

1. 一种分离的核酸,其包含编码抑制APOE4的表达或活性的抑制性核酸和表达APOE2的转入基因的表达构建物。
2. 根据权利要求1所述的分离的核酸,其中所述抑制性核酸由SEQ ID NO:5-8、12-15和17-20中的任一者所示的序列编码。
3. 根据权利要求1或2所述的分离的核酸,其中所述抑制性核酸由SEQ ID NO:7、8、14、15、19和20中的任一者所示的序列编码。
4. 根据权利要求1至3中的任一项所述的分离的核酸,其中所述表达APOE2的转入基因编码具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的蛋白质。
5. 根据权利要求1至4中的任一项所述的分离的核酸,其中所述表达APOE2的转入基因包含密码子优化的核酸序列,任选地其中所述核酸序列示出在SEQ ID NO:4中。
6. 根据权利要求1至5中的任一项所述的分离的核酸,其中所述表达构建物两侧带有腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。
7. 根据权利要求6所述的分离的核酸,其中所述ITR是AAV2 ITR。
8. 根据权利要求1至7中的任一项所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包含SEQ ID NO:11、16和21中的任一者所示的序列。
9. 一种分离的核酸,其包含编码APOE2蛋白的表达构建物,其中所述分离的核酸包含SEQ ID NO:4所示的序列。
10. 一种分离的核酸,其包含编码抑制APOE4的表达或活性的抑制性核酸的表达构建物。
11. 根据权利要求9或10所述的分离的核酸,其中所述表达构建物两侧带有腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR),任选地其中所述ITR是AAV2 ITR。
12. 根据权利要求1至11中的任一项所述的分离的核酸,其还包含一个或多个启动子,任选地其中所述一个或多个启动子各自独立地是鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子、CAG启动子、CD68启动子或JeT启动子。
13. 一种载体,其包含根据权利要求1至12中的任一项所述的分离的核酸。
14. 根据权利要求13所述的载体,其中所述载体是质粒。
15. 根据权利要求13所述的载体,其中所述载体是病毒载体,任选地其中所述病毒载体是重组AAV(rAAV)载体或杆状病毒载体。
16. 一种组合物,其包含根据权利要求1至12中的任一项所述的分离的核酸或根据权利要求13至15中的任一项所述的载体。
17. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求1至12中的任一项所述的分离的核酸或根据权利要求13至15中的任一项所述的载体。
18. 一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含:
 - (i) 衣壳蛋白;和
 - (ii) 根据权利要求1至12中的任一项所述的分离的核酸或根据权利要求15所述的载体。
19. 根据权利要求18所述的rAAV,其中所述衣壳蛋白能够跨过血脑屏障,任选地其中所述衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白或AAVrh.10衣壳蛋白。
20. 根据权利要求18或权利要求19所述的rAAV,其中所述rAAV转导中枢神经系统(CNS)

的神经元细胞和非神经元细胞。

21. 一种用于治疗患有或怀疑患有阿兹海默氏病的对象的方法,所述方法包括向所述对象给药根据权利要求1至12中的任一项所述的分离的核酸、根据权利要求13至15中的任一项所述的载体、根据权利要求16所述的组合物或根据权利要求18-20中的任一项所述的rAAV。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述给药包括直接注射到对象的CNS,任选地其中所述直接注射是脑内注射、实质内注射、鞘内注射或其任何组合。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述直接注射到对象的CNS包括对流增强递送(CED)。

24. 根据权利要求21-23中的任一项所述的方法,其中所述给药包括外周注射,任选地其中所述外周注射是静脉内注射。

25. 根据权利要求21-24中的任一项所述的方法,其中所述对象对于APOE4等位基因来说是纯合的。

用于神经变性疾病的基因疗法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年11月28日提交的题为“用于神经变性疾病的基因疗法”(GENE THERAPIES FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE)的美国临时申请系列号62/772,230的提交日期在美国专利法第119条(e)下的权益,所述临时申请的全部内容通过参考并入本文。

背景技术

[0003] 阿兹海默氏病(AD)是最常见形式的痴呆症,仅在美国就影响超过5百万人。阿兹海默氏病是一种不可逆的渐进性脑部障碍,以遍及整个脑部的异常蛋白沉积物的存在为特征,所述沉积物抑制神经元功能、破坏神经元之间的连接并最终导致细胞死亡。这些沉积物包含 β -淀粉样肽的斑块和由磷酸化tau蛋白形成的缠结。患有轻度AD的患者经历失忆,导致流浪、难以理财、重复提问以及性格和行为改变。中度AD患者表现出增加的失忆,导致意识混乱和难以识别朋友和家人、无法学习新事物、幻觉、妄想和偏执狂。患有严重AD的患者无法交流并且完全依赖他人照顾。最终,蛋白斑块和缠结蔓延到整个脑部,导致显著的组织萎缩。

发明内容

[0004] 大多数阿兹海默氏病(AD)患者具有晚发型AD,其中症状在对象的60多岁中期出现。载脂蛋白E(APOE)基因参与晚发型AD的发生。APOE具有几种亚型,包括针对AD提供保护的APOE2和与发生晚发型AD的风险提高相关的APOE4。带有两个APOE4拷贝的纯合患者(例如APOE4+/+对象)与带有一个APOE4拷贝和一个APOE2或APOE3拷贝的杂合患者相比处于甚至更大的发生晚发型AD的风险之中。

[0005] 本公开的各种情况涉及用于治疗患有或怀疑患有AD的对象的组合物和方法。本公开部分基于编码靶向AD相关基因(例如APOE,例如APOE4)的抑制性RNA(例如shRNA、miRNA、amiRNA等)的表达构建物。

[0006] 在某些情况下,本公开基于编码APOE2(或其部分)和任选的来自于AD相关基因的一种或多种另外的基因产物(例如靶向APOE4的抑制性核酸)的表达构建物(例如载体)。不希望受到任何特定理论限制,本文中描述的基因产物的组合当在对象中表达时一起(例如协同)起作用,以减轻AD的一种或多种体征和症状。

[0007] 因此,在某些情况下,本公开提供了一种分离的核酸,其包含编码APOE2蛋白的表达构建物,其中所述分离的核酸包含SEQ ID NO:4所示的序列。

[0008] 在某些实施方式中,本公开提供了一种分离的核酸,其包含编码抑制APOE4的表达或活性的抑制性核酸和表达APOE2的转入基因的表达构建物。在某些实施方式中,所述表达构建物两侧带有腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。在某些实施方式中,所述ITR是AAV2 ITR。

[0009] 在某些实施方式中,抑制性核酸与SEQ ID NO:1所示的序列的至少6个毗连核苷酸互补。在某些实施方式中,抑制性核酸是包含SEQ ID NO:5-8、12-15和17-20中的任一者所

示的核酸序列(或由所述核酸序列编码)的抑制性RNA。在某些实施方式中,抑制性核酸包含SEQ ID NO:7、8、14、15、19和20中的任一者所示的序列(或由所述序列编码)。

[0010] 在某些实施方式中,表达APOE2的转入基因编码具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的蛋白质。在某些实施方式中,表达APOE2的转入基因包含密码子优化的核酸序列。在某些实施方式中,编码APOE2的密码子优化的核酸序列示出在SEQ ID NO:4中。

[0011] 在某些实施方式中,本公开提供了一种分离的核酸,其包含SEQ ID NO:11、16和21中的任一者所示的序列。

[0012] 在某些情况下,本公开提供了一种分离的核酸,其包含编码APOE2蛋白的表达构建物,其中所述分离的核酸包含SEQ ID NO:4所示的序列。在某些情况下,本公开提供了一种分离的核酸,其包含编码抑制APOE4的表达或活性的抑制性核酸的表达构建物。在某些实施方式中,所述表达构建物两侧带有腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR),任选地其中所述ITR是AAV2 ITR。

[0013] 在某些实施方式中,分离的核酸还包含一个或多个启动子。在某些实施方式中,启动子是鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子、CAG启动子、CD68启动子或JeT启动子。

[0014] 在某些实施方式中,本公开提供了一种载体,其包含本公开所描述的分离的核酸。在某些实施方式中,载体是质粒。在某些实施方式中,载体是病毒载体。在某些实施方式中,病毒载体是重组AAV(rAAV)载体或杆状病毒载体。

[0015] 在某些情况下,本公开提供了一种组合物,其包含本文中所描述的分离的核酸或载体。在某些实施方式中,本公开提供了一种宿主细胞,其包含本文中所描述的分离的核酸或载体。

[0016] 在某些情况下,本公开提供了一种重组腺相关病毒(rAAV),其包含:衣壳蛋白;和本文中所公开的分离的核酸或载体。

[0017] 在某些实施方式中,衣壳蛋白能够跨过血脑屏障。在某些实施方式中,衣壳蛋白是AAV9衣壳蛋白或AAVrh.10衣壳蛋白。在某些实施方式中,rAAV转导中枢神经系统(CNS)的神经元细胞和非神经元细胞。

[0018] 在某些情况下,本公开提供了一种用于治疗患有或怀疑患有阿兹海默氏病的对象的方法,所述方法包括向所述对象给药本公开所描述的分离的核酸、载体、组合物或rAAV。

[0019] 在某些实施方式中,给药包括向所述对象的CNS直接注射。在某些实施方式中,直接注射是脑内注射、实质内注射、鞘内注射或其任何组合。在某些实施方式中,向所述对象的CNS直接注射包含对流增强递送(CED)。在某些实施方式中,给药包括外周注射。在某些实施方式中,外周注射是静脉内注射。在某些实施方式中,对象对于APOE4等位基因来说是纯合的(例如APOE4+/+)。

附图说明

[0020] 图1是描绘了包含rAAV载体的质粒的一个实施方式的示意图,所述载体包括编码靶向APOE(例如APOE转录本变体4ApoE4)的抑制性RNA的表达构建物。所述抑制性RNA可操作连接到H1启动子。

[0021] 图2是描绘了包含rAAV载体的质粒的一个实施方式的示意图,所述载体包括编码靶向APOE(例如APOE转录本变体4ApoE4)的抑制性RNA的表达构建物。所述抑制性RNA位于内

含子内并可操作连接到启动子序列。

[0022] 图3是描绘了包含rAAV载体的质粒的一个实施方式的示意图,所述载体包括编码靶向APOE(例如APOE转录本变体4ApoE4)的抑制性RNA的表达构建物。所述抑制性RNA位于启动子序列与APOE2蛋白编码序列之间的内含子内。

[0023] 图4是描绘了包含rAAV载体的质粒的一个实施方式的示意图,所述载体包括编码靶向APOE(例如APOE转录本变体4ApoE4)的抑制性RNA的表达构建物。所述抑制性RNA位于启动子序列与APOE2蛋白编码序列之间的内含子内。

[0024] 图5是描绘了包含rAAV载体的质粒的一个实施方式的示意图,所述载体包括编码靶向APOE(例如APOE转录本变体4ApoE4)的抑制性RNA的表达构建物。所述抑制性RNA位于启动子序列与APOE2蛋白编码序列之间的内含子内。

[0025] 图6是描绘了包含位于所述ITR的“外侧”(例如相对于转入基因插入片段或表达构建物接近于ITR的末端)的“D”区的rAAV载体(上图)和具有在所述载体的“内侧”上的ITR(例如接近于所述载体的转入基因插入片段)的野生型rAAV载体的示意图。

[0026] 图7A和B示出了通过qRT-PCR进行的带有不同的针对APOE4的shRNA和密码子优化的APOE2编码序列的rAAV载体的体外验证。图7A显示几种候选载体成功地降低内源APOE表达。图7B显示由这些载体表达的shRNA不影响所述密码子优化的APOE2的表达。

[0027] 图8是描绘了使用APOE4敲入小鼠对带有不同的针对APOE4的shRNA和密码子优化的APOE2编码序列的rAAV载体进行体内选择的实验设计的示意图。

具体实施方式

[0028] 本公开部分是基于用于在对象中表达AD相关基因产物的组合的组合物和方法。基因产物可以是蛋白质、蛋白质的片段(例如部分)、抑制AD相关基因的干扰核酸等。在某些实施方式中,基因产物是由AD相关基因编码的蛋白质或蛋白质片段。在某些实施方式中,基因产物是抑制AD相关基因的干扰核酸(例如shRNA、siRNA、miRNA、amiRNA等)。

[0029] AD相关基因是指编码在遗传、生物化学或功能上与阿兹海默氏病(AD)相关的基因产物的基因。例如,具有至少一个APOE4拷贝的个体处于发生晚发型AD的提高了的风险之中。在另一个实例中,APOE2在AD的小鼠模型中表现出神经保护作用。当在本文中使用时,术语“神经保护”是指细胞或对象中的神经元结构和/或功能相对于不存在神经保护(例如不存在神经保护药剂或蛋白)的情况下细胞或对象中的神经元结构和/或功能的存留。

[0030] 分离的核酸和载体

[0031] 分离的核酸可以是DNA或RNA。在某些情况下,本公开提供了一种分离的核酸,其包含编码靶向APOE4的抑制性核酸和/或编码APOE2蛋白或其部分的转入基因的表达构建物。

[0032] 通常,本文中所描述的分离的核酸可以编码1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个抑制性核酸(例如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA、amiRNA等)。在某些实施方式中,分离的核酸编码超过10个抑制性核酸。在某些实施方式中,所述一个或多个抑制性核酸中的每一者靶向不同的基因或基因部分(例如第一miRNA靶向基因的第一靶序列,第二miRNA靶向所述基因的不同于第一靶序列的第二靶序列)。在某些实施方式中,所述一个或多个抑制性核酸中的每一者靶向同一基因的不同靶序列(例如分离的核酸编码同一miRNA的多个拷贝)。

[0033] 本公开的方面涉及一种分离的核酸,其包含编码靶向APOE4蛋白(例如APOE基因的

E4亚型)的一个或多个干扰核酸(例如dsRNA、siRNA、miRNA、amiRNA等)的表达构建物。APOE蛋白是指载脂蛋白E,其是一种脂肪结合蛋白,在富含甘油三酯的脂蛋白的分解代谢中发挥作用。存在三种主要的APOE亚型,被称为APOE2、APOE3和APOE4。每种亚型与其余两者的区别在于两个位置,第130位氨基酸和第176位氨基酸(当排除蛋白质的信号肽时,也分别被称为第112和158位)。APOE2含有Cys130/Cys176,并且已被观察到与III型高脂蛋白血症和其他疾病相关,但也发挥神经保护作用。APOE3含有Cys130/Arg176,并且是最常见的APOE等位基因。APOE4含有Arg130/Arg176,并且已被观察到与晚发型阿兹海默氏病、动脉粥样硬化、创伤性脑损伤(TBI)中的不利结果和其他疾病相关。在人类中,APOE基因位于19号染色体上。在某些实施方式中,APOE4由SEQ ID NO:1所示的核酸序列(例如NCBI参考序列号NM_001302690.1)编码。在某些实施方式中,APOE2由SEQ ID NO:2所示的核酸序列(例如NCBI参考序列号NM_000041.3)编码。

[0034] 靶向APOE基因(例如APOE4)的抑制性核酸可以包含长度在6至50个核苷酸之间的互补性区域(例如所述抑制性核酸的杂交到靶基因例如编码APOE4的基因的区域)。在某些实施方式中,抑制性核酸包含长度在约6至30、约8至20或约10至19个核苷酸之间的与APOE的互补性区域。在某些实施方式中,抑制性核酸与APOE序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个毗连核苷酸互补。在某些实施方式中,靶向APOE基因的抑制性核酸是非等位基因特异性的(例如所述抑制性核酸沉默APOE基因的所有亚型)。在某些实施方式中,抑制性核酸靶向APOE的一个或多个特定等位基因,例如APOE2、APOE3和/或APOE4中的一者或多者。

[0035] 在某些实施方式中,基因产物(例如编码APOE2的转入基因)由天然存在的基因的编码部分(例如cDNA)编码。在某些实施方式中,基因产物是由APOE基因的APOE2亚型编码的蛋白质(或其片段)。在某些实施方式中,APOE2基因包含SEQ ID NO:3所示的核酸序列。

[0036] 在某些实施方式中,基因产物是靶向(例如杂交到或包含与其互补的区域)AD相关基因(例如APOE基因的APOE4亚型)的抑制性核酸。专业技术人员会认识到,第一基因产物(例如APOE2)和第二基因产物(例如靶向APOE基因的APOE4亚型的抑制性RNA)的表达顺序通常可以颠倒(例如所述抑制性RNA是第一基因产物并且APOE2是第二基因产物)。在某些实施方式中,基因产物是APOE基因的片段(例如部分)。蛋白质片段可以包含由APOE基因编码的蛋白质的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约99%。在某些实施方式中,蛋白质片段包含具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的蛋白质的50%至99.9%之间(例如50%至99.9%之间的任何值)。在某些实施方式中,基因产物(例如抑制性RNA)杂交到靶基因的一部分(例如与靶基因例如APOE的APOE4亚型例如SEQ ID NO:1所示的序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21个或更多个毗连核苷酸互补)。

[0037] 在某些实施方式中,表达构建物是单顺反子的(例如所述表达构建物编码包含第一基因产物和第二基因产物的单一融合蛋白)。在某些实施方式中,表达构建物是多顺反子的(例如所述表达构建物编码两个不同基因产物,例如两个不同蛋白质或蛋白质片段)。

[0038] 多顺反子表达载体可以包含一个或多个(例如1、2、3、4、5个或更多个)启动子。可以使用任何适合的启动子,例如组成型启动子、诱导型启动子、内源启动子、组织特异性启动子(例如CNS特异性启动子)等。在某些实施方式中,启动子是鸡 β -肌动蛋白启动子(CBA启动子)、CAG启动子(例如由Alexopoulou等,(2008) BMC Cell Biol.9:2;doi:10.1186/1471-

2121-9-2所描述的)、CD68启动子或JeT启动子(例如由Tornøe等,(2002)Gene 297(1-2):21-32所描述的)。在某些实施方式中,启动子可操作连接到编码第一基因产物、第二基因产物或第一基因产物和第二基因产物的核酸序列。在某些实施方式中,表达盒包含一个或多个另外的调控序列,包括但不限于转录因子结合序列、内含子剪切位点、poly(A)添加位点、增强子序列、阻遏物结合位点或上述序列的任何组合。

[0039] 在某些实施方式中,编码第一基因产物的核酸序列和编码第二基因产物的核酸序列被编码内部核糖体进入位点(IRES)的核酸序列分隔开。IRES位点的实例由例如Mokrejs等,(2006)Nucleic Acids Res.34(数据库版):D125-30描述。在某些实施方式中,编码第一基因产物的核酸序列和编码第二基因产物的核酸序列被编码自切割肽的核酸序列分隔开。自切割肽的实例包括但不限于T2A、P2A、E2A、F2A、BmCPV 2A和BmIFV 2A,以及由Liu等,(2017)Sci Rep.7:2193描述的那些。在某些实施方式中,所述自切割肽是T2A肽。

[0040] 在某些实施方式中,障碍例如AD与至少一个拷贝的APOE4的表达相关。因此,在某些实施方式中,本文描述的分离的核酸包含降低或阻止APOE4(例如APOE)的表达的抑制性核酸。编码抑制性核酸的序列可以放置在表达载体的非翻译区(例如内含子、5' UTR、3' UTR等)中。

[0041] 在某些实施方式中,抑制性核酸被放置在表达构建物的内含子中,例如在编码第一基因产物的序列上游的内含子中。抑制性核酸可以是双链RNA(dsRNA)、shRNA、siRNA、micro RNA(miRNA)、人工miRNA(amiRNA)或RNA适体。通常,抑制性核酸与靶RNA(例如mRNA)的约6至约30个之间(例如含端值的6至30之间的任何整数)的毗连核苷酸(例如与所述毗连核苷酸杂交)结合。在某些实施方式中,所述抑制性核酸分子是miRNA或amiRNA,例如靶向APOE的APOE4亚型(编码APOE4蛋白的基因)的miRNA。在某些实施方式中,所述miRNA不包含与它所杂交的APOE mRNA的区域的任何错配(例如所述miRNA是“完美的”)。在某些实施方式中,所述抑制性核酸是shRNA(例如靶向APOE的shRNA),例如SEQ ID NO:7、14和19中的任一者中所示的。在某些实施方式中,miRNA包含与它所杂交的APOE mRNA的区域的至少一个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)错配。

[0042] 在某些实施方式中,抑制性核酸是人工microRNA(amiRNA)。microRNA(miRNA)通常是指在植物和动物中发现的小的非编码RNA,并在基因表达的转录和翻译后调控中起作用。MiRNA被RNA聚合酶转录,以形成被称为pri-miRNA的发夹-环结构,其随后被酶(例如Drosha、Pasha、剪接体等)加工以形成pre-miRNA发夹结构,然后被Dicer加工以形成miRNA/miRNA*双链体(其中*指示所述miRNA双链体的随从链),其一条链随后并入到RNA诱导的沉默复合体(RISC)中。在某些实施方式中,本文中所描述的抑制性RNA是靶向APOE的APOE4亚型(编码APOE4蛋白的基因)的miRNA。

[0043] 在某些实施方式中,靶向APOE(例如APOE的APOE4亚型)的抑制性核酸包含miRNA/miRNA*双链体。在某些实施方式中,miRNA/miRNA*双链体的miRNA链包含SEQ ID NO:5、6、12、13、17和18中的任一者所示的序列或由所述序列构成。在某些实施方式中,miRNA/miRNA*双链体的miRNA*链包含SEQ ID NO:5、6、12、13、17和18中的任一者所示的序列或由所述序列构成。

[0044] 人工microRNA(amiRNA)通过修饰本源miRNA以用感兴趣的靶向区代替pre-mRNA的天然靶向区来产生。例如,可以将天然存在的表达的miRNA用作支架或骨架(例如pri-miRNA

支架),并将茎序列用靶向感兴趣的基因的miRNA的茎序列代替。人工前体microRNA(pre-amiRNA)通常被加工,以便偏好性地产生单一的稳定的小RNA。在某些实施方式中,本文中描述的rAAV载体和rAAV包含编码amiRNA的核酸。在某些实施方式中,所述amiRNA的pri-miRNA支架源自于选自pri-MIR-21、pri-MIR-22、pri-MIR-26a、pri-MIR-30a、pri-MIR-33、pri-MIR-122、pri-MIR-375、pri-MIR-199、pri-MIR-99、pri-MIR-194、pri-MIR-155和pri-MIR-451的pri-miRNA。在某些实施方式中,amiRNA包含靶向APOE(例如APOE的APOE4亚型)的核酸序列和eSIBR amiRNA支架,例如在Fowler等,Nucleic Acids Res.2016 3月18日;44(5):e48中所描述的。

[0045] 在某些实施方式中,靶向APOE(例如APOE的APOE4亚型)的amiRNA包含SEQ ID NO:8、15和20中的任一者所示的序列或由所述序列构成。

[0046] 本文中所述的分离的核酸可以独立地或作为载体的一部分存在。通常,载体可以是质粒、粘粒、噬菌粒、细菌人工染色体(BAC)或病毒载体(例如腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、反转录病毒载体、杆状病毒载体等)。在某些实施方式中,所述载体是质粒(例如包含本文中所述的分离的核酸的质粒)。在某些实施方式中,所述载体是重组AAV(rAAV)载体。rAAV可以包含rAAV载体的“正链”或“负链”。在某些实施方式中,rAAV载体是单链的(例如单链DNA)。在某些实施方式中,载体是杆状病毒载体(例如苜蓿银纹夜蛾(Autographa californica)核型多角体病毒(AcNPV)载体)。

[0047] 通常,rAAV载体包含两侧带有两个AAV反向末端重复(ITR)序列的转入基因(例如包含一个或多个下述每一者的表达构建物:启动子,内含子,增强子序列,蛋白质编码序列,抑制性RNA编码序列,polyA尾序列等)。在某些实施方式中,rAAV载体的转入基因包含本公开所描述的分离的核酸。在某些实施方式中,rAAV载体的两个ITR序列中的每一者是全长ITR(例如长度约为145bp,并含有有功能的Rep结合位点(RBS)和末端解离位点(trs))。在某些实施方式中,rAAV载体的ITR之一被截短(例如缩短或非全长)。在某些实施方式中,截短的ITR缺少有功能的末端解离位点(trs),并被用于产生自身互补的AAV载体(scAAV载体)。在某些实施方式中,截短的ITR是 Δ ITR,例如由McCarty等,(2003) Gene Ther.10(26):2112-8所描述的。

[0048] 本公开的某些方面涉及包含ITR的分离的核酸(例如rAAV载体),所述ITR相对于野生型AAV ITR,例如相对于野生型AAV2 ITR(例如SEQ ID NO:25)具有一个或多个修饰(例如核酸添加、缺失、替换等)。野生型AAV2 ITR的结构示出在图6中。通常,野生型ITR包含125个核苷酸的区域,其自身退火以形成回文双链T形发夹结构,所述发夹结构由两个横臂(分别由被称为B/B'和C/C'的序列形成)、较长的茎区(由序列A/A'形成)和被称为“D”区的单链末端区域构成(图6)。通常,ITR的“D”区位于rAAV载体的由A/A'序列形成的茎区与含有转入基因的插入片段之间(例如位于所述ITR的相对于ITR的末端的“内侧”上或靠近rAAV载体的转入基因插入片段或表达构建物)。在某些实施方式中,“D”区包含SEQ ID NO:23所示的序列。已观察到所述“D”区在衣壳蛋白对rAAV载体的衣壳化中发挥重要作用,例如由Ling等,(2015) J MolGenet Med 9(3)所公开的。

[0049] 本公开部分是基于下述令人吃惊地发现,即包含位于ITR的“外侧”上(例如相对于转入基因插入片段或表达构建物靠近ITR的末端)的“D”区的rAAV载体与具有未修饰的(例如野生型)ITR的rAAV载体相比,被AAV衣壳蛋白高效衣壳化。在某些实施方式中,具有修饰

的“D”序列(例如在“外侧”位置中的“D”序列)的rAAV载体相对于具有野生型ITR序列的rAAV载体具有降低的毒性。

[0050] 在某些实施方式中,修饰的“D”序列相对于野生型“D”序列(例如SEQ ID NO:23)包含至少一个核苷酸替换。修饰的“D”序列相对于野生型“D”序列(例如SEQ ID NO:23)可能具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个核苷酸替换。在某些实施方式中,修饰的“D”序列相对于野生型“D”序列(例如SEQ ID NO:23)包含至少10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个核酸替换。在某些实施方式中,修饰的“D”序列与野生型“D”序列(例如SEQ ID NO:23)具有约10%至约99%之间(例如10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%)的同一性。在某些实施方式中,修饰的“D”序列包含也被称为“S”序列的SEQ ID NO:22所示的序列,正如在Wang等,(1995) *J Mol Biol* 250 (5):573-80中所述。

[0051] 本公开所描述的分离的核酸或rAAV载体可能还包含例如SEQ ID NO:24所示的“TRY”序列,正如由Francois等,2005. *J Virol* 最小2型腺相关病毒p5元件的Rep依赖性复制需要细胞TATA结合蛋白(The Cellular TATA Binding Protein Is Required for Rep-Dependent Replication of a Minimal Adeno-Associated Virus Type 2 p5 Element)所描述的。在某些实施方式中,TRY序列位于分离的核酸或rAAV载体的ITR(例如5' ITR)与表达构建物(例如编码转入基因的插入片段)之间。

[0052] 在某些情况下,本公开涉及包含本公开所描述的分离的核酸或rAAV载体的杆状病毒载体。在某些实施方式中,所述杆状病毒载体是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)载体,例如由Urabe等,(2002) *Hum Gene Ther* 13(16):1935-43和Smith等,(2009) *Mol Ther* 17(11):1888-1896所描述的。

[0053] 在某些情况下,本公开提供了一种包含本文中所描述的分离的核酸或载体的宿主细胞。宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。例如,宿主细胞可以是哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞等。在某些实施方式中,宿主细胞是哺乳动物细胞例如HEK293T细胞。在某些实施方式中,宿主细胞是细菌细胞例如大肠杆菌(*E. coli*)细胞。

[0054] rAAV

[0055] 在某些情况下,本公开涉及包含编码本文中所描述的核酸的转入基因的重组AAV(rAAV)(例如本文中所描述的rAAV载体)。术语“rAAV”通常是指包含被一种或多种AAV衣壳蛋白衣壳化的rAAV载体的病毒粒子。本公开描述的rAAV可能包含具有选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10的血清型的衣壳蛋白。在某些实施方式中,rAAV包含来自于非人类宿主的衣壳蛋白,例如恒河猴AAV衣壳蛋白如AAVrh.10、AAVrh.39等。在某些实施方式中,本公开描述的rAAV包含的衣壳蛋白是野生型衣壳蛋白的变体,例如相对于它所源自的野生型AAV衣壳蛋白包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个(例如15、20、25、50、100个等)氨基酸替换(例如突变)的衣壳蛋白变体。

[0056] 在某些实施方式中,本公开描述的rAAV容易传播通过CNS,特别是在被引入到CSF空间中或直接引入到脑实质中时。因此,在某些实施方式中,本公开描述的rAAV包含能够跨过血脑屏障(BBB)的衣壳蛋白。例如,在某些实施方式中,rAAV包含具有AAV9或AAVrh.10血清型的衣壳蛋白。rAAV的生产由例如Samulski等,(1989) *J Virol*.63(9):3822-8和Wright(2009) *Hum Gene Ther*.20(7):698-706所描述。

[0057] 在某些实施方式中,本公开所描述的rAAV(例如包含被AAV衣壳蛋白衣壳化的重组rAAV基因组以形成rAAV衣壳粒子)在杆状病毒载体表达系统(BEVS)中生产。使用BEVS生产rAAV由例如Urabe等,(2002) Hum Gene Ther 13(16):1935-43,Smith等,(2009) Mol Ther 17(11):1888-1896,美国专利号8,945,918,美国专利号9,879,282和国际PCT公开WO 2017/184879所描述。然而,rAAV可以使用任何适合的方法(例如使用重组rep和cap基因)来生产。

[0058] 药物组合物

[0059] 在某些情况下,本公开提供了包含本文所描述的分离的核酸或rAAV和可药用载体的药物组合物。当在本文中使用时,术语“可药用”是指材料例如载体或稀释剂不废止化合物的生物活性或性质并且相对无毒,例如所述材料可以给药到个体,而不引起不想要的生物效应或以有害方式与包含它的组合物的任何组分相互作用。

[0060] 当在本文中使用时,术语“可药用载体”意味着可药用材料、组合物或载体例如液体或固体填充剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、稀释剂、赋形剂、增稠剂、溶剂或包封材料,它们参与在本发明中有用的化合物在患者中或向患者的运载和运输,使其可以执行目标功能。在本发明的实践中使用的药物组合物中可以包含的其他成分在本领域中是已知的,并且描述在例如通过参考并入本文的《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(Genaro主编,Mack Publishing Co.,1985,宾夕法尼亚州伊斯顿)中。

[0061] 本文中提供的组合物(例如药物组合物)可以通过任何途径给药,包括肠内(例如口服)、肠胃外、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、脑室内、透皮、真皮内、直肠、阴道内、腹膜内、局部(例如通过粉剂、软膏、霜剂和/或滴剂)、黏膜、鼻、颊、舌下,通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入,和/或作为口喷剂、鼻喷剂和/或气溶胶。具体设想的途径是口服给药、静脉内给药(例如系统性静脉内注射)、通过血液和/或淋巴供应的区域性给药和/或直接给药到受影响的部位。通常,最适合的给药途径取决于各种不同的因素,包括药剂的性质(例如它在胃肠道环境中的稳定性)和/或对象的状况(例如所述对象是否能够耐受口服给药)。在某些实施方式中,本文中描述的化合物或药物组合物适合于局部给药到对象的眼。

[0062] 方法

[0063] 本公开部分是基于用于在对象中表达一起(例如协同)作用以治疗阿兹海默氏病的AD相关基因产物的组合的组合物。当在本文中使用时,“治疗”是指(a)阻止或延迟阿兹海默氏病的发作;(b)减轻阿兹海默氏病的严重程度;(c)减轻或阻止阿兹海默氏病特征性的症状的发展;(d)和/或阻止阿兹海默氏病特征性的症状的恶化。阿兹海默氏病的症状包括例如认知功能障碍(例如痴呆、幻觉、失忆等)、运动功能障碍(例如难以执行日常任务等)以及情绪和行为功能障碍。

[0064] 因此,在某些情况下,本公开提供了一种用于治疗患有或怀疑患有阿兹海默氏病的对象的方法,所述方法包括向所述对象给药本公开所描述的组合物(例如包含分离的核酸或载体或rAAV的组合物)。

[0065] 对象通常是哺乳动物,例如人类、狗、猫、猪、仓鼠、大鼠、小鼠等。在某些实施方式中,对象是人类。在某些实施方式中,对象通过APOE4等位基因来表征。对象对于APOE4来说可以是纯合(例如APOE4+/+)或杂合的。在某些实施方式中,对象对于APOE4来说是杂合的,并且所述对象的第二个APOE等位基因选自APOE2和APOE3。

[0066] 在某些实施方式中,组合物被直接例如通过直接注射到所述对象的脑和/或脊髓中给药到所述对象的CNS。CNS直接给药模式的实例包括但不限于脑内注射、脑室内注射、脑池内注射、实质内注射、鞘内注射以及上述模式的任何组合。在某些实施方式中,直接注射到对象的CNS中引起转入基因在所述对象的中脑、纹状体和/或大脑皮层中的表达(例如第一基因产物、第二基因产物以及如果适用的话第三基因产物的表达)。在某些实施方式中,直接注射到CNS中引起转入基因在所述对象的脊髓和/或CSF中的表达(例如第一基因产物、第二基因产物以及如果适用的话第三基因产物的表达)。

[0067] 在某些实施方式中,直接注射到对象的CNS包括对流增强递送(CED)。对流增强递送是一种治疗策略,涉及通过手术使脑暴露并将小直径导管直接置于脑的目标区域中,然后将治疗剂(例如本文所述的组合物或rAAV)直接输注到所述对象的脑。CED被例如Debinski等,(2009) Expert Rev Neurother. 9 (10) :1519-27描述。

[0068] 在某些实施方式中,将组合物外周给药到对象,例如通过外周注射。外周注射的实例包括皮下注射、静脉内注射、动脉内注射、腹膜内注射或上述方式的任何组合。在某些实施方式中,所述外周注射是动脉内注射,例如注射到对象的颈动脉中。

[0069] 在某些实施方式中,本公开所描述的组合物(例如包含分离的核酸或载体或rAAV的组合物)既外周给药也直接给药到对象的CNS。例如,在某些实施方式中,通过动脉内注射(例如注射到颈动脉中)并通过实质内注射(例如通过CED的实质内注射)向对象给药组合物。在某些实施方式中,向CNS的直接注射和外周注射是同时的(例如同时发生)。在某些实施方式中,所述直接注射发生在外周注射之前(例如之前1分钟至1周之间或更长时间)。在某些实施方式中,所述直接注射发生在外周注射之后(例如之后1分钟至1周之间或更长时间)。

[0070] 给药到对象的本公开所描述的组合物(例如包含分离的核酸或载体或rAAV的组合物)的量随着给药方法而变。例如,在某些实施方式中,本文所描述的rAAV以约 10^9 个基因组拷贝(GC)/kg至约 10^{14} GC/kg之间(例如约 10^9 GC/kg、约 10^{10} GC/kg、约 10^{11} GC/kg、约 10^{12} GC/kg、约 10^{13} GC/kg或约 10^{14} GC/kg)的滴度给药到对象。在某些实施方式中,通过注射到CSF空间或通过实质内注射以高滴度给药到对象(例如 $>10^{12}$ 个基因组拷贝GC/kg的rAAV)。

[0071] 本公开所描述的组合物(例如包含分离的核酸或载体或rAAV的组合物)可以一次或多次(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、20次或更多次)给药到对象。在某些实施方式中,组合物例如通过输注泵被连续(例如长期)给药到对象。

[0072] 实施例

[0073] 实施例1:核酸和rAAV载体

[0074] 本实施例描述了包含靶向APOE4的抑制性核酸和/或编码APOE2蛋白或其部分的转入基因的分离的核酸(例如含有分离的核酸的载体如rAAV载体和rAAV)。在某些实施方式中,本实施例中描述的构建物可用于治疗患有或怀疑患有阿兹海默氏病(AD)对象,所述对象具有至少一个APOE4亚型拷贝。在某些实施方式中,对象对于APOE4亚型来说是纯合的(例如APO44^{+/+})。

[0075] 编码shRNA的分离的核酸被用于在体外和体内两种情况下特异性敲落APOE4亚型的表达。在某些实施方式中,所述shRNA是非等位基因特异的,例如它们也能敲落其他APOE亚型(例如E2、E3或E4)的表达。

[0076] 编码APOE2编码转入基因的分离的核酸被用于过表达APOE2。所述APOE2转入基因被密码子优化以与细胞中的内源APOE2序列具有足够差异,使得它不被靶向无论何种亚型的野生型APOE的shRNA识别。

[0077] 所述shRNA和转入基因可以被可操作连接到同一个启动子或分开的启动子。shRNA在分开的启动子下表达,通常为Po1 III启动子(例如H1启动子)或Po1 II启动子(例如CBA、T7等)。通常,所述shRNA被可操作连接到放置在包含密码子优化的APOE2转入基因的开放阅读框上游的内含子序列中的Po1 II启动子。本公开描述的表达构建物的实例示出在图1-5和下面的表1中。

[0078] 包含所述分离的核酸的重组腺相关病毒(rAAV)使用用于三质粒转染的细胞例如HEK293细胞来产生。ITR序列在表达构建物的两侧,所述表达构建物通常包含一个或多个下述元件:至少一个启动子/增强子元件,3' polyA信号,以及翻译后信号例如WPRE元件。多个基因产物被同时表达,例如APOE的APOE2亚型和一种或多种抑制性核酸(例如靶向APOE的APOE4亚型的抑制性核酸)。在被表达基因的上游存在被高效剪接的短内含子序列,这可以提高表达水平。shRNA和其他调节性RNA可以被潜在地包含在这些序列内。

[0079] 表1

名称	启动子 1	shRNA	CDS1	PolyA 1	ITR 之间的长度
H1_ApoE_广谱_sh	H1	ApoE	-	-	903
内含子_ApoE_广谱_sh	CMVe_CBAP	ApoE	-	WPRE_bGHpolyA	2251
[0080] 内含子_ApoE_sh_ApoE2_I00025	CMVe_CBAP	ApoE	APOE2_CDS_优化	WPRE_bGHpolyA	3507
内含子_ApoE_Chen1_sh_APOE2_I00026	CMVe_CBAP	ApoE	ApoE2_CDS_优化	WPRE_bGHpolyA	3506
[0081] 内含子_APOE_Chen2_sh_APOE2_I00027	CMVe_CBAP	ApoE	ApoE2_CDS_优化	WPRE_bGHpolyA	3502

[0082] 实施例2:病毒在APOE4^{+/+}细胞中的转导的基于细胞的测定法

[0083] 细胞作为例如来自于AD患者的成纤维细胞、单核细胞或hES细胞或患者来源的诱导性多能干细胞(iPSC)被获得。这些细胞积累包含β-淀粉样肽蛋白的蛋白斑块和包含Tau蛋白的扭曲链的缠结。

[0084] 使用这些细胞模型,通过例如使用抗β-淀粉样肽抗体或抗磷酸化Tau抗体,然后使用荧光显微镜成像,根据蛋白聚集体例如斑块和缠结的积累来定量与AD相关的神经变性特征。还通过蛋白标志物例如β-淀粉样肽、磷酸化Tau或APOE4的ICC,进行了与AD相关的神经变性特征的成像。使用Western印迹、ELISA和/或qPCR来定量这些细胞中APOE4的表达水平。

[0085] 在rAAV转导的表达的背景下测量治疗终点(例如AD相关病理的减轻),以确认和量化活性和功能。 β -淀粉样肽和磷酸化Tau的水平也使用Western印迹、ELISA和/或qPCR来定量。

[0086] 实施例3:使用表达人类APOE4的小鼠的体内测定法

[0087] 本实施例描述了使用突变体小鼠的rAAV的体内测定法。在突变体小鼠中如上所述的rAAV的体内研究使用例如下述文献中描述的测定法来进行:Liao等,(2018) J.Clin.Invest 128(5):2144-2155;Rosenberg等,(2018) Hum Gene Ther Clin Dev 29(1):24-47;Zhao等,(2016) Neurobiol Aging 44:159-172。这些突变体小鼠在鼠类APOE基因座处具有人类APOE4亚型。

[0088] 介质对照和rAAV的鞘内或脑室内递送(例如以 2×10^{11} vg/小鼠的剂量)使用浓缩的rAAV储用液,以例如5-10 μ L之间的注射体积进行。实质内递送通过对流增强递送进行。

[0089] 治疗在症状发作之前或发作后开始。测量的终点是CNS和CSF中的APOE4和APOE2的表达水平。

[0090] 实施例4:小鼠AD模型的体内测定法

[0091] 本实施例描述了使用突变体小鼠的rAAV的体内测定法。在突变体小鼠中如上所述的rAAV的体内研究使用例如下述文献中描述的测定法来进行:Liao等,(2018) J.Clin.Invest 128(5):2144-2155;Rosenberg等,(2018) Hum Gene Ther Clin Dev 29(1):24-47;Zhao等,(2016) Neurobiol Aging 44:159-172。这些突变体小鼠在鼠类APOE基因座处具有人类APOE4亚型。在某些情况下,这些小鼠还表达突变的人类淀粉样肽前体蛋白(APP)、突变的人类早老蛋白1(PS1)蛋白和/或突变的人类早老蛋白2(PS2)蛋白,以模拟人类AD中 β -淀粉样肽斑块的发生。

[0092] 介质对照和rAAV的鞘内或脑室内递送(例如以 2×10^{11} vg/小鼠的剂量)使用浓缩的rAAV储用液,以例如5-10 μ L之间的注射体积进行。实质内递送通过对流增强递送进行。外周递送通过尾静脉注射来实现。

[0093] 治疗在症状发作之前或发作后开始。测量的终点是CNS和CSF中的APOE4和APOE2的表达水平,更长的 β -淀粉样肽(AB)种类例如AB₄₂的积累,所有AB种类的增加,运动和认知终点,以及 β -淀粉样肽斑块和Tau缠结的积累。

[0094] 实施例5:在AD患者中的临床试验

[0095] 本实施例描述了用于在AD患者中评估本公开所描述的rAAV的安全性和功效的临床试验。

[0096] 本公开的rAAV用于治疗AD的临床试验使用与Grabowski等,(1995) Ann.Intern.Med.122(1):33-39中所描述的相似的研究设计来进行。将所述rAAV递送到CSF中,实质内递送到海马体或另一个脑部区域,或外周递送。

[0097] 测量的终点是 β -淀粉样肽斑块和Tau缠结的水平、运动和认知终点以及APOE4和APOE2蛋白的水平。

[0098] 实施例6:在AD患者中与 β -淀粉样肽抗体相组合的临床试验

[0099] 本实施例描述了用于在AD患者中评估与 β -淀粉样肽抗体(例如bapineuzumab和索拉珠单抗)相组合使用的本公开所描述的rAAV的安全性和功效的临床试验。

[0100] 与抗 β -淀粉样肽抗体相组合的本公开的rAAV用于治疗AD的临床试验,使用与

Grabowski等, (1995) *Ann. Intern. Med.* 122 (1) :33-39中所描述的相似的研究设计来进行。将所述rAAV递送到CSF中,实质内递送到海马体或另一个脑部区域,或外周递送。

[0101] 在某些实施方式中,本公开的rAAV与抗 β -淀粉样肽抗体协同作用,以降低AD患者发生与APOE基因型高度关联的淀粉样肽相关成像异常(ARIR)的可能性。ARIA是在AD患者中观察到的一组异常,其与特别是使用人类单克隆抗体的淀粉样肽改变疗法相关。存在两种类型的ARIA,指向脑水肿的ARIA-E和指向脑微出血的ARIA-H。

[0102] 评估的终点是治疗之前和之后的脑成像以确定ARIA是否已经发生并且本公开的rAAV是否降低ARIA的可能性, β -淀粉样肽斑块和Tau缠结的水平,运动和认知终点,以及APOE4和APOE2蛋白的水平。

[0103] 实施例7:在APOE4^{+/+}、APOE4^{+/-}和APOE4^{-/-}的AD患者中的临床试验

[0104] 本实施例描述了用于评估本公开所描述的rAAV在APOE4^{+/+}AD患者中与APOE4^{+/-}和APOE4^{-/-}患者相比,在改善包括中风、冠状动脉疾病、动脉粥样硬化、头部创伤后恢复不良和旁路机器上手术后认知恢复不良在内的其他病理的高风险方面的功效的临床试验。

[0105] 本公开的rAAV用于治疗AD和改善与APOE4^{+/+}患者相关的其他病症的高风险的临床试验,使用与Grabowski等, (1995) *Ann. Intern. Med.* 122 (1) :33-39中所描述的相似的研究设计来进行。将所述rAAV递送到CSF中,实质内递送到海马体或另一个脑部区域,或外周递送。

[0106] 在使用本公开的rAAV治疗之前和之后评估的终点是血压、血液胆固醇和血糖水平、运动和认知终点、冠状动脉的MRI、PET和超声波成像、认知创伤后恢复以及旁路机器上手术后恢复。

[0107] 实施例8:在携带APOE4亚型的患者中预防AD或治疗AD

[0108] 本实施例描述了用于评估本公开所描述的rAAV在降低具有至少一个APOE4亚型的对象发生AD的风险中和在具有至少一个APOE4亚型的患者中治疗AD中的功效的临床试验。具有APOE4亚型的患者可以是APOE4^{+/+}或APOE4^{+/-}。

[0109] 本公开的rAAV用于在APOE4等位基因携带者中预防或治疗AD的临床试验,使用与Grabowski等, (1995) *Ann. Intern. Med.* 122 (1) :33-39中所描述的相似的研究设计来进行。将所述rAAV递送到CSF中,实质内递送到海马体或另一个脑部区域,或外周递送。

[0110] 在使用本公开的rAAV治疗之前和之后评估的终点是CSF和血液中APOE4和APOE2的水平以及认知和运动终点。

[0111] 实施例9:ITR“D”序列放置和细胞转导的试验

[0112] 调查了ITR“D”序列的放置对rAAV的细胞转导的影响。将HEK293细胞用编码ApoE2的rAAV转导,所述rAAV具有:1)野生型ITR(例如“D”序列靠近转入基因插入片段并远离ITR的末端),或2)“D”序列位于载体的“外侧”上的ITR(例如“D”序列位置靠近ITR的末端并远离转入基因插入片段),正如在图6中所示。

[0113] 实施例9:用于内源APOE沉默的shRNA和APOE2过表达的体外验证

[0114] 将含有针对APOE的独特shRNA和密码子优化的APOE2编码序列的多种质粒在体外转染筛选中进行评估,以评估APOE(例如APOE4)敲落和APOE2的异源表达的程度。质粒被特别设计以选择性敲落内源APOE基因而不影响载体编码的APOE2蛋白表达。通过qRT-PCR发现,多种质粒显示出内源APOE的减少(图7A)和密码子优化的APOE2的表达(图7B)。shRNA候

选物显示出内源APOE的显著减少,并且不影响密码子优化的APOE2。

[0115] 实施例10:用于内源APOE沉默的shRNA和APOE2过表达的体内验证

[0116] 选择表现出内源APOE的显著减少且不影响密码子优化的APOE2的shRNA候选物用于进一步的体内研究。使用APOE4敲入(KI)小鼠模型来评估针对APOE4的候选shRNA的体内功效。在APOE4 KI小鼠中,两个小鼠ApoE等位基因均被人类APOE-ε4代替。小鼠(n=5)通过脑室内注射(ICV)接受带有针对APOE4的候选shRNA的载体,并在注射后60天分析人类APOE4 mRNA的生物分布(图8)。

[0117] 等同性

[0118] 尽管已描述了本发明的至少一个实施方式的几个方面,但应该认识到,对于本领域技术人员来说,可以容易地进行各种不同的改变、修改和改进。这些改变、修改和改进打算作为本公开的一部分,并打算落于本发明的精神和范围之内。因此,上面的描述和附图仅仅是出于示例的目的。

[0119] 尽管在本文中已描述并说明了本发明的几个实施方式,但本领域普通技术人员可以容易地设想各种其他手段和/或结构,用于执行本文描述的功能和/或获得本文描述的结果和/或一个或多个优点,并且每个这样的改变和/或修改被视为在本发明的范围之内。更广义来说,本领域技术人员会容易地认识到,本文中描述的所有参数、维度、材料和配置均意在示例,并且实际参数、维度、材料和/或配置将取决于使用本发明的教导的一种或多种具体应用。本领域技术人员会认识到或使用不超过常规的实验能够确定本文描述的发明的特定实施方式的许多等同物。因此应该理解,上述实施方式仅仅作为示例呈现,并且在权利要求书及其等同物的范围之内,本发明可以以具体描述和宣称的之外的其他方式实践。本发明针对本文中描述的每个单独的特点、系统、物品、材料和/或方法。此外,两个或更多个此类特点、系统、物品、材料和/或方法的任何组合,如果此类特点、系统、物品、材料和/或方法不互相冲突的话,也包括在本发明的范围之内。

[0120] 当在本文中在说明书和权利要求书中使用时,除非清楚地指明不是如此,没有具体数目的指称应该被理解为意味着“至少一个”。

[0121] 当在本文中在说明书和权利要求书中使用时,短语“和/或”应该被理解为意味着如此结合的要素中的“任一者或两者”,即在某些情况下结合存在而在其他情况下不结合存在的要素。除非清楚地指明不是如此,除了由“和/或”从句具体指明的要素之外,可以任选地地存在其他要素,无论与那些具体指明的要素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言例如“包含”相结合使用时,对“A和/或B”的指称在一个实施方式中是指有A无B(任选地包括B之外的其他要素),在另一个所述方式中是指有B无A(任选地包括A之外的其他要素),在又一个实施方式中是指A和B两者(任选地包括其他要素),等等。

[0122] 当在本文中在说明书和权利要求书中使用时,“或”应该被理解为与上文所定义的“和/或”具有相同的含义。例如,当分隔名单中的条目时,“或”或“和/或”应该被解释为是包含性的,即包含多个要素或要素名单中的至少一者,但是也包括超过一个所述要素,并任选地包括其他未列出的条目。只有清楚指明不是如此的术语例如“中的仅仅一者”或“中的恰好一者”或在权利要求书中使用的“由……组成”,才是指包含多个要素或要素名单中的恰好一个要素。通常,当在本文中使用时,当后面跟有排他性术语例如“中的任一者”、“中的一者”、“中的仅仅一者”或“中的恰好一者”时,术语“或”应该只被解释为指示排他性的可选项

(即“一者或另一者但不是两者”)。当在权利要求书中使用时,“基本上由……组成”应具有在专利法领域中所使用的普通含义。

[0123] 当在本文中在说明书和权利要求书中使用时,在指称一个或多个要素的名单时,短语“至少一个”应该被理解为意味着选自所述要素名单中的任一个或多个要素的至少一个要素,但不必定包括在所述要素名单中具体列出的每一个要素的至少一个要素,并且不排除所述要素名单中的要素的任何组合。这个定义也允许可以任选地存在短语“至少一个”所指称的要素名单中具体指明的要素之外的要素,不论与那些具体指明的要素相关还是不相干。因此,作为非限制性实例,“至少一个A和B”(或等同地“至少一个A和/或B”)在一个实施方式中可以是指至少一个、任选地包括超过一个A且不存在B(并任选地包括B之外的要素),在另一个实施方式中是指至少一个、任选地包括超过一个B且不存在A(并任选地包括A之外的要素),在又一个实施方式中是指至少一个、任选地包括超过一个A和至少一个、任选地包括超过一个B(并任选地包括其他要素),等等。

[0124] 在权利要求书以及上面的说明书中,所有过渡性短语例如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”等应该被理解为是开放性的,即意味着包括但不限于。只有过渡性短语“由……组成”和“基本上由……组成”分别应当是封闭或半封闭的过渡性短语,正如在美国专利局专利审查程序手册(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03节中所阐述的。

[0125] 在权利要求书中用于修饰权利要求要素的序数词例如“第一”、“第二”、“第三”等,本身并不意味着一个权利要求要素相对于另一个权利要求要素的任何优先权、优先性或顺序或方法的行动执行的时间顺序,而是仅用作标签以将具有某个名称的一个权利要求要素与具有相同名称(但使用序数词)的另一个要素区分开来,以分辨所述权利要求要素。

[0126] 还应该理解,除非清楚地指明不是如此,否则在本文中提出的包括超过一个步骤或行动的任何方法权利要求中,所述方法的步骤或行动的顺序不一定限于叙述所述方法的步骤或行动的顺序。

[0127] 序列

[0128] 在某些实施方式中,编码一个或多个基因产物(例如第一、第二和/或第三基因产物)的表达盒包含SEQ ID NO:1-21中的任一者所示的序列或由所述序列组成。在某些实施方式中,基因产物由SEQ ID NO:1-21中的任一者所示的序列的一部分(例如片段)编码。专业技术人员会认识到,编码抑制性核酸的核酸序列可以被描述为其中所有“T”已被“U”代替的序列。

[0129] >人类APOE4核酸序列(NM_001302690.1)(SEQ ID NO:1)

[0130] GGATGGGGAGATAAGAGAAGACCAGGAGGGAGTTAAATAGGGAATGGGTTGGGGCGGCTTGGTAAATG
TGCTGGGATTAGGCTGTTGCAGATAATGCAACAAGGCTTGGAAGGCTAACCTGGGACTGGCCAATCACAGGCAGGAA
GATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTCACATTCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGA
CAGAGCCGGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAAGTGGCACTGGGTGCGTTT
TGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCCAGGTCACCCAGGA
ACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCTACAAATCGGAAGTGGAGGAACAAGTACCCCGG
TGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGAC
GTGTGCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGC

CCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGT
ACCAGGCCGGGGCCCGCGAGGGCGCCGAGCGCGCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGAACAG
GGCCGCGTGCGGGCCCGCCACTGTGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCCTGGGGCGAGCGG
CTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGCCGACCCGCGACCCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGT
GCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACGCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGT
TCGAGCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGC
GCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGAACGCCGAAGCCTGCAGCCATGCGACCCACGCCACCCCGTGCCTCCT
GCCTCCGCGCAGCCTGCAGCGGGAGACCCTGTCCCCGCCAGCCGTCCTCCTGGGGTGGACCCTAGTTTAATAAAG
ATTCACCAAGTTTACGCATCAAAAAA

[0131] >人类APOE2核酸序列(NM_000041.3)(SEQ ID NO:2)

[0132] GGGACAGGGGAGCCCTATAATTGGACAAGTCTGGGATCCTGAGTCTACTCAGCCCCAGCGGAGGTG
AAGGACGTCCTTCCCCAGGAGCCGACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGAAGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTC
ACATTCTGGCAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGAGCCCAGCTGCGCCAGCAGAC
CGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGAACTGGCACTGGGTCGCTTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAGACACTGT
CTGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAGCTCCAGGTCACCCAGAACTGAGGGCGCTGATGGACGAGACCATGAAG
GAGTTGAAGGCCTACAAATCGAACTGGAGGAACAACCTGACCCCGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTGTCCAA
GGAGCTGCAGGCGGGCAGGCCCGGCTGGGCGCGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGGGC
AGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCCTCGCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAG
CGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCCCGGAGGGCGCCGAGCG
CGGCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCCCTGGTGAACAGGGCCGCTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCC
TGGCCGGCCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCAGC
CGGACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCA
GATACGCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGAAGACATGCAGCGCC
AGTGGGCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGA
ACGCCGAAGCCTGCAGCCATGCGACCCACGCCACCCGTCCTCCTGCCTCCGCGCAGCCTGCAGCGGGAGACCCT
GTCCCCGCCAGCCGTCCTCCTGGGGTGGACCCTAGTTTAATAAAGATTACCAAGTTTACGCATCAAAAA

[0133] >人类ApoE2氨基酸序列(SEQ ID NO:3)

[0134] MKVLWAALLVTFLAGQAKVEQAVETEPEPELRQQTEWQSQQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEL
LSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRRLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQ
STEELRVRLASHLRKLRKLLRDADDLQKCLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGLAGQPLQE
RAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWEPLVEDMQRQWAGLVEK
VQAAVGTSAAPVPSDNH

[0135] >ApoE2核酸序列(密码子优化的)(SEQ ID NO:4)

[0136] ATGAAGGTGCTGTGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCTGGCCGGCTGCCAGGCCAAaGTcGAaCAGGC
CGTcGAGACCGAGCCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGCCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTG
GGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGCTGGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAGGAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGG
TGACCCAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAAaGAaCTcAAaGcTtAaAAGAGCGAGCTGGAGGAGCA
GCTGACCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCTGAGCAAGGAGCTGCAGGCCCGCCAGGCCCGCCTGGGCGCCG
ACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAG

CTGCGCGTGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGCGCGACGCCGACGACCTGCAGAAGTG
 CCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCTGAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCC
 TGGTGGAGCAGGGCCGCGTGCAGCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGCCAGCCCCTGCAGGAGCGCGCCAGGCC
 TGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGCACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCA
 GGTGGCCGAGGTGCGCGCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATCCGCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCC
 TGAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGGGCCGGCCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCCGCC
 GTGGGCACCAGCGCCCGCCCGTGGCCAGCGACAACCACTAA

[0137] >ApoE4 shRNA 1核酸序列 (SEQ ID NO:5)

[0138] TTGTAGGCCTTCAACTCCTTC

[0139] >ApoE4 shRNA 1核酸序列 (SEQ ID NO:6)

[0140] GAAGGAGTTGAAGGCCTACAA

[0141] >带有环的ApoE4 shRNA 1 (SEQ ID NO:7)

[0142] TTGTAGGCCTTCAACTCCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCTACA A

[0143] >ApoE4 amiRNA 1 (SEQ ID NO:8)

[0144] ttgtcctcctcccacggtggccatttgttccatgtgagtgctagtaacaggccttgtgtcctTTGTAG
 GCCTTCAACTCCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCTACAagacaacagcatacagccttcagca
 agcctcc a

[0145] >ApoE4 amiRNA rAAV载体H1 (SEQ ID NO:9)

[0146] ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggcgaccaaaggtcgcccagcggc
 gggctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggttcc
 tgctagctctgggtatttaagcccagtgagcacgcagggtctccattttgaagcgggaggttacgcgttcgtcga
 ctactagtgggtaccagagcaaaaaattgtcctcctcccacggtggccatttgttccatgtgagtgctagtaaca
 ggccttgtgtcctTTGTAGGCCTTCAACTCCTTCCATCTGTGGCTTCACTGAAGGAGTTGAAGGCCTACAagaca
 cagcatacagccttcagcaagcctccagtgggtctcatacagaacttataagattcccaatccaagacatttcac
 gtttatgggtgatttcccagaacacatagegacatgcaaatattgcagggcgccactcccctgtcctcagccat
 cttctgccagggcgacgcgctgggtgttccgcctagtgcactggggcgcgattccttgagcgggttga
 tgacgtcagcgtttcccatggtgaagcttgatctgatccctaggttctagaaccggtgaccaattgttaattaag
 tttaaacctcgaggccgaagcagatccacgatacaaacagcttttttgggtgaacatattgactgaattccc
 tgcaggttgccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggcgggcaaagcccggcgctcgggcga
 ctttgggtgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggttct

[0147] >ApoE4 amiRNA rAAV载体1 (SEQ ID NO:10)

[0148] ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC
 GACCTTTGGTGCCTcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccaactccatcactaggggttcc
 tgctagctctgggtatttaagcccagtgagcacgcagggtctccattttgaagcgggaggttacgcgttcgtcga
 ctactagtgggtaccagagctccctaggttctagaaccggtgacgtctccatggtgaagcttgatctgaattcg
 gtacctagttattaatagtaatacaattacggggctcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataac
 ttacggtaaatggcccgctggetgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccat
 agtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatatttacggtaaacgcccacttggcagtacat
 caagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgcccagt

acatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggtcgaggtgag
 ccccacgtttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtatatttttttaatta
 ttttgtgcagcgatggggcgggggggggggggggcgcgccaggcgggcgggcgggcgagggcgggcg
 gggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtctcttttatggcgaggcggcg
 gcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcggcggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccg
 ctccgcccgcctcgcgcccggcctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcggcgggacggc
 cttctcctcAgCgctgtaattagcgttggtttaataacggccttggaggcttgctgaaggctgtatgctgtt
 gtcTTGTAGGCCTTCAACTCCTTCAGTGAAGCCACAGATGGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAaggacacaaggcctg
 ttactagcactcacatggaacaaatggccaccgtgggaggatgacaatttctgtggctgcgtgaaagccttgaggg
 gctccgggagctagagcctctgtaacctatgtcatgccttcttcttttcttacagctcctgggcaacgtgctgg
 ttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcctcgaagatccgaaggaaagtcttcacgactgtgggatc
 cgttcgaagatatcaccggttgagccaccaattgttaattaagttaaaccctcgagccgcaagcttatcgata
 atcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatggtgctcttttacgctatgtgg
 atacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaatcc
 tggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcaactgttttgcagc
 caacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctattgc
 cacggcggaaactcatcgccgctgccttgcccgtgctggacaggggctcggcgtgtgggcaactgacaattccgtg
 gtgttgcggggaaatcatcgtcctttccttggtgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgaggacgtcct
 tctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccggcctgctgcccgtctgcggcctcttcc
 gcgtcttcgcttcgcccagacgagtcggatctccctttgggcccctccccgatcgataaccgtcgactagag
 ctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtttgtttgccccccccctgccttcttgac
 cctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcat
 tctattctggggggtggggggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggaga
 gatccacgataacaaacagcttttttggggtgaacataattgactgaattccctgcaggttgccactccctctctg
 cgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgacctttggtcggccgctcagtg
 gcgagcgcgagcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggttccct

[0149] >ApoE4 amiRNA-优化的ApoE2 rAAV载体1 (SEQ ID NO:11)

[0150] ttggccactccctctctcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaggctgcccgcgccc
 gggctttgcccggcggcctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggttcc
 tgctagctctgggtatttaagcccagtgagcacgcagggtctccattttgaagcgggaggttacgcttcgctga
 ctactagtgggtaccagagctccctaggttctagaaccgggtgacgtctcccatggtgaagcttgatctgaattcg
 gtaccctagttattaatagtaataattacggggtcatttagttcatagccataataggagttccgcttacataa
 cttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccca
 tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaacgcccacttgccagtaca
 tcaagtgtatcatatgccaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccag
 tacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggtcgaggtga
 gccccacgtttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtatatttttttaatt
 attttgtgcagcgatggggcgggggggggggggggcgcgccaggcgggcgggcgggcgagggcgggcg
 gggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtctcttttatggcgaggcggc

ggcggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgaggctcgctgcgacgctgccttcgccccgtgcccc
gctccgcccgcctcgccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcggcgggacgg
cccttctctcAgCgctgtaattagcgttggtttaatgacggcttggtggaggcttgctgaaggctgtatgctgt
tgtcTTGTAGGCTTCAACTCCTCAGTGAAGCCACAGATGGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAaggacacaaggcct
gttactagcactcacatggaacaaatggccaccgtgggaggatgacaatttctgtggctgcgtgaaagccttgagg
ggctccgggagctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttcttacagctcctgggcaacgtgctg
gttattgtgctgtctcatcattttggcaagaattcctcgaagatccgaaggaaagtcttccacgactgtgggat
ccgttcgaagatatcaccggttgagccaccATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCTGGCCGGCT
GCCAGGCCAAaGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCAGCCCAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGG
CCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGCTGGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAG
GAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACCCAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAAaGAaCTcAAaGcTt
AtAAGAGCGAGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCTGAGCAAGGAGCTGCAGGC
CGCCAGGCCCGCCTGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCC
ATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGCGTGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGC
GCGACGCCGACGACCTGCAGAAGTGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGGAGGGCGCCGAGCGCGCCTGAG
CGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCTGGTGGAGCAGGGCCGCGTGCGCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGC
CAGCCCCTGCAGGAGCGCGCCAGGCCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGACCC
GCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATCCG
CCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAGCTGGTTCGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGG
GCCGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCCCGCTGGGCACCAGCGCCCGCCCGTGGCCAGCGACAACCACTAAcaat
tgttaattaagtttaaacctcgagggcgaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagat
tgactggtattcttaactatggtgctcttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctat
tgcttcccgtatggctttcattttctctcttgtataaatcctggttgccttctttatgaggagtgtgtggccc
gttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacct
gtcagctcctttccgggactttcgcttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgectgccttgcccc
ctgctggacagggctcggctggtggcactgacaattcctggtggtgtgctggggaatcatcgtcctttccttg
ctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcgg
accttcttcccgcgacctgctgccgctctgcggcctcttcgcgctcttcgcttcgacctcagacgagtcggat
ctccctttgggcccctccccgcatcgataccgtcgactagagctcgtgatcagcctcgactgtgccttctagtt
gccagccatctgtgtttgccccctccccgctccttcttgacctggaagtgccactcccactgtcctttccta
ataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagc
aagggggaggattgggaagacaatagcagggcatgctggggagagatccacgataacaaacagcttttttgggggtga
acatattgactgaattcccctgcaggttgccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccccgggca
aagcccggcgctcgggcgacctttggtcggccgctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgggccaact
ccatcaactaggggttct

- [0151] >ApoE4 shRNA 2核酸序列 (SEQ ID NO:12)
- [0152] ctccaccgcttgctccacctt
- [0153] >ApoE4 shRNA 2核酸序列 (SEQ ID NO:13)
- [0154] aaggtggagcaagcgggtggag

[0155] >带有环的ApoE4 shRNA 2 (SEQ ID NO:14)

[0156] ctccaccgcttgctccaccttAGTGAAGCCACAGATGaaggtggagcaagcgggtggag>ApoE4
amiRNA 2 (SEQ ID NO:15)

[0157] tggaggcttgctgaaggctgtatgctgttgcctccaccgcttgctccaccttAGTGAAGCCACAGAT
Gaaggtggagcaagcgggtggagaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggccaccgtgggag
gatgacaa

[0158] >ApoE4 amiRNA-优化的ApoE2 rAAV载体2 (SEQ ID NO:16)

[0159] ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggcgacacaaaggtcgcccgcgccc
gggctttgcccggcgccctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgccaactccatcactaggggttcc
tgctagctctgggtatattaagcccagtgagcacgcagggtctccatTTTgaagcgggaggttacgcgttcgctga
ctactagtgggtaccagagctccctaggttctagaaccggtgacgtctccatgggtgaagcttggatctgaattcg
gtaccctagttattaatagtaataattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataa
cttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccca
tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatTTTtacggtaaacTgcccacttggcagtaca
teaagtgtatcatatgccaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccag
tacetgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgcctattaccatggctcgaggtga
gccccacgtttctgcttcactctccccatctccccccccctcccccccccaatTTTgtattttatttttttaatt
atTTTgtgcagcgatggggcgggggggggggggggcgcgccaggcggggcggggcgagggcggggc
ggggcgagggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtTtctTTTatggcgaggcggc
ggcgcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccc
gctccgcccgcctcgcgcccggccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcggggcgggacgg
cccttctctcAgCgctgtaattagcgttggTTTaatgacggcttgttggaggcttgcTgaaggctgtatgctgt
tgtcctccaccgcttgctccaccttAGTGAAGCCACAGATGaaggtggagcaagcgggtggagaggacacaaggcct
gttactagcactcacatggaacaaatggccaccgtgggaggatgacaatTTTctgtggctgcgtgaaagccttgagg
ggctccgggagctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttctTTTTctacagctcctgggcaacgtgctg
gttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcctcgaagatccgaaggaaagtcttccacgactgtgggat
ccgttcgaagatatcaccggttgagccaccATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCCTGGCCGGCT
GCCAGGCCAAaGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCCGAGCCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGG
CCAGCGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGCTGGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAG
GAGGAGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACCCAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAAaGAaCTcAAaGcTt
AtAAGAGCGAGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCCTGAGCAAGGAGCTGCAGGC
CGCCCAGGCCCGCCTGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCC
ATGCTGGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGCGTGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGC
GCGACGCCGACGACCTGCAGAAGTGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGGAGGGCGCCGAGCGCGCCTGAG
CGCCATCCGCGAGCGCCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGCGTGCGCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGC
CAGCCCCTGCAGGAGCGCGCCAGGCCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGACCC
GCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATCCG
CCTGCAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAGCTGGTTTCGAGCCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGG
GCCGGCCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCCCGCTGGGCACCAGCGCCGCCCGCCCGTGCCAGCGACAACCTAAcaat

tgtaattaagtttaaacctcgaggccgaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagat
 tgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtctgctttaatgcctttgtatcatgctat
 tgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaatcctggttgctgctcctttatgaggagtgtggccc
 gttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcaactgtgtttgctgacgaacccccactggttggggcattgccaccacct
 gtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccg
 ctgctggacaggggctcggctggtgggactgacaattccgtggtgttgctcggggaaatcatcgctcctttccttg
 ctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggcctcaatccagcgg
 accttcttcccgcggcctgctgcccgtctgcccctcttccgcgtcttcgcttcgcccctcagacgagtcggat
 ctccctttggggccgctccccgcacgataccgtcgactagagctcgtgatcagcctcgaactgtgccttctagtt
 gccagccatctgtgtttgccccccccctgccttcttgacctggaaggtgccactcccactgtccttttcta
 ataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagc
 aagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggagagatccacgataacaaacagcttttttgggggtga
 acatattgactgaattcccctgcaggttgccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggca
 aagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcggcctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgggccaact
 ccatcactaggggttct

[0160] >ApoE4 shRNA 3核酸序列 (SEQ ID NO:17)

[0161] tttgtaggccttcaactcc

[0162] >ApoE4 shRNA 3核酸序列 (SEQ ID NO:18)

[0163] ggagttgaaggcctacaaa

[0164] >带有环的ApoE4 shRNA 3 (SEQ ID NO:19)

[0165] tttgtaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGATGggagttgaaggcctacaaa

[0166] >ApoE4 amiRNA 3 (SEQ ID NO:20)

[0167] tggaggcttgcgtaaggctgtatgctgtgtctttgtaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGATGg
 gagttgaaggcctacaaaaggacacaaggcctgttactagcactccatggaacaaatggccaccgtgggaggatg
 acaa

[0168] >ApoE4 amiRNA-优化的ApoE2 rAAV载体3 (SEQ ID NO:21)

[0169] ttggccactccctctctgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggctgcccgcgccc
 gggctttgcccgggcggcctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgggcaactccatcactaggggttcc
 tgctagctctgggtatttaagcccagtgagcacgcagggtctccattttgaagcgggaggttacgcgttcgtcga
 ctactagtgggtaccagagctccctaggttctagaaccggtgacgtctccatggatgaagcttggatctgaattcg
 gtaccctagttattaatagtaataattacggggtcattagttcatagccatataatggagttccgcgttacataa
 cttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccca
 tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaaactgcccacttggcagtaca
 tcaagtgtatcatatgccaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccag
 tacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgcctattaccatggtcaggtga
 gccccagttctgcttcaacttccccatctcccccccccccccccccaattttgtattttatttttttaatt
 attttgtgcagcgatgggggcggggggggggggggggcgcgccaggcggggcggggcggggcgagggcgggggc
 ggggcgagggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttcttttatggcgaggcggc
 ggcggcgggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgcccc

gctccgcccgcctcgcgccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggaggacgg
cccttctctcAgCgctgtaattagecgttggtttaatgacggcttggtggaggcttgctgaaggctgtatgctgt
tgtctttgtaggccttcaactccAGTGAAGCCACAGATGggagttgaaggcctacaaaaggacacaaggcctgtta
ctagcactcacatggaacaaatggccaccgtgggaggatgacaatcttctgtggctgctgaaagccttgagggct
ccgggagctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttcttacagctcctgggcaacgtgctggtta
ttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcctcgaagatccgaaggaaagtcttccacgactgtgggatccgt
tcgaagatatacccggttgagccaccATGAAGGTGCTGTGGGCCGCCCTGCTGGTGACCTTCCTGGCCGGCTGCCA
GGCCAAaGTcGAaCAGGCCGTcGAGACCGAGCCCGAGCCCGAGCTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAG
CGCTGGGAGCTGGCCCTGGGCCGCTTCTGGGACTACCTGCGCTGGGTGCAGACCCTGAGCGAGCAGGTGCAGGAGG
AGCTGCTGAGCAGCCAGGTGACCCAGGAGCTGCGCGCCCTGATGGACGAGACCATGAAaGAaCTcAAaGcTtAA
GAGCGAGCTGGAGGAGCAGCTGACCCCGTGGCCGAGGAGACCCGCGCCCGCCTGAGCAAGGAGCTGCAGGCCGCC
CAGGCCCGCCTGGGCGCCGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGC
TGGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGCGTGCCTGGCCAGCCACCTGCGCAAGCTGCGCAAGCGCCTGCTGCGCGA
CGCCGACGACCTGCAGAAGTGCCTGGCCGTGTACCAGGCCGGCGCCCGGAGGGCGCCGAGCGCGCCTGAGCGCC
ATCCGCGAGCGCCTGGGCCCCCTGGTGGAGCAGGGCCGCGTGCAGCGCCGCCACCGTGGGCAGCCTGGCCGGCCAGC
CCCTGCAGGAGCGCGCCAGGCCTGGGGCGAGCGCCTGCGCGCCCGCATGGAGGAGATGGGCAGCCGCACCCGCGA
CCGCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCCGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATCCGCCTG
CAGGCCGAGGCCTTCCAGGCCCGCCTGAAGAGCTGGTTCGAGCCCTGGTGGAGGACATGCAGCGCCAGTGGGCCG
GCCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCCCGCTGGGCACCAGCGCCGCCCGTGGCCAGCGACAACCCTAAcaattgtt
aattaagtttaaacctcgaggccgaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgac
tggtattcttaactatggtgctcttttacgctatgtgatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgct
tcccgtatggctttcattttctctcttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttg
tcaggcaacgtggcggtgtgactgtgtttgctgacgaacccccactggttggggcattgccaccacctgtca
gctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgecttgcccgtgc
tggacaggggctcggctgttgggactgacaattcctggtgtgtgctggggaaatcatgctcctttccttggtgc
tcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggcctcaatccagcggacct
tccttcccgcggcctgctgccgctctgcgccctcttccgcgtcttcgcttcgcccctcagacgagtcggatctcc
ctttgggcccctccccgcatcgataccgtcgactagagctcgctgatcagcctcgactgtgecttctagtggcca
gccatctgtttgtttgccccccccctgecttcttgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataa
aatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagg
gggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggagagatccacgataacaaacagcttttttgggggtgaacat
attgactgaattccctgcaggttgccactcctctctgcgcgctcgctcgctcactgagggcggccgggcaaagc
ccgggctcgggagacctttggtcgcccggcctcagtgagcgcgagcgcgcagagaggagtgggccaactccat
cactaggggttct

- [0170] >AAV2 ITR D区“S”序列 (SEQ ID NO:22)
- [0171] TATTAGATCTGATGGCCGC
- [0172] >AAV2 ITR D区“D”序列 (SEQ ID NO:23)
- [0173] CTCCATCACTAGGGGTTCT
- [0174] >TRY基序序列 (SEQ ID NO:24)

[0175] AGCTCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTA

[0176] >野生型AAV2 ITR核酸序列 (SEQ ID NO:25)

[0177] AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA
CCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC
AA。

序列表

<110> 普利维尔治疗公司 (Prevail Therapeutics, Inc.)

<120> 用于神经变性疾病的基因疗法

<130> P1094.70007W000

<140> 尚未指定

<141> 与此同时

<150> US 62/772,230

<151> 2018-11-28

<160> 25

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 1251

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

ggatggggag ataagagaag accaggaggg agttaaataag ggaatgggtt gggggcggct 60
tggtaaatgt gctgggatta ggctgttgca gataatgcaa caaggcttgg aaggctaacc 120
tgggactggc caatcacagg caggaagatg aaggttctgt gggctgcgtt gctggtcaca 180
ttcctggcag gatgccaggc caaggtggag caagcggtag agacagagcc ggagcccagag 240
ctgcgccagc agaccgagtg gcagagcggc cagcgtggg aactggcact gggctcgttt 300
tgggattacc tgcgctgggt gcagacactg tctgagcagg tgcaggagga gctgctcagc 360
tcccagggtca cccaggaact gagggcgtg atggacgaga ccatgaagga gttgaaggcc 420
tacaaatcgg aactggagga acaactgacc ccggtggcgg aggagacgcg ggcacggctg 480
tccaaggagc tgcaggcggc gcaggcccgg ctgggcgcgg acatggagga cgtgtgcggc 540
cgcttggtgc agtaccgcgg cgaggtgcag gccatgctcg gccagagcac cgaggagctg 600
cgggtgcgcc tgcctccca cctgcgcaag ctgcgtaagc ggctcctccg cgatgccgat 660
gacctgcaga agcgcctggc agtgtaccag gccggggccc gcgagggcgc cgagcgcggc 720
ctcagcgcca tccgcgagcg cctggggccc ctggtggaac agggccgctg gcgggcccgc 780
actgtggctc cctggccggc cagccgctac aggagcgggc ccaggcctgg ggcgagcggc 840
tgcgcgcgcg gatggaggag atgggcagcc ggaccgcga ccgcctggac gaggtgaagg 900
agcaggtggc ggaggtgcgc gccaaactgg aggagcaggc ccagcagata cgcctgcagg 960
ccgaggcctt ccaggcccgc ctcaagagct ggttcgagcc cctggtgga gacatgcagc 1020
gccagtgggc cgggctgggt gagaaggtgc aggtgcctg gggcaccagc gccgcccctg 1080
tgcccagcga caatcactga acgccgaagc ctgcagccat gcgacccac gccaccccgt 1140
gcctcctgcc tccgcgcagc ctgcagcggg agaccctgtc cccgccccag ccgtctctct 1200
ggggtggacc ctagtttaat aaagattcac caagtttcac gcatcaaaaa a 1251

```

<210> 2

<211> 1220

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

```

gggacagggg gagccctata attggacaag tctgggatcc ttgagtccta ctgagcccca 60
gcgagggtga aggacgtcct tccccaggag ccgactggcc aatcacaggc aggaagatga 120
aggttctgtg ggctgcgttg ctggtcacat tcttggcagg atgccaggcc aaggtggagc 180
aagcgggtgga gacagagccg gagccccgagc tgcgccagca gaccgagtgg cagagcggcc 240
agcgcctggga actggcactg ggtcgcctttt gggattacct gcgctgggtg cagacactgt 300
ctgagcaggt gcaggaggag ctgctcagct cccaggtcac ccaggaactg agggcgctga 360
tggacgagac catgaaggag ttgaaggcct acaaatcgga actggaggaa caactgacct 420
cggtggcgga ggagacgcgg gcacggctgt ccaaggagct gcaggcggcg caggccccggc 480
tgggcgcgga catggaggac gtgtgcggcc gcttgggtgca gtaccgcggc gaggtgcagg 540
ccatgctcgg ccagagcacc gaggagctgc ggggtgcgct cgcctccac ctgcgcaagc 600
tgcgtaagcg gctcctccgc gatgccgatg acctgcagaa gcgctggca gtgtaccagg 660
ccggggcccc cgagggcgcc gagcgcggcc tcagcgcct cgcgagcgc ctggggcccc 720
tggtggaaca gggccgcgtg cgggcccga ctgtgggctc cctggccggc cagccgctac 780
aggagcgggc ccaggcctgg ggcgagcggc tgcgcgcgcg gatggaggag atgggcagcc 840
ggacccgcga ccgcctggac gaggtgaagg agcaggtggc ggaggtgcgc gccaaactgg 900
aggagcaggc ccagcagata cgcctgcagg ccgaggcctt ccaggccccg ctcaagagct 960
ggttcgagcc cctggtgga gacatgcagc gccagtgggc cgggctggtg gagaaggtgc 1020
aggctgccgt gggcaccagc gccgcccctg tgcccagcga caatcactga acgccgaagc 1080
ctgcagccat gcgacccac gccaccccgt gcctctgccc tccgcgcagc ctgcagcggg 1140
agaccctgtc cccgccccag ccgtcctcct ggggtggacc ctagttaaataa aaagattcac 1200
caagttttcac gcatcaaaaa 1220

```

<210> 3

<211> 317

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

```

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
1           5           10           15
Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
           20           25           30
Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
           35           40           45
Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
           50           55           60
Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
65           70           75           80

```

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
 85 90 95
 Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
 100 105 110
 Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
 115 120 125
 Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
 130 135 140
 Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
 145 150 155 160
 Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Cys
 165 170 175
 Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
 180 185 190
 Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
 195 200 205
 Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
 210 215 220
 Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
 245 250 255
 Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
 260 265 270
 Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
 275 280 285
 Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
 290 295 300
 Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
 305 310 315

<210> 4

<211> 954

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 4

atgaagggtgc tgtgggccgc cctgctggtg accttctctgg ccggctgccca ggccaaagtc 60
 gaacaggccg tcgagaccga gcccagagccc gagctgcgcc agcagaccga gtggcagagc 120

ggccagcgct gggagctggc cctgggccgc ttctgggact acctgcgctg ggtgcagacc 180
 ctgagcgagc aggtgcagga ggagctgctg agcagccagg tgaccagga gctgcgcgcc 240
 ctgatggacg agacatgaa agaactcaaa gcttataaga gcgagctgga ggagcagctg 300
 acccccgtgg ccgaggagac ccgcgcccgc ctgagcaagg agctgcaggc cgcccaggcc 360
 cgcctggggcg ccgacatgga ggacgtgtgc ggccgcctgg tgcagtaccg cggcgaggtg 420
 caggccatgc tgggccagag caccgaggag ctgcgcgtgc gcctggccag ccacctgcgc 480
 aagctgcgca agcgcctgct gcgcgacgcc gacgacctgc agaagtgcct ggccgtgtac 540
 caggccggcg cccgcgaggg cgccgagcgc ggctgagcg ccatccgca gcgcctgggc 600
 cccctggtgg agcagggccg cgtgcgcgcc gccacctgg gcagcctggc cggccagccc 660
 ctgcaggagc gcgcccaggc ctggggcgag cgctgcgcg cccgcatgga ggagatgggc 720
 agccgcaccc gcgaccgct ggacgaggtg aaggagcagg tggccgaggt gcgcgccaag 780
 ctggaggagc aggcccagca gatccgctg caggccgagg cttccaggc ccgcctgaag 840
 agctggttcg agcccctggt ggaggacatg cagcgccagt gggccggcct ggtggagaag 900
 gtgcaggccg ccgtgggcac cagcgccgcc cccgtgccc gcgacaacca ctaa 954

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 5

ttgtaggcct tcaactcctt c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 6

gaaggagttg aaggcctaca a 21

<210> 7

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 7

ttgtaggcct tcaactcctt ccactctgtg cttcactgaa ggagttgaag gcctaca 58

<210> 8

<211> 152

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 8

ttgtcatcct cccacggtgg ccatttggtc catgtgagtg ctagtaacag gccttggtgc 60
ctttgtaggc cttcaactcc ttccatctgt ggcttcaactg aaggagttga aggcctacaa 120
gacaacagca tacagccttc agcaagcctc ca 152

<210> 9

<211> 903

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 9

ttggcactc cctctctgcg cgtctgctcg ctactgagg cgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaactcca tcaactagggg ttctgtctag ctctgggtat ttaagcccga gtgagcacgc 180
agggtctcca ttttgaagcg ggaggttacg cgttcgtcga ctactagtgg gtaccagagc 240
aaaaaaaaattg tcatcctccc acggtggcca tttgttccat gtgagtgcta gtaacaggcc 300
ttgtgtcctt tgtaggcctt caactccttc catctgtggc ttactgaag gagttgaagg 360
cctacaagac aacagcatac agccttcagc aagcctccag tgggtctcata cagaacttat 420
aagattccca aatccaaaga catttcacgt ttatggtgat ttcccagaac acatagcgac 480
atgcaaatat tgcagggcgc cactcccctg tcctcagag ccactcttct gccagggcgc 540
acgcgcgctg ggtgttcccg cctagtgaca ctgggcccgc gattccttgg agcgggttga 600
tgacgtcagc gtttcccatg gtgaagcttg gatctgatcc ctaggttcta gaaccggtga 660
ccaattgtta attaaattta aaccctcgag gccgcaagca gatccacgat aacaaacagc 720
ttttttgggg tgaacatatt gactgaattc cctgcaggtt ggccactccc tctctgcgcg 780
ctcgtctgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 840
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 900
cct 903

<210> 10

<211> 2551

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 10

ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgcccgggc aaagcccggg 60
 cgtcggggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagt 120
 gccaaactcca tcactagggg ttcttgctag ctctgggtat ttaagcccga gtgagcacgc 180
 agggctctcca ttttgaagcg ggaggttacg cgttcgctga ctactagtgg gtaccagagc 240
 tccctagggtt ctagaaccgg tgacgtctcc catggtgaag cttggatctg aattcggtac 300
 ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 360
 gcgttacata acttacggtg aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 420
 tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 480
 aatgggtgga gtattttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 540
 caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgctggcat tatgcccagt 600
 acatgacctt atgggacttt ctaacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 660
 ccatggtcga ggtgagcccc acgtttctgct tcaactctcc catctcccc cctccccac 720
 ccccaatttt gtattttattt attttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg 780
 gggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga 840
 gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc 900
 ggcggcggcg gcggccctat aaaaagcga ggcgcggcg ggcgggagtc gctgcgacgc 960
 tgccttcgcc ccgtgccccg ctccgccgcc gcctcgccgc gcccgccccg gctctgactg 1020
 accgcgttac tcccacaggt gagcggggcg gacggcctt ctctcagcg ctgtaattag 1080
 cgcttggttt aatgacggct tgttgaggc ttgctgaagg ctgtatgctg ttgtcttgta 1140
 ggccttcaac tccttcagtg aagccacaga tggaaggagt tgaaggccta caaaggacac 1200
 aaggcctggt actagcactc acatggaaca aatggccacc gtgggaggat gacaatttct 1260
 gtggctgcgt gaaagcctg aggggctccg ggagctagag cctctgctaa ccatgttcat 1320
 gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1380
 tttggcaaag aattcctcga agatccgaag ggaaagtctt ccacgactgt gggatccgtt 1440
 cgaagatata accggtttag ccaccaatt gtaattaag ttaaaccct cgaggccgca 1500
 agcttatcga taatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta 1560
 actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgtgcttt aatgcctttg tatcatgcta 1620
 ttgcttcccg tatggcttc atttctct ccttgataa atcctggtg ctgtctcttt 1680
 atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgactgtg tttgctgacg 1740
 caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cttttccggg actttcgctt 1800
 tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgctg ctttgcccgc tgctggacag 1860
 gggctcggct gttgggcact gacaattccg tgggtttgct ggggaaatca tcgtcctttc 1920
 cttggctgct cgctgtgtt gccacctgga ttctgcgagg gacgtcctc tgctacgtcc 1980
 cttcgccct caatccagcg gaccttctt cccgcggcct gctgccgct ctgcggcctc 2040
 ttccggtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cttttgggccc gcctccccgc 2100
 atcgataacc tcgactagag ctgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc 2160
 atctgttgtt tgccccctcc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca ctcccactgt 2220
 cctttcctaa taaaatgagg aaattgcat gcattgtctg agtaggtgtc attctattct 2280
 ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc 2340

tggggagaga tccacgataa caaacagctt ttttggggtg aacatattga ctgaattccc 2400
 tgcaggttgg ccaactccctc tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag 2460
 cccgggcgctc gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag 2520
 ggagtggcca actccatcac taggggttcc t 2551
 <210> 11
 <211> 3506
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 11
 ttggccaactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc 60
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
 gccaaactcca tcaactagggg ttcttgetag ctctgggtat ttaagcccga gtgagcacgc 180
 aggggtctcca ttttgaagcg ggaggttacg cgttcgctga ctactagtgg gtaccagagc 240
 tccctaggtt ctagaaccgg tgacgtctcc catggtgaag cttggatctg aattcggtag 300
 cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 360
 cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca 420
 ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 480
 caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 540
 ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaagtcg ccgcttgcca ttatgcccag 600
 tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 660
 accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca 720
 ccccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 780
 gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 840
 agagggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg 900
 cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagt cgctgagcag 960
 ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc gcctcgcgc ccccccccc ggctctgact 1020
 gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggcctt tctcctcagc gctgtaatta 1080
 gcgcttggtt taatgacggc ttgttggagg cttgctgaag gctgtatgct gttgtcttgt 1140
 aggccttcaa ctcttcagt gaagccacag atggaaggag ttgaaggcct acaaaggaca 1200
 caaggcctgt tactagcaact cacatggaac aaatggccac cgtgggagga tgacaatttc 1260
 tgttgctgcg taaaagcctt gaggggctcc gggagctaga gcctctgcta accatgttca 1320
 tgcttcttc ttttccctac agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca 1380
 ttttggcaaa gaattcctcg aagatccgaa gggaaagtct tccacgactg tgggatccgt 1440
 tcgaagatat caccggttga gccaccatga aggtgctgtg ggccgcctg ctggtgacct 1500
 tcctggccgg ctgccaggcc aaagtccaac aggcctcga gaccgagccc gagcccagac 1560
 tgcgccagca gaccgagtgg cagagcggcc agcgtggga gctggcctg ggccgcttct 1620
 gggactacct gcgctgggtg cagaccctga gcgagcaggt gcaggaggag ctgctgagca 1680

gccagggtgac ccaggagctg cgcgccctga tggacgagac catgaaagaa ctcaaagctt 1740
 ataagagcga gctggaggag cagctgaccc ccgtggccga ggagaccgc gcccgctga 1800
 gcaaggagct gcaggccgcc caggcccgcc tggcgccga catggaggac gtgtgcggcc 1860
 gcctgggtgca gtaccgcggc gaggtgcagg ccatgctggg ccagagcacc gaggagctgc 1920
 gcgtgcgcct ggccagccac ctgcgcaagc tgcgcaagcg cctgctgcg cagcccgacg 1980
 acctgcagaa gtgcctggcc gtgtaccagg ccggcgcccc cgagggcgcc gagcgcgcc 2040
 tgagcgccat ccgcgagcgc ctgggcccc tggaggagca gggccgctg cgcgccgcca 2100
 ccgtggggcag cctggccggc cagccctgc aggagcgcgc ccaggcctgg ggcgagcgcc 2160
 tgcgcgcccc catggaggag atgggcagcc gcaccgcga ccgcctggac gaggtgaagg 2220
 agcagggtggc cgaggtgcgc gccaaagctgg aggagcaggc ccagcagatc gcctgcagg 2280
 ccgaggcctt ccaggcccc ctgaagagct ggttcgagcc cctgggtggag gacatgcagc 2340
 gccagtgggc cggcctggtg gagaaggtgc aggccgccc gggcaccagc gccgccccg 2400
 tgcccagcga caaccactaa caattgttaa ttaagttaa accctcgagg ccgcaagctt 2460
 atcgataatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat tcttaactat 2520
 gttgctcctt ttacgctatg tggatacgtc gctttaatgc ctttgtatca tgctattgct 2580
 tcccgtatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct gtttgcctgc tctttatgag 2640
 gagttgtggc ccgttgcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc 2700
 cccactgggt ggggcattgc caccacctgt cagctcctt ccgggacttt cgctttcccc 2760
 ctccctattg ccacggcgga actcatgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct 2820
 cggctgttgg gcaactgaaa ttccgtggtg ttgtcgggga aatcatcgtc ctttccttgg 2880
 ctgctcgcct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt cttctgcta cgtcccttcg 2940
 gccctcaatc cagcggacct tcctccccg gcctgctgc cggctctgc gcctcttccg 3000
 cgtcttcgcc ttcgccctca gacgagtcgg atctccctt gggccgctc cccgcatcga 3060
 taccgtcgac tagagctcgc tgatcagcct cgaactgtcc ttctagttgc cagccatctg 3120
 ttgtttgccc ctccccgtg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt 3180
 cctaataaaa tgaggaaatt gcatgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 3240
 gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 3300
 agagatccac gataacaaac agctttttt gggatgaacat attgactgaa ttccctgcag 3360
 gttggccact ccctctctgc gcctcctgc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg 3420
 gcgtcgggcg acctttggtc gccggcctc agtgagcgag cgagcgcga gagagggagt 3480
 ggccaactcc atcaactagg gttcct 3506

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 12

ctccaccgct tgctccacct t 21

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 13
 aaggtggagc aagcgggtgga g 21
 <210> 14
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 14
 ctccaccgct tgctccacct tagtgaagcc acagatgaag gtggagcaag cggtggag 58
 <210> 15
 <211> 152
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 15
 tggaggcttg ctgaaggctg tatgctgttg tctccaccg cttgctccac cttagtgaag 60
 ccacagatga aggtggagca agcgggtggag aggacacaag gcctgttact agcactcaca 120
 tggaacaaat ggccaccgtg ggaggatgac aa 152
 <210> 16
 <211> 3506
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的多核苷酸
 <400> 16
 ttggccaactc cctctctgcg cgetcgetcg ctactgagg cgggcgacc aaaggtcgcc 60
 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
 gccaaactcca tactagggg ttctgtag ctctgggtat ttaagcccga gtgagcacgc 180
 agggctctcca ttttgaagcg ggaggttacg cgttcgtcga ctactagtgg gtaccagagc 240
 tcctaggtt ctagaaccgg tgacgtctcc catggtgaag cttggatctg aattcggtac 300
 cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 360

cgcgttacat aacttacggt aaatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccgcca 420
 ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 480
 caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 540
 ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgcccag 600
 tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 660
 accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccactctccc cccctcccca 720
 ccccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 780
 gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 840
 agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg 900
 cggcgggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcggcggc gggcgggagt cgctgacgac 960
 ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgctcgcgc cgcccgccc ggctctgact 1020
 gaccgcgta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggcct tctctcagc gctgtaatta 1080
 gcgcttggtt taatgacggc ttgttgagg cttgctgaag gctgtatgct gttgtcctcc 1140
 accgcttgct ccaccttagt gaagccacag atgaaggtgg agcaagcggg ggagaggaca 1200
 caaggcctgt tactagcact cacatggaac aaatggccac cgtgggagga tgacaatttc 1260
 tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagctaga gcctctgcta accatgttca 1320
 tgccttcttc ttttctctac agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca 1380
 ttttgcaaaa gaattcctcg aagatccgaa gggaaagtct tccacgactg tgggatccgt 1440
 tcgaagatat caccggttga gccaccatga aggtgctgtg ggccgcctg ctggtgacct 1500
 tcttgccgg ctgccaggcc aaagtcaac aggccgtcga gaccgagccc gagcccgagc 1560
 tgcgccagca gaccgagtgg cagagcggcc agcgtgga gctggccctg ggccgcttct 1620
 gggactacct gcgctgggtg cagaccctga gcgagcaggt gcaggaggag ctgctgagca 1680
 gccaggtgac ccaggagctg cgcgccctga tggacgagac catgaaagaa ctcaaagctt 1740
 ataagagcga gctggaggag cagctgacct ccgtggccga ggagaccgc gcccgctga 1800
 gcaaggagct gcaggccgcc caggccgcc tggcgccga catggaggac gtgtgcggcc 1860
 gcctggtgca gtaccgcggc gaggtgcagg ccatgctggg ccagagcacc gaggagctgc 1920
 gcgtgcgcct ggccagccac ctgcgcaagc tgcgcaagcg cctgctgcmc gacgccgacg 1980
 acctgcagaa gtgcctggcc gtgtaccagg ccggcgcccg cgaggcgcc gagcgcggcc 2040
 tgagcgccat ccgcgagcgc ctgggcccc tggtggagca gggccgcgtg cgcgccgcca 2100
 ccgtgggcag cctggccggc cagcccctgc aggagcgcgc ccaggcctgg ggcgagcgc 2160
 tgcgcgccc catggaggag atgggcagcc gcaccgcga ccgcctggac gaggtgaagg 2220
 agcaggtggc cgaggtgcgc gccaaagtgg aggagcaggc ccagcagatc gcctgcagg 2280
 ccgaggcctt ccaggcccc ctgaagagct ggttcgagcc cctggtggag gacatgcagc 2340
 gccagtgggc cggcctggtg gagaaggtgc aggccgctt gggcaccagc gccgccccg 2400
 tgcccagcga caaccactaa caattgttaa ttaagttaa accctcgagg ccgcaagctt 2460
 atcgataatc aaacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat tcttaactat 2520
 gttgtcctt ttacgctatg tggatacgt gctttaatgc ctttgtatca tgctattgct 2580
 tccgatatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatct ggttgctgtc tctttatgag 2640
 gagttgtggc ccgttgcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgttgc tgacgcaacc 2700

cccactgggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgctttcccc 2760
 ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct 2820
 cggctgttgg gcaactgaaa ttccgtgggtg ttgtcgggga aatcatcgtc ctttccttgg 2880
 ctgctcgccct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt ccttctgcta cgtcccttcg 2940
 gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggctgctgc cggctctgcg gcctcttccg 3000
 cgtcttcgcc ttcgccctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcatcga 3060
 taccgtcgac tagagctcgc tgatcagcct cgaactgtcc ttctagttgc cagccatctg 3120
 ttgtttgccc ctccccgtg ccttccttga cctggaagg tgccactccc actgtccttt 3180
 cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcaat gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 3240
 gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 3300
 agagatccac gataacaaac agcttttttg gggatgaacat attgactgaa ttccctgcag 3360
 gttggccaact ccctctctgc gcctctctc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg 3420
 gcgtcggggc acctttggtc gcccgccctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt 3480
 ggccaactcc atcaactagg gttcct 3506

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 17

ttttaggcc ttcaactcc 19

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 18

ggagttgaag gcctacaaa 19

<210> 19

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 19

ttttaggcc ttcaactcca gtgaagccac agatgggagt tgaaggccta caaa 54

<210> 20

<211> 148

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 20

tggaggcttg ctgaaggctg tatgctgttg tctttgtagg cttcaactc cagtgaagcc 60
acagatggga gttgaaggcc tacaaaagga cacaaggcct gttactagca ctacatgga 120
acaaatggcc accgtgggag gatgacaa 148

<210> 21

<211> 3502

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 21

ttggcactc cctctctgcg cgtctgctcg ctactgagg cgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttctgctag ctctgggtat ttaagcccga gtgagcacgc 180
agggtctcca ttttgaagcg ggaggttacg cgttcgtcga ctactagtgg gtaccagagc 240
tcctaggtt ctagaaccgg tgacgtctcc catggtgaag cttggatctg aattcggtag 300
cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc 360
cgcgttacat aacttacggt aaatggccc cctggctgac cgcccaacga cccccccca 420
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 480
caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 540
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag 600
tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 660
accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttactctcc ccatctcccc cccctccca 720
cccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 780
gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 840
agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg 900
cgcgggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagt cgctgcgacg 960
ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgccgc cgctctgcgc cgcccgcgcc ggctctgact 1020
gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctctcagc gctgtaatta 1080
gcgcttggtt taatgacggc ttggttgagg cttgctgaag gctgtatgct gttgtctttg 1140
taggccttca actccagtga agccacagat gggagttgaa ggcctacaaa aggacacaag 1200
gcctgttact agcactcaca tggaaacaaat ggccaccgtg ggaggatgac aatttctgtg 1260
gctgcgtgaa agccttgagg ggctccggga gctagagcct ctgctaacca tgttcatgcc 1320
ttcttctttt tcctacagct cctgggcaac gtgctggtta ttgtgctgtc tcatcatttt 1380

ggcaaagaat tcctcgaaga tccgaaggga aagtcttcca cgactgtggg atccgttcga 1440
 agatatcacc ggttgagcca ccatgaaggt gctgtgggcc gccctgctgg tgaccttctt 1500
 ggccggctgc caggccaaag tcgaacaggc cgtcgagacc gagcccgagc ccgagctgcg 1560
 ccagcagacc gagtggcaga gcggccagcg ctgggagctg gccctgggcc gcttctggga 1620
 ctacctgctc tgggtgcaga ccctgagcga gcaggtgcag gaggagctgc ttagcagcca 1680
 ggtgacctag gagctgctgc ccctgatgga cgagaccatg aaagaactca aagcttataa 1740
 gagcgagctg gaggagcagc tgacccccgt ggccgaggag acccgcgccc gcctgagcaa 1800
 ggagctgcag gccgcccagg cccgctggg cgccgacatg gaggacgtgt gcggccgctt 1860
 ggtgcagtac cgcggcgagg tgcaggccat gctgggccag agcaccgagg agctgctgct 1920
 gcgctggcc agccacctgc gcaagctgct caagcgctg ctgctgctgc ccgacctt 1980
 gcagaagtgc ctggccgtgt accaggccgg cgcggcgag ggccgagc gcggcctgag 2040
 cgccatccgc gagcgctgg gcccctggt ggagcagggc cgcgtgctgc ccgccacct 2100
 gggcagcctg gccggccagc cctgagcga gcgccccag gcctggggcg agcgctgctg 2160
 cgcccgatg gaggagatgg gcagccgac ccgagaccg ctggacgagg tgaaggagca 2220
 ggtggccgag gtgctgcca agctggagga gcaggccag cagatccgc tgcaggccga 2280
 ggccctccag gccgctga agagctggtt cgagcccctg gtggaggaca tgcagcga 2340
 gtgggcccgc ctggtggaga aggtgcaggc cgccgtgggc accagcgccg ccccgtgct 2400
 cagcgacaac cactaacaat tgtaattaa gtttaacc tcgaggccgc aagcttatcg 2460
 ataataacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggattctt aactatggtg 2520
 ctcttttac gctatgtgga tacgtgctt taatgcctt gtatcatgct attgcttccc 2580
 gtatggctt cattttctc tcctgtata aatcctggtt gctgtctctt tatgaggagt 2640
 tgtggcccgt tgcaggcaa cgtggcgtg tgtgactgt gtttctgac gcaaccccc 2700
 ctggttgggg cattgccacc acctgctgac tctttccgg gactttcgtt tccccctc 2760
 ctattgccac ggccgaactc atcgccgct gccttgcgg ctgctggaca ggggctcggc 2820
 tgttgggcac tgacaattcc gtggtgtgt cggggaaatc atcgctctt ccttggctgc 2880
 tcgctgtgt tgccacctg attctgctg ggacgtcctt ctgctacgtc ccttcggccc 2940
 tcaatccagc ggaccttct tcccgggc tgctgcccgc tctgcccct cttccgctc 3000
 ttcgcttcg ccctcagac agtcggatc cctttgggc cgctccccg catcgatacc 3060
 gtcgactaga gctcgtgat cagcctgac tgtccttct agttgccagc catctgtgt 3120
 ttgccctcc ccgctgctt ccttgacct ggaaggtgc actcccactg tctttccta 3180
 ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggtgg 3240
 ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggagag 3300
 atccacgata acaaacagct ttttggggg gaacatattg actgaattcc ctgcaggtt 3360
 gccactccct ctctgctgc tcgctgctc actgagccg cccgggcaa gcccggcgt 3420
 cgggagacct ttgctgccc ggctcagtg agcgagcag cgcgagaga gggagtggcc 3480
 aactccatca ctagggttc ct 3502

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多核苷酸
<400> 22
tattagatct gatggccgc 19
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多核苷酸
<400> 23
ctccatcaact aggggttcct 20
<210> 24
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多核苷酸
<400> 24
agctctgggt atttaagccc gaggtagcac gcagggtctc cattttgaag cgggaggtta 60
<210> 25
<211> 145
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多核苷酸
<400> 25
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgccc ggccgctca gtgagcgagc 120
gagcgcgcag agaggagtg gccaa 145

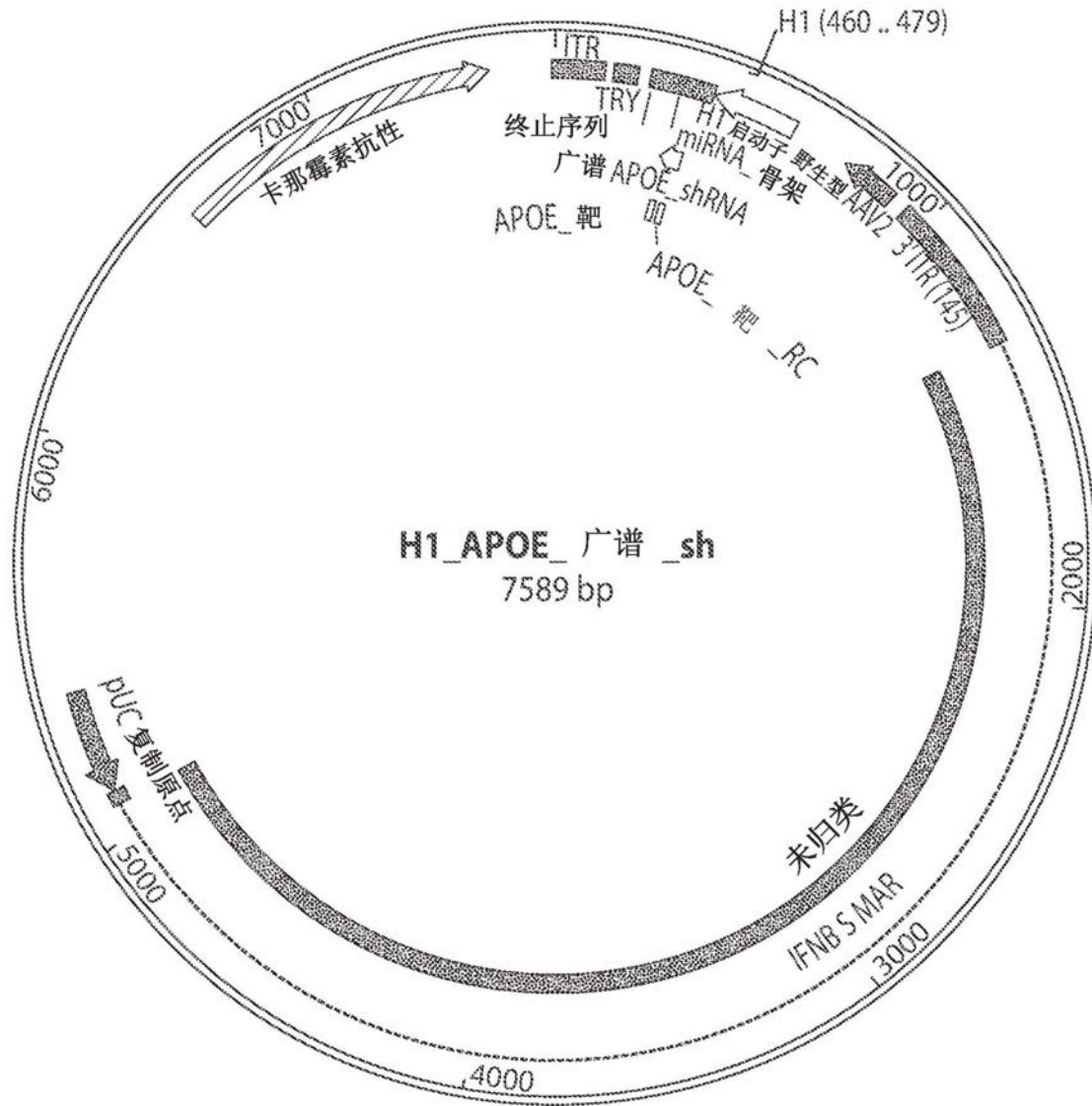


图1

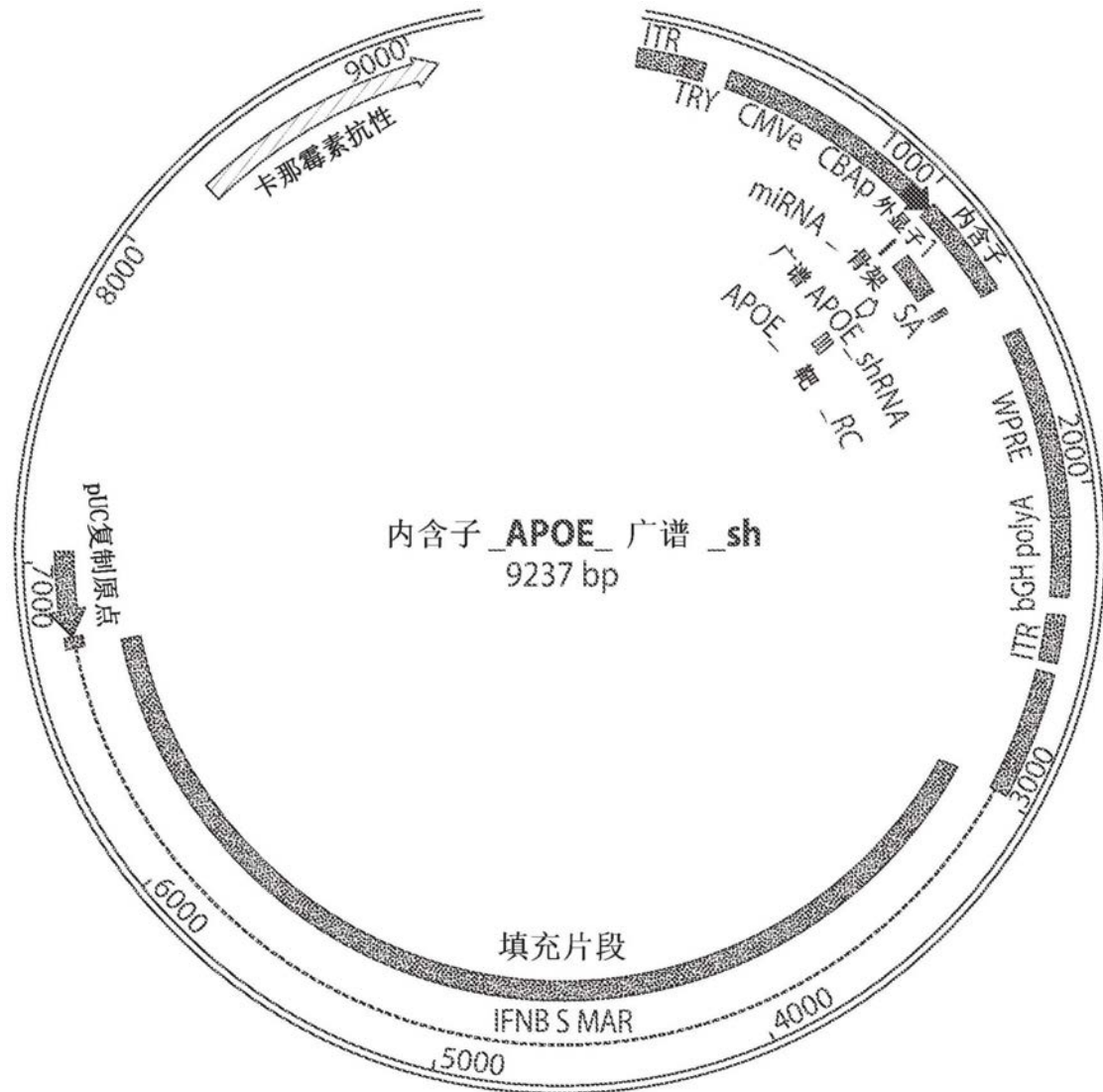


图2



图3

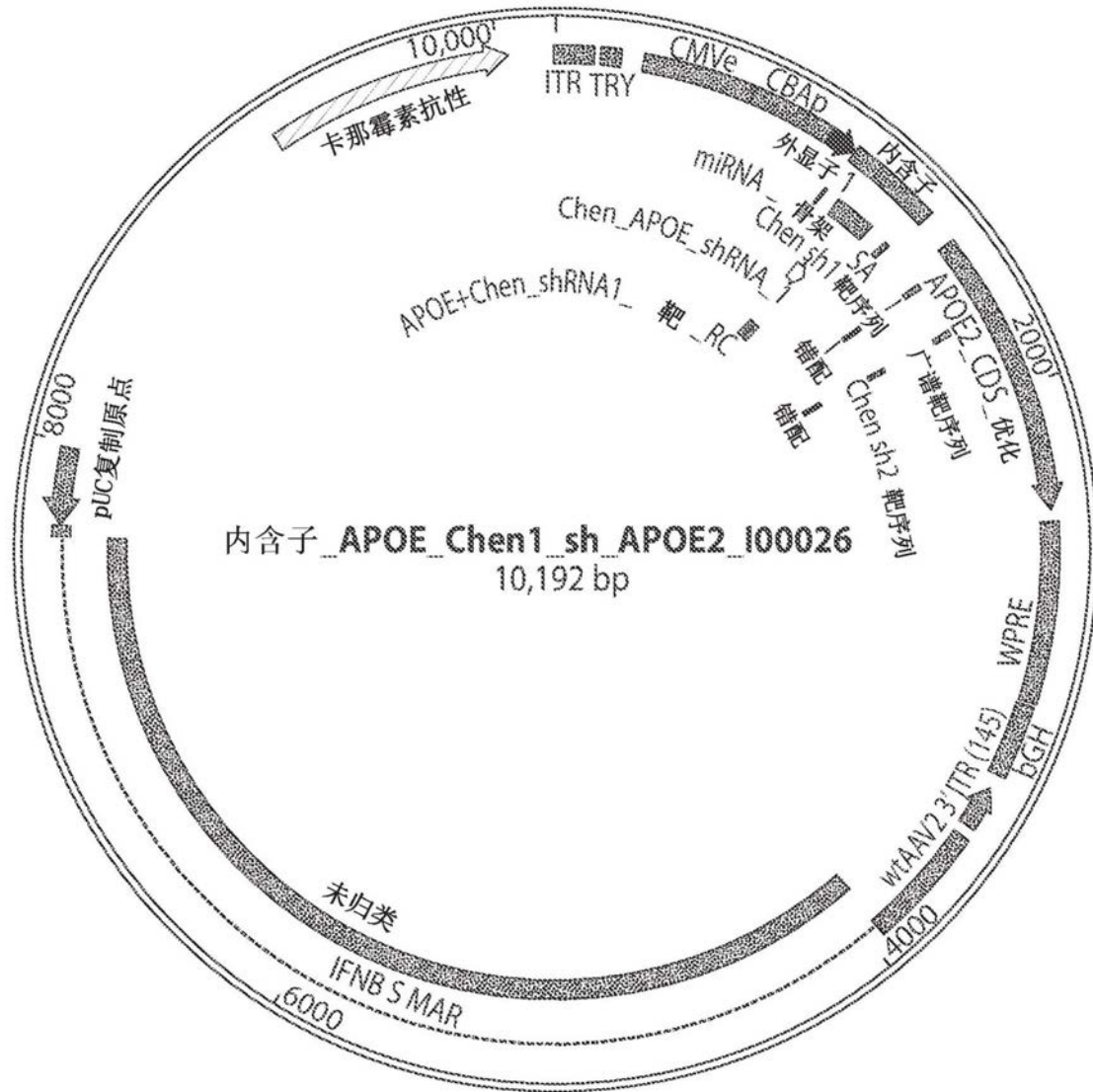


图4

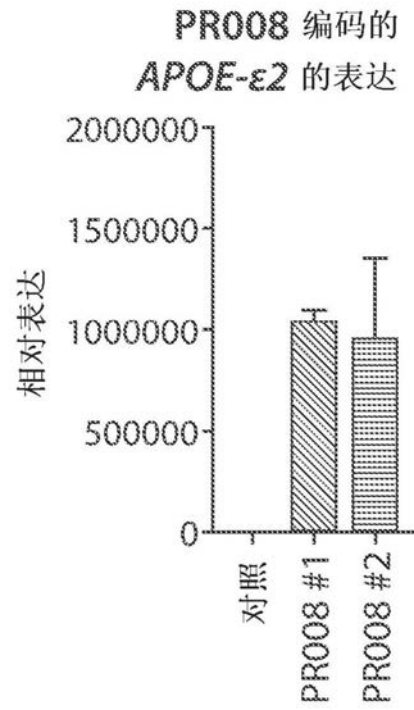


图7B



图8