(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115667530 A
(43)申请公布日 2023.01.31

(21)申请号 202180037433.2
(22)申请日 2021.03.24
(30)优先权数据
62/993,857 2020.03.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/023891 2021.03.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/195214 EN 2021.09.30
(71)申请人 世代生物公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 D·A·科尔 P·萨马约亚
N·西尔弗 S·阿吉雷
D·克拉特 E·H·帕萨克
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 袁泉
(51)Int.Cl.
C12N 15/85(2006.01)
C07K 14/745(2006.01)

权利要求书4页 说明书117页
序列表251页 附图30页

(54)发明名称

非病毒DNA载体和其用于表达因子IX治疗剂的用途

(57)摘要

本申请描述了用于递送和表达转基因的具有线性且连续结构的ceDNA载体。ceDNA载体包含通过两个ITR序列侧接的表达盒,其中所述表达盒编码了编码FIX蛋白的转基因。一些ceDNA载体进一步包含顺式调节元件,所述顺式调节元件包括调节开关。本文进一步提供了使用所述ceDNA载体进行可靠的体外、离体和体内FIX蛋白基因表达的方法和细胞系。本文提供了包含可用于在细胞、组织或受试者中表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法和组合物以及用表达FIX蛋白的所述ceDNA载体治疗疾病的方法。所述FIX蛋白能够被表达以治疗疾病,例如B型血友病。

CN 115667530 A

1.一种无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体,其包含:

在侧接反向末端重复序列(ITR)之间的至少一个核酸序列,其中所述至少一个核酸序列编码至少一种FIX蛋白。

2.根据权利要求1所述的ceDNA载体,其中编码至少一种FIX蛋白的所述至少一个核酸序列选自表1中所阐述的序列或表12中所列的任何ceDNA序列中所包括的任何开放阅读框(ORF)序列中的任一个。

3.根据权利要求1或2所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含可操作地连接到编码至少一种FIX蛋白的所述至少一个核酸序列的选自表7中的任一个启动子序列的启动子序列。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含选自表8中的任一个增强子序列的增强子序列。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含选自表9A中的任一个5'UTR和/或内含子序列的5'UTR和/或内含子序列。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含选自表9B中的任一个3'UTR序列的3'UTR序列。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含至少一个选自表10中的任一个聚A序列的聚A序列。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的ceDNA载体,其中所述ceDNA载体包含可操作地连接到至少一个核酸序列的至少一个启动子序列。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的ceDNA载体,其中所述至少一个核酸序列为cDNA。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的ceDNA载体,其中至少一个ITR包含功能末端解链位点及Rep结合位点。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的ceDNA载体,其中一个或两个所述ITR来自选自细小病毒(Parvovirus)、依赖病毒(Dependovirus)和腺相关病毒(AAV)的病毒。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR相对于彼此对称或不对称。

13.根据权利要求12所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR对称或基本上对称。

14.根据权利要求12所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR不对称。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的ceDNA载体,其中一个或两个所述ITR为野生型的,或其中两个所述ITR为野生型ITR。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR来自不同病毒血清型。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的ceDNA载体,其中所述侧接ITR选自表2中示出的任何病毒血清型对。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的ceDNA载体,其中一个或两个所述ITR包含选自表3中的一个或多个序列的序列。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的ceDNA载体,其中至少一个所述ITR由野生型AAV ITR序列通过影响所述ITR的总体三维构象的缺失、添加或取代进行改变。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的ceDNA载体,其中一个或两个所述ITR衍生自选

自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12的AAV血清型。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR为合成的。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR不为野生型ITR，或其中两个所述ITR不为野生型ITR。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR通过至少一个选自A、A'、B、B'、C、C'、D和D'的ITR区中的缺失、插入和/或取代进行修饰。

24.根据权利要求23所述的ceDNA载体，其中所述缺失、插入和/或取代引起通常通过所述A、A'、B、B'、C或C'区形成的茎-环结构全部或部分的缺失。

25.根据权利要求1至24中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR通过引起通常通过所述B和B'区形成的茎-环结构全部或部分的缺失的缺失、插入和/或取代进行修饰。

26.根据权利要求1至24中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR通过引起通常通过所述C和C'区形成的茎-环结构全部或部分的缺失的缺失、插入和/或取代进行修饰。

27.根据权利要求1至24中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR通过引起通常通过所述B和B'区形成的茎-环结构部分和/或通常通过所述C和C'区形成的茎-环结构部分的缺失的缺失、插入和/或取代进行修饰。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR包含通常包含通过所述B和B'区形成的第一茎-环结构和通过所述C和C'区形成的第二茎-环结构的区域中的单个茎-环结构。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR包含所述通常包含通过所述B和B'区形成的第一茎-环结构和通过所述C和C'区形成的第二茎-环结构的区域中的单个茎和两个环。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR包含所述通常包含通过所述B和B'区形成的第一茎-环结构和通过所述C和C'区形成的第二茎-环结构的区域中的单个茎和单个环。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的ceDNA载体，其中两个ITR以当所述ITR相对于彼此反向时产生总体三维对称性的方式进行改变。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的ceDNA载体，其中一个或两个所述ITR包含选自表3、5A、5B和6中所阐述的序列的核酸序列。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的ceDNA载体，其中至少一个核酸序列处于至少一个调节开关的控制下。

34.根据权利要求33所述的ceDNA载体，其中所述至少一个调节开关选自由以下组成的组：二元调节开关、小分子调节开关、密码调节开关、基于核酸的调节开关、转录后调节开关、辐射控制或超声波控制的调节开关、低氧介导的调节开关、炎症反应调节开关、剪切活化的调节开关和杀伤开关。

35.一种无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体，其包含选自表12的核酸序列。

36.一种无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体，其包含与SEQ ID NO:404、SEQ ID NO:405或

SEQ ID NO:406具有至少85%同一性的核酸序列。

37.一种无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体,其由选自由SEQ ID NO:404、SEQ ID NO:405和SEQ ID NO:406组成的组的核酸序列组成。

38.一种使FIX蛋白在细胞中表达的方法,其包含使所述细胞与根据权利要求1至37中任一项所述的ceDNA载体接触。

39.根据权利要求38所述的方法,其中所述细胞为肝细胞。

40.根据权利要求38或39所述的方法,其中所述细胞在体外或体内。

41.根据权利要求38至40中任一项所述的方法,其中所述至少一个核酸序列经密码子优化以在真核细胞中表达。

42.根据权利要求38至41中任一项所述的方法,其中经密码子优化的所述至少一个核酸序列选自表1中所阐述的序列或表12中所列的任何ceDNA序列中所包括的任何开放阅读框(ORF)序列中的任一个。

43.一种治疗患有B型血友病的受试者的方法,其包含向所述受试者施用根据权利要求1至37中任一项所述的ceDNA载体,其中至少一个核酸序列编码至少一种FIX蛋白。

44.根据权利要求43所述的方法,其中编码所述至少一种FIX蛋白的所述至少一个核酸序列选自表1中所阐述的任一个序列。

45.根据权利要求43或44所述的方法,其中向肝细胞施用所述ceDNA载体。

46.根据权利要求44至45中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体在肝细胞中表达所述FIX蛋白。

47.根据权利要求44至46中任一项所述的方法,其中通过静脉内或肌肉内注射来施用所述ceDNA载体。

48.根据权利要求44至47中任一项所述的方法,其进一步包含向所述受试者施用免疫调节剂。

49.根据权利要求48所述的方法,其中所述免疫调节剂为免疫抑制剂。

50.根据权利要求49所述的方法,其中所述免疫抑制剂为酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。

51.根据权利要求50所述的方法,其中向所述受试者施用呈约0.5mg/kg到约700mg/kg剂量的所述TKI。

52.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至37中任一项所述的ceDNA载体。

53.根据权利要求52所述的药物组合物,其进一步包含额外化合物。

54.根据权利要求52所述的药物组合物,其中所述额外化合物为免疫调节剂。

55.根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述免疫调节剂为免疫抑制剂。

56.根据权利要求55所述的药物组合物,其中所述免疫抑制剂为酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。

57.根据权利要求56所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包含赋形剂或载剂。

58.一种细胞,其含有根据权利要求1至37中任一项所述的ceDNA载体。

59.根据权利要求58所述的细胞,其中所述细胞为肝细胞。

60.一种组合物,其包含根据权利要求1至37中任一项所述的ceDNA载体和脂质。

61.根据权利要求60所述的组合物,其中所述脂质为脂质纳米粒子(LNP)。

62.一种试剂盒,其包含根据权利要求1至37中任一项所述的ceDNA载体、或根据权利要

求52至57中任一项所述的组合物、或根据权利要求58所述的细胞。

非病毒DNA载体和其用于表达因子IX治疗剂的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2020年3月24日提交的美国临时申请第62/993,857号的优先权,所述申请的全部内容通过引用以其全文并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子提交并在此通过全文引用的方式并入。所述ASCII副本创建于2021年3月22日,被命名为131698-06520_SL.txt并且大小为394,694字节。

技术领域

[0005] 本公开涉及基因疗法领域,所述基因疗法包括用于在受试者或细胞中表达转基因或经分离多核苷酸的非病毒载体。本公开还涉及核酸构建体、启动子、载体和宿主细胞,包括多核苷酸,以及将外源DNA序列递送至靶细胞、组织、器官或生物体的方法。举例来说,本公开提供了使用非病毒ceDNA载体从细胞表达FIX,例如表达FIX治疗蛋白以治疗患有B型血友病的受试者的方法。所述方法和组合物可以例如出于通过在有需要的受试者的细胞或组织中表达FIX蛋白来治疗疾病的目的来应用。

背景技术

[0006] 基因疗法旨在改善患有因基因表达谱畸变引起的基因突变或获得性疾病的患者的临床结果。基因疗法包括治疗或预防由可能导致病症、疾病、恶性病等的缺陷基因或异常基因调节或表达,例如表达不足或过表达导致的医学病况。举例来说,由缺陷基因造成的疾病或病症可以通过向患者递送矫正性遗传物质来加以治疗、预防或改善,或可以通过例如对患者用矫正性遗传物质改变缺陷基因或使缺陷基因沉默,从而引起遗传物质在患者体内进行治疗性表达来加以治疗、预防或改善。

[0007] 基因疗法的基础是向转录盒提供活性基因产物(有时称为转基因),例如能够产生正向功能获得效应、负向功能丧失效应或另一结果的活性基因产物。此类结果能够归因于活化抗体或融合蛋白或抑制(中和)抗体或融合蛋白的表达。基因疗法也可以用于治疗由其它因素引起的疾病或恶性疾病。人类单基因性病症为由单一基因变化造成的病症,可以通过将正常基因递送到靶细胞并进行表达来加以治疗。矫正基因在患者目标细胞中的递送和表达可以通过多种方法进行,包括使用工程化病毒和病毒基因递送载体。在许多可用的病毒来源载体(例如,重组逆转录病毒、重组慢病毒、重组腺病毒等)当中,重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus;rAAV)作为基因疗法中的多用途载体越来越受到欢迎。

[0008] 腺相关病毒(AAV)属于细小病毒科(Parvoviridae family),并且更具体地说,构成依赖病毒属(Dependoparvovirus genus)。衍生自AAV的载体(即,rAVV或AAV载体)对于递送遗传物质具有吸引力,因为(i)它们能够感染(转导)广泛多种的非分裂和分裂细胞类型,包括肌细胞和神经元;(ii)它们不含病毒结构基因,由此减弱了宿主细胞对病毒感染的反

应,例如干扰素介导的反应;(iii)野生型病毒被认为在人类中是非病理性的;(iv)与能够整合到宿主细胞基因组中的野生型AAV形成相比,复制缺陷型AAV载体缺乏复制(rep)基因,并且一般作为附加体存留,因此限制了插入突变形成或基因毒性的风险;以及(v)与其它载体系统相比,AAV载体一般被认为是相对较弱的免疫原,并且因此不会触发显著的免疫反应(参见ii),因此获得了载体DNA的存留性以及治疗性转基因的潜在长期表达。

[0009] 然而,使用AAV粒子作为基因递送载体存在几个主要缺陷。与rAAV相关的一个主要缺点是其对异源DNA的约4.5kb的病毒封装容量有限(Dong等人,1996;Athanasopoulos等人,2004;Lai等,2010),因此AAV载体的使用已限于小于150,000Da蛋白质编码容量。第二个缺点是,由于人群中野生型AAV感染盛行,所以必须筛查rAAV基因疗法候选者中从患者消除所述载体的中和抗体的存在。第三个缺点与衣壳免疫原性有关,所述免疫原性阻止了对未从初始治疗中排除的患者进行再施用。患者的免疫系统可以对有效充当"强化"注射的所述载体作出反应,以刺激免疫系统产生高滴度的抗AAV抗体,从而杜绝了进一步治疗。最近的一些报告指出在高剂量情况下对免疫原性的顾虑。另一个值得注意的缺点是,鉴于在异源基因表达之前必须将单链AAV DNA转化为双链DNA,所以AAV介导的基因表达的启动相对较慢。

[0010] 另外,通过引入一个或多个含有AAV基因组、rep基因和cap基因的质粒,产生有衣壳的常规AAV病毒体(Grimm等人,1998)。然而,发现这种衣壳化AAV病毒载体不能有效地转导某些细胞和组织类型,并且衣壳还诱导免疫反应。

[0011] 相应地,由于单次施用于患者(因患者免疫反应)、适于AAV载体递送的转基因遗传物质的范围因最小病毒封装容量(约4.5kb)而受限,以及AAV介导的基因表达缓慢,因此基因疗法使用腺相关病毒(AAV)载体受到限制。

[0012] 对B型血友病的疾病调节疗法存在大量未满足的要求。当前疗法为难以承担的并且需要频繁的静脉内(IV)施用。首先,这些因子IX可注射剂不提供因子的连续递送,其中低谷水平允许出血事件。其次,不存在审批通过的针对B型血友病的基因疗法,并且由于预先存在的抗体,基于AAV的疗法无法被25%到40%的患者使用。AAV仅可以施用一次,并且所产生的因子IX含量可能不够高而无效,或可能为超常的,无法滴定剂量水平。第三,一些B型血友病患者由于中和抗体发展成这些外源性人工凝血因子而无法利用这些疗法。

[0013] 因此,所属领域需要准许治疗性FIX蛋白在细胞、组织或受试者中表达以治疗B型血友病的技术。

发明内容

[0014] 本文所描述的技术涉及通过由具有共价封闭端的无衣壳(例如非病毒)DNA载体(在本文中称为"封闭端DNA载体"或"ceDNA载体")表达因子IX(FIX)蛋白来治疗B型血友病的方法和组合物,其中ceDNA载体包含FIX核酸序列或其经密码子优化型式。可以使用这些ceDNA载体产生用于治疗、监测和诊断的FIX蛋白。向受试者施用表达FIX的ceDNA载体以治疗B型血友病为有用的:(i)提供疾病调节含量的FIX酶,在递送中具微创性,可重复并且给药时生效,具有快速起效的治疗作用,引起矫正性FIX酶在肝中持久表达,恢复凝血级联,和/或可滴定以实现适当的药理学含量的缺陷酶。

[0015] 在一些实施例中,表达FIX的ceDNA载体任选地存在于脂质体纳米粒子配制物

(LNP)中以治疗B型血友病。本文所描述的ceDNA LNP配制物可以提供一种或多种益处,包括:提供疾病调节含量的FIX蛋白,在递送中具微创性,可重复并且给药时生效,具有通常在治疗性干预数天内快速起效的治疗作用,在循环中具有矫正性FIX含量的持久表达,可滴定以实现适当的药理学含量的缺陷凝血因子,和/或提供针对其它类型的血友病的治疗,所述其它类型的血友病包括但不限于因子VII缺陷。

[0016] 因此,本公开涉及包含编码FIX的基因以准许FIX治疗蛋白在细胞中表达的具有共价封闭端的无衣壳(例如非病毒)DNA载体(在本文中称为"封闭端DNA载体"或"ceDNA载体")。在一个实施例中,编码FIX的基因为异源基因。

[0017] 如本文所描述的用于表达FIX蛋白产生的ceDNA载体为由具有共价封闭端的互补DNA的连续链形成的无衣壳线性双链体DNA分子(线性、连续和非衣壳化结构),其包含5'反向末端重复(ITR)序列和3'ITR序列,其中5'ITR和3'ITR可以具有相同的相对于彼此的对称三维组织(即,对称或基本上对称的),或者,5'ITR和3'ITR可以具有不同的相对于彼此的三维组织(即,不对称ITR)。另外,ITR能够来自相同或不同的血清型。在一些实施例中,ceDNA载体能够包含ITR序列,所述ITR序列具有对称的三维空间组织,以便其结构在几何空间中呈相同形状,或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环(即,它们是相同的或相对于彼此呈镜像)。在一些实施例中,一个ITR可以来自一种AAV血清型,而另一个ITR可以来自不同的AAV血清型。

[0018] 因此,本文所描述的技术的一些方面涉及用于改善上述FIX蛋白的蛋白质表达和/或产生的ceDNA载体,其包含侧接核酸序列的ITR序列,所述核酸序列包含表1中所公开的任何FIX核酸序列或表12中所公开的任何ceDNA序列中所包括的任何开放阅读框序列,所述ITR序列选自以下中的任一个:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰AAV反向末端重复序列(ITR)(例如不对称的经修饰ITR);(ii)两个经修饰ITR,其中经修饰ITR对具有不同的相对于彼此的三维空间组织(例如不对称的经修饰ITR);或(iii)对称或基本上对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织;或(iv)对称或基本上对称的经修饰ITR对,其中每个经修饰ITR具有相同的三维空间组织。本文公开的ceDNA载体可以在真核细胞中产生,因此在昆虫细胞中没有原核DNA修饰和细菌内毒素污染。

[0019] 本文所描述的方法和组合物部分涉及探索可以用于由包括但不限于肝细胞的细胞表达至少一种FIX蛋白或超过一种FIX蛋白的具有共价封闭端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)。

[0020] 在一个方面中,本文提供包含可操作地连接到位于两个不同的AAV反向末端重复序列(ITR)之间的启动子的至少一个核酸序列的DNA载体(例如ceDNA载体),其中所述核酸序列编码转基因,一个所述ITR包含功能AAV末端解链位点和Rep结合位点,并且一个所述ITR相对于另一个ITR包含缺失、插入或取代;其中所述转基因编码FIX蛋白;并且其中当在非变性凝胶上分析时,与线性且非连续的DNA对照相比,所述DNA当被在DNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化时存在线性且连续的DNA的特征带。其它方面包括通过由如本文所描述的ceDNA载体对FIX蛋白进行体内表达来递送FIX蛋白,并且进一步包括使用编码FIX蛋白的ceDNA载体治疗B型血友病。本文还涵盖包含如本文所描述的编码FIX蛋白的ceDNA载体的细胞。

[0021] 本公开的方面涉及用于产生如本文所描述的可用于在细胞中表达FIX蛋白的

ceDNA载体的方法。其它实施例涉及通过本文所提供的方法产生的ceDNA载体。在一个实施例中，用于产生FIX蛋白的无衣壳(例如非病毒)DNA载体(ceDNA载体)获自包含多核苷酸表达构建体模板的质粒(在本文中称为“ceDNA质粒”)，所述模板按以下次序包含：第一5’反向末端重复序列(例如AAV ITR)；核酸序列；以及3’ITR(例如AAV ITR)，其中5’ITR和3’ITR可以相对于彼此不对称或对称(例如WT-ITR或经修饰的对称ITR)，如本文所定义。

[0022] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以通过在阅读本公开之后所属领域的普通技术人员已知的多种方式获得。举例来说，用于产生本公开的ceDNA载体的多核苷酸表达构建体模板可以为ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒。在一个实施例中，ceDNA质粒包含可操作地位于ITR之间的限制克隆位点(例如SEQ ID NO:123和/或124)，其中可以插入包含例如可操作地连接到转基因，例如编码FIX的核酸的启动子的表达盒。在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体由含有对称或不对称ITR(经修饰或WT ITR)的多核苷酸模板(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒、ceDNA杆状病毒)产生。

[0023] 在准许的宿主细胞中，在存在例如Rep的情况下，具有至少两个ITR的多核苷酸模板复制以产生表达FIX蛋白的ceDNA载体。ceDNA载体产生经历两个步骤：首先，通过Rep蛋白从模板主链(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒、ceDNA杆状病毒基因组等)中切除(“拯救”)模板；和其次，Rep介导所切除的ceDNA载体的复制。各种AAV血清型的Rep蛋白和Rep结合位点是所属领域的普通技术人员熟知的。普通技术人员了解基于至少一种功能性ITR从血清型中选择结合并复制核酸序列的Rep蛋白。例如，如果有复制能力的ITR来自AAV血清型2，那么对应的Rep将来自与所述血清型一起工作的AAV血清型，例如AAV2 ITR与AAV2或AAV4 Rep一起，但不是AAV5 Rep，它不行。复制后，共价封闭式ceDNA载体继续在准许细胞中累积，并且ceDNA载体在Rep蛋白存在下在标准复制条件下优选随时间足够稳定，例如，累积达至少1pg/细胞、优选至少2pg/细胞、优选至少3pg/细胞、更优选至少4pg/细胞、甚至更优选至少5pg/细胞的量。

[0024] 因此，本公开的一个方面涉及产生用于表达所述FIX蛋白的ceDNA载体的方法，所述方法包含以下步骤：a)在存在Rep蛋白的情况下，在有效诱导宿主细胞内产生ceDNA载体的条件下并持续足够诱导宿主细胞内产生ceDNA载体的时间来培育具有不含病毒衣壳编码序列的多核苷酸表达构建体模板(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒)的宿主细胞(例如昆虫细胞)群体，并且其中所述宿主细胞不包含病毒衣壳编码序列；和b)从宿主细胞中收取并分离ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰ITR的载体多核苷酸的复制以产生用于在宿主细胞中表达FIX蛋白的ceDNA载体。然而，没有表达病毒粒子(例如AAV病毒粒子)。因此，没有病毒粒子所施加的大小限制。

[0025] 从宿主细胞中分离的可用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的存在可以通过以下来证实：用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化从宿主细胞中分离的DNA，并在变性和非变性胶凝上分析所消化的DNA物质，以证实与线性且非连续的DNA相比线性且连续的DNA的特征带的存在。

[0026] 本文还提供了使用ceDNA载体在细胞或受试者中表达具有治疗用途的FIX蛋白的方法。所述FIX蛋白可以用于治疗B型血友病。因此，本文提供了用于治疗B型血友病的方法，其包含向有需要的受试者施用编码治疗FIX蛋白的ceDNA载体。

[0027] 在一些实施例中，本文所描述的技术的一个方面涉及具有共价封闭端的非病毒无

衣壳DNA载体(ceDNA载体),其中所述ceDNA载体包含可操作地位于两个ITR序列之间的至少一个核酸序列,其中当以下术语如本文所定义时,所述ITR序列可以不对称或对称或基本上对称,其中至少一个所述ITR包含功能末端解链位点(trs)和Rep结合位点,并且任选地,所述核酸序列编码转基因(例如FIX蛋白),并且其中所述载体不在病毒衣壳中。

[0028] 下文进一步详细描述本公开的这些和其它方面。

附图说明

[0029] 通过参考在附图中描绘的本公开的说明性实施例,可以理解上面简要概述并且在下面更详细论述的本公开的实施例。但是,附图仅示出了本公开的典型实施例,因此不应视为对范围的限制,因为本公开可以允许其它等效的实施例。

[0030] 图1A绘示了如本文所公开的包含不对称ITR的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构。在此实施例中,示范性ceDNA载体包括含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码FIX转基因的开放阅读框(ORF)可以插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点(R3/R4)中。表达盒侧接在两个反向末端重复序列(ITR)-表达盒上游(5'端)的野生型AAV2ITR和下游(3'端)的经修饰ITR,因此侧接表达盒的两个ITR彼此不对称。

[0031] 图1B绘示了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构,所述ceDNA载体包含不对称ITR以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码FIX转基因的开放阅读框(ORF)可以插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。所述表达盒侧接两个反向末端重复序列(ITR)-所述表达盒上游(5'端)的经修饰ITR和下游(3'端)的野生型ITR。

[0032] 图1C绘示了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构,所述ceDNA载体包含不对称ITR以及含有增强子/启动子、FIX转基因、转录后元件(WPRE)和聚A信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许将FIX转基因插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接两个彼此不对称的反向末端重复序列(ITR);所述表达盒上游(5'端)的修饰ITR和下游(3'端)的修饰ITR,其中所述5'ITR和3'ITR都是修饰ITR,但是具有不同的修饰(即,它们不具有相同的修饰)。

[0033] 图1D绘示了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构,所述ceDNA载体包含如本文所定义的对称的经修饰ITR或基本上对称的经修饰ITR以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码FIX转基因的开放阅读框(ORF)被插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接两个修饰的反向末端重复序列(ITR),其中5'经修饰ITR和3'经修饰ITR是对称的或基本上对称的。

[0034] 图1E绘示了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构,所述ceDNA载体包含如本文所定义的对称的经修饰ITR或基本上对称的经修饰ITR以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和聚A信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许将转基因(例如FIX)插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接两个修饰的反向末端重复序列(ITR),其中5'经修饰ITR和3'经修饰ITR是对称的或基本上对称的。

[0035] 图1F绘示了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构,所述ceDNA载体包含如本文所定义的对称的WT-ITR或基本上对称的WT-ITR以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码转基因(例如FIX)的开放阅读框(ORF)被插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR),其中5'WT-

ITR和3'WT ITR对称或基本上对称。

[0036] 图1G绘示了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性结构,所述ceDNA载体包含如本文所定义的对称的经修饰ITR或基本上对称的经修饰ITR以及含有增强子/启动子、转基因(例如FIX)、转录后元件(WPRE)和聚A信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许将转基因(例如FIX)插入在CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR),其中5'WT-ITR和3'WT ITR对称或基本上对称。

[0037] 图2A提供了AAV2的野生型左ITR(SEQ ID NO:52)的T形茎-环结构,以及A-A'臂、B-B'臂、C-C'臂、两个Rep结合位点(RBE和RBE')的标识,并且还显示了末端解析位点(trs)。RBE含有一连串4个双链体四聚体,它们被认为与Rep 78或Rep 68相互作用。另外,RBE'也被认为与在所述构建体中的野生型ITR或突变的ITR上装配的Rep复合物相互作用。D和D'区含有转录因子结合位点和其它保守结构。图2B显示了所提出的Rep催化的在野生型左ITR(SEQ ID NO:53)中产生的切割和接合活性,所述野生型左ITR包括AAV2的野生型左ITR的T形茎-环结构以及A-A'臂、B-B'臂、C-C'臂、两个Rep结合位点(RBE和RBE')的标识,并且还显示了末端解析位点(trs)以及包含若干转录因子结合位点和另一保守结构的D和D'区域。

[0038] 图3A提供了野生型左AAV2 ITR(SEQ ID NO:54)的A-A'臂的含RBE部分以及C-C'和B-B'臂的一级结构(多核苷酸序列)(左)和二级结构(右)。图3B显示了左ITR的示范性突变ITR(也称为修饰ITR)序列。显示的是示范性突变左ITR(ITR-1,左)(SEQ ID NO:113)的A-A'臂的RBE部分、C臂和B-B'臂的一级结构(左)和预测的二级结构(右)。图3C显示了野生型右AAV2 ITR(SEQ ID NO:55)的A-A'环的含RBE部分以及B-B'和C-C'臂的一级结构(左)和二级结构(右)。图3D显示了示范性右修饰ITR。显示的是示范性突变右ITR(ITR-1,右)(SEQ ID NO:114)的A-A'臂的含RBE部分、B-B'和C臂的一级结构(左)和预测的二级结构(右)。可以如本文所教示,使用左ITR和右ITR的任何组合(例如AAV2 ITR或其它病毒血清型ITR或合成ITR)。图3A-3D的多核苷酸序列中的每一个是指在用于产生如本文所述的ceDNA的质粒或杆粒/杆状病毒基因组中所用的序列。图3A-3D每一个中还包含从质粒或杆粒/杆状病毒基因组中的ceDNA载体构型推断出的相应ceDNA二级结构以及预测的吉布斯自由能(Gibbs free energy)值。

[0039] 图4A为绘示了用于制造感染杆状病毒的昆虫细胞(BIIC)的上游过程的示意图,所述细胞可用于在图4B的示意图中所描述的过程中产生本文所公开的用于表达FIX的ceDNA载体。图4B是ceDNA产生的一种示范性方法的示意图,图4C示出了证实ceDNA载体产生的一种生化方法和过程。图4D和图4E是描述了用于标识从在图4B的ceDNA产生过程期间获得的细胞集结粒收取的DNA中ceDNA的存在的过程的示意图。图4D显示未切割或用限制性核酸内切酶消化并然后在天然凝胶或变性凝胶上进行电泳的示范性ceDNA的示意性预期色带。最左边的示意图是天然凝胶,并显示多个色带,表明以其双链体和未切割形式的ceDNA以至少单体和二聚体状态存在,可看到呈迁移较快的较小单体和迁移较慢的二聚体,二聚体的大小是单体的两倍。左起第二个示意图显示,当用限制性核酸内切酶切割ceDNA时,原始色带消失并出现了迁移较快(例如较小)的色带,与切割后剩余的预期片段大小相对应。在变性条件下,原始双链体DNA是单链的,并且因为互补链是共价连接的,所以作为两倍于天然凝胶上观察到的大小的物种进行迁移。因此,在右起第二个示意图中,经过消化的ceDNA显示出与在天然凝胶上观察到的相似的色带分布,但是所述色带作为其天然凝胶对应物大小的

两倍的片段进行迁移。最右边的示意图显示,在变性条件下未切割的ceDNA作为单链开环进行迁移,因此观察到的色带是在不开环的天然条件下观察到的色带大小的两倍。在此图中,“kb”用于指示核苷酸分子的相对大小,取决于背景,其基于核苷酸链长(例如,对于在变性条件下观察到的单链分子)或碱基对数目(例如,对于在天然条件下观察到的双链分子)。图4E显示了具有不连续结构的DNA。ceDNA可以通过在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制性核酸内切酶切割,并在中性和变性两种条件下产生两个大小不同(1kb和2kb)的DNA片段。图4E还显示了具有线性且连续结构的ceDNA。所述ceDNA载体可被限制性核酸内切酶切割,并产生两个DNA片段,所述片段在中性条件下以1kb和2kb迁移,但在变性条件下,链保持连接并产生以2kb和4kb迁移的单链。

[0040] 图5是ceDNA载体实例跑变性凝胶的示范性图像,所述ceDNA载体用核酸内切酶消化(+)或不消化(-)(ceDNA构建体1和2使用EcoRI;ceDNA构建体3和4使用BamH1;ceDNA构建体5和6使用SpeI;且ceDNA构建体7和8使用XhoI)。构建体1-8描述于国际申请PCT PCT/US18/49996的实例1中,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。确定了用星号突出显示的色带的大小,并提供在图片的底部。

[0041] 图6描绘了实例7中所述的实验结果且特别地显示IVIS图像,所述图像获自经LNP-聚C对照治疗的小鼠(距左侧最远的小鼠)和经LNP-ceDNA荧光素酶治疗的四个小鼠(除距离左侧最远的小鼠之外的所有小鼠)。经ceDNA治疗的四只小鼠在小鼠的含肝脏区域中显示明显的荧光。

[0042] 图7描绘了实例8中所述的实验结果。暗斑点表示由被表达的ceDNA转基因产生的蛋白质存在且证实所施用的LNP-ceDNA与肝细胞结合。

[0043] 图8A-8B描绘了实例9中所阐述的眼部研究的结果。图8A显示了注射JetPEI®-ceDNA荧光素酶的大鼠眼睛(左上方)相对于相同大鼠的未注射眼睛(右上方)或注射质粒-荧光素酶DNA的大鼠眼睛(左下方)与相同大鼠的未注射眼睛(右下方)的代表性IVIS图像。图8B显示了每个治疗组的经治疗眼睛或相应未治疗眼睛中观察到的平均辐射度图。ceDNA治疗的大鼠在99天期间展现长时间的明显荧光(和因此荧光素酶转基因表达),与之形成鲜明对比的是经质粒-荧光素酶治疗的大鼠,其中观察到的相对荧光(和因此荧光素酶转基因表达)最小。

[0044] 图9A和9B描绘了实例10中所描述的Rag2小鼠的ceDNA存留性和重复给药研究的结果。图9A显示了在LNP-ceDNA-Luc治疗的野生型c57bl/6小鼠或Rag2小鼠中随时间观察到的总通量的图形。图9B提供的图形显示了重复剂量对Rag2小鼠中的荧光素酶转基因表达水平的影响,重复剂量之后,随之观察到增加的稳定表达(箭头表示重复剂量施用的时间)。

[0045] 图10提供了实例11中所述的经治疗小鼠的ceDNA荧光素酶表达研究的数据,显示了每组小鼠在研究期间的总通量。高水平的未甲基化CpG与小鼠中随时间所观察到的较低总通量相关,而肝脏特异性启动子的使用与ceDNA载体在至少77天期间对转基因的持久稳定表达相关。

[0046] 图11A和11B显示了表达FIX的ceDNA载体的流体动力学递送。图11A显示了在流体动力学注射两种不同的表达FIX(LPS1-FIX-v1;LPS1-FIX-v2)的ceDNA载体或对照ceDNA载体(仅表达荧光素酶的ceDNA)(显示为媒剂)之后在第3天和第7天来自小鼠的血清样品中的FIX表达水平。这两种FIX ceDNA载体均显示FIX表达。图11B显示了在流体动力学注射两种

不同的表达FIX(LPS1-FIX-v1;LPS1-FIX-v2)的ceDNA载体或媒剂对照ceDNA载体(仅表达荧光素酶)之后在28天时间段内来自小鼠的血清样品中的FIX表达水平。

[0047] 图12描绘了在第0天和第36天注射了LNP配制的FIX ceDNA构建体(2.0mg/kg)并在第-2天、第-1天、第0天、第1天和第36天经口给予了300mg/kg芦可替尼(ruxolitinib)的小鼠的血浆因子IX含量。

[0048] 图13A和13B显示了用ceDNA-FIX构建体(ceDNA-FIX v1;ceDNA-FIX 2109;或ceDNA-FIX 2112)治疗的雄性CD-1小鼠的FIX表达,每个所述ceDNA-FIX构建体都含有经密码子优化的人类FIX序列。图13A显示了通过流体动力学递送用1μg ceDNA-FIX v1、ceDNA-FIX 2109或ceDNA-FIX 2112治疗的CD-1小鼠的在第3天和第7天测量的人类FIX表达水平。图13B显示了通过流体动力学递送的用10μg ceDNA-FIX v1、ceDNA-FIX 2109或ceDNA-FIX 2112治疗的CD-1小鼠的在第3天和第7天测量的人类FIX表达水平。

具体实施方式

[0049] 本文提供了使用包含一种或多种编码FIX治疗蛋白或其片段的核酸的ceDNA载体治疗B型血友病的方法。本文还提供了如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体,所述ceDNA载体包含一种或多种编码FIX蛋白的核酸。在一些实施例中,FIX蛋白的表达可以包含将治疗蛋白分泌到所述治疗蛋白表达于其中的细胞之外。或者,在一些实施例中,所表达的FIX蛋白可以在所述FIX蛋白表达于其中的细胞内起作用或具有功能(例如,发挥其作用)。在一些实施例中,ceDNA载体在受试者的肝脏、肌肉(例如骨骼肌)或其它身体部位中表达FIX蛋白,其可以充当储槽以用于FIX治疗蛋白生产和分泌到许多全身腔室中。

[0050] I.定义

[0051] 除非本文另有定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。应理解,本公开不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文所使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,并且不打算限制仅由权利要求书界定的本公开的范围。免疫学和分子生物学中常用术语的定义能够在下列文献中找到:《默克诊疗手册(The Merck Manual of Diagnosis and Therapy)》第19版,默克夏普公司(Merck Sharp&Dohme Corp.)出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等人(编辑),《病毒学领域(Fields Virology)》第6版,Lippincott Williams&Wilkins出版,美国宾夕法尼亚州费城(Philadelphia,PA,USA)(2013);Knipe,D.M.和Howley,P.M.(编辑),《分子细胞生物学与分子医学百科全书(The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine)》,Blackwell科学有限公司出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编辑),《分子生物学与生物技术:综合案头参考(Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference)》,由VCH Publishers有限公司出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Werner Luttmann的《免疫学(Immunology)》,由Elsevier出版,2006;《詹韦氏免疫生物学(Janeway's Immunobiology)》,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编辑),Taylor&Francis有限公司,2014(ISBN 0815345305、9780815345305);《勒温基因XI(Lewin's Genes XI)》,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory

Manual)》,第4版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),美国纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.,USA)(2012)(ISBN 1936113414);Davis等人,《分子生物学的基本方法(Basic Methods in Molecular Biology)》,Elsevier科学出版有限公司,美国纽约(2012)(ISBN 044460149X);《酶学实验室方法:DNA(Laboratory Methods in Enzymology:DNA)》,Jon Lorsch(编辑)Elsevier,2013(ISBN 0124199542);《分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology,CPMB)》,Frederick M.Ausubel(编辑),John Wiley and Sons,2014(ISBN047150338X、9780471503385),《蛋白质科学现代方法(Current Protocols in Protein Science,CPPS)》,John E.Coligan(编辑),John Wiley and Sons,Inc.,2005;以及《免疫学现代方法(Current Protocols in Immunology,CPI)》(John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe(编辑)John Wiley and Sons,Inc.,2003(ISBN0471142735、9780471142737),其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0052] 如本文所使用,术语“异源核酸序列”和“转基因”可互换使用并且指并入如本文所公开的ceDNA载体中并可以由所述ceDNA载体递送和表达的感兴趣的核酸(除编码衣壳多肽的核酸之外)。根据一些实施例,术语“异源核酸”打算指不存在于其所接触的细胞或受试者中、由其所接触的细胞或受试者表达或衍生自其所接触的细胞或受试者的核酸(或转基因)。

[0053] 如本文所用,术语“表达盒”和“转录盒”可互换使用,并且是指一段线性核酸,其包括与一个或多个启动子或足以引导转基因转录的其它调节序列可操作地连接的转基因,但是不包含衣壳编码序列、其它载体序列或反向末端重复区域。表达盒可以另外包含一个或多个顺式作用序列(例如启动子、增强子或阻遏子)、一个或多个内含子和一个或多个转录后调节元件。

[0054] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物形式。因此,这个术语包含单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交物、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。“寡核苷酸”通常是指单链或双链DNA的约5至约100个核苷酸之间的多核苷酸。然而,出于本公开的目的,寡核苷酸的长度没有上限。寡核苷酸也称为“低聚物(oligomer)”或“低聚物(oligo)”,并且可以从基因中分离出来,或通过所属领域已知的方法化学合成。应理解,术语“多核苷酸”和“核酸”包括单链(例如有义或反义)和双链多核苷酸(适用于所描述的实施例时)。

[0055] DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、DNA-DNA双链体、预缩合DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合的形式。DNA可以呈小环、质粒、杆粒、小基因、辅助DNA(线性共价封闭的DNA载体)、封闭端线性双链体DNA(CELiD或ceDNA)、doggybone(dbDNA^{TM})DNA、哑铃形DNA、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、病毒载体或非病毒载体的形式。RNA可以呈小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)和其组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰主链残基或键联的核酸,其是合成的、天然存在的以及非天然存在的,并且其具有与参考核酸类似的结合特性。所述类似物和/或经修饰残基的实例包含(但不限于):硫代磷酸酯、磷酰二胺吗

啉代低聚体(吗啉代)、氨基磷酸酯、膦酸甲酯、手性膦酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNATM)和肽核酸(PNA)。除非特定限制,否则所述术语涵盖含有与参考核酸具有类似结合性质的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另有指示,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变异体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。

[0056] 如本文所使用的,"核苷酸"含有糖脱氧核苷(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基连接在一起。

[0057] "碱基"包括嘌呤和嘧啶,所述嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于放置新的反应性基团(诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧化物和烷基卤化物)的修饰。

[0058] 如本文所使用的,术语"核酸构建体"是指单链或双链的核酸分子,其是从天然基因中分离的,或者以自然界中不另外存在或合成的方式进行修饰以含有核酸的节段。当核酸构建体包含表达本公开的编码序列所需的控制序列时,术语核酸构建体与术语"表达盒"同义。"表达盒"包括可操作地连接至启动子的DNA编码序列。

[0059] "可杂交的"或"互补的"或"基本上互补的"意指核酸(例如RNA)包括使其能够与另一核酸序列在体外和/或体内适当的温度和溶液离子强度的条件下非共价结合,即形成沃森-克里克碱基对(Watson-Crick base pair)和/或G/U碱基对、"退火"或"杂交"以序列特异性的反向平行方式(即,核酸特异性地结合于互补核酸)的核苷酸序列。如所属领域已知的,标准的沃森-克里克碱基对包含:腺嘌呤(A)与胸苷(T)配对,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)配对,鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。另外,在所属领域中还已知对于两个RNA分子(例如dsRNA)之间的杂交,鸟嘌呤(G)碱基与尿嘧啶(U)配对。例如,在与mRNA中的密码子进行tRNA反密码子碱基配对的情况下,G/U碱基配对部分负责遗传密码的简并性(即,冗余)。在本公开的上下文中,靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合区段(dsRNA双链体)的鸟嘌呤(G)被认为与尿嘧啶(U)互补,反之亦然。这样,当可以在靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合节段(dsRNA双螺旋)的给定核苷酸位置形成G/U碱基对时,所述位置不被认为是非互补的,而是被认为是互补的。

[0060] 术语"肽"、"多肽"和"蛋白质"在本文可互换使用,是指任何长度的氨基酸的聚合物形式,其可以包含编码和非编码的氨基酸、经过化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸和具有修饰的肽主链的多肽。

[0061] "编码"特定FIX蛋白的DNA序列为转录到特定RNA和/或蛋白质中的DNA核酸序列。DNA多核苷酸可以编码被转译成蛋白质的RNA(mRNA),或者DNA多核苷酸可以编码未被转译成蛋白质的RNA(例如tRNA、rRNA或靶向DNA的RNA;也称为"非编码"RNA或"ncRNA")。

[0062] 如本文所使用,术语"融合蛋白"是指包含来自至少两种不同蛋白质的蛋白质结构域的多肽。举例来说,融合蛋白可以包含(i)FIX或其片段和(ii)至少一种非感兴趣的基因(GOI)蛋白。本文涵盖的融合蛋白包括但不限于与FIX蛋白融合的抗体、或抗体的Fc或抗原结合片段,例如受体、配体、酶或肽的胞外结构域。作为融合蛋白的一部分的FIX蛋白或其片段可以为单特异性抗体或双特异性抗体或多特异性抗体。

[0063] 如本文所用,术语"基因组安全港基因"或"安全港基因"是指可以插入核酸序列以使得所述序列可以以可预测的方式整合和起作用(例如表达所关注蛋白质)且对内源基因

活性没有明显的负面影响或不促进癌症的基因或基因座。在一些实施例中，安全港基因也是可有效地表达所插入的核酸序列并且表达水平比非安全港位点高的基因座或基因。

[0064] 如本文所用，术语“基因递送”意指将外来DNA转移到宿主细胞中以施加基因疗法的方法。

[0065] 如本文所用，术语“末端重复”或“TR”包括任何包含至少一个最低需要的复制起点和包含回文发夹结构的区域的病毒末端重复或合成序列。Rep结合序列(“RBS”)(也称为RBE(Rep结合元件))和末端解链位点(“TRS”)共同构成“最低需要的复制起点”，并且因此TR包括至少一个RBS和至少一个TRS。在给定的一段多核苷酸序列内彼此是反向互补序列的TR通常各自被称为“反向末端重复序列”或“ITR”。在病毒的背景下，ITR介导复制、病毒包装、整合和原病毒拯救。如出乎意料地发现，在其全长上不为反向互补序列的TR仍然可以执行ITR的传统功能，并且因此术语ITR在本文中用于指ceDNA基因组或ceDNA载体中能够介导ceDNA载体复制的TR。所属领域的普通技术人员将了解，在复杂的ceDNA载体构型中，可以存在超过两个ITR或不对称的ITR对。ITR可以是AAV ITR或非AAV ITR，或可以来源于AAV ITR或非AAV ITR。举例来说，ITR可以衍生自细小病毒科，所述细小病毒科涵盖细小病毒和依赖病毒(例如犬科动物细小病毒、牛科动物细小病毒、小鼠细小病毒、猪科动物细小病毒、人类细小病毒B-19)，或可以使用充当SV40复制起点的SV40发夹作为ITR，所述ITR可以通过截短、取代、缺失、插入和/或添加而被进一步修饰。细小病毒科病毒由两个亚科组成：感染脊椎动物的细小病毒亚科(Parvovirinae)以及感染无脊椎动物的浓病毒亚科(Densovirinae)。依赖病毒属包含腺相关病毒(AAV)的病毒家族，其能够在脊椎动物宿主中复制，所述宿主包含但不限于人、灵长类、牛、犬、马和羊物种。本文中为了方便起见，将位于ceDNA载体中表达盒的5’(上游)的ITR称为“5’ITR”或“左ITR”，并将位于ceDNA载体中表达盒的3’(下游)的ITR称为“3’ITR”或“右ITR”。

[0066] “野生型ITR”或“WT-ITR”是指AAV或其它依赖病毒中天然存在的ITR序列的序列，其保留例如Rep结合活性和Rep切口能力。由于遗传密码简并或漂移，来自任何AAV血清型的WT-ITR的核酸序列可能与典型的天然存在的序列略有不同，并且因此，本文涵盖的使用的WT-ITR序列包括归因于在产生过程中发生的天然存在的变化(例如复制误差)的WT-ITR序列。

[0067] 如本文所用，术语“基本上对称的WT-ITR”或“基本上对称的WT-ITR对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的一对WT-ITR，它们都是在整个长度上具有反向互补序列的野生型ITR。举例来说，ITR即使具有一个或多个偏离典型的天然存在的序列的核苷酸，只要变化并不影响所述序列的特性和整体三维结构，所述ITR也可以被认为是野生型序列。在一些方面，偏离的核苷酸代表保守的序列变化。作为一个非限制性实施例，序列与典范序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性(例如使用默认设置下的BLAST测量)，并且还与另一个WT-ITR具有对称的三维空间组织，以使它们的3D结构在几何空间中具有相同的形状。基本上对称的WT-ITR在3D空间中具有相同的A、C-C’和B-B’环。通过确定具有与合适的Rep蛋白配对的可操作的Rep结合位点(RBE或RBE’)和末端解链位点(trs)，可以在功能上确认基本上对称的WT-ITR为WT。可以选择测试其它功能，包含在准许条件下的转基因表达。

[0068] 如本文所使用的，短语“经修饰ITR(modified ITR/mod-ITR)”或“突变ITR”在本文中可互换使用，并且是指与来自相同血清型的WT-ITR相比在至少一个或多个核苷酸中具有

突变的ITR。突变可能导致ITR中A、C、C'、B、B'区中的一个或多个发生变化，并且可能导致三维空间组织(即，其几何空间中的3D结构)与相同血清型的WT-ITR的3D空间组织相比发生变化。

[0069] 如本文所使用的，术语“不对称ITR”也称为“不对称ITR对”，是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内在全长上不反向互补的一对ITR。作为一个非限制性实施例，不对称的ITR与其同源ITR不具有对称的三维空间组织，使得其3D结构在几何空间中具有不同的形状。换句话说，不对称的ITR对具有不同的整体几何结构，即它们在3D空间中具有不同的A、C-C'和B-B'环组织(例如，一个ITR与同源ITR相比可能具有短的CC'臂和/或短的BB'臂)。两个ITR之间的序列差异可能是由于一个或多个核苷酸添加、缺失、截短或点突变引起的。在一个实施例中，不对称ITR对中的一个ITR可以是野生型AAV ITR序列，另一个ITR是如本文定义的修饰ITR(例如非野生型或合成ITR序列)。在另一个实施例中，不对称ITR对中的ITR皆不是野生型AAV序列，并且两个ITR是在几何空间中具有不同形状的经修饰ITR(即，不同的整体几何结构)。在一些实施例中，不对称ITR对中的一个经修饰ITR可能具有短的C-C'臂，而另一个ITR可能具有不同的修饰(例如单臂或短的B-B'臂等)，使得它们与同源不对称经修饰ITR相比具有不同的三维空间组织。

[0070] 如本文所用，术语“对称ITR”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的一对ITR，其相对于野生型依赖病毒ITR序列发生突变或修饰并且在其全长上反向互补。这两个ITR都不是野生型ITR AAV2序列(即，它们是修饰ITR，也称为突变ITR)，并且由于核苷酸的添加、缺失、取代、截短或点突变，而在序列上与野生型ITR不同。本文中为了方便起见，将位于ceDNA载体中表达盒的5'(上游)的ITR称为“5'ITR”或“左ITR”，并将位于ceDNA载体中表达盒的3'(下游)的ITR称为“3'ITR”或“右ITR”。

[0071] 如本文所使用的，术语“基本上对称的经修饰ITR”或“基本上对称的经修饰ITR对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体中的一对修饰ITR，它们在其全长上具有反向互补序列。举例来说，经修饰ITR即使具有一些偏离反向互补序列的核苷酸序列，但只要变化不影响性质和整体形状，也可以认为其是基本上对称的。作为一个非限制性实例，序列与典型序列具有至少85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性(如使用默认设置下的BLAST所测量)，并且还与其同源的经修饰ITR具有对称的三维空间组织以使得其3D结构在几何空间中为相同形状。换句话说，基本上对称的经修饰ITR对具有在3D空间中组织的相同的A、C-C'和B-B'环。在一些实施例中，来自经修饰ITR对的ITR可以具有不同的反向互补核苷酸序列，但仍具有相同的对称三维空间组织，即两个ITR都具有产生相同的整体3D形状的突变。举例来说，经修饰ITR对中的一个ITR(例如5'ITR)可以来自一种血清型，而另一个ITR(例如3'ITR)可以来自不同血清型，然而，两者均能够具有相同的相应突变(例如，如果5'ITR在C区域中具有缺失，则来自不同血清型的经修饰同源3'ITR在C'区域中的相应位置具有缺失)，使得经修饰ITR对具有相同的对称三维空间组织。在所述实施例中，经修饰ITR对中的每个ITR可以来自不同血清型(例如，AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12)，例如AAV2与AAV6的组合，其中一个ITR中的修饰反映在来自不同血清型的同源ITR中的对应位置中。在一个实施例中，基本上对称的经修饰ITR对是指一对经修饰ITR(modified ITR/mod-ITR)，只要ITR之间的核苷酸序列的差异不影响特性或整体形状并且其在3D空间中具有基本上相同的形状即可。作为非限制性实例，如通过所属领域中熟知的标准方法，例

如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)或BLASTN所测定,经修饰ITR与典型经修饰ITR具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,并且还具有对称的三维空间组织以使其3D结构在几何空间中为相同形状。基本上对称的经修饰ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环,例如,如果基本上对称的经修饰ITR对中的经修饰ITR缺失C-C'臂,那么同源经修饰ITR对应缺失C-C'环,并且还具有在其同源经修饰ITR的几何空间中呈相同形状的剩余A和B-B'环的类似3D结构。

[0072] 术语"位于侧翼"是指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。通常,在序列ABC中,B的两侧是A和C。对于A×B×C排列,情况也是如此。因此,位于两侧的序列在被侧接的序列之前或之后,但不必与被侧接的序列相邻或紧邻。在一个实施例中,术语位于两侧是指在线性双链体ceDNA载体的每个末端出的末端重复序列。

[0073] 如本文所使用的,术语"ceDNA基因组"是指还并入了至少一个反向末端重复区域的表达盒。ceDNA基因组还可以包括一个或多个间隔区。在一些实施例中,ceDNA基因组作为DNA的分子间双链体多核苷酸并入质粒或病毒基因组中。

[0074] 如本文所使用的,术语"ceDNA间隔区"是指分隔ceDNA载体或ceDNA基因组中的功能元件的间插序列。在一些实施例中,ceDNA间隔区将两个功能元件保持在对于最优功能性来说所期望的距离上。在一些实施例中,ceDNA间隔区提供或增加了ceDNA基因组在例如质粒或杆状病毒内的遗传稳定性。在一些实施例中,ceDNA间隔区通过提供克隆位点等的便利位置,促进ceDNA基因组的就绪遗传操作。举例来说,在某些方面中,含有若干限制性核酸内切酶位点的寡核苷酸"多酶切点接头"或设计成不具有已知蛋白质(例如转录因子)结合位点的非开放阅读框序列能够定位于ceDNA基因组中以分离顺式作用因子,例如将6聚体、12聚体、18聚体、24聚体、48聚体、86聚体、176聚体等插入末端解链位点与上游转录调节元件之间。类似地,可以在多聚腺苷酸化信号序列和3'-末端解链位点之间并入间隔区。

[0075] 如本文所用,术语"Rep结合位点"、"Rep结合元件"、"RBE"和"RBS"可互换使用并且是指Rep蛋白(例如AAV Rep 78或AAV Rep 68)的结合位点,其在Rep蛋白结合后允许Rep蛋白在并入了所述RBS的序列上发挥其位点特异性核酸内切酶活性。RBS序列和其反向互补序列一起形成单个RBS。RBS序列在所属领域中为已知的,并且包括例如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60),即AAV2中所标识的RBS序列。在本公开的实施例中可以使用任何已知的RBS序列,包括其它已知的AAV RBS序列和其它天然已知的或合成的RBS序列。在不受理论束缚的情况下,认为Rep蛋白的核酸酶结构域结合到双链体核酸序列GCTC,并且因此两种已知的AAV Rep蛋白直接结合到以下并稳定地装配在以下上:双链体寡核苷酸5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3'(SEQ ID NO:60)。另外,可溶性聚集性构象异构体(即,数目未定的相互缔合的Rep蛋白)解离并结合到含有Rep结合位点的寡核苷酸。每个Rep蛋白都与每个链上的含氮碱基和磷酸二酯骨架相互作用。与含氮碱基的相互作用提供序列特异性,而与磷酸二酯主链的相互作用是非序列特异性的或较少序列特异性的,并稳定了蛋白质-DNA复合物。

[0076] 如本文所使用,术语"末端解链位点"和"TRS"在本文中可互换使用并且指一个区域,在所述区域Rep与5'胸苷形成酪氨酸-磷酸二酯键,从而产生3'OH,其充当用于通过细胞DNA聚合酶,例如DNA polδ或DNA polε进行DNA延伸的底物。可替代地,Rep-胸苷复合物可以参与配位接合反应。在一些实施例中,TRS最低限度地涵盖非碱基配对的胸苷。在一些实施

例中,TRS的切口产生效率可以至少部分地由其在同一分子内距RBS的距离来控制。当受体底物是互补ITR时,所产生的产物是分子内双链体。TRS序列在所属领域中已知,并且包括例如5'-GGTTGA-3'(SEQ ID NO:61),AAV2中所标识的六核苷酸序列。本公开的实施例中可以使用任何已知的TRS序列,包括其它已知的AAV TRS序列和其它天然已知的或合成的TRS序列,例如AGTT(SEQ ID NO:62)、GGTTGG(SEQ ID NO:63)、AGTTGG(SEQ ID NO:64)、AGTTGA(SEQ ID NO:65)和其它基序例如RRTTRR(SEQ ID NO:66)。

[0077] 如本文所使用的,术语"ceDNA"意指用于非病毒基因转移、合成或其它形式的无衣壳封闭式线性双链(ds)双链体DNA。ceDNA的详细描述描述于2017年3月3日提交的PCT/US2017/020828的国际申请中,所述申请的全部内容以引用的方式明确地并入本文中。使用基于细胞的方法产生包括各种反向末端重复(ITR)序列和构型的ceDNA的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的实施例1中,所述申请中的每一个以全文引用的方式并入本文中。用于产生包括各种ITR序列和构型的合成ceDNA载体的某些方法描述于例如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US2019/14122中,所述国际申请的全部内容以引用的方式并入本文中。如本文所使用的,术语"ceDNA载体"与"ceDNA"可互换地使用并且指包括至少一个末端回文结构的末端封闭式DNA载体。在一些实施例中,ceDNA包括两个共价封闭端。

[0078] 如本文所用,术语"ceDNA质粒"是指一种包含作为分子间双链体的ceDNA基因组的质粒。

[0079] 如本文所使用的,术语"ceDNA杆粒"是指一种包括作为分子间双链体的ceDNA基因组的感染性杆状病毒基因组,其能够作为质粒在大肠杆菌中增殖,因此可以作为杆状病毒的穿梭载体操作。

[0080] 如本文所用,术语"ceDNA杆状病毒"是指一种在杆状病毒基因组内包含作为分子间双链体的ceDNA基因组的杆状病毒。

[0081] 如本文所用,术语"ceDNA杆状病毒感染的昆虫细胞"和"ceDNA-BIIC"可互换使用,是指被ceDNA杆状病毒感染的无脊椎动物宿主细胞(包括但不限于昆虫细胞(例如Sf9细胞))。

[0082] 如本文所使用的,术语"末端封闭式DNA载体"是指具有至少一个共价封闭端的无衣壳DNA载体,其中所述载体的至少一部分具有分子内双螺旋结构。

[0083] 如本文中所定义,"报告体"是指可用于提供可检测的读出数的蛋白质。报告体通常产生可测量的信号,例如荧光、颜色或发光。报告蛋白编码序列编码在细胞或生物体中的存在易于观察到的蛋白质。例如,荧光蛋白当被特定波长的光激发时会导致细胞发荧光,荧光素酶引起细胞催化产生光的反应,以及如β-半乳糖苷酶的酶将底物转化为有色产物。可用于实验或诊断目的的示范性报告多肽包括但不限于β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶(AP)、胸苷激酶(TK)、绿色荧光蛋白(GFP)和其它荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和其它在所属领域中公知的报告多肽。

[0084] 如本文所用,术语"效应蛋白"是指一种提供可检测的读出数的多肽,例如作为报告多肽,或更适当地,作为杀伤细胞的多肽,例如毒素,或致使细胞易用所选作用剂或因缺乏所选作用剂而被杀伤的作用剂。效应蛋白包括直接靶向或损害宿主细胞的DNA和/或RNA的任何蛋白质或肽。例如,效应子蛋白可以包含但不限于:靶向宿主细胞DNA序列(无论是基

因组的还是在染色体外元件上的)的限制性核酸内切酶;降解细胞存活所必需的多肽目标的蛋白酶;DNA旋转酶抑制剂;以及核糖核酸酶型毒素。在一些实施例中,由如本文所描述的合成生物回路控制的效应子蛋白表达可作为一个因子参与另一个合成生物回路,从而扩大了生物回路系统反应性的范围和复杂度。

[0085] 转录调节因子是指活化或抑制感兴趣的基因转录的转录活化子和抑制因子,例如FIX。启动子是启动特定基因转录的核酸区域。转录活化因子通常在附近与转录启动子结合并募集RNA聚合酶来直接启动转录。阻遏子与转录启动子结合,并在空间上阻碍RNA聚合酶启动转录。其它转录调节子可取决于它们的结合位置以及细胞和环境条件来充当活化子或阻遏子。转录调节子类别的非限制性实施例包含但不限于同源域蛋白、锌指蛋白、翼状螺旋(叉头)蛋白和亮氨酸拉链蛋白。

[0086] 如本文所使用的,"阻遏蛋白"或"诱导蛋白"是与调节序列元件结合并分别阻遏或活化与调节序列元件操作性连接的序列的转录的蛋白质。如本文所描述的优选阻遏和诱导蛋白对至少一种输入剂或环境输入物的存在或不存在敏感。如本文所描述的优选蛋白质是模块的形式,包括例如可分离的DNA结合和输入剂结合或反应元件或结构域。

[0087] 如本文所使用的,"载剂"包含任何和所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、缓冲液、载剂溶液、悬液、胶体等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是所属领域熟知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语"药学上可接受的"是指当施用于宿主时不会产生毒性的、过敏性的或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0088] 如本文所使用的,"输入剂反应结构域"是转录因子的一个结构域,其以致使连接的DNA结合融合结构域对条件或输入剂的存在作出反应的方式与所述条件或输入剂结合或以其它方式作出反应。在一个实施例中,条件或输入剂的存在导致输入剂反应结构域或其融合的蛋白质发生构象变化,从而改变转录因子的转录调制活性。

[0089] 术语"体内"是指在生物体,如多细胞动物中或内部进行的分析或过程。在本文所描述的一些方面,当使用如细菌的单细胞生物体时,可以说方法或用途是在"体内"发生的。术语"离体"是指使用在多细胞动物体或植物体之外的具有完整膜的活细胞进行的方法和用途,所述活细胞例如外植体、培养细胞(包括原代细胞和细胞系)、转化的细胞系、以及提取的组织或细胞(包括血细胞)等等。术语"体外"是指不需要存在具有完整膜的细胞,例如细胞提取物的分析和方法,并且可以指在非细胞系统,例如不包含细胞或细胞系统的介质,例如细胞提取物中引入可编程的合成生物回路。

[0090] 如本文所用的术语"启动子"是指通过驱动核酸序列的转录来调节另一核酸序列表达的任何核酸序列,其可以是编码蛋白质或RNA的异源靶基因。启动子可以是组成型的、诱导型的、阻遏型的、组织特异性的或其任何组合。启动子是核酸序列的控制区域,在所述核酸序列的其余部分的引发和转录速率是受控的。启动子还可以含有可以结合调节蛋白和分子的遗传元件,例如RNA聚合酶和其它转录因子。在本文所述的方面的一些实施例中,启动子可以驱动调节启动子本身的表达的转录因子的表达。在启动子序列内将发现转录起始位点,以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合域。真核启动子将经常但并非总是含有"TATA"框和"CAT"框。各种启动子,包括诱导型启动子,可用于驱动本文公开的ceDNA载体中转基因的表达。启动子序列可以在其3'末端以转录起始位点为界并且向上游延伸(5'方向)以包括

为了在高于背景的可检测水平上引发转录所必需的最少数目个碱基或元件。

[0091] 如本文所使用,术语“增强子”是指结合一种或多种蛋白质(例如,活化蛋白或转录因子)以增加核酸序列的转录活化的顺式作用调节序列(例如,10-1,500个碱基对)。增强子可以位于其调节的基因起始位点上游或基因起始位点下游最多1,000,000个碱基对处。增强子可以位于内含子区域内,或无关基因的外显子区中。

[0092] 启动子可以被说成驱动其调节的核酸序列的表达或驱动其转录。短语“操作性地连接”、“操作性定位”、“操作性连接”,“在控制下”和“在转录控制下”指示启动子相对于其调节的核酸序列处于正确的功能位置和/或取向,以控制所述序列的转录启动和/或表达。如本文所使用的,“反向启动子”是指核酸序列处于相反的取向,使得编码链现在成为非编码链的启动子,并且反之亦然。反向启动子序列可以在各种实施例中用于调节开关的状态。另外,在各种实施例中,启动子可以与增强子结合使用。

[0093] 启动子可以是与基因或序列天然结合的启动子,如可以通过分离位于编码区段上游的5'非编码序列和/或给定基因或序列的外显子所获得。此类启动子可以称为“内源性的”。类似地,在一些实施例中,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于所述序列的下游或上游。

[0094] 在一些实施例中,编码核酸区段定位在“重组启动子”或“异源启动子”的控制下,所述启动子均指在其天然环境中通常不与其可操作地连接的编码核酸序列关联的启动子。重组或异源增强子是指在天然环境中正常不与给定核酸序列关联的增强子。这样的启动子或增强子可以包括其它基因的启动子或增强子;从任何其它原核、病毒或真核细胞中分离的启动子或增强子;以及非“天然存在”的合成启动子或增强子,即包含不同转录调节区域的不同元件、和/或通过所属领域已知的基因工程方法来改变表达的突变。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列之外,还可以结合本文公开的合成生物回路和模块,使用重组克隆和/或核酸扩增技术,包括PCR,来产生启动子序列(参见例如美国专利第4,683,202号、美国专利第5,928,906号,各自以引用的方式并入本文)。此外,预期也可以采用指导序列在例如线粒体、叶绿体等非核细胞器内的转录和/或表达的控制序列。

[0095] 如本文所描述的,“诱导型启动子”是特征在于当存在诱导物或诱导剂或受其影响或被其接触时,启动或增强转录活性的启动子。如本文所定义的“诱导物”或“诱导剂”可以是内源性的,或是以能够从诱寻型启动子诱导转录活性的方式施用的通常外源性的化合物或蛋白质。在一些实施例中,诱导物或诱导剂,即化学物质、化合物或蛋白质,本身可以是核酸序列转录或表达的结果(即诱导物可以是由另一组分或模块表达的诱导蛋白),转录或表达本身可以处于诱导型启动子的控制下。在一些实施例中,诱导型启动子是在不存在某些剂、例如阻遏蛋白的情况下被诱导的。诱导型启动子的实施例包括但不限于:四环素、金属硫蛋白、蜕皮素、哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;以及小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列(MMTV-LTR))和其它类固醇响应性启动子、雷帕霉素响应性启动子等。

[0096] 本文可互换使用的术语“DNA调节序列”、“控制元件”和“调节元件”是指提供和/或调节非编码序列(例如靶向DNA的RNA)或编码序列(例如定点修饰多肽或Cas9/Csn1多肽)的转录和/或调节所编码多肽的转译的转录和转译控制序列,诸如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0097] 如本文所使用,术语“开放阅读框(ORF)”意在指可以转译到肽或蛋白质中的几个

核苷酸三联体的序列。开放阅读框优选地在其5'端和通常展现3的倍数的核苷酸的长度的后续区域处含有起始密码子,即通常编码氨基酸甲硫氨酸(ATG)的三个后续核苷酸的组合。ORF优选地通过终止密码子(例如TAA、TAG、TGA)终止。通常,这是开放阅读框的唯一终止密码子。因此,在本发明的上下文中,开放阅读框优选地为由可以除以三的多个核苷酸组成、以起始密码子(例如ATG)开始并且优选地以终止密码子(例如,TAA、TGA或TAG)终止的核苷酸序列。开放阅读框可以被分离,或其可以例如在如本文所描述的ceDNA载体中并入较长的核酸序列中。

[0098] "可操作地连接"是指一种并置,其中所描述的组分处于允许它们以预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子可操作地连接到所述编码序列。"表达盒"包括可操作地连接到启动子或足以引导转基因在ceDNA载体中的转录的其它调节序列的DNA序列。合适的启动子包括例如组织特异性启动子。启动子也可以是AAV起源的。

[0099] 如本文所使用,术语"受试者"是指向其提供用本公开的ceDNA载体进行的治疗,包括预防性治疗的人类或动物。通常,动物为脊椎动物,例如但不限于灵长类动物、啮齿动物、家养动物或猎获的动物。灵长类动物包括但不限于黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和狨猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养和野生动物包括但不限于:牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种如家猫、犬科物种如狗、狐狸、狼、禽类物种如鸡、鸸鹋、鸵鸟,以及鱼如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼。在本文所述方面的某些实施例中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物或人。受试者可以是雄性或雌性。另外,受试者可以是婴儿或儿童。在一些实施例中,受试者可以是新生儿或未出生的受试者,例如,受试者还在子宫内。优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实施例。人以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病和病症的动物模型的受试者。另外,本文所述的方法和组合物可用于家养动物和/或宠物。人类受试者可以是任何年龄、性别、种族或人种群组,例如,高加索人(白人)、亚洲人、非洲人、黑人、非裔美国人、非裔欧洲人、西班牙人、中东人等。在一些实施例中,受试者可以是临床环境中的患者或其它受试者。在一些实施例中,受试者已在进行治疗。在一些实施例中,受试者是胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在一些实施例中,受试者是人类胎儿、人类新生儿、人类婴儿、人类儿童、人类青少年或人类成人。在一些实施例中,受试者是动物胚胎,或非人类胚胎或非人类灵长类动物胚胎。在一些实施例中,受试者是人胚胎。

[0100] 如本文所用,术语"宿主细胞"包括易于被本公开的核酸构建体或ceDNA表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。作为非限制性实施例,宿主细胞可以是分离的原代细胞、多能干细胞、$CD34^+$细胞、诱导的多能干细胞或许多永生化细胞系(例如HepG2细胞)中的任何一种。可替代地,宿主细胞可以是组织、器官或生物体中的原位或体内细胞。

[0101] 术语"外源"是指存在于除天然来源外的细胞中的物质。当在本文中使用时,术语"外源"可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸(例如编码多肽的核酸)或多肽,通常在所述细胞或生物体中未发现所述核酸或多肽,并且希望将核酸或多肽引入此类细胞或生物体中。可替代地,"外源"可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸或多肽,在所述细胞或生物体中发现核酸或多肽的量相对较低,并且希望增加细胞或生物体中核酸或多肽的量,例如以产生异位表达或

水平。与此相反，术语“内源”是指对于生物系统或细胞而言天然的物质。

[0102] 术语“序列同一性”是指两个核苷酸序列之间的相关性。为了本公开的目的，使用在EMBOSS软件包的Needle程序(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,同上)、优选版本3.0.0或更高版本中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,见上文)确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列同一性程度。使用的可选参数是空位开放罚分10，空位延伸罚分0.5和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替换矩阵。标记为“最长同一性”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作同一性百分比，并如下计算:(相同的脱氧核糖核苷酸乘以100)/(比对长度-比对空位总数)。比对的长度优选为至少10个核苷酸、优选为至少25个核苷酸、更优选为至少50个核苷酸并且最优选为至少100个核苷酸。

[0103] 如本文所用，术语“同源性”或“同源”被定义为，在比对序列且必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后，与靶染色体上的相应序列中的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。出于确定核苷酸序列同源性百分比的比对可以用所属技术领域中内的各种方式来实现，例如使用公开可用的计算机软件，如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2或Megalign(DNASTAR)软件。所属领域的技术人员可以确定用于比对序列的合适参数，包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施例中，当同源臂的例如核酸序列(例如DNA序列)与宿主细胞的相应原生或未经编辑的核酸序列(例如基因组序列)具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或更多同一性时，所述序列被视为“同源”。

[0104] 如本文所用，术语“异源”意指分别在天然核酸或蛋白质中未发现的核苷酸或多肽序列。异源核酸序列可以与天然存在的核酸序列(或其变异体)连接(例如通过基因工程)以产生编码嵌合多肽的嵌合核苷酸序列。异源核酸序列可以连接到变异多肽(例如通过基因工程改造)以产生编码融合变异多肽的核酸序列。或者，术语“异源”可以指不天然存在于细胞或受试者中的核酸序列。

[0105] “载体”或“表达载体”为可以与另一DNA区段，即“插入片段”附接以便使所附接的区段在细胞中复制的复制子，例如质粒、杆粒、噬菌体、病毒、病毒粒子或粘质体。载体可以是设计用于递送到宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用，载体在起源和/或最终形式上可以是病毒或非病毒的，但是出于本公开的目的，“载体”通常是指ceDNA载体，如本文所用。术语“载体”涵盖与适当的控制元件结合时能够复制并且可以将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。在一些实施例中，载体可以是表达载体或重组载体。

[0106] 如本文所用，术语“表达载体”是指引导RNA或多肽从与载体上的转录调节序列连接的序列的表达的载体。表达的序列通常但不一定与细胞异源。表达载体可以包含其它元件，例如，表达载体可以具有两个复制系统，从而使其可以在两种生物体中维持，例如在人类细胞中进行表达，以及在原核宿主中进行克隆和扩增。术语“表达”是指涉及产生RNA和蛋白质以及适当时分泌蛋白质的细胞过程，在适用时包括但不限于例如转录、转录物加工、转译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过转译从基因转录的mRNA所获得的多肽。术语“基因”意指当与适当的调节序列可操作地连接时在体外或在体内

转录为RNA的核酸序列(DNA)。基因可以包括或可以不包括编码区前后的区域,例如5'非转译(5'UTR)或"前导"序列和3'UTR或"尾区"序列,以及单个编码区段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0107] "重组载体"意指包括能够在体内表达的异源核酸序列或"转基因"的载体。应了解,在一些实施例中,本文所述的载体可以与其它合适的组合物和疗法组合。在一些实施例中,载体是游离型的。合适的游离型载体的使用提供了一种以高拷贝数的染色体外DNA维持受试者中的所关注核苷酸,从而消除染色体整合的潜在影响的方式。

[0108] 如本文所用的短语"遗传性疾病"是指部分或完全、直接或间接地由基因组中的一种或多种异常引起的疾病,尤其是从出生起出现的病状。异常可以是突变、插入或缺失。异常可能影响基因的编码序列或其调节序列。根据一些实施例,遗传疾病为FIX基因中的突变的结果。根据一些实施例,遗传疾病为FIX蛋白表达减少的结果。根据一些实施例,遗传疾病为血友病。根据一些实施例,血友病为B型血友病。

[0109] 如本文所使用,"凝血因子IX(fIX;FIX)"意在指有效凝血所需的维生素K依赖性蛋白,其在凝血中充当因子X的活化子。血液中约1-5μg/ml fIX的浓度被认为在正常范围内。FIX缺乏与B型血友病有关,并且当FIX浓度低于FIX正常浓度的约1%(即低于约0.01-0.05μg FIX/ml血液)时,会导致严重病例。

[0110] 如本文所使用,术语"施用(administration/administering)"和其变型是指将组合物或药剂(例如本文所描述的ceDNA)引入受试者中并且包括同时和依序引入一种或多种组合物或药剂。"施用"可以指例如治疗、药物动力学、诊断、研究、安慰剂以及实验方法。"施用"还涵盖体外和离体治疗。将组合物或药剂引入受试者中是通过任何适合的途径,包括经口、经肺、经鼻、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、瘤内或局部。施用包含自我施用和由另一个人施用。可以通过任何适合的途径进行施用。适合的施用途径使得组合物或药剂执行其预期功能。举例来说,如果所适合的途径是静脉内,那么通过将组合物或药剂引入受试者的静脉来施用组合物。

[0111] 如本文所用,短语"核酸治疗性"、"治疗性核酸"和"TNA"可互换地使用,并且是指使用核酸作为治疗疾病或病症的治疗剂的活性组分的治疗的任何模态。如本文所用,这些短语是指基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的非限制性实例包含mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性实例包含小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、末端封闭式线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggyboneTM DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒迷你串DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体("哑铃DNA")。根据一些实施例,治疗性核酸为ceDNA。

[0112] 如本文所使用,术语"免疫抑制剂"是指一组抑制蛋白激酶,例如酪氨酸激酶的小分子、单克隆抗体或多肽拮抗剂。

[0113] 如本文所用,术语"治疗效果"是指治疗的结果,其结果被判定为合乎需要并且有益的。治疗效果可以直接或间接地包括疾病显现的遏制、减少或消除。治疗效果还可以直接或间接地包括疾病显现的发展的遏制减少或消除。

[0114] 对于本文所描述的任何治疗剂,治疗有效量可以初始地根据初步的体外研究和/

或动物模型来确定。治疗有效剂量也可以根据人数据来确定。可以基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用剂量。基于上述方法和其它公知的方法调节剂量以实现最大功效在普通技术人员的能力内。下文总结了用于测定治疗有效性的一般原理，其可以在《古德曼和吉尔曼的治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》，第10版，麦格劳-希尔专业出版公司(McGraw-Hill)(纽约)(2001)的第1章中找到，所述文献以引用的方式并入本文中。

[0115] 药代动力学原理为修改剂量方案以获得期望程度的治疗功效并且具有最小的不可接受的副作用提供了基础。在可以测量药物的血浆浓度并且与治疗窗口有关的情况下，可以获得针对剂量修改的另外的指导。

[0116] 如本文所用，术语“治疗(treat/treating/treatment)”包括减轻、基本上抑制、减缓或逆转病状的发展，基本上改善病状的临床症状或基本上预防病状的临床症状的出现、获得有益或所需的临床结果。治疗进一步指代实现以下中的一个或多个：(a)降低病症的严重程度；(b)限制所治疗的一种或多种病症的症状特征的发展；(c)限制所治疗的一种或多种病症的症状特征的恶化；(d)限制先前患有病症的患者中的一种或多种病症的复发；以及(e)限制先前对于一种或多种病症无症状的患者中的症状的复发。

[0117] 有益或所需的临床结果，如药理学和/或生理学作用，包括(但不限于)：预防可能易患有疾病、病症或病状但尚未经历或展现疾病的症状的受试者出现所述疾病、病症或病状(防治性治疗)；缓解所述疾病、病症或病状的症状；减轻所述疾病、病症或病状的程度；稳定所述疾病、病症或病状(即，不恶化)；预防所述疾病、病症或病状的扩散；延迟或减缓所述疾病、病症或病状发展；改善或缓和所述疾病、病症或病状；以及其组合，以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比，延长存活期。

[0118] 如本文所用，术语“增加”、“增强”、“提高”(以及类似术语)通常是指相对于自然条件、预期条件或平均条件、或者相对于对照条件直接地或间接地增加浓度、水平、功能、活性或行为的作用。

[0119] 如本文所用，术语“遏制”、“减少”、“干扰”、“抑制”和/或“降低”(以及类似术语)通常是指直接或间接地降低相对于自然条件、预期条件或平均条件，或相对控制条件的浓度、水平、功能、活动或行为的行为。

[0120] 如本文所使用，“对照”意在指参考标准物。在一些实施例中，对照为从健康患者获得的阴性对照样品。在其它实施例中，对照为从诊断患有血友病的患者获得的阳性对照样品。在又其它实施例中，对照为历史对照或标准参考值或值范围(例如先前测试的对照样品，例如一组具有已知预后或结果的A型血友病患者，或一组代表基线或正常值的样品)。测试样品与对照之间的差异可以为增加或相反地减少。差异可以为定性差异或定量差异，例如统计学上显著的差异。在一些实例中，差异为相对于对照增加或减少至少约5％，例如至少约10％、至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约100％、至少约150％、至少约200％、至少约250％、至少约300％、至少约350％、至少约400％、至少约500％或大于500％。

[0121] 如本文所用的术语“包含(comprising/comprises)”在提及组合物、方法以及对所述方法或组合物来说必不可少的其相应组分时使用，但对于包括未指明的要素，无论是否必要，仍然是开放的。

[0122] 如本文所用，术语“基本上由……组成”是指给定实施例所需要的那些要素。所述术语允许存在不实质影响所述实施例的基本和新颖或功能性特征的要素。“包含”的使用表示包含而不是限制。

[0123] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法和其相应组分，其排除在所述实施例的描述中未叙述的任何要素。

[0124] 如本说明书和所附权利要求书所用，除非上下文另有明确规定，否则单数形式“一种/一个(a/an)”和“所述”包含多个提及物。因此，举例来说，提及“所述方法”包括一种或多种本文所描述的类型的方法和/或步骤，且/或在阅读本公开后，其将对于所属领域的技术人员而言变得显而易见，等等。类似地，除非上下文另有明确规定，否则单词“或”旨在包含“和”。尽管与本文所描述的方法和材料相似或等效的那些方法和材料可以用于实施或测试本公开，但在下文描述适合的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”源自于拉丁文exempli gratia，并且在本文中用以指示非限制性实例。因此，缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0125] 除了在操作例中或在另外指示的情况下，本文所使用的表示成分或反应条件的量的所有数字都应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。术语“约”在结合百分比使用时，可以意指±1％。以下实例进一步详细解释本公开，但本公开的范围不应限于此。

[0126] 本文所公开的本公开的替代性要素或实施例的分组不解释为限制。每个组成员可以单独提及和要求，或呈与所述组的其它成员或此处找到的其它要素的任何组合提及和要求。出于方便和/或可专利性的原因，一个组中的一个或多个成员可以包括在一个组中或从中删除。当发生任何这样的包括或删除时，在本文中认为说明书含有修改的组，从而满足所附权利要求书中使用的所有马库什组(Markush group)的书面描述。

[0127] 在任何方面的一些实施例中，本文描述的公开内容不涉及克隆人的方法、用于修饰人的种系遗传身份的方法、用于工业或商业目的的人胚胎的使用、或用于修饰动物的基因身份，可能导致其遭受痛苦而对人或动物没有任何实质性医学益处的方法，以及由这类方法产生的动物。

[0128] 其它术语在本文中限定于本公开的各个方面的描述内。

[0129] 本申请全文中引用的所有专利和其它出版物，包括参考文献、授权专利、已发布的专利申请和共同待决的专利申请，以引用的方式明确地并入本文中，以描述和公开例如在这些出版物中描述的可以与本文所述的技术结合使用的方法。提供这些出版物仅仅是出于其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。关于这一点，任何内容都不应被解释为承认发明者无权借助先前公开或出于任何其它原因而提前所述公开。关于这些文件的日期的所有声明或关于内容的陈述都是基于申请人可获得的信息，并且不等同于承认这些文件的日期或内容的正确性。

[0130] 本公开的实施例的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施例和实施例，但是如相关领域的技术人员将认识到的，在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如，虽然方法步骤或功能以给定的顺序呈现，但是替代实施例可以以不同的顺序执行功能，或者功能可以基本上同时执行。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其它程序或方法。本文描述的各种实施例可以进行组合以提供其它实施例。如果需要，可以修改本公开的各方面以采用上述参考文献和申

请的组合物、功能和概念来提供本公开的又一实施例。而且，由于生物学功能等效性的考虑，可以在不影响生物学或化学作用的种类或量的情况下对蛋白质结构进行一些改变。可以根据详细描述对本公开进行这些和其它改变。意图所有这些修改包括在所附权利要求书的范围内。

[0131] 任何前述实施例的特定要素都可以进行组合或替代其它实施例中的要素。此外，尽管已经在这些实施例的上下文中描述了与本公开的某些实施例相关联的优点，但是其它实施例也可以展现出这样的优点，并且并非所有实施例都需要为了落入本公开的范围内而展现出这样的优点。

[0132] 通过以下实施例进一步说明本文所述的技术，这些实施例决不应解释为进一步限制。应理解，本公开不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等，并且因此可以变化。本文所使用的术语仅用于描述特定实施例的目的，并且不打算限制仅由权利要求书界定的本公开的范围。

[0133] II.由ceDNA载体表达FIX蛋白

[0134] 本文所描述的技术大体上涉及由非病毒DNA载体，例如本文所描述的ceDNA载体在细胞中表达和/或产生FIX蛋白。用于表达FIX蛋白的ceDNA载体描述于本文中的标题为“通用ceDNA载体”的章节中。确切地说，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含一对ITR(例如，本文所描述的对称或不对称)和在所述ITR对之间的可操作地连接到启动子或调节序列的如本文所描述的编码FIX蛋白的核酸。用于表达FIX蛋白的ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势为对编码期望蛋白的核酸序列不存在大小约束。因此，甚至全长6.8kb FIX蛋白也可以由单个ceDNA载体表达。因此，本文所描述的ceDNA载体可以用于在有需要的受试者，例如患有B型血友病的受试者中表达治疗性FIX蛋白。

[0135] 如人们将了解，本文所描述的ceDNA载体技术可以适用于任何复杂程度或可以模块化方式使用，其中FIX蛋白的不同组分的表达可以非依赖性方式加以控制。举例来说，特别预期本文中所设计的ceDNA载体技术可以与使用单个ceDNA载体表达单个基因序列(例如FIX蛋白)一样简单，或可以与使用多个ceDNA载体一样复杂，其中每个载体表达各自独立地由不同启动子控制的多个FIX蛋白或相关辅因子或辅助蛋白。本文特别涵盖以下实施例且所属领域的技术人员能够按需要对其进行调适。

[0136] 在一个实施例中，单个ceDNA载体可以用于表达FIX蛋白的单个组分。或者，单个ceDNA载体可以用于在单个启动子(例如强启动子)的控制下，任选地使用用于确保每个组分，例如辅因子或辅助蛋白的适当表达的(多个)IRES序列表达FIX蛋白的多个组分(例如至少2个)。

[0137] 在另一个实施例中，本文还涵盖了包含至少两个插入片段(例如表达重链或轻链)的单个ceDNA载体，其中每个插入片段的表达是在其自身启动子的控制下进行。启动子可以包括相同启动子的多个拷贝、多个不同启动子或其任意组合。如所属领域的技术人员将了解，常常期望以不同的表达水平表达FIX蛋白的组分，从而控制所表达的单独组分的化学计量以确保FIX蛋白在细胞中的有效折叠和组合。

[0138] 所属领域的技术人员能够设想ceDNA载体技术的其它变化形式或能够使用常规载体通过蛋白质产生方法对其进行调适。

[0139] A.因子IX(FIX)表达

[0140] 在一些实施例中,编码FIX蛋白的转基因还可以编码分泌序列以使得FIX蛋白被引导到高尔基体(Golgi)设备和内质网,由此FIX蛋白将在其穿过ER并且离开细胞时通过伴护分子折叠成正确构象。示范性分泌序列包括(但不限于)VH-02(SEQ ID NO:88)和VK-A26(SEQ ID NO:89)和IgK信号序列(SEQ ID NO:126),以及允许标记的蛋白质从胞溶质中分泌出来的Gluc分泌信号(SEQ ID NO:188)、将经标记的蛋白质引导到高尔基体的TMD-ST分泌序列(SEQ ID NO:189)。

[0141] 调节开关还可以用于微调FIX蛋白的表达以使得FIX蛋白按期望进行表达,包括但不限于以期望表达水平或量表达FIX蛋白,或者,当存在或不存在特定信号时,包括细胞信号传导事件。举例来说,如本文所描述,当存在特定条件时,可以打开或关闭ceDNA载体对FIX蛋白的表达,如本文中在标题为调节开关的章节中所描述。

[0142] 举例来说并且仅出于说明的目的,FIX蛋白可以用于关闭非所期望的反应,例如FIX蛋白的过高的产生水平。FIX基因可以含有用于将FIX蛋白带到期望细胞的信号肽标记物。然而,在任一种情况下,都可能期望调节FIX蛋白的表达。ceDNA载体容易适应调节开关的使用。

[0143] ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势为对编码FIX蛋白的核酸序列不存在大小约束。因此,甚至全长FIX以及任选的任何辅因子或辅助蛋白可以由单个ceDNA载体表达。另外,取决于必要的立体化学,人们可以表达同一FIX蛋白的多个区段,并且可以使用相同或不同启动子,并且还可以使用调节开关来微调每个区域的表达。举例来说,如实例中所示,可以使用包含双启动子系统的ceDNA载体,以使得不同启动子用于FIX蛋白的每个结构域。使用ceDNA质粒产生FIX蛋白可以包括用于表达FIX蛋白结构域的启动子的独特组合,这引起适当比率的每个结构域用于形成功能性FIX蛋白。因此,在一些实施例中,ceDNA载体可以单独地(例如,在不同启动子的控制下)用于表达FIX蛋白的不同区域。

[0144] 在另一个实施例中,由ceDNA载体表达的FIX蛋白进一步包含额外功能,例如荧光、酶活性、分泌信号或免疫细胞活化子。

[0145] 在一些实施例中,编码FIX蛋白的ceDNA可以进一步包含例如接头结构域。如本文所使用,“接头结构域”是指使如本文所描述的FIX蛋白的任何结构域/区域连接在一起的长度为约2到100个氨基酸的寡肽或多肽区。在一些实施例中,接头能够包括或由柔性残基(例如甘氨酸和丝氨酸)构成,使得相邻蛋白质域相对于彼此自由地移动。当希望确保两个相邻结构域在空间上彼此无干扰时,可以使用较长接头。接头可以是可裂解的或不可裂解的。可裂解接头的实施例包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等效物以及其组合。接头可以是来源于明脉扁刺蛾病毒(Thosea asigna virus)的T2A的接头区域。

[0146] 其充分在所属领域的技术人员采用例如FIX等的已知和/或公开可用的蛋白质序列并且反向工程改造cDNA序列以编码此类蛋白质的能力内。然后能够对cDNA进行密码子优化以与预定的宿主细胞匹配,并且插入如本文所述的ceDNA载体中。

[0147] B.表达FIX蛋白的ceDNA载体

[0148] 具有一个或多个编码期望FIX的序列的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包含调节序列,例如启动子、分泌信号、聚A区和增强子。最低限度地,ceDNA载体包含一个或多个编码FIX蛋白的核酸序列。

[0149] 为了实现高效且精确的FIX蛋白装配,在一些实施例中,特别预期FIX蛋白包含内

质网ER前导序列以将其引导到ER,在所述ER中发生蛋白质折叠。举例来说,序列将所表达的蛋白质引导到ER进行折叠。

[0150] 在一些实施例中,细胞或细胞外定位信号(例如分泌信号、核定位信号、线粒体定位信号等)包含于ceDNA载体中以引导FIX的分泌或期望亚细胞定位以使得FIX蛋白可以结合到(多个)细胞内标靶(例如胞内抗体)或(多个)细胞外标靶。

[0151] 在一些实施例中,如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体准许以模块化方式装配和表达任何期望FIX蛋白。如本文所用,术语"模块化"是指能够轻松地从构建体中去除的ceDNA表达质粒中的元件。举例来说,产生ceDNA的质粒中的模块化元件包含与构建体内的每个元件侧接的独特限制位点对,从而能够排它性地操控个别元件(参见例如图1A-1G)。因此,ceDNA载体平台可以准许表达和装配任何期望FIX蛋白构型。本文在各个实施例中提供可以减少和/或最小化用于装配编码FIX蛋白的期望ceDNA载体所必需的操控量的ceDNA质粒载体。

[0152] C.由ceDNA载体表达的示范性FIX蛋白

[0153] 确切地说,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以编码例如但不限于用于治疗、预防和/或改善B型血友病的一种或多种症状的FIX蛋白以及其变异体和/或活性片段。在一个方面中,B型血友病为人类B型血友病。

[0154] (i)FIX治疗蛋白和其片段

[0155] 基本上任何型式的FIX治疗蛋白或其片段(例如,功能片段)都可以由如本文所描述的ceDNA载体编码并在其中且由其表达。所属领域的技术人员将理解FIX治疗蛋白包括FIX蛋白的所有剪接变异体和直系同源物。FIX治疗蛋白包括其完整分子以及片段(例如功能片段)。

[0156] 因子IX(FIX)

[0157] 因子IX(或克氏因子(Christmas factor))(EC 3.4.21.22)为凝血系统的丝氨酸蛋白酶之一;其属于肽酶家族S1。这种蛋白质的缺乏会造成B型血友病。因子IX以作为非活性前体的酶原形式产生。其被加工以去除信号肽,糖基化,并且然后被(接触路径的)因子XIa或(组织因子路径的)因子VIIa裂解以产生双链形式,其中链通过二硫桥键连接。当活化成因子IXa时,在存在Ca2+、膜磷脂和因子VIII辅因子下,其水解因子X中的一个精氨酸-异亮氨酸键以形成因子Xa。因子IX为维生素K依赖性的。因子IX受抗凝血酶抑制。

[0158] 因子IX基因或蛋白还可以称为F9、凝血因子IX、血浆凝血活酶组分、血浆促凝血组分、克氏因子、EC 3.4.21.22、PTC、克氏疾病、因子IX F9、B型血友病、因子IX、EC 3.4.21、因子9、F9 P22、THPH8、HEMB、FIX或P19。

[0159] 人类FIX基因处于X染色体中,有8个外显子,并且跨度为33.5Kb。因子IX在肝脏中产生,并且非活性前体蛋白在内质网和高尔基体中被加工,其中其经历多次转译后修饰并且在前肽蛋白水解裂解后分泌到血流中。

[0160] 因子IX mRNA的表达主要发生在肝脏中。额外组织可以表达因子IX mRNA,包括骨髓、全血、淋巴结、胸腺、大脑、大脑皮层、小脑、视网膜、脊髓、胫骨神经、心脏、动脉、平滑肌、骨骼肌、小肠、结肠、脂肪细胞、肾脏、肺、脾脏、胃、食道、膀胱、胰腺、甲状腺、唾液腺、肾上腺、垂体腺、乳房、皮肤、卵巢、子宫、胎盘、前列腺和睾丸。

[0161] 因子IX蛋白主要在血清、血浆和单核细胞中表达。因子IX蛋白表达也可以在全身

组织中检测到，包括但不限于扁桃体、骨髓间充质干细胞、脊髓、心脏、结肠肌肉、口腔上皮、食道、胃、贲门、结肠、直肠、肝脏、胎儿肝脏、肾脏、脾脏、滑液、玻璃体液、唾液腺、甲状腺、肾上腺、乳房、胰腺、胰岛、胆囊、前列腺、尿液、膀胱、皮肤、胎盘、子宫、子宫颈、卵巢、睾丸和精囊。

[0162] 存在至少两种已知的mRNA变异体，其各自编码因子IX的一种蛋白质同源异构体。变异体1代表较长的转录物并且编码较长的同源异构体1。变异体2与变异体1相比在5'编码区中缺乏替代框内外显子。其编码比同源异构体1短的同源异构体2。同源异构体2可以与同源异构体1经历类似的蛋白水解加工。mRNA变异体1和2以及蛋白质同源异构体1和2的代表性序列标识符示于下文：

[0163] 智人凝血因子IX(F9)、转录物变异体1、mRNA(NCBI参考序列:NM_000133.3)1386bp(SEQ ID NO:377)

[0164] 智人凝血因子IX同源异构体1前原蛋白(NCBI参考序列:NP_000124.1)461个氨基酸(SEQ ID NO:378)

[0165] 智人凝血因子IX(F9)、转录物变异体2、mRNA(NCBI参考序列:NM_001313913.1)2688bp(SEQ ID NO:379)

[0166] 智人凝血因子IX同源异构体2前体(NCBI参考序列:NP_001300842.1)423个氨基酸(SEQ ID NO:380)。

[0167] ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势为对编码期望蛋白的核酸序列不存在大小约束。因此，多个全长FIX治疗蛋白可以由单个ceDNA载体表达。

[0168] 由ceDNA载体表达FIX治疗蛋白或其片段可以使用一个或多个如所属领域中已知或本文所描述的可诱导或可抑制型启动子，包括如本文所描述的调节开关在空间上和时间上实现。

[0169] 在一个实施例中，FIX治疗蛋白为“治疗蛋白变异体”，其是指与其对应的天然FIX治疗蛋白相比具有改变的氨基酸序列、组成或结构的FIX治疗蛋白。在一个实施例中，FIX为功能性型式(例如野生型)。表达导致B型血友病的FIX蛋白的突变型式，例如点突变或缺失突变也可能适用于例如疾病的动物模型和/或B型血友病药物评估。可以将突变或经修饰FIX蛋白递送到细胞或动物模型系统以便产生疾病模型。此类细胞或动物模型可以用于研究和/或药物筛检。由ceDNA载体表达的FIX治疗蛋白可以进一步包含赋予额外功能性例如荧光、酶活性或分泌信号的序列/部分。在一个实施例中，FIX治疗蛋白变异体包含用于标识的非天然标签序列(例如免疫标签)以允许其与接受者宿主细胞中的内源性FIX治疗蛋白区分开来。

[0170] 其充分在所属领域的技术人员采用例如FIX治疗蛋白的已知和/或公开可用的蛋白质序列并且反向工程改造cDNA序列以编码此类蛋白质的能力内。然后能够对cDNA进行密码子优化以与预定的宿主细胞匹配，并且插入如本文所述的ceDNA载体中。

[0171] 在一个实施例中，编码FIX治疗蛋白的序列可以衍生自现有的宿主细胞或细胞系，例如通过反向转录获自宿主的mRNA并使用PCR扩增所述序列。

[0172] (ii)表达FIX治疗蛋白的ceDNA载体

[0173] 具有一个或多个编码期望FIX治疗蛋白的序列的ceDNA载体可以包含调节序列，例如启动子(例如，参见表7)、分泌信号、聚A区(例如，参见表10)和增强子(例如，参见表8)。最

低限度地，ceDNA载体包含一个或多个编码FIX治疗蛋白或其功能片段的核酸序列。用于产生编码FIX治疗蛋白的ceDNA载体的示范性盒插入片段描绘于图1A-1G中。在一个实施例中，ceDNA载体包含本文表1中所列的FIX序列。

[0174] 表1：用于治疗B型血友病的示范性FIX序列

描述	长度	参考	SEQ ID NO:
密码子优化的 hFIX	1386	Nathwani 等人，《血液（Blood）》（2006）107（7）:2653-2661。	381
衍生自 SPK9001 的 hFIX 外显子和第一内含子	2824	美国专利公开第 20160375110A1 号	382
仅衍生自 SPK9001 的 hFIX 外显子	1386	美国专利公开第 20160375110A1 号	383
内源性 hFIX cDNA	1386	NG_007994.1	384
含有 G338L 突变的 JCat 优化的 Padua 因子 IX ORF	1386		385
Jcat 优化的野生型人类因子 IX ORF	1386		386
Jcat 优化的野生型犬科动物因子 IX ORF	1359		387
人类 FIX ORF padua 变异体（密码子优化）1386 bp	1386		388
人类 FIX ORF（密码子优化）1386 bp	1386		389
鼠因子 IX cDNA	1419		390
[0175] 具有 GGGGS 接头（SEQ ID NO: 391）和 6xHis 标签（SEQ ID NO: 392）的鼠因子 IX cDNA	1452		393
具有 GGGGS 接头（SEQ ID NO: 391）和 Myc 标签的鼠因子 IX cDNA	1464		394
具有 Padua 突变（R338L）的鼠因子 IX cDNA	1419		395
具有 Padua 突变（R338L）和 GGGGS 接头（SEQ ID NO: 391）以及 6xHis 标签（SEQ ID NO: 392）的鼠因子 IX cDNA	1452		396
不含 CpG 的人类 FIX Padua（G388L）COOL 优化型	1386		397
人类因子 IX，WT.密码子优化型。	1194		398
WT 鼠因子 IX；小鼠密码子优化型	1416		399
具有 GGGGS 接头（SEQ ID NO: 391）和 6x His 标签（SEQ ID NO: 392）的 WT 鼠因子 IX；小鼠密码子优化型	1449		400
具有 GGGGS 接头（SEQ ID NO: 391）和 Myc 标签的 WT 鼠因子 IX；小鼠密码子优化型	1461		401
Padua 变异体鼠因子 IX；小鼠密码子优化型	1416		402
[0176] 具有 GGGGS 接头（SEQ ID NO: 391）和 6x His 标签（SEQ ID NO: 392）的 Padua 变异体鼠因子 IX；小鼠密码子优化型	1449		403

[0177] (iii)FIX治疗蛋白和其用于治疗B型血友病的用途

[0178] 本文所描述的ceDNA载体可以用于递送治疗性FIX蛋白以治疗与FIX蛋白的不当表达和/或FIX蛋白内的突变相关的B型血友病。

[0179] 如本文所描述的ceDNA载体可以用于表达任何期望FIX治疗蛋白。示范性治疗性FIX治疗蛋白包括但不限于由如本文表1中所阐述的序列表达的任何FIX蛋白。

[0180] 在一个实施例中,所表达的FIX治疗蛋白具有治疗B型血友病的功能。在一些实施例中,FIX治疗蛋白不引起免疫系统反应。

[0181] 在另一个实施例中,编码FIX治疗蛋白或其片段(例如功能片段)的ceDNA载体可以用于产生嵌合蛋白。因此,本文特别考虑可将表达嵌合蛋白的ceDNA载体施用于例如任何一种或多种选自以下的组织:肝、肾、胆囊、前列腺、肾上腺。在一些实施例中,当将表达FIX的ceDNA载体施用婴儿或施用受试者的子宫中时,人们可以将表达FIX的ceDNA载体施用选自以下的任何一个或多个组织:肝脏、肾上腺、心脏、肠、肺和胃或其肝脏干细胞前体以用于体内或离体治疗B型血友病。

[0182] B型血友病

[0183] B型血友病为由于因子IX的基因遗传突变而造成容易擦伤和出血并且导致因子IX缺乏的凝血病症。B型血友病作为X连锁隐性特质遗传。当前用于预防患有B型血友病的人群的出血的治疗涉及因子IX静脉内输注和/或输血。

[0184] 存在许多与B型血友病治疗相关的并发症。在儿童中,可以插入容易进入的静脉内端口以减少频繁的创伤性静脉内套管插入术。然而,这些端口与高感染率和在导管尖端形成凝块的风险相关,使其无用。病毒感染在血友病患者中很常见,因为频繁输血使患者面临血液传播感染的风险,例如HIV、乙型肝炎和丙型肝炎。朊病毒感染也可以通过输血传播。

[0185] 在一些情况下,FIX基因的启动子区中的突变导致不太严重的B型血友病莱顿(Leiden),所述疾病的特征为在儿童中几乎完全不存在FIX并且在青少年期间内源性FIX的含量稳定地增加到接近正常的值。

[0186] 凝血级联

[0187] 凝血(coagulation/clotting)为血液从液体变成凝胶,形成血凝块的过程。其可能引起止血,即停止受损血管的失血,接着进行修复。凝血机制涉及血小板的活化、粘附和聚集以及纤维蛋白的沉积和成熟。凝血障碍为可能导致出血(失血或擦伤)或阻塞性凝血(血栓形成)的疾病状态。

[0188] 在血管的损伤损坏血管内衬的内皮后,凝血几乎立即开始。血液暴露于内皮下空间引发两个过程:血小板的变化,以及内皮下组织因子暴露于血浆因子VII,最终导致纤维蛋白形成。血小板立即在受伤部位形成栓塞;这称为初级止血。继发性止血同时发生:除因子VII(包括因子VIII)之外的另外凝血因子或凝结因子以复杂的级联反应形成纤维蛋白链,从而加强了血小板栓塞。

[0189] 二次止血的凝血级联有两条导致纤维蛋白形成的初始途径。这些是接触激活途径(也称为内源性途径)和组织因子途径(也称为外源性途径),它们都导致产生纤维蛋白的相同基本反应。启动凝血的主要途径是组织因子(外源性)途径。所述途径是一系列反应,其中丝氨酸蛋白酶的酶原(无活性酶前体)及其糖蛋白辅因子被激活成为活性成分,然后所述活性成分催化级联中的下一个反应,最终产生交联的纤维蛋白。凝血因子通常用罗马数字表

示,附加小写字母a表示活性形式。

[0190] 凝血因子通常是丝氨酸蛋白酶(酶),它通过切割下游蛋白质起作用。例外是组织因子、FV、FVIII、FXIII。组织因子、FV和FVIII是糖蛋白,而因子XIII是转谷氨酰胺酶。凝血因子作为无活性的酶原循环。因此,凝血级联通常分为三个途径。组织因子和接触激活途径都激活因子X、凝血酶和纤维蛋白的"最终共同途径"。

[0191] 组织因子(外源性)途径的主要作用是产生"凝血酶爆发",通过所述过程,凝血酶(就其反馈激活作用而言是凝血级联的最重要组成)被非常迅速地释放。FVIIa的循环量高于任何其它活化凝血因子。所述过程包括以下步骤:

[0192] 步骤1:在血管受损之后,FVII离开循环并且与在携带组织因子的细胞(基质成纤维细胞和白细胞)上表达的组织因子(TF)接触,从而形成活化复合物(TF-FVIIa)。

[0193] 步骤2:TF-FVIIa活化FIX和FX。

[0194] 步骤3:FVII自身被凝血酶、FXIa、FXII和FXa活化。

[0195] 步骤4:由TF-FVIIa活化FX(以形成FXa)几乎立即受到组织因子路径抑制剂(TFPI)抑制。

[0196] 步骤5:FXa和其辅因子FVa形成凝血酶原酶复合物,所述凝血酶原酶复合物将凝血酶原活化为凝血酶。

[0197] 步骤6:凝血酶接着活化凝血级联的其它组分,包括FV和FVIII(其与FIX形成复合物),并且活化和释放FVIII,使其免于结合到血管性血友病因子(von Willebrand factor;vWF)。

[0198] 步骤7:FVIIIa为FIXa的辅因子,并且其一起形成活化FX的"液化酶"复合物;并且因此循环继续。

[0199] 接触激活(内源性)途径始于通过高分子量激肽原(HMWK)、前激肽释放酶和FXII(哈格曼因子)在胶原蛋白上形成初级复合物。前激肽释放酶转化为激肽释放酶,FXII变为FXIIa。FXIIa将FXI转化为FXIa。因子XIa激活FIX,FIX与其辅因子FVIIIa形成tenase复合物,将FX激活为FXa。FXII、HMWK和前激肽释放酶严重缺乏的患者没有出血性疾病,这一事实可以说明接触激活途径在启动凝块形成方面的次要作用。相反,接触激活系统更多地参与炎症和先天免疫。

[0200] 内源性和外源性凝血途径共有的最终共同途径涉及凝血酶原转化为凝血酶和纤维蛋白原转化为纤维蛋白。凝血酶具有多种功能,不仅将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,而且是止血栓子的构成要素。此外,它是最重要的血小板激活剂,除此之外,它还激活因子VIII和V及其抑制蛋白C(在血栓调节蛋白存在的情况下),并激活因子XIII,因子XIII形成交联纤维蛋白聚合物的共价键,纤维蛋白聚合物由活化单体形成。

[0201] 在接触因子或组织因子途径激活后,凝血级联通过FVIII和FIX的持续激活而维持在促血栓形成状态,以形成tenase复合物,直到它通过抗凝剂路径下调。

[0202] 所述方法包含向受试者施用有效量的包含如本文所描述的编码FIX治疗蛋白或其片段(例如功能片段)的ceDNA载体的组合物。如熟练的从业者将了解,术语"有效量"是指ceDNA组合物的施用量,引起蛋白以治疗疾病的"治疗有效量"表达。

[0203] 包含编码FIX治疗蛋白或其片段(例如,功能片段)的ceDNA载体的组合物的剂量范围取决于效力(例如,启动子的效率),并且包括足够大以产生期望作用,例如期望FIX治疗

蛋白的表达的量，以用于治疗B型血友病。剂量不应如此之大以至于造成不可接受的不良副作用。通常，剂量将随ceDNA载体的特定特征、表达效率以及随患者的年龄、病状和性别而变化。剂量可以由所属领域的技术人员确定，并且与传统的AAV载体不同，在任何并发症的情况下，也可以由个别医师来调节，因为ceDNA载体不包含阻止重复给药的免疫活化衣壳蛋白。

[0204] 可以在有限的时间段内重复施用本文所述的ceDNA组合物。在一些实施例中，定期或通过脉冲施用进行给药。在一个优选的实施例中，上述剂量被施用数月。治疗持续时间视受试者的临床进展和对治疗的反应而定。预期随着时间的推移加强治疗。此外，表达水平可以随着受试者的成长而滴定。

[0205] FIX治疗蛋白可以在受试者中表达至少1周、至少2周、至少1个月、至少2个月、至少6个月、至少12个月/一年、至少2年、至少5年、至少10年、至少15年、至少20年、至少30年、至少40年、至少50年或更长时间。通过在预定或期望的间隔时间反复施用本文所述的ceDNA载体能够达成长期表达。

[0206] 如本文所使用，术语“治疗有效量”为足以产生疾病生物标记物的表达的统计学上显著的可测量变化或既定疾病症状的减轻的所表达的FIX治疗蛋白或其功能片段的量(参见下文的“功效测量”)。指定的ceDNA组合物的此类有效量能够在临床试验以及动物研究中加以调整。

[0207] 需要施用的ceDNA载体的精确量取决于从业者的判断并且因个体而异。合适的施用方案也是可变的，但以初始施用为代表，随后通过后续注射或其它施用以一个或多个间隔重复给药。或者，考虑持续静脉内输注足以将血液中的浓度维持在体内治疗规定的范围内，特别是用于治疗急性疾病/病症。

[0208] 可用于本文所述的方法和组合物的药剂能够通过体表、静脉内(通过集团或连续输注)、细胞内注射、组织内注射、经口、通过吸入、腹膜内、皮下、腔内施用，并且必要时能够通过蠕动方式或通过所属领域的技术人员已知的其它方式递送。如果需要，可以全身施用所述药剂。其也可以在子宫内施用。

[0209] B型血友病的既定治疗的功效可以由熟练的临床医师测定。然而，在本文使用“有效治疗”时，如果疾病或病症的病征或症状中的任一者或全部以有益方式改变，或疾病的其它临床上接受的症状或标记物在用编码FIX或其功能片段的ceDNA载体治疗之后改良或改善例如至少10％，那么认为治疗为“有效治疗”。还可以根据个体未发生恶化来测量功效，如通过疾病的稳定或对医疗干预的需求(即，疾病的发展停止或至少减缓)所评估。测量这些指标的方法是所属领域的技术人员已知的和/或描述于本文中。治疗包括对个体或动物(一些非限制性实例包括人或哺乳动物)的疾病的任何治疗，并且包括：(1)抑制(例如遏制)疾病或减缓疾病或病症的发展；或(2)缓解疾病，例如引起症状消退；以及(3)阻止或减小疾病发展的可能性，或预防与疾病相关的继发疾病/病症(诸如肝脏或肾脏衰竭)。治疗疾病的有效量是指当施用于有需要的哺乳动物时足以产生对所述疾病有效治疗的量，所述术语如本文所定义。

[0210] 药剂的功效可以通过评估B型血友病特有的物理指标来测定。B型血友病指标的标准分析方法为所属领域中已知的。

[0211] 在一些实施例中，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体还可以编码可以

结合由ceDNA表达的FIX蛋白使用的辅因子或其它多肽、有义或反义寡核苷酸、或RNA(编码或非编码;例如siRNA、shRNA、微小RNA和其反义对应物(例如拮抗MiR))。另外,包含编码FIX蛋白的序列的表达盒还可以包括外源序列,所述外源序列编码待用于实验或诊断目的的报告蛋白,例如β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和所属领域中熟知的其它蛋白质。

[0212] 在一个实施例中,ceDNA载体包含用于表达FIX蛋白的核酸序列,所述FIX蛋白具有治疗B型血友病的功能。在一个优选实施例中,除非如此期望,否则治疗性FIX蛋白不引起免疫系统反应。

[0213] III.一般用于产生FIX治疗蛋白的ceDNA载体

[0214] 本公开的实施例基于包含可以表达FIX转基因的封闭端线性双链(ceDNA)载体的方法和组合物。在一些实施例中,转基因为编码FIX蛋白的序列。如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体不受大小限制,从而准许例如表达由单个载体表达转基因所需的所有组分。用于表达FIX蛋白的ceDNA载体优选地为分子,例如表达盒的至少一部分上的双链体,例如自互补双链体(例如,ceDNA不为双链环状分子)。ceDNA载体具有共价封闭端,因此抵抗核酸外切酶(例如,核酸外切酶I或核酸外切酶III)消化,例如在37℃下超过一个小时。

[0215] 一般来说,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体在5'到3'方向上包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、感兴趣的核酸序列(例如本文所描述的表达盒)和第二AAV ITR。ITR序列选自以下中的任一个:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰AAV反向末端重复序列(经修饰ITR)(例如经修饰的不对称ITR);(ii)两个经修饰ITR,其中经修饰ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组织(例如经修饰的不对称ITR);或(iii)对称或基本对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织;或(iv)对称或基本对称修饰的ITR对,其中每个经修饰ITR具有相同的三维空间组织。

[0216] 本文涵盖包含用于产生FIX蛋白的ceDNA载体的方法和组合物,其可以进一步包括递送系统,例如但不限于脂质体纳米粒子递送系统。本文公开了预期使用的非限制示范性脂质体纳米粒子系统。在一些方面中,本公开提供了包含ceDNA和可电离脂质的脂质纳米粒子。举例来说,2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开了脂质纳米粒子配制物,所述配制物经制备并且装载通过所述方法获得的ceDNA载体,所述国际申请并入本文中。

[0217] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体不具有由病毒衣壳内的有限空间所强加的包装约束。与经囊封的AAV基因组相反,ceDNA载体代表原核生物产生的质粒DNA载体的活的真核生物产生的替代物。这允许插入控制元件,例如本文公开的调节开关、大的转基因、多个转基因等。

[0218] 图1A-1E显示用于表达FIX蛋白的非限制性示范性ceDNA载体或ceDNA质粒的对应序列的示意图。用于表达FIX蛋白的ceDNA载体为无衣壳的并且可以获自质粒,所述质粒按照此次序编码:第一ITR、包含转基因的表达盒和第二ITR。表达盒可以包括一种或多种允许且/或控制转基因表达的调节序列,例如其中表达盒能够按照此次序包含以下中的一个或多个:增强子/启动子、ORF报告体(转基因)、转录后调节元件(例如WPRE),以及聚腺苷酸化和终止信号(例如BGH聚A)。

[0219] 表达盒还可包含内部核糖体进入位点(IRES)和/或2A元件。顺式调节元件包含但

不限于启动子、核糖开关、绝缘子、mir可调节元件、转录后调节元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在一些实施例中，ITR可以充当用于转基因，例如FIX蛋白的启动子。在一些实施例中，ceDNA载体包含用于调节转基因的表达的额外组分，例如调节开关，其在本文中标题为用于控制和调节FIX蛋白表达的“调节开关”的章节中描述，并且如果期望，可以包括作为使包含ceDNA载体的细胞能够控制细胞的细胞死亡的杀伤开关的调节开关。

[0220] 表达盒能够包含超过4000个核苷酸、5000个核苷酸、10,000个核苷酸或20,000个核苷酸、或30,000个核苷酸、或40,000个核苷酸、或50,000个核苷酸，或在约4000-10,000个核苷酸或10,000-50,000个核苷酸之间的任何范围，或超过50,000个核苷酸。在一些实施例中，表达盒能够包含长度在500到50,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施例中，表达盒能够包含长度在500到75,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施例中，表达盒能够包含长度在500到10,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施例中，表达盒能够包含长度在1000到10,000个核苷酸范围内的转基因。在一些实施例中，表达盒能够包含长度在500到5,000个核苷酸范围内的转基因。ceDNA载体不存在衣壳化AAV载体的尺寸限制，从而能够递送大尺寸表达盒以提供有效的转基因表达。在一些实施例中，ceDNA载体缺乏原核生物特异性甲基化。

[0221] ceDNA表达盒能够包括例如所编码的蛋白质在接受的受试者中不存在、无活性或活性不充分的可表达的外源序列(例如开放阅读框)或转基因，或所编码的蛋白质具有所期望的生物或治疗作用的基因。转基因能够编码能够用以校正缺陷基因或转录物表达的基因产物。原则上，表达盒可包括编码因突变而减少或不存在或在本公开的范围内认为过度表达时会展现治疗益处的蛋白质、多肽或RNA的任何基因。

[0222] 表达盒可以包含任何转基因(例如编码FIX蛋白)，例如适用于治疗受试者的B型血友病的FIX蛋白，即治疗性FIX蛋白。ceDNA载体可以用于单独或与编码多肽的核酸或非编码核酸(例如RNAi、miRs等)以及外源基因和核酸序列(包括受试者基因组中的病毒序列，例如HIV病毒序列等等)组合来在受试者中递送和表达任何感兴趣的FIX蛋白。优选地，本文所公开的ceDNA载体用于治疗目的(例如用于医学、诊断或兽医学用途)或免疫原性多肽。在某些实施例中，ceDNA载体适用于表达受试者中的所关注的任何基因，包括一种或多种多肽、肽、核糖核酸酶、肽核酸、siRNA、RNAi、反义寡核苷酸、反义多核苷酸，或RNA(编码或非编码；例如siRNA、shRNA、微RNA，和其反义对应物(例如拮抗MiR))、抗体、融合蛋白或其任何组合。

[0223] 表达盒还能够编码多肽、有义或反义寡核苷酸，或RNA(编码或非编码；例如siRNA、shRNA、微RNA，和其反义对应物(例如拮抗MiR))。表达盒可包括编码用于实验或诊断目的的报告蛋白的外源序列，所述报告蛋白例如β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和其它所属领域众所周知的报告蛋白。

[0224] 在表达盒，即本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的表达构建体中提供的序列可以针对靶宿主细胞进行密码子优化。如本文所用，术语“进行密码子优化”或“密码子优化”是指通过用如小鼠或人等所关注脊椎动物的基因中使用频率较高或最高的密码子替换天然序列(例如原核序列)的至少一个、超过一个或大量密码子来修饰核酸序列以增强其在所述脊椎动物的细胞中的表达的过程。各种物种对特定氨基酸的某些密码子展现出特定的偏好。通常，密码子优化不会改变原始转译蛋白质的氨基酸序列。优化的密码子可以使用

例如Aptagen的GENE FORGE®密码子优化和定制基因合成平台(Aptagen公司,2190Fox Mill Rd.Suite 300,Herndon,Va.20171)或另一公开可用的数据库来测定。在一些实施例中,如所属领域中已知,编码FIX蛋白的核酸经优化用于人类表达,和/或为人类FIX或其功能片段。

[0225] 由如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体表达的转基因编码FIX蛋白。不同于基于质粒的表达载体的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体存在许多结构特点。ceDNA载体可以具有以下特点中的一个或多个:缺乏原始(即,非插入)细菌DNA;缺乏原核复制起点;为自给式的,即,其不需要除两个ITR(包括Rep结合和末端解链位点(RBS和TRS))和在ITR之间的外源序列之外的任何序列;存在形成发夹的ITR序列;和不存在细菌型DNA甲基化或实际上被哺乳动物宿主视为异常的任何其它甲基化。一般来说,本发明载体优选不含有任何原核DNA,但作为非限制性实施例,预期可以将一些原核DNA作为外源序列插入启动子或增强子区中。将ceDNA载体与质粒表达载体区分开来的另一个重要特征是,ceDNA载体是具有封闭端的单链线性DNA,而质粒始终是双链DNA。

[0226] 通过本文所提供的方法产生的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体优选地具有线性且连续结构,而非非连续结构,如限制酶消化分析所测定(图4D)。相信线性和连续结构在受到细胞核酸内切酶攻击时更稳定,并且不太可能重组并引起诱变。因此,线性和连续结构的ceDNA载体是优选的实施例。连续、线性、单链的分子内双链体ceDNA载体可以具有共价结合的末端,而不具有编码AAV衣壳蛋白的序列。这些ceDNA载体在结构上不同于质粒(包含本文所描述的ceDNA质粒),所述质粒是细菌来源的环状双链体核酸分子。质粒的互补链在变性后可以分离,从而产生两个核酸分子,而与此相反,ceDNA载体虽具有互补链,却是单个DNA分子,并且因此即使变性,也仍保持是单个分子。在一些实施例中,与质粒不同,如本文所描述的ceDNA载体的产生可以没有原核类型的DNA碱基甲基化。因此,在结构方面(特别是线性对比环形)以及还根据用于产生和纯化这些不同物体的方法方面,以及还根据它们的DNA甲基化方面,即ceDNA质粒属于原核类型而ceDNA载体属于真核类型,ceDNA载体和ceDNA质粒是不同的。

[0227] 使用如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体相比于基于质粒的表达载体存在几个优势,所述优势包括但不限于:1)质粒含有细菌DNA序列,并进行原核特异性甲基化,例如6-甲基腺苷和5-甲基胞嘧啶甲基化,而无衣壳AAV载体序列是真核来源的,并且不进行原核特异性甲基化;因此,与质粒相比,无衣壳AAV载体诱导炎性和免疫反应的可能性较小;2)质粒在产生过程期间需要存在抗性基因,而ceDNA载体则不需要;3)环状质粒在引入细胞中后未递送到细胞核并需要超载来绕过细胞核酸酶的降解,而ceDNA载体含有赋予核酸酶抗性并可以被设计成靶向和递送到细胞核的病毒顺式元件,即ITR。假设:ITR功能必需的最小限定元件是Rep结合位点(RBS;对于AAV2,为5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60))和末端解链位点(TRS;对于AAV2,为5'-AGTTGG-3'(SEQ ID NO:64)),加上允许发夹形成的可变回文序列;且4)ceDNA载体不具有通常在原核生物来源的质粒中发现的CpG二核苷酸过度表达,原核生物来源的质粒据报导结合铎样受体家族成员,诱发T细胞介导的免疫反应。相比之下,用本文公开的无衣壳AAV载体进行的转导可以有效地靶向难以使用各种递送试剂用常规AAV病毒粒子转导的细胞和组织类型。

[0228] IV.反向末端重复序列(ITR)

[0229] 如本文所公开,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体含有位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的转基因或核酸序列,其中ITR序列可以为不对称的ITR对或对称或基本上对称的ITR对,当这些术语如本文所定义时。如本文所公开的ceDNA载体能够包含选自以下中的任一种的ITR序列:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰AAV反向末端重复序列(经修饰ITR)(例如不对称修饰的ITR);(ii)两个经修饰ITR,其中经修饰ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组织(例如不对称修饰的ITR),或(iii)对称或基本对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织,或(iv)对称或基本对称修饰的ITR对,其中每个经修饰ITR具有相同的三维空间组织,其中本公开的方法可以进一步包括递送系统,例如(但不限于)脂质体纳米粒子递送系统。

[0230] 在一些实施例中,ITR序列可以来自细小病毒科的病毒,细小病毒科包括两个亚科:感染脊椎动物的细小病毒亚科和感染昆虫的浓核病毒亚科。细小病毒亚科(称为细小病毒)包含依赖病毒属,所述依赖病毒属的成员在大多数情况下需要与辅助病毒例如腺病毒或疱疹病毒共同感染以用于生产性感染。依赖病毒属包括通常感染人类(例如,血清型2、3A、3B、5和6)或灵长类动物(例如,血清型1和4)的腺相关病毒(AAV)以及感染其它温血动物的相关病毒(例如,牛科动物、犬科动物、马科动物和绵羊科动物腺相关病毒)。细小病毒和细小病毒科的其它成员一般描述于Kenneth I.Berns,《病毒学领域(FIELDS VIROLOGY)》(第3版,1996)中第69章“细小病毒科:病毒和其复制(Parvoviridae:The Viruses and Their Replication)”。

[0231] 尽管在说明书和本文的实例中举例说明的ITR是AAV2 WT-ITR,但是所属领域的普通技术人员知道如上所述,可以使用来自任何已知的细小病毒,例如依赖病毒,例如AAV(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV 5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV 11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组。例如NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261)的ITR、嵌合ITR或来自任何合成AAV的ITR。在一些实施例中,AAV可以感染温血动物,例如禽类(AAAV)、牛(BAAV)、犬、马和绵羊腺相关病毒。在一些实施例中,ITR来自B19细小病毒(GenBank登录号:NC000883)、来自小鼠的细小病毒(MVM)(GenBank登录号NC 001510);鹅细小病毒(GenBank登录号NC 001701);蛇细小病毒1(GenBank登录号NC 006148)。在一些实施例中,如本文所论述,5'WT-ITR可以来自一种血清型,而3'WT-ITR来自不同血清型。

[0232] 普通技术人员知道,ITR序列具有双链霍利迪连结体(Holliday junction)的共同结构,所述结构典型是T形或Y形发夹结构(参见例如图2A和3A),其中每个WT-ITR由两个回文臂或环(B-B'和C-C')嵌入较大的回文臂(A-A')中与单链D序列形成(其中这些回文序列的顺序限定了ITR的翻转或翻动取向)。参见例如来自不同AAV血清型(AAV1-AAV6)的ITR的结构分析和序列比较,并描述于Grimm等人,《病毒学杂志(J.Virology)》,2006;80(1);426-439;Yan等人,《病毒学杂志》,2005;364-379;Duan等人,《病毒学(Virology)》1999;261;8-14。所属领域的技术人员基于本文提供的示范性AAV2 ITR序列,可以容易地确定用于ceDNA载体或ceDNA质粒的来自任何AAV血清型的WT-ITR序列。参见例如来自不同AAV血清型(AAV1-AAV6和禽类AAV(AAAV)和牛AAV(BAAV))的ITR的序列比较,其描述于Grimm等人,《病毒学杂志》,2006;80(1);426-439;其示出了AAV2的左ITR与来自其它血清型的左ITR的同一性%:AAV-1(84%)、AAV-3(86%)、AAV-4(79%)、AAV-5(58%)、AAV-6(左ITR)(100%)和

AAV-6(右ITR)(82%)。

[0233] A.对称的ITR对

[0234] 在一些实施例中,如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体在5'到3'方向上包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、感兴趣的核酸序列(例如本文所描述的表达盒)和第二AAV ITR,其中第一ITR(5'ITR)和第二ITR(3'ITR)相对于彼此对称或基本上对称-也就是说,ceDNA载体可以包含具有对称的三维空间组织以使得其结构在几何空间中为相同形状或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环的ITR序列。在这样的实施例中,对称的ITR对或基本上对称的ITR对可以是不是野生型ITR的修饰ITR(例如经修饰ITR)。一个经修饰ITR对可以具有相同的相对于野生型ITR具有一个或多个修饰的序列,并且为彼此的反向互补序列(反向)。在替代实施例中,修饰ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,修饰ITR对可以具有不同的序列,但是具有对应或相同的对称的三维形状。

[0235] (i)野生型ITR

[0236] 在一些实施例中,对称的ITR或基本上对称的ITR是如本文所描述的野生型(WT-ITR)。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须为来自相同AAV血清型的WT-ITR。也就是说,在一些实施例中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在这样的实施例中,WT-ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组织。

[0237] 因此,如本文所公开,ceDNA载体含有位于两个侧接野生型反向末端重复(WT-ITR)序列之间的转基因或核酸序列,所述WT-ITR序列为彼此的反向互补序列(反向),或者,相对于彼此基本上对称-也就是说,WT-ITR对具有对称的三维空间组织。在一些实施例中,野生型ITR序列(例如AAV WT-ITR)包含功能Rep结合位点(RBS;例如AAV2为5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3',SEQ ID NO:60)和功能末端解析位点(TRS;例如5'-AGTT-3',SEQ ID NO:62)

[0238] 在一个方面中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以从载体多核苷酸获得,所述载体多核苷酸编码可操作地位于两个WT反向末端重复序列(WT-ITR)之间的核酸(例如AAV WT-ITR)。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须是来自同一AAV血清型的WT-ITR。也就是说,在一些实施例中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在这样的实施例中,WT-ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组织。在一些实施例中,5'WT-ITR来自一种AAV血清型,而3'WT-ITR来自相同或不同的AAV血清型。在一些实施例中,5'WT-ITR和3'WT-ITR是彼此的镜像,即它们是对称的。在一些实施例中,5'WT-ITR和3'WT-ITR来自相同的AAV血清型。

[0239] WT ITR是众所周知的。在一个实施例中,两个ITR来自相同的AAV2血清型。在某些实施例中,可以使用来自其它血清型的WT。有许多同源的血清型,例如AAV2、AAV4、AAV6、AAV8。在一个实施例中,可以使用紧密同源的ITR(例如具有相似环结构的ITR)。在另一个实施例中,能够使用较多样化的AAV WT ITR,例如AAV2和AAV5,并且在仍另一个实施例中,能够使用基本上呈WT的ITR,也就是说,其不仅具有WT的基本环结构,而且具有不改变或不影响所述特性的一些保守核苷酸变化。当使用来自相同病毒血清型的WT-ITR时,可以进一步使用一种或多种调节序列。在某些实施例中,调节序列为准许调节ceDNA活性,例如所编码

的FIX蛋白的表达的调节开关。

[0240] 在一些实施例中，本文所描述的技术的一个方面涉及用于表达FIX蛋白的ceDNA载体，其中ceDNA载体包含至少一个可操作地位于两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR)之间的编码FIX蛋白的核酸序列，其中WT-ITR可以来自相同血清型、不同血清型或相对于彼此基本上对称(即，具有对称的三维空间组织以使得其结构在几何空间中为相同形状或在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环)。在一些实施例中，对称的WT-ITR包含功能性末端解链位点和Rep结合位点。在一些实施例中，核酸序列编码转基因，并且其中载体不在病毒衣壳中。

[0241] 在一些实施例中，WT-ITR为相同的，但为彼此的反向互补序列。例如，5'ITR中的序列AACG可以是3'ITR中相应位点处的CGTT(即，反向互补序列)。在一个实施例中，5'WT-ITR有义链包含ATCGATCG的序列，而相应的3'WT-ITR有义链包含CGATCGAT(即ATCGATCG的反向互补序列)。在一些实施例中，WT-ITR ceDNA进一步包含末端解链位点和复制蛋白结合位点(RPS)(有时称为复制蛋白结合位点)，例如Rep结合位点。

[0242] 用于包含WT-ITR的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中的示范性WT-ITR序列示于本文表2中，所述表显示WT-ITR对(5'WT-ITR和3'WT-ITR)。

[0243] 作为一个示范性实例，本公开提供了包含可操作地连接到转基因(例如核酸序列)的启动子、具有或不具有调节开关的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体，其中ceDNA不含衣壳蛋白，并且：(a)由编码WT-ITR的ceDNA质粒(例如参见图1F-1G)产生，其中每个WT-ITR的发夹二级构型具有相同数目个分子内双链碱基对(相较于这些参考序列，优选地排除这种构型中的任何AAA或TTT末端环的缺失)；和(b)使用用于标识ceDNA的分析通过在实例1中的天然凝胶和变性条件下进行琼脂糖凝胶电泳标识为ceDNA。

[0244] 在一些实施例中，位于两侧的WT-ITR彼此基本上对称。在所述实施例中，5'WT-ITR可以来自AAV的一种血清型，而3'WT-ITR可以来自AAV的另一种血清型，使得WT-ITR不是相同的反向互补序列。举例来说，5'WT-ITR能够来自AAV2，并且3'WT-ITR来自不同血清型，例如AAV1、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12。在一些实施例中，WT-ITR可以选自从以下中的任一种中选择的两种不同的细小病毒：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、蛇细小病毒(例如巨蟒细小病毒)、牛细小病毒、山羊细小病毒、禽类细小病毒、犬细小病毒、马细小病毒、虾细小病毒、猪细小病毒或昆虫AAV。在一些实施例中，WT ITR的这种组合是来自AAV2和AAV6的WT-ITR的组合。在一个实施例中，当一个相对于另一个ITR反向时，基本上对称的WT-ITR具有至少90％、至少95％、至少96％…97％…98％…99％....99.5％同一性以及之间的所有点，并具有相同的对称三维空间组织。在一些实施例中，WT-ITR对由于其具有对称的三维空间组织，例如具有A、C-C'、B-B'和D臂的相同3D组织，因此是基本对称的。在一个实施例中，基本上对称的WT-ITR对相对于彼此反向，并且具有至少95％、至少96％…97％…98％…99％....99.5％同一性和其间的所有点，并且一个WT-ITR保留5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的Rep结合位点(RBS)和末端解析位点(trs)。在一些实施例中，基本对称的WT-ITR对相对于彼此反向，并且具有至少95％、至少96％…97％…98％…99％....99.5％同一性和其间的所有点，并且一个WT-ITR保留5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的Rep结合位点(RBS)和末端解析位点(trs)，此外保留允许发夹二级结构形成的可变回文序列。同源性可以通过所属领域公知的

标准方法来确定,例如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)、BLASTN。

[0245] 在一些实施例中,ITR的结构元件可以是参与ITR与大的Rep蛋白(例如Rep 78或Rep68)的功能性相互作用的任何结构元件。在某些实施例中,结构元件为ITR与大的Rep蛋白的相互作用提供了选择性,即,至少部分确定哪种Rep蛋白与ITR功能性相互作用。在其它实施例中,当Rep蛋白与ITR结合时,结构元件与大的Rep蛋白物理上相互作用。每个结构元件可以为例如ITR的二级结构、ITR的核酸序列、在两个或更多个元件之间的间距或以上中的任一者的组合。在一个实施例中,结构元件选自由A和A'臂、B和B'臂、C和C'臂、D臂、Rep结合位点(RBE)和RBE'(即互补RBE序列)以及末端解链位点(trs)组成的组。

[0246] 仅举例而言,表2指示WT-ITR的示范性组合。

[0247] 表2:来自相同血清型或不同血清型或不同细小病毒的WT-ITR的示范性组合。显示的顺序并不表示ITR位置,例如,"AAV1,AAV2"表明ceDNA可以在5'位置包含WT-AAV1 ITR,而在3'位置包含WT-AAV2 ITR,反之亦然,WT-AAV2 ITR位于5'位置,WT-AAV1 ITR位于3'位置。缩写:AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型2(AAV2)、AAV血清型3(AAV3)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、AAV血清型7(AAV7)、AAV血清型8(AAV8)、AAV血清型9(AAV9)、AAV血清型10(AAV10)、AAV血清型11(AAV11)或AAV血清型12(AAV12);AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组(例如NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC006261)、来自温血动物的ITR(禽类AAV(AAAV)、牛科动物AAV(BAAV)、犬科动物、马科动物和绵羊科动物AAV)、来自B19细小病毒的ITR(基因库登录号:NC 000883)、来自小鼠的细小病毒(Minute Virus)(MVM)(基因库登录号NC 001510);鹅:鹅细小病毒(基因库登录号NC 001701);蛇:蛇细小病毒1(基因库登录号NC 006148)。

[0248] 表2:示范性WT-ITR组合

[0249]

AAV1、AAV1	AAV2、AAV2	AAV3、AAV3	AAV4、AAV4	AAV5、AAV5
AAV1、AAV2	AAV2、AAV3	AAV3、AAV4	AAV4、AAV5	AAV5、AAV6
AAV1、AAV3	AAV2、AAV4	AAV3、AAV5	AAV4、AAV6	AAV5、AAV7
AAV1、AAV4	AAV2、AAV5	AAV3、AAV6	AAV4、AAV7	AAV5、AAV8
AAV1、AAV5	AAV2、AAV6	AAV3、AAV7	AAV4、AAV8	AAV5、AAV9
AAV1、AAV6	AAV2、AAV7	AAV3、AAV8	AAV4、AAV9	AAV5、AAV10
AAV1、AAV7	AAV2、AAV8	AAV3、AAV9	AAV4、AAV10	AAV5、AAV11
AAV1、AAV8	AAV2、AAV9	AAV3、AAV10	AAV4、AAV11	AAV5、AAV12
AAV1、AAV9	AAV2、AAV10	AAV3、AAV11	AAV4、AAV12	AAV5、AAVRH8
AAV1、AAV10	AAV2、AAV11	AAV3、AAV12	AAV4、AAVRH8	AAV5、AAVRH10
AAV1、AAV11	AAV2、AAV12	AAV3、AAVRH8	AAV4、AAVRH10	AAV5、AAV13
AAV1、AAV12	AAV2、AAVRH8	AAV3、AAVRH10	AAV4、AAV13	AAV5、AAVDJ
AAV1、AAVRH8	AAV2、AAVRH10	AAV3、AAV13	AAV4、AAVDJ	AAV5、AAVDJ8
AAV1、AAVRH10	AAV2、AAV13	AAV3、AAVDJ	AAV4、AAVDJ8	AAV5、禽
AAV1、AAV13	AAV2、AAVDJ	AAV3、AAVDJ8	AAV4、禽	AAV5、牛
AAV1、AAVDJ	AAV2、AAVDJ8	AAV3、禽	AAV4、牛	AAV5、犬
AAV1、AAVDJ8	AAV2、禽	AAV3、牛	AAV4、犬	AAV5、马
AAV1、禽	AAV2、牛	AAV3、犬	AAV4、马	AAV5、山羊
AAV1、牛	AAV2、犬	AAV3、马	AAV4、山羊	AAV5、虾
AAV1、犬	AAV2、马	AAV3、山羊	AAV4、虾	AAV5、猪
AAV1、马	AAV2、山羊	AAV3、虾	AAV4、猪	AAV5、昆虫
AAV1、山羊	AAV2、虾	AAV3、猪	AAV4、昆虫	AAV5、绵羊
AAV1、虾	AAV2、猪	AAV3、昆虫	AAV4、绵羊	AAV5、B19
AAV1、猪	AAV2、昆虫	AAV3、绵羊	AAV4、B19	AAV5、MVM
AAV1、昆虫	AAV2、绵羊	AAV3、B19	AAV4、MVM	AAV5、鹅
AAV1、绵羊	AAV2、B19	AAV3、MVM	AAV4、鹅	AAV5、蛇
AAV1、B19	AAV2、MVM	AAV3、鹅	AAV4、蛇	
AAV1、MVM	AAV2、鹅	AAV3、蛇		
AAV1、鹅	AAV2、蛇			
AAV1、蛇				
AAV6、AAV6	AAV7、AAV7	AAV8、AAV8	AAV9、AAV9	AAV10、AAV10
AAV6、AAV7	AAV7、AAV8	AAV8、AAV9	AAV9、AAV10	AAV10、AAV11
AAV6、AAV8	AAV7、AAV9	AAV8、AAV10	AAV9、AAV11	AAV10、AAV12
AAV6、AAV9	AAV7、AAV10	AAV8、AAV11	AAV9、AAV12	AAV10、AAVRH8
AAV6、AAV10	AAV7、AAV11	AAV8、AAV12	AAV9、AAVRH8	AAV10、AAVRH10
AAV6、AAV11	AAV7、AAV12	AAV8、AAVRH8	AAV9、AAVRH10	AAV10、AAV13

	AAV6、AAV12	AAV7、AAVRH8	AAV8、AAVRH10	AAV9、AAV13	AAV10、AAVDJ
	AAV6、AAVRH8	AAV7、AAVRH10	AAV8、AAV13	AAV9、AAVDJ	AAV10、AAVDJ8
	AAV6、AAVRH10	AAV7、AAV13	AAV8、AAVDJ	AAV9、AAVDJ8	AAV10、禽
	AAV6、AAV13	AAV7、AAVDJ	AAV8、AAVDJ8	AAV9、禽	AAV10、牛
	AAV6、AAVDJ	AAV7、AAVDJ8	AAV8、禽	AAV9、牛	AAV10、犬
	AAV6、AAVDJ8	AAV7、禽	AAV8、牛	AAV9、犬	AAV10、马
	AAV6、禽	AAV7、牛	AAV8、犬	AAV9、马	AAV10、山羊
	AAV6、牛	AAV7、犬	AAV8、马	AAV9、山羊	AAV10、虾
	AAV6、犬	AAV7、马	AAV8、山羊	AAV9、虾	AAV10、猪
	AAV6、马	AAV7、山羊	AAV8、虾	AAV9、猪	AAV10、昆虫
	AAV6、山羊	AAV7、虾	AAV8、猪	AAV9、昆虫	AAV10、绵羊
	AAV6、虾	AAV7、猪	AAV8、昆虫	AAV9、绵羊	AAV10、B19
	AAV6、猪	AAV7、昆虫	AAV8、绵羊	AAV9、B19	AAV10、MVM
	AAV6、昆虫	AAV7、绵羊	AAV8、B19	AAV9、MVM	AAV10、鹅
	AAV6、绵羊	AAV7、B19	AAV8、MVM	AAV9、鹅	AAV10、蛇
	AAV6、B19	AAV7、MVM	AAV8、鹅	AAV9、蛇	
	AAV6、MVM	AAV7、鹅	AAV8、蛇		
	AAV6、鹅	AAV7、蛇			
	AAV6、蛇				
[0250]	AAV11、AAV11	AAV12、AAV12	AAVRH8、AAVRH8	AAVRH10、AAVRH10	AAV13、AAV13
	AAV11、AAV12	AAV12、AAVRH8	AAVRH8、AAVRH10	AAVRH10、AAV13	AAV13、AAVDJ
	AAV11、AAVRH8	AAV12、AAVRH10	AAVRH8、AAV13	AAVRH10、AAVDJ	AAV13、AAVDJ8
	AAV11、AAVRH10	AAV12、AAV13	AAVRH8、AAVDJ	AAVRH10、AAVDJ8	AAV13、禽
	AAV11、AAV13	AAV12、AAVDJ	AAVRH8、AAVDJ8	AAVRH10、禽	AAV13、牛
	AAV11、AAVDJ	AAV12、AAVDJ8	AAVRH8、禽	AAVRH10、牛	AAV13、犬
	AAV11、AAVDJ8	AAV12、禽	AAVRH8、牛	AAVRH10、犬	AAV13、马
	AAV11、禽	AAV12、牛	AAVRH8、犬	AAVRH10、马	AAV13、山羊
	AAV11、牛	AAV12、犬	AAVRH8、马	AAVRH10、山羊	AAV13、虾
	AAV11、犬	AAV12、马	AAVRH8、山羊	AAVRH10、虾	AAV13、猪
	AAV11、马	AAV12、山羊	AAVRH8、虾	AAVRH10、猪	AAV13、昆虫
	AAV11、山羊	AAV12、虾	AAVRH8、猪	AAVRH10、昆虫	AAV13、绵羊
	AAV11、虾	AAV12、猪	AAVRH8、昆虫	AAVRH10、绵羊	AAV13、B19
	AAV11、猪	AAV12、昆虫	AAVRH8、绵羊	AAVRH10、B19	AAV13、MVM
	AAV11、昆虫	AAV12、绵羊	AAVRH8、B19	AAVRH10、MVM	AAV13、鹅
	AAV11、绵羊	AAV12、B19	AAVRH8、MVM	AAVRH10、鹅	AAV13、蛇
	AAV11、B19	AAV12、MVM	AAVRH8、鹅	AAVRH10、蛇	

AAV11、MVM	AAV12、鹅	AAVRH8、蛇		
AAV11、鹅	AAV12、蛇			
AAV11、蛇				
AAVDJ、AAVDJ	AAVDJ8，AVVDJ8	禽，禽	牛，牛	犬，犬
AAVDJ，AAVDJ8	AAVDJ8，禽	禽，牛	牛，犬	犬，马
AAVDJ，禽	AAVDJ8，牛	禽，犬	牛，马	犬，山羊
AAVDJ，牛	AAVDJ8，犬	禽，马	牛，山羊	犬，虾
AAVDJ，犬	AAVDJ8，马	禽，山羊	牛，虾	犬，猪
AAVDJ，马	AAVDJ8，山羊	禽，虾	牛，猪	犬，昆虫
AAVDJ，山羊	AAVDJ8，虾	禽，猪	牛，昆虫	犬，绵羊
AAVDJ，虾	AAVDJ8，猪	禽，昆虫	牛，绵羊	犬，B19
AAVDJ，猪	AAVDJ8，昆虫	禽，绵羊	牛，B19	犬，MVM
AAVDJ，昆虫	AAVDJ8，绵羊	禽，B19	牛，MVM	犬，鹅
AAVDJ，绵羊	AAVDJ8，B19	禽，MVM	牛，鹅	犬，蛇
AAVDJ，B19	AAVDJ8，MVM	禽，鹅	牛，蛇	
AAVDJ，MVM	AAVDJ8，鹅	禽，蛇		
AAVDJ，鹅	AAVDJ8，蛇			
AAVDJ，蛇				
马，马	山羊，山羊	虾，虾	猪，猪	昆虫，昆虫
马，山羊	山羊，虾	虾，猪	猪，昆虫	昆虫，绵羊
马，虾	山羊，猪	虾，昆虫	猪，绵羊	昆虫，B19
马，猪	山羊，昆虫	虾，绵羊	猪，B19	昆虫，MVM
马，昆虫	山羊，绵羊	虾，B19	猪，MVM	昆虫，鹅
马，绵羊	山羊，B19	虾，MVM	猪，鹅	昆虫，蛇
马，B19	山羊，MVM	虾，鹅	猪，蛇	
马，MVM	山羊，鹅	虾，蛇		
马，鹅	山羊，蛇			
马，蛇				
绵羊，绵羊	B19，B19	MVM，MVM	鹅，鹅	蛇，蛇
绵羊，B19	B19，MVM	MVM，鹅	鹅，蛇	
绵羊，MVM	B19，鹅	MVM，蛇		
绵羊，鹅	B19，蛇			
绵羊，蛇				

[0251]

[0252] 仅举例而言，表3显示来自一些不同AAV血清型的示范性WT-ITR的序列。

[0253] 表3：示范性WT-ITR

[0254]

AAV血清型	5'WT-ITR(左)	3'WT-ITR(右)
AAV1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:10
AAV2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1
AAV3	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:11
AAV4	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:12
AAV5	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:13
AAV6	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:14

[0255] 在一些实施例中，WT-ITR序列的核酸序列可以经修饰(例如通过修饰1、2、3、4或5个或更多个核苷酸或其中的任何范围)，其中所述修饰为互补核苷酸例如G取代C，且反之亦然，和T取代A，且反之亦然。

[0256] 在本公开的某些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体不具有由选自SEQ ID NO:1、2、5-14中的任一者的核酸序列组成的WT-ITR。在本公开的替代性实施例中，如果ceDNA载体具有包含选自SEQ ID NO:1、2、5-14中的任一者的核酸序列的WT-ITR，那么侧接ITR也为WT，并且ceDNA载体包含调节开关，例如本文和国际申请PCT/US18/49996(例如，参见PCT/US18/49996的表11，全文通过引用并入本文中)中所公开。在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含如本文所公开的调节开关和经选择具有选自由SEQ ID NO:1、2、5-14组成的组中的任一者的核酸序列的WT-ITR。

[0257] 如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包括保留可操作的RBE、trs和RBE'部分的WT-ITR结构。出于示范性目的使用野生型ITR，图2A和图2B示出了关于ceDNA载体的野生型ITR结构部分内的trs位点操作的一种可能机制。在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体含有一个或多个功能WT-ITR多核苷酸序列，所述序列包含Rep结合位点(RBS；用于AAV2的5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60))和末端解链位点(TRS；5'-AGTT(SEQ ID NO:62))。在一些实施例中，至少一个WT-ITR是功能性的。在替代性实施例中，当用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含彼此基本上对称的两个WT-ITR时，至少一个WT-ITR具有功能并且至少一个WT-ITR不具有功能。

[0258] B.一般用于包含不对称的ITR对或对称的ITR对的ceDNA载体的经修饰ITR(modified ITR/mod-ITR)

[0259] 如本文所讨论，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包含对称的ITR对或不对称的ITR对。在两个例子中，ITR中的一个或两个可以是经修饰ITR，差异在于，在第一个例子(即，对称的经修饰ITR)中，经修饰ITR具有相同的三维空间组织(即，具有相同的A-A'、C-C'和B-B'臂构形)，而在第二个例子(即，不对称的经修饰ITR)中，经修饰ITR具有不同的三维空间组织(即，具有A-A'、C-C'和B-B'臂的不同构形)。

[0260] 在一些实施例中，相较于野生型ITR序列(例如AAV ITR)，经修饰ITR是通过缺失、插入和/或取代进行修饰的ITR。在一些实施例中，ceDNA载体中的至少一个ITR包含功能Rep结合位点(RBS；对于AAV2为例如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'，SEQ ID NO:60)和功能末端解析位点(TRS；例如5'-AGTT-3'，SEQ ID NO:62)。在一个实施例中，ITR中的至少一个是非功能性ITR。在一个实施例中，不同或修饰ITR不是来自不同血清型的每种野生型ITR。

[0261] 在本文中详细描述了ITR中的特定改变和突变，但是在ITR的情况下，"改变"或"突变"或"修饰"表明相对于野生型、参考或原始ITR序列，插入、缺失和/或取代核苷酸。改变或突变的ITR可以是工程化ITR。如本文所用，"工程化"是指通过人的手进行操纵的方面。例如，当多肽的至少一个方面，例如其序列，通过人的手进行操纵而不同于自然存在的方面时，则认为所述多肽是"工程化"的。

[0262] 在一些实施例中，经修饰ITR可以是合成的。在一个实施例中，合成的ITR是基于来自一种以上AAV血清型的ITR序列。在另一个实施例中，合成ITR不包含基于AAV的序列。在又一个实施例中，合成的ITR尽管仅具有一些或不具有源自AAV的序列，但是保留了上述的ITR结构。在一些方面，合成的ITR可以优先与野生型Rep或特定血清型的Rep相互作用，或者在某些情况下，野生型Rep将不识别其，而仅突变的Rep可识别其。

[0263] 技术人员可以通过已知手段确定其它血清型的相应序列。例如，确定改变是否在A、A'、B、B'、C、C'或D区域中，并确定另一种血清型中的相应区域。能够在默认状态下使用

BLAST®(基本局部比对搜索工具)或其它同源性比对程序测定相应序列。本公开进一步提供了包含来自不同AAV血清型的组合的经修饰ITR的ceDNA载体群体和多个所述ceDNA载体-也就是说,一个经修饰ITR可以来自一种AAV血清型,而另一个经修饰ITR可以来自不同血清型。不希望受理论的束缚,在一个实施例中,一个ITR可以来自或基于AAV2 ITR序列,而ceDNA载体的另一个ITR可以来自或基于以下中的任一种或多种ITR序列:AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、AAV血清型7(AAV7)、AAV血清型8(AAV8)、AAV血清型9(AAV9)、AAV血清型10(AAV10)、AAV血清型11(AAV11)或AAV血清型12(AAV12)。

[0264] 任何细小病毒ITR都可以用作ITR或用于修饰的基础ITR。优选地,细小病毒是依赖病毒。更优选是AAV。选择的血清型可以是基于血清型的组织嗜性。AAV2具有广泛的组织嗜性,AAV1优先靶向神经元和骨骼肌,而AAV5优先靶向神经元、视网膜色素上皮和光感受器。AAV6优先靶向骨骼肌和肺。AAV8优先靶向肝脏、骨骼肌、心脏和胰腺组织。AAV9优先靶向肝脏、骨骼和肺组织。在一个实施例中,修饰ITR是基于AAV2 ITR。

[0265] 更具体地说,可以通过修饰结构元件来改变结构元件与特定的大Rep蛋白功能性相互作用的能力。举例来说,与ITR的野生型序列相比,结构元件的核酸序列可以经修饰。在一个实施例中,可以除去ITR的结构元件(例如A臂、A'臂、B臂、B'臂、C臂、C'臂、D臂、RBE、RBE'和trs)并用来自不同细小病毒的野生型结构元件替代。例如,替代结构可以来自:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、蛇细小病毒(例如巨蟒细小病毒)、牛细小病毒、山羊细小病毒、禽类细小病毒、犬细小病毒、马细小病毒、虾细小病毒、猪细小病毒或昆虫AAV。例如,ITR可以是AAV2 ITR,并且A或A'臂或RBE可以用来自AAV5的结构元件替代。在另一个实例中,ITR可以是AAV5 ITR,并且C或C'臂、RBE和trs可以用来自AAV2的结构元件替代。在另一个实例中,AAV ITR可以是B和B'臂被AAV2 ITR B和B'臂替代的AAV5 ITR。

[0266] 仅举例而言,表4显示经修饰ITR的区域中的至少一个核苷酸的示范性修饰(例如缺失、插入和/或取代),其中X表示那个区段中的至少一个核酸相对于相应野生型ITR的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施例中,在C和/或C'和/或B和/或B'的任何区域中的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)在至少一个末端环中保留三个连续的T核苷酸(即,TTT)。例如,如果修饰引起以下任一种:单臂ITR(例如,单个C-C'臂或单个B-B'臂)或修饰的C-B'臂或C'-B臂、或具有至少一个截短臂(例如截短的C-C'臂和/或截短的B-B'臂)的两臂ITR,那么至少所述单臂、或两臂ITR(其中一个臂可以是截短的)的至少一个臂在至少一个末端环中保留三个连续的T核苷酸(即TTT)。在一些实施例中,截短的C-C'臂和/或截短的B-B'臂在末端环中具有三个连续的T核苷酸(即TTT)。

[0267] 表4:ITR的不同B-B'和C-C'区域或臂的至少一个核苷酸的修饰的示范性组合(例如,缺失、插入和/或取代)(X指示核苷酸修饰,例如所述区域中的至少一个核苷酸的添加、缺失或取代)。

[0268]

B区	B'区	C区	C'区
X			
	X		
X	X		

		X	
			X
		X	X
X		X	
X			X
	X	X	
	X		X
X	X	X	
X	X		X
X		X	X
	X	X	X
X	X	X	X

[0269] 在一些实施例中，如本文所公开的包含不对称的ITR对或对称的经修饰ITR对的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中所使用的经修饰ITR可以包含表4中所示的修饰组合中的任一者，以及选自以下的区域中的任一者或多者中的至少一个核苷酸的修饰：A'与C之间、C与C'之间、C'与B之间、B与B'之间以及B'与A之间。在一些实施例中，C或C'区或B或B'区中的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)仍然保留了茎环的末端环。在一些实施例中，在C和C'和/或B和B'之间的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)在至少一个末端环中保留三个连续的T核苷酸(即TTT)。在替代实施例中，C与C'之间和/或B与B'之间的至少一个核苷酸的任何修饰(例如缺失、插入和/或取代)使至少一个末端环中保留三个连续A核苷酸(即，AAA)。在一些实施例中，本文中使用的经修饰ITR能够包含表4中所示的修饰组合中的任一个，并且还包含选自以下的任一个或多个区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)：A'、A和/或D。举例来说，在一些实施例中，本文中使用的经修饰ITR能够包含表4中所示的修饰组合中的任一个，并且还包含A区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施例中，本文中使用的经修饰ITR可以包含表4中所示的修饰的组合中的任一个，并且还包含A'区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如，缺失、插入和/或取代)。在一些实施例中，本文中使用的经修饰ITR可以包括表4中所示出的修饰组合中的任一个，并且还包括A和/或A'区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。在一些实施例中，本文中使用的经修饰ITR可以包括表4中所示出的修饰组合中的任一个，并且还包括D区域中的至少一个核苷酸的修饰(例如缺失、插入和/或取代)。

[0270] 在一个实施例中，能够修饰结构元件的核苷酸序列(例如修饰1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多个核苷酸或其中的任何范围)，以产生经修饰结构元件。在一个实施例中，对ITR的特异性修饰例示于本文中(例如，SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187)，或示于2018年12月6日提交的国际专利申请第PCT/US2018/064242号的图7A-7B中(例如PCT/US2018/064242中的SEQ ID No 97-98、101-103、105-108、111-112、117-134、545-54)。在一些实施例中，能够修饰ITR(例如通过修饰1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个或更多个核苷酸或其中的任何范围)。在其它实施例中，ITR可以与SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187的经修饰ITR之一或SEQ ID

NO:3、4、15-47、101-116或165-187的A-A'臂和C-C'臂以及B-B'臂的含RBE区段具有至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或更大的序列同一性，或示于全文通过引用并入本文中的国际专利申请第PCT/US18/49996号的表2-9中(即，SEQ ID NO:110-112、115-190、200-468)。

[0271] 在一些实施例中，经修饰ITR可以例如包含特定臂的全部，例如A-A'臂的全部或一部分、或B-B'臂的全部或一部分、或C-C'臂的全部或一部分的去除或缺失，或者，形成环的茎的1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对的去除，只要对茎(例如单臂)进行加帽的最终环仍然存在即可(例如参见2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的图7A中的ITR-21)。在一些实施例中，经修饰ITR可以包括从B-B'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对。在一些实施例中，经修饰ITR可以包含从C-C'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对(参见例如2018年12月6日提交的国际专利申请第PCT/US2018/064242号的图3B中的ITR-1或图7A中的ITR-45)。在一些实施例中，经修饰ITR可以包括从C-C'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对以及从B-B'臂去除1、2、3、4、5、6、7、8、9个或更多个碱基对。设想去除碱基对的任何组合，例如可以在C-C'臂中去除6个碱基对以及在B-B'臂中去除2个碱基对。作为说明性实例，图3B展示了示范性的修饰ITR，其从C部分和C'部分各缺失至少7个碱基对，C和C'区域之间的环中的核苷酸被取代，以及从B区域和B'区域各自缺失至少一个碱基对，使得修饰ITR包含至少一个臂(例如C-C')截短的两个臂。在一些实施例中，修饰ITR还包含从B区域和B'区域各自缺失至少一个碱基对，使得臂B-B'相对于WT ITR也截短。

[0272] 在一些实施例中，经修饰ITR相对于全长野生型ITR序列可以具有1与50个之间(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50)的核苷酸缺失。在一些实施例中，相对于全长WT ITR序列，经修饰ITR可以具有1与30个之间的核苷酸缺失。在一些实施例中，相对于全长野生型ITR序列，经修饰ITR可以具有2与20个之间的核苷酸缺失。

[0273] 在一些实施例中，经修饰ITR在A或A'区域的含RBE部分中不含任何核苷酸缺失，以便不干扰DNA复制(例如，通过Rep蛋白结合到RBE，或在末端解链位点切割)。在一些实施例中，预期用于本文中的经修饰ITR在如本文所述的B、B'、C和/或C区域中具有一个或多个缺失。

[0274] 在一些实施例中，包含对称的ITR对或不对称的ITR对的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含如本文所公开的调节开关和至少一个经选择具有选自由SEQ ID NO:3、4、15-47、101-116或165-187组成的组中的任一者的核苷酸序列的经修饰ITR。

[0275] 在另一个实施例中，结构元件的结构可以为经修饰的。例如，结构元件改变了茎高和/或环中核苷酸的数目。例如，茎高可以是约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个或更多个核苷酸或其中的任何范围。在一个实施例中，茎高可以是约5个核苷酸至约9个核苷酸并与Rep功能性相互作用。在另一个实施例中，茎高可以是约7个核苷酸并与Rep功能性相互作用。在另一个实施例中，环可以具有3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个或更多个核苷酸或其中的任何范围。

[0276] 在另一个实施例中，RBE或扩展RBE内GAGY结合位点或GAGY相关结合位点的数目可以增加或减少。在一个实施例中，RBE或扩展RBE可以包括1、2、3、4、5或6个或更多个GAGY结

合位点或其中的任何范围。每个GAGY结合位点可以独立地是精确的GAGY序列或类似于GAGY的序列，只要所述序列足以结合Rep蛋白即可。

[0277] 在另一个实施例中，能够改变(例如增加或减少)两个元件(例如(但不限于)RBE和发夹)之间的间距，以改变与大Rep蛋白的功能相互作用。例如，间距可以是约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或21个或更多个核苷酸或其中的任何范围。

[0278] 如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包括ITR结构，所述ITR结构相对于本文所公开的野生型AAV2 ITR结构经修饰，但仍然保留可操作的RBE、trs和RBE'部分。图2A和图2B显示了用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的野生型ITR结构部分内的trs位点的一种可能的操作机制。在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体含有一个或多个功能ITR多核苷酸序列，所述序列包含Rep结合位点(RBS；用于AAV2的5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60))和末端解链位点(TRS；5'-AGTT(SEQ ID NO:62))。在一些实施例中，至少一个ITR(wt或修饰ITR)是功能性的。在替代性实施例中，当用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含彼此不同或不对称的两个经修饰ITR时，至少一个经修饰ITR具有功能并且至少一个经修饰ITR不具有功能。

[0279] 在一些实施例中，如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的经修饰ITR(例如，左或右ITR)在环臂、截短臂或间隔子内具有修饰。在环臂、截短臂或间隔子内具有修饰的ITR的示范性序列列于全文通过引用并入本文中的国际专利申请第PCT/US18/49996号的表2(即，SEQ ID NO:135-190、200-233)；表3(例如SEQ ID No:234-263)；表4(例如SEQ ID NO:264-293)；表5(例如本文中的SEQ ID No:294-318)；表6(例如SEQ ID NO:319-468；以及表7-9(例如SEQ ID No:101-110、111-112、115-134)或表10A或10B(例如SEQ ID No:9、100、469-483、484-499)中。

[0280] 在一些实施例中，用于包含不对称的ITR对或对称的经修饰ITR对的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中的经修饰ITR选自全文通过引用并入本文中的国际专利申请第PCT/US18/49996号的表2、3、4、5、6、7、8、9和10A-10B中所示的ITR中的任一者或组合。

[0281] 以上类别中的每一者中的包含不对称的ITR对或对称的经修饰ITR对的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中的额外示范性经修饰ITR提供于表5A和5B中。表5A中的经修饰的右ITR的预测二级结构示于2018年12月6日提交的国际专利申请第PCT/US2018/064242号的图7A中，并且表5B中的经修饰的左ITR的预测二级结构示于2018年12月6日提交的国际专利申请第PCT/US2018/064242号的图7B中，所述申请的全文通过引用并入本文中。

[0282] 表5A和表5B列举示范性经修饰的右和左ITR的SEQ ID NO。

[0283] 表5A：示范性经修饰的右ITR。经修饰的这些示范性右ITR能够包含GCGCGCTCGCTCGCTC-3′(SEQ ID NO:60)的RBE、ACTGAGGC(SEQ ID NO:69)的间隔子、间隔子补体GCCTCAGT(SEQ ID NO:70)和GAGCGAGCGAGCGCGC(SEQ ID NO:71)的RBE'(即，RBE的补体)。

[0284]

ITR构建体	SEQ ID NO:
右ITR-18	15
ITR-19右	16
ITR-20右	17

ITR-21右	18
ITR-22右	19
ITR-23右	20
ITR-24右	21
ITR-25右	22
ITR-26右	23
ITR-27右	24
ITR-28右	25
ITR-29右	26
ITR-30右	27
ITR-31右	28
ITR-32右	29
ITR-49右	30
ITR-50右	31

[0285] 表5B:示范性经修饰的左ITR。经修饰的这些示范性左ITR能够包含GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的RBE、ACTGAGGC(SEQ ID NO:69)的间隔子、间隔子补体GCCTCAGT(SEQ ID NO:70)和GAGCGAGCGAGCGCGC(SEQ ID NO:71)的RBE补体(RBE')。

[0286]

ITR构建体	SEQ ID NO:
ITR-33左	32
ITR-34左	33
ITR-35左	34
ITR-36左	35
ITR-37左	36
ITR-38左	37
ITR-39左	38
ITR-40左	39
ITR-41左	40
ITR-42左	41
ITR-43左	42
ITR-44左	43
ITR-45左	44
ITR-46左	45
ITR-47左	46
ITR-48左	47

[0287] 在一个实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体在5'到3'方向上包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、感兴趣的核酸序列(例如本文所描述的表达盒)和第二AAV ITR,其中第一ITR(5'ITR)和第二ITR(3'ITR)相对于彼此不对称-也就是说,其具有彼此不同的3D空间构型。作为示范性实施例,第一ITR可以是野生型ITR,并且第二ITR可以是突变或修饰ITR,或反过来,其中第一ITR可以是突变或修饰ITR,第二ITR可以是野生型

ITR。在一些实施例中，第一ITR和第二ITR均是经修饰ITR，但具有不同序列或具有不同修饰，因此不是相同的经修饰ITR，并且具有不同的3D空间构型。换句话说，具有不对称ITR的ceDNA载体包含如下ITR：其中一个ITR相对于WT-ITR的任何变化均未反映于另一个ITR中；或可替代地，其中具有经修饰的不对称ITR对的不对称ITR可以具有相对于彼此不同的序列和不同的三维形状。用于表达FIX蛋白并且用于产生ceDNA质粒的ceDNA载体中的示范性不对称的ITR示于表5A和5B中。

[0288] 在一个替代性实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含两个对称的经修饰ITR-也就是说，两个ITR都具有相同序列，但为彼此的反向互补序列(反向)。在一些实施例中，相对于来自相同AAV血清型的野生型ITR序列，对称的经修饰ITR对包含缺失、插入或取代中的至少一种或任何组合。对称ITR中的添加、缺失或取代为相同的，但为彼此的反向互补序列。举例来说，在5'ITR的C区中插入3个核苷酸将反映为在3'ITR的C'区中相应部分中插入3个反向互补核苷酸。仅出于说明目的，如果在5'ITR中添加AACG，那么在3'ITR中相应位点处添加CGTT。举例来说，如果5'ITR有义链是ATCGATCG，则G与A之间添加AACG会产生序列ATCGAACGATCG(SEQ ID NO:51)。相应的3'ITR有义链是CGATCGAT(ATCGATCG的反向补体)，其中T与C之间添加CGTT(即，AACG的反向补体)会产生序列CGATCGTTCGAT(SEQ ID NO:49)(ATCGAACGATCG的反向补体)(SEQ ID NO:51)。

[0289] 在替代实施例中，修饰ITR对如本文所定义是基本上对称的-即，修饰ITR对可以具有不同的序列，但是具有对应或相同的对称的三维形状。举例来说，一个经修饰ITR能够来自一种血清型，而另一个经修饰ITR能够来自不同血清型，但它们在相同区域中具有相同突变(例如核苷酸插入、缺失或取代)。换句话说，仅出于说明目的，5'经修饰ITR可以来自AAV2并在C区域有一个缺失，而3'经修饰ITR可以来自AAV5并在C'区域中有相应的缺失，并且如果5'经修饰ITR和3'经修饰ITR具有相同或对称的三维空间组织，那么其作为修饰ITR对涵盖用于在本文中。

[0290] 在一些实施例中，基本上对称的经修饰ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环，例如，如果基本上对称的经修饰ITR对中的修饰ITR缺失C-C'臂，那么同源经修饰ITR相应缺失C-C'环，并且在其同源经修饰ITR的几何空间呈相同形状下，剩余A和B-B'环具有相似3D结构。仅作为示例，基本上对称的ITR可以具有对称的空间组织，使得它们的结构在几何空间中是相同的形状。例如，当将GC对修饰为例如CG对，反之亦然，或者将AT对修饰为TA对，反之亦然时，可能会发生这种情况。因此，如果例如5'ITR具有序列ATCGAACCATCG(SEQ ID NO:50)(其中G另外修饰成C)，并且基本对称的3'ITR具有序列CGATCGTTCGAT(SEQ ID NO:49)(除a之外，T不进行相应修饰)，那么使用上述示范性实施例经修饰5'ITR作为ATCGAACGATCG(SEQ ID NO:51)和经修饰3'ITR作为CGATCGTTCGAT(SEQ ID NO:49)(即，ATCGAACGATCG的反向补体(SEQ ID NO:51))，这些经修饰ITR仍然会是对称的。在一些实施例中，此类经修饰ITR对是基本对称的，原因是经修饰ITR对具有对称立体化学构型。

[0291] 表6显示用于用以表达FIX蛋白的ceDNA载体中的示范性对称的经修饰ITR对(即，经修饰的左ITR和对称的经修饰的右ITR)。序列的黑体(红色)部分标识了部分ITR序列(即A-A'、C-C'和B-B'环的序列)，也在图31A-46B中示出。经修饰的这些示范性ITR能够包含GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:60)的RBE、ACTGAGGC(SEQ ID NO:69)的间隔子、间隔子补体GCCTCAGT(SEQ ID NO:70)和GAGCGAGCGAGCGCGC(SEQ ID NO:71)的RBE'(即，RBE的补

体)。

[0292] 表6:用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中的示范性对称的经修饰ITR对

[0293]

经修饰的左 ITR（经修饰 5' ITR）		经修饰的对称右 ITR（经修饰 3' ITR）	
ITR-33 左	SEQ ID NO: 32	ITR-18，右	SEQ ID NO: 15
ITR-34 左	SEQ ID NO: 33	ITR-51，右	SEQ ID NO: 48
ITR-35 左	SEQ ID NO: 34	ITR-19，右	SEQ ID NO: 16
ITR-36 左	SEQ ID NO: 35	ITR-20，右	SEQ ID NO: 17
ITR-37 左	SEQ ID NO: 36	ITR-21，右	SEQ ID NO: 18
ITR-38 左	SEQ ID NO: 37	ITR-22 右	SEQ ID NO: 19
ITR-39 左	SEQ ID NO: 38	ITR-23，右	SEQ ID NO: 20
ITR-40 左	SEQ ID NO: 39	ITR-24，右	SEQ ID NO: 21
ITR-41 左	SEQ ID NO: 40	ITR-25 右	SEQ ID NO: 22
ITR-42 左	SEQ ID NO: 41	ITR-26 右	SEQ ID NO: 23
ITR-43 左	SEQ ID NO: 42	ITR-27 右	SEQ ID NO: 24
ITR-44 左	SEQ ID NO: 43	ITR-28 右	SEQ ID NO: 25
ITR-45 左	SEQ ID NO: 44	ITR-29，右	SEQ ID NO: 26
ITR-46 左	SEQ ID NO: 45	ITR-30，右）	SEQ ID NO: 27
ITR-47，左	SEQ ID NO: 46	ITR-31，右	SEQ ID NO: 28
ITR-48，左	SEQ ID NO: 47	ITR-32 右	SEQ ID NO: 29

[0294] 在一些实施例中,包含不对称的ITR对的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包含具有修饰的ITR,所述修饰对应于以下中的任一种修饰:本文表5A-5B中的任一个或多个中所示的ITR序列或ITR部分序列;或全文并入本文中的2018年12月6日提交的国际专利申请第PCT/US2018/064242号的图7A-7B中所示或全文通过引用并入本文中的2018年9月7日提交的国际专利申请第PCT/US18/49996号的表2、3、4、5、6、7、8、9或10A-10B中所公开的序列。

[0295] V.示范性ceDNA载体

[0296] 如上文所描述,本公开涉及重组ceDNA表达载体和编码FIX蛋白的ceDNA载体,其包含以下中的任一者:如上文所描述的不对称的ITR对、对称的ITR对或基本上对称的ITR对。在某些实施例中,本公开涉及具有侧接ITR序列和转基因的用于表达FIX蛋白的重组ceDNA载体,其中如本文所定义,ITR序列相对于彼此不对称、对称或基本上对称,并且ceDNA进一步包含位于侧接ITR之间的感兴趣的核酸序列(例如包含转基因的核酸的表达盒),其中所述核酸分子不含病毒衣壳蛋白编码序列。

[0297] 用于表达FIX蛋白的ceDNA表达载体可以为可以便利地进行重组DNA程序的包括如本文所描述的(多个)核酸序列的任何ceDNA载体,前提是至少一个ITR发生改变。本公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体与其中将引入ceDNA载体的宿主细胞相容。在某些实施例中,ceDNA载体可以是线性的。在某些实施例中,ceDNA载体可以作为染色体外实体存在。在某些实施例中,本公开的ceDNA载体可以含有容许供体序列整合到宿主细胞基因组中的元件。如本文所使用,“转基因”、“核酸序列”和“异源核酸序列”同义,并且编码FIX蛋白,如本文所描述。

[0298] 现参看图1A-1G,显示了可用于制造用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的两种非限制性质粒的功能组分的示意图。图1A、1B、1D、1F显示了用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的构建体或ceDNA质粒的对应序列。ceDNA载体为无衣壳的并且可以获自质粒,所述质粒按照此次序编码:第一ITR、可表达的转基因盒和第二ITR,其中如本文所定义,第一ITR序列与第二

ITR序列相对于彼此不对称、对称或基本上对称。用于表达FIX蛋白的ceDNA载体为无衣壳的并且可以获自质粒，所述质粒按照此次序编码：第一ITR、可表达的转基因(蛋白质或核酸)和第二ITR，其中如本文所定义，第一ITR序列与第二ITR序列相对于彼此不对称、对称或基本上对称。在一些实施例中，可表达的转基因盒在需要时包括：增强子/启动子、一个或多个同源臂、供体序列、转录后调节元件(例如WPRE，例如SEQ ID NO:67)，以及聚腺苷酸化和终止信号(例如BGH聚A，例如SEQ ID NO:68)。

[0299] 图5是使用实例中所述的方法证实从多个质粒构建体产生ceDNA的凝胶。如以上关于图4A和实例中所论述，ceDNA由凝胶中的特征色带图案证实。

[0300] A.调节元件.

[0301] 包含如本文所定义的不对称的ITR对或对称的ITR对的如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以进一步包含顺式调节元件的特定组合。顺式调节元件包含但不限于启动子、核糖开关、绝缘子、mir可调节元件、转录后调节元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。示范性启动子列于表7中。示范性增强子列于表8中。在一些实施例中，ITR可以充当用于转基因，例如FIX蛋白的启动子。在一些实施例中，如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含用于调节转基因表达的额外组分，例如本文所描述的用于调节转基因表达的调节开关或可以杀伤包含编码其FIX蛋白的ceDNA载体的细胞的杀伤开关。调节元件，包括可以用于本公开中的调节开关更充分地讨论于国际专利申请第PCT/US18/49996号中，所述申请的全文通过引用并入本文中。

[0302] 在实施例中，第二核酸序列包括调节序列和编码核酸酶的核酸序列。在某些实施例中，基因调节序列可操作地连接到编码核酸酶的核酸序列。在某些实施例中，调节序列适合于控制核酸酶在宿主细胞中的表达。在某些实施例中，调节序列包括适合的启动子序列，所述启动子序列能够引导可操作地连接到启动子序列的基因的转录，例如编码本公开的(多种)核酸酶的核酸序列。在某些实施例中，第二核酸序列包括连接到编码核酸酶的核酸序列的5'端的内含子序列。在某些实施例中，在启动子的上游提供增强子序列以增加启动子的功效。在某些实施例中，调节序列包括增强子和启动子，其中第二核酸序列包括编码核酸酶的核酸序列上游的内含子序列，其中内含子包括一个或多个核酸酶裂解位点，并且其中启动子可操作地连接到编码核酸酶的核酸序列。

[0303] 以合成方式或使用如本文在实例中所描述的基于细胞的产生方法产生的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以进一步包含顺式调节元件的特定组合，例如WHP转录后调节元件(WPRE)(例如SEQ ID NO:67)和BGH聚A(SEQ ID NO:68)。适用于表达构建体中的表达盒不受病毒衣壳强加的包装约束的限制。

[0304] (i).启动子：

[0305] 一般技术人员应了解，适当时，应该根据其启动的特定序列来定制如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中所使用的启动子。可用于ceDNA载体中的可操作地连接到转基因(例如FIX)的示范性启动子的序列标识符公开于本文表7中。

[0306] 表7:示范性启动子

[0307]

描述	长度	组织特异性	CG 含量	SEQ ID NO
鸡 B-肌动蛋白核心启动子；组成型 CAG 启动子集的一部分	278	组成型	33	200
hAAT 启动子；HAAT 启动子集的一部分	348	肝脏	12	201
不含 CpG 的人类 EF1a 核心启动子（3'序列 AAGCTT 可以为间隔子/限制酶切位点并被吸收）；CET 启动子集的一部分	226	组成型	0	202
鼠 TTR 肝脏特异性启动子（3' CTCCTG 可以为间隔子/限制酶切位点并被吸收）；CRM8 VandenDriessche 启动子集的一部分	225	肝脏	5	203
衍生自 BMN270 的 HLP 启动子	143	肝脏	5	204
衍生自 SPK-8011 的突变 TTR 启动子	222	肝脏	4	205
衍生自 Sangamo CRMSBS2-内含子 3 的 TTR 启动子	223	肝脏	4	206
内源性 hFIX 启动子（5'侧接基因组序列的 -3000 到-1）	3000	内源性	21	207
衍生自 hFIX 的 hAAT 启动子	205	肝脏	10	208
衍生自 SPK9001 的 hAAT 启动子	397	肝脏	12	209
内源性 hG6Pase 启动子（5'侧接的-2864 到 -1）	2864	内源性（肝脏）	28	210
人类视紫红质激酶（GRK1）启动子（基因库条目 AY327580 的 1793-2087）	295	感光器	11	211
截短 hAAT 核心启动子；LP1 启动子集的一部分	206	肝脏	10	212
人类 EF-1a 启动子（含有 EF-1a 内含子 A）	1179	组成型	94	213
hRK 启动子-与人类视紫红质激酶（GRK1）启动子（基因库条目 AY327580 的 1793-2087）几乎相同，但有少许来源不明的插入/缺失。	292	感光器	11	214
光感受器间类视黄醇结合蛋白（IRBP）启动子序列	1325	感光器	14	215
含有 CpGmin CME 增强子、SV40_增强子_Invivogen 和不含 CpG 的 hEF1a 核心启动子的启动子集	883	组成型	0	216
含有 SV40_增强子_Invivogen、不含 CpG 的 hEF1a 核心启动子和 CET 内含子的启动子集	639	组成型	0	217

[0308]

CpGmin hAAT 启动子集；含有 CpGmin APOe-CR hAAT 增强子、hAAT 核心启动子和 CpGmin hAAT-内含子	1272	肝脏	24	218
LP1 启动子集；含有 hAAT-HCR_LP1_增强子、hAAT_LP1_启动子和 hAAT-内含子	547	肝脏	14	219
具有 5 个 CpG 的合成 CRM8 TBG 启动子集；含有 HS-CRM8_SERP_增强子、TBG 启动子和 MVM 内含子的 2 个副本	709	肝脏	5	220
TBG 核心启动子（甲状腺素结合球蛋白；肝脏特异性）	460	肝脏	1	221
具有 18 个 CpG 的合成 CRM8 LP1 启动子集；含有 HS-CRM8_SERP_增强子、hAPO-HCR_LP1_增强子、hAAT_LP1_启动子和 hAAT-内含子的 2 个副本	699	肝脏	18	222
合成 mic/bik TBG 启动子集；含有 mic/bik 增强子、TBG 核心启动子的 2 个副本；不含内含子	681	肝脏	1	223
合成人类 CEFI 启动子集；含有人类_CMV_增强子和 hEF1a 核心启动子	532	组成型	0	224
合成人类 CEFI 启动子集；含有鼠_CMV_增强子、人类_CMV_增强子和 hEF1a 核心启动子（按照那种次序）	955	组成型	0	225
合成人类 CEFI 启动子集；含有人类_CMV_增强子、鼠_CMV_增强子和 hEF1a 核心启动子（按照那种次序）	955	组成型	0	226
含有 CMV 增强子、gB-肌动蛋白_启动子和 CAG-内含子的组成型启动子集	1923	组成型	192	227
hAAT 启动子集；含有 APOe-CR hAAT 增强子、hAAT 核心启动子和 hAAT-内含子（由 hAAT 5' UTR 和 modSV40 内含子构成）	1272	肝脏	26	228
不含 CpG 的 CET 启动子集；含有鼠_CMV_增强子、hEF1a 核心启动子和 CET 合成内含子	826	组成型	0	229
典型 VandenDriessche 启动子集；含有 HS-SERP_增强子、TTR 肝脏特异性启动子和 MVM 内含子的 1 个副本	399	肝脏	9	230
含有 CMV 增强子和 CMV 启动子的组成型启动子集（无内含子）	654	组成型	33	231
鼠磷酸甘油酸激酶（PGK）启动子	500	组成型	39	232

[0309]

SV40 +人类白蛋白 Invivogen 启动子集；含有 SV40 增强子（Invivogen）和 huAlb 启动子（Invivogen）	450	肝脏	3	233
CMV 增强子+人类白蛋白 Invivogen 启动子集；含有 CMV 增强子和 huAlb 启动子（Invivogen）	594	肝脏	22	234
人类 UBC 启动子	1210	组成型	95	235
内源性 hGFAP 启动子（5' 3kb 区）	3000	穆勒细胞（Muller Cell）	44	236
内源性 hRLBP1 启动子（5' 3kb 区）	3000	穆勒细胞	32	237
鼠 RPE65 启动子	718	RPE 细胞	2	238
大鼠 EF-1a 启动子	1313	组成型	102	239
由 SV40_增强子_Oz 和人类_全长_EF1a 启动子构成的人类 EF-1a 启动子集	1420	组成型	95	240
由 CMV_增强子和大鼠_全长_EF1a 启动子构成的大鼠 EF-1a 启动子集	1831	组成型	124	241
内源性 hABCB11 启动子（5' 3kb 区）	3000	内源性（肝脏）	21	242
内源性 hFIX 启动子（5' 3kb 区）	3095	内源性（肝脏）	37	243
鼠 CD44 启动子序列	1807	穆勒细胞	34	244
内源性 hABCB4 启动子（5' 3kb 区）	3000	内源性（肝脏）	91	245
NG_008472.1 的人类 RPE65 启动子（-742 : +15）	757	RPE 细胞	1	246
tMCK 启动子。2R5S 增强子序列的三联体重复序列，接着为鼠 MCK 启动子的[-80 : +7]	720	肌肉	16	247
MHCK7 启动子	772	肌肉	16	248
衍生自 rAAVirh74.MCK GALGT2 的 MCK 启动子（用于促进抗肌萎缩蛋白相关蛋白（Utrophin）使用的 Serepta 的肌萎缩蛋白聚糖调节疗法）。衍生自与 MCK 核心启动子（351 bp)融合的小鼠 MCK 核心增强子(206 bp）	558	肌肉	12	249
衍生自 rAAVirh74.MCK GALGT2 的 MCK 启动子/5pUTR（用于促进抗肌萎缩蛋白相关蛋白使用的 Serepta 的肌萎缩蛋白聚糖调节疗法）	766	肌肉	21	250

[0310]

含有连接到SV40内含子的MHCK7启动子	961	肌肉	25	251
衍生自人类结蛋白基因的肌肉特异性启动子。含有从转录起始位点上游1.7 kb延伸到DES外显子I内下游35 bp的~1.7 kb人类DES启动子/增强子区。	1736	肌肉	39	252
用于Stargen pONY8.95CMVABCR构建体中的CMV增强子+ CMV启动子+ 5pUTR + Kozak	807	组成型	48	253
内源性hFIX ORF（-973到-3）	973	内源性（感光器）	17	254
肌肉特异性CK8启动子	450	肌肉	9	255
肌肉特异性人类cTnT_启动子	455	肌肉	4	256
内源性hABCB4启动子（5' 3050bp区）	3050	内源性（肝脏）	91	257
内源性hUSH1b启动子（5' 3kb区）	3000	内源性（感光器）	49	258
内源性hUSH2a启动子（5' 3kb区）	3000	内源性（感光器）	21	259
含有CMV增强子、泛素C增强子元件和鸡B-肌动蛋白核心启动子的CASI启动子集	1053	组成型	99	260
内源性hABCB4启动子（5' 3kb区）	3000	内源性（肝脏）	38	261
内源性hABCB4启动子（5' 3.1kb区）	3102	肝脏	33	262
鼠白蛋白启动子（muAlb增强子区+核心muAlb启动子）	2337	肝脏	15	263
嵌合启动子hAPOe增强子+ TBG核心启动子+ modSV40内含子	1330	肝脏	14	264
mCMV增强子+ EF-1a核心启动子+ SI 126内含子	937	组成型	21	265
LSP启动子2号-合成mTTRenh-启动子Shire	367	肝脏	11	266
LSP启动子4号- HS-CRM8 2x SerpEnh TTRmin MVM内含子	468	肝脏	9	267
LSP启动子5号- HS-CRM1 AlbEnh TTRmin MVM	426	肝脏	7	268
LSP启动子6号- HS-CRM2 Apo4Enh TTRmin MVM	396	肝脏	7	269
LSP启动子7号- HS-CRM10 Enh TTRmin MVM	495	肝脏	6	270

[0311]

LSP 启动子 8 号- HS-CRM8 SerpEnh huTBGpro MVM	640	肝脏	4	271
LSP 启动子 9 号- HS-CRM1 AlbEnh huTBGpro MVM	667	肝脏	3	272
LSP 启动子 10 号- HS-CRM2 Apo4Enh huTBGpro MVM	637	肝脏	3	273
LSP 启动子 11 号- HS-CRM10 Enh huTBGpro MVM	736	肝脏	2	274
LSP 启动子 12 号- HS-CRM8 SerpEnh muAlbpro MVM	515	肝脏	6	275
LSP 启动子 13 号- HS-CRM1 AlbEnh muAlbpro MVM	542	肝脏	5	276
LSP 启动子 14 号- HS-CRM2 Apo4Enh muAlbpro MVM	512	肝脏	5	277
LSP 启动子 15 号- HS-CRM10 Enh muAlbpro MVM	611	肝脏	4	278
LSP 启动子 16 号- CRM8 SerpEnh huAlbpro MVM	355	肝脏	5	279
LSP 启动子 17 号- HS-CRM1 AlbEnh huAlbpro MVM	382	肝脏	4	280
LSP 启动子 18 号- HS-CRM2 Apo4Enh huAlbpro MVM	352	肝脏	4	281
LSP 启动子 19 号- HS-CRM10 Enh huAlbpro MVM	451	肝脏	3	282
LSP 启动子 20 号- HS-CRM8 SerpEnh huAATpro MVM	430	肝脏	13	283
LSP 启动子 21 号- HS-CRM1 AlbEnh huAATpro MVM	457	肝脏	12	284
LSP 启动子 22 号- HS-CRM2 Apo4Enh huAATpro MVM	427	肝脏	12	285
LSP 启动子 23 号- HS-CRM10 Enh huAATpro MVM	526	肝脏	11	286
LSP 启动子 24 号- HS-CRM8 SerpEnh huAATpro SV40in	435	肝脏	14	287
LSP 启动子 25 号- HS-CRM1 AlbEnh huAATpro SV40in	462	肝脏	13	288
LSP 启动子 26 号- HS-CRM2 Apo4Enh huAATpro SV40in	448	肝脏	16	289
LSP 启动子 27 号- HS-CRM10 Enh huAATpro SV40in	531	肝脏	12	290

[0312]

LSP 启动子 28 号- HS-CRM8 SerpEnh huTBGpro SV40in	636	肝脏	4	291
LSP 启动子 29 号- HS-CRM1 AlbEnh huTBGpro SV40in	663	肝脏	3	292
LSP 启动子 30 号- HS-CRM2 Apo4Enh huTBGpro SV40in	633	肝脏	3	293
LSP 启动子 31 号- HS-CRM10 Enh huTBGpro SV40in	732	肝脏	2	294
LSP 启动子 32 号- AMPBenh2x-huTBGpro SV40in	762	肝脏	4	295
LSP 启动子 33 号- AMPBenh2x-huTBGpro MVM	766	肝脏	4	296

[0313] 用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的表达盒可以包括可以影响整体表达水平以及细胞特异性的启动子，例如选自表7的任一个启动子。对于转基因表达，例如FIX蛋白表达，其可以包括高活性病毒衍生的即刻早期启动子。表达盒可以含有组织特异性的真核启动子，以将转基因表达限制在特定细胞类型，并减少由不受调节的异常表达引起的毒性效应和免疫反应。在一些实施例中，表达盒能够含有启动子或合成调节元件，例如CAG启动子(SEQ ID NO:72)。CAG启动子包括(i)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件，(ii)鸡β-肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子，以及(iii)兔β-珠蛋白基因的剪接受体。替代地，表达盒能够含有α-1-抗胰蛋白酶(AAT)启动子(SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74)、肝脏特异性(LP1)启动子(SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76)，或人延伸因子-1α(EF1a)启动子(例如SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:78)。在一些实施例中，表达盒包括一个或多个组成型启动子，例如逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus，RSV)LTR启动子(任选地具有RSV增强子)，或细胞巨大病毒(CMV)即刻早期启动子(任选地具有CMV增强子，例如SEQ ID NO:79)。可替代地，可以使用诱导型启动子、转基因的天然启动子、组织特异性启动子或所属领域已知的各种启动子。

[0314] 适合的启动子，包括表7和上文所描述的启动子，可以衍生自病毒并因此可以称为病毒启动子，或其可以衍生自任何生物体，包括原核或真核生物体。适合的启动子可以用于通过任何RNA聚合酶(例如，pol I、pol II、pol III)来驱动表达。示范性启动子包括(但不限于)SV40早期启动子、小鼠乳房肿瘤病毒长末端重复(LTR)启动子；腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)；单纯疱疹病毒(HSV)启动子、细胞巨大病毒(CMV)启动子(例如CMV即刻早期启动子区域(CMVIE))、劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子、人U6小核启动子(U6，例如SEQ ID NO:80)(Miyagishi等人，《自然·生物技术(Nature Biotechnology)》20，497-500(2002))、增强型U6启动子(例如Xia等人，《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》2003年9月1日；31(17))、人H1启动子(H1)(例如SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:155)、CAG启动子、人α1-抗胰蛋白酶(HAAT)启动子(例如SEQ ID NO:82)等等。在某些实施例中，这些启动子在其下游含内含子的末端处被改变以包括一个或多个核酸酶裂解位点。在某些实施例中，含有核酸酶裂解位点的DNA与启动子DNA是无关的。

[0315] 在一个实施例中，使用的启动子是编码治疗性蛋白的基因的天然启动子。编码治疗蛋白的相应基因的启动子和其它调节序列是已知的并且已被表征。所用启动子区域可以进一步包括一种或多种额外的调节序列(例如原生)，例如增强子(例如SEQ ID NO:79和SEQ

ID NO:83)，包括SV40增强子(SEQ ID NO:126)。

[0316] 在一些实施例中，启动子还可以是来自人基因的启动子，例如人泛素C(hUbC)、人肌动蛋白、人肌凝蛋白、人血红素、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白。启动子还可以是组织特异性启动子，例如肝脏特异性启动子，例如天然或合成的人α1-抗胰蛋白酶(HAAT)。在一个实施例中，使用内源性ApoE、通过存在于肝细胞表面上的低密度脂蛋白(LDL)受体将包括ceDNA载体的组合物特异性靶向肝细胞能够实现向肝脏的递送。

[0317] 根据本公开使用的适合的启动子的非限制性实例包括表7中列出的任一个启动子或以下中的任一个：例如CAG启动子(SEQ ID NO:72)、HAAT启动子(SEQ ID NO:82)、人类EF1-α启动子(SEQ ID NO:77)或EF1a启动子片段(SEQ ID NO:78)、IE2启动子(例如SEQ ID NO:84)以及大鼠EF1-α启动子(SEQ ID NO:85)、mEF1启动子(SEQ ID NO:59)或1E1启动子片段(SEQ ID NO:125)。

[0318] (ii)增强子

[0319] 在一些实施例中，表达FIX的ceDNA包含一个或多个增强子。在一些实施例中，增强子序列位于启动子序列的5'。在一些实施例中，增强子序列位于启动子序列的3'。示范性增强子的序列标识符列于本文表8中。

[0320] 表8：示范性增强子序列

[0321]

描述	长度	组织特异性	CG 含量	SEQ ID NO:
巨细胞病毒增强子	518	组成型	22	**300**
人载脂蛋白 E/C-I 肝脏特异性增强子	777	肝脏	13	**301**
不含 CpG 的鼠类 CMV 增强子	427	组成型	0	**302**
HS-CRM8 SERP 增强子	83	肝脏	4	**303**
人载脂蛋白 E/C-I 肝脏特异性增强子	777	肝脏	12	**304**
34 bp APOe/c-1 增强子和 32 bp AAT X-区域	66	肝脏	1	**305**
绝缘序列和 hAPO-HCR 增强子	212	肝脏	4	**306**
源自 SPK9001 的 hAPO-HCR 增强子	330	肝脏	4	**307**
hAPO-HCR 增强子	194	肝脏	3	**308**
SV40 增强子 Invivogen	240	组成型	0	**309**
去除了所有间隔子/切割位点的 HS-CRM8 SERP 增强子	73	肝脏	2	**310**
α mic/bik 增强子	100	肝脏	0	**311**
不含 CpG 的人 CMV 增强子 v2	296	组成型	0	**312**
SV40 增强子	235	组成型	1	**313**

[0322] (iii)5'UTR序列和内含子序列

[0323] 在一些实施例中，ceDNA载体包含5'UTR序列和/或位于5'ITR序列的3'的内含子序列。在一些实施例中，5'UTR位于转基因，例如编码FIX蛋白的序列的5'。示范性5'UTR序列的序列标识符列于表9A中。

[0324] 表9A：示范性5'UTR序列和内含子序列

[0325]

描述	长度	参考文献	CG 含量	SEQ ID NO:
由鸡 B-肌动蛋白 5' UTR/内含子和兔 B-珠蛋白内含子和第 1 外显子构成的合成 5' UTR 元件	1127		137	**315**
经修饰 SV40 内含子	93		0	**316**
正好位于 ORF 上游的 hAAT 的 5' UTR（3' CGGA 可能是间隔子/限制酶切割位点，并且被吸收到序列中）	54		1	**317**
CET 启动子组合成内含子	173		0	**318**
小鼠微小病毒（MVM）内含子	91		0	**319**
hAAT 的 5' UTR	54		0	**320**
与 modSV40 内含子组合的 hAAT 的 5' UTR	147		1	**321**
与 modSV40 内含子组合的 hAAT 的 5' UTR（3' TAATTA 可能是间隔子/限制酶切割位点，并且被吸收到序列中）	147		0	**322**
源自 BMN270 的 AAT 的 5' UTR 的 42bp -包括 Kozak	48	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292164	1	**323**
来自 EF1a1 的内含子/增强子	128	US2017/0216408	6	**324**
源自 Sangamo CRMSBS2-内含子 3 的合成 SBR 内含子-包括 kozak	98	WO2017074526	2	**325**
内源性 hFIX 5' UTR	172	NG_011403.1	0	**326**
hAAT 5' UTR + modSV40 + kozak	160	http://www.bloodjournal.org/content/early/2005/12/01/blood-2005-10-4035?sso-checked=true	1	**327**
hFIX 5' UTR 和 Kozak	29	US20160375110	0	**328**
嵌合内含子	133	U47119.2	2	**329**
人 α1 抗胰蛋白酶（AAT）5' UTR 的大片段	341		9	**330**
5pUTR	316	US9644216	6	**331**
人 cDNA ABCB4 5pUTR（变异 A，主要的同种型）	76	NM_000443	8	**332**
人 cDNA ABCB11 5pUTR	127	NM_003742	2	**333**

[0326]

人 G6Pase 5pUTR	80	NM_000151.3	0	**334**
源自 rAAVirh74.MCK GALGT2 的 MCK 5pUTR。含有 53bp 的内源性小鼠 MCK 外显子 1(未转译)、SV40 晚期 16S/19S 剪接信号、源自质粒 pCMVB 的 5pUTR。	208	https://patentimages.storage.googleapis.com/4f/8a/d6/b915c650f5eeb5/WO2017049031A1.pdf	8	**335**
不含 CpG 的 5' UTR 合成（SI 126）内含子	159		0	**336**
人细胞色素 b-245 α 链（CYBA）基因的 5' UTR	36	（NM_000101.4）	5	**337**
人 2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶 1（DECR1）基因的 5' UTR	141	（NM_001330575.1）	14	**338**
人胶质成熟因子 γ（GMFG）基因的 5' UTR	110	（NM_001301008.1）	4	**339**
人晚期内体/溶酶体衔接子、MAPK 和 MTOR 活化因子 2（LAMTOR2）的 5' UTR	164	（NM_001145264.1）	13	**340**
人肌球蛋白轻链 6B（MYL6B）的 5' UTR	127	（NM_002475.4）	8	**341**
人 α1 抗胰蛋白酶（AAT）5' UTR 的大片段	341		9	**342**

[0327] (iv)3'UTR序列

[0328] 在一些实施例中,ceDNA载体包含位于3'ITR序列的5'的3'UTR序列。在一些实施例中,3'UTR位于转基因,例如编码FIX蛋白的序列的3'。示范性3'UTR序列的序列标识符列于表9B中。

[0329] 表9B:示范性3'UTR序列和内含子序列

[0330]

描述	长度	参考	CG 含量	SEQ ID NO:
WHP 转录后反应元件	581		20	**345**
mir-142 结合位点的三联体重复	77		1	**346**
源自 SPK9001 的 hFIX 3' UTR 和聚 A 间隔子	88	US2016/0375110	0	**347**
人血红蛋白 β（HBB）3pUTR	395		1	**348**
干扰素 β S/MAR（支架/基质相关区域）	800		0	**349**
β-球蛋白 MAR（基质相关区域）	407		0	**350**
人白蛋白 3' UTR 序列	186		1	**351**
CpG 最小化的 HBB 3pUTR	395		0	**352**
WHP 转录后反应元件。缺少 3'胞嘧啶。	580		20	**353**
人细胞色素 b-245 α 链（CYBA）基因的 3' UTR	64	（NM_000101.4）	5	**354**
具有最少 γ 和 α 元件的缩短的 WPRE3 序列	247	WPRE3 参考 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975461/	10	**355**
人血红蛋白 β（HBB）3pUTR	144		1	**356**
WPRE 3pUTR 元件的前 62bp	62		1	**357**

[0331] (v).聚腺苷酸化序列:

[0332] 编码聚腺苷酸化序列的序列可以包括于用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中以使由ceDNA载体表达的mRNA稳定并且有助于核输出和转译。在一个实施例中，ceDNA载体不包括多聚腺苷酸化序列。在其它实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包括至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少45个、至少50个或更多个腺嘌呤二核苷酸。在一些实施例中，多聚腺苷酸化序列包括约43个核苷酸、约40-50个核苷酸、约40-55个核苷酸、约45-50个核苷酸、约35-50个核苷酸或它们之间的任何范围。

[0333] 表达盒可以包含所属领域已知的任何聚腺苷酸化序列或其变体。在一些实施例中，聚腺苷酸化(聚A)序列选自表10中列出的任一个序列。也可以使用所属领域中通常已知的其它聚A序列，例如包括但不限于从牛科动物BGHpA(例如，SEQ ID NO:68)或病毒SV40pA(例如，SEQ ID NO:86)中分离的天然存在的序列、或合成序列(例如，SEQ ID NO:87)。一些表达盒还可以包含SV40晚期聚A信号上游增强子(USE)序列。在一些实施例中，USE序列可以与SV40pA或异源聚A信号组合使用。聚A序列位于编码FIX蛋白的转基因的3'。

[0334] 表达盒还可以包含转录后元件以增加转基因的表达。在一些实施例中，使用土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调节元件(WPRE)(例如SEQ ID NO:67)增强转基因表达。可以使用其它转录后加工元件，例如来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因或乙型肝炎病毒(HBV)的转录后元件。分泌序列能够连接到转基因，例如VH-02和VK-A26序列，例如SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89。

[0335] 表10:示范性聚A序列的序列标识符

[0336]

描述	长度	参考	CG 含量	SEQ ID NO:
牛生长激素终止子和聚腺苷酸化序列。	225		3	**360**
源自 BMN270 的合成聚 A	49	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292164	0	**361**
源自 SPK8011 的合成聚 A	54	US2017/0216408	2	**362**
源自 Sangamo_CRMSBS2-内含子 3 的合成聚 A 和绝缘序列	74	WO2017074526	2	**363**
衍生自 hFIX 的 SV40 晚期聚 A 和 3' 绝缘序列	143	http://www.bloodjournal.org/content/early/2005/12/01/blood-2005-10-4035?sso-checked=true	1	**364**
源自 SPK9001 的 bGH 聚 A	228	US2016/0375110	0	**365**
不含 CpG 的 SV40 聚 A	222		0	**366**
SV40 晚期聚 A	226		0	**367**
含有 A64 聚 A 序列和 C30 组蛋白茎环序列的 C60pAC30HSL 聚 A	129		0	**368**
含有 SV40 聚 A 的用于 J. Chou G6Pase 构建体中的聚 A	232	US9644216	4	**369**
SV40 聚腺苷酸化信号	135		0	**370**
疱疹病毒胸苷激酶聚腺苷酸化信号	49		4	**371**
SV40 晚期聚腺苷酸化信号	226		0	**372**
人白蛋白 3' UTR 和终止子/聚 A 序列	416		2	**373**
人白蛋白 3' UTR 和终止子/聚 A 序列	415		2	**374**
不含 CpG 的短 SV40 聚 A	122		0	**375**
不含 CpG 的短 SV40 聚 A	133		0	**376**

[0337] (vi).核定位序列

[0338] 在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含一个或多个核定位序列(NLS),例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个NLS。在一些实施例中,一个或多个NLS位于氨基端或附近、羧基端或附近,或这些位置的组合(例如氨基端的一个或多个NLS和/或羧基端的一个或多个NLS)。当存在超过一个NLS时,可以彼此独立地选择,使得单个NLS可以呈超过一个拷贝存在和/或与呈一个或多个拷贝存在的一个或多个其它NLS组合存在。NLS的非限制性实例的序列标识符示于表11中。

[0339] 表11:核定位序列

[0340]

来源	SEQ ID NO.
SV40 病毒大 T 抗原	90
核质蛋白	92
c-myc	93
	94
hRNPA1 M9	95
来自输入蛋白-α 的 IBB 域	96
肌瘤 T 蛋白	97
	98
人 p53	99
小鼠 c-abl IV	100
流感病毒 NS1	117
	118
肝炎病毒 δ 抗原	119
小鼠 Mx1 蛋白	120
人聚(ADP-核糖)聚合酶	121
类固醇激素受体（人）糖皮质激素	122

[0341] B.ceDNA载体的额外组分

[0342] 本公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以含有编码用于基因表达的其它组分的核苷酸。例如，为了选择特定的基因靶向事件，可以将保护性shRNA嵌入微型RNA中，然后插入被设计成位点特异性地整合至高活性基因座(如白蛋白基因座)中的重组ceDNA载体中。这样的实施例可以提供用于在任何遗传背景下体内选择和扩增基因修饰的肝细胞的系统，例如在Nygaard等人的《体内选择基因修饰的肝细胞的通用系统(A universal system to select gene-modified hepatocytes in vivo)》《基因疗法(Gene Therapy)》,2016年6月8日)中所述。本公开的ceDNA载体可以含有一种或多种选择性标志物，其允许选择转化、转染、转导等的细胞。选择性标志物是产物提供杀生物剂或病毒抗性、对重金属的抗性、对营养缺陷型的原营养、NeoR等的基因。在某些实施例中，将正向选择标志物并入供体序列中，例如NeoR。可以将负向选择标志物并入供体序列的下游，例如可以将编码负向选择标志物的核酸序列HSV-tk并入供体序列下游的核酸构建体中。

[0343] C.调节开关

[0344] 分子调节开关是一种响应信号而产生可测量的状态变化的开关。所述调节开关可以有效地与如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体组合以控制ceDNA载体对FIX蛋白的表达的输出。在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含用于微调FIX蛋白表达的调节开关。例如，其可以发挥ceDNA载体的生物封存功能。在一些实施例中，开关为“ON/OFF”开关，其被设计成以可控制和可调节的方式启动或终止(即，关闭)ceDNA载体中FIX蛋白的表达。在一些实施例中，开关可以包含“杀伤开关”，一旦所述开关被激活，其就可以指令包括ceDNA载体的细胞经历细胞程序性死亡。所涵盖的用于用以表达FIX蛋白的ceDNA载体中的示范性调节开关可以用于调节转基因表达，并更全面地论述于全文通过引用并入本文中的国际申请PCT/US18/49996中。

[0345] (i)二元调节开关

[0346] 在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体包含可以用于可控制地调节FIX

蛋白表达的调节开关。举例来说，位于ceDNA载体的ITR之间的表达盒可以另外包含可操作地连接到编码FIX蛋白的核酸序列的调节区，例如启动子、顺式元件、抑制因子、增强子等，其中调节区由一种或多种辅因子或外源因子调节。仅举例来说，调节区可以通过小分子开关或诱导型或阻遏型启动子进行调节。诱导型启动子的非限制性实施例是激素诱导型或金属诱导型启动子。其它示范性诱导型启动子/增强子元件包括(但不限于)：RU486诱导型启动子、蜕皮激素诱导型启动子、雷帕霉素诱导型启动子和金属硫蛋白启动子。

[0347] (ii)小分子调节开关

[0348] 多种所属领域已知的基于小分子的调节开关为所属领域中已知的，并且可以与如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体组合以形成调节开关控制的ceDNA载体。在一些实施例中，调节开关可以选自以下任一种或组合：正交配体/核受体对，例如类视色素受体变体/LG335和GRQCIMFI，以及控制操作性连接的转基因的表达的人工启动子，例如Taylor等人，《BMC生物技术(BMC Biotechnology)》10(2010):15中公开的人工启动子；工程化的类固醇受体，例如C末端截短的修饰孕激素受体，其不能结合孕激素但结合RU486(米非司酮)(美国专利第5,364,791号)；来自果蝇(Drosophila)的蜕皮素受体和其蜕皮类固醇配体(Saez等人，《美国国家科学院院刊(PNAS)》，97(26)(2000)，14512-14517；或由抗生素甲氧苄啶(trimethoprim，TMP)控制的开关，如Sando R;《自然方法》第3版2013，10(11):1085-8中所公开。在一些实施例中，控制转基因或由ceDNA载体表达的调节开关是前药活化开关，如美国专利8,771,679和6,339,070中公开的活化开关。

[0349] (iii)“密码”调节开关

[0350] 在一些实施例中，调节开关可以是“密码开关”或“密码回路”。在发生特定条件时，也就是说，需要存在条件的组合才能发生转基因表达和/或阻遏时，密码开关允许微调对转基因从ceDNA载体的表达的控制。例如，为了发生转基因的表达，至少必须发生条件A和B。密码调节开关可以是任何数目的条件，例如，要存在至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个、或至少6个、或至少7个或更多个条件方能发生转基因表达。在一些实施例中，需要发生至少2个条件(例如A、B条件)，并且在某些实施例中，需要发生至少3个条件(例如A、B和C，或A、B和D)。仅举例来说，为了从具有密码“ABC”调节开关的ceDNA发生基因表达，必须存在条件A、B和C。条件A、B和C可以如下：条件A是存在病状或疾病，条件B是激素响应，并且条件C是对转基因表达的响应。举例来说，如果转基因编辑缺陷性EPO基因，那么条件A是存在慢性肾病(CKD)，如果受试者的肾脏中有低氧状况，那么发生条件B，条件C是肾脏中产生促红细胞产生素的细胞(EPC)的募集受损；或可替代地，HIF-2活化受损。一旦氧水平升高或达到期望的EPO水平，转基因就会关闭，直到再次发生3个条件，它重新打开。

[0351] 在一些实施例中，涵盖用于ceDNA载体中的密码调节开关或“密码回路”包含杂合转录因子(TF)以扩大用于界定生物封存条件的环境信号的范围和复杂度。与在预定条件存在下触发细胞死亡的致命开关相反，“密码回路”允许在特定“密码”存在下细胞存活或转基因表达，并且只有当存在预定环境条件或密码时，才可以容易地重新编程以允许转基因表达和/或细胞存活。

[0352] 本文公开的调节开关，例如小分子开关、基于核酸的开关、小分子-核酸杂合开关、转录后转基因调节开关、转译后调节、辐射控制开关、低氧介导的开关和如本文公开的所属领域中普通技术人员已知的其它调节开关中的任何和所有组合均可以用于如本文公开的

密码调节开关中。预期使用的调节开关也在综述文章Kis等人,《皇家学会界面杂志(J R Soc Interface)》.12:20141000(2015)中论述,并总结在Kis的表1中。在一些实施例中,用于密码系统中的调节开关能够选自国际专利申请PCT/US18/49996的表11中所公开的任何开关或开关组合,所述专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0353] (iv).控制转基因表达的基于核酸的调节开关

[0354] 在一些实施例中,用于控制ceDNA对FIX蛋白的表达的调节开关是在基于核酸的控制机制的基础上。示范性核酸控制机制是所属领域中已知的并且是设想使用的。举例来说,此类机制包括核糖开关,例如以下文献中所公开的核糖开关:例如US2009/0305253、US2008/0269258、US2017/0204477、WO2018026762A1、美国专利9,222,093和EP申请EP288071;以及Villa JK等人的评论中所公开的核糖开关,《微生物学光谱(Microbiol Spectr.)》2018年5月;6(3)。还包括代谢物响应性转录生物传感器,例如WO2018/075486和WO2017/147585中公开的那些。设想使用的其它所属领域已知的机制包括用siRNA或RNAi分子(例如miR、shRNA)使转基因沉默。举例来说,ceDNA载体能够包含编码RNAi分子的调节开关,所述RNAi分子与ceDNA载体所表达的转基因的一部分互补。当所述RNAi被表达时,即使ceDNA载体表达转基因(例如FIX蛋白),所述转基因也将因互补的RNAi分子而沉默,并且当ceDNA载体表达转基因时而所述RNAi未被表达时,所述转基因(例如FIX蛋白)不会因RNAi而沉默。

[0355] 在一些实施例中,调节开关为组织特异性自我失活型调节开关,例如US2002/0022018中所公开,其中调节开关在其中转基因表达原本可能不利的位点有意地将转基因(例如FIX蛋白)关闭。在一些实施例中,调节开关是重组酶可逆基因表达系统,例如US2014/0127162和美国专利8,324,436中所公开。

[0356] (v).转录后和转译后调节开关

[0357] 在一些实施例中,用于控制ceDNA载体对FIX蛋白的表达的调节开关为转录后修饰系统。例如,这样的调节开关可以是对四环素或茶碱敏感的适体酶(aptazyme)核糖开关,如以下中所公开:US2018/0119156、GB201107768、WO2001/064956A3、欧洲专利2707487和Beilstein等人,《ACS合成生物学(ACS Synth.Biol.)》,2015,4(5),第526-534页;Zhong等人,Elife.2016年11月2日;5.pii:e18858。在一些实施例中,设想所属领域的普通技术人员可以编码转基因和含有配体敏感性(OFF-开关)适体的抑制性siRNA二者,净结果是配体敏感性ON-开关。

[0358] (vi).其它示范性调节开关

[0359] 任何已知的调节开关都可以用于ceDNA载体中以控制ceDNA载体对FIX蛋白的表达,包括环境变化所触发的表达。其它实例包括但不限于;Suzuki等人,《科学报告(Scientific Reports)》8;10051(2018)的BOC方法;遗传密码扩展和非生理氨基酸;辐射控制或超声控制的on/off开关(参见例如Scott S等人,《基因疗法(Gene Ther)》.2000年7月;7(13):1121-5;美国专利5,612,318;5,571,797;5,770,581;5,817,636;以及WO1999/025385A1。在一些实施例中,调节开关是由可植入系统控制,例如美国专利7,840,263;US2007 0190028A1中所公开,其中基因表达由一种或多种形式的能量控制,包括电磁能,所述能量将可操作地连接到ceDNA载体中的转基因的启动子活化。

[0360] 在一些实施例中,设想用于ceDNA载体中的调节开关是低氧介导或应激活化的开

关,例如以下文献中所公开的那些:WO1999060142A2、美国专利5,834,306;6,218,179;6,709,858;US2015/0322410;Greco等人(2004)《靶向癌症疗法(Targeted Cancer Therapies)》9;S368以及FROG、TOAD和NRSE元件,以及条件诱导型静默元件,包括低氧反应元件(HRE)、炎症反应元件(IRE)和剪切应激活化元件(SSAE),例如美国专利9,394,526中所公开。此类实施例适用于在缺血后或在缺血组织和/或肿瘤中打开转基因从ceDNA载体的表达。

[0361] (vii).杀伤开关

[0362] 本文所描述的其它实施例涉及如本文所描述的包含杀伤开关的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体。如本文公开的杀伤开关能够使包括ceDNA载体的细胞被杀伤或经历程序性细胞死亡,作为从受试者的系统中永久去除引入的ceDNA载体的手段。所属领域的普通技术人员将了解,杀伤开关在用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中的使用通常联合ceDNA载体靶向受试者能够接受地损失的有限数目个细胞或靶向期望细胞凋亡时的细胞类型(例如癌细胞)。在所有方面,如本文公开的"杀伤开关"被设计成在缺乏输入的存活信号或其它指定条件下提供对包括ceDNA载体的细胞的快速而稳固的细胞杀伤。换句话说,由如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体编码的杀伤开关可以使包含ceDNA载体的细胞的细胞存活受特定输入信号所限定的环境限制。如果期望从受试者中去除ceDNA载体对FIX蛋白的表达或确保其不表达所编码的FIX蛋白,则所述杀伤开关发挥生物学生物封存功能。

[0363] 涵盖例如US2010/0175141、US2013/0009799、US2011/0172826、US2013/0109568中所公开的用于如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体中的所属领域的普通技术人员已知的其它杀伤开关,以及以下中所公开的杀伤开关:Jusiak等人,《细胞生物学和分子医药评论(Reviews in Cell Biology and molecular Medicine)》;2014;1-56;Kobayashi等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,2004;101;8419-9;Marchisio等人,《国际生物化学和细胞生物学杂志(Int.Journal of Biochem and Cell Biol.)》,2011;43;310-319;以及Reinshagen等人,《科学转化医学(Science Translational Medicine)》2018,11。

[0364] 因此,在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包含杀伤开关核酸构建体,所述杀伤开关核酸构建体包含编码效应毒素或报告蛋白的核酸,其中效应毒素(例如死亡蛋白)或报告蛋白的表达受预定条件的控制。举例来说,预定条件可以是存在环境试剂,例如外源试剂,在没有所述环境试剂的情况下,细胞将默认表达效应毒素(例如死亡蛋白质)并且被杀伤。在替代性实施例中,预定条件是存在两种或更多种环境试剂,例如细胞将仅在提供两种或更多种必需的外源试剂时存活,而在其中的任一种不存在的情况下,包含ceDNA载体的细胞被杀伤。

[0365] 在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体经修饰以并入杀伤开关,从而破坏包含ceDNA载体的细胞,以有效地终止ceDNA载体所表达的转基因的体内表达(例如FIX蛋白的表达)。具体地说,进一步对ceDNA载体进行基因工程改造以表达在哺乳动物细胞中、在正常生理学条件下不具功能性的开关蛋白。仅在药物施用后或在特异性靶向这种开关蛋白的环境条件下,表达开关蛋白的细胞被破坏,从而终止治疗蛋白或肽的表达。举例来说,据报导,表达HSV-胸苷激酶的细胞在药物(例如苷昔洛韦(ganciclovir)和胞嘧啶脱氨酶)施用后能够被杀伤。参见例如Dey和Evans,单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSV-TK)的自杀基因疗法(Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase(HSV-TK)),

于You编辑的《基因疗法中的靶标(Targets in Gene Therapy)》(2011);以及Beltinger等人,《美国国家科学院院刊》96(15):8699-8704(1999)。在一些实施例中,ceDNA载体能够包含siRNA杀伤开关,称为DISE(存活基因排除所诱导的死亡)(Murmann等人,《肿瘤标靶(Oncotarget)》2017;8:84643-84658.DISE在体内卵巢癌细胞中的诱导(Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo))。

[0366] D.示范性ceDNA-FIX载体

[0367] 根据一些实施例,示范性ceDNA-FIX载体选自下表12中所示的ceDNA-FIX载体。根据一些实施例,本公开提供无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体,其包含至少一个在侧接反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列,其中至少一个核酸序列编码至少一种FIX蛋白,并且其中ceDNA载体选自表12中所示的ceDNA-FIX载体。

[0368] 表12:ceDNA-FIX构建体

[0369]

构建体	序列标识符
ceDNA-FIX v1	SEQ ID NO:404
ceDNA-FIX 2109	SEQ ID NO:405
ceDNA-FIX 2112	SEQ ID NO:406
ceDNA-FIX 2113	SEQ ID NO:407
ceDNA-FIX 2114	SEQ ID NO:408
ceDNA-FIX 2115	SEQ ID NO:409
ceDNA-FIX 2116	SEQ ID NO:410

[0370] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:404的ceDNA-FIXv1。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:404具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0371] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:405的ceDNA-FIX2109。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:405具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0372] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:406的ceDNA-FIX2112。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:406具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0373] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:407的ceDNA-FIX2113。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:407具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0374] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:408的ceDNA-FIX2114。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:408具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0375] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:409的ceDNA-FIX2115。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:409具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0376] 根据一些实施例,示范性ceDNA载体为包含SEQ ID NO:410的ceDNA-FIX2116。根据一些实施例,ceDNA载体与SEQ ID NO:410具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至

少93％、至少94％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性。

[0377] 根据一些实施例，本公开提供了无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体，其包含至少一个在侧接反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列，其中至少一个核酸序列编码至少一种FIX蛋白，并且其中ceDNA载体包含SEQ ID NO:404。根据一些实施例，ceDNA载体与SEQ ID NO:404具有至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性。

[0378] 根据一些实施例，本公开提供了无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体，其包含至少一个在侧接反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列，其中至少一个核酸序列编码至少一种FIX蛋白，并且其中ceDNA载体包含SEQ ID NO:405。根据一些实施例，ceDNA载体与SEQ ID NO:405具有至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性。

[0379] 根据一些实施例，本公开提供了无衣壳封闭端DNA(ceDNA)载体，其包含至少一个在侧接反向末端重复序列(ITR)之间的核酸序列，其中至少一个核酸序列编码至少一种FIX蛋白，并且其中ceDNA载体包含SEQ ID NO:406。根据一些实施例，ceDNA载体与SEQ ID NO:406具有至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％同一性。

[0380] 根据一些实施例，SEQ ID NO:404包含以下组分，其中数字指示核酸残基：

[0381] 1..141＝左-ITR_v1

[0382] 142..194＝间隔子_左-ITR_v1

[0383] 195..524＝增强子

[0384] 525..921＝启动子

[0385] 922..950＝5pUTR

[0386] 951..1034＝hFIX信号肽

[0387] 951..1037＝CDS

[0388] 951..3774＝外显子内含子_ORF

[0389] 1039..2476＝内含子

[0390] 2476..3774＝CDS“转译2476-3774”

[0391] 3538..3540＝R338L Padua突变

[0392] 3775..3862＝3p UTR

[0393] 3863..4090＝聚A

[0394] 4091..4151＝间隔子右-ITR

[0395] 4152..4281＝右-ITR

[0396] 根据一些实施例，SEQ ID NO:405包含以下组分，其中数字指示核酸残基：

[0397] 1..141＝左-ITR

[0398] 142..183＝间隔子_左-ITR_v.2.1

[0399] 184..255＝Serpin增强子

[0400] 184..837＝3x Serpin-TTRe_启动子集

[0401] 257..328＝Serpin增强子

[0402] 330..401＝Serpin增强子

[0403] 562..745＝小鼠TTR 5pUTR

[0404] 714..745＝5pUTR

[0405] 746..836＝MVM内含子

[0406] 838..845＝PmeI_位点

[0407] 846..854＝共有Kozak

[0408] 855..2240＝FIX-cDNA-691_2

[0409] 2241..2248＝PacI位点

[0410] 2249..2829＝WPRE_3pUTR

[0411] 2830..3054＝bGH

[0412] 3055..3115＝间隔子_右-ITR_v1

[0413] 3116..3245＝右-ITR_v1

[0414] 根据一些实施例,SEQ ID NO:406包含以下组分,其中数字指示核酸残基:

[0415] 1..141＝左-ITR_v1

[0416] 142..183＝间隔子_左-ITR_v2.1

[0417] 184..255＝Serpin增强子

[0418] 184..837＝3x Serpin-TTRe_启动子集

[0419] 257..328＝Serpin增强子

[0420] 330..401＝Serpin增强子

[0421] 562..745＝小鼠TTR 5pUTR(NM_013697.5)

[0422] 714..745＝5pUTR

[0423] 746..836＝MVM内含子

[0424] 838..845＝PmeI_位点

[0425] 846..854＝共有_Kozak

[0426] 855..2240＝FIX-cDNA-691_16

[0427] 2241..2248＝PacI_位点

[0428] 2249..2829＝WPRE_3pUTR

[0429] 2830..3054＝bGH

[0430] 3055..3115＝间隔子_右-ITR_v1

[0431] 3116..3245＝右-ITR_v1

[0432] VI.产生ceDNA载体的详细方法

[0433] A.一般产生

[0434] 用于产生如本文所定义的包含不对称的ITR对或对称的ITR对的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996的章节IV中,所述申请的全文通过引用并入本文中。在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以如本文所描述使用昆虫细胞产生。在替代性实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以以合成方式产生,并且在一些实施例中,以游离方法产生,如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122所公开,所述申请的全文通过引用并入本文中。

[0435] 如本文所描述,在一个实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以例如通过包

含以下步骤的方法获得:a)在有效地诱导在宿主细胞内产生ceDNA载体的条件下并持续足以诱导在宿主细胞内产生ceDNA载体的时间,在存在Rep蛋白下,培育具有不含病毒衣壳编码序列的多核苷酸表达构建体模板(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒)的宿主细胞(例如昆虫细胞)群体,并且其中宿主细胞不包含病毒衣壳编码序列;和b)从宿主细胞中收取并分离出ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生ceDNA载体。然而,没有表达病毒粒子(例如AAV病毒粒子)。因此,没有大小限制,如在AAV或其它基于病毒的载体中天然强加的大小限制。

[0436] 可以通过以下来确认从宿主细胞分离的ceDNA载体的存在:用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶来消化从宿主细胞分离的DNA,并在非变性凝胶上分析消化的DNA材料,以与线性和非连续DNA相比确认线性和连续DNA的特征带的存在。

[0437] 在又另一个方面中,本公开提供了将DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板)稳定地整合到其自身基因组中的宿主细胞系用于产生非病毒DNA载体的用途,例如Lee,L.等人(2013)《公共科学图书馆·综合(Plos One)》8(8):e69879中所描述。优选地,Rep以约3的MOI加入宿主细胞中。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系、例如HEK293细胞时,所述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板,并且可以使用第二载体、例如疱疹病毒将Rep蛋白引入细胞中,使得在Rep和辅助病毒存在下切除和扩增ceDNA。

[0438] 在一个实施例中,用于制造如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的宿主细胞为昆虫细胞,并且杆状病毒用于递送编码Rep蛋白的多核苷酸和用于ceDNA的非病毒DNA载体多核苷酸表达构建体模板,例如图4A-4C和实例1中所描述。在一些实施例中,宿主细胞经工程改造以表达Rep蛋白。

[0439] 然后从宿主细胞中收取和分离ceDNA载体。从细胞采集和收集本文所描述的ceDNA载体的时间可以进行选择和优化,以实现高产率地产生ceDNA载体。举例来说,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收取时间。在一个实施例中,细胞生长并在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体的时间、但在大多数细胞因杆状病毒毒性而开始死亡之前进行收取。可以使用质粒纯化试剂盒,例如Qiagen Endo-Free Plasmid试剂盒分离DNA载体。为分离质粒而开发的其它方法也适用于DNA载体。通常,可以采用任何核酸纯化方法。

[0440] DNA载体可以通过所属领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施例中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0441] 用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的存在可以通过以下来证实:用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化从细胞中分离的载体DNA,并使用凝胶电泳分析被消化和未被消化的DNA物质,以证实与线性且非连续的DNA相比线性且连续的DNA的特征带的存在。图4C和图4D示出了用于标识通过本文的方法产生的封闭端ceDNA载体的存在的一个实施例。

[0442] 根据一些实施例,ceDNA是在游离环境中以合成方式产生的。

[0443] B.ceDNA质粒

[0444] ceDNA质粒为用于后续产生用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的质粒。在一些实施例中,ceDNA质粒可以使用已知的技术构建,以在转录方向上提供至少以下作为可操作地连接的组分:(1)经修饰5'ITR序列;(2)含有顺式调节元件例如启动子、可诱导型启动子、调节开关、增强子等的表达盒;以及(3)经修饰3'ITR序列,其中3'ITR序列相对于5'ITR序列对称。

在一些实施例中,侧接有ITR的表达盒包含用于引入外源序列的克隆位点。表达盒替换了AAV基因组的rep和cap编码区。

[0445] 在一个方面中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体获自质粒,所述质粒在本文中称为“ceDNA质粒”,其按照此次序编码:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、包含转基因的表达盒以及突变或经修饰AAV ITR,其中所述ceDNA质粒不含AAV衣壳蛋白编码序列。在替代性实施例中,ceDNA质粒按照此次序编码:第一(或5')经修饰或突变AAV ITR、包含转基因的表达盒以及第二(或3')经修饰AAV ITR,其中所述ceDNA质粒不含AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'ITR和3'ITR相对于彼此对称。在替代性实施例中,ceDNA质粒按照此次序编码:第一(或5')经修饰或突变AAV ITR、包含转基因的表达盒以及第二(或3')突变或经修饰AAV ITR,其中所述ceDNA质粒不含AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'经修饰ITR和3'经修饰ITR具有相同修饰(即,其相对于彼此为反向互补序列或为对称的)。

[0446] 在另一个实施例中,ceDNA质粒系统不含病毒衣壳蛋白编码序列(即,其不含AAV衣壳基因,也没有其它病毒的衣壳基因)。另外,在特定实施例中,ceDNA质粒还不含AAV Rep蛋白编码序列。因此,在一个优选实施例中,ceDNA质粒缺乏AAV2的功能性AAV cap和AAV rep基因GG-3'加上允许发夹形成的可变回文序列。

[0447] 本公开的ceDNA质粒可以使用所属领域中熟知的任何AAV血清型的基因组的天然核酸序列来产生。在一个实施例中,ceDNA质粒主链源自于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV 11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组。例如NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261;Kotin和Smith,《Springer病毒索引(The Springer Index of Viruses)》,在Springer维护的URL上可得(www网址:oesys.springer.de/viruses/database/mkchapter.asp?virID＝42.04.)(注意-对URL或数据库的引用是指截至本申请生效提交日为止的URL或数据库的内容)。在一个特定实施例中,ceDNA质粒主链源自于AAV2基因组。在另一个特定实施例中,ceDNA质粒主链是合成的主链,其经过基因工程以在它的5'和3'ITR处包含源自于这些AAV基因组之一。

[0448] ceDNA质粒可以任选地包括选择性或选择标记物,用于建立产生ceDNA载体的细胞系。在一个实施例中,选择标记物可以插入3'ITR序列的下游(即3')。在另一个实施例中,选择标记物可以插入5'ITR序列的上游(即5')。适当的选择标志物包含例如赋予耐药性的那些标志物。选择标志物可以是例如杀稻瘟菌素S抗性基因、卡那霉素(kanamycin)、遗传霉素(geneticin)等。在优选的实施例中,药物选择标志物是杀稻瘟菌素S抗性基因。

[0449] 用于表达FIX蛋白的示范性ceDNA(例如rAAV0)载体由rAAV质粒产生。一种用于产生rAAV载体的方法可以包括:(a)为宿主细胞提供如上文所描述的rAAV质粒,其中宿主细胞和质粒均不含衣壳蛋白编码基因,(b)在允许产生ceDNA基因组的条件下培养宿主细胞;以及(c)收取细胞并分离从所述细胞产生的AAV基因组。

[0450] C.由ceDNA质粒制造ceDNA载体的示范性方法

[0451] 本文还提供了用于制造用于表达FIX蛋白的无衣壳ceDNA载体的方法,尤其以足够高的产量提供足以用于体内实验的载体的方法。

[0452] 在一些实施例中,用于产生用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法包含以下步骤:(1)将包含表达盒和两个对称的ITR序列的核酸构建体引入宿主细胞(例如Sf9细胞)中;(2)

任选地，例如通过使用质粒上存在的选择标记物建立克隆细胞系；(3)将Rep编码基因引入(通过用携带所述基因的杆状病毒转染或感染)所述昆虫细胞中；以及(4)收取细胞并纯化ceDNA载体。上述用于产生ceDNA载体的包括表达盒和两个ITR序列的核酸构建体可以呈ceDNA质粒的形式，或如下所述用ceDNA质粒产生的杆粒或杆状病毒的形式。可以通过转染、病毒转导、稳定整合或所属领域中已知的其它方法将核酸构建体引入宿主细胞中。

[0453] D.细胞系

[0454] 用于产生用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的宿主细胞系可以包括衍生自草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)的昆虫细胞系，例如Sf9 Sf21，或粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)细胞，或其它无脊椎动物、脊椎动物或其它真核细胞系，包括哺乳动物细胞。也可以使用普通技术人员已知的其它细胞系，如HEK293、Huh-7、HeLa、HepG2、HeplA、911、CHO、COS、MeWo、NIH3T3、A549、HT1 180、单核细胞、以及成熟和不成熟的树突状细胞。可以转染宿主细胞系以稳定表达ceDNA质粒，从而高产率地产生ceDNA载体。

[0455] 可以使用所属领域已知的试剂(例如脂质体、磷酸钙)或物理手段(例如电穿孔)，通过瞬时转染将ceDNA质粒引入Sf9细胞中。可替代地，可以建立将ceDNA质粒稳定整合至基因组中的稳定Sf9细胞系。此类稳定细胞系可以通过如上文所描述将选择标志物并入ceDNA质粒中来建立。如果用于转染细胞系的ceDNA质粒包含选择标志物，如抗生素，那么可以通过向细胞生长培养基中加入抗生素来选择已用ceDNA质粒转染并将ceDNA质粒DNA整合到基因组中的细胞。然后可以通过单细胞稀释或集落转移技术来分离细胞的抗性克隆并增殖。

[0456] E.分离并纯化ceDNA载体

[0457] 用于获得和分离ceDNA载体的方法的实例描述于图4A-4E和下文特定实例中。本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以从表达(多种)AAV Rep蛋白的生产细胞获得，进一步用ceDNA质粒、ceDNA杆粒或ceDNA杆状病毒转化。可用于产生ceDNA载体的质粒包括编码FIX蛋白的质粒或编码一种或多种REP蛋白的质粒。

[0458] 在一个方面中，多核苷酸编码在质粒(Rep质粒)、杆粒(Rep杆粒)或杆状病毒(Rep杆状病毒)中递送到生产细胞的AAV Rep蛋白(Rep 78或68)。Rep质粒、Rep杆粒和Rep杆状病毒可以通过上文所描述的方法产生。

[0459] 用于产生用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法描述于本文中。用于产生如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的表达构建体可以为质粒(例如ceDNA质粒)、杆粒(例如ceDNA杆粒)和/或杆状病毒(例如ceDNA杆状病毒)。仅举例来说，ceDNA-载体可以由用ceDNA杆状病毒和Rep杆状病毒共同感染的细胞产生。由Rep杆状病毒产生的Rep蛋白可以复制ceDNA杆状病毒以产生ceDNA-载体。或者，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以由经构建体稳定转染的细胞产生，所述构建体包含编码AAV Rep蛋白(Rep78/52)的序列，所述AAV Rep蛋白是在Rep质粒、Rep杆粒或Rep杆状病毒中递送。CeDNA杆状病毒可以瞬时转染到细胞中，通过Rep蛋白复制并产生ceDNA载体。

[0460] 杆粒(例如ceDNA杆粒)能够转染到准许的昆虫细胞中，例如Sf9、Sf21、Tni(粉纹夜蛾)细胞、High Five细胞，并且产生ceDNA杆状病毒，所述杆状病毒是重组杆状病毒，其包括包含对称ITR的序列和表达盒。ceDNA杆状病毒能够再次感染到昆虫细胞中以获得下一代重组杆状病毒。任选地，所述步骤可以重复一次或多次以产生更大量的重组杆状病毒。

[0461] 从细胞收取和收集如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的时间可以进

行选择和优化以实现ceDNA载体的高产量生产。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收取时间。通常,细胞可在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体(例如ceDNA载体)的时间后但在大多数细胞开始因病毒毒性而死亡之前收取。可以使用质粒纯化试剂盒,例如Qiagen ENDO-FREEPLASMID®试剂盒从Sf9细胞中分离出ceDNA载体。所研发的其它质粒分离方法也可以适于ceDNA载体。一般而言,可以采用所属领域中已知的任何核酸纯化方法,以及可商购的DNA提取试剂盒。

[0462] 可替代地,可以通过对细胞团粒进行碱溶解工艺、离心所得溶解液并进行色谱分离来实施纯化。作为一个非限制性实例,所述方法可以通过以下执行:将上清液装载于保留核酸的离子交换柱(例如SARTOBINDQ®)上,并且然后洗脱(例如用1.2M NaCl溶液)并且在凝胶过滤柱上执行进一步色谱纯化(例如6个快速流动GE)。然后通过例如沉淀来回收无衣壳AAV载体。

[0463] 在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体还可以以外泌体或微米粒子形式纯化。所属领域中已知,许多细胞类型不仅释放出可溶性蛋白质,而且通过膜微囊泡脱落释放出复杂的蛋白质/核酸货物(Cocucci等人,2009;EP 10306226.1)此类囊泡包括微囊泡(也称为微粒)和外泌体(也称为纳米囊泡),二者均包含蛋白质和RNA作为货物。微囊泡由质膜的直接出芽产生,而外泌体在多囊泡内体与质膜融合后释放到细胞外的环境中。因此,可以从已经用ceDNA质粒转导的细胞或用ceDNA质粒产生的杆粒或杆状病毒中分离出含有ceDNA载体的微囊泡和/或外泌体。

[0464] 微囊泡可以通过对培养基进行过滤或以20,000×g超速离心来分离,而对外泌体以100,000×g超速离心。超速离心的最优持续时间可以通过实验确定,并将取决于从中分离出囊泡的特定细胞类型。优选地,首先利用低速离心(例如在2000×g下进行5-20分钟)清除培养基并且使用例如AMICON®离心柱(密理博(Millipore),英国赫特福德郡(Watford,UK))进行离心浓缩。微米囊泡和外泌体可以通过使用识别存在于微米囊泡和外泌体上的特定表面抗原的特异性抗体,通过FACS或MACS进一步纯化。其它微米囊泡和外泌体纯化方法包括但不限于免疫沉淀、亲和色谱、过滤和涂有特异性抗体或适体的磁珠。纯化后,用例如磷酸盐缓冲盐水洗涤囊泡。使用微米囊泡或外泌体递送含ceDNA的囊泡的一个优点是,这些囊泡可通过在它们的膜上包括被相应细胞类型上的特异性受体识别的蛋白质而靶向各种细胞类型。(也参见EP 10306226)

[0465] 本文的本公开的另一个方面涉及从已经将ceDNA构建体稳定整合到其自身基因组中的宿主细胞系中纯化ceDNA载体的方法。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施例中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0466] 国际申请PCT/US18/49996的图5显示了凝胶证实ceDNA的产生,所述ceDNA使用实例中所述的方法由多种ceDNA质粒构建体产生。如实例中关于图4D所论述,ceDNA通过凝胶中的特征色带图案来证实。

[0467] VII.药物组合物

[0468] 在另一方面,提供了药物组合物。药物组合物包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体和药学上可接受的载剂或稀释剂。

[0469] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以并入适用于施用受试者的药物组合物中以用于体内递送到受试者的细胞、组织或器官。通常,药物组合物包括如本文公

开的ceDNA-载体和药学上可接受的载剂。举例来说，如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以并入适用于期望的治疗施用途径(例如肠胃外施用)的药物组合物中。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及例如核内显微注射或胞浆内注射等细胞内注射进行的被动组织转导。用于治疗目的的药物组合物能够配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合高ceDNA载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分之一或组合一起并入适当的缓冲液中、然后进行过滤灭菌来制备。可以配制包括ceDNA载体，以将核酸中的转基因递送到接受者的细胞，使得转基因或供体序列在其中治疗性表达。组合物还可以包含药学上可接受的载剂。

[0470] 包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药学活性组合物可以被配制成将用于不同目的的转基因递送到细胞，例如受试者的细胞。

[0471] 用于治疗目的的药物组合物通常必须在制造和存储条件下是无菌的和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高ceDNA载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起并入适当的缓冲液中，接着进行过滤灭菌来制备。

[0472] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以并入适用于局部、全身、羊膜内、鞘内、颅内、动脉内、静脉内、淋巴管内、腹膜内、皮下、气管、组织内(例如肌肉内、心内、肝内、肾内、脑内)、鞘内、膀胱内、结膜(例如眼眶外、眼眶内、眼眶后、视网膜内、视网膜下、脉络膜、脉络膜下、基质内、眼房内和玻璃体内)、耳蜗内和粘膜(例如口腔、直肠、鼻)施用的药物组合物中。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及如核内显微注射或胞质内注射的细胞内注射进行的被动组织转导。

[0473] 在一些方面中，本文所提供的方法包含将一种或多种如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体递送到宿主细胞。本文还提供了通过这类方法产生的细胞，以及包含这类细胞或由这类细胞产生的生物体(例如动物、植物或真菌)。核酸的递送方法可包括脂质转染、核转染、显微注射、生物弹药、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质：核酸缀合物、裸DNA和试剂增强的DNA吸收。脂质体转染描述于例如美国专利第5,049,386号、第4,946,787号和第4,897,355号)并且脂质体转染试剂有市售(例如Transfectam™和Lipofectin™)。能够递送到细胞(例如体外或离体施用)或靶组织(例如体内施用)。

[0474] 将核酸递送到细胞的各种技术和方法是所属领域中已知的。举例来说，核酸例如用于表达FIX蛋白的ceDNA可以被配制到脂质纳米粒子(LNP)、类脂质(lipidoid)、脂质体、脂质纳米粒子、脂质体复合物(lipoplex)或核壳纳米粒子中。通常，LNP由核酸(例如ceDNA)分子、一种或多种可电离或阳离子脂质(或其盐)、一种或多种非离子或中性脂质(例如磷脂)、防止聚集的分子(例如PEG或PEG-脂质缀合物)以及任选的固醇(例如胆固醇)构成。

[0475] 另一种用于将核酸例如用于表达FIX蛋白的ceDNA递送到细胞的方法为使核酸与被细胞内化的配体缀合。例如，配体可以结合细胞表面上的受体并通过胞吞而被内化。配体可以与核酸中的核苷酸共价连接。用于将核酸递送到细胞中的示范性缀合物描述于例如WO2015/006740、WO2014/025805、WO2012/037254、WO2009/082606、WO2009/073809、WO2009/018332、WO2006/112872、WO2004/090108、WO2004/091515和WO2017/177326中。

[0476] 核酸例如用于表达FIX蛋白的ceDNA载体还可以通过转染递送到细胞。有用的转染方法包含(但不限于)：脂质介导的转染、阳离子聚合物介导的转染或磷酸钙沉淀。转染试剂

在所属领域中是熟知的并且包含(但不限于):TurboFect转染试剂(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific))、Pro-Ject试剂(赛默飞世尔科技)、TRANSPASS™ P蛋白转染试剂(新英格兰生物实验室)、CHARIOT™蛋白递送试剂(Active Motif)、PROTEOJUICE™蛋白转染试剂(EMD密理博)、293fectin、LIPOFECTAMINE™ 2000、LIPOFECTAMINE™ 3000(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTAMINE™(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTIN™(赛默飞世尔科技)、DMRIE-C、CELLFECTIN™(赛默飞世尔科技)、OLIGOFECTAMINE™(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTACE™、FUGENE™(瑞士巴塞尔的罗氏(Roche,Basel,Switzerland))、FUGENE™ HD(罗氏)、TRANSFECTAM™(转染胺,威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega,Madison,Wis.))、TFX-10™(普洛麦格公司)、TFX-20™(普洛麦格公司)、TFX-50™(普洛麦格公司)、TRANSFECTIN™(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(BioRad,Hercules,Calif.))、SILENTFECT™(伯乐公司)、Effectene™(加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司(Qiagen,Valencia,Calif.))、DC-chol(阿凡提极性脂质公司(Avanti Polar Lipids))、GENEPORTER™(加利福尼亚圣地亚哥的基因疗法系统(Gene Therapy Systems,San Diego,Calif.))、DHARMAFECT 1™(科罗拉多州拉斐特的达尔马肯(Dharmacon,Lafayette,Colo.))、DHARMAFECT 2™(达尔马肯)、DHARMAFECT 3™(达尔马肯)、DHARMAFECT 4™(达尔马肯)、ESCORT™ III(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma,St.Louis,Mo.))和ESCORT™ IV(西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co.))。核酸,如ceDNA,也可以通过所属领域的技术人员已知的微流体方法递送到细胞。

[0477] 如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体还可以直接施用生物体以在体内转导细胞。施用是通过正常用于引入分子与血液或组织细胞最终接触的任何途径,包含(但不限于):注射、输注、局部施用和电穿孔。适合的施用此类核酸的方法是可利用的并且是所属领域的技术人员熟知的,并且虽然可以使用超过一种途径来施用特定的组合物,但特定的途径经常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0478] 用于引入如本文所公开的用于表达FIX蛋白的核酸载体ceDNA载体的方法可以例如通过如例如美国专利第5,928,638号中所描述的方法来递送到造血干细胞中。

[0479] 本公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以被添加到脂质体中以递送到受试者的细胞或靶器官中。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在药物研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其它脂质。2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的国际申请PCT/US2018/064242中公开了示范性脂质体和脂质体配制物,包括(但不限于)含有聚乙二醇(PEG)官能团的化合物,参见例如标题为“药物配制物”的章节。

[0480] 所属领域已知的各种递送方法或其改良方法可用于在体外或体内递送ceDNA载体。举例来说,在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体通过在细胞膜中利用机械能、电能、超声波能、流体动力能或基于激光的能量进行短暂渗透以使得便于DNA进入靶细胞中来递送。例如,可以通过经过大小限制的通道挤压细胞或通过所属领域中已知的其它手段来瞬时破坏细胞膜来递送ceDNA载体。在一些情况下,单独的ceDNA载体作为裸DNA直接注射到以下任一组织中:任何一种或多种组织选自:肝脏、肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心

脏、肠、肺和胃、皮肤、胸腺，心肌或骨骼肌。在一些情况下，通过基因枪递送ceDNA载体。涂覆有无衣壳AAV载体的金或钨球形粒子(直径1-3μm)可以通过加压气体加速到高速而渗透到目标组织细胞中。

[0481] 本文特别涵盖包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体和药学上可接受的载剂的组合物。在一些实施例中，ceDNA载体与脂质递送系统，例如本文所述的脂质体一起配制。在一些实施例中，这类组合物通过熟练的从业者期望的任何途径来施用。可以通过不同途径，包括经口、肠胃外、舌下、经皮直肠、经粘膜、局部、通过吸入、经颊施用、胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、鼻内鞘内和关节内或其组合，向受试者施用组合物。对于兽医用途，可根据正常兽医实践将组合物作为适当可接受的配制物施用。兽医可以很容易地确定最适合具体动物的给药方案和施用途径。可以通过传统注射器、无针注射装置、“微弹轰击基因枪”或其它物理方法(例如电穿孔(“EP”)、流体动力学方法或超声波)施用组合物。

[0482] 在一些情况下，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是通过流体动力学注射来递送，所述流体动力学注射为将任何水溶性化合物和粒子直接细胞内递送到内脏和整个肢体的骨骼肌中的简单且高效的方法。

[0483] 在一些情况下，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是通过超声波，通过在膜中制造纳米级孔以便于将DNA粒子细胞内递送到内脏或肿瘤的细胞中来递送，因此质粒DNA的大小和浓度在系统的效率中起重要作用。在一些情况下，通过使用磁场的磁转染来递送ceDNA载体，以将含有核酸的粒子集中到目标细胞中。

[0484] 在一些情况下，可以使用化学递送系统，例如通过使用纳米复合物，其包含用属于阳离子脂质体/胶束或阳离子聚合物的聚阳离子纳米粒子来压紧带负电核酸。用于递送方法的阳离子脂质包含但不限于单价阳离子脂质、多价阳离子脂质、含胍化合物、胆固醇衍生化合物、阳离子聚合物、(例如聚(乙烯亚胺)、聚-L-赖氨酸、鱼精蛋白、其它阳离子聚合物)和脂质-聚合物杂化物。

[0485] A.外泌体：

[0486] 在一些实施例中，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是通过包装于外泌体中来递送。外泌体是胞吞来源的小膜囊泡，其在多囊泡体与质膜融合后被释放到细胞外环境中。其表面由来自供体细胞的细胞膜的脂质双层组成，其含有来自产生外泌体的细胞的胞溶质并且在表面上展现来自亲本细胞的膜蛋白。外泌体由包含上皮细胞、B和T淋巴细胞、肥大细胞(MC)以及树突状细胞(DC)在内的各种细胞类型产生。一些实施例设想使用直径在10nm与1μm之间、20nm与500nm之间、30nm与250nm之间、50nm与100nm之间的外泌体。使用外泌体的供体细胞或通过将特定核酸引入外泌体中，可以分离外泌体以递送到目标细胞中。所属领域中已知的各种方法可以用于产生含有本公开的无衣壳AAV载体的外泌体。

[0487] B.微米粒子/纳米粒子

[0488] 在一些实施例中，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是通过脂质纳米粒子来递送。一般来说，脂质纳米粒子包含可电离的氨基脂质(例如4-(二甲氨基)丁酸三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯、DLin-MC3-DMA、磷脂酰胆碱(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱，DSPC)、胆固醇和包被脂质(聚乙二醇-二肉豆蔻酰基甘油，PEG-DMG)，例如Tam等人(2013).《用于递送siRNA的脂质纳米粒子的进展(Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery.)》，《制药(Pharmaceuticals)》5(3):498-507所公开。

[0489] 在一些实施例中,脂质纳米粒子的平均直径在约10nm与约1000nm之间。在一些实施例中,脂质纳米粒子的直径小于300nm。在一些实施例中,脂质纳米粒子的直径在约10nm与约300nm之间。在一些实施例中,脂质纳米粒子的直径小于200nm。在一些实施例中,脂质纳米粒子的直径在约25nm与约200nm之间。在一些实施例中,脂质纳米粒子制剂(例如包含多个脂质纳米粒子的组合物)具有一定的尺寸分布,其中平均尺寸(例如直径)是约70nm至约200nm,且更典型地,平均尺寸是约100nm或更小。

[0490] 所属领域中已知的多种脂质纳米粒子可以用于递送如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体。例如,在美国专利第9,404,127号、第9,006,417号和第9,518,272号中描述了使用脂质纳米粒子的各种递送方法。

[0491] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是通过金纳米粒子来递送。通常,核酸可以与金纳米粒子共价结合或与金纳米粒子非共价结合(例如通过电荷-电荷相互作用结合),例如Ding等人(2014).《用于核酸递送的金纳米粒子(Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery)》.《分子疗法》22(6):1075-1083所描述。在一些实施例中,使用例如美国专利第6,812,334号中描述的方法产生金纳米粒子-核酸缀合物。

[0492] C.缀合物

[0493] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体与增强细胞吸收的试剂缀合(例如共价结合)。"增加细胞吸收的药剂"是促进核酸跨脂质膜运输的分子。例如,核酸能够与亲脂性化合物(例如胆固醇、生育酚等)、细胞穿透肽(CPP)(例如穿膜肽、TAT、Syn1B等)和多胺(例如精胺)缀合。增强细胞吸收的试剂的其它实施例公开于例如Winkler(2013)《用于治疗应用的寡核苷酸缀合物(Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications.)》《治疗剂递送(Ther.Deliv.)》4(7):791-809。

[0494] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体与聚合物(例如聚合分子)或叶酸(folate)分子(例如叶酸(folic acid)分子)缀合。通常,与聚合物缀合的核酸的递送是所属领域中已知的,例如WO2000/34343和WO2008/022309中所描述。在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体与聚(酰胺)聚合物缀合,例如美国专利第8,987,377号所描述。在一些实施例中,如美国专利第8,507,455号中所描述,将本公开所描述的核酸与叶酸分子缀合。

[0495] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体与碳水化合物缀合,例如美国专利第8,450,467号中所描述。

[0496] D.纳米胶囊

[0497] 或者,可以使用如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的纳米胶囊配制物。纳米胶囊通常可以呈稳定并且可再现的方式截留物质。为了避免由于细胞内聚合物过载所致的副作用,应使用能够在体内降解的聚合物来设计此类超细粒子(尺寸约0.1μm)。满足这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米粒子是预期使用的。

[0498] E.脂质体

[0499] 本公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以被添加到脂质体中以递送到受试者的细胞或靶器官中。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在药物研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药

物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其它脂质。

[0500] 脂质体的形成和使用是所属领域的技术人员通常已知的。已经研发了血清稳定性和循环半衰期有所改善的脂质体(美国专利第5,741,516号)。此外,已经描述了脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载剂的各种方法(美国专利第5,567,434号;第5,552,157号;第5,565,213号;第5,738,868号和第5,795,587号)。

[0501] F.示范性脂质体和脂质纳米粒子(LNP)组合物

[0502] 本公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以被添加到脂质体中以递送到细胞,例如需要表达转基因的细胞。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在药物研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其它脂质。

[0503] 包含ceDNA载体的脂质纳米粒子(LNP)公开于2018年9月7日提交的全文并入本文中的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的全文并入本文中的国际申请PCT/US2018/064242中,并且设想用于针对如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法和组合物中。

[0504] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体配制物,其包含一种或多种具有聚乙二醇(PEG)官能团的化合物(所谓的“PEG化的化合物”),所述聚乙二醇官能团可以降低一种或多种所述化合物的免疫原性/抗原性、为其提供亲水性和疏水性并降低剂量频率。或者,脂质体配制物仅包含聚乙二醇(PEG)聚合物作为额外组分。在此类方面,PEG或PEG官能团的分子量可以从62Da至约5,000Da。

[0505] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体配制物,其将在数小时至数周的时间内以延长释放或受控释放曲线来递送API。在一些相关的方面,脂质体配制物可以包括以脂质双层结合的水性腔。在其它相关方面,脂质体配制物将API与组分一起包封起来,所述组分在升高的温度下经历物理转变,在数小时到数周的时段内释放API。

[0506] 在一些方面,脂质体配制物包括鞘磷脂和一种或多种本文公开的脂质。在一些方面,脂质体配制物包括光敏体。

[0507] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体配制物,其包含一种或多种选自以下的脂质:N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐、(二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺)、MPEG(甲氧基聚乙二醇)缀合的脂质、HSPC(氢化大豆磷脂酰胆碱);PEG(聚乙二醇);DSPE(二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺);DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱);DOPC(二油酰基磷脂酰胆碱);DPPG(二棕榈酰基磷脂酰甘油);EPC(绵羊磷脂酰胆碱);DOPS(二油酰基磷脂酰丝氨酸);POPC(棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱);SM(鞘磷脂);MPEG(甲氧基聚乙二醇);DMPC(二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱);DMPG(二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油);DSPG(二硬脂酰基磷脂酰甘油);DEPC(二芥酰基磷脂酰胆碱);DOPE(二油酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺)、硫酸胆固醇酯(CS)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、DOPC(二油酰基-sn-甘油-磷脂酰胆碱)或其任何组合。

[0508] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体配制物,其包括磷脂、胆固醇和PEG化脂质,摩尔比为56:38:5。在一些方面,脂质体配制物的总脂质含量为2-16mg/mL。在一些方面,本

公开提供了一种脂质体配制物，其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和PEG化脂质。在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和PEG化脂质，摩尔比分别为3:0.015:2。在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、胆固醇和PEG化脂质。在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其包括含有磷脂酰胆碱官能团的脂质和胆固醇。在一些方面，PEG化脂质是PEG-2000-DSPE。在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其包括DPPG、大豆PC、MPEG-DSPE脂质缀合物和胆固醇。

[0509] 在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其包括一种或多种含有磷脂酰胆碱官能团的脂质和一种或多种含有乙醇胺官能团的脂质。在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其包括以下中的一种或多种：含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和固醇，例如胆固醇。在一些方面，脂质体配制物包括DOPC/DEPC；和DOPE。

[0510] 在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其还包含一种或多种药物赋形剂，例如蔗糖和/或甘氨酸。

[0511] 在一些方面，本公开提供了一种结构上为单层或多层的脂质体配制物。在一些方面中，本公开提供了一种包含多囊泡粒子和/或泡沫基粒子的脂质体配制物。在一些方面，本公开提供了一种相对普通纳米粒子的相对尺寸更大并且尺寸为约150至250nm的脂质体配制物。在一些方面，脂质体配制物是冻干粉末。

[0512] 在一些方面，本公开提供了一种脂质体配制物，其通过向在脂质体外部具有分离的ceDNA的混合物中添加弱碱，用本文中公开或描述的ceDNA载体制备并负载所述ceDNA载体。这种添加将脂质体外部的pH提高到大致7.3，并驱动API进入脂质体中。在一些方面，本公开提供了一种脂质体内部pH为酸性的脂质体配制物。在此类情况下，脂质体的内部可以处于pH 4-6.9下，并且更优选pH 6.5。在其它方面，本公开提供了一种通过使用脂质体内药物稳定化技术制备的脂质体配制物。在这样的情况下，利用聚合或非聚合的带高电荷阴离子和脂质体内俘获剂，例如多磷酸盐或蔗糖八硫酸盐。

[0513] 在一些方面中，本公开提供了包含ceDNA和可电离脂质的脂质纳米粒子。举例来说，通过如2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开的方法获得的ceDNA制备并负载ceDNA的脂质纳米粒子配制物，所述申请并入本文中。这可以通过在低pH下将乙醇脂质与ceDNA水溶液高能混合，使可电离脂质质子化并为ceDNA/脂质缔合和粒子成核提供有利的能量来实现。通过水稀释和去除有机溶剂可以进一步稳定粒子。能够将粒子浓缩至所需水平。

[0514] 一般来说，脂质纳米粒子是以约10:1到60:1的总脂质:ceDNA(质量或重量)比制备。在一些实施例中，脂质与ceDNA的比率(质量/质量比率;w/w比率)可以在约1:1到约60:1、约1:1到约55:1、约1:1到约50:1、约1:1到约45:1、约1:1到约40:1、约1:1到约35:1、约1:1到约30:1、约1:1到约25:1、约10:1到约14:1、约3:1到约15:1、约4:1到约10:1、约5:1到约9:1、约6:1到约9:1;约30:1到约60:1的范围内。根据一些实施例，脂质粒子(例如，脂质纳米粒子)以约60:1的ceDNA(质量或重量)与总脂质比率制备。根据一些实施例，脂质粒子是以约10:1到30:1的总脂质:ceDNA(质量或重量)比制备。在一些实施例中，脂质与ceDNA比率(质量/质量比率;w/w比率)可以在约1:1至约25:1、约10:1至约14:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1范围内。能够调节脂质和ceDNA的量以提供所需的N/

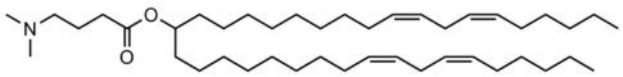
P比，例如N/P比为3、4、5、6、7、8、9、10或更高。通常，脂质粒子配制物的总脂质含量能够在约5mg/ml至约30mg/mL的范围内。

[0515] 可电离的脂质通常用于在低pH值下浓缩核酸货物(例如ceDNA)并驱动膜缔合和融合。通常，可电离的脂质是包含至少一个氨基的脂质，所述氨基在酸性条件下(例如在pH 6.5或更低的条件下)带正电或质子化。可电离脂质在本文中也称为阳离子脂质。

[0516] 示范性可电离脂质描述于国际PCT专利公开WO2015/095340、WO2015/199952、WO2018/011633、WO2017/049245、WO2015/061467、WO2012/040184、WO2012/000104、WO2015/074085、WO2016/081029、WO2017/004143、WO2017/075531、WO2017/117528、WO2011/022460、WO2013/148541、WO2013/116126、WO2011/153120、WO2012/044638、WO2012/054365、WO2011/090965、WO2013/016058、WO2012/162210、WO2008/042973、WO2010/129709、WO2010/144740、WO2012/099755、WO2013/049328、WO2013/086322、WO2013/086373、WO2011/071860、WO2009/132131、WO2010/048536、WO2010/088537、WO2010/054401、WO2010/054406、WO2010/054405、WO2010/054384、WO2012/016184、WO2009/086558、WO2010/042877、WO2011/000106、WO2011/000107、WO2005/120152、WO2011/141705、WO2013/126803、WO2006/007712、WO2011/038160、WO2005/121348、WO2011/066651、WO2009/127060、WO2011/141704、WO2006/069782、WO2012/031043、WO2013/006825、WO2013/033563、WO2013/089151、WO2017/099823、WO2015/095346和WO2013/086354;以及美国专利公开US2016/0311759、US2015/0376115、US2016/0151284、US2017/0210697、US2015/0140070、US2013/0178541、US2013/0303587、US2015/0141678、US2015/0239926、US2016/0376224、US2017/0119904、US2012/0149894、US2015/0057373、US2013/0090372、US2013/0274523、US2013/0274504、US2013/0274504、US2009/0023673、US2012/0128760、US2010/0324120、US2014/0200257、US2015/0203446、US2018/0005363、US2014/0308304、US2013/0338210、US2012/0101148、US2012/0027796、US2012/0058144、US2013/0323269、US2011/0117125、US2011/0256175、US2012/0202871、US2011/0076335、US2006/0083780、US2013/0123338、US2015/0064242、US2006/0051405、US2013/0065939、US2006/0008910、US2003/0022649、US2010/0130588、US2013/0116307、US2010/0062967、US2013/0202684、US2014/0141070、US2014/0255472、US2014/0039032、US2018/0028664、US2016/0317458和US2013/0195920，所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0517] 在一些实施例中，可电离脂质为具有以下结构的MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3)：

[0518]



DLin-M-C3-DMA ("MC3")

。

[0519] 脂质DLin-MC3-DMA描述于Jayaraman等人，《英国应用化学国际版(Angew.Chem.Int.Ed Engl.)》(2012),51(34):8529-8533，其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0520] 在一些实施例中，可电离脂质是如WO2015/074085中所述的脂质ATX-002，其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0521] 在一些实施例中，可电离脂质是如WO2012/040184中所述的(13Z,16Z)-N,N-二甲

基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(化合物32),所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0522] 在一些实施例中,可电离脂质是如WO2015/199952中所述的化合物6或化合物22,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0523] 没有限制,可电离的脂质可以占脂质纳米粒子中存在的总脂质的20-90%(mol)。例如,可电离的脂质摩尔含量可以为脂质纳米粒子中存在的总脂质的20-70%(mol)、30-60%(mol)或40-50%(mol)。在一些实施例中,可电离的脂质占脂质纳米粒子中存在的总脂质的约50mol%至约90mol%。

[0524] 在一些方面中,脂质纳米粒子可以进一步包含非阳离子脂质。非离子脂质包括两亲脂质、中性脂质和阴离子脂质。因此,非阳离子脂质可以是中性不带电的、两性离子型或阴离子脂质。非阳离子脂质通常用于增强融合性。

[0525] 设想用于如本文所公开的方法和组合物中的示范性非阳离子脂质描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242中,所述国际申请全文并入本文中。示范性非阳离子脂质描述于国际申请公开WO2017/099823和美国专利公开US2018/0028664中,两者的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0526] 非阳离子脂质能够占脂质纳米粒子中存在的总脂质的0-30%(mol)。例如,非阳离子脂质含量为脂质纳米粒子中存在的总脂质的5-20%(mol)或10-15%(mol)。在各种实施例中,可电离的脂质与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

[0527] 在一些实施例中,脂质纳米粒子不包含任何磷脂。在一些方面中,脂质纳米粒子能够进一步包含例如固醇等组分,以提供膜完整性。

[0528] 能够用于脂质纳米粒子的一种示范性固醇是胆固醇和其衍生物。示范性胆固醇衍生物描述于国际申请WO2009/127060和美国专利公开US2010/0130588中,所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0529] 提供膜完整性的组分(例如固醇)能够占脂质纳米粒子中存在的总脂质的0-50%(mol)。在一些实施例中,此类组分占脂质纳米粒子的总脂质含量的20%-50%(mol)、30%-40%(mol)。

[0530] 在一些方面,脂质纳米粒子可以还包含聚乙二醇(PEG)或缀合的脂质分子。通常,这些用于抑制脂质纳米粒子的聚集和/或提供空间稳定。示范性的缀合脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)、阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物以及其混合物。在一些实施例中,缀合的脂质分子是PEG-脂质缀合物,例如(甲氧基聚乙二醇)缀合的脂质。示范性PEG-脂质缀合物包括(但不限于):PEG-二酰基甘油(DAG)(如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG丁二酸酯二酰基甘油(PEGS-DAG)(如4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,或其混合物。另外的示范性PEG-脂质缀合物描述于例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224和US2017/0119904中,所有所述案的内容的全文都通过引用并入本文中。

[0531] 在一些实施例中,PEG-脂质是如US2018/0028664中定义的化合物,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中,US20150376115或US2016/0376224中公开了PEG-脂质,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0532] PEG-DAA缀合物可以是例如PEG-二月桂酰氧基丙基、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基、PEG-二棕榈酰氧基丙基或PEG-二硬脂酰氧基丙基。PEG-脂质可以是以下中的一种或多种:PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕榈酰基甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油酰胺、PEG-二肉豆蔻基甘油酰胺、PEG-二棕榈酰基甘油酰胺、PEG-二硬脂基甘油酰胺、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰氨基-3',6'-二氧杂辛基]氨甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)、PEG-DMB(3,4-二(十四烷氧基)苯甲基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚),以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些实施例中,PEG-脂质可以选自由以下组成的组:PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

[0533] 还能够使用与除PEG之外的分子缀合的脂质替代PEG-脂质。举例来说,代替PEG-脂质或除PEG-脂质以外,还可以使用聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)和阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物。示范性的缀合脂质(即,PEG-脂质、(POZ)-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物和阳离子聚合物-脂质)描述于WO1996/010392、WO1998/051278、WO2002/087541、WO2005/026372、WO2008/147438、WO2009/086558、WO2012/000104、WO2017/117528、WO2017/099823、WO2015/199952、WO2017/004143、WO2015/095346、WO2012/000104、WO2012/000104和WO2010/006282;美国专利申请公开US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2013/0303587、US2018/0028664、US2015/0376115、US2016/0376224、US2016/0317458、US2013/0303587、US2013/0303587和US20110123453;和US5,885,613、US6,287,591、US6,320,017和US6,586,559,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0534] 在一些实施例中,一种或多种另外的化合物可以是治疗剂。治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。换句话说,治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。换句话说,可以根据治疗目的和所需的生物学作用选择治疗剂。举例来说,如果LNP内的ceDNA可用于治疗B型血友病,那么额外化合物可以为抗B型血友病剂(例如化学治疗剂或其它B型血友病疗法(包括但不限于小分子或抗体))。举例来说,如果LNP内的ceDNA可用于治疗血友病A,则另外的化合物可以是抗微生物剂(例如抗生素或抗病毒化合物)。在又一个实施例中,如果含有ceDNA的LNP可用于治疗免疫疾病或病症,那么另外的化合物可以是调节免疫反应的化合物(例如免疫抑制剂、免疫刺激化合物或调节一种或多种特异性免疫途径的化合物)。在一些实施例中,含有不同化合物例如编码不同蛋白质的ceDNA或不同化合物例如治疗剂的不同脂质纳米粒子的不同混合液可以用于本公开的组合物和方法中。

[0535] 在一些实施例中,另外的化合物是免疫调节剂。例如,另外的化合物是免疫抑配制物。本文所描述的免疫抑制剂包括蛋白激酶抑制剂(PKI),例如酪氨酸激酶抑制剂(TKI),所述抑制剂包括但不限于小分子化合物、生物制剂(例如单克隆抗体)和抑制例如IFN信号传导和生产途径的活性的大多肽分子,或可以减少免疫反应路径中靶蛋白的表达的任何其它形式的拮抗剂。应理解,本公开涵盖可以充当例如调节免疫反应的IFN信号传导和生产路径的拮抗剂的治疗剂的任何模态的用途。

[0536] 免疫抑制剂为属于广泛类别的抑制蛋白激酶活性的化合物的蛋白激酶抑制剂，并且可以与触发宿主细胞或罹患遗传病症的受试者中的免疫反应(先天性和/或适应性)的任何核酸治疗剂结合使用。酪氨酸激酶调节多种细胞功能，所述细胞功能包括细胞生长(例如，IFN信号传导和生产以及表皮生长因子(“EGFR”，例如ERBB1、ERBB2/HER2、ERBB3/HER3、ERBB4/HER4))。这些为在多种细胞因子、生长因子和激素下游起作用，由此调节免疫反应的主要信号转导子和活化因子。举例来说，当特定配体与其同源受体结合时，构象变化引起受体低聚和受体相关JAK活化。JAK彼此自身和反式磷酸化并磷酸化受体链，从而为STAT分子提供对接位点。STAT随后进行JAK介导的磷酸化、二聚合和易位到细胞核，其中其调节涉及免疫反应的靶基因(例如干扰素-α、干扰素-β、干扰素-γ、TNFα、IL2、IL-6、IL-18等)的转录。

[0537] 在一些实施例中，免疫抑制剂为Jak1、Jak2、Jak3、Stat、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFRs、RON、IGF1R、EPHA2、EPHA3、VEGF或VEGFR的拮抗剂。在一些实施例中，免疫抑制剂为酪氨酸激酶的拮抗剂。在一个实施例中，免疫抑制剂为Jak1的拮抗剂。在另一个实施例中，免疫抑制剂是Jak2的拮抗剂。在一个实施例中，免疫抑制剂为Jak3的拮抗剂。在又另一个实施例中，免疫抑制剂为Tyk2的拮抗剂。在又另一个实施例中，免疫抑制剂为EGFR的拮抗剂。在一个实施例中，免疫抑制剂为ALK的拮抗剂。在又另一个实施例中，免疫抑制剂为Syk的拮抗剂。

[0538] 在一个实施例中，免疫抑制剂为小分子拮抗剂。在另一个实施例中，免疫抑制剂为结合到蛋白激酶标靶的抗体。在另一个实施例中，免疫抑制剂为结合到酪氨酸激酶的抗体。在另一个实施例中，免疫抑制剂为针对蛋白激酶的单克隆抗体。在另一个实施例中，免疫抑制剂为针对酪氨酸激酶的单克隆抗体。在另一个实施例中，免疫抑制剂为针对选自由Jak1、Jak2、Jak3、Stat、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFRs、RON、IGF1R、EPHA2、EPHA3、VEGF和VEGFR组成的组的标靶的单克隆抗体。在又另一个实施例中，免疫抑制剂为对蛋白激酶具有结合亲和力的多肽。在又另一个实施例中，免疫抑制剂为减弱Jak1、Jak2、Jak3、Stat、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFRs、RON、IGF1R、EPHA2、EPHA3、VEGF或VEGFR的表达的核酸，例如RNAi或反义寡核苷酸。

[0539] 在一些实施例中，对蛋白激酶例如酪氨酸激酶的抑制可以通过使用结合到既定蛋白激酶的ATP袋形物，从而阻断其催化靶蛋白磷酸化的小分子来实现。因此，在一些实施例中，免疫抑制剂可以为蛋白激酶的小分子拮抗剂。免疫抑制剂蛋白激酶拮抗剂的非限制性实例包括甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)(GLEEVEC®)、尼罗替尼(Nilotinib)(TASIGNA®)、索拉非尼(sorafenib)(NEXAVAR®)、舒尼替尼(sunitinib)(SUTNET®)、达沙替尼(dasatinib)(SPRCEL®)、阿卡替尼(acalabrutinib)、阿来替尼(alectinib)、阿西替尼(axitinib)、巴瑞替尼(baricitinib)、阿法替尼(afatinib)、伯舒替尼(bosutinib)、布加替尼(brigatinib)、卡博替尼(cabozantinib)、赛度替尼(cerdulatinib)、色瑞替尼(ceritinib)、考比替尼(cobimetinib)、克唑替尼(crizotinib)、达可替尼(dacomitinib)、达沙替尼(dasatinib)、埃罗替尼(erlotinib)、伊马替尼(imatinib)、福他替尼(fostamatinib)、吉非替尼(gefitinib)、AG-1478、拉帕替尼

(lapatinib)、劳拉替尼(lorlatinib)、TAK-659、芦可替尼(ruxolitinib)、奥希替尼(osimertinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、哌加他尼(pegaptanib)、普纳替尼(ponatinib)、瑞格非尼(regorafenib)、塞卡替尼(saracatinib)、托法替尼(tofacitinib)、BMS-986165、凡德他尼(vandetinib)、维罗非尼(vemurafenib)、或其药学上可接受的盐。

[0540] 在一些实施例中,免疫抑制剂可以为酪氨酸激酶的小分子拮抗剂,并且选自由以下组成的组:巴瑞替尼、阿法替尼、布加替尼、赛度替尼、色瑞替尼、考比替尼、达可替尼、达沙替尼、奥希替尼、福他替尼、塞卡替尼、TAK-659、芦可替尼、BMS-986165、托法替尼和其药学上可接受的盐。

[0541] 在一些实施例中,所述TKI选自由以下组成的组:舒尼替尼、伊马替尼、索拉非尼、达沙替尼、恩托普利替尼(entoplestinib)、福他替尼、TAK-659、芦可替尼、巴瑞替尼、BMS-986165、托法替尼和其药学上可接受的盐。

[0542] 在一些实施例中,TKI选自由以下组成的组:福他替尼、芦可替尼、BMS-986165和其药学上可接受的盐。

[0543] 在一个实施例中,TKI为芦可替尼或磷酸芦可替尼。

[0544] 在一些实施例中,TKI可以选择性抑制一种或多种激酶;或靶向相同路径中的多种激酶。举例来说,芦可替尼和巴瑞替尼可以抑制Jak1和Jak2。劳拉替尼可以抑制ROS1和ALK。达沙替尼可以抑制Alb、Src和c-Kit。布加替尼、吉非替尼(genfinitinib)、埃罗替尼、AG-1478和拉帕替尼可以抑制EGFR。克唑替尼(crizitinib)可以抑制ALK和c-Met。福他替尼和赛度替尼(cerdulitinib)可以选择性抑制Syk。塞卡替尼可以抑制Src和Abl。在一些实施例中,TKI为Jak1的抑制剂。在一些实施例中,TKI为Jak2的抑制剂。在一些实施例中,TKI为Jak1和Jak2的抑制剂。在一些实施例中,TKI为EGFR的抑制剂。在一些实施例中,TKI为ALK的抑制剂。在一些实施例中,TKI为Syk的抑制剂。

[0545] 免疫反应路径中的蛋白激酶活性还可以受生物药物例如针对蛋白激酶的单克隆抗体抑制。这些治疗剂可以通过防止受体蛋白激酶活化来发挥功效并且能够以高特异性结合细胞表面抗原。数种单克隆抗体靶向在抑制涉及于DNA感知免疫反应信号传导路径中的蛋白激酶中起作用的受体蛋白激酶。曲妥珠单抗(trastuzumab)和贝伐单抗(bevacizumab)为所述单克隆抗体的非限制性实例。

[0546] 在一些实施例中,用以抑制不合需要的针对TNA的免疫反应的生物剂为选自由以下组成的组的单克隆抗体:阿多-曲妥珠单抗恩他新(ado-trastuzumab emtansine)、西妥昔单抗(cetuximab)、CetuGEX™、西妥木单抗(cixutumumab)、达罗托组单抗(dalotuzumab)、度利戈妥单抗(duligotumab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、伏妥昔单抗(futuximab)、加尼妥单抗(ganitumab)、艾芦库单抗(icrucumab)、马戈妥昔单抗(margetuximab)、纳纳土单抗(narnatumab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、尼妥组单抗(nimotuzumab)(h-R3)、奥拉单抗(olaratumab)、奥那妥组单抗(onartuzumab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、雷珠单抗(ranibizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、瑟瑞妥单抗(seribantumab)、坦尼单抗(tanibirumab)、替妥木单抗(teprotumumab)、trasGEXTM、曲妥珠单抗和杂图昔单抗(zatuximab)。在一个实施例中,单克隆抗体为曲妥珠单抗。在另一个实施例中,单克隆抗体为西妥昔单抗。

[0547] 在一些实施例中,蛋白激酶抑制剂为肽。肽可以为对靶蛋白例如Jak1、Jak2、Jak3、

STAT、Tyk2、c-MET、EGFR、c-KIT、BTK、ALK、ABL、SRC、ROS1、Syk、MEK、ATM、NRF2、Flt3、fms/CSF1R、FDGFRs、RON、IGF1r、EPHA2、EPHA3、VEGF或VEGFR具有特异性结合亲和力的多肽。多肽免疫抑制剂的非限制性实例包括阿柏西普(aflibercept)(VEGF)。肽的结合标靶可以在涉及例如IFN反应和生产路径的信号传导途径中。

[0548] 在一些实施例中,当本公开的免疫抑制剂与核酸治疗剂组合存在时,所述免疫抑制剂有效地降低体外和体内促炎性细胞因子和趋化因子含量。促炎性细胞因子可以选自干扰素-α(IFN-α)、干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-18(IL-18)、血管内皮生长因子(VEGF)、白血病抑制因子(LIF)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、RANTES(CCL5)、IP-10(CXCL10)、巨噬细胞炎症蛋白-1α(MIP-1α;CCL3)和/或巨噬细胞炎症蛋白-1β(MIP-1β;CCL4)中的任一种或组合。

[0549] 在一些实施例中,额外化合物为免疫刺激剂。本文还提供了包含所产生的经脂质纳米粒子囊封的昆虫细胞、或如本文所描述的用于表达FIX蛋白的以合成方式产生的ceDNA载体、和药学上可接受的载剂或赋形剂的药物组合物。

[0550] 在一些方面,本公开提供了一种脂质纳米粒子配制物,其还包含一种或多种药物赋形剂。在一些实施例中,脂质纳米粒子配制物还包含蔗糖、tris、海藻糖和/或甘氨酸。

[0551] ceDNA载体能够与粒子的脂质部分复合或囊封于脂质纳米粒子的脂质位置。在一些实施例中,可以将ceDNA完全囊封在脂质纳米粒子的脂质位置中,从而保护其免于被核酸酶降解,例如在水溶液中。在一些实施例中,脂质纳米粒子中的ceDNA在37℃下脂质纳米粒子暴露于核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟后基本上不降解。在一些实施例中,脂质纳米粒子中的ceDNA在粒子在血清中在37℃下培育至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后基本上不降解。

[0552] 在某些实施例中,脂质纳米粒子对受试者,例如对哺乳动物,例如人基本上是无毒的。在一些方面,脂质纳米粒子配制物是冻干粉末。

[0553] 在一些实施例中,脂质纳米粒子是具有至少一个脂质双层的固体核心粒子。在其它实施例中,脂质纳米粒子具有非双层结构,即非层状(即非双层)形态。不受限制,非双层形态能够包括例如三维管、棒、对称立方体等。举例来说,使用例如Cryo-TEM分析,能够轻松地评估且表征脂质纳米粒子的形态(片层对非片层),如US2010/0130588中所述,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0554] 在一些其它实施例中,具有非层状形态的脂质纳米粒子是电子致密的。在一些方面,本公开提供了一种结构上为单层或多层的脂质纳米粒子。在一些方面,本公开提供了一种包含多囊泡粒子和/或基于泡沫的粒子的脂质纳米粒子配制物。

[0555] 通过控制脂质组分的组成和浓度,可以控制脂质缀合物从脂质粒子中交换出来的速率,进而可以控制脂质纳米粒子融合的速率。另外,包括例如pH、温度或离子强度的其它变量可以用于改变和/或控制脂质纳米粒子融合的速率。基于本公开,所属领域的普通技术人员将清楚可以用于控制脂质纳米粒子融合的速率的其它方法。同样显而易见,通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可以控制脂质粒子的大小。

[0556] 配制的阳离子脂质的pKa可以与LNP递送核酸的效力相关(参见Jayaraman等人,《应用化学国际版》(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,《自然生物技术》28,172-176(201 0),两个文献都以全文引用的方式并入本文中)。pKa的优选范围是约5到约7。使用基于2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸(TNS)荧光的分析测定脂质纳米粒子中阳离子脂质的pKa。

[0557] VIII.使用方法

[0558] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体还可以用于将感兴趣的核酸序列(例如编码FIX蛋白)递送到靶细胞(例如宿主细胞)的方法中。确切地说,所述方法可以为用于将FIX蛋白递送到有需要的受试者的细胞并治疗B型血友病的方法。本公开允许在受试者的细胞中体内表达在ceDNA载体中编码的FIX蛋白,以使得发生FIX蛋白表达的治疗作用。在ceDNA载体的体内和体外递送模式中均可以看到这些结果。

[0559] 另外,本公开提供了用于在有需要的受试者的细胞中递送FIX蛋白的方法,其包含多次施用编码所述FIX蛋白的本公开的ceDNA载体。由于本公开的ceDNA载体不像对包封病毒载体通常所观察到那样诱导免疫反应,所以所述多次施用策略将可能在基于ceDNA的系统中取得更大的成功。ceDNA载体是以足以转染期望组织的细胞和提供足够水平的基因转移和FIX蛋白表达而无不当副作用的量施用。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于视网膜施用(例如视网膜下注射,脉络膜上注射或玻璃体内注射)、静脉内施用(例如在脂质体配制物中)、直接递送至所选器官(例如选自肝脏、肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心脏、肠、肺和胃中的任何一种或多种组织)、肌肉内施用和其它肠胃外施用途径。如果需要,可以组合施用途径。

[0560] 如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的递送不限于所表达的FIX蛋白的递送。举例来说,常规产生(例如使用基于细胞的产生方法(例如昆虫细胞产生方法))或合成产生的如本文所述的ceDNA载体可以联合为了提供基因疗法的一部分而提供的其它递送系统使用。可以与本公开的ceDNA载体组合的系统的一个非限制性实例包括单独递送一种或多种辅因子或免疫抑制剂以用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的有效基因表达的系统。

[0561] 本公开还提供了治疗受试者的B型血友病的方法,其包含将治疗有效量的ceDNA载体和任选的药学上可接受的载剂引入受试者的有需要的靶细胞(尤其肌肉细胞或组织)中。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入,但此类载剂不是必需的。所选择的ceDNA载体包含可用于治疗B型血友病的编码FIX蛋白的核酸序列。确切地说,ceDNA载体可以包含可操作地连接到控制元件的期望FIX蛋白序列,所述控制元件能够在由外源性DNA序列编码的期望FIX蛋白引入受试者中时引导其转录。ceDNA载体可以通过如上文和本文其它地方提供的任何适合的途径施用。

[0562] 本文所提供的组合物和载体可以用于递送FIX蛋白以用于各种目的。在一些实施例中,转基因编码旨在用于研究目的,例如创建具有转基因的体细胞转基因动物模型,例如研究FIX蛋白产物的功能的FIX蛋白。在另一个实例中,转基因编码旨在用于创建B型血友病动物模型的FIX蛋白。在一些实施例中,所编码的FIX蛋白可以用于治疗或预防哺乳动物受试者的B型血友病状态。FIX蛋白可以足以治疗与基因的表达减少、表达缺乏或功能异常相关的B型血友病的量转移到患者(例如于患者中表达)。

[0563] 原则上,表达盒可以包括编码FIX蛋白的核酸或任何转基因,所述FIX蛋白因突变而减少或不存在或在本公开的范围内被认为是过度表达时会赋予治疗益处。优选地,本文

提供的ceDNA组合物中不存在未插入的细菌DNA，并且优选地不存在细菌DNA。

[0564] ceDNA载体不限于ceDNA载体的一种。因而，在另一个方面中，表达不同蛋白或相同FIX蛋白、但可操作地连接到不同启动子或顺式调节元件的多种ceDNA载体可以同时或依序递送到靶细胞、组织、器官或受试者。因此，这种策略能够允许多个蛋白质同时进行基因疗法或基因递送。将FIX蛋白的不同部分分离成单独ceDNA载体(例如，FIX蛋白的功能所需的不同结构域和/或辅因子)也是可能的，所述单独ceDNA载体可以同时或在不同时间施用并且可以为单独可调节的，由此新增额外程度的对FIX蛋白的表达的控制。考虑到由于缺乏病毒衣壳而缺乏抗衣壳宿主免疫反应，递送也可以进行多次，并且对于临床环境中的基因疗法来说，重要的是随后增加或减少剂量。可以预期，由于没有衣壳，因此不会发生抗衣壳反应。

[0565] 本公开还提供了治疗受试者的B型血友病的方法，其包含将治疗有效量的如本文所公开的ceDNA载体和任选的药学上可接受的载剂引入受试者的有需要的靶细胞(尤其肌肉细胞或组织)中。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入，但此类载剂不是必需的。所建构的ceDNA载体包含可用于治疗B型血友病的感兴趣的核酸序列。确切地说，ceDNA载体可以包含可操作地连接到控制元件的期望外源性DNA序列，所述控制元件能够在引入受试者中时引导由外源性DNA序列编码的期望多肽、蛋白质或寡核苷酸的转录。ceDNA载体可以通过如上文和本文其它地方提供的任何适合的途径施用。

[0566] IX.递送用于产生FIX蛋白的ceDNA载体的方法

[0567] 在一些实施例中，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以通过各种适合的方法体外或体内递送到靶细胞。可以施用或注射单独的ceDNA载体。ceDNA载体可以在不借助于转染试剂或其它物理方式的情况下递送到细胞。或者，用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以使用任何所属领域已知的转染试剂或其它所属领域已知的便于DNA进入细胞中的物理方式来递送，例如脂质体、醇类、富含聚赖氨酸的化合物、富含精氨酸的化合物、磷酸钙、微囊泡、显微注射、电穿孔等等。

[0568] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以有效地靶向通常难以使用各种递送试剂用常规AAV病毒粒子转导的细胞和组织类型。

[0569] 本文所描述的技术的一个方面涉及将FIX蛋白递送到细胞的方法。通常，对于体内和体外方法，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以使用如本文所公开的方法以及所属领域中已知的其它方法引入细胞中。如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体优选以生物学有效量施用细胞。如果将ceDNA载体体内施用细胞(例如施用受试者)，那么ceDNA载体的生物学有效量为足以使FIX蛋白在靶细胞中转导和表达的量。

[0570] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的示范性施用模式包括经口、经直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如，通过气雾剂)、经颊(例如，舌下)、经阴道、鞘内、眼内、透皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如，静脉内、皮下、皮内、颅内、肌肉内[包括施用骨骼肌、隔膜肌和/或心肌]、胸膜内、脑内和关节内)。施用可以全身或直接递送至肝脏或其它地方(例如，任何肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心脏、肠、肺和胃)。

[0571] 施用可以是局部(例如，皮肤和粘膜表面，包括气道表面和透皮施用)、淋巴管内等，以及直接组织或器官注射(例如但不限于肝脏，但也可用于眼睛、肌肉，包括骨骼肌、心肌、膈肌或大脑)。

[0572] 可以向受试者的任何部位施用ceDNA载体,包括(但不限于)选自由以下组成的组的部位:肝脏和/或眼睛、脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、膈膜、气道上皮、肾脏、脾脏、胰腺。

[0573] 在任何给定情况下最适合的途径将取决于所治疗、改善和/或预防的病状的性质和严重程度,以及所使用的特定ceDNA载体的性质。另外,ceDNA准许人们施用在单个载体或多个ceDNA载体(例如ceDNA混合液)中的超过一种FIX蛋白。

[0574] A.ceDNA载体的肌肉内施用

[0575] 在一些实施例中,治疗受试者的疾病的方法包含将治疗有效量的编码FIX蛋白的ceDNA载体和任选的药学上可接受的载剂引入受试者的有需要的靶细胞(尤其肌肉细胞或组织)中。在一些实施例中,向受试者的肌肉组织施用用于表达FIX蛋白的ceDNA载体。

[0576] 在一些实施例中,ceDNA载体能够施用受试者的任何部位,包括但不限于选自由骨骼肌、平滑肌、心脏、隔膜或眼肌的部位组成的组。

[0577] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体向本公开的骨骼肌的施用包括但不限于施用肢体(例如上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背、颈、头(例如舌)、胸腔、腹部、骨盘/会阴和/或手指的骨骼肌。如本文所公开的ceDNA载体可以通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌注(任选地,腿和/或手臂的隔离肢体灌注;参见例如Arruda等人,(2005)《血液(Blood)》105:3458-3464)和/或直接肌肉内注射来递送到骨骼肌。在特定实施例中,如本文所公开的ceDNA载体通过肢体灌注、任选地隔离肢体灌注(例如静脉内或关节内施用)来施用到受试者(例如患有如DMD的肌营养不良症的受试者)的肢体(臂和/或腿)。在实施例中,如本文所公开的ceDNA载体可以在不使用“流体动力学”技术的情况下施用。

[0578] 举例来说,常规病毒载体的组织递送(例如递送到肌肉)通常利用流体动力学技术增强(例如大体积的静脉内/静脉内施用),其增强血管压力并且促进病毒载体穿越内皮细胞屏障的能力。在特定实施例中,本文所述的ceDNA载体能够在流体动力学技术缺乏的情况下施用,例如大体积输注和/或升高的血管内压力(例如大于正常收缩压,例如小于或等于血管内压力相对于正常收缩压的5%、10%、15%、20%、25%增幅)。这样的方法可以减少或避免与流体动力学技术相关的副作用,例如水肿、神经损伤和/或腔室综合征。

[0579] 此外,包含施用骨骼肌的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的组合物可以施用肢体(例如上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背、颈、头(例如舌)、胸腔、腹部、骨盘/会阴和/或手指的骨骼肌。适合的骨骼肌包括但不限于外展小指肌(abductor digiti minimi)(在手中)、外展小趾肌(abductor digiti minimi)(在脚中)、拇展肌(abductor hallucis)、第五趾(指)展肌(abductor ossis metatarsi quinti)、拇短展肌(abductor pollicis brevis)、拇长展肌(abductor pollicis longus)、内收短肌(adductor brevis)、拇收肌(adductor hallucis)、内收长肌(adductor longus)、内收大肌(adductor magnus)、拇收肌(adductor pollicis)、肘肌(anconeus)、前斜角肌(anterior scalene)、膝关节肌(articularis genus)、肱二头肌(biceps brachii)、股二头肌(biceps femoris)、肱肌(brachialis)、肱挠肌(brachioradialis)、颊肌(buccinator)、喙肱肌(coracobrachialis)、皱眉肌(corrugator supercilii)、三角肌(deltoid)、降口角肌(depressor anguli oris)、降下唇肌(depressor labii inferioris)、二腹肌(digastric)、骨间背侧肌(dorsal interossei)(在手中)、骨间背侧肌(在脚中)、桡侧腕短伸肌(extensor carpi radialis brevis)、桡侧腕长伸肌(extensor carpi radialis

longus)、尺侧伸腕肌(extensor carpi ulnaris)、伸小指肌(extensor digiti minimi)、伸趾肌(extensor digitorum)、伸趾短肌(extensor digitorum brevis)、伸趾长肌(extensor digitorum longus)、伸拇短肌(extensor hallucis brevis)、伸拇长肌(extensor hallucis longus)、伸食指肌(extensor indicis)、伸拇短肌(extensor pollicis brevis)、伸拇长肌(extensor pollicis longus)、桡侧腕屈肌(flexor carpi radialis)、尺侧屈腕肌(flexor carpi ulnaris)、小指短屈肌(flexor digiti minimi brevis)(在手中)、小趾短屈肌(flexor digiti minimi brevis)(在脚中)、趾短屈肌(flexor digitorum brevis)、趾长屈肌(flexor digitorum longus)、指深屈肌(flexor digitorum profundus)、指浅屈肌(flexor digitorum superficialis)、拇短屈肌(flexor hallucis brevis)、拇长屈肌(flexor hallucis longus)、拇短屈肌(flexor pollicis brevis)、拇长屈肌(flexor pollicis longus)、额肌(frontalis)、腓肠肌(gastrocnemius)、颏舌骨肌(geniohyoid)、臀大肌(gluteus maximus)、臀中肌(gluteus medius)、臀小肌(gluteus minimus)、股薄肌(gracilis)、颈髂肋肌(iliocostalis cervicis)、腰髂肋肌(iliocostalis lumborum)、胸髂肋肌(iliocostalis thoracis)、髂肌(illiacus)、下孖肌(inferior gemellus)、下斜肌(inferior oblique)、下直肌(inferior rectus)、冈下肌(infraspinatus)、棘间肌(interspinalis)、横突间肌(intertransversi)、翼外肌(lateral pterygoid)、外直肌(lateral rectus)、背阔肌(latissimus dorsi)、提口角肌(levator anguli oris)、提上唇肌(levator labii superioris)、提上唇鼻翼肌(levator labii superioris alaeque nasi)、提上睑肌(levator palpebrae superioris)、肩胛提肌(levator scapulae)、长回旋肌(long rotators)、头最长肌(longissimus capitis)、颈最长肌(longissimus cervicis)、胸最长肌(longissimus thoracis)、头长肌(longus capitis)、颈长肌(longus colli)、蚓状肌(lumbricals)(在手中)、蚓状肌(lumbricals)(在脚中)、咬肌(masseter)、翼内肌(medial pterygoid)、内直肌(medial rectus)、中斜角肌(middle scalene)、多裂肌(multifidus)、下颌舌骨肌(mylohyoid)、头下斜肌(obliquus capitis inferior)、头上斜肌(obliquus capitis superior)、闭孔外肌(obturator externus)、闭孔内肌(obturator internus)、枕肌(occipitalis)、肩胛舌骨肌(omohyoid)、小指对掌肌(opponens digiti minimi)、拇对掌肌(opponens pollicis)、眼轮匝肌(orbicularis oculi)、口轮匝肌(orbicularis oris)、骨间掌侧肌(palmar interossei)、掌短肌(palmaris brevis)、掌长肌(palmaris longus)、耻骨肌(pectineus)、胸大肌(pectoralis major)、胸小肌(pectoralis minor)、腓短肌(peroneus brevis)、腓长肌(peroneus longus)、第三腓骨肌(peroneus tertius)、梨状肌(piriformis)、跖侧骨间肌(plantar interossei)、跖肌(plantaris)、颈阔肌(platysma)、腘肌(popliteus)、后斜角肌(posterior scalene)、旋前方肌(pronator quadratus)、旋前圆肌(pronator teres)、腰大肌(psoas major)、股方肌(quadratus femoris)、跖方肌(quadratus plantae)、头直前肌(rectus capitis anterior)、头侧直肌(rectus capitis lateralis)、头后大直肌(rectus capitis posterior major)、头后小直肌(rectus capitis posterior minor)、股直肌(rectus femoris)、大菱形肌(rhomboid major)、小菱形肌(rhomboid minor)、笑肌(risorius)、缝匠肌(sartorius)、小斜角肌(scalenus minimus)、半膜肌(semimembranosus)、头半棘肌(semispinalis capitis)、颈

半棘肌(semispinalis cervicis)、胸半棘肌(semispinalis thoracis)、半腱肌(semitendinosus)、前锯肌(serratus anterior)、短回旋肌(short rotators)、比目鱼肌(soleus)、头棘肌(spinalis capitis)、颈棘肌(spinalis cervicis)、胸棘肌(spinalis thoracis)、头夹肌(splenius capitis)、颈夹肌(splenius cervicis)、胸锁乳突肌(sternocleidomastoid)、胸舌骨肌(sternohyoid)、胸骨甲状肌(sternothyroid)、茎突舌骨肌(stylohyoid)、锁骨下肌(subclavius)、锁骨下肌(subscapularis)、上孖肌(superior gemellus)、上斜肌(superior oblique)、上直肌(superior rectus)、旋后肌(supinator)、冈上肌(supraspinatus)、颞肌(temporalis)、阔筋膜张肌(tensor fascia lata)、大圆肌(teres major)、小圆肌(teres minor)、胸肌(thoracis)、甲状舌骨肌(thyrohyoid)、胫前肌(tibialis anterior)、胫骨后肌(tibialis posterior)、斜方肌(trapezius)、肱三头肌(triceps brachii)、股中间肌(vastus intermedius)、股外侧肌(vastus lateralis)、股内侧肌(vastus medialis)、颧大肌(zygomaticus major)和颧小肌(zygomaticus minor)、以及所属领域中已知的任何其它适合的骨骼肌。

[0580] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体向隔膜肌的施用可以通过任何适合的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用来进行。在一些实施例中,从ceDNA载体表达的转基因递送到靶组织还能够通过递送包含ceDNA载体的合成储槽来实现,其中将包含ceDNA载体的储槽植入骨骼肌、平滑肌、心肌和/或隔膜肌组织,或能够使肌肉组织与包含如本文所述的ceDNA载体的膜或其它基质接触。此类可植入基质或底物描述于美国专利第7,201,898号中。

[0581] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体向心肌的施用包括向左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜(septum)的施用。如本文所述的ceDNA载体可以通过静脉内施用、动脉内施用、例如主动脉内施用、直接心脏注射(例如注入左心房、右心房、左心室、右心室)和/或冠状动脉灌注而递送到心肌。

[0582] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体向平滑肌的施用可以通过任何适合的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用来进行。在一个实施例中,可以施用存在于平滑肌内、附近和/或平滑肌上的内皮细胞。平滑肌的非限制实施例包括眼虹膜、肺细支气管、喉肌(声带)、胃肠道的胃、食道、小肠和大肠肌肉层、膀胱的输尿管、逼尿肌肌肉、子宫的子宫肌层、阴茎或前列腺腺体。

[0583] 在一些实施例中,将如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体施用骨骼肌、隔膜肌和/或心肌。在代表性实施例中,本公开的ceDNA载体用于治疗和/或预防骨骼肌、心肌和/或隔膜肌病症。

[0584] 具体地说,预期包含如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的组合物可以被递送到眼睛的一种或多种肌肉(例如外直肌(Lateral rectus)、内直肌(Medial rectus)、上直肌(Superior rectus)、下直肌(Inferior rectus)、上斜肌(Superior oblique)、下斜肌(Inferior oblique))、面部肌肉(例如枕额肌(Occipitofrontalis muscle)、颞下颌肌(Temporoparietalis muscle)、降眉间肌(Procerus muscle)、鼻肌(Nasalis muscle)、降鼻中隔肌(Depressor septi nasi muscle)、眼轮匝肌(Orbicularis oculi muscle)、皱眉肌(Corrugator supercilii muscle)、降眉肌(Depressor supercilii muscle)、耳廓肌(Auricular muscles)、口轮匝肌(Orbicularis oris

muscle)、降口角肌(Depressor anguli oris muscle)、笑肌(Risorius)、颧大肌(Zygomaticus major muscle)、颧小肌(Zygomaticus minor muscle)、提上唇肌(Levator labii superioris)、提上唇鼻翼肌(Levator labii superioris alaeque nasi muscle)、降下唇肌(Depressor labii inferioris muscle)、提口角肌(Levator anguli oris)、颊肌(Buccinator muscle)、颏肌(Mentalis))或舌肌(例如颏舌肌(genioglossus)、舌骨舌肌(hyoglossus)、小角舌肌(chondroglossus)、茎舌肌(styloglossus)、腭舌肌(palatoglossus)、舌上纵肌(superior longitudinal muscle)、舌下纵肌(inferior longitudinal muscle)、舌直肌(vertical muscle)和舌横肌(transverse muscle))。

[0585] (i)肌肉内注射:在一些实施例中,可以使用针将包含如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的组合物注射到受试者的既定肌肉的一个或多个部位,例如骨骼肌(例如三角肌、股外侧肌、背外侧肌的侧臀肌或婴儿的前外侧股)。包含ceDNA的组合物能够引入肌肉细胞的其它亚型中。肌肉细胞亚型的非限制性实施例包括骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和/或隔膜肌细胞。

[0586] 肌肉内注射的方法是所属领域的技术人员已知的,因此本文中不再详细描述。然而,当执行肌肉内注射时,应该基于患者的年龄和体型、组合物的粘度以及注射部位来确定适当的针头尺寸。表13提供了示范性注射部位和对应针尺寸的指南:

[0587] 表13:人类患者的肌肉内注射指南

[0588]

注射部位	***针头规格***	***针头尺寸***	***组合物的最大体积***
侧臀部位(臀中肌和臀小肌)	*水溶液*:20-25 号规格 *粘性或油性溶液*:18-21 号规格	成年瘦子:15 到 25 mm 成人平均:25 mm 较大体型成人(超过 150 lbs):25 到 38 mm。 儿童和婴儿:需要较小号针头	3 mL
股外侧肌	*水溶液*:20-25 号规格 *粘性或油性溶液*:18-21 号规格 儿童/婴儿:22 至 25 号规格	成人:25 mm 到 38 mm	3 mL
三角肌	22 到 25 号规格	男性: 130-260lbs:25 mm 女性: <130 lbs:16 mm 130-200 lbs:25mm >200lbs:38mm	1 mL

[0589] 在某些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是以小体积,例如表13中针对既定受试者所概述的示范性体积来配制。在一些实施例中,必要时,受试者在注射之前,能够施用全身或局部麻醉剂。如果需要多次注射,或如果注射更深的肌肉,而非

上文提及的常见注射部位,这是特别期望的。

[0590] 在一些实施例中,能够将肌肉内注射与以下组合:电穿孔、递送压力或使用转染试剂增强ceDNA载体的细胞吸收。

[0591] (ii)转染试剂:在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体被配制在包含一种或多种转染试剂的组合物中以便于载体吸收到肌管或肌肉组织中。因此,在一个实施例中,使用本文中别处所述的方法、通过转染将本文所述的核酸施用于肌肉细胞、肌管或肌肉组织。

[0592] (iii)电穿孔:在某些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是在不存在载剂下施用以便于ceDNA进入细胞中,或在生理学上惰性的药学上可接受的载剂(即,不改善或增强无衣壳非病毒载体吸收到肌管中的任何载剂)中施用。在此类实施例中,通过对细胞或组织进行电穿孔能够促进无衣壳非病毒载体的吸收。

[0593] 细胞膜天然地抵抗从细胞外传递到细胞的细胞质中。一种用于暂时减小这种抵抗力的方法是“电穿孔”,其中使用电场在细胞中产生孔隙而对细胞不引起持久性损伤。这些孔隙大足以允许DNA载体、药物、DNA和其它极性化合物触及细胞内部。细胞膜中的孔隙封闭并且细胞再次变得不可通透。

[0594] 电穿孔能够用于体外和体内应用中以将例如外源DNA引入活细胞中。体外应用典型地是将活细胞样品与包含例如DNA的组合物混合。然后将细胞放在电极(例如平行板)之间并且向细胞/组合物混合物施加电场。

[0595] 体内电穿孔的方法有多种;电极能够以多种配置提供,例如夹持表皮的测径规上覆于待治疗的细胞区域上。替代地,可以将针形电极插入组织中,从而更深地触及所定位的细胞。在任一情况下,将包含例如核酸的组合物注射到治疗区域之后,电极向所述区域施加电场。在一些电穿孔应用中,这个电场包含约10到60ms持续时间的约100到500V/cm的单一方波脉冲。此类脉冲可以通过例如Genetronics有限公司的分公司BTX制造的Electro Square Porator T820的已知应用产生。

[0596] 典型地,仅当肌肉在施用组合物(例如注射到肌肉中)之后立即或不久加以电刺激时才成功地发生例如核酸的吸收。

[0597] 在某些实施例中,使用电场脉冲或使用低电压/长脉冲治疗方案(例如使用方波脉冲电穿孔系统)达成电穿孔。能够产生脉冲电场的示范性脉冲发生器包括例如能够产生指数波形的ECM600,和能够产生方波形的ElectroSquarePorator(T820),两者均获自BTX,Genetronics有限公司的分公司(加利福尼亚州圣地亚哥)。方波电穿孔系统递送可控的电脉冲,其快速地升高到设定电压,在那个水平保持设定的时间长度(脉冲长度),然而快速地降到零。

[0598] 在一些实施例中,施用局部麻醉剂,例如通过在治疗部位注射以减少疼痛,所述疼痛可能与组织在包含如本文所述的无衣壳非病毒载体的组合物存在下电穿孔有关。另外,所属领域的技术人员将了解,应该选择最小化且/或防止过度组织损伤、以致肌肉发生纤维化、坏死或发炎的组合物剂量。

[0599] (iv)递送压力:在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体向肌肉组织的递送是通过递送压力来促进,所述递送压力使用大体积与快速注射到向肢体供应的动脉(例如髂动脉)的组合。这种施用模式能够通过多种方法达成,包括将包含ceDNA

载体的组合物输注到肢体血管中，典型地同时使用血管钳压脉带将肌肉与全身循环分隔。在一种方法中，组合物通过肢体血管循环以容许外渗到细胞中。在另一方法中，提高血管内流体动力学压力以扩展血管床且增强ceDNA载体吸收到肌肉细胞或组织中。在一个实施例中，将ceDNA组合物施用于动脉。

[0600] (v)脂质纳米粒子组合物：在一些实施例中，将用于肌肉内递送的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体配制在包含如本文其它地方所描述的脂质体的组合物中。

[0601] (vi)靶向肌肉组织的ceDNA载体的全身施用：在一些实施例中，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体被配制成通过间接递送施用来靶向肌肉，其中与肝脏相反，将ceDNA输送到肌肉。因此，本文所描述的技术涵盖向肌肉组织间接施用包含如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的组合物，例如通过全身施用。此类组合物能够通过体表、静脉内(通过集团或连续输注)、细胞内注射、组织内注射、经口、通过吸入、腹膜内、皮下、腔内施用，并且在必要时能够通过蠕动方式或通过所属领域的技术人员已知的其它方式递送。药剂能够全身性施用，例如通过静脉内输注(如果希望如此)。

[0602] 在一些实施例中，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体到肌肉细胞/组织中的吸收是通过使用优先将载体引导到肌肉组织的靶向剂或部分来增加。因此，在一些实施例中，相较于无衣壳ceDNA载体存在于身体的其它细胞或组织中的量，无衣壳ceDNA载体能够在肌肉组织中浓缩。

[0603] 在一些实施例中，包含如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的组合物进一步包含到肌肉细胞的靶向部分。在其它实施例中，所表达的基因产物包含对期望产生作用的组织具有特异性的靶向部分。靶向部分能包括能够靶向细胞或组织的细胞内、细胞表面或细胞外生物标志物、与其相互作用、与其偶联且/或结合至其的任何分子或分子复合物。生物标志物能包括例如细胞蛋白酶、激酶、蛋白质、细胞表面受体、脂质和/或脂肪酸。靶向部分能靶向、相互作用、偶联和/或结合到的生物标志物的其它实施例包括与特定疾病有关的分子。举例来说，生物标志物能够包括涉及癌症发展的细胞表面受体，例如表皮生长因子受体和运铁蛋白受体。靶向部分能够包括(但不限于)结合到靶肌肉组织中所表达的分子的合成化合物、天然化合物或产物、巨分子实体、生物工程化分子(例如多肽、脂质、多核苷酸、抗体、抗体片段)以及小实体(例如小分子、神经传递素、底物、配体、激素和元素化合物)。

[0604] 在某些实施例中，靶向部分可以进一步包含受体分子，包括例如天然地识别靶细胞中的特定期望分子的受体。此类受体分子包括已经修饰以增强其与靶分子相互作用的特异性的受体、已经修饰以与受体天然不识别的所期望靶分子相互作用的受体，以及此类受体的片段(参见例如Skerra，2000，《分子识别杂志(J.Molecular Recognition)》，13:167-187)。优选的受体是趋化因子受体。示范性趋化因子受体已经描述于例如Lapidot等人，2002，《实验血液学(Exp Hematol)》，30:973-81和Onuffer等人，2002，《制药学趋势(Trends Pharmacol Sci)》，23:459-67。

[0605] 在其它实施例中，另外的靶向部分可以包含配体分子，包括例如天然地识别靶细胞的特定期望受体的配体，例如运铁蛋白(Tf)配体。此类配体分子包括已经修饰以增强其与靶受体相互作用的特异性的配体、已经修饰以与配体天然不识别的期望受体相互作用的配体，和此类配体的片段。

[0606] 在仍其它实施例中,靶向部分可以包含适体。适体是经选择可特异性结合到靶细胞的期望分子结构的寡核苷酸。适体典型地是类似于噬菌体呈现亲和力选择(又称为体外分子进化)的亲和力选择方法的产物。所述方法涉及执行亲和力分离的若干次串联迭代,例如使用致病免疫原所结合的固体载体执行;随后执行聚合酶链反应(PCR)以扩增结合到免疫原的核酸。每一轮亲和力分离由此从核酸群体中富集成功地结合期望免疫原的分子。以这种方式,可以"培育"随机核酸池,从而产生特异性结合靶分子的适体。适体典型地是RNA,但可以是DNA或其类似物或衍生物,例如(不限于)肽核酸(PNA)和硫代磷酸酯核酸。

[0607] 在一些实施例中,靶向部分能够包含光可降解配体(即,'笼状'配体),所述配体通过例如聚焦光束释放,从而使无衣壳非病毒载体或基因产物靶向特定组织。

[0608] 本文还预期组合物递送到受试者的一种或多种肌肉的多个部位。也就是说,能够在至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95、至少100个注射部位中进行注射。此类部位相对于单一肌肉的区域能够扩展或能够在多种肌肉之间分布。

[0609] B.将用于表达FIX蛋白的ceDNA载体施用非肌肉位置

[0610] 在另一个实施例中,向肝脏施用用于表达FIX蛋白的ceDNA载体。可以将ceDNA载体施用眼睛的不同区域,例如角膜和/或视神经。还可以将ceDNA载体引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、垂体腺、黑质、松果体)、小脑、端脑(纹状体;包括枕骨、颞叶、顶叶和额叶的大脑;皮质;基底神经节;海马和杏仁核(portaamygdala))、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。ceDNA载体可以被递送到脑脊髓液中(例如通过腰椎穿刺)。可以在血脑屏障已经被扰动(例如脑瘤或大脑梗塞)的情况下进一步将用于表达FIX蛋白的ceDNA载体血管内施用CNS。

[0611] 在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以通过所属领域已知的任何途径施用眼睛的(多个)期望区域,所述途径包括但不限于鞘内、眼内、大脑内、脑室内、静脉内(例如在存在糖例如甘露糖醇下)、鼻内、耳内、眼内(例如玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如眼球筋膜囊下区(sub-Tenon's region))递送以及肌肉内递送和逆行递送到运动神经元。

[0612] 在一些实施例中,用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是在液体配制物中通过直接注射(例如立体定向注射)施用CNS中的期望区域或腔室中。在其它实施例中,可以通过局部施加到期望区域或通过鼻内施用气雾剂配制物来提供ceDNA载体。可以通过局部施加液滴来施用至眼睛。作为另一替代方案,ceDNA载体能够作为固体、缓释型配制物施用(参见例如美国专利第7,201,898号)。在另外的实施例中,ceDNA载体可用于逆行转运,以治疗、改善和/或预防涉及运动神经元的疾病和病症(例如肌萎缩性侧索硬化(ALS);脊髓性肌萎缩(SMA)等)。例如,可以将ceDNA载体递送至肌肉组织,它可以从肌肉组织迁移到神经元中。

[0613] C.离体治疗

[0614] 在一些实施例中,从受试者中去除细胞,将如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体引入其中,并且然后将细胞替换回到受试者中。从受试者取出细胞进行离体治疗、然后再引回到受试者中的方法是所属领域已知的(参见例如美国专利第5,399,346号;其公开内容整体并入本文中)。可替代地,将ceDNA载体引入另一个受试者的细胞,引入培养

细胞中,或引入任何其它适合来源的细胞中,并将细胞施用有需要的受试者。

[0615] 经如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体转导的细胞优选地以“治疗有效量”与药物载剂组合施用受试者。所属领域的技术人员将了解,治疗效果不必是完全的或治愈的,只要给受试者提供了一些益处即可。

[0616] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以编码如本文所描述的FIX蛋白(有时称为转基因或核酸序列),所述FIX蛋白是在细胞中体外、离体或体内产生的。举例来说,与在如本文所论述的治疗方法中使用本文所描述的ceDNA载体相比,在一些实施例中,可以将用于表达FIX蛋白的ceDNA载体引入所培养细胞中并且从细胞中分离出所表达的FIX蛋白,例如用于产生抗体和融合蛋白。在一些实施例中,包含如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的所培养细胞可以用于商业上生产抗体或融合蛋白,从而例如充当小规模或大规模生物制造抗体或融合蛋白的细胞源。在替代性实施例中,将如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体引入宿主非人类受试者的细胞中,用于体内产生抗体或融合蛋白,包括小规模生产以及商业上大规模FIX蛋白生产。

[0617] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于兽医学与医学应用中。如上所述的离体基因递送方法的合适受试者包括禽类(例如鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡和野鸡)和哺乳动物(例如人、牛、绵羊、山羊、马、猫、犬和兔),以哺乳动物为优选。人类受试者是最优选的。人类受试者包括新生儿、婴儿、青少年和成人。

[0618] D.剂量范围

[0619] 本文提供了治疗方法,其包含向受试者施用有效量的包含如本文所描述的编码FIX蛋白的ceDNA载体的组合物。如熟练的从业者将了解,术语“有效量”是指ceDNA组合物的施用量,所述量引起FIX蛋白以“治疗有效量”表达以用于治疗B型血友病。

[0620] 可以任选地采用体内和/或体外分析来帮助标识使用的最优剂量范围。配制物中使用的精确剂量还取决于施用途径和病状的严重程度,并且应该根据所属领域的技术人员的判断和每个受试者的情形来决定。有效剂量可以从衍生自体外或动物模型试验系统的剂量-反应曲线外推。

[0621] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体是以足以转染期望组织的细胞和足以提供足够水平的基因转移和表达而无不当副作用的量施用。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于上文在“施用”部分中所述的那些途径,例如直接递送至选定的器官(例如门静脉内递送至肝脏)、经口、吸入(包括鼻内和气管内递送)、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、肿瘤内和其它胃肠外施用途径。如果需要,施用途径可以组合。

[0622] 实现特定“治疗作用”所需的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的剂量将基于若干因素而变化,所述因素包括但不限于:核酸施用途径、实现治疗作用所需的基因或RNA表达水平、所治疗的特定疾病或病症以及(多种)基因、(多种)RNA产物或(多种)所产生的所表达的蛋白质的稳定性。所属领域的技术人员可以基于前述的因素以及所属领域中熟知的其它因素容易地确定治疗患有特定疾病或病症的患者的ceDNA载体剂量范围。

[0623] 剂量方案可以调整,以提供最优的治疗反应。例如,可以重复施用寡核苷酸,例如可以每天施用若干剂,或者可以根据治疗情况的紧急程度的指示,按比例减少剂量。所属领域的普通技术人员将能够容易地确定主题寡核苷酸的适当剂量和施用计划,无论所述寡核苷酸是将施用于细胞还是受试者。

[0624] “治疗有效剂量”将落在相对较宽的范围内，所述范围可以通过临床试验确定并将取决于特定应用(神经细胞将需要很少的量，而全身性注射将需要大量)。例如，对于体内直接注射到人类受试者的骨骼肌或心肌中，治疗有效剂量将为约1μg至100g左右的ceDNA载体。如果使用外泌体或微粒来递送ceDNA载体，那么可以通过实验确定治疗有效剂量，但预计递送1μg至约100g的载体。此外，治疗有效剂量是表达足量的转基因、从而对受试者起作用的ceDNA载体的量，其使得疾病的一种或多种症状减少，但不产生显著的脱靶或显著的不良副作用。在一个实施例中，“治疗有效量”为所表达的FIX蛋白的量，所述量足以使B型血友病生物标记物的表达产生统计学上显著的可测量变化或既定疾病症状减轻。指定的ceDNA载体组合物的此类有效量能够在临床试验以及动物研究中加以调整。

[0625] 药学上可接受的赋形剂和载剂溶液的配制物是所属领域的技术人员熟知的，开发在多种治疗方案中使用本文所描述的特定组合物的适合的剂量和治疗方案也是所属领域的技术人员熟知的。

[0626] 对于体外转染，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体递送到细胞(1×10^6个细胞)的有效量将为约0.1到100μg、优选1到20μg并且更优选1到15μg或8到10μg ceDNA载体。ceDNA载体越大，需要的剂量越高。如果使用外泌体或微粒，那么可以通过实验确定有效的体外剂量，但意图递送大致相同量的ceDNA载体。

[0627] 对于B型血友病治疗，如本文所公开的表达FIX蛋白的ceDNA载体的适当剂量将取决于待治疗的疾病的特定类型、FIX蛋白类型、B型血友病的严重性和病程、先前疗法、患者的临床史和对抗体的反应以及主治医师的判断。编码FIX蛋白的ceDNA载体适当地一次或在一系列治疗内施用患者。本文涵盖了各种给药排程，包括但不限于单次施用或在不同时间点内的多次施用、集团施用和脉冲输注。

[0628] 取决于疾病的类型和严重性，通过一次或多次单独施用或通过连续输注施用呈表达约0.3mg/kg到100mg/kg(例如15mg/kg-100mg/kg或在所述范围内的任何剂量)的经编码FIX蛋白的量的ceDNA载体。取决于上文所提及的因素，ceDNA载体的一种典型日剂量足以引起在约15mg/kg到100mg/kg或更大的范围内的经编码FIX蛋白的表达。ceDNA载体的一种示范性剂量为足以引起在约10mg/kg到约50mg/kg范围内的如本文所公开的经编码FIX蛋白的表达的量。因此，可以向患者施用一次或多次剂量的呈足以引起约0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、3mg/kg、4.0mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg(或其任何组合)的经编码FIX蛋白的表达的量的ceDNA载体。在一些实施例中，ceDNA载体为足以引起在50mg到2500mg范围内的总剂量的经编码FIX蛋白表达的量。ceDNA载体的示范性剂量为足以引起约50mg、约100mg、200mg、300mg、400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约720mg、约1000mg、约1050mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2050mg、约2100mg、约2200mg、约2300mg、约2400mg或约2500mg(或其任何组合)的经编码FIX蛋白的总表达的量。由于ceDNA载体对FIX蛋白的表达可以由本文中的调节开关小心地控制，或者，向受试者施用多次剂量的ceDNA载体，ceDNA载体对FIX蛋白的表达可以使得可以间歇地，例如每周、每两周、每三周、每四周、每月、每两个月、每三个月或每六个月从ceDNA载体施用所表达的FIX蛋白的剂量的方式进行控制。通过常规技术和分析能够监测此疗法的进展。

[0629] 在某些实施例中，施用足以引起15mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg或均一剂量例如300mg、500mg、700mg、800mg或更高的剂量的经编码FIX蛋白的表达的量的ceDNA载体。在一些实施例中，ceDNA载体对FIX蛋白的表达受到控制以使得FIX蛋白在一段时间内每天、每隔一天、每周、每2周或每4周进行表达。在一些实施例中，ceDNA载体对FIX蛋白的表达受到控制以使得FIX蛋白在一段时间内每2周或每4周进行表达。在某些实施例中，时间段是6个月、一年、十八个月、两年、五年、十年、15年、20年或患者一生。

[0630] 治疗可以涉及施用单次剂量或多次剂量。在一些实施例中，可以向受试者施用超过一次剂量；实际上，可以根据需要施用多次剂量，这是因为ceDNA载体因不存在病毒衣壳而不会引发抗衣壳宿主免疫反应。因此，所属领域的技术人员可以容易地确定适当剂量次数。施用的剂数可以例如1-100剂，优选地2-20剂的量级。

[0631] 在不希望受任何特定理论束缚的情况下，缺乏通过施用如本公开所描述的ceDNA载体(即，不存在衣壳组分)所引发的典型抗病毒免疫反应允许用于表达FIX蛋白的ceDNA载体在多种场合施用宿主。在一些实施例中，将核酸递送到受试者的场合数在2到10次范围内(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10次)。在一些实施例中，向受试者递送ceDNA载体超过10次。

[0632] 在一些实施例中，每个日历天(例如24小时时间段)向受试者施用一种剂量的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体不超过一次。在一些实施例中，每2个、3个、4个、5个、6个或7个日历天向受试者施用一剂ceDNA载体不超过一次。在一些实施例中，每个日历周(例如7个日历天)向受试者施用一种剂量的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体不超过一次。在一些实施例中，ceDNA载体的剂量施用受试者，每两周不超过一次(例如两个日历周时间段为一次)。在一些实施例中，每个日历月(例如30个日历天一次)向受试者施用一种剂量的ceDNA载体不超过一次。在一些实施例中，每六个日历月向受试者施用一种剂量的ceDNA载体不超过一次。在一些实施例中，每个日历年(例如365天或在闰年366天)向受试者施用一种剂量的ceDNA载体不超过一次。

[0633] 在一些实施例中，在第0天施用一种剂量的ceDNA载体。在第0天进行初始治疗后，可以在用ceDNA载体进行初始治疗后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周或约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月或约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年、约31年、约32年、约33年、约34年、约35年、约36年、约37年、约38年、约39年、约40年、约41年、约42年、约43年、约44年、约45年、约46年、约47年、约48年、约49年或约50年内执行第二次给药(重新给药)。

[0634] 根据一些实施例，重新给药治疗性核酸引起治疗性核酸的表达增加。根据一些实施例，与第一剂量之后治疗性核酸的表达相比，在重新给药之后治疗性核酸的表达在重新给药治疗性核酸之后增加高于约0.5倍到约10倍、约1倍到约5倍、约1倍到约2倍、或约0.5倍、约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍或约10倍。

[0635] 在特定实施例中，超过一次施用(例如两次、三次、四次或更多次施用)如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于在不同间隔的时间段内，例如每天、每周、每月、每年等实现所期望的基因表达水平。

[0636] 在一些实施例中，由如本文所公开的ceDNA载体编码的治疗性FIX蛋白可以通过调

节开关、可诱导或可抑制型启动子进行调节以使得其在受试者中表达至少1小时、至少2小时、至少5小时、至少10小时、至少12小时、至少18小时、至少24小时、至少36小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少1个月、至少2个月、至少6个月、至少12个月/一年、至少2年、至少5年、至少10年、至少15年、至少20年、至少30年、至少40年、至少50年或更长时间。在一个实施例中，通过在预定或期望的间隔时间反复施用本文所述的ceDNA载体能够达成表达。或者，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以进一步包含基因编辑系统的组分(例如CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸内切酶等)以准许插入一个或多个编码FIX蛋白的核酸序列以基本上永久地治疗或“治愈”疾病。包含基因编辑组分的所述ceDNA载体公开于国际申请PCT/US18/64242中，并且可以包括5’和3’同源臂(例如SEQ ID NO:151-154或与其具有至少40％、50％、60％、70％或80％同源性的序列)以将编码FIX蛋白的核酸，例如但不包括白蛋白基因或CCR5基因插入安全港区域中。举例来说，表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包含用于将FIX转基因插入基因组安全港中的至少一个基因组安全港(GSH)特异性同源臂，其公开于2019年3月1日提交的国际专利申请PCT/US2019/020225中，所述申请的全文通过引用并入本文中。

[0637] 如本文所描述，根据一些实施例，表达FIX蛋白的ceDNA载体可以与额外化合物组合施用。

[0638] 本文所公开的方法可以包含向受试者施用有效量的免疫抑制剂(例如TKI或其衍生物或盐)与治疗性核酸(例如包含编码FIX蛋白的核酸序列的ceDNA载体)的组合以改善遗传病症伴随充足程度的免疫反应减少，这允许安全施用治疗性核酸。这两种药剂能够以共同配制物的形式同时施用，也能够以不同配制物的形式同时施用，或者它们能够在不同的时间单独施用。

[0639] 在一些实施例中，可以向受试者同时施用一种或多种免疫抑制剂(或其衍生物或盐)和包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物。举例来说，所述方法可以包含向受试者施用免疫抑制剂和包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物，所述物质是作为两种单独配制物但同时施用的。在另一个实例中，所述方法可以包含向受试者同时施用在一种配制物中的免疫抑制剂和包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物，由此可以在同一时间向受试者施用免疫抑制剂和治疗性核酸。

[0640] 在一些实施例中，可以向受试者依序施用一种或多种免疫抑制剂(或其衍生物或盐)和包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物。举例来说，可以在施用药物组合物之前施用免疫抑制剂。

[0641] 在依序施用的情况下，在施用一种或多种免疫抑制剂和包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之间可能存在延迟期。举例来说，可以在施用包含如本文所描述的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之前数小时、数天或数周(例如，在施用治疗性核酸之前至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时、至少21小时、至少22小时、至少23小时、至少24小时、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约1周、至少约2周、至少约3周和至少约4周)施

用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约三十(30)分钟施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约一(1)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约两(2)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约三(3)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用治疗性核酸之前约四(4)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约五(5)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约六(6)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约七(7)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约八(8)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约九(9)小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用药物组合物之前约十(10)小时施用免疫抑制剂。

[0642] 在一个实施例中，在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之前不超过约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或24小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之前不超过约1天、约2天、约3天、约4天、约6天或约7天施用免疫抑制剂。

[0643] 在一些实施例中，可以在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之后约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或24小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之后约1天、约2天、约3天、约4天、约6天或约7天施用免疫抑制剂。

[0644] 在一个实施例中，在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之后不超过约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或24小时施用免疫抑制剂。在一些实施例中，可以在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之后不超过约1天、约2天、约3天、约4天、约6天或约7天施用免疫抑制剂。

[0645] 在一些实施例中，可以在施用包含用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物之前、同时和/或之后多次施用一种或多种免疫抑制剂。

[0646] 在一些实施例中，ceDNA载体可以联合本文所公开的一种或多种免疫抑制剂一起多次施用和重新给药。举例来说，ceDNA载体可以在第0天与一种或多种免疫抑制剂一起施用，所述一种或多种免疫抑制剂是在第一给药方案中施用治疗性核酸之前、之后或同时施用。在第0天进行初始治疗后，可以在用ceDNA载体，优选地用本文所公开的一种或多种免疫抑制剂进行初始治疗之后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、或约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、或约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年、约31年、约32年、约33年、约34年、约35年、

约36年、约37年、约38年、约39年、约40年、约41年、约42年、约43年、约44年、约45年、约46年、约47年、约48年、约49年或约50年内执行第二次给药(重新给药)。

[0647] 治疗持续时间视受试者的临床进展和对治疗的反应而定。初始较高治疗剂量之后,预期为连续的相对较低维持剂量。

[0648] E.单位剂型

[0649] 在一些实施例中,包含如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的药物组合物可以便利地以单位剂型呈现。单位剂型通常将适于药物组合物的一种或多种特定施用途径。在一些实施例中,单位剂型适合于直接施用到眼睛的液滴。在一些实施例中,单位剂型适合于通过吸入施用。在一些实施例中,单位剂型适合于通过汽化器施用。在一些实施例中,单位剂型适合于通过喷雾器施用。在一些实施例中,单位剂型适合于通过气雾器施用。在一些实施例中,单位剂型适合于经口施用、经颊施用或舌下施用。在一些实施例中,单位剂型适合于静脉内、肌肉内或皮下施用。在一些实施例中,单位剂型适合于视网膜下注射、脉络膜上注射或玻璃体内注射。

[0650] 在一些实施例中,单位剂型适合于鞘内或脑室内施用。在一些实施例中,配制药物组合物以供局部施用。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将通常是化合物产生治疗效果的量。

[0651] X.治疗方法

[0652] 本文所描述的技术还通过多种方式,包括例如离体、非原位、体外和体内应用、方法、诊断程序和/或基因疗法方案展现了用于制造所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法以及使用所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法。

[0653] 在一个实施例中,由如本文所公开的ceDNA载体表达的所表达的治疗性FIX蛋白具有治疗疾病的功能。在一个优选实施例中,治疗性FIX蛋白不引起免疫系统反应,除非期望如此。

[0654] 本文提供了治疗受试者的B型血友病的方法,其包含将治疗有效量的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体和任选的药学上可接受的载剂引入受试者的有需要的靶细胞(例如肌肉细胞或组织或其它受影响的细胞类型)中。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入,但此类载剂不是必需的。所建构的ceDNA载体包含可用于治疗疾病的如本文所描述的编码FIX蛋白的核酸序列。确切地说,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以包含可操作地连接到控制元件的期望FIX蛋白DNA序列,所述控制元件能够在由外源性DNA序列编码的期望FIX蛋白引入受试者中时引导其转录。如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以通过如上文和本文其它地方所提供的任何适合的途径施用。

[0655] 本文公开了如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体组合物和配制物,其包括本公开的一种或多种ceDNA载体以及一种或多种药学上可接受的缓冲剂、稀释剂或赋形剂。所述组合物可以包括于一种或多种诊断或治疗试剂盒中以用于诊断、预防、治疗或改善B型血友病的一种或多种症状。在一个方面中,疾病、损伤、病症、创伤或功能障碍为人类疾病、损伤、病症、创伤或功能障碍。

[0656] 本文所描述的技术的另一个方面提供了向有需要的受试者提供诊断或治疗有效量的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的方法,所述方法包含向有需要的受试者的细胞、组织或器官提供一定量的如本文所公开的ceDNA载体,并且持续有效实现ceDNA

载体表达FIX蛋白的时间，由此向受试者提供诊断或治疗有效量的由ceDNA载体表达的FIX蛋白。在另一方面，受试者为人。

[0657] 本文所描述的技术的另一个方面提供了用于诊断、预防、治疗或改善受试者的B型血友病、病症、功能障碍、损伤、异常病况或创伤的至少一种或多种症状的方法。在整体和一般意义上，所述方法至少包括以足以诊断、预防、治疗或改善受试者的疾病、病症、功能障碍、损伤、异常病况或创伤的一种或多种症状的量并持续足以诊断、预防、治疗或改善受试者的疾病、病症、功能障碍、损伤、异常病况或创伤的一种或多种症状的时间向有需要的受试者施用一种或多种所公开的用于产生FIX蛋白的ceDNA载体的步骤。在此类实施例中，可以评估受试者的FIX蛋白的功效，或者，检测受试者的FIX蛋白或FIX蛋白的组织位置(包括细胞和亚细胞位置)。因此，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用作体内诊断工具，例如用于检测癌症或其它适应症。在另一方面，受试者为人。

[0658] 另一个方面为如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体用作用于治疗或减轻B型血友病或疾病状态的一种或多种症状的工具的用途。有许多遗传疾病中的缺陷基因是已知的，并且通常分为两类：缺陷状态，通常是酶，一般以隐性方式遗传；和不平衡状态，其可以涉及调节蛋白或结构蛋白，并且通常但不总是以显性方式遗传。对于不平衡的疾病状态，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于在模型系统中创建B型血友病状态，然后可以使用所述模型系统尝试抵消疾病状态。因此，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体准许治疗遗传疾病。如本文所使用，可以通过部分或完全拯救导致疾病或使其更严重的缺陷或不平衡来治疗B型血友病状态。

[0659] A.宿主细胞

[0660] 在一些实施例中，如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体将FIX蛋白转基因递送到受试者宿主细胞中。在一些实施例中，细胞是感光细胞。在一些实施例中，细胞是RPE细胞。在一些实施例中，受试者的宿主细胞是人宿主细胞，包括例如血细胞、干细胞、造血细胞、$CD34^+$细胞、肝细胞、癌细胞、血管细胞、肌肉细胞、胰腺细胞、神经细胞、视觉或视网膜细胞、上皮或内皮细胞、树突状细胞、成纤维细胞或任何其它哺乳动物来源的细胞，包括但不限于肝(即肝)细胞、肺细胞、心脏细胞、胰腺细胞、肠细胞、隔膜细胞、肾(即肾)细胞、神经细胞、血细胞、骨髓细胞或预期进行基因治疗的受试者的任何一种或多种选定的组织。在一方面，受试者的宿主细胞是人类宿主细胞。

[0661] 本公开还涉及如上文所提及的重组宿主细胞，其包括如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体。因此，对于熟练技术人员而言显而易见的是，人们可以取决于目的使用多种宿主细胞。将包括供体序列的如本文所公开的用于表达FIX蛋白的构建体或ceDNA载体引入宿主细胞中以使得供体序列维持为染色体整合体，如早先所描述。术语宿主细胞涵盖由于复制过程中发生的突变而与亲本细胞不同的亲本细胞的任何后代。宿主细胞的选择在很大程度上取决于供体序列和其来源。

[0662] 宿主细胞还可以是真核生物，例如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。在一个实施例中，宿主细胞是人细胞(例如原代细胞、干细胞或永生化细胞系)。在一些实施例中，可以向宿主细胞离体施用如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体并且然后在基因疗法事件之后递送到受试者。宿主细胞可以是任何细胞类型，例如体细胞或干细胞、诱导型多能干细胞或血细胞，例如T细胞或B细胞，或骨髓细胞。在某些实施例中，宿主细胞是同种异体

细胞。例如,T细胞基因组工程可用于癌症免疫疗法、如HIV疗法的疾病调节(例如受体敲除,如CXCR4和CCR5)和免疫缺陷疗法。可靶向B细胞上的MHC受体进行免疫治疗。在一些实施例中,能够将基因经修饰宿主细胞(例如骨髓干细胞,例如$CD34^+$细胞,或诱导多能干细胞)移植回到患者中用于表达治疗蛋白。

[0663] B.基因疗法针对的额外疾病

[0664] 一般来说,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于递送上文说明书的任何FIX蛋白以治疗、预防或改善与受试者的异常蛋白质表达或基因表达有关的B型血友病相关症状。

[0665] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于将FIX蛋白递送到骨骼肌、心肌或隔膜肌,以产生FIX蛋白用于血液中的分泌和循环或用于全身递送到其它组织,从而治疗、改善和/或预防B型血友病。

[0666] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以通过任何适合的方式,任选地通过施用受试者所吸入的包含ceDNA载体的可吸入粒子的气雾剂悬浮液来施用受试者的肺。可吸入粒子可以是液体或固体。包含ceDNA载体的液体粒子的气雾剂可以通过任何合适的手段产生,例如用压力驱动的气雾剂喷雾器或超声喷雾器,如所属领域的技术人员所知。参见例如美国专利第4,501,729号。包含ceDNA载体的固体粒子的气雾剂也可以通过制药领域已知的技术,用任何固体粒子药物气雾剂发生器产生。

[0667] 在一些实施例中,如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以施用CNS组织(例如大脑、眼睛)。在一些实施例中,可以向CNS组织,例如眼部组织施用用于表达FIX蛋白的ceDNA载体来治疗与血友病相关的眼部出血。

[0668] 在一些方面中,连接到报告多肽的表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于诊断目的,以及用于测定ceDNA载体在其所施用的受试者中的功效或用作ceDNA载体在所述受试者中的活性的标记物。

[0669] C.使用ceDNA载体测试成功的基因表达

[0670] 所属领域中熟知的分析可以用于测试ceDNA载体对FIX蛋白的基因递送的效率,所述测试可以在体外和体内模型中执行。所属领域的技术人员可以通过测量FIX蛋白的mRNA和蛋白质含量(例如逆转录PCR、蛋白质印迹分析和酶联免疫吸附分析(ELISA))来评估ceDNA对FIX蛋白的表达水平。在一个实施例中,ceDNA包含报告蛋白,所述报告蛋白可以用于评估FIX蛋白的表达,例如通过利用荧光显微术或发光读盘器检查报告蛋白的表达。对于体内应用,蛋白质功能分析可以用于测试既定FIX蛋白的功能以确定基因表达是否成功进行。熟练的技术人员能够确定用于测量由ceDNA载体体外或体内表达的FIX蛋白的功能的最佳测试。

[0671] 本文预期在细胞或受试者中ceDNA载体对FIX蛋白的基因表达的效应可以持续至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少四个月、至少5个月、至少六个月、至少10个月、至少12个月、至少18个月、至少2年、至少5年、至少10年、至少20年,或可以永久。

[0672] 在一些实施例中,本文所描述的表达盒、表达构建体或ceDNA载体中的FIX蛋白可以针对宿主细胞进行密码子优化。

[0673] D.通过评估ceDNA载体对FIX蛋白的表达来测定功效

[0674] 所属领域中已知的用于测定蛋白质表达的基本上任何方法都可以用于分析ceDNA

载体对FIX蛋白的表达。此类方法/分析的非限制性实施例包括酶联免疫分析(ELISA)、亲和力ELISA、ELISPOT、连续稀释、流式细胞术、表面等离子体共振分析、动力学排除分析、质谱学、蛋白质印迹、免疫沉淀和PCR。

[0675] 为了评估体内FIX蛋白表达表达,可以从受试者获得生物样品用于分析。示范性生物样品包括生物流体样品、体液样品、血液(包括全血)、血清、血浆、尿液、唾液、切片和/或组织样品等。生物样品或组织样品还可以指从个体中分离出的组织或流体样品,包括(但不限于)肿瘤切片、粪便、脊髓液、胸膜液、乳头抽出物、淋巴液、皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外部切片、泪液、唾液、母乳、细胞(包括(但不限于)血细胞)、肿瘤、器官,以及体外细胞培养液成分的样品。术语还包括上述样品的混合物。术语“样品”还包括未治疗或预治疗(或预处理)的生物样品。在一些实施例中,用于本文描述的分析和方法的样品包含从待测受试者收集的血清样品。

[0676] E.通过临床参数测定所表达的FIX蛋白的功效

[0677] 由ceDNA载体表达的既定FIX蛋白对B型血友病的功效(即功能性表达)可以由熟练的临床医师测定。然而,在本文使用“有效治疗”时,如果B型血友病的病征或症状中的任一者或全部以有益方式改变,或疾病的其它临床上接受的症状或标记物在用如本文所描述的编码治疗性FIX蛋白的ceDNA载体治疗之后改良或改善例如至少10%,那么认为治疗为“有效治疗”。还可以根据个体未发生恶化来测量功效,如根据B型血友病的稳定或对医疗干预的需求所评估(即,疾病的发展停止或至少减缓)。测量这些指标的方法是所属领域的技术人员已知的和/或描述于本文中。治疗包括对个体或动物(一些非限制性实例包括人类或哺乳动物)的疾病的任何治疗,并且包括:(1)抑制,例如遏制B型血友病,或减缓B型血友病的发展;或(2)缓解B型血友病,例如引起B型血友病症状消退;和(3)预防B型血友病发展或降低B型血友病发展的可能性,或预防与B型血友病相关的继发性疾病/病症。当本文定义有效治疗时,治疗疾病的有效量意味着当施用有需要的哺乳动物时足以对所述疾病产生有效治疗的量。药剂功效可以通过评估B型血友病所特有的身体指标来测定。医师可以评估包括以下的B型血友病临床症状中的任一者或多者:**(i)血清因子IX减少。FIX减少为B型血友病治疗研发的关键生物标记物。

[0678] XI.表达抗体或融合蛋白的ceDNA载体的各种应用

[0679] 如本文所公开,如本文所描述的组合物和用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以出于一系列目的用于表达FIX蛋白。在一个实施例中,表达FIX蛋白的ceDNA载体可以用于产生具有转基因的体细胞转基因动物模型,例如用于研究功能或B型血友病的疾病发展。在一些实施例中,表达FIX蛋白的ceDNA载体可用于治疗、预防或改善哺乳动物受试者的B型血友病状态或病症。

[0680] 在一些实施例中,FIX蛋白在受试者中可以以足以治疗与基因产物的表达增强、活性提高或基因的不当上调有关的疾病的量由ceDNA载体表达。

[0681] 在一些实施例中,FIX蛋白在受试者中可以以足以治疗在蛋白质的表达减少、缺乏表达或功能障碍情况下的B型血友病的量由ceDNA载体表达。

[0682] 所属领域的普通技术人员应了解,转基因可以不为待自身转录的基因的开放阅读框;相反,其可以为靶基因的启动子区或抑制因子区,并且ceDNA载体可以修饰所述区域,因此如此调节了FIX基因的表达。

[0683] 如本文所公开的组合物和用于表达FIX蛋白的ceDNA载体可以出于如上文所描述的各种目的用于递送FIX蛋白。

[0684] 在一些实施例中,转基因编码一种或多种FIX蛋白,所述FIX蛋白可用于治疗、改善或预防哺乳动物受试者的B型血友病状态。向患者施用呈足以治疗与异常基因序列相关的B型血友病的量的由ceDNA载体表达的FIX蛋白,这可以产生以下中的任一者或多者:蛋白质表达增强、优先于蛋白质活性、表达减少、缺乏靶基因或蛋白质的表达或功能障碍。

[0685] 在一些实施例中,设想如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体用于诊断和筛检方法中,其中FIX蛋白在细胞培养系统中或者在转基因动物模型中短暂地或稳定地表达。

[0686] 本文所描述的技术的另一个方面提供了用如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体转导哺乳动物细胞群体的方法。在整体和一般意义上,所述方法至少包括将包含有效量的一种或多种如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体的组合物引入群体的一个或多个细胞中的步骤。

[0687] 另外,本公开提供了包括一种或多种如本文所公开的用于表达FIX蛋白的所公开ceDNA载体的组合物以及治疗和/或诊断试剂盒、或用一种或多种额外成分配制或根据其一个或多个使用指令制备的ceDNA组合物。

[0688] 如本文所公开的用于表达FIX蛋白的ceDNA载体所施用的细胞可以为任何类型,包括但不限于神经细胞(包括末梢和中枢神经系统的细胞,尤其大脑细胞)、肺细胞、视网膜细胞、上皮细胞(例如肠道和呼吸道上皮细胞)、肌肉细胞、树突状细胞、胰腺细胞(包括胰岛细胞)、肝细胞、心肌细胞、骨细胞(例如骨髓干细胞)、造血干细胞、脾细胞、角质细胞、纤维母细胞、内皮细胞、前列腺细胞、生殖细胞等等。可替代地,细胞可以是任何祖细胞。作为另一个替代方案,细胞可以是干细胞(例如神经干细胞、肝干细胞)。作为又一个替代方案,细胞可以是癌细胞或肿瘤细胞。此外,如上文指出,细胞可以来自任何物种来源。

[0689] A.生产和纯化表达FIX的ceDNA载体

[0690] 本文所公开的ceDNA载体将用于体外或体内产生FIX蛋白。以这种方式产生的FIX蛋白可以分离出来,针对期望功能加以测试,并且经过纯化以便进一步用于研究中或用作治疗性治疗。每种蛋白产生系统具有其自身的优点/缺点。虽然体外产生的蛋白能够轻松地纯化且能够在短时间内产生蛋白,但体内产生的蛋白能够具有转译后修饰,例如糖基化。

[0691] 使用ceDNA载体产生的FIX治疗蛋白可以使用所属领域的技术人员已知的任何方法,例如离子交换色谱、亲和色谱、沉淀或电泳来纯化。

[0692] 通过本文所描述的方法和组合物产生的FIX治疗蛋白可以针对与期望靶蛋白的结合加以测试。

[0693] 实例

[0694] 通过说明而非限制的方式提供了以下实例。所属领域的普通技术人员将了解,可以从本文所述的任何野生型或修饰ITR中构建ceDNA载体,并且以下示范性方法可以用于构建和评估这类ceDNA载体的活性。虽然这些方法以某些ceDNA载体为例,但它们适用于符合描述的任何ceDNA载体。

[0695] 实例1:使用基于昆虫细胞的方法构建ceDNA载体

[0696] 使用多核苷酸构建体模板生产ceDNA载体描述于PCT/US18/49996的实例1中,其通

过引用整体并入本文。举例来说,用于产生本公开的ceDNA载体的多核苷酸构建体模板可以为ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒。不受理论束缚,在准许的宿主细胞中,在例如Rep存在下,具有两个对称ITR(其中至少一个ITR相对于野生型ITR序列经修饰)和表达构建体的多核苷酸构建体模板复制而产生ceDNA载体。ceDNA载体产生经历两个步骤:第一,通过Rep蛋白从模板主链(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒、ceDNA杆状病毒基因组等)中切除("拯救")模板;以及第二,Rep介导所切除的ceDNA载体复制。

[0697] 产生ceDNA载体的一种示范性方法是从如本文所描述的ceDNA质粒产生。参考图1A和1B,ceDNA质粒中的每一种的多核苷酸构建体模板均包括左修饰ITR和右修饰ITR,在ITR序列之间具有以下:(i)增强子/启动子;(ii)转基因的克隆位点;(iii)转录后反应元件(例如,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE));以及(iv)聚腺苷酸化信号(例如,来自牛生长激素基因(BGHpA))。在每个组分之间还引入了独特的限制性核酸内切酶识别位点(R1-R6)(图1A和图1B中所示),以便于将新的遗传组分引入构建体中的特定位点。将R3(PmeI)GTTTAAAC(SEQ ID NO:123)和R4(PacI)TTAATTAA(SEQ ID NO:124)酶位点工程改造成克隆位点以引入转基因的开放阅读框。将这些序列克隆到从ThermoFisher Scientific获得的pFastBac HT B质粒中。

[0698] ceDNA杆粒的产生:

[0699] 依循根据制造商说明书的方案,用测试或对照质粒转化DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY® DH10Bac™感受态细胞,赛默飞世尔)。诱导DH10Bac细胞中质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组ceDNA杆粒。通过以下方法来选择重组杆粒:在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上利用抗生素基于大肠杆菌中的蓝白筛选来筛选阳性选择(Φ80dlacZΔM15标志物提供了来自杆粒载体的β-半乳糖苷酶基因的α-互补),以选择转化体并维持杆粒和转座酶质粒。挑选出由破坏β-半乳糖苷指示基因的转座所造成的白色菌落,并在10ml培养基中进行培养。

[0700] 从大肠杆菌中分离重组ceDNA杆粒,并使用FugeneHD将其转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中以产生感染性杆状病毒。将附着性Sf9或Sf21昆虫细胞在25℃下在T25烧瓶内的50ml培养基中进行培养。四天后,从细胞去除培养基(含有P0病毒),将培养基通过0.45μm过滤器过滤,从细胞或细胞碎片中分离出感染性杆状病毒粒子。

[0701] 任选地,第一代杆状病毒(P0)通过在50到500ml培养基中感染原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增。将细胞在回转式振荡培育箱的悬浮培养液中、在130rpm下、在25℃下维持,监测细胞直径和存活率,直到细胞达到18-19nm直径(从14-15nm的原初直径)和～4.0E+6个细胞/mL的密度。感染后第3天到第8天,利用离心去除细胞和残骸、然后通过0.45μm过滤器过滤来收集培养基中的P1杆状病毒粒子。

[0702] 收集包括测试构建体的ceDNA杆状病毒,并测定杆状病毒的感染活性或滴度。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理4×20ml 2.5E+6个细胞/ml的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并且在25℃-27℃下温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及持续4到5天的每天的细胞活力的变化来测定感染性。

[0703] 如PCT/US18/49996的图8A中所公开的"Rep质粒"(所述文献以全文引用的方式并入本文中)在pFASTBAC™-Dual表达载体(赛默飞世尔)中产生,所述表达载体包含Rep78(SEQ ID NO:131或133)和Rep52(SEQ ID NO:132)或Rep68(SEQ ID NO:130)和Rep40(SEQ ID NO:

129)。依循制造商提供的方案,将Rep质粒转化到DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY® DH10Bac™感受态细胞(赛默飞世尔))中。诱导DH10Bac细胞中Rep质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组杆粒("Rep杆粒")。通过阳性选择来选择重组杆粒,所述阳性选择包含在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上在大肠杆菌中进行蓝白筛选(Φ80dlacZΔM15标志物提供了来自杆粒载体的β-半乳糖苷酶基因的α-互补)。挑选分离的白色菌落,并接种到10ml选择培养基(含卡那霉素、庆大霉素、四环素的LB培养液)中。从大肠杆菌中分离出重组杆粒(Rep杆粒),并将Rep杆粒转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中,以产生感染性杆状病毒。

[0704] 将Sf9或Sf21昆虫细胞在50ml培养基中培养4天,并从培养物中分离感染性重组杆状病毒("Rep杆状病毒")。任选地,第一代Rep杆状病毒(P0)通过感染原生Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增并且在50ml到500ml培养基中培养。在感染后3天与8天之间,通过离心或过滤或其它分级分离方法分离细胞来收集培养基中的P1杆状病毒粒子。收集Rep杆状病毒并测定杆状病毒的感染活性。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理四个20mL的$2.5x10^6$个细胞/mL的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0705] ceDNA载体产生和表征

[0706] 参考图4B,然后将含有(1)含有ceDNA杆粒或ceDNA杆状病毒的样品和(2)上述Rep杆状病毒二者之一的Sf9昆虫细胞培养基分别以1:1000和1:10,000的比率加入到新鲜的Sf9细胞培养物(2.5E+6个细胞/毫升,20ml)中。然后将细胞在25℃下以130rpm培养。共同感染4-5天后,检测细胞直径和活力。当细胞直径达到18nm-20nm并且活力为约70%-80%时,将细胞培养物离心,去除培养基,并收集细胞团粒。首先将细胞团粒悬浮于适量的水性介质,即水或缓冲液中。使用凯杰(Qiagen)MIDI PLUSTM纯化方案(凯杰,每个柱处理0.2mg细胞团粒质量)从细胞中分离并纯化ceDNA载体。

[0707] 初始基于260nm下的UV吸光度,测定从Sf9昆虫细胞产生和纯化的ceDNA载体的产量。

[0708] 可以通过如图4D所示在天然或变性条件下的琼脂糖凝胶电泳进行标识来评估ceDNA载体,其中(a)在限制性核酸内切酶裂解和凝胶电泳分析后,对比天然凝胶,变性凝胶上存在以两倍大小迁移的特征色带;以及(b)在未裂解物质的变性凝胶上存在单体和二聚体(2x)色带是ceDNA载体存在的特征。

[0709] 通过用限制性核酸内切酶消化从共同感染的Sf9细胞(如本文所述)获得的DNA,进一步分析分离的ceDNA载体的结构,所述限制性核酸内切酶是针对以下条件选择的:a)在ceDNA载体内仅存在单个切割位点;和b)所得到的片段足够大,以便在0.8%变性琼脂糖凝胶上进行分级分离时被清楚看到(>800bp)。如图4D和图4E所示,具有非连续结构的线性DNA载体以及具有线性且连续结构的ceDNA载体可以通过它们反应产物的大小来区分-例如,预计具有非连续结构的DNA载体将产生1kb和2kb片段,而具有连续结构的非衣壳化载体预计产生2kb和4kb片段。

[0710] 因此,为了以定性方式证明分离的ceDNA载体是根据定义所要求那样共价封闭端的,将样品用在特定DNA载体序列的背景下被标识为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化,优选产生两个大小不等的裂解产物(例如1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后,线性、非共价封闭的DNA将以1000bp和2000bp大小

分解,而共价封闭的DNA(即ceDNA载体)将以2倍大小分解(2000bp和4000bp),这是因为两条DNA链是连接的并且现在伸展且长度翻倍(尽管是单链)。此外,由于多聚体DNA载体的端对端连接,对单体、二聚体和n聚体形式的DNA载体的消化都将分解为相同大小的片段(参见图4D)。

[0711] 如本文所使用的,短语"通过在天然凝胶和变性条件下的琼脂糖凝胶电泳标识DNA载体的分析"是指通过进行限制性核酸内切酶消化,然后对消化产物进行电泳评估来评估ceDNA封闭端的分析。后面是一种这样的示范性分析,尽管所属领域的普通技术人员将了解,对这个实例可以进行许多所属领域已知的变化。选择限制性核酸内切酶作为所关注的ceDNA载体的单切酶,其将产生DNA载体长度的大致1/3x和2/3x的产物。由此使天然凝胶和变性凝胶上的色带解析。变性之前,重要的是从样品中去除缓冲液。Qiagen PCR纯化试剂盒或脱盐"离心柱"(例如GE HEALTHCARE ILUSTRA™ MICROSPIN™ G-25柱)是所属领域中已知用于内切核酸酶消化的一些选项。所述分析包括例如:i)用适当的限制性核酸内切酶消化DNA;2)施加于例如Qiagen PCR清洁试剂盒,用蒸馏水洗脱;iii)加入10x变性溶液(10x=0.5M NaOH、10mM EDTA),加入10X染料,不进行缓冲,并与通过添加入10X变性溶液至4x而制备的DNA序列梯一起,在预先与1mM EDTA和200mM NaOH一起培育以确保凝胶和凝胶盒中的NaOH浓度均匀的0.8-1.0%凝胶上进行分析,并在1x变性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)存在下跑动凝胶。所属领域的普通技术人员将了解基于所得物的大小和期望的计时使用什么电压来跑动电泳。电泳后,将凝胶排出并在1×TBE或TAE中进行中和,并转移到蒸馏水或含1×SYBR金的1×TBE/TAE中。然后使用例如赛默飞世尔SYBR®金核酸凝胶染色剂(DMSO中的10,000×浓缩液)和落射荧光(蓝色)或UV(312nm)使带可视化。

[0712] 产生的ceDNA载体的纯度可以使用任何所属领域已知的方法来评估。作为一个示范性和非限制性方法,通过对ceDNA载体的荧光强度与标准进行比较,能够估计ceDNA质粒对样品的总体UV吸光度的贡献。举例来说,若基于UV吸光度将4μg ceDNA载体装载于凝胶上并且ceDNA载体荧光强度等效于已知是1μg的2kb色带,则存在1μg ceDNA载体,且ceDNA载体是总UV吸收材料的25%。然后将凝胶上的带强度相对于带表示的计算输入作图-例如,如果总ceDNA载体是8kb,而切下的比较带为2kb,那么带强度将按总输入的25%绘制,在这种情况下,对于1.0μg输入,将为.25μg。使用ceDNA载体质粒滴定来绘制标准曲线,然后使用回归线方程计算ceDNA载体色带的量,然后可用于测定ceDNA载体所占的总输入的百分比或纯度百分比。

[0713] 出于比较目的,实施例1描述了使用基于昆虫细胞的方法和多核苷酸构建体模板产生ceDNA载体,并且还描述于PCT/US18/49996的实施例1中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。举例来说,用于根据实例1产生本公开的ceDNA载体的多核苷酸构建体模板可以为ceDNA质粒、ceDNA杆粒和/或ceDNA杆状病毒。不受理论束缚,在准许的宿主细胞中,在例如Rep存在下,具有两个对称ITR(其中至少一个ITR相对于野生型ITR序列经修饰)和表达构建体的多核苷酸构建体模板复制而产生ceDNA载体。ceDNA载体产生经历两个步骤:第一,通过Rep蛋白从模板主链(例如ceDNA质粒、ceDNA杆粒、ceDNA杆状病毒基因组等)中切除("拯救")模板;以及第二,Rep介导所切除的ceDNA载体复制。

[0714] 在使用昆虫细胞的方法中产生ceDNA载体的示范性方法是通过如本文所述的ceDNA质粒。参考图1A和1B,ceDNA质粒中的每一种的多核苷酸构建体模板均包括左修饰ITR

和右修饰ITR,在ITR序列之间具有以下:(i)增强子/启动子;(ii)转基因的克隆位点;(iii)转录后反应元件(例如,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE));以及(iv)聚腺苷酸化信号(例如,来自牛生长激素基因(BGHpA))。在每个组分之间还引入了独特的限制性核酸内切酶识别位点(R1-R6)(图1A和图1B中所示),以便于将新的遗传组分引入构建体中的特定位点。将R3(PmeI)GTTTAAAC(SEQ ID NO:123)和R4(PacI)TTAATTAA(SEQ ID NO:124)酶位点工程改造成克隆位点以引入转基因的开放阅读框。将这些序列克隆到从ThermoFisher Scientific获得的pFastBac HT B质粒中。

[0715] ceDNA杆粒的产生:

[0716] 依循根据制造商说明书的方案,用测试或对照质粒转化DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY®DH10Bac™感受态细胞,赛默飞世尔)。诱导DH10Bac细胞中质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组ceDNA杆粒。通过以下方法来选择重组杆粒:在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上利用抗生素基于大肠杆菌中的蓝白筛选来筛选阳性选择(Φ80dlacZΔM15标志物提供了来自杆粒载体的β-半乳糖苷酶基因的α-互补),以选择转化体并维持杆粒和转座酶质粒。挑选出由破坏β-半乳糖苷指示基因的转座所造成的白色菌落,并在10ml培养基中进行培养。

[0717] 从大肠杆菌中分离重组ceDNA杆粒,并使用FugeneHD将其转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中以产生感染性杆状病毒。将附着性Sf9或Sf21昆虫细胞在25℃下在T25烧瓶内的50ml培养基中进行培养。四天后,从细胞去除培养基(含有P0病毒),将培养基通过0.45μm过滤器过滤,从细胞或细胞碎片中分离出感染性杆状病毒粒子。

[0718] 任选地,第一代杆状病毒(P0)通过在50到500ml培养基中感染原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增。将细胞在回转式振荡培育箱的悬浮培养液中、在130rpm下、在25℃下维持,监测细胞直径和存活率,直到细胞达到18-19nm直径(从14-15nm的原初直径)和～4.0E+6个细胞/mL的密度。感染后第3天到第8天,利用离心去除细胞和残骸、然后通过0.45μm过滤器过滤来收集培养基中的P1杆状病毒粒子。

[0719] 收集包括测试构建体的ceDNA杆状病毒,并测定杆状病毒的感染活性或滴度。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理4×20ml 2.5E+6个细胞/ml的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并且在25℃-27℃下温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0720] 使“Rep质粒”在pFASTBAC™-Dual表达载体(赛默飞世尔)中产生,所述表达载体包含Rep78(SEQ ID NO:131或133)或Rep68(SEQ ID NO:130)和Rep52(SEQ ID NO:132)或Rep40(SEQ ID NO:129)。依循制造商提供的方案,将Rep质粒转化到DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY®DH10Bac™感受态细胞(赛默飞世尔))中。诱导DH10Bac细胞中Rep质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组杆粒(“Rep杆粒”)。通过阳性选择来选择重组杆粒,所述阳性选择包含在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上在大肠杆菌中进行蓝白筛选(Φ80dlacZΔM15标志物提供了来自杆粒载体的β-半乳糖苷酶基因的α-互补)。挑选分离的白色菌落,并接种到10ml选择培养基(含卡那霉素、庆大霉素、四环素的LB培养液)中。从大肠杆菌中分离出重组杆粒(Rep杆粒),并将Rep杆粒转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中,以产生感染性杆状病毒。

[0721] 将Sf9或Sf21昆虫细胞在50ml培养基中培养4天,并从培养物中分离感染性重组杆

状病毒(“Rep杆状病毒”)。任选地,第一代Rep杆状病毒(P0)通过感染原生Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增并且在50ml到500ml培养基中培养。在感染后3天与8天之间,通过离心或过滤或其它分级分离方法分离细胞来收集培养基中的P1杆状病毒粒子。收集Rep杆状病毒并测定杆状病毒的感染活性。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理四个20mL的2.5x10^6个细胞/mL的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0722] ceDNA载体产生和表征

[0723] 然后将Sf9昆虫细胞培养基分别按照1:1000和1:10,000的比率添加到新制的Sf9细胞培养基(2.5E+6个细胞/毫升,20ml)中,所述昆虫细胞培养基含有:(1)含有ceDNA杆粒或ceDNA杆状病毒的样品;和(2)上述Rep杆状病毒。然后将细胞在25℃下以130rpm培养。共同感染4-5天后,检测细胞直径和活力。当细胞直径达到18nm-20nm并且活力为约70%-80%时,将细胞培养物离心,去除培养基,并收集细胞团粒。首先将细胞团粒悬浮于适量的水性介质,即水或缓冲液中。使用凯杰(Qiagen)MIDI PLUS™纯化方案(凯杰,每个柱处理0.2mg细胞团粒质量)从细胞中分离并纯化ceDNA载体。

[0724] 初始基于260nm下的UV吸光度,测定从Sf9昆虫细胞产生和纯化的ceDNA载体的产量。使用实例5中所述的电泳方法能够评估所纯化的ceDNA载体的正确封闭端构型。

[0725] 实例2:通过切除从双链DNA分子产生合成的ceDNA

[0726] ceDNA载体的合成产生描述于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122的实例2-6中,所述国际申请通过引用整体并入本文。使用合成方法产生ceDNA载体的一种示范性方法涉及切除双链DNA分子。简而言之,可以使用双链DNA构建体产生ceDNA载体,例如,参见PCT/US19/14122的图7A-8E。在一些实施例中,双链DNA构建体是ceDNA质粒,例如参见例如2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US2018/064242的图6)。

[0727] 在一些实施例中,制备ceDNA载体的构建体包含如本文所述的调节开关。

[0728] 出于说明的目的,实施例2描述了ceDNA载体的产生,所述ceDNA载体是使用此方法产生的示范性封闭端DNA载体。然而,虽然这个实例中以ceDNA载体为例来说明产生封闭端DNA载体的体外合成产生方法,所述方法通过如本文所描述,切除包含ITR和表达盒(例如核酸序列)的双链多核苷酸、接着将游离3’和5’端接合来进行,但所属领域的普通技术人员了解,人们可以如上所说明修饰双链DNA多核苷酸分子以使得产生任何所期望的封闭端DNA载体,包括但不限于狗骨状DNA、哑铃状DNA等等。能够利用实施例2中所述的合成产生方法产生的用于产生抗体或融合蛋白的示范性ceDNA载体论述于标题为“III.通用ceDNA载体”的章节中。由ceDNA载体表达的示范性抗体和融合蛋白描述于标题为“IIC.由ceDNA载体表达的示范性抗体和融合蛋白”的章节中。

[0729] 所述方法包括(i)从双链DNA构建体中切除编码表达盒的序列和(ii)在一个或多个ITR处形成发夹和(iii)通过接合(例如通过T4 DNA连接酶)将自由的5’与3’端连接。

[0730] 双链DNA构建体按照5’到3’次序包含:第一限制性核酸内切酶位点;上游ITR;表达盒;下游ITR;以及第二限制性核酸内切酶位点。然后使双链DNA构建体与一种或多种限制核酸内切酶接触,以在两个限制性核酸内切酶位点处均产生双链断裂。一种核酸内切酶可以靶向两个位点,或者每个位点可以被不同的核酸内切酶靶向,只要限制性位点不存在于ceDNA载体模板中。这从双链DNA构建体的其余部分切除了限制性核酸内切酶位点之间的序

列(参见PCT/US19/14122的图9)。接合后,形成封闭式DNA载体。

[0731] 所述方法中使用的一个或两个ITR可以是野生型ITR。也可以使用经修饰ITR,其中所述修饰能够包括形成B和B'臂和/或C和C'臂的序列中的野生型ITR中的一个或多个核苷酸的缺失、插入或取代(参见例如PCT/US19/14122的图6-8和10;图11B),并且可以具有两个或更多个发夹环(参见例如PCT/US19/14122的图6-8;图11B)或单个发夹环(参见例如PCT/US19/14122的图10A-10B、图11B)。通过对现有寡核苷酸进行基因修饰或通过重新生物学和/或化学合成能够产生发夹环经修饰ITR。

[0732] 在一个非限制性实施例中,左和右ITR-6(SEQ ID NO:111和112)在B-B'和C-C'臂中包括来自AAV2的野生型ITR的40个核苷酸的缺失。经修饰ITR中剩余的核苷酸预测可形成单个发夹结构。展开结构的吉布斯自由能(Gibbs free energy)是约-54.4千卡/摩尔。还可以对ITR产生其它修饰,包括功能Rep结合位点或Trs位点的任选缺失。

[0733] 实例3:通过寡核苷酸构建来产生ceDNA

[0734] 使用涉及装配不同寡核苷酸的合成方法产生ceDNA载体的另一种示范性方法提供于PCT/US19/14122的实例3中,其中ceDNA载体是通过合成5'寡核苷酸和3'ITR寡核苷酸并且将ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合来产生。PCT/US19/14122的图11B显示了将5'ITR寡核苷酸和3'ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合的示范性方法。

[0735] 如本文所公开,ITR寡核苷酸能够包含WT-ITR(参见例如图3A、图3C),或经修饰ITR(参见例如图3B和图3D)。(还参见例如PCT/US19/14122的图6A、6B、7A和7B,所述文献全文并入本文中)。示范性ITR寡核苷酸包括(但不限于)SEQ ID NO:134-145(参见例如PCT/US19/14122的表7)。经修饰ITR可以包括形成B和B'臂和/或C和C'臂的序列中的野生型ITR中的一个或多个核苷酸的缺失、插入或取代。用于游离合成的包括如本文所述的WT-ITR或经修饰ITR的ITR寡核苷酸可通过遗传修饰或生物学和/或化学合成产生。如本文所讨论的,实例2和3中的ITR寡核苷酸可以包括如本文所讨论的对称或非对称构型的WT-ITR或经修饰ITR(modified ITR/mod-ITR)。

[0736] 实施例4:通过单链DNA分子产生ceDNA

[0737] PCT/US19/14122的实例4中提供了使用合成方法产生ceDNA载体的另一个示范性方法,所述方法使用包括两个有义ITR的单链线性DNA,所述有义ITR侧接于有义表达盒序列并共价连接到两个反义ITR,所述反义ITR侧接于反义表达盒,然后将其单链线性DNA的末端接合,以形成末端封闭式单链分子。一个非限制性实例包含合成和/或产生单链DNA分子、使所述分子的各部分粘接以形成具有二级结构的一个或多个碱基对区域的单一线性DNA分子,然后使自由的5'与3'端彼此接合以形成封闭的单链分子。

[0738] 用于产生ceDNA载体的示范性单链DNA分子从5'至3'包括:

[0739] 第一有义ITR;

[0740] 有义表达盒序列;

[0741] 第二有义ITR;

[0742] 第二反义ITR;

[0743] 反义表达盒序列;和

[0744] 第一反义ITR。

[0745] 实例4的示范性方法中使用的单链DNA分子能够通过本文所述的任何DNA合成方法

形成，例如体外DNA合成，或如下提供：用核酸酶使DNA构建体(例如质粒)裂解且使所得dsDNA片段解链以得到ssDNA片段。

[0746] 通过将温度降低到低于有义和反义序列对的所计算的解链温度可以实现粘接。解链温度取决于特定核苷酸碱基含量和所用溶液的特征，例如盐浓度。任何给定序列的解链温度和溶液组合容易由所属领域的普通技术人员计算出。

[0747] 退火分子的游离5'和3'端可以彼此接合，或接合到发夹分子上以形成ceDNA载体。适合的示范性接合方法和发夹分子描述于实例2和3中。

[0748] 实例5：ceDNA的纯化和/或产生确认

[0749] 通过本文所述方法(包括例如实例1中所述的基于昆虫细胞的产生方法或实例2到4中所述的合成产生方法)产生的任一种DNA载体产物能够使用所属领域的技术人员通常已知的方法加以纯化，例如去除杂质、未使用的组分或副产物；且/或能够加以分析，从而确认所产生的DNA载体(在此情况下是ceDNA载体)是所期望的分子。用于纯化DNA载体(例如ceDNA)的示范性方法是使用Qiagen Midi Plus纯化方案(Qiagen)和/或凝胶纯化。

[0750] 以下是用于确认ceDNA载体身份的示范性方法。

[0751] 可以通过如图4D所示在天然或变性条件下的琼脂糖凝胶电泳进行标识来评估ceDNA载体，其中(a)在限制性核酸内切酶裂解和凝胶电泳分析后，对比天然凝胶，变性凝胶上存在以两倍大小迁移的特征色带；以及(b)在未裂解物质的变性凝胶上存在单体和二聚体(2x)色带是ceDNA载体存在的特征。

[0752] 分离出的ceDNA载体的结构进一步如下分析：用根据以下所选的限制核酸内切酶消化经纯化的DNA：a)ceDNA载体内仅存在单个切割位点；和b)所得片段当在0.8％变性琼脂糖凝胶上分级分离时大得足以清晰可见(>800bp)。如图4C和4D中所说明，具有非连续结构的线性DNA载体和具有线性连续结构的ceDNA载体能够根据其反应产物的尺寸区分，举例来说，具有非连续结构的DNA载体预期产生1kb和2kb片段，而具有连续结构的ceDNA载体预期产生2kb和4kb片段。

[0753] 因此，为了以定性方式证明分离的ceDNA载体是根据定义所要求那样共价封闭端的，将样品用在特定DNA载体序列的背景下被标识为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化，优选产生两个大小不等的裂解产物(例如1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后，线性、非共价封闭的DNA将以1000bp和2000bp大小分解，而共价封闭的DNA(即ceDNA载体)将以2倍大小分解(2000bp和4000bp)，这是因为两条DNA链是连接的并且现在伸展且长度翻倍(尽管是单链)。另外，由于多聚体DNA载体存在端对端连接，因此DNA载体的单体、二聚和n聚形式的消化都将解析为相同尺寸的片段(参见图4E)。

[0754] 如本文所用，短语“通过在天然凝胶和变性条件下进行琼脂糖凝胶电泳来标识DNA载体的分析”是指一种通过执行限制性核酸内切酶消化、随后对消化产物进行电泳评估来评估ceDNA封闭端的分析。后面是一种这样的示范性分析，尽管所属领域的普通技术人员将了解，对这个实例可以进行许多所属领域已知的变化。选择限制性核酸内切酶作为所关注的ceDNA载体的单切酶，其将产生DNA载体长度的大致1/3x和2/3x的产物。由此使天然凝胶和变性凝胶上的色带解析。变性之前，重要的是从样品中去除缓冲液。Qiagen PCR纯化试剂盒或脱盐“离心柱”(例如GE HEALTHCARE ILUSTRA MICROSPIN G-25柱)是所属领域中已知

用于内切核酸酶消化的一些选项。所述分析包括例如:i)用适当的限制性核酸内切酶消化DNA;2)施加于例如Qiagen PCR清洁试剂盒,用蒸馏水洗脱;iii)加入10x变性溶液(10x=0.5M NaOH、10mM EDTA),加入10X染料,不进行缓冲,并与通过添加入10X变性溶液至4x而制备的DNA序列梯一起,在预先与1mM EDTA和200mM NaOH一起培育以确保凝胶和凝胶盒中的NaOH浓度均匀的0.8-1.0%凝胶上进行分析,并在1x变性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)存在下跑动凝胶。所属领域的普通技术人员将了解基于所得物的大小和期望的计时使用什么电压来跑动电泳。电泳后,将凝胶排出并在1×TBE或TAE中进行中和,并转移到蒸馏水或含1×SYBR金的1×TBE/TAE中。然后使用例如赛默飞世尔SYBR®金核酸凝胶染色剂(DMSO中的10,000×浓缩液)和落射荧光(蓝色)或UV(312nm)使带可视化。前述基于凝胶的方法通过从凝胶色带中分离出ceDNA载体且允许其复性而能够根据纯化目的调整。

[0755] 产生的ceDNA载体的纯度可以使用任何所属领域已知的方法来评估。作为一个示范性和非限制性方法,通过对ceDNA载体的荧光强度与标准进行比较,能够估计ceDNA质粒对样品的总体UV吸光度的贡献。举例来说,若基于UV吸光度将4μg ceDNA载体装载于凝胶上并且ceDNA载体荧光强度等效于已知是1μg的2kb色带,则存在1μg ceDNA载体,且ceDNA载体是总UV吸收材料的25%。然后将凝胶上的带强度相对于带表示的计算输入作图-例如,如果总ceDNA载体是8kb,而切下的比较带为2kb,那么带强度将按总输入的25%绘制,在这种情况下,对于1.0μg输入,将为.25μg。使用ceDNA载体质粒滴定来绘制标准曲线,然后使用回归线方程计算ceDNA载体色带的量,然后可用于测定ceDNA载体所占的总输入的百分比或纯度百分比。

[0756] 实例6:ceDNA的可控转基因表达:重新给药施用能够维持和/或增加体内ceDNA载体的转基因表达

[0757] 根据以上实例1中所描述的方法,使用包含CAG启动子(SEQ ID NO:72)和侧接于不对称的ITR(例如5'WT-ITR(SEQ ID NO:2)与3'经修饰ITR(SEQ ID NO:3)之间的作为示范性FIX的荧光素酶转基因(SEQ ID NO:56)的ceDNA质粒产生ceDNA载体,并且在不同的体内治疗程序中进行评估。实施例6到10所述的所有后续实验中都使用这种ceDNA载体。在实施例6中,纯化ceDNA载体且配制成脂质纳米粒子(LNP ceDNA)且注射到每只CD-1®IGS小鼠的尾静脉中。脂质体是用适合的脂质掺混物配制而成,所述脂质掺混物包含四种组分以形成脂质纳米粒子(LNP)脂质体,包括阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG-脂质。

[0758] 为了评估ceDNA载体在体内在长时间段内对转基因的持续表达,通过尾静脉的静脉内注射将存在于无菌PBS中的LNP-ceDNA施用于大约5到7周龄的CD-1®IGS小鼠。评估三个不同剂量组:0.1mg/kg、0.5mg/kg和1.0mg/kg,每组十只小鼠(除1.0mg/kg之外,每组15只小鼠)。第0天施用注射液。每组五只小鼠在第28天另外注射相同剂量。静脉内施用于CD-1®IGS小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories);野生型小鼠)之后,通过IVIS成像来测量荧光素酶表达。在第3、4、7、14、21、28、31、35和42天,以及在第42天至第110天之间常规地(例如每周、每两周,或每10天或每2周)腹膜内注射150mg/kg荧光素底物之后,通过IVIS成像来评估荧光素酶表达。如通过在3种不同的施用方案后进行IVIS成像持续至少132天所测量,荧光素酶转基因作为示范性FIX进行表达(数据未示出)。

[0759] 为了研究重复剂量(例如再施用)的表达荧光素酶的LNP-ceDNA对经LNP-ceDNA治疗的受试者的效果,进行了扩展研究。具体地说,评估其以确定一次或多次额外施用ceDNA

载体是否能够增加表达水平。

[0760] 在此研究中，在第0天和第28天初始静脉内施用1.0mg/kg(即，预致敏剂量)之后，通过IVIS评估ceDNA载体的荧光素酶表达在CD-1®IGS小鼠中的生物分布(A组)。ceDNA载体的第二次施用是在第84天，通过尾静脉注射3mg/kg(B组)或10mg/kg(C组)，以1.2mL施用于尾静脉。在此研究中，A、B和C组各自使用五(5)只CD-1®小鼠。如上文所述，在第49、56、63和70天额外给药之前，且在第84天和第91、98、105、112和132天重复剂量后，对小鼠中的荧光素酶表达进行IVIS成像。评估且检测到所有三个组A、B和C的荧光素酶表达直到至少110天(所评估的最长时间段)。

[0761] 显示LNP-ceDNA-Luc重复剂量(即，ceDNA组合物再施用)使荧光素酶表达水平增加，如通过在荧光素存在下评估荧光素酶活性所测定。如通过在3种不同的施用方案后进行IVIS成像持续至少110天所测量，荧光素酶转基因作为示范性FIX进行表达(A、B和C组)。在研究期间，对于尚未给予任何额外重复剂量(1mg/kg预致敏剂量(即，A组))治疗的小鼠观察到稳定的荧光素酶表达。已施用3mg/kg ceDNA载体重复剂量的B组小鼠的辐射度观察值相对于C组小鼠增加大约七倍。惊人地，重复给药10mg/kg ceDNA载体的小鼠的荧光素酶辐射度观察值相对于未接受任何重复剂量的小鼠(A组)增加17倍。

[0762] 在第0和28天静脉内施用1mg/kg ceDNA载体于尾静脉之后，A组的CD-1®IGS小鼠显示荧光素酶表达。B组和C组显示在第一时间点(第0天)施用1mg/kg ceDNA载体且在第二时间点第84天重复给药施用ceDNA载体的CD-1®IGS小鼠的荧光素酶表达。ceDNA载体的第二次施用(即，重复剂量)使表达增加至少7倍、甚至高达17倍。

[0763] B组重复剂量施用的ceDNA载体的剂量(即，量)的3倍增加(即，重复剂量施用3mg/kg)引起荧光素酶表达增加7倍。还意外的是，C组重复剂量施用ceDNA载体的量增加10倍(即，重复剂量施用10mg/kg)引起荧光素酶表达增加17倍。因此，ceDNA的第二次施用(即，重复剂量)使表达增加至少7倍、甚至高达17倍。这表明，重复剂量引起的转基因表达增加大于预期且依赖于ceDNA载体在重复剂量施用时的剂量或量，且似乎与第0天的初始预致敏施用引起的初始转基因表达协同作用。也就是说，转基因表达的剂量依赖性增加不具有相加作用；相反，转基因表达水平具有剂量依赖性且大于在每个时间点所施用的ceDNA载体的量的总和。

[0764] 相较于未在第二时间点重新给药ceDNA载体的对照小鼠(A组)，B组和C组均显示荧光素酶表达有明显的剂量依赖性增加。综合而言，这些数据表明ceDNA载体对转基因的表达能够通过在至少第二时间点重复给药(即，再施用)ceDNA载体、以剂量依赖性方式增加。

[0765] 综合而言，这些数据表明，转基因的表达水平，例如由ceDNA载体进行的FIX的表达水平可以维持在持续水平下至少84天并且可以在重新给药至少在第二时间点施用的ceDNA载体之后体内提高。

[0766] 实例7:LNP配制的ceDNA载体在体内的持续转基因表达

[0767] 评估具有不同脂质纳米粒子的实例6的结果在体内、在小鼠中的再现性。小鼠在第0天给予包含由CAG启动子驱动的荧光素酶转基因的ceDNA载体，所述ceDNA载体囊封于与实例6中所用不同的LNP中或包含聚C、但缺乏ceDNA或荧光素酶基因的相同LNP中。具体地说，大约4周龄的雄性CD-1®小鼠在第0天通过单次注射0.5mg/kg LNP-TTX-荧光素酶或对照LNP-聚C(通过外侧尾静脉静脉内施用)来治疗。第14天，动物通过腹膜内注射2.5mL/kg全身

性给予150mg/kg荧光素。在荧光素施用之后的大致15分钟，使用体内成像系统(“IVIS”)对每只动物进行成像。

[0768] 如图7中所示，观察到所有四只经ceDNA治疗的小鼠的肝脏中存在明显荧光，并且除注射部位之外，在动物中观察到的其它荧光极少，表明LNP介导ceDNA构建体发生肝脏特异性递送且递送的ceDNA载体在施用之后至少两周能够控制其转基因的持续表达。

[0769] 实例8:体内施用ceDNA载体引起的转基因在肝脏中的持续表达

[0770] 在单独实验中，评估LNP递送的ceDNA在经治疗动物的肝脏内的定位。将包含所关注的功能转基因的ceDNA载体囊封于实施例7所用的相同LNP中且以0.5mg/kg的剂量水平、通过体内静脉内注射施用于小鼠。6小时之后，终结小鼠且取肝脏样品，用福尔马林固定且使用标准方案进行石蜡包埋。进行RNAscope®原位杂交分析，以使用对ceDNA转基因具特异性的探针使组织内的ceDNA载体可视化且利用显色反应和苏木精染色(Advanced Cell Diagnostics)进行检测。图8显示了结果，其表明ceDNA存在于肝细胞中。

[0771] 实例9:ceDNA在体内发生的持续眼部转基因表达

[0772] 评估ceDNA载体转基因表达在除肝脏之外的组织中的可持续性，以测定在眼部施用之后，ceDNA载体在体内的耐受性和表达。虽然荧光素酶用作实例9中的示范性转基因，但普通技术人员可以容易地用来自表1中列出或表12中所包括的FIX序列中的任一者的FIX序列替代荧光素酶转基因。

[0773] 第0天，向大约9周龄的雄性史泊格多利大鼠(Sprague Dawley rats)视网膜下注射使用jetPEI®转染试剂(Polyplus)配制的5μL包含荧光素酶转基因的ceDNA载体或使用jetPEI®配制的编码荧光素酶的质粒DNA，两者浓度均为0.25μg/μL。每组测试四只大鼠。给动物服镇静剂且使用33号针在右眼视网膜下注射测试制品。每只动物的左眼不治疗。注射之后立即利用光学相干断层扫描或眼底成像来检查眼睛以便确认视网膜下水泡的存在。大鼠根据标准程序用丁基原啡因(buprenorphine)和体表抗生素软膏治疗。

[0774] 第7、14、21、28和35天，两组动物在荧光素施用后的5到15分钟，通过腹膜内注射(2.5mL/kg)全身性给予150mg/kg新制荧光素，所有动物均在异氟醚麻醉下的同时使用IVIS成像。在5分钟暴露期间，获得包含眼睛的所关注区域内的总通量[p/s]和平均通量(p/s/sr/cm^2)。结果作为每个治疗组的经治疗眼睛(“注射”)的平均辐射度相对于每个治疗组的未治疗眼睛(“未注射”)的平均辐射度的图形表示(图9B)。在ceDNA载体治疗的眼睛中容易检测到明显的荧光，但在质粒治疗的眼睛中则弱得多(图9A)。35天之后，将质粒注射的大鼠终结，同时继续研究ceDNA治疗的大鼠，在第42、49、56、63、70和99天进行荧光素注射和IVIS成像。结果表明，通过单次注射引入大鼠眼睛中的ceDNA载体介导体内转基因表达，且所述表达在高水平持续到注射之后的至少99天。

[0775] 实例10:ceDNA载体对Rag2小鼠的持续给药和重新给药。

[0776] 在ceDNA载体的基因表达盒中编码的一个或多个转基因表达于宿主环境(例如细胞或受试者)的情形中，在所表达的蛋白质被识别为外来蛋白质的情况下，宿主将可能建立适应性免疫反应，这可能使表达产物发生非期望的耗竭，从而会潜在地与表达的缺乏发生混淆。在一些情况下，与正常宿主环境异源的报告分子可能会发生这种情况。因此，在Rag2小鼠模型中评估体内的ceDNA载体转基因表达，所述模型缺乏B细胞和T细胞并且因此未建立针对非原生鼠蛋白例如荧光素酶的适应性免疫反应。简单来说，c57bl/6和Rag2基因敲除

小鼠在第0天，通过尾静脉注射，静脉内给予0.5mg/kg的经LNP囊封的表达荧光素酶的ceDNA载体或聚C对照，且在第21天，某些小鼠重复给药相同剂量水平的相同的经LNP囊封的ceDNA载体。所有测试组各自由4只小鼠组成。如实施例9中所述，每周按时间间隔注射荧光素之后，进行IVIS成像。

[0777] 与从IVIS分析中观察到的总通量相比，在给予LNP-ceDNA载体-Luc的野生型小鼠中观察到的荧光(所表达的荧光素酶的存在的间接量度)在第21天之后逐渐减少，而施用相同治疗的Rag2小鼠在42天实验内展现相对恒定的持续的荧光素酶表达(图10A)。在野生型小鼠中观察到减少的大约第21天时间点对应于预期可能会产生适应性免疫反应的时间范围。LNP-ceDNA载体再施用于Rag2小鼠引起表达明显增加，在此研究中追踪其的至少21天期间，所述表达的明显增加被维持(图10B)。结果表明，当ceDNA载体在宿主中表达非原生蛋白质时，适应性免疫可以起作用，并且在从初始施用的20+天时间范围内观察到的表达的减少可以使混杂的适应性免疫反应而非表达的衰减(或除其之外)信号传导到所表达的分子。值得注意的是，当原生蛋白质在宿主中表达时，这个反应预期较低，其中预期宿主将所表达的分子正确地识别为自身的且将不产生此类免疫反应。

[0778] 实例11:肝脏特异性表达和CpG调节对持续表达的影响

[0779] 如实例10中所述，非期望的宿主免疫反应在一些情况下可能会人为地抑制原本是一个或多个期望转基因从所引入的ceDNA载体中的持续表达。采取两种方法来评估避免和/或抑制潜在宿主免疫反应对来自ceDNA载体的持续表达的影响。首先，由于前述实施例中所用的ceDNA-Luc载体处于组成型CAG启动子的控制下，因此使用肝脏特异性启动子(hAAT)或不同组成型启动子(hEF-1)制备类似构建体，以了解避免长时间暴露于骨髓细胞或非肝脏组织是否减少所观察到的任何免疫效应。其次，对某些ceDNA荧光素酶构建体进行工程改造以使CpG含量减小(一种已知的用于宿主免疫反应的触发事件)。将此类工程化和启动子开关的ceDNA载体施用于小鼠后，测量ceDNA编码的荧光素酶基因表达。

[0780] 使用三种不同ceDNA载体，每种编码作为转基因的荧光素酶。第一种ceDNA载体具有数目较多的未甲基化CpG(约350)且包含组成型CAG启动子(“ceDNA CAG”)；第二种具有中等数目个未甲基化CpG(约60)且包含肝脏特异性hAAT启动子(“ceDNA hAAT低CpG”)；并且第三种是第二种的甲基化形式，使得其不含有未甲基化CpG，并且也包含hAAT启动子(“ceDNA hAAT无CpG”)。ceDNA载体原本是相同的。如上文所述制备载体。

[0781] 四组大约4周龄的四只雄性CD-1®小鼠用囊封于LNP中的ceDNA载体之一或聚C对照治疗。第0天，每只小鼠施用0.5mg/kg ceDNA载体的单次静脉内尾静脉注射液，体积为5mL/kg。在第-1、-、1、2、3、7天和随后每周记录体重，直到小鼠终结为止。在第0、1和35天，获取全血和血清样品。在第7、14、21、28和35天和随后每周使用体内成像系统(IVIS)执行一生成像(in-life imaging)。为了成像，每只小鼠通过腹膜内注射2.5mL/kg来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后，使每只小鼠麻醉并且成像。第93天终结小鼠且收集末端组织，包括肝脏和脾脏。第0天给药之后的6小时进行细胞因子测量。

[0782] 虽然所有经ceDNA治疗的小鼠在第7天和第14天显示明显的荧光，但是ceDNA CAG小鼠中的荧光在第14天之后快速减少且在研究的其余时间内逐渐减少。相比之下，ceDNA hAAT低CpG和无CpG治疗的小鼠的总通量保持在稳定的高水平下(图11)。这表明，将ceDNA载体递送特异性引向肝脏使得载体的转基因表达在单次注射之后的至少77天期间持续、持

久。CpG最少化或完全不存在CpG含量(无CpG)的构建体具有类似的持久、持续的表达特征，而高CpG组成型启动子构建体展现随时间推移衰减的表达，这表明通过引入ceDNA载体引起的宿主免疫活化可以在从受试者中的所述载体观察到的任何表达减少中起作用。这些结果提供了按照所期望水平定制反应持续时间的替代方法，这是通过在观察到宿主免疫反应(一种潜在的转基因特异性反应)的情况下选择组织限制性启动子和/或改变ceDNA载体的CpG含量来实现。

[0783] 实例12:所选的酪氨酸激酶抑制剂的体内作用

[0784] 在一项扩展研究中，向小鼠(n＝4)给予携带人类因子IX(FIX)的治疗性ceDNA以评估在56天时间段内免疫抑制剂TKI(例如芦可替尼)与治疗性FIX核酸的组合对体内FIX表达的影响。如下文所阐述进行研究设计和细节。

[0785] 研究设计

[0786] 表14阐述研究的激酶抑制剂施用组分的设计。如表14中所示，以10mL/kg的剂量体积向两组雄性CD-1小鼠(第1组，n＝4；第2组，n＝4组)经口施用媒剂或芦可替尼(300mg/kg)。对于第1组和第2组，在第-2、-1、1、0和36天进行给药。

[0787] 表14:激酶抑制剂施用的研究设计

[0788]

组编号	每组动物	抑制剂[a]	剂量水平(mg/kg)	剂量体积(mL/kg)	治疗方案，通过 PO
1	4	媒剂	NA	10	第-2、-1 和 1 天 第 0 天：给药前 90 分钟 第 36 天：给药前 30 分钟和给药后 5 小时
2	4	芦可替尼	300		

[0789] No.＝编号；PO＝经口管饲；ROA＝施用途径；min＝分钟；hr＝小时。[a]用于给药和抑制剂制备的媒剂＝0.5％甲基纤维素

[0790] 表15阐述研究的测试材料施用组分的设计。如表15中所示，以1mg/kg的剂量水平和5mL/kg的剂量体积向一组雄性CD-1小鼠(第1组，n＝4)在第0天静脉内施用LNP:空或在第36天静脉内施用LNP:空。以2mg/kg的剂量水平和5mL/kg的剂量体积向第二组雄性CD-1小鼠(第2组，n＝4)在第0天静脉内施用LNP:ceDNA-FIX并在第36天重新给药LNP:ceDNA-FIX。第56天为研究的终末时间点。

[0791] 表15:LNP:ceDNA-FIX施用的研究设计

[0792]

组编号	每组动物	治疗	剂量水平(mg/kg)	剂量体积(毫升/公斤)	治疗方案，IV	终末时间点
1	4	LNP:空（第 0 天）或 LNP:空（第 36 天）	1.0	5	在第 0 天和第 36 天一次	第 56 天
2	4	LNP:ceDNA-FIX LNP:ceDNA-FIX（第 36 天）	2.0			

[0793] No.＝编号；IV＝静脉内；ROA＝施用途径

[0794] 样品收集

[0795] 如下进行血液收集或血浆收集(临时)。对于第1组和第2组的小鼠，在第7、14、21、28、35、42、49和56天在眼眶中收集120ml全血样品。在第7、14、21、28、35、42、49和56天从血液中收集血浆样品。为了处理和储存血液样品，将120μL全血添加到预涂布有13.33μL的

3.2%柠檬酸钠的试管中并且保持在环境中直到处理。为了处理和储存血浆样品，将一个等分试样的血浆在标称-70℃下冷冻。

[0796] 研究细节

[0797] 体重：在第-2、-1、0、1、2、3、7、14、21、28、35、36、37、38、39、42、49和56天(在安乐死前)记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。

[0798] 临时血液收集：第1-2组中的所有动物具有在第0天在测试材料给予后6小时、然后在第7、14、21、28、35、42、49和56天收集的临时血液(±5%)，如上文所指示。

[0799] 抑制剂施用：在第-2、-1、0和1天并再次在第36天通过PO施用(经口管饲)给予10mL/kg抑制剂或媒剂。在第0天，在第0天ceDNA施用之前1.5小时(±10分钟)给予抑制剂或媒剂。在第36天，在第0天ceDNA施用之前0.5小时(±10分钟)和在施用之后5小时(±20分钟)给予抑制剂或媒剂。每天大致在同一时间(±1小时)施用抑制剂。

[0800] 剂量施用：在第0天和第36天通过外侧尾静脉进行静脉内(IV)施用向第1-2组给予5mL/kg测试物。

[0801] 安乐死和终末收集：在第56天，在放血以获得血浆之后，通过CO_2窒息将动物安乐死，接着进行开胸术或颈椎脱位。将不收集组织。

[0802] 如图12中所示，在第-2、-1、1、0和36天用芦可替尼(300mg/kg)和在第0天和第36天用LNP:ceDNA-FIX(2.0mg/kg)治疗的小鼠表达因子IX(FIX)蛋白(IU/mL)，这从第7天开始到研究结束(第56天)体内检测到。值得注意的是，在第36天重新给药ceDNA-FIX引起FIX表达在第42天后急剧增加，直到研究结束。相比之下，在-48小时、-24小时、-1.5小时和24小时用媒剂对照和在第0天或第36天用LNP:空(1.0mg/kg)治疗的小鼠不表达FIX蛋白。

[0803] 这些结果还表明，治疗性核酸(例如ceDNA-FIX)可以在治疗模型中联合一种或多种免疫抑制剂TKI(例如JAK抑制剂芦可替尼)多次施用和重新给药。如图12中所示，组合方法允许重新给药ceDNA-FIX，这引起FIX表达相当大地增加。

[0804] 实例13：表达FIX的ceDNA的流体动力学递送

[0805] 将核酸引入啮齿动物中的肝脏的熟知的方法是通过流体动力学尾静脉注射。在此系统中，大量未囊封核酸的加压注射导致细胞通透性的瞬时增加，并直接递送到组织和细胞中。这提供了绕过许多宿主免疫系统(诸如巨噬细胞递送)的实验机制，提供了在没有这种活性的情况下观察递送和表达的机会。

[0806] 如上文在实例1和5中所描述制备和纯化各自具有野生型左ITR和截短突变右ITR并具有编码FIX的转基因区的两种不同的ceDNA载体。将在肝脏特异性启动子或不具有载体的PBS的控制下的ceDNA FIX载体施用于大致6周龄的雄性C57bl/6J小鼠。以在5-8秒内施用的100mL/kg的体积通过外侧尾静脉进行流体动力学静脉内注射给予每只动物(每组4只动物)0.005mg裸ceDNA载体。在第0、1、2、3和7天及其后每周测量体重。在第3天、第7天、第14天、第21天以及末尾第28天，从每个经治疗的动物收集血液样品。使用因子IX(F9，FIX)ELISA试剂盒(Affinity Biologicals)测量血浆样品中所表达的FIX的存在。

[0807] 如图11A中所示，在来自用每种ceDNA FIX载体治疗的小鼠的第3天和第7天血浆样品中容易检测到FIX，但在用PBS治疗的小鼠中未观察到FIX。图11B显示，FIX表达在28天研究的持续时间内持续存在，在21天时间点时趋于平稳。这项实验表明，ceDNA载体能够在流体动力学注射之后从肝脏中表达FIX，并且在ceDNA施用之后在血浆中快速且容易地可检测

到FIX。

[0808] 实例14:在雄性CD-1小鼠中通过流体动力学递送标识FIX构建体

[0809] 本研究的目标为测定在流体动力学注射重组DNA之后的FIX蛋白表达。

[0810] 研究设计

[0811] 表16:ceDNA-FIX流体动力学施用的研究设计

[0812]

组编号	动物数目	测试材料	剂量水平（μg/an）	剂量体积（mL/kg）	给药方案 ROA	终末时间点
1	5	PBS	NA	90 - 100 ML/KG （设定体积）	在 第 0 天一次，通过 IV 流体动力学	第 7 天
2	5	CEDNA-FIX V1	1.0			
3	5	CEDNA-FIX V1	10.0			
4	5	CEDNA-FIX 2109	1.0			
5	5	CEDNA-FIX 2109	10.0			
6	5	CEDNA-FIX 2112	1.0			
7	5	CEDNA-FIX 2112	10.0			

[0813] No.＝编号/数目;IV＝静脉内;ROA＝施用途径;an＝动物

[0814] 物种:小家鼠(Mus Musculus)

[0815] 菌株:CD-1

[0816] 雄性数目:35加3个备用

[0817] 年龄:到达时4周龄

[0818] 将CD-1小鼠分组容纳于具有接触垫层的透明聚碳酸酯笼中,并且随意提供小鼠饮食5058,并过滤用1N HCl酸化到2.5-3.0的目标pH的自来水。

[0819] 剂量配制、施用和观察

[0820] 将ceDNA-FIX构建体(即,ceDNA-FIX v1、ceDNA-FIX 2109和ceDNA-FIX 2112)升温到室温并且在使用前立即用所提供的PBS稀释。示范性ceDNA-FIX v1载体的序列信息阐述于本文的表12中。在第0天通过流体动力学IV施用、以每只动物90-100mL/kg的设定体积(取决于群组中的最轻动物)通过外侧尾静脉给予ceDNA-FIX v1、2109和2112(在5秒内给药)。将剂量四舍五入到最接近的0.1mL。每天将至少执行一次笼侧动物健康检查以检查一般健康状况、死亡率和垂死率。在给药后～1小时,在给药日结束之前(3-6小时),并且然后在第0天测试材料给药之后～24小时执行临床观察。每个例外都进行了额外的观察。在第0、1、2、3、7天记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。

[0821] 血液收集

[0822] 第1-7组中的所有动物具有在第3天收集的临时血液。收集后,动物接受0.5-1.0mL乳酸林格氏液;在皮下。对于血浆收集,在麻醉下通过眶窦穿刺将全血收集到未涂布埃彭道夫(Eppendorf)式试管中。取出120μL并且将其放入含有13.33μL的3.2%柠檬酸钠的试管中。将血液样品轻轻地混合并维持在环境中直到处理。全血样品在环境条件(20-25℃)下以2,000g离心15分钟。血浆样品被取出,避免细胞堆积。通过注射器收集终末全血,并立即将500μL放在含有55.6μL的3.2%柠檬酸钠的试管中。

[0823] 结果

[0824] 如图13A中所示，在每只动物1μg下，所有三种构建体的表达等同。在较高剂量(每只动物10μg)下，与所测试的其它构建体相比，ceDNA-FIX 2109在第7天显示优异且增加的FIX表达水平(图13B)。

[0825] 实例15：用于评估雄性C57Bl/6小鼠中通过IV递送的ceDNA-FIX配制物的研究

[0826] 进行以下用于测定在IV注射LNP配制的ceDNA之后的蛋白质表达的研究。将ceDNA-FIX配制到两种不同的LNP组合物(LNP配制物1：可电离脂质:DSPC:胆固醇:PEG-脂质+DSPE-PEG-GalNAc4(47.5:10.0:39.2:3.3)(称为“1号DP”)；和LNP配制物2：可电离脂质:DSPC:胆固醇:PEG-脂质+DSPE-PEG2000-GalNAc4(47.3:10.0:40.5:2.3)(称为“2号DP”)中。在第0天通过静脉内给药将一定剂量的测试材料施用到外侧尾静脉中。以5mL/kg(2mg/kg)的剂量体积施用含有ceDNA-FIX的LNP。用于研究的测试材料示于下表17中。表达因子IX的ceDNA(ceDNA-FIX)用作独立对照。

[0827] 表17

[0828]

组编号	动物数目	测试材料	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	给药方案 ROA	终末时间点
1	5	PBS	NA	5	在 第 0 天一次，通过 IV	第 14 天
4	5	ceDNA-FIX v1	2.0			
5	5	ceDNA-FIX v1	2.0			
6	5	ceDNA-FIX v1	2.0			

[0829] 与不显示hFIX的用媒剂治疗的小鼠相比，用ceDNA-FIX v1 LNP配制物(1号DP或2号DP)治疗的小鼠在其血浆中展现出人类FIX的存在，这表明ceDNA-FIX v1 LNP配制物可以成功靶向并整合到引起FIX蛋白表达的细胞。总的来说，ceNDA-FIX LNP配制物耐受良好。

[0830] 实例16：食蟹猕猴中脂质纳米粒子配制物的14天单次剂量静脉内输注毒性研究

[0831] 本研究的目标为测定在向雄性食蟹猕猴IV施用LNP配制的ceDNA之后单次静脉内(IV)剂量的脂质纳米粒子ceDNA转基因表达的毒性作用。通过IV输注(70分钟±10分钟)给药到隐静脉(必要时，使用头静脉或尾静脉)，以0.42毫升/千克/小时给药15分钟，并且然后递增到4.59毫升/千克/小时，持续55分钟。需要具有递增的给药速率设计的长期输注来预防/缓解输注反应。将给药的第一天称为第1天。在第1天执行给药一次并且进行15天。研究细节示于表18中。

[0832] 表18：ce-DNA-FIX配制物毒性研究中的测试材料施用

[0833]

组编号	测试材料	剂量水平 (mg/kg/剂量)	剂量体积 [a] (mL/kg)	剂量 浓度(mg/mL)	动物数目 雄性 [b]
1	媒剂	0	4.31	0	2
2	ceDNA-FIX v1	2.0	4.31	0.46	2
3	ceDNA-FIX v1	2.0	4.31	0.46	2
4	ceDNA-FIX v1	2.0	4.31	0.46	2

[0834] 基于最近的体重测量结果。给药的第一天是基于第1天体重。

[0835] 在输注开始之前，用大致2mL无菌盐水冲洗导管。接下来，以0.42毫升/千克/小时施用给药配制物，持续前15分钟(靶时间)。停止输注泵，重新编程以输注剩余剂量持续4.59毫升/千克/小时的输注速率，持续输注的剩余的55分钟(靶时间)。在剂量施用之后通过导管施用大致1.0mL无菌盐水冲洗液。

[0836] 为了缓解潜在输注反应，在输注开始之前大致30±5分钟用苯海拉明(diphenhydramine)和地塞米松(dexamethasone)预治疗所有动物。另外，所有动物在输注后大致4小时±10分钟接受第二剂量的苯海拉明和地塞米松。苯海拉明以0.1ml/kg的剂量体积以肌肉内注射的形式施用以实现5mg/kg/剂量的剂量水平。地塞米松以0.25ml/kg的剂量体积以肌肉内注射的形式施用以实现1mg/kg/剂量的剂量水平。

[0837] 表19:因子IX样品收集、处理和分析

[0838]

组编号	因子 IX 血液样品收集		
	预治疗	第 5 天	第 14 天
第 1-4 组	X	X	X

[0839] X＝要收集的样品

[0840] 将样品轻轻地混合并立即离心。分离所得血浆，并且将其分成两个等分试样。在独特地标记的聚丙烯试管中制造所有等分试样，并且在干冰上或在设定成维持-70℃或更冷的冷冻器中立即冷冻直至样品分析。

[0841] 结果

[0842] 与不显示表达的仅用媒剂治疗的食蟹猕猴相比，用ceDNA-FIX v1治疗的食蟹猕猴显示升高的人类FIX血浆浓度(IU/ml)。未观察到不良事件，并且测试物似乎耐受良好，这表明本文所公开的ceDNA构建体可以用于增加血浆FIX蛋白以促进灵长类动物和可能人类患者的凝血。

[0843] 参考文献

[0844] 在本说明书和本文的实施例中引用的所有出版物和参考文献，包括但不限于专利和专利申请，都以全文引用的方式并入本文中，如同每个单独的出版物或参考文献被明确且单独地指出像充分阐述一样，以引用的方式并入本文中一般。本申请要求优先权的任何专利申请也以上述针对出版物和参考文献的方式通过引用并入本文中。

序列表

<110> 世代生物公司

<120> 非病毒 DNA 载体和其用于表达因子 IX 治疗剂的用途

<130> 131698-06520

<140>
<141>

<150> 62/993,857
<151> 2020-03-24

<160> 410

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0001] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 1
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag ctgcctgcag g 141

<210> 2
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 2
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 3
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 3
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120

tgcctgcagg 130

<210> 4
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0002] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 4
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct 130

<210> 5
<211> 143
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 5
ttgcccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcggtgggg cctgcggacc aaaggtccgc 60

agacggcaga ggtctcctct gccggcccca ccgagcgagc gacgcgcgca gagagggagt 120

gggcaactcc atcactaggg taa 143

<210> 6
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 6
ttggccactc cctctatgcg cactcgctcg ctcggtgggg cctggcgacc aaaggtcgcc 60

agacggacgt gggtttccac gtccggcccc accgagcgag cgagtgcgca tagagggagt 120

ggccaactcc atcactagag gtat 144

<210> 7
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0003] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 7
ttggccactc cctctatgcg cgctcgctca ctcactcggc cctggagacc aaaggtctcc 60

agactgccgg cctctggccg gcagggccga gtgagtgagc gagcgcgcat agagggagtg 120

gccaact 127

<210> 8
<211> 166
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 8
tccccccctgt cgcgttcgct cgctcgctgg ctcgtttggg ggggcgacgg ccagagggcc 60

gtcgtctggc agctctttga gctgccaccc ccccaaacga gccagcgagc gagcgaacgc 120

gacaggggggg agagtgccac actctcaagc aaggggggttt tgtaag 166

<210> 9
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 9
ttgcccactc cctctaatgc gcgctcgctc gctcggtggg gcctgcggac caaaggtccg 60

cagacggcag aggtctcctc tgccggcccc accgagcgag cgagcgcgca tagagggagt 120

gggcaactcc atcactaggg gtat 144

<210> 10
<211> 143
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0004] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 10
ttaccctagt gatggagttg cccactccct ctctgcgcgc gtcgctcgct cggtggggcc 60

ggcagaggag acctctgccg tctgcggacc tttggtccgc aggccccacc gagcgagcga 120

gcgcgcagag agggagtggg caa 143

<210> 11
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 11
atacctctag tgatggagtt ggccactccc tctatgcgca ctcgctcgct cggtggggcc 60

ggacgtggaa acccacgtcc gtctggcgac ctttggtcgc caggccccac cgagcgagcg 120

agtgcgcata gagggagtgg ccaa 144

<210> 12
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 12
agttggccac attagctatg cgcgctcgct cactcactcg gccctggaga ccaaaggtct 60

ccagactgcc ggcctctggc cggcagggcc gagtgagtga gcgagcgcgc atagagggag 120

tggccaa 127

<210> 13
<211> 166
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0005] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 13
cttacaaaac ccccttgctt gagagtgtgg cactctcccc cctgtcgcgt tcgctcgctc 60

gctggctcgt ttgggggggt ggcagctcaa agagctgcca gacgacggcc ctctggccgt 120

cgccccccca aacgagccag cgagcgagcg aacgcgacag ggggga 166

<210> 14
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 14
ataccccctag tgatggagtt gcccactccc tctatgcgcg ctcgctcgct cggtggggcc 60

ggcagaggag acctctgccg tctgcggacc tttggtccgc aggccccacc gagcgagcga 120

gcgcgcatta gagggagtgg gcaa 144

<210> 15
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 15
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

cgcacgcccg ggtttcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc tgcctgcagg 120

<210> 16
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0006]

<400> 16
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 17
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 17
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct 120

gcctgcagg 129

<210> 18

<211> 101
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 18
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ctttgcctca gtgagcgagc gagcgcgcag ctgcctgcag g 101

<210> 19
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 19
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

[0007]

ccgggcgaca aagtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120

gcgcgcagct gcctgcagg 139

<210> 20
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 20
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgaaa atcgcccgac gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc 120

gcgcagctgc ctgcagg 137

<210> 21
<211> 135
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 21
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgaaa cgcccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 120

gcagctgcct gcagg 135

<210> 22
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 22
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

[0008]

ccgggcaaag cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 120

agctgcctgc agg 133

<210> 23
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 23
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gtttcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120

gcgcgcagct gcctgcagg 139

<210> 24
<211> 137
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 24
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg tttccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc 120

gcgcagctgc ctgcagg 137

<210> 25
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 25
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60
[0009]
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgt ttcgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 120

gcagctgcct gcagg 135

<210> 26
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 26
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccctt tgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 120

agctgcctgc agg 133

<210> 27
<211> 131
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 27
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccttt ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag 120

ctgcctgcag g 131

<210> 28
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 28
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

[0010]

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgctttg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct 120

gcctgcagg 129

<210> 29
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 29
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgtttcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc 120

ctgcagg 127

<210> 30
<211> 122
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 30
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 31
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 31
[0011] aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120

tgcctgcagg 130

<210> 32
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 32
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct 120

<210> 33
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 33
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgt cgggcgacct ttggtcgccc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120

ct 122

<210> 34
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 34
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

[0012] ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 120

ct 122

<210> 35
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 35
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgcc cgggcgtcgg gcgacctttg 60

gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta 120

ggggttcct 129

<210> 36
<211> 101
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 36
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcaaa gcctcagtga gcgagcgagc 60

gcgcagagag ggagtggcca actccatcac taggggttcc t 101

<210> 37
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 37
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacttt gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac 120

tccatcacta ggggttcct 139

[0013]

<210> 38
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 38
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgatttt cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc 120

catcactagg ggttcct 137

<210> 39
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 39
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgtttcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca 120

tcactagggg ttcct 135

<210> 40
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 40
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggctttgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120

actaggggtt cct 133

[0014]

<210> 41
<211> 139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 41
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtcgg 60

gcgacctttg gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac 120

tccatcacta ggggttcct 139

<210> 42
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 42
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccggaaaccg ggcgtcgggc 60

gacctttggt cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc 120

catcactagg ggttcct 137

<210> 43
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 43
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgaaacggg cgtcgggcga 60

cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca 120

tcactagggg ttcct 135

[0015]

<210> 44
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 44
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccaaagggcg tcgggcgacc 60

tttggtcgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc 120

actaggggtt cct 133

<210> 45
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 45
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc caaaggcgtc gggcgacctt 60

tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac 120

taggggttcc t 131

<210> 46
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 46
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc aaagcgtcgg gcgacctttg 60

gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta 120

ggggttcct 129

[0016]

<210> 47
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 47
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccga aacgtcgggc gacctttggt 60

cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc catcactagg 120

ggttcct 127

<210> 48
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 48
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca 120

gg 122

<210> 49
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 49
cgatcgttcg at 12

<210> 50
<211> 12
[0017] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 50
atcgaaccat cg 12

<210> 51
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 51
atcgaacgat cg 12

<210> 52
<211> 165

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 52
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca tcactagggg ttcct 165

<210> 53
<211> 140
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 53
[0018] cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc 60

cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg 120

cgcagagaga tcactagggg 140

<210> 54
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 54
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60

tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 91

<210> 55
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 55
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc 60

ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 91

<210> 56
<211> 1662
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 56
gccgccacca tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatccgctg 60

gaagatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatacgc cctggttcct 120

[0019] ggaacaattg cttttacaga tgcacatatc gaggtggaca tcacttacgc tgagtacttc 180

gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga 240

atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cggtgttggg cgcgttattt 300

atcggagttg cagttgcgcc cgcgaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt 360

atgggcattt cgcagcctac cgtggtgttc gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg 420

aacgtgcaaa aaaagctccc aatcatccaa aaaattatta tcatggattc taaaacggat 480

taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc atctacctcc cggttttaat 540

gaatacgatt ttgtgccaga gtccttcgat agggacaaga caattgcact gatcatgaac 600

tcctctggat ctactggtct gcctaaaggt gtcgctctgc ctcatagaac tgcctgcgtg 660

agattctcgc atgccagaga tcctattttt ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt 720

ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata 780

tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgtttct gaggagcctt 840

caggattaca agattcaaag tgcgctgctg gtgccaaccc tattctcctt cttcgccaaa 900

agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tggtggcgct 960

cccctctcta aggaagtcgg ggaagcggtt gccaagaggt tccatctgcc aggtatcagg 1020

caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacacccga gggggatgat 1080

aaaccgggcg cggtcggtaa agttgttcca ttttttgaag cgaaggttgt ggatctggat 1140

accgggaaaa cgctgggcgt taatcaaaga ggcgaactgt gtgtgagagg tcctatgatt 1200

atgtccggtt atgtaaacaa tccggaagcg accaacgcct tgattgacaa ggatggatgg 1260

ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat cgttgaccgc 1320

ctgaagtctc tgattaagta caaaggctat caggtggctc ccgctgaatt ggaatccatc 1380

ttgctccaac accccaacat cttcgacgca ggtgtcgcag gtcttcccga cgatgacgcc 1440

ggtgaacttc ccgccgccgt tgttgttttg gagcacggaa agacgatgac ggaaaaagag 1500

atcgtggatt acgtcgccag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgcgg aggagttgtg 1560

tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag 1620

[0020] atcctcataa aggccaagaa gggcggaaag atcgccgtgt aa 1662

<210> 57
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多肽”

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任何氨基酸

<400> 57
Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

```
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125
```

[0021]

```
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240
```

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

[0022] Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 58
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

[0023]

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 59
<211> 1310
<212> DNA
<213> 人工序列

[0024]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 59
ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga 60

ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc 120

atgcgctcag ggctgagcgc ggggagagca gagcacacaa gctcatagac cctggtcgtg 180

gggggggagga ccggggagct ggcgcggggc aaactgggaa agcggtgtcg tgtgctggct 240

ccgccctctt cccgagggtg ggggagaacg gtatataagt gcggcagtcg ccttggacgt 300

tctttttcgc aacgggtttg ccgtcagaac gcaggtgagg ggcgggtgtg gcttccgcgg 360

gccgccgagc tggaggtcct gctccgagcg ggccgggccc cgctgtcgtc ggcggggatt 420

agctgcgagc attcccgctt cgagttgcgg gcggcgcggg aggcagagtg cgaggcctag 480

cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc tagcgtggtg tccgcgccgc 540

cgccgcgtgc tactccggcc gcactctggt ctttttttttt tttgttgttg ttgccctgct 600

gccttcgatt gccgttcagc aataggggct aacaaaggga gggtgcgggg cttgctcgcc 660

cggagcccgg agaggtcatg gttggggagg aatggaggga caggagtggc ggctggggcc 720

cgcccgcctt cggagcacat gtccgacgcc acctggatgg ggcgaggcct ggggtttttc 780

ccgaagcaac caggctgggg ttagcgtgcc gaggccatgt ggccccagca cccggcacga 840

tctggcttgg cggcgccgcg ttgccctgcc tccctaacta gggtgaggcc atcccgtccg 900

gcaccagttg cgtgcgtgga aagatggccg ctcccgggcc ctgttgcaag gagctcaaaa 960

tggaggacgc ggcagcccgg tggagcgggc gggtgagtca cccacacaaa ggaagagggc 1020

ctggtccctc accggctgct gcttcctgtg accccgtggt cctatcggcc gcaatagtca 1080

cctcgggctt ttgagcacgg ctagtcgcgg cgggggggagg ggatgtaatg gcgttggagt 1140

ttgttcacat ttggtgggtg gagactagtc aggccagcct ggcgctggaa gtcatttttg 1200

gaatttgtcc ccttgagttt tgagcggagc taattctcgg gcttcttagc ggttcaaagg 1260

tatcttttaa accctttttt aggtgttgtg aaaaccaccg ctaattcaaa 1310

[0025]

<210> 60
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 60
gcgcgctcgc tcgctc 16

<210> 61
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 61
ggttga 6

<210> 62
<211> 4
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 62
agtt 4

<210> 63
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 63
ggttgg 6

[0026]

<210> 64
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 64
agttgg 6

<210> 65
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 65
agttga 6

<210> 66
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 66
rrttrr 6

<210> 67
<211> 581
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 67
gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggtatacat 60

[0027]

ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt 120

actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttatttacgc 180

tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tgatattctt 240

aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct 300

attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt 360

ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac 420

gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct 480

ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca 540

ggggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt c 581

<210> 68
<211> 225
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 68
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 60

ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 120

gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 180

ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc 225

<210> 69
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 69
actgaggc 8

[0028]

<210> 70
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 70
gcctcagt 8

<210> 71
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 71
gagcgagcga gcgcgc 16

<210> 72
<211> 1923
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 72
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

[0029] cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg 540

cttcactctc cccatctccc ccccctcccc acccccaatt ttgtatttat ttatttttta 600

attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg 660

gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg 720

cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg 780

aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgac gctgccttcg ccccgtgccc cgctccgccg 840

ccgcctcgcg ccgcccgccc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc 900

gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg cttgtttctt 960

ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc 1020

ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgctgc 1080

ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc agtgtgcgcg 1140

aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag gggaacaaag 1200

gctgcgtgcg gggtgtgtgc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg gcggtcgggc 1260

tgtaaccccc ccctgcaccc ccctccccga gttgctgagc acggcccggc ttcgggtgcg 1320

gggctccgta cggggcgtgg cgcggggctc gccgtgccgg gcgggggggtg gcggcaggtg 1380

ggggtgccgg gcgggggcggg gccgcctcgg gccggggagg gctcgggggga ggggcgcggc 1440

ggcccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc gcagccattg ccttttatgg 1500

taatcgtgcg agagggcgca gggacttcct ttgtcccaaa tctgtgcgga gccgaaatct 1560

gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg cgcggggcga agcggtgcgg cgccggcagg 1620

aaggaaatgg gcgggggaggg ccttcgtgcg tcgccgcgcc gccgtcccct tctccctctc 1680

cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg 1740

ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggctct agagcctctg ctaaccatgt tttagccttc 1800

ttctttttcc tacagctcct gggcaacgtg ctggttattg tgctgtctca tcatttgtcg 1860

acagaattcc tcgaagatcc gaaggggttc aagcttggca ttccggtact gttggtaaag 1920

cca 1923

[0030]

<210> 73
<211> 1272
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 73
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctattttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccggat 780

cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt 840

ggtactctcc cagagactgt ctgactcacg ccacccccctc caccttggac acaggacgct 900

gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg 960

cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 1020

cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc 1080

ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 1140

[0031] cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt 1200

tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac 1260

ctttggaact ga 1272

<210> 74
<211> 1177
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 74
ggctcagagg ctcagaggca cacaggagtt tctgggctca ccctgccccc ttccaacccc 60

tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaaac 120

ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac 180

agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggccca 240

tgccacctcc aacatccact cgacccccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc 300

ctggcgtggt ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgct gggtggggag 360

tcgtcagtaa gtggctatgc cccgaccccg aagcctgttt ccccatctgt acaatggaaa 420

tgataaagac gcccatctga tagggttttt gtggcaaata aacatttggt ttttttgttt 480

tgttttgttt tgtttttga gatggaggtt tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtga 540

cacaatctca tctcaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca 600

agcatgtgcc accacacctg gctaattttc tatttttagt agagacgggt ttctccatgt 660

tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca cacccggcta 720

atttttttcta tttttgacag ggacggggtt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctagaggt 780

accggatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca 840

gctaagtggt actctcccag agactgtctg actcacgcca ccccctccac cttggacaca 900

ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg 960

tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg 1020

[0032] gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca 1080

gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 1140

tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt 1177

<210> 75
<211> 547
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 75
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggggaatga ctcctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240

gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga cttagcccct 300

gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggttaatatt caccagcagc ctcccccgtt 360

gcccctctgg atccactgct taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca 420

ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa 480

gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg 540

gaactga 547

<210> 76
<211> 556
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 76
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

[0033]
cactcgaccc cttggaattt cggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt 180

agtgtgagag gggaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca ctgcccaggc 240

aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagcccctgt 300

ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct cccccgttgc 360

ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacactcg agggccctgt ctcctcagct 420

tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atccggacat cgattctaag gtaaatataa 480

aatttttaag tgtataattt gttaaactac tgattctaat tgtttctctc ttttagattc 540

caacctttgg aactga 556

<210> 77
<211> 1179
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 77

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60

ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120

gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180

gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240

gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300

acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360

gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg 420

cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggtggcacc ttcgcgcctg tctcgctgct 480

ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg 540

caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc 600

gcgggcggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660

gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct 720

[0034]

ggtctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca 780

gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg 840

acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900

tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat 960

tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg 1020

gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa 1080

ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttggt tcattctcaa gcctcagaca 1140

gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga 1179

<210> 78
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 78
aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttgtt 60

cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc 120

tgcggcgcgc gcagcacctt t 141

<210> 79
<211> 317
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 79
ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120

tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 180

[0035] ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 240

aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 300

gcctaggctt ttgcaaa 317

<210> 80
<211> 241
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 80
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60

ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggctt tatatatctt gtggaaagga 240

c 241

<210> 81
<211> 215
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 81
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60

cacccagcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120

tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg 180

gatttgggaa tcgtataaga actgtatgag accac 215

<210> 82
<211> 546
<212> DNA
<213> 人工序列

[0036]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 82
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggggaatga ctcctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240

gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga cttagccccc 300

gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggttaatatt caccagcagc ctccccccgtt 360

gcccctctgg atccactgct taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca 420

ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa 480

gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg 540

gaactg 546

<210> 83
<211> 576
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 83
tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 60

cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 120

atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 180

tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc 240

cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta 300

tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 360

cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt 420

ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 480

[0037]

aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag 540

gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcag 576

<210> 84
<211> 150
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 84
ataaacgata acgccgttgg tggcgtgagg catgtaaaag gttacatcat tatcttgttc 60

gccatccggt tggtataaat agacgttcat gttggttttt gtttcagttg caagttggct 120

gcggcgcgcg cagcaccttt gcggccatct 150

<210> 85
<211> 1313
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 85

[0038]

ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga 60

ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc 120

atgcgcccag ggctgagcgc gggtagatca gagcacacaa gctcacagtc cccggcggtg 180

gggggagggg cgcgctgagc gggggccagg gagctggcgc ggggcaaact gggaaagtgg 240

tgtcgtgtgc tggctccgcc ctcttcccga gggtggggga gaacggtata taagtgcggt 300

agtcgccttg gacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgtc agaacgcagg tgagtggcgg 360

gtgtggcttc cgcgggcccc ggagctggag ccctgctctg agcgggccgg gctgatatgc 420

gagtgtcgtc cgcagggttt agctgtgagc attcccactt cgagtggcgg gcggtgcggg 480

ggtgagagtg cgaggcctag cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc 540

tagcgtggtg tccgccgccg cgtgccactc cggccgcact atgcgttttt tgtccttgct 600

gccctcgatt gccttccagc agcatgggct aacaaaggga gggtgtgggg ctcactctta 660

aggagcccat gaagcttacg ttggatagga atggaagggc aggaggggcg actggggccc 720

gcccgccttc ggagcacatg tccgacgcca cctggatggg gcgaggcctg tggctttccg 780

aagcaatcgg gcgtgagttt agcctacctg ggccatgtgg ccctagcact gggcacggtc 840

tggcctggcg gtgccgcgtt cccttgcctc ccaacaaggg tgaggccgtc ccgcccggca 900

ccagttgctt gcgcggaaag atggccgctc ccggggccct gttgcaagga gctcaaaatg 960

gaggacgcgg cagcccggtg gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aagagggcct 1020

tgcccctcgc cggccgctgc ttcctgtgac cccgtggtct atcggccgca tagtcacctc 1080

gggcttctct tgagcaccgc tcgtcgcggc gggggggaggg gatctaatgg cgttggagtt 1140

tgttcacatt tggtgggtgg agactagtca ggccagcctg gcgctggaag tcattcttgg 1200

aatttgcccc tttgagtttg gagcgaggct aattctcaag cctcttagcg gttcaaaggt 1260

attttctaaa cccgtttcca ggtgttgtga aagccaccgc taattcaaag caa 1313

<210> 86
<211> 213
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 86
taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 60

tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 120

ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt 180

tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gta 213

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0039]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成肽”

<400> 87
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 88
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成肽”

<400> 88
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 89
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成肽”

<400> 89
Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 猿猴病毒 40

<400> 90
[0040] Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> 猿猴病毒 40

<400> 91
cccaagaaga agaggaaggt g 21

<210> 92
<211> 16
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /附注=“未知描述：核质蛋白双部分 NLS 序列”

<400> 92
Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /附注=“未知描述：C-myc NLS序列”

<400> 93
Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
1 5

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /附注=“未知描述：C-myc NLS序列”

<400> 94
[0041] Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro
1 5 10

<210> 95
<211> 38
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95
Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
20 25 30

Arg Asn Gln Gly Gly Tyr
35

<210> 96
<211> 42
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /附注=“未知描述：输入蛋白-α 序列的 IBB 结构域”

<400> 96
Arg Met Arg Ile Glx Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys
20 25 30

Asp Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val
35 40

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> source
[0042] <223> /附注=“未知描述：肌瘤 T 蛋白序列”

<400> 97
Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro
1 5

<210> 98
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> source
<223> /附注=“未知描述：肌瘤 T 蛋白序列”

<400> 98
Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp
1 5

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 99
Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu
1 5

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 100
Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro
1 5 10

<210> 101
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 101
[0043] gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggaaacccgg gcgtgcgcct cagtgagcga 60

gcgagcgcgc 70

<210> 102
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 102
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcacgc ccgggtttcc cgggcggcct cagtgagcga 60

gcgagcgcgc 70

<210> 103
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 103
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgtcgg gcgacctttg gtcgcccggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 104
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 104
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

[0044]

<210> 105
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 105
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 106
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 106
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 107
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 107
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg ctttgcccgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 108
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0045] <223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 108
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca aagcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 109
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 109
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgaaac gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 60

tgagcgagcg agcgcgc 77

<210> 110
<211> 77
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 110
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgtt tcggcctcag 60

tgagcgagcg agcgcgc 77

<210> 111
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 111
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcaaagcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 51

[0046] <210> 112
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 112
gcgcgctcgc tcgctcactg aggctttgcc tcagtgagcg agcgagcgcg c 51

<210> 113
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 113
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 114
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 114
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 115
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

[0047] <400> 115
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 116
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 116
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcgcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 117
<211> 5
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 117
Asp Arg Leu Arg Arg
1 5

<210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> 流感病毒

<400> 118
Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 119
<211> 10
<212> PRT
<213> 肝炎 δ 病毒

<400> 119
Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu
1 5 10

[0048]
<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 120
Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg
1 5 10

<210> 121
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121
Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys
1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys
20

<210> 122

<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122
Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 123
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 123
gtttaaac 8

[0049]

<210> 124
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 124
ttaattaa 8

<210> 125
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 125
aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttgtt 60

cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc 120

tgcggcgcgc gcagcacctt t 141

<210> 126
<211> 317
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 126
ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120

tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 180

ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 240

aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 300

[0050] gcctaggctt ttgcaaa 317

<210> 127
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 127
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 128
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 128
gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc cactggtgac 60

<210> 129
<211> 1260
<212> DNA
<213> 腺相关病毒-2

<400> 129
atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag 60

gaggaccagg cctcatacat ctccttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag 120

gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg 180

gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat tttggaacta 240

aacgggtacg atccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc 300

ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg 360

gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgcgtaa actggaccaa tgagaacttt 420

[0051] cccttcaacg actgtgtcga caagatggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc 480

aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa 540

tgcaagtcct cggcccagat agacccgact cccgtgatcg tcacctccaa caccaacatg 600

tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg 660

atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag 720

gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc 780

tacgtcaaaa agggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtgag 840

cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc 900

aactacgcag acaggtacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg 960

tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga 1020

cagaaagact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa 1080

aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc 1140

actgcctgcg atctggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataaatgatt 1200

taaatcaggt atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga 1260

<210> 130
<211> 1932
<212> DNA
<213> 腺相关病毒-2

<400> 130
atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60

ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120

tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag 180

cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct tttctttgtg 240

caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg 300

aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360

taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac cagaaatggc 420

gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctccccaaa 480

[0052]

acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag cgcctgtttg 540

aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600

gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag atcaaaaact 660

tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac ctcggagaag 720

cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcgg 780

tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840

cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900

attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct gggatgggcc 960

acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac taccgggaag 1020

accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080

aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg 1140

aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc 1200

gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat cgtcacctcc 1260

aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320

ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga ctttgggaag 1380

gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440

gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc cagtgacgca 1500

gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560

gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620

aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc aaatatctgc 1680

ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc tcaacccgtt 1740

tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaaggtg 1800

ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa 1860

caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat cttccagatt ggctcgagga 1920

cactctctct ga 1932

[0053]

<210> 131
<211> 1876
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 131
cgcagccacc atggcggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg 60

gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 120

gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga 180

gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 240

tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac 300

caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat 360

tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac 420

cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 480

gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 540

cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 600

gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag 660

atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac 720

ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc 780

caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 840

taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 900

gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct 960

gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac 1020

taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1080

aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg 1140

ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1200

caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat 1260

[0054]

cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca 1320

ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga 1380

ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt 1440

ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc 1500

cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac 1560

gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca 1620

cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1680

aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc 1740

tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1800

gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg 1860

catctttgaa caataa 1876

<210> 132
<211> 1194

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 132
atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag 60

gaggaccagg cctcatacat ctccttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag 120

gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg 180

gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat tttggaacta 240

aacgggtacg atccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc 300

ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg 360

gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgcgtaa actggaccaa tgagaacttt 420

cccttcaacg actgtgtcga caagatggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc 480

aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa 540

[0055]

tgcaagtcct cggcccagat agacccgact cccgtgatcg tcacctccaa caccaacatg 600

tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg 660

atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag 720

gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc 780

tacgtcaaaa agggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagtgag 840

cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc 900

aactacgcag accgctacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg 960

tttccctgca gacaatgcga gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcacgga 1020

cagaaagact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa 1080

aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc 1140

actgcctgcg atctggtcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataa 1194

<210> 133
<211> 1876

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 133
cgcagccacc atggcggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg 60

gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt 120

gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga 180

gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct 240

tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac 300

caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat 360

tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac 420

cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt 480

gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag 540

[0056]

cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc 600

gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag 660

atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac 720

ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc 780

caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac 840

taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg 900

gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct 960

gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac 1020

taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt 1080

aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg 1140

ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag 1200

caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat 1260

cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca 1320

ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga 1380

ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt 1440

ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc 1500

cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac 1560

gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca 1620

cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc 1680

aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc 1740

tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat 1800

gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg 1860

catctttgaa caataa 1876

[0057]

<210> 134
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 134
ctaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg c 51

<210> 135
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 135
ctaggactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt cgcccggcct 60

cagtc 65

<210> 136

<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 136
ggactgaggc cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag 60

tcctgca 67

<210> 137
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 137
gtgcgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggcgcactc a 41

[0058]

<210> 138
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 138
ggactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg cggcctcagt cctgca 56

<210> 139
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 139
ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc agtc 54

<210> 140
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 140
ggactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacggcctca gtcctgca 48

<210> 141
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 141
ctaggactga ggccgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtc 46

[0059]

<210> 142
<211> 67
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 142
ggactgaggc ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcgcctcag 60

tcctgca 67

<210> 143
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 143
atacctaggc acgcgtgtta ctagttatta atagtaatca attacgg 47

<210> 144
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 144
atacctaggg gccgcacgcg tgttactag 29

<210> 145
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0060] <223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 145
atacactcag tgcctgcagg cacgtggtcc ggagatccag ac 42

<210> 146
<211> 3754
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 146
cctaggtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct 60

tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatcgcggcc gctcaatatt ggccattagc 120

catattattc attggttata tagcataaat caatattggc tattggccat tgcatacgtt 180

gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt ccaatatgac cgccatgttg 240

gcattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 300

atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 360

cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 420

tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca 480

agtgtatcat atgccaagtc cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg 540

gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 600

agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc 660

ccccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttatttttt taattatttt gtgcagcgat 720

gggggcgggg ggggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 780

cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc 840

ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 900

agtcgctgcg acgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgccgcctcg cgccgcccgc 960

cccggctctg actgaccgcg ttactcccac aggtgagcgg gcgggacggc ccttctcctc 1020

cgggctgtaa ttagcgcttg gtttaatgac ggcttgtttc ttttctgtgg ctgcgtgaaa 1080

[0061]

gccttgaggg gctccgggag ggccctttgt gcgggggggga gcggctcggg gggtgcgtgc 1140

gtgtgtgtgt gcgtggggag cgccgcgtgc ggcccgcgct gcccggcggc tgtgagcgct 1200

gcgggcgcgg cgcggggctt tgtgcgctcc gcagtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg 1260

gcggtgcccc gcggtgcggg gggggctgcg aggggaacaa aggctgcgtg cggggtgtgt 1320

gcgtgggggg gtgagcaggg ggtgtgggcg cggcggtcgg gctgtaaccc ccccctgcac 1380

cccccteccc gagttgctga gcacggcccg gcttcgggtg cggggctccg tacggggcgt 1440

ggcgcggggc tcgccgtgcc gggcgggggg tggcggcagg tgggggtgcc gggcggggcg 1500

gggccgcctc gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg gcggcccccg gagcgccggc 1560

ggctgtcgag gcgcggcgag ccgcagccat tgccttttat ggtaatcgtg cgagagggcg 1620

cagggacttc ctttgtccca aatctgtgcg gagccgaaat ctgggaggcg ccgccgcacc 1680

ccctctagcg ggcgcggggc gaagcggtgc ggcgccggca ggaaggaaat gggcggggag 1740

ggccttcgtg cgtcgccgcg ccgccgtccc cttctccctc tccagcctcg gggctgtccg 1800

cgggggacg gctgccttcg gggggacgg ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg 1860

accggcggct ctagagcctc tgctaaccat gttttagcct tcttcttttt cctacagctc 1920

ctgggcaacg tgctggttat tgtgctgtct catcatttgt cgacagaatt cctcgaagat 1980

ccgaaggggt tcaagcttgg cattccggta ctgttggtaa agccagttta aacgccgcca 2040

ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg 2100

acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct 2160

acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca 2220

ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga 2280

agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct 2340

tcttcaagga cgacggcaac tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc 2400

tggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc 2460

acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga 2520

acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg 2580

[0062] ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc 2640

actacctgag cacccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg 2700

tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcactctcgg catggacgag ctgtacaagt 2760

aattaattaa gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt 2820

gggtatacat ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg 2880

atatgtaatt actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg 2940

ttatttacgc tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac 3000

tgatattctt aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct 3060

gtatctagct attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgtata aatcctggtt 3120

gctgtctctt ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt 3180

gtttgctgac gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg 3240

gactttcgct ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg 3300

ctgctggaca ggggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt ctgtgccttc 3360

tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc tggaaggtgc 3420

cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg 3480

tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa 3540

tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatggctcta gagcatggct acgtagataa 3600

gtagcatggc gggttaatca ttaactacac ctgcagcagg aacccctagt gatggagttg 3660

gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc cctgcaggac tgaggccggg cgaccaaagg 3720

tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtcctg cagg 3754

<210> 147
<211> 8418
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0063]

<400> 147
ggcagctgcg cgctcgctcg ctcacctagg ccgcccgggc aaagcccggg cgtcgggcga 60

cctttggtcg cccggcctag gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaactcca 120

tcactagggg ttccttgtag ttaatgatta acccgccatg ctacttatcg cggccgctca 180

atattggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata ttggctattg 240

gccattgcat acgttgtatc tatatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaat 300

atgaccgcca tgttggcatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 360

attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 420

tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 480

aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca 540

cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtccgccc cctattgacg tcaatgacgg 600

taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta cgggactttc ctacttggca 660

gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt 720

cactctcccc atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt 780

attttgtgca gcgatggggg cgggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg 840

gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc 900

gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag 960

cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc tccgccgccg 1020

cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg agcgggcggg 1080

acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt gtttcttttc 1140

tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg ggggagcggc 1200

tcgggggggtg cgtgcgtgtg tgtgtgcgtg gggagcgccg cgtgcggccc gcgctgcccg 1260

gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt gtgcgcgagg 1320

ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg aacaaaggct 1380

gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggggtgt gggcgcggcg gtcgggctgt 1440

aaccccccccc tgcacccccc tccccgagtt gctgagcacg gcccggcttc gggtgcgggg 1500

ctccgtacgg ggcgtggcgc ggggctcgcc gtgccgggcg gggggtggcg gcaggtgggg 1560

[0064]

gtgccgggcg gggcggggcc gcctcgggcc ggggagggct cgggggaggg gcgcggcggc 1620

ccccggagcg ccggcggctg tcgaggcgcg gcgagccgca gccattgcct tttatggtaa 1680

tcgtgcgaga gggcgcaggg acttcctttg tcccaaatct gtgcggagcc gaaatctggg 1740

aggcgccgcc gcacccccctc tagcgggcgc ggggcgaagc ggtgcggcgc cggcaggaag 1800

gaaatgggcg gggagggcct tcgtgcgtcg ccgcgccgcc gtccccttct ccctctccag 1860

cctcggggct gtccgcgggg ggacggctgc cttcgggggg gacggggcag ggcggggttc 1920

ggcttctggc gtgtgaccgg cggctctaga gcctctgcta accatgtttt agccttcttc 1980

tttttcctac agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca tttgtcgaca 2040

gaattcctcg aagatccgaa ggggttcaag cttggcattc cggtactgtt ggtaaagcca 2100

gtttaaacgc cgccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca 2160

tcctggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgagggcg 2220

agggcgatgc cacctacggc aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc 2280

ccgtgccctg gcccaccctc gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct 2340

accccgacca catgaagcag cacgacttct tcaagtccgc catgcccgaa ggctacgtcc 2400

aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc gaggtgaagt 2460

tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg 2520

gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg 2580

ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg 2640

gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc 2700

tgctgcccga caaccactac ctgagcaccc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga 2760

agcgcgatca catggtcctg ctggagttcg tgaccgccgc cgggatcact ctcggcatgg 2820

acgagctgta caagtaatta attaagagca tcttaccgcc atttattccc atatttgttc 2880

tgtttttctt gatttgggta tacatttaaa tgttaataaa acaaaatggt ggggcaatca 2940

tttacatttt tagggatatg taattactag ttcaggtgta ttgccacaag acaaacatgt 3000

taagaaactt tcccgttatt tacgctctgt tcctgttaat caacctctgg attacaaaat 3060

[0065] ttgtgaaaga ttgactgata ttcttaacta tgttgctcct tttacgctgt gtggatatgc 3120

tgctttatag cctctgtatc tagctattgc ttcccgtacg gctttcgttt tctcctcctt 3180

gtataaatcc tggttgctgt ctcttttaga ggagttgtgg cccgttgtcc gtcaacgtgg 3240

cgtggtgtgc tctgtgtttg ctgacgcaac ccccactggc tggggcattg ccaccacctg 3300

tcaactcctt tctgggactt tcgctttccc cctcccgatc gccacggcag aactcatcgc 3360

cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc taggttgctg ggcactgata attccgtggt 3420

gttgtctgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt 3480

gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 3540

ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga 3600

ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg ggatgcggtg ggctctatgg ctctagagca 3660

tggctacgta gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacacctgca gcaggaaccc 3720

ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctccctgc aggactgagg 3780

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tcctgcaggg agcgagcgag 3840

cgcgcagctg cctgcacggg cgcgccggta ccgggagatg ggggaggcta actgaaacac 3900

ggaaggagac aataccggaa ggaacccgcg ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa 3960

cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa cgcggggttc ggtcccaggg ctggcactct 4020

gtcgataccc caccgagacc ccattgggac caatacgccc gcgtttcttc cttttcccca 4080

ccccaacccc caagttcggg tgaaggccca gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaagc 4140

cctgccatag ccactacggg tacgtaggcc aaccactaga actatagcta gagtcctggg 4200

cgaacaaacg atgctcgcct tccagaaaac cgaggatgcg aaccacttca tccggggtca 4260

gcaccaccgg caagcgccgc gacggccgag gtctaccgat ctcctgaagc cagggcagat 4320

ccgtgcacag caccttgccg tagaagaaca gcaaggccgc caatgcctga cgatgcgtgg 4380

agaccgaaac cttgcgctcg ttcgccagcc aggacagaaa tgcctcgact tcgctgctgc 4440

ccaaggttgc cgggtgacgc acaccgtgga aacggatgaa ggcacgaacc cagttgacat 4500

aagcctgttc ggttcgtaaa ctgtaatgca agtagcgtat gcgctcacgc aactggtcca 4560

gaaccttgac cgaacgcagc ggtggtaacg gcgcagtggc ggttttcatg gcttgttatg 4620

[0066]

actgtttttt tgtacagtct atgcctcggg catccaagca gcaagcgcgt tacgccgtgg 4680

gtcgatgttt gatgttatgg agcagcaacg atgttacgca gcagcaacga tgttacgcag 4740

cagggcagtc gccctaaaac aaagttaggt ggctcaagta tgggcatcat tcgcacatgt 4800

aggctcggcc ctgaccaagt caaatccatg cgggctgctc ttgatctttt cggtcgtgag 4860

ttcggagacg tagccaccta ctcccaacat cagccggact ccgattacct cgggaacttg 4920

ctccgtagta agacattcat cgcgcttgct gccttcgacc aagaagcggt tgttggcgct 4980

ctcgcggctt acgttctgcc caggtttgag cagccgcgta gtgagatcta tatctatgat 5040

ctcgcagtct ccggcgagca ccggaggcag ggcattgcca ccgcgctcat caatctcctc 5100

aagcatgagg ccaacgcgct tggtgcttat gtgatctacg tgcaagcaga ttacggtgac 5160

gatcccgcag tggctctcta tacaaagttg ggcatacggg aagaagtgat gcactttgat 5220

atcgacccaa gtaccgccac ctaacaattc gttcaagccg agatcggctt cccggccgcg 5280

gagttgttcg gtaaattgtc acaacgccgc gaatatagtc tttaccatgc ccttggccac 5340

gcccctcttt aatacgacgg gcaatttgca cttcagaaaa tgaagagttt gctttagcca 5400

taacaaaagt ccagtatgct ttttcacagc ataactggac tgatttcagt ttacaactat 5460

tctgtctagt ttaagacttt attgtcatag tttagatcta ttttgttcag tttaagactt 5520

tattgtccgc ccacacccgc ttacgcaggg catccattta ttactcaacc gtaaccgatt 5580

ttgccaggtt acgcggctgg tctgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5640

taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 5700

ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg 5760

gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 5820

gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgcccccctg acgagcatca caaaaatcga 5880

cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttcccccct 5940

ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc 6000

tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg 6060

gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 6120

[0067] tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca 6180

ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 6240

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct 6300

ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc 6360

accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga 6420

tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca 6480

cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat 6540

taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac 6600

caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt 6660

gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt 6720

gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag 6780

ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc catccagtct 6840

attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt 6900

gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc 6960

tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcggtt 7020

agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg 7080

gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg 7140

actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct 7200

tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc 7260

attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt 7320

tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt 7380

tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg 7440

aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat 7500

tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg 7560

cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgaa attgtaaacg ttaatatttt gttaaaattc 7620

gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc 7680

[0068]

ccttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag 7740

agtccactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc 7800

gatggcccac tacgtgaacc atcaccctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa 7860

gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg 7920

aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt 7980

gtagcggtca cgctgcgcgt aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc 8040

gcgtcccatt cgccattcag gctgcaaata agcgttgata ttcagtcaat tacaaacatt 8100

aataacgaag agatgacaga aaaattttca ttctgtgaca gagaaaaagt agccgaagat 8160

gacggtttgt cacatggagt tggcaggatg tttgattaaa aacataacag gaagaaaaat 8220

gccccgctgt gggcggacaa aatagttggg aactgggagg ggtggaaatg gagtttttaa 8280

ggattattta gggaagagtg acaaaataga tgggaactgg gtgtagcgtc gtaagctaat 8340

acgaaaatta aaaatgacaa aatagtttgg aactagattt cacttatctg gttcggatct 8400

cctagtgagc tccctgca 8418

<210> 148
<211> 225
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 148
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 60

ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 120

gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 180

ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc 225

<210> 149
<211> 1177
<212> DNA
<213> 人工序列

[0069]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 149
ggctcagagg ctcagaggca cacaggagtt tctgggctca ccctgccccc ttccaacccc 60

tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaaac 120

ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac 180

agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggccca 240

tgccacctcc aacatccact cgacccccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc 300

ctggcgtggt ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgct gggtggggag 360

tcgtcagtaa gtggctatgc cccgaccccg aagcctgttt ccccatctgt acaatggaaa 420

tgataaagac gcccatctga tagggttttt gtggcaaata aacatttggt ttttttgttt 480

tgttttgttt tgttttttga gatggaggtt tgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtga 540

cacaatctca tctcaccaca accttccccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca 600

agcatgtgcc accacacctg gctaattttc tatttttagt agagacgggt ttctccatgt 660

tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca cacccggcta 720

atttttttcta tttttgacag ggacggggtt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctagaggt 780

accggatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca 840

gctaagtggt actctcccag agactgtctg actcacgcca ccccctccac cttggacaca 900

ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg 960

tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg 1020

gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca 1080

gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 1140

tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt 1177

<210> 150
<211> 1326
<212> DNA
<213> 人工序列

[0070]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 150
ctgcagggcc cactagtgga gccgagagta attcatacaa aaggagggat cgccttcgca 60

aggggagagc ccagggaccg tccctaaatt ctcacagacc caaatccctg tagccgcccc 120

acgacagcgc gaggagcatg cgcccagggc tgagcgcggg tagatcagag cacacaagct 180

cacagtcccc ggcggtgggg ggaggggcgc gctgagcggg ggccagggag ctggcgcggg 240

gcaaactggg aaagtggtgt cgtgtgctgg ctccgccctc ttcccgaggg tgggggagaa 300

cggtatataa gtgcggtagt cgccttggac gttctttttc gcaacgggtt tgccgtcaga 360

acgcaggtga gtggcgggtg tggcttccgc gggccccgga gctggagccc tgctctgagc 420

gggccgggct gatatgcgag tgtcgtccgc agggtttagc tgtgagcatt cccacttcga 480

gtggcgggcg gtgcgggggt gagagtgcga ggcctagcgg caaccccgta gcctcgcctc 540

gtgtccggct tgaggcctag cgtggtgtcc gccgccgcgt gccactccgg ccgcactatg 600

cgtttttgt ccttgctgcc ctcgattgcc ttccagcagc atgggctaac aaagggaggg 660

tgtggggctc actcttaagg agcccatgaa gcttacgttg gataggaatg gaagggcagg 720

aggggcgact ggggcccgcc cgccttcgga gcacatgtcc gacgccacct ggatggggcg 780

aggcctgtgg ctttccgaag caatcgggcg tgagtttagc ctacctgggc catgtggccc 840

tagcactggg cacggtctgg cctggcggtg ccgcgttccc ttgcctccca acaagggtga 900

ggccgtcccg cccggcacca gttgcttgcg cggaaagatg gccgctcccg gggccctgtt 960

gcaaggagct caaaatggag gacgcggcag cccggtggag cgggcgggtg agtcacccac 1020

acaaaggaag agggccttgc ccctcgccgg ccgctgcttc ctgtgacccc gtggtctatc 1080

ggccgcatag tcacctcggg cttctcttga gcaccgctcg tcgcggcggg gggaggggat 1140

ctaatggcgt tggagtttgt tcacatttgg tgggtggaga ctagtcaggc cagcctggcg 1200

ctggaagtca ttcttggaat ttgccccttt gagtttggag cgaggctaat tctcaagcct 1260

cttagcggtt caaaggtatt ttctaaaccc gtttccaggt gttgtgaaag ccaccgctaa 1320

[0071] ttcaaa 1326

<210> 151
<211> 573
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 151
gtaagagttt tatgtttttt catctctgct tgtatttttc tagtaatgga agcctggtat 60

tttaaaatag ttaaattttc ctttagtgct gatttctaga ttattattac tgttgttgtt 120

gttattattg tcattatttg catctgagaa cccttaggtg gttatattat tgatatattt 180

ttggtatctt tgatgacaat aatgggggat tttgaaagct tagctttaaa tttcttttaa 240

ttaaaaaaaa atgctaggca gaatgactca aattacgttg gatacagttg aatttattac 300

ggtctcatag ggcctgcctg ctcgaccatg ctatactaaa aattaaaagt gtgtgttact 360

aattttataa atggagtttc catttatatt tacctttatt tcttatttac cattgtctta 420

gtagatattt acaaacatga cagaaacact aaatcttgag tttgaatgca cagatataaa 480

cacttaacgg gttttaaaaa taataatgtt ggtgaaaaaa tataactttg agtgtagcag 540

agaggaacca ttgccacctt cagattttcc tgt 573

<210> 152
<211> 1993
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 152
acgatcggga actggcatct tcagggagta gcttaggtca gtgaagagaa gaacaaaaag 60

cagcatatta cagttagttg tcttcatcaa tctttaaata tgttgtgtgg tttttctctc 120

cctgtttcca cagacaagag tgagatcgcc catcggtata atgatttggg agaacaacat 180

ttcaaaggcc tgtaagttat aatgctgaaa gcccacttaa tatttctggt agtattagtt 240

aaagttttaa aacacctttt tccaccttga gtgtgagaat tgtagagcag tgctgtccag 300

tagaaatgtg tgcattgaca gaaagactgt ggatctgtgc tgagcaatgt ggcagccaga 360

gatcacaagg ctatcaagca ctttgcacat ggcaagtgta actgagaagc acacattcaa 420

ataatagtta attttaattg aatgtatcta gccatgtgtg gctagtagct cctttcctgg 480

[0072]

agagagaatc tggagcccac atctaacttg ttaagtctgg aatcttattt tttatttctg 540

gaaaggtcta tgaactatag ttttgggggc agctcactta ctaactttta atgcaataag 600

atctcatggt atcttgagaa cattattttg tctctttgta gtactgaaac cttatacatg 660

tgaagtaagg ggtctatact taagtcacat ctccaacctt agtaatgttt taatgtagta 720

aaaaaatgag taattaattt atttttagaa ggtcaatagt atcatgtatt ccaaataaca 780

gaggtatatg gttagaaaag aaacaattca aaggacttat ataatatcta gccttgacaa 840

tgaataaatt tagagagtag tttgcctgtt tgcctcatgt tcataaatct attgacacat 900

atgtgcatct gcacttcagc atggtagaag tccatattcc tttgcttgga aaggcaggtg 960

ttcccattac gcctcagaga atagctgacg ggaagaggct ttctagatag ttgtatgaaa 1020

gatatacaaa atctcgcagg tatacacagg catgatttgc tggttgggag agccacttgc 1080

ctcatactga ggtttttgtg tctgcttttc agagtcctga ttgccttttc ccagtatctc 1140

cagaaatgct catacgatga gcatgccaaa ttagtgcagg aagtaacaga ctttgcaaag 1200

acgtgtgttg ccgatgagtc tgccgccaac tgtgacaaat cccttgtgag taccttctga 1260

ttttgtggat ctactttcct gctttctgga actctgtttc aaagccaatc atgactccat 1320

cacttaaggc cccgggaaca ctgtggcaga gggcagcaga gagattgata aagccagggt 1380

gatgggaatt ttctgtggga ctccatttca tagtaattgc agaagctaca atacactcaa 1440

aaagtctcac cacatgactg cccaaatggg agcttgacag tgacagtgac agtagatatg 1500

ccaaagtgga tgagggaaag accacaagag ctaaaccctg taaaaagaac tgtaggcaac 1560

taaggaatgc agagagaaga agttgccttg gaagagcata ccaactgcct ctccaatacc 1620

aatggtcatc cctaaaacat acgtatgaat aacatgcaga ctaagcaggc tacatttagg 1680

aatatacatg tatttacata aatgtatatg catgtaacaa caatgaatga aaactgaggt 1740

catggatctg aaagagagca agggggctta catgagaggg tttggaggga ggggttggag 1800

ggagggaggt attattcttt agttttacag ggaacgtagt aaaaacatag gcttctccca 1860

aaggagcaga gcccatgagg agctgtgcaa ggttccccag cttgatttta cctgctcctc 1920

aaattccctt gatttgtttt tattataatg actttactcc tagcttttag tgtcagatag 1980

[0073] aaaacatgga agg 1993

<210> 153
<211> 1350
<212> DNA
<213> 智人

<400> 153
taggaggctg aggcaggagg atcgcttgag cccaggagtt cgagaccagc ctgggcaaca 60

tagtgtgatc ttgtatctat aaaaataaac aaaattagct tggtgtggtg gcgcctgtag 120

tccccagcca cttggagggg tgaggtgaga ggattgcttg agcccgggat ggtccaggct 180

gcagtgagcc atgatcgtgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtga gaccctgtct 240

cacaacaaca acaacaacaa caaaaaggct gagctgcacc atgcttgacc cagtttctta 300

aaattgttgt caaagcttca ttcactccat ggtgctatag agcacaagat tttatttggt 360

gagatggtgc tttcatgaat tcccccaaca gagccaagct ctccatctag tggacaggga 420

agctagcagc aaaccttccc ttcactacaa aacttcattg cttggccaaa aagagagtta 480

attcaatgta gacatctatg taggcaatta aaaacctatt gatgtataaa acagtttgca 540

ttcatggagg gcaactaaat acattctagg actttataaa agatcacttt ttatttatgc 600

acagggtgga acaagatgga ttatcaagtg tcaagtccaa tctatgacat caattattat 660

acatcggagc cctgccaaaa aatcaatgtg aagcaaatcg cagcccgcct cctgcctccg 720

ctctactcac tggtgttcat ctttggtttt gtgggcaaca tgctggtcat cctcatcctg 780

ataaactgca aaaggctgaa gagcatgact gacatctacc tgctcaacct ggccatctct 840

gacctgtttt tccttcttac tgtccccttc tgggctcact atgctgccgc ccagtgggac 900

tttggaaata caatgtgtca actcttgaca gggctctatt ttataggctt cttctctgga 960

atcttcttca tcatcctcct gacaatcgat aggtacctgg ctgtcgtcca tgctgtgttt 1020

gctttaaaag ccaggacggt cacctttggg gtggtgacaa gtgtgatcac ttgggtggtg 1080

gctgtgtttg cgtctctccc aggaatcatc tttaccagat ctcaaaaaga aggtcttcat 1140

tacacctgca gctctcattt tccatacagt cagtatcaat tctggaagaa tttccagaca 1200

ttaaagatag tcatcttggg gctggtcctg ccgctgcttg tcatggtcat ctgctactcg 1260

[0074] ggaatcctaa aaactctgct tcggtgtcga aatgagaaga agaggcacag ggctgtgagg 1320

cttatcttca ccatcatgat tgtttatttt 1350

<210> 154
<211> 1223
<212> DNA
<213> 智人

<400> 154
tgacagagac tcttgggatg acgcactgct gcatcaaccc catcatctat gcctttgtcg 60

gggagaagtt cagaaactac ctcttagtct tcttccaaaa gcacattgcc aaacgcttct 120

gcaaatgctg ttctattttc cagcaagagg ctcccgagcg agcaagctca gtttacaccc 180

gatccactgg ggagcaggaa atatctgtgg gcttgtgaca cggactcaag tgggctggtg 240

acccagtcag agttgtgcac atggcttagt tttcatacac agcctgggct gggggtgggg 300

tgggagaggt ctttttaaa aggaagttac tgttatagag ggtctaagat tcatccattt 360

atttggcatc tgtttaaagt agattagatc ttttaagccc atcaattata gaaagccaaa 420

tcaaaatatg ttgatgaaaa atagcaacct ttttatctcc ccttcacatg catcaagtta 480

ttgacaaact ctcccttcac tccgaaagtt ccttatgtat atttaaaaga aagcctcaga 540

gaattgctga ttcttgagtt tagtgatctg aacagaaata ccaaaattat ttcagaaatg 600

tacaactttt tacctagtac aaggcaacat ataggttgta aatgtgttta aaacaggtct 660

ttgtcttgct atggggagaa aagacatgaa tatgattagt aaagaaatga cacttttcat 720

gtgtgatttc ccctccaagg tatggttaat aagtttcact gacttagaac caggcgagag 780

acttgtggcc tgggagagct ggggaagctt cttaaatgag aaggaatttg agttggatca 840

tctattgctg gcaaagacag aagcctcact gcaagcactg catgggcaag cttggctgta 900

gaaggagaca gagctggttg ggaagacatg gggaggaagg acaaggctag atcatgaaga 960

accttgacgg cattgctccg tctaagtcat gagctgagca gggagatcct ggttggtgtt 1020

gcagaaggtt tactctgtgg ccaaaggagg gtcaggaagg atgagcattt agggcaagga 1080

gaccaccaac agccctcagg tcagggtgag gatggcctct gctaagctca aggcgtgagg 1140

atgggaagga gggaggtatt cgtaaggatg ggaaggaggg aggtattcgt gcagcatatg 1200

[0075] aggatgcaga gtcagcagaa ctg 1223

<210> 155
<211> 215
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 155
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60

cacccagcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120

tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg 180

gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accac 215

<210> 156
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 156
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca cctaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctaggtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 157
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 157
gcgcgctcgc tcgctcacc 19

[0076] <210> 158
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 158
ctaggtgagc gagcgagcgc gc 22

<210> 159
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 159
cctgcaggac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg 60

cctcagtcct gcagg 75

<210> 160
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 160
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagt 60

gcgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcactcag tgagcgagcg agcgcgcagc 120

tgcctgcagg 130

<210> 161
<211> 142
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0077] <221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 161
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctcc ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggcg 60

acctttggtc gcccggcctc agtcctaggg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc 120

aactccatca ctaggggttc ct 142

<210> 162
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 162
gcgcgctcgc tcgctcactg agtgcgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcgcact 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 163
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 163
gcgcgctcgc tcgctcactg a 21

<210> 164
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 164
gtgagcgagc gagcgcgc 18

[0078]

<210> 165
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 165
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgactttgtc 60

gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 166
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 166

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaagtcgc ccgacgcccg ggctttgccc 60

gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 167
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 167
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgattttcgc 60

ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 168
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

[0079] <220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 168
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaaatcgccc gacgcccggg ctttgcccgg 60

gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 169
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 169
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgtttcgccc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 170

<210> 85
<211> DNA
<212> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 170
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaacgcccga cgcccgggct ttgcccgggc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 171
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 171
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggaaacccgg gcgtcgggcg acctttggtc 60

[0080]

gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 172
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 172
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggtttccc 60

gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgc 89

<210> 173
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source

<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 173
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg gaaaccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc 60

ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 174
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 174
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cggtttccgg 60

gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 87

<210> 175
<211> 85
[0081] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 175
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg aaacgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 176
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 176
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgtttcgggc 60

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc 85

<210> 177
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 177
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccca aagggcgtcg ggcgaccttt ggtcgcccgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 178
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

[0082] <400> 178
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc ctttgggcgg 60

cctcagtgag cgagcgagcg cgc 83

<210> 179
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 179
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccaa aggcgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc 60

tcagtgagcg agcgagcgcg c 81

<210> 180
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 180
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc tttggcggcc 60

tcagtgagcg agcgagcgcg c 81

<210> 181
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 181
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcaaa gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

[0083]

<210> 182
<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 182
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgct ttgcggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 183
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 183

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgaa acgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgca g 81

<210> 184
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 184
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg tttcggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgca g 81

<210> 185
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工序列

[0084] <220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 185
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc 60

gagcgagcgc gc 72

<210> 186
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 186
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcggcct 60

cagtgagcga gcgagcgcgc 80

<210> 187

<211> 79
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 187
gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc 60

agtgagcgag cgagcgcgc 79

<210> 188
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 188
[0085] ggagtcaaag ttctgtttgc cctgatctgc atcgctgtgg ccgaggcc 48

<210> 189
<211> 99
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 189
attcatacca acttgaagaa aaagttcagc ctcttcatcc tggtctttct cctgttcgca 60

gtcatctgtg tttggaagaa agggagcgac tatgaggcc 99

<210> 190
<211> 588
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 190
gcccctctcc ctccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt 60

gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc 120

ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttccccct ctcgccaaag 180

gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240

aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300

tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc 360

acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca 420

aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 480

gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 540

gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacc 588

<210> 191

[0086] <400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

[0087] <210> 200
<211> 278
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 200
tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc ccccccctcc ccacccccaa 60

ttttgtattt atttatttttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120

ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg 180

cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc 240

ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcg 278

<210> 201
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 201
gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta 60

agtggtactc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac 120

gctgtggttt ctgagccagg tacaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca 180

ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 240

tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 300

cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagg 348

<210> 202
<211> 226
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0088] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 202
gtggagaaga gcatgcttga gggctgagtg cccctcagtg ggcagagagc acatggccca 60

cagtccctga gaagttgggg ggaggggtgg gcaattgaac tggtgcctag agaaggtggg 120

gcttgggtaa actgggaaag tgatgtggtg tactggctcc acctttttcc ccagggtggg 180

ggagaaccat atataagtgc agtagtctct gtgaacattc aagctt 226

<210> 203
<211> 225
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 203
ccgtctgtct gcacatttcg tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg 60

ttcatatttg tgtaggttac ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag 120

caggtttgga gtcagcttgg cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa 180

gccccttcac caggagaagc cgtcacacag atccacaagc tcctg 225

<210> 204
<211> 143
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 204
ggcgactcag atcccagcca gtggacttag cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg 60

accttggtta atattcacca gcagcctccc ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat 120

acggacgagg acagggccct gtc 143

<210> 205
<211> 222
<212> DNA
[0089] <213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 205
gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaaggtt 60

catattgact taggttactt attctccttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca 120

ggtttggagt cagcttggca gggatcagca gcctgggttg gaaggagggg gtataaaagc 180

cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ct 222

<210> 206
<211> 223
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 206

gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaaggtt 60

catatttgtg taggttactt attctccttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca 120

ggtttggagt cagcttggca gggatcagca gcctgggttg gaaggagggg gtataaaagc 180

cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ctg 223

<210> 207
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 207
gttcaagcga ttctcctgcc tcagcctccc aagtagctgg gactacaggc acgtgccacc 60

atgcccggct aatttttgt attttagta gaggaggagt ttcatcttgt tagctaggat 120

ggtctagatc tcctgacctc gtgatctgcc cgcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac 180

[0090] aggtgtgagc caccgtgccc ggccatattt tgatttaaaa tttagcaata atagataaaa 240

ttttcaatca actaagccct tgggccaggg aatgctattc cttaaaaagt gcttctatca 300

atatagcctc tgactcatta ctttgttaat ttttaaattg tatttcattc ctgattaaca 360

ttcccaccca gattattaat tatacaatct gttaactgta gaacctcaaa catgttggat 420

tgtactgtat ttgtctggaa gacacatttt taaaacattg taatcgctat aagagaagca 480

ctgggaaaga aaggagcttc tatgcctgca gtgcctgagg agccctttaa cagtgtgccc 540

cgcccctaag ctactcatgc agtcatcccc atcccagtta gtcaacttta ttccaaaaaa 600

cttggtgttc caaatttttc cttctcaaag cccacagatc caaaattcat cagcagttcc 660

cacaaacgtt accctcacaa tgaatccagc catttttcac cctctccagt ggtaccatca 720

tagcccaagc cgccaccatt tctcaccccc ggttaacagg ccaccctcct tctaccctta 780

tcctgctaga gtttgtttta tctacagtga tcagaaagat cagcctaaaa gataattctg 840

atcaccaccc tcctctactc acaacccggc cgtgtctccc cattgccctc agtgtagaag 900

tcaatgtccc tttgctgaaa tgcaacctta gtgaaacttt ccatgactaa cctcctttaa 960

aattgcaacc tggtccaccc ttactccccc ttaccccact tctctttttt gcacagcact 1020

tattttacct tctaacatac tgtataatgt actcatgtat tgtaattatt gcttatcatc 1080

cctctttcag ttgcttatat ttttcatcaa tgtgtaccca gtgcctagga caatatctgt 1140

ctaggacaaa tgggtagtta tgtggctgta ggcaagccat ttaacctctc tgtacctcag 1200

ttactttatc tgtatccact ttgcggtgtt gtcatgagga ttaaatcaga tagcctatgt 1260

gtagcacctg gcagtgaatt tatcaccctg tactgtaact gtctactttt ctgtctcctc 1320

cattggactg tcattcccag ggggttggga actgggattt cttcatttct gaggcataga 1380

agtatagcat agtggttagg agcatgactt ctggagccag agtacatggg tttgaatgct 1440

accactcaca agctgtgtgg ccatggagaa gttgcctaac ctctccgtgc ttcagtttca 1500

tcacccataa aatgaaggta agaatagtac ctgtatttaa aagcacctag aacagttcct 1560

ggcatatagt gtcagctgtc atctctgcat ccttgtacct gtcagagagg agtgtttatc 1620

aaaggggctt cttgctgcct gtttccaaac cagtcgacaa tataccaatt gctccctaac 1680

acattcttgt ttgtgcagaa ctgagctcaa tgataacatt tttatagcaa ccctgatcaa 1740

[0091]

gtttcttctc ataatctctt acactttgag gcccctgcag gggccctcac tctccctaat 1800

aaacattaac ctgagtaggg tgtttgagct caccatggct acattctgat gtaaagagat 1860

atatcctata cctgggccaa atgtaaacag cctggaaaag tgttaggtta aaaacaaaac 1920

aaaataaata aatgaataaa tgccaggtgg ttatgagtgc tattgagaaa aatgaagcca 1980

agagggatat cagtgatgca ggtgggggta aagagcttac aacataaatg tggtgttcca 2040

tatttaaacc tcattcaaca gggaagattg gagctgaaat gtgaaggagt tgtgggagtg 2100

gaactacgtg gaaatctggg ggaaaggtgt tttgggtaaa agaaatagca agtgttgagg 2160

tccaggggca tgagtgtgct tgatatttta gggaagagta aggagaccag tataaccaga 2220

gtgagatgag actacagagg tcaggagaaa gggcatgcag accatgtggg atgctctagg 2280

acctaggcca tggtaaagat gtagggtttt accctgatgg aggtcagaag ccattggagg 2340

attctgagaa gaggagtgac aggactcgct ttatagtttt aaattataac tataaattat 2400

agtttttaaa acaatagttg cctaacctca tgttatatgt aaaactacag ttttaaaaac 2460

tataaattcc tcatactggc agcagtgtga ggggcaaggg caaaagcaga gagactaaca 2520

ggttgctggt tactcttgct agtgcaagtg aattctagaa tcttcgacaa catccagaac 2580

ttctcttgct gctgccactc aggaagaggg ttggagtagg ctaggaatag gagcacaaat 2640

taaagctcct gttcactttg acttctccat ccctctcctc ctttccttaa aggttctgat 2700

taaagcagac ttatgcccct actgctctca gaagtgaatg ggttaagttt agcagcctcc 2760

cttttgctac ttcagttctt cctgtggctg cttcccactg ataaaaagga agcaatccta 2820

tcggttactg cttagtgctg agcacatcca gtgggtaaag ttccttaaaa tgctctgcaa 2880

agaaattggg acttttcatt aaatcagaaa ttttacttt ttcccctcct gggagctaaa 2940

gatattttag agaagaatta acctttgct tctccagttg aacatttgta gcaataagtc 3000

<210> 208
<211> 205
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0092] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 208
aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg cccaggcaaa gcgtccgggc 60

agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag cccctgtttg ctcctccgat 120

aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc ccgttgcccc tctggatcca 180

ctgcttaaat acggacgagg acagg 205

<210> 209
<211> 397
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 209
gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta 60

agtggtactc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac 120

gctgtggttt ctgagccagg tacaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca 180

ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 240

tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 300

cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 360

cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaat 397

<210> 210
<211> 2864
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 210
cctttgagaa tccacggtgt ctcgatgcag tcagctttct aacaagctgg ggcctcacct 60

gttttcccac ggataaaaac gtgctggagg aagcagaaag gggctggcag gtggaaagat 120

[0093]

gaggaccagc tcatcgtctc atgactatga ggttgctctg atccagaggg tccccctgcc 180

tggtggccca ccgccaggaa gactcccact gtccctggat gcccagagtg ggatgtcaac 240

tccatcactt atcaactcct tatccatagg ggtattcttc ctgaggcgtc tcagaaaaca 300

gggccctccc catatgctga ccacataata gaacccctcc caactcagag accctggctg 360

ctagctgccc tggcatgacc cagacagtgg cctttgtata tgtttttaga ctcaccttga 420

ctcacctctg accatagaaa ctctcatccc agaggtcact gcaatagtta ctccacaaca 480

gaggcttatc tgggtagagg gaggctccct acctatggcc cagcagccct gacagtgcag 540

atcacatata ccccacgccc cagcactgcc tgccacgcat gggcttactt tacacccacc 600

cacagtcacc aacacattac ctgctctcca aggttaggcg tggcaggaga agtttgcttg 660

gaccagcaga aaccatgcag tcaaggacaa ctggagtcag catgggctgg gtgcgagccc 720

ttggtggggt ggggaggaga ctccaggtca tacctcctgg aggatgtttt aatcatttcc 780

agcatggaat gctgtcaact tttgccacag attcattagc tctgagtttc ttttttctgt 840

ccccagctac cccttacatg tcaatatgga cttaatgatg ggaaattcag gcaagttttt 900

aaacatttta ttccccctgg ctcttatcct caaaaaatgc atgaatttgg aggcagtggc 960

tcatgcctgt aatcccaatg ctttgctagg ttgaggcggg aggatcactt gaagccagga 1020

atttgagacc agcctgggcc gcatagtgag accccgtttc tacaaaaata aataaataaa 1080

taataaataa tagtgatatg aagcatgatt aaatagccct atttttaaa atgcatgagt 1140

tcgttacctg attcattccc tggttccttt cacagtcctc cgtgacccaa gtgttagggt 1200

tttggtctct ctactatttg taggctgata tatagtatac acacacacac acacacacat 1260

atacacacac acagtgtatc ttgagctttc ttttgtatat ctacacacat atgtataaga 1320

aagctcaaga tatagaagcc ctttttcaaa aataactgaa agtttcaaac tctttaagtc 1380

tccagttacc attttgctgg tattcttatt tggaaccata cattcatcat attgttgcac 1440

agtaagacta tacattcatt attttgctta aacgtatgag ttaaaacact tggccaggca 1500

tggtggttca cacctgtaat cccagagctt tgggaagcca agactggcag atctcttgag 1560

ctcaggaatt caagaccagc ctgggcaaca tggaaaaacc ccatctctac aaaagataga 1620

aaaattagcc aggcatggtg gcgtgtgcct gtggtcccag ctactcagga ggctgaggtg 1680

[0094]

ggaggatcac attagcccag gaggttgagg ctgcagtgag ccgtgattat gccactgcac 1740

tccagcctgg gagacagagt gagaccctgt ttcaaaaaaa agagagagaa aatttaaaaa 1800

agaaaacaac accaagggct gtaactttaa ggtcattaaa tgaattaatc actgcattca 1860

aaaacgatta ctttctggcc ctaagagaca tgaggccaat accaggaagg gggttgatct 1920

cccaaaccag aggcagaccc tagactctaa tacagttaag gaaagaccag caagatgata 1980

gtccccaata caatagaagt tactatattt tatttgttgt ttttcttttg ttttgttttg 2040

ttttgttttg ttttgtttta gagactgggg tcttgctcga ttgcccaggc tgtagtgcag 2100

cggtgggaca atagctcact gcagactcca actcctgggc tcaagcaatc ctcctgcctc 2160

agcctcctga atagctggga ctacaagggt acaccatcac acacaccaaa acaatttttt 2220

aaatttttgt gtagaaacga gggtcttgct ttgttgccca ggctggtctc caactcctgg 2280

cttcaaggga tcctcccacc tcagcctccc aaattgctgg gattacaggt gtgagccacc 2340

acaaccagcc agaactttac taattttaaa attaagaact taaaacttga atagctagag 2400

caccaagatt tttctttgtc cccaaataag tgcagttgca ggcatagaaa atctgacatc 2460

tttgcaagaa tcatcgtgga tgtagactct gtcctgtgtc tctggcctgg tttcggggac 2520

caggagggca gacccttgca ctgccaagaa gcatgccaaa gttaatcatt ggccctgctg 2580

agtacatggc cgatcaggct gtttttgtgt gcctgttttt ctattttacg taaatcaccc 2640

tgaacatgtt tgcatcaacc tactggtgat gcacctttga tcaatacatt ttagacaaac 2700

gtggtttttg agtccaaaga tcagggctgg gttgacctga atactggata cagggcatat 2760

aaaacagggg caaggcacag actcatagca gagcaatcac caccaagcct ggaataactg 2820

caagggctct gctgacatct tcctgaggtg ccaaggaaat gagg 2864

<210> 211
<211> 295
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0095] <400> 211
gggccccaga agcctggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggccccttg 60

gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaatc ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt 120

ttctagcacc ttcttgccac tcctaagcgt cctccgtgac cccggctggg atttagcctg 180

gtgctgtgtc agccccgggc tcccaggggc ttcccagtgg tccccaggga accctcgaca 240

gggccagggc gtctctctcg tccagcaagg gcagggacgg gccacaggca agggc 295

<210> 212
<211> 206
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 212
gaatgactcc tttcggtaag tgcagtggaa gctgtacact gcccaggcaa agcgtccggg 60

cagcgtaggc gggcgactca gatcccagcc agtggactta gcccctgttt gctcctccga 120

taactggggt gaccttggtt aatattcacc agcagcctcc cccgttgccc ctctggatcc 180

actgcttaaa tacggacgag gacagg 206

<210> 213
<211> 1179
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 213
ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60

ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120

gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180

gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240

gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300

[0096]

acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360

gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg 420

cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tggtggcacc ttcgcgcctg tctcgctgct 480

ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg 540

caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc 600

gcgggcggcg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660

gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct 720

ggtctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca 780

gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg 840

acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900

tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gagtaccggg cgccgtccag gcacctcgat 960

tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg 1020

gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca cttgatgtaa 1080

ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttggt tcattctcaa gcctcagaca 1140

gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtga 1179

<210> 214
<211> 292
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 214
gggccccaga agcctggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggccccttg 60

gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaatc ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt 120

ttctagcacc ttcttgccac tcctaagcgt cctccgtgac cccggctggg atttagcctg 180

gtgctgtgtc agccccggtc tcccaggggc ttcccagtgg tccccaggaa ccctcgacag 240

ggcccggtct ctctcgtcca gcaagggcag ggacgggcca caggccaagg gc 292

[0097]

<210> 215
<211> 1325
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 215
gctgcctact gaggcacaca ggggcgcctg cctgctgccc gctcagccaa ggcggtgttg 60

ctggagccag cttgggacag ctctcccaac gctctgccct ggccttgcga cccactctct 120

gggccgtagt tgtctgtctg ttaagtgagg aaagtgccca tctccagagg cattcagcgg 180

caaagcaggg cttccaggtt ccgaccccat agcaggactt cttggatttc tacagccagt 240

cagttgcaag cagcacccaa attatttcta taagaagtgg caggagctgg atctgaagag 300

tcagcagtct acctttccct gtttcttgtg ctttatgcag tcaggaggaa tgatctggat 360

tccatgtgaa gcctgggacc acggagaccc aagacttcct gcttgattct ccctgcgaac 420

tgcaggctgt gggctgagcc ttcaagaagc aggagtcccc tctagccatt aactctcaga 480

gctaacctca tttgaatggg aacactagtc ctgtgatgtc tggaaggtgg gggcctctac 540

actccacacc ctacatggtg gtccagacac atcattccca gcattagaaa gctctagggg 600

gacccgttct gttccctgag gcattaaagg gacatagaaa taaatctcaa gctctgaggc 660

tgatgccagc ctcagactca gcctctgcac tgtatgggcc aattgtagcc ccaaggactt 720

cttcttgctg caccccctat ctgtccacac ctaaaacgat gggcttctat tagttacaga 780

actctctggc ctgttttgtt ttgctttgct ttgttttgtt ttgttttttt gttttttgt 840

tttttagcta tgaaacagag gtaatatcta atacagataa cttaccagta atgagtgctt 900

cctacttact gggtactggg aagaagtgct ttacacatat tttctcattt aatctacaca 960

ataagtaatt aagacatttc cctgaggcca cgggagagac agtggcagaa cagttctcca 1020

aggaggactt gcaagttaat aactggactt tgcaaggctc tggtggaaac tgtcagcttg 1080

taaaggatgg agcacagtgt ctggcatgta gcaggaacta aaataatggc agtgattaat 1140

gttatgatat gcagacacaa cacagcaaga taagatgcaa tgtaccttct gggtcaaacc 1200

[0098] accctggcca ctcctccccg atacccaggg ttgatgtgct tgaattagac aggattaaag 1260

gcttactgga gctggaagcc ttgccccaac tcaggagttt agccccagac cttctgtcca 1320

ccagc 1325

<210> 216
<211> 883
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 216
gagtcaatgg gaaaaaccca ttggagccaa gtacactgac tcaataggga ctttccattg 60

ggttttgccc agtacataag gtcaataggg ggtgagtcaa caggaaagtc ccattggagc 120

caagtacatt gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat aaggtcaatg 180

ggaggtaagc caatgggttt ttcccattac tgacatgtat actgagtcat tagggacttt 240

ccaatgggtt ttgcccagta cataaggtca ataggggtga atcaacagga aagtcccatt 300

ggagccaagt acactgagtc aatagggact ttccattggg ttttgcccag tacaaaaggt 360

caatagggggg tgagtcaatg ggtttttccc attattggca catacataag gtcaataggg 420

gtggggcctg aaataacctc tgaaagagga acttggttag gtaccttctg aggctgaaag 480

aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 540

agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc 600

tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtccca 660

ctagtggaga agagcatgct tgagggctga gtgcccctca gtgggcagag agcacatggc 720

ccacagtccc tgagaagttg gggggagggg tgggcaattg aactggtgcc tagagaaggt 780

ggggcttggg taaactggga aagtgatgtg gtgtactggc tccacctttt tccccagggt 840

gggggagaac catatataag tgcagtagtc tctgtgaaca ttc 883

<210> 217
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

[0099]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 217
gggcctgaaa taacctctga aagaggaact tggttaggta ccttctgagg ctgaaagaac 60

cagctgtgga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga 120

agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc 180

ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccacta 240

gtggagaaga gcatgcttga gggctgagtg cccctcagtg ggcagagagc acatggccca 300

cagtccctga gaagttgggg ggaggggtgg gcaattgaac tggtgcctag agaaggtggg 360

gcttgggtaa actgggaaag tgatgtggtg tactggctcc acctttttcc ccagggtggg 420

ggagaaccat atataagtgc agtagtctct gtgaacattc aagcttctgc cttctccctc 480

ctgtgagttt ggtaagtcac tgactgtcta tgcctgggaa agggtgggca ggagatgggg 540

cagtgcagga aaagtggcac tatgaaccct gcagccctag acaattgtac taaccttctt 600

ctctttcctc tcctgacagg ttggtgtaca gtagcttcc 639

<210> 218
<211> 1272
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 218
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

[0100]

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctattttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtactggat 780

cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt 840

ggtactctcc cagagactgt ctgactcacg ccacccccctc caccttggac acaggacgct 900

gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg 960

cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 1020

cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc 1080

ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 1140

cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaataattac tctaaggtaa atataaaatt 1200

tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac 1260

ctttggaact ga 1272

<210> 219
<211> 547
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 219
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggggaatga ctcctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag 240

[0101]

gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcagatccc agccagtgga cttagcccct 300

gtttgctcct ccgataactg gggtgacctt ggttaatatt caccagcagc ctcccccgtt 360

gcccctctgg atccactgct taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca 420

ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa 480

gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg 540

gaactga 547

<210> 220
<211> 709
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 220
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatacggg ggaggctgct ggtgaatatt aaccaaggtc accccagtta 120

tcggaggagc aaacaggggc taagtccaca tagggctgga agctaccttt gacatcattt 180

cctctgcgaa tgcatgtata atttctacag aacctattag aaaggatcac ccagcctctg 240

cttttgtaca actttccctt aaaaaactgc caattccact gctgtttggc ccaatagtga 300

gaacttttc ctgctgcctc ttggtgcttt tgcctatggc ccctattctg cctgctgaag 360

acactcttgc cagcatggac ttaaacccct ccagctctga caatcctctt tctcttttgt 420

tttacatgaa gggtctggca gccaaagcaa tcactcaaag ttcaaacctt atcatttttt 480

gctttgttcc tcttggcctt ggttttgtac atcagctttg aaaataccat cccagggtta 540

atgctggggt taatttataa ctaagagtgc tctagttttg caatacagga catgctataa 600

aaatggaaag atctcctgaa gaggtaaggg tttaagggat ggttggttgg tggggtatta 660

atgtttaatt acctggagca cctgcctgaa atcacttttt ttcaggttg 709

<210> 221
<211> 460
[0102] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 221
gggctggaag ctacctttga catcatttcc tctgcgaatg catgtataat ttctacagaa 60

cctattagaa aggatcaccc agcctctgct tttgtacaac tttcccttaa aaaactgcca 120

attccactgc tgtttggccc aatagtgaga actttttcct gctgcctctt ggtgcttttg 180

cctatggccc ctattctgcc tgctgaagac actcttgcca gcatggactt aaaccctcc 240

agctctgaca atcctctttc tcttttgttt tacatgaagg gtctggcagc caaagcaatc 300

actcaaagtt caaaccttat catttttgc tttgttcctc ttggccttgg ttttgtacat 360

cagctttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggtta atttataact aagagtgctc 420

tagttttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat 460

<210> 222

<211> 699
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 222
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatacggg ggaggctgct ggtgaatatt aaccaaggtc accccagtta 120

tcggaggagc aaacaggggc taagtccaca taccctaaaa tgggcaaaca ttgcaagcag 180

caaacagcaa acacacagcc ctccctgcct gctgaccttg gagctggggc agaggtcaga 240

gacctctctg ggcccatgcc acctccaaca tccactcgac cccttggaat ttttcggtgg 300

agaggagcag aggttgtcct ggcgtggttt aggtagtgtg agaggggaat gactcctttc 360

ggtaagtgca gtggaagctg tacactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc 420

gactcagatc ccagccagtg gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc 480

[0103] ttggttaata ttcaccagca gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg 540

gacgaggaca gggccctgtc tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtgaa 600

tccggactct aaggtaaata taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct 660

aattgtttct ctcttttaga ttccaacctt tggaactga 699

<210> 223
<211> 681
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 223
aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa 120

aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt 180

aataatctca ggagcacaaa cattccagat cctgctctcc agggctggaa gctacctttg 240

acatcatttc ctctgcgaat gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc 300

cagcctctgc ttttgtacaa ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc 360

caatagtgag aacttttttcc tgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc 420

ctgctgaaga cactcttgcc agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt 480

ctcttttgtt ttacatgaag ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta 540

tcatttttttg ctttgttcct cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc 600

ccagggttaa tgctggggtt aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac 660

atgctataaa aatggaaaga t 681

<210> 224
<211> 532
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0104]

<400> 224
gttacataac ttatggtaaa tggcctgcct ggctgactgc ccaatgaccc ctgcccaatg 60

atgtcaataa tgatgtatgt tcccatgtaa tgccaatagg gactttccat tgatgtcaat 120

gggtggagta tttatggtaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag 180

tatgcccccct attgatgtca atgatggtaa atggcctgcc tggcattatg cccagtacat 240

gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctatgta ttagtcattg ctattaccat 300

gggaattcac tagtggagaa gagcatgctt gagggctgag tgcccctcag tgggcagaga 360

gcacatggcc cacagtccct gagaagttgg ggggaggggt gggcaattga actggtgcct 420

agagaaggtg gggcttgggt aaactgggaa agtgatgtgg tgtactggct ccacctttttt 480

ccccagggtg ggggagaacc atatataagt gcagtagtct ctgtgaacat tc 532

<210> 225
<211> 955
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 225
gagtcaatgg gaaaaaccca ttggagccaa gtacactgac tcaataggga ctttccattg 60

ggttttgccc agtacataag gtcaataggg ggtgagtcaa caggaaagtc ccattggagc 120

caagtacatt gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat aaggtcaatg 180

ggaggtaagc caatgggttt ttcccattac tgacatgtat actgagtcat tagggacttt 240

ccaatgggtt ttgcccagta cataaggtca ataggggtga atcaacagga aagtcccatt 300

ggagccaagt acactgagtc aatagggact ttccattggg ttttgcccag tacaaaaggt 360

caataggggg tgagtcaatg ggtttttccc attattggca catacataag gtcaataggg 420

gtggttacat aacttatggt aaatggcctg cctggctgac tgcccaatga cccctgccca 480

atgatgtcaa taatgatgta tgttcccatg taatgccaat agggactttc cattgatgtc 540

aatgggtgga gtatttatgg taactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 600

[0105]

aagtatgccc cctattgatg tcaatgatgg taaatggcct gcctggcatt atgcccagta 660

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctat gtattagtca ttgctattac 720

catgggaatt cactagtgga gaagagcatg cttgagggct gagtgcccct cagtgggcag 780

agagcacatg gcccacagtc cctgagaagt tgggggggagg ggtgggcaat tgaactggtg 840

cctagagaag gtggggcttg ggtaaactgg gaaagtgatg tggtgtactg gctccacctt 900

tttccccagg gtgggggaga accatatata agtgcagtag tctctgtgaa cattc 955

<210> 226
<211> 955
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 226
gttacataac ttatggtaaa tggcctgcct ggctgactgc ccaatgaccc ctgcccaatg 60

[0106]

atgtcaataa tgatgtatgt tcccatgtaa tgccaatagg gactttccat tgatgtcaat 120

gggtggagta tttatggtaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag 180

tatgcccccc attgatgtca atgatggtaa atggcctgcc tggcattatg cccagtacat 240

gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctatgta ttagtcattg ctattaccat 300

gggagtcaat gggaaaaacc cattggagcc aagtacactg actcaatagg gactttccat 360

tgggttttgc ccagtacata aggtcaatag ggggtgagtc aacaggaaag tcccattgga 420

gccaagtaca ttgagtcaat agggactttc caatgggttt tgcccagtac ataaggtcaa 480

tgggaggtaa gccaatgggt ttttcccatt actgacatgt atactgagtc attagggact 540

ttccaatggg ttttgcccag tacataaggt caataggggt gaatcaacag gaaagtccca 600

ttggagccaa gtacactgag tcaataggga ctttccattg ggttttgccc agtacaaaag 660

gtcaataggg ggtgagtcaa tgggtttttc ccattattgg cacatacata aggtcaatag 720

gggtggaatt cactagtgga gaagagcatg cttgagggct gagtgcccct cagtgggcag 780

agagcacatg gcccacagtc cctgagaagt tgggggggagg ggtgggcaat tgaactggtg 840

cctagagaag gtgggggcttg ggtaaactgg gaaagtgatg tggtgtactg gctccacctt 900

tttccccagg gtgggggaga accatatata agtgcagtag tctctgtgaa cattc 955

<210> 227
<211> 1923
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 227
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg 540

cttcactctc cccatctccc ccccctcccc acccccaatt ttgtatttat ttatttttta 600

attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg 660

gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg 720

cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg 780

aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgac gctgccttcg ccccgtgccc cgctccgccg 840

ccgcctcgcg ccgcccgccc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc 900

gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg cttgtttctt 960

ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc 1020

ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgctgc 1080

[0107]

ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc agtgtgcgcg 1140

aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag gggaacaaag 1200

gctgcgtgcg gggtgtgtgc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg gcggtcgggc 1260

tgtaaccccc ccctgcaccc ccctccccga gttgctgagc acggcccggc ttcgggtgcg 1320

gggctccgta cggggcgtgg cgcggggctc gccgtgccgg gcgggggggtg gcggcaggtg 1380

ggggtgccgg gcggggcggg gccgcctcgg gccggggagg gctcgggggga ggggcgcggc 1440

ggcccccgga gcgccggcgg ctgtcgaggc gcggcgagcc gcagccattg ccttttatgg 1500

taatcgtgcg agagggcgca gggacttcct ttgtcccaaa tctgtgcgga gccgaaatct 1560

gggaggcgcc gccgcacccc ctctagcggg cgcggggcga agcggtgcgg cgccggcagg 1620

aaggaaatgg gcggggaggg ccttcgtgcg tcgccgcgcc gccgtcccct tctccctctc 1680

cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc tgccttcggg ggggacgggg cagggcgggg 1740

ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggctct agagcctctg ctaaccatgt tttagccttc 1800

ttctttttcc tacagctcct gggcaacgtg ctggttattg tgctgtctca tcatttgtcg 1860

acagaattcc tcgaagatcc gaaggggttc aagcttggca ttccggtact gttggtaaag 1920

cca 1923

<210> 228
<211> 1272
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 228
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

[0108]

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctatttttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccggat 780

cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt 840

ggtactctcc cagagactgt ctgactcacg ccacccccctc caccttggac acaggacgct 900

gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg 960

cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 1020

cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc 1080

ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 1140

cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt 1200

tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac 1260

ctttggaact ga 1272

<210> 229
<211> 826
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 229
gagtcaatgg gaaaaaccca ttggagccaa gtacactgac tcaataggga ctttccattg 60

ggttttgccc agtacataag gtcaataggg ggtgagtcaa caggaaagtc ccattggagc 120

caagtacatt gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat aaggtcaatg 180

[0109]

ggaggtaagc caatgggttt ttcccattac tgacatgtat actgagtcat tagggacttt 240

ccaatgggtt ttgcccagta cataaggtca ataggggtga atcaacagga aagtcccatt 300

ggagccaagt acactgagtc aatagggact ttccattggg ttttgcccag tacaaaaggt 360

caatagggggg tgagtcaatg ggtttttccc attattggca catacataag gtcaataggg 420

gtgactagtg gagaagagca tgcttgaggg ctgagtgccc ctcagtgggc agagagcaca 480

tggcccacag tccctgagaa gttgggggga ggggtgggca attgaactgg tgcctagaga 540

aggtggggct tgggtaaact gggaaagtga tgtggtgtac tggctccacc tttttcccca 600

gggtggggga gaaccatata taagtgcagt agtctctgtg aacattcaag cttctgcctt 660

ctccctcctg tgagtttggt aagtcactga ctgtctatgc ctgggaaagg gtgggcagga 720

gatggggcag tgcaggaaaa gtggcactat gaaccctgca gccctagaca attgtactaa 780

ccttcttctc tttcctctcc tgacaggttg gtgtacagta gcttcc 826

<210> 230
<211> 399

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 230
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacacgcgtg gtaccgtctg tctgcacatt tcgtagagcg agtgttccga 120

tactctaatc tccctaggca aggttcatat ttgtgtaggt tacttattct ccttttgttg 180

actaagtcaa taatcagaat cagcaggttt ggagtcagct tggcagggat cagcagcctg 240

ggttggaagg agggggtata aaagcccctt caccaggaga agccgtcaca cagatccaca 300

agctcctgaa gaggtaaggg tttaagggat ggttggttgg tggggtatta atgtttaatt 360

acctggagca cctgcctgaa atcacttttt ttcaggttg 399

[0110]

<210> 231
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 231
gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480

ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa 540

tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctctctgg ctaactagag 600

aacccactgc ttactggctt atcgaaatta atacgactca ctatagggag accc 654

<210> 232
<211> 500
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 232
gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt ctggagcatg cgctttagca gccccgctgg 60

gcacttggcg ctacacaagt ggcctctggc ctcgcacaca ttccacatcc accggtaggc 120

gccaaccggc tccgttcttt ggtggcccct tcgcgccacc ttctactcct cccctagtca 180

ggaagttccc ccccgccccg cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac 240

gtctcactag tctcgtgcag atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt 300

[0111] ggggcagcgg ccaatagcag ctttgctcct tcgctttctg ggctcagagg ctgggaaggg 360

gtgggtccgg gggcgggctc aggggcgggc tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggtcct 420

ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa agcgcacgtc tgccgcgctg ttctcctctt 480

cctcatctcc gggcctttcg 500

<210> 233
<211> 450
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 233
gggcctgaaa taacctctga aagaggaact tggttaggta ccttctgagg ctgaaagaac 60

cagctgtgga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga 120

agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc 180

ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccacta 240

gttccagatg gtaaatatac acaagggatt tagtcaaaca atttttggc aagaatatta 300

tgaattttgt aatcggttgg cagccaatga aatacaaaga tgagtctagt taataatcta 360

caattattgg ttaaagaagt atattagtgc taatttccct ccgtttgtcc tagcttttct 420

cttctgtcaa ccccacacgc ctttggcacc 450

<210> 234
<211> 594
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 234
gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

[0112]

ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgccccct ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg actagttcca gatggtaaat atacacaagg gatttagtca 420

aacaattttt tggcaagaat attatgaatt ttgtaatcgg ttggcagcca atgaaataca 480

aagatgagtc tagttaataa tctacaatta ttggttaaag aagtatatta gtgctaattt 540

ccctccgttt gtcctagctt ttctcttctg tcaaccccac acgcctttgg cacc 594

<210> 235
<211> 1210
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 235

ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg 60

ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc tcaggacagc 120

ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg acattttagg 180

acgggacttg ggtgactcta gggcactggt tttctttcca gagagcggaa caggcgagga 240

aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgccgatg 300

attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc 360

gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttggtg agtagcgggc tgctgggctg 420

gccggggctt tcgtggccgc cgggccgctc ggtgggacgg aagcgtgtgg agagaccgcc 480

aagggctgta gtctgggtcc gcgagcaagg ttgccctgaa ctgggggttg gggggagcgc 540

agcaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga atggaagacg cttgtgaggc gggctgtgag 600

gtcgttgaaa caaggtgggg ggcatggtgg gcggcaagaa cccaaggtct tgaggccttc 660

gctaatgcgg gaaagctctt attcgggtga gatgggctgg ggcaccatct ggggaccctg 720

acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc ggtttgtcgt ctgttgcggg ggcggcagtt 780

[0113]

atgcggtgcc gttgggcagt gcacccgtac ctttgggagc gcgcgccctc gtcgtgtcgt 840

gacgtcaccc gttctgttgg cttataatgc agggtggggc cacctgccgg taggtgtgcg 900

gtaggctttt ctccgtcgca ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggctc tcctgaatcg 960

acaggcgccg gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagtttc tttggtcggt 1020

tttatgtacc tatcttctta agtagctgaa gctccggttt tgaactatgc gctcggggtt 1080

ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat ttgggtcaat 1140

atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt ttttggcttt 1200

tttgttagac 1210

<210> 236
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 236

[0114]

ttaagggttg agtgtgagga aaggtctgag ggttgagaag gggtggagga tgcacctggg 60

cctatgacag gggtccacgg aggtggctga tggcaaaagc tgggggactc caactgctga 120

tgctgaaaca agcttgtgtc tcacatacac agggacagtt cactgagctt caatgacagg 180

cacctcctgc tcatcacatc ttttctctct aggacagctt tgcccttatt ttaactagac 240

ttcccttgaa ccaaaaggga aggctacatg ctgtgacttg ctgggcagcc tggaaaggcg 300

ggccactcct agccacagag atgagacaga gttcagacaa gagcttatcc ccagtcttcc 360

ttttctattt tgtttatttt attttatttt tttatttatt gagacagagt ctctgtcacc 420

caggctgggg tgcagtgatg cgacattggc ttactgcagt ctccacctcc tgggctcagg 480

tgatcctccc acctcagcct cccgaatagc tgggatcaca gtagtgcacc accatacctg 540

gctaattttt ttgtattttt tgtacagaca aaatttcacc acattgccca ggctggtctc 600

gaactcctgg actcaagcga tccgcccacc tcagcctccc aaagtgctcg gattacaggc 660

atgagccact atgcccagcc ttgctcttcc tttaaagcct cctgtccttc cccaggtccc 720

cagttcatag caggatcaaa ggtcactggg cgctcacccc gtcttcaaga tgctctttcc 780

tatgtcactg cttacgccca ggtcagatgt gactagagcc taaggagctc ccacctccct 840

ctctgtgctg ggactcacag agggagacct caggaggcag tctgtccatc acatgtccaa 900

atgcagagca taccctgggc tgggcgcagt ggcgcacaac tgtaattcca gcactttggg 960

aggctgatgt ggaaggatca cttgagccca gaagttctag accagcctgg gcaacatggc 1020

aagaccctat ctctacaaaa aaagttaaaa aatcagccac gtgtggtgac acacacctgt 1080

agtcccagct attcaggagg ctgaggtgag gggatcactt aaggctggga ggttgaggct 1140

gcagtgagtc gtggttgcgc cactgcactc cagcctgggc aacagtgaga ccctgtctca 1200

aaagacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaag aacatatcct ggtgtggagt aggggacgct 1260

gctctgacag aggctcgggg gcctgagctg gctctgtgag ctggggagga ggcagacagc 1320

caggccttgt ctgcaagcag acctggcagc attgggctgg ccgcccccca gggcctcctc 1380

ttcatgccca gtgaatgact caccttggca cagacacaat gttcggggtg ggcacagtgc 1440

ctgcttcccg ccgcacccca gccccccctca aatgccttcc gagaagccca ttgagcaggg 1500

ggcttgcatt gcaccccagc ctgacagcct ggcatcttgg gataaaagca gcacagcccc 1560

ctaggggctg cccttgctgt gtggcgccac cggcggtgga gaacaaggct ctattcagcc 1620

tgtgcccagg aaaaggggatc aggggatgcc caggcatgga cagtgggtgg caggggggga 1680

gaggagggct gtctgcttcc cagaagtcca aggacacaaa tgggtgaggg gactgggcag 1740

ggttctgacc ctgtgggacc agagtggagg gcgtagatgg acctgaagtc tccagggaca 1800

acagggccca ggtctcaggc tcctagttgg gcccagtggc tccagcgttt ccaaacccat 1860

ccatccccag aggttcttcc catctctcca ggctgatgtg tgggaactcg aggaaataaa 1920

tctccagtgg gagacggagg ggtggccagg gaaacggggc gctgcaggaa taaagacgag 1980

ccagcacagc cagctcatgt gtaacggctt tgtggagctg tcaaggcctg gtctctggga 2040

gagaggcaca gggaggccag acaaggaagg ggtgacctgg agggacagat ccaggggcta 2100

aagtcctgat aaggcaagag agtgccggcc ccctcttgcc ctatcaggac ctccactgcc 2160

acatagaggc catgattgac ccttagacaa agggctggtg tccaatccca gcccccagcc 2220

[0115] ccagaactcc agggaatgaa tgggcagaga gcaggaatgt gggacatctg tgttcaaggg 2280

aaggactcca ggagtctgct gggaatgagg cctagtagga aatgaggtgg cccttgaggg 2340

tacagaacag gttcattctt cgccaaattc ccagcacctt gcaggcactt acagctgagt 2400

gagataatgc ctgggttatg aaatcaaaaa gttggaaagc aggtcagagg tcatctggta 2460

cagcccttcc ttccctttt ttttttttt tttgtgagac aaggtctctc tctgttgccc 2520

aggctggagt ggcgcaaaca cagctcactg cagcctcaac ctactgggct caagcaatcc 2580

tccagcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacaagcatg agccacccca ctcagccctt 2640

tccttccttt ttaattgatg cataataatt gtaagtattc atcatggtcc aaccaaccct 2700

ttcttgaccc accttcctag agagagggtc ctcttgcttc agcggtcagg gccccagacc 2760

catggtctgg ctccaggtac cacctgcctc atgcaggagt tggcgtgccc aggaagctct 2820

gcctctgggc acagtgacct cagtggggtg aggggagctc tccccatagc tgggctgcgg 2880

cccaacccca ccccctcagg ctatgccagg gggtgttgcc aggggcaccc gggcatcgcc 2940

agtctagccc actccttcat aaagccctcg catcccagga gcgagcagag ccagagcagg 3000

<210> 237
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 237
acgatttccc ttcacctctt attaccctgg tggtggtggt gggggggggg gggtgctctc 60

tcagcaaccc caccccggga tcttgaggag aaagagggca gagaaaagag ggaatgggac 120

tggcccagat cccagcccca cagccgggct tccacatggc cgagcaggaa ctccagagca 180

ggagcacaca aaggagggct ttgatgcgcc tccagccagg cccaggcctc tcccctctcc 240

cctttctctc tgggtcttcc tttgccccac tgagggcctc ctgtgagccc gatttaacgg 300

aaactgtggg cggtgagaag ttccttatga cacactaatc ccaacctgct gaccggacca 360

cgcctccagc ggagggaacc tctagagctc caggacattc aggtaccagg tagccccaag 420

[0116] gaggagctgc cgacctggca ggtaagtcaa tacctggggc ttgcctgggc cagggagccc 480

aggactgggg tgaggactca ggggagcagg gagaccacgt cccaagatgc ctgtaaaact 540

gaaaccacct ggccattctc caggttgagc cagaccaatt tgatggcaga tttagcaaat 600

aaaaatacag gacacccagt taaatgtgaa tttcagatga acagcaaata ctttttagt 660

attaaaaaag ttcacattta ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg aggccgaggc 720

aggcagatca cctgaggtca ggagttcgag accagcctgg ccaacatggt gaaaccccat 780

ctccactaaa aataccaaaa attagccagg cgtgctggtg ggcacctgta gttccagcta 840

ctcaggaggc taaggcagga gaattgcttg aacctgggag gcagaggttg cagtgagctg 900

agatcgcacc attgcactct agcctgggcg acaagaacaa aactccatct caaaaaaaaa 960

aaaaaaaaaa aagttcacat ttaactgggc attctgtatt taattggtaa tctgagatgg 1020

cagggaacag catcagcatg gtgtgaggga taggcatttt ttcattgtgt acagcttgta 1080

aatcagtatt tttaaaactc aaagttaatg gcttgggcat atttagaaaa gagttgccgc 1140

acggacttga accctgtatt cctaaaatct aggatcttgt tctgatggtc tgcacaactg 1200

gctgggggtg tccagccact gtccctcttg cctgggctcc ccagggcagt tctgtcagcc 1260

tctccatttc cattcctgtt ccagcaaaac ccaactgata gcacagcagc atttcagcct 1320

gtctacctct gtgcccacat acctggatgt ctaccagcca gaaaggtggc ttagatttgg 1380

ttcctgtggg tggattatgg cccccagaac ttccctgtgc ttgctggggg tgtggagtgg 1440

aaagagcagg aaatgggggа ccctccgata ctctatgggg gtcctccaag tctctttgtg 1500

caagttaggg taataatcaa tatggagcta agaaagagaa ggggaactat gctttagaac 1560

aggacactgt gccaggagca ttgcagaaat tatatggttt tcacgacagt tcttttggt 1620

aggtactgtt attatcctca gtttgcagat gaggaaactg agacccagaa aggttaaata 1680

acttgctagg gtcacacaag tcataactga caaagcctga ttcaaaccca ggtctcccta 1740

acctttaagg tttctatgac gccagctctc ctagggagtt tgtcttcaga tgtcttggct 1800

ctaggtgtca aaaaaagact tggtgtcagg caggcatagg ttcaagtccc aactctgtca 1860

cttaccaact gtgactaggt gattgaactg accatggaac ctggtcacat gcaggagcag 1920

gatggtgaag ggttcttgaa ggcacttagg caggacattt aggcaggaga gaaaacctgg 1980

[0117]

aaacagaaga gctgtctcca aaaataccca ctggggaagc aggttgtcat gtgggccatg 2040

aatgggacct gttctggtaa ccaagcattg cttatgtgtc cattacattt cataacactt 2100

ccatcctact ttacagggaa caaccaagac tggggttaaa tctcacagcc tgcaagtgga 2160

agagaagaac ttgaacccag gtccaacttt tgcgccacag caggctgcct cttggtcctg 2220

acaggaagtc acaacttggg tctgagtact gatccctggc tatttttttgg ctgtgttacc 2280

ttggacaagt cacttattcc tcctcccgtt tcctcctatg taaaatggaa ataataatgt 2340

tgaccctggg tctgagagag tggatttgaa agtacttagt gcatcacaaa gcacagaaca 2400

cacttccagt ctcgtgatta tgtacttatg taactggtca tcacccatct tgagaatgaa 2460

tgcattgggg aaagggccat ccactaggct gcgaagtttc tgagggactc cttcgggctg 2520

gagaaggatg gccacaggag ggaggagaga ttgccttatc ctgcagtgat catgtcattg 2580

agaacagagc cagattcttt ttttcctggc agggccaact tgttttaaca tctaaggact 2640

gagctatttg tgtctgtgcc ctttgtccaa gcagtgtttc ccaaagtgta gcccaagaac 2700

catctccctc agagccacca ggaagtgctt taaattgcag gttcctaggc cacagcctgc 2760

acctgcagag tcagaatcat ggaggttggg acccaggcac ctgcgtttct aacaaatgcc 2820

tcgggtgatt ctgatgcaat tgaaagtttg agatccacag ttctgagaca ataacagaat 2880

ggtttttcta acccctgcag ccctgacttc ctatcctagg gaaggggccg gctggagagg 2940

ccaggacaga gaaagcagat cccttctttt tccaaggact ctgtgtcttc cataggcaac 3000

<210> 238
<211> 718
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 238
gaacaaaagc aatggtgaag acagtgatgg acaacaggca agcagtggtg ataagcaaaa 60

acatgtagtg tttcctcttt aataagttct cagctaaagt tctcagcctt gttgaaagga 120

cctggatact gaactgtgcc gaagaaggat agcagggtta aaacatgcaa agacagcacc 180

[0118]

tcatatacct ctaatgttgt taacaatagc taacttttat caaacagtgt cctgtcacca 240

tgacagttac aacataatga taatgactgt actttctcta accaggtcta gatcacttat 300

aataaatata tcttttagta attgagtaaa tgaattacag tgaggataac agcaaagaaa 360

tggtggacag atgtttacac caagaaagta tgatgactga ggtcagctca ggactgcatg 420

gcaggcccac atggctcttt tttatccaac tcactactcc ctctcccttg aaaggatcca 480

agtctggaaa atagccaaaa cactgttatg taaacaccaa gtccaaataa tgtgcaagca 540

tctaaagtat tgaaagccac ttttgttacc ttccatcagc tgaggggtgg agagggttcc 600

cagagccgca ggctcctcca ataaggatta gattgcatac aaaaaagccc tggctaagaa 660

cttgcttcct catcctacag ctggtaccag aactctctct aatcttcact ggaagaaa 718

<210> 239
<211> 1313
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 239
ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga 60

ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc 120

atgcgcccag ggctgagcgc gggtagatca gagcacacaa gctcacagtc cccggcggtg 180

gggggagggg cgcgctgagc gggggccagg gagctggcgc ggggcaaact gggaaagtgg 240

tgtcgtgtgc tggctccgcc ctcttcccga gggtggggga gaacggtata taagtgcggt 300

agtcgccttg gacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgtc agaacgcagg tgagtggcgg 360

gtgtggcttc cgcgggcccc ggagctggag ccctgctctg agcgggccgg gctgatatgc 420

gagtgtcgtc cgcagggttt agctgtgagc attcccactt cgagtggcgg gcggtgcggg 480

ggtgagagtg cgaggcctag cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc 540

tagcgtggtg tccgccgccg cgtgccactc cggccgcact atgcgttttt tgtccttgct 600

gccctcgatt gccttccagc agcatgggct aacaaaggga gggtgtgggg ctcactctta 660

[0119]

aggagcccat gaagcttacg ttggatagga atggaagggc aggaggggcg actggggccc 720

gcccgccttc ggagcacatg tccgacgcca cctggatggg gcgaggcctg tggctttccg 780

aagcaatcgg gcgtgagttt agcctacctg ggccatgtgg ccctagcact gggcacggtc 840

tggcctggcg gtgccgcgtt cccttgcctc ccaacaaggg tgaggccgtc ccgcccggca 900

ccagttgctt gcgcggaaag atggccgctc ccggggccct gttgcaagga gctcaaaatg 960

gaggacgcgg cagcccggtg gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aagagggcct 1020

tgcccctcgc cggccgctgc ttcctgtgac cccgtggtct atcggccgca tagtcacctc 1080

gggcttctct tgagcaccgc tcgtcgcggc gggggggaggg gatctaatgg cgttggagtt 1140

tgttcacatt tggtgggtgg agactagtca ggccagcctg gcgctggaag tcattcttgg 1200

aatttgcccc tttgagtttg gagcgaggct aattctcaag cctcttagcg gttcaaaggt 1260

attttctaaa cccgtttcca ggtgttgtga aagccaccgc taattcaaag caa 1313

<210> 240
<211> 1420

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 240
ggcctgaaat aacctctgaa agaggaactt ggttaggtac cttctgaggc ggaaagaacc 60

agctgtggaa tgtgtgtcag ttagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa 120

gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccaggtg tggaaagtcc ccaggctccc 180

cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccactag 240

tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg 300

gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag 360

tgatgtcgtg tactggctcc gccttttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc 420

agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc 480

cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat 540

[0120]

tacttccacc tggctgcagt acgtgattct tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg 600

ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg 660

gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc 720

tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg 780

gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc 840

cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg 900

agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc 960

tggtctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc 1020

agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct gcagggagct caaaatggag 1080

gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc 1140

gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga 1200

ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat 1260

ggagtttccc cacactgagt gggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta 1320

attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg ttcattctca agcctcagac 1380

agtggttcaa agtttttttc ttccatttca ggtgtcgtga 1420

<210> 241
<211> 1831
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 241
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

[0121]

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggg agccgagagt aattcataca 540

aaaggaggga tcgccttcgc aaggggagag cccagggacc gtccctaaat tctcacagac 600

ccaaatccct gtagccgccc cacgacagcg cgaggagcat gcgcccaggg ctgagcgcgg 660

gtagatcaga gcacacaagc tcacagtccc cggcggtggg gggaggggcg cgctgagcgg 720

gggccaggga gctggcgcgg ggcaaactgg gaaagtggtg tcgtgtgctg gctccgccct 780

cttcccgagg gtgggggaga acggtatata agtgcggtag tcgccttgga cgttcttttt 840

cgcaacgggt ttgccgtcag aacgcaggtg agtggcgggt gtggcttccg cgggccccgg 900

agctggagcc ctgctctgag cgggccgggc tgatatgcga gtgtcgtccg cagggtttag 960

ctgtgagcat tcccacttcg agtggcgggc ggtgcggggg tgagagtgcg aggcctagcg 1020

gcaaccccgt agcctcgcct cgtgtccggc ttgaggccta gcgtggtgtc cgccgccgcg 1080

tgccactccg gccgcactat gcgtttttg tccttgctgc cctcgattgc cttccagcag 1140

catgggctaa caaagggagg gtgtggggct cactcttaag gagcccatga agcttacgtt 1200

ggataggaat ggaagggcag gaggggcgac tggggcccgc ccgccttcgg agcacatgtc 1260

cgacgccacc tggatggggc gaggcctgtg gctttccgaa gcaatcgggc gtgagtttag 1320

cctacctggg ccatgtggcc ctagcactgg gcacggtctg gcctggcggt gccgcgttcc 1380

cttgcctccc aacaagggtg aggccgtccc gcccggcacc agttgcttgc gcggaaagat 1440

ggccgctccc ggggccctgt tgcaaggagc tcaaaatgga ggacgcggca gcccggtgga 1500

gcgggcgggt gagtcaccca cacaaaggaa gagggccttg cccctcgccg gccgctgctt 1560

cctgtgaccc cgtggtctat cggccgcata gtcacctcgg gcttctcttg agcaccgctc 1620

gtcgcggcgg ggggagggga tctaatggcg ttggagtttg ttcacatttg gtgggtggag 1680

actagtcagg ccagcctggc gctggaagtc attcttggaa tttgcccctt tgagtttgga 1740

gcgaggctaa ttctcaagcc tcttagcggt tcaaaggtat tttctaaacc cgtttccagg 1800

[0122] tgttgtgaaa gccaccgcta attcaaagca a 1831

<210> 242
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 242
ccaggcatgg tggctcatac ccgtaatccc agctactcag gaggctgagg caggagaatc 60

acatgaaccc aagaggtgga ggttgcagtg agccaagatt gagccactgt actccagcct 120

gggcaacaga gcaagacttg gtctcagaaa aaaaaaaaaa gtgtatgtct tgactttaaa 180

aaattcaata aactgacctg tctttttta aaaaacagcc ttttgagggt ataatttaca 240

tatcacagag ttcacctatg taaagtattc aatggttttc aatatattaa cagagttgtg 300

cgaccatcac cataatctaa ctttagaaca ttttcttcat ccccaaaaga aaccttatat 360

ctgttaccag tcactcctca ttcccctccc acccctaccc ctaccccagc attaggcaac 420

cacttattta ttttctgtcc ctatagattt gcctatcttg gacatttcat gtaaatggaa 480

tcatacagta tgtggtcttt tgagaccgtc ttctttcacg tagcatgatt ttgaggttca 540

tctgtgtagc atgtatcagt acttcaatct acatacattt accgtaatta ctgaaccgtt 600

tggactattt tcaataatat tcatttatgt tttctgtttg ttatgctttt tttagtttct 660

ttagtttttt ttaacttttg ttggattgat gacattttct acatacttag tttttaatcc 720

tttgcttatt tagaaactat agattttact ggtacttttt cattgctttt tcttaaaatt 780

ttcagatatt ggttgaactt tgttcagata ttagttgaac tttgtaatta aaaaatggtt 840

aaatattggc aatttccttt ggtttaatca aacatatatt taattatagt tgtataaata 900

tgtatttaat tataattata aaacaatgtc ctcagattgt cataacaatg aacttaacat 960

actttatctg catatcgaac accttatctt gtgttcaagt tacactcata tctacatact 1020

gtgtagagtt ttaattatgt tcttttgaaa tataaaaggt tatacttggt atcaatattt 1080

gattggccgt cctgacatat tttgttaact cttgtgctca cccttgtttc tctctttcat 1140

[0123] ggctcccttc tggatactcc ttctggctaa ggcacatcct ctagttgttg ttttatgcag 1200

gtctgtaagt gtaaaccctc tgactttgaa tgtctgtaaa gatgctgaat aatttttttgg 1260

ctcagtgtaa aattctaagt taaagattac ttttttttct catcactttg aagacattac 1320

gccactgttt tctagcctct attgctgatg agaaaacttc tgtcagtctg ttctttatat 1380

ttgaatatgc attttcccct ttcacagtgt ttaggatgga ttttgtttat tcttgatgct 1440

ttactacagt ttgattcttg aacaacacag gttgcaactg tggaggtcca cttgtatggg 1500

gattgttttc aaccaatctc agatgaaaaa tatagtattc tcaggatgca aaaccagtgg 1560

atatgtagag ccaatttttc ctatgcacaa gttctgcaag ccaactgtag gacttgtgta 1620

tacctggatt ttggtatatg caaattttgg tatacatggg agtgctagaa ccaatctcct 1680

gcatatactg agggacattt ctatataatg tatctaagtt ttgactgata tctattccaa 1740

tcaattcttg gtgtctactg ttaatttgaa gaatcaggta attgcttctg gaaaattctt 1800

agcaattatc tctttaatta ttacacttct gtcattctcc actctctgct tctgggattc 1860

caattaggtg aatttagaag attttcataa ctccccccttt ctctctttta tttgtacatg 1920

tgtgtatata tgtatgtaat acatatcacg gtctcctcct gtgacctcca tgggtctgca 1980

tttcatcata aggaatagat gcttcaatgg tggccagcag tttcctcagg gtcttctcag 2040

cagtgcatgg ggcccacatt agctcctctg gctccaagcg aagagatggt ctctagcccc 2100

ctgtttgatt tggggcactt acagtcctct cgccagctaa actctcacac tcgtcagcat 2160

ccagacgctg aggggaaaat accagctgct tctgtgctct gcttactctt cggtacttct 2220

ctgccatttc tggttcctga agatgtttat ttttatttat ttgagtctga ctgtatctct 2280

ttttaaaaac atgttatcca ccattgctat atatttgaag cagagaaagt tagtgaagca 2340

taaacttcat gctgaatcga gtgtctatat cctggaattc tcagcctgta ccctctataa 2400

actaattttt ccactgtgaa taagactaat catgactctg tcgacattta cattttattt 2460

agaaaatgtc ttccttctgt tcctttgatc caagcttgac tcaccttacc ttgaggttgc 2520

atttacaaag gaacactgaa ggttacccaa cagtatgtgg gtgtcgttca tcaactacag 2580

tgactcaaga atatcaccag ttggtttgcc tttctcatgg ttttaatgtt ttctcattaa 2640

[0124] aaataaataa agcacagata agcagaaaga ataaccatcc atccaacaac tagaggaaaa 2700

tttatcaatg gttttgcttt atctttccta taattaagct ataaaaaaca accatccatg 2760

taacaactag agaaaacctt tatcaatgac tgtggcttat ctttcctgat aattaggctc 2820

tttcagggag ttattaaccg attttaaaac ttttgtctga gattgattag taaagattat 2880

ttcttgaacc aaattgttct ttcgtttggc tactttgatt aaagaagaaa gaagagataa 2940

taattgcaat gattctttta ttttatttta tagggtcgtt ggctgtgggt tgcaattacc 3000

<210> 243
<211> 3095
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 243
tatggcacaa gcaatctctt atttttatct tagtgcataa ataaattttt ccttttgcc 60

agaataattt tttttaaaga agcgattagt ttttcttctc tcagatagca atgatgtgct 120

[0125]

ttcctctcaa cctagattta gggcattttt atgtgagata ggattaaaaa ttccattttt 180

gtacaaccac tatggagaac agtttggcag ttccccaaaa aactaaaaat agagctacta 240

tatgatctag tgatcccact gctgggtata tacctataag aaaggaaatc agtatatcaa 300

agagatgtct gttcttttat gtttgttgca gcactgttca caatagccaa gatctggaag 360

caacccaagt ctccatcaac atgggtttta aaaaaatgtg gtactttaat acacaatgga 420

gtactattca gcaataaaaa agaatgagat cctgttattt gcaataacat ggacagaact 480

ggaggtcatt atgtcaaatg aaataagcca ggcacagaaa gccaaacatc acatattctc 540

actcatatgt ggggtctaaa aatcaaaaca atctgattca tggagctaga gagtagagag 600

ctaattacca gaggtgggga agggtagtag gggcctggag gggaggtgga gatggttaat 660

aggtacaaaa aaatatagaa agaatgaata agacctagta tttgatagta caacagggcg 720

aatatagtca aaataattta attatacatt taaaaatacc tgaaagagta taattggctt 780

gtttgcaaca caaaagataa atgcttgagg ggatggatgc cccattttca atgatgtgat 840

tattacacat tgcatgcctg tatcaaaata ttgcacatac tccatgaatg catacatcta 900

ctatgttccc acaaaaatta aacattagaa aaaagagttg cattttcagc tgttatgggg 960

agaagaaaga aaagctatca ttttgttgtc ctaaaaatta tgttgtcctc atttcaaaca 1020

ggaaagcaaa agtatttgag agccagtgca gtgccttggt gttgggtgaa acatagattg 1080

aatttgggcc atttgtttaa acttcctagg cctcagtttc ttgcctatta aaagggagtg 1140

catagttcat gggattgtta agaggaagaa gtgaaaccat gcacgtggag agcgtggcac 1200

agtgtctaag acagagtgtg catgcaaata agtagataat attctttgct tttctttatt 1260

gcatgcctgt aatatttttg gagttgtcac attcattgcc ctcaagtagc atcaagggat 1320

gaaattatgt ttgtaagaaa atcctgaggc tgaggaatac aacatgtttt atgtctacta 1380

cactgaaaaa tgccggagtc agataaagaa tacagattct cctgaggatg gaaatcaaga 1440

tcttcgcctt caatatttaa caacattgag cttccaactt actatgggaa atattcatca 1500

ggcccctaaa ggttccttttt ggacagaaat tgcacttgtt atatctgtat tcttagcaga 1560

cagtagacag cctggcacat cataaaggct taaggaatcc taaatatccc ttaaaattct 1620

cattttaaag acaaaaacaa aacaaaaaaa aaaaacaaaa aaaaactgag gcatgggctt 1680

gaccaaatca gtggtagaac caagagttaa accacttgtt ttgaatccta aacctgagtt 1740

ttattttact tatttattta tttatttgtt tatttatttt cagatgcttg gtcaaagaac 1800

agtgggagga gagggatggg cttccagcaa cctttattat tggcttattt tcttacagcc 1860

cattactttc tcttgggaaa atattaagca ggcactcaag gcttgaggcc cctgagtttt 1920

cacatccttt ctgaacctct gaacctgctt tccagcattc ttttatactt tgttttacct 1980

cctggtcagt aatgcctcac cctcagtctt ctctaaaagt gtggttaatg gcatcttcct 2040

gactatttga agaccactgg ccaaatccca ccagctcact catagaccat ccccctactt 2100

tactttcttc aaaagactta gccctaccta aacttattta tatgtttatt ttctgcccac 2160

cagaatggca gcatagctgg ggaggcagag tctgttttgt tcattgctgt attcccaaag 2220

actagaacac caccaagcac acggtacagg tctcagtaat tattgtcaaa tttatgtgga 2280

tttgctttta aacaatatct tccatttact gagtgtttat gtggaagaac tgtactaaat 2340

tttaatgcat ttctttattc ctattcttaa aaccttccag caaggtggct ctaccaccct 2400

[0126] cttttccgag cttcaggagc agttgtgcga atagctggag aacaccaggc tggatttaaa 2460

cccagatcgc tcttacattt gctctttacc tgctgtgctc agcgttcacg tgccctctag 2520

ctgtagtttt ctgaagtcag cgcacagcaa ggcagtgtgc ttagaggtta acagaaggga 2580

aaacaacaac aacaaaaatc taaatgagaa tcctgactgt ttcagctggg ggtaaggggg 2640

gcggattatt catataattg ttataccaga cggtcgcagg cttagtccaa ttgcagagaa 2700

ctcgcttccc aggcttctga gagtcccgga agtgcctaaa cctgtctaat cgacggggct 2760

tgggtggccc gtcgctccct ggcttcttcc ctttacccag ggcgggcagc gaagtggtgc 2820

ctcctgcgtc ccccacaccc tccctcagcc cctcccctcc ggcccgtcct gggcaggtga 2880

cctggagcat ccggcaggct gccctggcct cctgcgtcag gacaacgccc acgaggggcg 2940

ttactgtgcg gagatgcacc acgcaagaga cacccttttgt aactctcttc tcctccctag 3000

tgcgaggtta aaaccttcag ccccacgtgc tgtttgcaaa cctgcctgta cctgaggccc 3060

taaaaagcca gagacctcac tcccggggag ccagc 3095

<210> 244

<211> 1807
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 244

[0127]

agcttgtaga tactcggaac aaatgcaatt cttacgaata cttttagtct atacacagaa 60

aaagctggct gaaaaataaa atgattattt ttaatatttt aacagttatt aattgtgtgt 120

atgtggcagg cctgtgacag gtagaggaca acttgcctaa ggcaccatgt gggttccgaa 180

ggatctaact tgtcccatgc ttggcagcaa gcacttatca ctggccatct tcccagtcct 240

agctgtagtt tgcagtatat tttatactgc agcagccact ggcttgtgtg ggagctagtg 300

cctagaccaa accaggattg cttctcttga aaccctctgg cactcattac gtgcttgatg 360

aataaatgga tggacaggtg gctgtgtaca tttctctcac ttctcagttt ctttcagtaa 420

atcccaaaat atcattttcc ttcagaaatt ctggcatgat tcattccggg tcctgccctg 480

gccatgcctt ctgtgtttct cattcagtaa gaagtccact cagatttagt tcacattaaa 540

aaataaacag agctttgata tccaaatgtc aacttgcagg gtattagaga agatagggaa 600

ttgcaatttt acatacgatt ttccccgatt ttcagccttg agatttcgtc cttgaaagca 660

tatggcaaat gtgcatccct ctttgaaatg tactaagatg taaaggggaa tttgaatgta 720

ttaaagtttg cagcaaagag aatataaatg taaacaagaa agaacagtta aatgtgtgag 780

tggatatggg gatgggtaga atgagagacg ggaaccatgt atgtgcgtcg ggatggatag 840

gaaatatgat gaacagatat agctgaggag gggtgtgaaa aggattgaaa agttgtgcag 900

gtgggcgaat acaagaattg gtgggcaggt gtagtatggc tagattagtg catttgcaga 960

aggaagatgg gtggacagag gaatggatgg gtggattgtg agtcgagaag gatttaagaa 1020

attggtagat attttgagag catgaatgaa atgtgttgag cacccttggg ttttccccgg 1080

atcaaagatc agatgagcgg tttggacttc tctcagaggg aaagaggaaa gaacactccc 1140

acaagttccc cacttttcag tccccaccct ggccaggaaa gcactctcca ctaggatgga 1200

tctctctagt ctctctctct cccttcagcc tctttctttc ttcagttcct ccctaagata 1260

agtccagctt cctcagcttc ctgggaaaac cagtctttcc ctagccaggt tcccaagttt 1320

agtgggaaag gagaaactgg aagatttaac tgagaggggc gaggtcttag aactcagtca 1380

ttctccttgt cccaggcagc gcttctcata ggctggtagg ctgggccagg gtaggaagcc 1440

tgtggagtgg ccctggagaa cgtggggcgg cacgggggct gggggggggag gggggcggcc 1500

attctcttct gtccaagaga gcagggcagg agtgcagggg cagtagcgaa agcaggctgg 1560

tgtgtcttta aacttccgtt ggctgcttag tcacagcccc ctcgctttgg gtgtgtcctt 1620

cgcgcgctcc ctccctctta ggtcactcac tctttcaaag cctggaataa aaaccacagc 1680

caacttccga agcggtctca ttgcccagca gcccccagcc agtgacaggt tccattcacc 1740

ctcgttgccc ttctccccac gacccttttc cagaggcgac tagatccctc cgtttcatcc 1800

agcacgc 1807

[0128]

<210> 245
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 245
gaaaatttgt cacaaactaa agaaaacaag aaagagacag tagatgaaag agtgctcatt 60

aggtgaaagg aaaatgatcc aagagggtag ctttgagatg taggaagaaa caaaaagcaa 120

gaaaatgata aatgttttga taaagctaaa taagtatcaa ctcataaaga aataatattc 180

ccagaagagt catgaatata cagagaaaat taaagtacat gacaatggca atgtaaaagt 240

taggggtgaa taaaaaagag acttaagagt tctaaaatca ttgcattgtc ctggaagagg 300

aaaaagtaca atgattagtc aaagatacat gtcataatcc ctagaaagga gatcattatt 360

aaatagaaaa taaaagaata catcttatag aaaggaaatc taaatgataa tattaaacag 420

atctaaaata aggcaaaagt gaggataaaa aagaaagatg gaaccaatgg ggcaaataga 480

aaaagtaaga tagcgtggta gggcattaat tccagcctta catcaatgca taagtatctc 540

aatattctac tgtaaaggga aagtaaagat ttcttacagc ctgagtgtaa tggagaaatc 600

tagtttatca tagtgcttta aatattgtaa gtcttcaact tctagttgat gaataaatga 660

tggaattctc agtgatactg cactgttatc aaataaatat aaaaggagct cctggaattg 720

gatgtaatac aggtaaagaa gtaaacacag ccatataggc atggcttctt gcagggacaa 780

ctttgtgaat cggctcagac agacagacag gcaaatacac ctcattgcct catacatgtt 840

atttgcttta gtttttgttc tgaaccttcc tactccttca agtatctgca tttactttat 900

caaattctct tttattagag actgaagaaa ctgtcatctc cttatgtgct aatgagttta 960

ataatgtcct ccagtcacca caagccttct ttcaaactac acaattccaa ctgcttccgt 1020

ctcagagtat cttgaaataa tgatctgacc gcctgttaga ccagtgaagg gaaggaattt 1080

gggttgattt aagaagagaa tcctcatggt catggtagac tgatatggag agaaaacatt 1140

ttgaggaaaa atactcaact aaattcattt ctactccagc atgcagtttc aagtcaagtt 1200

ccaccttagc tccaggtggc aggcagagca ggatgcagag gcacagcaca agtaaggggt 1260

gagtgccgaa gctgctggct cctgttccag tctttcttcc ttggcctcgc ctgaactttt 1320

actataataa tagtcaccat ttattaggtg tctcctacgt gcaggacact ttacacacag 1380

[0129]

tatccctaat cctaataaca cccttatttt atagatccaa tgactgagtc aagaattaca 1440

taacctggcc agacagctgg tacatgggaa aggtgagatt cacaccaggg tccacccagc 1500

atctctactt ataccatgct ctgctttaag gttctctgag aactcagaca agccttgggc 1560

taacaattgt gttaacagga catagcaggt gcaaggaccc actggtcatc ctgctacctg 1620

atcagaagga aggaaagttg tatttgttgc tcacctacta tgttttaggc atagtactag 1680

gtgcttttac ctagtactta attcccttat cctcaactca tttattcctc gcaataacct 1740

gataagggag atgtttttat cctcatttta catataagga aacaggccta gagaaatgag 1800

cacagtgtcc aaagtcacat agttaataag atgtgaagct ctgagtttga aagtctccgg 1860

tttcaaagcc atgaaactta tggctccccg ttttagacac ttccttttgg gaagagtgtg 1920

gaggaattaa tcagaaagaa gaaagtcata ctcaaatagg tggtaggagc agagacaatt 1980

caatacagac agaagtctta gatgagagca gtgagccagg gcactggact gggactcagg 2040

aggcttcccc tagactctgg ttccaccgat gcagcctcag gcaggacttc acctctctgg 2100

gcatccgttt cttcatatgt taaacatacg gggttttaat tagatgatcg ctgaagaccc 2160

ctctagccct aaaactctgt gtctcttaag tgctaagagg gcaccaacag cgttcctcct 2220

ccccaaggag cataatgtga tggttcctgc cggccctggc tgactctcgc cgtccttgga 2280

gataattggg ttcagtgcca cctggaccag aactggggat gcggaagcaa gaggcgagtc 2340

tattgctctc tctcggtcct gggccgccct gtgattgttg ggcgtccgga aactgtctcc 2400

cctatgggtt taaaaacaaa actgagcgcc catggggtgt gacagtcatc tgcaggggct 2460

tgggtggccc atcaggcgag gctttctcgg cacccgaggc tccagcctga tctcggtctt 2520

atcctgcgac cgggctggtt ctggcgggtc gccagggtgg gcggcggccc cagccgggcg 2580

ccccggcggc aagagcggca ggctgcgccc ctggcccgcg cctagcctgg ggagagagct 2640

gggcgggcgg cgggagctgc tctcgcgggc cgcggccctc gccctggctg caacggtagg 2700

cgtttcccgg gccggacgcg cgtgggggggc gggggcgggg gcgggggcga ggccgcggcg 2760

agcaaagtcc aggcccctct gctgcagcgc ccgcgcgtcc agaggccctg ccagacacgc 2820

gcgaggttcg aggtgagaga ggtccgggcg cgtctggcct cgaagggaga cccgggacgt 2880

[0130] ggggcgcggg gcgggagtgg ccggacctcc acccagtgcc cccgggcccc gcgactcgtg 2940

cgccgggccg ccggagaggg tgtacttggt tctgaggctg tggtttctcc tcaggctgag 3000

<210> 246
<211> 757
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 246
tgaattgatg ctgtatactc tcagagtgcc aaacatatac caatggacaa gaaggtgagg 60

cagagagcag acaggcatta gtgacaagca aagatatgca gaatttcatt ctcagcaaat 120

caaaagtcct caacctggtt ggaagaatat tggcactgaa tggtatcaat aaggttgcta 180

gagagggtta gaggtgcaca atgtgcttcc ataacatttt atacttctcc aatcttagca 240

ctaatcaaac atggttgaat actttgttta ctataactct tacagagtta taagatctgt 300

gaagacaggg acagggacaa tacccatctc tgtctggttc ataggtggta tgtaatagat 360

atttttaaaa ataagtgagt taatgaatga gggtgagaat gaaggcacag aggtattagg 420

gggaggtggg ccccagagaa tggtgccaag gtccagtggg gtgactggga tcagctcagg 480

cctgacgctg gccactccca cctagctcct ttctttctaa tctgttctca ttctccttgg 540

gaaggattga ggtctctgga aaacagccaa acaactgtta tgggaacagc aagcccaaat 600

aaagccaagc atcaggggga tctgagagct gaaagcaact tctgttcccc ctccctcagc 660

tgaaggggtg gggaagggct cccaaagcca taactccttt taagggattt agaaggcata 720

aaaaggcccc tggctgagaa cttccttctt cattctg 757

<210> 247
<211> 720
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0131]

<400> 247
ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct 60

ggttataatt aaccccaaca cctgctgccc ccccccccccc aacacctgct gcctgagcct 120

gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 180

cgctctaaaa ataaccctgt ccctggtggg cccactacgg gtctaggctg cccatgtaag 240

gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taaccccaac acctgctgcc 300

ccccccccccc caacacctgc tgcctgagcc tgagcggtta ccccacccccg gtgcctgggt 360

cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataaccctg tccctggtgg 420

gccactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc 480

tggttataat taaccccaac acctgctgcc ccccccccccc caacacctgc tgcctgagcc 540

tgagcggtta ccccacccccg gtgcctgggt cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc 600

tcgctctaaa aataaccctg tccctggtgg gcccctcccc ggggacagcc cctcctggct 660

agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac ccaggggcac aggggctgcc cccgggtcac 720

<210> 248
<211> 772
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 248
accttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc 60

tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact 120

aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg 180

ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc 240

ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccagac atgtggctgc ccccccccc 300

ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat 360

cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt 420

[0132] atacgtgcct gggactccca aagtattact gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt 480

cccccgccag ctagactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg 540

cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg 600

tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctccctg gggacagccc 660

ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct ctatataacc caggggcaca ggggctgccc 720

tcattctacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca gc 772

<210> 249
<211> 558
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 249
cagccactat gggtctaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg 60

cctggttata attaacccag acatgtggct gctccccccc ccccaacacc tgctgcctga 120

gcctcacccc cacccggtg cctgggtctt aggctctgta caccatggag gagaagctcg 180

ctctaaaaat aaccctgtcc ctggtgggct gtgggggact gagggcaggc tgtaacaggc 240

ttgggggcca gggcttatac gtgcctggga ctcccaaagt attactgttc catgttcccg 300

gcgaagggcc agctgtcccc cgccagctag actcagcact tagtttagga accagtgagc 360

aagtcagccc ttggggcagc ccatacaagg ccatggggct gggcaagctg cacgcctggg 420

tccggggtgg gcacggtgcc cgggcaacga gctgaaagct catctgctct caggggcccc 480

tccctgggga cagcccctcc tggctagtca caccctgtag gctcctctat ataacccagg 540

ggcacagggg ctgccccc 558

<210> 250
<211> 766
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0133]

<400> 250
cagccactat gggtctaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg 60

cctggttata attaacccag acatgtggct gctccccccc ccccaacacc tgctgcctga 120

gcctcacccc cacccggtg cctgggtctt aggctctgta caccatggag gagaagctcg 180

ctctaaaaat aaccctgtcc ctggtgggct gtgggggact gagggcaggc tgtaacaggc 240

ttgggggcca gggcttatac gtgcctggga ctcccaaagt attactgttc catgttcccg 300

gcgaagggcc agctgtcccc cgccagctag actcagcact tagtttagga accagtgagc 360

aagtcagccc ttggggcagc ccatacaagg ccatggggct gggcaagctg cacgcctggg 420

tccggggtgg gcacggtgcc cgggcaacga gctgaaagct catctgctct caggggcccc 480

tccctgggga cagcccctcc tggctagtca caccctgtag gctcctctat ataacccagg 540

ggcacagggg ctgcccccgg gtcaccacca cctccacagc acagacagac actcaggagc 600

cagccagcca ggtaagttta gtctttttgt cttttatttc aggtcccgga tccggtggtg 660

gtgcaaatca aagaactgct cctcagtgga tgttgccttt acttctaggc ctgtacggaa 720

gtgttacttc tgctctaaaa gctgcggaat tgtacccgcg gccgcg 766

<210> 251
<211> 961
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 251
gtttaaacaa gcttgcatgt ctaagctaga cccttcagat taaaaataac tgaggtaagg 60

gcctgggtag gggaggtggt gtgagacgct cctgtctctc ctctatctgc ccatcggccc 120

tttggggagg aggaatgtgc ccaaggacta aaaaaaggcc atggagccag aggggcgagg 180

gcaacagacc tttcatgggc aaaccttggg gccctgctgt ctagcatgcc ccactacggg 240

tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct ggttataatt 300

aacccagaca tgtggctgcc ccccccccccc caacacctgc tgcctctaaa aataaccctg 360

[0134] tccctggtgg atcccctgca tgcgaagatc ttcgaacaag gctgtggggg actgagggca 420

ggctgtaaca ggcttggggg ccagggctta tacgtgcctg ggactcccaa agtattactg 480

ttccatgttc ccggcgaagg gccagctgtc ccccgccagc tagactcagc acttagttta 540

ggaaccagtg agcaagtcag cccttggggc agcccataca aggccatggg gctgggcaag 600

ctgcacgcct gggtccgggg tgggcacggt gcccgggcaa cgagctgaaa gctcatctgc 660

tctcaggggc ccctccctgg ggacagcccc tcctggctag tcacaccctg taggctcctc 720

tatataaccc aggggcacag gggctgccct cattctacca ccacctccac agcacagaca 780

gacactcagg agccagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 840

caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt 900

tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc 960

g 961

<210> 252
<211> 1736
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 252

[0135]

aaaagagtgc agtaacaaag ccccctttac aatttacccg gcacattcac acccatcctg 60

aggccaaagc cacaggctgt gaggtctcac tgtctcagct tcctgagcta taaaatggga 120

atgatgctag tgtctacctc ctagggttgg agaattgggg gtcatgggtg tgaagtgctc 180

agcagcttgg cccacactag gtggtcagta catgtaaggt attattgttg ctacatacat 240

tagtagggcc tgggcctctt taaaccttta tagggtagca tggcaaggct aaccatcctc 300

actttatatc tgacaagctg gggctcagag aggacgtgcc tgagctgggg ctcagacaag 360

gacacaccta ctagtaaccc ctccagctgg tgatggcagg tctagggtag gaccagtgac 420

tggctcctaa tcgagcactc tattttcagg gtttgcattc caaaagggtc aggtccaaga 480

gggacctgga gtgccaagtg gaggtgtaga ggcacggcca gtacccatgg agaatggtgg 540

atgtccttag gggttagcaa gtgccgtgtg ctaaggaggg ggctttggag gttgggcagg 600

ccctctgtgg ggctccattt ttgtgggggt gggggctgga gcattatagg gggtgggaag 660

tgattggggc tgtcacccta gccttcctta tctgacgccc acccatgcct cctcaggtac 720

cccctgcccc ccacagctcc tctcctgtgc cttgtttccc agccatgcgt tctcctctat 780

aaatacccgc tctggtattt ggggttggca gctgttgctg ccagggagat ggttgggttg 840

acatgcggct cctgacaaaa cacaaacccc tggtgtgtgt gggcgtgggt ggtgtgagta 900

gggggatgaa tcagggaggg ggcgggggac ccaggggggca ggagccacac aaagtctgtg 960

cgggggtggg agcgcacata gcaattggaa actgaaagct tatcagaccc tttctggaaa 1020

tcagcccact gtttataaac ttgaggcccc accctcgaca gtaccgggga ggaagagggc 1080

ctgcactagt ccagagggaa actgaggctc agggctagct cgcccataga catacatggc 1140

aggcaggctt tggccaggat ccctccgcct gccaggcgtc tccctgccct cccttcctgc 1200

ctagagaccc ccaccctcaa gcctggctgg tctttgcctg agacccaaac ctcttcgact 1260

tcaagagaat atttaggaac aaggtggttt agggcctttc ctgggaacag gccttgaccc 1320

tttaagaaat gacccaaagt ctctccttga ccaaaaaggg gaccctcaaa ctaaagggaa 1380

gcctctcttc tgctgtctcc cctgacccca ctccccccca ccccaggacg aggagataac 1440

cagggctgaa agaggcccgc ctgggggctg cagacatgct tgctgcctgc cctggcgaag 1500

gattggcagg cttgcccgtc acaggacccc cgctggctga ctcaggggcg caggcctctt 1560

gcgggggagc tggcctcccc gcccccacgg ccacgggccg ccctttcctg gcaggacagc 1620

gggatcttgc agctgtcagg ggaggggagg cgggggctga tgtcaggagg gatacaaata 1680

gtgccgacgg ctgggggccc tgtctccccc cgccgcatcc actctccggc cggccg 1736

<210> 253
<211> 807
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0136]

<400> 253
gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480

ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa 540

tgggcggtag gcatgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc 600

agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat 660

ccagcctccg cggccccaag cttcagctgc tcgagggcgc gcctctagag ctagcgttgc 720

ggccgcctgg ctcttaacgg cgtttatgtc ctttgctgtc tgaggggcct cagctctgac 780

caatctggtc ttcgtgtggt cattagc 807

<210> 254
<211> 973
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 254
aagtcagcat ccattcctct ctgtggttct ccctccgccc catccaggtc tcaagggtct 60

agagtctttc aaagagaaca cattctgaga tttgaggagg cagagacaaa aagttccact 120

gcgaagtgcc agggaggctt ctgtttgggg tgtcccttgg gatcacagat cccccacctg 180

gtgatgagtc aacccagcac caccccattg cagggctgga atgacagtaa tgggcccacc 240

tgctgcctct cctcataccc gcaccccagt cagacattgc aagtcagtca cggctctgtc 300

ctgctgggcc tggagtgttc cagtgccttt tccatcacag caccaagcag ccactactag 360

[0137] tcgatcaatt tcagcacaag agataaacat cattaccctc tgctaagctc agagataacc 420

caactagctg accataatga cttcagtcat tacggagcaa gataaaagac taaaagaggg 480

agggatcact tcagatctgc cgagtgagtc gattggactt aaagggccag tcaaaccctg 540

actgccggct catggcaggc tcttgccgag gacaaatgcc cagcctatat ttatgcaaag 600

agattttgtt ccaaacttaa ggtcaaagat acctaaagac atccccctca ggaacccctc 660

tcatggagga gagtgcctga gggtcttggt ttcccattgc atcccccacc tcaatttccc 720

tggtgcccag ccacttgtgt ctttagggtt ctctttctct ccataaaagg gagccaacac 780

agtgtcggcc tcctctcccc aactaagggc ttatgtgtaa ttaaaaggga ttatgctttg 840

aaggggaaaa gtagccttta atcaccagga gaaggacaca gcgtccggag ccagaggcgc 900

tcttaacggc gtttatgtcc tttgctgtct gaggggcctc agctctgacc aatctggtct 960

tcgtgtggtc att 973

<210> 255
<211> 450
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 255
ctagactagc atgctgccca tgtaaggagg caaggcctgg ggacacccga gatgcctggt 60

tataattaac ccagacatgt ggctgccccc ccccccccaa cacctgctgc ctctaaaaat 120

aaccctgcat gccatgttcc cggcgaaggg ccagctgtcc cccgccagct agactcagca 180

cttagtttag gaaccagtga gcaagtcagc ccttggggca gcccatacaa ggccatgggg 240

ctgggcaagc tgcacgcctg ggtccggggt gggcacggtg cccgggcaac gagctgaaag 300

ctcatctgct ctcaggggcc cctccctggg gacagcccct cctggctagt cacaccctgt 360

aggctcctct atataaccca ggggcacagg ggctgccctc attctaccac cacctccaca 420

gcacagacag acactcagga gccagccagc 450

[0138] <210> 256
<211> 455
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 256
ctgctcccag ctggccctcc caggcctggg ttgctggcct ctgctttatc aggattctca 60

agagggacag ctggtttatg ttgcatgact gttccctgca tatctgctct ggttttaaat 120

agcttatctg ctagcctgct cccagctggc cctcccaggc ctgggttgct ggcctctgct 180

ttatcaggat tctcaagagg gacagctggt ttatgttgca tgactgttcc ctgcatatct 240

gctctggttt taaatagctt atctgagcag ctggaggacc acatgggctt atatggggca 300

cctgccaaaa tagcagccaa cacccccccc tgtcgcacat tcctccctgg ctcaccaggc 360

cccagcccac atgcctgctt aaagccctct ccatcctctg cctcacccag tccccgctga 420

gactgagcag acgcctccag gatctgtcgg cagct 455

<210> 257
<211> 3050
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 257
attttcaag ataaaagtga aataaatttt caggaaaaaa aagctgagaa aatttgtcac 60

aaactaaaga aaacaagaaa gagacagtag atgaaagagt gctcattagg tgaaaggaaa 120

atgatccaag agggtagctt tgagatgtag gaagaaacaa aaagcaagaa aatgataaat 180

gttttgataa agctaaataa gtatcaactc ataaagaaat aatattccca gaagagtcat 240

gaatatacag agaaaattaa agtacatgac aatggcaatg taaaagttag gggtgaataa 300

aaaagagact taagagttct aaaatcattg cattgtcctg gaagaggaaa aagtacaatg 360

attagtcaaa gatacatgtc ataatcccta gaaaggagat cattattaaa tagaaaataa 420

aagaatacat cttatagaaa ggaaatctaa atgataatat taaacagatc taaaataagg 480

[0139]

caaaagtgag gataaaaaag aaagatggaa ccaatggggc aaatagaaaa agtaagatag 540

cgtggtaggg cattaattcc agccttacat caatgcataa gtatctcaat attctactgt 600

aaagggaaag taaagatttc ttacagcctg agtgtaatgg agaaatctag tttatcatag 660

tgctttaaat attgtaagtc ttcaacttct agttgatgaa taaatgatgg aattctcagt 720

gatactgcac tgttatcaaa taaatataaa aggagctcct ggaattggat gtaatacagg 780

taaagaagta aacacagcca tataggcatg gcttcttgca gggacaactt tgtgaatcgg 840

ctcagacaga cagacaggca ggcaaataca cctcattgcc tcatacatgt tatttgcttt 900

agtttttgtt ctgaaccttc ctactccttc aagtatctgc atttacttta tcaaattctc 960

ttttattaga gactgaagaa actgtcatct ccttatgtgc taatgagttt aataatgtcc 1020

tccagtcacc acaagccttc tttcaaacta cacaattcca actgcttccg tctcagagta 1080

tcttgaaata atgatctgac cgcctgttag accagtgaag ggaaggaatt tgggttgatt 1140

taagaagaga atcctcatgg tcatggtaga ctgatatgga gagaaaacat tttgaggaaa 1200

aatactcaac taaattcatt tctactccag catgcagttt caagtcaagt tccaccttag 1260

ctccaggtgg caggcagagc aggatgcaga ggcacagcac aagtaagggg tgagtgccga 1320

agctgctggc tcctgttcca gtctttcttc cttggcctcg cctgaacttt tactataata 1380

atagtcacca tttattaggt gtctcctacg tgcaggacac tttacacaca gtatccctaa 1440

tcctaataca cccttatttt atagatccaa tgactgagtc aagaattaca taacctggcc 1500

agacagctgg tacatgggaa aggtgagatt cacaccaggg tccacccagc atctctactt 1560

ataccatgct ctgctttaag gttctctgag aactcagaca agccttgggc taacaattgt 1620

gttaacagga catagcaggt gcaaggaccc actggtcatc ctgctacctg atcagaagga 1680

aggaaagttg tatttgttgc tcacctacta tgttttaggc atagtactag gtgcttttac 1740

ctagtactta attcccttat cctcaactca tttattcctc gcaataacct gataagggag 1800

atgtttttat cctcatttta catataagga aacaggccta gagaaatgag cacagtgtcc 1860

aaagtcacat agttaataag atgtgaagct ctgagtttga aagtctccgg tttcaaagcc 1920

atgaaactta tggctccccg ttttagacac ttccttttgg gaagagtgtg gaggaattaa 1980

[0140] tcagaaagaa gaaagtcata ctcaaatagg tggtaggagc agagacaatt caatacagac 2040

agaagtctta gatgagagca gtgagccagg gcactggact gggactcagg aggcttcccc 2100

tagactctgg ttccaccgat gcagcctcag gcaggacttc acctctctgg gcatccgttt 2160

cttcatatgt taaacatacg gggttttaat tagatgatcg ctgaagaccc ctctagccct 2220

aaaactctgt gtctcttaag tgctaagagg gcaccaacag cgttcctcct ccccaaggag 2280

cataatgtga tggttcctgc cggccctggc tgactctcgc cgtccttgga gataattggg 2340

ttcagtgcca cctggaccag aactggggat gcggaagcaa gaggcgagtc tattgctctc 2400

tctcggtcct gggccgccct gtgattgttg ggcgtccgga aactgtctcc cctatgggtt 2460

taaaaacaaa actgagcgcc catggggtgt gacagtcatc tgcaggggct tgggtggccc 2520

atcaggcgag gctttctcgg cacccgaggc tccagcctga tctcggtctt atcctgcgac 2580

cgggctggtt ctggcgggtc gccagggtgg gcggcggccc cagccgggcg ccccggcggc 2640

aagagcggca ggctgcgccc ctggcccgcg cctagcctgg ggagagagct gggcgggcgg 2700

cgggagctgc tctcgcgggc cgcggccctc gccctggctg caacggtagg cgtttcccgg 2760

gccggacgcg cgtgggggggc gggggcgggg gcgggggcga ggccgcggcg agcaaagtcc 2820

aggcccctct gctgcagcgc ccgcgcgtcc agaggccctg ccagacacgc gcgaggttcg 2880

aggtgagaga ggtccgggcg cgtctggcct cgaagggaga cccgggacgt ggggcgcggg 2940

gcgggagtgg ccggacctcc acccagtgcc cccgggcccc gcgactcgtg cgccgggccg 3000

ccggagaggg tgtacttggt tctgaggctg tggtttctcc tcaggctgag 3050

<210> 258
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 258
gggtggctcc cagtcagctg gtttggcaaa gtttctggat gattacggaa taacatgtgt 60

ccccaacccg cagagcaggt tgtgggggca atgttgcatt gaccagcgtc agagaacaca 120

[0141]

catcagaggc aagggtgggt gtgcaggagg gagaaggcgc agaaggcagg gctttagctc 180

agcactctcc ctcctgccat gctctgcctg accgttccct ctctgagtcc caaacagcca 240

ggtagaggag gaagaaatgg ggctgagacc ccagcacatc agtgattaag tcaggatcag 300

gtgcggtttc ctgctcaggt gctgagacag caggcggtgt cctgcaaaca acaggaggca 360

cctgaagcta gcctgggggg cccacgccca ggtgcggtgc attcagcagc acagccagag 420

acagacccca atgaccccgc ctccctgtcg gcagccagtg ctctgcacag agccctgagc 480

agcctctgga cattagtccc agccccagca cggcccgtcc cccacgctga tgtcaccgca 540

cccagacctt ggaggccccc tccggctccg cctcctggga gaaggctctg gagtgaggag 600

gggagggcag cagtgctggc tggacagctg ctctgggcag gagagagagg gagagacaag 660

agacacacac agagagacgg cgaggaaggg aaagacccag agggacgcct agaacgagac 720

ttggagccag acagaggaag aggggacgtg tgtttgcaga ctggctgggc ccgtgaccca 780

gcttcctgag tcctccgtgc aggtggcagc tgtaccaggc tggcaggtca ctgagagtgg 840

gcagctgggc cccaggtaag gatgggctgc ccactgtcct gggcattggg aggggtttgg 900

[0142]

atgtggagga gtcatggact tgagctacct ctagagcctc tgccccacag ccacttgctc 960

ctgggactgg gcttcctgcc acccttgagg gctcagccac cacagccact gaatgaaact 1020

gtcccgagcc tgggaagatg gatgtgtgtc ccctggagga gggaagagcc aaggagcatg 1080

ttgtccatcg aatcttctct gagctggggc tggggttagt ggcatcctgg ggccagggga 1140

atagacatgc tgtggtggca gagagaagag tccgttctct ctgtctcctt tgctttctct 1200

ctgacactct ttatctccgt ttttggataa gtcacttcct tcctctatgc cccaaatatc 1260

ccatctgtga aatgggagta tgaagcccca acagccaggg ttgtagtggg gaagaggtaa 1320

aatcaggtat agacatagaa atacaaatac agtctatgcc ccctgttgtc agttggaaaa 1380

gaaattaact tgaaggtggt ctagttctca tttttagaaa tgaaatgtct gtctggtcat 1440

tttaaaatgt ggcccttaaa tttcacgccc tcaccactct cccccatccc ttggagcccc 1500

atgtctctag tgaaagcact ggctctgccc ccagccctca tggctcatgc tggcataggg 1560

cgcctgctcc acagcctggg caccatcttc agacaagtgc ccggtggcaa ctgcctgctg 1620

gccctgttga atccacatct ccaccaggca tccagactag ttcaggtctc tggaaggact 1680

gtgggtttgc tgtgtcccag agctccaggg caggggtcag ggctcggatg tcgggcagtg 1740

tcatgggcag aggatcgaat gccccggcgg ctctgaatgg gcccttgtga aaaattgatg 1800

cgcattctag gagacaggtt gggagccaga ggggcctcat accagggtct gtaggctggg 1860

gctgcctttt aagctccttc ctgaggccgt ctctgggtct ggccctgtgc tggacaaggc 1920

tggagacaag gcaatgtctc agaccctctc ccattggcca catcctgccc tggatcaact 1980

cgccaacttt gggggcagag gtgggactga cccttaccct gacaacataa tgcatatagt 2040

caaaatggga taaaggggaa tatagaggct cttggcagct tgggagtggt cagggaaggc 2100

ttcctggagg aggtatcatc tgaactgagc catgaaccat aagtggaaat tcactagtca 2160

aaatttcagg tagaagggcc agtgtgtgaa ggccaggaga tggcaagagc tggcgtattt 2220

caggaacagt gagtcactga ggatgtccaa gtataagggt aggaaaggga gtgagcagtg 2280

agagaaaaga ccgaggcatc agcaggggcc agattgtgct gggcctagcg gggcgggccc 2340

gggcccgggc ccaggcccag gtgcggtgca ttcagcagca cagccagaga cagaccccaa 2400

tgaccctgcc tccccgtcag cagccagtgc tctgcacaga gccatcctga gggcagtggg 2460

tgctcttgag aggtttcagg cagggtgtgc tgtgagcagg tcatgcccag cccttgacct 2520

tctgctcagt caggcttgtc cttgtcaccc acattcctgg ggcagtccct aagctgagtg 2580

ccggagatta agtcctagtc ctaaatttgc tctggctagc tgtgtgaccc tgggcaagtc 2640

ttggtccctc tctgggcccc tttgccgtag gtccctggtg gggccagact tgctactttc 2700

taggagccct ttgggaatct ctgaatgaca gtggctgaga gaagaattca gctgctctgg 2760

gcagtggtgc tggtgacagt ggctgaggct caggtcacac aggctgggca gtggtcagag 2820

ggagagaagc caaggagggt tcccttgagg gaggaggagc tggggctttg ggaggagccc 2880

aggtgacccc agccaggctc aaggcttcca gggctggcct gcccagaagc atgacatggt 2940

ctctctccct gcagaactgt gcctggccca gtgggcagca ggagctcctg acttgggacc 3000

<210> 259
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

[0143]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 259
taataggcag agtttcttaa tgtggactag agttgctaat cttagattat ccatttgagt 60

catgatttcc tactatacaa agcaggagtt gttatggggt agaagaattt ttatcccagg 120

aatgacaaag ataagttgaa gcactacagt aaaaaattag agttagacat ggacacgtag 180

aagggaacaa cagactctac agactctagg acctacttga ggctgaaggg tgggaggagg 240

tggaagattg aaaaactacc tatcaggtac tgtgcttatt acctggatga tgacataatc 300

tgtacatcta acccccatga cacacaattt acctatataa caaacctcca aatgtacccc 360

tgaacctaaa ataaaagttt agaaaaaatg agaattagtt cttggattca caagatataa 420

agagaagcca gccattgaat accttgtttg aaagtaggtt gacttcatgt tttgtagcag 480

gtctgaataa tccatttgtc taattcactg tgctctataa tacctatttt caaagatagt 540

ttcccaagtt ctgagaagtc cttacatatt agctgacttt atactaaaat ttgggtttaa 600

aaaaattttt ttttagagac atggtctcac tctgtcatcc aggttaaagt gcagtggtgg 660

tgtgataata gtttactgca gcctcgaaat cctgggctca acaaccctcc cacctcagca 720

tcctaagtag ctgggactac gagtgtgtgc caccatgcct ggcttaaatt tttttatttt 780

tatttttatt tttatttttt ttttggagac gtgggatttc actatgttgc acagcatggt 840

cttgaactcc tggcttcaag caatcctccc accttggcct cccaaatccc taggaggcac 900

aagcatgagc cattgtgctt tgccctaaaa tttgttttaa attaaagttt ttctggtaag 960

aatgtaatag cgtattttga caaagggtga gaaaggcttc ttctggaagc aactaatgct 1020

aattgataaa attgatatat aaatgggttg tggtttccag ctctcttctg ggagagaaat 1080

aaaagggaat ctaataaaga acaatgttgg tttttctctg gctgctttac taacaagaaa 1140

caccatgaaa catttctctc atttctaaac atttctataa aaaagataac ttatagagaa 1200

caaaatcaca atcgaccagt tatttcccaa acaaattttc catttttaca atacaaaggg 1260

aaagctacaa gtattagctg atttagaata tttctcatct aggatgagat gtcccagatg 1320

gcagagtaga gagagttttg gatataattg aaactctata gaattggtgg caaatgtgca 1380

[0144] catatacaca cacacacacg ttcctatcca attaagcagc caaaaagtca gcaatcccat 1440

tgcttcttta gtttaattaa agtcactgat tttccaaacc caacatttag agatcacatc 1500

agatgctact cataatgtaa ggaagcatgt attatggaga ggttatcctg ggtgaaaggt 1560

acagcaacaa ctgaatagtc aaccgaaact tctatcaatg ggccaagctt tgggagcatc 1620

aatatataaa agtttagaat tccattttgt atcctcttct cccccaaaaa gaaagagcac 1680

tggaaattat tccttgtgtg gtgtttaata gtggtagatc attttgatta aggaattaaa 1740

tggattgagg tgcatgagag caagaaagag gaggggcaag agggggggatt ataggataag 1800

gtgtactgct actttaaaat tatgtatgca tgatcccatc caggtccctc ccactgcttg 1860

aggtaccagc ggaaagcttg ggcagctcag ttccaagagg gccaccaagc agaccacgct 1920

ctgagcttca ggtaaccaag tgtttgctct gcagaatact ttacctgggc acccaagtct 1980

tccttccagc attcctgctg ctacagccta tttgctgagt aaccaggggt tacagcagcg 2040

ttgccaggca acgagggaca gcggtcctgt tgaagagcca tttgtcacac tgaggggact 2100

ggttgaaatg caataaagaa atggtaactc agcttattta tcaatacaat tacttgcaca 2160

gtattaggga tccatgtgta acctacaaat tcatagtcat atgaggaaac acagaaacat 2220

tttgctaaat attaaagcat aggacagaca gatggtgttg ggtttctaat cagctttact 2280

ctgagcttaa agttgctgca catgctggga taaggggaaa ggcccaaagt cctttgccag 2340

ctttattttg ggcatctgta agttagctct gggttacaat gtacagtgca tgtgtaaaga 2400

aaatctacaa gattcttttc cctgttaagt agagctggta atgccattgc taattccctg 2460

gggtgaagta acaacacaaa attattgtat gtgtaatata ttattaataa ttatatatat 2520

ataaaacaca cacatatatt atataaatat ttatgtataa ctggttataa atattactgg 2580

ttgtcctgtg gacttataaa gtgcttgatt tgcccaatgc aatcaagaga tttaccaaaa 2640

ggatgagtat tttactctga gcactgtgct tcaaaatgtt ttttgagaag ttcagtagtg 2700

ttgcttctag gagctcaaag tcctcaggcc tgggatgagc ttcagtttta aaggtgcagc 2760

agctttccct tgacgcccta cgtttttgat tcccagatac cagcagctac tcatgtcttc 2820

gccattgcta agaacgtcgt tggtattacc ttactctgag aacgtgtctg cagtttccag 2880

[0145] aaaatggagt atcgcaacat cacttaaagt accctgcttc aaagtattgc tggcaagtgg 2940

cgtgggcctg attatttatt tagaaatgct ttatcaggag gagaatgctt ttttgtaaac 3000

<210> 260
<211> 1053
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 260
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300

catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc 360

cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggg 420

gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 480

aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 540

gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg 600

ccttcgcccc gtgccccgct ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac 660

cgcgttacta aaacaggtaa gtccggcctc cgcgccgggt tttggcgcct cccgcgggcg 720

ccccccctcct cacggcgagc gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag cgtcctgatc 780

cttccgcccg gacgctcagg acagcggccc gctgctcata agactcggcc ttagaacccc 840

agtatcagca gaaggacatt ttaggacggg acttgggtga ctctagggca ctggttttct 900

ttccagagag cggaacaggc gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct gcggagggat 960

ctccgtgggg cggtgaacgc cgatgatgcc tctactaacc atgttcatgt tttcttttt 1020

tttctacagg tcctgggtga cgaacaggct agc 1053

[0146]

<210> 261
<211> 3000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 261
gcttgctact gaaaagctaa ggccagaggt aaagactatg gatttgggga atgaatattc 60

tgtgaagcca taagataatg gcctgaggtg ctgaggacca gtagtgctag gaactttgca 120

tccatgacta tagggctctt tagaactgtg ccacagtaca gcatcatgca gtagaatcta 180

agttgttctt tgtaataatg aatgccagca atattttaaa ataataataa taccattaaa 240

aagtgggcaa aggacatgaa tagacatttt tcaaaaggaa acatacaaat cgccaagaag 300

tatatgaaaa attaacagtt aatgttcatt gaatacttat tgcaggctag gtactgagtt 360

gagcattttg catgcatcat ctcacttaaa ataatgtatg tcccagcctg gccaacatgg 420

tgaaacccca tctctactaa aaatacaaaa attagccaga catggtggta catgcctgta 480

atcccagcta ctcaggaggc tgaggcagga gaattgcttg aatctgggag gcagaggttg 540

cagtgagccg agattgcacc actgcactct agcctgggtg acagagcgat actctgtctc 600

aaaagataat aataataaaa taatgtatgt caattgttga aattttggaa aatgaacaag 660

tgtgtgtgtg aataactggg tgtattctat acatatggct ttataactta cctattaact 720

taaggtcatt aatgcaatgt catcaaatac tctttggatc atctagattg ttgcacatta 780

tcctataata tgagatgcca caatttattt acacagtcga caattgtaac ccagcttgct 840

tttggctttt actgttttac ataatacttg gtaaaaatcc tcatataaat atttgaaaat 900

ttcctaagtg tccatttgtg aatgtaaaaa ttattttaga gatctaagat ttggtgcaaa 960

acttgcaatc agctacatag ttctacttga ggcaattttc actcaaaata tatcataaac 1020

catagtacaa aaatagagca tagacctctc cttgtgaagc agttgttttt gccttacatt 1080

tttttttttt tttttttttt ttgagatgga gtctcgctct gtcgcccggg ctggagtgca 1140

gtggcgcaat ctcagctcac tgcaagctcc gcctcccggg ttcacgccat tctcctgcct 1200

cagcctcccg agcagctggg actacaggtg cccgctacca cgtctggcta atttttttata 1260

[0147]

tttttagtag aaacggggtt tcactgtgtt agccaggatg gtctcgatct cctgacctcg 1320

tgatccgccc acctcggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc accgtgcgtg 1380

gctgccttaa atttttaata atcattgtgc aaattattta gcactccagt gttttgattt 1440

ttctcctctg ctgggtagga ataacaataa tactgttatt caccatggtg gtgtgggaag 1500

tttcaaagag cacatgtcta taaagtgctt agtgcaaggc ttggcatgca gttaacacaa 1560

aataaatgcg agctgctgtc attaacaata ctgactacac ggcactgtga tgcttatgta 1620

aatgccaggc tgtgtgtctg taacctgagg tatttgtgta aatattttcc taaaataaat 1680

ctaactaagg ttgttcttct cacttgtatg gggtcatctt atgcggtaga tgctcaaaca 1740

caaattccag atacagagtg ggcagtggta gttaggaaga tagaaaggct agggagtgtt 1800

cctgggaagt cagtaaactt ggaagatcta aggttatatt aaaaatgttg tatcagaaca 1860

aaggctcagg acgttagtgt tagcagaaac cagatatctt agagcagtgg tttgtcaact 1920

ttgccagcaa tccacagtaa gaaattcaac tccggccggg cgcgggcctg taatcccagc 1980

actttgggaa gccgaggcgg gtggatgact tgaggtcagg agttcgagac catcctggct 2040

aacacagtga aaccccgtct ctactaaaaa tacaaaaatt agccgggcgt ggtggtgtgt 2100

gcctgtaatc ccagctactt gggaggttga ggcaggagaa tcacttgaac acaggaggcg 2160

gaggtgacag tgagccgaga tcgtgccatt gcactccagc ctgggtgaca gagggagact 2220

ctatctcaaa aaaagaaaaa aaagaaattc aactccacta acacccacaa tgcaaataaa 2280

tgtgtgaatg tgtacaacta ttttatcaag cagtacttat tatatgtgct gtaatctgat 2340

attttatagc ctgtttcatt ttatttaat gttgattgtt acccactaaa tttatttcat 2400

tgagaccccc taatttgaaa tattgccttg aatatatata tacatatata tacacatata 2460

tacatatata tacacacata tatacacata tatacacaca tatatacaca tatatataca 2520

tatatacaca tatatacata tatacacata tatacatata tacatatata tacacatata 2580

tacatatata cacatatata catatataca catatataca tatatacaca tatatacata 2640

tatacatata tatacatata tacacatata tacatataca catatatata catatataca 2700

tatatatata cacatacata tatatatata cccttgttta aaaataaaag gtttgcagct 2760

[0148] ccatattttt taaaaaaatc ttacccaagc atttaatcag tactgaatgg ttttgttctt 2820

gtcttcatgt caagttgaat ttgggggtac tattccagaa tatttacatg ttagacaatg 2880

ttctgtaaaa ggggcattgt agcagcatgc aggcagtatt caaccaaaaa ctgggcaaga 2940

gtcataattc actctggttt ctctttcctt ttaagcaggt agttccaatt tgccagcaga 3000

<210> 262
<211> 3102
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 262
cgggagtcct gagggtagca gaagggtgcg gatttaaagt tactgttaga gtggctggaa 60

aatgggagac cggttcagag acattttatc tacttaaaaa ctgtgccttt tgtatcacgt 120

caaagtgaat gcaaaacaaa gaacaaaagg gttaaaggct caggtttaaa tcccaggtat 180

atgtacattt caattgaggt attttttttt tcttttctaa atgatcagta cacttattct 240

ttctaaagaa aatacttttc ttaactactc tctattttta aacttctccc acaaagatga 300

gaaaacattt aaaaatcatt ggggctattt ttctgtttac cgagtaaaga gaatctctaa 360

accatattta taactcttac tctaaatatt tgcatttacc ctcatgccag agcccgttga 420

tgactgacta aacagagttt caaagtttga agaacaggaa atttagaaat gactaacaat 480

tatgtaggtt tatttctctc agtatagaat gttcatatag aattaatgcc agaggttttc 540

agagaaaaat gcagaaattt ttactttgca aatccagaag atgcaattgt tcaagtattt 600

gttaagaaac attaatttta agtatgcaga tatcattgag aattaaatat tttaatttct 660

aaactattaa tcttttagta ggatgcacat atgcaaaatg cctcattagt actgtaagaa 720

aagattcttg gccgggcgcg gtggctcatg actgtaatcc cagcacttag ggaggccgag 780

gtgggcggat gacgaggtca ggagatcgag accaccctgg cacacggtca aaccccgtct 840

ctactaaaga tacaaaaaat tagccgggcg tgatggcggg cgcctgtagt cccagctact 900

cgggaggctg aggcagaaga atggcgtgaa ctcgggaggc ggagcttgca agtgagccga 960

[0149] gatagtgcca ctgcactcca gtctgggcga aagagcgaga ctccatctca aaaaaaaaaa 1020

aaaaaaaaga aaagattctt ttaggtttca tcaattttgt tttaaagcta gggctcttca 1080

ttagatatag gaaaatcaat tcaaagtttc tattcagtca tgatgaattt gagatttttt 1140

taggtttctt tgtatttaac aatatattac attataatgt tgtggtgaaa actaaatgga 1200

ctaatattat tcttttcatt tgttaaatga aaaagtatgc acaaagtata tgtgagagtg 1260

acaaaggcct gaatttgtca attagtaaca attgtattca acagtaagga ttttatgttt 1320

gggtaggcct ttcccaggga cttctacaag gaaaaagcta gagttggtta ctgacttcta 1380

ataaataatg cctacaattt ctaggaagtt aaaagttgac ataatttatc caagaaagaa 1440

ttattttctt aacttagaat agtttctttt ttcttttcag atgtaggttt ttctggcttt 1500

agaaaaaatg cttgtttttc ttcaatggaa aataggcaca cttgttttat gtctgttcat 1560

ctgtagtcag aaagacaagt ctggtatttc ctttcaggac tcccttgagt cattaaaaaa 1620

aatcttccta tctatctatg tatctatcat ccatctagct ttgatttttt cctcttctgt 1680

gctttattag ttaattagta cccatttctg aagaagaaat aacataagat tatagaaaat 1740

aatttctttc attgtaagac tgaatagaaa aaattttctt tcattataag actgagtaga 1800

aaaaataata ctttgttagt ctctgtgcct ctatgtgcca tgaggaaatt tgactactgg 1860

ttttgactga ctgagttata taattaagta aaataactgg cttagtacta attattgttc 1920

tgtagtatca gagaaagttg ttcttcctac tggttgagct cagtagttct tcatattctg 1980

agcaaaaggg cagaggtagg atagcttttc tgaggtagag ataagaacct tgggtaggga 2040

aggaagattt atgaaatatt taaaaaatta ttcttccttc gctttgtttt tagacataat 2100

gttaaattta ttttgaaatt taaagcaaca taaaagaaca tgtgattttt ctacttattg 2160

aaagagagaa aggaaaaaaa tatgaaacag ggatggaaag aatcctatgc ctggtgaagg 2220

tcaagggttc tcataaccta cagagaattt ggggtcagcc tgtcctattg tatattatgg 2280

caaagataat catcatctca tttgggtcca ttttcctctc catctctgct taactgaaga 2340

tcccatgaga tatactcaca ctgaatctaa atagcctatc tcagggcttg aatcacatgt 2400

gggccacagc aggaatggga acatggaatt tctaagtcct atcttacttg ttattgttgc 2460

tatgtctttt tcttagtttg catctgaggc aacatcagct ttttcagaca gaatggcttt 2520

[0150]

ggaatagtaa aaaagacaca gaagccctaa aatatgtatg tatgtatatg tgtgtgtgcg 2580

tgcgtgagta cttgtgtgta aatttttcat tatctatagg taaaagcaca cttggaatta 2640

gcaatagatg caatttggga cttaactctt tcagtatgtc ttatttctaa gcaaagtatt 2700

tagtttggtt agtaattact aaacactgag aactaaattg caaacaccaa gaactaaaat 2760

gttcaagtgg gaaattacag ttaaatacca tggtaatgaa taaaaggtac aaatcgtttt 2820

aactcttatg taaaatttga taagatgttt tacacaactt taatacattg acaaggtctt 2880

gtggagaaaa cagttccaga tggtaaatat acacaaggga tttagtcaaa caatttttg 2940

gcaagaatat tatgaatttt gtaatcggtt ggcagccaat gaaatacaaa gatgagtcta 3000

gttaataatc tacaattatt ggttaaagaa gtatattagt gctaatttcc ctccgtttgt 3060

cctagctttt ctcttctgtc aaccccacac gcctttggca ca 3102

<210> 263
<211> 2337
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 263

[0151]

tctagcttcc ttagcatgac gttccacttt tttctaaggt ggagcttact tctttgattt 60

gatcttttgt gaaacttttg gaaattaccc atcttcctaa gcttctgctt ctctcagttt 120

tctgcttgct cattccactt ttccagctga ccctgccccc taccaacatt gctccacaag 180

cacaaattca tccagagaaa ataaattcta agttttatag ttgtttggat cgcataggta 240

gctaaagagg tggcaaccca cacatcctta ggcatgagct tgatttttt tgatttagaa 300

ccttcccctc tctgttccta gactacacta cacattctgc aagcatagca cagagcaatg 360

ttctacttta attactttca ttttcttgta tcctcacagc ctagaaaata acctgcgtta 420

cagcatccac tcagtatccc ttgagcatga ggtgacacta cttaacatag ggacgagatg 480

gtactttgtg tctcctgctc tgtcagcagg gcactgtact tgctgatacc agggaatgtt 540

tgttcttaaa taccatcatt ccggacgtgt ttgccttggc cagttttcca tgtacatgca 600

gaaagaagtt tggactgatc aatacagtcc tctgccttta aagcaatagg aaaaggccaa 660

cttgtctacg tttagtatgt ggctgtagaa agggtataga tataaaaatt aaaactaatg 720

aaatggcagt cttacacatt tttggcagct tatttaaagt cttggtgtta agtacgctgg 780

agctgtcaca gctaccaatc aggcatgtct gggaatgagt acacggggac cataagttac 840

tgacattcgt ttcccattcc atttgaatac acacttttgt catggtattg cttgctgaaa 900

ttgttttgca aaaaaaaccc cttcaaattc atatatatta ttttaataaa tgaattttaa 960

tttatctcaa tgttataaaa aagtcaattt taataattag gtacttatat acccaataat 1020

atctaacaat catttttaaa catttgttta ttgagcttat tatggatgaa tctatctcta 1080

tatactctat atactctaaa aaagaagaaa gaccatagac aatcatctat ttgatatgtg 1140

taaagtttac atgtgagtag acatcagatg ctccatttct cactgtaata ccatttatag 1200

ttacttgcaa aactaactgg aattctagga cttaaatatt ttaagtttta gctgggtgac 1260

tggttggaaa attttaggta agtactgaaa ccaagagatt ataaaacaat aaattctaaa 1320

gttttagaag tgatcataat caaatattac cctctaatga aaatattcca aagttgagct 1380

acagaaattt caacataaga taattttagc tgtaacaatg taatttgttg tctattttct 1440

tttgagatac agtttttttct gtctagcttt ggctgtcctg gaccttgctc tgtagaccag 1500

gttggtcttg aactcagaga tctgcttgcc tctgccttgc aagtgctagg attaaaagca 1560

tgtgccacca ctgcctggct acaatctatg ttttataaga gattataaag ctctggcttt 1620

gtgacattaa tctttcagat aataagtctt ttggattgtg tctggagaac atacagactg 1680

tgagcagatg ttcagaggta tatttgctta ggggtgaatt caatctgcag caataattat 1740

gagcagaatt actgacactt ccattttata cattctactt gctgatctat gaaacataga 1800

taagcatgca ggcattcatc atagttttct ttatctggaa aaacattaaa tatgaaagaa 1860

gcactttatt aatacagttt agatgtgttt tgccatcttt taatttctta agaaatacta 1920

agctgatgca gagtgaagag tgtgtgaaaa gcagtggtgc agcttggctt gaactcgttc 1980

tccagcttgg gatcgacctg caggcatgct tccatgccaa ggcccacact gaaatgctca 2040

aatgggagac aaagagatta agctcttatg taaaatttgc tgttttacat aactttaatg 2100

[0152] aatggacaaa gtcttgtgca tgggggtggg ggtggggtta gaggggaaca gctccagatg 2160

gcaaacatac gcaagggatt tagtcaaaca acttttggc aaagatggta tgattttgta 2220

atggggtagg aaccaatgaa atgcgaggta agtatggtta atgatctaca gttattggtt 2280

aaagaagtat attagagcga gtctttctgc acacagatca cctttcctat caacccc 2337

<210> 264
<211> 1330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 264
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctattttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccgggg 780

ctggaagcta cctttgacat catttcctct gcgaatgcat gtataatttc tacagaacct 840

attagaaagg atcacccagc ctctgctttt gtacaacttt cccttaaaaa actgccaatt 900

ccactgctgt ttggcccaat agtgagaact ttttcctgct gcctcttggt gcttttgcct 960

[0153] atggccccta ttctgcctgc tgaagacact cttgccagca tggacttaaa cccctccagc 1020

tctgacaatc ctctttctct tttgttttac atgaagggtc tggcagccaa agcaatcact 1080

caaagttcaa accttatcat tttttgcttt gttcctcttg gccttggttt tgtacatcag 1140

ctttgaaaat accatcccag ggttaatgct ggggttaatt tataactaag agtgctctag 1200

ttttgcaata caggacatgc tataaaaatg gaaagatctc taaggtaaat ataaaatttt 1260

taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc taattgtttc tctcttttag attccaacct 1320

ttggaactga 1330

<210> 265
<211> 937
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 265
agattgtacc tgcccgtaca taaggtcaat agggggtgaa tcaacaggaa agtcccattg 60

gagccaagta cactgcgtca atagggactt tccattgggt tttgcccggt acataaggtc 120

aataggggat gagtcaatgg gaaaaaccca ttggagccaa gtacactgac tcaataggga 180

ctttccattg ggttttgccc agtacataag gtcaataggg ggtgagtcaa caggaaagtc 240

ccattggagc caagtacatt gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat 300

aaggtcaatg ggaggtaagc caatgggttt ttcccattac tggcacgtat actgagtcat 360

tagggacttt ccaatgggtt ttgcccagta cataaggtca ataggggtga atcaacagga 420

aagtcccatt ggagccaagt acactgagtc aatagggact ttccattggg ttttgcccag 480

tacaaaaggt caataggggg tgagtcaatg ggtttttccc attattggca cgtacataag 540

gtcaataggg gtgactagtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt 600

gggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga 660

aagtgatgtc gtgtactggc tccgcctttt tcccgagggt gggggagaac cgtatataag 720

tgcagtagtt gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa 780

[0154] gcttctgcct tctccctcct gtgagtttgg taagtcactg actgtctatg cctgggaaag 840

ggtgggcagg agatggggca gtgcaggaaa agtggcacta tgaaccctgc agccctagac 900

aattgtacta accttcttct ctttcctctc ctgacag 937

<210> 266
<211> 367
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 266
gagcttgggc tgcaggtcga gggcactggg aggatgttga gtaagatgga aaactactga 60

tgacccttgc agagacagag tattaggaca tgtttgaaca ggggccgggc gatcagcagg 120

tagctctaga ggatccccgt ctgtctgcac atttcgtaga gcgagtgttc cgatactcta 180

atctccctag gcaaggttca tatttgtgta ggttacttat tctccttttg ttgactaagt 240

caataatcag aatcagcagg tttggagtca gcttggcagg gatcagcagc ctgggttgga 300

aggaggggt ataaaagccc cttcaccagg agaagccgtc acacagacta ggcgcgccac 360

cgccacc 367

<210> 267
<211> 468
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 267
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatacggg ggaggctgct ggtgaatatt aaccaaggtc accccagtta 120

tcggaggagc aaacaggggc taagtccaca taccgtctgt ctgcacattt cgtagagcga 180

gtgttccgat actctaatct ccctaggcaa ggttcatatt tgtgtaggtt acttattctc 240

ctttttgttga ctaagtcaat aatcagaatc agcaggtttg gagtcagctt ggcagggatc 300

[0155]

agcagcctgg gttggaagga gggggtataa aagcccccttc accaggagaa gccgtcacac 360

agatccacaa gctcctgaag aggtaagggt ttaagggatg gttggttggt ggggtattaa 420

tgtttaatta cctggagcac ctgcctgaaa tcacttttttt tcaggttg 468

<210> 268
<211> 426
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 268
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta ccgtctgtct 120

gcacatttcg tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg 180

tgtaggttac ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga 240

gtcagcttgg cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac 300

caggagaagc cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt 360

tggttggtgg ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc 420

aggttg 426

<210> 269
<211> 396
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 269
gaatgacctt cagcctgttc ccgtccctga tatgggcaaa cattgcaagc agcaaacagc 60

aaacacatag atgcgtgtta ccgtctgtct gcacatttcg tagagcgagt gttccgatac 120

tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac ttattctcct tttgttgact 180

[0156] aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg cagggatcag cagcctgggt 240

tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc cgtcacacag atccacaagc 300

tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg ggtattaatg tttaattacc 360

tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttg 396

<210> 270
<211> 495
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 270
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttac 180

cgtctgtctg cacatttcgt agagcgagtg ttccgatact ctaatctccc taggcaaggt 240

tcatatttgt gtaggttact tattctcctt ttgttgacta agtcaataat cagaatcagc 300

aggtttggag tcagcttggc agggatcagc agcctgggtt ggaaggaggg ggtataaaag 360

ccccttcacc aggagaagcc gtcacacaga tccacaagct cctgaagagg taagggttta 420

agggatggtt ggttggtggg gtattaatgt ttaattacct ggagcacctg cctgaaatca 480

ctttttttca ggttg 495

<210> 271
<211> 640
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 271
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatgcgtg ttagggctgg aagctacctt tgacatcatt tcctctgcga 120

[0157]

atgcatgtat aatttctaca gaacctatta gaaaggatca cccagcctct gcttttgtac 180

aactttccct taaaaaactg ccaattccac tgctgtttgg cccaatagtg agaacttttt 240

cctgctgcct cttggtgctt ttgcctatgg cccctattct gcctgctgaa gacactcttg 300

ccagcatgga cttaaacccc tccagctctg acaatcctct ttctcttttg ttttacatga 360

agggtctggc agccaaagca atcactcaaa gttcaaacct tatcattttt tgctttgttc 420

ctcttggcct tggttttgta catcagcttt gaaaatacca tcccagggtt aatgctgggg 480

ttaatttata actaagagtg ctctagtttt gcaatacagg acatgctata aaaatggaaa 540

gatctcctga agaggtaagg gtttaaggga tggttggttg gtggggtatt aatgtttaat 600

tacctggagc acctgcctga aatcactttt tttcaggttg 640

<210> 272
<211> 667
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 272
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta gggctggaag 120

ctacctttga catcatttcc tctgcgaatg catgtataat ttctacagaa cctattagaa 180

aggatcaccc agcctctgct tttgtacaac tttcccttaa aaaactgcca attccactgc 240

tgtttggccc aatagtgaga acttttttcct gctgcctctt ggtgcttttg cctatggccc 300

ctattctgcc tgctgaagac actcttgcca gcatggactt aaaccccctcc agctctgaca 360

atcctctttc tcttttgttt tacatgaagg gtctggcagc caaagcaatc actcaaagtt 420

caaaccttat catttttgc tttgttcctc ttggccttgg ttttgtacat cagctttgaa 480

aataccatcc cagggttaat gctggggtta atttataact aagagtgctc tagttttgca 540

atacaggaca tgctataaaa atggaaagat ctcctgaaga ggtaagggtt taagggatgg 600

[0158] ttggttggtg gggtattaat gtttaattac ctggagcacc tgcctgaaat cacttttttt 660

caggttg 667

<210> 273
<211> 637
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 273
gaatgacctt cagcctgttc ccgtccctga tatgggcaaa cattgcaagc agcaaacagc 60

aaacacatag atgcgtgtta gggctggaag ctacctttga catcatttcc tctgcgaatg 120

catgtataat ttctacagaa cctattagaa aggatcaccc agcctctgct tttgtacaac 180

tttcccttaa aaaactgcca attccactgc tgtttggccc aatagtgaga acttttttcct 240

gctgcctctt ggtgcttttg cctatggccc ctattctgcc tgctgaagac actcttgcca 300

gcatggactt aaaccccctcc agctctgaca atcctctttc tcttttgttt tacatgaagg 360

gtctggcagc caaagcaatc actcaaagtt caaaccttat catttttgc tttgttcctc 420

ttggccttgg ttttgtacat cagctttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggtta 480

atttataact aagagtgctc tagttttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat 540

ctcctgaaga ggtaagggtt taagggatgg ttggttggtg gggtattaat gtttaattac 600

ctggagcacc tgcctgaaat cacttttttt caggttg 637

<210> 274
<211> 736
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 274
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

[0159] tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttag 180

ggctggaagc tacctttgac atcatttcct ctgcgaatgc atgtataatt tctacagaac 240

ctattagaaa ggatcaccca gcctctgctt ttgtacaact ttcccttaaa aaactgccaa 300

ttccactgct gtttggccca atagtgagaa ctttttcctg ctgcctcttg gtgcttttgc 360

ctatggcccc tattctgcct gctgaagaca ctcttgccag catggactta aacccctcca 420

gctctgacaa tcctctttct cttttgtttt acatgaaggg tctggcagcc aaagcaatca 480

ctcaaagttc aaaccttatc atttttgct ttgttcctct tggccttggt tttgtacatc 540

agctttgaaa ataccatccc agggttaatg ctggggttaa tttataacta agagtgctct 600

agttttgcaa tacaggacat gctataaaaa tggaaagatc tcctgaagag gtaagggttt 660

aagggatggt tggttggtgg ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc 720

actttttttc aggttg 736

<210> 275
<211> 515
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 275
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatgcgtg ttaggcatgc ttccatgcca aggcccacac tgaaatgctc 120

aaatgggaga caaagagatt aagctcttat gtaaaatttg ctgttttaca taactttaat 180

gaatggacaa agtcttgtgc atgggggtgg gggtggggtt agaggggaac agctccagat 240

ggcaaacata cgcaagggat ttagtcaaac aacttttgg caaagatggt atgattttgt 300

aatggggtag gaaccaatga aatgcgaggt aagtatggtt aatgatctac agttattggt 360

taaagaagta tattagagcg agtctttctg cacacagatc acctttccta tcaacccccct 420

cctgaagagg taagggttta agggatggtt ggttggtggg gtattaatgt ttaattacct 480

ggagcacctg cctgaaatca ctttttttca ggttg 515

[0160]

<210> 276
<211> 542
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 276
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta ggcatgcttc 120

catgccaagg cccacactga aatgctcaaa tgggagacaa agagattaag ctcttatgta 180

aaatttgctg ttttacataa ctttaatgaa tggacaaagt cttgtgcatg ggggtggggg 240

tggggttaga ggggaacagc tccagatggc aaacatacgc aagggattta gtcaaacaac 300

tttttggcaa agatggtatg attttgtaat ggggtaggaa ccaatgaaat gcgaggtaag 360

tatggttaat gatctacagt tattggttaa agaagtatat tagagcgagt ctttctgcac 420

acagatcacc tttcctatca acccccctcct gaagaggtaa gggtttaagg gatggttggt 480

tggtggggta ttaatgttta attacctgga gcacctgcct gaaatcactt tttttcaggt 540

tg 542

<210> 277
<211> 512
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 277
gaatgacctt cagcctgttc ccgtccctga tatgggcaaa cattgcaagc agcaaacagc 60

aaacacatag atgcgtgtta ggcatgcttc catgccaagg cccacactga aatgctcaaa 120

tgggagacaa agagattaag ctcttatgta aaatttgctg ttttacataa ctttaatgaa 180

tggacaaagt cttgtgcatg ggggtggggg tggggttaga ggggaacagc tccagatggc 240

aaacatacgc aagggattta gtcaaacaac tttttggcaa agatggtatg attttgtaat 300

[0161]

ggggtaggaa ccaatgaaat gcgaggtaag tatggttaat gatctacagt tattggttaa 360

agaagtatat tagagcgagt ctttctgcac acagatcacc tttcctatca acccccctcct 420

gaagaggtaa gggtttaagg gatggttggt tggtggggta ttaatgttta attacctgga 480

gcacctgcct gaaatcactt tttttcaggt tg 512

<210> 278
<211> 611
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 278
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttag 180

gcatgcttcc atgccaaggc ccacactgaa atgctcaaat gggagacaaa gagattaagc 240

tcttatgtaa aatttgctgt tttacataac tttaatgaat ggacaaagtc ttgtgcatgg 300

gggtgggggt ggggttagag gggaacagct ccagatggca aacatacgca agggatttag 360

tcaaacaact ttttggcaaa gatggtatga ttttgtaatg gggtaggaac caatgaaatg 420

cgaggtaagt atggttaatg atctacagtt attggttaaa gaagtatatt agagcgagtc 480

tttctgcaca cagatcacct ttcctatcaa ccccctcctg aagaggtaag ggtttaaggg 540

atggttggtt ggtggggtat taatgtttaa ttacctggag cacctgcctg aaatcacttt 600

ttttcaggtt g 611

<210> 279
<211> 355
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0162]

<400> 279
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatgcgtg ttaaacagtt ccagatggta aatatacaca agggatttag 120

tcaaacaatt ttttggcaag aatattatga attttgtaat cggttggcag ccaatgaaat 180

acaaagatga gtctagttaa taatctacaa ttattggtta aagaagtata ttagtgctaa 240

tttccctccg tttgtcctct cctgaagagg taagggttta agggatggtt ggttggtggg 300

gtattaatgt ttaattacct ggagcacctg cctgaaatca ctttttttca ggttg 355

<210> 280
<211> 382
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 280
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta aacagttcca 120

gatggtaaat atacacaagg gatttagtca aacaattttt tggcaagaat attatgaatt 180

ttgtaatcgg ttggcagcca atgaaataca aagatgagtc tagttaataa tctacaatta 240

ttggttaaag aagtatatta gtgctaattt ccctccgttt gtcctctcct gaagaggtaa 300

gggtttaagg gatggttggt tggtggggta ttaatgttta attacctgga gcacctgcct 360

gaaatcactt tttttcaggt tg 382

<210> 281
<211> 352
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 281
gaatgacctt cagcctgttc ccgtccctga tatgggcaaa cattgcaagc agcaaacagc 60

[0163]

aaacacatag atgcgtgtta aacagttcca gatggtaaat atacacaagg gatttagtca 120

aacaattttt tggcaagaat attatgaatt ttgtaatcgg ttggcagcca atgaaataca 180

aagatgagtc tagttaataa tctacaatta ttggttaaag aagtatatta gtgctaattt 240

ccctccgttt gtcctctcct gaagaggtaa gggtttaagg gatggttggt tggtggggta 300

ttaatgttta attacctgga gcacctgcct gaaatcactt tttttcaggt tg 352

<210> 282
<211> 451
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 282
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttaa 180

acagttccag atggtaaata tacacaaggg atttagtcaa acaatttttt ggcaagaata 240

ttatgaattt tgtaatcggt tggcagccaa tgaaatacaa agatgagtct agttaataat 300

ctacaattat tggttaaaga agtatattag tgctaatttc cctccgtttg tcctctcctg 360

aagaggtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtggggtat taatgtttaa ttacctggag 420

cacctgcctg aaatcacttt ttttcaggtt g 451

<210> 283
<211> 430
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 283
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

[0164] gggctaagtc cacatgcgtg ttaaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca 120

ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 180

tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 240

cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 300

cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtctcctga agaggtaagg gtttaaggga 360

tggttggttg gtggggtatt aatgtttaat tacctggagc acctgcctga aatcactttt 420

tttcaggttg 430

<210> 284
<211> 457
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 284
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta aatgactcct 120

ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg 180

ggcgactcag atcccagcca gtggacttag cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg 240

accttggtta atattcacca gcagcctccc ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat 300

acggacgagg acagggccct gtctcctcag cttcaggcac caccactgac ctgggacagt 360

ctcctgaaga ggtaagggtt taagggatgg ttggttggtg gggtattaat gtttaattac 420

ctggagcacc tgcctgaaat cactttttt caggttg 457

<210> 285
<211> 427
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0165]

<400> 285
gaatgacctt cagcctgttc ccgtccctga tatgggcaaa cattgcaagc agcaaacagc 60

aaacacatag atgcgtgtta aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg 120

cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 180

cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc 240

ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 300

cttcaggcac caccactgac ctgggacagt ctcctgaaga ggtaagggtt taagggatgg 360

ttggttggtg gggtattaat gtttaattac ctggagcacc tgcctgaaat cactttttt 420

caggttg 427

<210> 286
<211> 526
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 286
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttaa 180

atgactcctt tcggtaagtg cagtggaagc tgtacactgc ccaggcaaag cgtccgggca 240

gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag tggacttagc ccctgtttgc tcctccgata 300

actggggtga ccttggttaa tattcaccag cagcctcccc cgttgccccc ctggatccac 360

tgcttaaata cggacgagga cagggccctg tctcctcagc ttcaggcacc accactgacc 420

tgggacagtc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg ggtattaatg 480

tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttg 526

<210> 287
<211> 435
<212> DNA
<213> 人工序列

[0166]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 287
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatgcgtg ttaaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca 120

ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 180

tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 240

cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 300

cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaatccg gactctaagg taaatataaa 360

atttttaagt gtataatgtg ttaaactact gattctaatt gtttctctct tttagattcc 420

aacctttgga actga 435

<210> 288
<211> 462
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 288
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta aatgactcct 120

ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg 180

ggcgactcag atcccagcca gtggacttag cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg 240

accttggtta atattcacca gcagcctccc ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat 300

acggacgagg acagggccct gtctcctcag cttcaggcac caccactgac ctgggacagt 360

gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt tttaagtgta taatgtgtta aactactgat 420

tctaattgtt tctctctttt agattccaac ctttggaact ga 462

[0167] <210> 289
<211> 448
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 289
gcggccgcga atgaccttca gcctgttccc gtccctgata tgggcaaaca ttgcaagcag 60

caaacagcaa acacatagat gcgtgttaaa tgactccttt cggtaagtgc agtggaagct 120

gtacactgcc caggcaaagc gtccgggcag cgtaggcggg cgactcagat cccagccagt 180

ggacttagcc cctgtttgct cctccgataa ctggggtgac cttggttaat attcaccagc 240

agcctccccc gttgcccctc tggatccact gcttaaatac ggacgaggac agggccctgt 300

ctcctcagct tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atccggactc taaggtaaat 360

ataaaatttt taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc taattgtttc tctcttttag 420

attccaacct ttggaactga gtttaaac 448

<210> 290
<211> 531
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 290
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttaa 180

atgactcctt tcggtaagtg cagtggaagc tgtacactgc ccaggcaaag cgtccgggca 240

gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag tggacttagc ccctgtttgc tcctccgata 300

actggggtga ccttggttaa tattcaccag cagcctcccc cgttgccccc ctggatccac 360

tgcttaaata cggacgagga cagggccctg tctcctcagc ttcaggcacc accactgacc 420

[0168] tgggacagtg aatccggact ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa 480

actactgatt ctaattgttt ctctctttta gattccaacc tttggaactg a 531

<210> 291
<211> 636
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 291
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacatgcgtg ttagggctgg aagctacctt tgacatcatt tcctctgcga 120

atgcatgtat aatttctaca gaacctatta gaaaggatca cccagcctct gcttttgtac 180

aactttccct taaaaaactg ccaattccac tgctgtttgg cccaatagtg agaacttttt 240

cctgctgcct cttggtgctt ttgcctatgg cccctattct gcctgctgaa gacactcttg 300

ccagcatgga cttaaacccc tccagctctg acaatcctct ttctcttttg ttttacatga 360

agggtctggc agccaaagca atcactcaaa gttcaaacct tatcattttt tgctttgttc 420

ctcttggcct tggttttgta catcagcttt gaaaatacca tcccagggtt aatgctgggg 480

ttaatttata actaagagtg ctctagtttt gcaatacagg acatgctata aaaatggaaa 540

gatctctaag gtaaatataa aatttttaag tgtataatgt gttaaactac tgattctaat 600

tgtttctctc ttttagattc caacctttgg aactga 636

<210> 292
<211> 663
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 292
agccaatgaa atacaaagat gagtctagtt aataatctac aattattggt taaagaagta 60

tattagtgct aatttccctc cgtttgtcct agcttttctc atgcgtgtta gggctggaag 120

[0169]

ctacctttga catcatttcc tctgcgaatg catgtataat ttctacagaa cctattagaa 180

aggatcaccc agcctctgct tttgtacaac tttcccttaa aaaactgcca attccactgc 240

tgtttggccc aatagtgaga acttttttcct gctgcctctt ggtgcttttg cctatggccc 300

ctattctgcc tgctgaagac actcttgcca gcatggactt aaacccctcc agctctgaca 360

atcctctttc tcttttgttt tacatgaagg gtctggcagc caaagcaatc actcaaagtt 420

caaaccttat cattttttgc tttgttcctc ttggccttgg ttttgtacat cagctttgaa 480

aataccatcc cagggttaat gctggggtta atttataact aagagtgctc tagttttgca 540

atacaggaca tgctataaaa atggaaagat ctctaaggta aatataaaat ttttaagtgt 600

ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt ttctctcttt tagattccaa cctttggaac 660

tga 663

<210> 293
<211> 633
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 293
gaatgacctt cagcctgttc ccgtccctga tatgggcaaa cattgcaagc agcaaacagc 60

aaacacatag atgcgtgtta gggctggaag ctacctttga catcatttcc tctgcgaatg 120

catgtataat ttctacagaa cctattagaa aggatcaccc agcctctgct tttgtacaac 180

tttcccttaa aaaactgcca attccactgc tgtttggccc aatagtgaga acttttttcct 240

gctgcctctt ggtgcttttg cctatggccc ctattctgcc tgctgaagac actcttgcca 300

gcatggactt aaaccccctcc agctctgaca atcctctttc tcttttgttt tacatgaagg 360

gtctggcagc caaagcaatc actcaaagtt caaaccttat catttttgc tttgttcctc 420

ttggccttgg ttttgtacat cagctttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggtta 480

atttataact aagagtgctc tagttttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat 540

ctctaaggta aatataaaat ttttaagtgt ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt 600

[0170] ttctctcttt tagattccaa cctttggaac tga 633

<210> 294
<211> 732
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 294
gatgctctaa tctctctaga caaggttcat atttgtatgg gttacttatt ctctctttgt 60

tgactaagtc aataatcaga atcagcaggt ttgcagtcag attggcaggg ataagcagcc 120

tagctcagga gaagtgagta taaaagcccc aggctgggag cagccatcaa tgcgtgttag 180

ggctggaagc tacctttgac atcatttcct ctgcgaatgc atgtataatt tctacagaac 240

ctattagaaa ggatcaccca gcctctgctt ttgtacaact ttcccttaaa aaactgccaa 300

ttccactgct gtttggccca atagtgagaa ctttttcctg ctgcctcttg gtgcttttgc 360

ctatggcccc tattctgcct gctgaagaca ctcttgccag catggactta aacccctcca 420

gctctgacaa tcctctttct cttttgtttt acatgaaggg tctggcagcc aaagcaatca 480

ctcaaagttc aaaccttatc atttttttgct ttgttcctct tggccttggt tttgtacatc 540

agctttgaaa ataccatccc agggttaatg ctggggttaa tttataacta agagtgctct 600

agttttgcaa tacaggacat gctataaaaa tggaaagatc tctaaggtaa atataaaatt 660

tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac 720

ctttggaact ga 732

<210> 295
<211> 762
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 295

[0171]

aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa 120

aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt 180

aataatctca ggagcacaaa cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg 240

acatcatttc ctctgcgaat gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc 300

cagcctctgc ttttgtacaa ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc 360

caatagtgag aacttttttcc tgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc 420

ctgctgaaga cactcttgcc agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt 480

ctcttttgtt ttacatgaag ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta 540

tcatttttttg ctttgttcct cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc 600

ccagggttaa tgctggggtt aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac 660

atgctataac tctaaggtaa atataaaatt tttaagtgta taatgtgtta aactactgat 720

tctaattgtt tctctctttt agattccaac ctttggaact ga 762

<210> 296
<211> 766
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 296

[0172]

aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa 120

aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt 180

aataatctca ggagcacaaa cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg 240

acatcatttc ctctgcgaat gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc 300

cagcctctgc ttttgtacaa ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc 360

caatagtgag aacttttttcc tgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc 420

ctgctgaaga cactcttgcc agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt 480

ctcttttgtt ttacatgaag ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta 540

tcatttttttg ctttgttcct cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc 600

ccagggttaa tgctggggtt aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac 660

atgctataac tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg ggtattaatg 720

tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttg 766

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300
<211> 518
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 300
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

[0173] agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgg 518

<210> 301
<211> 777
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 301
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctattttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccg 777

<210> 302
<211> 427
<212> DNA
<213> 人工序列

[0174]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 302
gagtcaatgg gaaaaaccca ttggagccaa gtacactgac tcaataggga ctttccattg 60

ggttttgccc agtacataag gtcaataggg ggtgagtcaa caggaaagtc ccattggagc 120

caagtacatt gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat aaggtcaatg 180

ggaggtaagc caatgggttt ttcccattac tgacatgtat actgagtcat tagggacttt 240

ccaatgggtt ttgcccagta cataaggtca ataggggtga atcaacagga aagtcccatt 300

ggagccaagt acactgagtc aatagggact ttccattggg ttttgcccag tacaaaaggt 360

caatagggggg tgagtcaatg ggtttttccc attattggca catacataag gtcaataggg 420

gtgacta 427

<210> 303
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 303
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cacacgcgtg gta 83

<210> 304
<211> 777
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 304
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

[0175]

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag 360

taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa 420

gacgcccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg 480

ttttgttttt tgagatggag gtttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc 540

tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt 600

gccaccacac ctggctaatt ttctatttttt agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag 660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgcca ccacacccgg ctaatttttt 720

ctatttttga cagggacggg gtttcaccat gttggtcagg ctggtctaga ggtactg 777

<210> 305
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 305
gtttgctgct tgcaatgttt gcccatttta gggtggacac aggacgctgt ggtttctgag 60

ccaggg 66

<210> 306
<211> 212
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 306
ggaggggtgg agtcgtgacc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca 60

cacagccctc cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc 120

[0176] ccatgccacc tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt 180

gtcctggcgt ggtttaggta gtgtgagagg gg 212

<210> 307
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 307
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg ggtacccggg 330

<210> 308
<211> 194
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 308
ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc 60

tgaccttgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120

cactcgaccc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag 180

gtagtgtgag aggg 194

<210> 309
<211> 240
<212> DNA
<213> 人工序列

[0177] <220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 309
gggcctgaaa taacctctga aagaggaact tggttaggta ccttctgagg ctgaaagaac 60

cagctgtgga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga 120

agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc 180

ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccacta 240

<210> 310
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 310
cgggggaggc tgctggtgaa tattaaccaa ggtcacccca gttatcggag gagcaaacag 60

gggctaagtc cac 73

<210> 311
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 311
aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc 100

<210> 312
<211> 296
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0178] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 312
gttacataac ttatggtaaa tggcctgcct ggctgactgc ccaatgaccc ctgcccaatg 60

atgtcaataa tgatgtatgt tcccatgtaa tgccaatagg gactttccat tgatgtcaat 120

gggtggagta tttatggtaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag 180

tatgcccccc attgatgtca atgatggtaa atggcctgcc tggcattatg cccagtacat 240

gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctatgta ttagtcattg ctatta 296

<210> 313
<211> 235
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 313
ggcctgaaat aacctctgaa agaggaactt ggttaggtac cttctgaggc ggaaagaacc 60

agctgtggaa tgtgtgtcag ttagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa 120

gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccaggtg tggaaagtcc ccaggctccc 180

cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtccc 235

<210> 314

<400> 314
000

<210> 315
<211> 1127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 315
ggagtcgctg cgacgctgcc ttcgccccgt gccccgctcc gccgccgcct cgcgccgccc 60

[0179]

gccccggctc tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcgggacg gcccttctcc 120

tccgggctgt aattagcgct tggtttaatg acggcttgtt tcttttctgt ggctgcgtga 180

aagccttgag gggctccggg agggcccttt gtgcgggggg gagcggctcg gggggtgcgt 240

gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgccgcgt gcggcccgcg ctgcccggcg gctgtgagcg 300

ctgcgggcgc ggcgcggggc tttgtgcgct ccgcagtgtg cgcgagggga gcgcggccgg 360

gggcggtgcc ccgcggtgcg gggggggctg cgaggggaac aaaggctgcg tgcggggtgt 420

gtgcgtgggg gggtgagcag ggggtgtggg cgcggcggtc gggctgtaac ccccccctgc 480

acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg tgcggggctc cgtacggggc 540

gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcggca ggtgggggtg ccgggcgggg 600

cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg cggcggcccc cggagcgccg 660

gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg 720

cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgccgccgca 780

ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggt gcggcgccgg caggaaggaa atgggcgggg 840

agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc tctccagcct cggggctgtc 900

cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 960

tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttttagc cttcttcttt ttcctacagc 1020

tcctgggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcatcattt gtcgacagaa ttcctcgaag 1080

atccgaaggg gttcaagctt ggcattccgg tactgttggt aaagcca 1127

<210> 316
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 316
ctctaaggta aatataaaat ttttaagtgt ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt 60

ttctctcttt tagattccaa cctttggaac tga 93

[0180]

<210> 317
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 317
gccctgtctc ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cgga 54

<210> 318
<211> 173
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 318
ctgccttctc cctcctgtga gtttggtaag tcactgactg tctatgcctg ggaaagggtg 60

ggcaggagat ggggcagtgc aggaaaagtg gcactatgaa ccctgcagcc ctagacaatt 120

gtactaacct tcttctcttt cctctcctga caggttggtg tacagtagct tcc 173

<210> 319
<211> 91
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 319
aagaggtaag ggtttaaggg atggttggtt ggtggggtat taatgtttaa ttacctggag 60

cacctgcctg aaatcacttt ttttcaggtt g 91

<210> 320
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

[0181]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 320
gccctgtctc ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaata atta 54

<210> 321
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 321
gccctgtctc ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa 60

ggtaaatata aaatttttaa gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct 120

cttttagatt ccaacctttg gaactga 147

<210> 322
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 322
gccctgtctc ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaata attactctaa 60

ggtaaatata aaatttttaa gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct 120

cttttagatt ccaacctttg gaactga 147

<210> 323
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

[0182]

<400> 323
tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtgaa tcgccacc 48

<210> 324
<211> 128
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 324
gctagcaggt aagtgccgtg tgtggttccc gcgggcctgg cctctttacg ggttatggcc 60

cttgcgtgcc ttgaattact gacactgaca tccacttttt ctttttctcc acaggtttaa 120

acgccacc 128

<210> 325
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 325
aagaggtaag ggtttaagtt atcgttagtt cgtgcaccat taatgtttaa ttacctggag 60

cacctgcctg aaatcatttt tttttcaggt tggctagt 98

<210> 326
<211> 172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 326
gcttagtgct gagcacatcc agtgggtaaa gttccttaaa atgctctgca aagaaattgg 60

gacttttcat taaatcagaa attttacttt tttcccctcc tgggagctaa agatatttta 120

[0183] gagaagaatt aacctttttgc ttctccagtt gaacatttgt agcaataagt ca 172

<210> 327
<211> 160
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 327
gccctgtctc ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa 60

ggtaaatata aaatttttaa gtgtataatg tgttaaacta ctgattctaa ttgtttctct 120

cttttagatt ccaacctttg gaactgaatt ctagaccacc 160

<210> 328
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 328
accactttca caatctgcta gcaaaggtt 29

<210> 329
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 329
gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60

cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120

tttctctcca cag 133

<210> 330
[0184] <211> 341
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 330
tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60

gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120

ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180

tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcctc 240

ccccgttgcc cctctggatc cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc 300

agcttcaggc accaccactg acctgggaca gtgaatcgac a 341

<210> 331
<211> 316
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 331
tctagagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat tgctaacgca gtcagtgctt 60

ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gtgactctct taaggtagcc ttgcagaagt 120

tggtcgtgag gcactgggca ggtaagtatc aaggttacaa gacaggttta aggagaccaa 180

tagaaactgg gcttgtcgag acagagaaga ctcttgcgtt tctgataggc acctattggt 240

cttactgaca tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc actcccagtt caattacagc 300

tcttaaggcc ctgcag 316

<210> 332
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列

[0185]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 332
caaagtccag gcccctctgc tgcagcgccc gcgcgtccag aggccctgcc agacacgcgc 60

gaggttcgag gctgag 76

<210> 333
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 333
agaatgatga aaaccgaggt tggaaaaggt tgtgaaacct tttaactctc cacagtggag 60

tccattattt cctctggctt cctcaaattc atattcacag ggtcgttggc tgtgggttgc 120

aattacc 127

<210> 334
<211> 80
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 334
atagcagagc aatcaccacc aagcctggaa taactgcaag ggctctgctg acatcttcct 60

gaggtgccaa ggaaatgagg 80

<210> 335
<211> 208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0186] <400> 335
gggtcaccac cacctccaca gcacagacag acactcagga gccagccagc caggtaagtt 60

tagtcttttt gtcttttatt tcaggtcccg gatccggtgg tggtgcaaat caaagaactg 120

ctcctcagtg gatgttgcct ttacttctag gcctgtacgg aagtgttact tctgctctaa 180

aagctgcgga attgtacccg cggccgcg 208

<210> 336
<211> 159
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 336
aagcttctgc cttctccctc ctgtgagttt ggtaagtcac tgactgtcta tgcctgggaa 60

agggtgggca ggagatgggg cagtgcagga aaagtggcac tatgaaccct gcagccctag 120

acaattgtac taaccttctt ctctttcctc tcctgacag 159

<210> 337
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 337
cgcgcctagc agtgtcccag ccgggttcgt gtcgcc 36

<210> 338
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 338
acgccgcctg ggtcccagtc cccgtcccat cccccggcgg cctaggcagc gtttccagcc 60

[0187] ccgagaactt tgttcttttt gtcccgcccc ctgcgcccaa ccgcctgcgc cgccttccgg 120

cccgagttct ggagactcaa c 141

<210> 339
<211> 110
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 339
gttggatgaa accttcctcc tactgcacag cccgcccccc tacagccccg gtccccacgc 60

ctagaagaca gcggaactaa gaaaagaaga ggcctgtgga cagaacaatc 110

<210> 340
<211> 164
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 340
ggtggggcgg ggttgagtcg gaaccacaat agccaggcga agaaactaca actcccaggg 60

cgtcccggag caggccaacg ggactacggg aagcagcggg cagcggcccg cgggaggcac 120

ctcggagatc tgggtgcaaa agcccagggt taggaaccgt aggc 164

<210> 341
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 341
ggccaccgga attaaccctt cagggctggg ggccgcgcta tgccccgccc cctccccagc 60

cccagacacg gaccccgcag gagatgggtg cccccatccg cacactgtcc tttggccacc 120

[0188]
ggacatc 127

<210> 342
<211> 341
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 342
tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60

gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120

ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180

tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcctc 240

ccccgttgcc cctctggatt cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc 300

agcttcaggc accaccactg acctgggaca gtgaatcgac a 341

<210> 343

<400> 343
000

<210> 344

<400> 344
000

<210> 345
<211> 581
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 345
gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggtatacat 60

ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt 120

[0189]

actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttatttacgc 180

tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tgatattctt 240

aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct 300

attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt 360

ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac 420

gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct 480

ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca 540

ggggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt c 581

<210> 346
<211> 77
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 346
tccataaagt aggaaacact acacgattcc ataaagtagg aaacactaca tcactccata 60

aagtaggaaa cactaca 77

<210> 347
<211> 88
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 347
tgaaagatgg atttccaagg ttaattcatt ggaattgaaa attaacagag atctagagct 60

gaattcctgc agccaggggg atcagcct 88

<210> 348
<211> 395
<212> DNA
<213> 人工序列

[0190]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 348
taaaatacag catagcaaaa ctttaacctc caaatcaagc ctctacttga atccttttct 60

gagggatgaa taaggcatag gcatcagggg ctgttgccaa tgtgcattag ctgtttgcag 120

cctcaccttc tttcatggag tttaagatat agtgtatttt cccaaggttt gaactagctc 180

ttcatttctt tatgttttaa atgcactgac ctcccacatt ccctttttag taaaatattc 240

agaaataatt taaatacatc attgcaatga aaataaatgt tttttattag gcagaatcca 300

gatgctcaag gcccttcata atatccccca gtttagtagt tggacttagg gaacaaagga 360

acctttaata gaaattggac agcaagaaag cgagc 395

<210> 349
<211> 800
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 349
agtcaatatg ttcaccccaa aaaagctgtt tgttaacttg ccaacctcat tctaaaatgt 60

atatagaagc ccaaaagaca ataacaaaaa tattcttgta gaacaaaatg ggaaagaatg 120

ttccactaaa tatcaagatt tagagcaaag catgagatgt gtggggatag acagtgaggc 180

tgataaaata gagtagagct cagaaacaga cccattgata tatgtaagtg acctatgaaa 240

aaaatatggc attttacaat gggaaaatga tggtcttttt ctttttaga aaaacaggga 300

aatatattta tatgtaaaaa ataaaaggga acccatatgt cataccatac acacaaaaaa 360

attccagtga attataagtc taaatggaga aggcaaaact ttaaatcttt tagaaaataa 420

tatagaagca tgccatcaag acttcagtgt agagaaaaat ttcttatgac tcaaagtcct 480

aaccacaaag aaaagattgt taattagatt gcatgaatat taagacttat ttttaaaatt 540

aaaaaaccat taagaaaagt caggccatag aatgacagaa aatatttgca acaccccagt 600

[0191]

aaagagaatt gtaatatgca gattataaaa agaagtctta caaatcagta aaaaataaaa 660

ctagacaaaa atttgaacag atgaaagaga aactctaaat aatcattaca catgagaaac 720

tcaatctcag aaatcagaga actatcattg catatacact aaattagaga aatattaaaa 780

ggctaagtaa catctgtggc 800

<210> 350
<211> 407
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 350
aattatctct aaggcatgtg aactggctgt cttggttttc atctgtactt catctgctac 60

ctctgtgacc tgaaacatat ttataattcc attaagctgt gcatatgata gatttatcat 120

atgtattttc cttaaaggat ttttgtaaga actaattgaa ttgatacctg taaagtcttt 180

atcacactac ccaataaata ataaatctct ttgttcagct ctctgtttct ataaatatgt 240

accagtttta ttgtttttag tggtagtgat tttattctct ttctatatat atacacacac 300

atgtgtgcat tcataaatat atacaatttt tatgaataaa aaattattag caatcaatat 360

tgaaaaccac tgatttttgt ttatgtgagc aaacagcaga ttaaaag 407

<210> 351
<211> 186
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 351
catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60

aagcttattc atctgttttt ctttttcgtt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120

ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180

[0192] gaatct 186

<210> 352
<211> 395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 352
taaaatacag catagcaaaa ctttaacctc caaatcaagc ctctacttga atccttttct 60

gagggatgaa taaggcatag gcatcagggg ctgttgccaa tgtgcattag ctgtttgcag 120

cctcaccttc tttcatggag tttaagatat agtgtatttt cccaaggttt gaactagctc 180

ttcatttctt tatgttttaa atgcactgac ctcccacatt ccctttttag taaaatattc 240

agaaataatt taaatacatc attgcaatga aaataaatgt tttttattag gcagaatcca 300

gatgctcaag gcccttcata atatccccca gtttagtagt tggacttagg gaacaaagga 360

acctttaata gaaattggac agcaagaaag ccagc 395

<210> 353
<211> 580
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 353
gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggtatacat 60

ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg atatgtaatt 120

actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttcccg ttatttacgc 180

tctgttcctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tgatattctt 240

aactatgttg ctccttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct 300

attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt 360

ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac 420

[0193] gcaacccccа ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgct 480

ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca 540

ggggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt 580

<210> 354
<211> 64
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 354
cctcgccccg gacctgccct cccgccaggt gcacccacct gcaataaatg cagcgaagcc 60

ggga 64

<210> 355
<211> 247
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 355
gataatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt 60

gctcctttta cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc 120

cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt tagttcttgc cacggcggaa 180

ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc ggctgttggg cactgacaat 240

tccgtgg 247

<210> 356
<211> 144
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
[0194] <223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 356
aaatacatca ttgcaatgaa aataaatgtt ttttattagg cagaatccag atgctcaagg 60

cccttcataa tatcccccag tttagtagtt ggacttaggg aacaaaggaa cctttaatag 120

aaattggaca gcaagaaagc gagc 144

<210> 357
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 357
gagcatctta ccgccattta ttcccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggtatacat 60

tt 62

<210> 358

<400> 358
000

<210> 359

<400> 359
000

<210> 360
<211> 225
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 360
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct 60

ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 120

[0195] gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 180

ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc 225

<210> 361
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 361
aataaaagat ctttattttc attagatctg tgtgttggtt ttttgtgtg 49

<210> 362
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 362
gcggccgcaa taaaagatca gagctctaga gatctgtgtg ttggtttttt gtgt 54

<210> 363
<211> 74
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 363
ggatccaata aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgttttc 60

ctgtaacgat cggg 74

<210> 364
<211> 143
<212> DNA
<213> 人工序列

[0196]
<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 364
ctcgatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc attataagct 60

gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcaggtt caggggggagg 120

tgtgggaggt tttttaaact agt 143

<210> 365
<211> 228
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 365
ctactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccccttg ccttccttga 60

ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcacatt 120

gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aaggggggagg 180

attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcagtggg ctctatgg 228

<210> 366
<211> 222
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 366
cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60

aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120

ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggagatgt 180

gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg ta 222

<210> 367
[0197] <211> 226
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 367
ccagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 60

aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc 120

aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg 180

tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtatgg 226

<210> 368
<211> 129
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 368
gttaacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa tgcatccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccaaag gctcttttca 120

gagccacca 129

<210> 369
<211> 232
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 369
gcggccgcgg ggatccagac atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaacta 60

gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa 120

ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg 180

[0198] ttcaggggga ggtgtgggag gttttttagt cgaccatgct ggggagagat ct 232

<210> 370
<211> 135
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 370
gatccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60

aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 120

tgcaataaac aagtt 135

<210> 371
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”

<400> 371
cggcaataaa aagacagaat aaaacgcacg ggtgttgggt cgtttgttc 49

<210> 372
<211> 226
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 372
ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa 60

cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg 120

ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt cactgcattc 180

tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgg 226

[0199]

<210> 373
<211> 416
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 373
catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60

aagcttattc atctgttttt ctttttcgtt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120

ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180

gaatctaata gagtggtaca gcactgttat ttttcaaaga tgtgttgcta tcctgaaaat 240

tctgtaggtt ctgtggaagt tccagtgttc tctcttattc cacttcggta gaggatttct 300

agtttcttgt gggctaatta ataaaatcat taatactctt ctaagttatg gattataaac 360

attcaaaata atattttgac attatgataa ttctgaataa aagaacaaaa accatg 416

<210> 374
<211> 415
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 374
atcacattta aaagcatctc agcctaccat gagaataaga gaaagaaaat gaagatcaaa 60

agcttattca tctgtttttc tttttcgttg gtgtaaagcc aacaccctgt ctaaaaaaca 120

taaatttctt taatcatttt gcctcttttc tctgtgcttc aattaataaa aaatggaaag 180

aatctaatag agtggtacag cactgttatt tttcaaagat gtgttgctat cctgaaaatt 240

ctgtaggttc tgtggaagtt ccagtgttct ctcttattcc acttcggtag aggatttcta 300

gtttcttgtg ggctaattaa ataaatcatt aatactcttc taagttatgg attataaaca 360

ttcaaaataa tattttgaca ttatgataat tctgaataaa agaacaaaaa ccatg 415

[0200]

<210> 375
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 375
taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 60

tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 120

tt 122

<210> 376
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 376
tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat 60

aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg 120

gaggtttttt aaa 133

<210> 377
<211> 1386
<212> DNA
<213> 智人

<400> 377
atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60

ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120

ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt 180

gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300

ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360

[0201]

tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420

tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctcctg tactgaggga 480

tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540

gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac 600

tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca 660

tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720

caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780

tggattgtaa ctgctgccca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt 840

gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900

cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960

ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020

tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080

cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140

acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200

gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260

gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320

tatggaatat ataccaaggt atcccggtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380

acttaa 1386

<210> 378
<211> 461
<212> PRT
<213> 智人

<400> 378
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

[0202]

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe

130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

[0203] Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
[0204] 435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
450 455 460

<210> 379
<211> 2688
<212> DNA
<213> 智人

<400> 379
accactttca caatctgcta gcaaaggtta tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat 60

caccaggcct catcaccatc tgccttttag gatatctact cagtgctgaa tgtacagttt 120

ttcttgatca tgaaaacgcc aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta 180

aattggaaga gtttgttcaa gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt 240

ttgaagaagc acgagaagtt tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt 300

atgttgatgt aacatgtaac attaagaatg gcagatgcga gcagttttgt aaaaatagtg 360

ctgataacaa ggtggtttgc tcctgtactg agggatatcg acttgcagaa aaccagaagt 420

cctgtgaacc agcagtgcca tttccatgtg gaagagtttc tgtttcacaa acttctaagc 480

tcacccgtgc tgagactgtt tttcctgatg tggactatgt aaattctact gaagctgaaa 540

ccattttgga taacatcact caaagcaccc aatcatttaa tgacttcact cgggttgttg 600

gtggagaaga tgccaaacca ggtcaattcc cttggcaggt tgttttgaat ggtaaagttg 660

atgcattctg tggaggctct atcgttaatg aaaaatggat tgtaactgct gcccactgtg 720

ttgaaactgg tgttaaaatt acagttgtcg caggtgaaca taatattgag gagacagaac 780

atacagagca aaagcgaaat gtgattcgaa ttattcctca ccacaactac aatgcagcta 840

ttaataagta caaccatgac attgcccttc tggaactgga cgaaccctta gtgctaaaca 900

gctacgttac acctatttgc attgctgaca aggaatacac gaacatcttc ctcaaatttg 960

gatctggcta tgtaagtggc tggggaagag tcttccacaa agggagatca gctttagttc 1020

ttcagtacct tagagttcca cttgttgacc gagccacatg tcttcgatct acaaagttca 1080

ccatctataa caacatgttc tgtgctggct tccatgaagg aggtagagat tcatgtcaag 1140

[0205] gagatagtgg gggaccccat gttactgaag tggaagggac cagtttctta actggaatta 1200

ttagctgggg tgaagagtgt gcaatgaaag gcaaatatgg aatatatacc aaggtatccc 1260

ggtatgtcaa ctggattaag gaaaaaacaa agctcactta atgaaagatg gatttccaag 1320

gttaattcat tggaattgaa aattaacagg gcctctcact aactaatcac tttcccatct 1380

tttgttagat ttgaatatat acattctatg atcattgctt tttctcttta caggggagaa 1440

tttcatattt tacctgagca aattgattag aaaatggaac cactagagga atataatgtg 1500

ttaggaaatt acagtcattt ctaagggccc agcccttgac aaaattgtga agttaaattc 1560

tccactctgt ccatcagata ctatggttct ccactatggc aactaactca ctcaattttc 1620

cctccttagc agcattccat cttcccgatc ttctttgctt ctccaaccaa aacatcaatg 1680

tttattagtt ctgtatacag tacaggatct ttggtctact ctatcacaag gccagtacca 1740

cactcatgaa gaaagaacac aggagtagct gagaggctaa aactcatcaa aaacactact 1800

ccttttcctc taccctattc ctcaatcttt taccttttcc aaatcccaat ccccaaatca 1860

gtttttctct ttcttactcc ctctctccct tttaccctcc atggtcgtta aaggagagat 1920

ggggagcatc attctgttat acttctgtac acagttatac atgtctatca aacccagact 1980

tgcttccgta gtggagactt gcttttcaga acatagggat gaagtaaggt gcctgaaaag 2040

tttgggggaa aagtttcttt cagagagtta agttatttta tatatataat atatatataa 2100

aatatataat atacaatata aatatatagt gtgtgtgtat gcgtgtgtgt agacacacac 2160

gcatacacac atataatgga agcaataagc cattctaaga gcttgtatgg ttatggaggt 2220

ctgactaggc atgatttcac gaaggcaaga ttggcatatc attgtaacta aaaaagctga 2280

cattgaccca gacatattgt actctttcta aaaataataa taataatgct aacagaaaga 2340

agagaaccgt tcgtttgcaa tctacagcta gtagagactt tgaggaagaa ttcaacagtg 2400

tgtcttcagc agtgttcaga gccaagcaag aagttgaagt tgcctagacc agaggacata 2460

agtatcatgt ctcctttaac tagcataccc cgaagtggag aagggtgcag caggctcaaa 2520

ggcataagtc attccaatca gccaactaag ttgtcctttt ctggtttcgt gttcaccatg 2580

gaacattttg attatagtta atccttctat cttgaatctt ctagagagtt gctgaccaac 2640

tgacgtatgt ttccctttgt gaattaataa actggtgttc tggttcat 2688

[0206]

<210> 380
<211> 423
<212> PRT
<213> 智人

<400> 380

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Val Thr Cys
85 90 95

Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp
100 105 110

Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn
115 120 125

Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser
130 135 140

Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp
145 150 155 160

Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile
165 170 175

[0207] Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly
180 185 190

Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly
195 200 205

Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile
210 215 220

Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val
225 230 235 240

Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg
245 250 255

Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn
260 265 270

Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val

275 280 285

Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr
290 295 300

Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg
305 310 315 320

Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val
325 330 335

Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile
340 345 350

Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser
355 360 365

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr
370 375 380

[0208]

Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys
385 390 395 400

Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile
405 410 415

Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
420

<210> 381
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 381
atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgtctgctga gtgcactgtg ttcctggacc atgagaatgc caacaagatc 120

ctgaacaggc ccaagagata caactctggc aagctggagg agtttgtgca gggcaacctg 180

gagagggagt gcatggagga gaagtgcagc tttgaggagg ccagggaggt gtttgagaac 240

actgagagga ccactgagtt ctggaagcag tatgtggatg gggaccagtg tgagagcaac 300

ccctgcctga atgggggcag ctgcaaggat gacatcaaca gctatgagtg ctggtgcccc 360

tttggctttg agggcaagaa ctgtgagctg gatgtgacct gcaacatcaa gaatggcaga 420

tgtgagcagt tctgcaagaa ctctgctgac aacaaggtgg tgtgcagctg cactgagggc 480

tacaggctgg ctgagaacca gaagagctgt gagcctgctg tgccattccc atgtggcaga 540

gtgtctgtga gccagaccag caagctgacc agggctgagg ctgtgttccc tgatgtggac 600

tatgtgaaca gcactgaggc tgaaaccatc ctggacaaca tcacccagag cacccagagc 660

ttcaatgact tcaccagggt ggtgggggg gaggatgcca agcctggcca gttcccctgg 720

caagtggtgc tgaatggcaa ggtggatgcc ttctgtgggg gcagcattgt gaatgagaag 780

tggattgtga ctgctgccca ctgtgtggag actggggtga agatcactgt ggtggctggg 840

[0209]

gagcacaaca ttgaggagac tgagcacact gagcagaaga ggaatgtgat caggatcatc 900

ccccaccaca actacaatgc tgccatcaac aagtacaacc atgacattgc cctgctggag 960

ctggatgagc ccctggtgct gaacagctat gtgaccccca tctgcattgc tgacaaggag 1020

tacaccaaca tcttcctgaa gtttggctct ggctatgtgt ctggctgggg cagggtgttc 1080

cacaagggca ggtctgccct ggtgctgcag tacctgaggg tgcccctggt ggacagggcc 1140

acctgcctga ggagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200

gaggggggca gggacagctg ccaggggggac tctgggggcc cccatgtgac tgaggtggag 1260

ggcaccagct tcctgactgg catcatcagc tgggggggagg agtgtgccat gaagggcaag 1320

tatggcatct acaccaaagt ctccagatat gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg 1380

acctga 1386

<210> 382
<211> 2824
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 382

[0210]

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgtctgctga atgtacaggt ttgtttcctt ttttataata cattgagtat 120

gcttgccttt tagatataga aatatctgat tctgtcttct tcactaaatt ttgattacat 180

gatttgacag caatattgaa gagtctaaca gccagcaccc aggttggtaa gtactggttc 240

tttgttagct aggttttctt cttcttcact tttaaaacta aatagatgga caatgcttat 300

gatgcaataa ggtttaataa acactgttca gttcagtatt tggtcatgta attcctgtta 360

aaaaacagtc atctccttgg tttaaaaaaa ttaaaagtgg gaaaacaaag aaatagcaga 420

atatagtgaa aaaaaataac cacagtattt ttgtttggac ttaccacttt gaaatcaaat 480

tgggaaacaa aagcacaaac agtggcctta tttacacaaa aagtctgatt ttaagatatg 540

tgacaattca aggtttcaga agtatgtaag gaggtgtgtc tctaattttt taaattatat 600

atcttcaatt taaagtttta gttaaaacat aaagattaac ctttcattag caagctgtta 660

gttatcacca aagcttttca tggattagga aaaaatcatt ttgtctctat ctcaaacatc 720

ttggagttga tatttgggga aacacaatac tcagttgagt tccctagggg agaaaagcaa 780

gcttaagaat tgacacaaag agtaggaagt tagctattgc aacatatatc actttgtttt 840

ttcacaacta cagtgacttt atttatttcc cagaggaagg catacaggga agaaattatc 900

ccatttggac aaacagcatg ttctcacagt aagcacttat cacacttact tgtcaacttt 960

ctagaatcaa atctagtagc tgacagtacc aggatcaggg gtgccaaccc taagcacccc 1020

cagaaagctg actggccctg tggttcccac tccagacatg atgtcagctg tgaaatccac 1080

ctccctggac cataattagg cttctgttct tcaggagaca tttgttcaaa gtcatttggg 1140

caaccatatt ctgaaaacag cccagccagg gtgatggatc actttgcaaa gatcctcaat 1200

gagctatttt caagtgatga caaagtgtga agttaagggc tcatttgaga actttctttt 1260

tcatccaaag taaattcaaa tatgattaga aatctgacct tttattactg gaattctctt 1320

gactaaaagt aaaattgaat tttaattcct aaatctccat gtgtatacag tactgtggga 1380

acatcacaga ttttggctcc atgccctaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta 1440

aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac 1500

taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaatgcca acaaaattct 1560

gaatagacca aagaggtata actctggcaa gcttgaagag tttgtacagg ggaatctgga 1620

gagagagtgt atggaagaga agtgcagctt tgaggaagcc agagaagtgt ttgaaaatac 1680

agagagaaca actgaatttt ggaagcagta tgtggatggt gatcaatgtg agagcaatcc 1740

ctgcttgaat gggggggagct gtaaagatga tatcaacagc tatgaatgtt ggtgtccctt 1800

tggatttgag gggaaaaact gtgagcttga tgtgacctgt aatatcaaga atggcaggtg 1860

tgagcaattt tgcaagaatt ctgctgataa caaagtggtc tgtagctgca ctgagggata 1920

taggctggct gaaaaccaga agagctgtga acctgcagtg ccttttccct gtgggagagt 1980

gtctgtgagc caaaccagca agctgactag ggctgaagca gtctttcctg atgtagatta 2040

tgtgaatagc actgaggctg agacaatcct tgacaatatc actcagagca cacagagctt 2100

[0211] caatgacttc accagggtgg taggagggga ggatgccaag cctgggcagt tcccctggca 2160

ggtagtgctc aatggaaaag tggatgcctt ttgtggaggt tcaattgtaa atgagaagtg 2220

gattgtgact gcagcccact gtgtggaaac tggagtcaag attactgtgg tggctggaga 2280

gcacaatatt gaggaaactg agcacactga gcagaagagg aatgtgatca ggattatccc 2340

ccaccacaac tacaatgctg ctatcaacaa gtacaaccat gacattgccc tcctggaact 2400

ggatgaaccc ctggtcttga acagctatgt gacacccatc tgtattgctg ataaagagta 2460

caccaacatc ttcttgaaat ttgggtctgg atatgtgtct ggctggggca gggtgttcca 2520

taaaggcagg tctgccctgg tattgcagta tttgagggtg cctctggtgg atagagcaac 2580

ctgcttgctg agcaccaagt ttacaatcta caacaatatg ttctgtgcag ggttccatga 2640

aggtggtaga gacagctgcc agggagattc tgggggtccc catgtgactg aggtggaggg 2700

aaccagcttc ctgactggga ttatcagctg gggtgaggag tgtgctatga agggaaagta 2760

tgggatctac acaaaagtat ccagatatgt gaactggatt aaggagaaaa ccaagctgac 2820

ttga 2824

<210> 383
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 383
atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgtctgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaatgc caacaaaatt 120

ctgaatagac caaagaggta taactctggc aagcttgaag agtttgtaca ggggaatctg 180

gagagagagt gtatggaaga gaagtgcagc tttgaggaag ccagagaagt gtttgaaaat 240

acagagagaa caactgaatt ttggaagcag tatgtggatg gtgatcaatg tgagagcaat 300

ccctgcttga atgggggggag ctgtaaagat gatatcaaca gctatgaatg ttggtgtccc 360

tttggatttg aggggaaaaa ctgtgagctt gatgtgacct gtaatatcaa gaatggcagg 420

[0212] tgtgagcaat tttgcaagaa ttctgctgat aacaaagtgg tctgtagctg cactgaggga 480

tataggctgg ctgaaaacca gaagagctgt gaacctgcag tgccttttcc ctgtgggaga 540

gtgtctgtga gccaaaccag caagctgact agggctgaag cagtctttcc tgatgtagat 600

tatgtgaata gcactgaggc tgagacaatc cttgacaata tcactcagag cacacagagc 660

ttcaatgact tcaccagggt ggtaggaggg gaggatgcca agcctgggca gttcccctgg 720

caggtagtgc tcaatggaaa agtggatgcc ttttgtggag gttcaattgt aaatgagaag 780

tggattgtga ctgcagccca ctgtgtggaa actggagtca agattactgt ggtggctgga 840

gagcacaata ttgaggaaac tgagcacact gagcagaaga ggaatgtgat caggattatc 900

ccccaccaca actacaatgc tgctatcaac aagtacaacc atgacattgc cctcctggaa 960

ctggatgaac ccctggtctt gaacagctat gtgacaccca tctgtattgc tgataaagag 1020

tacaccaaca tcttcttgaa atttgggtct ggatatgtgt ctggctgggg cagggtgttc 1080

cataaaggca ggtctgccct ggtattgcag tatttgaggg tgcctctggt ggatagagca 1140

acctgcttgc tgagcaccaa gtttacaatc tacaacaata tgttctgtgc agggttccat 1200

gaaggtggta gagacagctg ccagggagat tctgggggtc cccatgtgac tgaggtggag 1260

ggaaccagct tcctgactgg gattatcagc tggggtgagg agtgtgctat gaagggaaag 1320

tatgggatct acacaaaagt atccagatat gtgaactgga ttaaggagaa aaccaagctg 1380

acttga 1386

<210> 384
<211> 1386
<212> DNA
<213> 智人

<400> 384
atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60

[0213]

ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120

ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt 180

gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300

ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360

tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420

tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctcctg tactgaggga 480

tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540

gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgaga ctgtttttcc tgatgtggac 600

tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca 660

tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720

caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780

tggattgtaa ctgctgccca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt 840

gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900

cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960

ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020

tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080

cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140

acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200

gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260

gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320

tatggaatat ataccaaggt atcccggtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380

acttaa 1386

<210> 385
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 385
atgcagcgcg tgaacatgat catggccgag agccccggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

[0214]

ggctacctgc tgagcgccga gtgcaccgtg ttcctggacc acgagaacgc caacaagatc 120

ctgaaccgcc ccaagcgcta caacagcggc aagctggagg agttcgtgca gggcaacctg 180

gagcgcgagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg cccgcgaggt gttcgagaac 240

accgagcgca ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagagcaac 300

ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc 360

ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggccgc 420

tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaaggtgg tgtgcagctg caccgagggc 480

taccgcctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccgccg tgcccttccc ctgcggcagg 540

gtgagcgtga gccagaccag caagctgacc cgcgccgagg ccgtgttccc cgacgtggac 600

tacgtgaaca gcaccgaggc cgagaccatc ctggacaaca tcacccagag cacccagagc 660

ttcaacgact tcacccgcgt ggtgggcggc gaggacgcca agcccggcca gttcccctgg 720

caggtggtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcggcg gcagcatcgt gaacgagaag 780

tggatcgtga ccgccgccca ctgcgtggag accggcgtga agatcaccgt ggtggccggc 840

gagcacaaca tcgaggagac cgagcacacc gagcagaagc gcaacgtgat ccgcatcatc 900

ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgacatcgc cctgctggag 960

ctggacgagc ccctggtgct gaacagctac gtgaccccca tctgcatcgc cgacaaggag 1020

tacaccaaca tcttcctgaa gttcggcagc ggctacgtga gcggctgggg ccgcgtgttc 1080

cacaagggcc gcagcgccct ggtgctgcag tacctgcgcg tgcccctggt ggaccgcgcc 1140

acctgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac 1200

gagggcggca gggacagctg ccagggcgac agcggcggcc cccacgtgac cgaggtggag 1260

ggcaccagct tcctgaccgg catcatcagc tggggcgagg agtgcgccat gaagggcaag 1320

tacggcatct acaccaaggt gagccgctac gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg 1380

acctaa 1386

<210> 386
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

[0215]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 386
atgcagcgcg tgaacatgat catggccgag agccccggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgagcgccga gtgcaccgtg ttcctggacc acgagaacgc caacaagatc 120

ctgaaccgcc ccaagcgcta caacagcggc aagctggagg agttcgtgca gggcaacctg 180

gagcgcgagt gcatggagga gaagtgcagc ttcgaggagg cccgcgaggt gttcgagaac 240

accgagcgca ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagagcaac 300

ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc 360

ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggccgc 420

tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaaggtgg tgtgcagctg caccgagggc 480

taccgcctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccgccg tgcccttccc ctgcggcagg 540

gtgagcgtga gccagaccag caagctgacc cgcgccgagg ccgtgttccc cgacgtggac 600

tacgtgaaca gcaccgaggc cgagaccatc ctggacaaca tcacccagag cacccagagc 660

ttcaacgact tcacccgcgt ggtgggcggc gaggacgcca agcccggcca gttcccctgg 720

caggtggtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcggcg gcagcatcgt gaacgagaag 780

tggatcgtga ccgccgccca ctgcgtggag accggcgtga agatcaccgt ggtggccggc 840

gagcacaaca tcgaggagac cgagcacacc gagcagaagc gcaacgtgat ccgcatcatc 900

ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgacatcgc cctgctggag 960

ctggacgagc ccctggtgct gaacagctac gtgaccccca tctgcatcgc cgacaaggag 1020

tacaccaaca tcttcctgaa gttcggcagc ggctacgtga gcggctgggg ccgcgtgttc 1080

cacaagggcc gcagcgccct ggtgctgcag tacctgcgcg tgcccctggt ggaccgcgcc 1140

acctgcctgc gcagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac 1200

gagggcggca gggacagctg ccagggcgac agcggcggcc cccacgtgac cgaggtggag 1260

ggcaccagct tcctgaccgg catcatcagc tggggcgagg agtgcgccat gaagggcaag 1320

[0216] tacggcatct acaccaaggt gagccgctac gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg 1380

acctaa 1386

<210> 387
<211> 1359
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 387
atggccgagg ccagcggcct ggtgaccgtg tgcctgctgg gctacctgct gagcgccgag 60

tgcgccgtgt tcctggaccg cgagaacgcc accaagatcc tgagccgccc caagcgctac 120

aacagcggca agctggagga gttcgtgcgc ggcaacctgg agcgcgagtg catcgaggag 180

aagtgcagct tcgaggaggc ccgcgaggtg ttcgagaaca ccgagaagac caccgagttc 240

tggaagcagt acgtggacgg cgaccagtgc gagagcaacc cctgcctgaa cgacggcgtg 300

tgcaaggacg acatcaacag ctacgagtgc tggtgccgcg ccggcttcga gggcaagaac 360

tgcgagctgg acgtgacctg caacatcaag aacggccgct gcaagcagtt ctgcaagctg 420

ggccccgaca acaaggtggt gtgcagctgc accaccggct accagctggc cgaggaccag 480

cgcagctgcg agcccgccgt gcccttcccc tgcggcaggg tgagcgtgcc ccacatcagc 540

atgacccgca cccgcgccga gaccctgttc agcaacatgg actacgagaa cagcaccgag 600

gtggagaaga tcctggacaa cgtgacccag cccctgaacg acttcacccg cgtggtgggc 660

ggcaaggacg ccaagcccgg ccagttcccc tggcaggtgc tgctgaacgg caaggtggac 720

gccttctgcg gcggcagcat catcaacgag aagtgggtgg tgaccgccgc ccactgcatc 780

gagcccgacg tgaagatcac catcgtggcc ggcgagcaca acaccgagaa gcgcgagcac 840

accgagcaga agcgcaacgt gatccgcacc atcctgcacc acagctacaa cgccaccatc 900

aacaagtaca accacgacat cgccctgctg gagctggacg agcccctgac cctgaacagc 960

tacgtgaccc ccatctgcat cgccgaccgc gagtacagca acatcttcct gaagttcggc 1020

agcggctacg tgagcggctg gggccgcgtg ttcaacaagg gccgcagcgc cagcatcctg 1080

[0217] cagtacctga aggtgccccc ggtggaccgc gccacctgcc tgcgcagcac caagttcacc 1140

atctacaaca acatgttctg cgccggcttc cacgagggcg gcaaggacag ctgccagggc 1200

gacagcggcg gcccccacgt gaccgaggtg gagggcatca gcttcctgac cggcatcatc 1260

agctggggcg aggagtgcgc catgaagggc aagtacggca tctacaccaa ggtgagccgc 1320

tacgtgaact ggatcaagga gaagaccaag ctgacctaa 1359

<210> 388
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 388
atgcagcgcg tgaacatgat tatggccgag tctcccggcc tgatcaccat ctgtctgctg 60

ggctatctgc tgagcgccga gtgcaccgtg tttctggatc acgagaacgc caacaagatc 120

ctgaacagac ccaagcggta caacagcggc aagctggaag agttcgtgca gggcaacctg 180

gaacgcgagt gcatggaaga gaagtgcagc ttcgaagagg ccagagaggt gttcgagaac 240

accgagagaa ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccttgtctga atggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc 360

ttcggcttcg agggcaagaa ttgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggcaga 420

tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaaggtcg tgtgctcctg cacagagggc 480

tacagactgg ccgagaacca gaagtcttgc gagcccgctg tgcctttcc atgtggcaga 540

gtgtctgtgt cccagaccag caagctgacc agagccgaag ccgtgtttcc cgacgtggac 600

tacgtgaaca gcaccgaggc cgagacaatc ctggacaaca tcacccagag cacccagtcc 660

ttcaacgact tcaccagagt cgtcggcggc gaggatgcta agcctggaca gtttccttgg 720

caagtggtgc tgaacggcaa ggtggacgct ttttgtggcg gctccatcgt gaacgagaag 780

tggatcgtga ccgccgctca ctgtgtggaa accggcgtga agattacagt ggtggccggc 840

gagcacaaca tcgaggaaac agagcacacc gagcagaaac ggaacgtgat cagaatcatc 900

cctcaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgatatcgc cctgctggaa 960

[0218]

ctggacgagc ccctggtcct gaactcttac gtgaccccta tctgtatcgc cgacaaagag 1020

tacaccaaca tctttctgaa gttcggcagc ggctacgtgt ccggctgggg aagagttttc 1080

cacaagggca gatcagccct ggtgctgcag tacctgagag tgcccctggt ggatagagcc 1140

acatgcctgc tgagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac 1200

gaaggcggca gagattcttg tcaaggcgat tctggcggcc ctcacgtgac agaggttgag 1260

ggcacaagct ttctgaccgg catcatcagc tggggcgaag agtgtgccat gaaggggaag 1320

tacggcatct acaccaaggt gtccagatac gtgaactgga tcaaagaaaa gaccaagctc 1380

acctag 1386

<210> 389
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 389

atgcagcgcg tgaacatgat tatggccgag tctcccggcc tgatcaccat ctgtctgctg 60

ggctatctgc tgagcgccga gtgcaccgtg tttctggatc acgagaacgc caacaagatc 120

ctgaacagac ccaagcggta caacagcggc aagctggaag agttcgtgca gggcaacctg 180

gaacgcgagt gcatggaaga gaagtgcagc ttcgaagagg ccagagaggt gttcgagaac 240

accgagagaa ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccttgtctga atggcggcag ctgcaaggac gacatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc 360

ttcggcttcg agggcaagaa ttgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggcaga 420

tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgccgac aacaaggtcg tgtgctcctg cacagagggc 480

tacagactgg ccgagaacca gaagtcttgc gagcccgctg tgccctttcc atgtggcaga 540

gtgtctgtgt cccagaccag caagctgacc agagccgaag ccgtgtttcc cgacgtggac 600

tacgtgaaca gcaccgaggc cgagacaatc ctggacaaca tcacccagag cacccagtcc 660

[0219] ttcaacgact tcaccagagt cgtcggcggc gaggatgcta agcctggaca gtttccttgg 720

caagtggtgc tgaacggcaa ggtggacgct ttttgtggcg gctccatcgt gaacgagaag 780

tggatcgtga ccgccgctca ctgtgtggaa accggcgtga agattacagt ggtggccggc 840

gagcacaaca tcgaggaaac agagcacacc gagcagaaac ggaacgtgat cagaatcatc 900

cctcaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgatatcgc cctgctggaa 960

ctggacgagc ccctggtcct gaactcttac gtgaccccta tctgtatcgc cgacaaagag 1020

tacaccaaca tctttctgaa gttcggcagc ggctacgtgt ccggctgggg aagagttttc 1080

cacaagggca gatcagccct ggtgctgcag tacctgagag tgcccctggt ggatagagcc 1140

acctgtctga gaagcaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac 1200

gaaggcggca gagattcttg tcaaggcgat tctggcggcc ctcacgtgac agaggttgag 1260

ggcacaagct ttctgaccgg catcatcagc tggggcgaag agtgtgccat gaaggggaag 1320

tacggcatct acaccaaggt gtccagatac gtgaactgga tcaaagaaaa gaccaagctc 1380

acctag 1386

<210> 390
<211> 1419
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 390
atgaagcacc tgaacaccgt catggcagaa tccccggctc tcatcaccat cttcctttta 60

ggatatctac tcagtaccga atgtgcagtt ttccttgatc gtgaaaatgc caccaaaatt 120

cttacccgtc caaagagata taattcagga aaactagaag agtttgttcg aggaaacctt 180

gaaagagagt gtatagaaga aagatgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaaaaa ctactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgaatcaaat 300

ccttgtttaa atggtggaat atgcaaggat gatattagtt cctatgaatg ctggtgccaa 360

gttggatttg aaggaaggaa ctgtgaatta gatgcaacgt gtaacattaa aaatggcagg 420

tgcaagcagt tttgtaaaaa cagtcctgat aacaaggtaa tttgttcctg cactgaggga 480

[0220]

taccaacttg cagaagacca gaagtcctgt gaaccaacag ttccatttcc atgtgggaga 540

gcttctattt catacagttc taaaaagatc acgagagctg agactgtttt ctctaatatg 600

gactatgaaa attctactga agctgtattc attcaagatg acatcactga tggtgccatt 660

cttaataacg tcactgaaag tagtgaatca cttaatgact tcactcgagt tgttggtgga 720

gaaaacgcaa aaccgggtca aatcccttgg caggtcattt taaatggtga aattgaggca 780

ttctgtggag gtgccatcat taatgaaaaa tggattgtaa ctgctgccca ctgtcttaaa 840

cctggtgata aaattgaggt tgttgctggt gaatataaca ttgataagaa ggaagacaca 900

gaacaaagga gaaatgtgat tcgaactatc cctcatcacc agtacaatgc aactattaat 960

aagtatagtc atgacattgc cttgctggaa ctggataaac ctttaatact aaacagctat 1020

gtaacaccta tctgtgttgc caatagggaa tatacaaata tcttcctcaa gtttggttct 1080

ggctatgtca gtggctgggg aaaagtcttc aacaaaggga gacaggcttc cattcttcag 1140

taccttagag ttccactggt ggatagagcc acatgcctta ggtccacaac attcactatc 1200

tataacaaca tgttctgtgc aggctaccgt gaaggaggca aagattcgtg tgaaggagat 1260

agtgggggac cccatgttac tgaagtagaa gggacaagtt tcttaactgg cattattagc 1320

tggggtgaag aatgtgcaat gaaaggcaaa tatggaatat atactaaggt ttcccggtac 1380

gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagcta acttaatga 1419

<210> 391
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成肽”

<400> 391
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 392
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0221]

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成 6xHis 标签”

<400> 392
His His His His His His
1 5

<210> 393
<211> 1452
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 393
atgaagcacc tgaacaccgt catggcagaa tccccggctc tcatcaccat cttcctttta 60

ggatatctac tcagtaccga atgtgcagtt ttccttgatc gtgaaaatgc caccaaaatt 120

cttacccgtc caaagagata taattcagga aaactagaag agtttgttcg aggaaacctt 180

gaaagagagt gtatagaaga aagatgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaaaaa ctactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgaatcaaat 300

ccttgtttaa atggtggaat atgcaaggat gatattagtt cctatgaatg ctggtgccaa 360

gttggatttg aaggaaggaa ctgtgaatta gatgcaacgt gtaacattaa aaatggcagg 420

tgcaagcagt tttgtaaaaa cagtcctgat aacaaggtaa tttgttcctg cactgaggga 480

taccaacttg cagaagacca gaagtcctgt gaaccaacag ttccatttcc atgtgggaga 540

gcttctattt catacagttc taaaaagatc acgagagctg agactgtttt ctctaatatg 600

gactatgaaa attctactga agctgtattc attcaagatg acatcactga tggtgccatt 660

cttaataacg tcactgaaag tagtgaatca cttaatgact tcactcgagt tgttggtgga 720

gaaaacgcaa aaccgggtca aatcccttgg caggtcattt taaatggtga aattgaggca 780

ttctgtggag gtgccatcat taatgaaaaa tggattgtaa ctgctgccca ctgtcttaaa 840

cctggtgata aaattgaggt tgttgctggt gaatataaca ttgataagaa ggaagacaca 900

[0222] gaacaaagga gaaatgtgat tcgaactatc cctcatcacc agtacaatgc aactattaat 960

aagtatagtc atgacattgc cttgctggaa ctggataaac ctttaatact aaacagctat 1020

gtaacaccta tctgtgttgc caatagggaa tatacaaata tcttcctcaa gtttggttct 1080

ggctatgtca gtggctgggg aaaagtcttc aacaaaggga gacaggcttc cattcttcag 1140

taccttagag ttccactggt ggatagagcc acatgcctta ggtccacaac attcactatc 1200

tataacaaca tgttctgtgc aggctaccgt gaaggaggca aagattcgtg tgaaggagat 1260

agtgggggac cccatgttac tgaagtagaa gggacaagtt tcttaactgg cattattagc 1320

tggggtgaag aatgtgcaat gaaaggcaaa tatggaatat atactaaggt ttcccggtac 1380

gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagcta actgggggtg gaggctctca tcaccatcac 1440

catcactaat ga 1452

<210> 394
<211> 1464
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 394

[0223]

atgaagcacc tgaacaccgt catggcagaa tccccggctc tcatcaccat cttcctttta 60

ggatatctac tcagtaccga atgtgcagtt ttccttgatc gtgaaaatgc caccaaaatt 120

cttacccgtc caaagagata taattcagga aaactagaag agtttgttcg aggaaacctt 180

gaaagagagt gtatagaaga aagatgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaaaaa ctactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgaatcaaat 300

ccttgtttaa atggtggaat atgcaaggat gatattagtt cctatgaatg ctggtgccaa 360

gttggatttg aaggaaggaa ctgtgaatta gatgcaacgt gtaacattaa aaatggcagg 420

tgcaagcagt tttgtaaaaa cagtcctgat aacaaggtaa tttgttcctg cactgaggga 480

taccaacttg cagaagacca gaagtcctgt gaaccaacag ttccatttcc atgtgggaga 540

gcttctattt catacagttc taaaaagatc acgagagctg agactgtttt ctctaatatg 600

gactatgaaa attctactga agctgtattc attcaagatg acatcactga tggtgccatt 660

cttaataacg tcactgaaag tagtgaatca cttaatgact tcactcgagt tgttggtgga 720

gaaaacgcaa aaccgggtca aatcccttgg caggtcattt taaatggtga aattgaggca 780

ttctgtggag gtgccatcat taatgaaaaa tggattgtaa ctgctgccca ctgtcttaaa 840

cctggtgata aaattgaggt tgttgctggt gaatataaca ttgataagaa ggaagacaca 900

gaacaaagga gaaatgtgat tcgaactatc cctcatcacc agtacaatgc aactattaat 960

aagtatagtc atgacattgc cttgctggaa ctggataaac ctttaatact aaacagctat 1020

gtaacaccta tctgtgttgc caatagggaa tatacaaata tcttcctcaa gtttggttct 1080

ggctatgtca gtggctgggg aaaagtcttc aacaaaggga gacaggcttc cattcttcag 1140

taccttagag ttccactggt ggatagagcc acatgcctta ggtccacaac attcactatc 1200

tataacaaca tgttctgtgc aggctaccgt gaaggaggca aagattcgtg tgaaggagat 1260

agtgggggac cccatgttac tgaagtagaa gggacaagtt tcttaactgg cattattagc 1320

tggggtgaag aatgtgcaat gaaaggcaaa tatggaatat atactaaggt ttcccggtac 1380

gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagcta actgggggtg gaggctctga gcagaaactc 1440

atctctgaac aggatctgta atga 1464

<210> 395
<211> 1419
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 395
atgaagcacc tgaacaccgt catggcagaa tccccggctc tcatcaccat cttcctttta 60

ggatatctac tcagtaccga atgtgcagtt ttccttgatc gtgaaaatgc caccaaaatt 120

cttacccgtc caaagagata taattcagga aaactagaag agtttgttcg aggaaacctt 180

gaaagagagt gtatagaaga aagatgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaaaaa ctactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgaatcaaat 300

[0224]

ccttgtttaa atggtggaat atgcaaggat gatattagtt cctatgaatg ctggtgccaa 360

gttggatttg aaggaaggaa ctgtgaatta gatgcaacgt gtaacattaa aaatggcagg 420

tgcaagcagt tttgtaaaaa cagtcctgat aacaaggtaa tttgttcctg cactgaggga 480

taccaacttg cagaagacca gaagtcctgt gaaccaacag ttccatttcc atgtgggaga 540

gcttctattt catacagttc taaaaagatc acgagagctg agactgtttt ctctaatatg 600

gactatgaaa attctactga agctgtattc attcaagatg acatcactga tggtgccatt 660

cttaataacg tcactgaaag tagtgaatca cttaatgact tcactcgagt tgttggtgga 720

gaaaacgcaa aaccgggtca aatcccttgg caggtcattt taaatggtga aattgaggca 780

ttctgtggag gtgccatcat taatgaaaaa tggattgtaa ctgctgccca ctgtcttaaa 840

cctggtgata aaattgaggt tgttgctggt gaatataaca ttgataagaa ggaagacaca 900

gaacaaagga gaaatgtgat tcgaactatc cctcatcacc agtacaatgc aactattaat 960

aagtatagtc atgacattgc cttgctggaa ctggataaac ctttaatact aaacagctat 1020

gtaacaccta tctgtgttgc caatagggaa tatacaaata tcttcctcaa gtttggttct 1080

ggctatgtca gtggctgggg aaaagtcttc aacaaaggga gacaggcttc cattcttcag 1140

taccttagag ttccactggt ggatagagcc acatgccttc tgtccacaac attcactatc 1200

tataacaaca tgttctgtgc aggctaccgt gaaggaggca aagattcgtg tgaaggagat 1260

agtgggggac cccatgttac tgaagtagaa gggacaagtt tcttaactgg cattattagc 1320

tggggtgaag aatgtgcaat gaaaggcaaa tatggaatat atactaaggt ttcccggtac 1380

gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagcta acttaatga 1419

<210> 396
<211> 1452
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 396
atgaagcacc tgaacaccgt catggcagaa tccccggctc tcatcaccat cttcctttta 60

[0225]

ggatatctac tcagtaccga atgtgcagtt ttccttgatc gtgaaaatgc caccaaaatt 120

cttacccgtc caaagagata taattcagga aaactagaag agtttgttcg aggaaacctt 180

gaaagagagt gtatagaaga aagatgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaaaaa ctactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgaatcaaat 300

ccttgtttaa atggtggaat atgcaaggat gatattagtt cctatgaatg ctggtgccaa 360

gttggatttg aaggaaggaa ctgtgaatta gatgcaacgt gtaacattaa aaatggcagg 420

tgcaagcagt tttgtaaaaa cagtcctgat aacaaggtaa tttgttcctg cactgaggga 480

taccaacttg cagaagacca gaagtcctgt gaaccaacag ttccatttcc atgtgggaga 540

gcttctattt catacagttc taaaaagatc acgagagctg agactgtttt ctctaatatg 600

gactatgaaa attctactga agctgtattc attcaagatg acatcactga tggtgccatt 660

cttaataacg tcactgaaag tagtgaatca cttaatgact tcactcgagt tgttggtgga 720

gaaaacgcaa aaccgggtca aatcccttgg caggtcattt taaatggtga aattgaggca 780

ttctgtggag gtgccatcat taatgaaaaa tggattgtaa ctgctgccca ctgtcttaaa 840

cctggtgata aaattgaggt tgttgctggt gaatataaca ttgataagaa ggaagacaca 900

gaacaaagga gaaatgtgat tcgaactatc cctcatcacc agtacaatgc aactattaat 960

aagtatagtc atgacattgc cttgctggaa ctggataaac ctttaatact aaacagctat 1020

gtaacaccta tctgtgttgc caatagggaa tatacaaata tcttcctcaa gtttggttct 1080

ggctatgtca gtggctgggg aaaagtcttc aacaaaggga gacaggcttc cattcttcag 1140

taccttagag ttccactggt ggatagagcc acatgccttc tgtccacaac attcactatc 1200

tataacaaca tgttctgtgc aggctaccgt gaaggaggca aagattcgtg tgaaggagat 1260

agtgggggac cccatgttac tgaagtagaa gggacaagtt tcttaactgg cattattagc 1320

tggggtgaag aatgtgcaat gaaaggcaaa tatggaatat atactaaggt ttcccggtac 1380

gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagcta actgggggtg gaggctctca tcaccatcac 1440

catcactaat ga 1452

[0226]

<210> 397
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 397
atgcagagag tcaacatgat catggcagag tccccagggt tgattactat ctgtttgctg 60

gggtacctgt tgtctgcaga atgtacagtg ttcttagacc atgagaatgc caacaagatt 120

ctcaacaggc ccaagaggta caacagtgga aagctggagg aatttgtgca gggtaacctg 180

gaaagggagt gcatggagga gaaatgtagt tttgaggagg caagagaagt atttgaaaac 240

actgagagga ccactgagtt ctggaagcag tatgttgatg gagaccagtg tgagagcaac 300

ccctgcttga atgggggctc atgtaaagat gatattaatt catatgaatg ctggtgcccc 360

tttggctttg aaggtaagaa ctgtgagctg gatgtcacat gcaacattaa aaatggaaga 420

tgtgaacagt tctgcaaaaa ctcagctgac aacaaagttg tctgttcctg cactgaaggc 480

tacagacttg cagagaatca gaagagttgt gaacctgcag tcccatttcc atgtgggagg 540

[0227]

gtttcagtct ctcaaacttc taaattaacc agggctgaag ctgtgtttcc tgatgtggac 600

tatgtaaatt ctacagaggc tgagacaata ttggataata tcacccagag tacacagagc 660

ttcaatgact tcacaagagt ggtgggaggg gaagatgcca agcctggcca gtttccctgg 720

caggtagtcc tcaatgggaa ggtagatgcc ttctgtggtg gaagcattgt taatgaaaag 780

tggattgtga cagctgccca ctgtgtggag actggtgtga agatcactgt ggtggctggt 840

gaacataata ttgaggaaac agagcacact gagcagaaaa gaaatgtgat aagaatcatc 900

cctcaccaca actacaatgc tgccatcaac aaatataatc atgacatagc actcctagaa 960

ttagatgaac cattggtcct taacagctat gtcaccccca tctgcattgc agacaaagaa 1020

tacaccaaca tcttcctgaa gtttggatca ggttatgtga gtgggtgggg cagggtcttt 1080

cataaaggga gaagtgccct ggtgctccag tacttaagag tgccccttgt ggacagagcc 1140

acatgtctgc tgtccaccaa attcaccatt tacaacaata tgttctgtgc tggcttccat 1200

gaaggaggaa gagatagctg ccagggagat tcaggaggcc cccatgtaac agaggtagag 1260

gggacctcct tcctcacagg gatcatttcc tggggagaag agtgtgccat gaagggcaag 1320

tatggaatct acacaaaggt gtctaggtat gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg 1380

acctga 1386

<210> 398
<211> 1194
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 398
atggaggaga agtgctcatt tgaagaggcc agggaggtct ttgagaacac agagaggacc 60

acagagttct ggaagcagta tgtggatggg gaccagtgtg agagcaaccc ctgccttaat 120

gggggcagct gtaaagatga tattaatagc tatgaatgct ggtgcccctt tggatttgag 180

gggaaaaact gtgaattgga tgttacttgc aacatcaaaa atggtagatg tgagcagttc 240

tgcaagaact ctgcagacaa taaagtggtc tgctcctgca ctgaagggta cagactggca 300

gaaaaccaga agagttgtga gccagctgtg cccttcccct gtggcagagt ttctgtgagc 360

cagaccagca aactcaccag agctgaggct gtctttccag atgtggacta tgtgaactcc 420

acagaagctg agactatcct ggacaacatt actcagagca cccagtcctt caatgacttc 480

acaagggtgg ttggaggaga agatgccaag ccagggcagt ttccctggca ggtggtactg 540

aatggaaaag ttgatgcttt ctgtggaggg agcattgtga atgaaaaatg gattgtcact 600

gctgcccact gtgtggaaac tggggtgaag atcactgtgg tggctgggga gcataatatt 660

gaagaaacag agcacactga acagaaaaga aatgtgatca ggatcatccc ccaccacaac 720

tacaatgcag ccatcaacaa atacaaccat gacattgccc tgctggagct ggatgagccc 780

ctggtgctga acagctatgt gacccccatc tgtattgctg acaaggagta cacaaatatc 840

ttcctgaagt ttggctctgg ctatgtgagt ggctggggca gagtgttcca caagggaaga 900

tctgccctgg tgctgcagta cctgagggtg ccactggtgg acagggccac ctgcctgagg 960

agcacaaagt tcaccattta taacaacatg ttttgtgctg gcttccatga gggaggcagg 1020

[0228] gacagctgcc agggagattc tggagggccc catgtgactg aggtggaggg cacctccttt 1080

ctgacaggca ttatcagctg gggagaggag tgtgccatga agggcaagta tggcatctac 1140

accaaggtgt ccagatatgt caactggatc aaggaaaaga ccaaactgac ctaa 1194

<210> 399
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 399
atgaagcacc tgaacacagt gatggccgag agccctgctc tgatcaccat cttcctgctg 60

ggctacctgc tgtccacaga gtgcgccgtg tttctggatc gggagaacgc taccaagatc 120

ctgacacggc caaagaggta caacagcggc aagctggagg agttcgtgag gggaaacctg 180

gagagagagt gcatcgagga gaggtgttcc ttcgaggagg ccagagaggt gtttgagaac 240

accgagaaga ccacagagtt ttggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccatgtctga acggcggaat ctgtaaggac gatatcagct cctacgagtg ctggtgtcaa 360

gtgggcttcg agggacggaa ctgcgagctg gacgccacct gtaacatcaa gaacggacgc 420

tgcaagcagt tttgtaagaa ctcccccgac aacaaggtga tctgctcttg taccgagggc 480

taccagctgg ctgaggatca gaagtcttgc gagcctacag tgcccttccc ttgtggaagg 540

gccagcatct cctactctag caagaagatc accagagctg agacagtgtt cagcaacatg 600

gactacgaga actccaccga ggccgtgttt atccaggacg atatcaccga tggcgctatc 660

ctgaacaacg tgacagagtc ctctgagtcc ctgaacgact tcacaagagt ggtgggcgga 720

gagaacgcca agccaggcca gatcccctgg caggtgatcc tgaacggaga gatcgaggcc 780

ttttgcggcg gagctatcat caacgagaag tggatcgtga ccgccgctca ctgtctgaag 840

ccaggcgata agatcgaggt ggtggctgga gagtacaaca tcgacaagaa ggaggatacc 900

gagcagagga gaaacgtgat caggacaatc ccccaccacc agtacaacgc caccatcaac 960

aagtactctc acgacatcgc tctgctggag ctggataagc ctctgatcct gaacagctac 1020

[0229] gtgaccccaa tctgcgtggc caacagagag tacacaaaca tcttcctgaa gtttggctct 1080

ggatacgtga gcggctgggg aaaggtgttc aacaagggcc ggcaggcctc catcctgcag 1140

tacctgaggg tgccactggt ggacagggct acctgtctgc gctctaccac attcacaatc 1200

tacaacaaca tgttttgcgc tggatacagg gagggaggaa aggactcctg tgagggagat 1260

tctggaggac ctcacgtgac cgaggtggag ggcacctctt ttctgacagg catcatcagc 1320

tggggagagg agtgcgctat gaagggcaag tacggaatct acacaaaggt gtcccgctac 1380

gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg acatga 1416

<210> 400
<211> 1449
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 400
atgaagcacc tgaacacagt gatggccgag agccctgctc tgatcaccat cttcctgctg 60

ggctacctgc tgtccacaga gtgcgccgtg tttctggatc gggagaacgc taccaagatc 120

ctgacacggc caaagaggta caactctggc aagctggagg agttcgtgag gggaaacctg 180

gagagagagt gcatcgagga gaggtgtagc ttcgaggagg ccagagaggt gtttgagaac 240

accgagaaga ccacagagtt ttggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccatgtctga acggcggaat ctgtaaggac gatatcagct cctacgagtg ctggtgtcaa 360

gtgggcttcg agggacggaa ctgcgagctg gacgccacct gtaacatcaa gaacggacgc 420

tgcaagcagt tttgtaagaa ctcccccgac aacaaggtga tctgctcttg taccgagggc 480

taccagctgg ctgaggatca gaagtcctgc gagcctacag tgcccttccc ttgtggaagg 540

gccagcatct cctactctag caagaagatc accagagctg agacagtgtt cagcaacatg 600

gactacgaga actccaccga ggccgtgttt atccaggacg atatcaccga tggcgctatc 660

ctgaacaacg tgacagagtc ctctgagtct ctgaacgact tcacaagagt ggtgggcgga 720

gagaacgcca agccaggcca gatcccctgg caggtgatcc tgaacggaga gatcgaggcc 780

ttttgcggcg gagctatcat caacgagaag tggatcgtga ccgccgctca ctgtctgaag 840

[0230]

ccaggcgata agatcgaggt ggtggctgga gagtacaaca tcgacaagaa ggaggatacc 900

gagcagagga gaaacgtgat caggacaatc ccccaccacc agtacaacgc caccatcaac 960

aagtactctc acgacatcgc tctgctggag ctggataagc ctctgatcct gaacagctac 1020

gtgaccccaa tctgcgtggc caacagagag tacacaaaca tcttcctgaa gtttggctct 1080

ggatacgtga gcggctgggg aaaggtgttc aacaagggcc ggcaggcctc catcctgcag 1140

tacctgaggg tgccactggt ggacagggct acctgtctgc gctctaccac attcacaatc 1200

tacaacaaca tgttttgcgc tggatacagg gagggaggaa aggactcctg tgagggagat 1260

tctggaggac ctcacgtgac cgaggtggag ggcacctctt ttctgacagg catcatcagc 1320

tggggagagg agtgcgctat gaagggcaag tacggaatct acacaaaagt gagccgctac 1380

gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg acaggaggag gaggcagcca ccaccaccac 1440

caccactga 1449

<210> 401
<211> 1461

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 401
atgaagcacc tgaacacagt gatggccgag tctcctgctc tgatcaccat cttcctgctg 60

ggctacctgc tgagcacaga gtgcgccgtg tttctggatc gggagaacgc taccaagatc 120

ctgacacggc caaagaggta caactctggc aagctggagg agttcgtgag gggaaacctg 180

gagagagagt gcatcgagga gaggtgtagc ttcgaggagg ccagagaggt gtttgagaac 240

accgagaaga ccacagagtt ttggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccatgtctga acggcggaat ctgtaaggac gatatcagct cctacgagtg ctggtgtcaa 360

gtgggcttcg agggacggaa ctgcgagctg gacgccacct gtaacatcaa gaacggacgc 420

tgcaagcagt tttgtaagaa cagccccgac aacaaggtga tctgctcctg taccgagggc 480

taccagctgg ctgaggatca gaagtcctgc gagcctacag tgcccttccc ttgtggaagg 540

[0231]

gccagcatct cctactctag caagaagatc accagagctg agacagtgtt ctctaacatg 600

gactacgaga acagcaccga ggccgtgttt atccaggacg atatcaccga tggcgctatc 660

ctgaacaacg tgacagagtc ctctgagtct ctgaacgact tcacaagagt ggtgggcgga 720

gagaacgcca agccaggcca gatcccctgg caggtgatcc tgaacggaga gatcgaggcc 780

ttttgcggcg gagctatcat caacgagaag tggatcgtga ccgccgctca ctgtctgaag 840

ccaggcgaca agatcgaggt ggtggctgga gagtacaaca tcgacaagaa ggaggatacc 900

gagcagagga gaaacgtgat caggacaatc ccccaccacc agtacaacgc caccatcaac 960

aagtactccc acgacatcgc tctgctggag ctggataagc ctctgatcct gaactcttac 1020

gtgaccccaa tctgcgtggc caacagagag tacacaaaca tcttcctgaa gtttggctct 1080

ggatacgtga gcggctgggg aaaggtgttc aacaagggcc ggcaggccag catcctgcag 1140

tacctgaggg tgccactggt ggatagggct acctgtctgc gctccaccac attcacaatc 1200

tacaacaaca tgttttgcgc tggatacagg gagggaggaa aggactcctg tgagggagat 1260

tctggaggac ctcacgtgac cgaggtggag ggcacctcct ttctgacagg catcatctct 1320

tggggagagg agtgcgctat gaagggcaag tacggaatct acacaaaggt gtcccgctac 1380

gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg acaggcggag gcggaagcga gcagaagctg 1440

atctccgagc aggacctgtg a 1461

<210> 402
<211> 1416
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 402
atgaagcacc tgaacacagt gatggccgag agccctgctc tgatcaccat cttcctgctg 60

ggctacctgc tgtccacaga gtgcgccgtg tttctggatc gggagaacgc taccaagatc 120

ctgacacggc caaagaggta caacagcggc aagctggagg agttcgtgag gggaaacctg 180

gagagagagt gcatcgagga gaggtgttcc ttcgaggagg ccagagaggt gtttgagaac 240

[0232]

accgagaaga ccacagagtt ttggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccatgtctga acggcggaat ctgtaaggac gatatcagct cctacgagtg ctggtgtcaa 360

gtgggcttcg agggaaggaa ctgcgagctg gacgccacct gtaacatcaa gaacggaaga 420

tgcaagcagt tttgtaagaa ctcccccgac aacaaggtga tctgctcttg taccgagggc 480

taccagctgg ctgaggatca gaagtcttgc gagcctacag tgcccttccc ttgtggacgg 540

gccagcatct cctactctag caagaagatc acccgcgctg agacagtgtt cagcaacatg 600

gactacgaga actccaccga ggccgtgttt atccaggacg atatcaccga tggcgctatc 660

ctgaacaacg tgacagagtc ctctgagtcc ctgaacgact tcacacgggt ggtgggcgga 720

gagaacgcca agccaggcca gatcccctgg caggtgatcc tgaacggaga gatcgaggcc 780

ttttgcggcg gagctatcat caacgagaag tggatcgtga ccgccgctca ctgtctgaag 840

ccaggcgata agatcgaggt ggtggctgga gagtacaaca tcgacaagaa ggaggatacc 900

gagcagagga gaaacgtgat ccgcacaatc ccccaccacc agtacaacgc caccatcaac 960

aagtactctc acgacatcgc tctgctggag ctggataagc ctctgatcct gaacagctac 1020

gtgaccccaa tctgcgtggc caaccgggag tacacaaaca tcttcctgaa gtttggctct 1080

ggatacgtga gcggctgggg aaaggtgttc aacaagggcc gccaggcctc catcctgcag 1140

tacctgaggg tgccactggt ggacagggct acctgtctgc tgtctaccac attcacaatc 1200

tacaacaaca tgttttgcgc cggctacagg gagggcggaa aggactcctg tgagggagat 1260

tctggaggac ctcacgtgac cgaggtggag ggcacctctt ttctgacagg catcatcagc 1320

tggggagagg agtgcgctat gaagggcaag tacggaatct acacaaaggt gtccagatac 1380

gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg acatga 1416

<210> 403
<211> 1449
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0233] <400> 403
atgaagcacc tgaacacagt gatggccgag agccctgctc tgatcaccat cttcctgctg 60

ggctacctgc tgtccacaga gtgcgccgtg tttctggatc gggagaacgc taccaagatc 120

ctgacacggc caaagaggta caactctggc aagctggagg agttcgtgag gggaaacctg 180

gagagagagt gcatcgagga gaggtgtagc ttcgaggagg ccagagaggt gtttgagaac 240

accgagaaga ccacagagtt ttggaagcag tacgtggacg gcgatcagtg cgagagcaac 300

ccatgtctga acggcggaat ctgtaaggac gatatcagct cctacgagtg ctggtgtcaa 360

gtgggcttcg agggaaggaa ctgcgagctg gacgccacct gtaacatcaa gaacggaaga 420

tgcaagcagt tttgtaagaa ctcccccgac aacaaggtga tctgctcttg taccgagggc 480

taccagctgg ctgaggatca gaagtcctgc gagcctacag tgcccttccc ttgtggacgg 540

gccagcatct cctactctag caagaagatc acccgcgctg agacagtgtt cagcaacatg 600

gactacgaga actccaccga ggccgtgttt atccaggacg atatcaccga tggcgctatc 660

ctgaacaacg tgacagagtc ctctgagtct ctgaacgact tcacacgggt ggtgggcgga 720

gagaacgcca agccaggcca gatcccctgg caggtgatcc tgaacggaga gatcgaggcc 780

ttttgcggcg gagctatcat caacgagaag tggatcgtga ccgccgctca ctgtctgaag 840

ccaggcgata agatcgaggt ggtggctgga gagtacaaca tcgacaagaa ggaggatacc 900

gagcagagga gaaacgtgat ccgcacaatc ccccaccacc agtacaacgc caccatcaac 960

aagtactctc acgacatcgc tctgctggag ctggataagc ctctgatcct gaacagctac 1020

gtgacccccaa tctgcgtggc caaccgggag tacacaaaca tcttcctgaa gtttggctct 1080

ggatacgtga gcggctgggg aaaggtgttc aacaagggcc gccaggcctc catcctgcag 1140

tacctgaggg tgccactggt ggacagggct acctgtctgc tgtctaccac attcacaatc 1200

tacaacaaca tgttttgcgc cggctacagg gagggcggaa aggactcctg tgagggagat 1260

tctggaggac ctcacgtgac cgaggtggag ggcacctctt ttctgacagg catcatcagc 1320

tggggagagg agtgcgctat gaagggcaag tacggaatct acacaaaagt gagcagatac 1380

gtgaactgga tcaaggagaa gaccaagctg acaggaggag gaggcagcca ccaccaccac 1440

caccactga 1449

[0234]

<210> 404
<211> 4281
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 404
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatctacgt 180

agccatgctc tagaaggctc agaggcacac aggagtttct gggctcaccc tgccccttc 240

caacccctca gttcccatcc tccagcagct gtttgtgtgc tgcctctgaa gtccacactg 300

aacaaacttc agcctactca tgtccctaaa atgggcaaac attgcaagca gcaaacagca 360

aacacacagc cctccctgcc tgctgacctt ggagctgggg cagaggtcag agacctctct 420

gggcccatgc cacctccaac atccactcga ccccttggaa tttcggtgga gaggagcaga 480

ggttgtcctg gcgtggttta ggtagtgtga gaggggtacc cggggatctt gctaccagtg 540

gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca gctaagtggt actctcccag 600

agactgtctg actcacgcca ccccctccac cttggacaca ggacgctgtg gtttctgagc 660

caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg tacactgccc aggcaaagcg 720

tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg gacttagccc ctgtttgctc 780

ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca gcctcccccg ttgcccctct 840

ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc tcctcagctt caggcaccac 900

cactgacctg ggacagtgaa taccactttc acaatctgct agcaaaggtt atgcagaggg 960

tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg ggctacctgc 1020

tgtctgctga atgtacaggt ttgtttcctt ttttataata cattgagtat gcttgccttt 1080

tagatataga aatatctgat tctgtcttct tcactaaatt ttgattacat gatttgacag 1140

caatattgaa gagtctaaca gccagcaccc aggttggtaa gtactggttc tttgttagct 1200

[0235] aggttttctt cttcttcact tttaaaacta aatagatgga caatgcttat gatgcaataa 1260

ggtttaataa acactgttca gttcagtatt tggtcatgta attcctgtta aaaaacagtc 1320

atctccttgg tttaaaaaaa ttaaaagtgg gaaaacaaag aaatagcaga atatagtgaa 1380

aaaaaataac cacagtattt ttgtttggac ttaccacttt gaaatcaaat tgggaaacaa 1440

aagcacaaac agtggcctta tttacacaaa aagtctgatt ttaagatatg tgacaattca 1500

aggtttcaga agtatgtaag gaggtgtgtc tctaattttt taaattatat atcttcaatt 1560

taaagtttta gttaaaacat aaagattaac ctttcattag caagctgtta gttatcacca 1620

aagcttttca tggattagga aaaaatcatt ttgtctctat ctcaaacatc ttggagttga 1680

tatttgggga aacacaatac tcagttgagt tccctagggg agaaaagcaa gcttaagaat 1740

tgacacaaag agtaggaagt tagctattgc aacatatatc actttgtttt ttcacaacta 1800

cagtgacttt atttatttcc cagaggaagg catacaggga agaaattatc ccatttggac 1860

aaacagcatg ttctcacagt aagcacttat cacacttact tgtcaacttt ctagaatcaa 1920

atctagtagc tgacagtacc aggatcaggg gtgccaaccc taagcacccc cagaaagctg 1980

actggccctg tggttcccac tccagacatg atgtcagctg tgaaatccac ctccctggac 2040

cataattagg cttctgttct tcaggagaca tttgttcaaa gtcatttggg caaccatatt 2100

ctgaaaacag cccagccagg gtgatggatc actttgcaaa gatcctcaat gagctatttt 2160

caagtgatga caaagtgtga agttaagggc tcatttgaga actttctttt tcatccaaag 2220

taaattcaaa tatgattaga aatctgacct tttattactg gaattctctt gactaaaagt 2280

aaaattgaat tttaattcct aaatctccat gtgtatacag tactgtggga acatcacaga 2340

ttttggctcc atgccctaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta aaaacaaaga 2400

ctttcttaag agatgtaaaa ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac taaagaatta 2460

ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaatgcca acaaaattct gaatagacca 2520

aagaggtata actctggcaa gcttgaagag tttgtacagg ggaatctgga gagagagtgt 2580

atggaagaga agtgcagctt tgaggaagcc agagaagtgt ttgaaaatac agagagaaca 2640

actgaatttt ggaagcagta tgtggatggt gatcaatgtg agagcaatcc ctgcttgaat 2700

gggggggagct gtaaagatga tatcaacagc tatgaatgtt ggtgtccctt tggatttgag 2760

[0236]

gggaaaaact gtgagcttga tgtgacctgt aatatcaaga atggcaggtg tgagcaattt 2820

tgcaagaatt ctgctgataa caaagtggtc tgtagctgca ctgagggata taggctggct 2880

gaaaaccaga agagctgtga acctgcagtg ccttttccct gtgggagagt gtctgtgagc 2940

caaaccagca agctgactag ggctgaagca gtctttcctg atgtagatta tgtgaatagc 3000

actgaggctg agacaatcct tgacaatatc actcagagca cacagagctt caatgacttc 3060

accagggtgg taggagggga ggatgccaag cctgggcagt tcccctggca ggtagtgctc 3120

aatggaaaag tggatgcctt ttgtggaggt tcaattgtaa atgagaagtg gattgtgact 3180

gcagcccact gtgtggaaac tggagtcaag attactgtgg tggctggaga gcacaatatt 3240

gaggaaactg agcacactga gcagaagagg aatgtgatca ggattatccc ccaccacaac 3300

tacaatgctg ctatcaacaa gtacaaccat gacattgccc tcctggaact ggatgaaccc 3360

ctggtcttga acagctatgt gacacccatc tgtattgctg ataaagagta caccaacatc 3420

ttcttgaaat ttgggtctgg atatgtgtct ggctggggca gggtgttcca taaaggcagg 3480

tctgccctgg tattgcagta tttgagggtg cctctggtgg atagagcaac ctgcttgctg 3540

agcaccaagt ttacaatcta caacaatatg ttctgtgcag ggttccatga aggtggtaga 3600

gacagctgcc agggagattc tgggggtccc catgtgactg aggtggaggg aaccagcttc 3660

ctgactggga ttatcagctg gggtgaggag tgtgctatga agggaaagta tgggatctac 3720

acaaaagtat ccagatatgt gaactggatt aaggagaaaa ccaagctgac ttgatgaaag 3780

atggatttcc aaggttaatt cattggaatt gaaaattaac agagatctag agctgaattc 3840

ctgcagccag ggggatcagc ctctactgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc 3900

ccctcccct tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa 3960

aatgaggaaa ttgcatcaca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg 4020

gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg ggatgcagtg 4080

ggctctatgg tctagagcat ggctacgtag ataagtagca tggcgggtta atcattaact 4140

acacctgcag gaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc 4200

gctcactgag gccgggcgac caaaggtcgc ccgacgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 4260

[0237] gagcgcgcag ctgcctgcag g 4281

<210> 405
<211> 3245
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 405
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatcgcggc 180

cgcgggggag gctgctggtg aatattaacc aaggtcaccc cagttatcgg aggagcaaac 240

aggggctaag tccaccgggg gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat 300

cggaggagca aacaggggct aagtccaccg ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg 360

tcaccccagt tatcggagga gcaaacaggg gctaagtcca cggtacccac tgggaggatg 420

ttgagtaaga tggaaaacta ctgatgaccc ttgcagagac agagtattag gacatgtttg 480

aacaggggcc gggcgatcag caggtagctc tagaggatcc ccgtctgtct gcacatttcg 540

tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac 600

ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg 660

cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc 720

cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg 780

ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttgggtt 840

taaacgccgc caccatgcaa agagtgaaca tgatcatggc tgaatcccct ggacttatta 900

ccatctgcct tttgggttac ctcctgagtg ctgagtgcac agtgttcctg gaccatgaga 960

atgccaacaa gatcctgaac aggcccaaga gatacaactc aggaaagctg gaagaatttg 1020

tgcaggggaa cctggagagg gaatgcatgg aagagaagtg cagctttgaa gaagccaggg 1080

aagtctttga gaacactgag agaaccactg agttctggaa gcaatatgtg gatggggacc 1140

[0238] agtgtgaatc caacccttgc ctcaatggtg gcagctgcaa ggatgacatt aacagctatg 1200

agtgctggtg ccccctttgga tttgagggaa agaactgtga acttgatgtg acatgcaaca 1260

tcaagaatgg cagatgtgaa cagttctgca agaactctgc tgacaacaaa gtggtctgca 1320

gctgcactga aggctacagg ctggcagaga accagaagtc ctgtgaacca gcagtcccat 1380

tcccctgtgg aagagtgtca gtctcccaaa cctccaagct gaccagggct gaggcagtgt 1440

tccctgatgt ggactatgtg aactccactg aggcagaaac catcctggac aacatcaccc 1500

agtccaccca gtccttcaat gacttcacca gagtagtggg aggggaagat gccaagcctg 1560

gacagttccc ttggcaagtt gtgctcaatg gcaaagtgga tgccttctgt gggggctcca 1620

ttgtcaatga gaagtggatt gtgactgcag cccactgtgt ggagactggt gtcaagatca 1680

ctgtggtggc tggggagcac aacattgaag agactgagca cactgagcag aagagaaatg 1740

tcatcagaat catcccccac cacaactaca atgcagccat caacaagtac aaccatgaca 1800

ttgccctcct ggaactggat gagccactgg tgctgaactc ctatgtgacc cccatctgca 1860

ttgctgacaa ggagtacacc aacatattcc tcaagtttgg ctcaggatat gtgtcaggct 1920

ggggcagagt gttccacaag ggaagatctg ccctggtgct gcagtacttg agggtccccc 1980

tggtggacag ggccacttgc ctgctgagca ccaagttcac catctacaac aacatgttct 2040

gtgctggttt ccatgagggt ggaagggaca gctgccaggg agactcaggg ggccctcatg 2100

tcactgaagt ggaaggcacc tccttcctca ctggcatcat ctcctgggga gaagagtgtg 2160

ccatgaaggg aaaatatgga atctacacca aagtgtccag atatgtgaac tggattaagg 2220

aaaagaccaa gctcacctaa ttaattaaga gcatcttacc gccatttatt cccatatttg 2280

ttctgttttt cttgatttgg gtatacattt aaatgttaat aaaacaaaat ggtggggcaa 2340

tcatttacat ttttagggat atgtaattac tagttcaggt gtattgccac aagacaaaca 2400

tgttaagaaa ctttcccgtt atttacgctc tgttcctgtt aatcaacctc tggattacaa 2460

aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tgtgtggata 2520

tgctgcttta tagcctctgt atctagctat tgcttcccgt acggctttcg ttttctcctc 2580

cttgtataaa tcctggttgc tgtctctttt agaggagttg tggcccgttg tccgtcaacg 2640

tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact ggctggggca ttgccaccac 2700

[0239]

ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccctcccg atcgccacgg cagaactcat 2760

cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg ctgggcactg ataattccgt 2820

ggtgttgtct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 2880

cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2940

gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 3000

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggctctaga 3060

gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacacct gcaggaggaa 3120

cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 3180

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct 3240

gcagg 3245

<210> 406
<211> 3245
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 406

[0240]

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatcgcggc 180

cgcgggggag gctgctggtg aatattaacc aaggtcaccc cagttatcgg aggagcaaac 240

aggggctaag tccaccgggg gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat 300

cggaggagca aacaggggct aagtccaccg ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg 360

tcaccccagt tatcggagga gcaaacaggg gctaagtcca cggtacccac tgggaggatg 420

ttgagtaaga tggaaaacta ctgatgaccc ttgcagagac agagtattag gacatgtttg 480

aacaggggcc gggcgatcag caggtagctc tagaggatcc ccgtctgtct gcacatttcg 540

tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac 600

ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg 660

cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc 720

cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg 780

ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttgggtt 840

taaacgccgc caccatgcag agagtgaaca tgatcatggc agaatcccca ggcctcatca 900

ccatctgcct cctgggatac ctcctgagtg ctgagtgcac agtgttcctt gaccatgaaa 960

atgccaacaa gatcctcaac cgccctaagc ggtacaactc tggcaaactg gaggagtttg 1020

tgcagggcaa cctggaaaga gaatgcatgg aggaaaagtg ctcctttgag gaggccaggg 1080

aagtgtttga aaacactgag agaaccactg aattctggaa gcagtatgtg gatggggacc 1140

agtgtgaatc caacccctgc ctcaatggag gatcctgcaa agatgacatc aactcctatg 1200

agtgctggtg ccccttggc tttgagggga agaactgtga actggatgtc acttgcaaca 1260

ttaagaatgg tcgctgtgaa cagttctgca agaactcagc agacaacaag gtggtctgct 1320

cctgcactga gggatacagg ctggcagaaa accaaaagtc ctgtgaaccg gctgtccctt 1380

tcccctgtgg gagagtctca gtgtcccaaa cctccaagct caccagagca gaagctgtgt 1440

tccctgatgt ggactacgtg aacagcactg aggcagagac tattcttgac aacatcaccc 1500

agagcaccca gagcttcaat gacttcacca gagttgtggg gggagaggat gccaagccag 1560

gccaattccc ttggcaagtg gtgctgaatg gaaaagtgga tgccttctgt ggtggtagca 1620

ttgtcaatga gaagtggatt gtcacagctg cccactgtgt ggaaactgga gtgaagatca 1680

cagtggtggc tggggaacac aacatagagg aaactgaaca cactgaacag aagcggaatg 1740

tgatcagaat cattccacac cacaactaca atgctgccat taacaagtac aaccatgaca 1800

ttgccctgct tgagctggat gaacctctgg tgctgaactc ctatgtcacc cccatttgca 1860

ttgcggacaa ggagtacacc aacatcttcc tgaagtttgg ctcaggctat gtgtcgggtt 1920

ggggaagggt ctttcacaag ggccggtctg ccctggtgct gcagtacttg agggtgcccc 1980

tggtggacag ggccacctgt ttgctgagca ccaagttcac catctacaac aacatgttct 2040

gtgcgggctt ccatgaggga ggccgggaca gctgccaggg agactcaggg ggtccccatg 2100

[0241] tcactgaagt agagggaacc agcttcctga ctggaatcat ctcctgggga gaagagtgtg 2160

ccatgaaggg aaaatacgga atctacacca aggtgtcccg ctatgtcaac tggatcaagg 2220

aaaagaccaa actcacctaa ttaattaaga gcatcttacc gccatttatt cccatatttg 2280

ttctgttttt cttgatttgg gtatacattt aaatgttaat aaaacaaaat ggtggggcaa 2340

tcatttacat ttttagggat atgtaattac tagttcaggt gtattgccac aagacaaaca 2400

tgttaagaaa ctttcccgtt atttacgctc tgttcctgtt aatcaacctc tggattacaa 2460

aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tgtgtggata 2520

tgctgcttta tagcctctgt atctagctat tgcttcccgt acggctttcg ttttctcctc 2580

cttgtataaa tcctggttgc tgtctctttt agaggagttg tggcccgttg tccgtcaacg 2640

tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact ggctggggca ttgccaccac 2700

ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccctcccg atcgccacgg cagaactcat 2760

cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg ctgggcactg ataattccgt 2820

ggtgttgtct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 2880

cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2940

gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 3000

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggctctaga 3060

gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacacct gcaggaggaa 3120

cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 3180

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct 3240

gcagg 3245

<210> 407
<211> 3245
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

[0242]

<400> 407
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatcgcggc 180

cgcgggggag gctgctggtg aatattaacc aaggtcaccc cagttatcgg aggagcaaac 240

aggggctaag tccaccgggg gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat 300

cggaggagca aacaggggct aagtccaccg ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg 360

tcaccccagt tatcggagga gcaaacaggg gctaagtcca cggtacccac tgggaggatg 420

ttgagtaaga tggaaaacta ctgatgaccc ttgcagagac agagtattag gacatgtttg 480

aacaggggcc gggcgatcag caggtagctc tagaggatcc ccgtctgtct gcacatttcg 540

tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac 600

ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg 660

cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc 720

cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg 780

ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttgggtt 840

taaacgccgc caccatgcaa agagtcaaca tgatcatggc agaatcccca ggactgatca 900

ccatttgcct tctgggctac ttgctgtcag cagaatgcac tgtgttcctg gaccatgaaa 960

atgccaacaa gatcctgaac aggcccaaga ggtacaactc aggaaagctg gaggagtttg 1020

tccagggcaa ccttgagaga gagtgcatgg aggaaaagtg ctcctttgag gaggccaggg 1080

aggtctttga aaacacagaa aggaccactg aattctggaa gcagtatgtg gatggggacc 1140

agtgtgaatc caacccttgc ctcaatggag gctcctgcaa ggatgacatc aactcctatg 1200

aatgctggtg ccccttggt tttgagggga agaactgtga actggatgtg acctgtaaca 1260

taaagaatgg cagatgtgaa cagttctgca agaactcagc agacaacaag gttgtgtgct 1320

cctgcactga gggttacagg ctggcagaaa accagaaaag ctgtgaacca gctgtcccct 1380

tcccctgtgg tagagtcagt gtgtcccaga cctccaagct caccagagct gaagctgtgt 1440

tccctgatgt ggactatgtg aactccactg aagctgagac tatcctggac aacatcaccc 1500

agtccaccca aagcttcaat gacttcacca gggtagtggg aggggaggat gccaagcctg 1560

[0243]

gacagttccc ttggcaagtg gtgctcaatg gcaaagtgga tgccttctgt gggggcagca 1620

ttgtgaatga gaagtggatt gtcactgctg cccactgtgt ggaaactgga gtgaagatca 1680

ctgtggtggc aggagaacac aacattgagg aaacagagca cactgagcaa aagagaaatg 1740

tcatcagaat cattcctcac cacaactaca atgcagccat taacaagtac aaccatgaca 1800

ttgccctgct ggaactggat gaacccctg tgctgaacag ctatgtgacc cctatttgca 1860

ttgctgacaa ggagtacacc aacatcttcc tgaagtttgg ttctggctat gtgtcaggct 1920

ggggaagggt gttccacaag ggaagatctg ccttggtgct gcagtacctc agagtgcccc 1980

tggtggacag ggccacctgt ctcttgagca ccaagttcac catctacaac aacatgttct 2040

gtgctggctt ccatgaggga ggcagagaca gctgccaggg ggactcagga ggaccacatg 2100

tcactgaagt ggagggtacc agcttcctca ctggcatcat ctcctgggga gaagagtgtg 2160

ccatgaaggg gaaatatgga atctacacca aagtgtccag atatgtcaac tggatcaagg 2220

agaaaaccaa gctgacctaa ttaattaaga gcatcttacc gccatttatt cccatatttg 2280

ttctgttttt cttgatttgg gtatacattt aaatgttaat aaaacaaaat ggtggggcaa 2340

[0244]

tcatttacat ttttagggat atgtaattac tagttcaggt gtattgccac aagacaaaca 2400

tgttaagaaa ctttcccgtt atttacgctc tgttcctgtt aatcaacctc tggattacaa 2460

aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tgtgtggata 2520

tgctgcttta tagcctctgt atctagctat tgcttcccgt acggctttcg ttttctcctc 2580

cttgtataaa tcctggttgc tgtctctttt agaggagttg tggcccgttg tccgtcaacg 2640

tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact ggctggggca ttgccaccac 2700

ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccctcccg atcgccacgg cagaactcat 2760

cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg ctgggcactg ataattccgt 2820

ggtgttgtct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt gtcccctccc ccgtgccttc 2880

cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2940

gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 3000

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggctctaga 3060

gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacacct gcaggaggaa 3120

cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 3180

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct 3240

gcagg 3245

<210> 408
<211> 3245
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 408
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac tagggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatcgcggc 180

cgcgggggag gctgctggtg aatattaacc aaggtcaccc cagttatcgg aggagcaaac 240

aggggctaag tccaccgggg gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat 300

cggaggagca aacaggggct aagtccaccg ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg 360

tcaccccagt tatcggagga gcaaacaggg gctaagtcca cggtacccac tgggaggatg 420

ttgagtaaga tggaaaacta ctgatgaccc ttgcagagac agagtattag gacatgtttg 480

aacaggggcc gggcgatcag caggtagctc tagaggatcc ccgtctgtct gcacatttcg 540

tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac 600

ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg 660

cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc 720

cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg 780

ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttgggtt 840

taaacgccgc caccatgcag agagttaaca tgatcatggc tgaatcccct ggcctcatca 900

ccatttgcct cctgggttac ttgctgtcag cagagtgcac agtgttcttg gaccatgaaa 960

[0245] atgccaacaa gattctgaac agacccaaga gatacaactc tggaaagctt gaagagtttg 1020

tgcaggggaa cctggagaga gagtgcatgg aagagaagtg cagctttgaa gaagccagag 1080

aagtgtttga gaacactgag aggaccactg agttctggaa gcaatatgtg gatggggacc 1140

agtgtgaatc caacccttgc ctcaatggtg gcagctgcaa ggatgacatc aactcctatg 1200

agtgctggtg ccccttggc tttgagggaa agaactgtga acttgatgtc acatgcaaca 1260

tcaagaatgg cagatgtgaa cagttctgca agaactcagc tgacaacaaa gtggtctgca 1320

gctgcactga aggctacagg ctggcagaga accagaagtc ctgtgaacca gcagtgcctt 1380

tcccatgtgg aagggtgtca gtctcccaaa ccagcaagct gaccagagca gaagctgtgt 1440

tccctgatgt ggactatgtg aactccactg aagctgaaac cattctggac aacatcaccc 1500

agtccaccca gtccttcaat gacttcacca gggtagtggg aggggaagat gccaagccag 1560

gacagttccc ttggcaagtg gtgctcaatg ggaaagtgga tgccttctgt ggtggcagca 1620

tagtcaatga gaagtggatt gtgactgcag cccactgtgt ggagactgga gtgaagatca 1680

ctgtggtggc tggggaacac aacattgaag agactgagca cactgagcag aagaggaatg 1740

tcatcaggat catcccccac cacaactaca atgcagccat caacaagtac aaccatgaca 1800

ttgccctcct ggagcttgat gagcccctgg tcctgaactc ctatgtgacc cccatctgca 1860

ttgctgacaa ggagtacacc aacatcttcc tgaagtttgg ctcaggctat gtctctggct 1920

gggggagagt gttccacaag ggtagaagtg ccctggtgct gcaatacctg agggtccctc 1980

tggtggacag agccacttgc ctcctgtcca ccaagttcac catctacaac aacatgttct 2040

gtgctggatt ccatgagggt ggaagggaca gctgccaggg agactcagga ggaccccatg 2100

tcactgaagt ggaaggaacc tccttcctca ctggcatcat ctcctgggga gaagagtgtg 2160

ccatgaaggg aaaatatggc atctacacca aagtgtccag atatgtgaac tggattaagg 2220

aaaagaccaa gctgacctaa ttaattaaga gcatcttacc gccatttatt cccatatttg 2280

ttctgttttt cttgatttgg gtatacattt aaatgttaat aaaacaaaat ggtggggcaa 2340

tcatttacat ttttagggat atgtaattac tagttcaggt gtattgccac aagacaaaca 2400

tgttaagaaa ctttcccgtt atttacgctc tgttcctgtt aatcaacctc tggattacaa 2460

aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tgtgtggata 2520

[0246]

tgctgcttta tagcctctgt atctagctat tgcttcccgt acggctttcg ttttctcctc 2580

cttgtataaa tcctggttgc tgtctctttt agaggagttg tggcccgttg tccgtcaacg 2640

tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact ggctggggca ttgccaccac 2700

ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccctcccg atcgccacgg cagaactcat 2760

cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg ctgggcactg ataattccgt 2820

ggtgttgtct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 2880

cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2940

gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 3000

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggctctaga 3060

gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacacct gcaggaggaa 3120

cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 3180

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct 3240

gcagg 3245

<210> 409
<211> 3245
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 409
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatcgcggc 180

cgcgggggag gctgctggtg aatattaacc aaggtcaccc cagttatcgg aggagcaaac 240

aggggctaag tccaccgggg gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat 300

cggaggagca aacaggggct aagtccaccg ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg 360

tcaccccagt tatcggagga gcaaacaggg gctaagtcca cggtacccac tgggaggatg 420

[0247] ttgagtaaga tggaaaacta ctgatgaccc ttgcagagac agagtattag gacatgtttg 480

aacaggggcc gggcgatcag caggtagctc tagaggatcc ccgtctgtct gcacatttcg 540

tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac 600

ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg 660

cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc 720

cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg 780

ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttgggtt 840

taaacgccgc caccatgcaa agagtgaaca tgattatggc tgaaagccct ggactcatta 900

ccatctgcct ccttggatac ttgctgtcag cagagtgcac agtgttcctg gaccatgaga 960

atgccaacaa gatcctgaac aggcctaaga gatacaactc aggaaagctg gaagagtttg 1020

tccagggaaa cctggagagg gaatgcatgg aagagaagtg cagctttgaa gaagccaggg 1080

aagtgtttga gaacactgag aggaccacag agttctggaa gcaatatgtg gatggggacc 1140

agtgtgaatc caacccctgc ctcaatggtg gcagctgcaa ggatgacatc aactcctatg 1200

agtgctggtg ccccttggg tttgagggaa agaactgtga acttgatgtg acctgtaaca 1260

tcaagaatgg cagatgtgaa cagttctgca agaactcagc tgacaacaaa gtggtctgca 1320

gctgcactga aggctacaga ctggctgaga accagaagtc ctgtgaacca gcagtgccct 1380

tcccttgtgg gagagtgtca gtcagccaaa cctccaagct gaccagggca gaggcagtgt 1440

tccctgatgt ggactatgtc aactccactg aagcagaaac catcctggac aacatcaccc 1500

agtccaccca gtccttcaat gacttcacca gagtggttgg aggggaagat gccaagcctg 1560

gccagttccc ttggcaagtg gtgctcaatg gcaaagtgga tgccttctgt ggtggctcca 1620

ttgtgaatga gaagtggatt gtcactgctg cccactgtgt ggagactggt gtcaagatca 1680

ctgtggtagc aggggagcac aacattgaag agactgaaca cactgagcag aagagaaatg 1740

tcatcaggat catcccccac cacaactaca atgctgccat caacaagtac aaccatgaca 1800

ttgccctctt ggaactggat gagccactgg tgctgaactc ctatgtcacc cccatctgca 1860

ttgctgacaa ggagtacacc aacatcttcc tgaagtttgg ctctggatat gtgtcaggct 1920

[0248] ggggaagggt gttccacaag ggtagaagtg ccctggtgct gcagtacctg agagtgcccc 1980

tggtggacag ggccacttgc cttctgtcca ccaagttcac catatacaac aacatgttct 2040

gtgctggctt ccatgaggga ggcagagaca gctgccaggg agactctggt ggaccacatg 2100

tcactgaagt ggaagggacc tccttcctca ctggcatcat ttcctgggga gaagagtgtg 2160

ccatgaaggg aaaatatgga atctacacca aagtgtccag atatgtgaac tggatcaagg 2220

aaaagaccaa gctcacctaa ttaattaaga gcatcttacc gccatttatt cccatatttg 2280

ttctgttttt cttgatttgg gtatacattt aaatgttaat aaaacaaaat ggtggggcaa 2340

tcatttacat ttttagggat atgtaattac tagttcaggt gtattgccac aagacaaaca 2400

tgttaagaaa ctttcccgtt atttacgctc tgttcctgtt aatcaacctc tggattacaa 2460

aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tgtgtggata 2520

tgctgcttta tagcctctgt atctagctat tgcttcccgt acggctttcg ttttctcctc 2580

cttgtataaa tcctggttgc tgtctctttt agaggagttg tggcccgttg tccgtcaacg 2640

tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact ggctggggca ttgccaccac 2700

ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccctcccg atcgccacgg cagaactcat 2760

cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg ctgggcactg ataattccgt 2820

ggtgttgtct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 2880

cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2940

gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 3000

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggctctaga 3060

gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacacct gcaggaggaa 3120

cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 3180

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct 3240

gcagg 3245

[0249]

<210> 410
<211> 3245
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /附注=“人工序列的描述：合成多核苷酸”

<400> 410
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaaccc gccatgctac ttatcgcggc 180

cgcgggggag gctgctggtg aatattaacc aaggtcaccc cagttatcgg aggagcaaac 240

aggggctaag tccaccgggg gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat 300

cggaggagca aacaggggct aagtccaccg ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg 360

tcaccccagt tatcggagga gcaaacaggg gctaagtcca cggtacccac tgggaggatg 420

ttgagtaaga tggaaaacta ctgatgaccc ttgcagagac agagtattag gacatgtttg 480

aacaggggcc gggcgatcag caggtagctc tagaggatcc ccgtctgtct gcacatttcg 540

tagagcgagt gttccgatac tctaatctcc ctaggcaagg ttcatatttg tgtaggttac 600

ttattctcct tttgttgact aagtcaataa tcagaatcag caggtttgga gtcagcttgg 660

cagggatcag cagcctgggt tggaaggagg gggtataaaa gccccttcac caggagaagc 720

cgtcacacag atccacaagc tcctgaagag gtaagggttt aagggatggt tggttggtgg 780

ggtattaatg tttaattacc tggagcacct gcctgaaatc actttttttc aggttgggtt 840

taaacgccgc caccatgcaa agagtgaaca tgattatggc agaatcccct ggactgatta 900

ccatttgcct tcttggatac ctcctgagtg ctgagtgcac agtgttcctg gaccatgaga 960

atgccaacaa gatcctgaac aggcccaaga gatacaactc tggaaagctg gaagagtttg 1020

tgcaggggaa cctggagaga gagtgcatgg aagagaagtg cagctttgag gaagccagag 1080

aagtctttga aaacactgag aggaccactg agttctggaa gcaatatgtg gatggggacc 1140

agtgtgaatc caacccctgc cttaatggag gcagctgcaa ggatgacatc aactcctatg 1200

agtgctggtg ccccttgga tttgagggaa agaactgtga actggatgtc acttgcaaca 1260

tcaagaatgg cagatgtgaa cagttctgca agaactcagc tgacaacaaa gtggtctgca 1320

gctgcactga aggctacagg ctggcagaaa accagaagtc ctgtgagcct gcagtgcctt 1380

[0250]

tcccatgtgg tagagtgtca gtcagccaga cctccaagct caccagggca gaggcagtgt 1440

tccctgatgt ggactatgtg aactccactg aagctgaaac catcctggac aacatcaccc 1500

agtccaccca gtccttcaat gacttcacca gagtagtggg aggggaagat gccaagccag 1560

ggcagttccc ttggcaagtg gtcctcaatg ggaaagtgga tgccttctgt ggtggctcca 1620

ttgtgaatga gaagtggatt gtgactgctg cccactgtgt ggagactgga gtgaagatca 1680

cagtggtggc aggagagcac aacattgaag aaactgagca cactgaacag aagagaaatg 1740

tcatcaggat catcccccac cacaactaca atgctgccat aaacaagtac aaccatgaca 1800

ttgccctcct ggaattggat gagccactgg tgctcaacag ctatgtgacc cccatctgca 1860

ttgctgacaa ggagtacacc aacatcttcc tgaagtttgg ctcaggctat gtgtctggct 1920

ggggtagagt gttccacaag ggcagatcag ccctggtgct ccaatacttg agggtccccc 1980

tggtggacag ggccacttgc ctgctgtcca ccaagttcac catctacaac aacatgttct 2040

gtgctggctt ccatgagggt ggaagggaca gctgccaggg agactcaggg ggacctcatg 2100

tcactgaagt ggaaggcacc tccttcctca ctggtatcat ctcctgggga gaagagtgtg 2160

ccatgaaggg aaaatatggc atctacacca aagtgtccag atatgtcaac tggatcaagg 2220

aaaagaccaa gctgacctaa ttaattaaga gcatcttacc gccatttatt cccatatttg 2280

ttctgttttt cttgatttgg gtatacattt aaatgttaat aaaacaaaat ggtggggcaa 2340

tcatttacat ttttagggat atgtaattac tagttcaggt gtattgccac aagacaaaca 2400

tgttaagaaa ctttcccgtt atttacgctc tgttcctgtt aatcaacctc tggattacaa 2460

aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tgtgtggata 2520

tgctgcttta tagcctctgt atctagctat tgcttcccgt acggctttcg ttttctcctc 2580

cttgtataaa tcctggttgc tgtctctttt agaggagttg tggcccgttg tccgtcaacg 2640

tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact ggctggggca ttgccaccac 2700

[0251] ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccctcccg atcgccacgg cagaactcat 2760

cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg ctgggcactg ataattccgt 2820

ggtgttgtct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 2880

cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2940

gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 3000

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggctctaga 3060

gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt aactacacct gcaggaggaa 3120

cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 3180

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct 3240

gcagg 3245

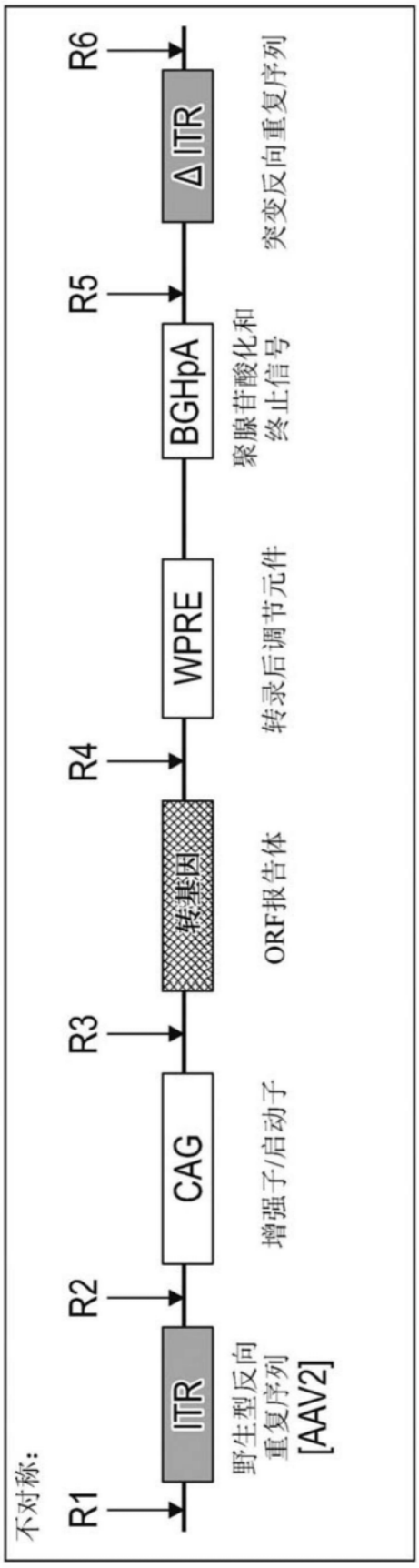

不对称:
R1
ITR
野生型反向重复序列[AAV2]
R2
CAG
增强子/启动子
R3
转基因
ORF报告体
R4
WPRE
转录后调节元件
R5
BGHpA
聚腺苷酸化和终止信号
R6
Δ ITR
突变反向重复序列

图1A

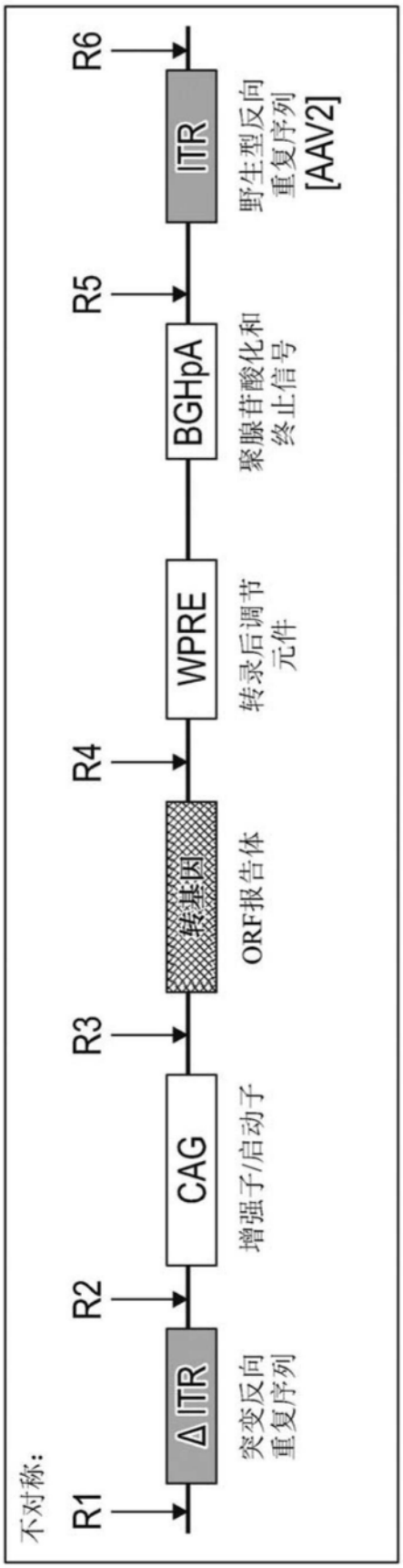

不对称:
R1
ΔITR
突变反向
重复序列
R2
CAG
增强子/启动子
R3
转基因
ORF报告体
R4
WPRE
转录后调节
元件
R5
BGHpA
聚腺苷酸化和
终止信号
R6
ITR
野生型反向
重复序列
[AAV2]

图1B

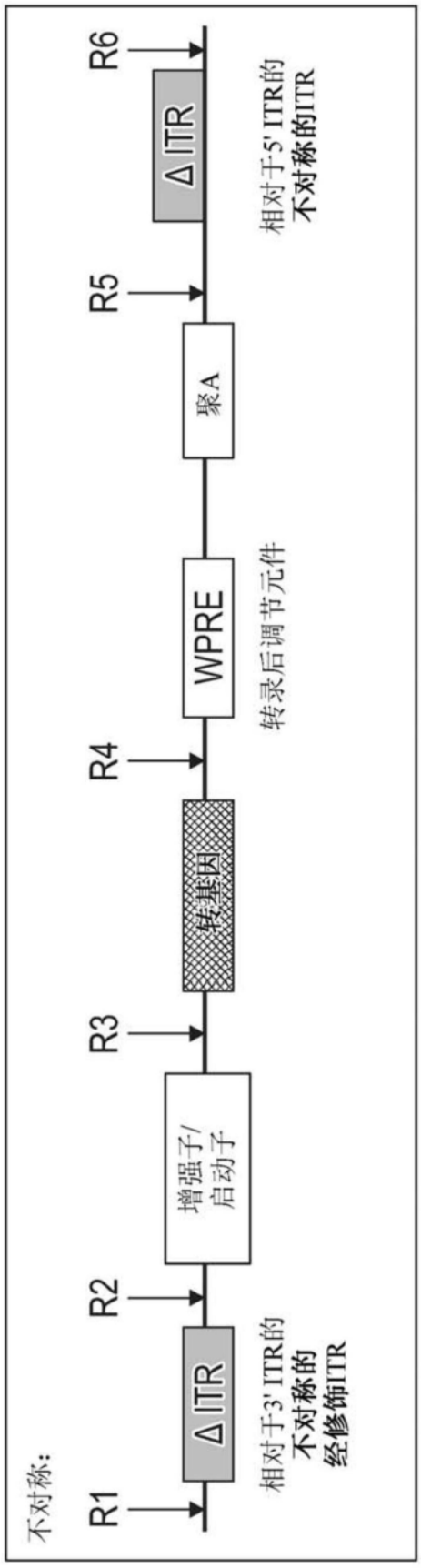

不对称：
R1
ΔITR
相对于3' ITR的
不对称的
经修饰ITR
R2
增强子/
启动子
R3
转基因
R4
WPRE
转录后调节元件
R5
聚A
R6
ΔITR
相对于5' ITR的
不对称的ITR

图1C

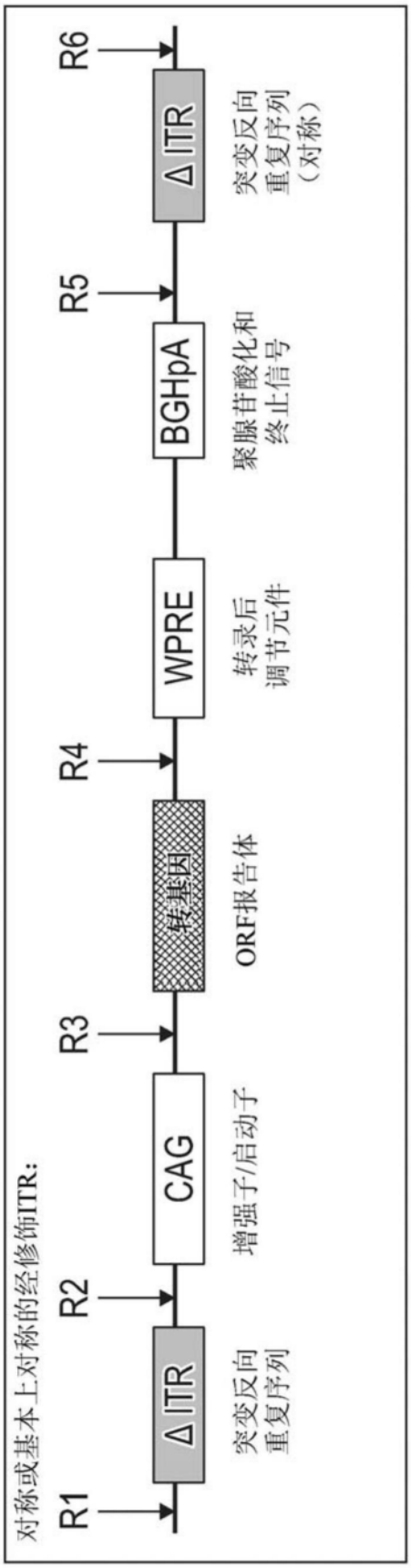

对称或基本上对称的经修饰ITR:
R1
R2
R3
R4
R5
R6
ΔITR
CAG
转基因
WPRE
BGHpA
ΔITR
突变反向重复序列
增强子/启动子
ORF报告体
转录后调节元件
聚腺苷酸化和终止信号
突变反向重复序列（对称）

图1D

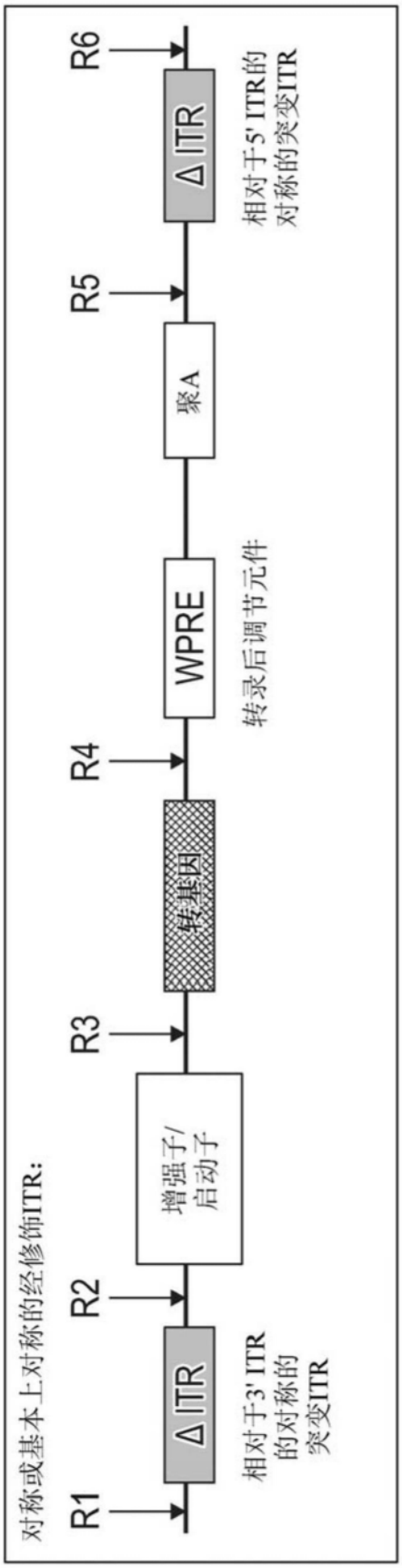

对称或基本上对称的经修饰ITR:
R1
ΔITR
相对于3' ITR
的对称的
突变ITR
R2
增强子/
启动子
R3
转基因
R4
WPRE
转录后调节元件
R5
聚A
R6
ΔITR
相对于5' ITR的
对称的突变ITR

图1E

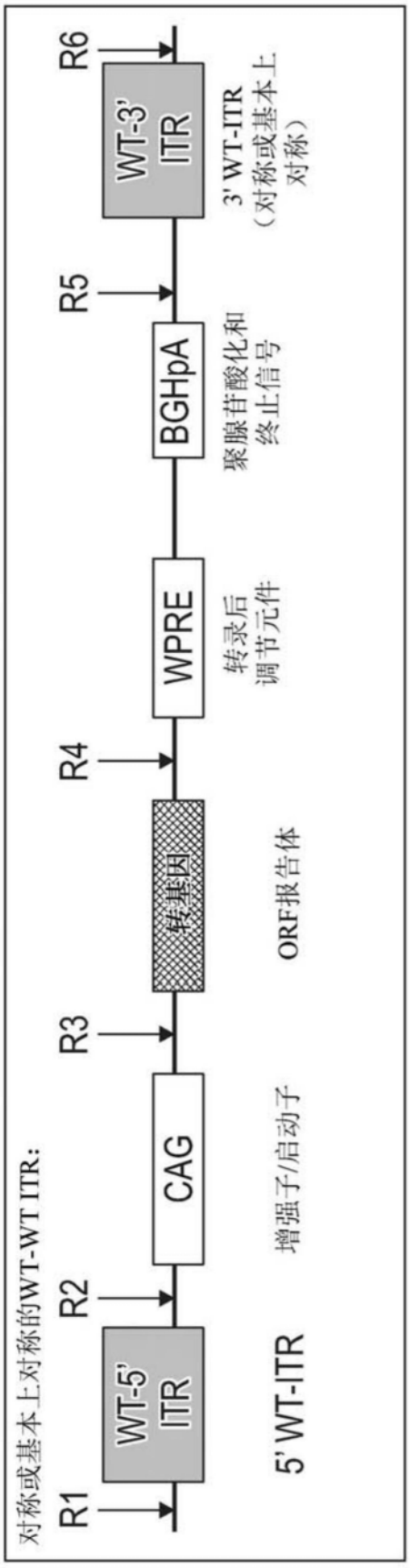

对称或基本上对称的WT-WT ITR:
R1
WT-5' ITR
R2
CAG
R3
转基因
R4
WPRE
R5
BGHpA
R6
WT-3' ITR
5' WT-ITR
增强子/启动子
ORF报告体
转录后调节元件
聚腺苷酸化和终止信号
3' WT-ITR (对称或基本上对称)

图1F

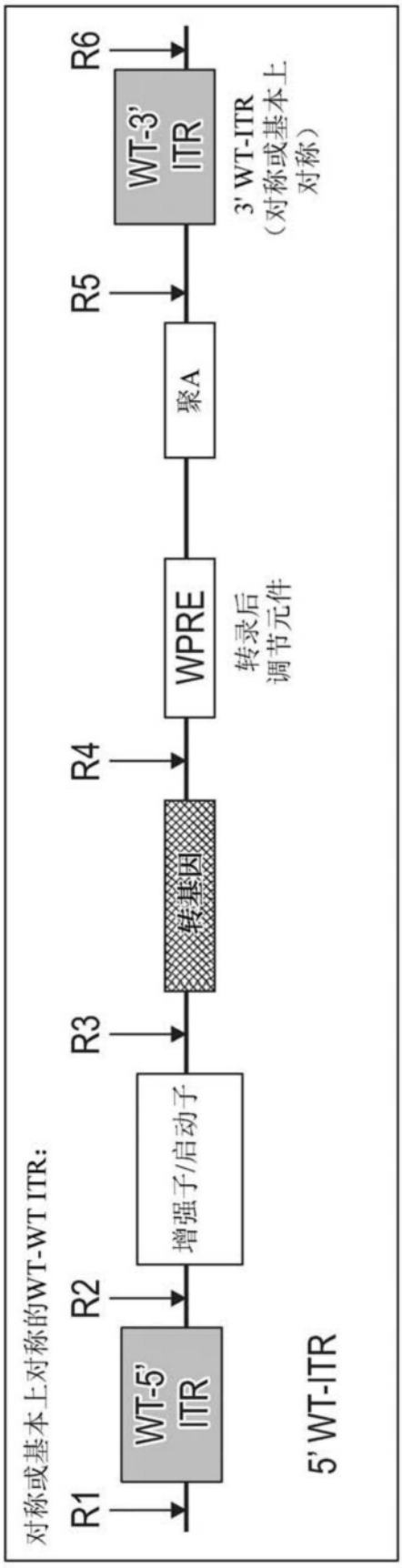

对称或基本上对称的WT-WT ITR:
R1
WT-5' ITR
R2
增强子/启动子
R3
转基因
R4
WPRE
转录后调节元件
R5
聚A
R6
WT-3' ITR
3' WT-ITR（对称或基本上对称）
5' WT-ITR

图1G

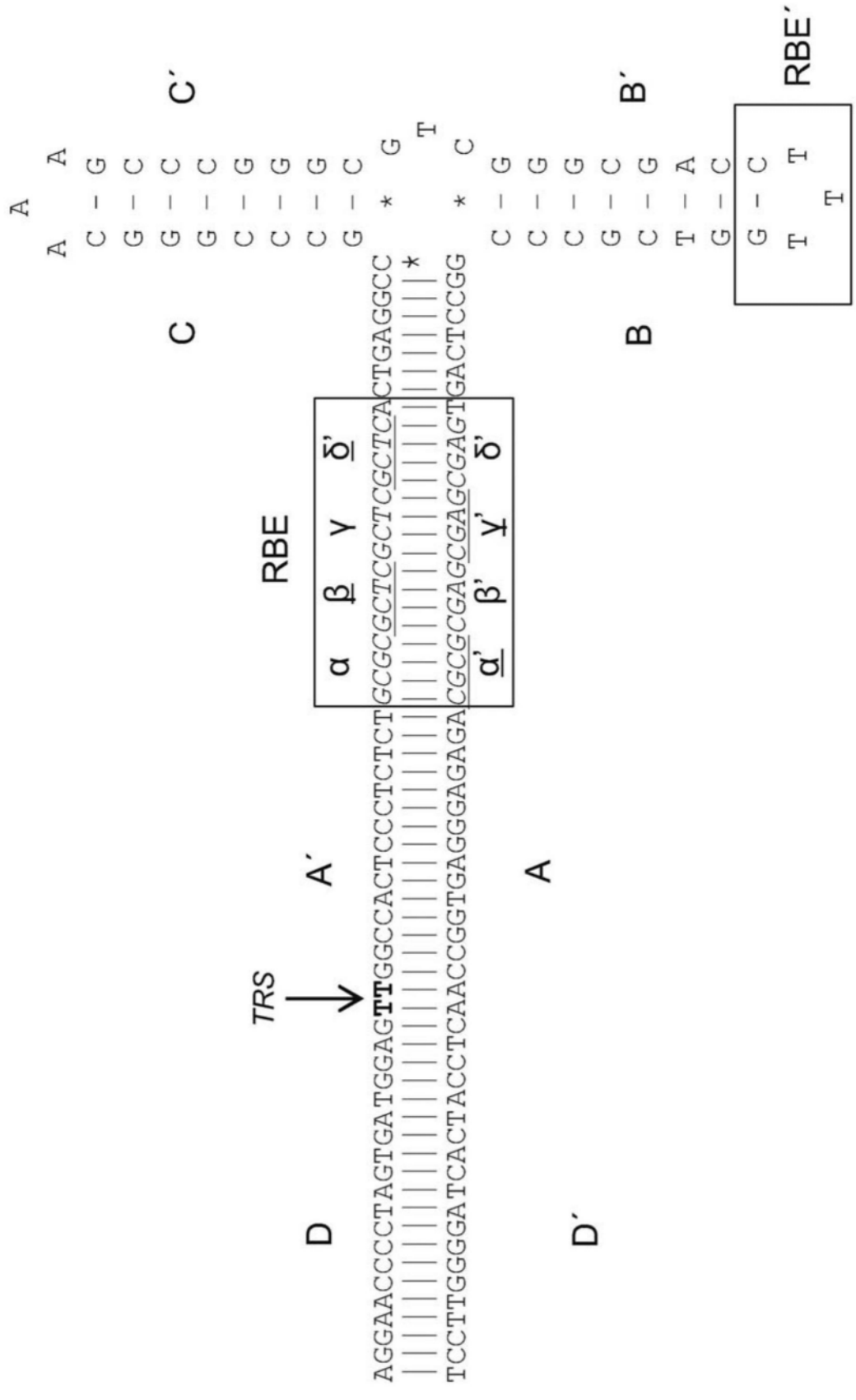

TRS
RBE
RBE′
A′
A
B
B′
C
C′
D
D′
α β γ δ′
α′ β′ γ′ δ′
AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC
TCCTTGGGGATCACTACCTCAACCGGTGAGGGAGAGACGCGAGCGAGCGAGTGACTCCGG

图2A

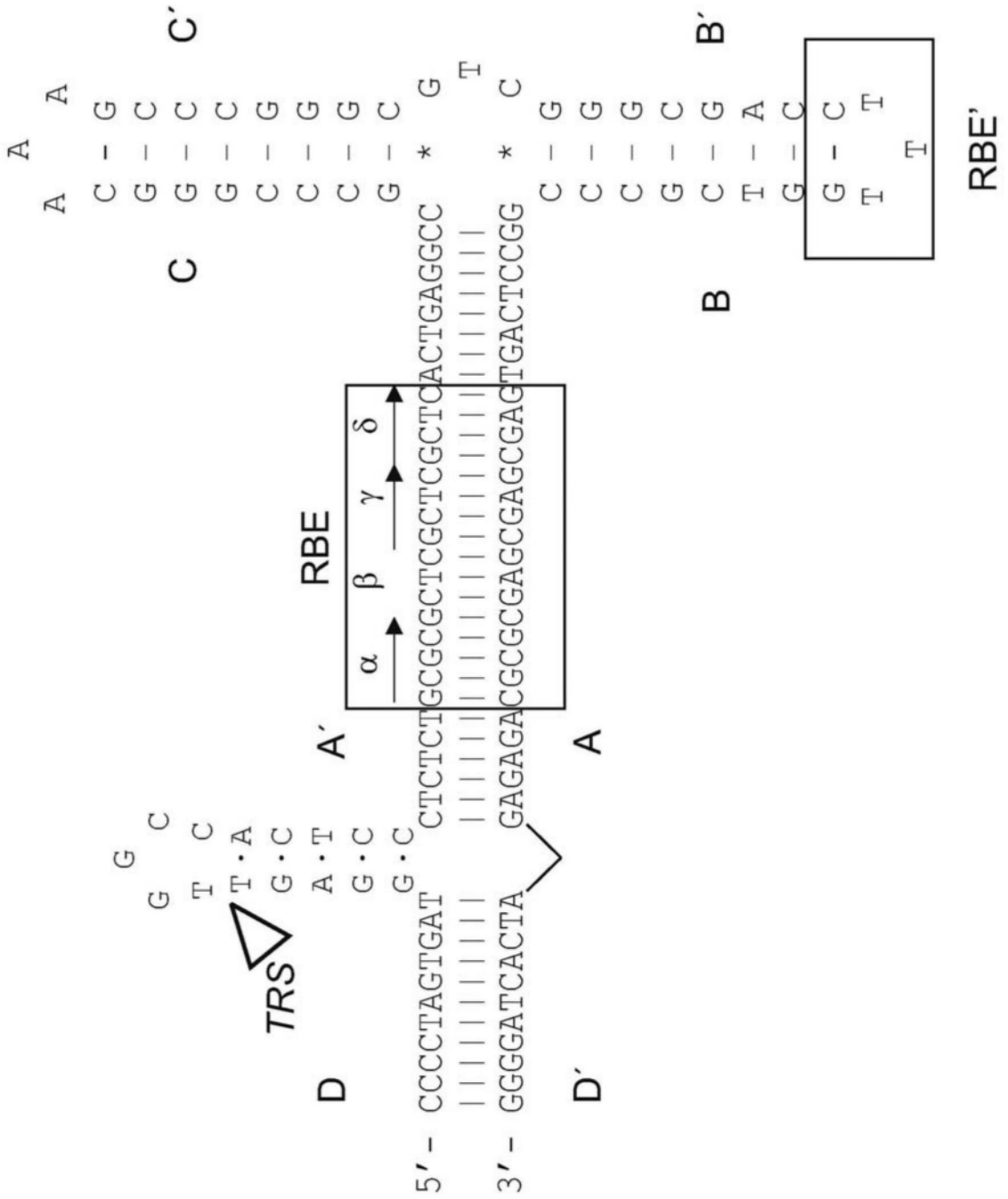

C′
C
B′
B
RBE′
RBE
A′
A
D
D′
TRS
α
β
γ
δ
5′- CCCCTAGTGAT
3′- GGGGATCACTA
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGACTGAGGCC
GAGAGACGCGCGAGCGAGCTGACTCCGG

图2B

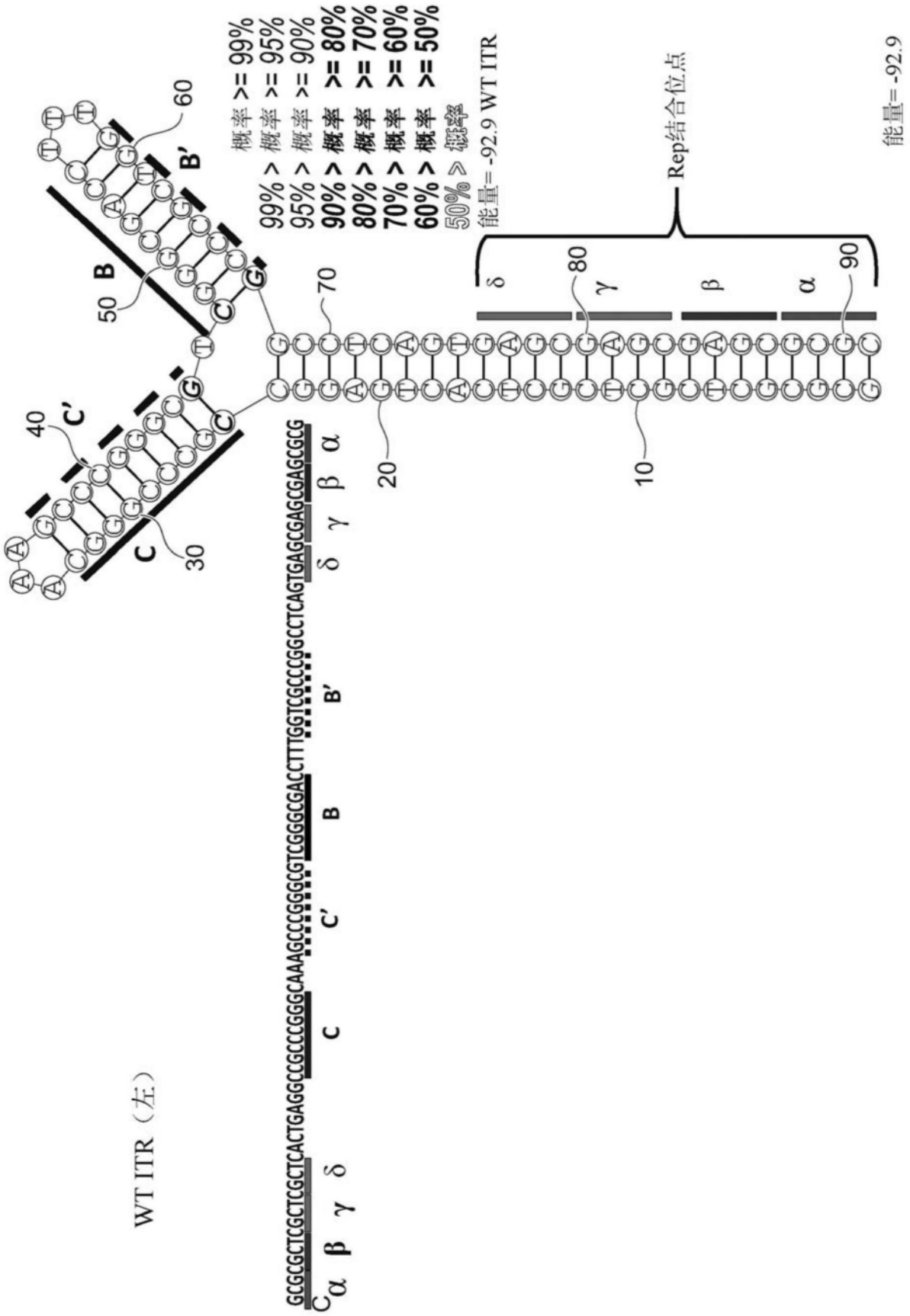

WT ITR（左）
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
C α β γ δ
C
C'
B
B'
δ γ β α
20
70
10
80
90
δ
γ
β
α
Rep结合位点
能量= -92.9 WT ITR
能量= -92.9
概率 >= 99%
概率 >= 95%
概率 >= 90%
99% > 概率 >= 80%
95% > 概率 >= 70%
90% > 概率 >= 60%
80% > 概率 >= 50%
70% > 概率 >= 40%
60% > 概率 >= 30%
50% > 概率
40
C'
C
30
50
B
60
B'

图3A

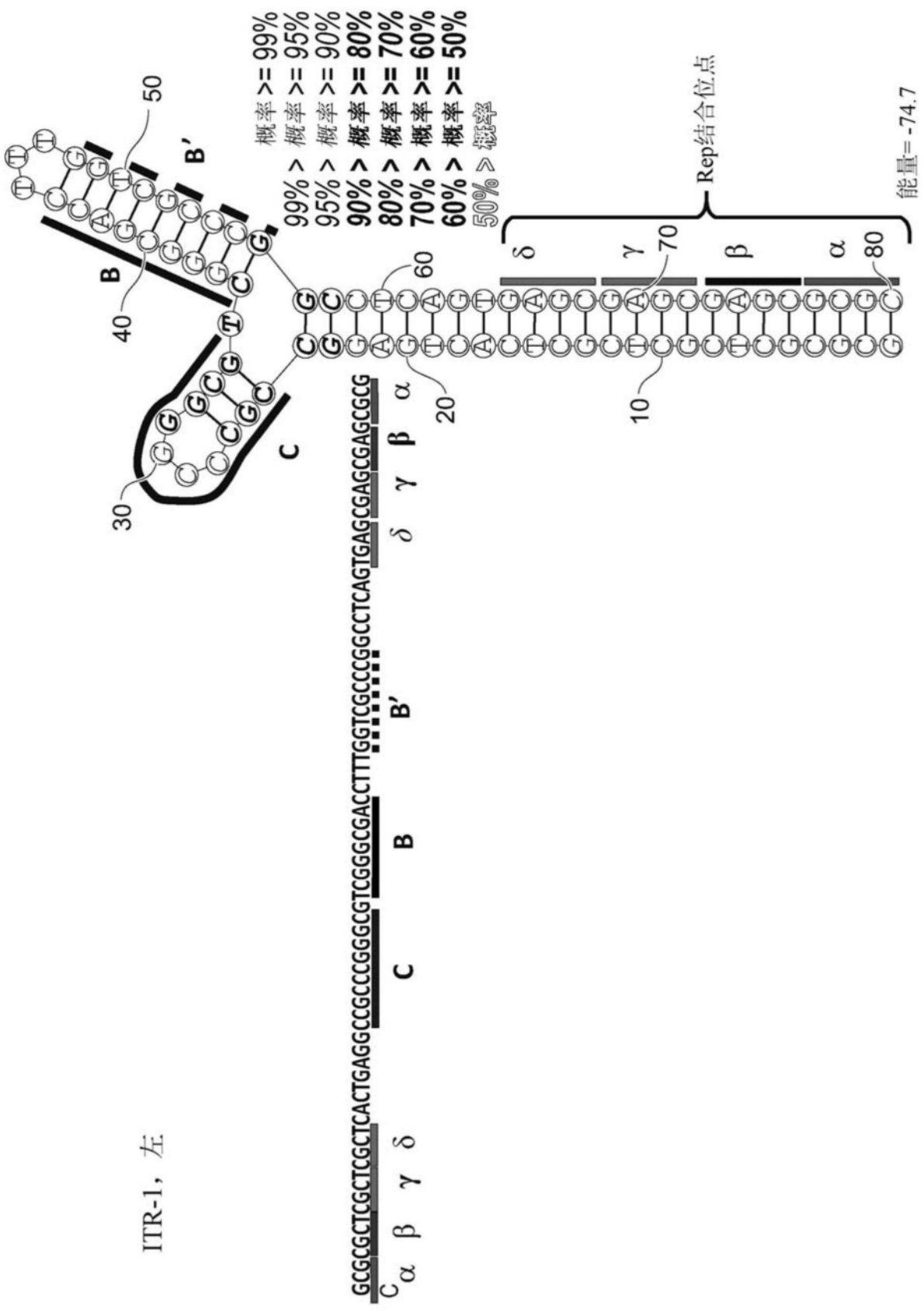

ITR-1，左
概率 >= 99%
概率 >= 95%
概率 >= 90%
90% > 概率 >= 80%
80% > 概率 >= 70%
70% > 概率 >= 60%
60% > 概率 >= 50%
50% > 概率
Rep结合位点
能量= -74.7
α β γ δ
C
B
B'
δ γ β α
10
20
30
40
50
60
70
80

图3B

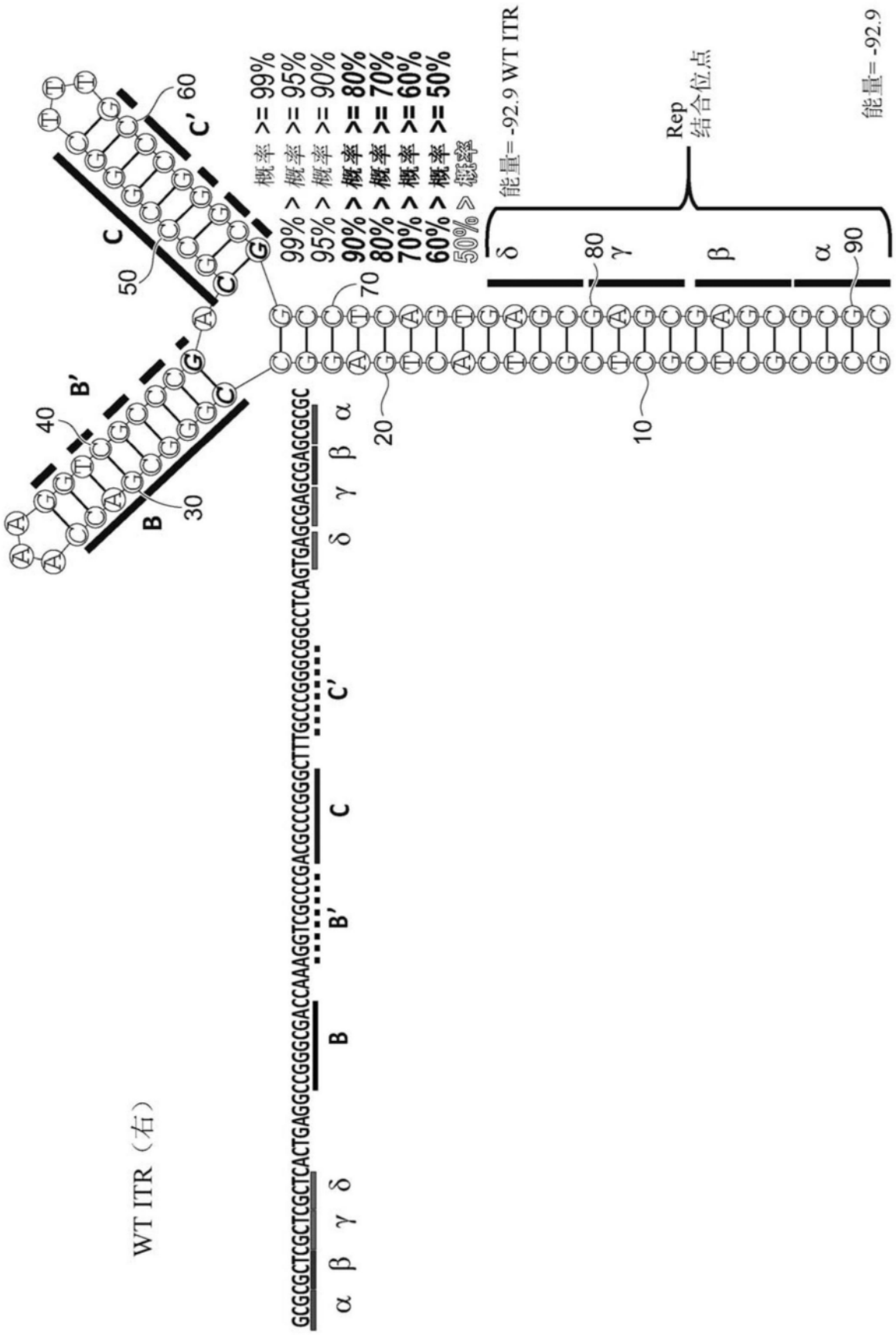

WT ITR（右）
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
α β γ δ
B
B′
C
C′
δ γ β α
概率 >= 99%
99% > 概率 >= 95%
95% > 概率 >= 90%
90% > 概率 >= 80%
80% > 概率 >= 70%
70% > 概率 >= 60%
60% > 概率 >= 50%
50% > 概率
能量= -92.9 WT ITR
Rep
结合位点
能量= -92.9
10
20
30
40
50
60
70
80
90

图3C

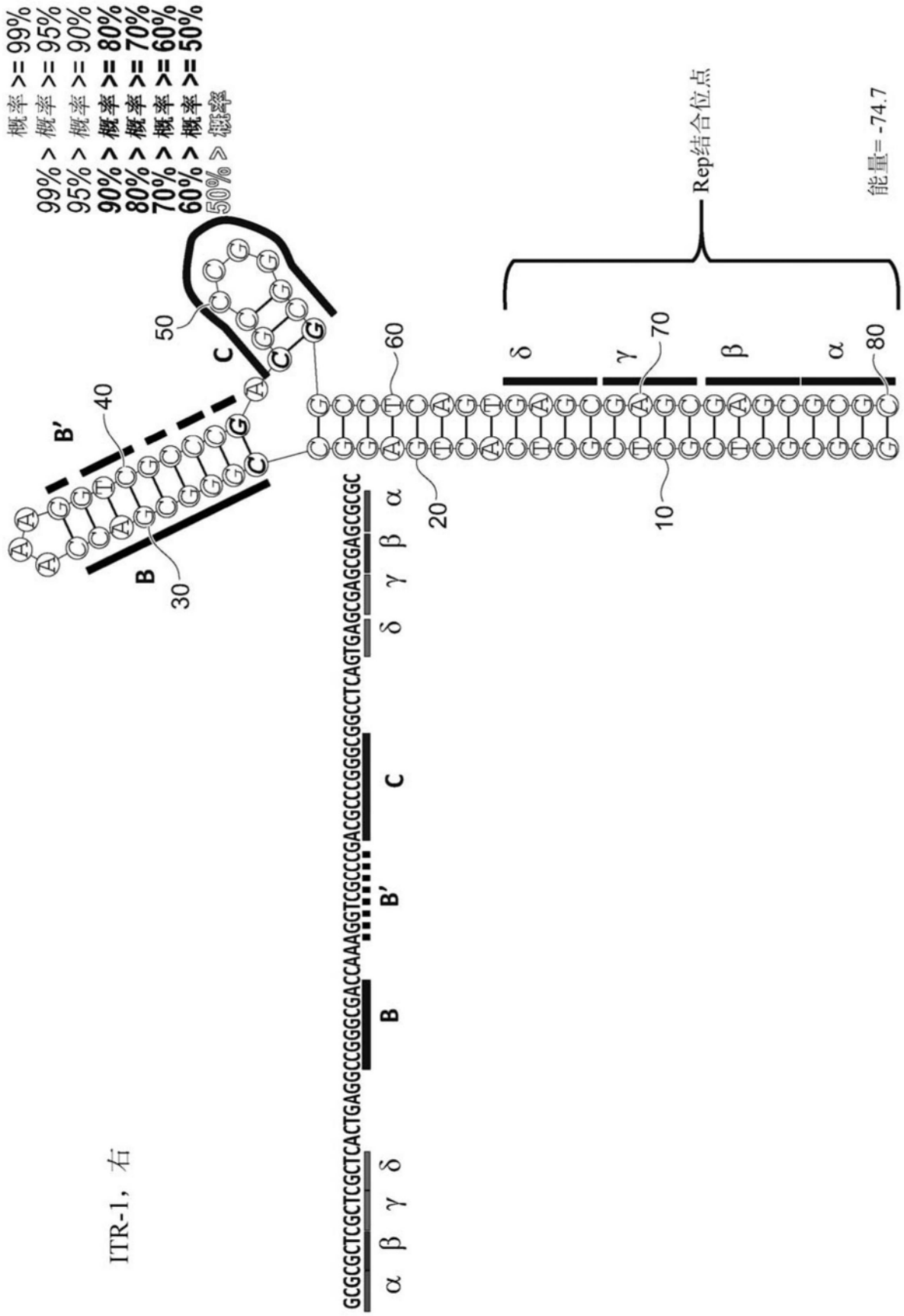

概率 >= 99%
概率 >= 95%
概率 >= 90%
概率 >= 80%
概率 >= 70%
概率 >= 60%
概率 >= 50%
99% > 概率
95% > 概率
90% > 概率
80% > 概率
70% > 概率
60% > 概率
50% > 概率
Rep结合位点
能量= -74.7
ITR-1，右
GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
α β γ δ
B
B′
C
δ γ β α
10
20
30
40
50
60
70
80

图3D

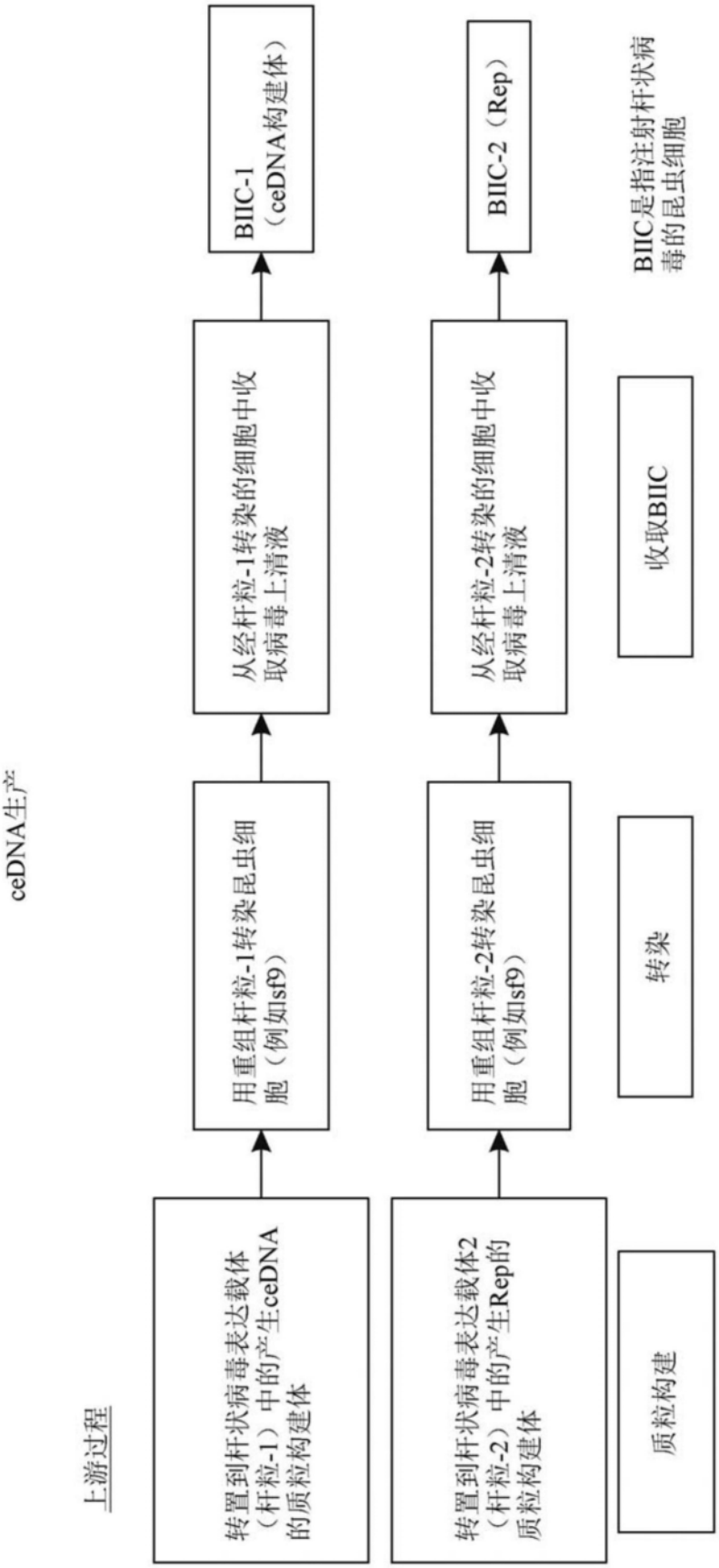

ceDNA生产
上游过程
转置到杆状病毒表达载体（杆粒-1）中的产生ceDNA的质粒构建体
转置到杆状病毒表达载体2（杆粒-2）中的产生Rep的质粒构建体
质粒构建
用重组杆粒-1转染昆虫细胞（例如sf9）
用重组杆粒-2转染昆虫细胞（例如sf9）
转染
从经杆粒-1转染的细胞中收取病毒上清液
从经杆粒-2转染的细胞中收取病毒上清液
收取BIIC
BIIC-1（ceDNA构建体）
BIIC-2（Rep）
BIIC是指注射杆状病毒的昆虫细胞

图4A

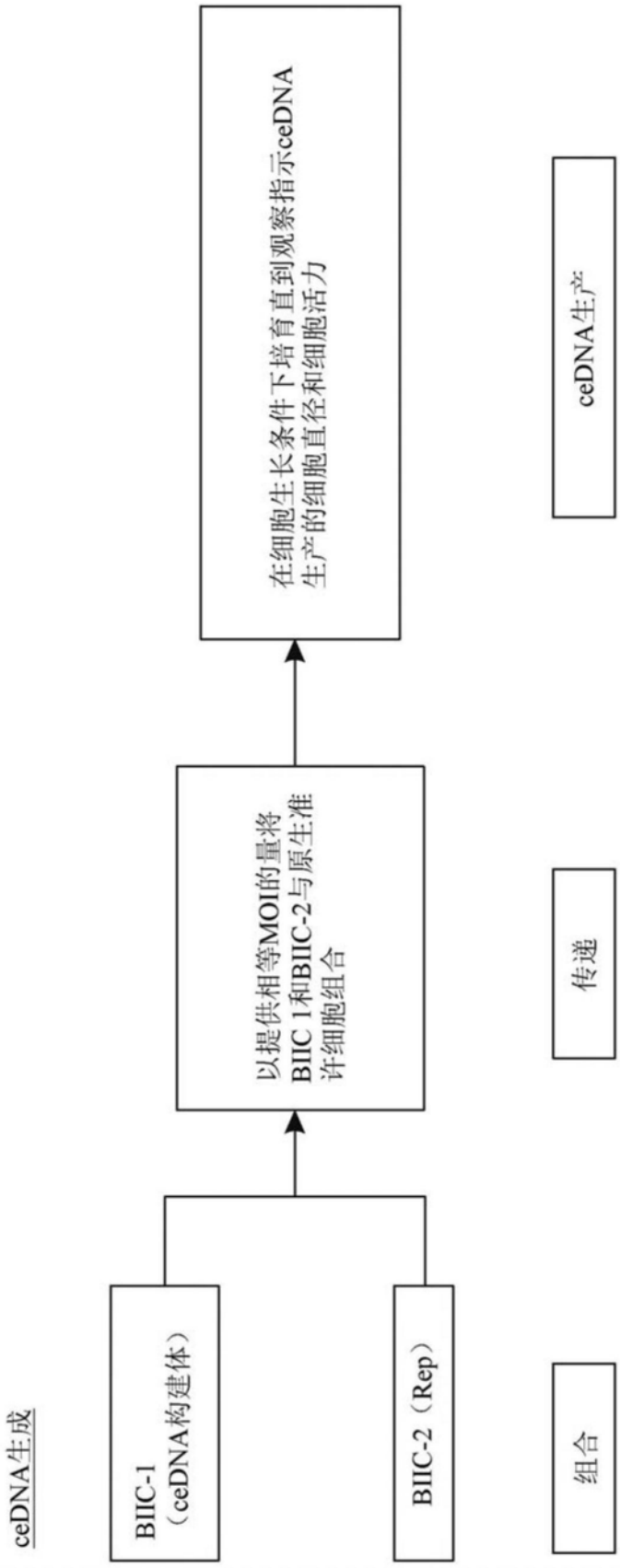

ceDNA生产
ceDNA生成
BIIC-1
（ceDNA构建体）
BIIC-2（Rep）
组合
以提供相等MOI的量将
BIIC 1和BIIC-2与原生准
许细胞组合
传递
在细胞生长条件下培育直到观察指示ceDNA
生产的细胞直径和细胞活力
ceDNA生产

图4B

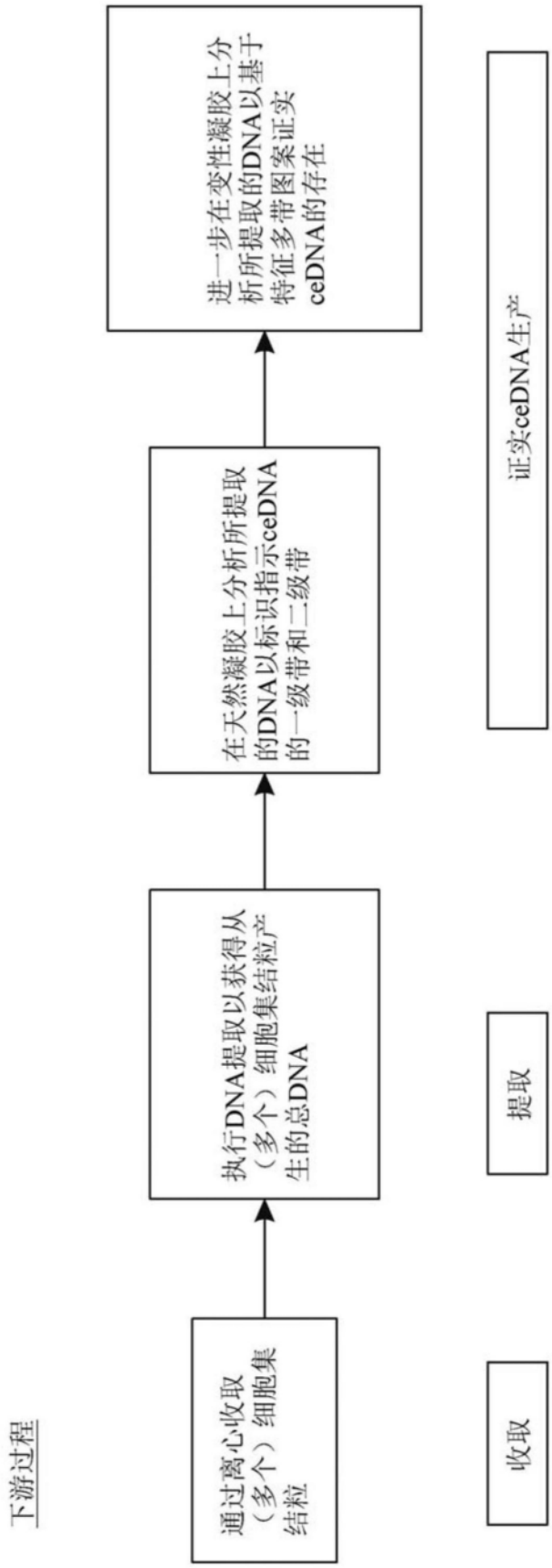

下游过程
通过离心收取（多个）细胞集结粒
执行DNA提取以获得从（多个）细胞集结粒产生的总DNA
在天然凝胶上分析所提取的DNA以标识指示ceDNA的一级带和二级带
进一步在变性凝胶上分析所提取的DNA以基于特征多带图案证实ceDNA的存在
ceDNA生产
收取
提取
证实ceDNA生产

图4C

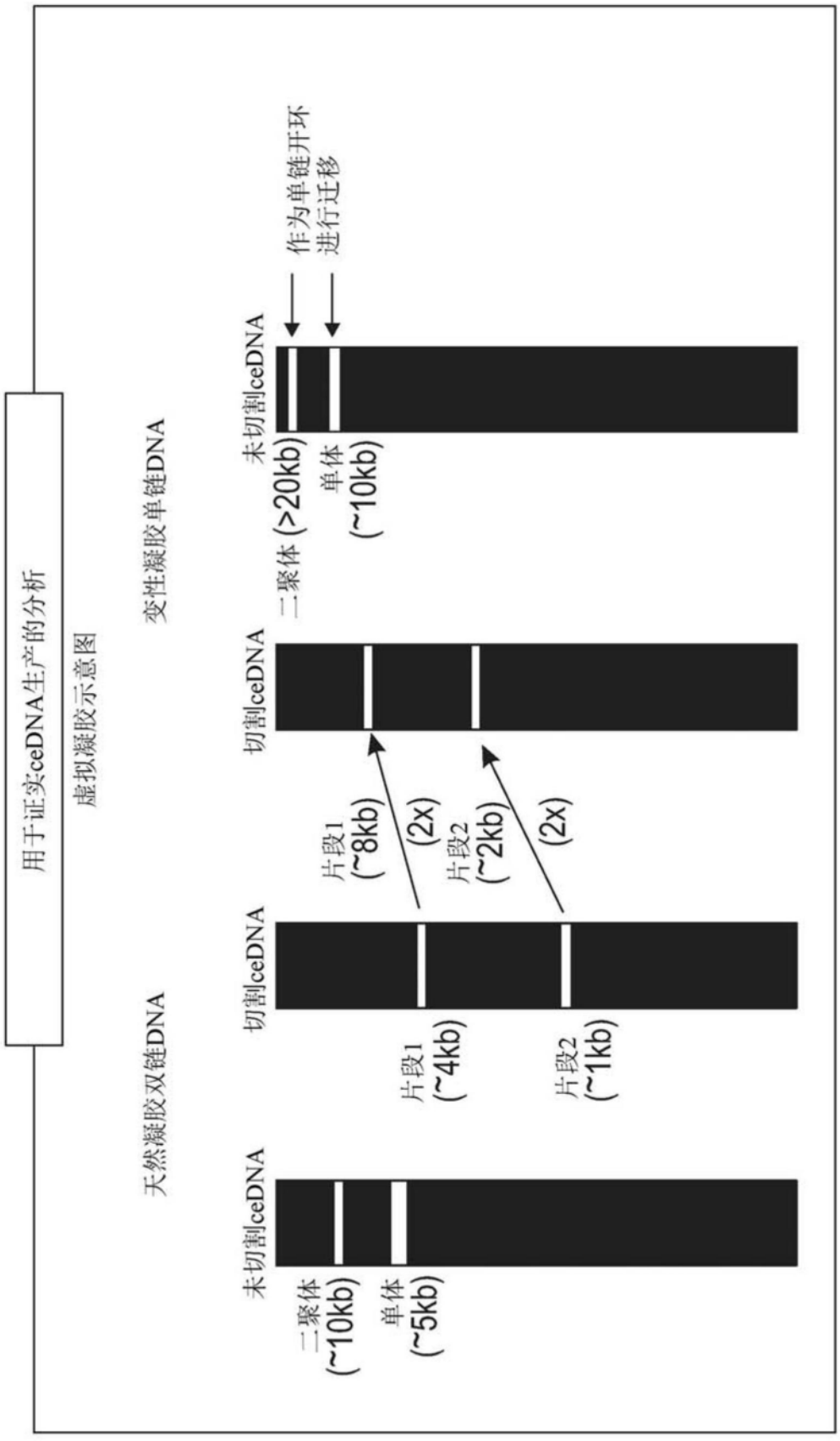

用于证实ceDNA生产的分析
虚拟凝胶示意图
天然凝胶双链DNA
变性凝胶单链DNA
未切割ceDNA
二聚体 (~10kb)
单体 (~5kb)
切割ceDNA
片段1 (~4kb)
片段2 (~1kb)
切割ceDNA
片段1 (~8kb)
(2x)
片段2 (~2kb)
(2x)
未切割ceDNA
二聚体 (>20kb)
单体 (~10kb)
作为单链开环进行迁移

图4D

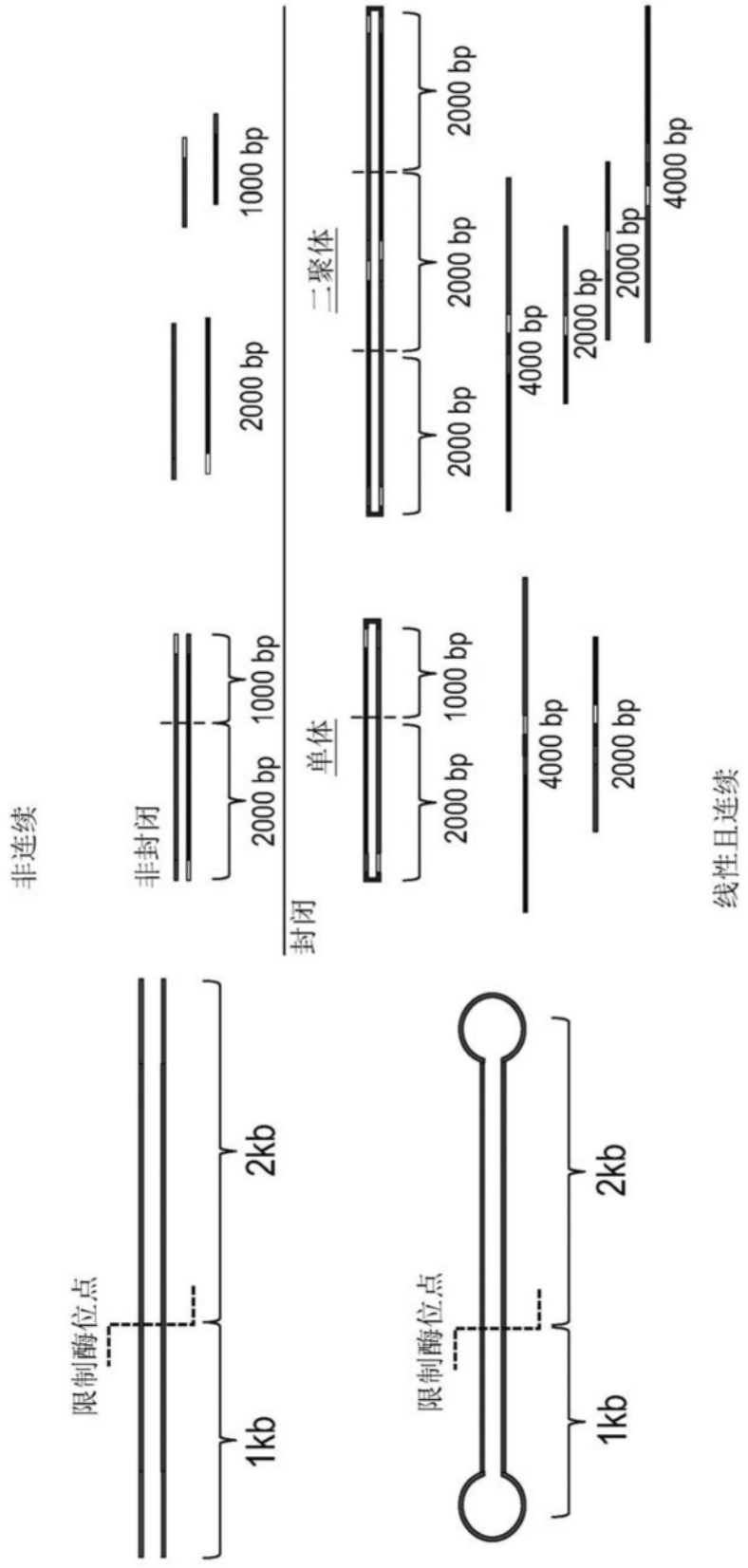

非连续
非封闭
2000 bp
1000 bp
封闭
单体
二聚体
2000 bp
1000 bp
4000 bp
线性且连续
限制酶位点
1kb
2kb

图4E

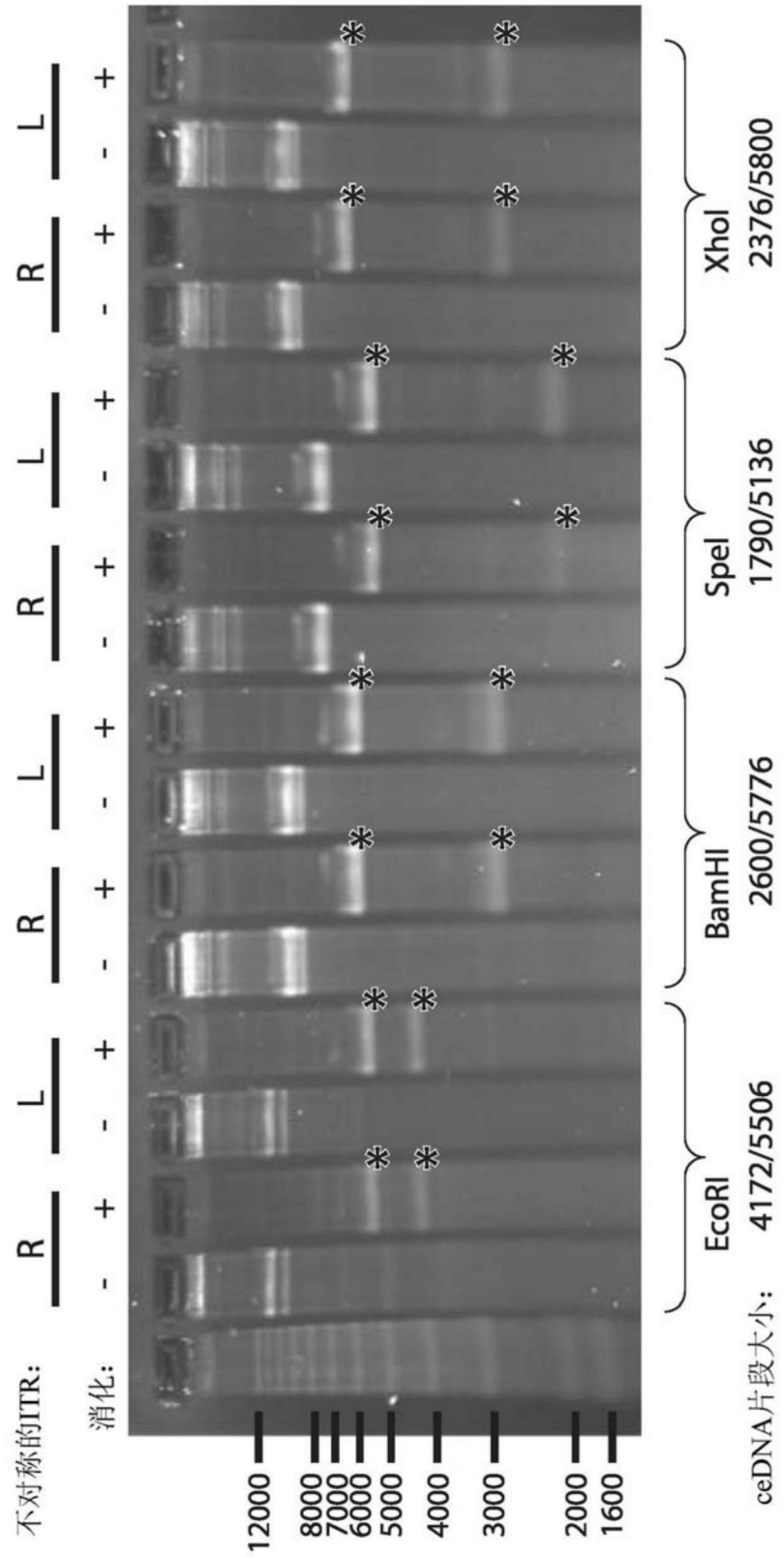

不对称的ITR:
构建体-1,2
构建体-3,4
构建体-5,6
构建体-7,8
R
L
消化:
-
+
12000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1600
ceDNA片段大小:
EcoRI 4172/5506
BamHI 2600/5776
SpeI 1790/5136
XhoI 2376/5800

图5

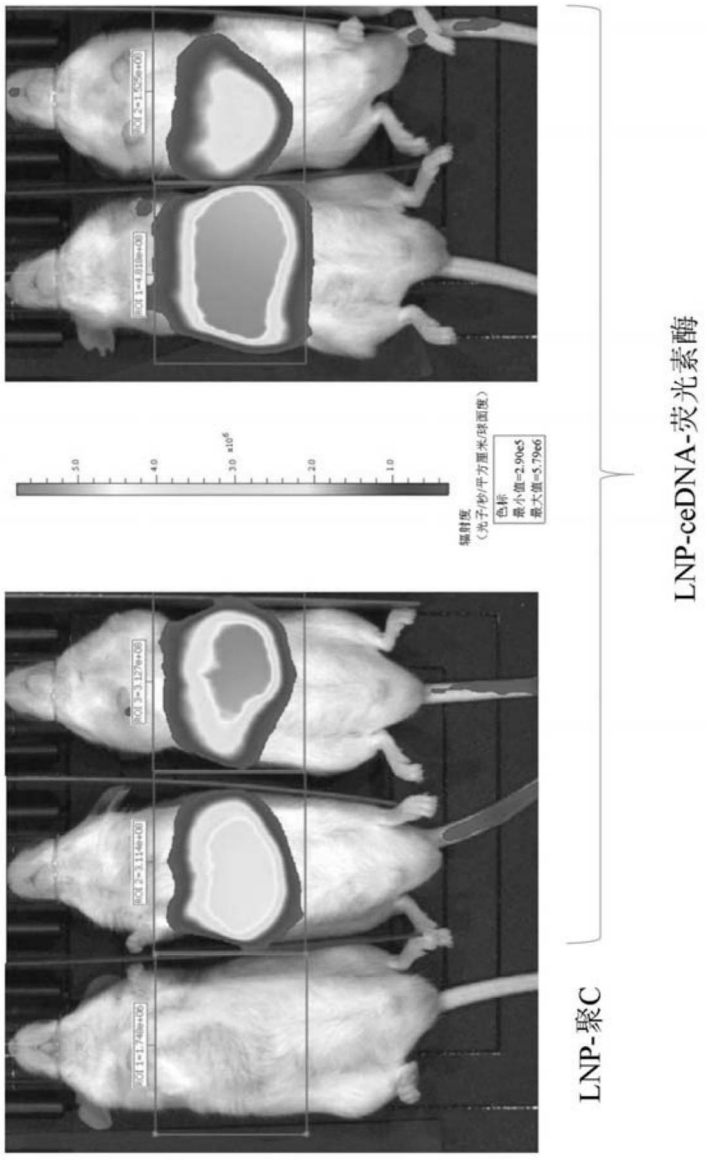


图6

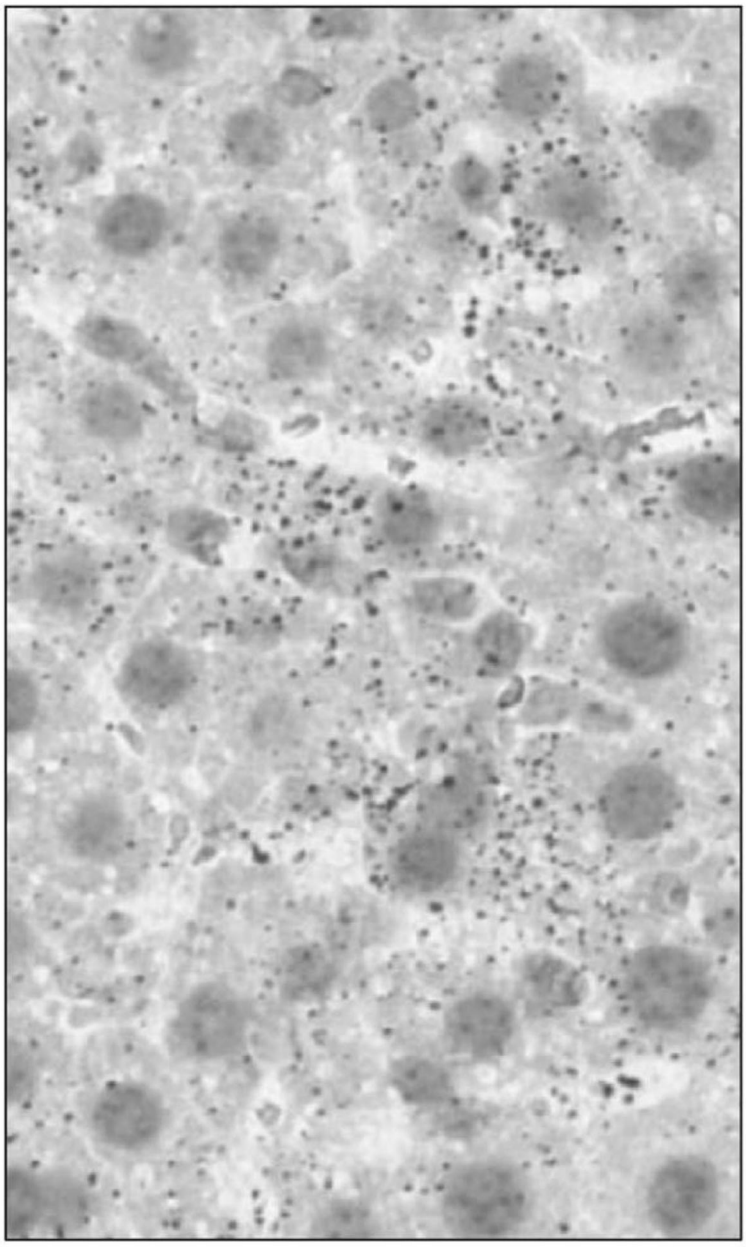


图7

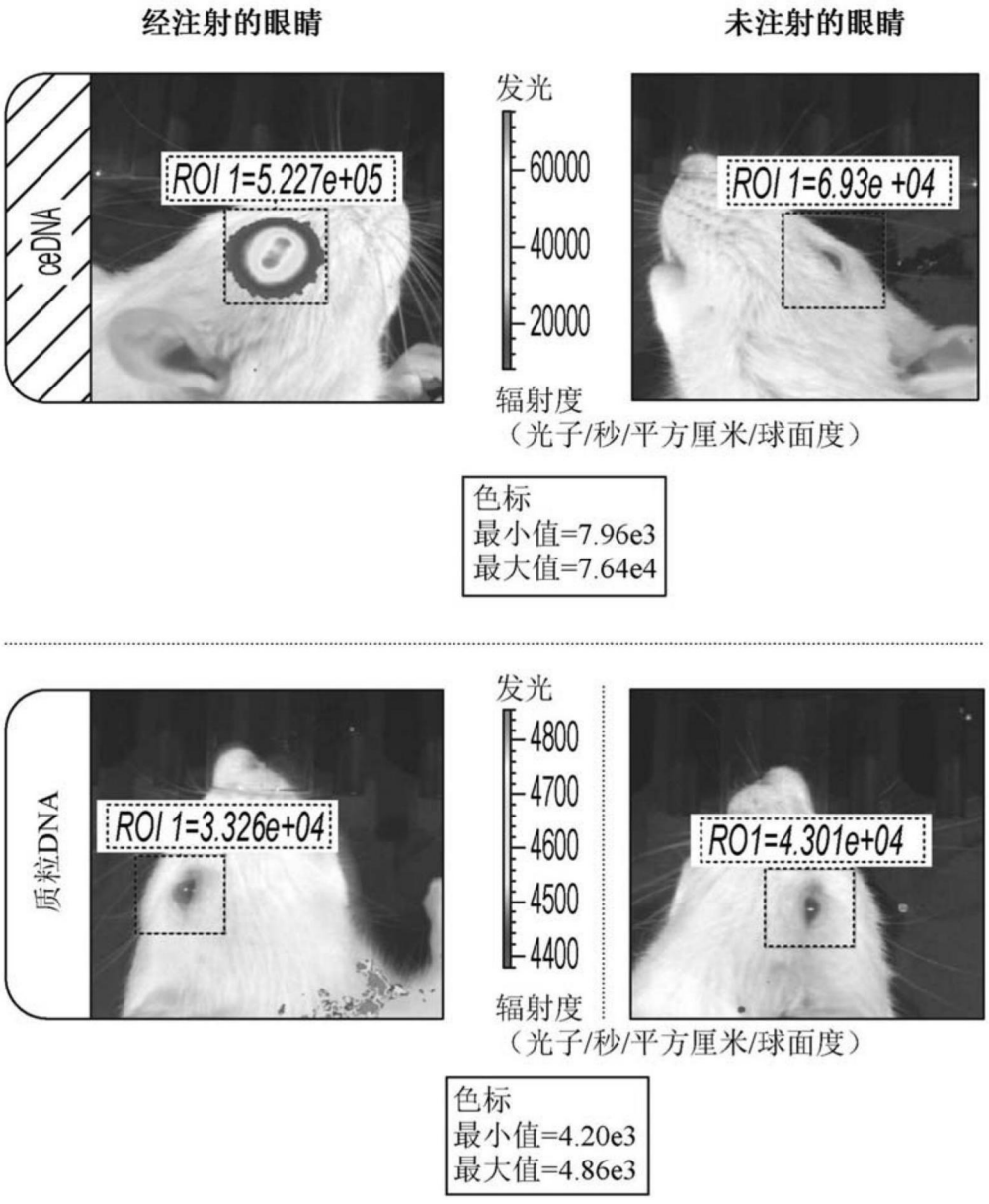

经注射的眼睛
未注射的眼睛
ceDNA
ROI 1=5.227e+05
发光
60000
40000
20000
辐射度
（光子/秒/平方厘米/球面度）
ROI 1=6.93e +04
色标
最小值=7.96e3
最大值=7.64e4
质粒DNA
ROI 1=3.326e+04
发光
4800
4700
4600
4500
4400
辐射度
（光子/秒/平方厘米/球面度）
RO1=4.301e+04
色标
最小值=4.20e3
最大值=4.86e3

图8A

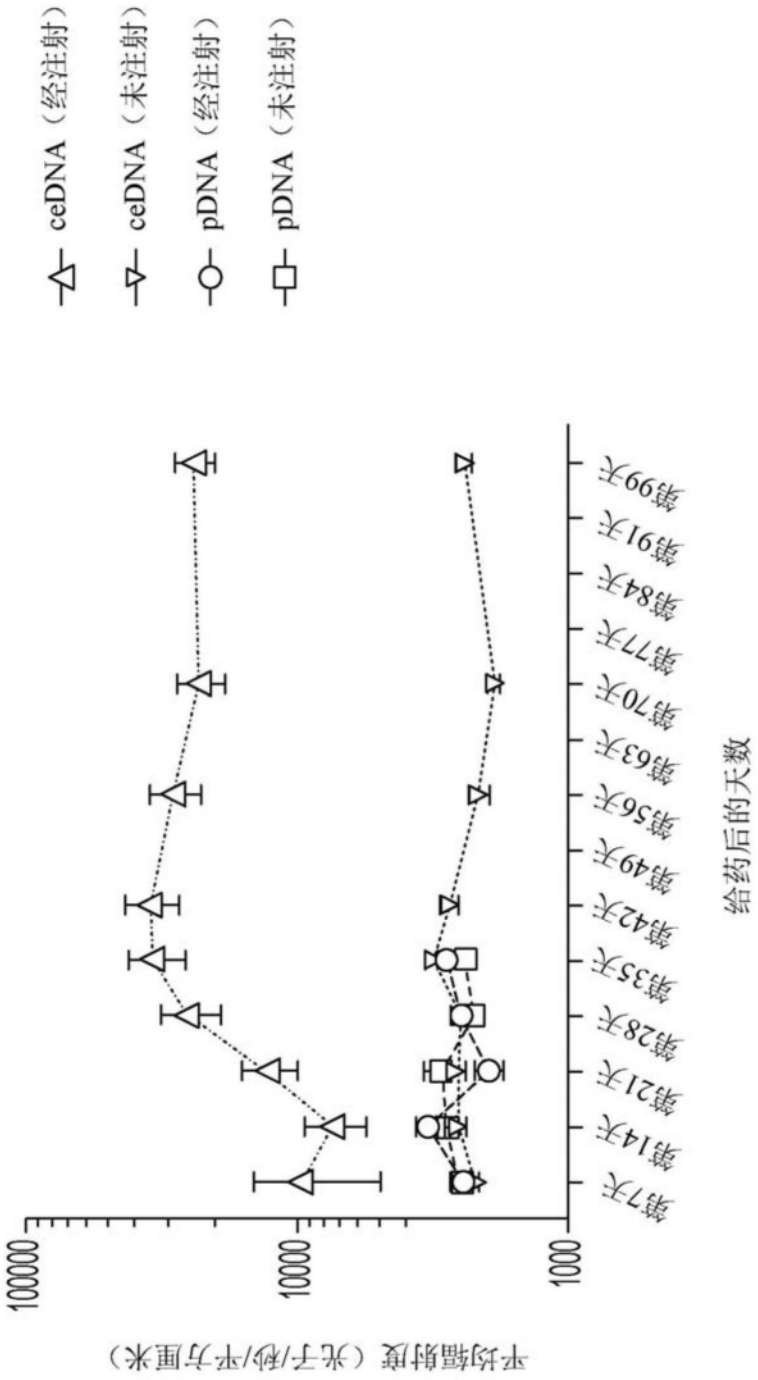

ceDNA（经注射）
ceDNA（未注射）
pDNA（经注射）
pDNA（未注射）
100000
10000
1000
平均辐射度（光子/秒/平方厘米）
第7天
第14天
第21天
第28天
第35天
第42天
第49天
第56天
第63天
第70天
第77天
第84天
第91天
第99天
给药后的天数

图8B

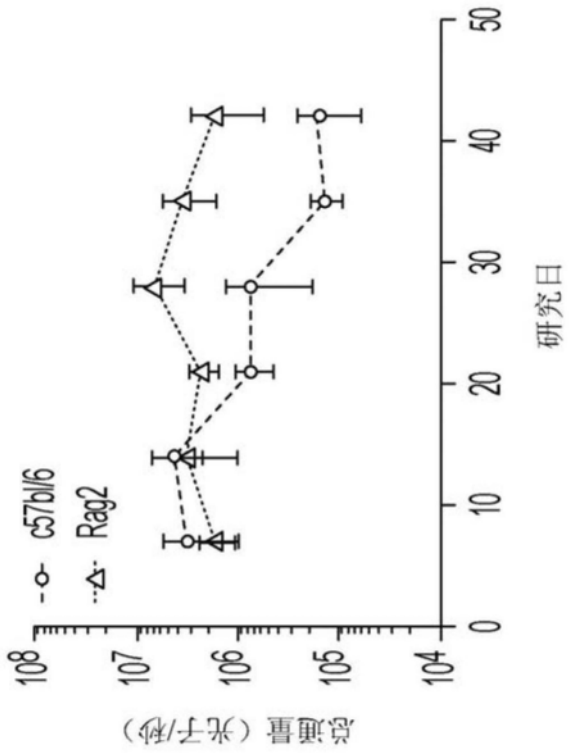


图9A

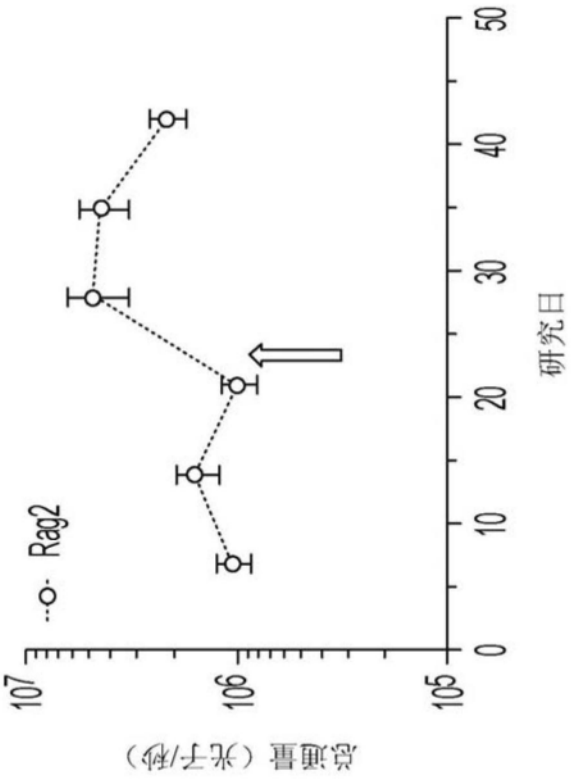


图9B

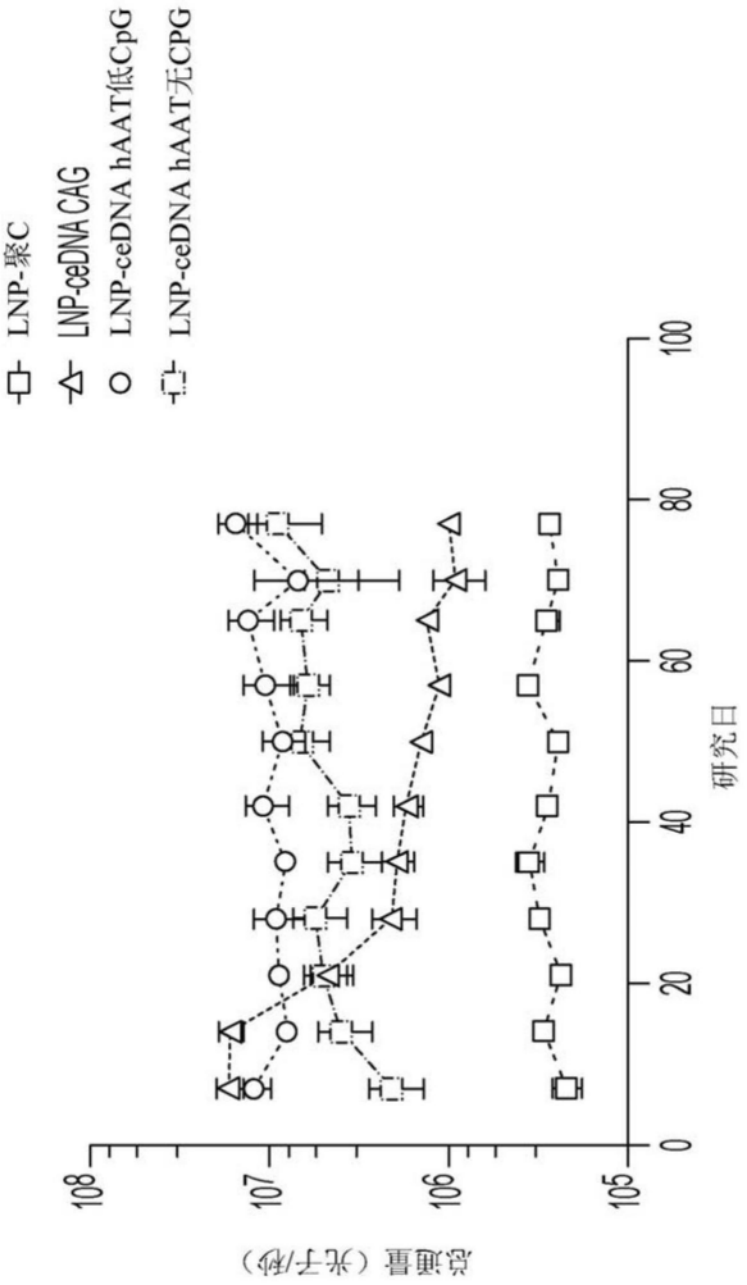

LNP-聚C
LNP-ceDNA CAG
LNP-ceDNA hAAT低CpG
LNP-ceDNA hAAT无CPG
总通量（光子/秒）
108
107
106
105
0
20
40
60
80
100
研究日

图10

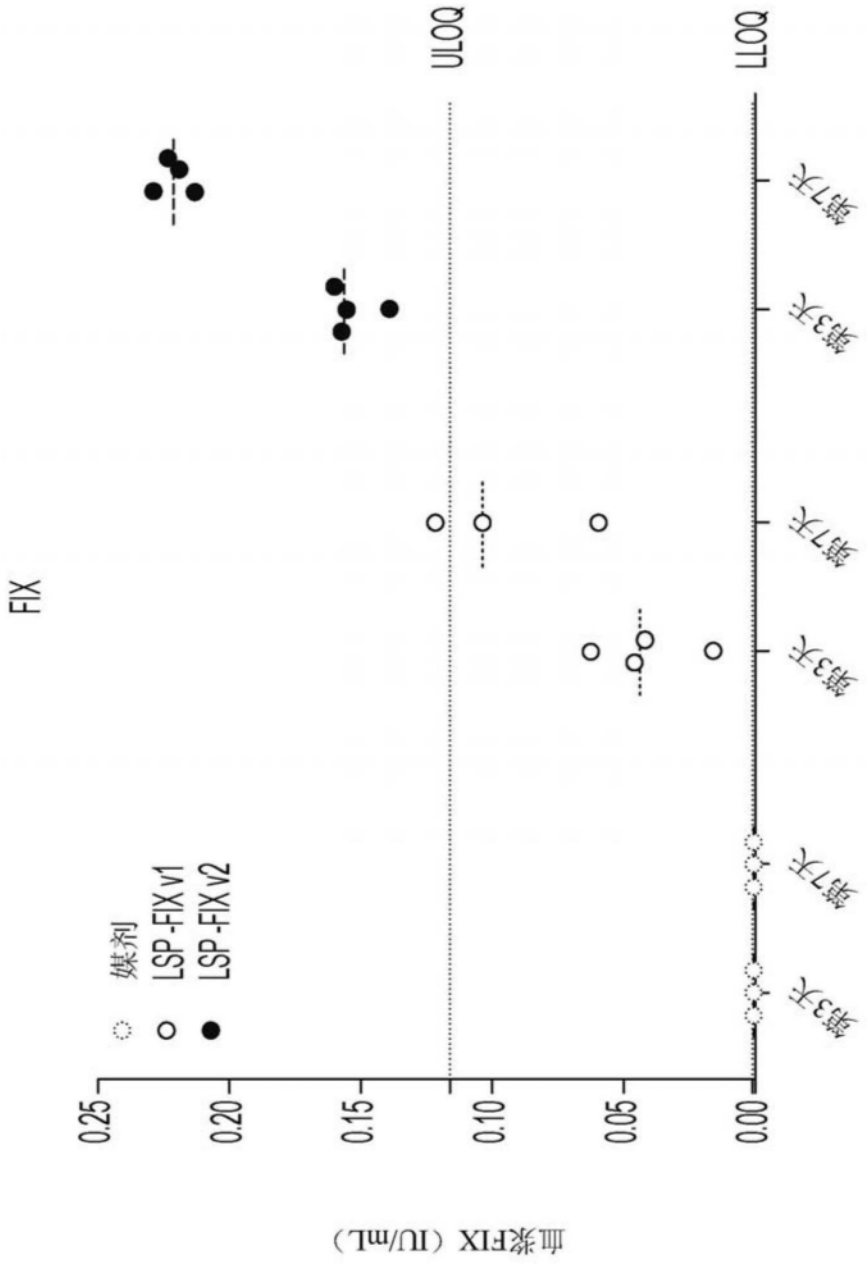

FIX
ULOQ
LLOQ
媒剂
LSP-FIX v1
LSP-FIX v2
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
第3天
第7天
第3天
第7天
第3天
第7天
血浆FIX（IU/mL）

图11A

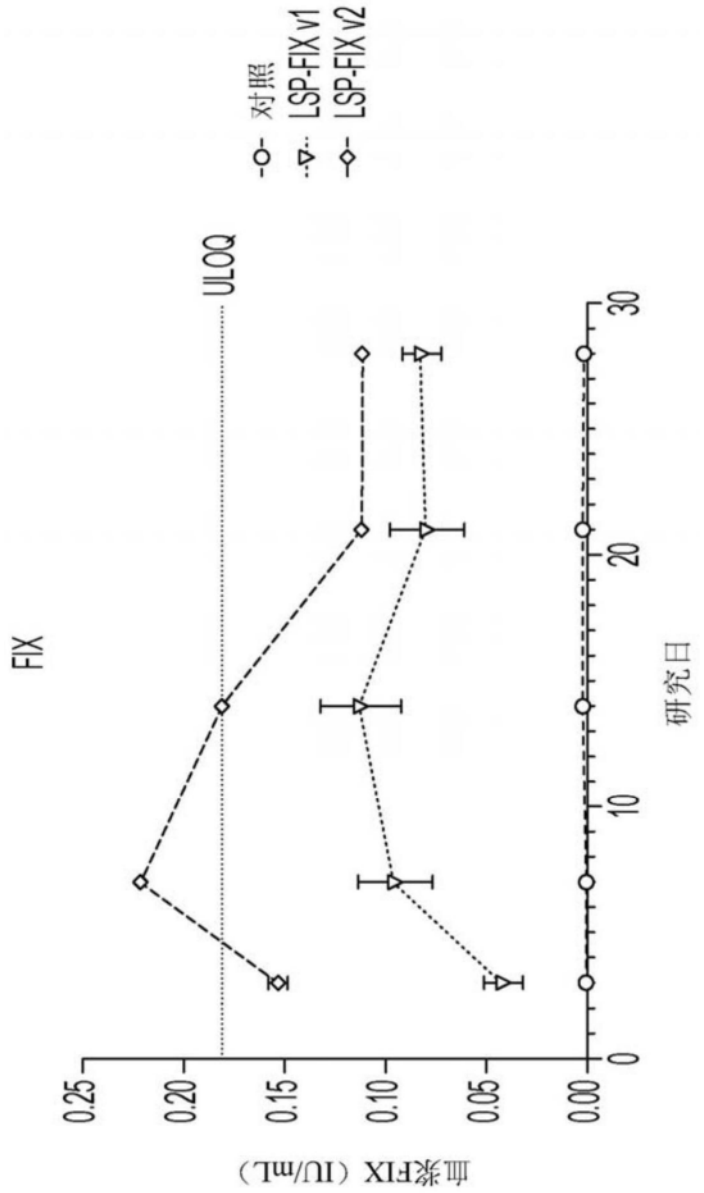

对照
LSP-FIX v1
LSP-FIX v2
ULOQ
FIX
血浆FIX（IU/mL）
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
10
20
30
研究日

图11B

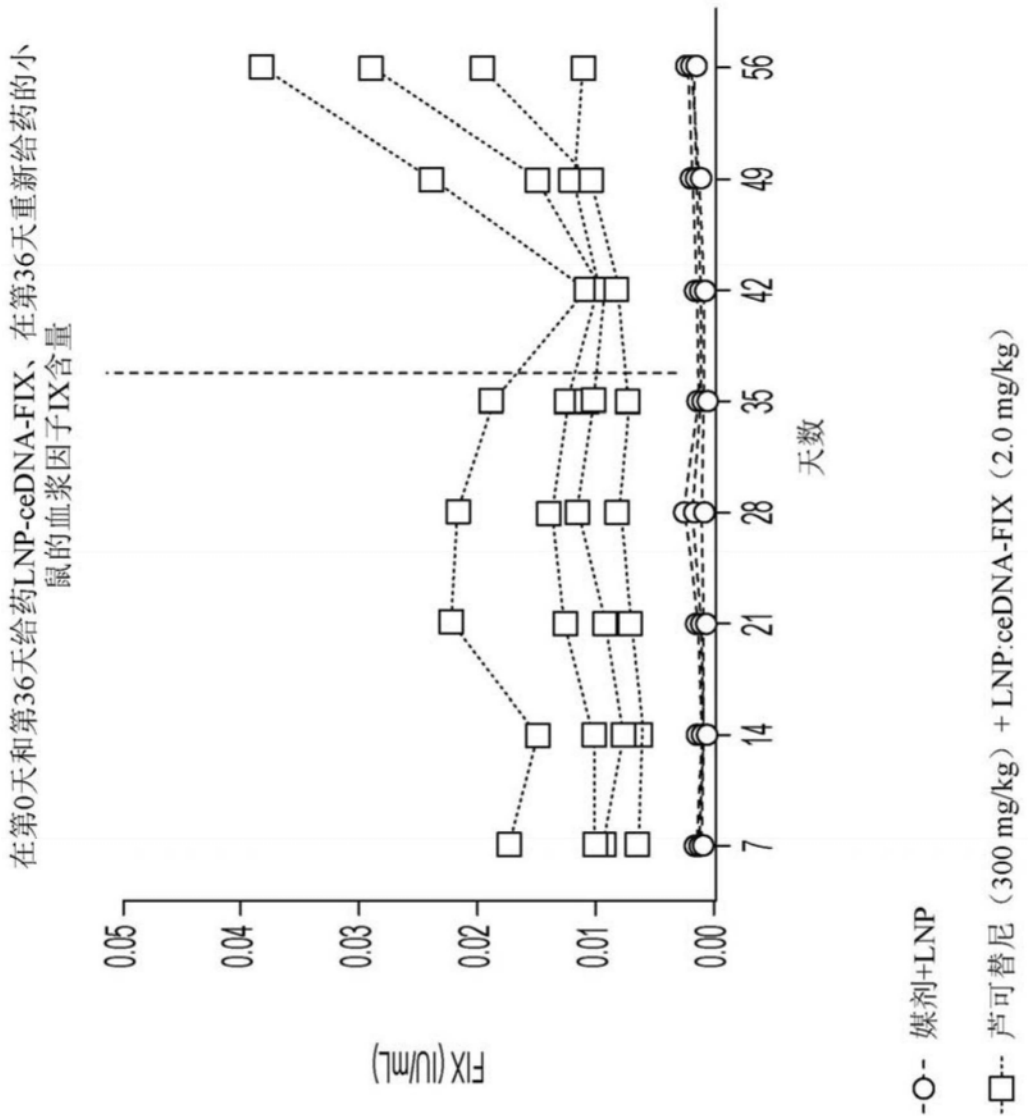

在第0天和第36天给药LNP-ceDNA-FIX、在第36天重新给药的小鼠的血浆因子IX含量
FIX (IU/mL)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
7
14
21
28
35
42
49
56
天数
媒剂+LNP
芦可替尼（300 mg/kg）+ LNP:ceDNA-FIX（2.0 mg/kg）

图12

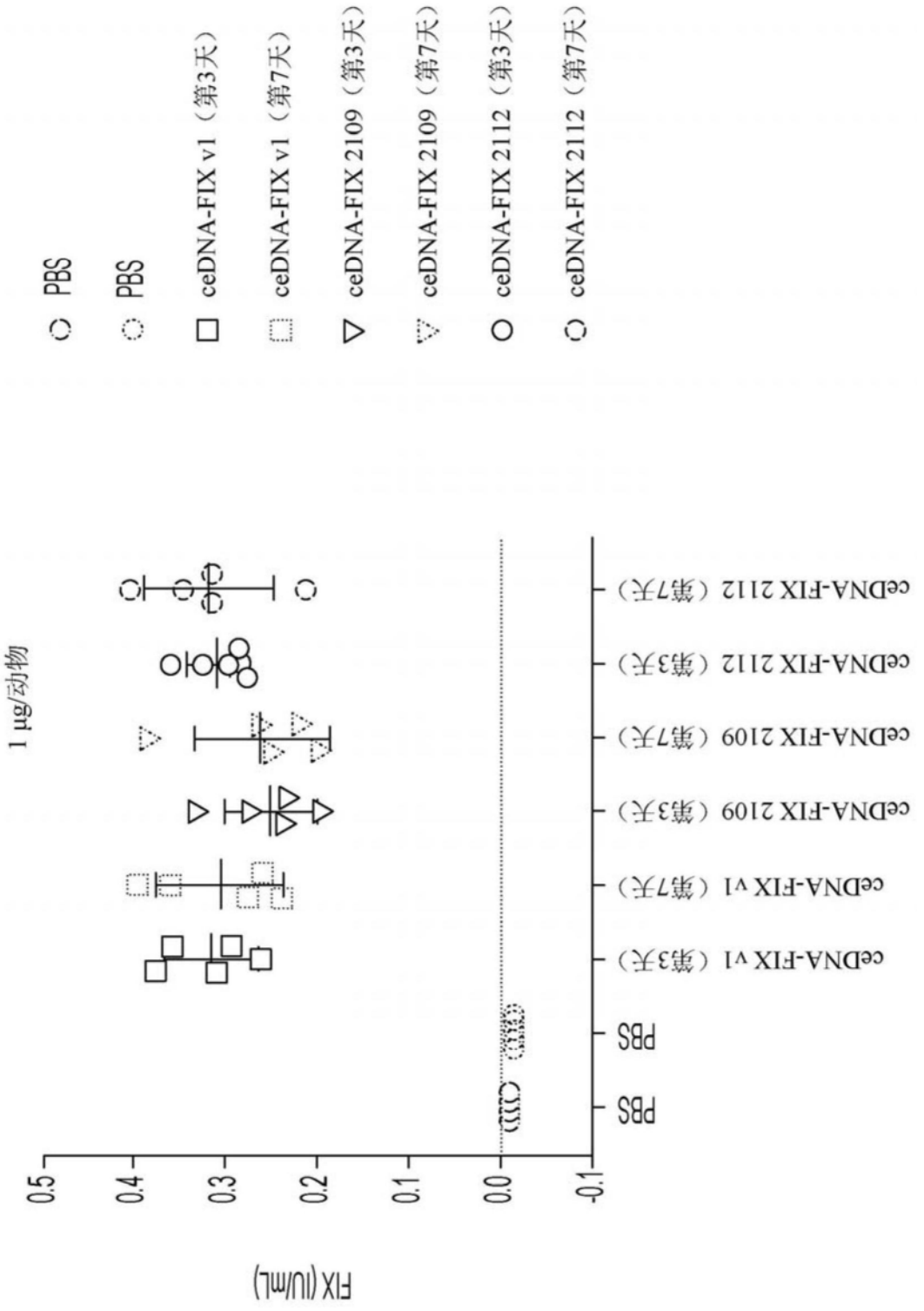

PBS
PBS
ceDNA-FIX v1（第3天）
ceDNA-FIX v1（第7天）
ceDNA-FIX 2109（第3天）
ceDNA-FIX 2109（第7天）
ceDNA-FIX 2112（第3天）
ceDNA-FIX 2112（第7天）
1 μg/动物
FIX (IU/mL)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
PBS
PBS
ceDNA-FIX v1（第3天）
ceDNA-FIX v1（第7天）
ceDNA-FIX 2109（第3天）
ceDNA-FIX 2109（第7天）
ceDNA-FIX 2112（第3天）
ceDNA-FIX 2112（第7天）

图13A

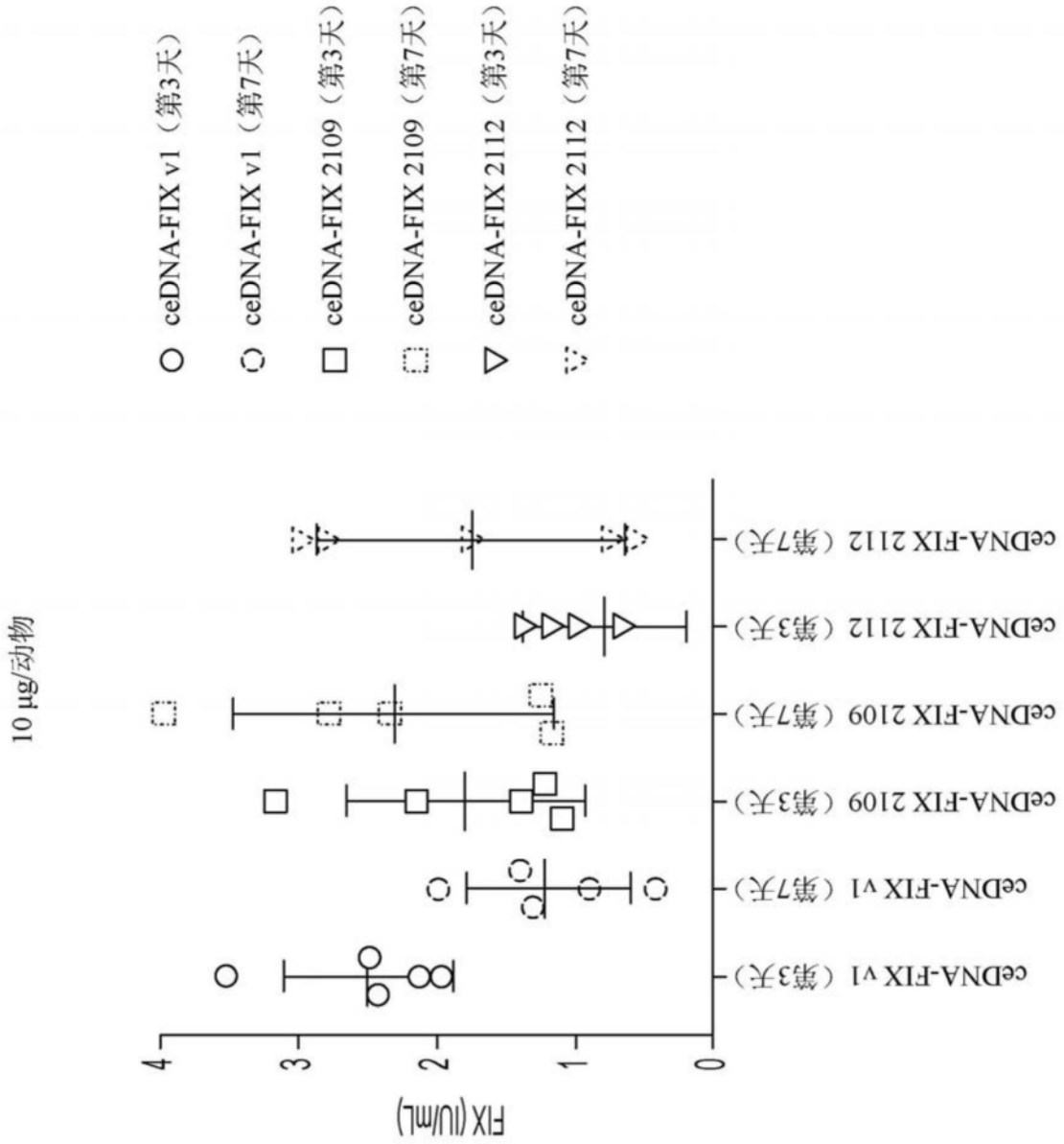

ceDNA-FIX v1（第3天）
ceDNA-FIX v1（第7天）
ceDNA-FIX 2109（第3天）
ceDNA-FIX 2109（第7天）
ceDNA-FIX 2112（第3天）
ceDNA-FIX 2112（第7天）
10 μg/动物
FIX (IU/mL)
0
1
2
3
4
ceDNA-FIX v1（第3天）
ceDNA-FIX v1（第7天）
ceDNA-FIX 2109（第3天）
ceDNA-FIX 2109（第7天）
ceDNA-FIX 2112（第3天）
ceDNA-FIX 2112（第7天）

图13B