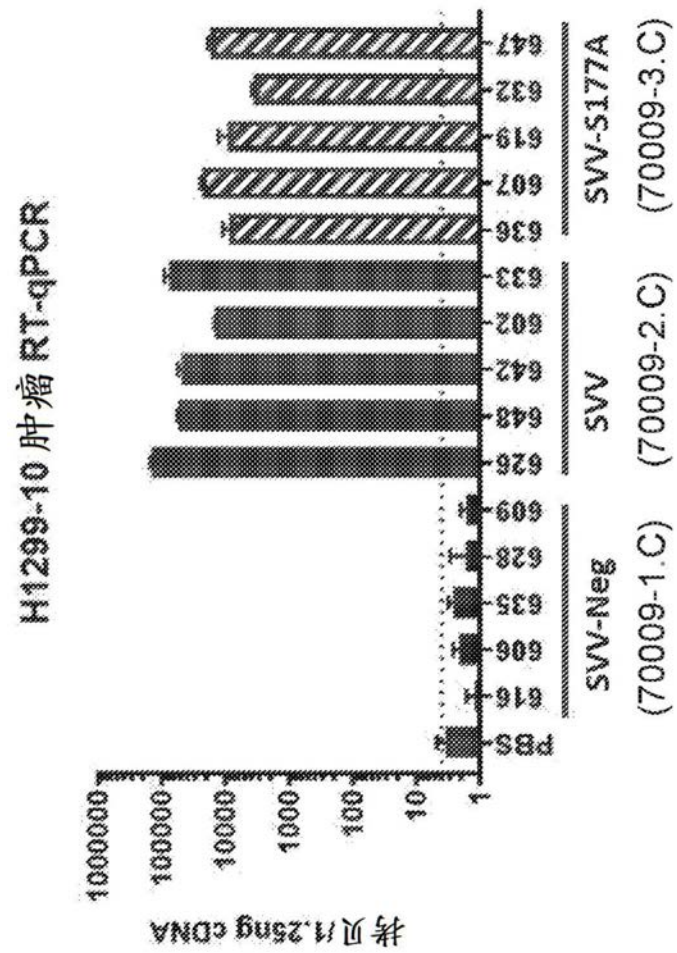


图6C

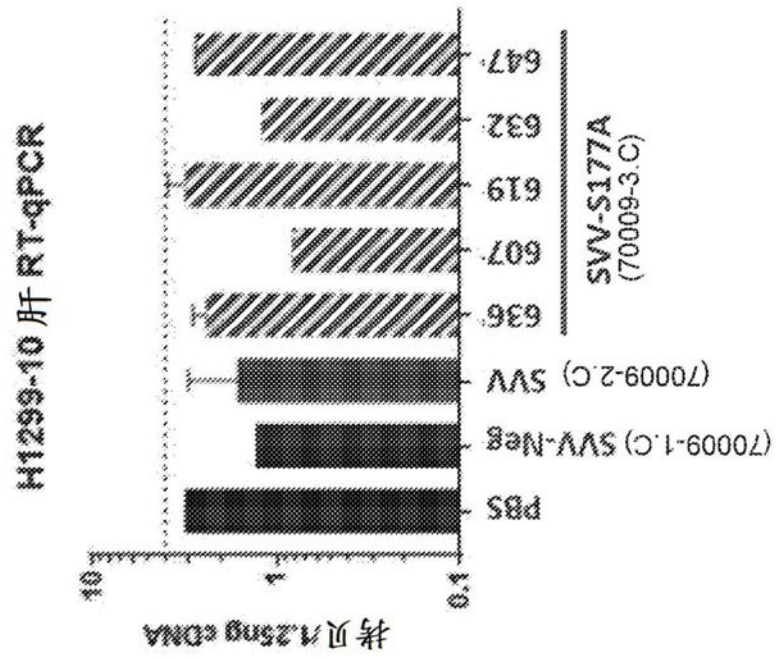


图6D

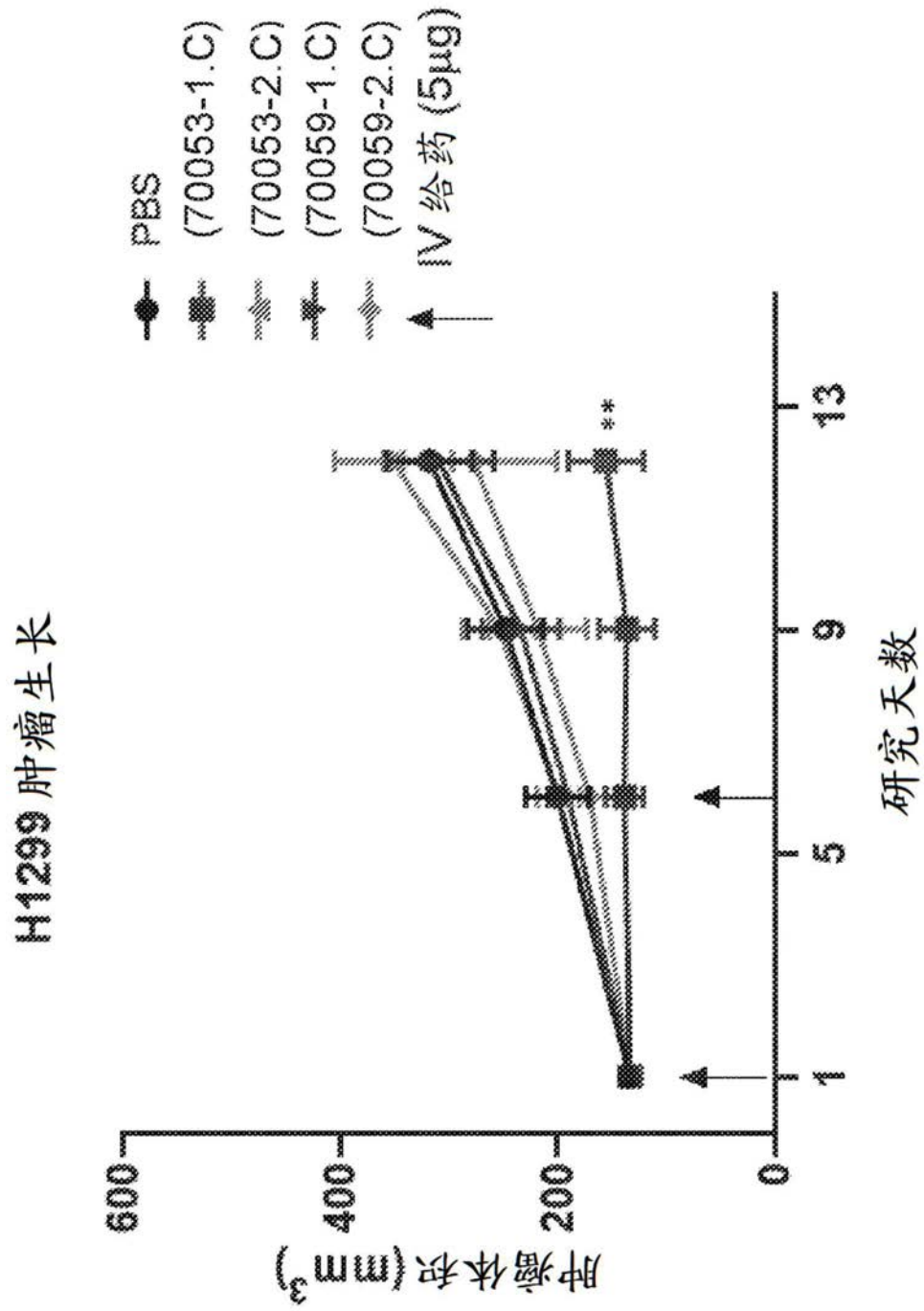


图7

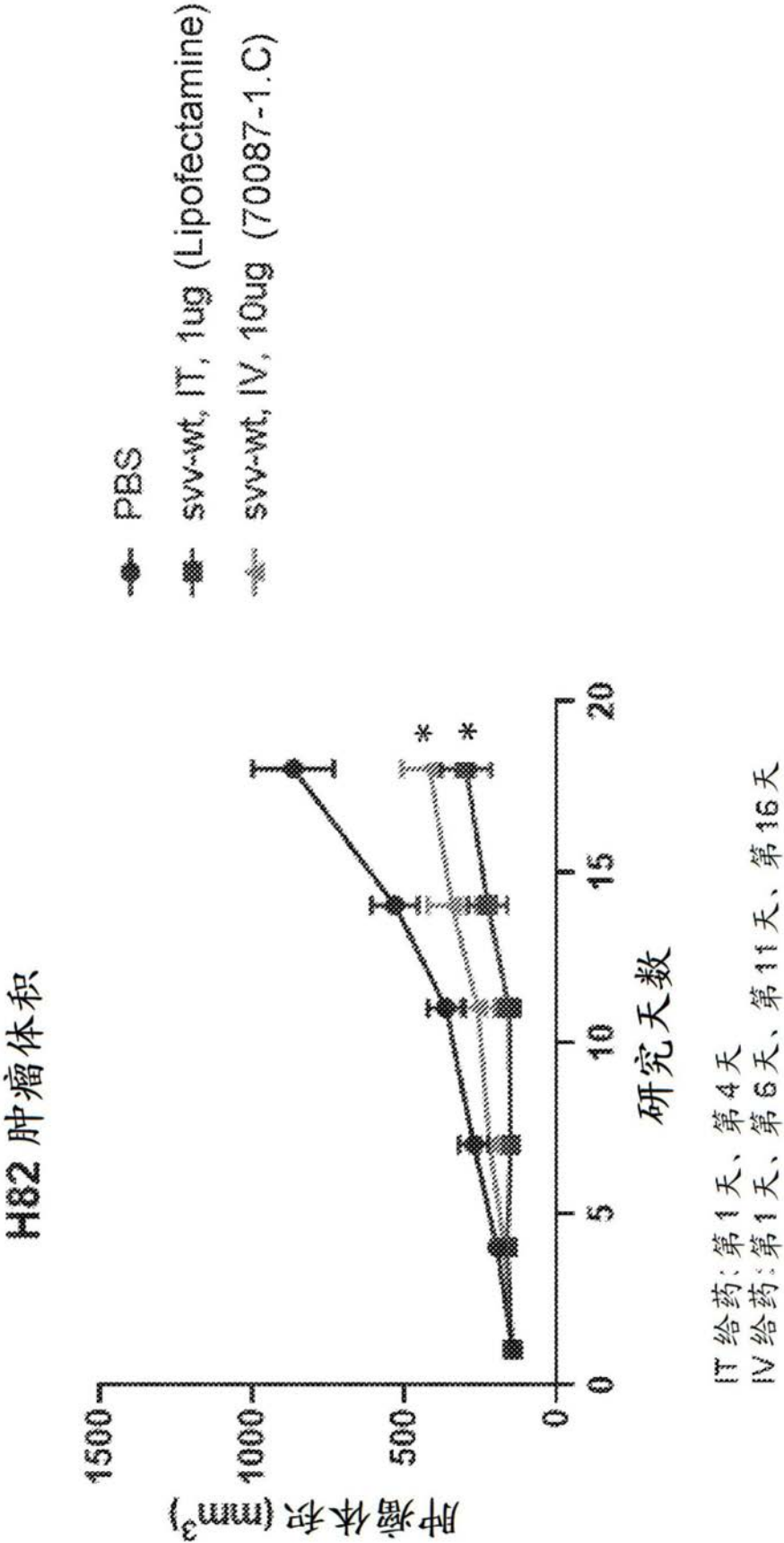


图8

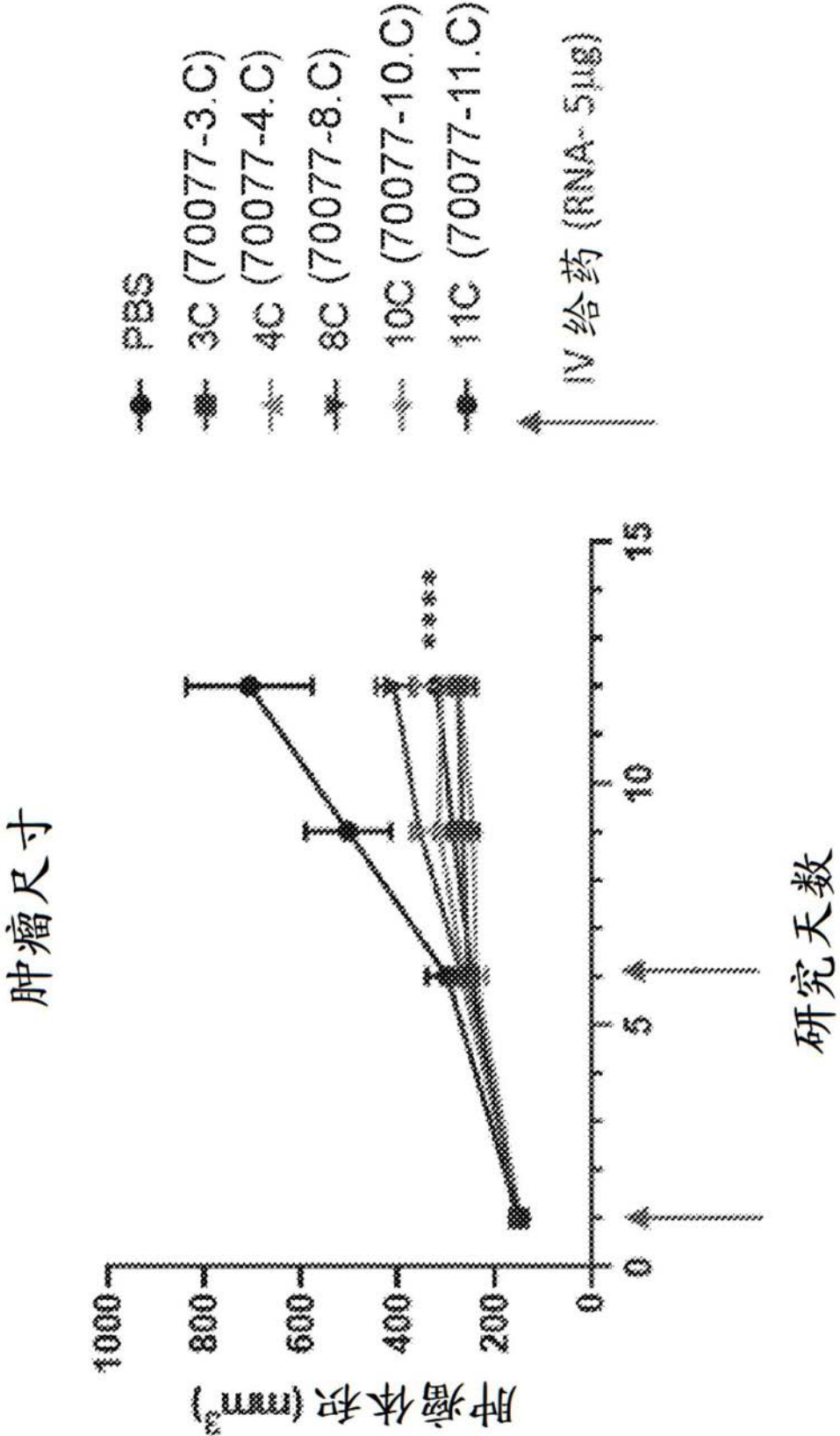


图9A

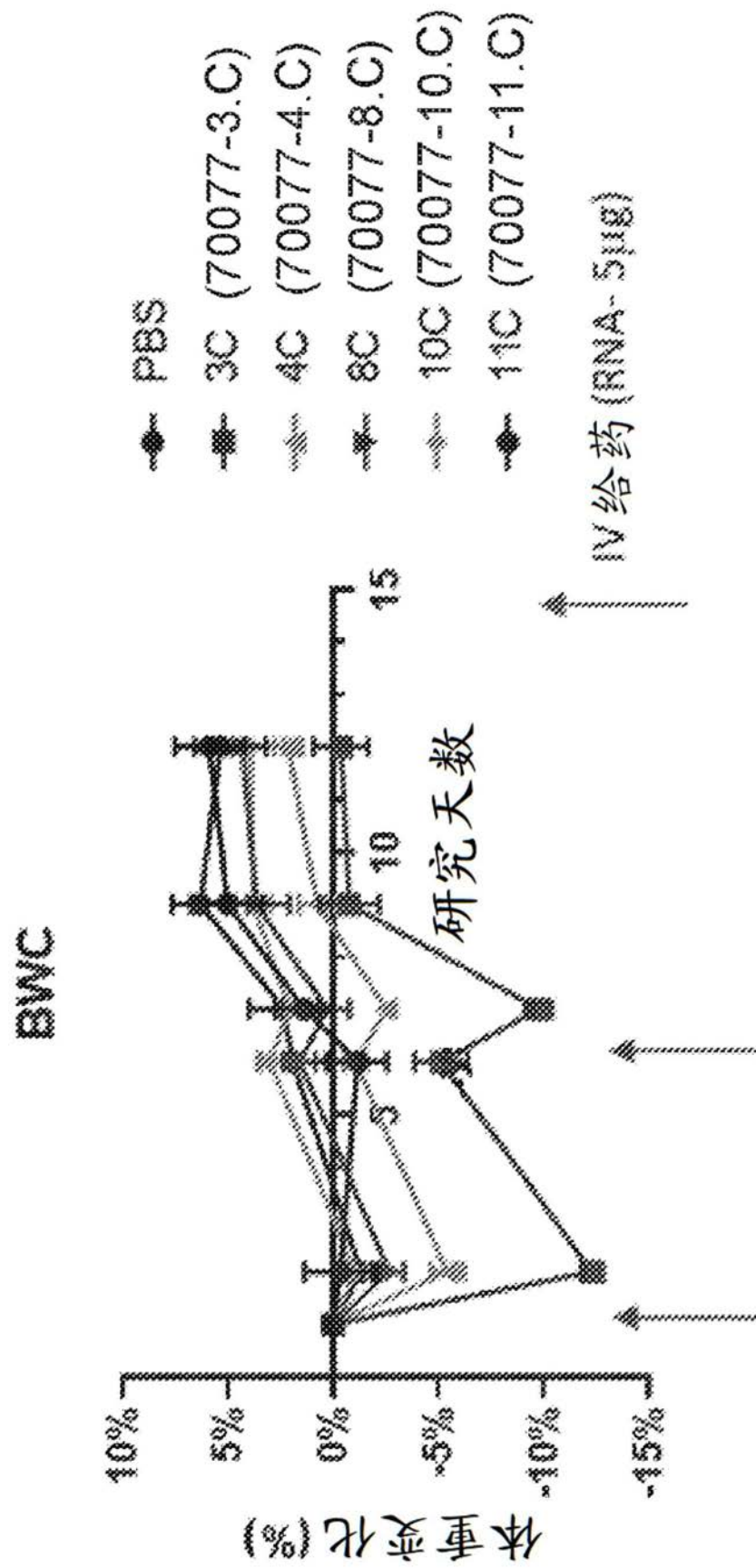


图9B

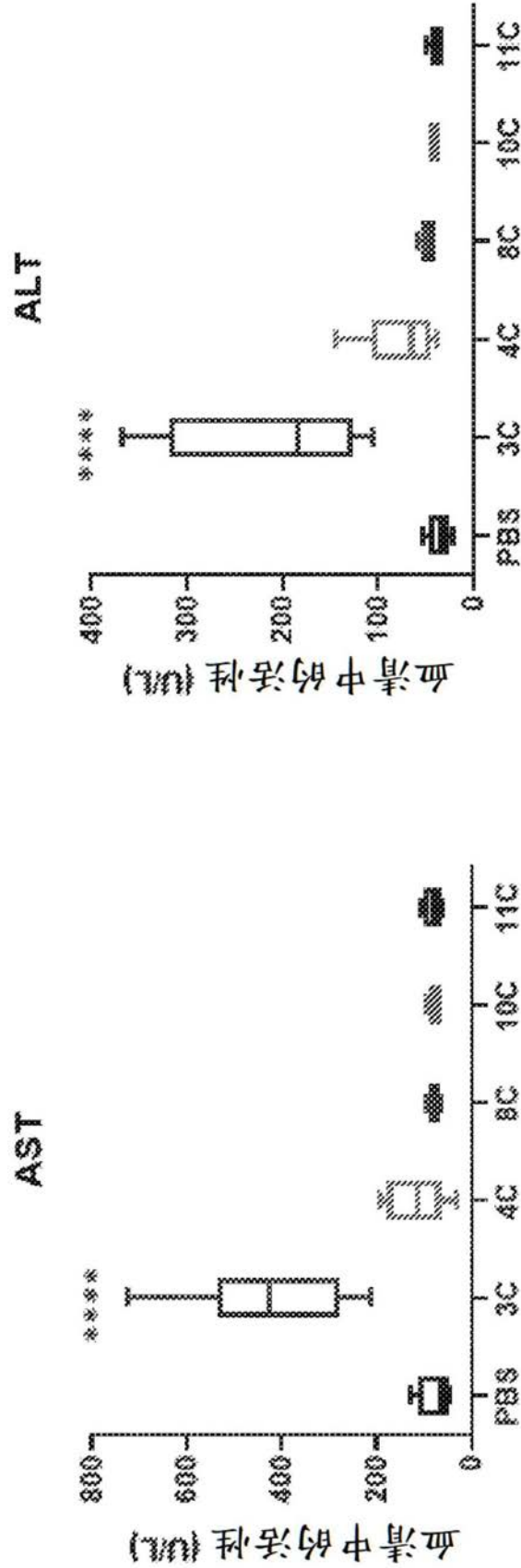


图9C

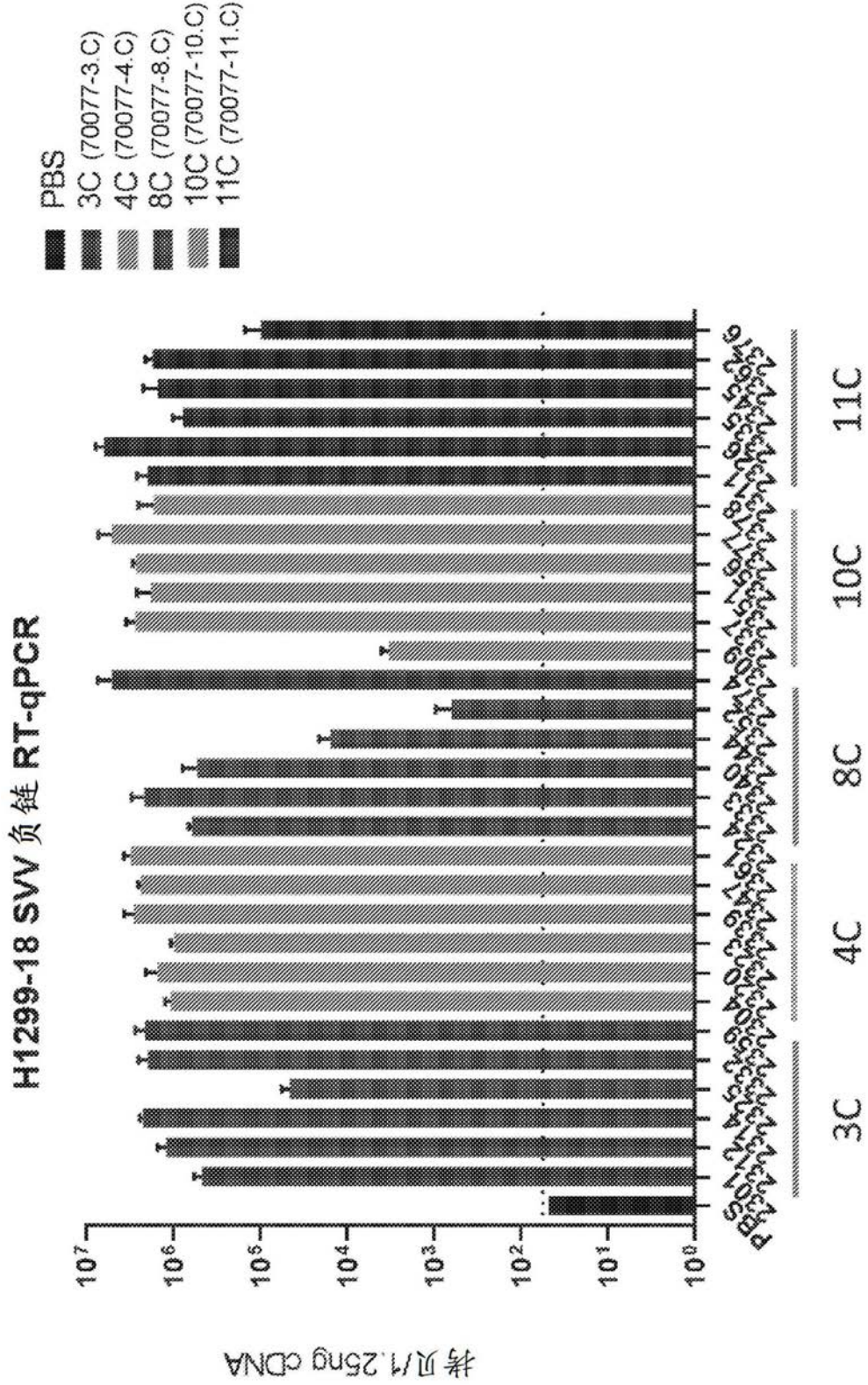


图9D

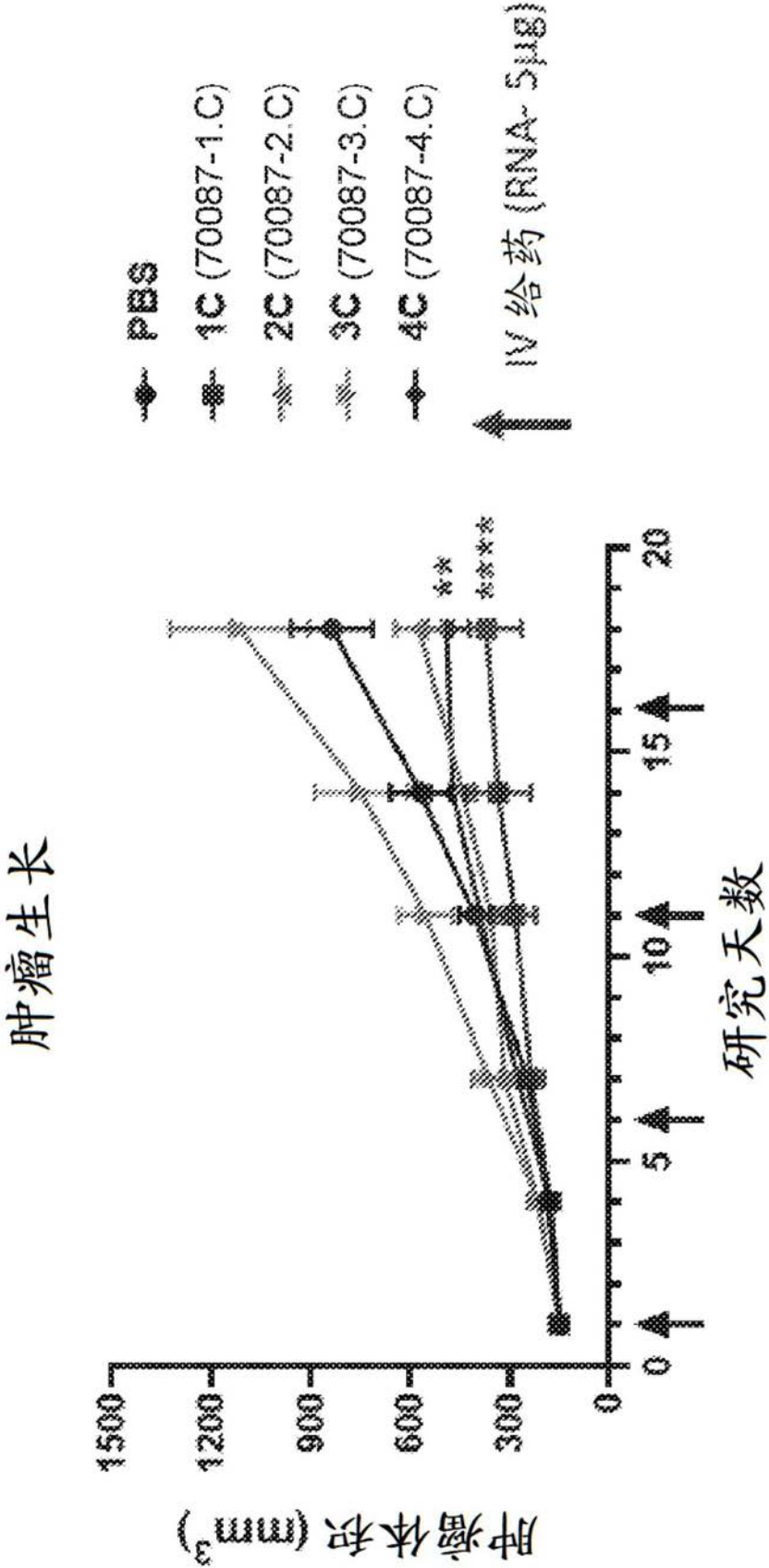


图10

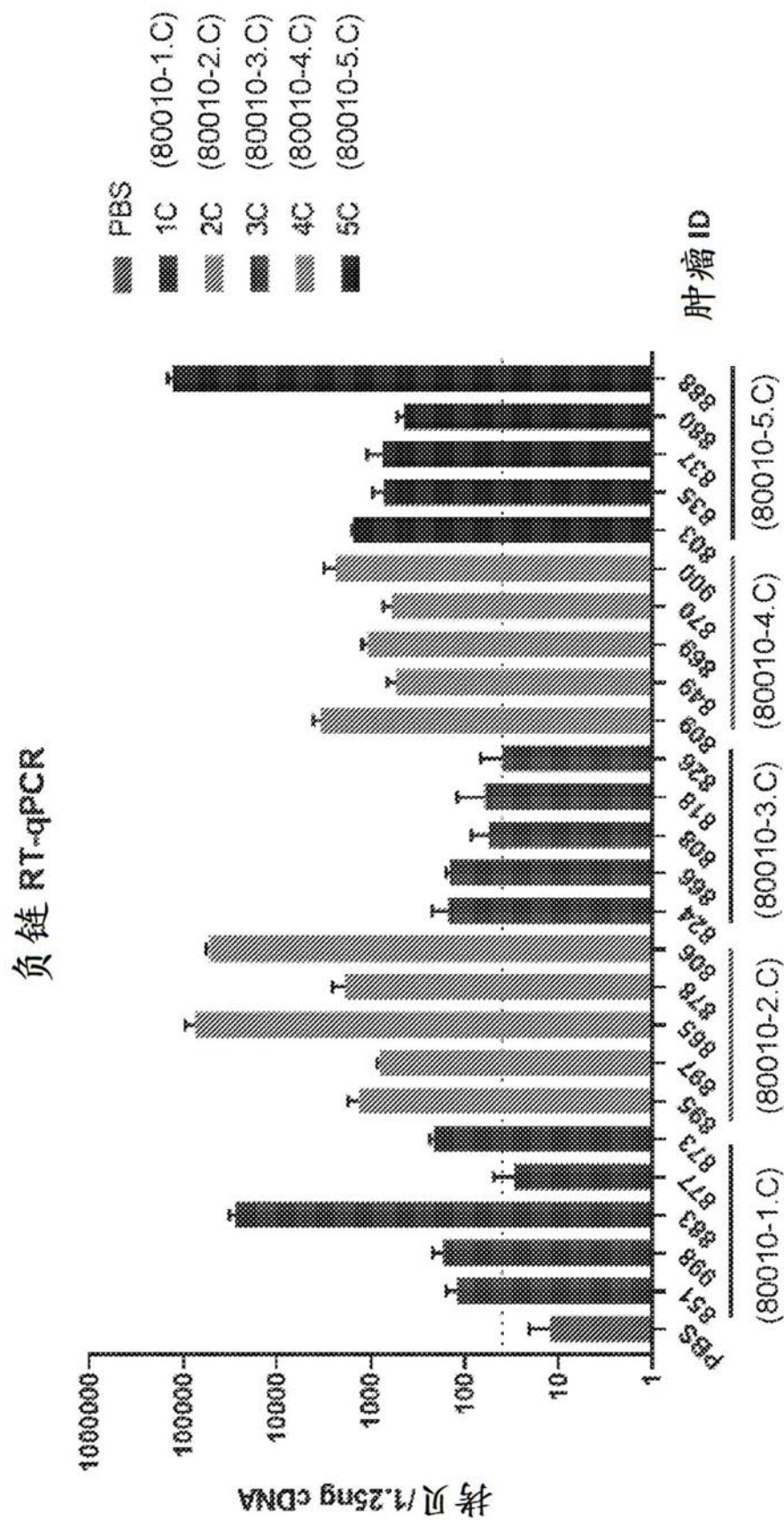


图11

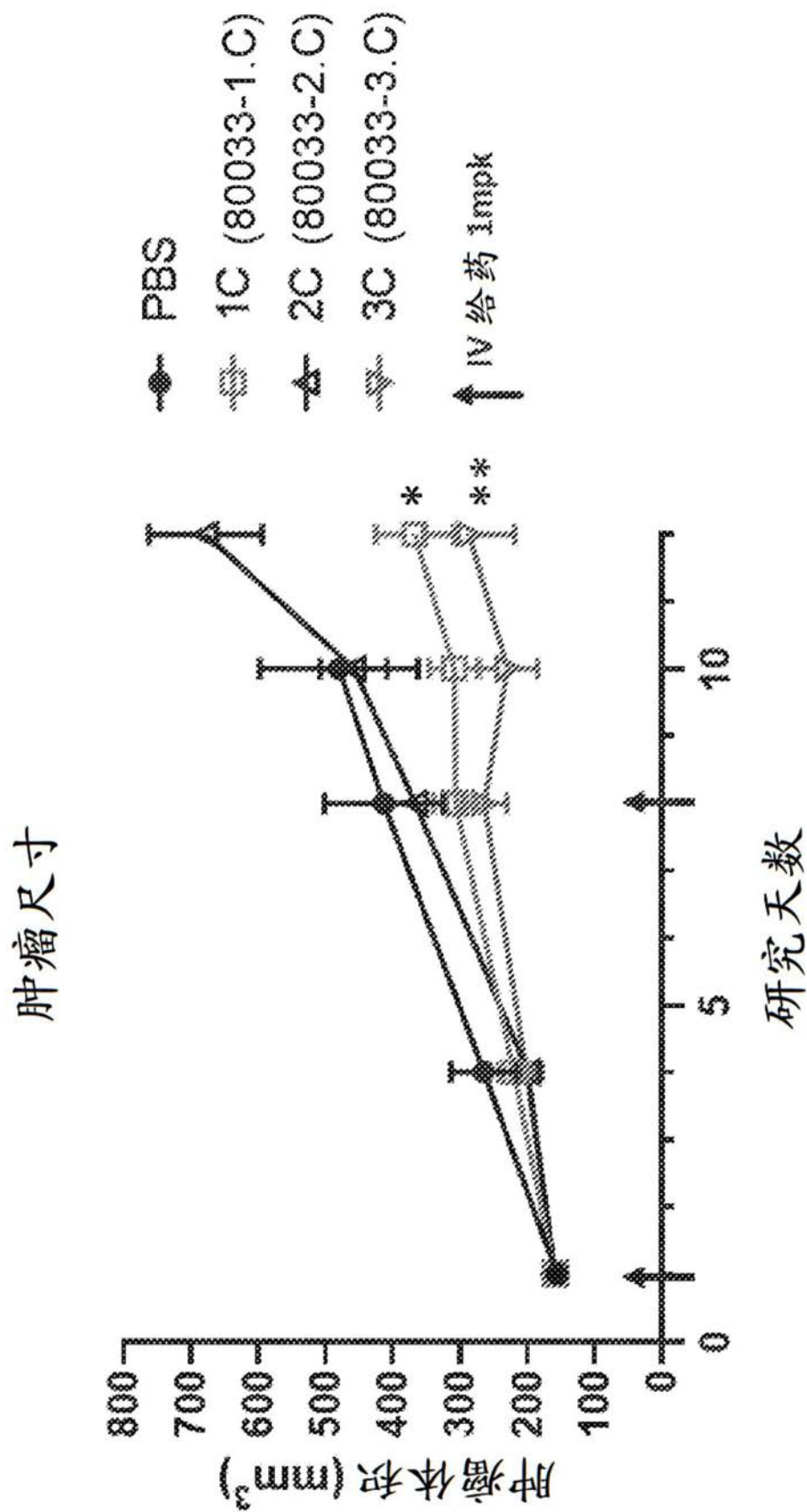


图12

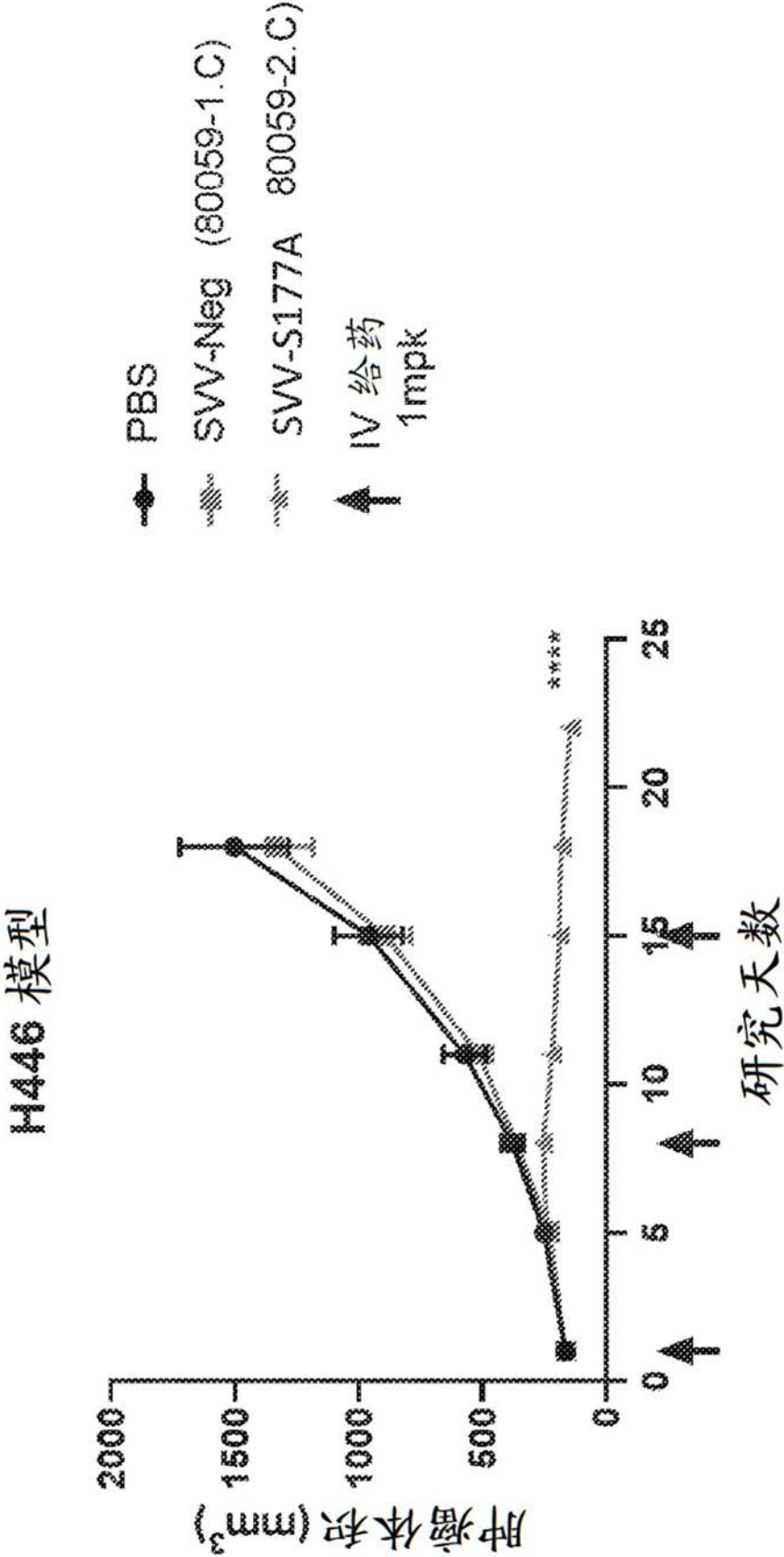


图13A

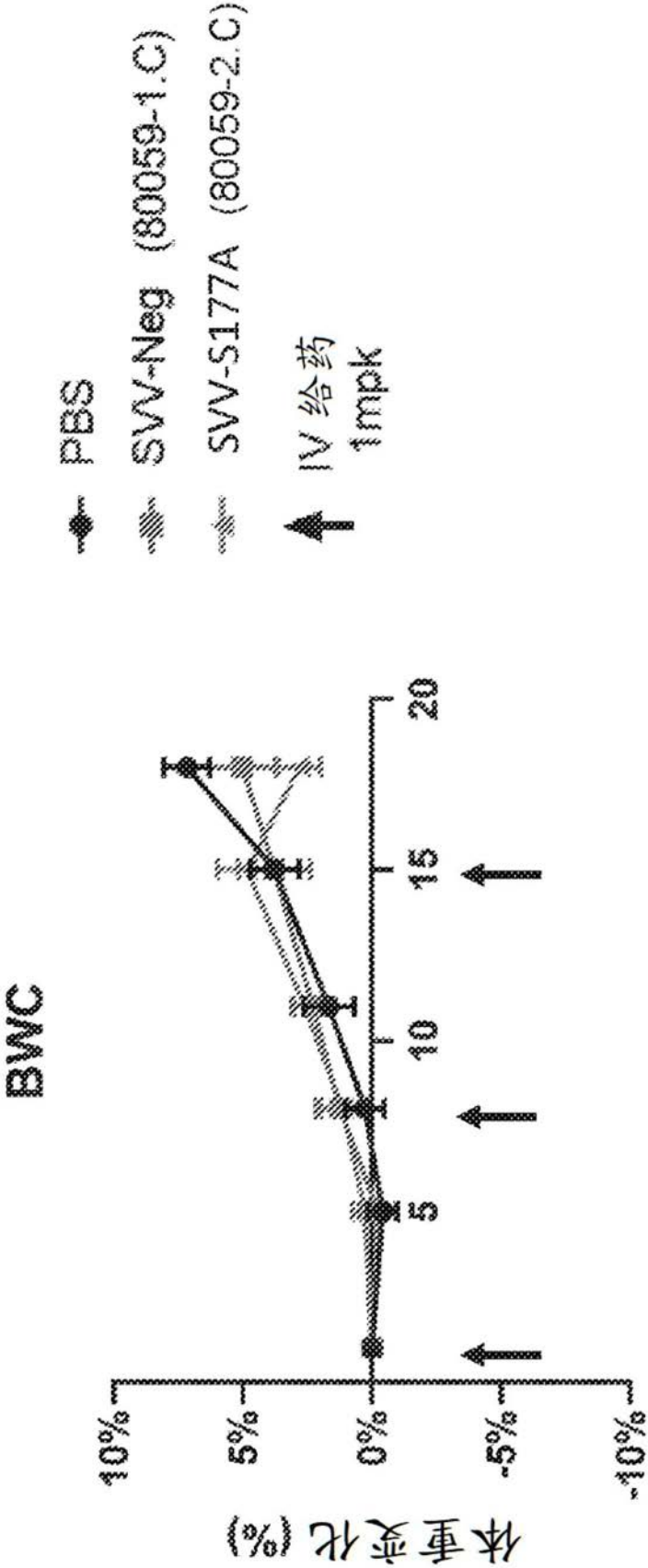


图13B

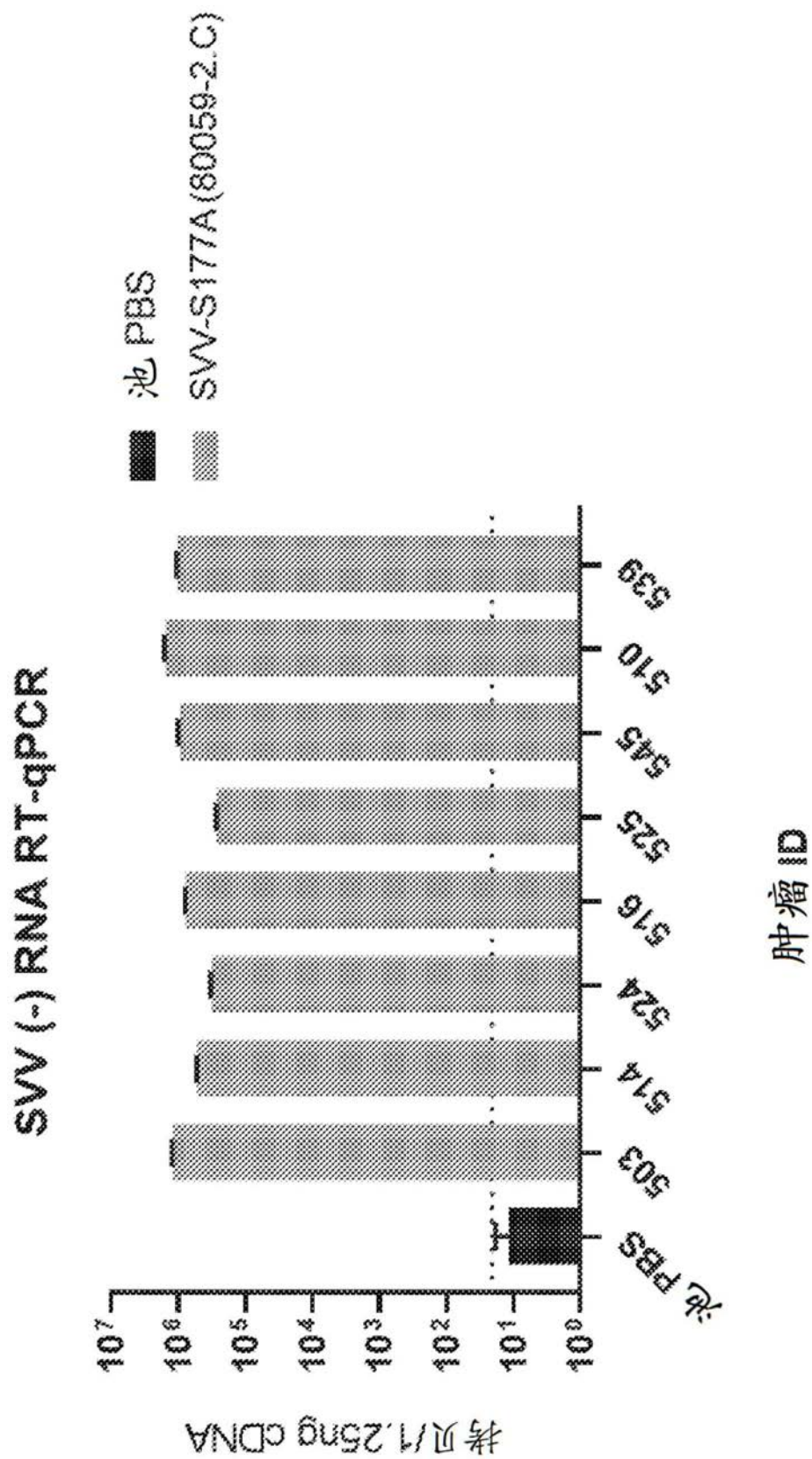


图13C

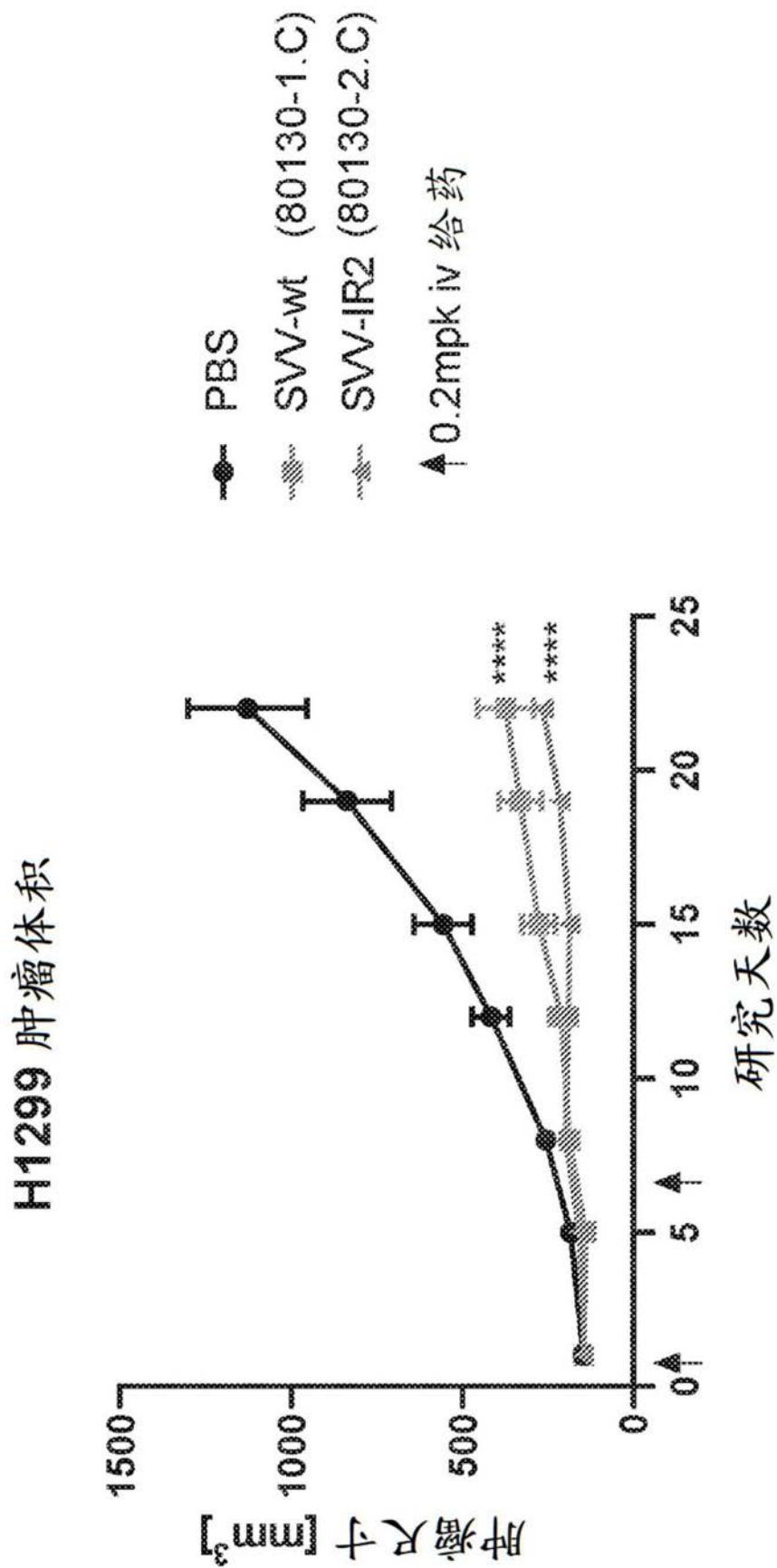


图14

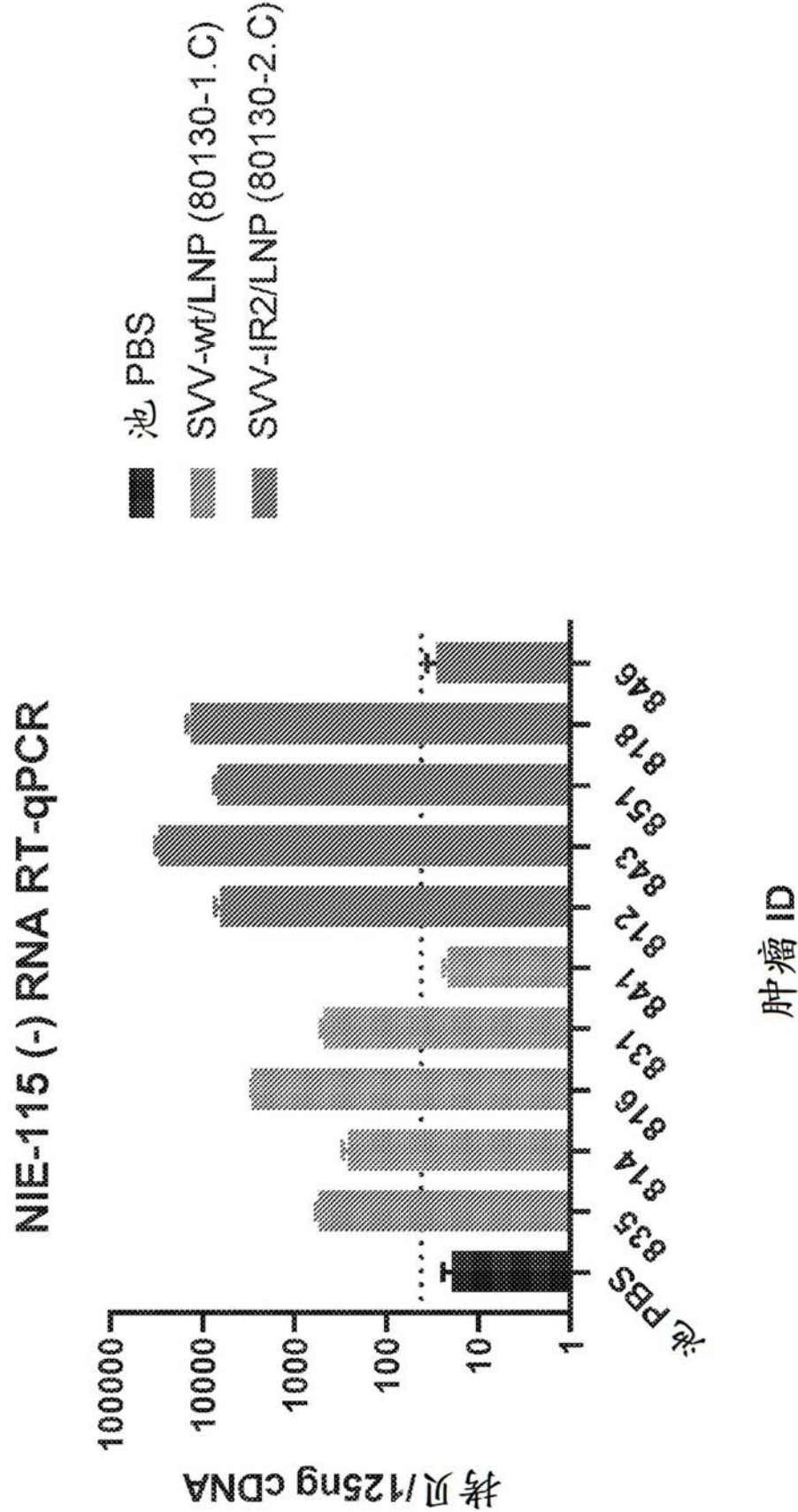


图15

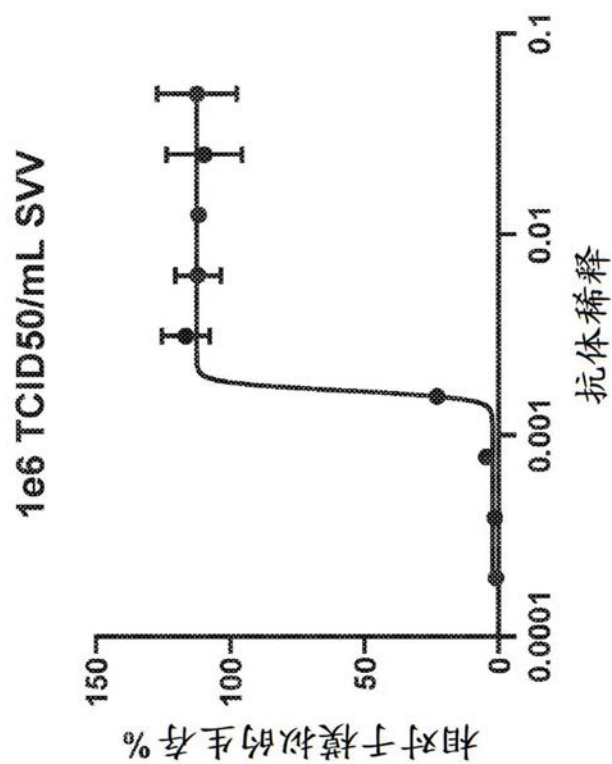


图16A

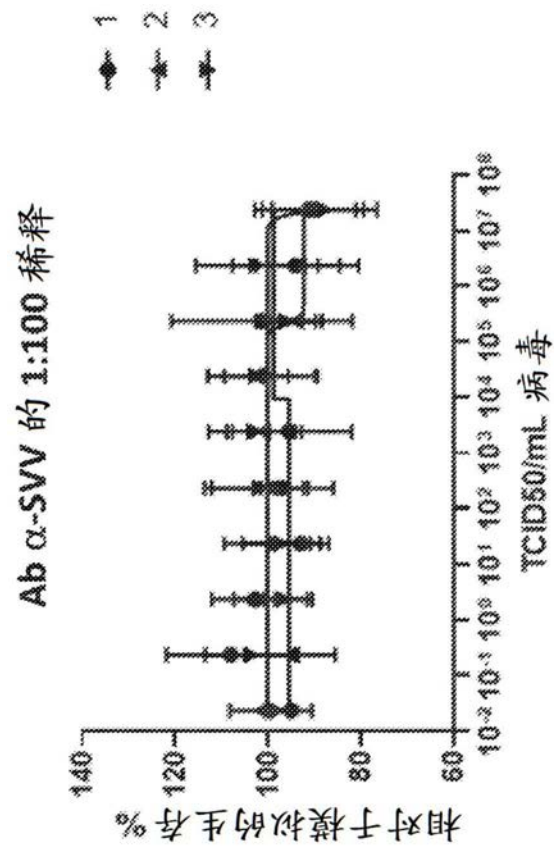


图16B

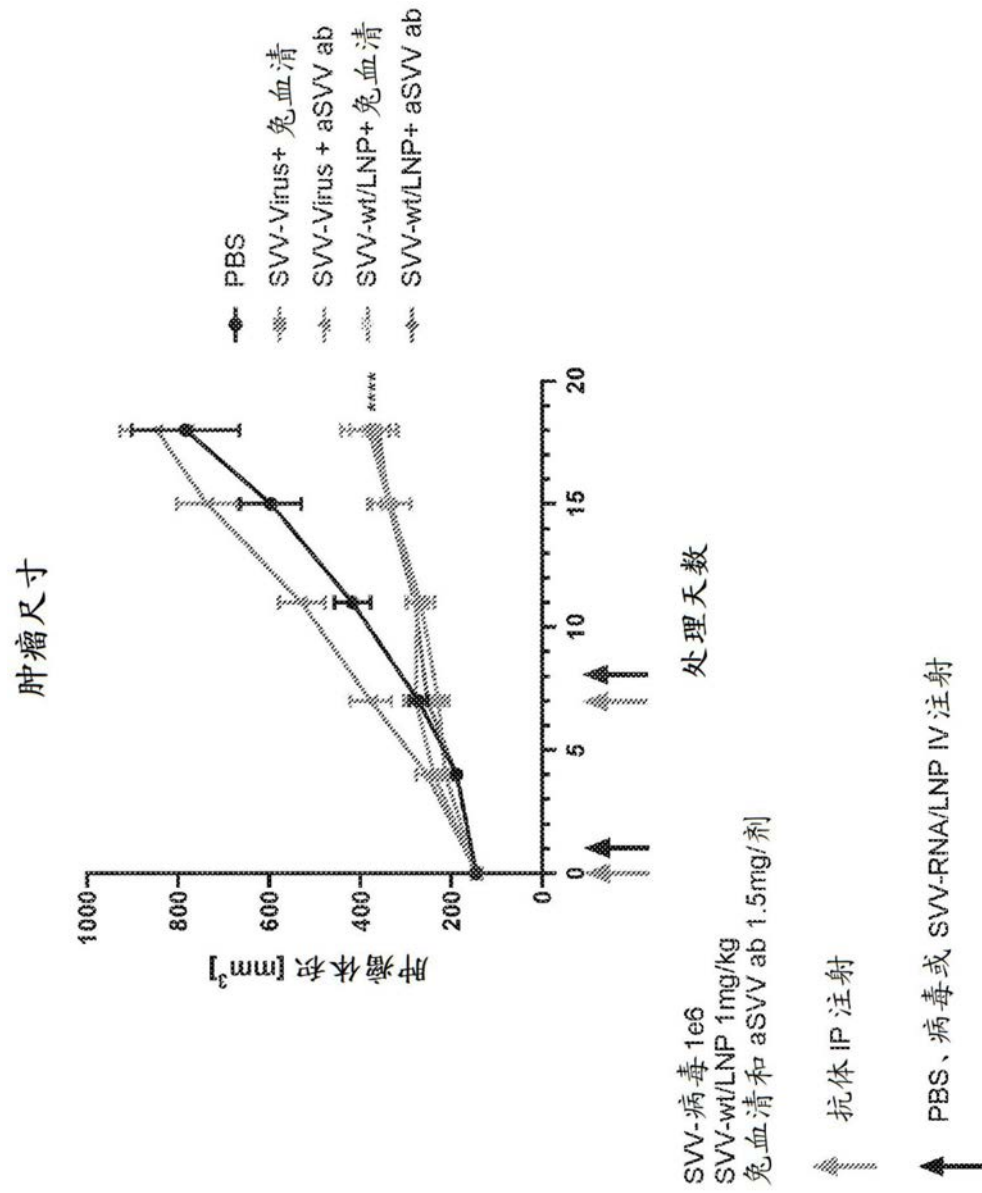
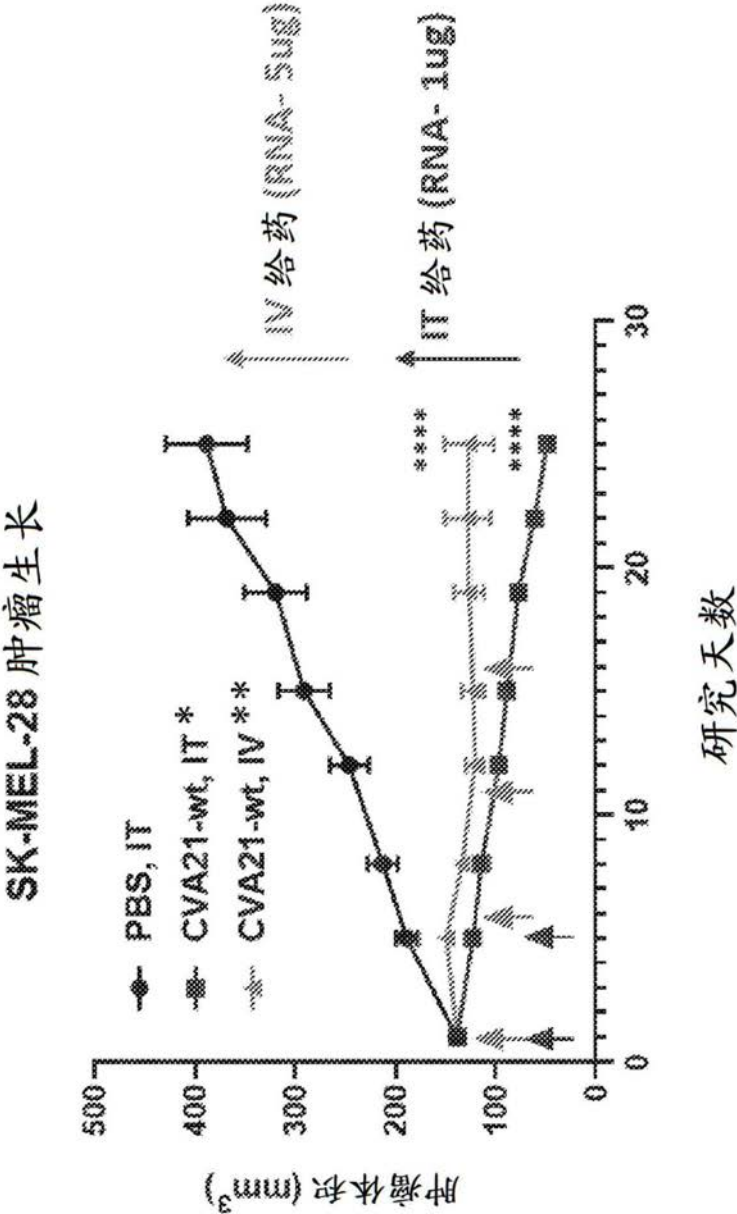


图17



*CVA21 LNP 制剂编号 70032-6.C
**与 Lipofectamine 一起配制的编码 CVA21 的 RNA (阳性对照物)

图18

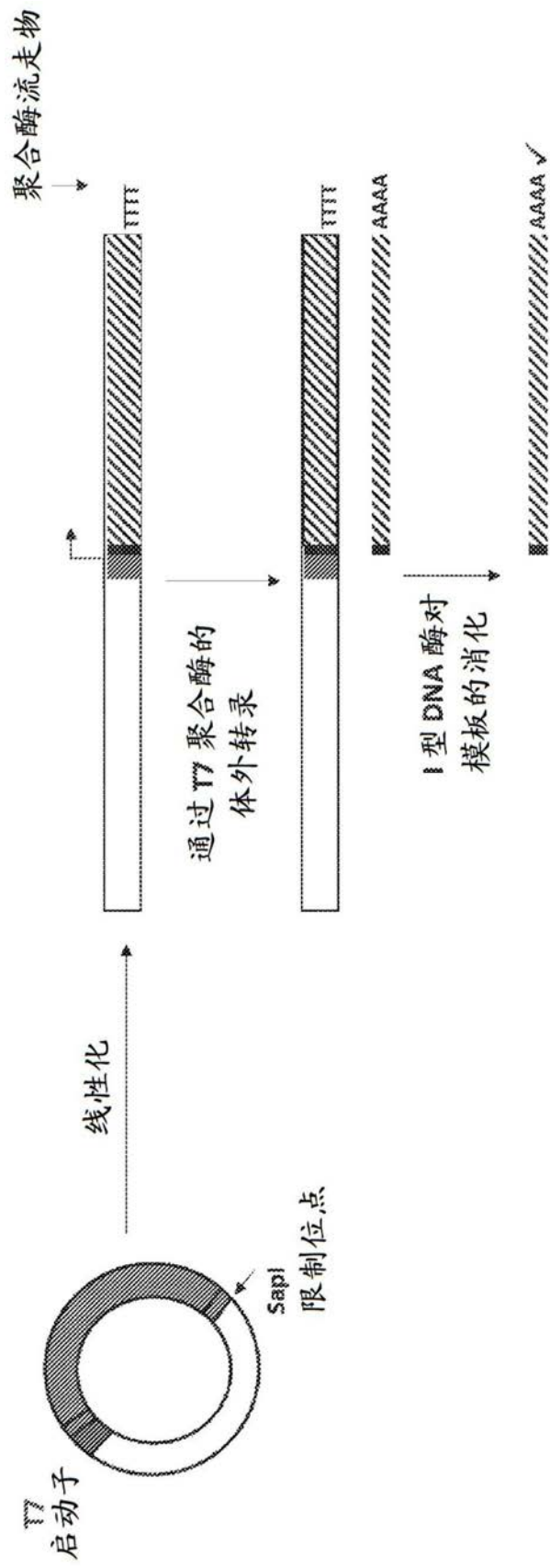


图19

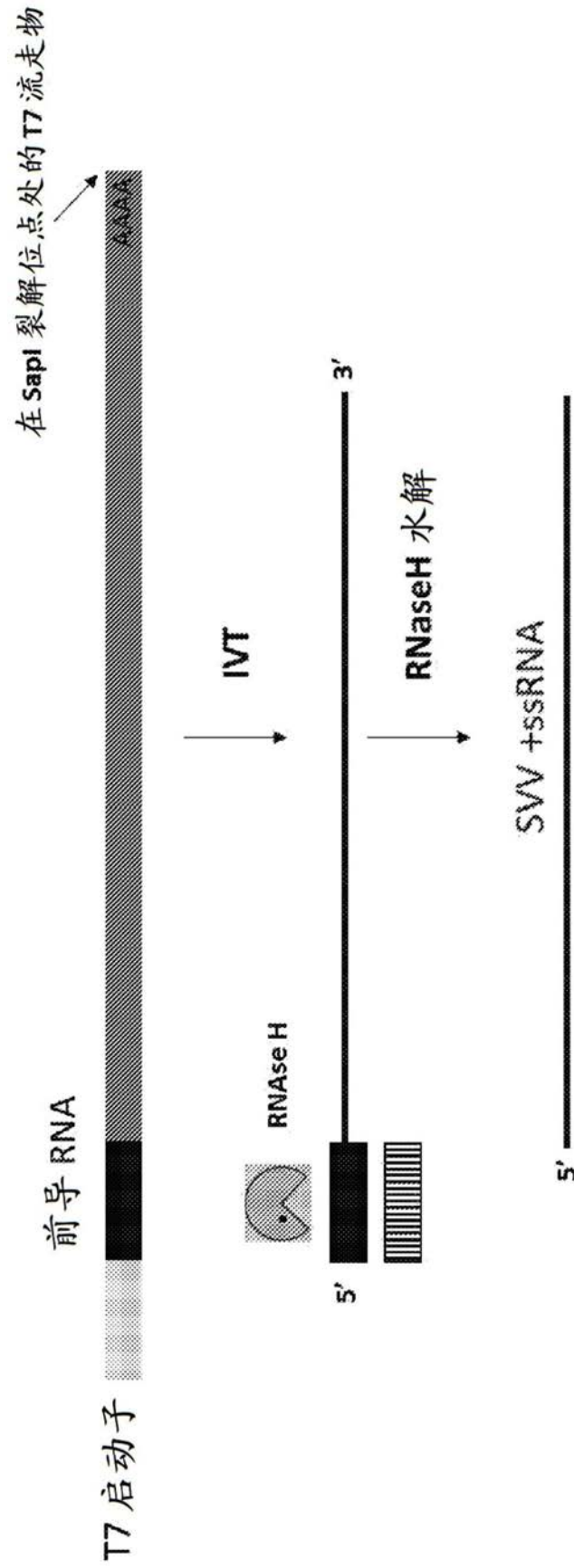


图20

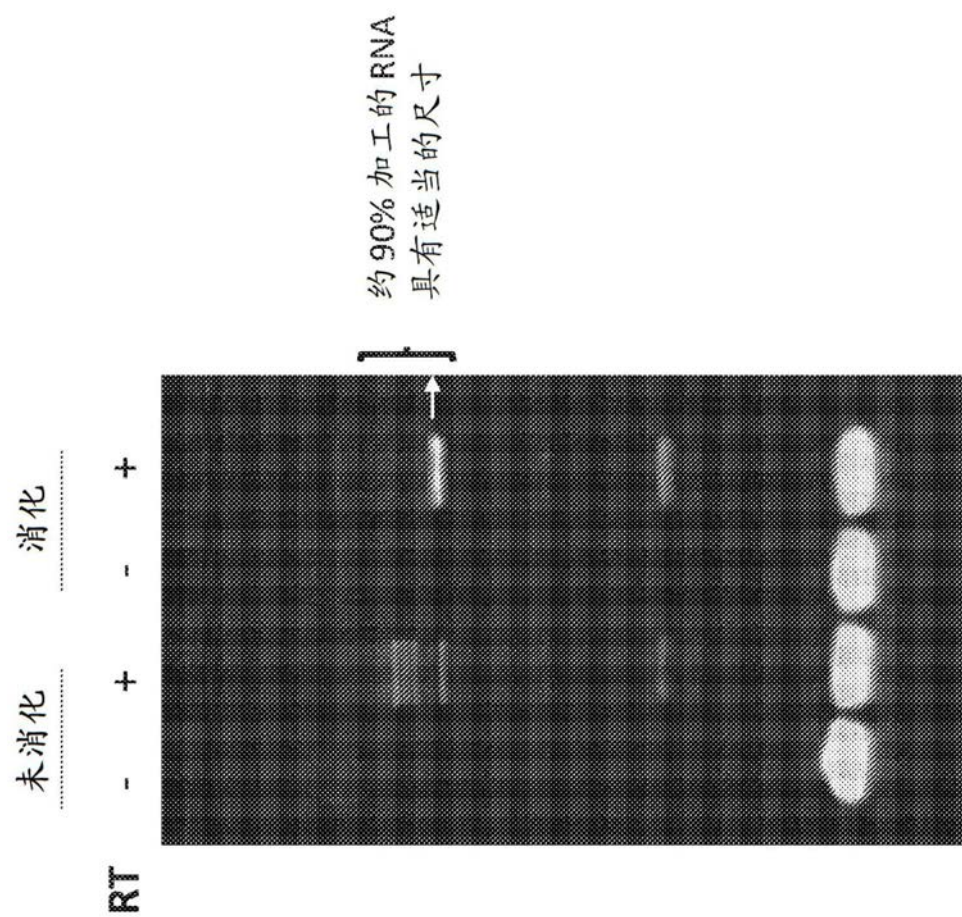


图21

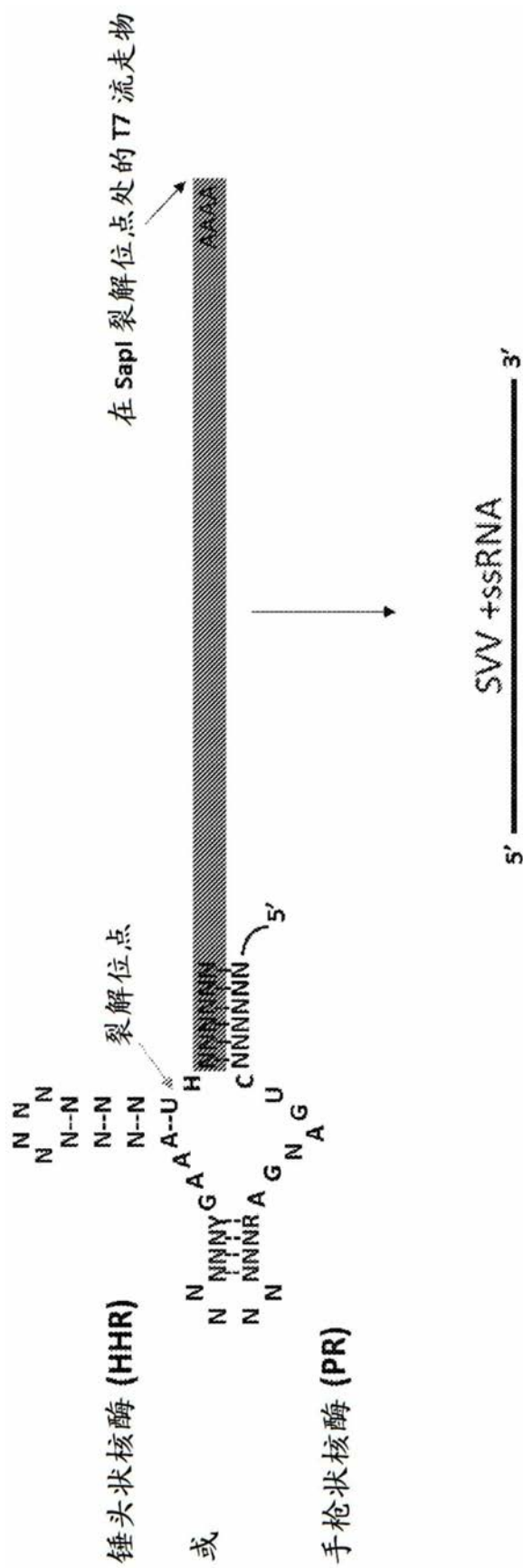


图22

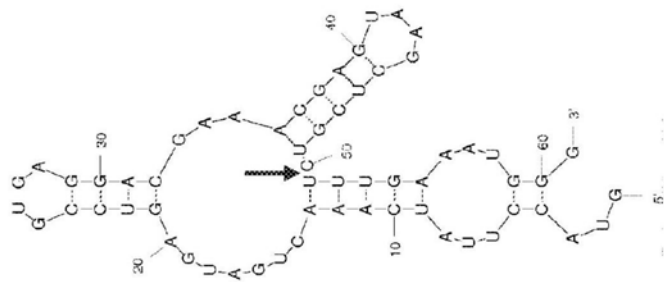


图23A

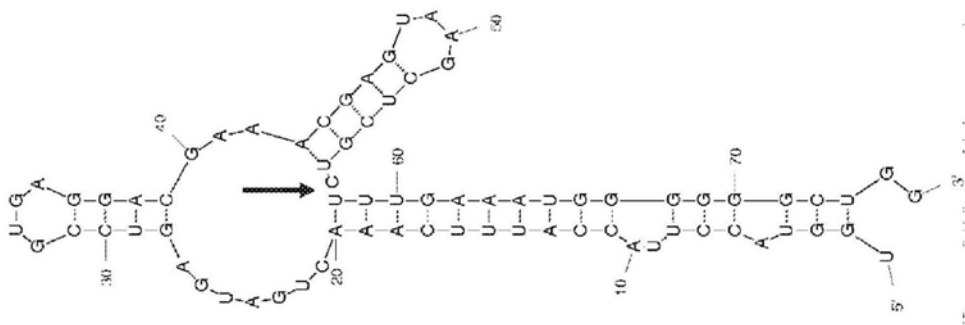


图23B

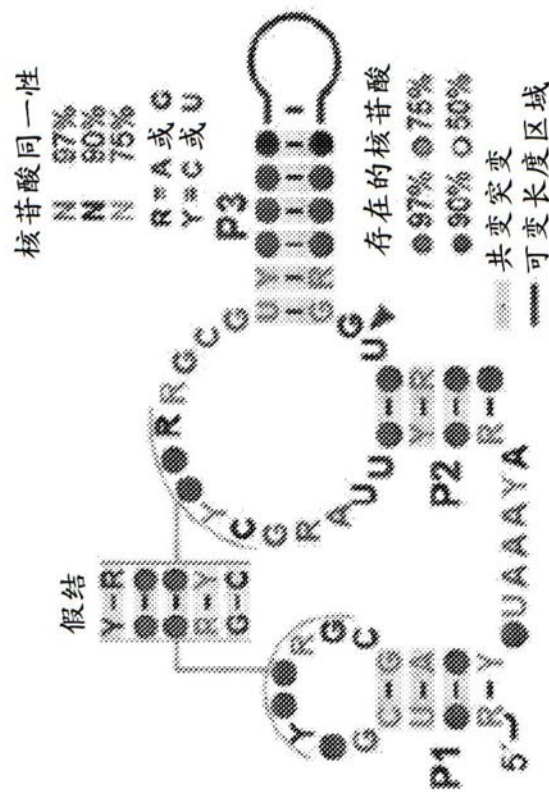


图24A

PMD: 22454536

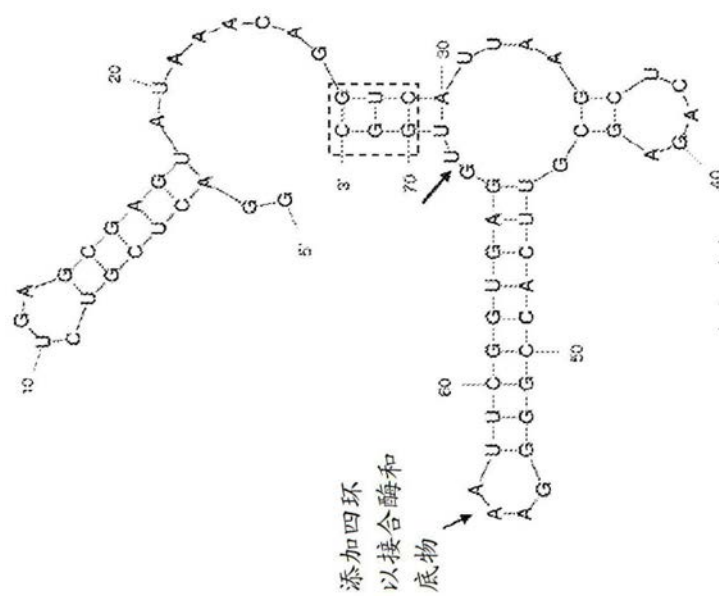


图24B

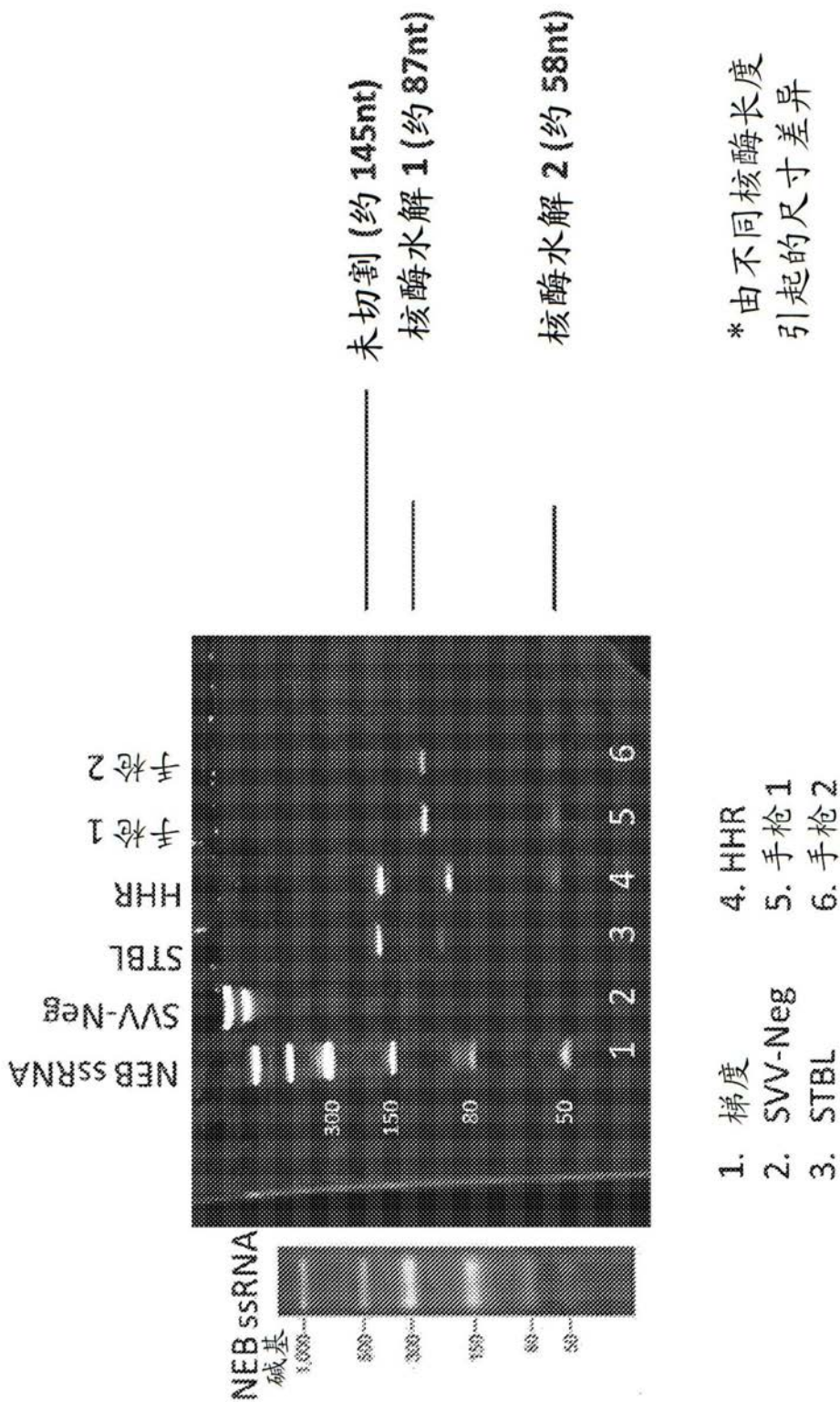


图25

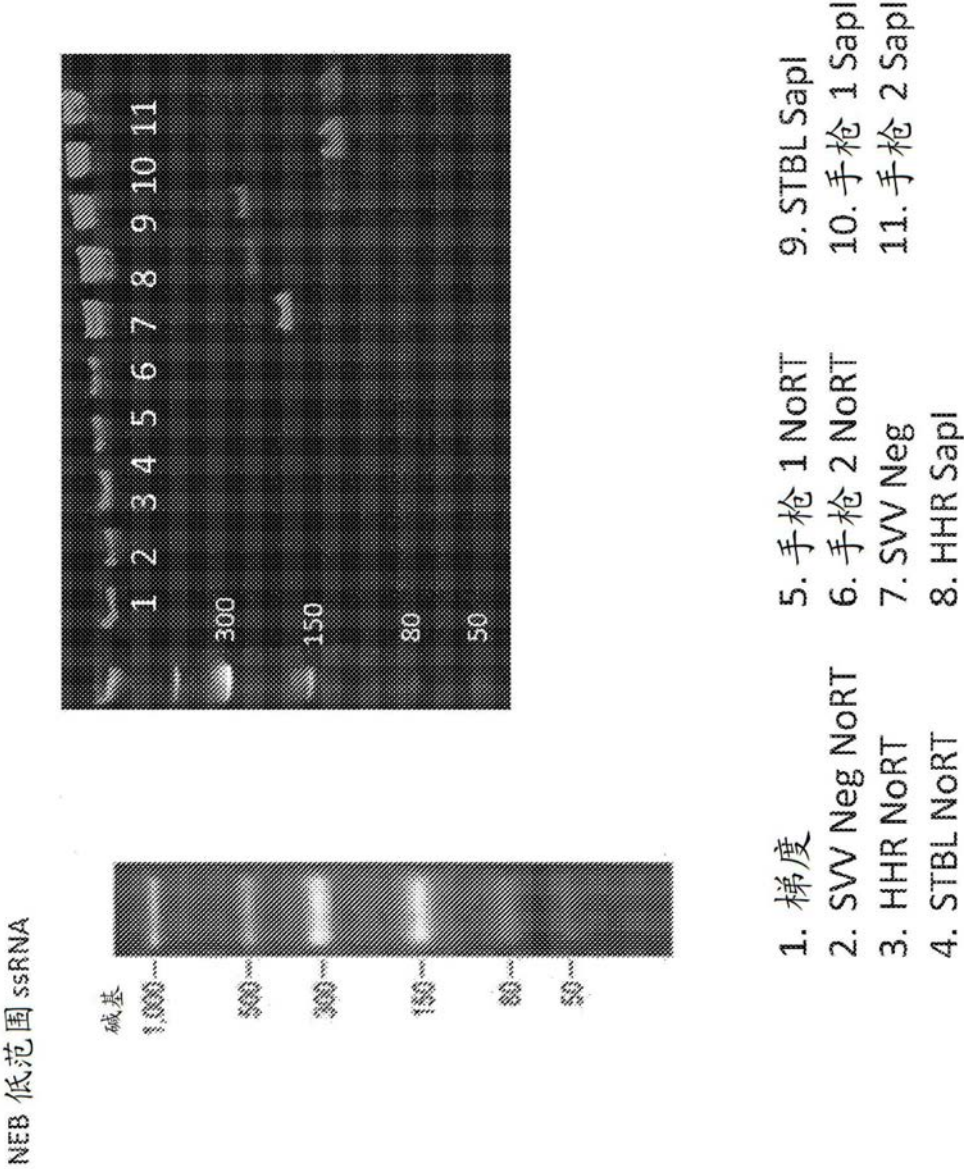


图26

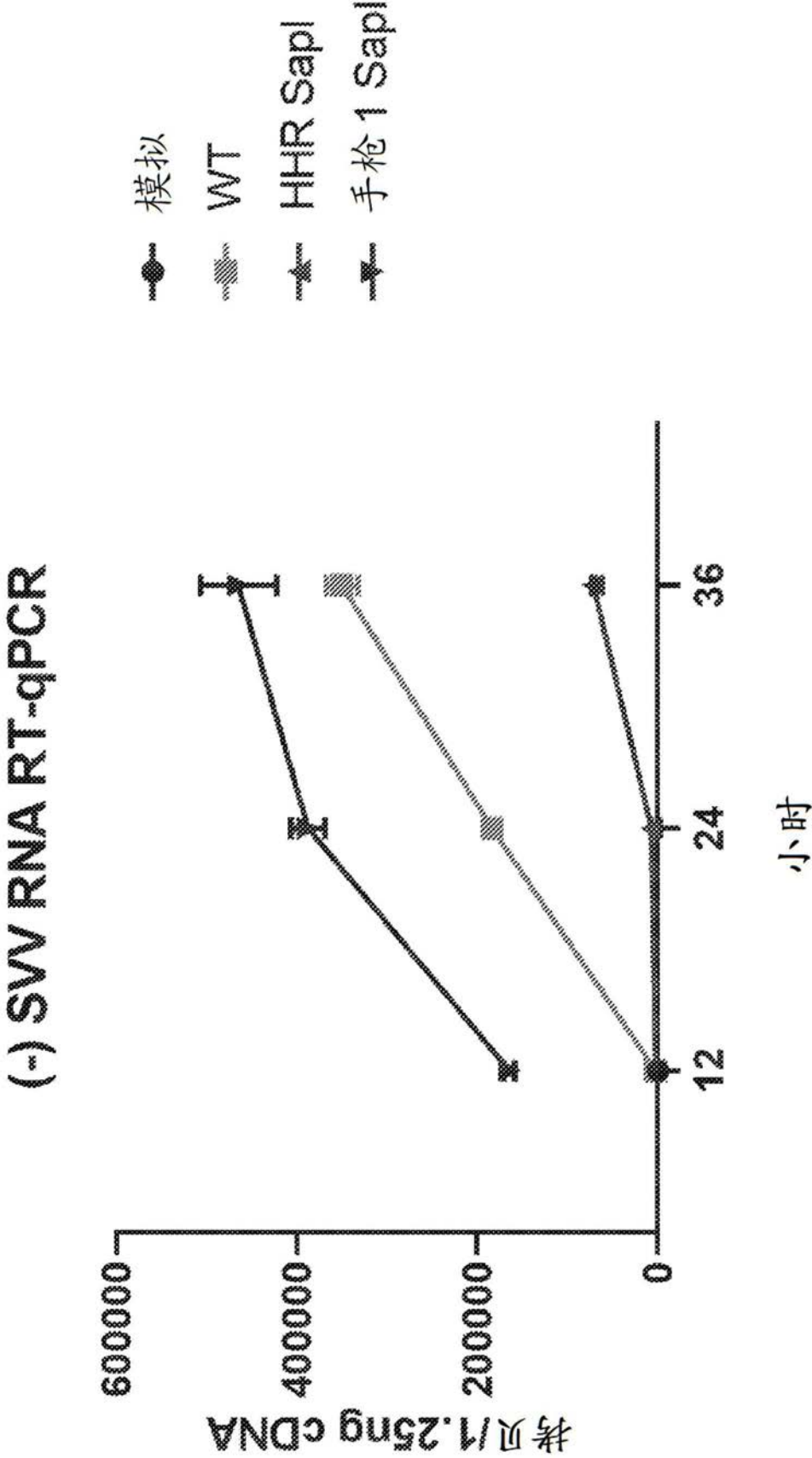


图27

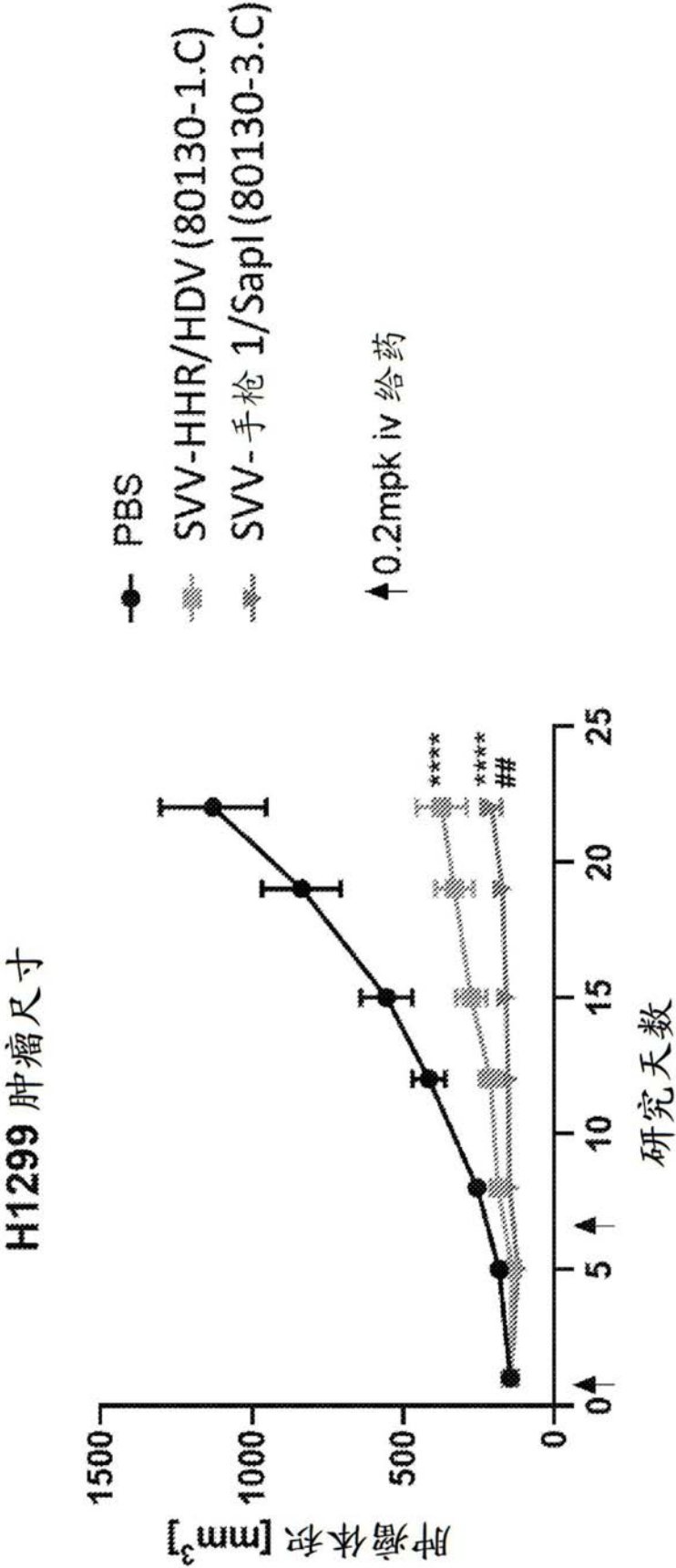


图28

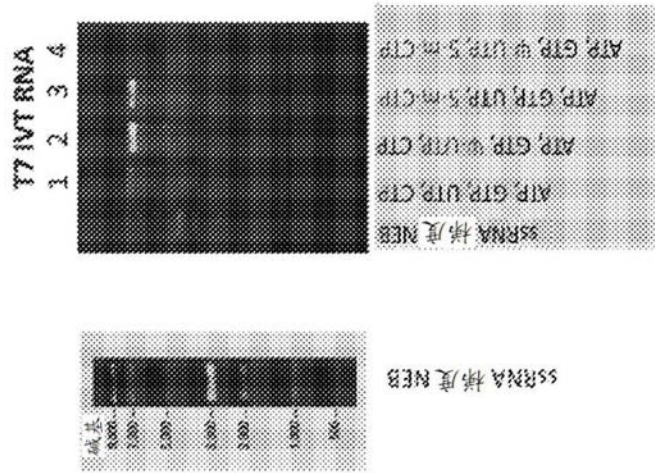


图29A

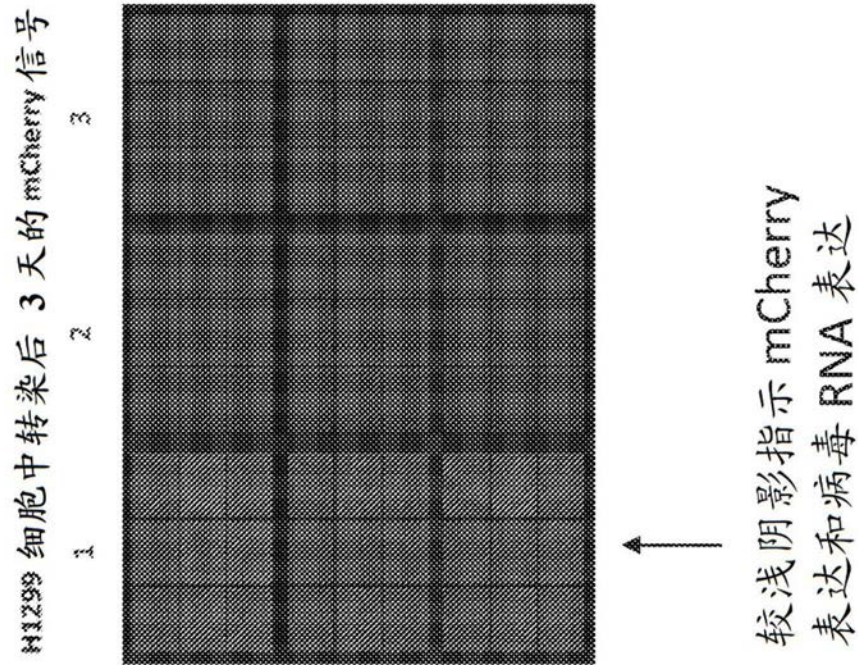


图29B

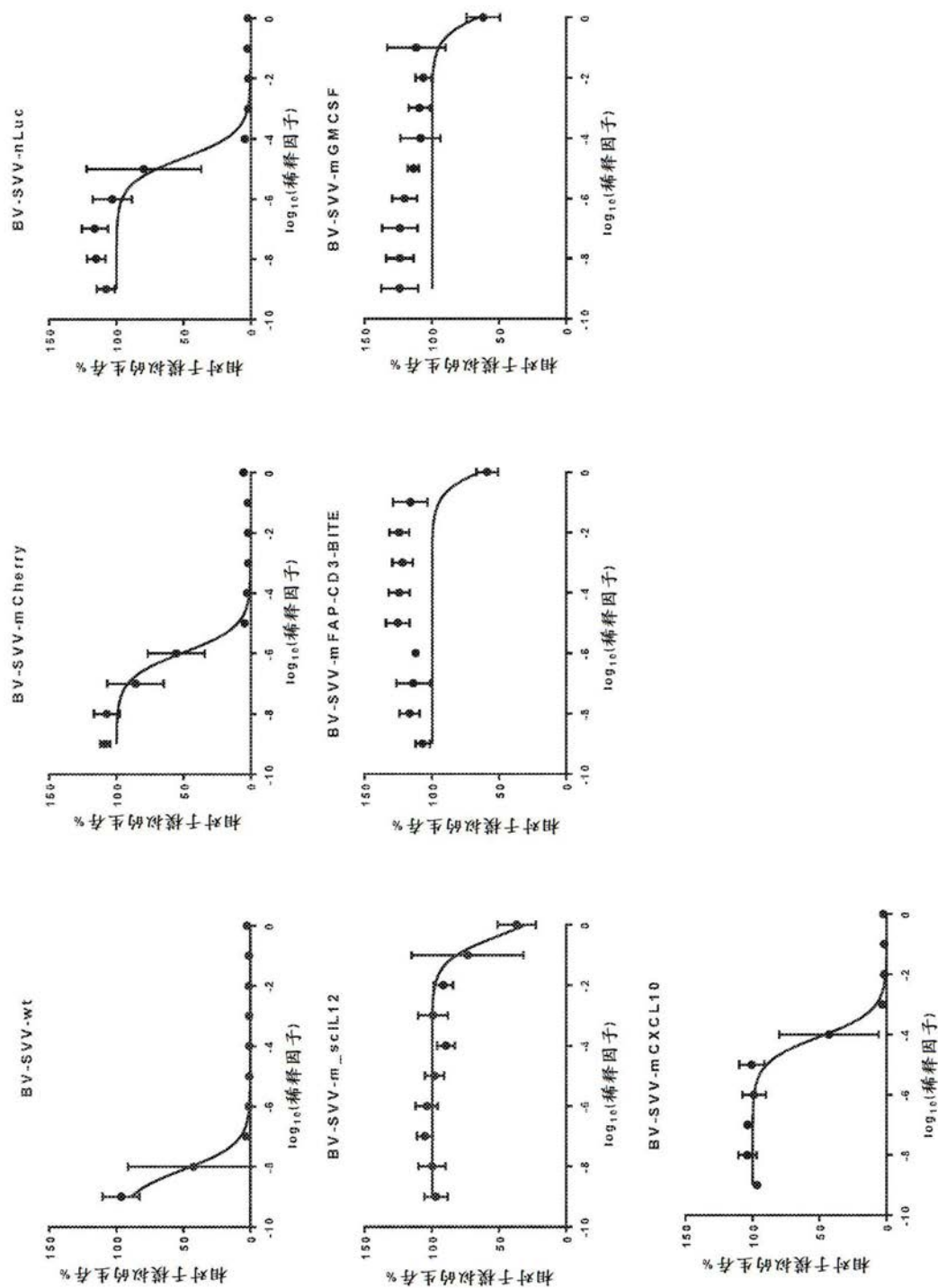


图30

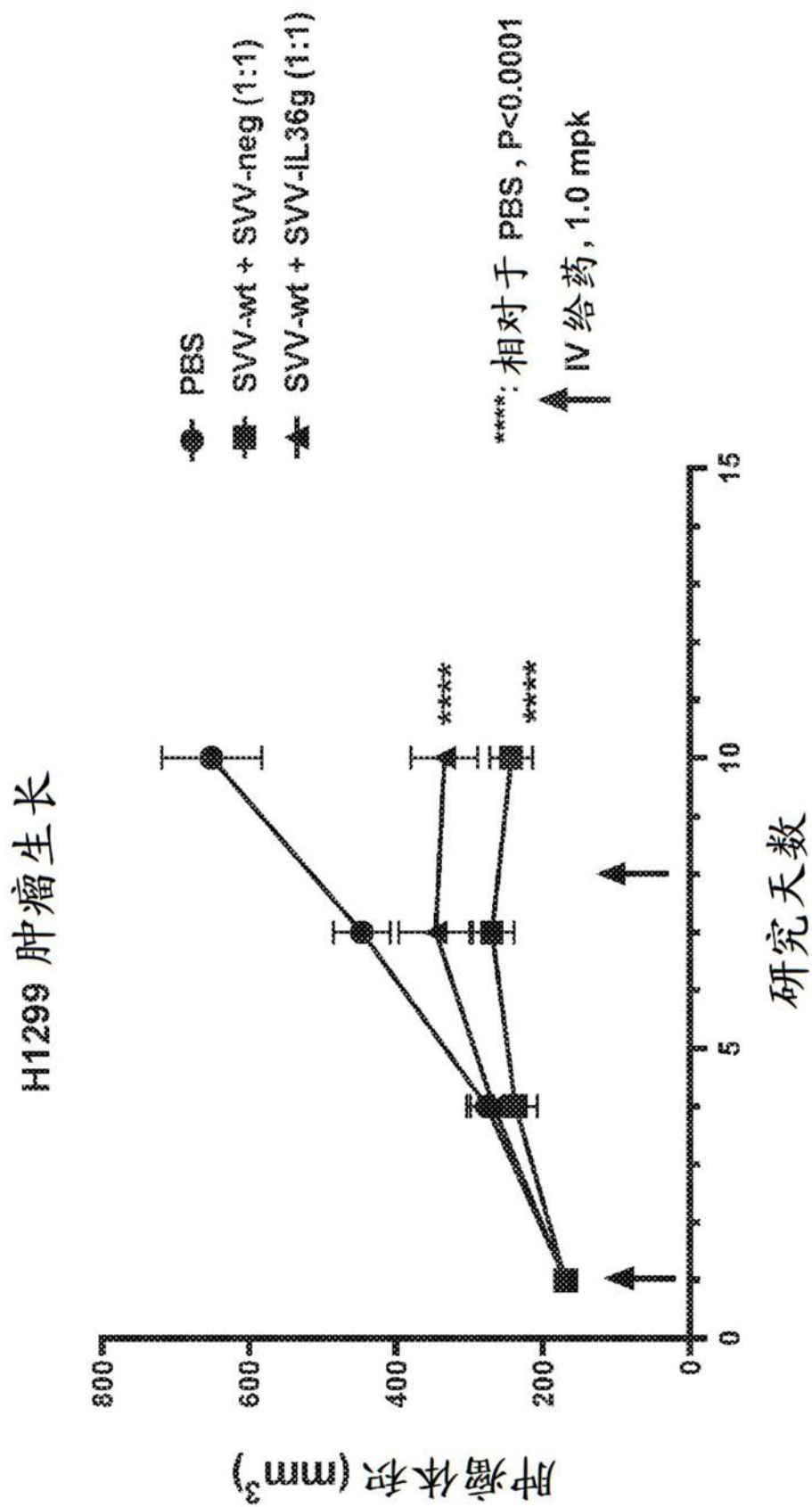


图31A

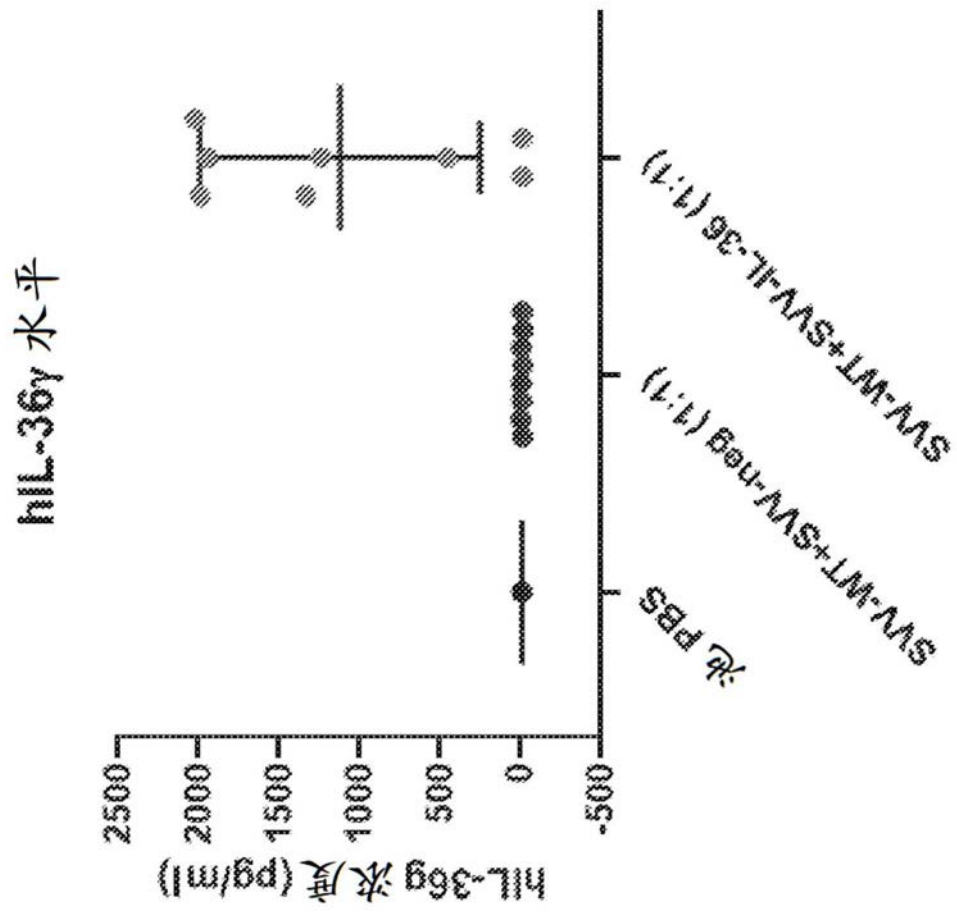


图31B

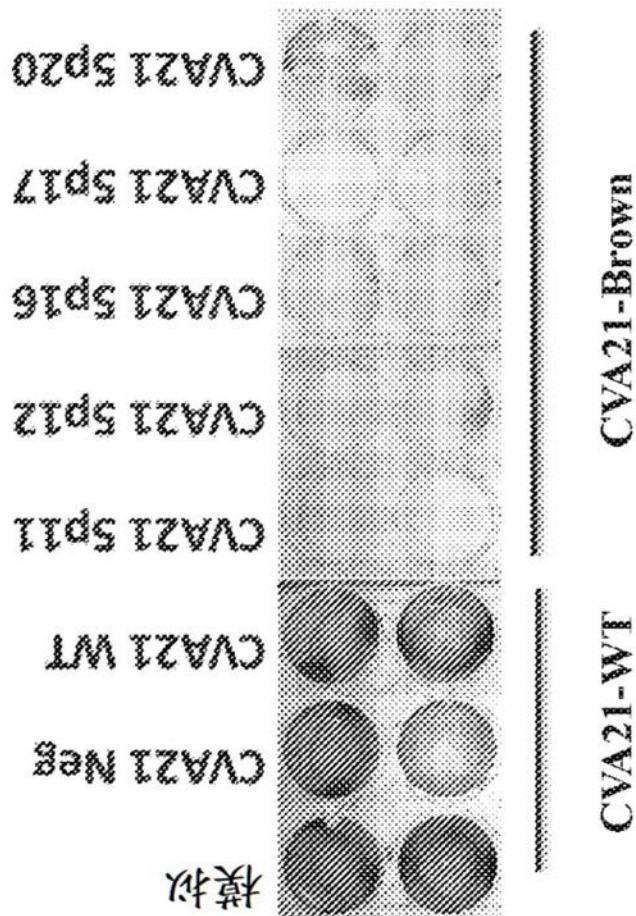


图32A

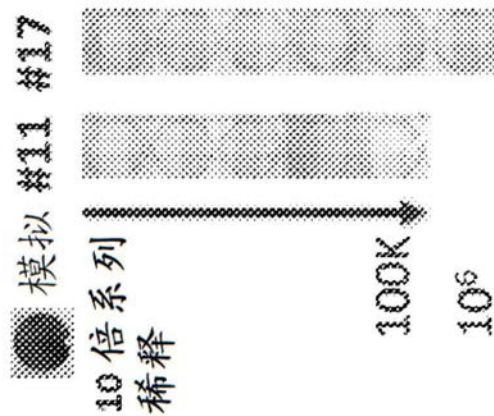


图32B

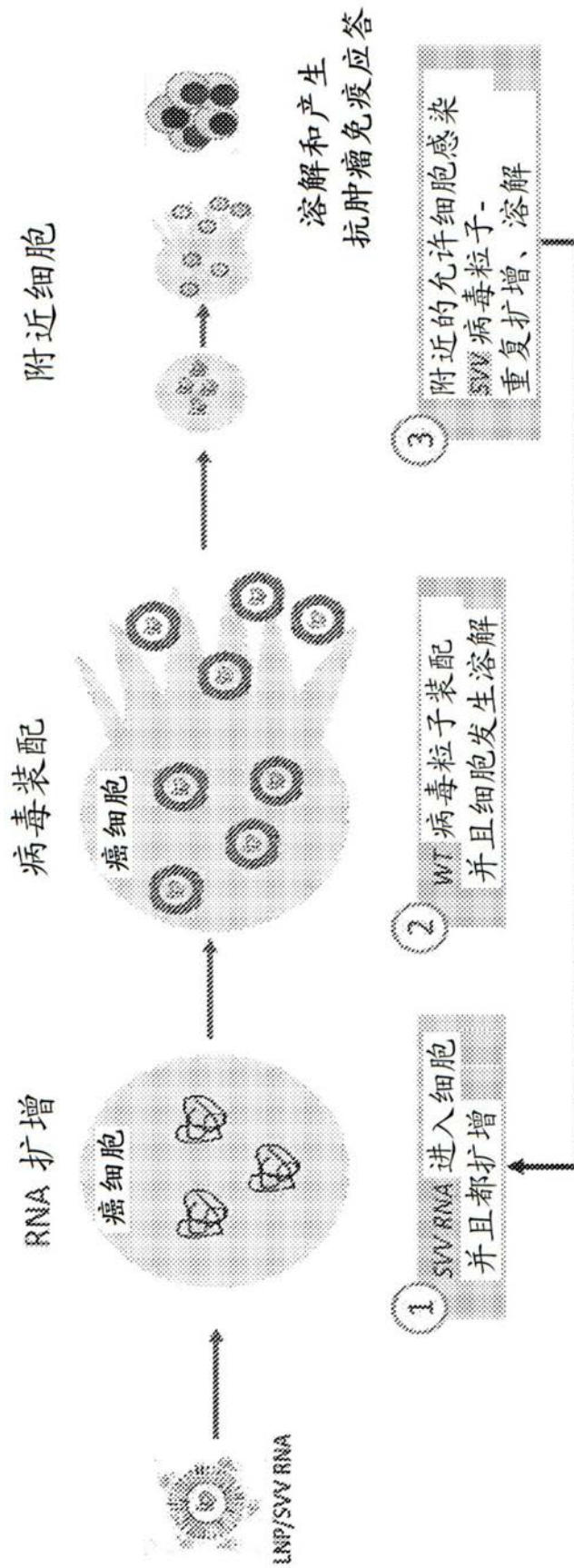


图33

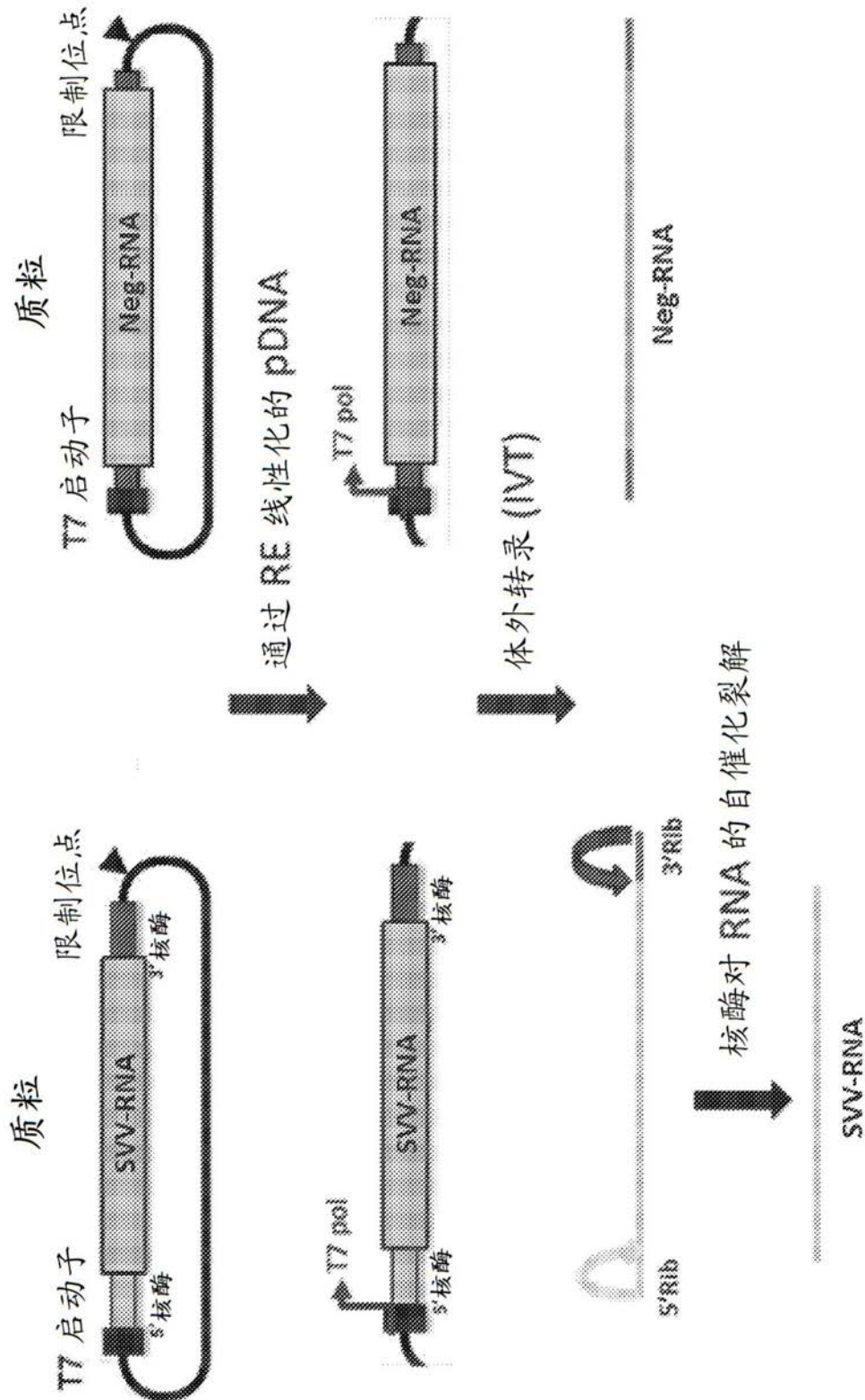


图34

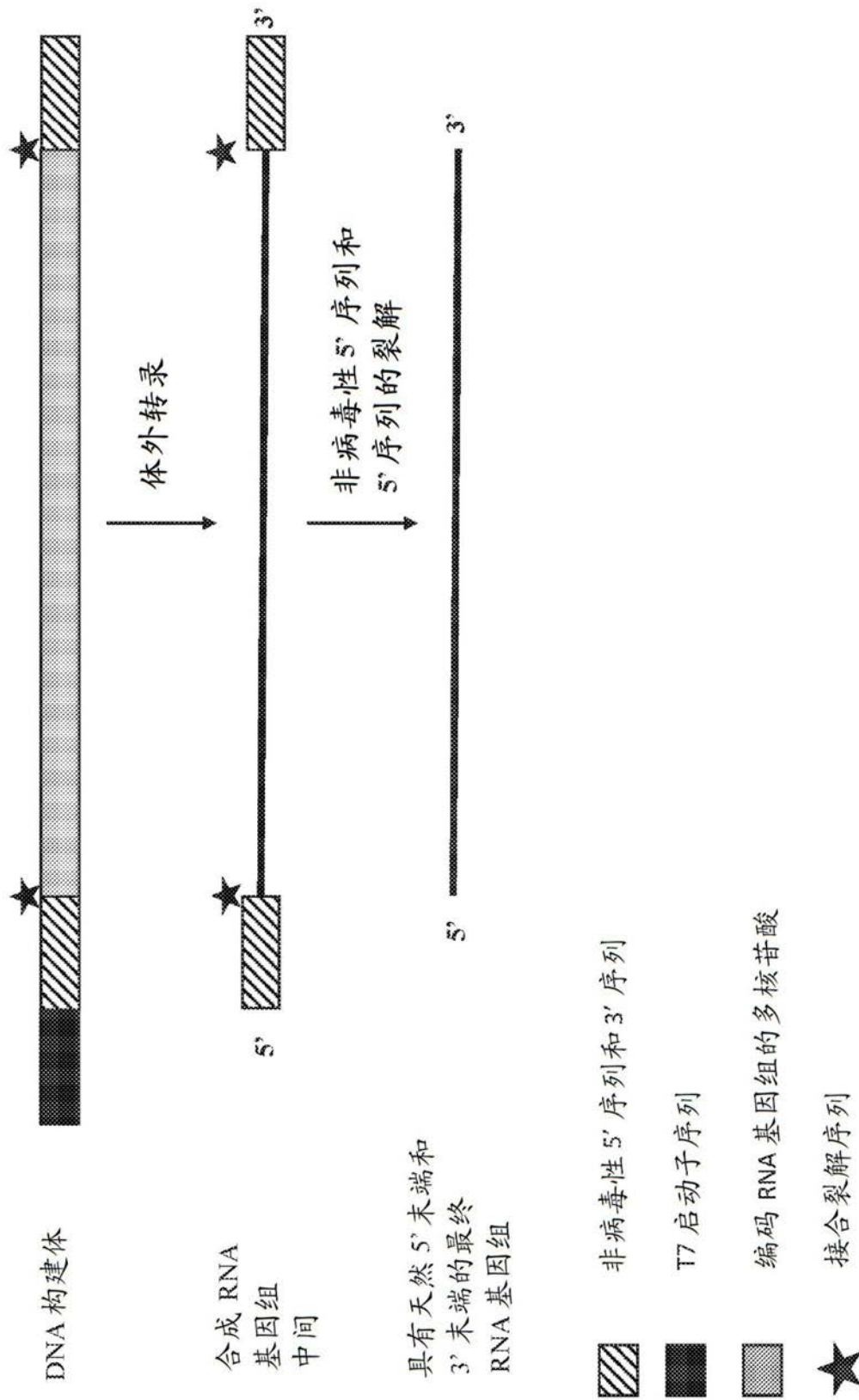


图35