(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114402066 A
(43)申请公布日 2022.04.26

(21)申请号 202080064369.2

(22)申请日 2020.08.12

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/045906 2020.08.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/011941 EN 2021.01.21

(71)申请人 查尔斯河实验室股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 王启钊

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所(普通合伙) 44240
代理人 金辉

(51)Int.Cl.
*C12N 7/02*(2006.01)
*C12N 15/864*(2006.01)
*C12N 7/00*(2006.01)
*C12N 15/86*(2006.01)

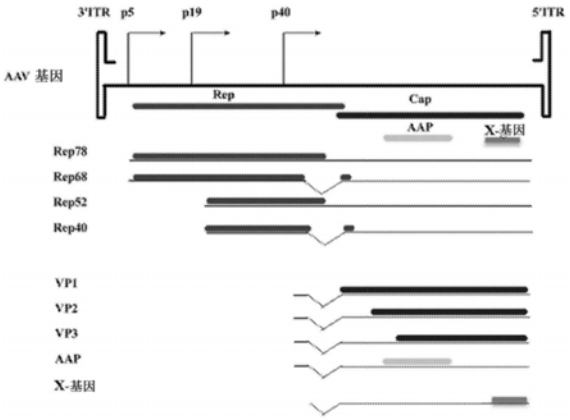
权利要求书2页 说明书34页
序列表14页 附图10页

(54)发明名称

使用离子浓度提高重组腺相关病毒的包装效率

(57)摘要

本发明涉及提高重组腺相关病毒(rAAV)的包装效率,以提高其生产滴度的方法。更具体地,本发明涉及通过施用另外的离子提高细胞培养基的离子强度,以提高转染细胞的rAAV生产滴度的方法。




CN 114402066 A

1.一种提高重组修饰腺相关病毒(rAAV)的生产滴度的方法,其中所述方法包括以下步骤:

(A)在足以允许生产rAAV的条件下,将用所述rAAV转染的细胞在初始培养基中培养初始时间,其中所述细胞还含有AAV辅助功能提供多核苷酸和非AAV辅助功能提供多核苷酸;

(B)在所述初始时间之后,通过向所述培养基中添加除$Na^+$之外的一种或多种离子来改变所述培养基的离子强度;以及

(C)继续所述细胞的所述培养,从而产生比在没有步骤(B)的情况下获得的滴度更大的所述rAAV的生产滴度。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述添加的离子中的每种以足以使所述初始培养基中的这种离子的浓度增加约10mM至约80mM的含量提供。

3.根据权利要求1或2中任一项所述的方法,其中生产滴度比在没有所述步骤(B)的情况下类似地进行细胞培养得到的滴度大至少50%。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述rAAV包括编码蛋白质的转基因盒,或包括转录核酸,其对基因或可遗传性疾病或病况具有治疗作用。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述rAAV属于rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8、rAAV9或rAAV10血清型或属于所述血清型的杂交型。

6.根据权利要求5所述的方法,其中所述rAAV属于rAAV2、rAAV5或rAAV9血清型或属于所述血清型的杂交型。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述添加的离子包括$K^+$、$Ca^{++}$或$Mg^{++}$中的一种或多种。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述添加的离子包括$CO_3^=$、$HCO_3^-$、$HPO_4^-$、$PO_4^=$、$SCN^-$、$SO_4^=$、$HSO_4^-$和$Cl^-$中的一种或多种。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述添加的离子包括乙酸盐、天冬氨酸盐、苯二甲酸氢盐、酒石酸氢盐、丁氧基乙氧基乙酸酯、辛酸盐、柠檬酸盐、脱氢乙酸盐、二乙酸盐、二羟基甘氨酸盐、d-糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘氨酸盐、糖硫酸盐、羟基甲烷磺酸盐、乳酸盐、甲硫氨酸盐、草酸盐、苯酚盐、苯酚磺酸盐、丙酸盐、丙酸盐、糖精、水杨酸盐、肌氨酸盐、山梨酸盐、巯基乙酸盐和对甲苯磺酸盐。

10.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述添加的离子包括$K^+$和$CO3^=$。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述细胞是人胚胎肾细胞。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述细胞是HEK293细胞。

13.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述细胞是幼仓鼠肾细胞。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述细胞是BHK21细胞。

15.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述细胞是sf9昆虫细胞。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述初始培养基为杜氏改良伊格尔培养基。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述初始培养基补充有血清。

18.药物组合物,包括:

(A)通过权利要求1-17中任一项所述的方法生产的重组修饰腺相关病毒(rAAV)的制剂,其中所述rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或转录核酸,其对基因或可遗传性疾病或病

况有治疗作用,并且所述药物组合物含有有效量的所述rAAV的制剂;和

(B)药学上可接受的载剂。

19.由权利要求1-17中任一项所述的方法生产的重组修饰腺相关病毒(rAAV)的制剂,其中rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或转录核酸,或权利要求18所述的药物组合物,用于治疗基因或可遗传性的疾病或病况。

# 使用离子浓度提高重组腺相关病毒的包装效率

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请是于2019年7月15日提交的美国专利申请序列号16/511,612(在审)的延续申请,并要求其权益,该申请通过引用全部并入本文。

## 技术领域

[0002] 本发明涉及提高重组腺相关病毒(rAAV)的包装效率,以提高其生产滴度的方法。更具体地,本发明涉及通过施用另外的离子提高细胞培养基的离子强度,以提高转染细胞产生的rAAV生产滴度的方法。

序列表的引用

[0003] 本申请包括一种或多种按照37 C.F.R.1.821et seq.的序列表,其以计算机可读介质公开(文件名:2650-0002US_ST25.txt,创建于2019年7月15日,文件大小为38,334个字节),该文件通过引用全部并入本文。

## 背景技术

I.腺相关病毒(AAV)

[0004] 腺相关病毒(AAV)是小的、自然形成的、非致病性的病毒,属于细小病毒科的依赖病毒属(Balakrishnan,B.et al.(2014)“Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV)Vectors Used in Gene Therapy,”Curr.Gene Ther.14(2):86-100;Zinn,E.et al.(2014)“Adeno-Associated Virus:Fit To Serve,”Curr.Opin.Virol.0:90-97)。尽管没有造成疾病,已知AAV能够感染人类和其他灵长类动物,并且在人类群体中流行(Johnson,F.B.et al.(1972)“Immunological Reactivity of Antisera Prepared Against the Sodium Dodecyl Sulfate-Treated Structural Polypeptides of Adenovirus-Associated Virus,”J.Virol.9(6):1017-1026)。AAV感染大范围的不同细胞类型(例如,中枢神经系统细胞、心脏细胞、肾细胞、肝细胞、肺细胞、胰腺细胞、视网膜色素上皮细胞或感光细胞或骨骼肌细胞)。已经识别出病毒的十二种血清型(例如,AAV2、AAV5、AAV6等)表现出不同的组织感染能力(“向性”)(Colella,P.et al.(2018)“Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy,”Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.8:87-104;Hocquemiller,M.et al.(2016)“Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases,”Hum.Gene Ther.27(7):478-496;Lisowski,L.et al.(2015)“Adeno-Associated Virus Serotypes For Gene Therapeutics,”24:59-67)。

[0005] AAV是单链DNA病毒,由大约4,700个核苷酸组成。病毒基因组可以描述为5’半和3’半,其共同构成编码病毒蛋白的基因(图1)。AAV基因组的5’半包括AAV rep基因,该基因通过使用多种阅读框架、交错的起始启动子(p5、p19和p40)和可变剪接编码四种非结构Rep蛋白(Rep40、Rep52、Rep68和Rep78),这是病毒转录控制和复制和将病毒基因组包装到病毒衣壳所必需的(Lackner,D.F.et al.(2002)“Studies of the Mechanism of Transactivation of the Adeno-Associated Virus p19 Promoter by Rep Protein,”

J.Virol.76(16):8225-8235)。AAV基因组的3'半包括AAV衣壳基因(cap),该基因编码三种衣壳蛋白(VP):VP1、VP2和VP3。这三种衣壳蛋白从由单个启动子(在AAV2的情况下,p40)控制的单独的mRNA转录物翻译而来的。AAV基因组的3'半还包括AAP基因,该基因编码AAV组装活化蛋白(AAP)。六十个VP单体(包括大约VP1的5个副本、VP2的5个副本和VP3的50个副本)在AAV基因组周围自组装以形成成熟病毒颗粒的二十面体蛋白质壳(衣壳)(Büning,H.et al.(2019)"Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors,"Mol.Ther.Meth.Clin.Devel.12:P248-P265;Van Vliet K.M.et al.(2008) The Role of the Adeno-Associated Virus Capsid in Gene Transfer.In:Drug Delivery Systems,Jain,K.K.(eds.),Meth.Molec.Biol.437:51-91)。AAV AAP蛋白质被认为是稳定和将新产生的VP蛋白质从细胞质运输到细胞核中所需要的。AAV基因组的3'半还包括AAV X基因,该基因被认为编码支持基因复制的蛋白质(Colella,P.et al.(2018) "Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy," Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.8:87-104;Büning,H.et al.(2019)"Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors," Mol.Ther.Meth.Clin.Devel.12:P248-P265;Cao,M.et al.(2014)"The X Gene Of Adeno-Associated Virus 2(AAV2)Is Involved In Viral DNA Replication,"PLoS ONE 9, e104596:1-10)。

[0006] 上述AAV基因编码序列的两侧是145个核苷酸的两个AAV特异性的回文反向重复序列(ITR)(Balakrishnan,B.et al.(2014)"Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV)Vectors Used in Gene Therapy,"Curr.Gene Ther.14(2):86-100;Colella,P.et al.(2018)"Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy," Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.8:87-104)。

[0007] AAV是一种天生有缺陷的病毒,缺乏执行以下至少两种至关重要的功能的能力:启动病毒特异性产物合成的能力和组装这种产物以形成成熟的感染性病毒颗粒的十二面体蛋白质壳(衣壳)的能力。因此,AAV需要共感染"辅助(helper)"病毒,例如腺病毒(Ad)、单纯疱疹病毒(HSV)、巨细胞病毒(CMV)、牛痘病毒或人乳头瘤病毒以提供病毒相关RNA,该RNA不是由AAV基因组的基因编码的。这种VA RNA没有进行翻译,但在调节其他病毒基因的翻译方面发挥作用。类似地,AAV基因组不包括编码Ad的病毒蛋白E1a、E1b、E2a和E4的基因;因此,这些蛋白还必须由共感染"辅助"病毒提供。E1a蛋白极大地促进了在增殖性感染过程中的病毒基因转录。E1b蛋白阻断了在腺病毒感染的细胞中的凋亡,因此允许增殖性感染继续进行。E2a蛋白通过展开模板和增强转录的启动,在病毒链置换复制的伸长阶段发挥作用。E4蛋白已被证明会影响转基因持久性、载体毒性和免疫原性(参见Grieger,J.C.et al. (2012)"Adeno-Associated Virus Vectorology,Manufacturing,and Clinical Applications,"Meth.Enzymol.507:229 254;Dyson,N.et al.(1992)"Adenovirus E1A Targets Key Regulators Of Cell Proliferation,"Canc.Surv.12:161-195;Jones N.C. (1990)"Transformation By The Human Adenoviruses,"Semin.Cancer Biol.1(6):425-435;Ben-Israel,H.et al.(2002)"Adenovirus and Cell Cycle Control," Front.Biosci.7:D1369-d1395;Hoeben,R.C.et al.(2013)"Adenovirus DNA Replication,"Cold Spring Harb.Perspect.Biol.5:a013003(pages 1-11);Berk,A.J.

(2013)“Adenoviridae:The Viruses And Their Replication,In:Fields Virology,6th Edition(Knipe,D.M.et al.,Eds.),Vol.2.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,pages 1704-1731;Weitzman,M.D.(2005)“Functions Of The Adenovirus E4 Proteins And Their Impact On Viral Vectors,”Front.Biosci.10:1106-1117)。

[0008] AAV病毒同时感染分裂细胞和非分裂细胞,并持续作为环状游离分子或可以在特定的染色体位点(腺相关病毒整合位点或AAVS)整合到宿主细胞的DNA(Duan,D.(2016)“Systemic Delivery Of Adeno-Associated Viral Vectors,”Curr.Opin.Virol.21:16-25;Grieger,J.C.et al.(2012)“Adeno-Associated Virus Vectorology,Manufacturing,and Clinical Applications,”Meth.Enzymol.507:229-254)。AAV仍然潜伏于这类受感染的细胞中,除非存在辅助病毒以提供AAV复制和成熟所需要的功能。

II.rAAV及其在基因治疗的用途

[0009] 鉴于AAV的特性,AAV的重组修改版本(rAAV)已发现作为基因治疗的载体的实质性效用(参见Naso,M.F.et al.(2017)“Adeno-Associated Virus(AAV)as a Vector for Gene Therapy,”BioDrugs 31:317-334;Berns,K.I.et al.(2017)“AAV:An Overview of Unanswered Questions,”Human Gene Ther.28(4):308-313;Berry,G.E.et al.(2016)“Cellular Transduction Mechanisms Of Adeno-Associated Viral Vectors,”Curr.Opin.Virol.21:54-60;Blessing,D.et al.(2016)“Adeno-Associated Virus And Lentivirus Vectors:A Refined Toolkit For The Central Nervous System,”21:61-66;Santiago-Ortiz,J.L.(2016)“Adeno-Associated Virus(AAV)Vectors in Cancer Gene Therapy,”J.Control Release 240:287-301;Salganik,M.et al.(2015)“Adeno-Associated Virus As A Mammalian DNA Vector,”Microbiol.Spectr.3(4):1-32;Hocquemiller,M.et al.(2016)“Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases,”Hum.Gene Ther.27(7):478-496;Lykken,E.A.et al.(2018)“Recent Progress And Considerations For AAV Gene Therapies Targeting The Central Nervous System,”J.Neurodevelop.Dis.10:16:1-10;Büning,H.et al.(2019)“Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors,”Mol.Ther.Meth.Clin.Devel.12:P248-P265;During,M.J.et al.(1998)“In Vivo Expression Of Therapeutic Human Genes For Dopamine Production In The Caudates Of MPTP-Treated Monkeys Using An AAV Vector,”Gene Ther.5:820-827;Grieger,J.C.et al.(2012)“Adeno-Associated Virus Vectorology,Manufacturing,and Clinical Applications,”Meth.Enzymol.507:229-254;Kotterman,M.A.et al.(2014)“Engineering Adeno-Associated Viruses For Clinical Gene Therapy,”Nat.Rev.Genet.15(7):445-451;Kwon,I.et al.(2007)“Designer Gene Delivery Vectors:Molecular Engineering and Evolution of Adeno-Associated Viral Vectors for Enhanced Gene Transfer,”Pharm.Res.25(3):489-499)。

[0010] 通常使用环形质粒(“rAAV质粒载体”)产生rAAV。通常从这类结构中删除AAV rep和cap基因并替换成启动子、β-球蛋白内含子、插入所选治疗基因(转基因)的克隆位点和多聚腺苷酸化(“polyA”)位点。然而,仍保留rAAV的末端反向重复序列(ITR),使得rAAV质粒载体的转基因表达盒的两侧是AAV ITR序列(Colella,P.et al.(2018)“Emerging Issues in

AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy,"Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.8:87-104;Büning,H.et al.(2019)"Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors,"Mol.Ther.Meth.Clin.Devel.12:P248-P265)。因此,在5'至3'方向,rAAV包括5'ITR、rAAV的转基因表达盒和3'ITR。

[0011] rAAV已被用于向患有大量基因疾病(例如,遗传性脂蛋白脂酶缺乏症(LPLD)、莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)、芳香族L-胺基酸类脱羧基酶缺乏症(AADC)、无脉络膜症和血友病)中的任一种的患者递送转基因,并且在新型临床形式中具有效用,例如RNA干扰(RNAi)治疗和基因修饰策略,例如Crispr/Cas9(美国专利号8,697,359、10,000,772、10,113,167、10,227,611;Lino,C.A.et al.(2018)"Delivering CRISPR:A Review Of The Challenges And Approaches,"Drug Deliv.25(1):1234-1237;Ferreira,V.et al.(2014)"Immune Responses To AAV-Vectors,The Glybera Example From Bench To Bedside" Front.Immunol.5(82):1-15),Büning,H.et al.(2019)"Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors," Mol.Ther.Meth.Clin.Devel.12:P248-P265;Rastall,D.P.W.(2017)"Current and Future Treatments for Lysosomal Storage Disorders,"Curr.Treat Options Neurol.19(12):45;Kay,M.et al.(2017)"Future Of rAAV Gene Therapy:Platform For RNAi,Gene Editing And Beyond,"Human Gene Ther.28:361-372);Berns,K.I.et al.(2017)"AAV:An Overview of Unanswered Questions,"Human Gene Ther.28(4):308-313)。已经建立超过150个涉及rAAV的临床试验(Büning,H.et al.(2019)"Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors," Mol.Ther.Meth.Clin.Devel.12:P248-P265;Clément,N.et al.(2016)"Manufacturing Of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors For Clinical Trials," Meth.Clin.Develop.3:16002:1-7)。这类重组修饰AAV最常用的AAV血清型是AAV2,其能够感染中枢神经系统细胞、肾细胞、视网膜色素上皮细胞和感光细胞。另一种AAV血清型是AAV9,其感染肌肉细胞,还得到了广泛使用(Duan,D.(2016)"Systemic Delivery Of Adeno-Associated Viral Vectors,"Curr.Opin.Virol.21:16-25)。AAV血清型描述于美国专利号10,301,650;10,266,846;10,265,417;10,214,785;10,214,566;10,202,657;10,046,016;9,884,071;9,856,539;9,737,618;9,677,089;9,458,517;9,457,103;9,441,244;9,193,956;8,846,389;8,507,267;7,906,111;7,479,554;7,186,552;7,105,345;6,984,517;6,962,815;和6,733,757。

III.rAVV的生产方法

[0012] 含有所需的转基因表达盒的rAAV通常由在粘附和悬浮液中生长的人类细胞(例如HEK293)所产生。如上所述,因为rAAV是缺陷型病毒,必须提供另外的功能以复制和包装rAAV。

[0013] 通常,rAAV是由具有rAAV质粒载体和第二质粒载体的瞬时转染细胞所产生的,第二质粒载体包括AAV辅助功能提供多核苷酸,该多核苷酸提供载体转录控制和复制以及将病毒基因组包装至病毒衣壳中(Rep40和Rep68不是rAAV生产所需的)所需的Rep52和Rep78基因,和从AAV中删除以产生rAAV的cap基因。第二质粒载体可另外包括非AAV辅助功能提供多核苷酸,其编码AAV增殖所需的病毒转录和翻译因子(E1a、E1b、E2a、VA和E4),以便与rAAV

一起构成双质粒转染系统(Grimm,D.et al.(1998)“Novel Tools For Production And Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors,”Hum.Gene Ther.9:2745-2760;Penaud-Budloo,M.et al.(2018)“Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production,”Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.8:166-180)。

[0014] 然而,克隆AAV辅助功能提供多核苷酸(其提供所需的rep和cap基因)到“AAV辅助质粒”和在不同质粒(例如“Ad辅助质粒”)上克隆非AAV辅助功能提供多核苷酸(其提供编码病毒转录和翻译因子的基因)变得越来越普遍,使得这类质粒与rAAV质粒一起构成三质粒转染系统(图2)。使用三质粒转染系统的优点是允许人们将一个cap基因简单切换到另一cap基因,从而促进rAAV血清型变化。使用辅助质粒,而不是辅助病毒,允许在没有另外产生的辅助病毒颗粒的情况下产生rAAV(François,A.et al.(2018)“Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls,”Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.10:223-236;Matsushita,T.et al.(1998)“Adeno-Associated Virus Vectors Can Be Efficiently Produced Without Helper Virus,”Gene Ther.5:938-945)。

[0015] 通过磷酸钙共沉淀法将包含rAAV质粒载体、提供AAV辅助功能rep和cap基因的质粒载体和提供非AAV辅助功能的质粒载体的质粒DNA瞬时转染到HEK293细胞中,已经变成在研究实验室中产生rAAV的标准方法(Grimm,D.et al.(1998)“Novel Tools For Production And Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors,”Hum.Gene Ther.9:2745-2760)。然而,将这类磷酸钙介导的转染方法与悬浮培养的转染哺乳动物细胞一起使用需要更换培养基,因此不被认为是为了产生治疗剂量的rAAV所需的大规模rAAV生产的理想方法(Lock,M.et al.(2010)“Rapid,Simple,and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale,”Hum.Gene Ther.21:1259-1271)。出于这一原因,将聚乙烯亚胺(PEI)用作转染试剂,并且已发现提供与那些使用磷酸钙介导的转导所获得的病毒产率相似的病毒产率(Durocher,Y.et al.(2007)“Scalable Serum-Free Production Of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2By Transfection Of 293Suspension Cells,”J.Virol.Meth.144:32-40)。

[0016] 或者,可在昆虫细胞(例如,sf9细胞)中使用杆状病毒载体(参见,例如美国专利号9,879,282;9,879,279;8,945,918;8,163,543;7,271,002和6,723,551),或在HSV感染的幼仓鼠肾(BHK)细胞(例如,BHK21)中(François,A.et al.(2018)“Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls,”Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.10:223-236)产生rAAV。rAAV生产方法记载于Grieger,J.C.et al.(2012)“Adeno-Associated Virus Vectorology,Manufacturing,and Clinical Applications,”Meth.Enzymol.507:229-254,以及在Penaud-Budloo,M.et al.(2018)“Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production,”Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.8:166-180中。

IV.rAAV纯化和回收的方法

[0017] 通常,在生产后,通过一种或多种过夜CsCl梯度离心法(Zolotukhin,S.et al.(1999)“Recombinant Adeno-Associated Virus Purification Using Novel Methods Improves Infectious Titer And Yield,”Gene Ther.6:973-985)收集和纯化rAAV,然后

通过脱盐以形成纯化的rAAV生产储备。可获得滴度为$10^{12}$-$10^{13}$感染性rAAV衣壳/mL。

[0018] 因为rAAV感染没有造成细胞病变效应，所以空斑测定不能用于确定rAAV制剂的感染性滴度。因此感染性滴度通常测量为半数组织培养感染剂量(TCID50)。以这种方法，HeLa衍生AAV2rep和cap表达细胞系在96孔板中生长，并在存在血清型5的腺病毒情况下，使用rAAV制剂的10倍连续稀释液重复感染。在感染后，载体基因组复制由定量PCR(qPCR)确定(Zen,Z.et al.(2004)“Infectious Titer Assay For Adeno-Associated Virus Vectors With Sensitivity Sufficient To Detect Single Infectious Events,”Hum.Gene Ther.15:709-715)。或者，可以使用感染中心测定(ICA)测量rAAV制剂的感染性滴度。这一检测使用HeLa rep-cap细胞和Ad，但是，在孵育后，涉及将细胞转移到膜上。将与所采用的转基因的一部分互补的标记探针通过杂交用于检测感染性中心(代表个别受感染的细胞)。尽管得到更广泛的使用，TCID50测定已被报道造成比ICA更高的背景，并且相对于ICA高估了载体感染性(François,A.et al.(2018)“Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls,”Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.10:223-236)。产生和纯化rAAV的方法除其他外描述于美国专利号10,294,452;10,161,011;10,017,746;9,598,703;7,625,570;7,439,065;7,419,817;7,208,315;6,995,006;6,989,264;6,846,665和6,841,357。

[0019] 如上所讨论的，通常采用多次过夜氯化铯梯度离心法以在研究实验室中产生rAAV。然而，长时间暴露于CsCl已被报道会损害rAAV质粒载体的效力(Zolotukhin,S.et al.(1999)“Recombinant Adeno-Associated Virus Purification Using Novel Methods Improves Infectious Titer And Yield,”Gene Ther.6:973-985)。此外，这类梯度法对细胞裂解物具有有限的负载能力，因此限制了可纯化rAAV的数量。尽管已经将等渗替代梯度培养基、碘克沙醇(iodixanol)用于纯化rAAV质粒载体，碘克沙醇也具有与用于rAAV生产的CsCl的相同的负载能力缺点。

[0020] 为了克服这类梯度特异性限制，研究者已经发明离子交换色谱法、亲和纯化法和基于抗体亲和的rAAV纯化法(Auricchio,A.et al.(2001)“Isolation Of Highly Infectious And Pure Adeno-Associated Virus Type 2Vectors With A Single-Step Gravity-Flow Column,”Hum.Gene Ther.12:71-76;Brument,N.et al.(2002)“A Versatile And Scalable Two-Step Ion-Exchange Chromatography Process For The Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotypes-2And-5,”Mol.Ther.6:678-686;Zolotukhin,S.et al.(2002)“Production And Purification Of Serotype 1,2,And 5Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors,”Methods 28:158-167;Davidoff,A.M.et al.(2004)“Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 8Vectors By Ion Exchange Chromatography Generates Clinical Grade Vector Stock,”J.Virol.Methods 121:209-215;Smith,R.H.et al.(2009)“A Simplified Baculovirus-AAV Expression Vector System Coupled With One-Step Affinity Purification Yields High-Titer rAAV Stocks From Insect Cells,”Mol.Ther.17:1888-1896;Lock,M.et al.(2010)“Rapid,Simple,and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale,”Hum.Gene Ther.21:1259-1271)。然而，不幸的是，这类基于色谱分析的纯化法通常不能分离载体相关的杂质，例如，

来自完全功能化载体颗粒的空衣壳。因此，尽管其缺点，CsCl梯度离心法仍然是用于从rAAV载体制剂移除空颗粒最好的表征方法。

[0021] 已经观察到，在磷酸钙和PEI转染培养物中各种血清型的rAAV被释放到上清液中(Lock,M.et al.(2010)“Rapid,Simple,and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale,”Hum.Gene Ther.21:1259-1271;美国专利号6,566,118和6,989,264和美国专利公开US 2005/0266567)。美国专利号6,566,118和6,989,264，以及美国专利公开US 2005/0266567公开了如果使用NaCl和其他但非特定的盐、甘露醇或葡萄糖配制培养基以初始包括约100mOsM至约650mOsM之间的渗透压或通过使用离子溶质(例如$Na^+$或$K^+$)控制培养基的电导率到至少约5mS，高滴度的重组AAV载体被释放到细胞悬浮液的上清液中。起始渗透压为300mOsM(150mM)NaCl被发现是最佳的。Adamson-Small,L.et al(2017)同样证明了在转导后4-6小时氯化钠增加的感染条件下，在生产培养基中60-90mM氯化钠导致了在rAAV9转导单元和衣壳蛋白中的显著增加(WO 2017/112948;Adamson-Small,L.et al.(2017)“Sodium Chloride Enhances Recombinant Adeno-Associated Virus Production in a Serum-Free Suspension Manufacturing Platform Using the Herpes Simplex Virus System,”Hum.Gene Ther.Meth.28(1):1-14)。

[0022] Lock,M.et al.(2010)公开了一种基于PEI转染和基于上清液收获的技术，用于回收rAAV颗粒(Lock,M.et al.(2010)“Rapid,Simple,and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale,”Hum.Gene Ther.21:1259-1271)。该方法是基于属于除AAV2外AAV血清型的rAAV主要被释放到磷酸钙转染细胞的培养基并且在细胞裂解物中没有保留的观察。因此，Lock,M.et al.(2010)公开了针对这类rAAV血清型，生产培养基是相对纯的rAAV质粒载体来源，其具有低水平的细胞污染物，并且这些因子提高了负载能力和纯度梯度法的分辨率。在这种公开方法中，使用磷酸钙将rAAV(包括属于AVV2血清型的rAAV)转染至HEK293细胞中。转染后七十二小时(或120小时)，添加不含血清的培养基，并额外继续孵育28小时。然后将降解所有形式的DNA和RNA的基因工程核酸内切酶Benzonase®添加到培养物上清液中。在2小时后，将NaCl添加到500mM，然后在收获培养基前另外继续孵育2小时。然后将澄清的培养基通过切向流过滤(TFF)浓缩125倍，并且使用碘克沙醇分级梯度法(step gradient)将rAAV进行纯化。血清型AAV1、AAV6、AAV7、AAV8和AAV9的AAV可以采用该方法。Lock et al.(2010)公开了使用高盐孵育以导致rAAV6和rAAV9质粒载体进一步释放20％到培养基中(相对于美国专利申请号6,566,118和6,989,264以及美国专利公开US 2005/0266567的方法)，但认为相对于其他血清型，引起很小的变化。尽管rAAV8和rAAV9的平均整体产率较高($2.2\times10^{14}$基因组副本)，但是其他rAAV血清型的产率显著较低(例如rAAV6为$6.7\times10^{13}$基因组副本)。尽管所生产的rAAV估计纯度超过90％，但是在加工步骤中损失了35％至50％所生产的rAAV8和rAAV9，以及在加工步骤中损失了80-85％所生产的rAAV6，并且rAAV2大部分保留在细胞内，没有释放到培养基中。

[0023] 还将提供的盐用于使细胞通透化以更简单地测量转基因相关的基因表达。因此，例如，During,M.J.et al.(1998)使用含有135mm NaCl、3mm KCl、1.2mm $CaCl_2$、1.0mm $MgCl_2$、10mm葡萄糖、200mm抗坏血酸盐和2mm的磷酸氢钠和磷酸氢二钠的“释放缓冲液”缓冲到pH 7.4以促进来自HEK293细胞的多巴胺释放，HEK293细胞已经被表达人酪氨酸羟化酶(TH)和芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)的rAAV转染(During,M.J.et al.(1998)“In Vivo

Expression Of Therapeutic Human Genes For Dopamine Production In The Caudates Of MPTP-Treated Monkeys Using An AAV Vector,"Gene Ther.5:820-827)。

[0024] 然而,尽管之前已经取得了全部这些成功,但是仍然需要开发能够解决目前限制rAAV应用到基因治疗的问题的方法(Grieger,J.C.et al.(2012)"Adeno-Associated Virus Vectorology,Manufacturing,and Clinical Applications,"Meth.Enzymol.507:229-254;Kotterman,M.A.et al.(2014)"Engineering Adeno-Associated Viruses For Clinical Gene Therapy,"Nat.Rev.Genet.15(7):445-451;Kwon,I.et al.(2007)"Designer Gene Delivery Vectors:Molecular Engineering and Evolution of Adeno-Associated Viral Vectors for Enhanced Gene Transfer,"Pharm.Res.25(3):489-499;Naso,M.F.et al.(2017)"Adeno-Associated Virus(AAV)as a Vector for Gene Therapy,"BioDrugs 31:317-334)。这些问题包括:

(1)rAAV的有限组织特异性向性:这些问题中的一个反应了AAV和rAAV的有限组织特异性向性。已经开发出多种编码不同血清型衣壳蛋白(即"花叶(mosiac)"衣壳)的质粒的用途,以增大可以由rAAV感染的组织类型的范围(Hauck,B.et al.(2003)"Generation And Characterization Of Chimeric Recombinant AAV Vectors,"Mol.Ther.7:419-425;Rabinowitz,J.E.et al.(2004)"Crossdressing The Virion:The Transcapsidation Of Adeno-Associated Virus Serotypes Functionally Defines Subgroups,"J.Virol.78:4421-4432;Lisowski,L.et al.(2015)"Adeno-Associated Virus Serotypes For Gene Therapeutics,"24:59-67)。

(2)抗rAAV免疫应答的流行:这些问题中的第二个反应了一个事实,即30-80%的人类已经自然暴露于AAV感染(主要是AAV2)中,以及20-67%的人在其血液或其他体液中携带中和抗AAV衣壳抗体的滴度(Liu,Q.et al.(2014)"Neutralizing Antibodies Against AAV2,AAV5 And AAV8 In Healthy And HIV-1-Infected Subjects In China:Implications For Gene Therapy Using AAV Vectors,"Gene Ther.21:732-738;Vandamme,C.et al.(2017)"Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial,"Hum.Gene.Ther.28(11):1061-1074)。这些抗体的存在通过阻止转基因表达降低了rAAV治疗的有效性。已经将成聚合物共聚物(例如聚乙二醇(PEG))用作保护rAAV不受中和抗体侵害的方法(Le,H.T.et al.(2005)"Utility Of Pegylated Recombinant Aeno-Associated Viruses For Gene Transfer,"J.Control.Release 108:161-177;Lee,G.K.et al.(2005)"PEG Conjugation Moderately Protects Adeno-Associated Viral Vectors Against Antibody Neutralization,"Biotechnol.Bioeng.92:24-34)。还取得了具有替代血清型或突变非免疫原性衣壳的rAAV的用途(Smith,J.K.et al.(2018)"Creating An Arsenal Of Adeno-Associated Virus(AAV)Gene Delivery Stealth Vehicles,"PLoS Pathog.14(5):1-6)。

(3)rAAV包装能力的限制:已经发现rAVV的包装效率显著降低超过5kb,封装较大基因组时在5'端截断(truncation)(Wu,Z.et al.(2010)"Effect Of Genome Size On AAV Vector Packaging,"Molec.Ther.18:80-86;Ghosh,A.et al.(2007)"Expanding Adeno-Associated Viral Vector Capacity:A Tale Of Two Vectors,"Biotechnol.Genet.Eng.Rev.24:165-177;McClements,M.E.et a.(2017)"Adeno-

associated Virus(AAV)Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes,"Yale J.Biol.Med.90:611-623)。

(4)大规模制造技术的限制:制造rAAV以足够用于大规模治疗的量的能力已经成为该技术成功应用的阻碍,该方法的产率范围为低于5%至低于30%(Lock,M.et al.(2010)"Rapid,Simple,and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale,"Hum.Gene Ther.21:1259-1271)。

在一些情况下,这些问题是相互关联的。例如,最终产物中空颗粒的存在将载体的受体暴露于大量AAV抗原,可导致不需要的免疫应答和毒性。因此,提高包装效率和获得高生产滴度的改进方法是非常重要的。

[0025] 本发明涉及在rAAV生产过程中通过改变在培养基中的离子浓度来提高rAAV包装效率的方法。

## 发明内容

[0026] 本发明涉及提高包装重组腺相关病毒(rAAV)效率,以提高其生产滴度的方法。更具体地,本发明涉及通过施用另外的离子提高细胞培养基的离子强度,以提高转染细胞产生的rAAV生产滴度的方法。

[0027] 详细地,本发明提供提高重组修饰腺相关病毒(rAAV)的生产滴度,其中该方法包括:

(A)在足以允许rAAV产生的条件下在初始培养基中在初始时间段内培养已经使用rAAV进行转染的细胞,其中该细胞另外含有AAV辅助功能提供多核苷酸和非AAV辅助功能提供多核苷酸;

(B)在初始时间段后通过添加一种或多种除Na+以外的离子到培养基中以改变培养基的离子强度;和

(C)继续细胞的培养,从而产生比缺乏步骤(B)所获得的滴度更大的rAAV生产滴度。

[0028] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中每种所添加的离子以足够提高初始培养基中这类离子的浓度从约10mM到约80mM的含量提供。

[0029] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中生产滴度比来自在缺乏步骤(B)的情况下相似培养的细胞中所获得的滴度大至少50%。

[0030] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或包括转录核酸,有助于治疗基因或可遗传性疾病或病况。

[0031] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中rAAV属于rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8、rAAV9或rAAV10血清型或这些血清型的杂交型。

[0032] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中rAAV属于rAAV2、rAAV5或rAAV9血清型或这些血清型的杂交型。

[0033] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中所添加的离子包括$K^+$、$Ca^{++}$或$Mg^{++}$中的一种或多种。

[0034] 本发明另外提供这一方法的实施例,其中所添加的离子包括$CO_3^=$、$HCO_3^-$、$HPO_4^-$、$PO_4^=$、$SCN^-$、$SO_4^=$、$HSO_4^-$和$Cl^-$中的一种或多种。

[0035] 本发明另外提供这一方法的实施例，其中所添加的离子包括以下的一种或多种：乙酸盐、天冬氨酸盐、苯二甲酸氢盐、酒石酸氢盐、丁氧基乙氧基乙酸酯、辛酸盐、柠檬酸盐、脱氢乙酸盐、二乙酸盐、二羟基甘氨酸盐、d-糖酸盐(d-saccharate)、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘氨酸盐、糖硫酸盐(glycosulfate)、羟基甲烷磺酸盐、乳酸盐、甲硫氨酸盐、草酸盐、苯酚盐、苯酚磺酸盐、丙酸盐、丙酸盐、糖精、水杨酸盐、肌氨酸盐、山梨酸盐、巯基乙酸盐和对甲苯磺酸盐。

[0036] 本发明另外提供这一方法的实施例，其中所添加的离子包括$K^+$和$CO_3^=$。

[0037] 本发明另外提供这一方法的实施例，其中该细胞是人胚胎肾细胞、幼仓鼠肾细胞或sf9昆虫细胞。

[0038] 本发明另外提供这一方法的实施例，其中该细胞是HEK293人胚胎肾细胞。

[0039] 本发明另外提供这一方法的实施例，其中该细胞是BHK21幼仓鼠肾细胞。

[0040] 本发明另外提供这一方法的实施例，其中初始培养基是杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)或补充有血清的杜氏改良伊格尔培养基。

[0041] 本发明另外提供药学组合物，该药学组合物包括：

(A)由上述方法中任一种产生的重组修饰的腺相关病毒(rAAV)的制剂，其中该rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或转录核酸，有助于治疗基因或可遗传性疾病或病况，并且其中该药学组合物含有有效量的rAAV制剂；和

(B)药学上可接受的载剂。

[0042] 本发明另外提供由上述方法中任一种产生的重组修饰腺相关病毒(rAAV)的制剂(其中该rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或转录核酸)或上述药学组合物在治疗基因或可遗传性疾病或病况的用途。

## 附图说明

[0043] 图1提供了野生型(Wt)AAV基因组的遗传图谱示意图。

[0044] 图2提供了野生型AAV2基因组(1)、重组AAV(rAAV)(2)、互补“AAV辅助质粒”(3)和腺病毒辅助质粒(“Ad辅助质粒”)(4)的结构域示意图。野生型(Wt)AAV2(1)由AAV特异性回文末端反向重复序列(ITR)、含有编码Rep蛋白的基因的5'半和含有编码蛋白Cap的基因的3'半组成。通过将野生型(Wt)AAV2(1)的Rep和Cap编码基因替换成包括启动子(Pro)、感兴趣的外源性转基因和多腺苷酸化位点(pA)的转基因盒，形成rAAV(2)。为了产生rAAV(2)，提供互补“AAV辅助”质粒载体(3)和腺病毒辅助质粒载体(Ad辅助质粒)(4)。互补AAV辅助质粒(3)提供Rep和Cap蛋白。Ad辅助质粒(4)提供腺病毒蛋白E1a、E1b、E2a、VA和E4。

[0045] 图3示出了AAV辅助质粒载体pAAV-RC2的图谱。

[0046] 图4示出了非AAV辅助质粒载体pHelper-Kan的图谱。

[0047] 图5示出了rAAV质粒载体pAV-CMV-EGFP的图谱。

[0048] 图6示出了rAAV质粒载体pAV-TBG-EGFP的图谱。

[0049] 图7A-7C通过转染细胞示出了产物上阳离子和阳离子浓度的作用。图7A使用感染中心测定示出了在转染细胞中增强绿色荧光蛋白(EGFP)的表达程度和rAAV储备的滴度。在存在另外添加的NaCl、KCl、$CaCl_2$或$MgCl_2$的存在情况下，通过在杜氏改良伊格尔培养基中培养转染HEK293细胞产生储备。这一另外提供的盐的浓度是0、20、40、60、80或100mM。图7A示

出了感染中心测定。图7B是AAV载体的滴度和盐浓度的倍数变化的图表。图7C是AAV全基因组(TG)的倍数变化与阳离子和阳离子浓度的函数图像。图中示出的浓度是通过添加这些盐提供的培养基的浓度增加。

[0050] 图8A-8B示出了rAAV储备的产物上阳离子和阳离子浓度的作用。图8A示出了使用感染中心测定在转染细胞中增强绿色荧光蛋白(EGFP)的表达程度和rAAV储备的滴度。在存在另外添加的12种盐的情况下,通过在杜氏改良伊格尔培养基中培养转染HEK293细胞产生储备。这一另外提供的盐的浓度是40、50、60或70mM。图8A示出了感染中心测定。图8B是AAV载体的滴度倍数变化和盐浓度的图像。图中显示了在不同的阴离子和不同的另外提供的阴离子的浓度下产生的rAAV滴度的倍数变化。图中示出的浓度是通过添加这些阳离子提供的培养基中的浓度增加。

[0051] 图9A-9B表明提供$KHCO_3$导致了rAAV意料之外的更高滴度,相对于其他离子(图9A:培养基中AAV滴度的倍数变化;图9B:全基因组的倍数变化)图中示出的浓度(40、50、60或70mM)是通过添加这种$KHCO_3$提供的培养基中的浓度增加。

[0052] 图10示出了所产生的rAAV的总含量的倍数变化和由细胞释放到培养基中的rAAV的含量,该细胞使用Ad辅助质粒进行共转染,质粒提供AAV ITR、增强绿色荧光蛋白编码的转基因盒和AAV2辅助质粒或AAV8辅助质粒以提供AAVrep和cap基因功能。在转染后2、4、6、8和10小时,添加$KHCO_3$以在培养基中产生30mM的额外浓度,并且在转染后72小时,测定释放到培养基中的rAAV(AAV2-培养基和AAV8-培养基)和细胞裂解物中的全基因组(AAA2-全基因组和AAV8-全基因组)的倍数变化。

[0053] 图11A-11B示出了提供$KHCO_3$对不同血清型的rAAV的生产的增强作用。图11A:示出了24小时后释放到培养基中的rAAV的倍数变化;图11B示出了rAAV的全基因组的倍数变化;$KHCO_3$-30表示添加$KHCO_3$以在培养基中产生30mM的额外浓度;$KHCO_3$-55表示添加$KHCO_3$以在培养基中产生55mM的额外浓度。

[0054] 图12示出了悬浮液中培养的细胞响应于$KHCO_3$的提供以产生增强水平的rAAV的能力。提供足够的$KHCO_3$,使培养基中的$KHCO_3$浓度增加大于约20mM,可在20小时后提高rAAV5和rAAV6的产量。

## 具体实施方式

I.本发明的方法

[0055] 本发明涉及提高重组腺相关病毒(rAAV)的包装效率,以提高其生产滴度的方法。更具体地,本发明涉及通过施用另外的离子提高细胞培养基的离子强度,以提高转染细胞产生的rAAV生产滴度的方法。

[0056] 如本文所使用的,术语“AAV”旨在表示腺相关病毒,可用于指病毒本身或其衍生物。该术语涵盖所有亚型以及自然形成和重组形式。如本文所使用的,术语“rAAV”旨在表示AAV的重组修饰版本,包括非AAV起源的多核苷酸序列(即与AAV异源的多核苷酸)。rAAV可以是单链或双链的,可由脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸组成。

[0057] 如本文所使用的,术语“AAV辅助功能”表示rAAV复制和包装所需的AAV蛋白(例如,Rep和Cap)和/或AAV的多核苷酸。这类AAV辅助功能由“AAV辅助功能提供多核苷酸”提供,本文所使用的该术语是被整合到细胞染色体中的病毒、质粒载体、非质粒载体或多核苷酸,其

提供AAV辅助功能。AAV辅助质粒，可根据本发明使用以提供AAV辅助功能，例如pAAV-RC(Agilent;Addgene;Cell Biolabs)、pAAV-RC2(Cell Biolabs)等，是市售可得的。质粒pAAV-RC2(SEQ ID NO:1;图3)是AAV辅助质粒，可根据本发明使用以提供AAV辅助功能。

质粒pAAV-RC2的编码链(SEQ ID NO:1)：

ccgggccccc cctcgaggtc gacggtatcg ggggagctcg cagggtctcc
attttgaagc gggaggtttg aacgcgcagc cgccatgccg gggttttacg
agattgtgat taaggtcccc agcgaccttg acgagcatct gcccggcatt
tctgacagct ttgtgaactg ggtggccgag aaggaatggg agttgccgcc
agattctgac atggatctga atctgattga gcaggcaccc ctgaccgtgg
ccgagaagct gcagcgcgac tttctgacgg aatggcgccg tgtgagtaag
gccccggagg ctcttttctt tgtgcaattt gagaagggag agagctactt
ccacatgcac gtgctcgtgg aaaccaccgg ggtgaaatcc atggttttgg
gacgtttcct gagtcagatt cgcgaaaaac tgattcagag aatttaccgc
gggatcgagc cgactttgcc aaactggttc gcggtcacaa agaccagaaa
tggcgccgga ggcgggaaca aggtggtgga tgagtgctac atccccaatt
acttgctccc caaaacccag cctgagctcc agtgggcgtg gactaatatg
gaacagtatt taagcgcctg tttgaatctc acggagcgta aacggttggt
ggcgcagcat ctgacgcacg tgtcgcagac gcaggagcag aacaaagaga
atcagaatcc caattctgat gcgccggtga tcagatcaaa aacttcagcc
aggtacatgg agctggtcgg gtggctcgtg gacaagggga ttacctcgga
gaagcagtgg atccaggagg accaggcctc atacatctcc ttcaatgcgg
cctccaactc gcggtcccaa atcaaggctg ccttggacaa tgcgggaaag
attatgagcc tgactaaaac cgcccccgac tacctggtgg gccagcagcc
cgtggaggac atttccagca atcggattta taaaattttg gaactaaacg
ggtacgatcc ccaatatgcg gcttccgtct ttctgggatg ggccacgaaa
aagttcggca agaggaacac catctggctg tttgggcctg caactaccgg
gaagaccaac atcgcggagg ccatagccca cactgtgccc ttctacgggt
gcgtaaactg gaccaatgag aactttccct tcaacgactg tgtcgacaag
atggtgatct ggtgggagga ggggaagatg accgccaagg tcgtggagtc
ggccaaagcc attctcggag gaagcaaggt gcgcgtggac cagaaatgca
agtcctcggc ccagatagac ccgactcccg tgatcgtcac ctccaacacc
aacatgtgcg ccgtgattga cgggaactca acgaccttcg aacaccagca

gccgttgcaa gaccggatgt tcaaatttga actcacccgc cgtctggatc
atgactttgg gaaggtcacc aagcaggaag tcaaagactt tttccggtgg
gcaaaggatc acgtggttga ggtggagcat gaattctacg tcaaaaaggg
tggagccaag aaaagacccg cccccagtga cgcagatata agtgagccca
aacgggtgcg cgagtcagtt gcgcagccat cgacgtcaga cgcggaagct
tcgatcaact acgcagacag gtaccaaaac aaatgttctc gtcacgtggg
catgaatctg atgctgtttc cctgcagaca atgcgagaga atgaatcaga
attcaaatat ctgcttcact cacggacaga aagactgttt agagtgcttt
cccgtgtcag aatctcaacc cgtttctgtc gtcaaaaagg cgtatcagaa
actgtgctac attcatcata tcatgggaaa ggtgccagac gcttgcactg
cctgcgatct ggtcaatgtg gatttggatg actgcatctt tgaacaataa
atgatttaaa tcaggtatgg ctgccgatgg ttatcttcca gattggctcg
aggacactct ctctgaagga ataagacagt ggtggaagct caaacctggc
ccaccaccac caaagcccgc agagcggcat aaggacgaca gcaggggtct
tgtgcttcct gggtacaagt acctcggacc cttcaacgga ctcgacaagg
gagagccggt caacgaggca gacgccgcgg ccctcgagca cgacaaagcc
tacgaccggc agctcgacag cggagacaac ccgtacctca agtacaacca
cgccgacgcg gagtttcagg agcgccttaa agaagatacg tcttttgggg
gcaacctcgg acgagcagtc ttccaggcga aaaagagggt tcttgaacct
ctgggcctgg ttgaggaacc tgttaagacg gctccgggaa aaaagaggcc
ggtagagcac tctcctgtgg agccagactc ctcctcggga accggaaagg
cgggccagca gcctgcaaga aaaagattga attttggtca gactggagac
gcagactcag tacctgaccc ccagcctctc ggacagccac cagcagcccc
ctctggtctg ggaactaata cgatggctac aggcagtggc gcaccaatgg
cagacaataa cgagggcgcc gacggagtgg gtaattcctc gggaaattgg
cattgcgatt ccacatggat gggcgacaga gtcatcacca ccagcacccg
aacctgggcc ctgcccacct acaacaacca cctctacaaa caaatttcca
gccaatcagg agcctcgaac gacaatcact actttggcta cagcacccct
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccactttt caccacgtga
ctggcaaaga ctcatcaaca acaactgggg attccgaccc aagagactca
acttcaagct ctttaacatt caagtcaaag aggtcacgca gaatgacggt
acgacgacga ttgccaataa ccttaccagc acggttcagg tgtttactga
ctcggagtac cagctcccgt acgtcctcgg ctcggcgcat caaggatgcc
tcccgccgtt cccagcagac gtcttcatgg tgccacagta tggatacctc
accctgaaca acgggagtca ggcagtagga cgctcttcat tttactgcct
ggagtacttt ccttctcaga tgctgcgtac cggaaacaac tttaccttca
gctacacttt tgaggacgtt cctttccaca gcagctacgc tcacagccag
agtctggacc gtctcatgaa tcctctcatc gaccagtacc tgtattactt
gagcagaaca aacactccaa gtggaaccac cacgcagtca aggcttcagt
tttctcaggc cggagcgagt gacattcggg accagtctag gaactggctt
cctggaccct gttaccgcca gcagcgagta tcaaagacat ctgcggataa
caacaacagt gaatactcgt ggactggagc taccaagtac cacctcaatg
gcagagactc tctggtgaat ccgggcccgg ccatggcaag ccacaaggac
gatgaagaaa agtttttcc tcagagcggg gttctcatct ttgggaagca
aggctcagag aaaacaaatg tggacattga aaaggtcatg attacagacg
aagaggaaat caggacaacc aatcccgtgg ctacggagca gtatggttct
gtatctacca acctccagag aggcaacaga caagcagcta ccgcagatgt
caacacacaa ggcgttcttc caggcatggt ctggcaggac agagatgtgt
accttcaggg gcccatctgg gcaaagattc cacacacgga cggacatttt
caccctctc ccctcatggg tggattcgga cttaaacacc ctcctccaca

gattctcatc aagaacaccc cggtacctgc gaatccttcg accaccttca
gtgcggcaaa gtttgcttcc ttcatcacac agtactccac gggacaggtc
agcgtggaga tcgagtggga gctgcagaag gaaaacagca aacgctggaa
tcccgaaatt cagtacactt ccaactacaa caagtctgtt aatgtggact
ttactgtgga cactaatggc gtgtattcag agcctcgccc cattggcacc
agatacctga ctcgtaatct gtaattgctt gttaatcaat aaaccgttta
attcgtttca gttgaacttt ggtctctgcg tatttctttc ttatctagtt
tccatgctct aggatccact agtaacggcc gccagtgtgc tggaattcgg
ctttgtagtt aatgattaac ccgccatgct acttatctac gtagccatgc
tctagaggtc ctgtattaga ggtcacgtga gtgttttgcg acattttgcg
acaccatgtg gtcacgctgg gtatttaagc ccgagtgagc acgcagggtc
tccattttga agcgggaggt ttgaacgcgc agccgccaag ccgaattctg
cagatatcca aacactggcg gccgctcgac tagagcggcc gccaccgcgg
tggagctcca gcttttgttc cctttagtga gggttaattg cgcgcttggc
gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa
ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc
taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt
ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct
ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct
ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccgg ttcagcccga ccgctgcgcc
ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga
agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa
aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa
ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat
gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat
ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca
atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg
ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt
gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc
ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa
gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag
tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac

cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg
taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga
atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa
aagtgccacc taaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa
atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa
atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc
agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag
ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc
taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc
taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg
cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca
agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acacccgccg cgcttaatgc
gccgctacag ggcgcgtccc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg
aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg
ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt tttcccagtc
acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagcg cgcgtaatac gactcactat
agggcgaatt gggta

[0058] 在SEQ ID NO:1中,pAAV-RC2的残基85-1950编码Rep蛋白Rep78(残基484-663对应于P19启动子,残基1464-1643对应于P40启动子以及残基1668-1676是供体位点);残基1967-4174编码衣壳蛋白VP1;残基1992-2016编码Rep68蛋白的一部分;残基4175-4256编码polyA序列;残基4610-4626是M13Rev序列;残基4634-4650是Lac操作子序列;4658-4688是Lac启动子序列;残基4951-5675对应于pMB ori序列,残基5771-6631编码氨苄青霉素抗性决定簇;和残基6632-6730是bla启动子序列(图3)。

[0059] 如本文所用,术语“非AAV辅助功能”表示Ad、CMV、HSV或其他非AAD病毒(例如E1a、E1b、E2a、VA和E4)的蛋白质和/或Ad、CMV、HSV或其他非AAD病毒的多核苷酸,其是rAAV的复制和包装所需的。这类非AAV辅助功能是由“提供非AAV辅助功能的多核苷酸”提供的,该术语在本文中是指提供非AAV辅助功能的病毒、质粒载体、非质粒载体或已整合到细胞染色体的多核苷酸。载体、pHelper及其衍生物(可从Cell Biolabs,Inc.、Invitrogen和Stratagene购买得到)是合适的非AAV辅助功能提供多核苷酸(参见,例如Matsushita,T.et al.(1998)“Adeno-Associated Virus Vectors Can Be Efficiently Produced Without Helper Virus,”Gene Ther.5:938-945;Sharma,A.et al.(2010)“Transduction Efficiency Of AAV 2/6,2/8And 2/9Vectors For Delivering Genes In Human Corneal Fibroblasts,”Brain Res.Bull.81(2-3):273-278)。质粒pHelper-Kan(SEQ ID NO:2;图4)是非AAV辅助功能提供多核苷酸,可根据本发明使用以提供非AVV辅助功能。

质粒pHelper-Kan的编码链(SEQ ID NO:2):

ggtacccaac tccatgctta acagtcccca ggtacagccc accctgcgtc
gcaaccagga acagctctac agcttcctgg agcgccactc gccctacttc
cgcagccaca gtgcgcagat taggagcgcc acttcttttt gtcacttgaa
aaacatgtaa aaataatgta ctaggagaca ctttcaataa aggcaaatgt
ttttatttgt acactctcgg gtgattattt acccccccacc cttgccgtct
gcgccgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgct atgcgccact
ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgctccact taaactcagg
cacaaccatc cgcggcagct cggtgaagtt ttcactccac aggctgcgca
ccatcaccaa cgcgtttagc aggtcgggcg ccgatatctt gaagtcgcag
ttggggcctc cgccctgcgc gcgcgagttg cgatacacag ggttgcagca
ctggaacact atcagcgccg ggtggtgcac gctggccagc acgctcttgt
cggagatcag atccgcgtcc aggtcctccg cgttgctcag ggcgaacgga
gtcaactttg gtagctgcct tcccaaaaag ggtgcatgcc caggctttga
gttgcactcg caccgtagtg gcatcagaag gtgaccgtgc ccggtctggg
cgttaggata cagcgcctgc atgaaagcct tgatctgctt aaaagccacc
tgagcctttg cgccttcaga gaagaacatg ccgcaagact tgccggaaaa
ctgattggcc ggacaggccg cgtcatgcac gcagcacctt gcgtcggtgt
tggagatctg caccacattt cggccccacc ggttcttcac gatcttggcc
ttgctagact gctccttcag cgcgcgctgc ccgttttcgc tcgtcacatc
catttcaatc acgtgctcct tatttatcat aatgctcccg tgtagacact
taagctcgcc ttcgatctca gcgcagcggt gcagccacaa cgcgcagccc
gtgggctcgt ggtgcttgta ggttacctct gcaaacgact gcaggtacgc
ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttgttg ctggtgaagg
tcagctgcaa cccgcggtgc tcctcgttta gccaggtctt gcatacggcc
gccagagctt ccacttggtc aggcagtagc ttgaagtttg cctttagatc
gttatccacg tggtacttgt ccatcaacgc gcgcgcagcc tccatgccct
tctcccacgc agacacgatc ggcaggctca gcgggtttat caccgtgctt
tcactttccg cttcactgga ctcttccttt tcctcttgcg tccgcatacc
ccgcgccact gggtcgtctt cattcagccg ccgcaccgtg cgcttacctc
ccttgccgtg cttgattagc accggtgggt tgctgaaacc caccatttgt
agcgccacat cttctctttc ttcctcgctg tccacgatca cctctgggga
tggcgggcgc tcgggcttgg gagaggggcg cttcttttc tttttggacg
caatggccaa atccgccgtc gaggtcgatg gccgcgggct gggtgtgcgc
ggcaccagcg catcttgtga cgagtcttct tcgtcctcgg actcgagacg
ccgcctcagc cgcttttttg ggggcgcgcg gggaggcggc ggcgacggcg
acggggacga cacgtcctcc atggttggtg gacgtcgcgc cgcaccgcgt
ccgcgctcgg gggtggtttc gcgctgctcc tcttcccgac tggccatttc
cttctcctat aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aaggaggaca
gcctaaccgc ccccttttgag ttcgccacca ccgcctccac cgatgccgcc
aacgcgccta ccaccttccc cgtcgaggca cccccgcttg aggaggagga
agtgattatc gagcaggacc caggttttgt aagcgaagac gacgaggatc
gctcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacga cgcagaggca
aacgaggaac aagtcgggcg gggggaccaa aggcatggcg actacctaga
tgtgggagac gacgtgctgt tgaagcatct gcagcgccag tgcgccatta
tctgcgacgc gttgcaagag cgcagcgatg tgcccctcgc catagcggat

gtcagccttg cctacgaacg ccacctgttc tcaccgcgcg tacccccaa
acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgcctc aacttctacc
ccgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa
aactgcaaga tacccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa
gcagctggcc ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatatc gcctcgctcg
acgaagtgcc aaaaatcttt gagggtcttg gacgcgacga gaaacgcgcg
gcaaacgctc tgcaacaaga aaacagcgaa aatgaaagtc actgtggagt
gctggtggaa cttgagggtg acaacgcgcg cctagccgtg ctgaaacgca
gcatcgaggt cacccacttt gcctacccgg cacttaacct acccccaag
gttatgagca cagtcatgag cgagctgatc gtgcgccgtg cacgacccct
ggagagggat gcaaacttgc aagaacaaac cgaggagggc ctacccgcag
ttggcgatga gcagctggcg cgctggcttg agacgcgcga gcctgccgac
ttggaggagc gacgcaagct aatgatggcc gcagtgcttg ttaccgtgga
gcttgagtgc atgcagcggt tctttgctga cccggagatg cagcgcaagc
tagaggaaac gttgcactac acctttcgcc agggctacgt gcgccaggcc
tgcaaaattt ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctcct accttggaat
tttgcacgaa aaccgcctcg ggcaaaacgt gcttcattcc acgctcaagg
gcgaggcgcg ccgcgactac gtccgcgact gcgtttactt atttctgtgc
tacacctggc aaacggccat gggcgtgtgg cagcaatgcc tggaggagcg
caacctaaag gagctgcaga agctgctaaa gcaaaacttg aaggacctat
ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacattatc
ttccccgaac gcctgcttaa aaccctgcaa cagggtctgc cagacttcac
cagtcaaagc atgttgcaaa actttaggaa ctttatccta gagcgttcag
gaattctgcc cgccacctgc tgtgcgcttc ctagcgactt tgtgcccatt
aagtaccgtg aatgccctcc gccgctttgg ggtcactgct accttctgca
gctagccaac taccttgcct accactccga catcatggaa gacgtgagcg
gtgacggcct actggagtgt cactgtcgct gcaacctatg caccccgcac
cgctccctgg tctgcaattc gcaactgctt agcgaaagtc aaattatcgg
taccttgag ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtcc gcggctccgg
ggttgaaact cactccgggg ctgtggacgt cggcttacct tcgcaaattt
gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt aggttctacg aagaccaatc
ccgcccgcca aatgcggagc ttaccgcctg cgtcattacc cagggccaca
tccttggcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta
cgaaagggac ggggggttta cctggacccc cagtccggcg aggagctcaa
cccaatcccc ccgccgccgc agccctatca gcagccgcgg gcccttgctt
cccaggatgg cacccaaaaa gaagctgcag ctgccgccgc cgccacccac
ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc agaggaggtt ttggacgagg
aggaggagat gatggaagac tgggacagcc tagacgaagc ttccgaggcc
gaagaggtgt cagacgaaac accgtcaccc tcggtcgcat tcccctcgcc
ggcgccccag aaattggcaa ccgttcccag catcgctaca acctccgctc
ctcaggcgcc gccggcactg cctgttcgcc gacccaaccg tagatgggac
accactggaa ccagggccgg taagtctaag cagccgccgc cgttagccca
agagcaacaa cagcgccaag gctaccgctc gtggcgcggg cacaagaacg
ccatagttgc ttgcttgcaa gactgtgggg gcaacatctc cttcgcccgc
cgctttcttc tctaccatca cggcgtggcc ttcccccgta acatcctgca
ttactaccgt catctctaca gcccctactg caccggcggc agcggcagcg
gcagcaacag cagcggtcac acagaagcaa aggcgaccgg atagcaagac
tctgacaaag cccaagaaat ccacagcggc ggcagcagca ggaggaggag
cgctgcgtct ggcgcccaac gaacccgtat cgacccgcga gcttagaaat
aggatttttc ccactctgta tgctatattt caacaaagca ggggccaaga

acaagagctg aaaataaaaa acaggtctct gcgctccctc acccgcagct
gcctgtatca caaaagcgaa gatcagcttc ggcgcacgct ggaagacgcg
gaggctctct tcagcaaata ctgcgcgctg actcttaagg actagtttcg
cgccctttct caaatttaag cgcgaaaact acgtcatctc cagcggccac
acccggcgcc agcacctgtc gtcagcgcca ttatgagcaa ggaaattccc
acgccctaca tgtggagtta ccagccacaa atgggacttg cggctggagc
tgcccaagac tactcaaccc gaataaacta catgagcgcg ggaccccaca
tgatatcccg ggtcaacgga atccgcgccc accgaaaccg aattctcctc
gaacaggcgg ctattaccac cacacctcgt aataacctta atccccgtag
ttggcccgct gccctggtgt accaggaaag tcccgctccc accactgtgg
tacttcccag agacgcccag gccgaagttc agatgactaa ctcaggggcg
cagcttgcgg gcggctttcg tcacagggtg cggtcgcccg ggcgttttag
ggcggagtaa cttgcatgta ttgggaattg tagtttttt aaaatgggaa
gtgacgtatc gtgggaaaac ggaagtgaag atttgaggaa gttgtgggtt
ttttggcttt cgtttctggg cgtaggttcg cgtgcggttt tctgggtgtt
ttttgtggac tttaaccgtt acgtcatttt ttagtcctat atatactcgc
tctgtacttg gccctttta cactgtgact gattgagctg gtgccgtgtc
gagtggtgtt ttttaatagg tttttttact ggtaaggctg actgttatgg
ctgccgctgt ggaagcgctg tatgttgttc tggagcggga gggtgctatt
ttgcctaggc aggagggttt ttcaggtgtt tatgtgtttt tctctcctat
taattttgtt atacctccta tgggggctgt aatgttgtct ctacgcctgc
gggtatgtat tcccccgggc tatttcggtc gctttttagc actgaccgat
gttaaccaac ctgatgtgtt taccgagtct tacattatga ctccggacat
gaccgaggaa ctgtcggtgg tgctttttaa tcacggtgac cagttttttt
acggtcacgc cggcatggcc gtagtccgtc ttatgcttat aagggttgtt
tttcctgttg taagacaggc ttctaatgtt taaatgtttt ttttttgtt
attttatttt gtgtttaatg caggaacccg cagacatgtt tgagagaaaa
atggtgtctt tttctgtggt ggttccggaa cttacctgcc tttatctgca
tgagcatgac tacgatgtgc ttgctttttt gcgcgaggct ttgcctgatt
ttttgagcag caccttgcat tttatatcgc cgcccatgca acaagcttac
ataggggcta cgctggttag catagctccg agtatgcgtg tcataatcag
tgtgggttct tttgtcatgg ttcctggcgg ggaagtggcc gcgctggtcc
gtgcagacct gcacgattat gttcagctgg ccctgcgaag ggacctacgg
gatcgcggta tttttgttaa tgttccgctt ttgaatctta tacaggtctg
tgaggaacct gaatttttgc aatcatgatt cgctgcttga ggctgaaggt
ggagggcgct ctggagcaga tttttacaat ggccggactt aatattcggg
atttgcttag agacatattg ataaggtggc gagatgaaaa ttatttgggc
atggttgaag gtgctggaat gtttatagag gagattcacc ctgaagggtt
tagcctttac gtccacttgg acgtgagggc agtttgcctt ttggaagcca
ttgtgcaaca tcttacaaat gccattatct gttctttggc tgtagagttt
gaccacgcca ccggagggga gcgcgttcac ttaatagatc ttcattttga
ggttttggat aatcttttgg aataaaaaaa aaaaaacatg gttcttccag
ctcttcccgc tcctcccgtg tgtgactcgc agaacgaatg tgtaggttgg
ctgggtgtgg cttattctgc ggtggtggat gttatcaggg cagcggcgca
tgaaggagtt tacatagaac ccgaagccag ggggcgcctg gatgctttga
gagagtggat atactacaac tactacacag agcgagctaa gcgacgagac
cggagacgca gatctgtttg tcacgcccgc acctggtttt gcttcaggaa
atatgactac gtccggcgtt ccatttggca tgacactacg accaacacga
tctcggttgt ctcggcgcac tccgtacagt agggatcgcc tacctccttt
tgagacagag acccgcgcta ccatactgga ggatcatccg ctgctgcccg

aatgtaacac tttgacaatg cacaacgtga gttacgtgcg aggtcttccc
tgcagtgtgg gatttacgct gattcaggaa tgggttgttc cctgggatat
ggttctgacg cgggaggagc ttgtaatcct gaggaagtgt atgcacgtgt
gcctgtgttg tgccaacatt gatatcatga cgagcatgat gatccatggt
tacgagtcct gggctctcca ctgtcattgt tccagtcccg gttccctgca
gtgcatagcc ggcgggcagg ttttggccag ctggtttagg atggtggtgg
atggcgccat gtttaatcag aggtttatat ggtaccggga ggtggtgaat
tacaacatgc caaaagaggt aatgtttatg tccagcgtgt ttatgagggg
tcgccactta atctacctgc gcttgtggta tgatggccac gtgggttctg
tggtccccgc catgagcttt ggatacagcg ccttgcactg tgggattttg
aacaatattg tggtgctgtg ctgcagttac tgtgctgatt taagtgagat
cagggtgcgc tgctgtgccc ggaggacaag gcgtctcatg ctgcgggcgg
tgcgaatcat cgctgaggag accactgcca tgttgtattc ctgcaggacg
gagcggcggc ggcagcagtt tattcgcgcg ctgctgcagc accaccgccc
tatcctgatg cacgattatg actctacccc catgtaggcg tggacttccc
cttcgccgcc cgttgagcaa ccgcaagttg gacagcagcc tgtggctcag
cagctggaca gcgacatgaa cttaagcgag ctgcccgggg agtttattaa
tatcactgat gagcgtttgg ctcgacagga aaccgtgtgg aatataacac
ctaagaatat gtctgttacc catgatatga tgctttttaa ggccagccgg
ggagaaagga ctgtgtactc tgtgtgttgg gagggaggtg gcaggttgaa
tactagggtt ctgtgagttt gattaaggta cggtgatcaa tataagctat
gtggtggtgg ggctatacta ctgaatgaaa aatgacttga aattttctgc
aattgaaaaa taaacacgtt gaaacataac atgcaacagg ttcacgattc
tttattcctg ggcaatgtag gagaaggtgt aagagttggt agcaaaagtt
tcagtggtgt attttccact ttcccaggac catgtaaaag acatagagta
agtgcttacc tcgctagttt ctgtggattc actagaatcg atgtaggatg
ttgcccctcc tgacgcggta ggagaagggg agggtgccct gcatgtctgc
cgctgctctt gctcttgccg ctgctgagga ggggggcgca tctgccgcag
caccggatgc atctgggaaa agcaaaaaag gggctcgtcc ctgtttccgg
aggaatttgc aagcggggtc ttgcatgacg gggaggcaaa cccccgttcg
ccgcagtccg gccggcccga gactcgaacc gggggtcctg cgactcaacc
cttggaaaat aaccctccgg ctacagggag cgagccactt aatgctttcg
ctttccagcc taaccgctta cgccgcgcgc ggccagtggc caaaaaagct
agcgcagcag ccgccgcgcc tggaaggaag ccaaaaggag cgctcccccg
ttgtctgacg tcgcacacct gggttcgaca cgcgggcggt aaccgcatgg
atcacggcgg acggccggat ccggggttcg aaccccggtc gtccgccatg
ataccccttgc gaatttatcc accagaccac ggaagagtgc ccgcttacag
gctctccttt tgcacggtct agagcgtcaa cgactgcgca cgcctcaccg
gccagagcgt cccgaccatg gagcactttt tgccgctgcg caacatctgg
aaccgcgtcc gcgactttcc gcgcgcctcc accaccgccg ccggcatcac
ctggatgtcc aggtacatct acggattacg tcgacgttta aaccatatga
tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa
cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact
ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga
agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta
ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg
accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga

cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc
gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg
gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc
tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag
tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct
aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gtcagaagaa ctcgtcaaga
aggcgataga aggcgatgcg ctgcgaatcg ggagcggcga taccgtaaag
cacgaggaag cggtcagccc attcgccgcc aagctcttca gcaatatcac
gggtagccaa cgctatgtcc tgatagcggt ccgccacacc cagccggcca
cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt tccaccatga tattcggcaa
gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc ctcgccgtcg ggcatgctcg
ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg atgctcttcg
tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg
ctcgatgcga tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa
gcgtatgcag ccgccgcatt gcatcagcca tgatggatac tttctcggca
ggagcaaggt gagatgacag gagatcctgc cccggcactt cgcccaatag
cagccagtcc cttcccgctt cagtgacaac gtcgagtaca gctgcgcaag
gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgcagt
tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccgggcgccc
ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt
gtgcccagtc atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct
gcgtgcaatc catcttgttc aatcatactc ttccttttc aatattattg
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt
tgttaaatca gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc
ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt
ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatc
aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga
aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt
agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc
tacagggcgc gatggatcc

[0060] 在SEQ ID NO:2中,pHelper-Kan的残基1-5343来源于腺病毒,包括编码E2A蛋白(残基258-1847)的多核苷酸;残基5344-8535来源于腺病毒,包括编码E4orf6蛋白的多核苷酸;残基9423-10011对应于ori序列;残基10182-10976编码由bla启动子序列(残基10977-11081)表达的卡那霉素抗性决定簇;残基11107-11561对应于f1 ori序列(图4)。

[0061] 如上所讨论的,AAV辅助功能提供多核苷酸和非AAV辅助功能提供多核苷酸通常与rAAV质粒共同使用以构成三质粒转染系统。多种市售可得的rAAV质粒载体(例如pAV-CMV-EGFP、pGOI等(Cell Biolabs,Inc.、Invitrogen和Stratagene))可根据本发明使用。可根据本发明使用的说明性rAAV质粒载体是pAV-CMV-EGFP(SEQ ID NO:3;图5),包括5'ITR、U6启动子、CMV增强子和启动子序列、编码增强绿色荧光蛋白(EGFP)的多核苷酸(Gambotto,A.et al.(2000)"Immunogenicity Of Enhanced Green Fluorescent Protein(EGFP)In BALB/C Mice:Identification Of An H2-Kd-Restricted CTL Epitope,"Gene Ther.7(23):2036-

2040;Tsien,R.Y.(1998)“The Green Fluorescent Protein,”Annu.Rev.Biochem.67:509-544;Cinelli,R.A.et al.(2000)“The Enhanced Green Fluorescent Protein As A Tool For The Analysis Of Protein Dynamics And Localization:Local Fluorescence Study At The Single-Molecule Level,”Photochem.Photobiol.71(6):771-776;Chopra A.(2008)“Recombinant Adenovirus With Enhanced Green Fluorescent Protein,”In:Molecular Imaging and Contrast Agent Database(MICAD),National Center for Biotechnology Information,Bethesda MD)、用于促进表达蛋白质的回收和定位的FLAG标签和6xHis标签位点、SV40 poly(A)位点和3’ITR。

质粒pAV-CMV-EGFP的编码链(SEQ ID NO:3)：

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg
ggcgaccttt ggtcgcccgg ccctccagtg agcgagcgcg cagagaggga
gtggccaact ccatcactag gggttcctgc ggccgcacgc gtctagttat
taatagtaat cgaattcgtg ttactcataa ctagtaaggt cgggcaggaa
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc
tgttagagag ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag
tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt
ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa
gtatttcgat ttcttgggtt tatatatctt gtggaaagga cgcgggatcc
actggaccag gcagcagcgt cagaagactt ttttggaaaa gcttgactag
taatactgta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc
gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag
taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg
taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt
acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca
atgggagttt gttttgcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta
acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag
gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagagatc
cggtaccgag gagatctgcc gccgcgatcg ccggcgcgcc agatctcacg
cttaactagc tagcggaccg acgcgtacgc ggccgctcga gatggtgagc
aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga
cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg
atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac caccggcaag
ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca

gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt
ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac
gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct
ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca
tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatc
atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca
caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca
cccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc
acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt
cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc
tgtacaagta agtcgaggat tataaggatg acgacgataa attcgtcgag
caccaccacc accaccacta ataaggttta tccgatccac cggatctaga
taagatatcc gatccaccgg atctagataa ctgatcataa tcagccatac
cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc
tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt
gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa
taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca
atgtatctta acgcggtaac cacgtgcgga ccgagcggcc gcaggaaccc
ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga
ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct
cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc aggggcgcct gatgcggtat
tttctcctta cgcatctgtg cggtatttca caccgcatac gtcaaagcaa
ccatagtacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt
tacgcgcagc gtgaccgcta cacctgccag cgccttagcg cccgctcctt
tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa
gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca
cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggccat
cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc cacgttcttt
aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggg
ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta
acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc
atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac
gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc
gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag
acgaaagggc ctcgtgatac gcctatttt ataggttaat gtcatgataa
taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga
acccctattt gtttatttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta
tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt
tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca
gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg
agcacttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg
ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta
agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat

ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt
cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca
cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg
gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt
taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa
cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc
gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc
tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt

[0062] 在SEQ ID NO:3中,pAV-CMV-EGFP的残基1-128对应于5'ITR;残基201-441是U6启动子序列;残基562-865是人巨细胞病毒(CMV)即刻早期增强子序列;残基866-1068包括CMV即刻早期启动子;残基1192-1911包括编码EGFP的哺乳动物密码子优化的多核苷酸;残基1918-1941编码FLAG标签;残基1951-1968编码6xHis标签;残基2139-2260编码SV40 poly(A)序列;残基2293-2433对应于3'ITR;残基2508-22963对应于F1 ori序列;残基3350-4210编码由bla启动子序列(残基3245-3349)表达的氨苄青霉素抗性决定簇及其信号序列(残基3350-3418);残基4381-4969对应于ori序列(图5)。

[0063] 可根据本发明使用的第二说明性rAAV质粒载体是pAV-TBG-EGFP(SEQ ID NO:4;图6),包括5'ITR、甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、编码增强绿色荧光蛋白(EGFP)的多核苷酸、用于促进表达蛋白的回收或定位的FLAG标签和6xHis标签位点、SV40 poly(A)位点和3'ITR。

质粒pAV-TBG-EGFP的编码链(SEQ ID NO:4):

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg
ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg
gagtggccaa ctccatcact aggggttcct gcggccggtc gcgtctagta
ctagtaggtt aatttttaaa aagcagtcaa aagtccaagt ggcccttggc
agcatttact ctctctgttt gctctggtta ataatctcag gagcacaaac
attccagatc caggttaatt tttaaaaagc agtcaaaagt ccaagtggcc

cttggcagca tttactctct ctgtttgctc tggttaataa tctcaggagc
acaaacattc cagatccggc gcgccagggc tggaagctac ctttgacatc
atttcctctg cgaatgcatg tataatttct acagaaccta ttagaaagga
tcacccagcc tctgcttttg tacaactttc ccttaaaaaa ctgccaattc
cactgctgtt tggcccaata gtgagaactt tttcctgctg cctcttggtg
cttttgccta tggcccctat tctgcctgct gaagacactc ttgccagcat
ggacttaaac ccctccagct ctgacaatcc tctttctctt ttgttttaca
tgaagggtct ggcagccaaa gcaatcactc aaagttcaaa ccttatcatt
ttttgctttg ttcctcttgg ccttggtttt gtacatcagc tttgaaaata
ccatcccagg gttaatgctg gggttaattt ataactaaga gtgctctagt
tttgcaatac aggacatgct ataaaaatgg aaagatgttg ctttctgaga
gacaggtacc gaggagatct gccgccgcga tcgccaccat ggtgagcaag
ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg
cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg
ccacttacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg
cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg
cttcagccgc taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg
ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac
ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt
gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc
tggggcacaa gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg
gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa
catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc
ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc
cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct
gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt
acaagtagac gcgtacgcgg ccgctcgagg attataagga tgacgacgat
aaattcgtcg agcaccacca ccaccaccac taataaggtt tatccgatcc
accggatcta gataagatat ccgatccacc ggatctagat aactgatcat
aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc
cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt
aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac
aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt
ccaaactcat caatgtatct taacgcggta accacgtgcg gacccaacgg
ccgcaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg
ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc ccgggctttg
cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct gcaggggcgc
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat
acgtcaaagc aaccatagta cgcgccctgt agcggcacat taagcgcggc
gggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacctgcc agcgccttag
cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc
tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag
tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac
gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag
tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa
ctctatctcg ggctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg
tctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt
aacaaaatat taacgtttac aattttatgg tgcactctca gtacaatctg
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct

gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta
atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga
aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa
aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt
tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt
tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat
ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa
ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg
gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac
ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa
gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac
tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc
ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac
tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag
atccttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta
ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac
ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc
ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac
gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg
atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct
ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gt

[0064] 在SEQ ID NO:4,pAV-TBG-EGFP的残基1-130对应于5'ITR;残基150-854是TBG启动子序列,残基415-824包括TBG启动子;残基886-1608编码EGFP;残基1630-1653编码FLAG标签;残基1663-1680编码6xHis标签;残基1851-1972编码poly(A)序列;残基2005-2145对应于3'ITR;残基2220-2675对应于F1 ori序列;残基3062-3922编码由bla启动子序列(残基2957-3061)表达的氨苄青霉素抗性决定簇及其信号序列(残基3062-3130);残基4093-4681对应于ori序列(图6)。

[0065] 如本文所使用的,术语"生产滴度"旨在表示制剂中感染性rAAV浓度的量。这种含量或浓度优选地通过滴定这类制剂中的AAV或rAAV确定。将生产细胞(例如,HEK293,其使用rAAV质粒载体、提供Rep和Cap蛋白的AAV辅助载体、和提供所需的腺病毒复制和翻译因子的Ad辅助载体进行转化)经过三轮冷冻/解冻,然后超声处理以释放rAAV颗粒,优选地滴定测

定本发明的rAAV制剂的生产滴度。然后将制剂离心。所采用的AAV载体位于上清液中。使用蛋白酶K处理制剂的等分试样，并且测定AAV基因组的数量。将制剂的等分试样感染到HeLa-32C2细胞中(表达AAV2 Rep和Cap蛋白)，使用感染中心测定(ICA)测量感染性滴度(François, A.et al.(2018)“Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls,” Molec.Ther.Meth.Clin.Develop.10:223-236)，或更优选地，作为半数组织培养感染剂量(TCID50)(Zen,Z.et al.(2004)“Infectious Titer Assay For Adeno-Associated Virus Vectors With Sensitivity Sufficient To Detect Single Infectious Events,” Hum.Gene Ther.15:709-715)。

[0066] 如本文所使用的，如果使用本发明的方法获得的生产滴度比从类似进行生产所获得的滴度(其中未提供额外提供的离子)大至少10％，更优选地大至少20％，仍然更优选地大至少30％，仍然更优选地大至少40％，仍然更优选地大至少50％，仍然更优选地大至少60％，仍然更优选地大至少70％，仍然更优选地大至少80％，仍然更优选地大至少90％，仍然更优选地大至少2倍，仍然更优选地大至少110％，仍然更优选地大至少120％，仍然更优选地大至少130％，仍然更优选地大至少140％，仍然更优选地大至少2.5倍，仍然更优选地大至少160％，仍然更优选地大至少170％，仍然更优选地大至少180％，仍然更优选地大至少190％，仍然更优选地大至少3倍，则称为通过本发明的方法“增加”rAAV生产滴度。

[0067] 使用本发明的方法可增加其生产滴度的rAAV可包括任何允许将rAAV包装成可封装在AAV衣壳颗粒内的rAAV质粒载体的转基因盒。没有限制的情况下，这类转基因盒可以是源于人类、灵长类(包括黑猩猩、长臂猿、大猩猩、红毛猩猩等)、猴(包括狒狒、食蟹猕猴、黑长尾猴(velvet monkey)等)、犬科、鼠科(包括大鼠、小鼠、仓鼠、豚鼠等)、猫科、绵羊科、山羊科或马科。

[0068] 在优选实施例中，这类rAAV或rAAV质粒载体会编码蛋白质(例如，酶、激素、抗体、受体、配体等)或包括转录核酸，其与基因或可遗传性疾病或病况相关，使其可用于基因治疗以治疗这类疾病或病况。

[0069] 本发明的方法可用于提高细胞中rAAV和rAAV质粒载体的生产滴度，该细胞使用所需的rAAV或rAAV质粒载体或使用这类一种或多种可提供蛋白质或RNA分子(此类rAAV或rAAV质粒载体未提供的，但不是其生产所需的)的病毒和/或辅助质粒进行转染。如上所讨论的，这类蛋白质或RNA分子包括编码载体转录控制和复制以及将病毒基因组包装至病毒衣壳中所需要的Rep52和Rep78蛋白的基因，和在rAAV的情况下，编码形成感染性颗粒所需的VP衣壳蛋白的cap基因。这类蛋白或RNA分子还包括AAV增殖所需的病毒转录和翻译因子(E1a、E1b、E2a、VA和E4)。在生产本发明的rAAV的一个实施例中，所有这些基因和RNA分子在相同辅助病毒(或更优选地，辅助载体)上提供，以便与rAAV一起构成双质粒转染系统。然而，更优选地，为生产本发明的rAAV，由一个质粒提供所需的rep和cap基因，并且编码病毒转录和翻译因子的基因在第二质粒上提供，使得这类质粒与rAAV一起构成三质粒转染系统。

[0070] 可采用本发明的方法以提高属于任何血清型的rAAV的生产滴度，包括AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10血清型和rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8、rAAV9和rAAV10血清型，并且包括杂交血清型(例如，AAV2/5和rAAV2/5，其为血清型2和5的

杂交,因此具有这两种血清型的营养性)。

[0071] 可采用本发明的方法以提高使用由腺病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、牛痘病毒或乳头瘤病毒提供的“辅助”RNA或蛋白质生产的rAAV的生产滴度。

[0072] 可采用本发明的方法以提高由单层贴壁培养或悬浮培养中的细胞生产的rAAV的生产滴度,并可与能够生成rAAV的任何方法一起使用。然而,优选地,通过转染幼仓鼠肾(BHK)细胞生产rAAV,或更优选在与上述质粒载体组织培养中生长的人胚胎肾(HEK)细胞。缺乏内源性逆转录病毒的BHK细胞系BHK-21(ATCC CCL-10)是优选的BHK细胞系。HEK细胞系HEK293(ATCC CRL-1573)及其衍生物,例如HEK293T(ATCC CRL-3216,其为HEK293细胞系的高度可转染衍生物,其中插入了SV40 T抗原的温敏基因)或HEK293T/17(ATCC® CRL-11268,出于便于转染而选择)是特别优选的。HEK293T/17SF细胞系(ATCC ACS-4500)是293T/17细胞系(ATCC CRL-11268)的衍生物,适于不含血清的培养基和悬浮液,如果需要可以采用。

[0073] 优选的用于培养这类细胞的本发明中的基础培养基是伊格尔最低必需培养基(Eagle's Minimum Essential Medium,ATCC目录号30-2003)或杜氏改良伊格尔培养基(DMEM;Mediatech,马纳萨斯,弗吉尼亚)。将胎牛血清(例如,EBS;HyClone Laboratories,南洛根,犹他州)添加到10%的最终浓度以制造完全生长培养基。伊格尔最低必须培养基和杜氏改良伊格尔培养基是含有氨基酸、维生素和可选地葡萄糖,以及各种无机盐的复合培养基。尽管不同来源在这些盐的浓度上稍微有些区别,杜氏改良伊格尔培养基(可从例如ThermoFisher Scientific购买得到)另外含有近似于表1所示的无机盐。培养基的区别在于,杜氏改良伊格尔培养基含有大约四倍存在于伊格尔最低必须培养基的原始制剂中的维生素和氨基酸和两至四倍葡萄糖。另外,其含有硫酸铁形式的离子和用于指示pH的酚红(Yao,T et al.(2017)“Animal-Cell Culture Media:History,Characteristics,And Current Issues,”Reproduc.Med.Biol.16(2):99-117)。

表 1

| 无机盐 | 制剂 | 浓度 | |
|---|---|---|---|
| | | mg/L | 摩尔浓度 |
| 氯化钙 | $CaCl_2$ | 200 | 1.80 mM |
| 硝酸铁 | $Fe(NO_3)_3$-$9H_2O$ | 0.1 | 0.25 μM |
| 硫酸镁(无水) | $MgSO_4$ | 97.67 | 0.81 mM |
| 氯化钾 | KCl | 400 | 5.37 mM |
| 碳酸氢钠 | $NaHCO_3$ | 3700 | 44.04 mM |
| 氯化钠 | NaCl | 6400 | 109.5 mM |
| 磷酸二氢钠 | $NaH_2PO4$-$H_2O$ | 125 | 0.78 mM |
| 磷酸氢二钠 | $Na_2HPO_4$-$H_2O$ | | |

[0074] 用于这种转染的细胞优选地每周传代两次以维持其在指数增长阶段。针对小规模转染,可以采用等分试样,例如,在多孔板上每孔$1\times10^6$HEK293或BHK细胞或每15cm培养皿$1.5\times10^7$HEK293细胞。针对大规模生产,可从多个汇合的15cm板收集HEK293或BHK细胞,并分成两个10层细胞堆(cell stack)(Corning,康宁,纽约州),其中含有1升完全培养基。在一个实施例中,转染前这类细胞在培养基中生长4天。在转染前一天,对这两个细胞堆进行

胰蛋白酶消化并且将细胞(例如,大约$6\times10^8$细胞)重新悬浮在200ml培养基中。优选地,在转染前允许细胞附着24小时。可以使用Diaphot倒置显微镜(Nikon,梅尔维尔,纽约州)监测细胞堆的汇合度,相差硬件已从中移除,以便在显微镜载物台上容纳细胞堆。

[0075] 如本文所使用的,词组"离子强度"旨在表示溶液中离子的浓度。本发明通过向用于培养rAAV转染细胞的培养基提供额外的离子提高细胞培养基的离子强度,以提高rAAV生产滴度。在一个实施例中,所提供的离子是阳离子。合适的阳离子包括$Na^+$、$K^+$、$Ca^{++}$和$Mg^{++}$。这类阳离子可以作为无机盐或作为有机分子的盐提供。在另一个实施例中,所提供的离子是阴离子。合适的阴离子包括无机阴离子,例如:$CO_3^=$、$HCO_3^-$、$HPO_4^-$、$PO_4^=$、$SCN^-$(硫氰酸根)、$SO_4^=$、$HSO_4^-$和$Cl^-$,以及有机离子,例如:乙酸盐($CH_3COO^-$)、天冬氨酸盐、苯二甲酸氢盐、酒石酸氢盐、丁氧基乙氧基乙酸酯、辛酸盐、柠檬酸盐($C_6H_5O_7^{\equiv}$)、脱氢乙酸盐、二乙酸盐、二羟基甘氨酸盐、d-糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘氨酸盐、糖硫酸盐、羟基甲烷磺酸盐、乳酸盐、甲硫氨酸盐、草酸盐、苯酚盐、苯酚磺酸盐、丙酸盐、丙酸盐、糖精、水杨酸盐、肌氨酸盐、山梨酸盐、巯基乙酸盐和对甲苯磺酸盐。

[0076] 这类阳离子或阴离子可以任何足以提高rAAV生产滴度超过在没有任何这类另外提供的阳离子的相同培养基中所产生的滴度的浓度提供。这类阳离子或阴离子的合适浓度包括足以使培养基中这类离子的初始浓度从约30mM增加至约80mM、从约40mM至约80mM、从约50mM至约80mM、从约60mM至约80mM、从约70mM至约80mM或约80mM的浓度,其中这种浓度是在添加之前存在于培养基中的这类离子的任何浓度之外的。如果这种培养基初始不含有待施用的离子,则这类添加的离子优选地以足以提供这种培养基中提供的离子浓度从约30mM至约80mM、从约40mM至约80mM、从约50mM至约80mM、从约60mM至约80mM、从约70mM至约80mM或约80mM的含量提供。

[0077] 待添加到初始培养基中的离子或盐可以在收获所生产的rAAV之前的任何时间添加。优选地,这类离子或盐在启动培养后至少约1小时、至少约2小时、至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约12小时、至少约15小时、至少约18小时、至少约20小时、至少约22小时或至少约24小时添加。

[0078] 如本文所使用的,当术语"约(about)"指浓度、含量或时间时,旨在表示这种浓度以及浓度范围是在这种浓度的±40%内,更优选地在这种浓度的±30%内,仍然更优选地在这种浓度的±20%内,仍然更优选地在这种浓度的±10%内,仍然更优选地在这种浓度的±5%内。因此,例如,所列举10.0mM的浓度表示10.0mM的浓度以及6-14mM之间的浓度,更优选地7-13mM之间的浓度,仍然更优选地8-12mM之间的浓度,仍然更优选地9-11mM之间的浓度,仍然更优选地9.5-10.5mM之间的浓度。

[0079] 因此,例如,因为杜氏改良伊格尔培养基具有约5.37mM的初始$K^+$浓度,提供足以使该阳离子浓度增加约30mM的额外$K^+$会造成培养基产生的$Na^+$浓度为约35.4mM。同样,因为杜氏改良伊格尔培养基具有约44.04mM的初始$HCO_3^-$浓度,提供足以使该阳离子浓度增加约30mM的额外$HCO_3^-$会造成培养基产生的$HCO_3^-$浓度为约74.04mM。

[0080] 因此,特别地,本发明提供一种提高重组修饰AAV(rAAV)的生产滴度的方法,该方法包括以下步骤:

(A)在足以允许rAAV生产的条件下,在培养基中在初始时间内培养使用这类rAAV

转染的细胞；

(B)在初始时间后通过添加一种或多种离子，优选地一种或多种除$Na^+$外的离子到培养基中改变培养基的离子浓度，以足以增加培养基中这类离子的浓度从约30mM至约80mM的含量添加；

(C)继续培养细胞，从而产生大于在缺乏步骤(B)的情况下所获得的滴度的rAAV生产滴度。

[0081] 本发明特别考虑了使用$KHCO_3$以提高rAAV生产滴度。这种$KHCO_3$优选地以足以使培养基中$K^+$和$HCO_3^-$的浓度增加约20mM、约30mM、约40mM或约50mM的量提供。这种添加会导致杜氏改良伊格尔培养基中$K^+$的浓度至约25mM、约35mM、约45mM或约55mM，会导致这种培养基中$HCO_3^-$的浓度至约64mM、约74mM、约84mM或约94mM。如果这种培养基不含有$K^+$和$HCO_3^-$离子，则该$KHCO_3$优选地以足以在该培养基中提供浓度为约20mM、约30mM或约40mM的$K^+$和$HCO_3^-$的含量提供。

II.本发明的药物组合物

[0082] 本发明另外包括药物组合物，该药物组合物包含根据本发明方法所生产的rAAV的药学上可接受的制剂和药学上可接受的载剂。该药物组合物的rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或包括转录核酸，其治疗基因或可遗传性疾病或病况，并且以治疗有效量(“有效量”)存在于药物组合物中。

[0083] 术语“药学上可接受的”是指联邦管理机构或州政府批准的或US药典中所列的或其他用于动物(尤其是人类)的普遍认可的药典。术语“载剂”是指稀释剂、佐剂(例如，弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂)、赋形剂或用于施用治疗的媒介物。药物载剂可以是无菌液体，例如水和油，包括那些石油、动物、蔬菜或合成来源，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当通过静脉注射施用药物组合物时，水是优选的载剂。还可以采用盐溶液和葡萄糖水溶液和丙三醇溶液作为液体载剂，特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、壳粉(chalk)、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、丙三醇、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要，该组合物还可含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释制剂等形式。合适的药物赋形剂描述于美国专利号8,852,607;8,192,975;6,764,845;6,759,050;和7,598,070。

[0084] 通常，本发明组合物的成分分开或以单位剂量形式混合在一起供应，例如，作为干燥的冻干粉或无水浓缩物，或作为水溶液在不透气的密封容器中，例如标明活性剂的量的小瓶、安瓿或小袋中。在通过输液给药的情况下，可以用含有无菌医药级水或盐水的输液瓶配药。在通过注射给药的情况下，可以提供一安瓿注射用无菌水或生理盐水或其他稀释剂，以便在施用前混合各种成分。

[0085] 本发明还提供了包括一个或多个容器的药物组合物的药包或试剂盒。可选地，与这种容器相关的是由监管药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的告示，该告示反映了该机构对制造、使用或销售用于人体的批准。

[0086] 这种药物组合物的rAAV优选地包装在不透气的密封容器中，例如标明分子数量的小瓶、安瓿或小袋，并可选地包括使用说明。在一个实施例中，这种试剂盒的rAAV是以不透气的密封容器中的干燥灭菌冻干粉或无水浓缩物的形式提供的，并且可以复溶，例如与水、

生理盐水或其他稀释剂复溶到适当的浓度，以便施用给受试者。冻干材料应储存在2℃和8℃之间的原始容器中，材料应在复溶后12小时内给药，优选地在6小时内、5小时内、3小时内或1小时内给药。在另一实施例中，这种试剂盒的rAAV以水溶液的形式在不透气的密封容器中提供，并且可以稀释，例如用水、生理盐水或其他稀释剂稀释到适当的浓度，以便施用给受试者。该试剂盒可进一步包括在一个或多个容器中的一种或多种对治疗疾病或病症有用的其他预防和/或治疗剂；和/或该试剂盒可进一步包括一种或多种与癌症相关的一种或多种癌症抗原结合的细胞毒性抗体。在某些实施例中，其他预防或治疗剂是化学治疗剂。在其他实施例中，预防或治疗剂是生物或激素治疗剂。

III.本发明的用途

[0087] 本发明的方法可用于促进rAAV的生产，特别是可用于促进包括转基因盒的rAAV的生产，该转基因盒编码蛋白质(例如酶、激素、抗体、受体、配体等)，或包括转录核酸的rAAV的生产，其与基因或可遗传性疾病或病况有关，从而可用于基因治疗以治疗这种疾病或病况。这类疾病和病况的示例包括：全色盲(ACHM)；α-1抗胰蛋白酶(AAT)缺乏症；阿尔茨海默病；芳香族L-氨基酸脱羧酶(AADC)缺乏症；无脉络膜症(CHM)；癌症；杜氏肌营养不良症；dysferlin缺乏症；卵泡抑素基因缺乏症(BMDSIBM)；血友病A；血友病B；甲肝；乙肝；丙肝；亨廷顿氏病；特发性帕金森氏病；晚期婴儿型神经元蜡样质脂褐素沉积病(LINCL，贝敦氏症的婴儿型)；莱伯氏先天性黑蒙症(LCA)；莱伯氏遗传性视神经病(LHON)；肢带型肌营养不良症1B(LGMD1B)；肢带型肌营养不良症1C(LGMD1C)；肢带型肌营养不良症2A(LGMD2A)；肢带型肌营养不良症2B(LGMD2B)；肢带型肌营养不良症2I(LGMD2I)；肢带型肌营养不良症2L(LGMD2L)；脂蛋白脂肪酶(LPL)缺乏症；异染性脑白质营养不良；神经性疾病；神经运动障碍；神经骨骼损伤；帕金森病；类风湿性关节炎；Sanfilippo A综合征；脊髓性肌萎缩症(SMA)；X连锁视网膜劈裂(XLRS)；α-肌多糖缺乏症(LGMD2D)；β-肌多糖缺乏症(LGMD2E)；γ-肌多糖缺乏症(LGMD2C)和δ-肌多糖缺乏症(LGMD2F)。

IV.本发明的实施例

[0088] 本发明涉及一种提高重组修饰的腺相关病毒(rAAV)生产滴度的方法、由这种方法产生的重组修饰腺相关病毒(AAV)辅助载体以及其用途和组成。特别是针对以下实施例E1-E19：

E1.一种提高重组修饰腺相关病毒(rAAV)的生产滴度的方法，其中该方法包括以下步骤：

(A)将已用rAAV转染的细胞在初始培养基中，在足以允许生产rAAV的条件下培养初始时间，其中细胞还含有一种AAV辅助功能提供的多核苷酸和一种非AAV辅助功能提供的多核苷酸；

(B)在初始时间后，通过向培养基中添加除$Na^+$以外的一种或多种离子来改变培养基的离子强度；以及

(C)继续培养细胞，从而产生大于在没有步骤(B)的情况下获得的rAAV的生产滴度。

E2.根据E1所述的方法，其中每一种添加的离子以足以使初始培养基中这种离子浓度增加约10mM至约80mM的含量提供。

E3.根据E1或E2中任一项所述的方法，其中生产滴度比在没有步骤(B)的情况下类

似地进行细胞培养得到的滴度大至少50％。

E4.根据E1-E3中任一项所述的方法，其中rAAV包括编码蛋白质的转基因盒，或包括转录核酸，其对基因或可遗传性的疾病或病况具有治疗作用。

E5.根据E1-E4中任一项所述的方法，其中rAAV属于rAAV1、rAAV2、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8、rAAV9或rAAV10血清型或属于这些血清型的杂交型。

E6.根据E5所述的方法，其中该rAAV属于rAAV2、rAAV5或rAAV9血清型或属于这些血清型的杂交型。

E7.根据E1-E6中任一项所述的方法，其中添加的离子包括$K^{+}$、$Ca^{++}$或$Mg^{++}$中的一种或多种。

E8.根据E1-E7中任一项所述的方法，其中添加的离子包括$CO_3^{=}$、$HCO_3^{-}$、$HPO_4^{-}$、$PO_4^{=}$、$SCN^{-}$、$SO_4^{=}$、$HSO_4^{-}$和$Cl^{-}$中的一种或多种。

E9.根据E1-E7中任一项所述的方法，其中添加的离子包括乙酸盐、天冬氨酸盐、苯二甲酸氢盐、酒石酸氢盐、丁氧基乙氧基乙酸酯、辛酸盐、柠檬酸盐、脱氢乙酸盐、二乙酸盐、二羟基甘氨酸盐、d-糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、甘氨酸盐、糖硫酸盐、羟基甲烷磺酸盐、乳酸盐、甲硫氨酸盐、草酸盐、苯酚盐、苯酚磺酸盐、丙酸盐、丙酸盐、糖精、水杨酸盐、肌氨酸盐、山梨酸盐、巯基乙酸盐和对甲苯磺酸盐中的一种或多种。

E10.根据E1-E8中任一项所述的方法，其中添加的离子包括$K^{+}$和$CO_3^{=}$。

E11.根据E1-E10中任一项所述的方法，其中该细胞是人胚胎肾细胞。

E12.根据E11所述的方法，其中该细胞是HEK293细胞。

E13.根据E1-E10中任一项所述的方法，其中该细胞是幼仓鼠肾细胞。

E14.根据E13所述的方法，其中该细胞是BHK21细胞。

E15.根据E1-E10中任一项所述的方法，其中该细胞是sf9昆虫细胞。

E16.根据E1-E15中任一项所述的方法，其中初始培养基是杜氏改良伊格尔培养基。

E17.根据E16所述的方法，其中初始培养基中补充有血清。

E18.药物组合物，包括：

(A)通过E1-E17中任一项所述的方法生产的重组修饰腺相关病毒(rAAV)的制剂，其中rAAV包括编码蛋白质的转基因盒或转录核酸，对基因或可遗传性疾病或病况有治疗作用，并且其中药物组合物含有有效量的rAAV制剂；和

(B)药学上可接受的载剂。

E19.由E1-E17中任一项的方法生产的重组修饰腺相关病毒(rAAV)的制剂，其中rAAV包括编码蛋白质的转基因盒，或转录核酸，或E18所述的药物组合物，用于治疗基因或可遗传性疾病或病况。

示例

[0089] 在对本发明进行了一般性描述之后，通过参考以下示例将更容易理解本发明，这些示例是以说明的方式提供的，除非特别说明，否则不对本发明进行限制。

示例1

阳离子和阳离子浓度对rAAV生产的影响

[0090] 使用培养的HEK293细胞证明阳离子和阳离子浓度对AAV生产的影响。更换培养基，

然后在一小时后，使用以下对细胞进行转染：

(1)质粒载体pAAV-RC2，它能够表达AAV rep和cap基因的功能，这些功能是rAAV的复制和包装所需要的。

(2)质粒载体pHelper，它能够提供AAV增殖所需的病毒转录和翻译因子(E1a、E1b、E2a、VA和E4)；以及

(3)rAAV质粒载体pAV-CMV-EGFP，包括编码增强绿色荧光蛋白(EGFP)的转基因盒和AAV ITR。

[0091] 在这种转染5小时后，提供盐(NaCl、KCl、$CaCl_2$或$MgCl_2$)，最终浓度为0、20、40、60 80或100mM。图7A显示了EGFP在转染细胞中的表达程度，以及使用感染中心检测法对rAAV储备进行滴定。图7B是感染中心的倍数变化与这种阳离子和阳离子浓度的函数图。图7C是AAV全基因组(TG)的倍数变化与这种阳离子和阳离子浓度的函数图。结果显示，阳离子的提供影响了产生的全基因组(TG)，提供NaCl、KCl和$MgCl_2$增加了AAV基因组的复制和AAV的生产。发现提供NaCl和KCl会导致全基因组的最高滴度和AAV产量的最大增加，在NaCl和KCl的浓度足以使培养基中这类离子的浓度增加约40mM至约80mM之间时，增幅最大。发现提供较高浓度的阳离子会抑制EGFP的表达(NaCl≥180mM;KCl≥100mM;$MgCl_2$≥60mM)。

示例2

阴离子和阴离子浓度对rAAV生产的影响

[0092] 还用培养的HEK293细胞证明阴离子和阴离子浓度对AAV生产的影响。如示例1，更换培养基，一小时后，用Ad辅助质粒、AAV辅助质粒和提供AAV ITR和编码增强绿色荧光蛋白的转基因盒的pAAV-ITR质粒载体转染细胞。在这种转染5小时后，提供盐($K_2CO_3$、$KHCO_3$、$KH_2PO_4$、$KCH_3COO$(醋酸钾)、KCNS、$K_2SO4$、$KNO_3$、$K_3C_6H_5O_7$(柠檬酸钾)或KCL)，其量足以使培养基中的这类离子浓度增加40、50、60或70mM。72小时后测定rAAV感染中心的倍数变化。发现提供$KHCO_3$会导致rAAV产量的最大增加，在足以使这类离子的浓度增加约40mM至约50mM之间时，增幅最大(图8A)。图8B是rAAV载体滴度的倍数变化与这种阴离子和阴离子浓度的函数图。结果显示，阴离子的提供影响了产生的全基因组(TG)。发现提供高浓度的离子(>60mM)会减少rAAV的生产。结果表明，提供$KHCO_3$的量足以使培养基中这类离子的浓度增加约30mM至约50mM，提供的结果出乎意料地好于使用其他盐的结果(图9A-9B)。浓度增加约30mM被认为是最佳的。

示例3

提供$KHCO_3$的时间对rAAV生产的影响

[0093] 还研究了在转染后不同时间提供$KHCO_3$所造成的影响。培养HEK293细胞并与以下共转染：(1)上述Ad辅助质粒，(2)提供AAV ITR和编码增强绿色荧光蛋白的转基因盒的pAAV-ITR质粒载体，和(3)AAV2辅助质粒或AAV8辅助质粒，以提供AAV rep和cap基因功能。培养基在共转染前一小时已经更换。在转染后的2、4、6、8和10小时，加入$KHCO_3$，其量足以使培养基中这类离子的浓度增加30mM，并在72小时评估释放到培养基中的rAAV的倍数变化。还评估了产生的rAAV总量的倍数变化(图10)。结果表明，在转染后4-8小时加入盐类时，增强效果最大。

示例4

血清型对rAAV生产的影响

[0094] 如上所述，对于具有AAV2血清型的rAAV来说，先前提高rAAV产量的方法并不成功(Lock,M.et al.(2010)“Rapid,Simple,and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at、Scale,”Hum.Gene Ther.21:1259-1271)。为了评估添加$KHCO_3$增强不同血清型rAAV生产的能力，将编码血清型1、2、5、6、7、8、9或10的Cap蛋白的AAV2辅助质粒与上述Ad辅助质粒和提供AAV ITR和编码增强绿色荧光蛋白的转基因盒的pAAV-ITR质粒载体(pAV-TBG-EGFP)一起转染到HEK293细胞中。转染后4小时，加入$KHCO_3$至最终浓度为30mM，72小时后评估释放到培养基中的rAAV的倍数变化。这项研究的结果如图11A-11B所示，并表明添加离子，特别是添加$KHCO_3$，显著提高了所有测试血清型的rAAV的生产滴度，包括rAAV2血清型。

示例5

离子提供对大规模rAAV生产的影响

[0095] 为了证明提供离子可以提高大规模制剂的rAAV的产量，在有或没有总浓度为30mM $KHCO_3$的情况下，在5个15cm的培养皿中大规模生产带有编码绿色荧光蛋白或其他外源分子的转基因盒的1、5、6和9血清型rAAV。AAV的滴度是在纯化后获得的。表2显示了这一证明的结果(pDNA_001供体构建体，PiBFXNco3和PiBFXNco11是对照载体)。

表 2
提供 $KHCO_3$ 对大规模 AAV 生产的影响

| AAV | 转基因 | 产量（每 mL） | 倍数变化 | $KHCO_3$ 添加 |
|---|---|---|---|---|
| AAV1 | | | | |
| A5514-1 | pAV-CMV-EGFP | $1.17\times10^{13}$ | -- | 无 |
| A5514-2 | pAV-CMV-EGFP | $3.8\times10^{13}$ | 3.2 | 30 mM，转染后 4 小时 |
| AAV5 | | | | |
| A5658 | pAV-CMV-EGFP | $1.14\times10^{13}$ | -- | 无 |
| A5659 | pAV-CMV-GFP | $3.03\times10^{13}$ | 2.7 | 30 mM，转染后 4 小时 |
| AAV6 | | | | |
| A5516-1 | pAV-CMV-EGFP | $1.25\times10^{13}$ | -- | 无 |
| A5516-2 | pAV-CMV-EGFP | $2.69\times10^{13}$ | 2.2 | 30 mM，转染后 4 小时 |
| A5555 | pDNA_001 供体构建体 | $8.99\times10^{12}$ | | 无 |
| A5556 | pDNA_001 供体构建体 | $2.64\times10^{13}$ | 2.9 | 30 mM，转染后 4 小时 |
| AAV9 | | | | |
| A5474-1 | PiBFXNco3 | $1.34\times10^{13}$ | -- | 无 |
| A5474-2 | PiBFXNco3 | $1.61\times10^{13}$ | 1.2 | 30 mM，转染后过夜 |
| A5475-1 | PiBFXNco11 | $3.14\times10^{12}$ | -- | 无 |
| A5475-2 | PiBFXNco11 | $1.46\times10^{13}$ | 4.6 | 30 mM，转染后过夜 |

[0096] 如表2所示，提供离子，特别是提供$KHCO_3$，导致rAAV产量增加1.2至4.6倍，平均增加倍数为约3倍。

示例6

提供离子对悬浮生长的细胞产生rAAV的影响

[0097] 为了证明提供离子能增强悬浮生长的细胞对rAAV的生产，将HEK293细胞与以下共转染：(1)上述Ad辅助质粒，(2)提供AAV ITR和编码增强绿色荧光蛋白的转基因盒的pAAV-

ITR质粒载体，和(3)AAV5辅助质粒或AAV6辅助质粒，以提供AAV rep和cap基因功能。在转染后5小时或20小时，加入$KHCO_3$的量足以使培养基中这类离子的浓度增加10、20、30、40、50或60mM。生产的rAAV的全基因组在转染后72小时被测定。悬浮细胞在37℃、5％的二氧化碳条件下培养，搅拌速度为120rpm。图8显示了悬浮培养的细胞在提供离子的情况下产生增强水平的rAAV的能力。如图12所示，提供最终浓度大于约20mM的离子增强了rAAV5和rAAV6的生产。

[0098] 本说明书中提到的所有出版物和专利通过引用并入本文，其程度与每个单独的出版物或专利申请特别或单独指明通过引用而全部并入一样。虽然本发明已结合其具体实施例进行了描述，但应理解它能够进一步修改，本申请旨在涵盖本发明的任何变化、使用或修改，一般来说，遵循本发明的原则，并包括本发明所属领域内的已知或常规做法的以及可能适用于本文前述的基本特征的与本发明的偏离。

序列表

<110> 查尔斯河实验室股份有限公司

王启钊

<120> 使用离子浓度提高重组腺相关病毒的包装效率

<130> 2650.0002US

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7415

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒pAAV-RC2的编码链

<400> 1

ccgggccccc cctcgaggtc gacggtatcg ggggagctcg cagggtctcc attttgaagc 60
gggaggtttg aacgcgcagc cgccatgccg gggttttacg agattgtgat taaggtcccc 120
agcgaccttg acgagcatct gcccggcatt tctgacagct ttgtgaactg ggtggccgag 180
aaggaatggg agttgccgcc agattctgac atggatctga atctgattga gcaggcaccc 240
ctgaccgtgg ccgagaagct gcagcgcgac tttctgacgg aatggcgccg tgtgagtaag 300
gccccggagg ctcttttctt tgtgcaattt gagaagggag agagctactt ccacatgcac 360
gtgctcgtgg aaaccaccgg ggtgaaatcc atggttttgg gacgtttcct gagtcagatt 420
cgcgaaaaac tgattcagag aatttaccgc gggatcgagc cgactttgcc aaactggttc 480
gcggtcacaa agaccagaaa tggcgccgga ggcgggaaca aggtggtgga tgagtgctac 540
atccccaatt acttgctccc caaaacccag cctgagctcc agtgggcgtg gactaatatg 600
gaacagtatt taagcgcctg tttgaatctc acggagcgta aacggttggt ggcgcagcat 660
ctgacgcacg tgtcgcagac gcaggagcag aacaaagaga atcagaatcc caattctgat 720
gcgccggtga tcagatcaaa aacttcagcc aggtacatgg agctggtcgg gtggctcgtg 780
gacaagggga ttacctcgga gaagcagtgg atccaggagg accaggcctc atacatctcc 840
ttcaatgcgg cctccaactc gcggtcccaa atcaaggctg ccttggacaa tgcgggaaag 900
attatgagcc tgactaaaac cgcccccgac tacctggtgg gccagcagcc cgtggaggac 960
atttccagca atcggattta taaaattttg gaactaaacg ggtacgatcc ccaatatgcg 1020
gcttccgtct ttctgggatg ggccacgaaa aagttcggca agaggaacac catctggctg 1080
tttgggcctg caactaccgg gaagaccaac atcgcggagg ccatagccca cactgtgccc 1140
ttctacgggt gcgtaaactg gaccaatgag aactttccct tcaacgactg tgtcgacaag 1200
atggtgatct ggtgggagga ggggaagatg accgccaagg tcgtggagtc ggccaaagcc 1260
attctcggag gaagcaaggt gcgcgtggac cagaaatgca agtcctcggc ccagatagac 1320
ccgactcccg tgatcgtcac ctccaacacc aacatgtgcg ccgtgattga cgggaactca 1380
acgaccttcg aacaccagca gccgttgcaa gaccggatgt tcaaatttga actcacccgc 1440

cgtctggatc atgactttgg gaaggtcacc aagcaggaag tcaaagactt tttccggtgg 1500
gcaaaggatc acgtggttga ggtggagcat gaattctacg tcaaaaaggg tggagccaag 1560
aaaagacccg cccccagtga cgcagatata agtgagccca aacgggtgcg cgagtcagtt 1620
gcgcagccat cgacgtcaga cgcggaagct tcgatcaact acgcagacag gtaccaaaac 1680
aaatgttctc gtcacgtggg catgaatctg atgctgtttc cctgcagaca atgcgagaga 1740
atgaatcaga attcaaatat ctgcttcact cacggacaga aagactgttt agagtgcttt 1800
cccgtgtcag aatctcaacc cgtttctgtc gtcaaaaagg cgtatcagaa actgtgctac 1860
attcatcata tcatgggaaa ggtgccagac gcttgcactg cctgcgatct ggtcaatgtg 1920
gatttggatg actgcatctt tgaacaataa atgatttaaa tcaggtatgg ctgccgatgg 1980
ttatcttcca gattggctcg aggacactct ctctgaagga ataagacagt ggtggaagct 2040
caaacctggc ccaccaccac caaagcccgc agagcggcat aaggacgaca gcaggggtct 2100
tgtgcttcct gggtacaagt acctcggacc cttcaacgga ctcgacaagg gagagccggt 2160
caacgaggca gacgccgcgg ccctcgagca cgacaaagcc tacgaccggc agctcgacag 2220
cggagacaac ccgtacctca agtacaacca cgccgacgcg gagtttcagg agcgccttaa 2280
agaagatacg tcttttgggg gcaacctcgg acgagcagtc ttccaggcga aaaagagggt 2340
tcttgaacct ctgggcctgg ttgaggaacc tgttaagacg gctccgggaa aaaagaggcc 2400
ggtagagcac tctcctgtgg agccagactc ctcctcggga accggaaagg cgggccagca 2460
gcctgcaaga aaaagattga attttggtca gactggagac gcagactcag tacctgaccc 2520
ccagcctctc ggacagccac cagcagcccc ctctggtctg ggaactaata cgatggctac 2580
aggcagtggc gcaccaatgg cagacaataa cgagggcgcc gacggagtgg gtaattcctc 2640
gggaaattgg cattgcgatt ccacatggat gggcgacaga gtcatcacca ccagcacccg 2700
aacctgggcc ctgcccacct acaacaacca cctctacaaa caaatttcca gccaatcagg 2760
agcctcgaac gacaatcact actttggcta cagcacccct tgggggtatt ttgacttcaa 2820
cagattccac tgccactttt caccacgtga ctggcaaaga ctcatcaaca acaactgggg 2880
attccgaccc aagagactca acttcaagct ctttaacatt caagtcaaag aggtcacgca 2940
gaatgacggt acgacgacga ttgccaataa ccttaccagc acggttcagg tgtttactga 3000
ctcggagtac cagctcccgt acgtcctcgg ctcggcgcat caaggatgcc tcccgccgtt 3060
cccagcagac gtcttcatgg tgccacagta tggatacctc accctgaaca acgggagtca 3120
ggcagtagga cgctcttcat tttactgcct ggagtacttt ccttctcaga tgctgcgtac 3180
cggaaacaac tttaccttca gctacacttt tgaggacgtt cctttccaca gcagctacgc 3240
tcacagccag agtctggacc gtctcatgaa tcctctcatc gaccagtacc tgtattactt 3300
gagcagaaca aacactccaa gtggaaccac cacgcagtca aggcttcagt tttctcaggc 3360
cggagcgagt gacattcggg accagtctag gaactggctt cctggaccct gttaccgcca 3420
gcagcgagta tcaaagacat ctgcggataa caacaacagt gaatactcgt ggactggagc 3480
taccaagtac cacctcaatg gcagagactc tctggtgaat ccgggcccgg ccatggcaag 3540
ccacaaggac gatgaagaaa agtttttcc tcagagcggg gttctcatct ttgggaagca 3600
aggctcagag aaaacaaatg tggacattga aaaggtcatg attacagacg aagaggaaat 3660
caggacaacc aatcccgtgg ctacggagca gtatggttct gtatctacca acctccagag 3720
aggcaacaga caagcagcta ccgcagatgt caacacacaa ggcgttcttc caggcatggt 3780

ctggcaggac agagatgtgt accttcaggg gcccatctgg gcaaagattc cacacacgga 3840
cggacatttt caccctctc ccctcatggg tggattcgga cttaaacacc ctcctccaca 3900
gattctcatc aagaacaccc cggtacctgc gaatccttcg accaccttca gtgcggcaaa 3960
gtttgcttcc ttcatcacac agtactccac gggacaggtc agcgtggaga tcgagtggga 4020
gctgcagaag gaaaacagca aacgctggaa tcccgaaatt cagtacactt ccaactacaa 4080
caagtctgtt aatgtggact ttactgtgga cactaatggc gtgtattcag agcctcgccc 4140
cattggcacc agatacctga ctcgtaatct gtaattgctt gttaatcaat aaaccgttta 4200
attcgtttca gttgaacttt ggtctctgcg tatttctttc ttatctagtt tccatgctct 4260
aggatccact agtaacggcc gccagtgtgc tggaattcgg ctttgtagtt aatgattaac 4320
ccgccatgct acttatctac gtagccatgc tctagaggtc ctgtattaga ggtcacgtga 4380
gtgttttgcg acattttgcg acaccatgtg gtcacgctgg gtatttaagc ccgagtgagc 4440
acgcagggtc tccattttga agcgggaggt ttgaacgcgc agccgccaag ccgaattctg 4500
cagatatcca aacactggcg gccgctcgac tagagcggcc gccaccgcgg tggagctcca 4560
gcttttgttc cctttagtga gggttaattg cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt 4620
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa 4680
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac 4740
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 4800
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc 4860
gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 4920
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 4980
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 5040
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 5100
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 5160
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 5220
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg 5280
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac 5340
acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 5400
gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat 5460
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 5520
ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 5580
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacggggtct gacgctcagt 5640
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 5760
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 5820
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 5880
catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat 5940
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 6000
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta 6120

tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 6180
gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 6240
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 6300
gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 6360
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 6420
taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 6480
tgttgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 6540
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 6600
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca 6660
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 6720
aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc taaattgtaa gcgttaatat 6780
tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga 6840
aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc 6900
agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac 6960
cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc taatcaagtt ttttggggtc 7020
gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg 7080
gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag 7140
ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acacccgccg cgcttaatgc 7200
gccgctacag ggcgcgtccc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc 7260
ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt 7320
aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagcg 7380
cgcgtaatac gactcactat agggcgaatt gggta 7415

<210> 2
<211> 11569
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 质粒pHelper-Kan的编码链
<400> 2

ggtacccaac tccatgctta acagtcccca ggtacagccc accctgcgtc gcaaccagga 60
acagctctac agcttcctgg agcgccactc gccctacttc cgcagccaca gtgcgcagat 120
taggagcgcc acttcttttt gtcacttgaa aaacatgtaa aaataatgta ctaggagaca 180
ctttcaataa aggcaaatgt ttttatttgt acactctcgg gtgattattt acccccccacc 240
cttgccgtct gcgccgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgct atgcgccact 300
ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgctccact taaactcagg cacaaccatc 360
cgcggcagct cggtgaagtt ttcactccac aggctgcgca ccatcaccaa cgcgtttagc 420
aggtcgggcg ccgatatctt gaagtcgcag ttggggcctc cgccctgcgc gcgcgagttg 480
cgatacacag ggttgcagca ctggaacact atcagcgccg ggtggtgcac gctggccagc 540
acgctcttgt cggagatcag atccgcgtcc aggtcctccg cgttgctcag ggcgaacgga 600

gtcaactttg gtagctgcct tcccaaaaag ggtgcatgcc caggctttga gttgcactcg 660
caccgtagtg gcatcagaag gtgaccgtgc ccggtctggg cgttaggata cagcgcctgc 720
atgaaagcct tgatctgctt aaaagccacc tgagcctttg cgccttcaga gaagaacatg 780
ccgcaagact tgccggaaaa ctgattggcc ggacaggccg cgtcatgcac gcagcacctt 840
gcgtcggtgt tggagatctg caccacattt cggccccacc ggttcttcac gatcttggcc 900
ttgctagact gctccttcag cgcgcgctgc ccgttttcgc tcgtcacatc catttcaatc 960
acgtgctcct tatttatcat aatgctcccg tgtagacact taagctcgcc ttcgatctca 1020
gcgcagcggt gcagccacaa cgcgcagccc gtgggctcgt ggtgcttgta ggttacctct 1080
gcaaacgact gcaggtacgc ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttgttg 1140
ctggtgaagg tcagctgcaa cccgcggtgc tcctcgttta gccaggtctt gcatacggcc 1200
gccagagctt ccacttggtc aggcagtagc ttgaagtttg cctttagatc gttatccacg 1260
tggtacttgt ccatcaacgc gcgcgcagcc tccatgccct tctcccacgc agacacgatc 1320
ggcaggctca gcgggtttat caccgtgctt tcactttccg cttcactgga ctcttccttt 1380
tcctcttgcg tccgcatacc ccgcgccact gggtcgtctt cattcagccg ccgcaccgtg 1440
cgcttacctc ccttgccgtg cttgattagc accggtgggt tgctgaaacc caccatttgt 1500
agcgccacat cttctctttc ttcctcgctg tccacgatca cctctgggga tggcgggcgc 1560
tcgggcttgg gagaggggcg cttctttttc tttttggacg caatggccaa atccgccgtc 1620
gaggtcgatg gccgcgggct gggtgtgcgc ggcaccagcg catcttgtga cgagtcttct 1680
tcgtcctcgg actcgagacg ccgcctcagc cgcttttttg ggggcgcgcg gggaggcggc 1740
ggcgacggcg acggggacga cacgtcctcc atggttggtg gacgtcgcgc cgcaccgcgt 1800
ccgcgctcgg gggtggtttc gcgctgctcc tcttcccgac tggccatttc cttctcctat 1860
aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aaggaggaca gcctaaccgc ccccttgag 1920
ttcgccacca ccgcctccac cgatgccgcc aacgcgccta ccaccttccc cgtcgaggca 1980
cccccgcttg aggaggagga agtgattatc gagcaggacc caggttttgt aagcgaagac 2040
gacgaggatc gctcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacga cgcagaggca 2100
aacgaggaac aagtcgggcg gggggaccaa aggcatggcg actacctaga tgtgggagac 2160
gacgtgctgt tgaagcatct gcagcgccag tgcgccatta tctgcgacgc gttgcaagag 2220
cgcagcgatg tgcccctcgc catagcggat gtcagccttg cctacgaacg ccacctgttc 2280
tcaccgcgcg taccccccaa acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgcctc 2340
aacttctacc ccgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa 2400
aactgcaaga taccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa gcagctggcc 2460
ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatatc gcctcgctcg acgaagtgcc aaaaatcttt 2520
gagggtcttg gacgcgacga gaaacgcgcg gcaaacgctc tgcaacaaga aaacagcgaa 2580
aatgaaagtc actgtggagt gctggtggaa cttgagggtg acaacgcgcg cctagccgtg 2640
ctgaaacgca gcatcgaggt cacccacttt gcctacccgg cacttaacct acccccccaag 2700
gttatgagca cagtcatgag cgagctgatc gtgcgccgtg cacgacccct ggagagggat 2760
gcaaacttgc aagaacaaac cgaggagggc ctacccgcag ttggcgatga gcagctggcg 2820
cgctggcttg agacgcgcga gcctgccgac ttggaggagc gacgcaagct aatgatggcc 2880
gcagtgcttg ttaccgtgga gcttgagtgc atgcagcggt tctttgctga cccggagatg 2940

cagcgcaagc tagaggaaac gttgcactac acctttcgcc agggctacgt gcgccaggcc 3000
tgcaaaattt ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctcct accttggaat tttgcacgaa 3060
aaccgcctcg ggcaaaacgt gcttcattcc acgctcaagg gcgaggcgcg ccgcgactac 3120
gtccgcgact gcgtttactt atttctgtgc tacacctggc aaacggccat gggcgtgtgg 3180
cagcaatgcc tggaggagcg caacctaaag gagctgcaga agctgctaaa gcaaaacttg 3240
aaggacctat ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacattatc 3300
ttccccgaac gcctgcttaa aaccctgcaa cagggtctgc cagacttcac cagtcaaagc 3360
atgttgcaaa actttaggaa ctttatccta gagcgttcag gaattctgcc cgccacctgc 3420
tgtgcgcttc ctagcgactt tgtgcccatt aagtaccgtg aatgccctcc gccgctttgg 3480
ggtcactgct accttctgca gctagccaac taccttgcct accactccga catcatggaa 3540
gacgtgagcg gtgacggcct actggagtgt cactgtcgct gcaacctatg caccccgcac 3600
cgctccctgg tctgcaattc gcaactgctt agcgaaagtc aaattatcgg tacctttgag 3660
ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtcc gcggctccgg ggttgaaact cactccgggg 3720
ctgtggacgt cggcttacct tcgcaaattt gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt 3780
aggttctacg aagaccaatc ccgcccgcca aatgcggagc ttaccgcctg cgtcattacc 3840
cagggccaca tccttggcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta 3900
cgaaagggac ggggggttta cctggacccc cagtccggcg aggagctcaa cccaatcccc 3960
ccgccgccgc agccctatca gcagccgcgg gcccttgctt cccaggatgg cacccaaaaa 4020
gaagctgcag ctgccgccgc cgccacccac ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc 4080
agaggaggtt ttggacgagg aggaggagat gatggaagac tgggacagcc tagacgaagc 4140
ttccgaggcc gaagaggtgt cagacgaaac accgtcaccc tcggtcgcat tcccctcgcc 4200
ggcgccccag aaattggcaa ccgttcccag catcgctaca acctccgctc ctcaggcgcc 4260
gccggcactg cctgttcgcc gacccaaccg tagatgggac accactggaa ccagggccgg 4320
taagtctaag cagccgccgc cgttagccca agagcaacaa cagcgccaag gctaccgctc 4380
gtggcgcggg cacaagaacg ccatagttgc ttgcttgcaa gactgtgggg gcaacatctc 4440
cttcgcccgc cgctttcttc tctaccatca cggcgtggcc ttcccccgta acatcctgca 4500
ttactaccgt catctctaca gcccctactg caccggcggc agcggcagcg gcagcaacag 4560
cagcggtcac acagaagcaa aggcgaccgg atagcaagac tctgacaaag cccaagaaat 4620
ccacagcggc ggcagcagca ggaggaggag cgctgcgtct ggcgcccaac gaacccgtat 4680
cgacccgcga gcttagaaat aggatttttc ccactctgta tgctatattt caacaaagca 4740
ggggccaaga acaagagctg aaaataaaaa acaggtctct gcgctccctc acccgcagct 4800
gcctgtatca caaaagcgaa gatcagcttc ggcgcacgct ggaagacgcg gaggctctct 4860
tcagcaaata ctgcgcgctg actcttaagg actagtttcg cgcctttct caaatttaag 4920
cgcgaaaact acgtcatctc cagcggccac acccggcgcc agcacctgtc gtcagcgcca 4980
ttatgagcaa ggaaattccc acgccctaca tgtggagtta ccagccacaa atgggacttg 5040
cggctggagc tgcccaagac tactcaaccc gaataaacta catgagcgcg ggaccccaca 5100
tgatatcccg ggtcaacgga atccgcgccc accgaaaccg aattctcctc gaacaggcgg 5160
ctattaccac cacacctcgt aataacctta atccccgtag ttggcccgct gccctggtgt 5220
accaggaaag tcccgctccc accactgtgg tacttcccag agacgcccag gccgaagttc 5280

agatgactaa ctcaggggcg cagcttgcgg gcggctttcg tcacagggtg cggtcgcccg 5340
ggcgttttag ggcggagtaa cttgcatgta ttgggaattg tagtttttt aaaatgggaa 5400
gtgacgtatc gtgggaaaac ggaagtgaag atttgaggaa gttgtgggtt ttttggcttt 5460
cgtttctggg cgtaggttcg cgtgcggttt tctgggtgtt ttttgtggac tttaaccgtt 5520
acgtcatttt ttagtcctat atatactcgc tctgtacttg gccctttta cactgtgact 5580
gattgagctg gtgccgtgtc gagtggtgtt ttttaatagg tttttttact ggtaaggctg 5640
actgttatgg ctgccgctgt ggaagcgctg tatgttgttc tggagcggga gggtgctatt 5700
ttgcctaggc aggagggttt ttcaggtgtt tatgtgtttt tctctcctat taattttgtt 5760
atacctccta tgggggctgt aatgttgtct ctacgcctgc gggtatgtat tcccccgggc 5820
tatttcggtc gctttttagc actgaccgat gttaaccaac ctgatgtgtt taccgagtct 5880
tacattatga ctccggacat gaccgaggaa ctgtcggtgg tgctttttaa tcacggtgac 5940
cagttttttt acggtcacgc cggcatggcc gtagtccgtc ttatgcttat aagggttgtt 6000
tttcctgttg taagacaggc ttctaatgtt taaatgtttt tttttttgtt attttatttt 6060
gtgtttaatg caggaacccg cagacatgtt tgagagaaaa atggtgtctt tttctgtggt 6120
ggttccggaa cttacctgcc tttatctgca tgagcatgac tacgatgtgc ttgctttttt 6180
gcgcgaggct ttgcctgatt ttttgagcag caccttgcat tttatatcgc cgcccatgca 6240
acaagcttac ataggggcta cgctggttag catagctccg agtatgcgtg tcataatcag 6300
tgtgggttct tttgtcatgg ttcctggcgg ggaagtggcc gcgctggtcc gtgcagacct 6360
gcacgattat gttcagctgg ccctgcgaag ggacctacgg gatcgcggta tttttgttaa 6420
tgttccgctt ttgaatctta tacaggtctg tgaggaacct gaatttttgc aatcatgatt 6480
cgctgcttga ggctgaaggt ggagggcgct ctggagcaga tttttacaat ggccggactt 6540
aatattcggg atttgcttag agacatattg ataaggtggc gagatgaaaa ttatttgggc 6600
atggttgaag gtgctggaat gtttatagag gagattcacc ctgaagggtt tagcctttac 6660
gtccacttgg acgtgagggc agtttgcctt ttggaagcca ttgtgcaaca tcttacaaat 6720
gccattatct gttctttggc tgtagagttt gaccacgcca ccggagggga gcgcgttcac 6780
ttaatagatc ttcattttga ggttttggat aatcttttgg aataaaaaaa aaaaaacatg 6840
gttcttccag ctcttcccgc tcctcccgtg tgtgactcgc agaacgaatg tgtaggttgg 6900
ctgggtgtgg cttattctgc ggtggtggat gttatcaggg cagcggcgca tgaaggagtt 6960
tacatagaac ccgaagccag ggggcgcctg gatgctttga gagagtggat atactacaac 7020
tactacacag agcgagctaa gcgacgagac cggagacgca gatctgtttg tcacgcccgc 7080
acctggtttt gcttcaggaa atatgactac gtccggcgtt ccatttggca tgacactacg 7140
accaacacga tctcggttgt ctcggcgcac tccgtacagt agggatcgcc tacctccttt 7200
tgagacagag acccgcgcta ccatactgga ggatcatccg ctgctgcccg aatgtaacac 7260
tttgacaatg cacaacgtga gttacgtgcg aggtcttccc tgcagtgtgg gatttacgct 7320
gattcaggaa tgggttgttc cctgggatat ggttctgacg cgggaggagc ttgtaatcct 7380
gaggaagtgt atgcacgtgt gcctgtgttg tgccaacatt gatatcatga cgagcatgat 7440
gatccatggt tacgagtcct gggctctcca ctgtcattgt tccagtcccg gttccctgca 7500
gtgcatagcc ggcgggcagg ttttggccag ctggtttagg atggtggtgg atggcgccat 7560
gtttaatcag aggtttatat ggtaccggga ggtggtgaat tacaacatgc caaaagaggt 7620

aatgtttatg tccagcgtgt ttatgagggg tcgccactta atctacctgc gcttgtggta 7680
tgatggccac gtgggttctg tggtccccgc catgagcttt ggatacagcg ccttgcactg 7740
tgggattttg aacaatattg tggtgctgtg ctgcagttac tgtgctgatt taagtgagat 7800
cagggtgcgc tgctgtgccc ggaggacaag gcgtctcatg ctgcgggcgg tgcgaatcat 7860
cgctgaggag accactgcca tgttgtattc ctgcaggacg gagcggcggc ggcagcagtt 7920
tattcgcgcg ctgctgcagc accaccgccc tatcctgatg cacgattatg actctacccc 7980
catgtaggcg tggacttccc cttcgccgcc cgttgagcaa ccgcaagttg gacagcagcc 8040
tgtggctcag cagctggaca gcgacatgaa cttaagcgag ctgcccgggg agtttattaa 8100
tatcactgat gagcgtttgg ctcgacagga aaccgtgtgg aatataacac ctaagaatat 8160
gtctgttacc catgatatga tgctttttaa ggccagccgg ggagaaagga ctgtgtactc 8220
tgtgtgttgg gagggaggtg gcaggttgaa tactagggtt ctgtgagttt gattaaggta 8280
cggtgatcaa tataagctat gtggtggtgg ggctatacta ctgaatgaaa aatgacttga 8340
aattttctgc aattgaaaaa taaacacgtt gaaacataac atgcaacagg ttcacgattc 8400
tttattcctg ggcaatgtag gagaaggtgt aagagttggt agcaaaagtt tcagtggtgt 8460
attttccact ttcccaggac catgtaaaag acatagagta agtgcttacc tcgctagttt 8520
ctgtggattc actagaatcg atgtaggatg ttgcccctcc tgacgcggta ggagaagggg 8580
agggtgccct gcatgtctgc cgctgctctt gctcttgccg ctgctgagga ggggggcgca 8640
tctgccgcag caccggatgc atctgggaaa agcaaaaaag gggctcgtcc ctgtttccgg 8700
aggaatttgc aagcggggtc ttgcatgacg gggaggcaaa cccccgttcg ccgcagtccg 8760
gccggcccga gactcgaacc gggggtcctg cgactcaacc cttggaaaat aaccctccgg 8820
ctacagggag cgagccactt aatgctttcg ctttccagcc taaccgctta cgccgcgcgc 8880
ggccagtggc caaaaaagct agcgcagcag ccgccgcgcc tggaaggaag ccaaaaggag 8940
cgctcccccg ttgtctgacg tcgcacacct gggttcgaca cgcgggcggt aaccgcatgg 9000
atcacggcgg acggccggat ccggggttcg aaccccggtc gtccgccatg ataccccttgc 9060
gaatttatcc accagaccac ggaagagtgc ccgcttacag gctctccttt tgcacggtct 9120
agagcgtcaa cgactgcgca cgcctcaccg gccagagcgt cccgaccatg gagcactttt 9180
tgccgctgcg caacatctgg aaccgcgtcc gcgactttcc gcgcgcctcc accaccgccg 9240
ccggcatcac ctggatgtcc aggtacatct acggattacg tcgacgttta aaccatatga 9300
tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 9360
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 9420
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 9480
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 9540
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 9600
agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 9660
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 9720
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 9780
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 9840
cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 9900
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 9960

ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 10020
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 10080
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 10140
aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gtcagaagaa ctcgtcaaga 10200
aggcgataga aggcgatgcg ctgcgaatcg ggagcggcga taccgtaaag cacgaggaag 10260
cggtcagccc attcgccgcc aagctcttca gcaatatcac gggtagccaa cgctatgtcc 10320
tgatagcggt ccgccacacc cagccggcca cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt 10380
tccaccatga tattcggcaa gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc ctcgccgtcg 10440
ggcatgctcg ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg atgctcttcg 10500
tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg ctcgatgcga 10560
tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa gcgtatgcag ccgccgcatt 10620
gcatcagcca tgatggatac tttctcggca ggagcaaggt gagatgacag gagatcctgc 10680
cccggcactt cgcccaatag cagccagtcc cttcccgctt cagtgacaac gtcgagtaca 10740
gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgcagt 10800
tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac 10860
agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt gtgcccagtc atagccgaat 10920
agcctctcca cccaagcggc cggagaacct gcgtgcaatc catcttgttc aatcatactc 10980
ttccttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 11040
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 11100
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca 11160
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 11220
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 11280
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat 11340
caccctaatc aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 11400
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 11460
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 11520
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gatggatcc 11569

<210> 3
<211> 5030
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 质粒pAV-CMV-EGFP的编码链
<400> 3

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg ccctccagtg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120
gggttcctgc ggccgcacgc gtctagttat taatagtaat cgaattcgtg ttactcataa 180
ctagtaaggt cgggcaggaa gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac 240
gatacaaggc tgttagagag ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag 300

tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat 360
gttttaaaat ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttgggtt 420
tatatatctt gtggaaagga cgcgggatcc actggaccag gcagcagcgt cagaagactt 480
ttttggaaaa gcttgactag taatactgta atagtaatca attacggggt cattagttca 540
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 600
gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 660
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 720
acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 780
cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 840
cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg 900
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 960
gttttgcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg 1020
caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac 1080
cgtcagatcc gctagagatc cggtaccgag gagatctgcc gccgcgatcg ccggcgcgcc 1140
agatctcacg cttaactagc tagcggaccg acgcgtacgc ggccgctcga gatggtgagc 1200
aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta 1260
aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg 1320
accctgaagt tcatctgcac caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc 1380
accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac 1440
ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac 1500
gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc 1560
atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag 1620
tacaactaca acagccacaa cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag 1680
gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac 1740
cagcagaaca cccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc 1800
acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag 1860
ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta agtcgaggat 1920
tataaggatg acgacgataa attcgtcgag caccaccacc accaccacta ataaggttta 1980
tccgatccac cggatctaga taagatatcc gatccaccgg atctagataa ctgatcataa 2040
tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc 2100
tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata 2160
atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc 2220
attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta acgcggtaac cacgtgcgga 2280
ccgagcggcc gcaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 2340
cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 2400
cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc aggggcgcct gatgcggtat tttctcctta 2460
cgcatctgtg cggtatttca caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtacg cgccctgtag 2520
cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacctgccag 2580
cgccttagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt 2640

tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca 2700
cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata 2760
gacggttttt cgcccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca 2820
aactggaaca acactcaacc ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc 2880
gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa 2940
caaaatatta acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc 3000
atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 3060
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 3120
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctattttt 3180
ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa 3240
tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 3300
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 3360
acatttccgt gtcgccctta ttccctttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca 3420
cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 3480
catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt 3540
tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc 3600
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 3660
accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 3720
cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 3780
ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 3840
accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 3900
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 3960
attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 4020
ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 4080
tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 4140
tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 4200
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 4260
tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc 4320
ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 4380
ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 4440
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 4500
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 4560
caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 4620
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 4680
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 4740
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 4800
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 4860
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 4920
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 4980

cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 5030

<210> 4

<211> 4742

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒pAV-TBG-EGFP的编码链

<400> 4

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct gcggccggtc gcgtctagta ctagtaggtt aatttttaaa aagcagtcaa 180
aagtccaagt ggcccttggc agcatttact ctctctgttt gctctggtta ataatctcag 240
gagcacaaac attccagatc caggttaatt tttaaaaagc agtcaaaagt ccaagtggcc 300
cttggcagca tttactctct ctgtttgctc tggttaataa tctcaggagc acaaacattc 360
cagatccggc gcgccagggc tggaagctac ctttgacatc atttcctctg cgaatgcatg 420
tataatttct acagaaccta ttagaaagga tcacccagcc tctgcttttg tacaactttc 480
ccttaaaaaa ctgccaattc cactgctgtt tggcccaata gtgagaactt tttcctgctg 540
cctcttggtg cttttgccta tggcccctat tctgcctgct gaagacactc ttgccagcat 600
ggacttaaac ccctccagct ctgacaatcc tctttctctt ttgttttaca tgaagggtct 660
ggcagccaaa gcaatcactc aaagttcaaa ccttatcatt ttttgctttg ttcctcttgg 720
ccttggtttt gtacatcagc tttgaaaata ccatcccagg gttaatgctg gggttaattt 780
ataactaaga gtgctctagt tttgcaatac aggacatgct ataaaaatgg aaagatgttg 840
ctttctgaga gacaggtacc gaggagatct gccgccgcga tcgccaccat ggtgagcaag 900
ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 960
ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacttacgg caagctgacc 1020
ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc 1080
ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccccgacc acatgaagca gcacgacttc 1140
ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac 1200
ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc 1260
gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacaa gctggagtac 1320
aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg 1380
aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag 1440
cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc 1500
cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc 1560
gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtagac gcgtacgcgg 1620
ccgctcgagg attataagga tgacgacgat aaattcgtcg agcaccacca ccaccaccac 1680
taataaggtt tatccgatcc accggatcta gataagatat ccgatccacc ggatctagat 1740
aactgatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc 1800
cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta 1860

ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 1920
ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct taacgcggta 1980
accacgtgcg gacccaacgg ccgcaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc 2040
tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc ccgggctttg 2100
cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct gcaggggcgc ctgatgcggt 2160
attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat acgtcaaagc aaccatagta 2220
cgcgccctgt agcggcacat taagcgcggc gggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc 2280
tacacctgcc agcgccttag cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct ttctcgccac 2340
gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag 2400
tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac gtagtgggcc 2460
atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg 2520
actcttgttc caaactggaa caacactcaa ctctatctcg ggctattctt ttgatttata 2580
agggattttg ccgatttcgg tctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa 2640
cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aattttatgg tgcactctca gtacaatctg 2700
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg 2760
acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 2820
catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 2880
acgcctattt ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac 2940
ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat 3000
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 3060
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc 3120
tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 3180
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 3240
cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc 3300
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt 3360
ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 3420
atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat 3480
cggaggaccg aaggagctaa ccgcttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 3540
tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat 3600
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc 3660
ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg 3720
ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc 3780
tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta 3840
cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc 3900
ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 3960
tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atccttttg ataatctcat 4020
gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat 4080
caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 4140
accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 4200

ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt 4260
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt 4320
accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 4380
gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt 4440
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac 4500
gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 4560
gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 4620
ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggggcgga gcctatggaa 4680
aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat 4740
gt 4742

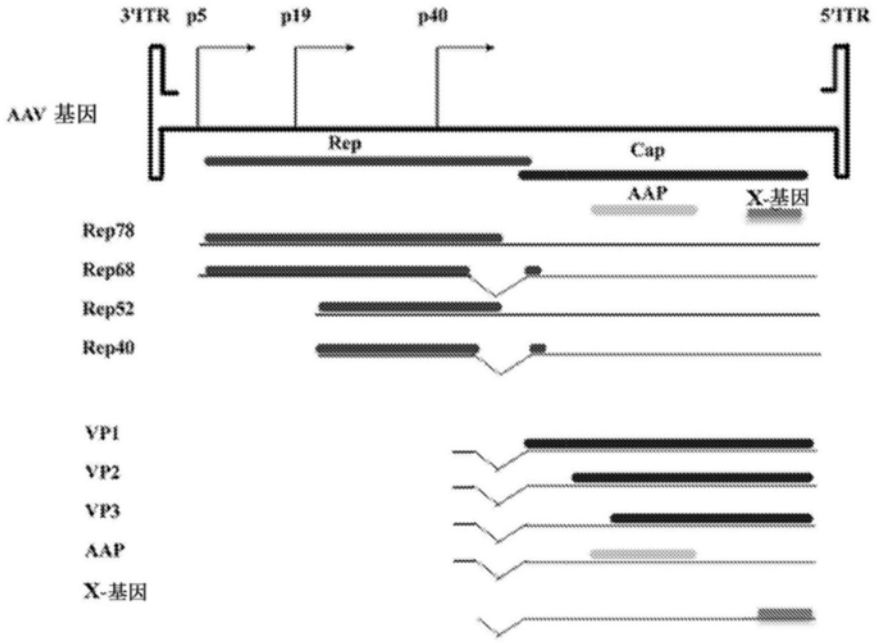

3'ITR
p5
p19
p40
5'ITR
AAV 基因
Rep
Cap
AAP
X-基因
Rep78
Rep68
Rep52
Rep40
VP1
VP2
VP3
AAP
X-基因

图1

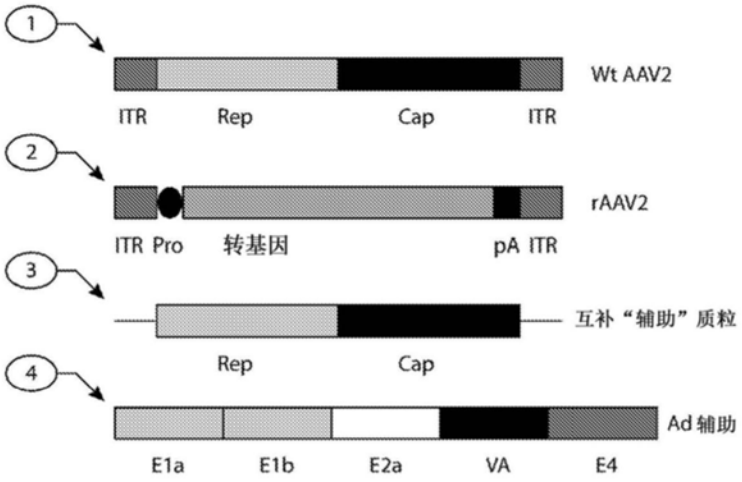

1
Wt AAV2
ITR
Rep
Cap
ITR
2
rAAV2
ITR Pro
转基因
pA ITR
3
互补“辅助”质粒
Rep
Cap
4
Ad 辅助
E1a
E1b
E2a
VA
E4

图2

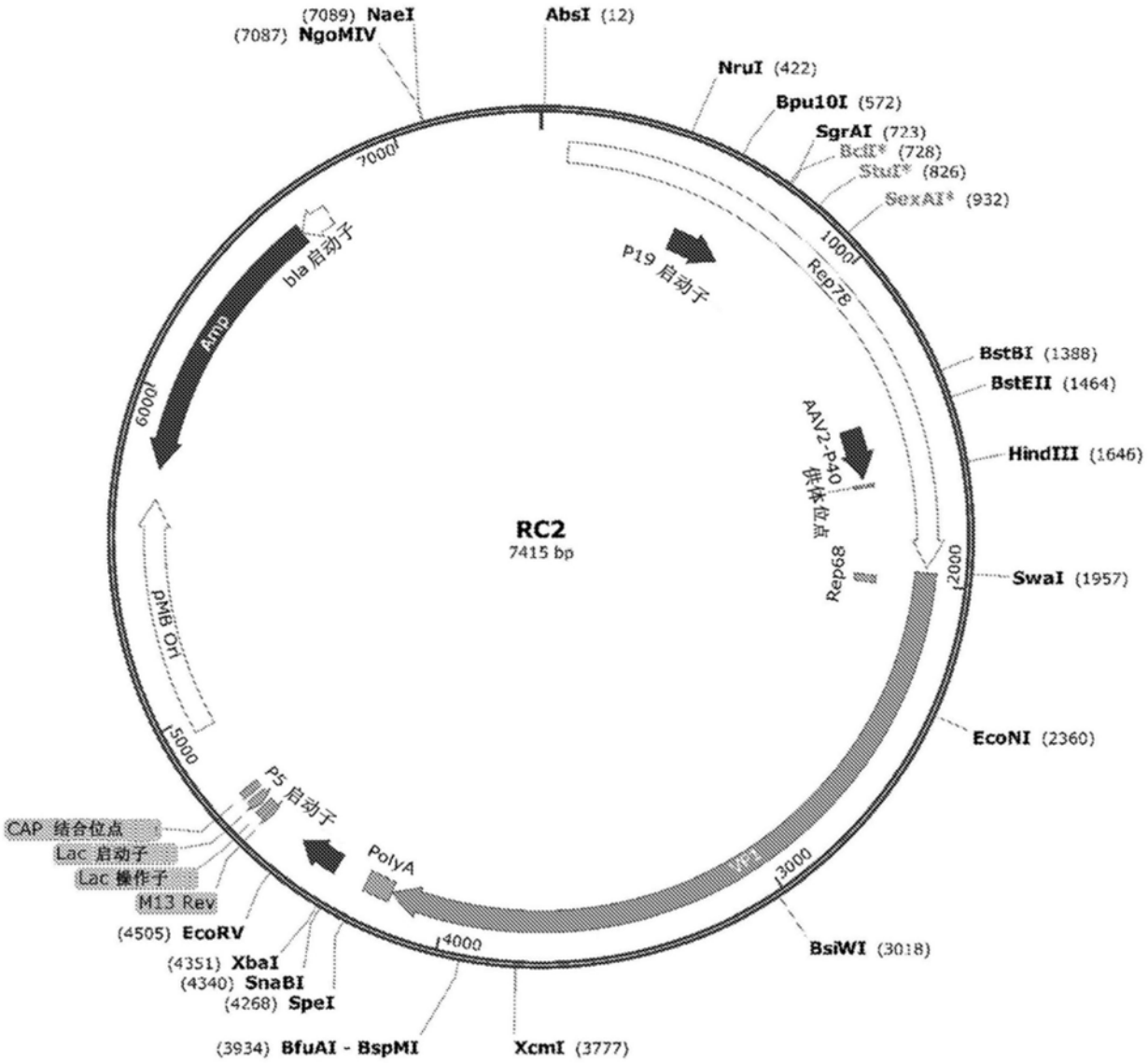

(7089) NaeI
(7087) NgoMIV
AbsI (12)
NruI (422)
Bpu10I (572)
SgrAI (723)
BclI* (728)
StuI* (826)
SexAI* (932)
1000
Rep78
P19 启动子
bla 启动子
Amp
7000
6000
BstBI (1388)
BstEII (1464)
HindIII (1646)
AAV2-P40
供体位点
Rep68
RC2
7415 bp
2000
SwaI (1957)
pMB Ori
5000
EcoNI (2360)
P5 启动子
CAP 结合位点
Lac 启动子
Lac 操作子
M13 Rev
PolyA
VP1
3000
(4505) EcoRV
(4351) XbaI
(4340) SnaBI
(4268) SpeI
4000
BsiWI (3018)
(3934) BfuAI - BspMI
XcmI (3777)

图3

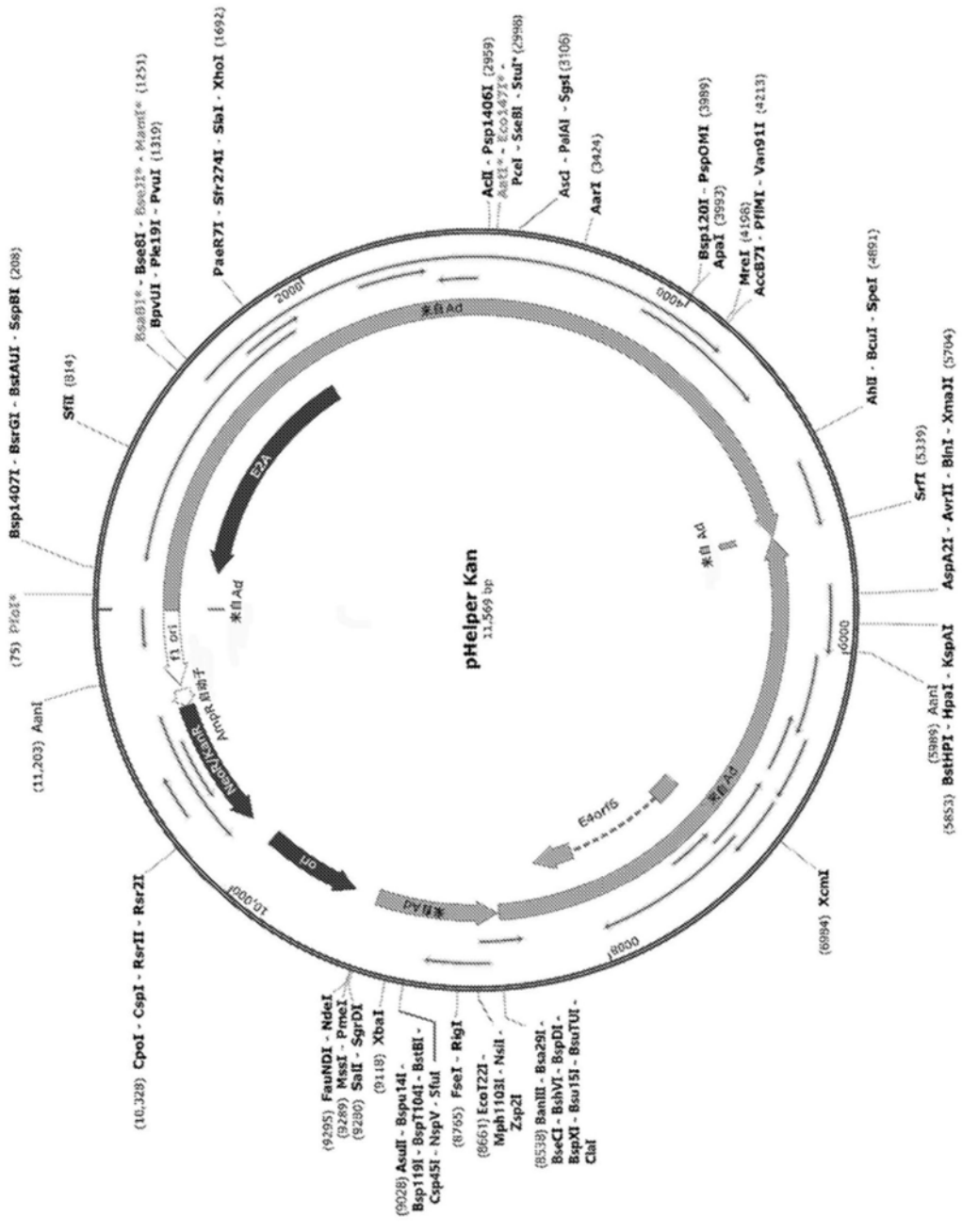

pHelper Kan
11,569 bp
E2A
E4orf6
pVIII
Ori
f1 ori
AdV Packaging
Hexon/Penton
2000
4000
6000
8000
10,000
12,000
AclI - Psp1406I (2959)
PceI - SseBI - StuI* (2968)
AscI - PolAI - SgsI (3106)
AarI (3424)
Bsp120I - PspOMI (3989)
ApaI (3993)
MreI (4156)
AccB7I - PflMI - Van91I (4213)
AhlI - BcuI - SpeI (4891)
SrfI (5339)
AspA2I - AvrII - BlnI - XmaJI (5704)
AanI
(5989) BstHPI - HpaI - KspAI (5853)
XcmI (6984)
CpoI - CspI - RsrII - Rsr2I (10,328)
AanI (11,203)
Bsp1407I - BsrGI - BstAUI - SspBI (208)
SfiI (314)
(75) PfoI*
FauNDI - NdeI (9295)
MssI - PmeI (9289)
SalI - SgrDI (9280)
XbaI (9118)
AsuII - Bspu14I - Bsp119I - BspT104I - BstBI - Csp45I - NspV - SfuI (9028)
FseI - RigI (8765)
EcoT22I - Mph1103I - NsiI - Zsp2I (8661)
BanIII - Bsa29I - BseCI - BshVI - BspDI - BspXI - Bsu15I - BsuTUI - ClaI (8538)

图4

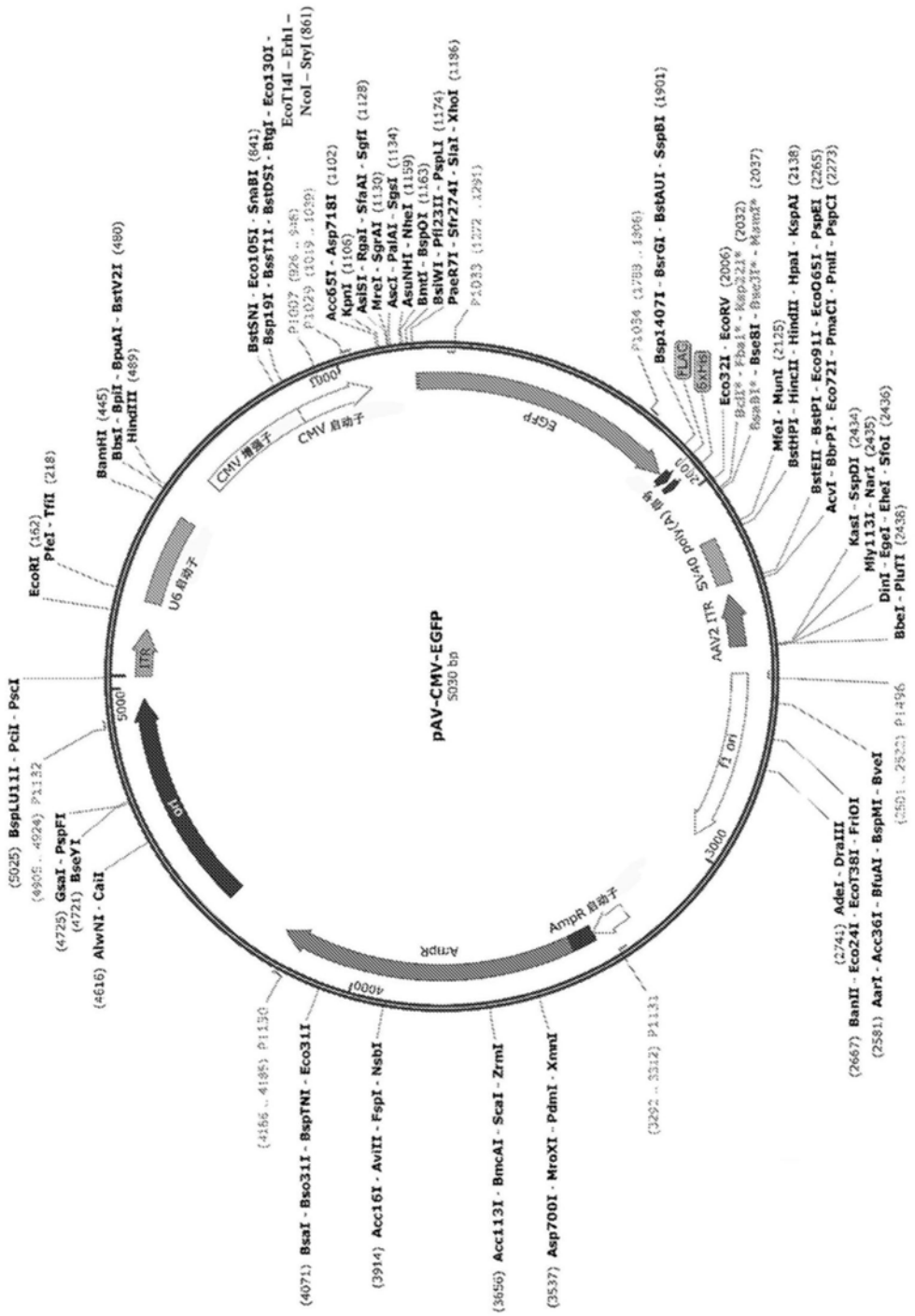

pAV-CMV-EGFP
5030 bp
CMV 增强子
CMV 启动子
EGFP
U6 启动子
ITR
Ori
AmpR
AmpR 启动子
AAV2 ITR
SV40 poly(A) 信号
f1 ori
FLAG
6xHis
BstSNI - Eco105I - SnaBI (641)
Bsp19I - BssT1I - BstDSI - BtgI - Eco130I - EcoT14I - ErhI - NcoI - StyI (861)
Acc65I - Asp718I (1102)
KpnI (1106)
AsiSI - RgaI - SfaAI - SgfI (1128)
MreI - SgrAI (1130)
AscI - PalAI - SgsI (1134)
AsuNHI - NheI (1159)
BmtI - BspQI (1163)
BsiWI - Pfl23II - PspLI (1174)
PaeR7I - Sfr274I - SlaI - XhoI (1186)
Bsp1407I - BsrGI - BstAUI - SspBI (1901)
Eco32I - EcoRV (2006)
MfeI - MunI (2125)
BstHPI - HincII - HindII - HpaI - KspAI (2138)
BstEII - BstPI - Eco91I - Eco065I - PspEI (2265)
AcvI - BbrPI - Eco72I - PmaCI - PmlI - PspCI (2273)
KasI - SspDI (2434)
MlyI13I - NarI (2435)
DinI - EgeI - EheI - SfoI (2436)
BbeI - PluTI (2438)
AdeI - DraIII (2741)
BanII - Eco24I - Eco73I - FriOI (2667)
AarI - Acc36I - BfuAI - BspMI - BveI (2581)
EcoRI (162)
PfeI - TfiI (218)
BamHI (445)
BbsI - BpiI - BpuAI - BstV2I (480)
HindIII (489)
(5025) BspLU11I - PciI - PscI
(4905 .. 4924) P1132
(4725) GsaI - PspFI
(4721) BseYI
(4616) AlwNI - CaiI
(4166 .. 4185) P1130
(4071) BsaI - Bso31I - BspTNI - Eco31I
(3914) Acc16I - AviII - FspI - NsbI
(3656) Acc113I - BmcAI - ScaI - ZrmI
(3537) Asp700I - MroXI - PdmI - XmnI
(3292 .. 3312) P1131
(2501 .. 2520) P1496
P1034 (1783 .. 1806)
P1033 (1272 .. 1291)
P1027 (926 .. 945)
P1029 (1019 .. 1039)
1000
2000
3000
4000
5000

图5

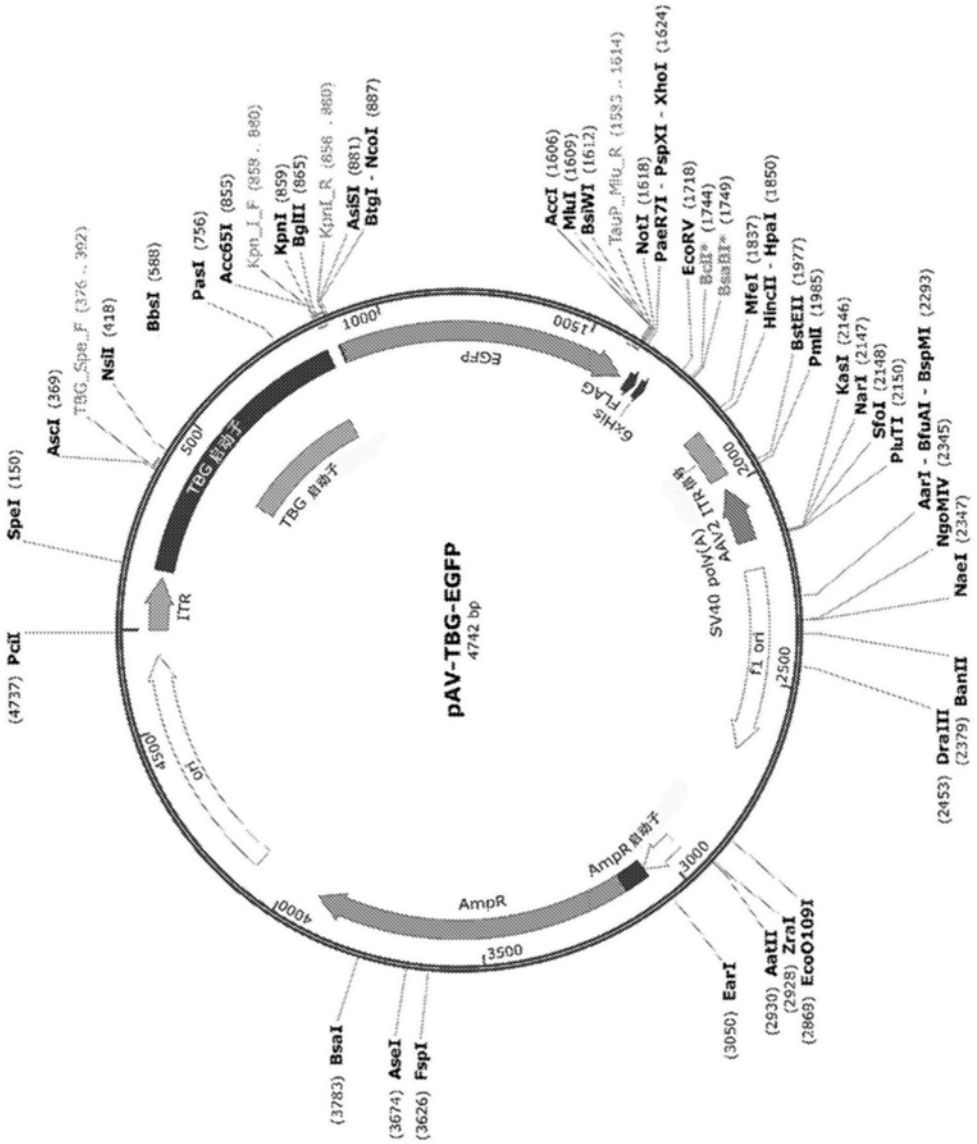

pAV-TBG-EGFP
4742 bp
TBG 启动子
EGFP
6xHis
FLAG
ITR
SV40 poly(A)
AAV2 ITR 序列
f1 ori
ori
AmpR
AmpR 启动子
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
500
SpeI (150)
AscI (369)
NsiI (418)
BbsI (568)
PasI (756)
Acc65I (855)
KpnI (859)
BglII (865)
AsiSI (881)
BtgI - NcoI (887)
AccI (1606)
MluI (1609)
BsiWI (1612)
NotI (1618)
PaeR7I - PspXI - XhoI (1624)
EcoRV (1718)
MfeI (1837)
HincII - HpaI (1850)
BstEII (1977)
PmlI (1985)
KasI (2146)
NarI (2147)
SfoI (2148)
PluTI (2150)
AarI - BfuAI - BspMI (2293)
NgoMIV (2345)
NaeI (2347)
BanII
DraIII (2379)
(2453)
EarI (3050)
AatII (2930)
ZraI (2928)
EcoO109I (2869)
BsaI (3783)
AseI (3674)
FspI (3626)
PciI (4737)

图6

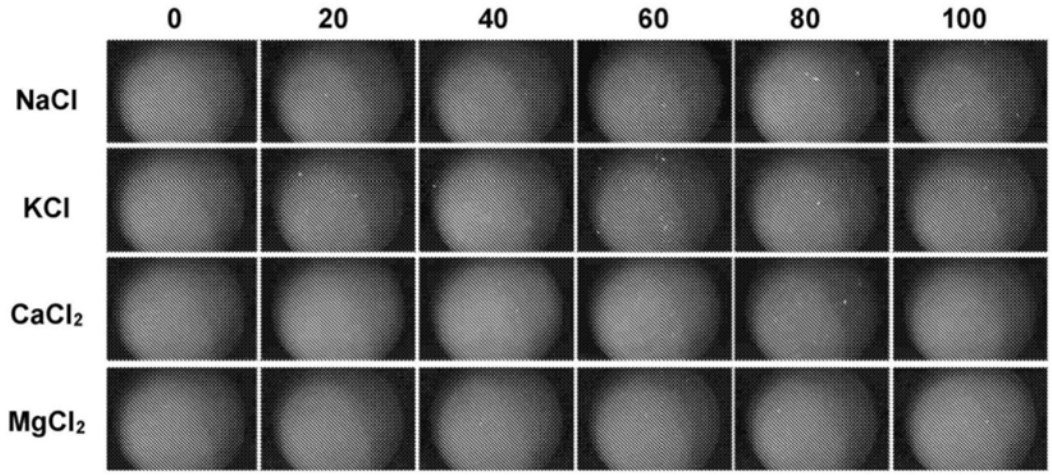

0
20
40
60
80
100
NaCl
KCl
CaCl2
MgCl2

图7A

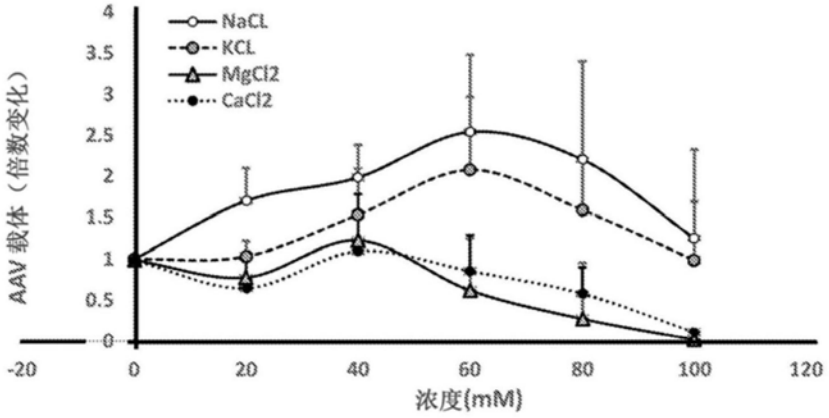

NaCL
KCL
MgCl2
CaCl2
AAV 载体（倍数变化）
浓度(mM)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-20
0
20
40
60
80
100
120

图7B

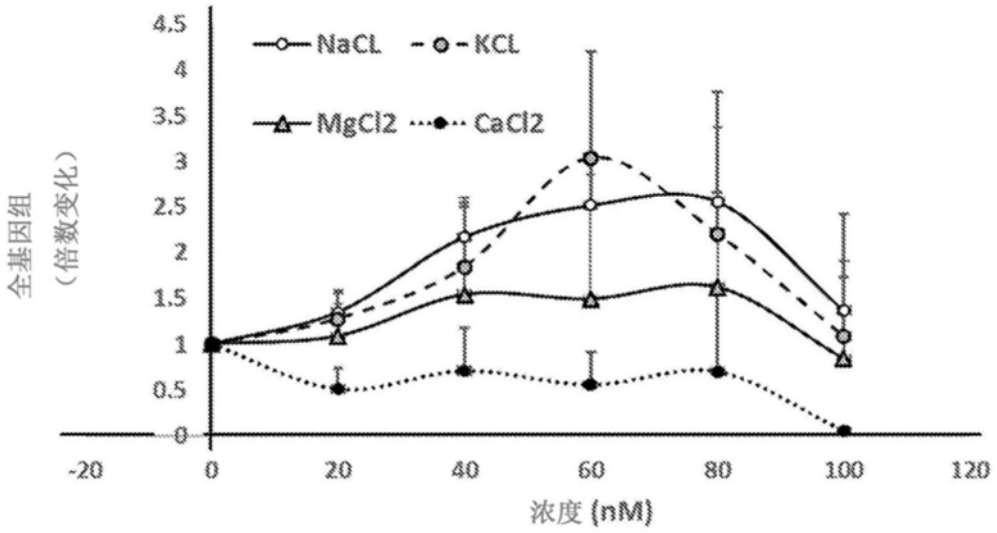

NaCL
KCL
MgCl2
CaCl2
全基因组
（倍数变化）
浓度 (nM)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-20
0
20
40
60
80
100
120

图7C

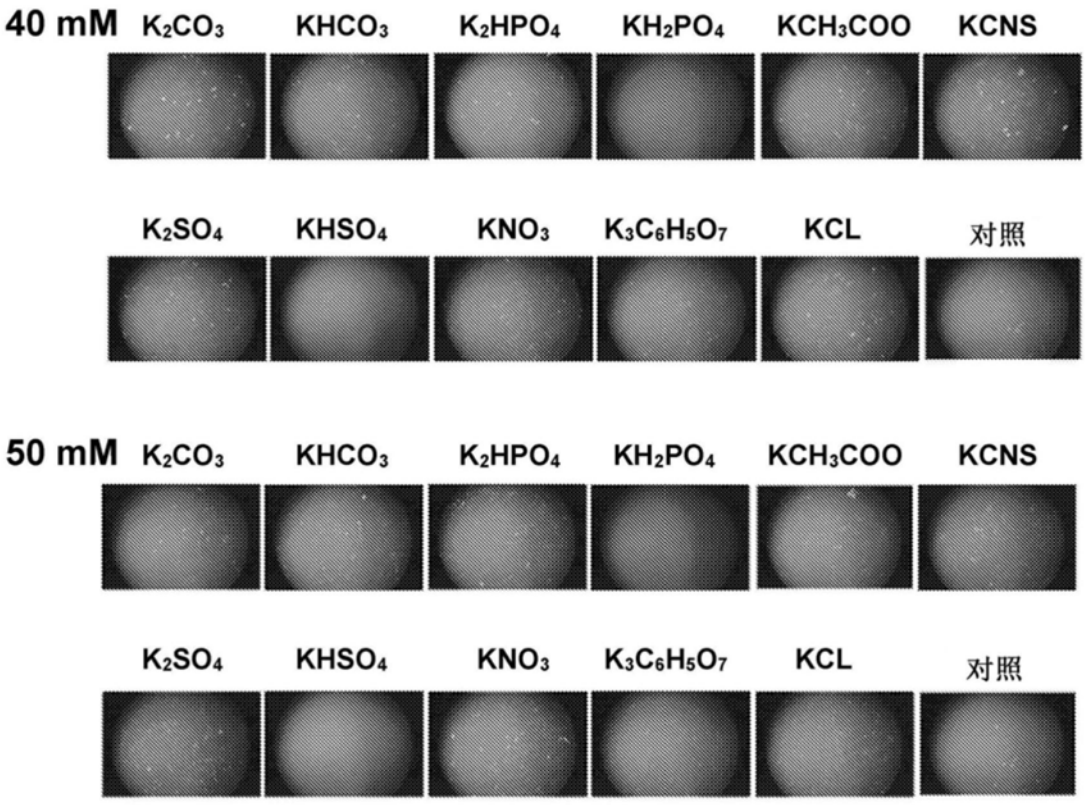

40 mM
K2CO3
KHCO3
K2HPO4
KH2PO4
KCH3COO
KCNS
K2SO4
KHSO4
KNO3
K3C6H5O7
KCL
对照
50 mM
K2CO3
KHCO3
K2HPO4
KH2PO4
KCH3COO
KCNS
K2SO4
KHSO4
KNO3
K3C6H5O7
KCL
对照

图8A

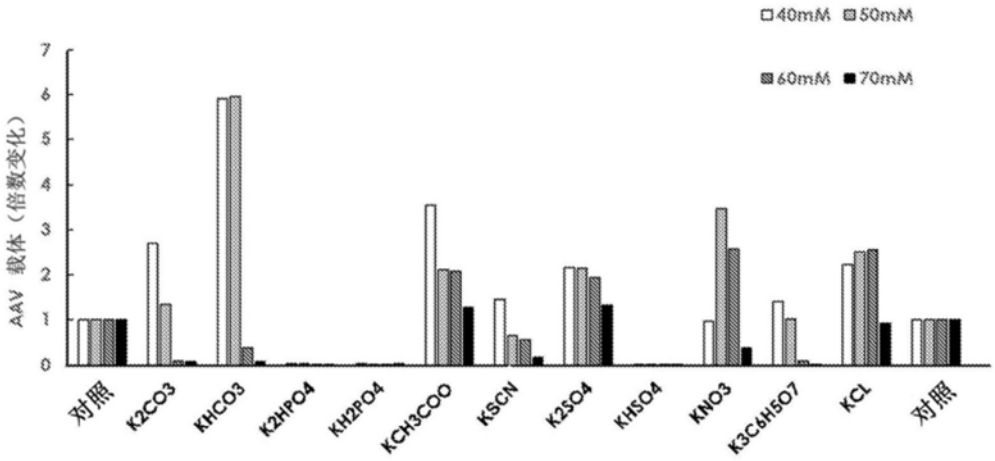

40mM
50mM
60mM
70mM
AAV 载体（倍数变化）
对照
K2CO3
KHCO3
K2HPO4
KH2PO4
KCH3COO
KSCN
K2SO4
KHSO4
KNO3
K3C6H5O7
KCL
对照

图8B

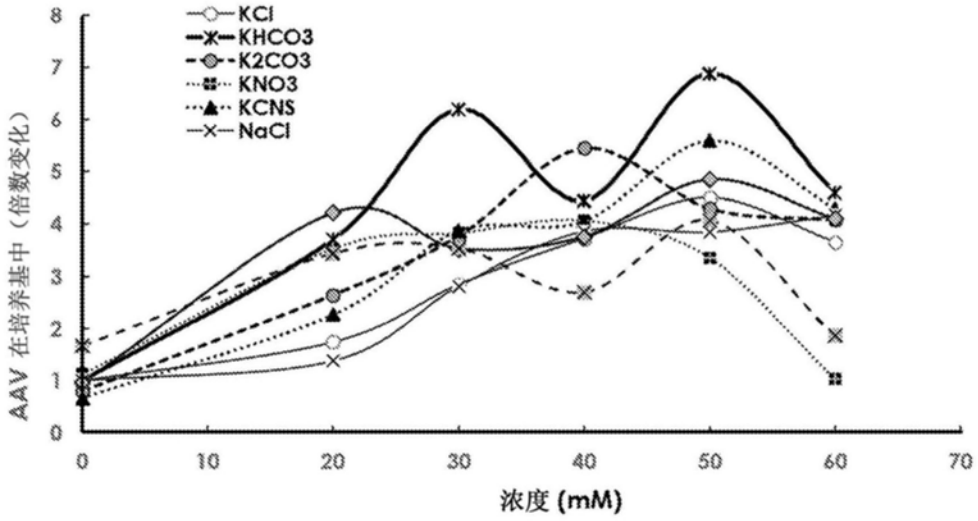

KCl
KHCO3
K2CO3
KNO3
KCNS
NaCl
AAV 在培养基中（倍数变化）
浓度 (mM)

图9A

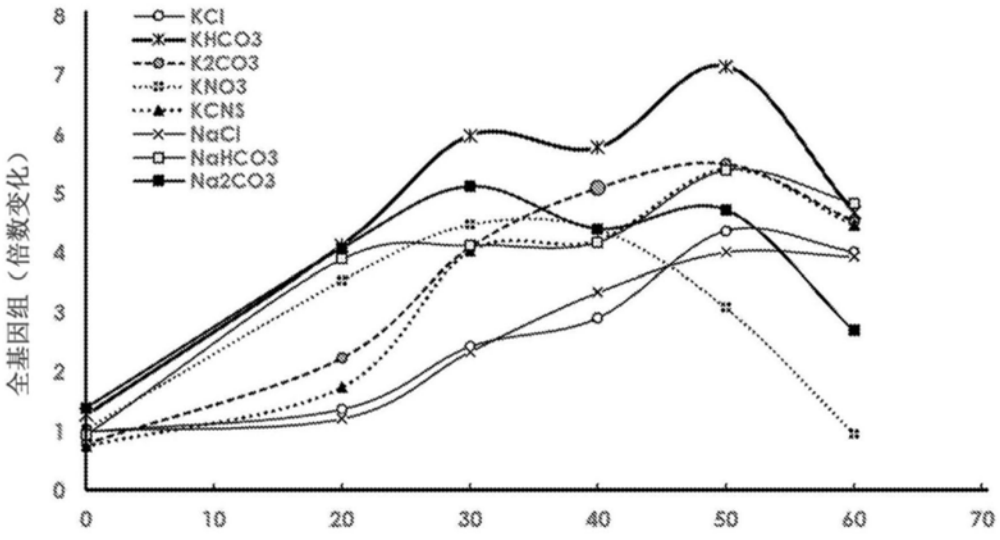

KCl
KHCO3
K2CO3
KNO3
KCNS
NaCl
NaHCO3
Na2CO3
全基因组（倍数变化）
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
10
20
30
40
50
60
70

图9B

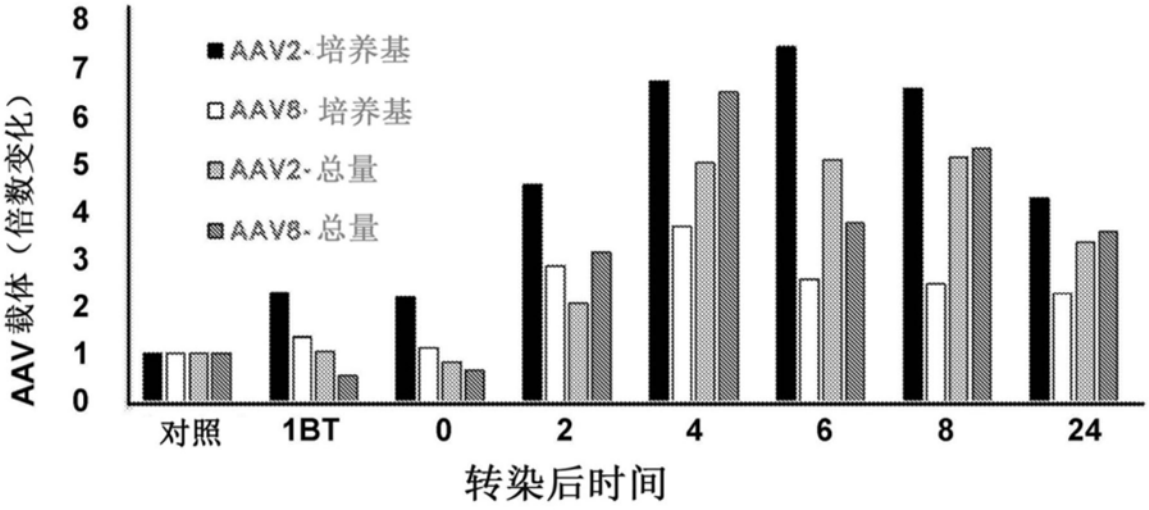

AAV2-培养基
AAV8-培养基
AAV2-总量
AAV8-总量
AAV载体（倍数变化）
0
1
2
3
4
5
6
7
8
对照
1BT
0
2
4
6
8
24
转染后时间

图10

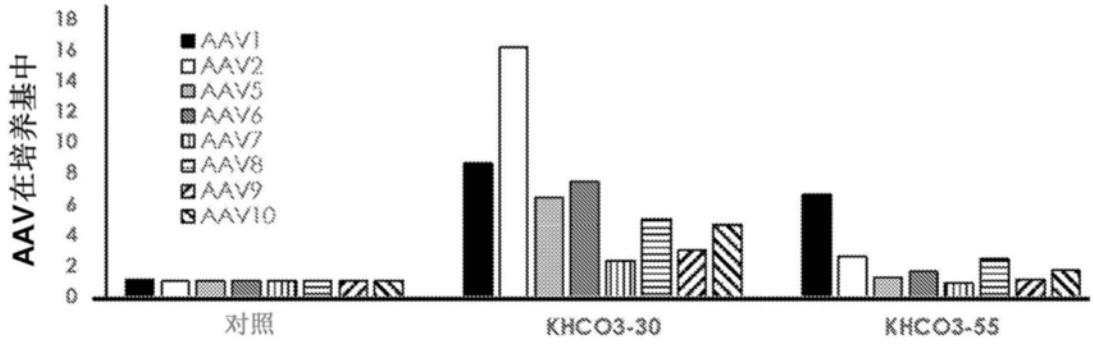

AAV1
AAV2
AAV5
AAV6
AAV7
AAV8
AAV9
AAV10
AAV在培养基中
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
对照
KHCO3-30
KHCO3-55

图11A

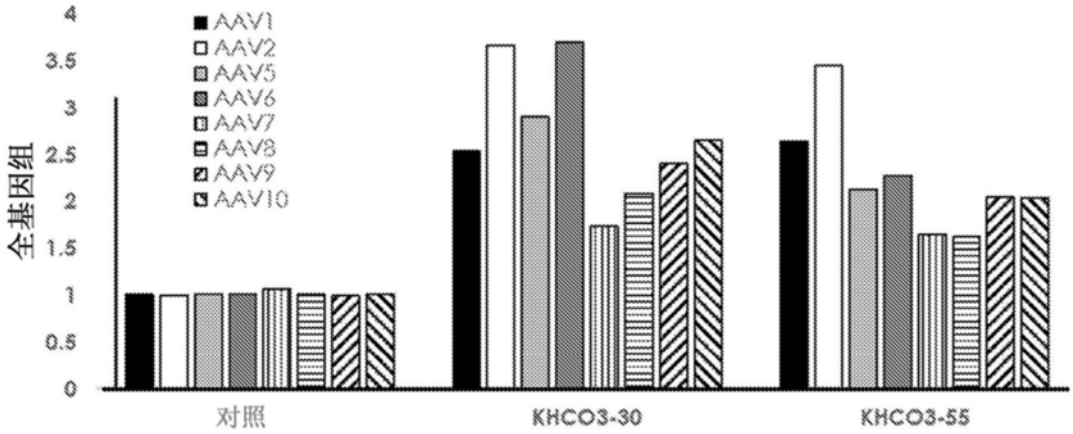

AAV1
AAV2
AAV5
AAV6
AAV7
AAV8
AAV9
AAV10
全基因组
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照
KHCO3-30
KHCO3-55

图11B

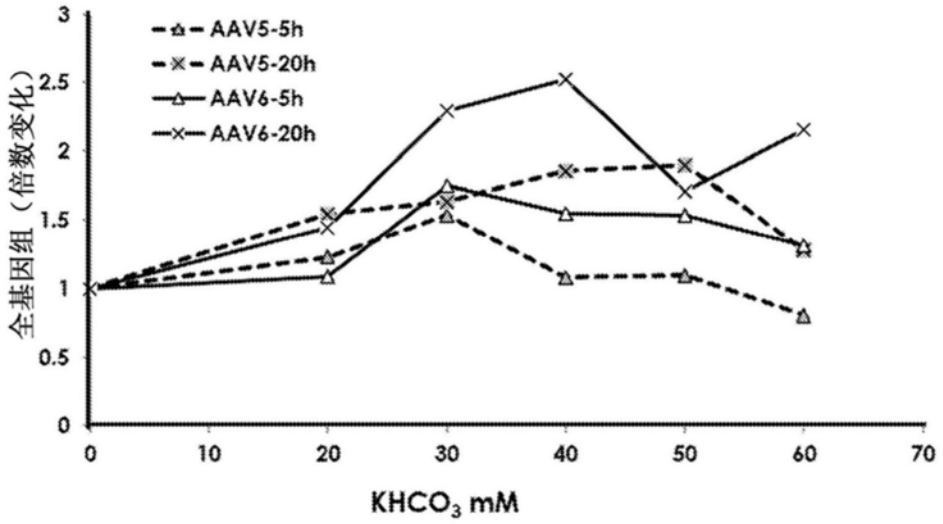

AAV5-5h
AAV5-20h
AAV6-5h
AAV6-20h
全基因组（倍数变化）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
KHCO3 mM

图12