



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108138159 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680043108.6

(22)申请日 2016.06.23

(30)优先权数据

62/183,599 2015.06.23 US

62/315,453 2016.03.30 US

62/338,315 2016.05.18 US

62/348,781 2016.06.10 US

62/349,572 2016.06.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/039075 2016.06.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/210170 EN 2016.12.29

(71)申请人 费城儿童医院

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 凯瑟琳·A·海 泽维尔·安谷拉

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 樊英如 李献忠

(51)Int.Cl.

C12N 9/64(2006.01)

C12N 15/52(2006.01)

C07K 14/745(2006.01)

C12N 15/864(2006.01)

A61K 38/48(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书9页 说明书42页

序列表42页 附图39页

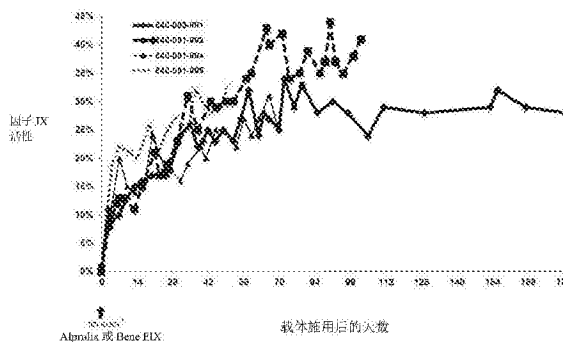
(54)发明名称

经修饰的因子IX、以及用于基因转移到细胞、器官和组织的组合物、方法和用途

(57)摘要

本发明涉及经修饰的因子IX编码序列、表达盒、如病毒(例如,慢病毒或腺相关病毒)载体之类的载体、以及基因转移方法和用途。具体而言,涉及将因子IX核酸靶向细胞、组织或器官以用于因子IX的表达(转录)。

前4个受试者的早期FIXsC活性水平的比较



1. 一种编码人因子IX蛋白的核酸序列,其中与编码人因子IX的野生型序列相比,所述核酸具有数量减少的CpG二核苷酸。

2. 一种包含编码人因子IX蛋白的核酸序列的表达载体或质粒,其中与编码人因子IX的天然序列相比,所述核酸具有数量减少的CpG二核苷酸,和/或其中如果除所述编码人因子IX的核酸序列之外的附加的一个或多个序列存在于所述载体或质粒中,则所述附加的序列与对应的天然或野生型序列相比任选地具有数量减少的CpG二核苷酸。

3. 根据权利要求1所述的编码人因子IX蛋白的核酸序列,根据权利要求2所述的表达载体或质粒,或根据权利要求3所述的组合物的核酸序列,其还包含内含子、表达调控元件、一种或多种腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)和/或填充多核苷酸序列,任选地其中所述内含子、表达调控元件、腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)和/或填充多核苷酸序列与对应的天然或野生型表达调控元件、腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)和/或填充多核苷酸序列相比具有数量减少的CpG二核苷酸。

4. 根据权利要求4所述的编码人因子IX蛋白的核酸序列,其中所述内含子在所述编码人因子IX蛋白的序列内,或者其中所述表达调控元件能操作地连接至所述编码人因子IX蛋白的序列,或其中所述AAV ITR位于所述编码人因子IX蛋白的序列的5'或3'端的旁侧,或者其中所述填充多核苷酸序列位于所述编码人因子IX蛋白的序列的5'或3'端旁侧。

5. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少1-5个。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少5-10个。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少10-15个。

8. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少15-20个。

9. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少20-25个。

10. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少25-30个。

11. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少30-40个。

12. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列与编码人因子IX的天然序

列相比具有的CpG二核苷酸少40-55个。

13. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列、内含子、表达调控元件、ITR和/或填充多核苷酸序列不含任何CpG二核苷酸。

14. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列包含与SEQ ID NO:10具有80%或以上同一性的序列,并且编码通过凝血测定确定的功能因子IX。

15. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列包含与SEQ ID NO:10具有90%或以上同一性的序列,并且编码通过凝血测定确定的功能因子IX。

16. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列包含与SEQ ID NO:10具有95%或以上同一性的序列,并且编码通过凝血测定确定的功能因子IX。

17. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26。

18. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人因子IX的天然序列包含如SEQ ID NO:11示出的序列。

19. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述内含子序列包含如SEQ ID NO:17示出的序列。

20. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述表达调控元件包含增强子序列,所述增强子序列包含如SEQ ID NO:14示出的序列。

21. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述表达调控元件包含启动子序列,所述启动子序列包含如SEQ ID NO:15示出的序列。

22. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述一个或多个腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)的序列包含如SEQ ID NO:13和/或SEQ ID NO:20示出的序列。

23. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述填充多核苷酸序列包含如SEQ ID NO:21示出的序列。

24. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列具有降低的诱导免疫应答的能力。

25. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述编码人FIX蛋白的序列以大于或相当于具有的CpG二核苷酸的数量没有减少的编码人因子IX的天然序列的水平表达。

26. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述表达调控元件包含组成型或可调控元件或组织特异性表达调控元件或启动子。

27. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述表达调控元件包含赋予在肝脏中表达的元件。

28. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述表达调控元件包含人 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶(hAAT)启动子和/或载脂蛋白E(ApoE)HCR-1和/或HCR-2增强子。

29. 根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其进一步包含位于

所述编码人因子IX的核酸序列的3'端的多腺苷酸化序列。

30. 根据权利要求29所述的编码人因子IX蛋白的核酸序列,其中位于所述编码人因子IX的核酸序列的3'端的所述多腺苷酸化序列包含bGH多腺苷酸化序列。

31. 根据权利要求29所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中位于所述编码人因子IX的核酸序列的3'端的所述多腺苷酸化序列包含已从其中去除所有CpG二核苷酸的多腺苷酸化序列。

32. 根据权利要求31所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述多腺苷酸化序列包含如SEQ ID NO:19示出的序列。

33. 根据权利要求4或5所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述填充多核苷酸序列位于所述编码人FIX蛋白的序列的3'端。

34. 根据权利要求4或5所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中AAV ITR位于所述编码人FIX蛋白的序列的3'端旁侧。

35. 根据权利要求34所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述填充多核苷酸序列位于在所述编码人FIX蛋白的序列的3'端旁侧的所述AAV ITR的3'端。

36. 根据权利要求4或5所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,其中所述填充多核苷酸序列包含 $\lambda$ 噬菌体序列。

37. 一种编码人FIX蛋白的质粒序列,其包含根据权利要求1-36中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列,还包含一个或多个复制起点和/或编码抗生素抗性的核酸。

38. 一种编码人FIX蛋白的质粒序列,其包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26。

39. 一种包含根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的序列的病毒载体或包含根据权利要求1-5中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列的表达载体。

40. 根据权利要求39所述的病毒载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或腺病毒载体。

41. 根据权利要求39所述的病毒载体,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

42. 根据权利要求41所述的AAV载体,其包含以下项中的任一项的ITR序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8 AAV血清型。

43. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列包含与AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8VP1、VP2和/或VP3序列具有90%或以上同一性的VP1、VP2和/或VP3衣壳序列。

44. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列包含选自以下项中的任一项的VP1、VP2或VP3衣壳序列:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8 AAV血清型。

45. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列包含:与SEQ ID NO:1具有90%或以上序列同一性的VP1序列或在SEQ ID NO:1中替代、缺失或添加1-50个氨基酸的VP1序列;与SEQ ID NO:2具有90%或以上序列同一性的VP2序列或在SEQ ID NO:2中替代、缺失或添加1-50个氨基酸的VP2序列;和/或与SEQ ID NO:3具有90%或以上序列同一性的VP3序列或在SEQ ID NO:3中替代、缺失或添加1-50个氨基酸的VP3序列。

46. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列具有在如SEQ ID NO:1示出的所述VP1衣壳序列的氨基酸位置195、199、201或202中的任一位置处的氨基酸替代,或者用精氨酸替代在如SEQ ID NO:1示出的所述VP1衣壳序列中的赖氨酸的氨基酸替代。



47. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列具有位于如SEQ ID NO:1示出的VP1衣壳序列的氨基酸位置195、199、201或202中的任一位置处的A、V、P或N氨基酸中的任一个的残基。

48. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列具有位于如SEQ ID NO:1示出的VP1衣壳序列的氨基酸位置195处的A残基、氨基酸位置199处的V残基、氨基酸位置201处的P残基或氨基酸位置202处的N残基。

49. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列具有位于如SEQ ID NO:4示出的VP1衣壳序列的氨基酸位置195处的A残基、氨基酸位置199处的V残基、氨基酸位置201处的P残基或氨基酸位置202处的N残基中的任何两个、三个或四个。

50. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列包含与SEQ ID NO:4-9中的任何一个具有90%或以上同一性的VP1衣壳序列。

51. 根据权利要求41所述的AAV载体,其中所述载体的衣壳序列包含VP1衣壳序列,所述VP1衣壳序列包含SEQ ID NO:4-9中的任一种。

52. 一种药物组合物,其包含权利要求1-38中任一项所述的编码人FIX蛋白的核酸序列和/或根据权利要求39-51中任一项所述的病毒载体。

53. 根据权利要求52所述的药物组合物,其进一步包含空衣壳AAV。

54. 根据权利要求53所述的药物组合物,其中所述空衣壳选自血清型AAV AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10和AAV11。

55. 一种表达载体,其包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:25。

56. 根据权利要求55所述的表达载体,其进一步包含增强子序列,所述增强子序列包含如SEQ ID NO:14示出的所述序列。

57. 根据权利要求55所述的表达载体,其进一步包含启动子序列,所述启动子序列包含如SEQ ID NO:15示出的所述序列。

58. 根据权利要求55所述的表达载体,其进一步包含如SEQ ID NO:12或26示出的上游和/或下游AAV2ITR,其中所述上游ITR位于所述增强子的5'端和/或所述下游AAV2 ITR位于如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26示出的hFIX外显子2-8的3'端。

59. 根据权利要求55所述的表达载体,其进一步包含位于如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:26示出的所述hFIX外显子2-8的3'端处并且位于所述下游AAV2 ITR的5'端处的polyA序列。

60. 一种AAV载体,其包含根据权利要求55-59中任一项所述的表达载体。

61. 根据权利要求60所述的AAV载体,其中所述衣壳序列包含VP1衣壳序列,所述VP1衣壳序列包含SEQ ID NO:4-9中的任一种。

62. 一种用于将核酸序列递送或转移到细胞中的方法,包括在允许所述细胞转导的条件下,使根据权利要求1-61中任一项所述的核酸序列、表达载体或病毒载体与所述哺乳动物细胞接触,从而将所述核酸序列递送或转移到所述哺乳动物细胞中。

63. 一种将核酸序列递送或转移至哺乳动物或哺乳动物细胞中的方法,其包括向所述哺乳动物或所述哺乳动物细胞施用根据权利要求1-61中任一项所述的核酸序列、表达载体或病毒载体,从而将所述核酸序列递送或转移到哺乳动物或哺乳动物细胞中。

64. 一种治疗需要因子IX蛋白的哺乳动物的方法,其包括:

(a) 提供根据权利要求1-61中任一项所述的核酸序列、表达载体或病毒载体;以及  
(b) 向所述哺乳动物施用一定量的根据权利要求1-61中任一项所述的核酸序列、表达载体或病毒载体,其中在所述哺乳动物中表达所述因子IX。

65. 根据权利要求62-64中任一项所述的方法,其中所述因子IX蛋白在所述哺乳动物的细胞、组织或器官中表达。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述细胞包含分泌细胞。

67. 根据权利要求65所述的方法,其中所述细胞包含内分泌细胞。

68. 根据权利要求65所述的方法,其中所述细胞包含肝细胞,神经细胞,神经胶质细胞,视网膜细胞,上皮细胞,肺细胞或全能干细胞、亚全能干细胞或多能干细胞。

69. 根据权利要求65所述的方法,其中所述哺乳动物的组织或器官包括肝、脑、中枢神经系统、脊髓、眼、视网膜或肺。

70. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物产生不足量的因子IX蛋白或缺陷或异常因子IX蛋白。

71. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物具有B型血友病。

72. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述核酸序列、表达载体或病毒载体经静脉内、经动脉内、肌肉内、皮下、口服、插管、经导管、经皮肤、颅内、经吸入、腔内或粘膜递送至所述哺乳动物。

73. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

74. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物对于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或AAV-Rh74血清型是血清阳性或血清阴性。

75. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其还包括施用空衣壳AAV。

76. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其还包括施用AAV1, AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和/或AAV-Rh74血清型的空衣壳。

77. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其还包括施用与所施用的所述AAV载体相同的血清型的空衣壳AAV。

78. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以对所述哺乳动物具有治疗效果的水平表达。

79. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以具有治疗效果的水平表达至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月。

80. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以约20%FIX活性或大于20%活性的水平存在连续的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月。

81. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述病毒载体以约 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 至 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 至 $1 \times 10^{13}$ 、或 $1 \times 10^{13}$ 至 $1 \times 10^{14}$ 个载体基因组/千克(vg/kg)所述哺乳动物范围内的剂量施用。

82. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述病毒载体以小于 $1 \times 10^{12}$ 个载体

基因组/千克 (vg/kg) 所述哺乳动物的剂量施用, 并且所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以约20%活性或大于20%活性的水平生产, 持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月。

83. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中所述病毒载体以约 $5 \times 10^{11}$ 个载体基因组/千克 (vg/kg) 所述哺乳动物的剂量施用, 并且所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以约20%活性或大于20%活性的水平生产, 持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月。

84. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中施用给所述哺乳动物的所述核酸序列、表达载体或病毒载体不产生针对所述因子IX蛋白和/或所述病毒载体的实质性免疫应答。

85. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月不产生针对因子IX蛋白和/或所述病毒载体的实质性免疫应答。

86. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中所述哺乳动物不产生针对所述因子IX蛋白的实质性免疫应答。

87. 根据权利要求62-69所述的方法, 其中所述哺乳动物不发展针对所述因子IX蛋白的足以降低或阻断所述因子IX蛋白治疗效果的免疫应答。

88. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月, 所述哺乳动物不发展针对因子IX蛋白的足以降低或阻断所述因子IX蛋白治疗效果的实质性免疫应答。

89. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月, 所述哺乳动物不发展针对所述因子IX蛋白的足以降低或阻断所述因子IX蛋白治疗效果的免疫应答。

90. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中所述哺乳动物不发展针对AAV载体的足以降低或阻断所述因子IX蛋白治疗效果的免疫应答。

91. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中所述哺乳动物不发展针对AAV载体的足以降低或阻断所述因子IX蛋白治疗效果的免疫应答, 持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月。

92. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中在没有施用免疫抑制剂(例如类固醇)的情况下, 所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以对所述哺乳动物具有治疗效果的量或活性水平表达。

93. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法, 其中在没有施用免疫抑制剂(例如类固醇)的情况下, 所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以对所述哺乳动物具有治疗效果的量或

活性水平表达持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月。

94. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月,所述哺乳动物没有发展异常高水平的肝脏ALT、AST和/或LDH酶。

95. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月,所述哺乳动物没有发展要求使用免疫抑制剂(例如类固醇)的异常高水平的肝脏ALT、AST和/或LDH酶。

96. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中以比降低自发性关节出血或脑出血的持续时间、严重程度或频率所需要的FIX的循环水平高的水平连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月表达。

97. 根据权利要求62-69中任一项所述的方法,其中所述因子IX蛋白在所述哺乳动物中表达连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天、连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14周或连续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个月,使得AAV载体施用后不需要或不施用重组FIX蛋白。

98. 一种用于治疗血友病B的重组AAV载体,其包含衣壳和基因组,其中所述衣壳包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VP1蛋白;并且其中所述基因组是单链的且按照从5'端到3'端的顺序包括以下元件:

(a) 第一AAV2 ITR,

(b) ApoE HCR-1增强子,

(c) AAT启动子,

(d) 编码人因子IX Padua的密码子优化的核酸,其中所述核酸缺少至少一种另外存在的CpG二核苷酸,

(e) 多腺苷酸化序列;以及

(f) 第二AAV2 ITR。

99. 根据权利要求98所述的rAAV载体,其中

(a) 所述第一AAV2 ITR的所述核酸序列由SEQ ID NO:12的核苷酸1-141组成,

(b) 所述ApoE HCR-1增强子的所述核酸序列由核苷酸SEQ ID NO:12的核苷酸152-472组成,

(c) 所述ATT启动子的所述核酸序列由SEQ ID NO:12的核苷酸482-878组成,

(d) 编码人因子IX Padua变体的所述核酸的所述核酸序列由SEQ ID NO:12的核苷酸908-3731组成,

(e) 所述多腺苷酸化序列的所述核酸序列由SEQ ID NO:12的核苷酸3820-4047组成;以及

(f) 所述第二AAV2ITR的所述核酸序列由SEQ ID NO:12的核苷酸4097-4204组成。

100. 根据权利要求99所述的rAAV载体,其中所述基因组包含对应于SEQ ID NO:12的核

昔酸1-4204的核酸序列。

101. 一种用于治疗患有血友病B的受试者的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求98或99中任一项所述的rAAV载体。

102. 根据权利要求101所述的方法,其中所述受试者患有重度血友病B,并且其中所述治疗有效地将血友病症状从重度降低至中度或轻度血友病B。

103. 根据权利要求101所述的方法,其中所述治疗有效实现是正常FIX活性的至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50%的血浆FIX活性水平。

104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述治疗有效实现所述血浆FIX活性水平持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年或5年的持续时间。

105. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少1%的血浆FIX活性持续至少6个月、1年、2年、3年、4年或5年的持续时间。

106. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少5%的血浆FIX活性持续至少6个月、1年、2年、3年、4年或5年的持续时间。

107. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少10%的血浆FIX活性持续至少6个月、1年、2年、3年、4年或5年的持续时间。

108. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少20%的血浆FIX活性持续至少6个月、1年、2年、3年、4年或5年的持续时间。

109. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少30%的血浆FIX活性持续至少6个月、1年、2年、3年、4年或5年的持续时间。

110. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少40%的血浆FIX活性持续至少6个月、1年、2年、3年、4年或5年的持续时间。

111. 根据权利要求104所述的方法,其中所述治疗有效实现至少20%血浆FIX活性持续至少6个月的持续时间。

112. 根据权利要求111所述的方法,其中所述AAV载体的治疗有效量为约 $5.0 \times 10^{11}$ vg/kg。

113. 根据权利要求101所述的方法,其中所述治疗有效地降低患有重度血友病B的普通人受试者需要FIX蛋白替代疗法的频率约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%以维持足够的止血。

114. 根据权利要求101所述的方法,其中当与未治疗的患有重度血友病B的普通人受试者相比时,所述治疗有效地降低患有重度血友病B的人受试者的自发性出血到关节中的频率约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

115. 根据权利要求103所述的方法,其中所述AAV载体导致针对所述衣壳的抗体滴度,当在施用后至少4周时测定时,所述抗体滴度不大于1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、

1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、或1:20。

116. 根据权利要求103所述的方法,其中所述AAV载体导致如使用ELISPOT测定法测得的针对所述衣壳的T细胞免疫应答,结果是,当施用后至少4周测定时,每百万PBMC有不超过10个斑点形成单位、20个斑点形成单位、30个斑点形成单位、40个斑点形成单位、50个斑点形成单位、100个斑点形成单位、200个斑点形成单位、300个斑点形成单位、400个斑点形成单位或500个斑点形成单位。

117. 根据权利要求103所述的方法,其中所述AAV载体导致肝酶水平升高不超过该酶的正常上限(ULN)值的0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。

118. 根据权利要求117所述的方法,其中所述酶是丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)或乳酸脱氢酶(LDH)。

119. 根据权利要求101所述的方法,其中所述治疗有效实现平均血浆FIX活性,当施用所述载体后至少8周测量时,所述平均血浆FIX活性至少为正常活性的1%、5%、10%、20%、30%或40%,标准偏差小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1。

120. 根据权利要求101-119中任一项所述的方法,其中所述AAV载体以包含空衣壳的药物组合物的形式施用,其中所述空衣壳包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VP1蛋白。

121. 根据权利要求120所述的方法,其中所述空衣壳与所述AAV载体的比例为约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、或10:1。

122. 一种宿主细胞,其包含与SEQ ID NO:12的1-4204的核酸序列相同的连续核酸序列。

123. 根据权利要求122所述的宿主细胞,其还包含AAV rep蛋白、AAV衣壳蛋白和腺病毒辅助蛋白。

124. 根据权利要求123所述的宿主细胞,其中所述AAV衣壳蛋白包含SEQ ID NO:4或与其具有90%或以上同一性的序列。

125. 根据权利要求123所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞表达FIX Padua蛋白。

126. 一种生产包含SEQ ID NO:12的1-4204的核酸序列的AAV载体的方法,所述方法包括在能将来自SEQ ID NO:12的1-4204的所述核酸序列包装成AAV颗粒的条件下培养根据权利要求123所述的宿主细胞,从而生产AAV载体。

127. 根据权利要求126所述的方法,其还包括纯化或分离如此生产的所述AAV载体。

128. 一种AAV载体,其通过根据权利要求126所述的方法生产。

129. 一种分离的或纯化的AAV载体,其通过根据权利要求127所述的方法生产。

## 经修饰的因子IX、以及用于基因转移到细胞、器官和组织的组合物、方法和用途

### 相关申请

[0001] 本专利申请要求于2015年6月23日提交的申请号62/183,599、于2016年3月30日提交的申请号62/315,453、于2016年5月18日提交的申请号62/338,315、于2016年6月10日提交的申请号62/348,781、于2016年6月13日提交的申请号62/349,572的美国专利申请的利益,所有这些申请的全部内容通过引用明确地并入本文。

### 介绍

[0002] 由于所希望的基因不存在或其缺陷(功能缺失)或者不希望有的或有缺陷的基因的表达(功能获得)引起的遗传病导致多种疾病。功能缺失型基因病症的一个示例是血友病,一种由凝血因子VIII(FVIII,A型血友病)或因子IX(FIX,B型血友病)缺乏造成的遗传性出血性疾病。功能获得型遗传病症的一个示例是亨廷顿病,一种由编码(特别是基底神经节和大脑皮层中的)神经元中累积的突变蛋白并导致(特别是基底神经节和大脑皮层中的)神经元逐渐破坏的病理性“HTT”基因(编码亨廷顿蛋白)引起的疾病。

[0003] 当前治疗血友病在于根据需要、在发生出血的情况下或预防性地静脉内施用重组凝血因子。然而,这种治疗方法有几个缺点,例如需要反复输注、治疗成本、发生抗治疗因子免疫反应的风险以及潜在的致命性出血的风险。这些限制已促使开发基于基因的血友病治疗。为此,血友病对基于基因转移的治疗是理想的,因为:1)治疗窗很宽,因为刚刚高于正常值1%的水平已经可导致表型从严重变至中度,并且100%的水平与任意副作用均不相关;2)治疗性转基因的组织特异性表达要求不严格;以及3)在测量治疗功效的终点方面具有相当多的经验。

[0004] 目前,腺相关病毒(AAV)载体被认为是选择的基因转移载体,因为它们对基因在体内的递送具有最佳的安全性和疗效性能。在目前为止所分离的AAV血清型中,AAV2和AAV8已被用于靶向患有严重B型血友病的人肝脏。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了核酸序列、表达载体(例如载体基因组)和质粒,组合物和病毒载体(其中核酸编码因子IX(例如人因子IX))。编码因子IX的核酸被修饰以相对于比较FIX编码序列减少CpG(胞嘧啶-鸟嘌呤)二核苷酸的数量。在一具体的实施方式中,与编码人因子IX的野生型或天然序列相比,编码因子IX的经修饰的核酸具有数量减少的CpG二核苷酸。

[0006] 编码因子IX的经修饰的核酸(例如经修饰以减少CpG(胞嘧啶-鸟嘌呤)二核苷酸的数量的FIX)可包含在载体(例如病毒载体)中。代表性的病毒载体包括靶向例如肝脏的肝细胞以及其他细胞类型的慢病毒载体和细小病毒载体(例如腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体)。作为用于核酸序列递送的载体,AAV载体驱动多核苷酸在细胞中的表达。编码蛋白的多核苷酸,例如编码因子IX的经修饰的核酸,能够在施用后表达,任选地以治疗水平表达。

[0007] 因此,提供了包含(衣壳化、包装)载体基因组的重组AAV载体,所述载体基因组包含编码因子IX的经修饰的核酸。在具体的实施方式中,重组AAV颗粒衣壳化或包装载体基因

组。本发明的重组AAV颗粒包括病毒载体基因组，其包含异源多核苷酸序列（例如，编码因子IX（如经修饰以减少CpG（胞嘧啶-鸟嘌呤）二核苷酸的数量的FIX）的经修饰的核酸）。在一个实施方式中，包含编码因子IX（如经修饰以减少CpG（胞嘧啶-鸟嘌呤）二核苷酸的数量的FIX）的经修饰的核酸的载体基因组被AAV衣壳或AAV衣壳变体衣壳化或包装。

[0008] 在本发明的重组AAV载体中，异源多核苷酸序列可被转录并随后翻译成蛋白。在各个方面，异源多核苷酸序列编码治疗性蛋白。在具体的方面，所述蛋白是凝血因子（例如因子IX、因子XIII、因子X、因子VIII、因子VIIa或蛋白C）。在更具体的方面，该载体包括编码因子IX的经修饰的核酸（例如，编码因子IX（如经修饰以减少CpG（胞嘧啶-鸟嘌呤）二核苷酸的数量的FIX）的经修饰的核酸）。

[0009] AAV和AAV变体（如衣壳变体）可递送提供所需或治疗益处的多核苷酸和/或蛋白，从而治疗各种疾病。例如，AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8及其变体和AAV衣壳变体（例如4-1）是用以将治疗性基因（例如因子IX）递送至细胞、组织和器官的有用的载体，以治疗血友病A、B等。

[0010] 在本发明中，包含（衣壳化、包装）载体基因组（病毒或AAV）的重组病毒和AAV载体包括以顺式或反式发挥作用的其他元件。在具体的实施方式中，包含（衣壳化、包装）载体基因组的重组病毒（例如AAV）载体还具有：在异源多核苷酸序列（例如，编码因子IX（如被修饰以减少CpG（胞嘧啶-鸟嘌呤）二核苷酸的数量的FIX）的经修饰的核酸序列）的5'或3'端旁侧的一个或多个反向末端重复（ITR）序列；驱动异源多核苷酸序列（例如，编码因子IX（如被修饰以减少CpG（胞嘧啶-鸟嘌呤）二核苷酸的数量的FIX）的经修饰的核酸序列）的转录（例如启动子或增强子）的表达调控元件，例如组成型或可调调控元件或组织特异性表达调控元件；内含子序列，填充或填料多核苷酸序列；和/或位于异源多核苷酸序列3'端的多腺苷酸化序列。

[0011] 因此，载体可以进一步包括内含子、表达调控元件（例如，（例如用于肝脏表达的）组成型或可调调控元件，或组织特异性表达调控元件或启动子，例如人 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶（hAAT）启动子和/或载脂蛋白E（ApoE）HCR-1和/或HCR-2增强子）、一个或多个腺相关病毒（AAV）反向末端重复序列（ITR）（例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8AAV血清型中的任一种的ITR序列）和/或填充多核苷酸序列。这些附加的元件的位置可以变化。在具体的方面，内含子位于编码人FIX蛋白的序列内，和/或表达调控元件与编码人FIX蛋白的序列可操作地连接，和/或AAV ITR位于编码人FIX蛋白的序列的5'或3'端的旁侧，和/或其中填充多核苷酸序列位于编码人FIX蛋白的序列的5'或3'端的旁侧。

[0012] 在多种实施方式中，经修饰以减少CpG（胞嘧啶-鸟嘌呤）二核苷酸的数量的FIX核酸与编码人因子IX的天然或野生型序列相比具有的CpG二核苷酸可少1-5个、少5-10个、少10-15个、少15-20个、少20-25个、少25-30个、少30-40个、少40-55个、少55-75个、少75-100个、少100-150个、少150-200个。在具体的方面，如本文所述的被修饰的FIX核酸编码人FIX蛋白，其表达水平大于或相当于编码不具有数量减少的CpG二核苷酸的编码人因子IX的野生型或天然序列。

[0013] 在另外的实施方式中，将内含子、表达调控元件（例如，（例如用于肝脏表达的）组成型或可调调控元件或组织特异性表达调控元件或启动子，例如人 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶（hAAT）



启动子和/或载脂蛋白E (ApoE) HCR-1和/或HCR-2增强子), 一种或多种腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复序列 (ITR) (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8血清型中的任一种的ITR序列) 和/或填充多核苷酸序列可以被修饰以与对应的天然或野生型表达调控元件、腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复序列 (ITR) 和/或填充多核苷酸序列相比较减少CpG (胞嘧啶-鸟嘌呤) 二核苷酸的数量。在具体的方面, 表达调控元件、腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复序列 (ITR) 和/或填充序列多核苷酸序列与天然或野生型的对应的序列相比具有的CpG二核苷酸少1-5个、少5-10个、少10-15个、少15-20个、少20-25个、少25-30个、少30-40个、少40-55个、少55-75个、少75-100个、少100-150个、少150-200个。

[0014] 示例性AAV载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8中的任一种的AAV衣壳序列, 或AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8的衣壳变体。本发明的重组AAV颗粒还包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8及其变体。特定的衣壳变体包括诸如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8的衣壳变体, 例如具有氨基酸替代、删除或插入/添加的衣壳序列。在具体的方面, 在Rh74VP1衣壳序列 (SEQ ID NO:1) 中, 例如在氨基酸位置195、199、201或202中的任一个上进行替代。在更具体的方面, 经替代的残基对应于Rh74VP1衣壳序列的氨基酸位置195、199、201或202中的任一个上的A、V、P或N氨基酸。在更具体的方面, 所述衣壳序列具有在Rh74VP1衣壳序列的氨基酸位置195的A残基; 氨基酸位置199的V残基, 氨基酸位置201的P残基, 或氨基酸位置202的N残基。在另外的具体的方面, 所述衣壳序列具有以下任意两个、三个或全部四个: 在Rh74VP1衣壳序列的氨基酸位置195的A残基; 氨基酸位置199的V残基, 氨基酸位置201的P残基, 或氨基酸位置202的N残基。

[0015] 在更具体的方面, 衣壳变体包含SEQ ID NO:4-9中的任一个。在另外的实施方式中, AAV载体具有具有AAV VP1、VP2和/或VP3序列的衣壳序列, 该AAV VP1、VP2和/或VP3序列与任何AAV血清型的任何VP1、VP2和/或VP3具有90%或更高序列同一性。在具体的方面, AAV载体具有具有VP1、VP2和/或VP3衣壳序列的衣壳序列, 该VP1、VP2和/或VP3衣壳序列与AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8VP1、VP2和/或VP3序列具有90%或更高的序列同一性。在更具体的方面, AAV载体具有具有选自以下的任意项的VP1、VP2或VP3衣壳序列的衣壳序列: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、RH10、Rh74或AAV-2i8AAV血清型。

[0016] 在另外的实施方式中, 重组载体基因组包括编码因子IX (如经修饰以减少CpG (胞嘧啶-鸟嘌呤) 二核苷酸数量的FIX) 的经修饰的核酸和填料或填充多核苷酸序列。在具体的方面, 编码因子IX的经修饰的核酸的长度小于约4.7Kb。在进一步具体的方面, 编码因子IX的经修饰的核酸的长度小于4.7Kb并位于一个或多个AAV ITR的旁侧或者位于两个腺相关病毒 (AAV) ITR序列内。在其他具体的方面, 填料或填充多核苷酸序列具有一定的长度, 当与编码因子IX的经修饰的核酸相组合时, 所述编码因子IX的核酸序列和填料或填充多核苷酸序列的总组合长度介于约3.0-5.5Kb, 或约4.0-5.0Kb, 或约4.3-4.8Kb之间。

[0017] 填料或填充多核苷酸序列可位于载体序列中的任意所期望的位置上, 使得其不阻止所述载体的功能或活性。在一个方面, 填料或填充多核苷酸序列定位在位于编码因子IX

(如具有数量减少的CpG(胞嘧啶-鸟嘌呤)二核苷酸的FIX)的核酸序列的各自5'和/或3'端旁侧的5' ITR和/或3' ITR(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8以及其变体的ITR)之间。在另一方面,填料或填充多核苷酸序列定位在位于编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的核酸序列的各自的5'和/或3'端的旁侧的5'和/或3' ITR内。在另外的方面,填料或填充多核苷酸序列被定位在位于编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的核酸序列的各自的5'和/或3'端的旁侧的5'和/或3' ITR的附近。在另外的方面,填料或填充多核苷酸序列被定位在编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸序列内,例如类似于在基因组核酸内的内含子。

[0018] 因此,在多个实施方式中,填料或填充多核苷酸序列被定位为与AAV ITR序列相邻;被定位在两个腺相关病毒(AAV) ITR序列内;被定位在两个腺相关病毒(AAV) ITR序列之外;或具有两个填料或填充多核苷酸序列,被定位在两个腺相关病毒(AAV) ITR序列内的第一填料或填充多核苷酸序列,和被定位在两个腺相关病毒(AAV) ITR序列之外的第二填料或填充多核苷酸序列。

[0019] 在更具体的方面,当被定位在两个腺相关病毒(AAV) ITR序列内时,填料或填充多核苷酸序列具有一定的长度,当与编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸组合时,所述异源多核苷酸序列和填料或填充多核苷酸序列的总组合长度为介于约3.0-5.5Kb、约4.0-5.0Kb或约4.3-4.8Kb之间。在其他更具体的方面,当被定位在两个腺相关病毒(AAV) ITR序列之外时,填料或填充多核苷酸序列的长度大于4.7Kb、介于约5.0-10.0Kb或约6.0-8.0Kb之间。

[0020] 通常,填料或填充多核苷酸序列是惰性的或无害的,并且不具有功能或活性。在多个具体的方面,填料或填充多核苷酸序列不是细菌多核苷酸序列,填料或填充多核苷酸序列不是编码蛋白或肽的序列,填料或填充多核苷酸序列是不同于任意以下项的序列:异源多核苷酸序列(例如编码因子IX的经修饰的核酸)、AAV反向末端重复序列(ITR)序列、表达调控元件、复制起点、选择性标记或多腺嘌呤(聚-A)信号序列。

[0021] 在多个另外的具体方面,填料或填充多核苷酸序列是与异源多核苷酸序列(例如编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸)相关或无关的内含子序列。在具体的方面,内含子序列被定位在异源多核苷酸序列(例如编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸)内。在其他具体的方面,内含子序列与异源多核苷酸序列(例如编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸)相关,因为内含子是在基因组DNA内,例如在编码蛋白的所述基因组DNA内,该蛋白也是由异源多核苷酸序列(例如编码因子IX的经修饰的核酸)编码的。

[0022] 本发明的包括(衣壳化、包装)重组AAV载体基因组的重组慢病毒或细小病毒(例如AAV)载体(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8)以及变体(如衣壳变体(例如,4-1))颗粒可被包含在细胞内。在这样的实施方式中,细胞可包括包装细胞,包装细胞产生或者可被裂解以产生病毒(AAV)颗粒,或靶细胞,在靶细胞中希望表达所述异源多核苷酸序列。因此,提供了包括编码因子IX(如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸、载体和慢病毒和细小病毒(例如AAV)载体(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-

2i8) 以及变体 (例如, 4-1) 颗粒的细胞。

[0023] 在另外的实施方式中, 在组合物中包括编码人FIX蛋白的核酸序列, 其中所述核酸与编码人因子IX的天然序列相比具有数量减少的CpG二核苷酸, 或者包括包含编码人FIX蛋白的核酸序列的表达载体或质粒, 其中所述核酸与编码人因子IX的天然序列相比具有数量减少的CpG二核苷酸。在一个特定的方面, 这样的核酸序列可以被包括在药物组合物中。因此, 包括 (衣壳化、包装) 载体基因组的本发明的重组慢病毒或细小病毒 (例如AAV) 载体 (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8) 以及变体 (例如, 4-1) 颗粒可被包含在药物组合物中。这样的组合物可用于向受试者施用包括 (衣壳化、包装) 载体 (例如AAV) 基因组的重组载体 (例如AAV) 和病毒颗粒 (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8) 以及变体 (例如, 4-1)。

[0024] 可在各种方法和用途中使用包含 (衣壳化、包装) 载体基因组的本发明的重组慢病毒或细小病毒 (例如AAV) 载体 (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8) 以及变体 (例如, 4-1) 颗粒。因此, 提供了用于将异源多核苷酸序列 (例如编码因子IX (如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX) 的经修饰的核酸) 递送或转移到生物体或细胞例如哺乳动物或哺乳动物细胞中的方法和用途。

[0025] 在一个实施方式中, 一种方法或用途包括在适于将异源多核苷酸序列递送或传送到哺乳动物或哺乳动物细胞中的条件下向所述哺乳动物或所述哺乳动物细胞施用包括在载体基因组 (衣壳化、包装) 中的所述异源多核苷酸序列 (例如编码因子IX (如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX) 的经修饰的核酸) 的慢病毒或细小病毒 (例如AAV) 载体 (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8) 或变体颗粒。在一个方面, 所述方法或用途将异源多核苷酸 (例如编码因子IX (如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX) 的经修饰的核酸) 传送/递送到哺乳动物和/或细胞中。在另一个方面, 所述方法允许将所述异源多核苷酸 (例如编码因子IX (如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX) 的经修饰的核酸) 传送/递送到所述细胞中, 随后转录, 从而形成转录物, 并随后翻译以形成基因产物 (例如因子IX)。

[0026] 在另外的实施方式中, 用于治疗缺乏或需要蛋白表达或功能的受试者 (例如哺乳动物) 的方法或用途包括提供慢病毒或细小病毒 (例如AAV) 载体 (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8) 或变体, 多种这样的病毒 (例如AAV) 颗粒, 或慢病毒或细小病毒 (例如AAV) 载体 (例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8) 或变体、颗粒或多种这样的病毒 (例如AAV) 颗粒的药物组合物; 以及向所述受试者 (例如哺乳动物) 施用所述病毒颗粒、多种病毒颗粒、或者病毒颗粒或多种病毒颗粒的药物组合物。随后可在所述受试者 (例如哺乳动物) 中表达这样施用的异源多核苷酸序列 (例如编码因子IX (如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX) 的经修饰的核酸)。

[0027] 用于施用或递送的方法和用途包括与受试者相容的任何模式。在特定的实施方式中, 经肠胃外 (诸如静脉内, 动脉内, 肌肉内, 皮下或经由导管) 施用或递送诸如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8之类的慢病毒或细小病毒 (例如AAV) 载体以及变体或多种这样的病毒颗粒。

[0028] 受试者包括哺乳动物,例如人和非人(例如,灵长类动物)。在具体的实施方式中,受试者将受益于或需要异源多核苷酸序列的表达。在更具体的实施方式中,受试者将受益于因子IX的表达或功能,例如表达数量减少的因子IX的受试者,例如具有血友病B的受试者。

[0029] 根据本发明,提供了产生包括(衣壳化、包装)载体基因组的重组慢病毒和细小病毒(例如AAV)载体(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8)以及变体的方法。在一个实施方式中,一种方法包括将重组载体(例如,AAV)质粒引入到包装细胞中以产生生产性病毒感染;以及在产生重组病毒颗粒的条件下培养所述包装细胞。在另一实施方式中,一种产生具有数量减少的重组病毒颗粒的重组病毒或AAV颗粒的方法,其中所述重组病毒载体包括污染性核酸,该方法包括将重组载体(例如,AAV)质粒引入到包装细胞中;并且在产生重组病毒颗粒的条件下培养所述包装细胞,其中与包含在其中填料或填充多核苷酸序列不存在于重组病毒载体的条件下产生的污染性核酸的病毒颗粒的数量相比较而言,所产生的所述重组病毒颗粒具有数量减少的带有包含污染性核酸的载体基因组的病毒颗粒。在具体的方面,所述污染性核酸是细菌核酸;或不是异源多核苷酸序列的序列,或ITR、启动子、增强子、复制起点、聚-A序列或选择性标记。

[0030] 包装细胞包括哺乳动物细胞。在具体的实施方式中,包装细胞包括辅助者(例如,AAV)功能以将所述(异源多核苷酸)序列(例如,编码因子IX的经修饰的核酸,诸如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)、表达载体(例如载体基因组)包装到病毒颗粒(例如,AAV颗粒)中。在具体的方面,包装细胞提供AAV Rep和/或Cap蛋白(例如Rep78和/或Rep68蛋白);包装细胞被稳定地或瞬时地转染编码一个或多个Rep和/或Cap蛋白序列的多核苷酸;和/或包装细胞被稳定地或瞬时地转染编码一个或多个序列的Rep78和/或Rep68蛋白多核苷酸。

[0031] 在本发明中,重组慢病毒或细小病毒(例如AAV)载体和伴随的顺式(例如表达调控元件,ITR,polyA)或反式(例如衣壳蛋白,包装功能例如Rep/Cap蛋白)元件可以基于任何生物体、物种、株系(strain)或血清型。本发明的重组病毒(例如AAV)颗粒通常基于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8以及变体,而且包括具有不同血清型的杂合体或嵌合体。代表性的AAV血清型包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、RH10、Rh74和AAV-2i8血清型。因此,本发明的包括载体基因组的重组病毒(例如,AAV)颗粒可包括来自不同血清型、血清型的混合物或者不同血清型的杂合体或嵌合体的衣壳蛋白,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8血清型的VP1、VP2或VP3衣壳蛋白。此外,本发明的重组慢病毒或细小病毒(例如AAV)载体(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8)、序列、质粒、载体基因组可包括来自任意一种血清型、血清型混合物或不同血清型的杂合体或嵌合体的元件。在多个实施方式中,重组AAV载体包括ITR、Cap、Rep和/或序列,其衍生自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和/或AAV-2i8血清型,或任意上述AAV血清型的混合物、杂合体或嵌合体。

## 附图说明

[0032] 图1显示了Rh74VP1的氨基酸序列。

- [0033] 图2显示了Rh74VP2的氨基酸序列。
- [0034] 图3显示了Rh74VP3的氨基酸序列。
- [0035] 图4显示了衣壳变体4-1VP1蛋白的氨基酸序列。
- [0036] 图5显示了衣壳变体15-1的氨基酸序列。
- [0037] 图6显示了衣壳变体15-2的氨基酸序列。
- [0038] 图7显示了衣壳变体15-3/15-5的氨基酸序列。
- [0039] 图8显示了衣壳变体15-4的氨基酸序列。
- [0040] 图9显示了衣壳变体15-6的氨基酸序列。
- [0041] 图10显示了FIX39的核酸序列。
- [0042] 图11显示了FIX19的核酸序列。
- [0043] 图12A显示了FIX39质粒的序列。
- [0044] 图12B显示了phFIX39v2质粒的序列。
- [0045] 图13显示了FIX39质粒的图谱。
- [0046] 图14显示了内含子A核酸序列。
- [0047] 图15显示了FIX39+内含子A的核酸序列。
- [0048] 图16显示了在体外环境中分析的AAV-4-1衣壳变体 (SEQ ID NO:4) 的转导效率。
- [0049] 图17显示了野生型小鼠在静脉内注射 $1 \times 10^{11}$ 或 $1 \times 10^{12}$ vg/kg的AAV-FIX39-Padua (正方形/圆形) 和AAV-FIX19-Padua (棱形/六角形) 的情况下生活8周后血浆中hFIX的水平。人FIX血浆水平通过ELISA测定,并表示在研究期间在同一组动物(每个组群中n=5只小鼠)上通过连续出血获得的多个测量结果。误差条表示平均值的标准误差。
- [0050] 图18显示了在流体动力学尾静脉注射5 $\mu$ g的pFIX19-Padua或pFIX39-Padua质粒后24小时,小鼠血浆中人FIX的循环水平。 $P=0.3337$ 。
- [0051] 图19显示了根据本发明的施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的四位人类B型血友病患者的数据总结,以及在随后的评估期间(分别为183天、102天、69天和50天)的FIX活性(%)。
- [0052] 图20A显示了在183天的评估期内,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的第一位人类血友病B患者的FIX活性(%)数据。
- [0053] 图20B显示在183天的评估期中,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的第一位人类A血友病B患者的肝功能测试 (ALT、AST和LDH酶) 数据。绘制的LDH值 (LDH<sup>1</sup>) 已被除以10以显示ALT和AST值。
- [0054] 图21A显示在102天的评估期内,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的第二位人类血友病B患者的FIX活性(%)数据。
- [0055] 图21B显示了在102天的评估期中,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的第二位人类A血友病B患者的肝功能测试 (ALT、AST和LDH酶) 数据。绘制的LDH值 (LDH<sup>1</sup>) 除以10以便与ALT和AST值一起显示。
- [0056] 图22A显示在69天的评估期内,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的第三位人类血友病B患者的FIX活性(%)数据。
- [0057] 图22B显示了在69天的评估期中,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体 (FIX39) 的载体的第三位人类A血友病B患者的肝功能测试 (ALT、AST和LDH酶) 数据。绘制的LDH值

(LDH<sup>1</sup>)除以10以便与ALT和AST值一起显示。

[0058] 图23A显示在50天的评估期内,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体(FIX39)的载体的第四位人类血友病B患者的FIX活性(%)数据。

[0059] 图23B显示了在50天的评估期中,施用单次输注携带AAV-FIX Padua变体(FIX39)的载体的第四位人类A血友病B患者的肝功能测试(ALT、AST和LDH酶)数据。绘制的LDH值(LDH<sup>1</sup>)除以10以便与ALT和AST值一起显示。

[0060] 图24A显示了人受试者中AAV-FIX39-Padua的低免疫原性概况。

[0061] 图24B显示了人受试者中AAV-FIX39-Padua和AAV8-FIX19的免疫原性概况。

### 具体实施方式

[0062] 本发明至少部分基于编码蛋白(例如人FIX蛋白)的经修饰的核酸序列的开发。在各种实施方式中,与编码因子IX的参照核酸序列(例如编码人因子IX的天然(野生型)序列)相比,经修饰的核酸具有数量减少的CpG(胞嘧啶-鸟嘌呤)二核苷酸。在进一步的实施方式中,与编码参考因子IX的核酸(例如编码人因子IX的天然序列)相比,具有数量减少的CpG二核苷酸的这样的经修饰的核酸包括在表达载体(例如载体基因组)或质粒内。

[0063] 本发明还包括组合物,例如包含编码人FIX的经修饰的核酸序列的组合物。在这样的组合物中,经修饰的核酸相对于参考序列(例如编码人因子IX的天然(野生型)序列)具有数量减少的CpG二核苷酸。组合物还包括包含具有数量减少的CpG二核苷酸的编码人FIX蛋白的这样的经修饰的核酸序列的表达载体(例如病毒载体/载体基因组)和质粒。

[0064] 在具体的方面,编码人FIX蛋白的核酸序列与编码人因子IX的天然序列相比具有的CpG二核苷酸少1-5个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少5-10个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少10-15个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少15-20个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少20-25个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少25-30个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少30-40个;或与编码人因子IX的天然(野生型)序列相比具有的CpG二核苷酸少40-55个;或者完全没有任何CpG二核苷酸。

[0065] 编码因子IX的经修饰的核酸,例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX,可以进一步包含一个或多个另外的顺式元件。代表性的顺式元件包括但不限于表达调控元件、内含子、ITR、终止密码子、聚A序列和/或填充多核苷酸序列。在具体的实施方式中,这种顺式作用元件也可以被修饰。例如,诸如表达调控元件、内含子、ITR、聚-A序列和/或填充多核苷酸序列之类的顺式作用元件可以具有数量减少的CpG二核苷酸。在一个方面,一个或多个顺式作用元件(如表达调控元件、内含子、ITR、聚-A序列和/或填充多核苷酸序列)不含CpG二核苷酸。在具体的方面,一个或多个顺式作用元件(如表达调控元件、内含子、ITR、聚-A序列和/或填充多核苷酸序列)与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少1-5个;与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少5-10个;与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少10-15个;与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少15-20个;与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少20-25个;与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少25-30个;与参考顺式作用元件相比具有的CpG二核苷酸少30-40个;与参考顺式作用元件相比

具有的CpG二核苷酸少40-55个;或者不含任何CpG二核苷酸。

[0066] 本发明还包括包含编码人FIX蛋白(例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸序列的病毒载体。在具体的实施方式中,载体包括慢病毒载体或细小病毒载体,如腺病毒载体。在更具体的实施方式中,编码人FIX蛋白(例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸序列包含在腺相关病毒(AAV)载体中。

[0067] 在进一步的具体的实施方式中,腺相关病毒(AAV)载体包括衍生自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8的衣壳,以及其变体(例如,衣壳变体,如氨基酸插入、添加和替代)。如本领域普通技术人员将理解的,AAV衣壳典型地包括VP1蛋白和称为VP2和VP3的两种较短的蛋白,其基本上是氨基末端截短的VP1。取决于普通技术人员已知的衣壳和其他因素,三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3通常分别以约1:1:10的比例存在于衣壳中,尽管这个比例,特别是VP3的比例,可以在很大程度上变化并且不应被认为是在任何方面的限制。

[0068] AAV变体包括AAV-Rh74变体,例如Rh74VP1衣壳序列(SEQ ID NO:1;图1)的AAV衣壳变体,包括但不限于如表1所描述的变体4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和15-6。分别在SEQ ID NO:2(图2)和SEQ ID NO:3(图3)中提供了Rh74VP2和Rh74VP3氨基酸序列。

表1.AAV衣壳变体

变体	在 Rh74 VP1 衣壳中的氨基酸替代和指示的位置	序列标识符	图
4-1	G195A-L199V- S201P-G202N	SEQ ID NO:4	图 4
15-1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R	SEQ ID NO:5	图 5
15-2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R	SEQ ID NO:6	图 6
15-3/15-5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R (变体 15-3) G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R (变体 15-5)	SEQ ID NO:7	图 7
15-4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R	SEQ ID NO:8	图 8
15-6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R	SEQ ID NO:9	图 9

[0069] 4-1变体(SEQ ID NO:4)分别在VP1衣壳的氨基酸位置195、199、201和202处具有丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸和天冬酰胺替代。图4(SEQ ID NO:4)显示了4-1变体VP1衣壳氨基酸序列,带有下划线和粗体显示的经替代的残基a、v、p和n。对于变体4-1,VP2序列由SEQ ID NO:27组成,而VP3序列由SEQ ID NO:3组成。

[0070] 15-1、15-2、15-3、15-4、1-5和15-6变体还分别在VP1衣壳氨基酸位置195、199、201和202具有丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸和天冬酰胺替代。另外,这些变体在不同位置具有赖氨酸的多个精氨酸替代。图5显示了15-1变体VP1衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:5);图6显示了15-2变体VP1衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:6);图7中显示了15-3/15-5变体VP1衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:7);图8中显示了15-4变体VP1衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:8);而图9中显示了

15-6变体VP1衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:9)。可用于本文的衣壳的示例包括但不限于美国专利公开号2015/0023924描述的那些。

[0071] 因此,提供了慢病毒载体和细小病毒载体(如AAV载体)和病毒载体变体(如AAV变体(例如衣壳变体,如4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和15-6)),其包括(衣壳化或包装)载体基因组,该载体基因组包括编码人FIX蛋白(例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸序列。

[0072] 在示例性研究中,AAV-Rh74介导的基因转移/递送产生显著高于几种其他血清型的蛋白表达水平。特别是,AAV-Rh74载体和衣壳变体(例如,4-1)靶基因用于递送到肝脏中,其效率与AAV8在B型血友病狗和/或在小鼠和/或猕猴中的肝转导金标准至少相当。

[0073] 如本文所述,病毒载体(例如慢病毒载体和细小病毒载体,包括AAV血清型和变体)提供了将多核苷酸序列离体、体外和体内递送入细胞的手段,其可以编码蛋白,使得细胞表达编码的蛋白。例如,重组AAV载体可包含编码所需蛋白或肽(例如因子IX)的异源多核苷酸。向受试者(例如,哺乳动物)递送或施用的载体因而向该受试者提供编码的蛋白和肽。因此,病毒载体(例如慢病毒载体和细小病毒载体,包括AAV血清型和变体,例如衣壳变体(例如4-1))可以用于转移/递送异源多核苷酸以用于表达,并且任选地用于治疗多种疾病。

[0074] 在具体的实施方式中,重组载体(例如,AAV)是细小病毒载体。细小病毒是具有单链DNA基因组的小病毒。“腺相关病毒”(AAV)属于细小病毒家族。

[0075] 包括AAV的细小病毒是用作基因治疗载体的病毒,因为它们可穿透细胞并引入核酸/遗传物质,使得核酸/遗传物质可稳定地保持在细胞中。此外,这些病毒可将核酸/遗传物质引入到特定位点,诸如,例如19号染色体上的特定位点。因为AAV与人类致病疾病无关,所以AAV载体能够将异源多核苷酸序列(例如,治疗性蛋白和试剂)递送给人类患者而不造成实质性AAV发病或疾病。

[0076] AAV和AAV变体(例如,衣壳变体,例如4-1)血清型(例如,VP1、VP2和/或VP3序列)可以与其他AAV血清型不同或可以相同,其他AAV血清型包括例如AAV1-AAV11、Rh74或Rh10(例如,与任意AAV1-AAV11、Rh74或Rh10血清型的VP1、VP2和/或VP3序列不同)。

[0077] 如本文所用的,术语“血清型”是用于指与其他AAV血清型具有血清学差异的具有衣壳的AAV的区分特征。基于与另一种AAV相比较而言抗体与一种AAV之间交叉反应性的缺乏来测定血清学特征。这样的交叉反应性差异通常由于衣壳蛋白序列/抗原决定簇的差异(例如,由于AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3序列差异)引起的。尽管包括衣壳变体的AAV变体与参考AAV或其他AAV血清型无血清学差异的可能性,但是与参考AAV血清型或其他AAV血清型相比较而言它们相差至少一个核苷酸或氨基酸残基。

[0078] 传统定义上,血清型意指已测试了所研究的病毒针对对用于中和活性的所有现有的和表征的血清型具有特异性的血清进行了测试并且没有发现中和所研究的病毒的抗体。随着越来越多的天然存在的病毒分离物的发现和/或衣壳突变体的产生,任意现有的血清型可能具有或可能无血清学差异。因此,在新病毒(例如,AAV)无血清学差异的情况下,该新病毒(例如AAV)将是相应血清型的亚组或变体。在许多情况下,已经对具有衣壳序列修饰的突变病毒进行用于中和活性的血清学测试以确定根据血清型的传统定义它们是否为另一血清型。因此,为了方便起见并为了避免重复,术语“血清型”广义地是指血清学差异的病毒(例如,AAV)以及血清学无差异的可以在指定的血清型的亚组或变体内的病毒(例如,AAV)



二者。

[0079] 重组载体(例如, AAV) 质粒、载体(例如, AAV) 基因组及其方法和用途包括任意病毒株或血清型。作为非限制性示例, 重组载体(例如, AAV) 质粒或载体(例如, AAV) 基因组可基于任意AAV基因组, 例如, 诸如AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-rh74、AAV-rh10或AAV-2i8。这样的载体可基于相同的株系或血清型(或亚组或变体), 或可以彼此不同。举非限制性示例而言, 基于一种血清型基因组的重组载体(例如, AAV) 质粒或载体(例如, AAV) 基因组可以与包装所述载体的一种或更多种衣壳蛋白相同。此外, 重组载体(例如, AAV) 质粒或载体(例如, AAV) 基因组可以基于与包装所述载体的一种或更多种衣壳蛋白不同的AAV(例如AAV2) 血清型基因组, 在此情况下, 三种衣壳蛋白中的至少一种可以是例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8或变体例如AAV-Rh74变体(例如, 衣壳变体, 例如4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和15-6)。

[0080] 因此, AAV载体包括与特定血清型的特征性的基因/蛋白序列相同的基因/蛋白序列。如本文所使用的“与AAV1相关的AAV载体”是指一种或更多种AAV蛋白(例如, VP1、VP2和/或VP3序列), 其序列与包含AAV1的一种或更多种多核苷酸或多肽序列基本上具有同一性。类似地, “与AAV8相关的AAV载体”是指一种或更多种AAV蛋白(例如VP1、VP2和/或VP3序列), 其序列与包含AAV8的一种或更多种多核苷酸或多肽序列基本上具有同一性。“与AAV-Rh74相关的AAV载体”是指一种或更多种AAV蛋白(例如VP1、VP2和/或VP3序列), 其序列与包含AAV-Rh74的一种或更多种多核苷酸或多肽序列基本上具有同一性(参见例如图1-3的VP1、VP2、VP3序列)。涉及另一种血清型的这种AAV载体, 例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8, 可以因此具有与AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74和AAV-2i8不同的一个或者多个序列, 但是可以表现出与一个或多个基因和/或蛋白的基本序列同一性, 和/或具有AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8(例如, 诸如细胞/组织向性)的一个或多个功能特征。示例性非限制性AAV-Rh74和相关的AAV变体(例如AAV-Rh74)或相关的AAV如AAV-Rh74变体(例如, 衣壳变体, 如4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和15-6)序列包括例如在图1-9中阐述的VP1、VP2和/或VP3。

[0081] 在各种示例性实施方式中, 与参考血清型相关的AAV载体具有其多核苷酸、多肽或子序列, 该多核苷酸、多肽或子序列包括与AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8(诸如例如在图1-9中所述的AAV-Rh74VP1、VP2和/或VP3序列)的一个或更多个具有至少80%或更高(例如, 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%等)同一性的序列或由该序列组成。

[0082] 本发明的方法和用途包括AAV序列(多肽和核苷酸)、AAV-Rh74序列(多肽和核苷酸)和其子序列, 其表现出与参考AAV血清型, 例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、或AAV-2i8, 例如AAV-Rh74基因或蛋白序列(例如, 图1-9中所述的VP1、VP2和/或VP3序列)具有小于100%序列同一性, 但是与已知的AAV基因或蛋白, 例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8基因或蛋白等不同且不完全相同。在一实施方式中, AAV多肽或其子序列包括与任意参考AAV序列或其子序列(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、

AAV11、Rh10、Rh74、或AAV-2i8 (例如,图1-9中所述的VP1、VP2和/或VP3序列))具有至少80%或以上同一性(例如85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%等,即高达100%的同一性)的序列或由该序列组成。在具体的方面,AAV变体具有所述的四个氨基酸替代中的一个、两个、三个或四个(例如,衣壳变体4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和15-6)。

[0083] 重组载体(例如,AAV)包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8和变体、相关的、杂合的和嵌合序列,可以使用本领域技术人员已知的重组技术构建,以包括一个或更多个异源多核苷酸序列(转基因),旁侧有一个或更多个功能AAV ITR序列。这样的载体可全部或部分删除野生型AAV基因中的一个或更多个,例如,rep和/或cap基因,但保留至少一个功能旁侧ITR序列,这是将重组载体救援、复制和包装到AAV载体颗粒中所必需的。因此,AAV载体基因组将包括复制和包装所需的顺式序列(例如功能性ITR序列)。

[0084] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文可互换使用,是指包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)在内的所有形式的核酸、寡核苷酸。多核苷酸包括基因组DNA、cDNA和反义DNA,和剪接或未剪接的mRNA、rRNA tRNA和抑制性DNA或RNA(RNAi,例如,小的或短的发夹(sh)RNA、微RNA(miRNA)、小的或短的干扰(si)RNA、反式剪接RNA或反义RNA)。多核苷酸包括天然存在的、合成的和有意修饰或改变的多核苷酸(例如具有减少的CpG二核苷酸)。多核苷酸可以是单链、双链或三链、线性或环状的,并且可以是任意长度。在讨论多核苷酸时,根据提供沿5'至3'方向的序列的惯例,本文可以描述特定多核苷酸的序列或结构。

[0085] “异源”多核苷酸是指为了将多核苷酸经载体介导转移/递送到细胞中的目的插入到载体(例如,AAV)中的多核苷酸。异源多核苷酸通常不同于载体(例如,AAV)核酸,也就是说,相对于病毒(例如,AAV)核酸而言是非天然的。一旦转移/递送到细胞中,那么包含在载体内的异源多核苷酸就可表达(例如,如果合适的话,转录并翻译)。或者,包含在载体内的被传送/递送到细胞中的异源多核苷酸不需要表达。虽然术语“异源”在本文中并不总是参考多核苷酸使用,但甚至在没有修饰词“异源”的情况下提及的多核苷酸意指即使省略“异源”也包括异源多核苷酸。异源序列的示例将是编码因子IX的核酸,例如编码因子IX的经修饰的核酸,例如相对于参考核酸序列具有减少的CpG二核苷酸的核酸。

[0086] 由“多核苷酸序列”编码的“多肽”、“蛋白”和“肽”包括全长天然序列,和天然存在的蛋白以及功能子序列、修饰形式或序列变体,只要所述子序列、修饰形式或变体保留天然全长蛋白的一定程度的功能性即可。在本发明的方法和用途中,由多核苷酸序列编码的这样的多肽、蛋白和肽可以是但不必需与治疗的哺乳动物中有缺陷的或表达不足或缺乏的内源蛋白相同。

[0087] 在本发明中,慢病毒载体和细小病毒载体,例如腺病毒载体和AAV载体(包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8和相关的AAV变体,如AAV-Rh74变体(例如,衣壳变体,如4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和15-6))可用于稳定或瞬时地将多核苷酸导入/递送到细胞及其后代中。本文所用的术语“转基因”方便地是指将被导入或已被导入细胞或生物体内的这样的异源多核苷酸。转基因包括任意多核苷酸,例如编码多肽或蛋白的基因(例如因子IX)。

[0088] 例如,在具有转基因的细胞中,所述转基因已通过载体(例如AAV)、细胞的“转导”

和“转染”而导入/转移。术语“转导”和“转染”是指将分子例如多核苷酸导入细胞或宿主生物中。

[0089] 其中已导入有转基因的细胞被称为“转导的细胞”。因此，“转导的”细胞(例如,在哺乳动物中,例如细胞或组织或器官细胞)意指在将外源分子例如多核苷酸或蛋白(例如,转基因)导入到细胞中之后细胞中的遗传改变。因此,例如,“转导的”细胞是其中或者其后代中已导入外源分子的细胞。一种或更多种细胞可被传代并且所导入的蛋白被表达或核酸被转录。对于基因治疗的用途和方法而言,转导的细胞可在受试者中。

[0090] 所导入的多核苷酸可以或可以不被整合到受体细胞或生物体的核酸内。如果所导入的多核苷酸被整合到受体细胞或生物体的核酸(基因组DNA)内,则其可稳定地保持在该细胞或生物体中,并进一步传代到受体细胞或生物体的传代细胞或生物体或由该传代细胞或生物体遗传。最后,所导入的核酸可仅短暂地存在于受体细胞或宿主生物体中。

[0091] 可被转导的细胞包括任意组织或器官类型的、任意来源(例如,中胚层、外胚层或内胚层)的细胞。细胞的非限制性示例包括肝(例如,肝细胞、肝窦内皮细胞),胰腺(例如,胰岛β细胞),肺,中枢或外周神经系统,例如脑(例如,神经、神经胶质或室管膜细胞)或脊柱,肾,眼(例如,视网膜、细胞组分),脾,皮肤,胸腺,睾丸,肺,膈肌,心脏(心肌),肌肉或腰肌,或内脏(例如内分泌腺),脂肪组织(白色、褐色或米色),肌肉(例如,成纤维细胞),滑膜细胞,软骨细胞,破骨细胞,上皮细胞,内皮细胞,唾液腺细胞,内耳神经细胞或造血的(例如,血液或淋巴)细胞。其他的示例包括干细胞,例如亚全能性(pluripotent)或多能(multipotent)祖细胞,其发育或分化为肝脏(例如,肝细胞、肝窦内皮细胞),胰腺(例如,胰岛β细胞),肺,中枢或外周神经系统,例如脑(例如,神经、神经胶质或室管膜细胞)或脊椎,肾,眼(视网膜,细胞组分),脾,皮肤,胸腺,睾丸,肺,膈肌,心脏(心脏的),肌肉或腰肌,或内脏(如内分泌腺),脂肪组织(白色,棕色或米色),肌肉(例如,成纤维细胞),滑膜细胞,软骨细胞,破骨细胞,上皮细胞,内皮细胞,唾液腺细胞,内耳神经细胞或造血的(例如,血液或淋巴)细胞。

[0092] 在一个实施方式中,“治疗分子”是可减轻或减少由细胞或受试者中蛋白缺乏或缺陷所造成的症状的肽或蛋白。或者,通过转基因编码的“治疗”肽或蛋白是赋予受试者益处的一种,例如,以纠正遗传缺陷、纠正基因(表达或功能)缺陷。

[0093] 根据本发明有用的编码基因产物(例如,治疗性蛋白)的异源多核苷酸的非限制性示例包括可用于治疗疾病或病症的那些,所述疾病或病症包括但不限于凝血障碍,例如血友病A、血友病B、地中海贫血和贫血症。

[0094] 编码基因产物的所有哺乳动物和非哺乳动物形式的多核苷酸(包括本文公开的非限制性基因和蛋白)被明确地包括,其或者是已知的或者是未知的。因此,本发明包括来自非哺乳动物、人类以外的哺乳动物和人类的基因和蛋白,这些基因和蛋白以与本文所述的人类基因和蛋白基本上相似的方式发挥作用。哺乳动物非人因子IX序列的非限制性示例描述在Yoshitake et al.,1985,supra;Kurachi et al.,1995,supra;Jallat et al.,1990,supra;Kurachi et al.,1982,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:6461-6464;Jaye et al.,1983,Nucl.Acids Res.11:2325-2335;Anson et al.,1984,EMBO J.3:1053-1060;Wu et al.,1990,Gene 86:275-278;Evans et al.,Proc Natl Acad Sci USA 86:10095(1989),Blood 74:207-212;Pendurthi et al.,1992,Thromb.Res.65:177-186;Sakar et al.,

1990, *Genomics* 1990, 6:133-143; 和 Katayama et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4990-4994 中。

[0095] 多核苷酸、多肽和其子序列包括修饰的形式和变体形式。如本文所用的术语“修饰”或“变体”及其语法变体意指多核苷酸、多肽或其子序列不同于参考序列。因此,经修饰的和变体序列可具有与参考序列基本上相同的活性或功能、或大于或小于参考序列的活性或功能,但至少保留参考序列的部分活性或功能。在具体的实施方式中,经修饰的核酸编码因子IX,并且已被修饰以与参考的编码因子IX的核酸(例如野生型因子IX序列,例如人或任何其他哺乳动物因子IX基因序列)相比减少CpG二核苷酸的数量。

[0096] 变体还包括功能获得和缺失变体。例如,野生型人因子IX DNA序列,其蛋白变体或突变体保留活性,或者是治疗有效的,或者与本发明的方法和用途中的非变体人因子IX的治疗活性相当或甚至更强。在称为“Padua”的天然存在的人因子IX变体的一个非限制性示例中,人因子IX在位置338处具有L(亮氨酸)而不是R(精氨酸)。与缺少Padua突变的人因子IX相比,Padua FIX具有更高的催化活性和凝血活性。将人因子IX中的残基338从精氨酸改变为丙氨酸引起催化活性的增加(Chang et al., *J. Biol. Chem.*, 273:12089-94(1998))。在另一具体的示例中,IV型胶原蛋白用于捕获因子IX,意味着当导入到哺乳动物的肌肉组织中时,一些因子IX不可用于参与凝血,因为它保留在肌肉组织中的间隙空间内。导致蛋白具有降低的IV型胶原蛋白结合(例如,功能丧失)的因子IX的序列中的突变是例如用于治疗血友病的有用的突变体。这样的突变体因子IX基因的示例编码人FIX蛋白,其中氨基酸丙氨酸替代从成熟蛋白开始的第五个氨基酸位置中的赖氨酸。

[0097] 修饰的非限制性示例包括一个或更多个核苷酸或氨基酸替代(例如,1-3、3-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-40、40-50、50-100或更多个核苷酸或残基),例如用CpG替代转基因(例如因子IX编码基因,例如具有数量减少的CpG二核苷酸的编码FIX的基因)中的可替代的二核苷酸。氨基酸替代的示例是衣壳序列中的保守氨基酸替代。氨基酸替代的另一个示例是精氨酸替代赖氨酸残基(例如,如4-1、15-1、15-2、15-3/15-5、15-4和/或15-6中任一项所述的赖氨酸的一个或多个精氨酸替代)。进一步的修饰包括参考序列的添加(例如,插入或1-3、3-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-40、40-50、50-100个或更多个核苷酸或残基)和删除(例如,子序列或片段)。在具体的实施方式中,经修饰或变体序列保留未经修饰的序列的至少一部分功能或活性。这样的修饰形式和变体可具有等于、小于或大于参考序列的功能或活性,但是具有该功能或活性的至少一部分,例如,如本文所述。

[0098] 如本文所阐述的,变体可具有一个或更多个非保守或保守氨基酸序列差异或修饰,或两者兼而有之。“保守替代”是一个氨基酸被生物学、化学或结构上相似的残基替代。生物学相似意指替代不破坏生物活性。结构相似意指氨基酸具有长度类似的侧链,例如丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸,或具有相似的大小。化学相似意指残基具有相同的电荷或均为亲水性的或疏水性的。具体的示例包括一个疏水残基(例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸)替代另一个,或一个极性残基替代另一个,例如精氨酸替代赖氨酸,谷氨酸替代天冬氨酸或谷氨酰胺替代天冬酰胺,丝氨酸替代苏氨酸等等。保守替代的具体示例包括疏水残基例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸替代另一个,极性残基替代另一个,例如精氨酸替代赖氨酸,谷氨酸替代天冬氨酸,或谷氨酰胺替代天冬酰胺等等。例如,保守氨基酸替代通常包括以下组内的替代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰

胺,谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸,精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。“保守替代”还包括使用经替代的氨基酸替代未经替代的母体氨基酸。

[0099] 因此,本发明包括(例如,本文所述的编码蛋白的多核苷酸的)基因和蛋白变体,其保留一种或更多种生物活性(例如,凝血功能等)。变体可不同于参考序列,例如天然存在的多核苷酸、蛋白或多肽。多核苷酸、蛋白或多肽的这样的变体包括蛋白或多肽,其已经或可使用重组DNA技术进行修饰,使得多核苷酸、蛋白或多肽具有改变的或其他的特性。

[0100] 在核苷酸序列水平,天然和非天然存在的变体基因与参考基因将通常具有至少约50%同一性,更通常约70%同一性,甚至更通常约80%同一性。因此,例如,具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX基因可以与野生型FIX基因具有80%或更多的同一性,或者与野生型FIX基因具有80-85%、85-90%、90-95%或更多的同一性,例如与野生型FIX基因具有96%、97%、98%或99%或更多的同一性。

[0101] 在氨基酸序列水平,天然和非天然存在的变体蛋白与参考蛋白将通常具有至少约70%同一性,更通常约80%同一性,甚至更通常约90%或更高同一性,尽管非同一性的大部分区域允许在非保守区(例如,小于70%同一性,例如小于60%、50%或甚至40%)。在其他实施方式中,所述序列与参考序列具有至少60%、70%、75%或更高同一性(例如,80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性)。

[0102] 术语“同一性”、“同源性”及其语法变体意指当两个或更多个参考实体在它们是“对准的”序列时它们是相同的。因此,举例而言,当两个多肽序列相同时,它们至少在参考区域或一部分内具有相同的氨基酸序列。当两个多核苷酸序列相同时,它们至少在参考区域或一部分内具有相同的多核苷酸序列。同一性可以是在序列的限定区域(区域或结构域)内。同一性的“区”或“区域”是指两个或更多个参考实体的相同的一部分。因此,当两个蛋白或核酸序列在一个或更多个序列区或区域内是相同时,它们在该区域内共享同一性。“对准的”序列是指多个多核苷酸或蛋白(氨基酸)序列,相比于参考序列通常具有用于缺失或添加的碱基或氨基酸(间隙)的校正。

[0103] 同一性可以在整个序列长度或序列的一部分上延伸。在具体的方面,共享百分比同一性的序列的长度为2、3、4、5或更多个连续的多核苷酸或氨基酸,例如,6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个等等连续的多核苷酸或氨基酸。在另外的具体方面,共享同一性的序列的长度为21个或更多个连续的多核苷酸或氨基酸,例如,21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40个等等连续的多核苷酸或氨基酸。在进一步的具体方面,共享同一性的序列的长度为41或更多个连续的多核苷酸或氨基酸,例如,42、43、44、45、45、47、48、49、50个等等连接的多核苷酸或氨基酸。在进一步的具体方面,共享同一性的序列的长度为50个或更多个连续的多核苷酸或氨基酸,例如,50-55、55-60、60-65、65-70、70-75、75-80、80-85、85-90、90-95、95-100、100-110个等等连续的多核苷酸或氨基酸。

[0104] 术语“同源”或“同源性”意指两个或更多个参考实体在给定的区域或部分上共享至少部分同一性。同源性或同一性的“区、区域或结构域”意指两个或更多个参考实体的一部分共享同源性或者是相同的。因此,当两个序列在一个或更多个序列区域上相同时,它们在这些区域共享同一性。“实质性同源性”意指分子是结构或功能上保守的,使得其具有或被预测具有参考分子或与其共享同源性的参考分子的相关的/相应的区域或一部分的一个

或更多个结构或功能的至少部分结构或功能(例如,生物功能或活性)。

[0105] 两个序列之间的同一性(同源性)程度可以使用计算机程序和/或数学算法确定。计算百分比序列同一性(同源性)的这样的算法通常导致序列间隙以及在比对区或区域上错配。例如,BLAST(例如,BLAST 2.0)搜索算法(参见例如,Altschul et al., J.Mol.Biol.215:403(1990),公众可通过NCBI获得)具有如下示例性搜索参数:错配-2;间隙口5;间隙延伸2。对于多肽序列比对而言,BLASTP算法通常与评分矩阵组合使用,例如PAM100、PAM 250、BLOSUM 62或BLOSUM 50。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)和SSEARCH序列比对程序也用于定量同一性程度(Pearson et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988);Pearson,Methods Mol Biol.132:185(2000);和Smith et al.,J.Mol.Biol.147:195(1981))。还开发了使用基于Delaunay的拓扑映射定量蛋白结构相似性的程序(Bostick et al.,Biochem Biophys Res Commun.304:320(2003))。

[0106] 多核苷酸包括添加和插入例如一个或者多个异源结构域。添加(例如,异源结构域)可以是任意类型分子与组合物共价或非共价连接。通常,添加和插入(例如,异源结构域)赋予互补或不同的功能或活性。

[0107] 添加和插入包括嵌合和融合序列,其是具有通常不存在于与所述序列共价连接的参考天然(野生型)序列中的一种或更多种分子的多核苷酸序列或蛋白。术语“融合”或“嵌合”及其语法变体当用于提及分子时意指所述分子的一部分或局部包含与所述分子不同(异源)的不同实体,因为它们通常不一起存在于自然界中。也就是说,例如,融合或嵌合的一部分包括或由不一起存在于自然界中并且结构不同的一部分组成。

[0108] 术语“载体”是指可以通过插入或引入多核苷酸来操纵的质粒、病毒(例如,AAV载体)、或其他载体。这样的载体可用于基因操纵(即“克隆载体”),以将多核苷酸导入/转移到细胞中,并在细胞中转录或翻译所插入的多核苷酸。载体核酸序列通常至少含有用于在细胞中传代的复制起点和任选的其他元件,例如异源多核苷酸序列、表达调控元件(例如,启动子、增强子)、内含子、ITR、选择性标记(例如,抗生素抗性)、多腺嘌呤(也称为多-腺苷酸化)序列。

[0109] 病毒载体来源于或基于包含病毒基因组的一个或多个核酸元件。特定的病毒载体包括慢病毒载体和细小病毒载体,如腺相关病毒(AAV)载体。

[0110] 如本文所使用的作为病毒载体的修饰语(例如重组的慢病毒和细小病毒(例如AAV)载体)以及作为序列的修饰语(例如重组多核苷酸和多肽)的术语“重组”意指所述组合物(例如,AAV或序列)已被以通常不存在于自然界中的方式处理过(即,经工程改造的)。重组载体(例如AAV载体)的具体示例将是其中通常不存在于野生型病毒(例如,AAV)基因组中的多核苷酸插入病毒基因组的情况。例如,重组多核苷酸的示例将是其中编码蛋白的异源多核苷酸(例如,基因)被克隆到载体中,具有或没有5'、3'和/或内含子区,所述基因通常于病毒(例如,AAV)基因组中关联。虽然术语“重组”在本文中并不总是参照载体(例如病毒和AAV载体以及例如多核苷酸和多肽等序列)使用,但是尽管有任意这样的省略,重组形式的病毒、AAV以及包括多核苷酸和多肽的序列仍明确地被包括。

[0111] 重组病毒“载体”或“AAV载体”是通过使用分子方法从病毒(例如AAV)中除去野生型基因组,并用非天然核酸(例如异源多核苷酸序列(例如,编码人FIX的经修饰的核酸序列,所述人FIX为例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX))替代,而从病毒(例如AAV)的野

生型基因组中衍生出来的。通常,对于AAV,AAV基因组的一个或两个反向末端重复序列(ITR)序列保留在AAV载体中。“重组”病毒载体(例如,AAV)与病毒(例如AAV)基因组区别开来,因为病毒基因组的全部或部分已经相对于病毒(例如AAV)基因组核酸(例如异源多核苷酸序列(例如,编码人FIX的经修饰的核酸序列,所述人FIX为例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX))被非天然序列替代。因此非天然序列(例如,编码人FIX的经修饰的核酸序列,所述人FIX为例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的并入定义病毒载体(例如AAV)为“重组”载体,在AAV的情况下的载体可以被称为“rAAV载体”。

[0112] 可以将重组载体(例如,慢AAV和细小AAV)序列包装“颗粒”中-在本文中称为“颗粒”,用于随后离体、体外或体内感染(转导)细胞。当重组载体序列被衣壳化或包装在AAV颗粒中时,该颗粒也可被称为“rAAV”。这样的颗粒包括衣壳化或包装载体基因组的蛋白。具体示例包括病毒包膜蛋白,并且在AAV的情况下为衣壳蛋白。

[0113] 对于重组质粒而言,载体“基因组”是指最终包装或衣壳化以形成病毒(例如AAV)颗粒的重组质粒序列部分。在重组质粒被用于构建或制造重组载体的情况下,所述载体基因组不包括“质粒”的不对应于重组质粒的载体基因组序列的部分。该重组质粒的非载体基因组部分被称为“质粒骨架”,其对于质粒的克隆和扩增(传代和重组病毒生产所需要的方法)是重要的,但其本身不包装或衣壳化到病毒(例如,AAV)颗粒中。

[0114] 因此,载体“基因组”是指由病毒(例如,AAV)包装或衣壳化的载体质粒的一部分,并且其含有异源多核苷酸序列。重组质粒的非载体基因组部分是“质粒骨架”,其对于质粒克隆和扩增重要的(例如具有可选择的标记,例如卡那霉素)但是其本身不被病毒(例如,AAV)包装或衣壳化。

[0115] 衣壳化/包装载体基因组的rAAV的量可以例如通过定量PCR来确定。该测定法通过实时定量聚合酶链式反应来测量包装的载体基因组的物理数量,并且可以在制造/提纯过程的不同阶段例如对大量的AAV载体和最终产物进行。

[0116] 重组载体序列通过插入或引入多核苷酸来操纵。如本文所公开的载体质粒通常至少包含用于在细胞中传代的复制起点和一个或多个表达调控元件。

[0117] 包括AAV载体的载体序列可包括一个或多个“表达调控元件”。通常,表达调控元件是影响可操作地连接的多核苷酸的表达的核酸序列。包括存在于载体中的调控元件(该调控元件包括如本文所述的表达调控元件,例如启动子和增强子)以促进适当的异源多核苷酸转录以及如果合适的话促进翻译(例如,启动子、增强子、内含子的剪接信号、维持基因的正确的阅读框架以允许框内翻译mRNA、和终止密码子等)。这些元件通常顺式作用(称为“顺式作用”元件)但也可以反式作用。

[0118] 表达调控可以在转录、翻译、剪接、信息稳定性等水平来实现。通常,调节转录的表达调控元件并列靠近所转录的多核苷酸(例如,编码人因子IX(例如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸序列)的5'端(即“上游”)。表达调控元件也可位于所转录的序列的3'端(即,“下游”)或转录物内(例如,在内含子中)。表达调控元件可定位邻近于所转录的序列或定位以一定距离远离所转录的序列(例如,距离所述多核苷酸1-10、10-25、25-50、50-100、100至500个或更多个核苷酸),甚至在相当远的距离处。然而,由于某些载体(例如AAV载体)的多核苷酸长度的限制,这样的表达调控元件将通常在与所述转录的多核苷酸距离1至1000个核苷酸范围内。

[0119] 在功能上,可操作地连接的异源多核苷酸的表达至少部分地可由所述元件(例如,启动子)调控,使得所述元件调节多核苷酸的转录以及适当时调节转录物的翻译。表达调控元件的具体示例是启动子,其通常位于转录序列的5'端。表达调控元件的另一个示例是增强子,其可位于所转录的序列的5'、3'端或位于所转录的序列内。

[0120] 如本文所用的“启动子”可以指定位邻近与编码重组产物的多核苷酸序列的核酸(DNA)序列。启动子通常可操作地连接在相邻的序列例如异源多核苷酸(例如编码因子IX的经修改的核酸)上。与在不存在启动子的情况下所表达的量相比较而言,启动子通常增加异源多核苷酸所表达的量。

[0121] 如本文所用的“增强子”可以指与异源多核苷酸相邻的序列。增强子元件通常位于启动子元件的上游,但是也可发挥功能并且可位于DNA序列(例如,异源多核苷酸)的下游或之内。因此,增强子元件可位于异源多核苷酸上游或下游的100个碱基对、200个碱基对或300或更多个碱基对处。增强子元件通常增加异源多核苷酸的表达至高于由启动子元件所赋予的增加的表达。

[0122] 表达调控元件(例如,启动子)包括在特定组织或细胞类型中具有活性的那些,本文中称为“组织特异性表达调控元件/启动子”。组织特异性表达调控元件通常在特定细胞或组织(例如,肝、脑、中枢神经系统、脊髓、眼、视网膜、骨骼、肌肉、肺、胰、心脏、肾细胞等)中具有活性。表达调控元件通常在这些细胞、组织或器官中具有活性,因为它们被转录激活蛋白或被是特定细胞、组织或器官类型所特有的其他转录调节剂识别。

[0123] 在骨骼肌中有活性的启动子的示例包括来自编码骨骼肌 $\alpha$ -肌动蛋白、肌球蛋白轻链2A、抗肌萎缩蛋白、肌肉肌酸激酶的基因的启动子以及具有高于天然存在的启动子的活性的合成肌肉启动子(参见例如Li, et al., *Nat. Biotech.* 17:241-245 (1999))。对肝脏具有组织特异性的启动子的示例是人 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶(hAAT)启动子;白蛋白, Miyatake, et al. *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997); 乙肝病毒核心启动子, Sandig, et al., *Gene Ther.* 3:1002-9 (1996); 甲胎蛋白(AFP), Arbuthnot, et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996); 骨(骨钙素, Stein, et al., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997); 骨唾液酸糖蛋白, Chen, et al., *J. Bone Miner. Res.* 11:654-64 (1996)), 淋巴细胞(CD2, Hansal, et al., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); 重链免疫球蛋白; T细胞受体链), 神经元(神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子, Andersen, et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993); 神经丝轻链基因, Piccioli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991); 神经元特异性vgf基因, Piccioli, et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)]等等。在肝脏中活性增强子的一个示例是载脂蛋白E(apoE)HCR-1和HCR-2(Allan et al., *J. Biol. Chem.*, 272:29113-19 (1997))。

[0124] 表达调控元件还包括普遍存在的或混杂的启动子/增强子,其能够驱动多核苷酸在许多不同的细胞类型中表达。这样的元件包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子/增强子序列、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子/增强子序列和在多种哺乳动物细胞类型中具有活性的其他病毒启动子/增强子,或自然界中不存在的合成元件(参见例如, Boshart et al, *Cell*, 41:521-530 (1985)), SV40启动子, 二氢叶酸还原酶启动子, 细胞质 $\beta$ 肌动蛋白启动子和磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。

[0125] 表达调控元件还可赋予以可调节的方式进行表达,即信号或刺激增加或减少可操作地连接的异源多核苷酸的表达。响应于信号或刺激增加可操作地连接的多核苷酸的表达



的调控元件也称为“诱导型元件”(即,被信号诱导)。具体的示例包括但不限于激素(例如,类固醇)诱导型启动子。响应于信号或刺激减少可操作地连接的多核苷酸的表达的调控元件被称为“阻遏型元件”(即,信号减少表达,使得当信号消失或不存在时表达增加)。通常,由这样的元件赋予的增加或减少的量与所存在的信号或刺激的量成正比;信号或刺激的量越大,表达的增加或减少越大。具体的非限制性示例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子;类固醇激素-诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MTV)启动子;T7聚合酶启动子系统(W098/10088);四环素阻遏系统(Gossen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992));四环素诱导系统(Gossen, et al., Science. 268:1766-1769 (1995));还参见 Harvey, et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518 (1998));RU486诱导系统(Wang, et al., Nat. Biotech. 15:239-243 (1997) 和 Wang, et al., Gene Ther. 4:432-441 (1997)];和雷帕霉素-诱导型系统(Magari, et al., J. Clin. Invest. 100:2865-2872 (1997); Rivera, et al., Nat. Medicine. 2:1028-1032 (1996))。可用在这种情况下的其他调节调控元件是由特定的生理状态(例如温度、急性期、发育)调节的那些。

[0126] 表达调控元件还包括用于异源多核苷酸的一个或多个天然元件。当希望异源多核苷酸的表达应模拟天然表达时可使用天然调控元件(例如,启动子)。当异源多核苷酸的表达是时间上或发育上调节的,或以组织特异性的方式或响应于特定的转录刺激调节时可使用天然元件。也可使用其他的天然表达调控元件,例如内含子、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列。

[0127] 如本文所用的术语“可操作的连接”或“可操作地连接的”是指组件的物理或功能并置以便描述允许它们以所期望的方式发挥功能。在与核酸可操作地连接的表达调控元件的示例中,该关系使得调控元件调节核酸的表达。更具体地,例如,可操作地连接的两个DNA序列意指以使至少一个DNA序列能对其他序列发挥生理作用这样的关系(顺式或反式)布置两个DNA。

[0128] 因此,编码人FIX蛋白的经修饰的核酸序列以及载体和质粒(包括病毒载体,如慢病毒载体和细小病毒载体,包括AAV载体及其组合物的载体)可包括其他核酸元件。这些元件包括但不限于一个或多个拷贝的AAV ITR序列、表达调控(例如启动子/增强子)元件、转录终止信号或停止密码子、位于多核苷酸序列旁侧的5'端或3'端非翻译区(例如,多腺苷酸化(聚A)序列)、或者内含子,例如基因组人因子IX的内含子I (SEQ ID NO:13)的全部或部分。

[0129] 核酸元件还包括例如填料或填充多核苷酸序列,例如以改善包装并减少污染核酸的存在,例如以减少质粒骨架的包装。如本文中所公开的,AAV载体通常接受具有有限大小范围的DNA插入物,通常为约4kb至约5.2kb,或略大。因此,对于较短的序列而言,将所述填充物或填料包含入插入片段中以调节长度至接近或处于将AAV载体包装到病毒颗粒中可接受的病毒基因组序列的正常大小。在多个实施方式中,填料/填充核酸序列是核酸的非翻译(非蛋白编码)区段。在AAV载体的具体实施方式中,异源多核苷酸序列的长度小于4.7kb并且填料或填充多核苷酸序列具有一定的长度使得当与异源多核苷酸序列组合(例如,插入载体中)时具有介于约3.0-5.5kb或约4.0-5.0Kb或约4.3-4.8Kb之间的总长度。

[0130] 内含子还可用作填料或填充多核苷酸序列以达到包装到病毒颗粒中的AAV载体的长度。用作填料或填充多核苷酸序列的内含子和内含子片段(例如FIX的内含子I的一部分)

也可增加表达。与在不存在内含子元件的表达相比较而言包含有内含子元件可增加表达 (Kurachi et al., 1995, supra)。

[0131] 内含子的用途并不限于包含有因子IX内含子I序列,而且还包括包含有其他内含子,这些内含子可与相同的基因(例如,在核酸编码因子IX的情况下,内含子衍生自因子IX基因组序列中存在的内含子)相关或与完全不同的基因或其他DNA序列相关。因此,核酸的其他非翻译(非编码蛋白)区域,例如在来自同源(相关)基因(异源多核苷酸序列编码由基因组序列编码的相同蛋白的所有或一部分)和非同源(不相关)基因(异源多核苷酸序列编码与由基因组序列编码的蛋白不同的蛋白)的基因组序列中发现的内含子也可以用作根据本发明的填料或填充多核苷酸序列。

[0132] 如本文所用的“内含子I的一部分”意指内含子I的具有的核苷酸的长度为约0.1kb至约1.7kb的区域,该区域增加因子IX的表达,当与不存在内含子I的一部分的情况下的FIX的表达相比较时在质粒或病毒载体模板上通常增加约1.5倍或更多倍。更具体的部分是内含子I的1.3kb的部分。因子IX内含子I的序列的一非限制性示例是内含子A,一种由如包含SEQ ID NO:13所示的FIX第一内含子的5'部分和3'部分组成的嵌合体。

[0133] 表达调控元件、ITR、聚A序列、填料或填充多核苷酸序列的长度可以变化。在具体的方面,表达调控元件、ITR、聚A序列、填料或填充多核苷酸序列是长度介于约1-10个核苷酸、10-20个核苷酸、20-30个核苷酸、30-40个核苷酸、40-50个核苷酸、50-60个核苷酸、60-75个核苷酸、75-100个核苷酸、100-150个核苷酸、150-200个核苷酸、200-250个核苷酸、250-300个核苷酸、300-400个核苷酸、400-500个核苷酸、500-750个核苷酸、750-1,000个核苷酸、1,000-1,500个核苷酸、1,500-2,000个核苷酸或2,000-2,500个核苷酸之间。

[0134] 根据一非限制性实施方式,AAV载体包含包含4-1衣壳变体VP1蛋白(SEQ ID NO:4)的AAV衣壳和用于在转导的哺乳动物细胞中表达异源基因的基因组。

[0135] 该载体的衣壳还可以包含来自4-1衣壳变体的VP2和VP3蛋白(分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:3)。根据某些非限制性实施方式,VP1蛋白和VP2蛋白处于大约1:1(或一些其他比例)的化学计量比,并且VP3蛋白与VP1或VP2或VP1和VP2两者的比例是处于约5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1的合适比例或其他比例。

[0136] 在一些实施方式中,包括但不限于具有包含4-1衣壳变体蛋白(VP1、VP2、VP3)的衣壳的AAV载体的基因组包含编码人因子IX(FIX)蛋白的异源核酸序列。在一些实施方式中, FIX蛋白是野生型的,并且在其他实施方式中, FIX蛋白含有改变蛋白活性的替代突变或其他突变。在一些实施方式中,突变增加FIX催化活性和/或蛋白作为促凝血剂的活性。在一些实施方式中, FIX蛋白是Padua FIX蛋白,在对应于FIX蛋白的第338位的氨基酸处具有Arg至Ala的替代。根据一些实施方式,编码人FIX(包括FIX Padua)的基因通过例如减少或甚至消除CpG二核苷酸进行密码子优化。其他类型的密码子优化也是可能的。

[0137] 在一些实施方式中, AAV载体的基因组还包含来自位于基因组的左端和右端(即,分别为5'和3'端)的AAV2的反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方式中,左侧ITR包含来自SEQ ID NO:12的核苷酸1-141(本文公开为SEQ ID NO:13)或由其组成,并且右侧ITR包含来自SEQ ID NO:12的核苷酸4097-4204(本文公开为SEQ ID NO:20)或由其组成。每个ITR可以通过可变长度的核酸序列与载体基因组中的其他元件分离。

[0138] 在其他实施方式中, AAV载体的基因组还包含表达调控元件, 其包含启动子和任选的增强子。在一些实施方式中, AAV载体基因组包含启动子和增强子, 其可以是组成型、诱导型或组织特异性的。在一些实施方式中, 启动子或增强子或两者是组织特异性的。根据一示例性实施方式, 与某些其他细胞类型相比, 增强子和启动子优先在肝细胞中是有活性的。根据一实施方式, 增强子是人ApoE HCR-1增强子的全部或一部分, 启动子是人 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶(AAT)启动子的全部或部分。在一些实施方式中, AAV载体基因组包括包含来自SEQ ID NO: 12的核苷酸152-472(本文公开为SEQ ID NO: 14)或其组成的人ApoE HCR-1增强子, 并且包括包含来自SEQ ID NO: 12的核苷酸482-878(本文公开为SEQ ID NO: 15)或其组成的人AAT启动子。在一些实施方式中, ApoE HCR-1增强子位于AAT启动子的5'端, 并且所述序列可以是连续的, 或被另一个核苷酸序列分开。根据一些实施方式, 增强子和启动子位于编码因子IX的核酸序列的5'端, 并且可以与因子IX基因的第一个外显子连续地连接, 或者可以通过来自人因子IX基因的5'非翻译序列(UTR)或用作间隔子的一些其他序列与因子IX基因的第一个外显子分开。在一示例性的非限制性实施方式中, 5'UTR序列包含来自SEQ ID NO: 12的核苷酸879-907或其组成。

[0139] 在一些实施方式中, 编码FIX(包括天然存在的FIX Padua)的基因包括存在于人因子IX基因组序列中的一个或多个内含子。在其他实施方式中, 可以排除所有内含子, 其示例公开为SEQ ID NO: 10的核酸序列并且在本文中被称为用于“FIX39”的编码序列。如果存在, 内含子可以表现为填充或填料序列, 如本文所述。整个基因可以进行密码子优化以耗尽或消除CpG二核苷酸。

[0140] 在一特定的非限制性实施方式中, 用于AAV载体中的编码人因子IX的基因包含来自SEQ ID NO: 12的核苷酸908-3731或其组成, 其编码FIX Padua并经密码子优化以消除CpG二核苷酸。该序列包括外显子1(来自SEQ ID NO: 12的核苷酸908-995)、第一内含子(有时称为内含子I; 来自SEQ ID NO: 12的核苷酸996-2433)和外显子2-8(来自SEQ ID NO: 12的核苷酸2434-3731)。

[0141] 在某些实施方式中, 编码因子IX的基因可以在其3'端跟随来自人因子IX基因的3'UTR序列(例如但不限于来自SEQ ID NO: 12的核苷酸3732-3779)和/或来自因子IX基因的多聚腺苷酸(聚A)或另一基因。在一非限制性示例中, 聚A序列可以来自牛生长激素(bGH)基因, 并且可以包含来自SEQ ID NO: 12的核苷酸3820-4047或其组成。在一些实施方式中, 3'UTR可以通过插入的核苷酸序列与聚A序列可变地间隔开。

[0142] 在一些实施方式中, 上述元件可以组合成一个AAV载体基因组。根据一非限制性示例, AAV载体可具有基因组, 该基因组按5'至3'顺序包含左侧AAV ITR、ApoE HCR-1增强子(或其部分)、hAAT启动子(或其部分)、人因子IX 5'UTR的一部分、编码人因子IX Padua的核酸(任选地包括一个或多个内含子, 例如内含子I)、人因子IX 3'UTR的一部分、来自bGH的polyA序列(或其部分)以及在右侧的AAV2ITR。在这些实施方式的一些中, 左侧AAV2ITR具有SEQ ID NO: 13的核酸序列; ApoE HCR-1增强子具有SEQ ID NO: 14的核酸序列; hAAT启动子具有SEQ ID NO: 15的核酸序列; 5'UTR具有SEQ ID NO: 16的核酸序列; 编码FIX Padua(包括内含子I)的基因编码由SEQ ID NO: 10的核酸序列编码的FIX蛋白; 3'UTR具有SEQ ID NO: 18的核酸序列; 聚A区具有SEQ ID NO: 19的核酸序列; 而右侧的AAV2ITR具有SEQ ID NO: 20的核酸序列。

[0143] 根据某些实施方式, AAV载体的基因组包含来自SEQ ID NO:12的核苷酸1-4204或者与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列, 或由其组成。在这些实施方式中的一些中, 衣壳包含4-1VP1衣壳蛋白变体 (SEQ ID NO:4) 和相应的VP2和VP2衣壳蛋白。在本文称为“AAV-FIX39-Padua”的AAV载体的特定的非限制性实施方式中, 载体包括由4-1衣壳变体蛋白 (VP1、VP2、VP3) 形成的衣壳和包含与来自SEQ ID NO:12的核苷酸1-4204对应的核酸序列的单链基因组。

[0144] 与含有AAV载体基因组的“含基因组的衣壳”相比, 本文使用的AAV“空衣壳”不含载体基因组 (因此, 术语“空”)。空衣壳是病毒样颗粒, 因为它们与一种或多种与完整 (含有AAV载体的基因组) 的病毒反应的抗体反应。

[0145] AAV载体制剂中可包含空衣壳。如果需要, 可以将AAV空衣壳加入AAV载体制剂中, 或根据本文的方法分开施用给受试者。

[0146] 尽管不希望被理论所束缚, 但是相信AAV空衣壳结合至抗AAV载体的抗体或与抗AAV载体的抗体反应, 从而用作诱饵以减少AAV载体的失活。这样的诱饵起作用以吸附针对AAV载体的抗体, 由此增加或改善细胞的AAV载体转基因转导 (转基因导入), 并且继而增加转录物和/或编码蛋白的细胞表达。

[0147] 可以以所确定的质量和其数量生成空衣壳并纯化。例如, 空衣壳滴度可以通过分光光度法通过在280nm波长处的光密度来测量 (基于Sommer et al., Mol. Ther. 2003, Jan; 7 (1):122-8)。

[0148] 在AAV载体制剂中有时天然存在空-AAV或空衣壳。这种天然混合物可以根据本发明使用, 或者如果需要的话可以被操纵来增加或减少空衣壳和/或载体的量。例如, 可将空衣壳的量任选地调节至预期降低与准备用于受试者中的载体介导的基因转导的AAV载体反应的抗体的抑制作用的量。美国公开2014/0336245中描述了空衣壳的用途。

[0149] 在多种实施方式中, AAV空衣壳用AAV载体配制和/或施用于受试者。在具体的方面, 用少于或等于载体的量配制AAV空衣壳 (例如AAV载体是AAV空衣壳的约1.5-100倍, 或AAV载体与AAV空衣壳的比率约为1:1)。在其它特定的方面中, AAV载体用过量的AAV空衣壳配制 (例如, AAV空衣壳是AAV载体的1倍以上, 例如, AAV空衣壳是AAV载体的1.5至100倍)。任选地, 具有低至负滴度的AAV NAb的受试者可以接受较低量的空衣壳 (AAV空衣壳为AAV载体的1至10倍, AAV空衣壳为AAV载体的2至6倍, 或AAV空衣壳为AAV载体的约4-5倍)。

[0150] 根据某些实施方式, 包含AAV载体的药物组合物包括包含4-1衣壳变体蛋白 (VP1, VP2和VP3) 的那些, 包含比在所述组合物中的AAV载体 (即含有载体基因组的那些) 的浓度大的过量空衣壳。空衣壳与AAV载体的比率可以是约1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2.0:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3.0:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4.0:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1、5.0:1、5.1:1、5.2:1、5.3:1、5.4:1、5.5:1、5.6:1、5.7:1、5.8:1、5.9:1、6.0:1、6.1:1、6.2:1、6.3:1、6.4:1、6.5:1、6.6:1、6.7:1、6.8:1、6.9:1、7.0:1、7.1:1、7.2:1、7.3:1、7.4:1、7.5:1、7.6:1、7.7:1、7.8:1、7.9:1、8.0:1、8.1:1、8.2:1、8.3:1、8.4:1、8.5:1、8.6:1、8.7:1、8.8:1、8.9:1、9.0:1、9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1、9.8:1、9.9:1、10:1, 或一些其它比率。

[0151] 在一些实施方式中, 空衣壳包含存在于AAV载体中的相同的VP1、VP2和VP3衣壳蛋

白。在其他实施方式中,空衣壳包含具有与在AAV载体中发现的氨基酸序列不同的氨基酸序列的VP1、VP2和VP3蛋白。通常,虽然不一定,但是如果空衣壳的衣壳蛋白和AAV载体的衣壳在序列上不相同,则它们将具有相同的血清型。

[0152] 根据一些实施方式,组合物包含本文中描述为AAV-FIX39-Padua的AAV载体(或具有相同的衣壳和与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性的基因组序列的AAV载体)和任选地包含相同的衣壳蛋白的过量的空衣壳,其中空衣壳与AAV载体的比率为约1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2.0:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3.0:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4.0:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1、5.0:1、5.1:1、5.2:1、5.3:1、5.4:1、5.5:1、5.6:1、5.7:1、5.8:1、5.9:1、6.0:1、6.1:1、6.2:1、6.3:1、6.4:1、6.5:1、6.6:1、6.7:1、6.8:1、6.9:1、7.0:1、7.1:1、7.2:1、7.3:1、7.4:1、7.5:1、7.6:1、7.7:1、7.8:1、7.9:1、8.0:1、8.1:1、8.2:1、8.3:1、8.4:1、8.5:1、8.6:1、8.7:1、8.8:1、8.9:1、9.0:1、9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1、9.8:1、9.9:1、10:1或其他的一些比率。在一些实施方式中,组合物中的AAV-FIX39-Padua与空衣壳的比率为约1:5。在其它实施方式中,将包含AAV-FIX39-Padua和空衣壳的组合物施用于患有血友病B的人受试者,包括严重、中度或轻度血友病B的人受试者。

[0153] “选择性标记基因”是指当表达时对转导细胞赋予选择性表型例如抗生素抗性(例如,卡那霉素)的基因。“报告”基因是提供可检测信号的基因。报告基因的非限制性示例是荧光素酶基因。

[0154] 包括修饰形式的核酸、多核苷酸、表达载体(例如载体基因组)、质粒可通过细胞表达或体外翻译和化学合成技术使用多种标准克隆、重组DNA技术进行生产。多核苷酸的纯度可通过测序、凝胶电泳等等来测定。例如,核酸可使用杂交或基于计算机的数据库筛选技术进行分离。这样的技术包括但不限于:(1)使基因组DNA或cDNA文库与探针杂交来检测同源核苷酸序列;(2)抗体筛选以检测具有共享结构特征的多肽,例如使用表达文库进行;(3)使用能够退火至所研究的核酸序列上的引物在基因组DNA或cDNA上的聚合酶链反应(PCR);(4)用于相关序列的序列数据库的计算机搜索;以及(5)消减核酸文库的差异筛选。

[0155] 术语“分离的”当用作组合物的修饰语时意指该组合物是通过人工制成的或者完全或至少部分从它们的天然存在的体内环境分离的。通常,所分离的组合物基本上不含在自然界中与它们通常相关的一种或更多种材料,例如,一种或更多种蛋白、核酸、脂质、碳水化合物、细胞膜。术语“分离的”不排除通过人工产生的组合物,例如,包装或衣壳化载体基因组和药物制剂的重组载体(例如,rAAV)序列,或病毒颗粒。术语“分离的”也不排除该组合物的可替代的物理形式,例如杂合体/嵌合体、多聚体/低聚体、修饰(例如,磷酸化、糖基化、脂化)或衍生的形式,或通过人工产生的在宿主细胞中表达的形式。

[0156] 本发明的方法和用途提供了用于将异源多核苷酸(转基因)递送(转导)到宿主细胞(包括分化和/或未分化的细胞)中的方法。本发明的重组载体(例如,rAAV)序列、载体基因组、重组病毒颗粒、方法、用途和药物制剂另外在向有需要的受试者递送、施用或提供核酸或蛋白的方法(用作治疗方法)中是有用的。在这种方式中,所述核酸被转录并且所述蛋白可在受试者体内产生。受试者可受益于或需要所述核酸或蛋白,因为受试者缺乏所述核酸或蛋白,或者由于受试者中所述核酸或蛋白的产生可赋予一些治疗效果,作为治疗或其

他方法。

[0157] 通常,重组慢病毒或者微小病毒载体(例如,AAV)序列、载体基因组、重组病毒颗粒、方法和用途可用于递送具有生物效应的任意异源多核苷酸(转基因)来治疗或改善和与不足或不希望有的基因表达相关的任意病症相关的一个或更多个症状。重组慢病毒或者微小病毒载体(例如,AAV)序列、质粒、载体基因组、重组病毒颗粒、方法和用途可用于提供对多种疾病状态的治疗。

[0158] 本发明的核酸、载体、重组载体(例如rAAV)、载体基因组和重组病毒颗粒、方法和用途允许治疗遗传疾病。通常,疾病状态分为两类:缺乏状态,通常缺乏酶,其通常以隐性方式遗传;和不平衡的状态,其至少有时涉及调节或结构蛋白,其以显性方式遗传。对于缺乏状态的疾病,基因转移可用于携带正常基因到影响组织中以用于替代治疗,以及以使用反义突变创建用于疾病的动物模型。对于不平衡的疾病状态,基因转移可用于在模型系统中创建疾病状态,其可以随后用于努力抵抗疾病状态。使用核酸序列的位点特异性整合以纠正缺陷也是可能的。

[0159] 疾病状态的说明性示例包括但不限于:凝血障碍,例如血友病A、血友病B、地中海贫血和贫血。

[0160] 根据本发明,提供了包括本发明的核酸、载体、重组载体(例如,rAAV)、载体基因组、和重组病毒颗粒的治疗方法和用途。本发明的方法和用途广泛适用于提供或者增加或刺激基因表达或功能(例如基因添加或替代)。

[0161] 在一实施方式中,本发明的方法或用途包括:(a)在例如载体或载体基因组中提供编码因子IX(诸如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸,其中经修饰的核酸序列可操作地连接到赋予所述序列转录的表达调控元件;和(b)向哺乳动物施用一定量的经修饰的核酸,使得因子IX在哺乳动物中表达。

[0162] 在另一个实施方式中,本发明的方法或用途包括通过以下措施将编码因子IX(诸如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸序列递送或转移到哺乳动物或哺乳动物细胞中:施用包括载体基因组的病毒(例如,AAV)颗粒或多个病毒(例如,AAV)颗粒(例如,衣壳变体(例如,4-1)),所述载体基因组包含编码因子IX(诸如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸(和任选的ITR、内含子、聚A、填料/填充多核苷酸序列)至哺乳动物或哺乳动物细胞,从而将编码因子IX的经修饰的核酸递送或转移到哺乳动物或哺乳动物细胞中。

[0163] 在本文公开的本发明的方法和用途的具体方面,核苷的表达对哺乳动物(例如,人)提供治疗益处。在更具体的方面,因子IX的表达对诸如具有血友病B之类的哺乳动物(例如,人)提供治疗益处。在多种进一步具体的方面,填料/填充多核苷酸序列包含在载体序列中,使得与编码因子IX(诸如具有数量减少的CpG二核苷酸的FIX)的经修饰的核酸的组合长度具有介于约3.0-5.5Kb、或约4.0-5.0Kb、或约4.3-4.8Kb之间的总长度。

[0164] 本发明的方法和用途包括治疗方法,这导致任意治疗或有益效果。在本发明的多个方法和用途中,进一步包括抑制、降低或减少由所述疾病引起或与其相关的一个或更多个不良事件(例如,物理的)症状、紊乱、病症、疾病或并发症。对于诸如血友病的出血性疾病,治疗性或有益的作用包括但不限于减轻的青肿,凝血时间缩短,出血事件(持续时间、严重程度、频率)减少。例如,关节或脑(脑)出血事件的持续时间、严重性或频率减少。对于出

血性疾病,如血友病,治疗性或有益效果还包括但不限于补充凝血因子蛋白(例如因子IX蛋白)的剂量减少或消除对补充凝血因子蛋白(例如,因子IX蛋白)的施用。

[0165] 因此,治疗或有利的治疗效果是向特定受试者提供任意客观或主观的可测量或可检测的改善或益处。治疗或有利的治疗作用可以但不必是所有或任意具体的不良症状、病症、病况或疾病并发症的完全消除。因此,当在短或长的持续时间(几小时、几天、几周、几个月等)内存在渐进的改善或部分减轻不良症状、病症、病况或疾病引起的或与疾病相关的并发症,或抑制、减少、降低、遏制、预防、限制或控制一个或多个不良症状、病症、病况或疾病引起的或与疾病相关的并发症的恶化或进展时,达到令人满意的临床终点。

[0166] 本发明的组合物(例如核酸、载体、重组载体(例如rAAV)、载体基因组以及包括载体基因组的重组病毒颗粒)、方法和用途可以以足够的或有效的量施用给有需要的受试者。“有效的量”或“足够的量”是指一定的量,该量使得以单剂量或多剂量、单独或与一种或更多种其他组合物(治疗剂例如药物)、治疗、方案或治疗方案剂相组合向受试者提供任意持续时间(长期或短期)的可检测的响应,任意可测量或可检测的程度的预期的或希望的结果或益处,持续任意时间段(例如,几分钟、几小时、几天、几个月、几年或治愈的)。

[0167] 本领域技术人员可以确定单次rAAV/载体剂量的施用是否足够或是否施用多剂量的rAAV/载体。例如,如果FIX水平降低到低于预定水平(例如,低于提供治疗益处的最小水平),则本领域技术人员可以确定(如果合适的话)施用额外剂量的rAAV/载体。

[0168] 达到治疗效果的剂量,例如载体基因组的剂量/千克体重(vg/kg)将根据一些因素的不同而变化,这些因素包括但不限于:施用途径、达到治疗效果所需的异源多核苷酸的表达水平、所治疗的特异性疾病、对所述病毒载体的任何宿主免疫应答、对异源多核苷酸或表达产物(蛋白)的宿主免疫应答以及所表达的蛋白的稳定性。本领域技术人员基于上述因素以及其他因素可确定rAAV/载体基因组的剂量范围以治疗具有特定疾病或病症的患者。通常,剂量范围将为至少 $1 \times 10^8$ 或更多,例如, $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 或 $1 \times 10^{14}$ 或更多载体基因组/千克受试者体重(vg/kg)以达到治疗效果。

[0169] 在一些实施方式中,AAV载体(包括例如AAV-FIX39-Padua,或具有相同的衣壳和与其有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性的基因组序列的载体)的治疗有效剂量是当施用给患有血友病B或其他因子IX活性缺陷的受试者(例如人)时足以将重度血友病B转化为中度或轻度血友病B或甚至导致显然无病状态的剂量。在其他实施方式中,AAV载体的治疗有效剂量是足以使血友病B的人受试者完全放弃因子IX替代疗法,或降低施用替代FIX以维持足够止血的频率的剂量。如本领域技术人员所理解的,因子替代疗法是血友病B的当前护理标准,但需要频繁注射重组产生的人因子IX以补偿患者不能产生足够水平的功能性凝血因子。

[0170] 普遍接受的是,重度血友病B的特征在于受试者的肌肉或关节经常自发地(没有先前的创伤)频繁出血(例如,每周至少一次或两次)。在健康人中发现的FIX活性不到1%与严重的血友病B相关。普遍接受的是,具有中度血友病B的人受试者比具有重度血友病B的人出血的频率低,例如每月约一次,但在手术、创伤或牙科工作之后出血会比正常时间更长。普遍接受的是,中度疾病的人受试者不会经常自发地出血。正常的FIX活性的1%-5%与中度血友病B相关。一般而言,轻度血友病B的人受试者出血过多,如果有的话,只是由于手术或严重创伤而出血。一般而言,轻度血友病与正常FIX活性的6%-40%相关。一般来说,被认为

是健康的、没有血友病B症状的个体具有正常FIX活性的约50%至150%的范围。其他信息可以在Fijnvandraat, et al., Diagnosis and management of hemophilia, Br. Med. J., 344: 36-40 (2012) 中找到。

[0171] 因子IX活性可以以本领域技术人员已知的各种方式测量。例如, 一个示例性的非限制性测定是用于确定从受试者获得的血浆样品中的FIX凝血活性的一期活化部分凝血激酶时间 (APTT) 测定法。FIX活性经常以国际单位 (IU) 表示, 其中1IU被定义为存在于来自正常供体的1ml汇集的血浆中的FIX凝血活性。使用该惯例, 重度血友病B与低于0.01IU/ml FIX水平相关, 中度疾病与0.02-0.05IU/ml FIX水平相关, 轻度疾病与0.06-0.40IU/ml FIX水平相关, 并且属于无疾病与0.50-1.50IU/ml FIX水平有关。

[0172] 如本领域技术人员将理解的, 与野生型人FIX相比具有更高催化活性的因子IX变体 (例如天然存在的FIX Padua变体) 可产生与“非-Padua”FIX相比具有较低浓度的活性蛋白的给定水平的FIX活性 (例如1IU/ml)。

[0173] 在某些实施方式中, AAV载体 (包括例如AAV-FIX39-Padua, 或与其具有相同的衣壳和与其有至少95%、96%、97%、98%或99%的同一性的基因组序列的载体) 的治疗有效剂量是当施用给患有重度、中度或轻度血友病B的受试者 (例如人) 时足以实现为正常FIX活性的约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、或50%或以上的血浆FIX活性的剂量。在其他实施方式中, 治疗有效的剂量是在否则缺乏这种活性的受试者中达到1%或更高FIX活性的剂量, 例如在受试者中从1.5-10%、10-15%、15-20%、20-25%、25-30%或更高的FIX活性。

[0174] 关于治疗患有血友病B的受试者, AAV载体 (包括例如AAV-FIX39-Padua, 或与其具有相同的衣壳和与其有至少98%或99%的同一性的基因组序列的载体) 的治疗有效剂量可以是至少 $1 \times 10^{10}$ 载体基因组 (vg) / 千克 (vg/kg) 受试者体重, 或介于约 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或介于约 $1 \times 10^{11}$ 至 $1 \times 10^{12}$ vg/kg受试者体重之间 (例如介于约 $1 \times 10^{11}$ 至 $2 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $2 \times 10^{11}$ 至 $3 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $3 \times 10^{11}$ 至 $4 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $4 \times 10^{11}$ 至 $5 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $5 \times 10^{11}$ 至 $6 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $6 \times 10^{11}$ 至 $7 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $7 \times 10^{11}$ 至 $8 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $8 \times 10^{11}$ 至 $9 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重之间, 或约 $9 \times 10^{11}$ 至 $1 \times 10^{12}$ vg/kg受试者体重之间), 或者介于约 $1 \times 10^{12}$ 至 $1 \times 10^{13}$ vg/kg受试者体重之间, 以达到所需的治疗效果。另外的剂量可以是在约 $5 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{10}$ 载体基因组 (vg) / 千克 (vg/kg) 受试者体重的范围内, 或在约 $1 \times 10^{10}$ 至 $5 \times 10^{11}$ vg/kg受试者体重的范围内, 或在约 $5 \times 10^{11}$ 至 $1 \times 10^{12}$ vg/kg受试者体重的范围内, 或在约 $1 \times 10^{12}$ 至 $5 \times 10^{15}$ vg/kg受试者体重的范围内, 以达到所需的治疗效果。在其他实施方式中, AAV载体的治疗有效剂量为约 $2.0 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.1 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.2 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.3 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.4 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.5 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.6 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.7 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.8 \times 10^{11}$ vg/kg、 $2.9 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.0 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.1 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.2 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.3 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.4 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.5 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.6 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.7 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.8 \times 10^{11}$ vg/kg、 $3.9 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.0 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.1 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.2 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.3 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.4 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.5 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.6 \times 10^{11}$ vg/kg、 $4.7 \times 10^{11}$ vg/kg、



4.8x10<sup>11</sup>vg/kg、4.9x10<sup>11</sup>vg/kg、5.0x10<sup>11</sup>vg/kg、5.1x10<sup>11</sup>vg/kg、5.2x10<sup>11</sup>vg/kg、5.3x10<sup>11</sup>vg/kg、5.4x10<sup>11</sup>vg/kg、5.5x10<sup>11</sup>vg/kg、5.6x10<sup>11</sup>vg/kg、5.7x10<sup>11</sup>vg/kg、5.8x10<sup>11</sup>vg/kg、5.9x10<sup>11</sup>vg/kg、6.0x10<sup>11</sup>vg/kg、6.1x10<sup>11</sup>vg/kg、6.2x10<sup>11</sup>vg/kg、6.3x10<sup>11</sup>vg/kg、6.4x10<sup>11</sup>vg/kg、6.5x10<sup>11</sup>vg/kg、6.6x10<sup>11</sup>vg/kg、6.7x10<sup>11</sup>vg/kg、6.8x10<sup>11</sup>vg/kg、6.9x10<sup>11</sup>vg/kg、7.0x10<sup>11</sup>vg/kg、7.1x10<sup>11</sup>vg/kg、7.2x10<sup>11</sup>vg/kg、7.3x10<sup>11</sup>vg/kg、7.4x10<sup>11</sup>vg/kg、7.5x10<sup>11</sup>vg/kg、7.6x10<sup>11</sup>vg/kg、7.7x10<sup>11</sup>vg/kg、7.8x10<sup>11</sup>vg/kg、7.9x10<sup>11</sup>vg/kg、或8.0x10<sup>11</sup>vg/kg或一些其他剂量。在这些实施方式中的任何一些中,AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0175] 对于治疗(例如,改善或提供治疗益处或改善)而言,“有效的量”或“足够的量”的剂量通常是有效的以提供对一个、更多个或所有不良症状、后果或疾病的并发症、一个或更多个不良症状、病症、疾病、病因或例如由疾病引起或与疾病相关的并发症的响应至可测量的程度,尽管降低、减少、抑制、禁止、限制或控制疾病的进展或恶化是令人满意的结果。

[0176] 有效量或足够量可以但不必在单次施用中提供,可能需要多次施用,并且可以但不必单独或与另一种组合物(例如,药剂)、治疗、方案或治疗方案组合施用。例如,所述量可以根据受试者的需要、治疗疾病的类型、状态和严重程度或治疗副作用(如果有的话)的指示按比例增加。此外,如果以单剂量或多剂量给予而没有第二组合物(例如,另一种药物或药剂)、治疗、方案或治疗方案时,有效量或足够量不必是有效的或足够的,因为可包括高于并超出这些剂量的其他的剂量、量或持续时间或其他的组合(例如,药物或药剂)、治疗,方案或治疗方案以被认为在给定的受试者中有效或足够。认为有效的量也包括导致另一种治疗剂、治疗方案或方案的使用减少的量,例如用于治疗凝血障碍(例如,A或B型血友病)的重组凝血因子蛋白的施用。

[0177] 有效量或足够量不必对每一个和每一位治疗的受试者均有效,也不必对给定的组或群中大多数治疗的受试者有效。有效量或足够量意指对特定的受试者而不是一组或普通人群有效或足够。因为对于这样的方法是典型的,一些受试者将对给定的治疗方法或用途表现出更大的响应或更小的响应或无响应。

[0178] 术语“改善”意指可检测或可测量地改善受试者中的疾病或其症状或潜在的细胞反应。可检测或可测量的改善包括主观或客观降低、减少、抑制、禁止、限制或控制疾病的发生、频率、严重程度、进展或持续时间或由疾病引起或与所述疾病相关的并发症,或者改善疾病的症状或潜在的病因或结果,或者逆转疾病。

[0179] 因此,成功的治疗结果可导致降低、减少、抑制、禁止、限制、控制或预防受试者中疾病的发生、频率、严重程度、进展或持续时间或疾病的一个或更多个不良症状或潜在病因或后果的“治疗效果”或“益处”。因此,影响疾病的一个或更多个潜在病因或不良症状的治疗方法和用途被认为是有益的。减少或降低恶化(例如稳定)疾病或其不良症状也是成功的治疗结果。

[0180] 因此,治疗益处或改善不必是疾病,或与该疾病相关的任一个、大多数或所有的不良症状、并发症、后果或潜在原因的完全消除。因此,当在短的或长的持续时间(几小时、几

天、几周、几月等)内受试者的疾病存在渐进的改善,或部分减少、降低、抑制、禁止、限制、控制或预防该疾病的发生、频率、严重程度、进展或持续时间,或抑制或逆转该疾病(例如,稳定一个或更多个症状或并发症)时达到令人满意的终点。方法或用途的有效性,例如对疾病提供潜在的治疗益处或改善的治疗,可以通过多种方法(例如凝血块形成时间等)来确定。

[0181] 根据一些实施方式,AAV载体的治疗有效剂量是当向具有血友病B的人受试者施用足量时足以导致FIX活性高于一定水平持续一段时间的剂量。在这些实施方式的一些中,AAV载体的有效剂量在具有血友病B的人受试者中导致至少1%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少5%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少10%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少15%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少20%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少25%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少30%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少35%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在其他实施方式中,AAV载体的有效剂量导致至少40%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续

时间。在其他实施方式中, AAV载体的有效剂量导致至少45%的正常FIX活性持续至少3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、或17个月,或至少1.5年、2年、2.5年、3年、3.5年、4年、4.5年、5年、5.5年、6年、6.5年、7年、7.5年、8年、8.5年、9年、9.5年、10年、或更长的持续时间。在这些实施方式中的任何一些中, AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0182] 根据其它实施方式, AAV载体的治疗有效剂量是当施用给患有重度或中度血友病B的人受试者时足以实现为正常FIX活性的至少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%、或45%的FIX活性持续至少6个月的剂量。在一些实施方式中, AAV-FIX39-Padua的剂量,或与其具有相同衣壳且与其有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体的剂量是约 $5.0 \times 10^{11}$ vg/kg,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0183] 可以看出,在已经接受治疗有效剂量的AAV载体(包括例如AAV-FIX39-Padua)或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体的一些人受试者中,则可归因于载体的FIX活性在延长的时间段(例如数月或数年)内下降至不再认为是足够的水平(例如,其中受试者显示出中度或重度血友病B的症状和/或FIX活性特征)。在这种情况下,受试者可再次用与初始治疗相同类型的AAV载体给药。在其他实施方式中,特别是如果受试者已经对初始载体形成了免疫反应,可以给患者服用AAV载体,该AAV载体被设计成在靶细胞中表达FIX,但是具有比第一AAV载体的免疫反应性更低的不同或变体血清型的衣壳。

[0184] 根据某些实施方式, AAV载体的治疗有效剂量是当施用给患有血友病B的人受试者时足以减少或甚至消除受试者为维持足够的止血而对重组人因子IX替代疗法的需求的剂量。因此,在一些实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体可以将具有中度或重度血友病B的普通人受试者为了维持足够止血而需要FIX替代疗法的频率降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在相关的实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体可以将具有中度或重度血友病B的平均人受试者为了维持足够止血而需要重组人FIX的剂量减少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在这些实施方式中的任何一些中, AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0185] 在其他实施方式中, AAV载体的治疗有效剂量是当施用给患有重度血友病B的人受试者时足以减少或甚至消除关节自然出血的剂量。因此,在一些实施方式中,与患有重度血友病B的未治疗的普通人受试者相比,治疗有效剂量的AAV载体可以将患有重度血友病B的

人受试者的关节自然出血的频率降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。可以使用关节的磁共振成像或超声波检测或本领域技术人员熟悉的其它技术来检测关节出血。在这些实施方式中的任何一些中,AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0186] 由于在先前的临床试验中对AAV衣壳具有稳健的免疫应答,因此相信,以前开发AAV载体来治疗血友病的努力是不成功的,至少部分是不成功的。(参见例如Nathwani, et al., NEJM 2011; 365 (25) :2357-2365; 和Manno, et al., Nat Med 2006; 12 (3) :342-347)。正在进行的临床试验已经证实,本文的AAV载体的某些实施方式可以在患有重度血友病B的人受试者中产生高水平的FIX活性,而在施用AAV载体后甚至在多达6个月的时间也不产生或具有最小的免疫应答(实施例5)。因此,根据某些实施方式,AAV载体的治疗有效剂量是当向具有重度或中度血友病B的受试者施用导致足以维持止血的FIX活性,而在相当长的时期内不产生或产生最小量的免疫应答的剂量。在某些实施方式中,免疫应答可以是先天性免疫应答、体液免疫应答或细胞免疫应答、或者甚至是所有三种类型的免疫应答。在一些实施方式中,免疫应答可以针对由转导的细胞产生的衣壳、载体基因组和/或因子IX蛋白。

[0187] 根据某些实施方式,治疗有效剂量的AAV载体导致FIX活性足以维持患有血友病B的受试者的止血,同时不产生或产生最小的针对由转导的细胞产生的衣壳、基因组和/或因子IX蛋白的体液(即抗体)免疫应答。可以通过使用免疫学领域技术人员熟悉的技术测量受试者血清或血浆中的抗体滴度来确定对病毒或病毒样颗粒(如AAV载体)的抗体应答。可以使用这样的技术来测量AAV载体的任何组分(例如衣壳蛋白)或由载体基因组编码并且在转导的细胞(例如因子IX Padua(或其它FIX变体))中产生的基因产物的抗体滴度。通常以表示稀释度的比率表示抗体滴度,在稀释前,抗体信号在用于检测抗体存在的特定测定中不再可检测到。可以使用不同的稀释因子,例如2倍、5倍、10倍或其他一些稀释因子。可以使用针对抗体存在的任何合适的测定法,例如但不限于ELISA、FACS或报告基因测定法,如WO2015/006743中所述。根据本领域技术人员的知识,使用其他测定也是可能的。可以在初次施用AAV载体后的不同时间测量抗体滴度。

[0188] 在某些实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体在患有血友病B的受试者中产生至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或更多的FIX活性,同时产生针对由转导细胞产生的衣壳、基因组和/或因子IX蛋白(例如FIX Padua)的抗体滴度,该滴度在向受试者施用AAV载体1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年、4年、5年或更长的时期测量时不大于1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500或以上。根据一示例性的非限制性实施方式,AAV载体在患有重度血友病B的受试者中导致至少20%的FIX活性,同时诱导针对由转导的细胞产生的衣壳和/或因子IX的抗体滴度在施用AAV载体后6个月不大于1:2、1:3、或1:4。在这些实施方式中的任何一些中,AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的

AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0189] 如上所述,使用针对血友病B的AAV介导的基因疗法的先前试验引发了自限性免疫应答,其阻止了该疗法在相当长的一段时间内有效,而不需要高剂量的类固醇引起免疫抑制。一个重要的因素似乎是细胞免疫应答,其消除了已经用研究中的AAV载体转导的肝细胞。这种效应可以从受试者中肝酶升高、提示肝损伤(suggesting liver damage)以及衣壳特异性T细胞的存在中检测到。

[0190] 在某些实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体导致FIX活性足以维持患有血友病B的受试者的止血,同时不产生或产生最小的针对由转导细胞产生的衣壳和/或因子IX蛋白的细胞免疫应答。可以以至少两种方式确定细胞免疫应答:测定对衣壳蛋白或因子IX特异性的T细胞活性,以及检测指示肝细胞损伤的升高的肝酶水平的存在。

[0191] 在一些实施方式中,细胞免疫应答通过测定对由转导肝细胞产生的衣壳蛋白和/或因子IX蛋白有特异性的T细胞活性来确定。本领域已知用于T细胞应答的不同测定法。在一个示例性的非限制性实施方式中,通过从先前用治疗血友病B的AAV载体进行治疗的受试者收集外周血单核细胞(PBMC)来确定T细胞应答。然后将细胞用源自载体中使用的VP1衣壳蛋白的肽和/或由转导的肝细胞产生的因子IX蛋白(如FIX Padua)进行孵育。特异性识别衣壳蛋白或因子IX蛋白的T细胞将被刺激以释放细胞因子,例如干扰素 $\gamma$ 或其他细胞因子,然后可以使用ELISPOT测定法或本领域技术人员熟悉的另一种测定法来检测和定量。(参见例如Manno, et al., Nat Med 2006; 12 (3) : 342-347)。可以在受试者接受用于治疗血友病B的AAV载体的剂量之前(例如每周、每月或某个其它时间间隔)监测T细胞应答和之后的不同时间(例如每周、每月或某个其它时间间隔)监测T细胞应答。因此,根据某些实施方式,治疗有效剂量的AAV载体导致FIX活性足以维持患有血友病B的受试者的止血(例如FIX活性为至少1%、5%、10%、20%、30%或更多),同时引起T细胞应答,当在AAV载体施用后每周、每月或其它一些时间间隔,或者在AAV载体施用后2周、1个月、2个月、3个月、6个月、9个月、1年、2年或一些不同时间时测量时,如使用ELISPOT测量,测得的该T细胞应答不大于10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900或更多斑点形成单位/100万个PBMC。在这些实施方式中的一些中,ELISPOT测定法被设计为检测由来自通过转导的肝细胞产生的AAV载体衣壳蛋白或因子IX蛋白(包括FIX Padua,或不同变体)的肽刺激的干扰素 $\gamma$ (或一些其它细胞因子)的产生。在这些实施方式中的任何一些中,AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0192] 作为针对转导的肝细胞的细胞免疫应答的替代,可以使用标准方法测定大于正常肝酶的存在。虽然不希望被理论所束缚,但相信某些AAV载体特异性的T细胞(例如先前临床试验中所用的那些)可攻击并杀死转导的肝细胞,其瞬时释放肝脏酶进入循环。示例性的肝脏酶包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH),但也可以监测其它指示肝损伤的酶。循环中这些酶的正常水平通常被定义为具有较高水平的范

围,高于该水平的酶水平被认为是升高的,因此指示肝损伤。正常范围部分取决于进行测定的临床实验室所使用的标准。在某些实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体导致FIX活性足以维持患有血友病B的受试者的止血(例如FIX活性为至少1%、5%、10%、20%、30%或更多),同时引起升高的循环肝酶水平,例如ALT、AST或LDH的水平,其不高于其相应的在施用AAV载体后、在不同时间(例如几周或几月的间隔),在从治疗中的同一受试者采集的多个样品中测得的平均范围的正常上限(ULN)值的0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、1500%、2000%,或者处于在施用AAV载体后,在不同时间(例如几周或几月的间隔),在从治疗中的同一受试者采集的多个样品中测得的最高水平。在这些实施方式中的任何一些中,AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0193] 在使用AAV载体治疗血友病B的以前的临床试验中,研究者需要联合施用免疫抑制剂药物,例如类固醇,以防止接受治疗的受试者产生免疫应答,所述免疫应答将消除产生因子IX蛋白的转导细胞。然而,由于在用某些AAV载体进行实验性治疗的受试者中观察到的免疫应答减弱,所以免疫抑制剂药物的联合给药可能不是必需的。因此,在某些实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体是足以在患有重度或中度血友病B的受试者中保持足够止血而不需要(在之前、同时或之后)联合给予免疫抑制剂药物(如类固醇或其他免疫抑制剂)的剂量。然而,因为在所有受试者中免疫应答是不可预测的,所以本文治疗血友病B的方法包括与免疫抑制剂药物联合给药的AAV载体。免疫抑制剂药物的联合给药可以在AAV载体被施用给患有血友病B的受试者之前、同时或之后进行。在一些实施方式中,免疫抑制剂药物在施用用于治疗血友病B的AAV载体后向受试者施用持续几天、几周或几个月的时间。示例性的免疫抑制剂药物包括类固醇(例如但不限于泼尼松或泼尼松龙)和非类固醇免疫抑制剂,例如环孢菌素、雷帕霉素等。实现足够的免疫抑制需要什么药物剂量和治疗时间过程取决于正在进行治疗的每个受试者独特的因素,但是确定剂量和治疗时间是在本领域普通技术人员的技术范围内。在一些实施方式中,免疫抑制剂可能需要不止一次给药。

[0194] 根据某些实施方式,治疗有效剂量的AAV载体当向患有重度或中度血友病B的人受试者群体施用导致FIX活性的一致升高。一致性可通过使用统计学方法如平均值和标准偏差(SD)或本领域技术人员熟悉的另一种统计技术计算人受试者群体中的响应的变异性来确定。在一些实施方式中,治疗有效剂量的AAV载体当向患有重度或中度血友病B的人受试者群体施用导致在施用后3个月、6个月、9个月、12个月、15个月、18个月、21个月或21个月,平均FIX活性为1-5%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为2.5-7.5%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为5-10%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为7.5-12.5%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为10-15%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为12.5-17.5%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为15-20%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均FIX活性为17.5-22.5%,SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1;平均

FIX活性为20-25%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为22.5-27.5%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为25-30%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为27.5-32.5%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为30-35%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为32.5-37.5%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为35-40%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为37.5-42.5%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为40-45%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；平均FIX活性为42.5-47.5%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1；或平均FIX活性为45-50%，SD小于15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1。在这些实施方式中的任何一些中，AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua，或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体，其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0195] 本发明的方法和用途可与具有所希望的治疗的、有利的、加成的、协同的或互补的活性或效果的任意化合物、药剂、药物、治疗或其他治疗方案或方案相组合。示例性的联合组合物和治疗包括第二活性剂，例如生物制剂(蛋白)、药剂和药物。这样的生物制剂(蛋白)、药剂、药物、治疗和疗法可以在本发明的任意其他方法或用途例如治疗受试者的凝血疾病的治疗方法之前、基本上同时或之后施用或进行。

[0196] 所述化合物、药剂、药物、治疗或其他治疗方案或方案可作为联合组合物施用或分开施用，例如在递送或施用核酸、载体、重组载体(例如rAAV)、载体基因组或重组病毒颗粒的同时或(之前或之后)串联或顺序施用。因此，本发明提供了组合，其中本发明的方法或用途与本文所述或本领域技术人员已知的任意化合物、药剂、药物、治疗方案、治疗协议、过程、治疗法或组合物相组合。所述化合物、药剂、药物、治疗方案、治疗协议、过程、治疗法或组合物可以在向受试者施用本发明的核酸、载体、重组载体(例如rAAV)、载体基因组或重组病毒颗粒之前、基本上同时或之后施用。

[0197] 在某些实施方式中，联合组合物包含一种或多种免疫抑制剂。在某些实施方式中，方法包括给哺乳动物施用或递送一种或多种免疫抑制剂。在某些实施方式中，联合组合物包含AAV-FIX颗粒和一种或多种免疫抑制剂。在某些实施方式中，一种方法包括将AAV-FIX颗粒施用或递送至哺乳动物，并将免疫抑制剂施用给哺乳动物。本领域技术人员可以确定这种联合组合物与一种或多种免疫抑制剂的适当需要或时间，并施用免疫抑制剂给哺乳动物。

[0198] 本发明的方法和用途还尤其包括导致减少对另一种化合物、药剂、药物、治疗方案、治疗协议、过程或治疗法的需要或使用的的方法和用途。例如，对于凝血疾病而言，如果在指定的受试者中较不频繁的或降低的剂量或消除施用用以补充受试者中不足的或有缺陷的(异常的或突变的)内源性凝血因子的重组凝血因子蛋白时，本发明的方法或用途具有治疗益处。因此，根据本发明，提供了减少另一种治疗或疗法的需要或使用的的方法和用途。

[0199] 本发明可用在动物中，包括人和兽医医疗应用。因此，合适的受试者包括哺乳动物例如人以及非人哺乳动物。术语“受试者”是指动物，通常是哺乳动物，例如人、非人灵长类

动物(猿、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、猕猴)、驯养动物(狗和猫)、农场动物(家禽,例如鸡、鸭、马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。人类受试者包括胎儿、新生儿、婴儿、青少年和成年受试者。受试者包括动物疾病模型,例如凝血疾病的小鼠和其他动物模型和本领域技术人员已知的其他模型。

[0200] 适用于治疗的受试者包括具有或处于产生不足量的或缺乏功能基因产物(蛋白)或产生可导致疾病的异常的、部分功能的或无功能的基因产物(蛋白)的风险的那些受试者。根据本发明适用于治疗的受试者还包括具有或处于产生导致疾病的异常的或有缺陷的(突变的)基因产物(蛋白)的风险的那些受试者,使得降低异常的或有缺陷的(突变的)基因产物(蛋白)的量、表达或功能将导致治疗疾病或减轻一个或更多个症状或改善疾病。因此,目标受试者包括具有异常、不足或不产生凝血因子产生的受试者,如血友病(例如血友病B)。

[0201] 根据本发明适于治疗的受试者还包括先前或目前用补充蛋白(例如重组凝血因子,如治疗血友病的FIX)治疗的那些受试者。此外,根据本发明适合于治疗的受试者还包括那些尚未产生将干扰或阻断基于FIX的基因治疗的针对FIX蛋白的实质性或可检测的免疫应答或针对FIX蛋白的大量抑制性抗体的受试者。

[0202] 在其他实施方式中,可以用AAV载体预防性地治疗被确定为具有血友病B(例如通过基因分型)但尚未显示出任何血友病B的任何症状的人儿科受试者以防止任何这样的症状首先发生,或者在其他实施方式中,防止如其在没有接受治疗的情况下那样严重。在一些实施方式中,以这种方式预防性治疗的人受试者当它们被施用AAV载体时是至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18个月大或更大,以产生和维持足以维持止血的FIX活性,从而预防或降低血友病B的一种或多种症状的严重性。在这些实施方式中的任何一些中,AAV载体可以是AAV-FIX39-Padua,或与其具有相同衣壳且与其具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的基因组序列的AAV载体,其可以以单独的药学上可接受的组合物施用给受试者或与相同衣壳类型的空衣壳一起以空衣壳比载体的约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1的比率或其他比率施用给受试者。

[0203] 向受试者施用或体内递送可在由所述疾病引起的或与之相关的不良症状、病症、并发症等的发展之前进行。例如,筛选(例如,遗传性)可用于识别这样的受试者作为本发明的组合物、方法和用途的候选者。因此,这样的受试者包括筛查功能基因产物(蛋白)的量不足或缺乏为阳性,或产生异常的、部分功能的或无功能的基因产物(蛋白)的那些。

[0204] 本发明的方法和用途包括全身、区域或局部或通过任意途径递送和施用,例如通过注射或输注递送和施用。这样的递送和施用包括经由肠胃外,例如经由血管内、静脉内、肌内、腹膜内、皮内、皮下、或粘膜等方式。示例性的施用和递送途径包括静脉内(i.v.)、腹膜内(i.p.)、动脉内、皮下、胸膜内、插管、肺内、腔内、离子电渗疗法、器官内、淋巴管内。

[0205] 替代地或附加地,AAV载体可经由门静脉递送至肝脏。在另一种替代方案中,引入股动脉的导管可用于经由肝动脉将AAV载体递送至肝脏。也可以使用非手术方式,例如内窥镜逆行胰胆管造影术(ERCP)将AAV载体直接递送至肝脏,由此绕过血液和AAV中和抗体。其他的导管系统,例如颌下腺的导管,也可以用作将AAV载体递送到发育或具有预先存在的抗AAV抗体的受试者的入口。

[0206] 剂量可变化并取决于进行治疗的疾病的类型、发作、进展、严重程度、频率、持续时



间或可能性,所需的临床终点,先前或同时治疗,受试者的一般健康状况、年龄、性别、种族或免疫能力以及本领域技术人员将理解的其他因素。剂量、数量、频率或持续时间可以按比例增加或减少,由任意不良副作用、并发症或治疗或疗法的其他风险因素和受试者的状态所指示。本领域技术人员将了解的是可能影响提供足够用于提供治疗性或预防性益处的量所需的剂量和定时的因素。

[0207] 如本文所公开的本发明的方法和用途可在受试者已被确定为具有靶向治疗的疾病、具有疾病的一种或更多种症状或即使受试者不具有疾病的一种或更多种症状但已被筛查并如本文所述被确定为阳性之后1-2、2-4、4-12、12-24或24-72小时内实施。当然,本发明的方法和用途可在受试者已被确定为具有靶向治疗的疾病、具有疾病的一种或更多种症状或已被筛查并如本文所述被确定为阳性之后1-7、7-14、14-21、21-48天或更多天、数月或数年实施。

[0208] 本发明的核酸、载体、重组载体(例如,rAAV)、载体基因组、以及重组病毒颗粒和其他组合物、药剂、药物、生物制剂(蛋白)可被掺入到药物组合物,例如,药学上可接受的载体或赋形剂中。这样的药物组合物尤其可用于体内或离体施用和递送到受试者。

[0209] 如本文所用的术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”意指生物学上可接受的制剂、气体、液体或固体或其混合物,其适于一种或更多种施用、体内递送或接触途径。“药学上可接受的”或“生理上可接受的”组合物不是生物学上的或换言之不希望有的副作用的材料,例如,该材料可施用给受试者,而不会导致实质性的不希望有的生物作用的材料。因此,这样的药物组合物可用于例如向受试者施用病毒载体或病毒颗粒。

[0210] 这样的组合物包括与药物施用或体内接触或递送相容的溶剂(水性或非水性的)、溶液(水性或非水性的)、乳剂(例如,水包油或油包水)、混悬液、糖浆、酞剂、分散体和混悬介质、包衣剂、等渗剂和吸收促进或延迟剂。水性和非水性溶剂、溶液和混悬液可包括混悬剂和增稠剂。这样的药学上可接受的载体包括片剂(包衣的或未包衣的)、胶囊(硬或软的)、微珠、粉末、颗粒和晶体。补充的活性化合物(例如,防腐剂、抗菌剂、抗病毒剂和抗真菌剂)也可以掺入到组合物中。

[0211] 药物组合物可配制成为与如本文所述或本领域技术人员已知的特定施用或递送途径相容。因此,药物组合物包括适用于通过多种途径施用的载体、稀释剂或赋形剂。

[0212] 适用于肠胃外施用的组合物包括活性化合物的水性和非水性溶液、混悬液或乳液,其制剂通常是无菌的并且可以是与预期接受者的血液等渗的。非限制性说明性示例包括水、盐水、葡萄糖、果糖、乙醇、动物油、植物油或合成油。

[0213] 助溶剂和佐剂可被添加到制剂中。助溶剂的非限制性示例包括羟基或其他极性基团,例如,醇,例如异丙醇;二醇,例如丙二醇,聚乙二醇,聚丙二醇,乙二醇醚;甘油;聚氧乙烯醇和聚氧乙烯脂肪酸酯。佐剂包括例如表面活性剂,例如大豆卵磷脂和油酸;脱水山梨醇酯例如脱水山梨醇三油酸酯;和聚乙烯吡咯烷酮。

[0214] 本发明的药物组合物和适用于该组合物的递送系统以及方法和用途是本领域中已知的(参见例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12<sup>th</sup> ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage

Forms (1993), Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; 和 Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315)。

[0215] 如本文所用的“单位剂量形式”是指适合作为单一剂量用于待治疗的受试者的物理上离散的单位；各单位含有任选地与药用载体（赋形剂、稀释剂、载体或填充剂）相关的预定量，当以一个或多个剂量施用，其被计算以产生所希望的作用（例如，预防或治疗作用）。单位剂量形式可以在例如安瓿和小瓶中，其可包含液体组合物，或冷冻干燥或冻干状态的组合物；无菌液体载体，例如，可在体内施用或递送之前加入。单个单位剂量形式可包括在多剂量试剂盒或容器中。重组载体（例如，rAAV）序列、载体基因组、重组病毒颗粒及其药物组合物可包装在单个或多个单位剂量形式中，以便于剂量的施用和均匀性。

[0216] 本发明提供了包括包装材料和其中的一种或更多种组分的试剂盒。试剂盒通常包括标签或包装插页，其包括组分的描述或其中组分的体外、体内或离体使用的说明书。试剂盒可包含这样的组分的集合，例如，核酸、重组载体、病毒（例如AAV）载体、载体基因组或病毒颗粒和任选的第二活性剂，例如另一种化合物、药剂、药物或组合物。

[0217] 试剂盒是指容纳试剂盒的一种或更多种组分的物理结构。包装材料可保持组分无菌，并且可由通常用于这种目的的材料（例如，纸、波纹纤维、玻璃、塑料、箔、安瓿、小瓶、管等等）制成。

[0218] 标签或插页可包括：标识其中的一种或更多种组分，剂量的量，包括作用机制的活性成分的临床药理学，药代动力学和药效学的信息。标签或插页可包括标识生产商、批号、生产地点和日期、有效期的信息。标签或插页可包括标识生产商、批号、生产地点和日期的信息。标签或插页可包括可使用该试剂盒组分的疾病的信息。标签或插页可包括临床医生或受试者使用方法、用途或治疗协议或治疗方案中的一种或更多种试剂盒组分的说明书。说明书可包括剂量、频率或持续时间，和用于实施本文所述的任意方法、用途、治疗协议或预防或治疗方案的说明书。

[0219] 标签或插页可包括有关组分可提供的任意益处例如预防或治疗益处的信息。标签或插页可包括有关潜在的不良反应、并发症或反应的信息，例如警告受试者或临床医师关于将不适合使用特定组合物的情况。当受试者已经、将要或目前正在服用会与组合物不相容的一种或更多种其他药物或受试者已经、将要或目前正在接受将与组合物不相容的另一种治疗协议或治疗方案时也可能发生不良反应或并发症，因此，说明书可包括关于这些不兼容性的信息。

[0220] 标签或插页包括“印刷品”，例如纸或纸板，或单独的或固定到组分、试剂盒或包装材料（例如，箱子）上，或连接在包含试剂盒组分的安瓿、管或小瓶上。标签或插页可另外包括计算机可读介质，例如条形码打印的标签，磁盘，光盘，例如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3，磁带或电存储介质（例如RAM和ROM）或这些的混合物，例如磁/光存储介质，闪存介质或存储器类型卡。

[0221] 除非另有定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义相同。尽管类似于或等同于本文所述的方法和材料可用于实施或测试本发明，但是本文中描述了合适的方法和材料。

[0222] 本文引用的所有申请、公开,专利和其它参考文献、GenBank登录和ATCC引文均通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。

[0223] 本文公开的所有特征可以任意组合形式相组合。本说明书中公开的每个特征均可被起到相同的、等效的或类似的作用的替代特征所替代。因此,除非另外明确声明,否则所公开的特征(例如,经修饰的核酸、载体、质粒、重组载体(例如,rAAV)序列、载体基因组或重组病毒颗粒)是等同或类似特征的类型示例。

[0224] 如本文所使用的单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数对象,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一个核酸”包括多个这样的核酸,提及“一个载体”包括多个这样的载体,以及提及“一个病毒”或“颗粒”包括多个这样的病毒粒子/颗粒。

[0225] 如本文所用的所有数值或数值范围包括该范围内的整数和该范围内的值或整数的分数,除非上下文另有明确说明。因此,举例而言,提及80%或以上的同一性,包括81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%等以及81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%等、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%的同一性等。

[0226] 提及具有多于(大于)或小于的整数包括分别大于或小于参考数的任意数。因此,例如,提及小于100,包括99、98、97等等,直到下降到数字一(1);并且小于10,包括9、8、7等等,直到下降到数字一(1)。

[0227] 如本文所用的所有数值或范围包括值的分数和该范围内的整数以及该范围内的整数的分数,除非上下文清楚地另外指明。因此,举例而言,提及数值范围,例如1-10包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等等。因此,提及1-50的范围包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等等,高达并包括50以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等等、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等等。

[0228] 提及一系列范围包括组合该系列内的不同范围边界的值的范围。因此,举例而言,提及一系列的范围例如1-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-75、75-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-750、750-1,000、1000-1500、1500-2000、2000-2500、2500-3000、3000-3500、3500-4000、4000-4500、4500-5000、5500-6000、6000-7000、7000-8000、8000-9000,包括范围10-50、50-100、100-1000、1000-3000、2000-4000等等。

[0229] 本文中通常使用肯定的语言公开本发明来描述许多实施方式和方面。本发明还具体地包括其中特定的主题被全部或部分排除的实施方式,其例如物质或材料、方法步骤和条件、协议或程序。例如,在本发明的某些实施方式或方面中,材料和/或方法步骤被排除在外。因此,虽然本发明通常不在本文中表述关于本发明不包括的内容,但是本发明中未明确地排除的方面被公开在本发明中。

[0230] 已经描述了本发明的许多实施方式。尽管如此,本领域技术人员在不脱离本发明的精神和范围的前提下可对本发明进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。因此,下述示例旨在说明但不限制本发明要求保护的范围。

#### [0231] 实施例1.载体设计/制备

[0232] 编码具有338L Padua变体(Simioni P, et al., N Engl J Med 2009, 361:1671)的高特异活性人因子IX蛋白的新型因子IX核酸被设计(“FIX 39-Padua”; SEQ ID No:10;图10)。FIX39-Padua在编码FIX和内含子序列中完全没有CpG二核苷酸。对于比较测试,制备和

修饰FIX19 (Mingozzi et al. Sci. Transl Med. 2013) 以包括FIX Padua, 以排除了FIX Padua带来的任何潜在的混杂效应 (“FIX 19-Padua”; SEQ ID NO:11; 图11)。

[0233] 质粒 (“pAAV-ApoE\_hAAT-FIX39”; 11125bp; SEQ ID NO:12; 图12A) 被合成并包括在表2中描述的FIX39-Padua表达盒和元件。图13示出了pAAV-ApoE\_hAAT-FIX39的图谱。

表2. pAAV-ApoE\_hAAT-FIX39

5' AAV2 ITR	SEQ ID NO:13
增强子 (肝控制区)	SEQ ID NO:14
hAAT 启动子	SEQ ID NO:15
5' UTR	SEQ ID NO:16
FIX39-Padua CDS	SEQ ID NO:10 (图 10)
内含子 A	SEQ ID NO:17 (图 14)
3' UTR	SEQ ID NO:18
聚 A	SEQ ID NO:19
3' AAV2 ITR	SEQ ID NO:20
$\lambda$ 填充序列	SEQ ID NO:21
FI 复制起点序列	SEQ ID NO:22
卡那霉素抗性	SEQ ID NO:23
pUC 复制起点序列	SEQ ID NO:24

[0234] FIX39-Padua编码序列和内含子A的序列如SEQ ID NO:25所示 (图15)。质粒也被合成, 其包含FIX19-Padua CDS和相同的调控元件、相同的腺相关反向末端重复序列 (ITR)、和相同的肝特异性的ApoE/hAAT启动子作为pAAV-ApoE\_hAAT-FIX39。

[0235] 使用三重转染过程, 然后进行双氯化铯梯度离心 (Ayuso E, Met al., Gene Ther 2010, 17:503), 为FIX39-Padua (“AAV-FIX39-Padua”) 和FIX19-Padua (“AAV-FIX19-Padua”) 转基因制备了具有4-1衣壳变体 (SEQ ID NO:4) 的AAV载体。使用线性化质粒作为标准, 通过定量PCR滴定载体。对于实施例3中描述的研究, 将载体用PBS、5%山梨糖醇、0.001%F68稀释至终体积为200 $\mu$ l/小鼠, 用于尾静脉注射。

#### 实施例2. 体外AAV变体4-1转导

[0236] 来自短尾猴和人源的原代肝细胞用表达萤光素酶的4-1变体衣壳 (SEQ ID NO:4) 以范围为每个细胞500-62500个载体基因组的四种不同感染复数 (MOI) 转导。转导后72小时, 分析萤光素酶表达。如图16所示, 根据所使用的MOI, 转导的人肝细胞相对于非人灵长类肝细胞的比率的范围为0.8至1.5。当比较食蟹猴和人受试者中凝血因子IX的表达时, 体外产生的这些数据似乎与以前的体内观察结果一致。

#### 实施例3. 效力研究

[0237] 进行研究以评估小鼠中AAV-FIX39-Padua对比AAV-FIX19-Padua的效力。5只小鼠的组在8-10周龄时分别注射 $1 \times 10^{11}$ 或 $1 \times 10^{12}$ vg/kg的AAV-FIX39-Padua和AAV-FIX19-Padua。施用载体后, 使用肝素化毛细管通过眼眶后出血收集血液; 在4 $^{\circ}$ C以9000rpm将血液离心10分钟, 并在-80 $^{\circ}$ C冷冻储存直至测定。

[0238] 收集的 plasma 用于评估hFIX转基因表达。使用ELISA试剂盒 (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canada) 测量血浆中的人FIX水平。

[0239] 通过活化的部分促凝血酶原激酶时间 (aPTT) 测定来测量人FIX的活性水平。通过将样品血浆与人FIX缺陷型血浆 (George King Biomedical, Inc) 和aPTT试剂 (Trinity

Biotech)以1:1:1的体积比混合,然后在37℃下180秒温育期进行aPTT测定。加入25mM氯化钙引发凝血。使用Start 4凝血仪器(Diagnostica Stago)测量凝块形成的时间。使用来自George King的合并的正常血浆在TBS pH 7.4 (48 $\mu$ l+192 $\mu$ l)中以1:5稀释开始,然后连续1:2稀释(120 $\mu$ l+120 $\mu$ l),产生标准曲线。使用人标准曲线计算载体施用后第17周时各样品的活性;还测量了两只未处理的小鼠中的活性。对未处理的小鼠中的FIX活性进行平均,然后从处理的样品中减去,以计算出由于FIX Padua蛋白而导致的额外(即人)活性。

[0240] 如图17所示,AAV-FIX39-Padua和AAV-FIX19-Padua似乎表达基本上等同水平的FIX。

[0241] 载体施用17周后,在用 $1 \times 10^{12}$ vg/kg的载体剂量处理过的这些小鼠中测定人FIX活性。活性与抗原比率介于5.2-7.5之间,FIX19-Padua和FIX39-Padua组的平均值均为6.4(表3)。

表3.人FIX活性值

动物 ID	抗原 (正常值的%)	活性 (正常值的%)	比率
01 - FIX19	53.9	352.7	6.5
02 - FIX19	95.6	631.8	6.6
03 - FIX19	120.6	882.3	7.3
04 - FIX19	132.9	797.1	6.0
05 - FIX19	105.2	599.7	5.7
06 - FIX39	163.1	1092.8	6.7
07 - FIX39	108.2	670.3	6.2
08 - FIX39	121.1	781.2	6.4
09 - FIX39	152.3	1147.8	7.5
10 - FIX39	134.1	702.1	5.2
	平均		
	抗原 (正常值的%)	活性 (正常值的%)	比率
AAV-FIX19-Padua	101.7	652.7	6.4
AAV-FIX39-Padua	135.8	878.8	6.4

[0242] 虽然这些结果表明两种表达盒的效力基本相似,但两种构建体也在质粒水动力学尾部静脉注射的设置中进行分析。评估来源于体内施用裸露DNA的FIX水平的基本原理是比较两种表达盒,而不具有AAV滴定、载体制造等方面的差异的潜在干扰。

[0243] 如图18所示,两种裸露表达盒在驱动FIX表达方面是同等有效的,从而确认在AAV设置中获得的数据。这些结果表明FIX19-Padua和FIX39-Padua表达盒具有相似的效力。

#### 实施例4. AAV-FIX39-Padua基因疗法

[0244] 正在进行临床研究以确定单次IV输注AAV-FIX39-Padua的安全性和动力学。在临床前研究中已经显示所使用的AAV4-1衣壳变体具有商品安全性和功效,具有在 $1 \times 10^{12}$ vg/kg下,在载体输注3个月后,能够在NHP中达到约35%的持续FIX活性水平的能力;并且中和抗

体(Ab)与AAV4-1衣壳变体的交叉反应比AAV8流行性低约10%。表4提供了这项研究的设计。

表4. AAV-FIX39-Padua临床研究设计

AAVFIX39- Padua 的安全性和耐受性	相对于基线，在生命体征、实验室检查值和临床评估（包括出血和生活质量）的临床意义
AAV FIX39-Padua AAV 的动力学	在峰值和的转基因 FIX 活性水平和抗原水平
稳定状态	
剂量	开始、中等和最高剂量组将包括 2-5 个受试者
设计	开放标签、非随机、剂量递增
参与的国家	有美国、有可能欧洲、日本和加拿大
样本量	最多 15 个受试者
资格	符合研究条件的年龄：18 岁及以上
	符合研究的性别：男性
	接受健康的志愿者：没有
纳入标准	能够提供知情同意并符合研究的要求
	男性≥18岁确诊为血友病 B ( $\leq 2\text{IU/dL}$ 或 $\leq 2\%$ 内源性因子 IX)
	接受≥50天的暴露于因子 IX 产品的天数
	每年至少平均 4 次出血事件，需要因子 IX 输注或预防性因子 IX 输注进行间歇性治疗
	由中心实验室评估没有可测量的因子 IX 抑制剂，并且没有针对因子 IX 蛋白的抑制剂的先前的历史
	同意使用可靠的屏障避孕措施，直到连续 3 个样品对于载体序列呈阴性
排除标准	活性乙型肝炎或丙型肝炎的证据
	目前正在进行针对乙肝或丙肝的抗病毒治疗
	有明显的潜在肝脏疾病
	具有 $\text{CD4}$ 计数 $\leq 200/\text{mm}^3$ 的 HIV-1 或 HIV-2 的血清学证据* (* HIV+且稳定, $\text{CD4}$ 计数 $> 200/\text{mm}^3$ 且病毒载量不能检测到的受试者有资格入选)
	具有与 4-1 变体 AAV 衣壳反应的可检测的抗体 (SEQ ID NO:4)
	参加过去 52 周内的基因转移试验或过去 12 周内的研究药物
	不能或不遵守研究评估
筛查访问	资格评估
	AAV NAb 滴度是主要筛查失败 (强烈建议参照 CHOP 的 AAV NAb 滴度方案对受试者进行电话筛查)
第 0 天访问	FIX 产品增量恢复，然后载体输注
后续访问 (约 17 次访问)	安全性和动力学评估
结束研究访问 (在第 52 周)	最终安全评估

#### 实施例5. 临床结果

[0245] 向四名血友病B受试者施用单次IV输注AAV-FIX39-Padua载体。前两个年龄分别为23岁和18岁的受试者既往没有肝病史，而第三个年龄为47岁的受试者有HCV感染史，但已经自发清除。筛选了所有4名受试者针对新型AAV衣壳中和抗体，发现其为阴性。

[0246] 在约1小时的时间内向受试者静脉注射  $5 \times 10^{11} \text{vg/kg}$  的 AAV-FIX 39-Padua 载体。图 20-23 显示了给每个受试者施用的总 AAV-FIX39-Padua 载体，其已与所示量的 AAV 空衣壳相

组合。

[0247] 图19-23显示了在第0天施用AAV-FIX39-Padua载体的研究结果。结果显示在所有四个受试者中产生的因子IX增加,如整个研究评估期间增加的FIX活性所反映的。

[0248] 从第0天到约第3天的FIX活性的初始增加是由于施用100IU/Kg Alprolix™或 BeneFIX™,其为具有约82小时的近似半衰期的重组FIX-Fc融合蛋白。在AAV载体输注后大约第6-8天开始可归因于AAV-FIX39Padua载体的因子IX活性。

[0249] 如图19所概括的并且如图20、图21A、图22A和图23A中的每个个体所示出的,因子IX活性在整个183、102、69和50天的评估期间对所有四名受试者逐渐增加并表现稳定。这些数据表明,单次输注 $5 \times 10^{11}$ vg/kg的AAV-FIX 39-Padua载体导致足够和持续的因子IX产生和活性,从而为血友病B患者提供有意义且有益的凝血活性以提供止血。

[0250] 如图19、20A、21A、22A和23A所示,对于受试者1-4,在输注后183、102、69和50天,因子IX活性水平分别为正常水平的28%、41%、26%和33%。载体输注后2天,受试者#3使用延长的半衰期产品治疗疑似脚踝出血;除此之外,在评估期间没有因子输注,也没有出血。

[0251] 未向任何受试者施用免疫抑制剂(类固醇)。另外,一般来说,转氨酶持续升高不超过正常上限,表明治疗没有副作用(图20B、21B、22B和23)。

[0252] ELISPOT用于监测T细胞对AAV的应答和对所有四个受试者的FIX的应答,并显示没有或非常低的应答。值得注意的是,因子IX水平上升到高原水平的时间过程迄今为止显著一致(图19)。考虑到因子IX Padua变体的比活性增大8倍,因此抗原水平的适度波动导致活性水平的更大变化。

[0253] 已发表的数据(Nathwani et al., N Engl J Med. 371 (21):1994-2004 (2014))已经显示在注入了表达野生型因子IX的AAV8载体的患有血友病B的男性中因子IX的长期表达。然而,表达水平在最低剂量( $2 \times 10^{11}$ 载体基因组[vg]/kg体重)下为正常的1.4%-2.2%至在最高剂量( $2 \times 10^{12}$ vg/kg)下为正常的2.9-7.2%。而且,以最高剂量输注的4/6个受试者需要免疫抑制剂(泼尼松龙)的疗程以减少与最高剂量相关的升高的转氨酶(但在 $2 \times 10^{11}$ 或 $6 \times 10^{11}$ vg/kg的较低剂量下未观察到)。来自血友病患者的自然史研究的数据表明,需要约12%FIX的循环水平以将年度自发性关节出血的数量降低至零(den Uijl et al., Haemophilia 17 (1):41-4 (2011))。

[0254] 这些是使用表达高比活性因子IX转基因的新型生物工程化AAV衣壳的第一临床结果。在受试者1-4中观察到的为正常的28%、41%、26%和33%的因子IX活性水平是基于公布的数据显著高于先前研究中观察到的那些的循环因子IX水平,并且超过了将年度自发性关节出血的数量减少到零所需要的循环因子IX水平。

[0255] 此外,在该研究中看到的实质因子IX活性水平是在载体输注以及不使用免疫抑制剂(类固醇)的情况下不使用重组因子IX而实现的。这些结果显示了AAV-FIX载体的发展,其可以在低剂量的AAV载体施用中靶向高水平的凝血因子表达,从而不需要免疫抑制-肝靶向性基因治疗的重要目标。本研究中观察到的因子IX活性水平在整个研究期间被维持。

#### 实施例6. AAV-FIX39-Padua载体的降低的免疫原性

[0256] 对于目前的I/II期研究,使用经验证的干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 酶联免疫斑点(ELISPOT)测定法来监测接受 $5 \times 10^{11}$ vg/kg AAV-FIX39-Padua的四名受试者的针对AAV载体的潜在免疫应答。通过干扰素 $\gamma$  ELISPOT测定法来测试从每周抽血中分离的纯化的PBMC。将含

有24-25个肽的六个AAV衣壳肽汇集物各自按 $2 \times 10^5$ 细胞一式三份温育。使用针对IFN- $\gamma$ 的生物素化抗体检测T细胞应答,然后进行比色显色,并报道为斑点形成单位(SFU)/百万细胞。每个时间点的最高响应池显示为SFU/百万细胞。历史使用的阳性截止值为 $>50$ SFU和3倍的培养基对照(蓝线)。受试者840-003-001、840-001-002、840-001-004和840-001-005(以黑色显示)已被分别追踪远至第26、14、11和8周。来自之前的试验(其中两名受试者CP-16和PT17接受 $1 \times 10^{12}$ vg/kg的AAV8-FIX19载体,一名受试者接受 $2 \times 10^{12}$ vg/kg的AAV8-FIX19)的ELISPOT结果显示为红色。

[0257] 使用历史上接受的 $>50$ SFU和3倍背景(培养基)对照的值作为阳性T细胞应答的标准,在输注后远至26周,三个受试者几乎没有甚至没有应答(图24A)。这与我们小组以前未发表的研究形成鲜明对比,该研究使用经密码子优化的AAV8载体将FIX转基因盒递送至3名受试者,其中在早至第2周时间点观察到强烈的IFN- $\gamma$  T细胞应答(图24B)。其他之前发表的使用AAV-2(Manno et al., 2006Nat Med)和AAV-8自身互补载体(Nathwani et al., 2011NEJM)的研究也显示了也对AAV衣壳的早期T细胞应答的证据。重要的是,在这个试验中没有观察到对转基因产物的应答。

[0258] 据推测,抗呈现AAV衣壳T细胞表位的转导肝细胞的T细胞介导的免疫应答的激活可能在显示转基因表达短暂且最终丧失的受试者中起作用。因此,AAV-FIX39-Padua载体的降低的免疫原性分布代表了对整体功效的有希望的改善。



## 序列表

<110> 费城儿童医院 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA)

<120> 经修饰的因子 IX、以及用于基因转移到细胞、器官和组织的组合物、方法和用途

<130> 074659-0447746

<140> 待指定

<141> 2016-06-23

<150> 62/183,599

<151> 2015-06-23

<150> 62/315,453

<151> 2016-03-30

<150> 62/338,315

<151> 2016-05-18

<150> 62/348,781

<151> 2016-06-10

<150> 62/349,572

<151> 2016-06-13

<160> 27

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 1

```

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1           5           10           15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
           20           25           30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
           35           40           45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
           50           55           60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65           70           75           80
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
           85           90           95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
           100          105          110

```

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		

420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro	Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu	
435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		
450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser		
485	490	495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His		
500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr		
515	520	525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val		
545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala		
580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735

Asn Leu  
 <210> 2  
 <211> 601  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 2  
 Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser  
 1                         5                         10                         15  
 Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys  
                           20                         25                         30  
 Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp  
                           35                         40                         45  
 Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser  
                           50                         55                         60  
 Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu  
 65                         70                         75                         80  
 Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser  
                           85                         90                         95  
 Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala  
                           100                         105                         110  
 Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr  
                           115                         120                         125  
 Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro  
                           130                         135                         140  
 Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg  
 145                         150                         155                         160  
 Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg  
                           165                         170                         175  
 Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn  
                           180                         185                         190  
 Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val  
                           195                         200                         205  
 Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His  
                           210                         215                         220  
 Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln  
 225                         230                         235                         240  
 Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser  
                           245                         250                         255  
 Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly

260	265	270
Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr	Asn Phe Glu Asp Val	Pro Phe His Ser
275	280	285
Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser	Leu Asp Arg Leu Met	Asn Pro Leu Ile
290	295	300
Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu	Ser Arg Thr Gln Ser Thr	Gly Gly Thr
305	310	315
320	325	330
Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu	Phe Ser Gln Ala Gly Pro	Asn Asn Met
335	340	345
Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp	Leu Pro Gly Pro Cys Tyr	Arg Gln Gln
350	355	360
Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser	Gln Asn Asn Ser Asn Phe	Ala Trp
365	370	375
Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His	Leu Asn Gly Arg Asp Ser	Leu Val Asn
380	385	390
Pro Gly Val Ala Met Ala Thr	His Lys Asp Asp Glu Glu	Arg Phe Phe
395	400	405
Pro Ser Ser Gly Val Leu Met	Phe Gly Lys Gln Gly Ala	Gly Lys Asp
410	415	420
Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val	Met Leu Thr Ser Glu Glu	Glu Ile Lys
425	430	435
Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr	Glu Gln Tyr Gly Val Val	Ala Asp Asn
440	445	450
Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala	Pro Ile Val Gly Ala Val	Asn Ser Gln
455	460	465
Gly Ala Leu Pro Gly Met Val	Trp Gln Asn Arg Asp Val	Tyr Leu Gln
470	475	480
Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile	Pro His Thr Asp Gly Asn	Phe His Pro
485	490	495
Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe	Gly Leu Lys His Pro Pro	Pro Gln Ile
500	505	510
Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val	Pro Ala Asp Pro Pro Thr	Thr Phe Asn
515	520	525
Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe	Ile Thr Gln Tyr Ser Thr	Gly Gln Val
530	535	540
Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu	Leu Gln Lys Glu Asn Ser	Lys Arg Trp
545	550	555
560	565	570
Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr	Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser	Thr Asn Val
575		

Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile  
 580 585 590  
 Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 595 600  
 <210> 3  
 <211> 535  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 3  
 Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp  
 20 25 30  
 Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro  
 35 40 45  
 Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly  
 50 55 60  
 Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp  
 85 90 95  
 Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn  
 100 105 110  
 Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly  
 115 120 125  
 Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr  
 130 135 140  
 Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly  
 165 170 175  
 Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe  
 180 185 190  
 Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn  
 195 200 205  
 Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr  
 210 215 220  
 Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln  
 225 230 235 240

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly  
 245 250 255  
 Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala  
 260 265 270  
 Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val  
 275 280 285  
 Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly  
 290 295 300  
 Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly  
 305 310 315 320  
 Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser  
 325 330 335  
 Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val  
 340 345 350  
 Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr  
 355 360 365  
 Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln  
 370 375 380  
 Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro  
 405 410 415  
 Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro  
 420 425 430  
 Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile  
 435 440 445  
 Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala  
 450 455 460  
 Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val  
 465 470 475 480  
 Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro  
 485 490 495  
 Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe  
 500 505 510  
 Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr  
 515 520 525  
 Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 530 535

<210> 4

<211> 738  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 4  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
                                 20                                  25                                  30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                                 35                                  40                                  45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
                                 50                                  55                                  60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
                                 85                                  90                                  95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
                                 100                                  105                                  110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
                                 115                                  120                                  125  
 Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                                 130                                  135                                  140  
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
                                 165                                  170                                  175  
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro  
                                 180                                  185                                  190  
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly  
                                 195                                  200                                  205  
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser  
                                 210                                  215                                  220  
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His  
                                 245                                  250                                  255  
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp  
                                 260                                  265                                  270  
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn



275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		
420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		
450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser		
485	490	495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His		
500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr		
515	520	525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val		
545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala		
580	585	590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val  
 595 600 605  
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile  
 610 615 620  
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
 625 630 635 640  
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val  
 645 650 655  
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe  
 660 665 670  
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu  
 675 680 685  
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr  
 690 695 700  
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg  
 725 730 735  
 Asn Leu  
 <210> 5  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 5  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro	Val Arg Thr Ala Pro	Gly Lys Lys Arg
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln	Arg Ser Pro Asp Ser	Ser Thr Gly Ile
145	150	155
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro	Ala Arg Lys Arg Leu	Asn Phe Gly Gln
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val	Pro Asp Pro Gln Pro	Ile Gly Glu Pro
180	185	190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val	Gly Pro Asn Thr Met	Ala Ala Gly Gly
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn	Asn Glu Gly Ala Asp	Gly Val Gly Ser
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys	Asp Ser Thr Trp Leu	Gly Asp Arg Val
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr	Trp Ala Leu Pro Thr	Tyr Asn Asn His
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn	Gly Thr Ser Gly Gly	Ser Thr Asn Asp
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser	Thr Pro Trp Gly Tyr	Phe Asp Phe Asn
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser	Pro Arg Asp Trp Gln	Arg Leu Ile Asn
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro	Lys Arg Leu Asn Phe	Lys Leu Phe Asn
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr	Gln Asn Glu Gly Thr	Arg Thr Ile Ala
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile	Gln Val Phe Thr Asp	Ser Glu Tyr Gln
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser	Ala His Gln Gly Cys	Leu Pro Pro Phe
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile	Pro Gln Tyr Gly Tyr	Leu Thr Leu Asn
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly	Arg Ser Ser Phe Tyr	Cys Leu Glu Tyr
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg	Thr Gly Asn Asn Phe	Glu Phe Ser Tyr
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe	His Ser Ser Tyr Ala	His Ser Gln Ser
420	425	430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 435 440 445  
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu  
 450 455 460  
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His  
 500 505 510  
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525  
 His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met  
 530 535 540  
 Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val  
 545 550 555 560  
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr  
 565 570 575  
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala  
 580 585 590  
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val  
 595 600 605  
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile  
 610 615 620  
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
 625 630 635 640  
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val  
 645 650 655  
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe  
 660 665 670  
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu  
 675 680 685  
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr  
 690 695 700  
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg  
 725 730 735  
 Asn Leu

<210> 6  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 6  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
                   20                   25                   30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                   40                   45  
 Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
                   50                   55                   60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp  
 65                   70                   75                   80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
                   85                   90                   95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
                   100                   105                   110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
                   115                   120                   125  
 Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                   130                   135                   140  
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Lys Arg Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
                   165                   170                   175  
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro  
                   180                   185                   190  
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly  
                   195                   200                   205  
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser  
                   210                   215                   220  
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225                   230                   235                   240  
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His  
                   245                   250                   255  
 Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp  
                   260                   265                   270

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn  
 275 280 285  
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn  
 290 295 300  
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala  
 325 330 335  
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln  
 340 345 350  
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe  
 355 360 365  
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn  
 370 375 380  
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr  
 385 390 395 400  
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr  
 405 410 415  
 Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser  
 420 425 430  
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 435 440 445  
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu  
 450 455 460  
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His  
 500 505 510  
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525  
 His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met  
 530 535 540  
 Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val  
 545 550 555 560  
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr  
 565 570 575  
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735
Asn Leu		
<210> 7		
<211> 738		
<212> PRT		
<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)		
<400> 7		
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser		
1	5	10
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro		
20	25	30
Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro		
35	40	45
Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro		
50	55	60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp		
65	70	75
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala		
85	90	95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly		
100	105	110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
Gly Lys Arg Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		



420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro	Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu	
435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		
450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser		
485	490	495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His		
500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr		
515	520	525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540
Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val		
545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala		
580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735

Asn Leu  
 <210> 8  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 8  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Arg Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
 165 170 175  
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro  
 180 185 190  
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly  
 195 200 205  
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser  
 210 215 220  
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His  
 245 250 255  
 Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp

	260		265		270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn					
	275		280		285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn					
	290		295		300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn					
305		310		315	320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala					
	325		330		335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln					
	340		345		350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe					
	355		360		365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn					
	370		375		380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr					
385		390		395	400
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr					
	405		410		415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser					
	420		425		430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu					
	435		440		445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu					
	450		455		460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp					
465		470		475	480
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser					
	485		490		495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His					
	500		505		510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr					
	515		520		525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met					
	530		535		540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val					
545		550		555	560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr					
	565		570		575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala  
 580 585 590  
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val  
 595 600 605  
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile  
 610 615 620  
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
 625 630 635 640  
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val  
 645 650 655  
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Arg Leu Ala Ser Phe  
 660 665 670  
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu  
 675 680 685  
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr  
 690 695 700  
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg  
 725 730 735  
 Asn Leu  
 <210> 9  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 9  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100	105	110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415

Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser	420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu	435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu	450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp	465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser	485	490	495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His	500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr	515	520	525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met	530	535	540
Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val	545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr	565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala	580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val	595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile	610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe	625	630	635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val	645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Arg Leu Ala Ser Phe	660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu	675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr	690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu	705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg			

	725	730	735	
Asn Leu				
<210> 10				
<211> 1386				
<212> DNA				
<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)				
<400> 10				
atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcacat ctgcctgctg	60			
ggctacctgc tgtctgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaatgc caacaaaatt	120			
ctgaatagac caaagaggta taactctggc aagcttgaag agtttgtaca ggggaatctg	180			
gagagagagt gtatggaaga gaagtgcagc tttgaggaag ccagagaagt gtttgaaaat	240			
acagagagaa caactgaatt ttggaagcag tatgtggatg gtgatcaatg tgagagcaat	300			
ccctgcttga atggggggag ctgtaaagat gatatcaaca gctatgaatg ttggtgtccc	360			
tttggatttg aggggaaaaa ctgtgagctt gatgtgacct gtaatatcaa gaatggcagg	420			
tgtgagcaat tttgcaagaa ttctgctgat aacaaagtgg tctgtagctg cactgaggga	480			
tataggctgg ctgaaaacca gaagagctgt gaacctgcag tgccttttcc ctgtgggaga	540			
gtgtctgtga gccaaaccag caagctgact agggctgaag cagtctttcc tgatgtagat	600			
tatgtgaata gcaactgagc tgagacaatc cttgacaata tcaactcagag cacacagagc	660			
ttcaatgact tcaccagggt ggtaggaggg gaggatgcc aagcctgggca gttcccctgg	720			
caggtagtgc tcaatggaaa agtggatgcc ttttgtggag gttcaattgt aatgagaag	780			
tggattgtga ctgcagccca ctgtgtggaa actggagtca agattactgt ggtggctgga	840			
gagcacaata ttgaggaaac tgagcacact gagcagaaga ggaatgtgat caggattatc	900			
ccccaccaca actacaatgc tgctatcaac aagtacaacc atgacattgc cctcctggaa	960			
ctggatgaac ccctggtcctt gaacagctat gtgacacca tctgtattgc tgataaagag	1020			
tacaccaaca tcttcttgaa atttgggtct ggatatgtgt ctggctgggg cagggtgttc	1080			
cataaaggca ggtctgccct ggtattgcag tatttgaggg tgcctctggt ggatagagca	1140			
acctgcttgc tgagaccaa gttacaatc tacaacaata tgttctgtgc agggttccat	1200			
gaaggtggta gagacagctg ccaggagat tctgggggtc cccatgtgac tgaggtggag	1260			
ggaaccagct tcctgactgg gattatcagc tggggtgagg agtgtgctat gaagggaaag	1320			
tatgggatct acacaaaagt atccagatat gtgaactgga ttaaggagaa aaccaagctg	1380			
acttga 1386				
<210> 11				
<211> 1386				
<212> DNA				
<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)				
<400> 11				
atgcagcgcg tgaacatgat catggccgag agccctggcc tgattacat ctgcctgtta	60			
ggatatctac tcagtgtga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatc	120			
ctgaaccggc ccaagcggta caactcaggc aagctggaag agttcgtgca gggcaacctg	180			

gaacgggagt gcatggaaga gaagtgcagc ttcgaggaag cccgggaggt gttcgagaac 240  
 accgagcggga ccaccgagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagtcaaac 300  
 ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gatatcaaca gctacgagtg ctggtgcccc 360  
 ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggccgc 420  
 tgcgagcagt tctgcaagaa cagcgcgcgac aacaaggtgg tgtgctcatg cactgagggc 480  
 taccggctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccgcg tgcccttccc ctgcggcaga 540  
 gtgtccgtga gccagaccag caagctgacc agggccgagg ccgtgttccc tgacgtggac 600  
 tacgtgaact caaccgaggc cgagacaatc ctggacaaca tcaccagag caccagctcc 660  
 ttcaacgact tcacccgggt ggtgggcggc gaggacgcca agcccggcca gttcccttgg 720  
 cagggtggtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcggcg gctcaatcgt gaacgagaag 780  
 tggatcgtga cagccgccc ctgctgagg acaggcgtga agatcacctg ggtggccggc 840  
 gaacacaata tcgaggaaac cgagcacacc gagcagaaac ggaacgtgat ccgattatc 900  
 ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgatatcgc cctgctggaa 960  
 ctggacgagc ctctggtgct gaattcatac gtgaccccc tctgtatcgc cgacaaagag 1020  
 tacaccaaca tctttctgaa gttcggcagc ggctacgtgt ccggctgggg cagggtgttc 1080  
 cacaagggcc gcagcgcct ggtgctgcag tacctgcggg tgcccctggt ggacagagcc 1140  
 acctgcctgc ggtaaccaa gttcaccatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttccac 1200  
 gagggcggca gggacagctg ccaggcgcac agcggcggac cccacgtgac cgaggtggag 1260  
 ggcaccagct ttctgaccgg catcatctca tggggcgagg aatgcgcat gaagggaag 1320  
 tacggaatct acactaaggt gtcaagatac gtgaactgga tcaaagagaa aaccaagctg 1380  
 acctga 1386  
 <210> 12  
 <211> 11125  
 <212> DNA  
 <213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)  
 <400> 12  
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60  
 gggcgacctt tggctgcccg gcctcagtga gcgagcagc gcgagagag ggagtggcca 120  
 actccatcac taggggttcc tgcggcctag taggctcaga ggcacacagg agtttctggg 180  
 ctaccctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatctcc agcagctgtt tgtgtgctgc 240  
 ctctgaagtc cacactgaac aaacttcage ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt 300  
 gcaagcagca aacagcaaac acacagccct cctgctgc tgaccttga gctggggcag 360  
 aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc cactcgacc cttggaattt 420  
 cggtggagag gagcagaggt tgcctggeg tggtttaggt agtgtgagag ggttaccgg 480  
 ggatcttget accagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct 540  
 aagtggtaact ctcccagaga ctgtctgact cacgccacc cctccacctt ggacacagga 600  
 cgctgtggtt tctgagccag gtacaatgac tccttctggg aagtgcagtg gaagctgtac 660  
 actgccccagg caaagcgtcc gggcagcgtg ggcgggcgac tcagatcca gccagtggac 720  
 ttagcccctg tttgctctc cgataactgg ggtgacctg gttaatatc accagcagcc 780



tccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg ccctgtctcc 840  
tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttcaca atctgctagc 900  
aaaggttatg cagaggggtga acatgatcat ggctgagagc cctggcctga tcaccatctg 960  
cctgctgggc tacctgctgt ctgctgaatg tacaggtttg tttccttttt tataatacat 1020  
tgagtatgct tgccttttag atataaaaat atctgattct gtctttctca ctaaattttg 1080  
attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccaggg ttggtaaagta 1140  
ctggttcttt gttagctagg ttttcttctt cttcactttt aaaactaaat agatggacaa 1200  
tgcttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcatgtaatt 1260  
cctgttaaaa aacagtcate tccttggttt aaaaaatta aaagtgggaa aacaaagaaa 1320  
tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta ccactttgaa 1380  
atcaaattgg gaaacaaaag cacaaacagt ggcttattt acacaaaag tctgatttta 1440  
agatatgtga caattcaagg tttcagaagt atgtaaggag gtgtgtctct aattttttaa 1500  
attatatac ttcaatttaa agtttttagtt aaaacataaa gattaacctt tcattagcaa 1560  
gctgttagtt atcacaaaag cttttcatgg attaggaaaa aatcattttg tctctatctc 1620  
aaacatcttg gaggttgatat ttggggaaac acaatactca gttgagttcc ctaggggaga 1680  
aaagcaagct taagaattga cacaaagagt aggaagttag ctattgcaac atatacact 1740  
ttgttttttc acaactacag tgactttatt tatttccag aggaaggcat acagggaga 1800  
aattatccca tttggacaaa cagcatgtt tcacagtaag cacttatec acttacttgt 1860  
caactttcta gaatcaaatc tagtagctga cagtaccagg atcaggggtg ccaaccetaa 1920  
gcacccccag aaagctgact ggccctgtgg ttcccactcc agacatgatg tcagctgtga 1980  
aatccacctc cctggaccat aattaggett ctgttcttca ggagacattt gttcaaagtc 2040  
atttgggcaa ccatattctg aaaacagccc agccagggtg atggatcact ttgcaaagat 2100  
cctcaatgag ctattttcaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggtcct tttgagaact 2160  
ttctttttca tccaaagtaa attcaaata gattagaaat ctgacctttt attactggaa 2220  
ttctcttgac taaaagtaaa attgaatttt aattcetaaa tctccatgtg tatacagtac 2280  
tgtgggaaca tcacagattt tggtccatg ccctaaagag aaattggctt tcagattatt 2340  
tggtatataa acaaagactt tcttaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg 2400  
ctaaaactaa agaattatc ttttacattt cagttttct tgatcatgaa aatgccaaca 2460  
aaattctgaa tagaccaaaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga 2520  
atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgttg 2580  
aaaatacaga gagaacaact gaattttgga agcagtatgt ggatggtgat caatgtgaga 2640  
gcaatccctg cttgaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttgg 2700  
gtccctttgg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg 2760  
gcaggtgtga gcaattttgc aagaattctg ctgataacaa agtggctctgt agctgactg 2820  
agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcct tttccctgtg 2880  
ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc tttctgatg 2940  
tagattatgt gaatagcact gaggetgaga caatccttga caatatacact cagagcacac 3000  
agagcttcaa tgacttcacc aggggtgtag gaggggagga tgccaagcct gggcagttcc 3060  
cctggcaggt agtgctcaat ggaaaagtgg atgccttttg tggaggttca attgtaaag 3120

agaagtggat tgtgactgca gcccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtggtgg 3180  
 ctggagagca caatattgag gaaactgagc aactgagca gaagaggaat gtgatcagga 3240  
 ttatcccca ccacaactac aatgctgcta tcaacaagta caacatgac attgccctcc 3300  
 tggaaactgga tgaaccctg gtcttgaaca gctatgtgac acccatctgt attgctgata 3360  
 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg 3420  
 tgttccataa aggcaggtct gccctggtat tgcagtattt gaggggtgcct ctggtggata 3480  
 gagcaacctg cttgctgagc accaagtta caatctacaa caatatgttc tgtgcagggt 3540  
 tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattctgg gggccccat gtgactgagg 3600  
 tggagggaac cagcttctg actgggatta tcagctgggg tgaggagtgt gctatgaagg 3660  
 gaaagtatgg gatctacaca aaagtatcca gatatgtgaa ctggattaag gagaaaacca 3720  
 agctgacttg atgaaagatg gatttccaag gttaattcat tggaaattgaa aattaacaga 3780  
 gatctagagc tgaattcctg cagccagggg gatcagctc tactgtgect tctagttgcc 3840  
 agccatctgt tgtttgcccc tcccccttgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca 3900  
 ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcacattg tctgagtagg tgtcatteta 3960  
 ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc 4020  
 atgctgggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga 4080  
 gatccactag ggccgcagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc tctgcgcgt 4140  
 cgctcgctca ctgaggccgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc 4200  
 gcagctgcct gcaggggcag cttgaaggaa atactaaggc aaaggtactg caagtgcctg 4260  
 caacattcgc ttatgcggat tattgccgta gtgccgcgac gccgggggca agatgcagag 4320  
 attgccatgg tacaggccgt gcggttgata ttgccaaaac agagctgtgg gggagagttg 4380  
 tcgagaaaga gtgcggaaga tgcaaaggcg tcggctatc aaggatgcca gcaagcgcag 4440  
 catatcgccg tgtgacgat ctaatcccaa acctacca acccactgg tcacgactg 4500  
 ttaagccgct gtatgacgct ctggtggtgc aatgccaaa agaagagtca atcgagaca 4560  
 acatittgaa tgcggtcaca cgtagcagc atgattgcca cggatggcaa catattaacg 4620  
 gcatgatatt gacttattga ataaaattgg gtaaatttga ctcaacgatg ggttaattcg 4680  
 ctcgttgg tagtgagatg aaaagaggcg gcgcttacta ccgattccgc ctagttggtc 4740  
 acttcgacgt atcgtctgga actccaacca tcgcagcag agaggtctgc aaaatgcaat 4800  
 cccgaaacag ttcgcaggta atagttagag cctgcataac ggtttcggga tttttatat 4860  
 ctgcacaaca ggtaagagca ttgagtcgat aatcgtgaag agtcggcgag cctggttagc 4920  
 cagtgtctt tccgttgtgc tgaattaagc gaataccgga agcagaaccg gatcaccaaa 4980  
 tgcgtacagg cgtcatcgcc gccagcaac agcacaacc aactgagcc gtagccactg 5040  
 tctgtcctga attcattagt aatagttacg ctgcggcctt ttacacatga cttcgtgaa 5100  
 agcgggtggc aggaggtcgc gctaacaacc tctgcccgtt ttgcccgtgc atateggtca 5160  
 cgaacaaatc tgattactaa acacagtagc ctggatttgt tctatcagta atcgacctta 5220  
 ttccataatta aatagagcaa atccccctat tgggggtaag acatgaagat gccagaaaa 5280  
 catgacctgt tggccgcat tctcgcggca aaggaacaag gcacggggc aatccttgcg 5340  
 tttgcaatgg cgtaccttcg cggcagatat aatggcgggtg cgtttacaaa aacagtaatc 5400  
 gacgcaacga tgtgcgcat tatcgctag ttcattcgtg accttctcga cttcgcggga 5460

ctaagtagca atctcgccta tataacgagc ggtttatcgc gctacatcgg tactgactcg 5520  
 attggttcgc ttatcaaacg cttcgcgtgc aaaaaagccg gagtagaaga tggtagaaat 5580  
 caataatcaa cgtaaggcgt tcctcgatat gctggcgtgg tcggaggaa ctgataacgg 5640  
 acgtcagaaa accagaaatc atggttatga cgtcattgta ggccgagagc tatttactga 5700  
 ttactccgat caccctcgca aacttgtcac gctaaacca aaactcaaat caacaggcgc 5760  
 cggacgctac cagcttcttt cccgttgggtg ggatgcctac cgcaagcagc ttggcctgaa 5820  
 agacttctct ccgaaaagtc aggacgctgt ggcatcgcag cagattaagg agcgtggcgc 5880  
 tttacctatg attgatcgtg gtgatatccg tcaggcaatc gaccgttgca gcaatatctg 5940  
 ggcttcaactg ccgggcgctg gttatggtea gttcagcagc aaggctgaca gcctgattgc 6000  
 aaaattcaaa gaagcgggcg gaacggctcag agagattgat gtatgagcag agtcaccgcg 6060  
 attatctccg ctctggttat ctgcacatc gtctgcctgt catgggctgt taatcattac 6120  
 cgtgataacg ccattaccta caaagcccag cgcgacaaaa atgccagaga actgaagctg 6180  
 gcgaacgcgg caattactga catgcagatg cgtcagcgtg atgttgctgc gctcgatgca 6240  
 aaatacacga aggagttagc tgatgctaaa gctgaaaatg atgctctgcg tgatgatgtt 6300  
 gccgctggtc gtcgctcggtt gcacatcaaa gcagtctgtc agtcagtgcg tgaagccacc 6360  
 accgcctccg gcgtggataa tgcagcctcc ccccgactgg cagacaccgc tgaacgggat 6420  
 tatttcacc tcagagagag gctgatcact atgcaaaaac aactggaagg aaccagaag 6480  
 tatattaatg agcagtgcag atagagtgc ccatatcgat gggcaactca tgcaattatt 6540  
 gtgagcaata cacacgcgct tccagcggag tataaatgcc taaagtaata aaaccgagca 6600  
 atccatttac gaatgttgc tgggttctg ttttaacaac atttctgcg ccgccacaaa 6660  
 ttttgctgc atcgacagtt ttctctgcc caattcaga aacgaagaaa tgatgggtga 6720  
 tggtttcctt tgggtgctact gctgccggtt tgttttgaa agtaaagtc tgttgagcac 6780  
 atcctgtaat aagcagggcc agcgcagtag cgagtagcat tttttcatg gtgttattcc 6840  
 cgatgctttt tgaagttcgc agaatcgtat gtgtagaaaa ttaacaaac ctaaacaat 6900  
 gagttgaaat tcatattgt taatatttat taatgtatgt caggtgcgat gaatcgtcat 6960  
 tgtattcccg gattaactat gtccacagcc ctgacgggga acttctctgc gggagtgtcc 7020  
 gggaataatt aaaacgatgc acacagggtt tagcgcgtac acgtattgca ttatgccaac 7080  
 gccccggtgc tgacacggaa gaaaccggac gttatgattt agcgtggaaa gatttgtgta 7140  
 gtgttctgaa tgctctcagt aaatagtaat gaattatcaa aggtatagta atatctttta 7200  
 tgttcatgga tatttgtaac ccacggaaa actcctgctt tagcaagatt ttccctgtat 7260  
 tgctgaaatg tgatttctct tgatttcaac ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg 7320  
 tttcttgaga atttaacatt tacaaccttt ttaagtctt ttattaacac ggtgttatcg 7380  
 ttttctaaca cgatgtgaat attatctgtg gctagatagt aatataatg tgagacgttg 7440  
 tgacgtttta gttcagaata aaacaattca cagtctaaat cttttgcac ttgatcgaat 7500  
 atttctttaa aaatggcaac ctgagccatt ggtaaaacct tccatgtgat acgagggcgc 7560  
 gtagtttgca ttatcgtttt taccgtttca atctggctctg acctccttgt gttttgttga 7620  
 tgatttatgt caaatattag gaatgtttc acttaatagt attggttgcg taacaaagtg 7680  
 cggctctgct ggcatcctgg agggaaatac aaccgacaga tgtatgtaag gccaacgtgc 7740  
 tcaaatcttc atacagaaag atttgaagta atattttaac cgctagatga agagcaagcg 7800

catggagcga caaaatgaat aaagaacaat ctgctgatga tcctcctgtg gatctgattc 7860  
gtgtaaaaaa tatgcttaat agcaccattt ctatgagtta ccctgatggt gtaattgcat 7920  
gtatagaaca taaggtgtct ctggaagcat tcagagcaat tgaggcagcg ttggtgaagc 7980  
acgataataa tatgaaggat tattccctgg tggttgactg atcaccataa ctgctaatac 8040  
ttcaaactat ttagtctgtg acagagccaa cacgcagtct gtcactgtca ggaaagtgg 8100  
aaaactgcaa ctcaattact gcaatgccct cgtaattaag tgaatttaca atatcgtcct 8160  
gttcggaggg aagaacgcgg gatgttcatt cttcatcact ttaattgat gtatatgctc 8220  
tcttttctga cgtagtctc cgacggcagg cttcaatgac ccaggctgag aaattcccgg 8280  
accctttttg ctcaagagcg atgttaattt gttcaatcat ttggttagga aagcggatgt 8340  
tgcgggttgt tgttctgcgg gttctgttct tcgttgacat gaggttggcc cgtattcagt 8400  
gtcctgattt tgtattgtct gaagtgtttt ttacgttaag ttgatgcaga tcaattaata 8460  
cgatacctgc gtcataattg attatttgac gtggtttgat ggccctccag cacgttgtga 8520  
tatgtagatg ataataatta tcactttacg ggtcctttcc ggtgatccga caggttacgg 8580  
ggcggcgacc tgccctgatgc ggtattttct ccttacgcct ctgtgcggta tttcacaccg 8640  
catacgtcaa agcaaccata gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggccgggtgtg 8700  
gtggttacgc gcagcgtgac cgtacaactt gccagcgcct tagcgcgccg tcctttcgtc 8760  
ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggttttcccc gtcaagctct aaatcggggg 8820  
ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaaa acttgatttg 8880  
ggtgatgggt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcggcc tttgacgttg 8940  
gagtcacagt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caactctatc 9000  
tcgggctatt cttttgattt agacctgcag gcatgcaage ttggcactgg ccgtcgtttt 9060  
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc 9120  
ccctttcggc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgcctt cccaacagtt 9180  
gcgacgcctg aatggcgaat gcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt caagtcagcg 9240  
taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac tcatcgagca 9300  
tcaaatgaaa ctgcaattta ttcataatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc 9360  
gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt 9420  
atcggctctg gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc cctcgtcaa 9480  
aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca 9540  
aaagcttatg catttcttc cagacttgtt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa 9600  
aatcaactgc atcaacaaa ccgttattea ttcgtgattg cgctgagcg agacgaaata 9660  
cgcgatcgtt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca 9720  
ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaat acctggaatg 9780  
ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc atcaggagta cggataaaat 9840  
gcttgatggg cggaagagge ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg 9900  
taacatcatt ggcaacgcta cctttgceat gtttcagaaa caactctggc gcategggct 9960  
tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccagc attatcgca gccatttat 10020  
accatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cttcgagcaa gacgtttccc 10080  
gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac agttttattg 10140

ttcatgatga tatatTTTTA tcttTgcaa Tgtaacatca gagatTTTga gacacaacgt 10200  
 ggctttgttg aataaatcga actTTTgctg agttgaagga tcagatcacg catcttcccg 10260  
 acaacgcaga ccgttccgtg gcaaagcaaa agttcaaaat caccaactgg tccacctaca 10320  
 acaaagctct catcaaccgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg 10380  
 cctggTatga gTcagcaaca cttcttcac gaggcagacc tctcgacgga gttccactga 10440  
 gcgTcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttctTgag atcctTTTTt tctgcgcgta 10500  
 atctgctgct Tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg Tggtttgttt gccgatcaa 10560  
 gagctaccaa ctctTTTTcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 10620  
 gttcttctag Tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 10680  
 tacctcgctc Tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gTcgtgtctt 10740  
 accgggtTgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 10800  
 ggTtctgTca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 10860  
 cgtgagctat gagaaaagcgc cacgettccc gaagggagaa aggcgacag gtatccggtta 10920  
 agcggcaggg Tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgctggtat 10980  
 ctttatagtc ctgtcgggtt Tcgccacctc Tgacttgagc gTcgatTTTT gtgatgctcg 11040  
 Tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcttgccc 11100  
 ttttTctggc cttttTctca catgt 11125

<210> 13

<211> 141

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 13

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60  
 gggcgacctt Tggtcgcggc gcctcagTga gcgagcagc gcgagagag ggagTggcca 120  
 actccatcac taggggttcc t 141

<210> 14

<211> 321

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 14

aggctcagag gcacacagga gtttctgggc Tcaccctgce cccttccaac ccctcagttc 60  
 ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgce tetgaagtec aactgaaca aacttcagcc 120  
 tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaca cacagccctc 180  
 cctgcctgct gacctTggag ctggggcaga ggTcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240  
 tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcttgccgt 300  
 ggTttagTga gtgtgagagg g 321

<210> 15

<211> 397

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 15

gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta 60  
 agtgggtactc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac 120  
 gctgtggttt ctgagccagg tacaatgact cttttcggtg agtgcagtgg aagctgtaca 180  
 ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 240  
 tagccccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 300  
 cccccgttgc ccctctggat ccaactgetta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 360  
 cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaat 397

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 16

accactttca caatctgcta gcaaagggt 29

<210> 17

<211> 1438

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 17

gtttgtttcc tttttataa tacattgagt atgettgcct tttagatata gaaatatctg 60  
 attctgtctt cttcactaaa ttttgattac atgatttgac agcaatattg aagagtctaa 120  
 cagccagcac ccaggttggg aagtactggg tctttgtag ctaggttttc ttcttctca 180  
 cttttaaaac taaatagatg gacaatgctt atgatgcaat aaggtttaat aaacactggt 240  
 cagttcagta tttggatcatg taattcctgt taaaaaacag tcattctcctt ggtttaaaaa 300  
 aattaaaagt gggaaaacaa agaaatagca gaatatagtg aaaaaaata accacagtat 360  
 ttttgtttgg acttaccact ttgaaatcaa attgggaaac aaaagcacia acagtggcct 420  
 tatttacaca aaaagtctga ttttaagata tgtgacaatt caaggtttca gaagtatgta 480  
 aggagggtgtg tctctaattt tttaaattat atatcttcaa tttaaagttt tagttaaaaa 540  
 ataaagatta acctttcatt agcaagctgt tagttateac caaagctttt catggattag 600  
 gaaaaaatca ttttgtctct atctcaaaca tcttgagtt gatatttggg gaaacacaat 660  
 actcagttga gtcccttagg ggagaaaagc aagcttaaga attgacacia agagtaggaa 720  
 gttagctatt gcaacatata tcactttggt ttttcacaa tacagtgact ttatttattt 780  
 ccagaggaa ggcatacagg gaagaaatta tcccatttgg acaaacagca tgttctcaca 840  
 gtaagcaact atcacactta cttgtcaact ttctagaatc aatctagta gctgacagta 900  
 ccaggatcag ggggtgccaa cctaagcacc ccagaaaagc tgactgcccc tgtggttccc 960  
 actccagaca tgatgtcagc tgtgaaatcc acctccctgg accataatta ggcttctggt 1020  
 cttcaggaga catttgttca aagtcatttg ggcaaccata ttctgaaaac agcccagcca 1080  
 ggggtgatgga tcactttgca aagatcctca atgagctatt ttcaagtgat gacaaagtgt 1140

gaagttaagg gctcatttga gaactttctt tttcatccaa agtaaattca aatatgatta 1200  
 gaaatctgac cttttattac tgggaattctc ttgactaaaa gtaaaattga attttaattc 1260  
 ctaaactctcc atgtgtatac agtactgtgg gaacatcaca gattttggct ccatgcccta 1320  
 aagagaaatt ggctttcaga ttatttggat taaaaacaaa gactttctta agagatgtaa 1380  
 aattttcatg atgttttctt ttttgctaaa actaaagaat tattctttta catttcag 1438

<210> 18

<211> 48

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 18

tgaaagatgg atttccaagg ttaattcatt ggaattgaaa attaacag 48

<210> 19

<211> 228

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 19

ctactgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgccc ctcccccttg ctttcttga 60  
 ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcacatt 120  
 gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg 180  
 attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcagtggg ctctatgg 228

<210> 20

<211> 108

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 20

aggaaccctt agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60  
 ccgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgagc 108

<210> 21

<211> 3631

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 21

agcttgaagg aaataactaag gcaaaggtac tgcaagtget cgcaacattc gcttatgcgg 60  
 attattgccg tagtgccgcg acgccggggg caagatgcag agattgcat ggtacaggcc 120  
 gtgcggttga tattgcaaaa acagagetgt gggggagagt tgtcgagaaa gactgcggaa 180  
 gatgcaaagg cgtcggtat tcaaggatgc cageaagegc agcatatcgc gctgtgacga 240  
 tgctaatccc aaaccttacc caaccacct ggtcacgcac tgttaagccg ctgtatgacg 300  
 ctctgggtgt gcaatgccac aaagaagagt caatcgcaga caacattttg aatgcggtca 360  
 cacgtagca gcatgattgc cacggatggc aacatattaa cggcatgata ttgacttatt 420

gaataaaatt gggtaaattt gactcaacga tgggttaatt cgctcgttgt ggtagtgaga 480  
 tgaaaagagg cggcgcttac taccgattcc gcctagttgg tcacttcgac gtatcgtctg 540  
 gaactccaac catcgcaggc agagaggtct gcaaaatgca atcccgaac agttcgcagg 600  
 taatagttag agcctgcata acggtttcgg gattttttat atctgcacaa caggtaagag 660  
 cattgagtcg ataatcgtga agagtcggcg agcctggta gccagtgtc tttccgttgt 720  
 gctgaattaa gcgaataaccg gaagcagaac cggatcacca aatgcgtaca ggcgtcatcg 780  
 ccgcccagca acagcacaac ccaaactgag ccgtagccac tgtctgtcct gaattcatta 840  
 gtaatagtta cgctgcggcc ttttacacat gaccttcgtg aaagcgggtg gcaggagtc 900  
 gcgctaacaa cctcctgccg ttttcccgt gcatactggt cacgaacaaa tctgattact 960  
 aaacacagta gcctggattt gttctatcag taatcgacct tattcctaataa taaatagagc 1020  
 aaatcccctt attgggggta agacatgaag atgccagaaa aacatgacct gttggccgcc 1080  
 attctcgcgg caaaggaaca aggcacgagg gcaatccttg cgtttgcaat ggcgtacctt 1140  
 cgcggcagat ataatggcgg tgcgtttaca aaaacagtaa tcgacgcaac gatgtgcgcc 1200  
 attatcgctt agttcattcg tgaccttctc gacttcgccg gactaagtag caatctcget 1260  
 tatataacga gcgtgtttat cggtacatc ggtactgact cgattggttc gcttatcaaa 1320  
 cgcttcgctg ctaaaaaagc cggagtagaa gatggtagaa atcaataatc aacgtaaggc 1380  
 gttcctcgat atgctggcgt ggtcggaggg aactgataac ggacgtcaga aaaccagaaa 1440  
 tcatggttat gacgtcattg taggcggaga gctatttact gattactccg atcaccctcg 1500  
 caaacttgtc acgctaaacc caaaactcaa atcaacaggc gccggacget accagcttct 1560  
 ttcccgttgg tgggatgcct accgcaagca gcttggcctg aaagacttct ctccgaaaag 1620  
 tcaggacgct gtggcattgc agcagattaa ggagcgtggc gctttaccta tgattgatcg 1680  
 tggtgatate cgtcaggcaa tcgaccgttg cagcaatate tgggcttcac tgccgggccc 1740  
 tggttatggc cagttcgagc ataaggctga cagcctgatt gcaaaattca aagaagcggg 1800  
 cggaacggtc agagagattg atgtatgagc agagtcaccg cgattatctc cgctctggtt 1860  
 atctgcatca tcgtctgcct gtcattgggt gttaatcatt accgtgataa cgccattacc 1920  
 tacaaagccc agcgcgacaa aatgcccaga gaactgaagc tggcgaacgc ggcaattact 1980  
 gacatgcaga tgcgtcagcg tgatgttgct gcgctcgat caaaatacac gaaggagtta 2040  
 gctgatgcta aagctgaaaa tgatgctctg cgtgatgatg ttgccgctgg tcgtcgtcgg 2100  
 ttgcacatca aagcagctcg tcagtcagtg cgtgaagcca ccaccgctc cggcgtggat 2160  
 aatgcagcct cccccgact ggcagacacc gctgaacggg attatttctc cctcagagag 2220  
 aggctgatca ctatgcaaaa acaactggaa ggaaccaga agtatattaa tgagcagtcg 2280  
 agatagagtt gcccataatc atgggcaact catgcaatta ttgtgagcaa tacacacggc 2340  
 cttccagcgg agtataaatg cctaaagtaa taaaaccgag caatccattt acgaatgttt 2400  
 gctgggttct tgttttaaca acattttctg cgcgccaca aattttggct gcactgcacg 2460  
 ttttcttctg cccaattcca gaaacgaaga aatgatgggt gatggtttcc tttggtgcta 2520  
 ctgctgccgg tttgttttga acagtaaaccg tctgttgagc acatcctgta ataagcaggg 2580  
 ccagcgcagt agcagtagc attttttca tgggtgttatt cccgatgctt tttgaagtcc 2640  
 gcagaatcgt atgtgtagaa aattaaacaa accctaaaca atgagttgaa atttcatatt 2700  
 gttaaatatt attaattgat gtcagggtcg atgaatcgtc attgtattcc cggattaact 2760



atgtccacag ccctgacggg gaacttctct gcgggagtgt ccgggaataa ttaaaacgat 2820  
 gcacacaggg tttagcgcgt acacgtattg cattatgcc aacccccggg gctgacacgg 2880  
 aagaaaccgg acgttatgat ttagcgtgga aagatttgtg tagtgttctg aatgctctca 2940  
 gtaaatagta atgaattatc aaaggtatag taatatcttt tatgttcatg gatatttgta 3000  
 acccatcgga aaactcctgc tttagcaaga ttttcctgt attgctgaaa tgtgatttct 3060  
 cttgatttca acctatcata ggacgtttct ataagatgcg tgtttcttga gaatttaaca 3120  
 tttacaacct ttttaagtcc ttttattaac acgggtttat cgttttctaa cacgatgtga 3180  
 atattatctg tggctagata gtaaatataa tgtgagacgt tgtgacgttt tagttcagaa 3240  
 taaaacaatt cacagtctaa atcttttgcg acttgatcga atatttcttt aaaaatggca 3300  
 acctgagcca ttggtaaaac ctccatgtg atacgagggc gcgtagtttg cattatcggt 3360  
 tttatcgttt caatctggtc tgacctcett gtgttttgtt gatgatttat gtcaaatatt 3420  
 aggaatgttt tcaactaata gtattggttg cgtaacaaag tgcggctctg ctggcattct 3480  
 ggagggaat acaaccgaca gatgtatgta aggccaacgt gctcaaatct tcatacagaa 3540  
 agatttgaag taatatttta accgctagat gaagagcaag cgcatggagc gacaaaatga 3600  
 ataaagaaca atctgctgat gatccctccg t 3631

<210> 22

<211> 307

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 22

gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc 60  
 ttagcgcgccc ctcttttgcg tttcttcctt tcctttctcg ccacgttgcg cggctttccc 120  
 cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc 180  
 gacccccaaa aacttgattt gggatgatgt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg 240  
 gtttttgcgc ctttgacggt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact 300  
 ggaacaa 307

<210> 23

<211> 813

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 23

gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttatte atatcaggat tatcaatacc 60  
 atatttttga aaaagccggt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgagge agttccatag 120  
 gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat 180  
 taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga 240  
 atccggtgag aatggcaaaa gettatgeat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc 300  
 attacgctcg tcatcaaaat cactcgcacg aaccaaacgg ttattcattc gtgattgcgc 360  
 ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgtgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg 420  
 caaccggcgc aggaacactg ccagcgcacg aacaatattt tcacctgaat caggatattc 480

ttctaatacc tggaaatgctg ttttcccggg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcadc 540  
aggagtacgg ataaaaatgct tgatggctcg aagaggcata aattccgtca gccagtttag 600  
tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgcatggt tcagaaacaa 660  
ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt gcccacatt 720  
atcgcgagcc cattataacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggctt 780  
cgagcaagac gtttcccgtt gaatatggt cat 813

<210> 24

<211> 668

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 24

gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg 60  
caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 120  
ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt 180  
tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg 240  
ctaactcctgt taccagtggc tgetgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 300  
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca 360  
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 420  
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 480  
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtct 540  
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatTTTTGT gatgctcgtc agggggcgcg 600  
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct 660  
tttgcctca 668

<210> 25

<211> 2824

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 25

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agcctggcc tgateccat ctgcctgctg 60  
ggctacctgc tgtctgctga atgtacaggt ttgtttcctt tttataata cattgagtat 120  
gcttgccttt tagatataga aatatctgat tctgtcttct tcaactaaatt ttgattacat 180  
gatttgacag caatattgaa gagtctaaca gccagcacc aggttggtaa gtactggttc 240  
tttgttagct aggttttctt cttcttcaact tttaaaacta aatagatgga caatgcttat 300  
gatgcaataa ggtttaaataa aactgttca gttcagatatt tggatcatgta attcctgtta 360  
aaaaacagtc atctccttgg tttaaaaaaa ttaaaagtgg gaaaacaaag aaatagcaga 420  
atatagtgaa aaaaaataac cacagtattt ttgtttggac ttaccacttt gaaatcaaat 480  
tgggaaacaa aagcacaac agtggcetta tttacacaaa aagtctgatt ttaagatatg 540  
tgacaattca aggtttcaga agtatgtaag gaggtgtgtc tctaattttt taaattatat 600  
atcttcaatt taaagtttta gttaaaacat aaagattaac ctttcattag caagctgtta 660

gttatcacca aagcttttca tggattagga aaaaatcatt ttgtctctat ctcaaacatc 720  
 ttggagttga tatttgggga aacacaatac tcagttgagt tccctagggg agaaaagcaa 780  
 gcttaagaat tgacacaaag agtaggaagt tagctattgc aacatatatc actttgtttt 840  
 ttcacaacta cagtgacttt atttatttcc cagaggaagg catacaggga agaaattatc 900  
 ccatttggac aaacagcatg ttctcacagt aagcacttat cacacttact tgtcaacttt 960  
 ctagaatcaa atctagtagc tgacagtacc aggatcaggg gtgccaaccc taagcacccc 1020  
 cagaaagctg actggccctg tggttcccac tccagacatg atgtcagctg tgaatccac 1080  
 ctccctggac cataattagg cttctgttct tcaggagaca tttgttcaaa gtcatttggg 1140  
 caacatatt ctgaaaacag cccagccagg gtgatggatc actttgcaaa gatcctcaat 1200  
 gagctatttt caagtgatga caaagtgtga agttaagggc tcatttgaga actttctttt 1260  
 tcatccaaag taaattcaaa tatgattaga aatctgacct tttattactg gaattctctt 1320  
 gactaaaagt aaaattgaat ttttaattcet aaatctecat gtgtatacag tactgtggga 1380  
 acatcacaga ttttggctcc atgccetaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta 1440  
 aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa ttttcatgat gttttctttt ttgctaaaac 1500  
 taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaatgcca acaaaattct 1560  
 gaatagacca aagaggtata actctggcaa gcttgaagag tttgtacagg ggaatctgga 1620  
 gagagagtgt atggaagaga agtgcagctt tgaggaagcc agagaagtgt ttgaaaatac 1680  
 agagagaaca actgaatttt ggaagcagta tgtggatggt gatcaatgtg agagcaatcc 1740  
 ctgcttgaat ggggggagct gtaaagatga tatcaacagc tatgaatggt ggtgtccctt 1800  
 tggatttgag gggaaaaact gtgagcttga tgtgacctgt aatatcaaga atggcaggtg 1860  
 tgagcaattt tgcaagaatt ctgctgataa caaagtggte tgtagctgca ctgagggata 1920  
 taggctggct gaaaaccaga agagctgtga acctgcagtg ctttttcctt gtgggagagt 1980  
 gtctgtgagc caaaccagca agctgactag ggctgaagca gtctttcctg atgtagatta 2040  
 tgtgaatagc actgaggctg agacaatcct tgacaatata actcagagca cacagagctt 2100  
 caatgacttc accagggtgg taggagggga ggatgccaa cctgggcagt tcccctggca 2160  
 ggtagtgctc aatggaaaag tggatgcctt ttgtggaggt tcaattgtaa atgagaagtg 2220  
 gattgtgact gcagcccact gtgtggaac tggagtcaag attactgtgg tggctggaga 2280  
 gcacaatatt gaggaaactg agcacactga gcagaagagg aatgtgatca ggattatccc 2340  
 ccaccacaac tacaatgctg ctatcaacia gtacaacat gacattgcc tcttggaaact 2400  
 ggatgaacc ctggtcttga acagctatgt gacaccatc tgtattgctg ataaagagta 2460  
 caccaacatc ttcttgaat ttgggtctgg atatgtgtct ggctggggca ggggtgtcca 2520  
 taaaggcagg tctgccctgg tattgcagta tttgaggggt cctctgggtg atagagcaac 2580  
 ctgcttgctg agcaccaagt ttacaateta caacaatag ttctgtgcag ggttccatga 2640  
 aggtggtaga gacagctgcc agggagatte tgggggtccc catgtgactg aggtggaggg 2700  
 aaccagcttc ctgactggga ttatcagctg ggggtgaggag tgtgctatga agggaaagta 2760  
 tgggatctac acaaaaagta ccagatatgt gaactggatt aaggagaaaa ccaagctgac 2820  
 ttga 2824

<210> 26

<211> 10659

<212> DNA

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 26

```

cctgcaggca gctgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
actccatcac taggggttcc tgcggcctag taggctcaga ggcacacagg agtttctggg 180
ctcaccctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatcctcc agcagctggt tgtgtgctgc 240
ctctgaagtc cacactgaac aaacttcage ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt 300
gcaagcagca aacagcaaac acacagecct cctgectgc tgaccttga gctggggcag 360
aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc cactcgacce cttggaattt 420
cggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt agtgtgagag gggtagccgg 480
ggatcttgct accagtggaa cagecactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct 540
aagtggtaact ctcccagaga ctgtctgaact cacgccacce cctccacctt ggacacagga 600
cgctgtgggt tctgagccag gtacaatgac tcctttcggt aagtgcagtg gaagctgtac 660
actgccccagg caaagcgtcc gggcagcgta ggcggggcag tcagatcca gccagtggac 720
ttagcccctg tttgctctc cgataactgg ggtgacctg gttaatattc accagcagcc 780
tccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg cctgtctcc 840
tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttcaca atctgctagc 900
aaaggttatg cagagggtga acatgatcat ggctgagagc cctggcctga tcaccatctg 960
cctgctgggc tacctgctgt ctgctgaatg tacaggttg tttcctttt tataatacat 1020
tgagtatgct tgccttttag atatagaaat atctgattct gtettettca ctaaattttg 1080
attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccaggg ttggtaaagta 1140
ctggttcttt gttagctagg ttttctctt cttcactttt aaaactaaat agatggacaa 1200
tgcttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcatgtaatt 1260
cctgttaaaa aacagtcatc tccttggtt aaaaaatta aaagtgggaa acaaaagaaa 1320
tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta ccactttgaa 1380
atcaaattgg gaaacaaaag cacaacaggt ggccttattt acacaaaag tctgatttta 1440
agatatgtga caattcaagg tttcagaagt atgtaaggag gtgtgtctct aatttttta 1500
attatatatc ttcaatttaa agtttttagtt aaacataaa gattaacctt tcattagcaa 1560
cctcaatgag ctattttcaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggetca tttgagaact 1620
ttctttttca tccaaagtaa attcaaata gattagaaat ctgacctttt attactggaa 1680
ttctcttgac taaaagtaaa attgaatttt aattctctaa tctccatgtg tatacagtac 1740
tgtgggaaca tcacagattt tggetccatg ccctaaagag aaattggctt tcagattatt 1800
tggtatataa acaaagactt tcttaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg 1860
ctaaaactaa agaattatc ttttacattt cagttttct tgatcatgaa aatgccaaca 1920
aaattctgaa tagaccaaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga 1980
atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgttg 2040
aaaatacaga gagaacaact gaattttgga agcagtatgt ggatggtgat caatgtgaga 2100
gcaatccctg cttgaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttgg 2160

```

gtccctttgg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg 2220  
 gcaggtgtga gcaattttgc aagaattctg ctgataacaa agtgggtctgt agctgcactg 2280  
 agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcct tttccctgtg 2340  
 ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc tttcctgatg 2400  
 tagattatgt gaatagcact gaggtgaga caatccttga caatatcact cagagcacac 2460  
 agagcttcaa tgacttcacc aggggtgtag gaggggagga tgccaagcct gggcagttcc 2520  
 cctggcaggt agtgctcaat ggaaaagtgg atgccttttg tggaggttca attgtaaattg 2580  
 agaagtggat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtggtgg 2640  
 ctggagagca caatattgag gaaactgagc aactgagca gaagaggaat gtgatcagga 2700  
 ttatcccca ccacaactac aatgtctgta tcaacaagta caacctgac attgccctcc 2760  
 tggaactgga tgaaccctg gtcttgaaca gctatgtgac acccatctgt attgctgata 2820  
 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg 2880  
 tgttccataa aggcaggtct gccttggtat tgcagtattt gagggtgcct ctggtggata 2940  
 gagcaacctg cttgctgagc accaagtta caatctaca caatatgttc tgtgcaggt 3000  
 tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattctgg gggtecccat gtgactgagg 3060  
 tggagggaac cagcttctg actgggatta tcagctgggg tgaggagtgt gctatgaagg 3120  
 gaaagtatgg gatctacaca aaagtatcca gatatgtgaa ctggattaag gagaaaacca 3180  
 agctgacttg atgaaagatg gattccaag gttattcat tggaaattgaa aattaacaga 3240  
 gatctagagc tgaattctg cagccagggg gatcagcctc tactgtgcct tctagttgcc 3300  
 agccatctgt tgtttgccc tccccttgc cttccttgac cctggaaggt gccactceca 3360  
 ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcacattg tctgagtagg tgtcattcta 3420  
 ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc 3480  
 atgctgggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga 3540  
 gatccactag ggccgcagga acccctagt atggagttgg ccaactcctc tctgcgcgct 3600  
 cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccagc gcccgggctt tgcccggcg 3660  
 gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagctgc ctgcaggggc ccatgggcag atgcaccacc 3720  
 tgtctcagtg caaagccctg cctaagtagg ctggtcataa gacctgtgt ctggctgtaa 3780  
 ctccaattga ttgtcagcat caataaaact tggccaacac tgttatatac tggattgat 3840  
 agttacaact gaacatattt gttaagcaa ttggaattaa gaattccat gcaatgatat 3900  
 caggtcctt ctctctggt tagtgtattg ggggaaatt ggacatctct cagctcagta 3960  
 ggctagttag gccaggatgg atgacatcca cageccctgg gcagagagat tatgatgtag 4020  
 ctagtctgac tctgacaaa gacttgettc ctggagcttc tactacttcc tgggtggatgg 4080  
 ctaagaaata tggttgtgtt ctttaagtc tgaagagcat tatttttggc aaccctgac 4140  
 caaacatcct tgccaaggaa aaggcctaaa atatatttgc atttaaagat attacaaact 4200  
 acttggtttt ggaatgtttg gccttcagg atcatagcta tcaaatatt agctatttgg 4260  
 ggtatgagat gtctgcttgg tcaaggacaa gttcttaaag acatcatgtt ggggaataat 4320  
 ggggaaaatg ggaaggctta tgetctgagt aagacatctg agttatcatc tgtcaaacat 4380  
 ttttgtagt catagtctaa tgggagcctg ttttccctct ttaatataca ttcacatctg 4440  
 aatttatgct cttcattgac aatgccagcc cagaacaaca gctcttacc tttggttttc 4500

ttcctaacct ttaactccaa tgaaccatt acctgccatt tcagtaaac cattattctc 4560  
cctacttacc cacccaagtt gtacaataaa gagtgtttgc tctcactcat atacaaagca 4620  
aattcatttg tttgtgatgt acagcttgct atgccacag atgtggtttg cctagtcctt 4680  
tgctctaggt catttgactg ggaacagatg ggatgctcac tttggttttt aatggttaac 4740  
tagtcattga aatgcatttc atcaaataat cttagaggat aattgtttaa atgtctgtcc 4800  
agactagctt tntagagcca ggtgccatta cacatgctac cttcttattt ctcttaattg 4860  
aatttttatc atctgagata ggaataatag agggcttttt caagtgaaga tattactata 4920  
gtctaaagac cttagtgtaa catcctggcc ctaaggaaa aacaagttct ggttcataca 4980  
tataataact ttgcatgtta tctgccactg agatgtgtcc taatccaaca gaaaggattg 5040  
aatctctgta gctaggtgta cagggcaaga gctgtacagg gaacctttaa agatagcttc 5100  
aggccaaagc tgaggaaaagt ggatggagac tggggaaaat gctaagacat tttaaagatt 5160  
ttcttttagt caaaaaataga ataagaaata gaccatttec ctggacattt tctgtaggtt 5220  
aatactgtta actattggta aatgcatatg ctacaactta atatgtctgc tttgtgagtt 5280  
tagcattgtc tccttgcac tccagaaatg aaatggcaaa tacatttaa tcagaactaa 5340  
aaaggggaac aggtataaaa ggetcaattt agtcaatca tttcccttc taccacacc 5400  
cctttaaac agatgtttgc caatgcatta acaatgcaga tgtttctga aagaaagttt 5460  
agtaactcaa gcagacacct tttttcttt tcaagcagaa aagactatga gatggtggtt 5520  
gtggttggtc tgggagggag aagataaaa tgataacat tatttcaaat catttcatga 5580  
cctcactgca cacttatagt tattgtacct gttgtctttt tgctgtcaag cctagctaag 5640  
atcatttggga atgttcaaga tcaactacac atgcatgtgc acacatacac atgcacatat 5700  
gttcaactcc tatttcatcc acatgaacta agattactga tgtgtacaga ttcaaagcac 5760  
ttttattctt ttcaaaggc aagaagctga gctactttec agaatagttg tgaagaccc 5820  
tgtcactact ctgcattggt tctccacac cacctccatc cagttcetta tgaatggtta 5880  
ctggttttca aaaatatgag ataaattgag tgtataaaag tcatttttag acaaaatgaa 5940  
acaggaaatg aaagaaacca gaatctctcc tcatttgtgg atgggccagc tccacatgt 6000  
catggttaat ctgcagggag gaaatactag atttgattgc agatcagact gcagcaaacc 6060  
tgctgtgact aaggcatcaa gagaaagcaa gcaacagctg gggcttcagt ggtgaaaaca 6120  
ttatatactc agctttgaaa tatgaaatac tgtttagcag tgtcacctag aaaagagtgt 6180  
ttcaaaatgc tgatgcttca taagaacctt tctcttcaga gttgtttctt ttatctttca 6240  
aattagccag ggtgggaaat aaagtgatca cttggtgaag aatctcaca aagaagaaca 6300  
tagagagttc actttcatct ggagtaatga acagattgaa caaactagaa atggttagtc 6360  
tgttaaagaa aagggttagg tgagctgttt gcaagagcca caagggaaag gggaagacaa 6420  
cttctttgtg gacttaaggg tgaagttgc aagcaggcaa gaccattctg acctcatta 6480  
agaaaaccct ttccaaccaa caaccactgg gttggttact caggttgggc agcattggga 6540  
gcaaatgttg attgaacaaa tgtttgtcag aattgttgac ttaaagagct gttctgtcac 6600  
tggggacagc agcagctaga tagcccatc cagggagagg gcatttgttc acctggccag 6660  
agatcagagc aggctaaggg actgctggga tctgtccag ctttgagacc ctacagagcc 6720  
atgttcacct agcaggtatc ccttctgagg tcaactctat ttcttacctt attccagggc 6780  
tttcaacctc gcttgccagg ctggagccaa gggccaaggc agcctcact tgttgctat 6840

ggtagcttcc caggagcccc ctatggttca ggaacagctc tgccctgcccc atcctgtttg 6900  
 ctacctccta aagccaaagg cactgggtggg ccaggccagc ttctaaagtc acacaaggtt 6960  
 agaaggttcc tgacaggaag ggcttgaggc caatggaagg aggtacttca gtttccctcc 7020  
 agatgcccag tgatgggctc agagctcctt gagaacttgg gaaaggaagc agggctctctg 7080  
 aagaaatact tcaggagtag aaagaggaag ctagagggtt aatgcacta cacaggaaca 7140  
 gaaatgagtt tttcttagag ttagtatatg tctagagggtg tagtaaacta aaacaagtct 7200  
 tgaattgcat acagccactt agggaagaaa tgaaaacctt tgaatattag tgaaaaaagg 7260  
 gaaactgcaa cccctgtatt actagatagc tttcatcaac agctcaaac agacagattt 7320  
 ttataggttt actgtgtgca ctttaataca agggcagtggtt tcagaacta gtcaggtcct 7380  
 gaaaaggatt taccaaatgt tgagtgtgcc ctctagtgtt cacacttccc agctttcttc 7440  
 ctataaagggt ggatcaagge acttgettac aactggaact gaaatcctcc aagtgggaact 7500  
 agacattgag atggagaaaa tattcattgt ccaactgtaat tatgcaagga atatccagtt 7560  
 gagataatgg acttgccctc tatctaataa taccagget caatgggtca ctgctttgtc 7620  
 cactttgccc aaaattcaag cacagetaag ttgatatttt aggacaaagg cagcttacta 7680  
 tcagccaga ggggagtaga atatggttaa gagagagtgg aaagaatgaa tgagccctgc 7740  
 tattcctcac tgccctgatg gctataagca cagcccttat ggaggcctta ggtcttgctt 7800  
 cataatattc cagtttgaag agggtttgaa aagacctcct agaaaaatca gtagtttttc 7860  
 tcttttgagt aacatgtagc aaaaaaatt tcatcatgta ggtacaggga acaccctaat 7920  
 aactattaat ctcaaggagt caagccagtg tgtttcctaa tgtatctgct gtatcccat 7980  
 gaagcaaatt ttgcatcag agaaactgac tcatggggaa aaaatccaag gacctcaaat 8040  
 caccaaaaga agccattcct cagatttgcc taagettaag ctccctgtc tctcattgtg 8100  
 tgttgcttcc aatgcagtta cataaatggc ttttttgttt atgcacaaa aacactaatt 8160  
 catctgcaaa gctataggtc aaagcaacca tagtatgcac cctgctagct ggcgcatata 8220  
 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccttagcgc 8280  
 ccgctccttt cgctttcttc ccttccttc tcgccagtt cgccggcttt ccccgtaag 8340  
 ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca 8400  
 aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 8460  
 gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa 8520  
 cactcaactc tatctcgggc tattcttttg atttagacct gcaggcatgc aagcttgga 8580  
 ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaacctg gcgttacca acttaatcgc 8640  
 cttgcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc 8700  
 ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgcgatt tattcaacaa agccgcctgc 8760  
 ccgtcaagtc agcgtaatgc tctgccagtg ttacaacca ttaaccaatt ctgattagaa 8820  
 aaactcatcg agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata 8880  
 tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat 8940  
 ggcaagatcc tggatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa 9000  
 tttcccctcg tcaaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc 9060  
 cggtgagaat ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt 9120  
 acgctcgtca tcaaaaatcac tcgcatcaac caaacctta ttcattcgtg attgcgctg 9180

agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa 9240  
 ccggcgcagg aacactgcc aacactgcc aatattttca cctgaatcag gatattcttc 9300  
 taatacctgg aatgctgttt tcccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg 9360  
 agtacggata aatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct 9420  
 gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc 9480  
 tggcgcacat ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc 9540  
 gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcttcga 9600  
 gcaagacggt tcccgttga tatggetcat aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc 9660  
 agacagtttt attgttcatt atgatatatt tttatcttgg gcaatgtaac atcagagatt 9720  
 ttgagacaca acgtggcttt gttgaataaa tcgaaacttt gctgagttga aggatcagat 9780  
 cacgcatctt cccgacaacg cagaccgttc cgtggcaaac caaaagtcca aaatcaccia 9840  
 ctggtccacc tacaacaaag ctctcatcaa ccgtggetec ctcaactttct ggctggatga 9900  
 tggggcgatt caggcctggt atgagtcagc aacacettct tcacgagga gacctctcga 9960  
 cggagttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcett 10020  
 tttttctgcg cgtaatctgc tgettgc aaaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 10080  
 gtttgccgga tcaagageta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 10140  
 agatacaaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 10200  
 tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tctgttacc agtggtgct gccagtggcg 10260  
 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg 10320  
 cgggctgaac ggggggttcg tgcaacacgc ccagcttga gcaacgacc tacaccgaac 10380  
 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaagg agaaaggcgg 10440  
 acaggtatcc ggtaagcggc aggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg 10500  
 gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcgg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 10560  
 ttttgtgatg ctctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 10620  
 tacggttctt ggcttttgc tggccttttgc ctacatgt 10659

<210> 27

<211> 601

<212> PRT

<213> 腺相关病毒 (Adeno-associated Virus)

<400> 27

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys  
                   20                    25                    30  
 Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro  
                   50                    55                    60  
 Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu



65					70					75					80
Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser
					85					90					95
Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala
					100					105					110
Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Gly	Thr
					115					120					125
Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Asp	Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro
					130					135					140
Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg
					145					150					155
Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg
					165					170					175
Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn
					180					185					190
Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Val
					195					200					205
Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His
					210					215					220
Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln
					225					230					235
Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser
					245					250					255
Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly
					260					265					270
Asn	Asn	Phe	Glu	Phe	Ser	Tyr	Asn	Phe	Glu	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser
					275					280					285
Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile
					290					295					300
Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Arg	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr
					305					310					315
Ala	Gly	Thr	Gln	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Asn	Asn	Met
					325					330					335
Ser	Ala	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro	Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln
					340					345					350
Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Leu	Ser	Gln	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp
					355					360					365
Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn
					370					375					380

Pro Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe			
385	390	395	400
Pro Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp			
	405	410	415
Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys			
	420	425	430
Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn			
	435	440	445
Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln			
	450	455	460
Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln			
465	470	475	480
Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro			
	485	490	495
Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile			
	500	505	510
Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn			
	515	520	525
Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val			
	530	535	540
Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp			
545	550	555	560
Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val			
	565	570	575
Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile			
	580	585	590
Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu			
	595	600	

Rh74 VP1 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAA  
 DAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVK  
 TAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPAGPSGLSGTMAAGGG  
 APMADNNEGADGVGSSSGNWHCSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYS  
 TPWGYDFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEY  
 QLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVFP  
 HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVST  
 TLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVML  
 TSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFH  
 PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTS  
 NYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

图1

Rh74 VP2 氨基酸 (SEQ ID NO:2):

TAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPAGPSGLSGTMAAGGG  
 APMADNNEGADGVGSSSGNWHCSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYS  
 TPWGYDFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEY  
 QLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVFP  
 HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVST  
 TLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVML  
 TSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFH  
 PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTS  
 NYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

图2

Rh74 VP3 氨基酸 (SEQ ID NO:3):

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND  
 NTYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQ  
 VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSY  
 NFEDVFP HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCY  
 RQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNV  
 DYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLGQPIWAKIP  
 HTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN  
 PEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

图3

4-1 变体 VP1 衣壳氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLD  
61 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ  
121 AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDS  
181 ESVPDPQPIGEPPAA<sup>A</sup>PSG<sup>V</sup>GP<sup>N</sup>TMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV  
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQ  
301 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA  
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFED  
421 VPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW  
481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMATHKDDEERFFPSS  
541 GVLMEFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS  
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP  
661 PTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE  
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

4-1 变体 VP2 衣壳氨基酸序列 (SEQ ID NO:27)

TAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSSESVDPDPQPIGEPPAA<sup>A</sup>PSG<sup>V</sup>GP<sup>N</sup>T  
MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTS  
GGSTNDNTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEG  
TKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL  
EYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLF  
SQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMAT  
HKDDEERFFPSSGVLMEFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAP  
IVGAVNSQALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP  
TFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPI  
GTRYLTRNL

4-1 变体 VP3 衣壳氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTS  
GGSTNDNTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEG  
TKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL  
EYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLF  
SQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMAT  
HKDDEERFFPSSGVLMEFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAP  
IVGAVNSQALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP  
TFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPI  
GTRYLTRNL

图4

15-1 变体 VP1 衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:5)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQRQDNGRGLVLPGYRYLGPFNGLD  
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFSGGNLGRAVFQ  
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQOPARKRLNFGQTGDS  
 181 ESVPDPQPIGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV  
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDPWQ  
 301 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA  
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFEFSYNFED  
 421 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW  
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHRDDEERFFPSS  
 541 GVLMFGRQAGRDNDYSSVMLTSEEEIRTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS  
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP  
 661 PTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE  
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

图5

15-2 变体 VP1 衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:6)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFNGLD  
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADADEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ  
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGI GKRQOPARK RLNFGQTGDS  
 181 ESVPDPQPIGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV  
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYDFNRF HCHFSRDPWQ  
 301 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA  
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED  
 421 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW  
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHR DDEERFFPSS  
 541 GVLMFGRQAGRDNDYSSVMLTSEEEIRTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS  
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP  
 661 PTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE  
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

图6

15-3/15-5 变体 VP1 衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:7)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKPGAPKPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFNGLD  
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADADEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ  
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGI GKRQOPAKK RLNFGQTGDS  
 181 ESVPDPQPIGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV  
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYDFNRF HCHFSRDPWQ  
 301 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA  
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED  
 421 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW  
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHR DDEERFFPSS  
 541 GVLMFGRQAGRDNDYSSVMLTSEEEIRTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS  
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP  
 661 PTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE  
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

图7

15-4 变体 VP1 衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:8)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAP KPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFNGLD  
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAYDQQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ  
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKRGOQPAKK RLNFGQTGDS  
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV  
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ  
 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNE GTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA  
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED  
 421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW  
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS  
 541 GVLMFGKQGAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRT TNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS  
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTPVPADP  
 661 PTTFNQARLASFITQYSTGQVSVEIEWELQ KENSKRWNP E IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE  
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

图8

15-6 变体 VP1 衣壳氨基酸序列(SEQ ID NO:9)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQRQDNNGRGLVLPGY RYLGPFNGLD  
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAYDQQLQAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSF GGNLGRAVFQ  
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGOQPAKK RLNFGQTGDS  
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWH CDSTWLGDRV  
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRF HCHFSPRDWQ  
 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLTSTIQVFTDSE YQLPYVLGSA  
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFEFSYNFED  
 421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGP NNMSAQAKNW  
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS  
 541 GVLMFGRQAGAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYGVVADNLQQQN AAPIVGAVNS  
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQIL IKNTPVPADP  
 661 PTTFNQARLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKS TNVDFAVNTE  
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

图9

FIX39 核酸序列(SEQ ID NO:10)

ATGCAGAGGGTGAACATGATCATGGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCTGCCTGCTGGGCTACCT  
 GCTGTCTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCAACAATACTGAATAGACCAAAGAG  
 GTATAACTCTGGCAAGCTTGAAGAGTTTGTACAGGGGAATCTGGAGAGAGAGTGTATGGAAGAGAAGT  
 GCAGCTTTGAGGAAGCCAGAGAAGTGTGAAAATACAGAGAGAACAACCTGAATTTTGGAAAGCAGTAT  
 GTGGATGGTGATCAATGTGAGAGCAATCCCTGCTTGAATGGGGGGAGCTGTAAAGATGATATCAACAG  
 CTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAGGGGAAAAACTGTGAGCTTGTGTGACCTGTAATATCAA  
 GAATGGCAGGTGTGAGCAATTTTGAAGAATTCTGCTGATAACAAAGTGGTCTGTAGCTGCACTGAGG  
 GATATAGGCTGGCTGAAAACAGAGAGCTGTGAACCTGCAGTGCCTTTCCCTGTGGGAGAGTGTCT  
 GTGAGCCAAACCAGCAAGCTGACTAGGGCTGAAGCAGTCTTCCCTGATGTAGATTATGTGAATAGCAC  
 TGAGGCTGAGACAATCCTTGACAATATCACTCAGAGCACACAGAGCTTCAATGACTTCACCAGGGTGG  
 TAGGAGGGGAGGATGCCAAGCCTGGGCAGTTCCCCTGGCAGGTAGTGCTCAATGGAAAAGTGGATGCC  
 TTTGTGGAGGTTCAATTGAAAATGAGAAGTGGATTGTGACTGCAGCCCCTGTGTGGAACTGGAGTC  
 AAGATTACTGTGGTGGCTGGAGAGCACAATATTGAGGAACTGAGCACACTGAGCAGAAGAGGAATG  
 TGATCAGGATTATCCCCACCACAACATAATGCTGCTATCAACAAGTACAACCATGACATTGCCCTCC  
 TGGAACTGGATGAACCCCTGGTCTTGAACAGCTATGTGACACCCATCTGTATTGCTGATAAAGAGTACA  
 CCAACATCTTCTGAAATTTGGGTCTGGATATGTGTCTGGCTGGGGCAGGGTGTCCATAAAGGCAGGT  
 CTGCCCTGGTATTGCAGTATTTGAGGGTGCCTCTGGTGGATAGAGCAACCTGCTTGTGAGCACCAAGT  
 TTACAATCTACAACAATATGTTCTGTGCAGGGTTCCATGAAGGTGGTAGAGACAGCTGCCAGGGAGAT  
 TCTGGGGGTCCCCTATGTGACTGAGGTGGAGGGAACCAGCTTCCCTGACTGGGATTATCAGCTGGGGTGA  
 GGAGTGTGCTATGAAGGGAAAGTATGGGATCTACACAAAAGTATCCAGATATGTGAACTGGATTAAGG  
 AGAAAACCAAGCTGACTTGA

图10

FIX19 核酸序列(SEQ ID NO:11)

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCCGAGAGCCCTGGCCTGATTACCATCTGCCTGTTAGGATATCTA  
 CTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAATACTGAACCGGCCAAGCGG  
 TACAACCTCAGGCAAGCTGGAAGAGTTCGTGCAGGGCAACCTGGAACGGGAGTGCATGGAAGAGAAGT  
 GCAGCTTCGAGGAAGCCCGGGAGGTGTTTCGAGAACACCCGAGCGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTA  
 CGTGGACGGCGACCAGTGCAGTCAAACCCCTGCCTGAACGGCGGCAGCTGCAAGGACGATATCAACA  
 GCTACGAGTGTGGTGGCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAAGTGCAGCTGGACGTGACCTGCAACATC  
 AAGAACGGCCGCTGCGAGCAGTTCGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGGTGGTGTGCTCATGCACTGA  
 GGGCTACCGGCTGGCCGAGAACCAGAAGAGCTGCGAGCCCGCCGTGCCCTTCCCCTGCGGCAGAGTGT  
 CCGTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGGGCCGAGGCCGTGTTCCCTGACGTGGACTACGTGAACTCA  
 ACCGAGGCCGAGACAATCCTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCCCTCAACGACTTCACCCGGGT  
 GGTGGGCGGCGAGGACGCCAAGCCCGGCCAGTTCCCTTGGCAGGTGGTGTGTAACGGCAAGGTGGAC  
 GCCTTCTGCGGCGGCTCAATCGTGAACGAGAAGTGGATCGTGACAGCCGCCACTGCGTGGAGACAGG  
 CGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGCGAACACAATATCGAGGAAACCGAGCACACCGAGCAGAAACGG  
 AACGTGATCCGATTATCCCCACCACAACATAACGCGCCATCAACAAGTACAACCACGATATCGC  
 CCTGCTGGAACCTGGACGAGCCTCTGGTGTGAAATCATAAGTACGACCCCATCTGTATCGCCGACAAAGA  
 GTACACCAACATCTTTCTGAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGTCCGGCTGGGGCAGGGTGTCCACAAGG  
 GCCGACGCGCCCTGGTGTGCAAGTACCTGCGGGTGCCTTGGTGGACAGAGCCACCTGCCTGCGGTCA  
 ACCAAGTTCACCATCTACAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCGGCAGGGACAGCTGCCA  
 GGGCGACAGCGGCGGACCCACGTGACCGAGGTGGAGGGCACCAGCTTTCTGACCGGCATCATCTCAT  
 GGGGCGAGGAATGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGAATCTACACTAAGGTGTCAAGATACGTGAACTG  
 GATCAAAGAGAAAACCAAGCTGACCTGA

图11

pAAV-ApoE hAAT-FIX39 (SEQ ID NO:12)

```

LOCUS          FIX39                      11125 bp    DNA     circular DNA
DEFINITION     AKA FIX39 Step 4.
ACCESSION     urn:local:...e-3um3omk
VERSION       urn:local:...e-3um3omk
KEYWORDS
SOURCE
ORGANISM
FEATURES             Location/Qualifiers
     repeat_region   1..141
                     /Imported_from="<a
                     href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper">PlasMapper</a>"
                     /Transferred_From="LAAV-2 ITR"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /modified_by="User"
                     /label="AAV2 ITR"
     enhancer        152..472
                     /created_by="User"
                     /modified_by="User"
                     /Transferred_From="ApoE HCR-1"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /label="ApoE HCR-1"
     promoter        482..878
                     /vntifkey=21
                     /ApEinfo_fwdcolor="#ffff00"
                     /ApEinfo_revcolor="#0080ff"
                     /Transferred_From="hAAT Promoter"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /modified_by="User"
                     /label="hAAT Promoter"
     5'UTR           879..907
                     /created_by="User"
                     /label="FIX 5'UTR"
     CDS             order(908..995,2434..3731)
                     /created_by="User"
                     /Transferred_From="hFIX CDS"
                     /Transferred_Similarity="79.22%"
                     /modified_by="User"
                     /label="hFIX CDS"
     intron          396..2433
                     /created_by="User"
                     /Transferred_From="hFIX Intron"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /modified_by="User"
                     /label="hFIX Intron"
     3'UTR           3732..3779
                     /created_by="User"
                     /label="hFS 3' UTR"
     Terminator      3820..4047
                     /Imported_from="<a
                     href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper">PlasMapper</a>"
                     /Transferred_From="bGH_PA term"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /label="bGH_PA term"
     repeat_region   complement(4897..4204)
                     /modified_by="User"
                     /label="AAV2 ITR"
     misc_feature    4219..8579
                     /modified_by="User"
                     /label="Lambda Stuffer"
     Gene            complement(8491..8580)
                     /Imported_from="<a
                     href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper">PlasMapper</a>"
                     /Transferred_From="cosN"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /label="cosN"
     rep_origin      8680..6986
                     /modified_by="User"
                     /label="FI Ori"

```

图12A



```

misc._marker 9284..10096
                /modified_by="User"
                /label="Kan R"
rep_origin     complement(10453..11120)
                /modified_by="User"
                /label="pUC Ori"

ORIGIN
1   cctgcaggca gctgagcgtt cgtctgctca ctgaggccgc cggggcaaaq ccgggycgtc
41  gggcgacctt cgytgcgccg gcctcagtgq gggagccgag cggccagagag gtagtggcca
121 actccatcac taggggttcc tggggcctag taggctcaga ggcacacagg agtcttcggg
181 ctccacctgc cccctcccaa cccctcagtt cccatcctcc agcagctggtt tgtgtgctgc
241 ctctgagagt cccactgaac aaactccagc cccactcagt cccctaaatg ggcacacatt
301 gcaagcagca aacagcaaac acacagcctc cccctgctgc tgccttga gctgggagag
361 eggctagaga cctctctggg cccatgccc ccccaaccat cactcgaccc ctctggaattt
421 cggctggagag gagcagaggt tgtctctggc tggcttaggt agtctgagag ggttaccctg
481 ggatcttgcg accagtgga cagccactaa ggtctctgca gtgagcag gggccactc
541 aagtggtact ctcccagaga ctgtctgact caagccaccc cctccacctt ggcaccagga
601 cgtctgtggt tctgagccag gtacaaatgac tcccttcggg aagtgcagtg gaagctgtac
661 actgcccagg caaagcgttc gggccagcgt gggccggcag ccagatcca gccagtgagc
721 cttagccctg cttgtctctc cgtactactg ggtgaccttg gttaatattc cccagcagcc
781 tcccctggtt cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg cccctgtctc
841 tccgcttcag gcccaccacc tgcactggga cagtgcatac cactttcaca atctgtctgc
901 aaaggttatg cagaggggtg acatgactat ggtctgagag cctggcctga tccacctctg
961 cctgctgggc tacctgctgt ctgctgcaatg tacaggtttg tttcctcttt tctaatctat
1021 tggatctgct tgcctttttg atatagaaat atctgattct gctctctca ctaaatcttg
1081 attacatgat ttgcagcaca tattgagagg tctaacagcc agcacccagg ttggtaagta
1141 ctggtctctt gttagctagg tttctctctt cttcactttt aaactcaaat agatggacaa
1201 tgcctatgat gcaataaggt tteataaaca ctggtcagtt cagtatttgk kcatgtaat
1261 aaacatctta acagctcttc tccctgggtt aaaaaaatta aaagtgggaa accaaagaaa
1321 tagcagcaata tagctgaaaa aaataaccac agtatctttg tttggactta ccaacttgaa
1381 atcaaatggg gaacaaaaag cacaaccagt ggccttattt acacaaaagv tctgatctta
1441 agtatatgta caattccagg tttccagcag atgtaaggag gtgtgtctct aatttttaa
1501 attatataat tcaaatctaa agttctagtt aaaaataaaa gattaacctt tcatctatc
1561 gctgtctagt atcaccaaag ctttctatgg attagaaaaa aatcattttg tctctatctc
1621 aaacatcttg gctgtgatct ttgggcaaac acatctctca gttgagcttc ctaggggaga
1681 aaagcaagct taagaaatga cacaagaggt aggaagttag ctattgcaac atatatcact
1741 ttgtcttttc scaaatcagc tgcacttatt ttttcccag aggaaggcct acagggagaa
1801 aatctatcca ttctgacaaa cagcctgttc tccagctaaq cactctatct acttctgt
1861 caactttctc gaatcaaatc tagtactgta cagtaccagv atcaggggtg caaacctaa
1921 gcaccccccg aaagctgact gggccctgtg tccccactcc agacatctat tgcagctgta
1981 aatccacctc cctggaccat aattlagcct ctgctctca ggcagcaatt gttcaagctc
2041 atttgggcaa ccatattctg aaaaacagcc agccagggty atggatcact ctgcacagat
2101 cctcaatgag ctatcttcaa gtgatgacaa agtctgaagt taagggpcca tttgagaaat
2161 tctctttca tccaaagtaa atctaaatat gattagaaat ctgacctttt attactgaa
2221 tctctctgac taaaagtaaa attgaatttt aattctaaa tctccatgtg tctacagtc
2281 tgtgggaaac tccacagatt tggctccatg ccccaagagv aatttggctt tccagctatt
2341 tggtaaaaa ccaaaagact tcttaagaga tgtaaaattt tcatgattt tctcttttg
2401 ctcaaaactaa agaattcttc tttcaatttt cagttttctc tgcactgaa eatgccaaac
2461 aatctctgaa tagaccaaag aggtataact ctggcagctc tgaagagttt gtaccagggg
2521 atctggagag agagtgtatg gaagagaggt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg
2581 aaactacaga gagaacacat gaactttgga agcagctatgt ggtgtgtgga caatgtgga
2641 gcaactcctg ctctgaaatgg gggagctgta aagatgatac caacagctat gaatgtctgt
2701 gtcctcttgg attttagggg aaaaactctg agcttctatg gacctgtaat atcaagaatg
2761 gcaggtgtga gcaattctg aaaaactctg ctgatacaaa agtggctctg agctgactg
2821 agggatateg gctggtgaa aaccagagaa gctgtgaacc tgcagctcct tttccctgtg
2881 ggagagtggt tgtgagccaa cccagcaagc tgcactgggc tgaagcagtc tttccctgatg
2941 tagatctatg gaatagcact gaggctgaga caatccttga caatctact cagagccac
3001 agagcttcaa tgcactcaac agggctgttag gaggggagaa tgcacagcct gggcagctcc
3061 cctggcaggt agtgcctaat ggaaaaagtg atgcttttg tggaggttca attgtaatg
3121 aqaagtggat tgtgactgca gcccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtggtg
3181 ctggagagca caatattgag gaaactgagc acactgagca gaagaggaat gtgatcagga
3241 ctatccccca ccaaacctac aatgctgcta tcaacaagta caaccatgac attgcccctc
3301 tggaaactgga tgaacccctg gtcttgaaca gctatgtgac accatctgt attgctgata
3361 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctgata tgtgtctgpc tggggccggg
3421 tgttccataa aggcaggtct gccctggtat tgcagtttt gagggtgctc ctggtggata
3481 gagcaacctg cttgtctgag accaagttta caatctcaaa caatctgtc tgtgcccgtt
3541 tccatgagag tggtagagac agctgcccag gagatctctg ggtccccat gtgactgag
3601 tggagggaac cagcttctct actgggatta tccagctggg tgaagaggtg gntatgag
3661 gaaagtatgg gatctacaca aagctatcca gctatgtgaa ctggaattag gagaacca
3721 agctgacttg atgaaagatg gatttccaag gtaattctat tggaaatgaa aattaaaga
3781 gatctagagc tgaattctct cagccagggg gatcagcctc tactgtgctt tctagtctc
3841 agcactctgt tgtttgccc tccccttgc cttctctgac cctggaaggt gcaactcca
3901 ctgctcttct ctaataaaat gaggaaattg catcaatttg tctgagtagg tctcatctc
3961 tctctggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcagc
4021 atctctgggg tgcagtgggc tctatggctt ctgagccaga aagaaacagc tggggctgca
4081 gatccactag ggcgcagagg cccctagtg atggagttgg ccaactctct tctgagcct
4141 cgtctcctca ctgagccccc cgggctcttg cccggccggc ctaagtgagc gagcagagcc

```

图12A续

```

4261 ggaggtgccc ggacggggcag ctggaaggaa atactaagggc aaagggtactg caagtgctcg
4262 caacacttccc ttatcggggat tattgcnngta gtgcncngac gccggggggca agatgagagag
4321 attgdcocatg tacacggccgt ggngtbgata ttgccnaaac agagctctggg gggagagcttg
4361 tcgggaaaga gtgnggaaga tgcnaaggcg tcggcttattc aaggatggcca gnaagngcag
4441 catatcggcgc tgtgacgatg gtaatcccaa acctacccca acccaactggg tcacgctactg
4501 ttaagccgct gtactgagcct ctgggtggctg aatgncacaa agagagactca atogncagaca
4561 acacttttcaa tgcgggtcaca cgttagcagc atgatggcca cggatggca catatcaacg
4621 gcatgatatt gacttattga atasaattgg gfaaatttga ctcaacgatg ggttaattog
4661 ctggctgtgg tagtgagatg aaaaagggcg actccaacca tcgatccgc ccgatccgc
4741 acttcgacgt atcgtctgga actccaacca tcgcaaggcag aggggtctgc aaaaatgcaat
4801 ccggaaacag ttccggggta atagttagag cctgcataac ggtttcggga ttttttatat
4861 ctgcnaacca ggttaagagca ttgagtcgat aatcgtgaag agtcggngag cctggttagc
4921 cagtgctctt tcogtctgag tgaactaaag gaatccggga agcagaaacc gatcaacaaa
4981 tgcgtacagc cgtcctggcc gccacgcaac agcaacaacc aaaaatgagcc gtagccactg
5041 tctgtcctga actcacttag eatagttacg ctcggggcctc ttaacatga ccttctgtaa
5101 agcgggtggc aggaagctgc gctaaacaacc tctctcogtt ttgcnngtg atctoggtca
5161 ogaaacaaatc tggatctacta acacagtagc ctggatttct tctatnagta atcgactta
5221 ttctcaattt aatagagcaa atcccttatt tgggggttaag acatgaagat gccagaaaaa
5281 catgaactgt tggccgctat cctcgggca agggcaaacg goatcggggc eatctctgg
5341 tttycaatgg cgtacctctg cggcagatct aatggcgggtg cgtttacaaa aacnagtaatc
5401 gacgcaacga tgtgcccctt tatcgcctag ttcatctgct accctctcga cctcggcggg
5461 ctaagtagca atctcgtctt talacagagc gttgtttatg gctacatcgg gctatctog
5521 attggttccc ttacnaaag cttcogctgt aaaaaagccg gagttagaaga tggtagaaat
5581 caatcaatca cgtcaaggct tccctcgatc gctggngtgg tcggagggga ctggtaacgg
5641 acgtcagaaa accagaaatc atgggtatga cgtcattgta gggcggagagc taktactga
5701 ttactccgat caacctcgca aacttgtcac gctaaacca aacctcaaat caacagggcc
5761 cggacgctac cagctctctt cccgtctggtg ggtgcttac cgtcaagpac cgtggcctgaa
5821 agactctctc ccgaaagctc aggcctggc ggcattgacg cagatcaagg agcgtggcgc
5881 tttaactatg attgatcgtg gttgatctcg tcaggcaatc gaccgttgca gcaatctctg
5941 ggcctcaactg ccggggcctg gttatggctc gttcagcaat aaggctgaca gctcaattgc
6001 aaaaatcaaa gaagcggggg gaacggtcag agagattgat gtatgagcag agtcaacggc
6061 atactctcgg ctctggttat ctgcatctc gctcggctgt cctgggctgt taatcaatc
6121 cgtgatcaag ccattaccta caaagccccg ccgcaaaaa atgcccagga actgagctg
6181 gcgaaacggg caatcaactg catgnagatg cgtcagcctg atgttctgct gctogaagca
6241 aeatcacacga aggagttagc tgatgctaaa gctgaaatg atgctctgog tgatgctgtt
6301 gccgctgggtc gtcgtcgggtc gcaatcaaaa gcagtctgtc agtcactgog tgaagctacc
6361 accgctcccg gccgtggata tgcagcctcc ccccgactgg ccagacccgc tcgaacgggt
6421 tatlccccc cccgagagca ctgcatcaat atgcaaaaa aactggaggy aacccagag
6481 tatattcaatg agcagctgag atagagttgc ccaatctgat gggcaactca tgcnaatatt
6541 gtcgnaata caacccgctc tccagcggag tatcaatgct taagtaata aacccagaca
6601 atccatttac gaatgttttg tgggtctctg ttttaacac atttctctgc ccgcaaaaa
6661 ttttggctgc atgacagctt ttctctctgc caattccaga aacgaaagaa tgatgggtga
6721 tgggttccct tgggtgctact gctgcccgtt tgttttgaac agtcaacgtc tgttagcac
6781 atcttgtaat aagcagggcc agccagtagc agagtagcat tttttctatg tggttatctc
6841 cgtatctttt tgaagctcgc agaatctgtc gttgtagaaa ctcaacaaac ctaaaccaat
6901 gagttagaat ttcaattgt taatatttat baatgtatgt caggtcgcgt gaatcgtcat
6961 atctctccg gatcaactc gtcacagccc ctgacgggga actctctctg gggagctctc
7021 gggcaataatc aaaaacgatc acacagggtt tagcgcctac aogtattgna tctatgcaac
7081 gccccgggtg tgacacggga gaaaacggac gttatgattt agcctgggaaa gatttctgta
7141 gttctctgaa tgcctcagat aaaaatgta ataatctca aggtatagta atactttta
7201 tgtctatgga tatttctaac caatcggaaa actctgctt tagcaagatt tctcctgtat
7261 tgcctgaaatg tgattctctc tgatttcaac ctatcatagg aogttctat aagatcgtg
7321 tttcttgaga atthaacatt tacaacottt ttaagctct ctatcaac ggtgtctc
7381 tttcttaaca cgatgtgact attatctgtg gctagatagc aaatataatg tgagacgttg
7441 tgcgctttta gttcagata aaacacttca cagtcaaat ctthctgcac ttgatcgaat
7501 atttctttta aatggcaac ctgagccatt ggtaaaaact tccatgtgat aogagggcgc
7561 gtagtttgc ttatcgtttt cctcgtttca atcggctctg acctcctgt gttttctga
7621 tgatttatgt caaatattag gaatgttttc acttaatagt attggttgcg taacaaagtg
7681 cggctcctgt ggcattctg agggcaaac acccgacaga tgtatgtaag gccaaactgc
7741 tcaaatcttc atacagaaag atttgaagta atatttcaac cgttagatga agagcaagcg
7801 catggagoga caaatgaa atagaaacat ctgctgatga tccctcgtg gatctgattc
7861 gtttaaaaa tatggttaac agcaacattt ctatgagta cctcgtgtt gtaattgcat
7921 gtatagaaca taaggtgtct cgggaagcat tcaagcnaat tgaagcagcg ttggtgaagc
7981 angataataa tatgaaggat battcctcgg tggttgactg atcacataa ctgctaatca
8041 tcaaacctat ctagtctgtg acagagccaa ccgncagctc gtcactgca ggaagttggt
8101 aaaaactgca ctcaattac gcaatgccct cgtaatcaag tgaaattaca atactgctc
8161 gttcgggggg aagaacggcg gatgttcaat ctctactact tthaattgat gttatgctc
8221 cctttctcga cgttagctcc cgaagcagg gttcaatca ctcaatgac ccaggctgag aatctcccg
8281 accctttttg ctcaagagcg atgtaattt gttcaatca tgggttagga tgggttagga aagcggatgt
8341 tgcgggttgt tgttctcggg gttctgttct cegttagaac gaggctgccc cgtactcagt
8401 gtcgctgatt tgtatgtct gaagttgttt tcaagttaaag ttgatgaga hcaatataa
8461 cgtacactgc gtcataattg attatctgac gttgtttgat ggcctcaac ggcctgctga
8521 tatgtagatg ataatcaata tcaacttaag ggtccttccc ggtgactcga cgggttaocg
8581 gggcgcagcc tgcctgatga ggtatttct ccttaacgca ctgtcgggta tttcaacccg
8641 calactcaaa agcaacata gtaacggccc tctagcggcg caataagcgc ggggggtgtg
8701 gtcggtcacc gcaagctgac cgtcaactt gccagcgcct tagcgcgcgc tccctctcgt
8761 ctcttccctc cctttctcgc caogtctgcg gcttcccd gtaaacctct aatcgggggg

```

图12A续

```

8821. ctceecttttag gggttcogatt tagtgcttta eggcacotcg accccaasaa acttgatttg
8881. ggtgahgggtt caogtagtgg gccatogccc tgatagaocgg tttttogccc tttgaogttg
8941. gagtccacgt tctttcaatag tggactcttg tccaaaactg gaacaacaact caactctatc
9001. togggtatctt cttttgattt agacotgcag goatgcsegc ttggccctgg cogtctttt
9061. ecaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt taoccaaactt aatcgecttg cagcaeatcc
9121. cccctttogcc agctggogta atagogaaga ggccogcann gatogcctt cccaacggtt
9181. ggcgagocgt aatggcgaat gcgattttatt caaacaagcc gccgtccogt caagtnaggg
9241. taatgctctg ccagtggtac aaccaattaa ccaattctga ttagaasaa ctcacgagca
9301. tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaagcc
9361. gtttctctaa tgaaggagaa aactcacccg ggpagttcca taggatggca agatcctggg
9421. atoggtctgc gattcngact cgtccaaact naatacaann tartaatctt cctctgtcaa
9481. aaataaggtt atcaagtgag aatcaacat gactgagcac tgaatccggt gagaatggca
9541. aaagcttatg cttttctttc cagactttgtt caacagggca gccattacgc tctctatca
9601. aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca tctgtgattg cgcctgagcg agcgsaata
9661. cgcgactcgt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccg cycgaggaac
9721. ctgcccagcc atcaacaata tttccacctg aatcaggata ttcttctaat accctggaatg
9781. ctgttttccc ggggatogca gtggtgagta accatgcac ctcaggagta cggataaaat
9841. gcttgatggt cggagagggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg
9901. taccatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcctogggct
9961. tcccatacaa tcgatagatt gtgcacctg attgcccga cttatcgcga gccatttat
10021. acccatataa atcagatcc atgntgggat ttaatcoggg ctccagcaa gacgtttccc
10081. gttgaatatg gctcataaca cccctgtat tactgtttat gtaagcagac agttttattg
10141. ttcctgatga tatattttta tcttgtaga tyaacatca gagattttga gacacaogt
10201. ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcac catctcccg
10261. acaacgcaga ccgttcogtg gcaagcama agttcaaat caccacctgg tccacctaca
10321. acaagctctt natcaaccgt ggctccctca cttctgtggt ggatgatggg gcgattcagg
10381. cctgggatga gtcagcaaca cctctttcac gaggcagacc tctcgcgga gttccactga
10441. gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagga tctctctgag atcccttttt tctgcogta
10501. atctgctgct tgcacaacaaa aaaaaccacc ctaccagcgg tggtttgttt gcccgatcaa
10561. gagctaacaa ctcttttccc gaaggttaact ggnttcagca gagcgcagat accaaaact
10621. gttctctctg tgtagccgta gttcggccac cacttcaage actctgtagc acogctaca
10681. tccctcctct tgcataact gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt
10741. accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataagggcc agcggctggg ctgaaagggg
10801. ggttcgtgca cacagcccag cttygagcga acgacctaca ccaactgag atacctacag
10861. cgtgagctat gagaagcgc nacgtttccc gaaagggagaa eggcggacag gtatccgta
10921. agcggcaggg toggascagg agagcgcacg syggagcttc cagggggaaa cgcctggat
10981. ctttaragtc ctgtcgggtt tgcacacctc tgaactgagc gtcgattttt gtagatctcg
11041. tsaggggggc ggagcctatg gaasacgccc agaacgogg cctttttacg gttcctggcc
11101. ttttgcctggc cttttgctca catgtt

```

//

图12A续

phFIX39v2 (SEQ ID NO.26)

LOCUS phFIX39v2 11199 bp DNA circular UNA

```

FEATURES
    Location/Qualifiers
    repeat_region      1..141
                        /label="AAV2 ITR"
    enhancer           152..473
                        /label="ApoE HCR-1"
    promoter           482..878
                        /label="hAAT Promoter"
    CDS                 order(908..995,3434..3731)
                        /label="hFIX CDS"
    intron             996..2433
                        /label="hFIX Intron"
    3'UTR              3732..3779
                        /label="hF9 3' UTR"
    Terminator         3820..4047
                        /label="bGH PA term"
    repeat_region      complement(4097..4237)
                        /label="AAV2 ITR"
    misc_feature       4248..8713
                        /label="Eukaryotic Stuffer"
    rep_origin         8754..9060
                        /label="F1 Ori"
    CDS                 complement(9355..10170)
                        /label="Kanamycin resistance"
    rep_origin         complement(10537..11194)
                        /label="pUC Ori"
    
```

ORIGIN

```

1 cctgcaggca gctgcgogct cgtcogctca ctgaggcgcg ccgggcaaaag cccggggcgtc
61 gggogacott tggtagocog gectcagtga gogagcgagc ggcagagag ggagtyggcca
121 actccatcac taggggtcc tggggcctag taggtccaga ggcacacaggy agtttctggg
181 ctccacctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatccctcc agcagctggt tgtgtgctgc
241 ctctgaagtc cacactgaac aaactccagc ctactccatgt cctcaaatg ggcaaacatt
301 gcaagcagca aacagcaaac acacagccct cctgcctgc tgacctgga gctggggcag
361 aggtcagaga cctctctggg cccatgcacc ctccaacatc cactcgacc cttggaaatt
421 cggtyggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt agtgyagag ggytaccggg
481 ggatcttgcct accagtygaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct
541 aagtygtact ctcccagaga ctgtctgact caagccacc cctccacctt ggacacagga
601 cgtctgtggt tctgagccag gtacaatgac tctttcgggt aagtgcagtg gaagctgtac
661 actgcccagg caaagcgtcc gggcagccta gggggggcag tcagatccc gccagtygac
721 ttageccctg tttgtctctc cyataactgy ggtgaccttg gtaaatatc accagcagcc
781 tccccogttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggy cctgtctcc
841 tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttccca ctctgctagc
901 aaaggttatg cagaggytga acatgatcat ggtgagagc cctggcctga tcaccatctg
961 cctgctgggc tacctgctgt ctgctgaatg tacaggtttg ttctctttt tataatacat
1021 tgagtatgct tgccttttag atatagaaat atctgattct gtctctctca ctaaattttg
1081 attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccaggy ttggttaagta
1141 ctggtttctt gttagctagg tttctctctt ctccactttt aaaactaaat agatggacaa
1201 tgcttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcatgtaatt
1261 cctgttaaaa acagctcatc tcttggttt aaaaaatta aaagtgggaa acaaaagaaa
1321 tagcagaata tagtgaaaa aaataaccac agtatTTTTT ttggactta ccactttgaa
1381 atcaaatgg gaacaaaag cacaaacagt ggccttattt acacaaaag totgatttta
1441 agatatgtga caattcaagg tttcagaagt atgtaaggag gtgtgtctct aatttttaa
1501 attatatac ttcaatttaa agtttttagt aaaaataaaa gattaacctt tcattagcaa
    
```

图12B

```

2101 cctcaatgag ctatnttcaaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggctca tttgagaact
2161 ttctttttca tccaaagtaa attcaaatat gattagaaat ctgacctttt attactggaa
2221 ttctcttgac taaaagtaaa attgaatttt aatctctaaa tctccatgtg tatacagtac
2281 tgtgggaaca tcacagatntt tggctccatg ccttaaagag aamtggctt tcagattatt
2341 tggattaana acaaaagact tottaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg
2401 ctaaaactaa agaattatct ttttacattt cagtntttct tgatcatgaa aatgccaaca
2461 aaattctgaa tagaccaaaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga
2521 atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg
2581 aaaatacaga gagaacaact gaatntttgga agragtatgt ggatgtgat caatgtgaga
2641 gcaatccctg cttgaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttgtt
2701 gtcctcttgg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg
2761 gcaggtgtga gcaatntttg aagaattctg ctgataacaa agtggctctg agctgcactg
2821 agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgect ttctctgtg
2881 ggagactgtc ttgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc ttctctgatg
2941 tagattatgt gaaatagcact gaggctgaga caatcttga caatatcact cagagccac
3001 agagcttcaa tgacttcaac aggtgtgtag gaggggagga tgcacaagct gggcagttcc
3061 cctggcaggt agtgcctaat ggaanaagtg atgctntttg tggaggttca attgtaaatg
3121 agaagtggat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtgtgtg
3181 ctggagagca caatattgag gaaactgagc acactgagca gaagaggaat gtgatcagga
3241 ttatccccc cacaactac aatgctgcta tcaacaagta caacctgac attgacctcc
3301 tggaaactga tgaacctctg gtcttgaaca gctatgtgac aacctctgt attgctgata
3361 aagagtacac caacatcttc ttgaaatntg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg
3421 tgttccataa aggcaggtct gccctggtat tgcagtatnt gagggtgctt ctggtggata
3481 gagcaacctg cttgctgagc acaagttta caatctaca caatatgttc tgtgcaggtt
3541 tccatgaagg tggtagagac agctgcccag gagattctgy gggtcccat gtgactgagg
3601 tggagggaac cagcttctct actgggatta tcaagctggg tgaggagtgt getatgagg
3661 gaaagtatgg gatctacaca aaagtatcca gatagttaa ctggattag gagaanaaca
3721 agctgacttg atgaaagatg gatttccaa gttaatctat tggaaatgaa aattaacaga
3781 gatctagagc tgaattctct cagccagggg gatcagcttc tactgtgctt tetagttgcc
3841 agccatctgt tgtttgcccc tcccccttgc ctctctgac cctggaaggt gccactccca
3901 ctgtctcttc ctaataaaat gaggaatntg cabcacattg tctgagtagg tgtcatteta
3961 ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggg
4021 atgtggggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggetoga
4081 gatccactag ggcgcagga accctagtg atggagttgg ccactccctc tetgcgeget
4141 cgctgctca gcgagccgg gcgaccaaag gtcgcccag ccccggtctt tgcocggcg
4201 gootcagtga gcgagccagc gcgagctgc ctgcaggggc ccatgggag atgcaaccac
4261 tgtctcagtg caaagccctg cctaaagtgg ctggtcataa gacctgtgt ctggctgtaa
4321 ctccaattga ttgtcagcat caataaaact tggccaacac tgttatatac tggatgtgac
4381 agttacaact gaacatattt gtttaagcaa ttggaattaa gaattcaat gcaatgatat
4441 caggytctt ctctctggt tagtgtatnt ggggaaatt ggaatctct caggtcagta
4501 ggtcagttag gccaggtgg atgacatcca cagccctggy gcagagagat tatgatgtag
4561 ctagtctgac tctgacaaa gacttgcctc ctggagcttc tactacttct tgggtgtg
4621 ctaagaaata tggttgtggt cttttaagtc tgaagagcat tattnttgc aaccctgac
4681 caaacatct tgcacaaggaa aaggcctaaa atatatttgc atttaaagat attacaaact
4741 acttgggttt ggaatgtntg gccnttcagg atcatagcta tcaaatatnt agctatttgg
4801 ggtatgagat gctctgcttg tcaaggacaa gttcttaaag acatcatgnt ggggaataat
4861 ggggaaaaat ggaagctta tgetctgagt aagacatcty agttatctc tgtcaaacat
4921 ttttghtagt catagtctaa tgggagctg ttttctctt tfaatataca ttcaatctg
4981 aatttatgct cttcattgac aatgocagcc cagaacaaca gctcttaacc ttgggtttc
5041 ttctaaact ttaactcaaa tghtaacatt aactgcaatt tcaagtaaac cattattctc
5101 cctacttacc cacccaagtt gtacaataaa gagtgtntgc tctactctat atacaaagca
5161 aattcatttg tttgtgatgt acagcttgc atgcccacag atgtggtttg cctagtctt
5221 tgetctaggt catttgactg ggaacagatg ggtatgctac tttggtttt aatggttaac
5281 tagtcaatga aatgcaatcc atcaaaat attagaggt aatgtnttaa atgtctgtcc
5341 agactagct tgttagagca ggtgocatta cacagtca cttctatnt ctcttaattg
5401 aattttctc atctgagata ggaataatag agggctnttt caagtgaaga tattactata
5461 gctaaagac cttagtgtaa catctggtcc ctaaggaaa acaagttct ggttcaatac
5521 tataataact ttgcatgtta tctgcaactg agatgtgctc taatcaaca gaaaggttg
5581 aatctctgta gctaggtgta cagggcaaga gctgtacagg gaaactntaa agatagcttc
5641 agpccaaaagc tgaggaaaagc ggtatggagc tgggaaaaat gctaaagact tntaaagatt
5701 ttcttttagt caaaaataga ataagaaata gaoatntcc ctggaatnt tctgtaggtt
5761 aatactgtta actatttgta aatgcatatg ctacaactta atatgtctgc tttgtgagtt
5821 tagcattgtc tcttgtctat tccagaaatg aaatggcaaa tacatntaaa tccagaaactaa

```

图12B续

```

5881 aaagggggaac aggggtataaa ggcctcaatth agtcacatca tttcccttbc tcacccaccc
5941 cctttaaacn agatggttgc caatgcatta acaatgcaga tgtttccgga aagaaggttt
6001 agtbaactcaa gcagacaact tathttcttt tcaagcagaa aagactatga gatgggtggtt
6061 gtaggttgttc tggggagggag aagatataaa tgatacacat tatttcaaat catttcatga
6121 cctcaactgca cacttatagt tathgtacct gttgtctttt tgcgtcaag cctagctaaq
6181 atcaatttga atgttcaaga tcactcaaac atgcattgtc acacatacac atgcacatct
6241 gttcaactccc tatttcaatc acatgaaact agattactga tgtgtacaga ttcaagrac
6301 ttttattctt ttccaaaagc aagaagctga gctactttcc agaatagttg tgaagaacc
6361 tgtcaactct ctgcattgtt tctccacac cccctccatc cagttcctta tgaatggta
6421 ctggttttca aaaatgatg ataatgtag tgtataaaag tcatttttag acaaaatgaa
6481 acaggyaaatg aaagaaaoca gaatctctcc tcattttggg atgggpcagc tccaccatgt
6541 catggttaat ctgcagggag gaaatactag atttgattgc agatcagact gcagcaaac
6601 tgcgttgact aaggcatcaa gagaagcaa gcaacagctg gggctcagt ggtgaaaaca
6661 ttatatactc agctttgaaa tatgaaatac tgnrttagcag tgtcccccag aaaaagatgt
6721 ttcaaaaatgc tgatgcttca taagaacct tctcttcaga gttgtttctt ttatcttca
6781 aattagccag ggtgggaaat aaagtgatca ctgggtgaag aaatctaca aagaagaaa
6841 tagagagttc actttcatct ggagtaatga acagattgaa caaactagaa atggttagtc
6901 tgttaaagaa aaggtgtagg tgagctgttt gcaagagcca caaggyaaag ggggaagaca
6961 ctcttttgtg gacttaaggg tgaaagttgc aagcaggcaa gaccattctg aactccatta
7021 agaagacct ttccaaocaa caacctctgg gttggttact caggttgggc agcattggga
7081 gcaaatgttg attgaacaaa tghttgcag aattgttgac ttaagagct gttctgtcac
7141 tggggcagc agcagctaga tagccctatt cagggagaggy gcaatttgtc aactggccag
7201 agatcagagc aggttaaggy actgctggga tccctgtccag ctltgagac ctacagagcc
7261 atgttcaact agcaggatcc cctctcgagg tcaactctat ttcttacctt atccagggc
7321 ttccacctca gcttgccagg ctggagccaa gggccaaggc agcctcaact tyttggctat
7381 gtaagcttcc caggagcccc ctatggttca ggaacagctc tgcctgccc atcctgthg
7441 cctactccta aagccaaagg cactggttgg ccaggccagc ttctaaagtc acacaaggtt
7501 agaaggttcc tgcagggaag ggcctgaggg caatggaagg aggtacttca gtttccctcc
7561 agatgcccag tgatgggtcc agagctcctt gagaacttgg gaaaggaagc aggtctctctg
7621 aagaataact tccgggtag aaaggggag ctagagggtt aaatgcaata cccaggyaaa
7681 gaaatgagtt ttcttagag ttagtatatg tctagaggtg tagtaaacta aaacaagtet
7741 tgaattgcat acagccactt agggaaagaa tgaaaacct tgaatattg tgaaaaaggy
7801 gaaactgcaa cccctgtatt actagatagc ttcatcaac agctraaaac agacagattt
7861 ttataggttt actgtgttca ctttaataca agggcagttg ttcagaacta gtcaggtcct
7921 gaaaaggatt taccaaatgt tgagtggtcc ctctagtgtt cacacttccc agctttcttc
7981 ctacaaggt ggatcaaggg acttgcctac aactggaact gaaatcctcc aagtggaaet
8041 agacatttgg atgggaaaaa tattcattgt ccaactgtaat latgcagga atatccagtt
8101 gagataatgg acttgcctct tatetaataa taccaggct caatggttca ctgctttgtc
8161 caecttgcce aaaattcaag cacagctaaq ttgatahtht aggaacaaag cagcttacta
8221 tccagccaga ggggagtaga atatggttaa gtagagagtg aaagaatgaa tgagccctgc
8281 tattcctcac tgcctggatg gctataagca cagcccttat ggaggcctta ggtcttctt
8341 cataatactc cagtttgaaa aggttttga aagacctctt agaaaaatca gtagttttc
8401 tctttttagt aacatgtage aaaaaaaatt tcatctgta ggtacaggya acaccttaat
8461 aactattaat ctcaaggagt caagccagtg tgnthctaa tgtatctgct gtatcccct
8521 gaagcaaaat ttgccatcag agaaactgac tcatggggaa aaaatccaaq gaactcaaat
8581 caocaaaaga agcoattcct cagatttgc taagcttaag ctccctgtc totcattgtg
8641 tghtgcttcc aatgcagta cataaatggc ttttttgtt atgacocaaa aaactaatt
8701 catctgcaaa gctataggtc aaagcaacca tagtatgac cctgctagct ggcgattaa
8761 ggcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgacogctac acttgcagc gcttagcgc
8821 cgcctccttt cgtttcttcc ccttcccttc tggcaagtt cgcggcttt cccngtcaag
8881 ctctaaatcg ggggtcctct ttgggttcc gatthagtgc tttcggcac ctgacccca
8941 aaaaacttga tttgggtgat ggttcaegta gtyggccatc gcoctgatag aeggttttc
9001 gccctttgac gttggagtc acgttcttta atagtggact ctgttccaa actggaaca
9061 cactcaactc tatctogggc taticttttg atrtagact gcaggcatgc aagcttggca
9121 ctggcogtgc ttttacaagc togtgactgg gaaaaacctg gogttacca acttaatgc
9181 cttgacagac atccccttt cgcagctgy cgraatagcg aagagccocg caccgatogc
9241 ccttcccaac agttgocnag cctgaaatggc gaatgogatt tattcaacaa agccgcogtc
9301 ccgtcaagtc agogtaatgc tctgocagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattgaa
9361 aaactctcg agcatcaaat gaaactgcaa tttattcaca tcaggattat caataccata
9421 ttttgaana agcogtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgagggcgt tccataggat
9481 ggcagatcc tggtatoggt ctgogattcc gactogtcca acatcaatac aactattaa
9541 tttccctog tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtg aactgaatc
9601 cgtgagaat ggcaaaagct tabgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt

```

图12B续



```

9661 aagctctgtca tcaaaatcac tggcatcaac caaaccttta ttcattcgtg attgogcctg
9721 agcgagagcga aatcgcgcgat cgtctgttaa eggacaatta caaacaggaa togatgcac
9781 cgggcgcagg aacactgcga ggcgatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc
9841 taatacctgg aatgctgttt tcccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg
9901 agtaaggata aatgcttga tggcgggaag aggcataaat tccgtcagcc agtthagtct
9961 gaccatctca tctgaaacat ccttggcaac gctaentttg ccatgttca gaanaactc
10021 tgggcacatcg ggttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgoc egacattatc
10081 gggagcccat ttataccat ataastcagc atccatgctg gaatttaac gggcttoga
10141 gcaagacggt tccgcttga tatggtcat aacaccctt gtattactgt ttatgtaage
10201 agacagtttt atgttcctg atgatatatt tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt
10261 ttgagacaca acgtggttt gtggaataa togaacttt gctgagttg aggatcagat
10321 cagcatalct cccgacaacg cagacgcttc cgtggcaag caaaagtta aatcaccac
10381 ctggtccacc taacacaag ctctcatca ccgtggtcc ctcacttct ggcctgatga
10441 tggggcgatt caggcctggt atgactcagc aacacctct taagaggca gactctcga
10501 cggagttcca ctgagcgtca gaccocgtag aaaagatcaa agpatctct tgagatcctt
10561 tttttctgag cgtaatctgc tgcctgcaaa caaaaaaac acccgtaaca gggctgggtt
10621 gtttgcggga tcagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactgcttc agcagagcgc
10681 agataccaaa taetgttct ctagtgtage cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg
10741 tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtgccg
10801 ataagtcgtg tttaccggg ttggactcaa gacgatggt ccgggataag ggcagcgggt
10861 cgggctgac ggggggttc tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgac tacaccgac
10921 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa ggcaccagct tccgaaggg agaaaggcgg
10981 acaggtatcc ggttaagcgc aggtctggaa caggagagcg cccgagggag ctccagggg
11041 gaaacgcctg gtatctttat agtctctgct ggtttcgcca cctctgaett gagcctgat
11101 ttttgtgatg ctcgtcagg gggcggagcc tatgaaaaa cgcagcaac gggcctttt
11161 tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctacatgt

```

11

图12B续

pAAV-ApoE haAT-FIX39

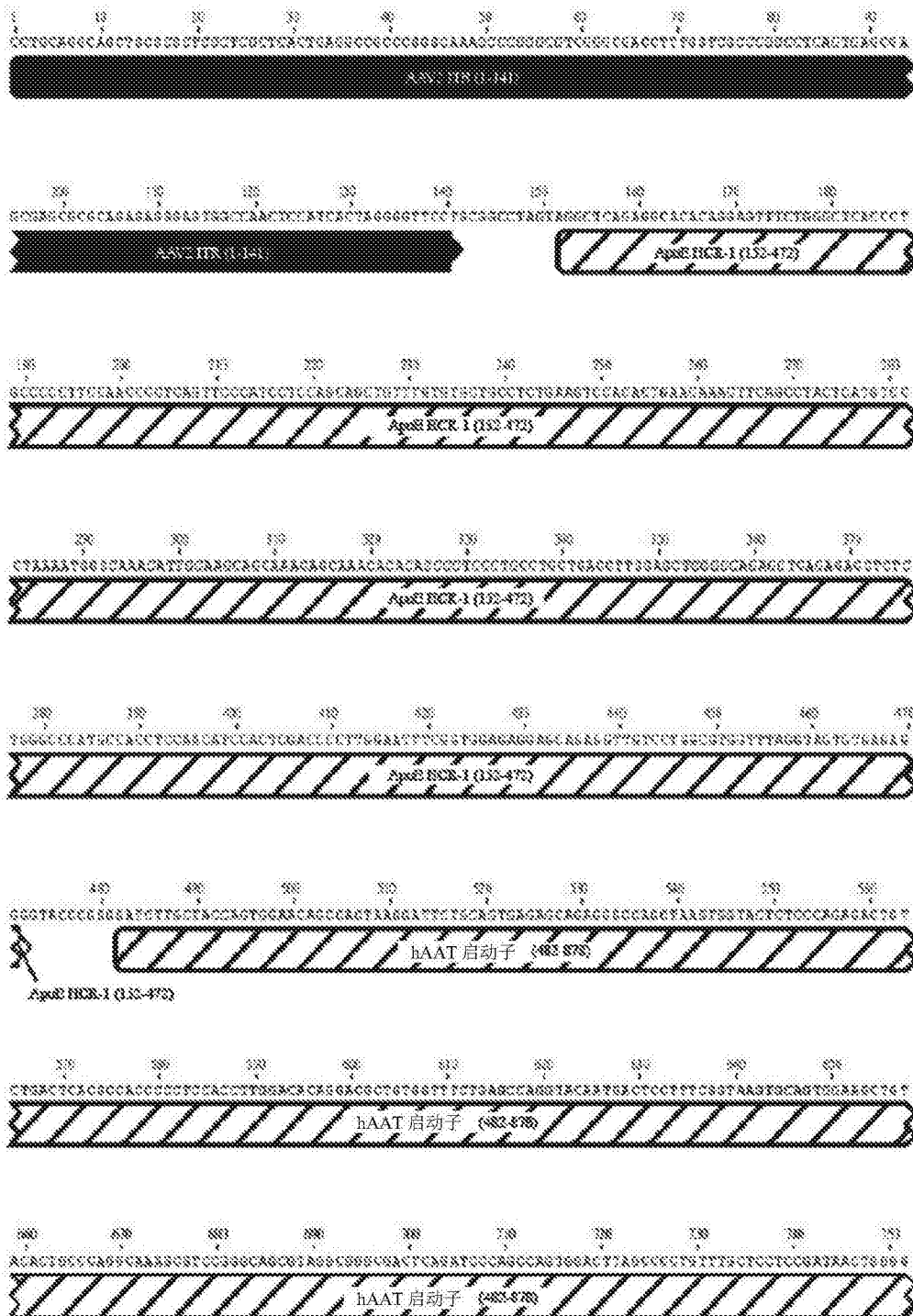


图13



pAAV-ApoE hAAT-FIX3

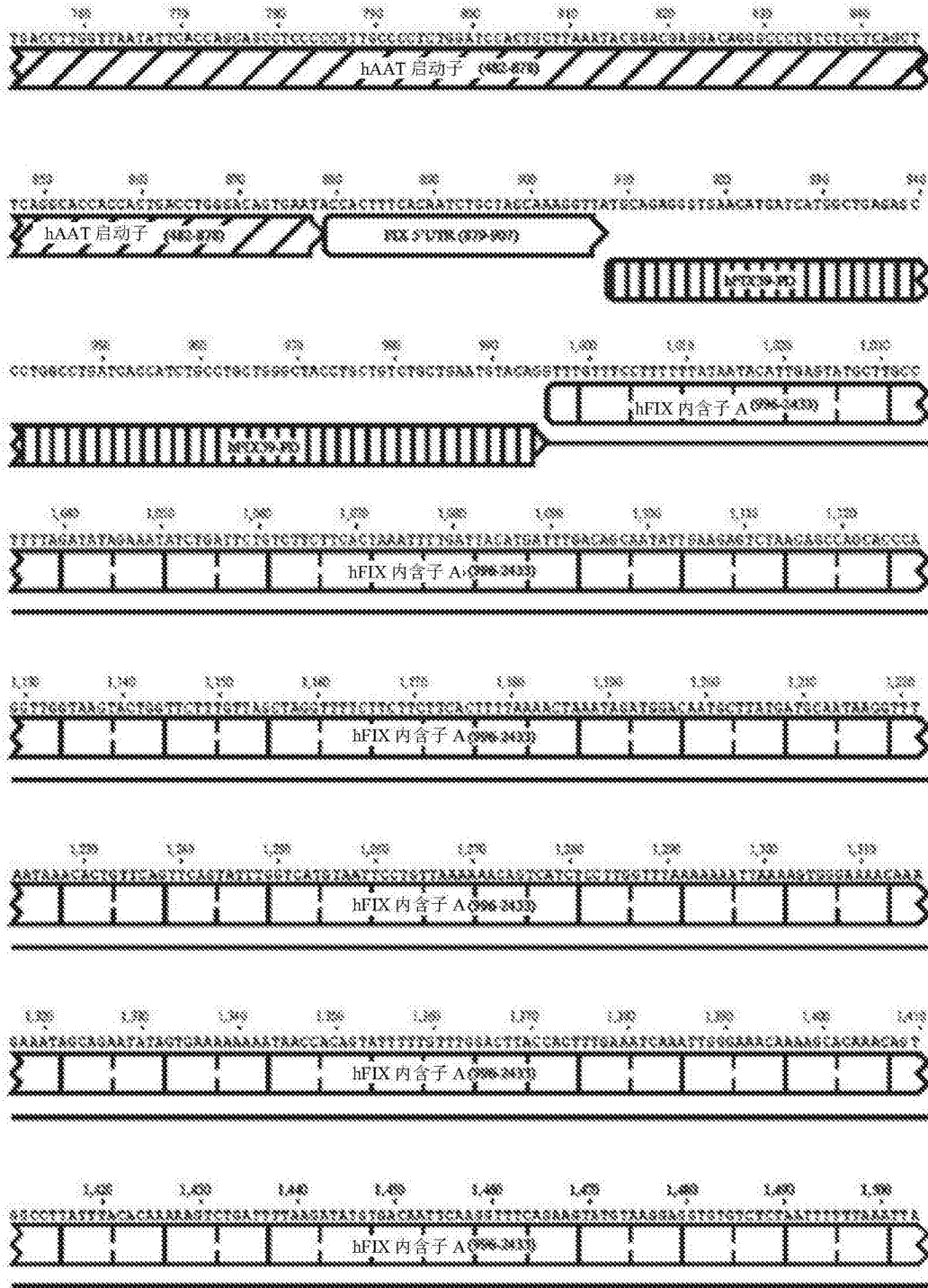


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

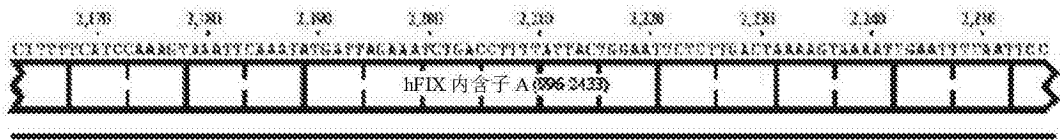
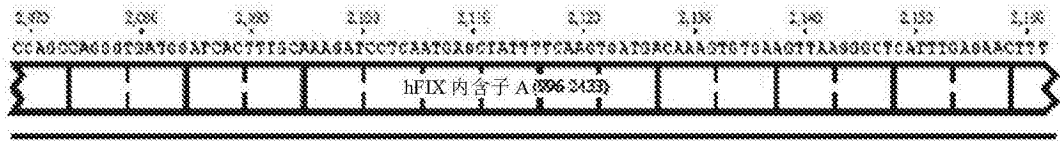
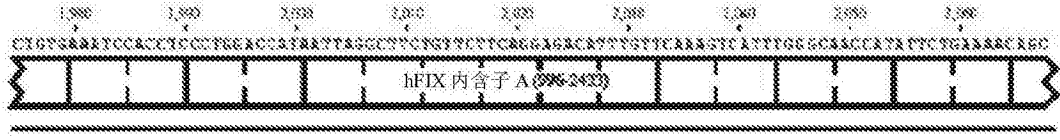
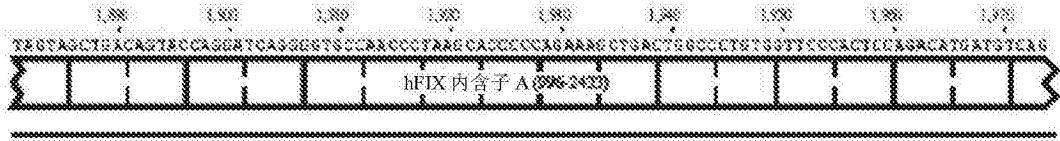
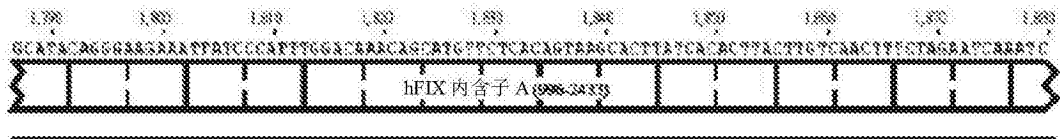
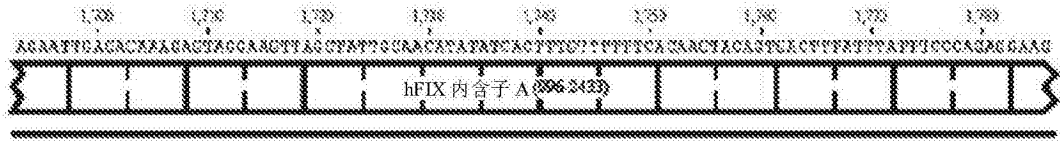
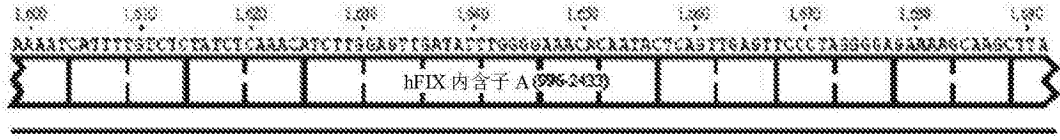
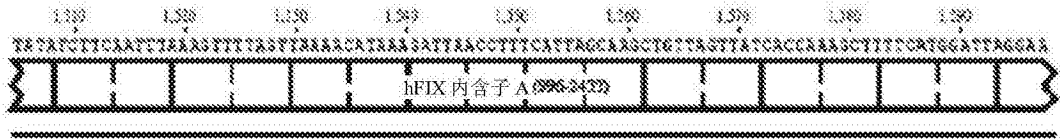


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

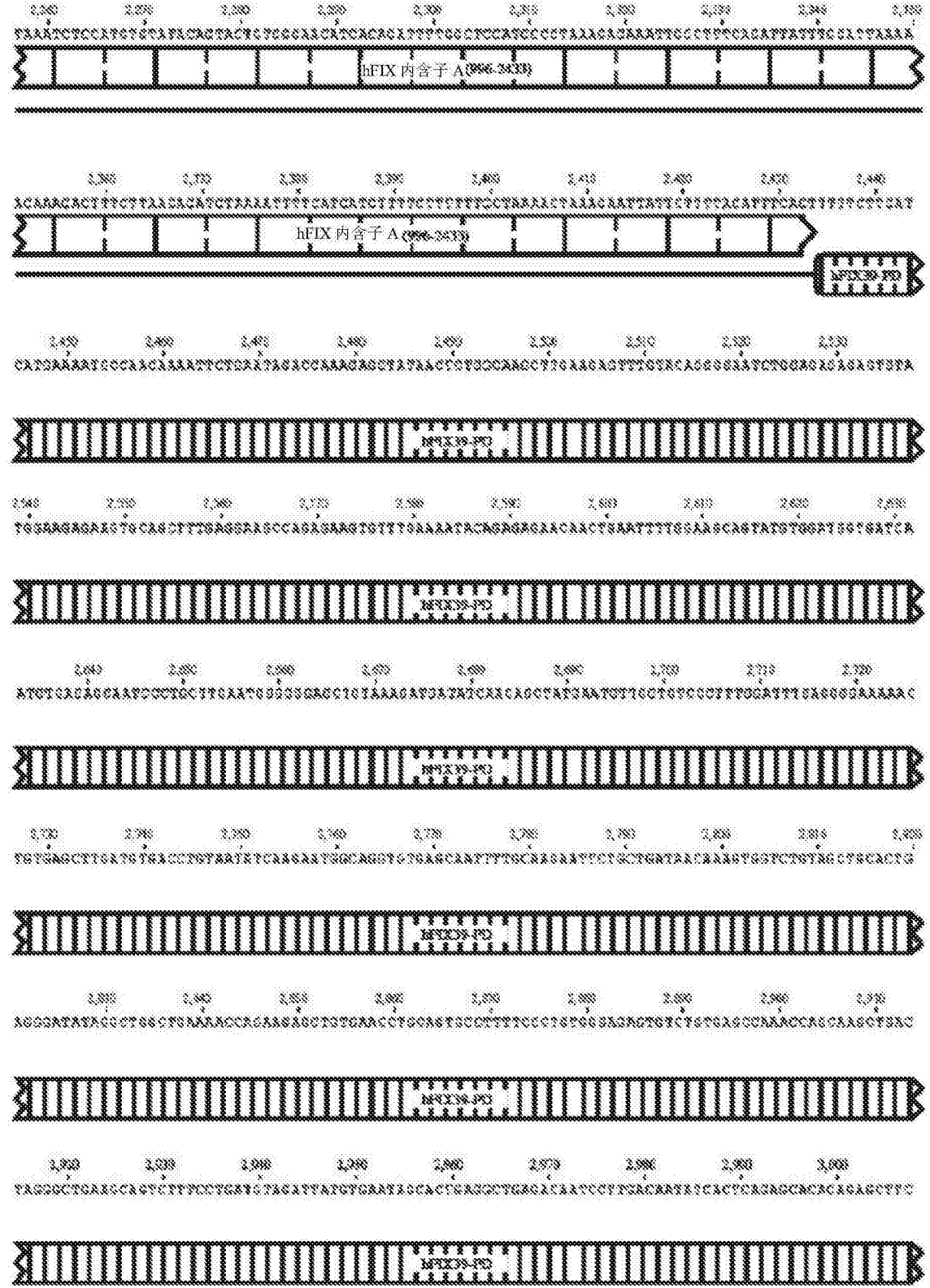


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIK3

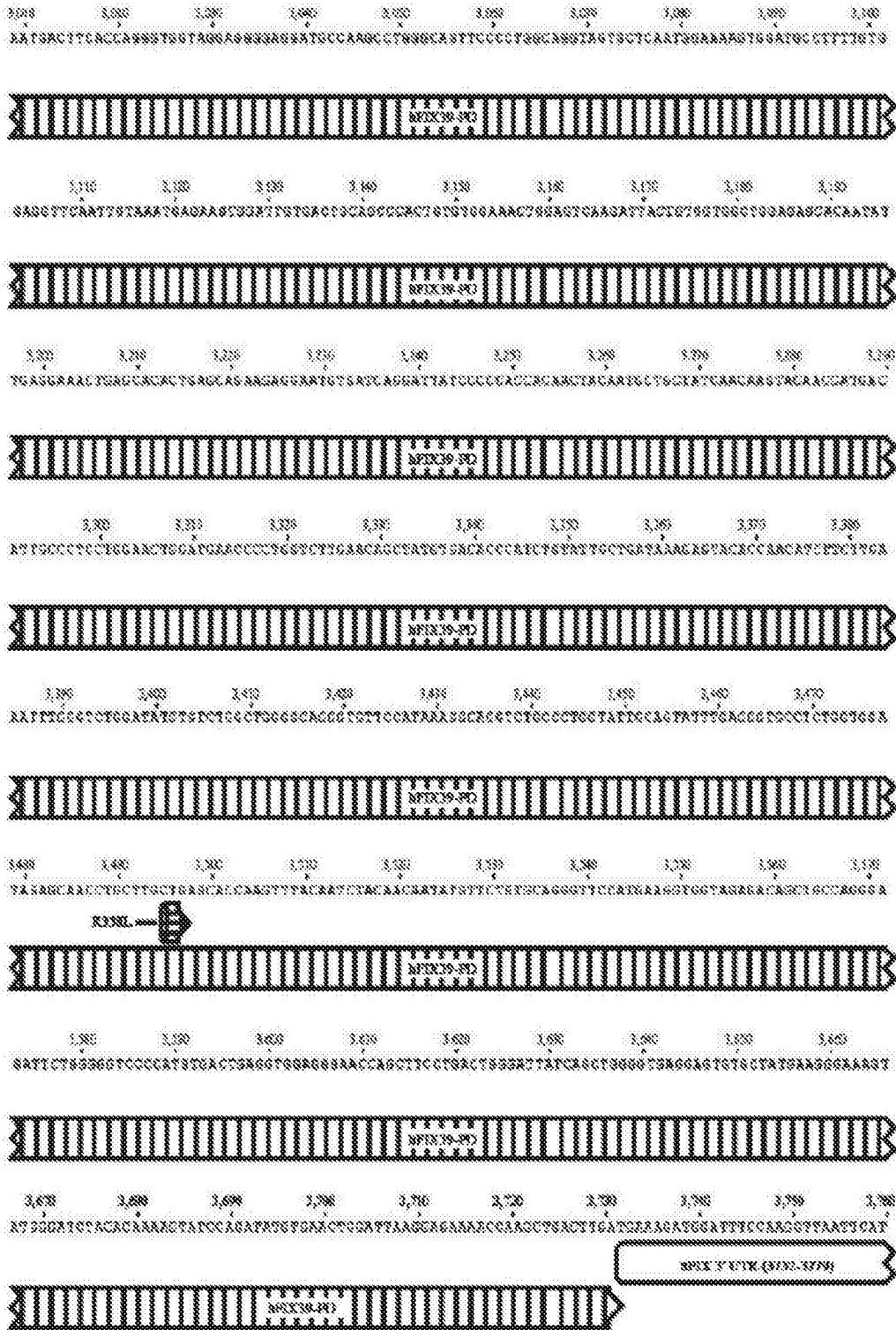


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

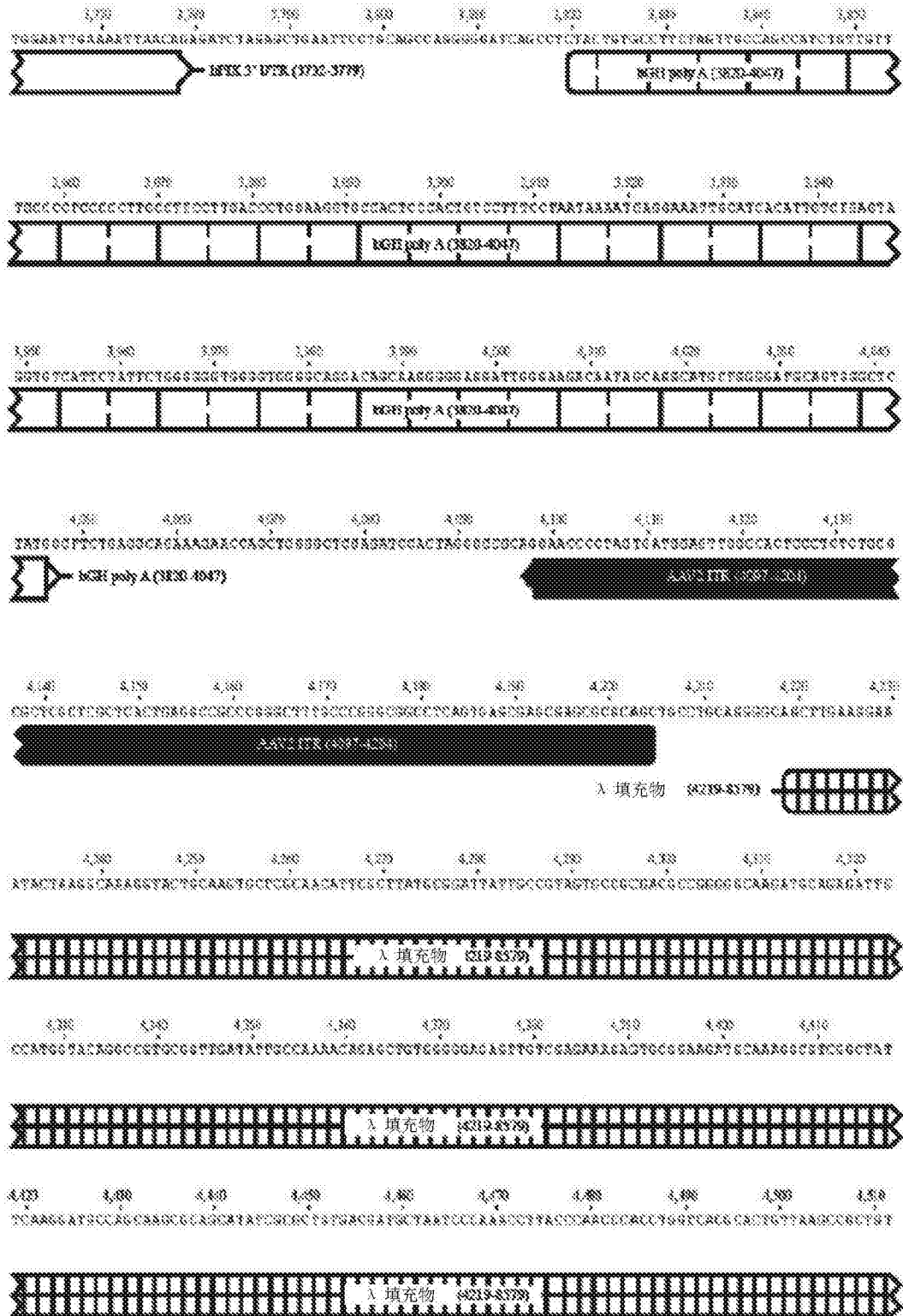


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

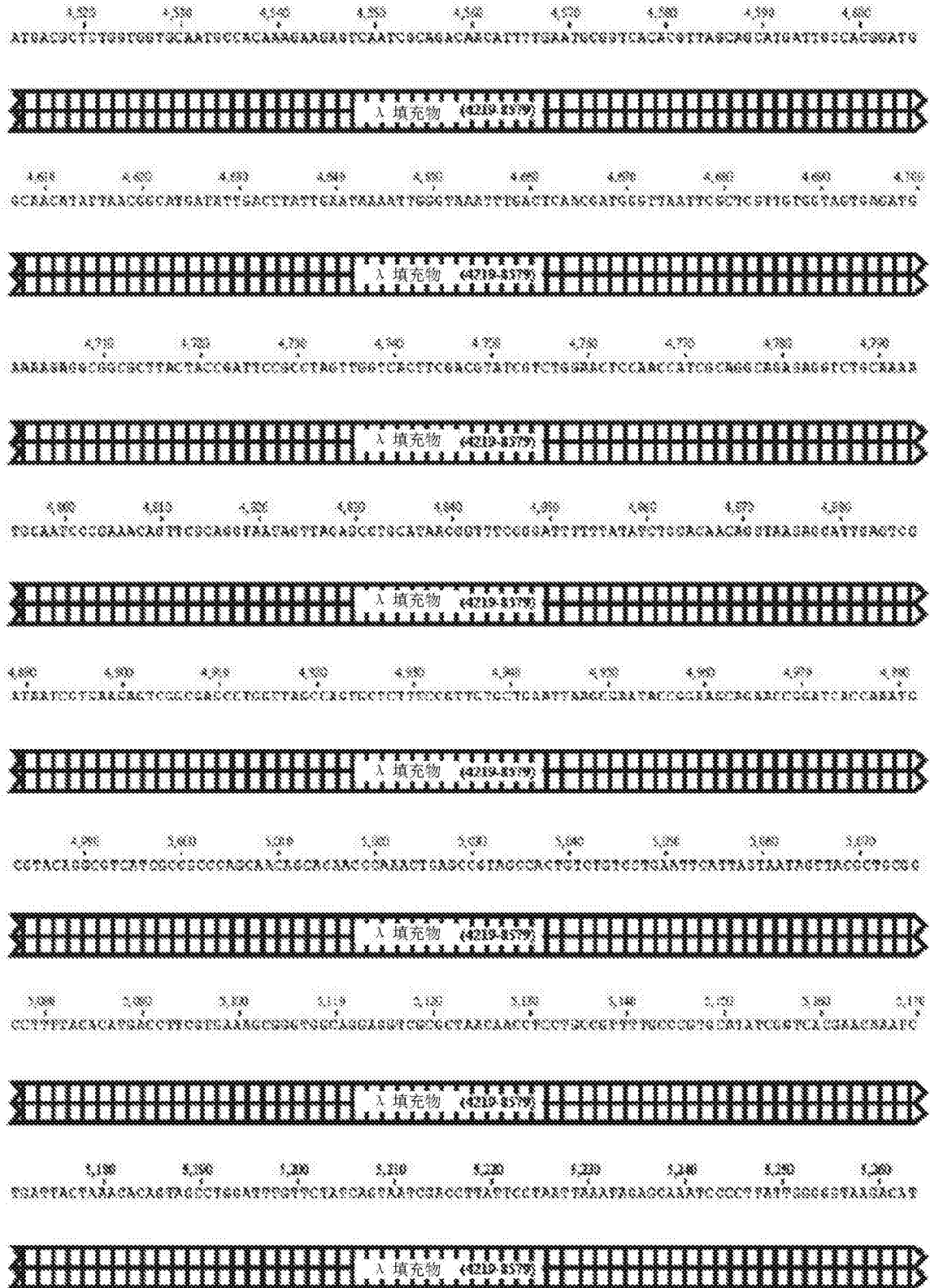


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

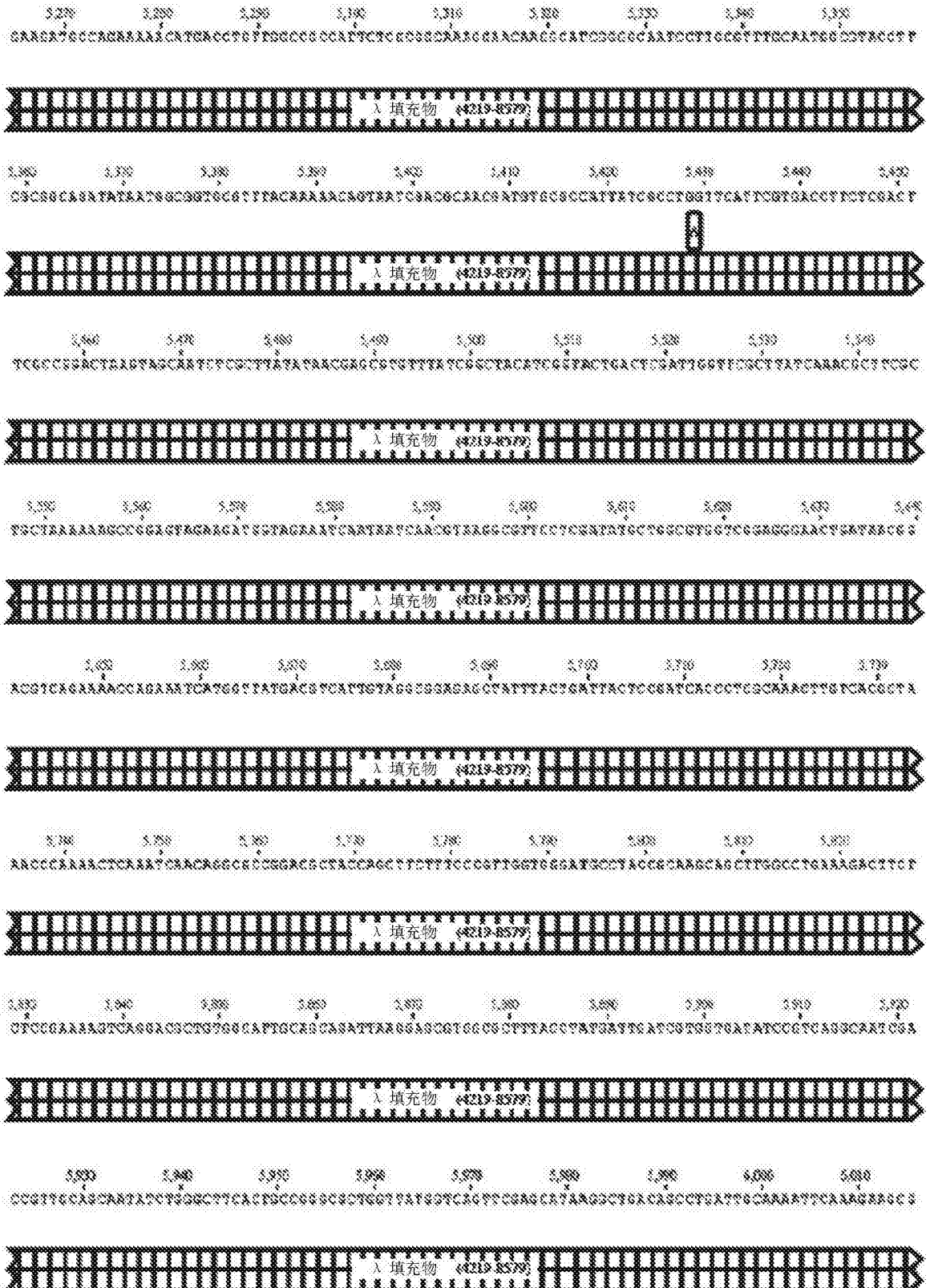


图13续





pAAV-ApoE hAAT-FIX3

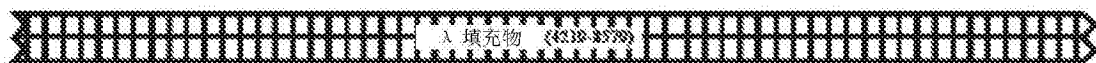
6,779 6,780 6,781 6,782 6,783 6,784 6,785 6,786 6,787 6,788  
TCCTTTGAGCAGCATCCCTTATATAGCAGGGCCAGCCGCAATAGCCGCTAGCAATTTTTTCATGATGTTTCCGAGTCTTTTGGAAATTCGCTG



6,793 6,794 6,795 6,796 6,797 6,798 6,799 6,800 6,801 6,802  
AATCGTATGTCGAGAAATTTAAACGAGCCCTAAACCAATGGGTGAAATTTCTATTTGTFATATTTATCTAACTGATTCCTCAGGTCGGATCAATCG



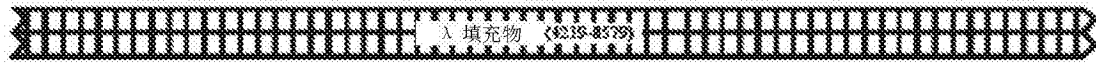
6,808 6,809 6,810 6,811 6,812 6,813 6,814 6,815 6,816 6,817  
TCATTTATTCCTGGATTAATCTATCTCCACGCCCTGACGAGGAACTTCCTCGCGGGAGTGTCCGGGAAATATTAAGACCAATGACACAGGCTT



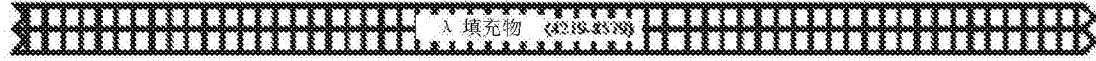
6,824 6,825 6,826 6,827 6,828 6,829 6,830 6,831 6,832 6,833  
TACGCGTACGCTATTTCACTTATGCGACGCCCCGGTCTCAGACCGGAAAGAAACCGGACGTTATGATTTTACGCTGAGAAATTTTATGATGCT



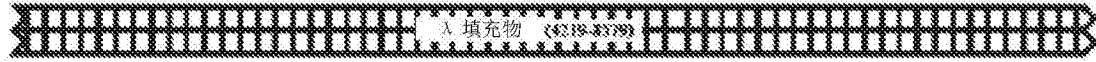
6,840 6,841 6,842 6,843 6,844 6,845 6,846 6,847 6,848 6,849  
TCGGAAGGCTCTGATTAATGCTATGAAATTAATCAAAAGGATAGTATCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTT



6,856 6,857 6,858 6,859 6,860 6,861 6,862 6,863 6,864 6,865  
TTTACGAGGATTTTCCCTGATTTCTGAAATGATTTTCTCTGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTT



6,872 6,873 6,874 6,875 6,876 6,877 6,878 6,879 6,880 6,881  
TTTACATTTACAGCTTTTAAATGCTTTTATTTAAGACGGTATTAATGATTTTCTAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTT



6,888 6,889 6,890 6,891 6,892 6,893 6,894 6,895 6,896 6,897  
AAATGATGAGCTTTGATGCTTTTATGTTCAAGAAATGAAACAAATGCTGCTGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTTCAATGATTTT

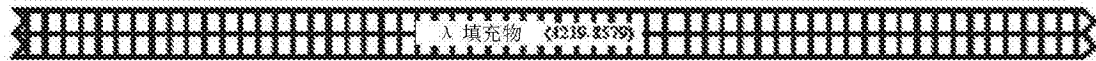


图13续





pAAV-ApoE hAAT-FIX3

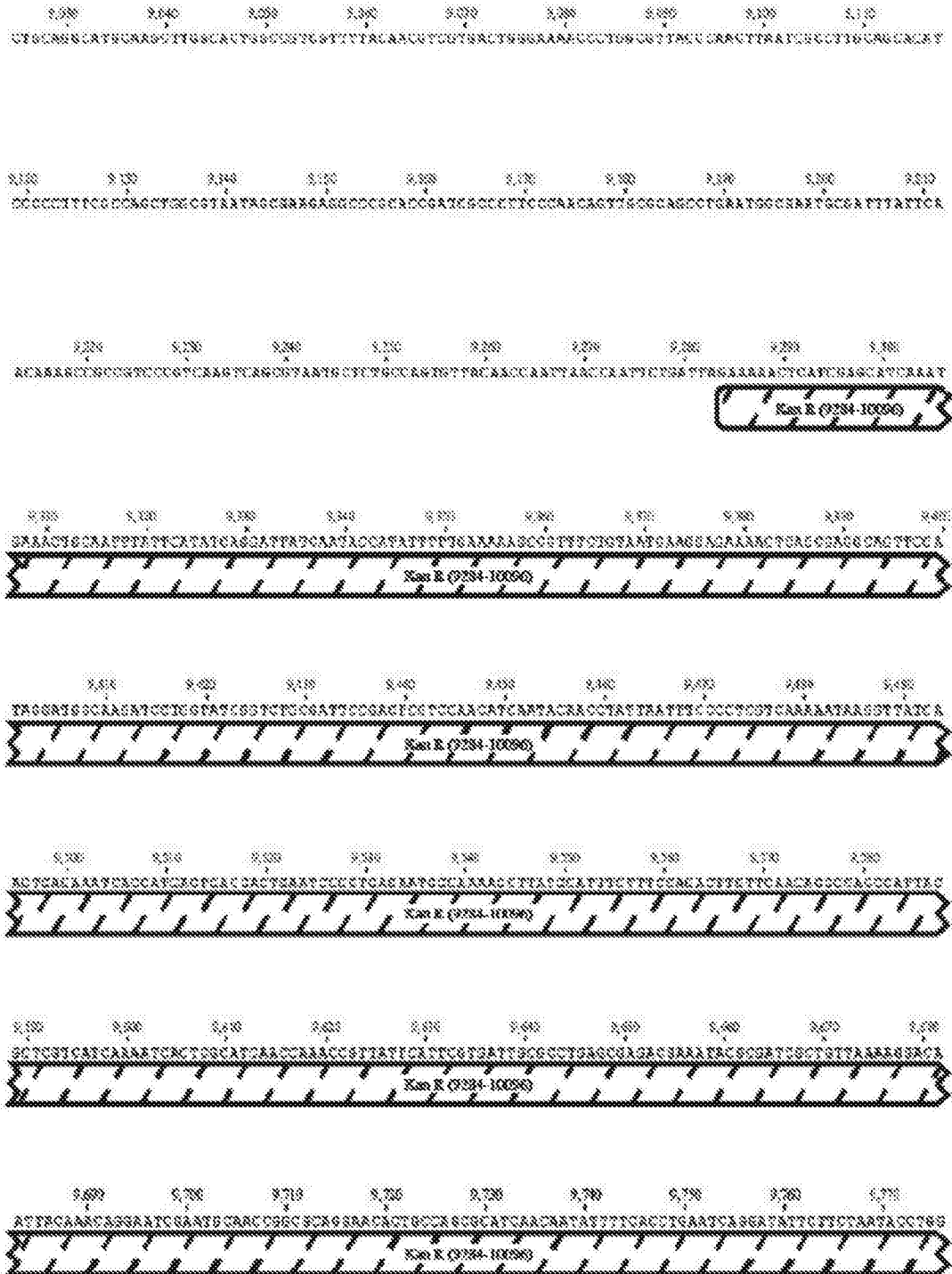


图13续

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

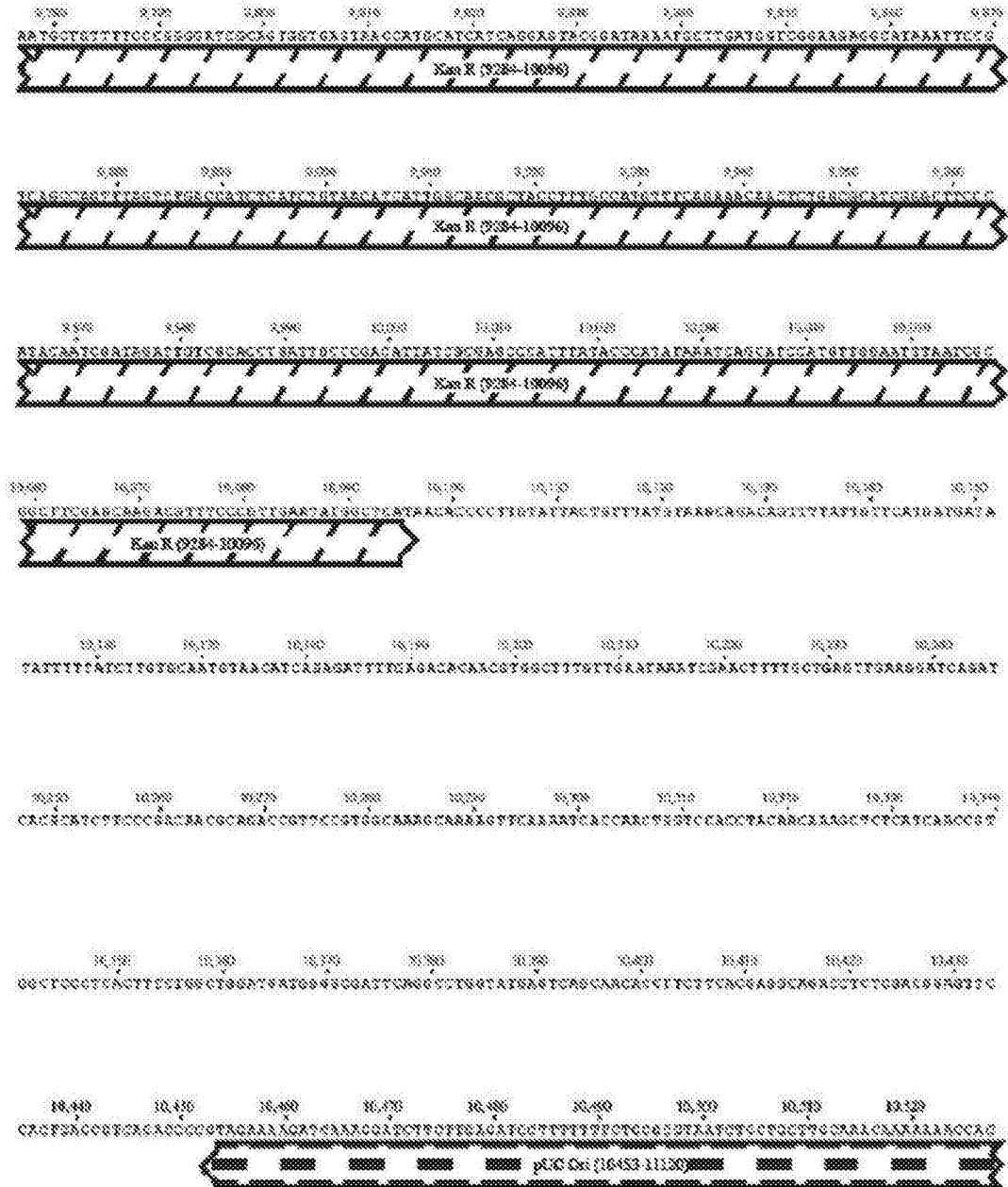


图13续



内含子 A 核酸序列 (SEQ ID NO: 17) :

```
GTTTGTTCCTTTTTATAATACATTGAGTATGCTTGCCTTTTATAGATATAGAAATATCTGATTCTGTC
TTCTTCACTAAATTTTGATTACATGATTTGACAGCAATATTGAAGAGTCTAACAGCCAGCACCCAG
GTTGGTAAGTACTGGTCTTTGTTAGCTAGGTTTTCTTCTTCACTTTTAAACTAAATAGATGG
ACAATGCTTATGATGCAATAAGGTTTAATAAACACTGTTTCAGTTCAGTATTTGGTCATGTAATTCCT
GTTAAAAAACAGTCATCTCCTTGGTTTTAAAAAATTAAAAGTGGGAAAACAAAGAAATAGCAGAA
TATAGTGAAAAAAAATAACCACAGTATTTTTGTTTGGACTTACCCTTTGAAATCAAATTGGGAAA
CAAAGCACAAAACAGTGGCCTTATTTACACAAAAAGTCTGATTTTAAGATATGTGACAATTCAAG
GTTTCAGAAGTATGTAAGGAGGTGTGTCTCTAATTTTTTAAATTATATATCTTCAATTTAAAGTTTT
AGTTAAAAACATAAAGATTAACCTTTCATTAGCAAGCTGTTAGTTATCACCAAAGCTTTTCATGGAT
TAGGAAAAAATCATTTTGTCTCTATCTCAAACATCTTGGAGTTGATATTTGGGGAAACACAATACT
CAGTTGAGTTCCCTAGGGGAGAAAAGCAAGCTTAAGAATTTGACACAAAGAGTAGGAAGTTAGCTA
TTGCAACATATATCACTTTGTTTTTTCACAACTACAGTGACTTTATTTATTTCCAGAGGAAGGCAT
ACAGGGAAGAAATTATCCCATTTGGACAAACAGCATGTTCTCACAGTAAGCACTTATCACACTTAC
TTGTCAACTTTCTAGAATCAAATCTAGTAGCTGACAGTACCAGGATCAGGGGTGCCAACCCCTAAGC
ACCCCCAGAAAGCTGACTGGCCCTGTGGTTCCCACTCCAGACATGATGTCAGCTGTGAAATCCACC
TCCCTGGACCATAAATTAGGCTTCTGTTCTTCAGGAGACATTTGTTCAAAGTCATTTGGGCAACCATA
TTCTGAAAACAGCCCAGCCAGGGTGATGGATCACTTTGCAAAGATCCTCAATGAGCTATTTTCAAG
TGATGACAAAAGTGTGAAGTTAAGGGCTCATTTGAGAACTTTCTTTTTCATCCAAAGTAAATTCAA
TATGATTAGAAATCTGACCTTTTATTACTGGAATTCCTTGACTAAAAGTAAAATTGAATTTAATF
CCTAAATCTCCATGTGTATACAGTACTGTGGGAACATCACAGATTTGGCTCCATGCCCTAAAGAG
AAATTGGCTTTCAGATFATTTGGATFAAAAACAAAGACTTTCTTAAGAGATGTAATAATTTTCATGA
TGTTTTCTTTTTTGCTAAAACATAAGAAATFATTTCTTTTACATTTTCAG
```

图14

包含内含子 A 的 FIX39 的核酸序列（内含子 A 有下划线）（SEQ ID NO: 25）：

ATGCAGAGGGTGAACATGATCATGGCTGAGAGCCCTGGCTGATCACCATCTGCCCTGGCTAC  
 CTGCTGTCGCTGAATGTACAGGTTTGGTTCTTTTTATAATAACATTGAGTATGCTTGGCTTTTAGA  
TATAGAAATATCTGATTCGCTCTCTTCACTAAAATTTTGATTACATGATTTGACAGCAATATTGAAG  
AGTCTAACAGCCAGCAGCCAGGTTGGTAAGTACTGGTTCTTTGGTJAGCTAGGTTTCTCTCTTCA  
CTTTTAAAACTAAATAGATEGACAATGCTTATGATGCAATAAGGTTTAAATAAACACTGTTCACTTC  
AGTATTTGGTCATGTAATTCCTGTTAAAAAACAGTCACTCTCTTGGTTAAAAAAATTTAAAAGTGG  
AAAAACAAGAAATAGCAGAATATAGTGAATAAAAAATAACCACAGTATTTTGGTTTGGACTTACC  
ACTTTGAAATCAAATTTGGGAAAAACAAAAGCACAAAACAGTGGCCCTTATTACACAAAAAGTCTGATT  
TTAAGATATGTGACAATTCAGGTTTCAAGAAGTATGTAAGGAGGTTGTCTCTAAATTTTTAAATTT  
ATATACTTCAATTTAAAAGTTTAAAGTAAAAACATAAAAGATTAAACCTTCAATTAGCAAGCTGTAGTT  
ATCACCAAAGCTTTTTCATEGATTAGGAAAAAAATCATTTTGTCCTATCTCAAACATCTTGGAGTTG  
ATATTTGGGGAAAAACAATACTCAGTTGAGTTCCCTAGGGGAGAAAAAGCAAGCTTAAAGAAATTGAC  
ACAAAGAGTAGGAAGTTAGCTATTGCAACATATACACTTTGTTTTTTCACAACACTACAGTGACTTT  
ATTTATTTCCAGAGGAAGGCATACAGGGAAAGAAATTAATCCATTTGGACAAAACAGCATGTTTCA  
CAGTAAGCACTTATCACACTTACTTGTCAACTTTCAGAAATCAAATCTAGTAGCTGACAGTACCAG  
GATCAGGGGTGCCAACCTAAGCACCCACAGAAAGCTGACTGGCCCTGGTTTCCCACTCCAGAC  
ATGATGTCAGCTGTGAAATCCACCTCCCTGGACCATAATTAGGCTTCTGTTCTTACAGGAGACATTT  
GTCAAAGTCAATTTGGGCAACCATATTTGAAAACAGCCAGCCAGGGTGAATGATCACTTTGC  
AGATCCTCAATGAGCTATTTTCAAGTATGACAAAGTGTGAAGTTAAGGGCTCAATTTGAGAATTT  
CTTTTTCATCCAAAGTAAATTCAAATATGATTAGAAAATCTGACCTTTTATTACTGGAATTTCTTGA  
CTAAAAGTAAAAATTTGAATTTTAAATTCCTAAATCTTCAATGTTGATACAGTACTGTGGGAACATACA  
GATTTGGCTCCATGGCCCTAAAGAGAAAATTTGGCTTTTCAAGATTATTGGATTAAAAACAAGACTTT  
CTTAAAGAGATGAAAAATTTTCATGATGTTTCTTTTTTGTCTAAAACATAAAGAATTTATCTTTTACAT  
TTCACTTTTCTTGATCATGAAAATGCCAACAAAATTCGAAATAGACCAAAGAGGTATAACTCTGG  
CAAGCTTTGAAGAGTTTGTACAGGGGAATCTGGAGAGAGAGTGTATGGAAGAGAAGTGCAGCTTTG  
AGGAAGCCAGAGAAGTGTGAAAATACAGAGAGAACAACCTGAATTTTGGAAAGCAGTATGTGGAT  
GGTGATCAATGTGAGAGCAATCCCTGCTTGAATGGGGGAGCTGTAAAGATGATATCAACAGCTA  
TGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAGGGGAAAAACTGTGAGCTTGTATGTGACCTGTAATAICAA  
GAATGGCAGGTGTGAGCAATTTGCAAGAATTTCTGCTGATAACAAGTGGTCTGTAGCTGCACCTGA  
GGGATATAGGCTGGCTGAAAACCAGAAGAGCTGTGAACCTGCAGTGCCTTTTCCCTGTGGGAGAG  
TGTTCTGTGAGCCAAACCAGCAAGCTGACTAGGGCTGAAGCAGTCTTCTCTGATGTAGATTATGTGA  
ATAGCACTGAGGCTGAGACAATCCTTGACAATATCACTCAGAGCACACAGAGCTTCAATGACTTC  
ACCAGGGTGGTAGGAGGGGAGGATGCCAAGCCTGGGCAGTTTCCCTGGCAGGTAGTGCTCAATGG  
AAAAGTGGATGCCCTTTTGTGGAGGTTCAATTTGTAATGAGAAGTGGATTGTGACTGCAGCCACTG  
TGTEGAAAACCTGGAGTCAAGATTAATGTTGGTGGCTGGAGAGCACAATATTGAGGAAAACCTGAGCACA  
CTGAGCAGAAGAGGAATGTGATCAGGATTAATCCCCACCACAACACTACAATGCTGCTATCAACAAG  
TACAACCATGACATTTGCCCTCTGGAACCTGGATGAACCCCTGGTCTTGAACAGCTATGTGACACCC  
ATCTGTATTGCTGATAAAGAGTACACCAACATCTTCTTGAATTTGGGCTGGATATGTGTCTGGCT  
GGGGCAGGCTGTTCATAAAGGCAGGCTGCCCTGGTATTGCAATTTGAGGGTGCCTCTGGTGG  
ATAGAGCAACCTGCTTCTGAGCACCAAGTTACAATCTACAACAATATGTTCTGTGCAGGGTTCC  
ATGAAAGTGGTGTAGAGACAGCTGCCAGGGAGATTTGGGGTCCCATGTEACTGAGGTGGAGGGA  
ACCAGCTTCTGACTGGGATTATCAGCTGGGGTGGAGGTGTGCTATGAAGGGAAGTATGGGAT  
CTACACAAAAGTATCCAGATATGTGAACTGGATTAAGGAGAAAACCAAGCTGACTTGA

图15



体外设置中分析的 AAV-4-1 变体衣壳 (SEQ ID NO: 4) 的转导效率

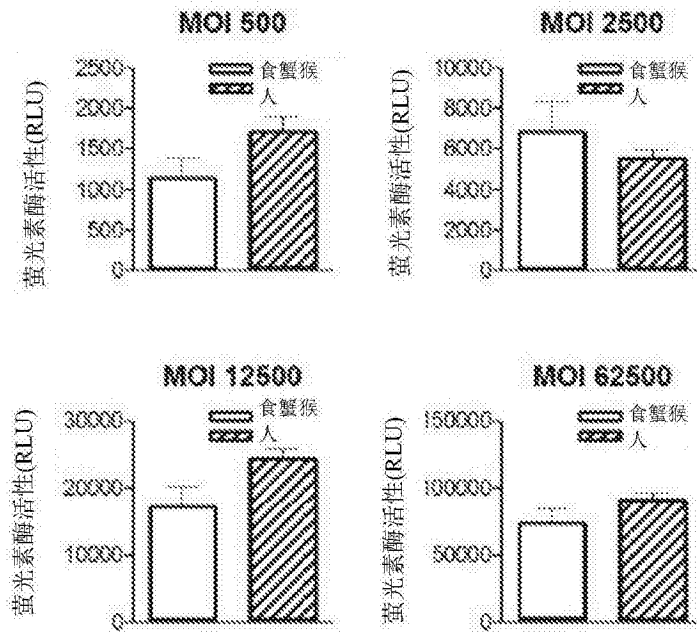


图16

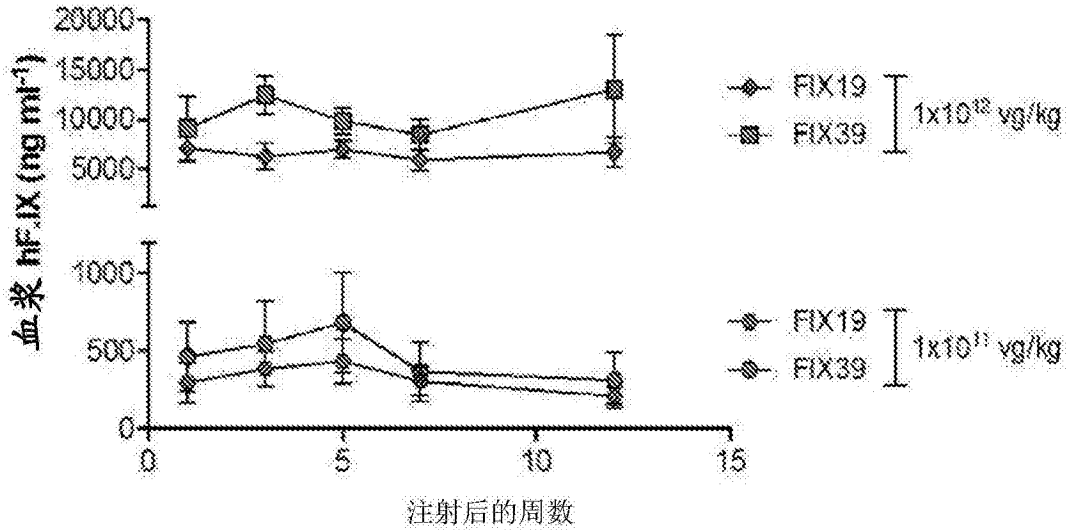


图17

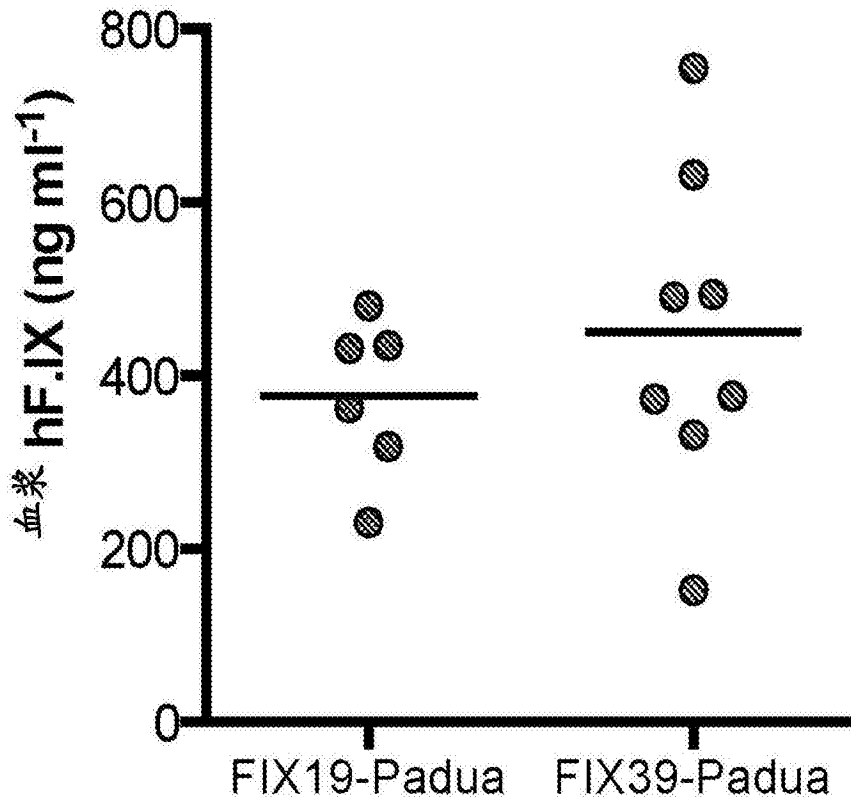


图18

前4个受试者的早期FIX：C活性水平的比较

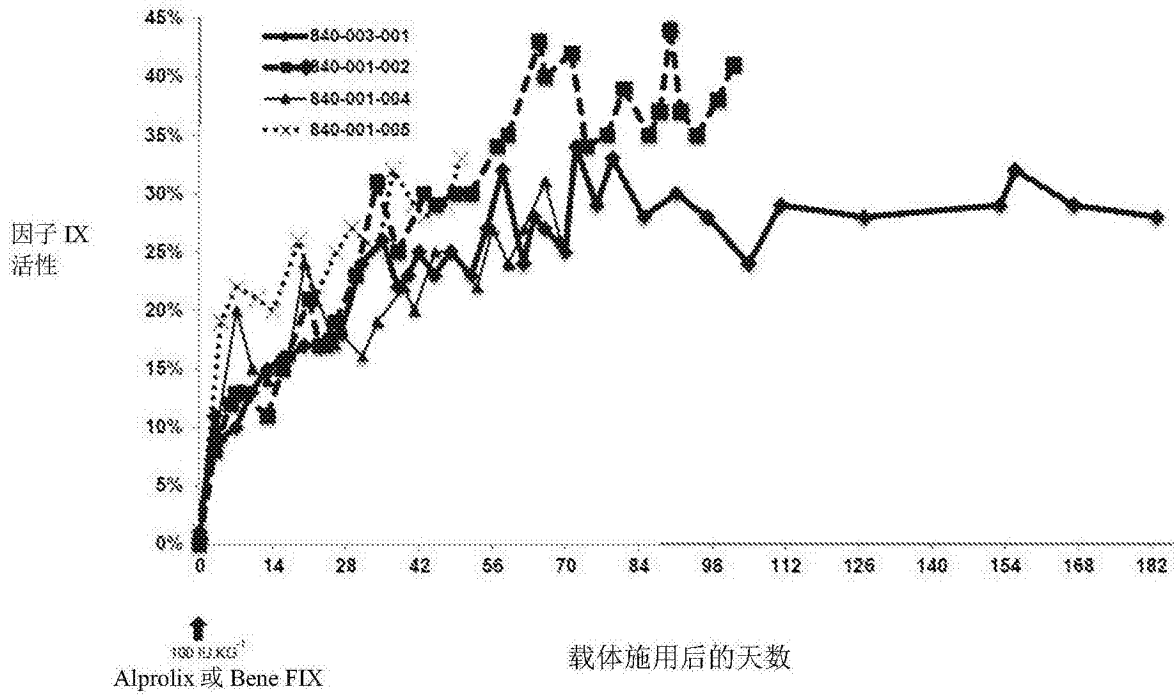


图19

AAV-FIX 39-Padua: 第1受试者第183天FIX:C活性水平为28%  
 自上一次Alprolix输注后183天的受试者1 [ $5 \times 10^{11}$ vg/kg]  
 剂量:  $4.08 \times 10^{13}$ vg AAV-FIX39-Padua +  $2.01 \times 10^{14}$ cp空衣壳[1: 5]

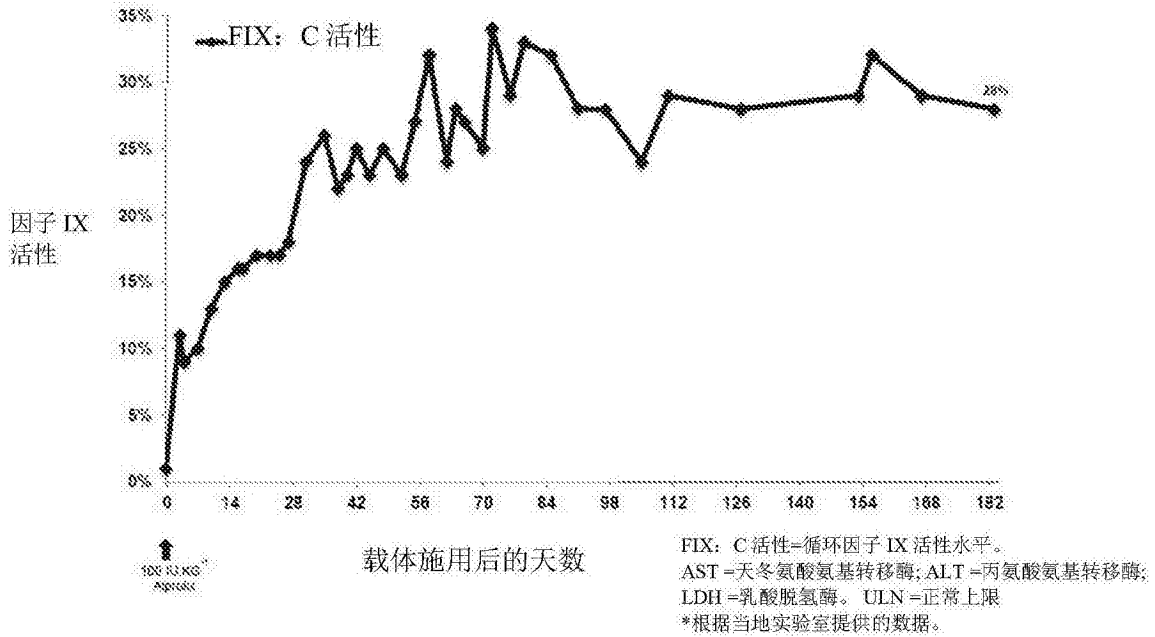


图20A

AAV-FIX 39-Padua: 第1受试者第183天肝功能  
 自上一次Alprolix输注后183天的受试者1 [ $5 \times 10^{11}$ vg/kg]  
 输注量:  $4.08 \times 10^{13}$ vg AAV-FIX39-Padua +  $2.01 \times 10^{14}$ cp空衣壳[1: 5]

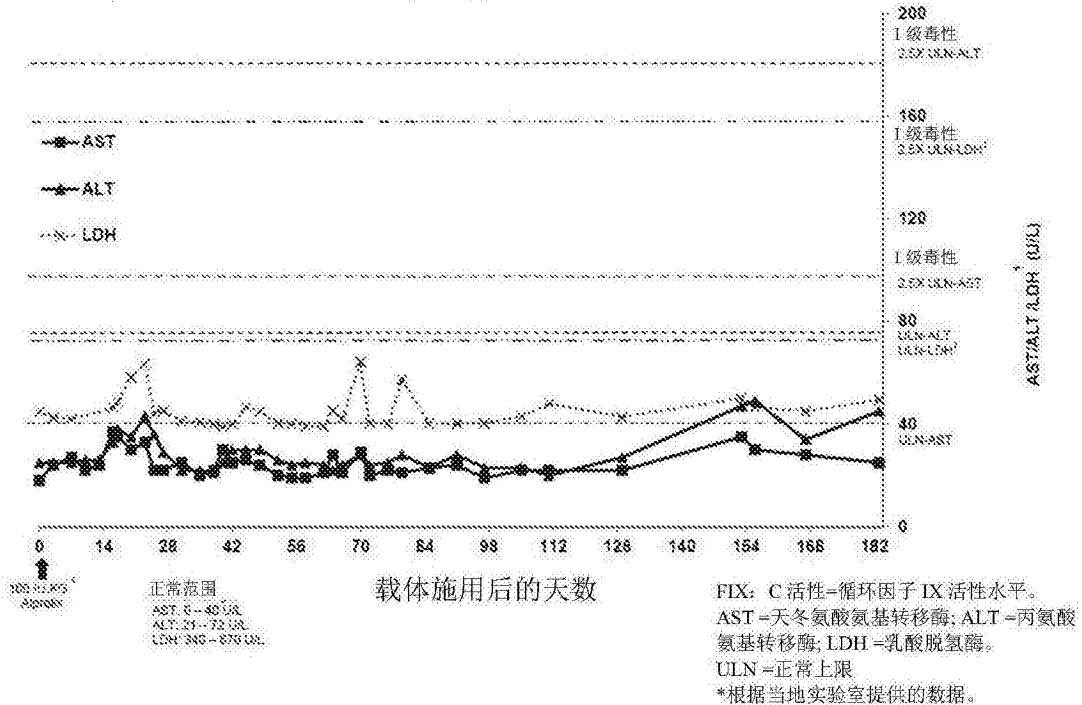


图20B

AAV-FIX 39-Padua: 第2受试者第102天FIX:C活性水平为41%  
自上一次BeneFIX输注后102天的受试者2 [ $5 \times 10^{11}$  vg/kg]  
剂量:  $2.84 \times 10^{13}$  vg AAV-FIX39-Padua +  $1.39 \times 10^{14}$  cp空衣壳[1: 5]

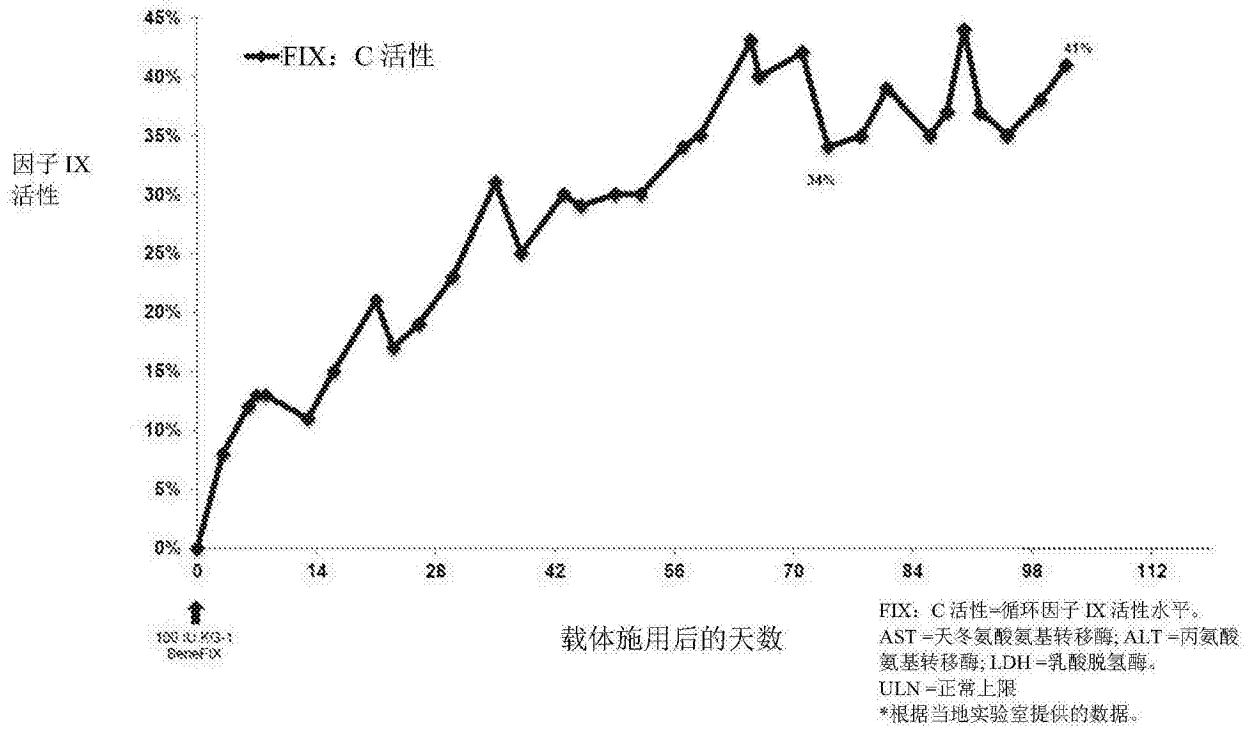


图21A

AAV-FIX 39-Padua: 第2受试者第102天肝功能  
 自上一次 BeneFIX 输注后 102 天的受试者 2 [ $5 \times 10^{11}$  vg/kg]  
 输注量:  $2.84 \times 10^{13}$  vg AAV-FIX39-Padua +  $1.39 \times 10^{14}$  cp 空衣壳[1: 5]

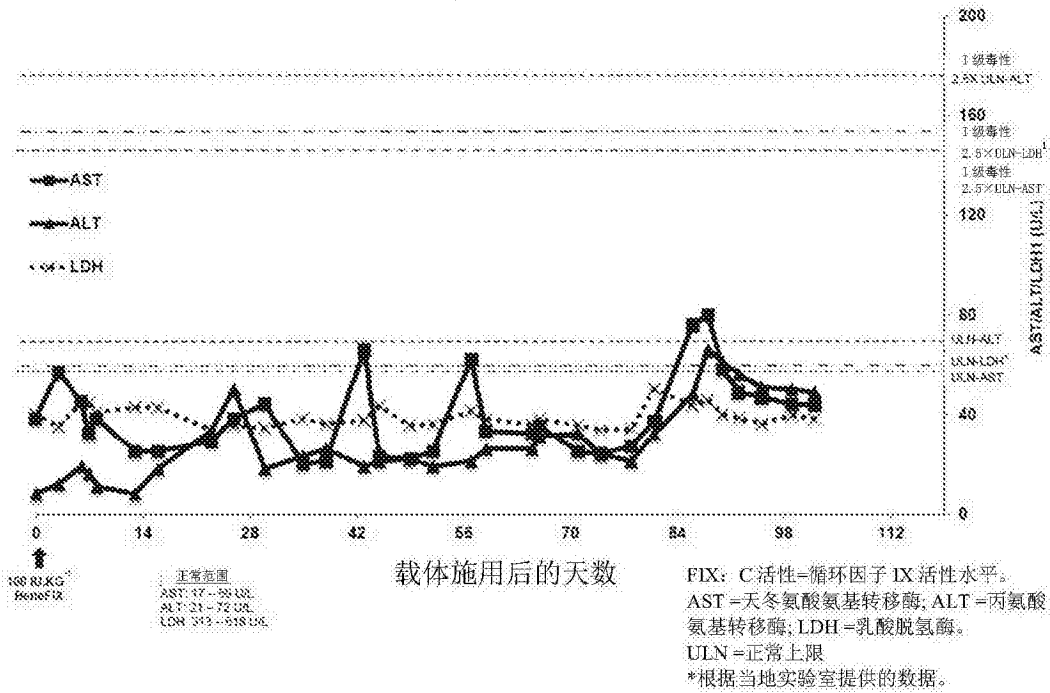


图21B

AAV-FIX 39-Padua: 第3受试者第69天 FIX:C 活性水平为 26%  
 自上一次 Alprolix 输注后 67 天的受试者 3 [ $5 \times 10^{11}$  vg/kg]  
 剂量:  $5.38 \times 10^{13}$  vg AAV-FIX39-Padua +  $1.93 \times 10^{14}$  cp 空衣壳[1:4]

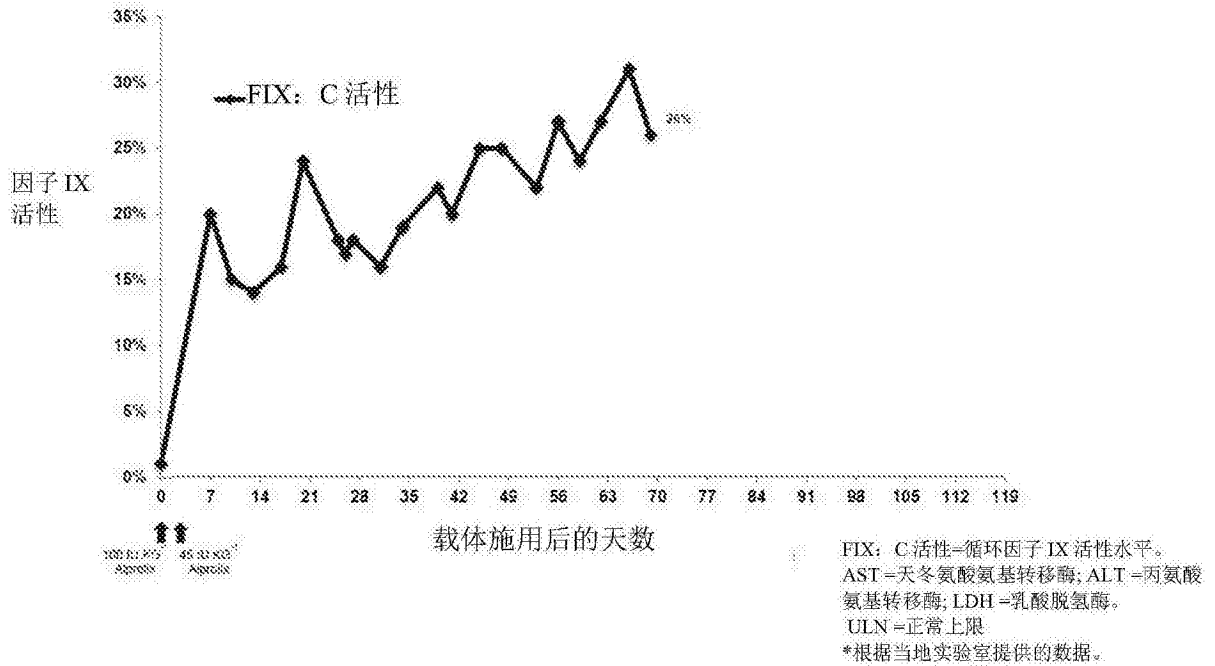


图22A

AAV-FIX 39-Padua: 第 3 受试者第 69 天肝功能  
 自上一次 Alprofix 输注后 67 天的受试者 3 [ $5 \times 10^{11}$  vg / kg]  
 剂量:  $5.38 \times 10^{13}$  vg AAV-FIX39-Padua +  $1.93 \times 10^{14}$  cp 空衣壳[1:4]

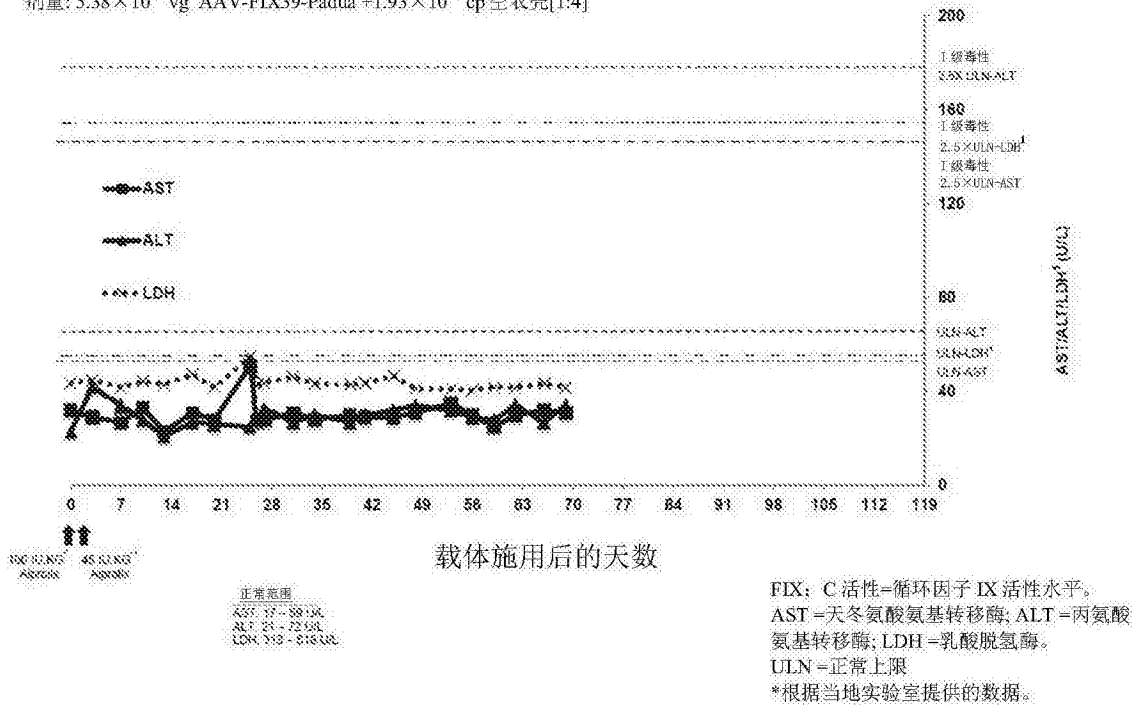


图 22B

AAV-FIX 39-Padua: 第 4 受试者第 50 天 FIX:C 活性水平为 33%  
 自上一次 BeneFIX 输注后 50 天的受试者 4 [ $5 \times 10^{11}$  vg / kg]  
 剂量:  $5.57 \times 10^{13}$  vg AAV-FIX39-Padua +  $2.22 \times 10^{14}$  cp 空衣壳[1:4]

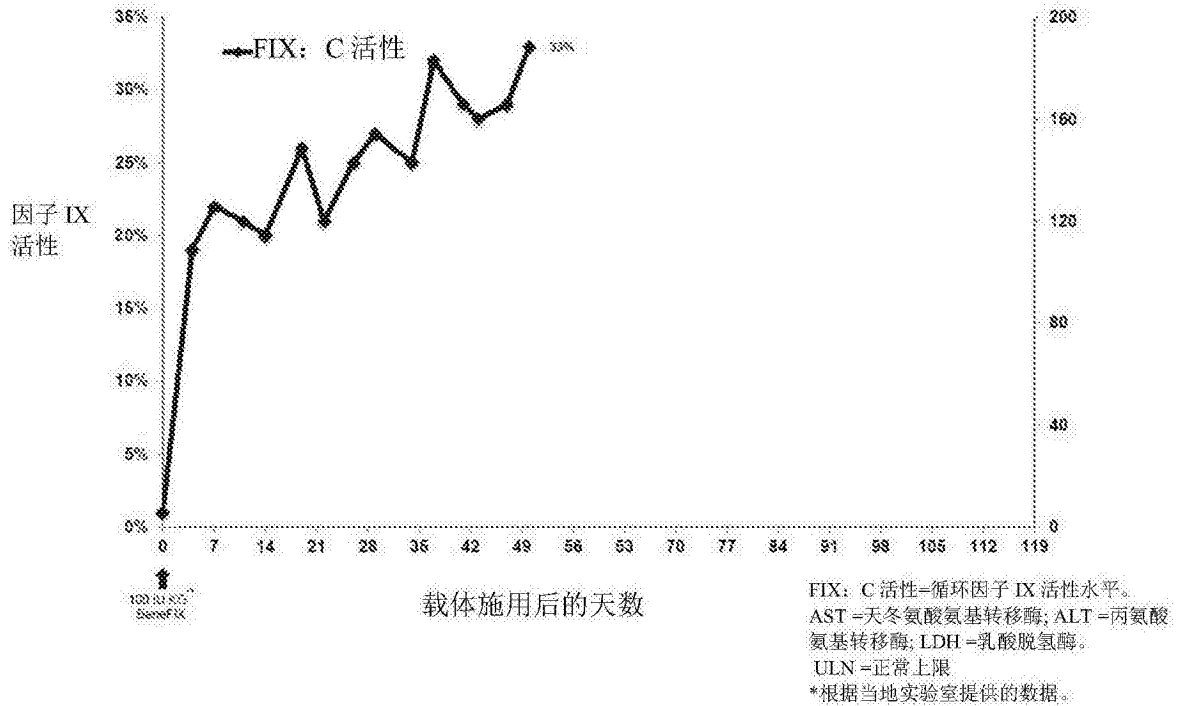


图 23A

AAV-FIX 39-Padua: 第4受试者第50天肝功能  
 自上一次 BeneFIX 输注后 50 天的受试者 4 [ $5 \times 10^{11}$  vg/kg]  
 剂量:  $5.57 \times 10^{13}$  vg AAV-FIX39-Padua +  $2.22 \times 10^{14}$  cp 空衣壳 [1:4]

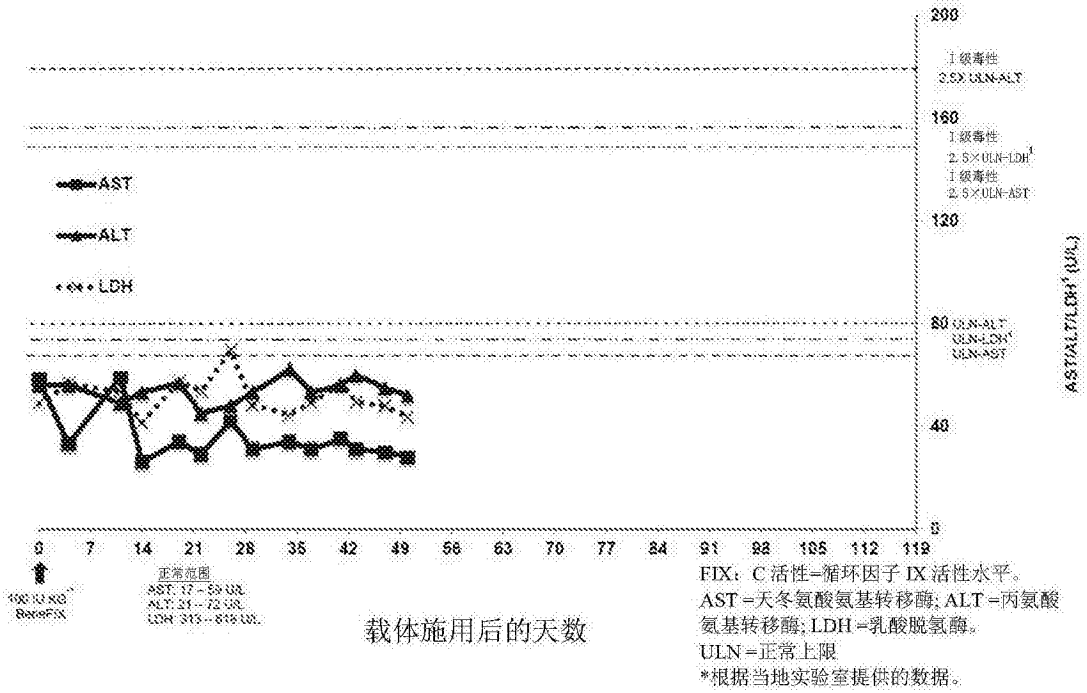


图23B

人受试者中 AAV-FIX39-Padua 的低免疫原性概况

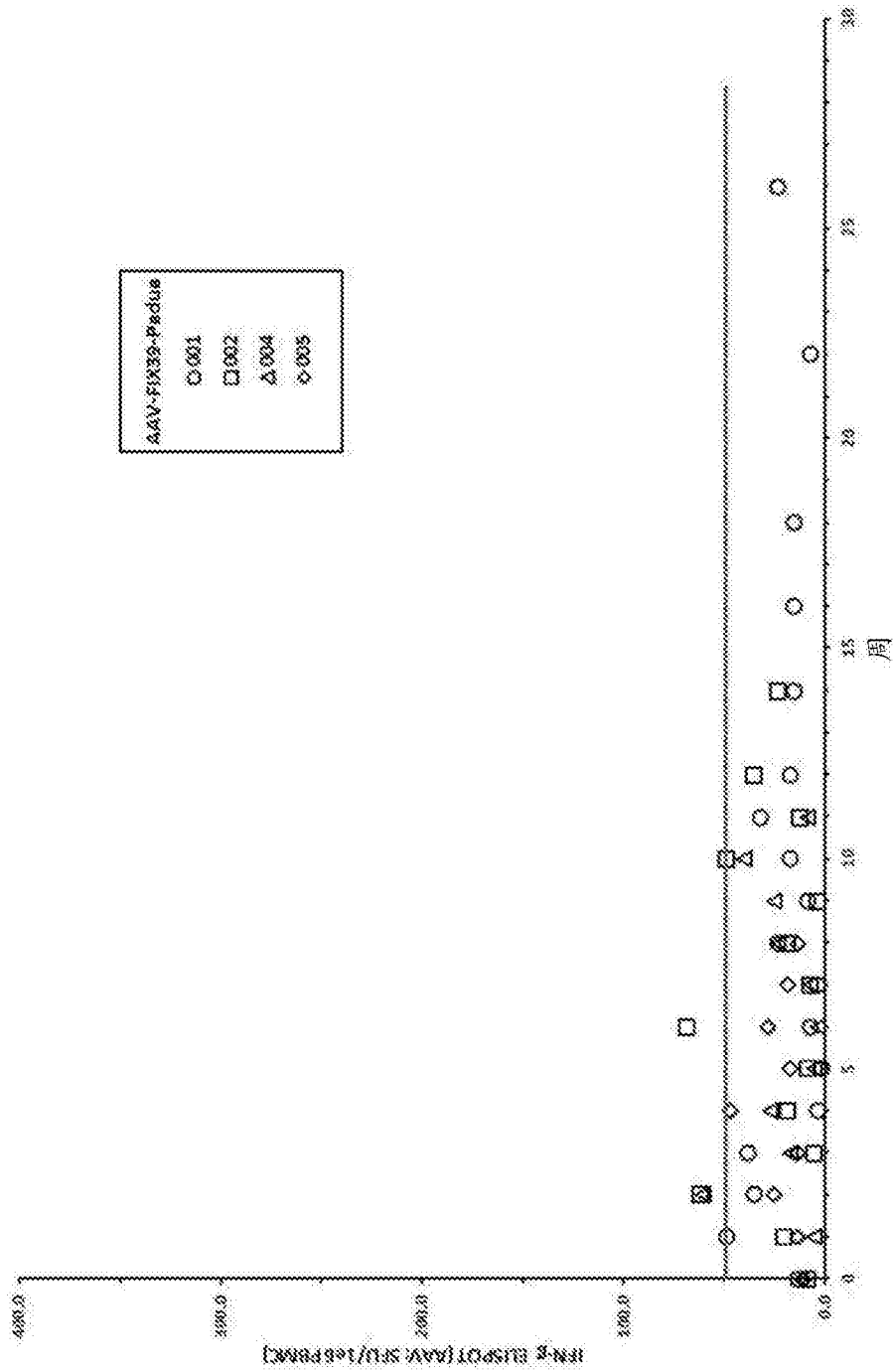


图24A



人受试者中 AAV 载体的比较无免疫原性概况

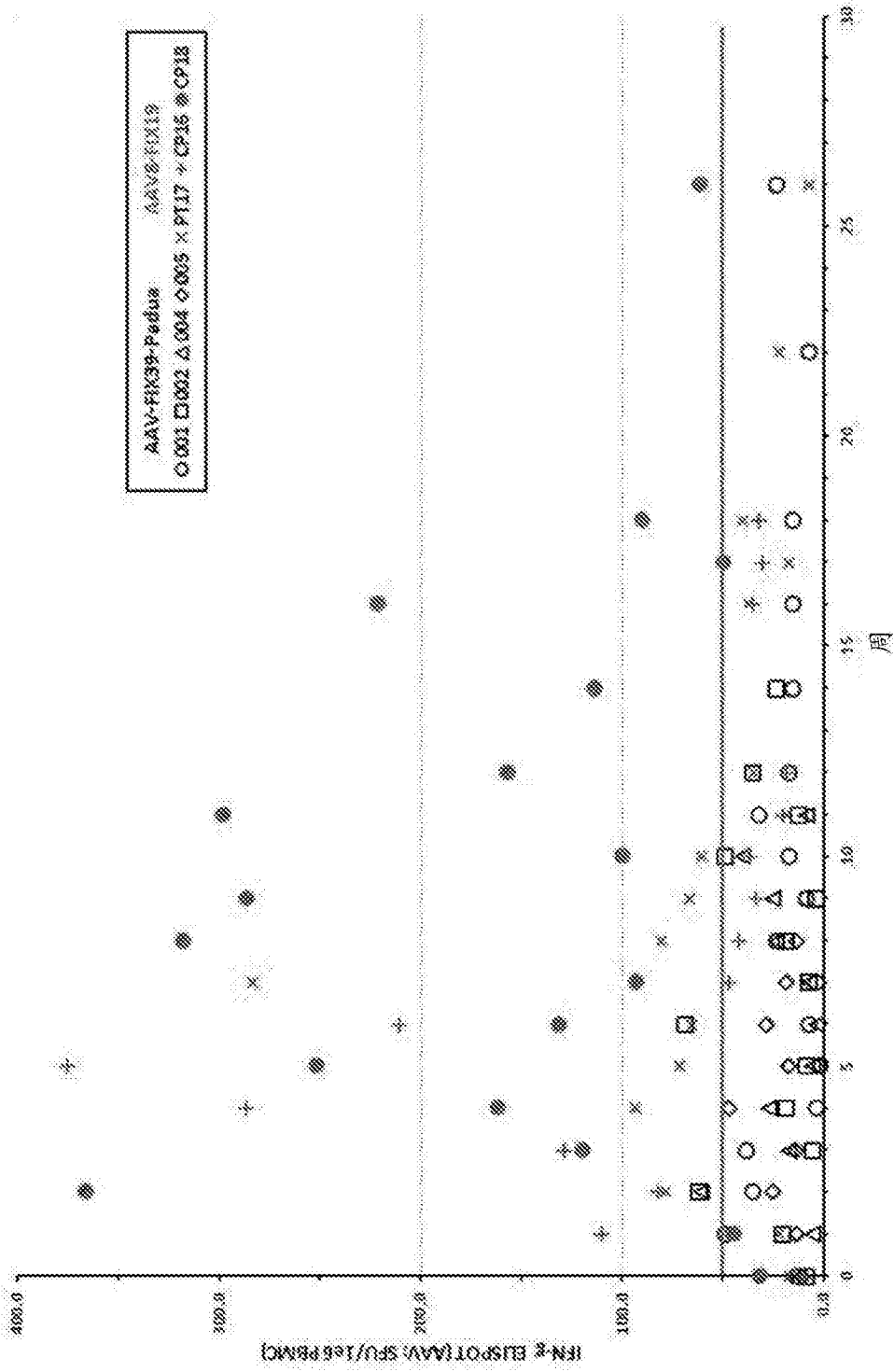


图24B