



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119487197 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 18

(21) 申请号 202280091862.2

(22) 申请日 2022.12.20

(30) 优先权数据

63/291,871 2021.12.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/082078 2022.12.20

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/122625 EN 2023.06.29

(71) 申请人 阿尔德夫隆有限责任公司

地址 美国北达科他州

(72) 发明人 金·许 乔迪·肯尼迪

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658

专利代理师 王怡瑾 黄幸兒

(51) Int.Cl.

C12N 15/75 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

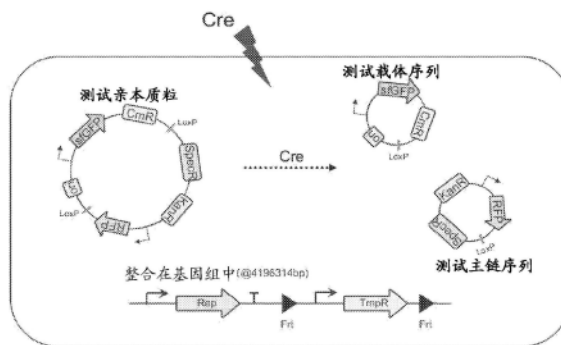
权利要求书7页 说明书68页 附图22页

(54) 发明名称

在工程化细菌中生产基因疗法载体

(57) 摘要

本文提供了用于生产环状DNA载体的工程化细菌细胞的改进方法、通过此类方法生产的环状DNA载体以及含有此类环状DNA载体的药物组合物。本文提供的方法适合于环状DNA载体的高纯度组合物的大规模生产。



1. 一种工程化细菌细胞,其包含:
 - (a) 整合到细菌基因组中的编码细菌复制蛋白的Rep基因;
 - (b) 环状DNA载体,其包含:
 - (i) 编码序列;和
 - (ii) 依赖于所述复制蛋白的复制起点。
2. 如权利要求1所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点的长度小于50个碱基对。
3. 如权利要求1或2所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点和所述复制蛋白来自ColE2相关质粒。
4. 如权利要求3所述的工程化细菌细胞,其中所述ColE2相关质粒是ColE2-P9。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。
6. 如权利要求5所述的工程化细菌细胞,其中所述第一诱导型启动子是T7 RNA聚合酶依赖性启动子。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含整合到所述细菌基因组中的编码T7 RNA聚合酶(T7RNAP)的基因。
8. 如权利要求7所述的工程化细菌细胞,其中所述T7RNAP基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。
9. 如权利要求8所述的工程化细菌细胞,其中所述第二诱导型启动子是Ptac。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含整合到所述细菌基因组中的编码外源限制性酶的基因。
11. 如权利要求10所述的工程化细菌细胞,其中所述编码所述外源限制性酶的基因操作性地偶联至第三诱导型启动子。
12. 如权利要求11所述的工程化细菌细胞,其中所述第三诱导型启动子是Pbad。
13. 如权利要求11或12所述的工程化细菌细胞,其中所述细菌基因组不包含所述外源限制性酶的识别序列。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述编码序列编码治疗性基因或核酸。
15. 如权利要求1至14中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述编码序列是真核序列。
16. 如权利要求1至15中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点是所述环状DNA载体中的唯一细菌序列。
17. 如权利要求1至16中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述工程化细菌细胞包含所述环状DNA载体的至少20个拷贝。
18. 如权利要求1至17中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述工程化细菌细胞能够在至少20轮细胞分裂中维持所述环状DNA载体。
19. 如权利要求1至18中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述工程化细菌细胞不包含除所述环状DNA载体的一个或多个拷贝之外的任何基因组外环状DNA分子。
20. 一种培养物,其包含多个如权利要求1至19中任一项所述的工程化细菌细胞,其中每个工程化细菌细胞的环状DNA载体的平均拷贝数为至少10。

21. 如权利要求20所述的培养物,其包含至少 10^7 个工程化细菌细胞。
22. 一种工程化细菌细胞,其包含:
 - (a) 整合到细菌基因组中的编码细菌复制蛋白的Rep基因;
 - (b) 质粒,其包含:
 - (i) 包含编码序列和依赖于所述细菌复制蛋白的复制起点的第一区段,其中所述第一区段不包含选择性标记;以及
 - (ii) 包含选择性标记的第二区段;其中所述第一区段侧接至少一种外源限制性酶或外源重组酶的认识序列。
23. 如权利要求22所述的工程化细菌细胞,其中侧接所述第一区段的所述认识序列是相同的。
24. 如权利要求22所述的工程化细菌细胞,其中侧接所述第一区段的所述认识序列是不同的。
25. 如权利要求22所述的工程化细菌细胞,其中所述第二区段还包含复制起点,其中所述第二区段中的所述复制起点与所述第一区段中的所述复制起点直向同源。
26. 如权利要求22所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点的长度小于50个碱基对。
27. 如权利要求22所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点和所述复制蛋白来自ColE2相关质粒。
28. 如权利要求22所述的工程化细菌细胞,其中所述ColE2相关质粒是ColE2-P9。
29. 如权利要求22至27中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。
30. 如权利要求29所述的工程化细菌细胞,其中所述第一诱导型启动子是T7 RNA聚合酶依赖性启动子。
31. 如权利要求22至30中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含整合到所述细菌基因组中的编码T7 RNA聚合酶(T7RNAP)的基因。
32. 如权利要求31所述的工程化细菌细胞,其中所述T7RNAP基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。
33. 如权利要求32所述的工程化细菌细胞,其中所述第二诱导型启动子是Ptac。
34. 如权利要求22至33中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含整合到所述细菌基因组中的编码所述外源限制性酶或外源重组酶的基因。
35. 如权利要求34所述的工程化细菌细胞,其中所述编码所述外源限制性酶或外源重组酶的基因操作性地偶联至第三诱导型启动子。
36. 如权利要求35所述的工程化细菌细胞,其中所述第三诱导型启动子是Pbad。
37. 如权利要求22至36中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述细菌基因组不包含所述外源限制性酶或所述外源重组酶的认识序列。
38. 如权利要求22至37中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述编码序列编码治疗性基因或核酸。
39. 如权利要求1至19中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述编码序列是真核序列。
40. 如权利要求22至39中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含外源限制性酶或外

源重组酶。

41. 一种制备环状DNA载体的方法,所述方法包括:

(a) 使细菌细胞内的质粒与外源限制性酶接触,以从所述质粒上切除第一区段,其中所述第一区段侧接所述外源限制性酶的识别序列,并且其中所述第一区段包含编码序列和依赖于细菌复制蛋白的复制起点,从而产生包含5'末端和3'末端以及互补突出端的线性DNA片段;以及

(b) 将所述线性DNA片段的5'末端和3'末端连接在一起以产生所述环状DNA载体。

42. 如权利要求41所述的方法,其中在步骤(a)之前,所述质粒包含含有选择性标记的第二区段。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述第二区段还包含复制起点,其中所述第二区段中的复制起点与所述第一区段中的复制起点直向同源。

44. 如权利要求41至43中任一项所述的方法,其中所述第一区段不包含选择性标记。

45. 如权利要求41至44中任一项所述的方法,其中使所述细胞内的所述质粒与所述外源限制性酶接触包含诱导所述外源限制性酶在所述细胞内的表达。

46. 如权利要求45所述的方法,其中将编码所述外源限制性酶的基因整合到操作性地偶联至诱导型启动子的细菌基因组中。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述诱导型启动子是 P_{bad} ,并且其中诱导所述外源限制性酶在所述细胞内的表达包括向所述细胞提供阿拉伯糖。

48. 如权利要求41至44中任一项所述的方法,其中使所述细胞内的所述质粒与所述外源限制性酶接触包含将所述外源限制性酶从所述细菌细胞外部引入所述细胞中。

49. 如权利要求41至48中任一项所述的方法,其中所述连接通过外源连接酶进行。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述外源连接酶由整合到所述细菌基因组中的基因表达。

51. 如权利要求50所述的方法,其中将所述外源连接酶从所述细菌细胞外部引入所述细菌细胞中。

52. 如权利要求41至51中任一项所述的方法,其中所述细菌细胞包含整合到所述基因组中的编码所述细菌复制蛋白的Rep基因。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述Rep基因操作性地偶联至能够以第一表达水平和第二表达水平表达所述细菌复制蛋白的诱导型启动子,其中所述第一表达水平低于所述第二表达水平。

54. 如权利要求53所述的方法,其中所述细菌复制蛋白的第一表达水平使所述复制起点维持在第一拷贝数,并且其中所述细菌复制蛋白的第二表达水平使所述复制起点维持在第二拷贝数,其中所述第一拷贝数低于5个、10个、15个、20个或50个拷贝/细胞,并且所述第二拷贝数为至少20个、50个、100个或200个拷贝/细胞。

55. 如权利要求53所述的方法,其中所述细菌复制基因在步骤(b)之前以所述第一表达水平表达,并且在步骤(b)之前不以所述第二表达水平表达。

56. 如权利要求54或55所述的方法,其中所述细菌复制基因在步骤(b)之后以所述第二表达水平表达。

57. 如权利要求53至56中任一项所述的方法,其中所述诱导型启动子是依赖于T7 RNA

聚合酶的PT7。

58. 如权利要求41至57中任一项所述的方法,其中所述细菌细胞包含整合到基因组中的编码T7 RNA聚合酶的基因(T7RNAP)。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述T7RNAP基因操作性地偶联至诱导型启动子。

60. 如权利要求59所述的方法,其中所述诱导型启动子是 P_{tac} 。

61. 如权利要求60所述的方法,其中所述质粒的第二区段还包含编码能够抑制来自所述 P_{tac} 启动子的表达的乳糖抑制蛋白的LacI基因,并且其中所述细菌复制基因的表达通过所述乳糖抑制蛋白的表达维持在所述第一表达水平或低于所述第一表达水平。

62. 如权利要求61所述的方法,其中在步骤(b)之后,所述乳糖抑制蛋白的表达减少,从而诱导所述细菌复制基因以所述第二表达水平表达,并且使所述环状DNA载体维持在所述第二拷贝数。

63. 如权利要求41至62中任一项所述的方法,其还包括在持续生长不需要所述质粒上的所述选择性标记的条件下培养所述细胞,从而产生缺乏所述选择性标记的所述细菌细胞的子代群体。

64. 如权利要求63所述的方法,其中在至少50次倍增后,所述群体将所述环状DNA载体维持在至少20个拷贝/细胞的平均拷贝数。

65. 如权利要求63或64所述的方法,其还包括纯化所述环状DNA载体。

66. 如权利要求41至65中任一项所述的方法,其中所述复制起点的长度小于50个碱基对。

67. 如权利要求41至66中任一项所述的方法,其中所述复制起点和所述复制蛋白来自Co1E2相关质粒。

68. 如权利要求67所述的方法,其中所述Co1E2相关质粒是Co1E2-P9。

69. 一种制备环状DNA载体的方法,所述方法包括:

(a) 获得如权利要求22至40中任一项所述的工程化细菌细胞;

(b) 使质粒与外源限制性酶接触以切除所述质粒的第一区段,从而产生侧接互补突出端的线性DNA片段;以及

(c) 自我连接所述线性DNA片段以产生所述环状DNA载体。

70. 一种制备环状DNA载体的方法,所述方法包括:

(a) 获得如权利要求22至40中任一项所述的工程化细菌细胞;

(b) 使质粒与识别侧接第一区段的识别序列的外源重组酶接触。

71. 一种药物组合物,其包含:

(a) 通过如权利要求41至70中任一项所述的方法产生的环状DNA载体;以及

(b) 用于向受试者递送所述药物组合物的合适载剂。

72. 一种工程化细菌细胞,其包含含有编码序列和长度小于50个碱基对的复制起点的环状DNA载体,其中所述环状DNA载体缺乏选择性标记。

73. 如权利要求72所述的工程化细菌细胞,其中所述工程化细菌细胞不包含除所述环状DNA载体的一个或多个拷贝之外的任何基因组外DNA分子。

74. 如权利要求72或73所述的工程化细菌细胞,其中所述工程化细菌细胞不包含编码选择性标记的基因。

75. 如权利要求72至74中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述工程化细菌细胞不包含基因组外DNA分子上的选择性标记。

76. 如权利要求72至75中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点来自ColE2-P9质粒。

77. 如权利要求72至76中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含编码识别复制起点的细菌复制蛋白的Rep基因。

78. 如权利要求77所述的工程化细菌细胞,其中所述Rep基因来自ColE2-P9质粒。

79. 如权利要求77或78所述的工程化细菌细胞,其中将所述Rep基因整合到所述细菌基因组中。

80. 如权利要求77至79中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述Rep基因操作性地偶联至诱导型启动子。

81. 如权利要求72至80中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述环状DNA载体还包含重组位点。

82. 如权利要求72至81中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述环状DNA载体不包含除所述复制起点和所述重组位点(当存在时)之外的任何细菌[或其他原核或噬菌体]序列。

83. 如权利要求81所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点和所述重组位点一起的长度不超过90个碱基对。

84. 如权利要求72至83中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含编码重组酶的基因。

85. 如权利要求72至83中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述细菌细胞包含所述环状DNA载体的至少10个拷贝。

86. 一种工程化细菌细胞,其包含质粒,所述质粒包含:

(a) 包含编码序列和长度小于50个碱基对的复制起点的第一区段,其中所述第一区段不包含选择性标记;以及

(b) 包含选择性标记的第二区段;

其中所述第一区段侧接外源重组酶的识别序列。

87. 如权利要求86所述的工程化细菌细胞,其还包含编码Rep基因的基因,所述Rep基因编码识别所述复制起点的细菌复制蛋白。

88. 如权利要求87所述的工程化细菌细胞,其中将所述Rep基因整合到所述细菌基因组中。

89. 如权利要求87或88所述的工程化细菌细胞,其中所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。

90. 如权利要求87至89中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述复制起点和所述复制蛋白来自ColE2相关质粒。

91. 如权利要求87至90中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述ColE2相关质粒是ColE2-P9。

92. 如权利要求86至91中任一项所述的工程化细菌细胞,其还包含编码所述外源重组酶的基因。

93. 如权利要求92所述的工程化细菌细胞,其中将所述编码所述外源重组酶的基因整合到所述细菌基因组中。

94. 如权利要求92所述的工程化细菌细胞,其中所述编码所述外源重组酶的基因在质粒或细菌人工染色体上。

95. 如权利要求92至94中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述编码外源重组酶的基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。

96. 如权利要求95所述的工程化细菌细胞,其中所述第二诱导型启动子是枯茗酸诱导型启动子。

97. 如权利要求92至96中任一项所述的工程化细菌细胞,其中所述重组酶是Bxb1。

98. 如权利要求97所述的工程化细菌细胞,其中所述识别序列包含attP-GA和attB-GA。

99. 一种制备环状DNA载体的方法,其包括在如权利要求86至98中任一项所述的工程化细菌细胞中诱导所述质粒的重组。

100. 如权利要求99所述的方法,其中诱导所述质粒的重组包括诱导所述外源重组酶在所述工程化细菌细胞中的表达。

101. 一种产生环状DNA载体的方法,所述方法包括在工程化细菌细胞中诱导质粒的重组,其中:

(a) 所述质粒包含:

(i) 包含编码序列和长度小于50个碱基对的复制起点的第一区段,其中所述第一区段不包含选择性标记,其中所述第一区段侧接外源重组酶的识别序列;以及

(ii) 包含选择性标记的第二区段;以及

(b) 所述工程化细菌细胞包含编码所述外源重组酶的基因;

其中所述诱导引起所述质粒的重组,从而产生包含所述第一区段的所述环状DNA载体。

102. 如权利要求101所述的方法,其中所述工程化细菌细胞还包含编码识别复制起点的细菌复制蛋白的Rep基因。

103. 如权利要求101或102所述的方法,其中将所述Rep基因整合到所述细菌基因组中。

104. 如权利要求102或103所述的方法,其中所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。

105. 如权利要求101至104中任一项所述的方法,其中所述复制起点是ColE2-P9复制起点。

106. 如权利要求102至105中任一项所述的方法,其中所述Rep基因是ColE2-P9 Rep基因。

107. 如权利要求101至106中任一项所述的方法,其中所述外源重组酶位于质粒或细菌人工染色体上。

108. 如权利要求101至107中任一项所述的方法,其中所述编码所述外源重组酶的基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。

109. 如权利要求108所述的方法,其中诱导所述质粒的重组包括诱导所述编码所述外源重组酶的基因的表达。

110. 如权利要求101至108中任一项所述的方法,其中所述诱导所述质粒的重组包括将所述质粒引入所述工程化细菌细胞中,其中所述外源重组酶在所述引入时在所述工程化细菌细胞中表达。

111. 如权利要求110所述的方法,其中所述外源重组酶在所述引入时以非诱导水平表

达。

112. 如权利要求101至111中任一项所述的方法,其中所述外源重组酶是Bxb1,并且所述识别序列包含attP-GA和attB-GA。

113. 如权利要求112所述的方法,其中编码Bxb1的基因操作性地偶联至枯茗酸诱导型启动子,所述工程化细菌细胞在所述引入时维持在不存在枯茗酸的情况下,并且所述Bxb1在所述引入时以非诱导水平表达。

114. 一种药物组合物,其包含:

- (a) 通过如权利要求99至113中任一项所述的方法产生的环状DNA载体;以及
- (b) 用于向受试者递送所述药物组合物的合适载剂。

115. 一种环状DNA载体,其包含:

- (a) 真核启动子;
 - (b) 真核编码序列;以及
 - (c) 长度小于50bp的细菌复制起点,
- 其中所述环状DNA载体缺乏选择性标记。

116. 如权利要求115所述的环状DNA载体,其中所述真核编码序列的3'末端通过包含所述细菌复制起点的序列连接至所述启动子的5'末端,其中所述包含所述细菌复制起点的序列长度小于100bp。

117. 一种药物组合物,其包含:

- (d) 如权利要求115或116中任一项所述的环状DNA载体;以及
- (e) 用于向受试者递送所述药物组合物的合适载剂。

118. 一种宿主细胞,其包含如权利要求115或116中任一项所述的环状DNA载体。

119. 如权利要求118所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

120. 如权利要求118或119所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是人细胞。

121. 如权利要求117至120中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是体外分离的。

在工程化细菌中生产基因疗法载体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2021年12月20日提交的美国临时申请第63/291,871号的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 总的来说,本公开涉及工程化细菌中的治疗性载体。

背景技术

[0004] 基因疗法正在成为治疗人类患者的多种疾病和病症的一种有前景的方法。重组腺相关病毒(rAAV)载体在人类患者和多种模型系统中具有高效基因转移的良好记录。rAAV载体的基因组的优势在于它们作为环状附加体在靶细胞的生命周期内在体内持久存在的能力。在另一方面,基于rAAV的载体存在很多的缺点,诸如有限的最大有效负载、免疫原性以及制备效率。

[0005] 为了解决rAAV技术中的这些挑战中的一些,非病毒替代物近年来得到了广泛的关注。然而,开发具有rAAV的效率和持久性的可扩大的非病毒基因治疗平台被证明是难以实现的。例如,传统的细菌质粒DNA载体代表了基因递送中的通用工具,但受限于质粒DNA载体中丰富的细菌组分,诸如抗生素抗性基因和转录调控元件,其可通过转录沉默导致免疫原性和基因表达丧失。

[0006] 尽管有各种努力通过去除主链组分来改进质粒DNA载体,但仍需要具有最少细菌元件的非病毒载体和大规模有效生产它们的方法。

发明内容

[0007] 本文公开了细菌产生的环状DNA载体(例如,治疗性环状DNA载体)和细菌细胞(例如,工程化细菌细胞),其可用于从亲本质粒,例如细菌细胞(例如,工程化细菌细胞)内的亲本质粒产生它们。本文提供的治疗性环状DNA载体包含小的(例如,少于50个碱基对)复制起点,并且缺乏选择标记(例如,抗生素抗性基因),这可以降低载体中外源序列引入的风险。因此,此类细菌产生的环状DNA载体可以有效地和大规模生产以用于治疗应用。

[0008] 本文公开的实施方案包括一种工程化细菌细胞,其包含:(a)整合到细菌基因组中的编码细菌复制蛋白的Rep基因;(b)环状DNA载体,其包含:(i)编码序列;以及(ii)依赖于复制蛋白的复制起点;其中所述环状DNA载体不包含选择性标记。在一些实施方案中,所述复制起点的长度小于50个碱基对。在一些实施方案中,所述复制起点和复制蛋白来自Co1E2相关质粒。在一些实施方案中,所述Co1E2相关质粒是Co1E2-P9。

[0009] 在一些实施方案中,所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第一诱导型启动子是T7 RNA聚合酶依赖性启动子。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含整合到细菌基因组中的编码T7 RNA聚合酶(T7RNAP)的基因。在一些实施方案中,所述T7RNAP基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第

二诱导型启动子是Ptac。

[0010] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含整合到细菌基因组中的编码外源限制性酶的基因。在一些实施方案中,编码外源限制性酶的基因操作性地偶联至第三诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第三诱导型启动子是Pbad。在一些实施方案中,所述细菌基因组不包含外源限制性酶的识别序列。

[0011] 在一些实施方案中,编码环状DNA载体的编码序列包含治疗性基因或核酸。在一些实施方案中,所述编码序列是真核序列(例如,可在哺乳动物细胞中表达的序列)。

[0012] 在一些实施方案中,所述复制起点是环状DNA载体中唯一的细菌序列。

[0013] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞包含环状DNA载体的至少20个拷贝。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞能够在至少20轮细胞分裂中维持环状DNA载体。

[0014] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞不包含除环状DNA载体的一个或多个拷贝之外的任何基因组外环状DNA分子。

[0015] 本文公开的实施方案包括一种培养物,其包含多个本文所述的任何工程化细菌细胞,其中每个工程化细菌细胞的环状DNA载体的平均拷贝数为至少10。在一些实施方案中,培养物含有至少 10^7 个工程化细菌细胞。

[0016] 本文公开的实施方案包括一种工程化细菌细胞,其包含:(a)整合到细菌基因组中的编码细菌复制蛋白的Rep基因;(b)质粒,其包含:(i)包含编码序列和依赖于细菌复制蛋白的复制起点的第一区段,其中所述第一区段不包含选择性标记;以及(ii)包含选择性标记的第二区段;其中所述第一区段侧接至少一种外源限制性酶或外源重组酶的识别序列。在一些实施方案中,侧接第一区段的识别序列是相同的。在一些实施方案中,侧接第一区段的识别序列是不同的。在一些实施方案中,所述第二区段还包含复制起点,其中第二区段中的复制起点与第一区段中的复制起点直向同源。

[0017] 在一些实施方案中,所述复制起点的长度小于50个碱基对。在一些实施方案中,所述复制起点和复制蛋白来自ColE2相关质粒。在一些实施方案中,所述ColE2相关质粒是ColE2-P9。

[0018] 在一些实施方案中,所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第一诱导型启动子是T7 RNA聚合酶依赖性启动子。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含整合到细菌基因组中的编码T7 RNA聚合酶(T7RNAP)的基因。在一些实施方案中,所述T7RNAP基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第二诱导型启动子是Ptac。

[0019] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含整合到细菌基因组中的编码外源限制性酶或外源重组酶的基因。在一些实施方案中,编码外源限制性酶或外源重组酶的基因操作性地偶联至第三诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第三诱导型启动子是Pbad。在一些实施方案中,所述细菌基因组不包含外源限制性酶或外源重组酶的识别序列。

[0020] 在一些实施方案中,第一区段的编码序列编码治疗性基因或核酸。在一些实施方案中,所述编码序列是真核序列(例如,可在哺乳动物细胞中表达的序列)。

[0021] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含外源限制性酶或外源重组酶。

[0022] 本文公开的实施方案包括一种制备环状DNA载体的方法,所述方法包括:(a)使细菌细胞内的质粒与外源限制性酶接触,以从所述质粒上切除第一区段,其中所述第一区段

侧接外源限制性酶的识别序列,并且其中所述第一区段包含编码序列和依赖于细菌复制蛋白的复制起点,从而产生包含5'末端和3'末端以及互补突出端的线性DNA片段;以及(b)将线性DNA片段的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状DNA载体。在一些实施方案中,在步骤(a)之前,所述质粒包含含有选择性标记的第二区段。在一些实施方案中,所述第二区段还包含复制起点,其中第二区段中的复制起点与第一区段中的复制起点直向同源。在一些实施方案中,所述第一区段不包括选择性标记。

[0023] 在一些实施方案中,使细胞内的质粒与外源限制性酶接触包括诱导外源限制性酶在细胞内的表达。在一些实施方案中,将编码外源限制性酶的基因整合到操作性地偶联至诱导型启动子的细菌基因组中。在一些实施方案中,所述诱导型启动子是 P_{bad} ,并且诱导外源限制性酶在细胞内的表达包括向细胞提供阿拉伯糖。在一些实施方案中,使细胞内的质粒与外源限制性酶接触包括将外源限制性酶从细菌细胞外部引入细胞中。

[0024] 在一些实施方案中,通过外源连接酶进行连接。在一些实施方案中,外源连接酶由整合到细菌基因组中的基因表达。在一些实施方案中,将外源连接酶从细菌细胞外部引入细菌细胞中。

[0025] 在一些实施方案中,所述细菌细胞包含整合到基因组中的编码细菌复制蛋白的Rep基因。在一些实施方案中,所述Rep基因操作性地偶联至能够以第一表达水平和第二表达水平表达细菌复制蛋白的诱导型启动子,其中第一表达水平低于第二表达水平。在一些实施方案中,细菌复制蛋白的第一表达水平使复制起点维持在第一拷贝数,并且细菌复制蛋白的第二表达水平使复制起点维持在第二拷贝数,其中第一拷贝数低于5个、10个、15个、20个或50个拷贝/细胞,并且第二拷贝数为至少20个、50个、100个或200个拷贝/细胞。在一些实施方案中,所述细菌复制基因在步骤(b)之前以第一表达水平表达,并且在步骤(b)之前不以第二表达水平表达。在一些实施方案中,所述细菌复制基因在步骤(b)之后以第二表达水平表达。在一些实施方案中,所述诱导型启动子是依赖于T7 RNA聚合酶的PT7。在一些实施方案中,所述细菌细胞包含整合到基因组中的编码T7 RNA聚合酶的基因(T7RNAP)。在一些实施方案中,所述T7RNAP基因操作性地偶联至诱导型启动子。在一些实施方案中,所述诱导型启动子是 P_{tac} 。在一些实施方案中,质粒的第二区段还包含编码能够抑制来自 P_{tac} 启动子的表达的乳糖抑制蛋白的LacI基因,并且其中细菌复制基因的表达通过乳糖抑制蛋白的表达维持在第一表达水平或低于第一表达水平。在一些实施方案中,在步骤(b)后,乳糖抑制蛋白的表达减少,从而诱导细菌复制基因以第二表达水平表达,并且使环状DNA载体维持在第二拷贝数。

[0026] 在一些实施方案中,制备环状DNA载体的方法还包括在持续生长不需要质粒上的选择性标记的条件下培养细胞,从而产生缺乏选择性标记的细菌细胞子代群体。在一些实施方案中,在至少50次倍增后,群体维持环状DNA载体。在一些实施方案中,在至少100次倍增后,例如至少150次倍增、至少200次倍增、至少250次倍增或至少290次倍增后,群体维持环状DNA载体。在一些实施方案中,在至少50次倍增后,群体将环状DNA载体维持在至少20个拷贝/细胞的平均拷贝数。在一些实施方案中,在至少100次倍增后,群体将环状DNA载体维持在至少20个拷贝/细胞的平均拷贝数。在一些实施方案中,在至少150次倍增、至少200次倍增、至少250次倍增或至少290次倍增后,群体将环状DNA载体维持在至少20个拷贝/细胞的平均拷贝数。在一些实施方案中,所述方法还包括纯化环状DNA载体。

[0027] 在一些实施方案中,所述复制起点的长度小于50个碱基对(例如,长度小于45个碱基对,或长度为约40个碱基对)。在一些实施方案中,所述复制起点和复制蛋白来自Co1E2相关质粒。在一些实施方案中,所述Co1E2相关质粒是Co1E2-P9。在一些实施方案中,所述复制起点包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:2(或反向互补序列)或其功能变体(例如,与SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:2具有至少92%序列同一性、与SEQ ID NO:2具有至少94%序列同一性、与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性、与SEQ ID NO:2具有至少96%序列同一性、与SEQ ID NO:2具有至少97%序列同一性、与SEQ ID NO:2具有至少98%序列同一性、与SEQ ID NO:2具有至少99%序列同一性或与SEQ ID NO:2具有100%序列同一性))的功能变体。在一些实施方案中,所述复制起点包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:3(或反向互补序列)或其功能变体(例如,与SEQ ID NO:3具有至少90%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:3具有至少92%序列同一性、与SEQ ID NO:3具有至少94%序列同一性、与SEQ ID NO:3具有至少95%序列同一性、与SEQ ID NO:3具有至少96%序列同一性、与SEQ ID NO:3具有至少97%序列同一性、与SEQ ID NO:3具有至少98%序列同一性、与SEQ ID NO:3具有至少99%序列同一性或与SEQ ID NO:3具有100%序列同一性))的功能变体。在一些实施方案中,所述复制起点包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:4(或反向互补序列)或其功能变体(例如,与SEQ ID NO:4具有至少90%序列同一性(例如,与SEQ ID NO:4具有至少92%序列同一性、与SEQ ID NO:4具有至少94%序列同一性、与SEQ ID NO:4具有至少95%序列同一性、与SEQ ID NO:4具有至少96%序列同一性、与SEQ ID NO:4具有至少97%序列同一性、与SEQ ID NO:4具有至少98%序列同一性、与SEQ ID NO:4具有至少99%序列同一性或与SEQ ID NO:4具有100%序列同一性))的功能变体。

[0028] 本文公开的实施方案包括一种制备环状DNA载体的方法,所述方法包括:(a)获得本文所述的包含亲本质粒的任何工程化细菌细胞,所述亲本质粒包含第一区段,所述第一区段包含编码序列和依赖于细菌复制蛋白的复制起点,其中所述第一区段不包含选择性标记,并且其中所述第一区段侧接至少一种外源限制性酶的识别序列;以及(b)使质粒与外源限制性内切酶接触以切除质粒的第一区段,从而产生侧接互补突出端的线性DNA片段;以及(c)自我连接线性DNA片段以产生环状DNA载体。

[0029] 本文公开的实施方案包括一种制备环状DNA载体的方法,所述方法包括:(a)获得本文所述的包含亲本质粒的任何工程化细菌细胞,所述亲本质粒包含第一区段,所述第一区段包含编码序列和依赖于细菌复制蛋白的复制起点,其中所述第一区段不包含选择性标记,并且其中所述第一区段侧接至少一种外源重组酶的识别序列;(b)使质粒与识别侧接第一区段的识别序列的外源重组酶接触。

[0030] 本文公开的实施方案包括一种药物组合物,其包含(a)通过本文所述的任何方法产生的环状DNA载体;以及(b)用于向受试者递送药物组合物的合适载剂。

[0031] 在另一方面,提供了一种工程化细菌细胞(例如,大肠杆菌(*E. coli*)),其包含含有编码序列和长度小于50个碱基对的复制起点的环状DNA载体,其中所述环状DNA载体缺乏选择性标记。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞不包含除环状DNA载体的一个或多个拷贝之外的任何基因组外DNA分子。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞不包含编码选择性标记的基因。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞不包含基因组外DNA分子上的选择性标记。在一些实施方案中,所述复制起点来自Co1E2相关质粒(例如,Co1E2-P9质粒)。在一

些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包括编码识别复制起点的细菌复制蛋白的Rep基因(例如,Rep基因来自ColE2-P9质粒(例如,SEQ ID NO:1))。在一些实施方案中,将Rep基因整合到细菌基因组中。在一些实施方案中,所述Rep基因操作性地偶联至诱导型启动子。

[0032] 在一些实施方案中,所述环状DNA载体还包含重组位点(例如,attL位点(例如,attL-GA)或attR位点)。

[0033] 在一些实施方案中,所述环状DNA载体不包含除复制起点和重组位点(当存在时)之外的任何细菌(或其他原核或噬菌体)序列。在一些实施方案中,复制起点和重组位点一起的长度不超过90个碱基对。

[0034] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包括编码重组酶的基因。

[0035] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞包含环状DNA载体的至少10个拷贝。

[0036] 另一方面,本文提供了一种工程化细菌细胞,其包含质粒,所述质粒包含:(a)包含编码序列和长度小于50个碱基对的复制起点的第一区段,其中所述第一区段不包含选择性标记;以及(b)包含选择性标记的第二区段;其中第一区段侧接外源重组酶的识别序列。在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包括编码Rep基因的基因,所述Rep基因编码识别复制起点的细菌复制蛋白。在一些实施方案中,将Rep基因整合到细菌基因组中。在一些实施方案中,所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。

[0037] 在一些实施方案中,复制起点和复制蛋白来自ColE2相关质粒,例如ColE2-P9。

[0038] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含编码外源重组酶的基因。在一些实施方案中,将编码外源重组酶的基因整合到细菌基因组中。在一些实施方案中,编码外源重组酶的基因位于质粒或细菌人工染色体上。在一些实施方案中,编码外源重组酶的基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。在一些实施方案中,所述第二诱导型启动子是枯茗酸诱导型启动子(cuminic acid-inducible promoter)。

[0039] 在一些实施方案中,所述重组酶是Bxb1。在一些实施方案中,所述识别序列包含attP-GA和attB-GA。

[0040] 另一方面,本文提供了一种制备环状DNA载体的方法,其中所述方法包括在前述方面中的任一者的工程化细菌细胞中诱导质粒的重组。在一些实施方案中,诱导质粒的重组包括诱导外源重组酶在工程化细菌细胞中的表达。

[0041] 在另一方面,提供了一种产生环状DNA载体的方法,所述方法包括在工程化细菌细胞中诱导质粒的重组,其中:(a)所述质粒包含:(i)包含编码序列和长度小于50个碱基对的复制起点的第一区段,其中所述第一区段不包含选择性标记,其中所述第一区段侧接外源重组酶的识别序列;以及(ii)包含选择性标记的第二区段;以及(b)所述工程化细菌细胞包含编码外源重组酶的基因;其中所述诱导引起质粒的重组,从而产生包含第一区段的环状DNA载体。

[0042] 在一些实施方案中,所述工程化细菌细胞还包含编码识别复制起点的细菌复制蛋白的Rep基因。在一些实施方案中,将Rep基因整合到细菌基因组中。在一些实施方案中,所述Rep基因操作性地偶联至第一诱导型启动子。

[0043] 在一些实施方案中,复制起点是ColE2-P9复制起点和/或Rep基因是ColE2-P9 Rep基因。

[0044] 在一些实施方案中,所述外源重组酶位于质粒或细菌人工染色体上。在一些实施

方案中,其中编码外源重组酶的基因操作性地偶联至第二诱导型启动子。

[0045] 在一些实施方案中,诱导质粒的重组包括诱导编码外源重组酶的基因的表达。在一些实施方案中,诱导质粒的重组包括将质粒引入工程化细菌细胞中,其中外源重组酶在引入时在工程化细菌细胞中表达。在一些实施方案中,所述外源重组酶在引入时以非诱导水平表达。

[0046] 在一些实施方案中,所述外源重组酶是Bxb1,并且识别序列包含attP-GA和attB-GA。在一些实施方案中,编码Bxb1的基因操作性地偶联至枯茗酸诱导型启动子,所述工程化细菌细胞在引入时维持在不存在枯茗酸的情况下,并且所述Bxb1在引入时以非诱导水平表达。

[0047] 在另一方面,提供了一种环状DNA载体(例如,工程化环状DNA载体),其包含(a)真核启动子;(b)真核编码序列;以及(c)长度小于50bp的细菌复制起点,其中环状DNA载体缺乏选择性标记。在一些实施方案中,所述真核编码序列的3'末端通过包含细菌复制起点的序列连接至启动子的5'末端,其中包含细菌复制起点的序列长度小于100bp。在一些实施方案中,所述环状DNA载体是单体超螺旋的。

[0048] 另一方面,提供了一种药物组合物,其包含环状DNA载体,所述环状DNA载体包含(a)真核启动子;(b)真核编码序列;以及(c)长度小于50bp的细菌复制起点,其中环状DNA载体缺乏选择性标记。在一些实施方案中,所述真核编码序列的3'末端通过包含细菌复制起点的序列连接至启动子的5'末端,其中包含细菌复制起点的序列长度小于100bp。

[0049] 在另一方面,提供了一种宿主细胞(例如哺乳动物细胞,例如人细胞),其包含环状DNA载体,所述环状DNA载体包含(a)真核启动子;(b)真核编码序列;以及(c)长度小于50bp的细菌复制起点,其中环状DNA载体缺乏选择性标记。在一些实施方案中,所述真核编码序列的3'末端通过包含细菌复制起点的序列连接至启动子的5'末端,其中包含细菌复制起点的序列长度小于100bp。在一些实施方案中,所述宿主细胞表达由编码序列编码的蛋白质。在一些实施方案中,所述宿主细胞是体外分离的。在一些实施方案中,通过电穿孔将环状DNA载体转染到宿主细胞中。

附图说明

[0050] 本公开的特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下阐述说明性实施方案的详细描述,将获得对本公开的特征和优点的更好理解,其中利用了本公开的原理,并且在附图中:

[0051] 图1是显示来自稳定性研究的结果的表格,其中测试了三个Co1E2-P9复制起点在大肠杆菌扩增中赋予质粒稳定性的能力。

[0052] 图2说明了可用于本文公开的实施方案中的亲本质粒的组装方法的实例。

[0053] 图3说明了根据本文公开的实施方案生产测试环状DNA载体的实验程序。

[0054] 图4显示了从在含有氯霉素("Cm";泳道7-12)或无氯霉素("无Cm";泳道1-6)的丰富培养基中生长的工程化细菌中纯化的染色体外DNA的琼脂糖凝胶电泳的结果。泳道2、3、5、8、9和11显示对应于由测试亲本质粒重组产生的测试环状DNA载体的条带。泳道1、4、7和10显示了对应于测试亲本质粒的条带。

[0055] 图5是显示在含有或不含氯霉素("Cm")的指定生长培养基中sfGFP阳性细胞的百

分比的图。ZB=发酵肉汤;TB=极品肉汤;SB=超级肉汤;SOB=超优肉汤;SOC=具有分解代谢物阻遏的超最佳肉汤;LB=Luria肉汤。

[0056] 图6是显示使用反向选择产生本发明的环状DNA载体的示例性方法的示意图。

[0057] 图7A至图7F是显示基于细菌人工染色体(BAC)的表达Bxb1以产生环状DNA载体的方法的内容的示意图。图7A是整合到宿主基因组中的Rep基因。图7B和图7C是两种可替代的BAC设计;图7B的Bxb1由枯茗酸诱导型启动子驱动,而图7C的Bxb1由阿拉伯糖诱导型启动子驱动。图7D是模板质粒,其在通过Bxb1重组后,成为图7E的环状DNA载体和图7F的副产物。因为环状DNA载体含有复制起点,并且(任选地)副产物包含PheS反向选择标记,所以当宿主细菌复制和扩增时,环状DNA载体成为优势物种。

[0058] 图8A和图8B是分别显示使用BAC 1696转化后24小时和72小时克隆荧光的照片。

[0059] 图9A和图9B是分别显示使用BAC 1697转化后24小时和72小时克隆荧光的照片。

[0060] 图10是显示与枯茗酸诱导剂接触24小时后克隆的荧光的一组照片。

[0061] 图11是显示与阿拉伯糖诱导剂接触24小时后克隆的荧光的一组照片。

[0062] 图12是显示在各种条件下在LB琼脂板上孵育过夜的重新划线1696菌落的荧光的一系列照片。

[0063] 图13是显示在各种条件下在LB琼脂板上孵育过夜的重新划线1697菌落的荧光的一系列照片。

[0064] 图14是显示1696和1697的反向选择培养物中环状DNA载体的存在的凝胶电泳实验的照片。显示理论条带的消化图显示在照片的左侧。

[0065] 图15A是示例性ABCA4模板质粒的质粒图谱。

[0066] 图15B是由图15A的模板质粒产生的ABCA4环状DNA载体的质粒图谱。

[0067] 图16A是显示实施例7中描述的环状DNA构建体消化物的条带模式的理论凝胶图。图16B是显示对应于图16A的实际条带模式的凝胶的照片。

[0068] 图17A是显示来自使用与模板质粒一起2小时Kan抗性孵育产生的纯化的ABCA4环状DNA载体的长读段测序数据的直方图。主峰是BAC和二聚体环状DNA载体。

[0069] 图17B是显示来自使用与模板质粒一起过夜Kan抗性孵育产生的纯化的ABCA4环状DNA载体的长读段测序数据的直方图。主峰是单体环状DNA载体和BAC。

[0070] 图18是显示用于在细菌宿主中表达Bxb1的辅助质粒的组分的质粒图谱。

[0071] 图19是显示绿色荧光菌落(圆圈)的照片,其含有环状DNA载体,没有通过图18的辅助质粒进行Bxb1表达产生的主链副产物。

[0072] 图20是描绘将Bxb1整合到宿主细胞基因组中的过程的一组图。

[0073] 图21是显示用于Bxb1整合的两个阳性克隆的凝胶的照片。1696质粒对照一式三份地显示在左下方。

[0074] 图22是显示用细菌产生的ABCA4环状DNA载体转染的HEK293T细胞表达ABCA4蛋白的蛋白质印迹(western blot)的照片。

具体实施方式

[0075] 本文提供了用于在工程化细菌细胞内从亲本质粒产生环状DNA载体的改进方法,以及相关组合物。过去,人们努力通过去除主链组分来改进质粒DNA载体。例如,在细菌细胞

中使用重组以从质粒中去除主链来制造微环,从而产生微环载体和环状主链副产物。然而,微环很难大规模生产,因为它们的分离需要从具有类似结构的主链副产物中纯化。通过在载体中包括复制起点和选择性标记,已经设计了替代的载体类型,诸如纳米质粒,以便通过阳性选择更容易地纯化。但是此类外来元件相对较大(通常有数百个碱基对长)并且对患者来说是外源的。

[0076] 本文公开了细菌产生的环状DNA载体(例如,治疗性环状DNA载体)和细菌细胞(例如,工程化细菌细胞),其可用于从亲本质粒,例如细菌细胞(例如,工程化细菌细胞)内的亲本质粒产生它们。本文提供的治疗性环状DNA载体包含小的(例如,少于50个碱基对)复制起点,并且缺乏选择标记(例如,抗生素抗性基因),这可以降低载体中外源序列引入的风险。因此,此类细菌产生的环状DNA载体可以有效地和大规模生产以用于治疗应用。此外,通过消除或减少细菌质粒DNA序列(诸如RNAPII阻滞位点),可以减少或消除环状DNA载体的转录沉默,从而使载体序列在个体中的持久存在。在本发明的具体实施方案中,免疫原性组分(例如,细菌内毒素、DNA或RNA,或细菌标志物,诸如CpG基序)不存在于本发明的环状DNA载体中,或以适合于药物或实验室应用的极低水平存在;因此,刺激宿主免疫响应的风险相对于常规的DNA载体(诸如质粒DNA载体)降低。下面将更详细地讨论所公开的实施方案的这些和其他方面。

[0077] I. 定义

[0078] 如在本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非内容另有明确规定。还应该注意的,除非内容清楚地另外指出,否则术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用。本文使用的术语“和/或”和“它们的任何组合”及其语法等同物可以互换使用。这些术语可以表示任何组合都是特别考虑的。仅出于说明的目的,以下短语“A、B和/或C”或“A、B、C或它们的任何组合”可以表示“单独地A;单独地B;单独地C;A和B;B和C;A和C;以及A、B和C”。术语“或”可以连用或析取使用,除非上下文特别提到析取使用。

[0079] 如在本说明书和权利要求中所使用的,词语“包含(comprising)”(和任何形式的包含,诸如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”)、“具有(having)”(和任何形式的具有,诸如“具有(have)”和“具有(has)”)、“包括(including)”(和任何形式的包括,诸如“包括(includes)”和“包括(include)”)或“含有(containing)”(和任何形式的含有,诸如“含有(contains)”和“含有(contain)”)是包含性的或开放式的,并且不排除附加的、未引用的要素或方法步骤。可以设想,本说明书中讨论的任何实施方案都可以相对于本公开的任何方法或组合物来实施,反之亦然。此外,本公开的组合物可用于实现本公开的方法。

[0080] 说明书中提到的“一些实施方案”、“一个实施方案(an embodiment/one embodiment)”或“其他实施方案”意味着结合实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本公开的至少一些实施方案中,但不一定包括在所有实施方案中。阐述了本说明书的某些具体细节,以便提供对各种实施方案的透彻理解。然而,本领域技术人员将理解,本公开可以在没有这些细节的情况下实施。在其他情况下,没有详细示出或描述众所周知的结构,以避免不必要地模糊对实施方案的描述。

[0081] 如本文所用,“诱导型启动子”指其表达可响应于刺激而被开启或增加的启动子。刺激可以是例如特定分子或培养条件的存在。刺激也可以是例如特定分子或培养条件的缺

乏。如本文所用，“诱导型启动子”包括其表达可以通过去除抑制来自所述启动子的表达的条件（诸如特定分子或其他培养条件的存在）而被开启或增加的启动子。在一些实施方案中，诱导型启动子是T7 RNA聚合酶依赖性启动子、 P_{tac} 启动子、 P_{bad} 启动子、PT7启动子或它们的组合。在一些实施方案中，将诱导型启动子整合到细菌基因组中，并且操作性地连接至基因（诸如例如编码Rep蛋白、限制性内切酶或重组酶的基因）。

[0082] 如本文所用，“外源”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入的或在生物体、细胞、组织或系统外部产生的任何物质。例如，在本文所述的实施方案中，其中外源限制性酶存在于工程化细菌细胞中，外源限制性酶不是在外源限制性酶没有从工程化细菌细胞外部引入工程化细菌细胞中的情况下将存在于工程化细菌细胞中的酶。可以通过例如将编码外源限制性酶的基因引入细菌细胞中或将限制性酶穿过细胞膜引入细胞中（诸如通过电穿孔）将外源限制性酶引入工程化细菌细胞中。本文描述的实施方案还包括例如外源连接酶和重组酶。

[0083] 如本文所用，“亲本质粒”是含有载体序列（如下文所定义）和“主链序列”（如下文所定义）两者的质粒。本文公开的实施方案包括制备环状DNA载体的方法，所述方法包括从载体序列中去除主链序列。

[0084] 如本文所用，亲本质粒的“载体序列”是指包括复制起点和所关注基因的编码序列的质粒DNA的一部分。在本文实施方案的一些描述中，载体序列被称为质粒的“第一区段”。

[0085] 如本文所用，亲本质粒的“主链序列”是指包括一个或多个选择性标记（诸如药物抗性基因或其片段）的载体序列之外的质粒DNA的一部分。在本文实施方案的一些描述中，主链序列被称为质粒的“第二区段”。

[0086] 如本文所用，“复制蛋白”是在对应于复制蛋白的复制序列起点处开始复制所必需的蛋白。如果复制起点依赖于在复制序列起点处开始复制的复制蛋白，则特定的复制序列起点对应于给定的复制蛋白。例如，由ColE2-P9质粒编码的复制蛋白对应于ColE2-P9 ori序列；也就是说，ColE2-P9复制蛋白对于在ColE2-P9 ori序列处开始DNA复制是必需的。

[0087] 如本文所用，核酸序列的“功能变体”在至少一个核酸残基上不同于参考核酸序列，诸如天然存在的核酸序列，其中变体的相关功能活性是参考核酸序列的相关功能活性水平的至少90%（例如，基本上类似于参考核酸序列的相关功能）。在本上下文中，至少一个核酸残基的差异可以包括例如一个核酸残基到另一个核酸的突变、缺失或插入。变体可以编码由参考核酸序列编码的治疗性蛋白质或其片段的同源物、同工型或转录变体，其中同源物、同工型或转录变体的特征分别在于本文定义的同源性或同源性的程度。

[0088] 在一些情况下，多核苷酸或多肽的功能变体包括至少一个核酸取代（例如，1-100个核酸或氨基酸取代、1-50个核酸或氨基酸取代、1-20个核酸或氨基酸取代、1-10个核酸或氨基酸取代，例如，1个核酸或氨基酸取代、2个核酸或氨基酸取代、3个核酸或氨基酸取代、4个核酸或氨基酸取代、5个核酸或氨基酸取代、6个核酸或氨基酸取代、7个核酸或氨基酸取代、8个核酸或氨基酸取代、9个核酸或氨基酸取代或10个核酸或氨基酸取代）。导致表达的多肽具有来自相同类别的交换氨基酸的核酸取代在本文中被称作保守取代。特别地，这些是具有脂族侧链、带正电或负电的侧链、侧链中有芳族基团的氨基酸，或其侧链可以形成氢桥的氨基酸，例如具有羟基官能团的侧链。通过保守取代，例如，具有极性侧链的氨基酸可以被具有对应极性侧链的另一种氨基酸取代，或者，例如，以疏水性侧链为特征的氨基酸可

以被具有对应疏水性侧链的另一种氨基酸取代(例如,丝氨酸(苏氨酸)被苏氨酸(丝氨酸)取代,或亮氨酸(异亮氨酸)被异亮氨酸(亮氨酸)取代)。

[0089] 为了确定两个序列(例如核酸序列,例如DNA或氨基酸序列)相同的百分比,可以将序列进行比对,以便随后相互比较。为此,可以将空位插入第一序列的序列中,并且可以比较第二序列的对应位置处的组分。如果第一序列中的一个位置被与第二序列中的对应位置相同的组分占据,则这两个序列在这个位置处是相同的。两个序列相同的百分比是相同位置数除以总位置数的函数。使用数学算法可以确定两个序列相同的百分比。可以使用的数学算法的优选但非限制性的实例是Karlin等人(1993), PNAS USA, 90:5873-5877或Altschul等人(1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402的算法。此类算法可以整合到例如BLAST程序中。在一定程度上与本发明的序列相同的序列可以通过这个程序进行鉴定。

[0090] 如本文所用,术语“侧接(flank、flanking和flanked)”是指在核酸分子的参考区域外部的核酸分子(例如,质粒)上的一对区域或点。在一些实施方案中,侧接核酸上的参考区域的一对区域或点与参考区域相邻(即,邻接)(即,在参考点和侧接点之间没有间插碱基)。在其他实施方案中,侧接参考区域的核酸分子上的一对区域或点与参考区域之间被一个或多个间插碱基(例如,最多1,000个间插碱基)分隔开。例如,如果第一限制性位点在给定序列上游200个碱基处,并且第二限制性位点在给定序列下游100个碱基处,则称第一限制性位点和第二限制性位点侧接给定序列。在一些实施方案中,侧接区域或点与参考区域之间的所有间插序列都不含细菌序列。在此类实施方案中,在通过在侧接载体序列的限制性位点或重组位点处从亲本质粒中切下的自我连接载体序列产生的环状DNA载体中没有除ori序列之外的细菌序列。例如,在此类实施方案中,切割侧接载体序列的位点的外源限制性酶可以产生环状DNA载体,其具有治疗性序列的5'末端与3'末端之间的序列;然而,这个区域不含细菌序列(例如,抗药性基因)。此类间插序列可以是由粘性末端连接产生的人工产物,例如,对应于由外源限制性酶产生的突出端碱基。

[0091] 除非另有说明,否则术语“ABCA4”指来自任何脊椎动物来源的任何天然ABCA4,包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人和食蟹猴)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠),以及功能变体(例如,天然或合成变体),例如突变体、突变蛋白、类似物、亚基、受体复合物、同种型、剪接变体及其片段。功能变体可以基于已知的ABCA4信号传导来确定。ABCA4涵盖全长的、未加工的ABCA4,以及由细胞中天然加工产生的任何形式的ABCA4。示例性人类ABCA4序列以NCBI参考序列:NG_009073或NM_000350提供。

[0092] 除非另有说明,否则术语“MYO7A”指来自任何脊椎动物来源的任何天然MYO7A(也称为DFNB2、MYU7A、NSRD2、USH1B、DFNA11或MYOVIIA),包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如,人和食蟹猴)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠),以及功能变体(例如,天然或合成变体),例如突变体、突变蛋白、类似物、亚基、受体复合物、同种型、剪接变体及其片段。功能变体可以基于已知的MYO7A信号传导来确定。MYO7A涵盖全长的、未加工的MYO7A,以及由细胞中天然加工产生的任何形式的MYO7A。示例性的人MYO7A序列作为国家生物技术信息中心(NCBI)基因ID:4647提供。

[0093] 如本文所用,术语“自我复制型RNA分子”是指包含从一个复制起点复制的RNA的自我复制型遗传元件。

[0094] 如本文所用,术语“操作性地连接”或“操作性地偶联”是指元件的排列方式,其中

所描述的组件被构造为进行它们通常的功能。当核酸与另一个核酸序列处于功能关系时，它是“操作性地连接”或“操作性地偶联”的。例如，如果启动子影响一个或多个异源性基因的转录，则所述启动子操作性地连接至一个或多个异源性基因。此外，操作性地连接至编码序列的调控元件能够影响编码序列的表达。调控元件不必与编码序列相邻，只要它们具有指导它们的表达的功能即可。因此，例如，间插的未翻译但已转录的序列可以存在于在启动子序列和编码序列之间，并且启动子序列仍然可以被视为“操作性地连接”或“操作性地偶联”至编码序列。

[0095] 如本文所用，“载体”是指这样的核酸分子，所述核酸分子能够将与其连接的所关注序列携带至靶细胞中，然后所关注序列可以在靶细胞中转录、复制、加工和/或表达。在靶细胞或宿主细胞加工载体的所关注序列后，所关注序列不被认为是载体。一种类型的载体是“质粒”，它是指能够自主复制并含有细菌主链的环状双链DNA环，所述细菌主链包括细菌复制起点和选择性标记，其中可以连接额外DNA区段。另一种类型的载体是噬菌体载体。另一类载体为病毒载体，其中可将额外DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如，非附加型哺乳动物载体）可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，并由此随宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”（或简称为“重组载体”或“表达载体”）。

[0096] 如本文所用，术语“个体”和“受试者”可互换使用，并且包括需要治疗或预防的任何哺乳动物，例如通过环状DNA载体或其药物组合物来治疗或预防，如本文所述。在一些实施方案中，个体或受试者是人类。在其他实施方案中，个体或受试者是非人类哺乳动物（例如，非人类灵长类动物（例如，猴）、小鼠、猪、兔、猫或狗）。个体或受试者可以是雄性或雌性。

[0097] 如本文所用，环状DNA载体或其药物组合物的“有效量”或“有效剂量”，是指例如当根据选定的施用形式、途径和/或时间表施用于个体时，足以实现所期望的生物学、药理学或治疗效果的量。如本领域的普通技术人员所理解，有效的特定组合物的绝对量可以根据诸如所期望的生物学或药理学终点、待递送的药剂、靶组织等因素而变化。本领域的普通技术人员将进一步理解，“有效量”可以与细胞接触或者以单剂量或通过使用多剂量施用于受试者。相对于参考群体（例如，未经治疗的或安慰剂群体，或者接受标准护理治疗的群体），治疗疾病的组合物的有效量可以减缓或阻止疾病进展，或者增加部分或完全响应。

[0098] 如本文所用，“治疗(treatment)”（及其语法变形，诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”）是指尝试改变接受治疗的个体的自然病程的临床干预，所述临床干预可以针对预防或在临床病理过程中进行。所期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、降低疾病进展的速率、改善或缓和疾病状态以及改善预后。在一些实施方案中，本发明的环状DNA载体被用于延缓疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0099] 术语“表达的水平”或“表达水平”可互换使用，并且通常是指生物样品（例如，视网膜）中的多核苷酸或氨基酸产物或蛋白质的量。“表达”通常是指基因编码的信息转化为细胞中存在和运行的结构的方法。因此，根据本发明，“表达”可以指转录成多核苷酸、翻译成蛋白质或蛋白质的翻译后修饰。已转录的多核苷酸的片段、已翻译的蛋白质或翻译后修饰的蛋白质也应被视为表达，无论它们来源于可变剪接产生转录物或已降解的转录物，还是

来源于蛋白质的翻译后加工(例如,通过蛋白水解)。“表达的基因”包括以mRNA形式转录成多核苷酸然后翻译成蛋白质的那些基因,以及转录成RNA但未翻译成蛋白质(例如,转运RNA和核糖体RNA)的那些基因。

[0100] 如本文所用,术语“表达持久性”是指所关注序列或其功能部分(例如,环状DNA载体的一个或多个编码序列)可在其所转染的细胞中表达的持续时间(“细胞内持久性”)或可在被转染的细胞的任何子代中表达的持续时间(“跨代持久性”)。如果所关注序列(诸如治疗性序列)或其功能部分未被沉默(例如,通过DNA甲基化和/或组蛋白甲基化和压缩来沉默),则可以表达。表达持久性可以通过检测或定量以下各项来评估:(i)从靶细胞或其子代中的序列转录的mRNA(例如,通过qPCR、RNA-seq或任何其他合适的方法)以及(ii)从靶细胞或其子代中的序列翻译的蛋白质(例如,通过蛋白质印迹、ELISA或任何其他合适的方法)。在一些情况下,表达持久性通过检测或定量靶细胞或其子代中的治疗性DNA(例如,靶细胞中是否存在环状DNA载体,例如,通过附加型DNA拷贝数分析)以及以下各项中的任一者或两者来评估:(i)从靶细胞或其子代中的治疗性序列转录的mRNA以及(ii)从靶细胞或其子代中的治疗性序列翻译的蛋白质。所关注序列或其功能部分的表达持久性可以使用本领域已知的任何基因表达表征方法,相对于参考载体进行定量,所述参考载体诸如具有本发明载体(例如,质粒)中不存在的一种或多种细菌标志物的对照载体。表达持久性可以在载体的施用后的任何给定时间点进行定量。例如,在一些实施方案中,如果在本发明的环状DNA载体的施用后两周,可在靶细胞或其子代中检测到所述环状DNA载体,则所述环状DNA载体在施用后持续至少两周。在一些实施方案中,如果在施用后一周、两周、三周、四周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年或更长时间,可在靶细胞中检测到基因的表达,则所述基因的表达在靶细胞中得以“持续”。在一些实施方案中,如果在给定的时间段(例如,在施用后一周、两周、三周、四周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年或更长时间)之后仍存在任何可检测的原始表达水平部分(例如,原始表达水平的至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少70%或至少100%),则序列的表达被视为在施用后持续所述给定的时间段。

[0101] 如本文所用,“细胞内持久性”是指序列或其功能部分(例如,环状DNA载体的一个或多个编码序列)可在其所转染的细胞(例如,靶细胞,诸如有丝分裂后细胞或静息细胞)中表达的持续时间。细胞内持久性可以通过检测或定量以下各项来评估:(i)从靶细胞中的序列转录的mRNA以及(ii)从靶细胞中的序列翻译的蛋白质。在一些情况下,细胞内持久性通过检测或定量靶细胞中的DNA(例如,靶细胞中是否存在环状DNA载体)以及以下各项中的任一者或两者来评估:(i)从靶细胞中的序列转录的mRNA以及(ii)从靶细胞中的序列翻译的蛋白质。在一些实施方案中,本发明的环状DNA载体相对于参考载体(例如,质粒DNA载体)表现出改善的细胞内持久性。

[0102] 如本文所用,“跨代持久性”是指序列或其功能部分(例如,DNA载体的一个或多个编码序列)可在基因转染的细胞的子代(例如,靶细胞的子代,诸如基因转染(例如,通过环状DNA载体)的细胞的第一代、第二代、第三代或第四代后代)中表达的持续时间。跨代持久性解释了细胞分裂过程中基因的任何稀释,因此可以用于测量载体在分裂组织中随时间推移的持久性。在一些实施方案中,本发明的环状DNA载体相对于参考载体(例如,质粒DNA载

体)表现出改善的跨代持久性。跨代持久性可以通过检测或定量以下各项来评估:(i)从靶细胞的子代中的载体序列转录的mRNA以及(ii)从靶细胞的子代中的载体序列翻译的蛋白质。在一些情况下,细胞内持久性通过检测或定量靶细胞的子代中的DNA(例如,靶细胞的子代中是否存在环状DNA载体)以及以下各项中的任一者或两者来评估:(i)从靶细胞的子代中的序列转录的mRNA以及(ii)从靶细胞的子代中的序列翻译的蛋白质。在一些实施方案中,本发明的环状DNA载体相对于参考载体(例如,质粒DNA载体)表现出改善的跨代持久性。

[0103] 如本文所用,术语DNA分子的“拷贝数”指给定细胞群体中每个细胞的DNA分子的平均拷贝数。

[0104] 术语“药学上可接受的”意指对于向哺乳动物(诸如人类)施用是安全的。在一些实施方案中,药学上可接受的组合物是通过联邦政府或州政府的监管机构批准,或者在美国药典或其他普遍认可的药典中列出可用于动物的,更具体而言用于人类的。

[0105] 术语“载剂”是指与本发明的载体或组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。合适的药物载剂的实例在“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA., 第23版, 2020年中有所描述。

[0106] 如本文所用,除非另外指明,否则术语“约”是指与参考值的变化在 $\pm 10\%$ 之内的值。

[0107] 对于不同的来源或参考文献之间的定义的任何冲突,以本文提供的定义为准。

[0108] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术性和科学性术语具有与本公开所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。虽然在本公开的实践或测试中可以使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但下文描述了合适的方法和材料。

[0109] 在整个公开内容中,数字特征以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应当被解释为对任何实施方案的范围的不可改变的限制。因此,除非上下文另有明确规定,否则范围的描述应该被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及在所述范围内的单个数值至下限单位的十分之一。例如,诸如从1至6的范围的描述应该被认为具有具体公开的子范围,诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及所述范围内的单个值,例如1.1、2、2.3、5和5.9。这适用于任何范围的宽度。这些间插范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且也涵盖在本发明内,受所陈述范围内任何具体排除的限值的约束。除非上下文中另有明确规定,否则在所述范围包括一个或两个极限的情况下,不包括这些所包括的极限中的一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0110] II. 在细菌中产生环状DNA载体的方法

[0111] 本文公开的实施方案包括在工程化细菌细胞中产生环状DNA载体的方法。本文公开的工程化细菌细胞可用于由亲本质粒产生环状DNA载体。在一些实施方案中,工程化细菌细胞包括整合到细菌基因组和亲本质粒中的编码细菌复制蛋白的Rep基因。在一些实施方案中,Rep基因包含在染色体外DNA分子上,诸如例如质粒(例如,辅助质粒)或细菌人工染色体(“BAC”)。在一些实施方案中,Rep基因包含在亲本质粒上。亲本质粒包含载体序列和主链序列。载体序列包括对应于Rep基因的ori序列,但不包括选择性标记。主链序列包括选择性标记,但不包括载体序列中包括的ori序列,但在一些实施方案中,可以包括不同的ori序列。亲本质粒还具有侧接经排列使得质粒主链序列可以通过限制性消化或位点特异性重组在细胞内与载体序列分离的载体序列的限制性酶识别序列或位点特异性重组序列。在限制

性消化的情况下,然后通过载体序列的自我连接形成环状DNA载体。在位点特异性重组的情况下,当重组完成时,形成环状DNA载体。在载体序列分离和环状DNA载体形成后,rep蛋白的表达可以维持环状DNA载体的高拷贝数,尽管环状DNA载体缺乏选择性标记。相反,通过改变培养条件以去除选择性标记的选择性压力,可以避免分离后工程化细菌细胞中质粒主链序列的保留。在不维持亲本质粒的条件下,培养具有高拷贝数环状DNA载体的细菌细胞群体可以有效地产生高产量的高纯度环状DNA载体。

[0112] 1. 工程化细菌细胞

[0113] 本文公开的产生环状DNA载体的方法包括使用工程化细菌细胞,其可包括例如工程化大肠杆菌细菌细胞或其他合适的细菌。在一些实施方案中,工程化细菌细胞包括整合到细菌基因组中的编码复制蛋白的外源Rep基因和具有对应于Rep基因的ori序列的亲本质粒。在一些实施方案中,Rep基因不整合到细菌基因组中,而是存在于染色体外DNA分子上,诸如质粒或BAC。

[0114] 在一些实施方案中,工程化细菌细胞具有整合到细菌基因组中的外源Rep基因。可以使用任何合适的染色体整合方法将Rep基因掺入到细菌基因组中,包括本领域众所周知的整合盒和程序。在一些实施方案中,Rep基因编码ColE2-P9复制蛋白或相关蛋白。在一些示例性实施方案中,Rep基因编码具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的ColE2-P9复制蛋白。其他合适的复制蛋白包括由天然存在的质粒编码的复制蛋白,包括例如与ColE2-P9相关的那些复制蛋白,诸如ColE3-CA38。复制蛋白可与它们对应的复制起点序列一起用于本文所述的实施方案中。

[0115] 选择包含在亲本质粒的载体序列中的ori序列,使得其与整合到工程化细菌细胞基因组中的Rep基因相对应,或者以其他方式存在于工程化细菌细胞中,诸如在质粒或BAC上。在一些示例性实施方案中,ori包含SEQ ID NO:2中所示的核苷酸序列。因此,本文公开的工程化细菌细胞的实施方案包括允许亲本质粒和/或环状DNA载体复制的复制蛋白和复制起点序列的功能对。在一些实施方案中,载体序列中存在的ori序列是ColE2-P9 ori序列或其功能片段。在一些实施方案中,载体序列中存在的ori序列是ColE2-P9 ori序列的功能片段,其具有SEQ ID NO:2中所示的DNA序列。SEQ ID NO:2中给出的40个碱基对功能片段能够支持表达ColE2-P9的细胞中的载体复制。在一些实施方案中,可以使用更短或更长的功能片段。在一些实施方案中,可以使用ColE2-P9的31个碱基对片段。其他合适的ori序列包括但不限于对应于合适的Rep蛋白的ori序列及其功能片段,诸如例如ColE3-CA38的ori序列。在一些实施方案中,ori的长度不大于或小于20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、150个、200个、250个、300个、350或400个核苷酸。在一些实施方案中,ori序列是天然存在的ori的功能性修饰版本,诸如例如,被修饰为比对应的天然存在的ori序列更短的ori序列,同时仍然保留支持复制开始的能力。在一些实施方案中,ori序列是天然存在的ori序列。

[0116] 在一些实施方案中,Rep基因操作性地连接至诱导型启动子。合适的诱导型启动子包括但不限于由T7 RNA聚合酶诱导的 P_{T7} 启动子、热诱导型 P_L 启动子、可被LacI抑制的 P_{tac} 启动子(并且因此可通过LacI的缺失或去除而诱导)、可被阿拉伯糖诱导的 P_{bad} 启动子。本领域

已知的其他诱导型启动子也可用于本文公开的实施方案中,包括例如细菌噬菌体启动子(例如, P_{Ls1con} 、T3、T7、SP6)和细菌启动子(例如, P_{mgrB} 、 $p\text{LlacO}$ 、 P_{trc2} 、 $p\text{LtetO}$ 、 $P_{\text{lac/ara}}$ 、 P_{m})。根据本公开使用的细菌启动子的例子包括但不限于正调控的大肠杆菌启动子,诸如正调控的 σ^{70} 启动子(例如,诱导型 $p\text{Bad/araC}$ 启动子、Lux盒右启动子、修饰的 λPrm 启动子、 $p\text{lacOr2-62}$ (正)、具有额外REN位点的 $p\text{Bad/AraC}$ 、 $p\text{Bad}$ 、 $P(\text{Las})\text{TetO}$ 、 $P(\text{Las})\text{CI0}$ 、 $P(\text{Rh1})$ 、 P_{u} 、 P_{fecA} 、 $p\text{RE}$ 、 cadC 、 hns 、 $p\text{Las}$ 、 $p\text{Lux}$)、 σ^S 启动子(例如, P_{dps})、 σ^{32} 启动子(例如,热休克(heat shock))和 σ^{54} 启动子(例如, glnAp2);负调控的大肠杆菌启动子,诸如负调控的 σ^{70} 启动子(例如,启动子(PRM+)、修饰的 λPrm 启动子、 TetR-TetR-4C 、 $P(\text{Las})\text{TetO}$ 、 $P(\text{Las})\text{CI0}$ 、 $P(\text{Lac})\text{IQ}$ 、 RecA_Dlex0_dLac01 、 dapAp 、 FecA 、 Pspac-hy 、 pcI 、 plux-cI 、 plux-lac 、 CinR 、 CinL 、葡萄糖控制、修饰的 Pr 、修饰的 Prm+ 、 FecA 、 PcyA 、 recA(SOS) 、 RecA(SOS) 、 EmrR 调控的、 BetI 调控的、 $p\text{Lac_lux}$ 、 $p\text{Tet_Lac}$ 、 $p\text{Lac/Mnt}$ 、 $p\text{Tet/Mnt}$ 、 LsrA/cI 、 $p\text{Lux/cI}$ 、 LacI 、 LacIQ 、 $p\text{LacIQ1}$ 、 $p\text{Las/cI}$ 、 $p\text{Las/Lux}$ 、 $p\text{Lux/Las}$ 、具有LexA结合位点的 $p\text{RecA}$ 、反向 bBa_R0011 、 $p\text{LacI/ara-1}$ 、 $p\text{LacIq}$ 、 rrnB P1 、 cadC 、 hns 、 Pfhua 、 $p\text{Bad/araC}$ 、 nhaA 、 OmpF 、 RcnR)、 σ^S 启动子(例如,具有替代 σ 因子 σ^{38} 的Lutz-Bujard Lac0)、 σ^{32} 启动子(例如,具有替代 σ 因子 σ^{32} 的Lutz-Bujard Lac0)和 σ^{54} 启动子(例如, glnAp2);负调控的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)启动子,诸如阻抑型枯草芽孢杆菌 σ^A 启动子(例如,革兰氏阳性IPTG诱导型、 Xyl 、 hyper-spank)和 σ^B 启动子。根据本公开,可以使用其他诱导型细菌启动子。例如,在一些实施方案中,可以使用枯茗酸诱导型启动子,诸如 $p\text{CymRC}$ 。

[0117] 在一些实施方案中,复制蛋白的表达水平影响包含对应ori序列的亲本质粒或环状DNA载体的拷贝数。因此,当需要相对低的拷贝数(例如,平均少于5个、10个或20个拷贝/细胞)时,工程化细菌细胞可以维持在复制蛋白以相对低的水平表达的条件下。当需要相对高的拷贝数(例如,平均超过20个、50个或100个拷贝/细胞)时,可以将工程化细菌细胞维持在复制蛋白从诱导型启动子以相对高的水平表达的条件下。在一些实施方案中,Rep基因操作性地连接至诱导型启动子,所述启动子在非诱导条件下提供第一水平的表达,并且可以被诱导以提供第二、更高水平的表达,这导致包含对应ori序列的亲本质粒或环状DNA载体的更高拷贝数。在一些实施方案中,在分离亲本质粒的载体序列和主链序列之前,将亲本质粒以低拷贝数维持在工程化细菌细胞中是有利的。在载体序列和主链序列通过限制性消化分离的实施方案中,具有相对低的拷贝数有助于确保线性化的载体序列自我连接,而不是与主链序列或载体序列的其他拷贝连接。在从主链序列中分离载体序列并形成环状DNA载体后,在一些实施方案中,含有ori序列的环状DNA载体维持相对高的拷贝数以产生高产量的环状DNA载体是有利的。因此,在一些实施方案中,在工程化细菌细胞内形成环状DNA载体后,通过例如添加从可操作性地连接至Rep基因的诱导型启动子诱导更高表达的分子来诱导复制蛋白的更高表达水平。在一些实施方案中,诱导型启动子维持未诱导状态,直到载体序列与主链序列分离之后。在一些实施方案中,诱导型启动子在载体序列与主链序列分离之后被诱导。在一些实施方案中,诱导型启动子在载体序列与主链序列分离的同时被诱导。在一些实施方案中,诱导型启动子在载体序列与主链序列分离之前被诱导。

[0118] 在一些实施方案中,亲本质粒的拷贝数维持在至少约、至多约或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160

个、170个、180个、190个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个拷贝/细胞或在这些值的任何两个之间的拷贝数。在一些实施方案中,环状DNA载体的拷贝数维持在至少约、至多约或约10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、250个、300个、350或400个拷贝/细胞或在这些值的任何两个之间。

[0119] 在一些实施方案中,整合到工程化细菌细胞基因组中的Rep基因处于组成型或非诱导型启动子的控制下。在一些实施方案中,在载体序列与主链序列分离之前、期间或之后,不调节复制蛋白的表达。在一些实施方案中,分离前的亲本质粒和分离后的环状DNA载体维持在至少约、至多约或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190或200个拷贝/细胞或在这些值的任何两个之间的拷贝数。

[0120] 除了亲本质粒或从亲本质粒分离的载体序列,工程化细菌还可以包括其他染色体外DNA分子,诸如辅助质粒或BAC。染色体外DNA分子可以编码例如外源重组酶、限制性内切酶、复制蛋白、连接酶、选择性标记、反向选择性标记或报告基因。在一些实施方案中,在从工程化细菌细胞的培养物中纯化环状DNA载体之前,从工程化细菌细胞中去除除载体序列之外的染色体外DNA分子。在一些实施方案中,可通过在不施加选择性压力以维持染色体外DNA分子的条件培养细胞,或通过减少或消除包括染色体外DNA分子的细胞生长的反向选择条件下培养细胞,从工程化细菌细胞中去除染色体外DNA分子。

[0121] 在一些实施方案中,包含在工程化细菌细胞中的染色体外DNA分子包括可用于追踪细胞中染色体外DNA分子的存在的报告构建体。例如,亲本质粒或辅助质粒或BAC的主链序列可以包括编码视觉上可检测的蛋白质(诸如GFP或RFP)的基因。在这种情况下,在UV光下对菌落颜色的视觉观察可以揭示染色体外DNA分子是否存在于菌落的细胞中。通过这种方式,可以检测到缺乏给定染色体外DNA分子的菌落。可以用其他方式检测的其他合适的报告构建体也可以用于确定工程化细菌细胞或菌落是否含有给定的染色体外DNA分子。

[0122] B. 亲本质粒

[0123] 本文公开的工程化细菌的实施方案包括亲本质粒(也称为模板质粒或质粒模板),其包含被两个限制性位点或重组位点彼此分开的载体序列和主链序列。

[0124] 载体序列包括ori序列和所关注序列,在一些实施方案中,所关注序列是治疗性编码序列、报告基因构建体或它们的组合。载体序列可以包括本文描述的环状DNA载体实施方案的任何组分。在一些实施方案中,载体序列不包含除ori序列之外的任何细菌起点的序列。在一些实施方案中,亲本质粒包括紧邻ori序列和/或治疗性序列或报告基因构建体的限制性位点或重组位点,使得在成为环状DNA载体的载体序列中没有外来的或无功能的DNA。

[0125] 在一些实施方案中,主链序列包括选择性标记,但不包括对应于整合的Rep基因编码的外源复制蛋白的ori序列。在一些实施方案中,主链序列包含不对应于整合的Rep基因的ori序列,即与载体序列中的ori序列和整合的Rep基因直向同源。在一些实施方案中,包含在主链序列中的选择性标记有助于确保亲本质粒维持在在选择性标记对于细胞生长或

存活是必需的条件下培养的工程化细菌细胞群体中。例如,在一些实施方案中,选择性标记是抗生素抗性基因。在对应抗生素的存在下培养工程化细菌细胞施加选择性压力,使得亲本质粒维持在工程化细菌细胞群体中。然而,一旦去除选择性压力,诸如通过将生长培养基改变为缺乏对应于抗生素抗性基因的抗生素的培养基,包含抗生素抗性基因的DNA分子可能从群体中丢失,尤其是如果此类DNA分子不包含ori序列。因此,在将载体序列与主链序列分离后,如果培养条件不施加选择性压力来维持主链序列,则主链序列可能会从群体中丢失或不能大量维持。

[0126] 在一些实施方案中,主链序列包含反向选择标记。反向选择标记可提供一种选择性生长不含主链序列的细胞的方式。在一些实施方案中,在从主链序列中分离载体序列后,在反向选择条件下培养细胞可以提高纯度,并且减少培养物和/或包含纯化载体序列的组合物中主链序列的量。合适的反向选择标记是本领域已知的,并且可以包括例如pheS、sacB、thyA、lacY、gata-1、ccdB、rpsL或tetAR。

[0127] 亲本质粒中侧接载体序列的限制性位点或重组位点可以选自载体序列中不存在的任何合适的限制性位点或重组位点。

[0128] C.限制性消化和连接

[0129] 本文公开的实施方案包括限制性消化步骤,以将载体序列与亲本质粒的主链序列分离。在一些实施方案中,限制性消化发生在工程化细菌细胞内。在一些实施方案中,消化亲本质粒的限制性酶是由引入工程化细菌细胞中的外源限制性酶基因表达的外源限制性酶。在一些实施方案中,将外源基因整合到工程化细菌细胞的基因组中。在一些实施方案中,外源基因在工程化细菌细胞内的质粒或BAC上编码。在一些实施方案中,有必要抑制或延迟限制性酶表达的诱导,直到需要将载体序列从亲本质粒的主链序列中分离出来时。因此,在一些实施方案中,外源基因操作性地连接至诱导型启动子。当需要分离时,可以诱导限制性酶的表达,然后进行分离。

[0130] 在一些实施方案中,用于将载体序列与主链序列分离的限制性酶是穿过细胞膜被引入到工程化细菌细胞中的外源限制性酶。在一些实施方案中,这通过电穿孔来实现。电穿孔和消化程序的非限制性实例如下:将含有亲本质粒的电感受态工程化大肠杆菌在SOB中在30°C下培养至OD为0.8。用冰冷的10%甘油洗涤细菌三次,并且重新悬浮于10%甘油中。将0.5 μ l的每种限制性酶和连接酶与电感受态细胞混合用10个单位的限制性酶消化1 μ g的DNA。将混合物转移至比色皿(1mm间隙)中,并且使用电穿孔仪(BTX)使用1800伏设置进行电穿孔。通过在37°C下在SOC中生长1小时来拯救细胞,并且将其铺在不含抗生素的LB琼脂板上。使用QIAGEN miniprep试剂盒生长菌落并纯化DNA。

[0131] 在载体序列分离后,通过载体序列的自我连接可以形成环状DNA载体。在一些实施方案中,连接发生在工程化细菌细胞内。在一些实施方案中,连接载体序列的末端的连接酶是由引入工程化细菌细胞中的外源连接酶基因表达的外源连接酶。连接酶可以是例如T3连接酶、T4连接酶或T7连接酶。在一些实施方案中,将外源连接酶基因整合到工程化细菌细胞的基因组中。在一些实施方案中,外源连接酶基因在工程化细菌细胞内的质粒上编码。在一些实施方案中,连接酶的表达被抑制或不被诱导,直到将载体序列从亲本质粒的主链序列中分离完成时。因此,在一些实施方案中,外源连接酶基因操作性地连接至诱导型启动子。

[0132] 在一些实施方案中,连接酶是穿过细胞膜引入工程化细菌细胞中的外源连接酶。

在一些实施方案中,这通过电穿孔来完成,电穿孔可以根据上述电穿孔方案来完成。在一些实施方案中,限制性酶和连接酶的电穿孔在单一步骤中完成,限制性酶和连接酶在单一电穿孔步骤中进入细胞。在一些实施方案中,将限制性酶和连接酶单独添加到细胞中。

[0133] 在一些实施方案中,载体序列的自我连接通过由工程化细菌细胞产生的内源连接酶来完成。

[0134] 在一些实施方案中,外源限制性酶和外源连接酶同时存在于工程化细菌细胞中。在一些实施方案中,在将外源连接酶引入工程化细菌细胞中之前(例如,通过外源限制性酶的电穿孔、通过用编码外源限制性酶的DNA分子转化或通过诱导型启动子的控制下诱导外源限制性酶基因的表达),将外源限制性酶引入工程化细菌细胞中(例如,通过外源连接酶的电穿孔、通过用编码外源连接酶的DNA分子转化或通过诱导型启动子的控制下诱导外源连接酶基因的表达)。在一些实施方案中,在将外源连接酶引入工程化细菌细胞中之前,将外源限制性酶引入工程化细菌细胞中。在一些实施方案中,将外源限制性酶与外源连接酶同时引入工程化细菌细胞中。

[0135] D. 位点特异性重组

[0136] 位点特异性重组可以使用导致序列之间的位点特异性重组的各种系统来进行。在一些实施方案中,位点特异性重组涉及在重组酶存在下能够彼此重组的两个特异性序列。

[0137] 在一些实施方案中,将载体序列与质粒序列分离的重组酶是由引入工程化细菌细胞中的外源重组酶基因表达的外源重组酶。在一些实施方案中,将外源重组酶基因整合到工程化细菌细胞的基因组中。在一些实施方案中,外源重组酶基因在工程化细菌细胞内的质粒或BAC上编码。在一些实施方案中,有必要抑制或延迟重组酶表达的诱导,直到需要将载体序列与亲本质粒的主链序列中分离出来时。因此,在一些实施方案中,外源重组酶基因操作性地连接至诱导型启动子,诸如本文公开的任何诱导型启动子。当需要分离时,可以诱导外源重组酶的表达,然后进行分离。在一些实施方案中,外源重组酶在亲本质粒被引入工程化细菌细胞中时表达,这可导致亲本质粒经历重组,而不必诱导重组酶的表达。在一些实施方案中,当亲本质粒被引入工程化细菌细胞中时,重组酶以相对低的水平表达。例如,在一些实施方案中,工程化细菌细胞可以包括操作地性偶联至在非诱导条件下提供低水平表达的诱导型启动子的外源重组酶基因(例如,在将亲本质粒引入工程化细菌细胞中之前,其可以整合到细菌染色体中或包含在存在于细菌细胞中的质粒或BAC上)。将亲本质粒引入具有适当低水平外源重组酶表达的工程化细菌细胞中可允许菌落在对亲本质粒主链序列上的选择性标记具有选择性的培养基上生长,同时也诱导亲本质粒的充分重组,以在菌落中产生具有与主链序列分离的载体序列的细胞群体。

[0138] 在一些实施方案中,用于从主链序列中分离载体序列的重组酶是穿过细胞膜被引入到工程化细菌细胞中的外源重组酶。在一些实施方案中,这通过电穿孔来实现。电穿孔和重组程序的非限制性实例如下:将含有亲本质粒的电感受态工程化大肠杆菌在SOB中在30℃下培养至OD为0.8。用冰冷的10%甘油洗涤细菌三次,并且重新悬浮于10%甘油中。将1μl的Cre(15个单位,NEB,M0298M)与50μl的电感受态细胞混合。将混合物转移至比色皿(1mm间隙)中,并且使用电穿孔仪(BTX)使用1800伏设置进行电穿孔。通过在37℃下在SOC中生长1小时来拯救细胞,并且将其铺在不含抗生素的LB琼脂板上。使用QIAGEN miniprep试剂盒生长菌落并纯化DNA。用10个单位的限制性酶消化1μg的DNA。

[0139] 本文公开的实施方案中使用的特定重组系统可以有不同的起点。特别地,所用的特定序列和重组酶可以属于不同的结构类别,诸如细菌噬菌体 λ 的整合酶家族或转座子Tn3的分解酶家族。

[0140] 属于细菌噬菌体 λ 的整合酶家族的重组酶包括例如噬菌体 λ (Landy等人, Science 197:1147, 1977)、P22和 ϕ 80 (Leong等人, J. Biol. Chem. 260:4468, 1985)的整合酶、流感嗜血杆菌的HP1 (Hauser等人, J. Biol. Chem. 267:6859, 1992)、噬菌体P1的Cre整合酶(其识别并引起LoxP位点的重组)、质粒pSAM2的整合酶(EP 350,341)或可替代地 2μ 质粒的FLP重组酶。在通过细菌噬菌体 λ 的整合酶家族的位点特异性系统重组制备环状DNA载体的实施方案中,所得环状DNA载体通常包含由对应细菌噬菌体或质粒的两个att附着序列之间的重组产生的序列。

[0141] 属于转座子Tn3家族的重组酶包括例如转座子Tn3或转座子Tn21和Tn522的分解酶(Stark等人, Trends Genet, 8, 432-439, 1992);细菌噬菌体 μ 的Gin转化酶,或可替代地质粒的分解酶,诸如RP4的par片段的分解酶(Albert等人, Mol. Microbiol. 12:131, 1994)。在通过转座子Tn3家族的位点特异性系统重组制备环状DNA载体的实施方案中,所得环状DNA载体通常包含由所讨论的转座子的分解酶的两个识别序列之间的重组产生的序列。

[0142] 在一些实施方案中,亲本质粒上的位点特异性重组序列来源于细菌噬菌体。在一些实施方案中,序列是细菌噬菌体整合酶的附着序列(attP和attB序列)或来源于此类附着序列的序列。这些序列能够在被称为整合酶的重组酶的存在下,在有或没有切除酶的情况下,特异性地相互重组。术语“来源于此类附着序列的序列”包括通过修饰细菌噬菌体的附着序列获得的序列,所述序列保留了在合适重组酶的存在下特异性重组的能力。因此,此类序列可以是这些序列的缩减片段,或可替代地是通过添加其他序列(限制性位点等)而延伸的片段。它们也可以是通过突变,特别是通过点突变获得的变体,诸如attP-GA和attB-GA附着序列。

[0143] 在一些实施方案中,所用的识别序列和重组酶来自酪氨酸重组酶家族成员,诸如例如Flp、XerC、XerD、 λ 整合酶或HP1整合酶,或丝氨酸重组酶家族成员,诸如例如 ϕ BT1、TP901、Bxb1、MR11、A118、 ϕ K38、 ϕ C31或W β 。

[0144] 在一些实施方案中,识别序列和重组酶来自Bxb1(例如,外源重组酶是Bxb1,并且识别序列是attP-GA和attB-GA)。

[0145] E. 通过培养细胞扩增环状DNA载体

[0146] 根据本文所述的实施方案,在工程化细菌细胞中形成环状DNA载体后,可通过培养包含环状DNA载体的工程化细菌细胞群体来增加所产生的环状DNA载体的量。可以选择培养条件以最大化细菌细胞生长和环状DNA载体的额外拷贝的产生。在一些实施方案中,选择培养条件以诱导复制蛋白的高水平表达,从而支持具有对应ori序列的环状DNA载体的高拷贝数。在一些实施方案中,选择培养条件以去除维持包含选择性标记的主链序列的选择性压力,使得主链序列在几轮细胞分裂中不被维持。在一些实施方案中,选择培养条件,其存在于主链序列上的反向选择标记提供反向选择性压力,使得包括主链序列的细胞具有降低的生长潜力或不能生长。

[0147] 在一些实施方案中,培养包含环状DNA载体的工程化细菌细胞群体导致将环状DNA载体在此类培养的细胞中维持至少2轮、3轮、4轮、5轮、6轮、7轮、8轮、9轮、10轮、15轮、20轮、

25轮、30轮、35轮、40轮、45轮、50轮、55轮、60轮、65轮、70轮、75轮、80轮、85轮、90轮、95轮或100轮细胞分裂。在一些实施方案中,在至少10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次、65次、70次、75次、80次、85次、90次、95次或100次倍增后,工程化细菌细胞的培养群体将环状DNA载体维持在至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19、20个拷贝/细胞的平均拷贝数(例如,至少10次倍增后至少1个拷贝/细胞(例如,至少10次倍增后至少5个拷贝/细胞、至少10次倍增后至少10个拷贝/细胞或至少10次倍增后至少20个拷贝/细胞)、至少20次倍增后至少1个拷贝/细胞(例如,至少20次倍增后至少5个拷贝/细胞、至少20次倍增后至少10个拷贝/细胞或至少20次倍增后至少20个拷贝/细胞)、至少50次倍增后至少1个拷贝/细胞(例如,至少50次倍增后至少5个拷贝/细胞、至少50次倍增后至少10个拷贝/细胞或至少50次倍增后至少20个拷贝/细胞)或至少100次倍增后至少1个拷贝/细胞(例如,至少100次倍增后至少5个拷贝/细胞、至少100次倍增后至少10个拷贝/细胞或至少100次倍增后至少20个拷贝/细胞))。在一些实施方案中,在载体序列从主链序列分离后,主链序列的平均拷贝数少于5个、4个、3个、2个、1个、0.5个、0.1个、0.01个或0.001个拷贝/细胞,或在至少1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次、65次、70次、75次、80次、85次、90次、95次或100次倍增后检测不到(例如,至少1次倍增后少于.001个拷贝/细胞(例如,至少10次倍增后少于.001个拷贝/细胞、至少20次倍增后少于.001个拷贝/细胞、至少50次倍增后少于.001个拷贝/细胞或至少100次倍增后少于.001个拷贝/细胞)、至少1次倍增后少于.01个拷贝/细胞(例如,至少10次倍增后少于.01个拷贝/细胞、至少20次倍增后少于.01个拷贝/细胞、至少50次倍增后少于.01个拷贝/细胞或至少100次倍增后少于.01个拷贝/细胞)、至少1次倍增后少于.1个拷贝/细胞(例如,至少10次倍增后少于.1个拷贝/细胞、至少20次倍增后少于.1个拷贝/细胞、至少50次倍增后少于.1个拷贝/细胞或至少100次倍增后少于.1个拷贝/细胞)或至少1次倍增后少于1个拷贝/细胞(例如,至少10次倍增后少于1个拷贝/细胞、至少20次倍增后少于1个拷贝/细胞、至少50次倍增后少于1个拷贝/细胞或至少100次倍增后少于1个拷贝/细胞))。在一些实施方案中,在载体序列从主链序列分离后,主链序列的平均拷贝数少于5个、4个、3个、2个、1个、0.5个、0.1个、0.01个或0.001个拷贝/细胞,或在最多1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次、65次、70次、75次、80次、85次、90次、95次或100次倍增后检测不到(例如,最多1次倍增后少于.001个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于.001个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于.001个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于.001个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于.001个拷贝/细胞)、最多1次倍增后少于.01个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于.01个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于.01个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于.01个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于.01个拷贝/细胞)、最多1次倍增后少于.1个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于.1个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于.1个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于.1个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于.1个拷贝/细胞)或最多1次倍增后少于1个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于1个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于1个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于1个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于1个拷贝/细胞))。

[0148] 在一些实施方案中,培养包含环状DNA载体的工程化细菌细胞群体导致将环状DNA载体在此类培养的细胞中维持至少2轮、3轮、4轮、5轮、6轮、7轮、8轮、9轮、10轮、15轮、20轮、25轮、30轮、35轮、40轮、45轮、50轮、55轮、60轮、65轮、70轮、75轮、80轮、85轮、90轮、95轮、100轮、150轮、200轮、250轮、290轮、294轮、300轮、350轮、400轮、450轮或500轮细胞分裂(例如,如通过Sanger测序所证实)。在一些实施方案中,在至少10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次、65次、70次、75次、80次、85次、90次、95次、100次、150次、200次、250次、290次、294次、300次、350次、400次、450次或500次倍增后,工程化细菌细胞的培养群体将环状DNA载体维持在至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个拷贝/细胞的平均拷贝数。在一些实施方案中,在载体序列从主链序列分离后,主链序列的平均拷贝数少于5个、4个、3个、2个、1个、0.5个、0.1个、0.01个或0.001个拷贝/细胞,或在最多1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次、20次、25次、30次、35次、40次、45次、50次、55次、60次、65次、70次、75次、80次、85次、90次、95次、100次、150次、200次、250次、290次、294次、300次、350次、400次、450次或500次倍增后检测不到(例如,最多1次倍增后少于.001个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于.001个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于.001个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于.001个拷贝/细胞或最多500次倍增后少于.001个拷贝/细胞)、最多1次倍增后少于.01个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于.01个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于.01个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于.01个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于.01个拷贝/细胞)、最多1次倍增后少于.1个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于.1个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于.1个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于.1个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于.1个拷贝/细胞)或最多1次倍增后少于1个拷贝/细胞(例如,最多10次倍增后少于1个拷贝/细胞、最多20次倍增后少于1个拷贝/细胞、最多50次倍增后少于1个拷贝/细胞或最多100次倍增后少于1个拷贝/细胞))。

[0149] 一些实施方案包括工程化细菌细胞的培养物,其中环状DNA载体或亲本质粒的平均拷贝数为至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个或100个拷贝/细胞,或在这些值的任何两个之间。在一些实施方案中,培养物包含至少 10^5 个、 10^6 个、 10^7 个、 10^8 个、 10^9 个、 10^{10} 个、 10^{11} 个或 10^{12} 个总细胞,或在这些值的任何两个之间。在一些实施方案中,培养物包含至少 10^4 个、 10^5 个、 10^6 个、 10^7 个、 10^8 个、 10^9 个或 10^{10} 个细胞/ml,或在这些值的任何两个之间。

[0150] E. 环状DNA载体的回收

[0151] 通过本领域已知的提取和纯化程序,可以从工程化细菌的培养物中回收由本文公开的实施方案产生的环状DNA载体。在一些实施方案中,每升培养的工程化细菌细胞可回收至少0.001mg、0.01mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mg、1.0mg、1.1mg、1.2mg、1.3mg、1.4mg、1.5mg、1.6mg、1.7mg、1.8mg、1.9mg、2.0mg、2.5mg、3.0mg、3.5mg、4.0mg、4.5mg或5.0mg的环状DNA载体。在一些实施方案中,环状DNA载体经过纯化程序,以将细菌污染物(诸如内毒素)的量降低至可用于药物组合中可接受的水平。合适的纯化方法包括色谱程序,诸如阴离子交换色谱法或疏水相互作用色谱法。

[0152] 在一些实施方案中,通过凝胶电泳纯化环状DNA载体,以进一步避免可能维持在工程化细菌细胞培养物中的主链序列的污染。在一些实施方案中,不需要纯化来避免主链序列对环状DNA载体的可检测污染。

[0153] 在一些实施方案中,可以从本文所述的工程化细菌细胞的培养物中纯化环状DNA载体,而纯化产物不会被主链序列或任何其他染色体外DNA分子污染。在一些实施方案中,从本文公开的工程化细菌细胞纯化的分离的环状DNA载体的组合物包含少于10ng/ml、1ng/ml、0.1ng/ml、0.01ng/ml、0.001ng/ml或0.0001ng/ml的包含主链序列的DNA。在一些实施方案中,通过定量PCR在组合物中检测不到包含主链序列的DNA。在一些实施方案中,在从工程化细菌细胞中分离环状DNA载体后,无需进行凝胶纯化或柱纯化步骤即可达到这些纯度水平。

[0154] 在一些实施方案中,本文公开的制备环状DNA载体的方法符合根据美国食品和药物管理局颁布并在21C.F.R.部分210和211中阐述的标准的现行良好生产规范(GMP),其全部内容通过引用并入本文。

[0155] III. 环状DNA载体

[0156] 本文提供了通过本文所述的产生方法中的任一种产生的环状DNA载体。在一些情况下,此类环状DNA载体以附加体形式在细胞内(例如,在分裂细胞或静止细胞,诸如有丝分裂后细胞中)持续存在,例如,以类似于AAV载体的方式持续存在。在本文所述的任何实施方案中,环状DNA载体可以是非整合载体。本文提供的环状DNA载体可以是裸露的DNA载体,不含病毒载体固有的组分(例如,病毒蛋白)和细菌质粒DNA,诸如免疫原性组分(例如,免疫原性细菌标志物(例如,CpG岛或CpG基序))或另外地或以其他方式与降低的持久性相关的组分(例如,CpG岛或CpG基序)。如本文所述产生的环状DNA载体以一个或多个治疗性序列为特征,并且可能缺乏质粒主链元件(例如,药物抗性基因)。在一些实施方案中,环状DNA载体缺乏重组位点。在一些实施方案中,特别是在重组用于从质粒主链序列中去除载体序列的实施方案中,环状DNA载体包括重组位点。

[0157] 在一些实施方案中,载体含有这样的DNA,其中至少50%(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或基本上全部)的DNA缺少细菌质粒DNA的一个或多个元件,诸如免疫原性组分(例如,免疫原性细菌标志物(例如,CpG基序))或者另外地或以其他方式与降低的持久性相关的组分(例如,CpG岛)。在一些实施方案中,至少50%(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或基本上全部)的DNA缺少CpG甲基化。在一些实施方案中,载体含有这样的DNA,其中至少50%(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或基本上全部)的DNA缺少细菌甲基化标志物,诸如Dam甲基化和Dcm甲基化。例如,在一些实施方案中,载体含有这样的DNA,其中至少50%(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或基本上全部)的GATC序列是未被甲基化的(例如,通过Dam甲基化酶)。另外地或可替代地,载体含有这样的DNA,其中至少50%(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%或基本上全部)的CCAGG序列和/或CCTGG序列是未被甲基化的(例如,通过Dcm甲基化酶)。

[0158] 在一些实施方案中,环状DNA载体在体内持久存在(例如,相对于参考载体(例如,在细菌中产生或者具有本发明的载体中不存在的一种或多种细菌标志物的环状DNA载体,

例如,质粒DNA),环状DNA载体表现出改善的表达持久性(例如,细胞内持久性和/或跨代持久性)和/或治疗持久性)。在一些实施方案中,环状DNA载体的表达持久性比参考载体高5%至50%、高50%至100%、一倍至五倍或五倍至十倍(例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍或更多)。在一些实施方案中,环状DNA载体的细胞内持久性比参考载体高5%至50%、高50%至100%、一倍至五倍或五倍至十倍(例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍或更多)。在一些实施方案中,环状DNA载体的跨代持久性比参考载体高5%至50%、高50%至100%、一倍至五倍或五倍至十倍(例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍或更多)。在一些实施方案中,环状DNA载体的治疗持久性比参考载体高5%至50%、高50%至100%、一倍至五倍或五倍至十倍(例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍或更多)。在一些实施方案中,参考载体是环状载体或质粒,其(a)具有与其比较的环状DNA载体相同的编码序列,和(b)具有与其比较的环状DNA载体中不存在的一种或多种细菌标志物,所述标志物可以包括例如抗生素抗性基因或其他选择性标记。

[0159] 在一些实施方案中,环状DNA载体的表达在施用后持续一周、两周、三周、四周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年或更长时间。在特定实施方案中,环状DNA载体在施用后表现出的细胞内持久性和/或跨代持久性为一周、两周、三周、四周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年或更长时间。在一些实施方案中,环状DNA载体的治疗持久性在施用后持续一周、两周、三周、四周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、一年或更长时间。

[0160] 在一些实施方案中,环状DNA载体的表达和/或治疗效果持续一周至四周、一个月至四个月或四个月至一年(例如,至少一周、至少两周、至少一个月或更长时间)。在一些实施方案中,环状DNA载体的表达水平在转染后1周或更长时间(例如,2周、3周、5周、7周、9周或更长时间、13周或更长时间、18周或更长时间)内与最初1、2或3天内观察到的水平相比,降低不超过90%、不超过50%或不超过10%。

[0161] 环状DNA载体可以是单体的、二聚体的、三聚体的、四聚体的、五聚体的、六聚体的等。在一些优选的实施方案中,环状DNA载体是单体的。在一些实施方案中,DNA载体是超螺旋的。由于工程化细菌细胞内的内源过程或由于用拓扑异构酶(例如,旋转酶)处理,环状DNA载体可以是超螺旋的。在一些实施方案中,环状DNA载体是单体的、超螺旋的环状DNA分子。在一些实施方案中,环状DNA载体是有切口的。在一些实施方案中,环状DNA载体是开放环状的。在一些实施方案中,环状DNA载体是双链环状的。在一些实施方案中,包含环状DNA载体的组合物包含至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%的超螺旋单体。在一些实施方案中,包含环状DNA载体的组合物包含至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%未经外源拓扑异构酶处理的超螺旋单体。

[0162] IV. 治疗性序列

[0163] 在一些实施方案中,本文描述的环状DNA载体的编码序列含有治疗性序列,其可以

包括一个或多个蛋白质编码结构域和/或一个或多个非蛋白质编码结构域(例如,治疗性核酸)。

[0164] 在涉及治疗性蛋白质编码治疗性结构域的特定实施方案中,治疗性序列包含以5'至3'方向连接的:启动子和单个治疗性蛋白质编码结构域(例如,单转录单位);启动子和两个或更多个治疗性蛋白质编码结构域(例如,多顺反子单位);或者第一转录单位和一个或多个附加转录单位(例如,多转录单位)。任何此类蛋白质编码治疗性序列可以另外包含非蛋白质编码结构域,诸如多腺苷酸化位点、调控元件、增强子、标记DNA的序列(例如,用于抗体识别)、PCR扩增位点、定义限制性酶位点的序列、位点特异性重组酶识别位点、由结合至和/或修饰核酸的蛋白质识别的序列、接头、剪接位点、前体mRNA结合结构域、调控序列和/或治疗性核酸(例如,微RNA编码序列)。治疗性蛋白质编码结构域可以是全长蛋白质编码结构域(例如,对应于天然基因或其天然变体)或它们的功能部分,诸如截短的蛋白质编码结构域(例如,小基因)。

[0165] 在一些实施方案中,治疗性序列编码单体蛋白质(例如,在生理条件下具有二级结构的单体蛋白质,例如,在生理条件下具有二级结构和三级结构的单体蛋白质,例如,在生理条件下具有二级结构、三级结构和四级结构的单体蛋白质)。另外地或可替代地,治疗性序列可以编码多聚体蛋白质(例如,二聚体蛋白质(例如,同源二聚体蛋白质或异源二聚体蛋白质)、三聚体蛋白质等)。

[0166] 在特定情况下,治疗性序列包括眼部基因。在一些实施方案中,眼部基因是在眼部组织中表达的基因,诸如例如视网膜组织,其可以包括例如感光细胞和/或视网膜色素上皮(RPE)细胞。在一些实施方案中,本文公开的表达构建体中的编码序列是人ABCA4或MYO7A基因序列。一个示例性的人ABCA4基因序列被提供为国家生物技术信息中心(NCBI)参考序列:NG_009073。示例性的ABCA4蛋白的氨基酸序列由蛋白登记号P78363.3给出。示例性的人MYO7A基因序列作为NCBI基因ID:4647提供。示例性MYO7A蛋白的氨基酸序列由蛋白登记号Q13402给出。

[0167] 在一些实施方案中,治疗性序列编码抗体或其部分、片段或变体。抗体包括能够结合至抗原的片段,诸如Fv、单链Fv(scFv)、Fab、Fab'、双scFv、sdAb(单结构域抗体)、(Fab')₂(包括化学连接的F(ab')₂)和纳米抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段都具有一个抗原结合位点,其余的“Fc”片段,其名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原的F(ab')₂片段。抗体还包括嵌合抗体和人源化抗体。此外,对于本文提供的所有抗体构建体,还设想具有来自其他生物体的序列的变体。因此,如果公开了抗体的人类形式,则本领域的技术人员将理解如何将基于人类序列的抗体转化为小鼠、大鼠、猫、狗、马等的序列。抗体片段还包含任一取向的单链scFv、串联双scFv、双价抗体、串联三scFv、微抗体、纳米抗体等。在一些实施方案中,诸如当抗体是scFv时,治疗性基因序列的单个多核苷酸编码包含连接在一起的重链和轻链两者的单个多肽。抗体片段还包括纳米抗体(例如,sdAb,具有单个单体结构域(诸如具有重链的一对可变结构域但没有轻链)的抗体)。多特异性抗体(例如,双特异性抗体、三特异性抗体等)是本领域已知的,并且被认为是本发明的治疗性基因序列的表达产物。

[0168] 在一些情况下,治疗性序列编码一种或多种蛋白质(例如,一种蛋白质、两种蛋白

质、三种蛋白质、四种蛋白质或更多种蛋白质),每种蛋白质具有的长度为至少25个氨基酸、至少50个氨基酸、至少100个氨基酸、至少200个氨基酸、至少500个氨基酸、至少1,000个氨基酸、至少1,500个氨基酸、至少2,000个氨基酸、至少2,500个氨基酸、至少3,000个氨基酸或更多个氨基酸(例如,25至5,000个氨基酸、50至5,000个氨基酸、100至5,000个氨基酸、200至5,000个氨基酸、500至5,000个氨基酸、1,000至5,000个氨基酸、1,500至5,000个氨基酸或2,000至5,000个氨基酸;例如,25至4,000个氨基酸、50至4,000个氨基酸、100至4,000个氨基酸、200至4,000个氨基酸、500至4,000个氨基酸、1,000至4,000个氨基酸、1,500至4,000个氨基酸或2,000至4,000个氨基酸;例如,25至3,000个氨基酸、50至3,000个氨基酸、100至3,000个氨基酸、200至3,000个氨基酸、500至3,000个氨基酸、1,000至3,000个氨基酸、1,500至3,000个氨基酸或2,000至3,000个氨基酸)。在这种治疗性序列编码两个或更多个蛋白质的实施方案中,治疗性序列可以是多顺反子治疗性序列或多转录单位治疗性序列。此类多顺反子治疗性序列可以是例如编码F1t3L、IL-12和XCL1的三顺反子盒,如本文实施例7中所述。

[0169] 在涉及非蛋白质编码治疗性序列的实施方案中,治疗性序列缺少蛋白质编码结构域(例如,治疗性蛋白质编码结构域)。例如,在一些实施方案中,治疗性序列包含非蛋白质编码治疗性核酸,诸如短发夹RNA(shRNA)编码序列或免疫活化性治疗性核酸(例如,TLR激动剂)。

[0170] 在一些实施方案中,治疗性序列或其他所关注序列(其可包括非治疗性编码序列,诸如用于测量表达或持久性的报告基因)的长度为0.1Kb至100Kb(例如,长度为0.2Kb至90Kb、0.5Kb至80Kb、1.0Kb至70Kb、1.5Kb至60Kb、2.0Kb至50Kb、2.5Kb至45Kb、3.0Kb至40Kb、3.5Kb至35Kb、4.0Kb至30Kb、4.5Kb至25Kb、4.6Kb至24Kb、4.7Kb至23Kb、4.8Kb至22Kb、4.9Kb至21Kb、5.0Kb至20Kb、5.5Kb至18Kb、6.0Kb至17Kb、6.5Kb至16Kb、7.0Kb至15Kb、7.5Kb至14Kb、8.0Kb至13Kb、8.5Kb至12.5Kb、9.0Kb至12.0Kb、9.5Kb至11.5Kb或10.0Kb至11.0Kb,例如,长度为0.1Kb至0.5Kb、0.5Kb至1.0Kb、1.0Kb至2.5Kb、2.5Kb至4.5Kb、4.5Kb至8Kb、8Kb至10Kb、10Kb至15Kb、15Kb至20Kb或更长,例如,长度为0.1Kb至0.25Kb、0.25Kb至0.5Kb、0.5Kb至1.0Kb、1.0Kb至1.5Kb、1.5Kb至2.0Kb、2.0Kb至2.5Kb、2.5Kb至3.0Kb、3.0Kb至3.5Kb、3.5Kb至4.0Kb、4.0Kb至4.5Kb、4.5Kb至5.0Kb、5.0Kb至5.5Kb、5.5Kb至6.0Kb、6.0Kb至6.5Kb、6.5Kb至7.0Kb、7.0Kb至7.5Kb、7.5Kb至8.0Kb、8.0Kb至8.5Kb、8.5Kb至9.0Kb、9.0Kb至9.5Kb、9.5Kb至10Kb、10Kb至10.5Kb、10.5Kb至11Kb、11Kb至11.5Kb、11.5Kb至12Kb、12Kb至12.5Kb、12.5Kb至13Kb、13Kb至13.5Kb、13.5Kb至14Kb、14Kb至14.5Kb、14.5Kb至15Kb、15Kb至15.5Kb、15.5Kb至16Kb、16Kb至16.5Kb、16.5Kb至17Kb、17Kb至17.5Kb、17.5Kb至18Kb、18Kb至18.5Kb、18.5Kb至19Kb、19Kb至19.5Kb、19.5Kb至20Kb、20Kb至21Kb、21Kb至22Kb、22Kb至23Kb、23Kb至24Kb、24Kb至25Kb或更长,例如,长度为约4.5Kb、约5.0Kb、约5.5Kb、约6.0Kb、约6.5Kb、约7.0Kb、约7.5Kb、约8.0Kb、约8.5Kb、约9.0Kb、约9.5Kb、约10Kb、约11Kb、约12Kb、约13Kb、约14Kb、约15Kb、约16Kb、约17Kb、约18Kb、约19Kb、约20Kb或更长)。在一些实施方案中,治疗性序列为至少10Kb(例如,10Kb至15Kb、15Kb至20Kb或20Kb至30Kb;例如,10Kb至13Kb、10Kb至12Kb或10Kb至11Kb;例如,10至11Kb、11至12Kb、12至13Kb、13至14Kb或14至15Kb)。在一些实施方案中,序列的长度为至少1,100bp(例如,长度为1,100bp至10,000bp、1,100bp至8,000bp或1,100bp至5,000bp)。在一些实施方案中,序列的长度为至

少2,500bp(例如,长度为2,500bp至15,000bp、2,500bp至10,000bp或2,500bp至5,000bp;例如,2,500bp至5,000bp、5,000bp至7,500bp、7,500bp至10,000bp、10,000bp至12,500bp或12,500bp至15,000bp)。在一些实施方案中,序列为至少8,000bp、至少9,000bp、至少10,000bp、至少11,000bp、至少12,000bp、至少13,000bp、至少14,000bp、至少15,000bp、至少16,000bp(例如,11,000bp至16,000bp、12,000bp至16,000bp、13,000bp至16,000bp、14,000bp至16,000bp或15,000bp至16,000bp)。在特定实施方案中,序列的长度足够以编码蛋白质,并且不是寡核苷酸治疗剂(例如,不是反义、siRNA、shRNA治疗剂等)。

[0171] 在一些实施方案中,所关注序列(诸如治疗性或非治疗性编码序列)的3'末端通过不超过50bp(例如,3bp至34bp、4bp至20bp、5bp至12bp或6bp至10bp;例如,3bp至5bp、4bp至6bp、8bp至12bp、12bp至18bp、18bp至24bp、24bp至30bp、30bp至35bp或35bp至40bp;例如,3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、31bp、32bp、33bp、34bp、35bp、36bp、37bp、38bp、39bp、40bp、41bp、42bp、43bp、44bp、45bp、46bp、47bp、48bp、49bp或50bp)的非细菌序列(例如重组位点,例如重组scar)连接至环状DNA载体中的ori序列的5'末端。

[0172] 在一些实施方案中,所关注序列(诸如治疗性或非治疗性编码序列)的3'末端通过不超过30bp(例如,3bp至24bp、4bp至18bp、5bp至12bp或6bp至10bp;例如,3bp至5bp、4bp至6bp、8bp至12bp、12bp至18bp、18bp至24bp或24bp至30bp;例如,3bp、4bp、5bp、6bp、7bp、8bp、10bp、15bp、20bp、25bp或30bp)的非细菌序列连接至环状DNA载体中的ori序列的5'末端。

[0173] 在一些实施方案中,除了治疗性蛋白质编码结构域或治疗性非蛋白质编码结构域之外,本文所述环状DNA载体中包含的所关注序列还包含报告序列。在一些实施方案中,治疗性序列缺少报告序列。在一些实施方案中,所关注序列包括报告序列,但不包括治疗性序列。报告序列可以是例如报告基因。此类报告基因可以用于验证治疗性基因序列的表达,例如,在特定细胞和组织中的表达。通过引用整体并入环状DNA载体中可以提供的报告序列包括但不限于编码 β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶的DNA序列以及本领域熟知的其他序列。当与驱动表达的调控元件缔合时,报告序列提供可通过常规手段检测的信号,这些手段包括酶促、放射成像、比色、荧光或其他光谱测定、荧光活化细胞分选测定和免疫测定(包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学测定)。例如,当标记序列是LacZ基因时,通过 β -半乳糖苷酶活性测定来检测携带信号的载体的存在。当转基因是绿色荧光蛋白或萤光素酶时,携带信号的载体可以通过光度计的颜色或光产生来目视测量。

[0174] 作为治疗性序列或所关注的其他序列的一部分,本发明的环状DNA载体可以包含调节或改善靶细胞中的转录、翻译和/或表达的常规调控元件。合适的调控元件在国际公布WO 2021/055760中有所描述,所述公布通过引用整体并入本文。

[0175] 在一些情况下,自我复制型RNA分子包含(i)复制酶编码序列(例如,编码可以从自我复制型RNA分子转录RNA的RNA依赖性RNA聚合酶的RNA序列)和(ii)异源性调控基因。聚合酶可以是甲病毒复制酶,例如,包含一个、两个、三个或全部四个甲病毒非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的甲病毒复制酶。在一些情况下,聚合酶是VEE复制酶,例如,包含一个、两个、三个或全部四个甲病毒非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的VEE复制酶。

[0176] 在本发明的一些情况下,自我复制型RNA分子不编码甲病毒结构蛋白(例如,衣壳蛋白)。这种自我复制型RNA可以使自身的基因组RNA拷贝在细胞中产生,但不产生含RNA病

毒颗粒。无法产生这些病毒颗粒意味着,与野生型甲病毒不同的是,自我复制型RNA分子不能以感染性形式延续。可以用编码所关注的异源性调控蛋白的基因来替代甲病毒结构蛋白,以使得亚基因组转录物编码异源性调控蛋白而非结构甲病毒颗粒蛋白。

[0177] 因此,在一些情况下,本发明的自我复制型RNA分子可以具有两个开放阅读框。第一(5')开放阅读框编码复制酶;第二(3')开放阅读框编码一种或多种(例如,两种或三种)治疗性蛋白质。在一些实施方案中,RNA可以具有附加(例如,下游)开放阅读框,例如,以编码其他基因或编码附属多肽。

[0178] 合适的自我复制型RNA分子可以具有不同的长度。在本发明的一些实施方案中,自我复制型RNA分子的长度为5,000至50,000个核苷酸(即,5kb至50kb)。在一些情况下,自我复制型RNA分子的长度为5kb至20kb(例如,长度为6kb至18Kb、7kb至16Kb、8kb至14kb或9kb至12kb,例如,长度为5kb至6Kb、6kb至7Kb、7kb至8Kb、8kb至9Kb、9kb至10Kb、10kb至11Kb、11kb至12Kb、12kb至13Kb、13kb至14Kb、14kb至15Kb、15kb至16Kb、16kb至18kb或18kb至20kb,例如,长度为约5Kb、约6Kb、约7Kb、约8Kb、约9Kb、约10Kb、约10.5Kb、约11Kb、约11.5Kb、约12Kb、约12.5Kb、约13Kb、约14Kb、约15Kb、约16Kb、约17Kb、约18Kb、约19kb或约20kb)。

[0179] 自我复制型RNA分子可以具有3'多聚-A尾。另外,自我复制型RNA分子可以包含多聚-A聚合酶识别序列(例如,AAUAAA)。

[0180] 在一个特定实施方案中,根据本发明的RNA不编码报告分子,诸如萤光素酶或荧光蛋白,诸如绿色荧光蛋白(GFP)。

[0181] 在一些实施方案中,自我复制型RNA编码的复制酶可以是本文所述的复制酶中的任一种的变体。在一些实施方案中,变体是功能片段(例如,在功能上与蛋白质相似或在功能上与蛋白质相同的蛋白质的片段)。

[0182] V. 药物组合物

[0183] 效率的提高使得本发明的方法特别适合于含有环状DNA载体的药物组合物的可扩大制备。本文所述的产生环状DNA载体的方法中的任一种均可以适用于产生含有在药学上可接受的载剂中的环状DNA载体的药物组合物。

[0184] 作为本文描述的任何方法的一部分,下游纯化过程可以容易地应用。例如,各种色谱法步骤在本领域中是已知的,并且可以适于去除细菌副产物、内毒素、细菌人工染色体(BAC)、辅助质粒等。在一些情况下,细菌产生的环状DNA载体的药物组合物通过阴离子交换色谱法或疏水作用色谱法来纯化。

[0185] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂含有在药学上可接受的载剂中的至少1.0mg环状DNA载体(例如,1.0mg至10g、1.0mg至5.0g、1.0mg至1.0g、1.0mg至500mg、1.0mg至200mg、1.0mg至100mg、1.0mg至50mg、1.0mg至25mg、1.0mg至20mg、1.0mg至15mg、1.0mg至10mg、1.0mg至5.0mg、2.0mg至10g、2.0mg至5.0g、2.0mg至1.0g、2.0mg至500mg、2.0mg至200mg、2.0mg至100mg、2.0mg至50mg、2.0mg至25mg、2.0mg至20mg、2.0mg至15mg、2.0mg至10mg、2.0mg至5.0mg、5.0mg至10g、5.0mg至5.0g、5.0mg至1.0g、5.0mg至500mg、5.0mg至200mg、5.0mg至100mg、5.0mg至50mg、5.0mg至25mg、5.0mg至20mg、5.0mg至15mg、5.0mg至10mg、10mg至10g、10mg至5.0g、10mg至1.0g、10mg至500mg、10mg至200mg、10mg至100mg、10mg至50mg、10mg至25mg、10mg至20mg或10mg至15mg)。

[0186] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂在药学上可接受的载剂中包含至少2.0mg环状DNA载体。在一些实施方案中,通过本文所述的方法中的任一种产生的药物制剂含有在药学上可接受的载剂中的至少5.0mg环状DNA载体。在一些实施方案中,通过本文所述的方法中的任一种产生的药物制剂含有在药学上可接受的载剂中的至少10.0mg环状DNA载体。

[0187] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂基本上不含杂质。例如,在一些实施方案中,药物制剂包含<2.0质量%的蛋白质含量(例如,<1.9质量%、<1.8质量%、<1.7质量%、<1.6质量%、<1.5质量%、<1.4质量%、<1.3质量%、<1.2质量%、<1.1质量%、<1.0质量%、<0.9质量%、<0.8质量%、<0.7质量%、<0.6质量%、<0.5质量%、<0.4质量%、<0.3质量%、<0.2质量%、<0.1质量%、<0.05质量%或<0.01质量%的蛋白质含量)。在一些情况下,蛋白质含量通过双辛可宁酸测定来确定。另外地或可替代地,蛋白质含量通过ELISA来确定。

[0188] 在一些情况下,药物制剂包含<5.0质量%的RNA含量(例如,<4.5质量%、<4.0质量%、<3.5质量%、<3.0质量%、<2.5质量%、<2.0质量%、<1.9质量%、<1.8质量%、<1.7质量%、<1.6质量%、<1.5质量%、<1.4质量%、<1.3质量%、<1.2质量%、<1.1质量%、<1.0质量%、<0.9质量%、<0.8质量%、<0.7质量%、<0.6质量%、<0.5质量%、<0.4质量%、<0.3质量%、<0.2质量%、<0.1质量%、<0.05质量%或<0.01质量%的RNA含量)。在一些实施方案中,RNA含量通过琼脂糖凝胶电泳来确定。在一些实施方案中,RNA含量通过定量PCR来确定。在一些实施方案中,RNA含量通过荧光测定(例如,Ribogreen)来确定。

[0189] 在一些实施方案中,药物制剂含有<5.0质量%的gDNA含量(例如,4.5质量%、<4.0质量%、<3.5质量%、<3.0质量%、<2.5质量%、<2.0质量%、<1.9质量%、<1.8质量%、<1.7质量%、<1.6质量%、<1.5质量%、<1.4质量%、<1.3质量%、<1.2质量%、<1.1质量%、<1.0质量%、<0.9质量%、<0.8质量%、<0.7质量%、<0.6质量%、<0.5质量%、<0.4质量%、<0.3质量%、<0.2质量%、<0.1质量%、<0.05质量%或<0.01%质量%gDNA含量)。在一些实施方案中,gDNA含量通过琼脂糖凝胶电泳或毛细管电泳来确定。在一些实施方案中,gDNA含量通过定量PCR来确定。在一些实施方案中,gDNA含量通过Southern印迹来确定。

[0190] 在一些实施方案中,药物制剂含有<40EU/mg内毒素。在一些实施方案中,药物制剂含有<20EU/mg内毒素。在一些实施方案中,药物制剂含有<10EU/mg内毒素。在一些实施方案中,药物制剂含有<5EU/mg内毒素(例如,<4EU/mg内毒素、<3EU/mg内毒素、<2EU/mg内毒素、<1EU/mg内毒素、<0.5EU/mg内毒素),例如,如通过鲎(Limulus)阿米巴样细胞裂解物(LAL)测定所测量。

[0191] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物符合根据美国食品和药物管理局颁布并在21C.F.R.部分210和211中阐述的标准的现行良好生产规范(GMP),其全部内容通过引用并入本文。

[0192] 本文提供的药物组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载剂,诸如赋形剂和/或稳定剂,所述药学上可接受的载剂在所采用的剂量和浓度处对接受治疗的个体(例如,人类患者)是无毒的。在一些实施方案中,药学上可接受的载剂是pH缓冲水溶液。药学上可接受的载剂的实例包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,

诸如甘露糖醇或山梨糖醇；成盐抗衡离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂，诸如吐温、聚乙二醇 (PEG) 和Pluronic。

[0193] 如果药物组合物以液体形式提供，则药学上可接受的载剂可以是水 (例如，无热原水)、等渗盐水或缓冲水溶液 (例如，磷酸盐缓冲溶液或柠檬酸盐缓冲溶液)。药物组合物的注射可以在水或缓冲液中进行，所述缓冲液诸如水性缓冲液，例如含有钠盐 (例如，至少50mM的钠盐)、钙盐 (例如，至少0.01mM的钙盐) 或钾盐 (例如，至少3mM的钾盐)。根据一个特定实施方案，钠盐、钙盐或钾盐可以以它们的卤化物形式存在，所述卤化物例如氯化物、碘化物或溴化物，也可以以它们的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐或硫酸盐等形式存在。钠盐的实例包括但不限于NaCl、NaI、NaBr、Na₂CO₂、NaHCO₂和Na₂SO₄。钾盐的实例包括例如KCl、KI、KBr、K₂CO₂、KHCO₂和K₂SO₄。钙盐的实例包括例如CaCl₂、CaI₂、CaBr₂、CaCO₂、CaSO₄和Ca(OH)₂。附加，缓冲液中可以含有前述阳离子的有机阴离子。根据一个特定实施方案，如上文定义的适合于注射目的的缓冲液可以含有选自以下的盐：氯化钠 (NaCl)、氯化钙 (CaCl₂) 或氯化钾 (KCl)，其中可以存在其他阴离子。CaCl₂也可以被另一种盐 (诸如KCl) 替代。在一些实施方案中，注射缓冲液中的盐以至少50mM氯化钠 (NaCl)、至少3mM氯化钾 (KCl) 和至少0.01mM氯化钙 (CaCl₂) 的浓度提供。相对于特定参考培养基，注射缓冲液可以是高渗的、等渗的或低渗的，即，相对于特定参考培养基，缓冲液可以具有更高、相等或更低的盐含量，其中优选地使用前述盐的这些浓度，不会由于渗透或其他浓度效应而对细胞造成损害。参考培养基可以是液体，诸如血液、淋巴、胞质液、其他体液或常见的缓冲液。此类常见缓冲液或液体是本领域的技术人员已知的。林格氏乳酸溶液是特别优选的基础液体。

[0194] 一种或多种相容性固体或液体填充剂、稀释剂或包封化合物可以适合于向人体施用。根据本发明的药物组合物的成分能够与如本文定义的根据本发明的核酸载体混合，这种混合方式不会发生在典型使用条件下显著降低根据本发明的 (药物) 组合物的药学有效性的相互作用。药学上可接受的载剂、填充剂和稀释剂可以具有足够高的纯度和足够低的毒性，以使它们适合于向接受治疗的个体施用。可以用作药学上可接受的载剂、填充剂或它们的成分的化合物的一些实例是糖，诸如乳糖、葡萄糖、海藻糖和蔗糖；淀粉，诸如玉米淀粉或马铃薯淀粉；葡萄糖；纤维素及其衍生物，诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、乙酸纤维素；粉末状黄蓍胶；麦芽；明胶；牛脂；固体助流剂，诸如硬脂酸、硬脂酸镁；硫酸钙；植物油，诸如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油；多元醇，诸如聚丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；或者藻酸。

[0195] 药学上可接受的载剂的选择可以根据药物组合物的施用方式来确定。

[0196] 适合于注射的单位剂量形式包括水、生理盐水以及它们的混合物的无菌溶液。此类溶液的pH可以调节至约7.4。适合于注射的载剂包括水凝胶、控制释放或延迟释放的装置、聚乳酸和胶原蛋白基质。适用于局部施加的药学上可接受的载剂包括适用于洗剂、霜剂、凝胶剂等中的载剂。如果药物组合物口服施用，则片剂、胶囊剂等等是优选的单位剂量形式。

[0197] 可以包含在药物组合物中的其他添加剂是乳化剂，诸如吐温；润湿剂，诸如月桂基硫酸钠；着色剂；药物载剂；稳定剂；抗氧化剂；和防腐剂。

[0198] 根据本发明的药物组合物可以以液体或干燥 (例如，冻干) 形式提供。在一个特定实施方案中，药物组合物的核酸载体以冻干形式提供。包含本发明的核酸载体的冻干组合

物可在施用前在合适的缓冲液中复溶,有利地基于水性载剂,例如林格-乳酸盐溶液(Ringer-Lactate solution)、林格溶液(Ringer solution)或磷酸盐缓冲液。

[0199] 在本发明的某些实施方案中,本发明的环状DNA载体中的任一种可以与一种或多种阳离子或聚阳离子化合物(例如,阳离子或聚阳离子聚合物、阳离子或聚阳离子肽或蛋白质(例如,鱼精蛋白)、阳离子或聚阳离子多糖以及/或者阳离子或聚阳离子脂质)复合。

[0200] 根据一个特定实施方案,本发明的环状DNA载体可以与脂质复合,以形成一种或多种脂质体、脂质复合物或脂质纳米颗粒。因此,在一个实施方案中,药物组合物包含含有环状DNA载体的脂质体、脂质复合物和/或脂质纳米颗粒。

[0201] 基于脂质的制剂由于其生物相容性和易于大规模生产,可以成为核酸载体的有效递送系统。阳离子脂质作为核酸递送的合成材料已经被广泛研究。在混合之后,核酸被阳离子脂质缩合,形成称为脂质复合物的脂质/核酸复合物。这些脂质复合物能够保护遗传物质免受核酸酶的作用,并且通过与带负电荷的细胞膜相互作用将遗传物质递送至细胞中。脂质复合物可以通过将在生理pH下带正电荷的脂质与带负电荷的核酸直接混合来制备。

[0202] 常规脂质体包含可以由阳离子、阴离子或中性磷脂和胆固醇组成的脂质双层,所述脂质双层包封水性核心。脂质双层和水性空间可以分别包含疏水性或亲水性化合物。脂质体的特征和体内行为可以通过向脂质体表面添加亲水性聚合物涂层(例如聚乙二醇(PEG))(以赋予空间稳定性)来进行修饰。此外,脂质体可以用于通过使配体(例如,抗体、肽和碳水化合物)与其表面附接或者与附接的PEG链的末端附接来实现特异性靶向。

[0203] 脂质体是基于胶体脂质的递送系统和基于表面活性剂的递送系统,所述递送系统由围绕水性区室的磷脂双层组成。它们可以以球形囊泡提供,并且大小范围为20nm至几微米。基于阳离子脂质的脂质体能够通过静电相互作用与带负电荷的核酸复合,从而使复合物具有生物相容性、低毒性,并且具有体内临床应用所需的大规模生产的可能性。脂质体可以与质膜融合从而被吸收;一旦进入细胞,脂质体就会通过内吞途径进行处理,然后遗传物质从胞内体/载剂释放至细胞质中。

[0204] 阳离子脂质体可以作为环状DNA载体的递送系统。阳离子脂质(诸如MAP(1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷)和DOTMA(N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-甲基硫酸铵))可以与带负电荷的核酸形成复合物或脂质复合物,以通过静电相互作用形成纳米颗粒,从而提供高体外转染效率。此外,用于核酸载体递送的基于中性脂质的纳米脂质体(例如,基于中性1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)的纳米脂质体)也是可用的。

[0205] 因此,在本发明的一个实施方案中,使环状DNA载体与阳离子脂质和/或中性脂质复合,从而在本发明的药物组合物中形成脂质体、脂质纳米颗粒、脂质复合物或基于中性脂质的纳米脂质体。

[0206] 在一个特定实施方案中,药物组合物包含与阳离子化合物或聚阳离子化合物和/或聚合物载剂一起配制的本发明的环状DNA载体。因此,在本发明的另一个实施方案中,如本文所定义的环状DNA载体与阳离子或聚阳离子化合物或聚合物载剂任选地以选自以下范围的核酸载体与阳离子或聚阳离子化合物和/或聚合物载剂的重量比缔合或复合:约5:1(w/w)至约0.25:1(w/w),例如,约5:1(w/w)至约0.5:1(w/w),例如,约4:1(w/w)至约1:1(w/w)或约3:1(w/w)至约1:1(w/w),例如,约3:1(w/w)至约2:1(w/w);或者任选地以在约0.1至10的范围内,例如,在约0.3至4或0.3至1的范围内,例如,在约0.5至1或0.7至1的范围内,例

如,在约0.3至0.9或0.5至0.9的范围内的核酸载体与阳离子或聚阳离子化合物和/或聚合物载剂的氮/磷酸盐(N/P)比率缔合或复合。例如,环状DNA载体与一种或多种聚阳离子的N/P比率在约0.1至10的范围内,包括在约0.3至4、约0.5至2、约0.7至2和约0.7至1.5的范围内。

[0207] 本文所述的核酸载体还可以与媒介物、转染剂或复合剂结合,以提高转染效率和/或根据本发明的调控基因的表达。

[0208] 在一些情况下,使根据本发明的环状DNA载体与一种或多种聚阳离子复合,优选地与鱼精蛋白或寡聚转染胺复合。可以用作转染剂或复合剂的其他阳离子或聚阳离子化合物可以包括阳离子多糖(例如壳聚糖、聚凝胺)、阳离子聚合物(例如聚乙烯亚胺(PEI))、阳离子脂质(例如DOTMA:[1-(2,3-唾液酸基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵、DMRIE、二-C14-脘、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGTC、CTAP、DOPE、LEAP、DOPE:二油酰磷脂酰乙醇-胺、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS:双十八烷基酰胺甘氨酸精胺、DIMRI:二肉豆蔻酰-氧丙基二甲基羟乙基溴化铵、MAP:二油酰基氧基-3-(三甲基铵)丙烷、DC-6-14:0,0-双十四烷酰基-N-(α -三甲基铵十六烷基)乙二醇胺氯化物、CLIP1:外消旋-[2,3-双十八烷基氧基丙基)(2-羟乙基)]-二甲基氯化铵、CLIP6:外消旋-[2(2,3-双十六烷基氧基丙基-氧基甲基氧基)乙基]三甲基铵、CLIP9:外消旋-[2(2,3-双十六烷基氧基丙基-氧基琥珀酰基氧基)乙基]三甲基铵、寡聚转染胺)或者阳离子或聚阳离子聚合物(例如改性聚氨基酸,诸如 β -氨基酸聚合物或反向聚酰胺等,改性聚乙烯,诸如PVP(聚(N-乙基-4-乙烯基吡啶溴化物))等,改性丙烯酸酯,诸如pDMAEMA(聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯))等,改性酰胺基胺,诸如pAMAM(聚(酰胺基胺))等,改性聚 β 氨基酯(PBAE),诸如二胺末端改性的1,4二丙烯酸丁二醇酯-共聚-5-氨基-1-戊醇聚合物等,树枝状聚合物,诸如聚丙胺树枝状聚合物或基于pAMAM的树枝状聚合物等,聚亚胺,诸如PEI:聚(乙烯亚胺)、聚(丙烯亚胺)等,聚烯丙胺,基于糖主链的聚合物,诸如基于环糊精的聚合物、基于葡聚糖的聚合物、壳聚糖等,基于甲硅烷主链的聚合物,诸如PMOXA-PDMS共聚物等,由一个或多个阳离子嵌段(例如,选自上文提及的阳离子聚合物)和一个或多个亲水性或疏水性嵌段(例如,聚乙二醇)的组合组成的嵌段聚合物);等等。

[0209] 根据一个具体的实施方案,药物组合物包括包封在聚合物载剂内或附着在聚合物载剂上的环状DNA载体。根据本发明使用的聚合物载剂可以是由二硫键交联的阳离子组分形成的聚合物载剂。二硫键交联的阳离子组分可以彼此相同或彼此不同。聚合物载剂还可以含有其他组分。另外特别优选的是,根据本发明使用的聚合物载剂包含阳离子肽、蛋白质或聚合物以及任选地如本文定义的其他组分的混合物,它们如本文所述通过二硫键交联。在本发明上下文中,WO 2012/013326的公开内容通过引用并入本文。在本发明上下文中,通过二硫键交联形成聚合物载剂基础的阳离子组分通常选自适合于此目的的任何合适的阳离子或聚阳离子肽、蛋白质或聚合物,尤其是能够使如本文定义的核酸载体或组合物中包含的其他核酸进行复合,从而优选地使核酸载体缔合的任何阳离子或聚阳离子肽、蛋白质或聚合物。阳离子或聚阳离子肽、蛋白质或聚合物可以是线性分子;然而,也可以使用支链阳离子或聚阳离子肽、蛋白质或聚合物。

[0210] 聚合物载剂的每种二硫键交联的阳离子或聚阳离子蛋白质、肽或聚合物(可以用于使作为药物组合物的一部分包含在内的根据本发明的环状DNA载体进行复合)可以含有至少一个SH部分(例如,至少一个半胱氨酸残基或表现出SH部分的任何其他化学基团),所

述SH部分能够在与至少一种其他阳离子或聚阳离子蛋白质、肽或聚合物(作为如本文提及的聚合物载剂的阳离子组分)发生缩合时形成二硫键。

[0211] 用于使本发明的环状DNA载体发生复合的此类聚合物载剂可以由二硫键交联的阳离子(或聚阳离子)组分形成。具体而言,聚合物载剂的此类阳离子或聚阳离子肽或蛋白质或聚合物(包含或另外被修饰为包含至少一个SH部分)可以选自作为复合剂的蛋白质、肽和聚合物。

[0212] 在其他实施方案中,根据本发明的环状DNA载体可以在合适的缓冲液中裸露施用,而不需要与任何其他媒介物、转染剂或复合剂结合。

[0213] VI. 使用方法

[0214] 本文提供了通过将本文所述的环状DNA载体中的任一种或它们的药物组合物施用于受试者来诱导所关注序列(如治疗序列)在有需要的受试者体内表达(例如,持续表达)(例如,作为基因治疗方案的一部分)的方法。受试者的靶细胞或靶组织可以通过检查宿主细胞的核酸序列(例如, RNA序列, 例如, mRNA序列)来表征, 诸如通过检测或定量所递送的治疗性序列的存在(例如, 持久存在)的Southern印迹或PCR分析来表征。或者, 治疗性序列在受试者体内的表达可以通过治疗性序列的递送以监测正在治疗的疾病的进展(例如, 与治疗性序列靶向的缺陷或突变相关)来表征(例如, 定量或定性表征)。在一些实施方案中, 治疗性序列的转录或表达(例如, 持续转录或持续表达)通过观察与疾病相关的一种或多种症状的减少来确认。

[0215] 因此, 本发明的实施方案包括通过将本文所述的环状DNA载体中的任一种或它们的药物组合物施用于受试者来治疗受试者的疾病的方法。本文所述的环状DNA载体中的任一种或它们的药物组合物可以以1 μ g至10mg DNA(例如, 5 μ g至5.0mg、10 μ g至2.0mg或100 μ g至1.0mg DNA, 例如, 10 μ g至20 μ g、20 μ g至30 μ g、30 μ g至40 μ g、40 μ g至50 μ g、50 μ g至75 μ g、75 μ g至100 μ g、100 μ g至200 μ g、200 μ g至300 μ g、300 μ g至400 μ g、400 μ g至500 μ g、500 μ g至1.0mg、1.0mg至5.0mg或5.0mg至10mg DNA, 例如, 约10 μ g、约20 μ g、约30 μ g、约40 μ g、约50 μ g、约60 μ g、约70 μ g、约80 μ g、约90 μ g、约100 μ g、约150 μ g、约200 μ g、约250 μ g、约300 μ g、约350 μ g、约400 μ g、约450 μ g、约500 μ g、约600 μ g、约700 μ g、约750 μ g、约1.0mg、约2.0mg、约2.5mg、约5.0mg、约7.5mg或约10mg DNA)的剂量施用于受试者。

[0216] 在一些实施方案中, 与其他基因治疗载体(例如, 质粒DNA载体和病毒载体)的施用相比, 环状DNA载体或其药物组合物的施用不太可能诱导受试者体内的免疫响应。

[0217] 在一些情况下, 本文提供的环状DNA载体以及它们的药物组合物适合于重复给予, 因为相对于参考载体(诸如质粒DNA载体或AAV载体), 它们能够转染靶细胞而不会触发免疫响应或诱导免疫响应的减少, 如上文所讨论。因此, 本发明提供了重复施用本文所述的环状DNA载体和药物组合物的方法。可以以合适的频率和持续时间来重复任何前述给予剂量。在一些实施方案中, 受试者接受约每天两次、约每天一次、约每周五次、约每周四次、约每周三次、约每周两次、约每周一次、约每月两次、约每月一次、约每六周一次、约每两个月一次、约每三个月一次、约每四个月一次、每年两次、每年一次或更低频率的剂量。在一些实施方案中, 剂量的次数和频率与靶细胞的转换率相对应。应当理解, 在使用本文所述的载体转染的长寿命有丝分裂后靶细胞中, 单剂量载体可以足以在相当长的时间内维持异源性基因在靶细胞内的表达。因此, 在其他实施方案中, 本文提供的环状DNA载体可以以单剂量施用于受

试者。将环状DNA载体递送至受试者的次数可以是维持临床(例如,治疗)有益效果所需的次数。

[0218] 本发明的方法包括通过任何合适的途径来施用环状DNA载体或其药物组合物。环状DNA载体或其药物组合物可以全身或局部施用,例如静脉内、眼部(例如,玻璃体内(例如通过玻璃体内注射)、视网膜下、通过滴眼剂、眼内、眶内)、肌肉内、皮内、肝内、脑内、肌肉内、经皮、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鞘内、鼻内、阴道内、直肠内、瘤内、皮下、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐下、口服、局部、透皮、通过吸入、通过气溶胶、通过注射(例如,通过快速注射)、通过电穿孔、通过移植、通过输注(例如,通过连续输注)、通过局部灌注直接浸泡靶细胞、通过导管、通过灌注、以霜剂或以脂质组合物施用。

[0219] 本文所述的环状DNA载体可以通过体内电转移(例如,体内电穿孔)来递送至细胞中。体内电穿孔已经在特定组织(诸如皮肤、骨骼肌、某些肿瘤类型和肺上皮)中得到展示。通过体内电穿孔将裸露的DNA递送至细胞中涉及将DNA施用至靶组织,然后施加电场以通过产生孔隙来暂时增加组织内的细胞膜渗透性,从而允许DNA分子穿过细胞膜。作为一个实例,使用体内电穿孔向皮肤递送在Cha&Daud Hum.Vaccin.Immunother.2012,8(11):1734-1738中有所描述,所述文献通过引用整体并入。骨骼肌的体内电穿孔在Sokolowska&Blachnio-Zabielska,Int.J.Molecular Sci.2019,20:2776中有所描述,所述文献通过引用整体并入。使用体内电穿孔进行的瘤内递送在Aung等人,Gene Therapy 2009,16:830-839中有所描述,所述文献通过引用整体并入。DNA至肺细胞的体内电穿孔在Pringle等人,J.Gene Med.2007,9:369-380中有所描述,所述文献通过引用整体并入。环状DNA载体至眼内细胞(例如,视网膜细胞和/或感光细胞)的体内电转移在国际专利公布WO 2022/198138中有所描述,所述专利公布通过引用整体并入。在一些情况下,在环状DNA载体施用于眼睛之后,可以将电极放置于眼睛内部(例如,距离视网膜约1mm以内),并且可以在适合于将环状DNA载体电转移至靶细胞的条件下通过电极将电场传输到目标眼组织(例如,通过施加六个至十个脉冲,每个脉冲10V至100V)。具有适用于在哺乳动物组织中传输电场的电极的装置和系统可商购获得并且可以用于本文公开的方法。在一些情况下,电场通过包括针(例如,放置于玻璃体内或视网膜下腔内的针)的电极传输。合适的针电极包括由IGEA®销售的CLINIPORATOR®电极和由AMBU®销售的针电极。本发明的方法包括将本文所述的环状DNA载体中的任一种或它们的药物组合物通过体内电转移施用于皮肤、骨骼肌、肿瘤(包括,例如,黑素瘤)、眼睛和肺。

[0220] 此外,或可替代地,环状DNA载体或其药物组合物可离体施用于宿主细胞,诸如通过从个体患者中移植(或以其他方式衍生,例如诱导分化)的细胞,然后将宿主细胞重新植入患者体内,例如在选择掺入载体的细胞后。因此,在一些方面,本公开提供了经转染的宿主细胞及其用于治疗疾病的施用方法。

[0221] 另外地或可替代地,本发明包括治疗患有疾病或障碍的受试者的方法,所述方法通过将本发明的分离的DNA载体(或其组合物)施用于受试者来进行。

[0222] 本文所述的环状DNA载体中的任一种的转染效率的评估可以使用本领域已知或本文所述的任何方法来进行。经转染的细胞的分离也可以根据标准技术来进行。例如,包含治疗性基因的细胞可以表达可见标记,诸如荧光蛋白(例如,GFP)或其他报告蛋白,所述可见

标记由异源性基因的序列编码,有助于鉴定和分离包含异源性基因的一种或多种细胞。含有治疗性基因的细胞也可以通过检查宿主细胞的核酸序列(例如,RNA序列,例如,mRNA序列)来表征,诸如通过测定载体中含有的异源性基因的存在Southern印迹或PCR分析来表征。

[0223] 因此,本发明的方法包括,在向受试者施用编码本文所述的基因的任何环状DNA载体后,随后检测所述基因在受试者中的表达。表达可以在施用后一周至四周、在施用后一个月至四个月、在施用后四个月至一年、在施用后一年至五年或在施用后五年至二十年(例如,在施用后至少一周、至少两周、至少一个月、至少四个月、至少一年、至少两年、至少五年、至少十年)检测到。在任何这些检测时间点,都可以观察到环状DNA载体的持久性(例如,附加型持久性)。在一些实施方案中,环状DNA载体的持久性比参考载体(例如,在细菌中产生或者具有本发明的载体中不存在的一种或多种细菌标志物的环状载体)高5%至50%、高50%至100%、一倍至五倍或五倍至十倍(例如,至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍或更多)。

[0224] VII. 试剂盒和制品

[0225] 在本发明的另一方面,本文描述了含有任何环状DNA载体或其药物组合物的制品或试剂盒。制品包括容器以及在容器上或与容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由多种材料(诸如玻璃或塑料)形成。容器容纳组合物,所述组合物本身或与另一种组合物组合可有效治疗、预防和/或诊断病症,并且容器可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的环状DNA载体或包含环状DNA载体的药物组合物。标签或包装插页标明组合物可用于治疗包装内容物可治疗的病症。此外,制品可以包括(a)第一容器,其中含有组合物,其中所述组合物包含环状DNA载体或其药物组合物;以及(b)第二容器,其中含有组合物,其中所述组合物包括附加治疗剂。制品还可以包括包装插页,所述包装插页标明组合物可用于治疗特定病症。可替代地或另外地,制品可以进一步包括第二(或第三)容器,所述容器包含药学上可接受的载剂,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液或上文公开的药学上可接受的载剂中的任一种。它还可以包括商业和使用者所需的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器或其他递送装置。

[0226] 实施例

[0227] 实施例1. ColE2-P9复制起点赋予稳定的质粒维持

[0228] 为了测试位于质粒内的ColE2-P9复制起点(ori)是否能赋予质粒在大肠杆菌中的稳定维持,在pir⁺细胞中构建并制备了含有ori的三种变体中的一种(SEQ ID NO:2-4)、R6K起点和羧苄青霉素抗性标记的质粒。将质粒转化到S1037中,并且在补充有羧苄青霉素的LB琼脂板上选择。来自每个板的菌落在37°C下在不含抗生素的LB中培养。过夜培养物在不含抗生素的新鲜LB中稀释1000倍并在37°C下培养。在五次传代后,将每种过夜培养物在不含抗生素的LB琼脂板上重新划线,并且在37°C下生长过夜。将每个板上的20个菌落铺在含或不含羧苄青霉素的LB琼脂板上。在总共六天后(在此期间估计发生了≥210次群体倍增),所有起点变体的菌落大小都是正常的,并且在所有三种起点变体的所有20个菌落中都检测到了质粒(图1)。这些结果表明,40-bp复制起点允许质粒在大肠杆菌中在多次群体倍增后保

持稳定。

[0229] 实施例2.用于生产环状DNA载体的亲本质粒的生产

[0230] 图2显示了根据本文公开的实施方案,可用于生产环状DNA载体的亲本质粒的生产过程的实例。转录单位的单个组分通过Golden Gate装配被装配到转录单位中。然后通过Golden Gate装配将转录单位装配到亲本质粒中。在这个实施例中,亲本质粒包括侧接载体序列(包含ori和MY07A基因的区段)的LoxP重组位点序列,并且将载体序列与主链序列(包含SpecR、KanR和RFP基因的区段)分开。

[0231] 实施例3.由亲本质粒体内生产环状DNA载体

[0232] 图3显示了体内生产环状DNA载体的实验过程。使用Golden Gate装配方法产生含有侧接LoxP重组位点的载体序列的测试亲本质粒。测试亲本质粒的测试载体序列包括ColE2-P9 ori序列和报告基因(sfGFP)。为了实验的目的,测试载体序列也包括氯霉素抗性基因(CmR),尽管本文描述的环状DNA载体的实施方案缺乏抗生素抗性基因。测试亲本质粒还包括测试主链序列,其包括抗生素抗性基因SpecR和KanR以及报告基因(RFP)。将测试亲本质粒转化到具有在整合到基因组中的组成型启动子(J23119)的控制下的ColE2-P9 Rep基因的工程化大肠杆菌细胞中。制备了测试亲本质粒的其他版本,其具有两个I-PpoI限制性位点、两个I-SceI限制性位点、两个PI-SceI限制性位点、两个I-CeuI限制性位点或一个PI-PspI限制性位点和一个SceI限制性位点,而不是侧接测试载体序列的LoxP位点。具有LoxP位点的测试亲本质粒被命名为p1603,并且具有两个PI-SceI限制性位点的测试亲本质粒被命名为p1600。

[0233] 通过对RFP荧光呈阳性来鉴定含有亲本测试质粒的细菌菌落。Cre重组酶被电穿孔到含有p1603的细胞中,以在LoxP位点处诱导重组并产生测试环状DNA载体。Cre电穿孔的程序如下:含有亲本质粒的电感受态工程化大肠杆菌在30℃下在SOB中培养至OD为0.8。用冰冷的10%甘油洗涤大肠杆菌三次,并且重新悬浮于10%甘油中。将1 μ l的Cre(15单位,NEB,M0298M)与50 μ l的电感受态细胞混合。将混合物转移到比色皿(1mm间隙)中,并且使用电穿孔仪(BTX)以1800伏设置进行电穿孔。通过在37℃下在SOC中生长1小时来拯救细胞,并且将其铺在不含抗生素的LB琼脂板上。使用QIAGEN miniprep试剂盒生长菌落并纯化DNA。将电穿孔的细胞铺在不含抗生素的LB板上。将LB板上GFP阳性的菌落在含有卡那霉素(Kan)和壮观霉素(Spec)的LB上划线,以测试测试主链序列的丢失(Kan/Spec敏感菌落)。

[0234] 图4显示了从单个菌落的培养物中纯化的基因组外DNA的琼脂糖凝胶电泳,并且显示了(1)通过Cre电穿孔含有p1603的细胞产生了测试环状DNA载体,和(2)测试环状DNA载体在没有选择性压力的情况下维持在细胞中。泳道2、3和5显示了来自p1603转化细胞的基因组外DNA,所述细胞在Cre电穿孔后为GFP阳性并且对Kan/Spec敏感,并且在缺乏氯霉素的丰富培养基中生长。这些泳道中的条带跑到约1500bp,这是测试环状DNA载体的预期大小,从而显示Cre电穿孔导致测试环状DNA载体的产生。泳道8、9和11分别对应于泳道2、3和5,但在含氯霉素的丰富培养基中生长。泳道2、3和5中的DNA丰度与泳道8、9和11相似,从而显示环状DNA载体在没有选择性压力的情况下维持在细胞中。泳道4显示了Cre电穿孔后GFP阳性、RFP阳性和Kan/Spec抗性的p1603转化细胞的基因组外DNA。这个泳道中的条带跑到约5000bp,这是测试亲本质粒的预期大小。泳道10对应于泳道4,但显示来自在含氯霉素培养基中生长的细胞的DNA。泳道1显示从p1600转化细胞的GFP阳性、RFP阳性、Kan/Spec抗性菌

落中纯化的染色体外DNA。这个泳道中的条带跑到约5000bp,这是测试亲本质粒的预期大小。泳道7对应于泳道1,但显示来自在含氯霉素培养基中生长的细胞的DNA。泳道6显示从用缺乏ColE2-P9 ori的质粒转化并在缺乏氯霉素的培养基中生长的相同工程化大肠杆菌细胞中纯化的染色体外DNA。从这种培养物中没有回收可检测的质粒,这可能指示在没有选择性压力的情况下ori是维持质粒所必需的。泳道12显示从用于泳道6但是在氯霉素的存在下生长的相同细胞的培养物中纯化的DNA。从这些细胞中回收质粒,这可能指示选择性压力将质粒维持在细胞中。

[0235] 实施例4.具有ColE2-P9 ori的环状DNA载体在没有选择性压力的情况下维持在表达ColE2-P9复制蛋白的工程化细胞中

[0236] 为了测试具有来自ColE2-P9的ori序列(例如,SEQ ID 2)的环状DNA载体在没有选择性压力的情况下在表达ColE2-P9复制蛋白(例如,SEQ ID 1)的细胞中维持的能力,将含有如实施例2中所述通过Cre重组产生的测试环状DNA载体的细胞在含有和不含氯霉素的各各种肉汤中培养。对每种培养物中sfGFP阳性细胞的百分比进行定量。结果如图5中所示。测试环状DNA载体在所有含和不含氯霉素的培养基中维持在高水平,除了SOC培养基,其在含和不含氯霉素时具有较低维持水平。

[0237] 从不含氯霉素的TB和ZB培养物中纯化测试环状DNA载体并进行定量。TB培养物产生0.33mg/L的测试环状DNA载体,并且SB培养物产生0.45mg/L的测试环状DNA载体。这些结果表明,无论选择性压力如何,环状DNA载体都得以维持。

[0238] 实施例5.具有反向选择的环状DNA载体的体内生产方法

[0239] 图6显示了使用反向选择产生本发明的环状DNA载体的示例性方法。这个实施例中的转基因是ABCA4,但是应当理解,驱动ABCA4的启动子可以用其他转基因盒取代。在第0天,使用本文描述的任何方法(例如,通过用细菌人工染色体(BAC)上编码的重组酶转化细胞)制备表达Rep基因的感受态工程化细菌细胞。在第1天,将细胞铺在补充有Kan的LB琼脂板上,并且添加模板质粒。在这个实施例中,模板质粒包括启动子下游的ABCA4转基因和复制起点(ori)。这个ori-ABCA4盒侧接重组位点(attP-GA和attB-GA)。在质粒的另一侧(主链区域)是选择性标记:抗生素抗性基因SpR和KanR、反向选择标记PheS和荧光标记RFP。在第2天,从红色菌落中挑选出白色菌落,并且在补充有4CP的LB中生长用于反向选择。在第3天,纯化环状DNA载体。

[0240] 实施例6.测试诱导型Bxb1以产生环状DNA载体

[0241] 为了测试Bxb1作为外源重组酶是否能有效产生环状DNA载体,将Bxb1重组酶编码在细菌人工染色体(BAC)上并转化到宿主大肠杆菌中,所述宿主大肠杆菌具有整合到其基因组中的Rep基因(SEQ ID NO:1)并由组成型启动子驱动(图7A)。测试了两种诱导型Bxb1 BAC:1696(图7B;SEQ ID NO:5)包括枯茗酸诱导型启动子和氯霉素(Cm)抗性(CmR)基因,和1697(图7C;SEQ ID NO:6)包括阿拉伯糖诱导型启动子和CmR基因。通过电穿孔将每个BAC转化到S1037细胞中并在氯霉素的存在下铺板。

[0242] 接下来,用携带GFP作为报告转基因的模板质粒转化细胞(图7D)。ColE2-P9复制起点(ori)位于GFP及其启动子的上游,并且重组位点(attP-GA和attB-GA)侧接ori-GFP盒。在质粒的另一侧(主链区域)是选择性标记(抗生素抗性基因SpR和KanR、反向选择标记PheS和荧光标记RFP)。因此,含有模板质粒的细胞具有GFP+、RFP+、Kan抗性、Spec抗性和4CP敏感

性,而仅含有环状DNA载体(图7E)(没有主链副产物(图7F))的细胞具有GFP+、RFP-、Kan-敏感性、Spec-敏感性和4CP抗性。

[0243] 将模板质粒电穿孔到没有诱导剂的S1037细胞中并铺在Cm+Kan板上。图8和图9显示了转化后24小时和72小时的结果。图8A和图8B显示了大多数含有1696BAC的菌落分别在转化后24小时和72小时是绿色的。观察到一些红色菌落。选择绿色菌落,并且通过Sanger测序和凝胶电泳证实环状DNA载体的存在和序列。与1696相反,图9A和图9B显示大多数含有1697BAC的菌落分别在转化后24小时和72小时是黄色的,而在72小时观察到一些绿色菌落(图9B)。

[0244] 为了评估Cm和阿拉伯糖诱导剂的效果,从每个板中挑选不同颜色的菌落,并且与Cm和枯茗酸或阿拉伯糖一起孵育24小时。结果如图10(1696)和图11(1697)中所示。接下来,在有或没有诱导剂的情况下,将每种培养物稀释500倍并在补充有4CP的LB中生长过夜以用于反向选择。过夜培养物在普通LB琼脂板上重新划线并观察荧光。结果如图12(1696)和13(1697)中所示。来自每个板的单菌落在补充有4CP的LB中生长过夜,微量制备,并且消化作图(BsaI)。凝胶电泳结果如图14中所示。下表1显示了每个预期物种1-4的预测条带:

[0245] 表1. 每种消化物种的预测条带

泳道编号	物种	条带大小
1	1696	6427bp; 4593bp; 1673bp
2	697	6225bp; 5288bp; 1673bp
3	模板质粒	5166bp; 855bp
4	环状DNA载体	855bp; 90bp

[0247] 对于含有任一类型BAC的菌落(1696或1697),添加任一诱导剂似乎增加了GFP表达菌落,从而指示Bxb1的表达发生在没有诱导剂的情况下。事实上,在转化模板质粒并铺在Cm/Kan板上后,Bxb1重组已经发生。在含有1606BAC的细菌中,非诱导的Bxb1导致>90%的绿色菌落,从而指示超过90%含有环状DNA载体,具有很少或没有模板质粒。

[0248] 实施例7. 含有治疗性转基因的环状DNA载体的生产

[0249] 在这项研究中,环状DNA载体被制成包括各种类型的治疗性转基因:(1) ABCA4, (2) IL-12, 和 (3) 编码F1t3L、IL-12和XCL1的三顺反子盒。ABCA4和IL-12构建体包括CAG启动子,并且三顺反子构建体包括三个基因中的每一个上游的CAG启动子。ABCA4模板质粒和所得环状DNA载体的示例性序列分别由图15A(SEQ ID NO:7)和图15B(SEQ ID NO:8)给出。

[0250] 首先,用1696BAC转化S1037细胞并生长过夜。在一天后,使细胞具有感受态,并且用编码ABCA4、IL-12或三顺反子盒的模板质粒转化。将细胞铺在补充有Kan的LB琼脂板上。在三天培养后,挑选白色小菌落(留下红色菌落)并在LB+4CP中生长过夜,以用于纯化前的反向选择。

[0251] 使用BsaI进行消化作图从每组的单个菌落中筛选纯化的构建体。如图16A(理论凝胶分布图)和16B(实际凝胶分布图)所示,所有菌落都产生预期大小的环状DNA载体条带。这些结果表明,本文所述的环状DNA载体生产方法可广泛用于有效生产具有各种大小和构型的转基因(例如,多顺反子)的环状DNA载体。

[0252] 实施例8. 环状DNA载体在细菌生长和放大中的稳定性

[0253] 本文所述的载体系统的一个有意义的优点是能够在没有选择标记的情况下培养

携带环状DNA载体的细菌细胞(例如,在从培养物中去除选择标记和其他细菌主链元件之后)。为此,申请人测试了含有治疗性转基因的环状DNA载体是否能在细菌培养物中随着载体生产的扩大而在许多细胞分裂中稳定表达。

[0254] 如实施例7中一样,将鉴定为含有编码ABCA4的环状DNA载体而没有主链的细胞培养过夜(每次14-16小时),连续培养七个晚上。在第七次培养后,通过测序证实环状DNA载体的存在。基于每小时三次分裂的平均速率,这种培养物已经经历了至少294次分裂,并且令人惊讶的是,尽管没有选择,仍然维持环状DNA载体的表达。

[0255] 利用这种显著的稳定性,细胞被放大以产生更大量的含有ABCA4转基因的环状DNA载体。将细胞在LB板上重新划线并生长以产生2.5L制剂。产生甘油原液,并且将这种原液重新划线以产生25L制剂。从这种制剂中纯化环状DNA载体,得到18mg环状DNA载体。

[0256] 实施例9. 单体环状DNA载体的检测。

[0257] 在这项研究中,对含有使用1696BAC产生的ABCA4转基因的环状DNA载体进行测序,以证实环状DNA载体呈单体形式(与二聚体相反,二聚体可由与另一模板质粒的反式重组产生)。在这项研究中,S1037细菌在含25ug/mL Kan的LB肉汤中在37°C下培养两小时。接下来,将细胞转移到含有4CP和10ng DNA的板上,并且在37°C下孵育过夜。使用常规方法(Oxford Nanopore)通过长读段测序分析样品。如图17A中所示,观察到单体峰,并且没有观察到二聚体。相反,当培养物与Kan一起孵育过夜时,环状DNA载体主要是二聚体(图17B)。

[0258] 实施例10. 使用Bxb1辅助质粒制备的环状DNA载体

[0259] 作为BAC-Bxb1的替代策略,使用辅助质粒将Bxb1转化到宿主细胞中来制备环状DNA载体。图18显示了示例性的辅助质粒,其包括cumate诱导型启动子(CuO)。此外,辅助质粒包括温度敏感的主链,以允许在产生环状DNA载体后去除辅助质粒。这种辅助质粒的DNA序列由SEQ ID NO:11给出。这种方法中使用的宿主细胞与类似实施例中的相同---具有整合到宿主基因组中并由组成型启动子驱动的Rep(SEQ ID NO:1)的S1037细胞。模板质粒与实施例6中的相同(图7D)。

[0260] 在这项研究中,将辅助质粒转化到S1037细胞中,并且与100ug/mL羧苄青霉素(carb100)一起孵育过夜。然后转化质粒模板并用carb100和500uM Cuma铺板,并且细胞在30°C下生长。使用这种辅助质粒方法,观察到几个绿色菌落(图19),从而指示成功生产含有环状DNA载体而没有主链副产物的细胞。

[0261] 实施例11. 通过将Bxb1整合到宿主基因组中制成的环状DNA载体

[0262] 本文提供的重组酶的另一来源是通过整合到细菌宿主基因组中。在这个实施例中,按照图20所示的过程进行Bxb1的整合。首先,含有lambda red重组辅助质粒的S1037细胞与0.2%阿拉伯糖一起生长并具有电感受态。然后电穿孔500ng的线性化1696BAC。在将BAC 1696整合到rsd-thiC基因座后,去除lambda red重组质粒。

[0263] 对所得菌落进行菌落PCR,并且使用凝胶电泳鉴定阳性克隆(图21)。通过基因组整合将所得细胞工程化为表达Rep和Bxb1两者。

[0264] 实施例12. 通过具有ColE2-P9 ori的环状DNA载体表达ABCA4蛋白。

[0265] 为了确定细菌产生的具有ColE2衍生的复制起点的环状DNA载体是否能够在人细胞中表达蛋白质,进行了体外研究,其中将携带人ABCA4基因的此类环状DNA载体转染到HEK293T细胞中,并且通过蛋白质印迹评估ABCA4蛋白质表达。

[0266] 将HEK293T细胞以150,000个细胞接种在24孔板的0.5mL标准培养基中。将板在37℃下孵育24小时。在转染时,细胞有60%-80%汇合。遵循制造商的方案,使用Lipofectamine 3000(Invitrogen)用环状DNA载体转染细胞。每孔添加的DNA总量为500ng。在37℃下孵育24小时后,收集细胞以用于蛋白质印迹分析,使用β肌动蛋白作为对照。蛋白质印迹结果显示在图22中,并且每个泳道在下表2中鉴定。

[0267] 表2:用于蛋白质表达测定的样品鉴定

泳道	样品
1和2	仅Lipofectamine (阴性对照)
3和4	合成环状DNA (阳性对照)
5-14	细菌衍生的环状DNA

[0269] 这些结果显示,具有CoIE2衍生的来源的细菌产生的环状DNA载体在HEK293T人细胞中表达了它们的ABCA4转基因。

[0270] 序列表

[0271]	SEQ ID NO: 1 CoIE2-P9 复制蛋白	MSAVLQRFREKLPHKPYCTNDFAYGVRILPKNIAILAR FIQQNQPHALYWLPFDVDRGTGASIDWSDRNCNPAPNITV KNPRNGHAHLLYALALPVRTAPDASASALRYAAAIER ALCEKLGADVNYSGLICKNPCHPEWQEVWREEPYTL DELADYLDLSASARRSVDKNYGLGRNYHLFEKVRKW AYRAIRQGWVFSQWLDAVIQRVEMYNASLPVPLSPA ECRAIGKSIKYTHRKFSPGFSVQAARGRKGKGGTKSK RAAVPTSARSLKPWEALGISRATYYRKLKCDPLAK
	SEQ ID NO: 2 CoIE2-P9 复制起点 (40-bp)	AGGGCGCTGTTATCTGATAAGGCTTATCTGGTCTCA TTTT
	SEQ ID NO: 3 CoIE2-P9 复制起点 (36-bp)	AGGGCGCTGTTATCTGATAAGGCTTATCTGGTCTCA
	SEQ ID NO: 4	GCGCTGTTATCTGATAAGGCTTATCTGGTCTCA

[0272]

ColE2-P9 复制起点 (33-bp)	
SEQ ID NO: 5: BAC1696	<p>gcggccgcaaggggttcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaac tatcgggcatcagagcagattgtaactgagagtgaccatagcgggtgaaataccgc acagatgcgtaaggagaaaataaccgcatcaggegccattcgccattcagctgcecaa ctgttgggaagggcgatcgggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagg gggatgtgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccagggtttccagtcacgacgt tgtaaacgacggccagtgaattgtaatacgaactactatagggcgaattcGGTCT CAAGGCGCTGGAAGCGCGCTTTGTGCTGGAAGATA AGCTGATTCTGCTGGTGCTTGACGCCGCCCGCGTCA AACATCCTGCTTGAGTTCTGCGCTGTTAACGGGAAA CACAGAAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCGGGCTT TTTTTTTCGACCAAAGGCTCGGTACCAAATTCCAGA AAAGACACCCGAAAGGGTGTTTTTTTCGTTTTGGTCCc aattattgaagcctccctaacggggggcctttttgttctggtcAccgcttaacgat cgttggetgaacaacagacaatctggtctgtttgtattatggaaaattttctgataata gattcaacaacagacaatctggtctgtttgtattatagctgtcaccggatgtgettccg gtctgatgagtcctgaggacgaacagcctctacaataattttgttaaTACTAG AGAAAGAGGAGAAATACTAGATGCGTGCAGTGGTT GTTATTCGTCTGAGCCGTGTTACCGATGCAACCACC AGTCCGGAACGTCAGCTGGAAAGCTGTCAGCAGCT GTGTGCACAGCGTGGTTGGGATGTTGTTGGTGTTC CGAAGATCTGGATGTTAGCGGTGCAGTTGATCCGTT TGATCGTAAACGTCGTCCGAATCTGGCACGTTGGCT GGCATTGGAAGAACAGCCGTTTGTATGTTATTGTTGC CTATCGTGTGATCGTCTGACCCGTAGCATTCTGTCAT CTGCAGCAGCTGGTTCATTGGGCAGAAGATCATAAA AAGCTGGTTGTGAGCGCAACCGAAGCACATTTTGTAT ACCACCACACCGTTTGCAGCAGTTGTTATTGCACTG ATGGGCACCGTTGCACAGATGGAAGTGGAAAGCAAT TAAAGAACGTAATCGTAGCGCAGCCATTTTAAACAT TCGTGCAGGTAAATATCGTGGTAGCCTGCCTCCGTG GGGTTATCTGCCGACACGTGTTGATGGTGAATGGCG TCTGGTTCCGGATCCTGTTTCAGCGTGAACGTATTCTG GAAGTTTATCATCGTGTGGTGGATAATCATGAACCG CTGCATCTGGTTGCACATGATCTGAATCGTCTGTTG GTTCTGAGCCCGAAAGATTATTTTGCACAGCTGCAG GGTCGTGAACCGCAGGGTTCGCGAATGGTCAGCAAC CGCACTGAAACGTAGCATGATTAGCGAAGCAATGCT GGGTTATGCAACCCTGAATGGTAAAACCGTTCGTGA TGATGATGGTGCACCGCTGGTTCGTGCAGAACCGAT TCTGACACGTGAACAGCTGGAAGCACTGCGTGCCGA ACTGGTTAAAACCAGCCGTGCAAACCAGGTCAGTTA GCACCCCGAGCCTGCTGCTGCGTGTCTGTTTTGTGC AGTTTGTGGTGAACCGGCATACAAATTTGCCGGTGG</p>

[0273]

TGGTCGTAAACATCCGCGTTATCGTTGTCGTAGCAT
GGGTTTTCCGAAACATTGTGGTAATGGTACAGTTGC
AATGGCAGAATGGGATGCATTTTGCGAAGAACAGG
TTCTGGATCTGCTGGGTGATGCCGAACGTCTGGAAA
AAGTTTGGGTTGCAGGTAGCGATAGCGCAGTTGAAC
TGGCCGAAGTTAATGCAGAACTGGTTGATCTGACCA
GCCTGATTGGTAGTCCGGCATAATCGTGCCGGTAGTC
CGCAGCGTGAAGCACTGGATGCACGTATTGCAGCAC
TGGCAGCACGTCAAGAAGAATTAGAAGGTCTGGAA
GCCCGTCCGAGCGGTTGGGAATGGCGTGAAACCGG
TCAGCGTTTTGGTGATTGGTGGCGTGAGCAGGATAC
CGCAGCCAAAAATACCTGGCTGCGTAGTATGAATGT
TCGCCTGACCTTTGATGTTTCGCGGTGGTCTGACGCG
TACCATTGATTTTGGCGATCTGCAAGAATATGAACA
GCATCTGCGTCTGGGTAGCGTTGTTGAACGTCTGCA
TACCGGCATGAGCTAAActcgggtaccaaattccagaaaagagcctccc
gaaagggggcctttttcgttttggccaatggcggcgccatcgaatggtgcaa
accttcgcggtatggcatgatagcggccggaagagagtcaattcaggggtggaata
tgagcccgaacgctgaccaggcagaacgtgcaatggaaaccagggtaaactg
attgcagcagcactgggtgtctgctgaaaaagggtatgcaggtttcgtattgcagat
gtccgggtgcagccggtgttagccgtggtgcacagagccatcattttccgaccaaact
ggaactgctgctggcaaccttgaatggctgtatgagcagattaccgaacgtagccgt
gcacgtctggcaaaactgaaaccggaagatgatgttattcagcagatgctggatgatg
cagcagaattttctggatgatgattttagcatcggcctggatcgtattgtgcagcagat
cgtgatccggcactgcgtgaaggattcagcgtaccgttgaacgtaacgttttgggtg
aagatatgtggctgggtgtgctggtagccgtggtctgagccgtgatgatccgaaga
tattctgtgctgattttaacagcgttcgtggtctggtagttcgtagcctgtggcagaaa
gataaagaacgtttgaacgtgtgcgtaatagcacctggaaattgcacgtgaacgttat
gcaaaattcaaacgttgataaggatcctaattgtaacgaatcagacaattgacggctc
gagggagtagcatagggtttcgagaatccctgcttcgtccatttgacaggcacattatg
catcgatgataagctgtcaaacatgagcagatcctctacgccggacgcatcgtggccg
gcatcaccggcgccacaggtgcggttctggcgcctatatcgccgacatcaccgatg
gggaagatcgggctcgccactcgggctcatgagcaaatattttatctgaggtgcttct
cgctcactgactcgtgcacgaggcagacctcaGGATCTccaggcatcaataa
aacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgtttgtcgggtaacg
ctctctactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcgtttataGGAT
CTgcaagtctctatacttttagagaataggaactcgGATCTgtgcgcggaac
ccctattgttttttctaaatactcaaatatgatccgctcatgagacaataaccctga
taaagctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgctgcc
ttattcctttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctgggtgaaagt
aaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaac
agcggtaagatccttgagagttttcggccgaagaacgtttccaatgatgagcactttt
aaagttctgctatgtggcgggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcg
gtcggcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactaccagtcacagaaaag
catcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtga
taactcgggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgc

[0274]

```

tttttgcaacaatgggggatcatgtaactcgccttgatcggtgggaaccggagctgaa
tgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaca
cgttgcgcaaacattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatag
actggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctg
gctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggttctcgcggtatcattgcag
cactggggccagatggaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtc
ggcaactatggatgaacgaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaag
cattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgattaaaactcatttta
attaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatcGGATCTgcaagttcctata
ctttctagagaataggaactcgCCGGCTTATCGGTCAGTTTCACC
TGATTTACGTAAAAACCCGCTTCGGCGGGTTTTTGC
TTTTGGAGGGGCAGAAAGATGAATGACTGTCCACG
ACGCTATACCCAAAAGAAAAAAAAAAAAaCCCGCC
CCTGACAGGGCGGGGTTTTTTTTGCTTCAAATGCGG
ATTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATTGTGCTAG
CCGTAATTTACATTCAATGCCCCATTTGCGGGGCTA
ATTTCTTGTCGGAGTGCCTTAACTGGCTGAGACCaaagc
ttgagtattctatagctcacctaaatagcttggcgtaatcatggatagctgttccctgtg
tgaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagttaa
agcctggggtgcctaataagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgccg
ctttccagtcgggaaacctgctggtccagctgcattaatgaatcgccaacgcgaacc
ccttgcggccgcccgggctgcaccaattctcatgtttgacagcttcatcgaattct
gccattcatccgcttattatcacttattcagcgtagcaaccaggcgttaagggcacca
ataactgccttaaaaaattacgccccgcctgccactcatcgagtaactgttgaattc
attaagcattctgccgacatggaagccatcacaacggcatgatgaactgaatagcc
agcggcatcagcaccttgcgcttgcgtataatattgcccatggtgaaaacgggggc
gaagaagttgcatattggccacgtttaaataaaaactggtgaaactcaccagggat
tggtgagacgaaaaacatattctcaataaacctttagggaataggccaggtttcac
cgtaacacgccacatcttgcgaatataatgtgtagaaactgccggaaatcgtcgtgttatt
cactccagagcgtatgaaaacgtttcagtttgctcatgaaaacggtgtaacaagggtg
aacactatcccatatcaccagctcaccgtcttccattgccatacgaattccggatgagc
attcatcaggcgggcaagaatgtgaataaggccggataaaaactgtgcttattttctt
acggtcttaaaaaggccgtaatatccagctgaacggtctggttataggtacattgagca
actgactgaaatgcctcaaaatgttctttacgatgccattgggatatacaacggtggtat
atccagtgattttttctcatttttagcttcttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaa
tacgcccggtagtgatcttattcattatggtgaaagtggaaaccttactgcccgatca
acgtctcatttcccaaaagtggcccagggttcccggatcaacaggacaccag
gatttatttctgcgaagtgtctccgtcacaggtatttattcgcgataagctcatgga
gcggcgtaacctgcacaggaaggacagagaaagcgcggatctgggaagtgacg
gacagaacggtcaggacctggattggggaggcgggttccgcccgtcgtgctgacgg
tgtgacgttctgttccggtcacaccacatacgttccgccattcctatgcgatcacatg
ctgtatgccggtataccgctgaaagttctgcaaagcctgatggacataagtccatcag
ttcaacggaagtctacgaaggttttgcgctggatgtggctgcccggcaccgggtg
cagtttgcgatccggagtctgatcgggttgcgatgctgaaacaattatcctgagaata
aatgccttggcctttatatggaatgtggaactgagtgatgctgttttctgtttaa
cagagaagctggctgttatccactgagaagcgaacgaaacagtcgggaaaactccc

```

[0275]

```

attatcgtagagatccgcattattaatctcaggagcctgtgtagcgtttataggaagtagt
gttctgtcatgatgcctgcaagcggtaacgaaaacgatttgaatatgccttcaggaaca
atagaaatcttcgtgcggtgttacgttgaagtggagcggattatgacgaatggacag
aacaacctaatgaacacagaacctatgatgtgtctgtccttttacagccagtagtgctcg
ccgcagtcgagcgacagggcgaagccctcggctggttgcctcggcctgggctgggctgg
cggccgtctatggccctgcaaacgcgccagaaacgccgtcgaagccgtgtgcgaga
caccgcggccggccggcggcgttgggatacctcgcggaaaactggccctcactga
cagatgagggggcgacgttgacacttgagggggcgcactcaccggcgcgcggttga
cagatgagggggcaggctcgtttcggccggcgacgtggagctggccagcctcgaa
atcggcgaaaacgctgattttacgcgagttcccacagatgatgtggacaagcctgg
ggataagtgcctgcggtattgacacttgagggggcgcactactgacagatgaggggg
cgcgatccttgacacttgagggggcagagtgtgacagatgagggggcgacctattga
cattgaggggctgtccacaggcagaaaatccagcatttgaaggggttccgccctgtt
ttcggccaccgtaacctgtcttttaacctgttttaaccaatattataaacctgtttta
accagggctgcgccctgtgcgcgtgaccgcgcacgccgaaggggggtgccccccc
ttctgaacctcccggctcagtgagcgaggaaaccagggaacagcacttatatat
tctgcttacacacgatgcctgaaaaaacttcccttgggggtatccactatccacgggga
tattttataaattttttatagtttttagatctcttttttagagcgcctttaggcctttacc
atgctggttctagagaaggtgtgtgacaaaattgcccttcagtgtgacaaatcacctc
aaatgacagtcctgtctgtgacaaaattgcccttaacctgtgacaaaattgccctcagaag
aagctgtttttcacaagttatccctgcttattgactctttttatttagtggacaatctaaa
aacttgcacacttcacatggatctgtcatggcggaacagcggttatcaatcacaaga
aacgtaaaaatagcccgcgaatcgtccagtcacacgacctactgagggcgcatata
gtctctcccgggatcaaaaacgtatgctgtatctgttcggtgaccagatcagaaaatctg
atggcaccctacaggaacatgacggatctgcgagatccatgttgcataaatatgctgaa
atattcggattgacctctgcggaagccagtaaggatatacggcaggcattgaagagttt
cgcggggaaaggaaagtgtttttatcgcctgaagaggatgccggcgatgaaaaagg
ctatgaatctttccttggttatcaaacgtgcgcacagtccatccagagggtttacagt
gtacatatcaaccatatctcattcccttctttatcgggttacagaaccgggtttacgcagttt
cggcttagtgaaacaaaagaaatccaatccgtatgccatgcgtttatacgaatccct
gtgtcagtatcgaagccggatggctcaggcatcgtctctgaaaatcgactggatca
tagagcgttaccagctgcctcaaagttaccagcgtatgctgacttccgccgcccttc
ctgcaggtctgtgtaatgagatcaacagcagaactccaatgcgcctctcatacattga
gaaaaagaaaggccgcagacgactcatatcgtatttcttccgcgatacacttccat
gacgacaggatagctgaggggtatctgtcacagattgaggggtgttcacacattgt
tctgacctactgagggtaatttgcacagtttctgtttccttcagcctgcattgatttct
catacttttgaactgtaattttaaggaagccaaattgagggcagttgtcacagttgatt
tcttctcttcccttcgtcatgtgacctgatcgggggttagttcgtcatcattgatgag
ggttgattatcacagtttattactctgaattggctatccgcgtgtgtacctctacctggagtt
ttcccacgggtgatatttcttcttgcgctgagcgttaagagctatctgacagaacagttctt
ctttgcttctcggcagttcgtcgtatgctcggttacacggctgcggcgagcgtagt
gataataagtgactgaggtatgtgctcttcttctctttttagtgtgtcttattttaaac
aacttgcgggtttttgatgactttgcgattttgtgttgccttgcagtaaattgcaagattaa
taaaaaaacgaaagcaatgataaaggatgttcagaatgaaactcatgaaacactta
accagtgcataaacgctggatgaaatgacgaaggctatgccattgcacagtttaat
gatgacagcccggagcgaggaaaataaccggcgctggagaataggtgaagcag

```

[0276]

cggatttagttggggtttctctcaggctatcagagatgccgagaaagcagggcgacta
 ccgcacccggatatggaaatcgaggacgggtgagcaacgtgttggtatacaattg
 aacaaattaatcatatcgtgatgtttggtacgcgattcgacgtgctgaagacgtatt
 tccaccggtgatcggggtgctgccataaagggtggcgttacaaaacctcagttctgt
 tcatcttgctcaggatctggctctgaaggggctacgtgtttgctcgtggaaggaacga
 cccccagggaacagcctcaatgtatcacggatgggtaccagatcttcatattcatgcag
 aagacactctcctgcctttctatcttggggaaaaggacgatgtcacttatgcaataaagc
 ccacttgctggccggggctgacattattccttctgtctggctctgcaccgtattgaac
 tgagttaatgggcaaattgatgaaggtaaactgccaccgatccacacctgatgctcc
 gactggccattgaaactgttctcatgactatgatgtcatagtattgacagcgcgccta
 acctgggtatcggcacgattaatgtcgtatgtctgctgatgtctgattgtcccacgc
 ctgctgagttgttgactacacctccgactgcagttttcगतatgcttcgtgatctgctc
 aagaacggtgatctaaagggttcgagcctgatgtacgtatgttcttaccaaaatacagca
 atagtaatggctctcagtcctcggatggaggagcaaattcgggatgctggggaa
 gcatggttctaaaaatgtgtacgtgaaacggatgaagttggtaaaggctcagatccgg
 atgagaactgttttgaacaggccattgatcaacgctcttcaactggtgctggagaaat
 gctctttctattgggaacctgtctgcaatgaaatttcgatcgtctgattaaaccacgtg
 ggagattagataatgaagcgtgcgcctgttattccaaaacatacgtcaatactcaacc
 ggttgaagatacttcgttatcgacaccagctgccccgatgggtgattcgttaattgcgcg
 cgtaggagtaatggctcgcggtaatgccactttgcctgatgtggtcgggatgtgaa
 gttfactctgaagtgtcctcggggtgatagtgtgagaagacctctcgggtatggtcag
 gtaatgaacgtgaccaggagctgcttactgaggacgactggatgatctcatcccttctt
 ttctactgactggtcaacagacaccggcgttcggtcgaagagtatcgtgtcatagaa
 attgccgatgggagtcgccgtcgtaaagctgctgcacttaccgaaagtattatcgtgtt
 ctggttggcgagctggatgatgagcagatggctgcattatccagattgggtaacgatta
 tcgccaacaagtcttatgaacgtggtcagcgttatgcaagccattgcagaatgaat
 ttgctgaaatatttctgcgtggctgatgcggaaaatatttcacgtaagattattaccg
 ctgtatcaacaccgcaaattgcctaaatcagttgttctctttttctacccccggtgaac
 tatctgcccggtcagggtgatgcactcaaaaagcctttacagataaagggaacttca
 agcagcaggcatctaaccttcatgagcagaaaaagctggggtgatattgaaactga
 agaagttatcactctttaactctgtcctaaaacgtcatctgcatcaagaactagttaag
 ctcacgacatcagtttctcctggagcagcagattgtataagggcgataaaatggtgc
 ttaacctggacaggtctcgtgttccaactgagtatagagaaaattgaggccattctta
 aggaactgaaaagccagcaccctgatgcgaccacgttttagtctacgtttatctgtcttt
 acttaatgtcctttgttacaggccagaaagcataactggcctgaatattctctctggccc
 actgttccactgtatcgtcggctctgataatcagactgggaccacggctccactcgtatc
 gtcggtctgattattagtctggaccacggctccactcgtatcgtcggctctgattattagt
 ctgggaccacggctccactcgtatcgtcggctctgataatcagactgggaccacggctc
 cactcgtatcgtcggctctgattattagtctggaccatggctccactcgtatcgtcggct
 gattattagtctgggaccacggctccactcgtatcgtcggctctgattattagtctggaacc
 acggctccactcgtatcgtcggctctgattattagtctgggaccacggctccactcgtatc
 gtcggtctgattattagtctgggaccacgatcccactcgtgttgcggctctgattatcgg
 ctgggaccacggctccacttattgtcgtatcagactatcagcgtgagactacgattcc
 atcaatgcctgtcaagggcaagtattgacatgtcgtcgtaacctgtagaacggagtaac
 ctggtgtcgggttatgcctgctgtgattgctgctgtcctgcttaccacaacattt
 tgcgcacgggttatgtggacaaaatacctggttaccagccgtgccggcacgttaacc

[0277]

	<p>gggctgcatccgatgcaagtgtgctgctgacgagctcgcgagctcggacatgag gttccccgtattcagtgctgctgattgtattgtctgaagtgttttacgtaagtgtatgc agatcaattaatac gatacctgctgataattgattattgacgtggtttgatggcctccac gcacgttgatagatgtagatgataatcattatcactttacgggtcctttccggatccgac aggttacggggcggcgacctcgcgggttttcgctatttatgaaaatttccggtttaagg cgttccgctctcttcgctataacttaattgttttatttaaaataccctctgaaaagaaagga aacgacaggtgctgaaagcgagcttttggcctctgctgtttcctttctctgttttgcctg ggaatgaacaatggaagtccgagctcatcgctaataactcgtatagcatacattatag aagttatattcgat</p>
<p>SEQ ID NO: 6: BAC1697</p>	<p>GCGGCCGCAAGGGGTTTCGCGTCAGCGGGTGTGGC GGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAG CAGATTGTA CTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAA ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCAT CAGGCGCCATTTCGCCATTCAGCTGCGCAACTGTTGG GAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGC CAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATT AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTC ACTATAGGGCGAATTCGGTCTCAACCAATTGGCGCG CGCTTCGCAATAAAAATCTCCCTTCGCCCAGTATTGG GAAAAGTAGATACATTCAA ACTGTGTACGCTGTTTC GTCTCACAGTTCACGACATTTAATAAAAAAAGGGCG GTCGCAAGATCGCCCTTTTTTACGTATGACACAGTG AAAAATGGCGCCCATCGGCGCCATTTTTTTATGcaatta ttgaaggcctccctaacggggggcctttttgtttctggtcAcccgttaacgatcgtt gctgagaaaccaattgtccatattgcatcagacattgccgtcactcgtcttttactgget ctctcgctaaccaaacggtaaccccgcttataaaagcattctgtaacaaagcggga ccaaagccatgacaaaaacgcgtaacaaaagtgtctataatcacggcagaaaagtcc acattgattatttgacggcgtcacactttgctatgccatagcattttatccataagattag cggatcctacctgacgcttttatcgcaactctctactgtttctccatTcccgagctgtca ccggatgtgctttccggctgatgagtcctgaggacgaaacagcctctacaaataatt tgtttaTACTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGCGT GCACTGGTTGTTATTCGTCTGAGCCGTGTTACCGAT GCAACCACCAGTCCGGAACGTCAGCTGGAAAGCTG TCAGCAGCTGTGTGCACAGCGTGGTTGGGATGTTGT TGGTGTTGCCGAAGATCTGGATGTTAGCGGTGCAGT TGATCCGTTTGATCGTAAACGTCGTCCGAATCTGGC ACGTTGGCTGGCATTGGAAGAACAGCCGTTTGATGT TATTGTTGCCTATCGTGTTGATCGTCTGACCCGTAGC ATTCGT CATCTGCAGCAGCTGGTTCATTGGGCAGAA GATCATAAAAAGCTGGTTGTGAGCGCAACCGAAGC ACATTTTGATACCACCACACCGTTTGCAGCAGTTGT TATTGCACTGATGGGCACCGTTGCACAGATGGA ACT GGAAGCAATTAAGAACGTAATCGTAGCGCAGCCC ATTTTAACATTCGTGCAGGTAATATCGTGGTAGCC TGCCTCCGTGGGGTTATCTGCCGACACGTGTTGATG</p>

[0278]

GTGAATGGCGTCTGGTTCCGGATCCTGTTACAGCGTG
 AACGTATTCTGGAAGTTTATCATCGTGTGGTGGATA
 ATCATGAACCGCTGCATCTGGTTGCACATGATCTGA
 ATCGTCGTGGTGTCTGAGCCCGAAAGATTATTTTG
 CACAGCTGCAGGGTCTGTAACCGCAGGGTTCGCGAA
 TGGTCAGCAACCGCACTGAAACGTAGCATGATTAGC
 GAAGCAATGCTGGGTTATGCAACCCTGAATGGTAAA
 ACCGTTTCGTGATGATGATGGTGCACCGCTGGTTCGT
 GCAGAACCGATTCTGACACGTGAACAGCTGGAAGC
 ACTGCGTGCCGAACTGGTTAAAACCAGCCGTGCAAA
 ACCGGCAGTTAGCACCCCGAGCCTGCTGCTGCGTGT
 TCTGTTTTGTGCAGTTTGTGGTGAACCGGCATACAA
 ATTTGCCGGTGGTGGTCGTAAACATCCGCGTTATCG
 TTGTCGTAGCATGGGTTTTCCGAAACATTGTGGTAA
 TGGTACAGTTGCAATGGCAGAATGGGATGCATTTTG
 CGAAGAACAGGTTCTGGATCTGCTGGGTGATGCCGA
 ACGTCTGGAAAAAGTTTGGGTTGCAGGTAGCGATAG
 CGCAGTTGAACTGGCCGAAGTTAATGCAGAACTGGT
 TGATCTGACCAGCCTGATTGGTAGTCCGGCATATCG
 TGCCGGTAGTCCGCAGCGTGAAGCACTGGATGCACG
 TATTGCAGCACTGGCAGCACGTCAAGAAGAATTAG
 AAGGTCTGGAAGCCCGTCCGAGCGGTTGGGAATGG
 CGTGAAACCGGTCAGCGTTTTGGTATTGGTGGCGT
 GAGCAGGATACCGCAGCCAAAAATACCTGGCTGCG
 TAGTATGAATGTTTCGCCTGACCTTTGATGTTCCGCGGT
 GGTCTGACGCGTACCATTGATTTTGGCGATCTGCAA
 GAATATGAACAGCATCTGCGTCTGGGTAGCGTTGTT
 GAACGTCTGCATACCGGCATGAGCTAAActcggtaccaaatc
 cagaaaagaggcctcccgaaagggggcctttttcgttttgccaatggcggcgcg
 ccatcgaatggtgcaaaccttcgcggtatggcatgatagcggcgggaagagagtc
 aattcagggtggtgaatatggtgaagcgcaaatgatcccctgctccgggatactc
 gttaatgccatctggtggcggttaacgccgattgaggccaacggttatctcgattt
 tttatcgaccgaccgctgggaatgaaaggttatattctcaatctcaccattcgcggtcag
 ggggtggtgaaaaatcagggacgagaatttgttgccgaccgggtgatatttgcgtgt
 cccgccaggagagattcactacggtcgtcatccggaggctcgcgaatggtatcac
 cagtgggttactttcgtccgcgcgcctactggcatgaatggcttaactggccgtcaata
 tttgccaatacggggtctttcggccggatgaagcgcaccagccgcatctcagcgacttt
 tttgggcaaatcattaacgccgggcaaggggaagggcgctattcggagctgctggcg
 ataatctgcttgagcaattgttactcggcgcatgctagcgattaacggatcgctccat
 ccaccgatggataatcgggtacgcgaggctgtcagtacatcagcgatcacctggca
 gacagcaatcttgatacggcagcgtcgcacagcatgtttgcttgcgccgtcgcgtctg
 tcacatctttccgccagcagttagggattagcgtcttaagctggcgcgaggaccaacg
 tatcagccaggcgaagctgcttttgaccaccggatgcttatgccaccgctgggt
 cgcaatgttggtttgacgatcaactctatttctcgggtatttaaaaaatgcaccgggg
 ccagcccagcgcgagtccgtgccggtttggaagaaaaagtgaatgatgtagccgtca
 agttgcatgataagatcctattccagcgggattaagaggagcgattaagcatggtta

[0279]

```

ctatcaatacggaaatctgctttaacgccacgttctttgcgggatacgcggcgatgaata
tgtttgttcggtagctgctgcggcgcaggattgtatttggcttgatcggcgtaac
gccggagcgttccggtcattaccgatcactttgtgctgaccagtcgttgcaggaatg
ggtggttagtagcatgatgctcgggtgcagcaattggtgcgctgtttaatggttgctgct
gttccgcctggggcgtaaatacagcctgatggcggggccatcctgttgtactcggtt
ctatagggtccgcttttgcgaccagcgtagagatgtaatcgccgctcgtgtggtgctg
ggcattgctgctgggatcgcgtcttacaccgctcctctgtatcttctgaaatggcaagt
aaaacgttcgcggtaagatgatcagatgtaccagttgatggtcacactcggcatcgtg
ctggcggttttatccgatacagcgttcagttatagcggtaactggcgcgcaatgttggg
gttcttgccttaccagcagttctgctgattattctgtagtatttctgcaaatagcccg
ctggctggcggaaaagggcgctcatattgaggcggagaagattgcgtatgctgcg
cgatacgtcggaaaaagcgcgagaagaactcaacgaaatcgtgaaagcctgaagtt
aaaacagggcggttggcactgtttaaagatcaaccgtaacgtccgctcgtgctgttct
cggatgttgtgagggcgtatgcagcagttaccggtatgaacatcatcatgtactacgc
gcccgctatctcaaatggcgggctttacgaccacagaacaacagatgattgcgact
ctggctgtagggctgaccttattgttccacctttattgcggtgtttacggtagataaag
cagggcgtaaaccggctctgaaaattggttcagcgtgatggcgttaggcactctggt
gctgggctattgcctgatgcagtttgataacggtagcgttccagtggttgcctggct
ctctgttgcatgacgatgatgtgattgccggttatgcgatgagcgcgcgaccagtg
tgtggatcctgtgctctgaaatcagccgctgaaatgccgcgatttcggtattacctgtc
gaccaccacgaactgggtgctgaatatgattatcggcgcgaccttctgacactgctg
atagcattggcgtcccggtactgttctgctctacactgcgctgaacattgcgtttgtg
gcattactttctggctcattccggaaacaaaaatgtcacgctggaacatcgaacgc
aaactgatggcagggcagaaagttgagaaatcggcgtctgataaggatcctaattgg
taacgaatcagacaattgacggctcagggagtagcataggggttgcagaatccctgc
ttcgtccatttgacaggcacattatgcatcgatgataagctgcaaacatgagcagatcc
tctacgccgacgcatcgtggccggcatcaccggcgccacaggtgcggttgcggc
gcctatcgcggacatcaccgatggggaagatcgggctcggcactcgggctcatg
agcaaatatctgaggtgcttctcctcactgactcgtgcacgaggcagacctc
aGGATCTccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggctttt
cgttttatctgttttgcggtaacgctctctactagagtcacactggtcacctcggg
tgggctttctgcgtttataGGATCCGAAGTTCCTATTCTCTAGA
AAGTATAGGAACTTCGGGTCCCAATAATTACGATT
TAAATTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTA
AGAGGTTCCAACCTTCACCATAATGAAATAAGATCA
CTACCGGGCGTATTTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAG
GAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACT
GGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGT
AAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAA
TGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACG
GCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAA
GTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCCTG
ATGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAA
GACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCT
TGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTT
TCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGG

```

[0280]

CAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGT
 TACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTT
 ATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGG
 GTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAAT
 ATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGC
 AAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCC
 GCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGG
 CTTCCATGTTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACA
 GTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAGAAG
 TTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCGCAGAC
 AAAAAAATGGCGCACAAATGTGCGCCATTTTTCACT
 TCACAGGTAATAATTGTTTTGAATTGAAAAGGGCGCT
 TCGGCGCCCTTTTTGCATTTGTTGACGGCATATATT
 GTATATCGAAGCGCCCTGATGGGCGCTTTTTTTATTT
 AATCGATAACCAGAACATTGCTGGCCGATGAGCTGA
 CCATTGGGCCTATCCGGGCTGTCCCGATGGATATTA
 CGCCGAAGTATGTGGGAATTGCCAGCGGATTGATGA
 ACGCCGTGAGACCAAGCTTACGTCTCATTTTCGCCA
 AAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGAC
 ACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTC
 ACAGGTATTTATTCGCGATAAGCTCATGGAGCGGGC
 TAACCGTCGCACAGGAAGGACAGAGAAAGCGCGGA
 TCTGGGAAGTGACGGACAGAACGGTCAGGACCTGG
 ATTGGGGAGGCGGTTGCCGCCGCTGCTGCTGACGGT
 GTGACGTTCTCTGTTCCGGTCACACCACATACGTTCC
 GCCATTCTATGCGATGCACATGCTGTATGCCGTA
 TACCGCTGAAAGTTCTGCAAAGCCTGATGGGACATA
 AGTCCATCAGTTCAACGGAAGTCTACACGAAGGTTT
 TTGCGCTGGATGTGGCTGCCCGCACCGGGTGCAGT
 TTGCGATGCCGAGTCTGATGCGGTTGCGATGCTGA
 AACAATTATCCTGAGAATAAATGCCTTGGCCTTTAT
 ATGGAATGTGGAAGTCTGAGTGGATATGCTGTTTTTG
 TCTGTAAACAGAGAAGCTGGCTGTTATCCACTGAG
 AAGCGAACGAAACAGTTCGGGAAAATCTCCATTAT
 CGTAGAGATCCGCATTATTAATCTCAGGAGCCTGTG
 TAGCGTTTATAGGAAGTAGTGTTCTGTTCATGATGCC
 TGCAAGCGGTAACGAAAACGATTTGAATATGCCTTC
 AGGAACAATAGAAATCTTCGTGCGGTGTTACGTTGA
 AGTGGAGCGGATTATGTCAGCAATGGACAGAACAA
 CCTAATGAACACAGAACCATGATGTGGTCTGTCCTT
 TTACAGCCAGTAGTGCTCGCCGCAGTCGAGCGACAG
 GGCGAAGCCCTCGGCTGGTTGCCCTCGCCGCTGGGC
 TGGCGGCCGTCTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA
 CGCCGTCGAAGCCGTGTGCGAGACACCGCGGCCGG
 CCGCCGGCGTTGTGGATACTCGCGGAAAACCTTGGC
 CCTCACTGACAGATGAGGGGCGGACGTTGACACTTG

[0281]

```

AGGGGCCGACTCACCCGGCGCGGCGTTGACAGATG
AGGGGCAGGCTCGATTTTCGGCCGGCGACGTGGAGC
TGGCCAGCCTCGCAAATCGGCGAAAACGCCTGATTT
TACGCGAGTTTCCCACAGATGATGTGGACAAGCCTG
GGGATAAGTGCCCTGCGGTATTGACACTTGAGGGGC
GCGACTACTGACAGATGAGGGGCGCGATCCTTGAC
ACTTGAGGGGCAGAGTGCTGACAGATGAGGGGCGC
ACCTATTGACATTTGAGGGGCTGTCCACAGGCAGAA
AATCCAGCATTTGCAAGGGTTTCCGCCCGTTTTTCG
GCCACCGCTAACCTGTCTTTTAACTGCTTTTAAACC
AATATTTATAAACCTTGTTTTTAAACCAGGGCTGCGC
CCTGTGCGCGTGACCGCGCACGCCGAAGGGGGGTG
CCCCCCTTCTCGAACCCCTCCCGGTGCGAGTGAGCGA
GGAAGCACCAGGGAACAGCACTTATATATTCTGCTT
ACACACGATGCCTGAAAAAACTTCCCTTGGGGTTAT
CCACTTATCCACGGGGATATTTTTATAATTATTTTTT
TTATAGTTTTTAGATCTTCTTTTTTAGAGCGCCTTGT
AGGCCTTTATCCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTGTTG
TGACAAATTGCCCTTTCAGTGTGACAAATCACCCTC
AAATGACAGTCCTGTCTGTGACAAATTGCCCTAAC
CCTGTGACAAATTGCCCTCAGAAGAAGCTGTTTTTT
CACAAAGTTATCCCTGCTTATTGACTCTTTTTTATTT
AGTGTGACAATCTAAAAACTTGTCACACTTCACATG
GATCTGTGATGGCGGAAACAGCGGTTATCAATCACA
AGAAACGTAAAAATAGCCCGCGAATCGTCCAGTCA
AACGACCTCACTGAGGCGGCATATAGTCTCTCCCGG
GATCAAAAACGTATGCTGTATCTGTTGTTGACCAG
ATCAGAAAATCTGATGGCACCCCTACAGGAACATGA
CGGTATCTGCGAGATCCATGTTGCTAAATATGCTGA
AATATTCGGATTGACCTCTGCGGAAGCCAGTAAGGA
TATACGGCAGGCATTGAAGAGTTTCGCGGGGAAGG
AAGTGGTTTTTTATCGCCCTGAAGAGGATGCCGGCG
ATGAAAAAGGCTATGAATCTTTTCCTTGGTTTATCA
AACGTGCGCACAGTCCATCCAGAGGGCTTTACAGTG
TACATATCAACCCATATCTCATTCCCTTCTTTATCGG
GTTACAGAACCGGTTTACGCAGTTTCGGCTTAGTGA
AACAAAAGAAATCACCAATCCGTATGCCATGCGTTT
ATACGAATCCCTGTGTCAGTATCGTAAGCCGGATGG
CTCAGGCATCGTCTCTCTGAAAATCGACTGGATCAT
AGAGCGTTACCAGCTGCCTCAAAGTTACCAGCGTAT
GCCTGACTTCCGCCGCCGCTTCCCTGCAGGTCTGTGTT
AATGAGATCAACAGCAGAACTCCAATGCGCCTCTCA
TACATTGAGAAAAGAAAGGCCGCCAGACGACTCA
TATCGTATTTTCCCTCCGCGATATCACTTCCATGACG
ACAGGATAGTCTGAGGGTTATCTGTACAGATTTGA
GGGTGGTTCGTACATTTGTTCTGACCTACTGAGGG

```

[0282]

TAATTTGTCACAGTTTTGCTGTTTCCTTCAGCCTGCA
TGGATTTTCTCATACTTTTTGAACTGTAATTTTAAAG
GAAGCCAAATTTGAGGGCAGTTTGTACAGTTGATT
TCCTTCTCTTTCCCTTCGTCATGTGACCTGATATCGG
GGTTAGTTCGTCATCATTGATGAGGGTTGATTATC
ACAGTTTATTACTCTGAATTGGCTATCCGCGTGTGTA
CCTCTACCTGGAGTTTTTCCCACGGTGGATATTTCTT
CTTGCGCTGAGCGTAAGAGCTATCTGACAGAACAGT
TCTTCTTTGCTTCCTCGCCAGTTCGCTCGCTATGCTC
GGTTACACGGCTGCGGGCAGCGCTAGTGATAATAA
GTGACTGAGGTATGTGCTCTTCTTATCTCCTTTTGT
GTGTTGCTCTTATTTTAAACAACCTTTCGGTTTTTTG
ATGACTTTGCGATTTTGTTGTTGCTTTGCAGTAAATT
GCAAGATTTAATAAAAAAACGCAAAGCAATGATTA
AAGGATGTTGAGAATGAAACTCATGGAAACACTTA
ACCAGTGCATAAACGCTGGTCATGAAATGACGAAG
GCTATCGCCATTGCACAGTTTAAATGATGACAGCCCG
GAAGCGAGGAAAATAACCCGGCGCTGGAGAATAGG
TGAAGCAGCGGATTTAGTTGGGGTTTCTTCTCAGGC
TATCAGAGATGCCGAGAAAGCAGGGCGACTACCGC
ACCCGGATATGGAAATTCGAGGACGGGTTGAGCAA
CGTGTGGTTATAACAATTGAACAAATTAATCATATG
CGTGATGTGTTTGGTACGCGATTGCGACGTGCTGAA
GACGTATTTCCACCGGTGATCGGGGTTGCTGCCCAT
AAAGGTGGCGTTTACAAAACCTCAGTTTCTGTTTCAT
CTTGCTCAGGATCTGGCTCTGAAGGGGCTACGTGTT
TTGCTCGTGGAAGGTAACGACCCCCAGGGAACAGC
CTCAATGTATCACGGATGGGTACCAGATCTTCATAT
TCATGCAGAAGACACTCTCCTGCCTTTCTATCTTGGG
GAAAAGGACGATGTCACTTATGCAATAAAGCCCACT
TGCTGGCCGGGGCTTGACATTATCCTTCCTGTCTGG
CTCTGCACCGTATTGAAACTGAGTTAATGGGCAAAT
TTGATGAAGGTAAACTGCCACCGATCCACACCTGA
TGCTCCGACTGGCCATTGAAACTGTTGCTCATGACT
ATGATGTCATAGTTATTGACAGCGCGCCTAACCTGG
GTATCGGCACGATTAATGTCGTATGTGCTGCTGATG
TGCTGATTGTTCCCACGCCTGCTGAGTTGTTTACTA
CACCTCCGCACTGCAGTTTTTTCGATATGCTTCGTGAT
CTGCTCAAGAACGTTGATCTTAAAGGGTTCGAGCCT
GATGTACGTATTTTGCTTACCAAATACAGCAATAGT
AATGGCTCTCAGTCCCCGTGGATGGAGGAGCAAATT
CGGGATGCCTGGGGAAGCATGGTTCTAAAAAATGTT
GTACGTGAAACGGATGAAGTTGGTAAAGGTCAGAT
CCGGATGAGAACTGTTTTTGAACAGGCCATTGATCA
ACGCTCTTCAACTGGTGCCTGGAGAAATGCTCTTTC
TATTTGGGAACCTGTCTGCAATGAAATTTTCGATCG

[0283]

TCTGATTA AACACGCTGGGAGATTAGATAATGAAG
CGTGCGCCTGTTATTCCAAAACATACGCTCAATACT
CAACCGGTTGAAGATACTTCGTTATCGACACCAGCT
GCCCCGATGGTGGATTCGTTAATTGCGCGCGTAGGA
GTAATGGCTCGCGGTAATGCCATTACTTTGCCTGTA
TGTGGTCGGGATGTGAAGTTTACTCTTGAAGTGCTC
CGGGGTGATAGTGTTGAGAAGACCTCTCGGGTATGG
TCAGGTAATGAACGTGACCAGGAGCTGCTTACTGAG
GACGCACTGGATGATCTCATCCCTTCTTTTCTACTGA
CTGGTCAACAGACACCGGCGTTCGGTCGAAGAGTAT
CTGGTGTCATAGAAATTGCCGATGGGAGTCGCCGTC
GTAAAGCTGCTGCACTTACCGAAAGTGATTATCGTG
TTCTGGTTGGCGAGCTGGATGATGAGCAGATGGCTG
CATTATCCAGATTGGGTAACGATTATCGCCCAACAA
GTGCTTATGAACGTGGTCAGCGTTATGCAAGCCGAT
TGCAGAATGAATTTGCTGGAAATATTTCTGCGCTGG
CTGATGCGGAAAATATTTACGTAAGATTATTACCC
GCTGTATCAACACCGCCAAATTGCCTAAATCAGTTG
TTGCTCTTTTTTCTCACCCCGGTGAACCTATCTGCCCG
GTCAGGTGATGCACTTCAAAAAGCCTTACAGATAA
AGAGGAATTACTTAAGCAGCAGGCATCTAACCTTCA
TGAGCAGAAAAAAGCTGGGGTGATATTTGAAGCTG
AAGAAGTTATCACTCTTTTAACTTCTGTGCTTAAAAC
GTCATCTGCATCAAGAACTAGTTTAAAGCTCACGACA
TCAGTTTGCTCCTGGAGCGACAGTATTGTATAAGGG
CGATAAAATGGTGCTTAACCTGGACAGGTCTCGTGT
TCCAAGTGTGATAGAGAAAATTGAGGCCATTCT
TAAGGAAGTTGAAAAGCCAGCACCTGATGCGACC
ACGTTTTAGTCTACGTTTATCTGTCTTACTTAATGT
CCTTTGTTACAGGCCAGAAAGCATAACTGGCCTGAA
TATTCTCTCTGGGCCACTGTTCCACTTGTATCGTCG
GTCTGATAATCAGACTGGGACCACGGTCCACTCGT
ATCGTCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCC
CACTCGTATCGTCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACC
ACGGTCCCACTCGTATCGTCGGTCTGATAATCAGAC
TGGGACCACGGTCCCACTCGTATCGTCGGTCTGATT
ATTAGTCTGGGACCATGGTCCCACTCGTATCGTCGG
TCTGATTATTAGTCTGGGACCACGGTCCCACTCGTA
TCGTCGGTCTGATTATTAGTCTGGAACCACGGTCCC
ACTCGTATCGTCGGTCTGATTATTAGTCTGGGACCA
CGGTCCCACTCGTATCGTCGGTCTGATTATTAGTCTG
GGACCACGATCCCACTCGTGTGTCGGTCTGATTAT
CGGTCTGGGACCACGGTCCCACTTGTATTGTGTCGATC
AGACTATCAGCGTGAGACTACGATTCCATCAATGCC
TGTC AAGGGCAAGTATTGACATGTCGTCGTAACCTG
TAGAACGGAGTAACCTCGGTGTGCGGTTGTATGCCT

	<p>GCTGTGGATTGCTGCTGTGTCCTGCTTATCCACAAC ATTTTGCGCACGGTTATGTGGACAAAATACCTGGTT ACCCAGGCCGTGCCGGCACGTTAACCGGGCTGCATC CGATGCAAGTGTGTCGCTGTCGACGAGCTCGCGAGC TCGGACATGAGGTTGCCCGTATTCAGTGTGCTGA TTTGTATTGTCTGAAGTTGTTTTACGTTAAGTTGAT GCAGATCAATTAATACGATACCTGCGTCATAATTGA TTATTTGACGTGGTTTGTATGGCCTCCACGCACGTTGT GATATGTAGATGATAATCATTATCACTTTACGGGTC CTTTCCGGTGATCCGACAGGTTACGGGGCGGCGACC TCGCGGGTTTTCGCTATTTATGAAAATTTCCGGTTT AAGGCGTTTCCGTTCTTCTTCGTCATAACTTAATGTT TTTATTTAAAATACCCTCTGAAAAGAAAGGAAACGA CAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTTGGCCTCTGTCGTT TCCTTTCTCTGTTTTTGTCCGTGGAATGAACAATGGA AGTCCGAGCTCATCGCTAATAACTTCGTATAGCATA CATTATACGAAGTTATATTCGAT</p>
<p>SEQ ID NO: 7. ABCA4 质 粒模板</p>	<p>CGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACA TTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCC ACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGT AAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCA ACGACCTTTTGAAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGA GCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTG TGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTA AGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAAT GACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATC GACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGA GAACATAGCGTTGCCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAG GAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTT GAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCG CCGCCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGT GCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAAC CGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACT GGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCC GTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAA GAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTG GAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACC AAGGTAGTCGGCAAATAACCaacGATCTGTTGATCAG CAGTTCAACCTGTTGATAGTACGTACTAAGCTCTCA TGTTTCACGTAATAAGCTCTCATGTTTAACTACTAA GCTCTCATGTTTAAACGAATAAACCTCATGGCTAA CGTACTAAGCTCTCATGGCTAACGTAATAAGCTCTC ATGTTTCACGTAATAAGCTCTCATGTTTGAACAATA AAATTAATATAAATCAGCAACTTAAATAGCCTCTAA GGTTTTAAGTTTTATAAGAAAAAAGAATATATAA GGCTTTTAAAGCTTTTAAAGTTTAAACGGTTGTGGAC</p>

[0284]

[0285]

AACAAAGCCAGGGATGTAACGCACTGAGAAGCCCTT
 AGAGCCTCTCAAAGCAATTTTGAGTGACACAGGAAC
 ACTTAACGGCTGACATGGgaattagccatgggccctgccaatcact
 atatCagaccgctgatcctcaactcagcaaaagttcgattattcaacaagccacgtt
 gtgtctcaaaatctctgatgttacattgcacaagataaaaatatacatcatgaacaataa
 aactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaa
 acgtcagggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggct
 cgcgataatgctgggcaatcaggtgcgacaatctatcgcttgatgggaagcccgatg
 cgccagagttgttctgaaacatggcaaaagtagcgttgccaatgatgttacagatgag
 atggtcagactaaactggctgacggaattatgcctctccgaccatcaagcattttatcc
 gtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccggaaaaacagcattccag
 gtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaaatgttgatgcgctggcagtggtcctgc
 gccggttgcaattcattcctgtttgtaattgtcctttaacagcgatecgcgtatttcgtctcg
 ctcaggcgcaatcacgaatgaataacggttgggtgatgcgagtgattttgatgacgag
 cgtaatgctggcctgtgaacaagtctgaaagaaatgcataaacttttgccattctca
 ccggattcagtcgtcactcatggtgatttctacttgataacctattttgacgaggggaa
 attaataggttgattgatgttgacgagtcggaatcgagaccgataccaggatcttgc
 catcctatggaactgcctcggtaggtttctccttcattacagaaacggcttttcaaaaat
 atggtattgataatcctgatatgaataaattgcagttcatttgatgctcagatgattttcta
 atcagaattggttaattggtgtaacactggcagagcattacgctgactgacgggagta
 tcacgaggcagaatttcagataaaaaaaaaatccttagctttcgctaaggatatttctgga
 attcgcggccgctctagagtcctatcagtgatagagattgacatccctatcagtgata
 gagatactgagcactactagagaaaggagaaatactagatggcttctccgaaga
 cgttatcaaagagttcatgcgtttcaaagttcgtatggaaggtccggttaacggtcacga
 gttcgaatcgaaggtgaaggtgaaggtcgtccgtacgaaggtaccagaccgctaa
 actgaaagtaccaaaaggtggtccgctgccgttcgcttgggacatcctgtccccgcagt
 tccagfacggttccaaagcttacgttaaacacccggctgacatcccggactacctgaaa
 ctgtccttcccgaaggttcaaatgggaacgtgttatgaactcgaagacgggtggtgtt
 gttaccgttaccaggactcctcctgcaagacggtagttcatctacaaagttaaactg
 cgtggtaccaactcccgtccgacgggtccggttatgcagaaaaaacatgggtggg
 aagcttccaccgaacgtatgtaccgggaagacgggtgctctgaaaggtgaaatcaaat
 gcgtctgaaactgaaagacgggtggtcactacgacgctgaagttaaaaccactacatg
 gctaaaaaacgggtcagctgccgggtgcttataaaaaccgacatcaaaactggacatca
 cctcccacaacgaagactacaccatcgttgaacagtacgaacgtgctgaaggtcgtca
 ctccaccggtgcttaataacgctgatagtgctagtgtagatcgctactagaccaggca
 tcaataaaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgttgcg
 gtgaacgctctctactagagtcacactggctcaccttcgggtgggctttctgcgtttata
 tactagtaggactcctaactcagcgtgcaggttctctcgtcactgactcgtcgtcgtc
 gtcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatggcttgcgac
 gacggcggactccgtcgtcaggatcataggcgctgttatctgataaggcttatctggt
 ctcattttCTCTTCGtatcacaggagaatttcagGGAGACATTGATT
 ATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC
 ATAACCTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
 CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA
 TGTTCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTG

[0286]

ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
 GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC
 CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT
 TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 ATTACCATGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCA
 CTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTT
 GTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATG
 GGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG
 GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGGAG
 GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG
 CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGC
 GGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGG
 GCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCC
 CCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCT
 CTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCG
 GGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT
 GGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGT
 GAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGC
 GGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGT
 GTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCC
 CGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGC
 TTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGG
 CCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGC
 GAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGT
 GGGGGGGTGAAGAGGGGGTGTGGGCGCGTCCGGTCCG
 GGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTG
 CTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTA
 CGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGG
 GGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGG
 GCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGC
 GCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGCGGCTGTTCGAGGC
 GCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCG
 TGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATC
 TGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCAC
 CCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCG
 CCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGT
 GCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCAGC
 CTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGG
 GGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGT
 GTGACCGGCGGCTCTAGACAATTGTAACCTTCT
 TCTCTTCTCCTCCTGACAGGGAGTTTAAACAGATA
 AGTTTGTACAAAAAGAGAGGTGCCACCATGGGCTT
 TGTGCGACAGATTCAGCTGCTGCTGTGGAAGAAGT
 GACCTGCGGAAGCGGCAGAAAATCAGATTCGTGG
 TGGAACCTCGTGTGGCCCTGAGCCTGTTTCTGGTGC

[0287]

TGATCTGGCTGCGGAACGCCAATCCTCTGTACAGCC
 ACCACGAGTGTCACTTCCCAACAAGGCCATGCCTT
 CTGCCGGAATGCTGCCTTGGCTGCAGGGCATCTTCT
 GCAACGTGAACAACCCCTGCTTTCAGAGCCCCACAC
 CTGGCGAAAGCCCTGGCATCGTGTCCAACACTACAACA
 ACAGCATCCTGGCCAGAGTGTACCGGGACTTCCAAG
 AGCTGCTGATGAACGCCCTGAGTCTCAGCACCTGG
 GCAGAATCTGGACCGAGCTGCACATCCTGAGCCAGT
 TCATGGACACCCTGAGAACACACCCCGAGAGAATC
 GCCGGCAGGGGCATCAGAATCCGGGACATCCTGAA
 GGACGAGGAAACCCTGACACTGTTCTCATCAAGAA
 CATCGGCCTGAGCGACAGCGTGGTGTACCTGCTGAT
 CAACAGCCAAGTGCGGCCCGAGCAGTTTGCTCATGG
 CGTGCCgGATCTCGCCCTGAAGGATATCGCCTGTTCT
 GAGGCCCTGCTGGAACGGTTCATCATCTTCAGCCAG
 CGGAGAGGCGCCAAGACCGTCAGATATGCCCTGTG
 CAGTCTGAGCCAGGGAACCCTGCAGTGGATCGAGG
 ATACCCTGTACGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTGT
 TCCGGGTGCTGCCCACTGCTGGATTCTAGATCCC
 AGGGCATCAACCTGAGAAGCTGGGGCGGCATCCTG
 TCCGACATGAGCCCAAGAATCCAAGAGTTCATCCAC
 CGGCCTAGCATGCAGGACCTGCTGTGGGTTACCAGA
 CCTCTGATGCAGAACGGCGGACCCGAGACATTCACC
 AAGCTGATGGGCATTCTGAGCGATCTGCTGTGCGGC
 TACCCTGAAGGCGGAGGATCTAGAGTGCTGAGCTTC
 AATTGGTACGAGGACAACAACACTACAAGGCCTTCCTG
 GGCATCGACTCCACCAGAAAGGACCCCATCTACAGC
 TACGACCGGCGGACAACCAGCTTCTGCAATGCCCTG
 ATCCAGAGCCTGGAAAGCAACCCTCTGACCAAGATC
 GCTTGGAGGGCCGCCAACCTCTGCTGATGGGAAA
 GATCCTGTACACCCTGACAGCCCTGCCGCCAGAAG
 AATCCTGAAGAACGCCAACAGCACCTTCGAGGAAAC
 TGGAACACGTGCGCAAGCTGGTCAAGGCCTGGGAA
 GAAGTGGGACCTCAGATtTGGTACTTCTTCGACAATA
 GCACCAGATGAACATGATCAGAGACACCCTGGGC
 AACCTACCGTGAAGGACTTCTGAACAGACAGCTG
 GGCGAAGAGGGCATTACCGCCGAGGCCATCCTGAA
 CTTTCTGTACAAGGGCCCCAGAGAGTCCCAGGCCGA
 CGACATGGCCAACCTTCGATTGGCGGGACATCTTCAA
 CATCACCGACAGAACCCTGCGGCTGGTCAACCAGTA
 CCTGGAATGCCTGGTGTGCTGGACAAGTTCGAGAGCTA
 CAACGACGAGACACAGCTGACCCAGAGAGCCCTGT
 CTCTGCTGGAAGAGAATATGTTCTGGGCTGGCGTGG
 TGTTCCCCGACATGTACCCTTGGACAAGCAGCCTGC
 CTCCTCACGTGAAGTACAAGATCCGGATGGACATCG
 ACGTGGTCGAAAAGACCAACAAGATCAAGGACCGG

[0288]

TACTGGGACAGCGGCCCTAGAGCTGATCCCGTGGAAGATTTTCGGTACATCTGGGGCGGATTCGCATACCTGCAGGACATGGTGGAAACAGGGAATCACACGGTCCCAAGTGCAGGCTGAAGCTCCTGTGGGAATCTACCTGCGCAGATGCCTTATCCTTGCTTCGTGGACGACAGCTTCATGATCATCCTGAATCGGTGCTTCCCCATCTTCATGTGCTGGCCTGGATCTACTCCGTGTCTATGACCGTGAAGTCCATCGTGCTGGAAAAAGAGCTGCGGCTGAAAGAGACACTGAAGAACCAGGGCGTGTCCAATGCCGTGATCTGGTGCACCTGGTTTCTGGACAGCTTCTCCATATGAGCATGAGCATCTTTCTGCTGACGATCTTCATCATGCACGGCCG_aATCCTGCACTACAGCGACCCCTTTATCCTCTTCCTGTTCCCTGCTGGCCTTCAGCACCGCTACAATCATGCTGTGTTTTCTGCTGTCCACCTTCTTCAGCAAGGCCTCTCTGGCCGCTGCTTGTAGCGGCGTGATCTACTTCACCCTGTACCTGCCTCACATCCTGTGCTTCGCATGGCAGGACAGAATGACCGCCGAGCTGAAGAAAGCTGTGTCCCTGCTGAGCCCTGTGGCCTTTGGCTTTGGCACCGAGTACCTCGTCAGATTTGAGGAACAAGGACTGGGACTGCAGTGGTCCAACATCGGCAATAGCCCTACAGAGGGCGACGAGTTCAGCTTCCTGCTGTCTATGCAGATGATGCTGCTGGACGCCGCGTGTATGGACTGCTGGCTTGGTATCTGGACCAGGTGTTCCAGGCGATTACGGCACTCCTCTGCCTTGGTATTTCTGCTGCAAGAGAGCTACTGGCTCGGCGGCGAGGGATGTAGCACAGAGAAGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCTCTGACCGAGGAAACAGAGGACCCTGAACACCCAGAGGGCATCCACGATAGCTTTTTTCGAGAGAGAACACCCCGGCTGGGTGCCAGGCGTGTGTGTGAAGAATCTGGTCAAGATTTTCGAGCCCTGCGGCAGACCTGCCGTGGACAGACTGAACATCACCTTCTACGAGAACCAGATTACCGCTTTCTGGGCCACAACGGCGCTGGCAAGACAACCACA_tTGAGCATCCTCACAGGCCTGCTGCCTCCAACAAGCGGCACAGTTCTCGTTGGCGGCAGAGACATCGAGACAAGCCTGGATGCCGTCAGACAGTCCCTGGGCATGTGCCCTCAGCACAAACATCCTGTTTACCACCTGACCGTGGCCGAGCACATGCTGTTTTATGCCAGCTGAAAGGCAAGAGCCAAGAAGAGGCTCAGCTGGAAATGGAAGCCATG_tT_gGAGGACACCGGCCTGCACCACAAGAGAAATGAGGAAGCCCAGGATCTGAGCGGCGGCATGCAGAGAAAATGAGCGTGGCCATTGCCTTCGTGGGCACGCCAAGGTTGTGATCCTGGATGAGCCTACAAGCGCGTGGACCCTTACAGCAGAAGATCCATCTGGGATCTGCTGCTGAAGTACAGAT_{ca}GGCCGGACCATCATCATGAGCACCCACCACATGGACGAGGCCGATCTGCTCGGAGACAGAATCGCCATCATTGCTCAGGGCAGACTGT

[0289]

ACTGCAGCGGCACCCCACTGTTTCTGAAGAACTGTT
 TCGGCACCGGACTGTATCTGACCCTCGTGCGGAAGA
 TGAAGAACATCCAGTCTCAGCGGAAGGGCAGCGAG
 GGCACCTGTAGCTGTTCTAGCAAGGGCTTTAGCACC
 ACCTGTCCAGCTCACGTGGACGATCTGACCCCTGAA
 CAGGTGCTGGATGGCGACGTGAACGAGCTGATGGA
 CGTGGTGTGCACCATGTGCCTGAGGCCAAGCTGGT
 GGAATGCATCGGCCAAGAAGCTGATTTTTTCTGCTCCC
 GAACAAGAAGTTCAAGCACCGGGCCTACGCCAGCC
 TGTTTCAGAGAGCTGGAAGAAACCCTGGCCGACCTG
 GGCCTGTCTAGCTTTGGCATCAGCGACACCCCTCTC
 GAAGAGATTTTCCTGAAAGTGACAGAGGACAGCGAT
 AGCGGCCCTCTGTTTGCTGGCGGAGCACAGCAAAG
 CGCGAGAACGTGAACCCTAGACACCCCTGTCTGGGC
 CCAAGAGAGAAAGCCGGACAGACCCCTCAGGACAG
 CAATGTGTGCTCTCCTGGTGCTCCTGCCGCTCATCCT
 GAGGGACAACCTCCACCTGAACCTGAGTGTCTGGA
 CCTCAGCTGAACACCGGAACACAGCTGGTTCTGCAG
 CACGTGCAGGCTCTGCTCGTGAAGAGATTCCAGCAC
 ACCATCAGAAGCCACAAGGACTTTCTGGCCCAGATC
 GTGCTGCCCGCCACCTTTGTTTTTCTGGCTCTGATGC
 TGAGCATCGTGATCCCTCCATTCGGCGAGTACCCCG
 CTCTGACACTGCACCCTTGGATCTACGGCCAGCAGT
 ACACCTTTTTCTCCATGGACGAACCCGGCAGCGAGC
 AGTTCACAGTGCTGGCTGATGTCCTGCTGAACAAGC
 CCGGCTTCGGCAACCGGTGTCTGAAAGAAGGATGG
 CTGCCTGAGTACCCTTGCGGCAACAGCACACCTTGG
 AAAACCCCTAGCGTGTCCCCTAACATCACCCAGCTG
 TTCCAAAAGCAGAAATGGACCCAAGTGAACCCCTCT
 CCATCCTGCCGGTGCTCCACAAGGGAAAAGCTGACC
 ATGCTGCCCGAGTGTCCAGAAGGCGCTGGCGGACTT
 CCTCCACCTCAGAGAACACAGAGATCCACCGAGATT
 CTCCAGGACCTGACCGACCGGAATATCAGCGACTTC
 CTGGTTAAGACATAACCCGCACTGATCCGGTCCAGC
 CTGAAGTCCAAGTTCTGGGTCAACGAACAGAGATAC
 GGCGGCATCAGCATCGGCGGAAAAGCTGCCTGTGGT
 GCCTATCACAGGCGAGGCCCTTGTGGGCTTTCTGTC
 CGATCTGGGGAGAATCATGAACGTGTCCGGCGGAC
 CTATCACAGGGAAGCCAGCAAAGAGATCCCCGAT
 TTCCTGAAGCACCTGGAAACCGAGGACAATATCAA
 AGTGTGGTTCAACAACAAAGGATGGCACGCCCTCGT
 GTCTTTTCTGAACGTGGCCCACAATGCCATCCTGCG
 GGCTAGCCTGCCTAAGGACAGAAGCCCTGAGGAAT
 ACGGCATCACCGTGATCTCCAGCCTCTGAATCTGA
 CCAAAGAGCAGCTGAGCGAGATCACCGTGCTGACC
 ACCTCTGTGGATGCTGTGGTGGCCATCTGCGTGATC

[0290]

TTCAGCATGAGCTTCGTGCCCGCCTCCTTCGTGCTGT
 ACCTGATTCAAGAGAGAGTGAACAAGAGCAAGCAC
 CTCCAGTTCATCTCCGGGGTGTCCCAACCACCTAC
 TGGGTCACCAATTTTCTGTGGGACATCATGAACTAC
 AGCGTGTCAGCCGGCCTGGTCGTGGGCATCTTTATC
 GGCTTTCAGAAGAAGGCCTACACGAGCCCCGAGAA
 CCTGCCTGCTTTGGTTGCTCTGCTGCTCCTGTATGGC
 TGGGCCGTGATTCCCATGATGTACCCCGCCAGCTTT
 CTGTTTGACGTGCCCAGCACAGCCTACGTGGCCCTG
 TCTTGCGCCAATCTGTTCATCGGCATCAACAGCAGC
 GCCATCACATTCATCCTGGAAGTGTTCGAGAACAAC
 AGGACCCTGCTGCGGTTCAACGCCGTGCTGCGGAAA
 CTGCTGATCGTGTTCCCTCACTTCTGTCTCGGCAGAG
 GCCTGATCGACCTGGCTCTGTCTCAGGCCGTGACCG
 ATGTGTACGCCAGATTTGGCGAGGAACACTCCGCCA
 ATCCATTCCACTGGGACCTGATCGGCAAGAACCTGT
 TCGCCATGGTGGTGGAAAGGCGTCGTGTACTTCCTGC
 TCACTCTGCTGGTGCAGAGACACTTTTTTCTGTCCCA
 ATGGATCGCCGAGCCTACCAAAGAACCCATTGTGGA
 CGAGGACGACGATGTGGCCGAGGAAAGACAGAGAA
 TCATCACCGGCGGCAACAAGACCGATATCCTGAGAC
 TGCACGAGCTGACAAAGATTTACCCCGGCACAAGCT
 CCCAGCCGTGGATAGGCTTTGTGTGGGAGTTAGAC
 CCGGCGAGTGCTTTGGCCTGCTGGGAGTTAATGGCG
 CCGGAAAGACCACCACCTTCAAGATGCTGACCCGC
 GACACCACAGTGACAAGCGGAGATGCTACAGTGGC
 CGGCAAGAGCATCCTGACCAACATCAGCGAAGTGC
 ATCAGAACATGGGCTACTGCCCTCAGTTCGACGCCA
 TCGACGAACTGCTGACAGGCCGCGAACACCTGTATC
 TGTATGCCAGACTGAGAGGCGTGCCCGCTGAAGAG
 ATCGAGAAGGTGGCCAACCTGGTCCATCAAGTCTCTG
 GGCCTGACAGTGTACGCCGACTGTCTGGCCGGAACA
 TACAGCGGAGGAAACAAGCGGAAGCTGAGCACCCGC
 CATTGCTCTGATCGGATGCCACCTCTGGTCCTGCTG
 GATGAACCCACCACCGGAATGGAeCCCCAGGCTAGA
 AGAATGCTCTGGAACGTGATCGTGTCTATCATCCGC
 GAGGGCAGAGCTGTGGTGCTGACCTCTCACAGCATG
 GAAGAGTGCGAGGCTCTGTGTACCCGGCTGGCCATT
 ATGGTCAAGGGCGCCTTCAGATGCATGGGCACCATT
 CAGCATCTGAAAAGCAAGTTCGGCGACGGCTACATC
 GTGACAATGAAGATCAAGAGCCCCAAGGACGACCT
 CCTGCCTGATCTGAACCCCGTGGAACAGTTTTTTCA
 GGGCAACTTCCCCGGCTCCGTGCAGCGGGAAAGAC
 ACTATAACATGCTGCAGTTTCAGGTGTCCTCCTCCA
 GCCTGGCTCGGATCTTTCAACTGCTGCTCTCTCAAA
 GGACAGCCTGCTGATTGAAGAGTACAGCGTGACAC

[0291]

AGACCACACTCGACCAGGTTTTTCGTGAACTTCGCCA
AGCAGCAGACCGAGAGCCACGACCTGCCTCTGCATC
CTAGAGCCGCTGGTGCCTCTAGACAAGCTCAGGACT
AAGCTTCCACTGGATTGTACAATTACATAAAAATAAA
ATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTT
GTGTGCGCTACTttttgagaccggttctgtggtcaaccaccggaactca
gtggtgtacggtacaaccCCATCCAGCTGATATCCttgacaGCTA
GCtcagtCCTAGGtataatGCTAGCgGATCTCGTCAGTAAC
GAGCCCTGGGAGAAAACAAAATGAGCCATCTGGCA
GAACTGGTTGCAAGCGCAAAGCAGCAATTAGCCA
GGCAAGTGATGTTGCAGCACTGGATAATGTTTCGTGT
TGAATATCTGGGTAAAAAGGGTCATCTGACCCTGCA
GATGACCACACTGCGTGAAGTGCCTCCGGAAGAAC
GTCCGGCAGCCGGTGCAGTTATTAATGAAGCAAAA
GAACAGGTTCAGCAGGCACTGAATGCACGTAAAGC
CGAACTGGAAAGCGCAGCCCTGAATGCCCGTCTGGC
AGCAGAAACCATTGATGTTAGCCTGCCTGGTTCGTTCG
TATTGAAAATGGTGGTCTGCATCCGGTTACACGTAC
CATTGATCGCATTGAAAGCTTTTTTCGGTGAAGTGGG
TTTTACCGTTGCAACCGGTCCGGAATTGAAGATGA
TTATCATAATTTTCGATGCCCTGAACATTCCGGGTGAT
CATCCGGCACGTGCAGATCATGATACCTTTTTGGTTT
GATACCACACGTCTGCTGCGTACCCAGACCAGCGGT
GTTTCAGATTCGTACCATGAAAGCACAGCAGCCTCCG
ATTCGTATTATTGCACCGGGTCGTGTTTATCGCAATG
ATTATGATCAGACCATAACGCCGATGTTTCATCAGA
TGGAAGGTCTGATTGTGGATACCAATATTAGCTTCA
CCAATCTGAAAGGCACCCTGCATGATTTTCTGCGCA
ATTTCTTTGAAGAGGACCTGCAGATTCGTTTTTCGTCC
GAGCTATTTTCCGTTTAGCGAACCGAGTGCCGAAGT
TGATGTTATGGGCAAAAATGGTAAATGGCTGGAAGT
TTAGGTTGCGGTATGGTTCATCCGAATGTTCTGCGT
AATGTTGGTATTGATCCGGAAGTTTATAGCGGTTTT
GGTTTTGGTATGGGCATGGAACGTCTGACCATGCTG
CGTTATGGTGTACCGATCTGCGTAGCTTCTTTGAAA
ATGATCTGCGTTTTTCTGAAACAGTTTAAATGAGGAT
CTcaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttctgtttatc
tggtgttctcgtgaaacgctctctactagagtcacactggetcaccttcgggtgggcctt
tctgcgtttataGCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATA
GCTGTTTCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAT
CTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCA
TCATGCCTCCTCTAGACCAGCCAGGACAGAAATGCC
TCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGC
ACACCGTGGAACGGATGAAGGCACGAACCCAGTG
GACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAA
GTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTT

	<p>GACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGG TTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTGGGGTACA GTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTA CGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAA CGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAA AGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAA GTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT</p>
<p>SEQ ID NO: 8. ABCA4 环 状 DNA 载 体</p>	<p>CTCTTCGgtatcacaggagaatttcagGGAGACATTGATTATTG ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA GTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAA CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTT CCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGT CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTG GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTC TCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGT TTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGG GCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGG CGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGG GGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG GGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCG CTCCGCCGCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTG ACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGG ACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGG TTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGA AAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGG GGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGT GCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCG GCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTT GTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCC GGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGA GGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGG GGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGG CTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCT GAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACG GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGG GTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGC CGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGC GGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGC GGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTG</p>

[0292]

[0293]

<p>CGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG TGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGGCGCCGCCGACCC CCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCC GGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGC GTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCT CGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGG GGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTG TGACCGGCGGCTCTAGACAATTGTAATAACCTTCTT CTCTTTCTCTCCTGACAGGGAGTTTAAACAGATAA GTTTGTACAAAAAAGAGAGGTGCCACCATGGGCTTT GTGCGACAGATTCAGCTGCTGCTGTGGAAGAACTGG ACCCTGCGGAAGCGGCAGAAAATCAGATTCGTGGT GGAACTCGTGTGGCCCCTGAGCCTGTTTCTGGTGCT GATCTGGCTGCGGAACGCCAATCCTCTGTACAGCCA CCACGAGTGTCACTTCCCCAACAAGGCCATGCCTTC TGCCGGAATGCTGCCTTGGCTGCAGGGCATCTTCTG CAACGTGAACAACCCCTGCTTTCAGAGCCCCACACC TGGCGAAAGCCCTGGCATCGTGTCCAATAACAACA CAGCATCCTGGCCAGAGTGTACCGGGACTTCCAAGA GCTGCTGATGAACGCCCTGAGTCTCAGCACCTGGG CAGAATCTGGACCGAGCTGCACATCCTGAGCCAGTT CATGGACACCCTGAGAACACACCCCGAGAGAATCG CCGGCAGGGGCATCAGAATCCGGGACATCCTGAAG GACGAGGAAACCCTGACACTGTTCCCTCATCAAGAAC ATCGGCCTGAGCGACAGCGTGGTGTACCTGCTGATC AACAGCCAAGTGCGGCCCGAGCAGTTTGCTCATGGC GTGCC₂GATCTCGCCCTGAAGGATATCGCCTGTTCTG AGGCCCTGCTGGAACGGTTCATCATCTTCAGCCAGC GGAGAGGGCGCCAAGACCGTCAGATATGCCCTGTGC AGTCTGAGCCAGGGAACCCTGCAGTGGATCGAGGA TACCCTGTACGCCAACGTGGACTTCTTCAAGCTGTT CCGGGTGCTGCCACACTGCTGGATTCTAGATCCCA GGGCATCAACCTGAGAAGCTGGGGCGGCATCCTGTC CGACATGAGCCCAAGAATCCAAGAGTTCATCCACCG GCCTAGCATGCAGGACCTGCTGTGGGTACCAGACC TCTGATGCAGAACGGCGGACCCGAGACATTCACCA AGCTGATGGGCATTCTGAGCGATCTGCTGTGCGGCT ACCCTGAAGGCGGAGGATCTAGAGTGCTGAGCTTCA ATTGGTACGAGGACAACAATAACAAGGCCTTCTGG GCATCGACTCCACCAGAAAGGACCCCATCTACAGCT ACGACCGGCGGACAACCAGCTTCTGCAATGCCCTGA TCCAGAGCCTGGAAAGCAACCCTCTGACCAAGATCG CTTGGAGGGCCGCCAACCTCTGCTGATGGGAAAG ATCCTGTACACCCTGACAGCCCTGCCGCCAGAAGA ATCCTGAAGAACGCCAACAGCACCTTCGAGGAACT GGAACACGTGCGCAAGCTGGTCAAGGCCTGGGAAG</p>

[0294]

AAGTGGGACCTCAGATtTGGTACTTCTTCGACAATAG
 CACCCAGATGAACATGATCAGAGACACCCTGGGCA
 ACCCTACCGTGAAGGACTTCCTGAACAGACAGCTGG
 GCGAAGAGGGCATTACCGCCGAGGCCATCCTGAAC
 TTTCTGTACAAGGGCCCCAGAGAGTCCCAGGCCGAC
 GACATGGCCAACTTCGATTGGCGGGACATCTTCAAC
 ATCACCGACAGAACCCTGCGGCTGGTCAACCAGTAC
 CTGGAATGCCTGGTGTGCTGGACAAGTTCGAGAGCTAC
 AACGACGAGACACAGCTGACCCAGAGAGCCCTGTC
 TCTGCTGGAAGAGAATATGTTCTGGGCTGGCGTGGT
 GTTCCCCGACATGTACCCTTGGACAAGCAGCCTGCC
 TCCTCACGTGAAGTACAAGATCCGGATGGACATCGA
 CGTGGTCGAAAAGACCAACAAGATCAAGGACCGGT
 ACTGGGACAGCGGCCCTAGAGCTGATCCCGTGGAA
 GATTTTCGGTACATCTGGGGCGGATTCGCATACCTG
 CAGGACATGGTGGAAACAGGGAATCACACGGTCCCA
 GGTGCAGGCTGAAGCTCCTGTGGGAATCTACCTGCA
 GCAGATGCCTTATCCTTGCTTCGTGGACGACAGCTT
 CATGATCATCCTGAATCGGTGCTTCCCCATCTTCATG
 GTGCTGGCCTGGATCTACTCCGTGTCTATGACCGTG
 AAGTCCATCGTGCTGGAAAAAGAGCTGCGGCTGAA
 AGAGACACTGAAGAACCAGGGCGTGTCCAATGCCG
 TGATCTGGTGCACCTGGTTTCTGGACAGCTTCTCCAT
 TATGAGCATGAGCATCTTTCTGCTGACGATCTTCATC
 ATGCACGGCCGaATCCTGCACTACAGCGACCCCTTT
 ATCCTCTTCCTGTTCCCTGCTGGCCTTCAGCACCGCTA
 CAATCATGCTGTGTTTTCTGCTGTCCACCTTCTTCAG
 CAAGGCCTCTCTGGCCGCTGCTTGTAGCGGCGTGAT
 CTACTTCACCCTGTACCTGCCTCACATCCTGTGCTTC
 GCATGGCAGGACAGAATGACCGCCGAGCTGAAGAA
 AGCTGTGTCCCTGCTGAGCCCTGTGGCCTTTGGCTTT
 GGCACCGAGTACCTCGTCAGATTTGAGGAACAAGG
 ACTGGGACTGCAGTGGTCCAACATCGGCAATAGCCC
 TACAGAGGGCGACGAGTTCAGCTTCTGCTGTCTAT
 GCAGATGATGCTGCTGGACGCCGCCGTGTATGGACT
 GCTGGCTTGGTATCTGGACCAGGTGTTCCCAGGCGA
 TTACGGCACTCCTCTGCCTTGGTATTTCCCTGCTGCAA
 GAGAGCTACTGGCTCGGCGGCGAGGGATGTAGCAC
 CAGAGAAGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCTC
 TGACCGAGGAAACAGAGGACCCTGAACACCCAGAG
 GGCATCCACGATAGCTTTTTTCGAGAGAGAACACCCC
 GGCTGGGTGCCAGGCGTGTGTGTGAAGAATCTGGTC
 AAGATtTTCGAGCCCTGCGGCAGACCTGCCGTGGAC
 AGACTGAACATCACCTTCTACGAGAACCAGATTACC
 GCCTTTCTGGGCCACAACGGCGCTGGCAAGACAACC
 ACAtTGAGCATCCTCACAGGCCTGCTGCCTCCAACA

[0295]

```

AGCGGCACAGTTCTCGTTGGCGGCAGAGACATCGA
GACAAGCCTGGATGCCGTCAGACAGTCCCTGGGCAT
GTGCCCTCAGCACAACATCCTGTTTCACCACCTGAC
CGTGGCCGAGCACATGCTGTTTTATGCCAGCTGAA
GGCAAGAGCCAAGAAGAGGCTCAGCTGGAAATGG
AAGCCATGtTgGAGGACACCGGCCTGCACCACAAGA
GAAATGAGGAAGCCCAGGATCTGAGCGGCGGCATG
CAGAGAAAAGTGAAGCGTGGCCATTGCCTTCGTGGGC
GACGCCAAGGTTGTGATCCTGGATGAGCCTACAAGC
GGCGTGGACCCTTACAGCAGAAGATCCATCTGGGAT
CTGCTGCTGAAGTACAGAtcaGGCCGGACCATCATCA
TGAGCACCCACCACATGGACGAGGCCGATCTGCTCG
GAGACAGAATCGCCATCATTGCTCAGGGCAGACTGT
ACTGCAGCGGCACCCCACTGTTTCTGAAGAACTGTT
TCGGCACCGGACTGTATCTGACCCTCGTGCGGAAGA
TGAAGAACATCCAGTCTCAGCGGAAGGGCAGCGAG
GGCACCTGTAGCTGTTCTAGCAAGGGCTTTAGCACC
ACCTGTCCAGCTCACGTGGACGATCTGACCCTGAA
CAGGTGCTGGATGGCGACGTGAACGAGCTGATGGA
CGTGGTGTGTCACCATGTGCCTGAGGCCAAGCTGGT
GGAATGCATCGGCCAAGAAGTGAATTTTTCTGCTCCC
GAACAAGAAGTTCAGCACCGGGCCTACGCCAGCC
TGTTTCAGAGAGCTGGAAGAAACCCTGGCCGACCTG
GGCCTGTCTAGCTTTGGCATCAGCGACACCCCTCTC
GAAGAGATtTTCCTGAAAGTGACAGAGGACAGCGAT
AGCGGCCCTCTGTTTGCTGGCGGAGCACAGAAAAG
CGCGAGAACGTGAACCCTAGACACCCCTGTCTGGGC
CCAAGAGAGAAAGCCGGACAGACCCCTCAGGACAG
CAATGTGTGCTCTCCTGGTGCTCCTGCCGCTCATCCT
GAGGGACAACCTCCACCTGAACCTGAGTGCTCTGGA
CCTCAGCTGAACACCGGAACACAGCTGGTTCTGCAG
CACGTGCAGGCTCTGCTCGTGAAGAGATTCCAGCAC
ACCATCAGAAGCCACAAGGACTTTCTGGCCCAGATC
GTGCTGCCCGCCACCTTTGTTTTTCTGGCTCTGATGC
TGAGCATCGTGATCCCTCCATTCGGCGAGTACCCCG
CTCTGACACTGCACCCTTGATCTACGGCCAGCAGT
ACACCTTTTTCTCCATGGACGAACCCGGCAGCGAGC
AGTTCACAGTGCTGGCTGATGTCCTGCTGAACAAGC
CCGGCTTCGGCAACCGGTGTCTGAAAGAAGGATGG
CTGCCTGAGTACCCTTGCGGCAACAGCACACCTTGG
AAAACCCCTAGCGTGTCCCCTAACATCACCCAGCTG
TTCCAAAAGCAGAAATGGACCCAAGTGAACCCCTCT
CCATCCTGCCGGTGCTCCACAAGGGAAAAGCTGACC
ATGCTGCCCGAGTGTCCAGAAGGCGCTGGCGGACTT
CCTCCACCTCAGAGAACACAGAGATCCACCGAGATT
CTCCAGGACCTGACCGACCGGAATATCAGCGACTTC

```

[0296]

CTGGTTAAGACATACCCCGCACTGATCCGGTCCAGC
 CTGAAGTCCAAGTTCTGGGTCAACGAACAGAGATAC
 GGCGGCATCAGCATCGGCGGAAAAGTGCCTGTGGT
 GCCTATCACAGGCGAGGCCCTTGTGGGCTTTCTGTC
 CGATCTGGGGAGAATCATGAACGTGTCCGGCGGAC
 CTATCACCAGGGAAGCCAGCAAAGAGATCCCCGAT
 TTCCTGAAGCACCTGGAAACCGAGGACAATATCAA
 AGTGTGGTTCAACAACAAAGGATGGCACGCCCTCGT
 GTCTTTTCTGAACGTGGCCCACAATGCCATCCTGCG
 GGCTAGCCTGCCTAAGGACAGAAGCCCTGAGGAAT
 ACGGCATCACCGTGATCTCCAGCCTCTGAATCTGA
 CCAAAGAGCAGCTGAGCGAGATCACCGTGCTGACC
 ACCTCTGTGGATGCTGTGGTGGCCATCTGCGTGATC
 TTCAGCATGAGCTTCGTGCCCGCCTCCTTCGTGCTGT
 ACCTGATTCAAGAGAGAGTGAACAAGAGCAAGCAC
 CTCCAGTTCATCTCCGGGGTGTCCCCAACCACTAC
 TGGGTCACCAATTTTCTGTGGGACATCATGAACTAC
 AGCGTGTGAGCCGGCCTGGTCGTGGGCATCTTTATC
 GGCTTTCAGAAGAAGGCCTACACGAGCCCCGAGAA
 CCTGCCTGCTTTGGTTGCTCTGCTGCTCCTGTATGGC
 TGGGCCGTGATTCCCATGATGTACCCCGCCAGCTTT
 CTGTTTGACGTGCCCAGCACAGCCTACGTGGCCCTG
 TCTTGCGCCAATCTGTTTCATCGGCATCAACAGCAGC
 GCCATCACATTCATCCTGGAACTGTTTCGAGAACAAC
 AGGACCCTGCTGCGGTTCAACGCCGTGCTGCGGAAA
 CTGCTGATCGTGTTCCCTCACTTCTGTCTCGGCAGAG
 GCCTGATCGACCTGGCTCTGTCTCAGGCCGTGACCG
 ATGTGTACGCCAGATTTGGCGAGGAACACTCCGCCA
 ATCCATTCCACTGGGACCTGATCGGCAAGAACCTGT
 TCGCCATGGTGGTGGAAAGGCGTCGTGTACTTCCTGC
 TCACTCTGCTGGTGCAGAGACACTTTTTTCTGTCCCA
 ATGGATCGCCGAGCCTACCAAAGAACCCATTGTGGA
 CGAGGACGACGATGTGGCCGAGGAAAGACAGAGAA
 TCATCACCAGGCGGCAACAAGACCGATATCCTGAGAC
 TGCACGAGCTGACAAAGATTTACCCCGGCACAAGCT
 CCCAGCCGTGGATAGGCTTTGTGTGGGAGTTAGAC
 CCGGCGAGTGCTTTGGCCTGCTGGGAGTTAATGGCG
 CCGGAAAGACCACCACCTTCAAGATGCTGACCGGC
 GACACCACAGTGACAAGCGGAGATGCTACAGTGGC
 CGGCAAGAGCATCCTGACCAACATCAGCGAAGTGC
 ATCAGAACATGGGCTACTGCCCTCAGTTCGACGCCA
 TCGACGAACTGCTGACAGGCCGCGAACACCTGTATC
 TGTATGCCAGACTGAGAGGCGTGCCCGCTGAAGAG
 ATCGAGAAGGTGGCCAAGTGGTCCATCAAGTCTCTG
 GGCCTGACAGTGTACGCCGACTGTCTGGCCGGAACA
 TACAGCGGAGGAAACAAGCGGAAGCTGAGCACCGC

[0297]

	<p>CATTGCTCTGATCGGATGCCACCTCTGGTCCTGCTG GATGAACCCACCACCGGAATGGAcCCCCAGGCTAGA AGAATGCTCTGGAACGTGATCGTGTCTATCATCCGC GAGGGCAGAGCTGTGGTGTGACCTCTCACAGCATG GAAGAGTGCAGAGGCTCTGTGTACCCGGCTGGCCATT ATGGTCAAGGGCGCCTTCAGATGCATGGGCACCATT CAGCATCTGAAAAGCAAGTTCGGCGACGGCTACATC GTGACAATGAAGATCAAGAGCCCCAAGGACGACCT CCTGCCTGATCTGAACCCCGTGGAACAGTTTTTTCA GGGCAACTTCCCCGGCTCCGTGCAGCGGAAAGAC ACTATAACATGCTGCAGTTTCAGGTGTCTCCTCCA GCCTGGCTCGGATCTTCAACTGCTGCTCTCTCACA GGACAGCCTGCTGATTGAAGAGTACAGCGTGACAC AGACCACACTCGACCAGTTTTTCGTGAACTTCGCCA AGCAGCAGACCGAGAGCCACGACCTGCCTCTGCATC CTAGAGCCGCTGGTGCCTCTAGACAAGCTCAGGACT AAGCTTCCACTGGATTGTACAATTACATAAAATAAA ATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTT GTGTGCGCTACTtttttgagaccggtttgtctggtcaaccaccgcgactcc gtcgtcaggatcatagggcgctgtatctgataaggcttatctggttcattt</p>
SEQ ID NO: 9. attP-GA	ggtttgtctggtcaaccaccgcgactcagtgggtgtacggtacaaacc
SEQ ID NO: 10. attB-GA	ggcttgtcgacgacggcgactccgtcgtcaggatcat
SEQ ID NO: 11. Bxb1 辅助 质粒	<p>caattattgaaggcctccctaacgggggctttttgtttctggtcAcccgcttaacga tcgttgctgaacaaacagacaatctggtctgtttgtattatggaaaattttctgtataata gattcaacaaacagacaatctggtctgtttgtattatagctgtcaccggatgtgctttccg gtctgatgagtcctgaggacgaacagcctctacaaataattttgttaaTACTAG AGAAAGAGGAGAAATACTAGATGCGTGCCTGGTT GTTATTCGTCTGAGCCGTGTTACCGATGCAACCACC AGTCCGGAACGTCAGCTGGAAAGCTGTCAGCAGCT GTGTGCACAGCGTGGTTGGGATGTTGTTGGTGTTC CGAAGATCTGGATGTTAGCGGTGCAGTTGATCCGTT TGATCGTAAACGTCGTCCGAATCTGGCACGTTGGCT GGCATTGAAGAACAGCCGTTTGATGTTATTGTTGC CTATCGTGTGATCGTCTGACCCGTAGCATTCTGTCAT CTGCAGCAGCTGGTTCATTGGGCAGAAGATCATAAA AAGCTGGTTGTGAGCGCAACCGAAGCACATTTTGAT ACCACCACACCGTTTGCAGCAGTTGTTATTGCACTG ATGGGCACCGTTGCACAGATGGAAGTGAAGCAAT TAAAGAACGTAATCGTAGCGCAGCCATTTTAAACAT TCGTGCAGGTAAATATCGTGGTAGCCTGCCTCCGTG GGGTTATCTGCCGACACGTGTTGATGGTGAATGGCG TCTGGTCCGGATCCTGTTTCAGCGTGAACGTATTCTG</p>

[0298]

GAAGTTTATCATCGTGTGGTGGATAATCATGAACCG
 CTGCATCTGGTTGCACATGATCTGAATCGTTCGTGGT
 GTTCTGAGCCCGAAAGATTATTTTGCACAGCTGCAG
 GGTCGTGAACCGCAGGGTCGCGAATGGTCAGCAAC
 CGCACTGAAACGTAGCATGATTAGCGAAGCAATGCT
 GGGTTATGCAACCCTGAATGGTAAAACCGTTCGTGA
 TGATGATGGTGCACCGCTGGTTCGTGCAGAACCGAT
 TCTGACACGTGAACAGCTGGAAGCACTGCGTGCCGA
 ACTGGTTAAAACCAGCCGTGCAAAACCGGCAGTTA
 GCACCCCGAGCCTGCTGCTGCGTGTCTGTTTTGTGC
 AGTTTGTGGTGAACCGGCATACAAATTTGCCGGTGG
 TGGTCGTAAACATCCGCGTTATCGTTGTCGTAGCAT
 GGGTTTTCCGAAACATTGTGGTAATGGTACAGTTGC
 AATGGCAGAATGGGATGCATTTTGCGAAGAACAGG
 TTCTGGATCTGCTGGGTGATGCCGAACGTCTGGAAA
 AAGTTTGGGTGCAGGTAGCGATAGCGCAGTTGAAC
 TGGCCGAAGTTAATGCAGAACTGGTTGATCTGACCA
 GCCTGATTGGTAGTCCGGCATATCGTGCCGGTAGTC
 CGCAGCGTGAAGCACTGGATGCACGTATTGCAGCAC
 TGGCAGCACGTCAAGAAGAATTAGAAGGTCTGGAA
 GCCCGTCCGAGCGGTTGGGAATGGCGTGAAACCGG
 TCAGCGTTTTGGTGATTGGTGGCGTGAGCAGGATAC
 CGCAGCCAAAAATACCTGGCTGCGTAGTATGAATGT
 TCGCCTGACCTTTGATGTTTCGCGGTGGTCTGACGCG
 TACCATTGATTTTGGCGATCTGCAAGAATATGAACA
 GCATCTGCGTCTGGGTAGCGTTGTTGAACGTCTGCA
 TACCGGCATGAGCTAAActcggtaccaaattccagaaaagaggcctccc
 gaaagggggcctttttcgttttggccaatggcggcgcccatcgaatggtgcaaa
 accttcgcggtatggcatgatagcggccggaagagagtcaattcaggggtggaata
 tgagcccgaaacgctgacctcaggcagaacgtcaatgaaaccagggtaaactg
 attgcagcagcactgggtgtctcgtgaaaagggtatgcaggtttcgtattgcagat
 gttccgggtgcagccggtgttagccgtggtgcacagagccatctttccgacaaaact
 ggaactgctgctggcaacctttgaatggctgtatgagcagattaccgaacgtagccgt
 gcacgtctggcaaaactgaaaccggaagatgatgtattcagcagatgctggatgatg
 cagcagaatTTTTctggatgatgatttagcatcggcctggatctgattgttcagcagat
 cgtgatccggcactgcgtgaaggtattcagcgtaccgtgaacgtaacgTTTTgtgtg
 aagatatgtggctgggtgtgctggtgagccgtggtctgagccgtgatgatccgaaga
 tattctgtgctgattttaacagcgttcgtggtctggtagttcgtagcctgtggcagaaa
 gataaagaacgtttgaacgtgtgcgtaatagcacctggaaattgcacgtgaacgttat
 gcaaaattcaaacgttgataaggatcctaattgtaacgaatcagacaattgacggctc
 gagggagtagcatagggtttcagaaatccctgcttcgtccatttgacaggcacattatg
 catcgatgataagctgtcaaacatgagcagatcctctacgccggacgcatcgtggccc
 gcatcaccggcgccacaggtgcggtgctggcgcttatatcgccgacatcaccgatg
 gggaaagatgggctcggcactcgggctcatgagcaaatTTTTatctgaggtgcttct
 cgctcactgactcgtgcacgaggcagacctcaGGATCTccaggcatcaataa
 aacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgtttatctgttgttgcggtgaacg

[0299]

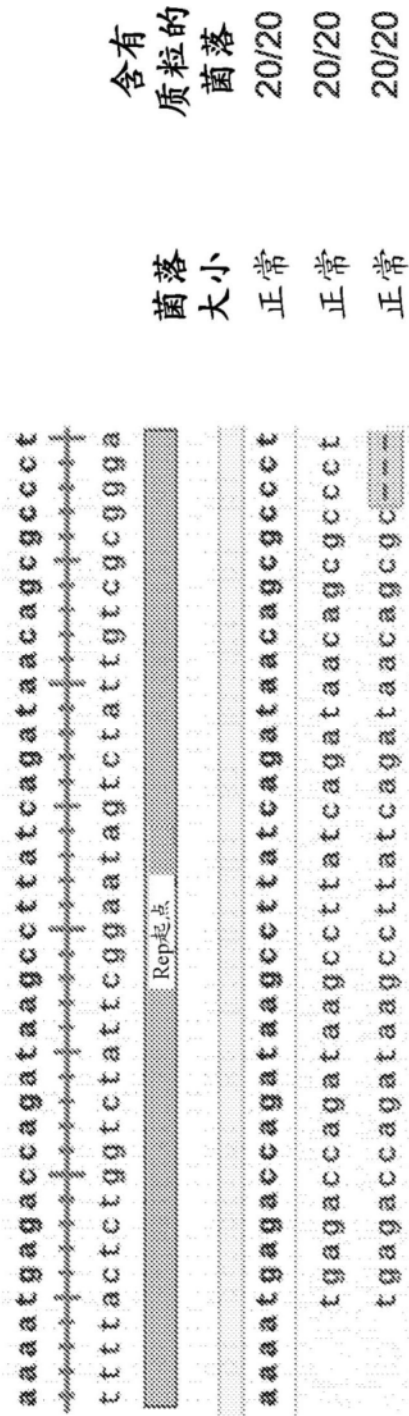
```

ctcttactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcgtttataGGAT
CTgcgaagttcctatactttctagagaataggaacttcgGATCTgtgcgcggaac
ccctattgtttatcttaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctga
taaagctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgctgcc
ttattccctttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagt
aaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaac
agcggtaagatccttgagagttttgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttt
aaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcg
gtcggcgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactcaccagtcacagaaaag
catcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtga
taactgcccgaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgc
tttttgcaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaa
tgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaa
cgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagctcccggcaacaattaatag
actggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctg
gctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtggttctcgcggtatcattgcag
cactggggccagatggaagccctcccgtatcgtattatcacacgacggggagtcag
ggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaag
cattgtaactgacagcaagttactcatatatacttttagattgattaaaactcattttta
atthaaaggatctaggtgaagatccttttgataatcTATGGACAGTTTTC
CCTTTGATATCTAACGGTGAACAGTTGTTCTACTTTT
GTTTGTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATAACAAG
AGCCATAAGAACCTCAGATCCTCCGTATTTAGCCA
GTATGTTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTTGCGTGAG
CCATGAGAACGAACCATTGAGATCATGCTTACTTTG
CATGTCACTCAAAAATTTTGCCTCAAACTGGTGAG
CTGAATTTTGCAGTTAAAGCATCGTGTAGTGTTTTT
CTTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATG
GTTGTTGGTATTTTGTACCATTCATTTTTATCTGGT
TGTTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCCATTTGTCTATC
TAGTTCAACTTGGAATAACACGTATCAGTCGGGCG
GCCTCGCTTATCAACCACCAATTTTCATATTGCTGTAA
GTGTTTAAATCTTTACTTATTGGTTTCAAACCCATT
GGTTAAGCCTTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAG
CATTAAACATGAACCTTAAATTCATCAAGGCTAATCTC
TATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTTGTGTTAGTTCTT
TTAATAACCACTCATAAATCCTCATAGAGTATTTGTT
TTCAAAGACTTAAACATGTTCCAGATTATATTTTATG
AATTTTTTAACTGGAAAAGATAAGGCAATATCTCT
TCACTAAAACCTAATTCTAATTTTTTCGCTTGAGAACT
TGGCATAGTTTGTCCACTGGAAAATCTCAAAGCCTT
TAACCAAAGGATTCCTGATTTCCACAGTTCTCGTCA
TCAGCTCTCTGGTTGCTTTAGCTAATACACCATAAG
CATTTTCCCTACTGATGTTTCATCATCTGAACGTATTG
GTTATAAGTGAACGATACCGTCCGTTCTTTCTTGTA
GGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTGCCACACAG

```

[0300]

CATAAAATTAGCTTGGTTTCATGCTCCGTAAAGTCAT AGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGAAAACAA CTAATTCAGACATACATCTCAATTGGTCTAGGTGAT TTAATCACTATACCAATTGAGATGGGCTAGTCAAT GATAATTACTAGTCCTTTTCCCTTTGAGTTGTGGGTAT CTGTAAATTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAAACCTTGT AAATTCTGCTAGACCCTCTGTAAATTCCGCTAGACC TTTGTGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTTATA ATTTATAGAATAAAGAAAGAATAAAAAAAGATAAA AAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACT TTAGTCAGTTCCGCAGTATTACAAAAGGATGTCGCA AACGCTGTTTGCTCCTCTACAAAACAGACCTTAAAA CCCTAAAGGCTTAAGTAGCACCCCTCGCAAGCTCGGG CAAATCGCTGAATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAG GCACCTGAGTCGCTGTCTTTTTTCGTGACATTCAGTTC GCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAA TGGCACTACAGGCGCCTTTTATGGATTCATGCAAGG AAACTACCCATAATAACAAGAAAAGCCCGTCACGGG CTTCTCAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGT GCTATCTGACTTTTTGCTGTTTCAGCAGTTCCTGCCCT CTGATTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTG ACAGGTCATTCAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGG CAGCGGTATCA
--



菌落大小
正常
正常
正常

图1

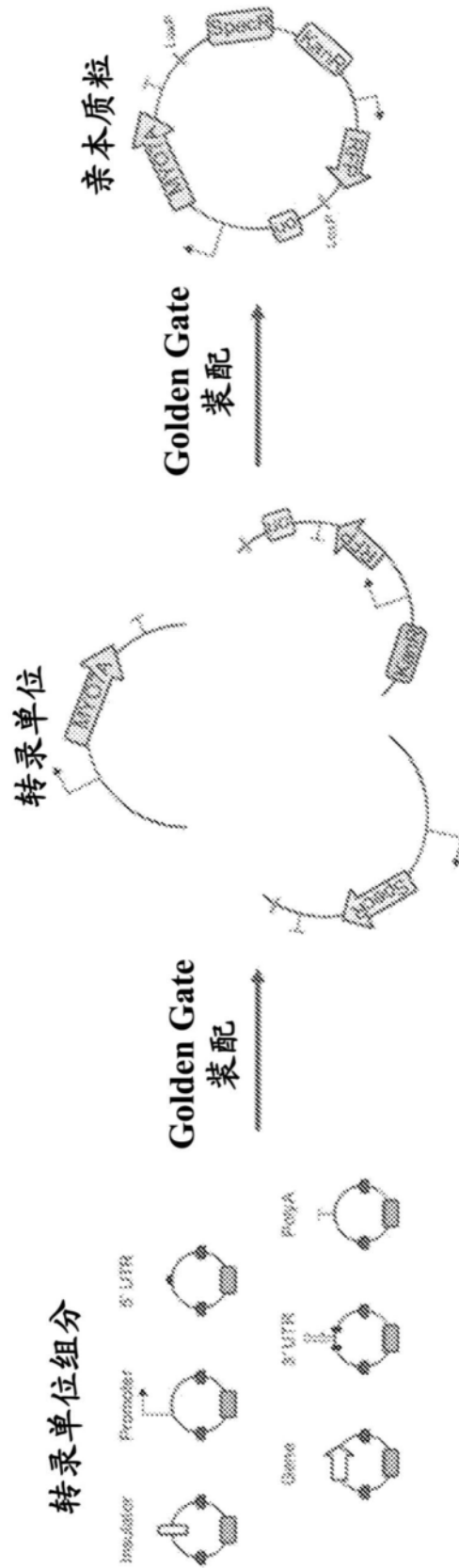


图2

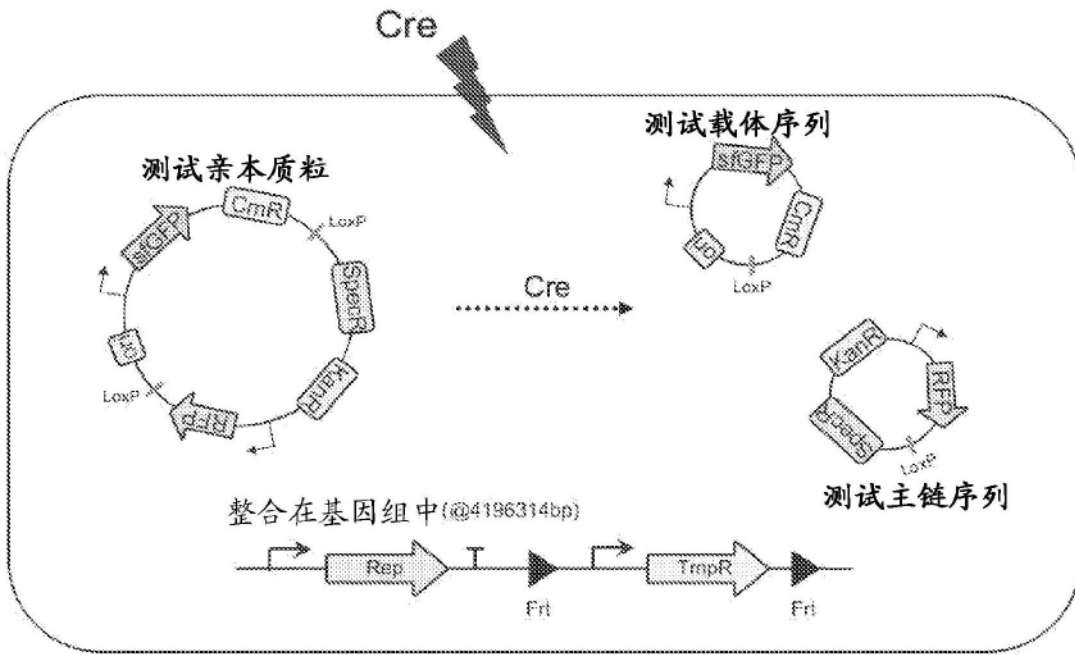


图3

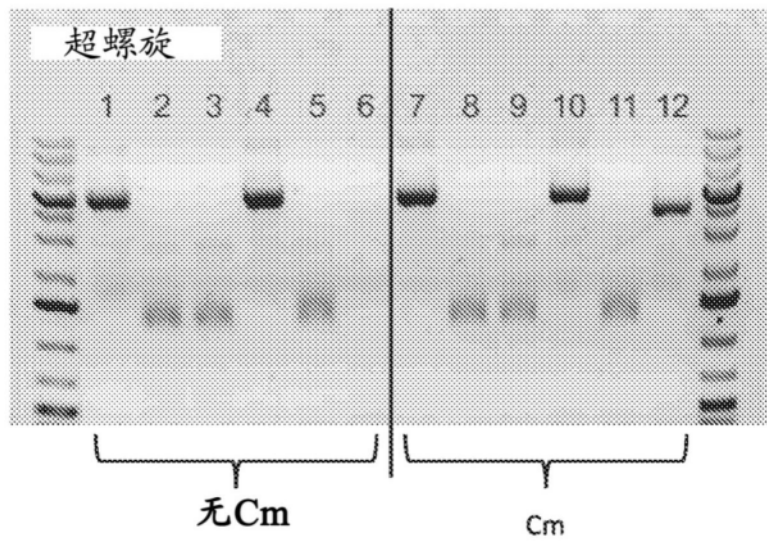


图4

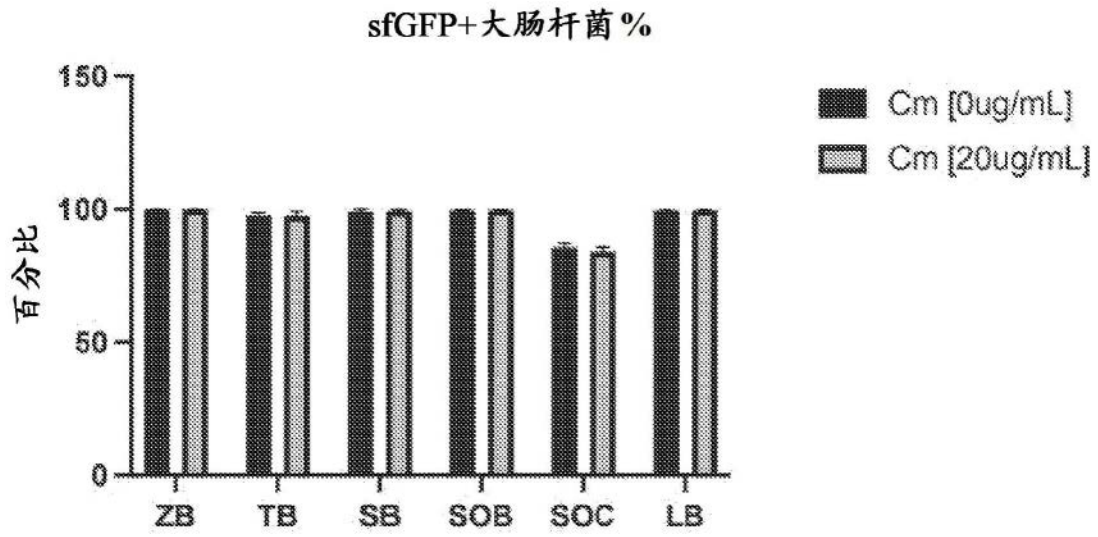


图5

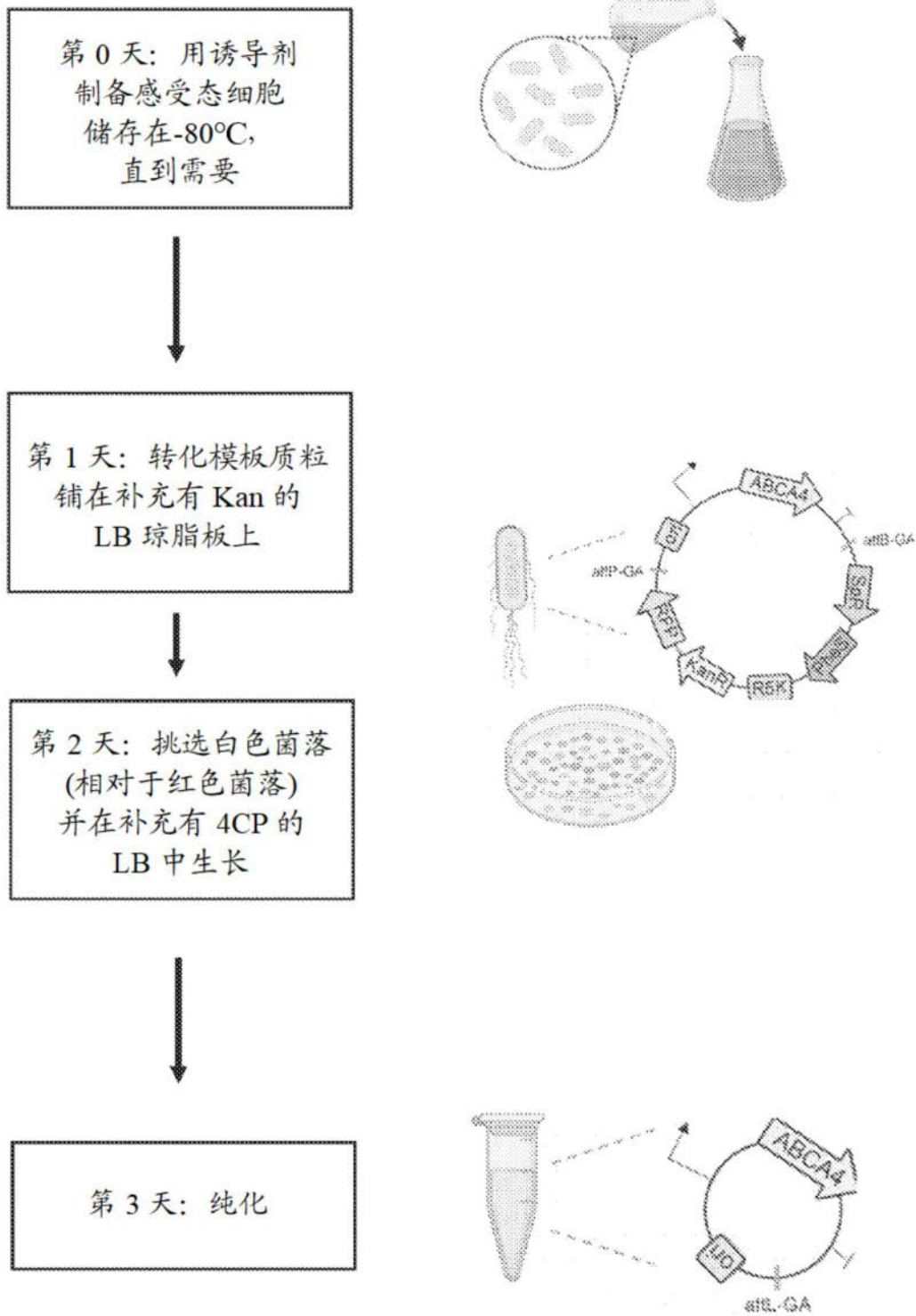


图6

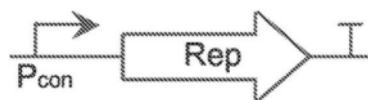


图7A

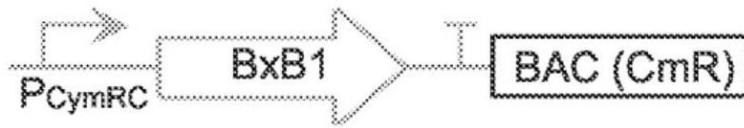


图7B

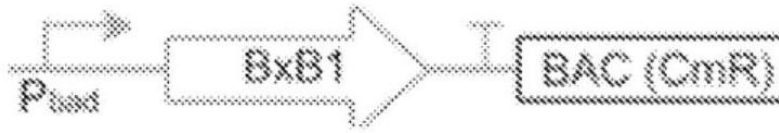


图7C

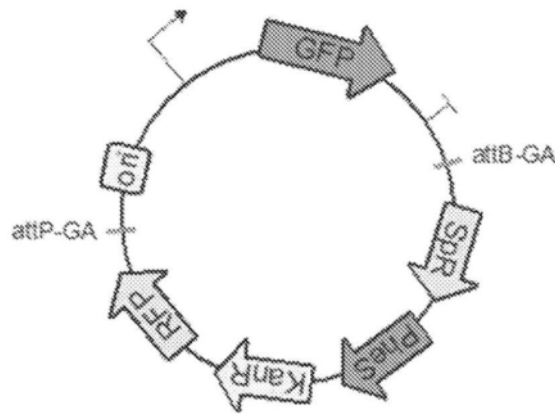


图7D

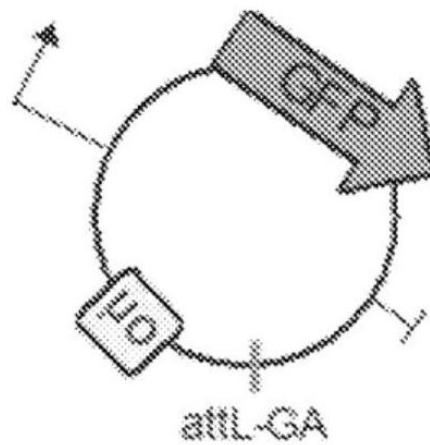


图7E

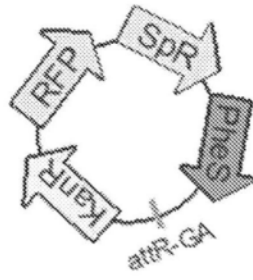


图7F

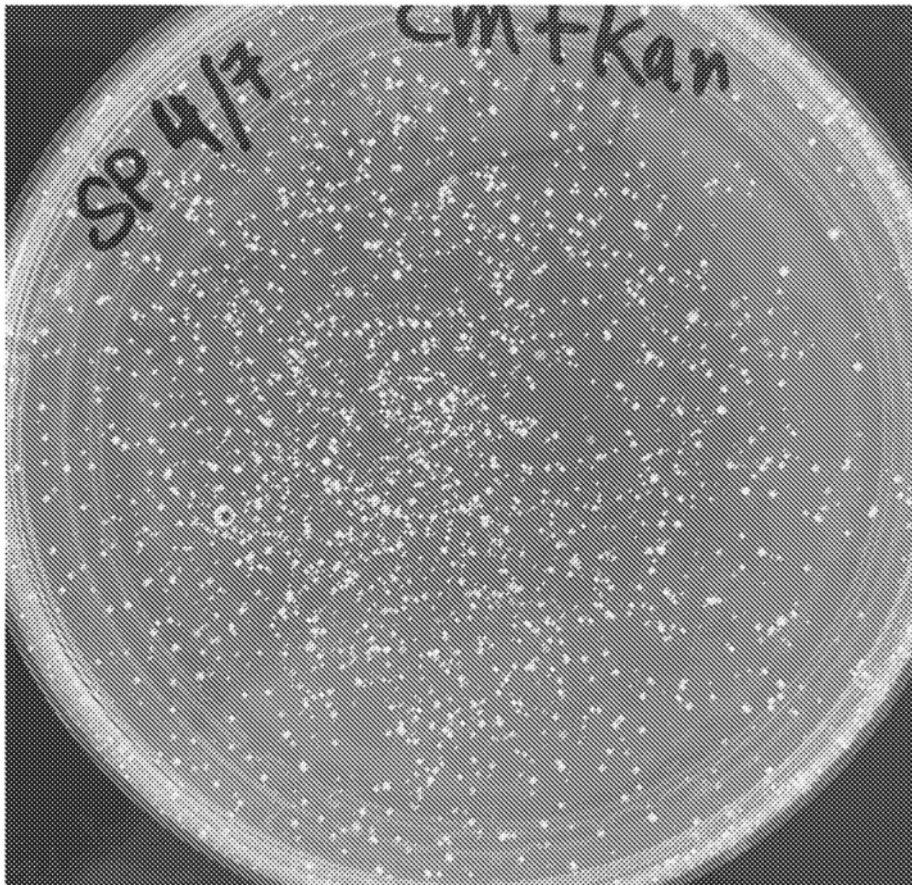


图8A

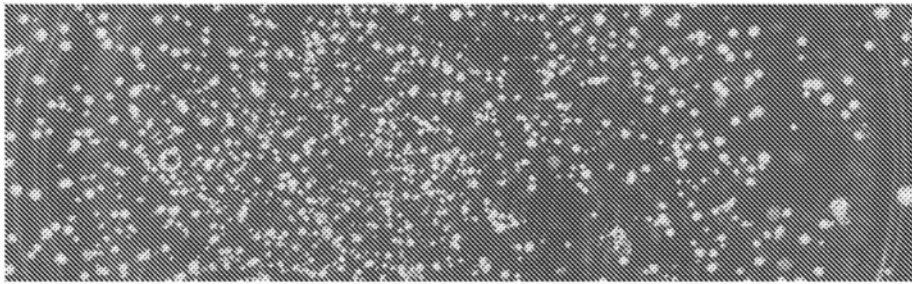


图8B

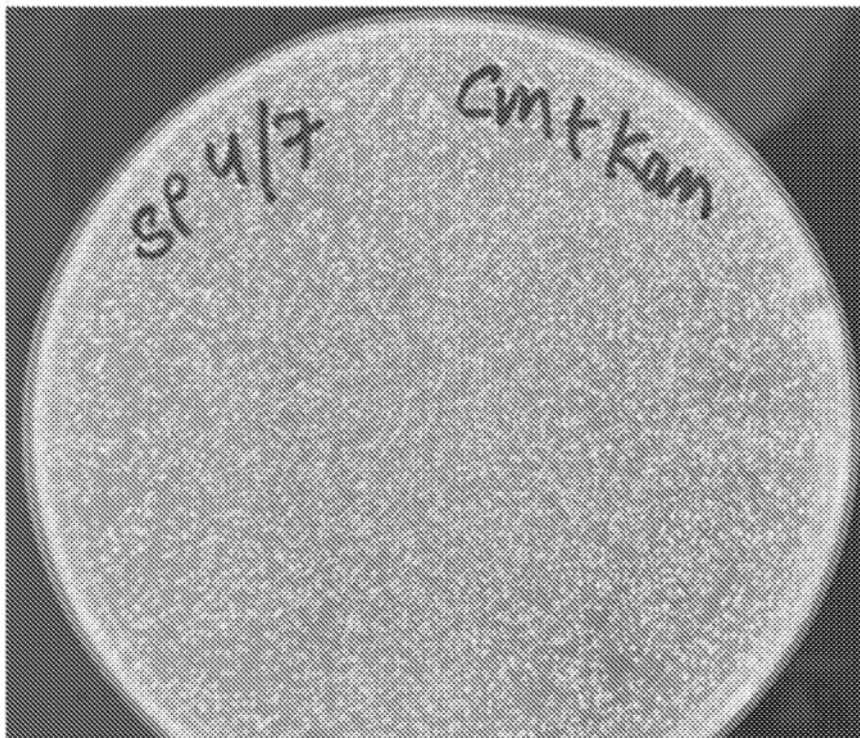


图9A

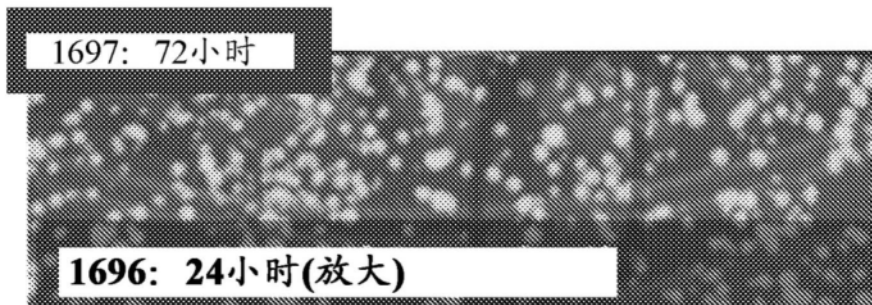


图9B

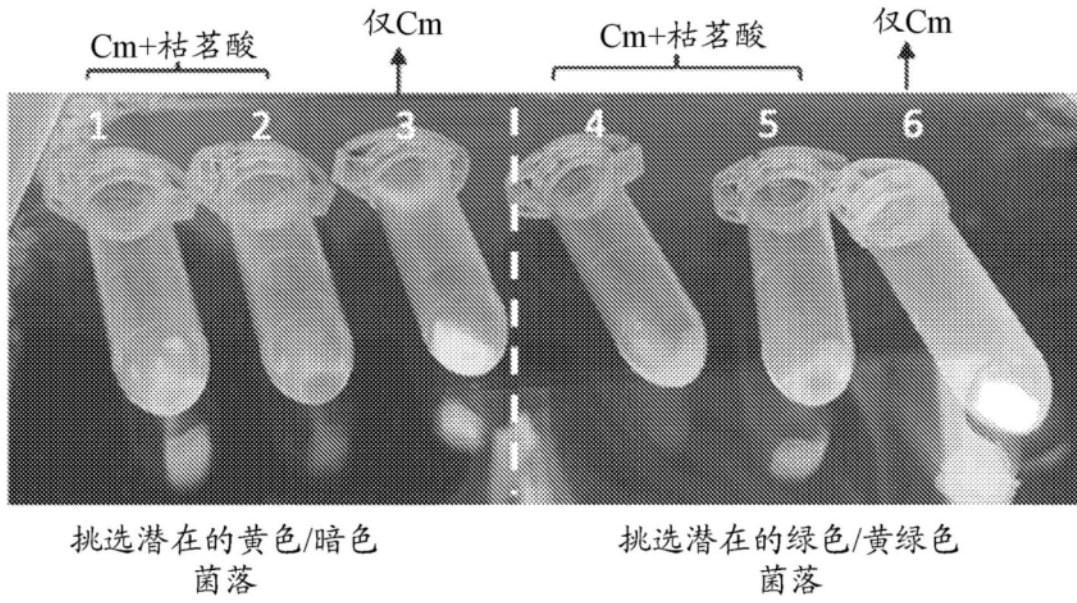


图10

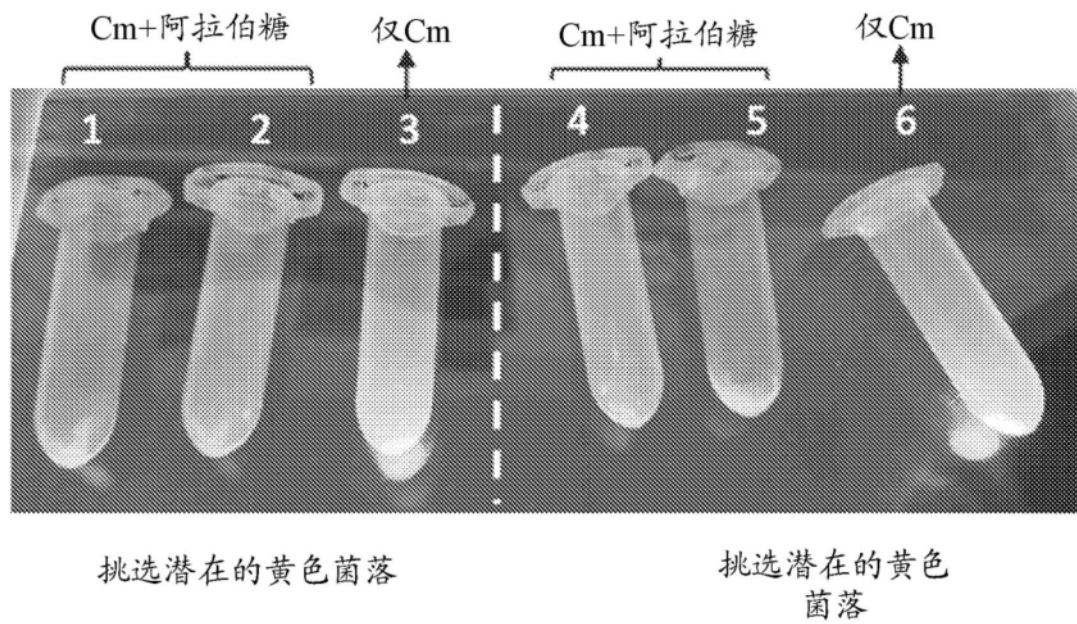


图11

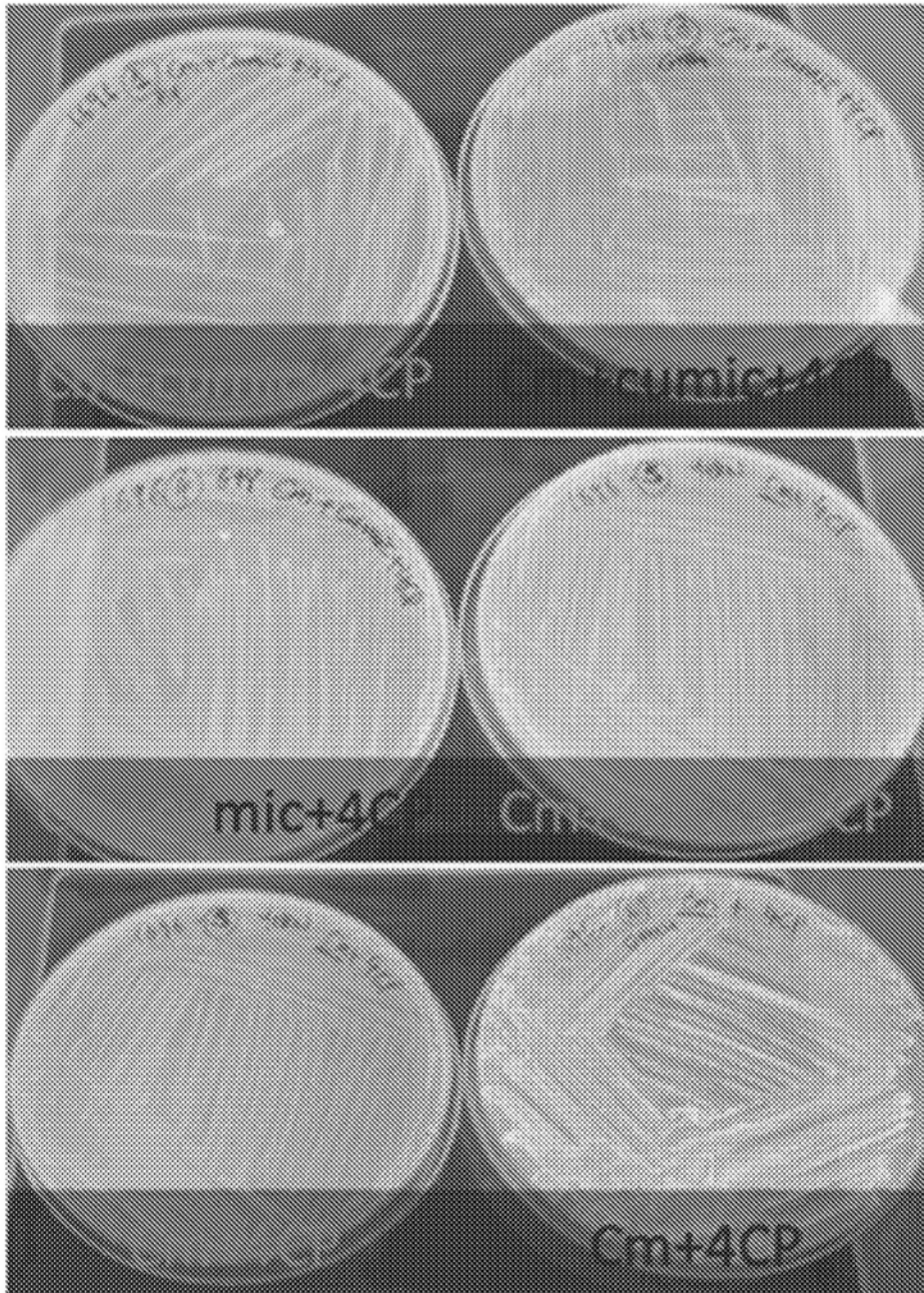


图12

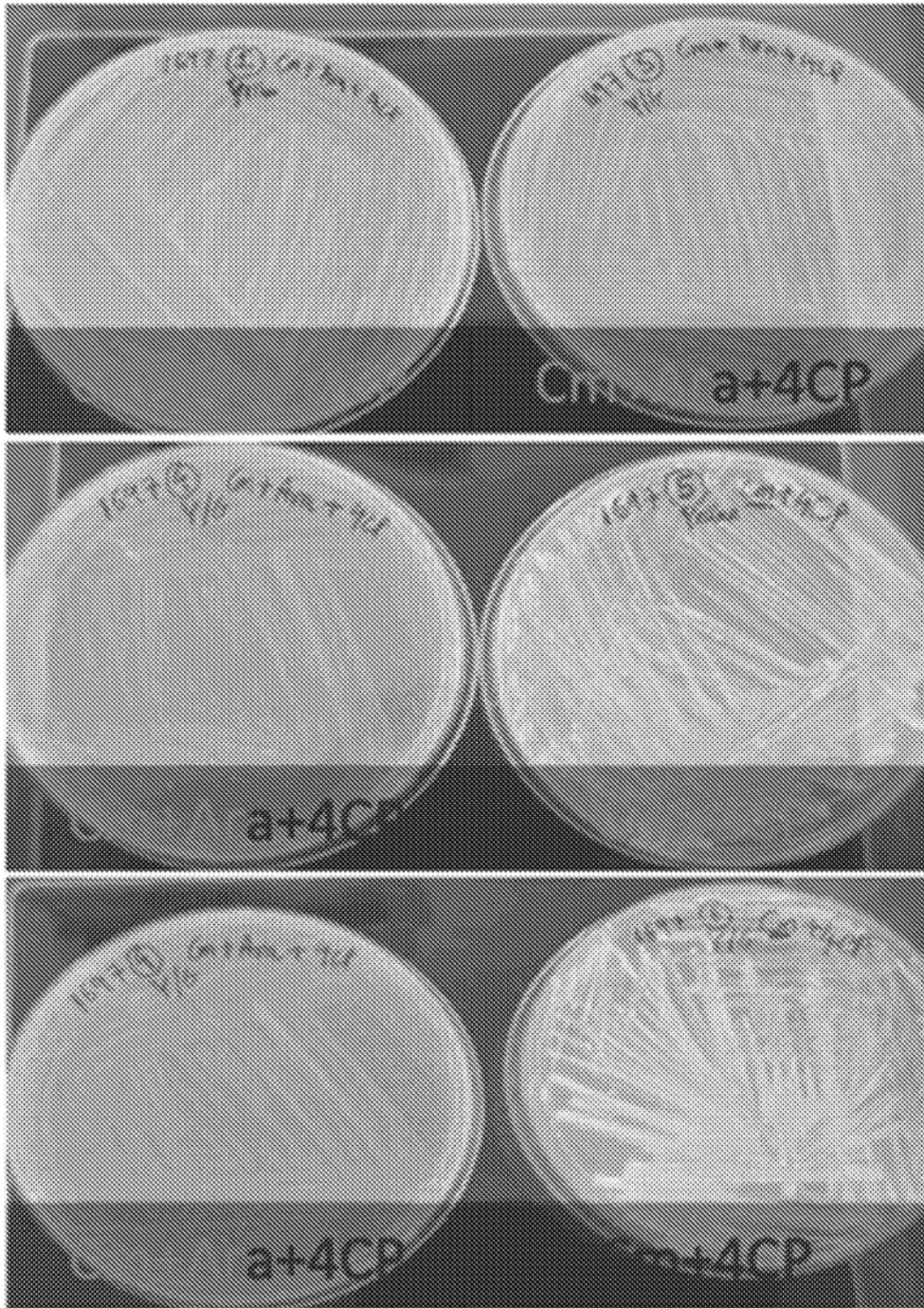


图13

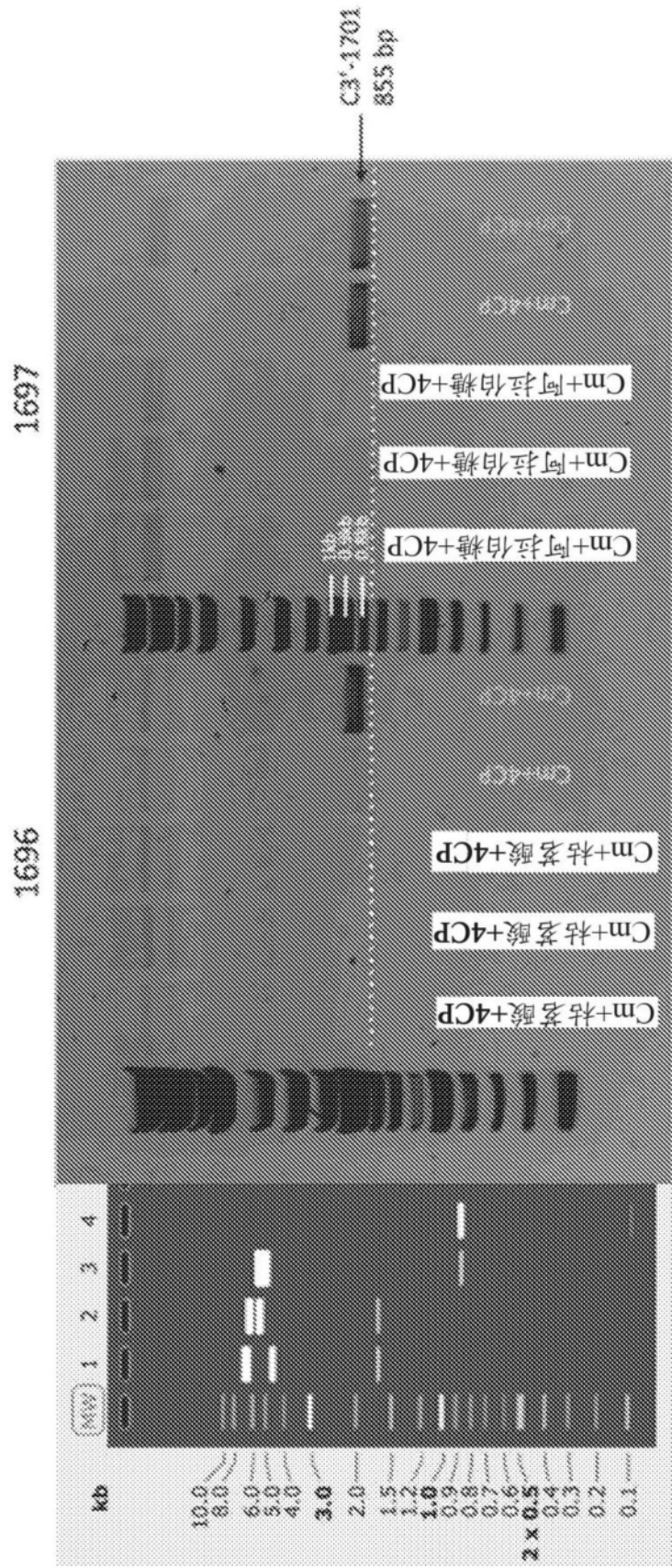


图14

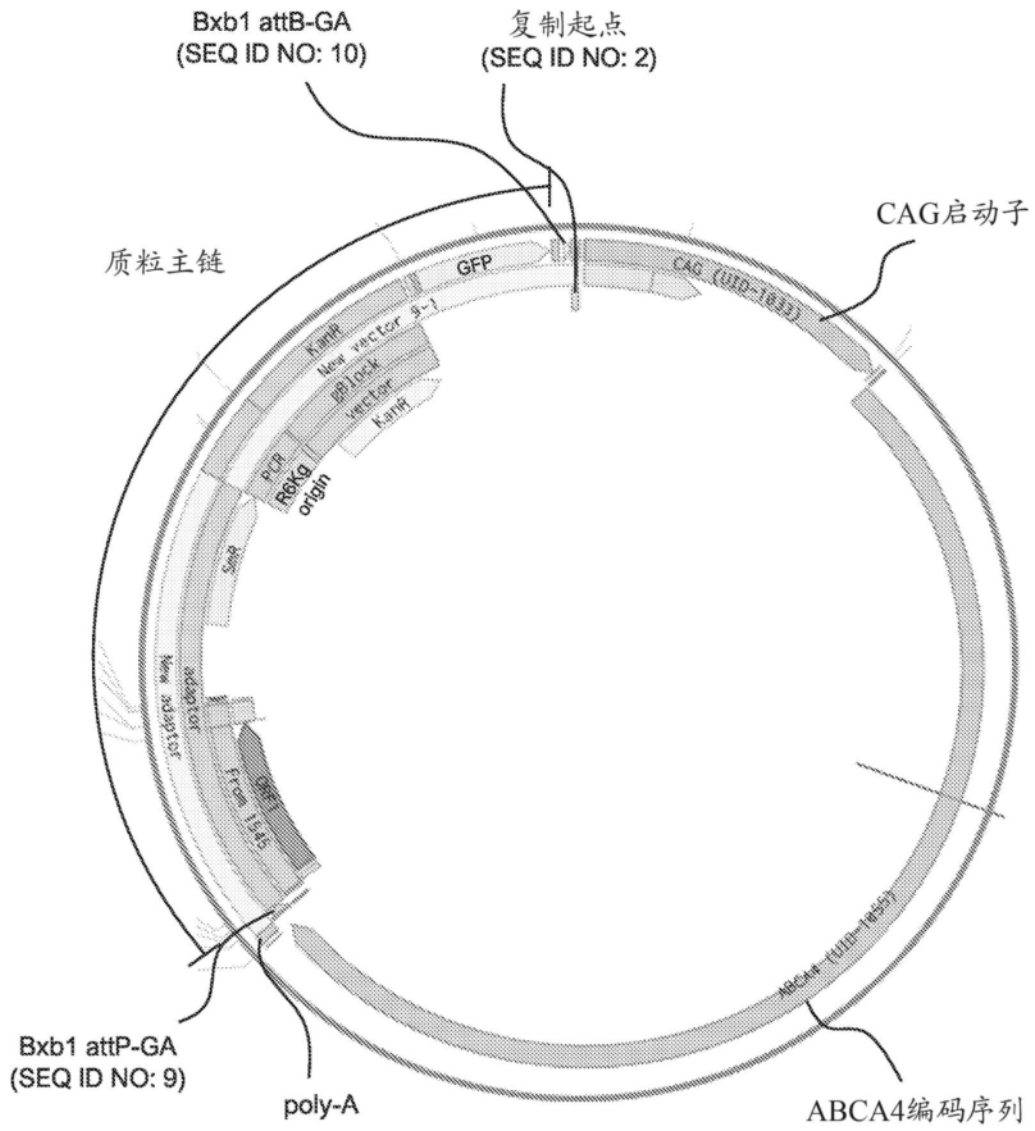


图15A

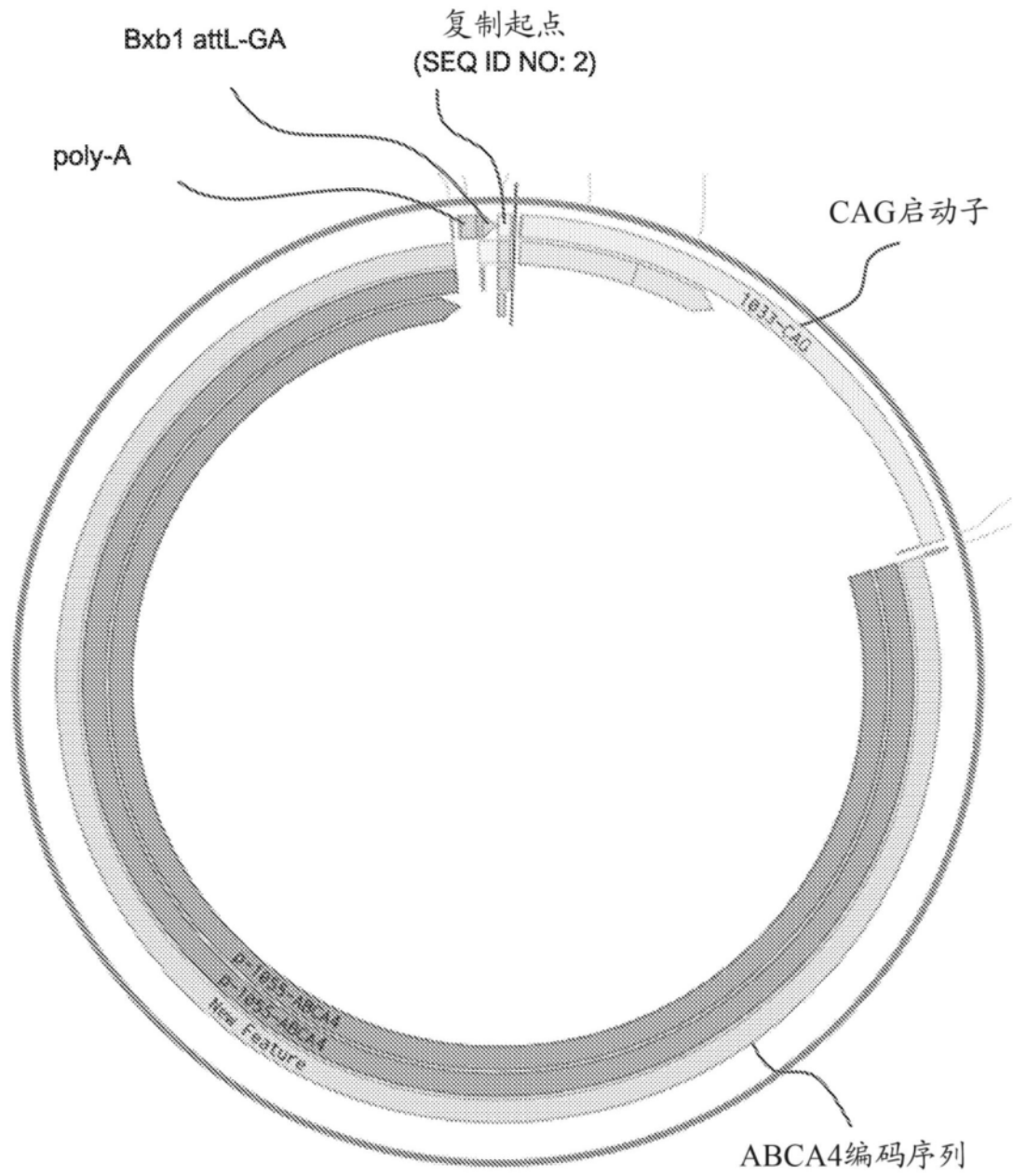


图15B

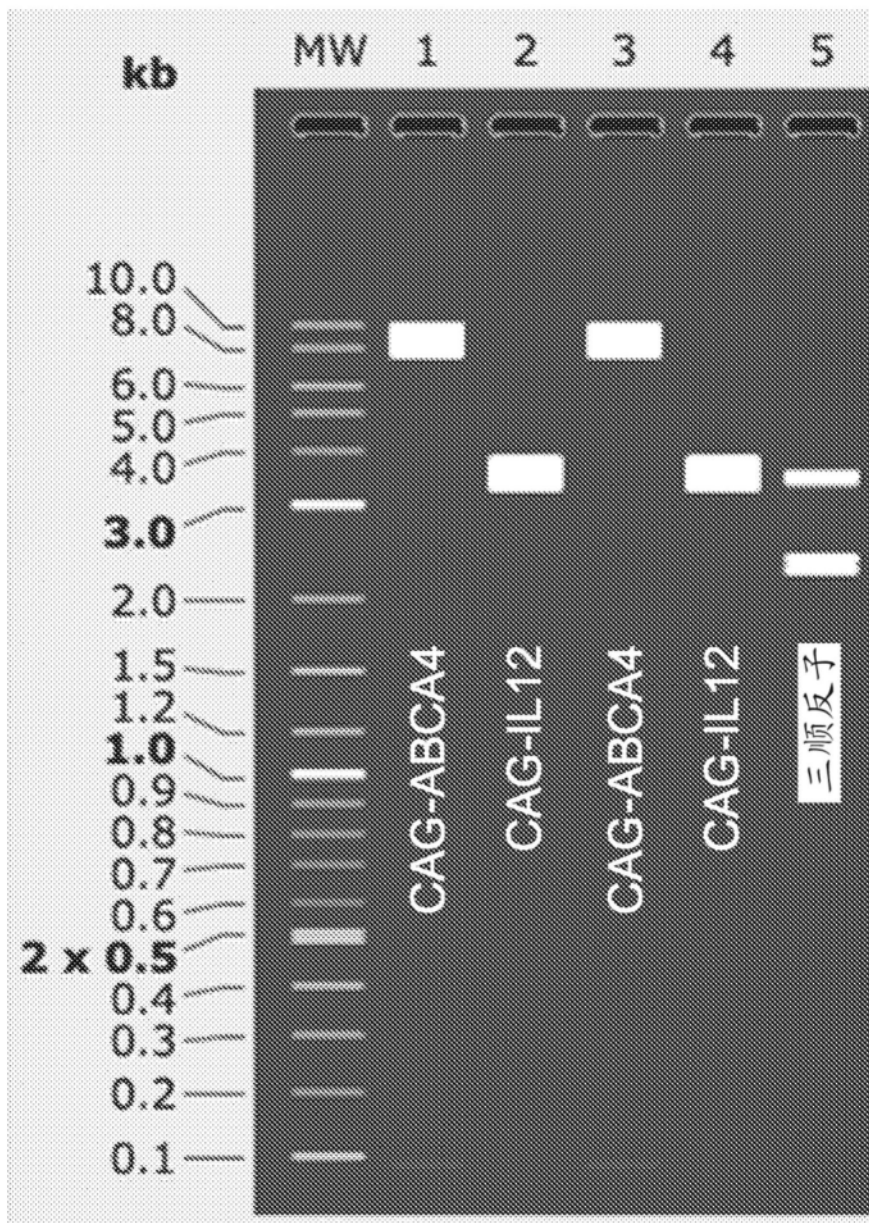


图16A

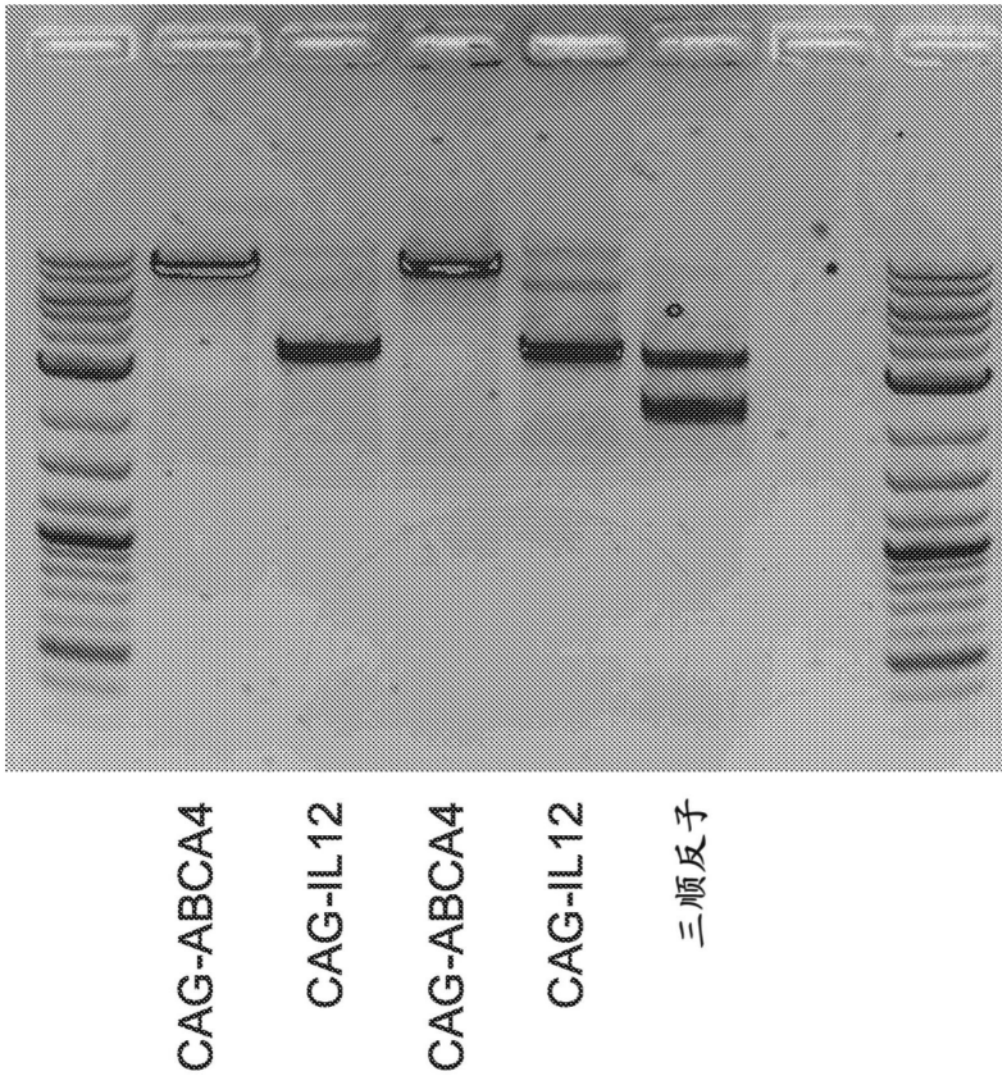


图16B

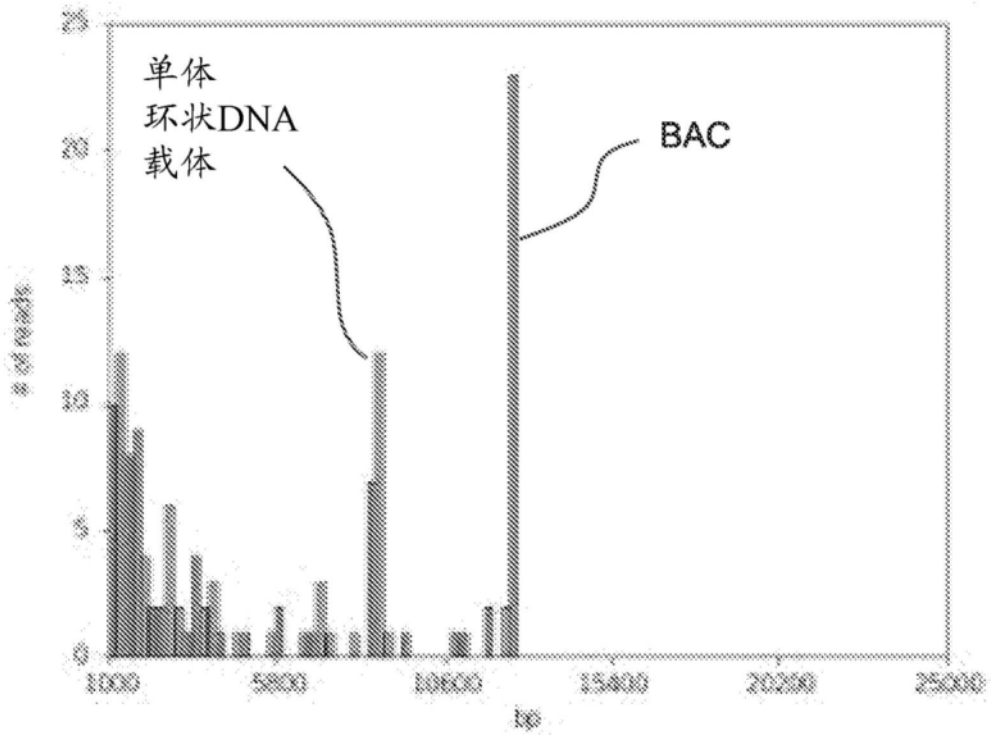


图17A

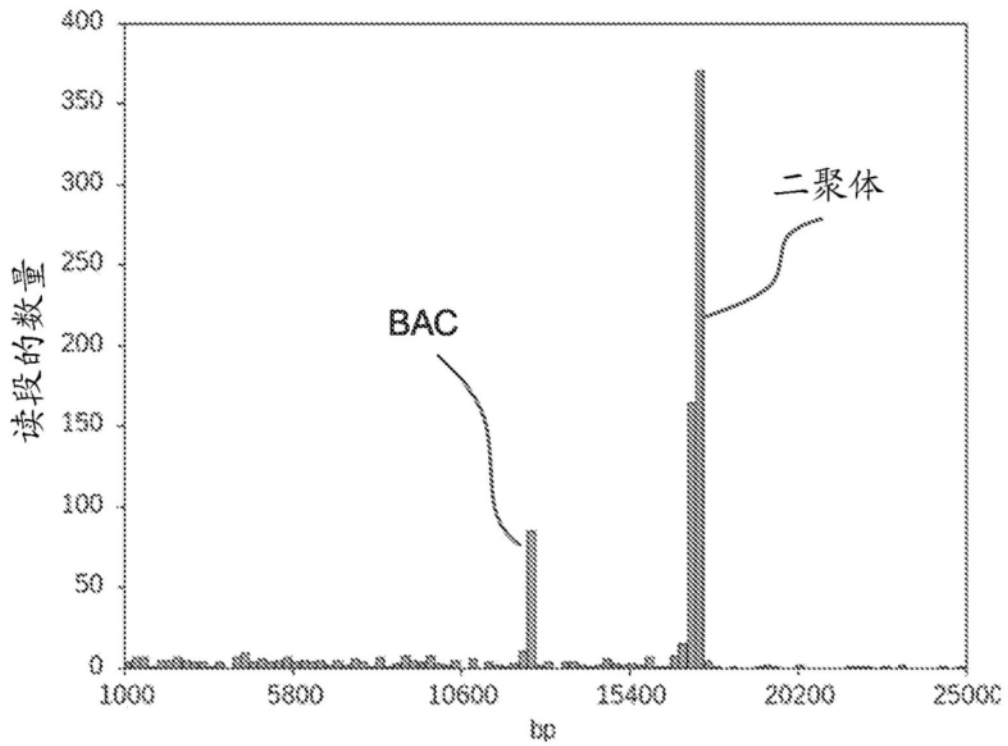


图17B

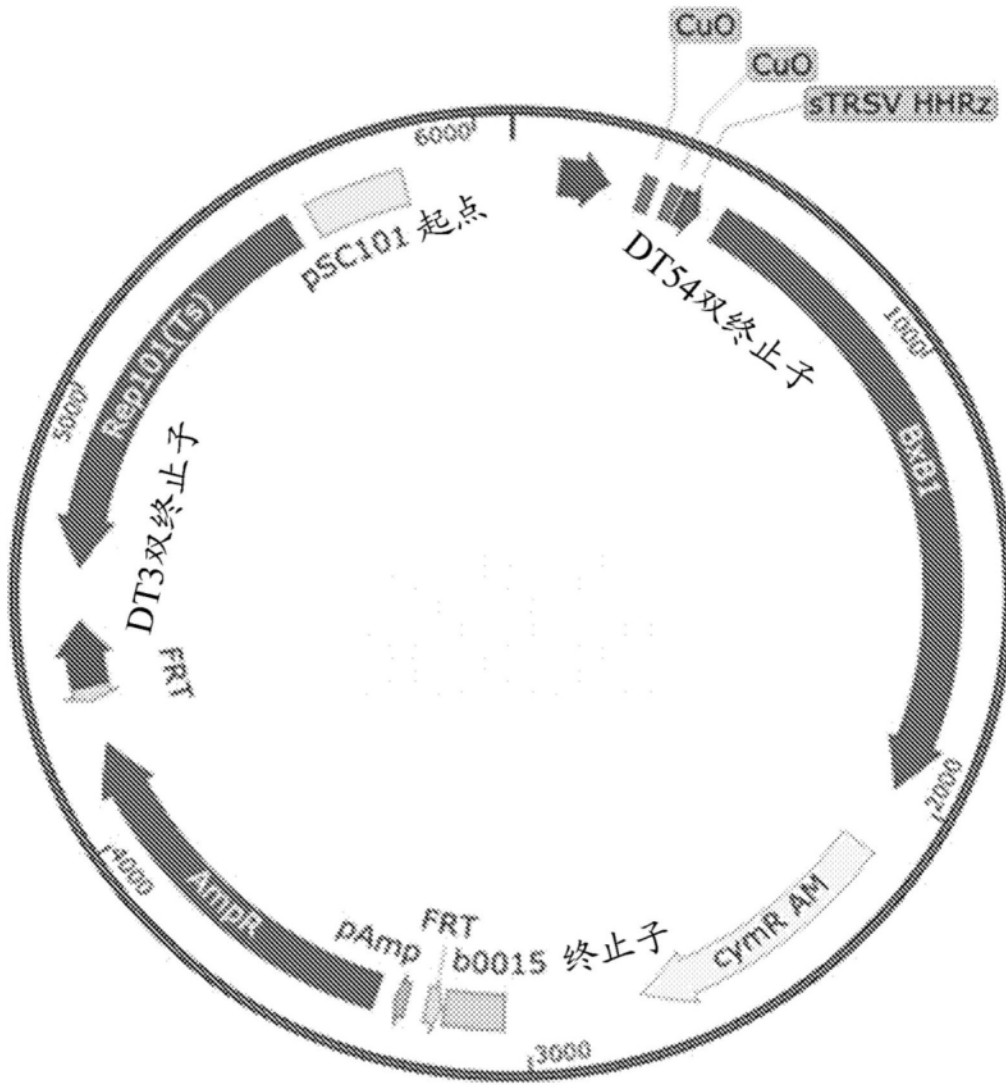


图18

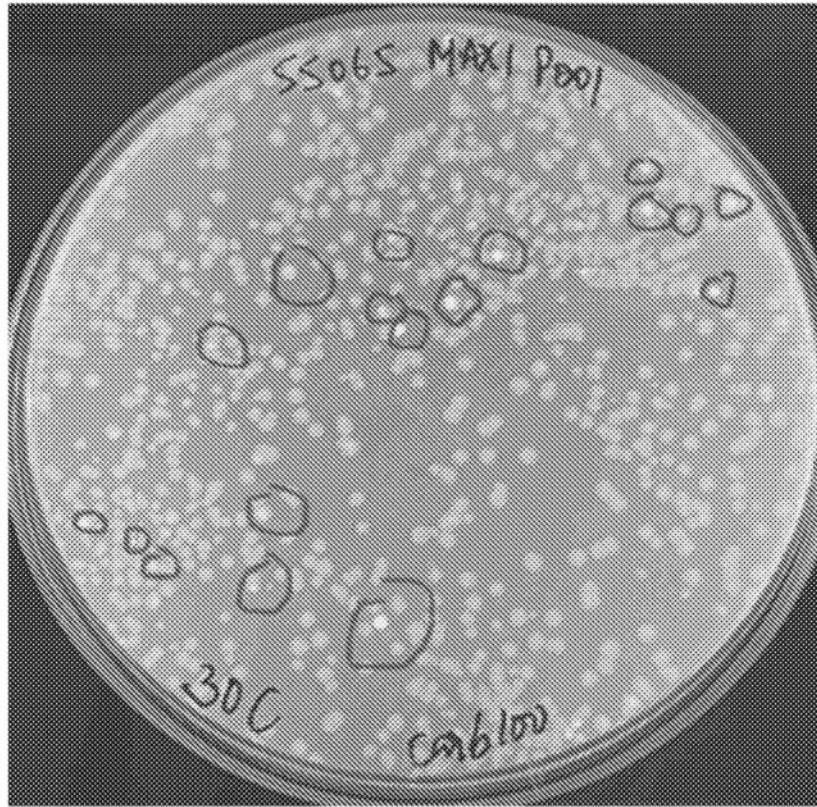


图19

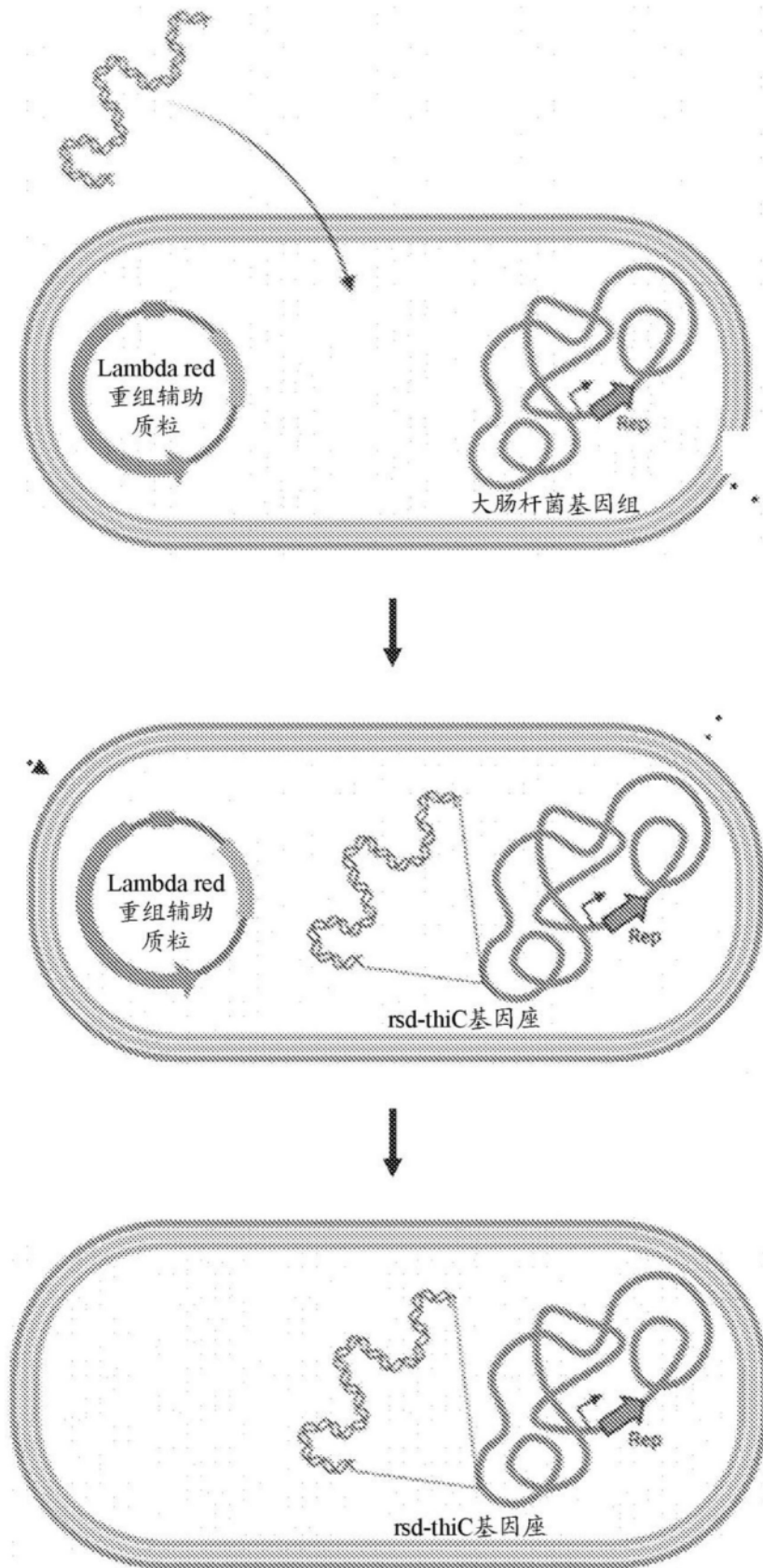


图20

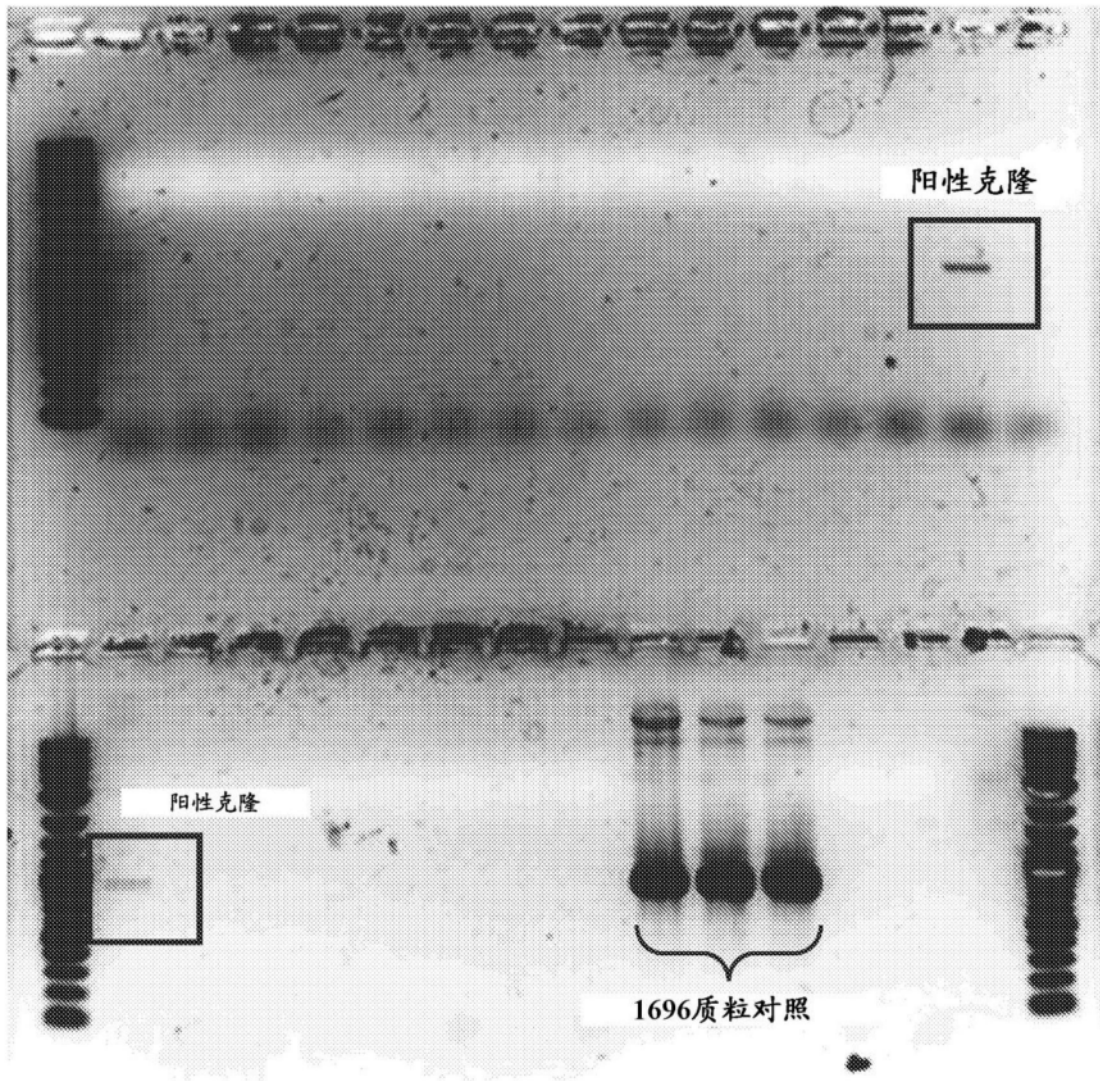


图21

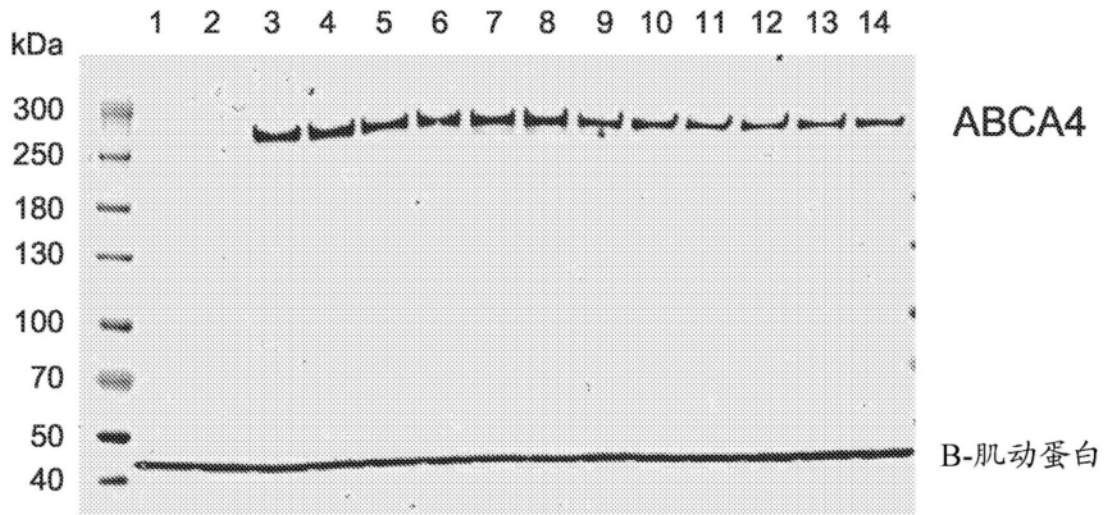


图22