



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113412331 A

(43) 申请公布日 2021.09.17

(21) 申请号 202080010834.4

(22) 申请日 2020.01.24

(30) 优先权数据

62/796,417 2019.01.24 US

62/796,450 2019.01.24 US

62/800,285 2019.02.01 US

62/800,303 2019.02.01 US

62/814,414 2019.03.06 US

62/814,424 2019.03.06 US

62/857,542 2019.06.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/015026 2020.01.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/154645 EN 2020.07.30

(71) 申请人 世代生物公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·A·科尔 P·萨马约亚

R·M·科廷 M·G·斯坦顿

O·阿尔坎 M·齐奥科

R·拉简德兰

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int.Cl.

C12N 15/69 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

权利要求书9页 说明书186页

序列表61页 附图30页

(54) 发明名称

闭合端DNA (ceDNA) 及其在减少与基因或核
酸疗法相关的免疫应答的方法中的用途

(57) 摘要

本文提供了方法和构建体,所述方法和构建
体涉及当通过用重复剂量的ceDNA载体递送转基
因而实现的将所需转基因施用到细胞中时使用
免疫应答抑制剂、特别是先天性免疫应答抑制剂
使免疫应答最小化。

1. 一种用于当转基因在细胞中表达时抑制免疫应答的方法,所述方法包括:
向所述细胞施用包含具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体 (ceDNA载体) 的组合物,其中所述ceDNA载体包含至少一个可操作地位于两个侧翼反向末端重复序列 (ITR) 之间的异源核苷酸序列;以及
向所述细胞施用至少一种免疫应答抑制剂。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述免疫应答是先天性免疫应答。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述免疫应答抑制剂是先天性免疫应答抑制剂。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体还编码所述至少一种免疫应答抑制剂。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述免疫应答抑制剂与所述ceDNA载体单独施用。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述免疫应答抑制剂是NLRP3炎性小体抑制剂、AIM2炎性小体抑制剂或半胱天冬酶1抑制剂。
7. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述免疫应答抑制剂是环状GMP-AMP合酶 (cGAS) 抑制剂。
8. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述免疫应答抑制剂是toll样受体 (TLR) 抑制剂。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述TLR抑制剂是TLR9抑制剂。
10. 如权利要求1至3或5中任一项所述的方法,其中所述免疫应答抑制剂是雷帕霉素或雷帕霉素类似物。
11. 如权利要求6所述的方法,其中由所述ceDNA编码的所述AIM2炎性小体抑制剂是SEQ ID NO:602的A151或其抑制所述AIM2炎性小体或半胱天冬酶1的变体。
12. 如权利要求6所述的方法,其中由所述ceDNA编码的所述NLRP3炎性小体抑制剂或所述AIM2炎性小体抑制剂或所述半胱天冬酶1抑制剂是对以下中的任一种具有特异性的miRNA:所述NLRP3炎性小体、所述AIM2炎性小体或半胱天冬酶1。
13. 如权利要求6所述的方法,其中由所述ceDNA编码的所述NLRP3炎性小体抑制剂或所述AIM2炎性小体抑制剂或所述半胱天冬酶1抑制剂是对以下中的任一种具有特异性的siRNA:所述NLRP3炎性小体、所述AIM2炎性小体或半胱天冬酶1。
14. 如权利要求6所述的方法,其中由所述ceDNA编码的所述NLRP3炎性小体抑制剂或所述AIM2炎性小体抑制剂或所述半胱天冬酶1抑制剂是结合以下中的任一种的抗体或抗原结合片段:所述NLRP3炎性小体、所述AIM2炎性小体或半胱天冬酶1。
15. 如权利要求6所述的方法,其中由所述ceDNA编码的所述NLRP3炎性小体抑制剂或所述AIM2炎性小体抑制剂或所述半胱天冬酶1抑制剂是与以下中的任一种结合的抗体或抗原结合片段:所述NLRP3炎性小体、所述AIM2炎性小体或半胱天冬酶1。
16. 如权利要求6所述的方法,其中所述NLRP3炎性小体抑制剂选自以下中的任一种: MCC950、16673-34-0、Bay11-7082、格列本脲或异甘草素。
17. 如权利要求6所述的方法,其中所述AIM2炎性小体抑制剂选自以下中的任一种: A151 (SEQ ID NO:602)、miR-223或抗人ASC单克隆抗体。

18. 如权利要求6所述的方法,其中所述半胱天冬酶1抑制剂选自以下中的任一种:贝那卡生、紫草素、乙酰紫草素、普那卡生、Z-VAD-FMK、Z-WEHD-FMK、Ac-YVAD-cmk、Ac-YVAD-CHO或小白菊内酯。

19. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是SEQ ID NO:882的卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒蛋白ORF52或其抑制cGAS的变体或ORF52的 γ 疱疹病毒直系同源物。

20. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是SEQ ID NO:883的卡波西氏肉瘤疱疹病毒LANA(潜伏相关核抗原)的胞质同种型。

21. 如权利要求20所述的方法,其中卡波西氏肉瘤疱疹病毒LANA的所述胞质同种型是LANA Δ 161 (SEQ ID NO:884)。

22. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是对cGAS具有特异性的miRNA。

23. 如权利要求22所述的方法,其中对cGAS具有特异性的所述miRNA选自miR-25 (SEQ ID NO:885)和miR-93 (SEQ ID NO:886)。

24. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是对cGAS具有特异性的siRNA。

25. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是结合cGAS的抗体或抗原结合片段。

26. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是抗疟疾药物。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述抗疟疾药物是基于氨基喹啉或基于氨基吡啶的抗疟疾药物。

28. 如权利要求27所述的方法,其中所述抗疟疾药物选自奎纳克林(QC)、9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶(AMCA)、羟氯喹(HCQ)和氯喹(CQ)。

29. 如权利要求7所述的方法,其中所述cGAS抑制剂是与cGAS的催化口袋结合的小分子化合物。

30. 如权利要求29所述的方法,其中与cGAS的所述催化口袋结合的所述小分子化合物选自RU166365、RU281332、RU320521、RU320519、RU320461、RU320462、RU320520、RU320467和RU320582。

31. 如权利要求30所述的方法,其中与cGAS的所述催化口袋结合的所述小分子化合物是RU320521。

32. 如如权利要求29所述的方法,其中与cGAS的所述催化口袋结合的所述小分子化合物选自化合物15、化合物16、化合物17、化合物18、化合物19和PF-06928215。

33. 如权利要求32所述的方法,其中与cGAS的所述催化口袋结合的所述小分子化合物是PF-06928215。

34. 如权利要求9所述的方法,其中所述TLR9抑制剂是TLR9抑制性寡核苷酸。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述TLR9抑制性寡核苷酸序列具有以下特征中的一个或多个:(i)在3'端有三个连续的G核苷酸;(ii)在5'端有CC(T)三联体;以及(iii)在所述5'CC(T)和下游GGG三联体之间的距离最佳应为3-5个核苷酸长。

36. 如权利要求34所述的方法,其中所述TLR9抑制性寡核苷酸序列包含TTAGGG_n (SEQ ID NO:888)的序列。

37. 如权利要求34所述的方法,其中所述TLR9抑制性寡核苷酸序列选自ODN-2088 (TCCTGGCGGGGAAGT, SEQ ID NO:889)、ODN-2114 (TCCTGGAGGGGAAGT, SEQ ID NO:890)、聚G

(GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG,SEQ ID NO:891)、ODN-A151 (TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG,SEQ ID NO:892)、G-ODN (CTCC-TATTGGGGGTTTCCTAT,SEQ ID NO:893)、IRS-869 (TCCTGGAGGGGTTGT,SEQ ID NO:894)、INH-1 (CCTGGATGGGAATTCCCATCCAGG,SEQ ID NO:895)、INH-4 (TTCCCATCCAGGCCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:896)、IRS-661 (TGCTTGCAAGCTT-GCAAGCA,SEQ ID NO:897)、4024 (TCCTGGATGGGAAGT,SEQ ID NO:898)、4084F (CCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:899)、INH-13 (CTTACCGCTGCACCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:900)、INH-18 (CCTGGATGGGAACTTACCGCTGCA,SEQ ID NO:901)、和IRS-954TGCTCCTGGAGGGGTTGT,SEQ ID NO:902)和AS1411 (GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG,SEQ ID NO:903)。

38. 如权利要求9所述的方法,其中所述TLR9抑制剂是对TLR9具有特异性的miRNA。

39. 如权利要求9所述的方法,其中所述TLR9抑制剂是对TLR9具有特异性的siRNA。

40. 如权利要求9所述的方法,其中所述TLR9抑制剂是结合TLR9的抗体或抗原结合片段。

41. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列可操作地位于两个侧翼野生型反向末端重复序列(WT-ITR)之间。

42. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列可操作地位于两个侧翼突变型反向末端重复序列(突变型ITR)之间。

43. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列可操作地位于两个侧翼反向末端重复序列之间,其中一个ITR是WT-ITR并且一个ITR是突变型ITR。

44. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述ITR是对称的ITR。

45. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述ITR是不对称的ITR。

46. 如权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个来自病毒,所述病毒选自细小病毒、依赖病毒和腺相关病毒(AAV)。

47. 如权利要求1至46中任一项所述的方法,其中所述侧翼ITR是对称的或不称的。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述侧翼ITR是对称的或基本上对称的。

49. 如权利要求47所述的方法,其中所述侧翼ITR是不对称的。

50. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个是野生型,或其中所述ITR中的两个都是野生型。

51. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述侧翼ITR来自不同的病毒血清型。

52. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述ITR中的至少一个由野生型AAV ITR序列通过影响所述ITR的整体三维构象的缺失、添加或取代而变成。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个源自选自以下的AAV血清型:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

54. 如权利要求1至53中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个是合成的。

55. 如权利要求53或权利要求54所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个不是野生型ITR,或其中所述ITR中的两个都不是野生型。

56. 如权利要求1至53中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个通过在选自A、A'、B、B'、C、C'、D和D'的至少一个ITR区域中的缺失、插入和/或取代而被修饰。

57. 如权利要求56所述的方法,其中所述缺失、插入和/或取代导致通常由所述A、A'、B、B'、C或C'区域形成的茎环结构的全部或一部分缺失。

58. 如权利要求56所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个通过缺失、插入和/或取代而被修饰,所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述B和B'区域形成的茎环结构的全部或部分发生缺失。

59. 如权利要求56所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个通过缺失、插入和/或取代而被修饰,所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述C和C'区域形成的茎环结构的全部或部分发生缺失。

60. 如权利要求56所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个通过缺失、插入和/或取代而被修饰,所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述B和B'区域形成的茎环结构的一部分和/或通常由所述C和C'区域形成的茎环结构的一部分发生缺失。

61. 如权利要求1至53中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎环结构的区域中包含单个茎环结构。

62. 如权利要求1至53中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎环结构的区域中包含单个茎和两个环。

63. 如权利要求1至53中任一项所述的方法,其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎环结构的区域中包含单个茎和单个环。

64. 如权利要求1至63中任一项所述的方法,其中两个ITR以使得当所述ITR相对于彼此呈反向时产生整体三维对称性的方式改变。

65. 如权利要求1至64中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列处于至少一个调控开关的控制下。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述至少一个调控开关选自二元调控开关、小分子调控开关、密码调控开关、基于核酸的调控开关、转录后调控开关、辐射控制的或超声波控制的调控开关、低氧介导的调控开关、炎症反应调控开关、剪切活化调控开关和杀灭开关。

67. 如权利要求1至66中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体和/或所述免疫应答抑制剂被囊封。

68. 如权利要求1至66中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体和/或所述免疫应答抑制剂在纳米载剂中。

69. 如权利要求67所述的方法,其中所述纳米载剂包含脂质纳米颗粒(LNP)。

70. 如权利要求1所述的方法,其中所述ceDNA当用在所述ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化时,当在非变性凝胶上分析时,相较于线性非连续DNA对照,存在线性连续DNA的特征性条带。

71. 如权利要求1至4和5至9中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体包含与所述至少一种免疫应答抑制剂可操作地连接的启动子。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述启动子选自表1中的那些中的任一种。

73. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体还包含选自表2中的那些中的任一种的增强子。

74. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体包含选自表2A中的那些

中的任一种的5'UTR和/或内含子序列。

75. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体包含选自表2B中的那些中的任一种的3'UTR。

76. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体包含选自表3中的那些中的任一种的至少一个聚A序列。

77. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体包含至少一个与所述至少一个异源核苷酸序列可操作地连接的启动子。

78. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中包含所述ceDNA载体的所述组合物还包含药学上可接受的载剂。

79. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中增加向所述细胞施用的所述ceDNA载体的量增加所述转基因在所述细胞中的表达。

80. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述异源核酸序列编码治疗性转基因,并且其中所述转基因的期望表达水平是治疗有效量。

81. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列在被转录或被翻译时纠正受试者中的内源性蛋白质的异常量。

82. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列在被转录或被翻译时纠正受试者中的内源性蛋白质或途径的异常功能或活性。

83. 如权利要求81或82所述的方法,其中所述受试者是需要治疗的人类患者。

84. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列编码或包含选自由以下项组成的组的核苷酸分子:RNAi、siRNA、miRNA、lncRNA和反义寡核苷酸或多核苷酸。

85. 如权利要求1至84中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列编码蛋白质。

86. 如权利要求85所述的方法,其中所述蛋白质为标记蛋白(例如报告蛋白)。

87. 如权利要求1至84中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列编码与疾病或病症相关的内源性蛋白或途径的激动剂或拮抗剂。

88. 如权利要求1至84中任一项所述的方法,其中所述至少一个异源核苷酸序列编码抗体。

89. 如前述权利要求中任一项所述的方法,还包括共同施用另外的免疫应答抑制剂。

90. 如权利要求1至89中任一项所述的方法,其中所述ceDNA载体从包括以下步骤的方法获得:(a)在至少一种Rep蛋白的存在下培育携带ceDNA表达构建体的昆虫细胞群体,其中所述ceDNA表达构建体在有效诱导所述ceDNA载体在所述昆虫细胞内产生的条件下持续足够的时间而编码所述ceDNA载体;以及(b)从所述昆虫细胞中分离所述ceDNA载体。

91. 如权利要求90所述的方法,其中所述ceDNA表达构建体选自ceDNA质粒、ceDNA杆粒和ceDNA杆状病毒。

92. 如权利要求90所述的方法,其中所述昆虫细胞表达至少一种Rep蛋白。

93. 如权利要求92所述的方法,其中所述至少一种Rep蛋白来自选自以下的病毒:细小病毒、依赖病毒和腺相关病毒(AAV)。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述至少一种Rep蛋白来自选自以下的AAV血清型:

AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

95. 一种ceDNA表达构建体,其编码通过如权利要求90所述的方法产生的ceDNA载体。

96. 如权利要求95所述的ceDNA表达构建体,其为ceDNA质粒、ceDNA杆粒或ceDNA杆状病毒。

97. 一种宿主细胞,其包含如权利要求95或权利要求96所述的ceDNA表达构建体。

98. 如权利要求97所述的宿主细胞,其表达至少一种Rep蛋白。

99. 如权利要求98所述的宿主细胞,其中所述至少一种Rep蛋白来自选自以下的病毒:细小病毒、依赖病毒和腺相关病毒(AAV)。

100. 如权利要求99所述的宿主细胞,其中所述至少一种Rep蛋白来自选自以下的AAV血清型:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

101. 如权利要求97至100中任一项所述的宿主细胞,其为昆虫细胞。

102. 如权利要求101所述的宿主细胞,其中所述昆虫细胞为Sf9细胞。

103. 一种产生ceDNA载体的方法,其包括:(a)在有效诱导所述ceDNA载体产生的条件下持续足够的时间培育如权利要求97至102中任一项所述的宿主细胞;以及(b)从所述宿主细胞中分离所述ceDNA。

104. 一种组合物,其包含具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体),其中所述ceDNA载体包含可操作地位于两个侧翼反向末端重复序列(ITR)之间的至少一个异源核苷酸序列。

105. 如权利要求104所述的组合物,其中所述ceDNA载体还编码所述至少一种免疫应答抑制剂。

106. 如权利要求104或权利要求105所述的组合物,其中所述免疫应答是先天性免疫应答。

107. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述至少一个异源核苷酸序列可操作地位于两个侧翼野生型反向末端重复序列(WT-ITR)之间。

108. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述至少一个异源核苷酸序列可操作地位于两个侧翼突变型反向末端重复序列(突变型ITR)之间。

109. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述至少一个异源核苷酸序列可操作地位于两个侧翼反向末端重复序列之间,其中一个ITR是WT-ITR并且一个ITR是突变型ITR。

110. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR是对称的ITR。

111. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR是不对称的ITR。

112. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个来自选自以下的病毒:细小病毒、依赖病毒和腺相关病毒(AAV)。

113. 如权利要求112所述的组合物,其中所述侧翼ITR是对称的或不称的。

114. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的两个都是野生型。

115. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述侧翼ITR来自不同的病毒血清型。

116. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的至少一个由野生型AAV ITR序列通过影响所述ITR的整体三维构象的缺失、添加或取代而变成。

117. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个源自选自以下的AAV血清型:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

118. 如权利要求104至117中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个是合成的。

119. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的两个都不是野生型。

120. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个通过在选自A、A'、B、B'、C、C'、D和D'的至少一个ITR区域中的缺失、插入和/或取代而被修饰。

121. 如权利要求120所述的组合物,其中所述缺失、插入和/或取代导致通常由所述A、A'、B、B'、C或C'区域形成的茎环结构的全部或一部分缺失。

122. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个通过缺失、插入和/或取代而被修饰,所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述B和B'区域形成的茎环结构的全部或一部分发生缺失。

123. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个通过缺失、插入和/或取代而被修饰,所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述C和C'区域形成的茎环结构的全部或一部分发生缺失。

124. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个通过缺失、插入和/或取代而被修饰,所述缺失、插入和/或取代使得通常由所述B和B'区域形成的茎环结构的一部分和/或通常由所述C和C'区域形成的茎环结构的一部分发生缺失。

125. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎环结构的区域中包含单个茎环结构。

126. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎环结构的区域中包含单个茎和两个环。

127. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中所述ITR中的一个或两个在通常包含由所述B和B'区域形成的第一茎环结构和由所述C和C'区域形成的第二茎环结构的区域中包含单个茎和单个环。

128. 如权利要求104至106中任一项所述的组合物,其中两个ITR以使得当所述ITR相对于彼此呈反向时产生整体三维对称性的方式改变。

129. 如权利要求104至128中任一项所述的组合物,其中所述ITR基于来自选自以下的病毒的序列:细小病毒、依赖病毒和腺相关病毒(AAV)。

130. 如权利要求104至129中任一项所述的组合物,其中至少一个异源核苷酸序列处于至少一个调控开关的控制下。

131. 如权利要求130所述的组合物,其中至少一个调控开关选自二元调控开关、小分子调控开关、密码调控开关、基于核酸的调控开关、转录后调控开关、辐射控制的或超声波控制的调控开关、低氧介导的调控开关、炎症反应调控开关、剪切活化调控开关和杀灭开关。

132. 如权利要求104至131中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体被囊封。

133. 如权利要求104至132中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体处于纳米载剂中。

134. 如权利要求133所述的组合物,其中所述纳米载剂包含脂质纳米颗粒(LNP)。

135. 如权利要求104至134中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA当用在所述ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化时,当在非变性凝胶上分析时,相较于线性非连续DNA对照,存在线性连续DNA的特征性条带。

136. 如权利要求104至135中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体包含与所述至少一种免疫应答抑制剂可操作地连接的启动子。

137. 如权利要求104至136中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体包含选自表2中的那些中的任一种的增强子。

138. 如权利要求104至137中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体包含选自表2A中的那些中的任一种的5'UTR和/或内含子序列。

139. 如权利要求104至138中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体包含选自表2B中的那些中的任一种的3'UTR。

140. 如权利要求104至139中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体包含选自表3中的那些中的任一种的至少一个聚A序列。

141. 如权利要求104至140中任一项所述的组合物,其中所述ceDNA载体包含至少一个与所述至少一个异源核苷酸序列可操作地连接的启动子。

142. 如权利要求104至141中任一项所述的组合物,其中至少一个ITR包含功能性末端解离位点和Rep结合位点,并且其中所述ITR中的一个相对于另一个ITR包含缺失、插入或取代。

143. 如权利要求104至142中任一项所述的组合物,其中所述至少一个异源核苷酸序列为了在真核细胞中表达而进行密码子优化。

144. 如权利要求104至143中任一项所述的组合物,其还包含药学上可接受的载剂。

145. 如权利要求104至144中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答抑制剂是NLRP3炎性小体抑制剂、AIM2炎性小体抑制剂或半胱天冬酶1抑制剂。

146. 如权利要求104至144中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答抑制剂是环状GMP-AMP合酶(cGAS)抑制剂。

147. 如权利要求104至144中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答抑制剂是toll样受体(TLR)抑制剂。

148. 如权利要求147所述的组合物,其中所述TLR抑制剂是TLR9抑制剂。

149. 如权利要求104至144中任一项所述的组合物,其中所述免疫应答抑制剂是雷帕霉素或雷帕霉素类似物。

150. 一种在细胞中表达免疫应答抑制剂的方法,所述方法包括使所述细胞与如权利要求104至149中任一项所述的组合物接触。

151. 如权利要求150所述的方法,其中所述细胞在体外或在体内。

152. 一种药物组合物,其包含如权利要求104至149中任一项所述的组合物。

153. 如权利要求152所述的药物组合物,其还包含先天性免疫应答抑制剂。

154. 如权利要求153所述的药物组合物,其中所述先天性免疫应答抑制剂与所述ceDNA

载体单独配制。

155. 一种细胞,其包含如权利要求104至149中任一项所述的组合物。

156. 一种试剂盒,其包含如权利要求104至149中任一项所述的组合物、如权利要求152至154中任一项所述的药物组合物或如权利要求155所述的细胞。

闭合端DNA (ceDNA) 及其在减少与基因或核酸疗法相关的免疫应答的方法中的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2019年1月24日提交的美国临时申请号62/796,417、于2019年2月1日提交的美国临时申请号62/800,303、于2019年1月24日提交的美国临时申请号62/796,450、于2019年2月1日提交的美国临时申请号62/800,285、于2019年3月6日提交的美国临时申请号62/814,414、于2019年3月6日提交的美国临时申请号62/814,424以及于2019年6月5日提交的美国临时申请号62/857,542的优先权,这些临时申请中的每一个特此以全文引用的方式并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子提交并在此通过全文引用的方式并入。2020年1月24日创建的所述ASCII拷贝命名为131698-03320-Sequence_Listing-FINAL.txt并且大小为117,124字节。

技术领域

[0005] 本发明的实施方案涉及基因疗法领域,包括将外源DNA序列递送至靶细胞、组织、器官或生物体,以及用于抑制对所述外源DNA序列的免疫应答(例如先天性免疫应答)的修饰和方法。

背景技术

[0006] 基因疗法旨在改善患有因基因表达谱畸变引起的基因突变或获得性疾病的患者的临床结局。基因疗法包括治疗或预防因可能导致病症、疾病、恶性病等的缺陷基因或者异常调节或表达、例如表达不足或过表达所引起的医学病状。例如,可以通过向患者递送矫正性遗传物质来治疗、预防或改善由缺陷基因引起的疾病或病症,或可以通过例如对患者用矫正性遗传物质改变或沉默缺陷基因,使得该遗传物质在患者体内发生治疗性表达来治疗、预防或改善。

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

[0008] 腺相关病毒(AAV)属于细小病毒科,并且更具体地说,组成依赖病毒属。源自于AAV的载体(即重组AAV(rAAV)或AAV载体)对于递送遗传物质具有吸引力,因为(i)它们能够感染(转导)多种多样的非分裂和分裂细胞类型,包括肌细胞和神经元;(ii)它们缺乏病毒结

构基因,从而减弱了宿主细胞对病毒感染的应答,例如干扰素介导的应答;(iii)野生型病毒被认为在人类中是非致病性的;(iv)与能够整合到宿主细胞基因组中的野生型AAV相比,复制缺陷型AAV载体缺乏rep基因,并且通常作为附加体存留,从而限制了插入诱变或基因毒性的风险;以及(v)与其他载体系统相比,AAV载体通常被认为是相对较弱的免疫原,因此不会触发明显的免疫应答(参见ii),从而获得了载体DNA的持久性以及治疗性转基因的潜在长期表达。

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

[0010] 另外,通过引入含有AAV基因组、rep基因和cap基因的质粒,产生有衣壳的常规AAV病毒体(Grimm等人,1998)。然而,发现这种衣壳化AAV病毒载体不能有效地转导某些细胞和组织类型,并且衣壳还诱导免疫应答。相应地,由于单次施用于患者(因患者免疫应答)、适于 AAV载体递送的转基因遗传物质的范围因最小病毒封装容量(约4.5kb) 而受限,以及AAV介导的基因表达缓慢,因此基因疗法使用腺相关病毒(AAV)载体受到限制。

[0011] 此外,哺乳动物免疫系统包括许多检测和消除入侵病原体以及异常细胞活性和过程的机制,这可以在向受试者施用病毒载体或核酸的情况下引发。例如,模式识别受体(PRR)是进化为充当检测保守的病原体相关分子(诸如外来核酸,例如病毒DNA和病毒RNA)并触发先天性免疫应答的感受器的一类分子。Toll样受体(TLR)是在内体的背景下检测核酸的一组PRR,并且包括TLR9(检测dsDNA,优先是未甲基化的CpG重复序列)、TLR3(检测dsRNA)和TLR7(检测ssRNA)。PRR的第二个系统位于细胞溶质中,用于检测感染细胞内的外来核酸,特别是双链RNA。¹这些PRR(被称为“RIG-I样受体”或RLR)包括RIG-I和MDA5。这些PRR是检测RNA的结构特征(诸如5'三磷酸和二磷酸)、RNA复制中间体和/或转录产物的解旋酶,并且启动I型干扰素反应的激活。^{1,2}第三类PRR由细胞溶质DNA触发,主要的细胞内DNA感受器是cGAS(环状GMP-AMP合酶),其与DNA结合并激活与ER结合的干扰素基因刺激物(STING),从而导致激活I型干扰素反应以及在一些情况下还激活^{1,4,5}其他提议的细胞溶质DNA感受器(包括黑素瘤缺乏因子(AIM2)、IFN- γ 诱导型蛋白16(IFI16)、干扰素诱导型蛋白X(IFIX)、LRRFIP1、DHX9、DHX36、DDX41、Ku70、DNA-PKcs、MRN复合物(包括MRE11、Rad50和Nbs1)^{2,7}和RNA聚合酶III¹⁰)。AIM2、IFI16和IFIX是热蛋白和HIN200结构域蛋白(PYHIN)蛋白质。^{2,6}此外,已经证明,如在源自人类1型免疫缺陷病毒(HIV-1)的单链DNA(ssDNA)的茎环结构中位于短的碱基配对DNA延伸段侧翼的未配对DNA核苷酸以序列依赖性方式激活了I型干扰素诱导的DNA感受器cGAS。^{8,9}含有位于短的(12至20bp)dsDNA(Y型DNA)侧翼的未配对鸟苷的DNA结构具有高度的刺激作用并且尤其增强了cGAS的酶促活性。^{8,9}

[0012] 最近,已经鉴定了其他细胞内微生物感受器,包括NOD样受体(NLR)。一些NLR还感应非微生物危险信号并形成称为炎性小体的大型胞质蛋白复合物,它们是先天性免疫和炎症的主要调节剂(Martinon等人,Annu.Rev.Immunol.2009 27:229-65)。

[0013] 炎性小体由NLR或AIM2家族受体和半胱天冬酶原(procaspase)1 构成。含有半胱天冬酶募集结构域(ASC)的凋亡相关斑点样蛋白是衔接蛋白,并且将NLR家族成员与半胱天冬酶原1连接。NLR家族成员与ASC一起组装为炎性小体复合物,后者进而又募集并激活半胱天冬酶1。NLR家族蛋白的几个成员参与形成独特的炎性小体,包括含NLR家族热蛋白结构域蛋白3(NLRP3;也称为隐热蛋白(cryopyrin)或NALP3)、含NLR家族CARD结构域蛋白4(NLRC4;也称为IPAF)、和NLRP1。不同的炎性小体被多种刺激物激活。例如,NLRP1被炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)产生的致死毒素激活,然而NLRC4对感染上沙门氏菌属(*Salmonella*)、军团菌属(*Legionella*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种的细胞中的细胞溶质鞭毛蛋白作出反应。NLRP3炎性小体被各种刺激物激活,所述刺激物包括微生物产物和内源性信号,诸如尿酸盐晶体、二氧化硅、淀粉样蛋白原纤维和ATP。

[0014] NOD样受体(NLR)感受器组分(即,隐热蛋白(NLRP3或NALP3))识别危险信号,诸如在组织损伤或应激期间释放的损伤相关分子模式分子(DAMP)(例如,细胞外ATP、尿酸盐晶体、 β 淀粉样蛋白、细胞碎片)和病原体相关分子模式(PAMP)。炎性小体是响应于这些病原体感染或“危险”信号而组装的,需要隐热蛋白的热蛋白结构域与衔接组分ASC相互作用,这导致半胱天冬酶1(来自半胱天冬酶原1)的募集和激活以及随后几种促炎性细胞因子(包括白介素 1β (IL- 1β)、IL-18和IL-33)的成熟和释放。

[0015] 除NLR之外,AIM2家族成员也可以激活炎性小体。AIM2的特征在于存在一个热蛋白结构域和一个DNA结合HIN结构域,并且通过检测细胞溶质DNA来激活半胱天冬酶1(Fernandes-Alnemri T等人2009.Nature 458:509-513)。炎性小体的组装需要经由TLR的先前启动信号,需要该先前启动信号来上调炎性小体受体和底物原-IL- 1β 的表达,然后第二个信号才能引发炎性小体复合物形成(Bauernfeind FG等人2009.《免疫学杂志(J.Immunol.)》183:787-791)。

[0016] 尽管从概念上讲是优雅的,但使用核酸分子用于治疗人类疾病的基因疗法的前景仍然不确定。这种不确定性的主要原因是与宿主对核酸治疗剂的先天性免疫应答有关的明显不良事件,以及因此还有这些物质在免疫应答的背景下调节其预期靶标表达的方式。围绕可用于临床应用的核酸分子的产生、功能、行为和优化的当前技术水平特别关注:(1)直接调节翻译和基因表达的反义寡核苷酸和双螺旋RNA;(2)导致长期表观遗传修饰的转录基因沉默RNA;(3)与基因剪接模式相互作用并改变基因剪接模式的反义寡核苷酸;(4)模拟天然存在的AAV或慢病毒基因组的生理功能的合成或病毒载体的产生;以及(5)治疗性寡核苷酸的体内递送。然而,尽管在核酸治疗剂的开发中取得了最近的临床成就中明显的进步,但是基因疗法领域仍然受到由治疗性核酸本身触发的在接受者中不希望的不良事件的严重限制。

[0017] 因此,在该领域中需要一种新技术,该新技术在向受试者施用载体或核酸后抑制(例如减少、改善、减轻、阻止)免疫应答,从而允许在细胞、组织或受试者中表达治疗蛋白以治疗各种疾病。

发明内容

[0018] 本公开提供了用于在患有遗传病症并接受基因或核酸疗法(“核酸治疗剂”或“治疗性核酸”(TNA))的受试者中抑制(即,减少或遏制)免疫应答的方法和药物组合物。本文提供了具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)和用于抑制免疫应答(例如先天性免疫应答)的抑制剂。根据一些实施方案,药物组合物和配制物可包含一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂,诸如雷帕霉素及其雷帕霉素类似物、TLR拮抗剂(例如TLR9拮抗剂)、cGAS拮抗剂和炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)。

[0019] 根据一些方面,本公开提供了使用具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)抑制(即减少或遏制)免疫应答(例如先天性免疫应答)的组合物和方法,所述载体用于从具有共价闭合端的无衣壳(例如,非病毒)DNA载体(本文中被称为“闭合端DNA载体”或“ceDNA载体”)表达先天性免疫应答抑制剂,其中所述ceDNA载体包含免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的核酸序列或其密码子优化形式。

[0020] 根据一些方面,本公开提供了使用具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)抑制(即减少或遏制)免疫应答(例如先天性免疫应答)的组合物和方法,所述载体用于从具有共价闭合端的无衣壳(例如,非病毒)DNA载体(本文中被称为“闭合端DNA载体”或“ceDNA载体”)中表达雷帕霉素及其雷帕霉素类似物,其中所述ceDNA载体包含雷帕霉素及其雷帕霉素类似物的核酸序列或其密码子优化形式。因此,这些ceDNA载体可用于产生雷帕霉素及其雷帕霉素类似物,以抑制免疫系统(例如先天性免疫系统)。

[0021] 根据一些方面,本公开提供了使用具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)抑制(即减少或遏制)免疫应答(例如先天性免疫应答)的组合物和方法,所述载体用于从具有共价闭合端的无衣壳(例如,非病毒)DNA载体(本文中被称为“闭合端DNA载体”或“ceDNA载体”)中表达TLR拮抗剂,其中所述ceDNA载体包含TLR拮抗剂的核酸序列或其密码子优化形式。因此,这些ceDNA载体可用于产生TLR拮抗剂,以抑制免疫系统(例如先天性免疫系统)。

[0022] 根据一些方面,本公开提供了使用具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)抑制(即减少或遏制)免疫应答(例如先天性免疫应答)的组合物和方法,所述载体用于从具有共价闭合端的无衣壳(例如,非病毒)DNA载体(本文中被称为“闭合端DNA载体”或“ceDNA载体”)中表达cGAS拮抗剂,其中所述ceDNA载体包含cGAS拮抗剂的核酸序列或其密码子优化形式。因此,这些ceDNA载体可用于产生cGAS拮抗剂,以抑制免疫系统(例如先天性免疫系统)。

[0023] 根据一些方面,本公开提供了使用具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)抑制(即减少或遏制)免疫应答(例如先天性免疫应答)的组合物和方法,所述载体用于从具有共价闭合端的无衣壳(例如,非病毒)DNA载体(本文中被称为“闭合端DNA载体”或“ceDNA载体”)中表达NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合,其中所述ceDNA载体包含NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合的核酸序列或其密码子优化形式。因此,这些ceDNA载体可用于产生NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合,以抑制免疫系统(例如先天性免疫系

统)。

[0024] 根据一些实施方案,药物组合物和配制物可包含与各种类型的治疗性核酸(TNA)和载剂(例如脂质纳米颗粒)结合的一种或多种如本文所述的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。根据一些实施方案,所述组合物还包含赋形剂或载剂。根据一些实施方案,药物组合物包含脂质纳米颗粒(LNP)。在一个实施方案中,LNP包含阳离子脂质。根据一些实施方案,LNP包含聚乙二醇(PEG)。根据一些实施方案,LNP包含胆固醇。

[0025] 本文所述的方法通常包括使用一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂(例如雷帕霉素及其类似物、TLR拮抗剂、cGAS拮抗剂)来阻止、减少、减弱或甚至消除与施用转基因(例如,治疗性核酸(TNA))相关的免疫应答。本文描述了包括施用它们的方法。

[0026] 在一个实施方案中,治疗性核酸是RNA分子或其衍生物。在一个实施方案中,RNA分子是反义寡核苷酸。在一个实施方案中,反义寡核苷酸是反义RNA。在一个实施方案中,RNA是RNA干扰物(RNAi)。

[0027] 在一个实施方案中,治疗性核酸是mRNA分子。

[0028] 在一个实施方案中,治疗性核酸是DNA分子或其衍生物。

[0029] 在一个实施方案中,治疗性核酸是DNA反义寡核苷酸。在一个实施方案中,DNA反义寡核苷酸是基于吗啉代的核酸。在一个实施方案中,基于吗啉代的核酸是二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)。

[0030] 在一个实施方案中,治疗性核酸是闭合端DNA(ceDNA)。在一个实施方案中,ceDNA包含表达盒,所述表达盒包含启动子序列和转基因。在一个实施方案中,ceDNA包含表达盒,所述表达盒包含聚腺苷酸化序列。在一个实施方案中,ceDNA包含在表达盒的5'或3'端侧翼的至少一个反向末端重复序列(ITR)。在一个实施方案中,表达盒的侧翼是两个ITR,其中所述两个ITR包含一个5'ITR和一个3'ITR。在一个实施方案中,表达盒在3'末端连接至ITR(3'ITR)。在一个实施方案中,表达盒在5'末端连接至ITR(5'ITR)。在一个实施方案中,ceDNA还包含在5'ITR与表达盒之间的间隔子序列。

[0031] 在一个实施方案中,ceDNA还包含在3'ITR与表达盒之间的间隔子序列。在一个实施方案中,间隔子序列的长度为至少5个碱基对。在一个实施方案中,间隔子序列的长度为5至200个碱基对。在一个实施方案中,间隔子序列的长度为5至500个碱基对。

[0032] 在一个实施方案中,ITR是衍生自AAV血清型的ITR。在一个实施方案中,AAV选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。在一个实施方案中,ITR衍生自鹅病毒的ITR。在一个实施方案中,ITR衍生自B19病毒ITR。在一个实施方案中,ITR是来自细小病毒的野生型ITR。在一个实施方案中,ITR是突变型ITR。在一个实施方案中,ceDNA包含在表达盒的5'和3'端的两个突变型ITR。

[0033] 在一个实施方案中,ceDNA具有切口或缺口。

[0034] 在一个实施方案中,ceDNA在无细胞环境中合成产生。

[0035] 在一个实施方案中,ceDNA在细胞中产生。在一个实施方案中,ceDNA在昆虫细胞中产生。在一个实施方案中,所述昆虫细胞是Sf9。在一个实施方案中,ceDNA在哺乳动物细胞中产生。在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞是人细胞系。

[0036] 在一个实施方案中,治疗性核酸是在其表达盒的5'和3'端包含至少一个端粒酶靶序列的闭合端DNA。

[0037] 在一个实施方案中,治疗性核酸是在表达盒的5'和3'端包含ITR的两个发夹结构的哑铃形线性双螺旋闭合端DNA。

[0038] 在一个实施方案中,治疗性核酸是基于DNA的小环或MIDGE。

[0039] 在一个实施方案中,治疗性核酸是线性共价闭合端DNA载体。在一个实施方案中,线性共价闭合端DNA载体是辅助(ministring) DNA。

[0040] 在一个实施方案中,治疗性核酸是狗骨头(doggybone) (dbDNATM) DNA。

[0041] 在一个实施方案中,治疗性核酸是小基因。

[0042] 在一个实施方案中,治疗性核酸是质粒。

[0043] 因此,本文在一些方面提供的是当在细胞中表达转基因时抑制或遏制免疫应答的方法,所述方法包括:向细胞共同施用(1)包含具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)的组合物和(2)免疫应答(例如先天性免疫应答)的抑制剂,如本文所述的。ceDNA载体包含编码可操作地定位于两个不同的AAV反向末端重复序列(ITR)之间的转基因的异源核酸序列,所述ITR中的一个包含功能性AAV末端解离位点和Rep结合位点,所述ITR中的一个相对于另一个ITR包含缺失、插入或取代,并且使得所述ceDNA载体当用在所述ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化时,当在非变性凝胶上分析时,相较于线性非连续DNA对照,存在线性连续DNA的特征性条带。如本文所示,在一些实施方案中,使用如在WO 2016/073799(其内容以全文引用的方式并入本文)中描述的合成纳米载剂共同施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,ceDNA载体也存在于纳米载剂中。根据一些实施方案,一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂选自雷帕霉素及其雷帕霉素类似物、TLR拮抗剂(例如TLR9拮抗剂)、cGAS拮抗剂和炎性小体拮抗剂(例如以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)。根据一些实施方案,TLR9抑制性寡核苷酸存在于至少一个ITR上。根据一些实施方案,cGAS的抑制剂由ceDNA编码并且可操作地连接至启动子,诸如诱导型启动子。在其他实施方案中,cGAS的抑制剂不是由ceDNA编码的。

[0044] 此外,本文在一个方面提供的是一种组合物,所述组合物包含(i)具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体),其中所述ceDNA载体包含编码可操作地定位于两个不同的AAV反向末端重复序列(ITR)之间的转基因的异源核酸序列,所述ITR中的一个包含功能性AAV末端解离位点和Rep结合位点,所述ITR中的一个相对于另一个ITR包含缺失、插入或取代,其中所述ceDNA载体当用在所述ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化时,当在非变性凝胶上分析时,相较于线性非连续DNA对照,存在线性连续DNA的特征性条带,以及(ii)免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。如本文所示,在一些实施方案中,在单独的合成纳米载剂中配制组合物的组分。在一个实施方案中,被在相同的合成纳米载剂中配制组合物的组分。根据一些实施方案,一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂选自雷帕霉素及其雷帕霉素类似物、TLR拮抗剂(例如TLR9拮抗剂)、cGAS拮抗剂和炎性小体拮抗剂(例如以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)。

[0045] 可从表达构建体(例如,质粒、杆粒、杆状病毒或整合细胞系)在允许的宿主细胞中(例如,参见于2018年9月7日提交的国际专利申请PCT/US18/49996中公开的实施例)或使用合成产生(例如,参见于2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US19/14122中公开的

实施例)产生本文所述的非病毒无衣壳DNA载体,所述国际专利申请中的每一个以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中,可用于如本文所公开的方法和组合物中的ceDNA载体包含异源核酸,例如定位于两个反向末端重复 (ITR) 序列之间的转基因。在一些实施方案中,与野生型ITR序列(例如AAV ITR) 相比,ITR中的至少一个通过缺失、插入和/或取代而被修饰;并且ITR中的至少一个包含功能性末端解离位点 (TRS) 和Rep结合位点。

[0046] 根据另一个方面,本公开的特征在于治疗受试者的遗传病症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文公开的药物组合物。

附图说明

[0047] 图1是示出了用于制备杆状病毒感染的昆虫细胞 (BIIC) 的上游过程的一个实施方案的示意图,所述杆状病毒感染的昆虫细胞可用于图2的示意图中描述的方法中生产ceDNA载体。i) 用Rep蛋白质粒或DNA载体产生质粒转染两个初始昆虫细胞群; ii) 收获病毒上清液并将其用于感染两个初始昆虫细胞群以产生DNA载体构建体的BIICS-1和BIICS-2 (REP)。BIICS是指杆状病毒感染的昆虫细胞。任选地,可以将步骤ii) 重复一次或多次以产生大量的重组杆状病毒。

[0048] 图2是示出了产生本文所述的ceDNA载体的一个实施方案的示意图。

[0049] 图3是示出了表征本文所述的DNA载体(下游过程)的一个实施方案的示意图。

[0050] 图4A至图4D是示出了可用于制备本文公开的ceDNA载体的示例性质粒和质粒组分的示意图。图4A显示了示例性Rep质粒并且图4B显示了含有ceDNA载体模板的示例性质粒TTX载体质粒。图4C和图4D是可用于制备本文提供的ceDNA载体的DNA载体模板的示例性功能组分的示意图。转基因(也称为所关注的核酸(例如报告核酸(诸如荧光素酶) 或者例如治疗性核酸))位于两个不同的ITR之间。经修饰的ITR可在模板中定向于左侧(图4C)或右侧(图4D)。另外,所关注核酸可以可操作地连接至启动子、增强子和终止元件。在替代实施方案中,在左侧(5' ITR)或右侧(3' ITR)的ITR可为任何类型。出于示例性目的,图4C和图4D中以及本文实施例中的ceDNA构建体中的ITR显示了经修饰的ITR (Δ ITR) 和WT ITR (ITR), 并且是不对称ITR对的示例。然而,本文涵盖含有位于任何两个反向末端重复 (ITR) 序列之间的异源核酸序列(例如转基因)的ceDNA载体,其中所述ITR序列可以是不对称ITR 对或者对称或基本上对称的ITR对,这些术语如本文所定义。如本文所公开的包含NLP的ceDNA载体可包含ITR序列,其选自以下中的任一种: (i) 至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复(mod-ITR) (例如不对称的修饰ITR); (ii) 两个经修饰的ITR,其中所述mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组织(例如不对称的修饰ITR),或(iii) 对称或基本上对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织,或(iv) 对称或基本上对称的修饰ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组织,其中本公开的方法还可包括递送系统,例如但不限于脂质体纳米颗粒递送系统。

[0051] 图5A和图5B是示出了鉴定本文所述DNA载体的存在的一个实施方案的图。图5A示出了具有非连续结构的DNA(非闭合DNA,例如,从具有开放端的模板TTX载体中分离的对照盒DNA)、以及当被在非连续DNA上具有单个识别位点的限制性核酸内切酶切割时产生的示例性特征性条带(例如在变性条件下观察到具有不同预期大小(例如1kb和2kb) 的两个DNA片段)。图5B示出了具有闭合端线性和连续结构的DNA,以及当被在线性双螺旋连续DNA上具

有单个识别位点的限制性核酸内切酶切割时产生的示例性特征性条带,例如在变性条件下观察到具有不同大小(例如2kb和4kb)的两个DNA片段,所述大小比DNA为非连续的情况大2倍。尽管DNA是变性的,但是互补链是共价结合的并且所得的变性产物是单链DNA,其长度是相应的非连续产物的两倍。

[0052] 图6是显示了高度稳定的DNA载体的存在和证实了高度稳定的闭合端DNA (ceDNA载体)的特征性条带的示例性非变性凝胶。

[0053] 图7是用于评价通过本文公开的方法产生的DNA材料的凝胶和定量标准曲线。

[0054] 图8是从含有各种构建体的HEK293细胞中表达并使用因子IX抗体可视化的FIX蛋白的蛋白质印迹分析。

[0055] 图9提供了实施例24的结果的示意图描绘。在三天的研究期内,相对于非水动力施用的样品,水动力施用的样品显示出总通量(例如,荧光素酶表达)的显著升高。

[0056] 图10A和图10B提供了在实施例中描述的THP-1培养细胞实验的数据,所述培养细胞实验评估了用ceDNA载体和免疫抑制剂治疗的细胞中的干扰素应答。图10A显示了具有完整cGAS/STING和TLR9途径的 THP-1细胞中响应于ceDNA的干扰素途径激活,但是在其中任一途径受损的相同细胞中缺乏激活。单独地,包含抑制剂A151或BX795相似地减少了这种干扰素途径激活。图10B是显示了A151和AS1411对干扰素诱导抑制的剂量依赖性的相似实验。在每组条形图中,左侧为2.5 μ M剂量,中间为1.25 μ M剂量,并且右侧为0.625 μ M剂量。

[0057] 图11A和图11B提供了在实施例26中获得的数据的图。图11A显示了当ceDNA中存在的CpG在施用至细胞之前被甲基化时在ceDNA施用后NF- κ B诱导减少。图11B进一步显示了在该测定中,包含免疫抑制剂 A151将ceDNA刺激的NF- κ B诱导降低到与CpG的甲基化相同的程度。

[0058] 图12A-图12C提供了实施例26中描述的实验的结果。图12A和图 12B是对从ceDNA载体治疗的小鼠或LNP-聚C对照治疗的小鼠中采集的血液样品进行的每种细胞因子诱导测定的数据的图,其中被询问的特定细胞因子反映在每幅图的顶部。图12C提供了在经治疗的小鼠中ceDNA驱动的荧光素酶表达测定的数据,显示了每组小鼠在研究期间的总通量。高水平的未甲基化的CpG与在小鼠中观察到的较低的总通量相关。

[0059] 图13提供了在第8天新生小鼠中从实施例27中描述的实验获得的总通量数据。在整个研究过程中,ceDNA-高CpG在整个测定过程中的通量降低,而具有减少的未甲基化CpG或没有未甲基化CpG的ceDNA维持了荧光素酶表达。单次重复剂量适度增加了在CpG最小化或无CpG的样品中观察到的表达水平,但是在高CpG样品组中未观察到在重复剂量后的这种持续增加。

[0060] 图14A-图14C提供了实施例28中描述的实验的结果。图14A和图 14B是对从具有突变STING遗传背景的经ceDNA载体治疗的小鼠中采集的血液样品或聚C对照治疗的样品进行的每种细胞因子诱导测定的数据的图,其中被询问的特定细胞因子反映在每幅图的顶部。除IL-18以外,在低和无甲基化CpG ceDNA的情况下观察到细胞因子的诱导显著更少。图14C提供了在经治疗的突变STING小鼠中的ceDNA驱动的荧光素酶表达测定的数据,显示了每组小鼠在研究期间的总通量。研究结果再次表明, ceDNA中高水平的未甲基化CpG与观察到的较低总通量之间存在相关性。

[0061] 图15A和图15B显示了Padua FIX和FIX转基因从本文公开的高稳定DNA载体的表

达。还按照供应商提供的方案,使用VisuLize因子IX ELISA试剂盒(Affinity Biologicals,#FIX-AG)评估了从质粒或载体表达的FIX蛋白水平的定量分析。

[0062] 图16A和图16B描绘了实施例10中描述的Rag2小鼠的ceDNA持久性和重复给药研究的结果。图16A显示了在LNP-ceDNA-Luc处理的野生型c57b1/6小鼠或Rag2小鼠中随时间观察到的总通量的图形。图16B提供的图形显示了重复剂量对Rag2小鼠中的荧光素酶转基因表达水平的影响,重复剂量之后,随之观察到增加的稳定表达(箭头表示重复剂量施用的时间)。

[0063] 图17提供了实施例29中描述的经治疗小鼠的ceDNA荧光素酶表达研究的数据,显示了每组小鼠在研究期间的总通量。高水平的未甲基化 CpG与小鼠中随时间所观察到的较低总通量相关,而肝脏特异性启动子的使用与ceDNA载体在至少77天期间对转基因的持久稳定表达相关。

[0064] 图18A-图18H显示了在ceDNA载体施用之后在药理学巨噬细胞耗竭 NLRP3抑制剂(MCC950)或半胱天冬酶1抑制剂(VX765)的情况下的细胞因子水平。图18A显示了IFN- α 水平,图18B显示了IFN- γ 水平,表明用NLRP3抑制剂MCC950显著降低了IFN- γ (参见箭头),图18C显示了IL- β 水平,图18D显示了IL-18水平,表明用NLRP3抑制剂 MCC950显著降低了IFN- γ (参见箭头),图18E显示了IL-6水平,图18F显示了IP-10水平,图18G显示了MCP-1水平,图18H显示了TNF α 水平。

具体实施方式

[0065] 核酸转移载体和治疗剂是用于多种应用(诸如基因表达及其调节)的有前途的治疗剂。病毒转移载体可包含编码蛋白质的转基因或核酸。此类载体的实例包括AAV载体、微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)以及与信使RNA(例如小核RNA(snRNA))的突变位点结合的反义寡核苷酸。不幸的是,这些治疗剂的前景尚未实现,这在很大程度上是由于针对病毒转移载体的细胞和体液免疫应答。这些免疫应答包括抗体、B细胞和T细胞应答,并且通常特异于病毒转移载体的病毒抗原,诸如病毒衣壳或外壳蛋白或其肽。

[0066] 当前,许多潜在的患者对病毒转移载体所基于的病毒具有某种水平的预先存在的免疫。实际上,针对病毒核酸(DNA和RNA两者)或蛋白质的抗体在人群中非常普遍。另外,即使预先存在的免疫水平低,例如由于病毒转移载体的免疫原性低,这种低水平仍可能阻止成功的转导(例如,Jeune等人,Human Gene Therapy Methods,24:59-67(2013))。因此,即使低水平的预先存在的免疫也可能阻碍在患者中使用特定的病毒转移载体,并且可能需要临床医生基于不会同样有效的不同血清型病毒来选择病毒转移载体,或如果另一种病毒转移载体疗法不可用,甚至完全选择不同类型的疗法。

[0067] 此外,病毒载体(诸如腺相关载体)可以是高免疫原性的,并引起可损害功效(特别是在再施用方面)的体液和细胞介导的免疫。实际上,在单次施用病毒转移载体之后,可发展出针对病毒转移载体的细胞和体液免疫应答。在病毒转移载体施用之后,中和抗体滴度可增加并保持在高水平数年之久,并且可降低病毒转移载体再施用的有效性。实际上,重复施用病毒转移载体通常导致增强的、不希望的免疫应答。另外,病毒转移载体特异性CD8⁺T细胞可产生并消除表达所需转基因产物的转导细胞,例如在再次暴露于病毒抗原样病毒核酸或衣壳蛋白时。例如,已经显示AAV核酸或衣壳抗原可以触发用AAV病毒转移载体转导的

肝细胞的免疫介导的破坏。对于许多治疗应用,认为为了长期获益,需要多轮施用病毒转移载体。然而,这样做的能力将受到严重限制,特别是如果需要再施用而没有本文提供的方法和组合物时。

[0068] 提供了为有效使用多种核酸治疗剂(包括病毒或非病毒(合成)转移载体)和其他用于治疗核酸治疗剂的上述障碍提出解决方案的方法和组合物。本公开涉及将外源DNA序列递送至靶细胞、组织、器官或生物体,以及用于抑制(即减少或遏制)对所述外源DNA序列的免疫应答(例如先天性免疫应答)的修饰和方法。用于抑制(即减少或遏制)免疫应答(例如先天性免疫应答)的此类修饰和方法可用于例如增强转基因表达的持续时间。

[0069] 已出乎意料地发现,可用本文提供的方法和相关组合物减弱对DNA转移载体的免疫应答(例如先天性免疫应答)。因此,即使重复施用病毒转移载体或其他核酸治疗剂,所述方法和组合物也可潜在地增加用病毒转移载体和其他治疗性核酸分子治疗的功效并提供长期的治疗益处。

[0070] I. 定义

[0071] 除非本文另有定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。应理解,本发明不限于本文所述的具体方法、方案和试剂等,因此可以变化。本文中所用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求限定。免疫学和分子生物学中常用术语的定义能够在下列文献中找到:《默克诊疗手册(The Merck Manual of Diagnosis and Therapy)》第19版,默克夏普公司(Merck Sharp&Dohme Corp.)出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等人(编辑),《病毒学领域(Fields Virology)》第6版,Lippincott Williams&Wilkins出版,美国宾夕法尼亚州费城(Philadelphia,PA,USA)(2013);Knipe,D.M.和Howley,P.M.(编辑),《分子细胞生物学与分子医学百科全书(The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine)》,Blackwell科学有限公司出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编辑),《分子生物学与生物技术:综合案头参考(Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference)》,由VCH Publishers有限公司出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Werner Luttmann的《免疫学(Immunology)》,由Elsevier出版,2006;《詹韦氏免疫生物学(Janeway's Immunobiology)》,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编辑),Taylor&Francis有限公司,2014(ISBN 0815345305、9780815345305);《勒温基因XI(Lewin's Genes XI)》,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第4版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),美国纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.,USA)(2012)(ISBN 1936113414);Davis等人,《分子生物学的基本方法(Basic Methods in Molecular Biology)》,Elsevier科学出版有限公司,美国纽约(2012)(ISBN 044460149X);《酶学实验室方法:DNA(Laboratory Methods in Enzymology:DNA)》,Jon Lorsch(编辑)Elsevier,2013(ISBN 0124199542);《分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology,CPMB)》,Frederick M.Ausubel(编辑),John Wiley and Sons,2014(ISBN047150338X、9780471503385);《蛋白质科学现代方法(Current Protocols in

Protein Science, CPPS)》, John E. Coligan (编辑), John Wiley and Sons, Inc., 2005; 以及《免疫学现代方法 (Current Protocols in Immunology, CPI)》(John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe (编辑) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735、9780471142737), 其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0072] 如本文所用, 术语“施用 (administration/administering)”及其变化形式是指将组合物或药剂 (例如, 如本文所述的治疗性核酸或免疫抑制剂) 引入受试者中并且包括同时和依序引入一种或多种组合物或药剂。“施用”可以指例如治疗、药物动力学、诊断、研究、安慰剂以及实验方法。“施用”还涵盖体外和离体治疗。将组合物或药剂引入个体中是通过任何适合的途径, 包括经口、经肺、经鼻、肠胃外 (静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、瘤内或局部。通过电穿孔将组合物或药剂引入受试者中。施用包含自我施用和由另一个人施用。可以通过任何适合的途径进行施用。适合的施用途径使得组合物或药剂执行其预期功能。举例来说, 如果所适合的途径是静脉内, 那么通过将组合物或药剂引入个体的静脉来施用组合物。

[0073] 如本文所用, 短语“核酸治疗性”、“治疗性核酸”和“TNA”可互换地使用, 并且是指使用核酸作为治疗疾病或病症的治疗剂的活性组分的治疗的任何模态。如本文所用, 这些短语是指基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的非限制性实例包括 mRNA、反义RNA 和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA (RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性实例包括小环DNA、小基因、病毒DNA (例如, 慢病毒或AAV基因组) 或非病毒合成DNA载体、闭合端线性双螺旋DNA (ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、狗骨头 (dbDNATM) DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达 (MIDGE) - 载体、非病毒辅助DNA载体 (线性共价闭合DNA载体) 或哑铃形DNA最小载体 (“哑铃DNA”)。

[0074] 如本文所用, 活性剂或治疗剂 (诸如免疫抑制剂和/或治疗性核酸) 的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生所需的效果 (例如, 免疫应答 (例如先天性免疫应答) 的归一化或减少、以及相比于在不存在治疗性核酸和 / 或免疫抑制剂的情况下检测到的表达水平靶序列的表达或表达的抑制) 的量。用于测量目标基因或目标序列的表达的适合的分析包括例如使用所属领域的技术人员已知的技术检查蛋白质或RNA水平, 所述技术如斑点印迹、北方印迹法、原位杂合、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及所属领域的技术人员已知的表型分析。然而, 剂量水平是基于多种因素, 包括损伤类型、年龄、体重、性别、患者的医学病状、病状的严重程度、施用途径和所采用的特定活性剂。因此, 剂量方案可以在很大范围内变化, 但可以由医生使用标准方法常规地确定。另外, 术语“治疗量”、“治疗有效量”和“药学上有效量”包括所描述的本发明的组合物的防治或预防量。在所描述的本发明的防治性或预防性应用中, 以足以消除或降低疾病、病症或病状的风险、减轻严重程度或延迟发病的量向易患有疾病、病症或病状或以其他方式处于疾病、病症或病状风险下的患者施用药物组合物或药剂, 所述疾病、病症或病状包括疾病、病症或病状的生物化学、组织学和/或行为症状, 其并发症和在疾病、病症或病状的发展期间呈现的中间病理学表型。通常优选使用最大剂量, 即, 根据一些医学判断的最高安全剂量。术语“剂量 (dose/dosage)”在本文中可互换地使用。

[0075] 如本文所用, 术语“治疗效果”是指治疗的结果, 其结果被判定为合乎需要并且有

益的。治疗效果可以直接或间接地包括疾病表现的遏制、减少或消除。治疗效果还可以直接或间接地包括疾病表现的进展的遏制减少或消除。

[0076] 对于本文所描述的任何治疗剂,治疗有效量可以初始地根据初步的体外研究和/或动物模型来确定。治疗有效剂量也可以根据人数据来确定。可以基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用剂量。基于上述方法和其他熟知的方法调整剂量以实现最大功效在普通技术人员的能力内。下文总结了用于测定治疗有效性的一般原理,其可以在《古德曼和吉尔曼的治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,第10版,麦格劳-希尔专业出版公司(McGraw-Hill)(纽约)(2001)的第1章中找到,所述文献以引用的方式并入本文中。

[0077] 药代动力学原理为修改剂量方案以获得期望程度的治疗功效并且具有最小的不可接受的副作用提供了基础。在可以测量药物的血浆浓度并且与治疗窗口有关的情况下,可以获得针对剂量修改的另外的指导。

[0078] 如本文所用,术语“异源核苷酸序列”和“转基因”可互换使用,并且是指并入如本文公开的ceDNA载体中并可以由其递送和表达的所关注的核酸(除编码衣壳多肽的核酸外)。

[0079] 如本文所用,术语“表达盒”和“转录盒”可互换使用,并且是指一段线性核酸,其包括与一个或多个启动子或足以引导转基因转录的其他调控序列可操作地连接的转基因,但是不包含衣壳编码序列、其他载体序列或反向末端重复区域。表达盒可以另外包含一个或多个顺式作用序列(例如启动子、增强子或阻遏子)、一个或多个内含子和一个或多个转录后调控元件。

[0080] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物形式。因此,这个术语包括单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交物、或包括嘌呤和嘧啶碱基或其他天然、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。“寡核苷酸”通常是指单链或双链DNA的约5个至约100个核苷酸之间的多核苷酸。然而,出于本公开的目的,寡核苷酸的长度没有上限。寡核苷酸也被称为“寡聚物(oligomer)”或“寡聚体(oligo)”,并且可以从基因中分离出来,或通过本领域已知的方法化学合成。应了解术语“多核苷酸”和“核酸”包括单链(诸如有义或反义)和双链多核苷酸(如果所描述的实施方案适用的话)。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、DNA-DNA双螺旋体、预缩合DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合的形式。DNA可以呈小环、质粒、杆粒、小基因、辅助DNA(线性共价闭合DNA载体)、闭合端线性双螺旋DNA(CELiD或ceDNA)、狗骨头(dbDNATM)DNA、哑铃形DNA、极小的免疫学定义的基因表达(MIDGE)载体、病毒载体或非病毒载体的形式。RNA可以呈小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)和其组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰的骨架残基或键联的核酸,其是合成的、天然存在的以及非天然存在的,并且其具有与参考核酸类似的结合特性。此类类似物和/或经修饰的残基的实例包括(但不限于):硫代磷酸酯、二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(吗啉基)、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNATM)和肽核酸(PNA)。除非特别限制,否则所述术语涵盖含有与参考核酸具有类似结合特性的天然核苷酸的已知类

似物的核酸。除非另外指出,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。

[0081] “核苷酸”含有糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基连接在一起。

[0082] “碱基”包括嘌呤和嘧啶,所述嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于放置新的反应性基团(诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧化物和烷基卤化物)的修饰。

[0083] 如本文所用,术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”包括当干扰RNA在与靶基因或序列相同的细胞中时能够减少或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导降解与干扰RNA序列互补的mRNA或抑制与干扰RNA序列互补的mRNA翻译)的单链RNA(例如,成熟的miRNA、ssRNAi寡核苷酸、ssDNAi寡核苷酸)、双链RNA(即,双螺旋RNA,诸如siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、shRNA、aiRNA或前-miRNA)、DNA-RNA杂交物(参见例如,PCT公开号WO 2004/078941)或DNA-DNA杂交物(参见例如,PCT公开号WO 2004/104199)。因此,干扰RNA是指与靶mRNA序列或与由两条互补链或由一条单一自身互补链形成的双链RNA互补的单链RNA。干扰RNA可能与靶基因或序列具有实质或完全同一性,或可能包含错配区域(即错配基序)。干扰RNA的序列可对应于全长靶基因或其子序列。优选地,干扰RNA分子是化学合成的。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0084] 干扰RNA包括“小干扰RNA”或“siRNA”,例如,长度为约15-60个、15-50个或15-40个(双螺旋)核苷酸,更通常长度为约15-30个、15-25个或19-25个(双螺旋)核苷酸的干扰RNA,并且优选地长度为约20-24个、21-22个或21-23个(双螺旋)核苷酸(例如,双链siRNA的每个互补序列的长度为15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个核苷酸,优选长度为20-24个、21-22个或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个碱基对,优选长度为约18-22个、19-20个或19-21个碱基对)。siRNA双螺旋可包含约1个至约4个核苷酸或约2个至约3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸末端。siRNA的实例包括但不限于由两条单独的链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一条链是有义链,而另一条链是互补的反义链;由单链分子组装的双链多核苷酸分子,其中有义区和反义区通过基于核酸的接头或基于非核酸的接头连接;含有自身互补的有义区和反义区的具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子;以及具有两个或更多个环结构和含有自身互补的有义区和反义区的茎的环状单链多核苷酸分子,其中所述环状多核苷酸可以在体内或在体外被加工以产生活性双链siRNA分子。如本文所用,术语“siRNA”包括RNA-RNA双螺旋以及DNA-RNA杂交物(参见,例如,PCT公开号WO 2004/078941)。

[0085] 如本文所用,术语“核酸构建体”是指单链或双链的核酸分子,其是从天然存在的基因中分离的,或者以自然界中不另外存在或合成的方式进行修饰以含有核酸区段。当核酸构建体含有表达本公开的编码序列所需的控制序列时,术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。“表达盒”包括可操作地连接至启动子的DNA编码序列。

[0086] “可杂交的”或“互补的”或“基本上互补的”意指核酸(例如RNA)包括使其能够与另一核酸序列在体外和/或体内适当的温度和溶液离子强度的条件下非共价结合,即形成沃森-克里克碱基对(Watson-Crick base pair)和/或G/U碱基对、“退火”或“杂交”以序列特异性的反向平行方式(即,核酸特异性地结合于互补核酸)的核苷酸序列。如本领域已知的,

标准的沃森-克里克碱基对包括：腺嘌呤 (A) 与胸苷 (T) 配对，腺嘌呤 (A) 与尿嘧啶 (U) 配对，鸟嘌呤 (G) 与胞嘧啶 (C) 配对。另外，在本领域中还已知对于两个RNA分子 (例如dsRNA) 之间的杂交，鸟嘌呤 (G) 碱基与尿嘧啶 (U) 配对。例如，在与mRNA中的密码子进行tRNA反密码子碱基配对的情况下，G/U碱基配对部分负责遗传密码的简并性 (即，冗余)。在本公开的上下文中，靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合区段 (dsRNA双链体) 的鸟嘌呤 (G) 被认为与尿嘧啶 (U) 互补，反之亦然。这样，当可以在靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合区段 (dsRNA双链体) 的给定核苷酸位置形成G/U碱基对时，该位置不被认为是非互补的，而是被认为是互补的。

[0087] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用，是指任何长度的氨基酸的聚合物形式，其可以包括编码和非编码的氨基酸、经过化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸和具有修饰的肽骨架的多肽。

[0088] “编码”特定炎性小体拮抗剂 (例如，以下中的任一种或多种：NLRP3 炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合) 的DNA序列为转录成特定RNA和/或蛋白质的 DNA核酸序列。DNA多核苷酸可以编码被翻译成蛋白质的RNA (mRNA)，或者DNA多核苷酸可以编码未被翻译成蛋白质的RNA (例如tRNA、rRNA或靶向DNA的RNA；也称为“非编码”RNA或“ncRNA”)。

[0089] 如本文所用，如本文所用的术语“融合蛋白”是指包含来自至少两种不同蛋白质的蛋白质域的多肽。例如，融合蛋白可包含 (i) 一种炎性小体拮抗剂 (例如，以下中的任一种或多种：NLRP3炎性小体途径抑制剂、或 AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合) 或其片段，以及 (ii) 至少一种非所关注基因 (GOI) 蛋白质或可替代地不同的炎性小体拮抗剂蛋白质。本文涵盖的融合蛋白包括但不限于与炎性小体拮抗剂 (例如，以下中的任一种或多种：NLRP3炎性小体途径抑制剂、或 AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合) 融合的抗体或抗体的Fc或抗原结合片段，例如受体、配体、酶或肽的细胞外结构域。炎性小体拮抗剂 (例如，以下中的任一种或多种：NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合) 或其作为融合蛋白一部分的片段可以是单特异性抗体或双特异性或多特异性抗体。

[0090] 如本文所用，术语“基因组安全港基因”或“安全港基因”是指可以插入核酸序列以使得该序列可以以可预测的方式整合和起作用 (例如表达所关注蛋白质) 且对内源基因活性没有明显的负面影响或不促进癌症的基因或基因座。在一些实施方案中，安全港基因也是可有效地表达所插入的核酸序列并且表达水平比非安全港位点高的基因座或基因。

[0091] 如本文所用，术语“基因递送”意指将外来DNA转移到宿主细胞中以施加基因疗法的方法。

[0092] 如本文所用，术语“末端重复”或“TR”包括任何包含至少一个最低需要的复制起点和包含回文发夹结构的区域的病毒末端重复或合成序列。Rep 结合序列 (“RBS”) (也称为RBE (Rep结合元件)) 和末端解离位点 (“TRS”) 共同构成“最低需要的复制起点”，并且因此TR包含至少一个RBS和至少一个TRS。在给定的一段多核苷酸序列内彼此是反向互补序列的TR通常各自被称为“反向末端重复序列”或“ITR”。在病毒背景下，ITR介导复制、病毒包装、整合和原病毒拯救。正如在本发明中意外发现的，在全长上不是反向互补序列的TR仍然可以执行ITR的传统功能，因此术语ITR在本文中用于指ceDNA基因组或ceDNA载体中能够介

导 ceDNA载体复制的ITR。本领域普通技术人员将了解,在复杂的ceDNA 载体构型中,可以存在超过两个ITR或不对称的ITR对。ITR可以是 AAV ITR或非AAV ITR,或可以源自于AAV ITR或非AAV ITR。例如, ITR可以源自于细小病毒科,其涵盖细小病毒和依赖病毒(例如犬细小病毒、牛细小病毒、小鼠细小病毒、猪细小病毒、人细小病毒B-19),或可以将充当SV40复制起点的SV40发夹用作ITR,其可以通过截断、取代、缺失、插入和/或添加而被进一步修饰。细小病毒科病毒由两个亚科组成:感染脊椎动物的细小病毒亚科和感染无脊椎动物的浓核病毒亚科。依赖病毒属包括腺相关病毒(AAV)的病毒家族,其能够在脊椎动物宿主中复制,所述宿主包括但不限于人、灵长类、牛、犬、马和羊物种。本文中为了方便起见,将位于ceDNA载体中表达盒的5' (上游)的ITR称为“5' ITR”或“左ITR”,并将位于ceDNA载体中表达盒的3' (下游)的 ITR称为“3' ITR”或“右ITR”。

[0093] “野生型ITR”或“WT-ITR”是指AAV或其他依赖病毒中天然存在的 ITR序列的序列,其保留例如Rep结合活性和Rep切口能力。由于遗传密码的简并性或漂移,来自任何AAV血清型的WT-ITR的核苷酸序列可能与规范的天然存在的序列略有不同,因此,本文涵盖使用的WT-ITR序列包括由于在产生过程中发生的天然存在的变化(例如复制误差)而产生的 WT-ITR序列。

[0094] 如本文所用,术语“基本上对称的WT-ITR”或“基本上对称的WT-ITR 对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的一对WT-ITR,它们都是在整个长度上具有反向互补序列的野生型ITR。举例来说,ITR即使具有一个或多个偏离典型的天然存在的序列的核苷酸,只要变化并不影响所述序列的特性和整体三维结构,所述ITR也可以被认为是野生型序列。在一些方面,偏离的核苷酸代表保守的序列变化。作为一个非限制性实例,序列与典范序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(例如使用默认设置下的BLAST测量),并且还 与另一个WT-ITR具有对称的三维空间组织,以使它们的3D结构在几何空间中具有相同的形状。基本上对称的WT-ITR在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环。通过确定具有与合适的Rep蛋白配对的可操作的Rep结合位点(RBE或RBE')和末端解离位点(TRS),可以在功能上将基本上对称的WT-ITR确认为 WT。可以任选地测试其他功能,包括在允许条件下的转基因表达。

[0095] 如本文所用,短语“经修饰的ITR”或“mod-ITR”或“突变型ITR”在本文中可互换使用,并且是指与来自相同血清型的WT-ITR相比在至少一个或多个核苷酸中具有突变的ITR。所述突变可以引起ITR中的A、C、C'、B、B'区中的一个或多个发生变化,并且可以使得三维空间组织(即,其几何空间中的3D结构)相较于相同血清型的WT-ITR的3D空间组织发生变化。

[0096] 如本文所用,术语“不对称ITR”也称为“不对称ITR对”,是指单个 ceDNA基因组或ceDNA载体内在全长上不反向互补的一对ITR。作为一个非限制性实例,不对称的ITR与其同源ITR不具有对称的三维空间组织,使得其3D结构在几何空间中具有不同的形状。换句话说,不对称的ITR 对具有不同的整体几何结构,即它们在3D空间中具有不同的A、C-C'和 B-B'环组织(例如,一个ITR与同源ITR相比可能具有短的CC'臂和/或短的BB'臂)。两个ITR之间的序列差异可能是由于一个或多个核苷酸添加、缺失、截断或点突变引起的。在一个实施方案中,不对称ITR对中的一个 ITR可以是野生型AAV ITR序列,另一个ITR是如本文定义的修饰ITR(例如非野生型或合成ITR序列)。在另一个实施方案中,不对称ITR对中的ITR皆不

是野生型AAV序列,并且两个ITR是在几何空间中具有不同形状的经修饰的ITR(即,不同的整体几何结构)。在一些实施方案中,不对称ITR对中的一个mod-ITR可能具有短的C-C'臂,而另一个ITR可能具有不同的修饰(例如单臂或短的B-B'臂等),使得它们与同源不对称mod-ITR相比具有不同的三维空间组织。

[0097] 如本文所用,术语“对称ITR”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的一对ITR,其相对于野生型依赖病毒ITR序列发生突变或修饰并且在其全长上反向互补。这两个ITR都不是野生型ITR AAV2序列(即,它们是修饰ITR,也称为突变ITR),并且由于核苷酸的添加、缺失、取代、截断或点突变,而在序列上与野生型ITR不同。本文中为了方便起见,将位于ceDNA载体中表达盒的5'(上游)的ITR称为“5' ITR”或“左ITR”,并将位于ceDNA载体中表达盒的3'(下游)的ITR称为“3' ITR”或“右 ITR”。

[0098] 如本文所用,术语“基本上对称的修饰ITR”或“基本上对称的mod-ITR对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体中的一对修饰ITR,它们在其全长上具有反向互补序列。例如,修饰ITR即使具有一些偏离反向互补序列的核苷酸序列,只要变化不影响特性和整体形状,也可以认为是基本上对称的。作为一个非限制性实例,序列与典型序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与其同源经修饰的ITR具有对称的三维空间组织,使得其3D结构在几何空间中具有相同的形状。换句话说,基本上对称的经修饰的ITR对具有在3D空间中组织的相同的A、C-C'和B-B'环。在一些实施方案中,来自mod-ITR对的ITR可以具有不同的反向互补核苷酸序列,但仍具有相同的对称三维空间组织,即两个ITR都具有产生相同的整体3D形状的突变。举例来说,mod-ITR对中的一个ITR(例如5' ITR)可以来自一种血清型,而另一个ITR(例如3' ITR)可以来自不同血清型,然而,两者均能够具有相同的相应突变(例如如果5' ITR在C区域中具有缺失,则来自不同血清型的经修饰的同源3' ITR在C'区域中的相应位置具有缺失),使得经修饰的ITR对具有相同的对称三维空间组织。在此类实施方案中,经修饰的ITR对中的每个ITR可来自不同血清型(例如AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12),诸如AAV2与AAV6的组合,其中一个ITR中的修饰在来自不同血清型的同源ITR的相应位置得到反映。在一个实施方案中,基本上对称的经修饰的ITR对是指一对经修饰的ITR(mod-ITR),只要ITR之间的核苷酸序列的差异不影响特性或整体形状并且其在3D空间中具有基本上相同的形状即可。作为非限制性实例,如通过本领域公知的标准方法如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)或BLASTN测定,mod-ITR与规范的mod-ITR具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,并且还具有对称的三维空间组织,以使其3D结构在几何空间中的形状相同。基本上对称的mod-ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环,例如,如果基本上对称的mod-ITR对中的经修饰的ITR缺失C-C'臂,那么同源mod-ITR对应缺失C-C'环,并且还具有在其同源mod-ITR的几何空间中呈相同形状的剩余A和B-B'环的类似3D结构。术语“位于侧翼”是指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。通常,在序列ABC中,B的侧翼是A和C。对于A×B×C排列,情况也是如此。因此,侧翼序列在所侧接的序列之前或之后,但不必与被侧接的序列相邻或紧邻。在一个实施方案中,术语侧翼(flanking)是指在线性双螺旋ceDNA载体的每个末端处的末端重复序列。如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”包括减轻、实质上抑制、减缓或逆转病状的进展,实质上改善病状临床症状或实质上预防病状临床症状的出现、获得有益或所需的临床结果。治疗进一步指代实现

以下中的一个或多个：(a) 降低病症的严重程度；(b) 限制所治疗的一种或多种病症的症状特征的发展；(c) 限制所治疗的一种或多种病症的症状特征的恶化；(d) 限制先前患有病症的患者中的一种或多种病症的复发；以及(e) 限制先前对于一种或多种病症无症状的患者中的症状的复发。有益或所需的临床结果，如药理学和/或生理学作用，包括(但不限于)：预防可能易患有疾病、病症或病状但尚未经历或展现疾病的症状的个体出现所述疾病、病症或病状(防治性治疗)；缓解所述疾病、病症或病状的症状；减轻所述疾病、病症或病状的程度；稳定所述疾病、病症或病状(即，不恶化)；预防所述疾病、病症或病状的扩散；延迟或减缓所述疾病、病症或病状进展；改善或缓和所述疾病、病症或病状；以及其组合，以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比，延长存活期。

[0099] 如本文所用，术语“增加”、“增强”、“提高”(以及类似术语)通常是指相对于自然条件、预期条件或平均条件、或者相对于对照条件直接地或间接地增加浓度、水平、功能、活性或行为的作用。

[0100] 如本文所用，术语“遏制”、“减少”、“干扰”、“抑制”和/或“降低”(以及类似术语)通常是指直接或间接地降低相对于自然条件、预期条件或平均条件，或相对控制条件的浓度、水平、功能、活动或行为的行为。通过免疫抑制剂“减少(decrease/decreasing)”或“降低(reduce/reducing)”免疫应答(例如免疫应答(例如先天性免疫应答))旨在表示对给定免疫抑制剂的免疫应答的可检测到的减少。可相对于在免疫抑制剂的存在下的免疫应答的水平确定通过免疫抑制剂引起的免疫应答减少的量。可检测到的减少可比在免疫抑制剂的存在下检测到的免疫应答低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。

[0101] 如本文所用，术语“脂质”是指一组有机化合物，其包括但不限于脂肪酸的酯，并且其特征不在于不溶于水，但是可溶于许多有机溶剂中。它们通常分为至少三类：(1)“简单脂质”，包括脂肪和油以及蜡；(2)“化合物脂质”，包括磷脂和糖脂；以及(3)“衍生脂质”，诸如类固醇。

[0102] 如本文所用，术语“脂质颗粒”包括可用于将治疗剂诸如核酸治疗剂和/或免疫抑制剂递送至所关注的靶位点(例如，细胞、组织、器官等)的脂质配制物。在优选的实施方案中，本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒，其通常由阳离子脂质、非阳离子脂质和任选地防止颗粒聚集的共轭脂质形成。在其他优选的实施方案中，可以将治疗剂诸如治疗性核酸囊封于颗粒的脂质部分中，从而保护其免于酶促降解。在其他优选的实施方案中，免疫抑制剂可以任选地包含在含有核酸的脂质颗粒中。

[0103] 如本文所用，术语“脂质囊封的”可以是指通过完全囊封、部分囊封或两者提供活性剂或治疗剂(诸如核酸(例如，ceDNA))的脂质颗粒。在优选的实施方案中，核酸被完全囊封在脂质颗粒中(例如，以形成含有核酸的脂质颗粒)。

[0104] 如本文所用，术语“脂质缀合物”是指抑制脂质颗粒聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物，例如，偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如，PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如，PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG和与神经酰胺偶联的PEG(参见例如，美国专利号5,885,613)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如，POZ-DAA缀合物；参见例如，2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294,828和2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295,140)、聚酰胺

寡聚物（例如，ATTA-脂质缀合物）及其混合物。POZ-脂质缀合物的其他实例在PCT公开号WO 2010/006282中有描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合，或者可以经由接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分，包括例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方案中，使用不含酯的接头部分，诸如酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的，将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0105] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱和二亚油酰基磷脂酰胆碱。缺少磷的其他化合物，诸如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸，也在被称为两亲性脂质的组内。此外，上述两亲性脂质可与其他脂质（包括甘油三酸酯和固醇）混合。

[0106] 如本文所用，术语“中性脂质”是指在所选pH下以不带电或中性两性离子形式存在的多种脂质种类中的任一种。在生理pH下，此类脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0107] 如本文所用，术语“非阳离子脂质”是指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

[0108] 如本文所用，术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、和加入其他阴离子改性基团的中性脂质。

[0109] 如本文所用，术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物，所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基、以及任选地被一个或多个芳族、环脂族或杂环基团取代的此类基团。合适的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0110] 如本文所用，术语“水性溶液”是指全部或部分包含水的组合物。

[0111] 如本文所用，术语“有机脂质溶液”是指全部或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0112] 如本文所用，术语“全身递送”是指脂质颗粒的递送，其导致活性剂诸如干扰RNA（例如，siRNA）在生物体内的广泛的生物分布。一些施用技术可导致某些药剂而非其他药剂的全身递送。全身递送意指使有用量（优选治疗量）的药剂暴露于身体的大部分部位。为了获得广泛的生物分布，通常需要血液寿命，以使药剂在到达施用位点远端的疾病位点之前不会迅速地降解或清除（诸如通过首过器官（肝、肺等）或通过快速、非特异性细胞结合）。脂质颗粒的全身递送可以通过本领域已知的任何手段（包括例如静脉内、皮下和腹膜内）进行。在优选的实施方案中，脂质颗粒的全身递送是通过静脉内递送进行的。

[0113] 如本文所用，术语“局部递送”是指将活性剂诸如干扰RNA（例如，siRNA）直接地递送到生物体内的靶位点。举例来说，药剂可以通过直接注射到疾病部位（如肿瘤或其他目标部位，如发炎部位或目标器官，如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等）中来局部递送。

[0114] 如本文所用，术语“末端重复”或“TR”包括任何包含至少一个最低需要的复制起点和包含回文发夹结构的区域的病毒末端重复或合成序列。Rep结合序列（“RBS”）（也称为RBE（Rep结合元件））和末端解离位点（“TRS”）共同构成“最低需要的复制起点”，并且因此

TR包含至少一个 RBS和至少一个TRS。在给定的一段多核苷酸序列内彼此是反向互补序列的TR通常各自被称为“反向末端重复序列”或“ITR”。在病毒背景下，ITR介导复制、病毒包装、整合和原病毒拯救。正如在本发明中意外发现的，在全长上不是反向互补序列的TR仍然可以执行ITR的传统功能，因此术语ITR在本文中用于指ceDNA基因组或ceDNA载体中能够介导 ceDNA载体复制的TR。本领域普通技术人员将了解，在复杂的ceDNA 载体构型中，可以存在超过两个ITR或不对称的ITR对。ITR可以是 AAV ITR或非AAV ITR，或可以源自于AAV ITR或非AAV ITR。例如，ITR可以源自于细小病毒科，其涵盖细小病毒和依赖病毒（例如犬细小病毒、牛细小病毒、小鼠细小病毒、猪细小病毒、人细小病毒B-19），或可以将充当SV40复制起点的SV40发夹用作ITR，其可以通过截断、取代、缺失、插入和/或添加而被进一步修饰。细小病毒科病毒由两个亚科组成：感染脊椎动物的细小病毒亚科和感染无脊椎动物的浓核病毒亚科。依赖病毒属包括腺相关病毒（AAV）的病毒家族，其能够在脊椎动物宿主中复制，所述宿主包括但不限于人、灵长类、牛、犬、马和羊物种。本文中为了方便起见，将位于ceDNA载体中表达盒的5'（上游）的ITR称为“5' ITR”或“左ITR”，并将位于ceDNA载体中表达盒的3'（下游）的 ITR称为“3' ITR”或“右ITR”。

[0115] “野生型ITR”或“WT-ITR”是指AAV或其他依赖病毒中天然存在的 ITR序列的序列，其保留例如Rep结合活性和Rep切口能力。由于遗传密码的简并性或漂移，来自任何AAV血清型的WT-ITR的核苷酸序列可能与规范的天然存在的序列略有不同，因此，本文涵盖使用的WT-ITR序列包括由于在产生过程中发生的天然存在的变化（例如复制误差）而产生的 WT-ITR序列。

[0116] 如本文所用，术语“基本上对称的WT-ITR”或“基本上对称的WT-ITR 对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的一对WT-ITR，它们都是在整个长度上具有反向互补序列的野生型ITR。举例来说，ITR即使具有一个或多个偏离典型的天然存在的序列的核苷酸，只要变化并不影响所述序列的特性和整体三维结构，所述ITR也可以被认为是野生型序列。在一些方面，偏离的核苷酸代表保守的序列变化。作为一个非限制性实例，序列与典范序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性（例如使用默认设置下的BLAST测量），并且还 与另一个WT-ITR具有对称的三维空间组织，以使它们的3D结构在几何空间中具有相同的形状。基本上对称的WT-ITR在3D空间中具有相同的A、C-C' 和B-B' 环。通过确定具有与合适的Rep蛋白配对的可操作的Rep结合位点（RBE或RBE'） 和末端解离位点（TRS），可以在功能上将基本上对称的WT-ITR确认为 WT。可以任选地测试其他功能，包括在允许条件下的转基因表达。

[0117] 如本文所用，短语“经修饰的ITR”或“mod-ITR”或“突变型ITR”在本文中可互换使用，并且是指与来自相同血清型的WT-ITR相比在至少一个或多个核苷酸中具有突变的ITR。所述突变可以引起ITR中的A、C、C'、B、B' 区中的一个或多个发生变化，并且可以使得三维空间组织（即，其几何空间中的3D结构）相较于相同血清型的WT-ITR的3D空间组织发生变化。

[0118] 如本文所用，术语“不对称ITR”也称为“不对称ITR对”，是指单个 ceDNA基因组或ceDNA载体内在全长上不反向互补的一对ITR。作为一个非限制性实例，不对称的ITR与其同源ITR不具有对称的三维空间组织，使得其3D结构在几何空间中具有不同的形状。换句话说，不对称的ITR 对具有不同的整体几何结构，即它们在3D空间中具有不同的A、C-C' 和 B-

B'环组织(例如,一个ITR与同源ITR相比可能具有短的CC'臂和/或短的BB'臂)。两个ITR之间的序列差异可能是由于一个或多个核苷酸添加、缺失、截断或点突变引起的。在一个实施方案中,不对称ITR对中的一个ITR可以是野生型AAV ITR序列,另一个ITR是如本文定义的修饰ITR(例如非野生型或合成ITR序列)。在另一个实施方案中,不对称ITR对中的ITR皆不是野生型AAV序列,并且两个ITR是在几何空间中具有不同形状的经修饰的ITR(即,不同的整体几何结构)。在一些实施方案中,不对称ITR对中的一个mod-ITR可能具有短的C-C'臂,而另一个ITR可能具有不同的修饰(例如单臂或短的B-B'臂等),使得它们与同源不对称mod-ITR相比具有不同的三维空间组织。

[0119] 如本文所用,术语“对称ITR”是指在单个ceDNA基因组或ceDNA载体内的、为野生型或突变型(例如相对于野生型被修饰的)依赖病毒ITR序列并且在其全长上反向互补的一对ITR。在一个非限制性实例中,两个ITR都是来自AAV2的野生型ITR序列。在另一个实例中,这两个ITR皆不是野生型ITR AAV2序列(即,它们是经修饰的ITR,也称为突变型ITR),并且由于核苷酸添加、缺失、取代、截短或点突变而在序列上与野生型ITR不同。本文中为了方便起见,将位于ceDNA载体中表达盒的5'(上游)的ITR称为“5'ITR”或“左ITR”,并将位于ceDNA载体中表达盒的3'(下游)的ITR称为“3'ITR”或“右ITR”。

[0120] 如本文所用,术语“基本上对称的修饰ITR”或“基本上对称的mod-ITR对”是指单个ceDNA基因组或ceDNA载体中的一对修饰ITR,它们在其全长上具有反向互补序列。例如,修饰ITR即使具有一些偏离反向互补序列的核苷酸序列,只要变化不影响特性和整体形状,也可以认为是基本上对称的。作为一个非限制性实例,序列与典型序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与其同源经修饰的ITR具有对称的三维空间组织,使得其3D结构在几何空间中具有相同的形状。换句话说,基本上对称的经修饰的ITR对具有在3D空间中组织的相同的A、C-C'和B-B'环。在一些实施方案中,来自mod-ITR对的ITR可以具有不同的反向互补核苷酸序列,但仍具有相同的对称三维空间组织,即两个ITR都具有产生相同的整体3D形状的突变。举例来说,mod-ITR对中的一个ITR(例如5'ITR)可以来自一种血清型,而另一个ITR(例如3'ITR)可以来自不同血清型,然而,两者均能够具有相同的相应突变(例如如果5'ITR在C区域中具有缺失,则来自不同血清型的经修饰的同源3'ITR在C'区域中的相应位置具有缺失),使得经修饰的ITR对具有相同的对称三维空间组织。在此类实施方案中,经修饰的ITR对中的每个ITR可来自不同血清型(例如AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12),诸如AAV2与AAV6的组合,其中一个ITR中的修饰在来自不同血清型的同源ITR的相应位置得到反映。在一个实施方案中,基本上对称的经修饰的ITR对是指一对经修饰的ITR(mod-ITR),只要ITR之间的核苷酸序列的差异不影响特性或整体形状并且其在3D空间中具有基本上相同的形状即可。作为非限制性实例,如通过本领域公知的标准方法如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)或BLASTN测定,mod-ITR与规范的mod-ITR具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,并且还具有对称的三维空间组织,以使其3D结构在几何空间中的形状相同。基本上对称的mod-ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环,例如,如果基本上对称的mod-ITR对中的经修饰的ITR缺失C-C'臂,那么同源mod-ITR对应缺失C-C'环,并且还具有在其同源mod-ITR的几何空间中呈相同形状的剩余A和B-B'环的类似3D结构。

[0121] 术语“位于侧翼”是指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。通常,在序

列ABC中,B的侧翼是A和C。对于A×B×C排列,情况也是如此。因此,侧翼序列在所侧接的序列之前或之后,但不必与被侧接的序列相邻或紧邻。在一个实施方案中,术语位于侧翼是指在线性双链体 ceDNA载体的每个末端处的末端重复序列。

[0122] 如本文所用,术语“ceDNA基因组”是指还并入了至少一个反向末端重复区域的表达盒。ceDNA基因组还可以包含一个或多个间隔区。在一些实施方案中,ceDNA基因组作为DNA的分子间双链体多核苷酸并入质粒或病毒基因组中。

[0123] 如本文所用,术语“ceDNA间隔区”是指分隔ceDNA载体或ceDNA 基因组中的功能元件的间插序列。在一些实施方案中,ceDNA间隔区将两个功能元件保持在对于最佳功能性来说所期望的距离上。在一些实施方案中,ceDNA间隔区提供或增加了ceDNA基因组在例如质粒或杆状病毒内的遗传稳定性。在一些实施方案中,ceDNA间隔区通过提供克隆位点等的便利位置,促进ceDNA基因组的就绪基因操作。举例来说,在某些方面,含有若干个限制性核酸内切酶位点的寡核苷酸“多酶切点接头”或设计成不具有已知蛋白质(例如,转录因子)结合位点的非开放阅读框序列可安置于ceDNA基因组中以将顺式作用因子分开,例如将6聚体、12聚体、18聚体、24聚体、48聚体、86聚体、176聚体等插入末端解离位点与上游转录调控元件之间。类似地,可以在聚腺苷酸化信号序列和3'-末端解离位点之间并入间隔子。

[0124] 如本文所用,术语“ceDNA-质粒”是指一种包含作为分子间双螺旋体的ceDNA基因组的质粒。

[0125] 如本文所用,术语“ceDNA-杆粒”是指一种包含作为分子间双链体的 ceDNA基因组的感染性杆状病毒基因组,其能够作为质粒在大肠杆菌中增殖,因此可以作为杆状病毒的穿梭载体操作。

[0126] 如本文所用,术语“ceDNA-杆状病毒”是指一种在杆状病毒基因组内包含作为分子间双螺旋体的ceDNA基因组的杆状病毒。

[0127] 如本文所用,术语“ceDNA-杆状病毒感染的昆虫细胞”和“ceDNA-BIIC”可互换使用,并且是指被ceDNA-杆状病毒感染的无脊椎动物宿主细胞(包括(但不限于)昆虫细胞(例如Sf9细胞))。

[0128] 如本文所用,术语“闭合端DNA载体”是指具有至少一个共价闭合端的无衣壳DNA载体,其中所述载体的至少一部分具有分子内双链体结构。

[0129] 如本文所用,术语“ceDNA”是指用于非病毒基因转移、合成或其他目的的无衣壳闭合端线性双链(ds)双螺旋DNA。ceDNA的详细描述描述于2017年3月3日提交的PCT/US2017/020828的国际申请中,所述申请的全部内容以引用的方式明确地并入本文中。使用基于细胞的方法产生包含各种反向末端重复(ITR)序列和构型的ceDNA的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的实施例1中,所述申请中的每一个以全文引用的方式并入本文中。用于产生包含各种ITR序列和构型的合成ceDNA载体的某些方法描述于例如2019年1月18日提交的国际申请 PCT/US2019/14122中,所述国际申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0130] 如本文所用,术语“ceDNA载体”与“ceDNA”可互换地使用并且指包含至少一个末端回文结构的闭合端DNA载体。在一些实施方案中,ceDNA 包含两个共价闭合端。

[0131] 如本文所用,术语“neDNA”或“带切口的ceDNA”是指在开放阅读框架(例如,待表达的启动子和转基因)上游的茎区或间隔区5'中具有1-100个碱基对的切口或间隙的闭合端

DNA。

[0132] 如本文所用,术语“间隙”和“切口”可互换地使用,并且是指本发明的合成DNA载体的中断部分,其在另外双链ceDNA中产生单链DNA部分的延伸段。在双螺旋DNA的一个链中,间隙的长度可以是1个碱基对到100个碱基对。由本文所描述的方法以及由所述方法产生的合成载体设计和产生的典型间隙的长度可以是例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60bp。本公开中的示例性间隙的长度可以是1bp到10bp、1bp到20bp、1bp到30bp。

[0133] 如本文所用,术语“Rep结合位点”、“Rep结合元件”、“RBE”和“RBS”可互换使用并且是指Rep蛋白(例如AAV Rep 78或AAV Rep 68)的结合位点,其在Rep蛋白结合后允许Rep蛋白在并入了所述RBS的序列上发挥其位点特异性核酸内切酶活性。RBS序列和其反向互补序列一起形成单个RBS。RBS序列在所属领域中是已知的,并且包括例如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:39),AAV2中所鉴定的RBS序列。在本发明的实施方案中可以使用任何已知的RBS序列,包括其他已知的AAV RBS序列和其他天然已知的或合成的RBS序列。不受理论束缚,认为Rep蛋白的核酸酶结构域与双螺旋核苷酸序列GCTC结合,并且因此两种已知的AAV Rep蛋白直接与双螺旋寡核苷酸5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3'(SEQ ID NO:39)结合并且在其上稳定地组装。另外,可溶性聚集性构象异构体(即,数目未定的相互缔合的Rep蛋白)解离并结合到含有Rep结合位点的寡核苷酸。每个Rep蛋白都与每个链上的含氮碱基和磷酸二酯骨架相互作用。与含氮碱基的相互作用提供序列特异性,而与磷酸二酯骨架的相互作用是非或较少序列特异性的,并稳定了蛋白质-DNA复合物。

[0134] 如本文所用,术语“末端解离位点”和“TRS”在本文可互换使用,是指一个区域,在此Rep与5'胸苷形成酪氨酸-磷酸二酯键,产生3'OH,充当通过DNA聚合酶、例如DNA pol δ 或DNA pol ϵ 进行DNA延伸的底物。可替代地,Rep-胸苷复合物可以参与配位接合反应。在一些实施方案中,TRS最低限度地涵盖非碱基配对的胸苷。在一些实施方案中,TRS的切口效率可以至少部分地由其在同一分子内距RBS的距离来控制。当受体底物是互补ITR时,所产生的产物是分子内双螺旋体。TRS序列在所属领域中已知,并且包括例如5'-GGTTGA-3'(SEQ ID NO:804),AAV2中所鉴定的六核苷酸序列。本发明的实施方案中可以使用任何已知的TRS序列,包括其他已知的AAV TRS序列和其他天然已知或合成的TRS序列,例如AGTT(SEQ ID NO:085)、GGTTGG(SEQ ID NO:806)、AGTTGG(SEQ ID NO:807)、AGTTGA(SEQ ID NO:808)和其他基序,例如RRTTRR(SEQ ID NO:809)。

[0135] 如本文所用,术语“有义”和“反义”是指多核苷酸上结构元件的取向。元件的有义和反义型式彼此反向互补。

[0136] 如本文所用,术语“合成AAV载体”和“AAV载体的合成产生”是指在完全无细胞环境中的AAV载体和其合成产生方法。

[0137] 如本文所用,“报告子”是指可用于提供可检测的读出数的蛋白质。报告子通常产生可测量的信号,如荧光、颜色或发光。报告蛋白编码序列编码在细胞或生物体中的存在易于观察到的蛋白质。举例来说,荧光蛋白当被特定波长的光激发时会导致细胞发荧光,荧光素酶引起细胞催化产生光的反应,以及如 β -半乳糖苷酶的酶将底物转化为有色产物。可用于实验或诊断目的的示例性报告多肽包括但不限于 β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱

性磷酸酶 (AP)、胸苷激酶 (TK)、绿色荧光蛋白 (GFP) 和其他荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、荧光素酶和其他在本领域中公知的报告多肽。

[0138] 如本文所用,术语“效应蛋白”是指一种提供可检测的读出数的多肽,例如作为报告多肽,或更适当地,作为杀死细胞的多肽,例如毒素,或致使细胞易用所选作用剂或因缺乏所选作用剂而被杀死的作用剂。效应蛋白包括直接靶向或损害宿主细胞的DNA和/或RNA的任何蛋白质或肽。举例来说,效应子蛋白可以包括(但不限于):靶向宿主细胞DNA序列(无论是基因组的还是在染色体外元件上的)的限制性核酸内切酶、降解细胞存活所必需的多肽目标的蛋白酶;DNA旋转酶抑制剂;以及核糖核酸酶型毒素。在一些实施方案中,由如本文所描述的合成生物回路控制的效应子蛋白表达可以作为一个因子参与另一个合成生物回路,从而扩大了生物回路系统应答性的范围和复杂度。

[0139] 转录调节剂是指激活或抑制所关注基因(诸如炎症小体拮抗剂(例如, NLRP3和/或AIM2炎症小体途径的一者或多者的抑制剂、或半胱天冬酶 1抑制剂))的转录的转录活化因子和阻遏子。启动子为引发特定基因转录的核酸区域。转录活化因子通常结合于转录启动子附近并且募集RNA 聚合酶以直接引发转录。阻遏子与转录启动子结合,并在空间上阻碍 RNA聚合酶引发转录。其他转录调控因子可以取决于其结合位置以及细胞和环境条件来充当活化因子或阻遏子。转录调控因子类别的非限制性实例包括(但不限于):同源域蛋白、锌指蛋白、翼状螺旋(叉头)蛋白和亮氨酸拉链蛋白。

[0140] 如本文所用,“阻遏蛋白”或“诱导蛋白”是与调控序列元件结合并分别阻遏或活化与调控序列元件可操作连接的序列的转录的蛋白质。如本文所描述的优选阻遏和诱导蛋白对至少一种输入剂或环境输入物的存在或不存在敏感。如本文所述的优选蛋白质是模块的形式,包含例如可分离的 DNA结合和输入剂结合或应答元件或结构域。

[0141] 如本文所用,“载剂(carrier)”包括任何和所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、缓冲液、载剂溶液、悬液、胶体等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是所属领域熟知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不会产生毒性的、过敏性的或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0142] 如本文所用,“输入剂应答结构域”是转录因子的一个结构域,其以致使连接的DNA结合融合结构域对条件或输入剂的存在作出应答的方式与所述条件或输入剂结合或以其他方式作出应答。在一个实施方案中,条件或输入剂的存在导致输入剂应答结构域或其融合的蛋白质发生构象变化,从而改变转录因子的转录调制活性。

[0143] 术语“体内”是指在生物体,如多细胞动物中或内部进行的分析或过程。在本文所描述的一些方面,当使用如细菌的单细胞生物体时,可以说方法或用途是在“体内”发生的。术语“离体”是指使用在多细胞动物体或植物体之外的具有完整膜的活细胞进行的方法和用途,所述活细胞例如外植体、培养细胞(包括原代细胞和细胞系)、转化的细胞系、以及提取的组织或细胞(包括血细胞)等等。术语“体外”是指不需要存在具有完整膜的细胞的分析和方法,如细胞提取物,并且可以指在非细胞系统,如不包含细胞或细胞系统的介质,如细胞提取物中引入可编程的合成生物回路。

[0144] 如本文所用,术语“启动子”是指通过驱动核酸序列的转录来调节另一核酸序列表达的任何核酸序列,其可以是编码蛋白质或RNA的异源目标基因。启动子可以是组成型的、

诱导型的、阻遏型的、组织特异性的或其任何组合。启动子是核酸序列的控制区域,在所述核酸序列的其余部分的引发和转录速率是受控的。启动子还可以含有可以结合调节蛋白和分子的遗传元件,例如RNA聚合酶和其他转录因子。在本文所述的方面的一些实施方案中,启动子可以驱动调节启动子本身的表达的转录因子的表达。在启动子序列内将发现转录起始位点,以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合域。真核启动子将经常但并非总是含有“TATA”框和“CAT”框。各种启动子,包括诱导型启动子,可以用于驱动本文公开的ceDNA载体中转基因的表达。启动子序列可以在其3'末端以转录起始位点为界并且向上游(5'方向)延伸以包括为了在高于背景的可检测水平上引发转录所必需的最少数目的碱基或元件。

[0145] 如本文所用,术语“增强子”是指顺式作用调控序列(例如50-1,500个碱基对),其结合一种或多种蛋白质(例如活化剂蛋白质或转录因子)以增强核酸序列的转录活化。增强子可以位于其调节的基因起始位点上游或基因起始位点下游最多1,000,000个碱基对处。增强子可以位于内含子区域内,或无关基因的外显子区中。

[0146] 启动子可以被说成驱动其调节的核酸序列的表达或驱动其转录。短语“可操作地连接”、“操作性定位”、“操作性连接”,“在控制下”和“在转录控制下”指示启动子相对于其调节的核酸序列处于正确的功能位置和/或取向,以控制该序列的转录启动和/或表达。如本文所用,“反向启动子”是指核酸序列处于相反的取向,使得编码链现在成为非编码链的启动子,并且反之亦然。反向启动子序列可以在各种实施方案中用于调控开关的状态。另外,在各种实施方案中,启动子可以与增强子结合使用。

[0147] 启动子可以是与基因或序列天然结合的启动子,如可以通过分离位于编码区段上游的5'非编码序列和/或给定基因或序列的外显子来获得。此类启动子可以称为“内源性的”。类似地,在一些实施方案中,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于所述序列的下游或上游。

[0148] 在一些实施方案中,编码核酸区段定位在“重组启动子”或“异源启动子”的控制下,所述启动子均指在其天然环境中通常不与其可操作地连接的编码核酸序列关联的启动子。重组或异源增强子是指在天然环境中正常不与给定核酸序列关联的增强子。这样的启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子;从任何其他原核、病毒或真核细胞中分离的启动子或增强子;以及非“天然存在”的合成启动子或增强子,即包含不同转录调节区域的不同元件、和/或通过本领域已知的基因工程方法来改变表达的突变。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列之外,还可以结合本文公开的合成生物回路和模块,使用重组克隆和/或核酸扩增技术,包括PCR,来产生启动子序列(参见例如美国专利第4,683,202号、美国专利第5,928,906号,各自以引用的方式并入本文)。此外,预期也可以采用指导序列在例如线粒体、叶绿体等非核细胞器内的转录和/或表达的控制序列。

[0149] 如本文所述,“诱导型启动子”是特征在于当存在诱导物或诱导剂或受其影响或被其接触时,启动或增强转录活性的启动子。如本文所定义的“诱导物”或“诱导剂”可以是内源性的,或是以能够从诱导型启动子诱导转录活性的方式施用的通常外源性的化合物或蛋白质。在一些实施方案中,诱导物或诱导剂,即化学物质、化合物或蛋白质,本身可以是核酸序列转录或表达的结果(即诱导物可以是由另一组分或模块表达的诱导蛋白),转录或表达本身可以处于诱导型启动子的控制下。在一些实施方案中,诱导型启动子是在不存在某些剂、例如阻遏蛋白的情况下被诱导的。诱导型启动子的实例包括但不限于:四环素、金属硫

蛋白、蜕皮素、哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;以及小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列(MMTV-LTR))和其他类固醇响应性启动子、雷帕霉素响应性启动子等。

[0150] 本文可互换使用的术语“DNA调控序列”、“控制元件”和“调控元件”是指提供和/或调节非编码序列(例如靶向DNA的RNA)或编码序列(例如定点修饰多肽或Cas9/Csn1多肽)的转录和/或调节所编码多肽的翻译的转录和翻译控制序列,诸如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0151] 短语“可操作地连接”是指一种并接,其中如此描述的组件处于允许它们按其预定方式发挥作用的关系中。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子可操作地连接到所述编码序列。“表达盒”包括异源DNA序列,其可操作地连接到启动子或足以引导转基因在ceDNA载体中转录的其他调控序列。合适的启动子包括例如组织特异性启动子。启动子也可以是AAV起源的。

[0152] 如本文所用的术语“受试者”是指向其提供用本发明的ceDNA载体的治疗、包括预防性治疗的人类或动物。通常,动物是脊椎动物,例如但不限于灵长类动物、啮齿动物、家养动物或野生动物。灵长类动物包括但不限于黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养和野生动物包括但不限于:牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种如家猫、犬科物种如狗、狐狸、狼、禽类物种如鸡、鹌鹑、鸵鸟,以及鱼如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼。在本文所述方面的某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物或人。受试者可以是雄性或雌性。另外,受试者可以是婴儿或儿童。在一些实施方案中,受试者可以是新生儿或未出生的受试者,例如,受试者还在子宫内。优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人类、非人类灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。人类以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病和病症的动物模型的个体。另外,本文所述的方法和组合物可用于家养动物和/或宠物。人类受试者可以是任何年龄、性别、种族或人种群组,例如,高加索人(白人)、亚洲人、非洲人、黑人、非裔美国人、非裔欧洲人、西班牙人、中东人等。在一些实施方案中,受试者可以是临床环境中的患者或其他受试者。在一些实施方案中,受试者已在进行治疗。在一些实施方案中,受试者是胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在一些实施方案中,受试者是人类胎儿、人类新生儿、人类婴儿、人类儿童、人类青少年或人类成人。在一些实施方案中,受试者是动物胚胎,或非人类胚胎或非人类灵长类动物胚胎。在一些实施方案中,受试者是人胚胎。

[0153] 如本文所用,术语“宿主细胞”包括易于被本公开的核酸构建体或ceDNA表达载体转化、转染、转导等的任何细胞类型。作为非限制性实例,宿主细胞可以是分离的原代细胞、多能干细胞、CD34⁺细胞、诱导的多能干细胞或许多永生化细胞系(例如HepG2细胞)中的任何一种。可替代地,宿主细胞可以是组织、器官或生物体中的原位或体内细胞。

[0154] 术语“外源”是指存在于除天然来源外的细胞中的物质。当在本文中使用时,术语“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸(例如编码多肽的核酸)或多肽,通常在所述细胞或生物体中未发现所述核酸或多肽,并且希望将核酸或多肽引入此类细胞或生物体中。可替代地,“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸或多肽,在所述细胞或生物体中发现核酸或多肽的量相对较低,并且希望增加细胞或生物体中核酸或多肽的量,例如以产生异位表达或水平。与此相反,术语“内源”是指对于生物系统或细胞而言天然物质。

[0155] 术语“序列一致性”是指两个核苷酸序列之间的相关性。为了本公开的目的,使用在EMBOSS软件包的Needle程序(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,同上)、优选版本3.0.0或更高版本中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,见上文)确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性程度。使用的可选参数是空位开放罚分10,空位延伸罚分0.5和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替换矩阵。标记为“最长一致性”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作一致性百分比,并按以下计算:(相同的脱氧核糖核苷酸乘以100)/(比对长度-比对空位总数)。比对的长度优选为至少10个核苷酸、优选为至少25个核苷酸、更优选为至少50个核苷酸并且最优选为至少100个核苷酸。

[0156] 如本文所用,术语“同源性”或“同源”被定义为,在比对序列且必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比之后,与靶染色体上的相应序列中的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。出于确定核苷酸序列同源性百分比的比对可以用所属技术领域中的各种方式来实现,例如使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,当同源臂的例如核酸序列(例如DNA序列)与宿主细胞的相应原生或未经编辑的核酸序列(例如基因组序列)至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多一致时,所述序列被视为“同源”。

[0157] 如本文所用,术语“异源”意指分别在天然核酸或蛋白质中未发现的核苷酸或多肽序列。异源核酸序列可以与天然存在的核酸序列(或其变体)连接(例如通过基因工程)以产生编码嵌合多肽的嵌合核苷酸序列。异源核酸序列可以连接到变异多肽(例如通过基因工程)以产生编码融合变异多肽的核苷酸序列。

[0158] “载体”或“表达载体”是复制子,诸如质粒、杆粒、噬菌体、病毒、病毒体或粘粒,另一个DNA区段(即“插入物”)可与之连接以便实现所连接区段在细胞中的复制。载体可以是设计用于递送到宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用,载体在起源和/或最终形式上可以是病毒或非病毒的,但是出于本公开的目的,“载体”通常是指ceDNA载体,如本文所用。术语“载体”涵盖与适当的控制元件结合时能够复制并且可以将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。在一些实施方案中,载体可以是表达载体或重组载体。

[0159] 如本文所用,术语“表达载体”是指指导RNA或多肽从与载体上的转录调控序列连接的序列的表达的载体。表达的序列通常但不一定与细胞异源。表达载体可以包含其他元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其可以在两种生物体中维持,例如在人类细胞中进行表达,以及在原核宿主中进行克隆和扩增。术语“表达”是指涉及产生RNA和蛋白质以及适当时分泌蛋白质的细胞过程,在适用时包括但不限于例如转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过翻译从基因转录的mRNA所获得的多肽。术语“基因”意指当与适当的调控序列可操作地连接时在体外或在体内转录为RNA的核酸序列(DNA)。基因可以包括或不包括编码区前后的区域,例如5'非翻译(5'UTR)或“前导”序列和3'UTR或“尾区”序列,以及单个编码区段(外显子)之间的插

入序列(内含子)。

[0160] “重组载体”意指包括能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”的载体。应了解,在一些实施方案中,本文所述的载体可以与其他合适的组合物和疗法组合。在一些实施方案中,载体是游离型的。合适的游离型载体的使用提供了一种以高拷贝数的染色体外DNA维持受试者中的所关注核苷酸,从而消除染色体整合的潜在影响的方式。

[0161] 如本文所用的短语“遗传性疾病”是指部分或完全、直接或间接地由基因组中的一种或多种异常引起的疾病,尤其是从出生起出现的病状。异常可以是突变、插入或缺失。异常可能影响基因的编码序列或其调控序列。遗传疾病可以是(但不限于)DMD、血友病、囊肿性纤维化、亨廷顿氏舞蹈病、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊氏疾病(Wilson's disease)、先天性肝卟啉症(hepatic porphyria)、遗传性肝代谢病症、勒什尼汗综合症(Lesch Nyhan syndrome)、镰状细胞贫血、地中海贫血、着色性干皮病、范克尼氏贫血(Fanconi's anemia)、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁氏综合症、视网膜母细胞瘤,和泰伊-萨克斯二氏病(Tay-Sachs disease)。

[0162] 如本文所用,“抑制性多核苷酸”是指减少或阻止第二(靶标)多核苷酸的表达(转录或翻译)的DNA或RNA分子。抑制性多核苷酸包括反义多核苷酸、核酶和外部指导序列。术语“抑制性多核苷酸”还包括DNA和RNA分子,例如编码实际抑制性物质的RNAi,诸如编码核酶的DNA分子。

[0163] 如本文所用,关于RNAi分子(例如siRNA或miRNA)的活性的“基因沉默”或“沉默的基因”是指靶基因(例如NLRP3、AIM2或半胱天冬酶1 mRNA)在细胞中的mRNA水平降低了在不存在miRNA或RNA干扰分子的情况下在细胞中发现的mRNA水平的至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、约100%。在一个优选的实施方案中,mRNA水平降低了至少约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、约100%。

[0164] 如本文所用,术语“RNAi”是指任何类型的干扰RNA,包括但不限于 siRNAi、shRNAi、内源性微小RNA和人工微小RNA。例如,其包括先前鉴定为siRNA的序列,而与RNA的下游加工机制无关(即,尽管据信 siRNA具有导致mRNA切割的特定体内加工方法,但是可将此类序列并入在本文所述的侧翼序列的背景下的载体中)。术语“RNAi”可既包括基因沉默RNAi分子,又包括激活基因表达的RNAi效应子分子。仅举例来说,在一些实施方案中,用于抑制或基因沉默的RNAi试剂可用于本文公开的方法、试剂盒和组合物中,例如以抑制免疫应答(例如先天性免疫应答)。

[0165] 如本文所用,术语“包含(comprising/comprises)”在提及组合物、方法以及对所述方法或组合物来说必不可少的一种或所种其相应组分时使用,但对于包括未指明的要素,无论是否必要,仍然是开放的。

[0166] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需要的那些要素。所述术语允许存在不实质影响所述实施方案的一个或多个基本和新颖或功能性特征的要素。“包含”的使用表示包含而不是限制。

[0167] 术语“由……组成”是指如本文所描述的组合物、方法和其相应组分,其排除在所述实施方案的描述中未叙述的任何要素。

[0168] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需要的那些要素。该

术语允许存在不实质上影响本发明的那个实施方案的基本和新颖或功能特征的额外元件。

[0169] 如本说明书和所附权利要求书所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一种/一个(a/an)”和“所述”包括多个提及物。因此,举例来说,提到“方法”包括本文所述的和/或在阅读本公开等之后对于所属领域技术人员而言将变得显而易见的类型的一种或多种方法和/或步骤。类似地,除非上下文另有明确规定,否则词语“或”旨在包括“和”。尽管与本文所描述的方法和材料相似或等效的那些方法和材料可以用于实施或测试本公开,但在下文描述适合的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”源自于拉丁文 *exempli gratia*,并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义的。

[0170] 除了在操作例中或在另外指示的情况下,本文所使用的表示成分或反应条件的量的所有数字都应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。术语“约”在结合百分比使用时,可以意指 $\pm 1\%$ 。以下实施例进一步详细解释本发明,但本发明的范围不应限于此。

[0171] 本文公开的本发明的替代要素或实施方案的分组不应解释为限制。每个组成员可以单独提及和要求,或呈与该组的其他成员或此处找到的其他要素的任何组合提及和要求。出于方便和/或可专利性的原因,一个组中的一个或多个成员可以包括在一个组中或从中删除。当发生任何这样的包括或删除时,在本文中认为说明书含有修改的组,从而满足所附权利要求书中使用的所有马库什组(Markush group)的书面描述。

[0172] 在任何方面的一些实施方案中,本文描述的公开内容不涉及克隆人的方法、用于修饰人的种系遗传身份的方法、用于工业或商业目的的人胚胎的使用、或用于修饰动物的基因身份,可能导致其遭受痛苦而对人或动物没有任何实质性医学益处的方法,以及由这类方法产生的动物。

[0173] 本文在本发明的各个方面的描述内定义了其他术语。

[0174] II. 核酸

[0175] 核酸很大、具有高的电荷、被迅速降解并从体内清除,并且通常具有较差的药理学特性,因为它们被认为是机体的异物并成为免疫应答(例如先天性免疫应答)的靶标。因此,某些核酸(诸如治疗性核酸或用于研究目的的核酸(例如,反义寡核苷酸或病毒载体))通常可在体内触发免疫应答。本公开提供了药物组合物和方法,所述药物组合物和方法通过在受试者接受者中以降低的免疫应答状态最大化核酸耐久性而增加表达水平来改善、减少或消除此类免疫应答并增强核酸的功效。这也可最小化在基因疗法过程中可能导致器官损伤或其他毒性的任何潜在不良事件。本文提供的许多组合物和方法涉及将免疫应答(例如先天性免疫应答)的特定抑制剂与核酸(例如治疗性核酸或用于研究目的的核酸)组合施用,从而减少由核酸的存在触发的免疫应答(例如先天性免疫应答)。

[0176] 免疫原性/免疫刺激性核酸可包括脱氧核糖核酸和核糖核酸两者。对于脱氧核糖核酸(DNA),已经显示特定的序列或基序在哺乳动物中诱导免疫刺激。这些序列或基序包括但不限于CpG基序、富含嘧啶的序列和回文序列。脱氧核糖核酸中的CpG基序通常被内体 toll样受体9(TLR-9)识别,后者进而触发先天性免疫刺激途径和习得性免疫刺激途径。某些免疫刺激性核糖核酸(RNA)序列与 toll样受体6和7(TLR-6和TLR-7)结合,并被认为通过免疫应答(例如先天性免疫应答)激活促炎性反应。此外,双链RNA由于其与TLR-3结合而通常可起到免疫刺激作用。因此,外来核酸分子(无论是病原体来源的还是治疗性起源的)都

可以在体内具有高度免疫原性。

[0177] 本文提供了与免疫应答(例如先天性免疫应答)的拮抗剂结合用于潜在治疗用途的核酸分子的表征和开发。在一些实施方案中,在适当情况下描述了出于改变和改善的体内性质(递送、稳定性、寿命、折叠、靶标特异性)以及其与治疗应用直接相关的生物学功能和机制的目的对寡核苷酸进行化学修饰。

[0178] 可具有免疫刺激作用并需要使用本文公开的免疫抑制剂的本文公开的说明性治疗性核酸可包括但不限于:小基因、质粒、小环、小干扰RNA (siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(Msg)、核酶、闭合端双链DNA(例如,ceDNA、CELiD、线性共价闭合DNA(“辅助”)、狗骨头(dbDNATM)DNA、前端粒闭合端DNA或哑铃线性DNA)、切丁酶-底物RNA、双发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNS(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA和DNA病毒载体、病毒RNA载体以及其任何组合。

[0179] 本发明还预期可以通过称作RNA干扰(RNAi)的过程下调特定蛋白质的细胞内水平的siRNA或miRNA为核酸治疗剂。在将siRNA或miRNA引入宿主细胞的胞质中之后,这些双链RNA构建体可以结合到称为RISC的蛋白质。siRNA或miRNA的有义链通过RISC复合物去除。RISC复合物当与互补mRNA组合时,裂解mRNA并且释放切割的链。RNAi是通过诱导mRNA的特异性破坏而导致相应蛋白质的下调。

[0180] 抑制mRNA翻译到蛋白质中的反义寡核苷酸(ASO)和核酶可以是核酸治疗剂。对于反义构建体,这些单链脱氧核酸与目标蛋白mRNA的序列具有互补序列,并且沃森(Watson)能够通过克里克碱基配对(Crick base pairing)结合到mRNA。这一结合阻止目标mRNA的翻译,和/或触发mRNA转录物的RNaseH降解。因此,反义寡核苷酸具有增加的作用特异性(即,特定疾病相关蛋白的下调)。

[0181] 在本文所提供的任何方法中,治疗性核酸可以是治疗性RNA。治疗性RNA可以是mRNA翻译的抑制剂、RNA干扰的药剂(RNAi)、催化活性RNA分子(核酶)、转移RNA(tRNA)或结合mRNA转录物的RNA(ASO)、蛋白质或其他分子配体(适体)。在本文所提供的方法中的任一种中,RNAi的药剂可以是双链RNA、单链RNA、微RNA、短干扰RNA、短发夹RNA或三链形成寡核苷酸。

[0182] 根据一些实施方案,治疗性核酸是闭合端双链DNA,例如ceDNA。根据一些实施方案,治疗蛋白在细胞中的表达和/或产生来自非病毒DNA载体,例如ceDNA载体。用于表达治疗蛋白的ceDNA载体相对于传统AAV载体和甚至慢病毒载体的独特优势是,编码所期望蛋白质的异源核酸序列不存在大小约束。因此,甚至可从单个ceDNA载体中表达大的治疗蛋白。因此,ceDNA载体可用于在有需要的受试者中表达治疗蛋白。

[0183] 一般来说,如本文所公开的用于表达治疗蛋白的ceDNA载体在5'至3'方向上包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如,如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR。ITR序列选自以下中的任一者:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复序列(mod-ITR)(例如不对称的修饰ITR);(ii)两个经修饰的ITR,其中mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组织(例如不对称的修饰ITR);或(iii)对称或基本上对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织;或(iv)对称或基本上对称的修饰ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组织。

[0184] III.ceDNA载体

[0185] 根据一些方面,本公开提供了具有与雷帕霉素或雷帕霉素类似物结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)。在一些实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以过饱和的量存在于如WO 2016/073799中所述的合成纳米载剂中。在一些实施方案中,ceDNA载体也存在于同一个纳米载剂中。

[0186] 根据一些方面,本公开提供了与一种或多种TLR9拮抗剂结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA)。本文还提供了包含部分编码一种或多种TLR9抑制性寡核苷酸的序列的ceDNA构建体。

[0187] 根据一些方面,本公开提供了与一种或多种cGAS拮抗剂结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA)。本文还提供了包含部分编码一种或多种cGAS抑制性RNA或蛋白质的序列的ceDNA构建体。

[0188] 根据一些方面,本公开提供了与一种或多种炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA)。本文还提供了包含部分编码一种或多种炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)的序列的ceDNA构建体。

[0189] 正如将了解的那样,本文所述的ceDNA载体技术能够适于任何复杂程度或能够以模块化方式使用,其中免疫应答(例如,先天性免疫应答)的抑制剂(诸如本文所述的那些)的不同组分的表达例如能够以独立方式控制。例如,特别涵盖了本文设计的ceDNA载体技术可以像使用单个ceDNA载体表达单个异源基因序列(例如,免疫应答(例如,先天性免疫应答)的单一抑制剂,诸如本文所述的那些)一样简单,或者可以像使用多种ceDNA载体一样复杂,其中每种载体表达各自由不同启动子独立控制的多种免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂(诸如本文所述的那些)、或者编码一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂(诸如本文所述的那些)的核酸序列、以及例如相关辅助因子或辅助蛋白。

[0190] 在一个实施方案中,单个ceDNA载体可用于表达炎性小体拮抗剂的单一组分(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)。可替代地,单个ceDNA载体可用于表达多种组分(例如,至少2种),例如,其可以在单个启动子(例如强启动子)控制下表达NLRP3炎性小体途径的两种或更多种抑制剂、和/或AIM2炎性小体途径的两种或更多种抑制剂、和/或半胱天冬酶1的两种或更多种抑制剂、或其任何组合),任选地使用IRES序列以确保组分(例如辅助因子或辅助蛋白)中每一种的适当表达。

[0191] 在另一个实施方案中,本文还涵盖了包含至少两个插入物的单个 ceDNA载体,其中每个插入物的表达是在其自身启动子的控制下进行。启动子可以包括相同启动子的多个拷贝、多个不同启动子或其任意组合。正如本领域技术人员将了解的那样,常常期望以不同的表达水平表达多种炎性小体拮抗剂,从而控制所表达的单独组分的化学计量以确保在细胞中的有效表达以及(如果是蛋白质)蛋白质折叠及它们的组合。

[0192] 根据一些实施方案,通过从双链DNA分子中切除产生合成的ceDNA。ceDNA载体的合成产生描述于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122的实施例2-6中,所述国际申请以全文引用的方式并入本文中。使用合成方法产生ceDNA载体的一种示例性方法涉及

切除双链 DNA 分子。简单来说,使用双链DNA构建体可以产生ceDNA载体,参见例如PCT/US19/14122的图7A-图8E。在一些实施方案中,双链DNA 构建体是ceDNA质粒,例如参见例如2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US2018/064242的图6)。

[0193] 在一些实施方案中,制备ceDNA载体的构建体包含如本文所描述的调控开关。

[0194] 使用涉及组装不同寡核苷酸的合成方法产生ceDNA载体的另一种示例性方法提供于PCT/US19/14122的实施例3中,其中ceDNA载体是通过合成5' 寡核苷酸和3' ITR寡核苷酸并且将ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合来产生。PCT/US19/14122的图11B展示了将5' ITR寡核苷酸和3' ITR寡核苷酸与包含表达盒的双链多核苷酸接合的示例性方法。

[0195] 在PCT/US19/14122的实施例4中提供了使用合成方法产生ceDNA载体的示例性方法,并且其使用包含两个有义ITR的单链线性DNA,所述两个有义ITR位于有义表达盒序列侧翼并且共价连接到位于反义表达盒侧翼的两个反义ITR,然后将所述单链线性DNA的末端连接以形成闭合端单链分子。一个非限制性实例包含合成和/或产生单链DNA分子、使所述分子的各部分粘接以形成具有二级结构的一个或多个碱基对区域的单一线性DNA分子,然后使自由的5' 与3' 端彼此接合以形成封闭的单链分子。

[0196] 本领域的技术人员能够设想ceDNA载体技术的其他变化形式或能够使用常规载体通过蛋白质产生方法对其进行调适。

[0197] 可以在允许的宿主细胞中由表达构建体(例如,质粒、杆粒、杆状病毒或整合细胞系)(例如参见在2018年9月7日提交的国际专利申请 PCT/US18/49996中公开的实施例)或使用合成产品(例如参见在2018年 12月6日提交的国际专利申请PCT/US19/14122中公开的实施例)产生非病毒无衣壳DNA载体,所述专利申请中每一个以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中,可用于如本文所公开的方法和组合物中的 ceDNA载体包含异源核酸,例如定位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的转基因。在一些实施方案中,与野生型ITR序列(例如AAV ITR)相比,ITR中的至少一个通过缺失、插入和/或取代而被修饰;并且ITR中的至少一个包含功能性末端解离位点(TRS)和Rep结合位点。在一个实施方案中,至少一个ITR相对于相应的AAV ITR(例如,对于野生型 AAV2,例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:51)具有至少一个多核苷酸缺失、插入或取代,以在Rep蛋白的存在下诱导DNA载体在宿主细胞中的复制。如上文所讨论,可使用任何ITR。为了示例性目的,表1A中的 ceDNA构建体中的ITR是经修饰的ITR和WT ITR。然而,本文涵盖了 ceDNA载体含有位于两个反向末端重复(ITR)序列之间的异源核酸序列,其中所述ITR序列可以是不对称ITR对或者对称或基本上对称的ITR对,这些术语如本文所定义。如本文所公开的包含NLS的ceDNA载体可包含 ITR序列,其选自以下中的任一种:(i)至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复(mod-ITR)(例如不对称的修饰ITR);(ii)两个经修饰的ITR,其中所述mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组织(例如不对称的修饰ITR),或(iii)对称或基本上对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组织,或(iv)对称或基本上对称的修饰ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组织,其中本公开的方法还可包括递送系统,例如但不限于脂质体纳米颗粒递送系统。

[0198] 在一些实施方案中,本文所述的方法和组合物涉及如本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂与任何ceDNA载体共同施用的用途,所述ceDNA载体包括但不限于如在2018年9月7日提交的国际专利申请PCT/US18/49996中公开的(参见例如实施例1-4)

包含不对称ITR的ceDNA载体；如在2018年12月6日提交的国际专利申请 PCT/US18/64242 中公开的（参见例如实施例1-7）用于基因编辑的 ceDNA载体；或如在2019年2月14日提交的国际专利申请 PCT/US19/18016中公开的（参见例如实施例1-4）用于生产抗体或融合蛋白的ceDNA载体；或如在2019年2月22日提交的国际专利申请 PCT/US19/18927中公开的用于受控的转基因表达的ceDNA载体，所述专利申请中每一个以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中，还设想了使用如本文所公开的免疫应答（例如先天性免疫应答）抑制剂的本文所述的方法和组合物可以与合成生产的ceDNA载体（例如在无细胞或无昆虫的ceDNA生产系统中生产的ceDNA载体，如在2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122中所公开，所述国际申请以全文引用的方式并入本文）一起使用。

[0199] ceDNA载体优选地在分子（例如转基因）在至少一部分上是双螺旋或自身互补的。ceDNA载体具有共价闭合端，并且因此优选地对核酸外切酶消化（例如，Exo I或Exo III）例如在37°C下在一小时内有抗性。宿主细胞（例如昆虫细胞或哺乳动物细胞）中Rep蛋白的存在促进具有经修饰的ITR的ceDNA载体多核苷酸模板的复制，从而诱导产生具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体。共价闭合端分子通过复制继续在允许细胞中积累，并且优选地在标准复制条件下在Rep蛋白的存在下随时间推移足够稳定，例如以便以至少1pg/细胞、优选至少2pg/细胞、优选至少3 pg/细胞、更优选至少4pg/细胞、甚至更优选至少5pg/细胞的产率积累。

[0200] 特别地，在一个实施方案中，通过提供具有包含两个不同的ITR（例如，AAV ITR）的多核苷酸载体模板（例如，表达构建体）和位于ITR之间的所关注核苷酸序列（异源核酸、表达盒）的细胞（例如昆虫细胞或哺乳动物细胞，例如293细胞等）来提供DNA载体，其中所述ITR中的至少一个是相对于另一个ITR包含插入、取代或缺失的经修饰的ITR。本文所述的多核苷酸载体模板包含含有Rep结合位点（RBS；例如，对于 AAV2，5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'）和功能性末端解离位点（TRS；例如5'-AGTT）的至少一个功能性ITR。所述细胞不表达病毒衣壳蛋白，并且所述多核苷酸载体模板不含病毒衣壳编码序列。

[0201] 在Rep的存在下，具有至少一个经修饰的ITR的载体多核苷酸模板复制以产生ceDNA载体。ceDNA载体生产经历两个步骤：首先通过Rep蛋白从载体骨架（例如质粒、杆粒、基因组等）中切除（“拯救”）模板，并且其次Rep介导切除的载体基因组的复制。各种AAV血清型的Rep蛋白和Rep结合位点是本领域技术人员熟知的。本领域技术人员理解从结合并复制功能性ITR的血清型中选择Rep蛋白。

[0202] 具有载体多核苷酸的细胞要么已经含有Rep（例如具有诱导型rep的细胞系），要么被含有Rep的载体转导并且然后在允许ceDNA载体复制和释放的条件下生长。然后从细胞中收获和分离ceDNA载体DNA。非病毒无衣壳DNA ceDNA载体的存在可通过如下方式进行确认：使用在DNA载体上具有单个识别位点的限制酶对从细胞中分离的载体DNA进行消化，并且在非变性凝胶上分析消化的DNA物质以便与线性和非连续DNA相比确认线性且连续DNA的特征性条带的存在。例如，图6是证实使用实施例中所描述的用于生产这些载体的一个实施方案由多种TTX质粒构建体生产ceDNA载体的凝胶图。如关于图4D所论述，通过凝胶中的特征性条带图案来确认ceDNA载体。图5A和图5B是示出了用于鉴定通过本文的方法生产的闭合端ceDNA载体的存在的一个实施方案的图。

[0203] 可使用本领域技术人员熟知的任何手段（包括但不限于转染（例如磷酸钙、纳米颗

粒或脂质体) 或者通过病毒载体(例如HSV或杆状病毒) 引入来将载体多核苷酸表达模板(例如, TTX-质粒、杆粒等) 和/或ii) 编码Rep的多核苷酸引入细胞中。例如, 用于产生本发明的ceDNA载体的载体多核苷酸表达构建体模板可以是质粒(例如, TTX-质粒, 参见例如图4B)、杆粒(例如, TTX-杆粒)、和/或杆状病毒(例如, TTX-杆状病毒)。在一个实施方案中, TTX-质粒包含可操作地定位在ITR之间的限制性克隆位点(例如SEQ ID NO:7), 其中异源核酸(例如包含报告基因或治疗性核酸的表达盒) 可以被插入。

[0204] 在一个优选的实施方案中, 用于制备本文所述的ceDNA载体的宿主细胞是昆虫细胞。在另一个优选的实施方案中, 杆状病毒用于递送编码 Rep蛋白的多核苷酸和用于ceDNA载体的非病毒DNA载体多核苷酸表达构建体模板。用于获得和分离ceDNA载体的此类方法的实例在图1-图33 中有描述。

[0205] 在又一个方面, 本发明提供了将本文所述的DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板) 稳定地整合至其自身基因组中用于生产非病毒 DNA载体的宿主细胞系。在Lee, L. 等人(2013) Plos One 8 (8) :e69879(其以全文引用的方式并入本文) 中描述了用于生产此类细胞系的方法。优选地, 以3的MOI将Rep蛋白(例如, 如实施例1中所述) 添加至宿主细胞中。在一个实施方案中, 宿主细胞系是无脊椎动物细胞系, 优选昆虫 Sf9细胞。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系、优选293细胞时, 所述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板, 并且可以使用第二载体(诸如疱疹病毒) 将Rep蛋白引入细胞中, 从而允许在Rep的存在下切除和扩增ceDNA。

[0206] 优选地, ceDNA包含含有Rep结合位点(RBS; 对于AAV2, 5'- GCGCGCTCGCTCGCTC-3', SEQ ID NO:39) 和末端解离位点(TRS; 5'- AGTT) 的一个或多个功能性ITR多核苷酸序列。

[0207] 可从表达构建体(例如, TTX-质粒、TTX-杆粒、TTX-杆状病毒) 生产无衣壳ceDNA载体, 所述表达构建体还包括顺式调控元件诸如WHP 转录后调控元件(WPRE) 和BGH聚A的特定组合。适用于表达构建体中的表达盒不受病毒衣壳强加的包装约束的限制。本公开的表达盒包括能够影响总体表达水平以及细胞特异性的启动子。为了转基因表达, 其可以包括高度活性的病毒来源的即刻早期启动子。表达盒可以含有组织特异性的真核启动子, 以将转基因表达限制在特定细胞类型并减少由不受调控的异常表达引起的毒性效应和免疫应答。在一些实施方案中, 表达盒可以含有合成调控元件, 诸如CAG启动子(SEQ ID NO:3)。CAG启动子包含 (i) 巨细胞病毒(CMV) 早期增强子元件(例如, SEQ ID NO:309), (ii) 鸡β肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子, 以及(iii) 兔β珠蛋白基因的剪接受体。可替代地, 例如表达盒可以含有α1-抗胰蛋白酶(AAT) 启动子(例如, SEQ ID NO:4)、肝特异性(LP1) 启动子(例如, SEQ ID NO:5)、或HAAT启动子(例如, SEQ ID NO:135) 或人延伸因子-1α(EF1-α) 启动子(SEQ ID NO:6) 或EF1-α片段(SEQ ID NO: 66) 或MND启动子(SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中, 表达盒包含一个或多个组成型启动子, 例如逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(RSV) LTR 启动子(任选地具有RSV增强子)、或巨细胞病毒(CMV) 即刻早期启动子(任选地具有CMV增强子) 等。可替代地, 可以使用诱导型启动子、转基因的天然启动子、组织特异性启动子或所属领域已知的各种启动子。在一个实施方案中, 在表达盒中使用基因编码序列的内源或天然启动子。

[0208] 使用ceDNA载体进行诱导型基因编辑可以使用例如在以下文献中所述的方法来进行: Dow等人Nat Biotechnol 33:390-394(2015); Zetsche等人Nat Biotechnol 33:139-42

(2015);Davis等人*Nat Chem Biol* 11:316-318 (2015);Polstein等人*Nat Chem Biol* 11:198-200 (2015);和/或Kawano等人*Nat Commun* 6:6256 (2015),所述文献中每一个的内容以全文引用的方式并入本文。表达盒还可以包含转录后元件,特别是土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)(SEQ ID NO:72),以增加转基因的表达。可以使用其他转录后处理元件,诸如来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因或乙型肝炎病毒(HBV)的转录后元件。表达盒可以包含所属领域中已知的聚腺苷酸化序列或其变异体(诸如从牛BGHpA或病毒SV40pA(例如,SEQ ID NO:10)中分离的天然存在的序列)或合成序列。一些表达盒还可以包括SV40晚期聚A信号上游增强子(USE)序列。USE可以与SV40pA或异源聚A信号组合使用。

[0209] 可以选择和优化从细胞中收获和收集本文所述的DNA载体的时间,以实现DNA载体的高产率生产。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等来选择收获时间。通常,可以在杆状病毒感染后足以生产DNA载体(例如TTX-载体)的时间之后、但在大多数细胞开始因病毒毒性而死亡之前收获细胞。可以例如使用质粒纯化试剂盒诸如Qiagen Endo-Free™ Plasmid试剂盒分离DNA载体。开发用于质粒分离的其他方法也可适用于DNA载体。通常,可以采用本领域已知的任何核酸纯化方法。

[0210] 调控序列和效应子

[0211] 在实施方案中,ceDNA载体除了包含编码治疗蛋白的一个或多个核苷酸序列外还包含第二核苷酸序列(例如,调控序列)。在实施方案中,基因调控序列与编码治疗蛋白的核苷酸序列可操作地连接。在实施方案中,调控序列适合用于控制治疗蛋白在宿主细胞中的表达。在实施方案中,调控序列包括合适的启动子序列,其能够指导与启动子序列可操作地连接的基因(诸如编码本公开的治疗蛋白的核苷酸序列)的转录。在实施方案中,第二核苷酸序列包含与编码治疗蛋白的核苷酸序列的5'末端连接的内含子序列。在实施方案中,在启动子的上游提供增强子序列,以增加启动子的功效。在实施方案中,调控序列包括增强子和启动子,其中所述第二核苷酸序列包含在编码治疗蛋白的核苷酸序列上游的内含子序列,其中所述内含子包含一个或多个核酸酶切割位点,并且其所述启动子与编码所述核酸酶的核苷酸序列可操作地连接。在实施方案中,所使用的调控序列对于载体中的编码序列而言是天然的。

[0212] 启动子:合适的启动子(包括上文所述的那些启动子)可以源自于病毒并且因此可以被称为病毒启动子,或者它们可以源自于任何生物体,包括原核或真核生物体。适合的启动子可以用于通过任何RNA聚合酶(例如pol I、pol II、pol III)来驱动表达。示例性启动子包括但不限于:SV40早期启动子;小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列(LTR)启动子;腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP);单纯疱疹病毒(HSV)启动子;巨细胞病毒(CMV)启动子,诸如CMV即刻早期启动子区域(CMVIE);劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子;人U6小核启动子(U6,例如SEQ ID NO:18(Miyagishi等人,*Nature Biotechnology* 20,497-500(2002)));增强的U6启动子(例如,Xia等人,*Nucleic Acids Res.*2003年9月1日;31(17))、人H1启动子(H1)(例如SEQ ID NO:19)、CAG启动子、人 α 1-抗胰蛋白酶(HAAT)启动子(例如SEQ ID NO:135)等等。在实施方案中,这些启动子在其下游内含子的末端处被更改以包括一个或多个核酸酶裂解位点。在实施方案中,含有一个或多个核酸酶裂解位点的DNA与启动子DNA是无关系的。

[0213] 启动子可以包含一个或多个特异性转录调控序列以进一步增强表达和/或更改其空间表达和/或时间表达。启动子还可以包含末端增强子或阻遏子元件,其可以位于来自

转录起始位点的多达几千个碱基对。启动子可以来源于包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。启动子可以相对于发生表达的细胞、组织或器官或相对于发生表达的发育阶段,或响应于外部刺激(如生理学压力、病原体、金属离子或诱发剂)组成性或有差异地调控基因组分的表达。启动子的代表性实例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、lac操纵子-启动子、tac启动子、SV40晚期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV40晚期启动子和CMV IE启动子,以及下文所列的启动子。此类启动子和/或增强子可以用于表达任何所关注的基因,例如基因编辑分子、供体序列、治疗蛋白等)。举例来说,载体可以包含可操作地连接到编码治疗蛋白的核酸序列的启动子。可操作地连接到编码序列的治疗蛋白的启动子可以是来自猴病毒40(SV40)的启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人类免疫缺陷病毒(HIV)启动子(如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复(LTR)启动子)、莫洛尼病毒(Moloney virus)启动子、禽白血病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(如CMV即刻早期启动子)、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus; EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子。启动子还可以是来自人类基因的启动子,例如人类泛素C(hUbC)、人类肌动蛋白、人类肌凝蛋白、人类血红素、人类肌肉肌酸或人类金属硫蛋白。启动子还可以是组织特异性启动子,例如肝脏特异性启动子,例如天然或合成的人 α 1-抗胰蛋白酶(HAAT)。在一个实施方案中,使用内源性ApoE、经由存在于肝细胞表面上的低密度脂蛋白(LDL)受体将包含ceDNA载体的组合物特异性地靶向肝细胞,可以实现向肝脏的递送。

[0214] 在一个实施方案中,所用的启动子是编码治疗蛋白的基因的天然启动子。编码治疗蛋白的相应基因的启动子和其他调控序列是已知的并且已被表征。所用的启动子区域还可包括一个或多个另外的调控序列(例如,天然的),例如增强子。

[0215] 适合根据本发明使用的启动子的非限制性实例包括:CAG启动子(例如SEQ ID NO:3)、HAAT启动子(SEQ ID NO:135)、人EF1- α 启动子(SEQ ID NO:6)或EF1- α 启动子的片段(SEQ ID NO:66)和大鼠EF1- α 启动子(SEQ ID NO:310)。

[0216] 增强子:在一些实施方案中,表达炎性小体拮抗剂(例如,NLRP3和/或AIM2炎性小体途径中的一者或多者的抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂)的ceDNA包含一个或多个增强子。在一些实施方案中,增强子序列位于启动子序列的5'。在一些实施方案中,增强子序列位于启动子序列的3'。在本文表1中列出了示例性增强子。

[0217] 表1. 示例性增强子序列

[0218] 描述	长度	组织特异性	CG含量	序列

[0219]

巨细胞病毒增强子	518	组成型	22	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTC CAATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTT ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC CATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATG GCGCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT AAAGTGGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC CAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACT TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT TACCATGG
人载脂蛋白 E/C-I 肝脏特异性增强子	777	肝脏	13	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCCTGC CCCCTCCAACCCCTCAGTCCCATCCTCCAGCAGCTGTT TGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAG CCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAG CAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCAT GCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTCCGGT GGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGT GTGAGAGGGTCCGGGTTCAAACCACTTGTCTGGGTGGGG AGTCGTCAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAGCTG TTTCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCAT CTGATAGGGTTTTTTGTGGCAAATAAACATTTGGTTTTTTT GTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTGAGATGGAGTTTGTCTCTG TCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCAC CACAACCTTCCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGA TTACAAGCATGTGCCACCACACCTGGCTAATTTTCTATTT TTAGTAGAGACGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTCAGC CTCCCAAGTAACCTGGGATTACAGGCCTGTGCCACCACAC CCGGCTAATTTTTTCTATTTTTGACAGGGACGGGTTTCA CCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCG
不含 CpG 的鼠类 CMV 增强子	427	组成型	0	GAGTCAATGGGAAAAACCCATTGGAGCCAAGTACACTG ACTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCAGTACAT AAGGTCAATAGGGGGTGAGTCAACAGGAAAGTCCCATT GGAGCCAAGTACATTGAGTCAATAGGGACTTTCCAATGG GTTTTGGCCAGTACATAAGGTCAATGGGAGGTAAGCCAA TGGGTTTTTCCCATTACTGACATGTATACTGATCATAG GGACTTTCCAATGGGTTTTGCCCAGTACATAAGGTCAAT AGGGGTGAATCAACAGGAAAGTCCCATTGGAGCCAAGT AACTGAGTCAATAGGGACTTTCCATTGGGTTTTGCCCA GTACAAAAGTCAATAGGGGGTGAGTCAATGGGTTTTTC CATTATTGGCACATAACATAAGGTCAATAGGGGTGACTA CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCC AGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGC GTGGTA
HS-CRM8 SERP 增强子	83	肝脏	4	CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCC AGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACACGC GTGGTA
人载脂蛋白 E/C-I 肝脏特异性增强子	777	肝脏	12	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCCCTGC CCCCTCCAACCCCTCAGTCCCATCCTCCAGCAGCTGTT TGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAG CCTACTCATGTCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAG CAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCAT GCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTCCGGT GGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGT GTGAGAGGGTCCGGGTTCAAACCACTTGTCTGGGTGGGG AGTCGTCAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAGCCTG

[0220]

				TTTCCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCAT CTGATAGGGTTTTTGTGGCAAATAAACATTTGGTTTTTTT GTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTGAGATGGAGTTTGCTCTG TCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCAC CACAACCTTCCCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGA TTACAAGCATGTGCCACCACACCTGGCTAATTTTCTATTT TTAGTAGAGACGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGCCTCAGC CTCCCAAGTAACCTGGGATTACAGGCCTGTGCCACCACAC CCGGCTAATTTTTTCTATTTTGGACAGGGACGGGTTTCA CCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTAAGT
34 bp APOe/c-1 增强子和 32 bp AAT X-区域	66	肝脏	1	GTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGGACAC AGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGG
绝缘序列和 hAPO- HCR 增强 子	212	肝脏	4	GGAGGGGTGGAGTCGTGACCCCTAAAAATGGGCAAACAT TGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCT GCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCT GGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGA ATTTCCGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTT TAGGTAGTGTGAGAGGGG
源自 SPK9001 的 hAPO- HCR 增强 子	330	肝脏	4	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCTGC CCCCTCCAACCCCTCAGTCCCATCCTCCAGCAGCTGTT TGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAG CCTACTCATGTCCCTAAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAG CAAACAGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTT GGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCAT GCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGAATTTCCGT GGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGT GTGAGAGGGGTACCCGGG
hAPO- HCR 增强 子	194	肝脏	3	CCCTAAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAA ACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGG CAGAGGCTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCAA CATCCACTCGACCCCTTGAATTTTCCGTGGAGAGGAG CAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTAGGTAGTGTGAGAGGG
SV40 增强 子 Invivogen	240	组成型	0	GGGCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGT ACCTTCTGAGGCTGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGT CAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACC AGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAG TATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGT CCCATA
去除了所有 间隔子/切割 位点的 HS-CRM8 SERP 增强 子	73	肝脏	2	CGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCC AGTTATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCAC
α mic/bik 增强子	100	肝脏	0	AGGTAAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAGTCCAAGTGGCC CTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGTCTGGTTAATAA TCTCAGGAGCACAAACATTCC
无 CpG 的 人 CMV 增 强子 v2	296	组成型	0	GTTACATAACTTATGGTAAATGGCCTGCCTGGCTGACTG CCCAATGACCCCTGCCCAATGATGTCAATAATGATGTAT GTTCCCATGTAATGCCAATAGGGACTTCCATTGATGTC AATGGGTGGAGTATTATGGTAACTGCCCACTTGGCAGT ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTATGCCCCCTATTGA TGTCAATGATGGTAAATGGCCTGCCTGGCATTATGCCCA GTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATC

				TATGTATTAGTCATTGCTATTA	
[0221]	SV40 增强子	235	组成型	1	GGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTA CCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTC AGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCA GAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGT ATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTC CC

[0222] 5'UTR序列和内含子序列:在一些实施方案中,ceDNA载体包含5' UTR序列和/或位于5' ITR序列的3'的内含子序列。在一些实施方案中,5' UTR位于转基因(例如,编码炎性小体拮抗剂(例如,NLRP3和/或 AIM2炎性小体途径中的一者或多者的抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂)的序列)的5'。表2A中列出了示例性5'UTR序列。

[0223] 表2A:示例性5'UTR序列和内含子序列

[0224]

描述	长度	参考文献	CG含量	序列
由鸡 B-肌动蛋白 5' UTR/内含子和兔 B-珠蛋白内含子和第一外显子构成的合成 5' UTR 元件	1127		137	GGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGA AAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGG GGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTG TGCGTGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCC GCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGCT TTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGG CCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGC GAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGTGTGTGCGT GGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCC GGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTT GCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGCTCCGT ACGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGG GGGGTGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGG GGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGG CGCGGCGGCCCGGAGCGCCGCGGCTGTCGAGG CGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATC GTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAAT CTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGA CCCCCTTAGCGGGCGGGGGCGAAGCGGTGCGGC GCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTCG TGCGTCGCGCGCCGCGCTCCCTTCTCCCTCCAG CCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGCTGCCTTCGG GGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTGCGCTTCTGGCG TGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGTAACCATGT TTTAGCCTTCTTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAAC GTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATATTGTGACAG AATTCCTCGAAGATCCGAAGGGGTTCAAGCTTGGCA TTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCA
经修饰的 SV40 内含子	93		0	CTTAAGGTAATAATAAAATTTTAAGTGATAATG TGTTAAACTACTGATTCTAATTGTTTCTCTCTTTAG ATTCCAACCTTTGGAAGTGA
正好位于 ORF 上游的 hAAT 的 5' UTR (3' CGGA 可能是间隔子/限制酶切割位点, 并且被吸收到序列中)	54		1	GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACC TGGGACAGTGAATCCGGA
CET 启动子组合成内含子	173		0	CTGCCTTCTCCCTCCTGTGAGTTTGGTAAGTCACTGA CTGTCTATGCCTGGGAAAGGTGGGCAGGAGATGG GGCAGTGCAGGAAAAGTGGCACTATGAACCCTGCA GCCCTAGACAATTGTAATAACCTTCTCTTTCCCTC TCCTGACAGGTTGGGTACAGTAGCTTCC
小鼠微小病毒 (MVM) 内含子	91		0	AAGAGGTAAGGGTTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGG GGTATTAATGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGA AATCACTTTTTTTCAGGTTG
hAAT 的 5' UTR	54		0	GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACC TGGGACAGTGAATAATTA
与 modSV40 内含子组合的	147		1	GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACC TGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAATAATAA

[0225]

hAAT 的 5' UTR				AATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCT AATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAC TGA
与 modSV40 内 含子组合的 hAAT 的 5' UTR (3' TAATTA 可能是间隔子/ 限制酶切割位 点, 并且被吸收 到序列中)	147		0	GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACC TGGGACAGTGAATAATTACTCTAAGGTAAATATAAA ATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCTA ATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAC TGA
源自 BMN270 的 AAT 的 5' UTR 的 42bp - 包括 Kozak	48	https://w ww.ncbi. nlm.nih. gov/pub med/292 92164	1	TCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAG TGAATCGCCACC
来自 EF1- α 的内 含子/增强子	128	US2017/ 0216408	6	GCTAGCAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGC CTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTGCGTGCCTTG AATTACTGACACTGACATCCACTTTTTCTTTTTCTCC ACAGGTTTAAACGCCACC
源自 Sangamo CRMSBS2-内含 子 3 的合成 SBR 内含子 - 包括 kozak	98	WO2017 074526	2	AAGAGGTAAGGGTTTAAAGTTATCGTTAGTTTCGTGCA CCATTAATGTTTAAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAA ATCATTTTTTTTCAGGTTGGCTAGT
内源性 hFVIII 5' UTR	172	NG_011 403.1	0	GCTTAGTGCTGAGCACATCCAGTGGGTAAAGTTCCT TAAAATGCTCTGCAAAGAAATTGGGACTTTTTCATTA AATCAGAAATTTACTTTTTTCCCCTCTGGGAGCTA AAGATATTTTAGAGAAGAATTAACCTTTTGCTTCTC CAGTTGAACATTTGTAGCAATAAGTCA
hAAT 5' UTR + modSV40 + kozak	160	http://w ww.bloo djournal. org/cont ent/early /2005/12 /01/bloo d-2005- 10- 4035?ss o- checked =true	1	GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACC TGGGACAGTGAATCCGGACTCTAAGGTAAATATAA AATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCT AATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAAC TGAATTCTAGACCACC
hFIX 5' UTR 和 Kozak	29	US2016 0375110	0	ACCACTTTCACAATCTGCTAGCAAAGGTT
嵌合内含子	133	U47119. 2	2	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGA CCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGAC TCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGA CATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG
人 α 1 抗胰蛋白 酶 (AAT) 5' UTR 的大片段	341		9	TGGGCAGGAACTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCA CTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCTGAGCTG AACCAAGAAGGAGGAGGGGGTTCGGCCTCCGAGGA AGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGGTT GGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTCAGGCCA CTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTGAGG AGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGCCTCCCCCGTTG

[0226]

				CCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGAC AGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTG ACCTGGGACAGTGAATCGACA
5pUTR	316	US9644 216	6	TCTAGAGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTT AAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAG TCTCGAACTTAAGCTGCAGTGACTCTTAAAGGTAG CCTTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTA AGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCA ATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCT TGCGTTTCTGATAGGCACCTATGGTCTTACTGACAT CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAG TTCAATTACAGCTCTTAAAGGCCCTGCAG
人 cDNA ABCB4 5pUTR (变异 A, 主要的 同种型)	76	NM_000 443	8	CAAAGTCCAGGCCCTCTGCTGCAGCGCCCGCGCGT CCAGAGGCCCTGCCAGACACGCGGAGGTTGAGG CTGAG
人 cDNA ABCB11 5pUTR	127	NM_003 742	2	AGAATGATGAAAACCGAGGTTGAAAAGGTTGTGA AACCTTTTAACTCTCCACAGTGGAGTCCATTATTTCC TCTGGCTTCTCAAATTCATATTCACAGGGTCGTTG GCTGTGGGTTGCAATTACC
人 G6P 酶 5pUTR	80	NM_000 151.3	0	ATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCCTGGAATAACT GCAAGGGCTCTGCTGACATCTTCTGAGGTGCCAAG GAAATGAGG
源自 rAAVrh74.MC K GALGT2 的 MCK 5pUTR。 含有 53bp 的内 源性小鼠 MCK 外显子 1 (未翻 译)、SV40 晚 期 16S/19S 剪接 信号、源自质粒 pCMVB 的 5pUTR。	208	https://p atentima ges.stora ge.googl eapis.co m/4f/8a/ d6/b915 c650f5ee b5/WO2 0170490 31A1.pd f	8	GGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACT CAGGAGCCAGCCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTG TCTTTTATTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGA AATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTA CTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTA AAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGCG
无 CpG 的 5' UTR 合成 (SI 126) 内含子	159		0	AAGCTTCTGCCTTCTCCCTCCTGTGAGTTTGGTAAGT CACTGACTGTCTATGCCTGGGAAAGGGTGGGCAGG AGATGGGGCAGTGCAGGAAAAGTGGCACTATGAAC CCTGCAGCCCTAGACAATTGTAACCTTCTTCTCT TTCTCTCCTGACAG
人细胞色素 b- 245α 链 (CYBA) 基因 的 5'UTR	36	(NM_0 00101.4)	5	CGCGCCTAGCAGTGTCCCAGCCGGGTTGTTGTCGCC
人 2,4-二烯酰辅 酶 A 还原酶 1 (DECRI) 基 因的 5'UTR	141	(NM_0 0133057 5.1)	14	ACGCCGCTGGGTCCCAGTCCCGTCCCATCCCCCG GCGGCCTAGGCAGCGTTTCCAGCCCCGAGAACTTTG TTCTTTTGTCCCGCCCCCTGCGCCCAACCGCCTGCG CCGCTTCCGGCCCCGAGTTCTGGAGACTCAAC
人胶质成熟因子 γ (GMFG) 基 因的 5'UTR	110	(NM_0 0130100 8.1)	4	GTTGGATGAAACCTTCTCCTACTGCACAGCCCCGCC CCCCTACAGCCCCGGTCCCCACGCCTAGAAGACAGC GGAACTAAGAAAAGAAGAGGCCTGTGGACAGAACA ATC
人晚期内体/溶 酶体衔接子、 MAPK 和	164	(NM_0 0114526	13	GGTGGGGCGGGGTTGAGTCGGAACCACAATAGCCA GGCGAAGAACTACAACCTCCAGGGCGTCCCGGAG CAGGCCAACGGGACTACGGGAAGCAGCGGGCAGCG

[0227]	MTOR 活化因子 2 (LAMTOR2) 的 5' UTR		4.1)		GCCCCGCGGAGGCACCTCGGAGATCTGGGTGCAAAAGCCCCAGGGTTAGGAACCGTAGGC
	人肌球蛋白轻链 6B (MYL6B) 的 5' UTR	127	(NM_002475.4)	8	GGCCACCGGAATTAACCCTTCAGGGCTGGGGGCCGCGCTATGCCCCGCCCCCTCCCCAGCCCCAGACACGGACCCCCGAGGAGATGGGTGCCCCATCCGCACACTGTCCTTTGGCCACCGGACATC
	人 α1 抗胰蛋白酶 (AAT) 5' UTR 的大片段	341		9	TGGGCAGGAACTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCTGAGCTGAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGGTTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTGAGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATTCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGACA

[0228] 3'UTR序列: 在一些实施方案中, ceDNA载体包含位于3' ITR序列的5'的3'UTR序列。在一些实施方案中, 3'UTR位于转基因 (例如, 编码炎性小体拮抗剂 (例如, NLRP3和/或AIM2炎性小体途径中的一者或多者的抑制剂、或胱天蛋白酶1抑制剂) 的序列) 的3'。表2B中列出了示例性3'UTR序列。

[0229] 表2B: 示例性3'UTR序列和内含子序列

描述	长度	参考文献	CG含量	序列
[0230] WHP 转录后反应元件	581		20	GAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC
mir-142 结合位点的三联体重复	77		1	TCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAAGTAGGAAACACTACA
源自 SPK9001 的 hFIX 3' UTR 和聚 A	88	US2016/0375110	0	TGAAAGATGGATTTCCAAGGTTAATTCATTGGAATTGAAAATTAACAGAGATCTAGAGCTGAATTCCTGCAGCCAGGGGGATCAGCCT

[0231]

间隔子				
人血红蛋白 β (HBB) 3pUTR	395		1	TAAAATACAGCATAGCAAAACTTTAACCTCCAAATCAAGC CTCTACTTGAATCCTTTTCTGAGGGATGAATAAGGCATAG GCATCAGGGGCTGTTGCCAATGTGCATTAGCTGTTTGCAG CCTCACCTTCTTTTCATGGAGTTAAGATATAGTGTATTTTC CCAAGGTTTGAAGTAGCTCTTCATTTCTTTATGTTTTAAAT GCACTGACCTCCCACATTCCCTTTTTAGTAAAATATTCAGA AATAATTTAAATACATCATTGCAATGAAAATAAATGTTTTT TATTAGGCAGAATCCAGATGCTCAAGGCCCTCATAATAT CCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAGGGAACAAAGGAACCT TTAATAGAAATTGGACAGCAAGAAAGCGAGC
干扰素 β S/MAR (支架/基质相关区域)	800		0	AGTCAATATGTTTCACCCCAAAAAAGCTGTTTGTAACTTGC CAACCTCATTCTAAAATGTATATAGAAGCCCAAAAGACAA TAACA AAAATATTCTTGTAGAACAAAATGGGAAAGAATGT TCCACTAAAATATCAAGATTTAGAGCAAAGCATGAGATGTG TGGGGATAGACAGTGAGGCTGATAAAATAGAGTAGAGCT CAGAAACAGACCCATTGATATATGTAAGTGACCTATGAAA AAAATATGGCATTTTACAATGGGAAAATGATGGTCTTTTTT TTTTTTAGAAAAACAGGGAATATATTTATATGTA AAAA TAAAAGGGAACCCATATGTCATACCATACACACAAAAAAA TTCCAGTGAATTATAAGTCTAAATGGAGAAGGCCAAAATCT TAAATCTTTTAGAAAATAATATAGAAGCATGCCATCAAGA CTTCAGTGTAGAGAAAAATTTCTTATGACTCAAAGTCCTA ACCACAAAGAAAAGATTGTTAATTAGATTGCATGAATATT AAGACTTATTTTTAAAATTA AAAAACCATTAAGAAAAGTC AGGCCATAGAATGACAGAAAATATTTGCAACACCCCGTA AAGAGAATTGTAATATGCAGATTATAAAAAGAAAGTCTTAC AAATCAGTAAAAAATAAACTAGACAAAAATTTGAACAG ATGAAAGAGAAACTCTAAATAATCATTACACATGAGAAAC TCAATCTCAGAAATCAGAGAACTATCATTGCATATACACT AAATTAGAGAAATATTA AAAAGGCTAAGTAACATCTGTGGC
β-球蛋白 MAR (基质相关区域)	407		0	AATTATCTCTAAGGCATGTGAACTGGCTGTCTTGGTTTTCA TCTGTACTTTCATCTGCTACCTCTGTGACCTGAAACATATTT ATAATTCCATTAAGCTGTGCATATGATAGATTTATCATATG TATTTTCCTTAAAGGATTTTTGTAAGAACTAATTGAATTGA TACCTGTA AAGTCTTTATCACACTACCCAATAAAAATAATA ATCTCTTTGTTTCAGCTCTCTGTTTCTATAAAATATGTACCAGT TTTATTGTTTTTAGTGGTAGTGATTTTATTCTCTTTCTAT ATATACACACACATGTGTGCATTATAAAATATATAAATTT TTATGAATAAAAATTATTAGCAATCAATATTGAAAACCA CTGATTTTTGTTTATGTGAGCAAACAGCAGATTA AAAAG
人白蛋白 3' UTR 序列	186		1	CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAG AGAAAGAAAATGAAGATCAAAAAGCTTATTCATCTGTTTTT CTTTTTCGTTGGTGTA AAGCCAACACCCTGTCTAAAAACA TAAATTTCTTTAATCATTTTGCTCTTTTCTCTGTGCTTCAA TTAATAAAAAATGGAAAGAATCT
CpG 最小化的 HBB 3pUTR	395		0	TAAAATACAGCATAGCAAAACTTTAACCTCCAAATCAAGC CTCTACTTGAATCCTTTTCTGAGGGATGAATAAGGCATAG GCATCAGGGGCTGTTGCCAATGTGCATTAGCTGTTTGCAG CCTCACCTTCTTTTCATGGAGTTAAGATATAGTGTATTTTC CCAAGGTTTGAAGTAGCTCTTCATTTCTTTATGTTTTAAAT GCACTGACCTCCCACATTCCCTTTTTAGTAAAATATTCAGA AATAATTTAAATACATCATTGCAATGAAAATAAATGTTTTT TATTAGGCAGAATCCAGATGCTCAAGGCCCTCATAATAT CCCCAGTTTAGTAGTTGGACTTAGGGAACAAAGGAACCT TTAATAGAAATTGGACAGCAAGAAAGCCAGC

WHP 转录后反应元件。缺少 3' 胞嘧啶。	580		20	GAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTACTAGTTCAGGTGTATTGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGT
人细胞色素 b-245 α 链 (CYBA) 基因的 3' UTR	64	(N M_00101.4)	5	CCTCGCCCCGGACCTGCCCTCCCGCCAGGTGCACCCACCTGCAATAAATGCAGCGAAGCCGGGA
具有最少 γ 和 α 元件的缩短的 WPRE3 序列	247	WPRE3 参考 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975461/	10	GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCCTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTAGTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGG
人血红蛋白 β (HBB) 3pUTR	144		1	AAATACATCATTGCAATGAAAATAAATGTTTTTTATTAGGCAGAATCCAGATGCTCAAGGCCCTCATAATATCCCCAGTTAGTAGTTGGACTTAGGGAACAAAGGAACCTTTAATAGAAATTGGACAGCAAGAAAGCGAGC
WPRE 3pUTR 元件的前 62bp	62		1	GAGCATCTTACCGCCATTTATTCCCATATTTGTTCTGTTTTTTCTTGATTTGGGTATACATT

[0233] 聚腺苷酸化序列：可在用于表达如本文所述的免疫应答（例如，先天性免疫应答）抑制剂的ceDNA载体中包括编码聚腺苷酸化序列的序列，以稳定由ceDNA载体表达的mRNA，并有助于核输出和翻译。在一个实施方案中，ceDNA载体不包括聚腺苷酸化序列。在其他实施方案中，用于表达炎性小体拮抗剂的ceDNA载体包括至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少45个、至少50个或更多个腺嘌呤二核苷酸。在一些实施方案中，聚腺苷酸化序列包含约43个核苷酸、约40-50个核苷酸、约40-55个核苷酸、约45-50个核苷酸、约35-50个核苷酸或它们之间的任何范围。

[0234] 表达盒可以包含本领域已知的任何聚腺苷酸化序列或其变体。在一些实施方案中，聚腺苷酸化（聚A）序列选自表3中所列出的任何序列。也可以使用本领域公知的其他聚A序列，例如，包括但不限于从牛BGHpA（例如，SEQ ID NO:9）或病毒SV40pA（例如，SEQ ID NO:10）中分离的天然存在的序列、或合成序列。一些表达盒还可以包括SV40晚期聚A信号

上游增强子 (USE) 序列。在一些实施方案中,USE可以与SV40pA 或异源聚A信号组合使用。聚A序列位于编码炎性小体拮抗剂的转基因的3’。

[0235] 表达盒还可以包括转录后元件以增加转基因的表达。在一些实施方案中,使用土拨鼠肝炎病毒 (WHP) 转录后调控元件 (WPRE) (例如 SEQ ID NO:72) 来增强转基因表达。可以使用其他转录后处理元件,如来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因或乙型肝炎病毒 (HBV) 的转录后元件。分泌序列能够连接到转基因,例如VH-02和VK-A26序列,例如SEQ ID NO:950和SEQ ID NO:951。

[0236] 表3:示例性聚A序列

[0237]

描述	长度	参考文献	CG含量	序列
牛生长激素终止子和聚腺苷酸化序列。	225		3	TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCC CCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT GTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAAATGCATCGCATTGT CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC
源自BMN270的合成聚A	49	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292164	0	AATAAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGT TTTTTGTGTG
源自SPK8011的合成聚A	54	US2017/0216408	2	GCGGCCGCAATAAAAAGATCAGAGCTCTAGAGATCTGTG TGTGTTTTTTTTGTGT

[0238]

源自 Sangamo_CR MSBS2-内含子 3 的合成聚 A 和绝缘序列	74	WO2017074526	2	GGATCCAATAAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGT GTTGGTTTTTGTGTGTTTTCTGTAAACGATCGGG
源自 Nathwani hFIX 的 SV40 晚期聚 A 和 3'绝缘序列	143	http://www.bloodjournal.org/content/early/2005/12/01/blood-2005-10-4035?sso-checked=true	1	CTCGATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTT ATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACA ACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGG AGGTGTGGGAGGTTTTTAAACTAGT
源自 SPK9001 的 bGH 聚 A	228	US2016/0375110	0	CTACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC CTCCCCCTGCTTCCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCC CACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCACA TTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT AGCAGGCATGCTGGGGATGCAGTGGGCTCTATGG
无 CpG 的 SV40 聚 A	222		0	CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACC ACAACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGA AATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAG CTGCAATAAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATT TATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTA AAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTA
SV40 晚期聚 A	226		0	CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAAC CACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTG AAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAA GCTGCAATAAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCAT TTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTTGGGAGGTTTTT TAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGG
含有 A64 聚 A 序列和 C30 组蛋白茎环序列的 C60pAC30H SL 聚 A	129		0	GTTAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGC ATCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGC TCTTTTCAGAGCCACCA
含有 SV40 聚 A 的用于 J. Chou G6P 酶构建体中的聚 A	232	US9644216	4	GCGGCCGCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGAT GAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAA ATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTT GTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAACAA CAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGT GTGGGAGGTTTTTAGTCGACCATGCTGGGGAGAGATC T
SV40 聚腺苷酸化信号	135		0	GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACA AACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTT GTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTA TAAGCTGCAATAAAACAAGTT
疱疹病毒胸苷激酶聚腺苷酸化信号	49		4	CGGCAATAAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTG GGTGCTTTGTTT

[0239]	SV40 晚期聚腺苷酸化信号	226		0	CCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAA CCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGA ATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATA ATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACACA AATAAAGCATTTTTTTCCTGCTGCTAGTTGTGGTTTTGT CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGG
	人白蛋白 3' UTR 和终止子/聚 A 序列	416		2	CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATA AGAGAAAAGAAAATGAAGATCAAAAAGCTTATTCATCTGT TTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAA AAAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTTGCCTCTTTTCTCTG TGCTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAG TGGTACAGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTGTTGCTATC CTGAAAATTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTCCAGTGTCT CTCTTATTCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTGTG GGCTAATTAATAAATCATTAAATACTCTTCTAAGTTATG GATTATAAACATTCAAAATAATTTTTGACATTATGATA ATTCTGAATAAAAAGAACA AAAA ACCATG
	人白蛋白 3' UTR 和终止子/聚 A 序列	415		2	ATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAA GAGAAAAGAAAATGAAGATCAAAAAGCTTATTCATCTGT TTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAA AAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTTGCCTCTTTTCTCTG GCTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAATCTAATAGAGT GGTACAGCACTGTTATTTTTCAAAGATGTGTTGCTATCC TGAAAATTCTGTAGGTTCTGTGGAAGTCCAGTGTCTC TCTTATTCCACTTCGGTAGAGGATTTCTAGTTTCTGTGG GCTAATTAATAAATCATTAAATACTCTTCTAAGTTATG ATTATAAACATTCAAAATAATTTTTGACATTATGATAA TTCTGAATAAAAAGAACA AAAA ACCATG
	无 CpG 的短 SV40 聚 A	122		0	TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACA ACTAGA ATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGAT GCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAA CAAGTT
	无 CpG 的短 SV40 聚 A	133		0	TGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG TAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAAC AATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTG TGGGAGGTTTTTTAAA

[0240] 在一个实施方案中,载体多核苷酸 (ceDNA载体) 包含一对选自以下的两个不同的 ITR:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:52;以及SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO:51。在这些方面的每一个的一个实施方案中,具有共价闭合端的载体多核苷酸或非病毒无衣壳DNA载体包含一对选自以下的 ITR:SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102;SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:104;SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106;SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:108;SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:110;SEQ ID NO:111和 SEQ ID NO:112;SEQ ID NO:113和SEQ ID NO:114;以及SEQ ID NO: 115和SEQ ID NO:116。在一些实施方案中,ceDNA载体不具有包含选自 SEQ ID NO: 500-529中的任何序列的ITR。

[0241] 可以选择和优化从细胞中收获和收集本文所述的DNA载体的时间,以实现ceDNA载体的高产率生产。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。在一个实施方案中,细胞在足以产生DNA载体 (例如,TTX-载体) 的条件下生长,并且在杆状病毒感染后足以产生 DNA载体 (例如,TTX-载体) 但在大多数细胞开始因病毒毒性而死亡之前的时间收获。可以使用质粒纯化试剂盒,诸如Qiagen Endo-Free Plasmid 试剂盒分离DNA载体。为分离质粒而开发的其他方法也可适用于DNA 载体。通常,可以采用任何核酸纯化方法。

[0242] DNA载体可以通过所属领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施方案中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施方案中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0243] 在一个实施方案中,无衣壳非病毒DNA载体包含含有多核苷酸模板的质粒或从含有多核苷酸模板的质粒获得,所述多核苷酸模板依次包含:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如,外源DNA的表达盒)和经修饰的AAV ITR,其中所述模板核酸分子缺乏AAV衣壳蛋白编码。在另一个实施方案中,本发明的核酸模板缺乏病毒衣壳蛋白编码序列(即,其缺乏AAV衣壳基因,也缺乏其他病毒的衣壳基因)。另外,在特定实施方案中,模板核酸分子还缺乏 AAV Rep蛋白编码序列。因此,在优选的实施方案中,本发明的核酸分子缺乏功能性AAV cap和AAV rep基因二者。

[0244] 在一个实施方案中,ceDNA载体可以包括相对于本文公开的野生型 AAV2 ITR已突变,但仍保留可操作的RBE、trs和RBE'部分的ITR结构。在一些实施方案中,ceDNA载体不具有包含选自SEQ ID NO:500-529中的任何序列的ITR。

[0245] 在一些实施方案中,编码炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)的转基因还可以编码分泌序列,使得所述炎性小体拮抗剂针对高尔基体和内质网,其中所述炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2 炎性小体途径抑制剂、半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)在其通过 ER并从细胞出去时将伴侣分子折叠成正确的构象。示例性分泌序列包括但不限于VH-02(SEQ ID NO:950)和VK-A26(SEQ ID NO:951)和 IgK信号序列,以及允许标记的蛋白质从细胞溶质中分泌出来的Gluc分泌信号、将标记的蛋白质引导到高尔基体的TMD-ST分泌序列。

[0246] 核定位序列:在一些实施方案中,用于表达例如免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体包含一个或多个核定位序列(NLS),例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个NLS。在一些实施方案中,一个或多个NLS位于氨基端或附近、羧基端或附近,或这些位置的组合(例如氨基端的一个或多个 NLS和/或羧基端的一个或多个NLS)。当存在超过一个NLS时,可以彼此独立地选择,使得单个NLS可以呈超过一个拷贝存在和/或与呈一个或多个拷贝存在的一个或多个其他NLS组合存在。NLS的非限制性实例如表4所示。

[0247] 表4:核定位信号

来源	序列	SEQ ID NO.
SV40 病毒大 T 抗原	PKKKRKV (由 CCAAGAAGAAGAGGAAGGTG 编码)	315
核质蛋白	KRPAATKKAGQAKKKK	316
c-myc	PAAKRVKLD	317
	RQRRNELKRSP	318
hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPGGGGQYFAKPRNQGGY	319
来自输入蛋白- α 的 IBB 域	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	320
[0248] 肌瘤 T 蛋白	VSRKRPRP	321
	PPKKARED	322
人 p53	PQPKKKPL	323
小鼠 c-abl IV	SALIKKKKKMAP	324
流感病毒 NS1	DRLRR	325
	PKQKKRK	326
肝炎 δ 病毒抗原	RKLKKIKKL	327
小鼠 Mx1 蛋白	REKKKFLKRR	328
人聚(ADP-核糖)聚合酶	KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK	329
类固醇激素受体 (人) 糖皮质激素	RKCLQAGMNLEARKTKK	330

[0249] 调控开关:分子调控开关是一种响应于信号而产生可测量的状态变化的开关。如本文所述,调控开关也可用于微调免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的表达,以便使免疫应答抑制剂如期望的那样表达,包括但不限于以期望的表达水平或量表达、或者可替代地在存在或缺乏特定信号(包括细胞信号传导事件)的情况下表达。例如,如本文所述,当特定条件发生时,可以打开或关闭免疫应答抑制剂从ceDNA载体的表达。在一些实施方案中,该开关是被设计成以可控制和可调节的方式开始或停止(即关闭)ceDNA载体中的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的表达的“开启/关闭”开关。在一些实施方案中,开关可以包括“杀灭开关”,一旦所述开关被激活,其就可以指令包含ceDNA载体的细胞经历细胞程序性死亡。涵盖用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的 ceDNA载体中的示例性调控开关可以用于调节转基因的表达,并且在以全文引用的方式并入本文的国际申请 PCT/US18/49996中更全面地进行了论述。

[0250] (i) 二元调控开关

[0251] 在一些实施方案中,用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体包含可以用于可控制地调节炎性小体拮抗剂的表达的调控开关。例如,位于ceDNA载体的 ITR之间的表达盒可以另外包含可操作地连接至编码免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的核酸序列的调控区域(例如启动子、顺式元件、阻遏子、增强子等),其中所述调控区域由一个或多个辅助因子或外源药剂调控。仅举例来说,调控区可以通过小分子开关或诱导型或阻遏型启动子进行调节。诱导型启动子的非限制性实例是激素诱导型或金属诱导型启动子。其他示例性诱导型启动子/增强子元件包括(但不限于):RU486诱导型启动子、蜕皮激素诱导型启动子、雷帕霉素诱导型启动子和金属硫蛋白启动子。

[0252] (ii) 小分子调控开关

[0253] 所属领域已知的多种基于小分子的调控开关在所属领域中已知并且可以与如本文所公开的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂组合以形成调控开关控制的ceDNA载体。在一些实施方案中,调控开关可以选自以下任一种或组合:正交配体/核受体对,例如类

视色素受体变体/LG335 和GRQCIMFI,以及控制操作性连接的转基因的表达的人工启动子,例如Taylor等人,《BMC生物技术(BMC Biotechnology)》10(2010):15 中公开的人工启动子;工程化的类固醇受体,例如C末端截断的修饰孕激素受体,其不能结合孕激素但结合RU486(米非司酮)(美国专利第 5,364,791号);来自果蝇(Drosophila)的蜕皮素受体和其蜕皮类固醇配体(Saez等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,97(26)(2000), 14512-14517;或由抗生素甲氧苄啶(trimethoprim,TMP)控制的开关,如Sando R;《自然方法》第3版2013, 10(11):1085-8中所公开。在一些实施方案中,控制转基因或由ceDNA载体表达的调控开关是前药活化开关,如美国专利8,771,679和6,339,070中公开的活化开关。

[0254] (iii) “密码”调控开关

[0255] 在一些实施方案中,调控开关可以是“密码开关”或“密码回路”。在发生特定条件时,也就是说,需要存在条件的组合才能发生转基因表达和/或阻遏时,密码开关允许微调对转基因从ceDNA载体的表达的控制。例如,为了发生转基因的表达,至少必须发生条件A和B。密码调控开关可以是任何数量的条件,例如,要存在至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个、或至少6个、或至少7个或更多个条件方能发生转基因表达。在一些实施方案中,需要发生至少2个条件(例如A、B条件),并且在某些实施方案中,需要发生至少3个条件(例如A、B和C,或A、B和D)。仅举例来说,为了从具有密码“ABC”调控开关的ceDNA发生基因表达,必须存在条件A、B和C。条件A、B和C可以如下:条件A是存在病状或疾病,条件B是激素响应,并且条件C是对转基因表达的响应。举例来说,如果转基因编辑缺陷性EPO基因,那么条件A是存在慢性肾病(CKD),如果受试者的肾脏中有低氧状况,那么发生条件B,条件C是肾脏中产生促红细胞产生素的细胞(EPC)的募集受损;或可替代地,HIF-2活化受损。一旦氧水平升高或达到期望的EPO水平,转基因就会关闭,直到再次发生3个条件,它重新打开。

[0256] 在一些实施方案中,涵盖用于ceDNA载体中的密码调控开关或“密码回路”包含杂合转录因子(TF)以扩大用于界定生物封存条件的环境信号的范围和复杂度。与在预定条件存在下触发细胞死亡的致命开关相反,“密码回路”允许在特定“密码”存在下细胞存活或转基因表达,并且只有当存在预定环境条件或密码时,才可以容易地重新编程以允许转基因表达和/或细胞存活。

[0257] 本文公开的调控开关,例如小分子开关、基于核酸的开关、小分子-核酸杂合开关、转录后转基因调控开关、翻译后调节、辐射控制开关、低氧介导的开关和如本文公开的本领域中普通技术人员已知的其他调控开关中的任何和所有组合均可以用于如本文公开的密码调控开关中。预期使用的调控开关也在综述文章Kis等人,《皇家学会界面杂志(J R Soc Interface)》.12:20141000(2015)中论述,并总结在Kis的表1中。在一些实施方案中,用于密码系统中的调控开关能够选自国际专利申请 PCT/US18/49996的表11中所公开的任何开关或开关组合,所述专利申请以全文引用的方式并入本文中。

[0258] (iv).控制转基因表达的基于核酸的调控开关

[0259] 在一些实施方案中,控制由ceDNA的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的表达的调控开关是根据基于核酸的控制机制。示例性核酸控制机构是所属领域中已知的并且是设想使用的。举例来说,此类机理包括核糖开关,例如以下文献中所公开的核糖开关:例如US2009/0305253、US2008/0269258、US2017/0204477、W02018026762A1、美国专利 9,222,093和EP申请EP288071;以及Villa JK等人的评论中所公开的核糖开关,《微生物学光

谱 (Microbiol Spectr.)》2018年5月;6(3)。还包括代谢物响应性转录生物传感器,例如 W02018/075486和W02017/147585 中公开的那些。设想使用的其他本领域已知的机制包括用siRNA或RNAi 分子(例如miR、shRNA)使转基因沉默。例如,ceDNA载体可以包含编码与ceDNA载体所表达的转基因的一部分互补的RNAi分子的调控开关。当此类RNAi被表达时,即使转基因(例如,炎性小体拮抗剂(例如, NLRP3和/或AIM2炎性小体途径中的一者或多者的抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂))被ceDNA载体表达,其也将被互补的RNAi分子静默,并且当RNAi不被表达时,当转基因被ceDNA载体表达时,转基因(例如,炎性小体拮抗剂)不被RNAi静默。

[0260] 在一些实施方案中,调控开关是组织特异性自失活调控开关,例如如 US2002/0022018中所公开,其中所述调控开关在转基因表达原本可能不利的位点有意地将转基因(例如,炎性小体拮抗剂)关闭。在一些实施方案中,调控开关是重组酶可逆基因表达系统,例如如US2014/0127162和美国专利8,324,436中所公开。

[0261] (v). 转录后和翻译后调控开关

[0262] 在一些实施方案中,控制ceDNA载体的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的表达的调控开关是转录后修饰系统。例如,这样的调控开关可以是对四环素或茶碱敏感的适体酶 (aptazyme) 核糖开关,如以下中所公开:US2018/0119156、GB201107768、W02001/064956A3、欧洲专利2707487和Beilstein等人,《ACS合成生物学 (ACS Synth. Biol.)》, 2015, 4(5), 第526-534页;Zhong等人,Elife. 2016年11月2日;5.pii: e18858。在一些实施方案中,设想所属领域的普通技术人员可以编码转基因和含有配体敏感性(OFF-开关)适体的抑制性siRNA二者,净结果是配体敏感性ON-开关。

[0263] (vi). 其他示例性调控开关

[0264] 可以将任何已知的调控开关用于ceDNA载体中,以控制ceDNA载体的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的表达,包括由环境变化所触发的那些表达。其他实例包括但不限于;Suzuki等人,《科学报告 (Scientific Reports)》8;10051(2018)的BOC方法;遗传密码扩展和非生理氨基酸;辐射控制或超声控制的on/off开关(参见例如Scott S等人,《基因疗法 (Gene Ther)》. 2000年7月;7(13):1121-5;美国专利 5,612,318;5,571,797;5,770,581;5,817,636;以及W01999/025385A1。在一些实施方案中,调控开关是由可植入系统控制,例如如美国专利 7,840,263;US2007 0190028A1中所公开,其中基因表达由一种或多种形式的能量控制,包括电磁能,所述能量将可操作地连接到ceDNA载体中的转基因的启动子活化。

[0265] 在一些实施方案中,设想用于ceDNA载体中的调控开关是低氧介导或应激活化的开关,例如以下文献中所公开的那些:W01999060142A2、美国专利5,834,306;6,218,179;6,709,858;US2015/0322410;Greco等人 (2004)《靶向癌症疗法 (Targeted Cancer Therapies)》9;S368以及 FROG、TOAD和NRSE元件,以及条件诱导型静默元件,包括低氧应答元件(HRE)、炎症反应元件(IRE)和剪切应激活化元件(SSAE),例如如美国专利9,394,526中所公开。此类实施方案适用于在缺血后或在缺血组织和/或肿瘤中打开转基因从ceDNA载体的表达。

[0266] (vii). 杀灭开关

[0267] 本文所述的其他实施方案涉及包含杀灭开关的用于表达如本文所述的免疫应答

(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体。如本文公开的杀灭开关能够使包含ceDNA载体的细胞被杀灭或经历程序性细胞死亡,作为从个体的系统中永久去除引入的ceDNA载体的手段。所属领域的普通技术人员将了解,杀灭开关在用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体中的使用通常联合ceDNA载体靶向受试者可以欣然接受地失去的有限数目的细胞或靶向希望细胞凋亡的细胞类型(例如癌细胞)。在所有方面,如本文公开的“杀灭开关”被设计成在缺乏输入的存活信号或其他指定条件下提供对包含ceDNA载体的细胞的快速而稳固的细胞杀灭。换句话说,由用于表达如本文所述的炎性小体拮抗剂的ceDNA载体编码的杀灭开关可以将包含ceDNA载体的细胞的细胞存活限制在特定输入信号所限定的环境。如果希望去除受试者中表达炎性小体拮抗剂的ceDNA载体或确保其不表达所编码的炎性小体拮抗剂,那么此类杀灭开关用于发挥生物学的生物封锁功能。

[0268] 所属领域的普通技术人员已知的其他杀灭开关涵盖用于表达如本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体中,所述杀灭开关例如如以下文献中所公开:US2010/0175141;US2013/0009799;US2011/0172826;US2013/0109568;以及以下文献中所公开的杀灭开关:Jusiak等人,《细胞生物学和分子医药评论(Reviews in Cell Biology and molecular Medicine)》;2014;1-56;Kobayashi等人,《美国国家科学院院刊》,2004;101;8419-9;Marchisio等人,《国际生物化学和细胞生物学杂志(Int. Journal of Biochem and Cell Biol.)》,2011;43;310-319;以及Reinshagen等人,《科学转化医学(Science Translational Medicine)》2018,11。

[0269] 因此,在一些实施方案中,用于表达如本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体可以包含杀灭开关核酸构建体,其包含编码效应子毒素或报告蛋白的核酸,其中所述效应子毒素(例如死亡蛋白)或报告蛋白的表达受预定条件控制。举例来说,预定条件可以是存在环境试剂,例如外源试剂,在没有所述环境试剂的情况下,细胞将默认表达效应毒素(例如死亡蛋白质)并且被杀灭。在替代性实施方案中,预定条件是存在两种或更多种环境试剂,例如细胞将仅在提供两种或更多种必需的外源试剂时存活,而在其中的任一种不存在的情况下,包含ceDNA载体的细胞被杀灭。

[0270] 在一些实施方案中,用于表达如本文所公开的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体经修饰以并入杀灭开关,从而破坏包含ceDNA载体的细胞,以有效地终止ceDNA载体(例如,炎性小体拮抗剂的表达)正在表达的转基因的体内表达。具体地说,进一步对ceDNA载体进行基因工程改造以表达在哺乳动物细胞中、在正常生理学条件下不具功能性的开关蛋白。仅在药物施用后或在特异性靶向这种开关蛋白的环境条件下,表达开关蛋白的细胞被破坏,从而终止治疗蛋白或肽的表达。举例来说,据报告,表达HSV-胸苷激酶的细胞在药物(例如昔昔洛韦(ganciclovir)和胞嘧啶脱氨酶)施用后可以被杀灭。参见例如Dey和Evans,《单纯疱疹病毒-1胸苷激酶(HSV-TK)的自杀基因疗法(Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase(HSV-TK))》,于You编辑的《基因疗法中的靶标(Targets in Gene Therapy)》(2011)中;以及Beltinger等人,《美国国家科学院院刊》96(15):8699-8704(1999)。在一些实施方案中,ceDNA载体可以包含siRNA杀灭开关,称为DISE(存活基因消除所诱发的死亡)(Murmman等人,《肿瘤标靶(Oncotarget)》2017;8:84643-84658.DISE在体内卵巢癌细胞中的诱导(Induction of DISE in ovarian cancer cells in vivo))。

[0271] 在另一个实施方案中,从ceDNA载体中表达的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂还包含另外的功能,诸如荧光、酶活性、分泌信号或免疫细胞活化因子。

[0272] 在一些实施方案中,编码免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA还可以包含例如接头结构域。如本文所用,“接头结构域”是指将如本文所述的炎性小体拮抗剂的任何结构域/区域连接在一起的长度为约2个至100个氨基酸的寡肽或多肽区域。在一些实施方案中,接头能够包括或由柔性残基(例如甘氨酸和丝氨酸)构成,使得相邻蛋白质域相对于彼此自由地移动。当希望确保两个相邻结构域在空间上彼此无干扰时,可以使用较长接头。接头可以是可裂解的或不可裂解的。可裂解接头的实例包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等效物以及其组合。接头可以是来源于明脉扁刺蛾病毒(*Thosea asigna virus*)的T2A的接头区域。

[0273] IV. 生产ceDNA载体的方法

[0274] A. 一般生产

[0275] 生产用于表达例如免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的包含如本文所定义的不对称ITR对或对称ITR对的ceDNA载体的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996的第IV章节中,所述国际申请以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中,可以使用如本文所述的昆虫细胞来生产如本文所公开的用于表达炎性小体拮抗剂的ceDNA载体。在替代性实施方案中,如本文所公开的用于表达炎性小体拮抗剂的ceDNA载体能够以合成方式生产并且在一些实施方案中以无细胞方法生产,如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122所公开,所述国际申请以全文引用的方式并入本文。

[0276] 如本文所述,在一个实施方案中,用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体例如能够通过例如包括以下步骤的方法获得:a)在诱导宿主细胞内生产ceDNA载体的有效条件和充足时间下,在Rep蛋白的存在下,培育具有缺乏病毒衣壳编码序列的多核苷酸表达构建体模板(例如,ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、和/或ceDNA-杆状病毒)的宿主细胞群(例如昆虫细胞),并且其中所述宿主细胞不包含病毒衣壳编码序列;以及b)从所述宿主细胞中收获和分离所述ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰的ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生ceDNA载体。然而,没有表达病毒粒子(例如AAV病毒粒子)。因此,没有大小限制,如在AAV或其他基于病毒的载体中天然强加的大小限制。

[0277] 可以通过用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化从宿主细胞分离的DNA,并在非变性凝胶上分析消化的DNA物质,以与线性和非连续DNA相比较确认线性和连续DNA的特征带的存在,从而确认从宿主细胞分离的ceDNA载体的存在。

[0278] 在又另一个方面,本发明提供了将DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板)稳定地整合到其自身基因组中的宿主细胞系在生产非病毒DNA载体中的用途,例如如Lee, L. 等人(2013) *Plos One* 8(8):e69879中所述。优选地,Rep以约3的MOI加入宿主细胞中。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系、例如HEK293细胞时,所述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板,并且可以使用第二载体、例如疱疹病毒将Rep蛋白引入细胞中,使得在Rep和辅助病毒存在下切除和扩增ceDNA。

[0279] 在一个实施方案中,用于制备用于表达例如如本文所述的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的宿主细胞是昆虫细胞,并且使用杆状病毒递送编码Rep蛋白的多核苷酸和用于ceDNA的非病毒DNA载体多核苷酸表达构建体模板,例如如图4A-图

4D和实施例1中所述。在一些实施方案中,宿主细胞经工程改造以表达Rep蛋白。

[0280] 然后从宿主细胞中收获和分离ceDNA载体。从细胞收获和收集本文所描述的ceDNA载体的时间可以进行选择和优化,以实现高产率地产生 ceDNA载体。举例来说,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。在一个实施方案中,细胞在足以产生ceDNA载体的条件下生长,并在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体但在大多数细胞开始因杆状病毒毒性而死亡之前的时间收获。可以使用质粒纯化试剂盒,例如 Qiagen Endo-Free Plasmid试剂盒分离DNA载体。为分离质粒而开发的其他方法也适用于DNA载体。通常,可以采用任何核酸纯化方法。

[0281] DNA载体可以通过所属领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施方案中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施方案中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0282] 用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的存在可以通过以下方式来确认:使用在DNA载体上具有单个识别位点的限制酶消化从细胞中分离的载体DNA,并且使用凝胶电泳术分析已消化和未消化的DNA物质以确认与线性且非连续DNA相比线性且连续 DNA的特征性条带的存在。图4C和图4D示出了用于鉴定通过本文的方法产生的闭合端ceDNA载体的存在的一个实施方案。

[0283] B. ceDNA质粒

[0284] ceDNA质粒是用于稍后生产表达例如免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的质粒。在一些实施方案中,ceDNA-质粒可以使用已知的技术构建,以在转录方向上提供至少下列作为可操作连接的组分:(1)经修饰的5' ITR序列;(2)含有顺式调控元件(例如启动子、诱导型启动子、调控开关、增强子等)的表达盒;以及(3)经修饰的3' ITR 序列,其中所述3' ITR序列相对于所述5' ITR序列是对称的。在一些实施方案中,侧翼为ITR的表达盒包含用于引入外源序列的克隆位点。表达盒替换了AAV基因组的rep和cap编码区。

[0285] 在一个方面,用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的 ceDNA载体例如获得自质粒(在本文中称为“ceDNA-质粒”),其依次编码:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、包含转基因的表达盒、以及突变的或经修饰的AAV ITR,其中所述ceDNA-质粒缺乏 AAV衣壳蛋白编码序列。在替代实施方案中,ceDNA-质粒依次编码:第一(或5')修饰或突变AAV ITR、包含转基因的表达盒、以及第二(或3')修饰AAV ITR,其中所述ceDNA质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'和3' ITR彼此对称。在替代实施方案中,ceDNA质粒依次编码:第一(或5')修饰或突变AAV ITR、包含转基因的表达盒、以及第二(或3')突变或修饰AAV ITR,其中所述ceDNA质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'和3'修饰ITR具有相同的修饰(即彼此反向互补或对称)。

[0286] 在另一个实施方案中,ceDNA-质粒系统不含病毒衣壳蛋白编码序列(即,其不含AAV衣壳基因,也没有其他病毒的衣壳基因)。另外,在特定实施方案中,ceDNA-质粒还不含AAV Rep蛋白编码序列。因此,在优选实施方案中,ceDNA-质粒缺乏AAV2的功能性AAV cap和AAV rep 基因GG-3'加上允许发夹形成的可变回文序列。

[0287] 本发明的ceDNA-质粒可以使用所属领域熟知的任何AAV血清型的基因组的天然核苷酸序列来产生。在一个实施方案中,ceDNA-质粒骨架源自于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV 5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV 11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和 AAV-DJ8基因

组。例如NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729; NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261;Kotin和Smith,《Springer病毒索引》(The Springer Index of Viruses)》,在Springer维护的URL上可得(www网址: oesys.springer.de/viruses/database/mkchapter.asp?virID=42.04.) (注意-对 URL或数据库的引用是指截至本申请生效提交日为止的URL或数据库的内容)。在一个特定实施方案中,ceDNA-质粒骨架源自于AAV2基因组。在另一个特定实施方案中,ceDNA-质粒骨架是合成的骨架,其经过基因工程以在它的5'和3' ITR处包括源自于这些AAV基因组之一。

[0288] ceDNA-质粒可以任选地包括选择性或选择标记,用于建立产生 ceDNA载体的细胞系。在一个实施方案中,选择标记可以插入3' ITR序列的下游(即3')。在另一个实施方案中,选择标记可以插入5' ITR序列的上游(即5')。适当的选择标记包括例如赋予耐药性的那些标记。选择标记可以是例如杀稻瘟菌素S抗性基因、卡那霉素(kanamycin)、遗传霉素(geneticin)等。在优选实施方案中,药物选择标记是杀稻瘟菌素 S抗性基因。

[0289] 由rAAV质粒生产用于表达炎性小体拮抗剂(例如,NLRP3和/或 AIM2炎性小体途径中的一者或多者的抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂)的示例性ceDNA(例如rAAV0)载体。一种用于产生rAAV载体的方法可以包含:(a)为宿主细胞提供如上文所描述的rAAV质粒,其中宿主细胞和质粒均不含衣壳蛋白编码基因,(b)在允许产生ceDNA基因组的条件下培养宿主细胞;以及(c)收获细胞并分离从所述细胞产生的AAV基因组。

[0290] C.从ceDNA质粒制备ceDNA载体的示例性方法

[0291] 本文还提供了用于制备表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的无衣壳ceDNA载体的方法,尤其是产量高得足以提供足够用于体内实验的载体的方法。

[0292] 在一些实施方案中,用于产生表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的方法例如包括以下步骤:(1)将包含表达盒和两个对称ITR序列的核酸构建体引入宿主细胞(例如,Sf9细胞)中;(2)任选地,例如通过使用质粒上存在的选择标记建立克隆细胞系;(3)将Rep编码基因引入(通过用携带所述基因的杆状病毒转染或感染)所述昆虫细胞中;以及(4)收获细胞并纯化ceDNA载体。上述用于产生ceDNA载体的包含表达盒和两个ITR序列的核酸构建体可以呈ceDNA-质粒的形式,或如下所述用ceDNA-质粒产生的杆粒或杆状病毒的形式。可以通过转染、病毒转导、稳定整合或所属领域中已知的其他方法将核酸构建体引入宿主细胞中。

[0293] D.细胞系:

[0294] 用于生产表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的宿主细胞系例如可以包括源自草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的昆虫细胞系(诸如Sf9、Sf21);或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)细胞;或其他无脊椎动物、脊椎动物或其他真核细胞系,包括哺乳动物细胞。也可以使用普通技术人员已知的其他细胞系,如HEK293、Huh-7、HeLa、HepG2、Hep1A、911、CHO、COS、MeWo、NIH3T3、A549、HT1 180、单核细胞、以及成熟和未成熟的树突状细胞。可以转染宿主细胞系以稳定表达ceDNA-质粒,从而高产率地产生ceDNA载体。

[0295] 可以使用本领域已知的试剂(例如脂质体、磷酸钙)或物理手段(例如电穿孔),通过瞬时转染将ceDNA-质粒引入Sf9细胞中。可替代地,可以建立将ceDNA-质粒稳定整合至基因组中的稳定Sf9细胞系。此类稳定细胞系可以通过如上文所描述将选择标记并入ceDNA-

质粒中来建立。如果用于转染细胞系的ceDNA-质粒包括选择标记,如抗生素,那么可以通过向细胞生长培养基中加入抗生素来选择已用ceDNA-质粒转染并将 ceDNA-质粒DNA整合到基因组中的细胞。然后可以通过单细胞稀释或集落转移技术来分离细胞的抗性克隆并增殖。

[0296] E. 分离和纯化ceDNA载体:

[0297] 图1-图7和下面的特定实施例中描述了用于获得和分离ceDNA载体的方法的实施例。本文所公开的用于表达例如免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体可以从表达一种或多种AAV Rep蛋白的生产者细胞中获得,所述生产者细胞进一步用ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒或ceDNA-杆状病毒转化。可用于生产ceDNA载体的质粒包括编码炎性小体拮抗剂的质粒\或编码一种或多种REP蛋白的质粒。

[0298] 在一个方面中,多核苷酸编码在质粒(Rep-质粒)、杆粒(Rep-杆粒)或杆状病毒(Rep-杆状病毒)中递送到生产细胞的AAV Rep蛋白(Rep 78或68)。Rep-质粒、Rep-杆粒和Rep-杆状病毒可以通过上文所描述的方法产生。

[0299] 本文描述了生产用于表达例如免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的方法。用于产生如本文所述的用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的表达构建体可以是质粒(例如ceDNA-质粒)、杆粒(例如ceDNA-杆粒)和/或杆状病毒(例如ceDNA-杆状病毒)。仅举例来说,ceDNA-载体可以由用ceDNA-杆状病毒和Rep-杆状病毒共同感染的细胞产生。由Rep-杆状病毒产生的Rep 蛋白可以复制ceDNA-杆状病毒以产生ceDNA-载体。可替代地,可以从用构建体稳定地转染的细胞产生用于表达炎性小体拮抗剂的ceDNA载体,所述构建体包含在Rep-质粒、Rep-杆粒或Rep-杆状病毒中递送的编码AAV Rep蛋白(Rep78/52)的序列。可以将ceDNA-杆状病毒瞬时地转染到细胞中,被Rep蛋白复制并生产ceDNA载体。

[0300] 可以将杆粒(例如ceDNA-杆粒)转染到允许的昆虫细胞(诸如Sf9、Sf21、Tni(粉纹夜蛾)细胞、High Five细胞)中,并且产生ceDNA-杆状病毒,所述ceDNA-杆状病毒是包括包含对称ITR的序列和表达盒的重组杆状病毒。可以再次将ceDNA-杆状病毒感染到昆虫细胞中以获得下一代重组杆状病毒。任选地,所述步骤可以重复一次或多次以产生更大量的重组杆状病毒。

[0301] 可以选择和优化从细胞中收获和收集如本文所述的用于表达免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的时间,以实现ceDNA 载体的高产率生产。例如,可以根据细胞存活率、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。通常,细胞可在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体(例如ceDNA载体)的时间后但在大多数细胞开始因病毒毒性而死亡之前收获。使用质粒提纯套组,例如Qiagen ENDO-FREE **PLASMID**®套组,能够从Sf9细胞中分离出ceDNA载体。为了分离质粒而开发的其他方法也可以适合于ceDNA载体。通常,可以采用所属领域中已知的任何核酸纯化方法,以及可商购的DNA提取试剂盒。

[0302] 可替代地,可以通过对细胞团块进行碱溶解法、离心所得溶解液并进行色谱分离来实施纯化。作为一个非限制性实例,所述方法可以如下进行:将上清液装载于保留核酸的离子交换柱(例如SARTOBIND **Q**®)上,然后洗脱(例如使用1.2M NaCl溶液)并且在凝胶过滤柱(例如6个快速流动GE)上进一步进行色谱纯化。然后通过例如沉淀来回收无衣壳的 AAV 载体。

[0303] 在一些实施方案中,用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体也能够以外泌体或微粒的形式纯化。所属领域中已知,许多细胞类型不仅释放出可溶性蛋白质,而且还通过膜微囊泡脱落释放出复杂的蛋白质/核酸货物(Cocucci等人,2009;EP 10306226.1)。此类囊泡包括微囊泡(也称为微粒)和外泌体(也称为纳米囊泡),二者均包含蛋白质和RNA作为货物。微囊泡由质膜的直接出芽产生,而外泌体在多囊泡内体与质膜融合后释放到细胞外的环境中。因此,可以从已经用 ceDNA-质粒转导的细胞或用ceDNA-质粒产生的杆粒或杆状病毒中分离出含有ceDNA载体的微囊泡和/或外泌体。

[0304] 微囊泡可以通过对培养基进行过滤或以 $20,000 \times g$ 超速离心来分离,而对外泌体以 $100,000 \times g$ 超速离心。超速离心的最佳持续时间可以通过实验确定,并将取决于从中分离出囊泡的特定细胞类型。优选地,首先通过低速离心(例如在 $2000 \times g$ 下持续5-20分钟)清除培养基并且使用例如 AMICON® 离心柱(密理博(Millipore®)),英国沃特福德郡(Watford, UK)进行离心浓缩。微囊泡和外泌体可以通过使用识别存在于微囊泡和外泌体上的特定表面抗原的特异性抗体,通过FACS或MACS进一步纯化。其他微米囊泡和外泌体提纯方法包括但不限于免疫沉淀、亲和色谱、过滤和涂有特异性抗体或适体的磁珠。提纯后,用例如磷酸盐缓冲盐水洗涤囊泡。使用微米囊泡或外泌体递送含ceDNA的囊泡的一个优点是,这些囊泡可通过在它们的膜上包括被相应细胞类型上的特异性受体识别的蛋白质而靶向各种细胞类型。(也参见EP 10306226)

[0305] 本文发明的另一方面涉及从已将ceDNA构建体稳定整合到自身基因组中的宿主细胞系中纯化ceDNA载体的方法。在一个实施方案中, ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施方案中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0306] 国际申请PCT/US18/49996的图5显示了确认ceDNA使用实施例中的所述的方法从多种ceDNA-质粒构建体产生的凝胶。ceDNA通过凝胶中的特征性条带图案进行确认(参见图5A)。

[0307] V. 药物组合物和配制物

[0308] 本发明涵盖包含治疗性核酸和一种或多种本文所述的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的药物组合物和配制物。在一些实施方案中,包含治疗性核酸和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的药物组合物可以包含药学上可接受的赋形剂或载剂。根据一些实施方案,药物组合物包含闭合端DNA载体(例如本文所述的ceDNA载体和雷帕霉素或雷帕霉素类似物)、以及药学上可接受的载剂或稀释剂。根据一些实施方案,药物组合物包含闭合端DNA载体(例如本文所述的ceDNA载体和 TLR抑制剂(例如TLR9抑制剂))、以及药学上可接受的载剂或稀释剂。根据一些实施方案,药物组合物包含闭合端DNA载体(例如本文所述的 ceDNA载体和cGAS抑制剂)、以及药学上可接受的载剂或稀释剂。根据一些实施方案,药物组合物包含闭合端DNA载体,例如本文所述的 ceDNA载体和炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3 炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合),以及药学上可接受的载剂或稀释剂。

[0309] 可以将本文所公开的DNA-载体掺入适合于施用至受试者以体内递送到所述受试者的细胞、组织或器官中的药物组合物,包括在一些实施方案中包含如本文所述的免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的药物组合物。典型地,医药组合物包含本文公开的DNA载体和药学上可接受的载剂。例如,可以将本发明的TTX-载体掺入适合于期望的治疗施用

途径（例如肠胃外施用）的药物组合物中。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及如核内显微注射或胞质内注射的细胞内注射进行的被动组织转导。可以将用于治疗目的的药物组合物配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其他适合于高TTX-载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过以下方式制备：将所需量的TTX-载体化合物与上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当的缓冲液中，随后过滤灭菌。

[0310] 可以将包含TTX-载体的药物活性组合物配制成将核酸中的转基因递送到接受者的细胞中，从而引起在其中的转基因的治疗性表达。组合物还可以包括药学上可接受的载剂。

[0311] 本文提供的组合物和载体能用于递送转基因以用于不同目的。在一些实施方案中，转基因编码旨在用于研究目的的蛋白质或功能性RNA，例如建立携带转基因的体细胞转基因动物模型，例如以研究转基因产物的功能。在另一个实例中，转基因编码旨在用于建立动物疾病模型的蛋白质或功能性RNA。在一些实施方案中，转基因编码一种或多种适用于治疗或预防哺乳动物受试者的疾病状态的肽、多肽或蛋白质。可以将转基因以足量转移到患者（例如在其中表达），以治疗与基因表达降低、缺乏表达或功能障碍有关的疾病。在一些实施方案中，转基因是基因编辑分子（例如核酸酶）。在某些实施方案中，核酸酶是CRISPR相关的核酸酶（Cas核酸酶）。

[0312] 根据一些实施方案，本文所述的药物活性组合物可以与抗组胺剂或类固醇组合施用。根据一些实施方案，抗组胺剂或类固醇以与本文所述的药物活性组合物相同的组合物施用。根据一些实施方案，抗组胺剂或类固醇以与本文所述的药物活性组合物分开的组合物施用。根据一些实施方案，抗组胺剂或类固醇与药物活性组合物同时施用。根据一些实施方案，抗组胺剂或类固醇与药物活性组合物依序施用。本领域已知的任何抗组胺剂均可用于本文的实施方案中。根据一些实施方案，所述抗组胺剂是以下中的一种或多种：溴苯那敏（ompheniramine）、布克力嗪、氯苯那敏、桂利嗪、氯马斯汀、赛克力嗪、赛庚啶、苯海拉明、二苯拉林、多西拉敏、美克洛嗪、非尼拉明、异丙嗪、曲普利啶、阿伐斯汀、阿司咪唑、西替利嗪、地氯雷他定、非索非那定、左西替利嗪、氯雷他定、咪唑斯汀、特非那定、其药学上可接受的盐、或它们的组合。本领域已知的任何类固醇均可用于本文的实施方案中。根据一些实施方案，所述类固醇是以下中的一种或多种：氟甲睾酮、美睾酮、羟甲雄二烯酮、诺龙-十一酸酯、诺龙-环戊丙酸酯（nandrolone-cyplonate）、氧雄龙、羟甲烯龙、诺龙-己氧基苯丙酸酯、睾酮、泼尼松、皮质醇、可的松、泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、倍氯米松、氟氢可的松、脱氧皮质酮、醛固酮和司坦唑醇中的至少一种。

[0313] 用于治疗目的的药物组合物通常必须在制造和存储条件下是无菌的和稳定的。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起并入适当的缓冲液中，接着进行过滤灭菌来制备。

[0314] 单位剂量

[0315] 根据一些实施方案，药物组合物可以单位剂型呈现。单位剂型通常将适合于药物组合物的一种或多种特定施用途径。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过吸入施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过汽化器施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过喷雾器施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于通过气雾器施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于口服施用、经颊施用或舌下施用。在一些实施方案中，单位剂型适合于静脉

内、肌肉内或皮下施用。在一些实施方案中,单位剂型适合于鞘内或脑室内施用。在一些实施方案中,配制药组合物以供局部施用。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将通常是化合物产生治疗效果的量。

[0316] IV. 施用和给药

[0317] 本文提供的公开内容描述了通过向受试者施用至少一种本文所述的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂和核酸(例如,治疗性核酸、用于研究目的的核酸)来阻止、减少或消除受试者(例如人受试者)中不想要的免疫应答(例如先天性免疫应答)的方法,其中所述免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的施用和所述核酸的施用当组合提供两种药剂的施用时在时间上相关,从而提供对免疫应答(例如,先天性免疫应答)的调节。这两种药剂能够以共同配制物的形式同时施用,也能够以不同配制物的形式同时施用,或者它们能够在不同的时间单独施用。

[0318] 在一个实施方案中,所表达的如本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂不引起免疫系统反应,而是与没有施用表达抑制剂的 ceDNA载体的情况相比,将受试者的先天性免疫系统抑制至少10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%、或90%、或95%、或98%、或99%、或100%。

[0319] 本文所述的技术总体上涉及用于将闭合端DNA载体与选自雷帕霉素或雷帕霉素类似物、TLR(例如TLR9)抑制剂、cGAS抑制剂中的一种或多种或者它们的组合的一种或多种免疫应答抑制剂(例如先天性免疫应答)、以及如本文所述的一种或多种炎性小体拮抗剂(例如,以下中的任一种或多种:NLRP3炎性小体途径抑制剂、或AIM2炎性小体途径抑制剂、或半胱天冬酶1抑制剂、或其任何组合)共同施用至受试者的方法。在一些实施方案中,闭合端DNA载体包括但不限于如本文所公开的 ceDNA载体、以及mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、小环DNA、小基因、病毒DNA(例如慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、闭合端线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、狗骨头(dbDNATM) DNA载体、极小的免疫学定义的基因表达(MIDGE)载体、非病毒辅助DNA载体(线性共价闭合DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。(参见例如W02010/0086626,其内容以全文引用的方式并入本文)。根据一些实施方案,先天性免疫应答抑制剂和核酸能够以任何组合的形式施用至受试者或患者。例如,可以施用一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。根据一些实施方案,向受试者或患者施用如本文所述的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂、以及核酸(例如,小环、小基因、辅助共价闭合DNA、狗骨头(dbDNATM) DNA、哑铃形DNA、线性闭合端双螺旋DNA(ceDNA和CELiD)、基于质粒的环状载体、反义寡核苷酸(ASO)、RNAi、siRNA、mRNA等)。根据一些实施方案,向受试者或患者施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物、一种或多种TLR9抑制剂和核酸。根据一些实施方案,向受试者或患者施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物、一种或多种cGAS抑制剂和核酸。根据一些实施方案,向受试者或患者施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物、一种或多种炎性小体拮抗剂和核酸。根据一些实施方案,向受试者或患者施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物、一种或多种TLR9抑制剂、一种或多种cGAS抑制剂和核酸。根据一些实施方案,向受试者或患者施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物、一种或多种TLR9抑制剂、一种或多种炎性小体拮抗剂和核酸。根据一些实施方案,向受试者或患者施用一种或多种TLR9抑制剂、一种或多种cGAS抑制剂和包含所述核酸的ceDNA载体。根据一些实施方案,向

受试者或患者施用一种或多种TLR9抑制剂、一种或多种cGAS抑制剂、一种或多种炎性小体拮抗剂和核酸。根据一些实施方案,向受试者或患者施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物、一种或多种TLR9抑制剂、一种或多种 cGAS抑制剂、一种或多种炎性小体拮抗剂和核酸。

[0320] 在一些实施方案中,伴随地向受试者施用一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂、以及一种或多种核酸(例如,小环、小基因、辅助共价闭合DNA、狗骨头(dbDNATM)DNA、哑铃形DNA、线性闭合端双螺旋DNA(ceDNA和CELiD)、基于质粒的环状载体、反义寡核苷酸(ASO)、RNAi、siRNA、mRNA等)。例如,所述方法可以包括向受试者施用免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂和核酸治疗剂(作为两种单独的配制物,但同时施用)。在另一个实例中,所述方法可以包括在一种配制物中同时向受试者同时地施用免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂和治疗性核酸。

[0321] 在一些实施方案中,依次地向受试者施用一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂、以及一种或多种核酸(例如,小环、小基因、辅助共价闭合DNA、狗骨头(dbDNATM)DNA、哑铃形DNA、线性闭合端双螺旋DNA(ceDNA和CELiD)、基于质粒的环状载体、反义寡核苷酸(ASO)、RNAi、siRNA、mRNA等)。例如,可以在施用治疗性核酸之前施用免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂。

[0322] 在依次施用的情况下,在施用一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂和TNA之间可能存在延迟的时间段。例如,可以在施用 TNA之前的数小时、数天或数周(例如,在施用核酸之前至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时、至少21小时、至少22小时、至少23小时、至少24小时、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约1周、至少约2周、至少约3周、和至少约4周)施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用TNA之前约三十(30)分钟施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约一(1)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约两(2)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约三(3)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约四(4)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约五(5)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约六(6)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约七(7)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约八(8)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约九(9)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之前约十(10)小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。

[0323] 在一个实施方案中,在施用核酸之前不超过约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、或24小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方

案中,可以在施用核酸之前不超过约1天、约2天、约3天、约4天、约6天或约7天施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。

[0324] 在一些实施方案中,可以在施用核酸之后约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、或24小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之后约1天、约2天、约3天、约4天、约6天或约7天施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。

[0325] 在一个实施方案中,在施用核酸之后不超过约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、或24小时施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,可以在施用核酸之后不超过约1天、约2天、约3天、约4天、约6天或约7天施用免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。

[0326] 在一些实施方案中,可以在施用核酸之前、同时和/或之后多次施用一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。

[0327] 在一些实施方案中,核酸(例如,ceDNA载体)可以作为单剂量或作为多剂量施用。根据一些实施方案,可以向受试者施用超过一个剂量。可以根据需要施用多个剂量,因为ceDNA载体由于没有病毒衣壳而不会引发抗衣壳的宿主免疫应答。根据一些实施方案,所施用的剂量数目可以例如在2-10个或更多个剂量之间,例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个。

[0328] 在一些实施方案中,核酸可以与一种或多种本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂组合施用和重复给药多次。例如,治疗性核酸可以在第0天与第一给药方案中在施用核酸之前、之后或同时施用的一种或多种免疫应答抑制剂一起施用。在第0天进行初始治疗后,可以在用核酸(优选地与一种或多种本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂一起)进行初始治疗之后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、或约3月、约4月、约5月、约6月、约7月、约8月、约9月、约10月、约11月、或约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年、约31年、约32年、约33年、约34年、约35年、约36年、约37年、约38年、约39年、约40年、约41年、约42年、约43年、约44年、约45年、约46年、约47年、约48年、约49年或约50年内进行第二次给药(重复剂量)。

[0329] 根据一些实施方案,核酸的再给药导致核酸的表达增加。根据一些实施方案,与第一剂量之后核酸的表达相比,再给药之后核酸表达的增加为在核酸再给药之后约0.5倍至约10倍、约1倍至约5倍、约1倍至约2倍、或约0.5倍、约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍或约10倍更高。

[0330] 通常,剂量将随ceDNA载体的特定特征、表达效率以及随患者的年龄、病状和性别而变化。剂量可以由本领域技术人员确定,并且与传统的AAV载体不同,在任何并发症的情况下,也可以由个别医师来调节,因为ceDNA载体不包含阻止重复给药的免疫活化衣壳蛋

白。

[0331] 根据一些实施方案,超过一次施用(例如两次、三次、四次或更多次施用)如本文所公开的用于表达蛋白质的核酸(例如ceDNA载体)可以用于在不同间隔期(例如每日、每周、每月、每年等)内实现所期望的基因表达水平。

[0332] 根据本文所公开的任何实施方案,核酸可以是治疗性核酸。

[0333] 治疗效果

[0334] 熟练的临床医生确定可以如本文所公开的表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体抑制或降低先天性免疫系统的功效。然而,在用如本文所公开的编码免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的 ceDNA载体治疗之后,如果先天免疫系统的任一种或所有体征或症状以有益方式减少和/或发生改变,或者临床上接受的其他症状或疾病标志物被改良或改善例如至少10%,则治疗在该术语在本文使用时被视为“有效治疗”。示例性标志物和症状在本文的实施例中进行论述。还可以根据个体未发生恶化来测量功效,如通过疾病的稳定或对医疗干预的需求(即,疾病的进展停止或至少减缓)所评估。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或描述于本文中。治疗包括对个体或动物(一些非限制性实例包括人或哺乳动物)的疾病的任何治疗,并且包括:(1)抑制(例如遏制)疾病或减缓疾病或病症的进展;或(2)缓解疾病,例如引起症状消退;以及(3)阻止或减小疾病发展的可能性,或预防与疾病相关的继发疾病/病症(诸如肝脏或肾脏衰竭)。治疗疾病的有效量是指当施用于有需要的哺乳动物时足以产生对该疾病有效治疗的量,所述术语如本文所定义。

[0335] 药剂功效能够通过评估指定疾病所特有的身体指标来测定。分析疾病指标的标准方法是本领域已知的。例如,先天免疫系统的身体指标包括例如但不限于血浆或血液中的可溶性CD14 (sCD14) 和IL-18、IL-22;CSF 或血液中的炎性小体蛋白质,诸如AIM2、NLRP3、NLRP1、ASC和半胱天冬酶1;细胞因子途径的激活可以用作NLRP3和/或AIM2炎性小体途径的激活或半胱天冬酶1激活的功能性读数,并且包括生物标志物,诸如但不限于:白介素(IL) - 1 β 、IL-6、IL-8、IL-18、干扰素(IFN) - γ 、干扰素(IFN) - α 、单核细胞趋化蛋白(MCP) - 1和/或肿瘤坏死因子(TNF) - α 。

[0336] 在一个实施方案中,ceDNA载体包含表达例如对先天免疫系统的抑制起作用的如本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的核酸序列。在优选的实施方案中,如本文所公开的,例如如本文所公开的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂不引起免疫系统反应,而是在受试者中抑制或降低免疫系统。

[0337] 用于治疗目的的药物组合物通常必须在制造和存储条件下是无菌的和稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其他适合于高浓度的闭合端DNA载体(例如ceDNA载体)的有序结构。无菌注射溶液可以通过以下方式制备:将所需量的ceDNA载体根据需要将上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当的缓冲液中,随后进行过滤灭菌。

[0338] 可以将如本文所公开的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂掺入适合于局部、全身、羊膜内、鞘内、颅内、动脉内、静脉内、淋巴内、腹膜内、皮下、气管、组织内(例如肌内、心内、肝内、肾内、脑内)、鞘内、膀胱内、结膜(例如眼眶外、眼眶内、眼眶后、视网膜内、视网膜下、脉络膜、脉络膜下、基质内、前房内和玻璃体内)、

耳蜗内和粘膜(例如口腔、直肠、鼻)施用的药物组合物中。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及如核内显微注射或胞质内注射的细胞内注射进行的被动组织转导。

[0339] 在一些方面,本文所提供的方法包括将一种或多种闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和如本文所述的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂递送至宿主细胞中。本文还提供了通过这类方法产生的细胞,以及包含这类细胞或由这类细胞产生的生物体(例如动物、植物或真菌)。核酸的递送方法可包括脂质转染、核转染、显微注射、生物弹药、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸偶联物、裸DNA和试剂增强的DNA吸收。脂质体转染描述于例如美国专利第5,049,386号、第4,946,787号和第4,897,355号)并且脂质体转染试剂有市售(例如TransfectamTM和LipofectinTM)。能够递送到细胞(例如体外或离体施用)或靶组织(例如体内施用)。

[0340] 将核酸递送到细胞的各种技术和方法是所属领域中已知的。例如,可以将如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和雷帕霉素或雷帕霉素类似物配制成脂质纳米颗粒(LNP)、类脂(lipidoid)、脂质体、脂质纳米颗粒、脂复合物(lipoplex)或核-壳纳米颗粒中。通常,LNP由核酸(例如ceDNA)分子、一种或多种可电离或阳离子脂质(或其盐)、一种或多种非离子或中性脂质(例如磷脂)、防止聚集的分子(例如PEG或PEG-脂质偶联物)以及任选的固醇(例如胆固醇)构成。

[0341] 将闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂递送至细胞的另一种方法是通过将核酸与被该细胞内化的配体缀合。例如,所述配体可以结合细胞表面上的受体并通过胞吞作用而被内化。配体可以与核酸中的核苷酸共价连接。用于将核酸递送到细胞中的示例性偶联物描述于例如W02015/006740、W02014/025805、W02012/037254、W02009/082606、W02009/073809、W02009/018332、W02006/112872、W02004/090108、W02004/091515和W02017/177326中。

[0342] 如本文所述的核酸和闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)也可以通过转染递送至细胞。有用的转染方法包括(但不限于):脂质介导的转染、阳离子聚合物介导的转染或磷酸钙沉淀。转染试剂在本领域中是熟知的并且包括但不限于:TurboFect转染试剂(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific®))、Pro-Ject试剂(赛默飞世尔科技)、TRANSPASSTM蛋白转染试剂(新英格兰生物实验室(New England Biolabs®))、CHARIOTTM蛋白递送试剂(Active Motif)、PROTEOJUICETM蛋白转染试剂(EMD密理博(EMD Millipore®))、293fectin、LIPOFECTAMINETM2000、LIPOFECTAMINETM3000(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTAMINETM(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTINTM(赛默飞世尔科技)、DMRIE-C、CELLFECTINTM(赛默飞世尔科技)、OLIGOFECTAMINETM(赛默飞世尔科技)、LIPOFECTACETM、FUGENETM(瑞士巴塞尔的罗氏(Roche®, Basel, Switzerland))、FUGENETMHD(罗氏)、TRANSFECTAMTM(转染胺(Transfectam),威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega®, Madison, Wis.))、TFX-10TM(普洛麦格公司(Promega®))、TFX-20TM(普洛麦格公司)、TFX-50TM(普洛麦格公司)、TRANSFECTINTM(加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(BioRad®, Hercules, Calif.))、SILENTFECTTM(伯乐公司(Bio-Rad®))、EffecteneTM

(加利福尼亚州瓦伦西亚的凯杰公司 (Qiagen®, Valencia, Calif.))、DC-chol (阿凡提极性脂质公司 (Avanti Polar Lipids))、GENEPORTER™ (加利福尼亚州圣地亚哥的基因疗法系统 (Gene Therapy Systems®, San Diego, Calif.))、DHARMAFECT 1™ (科罗拉多州拉斐特的达尔马肯 (Dharmacon®, Lafayette, Colo.))、DHARMAFECT 2™ (达尔马肯 (Dharmacon®))、DHARMAFECT 3™ (达尔马肯)、DHARMAFECT 4™ (达尔马肯)、ESCORT™ III (密苏里州圣路易斯的西格玛公司 (Sigma®, St. Louis, Mo.)) 和 ESCORT™ IV (西格玛化学品公司 (Sigma Chemical Co.))。核酸, 如 ceDNA, 也可以通过所属领域的技术人员已知的微流体方法递送到细胞。

[0343] 如本文所述的闭合端DNA载体 (包括 ceDNA 载体) 和免疫应答 (例如先天性免疫应答) 抑制剂也可以直接施用于生物体以在体内转导细胞。施用是通过正常用于引入分子与血液或组织细胞最终接触的任何途径, 包括 (但不限于): 注射、输注、局部施用和电穿孔。适合的施用此类核酸的方法是可利用的并且是所属领域的技术人员熟知的, 并且虽然可以使用超过一种途径来施用特定的组合物, 但特定的途径经常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0344] 引入如本文所述的闭合端DNA载体 (包括 ceDNA 载体) 和先天性免疫应答抑制剂的方法可以例如通过如美国专利第 5,928,638 号中所述的方法递送到造血干细胞中。

[0345] 可以将如本文所述的闭合端DNA载体 (包括 ceDNA 载体) 和免疫应答 (例如先天性免疫应答) 抑制剂加入到脂质体中以递送至受试者的细胞或靶器官。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下, 脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分 (API) 来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂, 尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成, 然而这些组合物还可以包括其他脂质。示例性脂质体和脂质体配制物公开于 2018年9月7日提交的国际申请 PCT/US2018/050042 和 2018年12月6日提交的国际申请 PCT/US2018/064242 中, 例如参见题为“药物配制物”的章节。

[0346] 本领域已知的各种递送方法或其改良方法可用于在体外或在体内递送如本文所述的闭合端DNA载体 (包括 ceDNA 载体) 和免疫应答 (例如先天性免疫应答) 抑制剂。举例来说, 在一些实施方案中, 通过机械、电力、超声波、流体动力或基于激光的能量让细胞膜瞬时渗透以便于DNA进入靶向细胞中来递送 ceDNA 载体。举例来说, 可以通过经过大小限制的通道挤压细胞或通过所属领域中已知的其他手段来瞬时破坏细胞膜来递送 ceDNA 载体。在一些情况下, 单独的 ceDNA 载体作为裸DNA直接注射到皮肤、胸腺、心肌、骨骼肌或肝细胞中。在一些情况下, 通过基因枪递送 ceDNA 载体。涂覆有无衣壳的 AAV 载体的金或钨球形粒子 (直径 1-3 μm) 可以通过加压气体加速到高速而渗透到目标组织细胞中。

[0347] 本文特别涵盖包含如本文所述的闭合端DNA载体 (包括 ceDNA 载体) 和雷帕霉素或雷帕霉素类似物以及药学上可接受的载剂的组合物。在一些实施方案中, ceDNA 载体与脂质递送系统, 例如本文所述的脂质体一起配制。在一些实施方案中, 这类组合物通过熟练从业人员期望的任何途径来施用。可以通过不同途径, 包括经口、肠胃外、舌下、经皮直肠、经粘膜、局部、通过吸入、经颊施用、胸膜内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌内、鼻内鞘内和关

节内或其组合,向受试者施用组合物。对于兽医用途,可根据正常兽医实践将组合物作为适当可接受的配制物施用。兽医可以很容易地确定最适合具体动物的给药方案和施用途径。组合物可以通过传统的注射器、无针注射装置、“微粒轰击枪”或其他物理方法,例如电穿孔(“EP”)、“流体力学方法”或超声波来施用。

[0348] 在一些情况下,通过流体动力注射来递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂,流体动力注射是一种将任何水溶性化合物和颗粒直接经细胞内递送至内脏器官和整个肢体的骨骼肌中的简单且高效的方法。

[0349] 在一些情况下,通过在膜上制造纳米孔以促进将DNA颗粒细胞内递送至内脏器官或肿瘤的细胞中通过超声波来递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂,因此闭合端DNA载体的大小和浓度在该系统的效率方面起着很大作用。在一些情况下,通过使用磁场使含有核酸的颗粒集中在靶细胞中通过磁转染来递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。

[0350] 在一些情况下,可以使用化学递送系统,例如通过使用纳米复合物,其包括用属于阳离子脂质体/胶束或阳离子聚合物的聚阳离子纳米粒子来压紧带负电核酸。用于递送方法的阳离子脂质包括但不限于单价阳离子脂质、多价阳离子脂质、含胍化合物、胆固醇衍生化合物、阳离子聚合物、(例如聚(乙烯亚胺)、聚-L-赖氨酸、鱼精蛋白、其他阳离子聚合物)和脂质-聚合物杂化物。

[0351] A. 外泌体:

[0352] 在一些实施方案中,通过包装在外泌体中来递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。外泌体是胞吞来源的小膜囊泡,其在多囊泡体与质膜融合后被释放到细胞外环境中。其表面由来自供体细胞的细胞膜的脂质双层组成,其含有来自产生外泌体的细胞的胞溶质并且在表面上展现来自亲本细胞的膜蛋白。外泌体由包括上皮细胞、B和T淋巴细胞、肥大细胞(MC)以及树突状细胞(DC)在内的各种细胞类型产生。一些实施方案设想使用直径在10nm与1 μ m之间、20nm与500nm之间、30nm与250nm之间、50nm与100nm之间的外泌体。使用外泌体的供体细胞或通过特定核酸引入外泌体中,可以分离外泌体以递送到目标细胞中。本领域已知的各种途径可用于产生含有本发明的无衣壳AAV载体的外泌体。

[0353] B. 微米颗粒/纳米颗粒:

[0354] 在一些实施方案中,通过脂质纳米颗粒来递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和雷帕霉素或雷帕霉素类似物。通常,脂质纳米粒子包含可电离的氨基脂质(例如4-(二甲基氨基)丁酸三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基酯、DLin-MC3-DMA、磷脂酰胆碱(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱, DSPC)、胆固醇和外被脂质(聚乙二醇-二肉豆蔻酰基甘油, PEG-DMG),例如如Tam等人(2013).《用于递送siRNA的脂质纳米粒子的进展(Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA delivery.)》《制药(Pharmaceuticals)》5(3):498-507所公开。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的平均直径在约10nm与约1000nm之间。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的直径小于300nm。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的直径在约10nm与约300nm之间。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的直径小于200nm。在

一些实施方案中,脂质纳米颗粒的直径在约25nm与约200nm之间。在一些其他实施方案中,包含治疗性核酸和/或免疫抑制剂的脂质颗粒通常具有从约20nm至约100nm、30nm 至约150nm、从约40nm至约150nm、从约50nm至约150nm、从约60nm 至约130nm、从约70nm至约110nm、从约70nm至约100nm、从约80nm 至约100nm、从约90nm至约100nm、从约70至约90nm、从约80nm至约90nm、从约70nm至约80nm、或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、或150nm的平均直径以确保有效递送。含核酸的脂质颗粒及其制备方法公开在例如PCT/US18/50042、美国专利公开号 20040142025和20070042031中,所述文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒制剂(例如包含多个脂质纳米颗粒的组合)具有一定的尺寸分布,其中平均尺寸(例如直径)是约70nm至约200nm,且更典型地,平均尺寸是约100nm或更小。

[0355] 根据一些实施方案,可以将包含本发明的核酸(例如,治疗性核酸、用于研究目的的核酸)和/或免疫应答(例如,先天性免疫应答)抑制剂的液体药物组合物配制在脂质颗粒中。在一些实施方案中,包含核酸的脂质颗粒可以由阳离子脂质形成。在一些其他实施方案中,包含核酸的脂质颗粒可以由非阳离子脂质形成。在优选的实施方案中,本发明的脂质颗粒是含核酸的脂质颗粒,其由包含选自以下的核酸的阳离子脂质形成:mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、小环DNA、小基因、病毒DNA(例如慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、闭合端线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、狗骨头(dbDNATM)DNA载体、极小的免疫学定义的基因表达(MIDGE)载体、非病毒辅助DNA载体(线性共价闭合DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。

[0356] 本领域已知的各种脂质纳米颗粒可以用于递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)。举例来说,在美国专利第9,404,127号、第9,006,417号和第9,518,272号中描述了使用脂质纳米粒子的各种递送方法。

[0357] 在一些实施方案中,通过金纳米颗粒递送如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。通常,核酸可以与金纳米粒子共价结合或与金纳米粒子非共价结合(例如通过电荷-电荷相互作用结合),例如如Ding等人(2014).《用于核酸递送的金纳米粒子(Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery.)》《分子疗法》22(6);1075-1083所描述。在一些实施方案中,使用例如美国专利第6,812,334号中描述的方法产生金纳米颗粒-核酸偶联物。

[0358] C. 偶联物

[0359] 在一些实施方案中,将如本文所公开的、如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂与增加细胞摄取的药剂缀合(例如共价结合)。“增加细胞吸收的药剂”是促进核酸跨脂质膜运输的分子。举例来说,核酸可以与亲脂性化合物(例如胆固醇、生育酚等)、细胞穿透肽(CPP)(例如穿膜肽、TAT、Syn1B等)和多元胺(例如精胺)偶联。增强细胞吸收的药剂的其他实例公开于例如Winkler(2013).《用于治疗应用的寡核苷酸偶联物(Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications.)》《治疗剂递送(Ther.Deliv.)》4(7);791-809中所公开。

[0360] 在一些实施方案中,将如本文所公开的、如本文所述的闭合端DNA载体(包括

ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂与聚合物(例如聚合分子)或叶酸类分子(例如叶酸分子)缀合。通常,与聚合物偶联的核酸的递送是所属领域中已知的,例如如W02000/34343和W02008/022309中所描述。在一些实施方案中,例如如美国专利第8,987,377号中所描述,将如本文公开的ceDNA载体与聚(酰胺)聚合物偶联。在一些实施方案中,如美国专利第8,507,455号中所描述,将本公开所描述的核酸与叶酸分子偶联。

[0361] 在一些实施方案中,将如本文所公开的、如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和雷帕霉素或雷帕霉素类似物与碳水化合物(例如如美国专利第8,450,467号中所述)缀合。

[0362] 在一些实施方案中,可以将脂质纳米颗粒与其他部分缀合以防止聚集。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物,例如,偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG和与神经酰胺偶联的PEG(参见例如,美国专利号5,885,613)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见例如,2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294,828和2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295,140)、聚酰胺寡聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)及其混合物。POZ-脂质缀合物的其他实例在PCT公开号W02010/006282中有描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以经由接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,包括例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方案中,使用不含酯的接头部分,诸如酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0363] D. 纳米胶囊

[0364] 可替代地,可以使用如本文所公开的、如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和雷帕霉素或雷帕霉素类似物。纳米胶囊通常可以呈稳定并且可再现的方式截留物质。为了避免由于细胞内聚合物过载所致的副作用,应使用能够在体内降解的聚合物来设计此类超细粒子(尺寸约0.1 μm)。满足这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒是预期使用的。

[0365] E. 脂质体

[0366] 可以将如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂加入到脂质体中以递送至受试者的细胞或靶器官。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其他脂质。

[0367] 脂质体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的。已经研发了血清稳定性和循环半衰期有所改善的脂质体(美国专利第5,741,516号)。此外,已经描述了脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载剂的各种方法(美国专利第5,567,434号;第5,552,157号;第5,565,213号;第5,738,868号和第5,795,587号)。

[0368] F. 示例性脂质体和脂质纳米颗粒(LNP)组合物

[0369] 可以将如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂加入到脂质体中以递送至受试者的细胞(例如需要转基因表达

的细胞)。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在药物研发的背景下,通常将脂质体用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分(API)来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包括其他脂质。

[0370] 包含ceDNA的脂质纳米颗粒(LNP)公开于各自以全文引用的方式并入本文中的2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的国际申请PCT/US2018/064242中,并且设想用于本文所公开的方法和组合物中。

[0371] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含一种或多种具有聚乙二醇(PEG)官能团的化合物(所谓的“PEG化的化合物”),聚乙二醇官能团可以降低所述化合物的免疫原性/抗原性、为其提供亲水性和疏水性并降低给药频率。或者,脂质体制剂仅包含聚乙二醇(PEG)聚合物作为额外组分。在这些方面中,PEG或PEG官能团的分子量可以从62 Da至约5,000Da。

[0372] 在一些方面中,本公开提供了一种脂质体制剂,其将在数小时至数周的时间内以延长释放或受控释放曲线来递送API。在一些相关的方面,脂质体制剂可以包含以脂质双层结合的水性腔。在其他相关方面,脂质体制剂将API与组分一起包封起来,所述组分在升高的温度下经历物理转变,在数小时到数周的时段内释放API。

[0373] 在一些方面,脂质体制剂包含鞘磷脂和一种或多种本文公开的脂质。在一些方面中,脂质体制剂包含光敏体。

[0374] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包括一种或多种选自以下的脂质:N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐、(二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺)、MPEG(甲氧基聚乙二醇)偶联的脂质、HSPC(氢化大豆磷脂酰胆碱);PEG(聚乙二醇);DSPE(二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺);DSPC(二硬脂酰基磷脂酰胆碱);DOPC(二油酰基磷脂酰胆碱);DPPG(二棕榈酰基磷脂酰甘油);EPC(绵羊磷脂酰胆碱);DOPS(二油酰基磷脂酰丝氨酸);POPC(棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱);SM(鞘磷脂);MPEG(甲氧基聚乙二醇);DMPC(二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱);DMPG(二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油);DSPG(二硬脂酰基磷脂酰甘油);DEPC(二芥酰基磷脂酰胆碱);DOPE(二油酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺)、硫酸胆固醇酯(CS)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、DOPC(二油酰基-sn-甘油-磷脂酰胆碱)或其任何组合。

[0375] 在一些方面中,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含磷脂、胆固醇和PEG化脂质,摩尔比为56:38:5。在一些方面,脂质体制剂的总脂质含量为2-16mg/mL。在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和PEG化脂质。在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和PEG化脂质,摩尔比分别为3:0.015:2。在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、胆固醇和PEG化脂质。在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含含有磷脂酰胆碱官能团的脂质和胆固醇。在一些方面,PEG化脂质是PEG-2000-DSPE。在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含DPPG、大豆PC、MPEG-DSPE脂质偶联物和胆固醇。

[0376] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂,其包含一种或多种含有磷脂酰胆碱官能团的脂质和一种或多种含有乙醇胺官能团的脂质。在一些方面,本公开提供了一种

脂质体制剂物,其包含以下中的一种或多种:含有磷脂酰胆碱官能团的脂质、含有乙醇胺官能团的脂质和固醇,例如胆固醇。在一些方面,脂质体制剂物包含DOPC/DEPC和DOPE。

[0377] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂物,其还包含一种或多种药物赋形剂,例如蔗糖和/或甘氨酸。

[0378] 在一些方面,本公开提供了一种结构上为单层或多层的脂质体制剂物。在一些方面中,本公开提供了一种包含多囊泡颗粒和/或泡沫基颗粒的脂质体制剂物。在一些方面中,本公开提供了一种相对普通纳米颗粒的相对尺寸更大并且尺寸为约150至250nm的脂质体制剂物。在一些方面中,脂质体制剂物是冻干粉末。

[0379] 在一些方面,本公开提供了一种脂质体制剂物,其通过向在脂质体外部具有分离的ceDNA的混合物中添加弱碱,用本文中公开或描述的 ceDNA载体制备并负载所述ceDNA载体。这种添加将脂质体外部的pH 提高到大致7.3,并驱动API进入脂质体中。在一些方面,本公开提供了一种脂质体内部pH为酸性的脂质体制剂物。在此类情况下,脂质体的内部可以处于pH 4-6.9下,并且更优选pH 6.5。在其他方面,本公开提供了一种通过使用脂质体内药物稳定化技术制备的脂质体制剂物。在此类情况下,利用聚合或非聚合的带高电荷阴离子和脂质体内捕获剂,例如多磷酸盐或蔗糖八硫酸盐。

[0380] 在一些方面,本公开提供了包含如本文所述的DNA载体(包括 ceDNA载体)和可电离的脂质的脂质纳米颗粒。举例来说,通过如2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开的方法获得的 ceDNA制备并负载ceDNA的脂质纳米粒子制剂物,所述申请并入本文中。这可以通过在低pH下将乙醇脂质与ceDNA水溶液高能混合,使可电离脂质质子化并为ceDNA/脂质缔合和粒子成核提供有利的能量来实现。通过水稀释和去除有机溶剂可以进一步稳定粒子。能够将颗粒浓缩至所需水平。

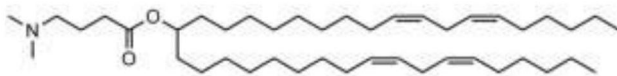
[0381] 通常,以约10:1至30:1的总脂质与ceDNA(质量或重量)比率制备脂质颗粒。在一些实施方案中,脂质与ceDNA比率(质量/质量比率; w/w比率)可以在约1:1至约25:1、约10:1至约14:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1范围内。根据本文任何方面或实施方案的一些实施方案,所述组合物具有约15:1的总脂质与 ceDNA之比。根据本文任何方面或实施方案的一些实施方案,所述组合物具有约30:1的总脂质与ceDNA之比。根据本文任何方面或实施方案的一些实施方案,所述组合物具有约40:1的总脂质与ceDNA之比。根据本文任何方面或实施方案的一些实施方案,所述组合物具有约50:1的总脂质与ceDNA之比。可以调节脂质和ceDNA的量以提供所需的N/P比,例如N/P比为3、4、5、6、7、8、9、10或更高。通常,脂质颗粒制剂的总脂质含量可以在约5mg/ml至约30mg/mL的范围内。

[0382] 可电离的脂质通常用于在低pH值下浓缩核酸货物(例如ceDNA)并驱动膜缔合和融合。通常,可电离脂质是包含至少一个氨基的在酸性条件下(例如在pH 6.5或更低的条件下)带正电或质子化的脂质。可电离脂质在本文中也称为阳离子脂质。

[0383] 示例性可电离脂质描述于国际PCT专利公开W02015/095340、W02015/199952、W02018/011633、W02017/049245、W02015/061467、W02012/040184、W02012/000104、W02015/074085、W02016/081029、W02017/004143、W02017/075531、W02017/117528、W02011/022460、W02013/148541、W02013/116126、W02011/153120、W02012/044638、W02012/054365、W02011/090965、W02013/016058、W02012/162210、W02008/042973、W02010/129709、W02010/144740、W02012/099755、W02013/049328、W02013/086322、

W02013/086373、W02011/071860、W02009/132131、W02010/048536、W02010/088537、W02010/054401、W02010/054406、W02010/054405、W02010/054384、W02012/016184、W02009/086558、W02010/042877、W02011/000106、W02011/000107、W02005/120152、W02011/141705、W02013/126803、W02006/007712、W02011/038160、W02005/121348、W02011/066651、W02009/127060、W02011/141704、W02006/069782、W02012/031043、W02013/006825、W02013/033563、W02013/089151、W02017/099823、W02015/095346和W02013/086354；以及美国专利公开US2016/0311759、US2015/0376115、US2016/0151284、US2017/0210697、US2015/0140070、US2013/0178541、US2013/0303587、US2015/0141678、US2015/0239926、US2016/0376224、US2017/0119904、US2012/0149894、US2015/0057373、US2013/0090372、US2013/0274523、US2013/0274504、US2013/0274504、US2009/0023673、US2012/0128760、US2010/0324120、US2014/0200257、US2015/0203446、US2018/0005363、US2014/0308304、US2013/0338210、US2012/0101148、US2012/0027796、US2012/0058144、US2013/0323269、US2011/0117125、US2011/0256175、US2012/0202871、US2011/0076335、US2006/0083780、US2013/0123338、US2015/0064242、US2006/0051405、US2013/0065939、US2006/0008910、US2003/0022649、US2010/0130588、US2013/0116307、US2010/0062967、US2013/0202684、US2014/0141070、US2014/0255472、US2014/0039032、US2018/0028664、US2016/0317458和US2013/0195920，所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0384] 在一些实施方案中，可电离脂质为具有以下结构的 MC3 (6Z, 9Z, 28Z, 31Z) -三十七碳-6, 9, 28, 31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基) 丁酸酯 (DLin-MC3-DMA或MC3)：



[0385]

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

[0386] 脂质 DLin-MC3-DMA 描述于 Jayaraman 等人，《英国应用化学国际版 (Angew. Chem. Int. Ed Engl.)》(2012), 51 (34): 8529-8533, 其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0387] 在一些实施方案中，可电离脂质是如 W02015/074085 中所述的脂质 ATX-002, 其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0388] 在一些实施方案中，可电离脂质是如 W02012/040184 中所述的 (13Z, 16Z) -N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13, 16-二烯-1-胺 (化合物 32), 所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0389] 在一些实施方案中，可电离脂质是如 W02015/199952 中所述的化合物 6 或化合物 22, 所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0390] 没有限制，可电离的脂质可以占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的 20- 90% (mol)。例如，可电离的脂质摩尔含量可以为脂质纳米颗粒中存在的总脂质的 20-70% (mol)、30-60% (mol) 或 40-50% (mol)。在一些实施方案中，可电离的脂质占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的约 50mol% 至约 90mol%。

[0391] 在一些方面中，脂质纳米颗粒可以进一步包含非阳离子脂质。非离子脂质包括两亲脂质、中性脂质和阴离子脂质。因此，非阳离子脂质可以是中性不带电的、两性离子型或

阴离子脂质。非阳离子脂质通常用于增强融合性。

[0392] 设想用于包含如本文所述的DNA载体,包括ceDNA载体的方法和组合物中的示例性非阳离子脂质描述于全文并入本文中的2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242中。

[0393] 示例性的非阳离子脂质描述于国际申请PCT公开案W02017/099823 和美国专利公开案US2018/0028664中,所述公开案的内容都以全文引用的方式并入本文中。

[0394] 非阳离子脂质可占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0-30% (mol)。例如,非阳离子脂质含量为脂质纳米颗粒中存在的总脂质的5-20% (mol) 或10-15% (mol)。在各种实施方案中,可电离的脂质与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

[0395] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒不包含任何磷脂。在一些方面中,脂质纳米颗粒能够进一步包含例如固醇等组分,以提供膜完整性。

[0396] 可以用于脂质纳米粒子中的一种示例性固醇是胆固醇和其衍生物。示例性胆固醇衍生物描述于国际申请W02009/127060和美国专利公开 US2010/0130588中,所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0397] 提供膜完整性的组分(例如固醇)能够占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0-50% (mol)。在一些实施方案中,此类组分占脂质纳米粒子的总脂质含量的20%-50% (mol)、30%-40% (mol)。

[0398] 在一些方面,脂质纳米粒子可以还包含聚乙二醇(PEG)或偶联的脂质分子。通常,这些用于抑制脂质纳米粒子的聚集和/或提供空间稳定。示例性偶联脂质包括(但不限于): PEG-脂质偶联物、聚噁唑啉(POZ)-脂质偶联物、聚酰胺-脂质偶联物(如ATTA-脂质偶联物)、阳离子聚合物脂质(CPL)偶联物以及其混合物。在一些实施方案中,偶联的脂质分子是PEG-脂质偶联物,例如(甲氧基聚乙二醇)偶联的脂质。示例性的PEG-脂质缀合物包括但不限于PEG-二酰基甘油(DAG)(例如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEGS-DAG)(例如丁二酸4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇 2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐或其混合物。另外的示例性PEG-脂质缀合物描述于例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224和US2017/0119904 中,所有这些文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0399] 在一些实施方案中,PEG-脂质是US2018/0028664中公开的化合物,其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0400] 在一些实施方案中,PEG-脂质公开于US20150376115或 US2016/0376224中,两者的全部内容以全文引用的方式并入本文中。

[0401] PEG-DAA偶联物可以是例如PEG-二月桂酰氧基丙基、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基、PEG-二棕榈酰氧基丙基或PEG-二硬脂酰氧基丙基。PEG-脂质可以是PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕榈酰基甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基糖酰胺、PEG-二肉豆蔻基糖酰胺、PEG-二棕榈酰基糖酰胺、PEG-二硬脂基糖酰胺、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3

[β]-氧基) 羧酰胺基-3',6'-二氧杂辛烷基] 氨甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)、PEG-DMB (3,4-二-十四烷氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇) 醚) 和 1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些实例中,PEG-脂质可以选自由以下组成的群组:PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

[0402] 也可以使用与除PEG以外的分子偶联的脂质代替PEG-脂质。举例来说,代替PEG-脂质或除PEG-脂质以外,还可以使用聚噁唑啉(POZ)-脂质偶联物、聚酰胺-脂质偶联物(如ATTA-脂质偶联物)和阳离子聚合物脂质(CPL)偶联物。在以下中描述了示例性偶联的脂质,即PEG-脂质、(POZ)-脂质偶联物、ATTA-脂质偶联物和阳离子聚合物-脂质:国际专利申请公开案W01996/010392、W01998/051278、W02002/087541、W02005/026372、W02008/147438、W02009/086558、W02012/000104、W02017/117528、W02017/099823、W02015/199952、W02017/004143、W02015/095346、W02012/000104、W02012/000104和W02010/006282;美国专利申请公开案US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2013/0303587、US2018/0028664、US2015/0376115、US2016/0376224、US2016/0317458、US2013/0303587、US2013/0303587和US20110123453;以及美国专利US5,885,613、US6,287,591、US6,320,017和US6,586,559,所有文献的内容以全文引用的方式并入本文。

[0403] 在一些实施方案中,一种或多种另外的化合物可以是治疗剂。治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。换句话说,治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。换句话说,可以根据治疗目的和所需的生物学作用选择治疗剂。举例来说,如果LNP内的ceDNA适用于治疗癌症,那么另外的化合物可以是抗癌剂(例如化学治疗剂、靶向癌症疗法(包括但不限于小分子、抗体或抗体-药物偶联物)。在另一个实例中,如果含有ceDNA的LNP适用于治疗感染,那么另外的化合物可以是抗菌剂(例如抗生素或抗病毒化合物)。在又一个实例中,如果含有ceDNA的LNP适用于治疗免疫疾病或病症,那么另外的化合物可以是调节免疫应答的化合物(例如免疫抑制剂、免疫刺激化合物或调节一种或多种特异性免疫途径的化合物)。在一些实施方案中,含有如编码不同蛋白质的ceDNA的不同化合物或如治疗剂的不同化合物的不同脂质纳米粒子的不同混合物可以用于本发明的组合物和方法中。

[0404] 在一些实施方案中,另外的化合物是免疫调节剂。例如,另外的化合物是免疫抑制剂。在一些实施方案中,另外的化合物是免疫刺激剂。

[0405] 本文还提供了药物组合物,其包含经脂质纳米颗粒囊封的如本文所述的ceDNA载体和雷帕霉素或雷帕霉素类似物、以及药学上可接受的载剂或赋形剂。本文还提供了药物组合物,其包含经脂质纳米颗粒囊封的ceDNA载体和药学上可接受的载剂或赋形剂,其中雷帕霉素或雷帕霉素类似物以如本文所述的不同组合物共同施用至受试者。

[0406] 在一些方面,本公开提供了一种脂质纳米粒子配制物,其还包含一种或多种药物赋形剂。在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制物还包含蔗糖、tris、海藻糖和/或甘氨酸。

[0407] 可以将如本文所述的闭合端DNA载体(包括ceDNA载体)和任选地一种或多种免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂与颗粒的脂质部分络合或囊封在脂质纳米颗粒的脂质位置中。在一些实施方案中,可以将如本文所述的DNA载体(包括ceDNA载体)完全囊封在脂质纳米颗粒的脂质位置中,从而例如在水溶液中保护其免于被核酸酶降解。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中的如本文所述的DNA载体(包括ceDNA载体)在脂质纳米颗粒于37°C下

暴露于核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟之后基本上不被降解。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中的 ceDNA在颗粒在血清中在37℃下培育至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后基本上不降解。

[0408] 在某些实施方案中,脂质纳米粒子对个体,例如对哺乳动物,如人类基本上是无毒的。在一些方面,脂质纳米粒子配制物是冻干粉末。

[0409] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子是具有至少一个脂质双层的固体芯粒子。在其他实施方案中,脂质纳米粒子具有非双层结构,即非层状(即非双层)形态。不受限制,非双层形态能够包括例如三维管、棒、对称立方体等。举例来说,例如使用如US2010/0130588中所述的Cryo-TEM分析,能够轻松地评估和表征脂质纳米颗粒的形态(片层与非片层),所述文献的内容以全文引用的方式并入本文。

[0410] 在一些其他实施方案中,具有非片层形态的脂质纳米颗粒是电子致密的。在一些方面中,本公开提供了结构上为单层或多层的脂质纳米颗粒。在一些方面中,本公开提供了脂质纳米颗粒配制物,其包含多囊泡颗粒和/或基于泡沫的颗粒。

[0411] 通过控制脂质组分的组成和浓度,可以控制脂质偶联物从脂质粒子中交换出来的速率,进而可以控制脂质纳米粒子融合的速率。另外,包括例如pH、温度或离子强度的其他变量可以用于改变和/或控制脂质纳米粒子融合的速率。基于本公开,所属领域的普通技术人员将清楚可以用于控制脂质纳米粒子融合的速率的其他方法。同样显而易见,通过控制脂质偶联物的组成和浓度,可以控制脂质粒子的大小。配制的阳离子脂质的pKa可能与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,《应用化学国际版(Angewandte Chemie, International Edition)》(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》28,172-176(2010),两个文献都以全文引用的方式并入本文)。pKa的优选范围是约5到约7。使用基于2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸(TNS)荧光的分析测定脂质纳米粒子中阳离子脂质的pKa。

[0412] VI. 免疫应答抑制剂

[0413] 本文提供了抑制剂或免疫应答。根据实施方案,免疫应答抑制剂是先天性免疫应答抑制剂。

[0414] 雷帕霉素或雷帕霉素类似物

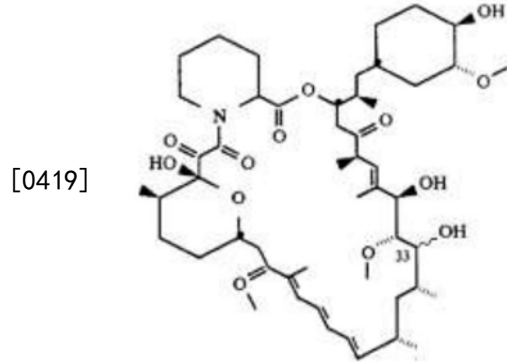
[0415] 根据一些方面,本公开提供了具有与雷帕霉素或雷帕霉素类似物结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA载体)。在一些实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以过饱和的量存在于如WO 2016/073799中所述的合成纳米载剂中。在一些实施方案中,ceDNA载体也存在于同一个纳米载剂中。

[0416] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,将雷帕霉素或雷帕霉素类似物与ceDNA载体一起共同施用至受试者。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,将ceDNA载体和雷帕霉素或雷帕霉素类似物一起以单一配制物共同施用。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以过饱和的浓度存在于如WO 2016/073799中所述的合成纳米载剂中。在一些实施方案中,ceDNA载体也存在于同一个纳米载剂中。在一些实施方案中,配制在脂质纳米颗粒中的ceDNA载体也存在于相同的纳米载

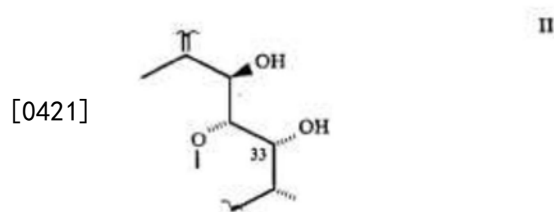
剂中。

[0417] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是本领域已知的任何雷帕霉素类似物,诸如在美国专利5,138,051或W0 2017/040341中所述的任何雷帕霉素类似物,所述文献各自的内容以全文引用的方式并入本文。

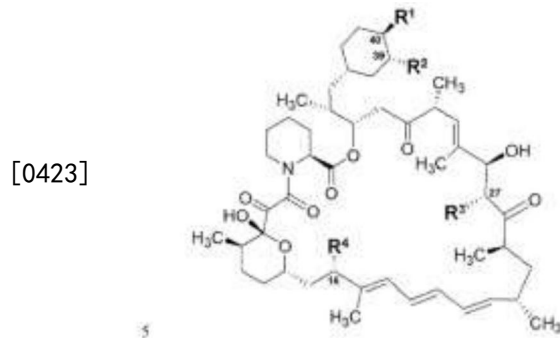
[0418] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是如下所示的式I的化合物:



[0420] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是式II的化合物,其中在式I的 C-33上的取代基的构型为如下所示的R构型:



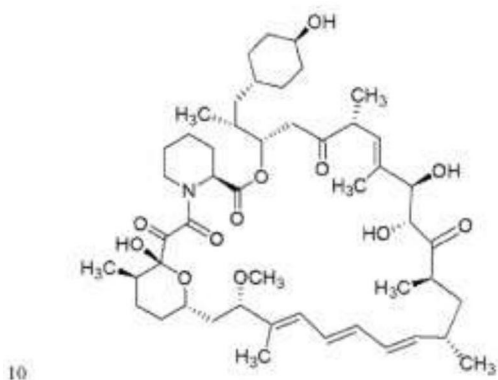
[0422] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是如下所示的式III的化合物:



[0424] 或其药学上可接受的盐,其中: R^1 为OH或 OCH_3 , R^2 为H或F, R^3 为H、OH或 OCH_3 ;并且 R^4 为OH或 OCH_3 。

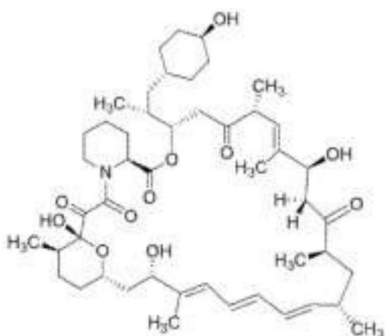
[0425] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是纯手性形式的式III化合物,作为式IV的单一非对映异构体,如下所示:

[0426]



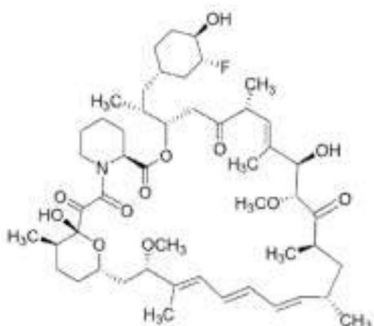
[0427] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是纯手性形式的式III化合物,作为式V的单一非对映异构体,如下所示:

[0428]



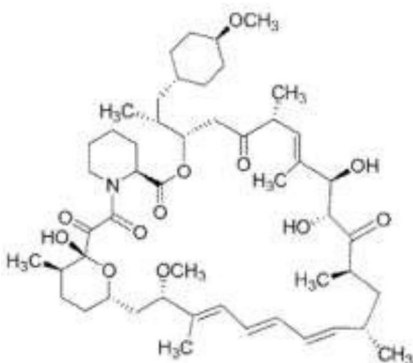
[0429] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是纯手性形式的式III化合物,作为式VI的单一非对映异构体,如下所示:

[0430]



[0431] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是纯手性形式的式III化合物,作为式VII的单一非对映异构体,如下所示:

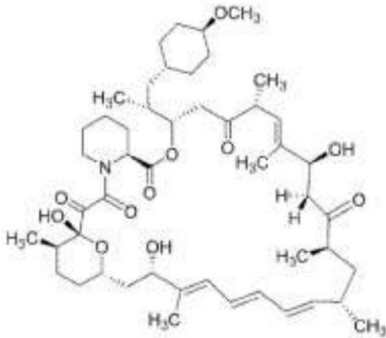
[0432]



[0433] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是纯手性形式的式III化合物,作为式VIII的

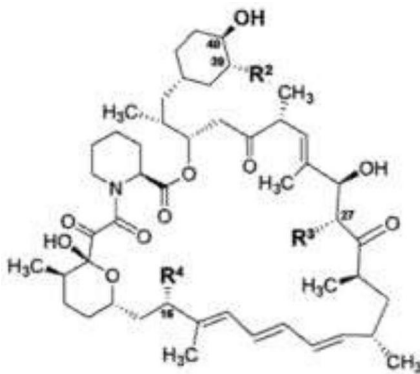
单一非对映异构体,如下所示:

[0434]



[0435] 在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是式IX的化合物,如下所示:

[0436]



[0437] 或其药学上可接受的盐,其中R²是H或F,R³是OH或OCH₃;并且R⁴是OCH₃或OH。在某些实施方案中,R⁴是OCH₃。在某些实施方案中,R⁴是OCH₃,R²是F,并且R³是OCH₃。在某些实施方案中,R⁴是OCH₃,R²是H,并且R³是OH。在某些实施方案中,R²是H,R³是H,并且R⁴是OH。在各种实施方案中,式IX的化合物作为外消旋混合物存在。

[0438] 因此,在一些实施方案中,雷帕霉素类似物选自式I-IX或其衍生物中的任一种。

[0439] 在一些实施方案中,使用如WO 2016/073799中所述的合成纳米载剂递送或施用雷帕霉素或雷帕霉素类似物,所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0440] 如WO 2016/073799中所述,在合成纳米载剂形成期间雷帕霉素在配制物中的浓度,相对于雷帕霉素在所述配制物中的溶解度极限,可以对所得的合成纳米载剂诱导免疫耐受的能力具有显著影响。另外,这种雷帕霉素如何通过合成的纳米载剂分散可能会影响所得的合成纳米载剂最初是否是无菌过滤的。因此,在一些实施方案中,在导致雷帕霉素浓度超过其在所形成的纳米载剂悬浮液中的溶解度的条件下产生的合成纳米载剂被用于本文所述的组合物和方法中。此类合成纳米载剂可以提供更持久的免疫耐受性,并且最初是无菌过滤的。

[0441] 在一些实施方案中,将ceDNA载体与包含合成的纳米载剂的组合物共同施用,所述合成纳米载剂包含疏水性聚酯载剂材料和雷帕霉素或雷帕霉素类似物,其中所述雷帕霉素或雷帕霉素类似物以稳定的超饱和的量存在于合成的纳米载剂中,所述稳定的超饱和的量相对于提供的疏水性聚酯载剂材料的重量基于雷帕霉素或雷帕霉素类似物的重量小于50重量%。

[0442] 在本文提供的组合物或方法中的任何一种的一个实施方案中,重量是在合成纳米载剂的配制期间组合的材料的配方重量。在本文提供的组合物或方法中的任何一种的一个

实施方案中,重量是在所得的合成纳米载剂组合物中的材料的重量。

[0443] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一些实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于45重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于40重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于35重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于30重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于25重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于20重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于15重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以小于10重量%的稳定的过饱和的量存在。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以大于7重量%的稳定的过饱和的量存在。

[0444] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,疏水性聚酯载剂材料包括PLA、PLG、PLGA或聚己内酯。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,疏水性聚酯载剂材料包括PLA-PEG、PLGA-PEG或PCL-PEG。

[0445] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,在合成纳米载剂中的疏水性聚酯载剂材料的量为5-95重量%的疏水性聚酯载剂材料/总固体。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,在合成纳米载剂中的疏水性聚酯载剂材料的量为60-95重量%的疏水性聚酯载剂材料/总固体。

[0446] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,合成纳米载剂还包含HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包括脱水山梨糖醇酯、脂肪醇、脂肪酸酯、乙氧基化脂肪醇、泊洛沙姆、脂肪酸、胆固醇、胆固醇衍生物或胆汁酸或盐。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包括SPAN 40、SPAN 20、油醇、硬脂醇、棕榈酸异丙酯、单硬脂酸甘油酯、BRIJ 52、BRIJ 93、普朗尼克(Pluronic) P-123、普朗尼克L-31、棕榈酸、十二烷酸、三棕榈酸甘油酯或三亚油酸甘油酯。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂是SPAN 40。

[0447] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子型表面活性剂被囊封在合成纳米载剂中、存在于合成纳米载剂的表面上或两者都是。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为>0.1重量%但<15重量%的HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载剂材料。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为>1重量%但<13重量%的HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载剂材料。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为>1重量%但<9重量%

的 HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载剂材料。

[0448] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,组合物最初是通过0.22 μ m过滤器无菌过滤的。

[0449] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,使用合成纳米载剂的动态光散射获得的粒度分布的平均值为大于120nm的直径。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,直径大于150nm。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,直径大于200nm。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,直径大于250nm。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,直径小于300nm。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,直径小于250nm。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,直径小于200nm。

[0450] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物被囊封在合成纳米载剂中。

[0451] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,组合物还包含药学上可接受的载剂。

[0452] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少1%。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少5%。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少10%。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少15%。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少20%。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少25%。在本文提供的组合物和方法中的任何一种的一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物以超饱和的量存在,所述超饱和的量比疏水性聚酯载剂材料中雷帕霉素或雷帕霉素类似物的饱和极限高至少30%。

[0453] 在本文提供的组合物和方法中的任何一种的另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少1%。在另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少5%。在另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少10%。在另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少15%。在另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少20%。在另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少25%。在另一个实施方案中,雷帕霉素或雷帕霉素类似物的量超过饱和极限至少30%。

[0454] cGAS抑制剂

[0455] 根据一些方面,本公开提供了与一种或多种cGAS拮抗剂结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA)。本文还提供了包含部分编码一种或多种cGAS抑制性RNA或蛋白质的序列的ceDNA构建体。

[0456] cGAS是由细胞溶质DNA触发的另一类PRR,它与DNA结合并激活与ER结合的干扰素基因刺激物(STING)。这导致I型干扰素反应的激活,以及在一些情况下其他提议的细胞溶质DNA感受器(包括黑素瘤缺乏因子(AIM2)、IFN- γ 诱导型蛋白16(IFI16)、干扰素诱导型蛋白X(IFIX)、LRRFIP1、DHX9、DHX36、DDX41、Ku70、DNA-PKcs、MRN复合物(包括MRE11、Rad50和Nbs1)和RNA聚合酶III)的激活。AIM2、IFI16和IFIX是热蛋白和HIN200结构域蛋白(PYHIN)蛋白。此外,已经显示,如在源自人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)的单链DNA(ssDNA)的茎环结构中的位于短的碱基配对的DNA延伸段侧翼的未配对DNA核苷酸以序列依赖性方式激活了I型干扰素诱导的DNA感受器cGAS。含有位于短的(12至20bp)dsDNA(Y型DNA)侧翼的未配对鸟苷的DNA结构具有高度的刺激作用,并且尤其增强了cGAS的酶促活性。

[0457] cGAS通过与两条DNA链的糖磷酸骨架相互作用而直接结合DNA(S.R.Paluden.《微生物学和分子生物学评论(Microbiology and Molecular Biology Reviews)》.2015.79(2):225)。这导致酶的构象变化,从而允许核苷酸底物ATP和GTP进入活性位点,导致cGAMP合成(A.Dempsey和A.G.Bowie,《病毒学(Virology)》2015年5月,0:146-152)。然后cGAMP结合STING,因而导致I型干扰素产生(A.Dempsey和A.G.Bowie,《病毒学(Virology)》2015年5月,0:146-152)。重要的是,cGAS仅通过DNA磷酸骨架接触dsDNA,从而导致不依赖核苷酸序列的传感(A.Dempsey和A.G.Bowie,《病毒学(Virology)》2015年5月,0:146-152)。还已经显示,cGAS可以被未配对DNA核苷酸(特别是鸟苷)激活,所述未配对DNA核苷酸的侧翼是12-20bp的短的碱基配对DNA延伸段,与源自人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)的单链DNA(ssDNA)的茎环结构一样(M.H.Christnesen和S.R.Paluden.《细胞和分子免疫学(Cellular and Molecular Immunology)》.2017.14:4-13;A-M Herzner等人,2015.《自然免疫学(Nature Immunology)》)。

[0458] 因此,对于通过PRR的先天性免疫激活重要的ceDNA的结构特征包括但不限于经修饰的AAV反向末端重复序列(ITR)、包括Rep结合位点(RBS)和末端解离位点(TRS);ITR中的发夹序列;RBS的富含CG性质;没有DNA甲基化;以及可以具有例如单链环状DNA的侧翼为ITR的线性双螺旋DNA结构。

[0459] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,将cGAS抑制剂与ceDNA一起共同施用至受试者。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,其中cGAS抑制剂是RNA或蛋白质序列,所述ceDNA编码cGAS的RNA或蛋白质抑制剂。

[0460] 在一些实施方案中,cGAS抑制剂是抗疟疾药物(J.An等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》2015年3月27日)。在一些实施方案中,抗疟疾药物是基于氨基喹啉或基于氨基吡啶的抗疟疾药物(J.An等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》2015年3月27日)。在一些实施方案中,抗疟疾药物选自奎纳克林(QC)、9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶(AMCA)、羟氯喹(HCQ)和氯喹(CQ)(J.An等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》2015年3月27日)。

[0461] 在一些实施方案中,cGAS抑制剂是与cGAS的催化口袋结合的小分子化合物(J.Vincent等人,《自然·通讯(Nature Communications)》,8:750)。在一些实施方案中,与cGAS的催化口袋结合的小分子化合物选自RU166365、RU281332、RU320521、RU320519、

161或SEQ ID NO:532(缺少SEQ ID NO:884的氨基酸 161-1162)。

[0466] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,cGAS抑制剂是结合 cGAS的抗体或抗原结合片段。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,结合cGAS的抗体或抗原结合片段由ceDNA编码。

[0467] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,cGAS抑制剂是 cGAS的RNA抑制剂,诸如对cGAS特异的siRNA。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,cGAS的RNA抑制剂由ceDNA编码。

[0468] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,cGAS抑制剂是 cGAS的miRNA抑制剂,诸如miR-25 (GGCCAGTGTGAGAGGCGGAGACTTGGGCAATTGCTGGACGCTGC CCTGGGCATTGCACT TGTCTCGGTCTGACAGTGCCGGCC;SEQ ID NO:885)和miR-93 (CTGGGGGCTCCAAAGTCTGTTCGTGC AGGTAGTGTGATTACCCA ACCTACTGCTGAGCTAGCACTTCCCAGCCCCCGG;SEQ ID NO:886)¹¹。认为miR-25和miR-93靶向核受体共活化因子3(NCOA3),这是一种表观遗传因子,其维持cGAS表达的基础水平,从而导致对cGAS的阻遏(Wu等人.2017.《自然·细胞生物学(Nat.Cell Biol.)》19(10):1286- 1296)。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,cGAS的miRNA 抑制剂由ceDNA编码。

[0469] TLR抑制剂

[0470] 根据一些方面,本公开提供了与一种或多种TLR拮抗剂结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA)。本文还提供了包含部分编码一种或多种TLR抑制性寡核苷酸的序列的ceDNA构建体。根据一些方面,本公开提供了与一种或多种TLR9拮抗剂结合施用的具有共价闭合端的非病毒无衣壳DNA载体(ceDNA)。本文还提供了包含部分编码一种或多种TLR9抑制性寡核苷酸的序列的ceDNA构建体。

[0471] 根据一些实施方案,TLR9抑制剂是小分子拮抗剂。在另一个实施方案中,TLR9抑制剂是针对TLR9的抗体。根据一些实施方案,TLR9抗体是单克隆抗体。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,ceDNA 的一个或多个末端结构元件(诸如ITR序列)包含TLR9抑制性寡核苷酸的序列。

[0472] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸具有一个或多个以下特征:(i)在3'端有三个连续的G核苷酸;(ii)在5'端有CC(T)三联体;以及(iii)在5'CC(T)与下游GGG三联体之间的距离最佳为3-5个核苷酸长。在一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸具有5'CCTN(3-5)G(3-5)RR3'(SEQ ID NO:887)的序列。在一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸在相邻G之间不具有链内和/或链间胡斯坦(Hoogsten)氢键。

[0473] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸是具有G4堆叠特性的G类TLR9抑制性寡核苷酸,并且包含多个G3 三联体或G4四联体,诸如包含TTAGGGn(SEQ ID NO:888)的抑制性寡核苷酸。此类G类TLR9抑制性寡核苷酸的非限制性实例包括ODN-2088(TCCTGGCGGGGAAGT,SEQ ID NO:889)、ODN-2114(TCCTGGAGGGGAAGT,SEQ ID NO:890)、聚-G(GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG,SEQ ID NO:891)、ODN-A151(TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG,SEQ ID NO:892)、G-ODN(CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT,SEQ ID NO:893)、和IRS-869(TCCTGGAGGGGTTGT,SEQ ID NO:894)以及AS1411(GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG,SEQ ID NO:903)。

[0474] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸是具有包括

为回文结构和/或具有短的5'或3'突出端在内的特性的R类 TLR9抑制性寡核苷酸,诸如INH-1抑制性寡核苷酸。此类R类TLR9抑制性寡核苷酸的非限制性实例包括INH-1 (CCTGGATGGGAATTCCCATCCAGG,SEQ ID NO:895)、INH-4 (TTCCCATCCAGGCCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:896)、和IRS-661 (TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA,SEQ ID NO:897)。

[0475] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸是具有线性特性和5' CC(T)→GGG-3' 基序的B类TLR9抑制性寡核苷酸,诸如INH-18抑制性寡核苷酸。此类B类TLR9抑制性寡核苷酸的非限制性实例包括ODN-2088 (TCCTGGCGGGGAAGT,SEQ ID NO:889)、ODN-2114 (TCCTGGAGGGGAAGT,SEQ ID NO:890)、4024 (TCCTGGATGGGAAGT,SEQ ID NO:898)、4084F (CCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:899)、INH-13 (CTTACCGCTGCACCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:900)、INH-18 (CCTGGATGGGAACCTTACCGCTGCA,SEQ ID NO:901)、G-ODN (CTCCTATTGGGGTTTCTAT,SEQ ID NO:893)、IRS-869 (TCCTGGAGGGGTTGT,SEQ ID NO:864)、IRS-954 (TGCTCCTGGAGGGGTTGT,SEQ ID NO:902)、和AS1411 (GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG,SEQ ID NO:903)。

[0476] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,修饰由ceDNA编码的编码序列(诸如转基因序列)使得在密码子三联体内分配给所选氨基酸的CpG二核苷酸被变为缺少CpG二核苷酸的相同氨基酸的密码子三联体。

[0477] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,其中TLR9抑制剂是RNA或蛋白质序列,所述ceDNA编码TLR9的RNA或蛋白质抑制剂。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制剂是结合TLR9的抗体或抗原结合片段。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,结合TLR9的抗体或抗原结合片段由ceDNA编码。

[0478] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,将TLR9抑制剂与ceDNA一起共同施用至受试者。TLR9抑制剂的非限制性实例可见于“To11样受体(TLR)7和9的抑制性寡核苷酸的分类、作用机制和治疗应用(Classification, Mechanisms of Action, and Therapeutic Applications of Inhibitory Oligonucleotides for Toll-Like Receptors (TLR) 7 and 9)”, P.S. Lenert,《炎症的调节剂(Mediators of Inflammation)》,第2010卷,986596;US20150203850;和US2017026800,所述文献各自的内容以全文引用的方式并入本文。

[0479] 因此,在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,将TLR9抑制剂与ceDNA一起共同施用至受试者。

[0480] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制剂以顺式形式由施用至受试者(包括例如ceDNA的后续递送)的ceDNA编码。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制剂以反式形式通过向受试者施用的ceDNA而施用。

[0481] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制剂是TLR9抑制性寡核苷酸。

[0482] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸具有一个或多个以下特征:(i)在3'端有三个连续的G核苷酸;(ii)在5'端有CC(T)三联体;以及(iii)在5'CC(T)与下游GGG三联体之间的距离最佳为3个至5个之间核苷酸长。在一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸具有5'CCTN(3-5)G(3-5)RR3'(SEQ ID NO:887)的序列。在一些实施方案中,TLR9抑制性寡核苷酸在相邻G之间不具有链内和/或链间胡斯坦(Hoogsten)氢

键。

[0483] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制剂是结合 TLR9的抗体或抗原结合片段。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,结合TLR9的抗体或抗原结合片段由ceDNA编码。

[0484] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,TLR9抑制剂是内体酸化的抑制剂,例如氯喹。

[0485] 炎性小体拮抗剂

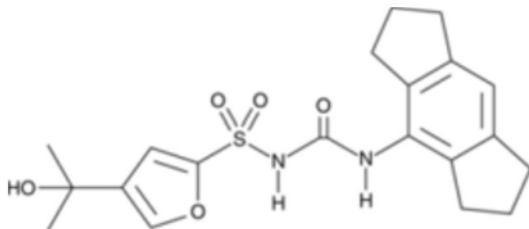
[0486] NLRP3炎性小体途径的抑制剂:

[0487] 在一些实施方案中,炎性小体拮抗剂抑制NLRP3。术语“NLRP3”也称为隐热蛋白,是指NOD样受体家族的含有含3)炎性小体的热蛋白结构域或NACHT、LRR和PYD结构域的蛋白3(NALP3),也称为隐热蛋白、冷诱导型自身炎症性综合症1(CIAS1)、毛虫样受体1.1(CLR1.1)或含热蛋白结构域的Apaf1样蛋白1(PYPAF1)。NALP3也称为以下别名:NLRP3 PYD-NACHT-NAD-LRR NALP3 Cias1、Pypaf1、Mmig1 PYD- NACHT-NAD-LRR。NLRP3是由NLRP3蛋白、ASC(含有CARD的细胞凋亡相关斑点样蛋白)和半胱天冬酶原1组成的多蛋白寡聚体的组分。

[0488] 以下文献中公开了涵盖用于本文方法和组合物中的NLRP3抑制剂: Shao,Bo-Zong等人“NLRP3炎性小体及其抑制剂:综述(NLRP3 inflammasome and its inhibitors:a review).”《药理学前沿(Frontiers in pharmacology)》6(2015):262.,乙基Wang等人,《实验室研究(Lab investigation)》,2017,97:922-934,所述文献以全文引用的方式并入本文。

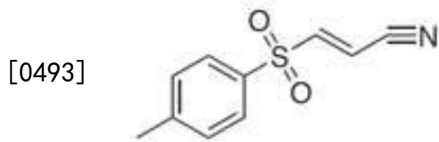
[0489] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体的抑制剂是MCC950或其功能衍生物。MCC950具有以下式:

[0490]



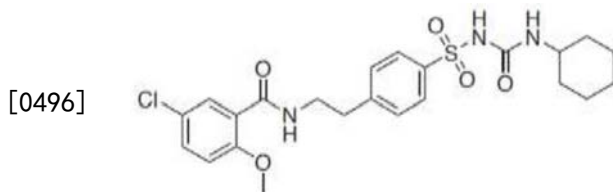
[0491] 并且是NLRP3的有效和选择性抑制剂。通过防止炎性小体衔接蛋白ASC(含有CARD的细胞凋亡相关斑点样蛋白)的寡聚化,MCC950阻止由NLRP3活化因子(诸如ATP、MSU和尼日利亚菌素)诱导的IL-1 β 的释放(Coll RC等人,2015.用于治疗炎症疾病的NLRP3炎性小体的小分子抑制剂(A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases).《自然·医学(Nature Med)》21(3),248-255;Guo H.等人,2015.炎性小体:作用机制、在疾病中的作用和治疗剂(Inflammasomes: mechanism of action,role in disease,and therapeutics).《自然·医学(Nat Med.)》21(7):677-87;Ren,Honglei等人“选择性 NLRP3(含热蛋白结构域的蛋白3)炎性小体抑制剂减少脑内出血后的脑损伤(Selective NLRP3 (Pyrin Domain-Containing Protein 3) Inflammasome Inhibitor Reduces Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage).”《中风(Stroke)》(2017):STROKEAHA-117。

[0492] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是Bay11-7082,其具有如下结构:



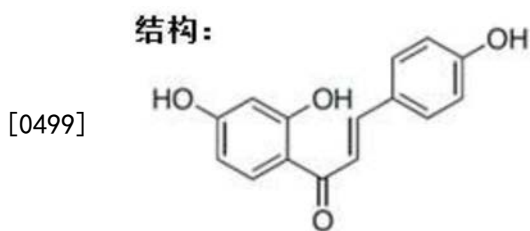
[0494] 并且据报道选择性地抑制巨噬细胞中的NLRP3炎性小体活性,而不受其对NF- κ B活性的抑制作用(Juliana C.等人,2010. 抗炎化合物小白菊内酯(Parthenolide)和Bay11-7082是炎性小体的直接抑制剂(Anti-inflammatory Compounds Parthenolide and Bay11-7082 Are Direct Inhibitors of the Inflammasome).《生物化学杂志(J.Biol Chem.)》285(13):9792- 9802)。

[0495] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是格列本脲(也称为优降糖),其具有以下结构:



[0497] 其通过抑制K⁺流出阻止半胱天冬酶1和前体IL-1 β 的成熟(Laliberte RE.等人,1999.ATP治疗人单核细胞促进半胱天冬酶1成熟和外化(ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1maturation and externalization).《生物化学杂志(J Biol Chem.)》274(52):36944-51)。格列本脲还有效地阻止由PAMP、DAMP和结晶物质诱导的NLRP3炎性小体的激活(Lamkanfi M.等人,2009. 优降糖抑制热蛋白/Nalp3炎性小体(Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome).《细胞生物学杂志(J.Cell Biol.)》,187:61-70;Dostert C.等人,2009. 疟疾原虫色素是Nalp3炎性小体激活危险信号(Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal).PLoS One.4(8):e6510)。

[0498] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是异甘草素(也称为 ILG),其具有以下结构:



[0500] 其是一种从甘草根(甘草(Glycyrrhiza uralensis))中分离的查耳酮型类黄酮,并且据报道抑制NLRP3激活的ASC寡聚化(Honda H.等人,2014. 异甘草素是NLRP3炎性小体激活和饮食诱导的脂肪组织炎症(Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation).《白细胞生物学杂志(J Leukoc Biol)》.96(6):1087-100)。NLRP3依赖性IL-1 β 产生已被低浓度的异甘草素(1至10 μ M)抑制,并证明异甘草素可以在预致敏步骤和激活步骤中阻断NLRP3炎性小体。

[0501] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是6673-34-0(5-氯-2-甲氧基-N-[2-

(4-氨磺酰基苯基)-乙基]-苯甲酰胺),其公开于美国申请 US20160052876,所述申请以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是US20160052876中所描述的任何小分子化合物,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文。

[0502] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是半胱氨酰白三烯受体拮抗剂,公开于 Ozaki等人,2015;Coll等人,2011;Haerter等人,2009和美国专利7,498,460中,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文。据报道,半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过阻止ASC寡聚化来抑制NLRP3和 AIM2炎性小体诱导的IL-1加工,并且似乎也在先天性免疫应答中具有进一步的作用,不同于其对炎性小体形成的衔接子作用(Ozaki等人,2015)。

[0503] 在一些实施方案中,靶向NLRP3和AIM2的小分子抑制剂已被表征并广泛描述于(Ozaki等人,2015)中。这些小分子抑制剂中的绝大多数是已被重新用于靶向炎性小体的药理学抑制剂(Guo等人,2015),并且它们包括:小白菊内酯(Juliana等人,2010)、Bay 11-708 (Juliana等人,2010)、CRID3(Coll等人,2011)、金诺芬(Isakov等人,2014)、异甘草素(Honda等人,2014)、3,4-亚甲二氧基-*m*-硝基苯乙烯(He等人,2014)、环戊烯酮前列腺素15d-PJ2(Maier等人,2015)和25-羟基胆固醇(25-HC)(Reboldi等人,2014)。此外,I型干扰素还已显示抑制炎性小体激活,但对机制了解很少(Guarda等人,2011)。然而,最近已证明,IFN刺激的基因产物胆固醇25-羟化酶(Ch25h)拮抗I11b转录以及 NLRP3、NLRC4和AIM2炎性小体激活,表明Ch25h具有对多种炎性小体的广泛抑制活性(Reboldi等人,2014)。

[0504] NLRP3由NCBI登录号NM_004895.1(SEQ ID NO:530)、NM_183395(SEQ ID NO:531)、NM_001079821(SEQ ID NO:532)、NM_001127461(SEQ ID NO:533)和NM_001127462(SEQ ID NO:534)编码。这里,NLRP3中的翻译起始密码子优选地是位于这些NCBI登录号中每一个中所描述的翻译起始密码子下游6个核苷酸的密码子。突变型 NLRP3基因的实例包括其中从翻译起始密码子起计数的位置1709(在 NCBI登录号显示的编码区的情况下,从翻译起始密码子起计数的位置 1715)处的腺嘌呤是鸟嘌呤,从翻译起始密码子起计数的位置1043(在 NCBI登录号中所示的编码区中的位置1049)处的胞嘧啶是胸腺嘧啶,或从翻译起始密码子起计数的位置587(在NCBI登录号中所示编码区中的位置593)处的鸟嘌呤是腺嘌呤的NLRP3基因。NLRP3优选地是其中位置1079处的核苷酸被突变为鸟嘌呤的一种NLRP3。如本领域技术人员将理解的,可以存在编码功能上等价的NLRP3的NLRP3基因变体,所述功能上等价的NLRP3至少部分地维持功能以激活半胱天冬酶1和/或促进炎症细胞因子诸如白介素1 β 和白介素18的成熟。因此,此类功能上等价的 NLRP3可以掺入不消除活性的氨基酸取代、缺失或添加。

[0505] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是NLRP3的RNA抑制剂(RNAi),诸如对NLRP3特异的siRNA。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,NLRP3的RNA抑制剂由 ceDNA编码。NLRP3 siRNA可以商购获得,例如,SI03060323 (Qiagen®)。

[0506] 在一些实施方案中,NLRP3抑制剂是在ceDNA中编码的RNAi。为了避免任何疑问,人NLRP3蛋白的氨基酸序列对应于NM_004895.1 (SEQ ID NO:539),并且为如下:

MKMASTRCKLARYLEDLEDVDLKKFKMHLEDYPPQKGCIPLRG
 QTEKADHVDLATLMIDFNNGEEKAWAMAVWIFAAINRRDLYEKAKRDEPKWGSNDARVS
 NPTVICQEDSIEEEWMGLLEYLSRISICKMKKDYRKKYRKYVRSRFQCIEDRNARLGE
 SVSLNKRYTRLRLIKEHRSQQEREQELLAIGKTKTCESPVSPKIMELLFDPDDEHSEP
 VHTVVFQGAAGIGKTIILARKMMLD WASGTYLQDRFDYLFYIHCREVSLVTQRSGLDLI
 MSCCPDPNPP IHKIVRKPSRILFLMDGFDELQGFDEHIGPLCTDWQKAERGDILLSS
 LIRKLLPEASLLITTRPVALEKLQHLLDHPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEAQA
 RAAFSLIQENEVLFMCFIPLVCWIVCTGLKQQMESGKSLAQTSKTTTAVYVFFLSSL
 LQPRGGSQEHGLCAHLWGLCSLAADGIWNQKILFEESDLRNHGLQKADVSAFLRMNLF
 [0507] QKEVDCEKFYSFIHMTFQEFFAAMYLLLEEEKEGRTNVPGSRLKLP SRDVTVLENYG
 KFEKGYLIFVVRFLFGLVNQERTSYLEKKLSCKISQQIRLELLKWIEVKAKAKKLQIQ
 PSQLELFYCLYEMQEEDFVQRAMDYFPKIEINLSTRMDH MVSSFCIENCHRVESLSLG
 FLHNMPKEEEEEKEGRHLD MVQCVPSSSHAACSHGLVNSHLTSSFCRGLFSVLSTS
 QSLTELDLSDNSLGDPGMRVLCETLQHPGCNIRRLWLGRCLGSHECCFDISLVLSSNQ
 KLVELDLSDNALGDFGIRLLCVGLKHLLCNLKKLWLVSCCLTSACCQDLASVLSTSHS
 LTRLYVGENALGDSGVAILCEKAKNPQCNLQKGLVNSGLTSVCCSALSSVLSTNQNL
 THLYLRGNTLGDGKIKLLCEGLLHPDCKLQVLELDNCNLTSHCCWDLSTLLTSSQSLR
 KLSLGNNDLGD LGVMMFCEVLKQQSCLLQNLGLSEMYFN YETKSALETLQEEKPELTV
 VFEP SW (SEQ ID NO: 539)

[0508] 人NLRP3蛋白由包含核酸序列NM_004895.1 (SEQ ID NO:530)、NM_183395 (SEQ ID NO:531)、NM_001079821 (SEQ ID NO:532)、NM_001127461 (SEQ ID NO:533) 和NM_001127462 (SEQ ID NO:534) 的NLRP3基因编码,并且人NLRP3蛋白具有NM_004895 (SEQ ID NO: 539)的氨基酸。

[0509] NLRP3抑制剂还包括反义多核苷酸,其可以用于抑制NLRP3基因转录,并且因而抑制NLRP3炎性小体激活。与编码NLRP3的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:530-534所示的多核苷酸)的区段互补的多核苷酸被设计成与编码NLRP3的mRNA结合并抑制这种mRNA的翻译。反义多核苷酸可以由如本文所公开的ceDNA载体编码,并且可以任选地与如本文所公开的组织特异性或诱导型启动子可操作地连接。

[0510] 可以根据技术人员通常已知的方法通过使RNAi分子基因沉默来抑制 NLRP3 mRNA。例如,特异性靶向人NLRP3 (NM_004895.1) 的基因沉默的siRNA寡核苷酸双螺旋可以容易地用于敲低NLRP3表达。可以使用 siRNA成功地靶向NLRP3 mRNA;并且基于靶mRNA的已知序列,本领域技术人员可以容易地制备其他siRNA分子。因此,为了避免任何疑问,本领域普通技术人员可以设计针对NM_004895.1的核酸序列的核酸抑制剂(诸如RNAi (RNA沉默) 剂), 所述核酸序列为如下:

[0511]

```

1 gtagatgagg aaactgaagt tgaggaatag tgaagagttt gtccaatgtc atagccccgt
61 aatcaacggg acaaaaattt tcttgctgat gggccaagat ggcacgtgga agtggttggt
121 caccgtaaac tgtaatacaa tccctgtttat ggatttggtt gcatattttt cccctccatag
181 ggaaaccttt cttccatggc tcaggacaca ctccctggatc gagccaacag gagaactttc
241 tggtaagcat ttggctaact tttttttttt tgagatggag tcttgctgtg tcgcctaggg
301 tggagtgcag tggcgtgatc ttggctcact gcagcctcca cttcccgggt tcaatcaatt
361 ctccctacctc aacttcctga gttagctggga ttacaggcgc cggccaccac acccggctca
421 tttttgtact tttagtagag acacagtttt gccatggtgg ccaggctggg cttgaattcc
481 tcagctcagg tgatctgcct gccttggcct ctcaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc
541 actgtgcccg gccttggcta acttttcaaa attaaagatt ttgacttgtt acagtcatgt
601 gacatTTTTT tctttctggt tgetgagttt ttgataattt atatctctca aagtggagac
661 tttaaaaaag actcatccgt gtgccgtggt cactgcctgg tatcttagtg tggaccgaag
721 cctaaggacc ctgaaaacag ctgcagatga agatggcaag caccgcctgc aagctggcca
781 ggtacctgga ggacctggag gatgtggact tgaagaaatt taagatgcac ttagaggact
841 atccctcccca gaagggtgc atccccctcc cgaggggtca gacagagaag gcagaccatg
901 tggatctagc cacgctaatt atcgacttca atggggagga gaaggcgtgg gccatggccg
961 tgtggatctt cgctgcgatc aacaggagag acctttatga gaaagcaaaa agagatgagc
1021 cgaagtgggg ttcagataat gcacgtggtt cgaatccac tgtgatatgc caggaagaca
1081 gcattgaaga ggagtggatg ggtttactgg agtacctttc gagaatctct atttgtaaaa
1141 tgaagaaaga ttaccgtaag aagtacagaa agtacgtgag aagcagattc cagtgcattg
1201 aagacaggaa tgcccgtctg ggtgagagtg tgagcctcaa caaacgctac acacgactgc
1261 gtctcatcaa ggagcaccgg agccagcagg agagggagca ggagcttctg gccatggca
1321 agaccaagac gtgtgagagc cccgtgagtc ccattaagat ggagttagtg tttgaccccg
1381 atgatgagca ttctgagcct gtgcacaccg tgggtgttcca gggggcggca gggattggga
1441 aaacaatcct ggccaggaag atgatgttgg actgggcgtc ggggacactc taccaagaca
1501 ggtttgacta tctgttctat atccactgtc gggaggtgag ccttgtgaca cagaggagcc
1561 tgggggacct gatcatgagc tgetgccccg acccaaacc acccatccac aagatcgtga
1621 gaaaaccctc cagaatcctc ttctcatgg acggcttcca tgagctgcaa ggtgccttg
1681 acgagcacat aggaccgctc tgcactgact ggcagaaggc cgagcgggga gacattctcc
1741 tgagcagcct catcagaaag aagetgcttc ccgaggcctc tctgctcatc accacgagac
1801 ctgtggccct ggagaaactg cagcacttgc tggaccatcc tggcatgtg gagatcctgg
1861 gtttctccga ggccaaaagg aaagagtact tcttcaagta cttctctgat gaggcccaag
1921 ccagggcagc cttcagctctg attcaggaga acgaggtcct cttcaccatg tcttcatcc
1981 cccgtgtctg ctggatcgtg tgcactggac tgaaacagca gatggagagc ggcaagagcc
2041 ttgccagac atccaagacc accaccgagg tgtacgtctt cttccttcc agtttgcctg
2101 agccccgggg agggagccag gagcacggcc tctgcgcca cctctggggg ctctgctctt
2161 tggctgcaga tggaatctgg aaccagaaaa tctgtttga ggagtccgac ctcaggaatc
2221 atggactgca gaaggcggat gtgtctgctt tctgaggat gaacctgtc caaaaggaag
2281 tggactgcga gaagtctac agcttcatcc acatgacttt ccaggagttc tttgcgcca
2341 tgtactacct gctggaagag gaaaaggaag gaaggacgaa cgttccaggg agtcgtttga
2401 agcttcccag ccgagacgtg acagtccttc tggaaaacta tggcaaattc gaaaaggggt
2461 atttgatatt tgttgtacgt ttctctttg gcctggtaaa ccaggagagg acctcctact
2521 tggagaagaa attaagttgc aagatctctc agcaaatcag gctggagctg ctgaaatgga
2581 ttgaagtgaa agccaaagct aaaaagctgc agatccagcc cagccagctg gaattgttct
2641 actgtttgta cgagatgcag gaggaggact tctgcaaaag ggccatggac tatttccca
2701 agattgagat caatctctcc accagaatgg accacatggt ttcttcttt tgcatgaga
2761 actgtcatcg ggtggagtca ctgtccctgg ggtttctcca taacatgcc aaggaggaag
2821 aggaggagga aaaggaaggc cgacaccttg atatggtgca gtgtgtcctc ccaagctcct
2881 ctcatgctgc ctgttctcat ggattggtga acagccacct cacttccagt ttttgcggg
2941 cctcttttc agttctgagc accagccaga gtctaactga attggacctc agtgacaatt
3001 ctctggggga cccaggatg agagtgttgt gtgaaacgct ccagcatcct ggctgtaaca
3061 ttcggagatt gtggttgggg cgetgtggcc tctcgcatga gtgtgtctc gacatctcct
3121 tggctcctcag cagcaaccag aagctgggtg agctggacct gagtgacaac gccctcgggtg
3181 acttcggaat cagacttctg tgtgtgggac tgaagcacct gttgtgcaat ctgaagaagc

```

```

3241 tctgggttgg cagctgctgc ctacacatcag catggttgtca ggatcttgca tcagtattga
3301 gcaccagcca ttccctgacc agactctatg tgggggagaa tgccttggga gactcaggag
3361 tcgcaatttt atgtgaaaaa gccagaatc cacagtgtaa cctgcagaaa ctggggttgg
3421 tgaattctgg ccttacgtca gtctgttgtt cagctttgtc ctcggtactc agcactaatc
3481 agaatctcac gcacctttac ctgcgaggca acactctcgg agacaagggg atcaaactac
3541 tctgtgaggg actcttgcac cccgactgca agcttcaggt gttggaatta gacaactgca
3601 acctcacgtc acactgctgc tgggatcttt ccacacttct gacctccagc cagagcctgc
3661 gaaagctgag cctgggcaac aatgacctgg gcgacctggg ggtcatgatg ttctgtgaag
3721 tgctgaaaca gcagagctgc ctctgcaga acctgggggt gtctgaaatg tatttcaatt
3781 atgagacaaa aagtgcgta gaaacacttc aagaagaaaa gcctgagctg accgtcgtct
[0512] 3841 ttgagccttc ttggtaggag tggaaacggg gctgccagac gccagtgttc tccggtccct
3901 ccagctgggg gccctcaggt ggagagagct gcgatccatc caggccaaga ccacagctct
3961 gtgatccttc cgggtggagt tgggagaaga gagcttgccg acgatgcctt cctgtgcaga
4021 gcttgggcat ctcttttacg ccagggtgag gaagacacca ggacaatgac agcatcgggt
4081 gttgttgtca tcacagcgcc tcagttagag gatgttcctc ttggtgacct catgtaatta
4141 gctcattcaa taaagcactt tctttatctt tctcttctct gtctaacttt ctttttcta
4201 tctttttct tctttgttct gtttactttt gctcatatca tcattcccgc tatcttcta
4261 ttaactgacc ataacacaga actagttgac tatatattat gttgaaattt tatggcagct
4321 atttatattt ttaaattttt tgtaacagtt ttgttttcta ataagaaaaa tccatgcttt
4381 ttgtagctgg ttgaaaattc aggaatatgt aaaacttttt ggtatttaat taattgatt
4441 ctttttctta attttaaaaa aaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 530)
    
```

[0513] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是siRNA,从而抑制 NLRP3炎性小体的 mRNA。在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是抑制人NLRP3表达的 GUGCAUUGAAGACAGGAAUTT (SEQ ID NO: 540) (Wang等人,《实验室研究 (Laboratory Invest.)》(2017) 97:922- 934,所述文献以全文引用的方式并入本文)、或者与其至少 50%、或至少60%或至少70%或至少80%或至少90%相同的其片段或同源物。在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是可商购获得的siRNA,诸如可从Santa Cruz® (目录号sc-40327) 获得。

[0514] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是与人NM_001079821.2 (NCBI基因 114548 (NLRP3)) 中的RNAi靶序列互补的RNAi。抑制 NLRP3的RNAi剂可以是与表5A所示的 SEQ ID NO:541-551的17-21个之间的连续碱基互补的核酸。

[0515] 表5A:用于抑制NLRP3的RNAi的靶序列:

靶序列	SEQ ID NO:	克隆 ID
GGCTGTAACATTCGGAGATTG	541	TRCN0000419896
TCATCATTCGCTATCTTTC	542	TRCN0000420883
CCGTAAGAAGTACAGAAAGTA	543	TRCN0000062723
[0516] GAGACTCAGGAGTCGCAATTT	544	TRCN0000431574
CCTCATGTAATTAGCTCATT	545	TRCN0000427726
GTGGATCTAGCCACGCTAATG	546	TRCN0000432208
CCACAGTGTAACCTGCAGAAA	547	TRCN0000062725
CCAGCCAGAGTCTAACTGAAT	548	TRCN0000062724
[0517] GCGTTAGAAACACTTCAAGAA	549	TRCN0000062726
GCTGGAATTGTTCTACTGTTT	550	TRCN0000062727
CCACATGACTTCCAGGAGTT	551	TRCN0000101069

[0518] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是siRNA剂。抑制 NLRP3的示例性siRNA序列示于表5B中。

[0519] 表5B:抑制NLRP3的示例性siRNA

[0520]

克隆 ID	靶序列	正向和反向寡核苷酸序列
TRCN00 00419896	GGCTGTAACATTCGGAGA TTG (SEQ ID NO: 552)	正 向 : CCGGGGCTGTAACATTCGGAGATTGCTCGAGCAATCTCCG AATGTTACAGCCTTTTGG (SEQ ID NO: 553)
		反 向 : AATTCAAAAAGGCTGTAACATTCGGAGATTGCTCGAGCA ATCTCCGAATGTTACAGCC (SEQ ID NO: 554)
TRCN00 00420883	TCATCATTCCCCTATCTT TC (SEQ ID NO: 555)	正 向 : CCGGTCATCATTCCCCTATCTTTCCTCGAGGAAAGATAG CGGGAATGATGATTTTTG (SEQ ID NO: 556)
		反 向 : AATTCAAAAATCATTCCCCTATCTTTCCTCGAGGAA AGATAGCGGGAATGATGA (SEQ ID NO: 557)
TRCN00 00062723	CCGTAAGAAGTACAGAA AGTA (SEQ ID NO: 558)	正 向 : CCGGCCGTAAGAAGTACAGAAAGTACTCGAGTACTTTCT GTACTTCTTACGGTTTTG (SEQ ID NO: 559)
		反 向 : AATTCAAAAACCGTAAGAAGTACAGAAAGTACTCGAGTA CTTCTGTACTTCTTACGG (SEQ ID NO: 560)
TRCN00 00431574	GAGACTCAGGAGTCGCA ATTT (SEQ ID NO: 561)	正 向 : CCGGGAGACTCAGGAGTCGCAATTTCTCGAGAAATTGCG ACTCTGAGTCTTTTTG (SEQ ID NO: 562)
		反 向 : AATTCAAAAAGAGACTCAGGAGTCGCAATTTCTCGAGAA ATTGCGACTCTGAGTCTC (SEQ ID NO: 563)
TRCN00 00427726	CCTCATGTAATTAGCTCA TTC (SEQ ID NO: 564)	正 向 : CCGGCCTCATGTAATTAGCTCATTCTCGAGGAATGAGCT AATTACATGAGGTTTTG (SEQ ID NO: 565)
		反 向 : AATTCAAAAACCTCATGTAATTAGCTCATTCTCGAGGAA TGAGCTAATTACATGAGG (SEQ ID NO: 566)
TRCN00 00432208	GTGGATCTAGCCACGCTA ATG (SEQ ID NO: 567)	正 向 : CCGGGTGGATCTAGCCACGCTAATGCTCGAGCATTAGCGT GGCTAGATCCACTTTTTG (SEQ ID NO: 568)
		反 向 : AATTCAAAAAGTGGATCTAGCCACGCTAATGCTCGAGCA TTAGCGTGGCTAGATCCAC (SEQ ID NO: 569)
TRCN00 00062725	CCACAGTGTAACCTGCAG AAA (SEQ ID NO: 570)	正 向 : CCGGCCACAGTGTAACCTGCAGAAACTCGAGTTTCTGCA GGTTACACTGTGGTTTTG (SEQ ID NO: 570)
		反 向 : AATTCAAAAACACAGTGTAACCTGCAGAAACTCGAGTT

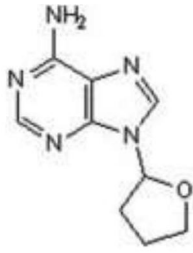
[0521]

		TCTGCAGGTTACACTGTGG (SEQ ID NO: 571)
TRCN00 00062724	CCAGCCAGAGTCTAACTG AAT (SEQ ID NO: 572)	正 向 : CCGGCCAGCCAGAGTCTAACTGAATCTCGAGATTCAGTTA GACTCTGGCTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 573)
		反 向 : AATTCAAAAACCAGCCAGAGTCTAACTGAATCTCGAGAT TCAGTTAGACTCTGGCTGG (SEQ ID NO: 574)
TRCN00 00062726	GCGTTAGAAACACTTCAA GAA (SEQ ID NO: 575)	正 向 : CCGGGCGTTAGAAACACTTCAAGAACTCGAGTTCTTGAA GTGTTTCTAACGCTTTTTG (SEQ ID NO: 576)
		反 向 : AATTCAAAAAGCGTTAGAAACACTTCAAGAACTCGAGTT CTTGAAGTGTTCCTAACGC (SEQ ID NO: 577)
TRCN00 00062727	GCTGGAATTGTTCTACTG TTT (SEQ ID NO: 578)	正 向 : CCGGGCTGGAATTGTTCTACTGTTTCTCGAGAAACAGTAG AACAATTCCAGCTTTTTG (SEQ ID NO: 579)
		反 向 : AATTCAAAAAGCTGGAATTGTTCTACTGTTTCTCGAGAAA CAGTAGAACAATTCCAGC (SEQ ID NO: 580)
TRCN00 00101069	CCACATGACTTCCAGGA GTT (SEQ ID NO: 581)	正 向 : CCGGCCACATGACTTCCAGGAGTTCTCGAGAACTCCTGG AAAGTCATGTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 582)
		反 向 : AATTCAAAAACCACATGACTTCCAGGAGTTCTCGAGAA CTCCTGAAAGTCATGTGG (SEQ ID NO: 583)
TRCN00 00191875	GAAAGCCAAAGCTAAGA AGTA (SEQ ID NO: 584)	正 向 : CCGGGAAAGCCAAAGCTAAGAAGTACTCGAGTACTTCTT AGCTTTGGCTTTCTTTTTG (SEQ ID NO: 585)
		反 向 : AATTCAAAAAGAAAGCCAAAGCTAAGAAGTACTCGAGTA CTTCTTAGCTTTGGCTTTC (SEQ ID NO: 586)

[0522] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是抑制NLRP3表达的 miRNA(miR)、或抑制NLRP3表达的miR激动剂。抑制NLRP3的示例性miR是miR-9和miR-223。

[0523] miR-9抑制NLRP3炎性小体激活(Wang,Yue等人“微小RNA-9通过 JAK1/STAT信号传导途径抑制人动脉粥样硬化炎症细胞模型中的NLRP3 炎性小体激活(MicroRNA-9inhibits NLRP3 inflammasome activation in human atherosclerosis inflammation cell models through the JAK1/STAT signaling pathway).”《细胞生理学与生物化学(Cellular Physiology and Biochemistry)》41.4(2017):1555-1571)。因此,前体miR-9(MiR-9前体)或miR-9可用于抑制NLRP3。成熟miR-9(MIMAT0000441)的序列是5'-UCU UUG GUU AUC U AG CUG UAU GA-3'(SEQ ID NO:587)。hsa-miR-9-5p(UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA)(SEQ ID NO: 588)。在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是miR-9激动剂 SQ22538(SQ;9-(四氢-2-咪喃基)-9H-嘌呤-6-胺),其据报道增加miR-9的表达(Ham,Onju等人“小分子介导的miR-9诱导抑制了球囊损伤后的血管平滑肌细胞增殖和新内膜形成(Small molecule-mediated induction of miR- 9suppressed vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury).”《肿瘤靶标(Oncotarget)》8.55(2017):93360.)。SQ22538的式如下:

[0524]



[0525] miR-223抑制NLRP3炎性小体的活性。(Bauernfeind,Franz等人“NLRP3炎性小体活性受到miR-223的负面控制(NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223).”《免疫学杂志(The Journal of Immunology)》189.8(2012):4175-4181;Feng,Zunyong等人“Ly6G+嗜中性粒细胞来源的miR-223抑制线粒体DAMP诱导的急性肺损伤中的NLRP3炎性小体(Ly6G+neutrophil-derived miR-223 inhibits the NLRP3 inflammasome in mitochondrial DAMP-induced acute lung injury).”《细胞死亡与疾病(Cell death&disease)》8.11(2017):e3170)。miR-223可以作为mmu-miR-223合成。与miR-223(5'-TGGGGTATTTGACAAACTGACA-3'(SEQ ID NO:589)互补的序列的至少一个或2个或3个或4个区块可用于抑制NLRP3。cbn-mir-233 MI0024890具有以下序列:UCGCCCAUCCC GUUGUCCAAUAUCCAACAACAAGUGAUUAUUG AGCAAUGC GAUGUGCGG(SEQ ID NO:590);cbr-mir-233 MI0000530具有以下序列:AAGCAUUUUCUGUCCCGCGCAUCCCUUGUCCAAUAUCAAAC CAG UAGAAAGAUUAUUGAGCAAUGCGCAUGUGCGGGACAGAUUG AAUAGCUG(SEQ ID NO:591);cel-mir-233MI0000308具有以下序列:AUAUAGCAUCUUUCUGUCUGCCCAUCCCGUUGCUCCAAUAUUCU AACACAAGUGAUUAUUGAGCAAUGCGCAUGUGCGGGAUAGACUG AUGGCUGC(SEQ ID NO:592);crm-mir-233MI0011059具有以下序列:UGAAGCGUCUCUCUGUCCCGCUCAUCCUGUUGUCCAAUAUCCA ACAG CCCAGUGAUUAUUGAGCAAUGCGCAUGUGCGGGACAGAUUG UAUGCUGCCAU(SEQ ID NO:593)。

[0526] 在一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是抑制miR表达的抗miRNA(抗miR),所述miR抑制NLRP3表达或功能。示例性的抗miR是抗miR-22和抗miR-33。已证明miR22维持NLRP3的表达(Li,S.等人,“MiR-22持续NLRP3表达并减弱幽门螺杆菌诱导的胃部致癌作用(MiR-22 sustains NLRP3 expression and attenuates H.pylori-induced gastric carcinogenesis).”《肿瘤基因(Oncogene)》37.7(2018):884)。miR-22的成熟序列是hsa-miR-22(hsa-miR-22-5p MIMAT000449):AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUA(SEQ ID NO:594),其中茎环序列如下:hsa-mir-22MI0000078具有序列:GGCUGAGCCGCGAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGCUUAUGUCCUGAC CCAGCUAAAGCUGCCAGUUGAAGAACUGUUGCCCUCUGCC(SEQ ID NO:595)。

[0527] 据报道miR-33上调在原代巨噬细胞中的NLRP3 mRNA和蛋白质的表达以及半胱天冬酶-1活性(Xie,Qingyun等人“微小RNA-33调节巨噬细胞中的NLRP3炎性小体信号传导途径(MicroRNA-33 regulates the NLRP3 inflammasome signaling pathway in macrophages).”《分子医学报告(Molecular medicine reports)》17.2(2018):3318-3327)。miR-33的成熟序列是mmu-miR-33-5p或MIMAT0000667;并且是:GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA(SEQ ID NO:596);其中茎环序列如下:mmu-mir-33MI0000707:CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGCAAUACCUGUG CAAUGUUCCACAGUGCAUCACGG(SEQ ID NO:597)。

[0528] 因此,在一些实施方案中,NLRP3抑制剂是与SEQ ID NO:594或 SEQ ID NO:595的

至少一部分(例如15-25聚体)互补的抗miR-22、或与SEQ ID NO:596或SEQ ID NO:597的至少一部分(例如15-21聚体)互补的抗miR-33。

[0529] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,NLRP3炎性小体抑制剂是来自研发系统公司(R&D Systems)(明尼苏达州明尼阿波利斯(Minneapolis,MN))的抗人NLRP3(目录号AF6789)。在一些实施方案中,NLRP3的抗体抑制剂由ceDNA编码。

[0530] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,NLRP3抑制剂是结合NLRP3的抗体或抗原结合片段。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,结合NLRP3的抗体或抗原结合片段由ceDNA编码。

[0531] NLRP3炎性小体抑制剂是指抑制或至少降低炎性小体活性的化合物,包括优降糖及其功能等价的前体或衍生物、半胱天冬酶1抑制剂、单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)活化因子和P2X7抑制剂。可以通过抑制炎性小体或半胱天冬酶1、但不会导致细胞色素P450(cyp)酶活性(包括cyp同种型3A4、2C9和2C19)发生变化的单一化合物或化合物组合来实现NLRP3炎性小体的抑制,所述细胞色素P450酶活性将对他汀类药物的代谢产生不利影响,从而降低他汀类药物的生物利用度。

[0532] AIM2炎性小体途径的抑制剂

[0533] 在一些实施方案中,炎性小体拮抗剂抑制AIM2。AIM2(可替代地被称为PISA)是343个氨基酸多肽(参见Genbank登录号AF024714.1; RefSeq登录号NP_004824.1)(SEQ ID NO:598)。AIM2是IFI20X/IFI116家族的成员,并且已知在脾脏、小肠、外周血白细胞和睾丸中表达。AIM2包含一个涉及与ASC相互作用的PYD结构域、以及一个涉及与dsDNA相互作用的HIN200结构域。AIM2在肿瘤发生逆转中起推定作用,并且可能控制细胞增殖。干扰素- γ 诱导AIM2的表达。

[0534] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,AIM2抑制剂是结合AIM2的抗体或抗原结合片段。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,结合NLRP3的抗体或抗原结合片段由ceDNA编码。在Farshchian等人,《肿瘤靶标(Oncotarget)》2017;8(28);45825-45836(其以全文引用的方式并入本文)中公开了AIM2抑制剂。

[0535] 在一些实施方案中,AIM2炎性小体抑制剂是抗人ASC单克隆抗体(克隆23-4,日本名古屋的MBL(MBL,Nagoya,Japan)),其据报道干扰ASC的PYD。在一些实施方案中,AIM2炎性小体抑制剂是抗人AIM2(目录号8055)抗体(Cell Signaling Technology®(马萨诸塞州贝弗利(Beverly,MA)))。在一些实施方案中,AIM2炎性小体抑制剂是内源性AIM2抑制剂,诸如最近由(Khare等人,2014;de Almeida等人,2015)描述的含热蛋白的蛋白质、或由Schauber及其同事(Dombrowski等,2011)报道的抗微生物肽抗菌肽。在一些实施方案中,AIM2炎性小体抑制剂是在Miriam Canavase“AIM2炎性小体的双重性:重点在于其在自身免疫和皮肤疾病中的作用(the duality of AIM2 inflammasome:A focus on its role in autoimmunity and Skin diseases)”《美国药物学与毒理学杂志(Am.J.Pharm&Toxicology)》;2016)的微型综述中公开的任何化合物。

[0536] 在一些实施方案中,AIM2炎性小体抑制剂是P202(其是p202四聚体),并且据报道降低AIM2激活,并防止ASC和AIM2炎性小体激活的dsDNA依赖性聚集(Fernandes-Alnemri,Teresa等人“AIM2炎性小体对于土拉热弗朗西丝菌的先天性免疫至关重要(The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis).”《自

然·免疫学 (Nature immunology)》11.5(2010):385;Yin,Qian等人“p202介导的对 AIM2 炎性小体激活的特异性抑制的分子机制 (Molecular mechanism for p202-mediated specific inhibition of AIM2 inflammasome activation).”《细胞报告 (Cell reports)》4.2(2013):327-339)。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,P202由 ceDNA 编码。

[0537] 在一些实施方案中,AIM2 炎性小体抑制剂是 W02017138586A 或 US2013/0158100A1 中所描述的任何小分子化合物,所述文献中每一者的内容以全文引用的方式并入本文。

[0538] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,AIM2 抑制剂是 AIM2 的 RNA 抑制剂,诸如对 AIM2 特异的 siRNA。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,AIM2 的 RNA 抑制剂由 ceDNA 编码。人 AIM2 蛋白由包含核酸序列 NM_004833.2 (SEQ ID NO:600) 的 AIM2 基因编码,并且人 AIM2 蛋白具有 NP_004824.1 (SEQ ID NO:598) 的氨基酸。AIM2 抑制剂还包括反义多核苷酸,其可用于抑制 AIM2 基因转录,从而抑制 AIM2 炎性小体激活。与编码 AIM2 的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:600 所示的多核苷酸)的区段互补的多核苷酸被设计成与编码 AIM2 的 mRNA 结合并抑制这种 mRNA 的翻译。反义多核苷酸可以由如本文所公开的 ceDNA 载体编码,并且可以任选地与如本文所公开的组织特异性或诱导型启动子可操作地连接。可以根据技术人员通常已知的方法通过使 RNAi 分子基因沉默来抑制 AIM2 mRNA。例如,特异性靶向人 AIM2 (NM_004833.2) 的基因沉默的 siRNA 寡核苷酸双螺旋可以容易地用于敲低 AIM2 表达。可以使用 siRNA 成功地靶向 AIM2 mRNA;并且基于靶 mRNA 的已知序列,本领域技术人员可以容易地制备其他 siRNA 分子。因此,为了避免任何疑问,本领域普通技术人员可以设计针对 NM_004833.2 的核酸序列的核酸抑制剂(诸如 RNAi (RNA 沉默)剂),所述核酸序列为如下:

```

1 atagacattt tcttctgtgg ctgctagtga gaacccaac cagctcagcc aattagagct
61 ccagttgtca ctctacca cactggcct gggggtgaag ggaagtgtt attaggggta
121 catgtgaagc cgtccagaag tgtcagagtc tttgtagctt tgaaagtcac ctagggttatt
181 tgggcatgct ctctgagtc ctctgctagt taagctctct gaaaagaagg tggcagaccc
241 ggtttgctga tcgccccagg gatcaggagg ctgatcccaa agttgtcaga tggagagtaa
301 atacaaggag atactcttgc taacaggcct ggataacatc actgatgagg aactggatag
361 gtttaagttc tttctttcag acgagtttaa tattgccaca ggcaactac atactgcaa
421 cagaatacaa gtagctacct tgatgattca aaatgctggg gcggtgtctg cagtgatgaa
481 gaccattcgt atttttcaga agttgaatta tatgcttttg gcaaacgctc ttcaggagga
541 gaaggagaaa gttgataagc aatacaaatc ggtaacaaaa ccaaagccac taagtcaagc
601 tgaatgatg cctgctgcat ctgcagccat cagaaatgat gtcgcaaagc aacgtgctgc
661 accaaaagtc tctcctcatg ttaagcctga acagaaacag atggtggccc agcaggaatc
721 tatcagagaa gggtttcaga agcgctgttt gccagttatg gtaactgaaag caaagaagcc
[0539] 781 cttcacgttt gagacccaag aaggcaagca ggagatgttt catgctacag tggctacaga
841 aaaggaattc ttctttgtaa aagtttttaa tacactgctg aaagataaat tcattccaaa
901 gagaataatt ataatagcaa gatattatcg gcacagtggg ttcttagagg taaatagcgc
961 ctcacgtgtg ttagatgctg aatctgacca aaagggttaat gtcccgtgta acattatcag
1021 aaaagctggg gaaaccccgga agatcaacac gcttcaaact cagccccttg gaacaattgt
1081 gaatggtttg tttgtagtc agaaaggtaac agaaaagaag aaaaacatat tatttgacct
1141 aagtgacaac actgggaaaa tggaaagtact ggggggttaga aacgaggaca caatgaaatg
1201 taaggaagga gataaggttc gacttacatt cttcacactg tcaaaaaatg gagaaaaact
1261 acagctgaca tctggagttc atagcaccat aaagggttatt aaggccaaaa aaaaaacata
1321 gagaagtaaa aaggaccaat tcaagccaac tgggtctaagc agcatttaat tgaagaatat
1381 gtgatacagc ctcttcaatc agattgtaag ttacctgaaa gctgcagttc acaggctcct
1441 ctctccacca aattaggata gaataattgc tggataaaca aattcagaat atcaacagat
gatcacaata aacatctgtt tctcattcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
(SEQ ID NO: 600)

```

[0540] 在一些实施方案中,AIM2 炎性小体抑制剂是 siRNA,从而抑制 AIM2 炎性小体的

mRNA。在一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂是抑制人AIM2表达的5'-CCC GAAGATCAACACGCTTCA-3' (SEQ ID NO: 601) 或5'-AAAGGTTAATGTCCCGCTGAA-3' (SEQ ID NO:665) (两者均来自Farshchian等人.《肿瘤靶标 (Oncotarget)》(2017) 8:45825- 45836) 或与其至少50%、或至少60%或至少70%或至少80%或至少90%相同的其片段或同源物。

[0541] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂是AIM2的RNA抑制剂，诸如对AIM2特异的siRNA。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中，AIM2的RNA抑制剂由ceDNA编码。AIM2 siRNA可以商购获得，例如，SI04261432 (Qiagen®)；或者来自OpenBiosystems® (阿拉巴马州亨茨维尔 (Huntsville, Ala.)) 的 RCN0000096104 (#1)、TRCN0000096105 (#2)、TRCN0000096106 (#3)。

[0542] 在一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂是用硫代磷酸酯(PO)骨架合成的A151 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (SEQ ID NO:602)) 或C151 (5'-TTCAAATTC AAATTC AAATTC AAA-3' (SEQ ID NO:603))。A151 (也称为ODN TTAGGG) 是含有通常在哺乳动物端粒DNA中发现的4个重复的免疫抑制性TTAGGG (SEQ ID NO:604) 基序的一种合成的寡核苷酸(ODN) (Steinhagen F.等人, 2017. 含有 TTAGGG基序的抑制性寡脱氧核苷酸抑制人单核细胞中的cGAS激活 (Suppressive oligodeoxynucleotides containing TTAGGG motifs inhibit cGAS activation in human monocytes).《欧洲免疫学杂志 (Eur J Immunol)》)。A151阻止响应于胞质dsDNA的AIM2炎性小体激活，但需要硫代磷酸酯(PO)骨架 (Kaminsji等人, J Immunol 2013; 191:3876-3883, 含有抑制性TTAGGG基序的合成寡核苷酸抑制AIM2炎性小体激活 (Synthetic Oligodeoxynucleotides Containing Suppressive TTAGGG Motifs Inhibit AIM2 Inflammasome Activation); Eichholz K.等人, 2016. 免疫复合腺病毒在人树突状细胞中诱导AIM2介导的细胞凋亡 (Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells).《美国科学公共图书馆病理学 (PLoS Pathog.)》12 (9):e1005871)。在一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂是A151 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (SEQ ID NO:602)) 或至少一个重复的TTAGGG (SEQ ID NO:604)，每个序列都具有硫代磷酸酯(PO)骨架。在一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂是不具有磷酸二酯(PE)骨架的A151 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (SEQ ID NO:602)) 或至少一个重复的TTAGGG (SEQ ID NO:604)。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂由施用至受试者 (包括例如ceDNA的后续递送) 的ceDNA编码。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中，由施用至受试者的ceDNA编码的AIM2炎性小体抑制剂是A151 (SEQ ID NO:602)。

[0543] 在一些实施方案中，AIM2炎性小体抑制剂是与人NM_001348247.1 (SEQ ID NO:566) (NCBI基因9447 (AIM2)) 中的RNAi靶序列互补的RNAi。抑制AIM2的RNAi剂可以是与表5C所示的SEQ ID NO:605- 610的17-21个之间的连续碱基互补的核酸。

[0544] 表5C: 用于抑制AIM2的RNAi的靶序列:

[0545]

靶序列	SEQ ID NO:	克隆ID
AGCCACTAAGTCAAGCTGAAA	605	TRCN0000107503
CCAACTGGTCTAAGCAGCATT	606	TRCN0000107500
GAAACGAGGACACAATGAAAT	607	TRCN0000413154

GCCACTAAGTCAAGCTGAAAT	608	TRCN0000107502
CTGGAGTTCATAGCACCATAA	609	TRCN0000107504
CCCGCTGAACATTATCAGAAA	610	TRCN0000107501

[0546] 在一些实施方案中,AIM2炎性小体抑制剂是siRNA剂。抑制AIM2 的示例性siRNA序列示于表5D中。

[0547] 表5D:抑制AIM2的示例性siRNA

[0548]

克隆 ID	靶序列	正向和反向寡核苷酸序列
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAGCTGAAA (SEQ ID NO: 666)	正 向 : CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAGCTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 667)
		反 向 : AATTCAAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 668)
TRCN0000107500	CCAACTGGTCTAAGCAGCATT (SEQ ID NO: 669)	正 向 : CCGGCCAACCTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCTGCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 670)
		反 向 : AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 671)
TRCN0000413154	GAAACGAGGACACAATGAAAT (SEQ ID NO: 672)	正 向 : CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTTCAATTGTGTCCTCGTTTCTTTTTG (SEQ ID NO: 673)
		反 向 : AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTTCAATTGTGTCCTCGTTTCTTTTTG (SEQ ID NO: 674)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGCTGAAAAT (SEQ ID NO: 675)	正 向 : CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAAATCTCGAGATTTCACTTGACTTAGTGGCTTTTTG (SEQ ID NO: 676)
		反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAAATCTCGAGATTTTCAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 677)
TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCACATAA (SEQ ID NO: 678)	正 向 : CCGGCTGGAGTTCATAGCACATAACTCGAGTTATGGTGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 679)
		反 向 : AATTCAAAAACTGGAGTTCATAGCACATAACTCGAGTTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 680)

[0549]

TRCN0000107501	CCCGCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 681)	正 向 : CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 682) 反 向 : AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 683)
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAG CTGAAA (SEQ ID NO: 684)	正 向 : CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAG CTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 685) 反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGA GTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 686)
TRCN0000107500	CCAAGTGGTCTAAGC AGCATT (SEQ ID NO: 687)	正 向 : CCGGCCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCT GCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 688) 反 向 : AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAG AATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 689)
TRCN0000413154	GAAACGAGGACACA ATGAAAT (SEQ ID NO: 690)	正 向 : CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTTTC ATTGTGTCCTCGTTTCTTTTTTG (SEQ ID NO: 691) 反 向 : AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGA GATTTTCATTGTGTCCTCGTTTC (SEQ ID NO: 692)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGC TGAAAT (SEQ ID NO: 693)	正 向 : CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAGATTTCA GCTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 694) 反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAG ATTTTCAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 695)
TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCA CCATAA (SEQ ID NO: 696)	正 向 : CCGGCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAGTTATGG TGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 697) 反 向 : AATTCAAAAAGTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAG TTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 698)
TRCN0000107501	CCCGCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 699)	正 向 : CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 700) 反 向 : AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 701)
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAG CTGAAA (SEQ ID NO: 702)	正 向 : CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAG CTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 703) 反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGA GTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 704)
TRCN0000107500	CCAAGTGGTCTAAGC AGCATT (SEQ ID NO: 705)	正 向 : CCGGCCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCT GCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 706) 反 向 : AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAG AATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 707)

[0550]

TRCN0000413154	GAAACGAGGACACA ATGAAAT (SEQ ID NO: 708)	正 向 : CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTC ATTGTGTCCTCGTTTCTTTTG (SEQ ID NO: 709)
		反 向 : AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGA GATTCATTGTGTCCTCGTTT (SEQ ID NO: 710)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGC TGAAAT (SEQ ID NO: 711)	正 向 : CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAGATTC GCTTGACTTAGTGGCTTTTG (SEQ ID NO: 712)
		反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAG ATTCAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 713)
TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCA CCATAA (SEQ ID NO: 714)	正 向 : CCGGCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAGTTATGG TGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 715)
		反 向 : AATTCAAAAAGTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAG TTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 716)
TRCN0000107501	CCCCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 717)	正 向 : CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAACTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 718)
		反 向 : AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAACTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 719)
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAG CTGAAA (SEQ ID NO: 720)	正 向 : CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAACTCGAGTTTCAG CTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 721)
		反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAACTCGA GTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 722)
TRCN0000107500	CCAACTGGTCTAAGC AGCATT (SEQ ID NO: 723)	正 向 : CCGGCCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCT GCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 724)
		反 向 : AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAG AATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 725)
TRCN0000413154	GAAACGAGGACACA ATGAAAT (SEQ ID NO: 726)	正 向 : CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTC ATTGTGTCCTCGTTTCTTTTG (SEQ ID NO: 727)
		反 向 : AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGA GATTCATTGTGTCCTCGTTT (SEQ ID NO: 728)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGC TGAAAT (SEQ ID NO: 729)	正 向 : CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAGATTC GCTTGACTTAGTGGCTTTTG (SEQ ID NO: 730)
		反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAG ATTCAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 731)
TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCA CCATAA (SEQ ID NO: 732)	正 向 : CCGGCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAGTTATGG TGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 733)
		反 向 : AATTCAAAAAGTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAG TTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 734)

[0551]

TRCN0000107501	CCCGCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 735)	正 向 : CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 736) 反 向 : AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 737)
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAG CTGAAA (SEQ ID NO: 738)	正 向 : CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAG CTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 738) 反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGA GTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 740)
TRCN0000107500	CCAACTGGTCTAAGC AGCATT (SEQ ID NO: 741)	正 向 : CCGGCCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCT GCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 742) 反 向 : AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAG AATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 742)
TRCN0000413154	GAAACGAGGACACA ATGAAAT (SEQ ID NO: 743)	正 向 : CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTTTC ATTGTGTCCTCGTTTCTTTTTTG (SEQ ID NO: 744) 反 向 : AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGA GATTTTCATTGTGTCCTCGTTTC (SEQ ID NO: 745)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGC TGAAAT (SEQ ID NO: 746)	正 向 : CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAGATTTCA GCTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 747) 反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAG ATTTTCAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 748)
TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCA CCATAA (SEQ ID NO: 749)	正 向 : CCGGCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAGTTATGG TGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 750) 反 向 : AATTCAAAAAGTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAG TTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 751)
TRCN0000107501	CCCGCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 752)	正 向 : CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 753) 反 向 : AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAAACTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 754)
TRCN0000185775	GATTGTTTCAACACA AGAGTA (SEQ ID NO: 755)	正 向 : CCGGGATTGTTTCAACACAAGAGTACTCGAGTACTCT TGTGTTGAAACAATCTTTTTTG (SEQ ID NO: 756) 反 向 : AATTCAAAAAGATTGTTTCAACACAAGAGTACTCGAG TACTCTTGTGTTGAAACAATC (SEQ ID NO: 757)
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAG CTGAAA (SEQ ID NO: 758)	正 向 : CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAG CTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 759) 反 向 : AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGA GTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 760)

[0552]

TRCN0000107500	CCAACTGGTCTAAGC AGCATT (SEQ ID NO: 761)	正 向 :	CCGGCCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCT GCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 762)
		反 向 :	AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAG AATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 763)
TRCN0000413154	GAAACGAGGACACA ATGAAAT (SEQ ID NO: 764)	正 向 :	CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTTT ATTGTGTCCTCGTTTCTTTTTG (SEQ ID NO: 765)
		反 向 :	AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGA GATTTCAATTGTGTCCTCGTTT (SEQ ID NO: 766)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGC TGAAAT (SEQ ID NO: 767)	正 向 :	CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAGATTTCA GCTTGACTTAGTGGCTTTTTG (SEQ ID NO: 768)
		反 向 :	AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAG ATTTAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 769)
TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCA CCATAA (SEQ ID NO: 780)	正 向 :	CCGGCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAGTTATGG TGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 781)
		反 向 :	AATTCAAAAAGTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAG TTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 782)
TRCN0000107501	CCCGCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 783)	正 向 :	CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAACTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 784)
		反 向 :	AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAACTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 785)
TRCN0000107503	AGCCACTAAGTCAAG CTGAAA (SEQ ID NO: 786)	正 向 :	CCGGAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGAGTTTCAG CTTGACTTAGTGGCTTTTTTG (SEQ ID NO: 787)
		反 向 :	AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAACTCGA GTTTCAGCTTGACTTAGTGGCT (SEQ ID NO: 788)
TRCN0000107500	CCAACTGGTCTAAGC AGCATT (SEQ ID NO: 789)	正 向 :	CCGGCCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAGAATGCT GCTTAGACCAGTTGGTTTTTG (SEQ ID NO: 790)
		反 向 :	AATTCAAAAACCAACTGGTCTAAGCAGCATTCTCGAG AATGCTGCTTAGACCAGTTGG (SEQ ID NO: 791)
TRCN0000413154	GAAACGAGGACACA ATGAAAT (SEQ ID NO: 792)	正 向 :	CCGGGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGAGATTTT ATTGTGTCCTCGTTTCTTTTTG (SEQ ID NO: 793)
		反 向 :	AATTCAAAAAGAAACGAGGACACAATGAAATCTCGA GATTTCAATTGTGTCCTCGTTT (SEQ ID NO: 794)
TRCN0000107502	GCCACTAAGTCAAGC TGAAAT (SEQ ID NO: 795)	正 向 :	CCGGGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAGATTTCA GCTTGACTTAGTGGCTTTTTG (SEQ ID NO: 796)
		反 向 :	AATTCAAAAAGCCACTAAGTCAAGCTGAAATCTCGAG ATTTAGCTTGACTTAGTGGC (SEQ ID NO: 797)

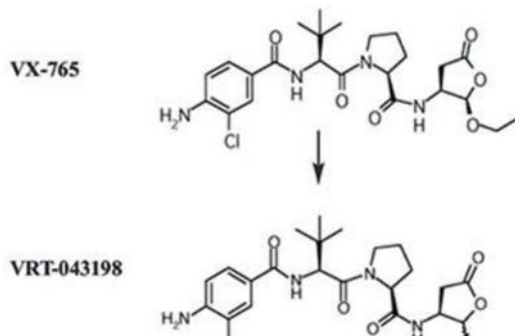
[0553]	TRCN0000107504	CTGGAGTTCATAGCA CCATAA (SEQ ID NO: 798)	正 向 : CCGGCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAGTTATGG TGCTATGAACTCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 799)
			反 向 : AATTCAAAAACCTGGAGTTCATAGCACCATAACTCGAG TTATGGTGCTATGAACTCCAG (SEQ ID NO: 800)
	TRCN0000107501	CCCGCTGAACATTAT CAGAAA (SEQ ID NO: 801)	正 向 : CCGGCCCGCTGAACATTATCAGAAAACCTCGAGTTTCTG ATAATGTTTCAGCGGGTTTTTG (SEQ ID NO: 802)
			反 向 : AATTCAAAAACCCGCTGAACATTATCAGAAAACCTCGAG TTTCTGATAATGTTTCAGCGGG (SEQ ID NO: 803)

[0554] 在一些实施方案中, AIM2炎性小体抑制剂是抑制AIM2表达的 miRNA(miR)、或抑制AIM2表达的miR激动剂。抑制AIM2的示例性 miR是miR-223(Yang, Fan等人“微小RNA-223通过AIM2信号传导途径在Con A诱导的急性肝衰竭的早期阶段起着Kupffer细胞激活的重要调节剂(MicroRNA-223acts as an important regulator to Kupffer cells activation at the early stage of Con A-induced acute liver failure via AIM2 signaling pathway).”《细胞生理学与生物化学(Cellular Physiology and Biochemistry)》34.6(2014):2137-2152)。因此,用于本文中的AIM2抑制剂是与SEQ ID NO:589-593中任一个对应的miR-223。

[0555] 根据Kaneko等人,2015中所公开的方法、或在美国申请 US2013/0158100A1中所公开的方法,在无细胞系统中重建的体外AIM2 炎性小体可用作筛选AIM2炎性小体抑制剂的工具,所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0556] 半胱天冬酶1抑制剂

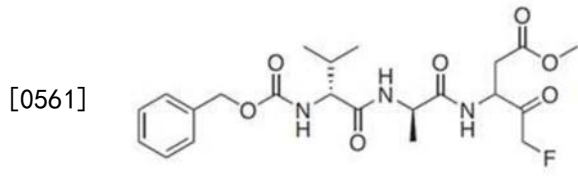
[0557] 在一些实施方案中,炎性小体拮抗剂抑制半胱天冬酶1。在一些实施方案中,用于所述方法和组合物中的半胱天冬酶1抑制剂是贝那卡生(Belnacasan, VX-765)。VX-765是VRT-043198的口服吸收前药,属于 ICE/半胱天冬酶1亚家族的半胱天冬酶的有效和选择性抑制剂,并且具有以下式:



[0559] (参见Wannamaker W.等人,2007.口服可用的选择性白介素(IL)转换酶/半胱天冬酶1抑制剂(S)-1-((S)-2-{{1-(4-氨基-3-氯-苯基)-甲酰基}-氨基}-3,3-二甲基-丁酰基)-吡咯烷-2-甲酸((2R,3S)-2-乙氧基-5-氧代-四氢呋喃-3-基)-酰胺(VX-765)通过抑制IL-1 β 和IL-18的释放而展现出有效的抗炎症活性((S)-1-((S)-2-{{1-(4-amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl}-amino}-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide(VX-765), an orally available selective interleukin (IL)-converting enzyme/caspase-

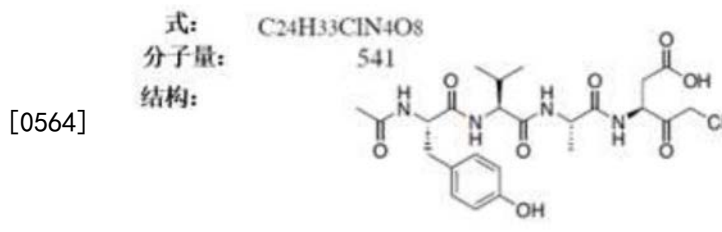
linh inhibitor, exhibits potent anti-inflammatory activities by inhibiting the release of IL-1 β and IL-18).《药理学和实验治疗学杂志(J Pharmacol Exp Ther)》.321(2):509-16)。

[0560] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂是Z-VAD-FMK,其具有以下结构:



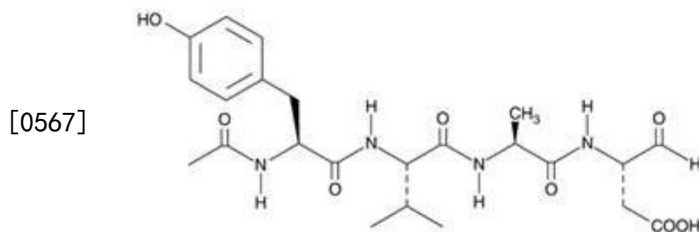
[0562] 并且是可透过细胞的泛半胱天冬酶抑制剂和NLRP3诱导细胞中有效的半胱天冬酶1激活的抑制剂(Dostert C.等人,2009.疟疾原虫色素是Nalp3 炎性小体激活危险信号(Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal).PLoS One.4(8):e6510)。Z-VAD-FMK与半胱天冬酶蛋白酶的催化位点不可逆地结合(Slee EA.等人,1996.苄氧基羰基-Val-Ala-Asp(OMe)氟甲基酮(Z-VAD.FMK)通过阻止CPP32的加工抑制细胞凋亡(Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32).《生物化学杂志(Biochem J.)》315(Pt 1):21-4)。

[0563] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂是Ac-YVAD-cmk,其具有以下结构:



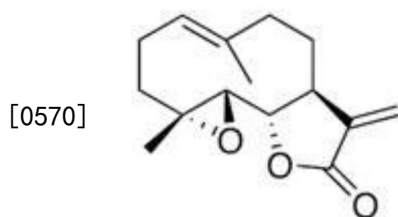
[0565] 并且是基于proIL-1 β 中的靶序列(YVHD)的半胱天冬酶1抑制剂和氯甲基酮四肽。据报道Ac-YVAD cmk阻止了炎性小体激活,并因此显示出抗炎症、抗凋亡和抗焦亡的作用。

[0566] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂是Ac-YVAD-CHO,其具有以下结构:



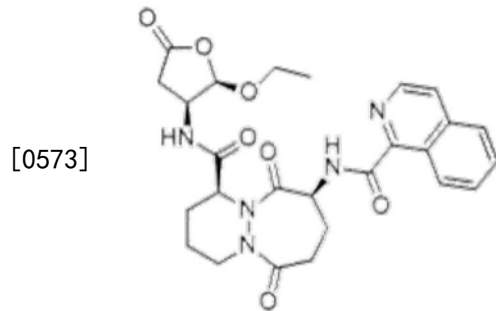
[0568] (Brenner, B.等人1998.《细胞死亡差异(Cell Death Differ)》.5:29- 37.PMID: 10200443)半胱天冬酶1底物(CAS 143305-11-7)

[0569] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂是小白菊内酯,其具有以下结构:



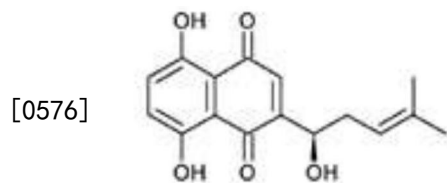
[0571] 小白菊内酯是一种源自黑叶母菊的倍半萜内酯,是已知的NF- κ B激活抑制剂,并且也是半胱天冬酶1和包括NLRP3和NLRP1炎性小体在内的多种炎性小体的直接抑制剂(Juliana C.等人,2010.抗炎化合物小白菊内酯和Bay 11-7082是炎性小体的直接抑制剂(Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome).《生物化学杂志(J Biol Chem.)》285(13):9792-802)。小白菊内酯通过干扰NLRP3 ATP酶活性来直接抑制NLRP3炎性小体。

[0572] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是以下中的任一种或组合:普那卡生(Pralnacasan, VX-740),其具有以下结构:

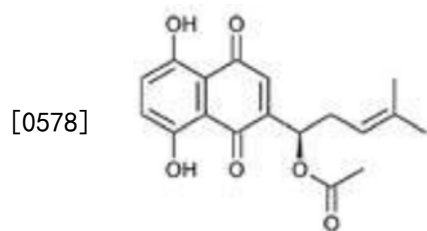


[0574] Z-WEHD-FMK (也称为苜氧基羰基-V-A-D-O-甲基氟甲基酮)。

[0575] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂是紫草素或乙酰紫草素,其中紫草素是:



[0577] 并且乙酰紫草素是:



[0579] 紫草素是由于多效性作用而用于传统中药中的一种存在于紫草 (Lithospermum erythrorhizon) 根中的高度亲脂性萘醌,并且抑制NLRP3 炎性小体激活(Zorman等人,PLOS One, 2016;11(7);e0159826)。

[0580] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂可以是小分子抑制剂,如本领域技术人员将理解的。非限制性实例包括含氰基丙酸酯的分子(诸如(S)-3-((S)-1-((S)-2-(4-氨基-3-氯苯甲酰胺基)-3,3-二甲基丁酰基)吡咯烷-2-甲酰胺基)-3-氰基-丙酸)、以及其他小分子半胱天冬酶1抑制剂(诸如(S)-1-((S)-2-([1-(4-氨基-3-氯-苯基)-甲酰基]-氨基)-3,3-二甲基-丁酰基)-吡咯烷-2-甲酸((2R,3S)-2-乙氧基-5-氧代-四氢咪喃-3-基)-酰胺)。可以化学合成此类抑制剂。

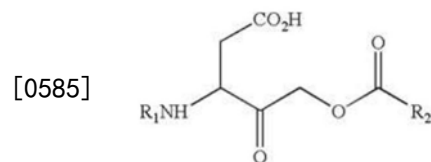
[0581] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂可以是半胱天冬酶1酶促活性的直接抑

制剂,或者可以是抑制炎性小体组装或炎性小体信号传播的起始的间接抑制剂。用于本发明中的半胱天冬酶1抑制剂可以是抗氧化剂,包括活性氧(ROS)抑制剂。此类半胱天冬酶1抑制剂的实例包括但不限于类黄酮,包括黄酮,诸如芹菜素、木犀草素和地奥司明;黄酮醇,诸如杨梅酮、漆黄素和槲皮素;黄烷醇及其聚合物,诸如儿茶素、没食子儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯和茶黄素;异黄酮植物雌激素;以及类芪(stilbenoid),诸如白藜芦醇。还包括酚酸及其酯,诸如没食子酸和水杨酸;萜类或类异戊二烯,诸如穿心莲内酯和小白菊内酯;维生素,诸如维生素A、C和E;维生素辅助因子(诸如辅酶Q10、锰和碘化物)、其他有机抗氧化剂(诸如柠檬酸、草酸、植酸和 α -硫辛酸)以及漆树(*Rhus verniciflua stokes*)提取物。半胱天冬酶1抑制剂可以是这些化合物的组合,例如, α -硫辛酸、辅酶Q10和维生素E的组合,或半胱天冬酶1抑制剂与另一种炎性小体抑制剂(诸如优降糖)或其功能等价的前体或衍生物的组合。

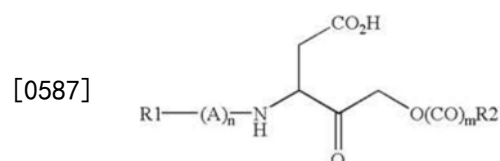
[0582] 一些炎性小体抑制剂的剂量的实例如下:芹菜素(约0.1-10mg/kg)、木犀草素(约1-100mg)、地奥司明(约100-900mg)、杨梅酮(约10-300mg)、槲皮素(约10-1000mg)、漆黄素(1-200mg/kg)、漆树提取物(1-100mg/kg)、儿茶素(约50-500mg)、没食子儿茶素(约100-1000mg)、表儿茶素(约0.1-10mg/kg)、表没食子儿茶素(约100-1000mg)、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(约100-1000mg)、茶黄素(约75-750mg)、异黄酮植物雌激素(约25-250mg)、白藜芦醇(约100-1000mg)、穿心莲内酯(约100-500mg)、小白菊内酯(约0.1-50mg)、维生素A(约5000-20000IU)、维生素C(约100-2000mg)、辅酶Q10(约30-500mg)、维生素E(约10-1000IU)、 α -硫辛酸(约10-1000mg)、辅酶Q10(30-500mg)、锰(约1-100mg)、 α -硫辛酸、辅酶Q10和维生素E(分别约为10-1000mg、30-500mg、10-1000IU),优降糖(约1-20mg)和缺乏环己基脲部分的优降糖衍生物(约1-200mg)。

[0583] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1的抑制剂是在美国专利6,355,618、6,632,962、5,756,466;或国际申请:W02001/042,216、W02004/064,713、W098/16502、W097/24339、EP623592;以及Dolle等人《医学化学杂志(J. Med. Chem.)》39,2438(1996);Dolle等人,《医学化学杂志(J. Med. Chem.)》40,1941(1997)中所描述的任何小分子化合物;所述文献中每一者的内容以全文引用的方式并入本文。在一些实施方案中,还报道了半胱天冬酶1的抑制剂是半胱天冬酶1的非肽抑制剂。美国专利号(Bemis等人);

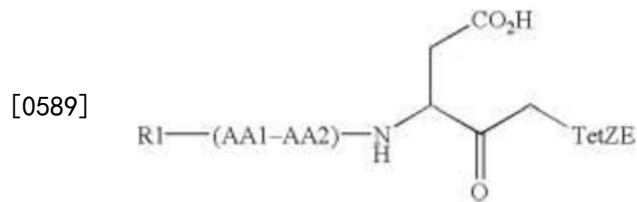
[0584] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是具有以下结构的ICE(半胱天冬酶1)抑制剂:



[0586] 其中 R_1 特别是 R_3CO- , R_3 特别是 C_1-C_6 烷基、芳基、杂芳基、 $-(CHR)_n-$ 芳基和 $-(CHR)_n-$ 杂芳基,并且 R_2 选自各种基团。在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是具有以下结构的ICE(半胱天冬酶1)抑制剂:



[0588] 其中 R_1 包括芳基和杂芳基;A是氨基酸;n为0-4;m为0或1;并且 R_2 是芳基。在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是具有以下结构的ICE(半胱天冬酶1)抑制剂:



[0590] 其中 R_1 包括芳基和杂芳基;AA1和AA2是单键或氨基酸残基;Tet 代表四唑环;Z代表亚烷基、亚烯基、O、S等;并且E代表H、烷基等。

[0591] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是半胱天冬酶1的RNA抑制剂,诸如对半胱天冬酶1特异的siRNA。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,AIM2的RNA抑制剂由 ceDNA编码。

[0592] 在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是半胱天冬酶1的RNA抑制剂,诸如对半胱天冬酶1特异的siRNA。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,半胱天冬酶1的RNA抑制剂由ceDNA编码。涵盖用于本文的试剂盒和组合物中的半胱天冬酶1 siRNA序列的实例公开于W02008/033,285;Keller, M.等人《细胞 (Cell)》.2008;132(5):818-831;Artlett, C.M.等人《关节炎和风湿病 (Arthritis and Rheumatology)》2011年7月;63(11):3563-3574;Burdette, D.等人《普通病毒学杂志 (J Gen Virology)》.2012,93:235-246中,所述文献以全文引用的方式并入本文。针对半胱天冬酶1的siRNA序列也是可商购获得的,并且是本领域技术人员已知的。

[0593] 人半胱天冬酶-1蛋白由包含核酸序列NM_033292.3 (SEQ ID NO:611) 的CASP1基因编码,并且人半胱天冬酶-1蛋白具有NP_150634.1 (SEQ ID NO:612) 的氨基酸。半胱天冬酶1抑制剂还包括反义多核苷酸,其可用于抑制半胱天冬酶1基因转录,从而抑制半胱天冬酶1以及下游的 NLRP3炎性小体和AIM2炎性小体途径。与编码半胱天冬酶1的多核苷酸(例如,SEQ ID NO:611所示的多核苷酸)的区段互补的多核苷酸被设计成与编码半胱天冬酶1的mRNA结合并抑制这种mRNA的翻译。反义多核苷酸可以由如本文所公开的ceDNA载体编码,并且可以任选地与如本文所公开的组织特异性或诱导型启动子可操作地连接。

[0594] 可以根据技术人员通常已知的方法通过使RNAi分子基因沉默来抑制半胱天冬酶1或半胱天冬酶原1mRNA。例如,特异性靶向人半胱天冬酶 1 (NM_033292.3) 的基因沉默的siRNA寡核苷酸双螺旋可以容易地用于敲低半胱天冬酶原1表达。可以使用siRNA成功地靶向半胱天冬酶1 mRNA;并且基于靶mRNA的已知序列,本领域技术人员可以容易地制备其他siRNA分子。因此,为了避免任何疑问,本领域普通技术人员可以设计针对NM_033292.3的核酸序列的核酸抑制剂(诸如RNAi (RNA 沉默) 剂),所述核酸序列为如下:

[0595] 1 atactttcag tttcagtcac acaagaaggg aggagagaaa agccatggcc gacaagggtcc
 61 tgaaggagaa gagaaagctg tttatccggt ccatgggtga aggtacaata aatggccttac
 121 tggatgaatt attacagaca aggggtgctga acaaggaaga gatggagaaa gtaaaacgtg
 181 aaaatgctac agttatggat aagacccgag ctttgattga ctccgttatt ccgaaagggg
 241 cacagggcatg ccaaatttgc atcacataca tttgtgaaga agacagttac ctggcagggg
 301 cgctgggact ctcagcagat caaacatctg gaaattacct taatatgcaa gactctcaag
 361 gagtactttc ttcctttcca gctcctcagg cagtgcagga caaccagct atgccacat
 421 cctcaggctc agaaggggat gtcaagcttt gtcctcctaga agaagctcaa aggatatgga
 481 aacaaaagtc ggcagagatt tatccaataa tggacaagtc aagccgcaca cgtcttgctc
 541 tcattatctg caatgaagaa tttgacagta ttcctagaag aactggagct gaggttgaca
 601 tcacaggcat gacaatgctg ctacaaaatc tggggtacag cgtagatgtg aaaaaaatc
 661 tcaactgctc ggacatgact acagagctgg aggcatttgc acaccgcca gagcacaaga
 721 cctctgacag cagcttcctg gtgttcattg ttcattggtat tcgggaaggc atttgtggga
 781 agaaacactc tgagcaagtc ccagatatac tacaactcaa tgcaatctt aacatgttga
 841 ataccaagaa ctgcccaagt ttgaaggaca aaccgaaggt gatcatcatc caggcctgcc
 901 gtggtgacag ccctgggtgtg gtgtggttta aagattcagt aggagtcttct ggaaacctat
 961 ctttaccac tacagaagag tttgaggatg atgctattaa gaaagcccac atagagaagg
 1021 attttatcgc tttctgctct tccacaccag ataatgttc ttggagacat cccacaatgg
 1081 gctctgtttt tattggaaga ctcattgaac atatgcaaga atatgcctgt tctgtgatg
 1141 tggaggaaat tttccgcaag gttcgatttt catttgagca gccagatggt agagcgcaga
 1201 tgcccaccac tgaaagagtg actttgacaa gatgtttcta cctcttcca ggacattaaa
 1261 ataaggaac tgtatgaatg tctgtgggca ggaagtgaag agatccttct gtaaaggttt
 1321 ttggaattat gtctgctgaa taataaactt ttttgaata ataaatctgg tagaaaaatg
 1381 aaaaaaaaaaaa aaa (SEQ ID NO: 611)

[0596] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是与NM_033292.3 (SEQ ID NO:611) (也称为NCBI基因834 (CASP1)) 中的RNAi靶序列互补的RNAi。半胱天冬酶1的当前野生型转录物包括:NM_001223.4、NM_001257118.2、NM_001257119.2、NM_033292.3 (SEQ ID NO:611)、NM_033293.3、NM_033294.3、NM_033295.3、XM_017018393.1、XM_017018394.1、XM_017018395.1、XM_017018396.1。抑制半胱天冬酶 1的RNAi剂可以是与表5E所示的SEQ ID NO:613-619的17-21个之间的连续碱基互补的核酸。

[0597] 表5E:用于抑制半胱天冬酶1的RNAi的靶序列:

[0598]

靶序列	SEQ ID NO:	克隆ID
CACACGTCTTGCTCTCATTAT	613	TRCN0000003504
CTACAACCTCAATGCAATCTTT	614	TRCN0000003503
CCAGATATACTACAACCTCAAT	615	TRCN0000003502
GAAGAGTTTGAGGATGATGCT	616	TRCN0000010796
CCATGGGTGAAGGTACAATAA	617	TRCN0000118461
GCTTTGATTGACTCCGTTATT	618	TRCN0000118459
GAAGGTACAATAAATGGCTTA	619	TRCN0000118460

[0599] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是siRNA剂。抑制半胱天冬酶1的示例性siRNA序列示于表5F中。

[0600] 表5F:抑制半胱天冬酶1的示例性siRNA

[0601]

转录物	克隆 ID	靶序列	正向和反向寡核苷酸序列
NM_03329 4.3	TRCN0000003 504	CACACGTCTTGC TCTCATTAT (SEQ ID NO: 620)	正 向 : CCGGCACACGTCTTGCTCTCATTATC TCGAGATAATGAGAGCAAGACGTGT GTTTTTG (SEQ ID NO: 621)
			反 向 : AATTCAAAAACACACGTCTTGCTCTC ATTATCTCGAGATAATGAGAGCAAG ACGTGTG (SEQ ID NO: 622)
NM_03329 4.3	TRCN0000003 503	CTACAACTCAAT GCAATCTTT (SEQ ID NO: 623)	正 向 : CCGGCTACAACCTCAATGCAATCTTTC TCGAGAAAGATTGCATTGAGTTGTAG TTTTTG (SEQ ID NO: 624)
			反 向 : AATTCAAAAACCTACAACCTCAATGCA ATCTTTCTCGAGAAAGATTGCATTGA GTTGTAG (SEQ ID NO: 625)
NM_03329 4.3	TRCN0000003 502	CCAGATATACTA CAACTCAAT (SEQ ID NO: 626)	正 向 : CCGGCCAGATATACTACAACCTCAATC TCGAGATTGAGTTGTAGTATATCTGG TTTTTG (SEQ ID NO: 627)
			反 向 : AATTCAAAAACCAGATATACTACAA CTCAATCTCGAGATTGAGTTGTAGTA TATCTGG (SEQ ID NO: 628)
NM_03329 4.3	TRCN0000010 795	TGTATGAATGTC TGCTGGGCA (SEQ ID NO: 629)	正 向 : CCGGTGTATGAATGTCTGCTGGGCAC TCGAGTGCCAGCAGACATTCATACA TTTTTG (SEQ ID NO: 630)
			反 向 : AATTCAAAAATGTATGAATGTCTGCT GGGCACTCGAGTGCCAGCAGACAT

[0602]

			TCATACA (SEQ ID NO: 631)
NM_03329 4.3	TRCN0000139 687	CAAGGACCTGAA GGAGAAGAA (SEQ ID NO: 632)	正 向 : CCGGCAAGGACCTGAAGGAGAAGAA CTCGAGTTCTTCTCCTTCAGGTCCTTG TTTTTG (SEQ ID NO: 633)
			反 向 : AATTCAAAAACAAGGACCTGAAGGA GAAGAACTCGAGTTCTTCTCCTTCAG GTCCTTG (SEQ ID NO: 634)
NM_03329 4.3	TRCN0000138 367	CAATGTCTGTGG GAGGAAGAA (SEQ ID NO: 635)	正 向 : CCGGCAATGTCTGTGGGAGGAAGAA CTCGAGTTCTTCTCCACAGACATT GTTTTG (SEQ ID NO: 636)
			反 向 : AATTCAAAAACAATGTCTGTGGGAG GAAGAACTCGAGTTCTTCTCCACA GACATTG (SEQ ID NO: 637)
NM_03329 4.3	TRCN0000072 917	CAAGGTCCTGTA GGGAGAAGA (SEQ ID NO: 638)	正 向 : CCGGCAAGGTCCTGTAGGGAGAAGA CTCGAGTCTTCTCCCTACAGGACCTT GTTTTG (SEQ ID NO: 639)
			反 向 : AATTCAAAAACAAGGTCCTGTAGGG AGAAGACTCGAGTCTTCTCCCTACAG GACCTTG (SEQ ID NO: 640)
NM_03329 4.3	TRCN0000233 250	CAAGGTCCTGTA GGGAGAAGA (SEQ ID NO: 641)	正 向 : CCGGCAAGGTCCTGTAGGGAGAAGA CTCGAGTCTTCTCCCTACAGGACCTT GTTTTG (SEQ ID NO: 642)
			反 向 : AATTCAAAAACAAGGTCCTGTAGGG AGAAGACTCGAGTCTTCTCCCTACAG GACCTTG (SEQ ID NO: 643)
NM_03329 4.3	TRCN0000321 071	ACAAGCCCAAGG TGATCATT (SEQ ID NO: 644)	正 向 : CCGGACAAGCCCAAGGTGATCATT CTCGAGTAATGATCACCTTGGGCTTG TTTTTG (SEQ ID NO: 645)
			反 向 : AATTCAAAAACAAGCCCAAGGTGA TCATTACTCGAGTAATGATCACCTTG GGCTTGT (SEQ ID NO: 646)
NM_03329 4.3	TRCN0000125 361	CAAGGACTTGAA GGAGAAGAA (SEQ ID NO: 647)	正 向 : CCGGCAAGGACTTGAAGGAGAAGAA CTCGAGTTCTTCTCCTTCAAGTCCTTG TTTTTG (SEQ ID NO: 648)
			反 向 : AATTCAAAAACAAGGACTTGAAGGA GAAGAACTCGAGTTCTTCTCCTTCAA

			GTCCTTG (SEQ ID NO: 649)
NM_03329 4.3	TRCN0000006 653	CCCAAGTTTGAA GTACAAGTA (SEQ ID NO: 650)	正 向 : CCGGCCCAAGTTTGAAGTACAAGTAC TCGAGTACTTGTACTTCAAAGTTGGG TTTTTG (SEQ ID NO: 651)
			反 向 : AATTCAAAAACCCAAGTTTGAAGTAC AAGTACTCGAGTACTTGTACTTCAAA CTTGGG (SEQ ID NO: 652)
NM_03329 4.3	TRCN0000058 747	CCCAGGACATGA TAATAAGAT (SEQ ID NO: 653)	正 向 : CCGGCCCAGGACATGATAATAAGAT CTCGAGATCTTATTATCATGTCCTGG GTTTTG (SEQ ID NO: 654)
			反 向 : AATTCAAAAACCCAGGACATGATAA TAAGATCTCGAGATCTTATTATCATG TCCTGGG (SEQ ID NO: 655)
[0603] NM_03329 4.3	TRCN0000153 291	GAATTTGACAGT TTCCTGCCA (SEQ ID NO: 656)	正 向 : CCGGGAATTTGACAGTTTCCTGCCAC TCGAGTGGCAGGAAACTGTCAAATTC TTTTTG (SEQ ID NO: 657)
			反 向 : AATTCAAAAAGAATTTGACAGTTTCC TGCCACTCGAGTGGCAGGAAACTGTC AAATTC (SEQ ID NO: 658)
NM_03329 4.3	TRCN0000073 644	CCCAAGTTTGAG GTCAAAGTT (SEQ ID NO: 659)	正 向 : CCGGCCCAAGTTTGAAGTCAAAGTTC TCGAGAAGTTTGACCTCAAAGTTGGG TTTTTG (SEQ ID NO: 660)
			反 向 : AATTCAAAAACCCAAGTTTGAAGTCA AAGTTCTCGAGAAGTTTGACCTCAAA CTTGGG (SEQ ID NO: 661)
NM_03329 4.3	TRCN0000038 805	CGACAAGATGTT CTCCCTCAA (SEQ ID NO: 662)	正 向 : CCGGCGACAAGATGTTCTCCCTCAAC TCGAGTTGAGGGAGAACATCTTGTCG TTTTTG (SEQ ID NO: 663)
			反 向 : AATTCAAAAACGACAAGATGTTCTCC CTCAACTCGAGTTGAGGGAGAACAT CTTGTCG (SEQ ID NO: 664)

[0604] 在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是siRNA,从而抑制半胱天冬酶1(或半胱天冬酶原1前体蛋白)的mRNA,从而抑制下游的 NLRP3炎性小体和/或AIM2炎性小体途径。在一些实施方案中,半胱天冬酶1抑制剂是抑制人半胱天冬酶1表达的GAA GGC CCA UAU AGA GAA A(SEQ ID NO:904;示出了有义链的序列)、或与其至少50%、或至少60%或至少70%或至少80%或至少90%相同的其片段或同源物。涵盖用于本文的试剂盒和组合物中的半胱天冬酶1siRNA序列的实例公开于W02008/033285或美国申请US20090280058;Keller,M.等人《细胞 (Cell)》.2008;132(5):818-831;Artlett,C.M.等人《关节炎和风湿病 (Arthritis and Rheumatology)》2011年7月;63(11):3563-3574;Burdette, D.等人《普通病毒学杂志 (J Gen Virology)》.2012,93:235-246;所述文献以全文引用的方式并入本文。

[0605] 可以从科罗拉多州拉斐特的Dharmacon研究公司订购产生针对 NLRP3、AIM2和半

的受试者的细胞中的方法,所述方法包括多次施用编码所述炎性小体拮抗剂的本发明的ceDNA载体。由于本发明的ceDNA载体不像对包封病毒载体通常所观察到那样诱发免疫应答,所以这样的多次施用策略将可能在基于ceDNA的系统中取得更大的成功。ceDNA载体的施用量足以转染所需组织的细胞,并提供足够水平的基因转移和免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的表达,例如而不会产生过度的副作用。常规和药理学上可接受的施用途径包括但不限于视网膜施用(例如视网膜下注射,脉络膜上注射或玻璃体内注射)、静脉内施用(例如在脂质体制剂中)、直接递送至所选器官(例如选自肝脏、肾脏、胆囊、前列腺、肾上腺、心脏、肠、肺和胃中的任何一种或多种组织)、肌肉施用和其他肠胃外施用途径。如果需要,可以组合施用途径。

[0614] 递送用于表达例如如本文所述的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体不限于递送所表达的抑制剂。举例来说,常规产生(例如使用基于细胞的产生方法(例如昆虫细胞产生方法))或合成产生的如本文所述的ceDNA载体可以联合为了提供基因疗法的一部分而提供的其他递送系统使用。可以与根据本公开的ceDNA载体组合的系统的一个非限制性实例包括为了使表达抑制剂的ceDNA载体实现有效的基因表达而单独递送一种或多种辅因子或免疫抑制剂的系统。

[0615] 本发明还提供了抑制受试者中的免疫应答(例如先天性免疫应答)的方法,所述方法包括将治疗有效量的ceDNA载体任选地与药理学上可接受的载剂一起引入受试者的有需要的靶细胞(尤其是肌肉细胞或组织)中。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入,但此类载剂不是必需的。所选择的ceDNA载体包含编码免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的核苷酸序列,例如可用于治疗或抑制免疫系统。具体地说,ceDNA载体可以包含与控制元件可操作地连接的所需炎性小体拮抗剂序列,所述控制元件能够指导由外源性DNA序列编码的所需炎性小体拮抗剂的转录。ceDNA载体可以通过如上文和本文其他地方提供的任何适合的途径施用。

[0616] 本文提供的组合物和载体可用于例如出于各种目的递送免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,转基因编码旨在用于研究目的的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂,例如,以建立具有该转基因的体细胞转基因动物模型,例如以研究免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的功能。在另一个实例中,转基因编码旨在用于建立受抑制的免疫系统或免疫受损的受试者的动物模型的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂。在一些实施方案中,所编码的免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂可用于例如响应于在哺乳动物受试者中的基因疗法或类似治疗而治疗或预防受试者的升高的免疫应答或升高的先天性免疫状态。可以将免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂以足够的量转移到患者体内(例如在患者体内表达),以减少或预防受试者中升高的免疫应答。

[0617] ceDNA载体不限于ceDNA载体的一种。因而,在另一个方面,可以将表达不同蛋白质或相同免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂、例如但可操作地连接到不同启动子或顺式调控元件的多种ceDNA载体同时或依次递送到靶细胞、组织、器官或受试者中。因此,这种策略能够允许多种炎性小体拮抗剂同时进行基因疗法或基因递送。还能够将抑制剂的不同部分分离成单独的ceDNA载体(例如免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的功能所需的不同结构域和/或辅因子),所述单独的ceDNA载体例如能够同时或在不同时间施用并且能够单独可调控,由此增添一种或多种抑制剂表达的额外控制水平。考虑到由于缺乏病毒衣壳

而缺乏抗衣壳宿主免疫应答,递送也可以进行多次,并且对于临床环境中的基因疗法来说,重要的是随后增加或减少剂量。可以预期,由于没有衣壳,因此不会发生抗衣壳应答。

[0618] 本发明还提供了抑制受试者中的免疫应答(例如先天性免疫应答)的方法,所述方法包括将治疗有效量的如本文所公开ceDNA载体任选地与药学上可接受的载剂一起引入受试者的有需要的靶细胞(尤其是肌肉细胞或组织)中。虽然ceDNA载体可以在载剂存在下引入,但此类载剂不是必需的。所实现的ceDNA载体包含所关注的核苷酸序列,例如,可用于抑制先天性免疫系统或降低受试者的升高的免疫状态的免疫应答抑制剂。具体地说,ceDNA载体可以包含与控制元件可操作地连接的期望的外源性DNA序列,当引入个体中时,所述控制元件能够指导由外源性DNA序列编码的期望的多肽、蛋白质或寡核苷酸的转录。ceDNA载体可以通过如上文和本文其他地方提供的任何适合的途径施用。

[0619] 离体治疗

[0620] 在一些实施方案中,从受试者中去除细胞,将例如本文所公开的用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体引入所述细胞中,然后将所述细胞替换回到所述受试者中。从个体取出细胞进行离体处理、然后再引回到个体中的方法是所属领域中已知的(参见例如美国专利第5,399,346号;其公开内容以全文引用的方式并入本文中)。可替代地,将ceDNA载体引入另一个个体的细胞,引入培养细胞中,或引入任何其他适合来源的细胞中,并将细胞施用有需要的个体。

[0621] 将用例如本文所公开的用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体转导的细胞优选地以“治疗有效量”与药物载剂组合施用至受试者。所属领域的技术人员将了解,治疗效果不必是完全的或治愈的,只要给个体提供了一些益处即可。

[0622] 在一些实施方案中,例如本文所公开的用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体能够编码如本文所述的炎性小体拮抗剂(有时称为转基因或异源核苷酸序列),所述炎性小体拮抗剂在细胞中体外、离体或体内产生。例如,与在如本文所论述的治疗方法中使用本文所述的ceDNA载体相比,在一些实施方案中,可以将用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体引入所培养细胞中并且从细胞中分离出所表达的炎性小体拮抗剂,例如用于产生抗体和融合蛋白。在一些实施方案中,包含如本文所公开的用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体的所培养细胞能够用于商业上生产抗体或融合蛋白,例如充当小规模或大规模生物制造抗体或融合蛋白的细胞源。在替代性实施方案中,将如本文所公开的用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的ceDNA载体引入宿主非人受试者的细胞中,用于体内产生抗体或融合蛋白,包括小规模生产以及商业上大规模生产炎性小体拮抗剂。

[0623] 如本文所公开的用于表达免疫应答(例如先天性免疫应答)抑制剂的 ceDNA载体可以在兽医和医学应用中使用。如上文所描述的离体基因递送方法的适合的个体包括禽类(例如鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡和野鸡)和哺乳动物(例如人类、牛、绵羊、山羊、马、猫、犬和兔),其中哺乳动物是优选的。人类个体是最优选的。人类个体包括新生儿、婴儿、青少年和成人。

[0624] 本申请全文中引用的所有专利和其他出版物,包括参考文献、授权专利、已发布的专利申请和共同待决的专利申请,以引用的方式明确地并入本文中,以描述和公开例如在这些出版物中描述的可以与本文所述的技术结合使用的方法。提供这些出版物仅仅是出于其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。关于这一点,任何内容都不应被解释为承

认发明者由于在先发明或任何其他原因而无权早于这种公开内容。关于这些文件的日期的所有声明或关于内容的陈述都是基于申请人可获得的信息,并且不等同于承认这些文件的日期或内容的正确性。

[0625] 本公开的实施方案的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方案和实施例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如,虽然方法步骤或功能以给定的顺序呈现,但是替代实施方案可以以不同的顺序执行功能,或者功能可以基本上同时执行。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本文描述的各种实施方案可以进行组合以提供其他实施方案。如果需要,可以修改本公开的各方面以采用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开的又一实施方案。而且,由于生物学功能等效性的考虑,可以在不影响生物学或化学作用的种类或数量的情况下对蛋白质结构进行一些改变。可以根据详细描述对本公开进行这些和其他改变。意图所有这些修改包括在所附权利要求书的范围内。

[0626] 任何前述实施方案的特定要素都可以进行组合或替代其他实施方案中的要素。此外,尽管已经在这些实施方案的上下文中描述了与本公开的某些实施方案相关联的优点,但是其他实施方案也可以表现出这样的优点,并且并非所有实施方案都需要为了落入本公开的范围内而表现出这样的优点。

[0627] 通过以下实施例进一步说明本文所述的技术,这些实施例决不应解释为进一步限制。应理解,本发明不限于本文所述的具体方法、方案和试剂等,因此可以变化。本文中使用的术语仅是出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求书限定。

[0628] 实施例

[0629] 实施例1:构建TTX-质粒

[0630] 制备了具有图4C (TTX-R) 或图4D (TTX-L) 所示结构方案的TTX 形式质粒。TTX-R和TTX-L质粒的实例在下表6A中描述。TTX-R和 TTX-L质粒的差异在于突变的AAV2 ITR序列的位置,分别如图4C和图 4D所示。通过本文所公开的分子克隆产生了TTX-R质粒 (TTX-质粒1、3、5和7) 以生产TTX-载体。TTX-L质粒 (TTX-质粒2、4、6和8) 可用于生产TTX-载体 (TTX-载体2、4、6、8)。每种TTX-R质粒包含 (a) AAV2的野生型反向末端重复序列 (ITR); (b) 表达盒和 (c) AAV2的经修饰的反向末端重复序列 (ITR), 如图4D所示。

[0631] 可以使用已知技术构建ceDNA质粒 (即包含用于稍后生产ceDNA载体的ceDNA载体模板的质粒), 以至少优选地在转录方向上提供以下作为可操作地连接的组分: 5' ITR (突变型或AAV野生型); 控制元件, 包括启动子; 所关注的外源DNA序列; 转录终止区; 以及3' ITR (突变型或野生型的相应的AAV ITR)。值得注意的是, ITR内的核苷酸序列基本上替代了rep和cap编码区。尽管rep序列理想地由辅助质粒或载体编码, 但是可替代地其可以由载体质粒本身携带。在此类情况下, rep序列优选地位于夹在ITR之间的区域之外, 但是也可以位于夹在ITR之间的区域之内。将所需的外源DNA序列可操作地连接至控制元件, 所述控制元件指导所编码的多肽、蛋白质或其寡核苷酸在细胞、组织、器官或受试者中的转录或表达 (即, 体外、离体或体内)。此类控制元件可包含通常与所选基因相关的控制序列。可替代地, 可以采用异源控制序列。有用的异源控制序列通常包括衍生自编码哺乳动物或病毒基因的序列

的那些。

[0632] 可将ceDNA载体中的所需的外源DNA序列可操作地连接至控制元件,所述控制元件指导所编码的多肽、蛋白质或其寡核苷酸在细胞、组织、器官或受试者中的转录或表达(即,体外、离体或体内)。此类控制元件可包含通常与所选基因相关的控制序列。可替代地,可以采用异源控制序列。有用的异源控制序列通常包括衍生自编码哺乳动物或病毒基因的序列的那些。实例包括但不限于启动子诸如SV40早期启动子;小鼠乳腺肿瘤病毒LTR启动子;腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP);单纯疱疹病毒(HSV)启动子;巨细胞病毒(CMV)启动子,诸如CMV立即早期启动子区域(CMVIE);劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子;合成启动子;杂合启动子;等等。另外,源自非病毒基因(诸如鼠类金属硫蛋白基因)的序列也将在本文中找到用途。许多AAV血清型的ITR序列是已知的。

[0633] 每种TTX质粒(TTX-R和TTX-L两者)的表达盒包括在ITR序列之间的以下序列:(i)增强子/启动子;(ii)转基因的克隆位点;(iii)WHP转录后响应元件(WPRE);以及(iv)来自牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号(BGHpA)。在每个组分之间还引入了独特的限制性核酸内切酶识别位点(R1-6)(例如参见,图4C和图4D),以便于将新的遗传组分引入构建体中的特定位点。将R3和R4酶位点工程化到克隆位点中,以引入转基因的开放阅读框。将这些序列克隆到从赛默飞世尔科学获得的pFastBac HT B质粒中。

[0634] 所有TTX质粒还包含外源序列,通过将外源序列插入克隆位点中也产生了转基因的开放阅读框(萤火虫荧光素酶或“Luc”或人因子IX或“FIX”)。表6A中提供的TTX质粒的多个实例的结构各自以图4D(右侧突变的AAV ITR)或图4C(左侧突变的ITR)的模式构建。每种TTX质粒均包含增强子/启动子和转基因(例如,具有各种启动子的荧光素酶或具有CAG启动子的FIX)、翻译后调控元件(WPRE)和聚腺苷酸化终止信号(BGH聚A),其侧翼为:(a)在表达盒左侧(L)或右侧(R)在质粒中编码的突变的AAV2反向末端重复序列(ITR)多核苷酸序列,以及(b)在表达盒相对末端的野生型(未突变的)的AAV2 ITR序列。

[0635] 将表6A中的TTX质粒用包含SEQ ID NO:8的WPRE和包含SEQ ID NO:9的BGHpA作为荧光素酶转基因和右侧ITR之间的组分构建。另外,每种TTX质粒(TTX-1至TTX-10)还在荧光素酶或因子IX(SEQ ID NO:12的Padua FIX或SEQ ID NO:11的FIX)ORF报告子序列的任一侧上都含有R3/R4克隆位点(SEQ ID NO:7)。

[0636] 参考表6A:

[0637] • “wt-L”是指在表达盒左侧的质粒(包含SEQ ID NO:51的多核苷酸序列)中编码的野生型AAV2 ITR;

[0638] • “wt-R”是指在表达盒右侧的质粒(包含SEQ ID NO:1的多核苷酸序列)中编码的野生型AAV2 ITR;

[0639] • “mut-L”是指SEQ ID NO:52中提供的突变的AAV2 ITR序列;

[0640] • “mut-R”是指SEQ ID NO:2中提供的突变的AAV2 ITR序列;

[0641] • “CAG”是指由(C)巨细胞病毒即刻早期增强子和启动子元件、(A)鸡β肌动蛋白基因的第一外显子和第一内含子、(G)SEQ ID NO:3的兔β珠蛋白基因的剪接受体构建的合成启动子;

[0642] • “具有SV40内含子的AAT”是指具有SEQ ID NO:4的SV40大T抗原内含子的(人α1-抗胰蛋白酶)AAT;并且

[0643] • “hEF1- α ”是指SEQ ID NO:6的人延伸因子-1 α (EF-1 α)。

[0644] 表6A

质粒	ITR-L	启动子	转基因	ITR-R
TTX-1	wt-L	CAG	荧光素酶	mut-R
TTX-2	mut-L	CAG	荧光素酶	wt-R
TTX-3	wt-L	具有 SV40 内含子的 AAT	荧光素酶	mut-R
TTX-4	mut-L	具有 SV40 内含子的 AAT	荧光素酶	wt-R
[0645] TTX-5	wt-L	具有 SV40 内含子的 LP1	荧光素酶	mut-R
TTX-6	mut-L	具有 SV40 内含子的 LP1	荧光素酶	wt-R
TTX-7	wt-L	hEF1- α	荧光素酶	mut-R
TTX-8	mut-L	hEF1- α	荧光素酶	wt-R
TTX-9	wt-L	CAG	Padua FIX	mut-R
TTX-10	wt-L	CAG	FIX	mut-R

[0646] 表6B

质粒	ITR-L	启动子	转基因	ITR-R
[0647] α (阿尔法)	wt-L	CAG	Luc	mut-R
β (贝塔)	wt-L	LP-1 β	FIX	mut-R

[0648] 表6B中的每种构建体包含经修饰的SV40聚A序列 (SEQ ID NO: 10), 其位于转基因和mut-R ITR之间的3'非翻译区 (UTR) 中。

[0649] “LP-1 β ”是指与具有2个另外的限制性酶切位点的LP-1启动子 (SEQ ID NO:5) 相同的LP-1 β 启动子 (SEQ ID NO:16)。

[0650] 在一个实施方案中,载体多核苷酸 (ceDNA载体) 包含一对选自以下的两个不同 ITR:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:52、以及SEQ ID NO:2 和SEQ ID NO:51。在这些方面的每一个方面的一个实施方案中,具有共价闭合端的载体多核苷酸或非病毒无衣壳DNA载体包含一对选自以下的 ITR:SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102;SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:104;SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106;SEQ ID NO:107和SEQ ID NO:108;SEQ ID NO:109和SEQ ID NO:110;SEQ ID NO:111和 SEQ ID NO:112;SEQ ID NO:113和SEQ ID NO:114;以及SEQ ID NO: 115和SEQ ID NO:116。在一些实施方案中,ceDNA载体不具有包含选自 SEQ ID NO: 500-529中的任何序列的ITR。

[0651] 实施例2:用于产生线性、连续和非衣壳化DNA载体的杆粒和杆状病毒

[0652] 根据供应商在其网站 (Thermo Fisher, 在以下万维网找到: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10361012>) 上提供的方案,用TTX或对照质粒转化DH10Bac感受态细胞 (MAXEfficiency® DH10Bac™感受态细胞, Thermo Fisher, 目录号10361012)。诱导 DH10Bac细胞中质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组杆粒 (“TTX-杆粒”)。通过在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上基于大肠杆菌 (E.coli) 中的蓝白筛选的正向选择 (Φ 80dlacZ Δ M15标记提供了来自杆粒载体的 β -半乳糖苷酶基因的

α -互补)来选择重组杆粒。挑出白色菌落并将其培养在10ml培养基中。

[0653] 从大肠杆菌中分离重组杆粒(“TTX-杆粒”),并使用FugeneHD™将其转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中以产生感染性杆状病毒。将附着性Sf9或Sf21昆虫细胞在25℃下在T25烧瓶内的50ml培养基中进行培养。四天后,从细胞中去除培养基(含有P0病毒),通过0.45 μ m过滤器过滤,并且用感染性重组杆状病毒颗粒(“TTX-杆状病毒”或“比较杆状病毒”)将培养物中的杆状病毒从细胞中分离出来。

[0654] 任选地,第一代杆状病毒(P0)通过在50ml到500ml培养基中感染未处理的Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增。将细胞以130rpm培养在25℃下,监测细胞直径和活力,直到细胞达到18-19nm的直径(从14-15nm的初始直径起)和约4.0E+6个细胞/mL的密度为止。在感染后3天与8天之间,在离心去除细胞和碎片后,然后通过0.45 μ m过滤器过滤后收集培养基中的P1杆状病毒粒子。

[0655] 收集TTX-杆状病毒并确定杆状病毒的感染活性。具体来说,将四个20ml的2.5E+6个细胞/ml的Sf9细胞培养物用P1杆状病毒按1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000的稀释度处理,并进行培育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0656] 将Rep 78序列(SEQ ID NO:13)可操作地连接至IE1启动子片段(SEQ ID NO:15),并且然后插入到pFASTBAC™-双表达载体(赛默飞世尔(ThermoFisher)目录号:10712024)的BamHI/KpnI限制性位点中,使得Rep 78序列在3'端与HSV TK聚A序列连接。然后将Rep 52序列(SEQ ID NO:14)克隆到载体的SalI-HindIII位点,以使Rep52序列可操作地连接至5'的pPH启动子上和3'的SV40聚A序列上。所得的构建体在本文中被称为“Rep-质粒”。

[0657] 按照供应商提供的方案,将Rep-质粒转化到DH10Bac感受态细胞(MAX Efficiency®DH10Bac™感受态细胞(赛默飞世尔,目录号10361012))中,方案可获自其网站(Thermo Fisher®, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10361012>)诱导DH10Bac细胞中Rep-质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组杆粒(“Rep-杆粒”)。通过在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上基于大肠杆菌(E.coli)中的蓝白筛选的正向选择(Φ 80dlacZ Δ M15标记提供了来自杆粒载体的 β -半乳糖苷酶基因的 α -互补)来选择重组杆粒。挑选分离的白色菌落,并接种到10ml选择培养基(含卡那霉素、庆大霉素、四环素的LB培养液)中。从大肠杆菌中分离出重组杆粒(Rep-杆粒),并将Rep-杆粒转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中,以产生感染性杆状病毒。

[0658] 将Sf9或Sf21昆虫细胞在50ml培养基中培养4天,并从培养物中分离感染性重组杆状病毒(“Rep-杆状病毒”)。任选地,第一代Rep-杆状病毒(P0)通过感染未处理的Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增并且在50ml到500ml培养基中培养。在感染后3天与8天之间,通过离心或过滤或其他分级分离方法分离细胞来收集培养基中的P1杆状病毒粒子。收集Rep-杆状病毒并测定杆状病毒的感染活性。具体来说,将四个20ml的2.5x10⁶个细胞/ml的Sf9细胞培养物用P1杆状病毒按1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000的稀释度处理,并进行培育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0659] 然后将Sf细胞培养基分别按照1:1000和1:10,000的比率添加到新制的Sf9细胞培养基(2.5E+6个细胞/ml,20ml)中,所述细胞培养基含有:(1)TTX或 α (阿尔法)杆状病毒、或

(2) 上述Rep杆状病毒。然后将细胞在25℃下以130rpm培养。共同感染4-5天后,检测细胞直径和活力。当细胞直径达到18-20nm并且活力为约70%-80%时,将细胞培养物离心,去除培养基,并收集细胞团块。首先将细胞团块悬浮于适量的水性介质,即水或缓冲液中。使用凯杰(Qiagen)Midi Plus纯化方案(凯杰目录号 12945,每个柱处理0.2mg细胞团块质量)从细胞中分离并纯化TTX或 α (阿尔法)-载体。

[0660] 初始基于260nm下的UV吸光度,确定从Sf9昆虫细胞产生和纯化的DNA载体(例如,TTX载体)的产量。下面表7中提供了基于UV吸光度确定的各种TTX-DNA载体的产量。

[0661] 表7

构建体	培养体积	培养参数 (直径以微米计)	产量 (mg/L)	估计产量 (pg/细胞)
[0662]	TTX-1	2x1L 总计: 6.02x10e6 活力: 53.3% 直径: 18.4u	15.8	5.23
	TTX-9	1L 总计: 6.65 x10e6 活力: 81.8% 直径: 18.7u	4.8	0.88
构建体	培养体积	培养参数 (直径以微米计)	产量 (mg/L)	估计产量 (pg/细胞)
[0663]		4L 总计: 2.45 x10e6 活力: 74.5% 直径: 18.5u	5.9	3.5
		1L 总计: 4.92 x10e6 活力: 84.4% 直径: 19.7u	4.0	1.0
	TTX-10	1L 总计: 5.55 x10e6 活力: 77.4% 直径: 18.6u	6.5	1.3

[0664] 实施例3:变性凝胶电泳以鉴定ceDNA载体的产生

[0665] 为了以定性方式证明分离的DNA载体物质如根据定义所要求的那样是共价闭合端的,将样品用被DNA载体序列鉴定为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化,优选地产生两个大小不等的切割产物(例如 1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后,线性、非共价闭合端DNA将以1000bp和2000bp大小分解,而共价闭合端DNA将以2倍大小分解(2000bp和4000bp),这是因为两条DNA链是连接的并且现在未折叠,并且长度翻倍(尽管是单链)。此外,由于多聚体DNA载体的端对端连接,对单体、二聚体和n聚体形式的DNA载体的消化全部都将分解为相同大小的片段(参见图 5B)。

[0666] 如本文所用,短语“用于在天然凝胶和变性条件下通过琼脂糖凝胶电泳鉴定DNA载体的测定”是指以下测定。对于限制性核酸内切酶,选择单切割酶以产生大约DNA载体长度的1/3x和2/3x的产物。由此使天然凝胶和变性凝胶上的带解析。变性之前,重要的是从样品中去除缓冲液。凯杰 PCR纯化试剂盒(凯杰目录号28104)或脱盐“旋转柱”(例如GE HealthCare Illustra™MicroSpin™G-25柱(GE Healthcare目录号27532501)在核酸内切

酶消化的情况下作用良好。

- [0667] 1. 用适当限制性核酸内切酶消化DNA
- [0668] 2. 适用于凯杰PCR纯化试剂盒,用dH₂O (30u1) 洗脱
- [0669] 3. 添加4u1 10x变性溶液 (10x=0.5M NaOH、10mM EDTA)
- [0670] 4. 添加6u1 10x凝胶加载溶液 (染料加甘油或蔗糖,未缓冲)
- [0671] 5. 无需凯杰试剂盒,通过添加10x变性溶液至终浓度4x来制备DNA 阶梯。
- [0672] 6. 在微波炉中制备在H₂O中的0.8%-1.0%凝胶直至沸腾,在环境温度下静置几分钟。
- [0673] 7. 将其倒入带有梳子的凝胶托盘中,并置于冷室中以加速聚合 (2小时)
- [0674] 8. 将托盘放入电泳盒中,并用1mM EDTA和200mM NaOH平衡2h,并偶尔搅拌,以确保凝胶和凝胶盒中的NaOH浓度均匀。
- [0675] 9. 制作1L的1x变性溶液 (50mM NaOH,1mM EDTA)
- [0676] 10. 将足够的体积倒入凝胶盒中,以将凝胶浸没到大于0.5cm的深度。
- [0677] 11. 大型凝胶 (15-20cm) - 将凝胶在25V下运行过夜。中型凝胶 (8- 11cm) 在20V下运行过夜。
- [0678] 凝胶运行后
- [0679] 12. 将凝胶转移至托盘并用dH₂O洗涤
- [0680] 13. 在1x TBE或TAE中排干并中和凝胶 (轻柔搅拌20分钟)
- [0681] 14. 用1x SYBR金色将凝胶转移到dH₂O (或1x TBE/TAE) 中 (轻柔搅拌20分钟)
- [0682] 赛默飞世尔**SYBR®**金色核酸凝胶染料 (在DMSO中10,000X浓缩液)
- [0683] 目录号:S11494
- [0684] 15. 用表面荧光灯 (蓝色) 或紫外光 (312nm) 使凝胶成像
- [0685] 分离DNA载体 - 如图5和图6所示在天然或变性条件下通过琼脂糖凝胶电泳鉴定载体。DNA载体在天然凝胶上产生多个条带,如图5A所提供。每个条带可以代表在天然条件下具有不同构象的载体,例如连续、不连续、单体、二聚体等。
- [0686] 通过用限制性核酸内切酶消化从共同感染的Sf9细胞 (如本文所述) 获得的DNA,进一步分析分离的DNA载体的结构,其中限制性核酸内切酶是针对以下条件选择的:a) 在DNA载体内仅存在单个切割位点;以及 b) 所得片段足够大,以便在0.8%变性琼脂糖凝胶上进行分级分离时被清楚看到 (>800bp)。
- [0687] 具体地,用限制性核酸内切酶在37°C下将相等量 (基于OD₂₆₀为2 μg) 的TTX-质粒和TTX-载体消化1小时。消化后,使用QIAquick柱分离DNA载体材料,并在水中洗脱。将样品在变性溶液 (0.05M NaOH,1 mM EDTA) 中变性,同时将在水中制得的0.8%琼脂糖凝胶在平衡缓冲液 (1mM EDTA、200mM NaOH) 中预平衡2小时。然后将样品在4°C下在凝胶中运行过夜,浸入1X变性溶液 (50mM NaOH、1mM EDTA) 中。第二天,将凝胶洗涤,在TBE中中和20分钟,在1x SYBR金色水溶液中浸泡1小时,并在UV/蓝光下成像。
- [0688] DNA载体的存在通过最初在天然凝胶上的特征性多条带图案 (主要条带和次要条带间隔开来表示次要条带代表为主要条带的质量的约两倍) 来鉴定,并且然后通过图5A右侧所示的特征性多条带图案在变性凝胶上确认。如图5B所示,具有非连续结构的线性DNA载体以及具有线性和连续结构的TTX-载体可以通过其反应产物的大小来区分 - 例如,预期

具有非连续结构的DNA载体将产生1kb和2kb片段,而具有连续结构的非衣壳化载体预期产生2kb和4kb片段。

[0689] 图6是实际变性凝胶的示例性图片,其具有TTX载体1和2、3和4、5和6、以及7和8(全部都在上表1A中进行了描述),被核酸内切酶消化(+)或不被核酸内切酶消化(-)。每种TTX载体在核酸内切酶反应之后产生两条个条带(*)。在图片底部提供了基于尺寸标记确定的其两个条带大小。条带大小证实了每种TTX载体具有连续的结构。

[0690] 通过将TTX-载体的荧光强度与标准品进行比较来估计TTX-质粒对UV吸光度的贡献。例如,如果将基于UV吸光度的4 μ g TTX-载体加载于凝胶上并且TTX-载体荧光强度等效于已知是1 μ g的2kb条带,则存在1 μ g TTX-载体。因此,TTX-载体为全部紫外光吸收材料的25%。然后将凝胶上的条带强度相对于条带所代表的输入计算值作图,举例来说,如果总TTX-载体是8kb,并且所切除的比较条带是2kb,则条带强度将按照总输入的25%作图,在此情况下,对于1.0 μ g输入,条带强度是.25 μ g。使用TTX-质粒滴定来绘制标准曲线,然后使用回归线方程计算TTX-载体条带的量,然后可以用于确定TTX-载体所代表的总输入的百分比或纯度百分比(图7)。

[0691] 实施例4:DNA载体在体外表达转基因编码的蛋白质

[0692] 将人因子IX mRNA的SA野生型cDNA序列(“wtFIX”,SEQ ID NO: 11)或该cDNA序列的Padua变体(“PaduaFIX”,SEQ ID NO:12)引入TTX-质粒1的克隆位点中,以分别产生TTX-质粒1-wtFIX和TTX-质粒1-PaduaFIX。使用本文所述的方法,将这些质粒引入Sf9昆虫细胞中,并分别用于产生TTX杆粒1-wtFIX和TTX-杆粒1-PaduaFIX、以及TTX-杆状病毒1-wtFIX和TTX-杆状病毒1-PaduaFIX。通过用250ng/孔的(1) TTX-质粒1-wtFIX、(2) TTX-质粒1-PaduaFIX、(3) TTX-载体1-wtFIX、(4) TTX-载体1-PaduaFIX、(5) β (贝塔)-质粒1-wtFIX、或(6) β (贝塔)-载体1-wtFIX,使用Fugene6转染试剂(3:1Fugene6:DNA)转染HEK293细胞(2E+5个细胞/孔,96孔板)来测试TTX-质粒和TTX-载体的体外蛋白质表达。在图8中提供了蛋白质印迹分析的结果。FIX-抗体反应揭示了55kDa条带,其与产生的FIX蛋白的质量相对应。用 β (贝塔)-质粒1-wtFIX或 β (贝塔)-载体1-wtFIX转染的阴性对照裂解物未产生可检测量的FIX蛋白。此结果证实TTX-载体1可以用于有效转移和表达治疗基因,诸如编码人因子IX的基因。

[0693] ELISA:简而言之,将来自转染细胞的培养基一式两份添加到抗FIX抗体处理的孔中,并培育1小时,随后洗涤并与检测抗体一起在室温下培育1小时。再次洗涤样品,添加TMB底物并显影10分钟,停止,并且立即读取样品在450nm处的吸光度。在图15A中提供了TMB底物反应之后的样品的实例,并且在图15A中提供了基于450nm处的样品吸光度确定的每个样品中的FIX浓度。检测到来自TTX-质粒1和TTX-载体1的FIX蛋白的高水平表达,而未检测到来自 β (比较)-质粒或 β (比较)载体的FIX的显著表达。

[0694] 这再次证实了与由不包括WPRE(SEQ ID NO:8)和BGHpA(SEQ ID NO:9)的 α (阿尔法)-质粒1产生的 α (阿尔法)-载体1相比,由从5'至3'包含WT-复制多核苷酸序列(SEQ ID NO:51)、CAG启动子(SEQ ID NO:3)、R3/R4克隆位点(SEQ ID NO:7)、WPRE(SEQ ID NO:8)、BGHpA(SEQ ID NO:9)和经修饰的复制多核苷酸序列(SEQ ID NO:2)的TTX-质粒1产生的TTX-载体1在诱导转基因表达方面明显更有效。

[0695] 实施例5:制备共表达因子IX和cGAS抑制剂的ceDNA

[0696] 将卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒蛋白ORF52 (SEQ ID NO:882) 或其抑制cGAS的变体、或缺少SEQ ID NO:882的氨基酸161-1162的截短的胞质LANA同种型 (LANA Δ 161或SEQ ID NO:884) 与启动子可操作地连接并且插入到编码因子IX转基因的TTX 9或TTX 10质粒的限制性克隆位点R5中,如实施例1和实施例4中所述。因此,如实施例2-3中所述,制备了编码因子IX和cGAS抑制剂的ceDNA。

[0697] 实施例6:确认由ceDNA表达的cGAS抑制剂的表达

[0698] 由ceDNA共同表达的所需cGAS抑制剂(诸如卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒蛋白ORF52 (SEQ ID NO:882) 或其抑制cGAS的变体、或截短的胞质LANA同种型 (SEQ ID NO:884)) 的表达可以使用HeLa细胞和对cGAS抑制剂特异的抗体(诸如Li等人(“由ORF52编码的卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒的cGAS抑制剂(KicGAS)是一种丰富的皮层蛋白并且是生产感染性后代病毒所必需的(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibitor of cGAS (KicGAS) Encoded by ORF52, is an Abundant Tegument protein and Is Required for Production of Infectious Progeny Viruses),”《病毒学杂志(J.Virol.)》2016,90(11):5329)中所描述的针对ORF52的抗体)来确认。例如,培养HeLa细胞,并使用例如Fusene6转染试剂(3:1;fusene6:DNA)对共同表达因子IX和所需cGAS抑制剂的构建体进行瞬时转染。如本领域技术人员已知的,将蛋白质印迹技术和/或流式细胞术用于检测cGAS抑制剂的表达。如实施例4中所述,确认了因子IX的表达。

[0699] 实施例7:制备共表达因子IX和TLR-9抑制剂的ceDNA

[0700] 可以形成包含以下序列的发夹结构的寡核苷酸:诸如(TCCTGGCGGGAAGT,SEQ ID NO:889)、ODN-2114 (TCCTGGAGGGAAGT,SEQ ID NO:890)、聚G (GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG,SEQ ID NO:891)、ODN-A151 (TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG,SEQ ID NO:892)、G-ODN (CTCC-TATTGGGGTTTCTAT,SEQ ID NO:893)、IRS-869 (TCCTGGAGGGTTGT,SEQ ID NO:894)、INH-1 (CCTGGATGGGAATTCCCATCCAGG,SEQ ID NO:895)、INH-4 (TCCCATCCAGGCCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:896)、(IRS-661 TGCTTGCAAGCTT-GCAAGCA,SEQ ID NO:897)、4024 (TCCTGGATGGGAAGT,SEQ ID NO:898)、4084F (CCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:899)、INH-13 (CTTACCCTGCACCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:900)、INH-18 (CCTGGATGGGAAGTACCCTGC,SEQ ID NO:901)、和IRS-954 (TGCTCCTGGAGGGTTGT,SEQ ID NO:902),被工程化为在使5'至3'链和互补的3'至5'链进行退火之后具有粘性末端,使得可以将它们通过连接插入到预先选择的限制性克隆位点(例如编码因子IX转基因的TTX 9或TTX 10质粒的R5或其他位点)中,如实施例1和实施例4中所述。

[0701] 例如,通过将每条链以等摩尔量在合适的缓冲液(例如100mM乙酸钾;30mM HEPES,pH 7.5)中混合来使具有适当限制位点的寡核苷酸退火并且将其加热至94°C持续2分钟,并逐渐冷却。所述寡核苷酸预计具有许多二级结构,因此更缓的冷却/退火步骤是有益的。这可以通过将寡核苷酸溶液放入水浴或加热块中,然后拔下电源插头/关闭机器的电源来完成。退火的寡核苷酸可以在无核酸酶的缓冲液中稀释,并以双链退火形式存储在4°C下。然后纯化具有TLR-9抑制性寡核苷酸序列的ceDNA质粒(例如,通过凝胶电泳或柱),并用于制备cDNA载体。可以制备编码因子IX并且包含TLR-9拮抗剂的ceDNA。

[0702] 实施例8:ceDNA的可控转基因表达:重复剂量施用能够维持和/或增加体内ceDNA载体的转基因表达。

[0703] 使用包含CAG启动子 (SEQ ID NO:3) 根据上面实施例1中所述的方法产生ceDNA载体,并且将侧接于不对称ITR (例如5'WT-ITR (SEQ ID NO:1) 与3'mod-ITR (SEQ ID NO:2) 之间的荧光素酶转基因 (SEQ ID NO:71) 用作示例性炎性小体拮抗剂,并且在不同体内治疗方案中进行评估。实施例6到10所述的所有后续实验中都使用这种ceDNA载体。在实施例6中,提纯ceDNA载体且配制成脂质纳米颗粒 (LNP ceDNA) 且注射到每只 **CD-1**[®] IGS小鼠的尾静脉中。脂质体是用适合的脂质掺混物配制而成,所述脂质掺混物包含四种组分以形成脂质纳米颗粒 (LNP) 脂质体,包括阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG-脂质。

[0704] 为了评估ceDNA载体在体内在长时段内对转基因的持续表达,通过尾静脉的静脉内注射将存在于无菌PBS中的LNP-ceDNA施用于大约5 到7周龄的 **CD-1**[®] IGS小鼠。评估三个不同剂量组:0.1mg/kg、0.5 mg/kg和1.0mg/kg,每组十只小鼠 (除1.0mg/kg之外,每组15只小鼠)。第0天施用注射液。每组五只小鼠在第28天另外注射相同剂量。静脉内施用于 **CD-1**[®] IGS小鼠 (查尔斯河实验室 (Charles River Laboratories); 野生型小鼠) 之后,通过IVIS成像来测量荧光素酶表达。在第3、4、7、14、21、28、31、35和42天,以及在第42天至第110天之间常规地 (例如每周、每两周,或每10天或每2周) 腹膜内注射150mg/kg荧光素底物之后,通过IVIS成像来评估荧光素酶表达。作为示例性炎性小体拮抗剂的荧光素酶转基因表达通过IVIS成像测量,持续3种不同施用方案之后的至少132天。

[0705] 为了研究重复剂量 (例如再施用) 的表达荧光素酶的LNP-ceDNA对经LNP-ceDNA治疗的受试者的效果,进行了扩展研究。具体地说,评估其以确定一次或多次额外施用ceDNA载体是否能够增加表达水平。

[0706] 在此研究中,在第0天和第28天初始静脉内施用1.0mg/kg (即,预致敏剂量) 之后,通过IVIS评估ceDNA载体的荧光素酶表达在 **CD-1**[®] IGS小鼠中的生物分布 (A组)。ceDNA载体的第二次施用是在第84 天,经由尾静脉注射3mg/kg (B组) 或10mg/kg (C组),以1.2mL施用于尾静脉。在此研究中,A、B和C组各自使用五 (5) 只 **CD-1**[®] 小鼠。如上文所述,在第49、56、63和70天额外给药之前,且在第84天和第 91、98、105、112和132天重复剂量后,对小鼠中的荧光素酶表达进行 IVIS成像。评估且检测到所有三个组A、B和C的荧光素酶表达直到至少110天 (所评估的最长时间段)。

[0707] 显示LNP-ceDNA-Luc重复剂量 (即,ceDNA组合物再施用) 使荧光素酶表达水平增加,如通过在荧光素存在下评估荧光素酶活性所测定。作为示例性炎性小体拮抗剂的荧光素酶转基因表达通过IVIS成像测量,持续3种不同施用方案之后的至少110天 (A、B和C组)。在研究期间,对于尚未给予任何额外重复剂量 (1mg/kg预致敏剂量 (即,A组)) 治疗的小鼠观察到稳定的荧光素酶表达。已施用3mg/kg ceDNA载体重复剂量的B组小鼠的辐射度观察值相对于C组小鼠增加大约七倍。惊人地,重复给药10mg/kg ceDNA载体的小鼠的荧光素酶辐射度观察值相对于未接受任何重复剂量的小鼠 (A组) 增加17倍。

[0708] 在第0和28天静脉内施用1mg/kg ceDNA载体于尾静脉之后,A组的 **CD-1**[®] IGS小鼠显示荧光素酶表达。B组和C组显示在第一时间点 (第 0天) 施用1mg/kg ceDNA载体且在第二时间点第84天重复给药施用 ceDNA载体的 **CD-1**[®] IGS小鼠的荧光素酶表达。ceDNA载体的第二次施用 (即,重复剂量) 使表达增加至少7倍、甚至高达17倍。

[0709] B组重复剂量施用的ceDNA载体的剂量(即,量)的3倍增加(即,重复剂量施用3mg/kg)引起荧光素酶表达增加7倍。还意外的是,C组重复剂量施用ceDNA载体的量增加10倍(即,重复剂量施用10mg/kg)引起荧光素酶表达增加17倍。因此,ceDNA的第二次施用(即,重复剂量)使表达增加至少7倍、甚至高达17倍。这表明,重复剂量引起的转基因表达增加大于预期且依赖于ceDNA载体在重复剂量施用时的剂量或量,且似乎与第0天的初始预致敏施用引起的初始转基因表达协同作用。也就是说,转基因表达的剂量依赖性增加不具有相加作用;相反,转基因表达水平具有剂量依赖性且大于在每个时间点所施用的ceDNA载体的量的总和。

[0710] 相较于未在第二时间点给予ceDNA载体的对照小鼠(A组),B组和C组均显示荧光素酶表达有明显的剂量依赖性增加。综合而言,这些数据表明ceDNA载体对转基因的表达能够通过至少在第二时间点重复给药(即,再施用)ceDNA载体、以剂量依赖性方式增加。

[0711] 综合而言,这些数据表明来自ceDNA载体的转基因(例如炎性小体拮抗剂)表达水平能够在持续的水平保持至少84天且至少在第二时间点施用ceDNA载体重复剂量之后能够在体内增加。

[0712] 实施例9:具有超饱和量的雷帕霉素的合成纳米载剂

[0713] 可使用水包油乳液蒸发法合成含有聚合物PLGA(3:1丙交酯:乙交酯,比浓对数粘度0.39dL/g)和PLA-PEG(5kDa PEG嵌段,比浓对数粘度0.36dL/g)以及药剂雷帕霉素(RAPA)的纳米载剂组合物。通过将聚合物和RAPA溶解于二氯甲烷形成有机相。通过在含有表面活性剂聚乙烯醇(PVA)的水相中均化有机相来形成乳液。然后将乳液与大量的水性缓冲液组合并混合以使溶剂蒸发。不同组合物中的RAPA含量会改变,使得随着RAPA含量增加,组合物超过系统的RAPA饱和极限。使用RAPA在水相和分散的纳米载剂相中的溶解度来计算在组合物的饱和极限处的RAPA含量。对于在水相中包含PVA作为主要溶质的组合物,发现RAPA在水相中的溶解度与PVA浓度成比例,使得RAPA与溶解的PVA以1:125的质量比可溶。对于含有所述PLGA和PLA-PEG作为纳米载剂聚合物的组合物,发现在分散的纳米载剂相中的RAPA溶解度为7.2% wt/wt。可以使用以下公式来计算组合物的饱和极限处的RAPA含量:

$$[0714] \text{RAPA含量} = V(0.008c_{\text{PVA}} + 0.072c_{\text{pol}})$$

[0715] 其中 c_{PVA} 是PVA的质量浓度, c_{pol} 是聚合物的组合质量浓度,并且V是在蒸发结束时纳米载剂悬浮液的体积。

[0716] 表8

[0717]	样品 ID	浓度超过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	直径 (nm)
	1	-50	2.5	143
	2	-25	3.8	146
	3	1	4.9	147
[0718]	4	23	4.9	130
	5	48	8.1	160
	6	73	9.8	189
	7	98	12.4	203

[0719] 对于1、2和3,未回收到一致的60% RAPA,这表明水相和有机相之间的亚饱和平衡状态。对于剩余的含有较高RAPA量的纳米载剂,未回收到一致的6.8mg RAPA。这种一致的绝对质量损失表明系统处于过饱和状态(即,在一个或多个相中过饱和)。

[0720] 实施例10:具有超饱和雷帕霉素的合成纳米载剂消除或延迟了抗体的开发

[0721] 使用实施例5中所述的水包油乳液蒸发法合成含有聚合物PLGA (3:1 丙交酯:乙交酯,比浓对数粘度0.39dL/g) 和PLA-PEG (5kDa PEG嵌段,比浓对数粘度0.36dL/g) 以及药剂RAPA的纳米载剂组合物。不同组合物中的RAPA含量会改变,使得随着RAPA含量增加,组合物超过系统的RAPA饱和极限。

[0722] 表9

样品 ID	浓度超过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	直径 (nm)
1	-50	2.5	143
3	1	4.9	147
8	21	8.5	163
9	48	13.5	159

[0723] 为了评估所述组合物诱导免疫耐受性的能力,每周向小鼠静脉内注射三次共同施用的纳米载剂和匙孔血蓝蛋白 (KLH),然后每周仅用KLH 激发一次。然后,在KLH激发之后分析小鼠血清中针对KLH的抗体。与处于饱和或低于饱和下建立且最终RAPA负载为5%或更低的组合物相比,在过饱和状态下制备且最终RAPA负载为8%或更高的组合物导致针对 KLH的抗体开发不存在或延迟的程度更大。

[0724] 实施例11:具有超饱和量的雷帕霉素的合成纳米载剂

[0725] 使用实施例9中所述的水包油乳液蒸发法合成含有聚合物PLA (比浓对数粘度0.41dL/g) 和PLA-PEG (5kDa PEG嵌段,比浓对数粘度0.50 dL/g) 以及药剂RAPA的纳米载剂组合物。使不同组合物中的RAPA含量改变,使得随着RAPA含量增加,组合物超过系统的RAPA饱和和极限。使用实施例9中所述的方法计算在组合物的饱和极限处的RAPA含量。对于含有所述PLA和PLA-PEG作为纳米载剂聚合物的组合物,发现在分散的纳米载剂相中的RAPA溶解度为8.4%wt/wt。使用以下公式来计算组合物的饱和极限处的RAPA含量:

$$[0726] \text{ RAPA含量} = V(0.008c_{\text{PVA}} + 0.084c_{\text{pol}})$$

[0727] 其中 c_{PVA} 是PVA的质量浓度, c_{pol} 是聚合物的组合质量浓度,并且V 是在蒸发结束时纳米载剂悬浮液的体积。所有纳米载剂批次均在形成结束时通过0.22 μm 过滤器进行过滤。

[0728] 表10

样品 ID	浓度超过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	未洗涤直径 (nm)	最终的直径 (nm)	已过滤通量 (g/m ²)
10	-10	5.4	145	149	> 171
11	0	6.2	150	155	> 180
12	10	6.1	151	154	> 170
13	20	6.1	148	148	80
14	30	6.2	171	151	28
15	40	5.8	202	154	16

[0731] 尽管向纳米载剂12-15中添加了递增量的RAPA,但是纳米载剂中最终的RAPA含量没有增加,而过滤器通量降低了。这表明该组合物是 RAPA过饱和的,并且在洗涤和/或过滤期间除去了过量的RAPA。

[0732] 实施例12:B型血友病的因子IX或VIII以及雷帕霉素一起共同施用的编码因子IX或VIII的ceDNA

[0733] 在包含具有有害突变(例如,对于hFIX的R333Q)的hFIX或 hFVIII序列敲入的因子IX或因子VIII缺陷小鼠中进行实验。雄性因子IX 或FVIII敲除小鼠接受单剂量或重复剂量的LNP-ceDNA(脂质纳米颗粒 ceDNA)与雷帕霉素或雷帕霉素类似物一起共同施用,其中所述LNP-ceDNA和雷帕霉素或雷帕霉素类似物包含在单独的组合物中。将LNP-ceDNA载体以0.3和5mg/kg之间的剂量在1.2mL体积中与以例如0.05 mg/kg、0.1mg/kg、高达5mg/kg施用的纳米载剂雷帕霉素(例如,如实施例9-11中所述的过饱和雷帕霉素(例如SVP-雷帕霉素))或其类似物一起共同施用。通过监测免疫应答的抑制功效(例如在单次和重复给药后)并测量所需的转基因表达量来确定治疗有效剂量。可经由静脉内施用来施用每个剂量。SVP-Rap可在例如第0天和第14天共同施用。

[0734] 通过如实施例4中所述的ELISA在不同时间点(例如在10、20、30、40、50、1000和200天或更长时间等)评估血浆中的因子IX或因子VIII 的表达。随着共同施用雷帕霉素或类似物对因子VIII或因子IX表达的功效和效果的确定,也可测量激活的部分凝血致活酶时间和出血时间。预计与仅接受ceDNA载体而不接受雷帕霉素或其类似物的小鼠相比,接受与雷帕霉素共同施用的ceDNA载体的小鼠将在更长的时间段内表现出增加的和/或持续的因子IX或VIII表达。进一步预计在重复剂量后,与在不施用雷帕霉素的小鼠中接受ceDNA载体重复剂量的小鼠相比,接受ceDNA 载体和雷帕霉素重复剂量的小鼠将表现出更少的细胞因子分泌激活以及增加的转基因表达持续时间和治疗功效。共同施用的时间安排可能错开0、1、2、3、4、5、6、7、8小时。

[0735] 实施例13:B型血友病的因子IX以及编码因子IX和cGAS拮抗剂的 ceDNA

[0736] 在包含具有有害突变(R333Q)的hFIX序列敲入的因子IX缺陷小鼠中进行该实验。雄性因子IX敲除小鼠接受单次或重复剂量的LNP-ceDNA(脂质纳米颗粒ceDNA)。使用了两种LNP-ceDNA载体:1)既编码人因子IX(天然人序列或Padua FIX变体)又编码卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒蛋白ORF52的LNP-ceDNA;作为比较的ceDNA载体,仅编码因子IX而不编码cGAS抑制剂的LNP-ceDNA。LNP-ceDNA载体以1.2mL的体积、以0.3与5mg/kg之间的剂量施用于相应小鼠。将经由静脉内流体动力施用来施用每个剂量。通过如本文所述的ELISA在不同时间点(例如在10、20、30、40、50、1000和200天或更长时间等)评估血浆中的因子IX的表达。随

着功效的确定,也测量了激活的部分凝血致活酶时间和出血时间。预计与接受仅表达因子IX而不表达ORF52或其他cGAS抑制剂的ceDNA 载体的小鼠相比,接受同时表达hFIX和ORF52的ceDNA载体的小鼠将在更长的时间段内表现出增加的和/或持续的因子IX表达。进一步预计在重复剂量后,与接受仅编码因子IX的ceDNA载体重复剂量的小鼠相比,接受包含ORF52和因子IX两者的ceDNA载体重复剂量的小鼠将表现出更少的细胞因子分泌激活以及增加的转基因表达持续时间和治疗功效。可在不同的ceDNA载体上递送cGAS抑制剂和因子IX,但是优选地,它们由同一载体编码,并且因此对cGAS的抑制发生在接受编码转基因(诸如因子IX)的ceDNA载体的同一细胞中。

[0737] 实施例14:确定ceDNA和cGAS拮抗剂共同施用对先天性免疫应答和因子IX表达持续时间的影响

[0738] 为了检查共同施用所关注的ceDNA和cGAS抑制剂或cGAS拮抗剂在体外对免疫应答(例如先天性免疫应答)的影响,报告细胞系可用于检查cGAS激活的功能测定。可用于此类体外测定的cGAS报告细胞系可以是在转录因子反应元件(诸如NF- κ B结合位点、AP-1结合位点或其组合)的转录控制下表达全长人cGAS和报告基因(诸如分泌的碱性磷酸酶(SEAP)报告基因)的稳定共转染的细胞系。例如,将报告细胞铺板在96孔板中。在预定时间段(诸如16小时)之后,在有或没有cGAS抑制剂的情况下用各种量的包含表达因子IX的ceDNA的组合物刺激细胞。可使用本领域技术人员已知的任何方法或测定来分析报告基因(诸如SEAP)的活性,以比较在有或没有cGAS抑制剂的情况下在所关注的ceDNA的存在下的cGAS激活水平。预计在cGAS抑制剂的存在下,观察到较少的报告分子的激活。

[0739] 此外,可使用cGAS敲除报告细胞系,诸如源自人THP-1单核细胞的那些,这是一种常用于研究DNA传感途径的细胞系,因为它们表达了迄今为止鉴定的所有胞质DNA感受器(DAI除外)。此类cGAS敲除报告细胞系可表达一种或多种诱导型分泌报告基因,诸如Luciferase和SEAP(分泌的胚胎碱性磷酸酶)。报告基因可在ISG54(干扰素刺激的基因)最小启动子的控制下与一个或多个(诸如五个)IFN刺激反应元件结合。报告基因还可在与一个或多个(例如五个)拷贝的反应元件(诸如NF- κ B反应元件)融合的IFN- β 最小启动子的控制下。可在敲除细胞系与亲代细胞系中比较在与本文所述的ceDNA组合的cGAS抑制剂的存在下的cGAS活性。

[0740] 为了检查共同施用所关注的ceDNA和cGAS抑制剂或cGAS拮抗剂离体对免疫应答(例如先天性免疫应答)的cGAS和STING激活的影响,可以通过例如外周血梯度密度离心和磁分离来分离人单核细胞。可使用合适的对照,在有或没有cGAS抑制剂的情况下,在与所关注的ceDNA接触和/或用所关注的ceDNA激活之前和之后检查这些单核细胞。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为cGAS/STING途径激活的功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如白介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、干扰素(IFN)- γ 、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1和/或肿瘤坏死因子(TNF)- α 。另外,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证NF- κ B的激活。预计在cGAS抑制剂的存在下,当施用ceDNA时,观察到较少的细胞因子途径激活和细胞因子分泌,导致增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0741] 为了检查共同施用所关注的ceDNA和cGAS抑制剂或cGAS拮抗剂在体内对免疫应答(例如先天性免疫应答)的cGAS和STING激活的影响,可以使用小鼠模型。可使用合适的对

照,在有或没有cGAS抑制剂的情况下,在与表达所关注的转基因(诸如因子IX)的ceDNA接触和/或用表达所关注的转基因(诸如因子IX)的ceDNA激活之前和之后检查来自小鼠的血清或淋巴细胞样品。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为cGAS/STING途径激活的功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如白介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、干扰素(IFN)- γ 、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1和/或肿瘤坏死因子(TNF)- α 。另外,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证NF- κ B的激活。预计在cGAS抑制剂的存在下,当施用ceDNA时,观察到较少的激活和细胞因子分泌,导致增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0742] 实施例15: B型血友病的因子IX以及编码因子IX和TLR-9拮抗剂的 ceDNA

[0743] 在包含具有有害突变(R333Q)的hFIX序列敲入的因子IX缺陷小鼠中进行该实验。雄性因子IX敲除小鼠接受单次或重复剂量的LNP-ceDNA(脂质纳米颗粒ceDNA)。使用了两种LNP-ceDNA载体:1)既编码人因子IX(天然人序列或Padua FIX变体)又编码卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒蛋白ORF52的LNP-ceDNA;作为比较的ceDNA载体,仅编码因子IX而不编码cGAS抑制剂的LNP-ceDNA。LNP-ceDNA载体以1.2mL的体积、以0.3与5mg/kg之间的剂量施用于相应小鼠。将经由静脉内流体动力施用来施用每个剂量。通过如实施例4中所述的ELISA在不同时间点(例如在10、20、30、40、50、1000和200天或更长时间等)评估血浆中的因子IX的表达。随着功效的确定,也测量了激活的部分凝血致活酶时间和出血时间。预计与接受仅表达因子IX而不表达TLR-9抑制剂的ceDNA载体的小鼠相比,接受包含TLR-9拮抗剂并表达hFIX的ceDNA载体的小鼠将在更长的时间段内表现出增加的和/或持续的因子IX表达。进一步预计在重复剂量后,与接受仅编码因子IX的ceDNA载体重复剂量的小鼠相比,接受包含TLR-9抑制剂(例如寡核苷酸发夹序列)和因子IX的 ceDNA载体重复剂量的小鼠将表现出更少的细胞因子分泌激活以及增加的转基因表达持续时间和治疗功效。可在不同的ceDNA载体上以反式递送TLR-9抑制剂和因子IX,但是优选地,它们由同一载体编码,并且因此对TLR-9的抑制发生在接受编码转基因(诸如因子IX)的ceDNA载体的同一细胞中。

[0744] 实施例16: 确定ceDNA和TLR拮抗剂对先天性免疫应答和转基因表达持续时间的影响

[0745] 为了检查共同施用所关注ceDNA和TLR9抑制剂或TLR9拮抗剂在体外对先天性免疫应答的影响,可将报告细胞系用于TLR9依赖性功能测定来检查TLR9激活的下游影响。TLR9报告细胞系可以是在转录因子反应元件(诸如NF- κ B结合位点、AP-1结合位点或其组合)的转录控制下表达全长人Toll样受体9(TLR9)和报告基因(诸如分泌的碱性磷酸酶(SEAP)报告基因)的稳定共转染的细胞系。例如,将报告细胞铺板在96孔板中。在预定的时间段(例如16小时)后,在有或没有TLR9拮抗剂的情况下用各种量的包含表达所关注转基因的ceDNA的组合物刺激细胞。这样的拮抗剂可以是TLR抑制性寡核苷酸。可使用本领域技术人员已知的任何方法或测定来分析报告基因(诸如SEAP)的活性,以确定在有或没有TLR9拮抗剂的情况下在所关注ceDNA的存在下的TLR9激活水平。预计在TLR9抑制剂的存在下,观察到较少的报告分子的激活。

[0746] 为了检查共同施用所关注ceDNA和TLR9抑制剂或TLR9拮抗剂离体对TLR9介导的先天性免疫应答激活的影响,可以通过例如外周血梯度密度离心和磁分离来分离人单核细胞。可使用合适的对照,在有或没有TLR9拮抗剂的情况下,在与所关注的ceDNA接触和/或用

所关注的 ceDNA 激活之前和之后检查这些单核细胞。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为 TLR9 激活的功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如白介素 (IL) -1 β 、IL-6、IL-8、干扰素 (IFN) - γ 、单核细胞趋化蛋白 (MCP) -1 和/或肿瘤坏死因子 (TNF) - α 。另外 0914800,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证 NF- κ B 的激活。预计在 TLR9 抑制剂的存在下,当施用 ceDNA 时,观察到较少的细胞因子途径激活和细胞因子分泌,导致增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0747] 为了检查共同施用所关注 ceDNA 和 TLR9 抑制剂或 TLR9 拮抗剂在体内对 TLR9 介导的先天性免疫应答激活的影响,可使用小鼠模型。可使用合适的对照,在有或没有 TLR9 抑制剂的情况下,在与表达所关注的转基因 (诸如因子 IX) 的 ceDNA 接触和/或用表达所关注的转基因 (诸如因子 IX) 的 ceDNA 激活之前和之后检查来自小鼠的血清或淋巴细胞样品。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为 cGAS/STING 途径激活的功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如白介素 (IL) -1 β 、IL-6、IL-8、干扰素 (IFN) - γ 、单核细胞趋化蛋白 (MCP) -1 和/或肿瘤坏死因子 (TNF) - α 。另外,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证 NF- κ B 的激活。预计在 TLR9 抑制剂的存在下,当施用 ceDNA 时,观察到较少的激活和细胞因子分泌,导致增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0748] 实施例 17: 将 ceDNA 与 RAPA 一起共同配制成 LNP 载体

[0749] 在一些实施方案中,可能希望将雷帕霉素直接包装到 ceDNA 载体中。ceDNA 和 RAPA 的这种直接共同配制的一个非限制性实例如下。

[0750] 在脂质纳米颗粒 (LNP) 中 ceDNA 与雷帕霉素的组合可以通过使用微流体装置 (例如 NanoAssemblr™) 以 1:3 (体积/体积) 的比率以 12 ml/min 的总流速将含有雷帕霉素的乙醇脂质溶液与 ceDNA 水溶液混合来制备。总脂质与 ceDNA 的重量比可为大约 10:1 至 30:1。简而言之,可电离的脂质 (例如 MC3)、非阳离子脂质 (例如二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC))、提供膜完整性的组分 (诸如固醇,例如胆固醇) 和缀合的脂质分子 (诸如 PEG-脂质,例如平均 PEG 分子量为 2000 的 1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油 (“PEG-DMG”)) 以 50:10:38.5:1.5 的摩尔比溶解于醇 (例如乙醇) 中。然后将雷帕霉素溶解在脂质溶液中至所需浓度。将 ceDNA 在 25mM 乙酸钠缓冲液 (pH 4) 中稀释至 0.2mg/mL。在形成 LNP 之后 (使用例如 NanoAssemblr™), 除去醇并通过透析用 PBS 替代乙酸钠缓冲液。可以通过例如透析或切向流过滤来实现酒精去除和同时进行缓冲液交换。通过 0.2 μ m 孔的无菌过滤器过滤所获得的脂质纳米颗粒,并与上述 ceDNA LNP 载体类似地储存。

[0751] 实施例 18: 确定 ceDNA 载体和雷帕霉素或雷帕霉素类似物共同施用对先天性免疫应答和因子 IX 表达持续时间的影响

[0752] 为了检查共同施用所关注的 ceDNA 和雷帕霉素或类似物对先天性免疫应答的影响,可将体外报告细胞系用于功能测定来检查 TLR 和 mTORC1 激活的下游影响。TLR9 报告细胞系可以是在转录因子反应元件 (诸如 NF- κ B 结合位点、AP-1 结合位点或其组合) 的转录控制下表达全长人 Toll 样受体 9 (TLR9) 和报告基因 (诸如分泌的碱性磷酸酶 (SEAP) 报告基因) 的稳定共转染的细胞系。例如,将报告细胞铺板在 96 孔板中。在预定的时间段 (例如 16 小时) 后,在有或没有雷帕霉素或其类似物的情况下用各种量的包含表达所关注转基因的 ceDNA 的组合物刺激细胞。可使用本领域技术人员已知的任何方法或测定来分析报告基因

(诸如 SEAP)的活性,以确定在有或没有雷帕霉素或其类似物的情况下在所关注ceDNA的存在下的mTORC1激活水平。预计在雷帕霉素的存在下,观察到更多的报告分子激活,并且细胞因子IL-10和其他细胞因子的STAT3 诱导将减少。

[0753] 为了检查共同施用所关注ceDNA和雷帕霉素离体对先天性免疫应答激活的影响,可以通过例如外周血梯度密度离心和磁分离来分离人单核细胞。可使用合适的对照,在有或没有雷帕霉素或其类似物的情况下,在与所关注的ceDNA接触和/或用所关注的ceDNA激活之前和之后检查这些单核细胞。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如 mTORC1激活和/或IL-10。另外,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证NF-KB的激活。预计在雷帕霉素或其类似物的存在下,当施用ceDNA时,观察到较少的细胞因子途径激活和细胞因子分泌(例如IL-10和I型IFN),导致增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0754] 实施例19:制备共表达因子IX和TLR-9抑制剂的ceDNA载体

[0755] 可以形成包含以下序列的发夹结构的寡核苷酸:诸如 (TCCTGGCGGGAAGT,SEQ ID NO:889)、ODN-2114 (TCCTGGAGGGAAGT,SEQ ID NO:890)、聚G (GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG,SEQ ID NO:891)、ODN-A151 (TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG,SEQ ID NO:892)、G-ODN (CTCC-TATTGGGGTTTCCTAT,SEQ ID NO:893)、IRS-869 (TCCTGGAGGGTTGT,SEQ ID NO:894)、INH-1 (CCTGGATGGGAATCCCATCCAGG,SEQ ID NO:895)、INH-4 (TTCCCATCCAGGCCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:896)、(IRS-661 TGCTTGCAAGCTT-GCAAGCA,SEQ ID NO:897)、4024 (TCCTGGATGGGAAGT,SEQ ID NO:898)、4084F (CCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:899)、INH-13 (CTTACCCTGCACCTGGATGGGAA,SEQ ID NO:900)、INH-18 (CCTGGATGGGAAGTACCCTGCAC,SEQ ID NO:901)、和IRS-954 (TGCTCCTGGAGGGTTGT,SEQ ID NO:902),被工程化为在使5'至3'链和互补的3'至5'链进行退火之后具有粘性末端,使得可以将它们通过连接插入到预先选择的限制性克隆位点(例如编码因子IX转基因的TTX 9或TTX 10质粒的R5或其他位点)中,如实施例1和实施例4中所述。

[0756] 例如,通过将每条链以等摩尔量在合适的缓冲液(例如100mM乙酸钾;30mM HEPES,pH 7.5)中混合来使具有适当限制位点的寡核苷酸退火并且将其加热至94℃持续2分钟,并逐渐冷却。所述寡核苷酸预计具有许多二级结构,因此更缓的冷却/退火步骤是有益的。这可以通过将寡核苷酸溶液放入水浴或加热块中,然后拔下电源插头/关闭机器的电源来完成。退火的寡核苷酸可以在无核酸酶的缓冲液中稀释,并以双链退火形式存储在4℃下。然后纯化具有TLR-9抑制性寡核苷酸序列的ceDNA载体(例如,通过凝胶电泳或柱),并用于制备cDNA载体。如实施例2-3中所述,可制备编码因子IX并且包含TLR-9拮抗剂的ceDNA载体。本文描述了确定共同施用表达TLR-9抑制剂的ceDNA载体和雷帕霉素或雷帕霉素类似物的影响的方法。

[0757] 实施例20:制备共表达因子IX和cGAS抑制剂的ceDNA载体

[0758] 将卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒蛋白ORF52(SEQ ID NO:882)或其抑制cGAS的变体、或缺少SEQ ID NO:883的氨基酸161-1162的截短的胞质LANA同种型(LANA Δ 161或SEQ ID NO:884)与启动子可操作地连接并且插入到编码因子IX转基因的TTX 9或TTX 10质粒的限制性克隆位点R5中,如实施例1和实施例4中所述。因此,如实施例2-3中所述,制备了编码因子IX和cGAS抑制剂的ceDNA载体。本文描述了确定共同施用表达cGAS抑制剂的ceDNA载体和

雷帕霉素或雷帕霉素类似物的影响的方法。

[0759] 实施例21:LNP配制的ceDNA载体在体内的持续转基因表达

[0760] 评估具有不同脂质纳米颗粒的实施例7的结果在体内、在小鼠中的再现性。小鼠在第0天给予包含由CAG启动子驱动的荧光素酶转基因的 ceDNA载体,所述ceDNA载体囊封于与实施例6中所用不同的LNP中或包含polyC、但缺乏ceDNA或荧光素酶基因的相同LNP中。具体地说,大约4周龄的雄性CD-1®小鼠在第0天通过单次注射0.5mg/kg LNP- TTX-荧光素酶或对照LNP-polyC(静脉内经由侧向尾静脉施用)来处理。第14天,动物经由腹膜内注射2.5mL/kg全身性给予150mg/kg荧光素。荧光素施用之后的大约15分钟,使用体内成像系统(“IVIS”)对每只动物进行成像。

[0761] 观察到所有四只经ceDNA处理的小鼠的肝脏中存在明显荧光,并且除注射部位之外,在动物中观察到的其他荧光极少,表明LNP介导ceDNA构建体发生肝脏特异性递送且递送的ceDNA载体在施用之后至少两周能够控制其转基因的持续表达。

[0762] 实施例22:体内施用ceDNA载体引起的转基因在肝脏中的持续表达

[0763] 在单独实验中,评估LNP递送的ceDNA在经处理动物的肝脏内的定位。将包含所关注的功能转基因的ceDNA载体囊封于实施例17所用的相同LNP中且以0.5mg/kg的剂量水平、通过体内静脉内注射施用于小鼠。6小时之后,终结小鼠且取肝脏样品,用福尔马林固定且使用标准方案进行石蜡包埋。进行RNAscope®原位杂交分析,以使用对ceDNA转基因具特异性的探针使组织内的ceDNA载体可视化且利用显色反应和苏木精染色(Advanced Cell Diagnostics)进行检测。成像分析证实,ceDNA存在于从经治疗的小鼠中采集的肝细胞样品中。技术人员将理解,可将荧光素酶在ceDNA载体中替换为选自表5的任何核酸序列。

[0764] 实施例23:ceDNA在体内的持续视觉转基因表达

[0765] 评估ceDNA载体转基因表达在除肝脏之外的组织中的可持续性,以测定在眼施用之后,ceDNA载体在体内的耐受性和表达。尽管荧光素酶被用作示例性转基因,但是本领域普通技术人员可容易地用来自表5A-表 5F中列出那些的任何炎性小体拮抗剂序列代替荧光素酶转基因。

[0766] 第0天,向大约9周龄的雄性史泊格多利大鼠(Sprague Dawley rats) 视网膜下注射使用jetPEI®转染试剂(Polyplus)配制的5μL包含荧光素酶转基因的ceDNA载体或使用jetPEI®配制的编码荧光素酶的质粒DNA,两者浓度均为0.25μg/μL。每组测试四只大鼠。给动物服镇静剂且使用33号针在右眼视网膜下注射测试制品。每只动物的左眼不处理。注射之后立即利用光学相干断层扫描或眼底成像来检查眼以便确认视网膜下水泡的存在。大鼠根据标准程序用丁基原啡因(buprenorphine)和体表抗生素软膏处理。

[0767] 第7、14、21、28和35天,两组动物在荧光素施用后的5到15分钟,经由腹膜内注射(2.5mL/kg)全身性给予150mg/kg新制荧光素,所有动物均在异氟醚麻醉下的同时使用IVIS成像。在5分钟暴露期间,获得包含眼的所关注区域内的总通量[p/s]和平均通量(p/s/sr/cm²)。结果作为每个处理组的经处理的眼(“注射”)的平均辐射度相对于每个处理组的未处理眼(“未注射”)的平均辐射度的图形表示。在ceDNA载体处理的眼中容易检测到明显的荧光,但在质粒处理的眼中则弱得多。35天之后,将质粒注射的大鼠终结,同时继续研究ceDNA处理的大鼠,在第42、49、56、63、70和99天进行荧光素注射和IVIS成像。结果表明,通过单

次注射引入大鼠眼中的ceDNA载体介导体内转基因表达,且所述表达在高水平持续到注射之后的至少99天。

[0768] 实施例24:ceDNA的流体动力递送

[0769] 将核酸引入啮齿动物中的肝脏的熟知的方法是通过流体动力尾静脉注射。在此系统中,大量未囊封核酸的加压注射导致细胞通透性的瞬时增加,并直接递送到组织和细胞中。这提供了绕过许多宿主免疫系统(诸如巨噬细胞递送)的实验机制。因此,将裸露的ceDNA载体流体动力注射之后观察到的荧光素酶表达与LNP囊封的ceDNA的更传统的静脉内注射之后观察到的荧光素酶表达进行了比较。对于本实验,ceDNA载体利用了野生型AAV2左ITR和突变型右ITR。

[0770] 简而言之,制备了编码在CAG启动子的控制下的荧光素酶的ceDNA载体,并将其囊封在LNP中或未囊封。成年雄性CD-1小鼠通过尾静脉注射进行施用:(i) 剂量为0.5mg/kg、总体积为5mL/kg的LNP囊封的ceDNA载体,或(ii) 剂量为0.01mg/kg、总体积为1.2mL的相同但未囊封的载体。每个治疗组中有三只小鼠。在第1天、第2天和第3天记录体重。使用体内成像系统(IVIS)在第1天和第3天进行体内成像。为了成像,每只小鼠经由腹膜内注射2.5mL/kg来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后,使每只小鼠麻醉并且成像。

[0771] 即使以50倍更低的剂量施用,在流体动力注射的小鼠中观察到的荧光素酶表达(约 10^{10} 最大总通量)也远远大于非流体动力注射的小鼠(约 10^7 最大总通量)(图9)。在先前的研究中发现,在没有ceDNA载体货物的情况下施用单独的LNP不会触发免疫应答(数据未示出),并且因此在两个剂量组之间的差异可能归因于一个或多个宿主免疫系统的LNP囊封的ceDNA载体的参与和避免通过流体动力施用的那些系统。

[0772] 实施例25:培养细胞中免疫途径的调节以及对ceDNA载体表达的影响

[0773] 建立了基于细胞的测定,以促进对各种免疫途径对宿主对ceDNA施用的反应的贡献的询问。所述测定使用多种变化形式的THP-1细胞(急性单核细胞白血病细胞系):具有用于检测NF- κ B激活(TLR9途径,用Quanti-BlueTM通过SEAP检测)和IRF途径激活(用Quanti-LucTM经由分泌的荧光素酶)两者的报告子构建体的稳定整合的THP-1DualTM细胞(英杰(Invitrogen))、在cGAS免疫途径中具有组成型敲除的THP-1细胞、和在STING免疫途径中具有组成型敲除的THP-1细胞。使用某些途径的已知抑制剂,有可能更好地了解内源性免疫途径对所观察到的对给定刺激物的免疫应答的相对贡献。

[0774] 简而言之,将培养物中的THP-1细胞在Opti-MEMTM培养基(赛默飞世尔)中稀释至 0.5×10^6 /mL,并且向96孔板的每个孔中添加150 μ L。用抑制剂预处理细胞:将所需的抑制剂稀释到Opti-MEMTM中,并且添加到指定的样品孔中。对于本实验,将A151(寡核苷酸TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG(SEQ ID NO:892)和BX795(N-[3-[[5-碘-4-[[3-[(2-噻吩基羰基)氨基]丙基]氨基]-2-嘧啶基]氨基]苯基]-1-吡咯烷甲酰胺,CAS 702675-74-9)在每个样品孔中以0 μ M、0.625 μ M、1.25 μ M或2.5 μ M的终浓度使用。将板在37 $^{\circ}$ C下培育2小时。将200ng所需的ceDNA载体在LipofectamineTM3000中按1:3稀释,并在室温下培育5-10分钟。然后将ceDNA载体-Lipofectamine复合物添加到样品孔中。将板在37 $^{\circ}$ C下培育24小时。根据制造商的说明,分别通过Quanti-BlueTM和Quanti-LucTM试剂盒对NF- κ B激活和IRF2激活的量进行定量。

[0775] 将两种不同的ceDNA载体制剂施用至THP-1双报告细胞均导致显著的干扰素诱导,

表明至少一种免疫途径的激活(图10A)。值得注意的是,当用相同浓度的ceDNA治疗两个THP-1敲除品系时,均未观察到干扰素的诱导(图10A),表明cGAS/STING途径参与了响应于ceDNA施用的细胞因子诱导。用ceDNA和BX795两者治疗THP-1双报告细胞时发现了相似的结果;BX795是一种STING途径特异性抑制剂,并且其对ceDNA诱导的干扰素诱导的废除再次表明所述STING途径参与其中(图10A)。已知A151抑制cGAS/STING途径、TLR9途径以及还有炎性小体介导的免疫途径。其具有与用BX795治疗观察到的效果相似的效果(图10A)。

[0776] 第二实验测定了观察到在ceDNA施用后的保护作用所需的抑制剂的浓度(图10B)。对于A151和AS1411两者,观察到的对干扰素诱导的抑制均是浓度依赖性的,在2.5 μ M的浓度下观察到最大抑制(图10B)。

[0777] 实施例26:调节ceDNA未甲基化的CpG含量对免疫应答的影响

[0778] 已知基因序列中的CpG基序刺激TLR9 DNA传感途径。因此,研究了将ceDNA构建体序列中的CpG基序减少对在体内引入该序列后的先天性免疫途径激活的影响。

[0779] A. 测试最小化ceDNA未甲基化CpG的影响的基于细胞的测定

[0780] 进行了研究以评估(i)响应于ceDNA施用的TLR9途径激活,以及(ii)调节CpG存在/甲基化状态对这种激活的影响。对于这项特定的研究,使用了表达绿色荧光蛋白并包含野生型左ITR和突变型右ITR的一种ceDNA载体。

[0781] 将表达人TLR9的HEK-293细胞(HEK-BLUE.hTLR9细胞,英杰(InvivoGen))以每孔50,000个细胞接种在96孔板中。将板在37 $^{\circ}$ C下培育过夜。对于进行甲基化预处理的ceDNA样品,按照本领域已知的方法,将ceDNA载体、缓冲液、S-腺苷甲硫氨酸、CpG甲基转移酶和水添加至总反应体积为50 μ L。将反应在37 $^{\circ}$ C下培育1小时,然后通过加热至65 $^{\circ}$ C持续20分钟而停止。使用可商购获得的纯化试剂盒(PCR清洁试剂盒, Qiagen[®])从反应混合物中纯化ceDNA,并测量所得的DNA浓度。

[0782] 将细胞用任何所需的抑制剂预处理3小时-在本实验中,以每孔最终浓度10 μ M使用A151。在预处理后,将细胞以与Lipofectamine 3000的1:3比率用300ng ceDNA转染,稀释于Opti-MEM[™]或已知刺激TLR9途径的阳性对照ODN2006中。将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培育24小时。然后使用Quanti-BLUE[™](英杰(InvivoGen[®]))测量Seap表达(TLR9途径的组分)。

[0783] 如图11A所示,ODN2006诱导稳固的NF- κ B应答;ceDNA构建体诱导了较小的应答,并且在进行预甲基化时,应答下降至背景水平。当与A151(已知抑制TLR9途径)组合时,经ceDNA处理的样品也显示出最低水平的NF- κ B诱导(图11B)。这首先表明,TLR9途径有助于宿主对ceDNA施用的免疫应答。此外,通过甲基化使CpG含量最小化消除了ceDNA引起的大部分TLR9激活,并且可通过在不改变CpG含量或甲基化状态的情况下用A151预处理细胞来模仿这种效应。

[0784] B. 评估ceDNA未甲基化CpG最小化的影响的小鼠研究

[0785] 还在小鼠中评估了ceDNA载体中CpG最小化的影响。测量了在将ceDNA载体施用至小鼠后的细胞因子反应和ceDNA编码的基因表达。

[0786] 使用三种不同ceDNA载体,每种编码作为转基因的荧光素酶。第一种ceDNA载体具有很高数目的未甲基化CpG(约350个) (“ceDNA高CpG”)且包含组成型CAG启动子;第二种ceDNA载体具有中等数目的未甲基化CpG(约60个) (“ceDNA低CpG”)且包含肝脏特异性hAAT

启动子;并且第三种ceDNA载体是第二种ceDNA载体的甲基化形式,使得其不含有未甲基化CpG(ceDNA无CpG)且也包含hAAT启动子。ceDNA载体原本是相同的。如上文所述制备载体。

[0787] 四组大约4周龄的四只雄性CD-1小鼠用囊封于LNP中的ceDNA载体之一或polyC对照物处理。第0天,每只小鼠施用0.5mg/kg ceDNA载体的单次静脉内尾静脉注射液,体积为5mL/kg。在第-1、-、1、2、3、7天和随后每周记录体重,直到小鼠终结为止。在第0、1和35天,获取全血和血清样品。第7、14、21、28和35天和随后每周使用体内成像系统(IVIS)执行体内成像。为了成像,每只小鼠经由腹膜内注射2.5mL/kg来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后,使每只小鼠麻醉并且成像。第93天终结小鼠且收集末端组织,包括肝脏和脾脏。第0天给药之后的6小时进行细胞因子测量。

[0788] 在每个经ceDNA治疗的小鼠组中观察到相似的体重减轻(5%-7%),随后在第7天迅速恢复。从第0天样品开始的细胞因子分析表明,尽管在所有治疗组中许多所评估的细胞因子都相似地升高,但是相对于高CpG样品,在低CpG或无CpG样品中干扰素 α 、肿瘤坏死因子 α 和MIP-1 α 全部都降低了(图12A和图12B)。

[0789] 尽管经低CpG和高CpG ceDNA治疗的小鼠在第7天和第14天都显示出显著的荧光,但是在高CpG小鼠中在第14天之后荧光迅速降低,并且在其余研究中稳定地降低。与此相反,经低CpG和无CpG ceDNA治疗的小鼠的总通量保持在稳定的高水平(图12C),表明将ceDNA载体中未甲基化CpG的存在保持在某个阈值以下并不会触发TLR9途径,这在本研究中有助于避免ceDNA编码的蛋白质表达(因此,荧光)的以其他方式观察到的更快速的下降。

[0790] 实施例27:新生小鼠中的表达和宿主反应

[0791] 先前的实验表明,cGAS/STING途径至少部分参与了在将ceDNA载体施用至细胞后观察到的细胞因子诱导反应。已知此途径在发育后期变得活跃,使得具有未成熟免疫系统的新生小鼠缺乏活跃的cGAS/STING途径。因此,进行了一项新生小鼠实验,以检查该途径的缺失对ceDNA载体表达和持久性的影响。

[0792] 使用了具有野生型AAV2左ITR和突变型右ITR以及CAG启动子的、编码荧光素酶作为转基因的ceDNA载体。如上所述制备ceDNA载体。将ceDNA载体样品或聚C对照品通过尾静脉注射以0.1或0.5mg/kg的剂量水平以至多5mL/kg的体积静脉内地施用至新生(8天大)雄性CD-1小鼠。每个样品组包括五个重复。在第一天和接下来的三天记录体重。使用体内成像系统(IVIS)在第7天、第14天和第21天进行体内成像。为了成像,每只小鼠经由腹膜内注射2.5mL/kg来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后,使每只小鼠麻醉并且成像。

[0793] 值得注意的是,在第零天注射之后,在任何治疗组中均未观察到体重减轻。在所有施用ceDNA的动物中均观察到高水平的总通量(代表来自引入的ceDNA载体的荧光素酶表达),其中在前14天内,0.5mg/kg剂量导致比0.1mg/kg剂量的表达水平高大约1个对数(图13)。此后,在两个剂量组中表达水平稳定并维持在相同水平。与成年CD-1小鼠中的类似研究相比,新生小鼠中ceDNA载体表达水平甚至在14天之后也至少高了2个对数(数据未示出)。这个结果表明,避免cGAS/STING途径激活有利于促进ceDNA载体的表达和持久性。

[0794] 实施例28:调节多种免疫途径对ceDNA持久性、表达和细胞因子诱导的影响

[0795] 先前的研究评估了TLR9途径调节在培养的细胞和鼠类系统两者中的作用。然而,已知多种分子途径参与宿主对外源DNA的反应,并且如果通过ceDNA施用一种或多种其他途

径继续参与其中,则可能难以观察到避免触发TLR9途径的影响。为了测试这一点,在金票小鼠品系的背景下测试了CpG最小化的ceDNA载体,所述金票小鼠品系具有废除STING 功能的突变。因此,该实验允许在不混淆cGAS/STING途径活性的情况下询问TLR9途径。

[0796] 使用三种不同ceDNA载体,每种编码作为转基因的荧光素酶。第一种ceDNA载体具有很高数目的未甲基化CpG(约350个) (“ceDNA高 CpG”)且包含组成型启动子(cET),第二种ceDNA载体具有中等数目的未甲基化CpG(约60个) (“ceDNA低CpG”),并且第三种ceDNA 载体具有很少数目的CpG(约36个)但被甲基化,使得其不含有未甲基化CpG(ceDNA无CpG)。第二种构建体和第三种构建体均包含肝脏特异性hAAT启动子。ceDNA载体原本是相同的。如上文所述制备载体。

[0797] 将每个ceDNA载体样品或聚C对照通过尾静脉注射以0.5mg/kg的剂量水平在5mL/kg的体积中静脉内地施用至成年雄性金票小鼠 (Tmem173^{gt})。在一些情况下,在第22天将第二剂量的ceDNA载体样品施用至小鼠。每个样品组中包括四个重复。在给药日和接下来的三天记录体重。在第0天(给药后6小时)和第22天(给药后6小时)采集全血和血清样品。使用体内成像系统(IVIS)在第7天、第14天、第22天、第29天、第36天和第43天进行体内成像。为了成像,每只小鼠经由腹膜内注射2.5mL/kg来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后,使每只小鼠麻醉并且成像。第43天终结小鼠且收集末端组织,包括肝脏和脾脏。在第0天和第22天从抽血中获取细胞因子测量值。

[0798] 施用ceDNA后的体重减轻少于5%,并且在所有情况下到第3天已基本恢复。在第22天重新施用后,经治疗的小鼠再次失去<5%的体重,并在接下来的几天迅速恢复体重。从第0天血液样品中评估细胞因子诱导(图14A)。除IL-18外,每种测定的细胞因子的水平与ceDNA构建体中CpG的存在程度相关(图14A),在经ceDNA无CpG治疗的小鼠中观察到对IFN- α 、IFN- γ 、IL-6、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 和 RANTES的低至没有诱导。在重复给药的小鼠中,相对于第0天读数,所有样品均显示所有细胞因子水平增加(图14B),但是再次在所有情况下,除了IL-18外,激活程度与在施用的ceDNA载体中存在的CpG的量相关。

[0799] 直到第22天,不同治疗组中的荧光素酶的表达是相似的(图14C)。该点之后,单剂量ceDNA和重复给药的ceDNA高CpG样品两者的总通量均急剧下降,而低CpG和无CpG组要么保持一致的总通量测量值,要么相对于高CpG组信号损失衰减。合并的结果表明,所施用的ceDNA载体中CpG含量的最小化(并通过扩展,避免了牵涉TLR9先天性免疫途径)有助于细胞因子诱导的显著下降,以及经治疗的金票小鼠中来自 ceDNA的基因表达的更稳固的持久性。

[0800] 实施例29:ceDNA载体对Rag2小鼠的持续给予和重复给药。

[0801] 在ceDNA载体的基因表达盒中编码的一个或多个转基因表达于宿主环境(例如细胞或受试者)的情形中,在所表达的蛋白质被识别为外来蛋白质的情况下,宿主将可能建立适应性免疫应答,这可能使表达产物发生非期望的耗竭,从而会潜在地与表达的缺乏发生混淆。在一些情况下,与正常宿主环境异源的报告分子可能会发生这种情况。相应地,评估Rag2 小鼠模型体内的ceDNA载体转基因表达,所述小鼠模型缺乏B和T细胞且因此未建立针对非原生鼠蛋白质(例如荧光素酶)的适应性免疫应答。简单来说,c57b1/6和Rag2基因敲除小鼠在第0天,经由尾静脉注射,静脉内给予0.5mg/kg的经LNP囊封的表达荧光素酶的ceDNA载体或polyC 对照物,且在第21天,某些小鼠重复给药相同剂量水平的相同的经LNP 囊封

的ceDNA载体。所有测试组各自由4只小鼠组成。按每周时间间隔注射荧光素之后,进行IVIS成像。

[0802] 与从IVIS分析中观察到的总通量相比,在给予LNP-ceDNA载体-Luc 的野生型小鼠中观察到的荧光(所表达的荧光素酶的存在间接测量)在第21天之后逐渐减少,而施用相同疗法的Rag2小鼠在第42天实验期间显示相对恒定持续的荧光素酶表达(图16A)。在野生型小鼠中观察到减少的大约第21天时间点对应于预期可能会产生适应性免疫应答的时间范围。LNP-ceDNA载体再施用于Rag2小鼠引起表达明显增加,在此研究中追踪其的至少21天期间,所述表达的明显增加被维持(图16B)。结果表明,当ceDNA载体在宿主中表达非原生蛋白质时,适应性免疫可以起作用,并且在从初始施用的20+天时间范围内观察到的表达的减少可以使混杂的适应性免疫应答而非表达的衰减(或除其之外)信号传导到所表达的分子。值得注意的是,当原生蛋白质在宿主中表达时,这个应答预期较低,其中预期宿主将所表达的分子正确地识别为自身的且将不产生此类免疫应答。

[0803] 实施例30:肝脏特异性表达和CpG调节对持续表达的影响

[0804] 如实施例29中所述,非期望的宿主免疫应答在一些情况下可能会人为地抑制原本是一个或多个期望转基因从所引入的ceDNA载体中的持续表达。采取两种方法来评估避免和/或抑制潜在宿主免疫应答对来自 ceDNA载体的持续表达的影响。首先,由于前述实例中所用的ceDNA-Luc载体处于组成型CAG启动子的控制下,因此使用肝脏特异性启动子(hAAT)或不同组成型启动子(hEF-1)制备类似构建体,以了解避免长时间暴露于骨髓细胞或非肝脏组织是否减少所观察到的任何免疫效应。其次,对某些ceDNA-荧光素酶构建体进行工程改造以使CpG含量减小(一种已知的用于宿主免疫反应的触发事件)。将此类工程化和启动子开关的 ceDNA载体施用于小鼠后,测量ceDNA编码的荧光素酶基因表达。

[0805] 使用三种不同ceDNA载体,每种编码作为转基因的荧光素酶。第一种ceDNA载体具有数目较多的未甲基化CpG(约350)且包含组成型 CAG启动子(“ceDNA CAG”);第二种具有中等数目个未甲基化CpG(约60)且包含肝脏特异性hAAT启动子(“ceDNA hAAT低CpG”);并且第三种是第二种的甲基化形式,使得其不含有未甲基化CpG,并且也包含hAAT启动子(“ceDNA hAAT无CpG”)。ceDNA载体原本是相同的。如上文所述制备载体。

[0806] 四组大约4周龄的四只雄性 **CD-1®** 小鼠用囊封于LNP中的ceDNA载体之一或polyC对照物处理。第0天,每只小鼠施用0.5mg/kg ceDNA载体的单次静脉内尾静脉注射液,体积为5mL/kg。在第-1、-1、2、3、7天和随后每周记录体重,直到小鼠终结为止。在第0、1和35天,获取全血和血清样品。第7、14、21、28和35天和随后每周使用体内成像系统(IVIS)执行体内成像。为了成像,每只小鼠经由腹膜内注射2.5mL/kg 来注射150mg/kg荧光素。15分钟之后,使每只小鼠麻醉并且成像。第93天终结小鼠且收集末端组织,包括肝脏和脾脏。第0天给药之后的6小时进行细胞因子测量。

[0807] 虽然所有经ceDNA处理的小鼠在第7天和第14天显示明显的荧光,但是ceDNA CAG小鼠中的荧光在第14天之后快速减少且在研究的其余时间内逐渐减少。相比之下,ceDNA hAAT低CpG和无CpG处理的小鼠的总通量保持在稳定的高水平(图17)。这表明,将ceDNA载体递送特异性引向肝脏使得载体的转基因表达在单次注射之后的至少77天期间持续、持久。CpG最小化或完全缺乏CpG含量的构建体具有相似的持久、持续表达特征,而高CpG组成型启动子构建体的表达随时间展现衰减,表明ceDNA载体引入引起的宿主免疫活化可以起到减

少此类载体在受试者中的所观察到的任何表达的作用。这些结果提供了按照所期望水平定制应答持续时间的替代方法,这是通过在观察到宿主免疫应答(一种潜在的转基因特异性应答)的情况下选择组织限制性启动子和/或改变ceDNA载体的CpG含量来实现。

[0808] 实施例31:炎性小体拮抗剂的体内表达

[0809] 在确认体外接受者细胞中适当的蛋白质表达和功能后,将具有编码炎性小体拮抗剂的序列的ceDNA载体用脂质纳米颗粒配制,并在不同时间点(子宫内、新生儿、4周龄和8周龄)施用至相应蛋白质产生的功能表达缺陷的小鼠,以验证体内的表达和蛋白质功能。

[0810] LNP-ceDNA载体以1.2mL的体积、以0.3与5mg/kg之间的剂量施用于相应小鼠。每次剂量经由静脉内流体动力施用方式施用,或通过例如腹膜内注射来施用。正常小鼠施用充当对照并且还能够用于检测治疗蛋白的存在和数量。

[0811] 在急性给药(例如单剂量的LNP-ceDNA)后,将在不同时间点(例如10、20、30、40、50、1000和200天或更长时间等)确定接受者小鼠肝脏组织中的表达。具体地,将获得小鼠肝脏和胆管的样品,以使用组织切片的免疫染色分析蛋白质的存在。将定量评估蛋白质存在,并还将评估在组织和其中的细胞内的适当定位。将评估肝脏中的细胞(例如,肝和上皮)和胆管中的细胞(例如,胆管细胞)的蛋白质表达。

[0812] 实施例32:制备共表达治疗基因(例如,因子IX)和NLRP3炎性小体途径抑制剂的ceDNA。

[0813] 如实施例1中所述,将抑制AIM2的A151(SEQ ID NO:892)或其变体与启动子可操作地连接并插入到ceDNA载体的限制性克隆位点R5中。因此制备了同时编码因子IX和AIM2抑制剂的ceDNA。

[0814] 实施例33:确认由ceDNA表达的NLRP3炎性小体抑制剂的表达

[0815] 可使用HeLa细胞和对抑制剂特异的抗体来确认由ceDNA共表达的所需NLRP3或AIM2或半胱天冬酶1抑制剂(诸如A151(SEQ ID NO: 892))的表达。例如,培养HeLa细胞,并使用例如Fusegene6转染试剂(3:1; fusingene6:DNA)对共表达因子IX和所需NLRP3或AIM2或半胱天冬酶1抑制剂的构建体进行瞬时转染。如本领域技术人员已知的,将蛋白质印迹技术和/或流式细胞术用于检测NLRP3或AIM2或半胱天冬酶1抑制剂的表达。

[0816] 实施例34:B型血友病的因子IX以及编码因子IX和NLRP3炎性小体途径抑制剂的ceDNA。

[0817] 在包含具有有害突变(R333Q)的hFIX序列敲入的因子IX缺陷小鼠中进行该实验。雄性因子IX敲除小鼠接受单次或重复剂量的LNP-ceDNA(脂质纳米颗粒ceDNA)。使用了两种LNP-ceDNA载体:1)既编码人因子IX(天然人序列或Padua FIX变体)又编码A151(SEQ ID NO:892)的LNP-ceDNA;作为比较的ceDNA载体,仅编码因子IX而不编码cGAS抑制剂的LNP-ceDNA。LNP-ceDNA载体以1.2mL的体积、以0.3与5mg/kg之间的剂量施用于相应小鼠。将经由静脉内流体动力施用来施用每个剂量。通过ELISA在不同时间点(例如在7、14和21天或更长时间等)评估血浆中的因子IX的表达。随着功效的确定,也测量了激活的部分凝血致活酶时间和出血时间。预计与接受仅表达因子IX而不表达A151或其他NLRP3或AIM2或半胱天冬酶1抑制剂的ceDNA载体的小鼠相比,接受同时表达hFIX和A151的ceDNA载体的小鼠将在更长的时间段内表现出增加的和/或持续的因子IX表达。进一步预计在重复剂量后,与接受仅编码因子IX的ceDNA载体重复剂量的小鼠相比,接受包含A151和因子IX两者的ceDNA载体

重复剂量的小鼠将表现出更少的细胞因子分泌激活以及增加的转基因表达持续时间和治疗功效。可在不同的 ceDNA载体上递送NLRP3炎性小体途径抑制剂和因子IX,但是优选地,它们由同一载体编码,并且因此对NLRP3炎性小体途径抑制剂的抑制发生在接受编码转基因(诸如因子IX)的ceDNA载体的同一细胞中。

[0818] 实施例35:确定ceDNA和NLRP3炎性小体抑制剂共同施用对先天性免疫应答和因子IX表达持续时间的影响

[0819] 为了检查共同施用所关注ceDNA和NLRP3炎性小体途径抑制剂在体外对先天性免疫应答的影响,可将报告细胞系用于功能测定来检查 NLRP3炎性小体或半胱天冬酶1激活。可用于此类体外测定的NLRP3炎性小体报告细胞系可以是在转录因子反应元件(诸如NF- κ B结合位点、AP-1结合位点或其组合)的转录控制下表达全长NLRP3和报告基因(诸如分泌的碱性磷酸酶(SEAP)报告基因)的稳定共转染的细胞系。例如,将报告细胞铺板在96孔板中。在预定时间段(诸如16小时)之后,在有或没有NLRP3炎性小体抑制剂的情况下用各种量的包含表达因子IX的 ceDNA的组合物刺激细胞。可使用本领域技术人员已知的任何方法或测定来分析报告基因(诸如SEAP)的活性,以比较在有或没有NLRP3炎性小体途径抑制剂的情况下在所关注的ceDNA的存在下的半胱天冬酶1 激活或NLRP3炎性小体激活水平。预计在NLRP3炎性小体抑制剂的存在下,观察到较少的报告分子的激活。相同的报告子测定可用于评估半胱天冬酶1抑制剂。

[0820] 类似地,为了检查共同施用所关注ceDNA和AIM2炎性小体途径抑制剂在体外对先天性免疫应答的影响,可将报告细胞系用于功能测定来检查AIM2炎性小体或半胱天冬酶1激活。可用于此类体外测定的AIM2炎性小体报告细胞系可以是在转录因子反应元件(诸如NF- κ B结合位点、AP-1结合位点或其组合)的转录控制下表达全长人AIM2和报告基因(诸如分泌的碱性磷酸酶(SEAP)报告基因)的稳定共转染的细胞系。可按照NLRP3炎性小体报告子测定进行检测,其中在预定时间段之后,在有或没有AIM2炎性小体抑制剂的情况下用各种量的包含表达因子IX的ceDNA的组合物刺激报告细胞(例如铺板在96孔板中)。可使用本领域技术人员已知的任何方法或测定来分析报告基因(诸如SEAP)的活性,以比较在有或没有AIM2炎性小体途径抑制剂的情况下在所关注的 ceDNA的存在下的半胱天冬酶1激活或AIM2炎性小体激活水平。预计在 AIM2炎性小体抑制剂的存在下,观察到较少的报告分子的激活。相同的报告子测定可用于评估半胱天冬酶1抑制剂。

[0821] 此外,可使用NLRP3炎性小体或AIM2炎性小体敲除报告细胞系,诸如抑制AIM2炎性小体的THP1-defNLRP3细胞(英杰(InvivoGen))或过表达TRIM11的THP-1细胞(Liu等人,《细胞报告(Cell Reports)》(2016)16:1988-2002)、以及本领域已知的其他细胞系。此类AIM2或 NLRP3敲除报告细胞系可表达一种或多种诱导型分泌报告基因,诸如 Lucia荧光素酶和SEAP(分泌的胚胎碱性磷酸酶)。报告基因可在ISG54(干扰素刺激的基因)最小启动子的控制下与一个或多个(诸如五个) IFN刺激反应元件结合。报告基因还可在与反应元件(诸如NF- κ B反应元件)的一个或多个(诸如五个)拷贝融合的IFN- β 最小启动子的控制下。可在敲除细胞系与亲本细胞系中比较在至少一种NLRP3或AIM2或半胱天冬酶1抑制剂与本文所述的ceDNA组合的存在下的NLRP3或AIM2或半胱天冬酶1活性。

[0822] 为了检查共同施用所关注的ceDNA和NLRP3炎性小体抑制剂和/或 AIM2炎性小体抑制剂、或NLRP3拮抗剂或AIM2拮抗剂对离体NLRP3 和/或AIM2炎性小体途径激活的影响,

可通过例如外周血梯度密度离心和磁分离来分离人单核细胞。可以使用合适的对照,在有或没有NLRP3 炎性小体抑制剂和/或AIM2炎性小体抑制剂、或NLRP3拮抗剂或AIM2 拮抗剂或半胱天冬酶1抑制剂的情况下,在与所关注的ceDNA接触和/或用所关注的ceDNA激活之前和之后检查这些单核细胞。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为 NLRP3炎性小体途径的激活和/或AIM2炎性小体途径的抑制剂的功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如白介素 (IL) -1 β 、IL-6、IL-8、IL-18、干扰素 (IFN) - γ 、干扰素 (IFN) - α 、单核细胞趋化蛋白 (MCP) -1、IP- 10和/或肿瘤坏死因子 (TNF) - α 。另外,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证NF- κ B的激活。预计在NLRP3和/或 AIM2炎性小体途径抑制剂或半胱天冬酶1抑制剂的存在下,当施用 ceDNA时,观察到较少的细胞因子途径激活和细胞因子分泌,从而促进增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0823] 为了检查共同施用所关注的ceDNA和NLRP3和/或AIM2炎性小体途径抑制剂或半胱天冬酶1抑制剂在体内对NLRP3和/或AIM2炎性小体途径激活或半胱天冬酶1激活的影响,可使用小鼠模型。可使用合适的对照,在有或没有NLRP3和/或AIM2炎性小体途径抑制剂或半胱天冬酶1 抑制剂的情况下,在与表达所关注的转基因(诸如因子IX)的ceDNA接触和/或用表达所关注的转基因(诸如因子IX)的ceDNA激活之前和之后检查来自小鼠的血清或淋巴细胞样品。在治疗后,使用技术人员已知的任何测定或方法,将血清和细胞上清液用于测量作为NLRP3和/或AIM2炎性小体途径的激活、或半胱天冬酶1激活的功能读数的一种或多种细胞因子途径,诸如白介素 (IL) -1 β 、IL-6、IL-8、IL-18、干扰素 (IFN) - γ 、干扰素 (IFN) - α 、单核细胞趋化蛋白 (MCP) -1和/或肿瘤坏死因子 (TNF) - α 。另外,使用技术人员已知的任何测定或方法,可将核提取物用于验证NF- κ B的激活。预计在NLRP3和/或AIM2炎性小体途径抑制剂或半胱天冬酶1抑制剂的存在下,当施用ceDNA时,观察到较少的免疫激活和细胞因子分泌,从而促进增加的转基因表达持续时间和治疗功效。

[0824] 评估了由质粒TTX-9产生的表达人因子IX的所关注ceDNA以及 NLRP3炎性小体和半胱天冬酶1抑制剂的共同施用。如表11所示评估了 C57bL小鼠组 (n=8)。

[0825] 表11:

LNP	组	ceDNA 剂量水平	免疫抑制
[0826]	1	siRNA 0.5 mg/kg	无
	2	0.5 mg/kg TTX9	无
	3	0.5 mg/kg TTX9	在 TTX9 之前 12-16 小时、然后在 TTX9 之前 1 小时通过口服管饲法施用克列莫佛 (溶剂对照)
	4	0.5 mg/kg TTX9	在 TTX9 之前 12-16 小时、然后在给药之前 1 小时通过口服管饲法施用在克列莫佛中的 VX765 100 mg/kg
	5	0.5 mg/kg TTX9	在 TTX9 之前 12-16 小时、然后在 ceDNA 之前 1 小时腹膜内施用 MCC950 (NLRP3 抑制剂) 50 mg/kg

[0827] 简而言之,根据如表12所示的组,用巨噬细胞激活抑制剂或对照对动物进行预处理。经由侧尾静脉通过静脉内施用在施用0.5mg/kg ceDNA (TTX9-LNP) (第5组) 或LNP-

siRNA (阴性对照) (第4组) 之前 12-16小时、然后也是其之前1小时,向动物腹膜内施用 MCC950 (NLRP2抑制剂) (第1组) 或VX765 (贝那卡生;选择性半胱天冬酶 1抑制剂) (第1组)。预处理对照组仅施用氯膦酸盐 (溶剂对照) (第 3组)。在第0天、第1天、第7天和第21天每组经由尾静脉或面静脉或眼眶出血收集全血。

[0828] 表12:预处理施用

组编号	每组动物	预处理	剂量水平	剂量体积	治疗方案, 施用途径	
[0829]	1	8	不适用	不适用	不适用	
	2	8	不适用	不适用	不适用	
	3	8	溶剂对照	0.0 MG/KG	在第-1天 ^A 和第0天 ^B 一次	
	4	8	VX765	200 MG/KG		
[0830]					通过口服管饲施用	
	5	8	MCC950 (NLRP3 抑制剂)	50 MG/KG	5 ML/KG	在测试制品之前 1 小时腹膜内施用

[0831] ^a首次口服管饲施用将发生在第0天ceDNA治疗之前12-16小时。

[0832] ^b第二次口服管饲施用将发生在第0天ceDNA治疗之前1小时。

[0833] No. = 编号; ROA = 施用途径; PO = 口服管饲; IP = 腹膜内; IV = 静脉内; TA = 测试制品; NA = 不适用。

[0834] 根据制造商的说明,使用ProcartaPlex多重免疫测定法(英杰(Invitrogen))对细胞因子水平进行定量和评估,这是用于使用Luminex 技术平台测量各种细胞因子和趋化因子的水平的一种基于定量多重珠粒的免疫测定。将从研究小鼠中获得的样品与预混合的定制小鼠细胞因子8重试剂盒磁珠混合,并测定IFN- α 、IFN- γ 、IL-6、IP-10、IL-18、IL-1 β 、MCP-1和TNF- α 的水平。在图18A至图18H中,评估了在TTX-9施用之后在药理学巨噬细胞耗竭NLRP3抑制剂(MCC950)或半胱天冬酶1抑制剂(VX765)的情况下的细胞因子水平。在MCC950(NLRP3抑制剂)治疗的情况下IFN γ 和IL-18的水平显著降低(图18B和图18D),在用MCC950的情况下IP-10的水平降低(图18F)。在用VX765(半胱天冬酶1抑制剂)的情况下IL-18的水平也降低(图18D)。

[0835]

非正式序列表

序列	描述	序列
SEQ ID NO: 1	AAV2 的 WT- ITR (右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGGACCAAA GGTCGCCCGACGCCCGGGCTTGGCCCGGGGCGCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGCGCAGCTGCCCTGCAGG
SEQ ID NO: 2	AAV2 的经修改 的 ITR (右)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGGACCAAA GGTCGCCCGACGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGCGCAGCTGCCCTGCAGG
SEQ ID NO: 3	CAG 启动子	TCAATATGGCCATTAGCCATAATTATTGTTATATAGCATAAAATCAATATTTGGCTATTGGCCATTGCATA CGTTGATCTATATCATAATAATGATCAATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGGCAATTGATTA TTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTCAGGGTCAATTAGTTCAATAGCCCATATATGAGTTCCCGGTTACATA ACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCACGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTAATGACGTAATGTT CCCATAGTACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCATGTTGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCATGACGTAATGACGTAATGACGTAATGACGTA TTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTCTACTTGGAGTACATCTACGTAATGACGTAATGACGTAATGACGTA TGCTCGAGGTGAGCCCCAGTCTGCTTCACTCCCATCTCCCATCTCCCATCTCCCATCTCCCATCTCCCATCTCCCAT TTTATTTTTTAAATTTTGTGACGGATGG CGGGCGAGGG AGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGG CTGCGACGCTGCCCTTCGCCCGTCCGCCCGTCCGCCCGTCCGCCCGTCCGCCCGTCCGCCCGTCCGCCCGTCCGCC CGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCGGGCTGTAAATTAGCGCTTGGTTAATGACG GCTTGTCTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCCTTGAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGAGCGGG CTCGGGGGTGCCTGCGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCTGCGGGCCCGCTGCGGGCCCGCTGCGGGCCCGCTGAG CGCTGGGGCGGGGGGGCTTGTGCGCTCCGAGTGTGCGAGGGGAGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG CCGGGTGCGGGGGGGTGCAGGGGAAACAAGGTGCTGCGGGGTGTGCTGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGTGTGGCGCGGGGGTCCGTGTAAACCCCGCTGACCCCGCTCCCGCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGG CTTCGGGTGCGGGCTCCGTACGGGGCTGGCGGGGGCTCCCGCTGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGTGCGGG GCCGGCGCTGTCGAGGCGGGGAGCCGACCCATTGCTTTATGTAATCTGTCGAGAGGGGGCGCAGGGA CTTCTTTGCCAAATCTGCGGAGCCGAAATCTGGAGGGCGCCCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGG CGAAGCGGTGCGGCCCGGAGGAAATGGCGGGGAGGGGCTTCGTGCTGCGCCCGCGCCCGCGCTCC CTTCTCCCTCCAGCTCGGGGTGTCCGGGGGGGACGGTGCCTCGGGGGGGGACGGGGGAGGGGGGGGGGGGGGG TTCCGGCTCTGGCGTGTACCGGGGGCTAGAGCTCTGCTAACCATGTTTACGCTTCTCTTTTCTTCTTCTTCTTCTA GCTCTGGGCAACGCTGCTGGTTATTGTGCTCTCATCATTTGTGACAGAAATCTCTCGAAGATCCCGAAGGGGG

[0836]

<p>SEQ ID NO: 4</p>	<p>AAT 启动子</p> <p>TTC AAGCTTGGCAATCCGGTACTGTGGTAAAGCCA AGGCTCAGAGGCACACAGGATTTCTGGGCTCACCTGCCCTTCCAAACCCCTCAGTCCCATCTCCAGCA GCTGTTGTGTGCTGCTGAAGTCCACACTGAAACAACTCAGCCTACTCATGTCCCTAAATGGGCAAAAC ATTGCAAGCAGCAAAACAGCAAAACACACAGCCCTCCCTGCTGACCTGGAGCTGGGCAGAGGTCAAGAG ACCTCTCTGGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTG TCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAAACCACTTGTGGTGGGAGTGTGTCAGTAA GTGGCTATGCCCCGACCCCGAAGCCTGTTCCCATCTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAG GGTTTTGTGGCAATAACAATTGGTTTTTTTGGTTTTTGGTTTTTGGATGGAGGTTTTGCTCTGT CGCCAGGCTGGAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCACCAACCTCCCTGCCCTCAGCCTCCCAAGTAGCT GGGATTACAAAGCATGTGCCACACACCTGGCTAATTTCTAATTTTGTAGAGACGGGTTTCTCCATGTTGGTC AGCCTCAGCCTCCCAAGTAACTGGGATACAGGCTGTGCCACCAACACCCGGTAAATTTTTCTAATTTTGACA GGGACGGGTTTCAACATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCGGATCTTGTCTCCAGTGGAAACAGCCACT AAGGATCTGAGTGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCC CCTCCACCTGGACACAGGACGCTGTGGTTTTCTGAGCCAGTACAATGACTCCTTTCCGTAAGTGCAGTGGAA GCTGTACTGCCAGCAAGCCTCCGGCAGCTAGGGGGGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGC CCCTGTTGCTCTCCGATAACTGGGGTACCTTGGTTAATAATTCACAGCAGCCTCCCTCCCTGCTGG ATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCCACCCACTGACCTGGGAC AGTGAATCCGGACTTAAGGTAATAATAAAATTTTAAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATGTTT CTCTCTTTTAGATTCCCAACCTTTGGAACTGA</p>
<p>SEQ ID NO: 5</p>	<p>LPI 启动子</p> <p>CCCTAAAATGGCAACATTGCAAGCAGCAAAACAGCAAAACACACAGCCCTCCCTGCTGCTGACCTTGGAGC TGGGCAGAGGTCAGAGACTCTCTGGGCCATGCCACCTCCAACATCCAATCGACCCCTTGGAAATTTTTCGG TGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCTTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGACTCTCTTCCGGTAAAGTGC AGTGGAACTGTACTGCTCCAGGCAAGCGTCCGGCAGCGTAGGGGGGACTCAGATCCCAAGCCAGTGG ACTTAGCCCTGTTGCTCTCCGATAACTGGGGTACCCTTGGTTAATAATTCACCAGCAGCCTCCCTCCCTGGCC CCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCCACCACTGACCC TGGGACAGTGAATCCGGACTTAAGTAAATAATAAAATTTTAAAGTGTATAATGTGTTAAACTACTGATTCTA ATTGTTCTCTCTTTTAGATTCCCAACCTTTGGAACTGA</p>
<p>SEQ ID NO: 6</p>	<p>EF1- 启动子</p> <p>GGTCCGGTGCCCGTCAAGTGGCAGAGGGCACAATCGCCCAAGTCCCGGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGC AATTGAACCGGTGCTAGAGAGGTTGGCGGGGTAAACTGGGAAGTGTGCTGTAAGTGGCTCCGCCTT TTTCCGAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTGTCCGCTGAACTGCTCTTTTTCGCAACGGGTTT CCGCCAGAAACACAGGTAAGTGCCTGTTGGTTCCTCCGGCCGCTGGCCCTTTACGGGTTATGGCCCTTGGCT GCCTTGAATTAATTCACCTGGCTGAGTACGTGATTTGATCCCGAGCTTCGGTGTGGAAAGTGGGTGGGAG AGTTCGAGGCTTGGCCTTAAGGAGCCCTTCCCTCTGCTGTGAGTTGAGGCTTGGCCCTGGGCGTGGGGCC GCCCGTGCGAATCTGGTGGCAGCTTCCGCGCTGCTCGCTTTCGATAGTCTTAGCCATTTAAATTTT TGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAAGATCTGCACACTGGTA</p>

[0837]

		<p>TTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGCGGACCGGGCCCGTGCCTCCAGGCAATGTTCCGGGAGGGGGGCC TCGAGCCGGCCACCGAGAAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGTGGCCGCTGCTCTGGTGCCTGGTCTCG CGCCCGGTGATCGCCCGCCCTGGCGGCAAGGCTGGCCGACCAAGTTGCGTGAAGCGGAAAGAT GGCCGTTCCCGCCCTGCTCAGGAGCTCAAAATGGAGACGCGGCGCTCGGAGAGCGGGGTGAG TCACCCACAAAGGAAAGGGCTTCCGCTCAGCCGCTCATGTACTCCACGGAGTACCGGGCGC CGTCCAGGACCTCGATTAGTCTCGAGCTTTGGAGTACGTCTCTTTAGTTGGGGAGGGGTTTTATGC GATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGTGGAGACTGAAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTATTCCTTG GAAATTCGCCCTTTTGGATTGGATCTTGGTTTCATTCACAGCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTTTTCTTCCA TTTCAGGTGTCGTGA</p>
<p>SEQ ID NO: 7</p>	<p>R3/R4</p>	<p>R3 (PmeI) GTTTAAAC; R4 (PacI) TTAATTAA</p>
<p>SEQ ID NO: 8</p>	<p>WPRE</p>	<p>GAGCATTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAA ACAAAATGGTGGGCAATCATTTACATTTTAGGGATATGTAATTAAGTTCAAGGTGATGGCCACAAGACA AACATGTTAAGAAACITTCCTGTTAATCAACCTCGGATTACAAAATTTGTGAA AGATTGACTGATATTTAACTATGTTGCTCTTTACGCTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTA GCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCCTTTGTAATAAATCCTGGTGTCTCTTTAGAGGAGTTG TGGCCGTTGTCCGTC AACGTGGCGTGGTGTCTGTGTTGTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTG CCACCACCTGCAACTCTTTCGGACTTTCGCTTTCCTCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCG TGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGTTGTGGGCACTGATAATCCGTTGTTGTC</p>
<p>SEQ ID NO: 9</p>	<p>BGHpA</p>	<p>TGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTTGGCCCTCCCGCTGCCTTCCCTTGAACCTGGAAAGGTGCCACTC CCACTGCTTCTTAATAAATGAGGAAATTGCAATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCATTTCTATTCGGGGGGT GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATGGC</p>
<p>SEQ ID NO: 10</p>	<p>经修饰的 SV40-pA</p>	<p>TAAGATACATTGATGATGGACAAAACCAACTAGAATGCAAGTGAATAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTG TGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAATAAGCTGCAATAAACAAGTTAAACAACAACAATTCATTTTA TGTTTTAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAAATGTGGTA</p>
<p>SEQ ID NO: 11</p>	<p>wFIX</p>	<p>ATGCAGCGGTGAACATGATCATGGCCGAGACCCCGCTGATCACCATCTGCCTGTGGGTACCTGTCTGA GCGCGAGTGCACCGTTCCTGGACCACGAGAACGCAACAAAGATCTGAACCGCCCAAGCGCTACAACA GCGCAAGCTGGAGGATTCGTGAGGCAACTGGAGCGGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCAGCTTCGAG GAGGCCGCGAGGTGTTGAGAACACCGAGCGCACCCAGGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACGGCGCAACA TGTGAGAGCAACCCCTGCCTGAACGGCGGAGTGCAGGACGACATCAACAGACTCGAGTGTGGTGGCC CTTCCGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGCTGCGAGCAGT CTGCAAGAACAGCGCCGACAAACAGGTGGTGTGACGCTGCACCGAGGGCTACCCGCTGGCCGAGAACCA</p>

[0838]

		<p>AGAGCTGCGAGCCCGCCGTGCCCTTCCCTGCGGACGGGTGAGGCTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCCCGG CCGAGGCCGTGTTCCCGACGTGGACTACGTGACAGCAACGAGCCGAGCCAGACCTCTGGACAACATCACCC AGAGACCCAGAGCTTCAACGACTTCAACCCGCTGTGGCGGAGGACGCCAAGCCCGCCAGTTCCTCCCT GGCAGGTGTCTGAACGGCAAGGTGACCGCTTTCGGCGGACAGTCTGTAACGAGAAAGTGGATCGTGA CCGCCGCCACTGCGTGGAGACCGGCGTGAAGATACCCGTGTGGCCGGGAGACAAACATCGAGGAGACC GAGCACACGAGCAGAGCGCAACGTGATCCGCATCATCCCCACCAACTACAAACGCCGCCATCAACAAG TACAACACGACATCGCCCTGTGGAGTGGACGAGCCCTGTGTGTGAACAGCTACGTGACCCCATCTGC ATCGCCGACAGGAGTACACCAACATCTTCTGAAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGAGCGGCTGGGGCCGCGTG TTCCACAAGGCCGACGCCCTGTGTGCAAGTACCTGCGGTGCCCTGTGGAACCGGCCACCTGCTGCTGC GCAGACCAAGTTCACCATACACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCGGACAGGACAGCTGCC AGGGCGACAGCGGCCGCCACGTGACCGAGGTGGAGGGCACCAAGTCTTCCACCGGCATCATCAGCTGGG GCGAGGATGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACCAAGGTGAGCCGCTACGTGAACCTGGATCAAG GAGAAGACCAAGCTGACCTAA</p>
<p>SEQ ID NO: 12</p>	<p>PaduaFIX</p>	<p>ATGCAGCGGTGAACATGATCATGGCCGAGAGCCCGGCTGATCACCATCTGCCTGTGGGTACTGTGCTGA GCGCGAGTGCACCGTGTCTGGACACGAGAACGCCAACAAAGATCTGAACCGCCCAAGCGCTACAACA GCGGCAAGCTGGAGGATTCGTGCAAGGCAACCTGGAGCGGAGTGCATGGAGGAGAAAGTGCAGCTTCGAG GAGCCCGGAGGTTCGAGAACACCGAGCGCACCCGAGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACGGCGACCA GTGGAGAGCAACCCCTGCTGAACGGCGGACGTCAAGGACGACATCAACAGCTACGAGTGTGTGTGCC CTTCCGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTGGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGCTGGGAGCAGTT CTGCAAGAACAGCGCCGACAAACAAAGTGTGTGAGCTGCACCGAGGGTACCCGCTGGCCGAGAACCCAGA AGAGCTGCGAGCCCGCTGCCCTTCCCTGCGCAGGGTGAAGCTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCCCGG CCGAGGCCGTGTTCCCGACGTGGACTACGTGAACAGCAACCGAGGCCGAGACCTCTGGACAACATCACCC AGAGACCCAGAGCTTCAACGACTTCAACCGCTGTGGCGGAGGACGCCAAGCCCGCCAGTTCCTCCCT GGCAGGTGTCTGAACGGCAAGGTGACCGCTTTCGGCGGACAGTCTGTAACGAGAAAGTGGATCGTGA CCGCCGCCACTGCGTGGAGACCGGCGTGAAGATCACCCGTGTGGCCGGGAGCAACATCGAGGAGACC GAGCACACGAGCAGAGCGCAACGTGATCCGCATCATCCCCACCAACTACAAACGCCGCCATCAACAAG TACAACACGACATCGCCCTGTGGAGTGGACGAGCCCTGTGTGTGAACAGCTACGTGACCCCATCTGC ATCGCCGACAGGAGTACACCAACATCTTCTGAAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGAGCGGCTGGGGCCGCGTG TTCCACAAGGCCGACGCCCTGTGTGCAAGTACCTGCGGTGCCCTGTGGAACCGGCCACCTGCTGCTGC TGAGCACCAAGTTCACCATACACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCGGACAGGACAGCTGCC AGGGCGACAGCGGCCGCCACGTGACCGAGGTGGAGGGCACCAAGTCTTCCACCGGCATCATCAGCTGGG GCGAGGATGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACCAAGGTGAGCCGCTACGTGAACCTGGATCAAG GAGAAGACCAAGCTGACCTAA</p>

注意：随后通过 GenScript 对序列进行了密码子优化。

[0839]

SEQ ID NO: 13	Rep 78	<p>注意：随后通过 GenScript 对序列进行了密码子优化。</p> <p>CGCAGCCACC</p> <p>ATGGCGGGTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCTCCACGGACCTTGACGGGCATCTGCCGGCATTCTTGACA GCTTTGTGAATGGGTGGCCGAGAAAGGATGGGATGGGATGGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTTG AGCAGGCACCCCTGACCTGGCCGAGAGCTCAGCGGACTTTCTGACGGAAATGGCCCGTGTGAGTAAGG CCCCGAGGCCCTTTCTGTGC AATTTGAGAAGGGAGAGACTCTCCACATGCACGTCTCGTGGAAAC CACCGGGTGAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTCGCGA AAAACTGATTCAGAGAAATTTAC CGCGGA TCGAGCCGACTTTGCCAA ACTGGTTCGCGGTCAAAAGACCAGAAAATGGCCCGGAGGGGGAA CAAGGTGGTGGATGATGCTACATCCCAATTACTTGTCTCCCAAAACCAGCTGAGCTCCAGTGGCGGTGG ACTAATATGGAACAGTATTAAGCGCCTGTTTGAATCTCAGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGA CGCACGTGTCAGACGCGAGGAGCAAAAGAGAAATCAGAAATCCCAATTTCTGATGCGCCGGTGATCAGAT CAAAAATTACAGCCAGGTACATGGAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG GGATCCAGGAGGACAGGCTCATACATCTCTTCAATGCGGCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGC CTTGGAACAATGGGGAAAGATTATGAGCTGACTAAACC GCCCCGACTACCTGGTGGCCAGACGCCCGT GGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCAATATGCGGCTTCC GTCTTCTGGGATGGCCACGAAAAGTTTCGGCAGAGAAACACCATCTGGCTGTTTGGCCCTGCAACTACC GGGAAGACCAATCGCGGAGGCCATAGCCCACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAG AACTTCCCTTCAACGACTGTGTGCAAGATGGTGTACTGTGGGAGGAGGGAAGATGACCGCCAAAGTTC GTGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGGTGGACCAAGAAATGCAAGTCTCGGCCAG ATAGACCCGACTCCCGTATCGTCACTCCAAACCAACATGTGCGCGTGTGATGACGGGAACTCAACGACCT TCGAACACAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAAATTTGAACCTACCCCGCTGATCATGACTTTGG GAAGTCAACC AAGCAGGAAAGTCAAAGACTTTTCCGGTGGCAAGGATCACTGGTGTGAGGTGGAGCATGA ATTCTACGTCAAAAAGGTGGAGCC AAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAAGCCCAAAC GGGTGCGGAGTCAAGTGGCAGCCATCGACGTACAGCGGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACC AAAACAAATGTTCTCGTACGTGGCATGAATCTGATGTTTCCCTGCAGACAATGGAGAGAATGAATC AGAAATCAAATATCTGCTTCACTACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGTCTTCCCGTGTGAGAAATCTCAACC CGTTTCTGCTCAAAAAGGCGTATCAGAAAACGTGCTACATTCATCATATCATGCGAAAGGTGCCAGACGCT TGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCACTTTTGAACAATAA</p>
SEQ ID NO: 14	Rep 52	<p>ATGGAGTGGTGGGTGGTCTGTGGACAAGGGGATTAACCTGGGAGAAAGCAGTGGATCCAGGAGCAGGC CTCATACATCTCTTCAATGGCGCTCCAATCGCGTCCCAAATCAAGGTGCTTGGACAATGCGGAAAG AATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCGACTACCTGGTGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAAT CGGATTTATAAAATTTGGAACATAACGGGTACGATCCCAATATGCGGCTTCCGCTTCTGGGATGGGCCA CGAAAAGTTTCGGCAAGAGAACCACTCTGGCTGTGGGCTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGG AGCCATAGCCACACTGTGCCCTTCTACGGTGGCTAACTGGAACTGAACTTTCCCTTCAACGACTG TGTCGACAAGATGGTATCTGGTGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAAGTCTGGAGTCCGGCCAGATAGACCCCAAGCCA TTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCTGGACCAGAAATGCAAGTCTCGGCCCCAGATAGACCCGACTCCCGTGA</p>

[0840]

		<p>TCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCGTGATTGACGGGAACCTCAACGACCTTCGAACAACAGCAGCCGTT GCAAGACCGGATGTTCAAAATTTGAATCACCAGCCGCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGA AGTCAAAGACTTTTCCGGTGGCAAGGATCAGTGGTTGAGGTGGAGCATGAAATTCACGTCAAAAAGG TGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGAGATATAAGTGAAGCCAAACGGGTGCGGAGTCAGTTG CGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGACGACCGCTACCAAAACAATGTTCTCGTC ACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCCTGCAGACAATCGGAGAGAATGAATCAGAAATTCAAATATCTGCTT CACTCAGGACAGAAAAGACTGTTTAGAGTCTTCCCGTGTCAAAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAAAAAG GCGTATCAGAAAAGTGTCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCCTGCGATCTGG TCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAACAATAA</p>
SEQ ID NO: 15	IE1 启动子片段	<p>AATAAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAAGGTTACATCATTAATCTTGTTCGCCATCCGGTTG GTATAAATAGACGTTTCATGTTGGTTTTTGTTCAGTTGCAAGTTGGCTGGCGCGCGCAGCACCTTT</p>
SEQ ID NO: 16	LP-1 启动子	<p>CCCTAAAATGGGCAAAACATTGCAAGCAGCAAAAAGCAAAACACACAGCCCTCCCTGCTGCTGACCTTGGAGC TGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTCCGGTG GAGAGGACAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAG TGGAAAGCTGTACTGCCAGCAAGCGTCCGGCAGCGTAGCGGGGACTCAGATCCAGCCAGTGGAC TTAGCCCTGTTGCTCCTCCGATAACTGGGTGACTTGGTTAATATCCAGCAGCCTCCCGGTTGCCCC TCTGGATCCAATGCTTAAATACGGACGAGGACACTCGAGGGCCCTGCTCCTCAGCTTCAGGCACCAACCACTG ACCTGGGACAGTGAATCCGGACATCGAATCTAAGGTAATAATAAAAATTTTAAAGTGTATAAATTTGTTAAACTA CTGATTCTAATTGTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAACTGA</p>
SEQ ID NO: 17	含 RBE 的 SEQ ID NO: 2 的选定部分	<p>GCGGCTCGCTCGTCACTGAGCCCGGGGACCAAGGTCCGCCGACGCCCCGGCGGCTCAGTGAGCGGAGC GAGCGCGC</p>
SEQ ID NO: 18	人 U6 snRNA 的 RNA 聚合酶 III 启动子 (人 U6 小核启动子)	<p>GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTGGAATTA ATTTGACTGTAAACACAAAAGATATAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTTGC AGTTTTAAAATATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTTGAAAAGTATTCGATTTCTTGGCTT TATATATCTTGTGGAAAGGAC</p>
SEQ ID NO: 19	人 HI RNA 启动子	<p>GAAAGCTGACGTCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAAGTGTCACTAGGCGGGAAACACCCAGCGCGC GTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGT</p>

[0841]

19	动子 (人 HI 启动子)	GTTCGGGAAATCACCAATAACGTGAAATGTCTTTGGATTGGGAATCGTATAAGAACTGTATGAGACCAC
SEQ ID NO: 20	IE2 启动子	ATAAACGATAAAGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAAGTTACATCATATCTTTGTCGCCATCCGGTTGG TATAAATAGACGTTTCATGTGGTTTTGTTTCAGTTGCAAGTTGGCTGGGGCGCCGACGACCTTTGGCGCC ATCT
SEQ ID NO: 21-38		
SEQ ID NO: 39	AAV2 的 Rep 结 合位点 (RBS)	GCGCGCTCGCTCGCTC
SEQ ID NO: 40-50		
SEQ ID NO: 51	AAV2 的 WT- ITR (左)	CCTGCAGGCAGCTGGCGGCTCGCTCCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGGACCTTTG GTCCCGCCCTCAGTAGCGGAGCGAGCGGAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT
SEQ ID NO: 52	AAV2 的经修饰 的 ITR (左)	CCTGCAGGCAGCTGGCGGCTCGCTCCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTGGGGGACCTTTTGGTCCGCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT
SEQ ID NO: 53	构建体 A	CCTGCAGGCAGCTGGCGGCTCGCTCCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGGCGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGAAACAGAGAAACAGGAG AATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAAGAACAGTTGGAAACAG CAGAAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAAGAACAGATGGTC CCCAGATGCGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACATCAGATGTTTCCAGGGTCCCCAAAGGACCTGAA ATGACCTGTGCCTTATTGAACTAACCAATCAGTTCCGTTCTCGCTTCTGTTCCGGCGCTTCTGCTCCCCGAG CTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCC ATAGAAAGCCGCCACCATGGAAGACGCCAAACATAAAGAAAGGCCCGCGCCATTCTATCCGCTGGAAG ATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAAACAATTGCTTTTA CAGATGCACATAATCGAGTGGACATCACTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTGGTGGCAGAAAGCTAT GAAACGATATGGGCTGATACAAATCACAGATCGCTGTGAGTGAACACTCTCTCAATCTTTATGCCCC GTGTTGGCGCGTTATTTACGGAGTTGACAGTTGCGCCCGGAAACGACATTTAATGAACGTTGAAATGCTCA ACAGTATGGGCATTTTCGACGCTACCCGTTGTTGTTCCAAAAGGGGTTGCAAAAATTTTGAACGTGCA

[0842]

<p>AAAAAGTCCCAATCATCCAAATAATTAATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAAGTCGATG TACAGTTCGTCAATCTACCTCCCGTTTAAATGAATACGATTTGTGCCAGATCCCTTCGATAGGGA CAAGACAATTGCACTGATCAATGAATCCTCTGGATCTACTGGTCTAAAGGTGCTCTGCCTCATAGA ACTGCTGTGGAGATTCCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATAAATCAATCCGGATACTGCGATTT AAGTGTGTTCCATTCCATCAGCGTTTTGGAAATGTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGATTTCCGAGTCG TCTTAATGATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTCTGAGGACCTTACAGGATTAACAAGATTAACAAGTGGCGTCT GGTGCCAAACCCTATTCTCTTCTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAAATACGATTTATCTAATTTACCGAA ATTGCTTGTGGCGCTCCCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTA TCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGTATTTCTGATTAACCCGAGGGGATGATAAACCCGG GCGCGTCCGTAAGATTGTTCCATTTTGAAGCAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAACAACGCTGGCGGT TAATCAAAGGGCAACTGTGTGTGAGAGTCTATGATTATGTCGGTTATGTAACAACATCCGGAAGCGAC CAACGCTTGTATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCGGAGACATAGCTTACTGGACGAAGCAACACTT CTTACGTTGACCGCTGAAGTCTGATTAAAGTACAAAAGGCTATCAGTGGTCCCGTGAATGGAATCC ATCTTGCTCCAACACCCAAACATCTTCGACGCGAGGTGTCGAGGTCTTCCGACGATGACGCGGTGAACCTTC CCGCCCGTGTGTTTTGGAGCAGGAAAGACGATGACGGAAAAGAGATCGTGGATTACGTCCCGCAGTTC AAGTAAACAACCGGAAAAGTTGCGCGGAGGATGTTGTTTGGACGAAGTACCGAAAAGTCTTACCCGAA AACTGACGCAAGAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAAGCCAAAGGCGGGAAGATCGCCGTGAAGAG CATCTACCGCCATTTATCCCAATAATTTGTTCTGTTTTCTTGAATTTGGGTATACATTAATTAATAAACA AAATGGTGGGCAATCATTTACATTTTAGGATAATGTAATAGTTCAAGGTGATTTGCCACAAGACAAC ATGTTAAGAAAACCTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGA TTGACTGATATCTTAACATGTTGCTCTTTACGCTGTGGATATGCTGTTTTATAGCCTCTGATCTAGCT ATTGCTCCCGTACGGTTCTGTTTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTGTGCTCTTTTAGAGGAGTTGTGG CCCGTTGTCGTCAAAGTGGCGTGGTGTGCTGTGTTGCTGACCAACCCCACTGGCTGGGCAATTGCCA CCACTGTCAACTCTTTCTGGGACTTTCCCGTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATGCCCGCCTGC CTTGCCCGCTGTGGACAGGGCTAGGTTGTGGCCTGATAATTCGTTGTTGTTGCTGTGCTCTTCTAGTTG CCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCGTCCCTTCTTGAACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTCTTCT AATAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGCTGAGTGGTGTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGGCAGG ACAGCAAGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCTATGTTGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCAGGAACC CCTAGTGTGAGGTTGGCCACTCCCTCTCTGGCGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGGGGACCAAAAGGTCCGC CGACGCCCCGGCTTTGCCCGGGGGCCCTCAGTGAGCGGAGCGGCGCAGCTGCCTGCAGG</p>	
<p>SEQ ID NO: 54</p>	<p>构建体 B</p>

[0843]

<p>CTATCCCGTGGAAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCGCTGGTTCCTGG AAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCG TTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGCTGAATACAAATCACAGAAATCGTCGTATGCAAGTAAACTCTCTT CAATTCTTTATGCCGGTGGGCGGTTAATATCGGAGTTGCAGTTGCCCGCAACGACATTTATAATG AACGTGAAATTGCTCAACAGTATGGCAATTCGCAAGCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAGGGTTGCAAAA AATTTTGAACGTGCAAAAAGTCCCAATCATCCAAAATAATTATCATGGAATCTAAAACGGATTACCAG GGATTTACAGTCGATACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTAAATGAATACGATTTTGTGCCAGA GTCCCTCGATAGGGACAAGACAATTGCACATGATCATGAACCTCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGC GCTGCTCATAGAACTGCTGCTGAGATTCGCAATGCCAGAGATCTAATTTTGGCAATCAAAATCAATCC GGATCTGCGAATTTAAGTGTTCATTCCTCACCGTGTGGAAATGTTTACACTCGGATATTGATAT GTGGATTCGAGTCGTTAATGATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTCTGAGGAGCTTCAGGATTAACAAGAT TCAAAGTGGCTGTGGTCCAACTTCTCTCTCCGCAAAAGCACTCTGATGACAAATACGATTTAT CTAATTTACAGAAATGCTTCTGGTGGCTCCCTCTTAAGAAAGTCCGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTT CCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAAGCTATTCTGATTAACACCCGAGGG GGATGATAAACCCGGCCGGTCCGTAAGTGTTCATTTTGAAGCAAGGTTGTGGATCTGGATACCCGGG AAAACGCTGGGCTTAATCAAAGAGGCAACTGTGTGAGAGGCTCTATGATTAATGTCCGGTTATGTAAC AATCCGGAAGCGACCAACGCTTGAATGACAAGGATGGATGGCTACATTCGGAGACATAGCTTACTGGAC GAAGCAGAACTTCTTCACTGTTGACCGCTGAAGTCTGATTAAGTCAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCG CTGAATTGGAATCCATCTTGTCTCAACACCCCAACAATCTCGACGAGGTCTCGAGGTTCTCCGACCGATGA CGCGGTGAACCTCCCGCCGCTTGTGTTGGAGCAGGAAAGACGATGACGGAAGAAAGAGATCGTGGA TTACGTGCCAGTCAAGTAAACCCGGAAAAGTGGCGGAGGAGTGTGTTGGACGAAATACCGAA AGGTCTTACGGAAAACTCGACGCAAGAAAATCAGAGACTCTATAAAGGCCAAGAAAGGCGGAAAGA TCGCCGTGTAAGAGCATCTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTCTGATTTGGGTATACATTTAA ATGTTAATAAAACAAATGGTGGGCAATCATTTACATTTTAGGATATGTAATTAAGTTCAAGTGTATT GCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTCCCGTTAATACGCTCTGTTCCCTGTTAATCAACCTCTGGATTACA AAATTTGTAAGATTGACTGATATCTTAACATGTTGCTCTTTACGCTGTGGATATGCTGCTTTATAG CCTCTGATCTAGCTATTGCTTCCCGTAGGGCTTTTCGTTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTTGCTGCTCTT TTAGAGGATTGTGGCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTG GCTGGGCCATTGCCACCACTGTCACTCTTCTGGACTTCCGTTTCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAA CTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGGACAGGGCTAGTGTGGCACTGATAAATCCGTGGTGTGT CTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCGTCCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACT CCCACTGCTCTTCTAATAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGG GTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGG TCTATGGCAGGAACCCCTAGTATGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCC CGGAAACCCGGGCGTGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCTGCAGG</p>	<p>SEQ ID NO: 55 构建体 C</p>
--	---------------------------------

[0844]

CAGAAATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAAGAACAGATGGTTC
 CCCAGATGGCGTCCCGCCCTCAGCAGITTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCTCCCAAGGACCTGAA
 ATGACCTGTGCCTTATTTGAACATAACCAATCAGTTCGTTCTCGTCTTCTGTCGCGGCTTCTGCTCCCGAG
 CTCTATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGACTTCC
 ATAGAAGCCGCCAACATGATCATGGCCGAGAGCCCTGGCTGATCACCATCTGCCTGTGGCTACCTGCTG
 AGCGGAGTGCACCCGTGTTCTGGACACGAGAACGCCAACAAAGATCTGAACCGGCCAAGAGATACAAC
 AGCGCAAGCTGGAGGATTCGTGCAAGGCAACCTGGAGGGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCAGCTTCGA
 GGAGGCCAGGGAAGTGTTCGAGAACACCCGAGCGGACCCAGGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACCGGACCC
 AGTGGAGAGCAACCCCTTGCCTGAACGGCGGACGTGCAAGGACGACATCAACAGTACGATCGATGCTGGTGC
 CTTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTGGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGCTGCGGAGCAGT
 TCTGCAAGAACAGCGCCGACAAACAAGTGGTGTAGTGCACCGAGGGCTACAGACTGGCCGAGAACCCAG
 AAGAGTGCAGCCCGCCCTGCCCTTCCCTGCGGCAAGTGCAGGCTGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGAG
 CCGGAGACCGTGTCCCGACGTTGACTACGTGATAGCACCGAGGGCGAGACATCCCTGGACAACATCAAC
 CAGACACCCAGTCTCAACGACTTCAACAGACTTGTGGGGCGGAGGACGCCAAAGCCCGCCAGTTCCTCC
 TGGCAGTGTGCTGAACGGCAAGTGGATGCCCTTCTGCGCGGCGAGCATCTGTAACGAGAAGTGGATCGTG
 ACAGCCGCCACTGCTGGAGACCGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCGGCGAACACAATATCGAGGAGAG
 CGAGCACCGGAGAGAGCGGAACGTATCCGGATTATCCCCACCACAATAACACGCCGCCATCAACA
 GTACAACACGACATCGCCTGTGGAGCTGACGAGCCTCTGTGTGTAATAGTACGTGACCCCTCTCTGC
 ATCCCGACAAGGAGTACACCAACATCTTCTGAACTTCGGCAGCGGCTACGTTCGGCTGGGGCAGAGTG
 TTCCACAAGGGCAGAGCGCCCTGTGTGCTGACGTACCTGAGAGTGCCTGTCAGAGACAGAGCCACCTGCCTG
 TTGAGCACCAAGTTCACCATCTACAACAACATGTTCTGCGCGGCTTCCACGAGGGCGGACAGACAGCTGC
 CAGGGCAGACGGCGGACCCACGTGACCGAAGTGGAGGCGCCAGCTTCTGACCGGCATCATCAGCTGG
 GCGAGGAGTGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCACTACACCAAAAGTGAAGCCGTAACGTGAACTGGATCAA
 GGAGAAACCAAGCTGACCTGAGAGCATCTTACCCTTACCCTTATTTCCCATATTTGTTCTGTTTCTGATTTGG
 GTATACATTTAATGTTAATAAACAATAATGGTGGGCAATCATTTACATTTTAAAGGATATGTAATTAATA
 TTCAGGTGATTTGCCACAAGACAACATGTTAAGAACCTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAAC
 CTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATAT
 GCTGCTTATAGCCTCTGATAGCTATGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTCTCCCTCTGATAAATCCTCG
 TTGCTGTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCACGTTGGCGTGGTGTCTGTGTGTGTGCTGACGC
 AACCCCACTGGCTGGGCATTTGCCACCACTGTCACTCCCTTTCGGGACTTTCGCTTCCCTCCCGATCG
 CCAAGCAGAACTATCGCCGCTGCTTGCCTGCTGGACAGGGCTAGTGTGTGGCACTGATAATTC
 CGTGTGTTGTGCTGCTTCTAGTTGCCAGCATCTGTTGTTGGCCCTCCCGCTCCCTGACCCCTGGA
 AGGTGCCACTCCACTGTCTTCTCAATAAATGAGGAATGTCATCGCATGCTGAGTAGGTGTCAATCT
 ATTTCTGGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGATGTGGGGA
 TCGGGTGGGCTCTATGGCAGGAACCCCTAGTGAATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
 TGAGGCCGGGACCAAGGTGCGCCCGACCGCCCGGGCTTTGCCCCGGGGCCCTCAGTGAAGCGGAGCGGAGCGCG
 CAGTGCCTGCAGG

[0845]

<p>SEQ ID NO: 56</p>	<p>构建体 D</p> <p>CCTGAGGCAGCTGGCGCTCGCTCACTGAGGCGCCCGGGCAAGCCGGGGCTGGGGCACTTTG GTCGCCCGCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGAGAGGAGTGGCCAACTCCATCAATAGGGGTTCTGAA CAGAGAACAGGAGAAATATGGGCCAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAAG AACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCC AAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCGCCCTCAGCAGTTCTAGAGAACATCAGATGTTTCCAGGGTG CCCCAAGACCTGAAATGACCCCTGTGCTTATTGAACTAACCAATCACTGCTTCTCGCTTCTGTTCCGGC CTTCTGCCCGAGCTCTATAAGCAGAGCTGTTTAGTGAACCTGATCGCCTGGAGACGCCATCCAC GCTGTTTGTACTTCCATAGAAGGCCCAACATGATGCGCGAGAGCCCTGGCTGATCAACATCTGCCTG CTGGCTACCTGCTGAGCGCCGAGTGCACCCGTTCTGACACAGAACGCCAACAGATCTGAACCCG CCCAAGATACAACAGCGCAAGCTGGAGGAGTTCGTGCAAGGCAACCTGGAGGGATGTCATGGAGGA GAAATGCACTTCAGGAGGCCAGGGAAGTTCAGAAACCCGAGCGGACCCAGGATTCGGAAGCAGT ACGTGACGGGACCACTGCGAGCAACCTTGTGCTGAACGGCGGACGTGCAAGGACGACATCAACAGC TACGAGTGTGGTCCCTTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAAC GGCCGTGCGAGAGTTCGCAAGAACAGCGCCGACAAAGTGTGTGTAGTGCACCGAGGGCTACAGA CTGGCCGAGAACAGAGAGCTGCGAGCCCGCTGCCCTTCCCCTGCGGAGAGTGAAGCTGCCAGACC AGCAAGCTGACCGAGCCGAGACCTGTTCCCGACGTGGACTACCTGTAATAGCACCGAGCCGAGACCATC CTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCTTCAACGACTTCAACAGAGTTGTGGCGGCGAGGACGCCAAG CCCGCCAGTTCCCTGGCAGTGGTCTGAACGGCAAGTGGATGCCCTTCTGCGGCGCAGCATCGTGAAC GAGAAAGTGGATCGTACAGCCGCCACTGCTGGAGACCGGCTGAGTAACTACCCGTGGCGGGCAACA CAATATCGAGGAGACCGGACACCCGAGCAGAACGGGAACTGCTCCGGAATATCCCCCAACCAACTCAA CGCCGCATCAACAAAGTCAACACGACATCGCCCTGCTGGAGTGGACGAGCCTCTGTTGCTGAATAGCTA CGTGACCCCATCTGCATCGCCGACAAGGAGTACACCAACTTCTGAAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGTC GGCTGGGCGAGTGTCCAAAGGGCAGAACGCCCTGGTGTGCACTGAGAGTGCCTGGTGGAC AGAGCCACTGCTGTTGAGCACCAGTTTCACTTACAAACAATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCG GCAGAGACAGTCCAGGGCGACAGCGGGGACCCACGTGACCCGAAAGTGGAGGGCACAGCTTCTGACC GGCATCATCAGCTGGGGGAGGAGTGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACCAAAGTGAGCCGGTA CGTGAACTGGATCAGGAGAAAACCAAGCTGACCTGAGAGCATCTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCT GTTTTCTTGAITTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAACAATAATGGTGGGCAATCATTTACATTTTAGGG ATATGTAATTACTAGTTAGGTGATTGGCCACAAGACAAACATGTTAAGAAACTTCCCGTTATTTACGCTCTG TTCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGAAAGATTGACTGATATCTTAACTATGTTGCTCCTTTT ACGCTGTGTGGATATGCTGCTTATAGCCTCTGTATAGTATGCTTCCCGTACGGCTTCCGTTTCTCCTCC TTGTATAAATCCTGGTGTCTTTTTAGAGAGTGTGGCCCGTGTCCGTCACCTGGCGGTGGTGTGCTC TGTGTTGTGACGCAACCCCACTGGCTGGGCATTTGCCACACCTGTCAACTCTTTCTGGGACTTTCCGCTT TCCCCCTCCGATCGCCACGGCAGAACTATCGCCCGCTGCTTCCCGTGTGGACAGGGGCTAGGTTGCT GGGCACTGATAATCCCGTGTGTTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCGCTG CTTCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTCTAATAAATGAGAAATGCAATGCAATGCTG AGTAGGTGTCATTTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGCGAGCAGCAAGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAG CAGGCATGCTGGGATGCGGTGGGCTATGGCAGGAACCCCTAGTGAATGGAGTTGGCACTCCCTCTCTGG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCGGGAACCCCGGGCTGCGCCTCAGTGAGCGGAGCGGACGCGCAGCTG</p>
--------------------------	--

[0846]

SEQ ID NO: 57	构建体 E	CCTGCAGG
<p>CCTGCAGG CAGCTCGCGCTCGCTCAGTGAAGCCGCCCGGGAACCCGGGGCGTGCCCGGGCCCTCAG TGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGTTCTGGCTCAGAGGCTCAGAG GCACAGGAGTTCTGGGTCACCTGCCCCCTCCAAACCCCTCAGTTCCATCCAGCAGCTGTTGTGT GCTGCTCTGAAGTCCACACTGAACAACTTCAAGCTACTCATGTCCTAAATGGGCAAACTTGGCAAGCAG CAACAGCAAAACACAGCCCTCCCTGCTGACCTGGAGCTGGGAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGG CCCATGCCACCTCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTCGGTGGAGAGGACAGAGTTGCTCTGGCGTGG TTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAACCCACTTGTGGTGGGAGTGTCAAGTAAAGTGGCTATGCC CCGACCCGAAAGCTGTTCCCACTGTCAATGGAATGATAAAGACGCCCACTGTGATAGGGTTTTTGTGG CAATAAACATTTGGTTG GAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCACCAACCTTCCCTGCTCAGCTCCCAAGTGTGGATTTACAAG CATGTGCCACACACCTGGTAATTTCTAATTTAGTAGAGACGGGTTCTCCATGTTGTCAGCCTCAGCCT CCCAAGTAACTGGGATTAACAGGCTGTGCCACACACCCGGCTAATTTTTCTAATTTTTGACAGGGACGGGT TTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCGGATCTTGTACCAAGTGAACAGCCACTAAGGATTTCTGC AGTAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTG GACACAGGACGCTGTGTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCTTTCGGTAAGTGCAGTGAAGCTGTACACTG CCCAGCAAAGCTCCGGCAGGTAGGGGGGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTTGCT CCTCCGATAACTGGGTGACCTTGGTTAATAATCCACAGCAGCTCCCTCCCTTGGCTTGGATCCACTGCTT AAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCTCAGCTTCAAGCACCACTCAGCTGGGACAGTCCGCCAC CATGAAAGACGCCAAACATAAAGAAAGGCCGGGCCATTTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCCCTGGAG AGCAACTGATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGTTCTCTGGAACAATTTGCTTTACAGATGCACATATCGA GGTGGACATCACTACGCTGAGTACTTCGAAATGTTCGTTGCGTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTG AATACAATCACAGATCGTCGTATGCAAGTGAACACTCTCTCAATCTTTATGCCGGTGTGGCGCGTTAT TTATCGGAGTTGCAAGTTGCCCGCGAACGACATTTATATGAACGTGAATGCTCAACAGTATGGGCATTTCC GCAGCCTACCGTGGTTCGTTTTCCAAAAGGGGTTGCAAAAATTTGAACGTGCAAAAAGGCTCCCAAT CATCCAAAATAATATCATGGATTTAAAACGGATTACCAGGATTTCAAGTCAAGTACAGTTCGTCACA TCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTTTGTGGCAGAGTCTTCGATAGGGCAAGCAATTTGCAC TGATCATGAACCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGCTGCTGCTCATAAGAACTGCCTGCGTGAG ATTTCCGATGCCAGAGATCTATTTTGGCAATCAATCATCCGGATCTGCGATTTAAAGTGTGTTCCAT TCCATCACGGTTTTGGAATGTTACTACACTCGGATTTGATATGTGGATTCGAGTCTTAATGTATAGA TTTTGAAGAAGAGCTGTTCTGAGGAGCTTCAAGATTACAAGTTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAAACCTAT TCTCCTTCTCGCCAAAAGCACTGTGATGACAAATACGATTTATCTAATTAACGAAATTTGCTTCTGGTGGC GCTCCCTCTAAGGAAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATAT GGGCTCACTGAGACTACATCAGTATCTGATTACCCGAGGGGATGATAAACCCGGGCGGTCGGTAA GTTGTTCCATTTTTGAAGCGAAAGGTTGTGATCTGGATACCCGGAACCTGGGCTTAAATCAAAGAGGGC AACTGTGTGAGAGGCTCTATGATTTGTCGGTTATGTAACAATCCGGGAAGCAACCGCTTGTGATTTGA CAAGGATGGATGGTACATTTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACCAACTTCTCATCTGTTGACCG CCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTTGGAATCCATCTGTCTCCAACAC</p>		

[0847]

<p>CCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGAGGTCTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCGCCGGCTTTTG TTTTGGACACGGAAAGACGATGACGGAAAGAAGATCGTGGATTACGTCCAGTCAAGTAACAACCCGG AAAAGTTGCGGGAGGAGTTGTGTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAACTCGACGCAAGA AAAATCAGAGAGATCCTATAAAGGCCAAGAGGGGAAAGATCGCCGTGTAAGAGCATCTTACCGCCATT TATCCCATATTTGTTCTGTTTTCTTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAACAATAATGGTGGGCA TCATTTACATTTTAGGATATGTAATTAATACTAGTTGAGGTGATTTGCCACAAGACAACATGTTAAGAAACTTT CCCGTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCGGATTAACAATTTGTGAAGATTGACTGATATTTCTT AACTATGTTGCTCTTACGCTGTGTGATATGCTGTTATAGCCTCTGTATAGCTATTGCTTCCCGTACG GCTTTCGTTTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTGTCTGTTCTTTTAGAGGAGTTGTGGCCGTTGTCCGTCAA CGTGGGTGGTGTCTGTGTTGTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTTGCCACCACCTGTCAACTCC TTTCTGGACTTTTCGCTTCCCTCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCTTGCCTGCCGCTGG ACAGGGGTAGTTGTGGCACTGATAAATCCGTGGTGTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT TTGCCCTCCCCGTGCTTCTTGAACCTGGAAGTGCACCTCCCACTGCTCTTCTAATAAATGAGGAAA TTGCATCGCAATTGTCTGATAGGTGTCAATTTCTTGGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGG ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGTGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCAGGAACCCCTAGTATGGAGTTG GCCACTCCTCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGACCAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTG CCCCGGGGCTCAGTGAGCGAGCGGCGCAGCTGCCTGCAGG</p>	<p>CCTGCAGGCACTGCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAAGCCGGGGCTGGGGCACTTTTG GTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGGC TCAGAGCTCAGAGGCACACAGAGTTTCTGGCTCACCTGCCCTTCCACCCCTCAGTCCCATCTCC AGCAGCTGTTGTGTGCTGCTGAAAGTCCACTGAACAACCTTCCAGCTACTCATGTCCCTAAAATGGC AAAATTGCAAGCAGCAACAGCAACAACAAGCTTCCCTGCTGCTGACCTTGGAGCTGGGCAGAGGTC AGAGACCTCTTGGGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTGACCCCTTGGAAATTTCCGGTGGAGAGGAGCAGA GGTTGCTGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGTCGGGTTCAAACCACTTGTGGTGGGAGTCTGCA GTAAGTGGCTATGCCCCGACCCGAAAGCCTGTTTCCCATCTGTACAAATGGAATGATAAAGACGCCCATCTG ATAGGTTTTTGTGGCAATAAACAATTTGGTTTTTGTGTTTTGTTTTGAGATGGAGTTTGCT CTGTCCCAAGGCTGGAGTGACGACAACTCATCTCACCAACCTTCCCTGCCCTCAGCTCCCAAGT AGCTGGGATTAACAAGCATGTGCCACCACTGGCTAATTTCTATTTTAGAGACGGGTTTCTCCATGTT GCTCAGCCTCAGCCTCCCAAGTAACTGGGATTAACAGGCTGTGCCACCAACCCGGCTAATTTTCTATTTT GACAGGACGGGTTTCAACATGTTGTCAGGCTGCTAGAGGTACCGGATCTGTACCAGTGGAAACAGC CACTAAGGATTTGCAAGTGTGAGAGCAGAGGGCCAGTAAAGTGTACTTCCAGAGACTGTCTGACTCACGCC ACCCCTCCACTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGTAACAATGACTCTTTCGGTAAGTCAAGT GGAAGCTGACTGCCAGGCAAGCGTCCGGCAGCGTAGGGGGGACTCAGATCCAGCCAGTGGACT TAGCCCTGTTGCTCCGATAACTGGGTGACCTTGGTTAATATCCAGAGCCTCCCGTTGCCCTT CTGGATCCACTGCTTAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTCAGGCACCACTGACCTGG GACAGTCCGCCACCATGGAAGACGCCAAAACAATAAAGAAAGCCCGGGCCATTTCTATCCGCTGGAAGAT GGAACCGCTGGAGAGCAATGCAATAAGGCTATGAAGATACGCCCTGTTCTCTGGAAACAATTGCTTTTACA GATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAAGTATGA</p>
<p>SEQ ID NO: 58</p>	<p>构建设 F</p>

[0848]

<p>AACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTGTATGCAGTGAATAAATCTCTTCAATTCCTTATATGCGGGT GTTGGGCGGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGGCCCGGAAACGACATTTATAATGAACGTGAATGCTCAAC AGTATGGCATTTCGCAGCCTACCGTGGTTCGTTTCCAAAAGGGGTTGCAAAAATTTTGAACGTGCAAA AAAAGTCCCAATCATCCAAAATAATATATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAAGGATTTACAGTCGATGTA CACGTTTCGTCACATCTCACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTGTGCCAGAGTCTTCGATAGGGACA AGACAATTGCACTGATGAATCCTCTGGATCTACTGCTGCTAAAGGTGCTGCTGCCTCATAGAAC TGCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCTATTTTGGCAATCAAAATCATTTCCGGATCTGCGATTTTAA GTGTTTCCATCCATACCGTTTTGGAAATGTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTCGAGTCTGTC TTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGAGCCTTACAGGATTAACAAGATTCAAAAGTCCGCTGCTGG TGCCAAACCTATTTCTCTTTCGCCAAAAGCACTCTGATGACAAAATAGCAATTTATCTAATTTACACGAAAT GCTTCTGGTGGGCTCCCTCTTAAGGAAGTGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCA GGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTTCTGATTAACCCGAGGGGATGATAAACCCGGCG CGTCCGTAAGGTTGTTCCATTTTTGAAGCGAAGTTGTGATCTGGATACCCGGAAAACGCTGGGCGTTAA TCAAAGGGCAACTGTGTGAGAGTCTATGATTTATGTCGGTTATGTAACAATCCGGAAAGCGACCAA CGCTTGAATTGACAAGGATGGTACATTTCTGGAGACATAGCTTACTGGACGAAAGACACATTTCTTC ATCGTTGACCGCTGAAGTCTGATTAGTACAAGGCTATCAGGTGGTCCCGTGAATTTGGAATCCATCT TGCTCAAACACCCCAACATCTTCGACGAGGTGTCGAGGTCTTCCGACGATGACCCGGTGAACCTTCCCGC CGCGTTGTTGTTGGAGCACGAAAGAGATGACGGAATAAGAGATCTGGATTACGTCGCCAGTCAAGT AACACCCGGAAAAGTTGGCGGAGGAGTTGTGTTGTGGACGAGTACCGAAAGGCTTACCGGAAAACCT CGACGAAGAAAATCAGAGAGATCTCATAAAGCCAAAGAGGGCGGAAAGATCCCGTGAAGAGCATC TTACCGCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTCTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAAACAAAAT GGTGGGCAATCATTTACATTTTAGGGATATGTAATTAATACTAGTTCAAGTGTATGCCACAAGACAAAACATGT TAAGAACTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGGATTAACAATTTGTGAAGATTGA CTGATATCTTAATACTATGTTGCTCTTTACGCTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTAGCTATTG CTTCCCGTACGGCTTTCGTTTCTCTCTGATAAATCCTGGTTGCTGCTCTTTAGAGGAGTTGTGGCCCC TTGTCCGTCAAACGTGGCGTGTGCTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTTGCCACCCAC CTGTCAACTCTCTTTCTGGACTTTCCCGTTCGCCATGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCTGCTTG CCCCGTGTGACAGGGGTAGTTGTGGGCACTGATAATTCGTGGTGTGTCTGTGCTTCTAGTTGCCA GCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCGTCTCTGACCCCTGGAAGTGGCACTCCCACTGCTCTTCTCTAAAT AAAATGAGGAAAATTGCATCGCATTTGCTGAGTAGGTGCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCAATGTGGGATGCGTGGGCTCTATGGCAGGAACCCCT AGTGAATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGTCTGCTACTGAGGCCGCCCGGGAAAACCCCGGGCGTGC GCCTCAGTGAGCGGAGCGAGCGGCAAGCTGCCTGCAGG</p>	<p>CTGCAGGAGCTGCGGCTGCTGCTACTGAGGCCGCCCGGAAAACCCGGGCGTGCCTGGCGGCTCAG TGAGCAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCAACTCCACTAGGGGTTCTGGCTCAGAGGCTCAGAG GCACACAGGAGTTCTGGGCTACCCCTGCCCTTCCAAACCTCCACTCCATCCAGCAGCTGTTGTGT GCTGCTCTGAATCCACACTGAACAAAATTCAGCCTACTCATGCTCCCTAAATGGGCAAAACATTGCAAGCAG CAAAACGCAACACACAGCCCTCCCTGCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTG</p>
	<p>SEQ ID NO: 59</p> <p>构建体 G</p>

[0849]

CCCATGCCACCTCCAAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGCTCGGCGTGG
 TTTAGGTAGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAACCACCTGTGGTGGGAGTCGTCAAGTAAAGTGGCTATGCC
 CCGACCCCGAAGCCTGTTCCCACTCTGACAATGAAATGATAAAGACGCCCATCTGATAGGGTTTTGTGG
 CAAATAAACATTTGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGAGATGGAGGTTTTGCTCTGTGCGCCAGGCTG
 GAGTGCAGTGACACAATCTCATCTCACCAACAACCTTCCCTGCTCAGCTCCCAAGTAGCTGGGATTAACAAG
 CATGTGCCACCAACCTGGCTAATTTTCTAATTTTATAGTAGACGGGTTTTCTCCATGTTGGTCAAGCTCAGCCT
 CCCAAGTAACTGGGATTACAGGCTGTGCCACCAACCCCGGCTAATTTTTCTATTTTTGACAGGGACGGGGT
 TTCACCATGTTGGTCAAGGCTGTTAGAGTACCGGATCTTGTACAGTGGAAACAGCCACTAAGGATTTCTGC
 AGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTACGCCACCCCTCCACCTTG
 GACACAGGACGCTGTGGTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCTTTCGGTAACTGCAAGTGAAGTGTACACTG
 CCCAGGCAAGCTCCGGCAGGTAGGGGGGACTCAGATCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTTGCT
 CCTCCGATAACTGGGTGACCTTGGTTAATATCACAGCAGCTCCCCCTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTT
 AAATAACGGACGAGGACAGGGCCCTGCTCCTCAGCTTACGGCACCACTGACCTGGGACAGTGCCTCCAC
 CATGATCATGGCCGAGACCTTGGCTGATCAACATCTGCTGTGGGTAACCTGTGAGCGCCGAGTGCACC
 GTGTTCTGGACACGAGAACGCCAACAGATCTCTGAACCGGCCAACAGATACAACAGCGGCAAGCTGGA
 GGAGTTCTGCAGGGCACTTGGAGGGGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAGGCCAGGGAAG
 TGTTCGAGAACACCCGAGGGACACCGAGTTCTGGAAAGCAGTACGTGGACGGGACCAAGTGCAGAGCAAC
 CCTTGCCTGAACGGGGCAGCTGCAAGGACGACATCAACAGCTACAGTGTGGTGGCTTTCGGCTTCGAG
 GGCAAGAACTGCGAGTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGCTGCGAGAGTTCGTGCAAGAACA
 CGCCGACAACAAAGTGGTGTAGCTGACCCGAGGGTACAGATGGCCGAGAACCAAGAGCTGCGAGC
 CCGCCGTCCCTCCCTGCGGACAGTGCAGTGTCCAGACCAGCAAGTGCACAGAGCCGAGACCCGTGT
 TCCCCGAGTGCATCGTGAATAGCACCGGGCCGAGACCATCTTGACAACTACATCACCCAGAGCACCCAGT
 CCTTCAACGACTTCAACAGAGTTGGGGGGGAGGACGCCAAGCCCGCCAGTTCCTCCCTGGCAGGTGGTGC
 TGAACGGCAAGTGGATGCTTCTGCGCGGACGATCGTGAACGAGAAAGTGGATCGTGAACGCGCCACT
 GCGTGGAGACCCGGGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGCAACACAATATCGAGGAGACCCGAGCACCCGAG
 CAGAAAGCGGACGTCATCCGGATTATCCCCACCACAACATCAACGCGCCATCAACAAGTACAACCCAGAC
 ATCGCCCTGTGGAGCTGGACGAGCCTCTGGTGTGAATAGTACGTGACCCCACTGCTGCGCGACAAGG
 AGTACAACACATCTTCGAAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGTCCGGTGGGCAAGAGTHTCCACAAGGGCA
 GAAGGCCCTGGTGTGCAGTACCTGAGATGCCCTGGTGGACAGACACCTGCCCTGTGAGCACCAAGT
 TCACCATCAACAACATGTTCTGCGCCGGCTCCACGAGGGCCGAGACAGTCCCGCCGAGGAGGAGTGGC
 GCGGACCCACGTGACCGAAAGTGGAGGGCACCAAGTCTTGCACCGCATCATCAGTGGGGCGAGAGTGGC
 CCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACAAAGTGAAGCCGATGAGTGAACCTGGATCAAGGAAACCAAG
 CTGACCTGAGAGCATCTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTCTGATTTGGGTATACATTTAAAT
 GTTAATAAACAATAATGGTGGGCAATCAITTTACATTTTAGGGATATGTAATTAAGTTCAGGTGATTCG
 CACAAGACAACATGTAAGAAACTTCCGTTATTTACGCTGTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAA
 AATTTGTGAAAGATGACTGATATTTCTAATAGTGTCTCTTTACGCTGTGGATATGCTGCTTTATAGC
 CTCTGTACTAGTATTGCTTCCCGTACGGCTTCGTTTTCTCTCTCTGTATAAATCTGGTGTGCTGCTCTTTT
 AGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTGTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGC
 TGGGGCATTTGCCACCACTGCACTCTTCTGGGACTTTCGCTTTCCTCCCTCCCGATCCGCAACGGCAGAACT

[0852]

<p>GGTCCGGGGGGTCCGAGGGGAACAAGGTCGCTCGGGGTGTGTCGTGGGGGGTGTGAGCAGGGGGT GTGGCGGGGGTGGGTGTAACCCCTGACCCCTCCCGAGTGTGAGCAGGGCCGGCTCG GGTCCGGGCTCCGTACGGGGCTGGCGGGGCTCGCGTCCGGCGGGGGTGGCGCAGTGGGGT GCCGGGGGGGGCCGCTCGGGCGGGAGGGCTCGGGGAGGGCGGGCGGGCCCGGAGCGCG GCGCTGTGAGGGCGGCGAGCGCAGCATTGCTTTATGTTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGACTTC CTTTGCCAAATCTGTCCGAGCCGAAATCTGGAGGGCGCCGCCACCCCTCTAGCGGGCGGGGCGA AGCGTGGCGGCGGAGGAAGAAATGGCGGGAGGGCTTCTGTCGTCGCCGCGCCCTCCCTTC TCCCTCCAGCTCGGGCTCGCGGGGAGCGCTGCCCTCGGGGGGACGGGCGAGGCGGGGTTCC GCTTGGCGTGTGACCGGGGCTAGAGCTCTGCTAAACCATGTTTTCCTTTCTTCTTCTACAGTC CTGGCAACGTCGTGTTATTGTCTCTCATCTTGTGACAGAAATTCCTCGAAAGATCCGAGGGGTTCA AGCTGGCATTCCGGTACTGTGGTAAAGCCACCTGGAAGACGCCAAAACATAAGAAAGGGCCGGCC ATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCACTGCATAAGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTC TGAAACAAATTGCTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCGGT CGTTGGCAGAACTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCTGATGCAGTGAATACTCT CTTCAATCTTATGCCGTTGGCGGTTATTTATCGGAGTTGCGAGTGGCCCGCAACGACATTTATAA TGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGCATTTCCAGCTACCGTGTGTTGTTCCAAAAGGGGTTGCAA AAAAATTTGAACGTGCAAAAAGTCCCAATCATCCAAAATAATATCATGATTTCTAAAACGGGATTACC AGGATTTACAGTGTGACACGTTCTGTCACATCTACTCCCGGTTTAAATGAATACGATTTTGGCCA GAGTCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCACTGACTCTGAGTCTACTGGTCTGCCTAAAGGTG TCGCTGCTCATAGAACTGCTGCTGAGATTCGCTGCAAGATCTATTTTGGCAATCAATCAT CCGATACTGCGATTTAAGTGTGTTCCATCCATCACGGTTTGGAAATTTACTACCTCGGATTTGAT ATGGATTTGAGTGTGCTTAAATGATAGATTTGAAGAAGGCTGTTCTGAGGAGCTTCAGGATACAAG ATTCAAAGTGGCTGTGGTCCAAACCTATTCTCTCTCCGCAAAAGCACTGTGATGACAAATACGATTT ATCTAATTTACAGAAATTTGCTTCTGGTGGCTCCCTCTAAGAAAGTGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGG TTCCATCTGCCAGTATCAGGCAAGGATATGGCTCACTGAGACTACATCAGTATTTGATACCCGAGG GGGATGATAAACCGGGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTGAAGCGAAGTTTGGATCTGGATACCCGG GAAAACGCTGGGGTTAATCAAAGAGGCGAATGTTGTGAGAGTCTATGATTAATGTCGGGTTATGTA CAATCCGGAAGCGACCAACGCTTGTGATGACAAGGATGGTACTATTTGGAGACATAGCTTACTGGGA CGAAGCAGCACTTCTCATCGTTGACCGCTGAACTCTGATTAAGTACAAGGCTATCAGTGGCTCCC GCTGAATTGGAATCCATCTGCTCCAAACCCCAACATCTCGACGCGAGGTCGCGAGTCTCCCGACGATG ACCGCGTGAACCTCCCGCGGTTGTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAGAAAGAGATCGTGG ATTACGTCGCCAGTCAAGTAAACCCGCAAAAAGTTGCGGAGGAGTTGTGTTGTGGACGAAATACCGA AAGTCTTACCGGAAAACCTGACGCAAGAAAATCAGAGAGATCTCATAAAGCCAAAGAAAGGGCGAAAG ATCGCGGTAAATCTAGAGTCGGGGCGGCGGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATGATGATGATTT GGACAAACCACTAGAATGCAAGTGAATAAATGCTTATTTGTAATTTGTAATTTGATGCTATTGCTTTATTG TAACCAATTAAAGCTGCAATAAACAAGTTAAACAACAATGCAATTTATGTTTCAAGTTTCAAGGGGA GGTGTGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTAACAAATGTTGTAATAATGATAGTGGACCGGAGCGG CCGCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGGGGTTAATCATTAACTACACCTGCAGGCAGCTGC GCGCTCGCTCCTACTGAGGCCCGCCCGGGCGTCCGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAATGAGCGGAGCGA</p>		
--	--	--

[0853]

<p>GCAGGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGTTTCCT</p>	<p>CCCTGAGGCAGCTGGCGCTCGCTCACTGAGCCCGCCGGGCAAGCCCGGGGCTCGGGGACCTTTG GTCGCCGGCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGTTTCCTTGT AGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGAGCGGCCGCTAGCCCTAAAAT GGCAACATTTGCAAGCAGCAAAAGCAACACACAGCCCTCCCTGCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGA GGTCAGAGACCTCTCTGGGCCATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTTCGGTGGAGAGGAGC AGAGTTGCTCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGAATGACTCTTTTCGGTAAAGTCAAGTGGAAAGCTGT ACACTGCCAGGCAAGCGTCCGGCAGCGTAGCCGGGCACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTG TTTGTCTCCCGATAACTGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCTCCCGTTGCCCTCTGGATCCA CTGTTAATAACGGACGAGGACACTCGAGGGCCCTGCTCCTCAGCTTCAGGCACCACACTGACCTGGGAC AGTGAATCCGGACATCGAATTTAAGGTAATAATAAATTTTAAAGTGTATAAATTTGTTAAACTACTGATTCTA ATTGTTCTCTCTTTTAGATTCCAACTTTGGAACTGAATTCAGACCACCTGCAGAGGGTGAACATGATCAT GGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCCTGCTGGCTACCTGCTGTGCTGAGTGCATGCTGTTCTG GACCATGAGATGCCAACAGATCTGAACAGGCCCAAGAGATCAACTTGGCAAGCTGGAGGAGTGTGAGAA CAGGGCAACTGGAGGGAGTGCATGGAGGAGAAAGTGCAGCTTTGAGGAGGCCAGGAGGTGTGAGAA CACTGAGAGGACCCTGAGTTCTGGAAAGCATGTGGATGGGACCAGTGTGAGAGCAACCCCTGCCCTGAA TGGGGCAGCTGCAAGGATGACATCAACAGCTATGAGTGTGGTGGCCCTTTGGCTTTGAGGGCAAGAACTG TGAGCTGGATGACCTGCAACATCAAGATGGCAGATGTGAGCAGTTCGCAAGAACTCTGCTGACAACAA GGTGGTGTGCACTGCACTGAGGGCTACAGGCTGGCTGAGAACCCAGAGAGCTGTGAGCCCTGCTGTGCCATT CCCATGTGGCAGAGTGTGTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGGGTGTGGCTGTGTTCCCTGATGTGA CTATGTGAACAGCACTGAGGTGAACCATCTCTGGACACATCAACCAGAGCACCAGAGCTTCAATGACTT CACAGGTGTGGGGGGAGGATGCCAAGCCTGGCCAGTTCCTCCCTGGCAAGTGGTGTGAATGGCAAGGT GGATGCCCTTCTGTGGGGCAGCATTGTGATGAAAGTGGATTGTGACTGCTGCCACTGTGTGGAGACTGG GGTGAAGATCACTGTGGTGGCTGGGAGCACAACATTGAGGAGACTGACACACTGAGCAGAGAGGAAATG TGATCAGGATCATCCCCCACCACAACATACTGCTGCCATCAACAAAGTACAACCATGACATTGCCCTGCTGGA GCTGGATGAGCCCTGCTGCTGAACAGCTATGTGACCCCTCATGCTGACAAAGGAGTACACCCAACATC TTCTGAAAGTTTGGCTGTGCTATGTGTGGTGGGCAAGGTGTTCCAAAGGCAAGGCTGCCCCTGGTGC TGCAGTACTGAGGGTGCCTGGTGGACAGGGCCACTGCTGAGGAGCACCAGTTCAACCATCTACAACA ACATGTTCTGTGGCTTCCATGAGGGGGCAGGGACAGCTGCCAGGGGACTCTGGGGGGCCCCATGTGA CTGAGGTGAGGGCACCAGCTTCTGACTGGCATCATCAGCTGGGGGAGGAGTGTGCCATGAAGGGCAAGT ATGGCATCTACACCAAAGTCTCCAGATATGTAACTGGATCAAGGAGAAGCACAAGCTGACCTAATGACTC ATGGTTCGAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTTGTAAACCATATAAGCTGCAATAAAC AAGTTAACAAACAACATGCAATTTATGTTTCAAGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAACCTA GTGGGGCCCTCTAGAGCATGGTACGTAGATAAGTAGCATGGGGGTTAATCAATTAACAGAGGAACCCC TAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTCAGTGGCCGGGGCCAAAGGTCGCCCC ACGCCCGGGGGCCCTCAGTGAGCGAGCGGAGCGGCGCAGCTGCTGCAGG</p>
<p>构建体</p>	
<p>SEQ ID NO: 62</p>	

[0854]

SEQ ID NO: 63	Mut2-L	CCTGCAGGCAGCTGCGGCTGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGAAACCCGGGGGTGCCCGGGCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGGGAGTGGCCAATCCATCACTAGGGGTTCTT
SEQ ID NO: 64	Mut3-R	AGGAAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGGAAACCCGGGCGTGCCTCAGTAGCGGAGCGAGCGCAGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 65	含 RBE 的 SEQ ID NO: 52 的选定部分	GCGGCTCGTCTGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGCTCGGGCGACCTTTGGTGCCTCCGGCTCAGTGAGCGGAGCGGCGGCG
SEQ ID NO: 66	IE1 启动子片段	AATAAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAAGGTTACATCATTAATCTTTGTTCCGCAATCCGGTTGGTATAAATAGACGTTTCAATGTTGGTTTTTTGTTTTCAGTTGCAAGTTGGCTCGGGCGCGCCAGCACCTTT
SEQ ID NO: 67	Rep 78 核苷酸序列 (包括加下划线的 Kozak 序列)	CGCAGCCACC- ATGGCGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCGAGCACCTTACGAGCATCTGCCCGGCAATTTCTGACA GCTTTGTGAACCTGGTGGCCGAGAAGGATGGGAGTTGCCCGCAGATTTCTGACATGGATCTGAATCTGATTG AGCAGGCACCCCTGACCTGGCCGAGAGCTGACCGCGACTTTCTGACCGAATGGCGCCGTGTAGTAAAG CCCCGGAGCCCTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAAGGAGAGACTCTCCACATGCACGTCTCGTGTGAAAC CACCGGGTGAATCCATGGTTTTGGGACGTTCTGAGTCACTCGGAAAACATGATTCAGAGAATTTAC CGGGGATCGAGCGGACTTTGCCAAACTGGTTCGGGTACAAAGACCAGAAATGGCGCGGAGGGGAA CAAGTGTGTGATGAGTCTACATCCCAATTAATGTTCTCCCAAAACCCAGCTGAGCTCCAGTGGCGGTGG ACTAATATGGAACAGTATTTAAGCCCTGTTTGAATCTCAGGAGCGTAAACGGTGGTGGCGCAGCATCTGA CGCACGTGTCGACAGCGAGGAGCAGAACAAAGAGAAATCAGAATCCCAATTTCTGATGCCCGGTGATCAGAT CAAAAACCTCAGCCAGGTACATGGAGCTGTCGGTGGTCTGAGCAAGGGGATTAACCTCGGAGAAAGCAGT GGATCCAGGAGACCGGCTCATACATCTCTCAATGGGCTCCCAACTCGCGGTCCCAAAATCAAGGCTGC CTTGGAACAATGCGGGAAGATTATGAGCTGACTAAACCGCCCGACTACTGTTGGGCGCAGCAGCCCGT GGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCAATATGCGGCTTCC GTCTTTTGGGATGGCCACGAAAAGTTCCGGAAGAGAAACCCATCTGGCTGTTTGGGCTGCAACTACC GGGAGACC AACATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAG AACTTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAGATGGTGTGATCTGGTGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAAGTIC GTGGATCGGCCAAAGCCATTTCTGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCTCGGCCAG ATAGACCCGACTCCCGTGTGTCACCTCCAAACCAACATGTGGCCCGTATTGACGGGAATCAACGACCT TCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAAATTTGAATCAACCCCGCTGGATCATGACTTTGG GAAGTCCAAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTCCGGTGGGCAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGA ATTTACGTCAAAAGGTTGGAGCCAAAGAAAGCCCGCCCAAGTACGACGATATAAGTGAAGCCCAAC GGGTGCGGATCAGTTGGCGAGCCATCGACGTCAGCCGGAAGCTTCGATCAACTACGACAGCAGGTACC AAAACAAATGTTCTCGTACGTTGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGGAGAGAAATGAATC AGAAITCAAATATCTGCTCACTACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGTCTTCCCGTGTGAGAAATCTCAACC

[0855]

<p>SEQ ID NO: 68</p>	<p>多角体蛋白启动子序列</p>	<p>CGTTTCTGTCGTCAAAAGGGGATCAGAAACTGTGTACATTCATCATATCATGCGAAAGGTGCCAGACGCT TGCACCTGCCGATCTGGTCAATGTGGATTGGATGACTGCACTCTTTGAACAATAA ATCATGGAGATAATTAATAATGATAACCATCTCGCAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGT AATAAAAAACCTATAAATAATCCGGATTATTCATAACCGTCCCACCATCGGGCGCG</p>
<p>SEQ ID NO: 69</p>	<p>Rep58 DNA 序列</p>	<p>GCCGCCACC- ATGGAGTTGGTGGCTGGCTCGTGACAAAAGGCATTACTTCGGAAAAGCAGTGGATTTCAGGAGGATCAGGCA TCTTACATCTCATTCAAAGCTGCCAGTAACTCGAGTCCAGATCAAGGCAGCGCTGGACAACGCGGGAAAG ATTATGAGTCTGACCAAACTGTCTCCAGACTACCTCGTTGGTCAGCAACCGGTGGAAGATACTCCAGCAACA GGATCTACAAGATTCTGGAGTCAACGGCTACGACCCCTCAATACCGTGCCTCAGTGTCTTGGGTTGGCCAC CAAGAAATTCGGCAAGAAACACTATCTGGCTGTTTCGGCCCGCTACCACTGGAAAGACAACATCGCAGA AGCGATTGCTCACACGGTGCCATTCTACGGCTGCTCAACTGGACAACCGAGAACCTCCCGTTCAACGACTGT GTCGATAAGATGGTTATCTGGTGGAGGAAGAAAGATGACGGCCAAGTGGTTCGAAAGCGCCAAGGCAAT TCTGGTGGCTCTAAAGTGGCTCGACCAAGAGTCAAACTTTCAAGCTCAAATCGATCTACCCCGTTATT GTGACATCAAAACACGAACATGTGTGCCGTGATCGACGGAAACAGTACAACGTTCCGAAACACCAACCTCTC CAGGATCGTATGTTCAAGTTCGAGCTCACCCGCGTTGGACCATGATTCGGCAAGGTCACTAAACAAGAGG TTAAGGACTTCTCCGTTGGCTAAAGATCACGTTGGAGGTTGAAACATGAGTTCTACGTCGAAGAAAGGAG GTGTAAGAAACGTCCAGCCCGTCCGACGAGATATCTCCGAACTAAGAGGTGAGAGATCGGTGCGCAC AGCCAAGCACTTCTGACGCAAGAGTTCCTTAAGTACCGAGATAGGTACCAAAACAAGTGCAGCAGACACG TGGGTATGAACCTGATGCTGTTCCATGCCCGCAGTGTGAGCGTATGAACCAAACTCTAACATCTGTTTCA ACATGGCCAGAAGGACTGCCTCGAATGTTCCCTGTGTGACAGAGTCAAGCCCGTCTCAGTCCGTTAAGAAAGCT TACCAAAAGTTGTGCTACATCCACCATATTTATGGGTAAGTCCCTGATGCTGTACCCGTTGTGATCTGGTCA ACGTGGATTTGGACGACTGTATTTTCGAGCAATAA</p>
<p>SEQ ID NO: 70</p>	<p>MND 启动子</p>	<p>GAAACAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATACTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCC AAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGCCAAACAGGATACTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGG GCCAAGAACAGATGTTCCAGATGGGTCCCGCTCAGCAGTTCAGAGAACCCATCAGATGTTTCCAGG GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTCGC GCGCTTCTGCTCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTATGTAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATC CACGCTGTTTGTACTTCATAGAAG</p>
<p>SEQ ID NO: 71</p>	<p>荧光素酶（具有 加下划线的 Kozak 序列</p>	<p>GCCGCCACC- ATGGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGA GCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGTTCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAG GTGGACATCACTTACGCTGAGTCTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAGCTATGAAACGATATGGGCTGA ATACAATCACAGAATCGTGTATGACGTGAAACTCTCTCAATTTATGCCGTTTGGGCGGCTTATTT ATCGGAGTTGCAAGTTGGCCCGCGAACGACATTTTAAATGAACGTGAATTGCTCAACAGATATGGGCATTTCCG</p>

[0856]

		<p>AGCTACCGTGGTTCGTTTCCAAAAGGGGTTGCAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAGCTCCCAATCA TCCAAAAAATATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGATTTCCAGGATTTACAGTCGATGTACACGTTCCGTCACATC TCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTTTGTCCAGAGTCTTCGATAGGGCAAGACAAATTCACATG ATCATGAATCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGTCTGCCTCATAGAACTGCCTCGCTGAGAT TCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTGGCAATCAATCAATCCGGATATCCGGATATTCAGTCTTAATGTTGTTCCATTC CATACGGTTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGATATAGATT TGAAGAAGAGCTGTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTAACAAGATTAAGTCCGCTGCTGGTCCAAACCTTATTC TCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTTACTAATTTACACGAAATTTGCTTCTGGTGGCGC TCCCCTCTAAGGAAGTGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGG GCTCACTGAGACTACATCAGTATTTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACCGGGCGGTCGGTAAAGT TGTTCATTTTTTGAAGCGAAAGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAACCGTGGCGGTTAATCAAAGAGGCGGA ACTGTGTGAGAGGTCCTATGATTTATGTCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACCGCTTGTATTGAC AAGGATGGATGGTACATTTCTGGAGACATAGCTTACTGGACGGAAGACACTTCTTCTCAGTTCGTTGACCCGC CTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAGGCTATCAGGTGGTCCCCTGAAATGGAAATCCATCTTGTCTCCAAACCC CCAACATCTTCGACCGCAGGTGTCAGGTTCTCCGACGATGACCGCGGTGAACCTCCCGCCCGCTTGTGTGT TTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAGAGATCTGGATTACGTGCCAGTCAAGTAAACAACCCGCGA AAAAGTTGCGGGAGGATTTGTGTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAA AAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAAGGGCGGAAAGATCGCCCTGTAA</p>
<p>SEQ ID NO: 72</p>	<p>WPRE</p>	<p>GAGCATTTACCGCCATTTATCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTGATTTGGGTATACATTTAAATGTTAATAA ACAAAAATGTTGGGCAATCATTTACATTTTAGGGATATGTAATTAAGTTCAGGTGATTTGCCACAAGACA AACATGTTAAGAAACTTCCCGTATTTACGCTCTGCTCTGTTAATCAACCTGGATTACAAAATTTGTGAA AGATTGACTGATATTTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGGATATGCTGCTTTATAGCCTCTGTATCTA GCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTTAGAGGAGTTG TGGCCCTTGTCCGTCAAACGTGGCGTGTGTGTTGCTGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTG CCACCCTGTCAAATCTTCTGGGACTTTCGCTTTCCTCCCGATCCCGCAGGCAACTCATCGCCCGC TGCCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGTTGCTGGGCACTGATAATTCCTGGTGTGTGTC</p>
<p>SEQ ID NO: 73</p>	<p>BGH-聚 A</p>	<p>TGTGCCCTTAGTTGCCAGCCAATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCCTTCCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTC CCACTGCTCTTCTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCATTTCTGGGGGGT GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATGGC</p>
<p>SEQ ID NO: 74</p>	<p>HLCR-AAT 启动子</p>	<p>GGCTCAGAGGCTCAGAGGCCACACAGGATTTCTGGGCTCACCTGGCCCTTCCAAACCCCTCAGTTCCCATCC TCCAGCAGCTGTTGTGTGCTGCTGAGTCCACACTGAACAACTTCAGCCTACTCATGTCCTTAAATG GGCAAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAAACACACAGCCTCCCTGCCTGCTGACCTGGAGCTGGGGCAGAG GTCAGAGACCTCTCTGGGCCCCATGCCACCTCCAAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTCCGTTGGAGAGGAGCA</p>

[0857]

SEQ ID NO: 75-100		GAGGTTGCTCGGCGTGTAGGTAGTGTGAGAGGGTCCGGGTTCAAACCACTTGTGGTGGGAGTGGT CAGTAAGTGGCTATGCCCCGACCCCGAAGCCTGTTTCCCATGTGTACAATGGAAATGATAAAGACGCCCATC TGATAGGGTTTTGTGGCAATAACAATTTGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGATGGAGGTTTTG CTGTGCCCCAGGCTGGAGTGACACAATCTCATCTCACCAACCTTCCCTGCTCAGCCTCCCAA GTAGTGGGATTACAAGCATGTGCCACCACACTGGCTAATTTTTATTTTTAGTAGAGACGGGTTTTCTCCAT GTTGGTCAGCCTCAGCCTCCCAAGTAACTGGGATTACAGGCCGTGTGCCACACACCCGGTAAATTTTTCTATT TTTGACAGGGACGGGTTTTACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTAGAGGTACCGGATCTTGTACCAAGTGGAAACA GCCACTAAGGATTCGAGTGAGAGACAGGGCCAGTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGC CCACCCCTCCACTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGTAAAGTGCA GTGGAAGCTGTACTGCCCCAGGCAAGGTCGGGGCAGCGT AGGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGGA CTTAGCCCCGTTTGTCTCTCCGATAACTGGGGTGAACCTTGGTTAATTTCAACAGACCTCCCGGTTGCC CTCTGGATCCACTGCTTAATAACGGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCCACCACTGACCT GGGACAGT
SEQ ID NO: 101	左 ITR-2	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGAACCCCGGGCGTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 102	右 ITR-2	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGGCGACGCCCGGGTTTTCCCGGGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 103	左 ITR-3	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGTGGGGCGACCTTTTGGTGGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 104	右 ITR-3	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 105	左 ITR-4	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCCCGGGCAAGCCCCGGGCGTCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 106	右 ITR-4	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 左 ITR-10	左 ITR-10	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCCCGGGCAAGCCCCGGGCGTCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC

[0858]

107			AGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 108	右 ITR-10		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCAAGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 109	左 ITR-17		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGAAACGTCGGGGGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGGAG CGCGC
SEQ ID NO: 110	右 ITR-17		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGACCAAAAGGTCGCCCGACGTTTCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGGAG CGCGC
SEQ ID NO: 111	左 ITR-6		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCAAAGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 112	右 ITR-6		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCTTTGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 113	左 ITR-1		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCGGGCTCGGGGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGGAGC GAGCGCGC
SEQ ID NO: 114	右 ITR-1		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGACCAAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGGAGC GAGCGCGC
SEQ ID NO: 115	左 ITR-5		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCGGGCTCGGGGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGGAGCG AGCGCGC
SEQ ID NO: 116	右 ITR-5		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGACCAAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCGCCTCAGTGAGCGGAGCG AGCGCGC
SEQ ID NO: 117	左 ITR-7		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCGGGCAAGCCCGGGCTCGGGGACCTTTGTCGCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 118	右 ITR-7		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGACAAAGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 119	左 ITR-8		GCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCGGGCAAGCCCGGGCTCGGGGCAATTTTCGCCCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGC

[0859]

SEQ ID NO: 120	右 ITR-8	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGGGCGAAATCGCCCGACGCCCGGGCTTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 121	左 ITR-9	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCCGCCGGGCAAGCCCGGGCGTCGGGCGTTTCGCCCGGGCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 122	右 ITR-9	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGGGCGAAACGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 123	左 ITR-11	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCCGCCGGGAAACCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCTGCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 124	右 ITR-11	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCTGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 125	左 ITR-12	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCCGCCGGAAACCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCTGCCCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 126	右 ITR-12	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCTGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTG AGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 127	左 ITR-13	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCCGCCGAAACGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCTGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 128	右 ITR-13	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCTGCCCGACGCCCGGGTTTCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 129	左 ITR-14	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCCGCCAAAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCTGCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 130	右 ITR-14	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCTGCCCGACGCCCTTTGGGCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 131	左 ITR-15	GCGGCTCGCTCGTCACTGAGGCCCGCCAAAGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGC

[0860]

SEQ ID NO: 132	右 ITR-15	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCGGGGGACCAAAAGGTGCGCCCGACGCCTTTGGCGGCCCTCAGTGAGCGGAG CGAGCGCGC
SEQ ID NO: 133	左 ITR-16	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGCAAAAGCGTGGGGGACCTTTGGTGCCTCCCGCCCTCAGTGAGCGGAGCG AGCGCGC
SEQ ID NO: 134	右 ITR-16	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGGACCAAAAGGTGCGCCCGACGCCTTTGGCGGCCCTCAGTGAGCGGAGCG AGCGCGC
SEQ ID NO: 135	HAAT 启动子	CCCTAAAATGGGCAAAATTGCAAGCAGCAAAACAGCAAAACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGC TGGGCAGAGGTACAGACCTCTCTGGGCCATGCCACCTCCAAACATCCACTCGACCCCTTGGAAATTTTCGG TGGAGAGGACAGAGTTGCTCGCTGGCTGTTAGTGTAGAGGGGAATGACTCCTTTCGGTAAGTGC AGTGAAGCTGTACTGCCAGCAAGCGTCCGGCAGGTAGGCGGACTCAGATCCACGCCAGTGG ACTTAGCCCTGTTTGTCTCCGATAACTGGGTGACCTTGGTTAATATTCACACAGAGCTCCCCCGTTGCC CCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGCTCAGCTTACAGGACCCACCACTGACC TGGGACAGTGAATCCGGACTTAAAGTAAATAAAATTTTAAAGTATAATGTGTTAAACTACTGATTTCTA ATTGTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTGGAACGTG
SEQ ID NO: 136-150		
SEQ ID NO: 151	ARSA (CR456383.1 智人 (Homo sapiens) ARSA 全长开放阅读框 (ORF) cDNA 克隆 (cDNA 克 隆 C22ORF pGEM.ARSA.V 2))	ATGTCCATGGGGCACCGGGTCCCTCCTGGCCCTGGTGTGGCTGGCCGTGGCCGTGGCCCGTCCGCCAACA TCGTGTGATCTTTGCCGACGACCTCGGTATGGGACCTGGGTGCTATGGCACCCAGCTTACCACCTC CAACTGGACCAGCTGGCGCGGGAGGGCTCGGTTCACAGACTTCTACGTGCTGTGTCTGTGACACACC TCTAGGGCCGCTCTGACCGCCGGCTCCCGTTCCGGATGGCATGTACCTGGCTCCTGGTGCACAGCT CCGGGGGGCTGCTCCCTGGAGAGGTGACCTGGCCGAAAGTCTGGCTGCCCAGGTAACCTCACAGGAA TGGCCGGCAAGTGGCACTTGGGTGGGGCTGAGGGGGCTTCTGCCCCCACTCAGGGCTTCCATCGATT TCTAGGCATCCGTACTCCACGACAGGGCCCTGCCAGAACCTGACCTGCTTCCCGCCGCACTCCTTGC GACGGTGTGTGACAGGGCTGTGTCCTCCATCCACTGTTGGCCAACTGTCCTGGAGGCGCAGCCCCCT GGTCCCAGACTAGAGCCCGCTACATGGCTTTCGCCCATGACCTATGGCCGACCCAGCCAGGATC GCCCTTCTCTGTACTATGCTCTCACACACCCACTACCTCAGTTTCAAGTGGGAGAGCTTTGCAGAGCGT TCAGGCCGGGGCCATTTGGGACTCCCTGTATGGAGCTGATGACAGCTGTGGGACCTGTATGACAGCCATA GGGACCTGGGGTCTTGAAGAGACGCTGGTACTTCACTGCAGACAATGACCTGAGACCATGCGTATG TCCCAGGCGGCTGCTCCGGTCTTGGGTGTGAAAGGAAAGGAAACGACCTACGAGGGCGGTGTCGAGAGCCT GCCTTGGCTTCTGGCCAGGTATATCGTCCCGGTGACCCAGCCAGCTGGCCAGCTCCCTGGACCTGTGC CTACCTGGCAGCCCTGGTGGGGCCCACTGGCCCAATGACCTTGGATGGATGGCTTTCAGCTCAGCCCTGTCT GCTGGGCAGGGCAAGAGCCCTGGCAGTCTCTTCTTCTACCCGCTTACCCAGCAGGAGTCCGTGGGGT TTTGTGTGGGACTGGAAAGTACAAGGCTCACTTCTCACCCAGGGCTTGCACCACAGTATACCACCTGAC ACCTTGCCTGCCACGCCTCCAGCTCTGACTGCTATGAGCCCCCGTCTATGACCTGTCCAAAGGACCT

[0861]

SEQ ID NO: 152	12S (Genbank 智 人艾杜糖醛酸 2-硫酸酯酶 (IDS) , RefSeqGene 在 X 染色体上)	GGTGAGAACTACAACCTGTGGGGGTGTGGCCGGGGCCACCCAGAGGTGTGCAAGCCCTGAAACAGCTT CAGCTGCTCAAGGCCAGTTAGACGCAGCTGTGACCTTCGGCCCCAGCCAGGTGGCCGGGGGAGGACCCC GCCCTGCAGATCTGCTGTATCTGGCTGCACCCCCCGCCAGCTTGTCTGCCATTGCCAGATCCCCATGCCTG A ATGCCCAACCCCGGACCGGCGGAGGCCCTTCTCTGGCTGGGTCTGGTCTGAGCTCCGCTGCGCCCTCG GATCCGAAACGCAGGCCAACTCGACCACAGATGCTCTGAACGTTCTTCTCATCATCTGTTGATGACCTGGCC CTCCCTGGCTGTTATGGGGATAAGCTGGTGGTCCCAATAATTGACCAACTGGCATCCACAGCTCCTC TTCCAGAAATGCCCTTGGCGAGCAAGCAGTGTGGCCCCGAGCCGGTTCCTTCTCACTGGCAGGAGACCTG ACACCACCCGCTGTACGACTTCAACTCTACTGGAGGTGCACGCTGAAACTTCTCCACCACATCCCCCAGTA CTTCAAGGAGAAATGGCTATGTGACCATGTGCGTGGGAAAGTCTTTCACCTGGGATATCTTCTAACCATACC GATGATTCCTCCGTATAGTGGTCTTTCACCTTATCATCTCTGAGAAAGTATGAAACACTAAAGACATG TCGAGGGCCAGATGGAGAACTCCATGCCAACTGCTTTGCCCTGTGGATGTGCTGGATGTTCCCGAGGGCACC TTGCTGACAAACAGAGCACTGAGCAAGCCATACAGTTGTGGAAAGATGAAACACTGAGCTCAGCTCCTTTC TTCCTGGCCGTTGGTATCATAAGCCACACATCCCTCAGATACCCCAAGGAATTTCAAGAAATTTGATCCCT TGGAGAACATCACCTGGCCCCGATCCGAGGTCCTGATGGCTACCCCTGTGGCTACAACCCCTGGAT GGACATCAGGCAACGGGAAGACGTCCAAAGCCTTAAACATCAGTGTGCCGATGGTCCAAATTCCTGTGGACTT CAGCGAAATCCGCCAGAGTACTTTGCCCTGTGTGATATTTGGATACACAGTCCGGCCGCTCTTGGAGTG CTTTGGACGATTTCAAGCTGGCCAAACAGCACCATATTGCAATTTACCTGGATCATGGTGGGCTTAGGTGA ACATGGAGAAATGGCCAAATACAGCAATTTTGTGTTGCTACCCATGTTCCCTGATAATTTCTATGTTCCCTGGA AGGACGGCTTCACTTCGGAGGCAGGCGAGAAAGCTTTCCCTTACCTGACCCCTTTTGAATCCGCCCTCACAGT TGATGGAGCCAGGCAATCCATGGACCTTGTGGAACTTGTGTCTTTTCCACCGTGGCTGGACTTGC AGGACTGCAGGTTCCACCTCGCTGCCCGTTCCTTCAATTCACGTTGAGCTGTCAGAGAAAGCAAGAACCTT CTGAAGCATTTTCGATTCGGTACTTGGAAAGGATCCGTACCTCCCTGGTAATCCCCGTGAATGATTGCT ATAGCCAGTATCCCGGCTTCAGACATCCCTCAGTGGAAATTCGACAAAGCCGAGTTTAAAAGATATAAAGAT CATGGGCTATTCCATACGCACCATAGACTATAGGTATACGTGTGGGTTGGCTTCAATCCTGATGAATTTCTA GCTAACTTTCTGACATCCATGCAGGGGAACTGTATTTGTGGATTTCTGACCCCAATTCAGGATCACAAATATGT ATAATGATTTCCAAAGGTGGAGATCTTTTCCAGTTGTTGATGCCTTGA
SEQ ID NO: 301	RBE-1	GCGCGCTCGCTCGCTC
SEQ ID NO: 302	间隔子	ACTGAGGC
SEQ ID NO: 303	环臂	CGGGCGACCAAAGTTCGCCCGA
SEQ ID NO: 304	截短的臂	CGCCCCGGGC

[0862]

SEQ ID NO: 305	间隔子补体	GCCTCAGT
SEQ ID NO: 306	RBE-2	GAGCGAGCGAGCGCGC
SEQ ID NO: 307		
SEQ ID NO: 308	SV40 增强子	GGTGTGAAAGTCCCCAGGTCCTCCAGCAGGAGAGTATGCAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCA GGTGTGAAAGTCCCCAGGTCCTCCAGCAGGAGAGTATGCAAGCATGCATCTCAATAGTCAGCAACCA TAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCCGCCAGTCCGCCCATTCCTCCGCCCATGGCTGA CTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCGGAGGCGCCCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAAGTGTAGGAGGCT TTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAA
SEQ ID NO: 309	CMV 增强子	TAGTAATCAATTACGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCGCTGGCTGACCCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCTCCATAGTAACGCC AATAGGACTTTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTAGCCCTTATGACGTCAATGACGTAATGACGTAATGGCCCGCTGGCATATGCCCCAGTACA TGACCTTATGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTT TGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTGAACACGCGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCA ATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTGTAACAATCCGCCCATTTGACGCA AATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAGCAGAGCTGGTTTATGTGAACCGTCTAG
SEQ ID NO: 310	大鼠 EF1- 启动子 (褐家鼠 (Rattus norvegicus) BAC CH230- 35L12 (奥克兰 研究所儿童医院 (Children's Hospital Oakland Research Institute)) 完 整序列 序列 ID: gi 49615137 AC	GGAGCCGAGAGTAATTCATAAAAAGGAGGGATCGCCTTCGCAAGGGGAGAGCCAGGGACCCGTCCCTAAA TTCTCAGAGACCAAAATCCCTGTAGCCGCCACGACAGCGGAGGAGCATGCGCCAGGGCTGAGCGCGGG TAGATCAGAGCACAAAGCTCACAGTCCCGCGGTGGGGAGGGGCGCGTGAAGCGGGCCAGGGAGC TGGCGGGGCAAACTGGAAAGTGGT TATATAAGTGGGTAGTCCCTTGGACGTTCTTTTCGCAACGGGTTGCCGTGAGAACGCGAGGTGAGTGGCG GGTGTGGCTCCCGGGCCCGGAGCTGGAGCCCTGCTGAGCGGGCCGGCTGATATGCGAGTGTCTGTCC GCAGGGTTTGTGTGTGAGCAATCCCACTTCGAGTGGCGGGGTGCGGGGTGAGAGTGCAGGCTTAGCGG CAACCCGTAGCTCGCTGTGTCCGGCTTGGCCCTAGGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT CACTATGCGTTTTTGTCTTGT GCTCACTTAAGGAGCCCATGAAGCTTACGTTGGATAGAAAGGAGGCGAGGAGGCGACTGGGGCCCG CCCGCTTCGGAGCACATGTCGACGCCACCTGGATGGGCGAGGCTGTGGCTTCCGAAAGCAATCGGGCG TGAGTTAGCTACCTGGCCATGTGGCCCTAGCACTGGCACGGTCTGGCTGGCGTGGCGTTCCTGCTTGTG CTCCCAACAAGGTTAGGCTCCCGCCCGCCAGCACTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT CTGTTGCAAGGAGTCAAAATGGAGACGCGGACGCCCGGTGGAGCGGGGTGAGTCAACCCACACAAG GAAGAGGGCTTGGCCCTCGCCCGCCGCTGCTCTGTGACCCCGTGTATCGGGCCGATAGTCAACCTCGG GCTTCTGTGACACCGCTCGTGTGCGGGGGGAGGGGATCTAATGGCGTTGGAGTTTGTTCACATTTGGTGT GGTGGAGACTAGTCAGGCCAGCTGGCGTGGGAGTCACTTGTGAAATTTGCCCTTTGAGTTTGGAGCGGAG CTAATCTCAAGCCTTACGGGTCAAGGTATTTTCTAAACCCGTTTCCAGGTTTGTGAAGCCACCCGCTA

[0863]

	097023.6)	ATTCAAAGCAA
SEQ ID NO: 313	VHI-02 分泌前 导序列	MDWTRILFLVAAATGAHS
SEQ ID NO: 314	VK A26 分泌前 导序列	MLPSQLIGFLLLVVPASRG
SEQ ID NO: 315	SV40 病毒大 T 抗原	PKKKRKV
SEQ ID NO: 316	核质蛋白	KRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO: 317	c-myc	PAAKRVKLD
SEQ ID NO: 318	c-myc	RQRRNELKRSP
SEQ ID NO: 319	hRNPA1 M9	NQSSNFGPMKGGNFGRRSSGYPYGGGGQYFAKPRNQGGY
SEQ ID NO: 320	来自输入蛋白- α 的 IBB 域	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV
SEQ ID NO: 321	肌糖 T 蛋白	VSRKRPRP
SEQ ID NO: 323	人 p53	POPKKKPL
SEQ ID NO: 324	小鼠 c-abl IV	SALIKKKKKMAP
SEQ ID NO: 325	流感病毒 NSI	DRLRR

[0864]

SEQ ID NO: 326	流感病毒 NSI	PKQKRRK	
SEQ ID NO: 327	肝炎 δ 病毒抗原	RKLKKKIKKL	
SEQ ID NO: 328	小鼠 Mx1 蛋白	REKKKFLKRR	
SEQ ID NO: 329	人聚(ADP-核糖)聚合酶	KRKGDEVGVDEVAKKSKK	
SEQ ID NO: 330	类固醇激素受体(人)糖皮质激素	RKCLQAGMNLARKTKK	
SEQ ID NO: 331-499			
SEQ ID: 500		GCCCCGCTGGTTTCCAGGGGCTGCGGGCCCGAAACGGGCCCGC	
SEQ ID: 501		CGGGCCCCGTGCGGGCCCAAGGGCCCCGC	
SEQ ID: 502		GCCCCGGCACGCCCGGGTTTCCCGGGCG	
SEQ ID: 503		CGTGCGGGCCCAAGGGCCCCGC	
右侧 ITR 的选定多核苷酸序列:			
	C-C'		整个序列
WT-ITR-R	CGGGCGACCAAGGTCGCCCG (SEQ ID: 504)	A	CGCCCCGGCTTTGCCCGGGC (SEQ ID: 505)
TTX1-R (ITR 折叠预测)	CGGGCGACCAAGGTCGCCCG (SEQ ID: 507)	A	CGCCCCGGC(TTTGCCCG)GGC (SEQ ID: 508)
Kotin 2 (p.11)	CGGG(CGACCAAGGTC)GCCG (SEQ ID: 510)	A	CGCCCCGGCTTTGCCCGGGC (SEQ ID: 511)
			CGGGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGC (SEQ ID: 512)

[0865]

Kotin 2 (p.11)	CGGG(CGACCAAAAGGTCG)C CCG (SEQ ID: 513)	A	CGCCCGGGCTTTGGCC GGGC (SEQ ID: 514)	CGGGCCGACGCCCGGGCTTTG CCCGGGC (SEQ ID: 515)
Kotin 2 (p.11)	[CGGGGACCAAAAGGTCGCC CG] 方括号内的全部或部分缺 失可用于建立不对称回断的自我 互补序列; (SEQ ID: 516)	A	CGCCCGGGCTTTGGCC GGGC (SEQ ID: 517)	
左侧 ITR 的选定多核苷酸序列:				
	C-C'		B-B'	整个序列
WT-ITR- L	GCCCGGGCAAAGCCCGGGCG (SEQ ID: 518)	T	CGGGGACCTTTGGTC GCCCC (SEQ ID: 519)	GCCCGGGCAAAGCCCGGGCGT CGGGCGACCTTTGGTCGCCCG (SEQ ID: 520)
SEQ ID: 22	[GCCCGGGCAAAGCCCGGGC G (SEQ ID: 521)	T	CGGGGACCTTTGGTC GCCCC (SEQ ID: 522)	GCCCGGGCGTCGGGGCACCTTT GGTCGCCCG (SEQ ID: 522)
TTX1-L (ITR 折 叠预测)	GCC(CGGGCAAAGCCCGGGC G (SEQ ID: 523)	T	CGGGGACCTTTGGTC GCCCC (SEQ ID: 524)	GCCCGGGCGGCACGGGGGAC CTTTGGTCGCCCG (SEQ ID: 525)
Kotin 2 (p.11)	GCCC(GGGCAAAGCCC)GGGC G (SEQ ID: 526)	T	CGGGGACCTTTGGTC GCCCC (SEQ ID: 527)	GCCCGGGCGTCGGGGCACCTTT GGTCGCCCG (SEQ ID: 528)
Kotin 2 (p.11)	[GCCCGGGCAAAGCCCGGGC G] 方括号内的全部或部分缺 失可用于建立不对称回断的自我 互补序列; (SEQ ID: 528)	T	CGGGGACCTTTGGTC GCCCC (SEQ ID: 529)	

SEQ ID NO: 530	NM_004895.1	CAGGCAGCCTCAGTCTGATTCAGGAGAACGAGGTCCTCTTCACCATGTGCTTCATCCCTGGTCTGCTGGATC GTGTGCACTGGACTGAAACAGCAGATGGAGAGTGGCAAGAGCCTTGCCAGACATCCAAAGACTCCACCCGGGT GTACGTCTTCTTCTCCAGTTTGTGTCAGCCCGGGAGGAGCCAGGAGCACGGCTCTGCGCCACCTCTGG GGCTCTGCTCTTTGGCTGCAGATGGAATCTGGAAACAGAAATCTGTTTGAAGAGTCCGACTCAGGAATCAT GGACTGCAGAAAGCCGATGTGTCTCTTCTGAGGATGAACTGTTCCTGTTTCCAAAGGAAGTGGACTCGGAGAAATTC TACAGCTTCATCCACATGACTTCCAGGAGTCTTTGCCCATGTACTACCTGTGAAAGAGGAAAGGAAGGA AGGACGAACGTCACGGAGTGTGTTGAAAGTCCAGCCGAGACGACGTCCTTCTGGAAAACCTATGGCAAA TTCGAAAAGGGGTATTTGATTTTGTGTAGCTTTCTTTGGCTGGTAAACCAGGAGAGGACCTCCTACTTGG AGAAGAAATTAAGTTGCATGATCTCTCAGCAAATCAGGCTGGAGCTGCTGAAATGGATTTGAAAGTGAAGCCAAA GCTAAAAGCTGCATGATCAGCCCAAGCCAGCTGGAAATTTTCTACTGTTTGTACGAGATGCAAGGAGGAGGACTTC
----------------	-------------	--

[0866]

		<p>GTGCAAGGGCCATGGACTATTTCCCAAGATTGAGATCAATCTCCACCAGAAATGGACCACACATGGTTTCTCC TTTTGCATTGAGAACTGTCATCGGGTGGAGTCACTGTCCCTGGGGTTTCTCCATAACATGCCCAAGGAGGAAGAG GAGGAGAAAGGAAGGCCGACACCTTGATATGGTGCAGTGTCTCCCAAGCTCTCTCATGCTGCTGTTCT CATGGGTTGGGGCGTGTGGCCTCTCCCATGAGTGTCTCGACATCTCTTGGTCTCAGCAGCAACCAGAAG CTGGTGGAGCTGGACCTGAGTGACAAACCCCTCGGTGACTTCGGAAATCAGACTTCTGTGTGGGACTGAAGCAC CTGTTGTGCAATCTGAAGAAGCTCTGGTTGGTAAATCTGCCTTACGTCACTGTGTGTTCAGCTTGTCTCCGTTA CTCAGCACTAATCAGAAATCTACGCACCTTTACTCGGAGGCAACACTCTCGGAGACAAGGGATCAAACTACTCTG TGAGGACTCTTGCAACCCGACTGCAAGCTTCAGGTGTGGAAATAGACAACCTGCAACCTCAGTCACTACTGCTG CTGGGACTTTCCACACTTCTGACTCCAGCCAGAGCTTCGAAAGCTGAGCTGGCAACAATGACCTGGGGGA CCTGGGGTCAATGATGTTCTGTGAAGTGTGAAACAGACAGAGCTGCTCTGCAAACTGGGGTGTCTGAAAT GTATTTCAATATGAGACAAAAGTGCCTTAGAAAACACTTCAAGAAGAAAGCTGAGCTGACCTGCTTTTGA GCCCTTTGGTAGGAGTGGAAACGGGGTCCAGAGGCCAGTGTTCCTCGGTCCCTCCAGCTGGGGCCCTCAGG TGGAGAGCTGGATCCATCCAGGCCAAGACCACAGCTCTGTGATCCTCCGGTGGAGTGTCCGAGAAAGAG CTTGCCGACGATGCCCTCTGTGCAGAGCTTGGGCATCTCCTTACGCCAGGTGAGGAAGACACAGGACAATG ACAGCATCGGGTGTGTGTCATCACAGCCCTCAGTTAGAGGATGTTCTCTGGTGACCTCATGTAATAGCTCA TTCAATAAGACATTTCTTATTTTCTTCTCTCTGCTAACCCTTCTTTTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGTT ACTTTGCTCATATCATCTCCCGCTATCTTTCTAATACTGACCATAACACAGAACTAGTTGACTATATATTATG TTGAAATTTATGGCAGCTATTTATTTAATTTTAAATTTTGTAAATAGTTTGTCTTAAATAAGAAAATCCATGCT TTTTGTAGCTGTTGAAATTTCAAGGAATATGTAATACTTTTGGGTATTTAATAATGATTTCTTTCTTAAATTT AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>
<p>SEQ ID NO: 531</p>	<p>NM_183395</p>	<p>GTTCTGAGGCTGGCATCTGGATGAGAAACTGAAAGTTGAGGAATAGTGAAGAGTTTGTCCAATGTCATAGCCCC GTAATCAACGGGACAAAAATTTCTGTGATGGTCAAGATGGCATGTGAAGTGGTTGTTCACCGTAAACTGT AATACAATCCTGTTATGGATTTGTTTGCATAATTTTCCCTCCATAGGGAAACCTTTCTCCATGGCTCAGGACACA CTCCTGGATCGACCAACAGGAAACTTTCTGGTAAAGCAATTTGGCTAACTTTTCTTTTGTGAGATGGAGTCTTGC TGTGTCGCCTAGGCTGGAGTGCAGTGGGTGATCTTGGTCACTGCAGCTCCACTTCCCGGGTCAATCAATCTT CCTACCTCAACTTCTGAGTACGCTGGGATACAGGCGCCGCCACACCCGGCTCATTTTGTACTTTTAGTAG AGACACAGTTTGGCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAATTCCTCAGCTCAGGTGATCTGCCTGCTTGGCCCTCA AAGTCTGGATTACAGGCGTGAACACTGTGCCCGGCTTGGCTAACTTTTCAAAATAAAGATTTTGACTTGT ACAGTCAATGACATTTTCTTCTGTTTGTGAGTTTTGATAATTTATATCTCAAGTGGAGACTTTTAA AAGACTCATCCGTGTGCCGTCACTGCTGGTATCTTAGTGGACCAGGCAAGCTTAAAGCTTGAAACAGCT GCAGATGAAGATGGCAAGCACCCGCTGCAAGCTGGCAGGTACCTGGAGACTTGGAGACTTGAAGAG AATTTAAGATGCACCTAGAGACTATCTCCCCAGAGGGCTGATCCCTCCAGGGGTGACACAGAGAAG GCAGACCATGTGGACTAGCCAGCTAATGATGACTCAATGGGAGGAGAGGCTGGCCATGGCCGTGTG GATCTTCGTCGATCAACAGGAGAGACTTTATGAGAAAGAAAAGAGATGAGCCGAAGTGGGGTTCAGATA ATGCACGTGTTTCGAATCCCACTGTGATATGCCAGGAAGACAGCATTTGAAGAGGATGGATGGGTTACTGGAGT ACCTTTCGAGAATCTCTATTTGTAATGAAGAAGATTACCGTAAAGATACAGAAAGTACGTGAGAAGCAGA TTCCAGTGCATTTGAAGACAGGAATGCCGCTGGGTGAGAGTGTGAGCTCAACAAACGCTACACACGACTGCGT CTCATCAAGGAGCACCGGAGCCAGCAGGAGAGGGAGCAGGAGCTTCTGGCCATCGGCAAGACCAAGACGCTGTGA GAGCCCCGTGAGTCCCATTAAGATGGAGTTGCTGTTTGAACCCCGATGATGAGCATCTGAGCCTGTGACACCCGT</p>

[0867]

		<p>GGTGTCCAGGGGGGGCAGGGAATTGGGAAACAATCTGGCCAGGAAGATGATGTTGGACTGGGGCTGGGGG CACTACCAAGACAGGTTGACTATCTGTTCTATATCCACTGTGAGAGGTGAGCCTTGTGACACAGAGGACC TGGGGACCTGATCATGAGCTGTGCCCCGACCCAAACCCACCCATCCAAAGATCGTAGAAACCCCTCCAGA ATCCTTTCTCATGGAAGGCTTCGATGAGTGCAGGTCCTTTGACGAGCACATAGGACCGCTCTGCACCTGACT GGCAGAGCCGAGGGGGAGACATTTCTCTGAGCAGCCTCATCAGAAAGAAAGCTGTCTCCGAGGCCCTCTG CTCATCACACGAGACCTGTGCCCTGGAGAACTGCAGACTTGTGGACCATCTCGCATGTGGAGATCCCTG GGTTCTCGAGGCCAAAAGGAAAGTACTTCTCAAGTACTTCTGATGAGGCCAAAGCCAGGCCAGCCTTC AGTCTGATTCAGGAAACGAGGTCCTTTCACCATGTGTTTATCCCTTGTCTGTTGATGATGATGATGATGATG TGAAACAGCAGATGGAGATGGCAAGAGCCTTGGCCAGACATCCAAAGCCACCAACCGGCTGTACGTTCTTCC TTTCCAGTTTGTCTGACGCCGGGGAGGGAGCCAGGACCGGCTCTGGCCCACTCTGGGGCTCTGCTCTT TGGCTCAGATGGAATCTGGAACCCAGAAATCTGTTTGAAGTCCGACCTCAGGAATCATGGACTGCAGAAG GCGGATGTCTGCTTCTGAGGATGAACCTGTTCCAAAAGGAAAGTGGACTGCGAGAGTTCTACAGCTTCATC CACATGACTTCCAGGAGTTCTTGGCCCATGTACTACCTGTGGAGAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAG CCAGGAGTGTGTTGAAAGTCTCCAGCCGAGACGTGACAGTCTTCTGGAAACTATGGAATAATTCGAAAGGG GTATTTGATTTTGTACGTTCTCTTTGGCCCTGGTAAACAGGAGGACCTCTACTTGGAGAAAGAAATTA AGTTGCAAGATCTCTCAGCAAAATCAGGCTGGAGCTGTAATGGATTGAAAGTGAAGCCAAAGCTAAAAGCT GCAGATCCAGCCAGCCAGTGAATGTTTACTGTTTACGAGATGCAGGAGGACTTCTGTCAAAGGGC CATGGACTATTTCCCAAGATTGAGATCAATCTCCACCAGATGGACACATGGTTCTTCTTTTGTGATTGAG AACTGTATCGGGTGGATCACTGTCCCTGGGTTTCTCCATAACATGCCAAAGGAAAGAGGAGGAAAGAA GGAAGGCCACACTTGATATGGTCAAGTGTCTCCCAAGCTCTCATGTCTGCTGTTCTCATGGGTTGGGG CGTGTGGCTCTCGCATGATGCTCTCGACATCTCTTGTCTCAGAGCAACCAAGAGCTGTGGAGCTG GACCTGAGTGACAACGCCCTCGGTGACTTCGGAATCAGACTTGTGTGGGACTGAAAGCACCTTGTGTGCAAT CTGAAGAAGCTGTGGTGAATTTCTGGCTTACGTCAGTCTGTGTTTCAAGTTTGTCTCGGTACTCAGCACTA ATCAGAACTCACGCACCTTACCTGGAGGCAACACTCTCGGAGACAAGGGGATCAAACACTCTGTGAGGGAC TCTTGCACCCGACTGCAAGCTTCAAGTGTGGAAATAGACAACCTGCAACCTCACGTCACACTGCTGGGATCT TTCCACACTTGTGACTCCAGCCAGGCTGCGAAAGCTGAGCCTGGCAACAATGACCTGGGGCAGCTGGGGGT CATGATGTTCTGTGAAGTGTGAAACAGCAGAGCTGCTCTGCAAGACTGGGGTGTGTGAAATGTAATTTCAA TTATGAGACAAAAGTGGCTTGAACAACACTTCAAGAAAGCCTGACTGACCGTCTTTGAGCCTTCTTG GTAGGAGTGGAAACGGGGTCCAGACGCCAGTGTCTCCGGTCCCTCCAGTGGGGCCCTCAGGTGGAGAGA GCTGGATCCATCCAGGCCAAGACCAAGCTGTGATCTTCCGGTGGAGTGTGGAGAGAGAGGAGGCTTGGCCGAC GATGCCCTTCTGTGACAGCTTGGGCATCTCTTTAGCCAGGGTGGAAAGACACCAAGGACAATGACAGCATCG GGTGTGTGTGTCATCACAGCCCTCAGTTAGAGGATGTTCTTGGTGACCTCATGTAATAGCTCATTCATAAA AGCACTTCTTTATTT</p>
SEQ ID NO: 532	NM_001079821	<p>GTTCTGAGGCTGGCATCTGGGAAACCTTTCTTCCATGGCTCAGGACACACTCTGGATCGAGCCAACAGGAGA ACTTCTGTGTGGACCGAAGCCTAAGGACCTGAAACAACAGCTGCAGATGAAGATGGCAAGCACCCGCTGCAAGC TGGCCAGGTACTTGGAGGACTTGGAGGATGTGGACTTGAAGAAATTTAAGATGCACCTTAGAGGACTATCTCTCCC AGAAGGGCTGCATCCCTCCGAGGGGTCAACAGAGAGGCAAGCCTATGTGGATCTAGCCACGCTAATGATC GACTTCAATGGGGAGGAGAAGGGCTGGGCCATGGCCGTGTGGATCTTCGCTGGATCAACAGGAGAGACCTTTA TGAGAAAGCAAAAAGAGATGAGCCGAAAGTGGGGTTCAGATAATGCACTGTTTCCGAAATCCCACTGTGATGACC</p>

[0868]

AGGAAGACAGCAATTGAAGAGGAGTGGATTACTGGAGTACCTTTCCGAGAACTCTATTTTGTAAAATGAAGA
AAGATTACCGTAAGAAGTACAGAAAGTACGTGAGAGCAGATCCAGTGCATTTGAAGACAGGAATGCCCGTCTG
GGTGAGAGTGTAGCCTCAACAAACGCTACACAGACTGCGTCTCATCAGGAGACCCGGAGCCAGCAGGAGAG
GGAGCAGGAGCTTCTGGCCATCGCAAGACCAGACGTGTGAGAGCCCGTGTAGTCCCATTAAGATGGAGTTG
TGTTTGAACCCCGATGAGCAATCTGAGCCTGTGCACACCGTGTGTCCAGGGGGCCGAGGGATTGGGAAAA
CAATCTGGCCAGGAAGATGATGTTGGACTGGCGTCCGGGACACTCTACCAAGACAGGTTTGAATCTGTCT
ATATCCACTGTGAGAGGTGAGCCTTGTGACACAGAGGAGCCTGGGGACCTGATCATGAGCTGTGCCCGGACC
CAACCCACCCATCCACAGATCGTGAGAAAACCCCTCAGATCTCTCTCATGAGCGGTTTCGATGAGCTGC
AAGTGCCCTTTGACGAGACATAGGACCCCTCTGACTGGCAGAGAGCCGAGAGCCGAGGAGACATTTCTCCTG
AGCAGCCTCATCAGAAAGAGCTGCTCCGAGCCCTCTGCTCATCACAGACCTGTGGCCCTGGAGAAA
CTGCAGCACTTGTGGACCATCTCGGCATGTGGAGATCTGGGTCTCCGAGGCCAAAAGAAAGAGAGTACTTC
TTCAGTACTTCTGTGATGAGGCCCAAGCCAGGCCAGCTTCAGTCTGATTCAGGAGAAACGAGGTTCTTCCACC
ATGTGCTTCACTCCCTGTGCTGTGATCTGTGACTGGACTGAAACAGCAGATGGAGATGGCAAGAGCCTT
GCCAGACATCCAGACCAACACCGCGGTACTCTCTTCTTCCAGTTTGTCTCAGCCCCGGGAGGGAGC
CAGGACACGGCCTCTGCCCCACTCTGGGGCTCTGCTCTTGGTGCAGATGGAATCTGGAACCCAGAAAATC
CTGTTGAGGAGTCCGACCTCAGGAATCATGGACTGCAGAGGGCGATGTCTGCTTCTCTGAGGATGAACCTG
TTCCAAAAGGAAGTGGACTCGAGAAAGTTCTACAGCTTCTACATGACTTCCAGGATCTTTCGCCGCCATGT
ACTACTGTGGAAGGAAAAGGAAGGACGAACTTCCAGGGAGTCTTGAAGCTTCCAGCCGAGAC
GTGACAGTCTTCTGGAAAACATGGCAAATTCGAAAAGGGGTATTGTATTTTGTGTACGTTTCTCTTTGGCC
TGGTAAACCCAGGAGAGACCTCTACTTGGAGAAAGAAATTAAGTTGCAAGATCTCTCAGCAAATCAGGCTGGAG
CTGCTGAAATGGATTGAAGTGAAGCCAAAGCTAAAAGCTGACAGTCCAGCCAGCCAGCTGGAATTGTCTA
CTGTTTGTACGAGATGCAGGAGGAGACTCTGTCAAAGGGCCATGGACTATTCCCAAAGATTGAGATCAATCT
CTCCACAGATGGACCACATGGTTTCTTCTTTTGGCAATTGAGAACTGTCATCGGGTGGAGTCACTGTCCCTGGGG
TTTCTCCATAACATGCCCAAGGAGGAAGAGGAGGAAAGGAAGGCCGACACCTTGTATATGGTGCAGTGTGT
CCTCCCAAGCTCTCTATGCTGCCCTTCTCATGGATTGGTGAACAGCCACCTCACTTCCAGTTTTGCCGGGC
CTTTTTCACTTCTGAGCACCAAGCCAGAGTCTAACTGAAITGGACCTCAGTGACAATTTCTGGGGGACCCAGGG
ATGAGATGTTGTGAAACGCTCCAGCATCTGGCTGTAACATTCGGAGATTGGTTGGGGCGCTGTGGCCCTC
TCGCATGATGCTGCTCGACATCTCCTTGGTCTCAGCAGCAACCAAGAGCTGGAGCTGGACCTGAGCTGATGAC
AACGCCCTCGGTGACTTCGGAATCAGACTTCTGTGTGGACTGAAGCACCTGTTGTCAATCTGAAAGAGCTC
TGGTTGGTCACTGCTGCCATCAGCATGTCAGGATCTTGGACTTTCAGTATTTGAGACCACGCAATTCCTG
CCAGACTCTATGTGGGGAGAAATGCTTGGGAGACTAGGATCGCAATTTATGGAATAAGCCAAAGAAATCCA
CAGTGAACCTGCAGAAATCGGGTTGGTGAATCTGGCTTACGCTCAGTGTGTTGTTCCGCTTGTCTCGGTAC
TCAGCACTAATCAGAACTCACGCCACTTACCTGCGAGGCCAACACTCGGAGACAAAGGGATCAAACTACTCT
GTGAGGACTCTTGCACCCCGACTGCAAGCTTCAGGTGTGAAATAGACAACCTGCAACCTCACACTGCT
GCTGGGATCTTCCACACTTCTGACCTCAGCCAGACCTCGGAAAGCTGAGCTGGGCAACAATGACCTGGGG
ACCTGGGGTCAATGATGTTCTGTGAAGTGTGAACAGCAGAGCTGCCCTGCAACCTGGGGTGTGTGAA
TGTATTTCAATATGAGACAAAAGTGCCTTAGAAACACTCAAGAAAGAAAGCCCTGAGCTGACCCGCTCTTGG
AGCCTTCTGGTAGGAGTGGAAACGGGGCTGCCAGACGCCAGTGTCTCCGGTCCCTCCAGCTGGGGGCCCTCAG
GTGGAGAGAGCTGGATCCATCCAGGCCAAGACCACAGCTCTGTGATCCTTCGGGTGGAGTGTCCGGAGAAAGAGA

[0869]

SEQ ID NO: 533	NM_001127461	<p>GCTTGCCGACGATGCCTTCCCTGTGCAGAGCTTGGGCATCTCCTTTAGGCCAGGGTGAGGAAGACACCAGGACAAT GACAGCATCGGGTGTGTTGTCATCAGCGGCTCAGTTAGAGGATGTTCTCTTGGTGACCTCATGTAATTAGCT CAITCAATAAGCACATTTCTTTAATTT GTTCTGAGGCTGGCATCTGGATGAGGAAAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGTGTCCTCAATGTCCATATGACCCCC GTAATCAACGGGACAATAATTTCTGTGCTGATGGGTCAAGATGGCATCGTGAAAGTGGTGTGTCACCGTAAACTGTGA ATACAATCCCTGTTATGGATTGTGTCATATTTTCCCTCCATAGGGAACCTTTCTCCATGGCTCAGGCACACAC TCCTGGATCGACCAACAGGAGAACTTCTGGTAAGCATTTGGCTAACTTTTTTTTTTTTGTAGATGGAGTCTTGCT GTGCGCTAGGCTGGAGTGCAGTGGCGTGAATCTGGCTCACTGCAGCTCCACTTCCCGGGTTCATCAATCAATCTC CTACCTCAACTTCTGAGTAGCTGGGATACAGGGCCCGCCACACACCCGGTCAATTTTGTACTTTTAGTAGA GACACAGTTTTGCCATGTGGCCAGGCTGTGAATCTCAGCTCAGGTGATCTGCCTGCCCTGGCCTCTCAA AGTGTGGGATTACAGGCGTGAACACTGTGCCCGGCTGGCTAACTTTCAAAAATTAAGATTTTGACTTGTTA CAGTCAATGTGACATTTTTTCTTCTGTGTGCTGAGTTTTGATAATTTATATCTCTCAAAGTGGAGACTTTAAAAA AGACTATCCGTGTCCGTGTTCACTGCCGTGATCTTAGTGTGGACCGAAGCCTAAGGACCTGAAAACAGCTG CAGATGAAGATGGCAAGCACCCGTCAAGCTGGCCAGGTACTGGAGGACCTGGAGGATGTGGACTTGAAGAA ATTTAAGATGCACCTTAGAGGACTATCTCCCAAGAGGGTGCATCCCTCCCGAGGGTCAAGACAGAGAAGGC AGACCATGTGGATCTAGCCACGCTAATGATCGACTCAATGGGAGGAGAGGCTGGCCATGGCCGTGTGGA TCTTCGCTCGGATCAACAGGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAAAAGAGATGAGCCGAAGTGGGGTTCAGATAAT GCACGTGTTTCGAATCCCACTGTGATATGCCAGGAGACAGCATGAAAGAGGATGGATGGTTACTGGAGTAC CTTTCGAGAATCTATTTGTAAAATGAAGAAAGATTACCTGAAAGTACAGAAAGTACGTGAGAAGCAGATTC CAGTGCAATTGAAGACAGGAATGCCCTGTGGGTGAGGTGAGCCTCAACAAAGCTACACACGACTGCGTCTC ATCAAGGAGCACCGGACGACAGGAGAGGGAGCAGGAGCTTCTGGCCATCGGCAAGACCAAGACGTTGTGAGA GCCCGTGTCCATTAAGATGGAGTGTGTTGACCCCGATGATGAGCATCTGAGCTGTGCACACCCGTGG TGTTCCAGGGGGCGCAGGGAATTGGGAAAACAATCTGGCCAGGAGATGATGTTGGAATGGGCTCGGGGACA CTCTACCAAGACAGGTTGACTATCTGTTCTATATCCACTGTGAGAGGTGAGCCTTGTGACACAGAGGAGCCTG GGGACCTGATGATGACTGTGCCCGACCAACCCACCCATCCACAAGATCGTGAGAAAACCCCTCCAGAATC CTCTCTCATGGAAGGCTTCGATGAGTGCAGGTTGCCCTTGACGACACATAGGACCCGCTCTGCACTGACTGG CAGAAAGCCGAGCGGGAGACATCTCCTGAGCAGCCTCATCAGAAAGAAAGTGTCTCCGAGGCCCTCTCTGCTC ATCACCAAGACACTGTGGCCCTGGAGAAACTGACAGCCTTGTGGACCCTCCTGGCATGTGGAGATCCTGGGT TTCCTCCAGGGCCAAAAGGAAAAGTACTTCTCAAGTACTTCTCTGATGAGGCCCAAGCCAGGGCAGCCITCAGT CTGATTCAGGAGAACGAGGTCCTTCCACCATGTCTTCCCTTCCCTGGTCTGGATCTGTGCACTGGACTGA AACAGCAGATGGAGATGGCAAGAGCCTTGGCCAGACATCCAAGACCCACCCGGTGTACGTTCTCTTCTT CCAGTTTGTGACCCCGGGGAGGAGCCAGGAGCAGGCTCTGCCCCACTCTGGGGCTCTGCTCTTGG CTGCAGATGGAATCTGGAACAGAAAATCCTGTTTGAAGTCCGACCTAGGAATCATGGACTGCAGAAAGGCG GATGTGCTGCTTTCTGAGGATGAACCTGTTTCCAAAAGGAAGTGGACTGCGAAGTTCACAGCTTCTATCCAC ATGACTTTCCAGGAGTCTTTGGCCCATGTACTACTGCTGGAAAGGAAAAGGAAGGAAGGACGAAACGTTCCA GGGAGTCGTTTGAAGCTTCCAGCCGAGACGTGACAGTCTCTGGAAAACATATGGCAAATTCGAAAAGGGGTAT TTGATTTTGTGACGTTCTTGGCCCTGGTAAACCAGGAGGAGCCTCTACTGGGAAAGAAAATTAAGTT GCAAGATCTCTCAGCAAATCAGGCTGGAGTGTGAATGGATTGAAAGTGAAGCCAAAGCTAAAAGCTGCAG ATCCAGCCAGCCAGCTGGAATTTGTTCTACTGTTTGTACGAGATGCAGGAGGAGGACTCTGTGCAAAAGGGCCATG</p>
----------------	--------------	---

[0870]

		<p>GACTATTTCCCAAGATTGAGATCAATCTCCACCAGAATGGACCACATGGTTCTTCCCTTTGCAATTGAGA GTCAATCGGGTGGAGTCACTCCCTGGGGTTTCTCCATAACATGCCAAGGAGGAAGAGGAGGAGGAAAGGAA GGCCGACACCTTGATATGTTGAGTGTCTCCCAAGTCTCTCATGCTGCTTCTCATGCTGCTTCTCATGATGGATTGGTGAACA GCCACCTCACTTCCAGTTTTGCCGGGCCCTTTTTCAGTTCTGAGCACCAGCCAGAGTCTAAGTAACTGAAATTTGGACCT CAGTGACAAATCTCTGGGGACCCAGGATGAGAGTGTGTGTGAAACCGTCCAGCATCTGGCTGTAACTTCG GAGATTGTGGTGGGCGCTGTGGCTCTCGCATGATGCTTTCGACATCTCTTGGTCTCAGCAGCAACCAG AAGCTGTGGAGCTGGACCTGAGTGACAAACGCCCTCGGTGACTTCGGAATCAGACTTCTGTGTGGGACTGAAG CACCTTTGTGCAATCTGAAGAAGCTCTGGTTGGTAAATCTGGCCCTACGTCACTGTGTTTCAGCTTTGTCTC GGTACTCAGCACTAATCAGAAATCTCAGCACTTACTCGGAGGCAACACTCTCGGAGCAAGGGGATCAA ACTCTGAGGGACTCTTGACCCCGACTGCAAGCTCAGGTGTGGAAATAGACAATGCAACTCACCTCAC CTGCTGGGACTTCCACACTTCTGACTCCAGCCAGGCTGGAAAGCTGAGCTGGGCAACAATGACT GGCGACTGGGGTCAATGATGTTCTGTGAAGTGTGAACAAGCAGAGCTGCTCCTGCAGAACCTGGGGTGT TGAAATGATTTCAATTAAGAGACAAAGTGGTGAACAACACTTCAAGAAAGAAAGCCTGAGCTGACCGTCTG CTTTGAGCCTTCTGTAGAGTGGAAACGGGGCTGCCAGACGCCAGTGTCTCCGGTCCCTCCAGCTGGGGCC CTCAGGTGGAGAGCTGCGATCCATCCAGGCCAAGACCACAGCTCTGTGATCTTCCGGTGGAGTGTCCGGAGAA GAGACTTCCGACGATGCTTCTGTGACAGCTTGGCATCTCTTACGCCAGGGTGGAAAGACACCAGGA CAATGACAGATCGGGTGTGTGTGTCATCAGCGCCTCAGTAGAGGATGTCTTGTGTTGACCTCATGTAAT AGTCAITCAATAAAGCACITTCITATTTT</p>
SEQ ID NO: 534	NM_001127462	<p>GTTCTGAGGCTGGCACTGGATGAGGAAACTGAAATTTGAGAAATAGTGAAGTGTTCCTCAATGTCATAGCCCC GTAATCAACGGGACAAAATTTTCTGTCTGATGGTCAAGATGGCATGCTGAAAGTGGTGTTCACCGTAAACTGT AATAAATCTGTTATGGATTTGTTGCAATATTTCCCTCCATAGGAAACCTTCTCCATGGCTCAGGACACA CTCTGGATCGAGCAACAGGAGAACTTCTGTAAAGATTTGGTAACTTTTTTTTTTGTGAGTGGAGTCTTGC TGTGCGCTAGGCTGGAGTGCAGTGGCTGATCTTGGTCACTGCAGCTCCACTTCCCGGGTCAATCAATCT CCTACCTCAACTTCTGAGTAGCTGGGATACAGGGCCCGCCACACACCCGGCTCATTTTTGTACTTTTAGTAG AGACACAGTTTTGCCATGTTGGCCAGGCTGTTGAAATCTCAGCTCAGGTGATCTGCCTTGGCCTCTCA AAGTGTGGGATACAGGCTGAGCCACTGTGCCCGGCCCTTGGCTAACTTTCAAAATTAAGATTTTGTACTTGT ACAGTCAATGACATTTTTTCTTCTGTGTGCTGATTTTTGATAATTTATACTCTCAAAGTGGAGACTTTAAA AAGACTATCCGTGTCCGTGTTCACTGCTGTTATCTAGTGTGGACCGAAGCCTAAGGACCTGAAACAAGCT GCAGATGAAGATGGCAAGCACCCGCTGCAAGCTGGCCAGTACTTGGAGGACCTGGAGGATGTGGACTTGAAGA AATTAAGATGCACTTAGAGGACTATCTCCCAAGAGGGTGCATCCCTCCCGAGGGTCCAGACAGAGAAG GCAGACCATGTGGATAGCCACGTTAATGATCGACTCAATGGGAGGAGAGGCTGGGCCATGGCCGTGTG GATCTCCGTGCGATCAACAGGAGAGACTTTATGAGAAAGCAAAAAGATGAGCCGAAGTGGGGTTCAGATA ATGCACGTGTTTCGAATCCACTGTGATATGCCAGGAGACAGCATTTGAAGAGGATGGTGGTTTACTGGAGT ACCTTTCGAGAACTCTATTTGTAATAAGAAAGATTTCCGTAAAGATACAGAAAGTACGTGAGAAGCAGA TTCCAGTGCATTTGAAGACAGGAATGCCCTGTGGTGTGAGTGTGAGCTCAACAAACGCTACACACGACTGGT CTCATCAAGGAGCACCGGAGCCAGCAGGAGGGGAGCAGGACTTCTGGCCATCGGCAAGACCAAGACGTGTGA GAGCCCCGTGAGTCCCAATTAAGATGGAGTTGTTGTGACCCCGATGATGAGCATCTGAGCTGTGCACACCGT GGTGTCCAGGGGGCGCAGGATTTGGGAAACAATCTGGCCAGGAAGATGATGTTGGACTGGGCGTCCGGGA CACTCTACCAAGACAGGTTTACTACTGTCTATATCCACTGTGAGAGGTTGAGCCTTGTGACACAGAGGAGCC</p>

[0871]

<p>TGGGGACCTGATCAGCTGCTGCCCGACCCAAACCCACCCATCCACAAGATCGTGAGAAAACCCCTCCAGA ATCCTCTCCATGGAAGGCTTCGATGAGCTGCAAGGTGCCCTTTCAGCGACACATAGGACCCGCTCGACTGACT GGCAGAAAGCCGAGCGGGGAGACATCTCCTGAGCAGCCTCATCAGAAAGAAAGCTGCTCCCGAGGCCCTCTG CTCATCCACAGACCTGTGGCCCTGGAGAACTGCAGACTTGTGGACCATCTCGGATGGAGATCCTG GGTTCTCCGAGGCCAAAGGAAAGAGTACTTCTCAAGTACTTCTGTAGAGGCCAAAGCCAGGGCAGCCTTC AGTCTGATTCAGGAGAACGAGGCTCTTCCACCATGTCTCATCCCTGTCTGCTGGATCGTGTGCACTGGAC TGAAACAGCAGATGGAGATGGCAAGAGCCTTGGCCAGACATCCAAAGACCCACCGGGTGTACGCTCTCTCC TTTCCAGTTTGTGAGCAGCCCGGGAGGGAGCCAGGAGCAGGCCCTCTGGCCACCTCTGGGGCTCTGCTCTT TGGCTGCAGATGGAATCTGGAACCCAGAAATCTCTGTGTGAGGAGTCCGACCTCAGGAATCATGGACTGCAGAAG GCGGATGTCTGCTTCTGAGGATGAACCTGTCCAAAGGAAGTGGACTCGGAGAAGTCTACAGCTTCATC CACATGACTTCCAGGATCTTGTCCGCCATGTACTACCTGTGGAGAGGAAAAGAAAGGAAAGGACGAT CCAGGGAGTCGTTGAAGCTTCCAGCCGAGACGTGACAGTCTTCTGGAAAATATGGCAAAATTCGAAAAGGG GTATTTGATTTTGTGACGTTCTTGTGGCTGGTAAACCAGGAGAGGACCTCTACTTGGAGAAAGAAATTA AGTTGCAAGATCTCAGCAAAATCAGGCTGGAGCTGAAATGGATTGAAGTGAAGCCAAAGCTAAAAGCT GCAGATCCAGCCAGCTGGAATTTGTCTACTCTGTGACGAGATGCAGGAGGAGGACTTCTGTGCAAGGGC CATGGACTATTTCCCAAGATTGAGATCAATCTCCACCAGATGGACCACATGGTTTCTTCTTTTGCATTGAG AACTGTATCCGGTGGAGTCACTGCTCCCTGGGTTTCTCCATAACATGCCCAAGGAGGAAAGAGGAGGAA GGAAGCCGACACTTGATATGGTGCAAGTGTCTCCCAAGCTCTCTCATGCTGCTGTCTCATGGGTTGGGG CGCTGGCCCTCAGCATGATGCTGCTTTCAGACTCTCTTGTGCTCAGCAGCAACCAAGACTGGTGGAGCTG GACCTGAGTGACAACGCCCTCGGTGACTTCGGAATCAGACTTCTGTGTGGACTGAAAGCACCCTGTGTGCAAT CTGAAGAAGCTCTGTTGTCAGCTGCTGCATCAGCATGTTGTCAGGATTTGATCAGTATTGAGCACCA GCCATCCCTGACCAGACTCTATGTGGGGGAGAAATGCCCTGGGAGACTCAGGAGTCCCAATTTTATGTGAAAAAG CCAAGAAATCCACAGTGAACCTGCAGAAAATGGGGTTGGTGAATTCGGCCCTTACGTCAGTCTGTGTTCAGCTTT GTCTCCGTTACTCAGCACTAATCAGAAATCTACGCACCTTTACCTCGGAGGCAACACTCTCGGAGACAAGGGGAT CAAACTACTCTGTGAGGACTTGTGACCCCGACTGCAAGCTTCAAGTGTGGAAATAGACAACTGCAACCTCAC GTCACACTGCTGGGATCTTCCACACTTCTGACTCCAGCCAGAGCCTGCGAAAGCTGAGCCTGGGCAACAA TGACCTGGCGACTGGGGTCAATGATGTTCTGTGAAGTGTGAAACAGCAGAGCTGCCTCTGAGAACCTGGG GTTGCTGAAAATGATTTCAATATAGACAAAAGTGGTTAGAAACACTTCAAGAAAAGCAAGCTGAGCTGAC CGTCGCTTTGAGCCCTTGTGAGAGTGGAAACGGGGCTGCCAGACGCCAGTGTCTCCGGTCCCTCCAGCTG GGGGCCCTCAGGTGGAGAGACTGCGGATCCATCCAGGCCAAGCAGCCAGCTCTGTGATCTTCCGGTGGAGTGC GGAGAAAGAGCTTCCGACGATGCCCTTCTGTGACAGACTTGGGCATCTCTTACGCCAGGGTGGAGAGACA CCAGGACAAATGACAGCATCGGCTGTTGTGTCATCAGCGCCCTCAGTTAGAGGATGTTCTTGTGGTACCTCAT GTAATTAGCTCAITCAATAAAGCAGCTTCTTTAATTTT</p>	
<p>SEQ ID NO: 535-537</p>	
<p>SEQ ID NO: 538</p>	<p>半胱天冬酶 1 底物 Asn-Glu-Ala-Tyr-Val-His-Asp-Ala-Pro-Val-Arg-Ser-Leu-Asn</p>

[0872]

SEQ ID NO: 539	对应于 NM—004895.1 的 NLRP3 蛋白	MKMASTRCKLARLYLEDLEDVLDLKKFKMHLEDPYPPQKGCIPLPRGQTEKADHVDLATALMIDFNGEEEKAWAMA VVWIFA AINRRDLYEKAKRDEPKWGSNDARVSNPTVICQEDSIEEEWMGLLEYLSRISICKMKDYRKKYRKYVRSRFQCIEDR NARLGESVSLNKRYYTRLRRLIKEHRSQEREQELL.AIGKTKTCESPVSPKMELELFDPPDDEHSEPVHTVVFQGAAGIGKTI LARKMMLDWASGTLYQDRFDYLFYIHCREVSLVTQRSLGDLIMSCCPDPNPIHKIVRKPRIKFLMDGFDELQGAFFE HIGPLCTDWQKAERGDILLSSLIRKLLPEASLLITRPALEKQLHLLDHPRHVEILGFSEAKRKEYFFKYFSDEAQAAR AASFLLIQENEVLFMCFIPLVCWIVCTGLKQOMESGKSLAQTSKTTTAVYVFFLSSLQPRGGSQEHGLCAHLWGLCSL AADGIWNQKILFEESDLRNHGLQKADVSAFLRMNLFQKEVDCEKFSFIHMTFQEFFAAMYLLLEEEKEGRNTNVPGSR LKLPSRDVTVLLENYGGKFEKGYLJFVVRFLFGLVNOERTSYLEKKL.SCKISQOIRLELLK.WIEVKAKAKKIQIPQSLEL FYCLYEMQEEFVQRAMIDYFPKIEINLSTRMDHMVSSFCIENCHR.VESLSLGFHNMPKEEEEEKEGRHLDMMVQCVL PSSSHAA.CSHGLVNSHL.TSSFCRGLFVLSSTQSLSLTELDSNLSLGDPMRVLCE TLQHPGCNIRRL.WLGRCLG.SHECC FDISLV.SSNQKLVELDLSNALGDFGIRLLCVGLKHLNCKL.WLVSCCLTSACQDLASVLSLSTSHSLTRL.YVGENA LGDSGVAIL.CEKAKNPQCNLQK.LGLVNSGLTSVCCSAL.SSVLSTNQNL.THL.YLRGNTLGDKGIKLLCEGLLHPDCKLQ VLELDNCNL.TSHCCWDLSTLL.TSSQSLRKL.SLGNNDL.GDLGVMMFCEVLKQQSCLLQNL.GLSEMYFNYYETKSALETL QEEKPELTVVFEPSW
SEQ ID NO: 540	NLRP3 炎性小体抑制剂	GUGCAUUGAAGACAGGAAUTT
SEQ ID NO: 541		GGCTGTAAACATTCGGAGATTG
SEQ ID NO: 542		TCATCATCCCGCTATCTTC
SEQ ID NO: 543		CCGTAAGAAGTACAGAAAGTA
SEQ ID NO: 544		GAGACTCAGGAGTCGCAATTT
SEQ ID NO: 545		CCTCATGTAATTAGCTCATTC
SEQ ID NO: 546		GTGGATCTAGCCACGCTAATG
SEQ ID NO: 547		CCACAGTGTAACCTGCAGAAA
SEQ ID NO: 548		CCAGCCAGAGTCTAACTGAAT
SEQ ID NO: 549		GCGTTAGAAACACTTCAAGAA
SEQ ID NO: 550		GCTGGAATTGTTCTACTGTTT

[0873]

SEQ ID NO: 551		CCACATGACTTTCAGGAGTT
SEQ ID NO: 552-586	参见说明书中表 5B	
SEQ ID NO: 587	成熟的 miR-9 (MIMAT0000441)	UCU UUG GUU AUC U AG CUG UAU GA
SEQ ID NO: 588	hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
SEQ ID NO: 589	miR-223	TGGGGTATTTGACAAACTGACA
SEQ ID NO: 590	cbn-mir-233 MI0024890	UCGCCCAUCCCGUUGUCCAAUAUUCCAACAAGUGAUUAUUGAGCAAUGCGCAUGUGCGG
SEQ ID NO: 591	cbr-mir-233 MI0000530	AAGCAUUUUUCUGCCCGGCAUCCCUUUGUCCAAUAUCAAACCAGUAGAAAAGAUUAUUGAGCAAUGCGC AUGUGCGGGACAGAUUGAAUAGCUG
SEQ ID NO: 592	cel-mir-233 MI0000308	AUAUAGCAUCUUUCUGUCUGCCCAUCCCGUUGCUCCAUAUUCUAACAACAAGUGAUUAUUGAGCAAUGCGC CAUGUGCGGGAUAGACUGAUGGCGUC
SEQ ID NO: 593	crm-mir-233 MI0011059	UGAAGCGUCUCUCUGUCCCGCUCAUCCUGUUGUCCAAUAUCCAACAAGCCAGUGAUUAUUGAGCAAUGCGC AUGUGCGGGACAGAUUGAUGCUGCCAU
SEQ ID NO: 594	hsa-miR-22-5p MIMAT000449	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
SEQ ID NO: 595	hsa-mir-22 MI0000078	GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUAUUGUCCUGACCCAGCUAAAAGCUGCCAGUUGAAGAACU GUUGCCUCUGCC
SEQ ID NO: 596	mmu-miR-33-5p or MIMAT0000667	GUGCAUUGAUGUUGCAUUGCA
SEQ ID NO: 597	mmu-mir-33 MI0000707	CUGUGGUGCAUUGAUGUUGCAUUGUUGGCAUACCUGUGCAAUUGUUUCCACAGUGCAUCACGG

[0874]

SEQ ID NO: 598	AIM2 (NP_004824.1)	MESKYKEILLTGLDNIIDEELDRFKFFLSDFNIAITGKLTANRIQVATLMIQNAGAVSVMKTIKRIQKLNMYMLLAKRLQEEKEKVDKQYKSVTKPKPLSQAE MSPAASAAIRNDVAKQRAAPKVSHPHVKPEQKQMVAAQESIREGFQKRCPLPVMVLKAKKPFTEQEGKQEMFHATVAATEKEFFVKVFNTLLKDKFKPIKRIIIARIYRHSGFLEVNSASRVLDAESDQKVVNPLNIIRKAGETPKINTLQTPPLGIVNGLFVVQKVTTEKKKNILFDLSDNTGKMEVGLVGRNEDTMKCKEGDKVRLTFFTL-SKNGEKLQLTSGVHSTIKVIKAKKKT
SEQ ID NO: 599		
SEQ ID NO: 600	人 Aim 2 (NM_004833.2)	ATAGACATTTCTTCTGTGGCTGTAGTGAGAACCCAAACCAGCTCAGCCAAATTAGAGTCCAGTTGTCACCTCCTA CCCACACTGGGCTGGGGTGAAGGAAAGTGTATTAGGGGTACATGTGAAGCCGTCAGAAAGTGTACAGAGTCT TGTAGCTTTGAAAGTACCTAGGTTATTTGGGCATGCTCTCTGAGTCTCTGCTAGTTAAGCTCTCGAAAAGA AGTGGCAGACCCGGTTTGTGATCGCCCGAGGATCAGGAGGCTGATCCCAAAGTTGTCAGATGGAGAGTAAA TACAAGGAGATACTTTGCTAACAGGCTGGATAACATCACTGATGAGGAACTGGATAGGTTAAGTTCTTCTTT CAGACGAGTTAATATTGCCACAGGCAAACTACATACTGCAAAACAGAATACAAGTAGTACCTACCTTGATGATTCAAA ATGCTGGGGCGGTGCTGCAGTGAAGACCATTCTGATTTTTCAGAAAGTTGAATATATGCTTTTGGCAAAACG TCITTCAGGAGGAGGAGAAAGTTGATAAGCAATACAAATCGGTAAACAACCAAGCCACTAAGTCAAGCTG AAATGAGTCTGTGATCTGCAGCCATCAGAAATGATGTCGCAAGCAACGCTGCTGCCCAAAAGTCTCTCCTC ATGTTAAGCCTGACAGAAACAGATGGTGCCAGCAGGAATCTATCAGAGAAGGTTTCAGAAAGCGCTGTTTG CCAGTTATGTTACTGAAAGCAAGAAGCCCTTTCAGTTTGAGACCCAAAGAGGCAAGCAGAGATGTTTCATGCT ACAGTGGCTACAGAAAAGGAATTTCTTTGTAAAAGTTTTAATACACTGCTGAAAGATAAATTCATTCCAAAG AGAATAATTATAATAGCAAGATATTATCGGCACAGTGGTTCTTAGAGGTAATAGCGCCTCACGTGTGTAGAT GCTGAATCTGACCAAAAAGGTTAATGTCCTGAAACATTATCAGAAAAGCTGGTGAACCCCGAAGATCAACAC GCTTCAAATCAGCCCTTGGAAACAATTGTGAATGGTTTGTGTAGTCCAGAGGTAACAGAAAAGAAAGAAAAA CATATTTTGAACCTAAGTGACAAACACTGGGAAAATGGAAAGTACTGGGGGTTAGAAACGAGGACACAAATGAAAT GTAAGGAAGGAGATAAGGTTTCGACTTACATTTCTCACACTGTCAAAAATGGAGAAAACACTACAGCTGACATCT GGAGTTCATAGCACCAATAAAGGTTAATAAGGCCAAAATAAAGGACATAGAGAAATGTAAGGCAATTCAGAGCC AACTGGTCTAAGCAGCATTTAATTGAAGAATATGTGATACAGCTCTTCAATCAGATTGTAAGTTACCTGAAAGC TGCAGTTCACAGGCTCCTCTCCACCAAATTAGGATAGAATAATTGCTGGATAACAAATTCAGAATATCAACA GATGATCACAATAAACATCTGTTTCTCATTCAA
SEQ ID NO: 601	AIM2 炎性小体抑制剂	CCCGAAGATCAACACGGTTCA
SEQ ID NO: 602	A151	TTAGGGTTAGGGTTAGGGT
SEQ ID NO: 603	C151	TTCAAATTCAAATTCAAATTCAAA

[0875]

SEQ ID NO: 604		TTAGGG
SEQ ID NOs: 605-610	参见说明书中表 5C	<p>ATACTTTCAGTTTCAGTCACACAAGAAAGGGAGAGAGAAAAGCCATGGCCGACAAAGGTCCTGAAAGGAGAAGAGA AAGCTGTTTATCCGTTCATGGGTGAAGGTACAATAAATGGTCTACTGGATGAATATTACAGACAAGGGTGGCTG AACAAAGGAAGATGGAGAAAGTAAACGTGAAAATGCTACAGTATAGGATAAGACCAGCTTTGATTGACTC CGTTATCCGAAAGGGCACAGGCATGCCAAATTTGCATCACATACATTTGTGAAGAAGACAGTACCTGGCAGG GACGCTGGACTCTCAGCAGATCAAAACATCTGAAATTTACCTAATATGCAAGACTCTCAAGGAGTACTTTCTC CTTTCCAGCTCTCAGGCAGTGCAGGACAACCAGCTATGCCACATCCTCAGGCTCAGAAGGGAATGTCAAAGCT TTGCTCCCTAGAAGAAGCTCAAAGGATATGGAAACAAAAGTCCGACAGAGATTTATCCAATAATGGACAAGTCAA GCCGCACACGTTCTCATTTATCTGCAATGAAGAATTTGACAGTATTCCTAGAAGAAGTGGAGCTGAGGTTG ACATCACAGGCATGACAATGCTACAAAATCTGGGGTACAGCCTAGATGTGAAAAAAAATCTCACTGCTTCGG ACATGACTACAGAGCTGGAGGCAATTTGACACACCGCCAGAGCAAGACCTCTGACAGCACGTTCTGGTGTTC TGCTCATGGTATTCGGGAAGGCATTTGTGGGAAGAAACACTCTGAGCAAGTCCAGATATACTACAACCTCAATG CAATCTTTAACATGTTGAATACCAAGAAGTCCCAAGTTTGAAGGACAAACCCGAAGGTGATCATCATCCAGGCT GCCGTGGTACAGCCCTGGTGTGGTTTAAAGATTCAGTAGGAGTTCTGGAAACCTATCTTACCAACTAC AGAAGATTTGAGGATGCTATTAAGAAAGCCACATAGAGAAGGATTTTTCGCTTCTGCTTCCACACC AGATAATGTTTGGAGACATCCCAATGGCTCTGTTTTATTGGAAGACTCATTGAACATATGCAAGAATAT GCCTGTTCCCTGTGATGTGGAGGAAATTTCCGCAAGGTTCCGATTTTCAATTTGAGCAGCCAGATGGTAGAGCGCAG ATGCCACCACTGAAAGAGTGACTTTGACAAGAATGTTTCTACCTCTCCAGGACATTAATAAAGGAAACTGTA TGAATGCTGTGGGCAGGAAGTGAAGATCCTCTGTAAAGGTTTTTGGAAATATGCTGCTGAATAATAAACT TTTTTGAAATAATAAATCTGGTAGAAAATGAAAAA</p> <p>MADKVLKEKRKLFIRSMGEGTINGLLDELLOTRVLNKEEMEKVKRENATVMDKTRALIDSVIPKGAQCQICTYICEE DSYLAGTLGLSADQTSNGNYLNMQDSQGVLSFFPAPQAVQDNPAMPFTSSGSEGNVKLCSLEEAOQRIWKQKSAEIIYPIMD KSSRTRLALJICNEEFDSIPRRRTGAEVDITGMTMLLQNLGYSDVVKKNL.TASDMTTELEAFHRPEHK.TSDSTFL.VFMS HGIREGICGKHKHSEQVPDILQLNAIFNMLN.TKNCPSL.KDKPK.VIIIQACR.GSDSPGV.VVFKDSVGV.SGNLSLPTTEEFEDD AIKK.AHIEKDFIAFC.SSTPDNV.SWRHPTMGSVFIGRLIEHM.QEYAC.SCDV.EE.IFRK.VRFSFEQPDG.RAQMQMPTTTERVTLTR CFYLFPGH</p>
SEQ ID NO: 611	NM_033292.3	
SEQ ID NO:612	NP_150634.1 人半胱天冬酶 1 蛋白	
SEQ ID NO: 613-619	参见说明书中表 5E	
SEQ ID NO: 620-664	参见说明书中表 5F	
SEQ ID NO: 665	AIM2 炎性小体抑制剂	AAAGGTTAATGTCCCGCTGAA

[0877]

SEQ ID NO: 884	截短的胞质 LANA 同种型 (ORF73)	MAPPGMRLRSRSTGAPLTRGSCRKRNRSPERCDDLHQLQRRKHVADSVDGRECGPHLPIPGSPTVFTSGLPAFVSSPTLPVAPIPSAPATLPPALLPPVTTSSSPPHPVSPGTTDTHSPSPALPPTQSPESQRPPPLSSPTGRPDSSTP
SEQ ID NO: 885	miR-25	GGCCAGTGTGAGAGCGGAGACTTGGGCAATTGCTGGACGCTGCCCTGGGCAATTGCACCTTGTCTCGGTCGTGACA GTGCCCGCC
SEQ ID NO: 886	miR-93	CTGGGGCTCCAAAGTCTGTTCGTGCAGGTAGTGTGATTACCCAACTACTGCTGAGCTAGCACCTTCCCGAGCC CCCCCG
SEQ ID NO: 887	TLR9 抑制性寡核苷酸	5'-CCTN(3-5)G(3-5)RR-3'
SEQ ID NO: 888	TLR9 抑制性寡核苷酸	TTAGGGn
SEQ ID NO: 889	ODN-2088	TCCTGGCGGGGAAGT
SEQ ID NO: 890	ODN-2114	TCCTGGAGGGGAAGT
SEQ ID NO: 891	聚 G	GGGGGGGGGGGGGGGGGG
SEQ ID NO: 892	ODN-A151	TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
SEQ ID NO: 893	G-ODN	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT
SEQ ID NO: 894	IRS-869	TCCTGGAGGGGTTGT
SEQ ID NO: 895	INH-1	CCTGGATGGGAAATCCCATCCAGG
SEQ ID NO: 896	INH-4	TTCCTATCCAGGCCTGGATGGAA
SEQ ID NO: 897	IRS-661	TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA
SEQ ID NO: 898	4024	TCCTGGATGGGAAGT
SEQ ID NO: 899	4084F	CCTGGATGGGA
SEQ ID NO: 900	INH-13	CTTACCGCTGCACCTGGATGGAA

[0878]

SEQ ID NO: 901	INH-18	CCTGGATGGAACTTACCGCTGCA
SEQ ID NO: 902	IRS-954	TGCTCCTGGAGGGTTGT
SEQ ID NO: 903	AS1411	GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGG
SEQ ID NO: 904	半胱天冬酶 1 抑制剂	GAA GGC CCA UAU AGA GAA A
SEQ ID NO: 905	AAV1 5' WT-IJR (左)	TTGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTGGGGCCTCGGACCAAAGTCCGACAGCGCAGA GGTCTCCTCTGCCGGCCCCACCGAGCGGACGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCAACTCCATCACTAGGGTAA
SEQ ID NO: 906	AAV1 3' WT-IJR (右)	TTACCCTAGTATGGAGTTGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGTGGGGCCGGCAGAGGACCTC TGCCGTCTGGGACCTTTGGTCCGAGGCCCCACCGAGCGAGCGGCGCAGAGGGAGTGGCAA
SEQ ID NO: 907	AAV2 5' WT-IJR (左)	CCTGACGGCAGCTGCGCTCGTCTACTGAGGCCCGCCGGGCAAGCCCGGGCGTGGGGGACCTTTGGTC GCCCCGCTCAGTAGCGAGCGAGCGGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT
SEQ ID NO: 908	AAV2 3' WT-IJR (右)	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGTCTGCTCACTGAGGCCGGGCAACAAAGG TCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTAGCGAGCGGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
SEQ ID NO: 909	AAV3 5' WT-IJR (左)	TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCTCGTGGGGCCTGGCGACCAAAGTCCGACAGACGGACGTGGTT TCCACGTCCGGCCCCACCGAGCGGAGTGCAGTAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGAGGTAT
SEQ ID NO: 910	AAV3 3' WT-IJR (右)	ATACCTTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGTCTGGTGGGGCCGGACGTGGAAACCCA CGTCCGTCTGGCGACCTTTGGTCCGCCAGGCCACCGCCCGAGCGAGTGGCATAGAGGGAGTGGCCAA
SEQ ID NO: 911	AAV4 5' WT-IJR (左)	TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGGTCTCCAGACTGCCGGCCTTG GCCGGCAGGGCCGAGTAGTGAGCGGAGCGCGCATAGAGGGAGTGGCCAACT
SEQ ID NO: 912	AAV4 3' WT-IJR (右)	AGTTGGCCACATTAGCTATGCGCGCTCGTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGGTCTCCAGACTGCCGGCCT CTGGCCGGCAGGGCCGAGTAGTGAGCGGCGCATAGAGGGAGTGGCCAA
SEQ ID NO: 913	AAV5 5' WT-IJR (左)	TCCCCCTGTGGGTTCGCTCGTGGTCTGTTGGGGGGCGACGGCCAGAGGGCCGTCTGGCAGCTCT TTGAGCTGCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGGAGCGAACCGCACAGGGGGAGAGTGCCCACTCTCAAGC AAGGGGGTTTTGTAAG
SEQ ID NO: 914	AAV5 3' WT-IJR (右)	CTTACAAAACCCCTTGTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCTGTGCGTTCGCTCGCTGGCTGTTGGG GGGTGGCAGCTCAAAGACTGCCAGACGCGGCCCTCTGGCCCTGCCCCCCCAACGAGCCAGCGGAGCGG

[0879]

SEQ ID NO: 915	AAV6 5' WT-ITR (左)	AACGCGACAGGGGGGA
SEQ ID NO: 916	AAV6 3' WT-ITR (右)	TTGCCACTCCCTCTAATGGCGCTCGCTCGCTCGGTGGGCTCGGACCAAGGTCCCGCAGACGGCAGAGGTC TCCTCTGCCGGCCCCACCGAGCGAGCGCGCATAGAGGGAGTGGCAACTCCATCACTAGGGGTAT ATACCCCTAGTATGGAGTTGCCACTCCCTCTATGGCGGCTCGCTCGCTCGGTGGGCGGCGCAGAGGACCTC TGCCGTCTGCCGACCTTTGGTCCGACGGCCCCACCGAGCGGAGCGGCGCATTAGAGGGAGTGGGCAA

名称	序列	SEQ ID NO:
右 ITR-18	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCGCACGCCCGGGTTT CCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCTGCAGG	917
右 ITR-19	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGACGCCCGGGCTT TGCCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCTGCAGG	918
右 ITR-20	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGGCGACCAAG GTCGCCGACGCCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGGCGCAGCTGCTGCAGG	919
右 ITR-21	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCTTTGCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCTGCAGG	920
右 ITR-22	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGGCGACAAAGT CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCTGCAGG	921
右 ITR-23	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGGCGAAATCG CCCCAGGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGGCGCAGCTGCTGCAGG	922
右 ITR-24	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGGCGAAACGCC CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGGCGCAGCTGCTGCAGG	923
右 ITR-25	AGGAACCCCTAGTATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTACTGAGGCCGGCGAAACGCCCG ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGCCTCAGTAGCGAGCGAGCGGCGCAGCTGCTGCAGG	924

[0880]

右 ITR- 26	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGTTTCCCGGGGGCCTCAGTGAGCGGAGCGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	925
右 ITR- 27	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGTTTCCCGGGGGCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	926
右 ITR- 28	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGTTTCCCGGGGGCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	927
右 ITR- 29	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGTTCGGGCGGCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	928
右 ITR- 30	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCTTGGCGGCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	929
右 ITR- 31	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCTTTCGGGCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	930
右 ITR- 32	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGTTTCGGGCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	931
右 ITR- 49	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGGCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	932
右 ITR- 50	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCAAAG GTCGCCCGACGCCCGGCGCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGGCGAGCTGCCTGCAGG	933
左 ITR- 33	CCTGACGGCAGCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGGAAACCCCGGGCGTGGCCTCAGTGAGCGGAG CGAGCGGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT	934
左 ITR- 34	CCTGACGGCAGCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGGGCGACCTTTGGTCCCGGCTCAGTGAGCGG AGCGAGCGGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT	935

[0881]

左 ITR- 35	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	936
左 ITR- 36	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGGCCCCGGCGCTGGCGGACCTTTGGTCCGCCCGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	937
左 ITR- 37	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGGCAAAGCCTCAGTGAGCGAGCGGCGCAGAGAGGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	938
左 ITR- 38	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGGACTTTGTGCG CCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	939
左 ITR- 39	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGGATTTTCGGCC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	940
左 ITR- 40	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGGTTTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	941
左 ITR- 41	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGTTCGCCCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	942
左 ITR- 42	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGGACCTTTGGTGC CCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	943
左 ITR- 43	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGGACCTTTGGTGC CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	944
左 ITR- 44	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGCCCGGGCGTCGGCGGACCTTTGGTGC GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	945
左 ITR- 45	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGTCACTGAGGCCGCCCGGCAAAAGGGGCGTCGGCGGACCTTTGGTGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT	946

[0882]

左 ITR- 46	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGGCGTCGGGGGACCTTTGGTCGCCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT	947
左 ITR- 47	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGCGTCGGGGGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT	948
左 ITR- 48	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCAAAGCGTCGGGGGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT	949
VH-02	MDWTWRILFLVAATGAHS	950
VK-A26	MLPSQLIGFLLLVVPSARG	951

[0883] 参考文献

[0884] 1. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. J.T.Crowl et

al., *Annu.Rev.Immunol.*2017,35:313-336

[0885] 2. Innate Immune Recognition of DNA: a recent history. A. Dempsey and A. G. Bowie, *Virology* 2015 May, 0:146-152

[0886] 3. Cutting Edge: Antimalarial Drugs Inhibit IFN- β Production through Blockade of Cyclic GMP-AMP Synthase-DNA Interaction. J. An et al., *J. Immunol.* March 27, 2015

[0887] 4. Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice. J. Vincent et al., *Nature Communications*, 8:750

[0888] 5. Discovery of PF-06928215 as a high affinity inhibitor of cGAS enabled by a novel fluorescence polarization assay. *PLoS ONE*. September 21, 2017

[0889] 6. The functional interactome of PYHIN immune regulators reveals IFIX is a sensor of viral DNA. B. A. Diner et al., *Molecular Systems Biology*, 2015, 11: 787

[0890] 7. Activation and Regulation of DNA-Driven Immune Responses. S. R. Paluden. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015. 79 (2) :225

[0891] 8. Viral Evasion of DNA-stimulated innate immune responses. M. H. Christnesen and S. R. Paluden. *Cellular and Molecular Immunology*. 2017. 14:4- 13

[0892] 9. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. A. M. Herzner et al., 2015. *Nature Immunology*

[0893] 10. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type-I Interferons Through the RIG-I Pathway. Y. H. Chiu et al. 2009. *Cell*. 138 (3) :576-591

[0894] 11. Mi-R-25/93 mediates hypoxia-induced immunosuppression by repressing cGAS. M. Z. Wu et al. 2017. *Nat. Cell Biol.* 19 (10) :1286-1296

[0895] 12. Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. Zhang G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 23; 113 (8) :E1034-43.

[0896] 13. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibitor of cGAS (KicGAS) Encoded by ORF52, is an Abundant Tegument protein and Is Required for Production of Infectious Progeny Viruses. W. Li, et al., *J. Virol.* 2016, 90 (11) : 5329.

序列表

	<110> 世代生物公司 (GENERATION BIO CO.)	
	<120> 闭合端 DNA (ceDNA) 及其在减少与基因或核酸疗法相关的免疫应答的方法中的用途	
	<130> 131698-03320	
	<140> 62/796, 417	
	<141> 2019-01-24	
	<140> 62/796, 450	
	<141> 2019-01-24	
	<140> 62/800, 285	
	<141> 2019-02-01	
	<140> 62/800, 303	
	<141> 2019-02-01	
	<140> 62/814, 414	
	<141> 2019-03-06	
	<140> 62/814, 424	
	<141> 2019-03-06	
	<140> 62/857, 542	
	<141> 2019-06-05	
	<150>	
	<151>	
	<160> 190	
[0001]	<170> PatentIn 版本 3.5	
	<210> 952	
	<211> 141	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成 多核苷酸	
	<400> 952	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcgccctca gtgagcgagc	120
	gagcgcgcag ctgcctgcag g	141
	<210> 953	
	<211> 141	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 多核苷酸	
	<400> 953	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc	60
	gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
	actccatcac taggggttcc t	141

<210> 954	
<211> 130	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 954	
aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc	120
tgcttcgagg	130
<210> 955	
<211> 130	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 955	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
aggggttctc	130
[0002] <210> 956	
<211> 143	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 956	
ttgcccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcggtgggg cctgcggacc aaaggtccgc	60
agacggcaga ggtctcctct gccggcccga ccgagcgagc gacgcgcgca gagagggagt	120
gggcaactcc atcactaggg taa	143
<210> 957	
<211> 144	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 957	
ttggccactc cctctatgcg cactcgctcg ctcggtgggg cctggcgacc aaaggtcgcc	60
agacggacgt gggtttccac gtccggcccc accgagcgag cgagtgcgca tagagggagt	120
ggccaactcc atcactagag gtat	144

<210> 958	
<211> 127	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 958	
ttggccactc cctctatgcg cgctcgetca ctactcggc cctggagacc aaaggtctcc	60
agactgcccg cctctggccc gcagggccga gtgagtgagc gagcgcgcac agagggagtg	120
gccaact	127
<210> 959	
<211> 166	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 959	
tccccctgt cgcgttcgct cgctcgtgg ctcgtttggg gggcgacgg ccagagggcc	60
gtcgtctggc agctcttga gctgccccc ccccaaacga gccagcgcgc gagcgaacgc	120
gacagggggg agagtgccac actctcaagc aagggggttt tgtaag	166
[0003] <210> 960	
<211> 144	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 960	
ttgcccactc cctctaatagc gcgctcctc gctcggtagg gcctgcggac caaaggtccg	60
cagacggcag aggtctcctc tgccggcccc accgagcgcg cgagcgcgca tagagggagt	120
gggcaactec atcactaggg gtat	144
<210> 961	
<211> 143	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 961	
ttaccctagt gatggagtgg cccactccct ctctgcgcgc gtcgctcgt cggtggggcc	60
ggcagaggag acctctgccg tctgcggacc tttggtccgc aggccccacc gagcgcgcga	120
gcgcgcagag agggagtggg caa	143

<210> 962	
<211> 144	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 962	
atacctctag tgatggagtt ggcactccc tctatgcgca ctcgctcgct cgggtggggcc	60
ggacgtggaa acccacgtcc gtctggcgac ctttggtcgc caggccccac cgagcgagcg	120
agtgcgcata gagggagtgg ccaa	144
<210> 963	
<211> 127	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
963	
agttggccac attagctatg cgcgctcgct cactcactcg gccctggaga ccaaaggtct	60
ccagactgcc ggcctctggc cggcagggcc gagtgagtga gcgagcgcgc atagagggag	120
tggccaa	127
[0004] <210> 964	
<211> 166	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 964	
cttacaaaac ccccttgctt gagagtgtgg cactctcccc cctgtcgcgt tcgctcgetc	60
gctggctcgt ttgggggggt ggcagctcaa agagctgcca gacgacggcc ctctggccgt	120
cgcccccca aacgagccag cgagcgagcg aacgcgacag ggggga	166
<210> 965	
<211> 144	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 965	
atacccctag tgatggagtt gccactccc tctatgcgcg ctcgctcgct cgggtggggcc	60
ggcagaggag acctctgccg tctgctggacc ttigtccgc aggccccacc gagcgagcga	144

	gcgcgatta gagggagtgg gcaa	144
	<210> 966	
	<211> 120	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 966	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	cgcacgcccg ggtttcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc tgcctgcagg	120
	<210> 967	
	<211> 122	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 967	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca	120
[0005]	gg	122
	<210> 968	
	<211> 129	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 968	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct	120
	gcctgcagg	129
	<210> 969	
	<211> 101	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 969	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ctttgcctca gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgcag g	101
	<210> 970	

<211> 139	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 970	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
ccgggcgaca aagtcgcccg acgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga	120
gcgcgcagct gcctgcagg	139
<210> 971	
<211> 137	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 971	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
ccgggcgaaa atcgcccgac gcccggtt tgcccggcg gcctcagtga gcgagcgagc	120
gcgcagctgc ctgcagg	137
<210> 972	
<211> 135	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 972	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
ccgggcgaaa cgcccagcgc ccgggctttg cccggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc	120
gcagctgcct gcagg	135
<210> 973	
<211> 133	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 973	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
ccgggcaaag cccgacgcc gggctttgcc cggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc	120
agctgcctgc agg	133
<210> 974	

[0006]

<211> 139	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 974	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg	60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gtttcccggg cggcctcagt gagcgagcga	120
gcgcgcagct gcctgcagg	139
<210> 975	
<211> 137	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 975	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg	60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg tttccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc	120
gcgcagctgc ctgcagg	137
<210> 976	
<211> 135	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 976	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg	60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgt ttcgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc	120
gcagctgcct gcagg	135
<210> 977	
<211> 133	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 977	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg	60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccctt tgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc	120
agctgcctgc agg	133
<210> 978	

[0007]

	<211> 131	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 978	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgccttt ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag	120
	ctgcctgcag g	131
	<210> 979	
	<211> 129	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 979	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgctttg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct	120
	gcctgcagg	129
[0008]	<210> 980	
	<211> 127	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 980	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgtttcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc	120
	ctgcagg	127
	<210> 981	
	<211> 122	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 981	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcga gctgcctgca	120
	gg	122
	<210> 982	

<211> 130	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 982	
aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg	60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc	120
tgctgcagg	130
<210> 983	
<211> 120	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 983	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgtgcg	60
cctcagttag cgagcgagcg cgacagagagg gaggggccaa ctccatcact aggggttct	120
<210> 984	
<211> 122	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 984	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgt cgggcgacct ttggtgccc	60
ggcctcagtg agcgcgcgag cgcgagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc	120
ct	122
<210> 985	
<211> 122	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 985	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
ggcctcagtg agcgcgcgag cgcgagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc	120
ct	122
<210> 986	
<211> 129	

[0009]

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 986	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgcc cgggctcgg gcgaccttg	60
	gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaac tccatcacta	120
	ggggttcct	129
	<210> 987	
	<211> 101	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 987	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcaaa gcctcagtga gcgagcgagc	60
	gcgagagag ggagtggcca actccatcac taggggttc t	101
	<210> 988	
	<211> 139	
[0010]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 988	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgc cgggcaaaag cccgggctc	60
	gggcgacttt gtcgcccggc ctcagtgagc gacgagcgc gcagagaggg agtggccaac	120
	tccatcacta ggggttcct	139
	<210> 989	
	<211> 137	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 989	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggcgc cgggcaaaag cccgggctc	60
	gggcgatttt cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc	120
	catcactagg ggttcct	137
	<210> 990	
	<211> 135	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 990	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
	gggcgtttcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg gccaaactcca	120
	tactagggg ttct	135
	<210> 991	
	<211> 133	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 991	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
	gggctttgcc cggcctcagt gagcgcgag gcgcgcagag agggagtggc caactccatc	120
	actaggggtt cct	133
	<210> 992	
	<211> 139	
	<212> DNA	
[0011]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 992	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggaaacc cgggcgctcg	60
	gcgacctttg gtcgcccgc ctcagtgagc gagcgcgag gcagagagg agtggccaac	120
	tccatcacta ggggttcct	139
	<210> 993	
	<211> 137	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 993	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccggaaaccg ggcgctgggc	60
	gaccttttgt cgcccgcct cagtgcgag gcgagcgcg agagaggag tggccaactc	120
	catcactagg ggttcct	137
	<210> 994	
	<211> 135	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 994	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgaaacggg cgtcgggcga	60
	cctttggctcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gccaaactcca	120
	tcactagggg ttct	135
	<210> 995	
	<211> 133	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 995	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccaaaggcg tcgggcgacc	60
	tttggctgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc	120
	actaggggtt cct	133
	<210> 996	
	<211> 131	
	<212> DNA	
[0012]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 996	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc caaaggcgtc gggcgacctt	60
	tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca actccatcac	120
	taggggttcc t	131
	<210> 997	
	<211> 129	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 997	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc aaagcgtcg gcgaccttg	60
	gtcggccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagagg agtgccaac tccatcacta	120
	ggggttcct	129
	<210> 998	
	<211> 127	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 998	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccga aacgtcgggc gacctttggt	60
	cgcccggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaactc catcactagg	120
	ggttcct	127
	<210> 999	
	<211> 122	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 999	
	aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctcactgagg	60
	ccgggcgacc aaagtcgcc cgacggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gctgcctgca	120
	gg	122
	<210> 1000	
	<211> 12	
	<212> DNA	
[0013]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1000	
	cgatcgttcg at	12
	<210> 1001	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1001	
	atcgaacct cg	12
	<210> 1002	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	

	<400> 1002	
	atcgaacgat cg	12
	<210> 1003	
	<211> 165	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 1003	
	aggaaccct agtgaaggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg	60
	ccgccgggc aaagccggg cgtcgggcga ctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc	120
	gagcgcgag agaggagtg gccactcca tctagggg ttcct	165
	<210> 1004	
	<211> 140	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 1004	
[0014]	cccctagtga tggagtggc cactccctct ctgcgcctc gctcgctcac tgaggccgc	60
	cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt ggtcggcccg cctcagtgag cgagcgagcg	120
	cgagagaga tctagggg	140
	<210> 1005	
	<211> 91	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1005	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgaccttgg	60
	tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	91
	<210> 1006	
	<211> 91	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1006	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggag accaaaggtc gcccgagccc cgggctttgc	60
	ccggcgggcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	91

<210>	1007	
<211>	1662	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述：合成	
	多核苷酸	
<400>	1007	
	gccgccacca tggaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgccatt ctatccgctg	60
	gaagatggaa ccgctggaga gcaactgcat aaggctatga agagatagc cctggttctt	120
	ggaacaattg cttttacaga tgcacatatt gaggtggaca tcacttacgc tgagtacttc	180
	gaaatgtccg ttcggttggc agaagctatg aaacgatatg ggctgaatac aaatcacaga	240
	atcgtcgtat gcagtgaaaa ctctcttcaa ttctttatgc cgggtgttggg cgcgttattt	300
	atcggagttg cagttgcgcc cgcgaacgac atttataatg aacgtgaatt gctcaacagt	360
	atgggcattt cgcagcctac cgtgggtgtt gtttccaaaa aggggttgca aaaaattttg	420
	aacgtgcaaa aaaagctccc aatcatccaa aaaattatta tcatggattc taaaacggat	480
	taccagggat ttcagtcgat gtacacgttc gtcacatctc atctacctcc cggttttaat	540
	gaatacgatt ttgtgccaga gtcttcgat agggacaaga caattgcaat gatcatgaac	600
	tcctctggat ctactggtct gcctaaaggt gtcgctctgc ctcatagaac tgcctgcgtg	660
	agattctcgc atgccagaga tcctattttt ggcaatcaaa tcattccgga tactgcgatt	720
	ttaagtgttg ttccattcca tcacggtttt ggaatgttta ctacactcgg atatttgata	780
[0015]	tgtggatttc gagtcgtctt aatgtataga tttgaagaag agctgtttct gaggagcctt	840
	caggattaca agattcaaag tgcgctgctg gtgccaacc tattctcctt ctccgcaaaa	900
	agcactctga ttgacaaata cgatttatct aatttacacg aaattgcttc tgggtggcgt	960
	ccccctcta aggaagtcgg ggaagcggtt gccaaagaggt tccatctgcc aggtatcagg	1020
	caaggatatg ggctcactga gactacatca gctattctga ttacaccga ggggatgat	1080
	aaaccgggcg cggtcggtaa agttgttcca ttttttgaag cgaaggttgt ggatctggat	1140
	accgggaaaa cgctgggcgt taatcaaaga ggcgaactgt gtgtgagagg tcctatgatt	1200
	atgtccggtt atgtaaacaa tccggaagcg accaacgcct tgattgacaa ggatggatgg	1260
	ctacattctg gagacatagc ttactgggac gaagacgaac acttcttcat cgttgaccgc	1320
	ctgaagtctc tgattaagta caaaggctat caggtggetc ccgctgaatt ggaatccatc	1380
	ttgtccaac accccaacat ctccgacgca ggtgtcgcag gtcttcccga cgatgacgcc	1440
	ggtgaacttc ccgccccgt tgttgttttg gagcacgga agacgatgac ggaaaaagag	1500
	atcgtggatt acgtcgcag tcaagtaaca accgcgaaaa agttgcgcgg aggagtgtg	1560
	tttgtggacg aagtaccgaa aggtcttacc ggaaaactcg acgcaagaaa aatcagagag	1620
	atctcataa aggccaaaga gggcggaaag atcgcctgt aa	1662
<210>	1008	
<211>	453	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述：合成	
	多肽	
<220>		

<221> 修饰的残基
 <222> (1)..(1)
 <223> 任何氨基酸
 <400> 1008

Xaa Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

[0016]

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly
 450
 <210> 1009
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成
 多肽
 <400> 1009
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

[0017]

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 1010

<211> 1310

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成
多核苷酸

<400> 1010

[0018]

```

ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccagggg      60
ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc      120
atgcctcag ggctgagcgc ggggagagca gagcacacaa gctcatagac cctggtcgtg      180
ggggggagga cgggggagct ggcgcggggc aaactgggaa agcgggtgtcg tgtgctggct      240
ccgccctctt cccgaggggtg ggggagaacg gtatataagt gcggcagtcg ccttggacgt      300
tctttttcgc aacgggtttg ccgtcagaac gcaggtgagg ggccgggtgtg gcttccgcgg      360
gccgccgagc tggaggtcct getccgagcg ggcggggccc cgctgtcgtc ggccggggatt      420
agctgcgagc attcccgtt cgagttgcgg gcggcgcggg aggcagagtg cgaggcctag      480
cggcaacccc gtagcctcgc ctctgttccg gcttgaggcc tagcgtggtg tccgcgccgc      540
cgcccgctgc tactccggcc gcaactctgt cttttttttt tttgttgtt ttgccctgct      600
gccttcgatt gccgttcagc aataggggct aacaaggga ggggtgcgggg cttgctcgcc      660
cggagcccgg agaggtcatg gttggggagg aatggaggga caggagtggc ggctggggcc      720
cgcccgcctt cggagacat gtccgacgcc acctggatgg ggcgaggcct ggggtttttc      780
ccgaagcaac caggctgggg ttagcgtgcc gagccatgt ggccccagca cccgacagca      840
tctgcttg cggcgcccg ttgccctgcc tcctaacta gggtagggcc atcccgtccg      900
gcaccagt cgtgcgtgga aagatggccg ctcccgggcc ctggtgcaag gagctcaaaa      960
tggaggagc ggcagcccgg tggagcgggc gggtagtca cccacacaaa ggaagagggc      1020
ctgtccctc accggtgct gcttcctgt accccgtggt cctatcgcc gcaatagtca      1080
cctcgggctt ttgagcacgg ctagtcgagg cggggggagg ggatgtaat gcgttgag      1140
ttgttcacat ttggtgggtg gagactagtc aggccagcct ggcgctggaa gtcattttt      1200
gaatttgcc ccttgagttt tgagcggagc taattctcgg gcttcttagc ggttcaaagg      1260
tatcttttaa accctttttt aggtgttgtg aaaaccaccg ctaattcaaa      1310

```

<210> 1011

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<400> 1011	
	gcgcgctcgc tcgctc	16
	<210> 1012	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<400> 1012	
	ggttga	6
	<210> 1013	
	<211> 4	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成寡核苷酸	
[0019]	<400> 1013	
	agtt	4
	<210> 1014	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<400> 1014	
	ggttgg	6
	<210> 1015	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<400> 1015	
	agttgg	6
	<210> 1016	
	<211> 6	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1016	
	agttga	6
	<210> 1017	
	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1017	
	rrttrr	6
	<210> 1018	
	<211> 581	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
[0020]	<400> 1018	
	gagcatctta cgcatttta ttccatatt tgttctgttt ttcttgattt gggatacat	60
	ttaaatgtta ataaaacaaa atgggtgggc aatcatttac attttaggg atatgtaatt	120
	actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgttaaga aactttccc ttatttacgc	180
	tctgttctcg ttaatcaacc tctggattac aaaatttggtg aaagattgac tgatattctt	240
	aactatggtg ctctttttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct gtatctagct	300
	attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgata aatcctgggt gctgtctctt	360
	ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt gtttgctgac	420
	gcaaccccca ctggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg gactttcgt	480
	ttccccctcc cgatcggcac ggcagaactc atcggcct gccttgccc ctgctggaca	540
	gggctaggt tgctgggcac tgataattcc gtggtgttgt c	581
	<210> 1019	
	<211> 225	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 1019	
	tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgaccct	60
	ggaagggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct	120
	gagtaggtgt cattctattc tgggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg	180

	ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc	225
	<210> 1020	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1020	
	actgaggc	8
	<210> 1021	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1021	
	gcctcagt	8
	<210> 1022	
	<211> 16	
	<212> DNA	
[0021]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1022	
	gagcgagcga gcgcgc	16
	<210> 1023	
	<211> 1923	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 多核苷酸	
	<400> 1023	
	tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
	ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
	aatatgaccg ccatggtggc attgattatt gactagtatt taatagtaat caattacggg	180
	gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
	gcctggctga ccgcccacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
	agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
	ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga	420
	cggtaaattgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgetat taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg	540
cttcaactctc cccatctccc ccccctcccc acccccaatt ttgtatttat ttatTTTTTA	600
attatTTTgt gcagcgatgg gggcgggggg gggggggggg cgcgccag gcggggcggg	660
gcggggcggag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggTgc gcggcagcca atcagagcgg	720
cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcgggcg cgcgccct ataaaaagcg	780
aagcgcgcgg cgggcggggag tcgctgcgac gctgccttcg ccccgtgcc cgctccgccg	840
ccgctcgcg ccgccgcc cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc	900
gggacggccc ttctctccg ggctgtaatt agcgcttggg ttaatgacgg ctgtttctt	960
ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggagg ccctttgtgc gggggggagc	1020
ggctcggggg gtgcgtgct gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtcgg cccgcgtgc	1080
ccggcggctg tgagcgtgc gggcgggcg cgggctttg tgcgctccgc agtgtgcgcg	1140
aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtcggggg gggctgcgag gggaacaaag	1200
gctgcgtgcg ggggtgtgtc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg gcggtcgggc	1260
tgtaaccccc ccctgcaccc ccctccccga gttgctgagc acggcccggc ttcgggtgcg	1320
gggtccgta cggggcgtgg cgcggggctc gccgtgccgg gcgggggggt gcggcaggtg	1380
gggtgccgg gcggggcggg gccgcctcgg gccggggagg gctcggggga ggggcgcggc	1440
ggccccgga gcgccggcg ctgtcgaggc gcggcgagcc gcagccattg ctttttatgg	1500
taatcgtgc agagggcgca gggacttctt ttgtccaaa tctgtcgga gccgaaatct	1560
gggagggccc gccgcacccc ctctagcggg cgcggggcga agcgggtcgg ccgccgagc	1620
aaggaaatgg gcggggaggg ccttcgtgcg tcgccgcgc gccgtcccct tctccctctc	1680
cagcctcggg gctgtccgcg gggggacggc tccttcggg ggggacgggg cagggcgggg	1740
ttcggttct ggctgtgac cggcggctct agagcctctg ctaacatgt tttagccttc	1800
ttcttttcc tacagctcct gggcaacgtg ctggttattg tgctgtctca tcatttgcg	1860
acagaattcc tcgaagatcc gaaggggttc aagcttgca ttccggtact gttgtaaag	1920
cca	1923
<210> 1024	
<211> 1272	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1024	
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcacctgcc ccctccaac ccctcagttc	60
ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tetgaagtcc aactgaaca aacttcagcc	120
tactcatgtc cctaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc	180
cctgcctgct gaccttgag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc	240
tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt	300
ggtttaggta gtgtgagagg gtccgggttc aaaaccactt gctgggtggg gagtcgtcag	360
taagtggcta tgccccgacc ccgaagcctg tttccccatc tgtacaatgg aaatgataaa	420
gacgccatc tgatagggtt tttgtggcaa ataaacattt ggtttttttg ttttgttttg	480
ttttgtttt tgagatggag gtttgcctg tcgcccaggc tggagtgcag tgacacaatc	540
tcatctcacc acaaccttcc cctgcctcag cctcccaagt agctgggatt acaagcatgt	600
gccaccacac ctggctaatt ttctatTTTT agtagagacg ggtttctcca tgttggtcag	660

cctcagcctc ccaagtaact gggattacag gcctgtgccca ccacaccg g ctaatTTTTT	720
ctatTTTTga cagggacggg gtttcacat gttggtcagg ctggtctaga ggtaccggat	780
cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagagg ccagctaagt	840
ggtactctcc cagagactgt ctgactcac ccacccctc caccttggac acaggacgct	900
gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg	960
cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag	1020
ccctgtttg ctctccgat aactggggtg accttggtta atattacca gcagcctccc	1080
ccgttcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctctcag	1140
cttcaggcac caccactgac ctgggacagt gaatccggac tctaaggtaa atataaaatt	1200
tttaagtgta taatgtgta aactactgat tctaattgtt tctctctttt agattccaac	1260
ctttggaact ga	1272
<210> 1025	
<211> 1177	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1025	
ggctcagagg ctccagaggca cacaggagt tctgggctca ccctgcccc ttccaacccc	60
tcagttccca tctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaac	120
ttcagcctac tcatgtcctt aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaca gcaaacacac	180
agccctccct gcctgtctgac cttgagctg gggcagagg cagagacctc tctgggcca	240
tgccacctcc aacatccact cgacccttg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc	300
ctggcgtggt ttaggtagtg tgagagggtc cgggttcaaa accacttgtt ggggtgggag	360
tcgtcagtaa gtggetatgc cccgacccc aagcctgttt ccccatctgt acaatgaaa	420
tgataaagac gcccactga tagggTTTTT gtggcaata aacatttgg ttttttgtt	480
tgTTTTgtt tgtTTTTga gatggaggt tgctctgtc cccagctgg agtgactga	540
cacaatctca tctaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca	600
agcatgtgcc accacacctg gctaattttc ttttttagt agagacgggt ttctccatgt	660
tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca cacccggeta	720
atTTTTtcta tttttgacag ggacggggtt tcaccatggt ggtcaggctg gtctagagg	780
accggatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca	840
gctaagtgg actctcccag agactgtctg actcacgcca cccctccac ctggtgacaca	900
ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctt cggtaagtga gtggaagetg	960
tactgccc aggcaaagcg tccgggcagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg	1020
gacttagccc ctgtttctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca	1080
gcctcccccg ttgcccctct ggatecactg cttaaatac gacgaggaca gggccctgtc	1140
tctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt	1177
<210> 1026	
<211> 547	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223>人工序列的描述：合成

多核苷酸

<400> 1026

ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc	60
tgaccttggg gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc	120
cactcgaccc cttggaatth ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag	180
gtagtgtgag aggggaaatga ctctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag	240
gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcatatccc agccagtgga cttagcccct	300
gtttgtcct ccgataactg gggtagcctt ggtaaatatt caccagcagc ctccccggtt	360
gcccctctgg atccactgct taaatacggg caggacagg gccctgtctc ctcagettca	420
ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatthttaa	480
gtgtataatg tgttaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg	540
gaactga	547

<210> 1027

<211> 556

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成

多核苷酸

<400> 1027

[0024] ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc	60
tgaccttggg gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc	120
cactcgaccc cttggaatth cgggtggagag gacagaggt tgtcctggcg tggtttaggt	180
agtgtagagag gggaatgact cttttcggta agtgcagtgg aagctgtaca ctgcccaggc	240
aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagcccctgt	300
ttgtcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaaatattca ccagcagcct cccccgttgc	360
ccctctggat ccaactgctta aatacggacg aggacactcg agggccctgt ctctcagct	420
tcaggcacca ccaactgacct gggacagtga atccggacat cgattctaag gtaaatataa	480
aatthttaaag tgtataatth gttaaactac tgattctaat tgtttctctc ttttagattc	540
caacctttgg aactga	556

<210> 1028

<211> 1179

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成

多核苷酸

<400> 1028

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg	60
ggaggggtcg gcaattgaac cgggtcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120
gatgtcgtgt actggctccg ctttttccc gaggtgggg gagaaccgta tataagtgca	180
gtagtgcgag tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc	240
gtgtgtgggt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt	300

	acttcacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccagac ttcgggttgg aagtgggtgg	360
	gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc cttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg	420
	cctgggcgct ggggcccgcg cgtgcgaatc tgggtggacc ttcgcgcctg tctcgtgct	480
	ttcgataagt ctctagccat ttaaaatctt tgatgacctg ctgcgacgt ttttttctgg	540
	caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc	600
	gcggggcgcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga	660
	gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct	720
	ggtctcgcgc cgccgtgtat cgccccgccc tggcgggcaa ggctggcccc gtcggcacca	780
	gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc gccctgctg caggagctc aaaatggagg	840
	acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaagaaaag ggccttccg	900
	tcctcagccg tcgcttcagt tgactccacg gactaccggg cgccgtccag gcacctgat	960
	tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcatg	1020
	gagtttccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgca cttgatgtaa	1080
	ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttgg tcatctcaa gcctcagaca	1140
	gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtga	1179
	<210> 1029	
	<211> 141	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
[0025]	<400> 1029	
	aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa gttacatca ttatcttgtt	60
	cgccatccgg ttggtataaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagtggc	120
	tgcggcgcgc gcagcacctt t	141
	<210> 1030	
	<211> 317	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 1030	
	ggtgtgaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt	60
	agtcagcaac cagggtgtga aagtccccag gtccccagc aggcagaagt atgcaaagca	120
	tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgccatc ccgccctaa	180
	ctccgccag ttccgccat tctccgccc atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag	240
	aggccgagge cgctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggagge ttttttggag	300
	gcctagcctt ttgcaaa	317
	<210> 1031	
	<211> 241	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	多核苷酸		
	<400> 1031		
	gagggcctat ttcccatgat tccttcataat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag	60	
	ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga	120	
	aagtaataat ttcttgggta gtttgagtt ttaaaattat gttttaaat ggactatcat	180	
	atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttgctt tatatatctt gtggaaagga	240	
	c	241	
	<210> 1032		
	<211> 215		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	多核苷酸		
	<400> 1032		
	gaacgctgac gtcatacaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa	60	
	caccagcgc gcgtgcgcc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc	120	
	tgcaatattt gcatgtcgt atgtgttctg gaaatcacc ataacgtga aatgtctttg	180	
	gatttggaa tcgtataaga actgtatgag accac	215	
[0026]	<210> 1033		
	<211> 546		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	多核苷酸		
	<400> 1034		
	ccctaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc	60	
	tgaccttga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc	120	
	cactcgacc cttggaattt ttcggtggag aggagcagag gttgtcctgg cgtggtttag	180	
	gtagtgtgag aggggaatga ctctttcgg taagtgcagt ggaagctgta cactgcccag	240	
	gcaaagcgtc cgggcagcgt aggcgggcga ctcatatccc agccagtgga cttagccct	300	
	gtttgctcct ccgataactg gggtagcctt ggtaaatatt caccagcagc ctccccgtt	360	
	gcccctctgg atccactgct taaatacga cgaggacagg gccctgtctc ctgagcttca	420	
	ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc cggactctaa ggtaaatata aaatttttaa	480	
	gtgtataatg tgttaacta ctgattctaa ttgtttctct cttttagatt ccaacctttg	540	
	gaactg	546	
	<210> 1035		
	<211> 576		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		

<223>人工序列的描述：合成

多核苷酸

<400> 1035

tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa	60
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata	120
atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag	180
tatttacgggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc	240
cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta	300
tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg	360
cggttttggc agtacatcaa tggcggtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt	420
ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaac ggactttcca	480
aatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt acggtgggag	540
gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcag	576

<210> 1036

<211> 150

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成

多核苷酸

<400> 1036

[0027] ataaacgata acgccgttgg tggcgtgagg catgtaaaag gttacatcat tatcttgttc	60
gccatccggt tggataaat agacgttcat gttggttttt gtttcagttg caagttggct	120
gcggcgcgcg cagcaccttt gcggccatct	150

<210> 1037

<211> 1313

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述：合成

多核苷酸

<400> 1037

ggagccgaga gtaattcata caaaaggagg gatcgccttc gcaaggggag agcccaggga	60
ccgtccctaa attctcacag acccaaatcc ctgtagccgc cccacgacag cgcgaggagc	120
atgcgccag ggctgagcgc gggtagatca gagcacacaa gctcacagtc cccggcggtg	180
gggggagggg cgcgctgagc gggggccagg gagctggcgc ggggcaaact gggaaagtgg	240
tgctgtgtgc tggctccgcc ctcttcccga gggtagggga gaacggtata taagtgcggt	300
agtcgccttg gacgttcttt ttcgcaacgg gtttgccgtc agaacgcagg tgagtggcgg	360
gtgtggcttc cgcgggcccc ggagctggag ccctgctctg agcgggcccgg gctgatatgc	420
gagtgtcgtc cgcagggttt agctgtgagc attcccactt cgagtggcgg gcggtgcggg	480
ggtgagagtg cgaggcctag cggcaacccc gtagcctcgc ctcgtgtccg gcttgaggcc	540
tagcgtggtg tccgccgcc cggtgccact cgccgcact atgcgttttt tgctcttct	600
gccctcgatt gccttcagc agcatgggct acaaaaggga ggggtgtggg ctcactctta	660
aggagcccat gaagcttacg ttgatagga atggaagggc aggagggcgc actggggccc	720

	gcccccttc ggagcacatg tccgacgcca cctggatggg gcgaggcctg tggctttccg	780
	aagcaatcgg gcgtgagttt agcctacctg ggccatgtgg ccctagcact gggcacggtc	840
	tggcctggcg gtgccgcgtt cccttgctc ccaacaaggg tgaggccgtc ccgcccggca	900
	ccagttgctt gcgcggaaag atggccgctc ccggggccct gttgcaagga gctcaaaatg	960
	gaggacgcgg cagcccgggtg gagcgggcggtg gtgagtcacc cacacaaagg aagagggcct	1020
	tgcccctcgc cggccgctgc ttctgtgac cccgtggtct atcggccgca tagtcacctc	1080
	gggttctct tgagcaccgc tcgtcgcggc ggggggaggg gatctaattg cgttggagtt	1140
	tgttcacatt tgggtgggtgg agactagtca ggccagcctg gcgctggaag tcattcttgg	1200
	aatttgcccc tttgagtttg gagcaggct aattctcaag cctcttagcg gttcaaaggt	1260
	atthtctaaa ccggtttcca ggtgttgtga aagccaccgc taattcaaag caa	1313
	<210> 1038	
	<211> 213	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸	
	<400> 1038	
	taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta	60
	tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc aataaacaag	120
	ttaacaacaa caattgcatt cttttatgt ttcaggttca gggggagggtg tgggaggtt	180
[0028]	tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gta	213
	<210> 1039	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	肽	
	<400> 1039	
	Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val	
	1 5	
	<210> 1040	
	<211> 19	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	肽	
	<400> 140	
	Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly	
	1 5 10 15	
	Ala His Ser	

<210> 1041
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成
 肽
 <400> 1041
 Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Gly

<210> 1042
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 猿猴病毒 40
 <400> 1042
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

[0029]

<210> 1043
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 猿猴病毒 40
 <400> 1043
 cccaagaaga agaggaaggt g

21

<210> 1044
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知描述:
 核质蛋白二重 NLS 序列
 <400> 1044
 Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 1045
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知描述:
 C-myc NLS 序列
 <400> 1045
 Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp

1 5
 <210> 1046
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知描述:
 C-myc NLS 序列
 <400> 1046
 Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro
 1 5 10
 <210> 1047
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1047
 Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
 20 25 30
 Arg Asn Gln Gly Gly Tyr
 35
 [0030] <210> 1048
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知描述:
 来自输入蛋白- α 序列的 IBB 域
 <400> 1048
 Arg Met Arg Ile Glx Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu
 1 5 10 15
 Arg Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys
 20 25 30
 Asp Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val
 35 40
 <210> 1049
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 未知描述:
 肌瘤 T 蛋白序列
 <400> 1049

	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcacgc ccgggtttcc cgggcggcct cagtgagcga	60
	gcgagcgcgc	70
	<210> 1055	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1055	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgtcgg gcgacctttg gtcgcccggc ctcagtgagc	60
	gagcgagcgc gc	72
	<210> 1056	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1056	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacggc ctcagtgagc	60
[0032]	gagcgagcgc gc	72
	<210> 1057	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1057	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggc ctcagtgagc	60
	gagcgagcgc gc	72
	<210> 1058	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1058	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc	60
	gagcgagcgc gc	72
	<210> 1059	
	<211> 83	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1059	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg ctttgcccgg	60
	cctcagtgag cgagcgagcg cgc	83
	<210> 1060	
	<211> 83	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1060	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggca aagcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg	60
	cctcagtgag cgagcgagcg cgc	83
	<210> 1061	
	<211> 77	
	<212> DNA	
[0033]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1061	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgaaac gtcgggagac ctttggtcgc ccggcctcag	60
	tgagcgagcg agcgcg	77
	<210> 1062	
	<211> 77	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1062	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggag accaaaggtc gcccgacgtt tcggcctcag	60
	tgagcgagcg agcgcg	77
	<210> 1063	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	

	寡核苷酸	
	<400> 1063	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcaaagcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	51
	<210> 1064	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1064	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggctttgcc tcagtgagcg agcgagcgcg c	51
	<210> 1065	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1065	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg gcgctcgggc gacctttggt cgccccgcct	60
[0034]	cagtgagcga gcgagcgcgc	80
	<210> 1066	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1066	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggcggcct	60
	cagtgagcga gcgagcgcgc	80
	<210> 1067	
	<211> 79	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1067	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgctcgggcg acctttggtc gcccggcctc	60
	agtgagcgag cgagcgcgc	79
	<210> 1068	
	<211> 79	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
<400> 1068	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgcgccc cgggcgcctc	60
agtgagcgag cgagcgcgc	79
<210> 1069	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 流感病毒	
<400> 169	
Asp Arg Leu Arg Arg	
1 5	
<210> 1070	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 流感病毒	
<400> 1070	
Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys	
1 5	
<210> 1071	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 丁型肝炎病毒	
<400> 1071	
Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu	
1 5 10	
<210> 1072	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400> 1072	
Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg	
1 5 10	
<210> 1273	
<211> 20	
<212> PRT	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 1073	
Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys	
1 5 10 15	
Lys Ser Lys Lys	

[0035]

20

<210> 1074
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 1074
 Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys
 1 5 10 15
 Lys

<210> 1075
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成
 寡核苷酸

<400> 1075
 gtttaaac 8

<210> 1076
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成
 寡核苷酸

<400> 1076
 ttaattaa 8

<210> 1077
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成
 多核苷酸

<400> 1077
 aataaacgat aacgccgttg gtggcgtgag gcatgtaaaa ggttacatca ttatcttggt 60
 cgccatccgg ttggtataaaa tagacgttca tgttggtttt tgtttcagtt gcaagttggc 120
 tgcggcgcgc gcagcacctt t 141

<210> 1078
 <211> 317
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

[0036]

	〈223〉人工序列的描述：合成	
	多核苷酸	
	〈400〉 1078	
	ggtgtgaaa gtccccagc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt	60
	agtcagcaac cagggtgtga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca	120
	tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgtcccctaac tccgcccatac ccgcccctaa	180
	ctccgcccag ttccgcccag tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag	240
	aggccgagge cgcctcgccc tctgagctat tccagaagta gtgaggagge ttttttggag	300
	gcctaggctt ttgcaaa	317
	〈210〉 1079	
	〈211〉 72	
	〈212〉 DNA	
	〈213〉 人工序列	
	〈220〉	
	〈223〉人工序列的描述：合成	
	寡核苷酸	
	〈400〉 1079	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgaggcg accaaaggtc gcccagcggc ctcaagtgagc	60
	gagcgagcgc gc	72
	〈210〉 1080	
	〈211〉 60	
	〈212〉 DNA	
	〈213〉 人工序列	
	〈220〉	
	〈223〉人工序列的描述：合成	
	寡核苷酸	
	〈400〉 1080	
	gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc cactggtgac	60
	〈210〉 1081	
	〈211〉 1260	
	〈212〉 DNA	
	〈213〉 腺相关病毒-2	
	〈400〉 1081	
	atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtggatccag	60
	gaggaccagg cctcatacat ctcttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag	120
	gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg	180
	gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat tttggaacta	240
	aacgggtacg atcccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc	300
	ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac caacatcgcg	360
	gaggccatag cccacactgt gcccttctac ggggtgcgtaa actggaccaa tgagaacttt	420
	cccttcaacg actgtgtcga caagatggtg atctggtggg aggaggggaa gatgaccgcc	480
	aagtcgtgg agtcgccaac agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt ggaccagaaa	540
	tgcaagtcct cggcccagat agaccgact cccgtgatcg tcacctcaa caccaacatg	600
	tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg	660

[0037]

atgttcaa	at	ttgaactcac	ccgccgtctg	gatcatgact	ttgggaaggt	caccaagcag	720	
gaagtcaa	ag	actttttccg	gtgggcaaa	gatcacgtgg	ttgaggtgga	gcatgaattc	780	
tacgtcaaaa	agg	gtggagc	caagaaaaga	cccgcccca	gtgacgcaga	tataagttag	840	
cccaaacggg	tgc	gcgagtc	agttgcgcag	ccatcgacgt	cagacgcgga	agcttcgata	900	
aactacgcag	acag	gtacca	aaacaaatgt	tctcgtcacg	tgggcatgaa	tctgatgctg	960	
tttccctgca	gaca	atgcga	gagaatgaat	cagaattcaa	atatctgctt	cactcacgga	1020	
cagaaagact	gttt	tagagt	ctttcccgtg	tcagaatctc	aacccttttc	tgctcgtcaa	1080	
aagcgtatc	agaa	actgtg	ctacattcat	catatcatgg	gaaaggtgcc	agacgcttgc	1140	
actgcctgcg	atct	gtgtcaa	tgtggatttg	gatgactgca	tctttgaaca	ataaatgatt	1200	
taaatcaggt	atgg	ctgccg	atggttatct	tccagattgg	ctcgaggaca	ctctctctga	1260	
<210>							1082	
<211>							1932	
<212>							DNA	
<213>							腺相关病毒-2	
<400>							1082	
atgccggggt	tttac	gagat	tgtgattaag	gtccccagcg	accttgacga	gcatctgccc	60	
ggcatttctg	acagct	ttgt	gaactgggtg	gccgagaagg	aatgggagtt	gccgccagat	120	
tctgacatgg	atctg	aatct	gattgagcag	gcaccctga	ccgtggccga	gaagctgcag	180	
cgcgactttc	tgacg	gaatg	gcgccgtgtg	agtaaggccc	cggaggccct	tttctttgtg	240	
caatttgaga	aggg	agagag	ctacttccac	atgcacgtgc	tcgtggaaac	caccggggtg	300	
aaatccatgg	ttttg	ggacg	tttctgagt	cagattcgcg	aaaaactgat	tcagagaatt	360	
taccgcggga	tcgag	ccgac	tttgccaaac	tggttcgctg	tcacaaagac	cagaaatggc	420	
gccggaggcg	ggaaca	aggt	ggtggatgag	tgctacatcc	ccaattactt	gctcccaaaa	480	
accagcctg	agctc	cagt	ggcgtggact	aatatggaac	agtatttaag	cgctgtttg	540	
aatctcacgg	agcgt	aaacg	gttgggtggcg	cagcatctga	cgcacgtgtc	gcagacgcag	600	
gagcagaaca	aagaga	atca	gaatcccaat	tctgatgcgc	cggtgatcag	atcaaaaact	660	
tcagccaggt	acatg	gagct	ggtcgggtgg	ctcgtggaca	aggggattac	ctcggagaag	720	
cagtggatcc	aggag	gacca	ggcctcatac	atctccttca	atgcggcctc	caactcgcgg	780	
tcccaaatca	agget	gcctt	ggacaatcgc	ggaaagatta	tgagcctgac	taaaaccgcc	840	
cccgactacc	tggtg	ggcca	gcagcccgtg	gaggacattt	ccagcaatcg	gatttataaa	900	
atthttggaac	taaac	gggta	cgatcccaaa	tatgcggctt	ccgtctttct	gggatgggcc	960	
acgaaaaagt	tcggc	aagag	gaacaccatc	tggtctgtttg	ggcctgcaac	taccgggaag	1020	
accaacatcg	cggag	gccc	at	gtcccttct	acgggtgcgt	aaactggacc	1080	
aatgagaact	ttcc	cttcaa	cgactgtgtc	gacaagatgg	tgatctggtg	ggaggagggg	1140	
aagatgaccg	ccaag	gtcgt	ggagtcggcc	aaagccatc	tcggaggaag	caaggtgcgc	1200	
gtggaccaga	aatg	caagtc	ctcggcccag	atagaccgga	ctcccgtgat	cgtcacctcc	1260	
aacaccaaca	tgtgc	gccgt	gattgacggg	aactcaacga	ccttcgaaca	ccagcagccg	1320	
ttgcaagacc	ggat	gttcaa	atthtgaactc	accgcccgtc	tggatcatga	ctthtgggaag	1380	
gtcacc	aagc	agga	agtcaa	agactthttc	cggtgggcaa	aggatcacgt	ggttgaggtg	1440
gagcatgaat	tctac	gtcaa	aaagggtgga	gccaagaaaa	gacccgcccc	cagtgcgca	1500	
gatataagt	agccc	aaacg	ggtgcgcgag	tcagttgcgc	agccatcgac	gtcagacgcg	1560	
gaagcttcga	tcaac	tacgc	agacaggtac	caaaacaaat	gttctcgtca	cgtgggcatg	1620	
aatctgatgc	tgtth	ccctg	cagacaatgc	gagagaatga	atcagaatc	aaatatctgc	1680	
ttcactcacg	gacag	aaaga	ctgtthtagag	tgctthccc	tgtcagaatc	tcaaccgctt	1740	

[0038]

tctgtcgtca	aaaaggcgta	tcagaaactg	tgctacattc	atcatatcat	gggaaaggtg	1800
ccagacgctt	gcactgcctg	cgatctggtc	aatgtggatt	tggatgactg	catctttgaa	1860
caataaatga	tttaaatcag	gtatggctgc	cgatggttat	cttccagatt	ggctcgagga	1920
cactctctct	ga					1932
<210>	1083					
<211>	1876					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列的描述: 合成					
	多核苷酸					
<400>	1083					
cgcagccacc	atggcggggt	tttacgagat	tgigattaag	gtccccagcg	accttgacgg	60
gcatctgccc	ggcatttctg	acagctttgt	gaactgggtg	gccgagaagg	aatgggagtt	120
gcccccagat	tctgacatgg	atctgaatct	gattgagcag	gcaccctga	ccgtggccga	180
gaagctgcag	cgcgactttc	tgacggaatg	gcgccgtgtg	agtaaggccc	cggaggcctt	240
tttctttgtg	caatttgaga	agggagagag	ctacttccac	atgcacgtgc	tcgtggaaac	300
caccggggtg	aatccatgg	ttttgggacg	tttctgagt	cagattcgcg	aaaaactgat	360
tcagagaatt	taccgcggga	tcgagccgac	tttgccaaac	tggttcgcgg	tcacaaagac	420
cagaaatggc	gccggaggcg	ggaacaaggt	ggtggatgag	tgctacatcc	ccaattactt	480
gctccccaaa	accagcctg	agctccagtg	ggcgtggact	aatatggaac	agtatttaag	540
cgctgtttg	aatctcacgg	agcgtaaacg	gttgggtggc	cagcatctga	cgcacgtgc	600
gcagacgcag	gagcagaaca	aagagaatca	gaatcccaat	tctgatgcgc	cggtgatcag	660
atcaaaaact	tcagccaggt	acatggagct	ggtcgggtgg	ctcgtggaca	aggggattac	720
ctcggagaag	cagtggatcc	aggaggacca	ggcctcatac	atctccttea	atgcggcctc	780
caactcgcgg	tcccaaatca	aggctgcctt	ggacaatgcg	ggaaagatta	tgagcctgac	840
taaaaccgcc	cccgactacc	tggtgggcca	gcagcccgtg	gaggacattt	ccagcaatcg	900
gatttataaa	attttggaac	taaacgggta	cgatcccaa	tatgcggctt	ccgtctttct	960
gggatgggcc	acgaaaaagt	tcggcaagag	gaacaccate	tggctgtttg	ggcctgcaac	1020
taccgggaag	accaacatcg	cggaggccat	agcccacact	gtgcccttct	acgggtgcgt	1080
aaactggacc	aatgagaact	ttcccttcaa	cgactgtgtc	gacaagatgg	tgatctggtg	1140
ggaggagggg	aagatgaccg	ccaaggtcgt	ggagtgcgcc	aaagccattc	tcggaggaag	1200
caaggtgcgc	gtggaccaga	aatgcaagtc	ctcggcccag	atagaccoga	ctcccgtgat	1260
cgtcacctcc	aacaccaaca	tgtgcgccgt	gattgacggg	aactcaacga	ccttcgaaca	1320
ccagcagccg	ttgcaagacc	ggatgttcaa	atltgaacte	acccgccgtc	tggatcatga	1380
ctttgggaag	gtcaccaagc	aggaagtcaa	agactttttc	cggtgggcaa	aggatcacgt	1440
ggttgagggtg	gagcatgaat	tctacgtcaa	aaagggtgga	gccaagaaaa	gacccgcccc	1500
cagtgacgca	gatataagtg	agcccaaacg	ggtgcgcgag	tcagttgcgc	agccatcgac	1560
gtcagacgcg	gaagcttcca	tcaactacgc	agacaggtac	caaaacaaat	gttctctgca	1620
cgtgggcatg	aatctgatgc	tgtttccctg	cagacaatgc	gagagaatga	atcagaattc	1680
aaatatctgc	ttcactcacg	gacagaaaga	ctgtttagag	tgctttcccg	tgtcagaatc	1740
tcaaccggtt	tctgtcgtca	aaaaggcgta	tcagaaactg	tgctacattc	atcatatcat	1800
gggaaaggtg	ccagacgctt	gcactgcctg	cgatctggtc	aatgtggatt	tggatgactg	1860
catctttgaa	caataa					1876

[0039]

<210> 1084	
<211> 1194	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1084	
atggagctgg tcggttgct cgtggacaag gggattacct cggagaagca gtgatccag	60
gaggaccagg cctcatacat ctcttcaat gcggcctcca actcgcggtc ccaaatcaag	120
gctgccttgg acaatcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg	180
gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat tttggaacta	240
aacgggtacg atccccaaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac gaaaaagttc	300
ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta cggggaagac caacatcgcg	360
gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtagcgtaa actggaccaa tgagaacttt	420
cccttcaacg actgtgtcga caagatggg atctgggtgg aggaggggaa gatgaccgcc	480
aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgctcgt ggaccagaaa	540
tgcaagtect cggcccagat agaccgact cccgtgatcg tcacctcaa caccaacatg	600
tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt gcaagaccgg	660
atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt caccaagcag	720
gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga gcatgaattc	780
tacgtcaaaa agggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga tataagttag	840
cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgac	900
aactacgcag accgctacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatctg	960
tttccctgca gacaatgca gagaatgaat cagaattcaa atatctgctt cactcagga	1020
cagaaagact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aaccgtttc tctcgtcaaa	1080
aagcgtatc agaaactgtg ctacattcat catatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc	1140
actgcctgcg atctgtgcaa tgtggatttg gatgactgca tctttgaaca ataa	1194
<210> 1085	
<211> 1876	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1085	
cgcagccacc atggcggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacgg	60
gcatctgccc ggcatctctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt	120
gccccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga ccgtggccga	180
gaagctgcag cgcgacttcc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggccct	240
tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tctggaaac	300
caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat	360
tcagagaatt taccgcgga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac	420
cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt	480

[0040]

	gctcccaaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtattttaag	540
	cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttgggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc	600
	gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggatgatcag	660
	atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac	720
	ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc	780
	caactcgcgg tcccaaatca aggtgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac	840
	taaaaccgcc cccgactacc tgggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg	900
	gatttataaa attttggaaac taaacgggta cgatcccaaa tatgcggctt ccgtctttct	960
	gggatgggccc acgaaaaagt tccgcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac	1020
	taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt	1080
	aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg	1140
	ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag	1200
	caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccoga ctcccgtgat	1260
	cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca	1320
	ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga	1380
	ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttcc cgggtgggcaa aggatcacgt	1440
	ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc	1500
	cagtgcgca gatataagtg agcccacaac ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac	1560
	gtcagacgcg gaagcttca tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca	1620
	cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc	1680
	aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgcagaatc	1740
[0041]	tcaaccggtt tctgtcgtca aaaaggcgtc tcagaaactg tgctacattc atcatatcat	1800
	gggaaaggtg ccagacgctt gcaactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg	1860
	catctttgaa caataa	1876
	<210> 1086	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1086	
	ctagccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt ggtcggccg c	51
	<210> 1087	
	<211> 65	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1087	
	ctaggactga ggccgcccgg gcaaagccc ggcgtcgggc gaccttggc cggccgcct	60
	cagtc	65
	<210> 1088	

	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	0	
	ggactgaggc cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggtcgc ccggcctcag	60
	tcctgca	67
	<210> 1099	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1099	
	gtgcgggcga ccaaaggteg cccgacgccc gggcgcactc a	41
	<210> 1100	
	<211> 56	
	<212> DNA	
[0042]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1100	
	ggactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ccggcctcagt cctgca	56
	<210> 1111	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1111	
	ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccgccctc agtc	54
	<210> 1112	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1112	

	ggactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacggcctca gtctgca	48
	<210> 1112	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1112	
	ctaggactga ggccgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtc	46
	<210> 1113	
	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1113	
	ggactgaggc cgggcgacc aaaggtcgccc cgacgcccgg gctttgcccg ggcgcctcag	60
	tcctgca	67
	<210> 1114	
	<211> 47	
[0043]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1114	
	atacctaggc acgcgtgtta ctagttatta atagtaatca attacgg	47
	<210> 1115	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1115	
	atacctaggg gccgcacgcg tgttactag	29
	<210> 1116	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	

寡核苷酸

<400> 1116
 atacactcag tgcctgcagg cacgtggtcc ggagatccag ac 42
 <210> 1117
 <211> 3754
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成

多核苷酸

<400> 1117
 cctagtgtag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttctt 60
 tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatcgcggcc gctcaatatt ggccattagc 120
 catattatc attggttata tagcataaat caatattggc tattggccat tgcatacgtt 180
 gtatctatat cataatatgt acatattat tggctcatgt ccaatatgac cgccatgttg 240
 gcattgatta ttgactagt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 300
 atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccac 360
 cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 420
 tttccattga cgtcaatggg tggagtatct acggtaaac gcccacttgg cagtacatca 480
 agtgtatcat atgccaagtc cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggccccctg 540
 gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttctact tggcagtaca tctacgtatt 600
 [0044] agtcatcgct attaccatgg tcgaggtgag cccacgctt tgettcactc tccccatctc 660
 cccccctcc ccacccccaa ttttgtatct atttattttt taattatttt gtgcagcgat 720
 gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg 780
 cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtctc 840
 ttttatggcg aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg 900
 agtcgctgcg acgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgccgctcg cgccgcccgc 960
 cccgctctg actgaccgcg ttactcccac aggtgagcgg gcgggacggc ctttctctc 1020
 cgggctgtaa ttagecctg gtttaatgac ggttgtttc ttttctgtg ctgcgtgaaa 1080
 gccttgaggg gctccgggag ggcctttgt gcggggggga gcgctcggg ggggtcgtgc 1140
 gtgtgtgtgt gcgtggggag cgccgcgtgc gcccgcgct gcccggcggc tgtgagcgt 1200
 gcgggcgcgg cgcggggctt tgtgcgctcc gcagtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg 1260
 gcggtgcccc gcggtgcggg gggggctcgc aggggaacaa aggetgcgtg cggggtgtgt 1320
 gcgtgggggg gtgagcagg ggtgtggcg cgcggtcgg gctgtaacc cccctgcac 1380
 ccccctccc gagttgctga gcacggccc gcttcgggtg cgggctccg tacggggcgt 1440
 ggcgcggggc tcgccgtgc gggcgggggg tggcggcagg tgggggtgcc gggcggggcg 1500
 gggccgctc gggccgggga gggctcgggg gaggggcgcg gcggccccg gagcgcgggc 1560
 ggctgtcag gcgcggcgag ccgcagccat tccttttat ggtaatcgt cgagagggcg 1620
 cagggacttc ctttgcacca aatctgtgag gagccgaaat ctgggagcgc ccgccacc 1680
 ccctctagcg ggcgcggggc gaagcgggtgc ggcgccggca ggaaggaaat gggcggggag 1740
 ggcttcgtg cgtcgcgcgc ccgccgtccc ctctcctc tccagcctcg gggctgtccg 1800
 cggggggacg gctgccttcg ggggggacgg gcagggcgg gtttcggctt ctggcgtgtg 1860
 accggcggt ctagagcctc tgctaaccat gtttagcct tcttctttt cctacagctc 1920
 ctgggcaacg tgctggttat tgtctgtct catcatttgt cgacagaatt cctcgaagat 1980

ccgaaggggt tcaagcttgg cattccggta ctgttggtaa agccagttta aacgccgcca	2040
ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccacctg gtcgagetgg	2100
acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct	2160
acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca	2220
ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga	2280
agcagcacga cttcttcaag tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct	2340
tcttcaagga cgacggcaac tacaagacct gcgcccagggt gaagttcgag ggcgacacct	2400
tggtgaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc	2460
acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga	2520
acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg	2580
ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc	2640
actacctgag caccagtc ccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg	2700
tcctcgtgga gttcgtgacc gccgcccggga tctctctcgg catggacgag ctgtacaagt	2760
aattaattaa gagcatctta ccgccattta ttccatatt tgttctgttt ttcttgattt	2820
gggtatacat ttaaatgtta ataaaacaaa atggtggggc aatcatttac atttttaggg	2880
atatgtaatt actagttcag gtgtattgcc acaagacaaa catgtaaga aactttccg	2940
ttatttacgc tctgttctg ttaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac	3000
tgatattctt aactatgttg ctccctttac gctgtgtgga tatgctgctt tatagcctct	3060
gtatctagct attgcttccc gtacggcttt cgttttctcc tccttgata aatcctggtt	3120
gctgtctctt ttagaggagt tgtggcccgt tgtccgtcaa cgtggcgtgg tgtgctctgt	3180
gtttctgac gcaaccccc actggctgggg cattgccacc acctgtcaac tcctttctgg	3240
gactttcgtc ttccccctcc cgatcgccac ggcagaactc atcgccgct gccttgcccg	3300
ctgctggaca ggggctaggt tctggtggcac tgataattcc gtggtgttgt ctgtgccttc	3360
tagttgccag ccattctgtt tttgcccctc ccccgtgct tccttgacc tggaggtgc	3420
cactcccact gtccttctc aataaaatga gaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg	3480
tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa	3540
tagcaggcat gctggggatg cgtggtgctc tatggtctc gagcatggt acgtagataa	3600
gtagcatggc gggttaatca ttaactacac ctgcagcagg aaccctagt gatggagtgt	3660
gccactcct ctctgcgcgc tcgctcgtc cctgcaggac tgaggccggg cgaccaaaag	3720
tcgcccgaag cccgggcggc ctcagtctg cagg	3754
<210> 1118	
<211> 8418	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1118	
ggcagctgcg cgctcgtcgc ctcacctagg ccgccgggc aaagcccggg cgctcggcga	60
cccttggctc cccggcctag gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg gccaaacctca	120
tcactagggg ttcctttag ttaatgatta acccgccatg ctacttatcg cggccgctca	180
atattggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata ttggctattg	240
gccattgcat acgttgtatc tatatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaat	300

atgaccgcca	tgttggcatt	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	360
attagttcat	agcccatata	tggagttccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgcc	420
tggctgaccg	cccaacgacc	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	480
aacgccaata	gggactttcc	attgacgtca	atgggtggag	tatttacggt	aaactgcca	540
cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	aagtccgcc	cctattgacg	tcaatgacgg	600
taaatggccc	gcctggcatt	atgcccagta	catgacctta	cgggactttc	ctacttggca	660
gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	catggctgag	gtgagcccca	cgttctgctt	720
cactctcccc	atctcccccc	cctccccacc	cccaattttg	tatttattta	ttttttaatt	780
attttgtgca	gcgatggggg	cggggggggg	gggggggcg	gcgccaggcg	gggcggggcg	840
gggcgagggg	cggggcgggg	cgaggcggag	aggtgcggcg	gcagccaatc	agagcggcgc	900
gctccgaaag	tttcctttta	tggcgaggcg	gcggcggcgg	cggccctata	aaaagcgaag	960
cgcgcgggcg	gcgggagtcg	ctgcgacgct	gccttcgccc	cgtgccccgc	tccgcccccg	1020
cctcgcccg	cccgcgccg	ctctgactga	ccgcgttact	cccacaggtg	agcgggaggg	1080
acggcccttc	tcctccgggc	tgttaattagc	gcttggttta	atgacggctt	gtttcttttc	1140
tgtggctgcg	tgaagccctt	gaggggctcc	gggagggcc	tttgtcggg	ggggagcggc	1200
tcggggggtg	cgtgcgtgtg	tgtgtgcgtg	gggagcggcg	cgtgcggccc	gcgctgcccg	1260
gcggctgtga	gcgctcggg	cgcggcggcg	ggctttgtgc	gctccgcagt	gtgcgcgagg	1320
ggagcgcggc	cggggcgggg	gccccgggt	gcgggggggg	ctgcgagggg	aacaaaggct	1380
gcgtgcgggg	tgtgtgcgtg	gggggggtgag	caggggggtgt	gggcgcggcg	gtcgggctgt	1440
aacccccccc	tgcaccccc	tccccgagtt	gctgagcacg	gccccgcttc	gggtgcgggg	1500
ctcctacgg	ggcgtggcgc	ggggctcgcc	gtgccgggcg	gggggtggcg	gcaggtgggg	1560
gtgccgggcg	gggcggggcc	gcctcgggcc	ggggagggct	cgggggaggg	gcgcggcggc	1620
[0046]	ccccggagcg	ccggcgggctg	tcgaggcgcg	gcgagccgca	gccattgcct	1680
tcgtgcgaga	gggcgcaggg	acttcctttg	tcccaaatct	gtgcggagcc	gaaatctggg	1740
aggcgcggcc	gcacccccctc	tagcgggcgc	ggggcgaagc	ggtgcggcgc	cggcaggaag	1800
gaaatgggcg	gggagggcct	tcgtgcgtcg	ccgcgccgcc	gtccccttct	ccctctccag	1860
cctcggggct	gtccgcgggg	ggacggctgc	cttcgggggg	gacggggcag	ggcggggttc	1920
ggcttctggc	gtgtgaccgg	cggctctaga	gcctctgcta	accatgtttt	agccttcttc	1980
tttttctac	agctcctggg	caacgtgctg	gttattgtgc	tgtctcatca	tttgtcgaca	2040
gaattcctcg	aagatccgaa	ggggttcaag	cttggcattc	cggctactgtt	ggtaaagcca	2100
gtttaaacgc	cgccaccatg	gtgagcaagg	gcgaggagct	gttcaccggg	gtggtgcccc	2160
tcctggtcga	gctggacggc	gacgtaaacc	gccacaagtt	cagcgtgtcc	ggcgagggcg	2220
agggcgatgc	cacctacggc	aagctgaccc	tgaagtteat	ctgcaccacc	ggcaagctgc	2280
ccgtgccctg	gcccaccctc	gtgaccaccc	tgacctacgg	cgtgcagtg	ttcagccgct	2340
accccgacca	catgaagcag	cacgaattct	tcaagtccgc	catgcccga	ggctacgtcc	2400
aggagcgcac	catcttcttc	aaggacgacg	gcaactacaa	gacccgcgcc	gaggtgaagt	2460
tcgagggcga	cacctgggtg	aaccgcatcg	agctgaaggg	catcgacttc	aaggaggacg	2520
gcaacatcct	ggggcacaag	ctggagtaca	actacaacag	ccacaacgtc	tatatcatgg	2580
ccgacaagca	gaagaacggc	atcaaggtga	actcaagat	ccgccacaac	atcgaggacg	2640
gcagcgtgca	gctcgcggac	cactaccagc	agaacacccc	catcggcgac	ggccccgtgc	2700
tgctgcccga	caaccactac	ctgagcacc	agtcgcct	gagcaaagac	cccaacgaga	2760
agcgcgatca	catggtcctg	ctggagttcg	tgaccgccc	cgggatcact	ctcggcatgg	2820
acgagctgta	caagtaatta	attaagagca	tcttaccgcc	atttattccc	atatttgitc	2880
tgtttttctt	gatttgggta	tacatttaaa	tgtaataaaa	acaaaatggt	ggggcaatca	2940

	tttacat	tttt	tagggat	atg	taattact	ag	ttcaggt	gta	ttgccaca	ag	acaacat	gt	3000						
	taagaa	actt	tcccgt	tatt	tacgct	ctgt	tctgt	ttaat	caacct	ctgg	attacaaa	aat	3060						
	ttgtgaa	aga	ttgact	gata	ttctta	acta	tgtt	gctcct	tttacg	ctgt	gtggat	atgc	3120						
	tgc	tttat	ag	cctctg	tatc	tagctat	tgc	ttcccg	tacg	gctttc	gttt	tctcct	ctt	3180					
	gtataa	atcc	tgg	ttgct	gt	ctcttt	taga	ggagt	ttgtg	cccgt	tgcc	gtcaac	gtg	3240					
	cgtggt	gtgc	tctgt	gtttg	ctgacg	caac	ccccact	ggc	tggggc	attg	ccaccac	ctg	3300						
	tcaact	ctct	tctggg	actt	tcgct	ttccc	ctccc	gatc	gccacg	gcag	aactcat	gcg	3360						
	cgctg	ctct	gccc	ctgct	ggt	caggggc	taggt	ttgct	ggcact	gata	attccg	ttgt	3420						
	gtt	gtct	gtg	ccttct	agtt	gccagcc	atc	tgtt	gtttg	ccctccc	cg	tgcctt	ctt	3480					
	gaccct	ggaa	ggtg	ccact	gtcct	ttccta	aataa	aatgag	gaaa	ttgcat	cgca		3540						
	ttgtct	gagt	aggt	gtcatt	ctatt	ctggg	gggt	gggg	gtg	gggcag	gaca	gcaaggg	gga	3600					
	ggatt	gggaa	gaca	atagca	ggcat	gtctg	ggat	gcgg	tg	ggctct	atgg	ctctag	agca	3660					
	tggct	acgta	gata	agtagc	atggc	gggtt	aatcatt	aac	tacac	ctgca	gcagga	aacc	3720						
	ctagt	gatgg	agttg	ccac	tccct	ctctg	cgctc	ctgct	cgctc	ctgc	aggact	gagg	3780						
	ccggg	cgacc	aaag	gtcgc	cgacg	ccccg	gcg	ccct	cag	tcctg	cagg	agcgag	cgag	3840					
	cgcg	acgtg	cctg	cacggg	cgcc	cggt	ccggg	agatg	gggg	aggct	actgaa	aacac	3900						
	ggaag	gagac	aata	ccgaa	ggaac	ccgcg	ctatg	acggc	aataa	aaaga	cagaata	aaaa	3960						
	cgcac	gggtg	ttggg	tcgtt	gtttc	ataaa	cgcg	gggtt	c	gg	tccc	agg	ctgg	cactct	4020				
	gtc	gata	acc	caccg	agacc	ccatt	gggac	caata	cgcc	gcg	tttctt	ctt	ttccc	ca	4080				
	cccc	aacc	caag	ttcgg	tgaag	gccc	gggtc	gcag	ccaac	gtcgg	ggcg	caagc	4140						
	cctg	ccat	ag	ccacg	gg	tacg	ta	gact	actat	gact	gag	tcctg	gg	4200					
[0047]	cgaaca	aaacg	atgct	gcct	tccaga	aaac	cgagg	atgcg	aacc	acttca	tccggg	gtca	4260						
	gcacc	accgg	caagc	cccgc	gacgg	cccag	gtct	accgat	ctcct	gaagc	cagggc	agat	4320						
	ccgtg	cacag	cacct	tgccg	taga	agaaca	gcaag	gccgc	caatg	cctga	cgatg	ctgtg	4380						
	agacc	gaaac	cttgc	ctcgt	ttgcc	agcc	aggac	agaaa	tgctc	gact	tcgct	getgc	4440						
	ccaag	gttg	cgggt	gacgc	acacc	gtgga	aacgg	atgaa	ggcac	gaacc	cagtt	gacat	4500						
	aagc	ctgtt	ggttc	gtaaa	ctgta	atgca	agtag	cgat	gcgct	cacgc	aactg	gtcca	4560						
	gaac	ctgac	cgaac	gcagc	ggtg	gtaacg	gcg	cagttg	gg	tttcatg	gctt	gttatg	4620						
	actg	ttttt	tgtac	agtct	atgc	ctcggg	catcc	aagca	gcaag	cgct	tacg	ccgtg	4680						
	gtc	gatg	ttt	gatg	ttatg	agcag	caacg	atgtt	acgca	gcag	caacg	tgtt	acg	4740					
	cagg	gcag	tc	gcc	ctaaa	ac	aaag	ttag	ggct	caag	tggg	catcat	tcg	cacat	4800				
	agg	ctcgg	cc	ctg	acca	ag	caaat	ccatg	cggg	ctgctc	ttgat	ctttt	cggt	ctgtg	4860				
	ttcgg	agacg	tag	ccac	cta	ccaac	at	cagcc	gact	ccgatt	acct	cggg	aact	tg	4920				
	ctcc	gtag	ta	agac	att	cat	cg	ctt	gct	gc	aaga	agcgg	tgtt	ggc	gct	4980			
	ctc	cg	gctt	acg	ttct	gccc	caggt	ttgag	cagcc	gcgta	gtgag	atcta	tat	ctat	gat	5040			
	ctc	gcag	ttct	ccgg	cagca	ccgg	aggcag	ggcatt	tgcca	ccgc	gctcat	caat	ctc	ctc	5100				
	aag	catg	agg	cca	acgc	gct	tgg	tgtt	at	gtgat	ctacg	tgca	agc	aga	ttac	gg	gtgac	5160	
	gat	ccc	gcag	tgg	ctct	ctata	caa	agttg	ggc	atac	ggg	aaga	ag	tgat	gcact	ttgat	5220		
	atc	gac	ccca	gtacc	gccac	ctaaca	at	gttca	agccg	agat	cggtt	ccc	ggc	ccg	5280				
	gag	ttgt	tcg	gtaa	attg	tc	acaac	gccgc	gaat	atag	tc	ttt	acc	atgc	cctt	gg	ccac	5340	
	gccc	ctctt	taac	gac	gg	gca	at	ttgca	cttc	agaaa	tga	ag	ag	ttt	gctt	tag	cca	5400	
	taaca	aaag	ccag	tat	gct	ttt	tcac	agc	ata	act	gg	ac	tg	att	tcag	ttaca	act	at	5460
	tctg	tctag	tta	ag	act	ttt	atg	ctag	tttag	atcta	tttt	gtt	ctag	ttta	ag	act	tt	5520	
	tatt	gt	ccgc	ccac	ac	ccgc	ttac	gcagg	cat	ccat	ttta	ctca	acc	gta	acc	gatt	5580		

	ttgccaggtt	acgcggctgg	tctgcggtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	5640
	taccgcatca	ggcgetcttc	cgcttctctg	ctcactgaet	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	5700
	ctgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaag	gcgtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	5760
	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	5820
	gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	5880
	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	5940
	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	6000
	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgttttct	caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	6060
	gtgtaggtcg	ttcgtcctca	gctgggctgt	gtcacgaac	cccccgttca	gcccagaccg	6120
	tgcgccttat	ccggtaaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	6180
	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgagg	atgtaggcgg	tgctacagag	6240
	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	6300
	ctgtcgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggtagct	cttgatccgg	caaaacaacc	6360
	accgctggta	gcggtggttt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	6420
	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtgga	cgaaaactca	6480
	cgttaaggga	ttttggtcat	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	ccttttaaat	6540
	taaaaatgaa	gttttaaatc	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	6600
	caatgcttaa	tcagtgaggc	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	6660
	gcctgactcc	ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	6720
	gctgcaatga	taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atztatcagc	aataaaccag	6780
	ccagccggaa	gggccgagcg	cagaagtgg	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagtct	6840
[0048]	attaattggt	gccgggaagc	tagagtaagt	agttgccag	ttaatagttt	gcgcaacggt	6900
	gttgccattg	ctacagggat	cggtggtgca	cgctcgtcgt	ttggtatggc	ttcattcagc	6960
	tccggttccc	aacgatcaag	gcgagttaca	tgatcccca	tgttgtgcaa	aaaagcggtt	7020
	agctccttcg	gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagtgg	ccgcagtgtt	atcactcatg	7080
	gttatggcag	cactgcataa	ttctcttact	gtcatgcat	ccgtaagatg	cttttctgtg	7140
	actggtgagt	actcaaccaa	gtcattctga	gaatagtgt	tgcggcgacc	gagttgetct	7200
	tgcccggcgt	caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	gaactttaa	agtgtctatc	7260
	attgaaaac	gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctggt	gagatccagt	7320
	tcgatgtaac	ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcgtt	7380
	tctgggtgag	caaaaacagg	aaggcaaaat	gccgcaaaaa	agggaataag	ggcgacacgg	7440
	aaatggtgaa	tactcatact	cttctttttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	7500
	tgtctcatga	gcggatacat	atttgaatgt	atttagaaaa	ataaacaat	aggggttccg	7560
	cgcacatttc	cccgaaaagt	gccacctgaa	attgtaaacg	ttaatatttt	gttaaaattc	7620
	gcgttaaatt	tttgttaaat	cagctcattt	tttaaccaat	aggccgaaat	cggcaaaatc	7680
	ccttataaat	caaaaagaata	gaccgagata	gggttgagtg	ttgttccagt	ttggaacaag	7740
	agtcactat	taaagaacgt	ggactccaac	gtcaaagggc	gaaaaaccgt	ctatcagggc	7800
	gatggcccac	tacgtgaacc	atcacctaa	tcaagttttt	tggggtcgag	gtgccgtaaa	7860
	gactaaatc	ggaaccctaa	aggagcccc	cgatttagag	cttgacgggg	aaagccggcg	7920
	aactggtcga	gaaaggaagg	gaagaaagcg	aaaggagcgg	gcgctagggc	gctggcaagt	7980
	gtagcggtea	cgctgcgctg	aaccaccaca	cccgcgcgc	ttaatgcgcc	gctacagggc	8040
	gcgtcccatt	cgccattcag	gctgcaaata	agcgttgata	ttcagtcaat	tacaaacatt	8100
	aataacgaag	agatgacaga	aaaattttca	ttctgtgaca	gagaaaaagt	agccgaagat	8160
	gacggtttgt	cacatggagt	tggcaggatg	tttgattaaa	aacataacag	gaagaaaaat	8220

gccccgctgt gggcggacaa aatagttggg aactgggagg ggtggaaatg gagtttttaa	8280
ggattattta gggaagagtg acaaaataga tgggaactgg gtgtagcgtc gtaagctaata	8340
acgaaaatta aaaatgacaa aatagtttgg aactagattt cacttatctg gttcggatct	8400
cctagtgage tccttgc	8418
<210> 1119	
<211> 225	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1119	
tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgaccct	60
ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct	120
gagtaggtgt cattctattc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg	180
ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggc	225
<210> 1120	
<211> 1177	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1120	
ggctcagagg ctcagaggca cacaggagt tctgggctca cctgcccc ttccaacccc	60
tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaac	120
ttcagcctac tcattgccct aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac	180
agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctgggccc	240
tgccacctec aacatccact cgacctctg gaatttcggt ggagaggagc agaggttgtc	300
ctggcgttgt ttaggtagt tgagagggtc cgggttcaa accacttgct gggtagggag	360
tcgtcagtaa gtggctatgc cccgacccc aagcctgtt ccccatctgt acaatgaaa	420
tgataaagac gccatctga tagggtttt gtggcaata aacatttgtt tttttgtt	480
tgttttgtt tgtttttga gatggaggt tgctctgtc cccaggctgg agtgagtg	540
cacaatctca tctcaccaca accttcccct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca	600
agcatgtgcc accacacctg gctaatttc ttttttagt agagacgggt ttctccatgt	660
tggtcagcct cagcctccca agtaactggg attacaggcc tgtgccacca caccgggcta	720
atTTTTtcta tttttgacag ggacggggt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctagaggt	780
accgatctt gctaccagtg gaacagccac taaggattct gcagtgagag cagagggcca	840
gctaagtgtg actctcccag agactgtctg actcagcca cccctccac ctggacaca	900
ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactccttc ggtaagtga gtggaagctg	960
tactactgcc aggcaaagcg tccgggcagc gtagggggc gactcagatc ccagccagtg	1020
gacttagccc ctgtttctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca	1080
gcctcccccg ttgccctct ggatccactg cttaaatac gacgaggaca gggcctgtc	1140
tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagt	1177

[0049]

<210> 1121	
<211> 1326	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1121	
ctgcagggcc cactagtgga gccgagagta attcatacaa aaggagggat cgccttcgca	60
aggggagagc ccagggaccg tcctaaatt ctcacagacc caaatccctg tagccgcccc	120
acgacagcgc gaggagcatg cgcccagggc tgagcgcggg tagatcagag cacacaagct	180
cacagtcccc ggcgggtggg ggaggggccc gctgagcggg ggccaggag ctggcgcggg	240
gcaaaactggg aaagtgggtg cgtgtgctgg ctccgccctc ttcccaggag tgggggagaa	300
cggtatataa gtgcggtagt gccttggac gttcttttc gcaacgggtt tgccgtcaga	360
acgcaggtga gtggcgggtg tggcttccgc gggccccgga gctggagccc tgctctgagc	420
gggcccggct gatatgcgag tgtcgtccgc agggtttagc tgtgagcatt cccacttoga	480
gtggcgggcg gtgcgggggt gagagtgcga ggcttagcgg caaccccgta gcctcgctc	540
gtgtccggtc tgaggcctag cgtggtgtcc gccgccgct gccactccgg ccgcaactatg	600
cgttttttgt ccttgetgcc ctcgattgcc ttccagcagc atgggctaac aaagggaggg	660
tgtgggctc actcttaagg agcccatgaa gttacgttg gataggaatg gaagggcagg	720
aggggcgact ggggcccgcc cgcttcgga gcacatgtcc gacgccacct ggatggggcg	780
aggcctgttg ctttccgaag caatcgggcg tgagttagc ctacctgggc catgtggccc	840
tagcactggg cacggtctgg cctggcgggt ccgcgttccc ttgcctccca acaaggttga	900
ggcctcccc cccggcacca gttgcttgcg cggaaagatg gccgctccc gggccctgtt	960
gcaaggagct caaaatggag gacgcggcag cccggtggag cgggcgggtg agtcaccac	1020
acaaaggaag agggccttgc ccctcgccgg ccgctgctc ctgtgacccc gtggtctatc	1080
ggccgcatag tcacctcggg cttctcttga gcaccgctc tcgcccggg gggaggggat	1140
ctaattggcgt tggagtttgt tcacatttgg tgggtggaga ctagttaggc cagcctggcg	1200
ctggaagtca ttcttggat ttgcccttt gagtttgag cgaggctaata tctcaagcct	1260
cttagcgggt caaaggtatt ttctaaacct gttccaggt gttgtgaaag ccaccgctaa	1320
ttcaaa	1326
<210> 1122	
<211> 573	
<212> DNA	
<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
<400> 1122	
gtaagagttt tatgtttttt catctctgct tgtattttcc tagtaatgga agcctggtat	60
tttaaaatag ttaaattttc ctttagtctg gatttctaga ttattattac tgttgttgtt	120
gttattattg tcattatttg catctgagaa cccttaggtg gttatattat tgatatattt	180
ttggtatctt tgatgacaat aatgggggat ttgaaagct tagctttaa tttcttttaa	240
ttaaaaaaa atgctaggca gaatgactca aattacgttg gatacagttg aatttattac	300
ggtctcatag ggcctgcctg ctgaccatg ctatactaaa aattaaagt gtgtgttact	360
aattttataa atggagtctc catttatatt tacctttatt tcttatttac cattgtctta	420
gtagatattt acaaacatga cagaaacact aatctttgag tttgaatgca cagatataaa	480

[0050]

	cacttaacgg gttttaaaaa taataatggt ggtgaaaaaa tataactttg agtgtagcag	540
	agaggaacca ttgccacctt cagattttcc tgt	573
	<210> 1123	
	<211> 1993	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠 (Mus musculus)	
	<400> 1123	
	acgatcggga actggcatct tcagggagta gcttaggtca gtgaagagaa gaacaaaaag	60
	cagcatatta cagttagttg tcttcatcaa tctttaaata tgtttgttgg tttttctctc	120
	cctgtttcca cagacaagag tgagatcgcc catcggata atgatttggg agaacaacat	180
	ttcaaaggcc tgtaagttaa aatgctgaaa gccacttaa ttttctggt agtattagtt	240
	aaagttttaa aacacctttt tccaccttga gtgtgagaat tgtagagcag tgctgtccag	300
	tagaaatgtg tgcattgaca gaaagactgt ggatctgtgc tgagcaatgt ggcagccaga	360
	gatcacaagg ctatcaagca ctttgcacat ggcaagtgt actgagaagc acacattcaa	420
	ataatagtta attttaattg aatgtatcta gccatgtgtg gctagtagct cctttcctgg	480
	agagagaate tggagccac atctaacttg ttaagtctgg aatcttattt tttatttctg	540
	gaaaggtcta tgaactatag ttttgggggc agctcactta ctaactttta atgcaataag	600
	atctcatggt atcttgagaa cattattttg tctctttgta gtactgaaac cttatacatg	660
	tgaagtaagg ggtctatact taagtcacat ctccaacctt agtaatgttt taatgtagta	720
	aaaaaatgag taattaattt atttttagaa ggtcaatagt atcatgtatt ccaataaaca	780
	gaggtatatg gttagaaaag aaacaattca aaggacttat ataatatcta gccttgacaa	840
[0051]	tgaataaatt tagagagtag tttgcctggt tgcctcatgt tcataaatct attgacacat	900
	atgtgcatct gcacttcagc atggtagaag tccatattcc tttgcttggg aaggcagggtg	960
	ttcccattac gcctcagaga atagctgacg ggaagaggct ttctagatag ttgtatgaaa	1020
	gatatacaaa atctcgcagg tatacacagg catgatttgc tggttgggag agccacttgc	1080
	ctcactactga ggtttttgtg tctgcttttc agagtctga ttgccttttc ccagtatctc	1140
	cagaaatgct catacgatga gcatgccaaa ttagtgcagg aagtaacaga ctttgcaaaag	1200
	acgtgtgttg ccgatgagtc tggcgccaac tgtgacaaat cccttgtgag taccttctga	1260
	ttttgtggat ctactttcct gctttctgga actctgtttc aaagccaatc atgactccat	1320
	cacttaaggc cccggaaca ctgtggcaga ggcagcaga gagattgata aagccagggt	1380
	gatgggaatt ttctgtggga ctccatttca tagtaattgc agaagctaca atacactcaa	1440
	aaagtctcac cacatgactg cccaaatggg agcttgacag tgacagtgc agtagatag	1500
	ccaaagtgga tgagggaaag accacaagag ctaaacctg taaaaagaac ttaggcaac	1560
	taaggaatgc agagagaaga agttgccttg gaagagcata ccaactgcct ctccaatacc	1620
	aatggtcatc cctaaaaacat acgtatgaat aacatgcaga ctaagcaggc tacatttagg	1680
	aatatacatg tatttacata aatgtatatg catgtaacaa caatgaatga aaactgaggt	1740
	catggatctg aaagagagca agggggctta catgagaggg tttggaggga ggggttggag	1800
	ggaggagggt attattcttt agttttacag ggaacgtagt aaaaacatag gcttctccca	1860
	aaggagcaga gccatgagg agctgtgcaa ggttccccag cttgatttta cctgctctc	1920
	aaattccctt gatttgtttt tattataatg actttactcc tagcttttag tgtcagatag	1980
	aaaacatgga agg	1993
	<210> 1124	
	<211> 1350	
	<212> DNA	

	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 1124	
	taggaggctg aggcaggagg atcgcttgag cccaggagt cgagaccagc ctgggcaaca	60
	tagtgtgac ttgtatctat aaaaataaac aaaattaget tgggtgtgtg gcgcctgtag	120
	tccccagcca cttggagggg tgaggtgaga ggattgcttg agcccgggat ggtccaggct	180
	gcagtgagcc atgatcgtgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtga gaccctgtct	240
	cacaacaaca acaacaacaa caaaaaggct gagctgcacc atgcttgacc cagtttctta	300
	aaattgttgt caaagetttc ttcactccat ggtgctatag agcacaagat tttatttgg	360
	gagatggtgc tttcatgaat tcccccaaca gagccaagct ctccatctag tggacagga	420
	agctagcagc aaaccttccc ttcactacaa aacttcattg cttggccaaa aagagagtta	480
	attcaatgta gacatctatg taggcaatta aaaacctatt gatgtataaa acagtttga	540
	ttcatggagg gcaactaaat acattctagg actttataaa agatcacttt ttatttatgc	600
	acagggtgga acaagatgga ttatcaagt tcaagtccaa tctatgacat caattattat	660
	acatcggagc cctgccccaa aatcaatgtg aagcaaatcg cagcccgcct cctgcctccg	720
	ctctactcac tgggtgttcat ctttggtttt gtgggcaaca tgctggtcat cctcatcctg	780
	ataaactgca aaaggctgaa gagcatgact gacatctacc tgctcaacct ggccatctct	840
	gacctgtttt tccttcttac tgtccccttc tgggctcact atgctgccgc ccagtgggac	900
	tttggaaata caatgtgtca actcttgaca gggtctatt ttataggctt cttctctgga	960
	atcttcttca tcctctctct gacaatcgat aggtacctgg ctgtcgtcca tgctgtgttt	1020
	gctttaaag ccaggacggt cacctttggg gtggtgacaa gtgtgatcac ttgggtgtgtg	1080
	gctgtgtttg cgtctctccc aggaatcctc ttaccagat ctcaaaaaga aggtcttcat	1140
[0052]	tacacctgca gctctcattt tccatacagt cagtatcaat tctggaagaa tttccagaca	1200
	ttaaagatag tcactcttgg gctgtgtctg ccgctgcttg tcatggtcat ctgctactcg	1260
	ggaatcctaa aaactctgct tcggtgtcga aatgagaaga agaggcacag ggctgtgagg	1320
	cttatcttca ccatcatgat tgtttatttt	1350
	<210> 1125	
	<211> 1223	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 1125	
	tgacagagac tcttgggatg acgcaactgct gcatcaacce catcatctat gcctttgtcg	60
	gggagaagtt cagaaactac ctcttagtct tcttccaaaa gcacattgcc aaacgcttct	120
	gcaaatgctg ttctattttc cagcaagagg ctcccagcgc agcaagctca gtttacaccc	180
	gatccactgg ggagcaggaa atatctgtgg gcttgtgaca cggactcaag tgggctggtg	240
	accagtcag agttgtgcac atggcttagt tttcatacac agcctgggct gggggtgggg	300
	tgggagaggt cttttttaa aggaagttac tgttatagag ggtctaagat tcattcattt	360
	atttggcacc tgtttaaagt agattagatc ttttaagccc atcaattata gaaagccaaa	420
	tcaaaatgat ttgatgaaaa atagcaacct tttatctcc cttcacatg catcaagtta	480
	ttgacaaact ctcccttcac tccgaaagt cttatgtat atttaaaaga aagcctcaga	540
	gaattgctga ttcttgagtt tagtgatctg aacagaaata ccaaaattat ttcagaaatg	600
	tacaactttt tacctagtac aaggcaacat ataggttga aatgtgttta aaacaggtct	660
	ttgtcttctg atggggagaa aagacatgaa tatgattagt aaagaaatga cacttttcat	720
	gtgtgatttc cctccaagg tatggttaat aagtttact gacttagaac caggcgagag	780
	acttgtggcc tgggagagct ggggaagctt cttaaattag aaggaatttg agttggatca	840

tctattgctg gcaaagacag aagcctcact gcaagcactg catgggcaag cttggctgta	900
gaaggagaca gagctggttg ggaagacatg gggaggaagg acaaggctag atcatgaaga	960
accttgacgg cattgctccg tctaagtcac gagctgagca gggagatcct ggttggtggtt	1020
gcagaagggtt tactctgtgg ccaaaggagg gtcaggaagg atgagcattt agggcaagga	1080
gaccaccaac agccctcagg tcagggtgag gatggcctct gctaagctca aggcgtgagg	1140
atgggaagga gggaggtatt cgtaaggatg ggaaggaggg aggtattcgt gcagcatatg	1200
aggatgcaga gtcagcagaa ctg	1223
<210> 1126	
<211> 215	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1126	
gaacgctgac gtcatacaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa	60
caccacgcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atgctgtga gggacagggg agtggcgccc	120
tgcaatattt gcatgtcget atgtgttctg gaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg	180
gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accac	215
<210> 1127	
<211> 141	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
多核苷酸	
<400> 1127	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgetca cctaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctaggtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc t	141
<210> 1128	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>人工序列的描述: 合成	
寡核苷酸	
<400> 1128	
gcgcgctcgc tcgctcacc	19
<210> 1129	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0053]

	<223>人工序列的描述：合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1129	
	ctaggtgagc gagcgagcgc gc	22
	<210> 1130	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1130	
	cctgcaggac tgaggccgcc cgggcaaagc ccggcgctcg ggcgaccttt ggtcgcccgg	60
	cctcagtccct gcagg	75
	<210> 1131	
	<211> 130	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成	
	多核苷酸	
[0054]	<400> 1131	
	aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagt	60
	gcggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gcgcaactcag tgagcgagcg agcgcgcagc	120
	tgctgcagg	130
	<210> 1132	
	<211> 142	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成	
	多核苷酸	
	<400> 1132	
	cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctcc ctaggactga ggccgcccgg gcgtcgggcg	60
	acctttggtc gcccgccctc agtcctaggg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc	120
	aactccatca ctaggggttc ct	142
	<210> 1133	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1133	

	gcgcgctcgc tcgctcactg agtgcgggcg accaaaggtc gcccgcgccc cgggcgact	60
	cagtgagcga gcgagcgcgc	80
	<210> 1134	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1134	
	gcgcgctcgc tcgctcactg a	21
	<210> 16135	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1135	
	gtgagcgcgc gagcgcgc	18
	<210> 1136	
	<211> 89	
[0055]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1136	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgactttgtc	60
	gcccggcctc agtgagcgcgc cgagcgcgc	89
	<210> 1137	
	<211> 89	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1137	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg acaaagtcgc ccgacgcccg ggctttgccc	60
	ggcggcctc agtgagcgcgc cgagcgcgc	89
	<210> 1138	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	寡核苷酸		
	<400> 1138		
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgattttcgc	60	
	ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgc	87	
	<210> 1139		
	<211> 87		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	寡核苷酸		
	<400> 1139		
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaaatcgccc gacgcccggg ctttgcccgg	60	
	gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc	87	
	<210> 1140		
	<211> 85		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
[0056]	<223>人工序列的描述：合成		
	寡核苷酸		
	<400> 1140		
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgccc ggcaaagccc gggcgtcggg cgtttcgccc	60	
	ggcctcagt agcgagcgag cgcgc	85	
	<210> 1141		
	<211> 85		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	寡核苷酸		
	<400> 1141		
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg aaacgcccga cgcccgggct ttgcccgggc	60	
	ggcctcagt agcgagcgag cgcgc	85	
	<210> 1142		
	<211> 89		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223>人工序列的描述：合成		
	寡核苷酸		
	<400> 1142		

	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg gaaaccgcg gcgtcggcg acctttggtc	60
	gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcg	89
	<210> 1143	
	<211> 89	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1143	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggtttccc	60
	ggcggcctc agtgagcgag cgagcgcg	89
	<210> 1144	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1144	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg gaaaccggcg gtcggcgac ctttggtcgc	60
[0057]	ccggcctcag tgagcgagcg agcgcg	87
	<210> 1145	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1145	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggcg accaaaggtc gcccgacgcc cggtttccgg	60
	gcgcctcag tgagcgagcg agcgcg	87
	<210> 1146	
	<211> 85	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成 寡核苷酸	
	<400> 1146	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg aaacggcgt cggcgacct ttggtcgecc	60
	ggcctcagtg agcgagcgag cgcg	85
	<210> 1147	
	<211> 85	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1147	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgtttcgggc	60
	ggcctcagtg agcgagcgag cgcgc	85
	<210> 1148	
	<211> 83	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1149	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcca aaggcgctcg ggcgaccttt ggtcgcccgg	60
	cctcagtgag cgagcgagcg cgc	83
	<210> 11150	
	<211> 83	
	<212> DNA	
[0058]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1151	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc ctttgggcg	60
	cctcagtgag cgagcgagcg cgc	83
	<210> 1151	
	<211> 81	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1152	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcca aaggcgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc	60
	tcagtgagcg agcgagcgcg c	81
	<210> 1153	
	<211> 81	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	

	寡核苷酸	
	<400> 1153	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc ttggcggcc	60
	tcagtgagcg agcgagcgcg c	81
	<210> 1154	
	<211> 79	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1154	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcaa gcgctcgggcg acctttggtc gcccggcctc	60
	agtgagcgag cgagcgcgc	79
	<210> 1155	
	<211> 79	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
[0059]	<400> 1155	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgct ttgcggcctc	60
	agtgagcgag cgagcgcgc	79
	<210> 1156	
	<211> 81	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1156	
	ctgcgcgctc gctcgetcac tgaggccgaa acgctcgggcg acctttggtc gcccggcctc	60
	agtgagcgag cgagcgcgca g	81
	<210> 1157	
	<211> 81	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1157	
	ctgcgcgctc gctcgetcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgaag ttctggcctc	60
	agtgagcgag cgagcgcgca g	81

	<210> 18158	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1158	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgcgagc ctcagtgagc	60
	gagcgagcgc gc	72
	<210> 1159	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1159	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgcgagc cggcgggcct	60
	cagtgagcga gcgagcgcgc	80
	<210> 1160	
[0060]	<211> 79	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 11160	
	gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcccgg gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc	60
	agtgagcgag cgagcgcgc	79
	<210> 1161	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述: 合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1151	
	ggagtcaaag ttctgtttgc cctgatctgc atcgtgtgg ccgaggcc	48
	<210> 1162	
	<211> 99	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223>人工序列的描述：合成	
	寡核苷酸	
	<400> 1162	
	attcatacca acttgaagaa aaagttcagc ctcttcatcc tggcttttct cctgttcgca	60
	gtcatctgtg ttggaagaa agggagcgac tatgaggcc	99
	<210> 1163	
	<211> 588	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223>人工序列的描述：合成	
[0061]	多核苷酸	
	<400> 1163	
	gcccctctcc ctccccccc cctaacgta ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt	60
	gtgcgtttgt ctatatgta ttttccacca tattgccgtc ttttgcaat gtgagggcc	120
	ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttctagggg tctttccct ctcgcaaag	180
	gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac	240
	aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcagc agcggaacce cccacctggc gacaggtgcc	300
	tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaa ggccgcacaa cccagtgcc	360
	acgttgtagg ttgatagtt gtgaaagag tcaaattggc ctctcaagc gtattcaaca	420
	aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcgt	480
	gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg	540
	gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacc	588

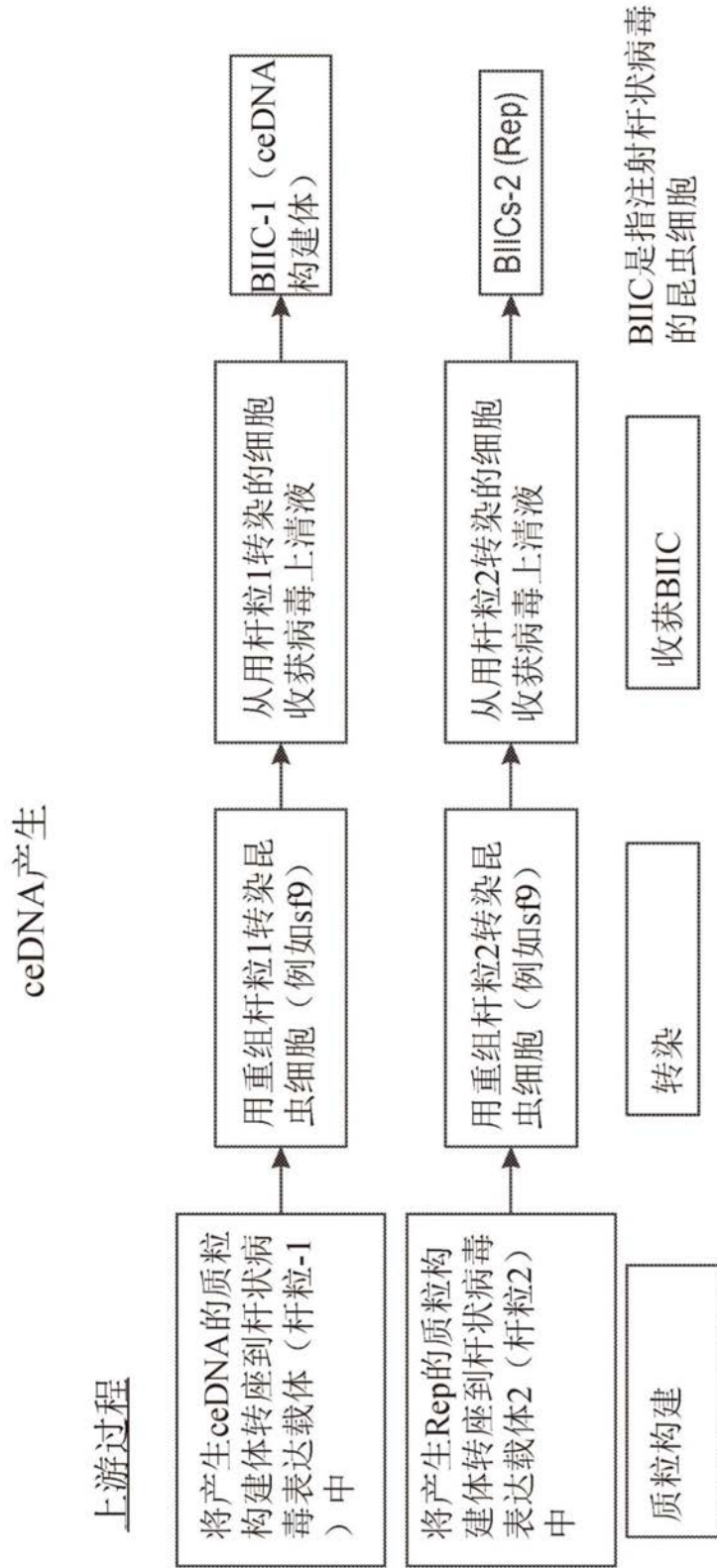


图1

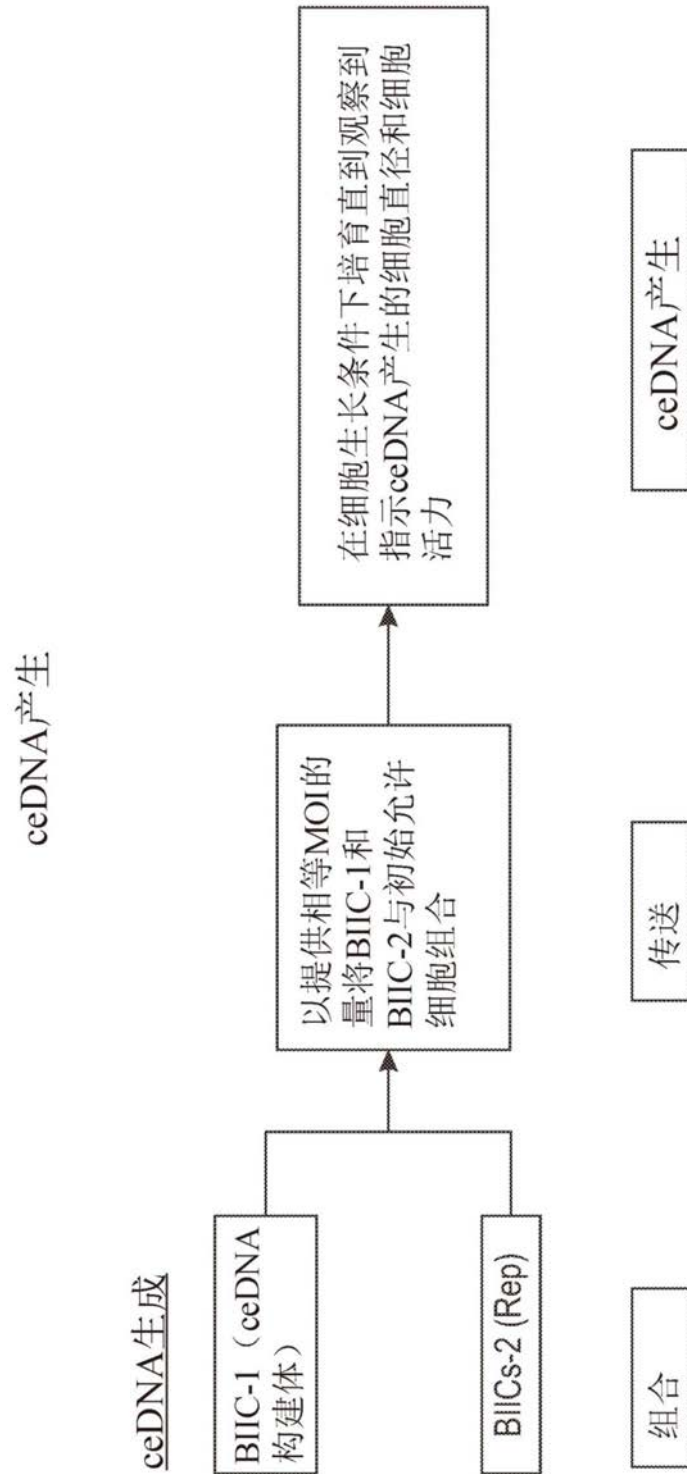


图2

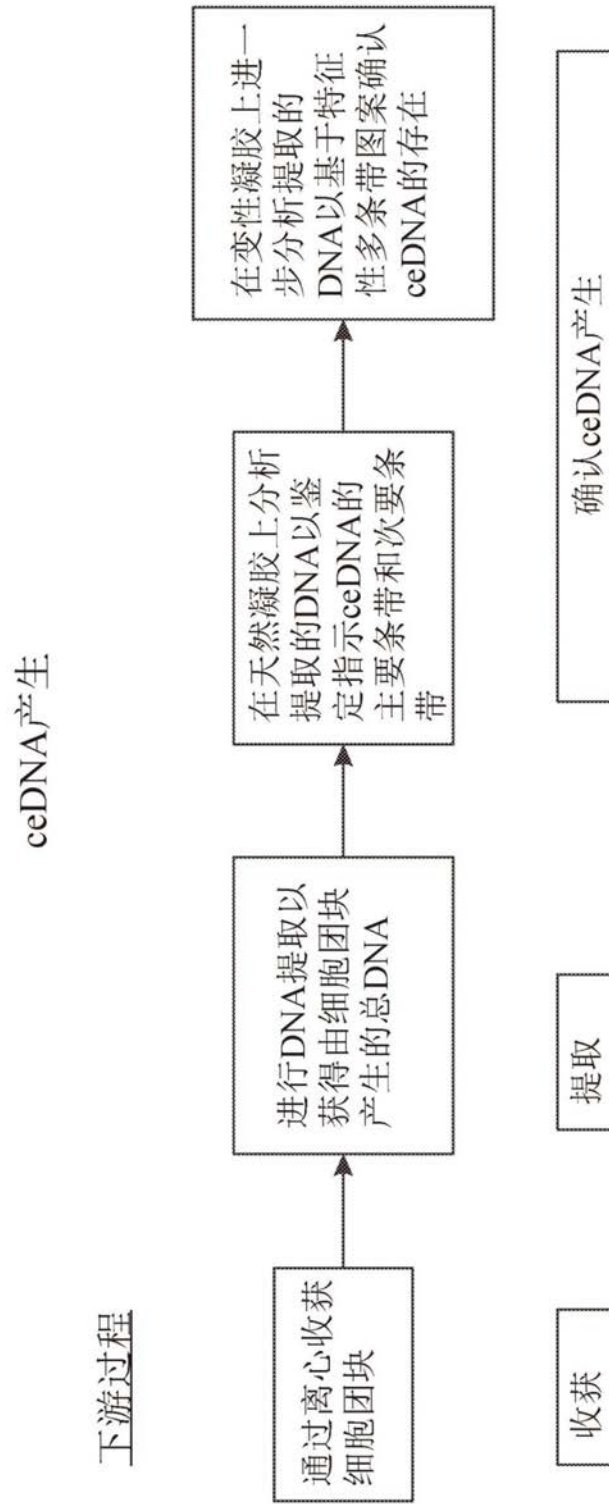


图3

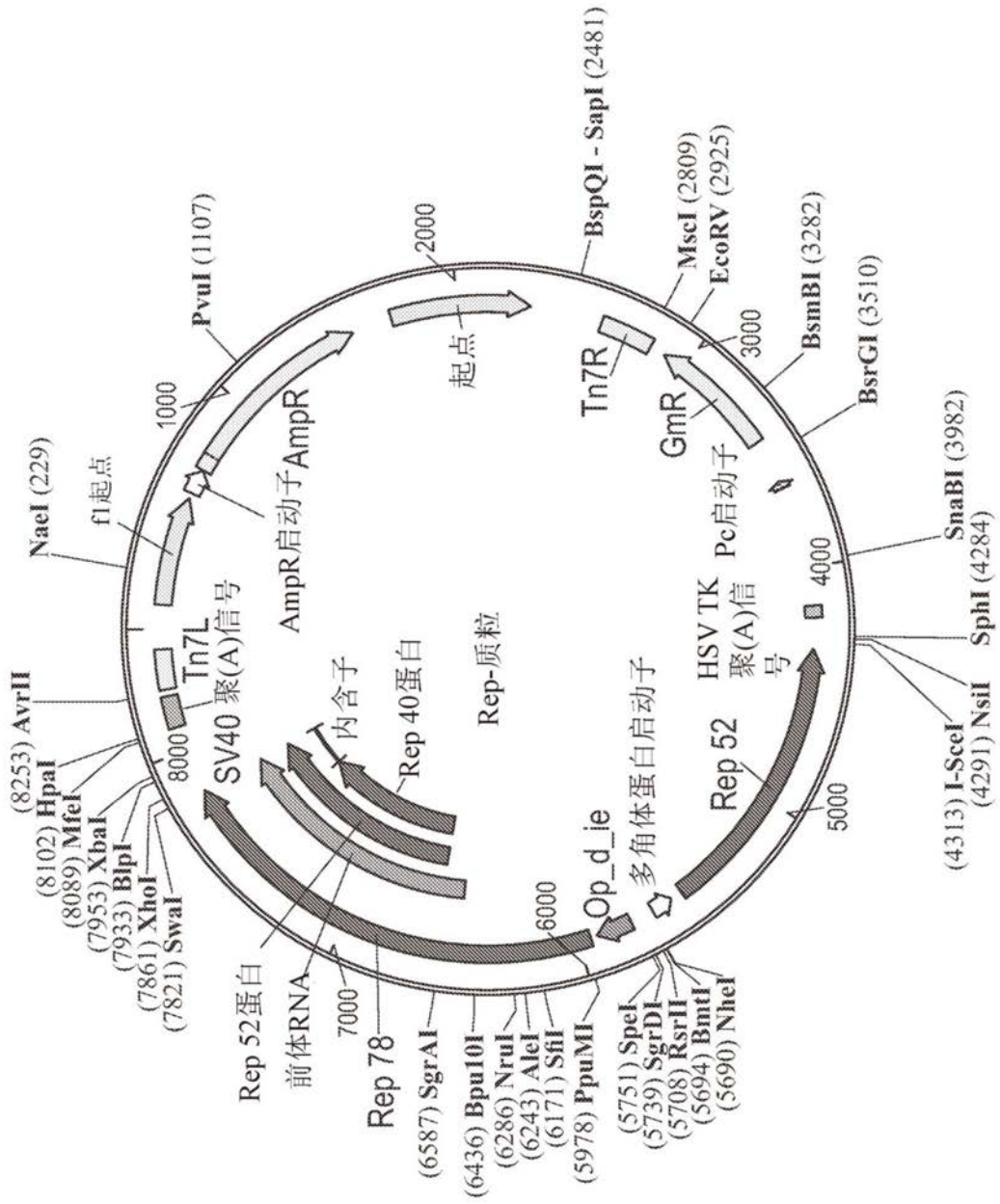


图4A

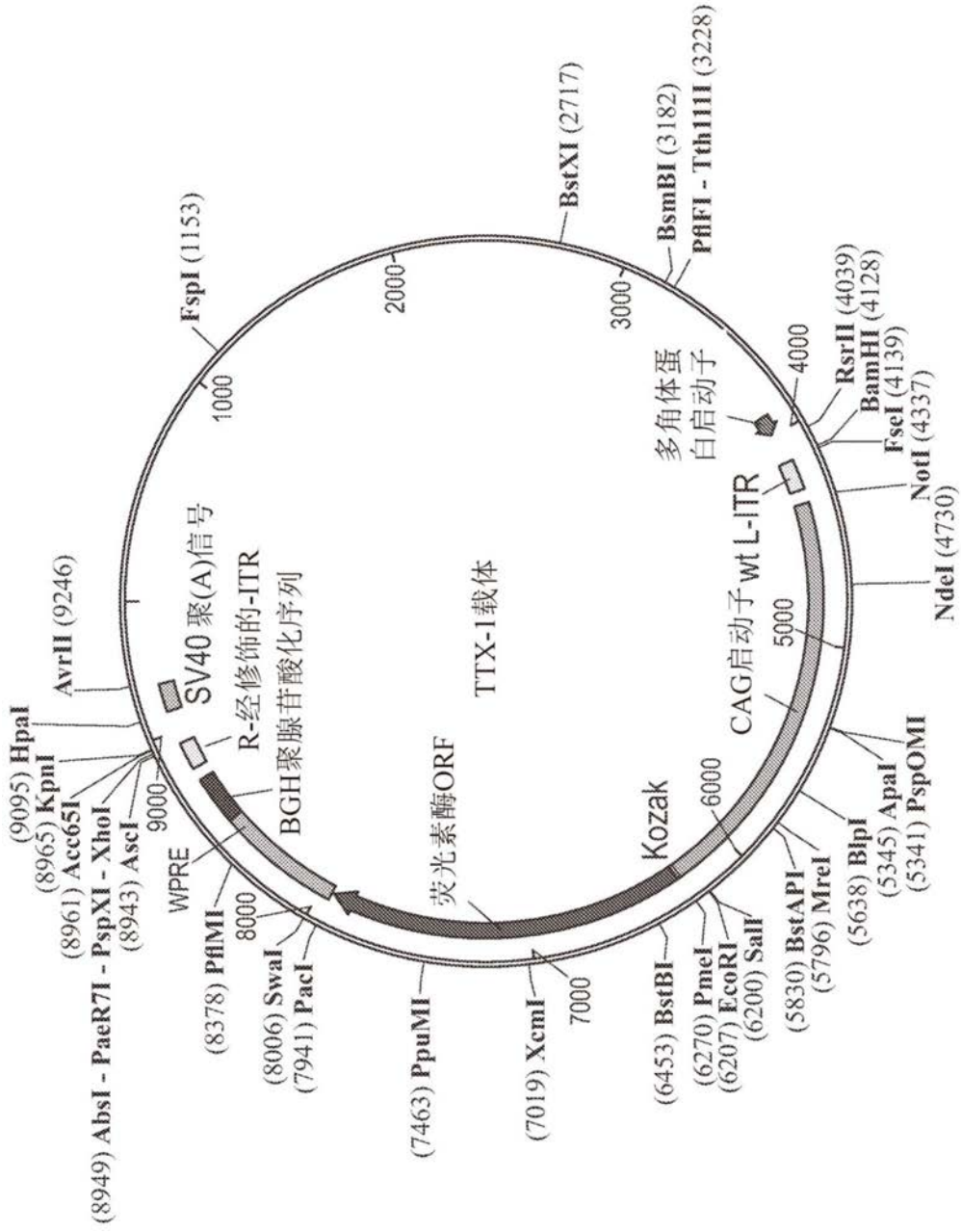


图4B

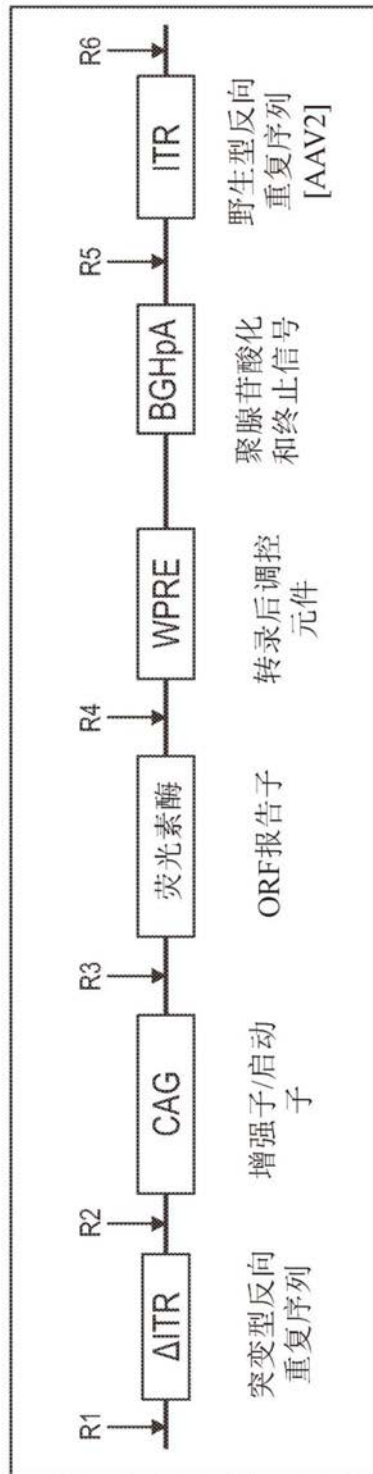


图4C

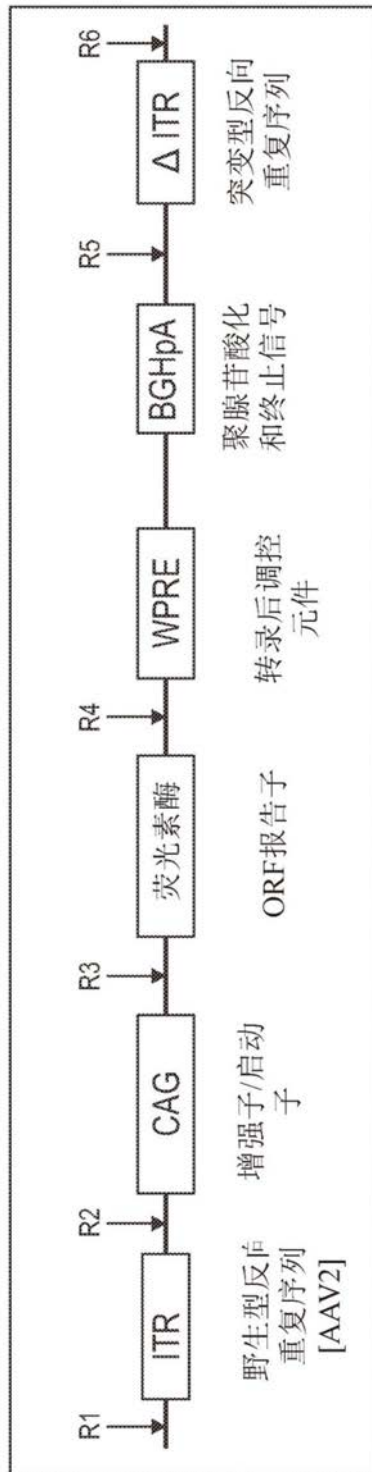


图4D

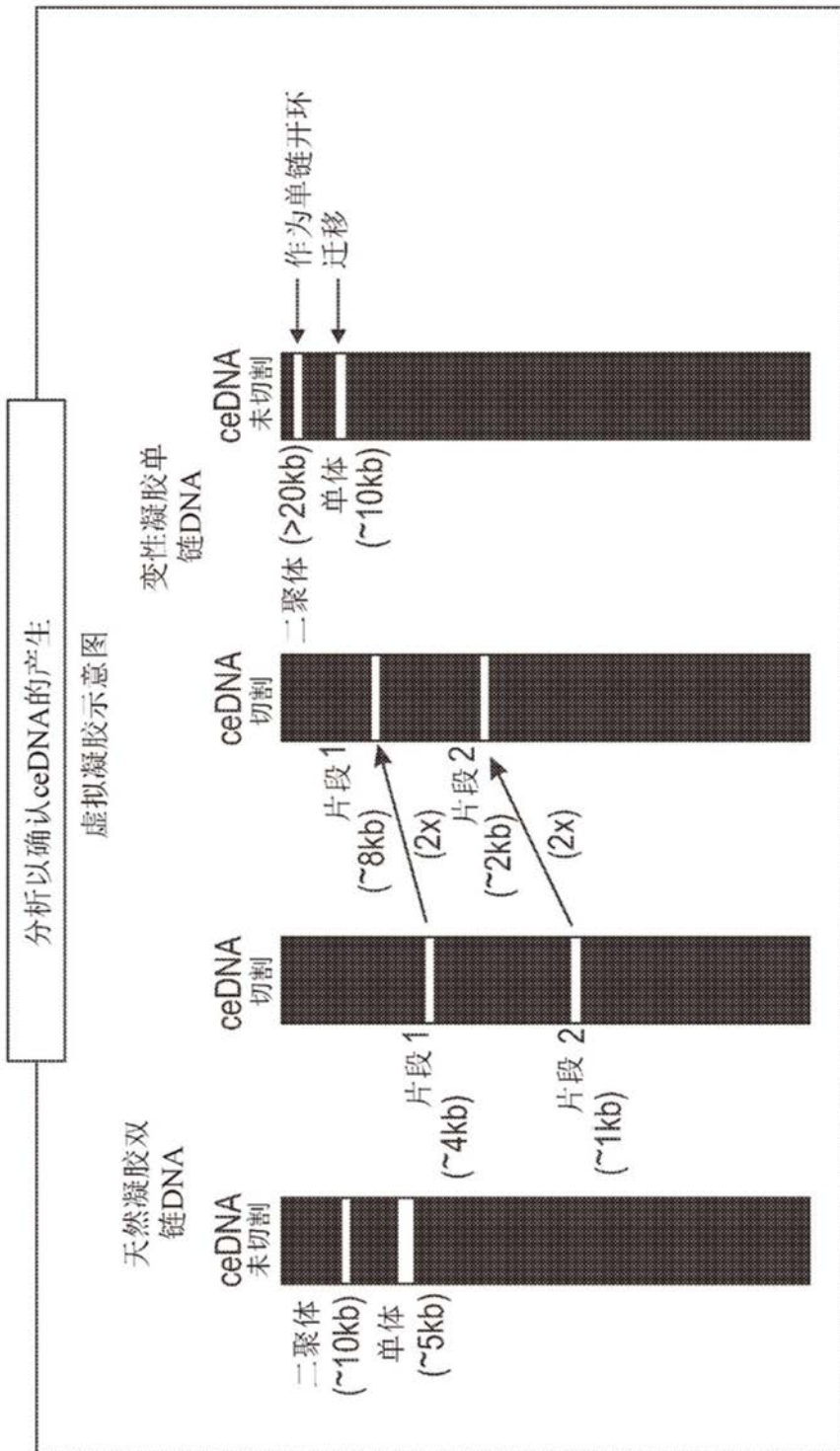


图5A

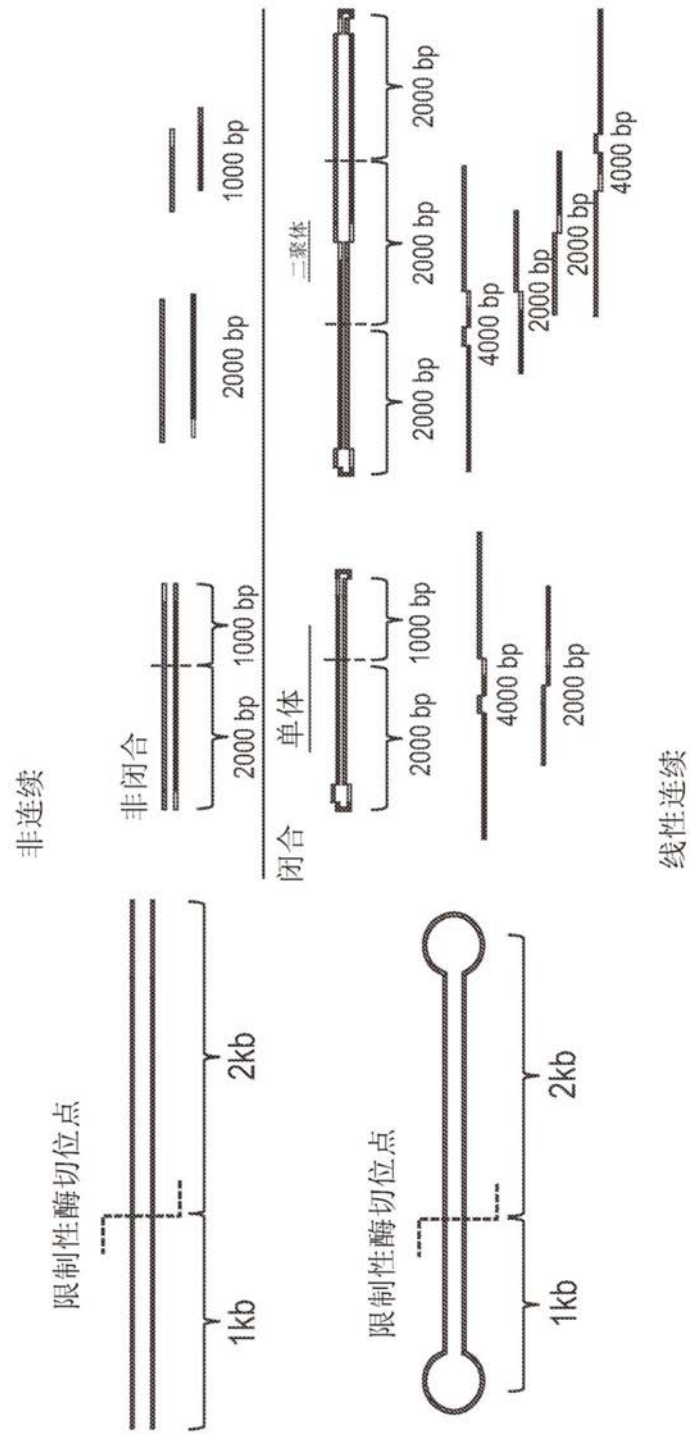


图5B

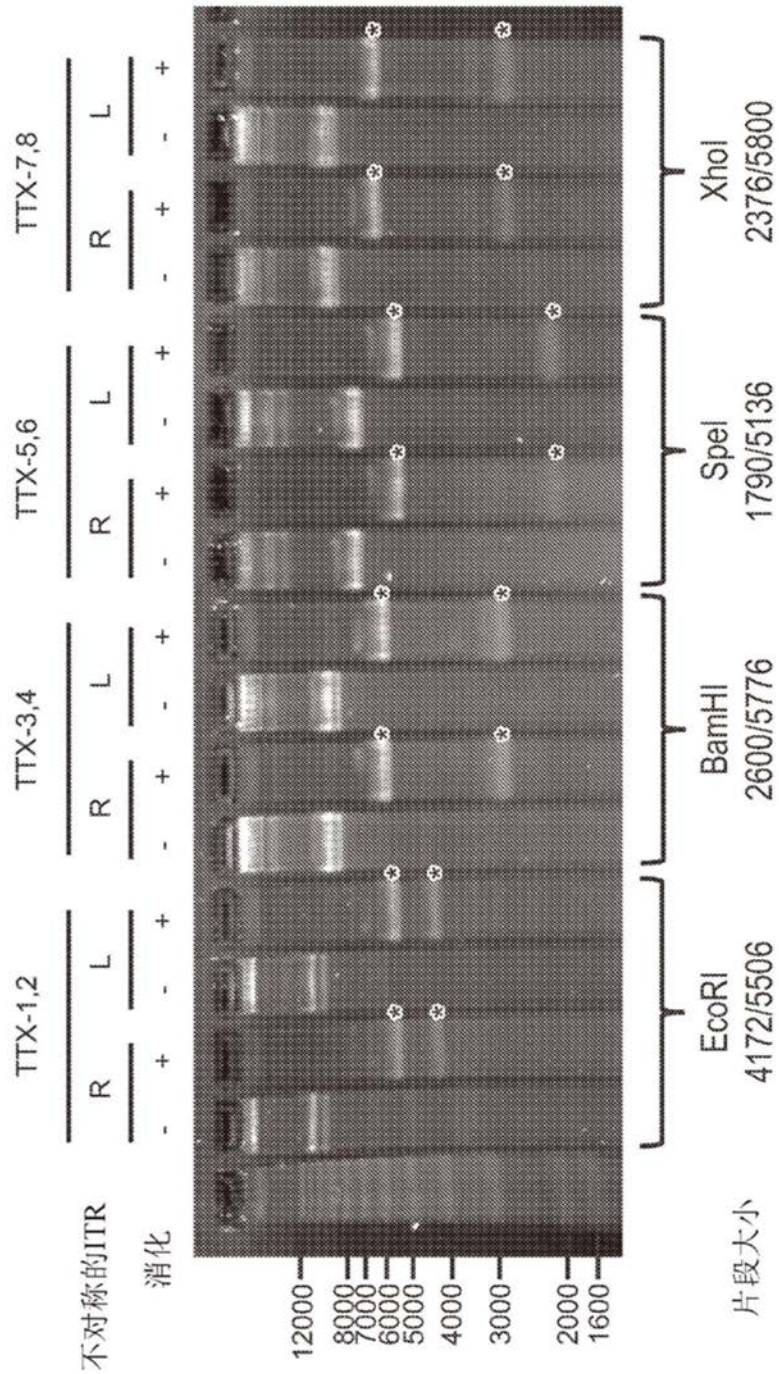


图6

ceDNA定量 - 质粒标准曲线

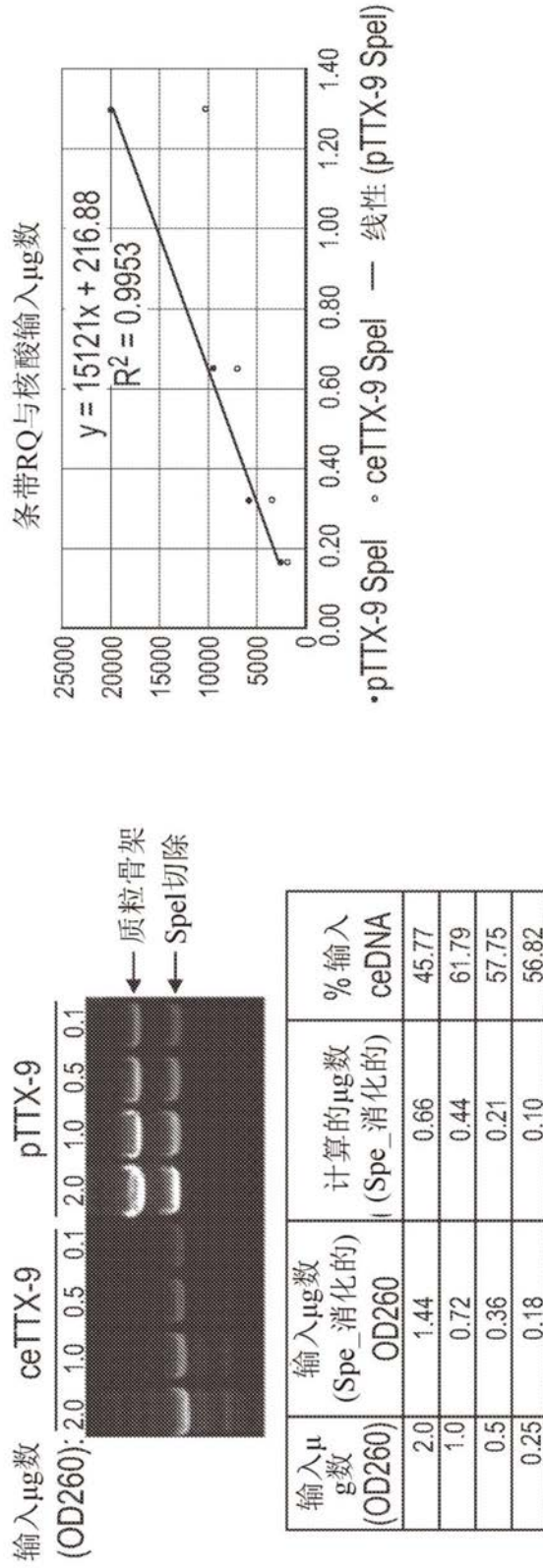


图7

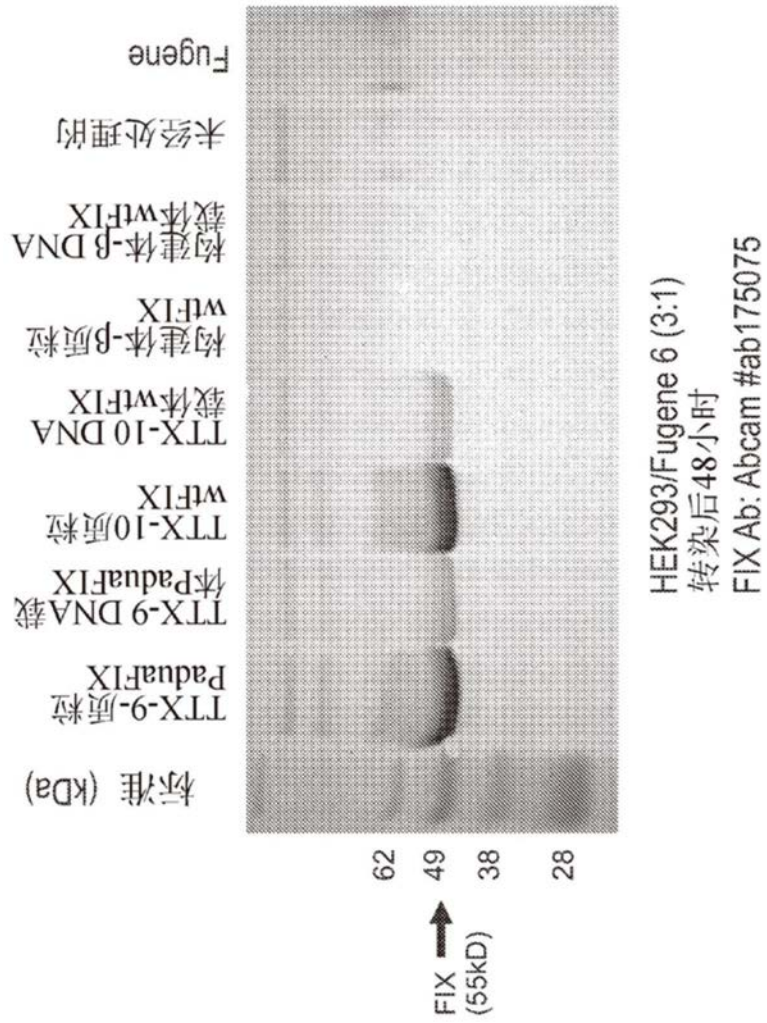


图8

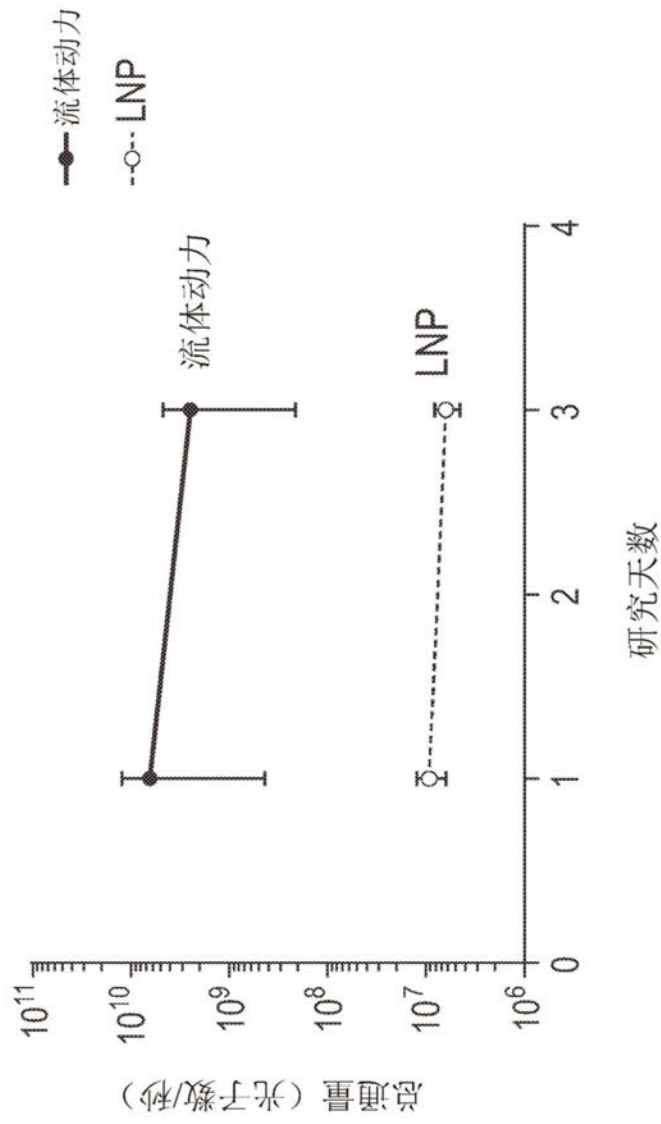


图9

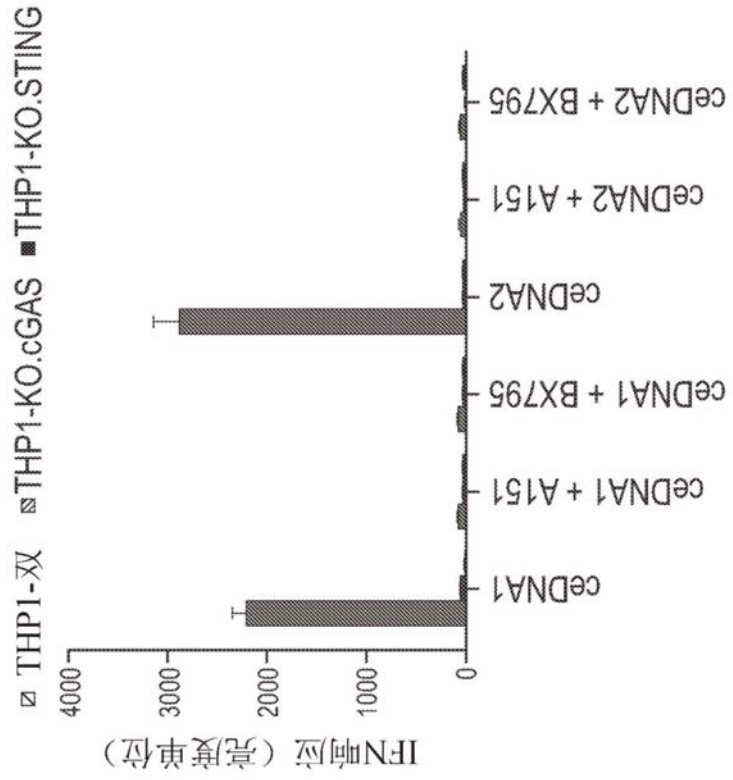


图10A

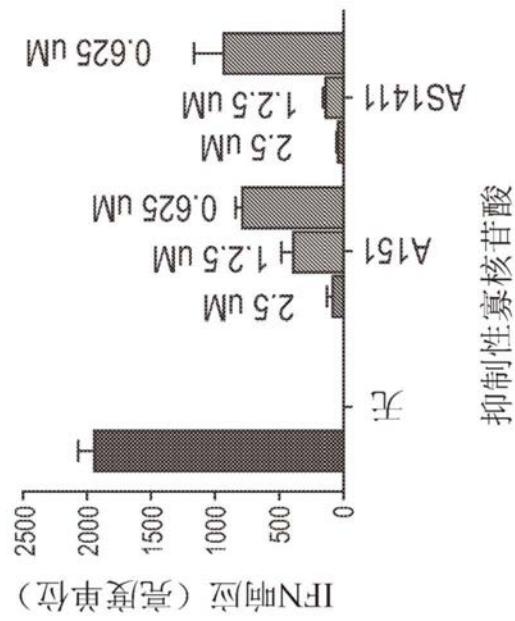


图10B

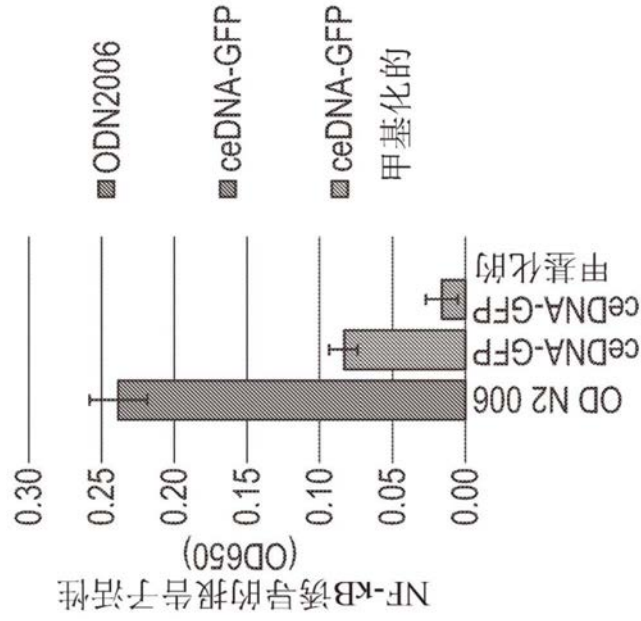


图11A

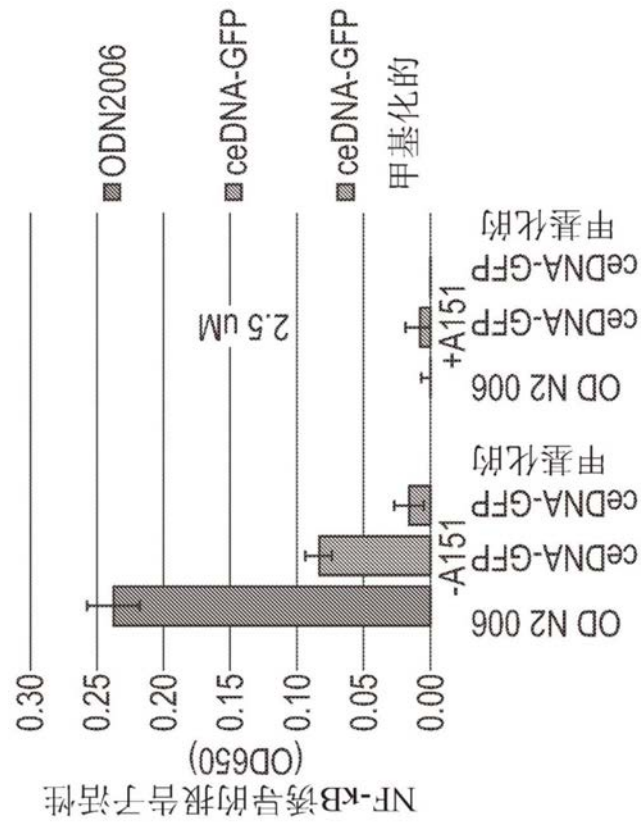


图11B

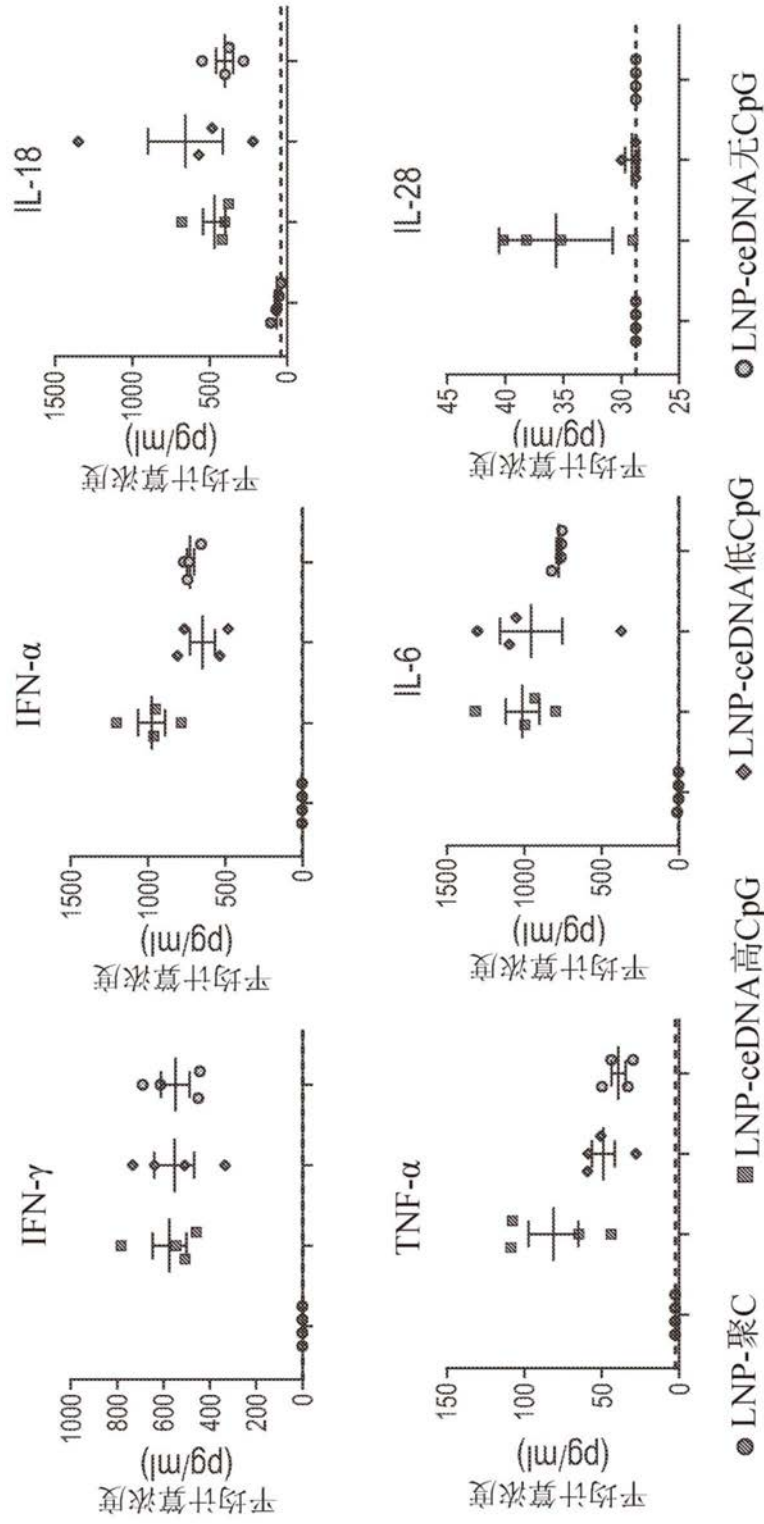


图12A

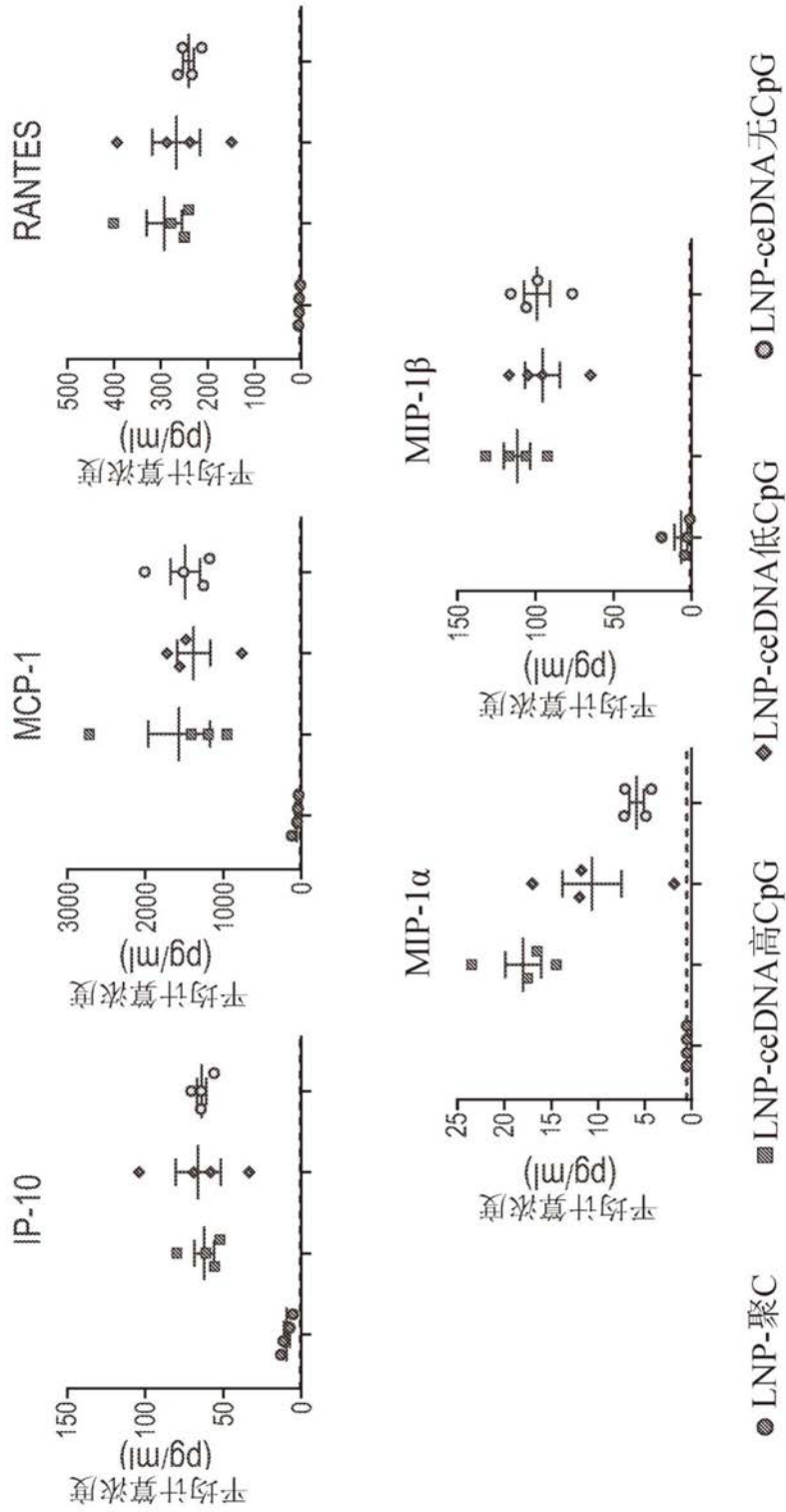


图12B

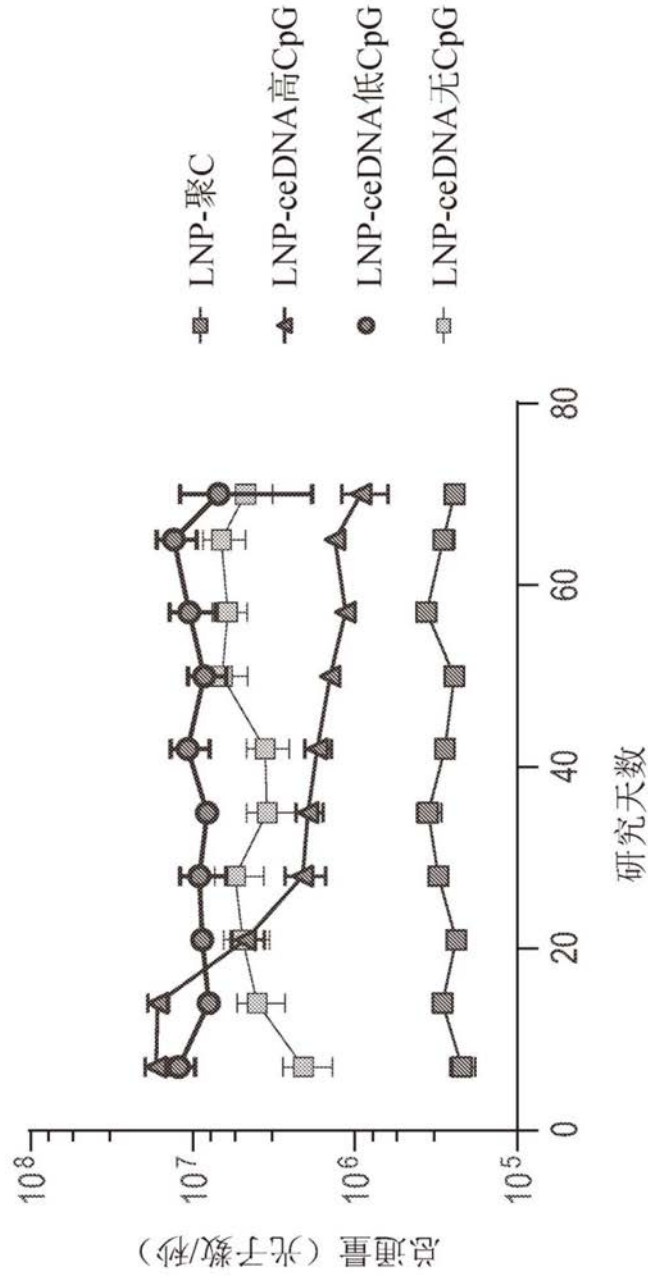


图12C

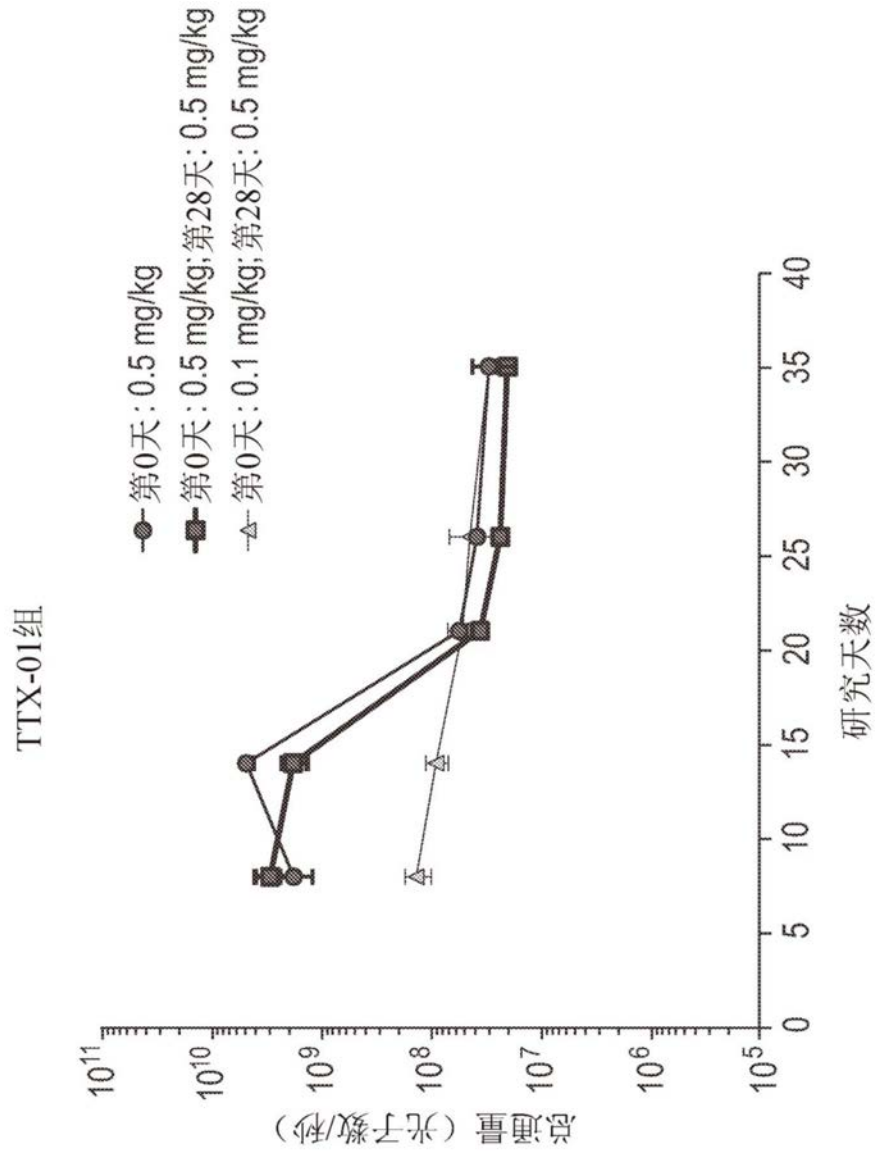


图13

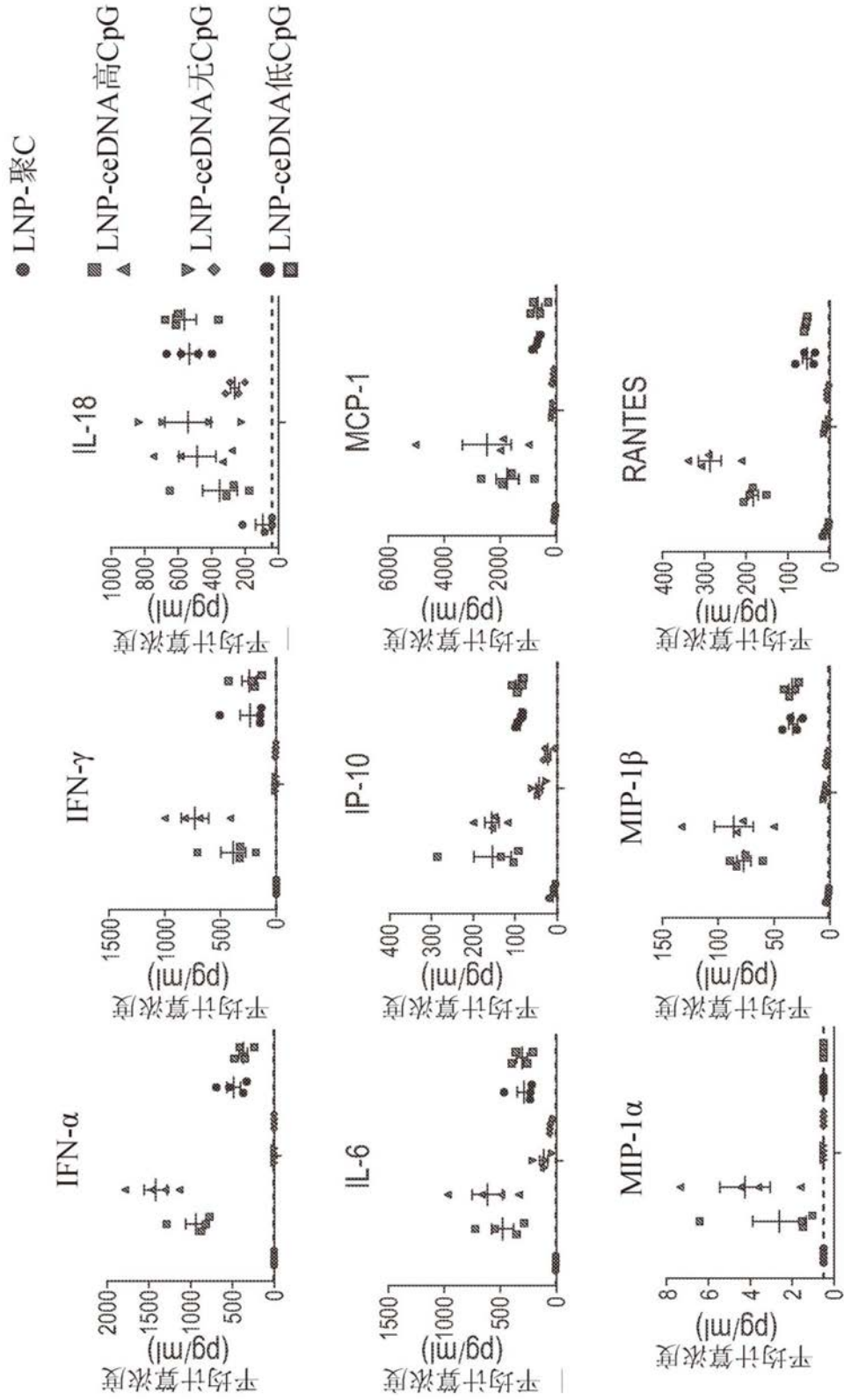


图14A

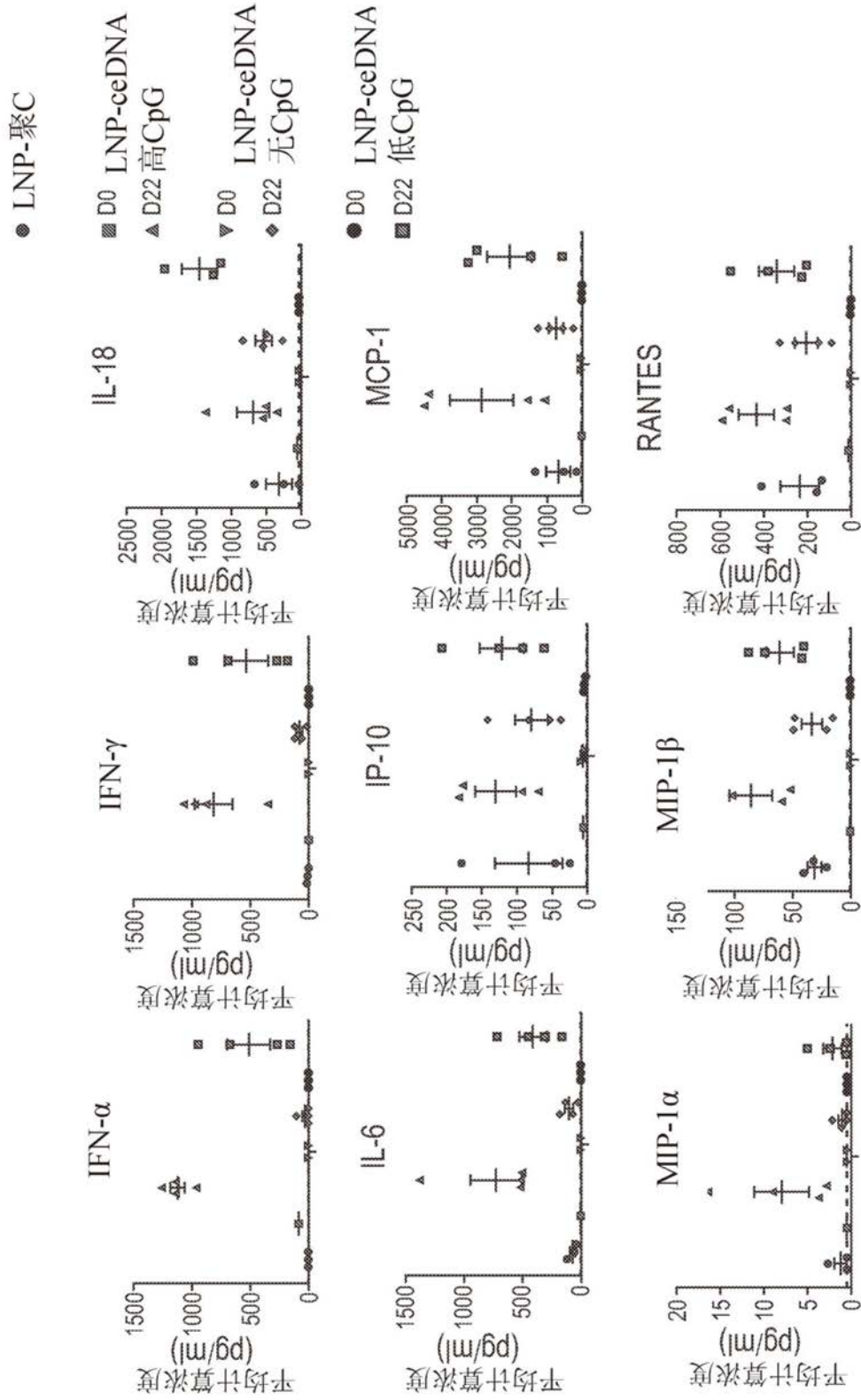


图14B

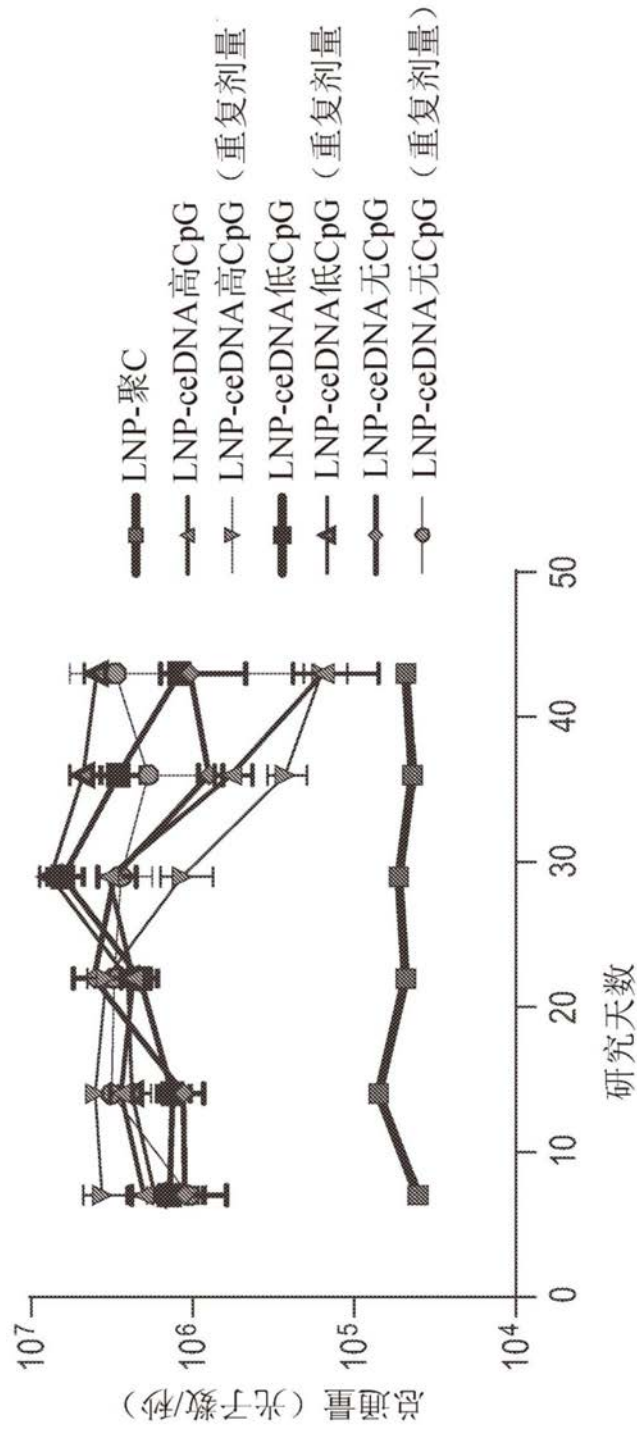


图14C

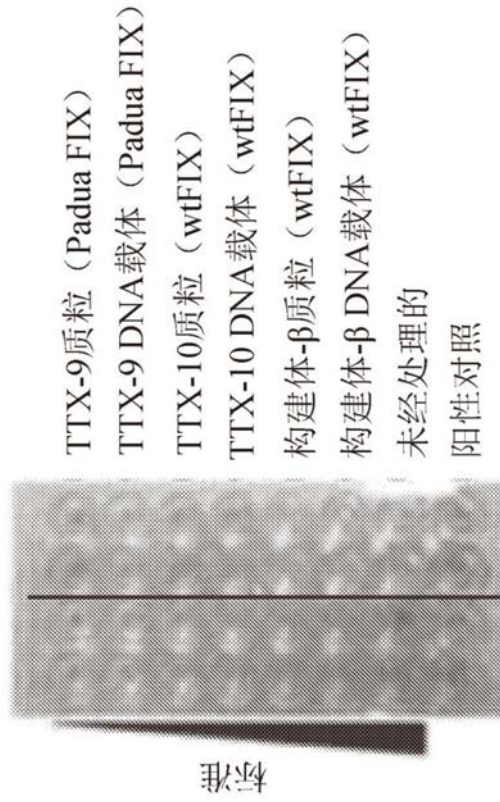


图15A

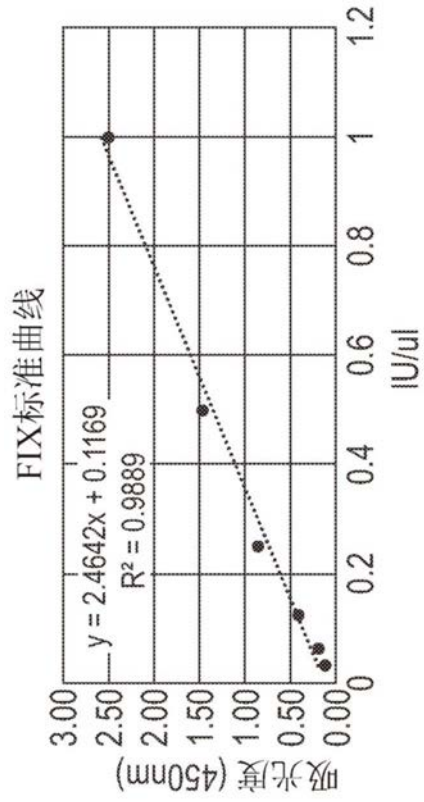


图15B

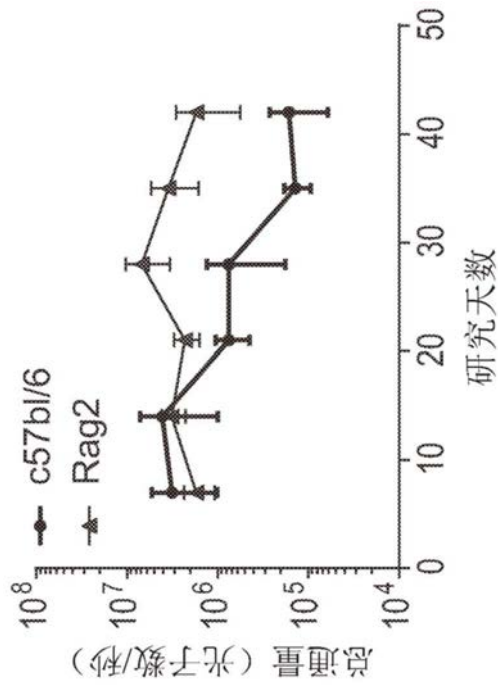


图16A

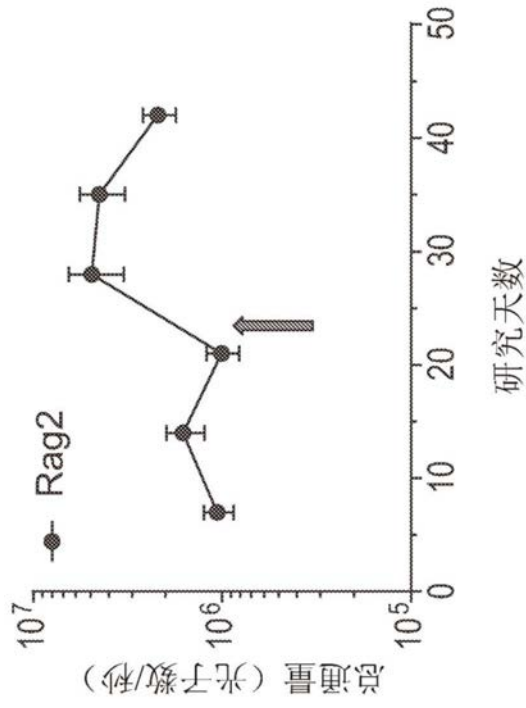


图16B

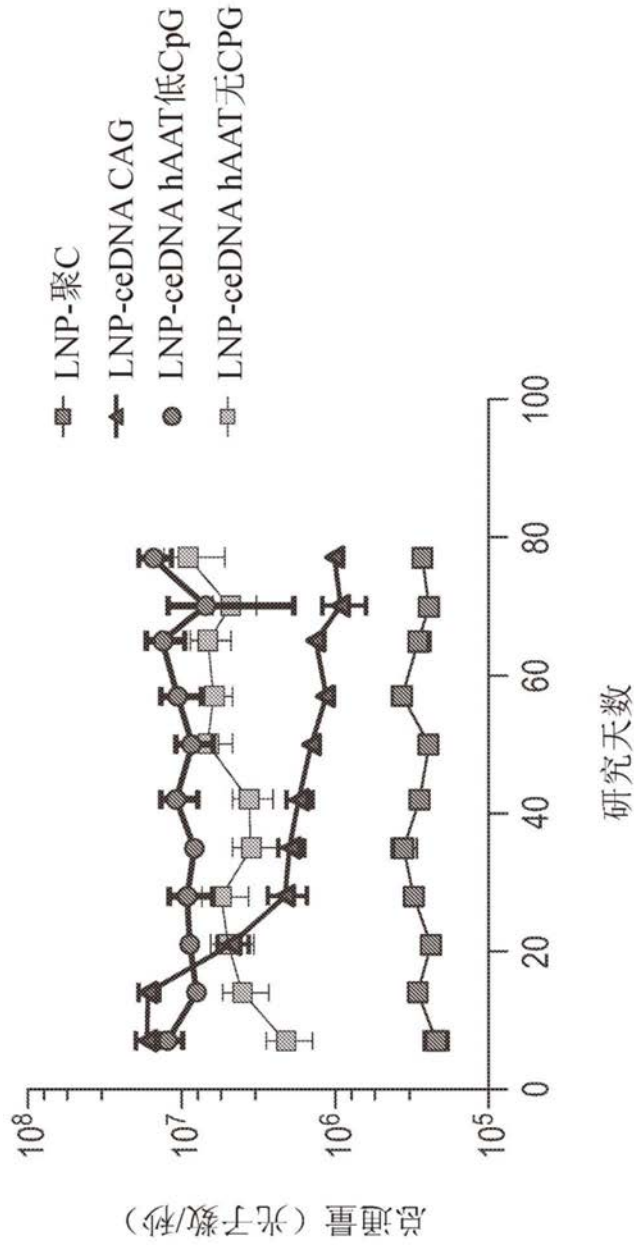


图17

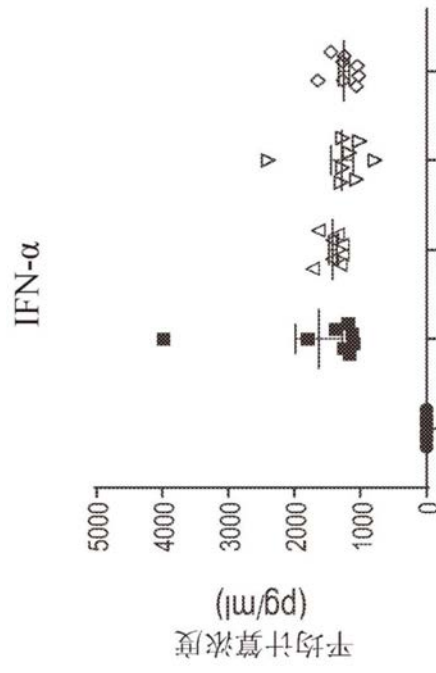


图18A

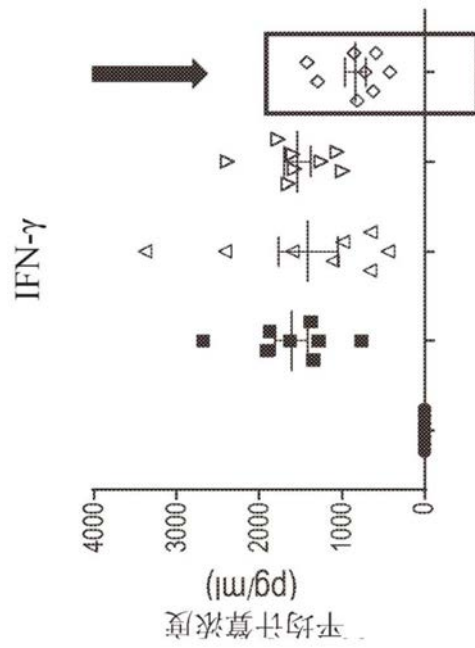


图18B

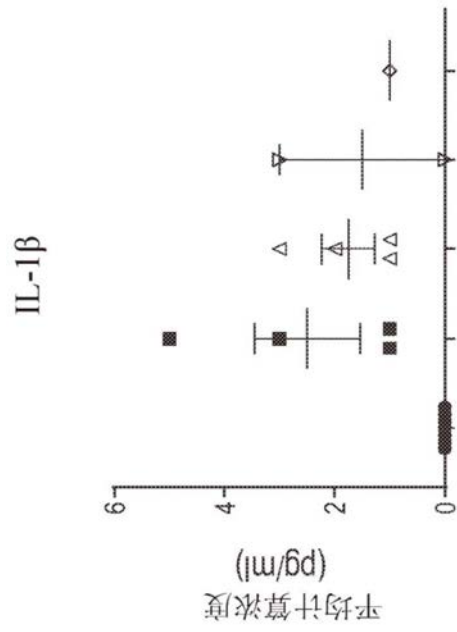


图18C

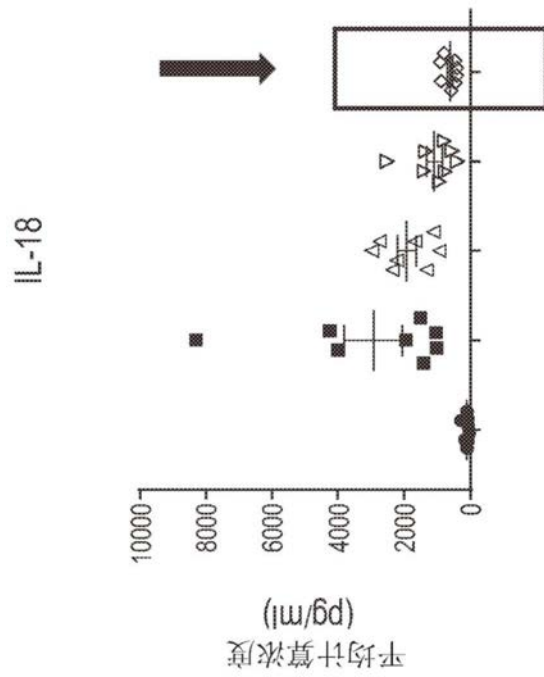


图18D

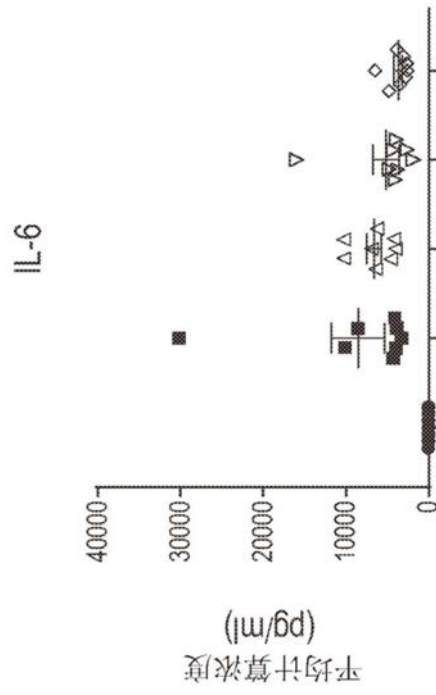


图18E

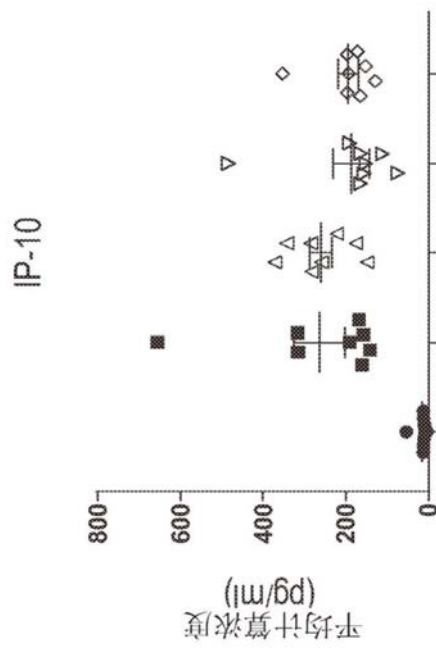


图18F

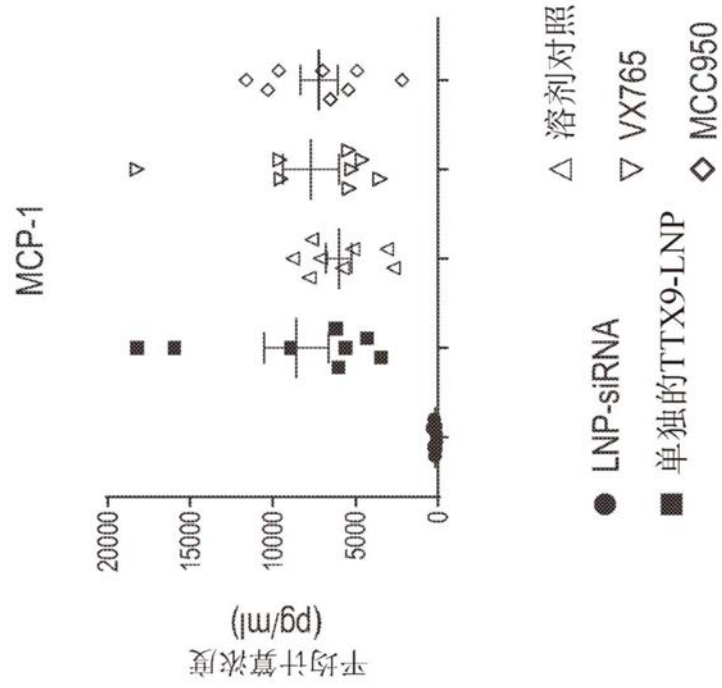


图18G

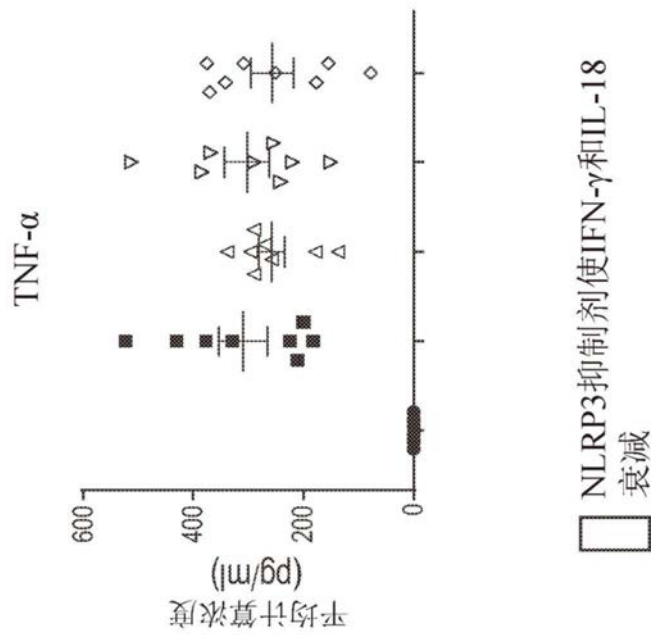


图18H