



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113748122 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202080030827.0

峰野纯一 田中佳典

(22) 申请日 2020.04.23

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113748122 A

专利代理师 罗文锋 彭昶

(43) 申请公布日 2021.12.03

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 14/015 (2006.01)

2019-082417 2019.04.24 JP

C12N 5/10 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.22

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

C40B 50/06 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/017495 2020.04.23

(56) 对比文件

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/218419 JA 2020.10.29

CN 104937100 A, 2015.09.23

JP 2017513486 A, 2017.06.01

(73) 专利权人 宝生物工程株式会社
地址 日本滋贺县草津市

审查员 戎晓媛

权利要求书1页 说明书16页
序列表35页 附图2页

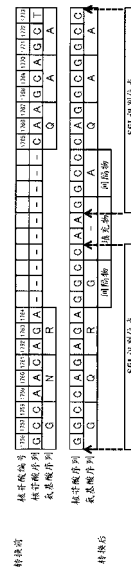
(72) 发明人 西江敏和 高岛扶有子 榎龙嗣

(54) 发明名称

具有脑靶向特性的AAV突变体

(57) 摘要

本发明提供编码腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白突变体的核酸,所述突变体含有包含选自SEQ ID No.15-62的氨基酸序列的肽或者包含通过在选自SEQ ID No.15-62的氨基酸序列中置换、缺失、插入和/或添加一个或数个氨基酸残基产生的氨基酸序列的肽;包含该核酸的DNA;具有该DNA的细胞;以及产生该细胞的方法。



1. 编码腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白的突变体的核酸, 在所述 AAV 衣壳蛋白中插入由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列组成的肽或插入间隔物序列和由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列组成的肽, 其中所述肽被置于 AAV 衣壳蛋白中对应于 AAV2 VP1 的氨基酸编号 588 和氨基酸编号 589 的氨基酸之间的位置。

2. 根据权利要求 1 的核酸, 其中 AAV 衣壳蛋白来源于 AAV2。

3. 包含根据权利要求 1 或 2 中任一项的核酸的重组 DNA。

4. 包含根据权利要求 1 或 2 的核酸或根据权利要求 3 的重组 DNA 的细胞。

5. 包含 AAV 衣壳蛋白的突变体的 AAV 颗粒, 在所述 AAV 衣壳蛋白中插入由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列组成的肽或插入间隔物序列和由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列组成的肽, 其中所述肽被置于 AAV 衣壳蛋白中对应于 AAV2 VP1 的氨基酸编号 588 和氨基酸编号 589 的氨基酸之间的位置。

6. 根据权利要求 5 的 AAV 颗粒, 其中 AAV 衣壳蛋白来源于 AAV2。

7. 产生基因转导细胞的方法, 该方法包含使包含 AAV 衣壳蛋白的突变体的 AAV 颗粒与细胞接触的步骤, 在所述 AAV 衣壳蛋白中插入由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列组成的肽或插入间隔物序列和由 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列组成的肽, 其中所述肽被置于 AAV 衣壳蛋白中对应于 AAV2 VP1 的氨基酸编号 588 和氨基酸编号 589 的氨基酸之间的位置。

8. 根据权利要求 7 的方法, 其中 AAV 衣壳蛋白来源于 AAV2。

具有脑靶向特性的AAV突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及编码具有脑向性的腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白突变体的核酸,包含该衣壳蛋白变体的AAV颗粒,以及通过使用该颗粒产生基因转导细胞的方法。

背景技术

[0002] AAV是具有4.7 kb线性单链DNA基因组(包含rep和cap两个基因的开放阅读框)的病毒。rep基因编码基因组复制所必需的四种蛋白(Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)。cap基因表达组装用于形成病毒衣壳的三种衣壳蛋白(VP1、VP2、VP3),以及组装活化蛋白(assembly-activating protein,AAP)。自然界中AAV的复制依赖辅助病毒(如腺病毒或疱疹病毒)的存在。在没有辅助病毒时,AAV的基因组维持在附加体中,或整合至宿主的染色体中,以使AAV以潜伏状态存在。目前已鉴定超过一百种AAV的血清型和进化枝(非专利文献1)。特别是,基于AAV2的基因传递载体的开发得到推进。

[0003] 1989年,基于AAV2的基因传递载体系统首次被开发。基于AAV的载体已被发现具有许多优点。由于野生型AAV是非致病性的,且与任意已知疾病没有病原学上的关系,因此基于AAV的载体被认为是非常安全的。此外,AAV具有高的基因转导效率。

[0004] AAV颗粒的施用实现了进入各种目标器官和目标细胞内长期且稳定的基因转导。到现在为止,已报道了以高效率进入骨骼肌、肝脏(肝细胞)、心脏(心肌细胞)、神经细胞、胰腺细胞和胰岛细胞内的基因转导。此外,AAV已被用于人类临床试验中。另一方面,已作出了通过改变AAV衣壳蛋白而改变AAV的细胞向性的尝试,以及通过中和抗体避免去除AAV颗粒的尝试。例如,已产生了具有对特定器官和细胞(如神经胶质细胞、气道上皮细胞、冠状动脉血管内皮细胞和肺)的向性的AAV衣壳,以及具有对肿瘤细胞(如胶质母细胞瘤细胞、黑色素瘤细胞、肺癌细胞及乳腺癌细胞)的向性的AAV衣壳(非专利文献2)。

[0005] 引文列表

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:Gao等人, J. Virology, Vol. 78, pp. 6381-6388, 2004

[0008] 非专利文献2:Adachi K.等人, Gene Ther. Regul., Vol. 5, pp. 31-55, 2010

[0009] 发明概述

[0010] 本发明将解决的问题

[0011] 本发明的目的包括提供具有脑向性的AAV衣壳蛋白突变体,以及提供将基因有效率地导入脑内的方法。

[0012] 对该问题的解决方案

[0013] 本发明者为解决上述问题作出深入细致努力,并且作为结果,产生了所期望的AAV颗粒,其中AAV颗粒包含含有选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列的AAV衣壳蛋白。从而完成了本发明。

[0014] 本发明概括来说涉及:

[0015] [1] 编码腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白突变体的核酸,所述突变体包含含有选自SEQ

ID NO: 15-62的氨基酸序列的肽或者含有因一个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽;

[0016] [2] 根据[1]的核酸,其中AAV衣壳蛋白来源于AAV2;

[0017] [3] 根据[2]的核酸,其中肽被置于AAV2的VP1中氨基酸编号588和氨基酸编号589之间的位置;

[0018] [4] 包含根据[1]至[3]任一项的核酸的重组DNA;

[0019] [5] 包含根据[1]至[3]任一项的核酸或根据[4]的重组DNA的细胞;

[0020] [6] 包含AAV衣壳蛋白突变体的AAV颗粒,所述突变体包含含有选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列的肽或者含有因一个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽;

[0021] [7] 根据[6]的AAV颗粒,其中AAV衣壳蛋白来源于AAV2;

[0022] [8] 根据[7]的AAV颗粒,其中肽被置于AAV2的VP1中氨基酸编号588和氨基酸编号589之间的位置;

[0023] [9] 产生基因转导细胞的方法,该方法包含使包含AAV衣壳蛋白突变体的AAV颗粒与细胞接触的步骤,所述突变体包含含有选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列的肽或者含有因一个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽;

[0024] [10] 根据[9]的方法,其中AAV衣壳蛋白来源于AAV2;以及

[0025] [11] 根据[10]的方法,其中肽被置于AAV2的VP1中氨基酸编号588和氨基酸编号589之间的位置。

[0026] 发明的效果

[0027] 根据本发明,提供了对进入脑内的基因转导有用的基因转导系统。本发明的AAV颗粒具有对脑的高的细胞向性,并且通过AAV颗粒转导的基因可强烈地表达。

[0028] 附图简述

[0029] [图1] 图1展示了产生用于使衣壳蛋白能够包含随机肽的核酸构建体的方法。

[0030] [图2] 图2展示了本发明的AAV衣壳蛋白突变体的向性的评价结果。

[0031] 实施发明的方式

[0032] 如本文所使用的,“腺相关病毒”指属于依赖病毒属(*Dependovirus*)的小病毒,其处于细小病毒科(*Parvoviridae*)中,且能感染包括人的灵长目动物和其他哺乳动物。在下文中,腺相关病毒简称为AAV。AAV具有非包膜的正二十面体外壳(衣壳)和在壳内的线性单链DNA。如本文所使用的,AAV包含野生型病毒及其衍生物,并且除非另有特别说明,包含AAV的所有血清型和进化枝。

[0033] 如本文所使用的,“载体”的意思为用于介导多核苷酸传递至细胞的分子或缔合分子,且其包含多核苷酸或与多核苷酸缔合。除非另有特别说明,载体的实例包括载体DNA(如质粒载体和噬菌体载体)、病毒载体颗粒、脂质体以及其他用于基因传递的运载体。

[0034] 如本文所使用的,“衣壳蛋白”的意思为由存在于AAV基因组的cap基因编码的且构成AAV衣壳的蛋白。野生型AAV基因组编码三种衣壳蛋白,存在VP1、VP2和VP3。如本文所使用的,衣壳蛋白包含VP1、VP2和VP3。

[0035] 如本文所使用的,在氨基酸置换、缺失、插入和/或添加的上下文中术语“数个”的

意思,取决于参考氨基酸序列的长度,为例如2、3、4、5、6、7、8或9个氨基酸。

[0036] (1) 编码AAV衣壳蛋白突变体的核酸

[0037] 本发明的核酸编码AAV衣壳蛋白的突变体,其包含含有选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列的肽或者含有因一个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO: 15-62的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。优选地,本发明的核酸编码AAV衣壳蛋白突变体,其包含含有选自SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:62的氨基酸序列的肽。更优选地,本发明的核酸编码AAV衣壳蛋白突变体,其包含含有选自SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列的肽或含有因一个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。含有因一个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与上述SEQ ID NO所显示的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽,当其被包含在AAV衣壳蛋白中时,保留了包含含有上述SEQ ID NO所显示的氨基酸序列的肽的AAV衣壳蛋白突变体的细胞向性。换言之,在上述SEQ ID NO所显示的氨基酸序列中发生置换、缺失、插入和/或添加的氨基酸数量并不受限,只要保留了含有上述SEQ ID NO所显示的氨基酸序列的肽赋予包含该肽的AAV衣壳蛋白突变体的细胞向性。可置换、缺失和/或插入例如1至5个,优选1至4个,更优选1、2或3个氨基酸。可添加例如1至9个,优选1至8个,更优选1至7个,再更优选1至6个,再更优选1、2、3或4个氨基酸。

[0038] 例如,待包含在AAV衣壳蛋白突变体中的肽可为含有与选自SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%同一性的氨基酸序列的肽。含有与上述SEQ ID NO所显示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%同一性的氨基酸序列的肽,当其被包含在AAV衣壳蛋白中时,保留了包含含有上述SEQ ID NO所显示的氨基酸序列的肽的AAV衣壳蛋白突变体的细胞向性。

[0039] 例如,待包含于AAV衣壳蛋白突变体中的肽可为包含由下式所示的氨基酸序列的肽:

[0040] 式I: $X^1X^2GX^3GWV$;

[0041] 式II: $X^4X^5X^6X^7GWV$;

[0042] 式III: $X^8X^9GX^{10}X^{11}WV$;

[0043] 式IV: $X^{12}X^{13}GX^{14}GX^{15}V$;

[0044] 式V: $X^{16}X^{17}GX^{18}GWX^{19}$;或

[0045] 式VI: $X^{20}X^{21}GX^{22}REX^{23}$,

[0046] 其中 X^1 至 X^{23} 的每一个为任意氨基酸残基,G表示甘氨酸,W表示色氨酸,V表示缬氨酸,R表示精氨酸,E表示谷氨酸。优选地,在式I ($X^1X^2GX^3GWV$)中, X^1 为E(谷氨酸)、G(甘氨酸)或T(苏氨酸),且 X^2 为R(精氨酸)、T(苏氨酸)、S(丝氨酸)、N(天冬酰胺)、E(谷氨酸)或D(天冬氨酸),且 X^3 为V(缬氨酸)、H(组氨酸)、R、M(甲硫氨酸)或L(亮氨酸)。优选地,在式II ($X^4X^5X^6X^7GWV$)中, X^4 为A(丙氨酸)或E, X^5 为D、G或A, X^6 为K(赖氨酸)、Q(谷氨酰胺)或N,且 X^7 为V或L。优选地,在式III ($X^8X^9GX^{10}X^{11}WV$)中, X^8 为A、E或G, X^9 为S、D、G或R, X^{10} 为T、M、D或V,且 X^{11} 为R、V、S或T。优选地,在式IV ($X^{12}X^{13}GX^{14}GX^{15}V$)中, X^{12} 为D、E、G或R, X^{13} 为A、G、D或V, X^{14} 为I、H、D、F(苯丙氨酸)、G或L,且 X^{15} 为Y(酪氨酸)、F、R、G或V。优选地,在式V ($X^{16}X^{17}GX^{18}GWX^{19}$)中, X^{16} 为A、

E或G, X¹⁷为G、R或S, X¹⁸为V、H或D, 且X¹⁹为T、G、K、I(异亮氨酸)或A。优选地, 在式VI (X²⁰X²¹GX²²REX²³)中, X²⁰为E或A, X²¹为Y或H, X²²为F或Y, 且X²³为G或P(脯氨酸)。

[0047] 含有式I所显示的氨基酸序列的肽的实例包括但不限于: 含有选自SEQ ID NO:18、20、21、22、46、55、59和60的氨基酸序列的肽, 以及含有因1至3个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO:18、20、21、22、46、55、59和60的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。含有式II所显示的氨基酸序列的肽的实例包括但不限于: 含有选自SEQ ID NO:25、29和32的氨基酸序列的肽, 以及含有因1至4个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO:25、29和32的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。含有式III所显示的氨基酸序列的肽的实例包括但不限于: 含有选自SEQ ID NO:15、24、38、48和54的氨基酸序列的肽, 以及含有因1至4个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO:15、24、38、48和54的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。含有式IV所显示的氨基酸序列的肽的实例包括但不限于: 含有选自SEQ ID NO:19、31、35、44、56和58的氨基酸序列的肽, 以及含有因1至4个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO:19、31、35、44、56和58的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。含有式V所显示的氨基酸序列的肽的实例包括但不限于: 含有选自SEQ ID NO:26、39、42、43、47和50的氨基酸序列的肽, 以及含有因1至4个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与选自SEQ ID NO:26、39、42、43、47和50的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。含有式VI所显示的氨基酸序列的肽的实例包括但不限于: 含有由SEQ ID NO:16或17所示的氨基酸序列的肽, 以及含有因1至4个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加而与由SEQ ID NO:16或17所示的氨基酸序列不同的氨基酸序列的肽。

[0048] 可通过将肽插入任意野生型AAV(例如1型AAV(AAV1)、2型AAV(AAV2)、3型AAV(AAV3A、AAV3B等)、4型AAV(AAV4)、5型AAV(AAV5)、6型AAV(AAV6)、7型AAV(AAV7)、8型AAV(AAV8)、9型AAV(AAV9)、10型AAV(AAV10)、11型AAV(AAV11)、鸟AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV或羊AAV)的AAV衣壳蛋白, 或者用所述肽替代AAV衣壳蛋白的部分氨基酸序列(换言之, 通过使AAV衣壳蛋白包含所述肽), 制备本发明的核酸所编码的AAV衣壳蛋白突变体。在本发明中, 优选使用AAV2的衣壳蛋白。

[0049] 本发明的核酸所编码的AAV衣壳蛋白突变体可为在野生型AAV衣壳蛋白中包含一个或多个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加以及上述肽的蛋白。该“包含一个或多个或数个氨基酸的置换、缺失、插入和/或添加以及上述肽的蛋白”保留了原始蛋白的特性, 例如上述肽所赋予的AAV衣壳蛋白突变体的细胞向性、衣壳形成能力、衣壳蛋白的功能(如病毒基因组的保护、进入宿主细胞后的脱壳)等等。

[0050] 进一步地, 间隔物序列可被添加至包含于AAV衣壳蛋白中的肽的N末端和/或C末端。间隔物序列优选由1至5个氨基酸残基组成。构成间隔物序列的氨基酸残基特别地受到限制。例如, 间隔物序列可包含选自甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的氨基酸。

[0051] 可使用AAV VP1、VP2或VP3作为包含肽的AAV衣壳蛋白。可使VP1、VP2和VP3中的任意一者包含肽, 或可使VP1、VP2和VP3全都包含肽。此外, 可使两种衣壳蛋白(如VP1和VP2、VP2和VP3或VP1和VP3)包含肽。VP1至VP3在AAV基因组中由cap基因区域编码。在本发明的一个实施方案中, 使VP1至VP3共有的区域包含肽, 从而使突变可被导入VP1至VP3三者中。在本发明的另一个实施方案中, 与AAV的cap基因区域分开地制备编码VP1、VP2或VP3的基因, 且突变被导入该基因中。在这种情况下, 可实施以下处理, 其抑制从AAV的cap基因区域表达与

由已导入突变的基因编码的衣壳蛋白对应的野生型衣壳蛋白。

[0052] 在使用AAV2 VP1的情况下,本发明的核酸编码的AAV衣壳蛋白突变体优选在氨基酸编号588和氨基酸编号589之间的位置包含肽。AAV2 VP1的氨基酸编号588为精氨酸。AAV2 VP1的氨基酸编号589为谷氨酰胺。AAV2 VP1的氨基酸编号588对应于AAV2 VP2的氨基酸编号451以及AAV2 VP3的氨基酸编号386。在使用AAV2以外的AAV血清型和进化枝的衣壳蛋白作为AAV衣壳蛋白的情况下,使AAV衣壳蛋白在与AAV2 VP1的氨基酸编号588和589对应的氨基酸之间包含肽。本领域技术人员可容易地确定AAV2以外的AAV血清型和进化枝的与在AAV2 VP1的氨基酸编号588的氨基酸对应的衣壳蛋白的氨基酸。例如,见Gao等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.99, No.18, pp. 11854-11859, 2002中展示的VP1氨基酸序列的比对。例如,AAV2 VP1的氨基酸编号588对应AAV1的氨基酸编号589、AAV7的氨基酸编号590以及AAV8的氨基酸编号591。

[0053] 本发明的核酸可与适合的控制序列可操作地连接。控制序列的实例包括启动子序列、多聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制起点、内部核糖体进入位点(IRES)和增强子。启动子序列的实例包括诱导型启动子序列和组成型启动子序列。控制序列可为AAV内源或外源的序列(衣壳蛋白来源自该AAV)、天然序列或合成序列。本发明也包括此类能表达AAV衣壳蛋白突变体的重组DNA。

[0054] 本发明的重组DNA对将本发明的核酸传递至体外的、离体的或体内的细胞以及将表达AAV衣壳蛋白突变体的能力赋予细胞是有用的。然后,本发明的核酸所传递至的细胞对产生AAV颗粒是有用的。重组DNA特别可用于将本发明的核酸传递或导入动物细胞,优选哺乳动物细胞。

[0055] 在本发明中,可通过使用作载体的DNA保留本发明的核酸而制备本发明的重组DNA。例如,可使用质粒DNA、噬菌体DNA、转座子、黏粒DNA、附加体DNA或病毒基因组。

[0056] (2) 含有本发明的核酸的细胞

[0057] 本发明也提供了包含本发明的核酸(具体地说,如上文(1)中所述重组DNA)的宿主细胞,例如分离的宿主细胞。例如,分离的细胞为在体外维持的细胞系。如下文所阐明的,本发明的宿主细胞对本发明的AAV颗粒的产生是有用的。当使用本发明的宿主细胞以产生AAV颗粒时,宿主细胞可被称为“包装细胞”或“生产细胞”。本发明的宿主细胞可包含整合至基因组内的如上文(1)中所述的本发明的重组DNA,或可将重组DNA保留在细胞中以瞬时表达AAV衣壳蛋白突变体。

[0058] 将本发明的重组DNA导入宿主细胞内可通过已知方法实施。例如,可使用电穿孔法、磷酸钙沉淀法、直接进入细胞的显微注射法、脂质体介导的基因转染法或使用高速粒子枪的核酸传递法。当使用病毒载体时,可选择适合该载体的感染方法。通过使用此类已确立的技术,将本发明的重组DNA稳定地导入宿主细胞的染色体或瞬时地导入宿主细胞的细胞质。为了稳定的转化,选择标记,例如众所周知的选择标记如新霉素抗性基因(编码新霉素磷酸转移酶)或潮霉素B抗性基因(编码氨基糖苷磷酸转移酶(APH)),可与本发明的重组DNA连接。

[0059] 各种细胞,例如哺乳动物细胞包括小鼠细胞和灵长目动物细胞(例如,人类细胞)或昆虫细胞,可作为宿主细胞使用。适合的哺乳动物细胞的实例包括但不限于原代细胞和细胞系。适合的细胞系的实例包括293细胞、COS细胞、HeLa细胞、Vero细胞、3T3小鼠成纤维

细胞、C3H10T1/2成纤维细胞、CHO细胞和衍生自它们的细胞。

[0060] (3) 包含含有本发明的核酸编码的氨基酸序列的AAV衣壳蛋白的AAV颗粒

[0061] 本发明的AAV颗粒为包含含有如上文(1)所述的肽的AAV衣壳蛋白突变体的AAV颗粒。本发明的AAV颗粒可从如上文(2)所述的宿主细胞中产生。本发明的AAV颗粒具有对脑的向性,且对将基因导入脑内是有用的。脑包括脑细胞如神经元细胞和胶质细胞(小胶质细胞、少突胶质细胞、星形胶质细胞)。通过本发明的AAV颗粒导入的基因在上述组织、器官和细胞中强烈地表达。

[0062] 为了产生AAV颗粒,可使用包含产生AAV颗粒所必需的一些元件的细胞作为包装细胞。第一元件为重组AAV的载体基因组(也称作表达载体),其可在宿主细胞中复制且包装于AAV颗粒中。重组AAV载体基因组包含所关注的异源多核苷酸和位于所关注的异源多核苷酸的每一侧(即5'-和3'-侧)的AAV反向末端重复(ITR)序列。所关注的异源多核苷酸可具有用于表达的控制序列。ITR序列的核苷酸序列是已知的。例如,关于AAV2-ITR序列,参见Human Gene Therapy, Vol.5, pp. 793-801, 1994。可使用来源于各种AAV血清型(包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7等)中的任意一种的ITR序列作为AAV ITR序列。用于本发明中的ITR序列可来源于野生型AAV,或者可通过核苷酸的插入、缺失或置换而改变。ITR序列使重组AAV载体基因组能够在Rep蛋白的存在下复制,且使重组AAV载体基因组能够在AAV颗粒的形成中掺入到衣壳颗粒内。

[0063] 可装载于本发明的AAV颗粒中的所关注的异源多核苷酸的尺寸通常少于约5千碱基(kb)。例如,所关注的异源多核苷酸可为编码受体所缺乏或缺失的所关注的蛋白的基因,编码具有期望的生物学或治疗活性(例如抗微生物、抗病毒或抗肿瘤活性)的蛋白的基因,编码抑制或减少有害或不期望的蛋白生成的RNA的期望的核苷酸序列,或编码抗原蛋白的核苷酸序列。可适当地根据目的选择所关注的异源多核苷酸。

[0064] 在本发明的一个实施方案中,重组AAV载体基因组缺乏cap基因区域和/或rep基因区域。在此实施方案中,AAV颗粒(其中包装了重组AAV载体基因组)不在感染的细胞中单独复制以再次形成AAV颗粒。

[0065] 产生AAV颗粒所必需的第二元件为提供在野生型AAV中编码的蛋白的构建体。该构建体编码提供AAV颗粒形成所需的AAV基因产物的AAV来源的基因。换言之,该构建体包含主要的AAV ORF(rep基因区域和cap基因区域的编码区域)之一或两者。为了产生本发明的AAV颗粒,至少将编码AAV衣壳蛋白突变体的核酸作为cap基因使用,所述突变体包含具有选自SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:62的氨基酸序列的肽。如上文(2)所述的能够表达突变体的本发明的宿主细胞可被用于AAV颗粒的产生。AAV颗粒具有由许多衣壳蛋白构成的外壳。所有衣壳蛋白都可为突变体,或者部分衣壳蛋白可为突变体且其他可为野生型衣壳蛋白。本发明的AAV颗粒可包含一种衣壳蛋白突变体或多种衣壳蛋白突变体。

[0066] AAV的rep基因包含于rep基因的编码区域,且其包括编码复制蛋白Rep78、Rep68、Rep52和Rep40的基因。已显示这些Rep表达产物具有许多功能,包括AAV基因组DNA复制起点的识别、结合和切口形成,DNA解旋酶活性,以及AAV来源的启动子的转录的调节。

[0067] 产生AAV颗粒所必需的第三元件为AAV复制的辅助病毒功能(也称为附属功能)。通常使用腺病毒以导入辅助功能。然而,也可使用其他病毒,如单纯疱疹病毒1型或2型以及牛痘病毒。当使用病毒时,宿主细胞受到作为辅助病毒的病毒感染的感染。例如,由于AAV颗粒的包

装仅需要腺病毒早期基因的表达,也可使用不呈现晚期基因表达的腺病毒。缺乏晚期基因表达的腺病毒突变体(例如ts100K或ts149腺病毒突变体)也可被使用。也可通过使用辅助病毒功能所必需的分自辅助病毒的核酸制备提供辅助病毒功能的核酸构建体,然后可将其导入宿主细胞。提供辅助病毒功能的构建体包含提供一种或多种辅助病毒功能的核苷酸序列,且其以质粒、噬菌体、转座子、黏粒或其他病毒的形式提供给宿主细胞。

[0068] 为了产生AAV颗粒,实施了(a)将第一元件即重组AAV载体基因组导入宿主细胞内的步骤,(b)将第二元件即提供AAV辅助功能的构建体导入宿主细胞内的步骤,以及(c)将第三元件即辅助病毒功能导入宿主细胞内的步骤。这些步骤可同时实施,或可按顺序实施。步骤(a)至(c)的顺序可为任意顺序。当第一至第三元件被导入宿主细胞内时,rep基因表达产物将重组载体基因组切下并复制。被表达的衣壳蛋白形成衣壳,且重组载体基因组在衣壳中被包装,以产生AAV颗粒。当宿主细胞表达AAV衣壳蛋白突变体时,产生的AAV颗粒的外壳包含AAV衣壳蛋白突变体。

[0069] AAV颗粒可通过各种纯化方法(如CaCl₂密度梯度离心)从宿主细胞的培养上清液或溶解产物中分离和纯化。例如,当在上述步骤(c)中使用病毒时,可添加基于它们的尺寸将AAV颗粒与辅助病毒分离的步骤。也可基于对肝素不同的亲和力将AAV颗粒与辅助病毒分离。此外,可通过已知方法使剩余的辅助病毒失活。例如,可通过在约60°C加热例如20分钟或更多而使腺病毒失活。由于AAV颗粒对热非常稳定,上述处理对选择性去除用作辅助病毒的腺病毒是有效的。

[0070] (4)本本发明的基因转导细胞的产生方法

[0071] 为了基因治疗目的或其他目的,通过上文(3)获得的本发明的AAV颗粒被用于将所关注的异源多核苷酸传递至细胞。AAV颗粒通常被导入体内或体外细胞。对于体外导入,使AAV颗粒与从活体获得的细胞接触。然后,也可将该细胞移植至活体内。对于将细胞导入活体内,将细胞作为药物组合物配制,以及可使用各种技术如肌肉内、静脉内、皮下及腹膜内施用。对于体内转导,将AAV颗粒作为药物组合物配制,且其通常肠胃外施用(例如通过肌肉内、皮下、肿瘤内、经皮或脊柱内途径施用)。包含AAV颗粒的药物组合物可含有药学上可接受的载剂,以及必要时含有其他试剂、药物、稳定剂、载剂、佐剂、稀释剂等。

实施例

[0072] 在下文中,本发明参考实施例进行说明,本发明并不特别限定于实施例。

[0073] 实施例1:AAV2随机肽质粒文库的制备

[0074] 从分布宿主大肠杆菌(*Escherichia coli*) HB101中提取携带AAV2基因组的质粒载体pAV1(ATCC号:37215)。从提取出的质粒中用限制性酶BglIII(TAKARA BIO Inc.生产)切下AAV2的基因组DNA(约4.7 kb)。将该基因组DNA插入pUC118 BamHI/BAP(TAKARA BIO Inc.生产)中。由此获得的质粒DNA命名为AAV2WG/pUC118。

[0075] 用限制性酶ScaI(TAKARA BIO Inc.生产)消化AAV2WG/pUC118以获得含有cap基因核苷酸1190至2017的约0.8 kb的片段。将此片段插入pUC118 HincII/BAP(TAKARA BIO Inc.生产)中。由此获得的质粒DNA命名为Cap-ScaI/pUC118。然后,对Cap-ScaI/pUC118进行PCR以实施一系列的改变,在所述改变中Cap-ScaI/pUC118中由Cap基因的核苷酸1759至1761组成的核苷酸序列AAC(587N)转换为CAG(587Q),由作为间隔物的GGC、作为填充物的

CAAG以及作为间隔物的GCC组成的10个核苷酸插入至核苷酸1764和核苷酸1765之间,以及由核苷酸1765至1773组成的核苷酸序列CAA (589Q) GCA (590A) GCT (591A) 转换为CAG (589Q) GCG (590A) GCC (591A),其中括号内的文字显示氨基酸编号和所编码的氨基酸。因此,插入了限制性酶SfiI的两个识别位点以及在SfiI识别位点之间的间隔物、填充物和间隔物。图1展示了Cap基因核苷酸1756至1773转换前后的核苷酸序列。转换前的核苷酸序列显示于序列表的SEQ ID NO:1。转换后的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:2。包含转换的核苷酸序列的质粒DNA命名为Cap-ScaI-S4/pUC118。为了in-fusion克隆, Cap-ScaI-S4/pUC118中的Cap基因部分通过PCR扩增,以获得约0.8 kb的片段。此片段作为插入DNA使用。

[0076] 对AAV2WG/pUC118进行PCR以将突变引入氨苄青霉素抗性基因中限制性酶ScaI的识别位点以及Rep基因中限制性酶SfiI的识别位点内,使得这些识别位点被转换为不被限制性酶识别的序列。对于ScaI识别位点,由氨苄青霉素抗性基因核苷酸304至306组成的核苷酸序列GAG (E) 转换为GAA (E)。转换前的序列显示于SEQ ID NO:3,而转换后的序列显示于SEQ ID NO:4。对于SfiI识别位点,由Rep基因核苷酸217至219组成的核苷酸序列GCC (A) 转换为GCA (A)。转换前的序列显示于SEQ ID NO:5,而转换后的序列显示于SEQ ID NO:6。用ScaI (TAKARA BIO Inc.生产) 消化由此获得的质粒DNA以获得缺乏作为Cap基因的一部分的约0.8 kb的线性载体。将此作为线性载体用于in-fusion克隆。

[0077] 使用In-Fusion (注册商标) HD克隆试剂盒 (Clontech Laboratories, Inc.生产) 和克隆增强剂 (Clontech Laboratories, Inc.生产),将插入DNA插入线性载体中,并且从而实施定向克隆。由此获得的质粒DNA命名为AAV2WG-Cap-ScaI-S4/pUC118Sx。

[0078] 包含编码7个氨基酸的随机肽的核苷酸序列的寡聚DNA (SEQ ID NO:7) 通过人工合成产生。通过与引物 (SEQ ID NO:8) 和Klenow片段 (TAKARA BIO Inc.生产) 在37°C反应3小时,从寡聚DNA制备双链DNA。使用核苷酸去除试剂盒 (Nucleotide removal kit) (QIAGEN生产) 纯化双链DNA,然后使用限制性酶BglI (TAKARA BIO Inc.生产) 将其消化。使用DNA连接试剂盒“Mighty Mix” (TAKARA BIO Inc.生产) 将此DNA插入至用SfiI消化的AAV2WG-Cap-ScaI-S4/pUC118Sx中。由此获得的质粒命名为AAV2WG-RPL/pUC118Sx,并将其作为AAV2随机肽质粒文库使用。

[0079] 实施例2:制备AAV2随机肽病毒文库

[0080] (1) 接种AAV293细胞

[0081] 收集培养的AAV293细胞 (Stratagene Corp.生产),然后使其在含有10% FBS和2 mM L-谷氨酸钠的DMEM (Sigma生产) 中以 5×10^4 个细胞/mL悬浮。将含有AAV293细胞的40 mL悬浮液放进细胞培养用T225 cm²瓶 (Corning Incorporated生产) 中,然后将其在CO₂孵育箱中37°C培养72小时。

[0082] (2) 将质粒导入AAV293细胞

[0083] 用400 ng实施例1中获得的AAV2WG-RPL/pUC118Sx和40 μg pHELP (CELL BIOLABS, Inc.生产) 通过一般的磷酸钙法转染AAV293细胞。在转染后六小时,完全去除培养基。在添加40 mL含有2% FBS和2 mM L-谷氨酸钠的DMEM后,将细胞在CO₂孵育箱中37°C培养48小时。

[0084] (3) 收集AAV2随机肽病毒文库

[0085] 将0.5 mL 0.5 M EDTA添加至正在孵育的T225 cm²瓶中,随后静置几分钟。然后通过移液剥离AAV293细胞并将其收集至50 mL管中,并且以300 x g将其离心10分钟。然后去

除上清液。将细胞重悬于每瓶2 mL TBS(Tris缓冲盐水)中,然后对其进行三次连续处理以收集含有AAV随机肽病毒文库的细胞溶解产物,所述连续处理由用乙醇/干冰冷冻15分钟、37°C水浴解冻15分钟以及涡旋震荡1分钟组成。向细胞溶解产物每1 mL TBS添加5 μ L 1 M $MgCl_2$,以及添加终浓度为200 U/mL的Benzonase(注册商标)核酸酶(Merck KGaA生产),然后在37°C反应30分钟。然后,通过每1 mL TBS添加6.5 μ L 0.5 M EDTA终止反应。细胞溶解产物以10000 rpm在4°C离心10分钟,然后收集上清液作为AAV载体溶液。

[0086] (4) 通过实时PCR定量AAV载体溶液滴度

[0087] 将2 μ L 10 X DNaseI缓冲液、15.2 μ L注射用水(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.生产)以及0.8 μ L DNaseI(TAKARA BIO Inc.生产)添加至2 μ L AAV载体溶液内,且将混合物在37°C孵育1小时以去除游离的基因组DNA和质粒DNA。为了使DNaseI失活,将混合物在99°C加热10分钟。然后添加15 μ L注射用水、4 μ L 10 X ProK缓冲液(0.1 M Tris-HCl(pH 7.8)、0.1 M EDTA、5% SDS)以及1 μ L蛋白酶K(TAKARA BIO Inc.生产),且将混合物在55°C孵育1小时。然后,为了使蛋白酶K失活,将混合物在95°C加热10分钟。使用SYBR(注册商标)Premix ExTaq2(TAKARA BIO Inc.生产)和引物(SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10),根据试剂盒所附说明书对此样品进行AAV滴度定量。用注射用水将样品稀释50倍,并且将2 μ L稀释的溶液使用于滴度定量。使用通过限制性酶消化pAV1得到的线性DNA作为标准品。

[0088] 实施例3: AAV随机肽病毒文库的纯化

[0089] (1) 通过氯化铯密度梯度离心的纯化1

[0090] 在用于超速离心的40PA管(HITACHI-KOKI Co., Ltd.生产)中,将4 mL密度调整至1.5的氯化铯溶液、4 mL密度调整至1.25的氯化铯溶液以及28 mL实施例2-(4)中制备的AAV载体溶液按此顺序从底部分层放入。该管用超速离心机HIMAC(HITACHI-KOKI Co., Ltd.生产)以25000 rpm在16°C离心3小时。离心后,从管的上部去除28 mL溶液,然后从上部将0.7 mL溶液的等分试样相继收集至1.5 mL管中。以与实施例2-(4)同样的方式,定量每份收集的溶液中含有的AAV载体的滴度。

[0091] (2) 通过氯化铯密度梯度离心的纯化2

[0092] 在实施例3-(1)中显示具有高滴度的数个部分中添加密度调整至1.39的氯化铯溶液以达到10.5 mL的总体积。将由此获得的溶液放入用于超速离心的13PA管(HITACHI-KOKI Co., Ltd.生产),然后将其以38000 rpm在18°C离心16小时。离心后,将0.7 mL溶液的等分试样先后从管上部收集。以与实施例2-(4)相同的方式,定量每份收集的溶液中所含有的AAV载体的滴度。

[0093] (3) 通过透析脱盐

[0094] 将实施例3-(2)中显示具有高滴度的多个部分混合,并随后添加至Slide-A-lyzer透析卡(Pierce生产)。通过用1 L磷酸盐缓冲盐水(PBS)在4°C透析3小时两次,以及用500 mL PBS/5%山梨糖醇溶液在4°C透析过夜,将纯化的AAV溶液脱盐。然后收集溶液,将其用0.22 μ m过滤器(Millipore生产)灭菌并储存于-80°C直至临用前。以与实施例2-(4)相同的方式分别定量纯化的AAV颗粒的滴度。

[0095] 实施例4: AAV2随机肽文库筛选

[0096] (1) 小鼠尾静脉施用

[0097] 将在实施例3-(3)中获得的纯化AAV颗粒以 1.5×10^{14} 病毒基因组(VG)/kg通过尾

静脉施用至BALB/c小鼠。施用72小时后,收集脑,通过使用NucleoSpin (注册商标) tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG生产)提取基因组DNA(第1轮)。

[0098] (2)用PCR再克隆随机肽序列

[0099] 使用实施例4-(1)中提取的基因组DNA作为模板以及PrimeSTAR(注册商标)GXL DNA聚合酶(TAKARA BIO Inc.生产)扩增编码随机肽序列的DNA。使用正向引物1(SEQ ID NO:11)和反向引物1(SEQ ID NO:12)作为引物。通过重复30个循环实施PCR,且PCR的每个循环由98°C 10秒,55°C 15秒以及68°C 40秒组成。然后使用二十五分之一的PCR反应溶液、正向引物2(SEQ ID NO:13)和反向引物2(SEQ ID NO:14)制备与之前量相同量的反应混合物。将反应混合物进行30个循环的PCR,其中每个循环由98°C 10秒,55°C 15秒以及68°C 15秒组成。通过使用Nucleospin extract II(MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG生产)从由此获得的反应溶液中纯化DNA,且用限制性酶BglI将其消化。电泳后,通过使用Nucleospin extract II纯化消化产物,且通过使用DNA连接试剂盒“Mighty Mix”将其再克隆至制备于实施例1中的AAV2WG-Cap-ScaI-S4/pUC118Sx中。

[0100] (3)AAV2随机肽病毒文库的产生和纯化

[0101] 使用实施例4-(2)中获得的质粒以与实施例2和实施例3所描述的那些相同的方法,实施AAV2随机肽病毒文库产生和AAV颗粒的纯化。

[0102] (4)筛选

[0103] 以与实施例4-(1)中相同的方式实施筛选(施用AAV颗粒至小鼠以及收集脑)且提取基因组DNA(第2轮)。此外,使用提取的基因组DNA,再次实施再克隆、产生和纯化文库以及筛选,且提取基因组DNA(第3轮)。

[0104] (5)随机肽测序

[0105] 在每个筛选阶段(第1轮至第3轮),对AAV随机肽质粒文库实施测序。由在第2轮和第3轮积聚于脑中的克隆所编码的肽序列以及出现频次在表1和表2中显示。

[0106] [表1]

序列	SEQ ID NO:	第 2 轮	第 3 轮
GSGVTWV	15	8	4
AHGYREP	16	4	2
EYGFREG	17	16	1
ETGHGWV	18	4	1
GGGIGYV	19	14	—
ERGVGWV	20	5	—
ENGVGWV	21	2	—
GSGVGWV	22	2	—
ADGITWG	23	1	—
ADGTRWV	24	1	—
ADKVGWV	25	1	—
AGGVGWT	26	1	—
[0107] AGGVTGV	27	1	—
AGNAGGM	28	1	—
AGQLGWV	29	1	—
ARGTEWE	30	1	—
DAGHGFV	31	1	—
EANVGWV	32	1	—
ECGLGEG	33	1	—
EGEVTWL	34	1	—
EGGDGRV	35	1	—
EGGFGEA	36	1	—
EGGG	37	1	—
EGGMVWV	38	1	—
EGGVGWT	39	1	—
EGGVMWL	40	1	—

[0108] [表2]

序列	SEQ ID NO:	第 2 轮	第 3 轮
EGQVTWL	41	1	—
ERGHGWG	42	1	—
ESGVGWK	43	1	—
GDGFGGV	44	1	—
GDGVTWA	45	1	—
GEGRGWV	46	1	—
GGGDGWI	47	1	—
GGGDSWV	48	1	—
GGGIAWVAQAAL	49	1	—
GGGVGWA	50	1	—
GKGQVME	51	1	—
[0109] GNGTGGG	52	1	—
GQGGHME	53	1	—
GRGVTWV	54	1	—
GSGMGWV	55	1	—
GVGGGVV	56	1	—
NDVRGRV	57	1	—
RDGLGFV	58	1	—
TDGLGWV	59	1	—
TEGHGWV	60	1	—
VAERLYG	61	1	—
VARGAGE	62	1	—
总计		95	8

[0110] 如表1和表2所示,具有包含特定肽序列的衣壳的AAV积聚在脑中。特别是提示了在第3轮观察到的肽序列GSGVTWV (SEQ ID NO:15)、AHGYREP (SEQ ID NO:16)、EYGFREG (SEQ ID NO:17)和ETGHGWV (SEQ ID NO:18)倾向于感染脑。

[0111] 此外,提示了SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:110的肽序列倾向于感染脑,所述序列为包含在第2轮观察到的序列和间隔物的序列。特别是GGSGVTWVA (SEQ ID NO:63)、GAHGYREPA (SEQ ID NO:64)、GEYGFREGA (SEQ ID NO:65)和GETGHGWVA (SEQ ID NO:66)倾向于感染脑,所述序列为包含在第3轮观察到的序列和间隔物的序列。

[0112] 实施例5:评价具有已获取肽序列的AAV载体的向性

[0113] (1) 构建具有已获取肽序列的pRC-GDDGTRG

[0114] 将具有如在实施例4-(5)中获得的肽序列 (SEQ ID NO:15-20) 的AAV2WG-Cap-ScaI-S4/pUC118Sx克隆用限制性酶SnaBI (TAKARA BIO Inc.生产)和HindIII (TAKARA BIO Inc.生产)消化以获得片段。将该片段通过DNA连接试剂盒“Mighty Mix” (TAKARA BIO Inc.生产)连接至通过用SnaBI和HindIII消化pAAVRC2载体 (CELL BIOLABS, Inc.生产)而获得的载体片段,以获得辅助质粒pRC-GSGVTWV、pRC-AHGYREP、pRC-EYGFREG、pRC-ETGHGWV、pRC-GGGIGYV和pRC-ERGVGWV。

[0115] (2) 产生和纯化AAV2-LacZ衣壳突变体

[0116] 使用pAAV-LacZ (TAKARA BIO Inc. 生产)、pHELP以及在实施例5- (1) 中制备的pRC辅助质粒 (pRC-GSGVTWV、pRC-AHGYREP、pRC-EYGFREG、pRC-ETGHGWV、pRC-GGGIGYV或pRC-ERGVGWV) 对接种于T255 cm²瓶的293 T细胞使用PEIpro (Polyplus Transfection生产) 进行转染。作为对照, 实施了用携带野生型衣壳的pRC2载体代替具有肽序列的pRC辅助质粒的转染。在CO₂孵育箱中将被转染的293 T细胞在37°C培养72小时。从T255 cm²瓶中收集含有AAV的上清液, 然后使用AVB琼脂糖凝胶 (GE healthcare生产) 对其进行亲和纯化。然后, 通过超滤浓缩和纯化AAV以制备纯化的AAV溶液。然后, 通过实施例2- (4) 中所述的方法定量AAV载体的滴度。

[0117] (3) 施用纯化AAV溶液至小鼠

[0118] 使用0.22 μm过滤器将在实施例5- (2) 中获得的纯化AAV溶液过滤, 然后通过尾静脉以0.5 x 10¹¹ VG/小鼠施用至小鼠。

[0119] (4) 从脑和其他组织制备基因组DNA以及定量AAV基因组

[0120] 在施用后4周将小鼠 (AAV在实施例5- (3) 中施用至所述小鼠) 安乐死, 且收集每种组织。通过使用NucleoSpin tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG生产) 从每种组织中提取基因组DNA。将提取的基因组DNA作为样品进行实时PCR, 以确定每种组织中所含有的AAV载体基因组的量。图2显示了在每种组织中每1 μg总基因组DNA的AAV基因组DNA分子数。

[0121] 如图2中所可见的, 包含具有肽序列GSGVTWV、AHGYREP、EYGFREG、ETGHGWV、GGGIGYV和ERGVGWV的衣壳的AAV载体倾向于转移至脑。进一步地, 一些AAV载体具有对肺以及脑的向性。

[0122] 产业实用性

[0123] 根据本发明, 提供了通过全身施用而具有脑向性的AAV衣壳蛋白突变体以及它们的氨基酸序列, 并且由此提供了有效率地将基因导入脑内的方法。

[0124] 序列表自由文本

[0125] SEQ ID NO:1: AAV2衣壳586-591编码序列

[0126] SEQ ID NO:2: 转换的AAV2衣壳编码序列

[0127] SEQ ID NO:3: 转换前的氨苄青霉素抗性基因

[0128] SEQ ID NO:4: 转换后的氨苄青霉素抗性基因

[0129] SEQ ID NO:5: 转换前的AAV2 rep基因

[0130] SEQ ID NO:6: 转换后的AAV2 rep基因

[0131] SEQ ID NO:7: 编码随机肽的DNA序列

[0132] SEQ ID NO:8: 用于合成双链DNA的引物

[0133] SEQ ID NO:9: 用于定量AAV滴度的正向引物

[0134] SEQ ID NO:10: 用于定量AAV滴度的反向引物

[0135] SEQ ID NO:11: 用于随机肽编码区域扩增的正向引物1

[0136] SEQ ID NO:12: 用于随机肽编码区域扩增的反向引物1

[0137] SEQ ID NO:13: 用于随机肽编码区域扩增的正向引物2

[0138] SEQ ID NO:14: 用于随机肽编码区域扩增的反向引物2

[0139] SEQ ID NO:15: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GSGVTWV

- [0140] SEQ ID NO:16: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列AHGYREP
[0141] SEQ ID NO:17: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EYGFREG
[0142] SEQ ID NO:18: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ETGHGWV
[0143] SEQ ID NO:19: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGIGYV
[0144] SEQ ID NO:20: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ERGVGWV
[0145] SEQ ID NO:21: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ENGVGWV
[0146] SEQ ID NO:22: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GSGVGWV
[0147] SEQ ID NO:23: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ADGITWG
[0148] SEQ ID NO:24: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ADGTRWV
[0149] SEQ ID NO:25: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ADKVGWV
[0150] SEQ ID NO:26: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列AGGVGWT
[0151] SEQ ID NO:27: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列AGGVTGV
[0152] SEQ ID NO:28: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列AGNAGGM
[0153] SEQ ID NO:29: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列AGQLGWV
[0154] SEQ ID NO:30: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ARGTEWE
[0155] SEQ ID NO:31: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列DAGHGFV
[0156] SEQ ID NO:32: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EANVGWV
[0157] SEQ ID NO:33: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ECGLGEG
[0158] SEQ ID NO:34: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGEVTWL
[0159] SEQ ID NO:35: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGGDGRV
[0160] SEQ ID NO:36: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGGFGEA
[0161] SEQ ID NO:37: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGGG
[0162] SEQ ID NO:38: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGGMVWV
[0163] SEQ ID NO:39: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGGVGWT
[0164] SEQ ID NO:40: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGGVMWL
[0165] SEQ ID NO:41: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列EGQVTWL
[0166] SEQ ID NO:42: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ERGHGWG
[0167] SEQ ID NO:43: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列ESGVGWK
[0168] SEQ ID NO:44: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GDGFGGV
[0169] SEQ ID NO:45: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GDGVTWA
[0170] SEQ ID NO:46: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGRGWV
[0171] SEQ ID NO:47: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGDGWI
[0172] SEQ ID NO:48: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGDSWV
[0173] SEQ ID NO:49: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGIAWVAQAAL
[0174] SEQ ID NO:50: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGVGWA
[0175] SEQ ID NO:51: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GKGQVME
[0176] SEQ ID NO:52: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列NGTG GG
[0177] SEQ ID NO:53: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GQGGHME
[0178] SEQ ID NO:54: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GRGVTWV

- [0179] SEQ ID NO:55: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GSGMGWV
[0180] SEQ ID NO:56: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GVGGGVV
[0181] SEQ ID NO:57: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列NDVRGRV
[0182] SEQ ID NO:58: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列RDGLGFV
[0183] SEQ ID NO:59: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列TDGLGWV
[0184] SEQ ID NO:60: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列TEGHGWV
[0185] SEQ ID NO:61: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列VAERLYG
[0186] SEQ ID NO:62: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列VARGAGE
[0187] SEQ ID NO:63: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGSGVTWVA
[0188] SEQ ID NO:64: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GAHGYREPA
[0189] SEQ ID NO:65: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEYGFREGA
[0190] SEQ ID NO:66: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GETGHGWVA
[0191] SEQ ID NO:67: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGGIGYVA
[0192] SEQ ID NO:68: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GERGVGWVA
[0193] SEQ ID NO:69: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GENGVGWVA
[0194] SEQ ID NO:70: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGSGVGWVA
[0195] SEQ ID NO:71: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GADGITWGA
[0196] SEQ ID NO:72: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GADGTRWVA
[0197] SEQ ID NO:73: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GADKVGWVA
[0198] SEQ ID NO:74: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GAGGVGWTA
[0199] SEQ ID NO:75: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GAGGVTGVA
[0200] SEQ ID NO:76: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GAGNAGGMA
[0201] SEQ ID NO:77: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GAGQLGWVA
[0202] SEQ ID NO:78: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GARGTEWEA
[0203] SEQ ID NO:79: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GDAGHGFVA
[0204] SEQ ID NO:80: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEANVGWVA
[0205] SEQ ID NO:81: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GECGLGEGA
[0206] SEQ ID NO:82: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGEVTWLA
[0207] SEQ ID NO:83: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGGDGRVA
[0208] SEQ ID NO:84: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGGFGEAA
[0209] SEQ ID NO:85: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGGGA
[0210] SEQ ID NO:86: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGGMVWVA
[0211] SEQ ID NO:87: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGGVGWTA
[0212] SEQ ID NO:88: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGGVMWLA
[0213] SEQ ID NO:89: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GEGQVTWLA
[0214] SEQ ID NO:90: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GERGHGWGA
[0215] SEQ ID NO:91: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GESGVGWKA
[0216] SEQ ID NO:92: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGDGF GGVA
[0217] SEQ ID NO:93: AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGDGVTWAA

- [0218] SEQ ID NO:94:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGEGRGWVA
- [0219] SEQ ID NO:95:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGGDGWIA
- [0220] SEQ ID NO:96:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGGDSWVA
- [0221] SEQ ID NO:97:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGGIAWVAQAALA
- [0222] SEQ ID NO:98:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGGGVWAA
- [0223] SEQ ID NO:99:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGKGQVMEA
- [0224] SEQ ID NO:100:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGNGTGGGA
- [0225] SEQ ID NO:101:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGQGGHMEA
- [0226] SEQ ID NO:102:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGRGVTWVA
- [0227] SEQ ID NO:103:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGSGMGWVA
- [0228] SEQ ID NO:104:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GGVGGGVVA
- [0229] SEQ ID NO:105:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GNDVRGRVA
- [0230] SEQ ID NO:106:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GRDGLGFVA
- [0231] SEQ ID NO:107:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GTDGLGWVA
- [0232] SEQ ID NO:108:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GTEGHGWVA
- [0233] SEQ ID NO:109:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GVAERLYGA
- [0234] SEQ ID NO:110:AAV衣壳蛋白突变体的肽序列GVARGAGEA
- [0235] SEQ ID NO:111:式I代表的肽序列
- [0236] SEQ ID NO:112:式II代表的肽序列
- [0237] SEQ ID NO:113:式III代表的肽序列
- [0238] SEQ ID NO:114:式IV代表的肽序列
- [0239] SEQ ID NO:115:式V代表的肽序列
- [0240] SEQ ID NO:116:式VI代表的肽序列。

序列表

	<110> 宝生物工程株式会社	
	<120> 具有脑向性的腺相关病毒突变体	
	<130> 675522	
	<150> JP2019-82417	
	<151> 2019-04-24	
	<160> 116	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> AAV2 衣壳 586-591 编码序列	
	<400> 1	
[0001]	gccaacagac aagcagct	18
	<210> 2	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 转换的 AAV2 衣壳编码序列	
	<400> 2	
	ggccagagag gccaaaggccc aggcggcc	28
	<210> 3	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 转换前的氨苄青霉素抗性基因	
	<400> 3	
	tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaag	45

	<210> 4	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 转换后的氨苄青霉素抗性基因	
	<400> 4	
	tattctcaga atgacttggt tgaatactca ccagtcacag aaaag	45
	<210> 5	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 转换前的 AAV2 rep 基因	
	<400> 5	
	gaatggcgcc gtgtgagtaa ggccccggag gcccttttct ttgtg	45
[0002]	<210> 6	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 转换后的 AAV2 rep 基因	
	<400> 6	
	gaatggcgcc gtgtgagtaa ggccccggag gcccttttct ttgtg	45
	<210> 7	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码随机肽的 DNA 序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (18)..(19)	
	<223> n 为 a、c、g 或 t	
	<220>	

	<221> misc_feature	
	<222> (21)..(22)	
	<223> n为a、c、g或t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (24)..(25)	
	<223> n为a、c、g或t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (27)..(28)	
	<223> n为a、c、g或t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (30)..(31)	
	<223> n为a、c、g或t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (33)..(34)	
	<223> n为a、c、g或t	
[0003]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (36)..(37)	
	<223> n为a、c、g或t	
	<400> 7	
	cagtcggcca gagaggcnnk nnknnknnkn nknnknnkgc ccaggcggct gacgag	56
	<210> 8	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 用于合成双链 DNA 的引物	
	<400> 8	
	ctcgtcagcc gcctgg	16
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 用于定量 AAV 滴度的正向引物	
	<400> 9 atcatatgcc aagtacgccc	20
	<210> 10 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 用于定量 AAV 滴度的反向引物	
	<400> 10 ccaaaaccgc atcacatg	19
	<210> 11 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 用于随机肽编码区域扩增的正向引物 1	
[0004]	<400> 11 ccaaaaccgc atcacatg	19
	<210> 12 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 用于随机肽编码区域扩增的反向引物 1	
	<400> 12 ctgtcccgtg gagtactgtg tg	22
	<210> 13 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 用于随机肽编码区域扩增的正向引物 2	
	<400> 13	

ctgtcccgtg gactactgtg tg 22

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于随机肽编码区域扩增的反向引物 2

<400> 14
 gccctgaag gtacacatct ctg 23

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GSGVTWV

<400> 15

[0005]

Gly Ser Gly Val Thr Trp Val
 1 5

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 AHGYREP

<400> 16

Ala His Gly Tyr Arg Glu Pro
 1 5

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EYGFREG

<400> 17

Glu Tyr Gly Phe Arg Glu Gly
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ETGHGWV

<400> 18

Glu Thr Gly His Gly Trp Val
1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGIGYV

<400> 19

Gly Gly Gly Ile Gly Tyr Val
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ERGVGWV

<400> 20

Glu Arg Gly Val Gly Trp Val
1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ENGVGWV

<400> 21

Glu Asn Gly Val Gly Trp Val
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GSGVGWV

<400> 22

Gly Ser Gly Val Gly Trp Val
1 5

[0007]

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ADGITWG

<400> 23

Ala Asp Gly Ile Thr Trp Gly
1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ADGTRWV

<400> 24

Ala Asp Gly Thr Arg Trp Val
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ADKVGWV

<400> 25

Ala Asp Lys Val Gly Trp Val
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 AGGVGWT

<400> 26

[0008] Ala Gly Gly Val Gly Trp Thr
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 AGGVTGV

<400> 27

Ala Gly Gly Val Thr Gly Val
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 AGNAGGM

<400> 28

Ala Gly Asn Ala Gly Gly Met
1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 AGQLGWV

<400> 29

Ala Gly Gln Leu Gly Trp Val
1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0009]

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ARGTEWE

<400> 30

Ala Arg Gly Thr Glu Trp Glu
1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 DAGHGFV

<400> 31

Asp Ala Gly His Gly Phe Val
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EANVGWV

 <400> 32

Glu Ala Asn Val Gly Trp Val
 1 5

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ECGLGEG

 <400> 33

Glu Cys Gly Leu Gly Glu Gly
 1 5

[0010]

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGEVTWL

 <400> 34

Glu Gly Glu Val Thr Trp Leu
 1 5

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGGDGRV

 <400> 35

Glu Gly Gly Asp Gly Arg Val

1 5

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGGFGEA

<400> 36

Glu Gly Gly Phe Gly Glu Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGGG

[0011] <400> 37

Glu Gly Gly Gly
 1

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGGMVWV

<400> 38

Glu Gly Gly Met Val Trp Val
 1 5

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGGVGWT

<400> 39

Glu Gly Gly Val Gly Trp Thr
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGGVMWL

<400> 40

Glu Gly Gly Val Met Trp Leu
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

[0012] <213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 EGQVTWL

<400> 41

Glu Gly Gln Val Thr Trp Leu
1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ERGHGWG

<400> 42

Glu Arg Gly His Gly Trp Gly
1 5

<210> 43

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 ESGVGWK

<400> 43

Glu Ser Gly Val Gly Trp Lys
 1 5

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GDGFGGV

<400> 44

Gly Asp Gly Phe Gly Gly Val
 1 5

[0013]

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GDGVTWA

<400> 45

Gly Asp Gly Val Thr Trp Ala
 1 5

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEGRGWV

<400> 46

Gly Glu Gly Arg Gly Trp Val
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGDGWI

<400> 47

Gly Gly Gly Asp Gly Trp Ile
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGDSWV

[0014]

<400> 48

Gly Gly Gly Asp Ser Trp Val
1 5

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGIAWVAQAAL

<400> 49

Gly Gly Gly Ile Ala Trp Val Ala Gln Ala Ala Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGVGWA

<400> 50

Gly Gly Gly Val Gly Trp Ala
1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GKGQVME

<400> 51

Gly Lys Gly Gln Val Met Glu
1 5

[0015]

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GNGTGGG

<400> 52

Gly Asn Gly Thr Gly Gly Gly
1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GQGGHME

<400> 53

Gly Gln Gly Gly His Met Glu
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GRGVTWV

<400> 54

Gly Arg Gly Val Thr Trp Val
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GSGMGWV

<400> 55

[0016] Gly Ser Gly Met Gly Trp Val
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GVGGGVV

<400> 56

Gly Val Gly Gly Gly Val Val
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 NDVGRV

<400> 57

Asn Asp Val Arg Gly Arg Val
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 RDGLGFV

<400> 58

Arg Asp Gly Leu Gly Phe Val
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0017]

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 TDGLGWV

<400> 59

Thr Asp Gly Leu Gly Trp Val
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 TEGHGWV

<400> 60

Thr Glu Gly His Gly Trp Val
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 VAERLYG

<400> 61

Val Ala Glu Arg Leu Tyr Gly
1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 VARGAGE

<400> 62

Val Ala Arg Gly Ala Gly Glu
1 5

[0018]

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGSGVTWVA

<400> 63

Gly Gly Ser Gly Val Thr Trp Val Ala
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GAHGYREPA

<400> 64

Gly Ala His Gly Tyr Arg Glu Pro Ala
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEYGFREGA

<400> 65

Gly Glu Tyr Gly Phe Arg Glu Gly Ala
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GETGHGWVA

<400> 66

[0019] Gly Glu Thr Gly His Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGGIGYVA

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ile Gly Tyr Val Ala
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GERGVGWVA

<400> 68

Gly Glu Arg Gly Val Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GENGVGWVA

<400> 69

Gly Glu Asn Gly Val Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGSGVGWVA

<400> 70

Gly Gly Ser Gly Val Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GADGITWGA

<400> 71

Gly Ala Asp Gly Ile Thr Trp Gly Ala
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GADGTRWVA

<400> 72

Gly Ala Asp Gly Thr Arg Trp Val Ala
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GADKVGWVA

<400> 73

Gly Ala Asp Lys Val Gly Trp Val Ala
1 5

[0021]

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GAGGVGWTA

<400> 74

Gly Ala Gly Gly Val Gly Trp Thr Ala
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GAGGVTGVA

<400> 75

Gly Ala Gly Gly Val Thr Gly Val Ala
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GAGNAGGMA

<400> 76

Gly Ala Gly Asn Ala Gly Gly Met Ala
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GAGQLGWVA

<400> 77

[0022] Gly Ala Gly Gln Leu Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GARGTEWEA

<400> 78

Gly Ala Arg Gly Thr Glu Trp Glu Ala
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GDAGHGFVA

<400> 79

Gly Asp Ala Gly His Gly Phe Val Ala
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEANVGWVA

<400> 80

Gly Glu Ala Asn Val Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0023]

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GECGLGEGA

<400> 81

Gly Glu Cys Gly Leu Gly Glu Gly Ala
1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEGEVTWLA

<400> 82

Gly Glu Gly Glu Val Thr Trp Leu Ala
1 5

<210> 83

<211> 9

1 5

<210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEGGVGWTA

<400> 87

Gly Glu Gly Gly Val Gly Trp Thr Ala
 1 5

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEGGVMWLA

[0025] <400> 88

Gly Glu Gly Gly Val Met Trp Leu Ala
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GEGQVTWLA

<400> 89

Gly Glu Gly Gln Val Thr Trp Leu Ala
 1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GERGHGWGA

<400> 90

Gly Glu Arg Gly His Gly Trp Gly Ala
1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GESGVGWKA

<400> 91

Gly Glu Ser Gly Val Gly Trp Lys Ala
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

[0026] <213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGDGFGGVA

<400> 92

Gly Gly Asp Gly Phe Gly Gly Val Ala
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGDGVTWAA

<400> 93

Gly Gly Asp Gly Val Thr Trp Ala Ala
1 5

<210> 94

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGEGRGWVA

<400> 94

Gly Gly Glu Gly Arg Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGGDGWIA

<400> 95

Gly Gly Gly Gly Asp Gly Trp Ile Ala
1 5

[0027]

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGDGSWVA

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Asp Ser Trp Val Ala
1 5

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGGIWVAQAALA

<400> 97

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Trp Val Ala Gln Ala Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGGGVGWAA

<400> 98

Gly Gly Gly Gly Val Gly Trp Ala Ala
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0028]

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGKGQVMEA

<400> 99

Gly Gly Lys Gly Gln Val Met Glu Ala
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGNGTGGGA

<400> 100

Gly Gly Asn Gly Thr Gly Gly Gly Ala
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGQGGHMEA

<400> 101

Gly Gly Gln Gly Gly His Met Glu Ala
1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGRGVTWVA

<400> 102

Gly Gly Arg Gly Val Thr Trp Val Ala
1 5

[0029]

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGSGMGWVA

<400> 103

Gly Gly Ser Gly Met Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GGVGGGVVA

<400> 104

Gly Gly Val Gly Gly Gly Val Val Ala
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GNDVGRVA

<400> 105

Gly Asn Asp Val Arg Gly Arg Val Ala
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GRDGLGFVA

<400> 106

[0030]

Gly Arg Asp Gly Leu Gly Phe Val Ala
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GTDGLGWVA

<400> 107

Gly Thr Asp Gly Leu Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GTEGHGWVA

<400> 108

Gly Thr Glu Gly His Gly Trp Val Ala
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GVAERLYGA

<400> 109

Gly Val Ala Glu Arg Leu Tyr Gly Ala
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0031]

<220>
<223> AAV 衣壳蛋白突变体的肽序列 GVARGAGEA

<400> 110

Gly Val Ala Arg Gly Ala Gly Glu Ala
1 5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式 I 代表的肽序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任意氨基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> 任意氨基酸

<400> 111

Xaa Xaa Gly Xaa Gly Trp Val
 1 5

<210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 式 II 代表的肽序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 任意氨基酸

[0032]

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> 任意氨基酸

<400> 112

Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Trp Val
 1 5

<210> 113
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> 任意氨基酸

<400> 114

Xaa Xaa Gly Xaa Gly Xaa Val
 1 5

<210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 式 V 代表的肽序列

[0034]

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> 任意氨基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> 任意氨基酸

<400> 115

Xaa Xaa Gly Xaa Gly Trp Xaa
 1 5

<210> 116

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 式 VI 代表的肽序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 任意氨基酸

[0035]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> 任意氨基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 任意氨基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 任意氨基酸

<400> 116

Xaa Xaa Gly Xaa Arg Glu Xaa
1 5

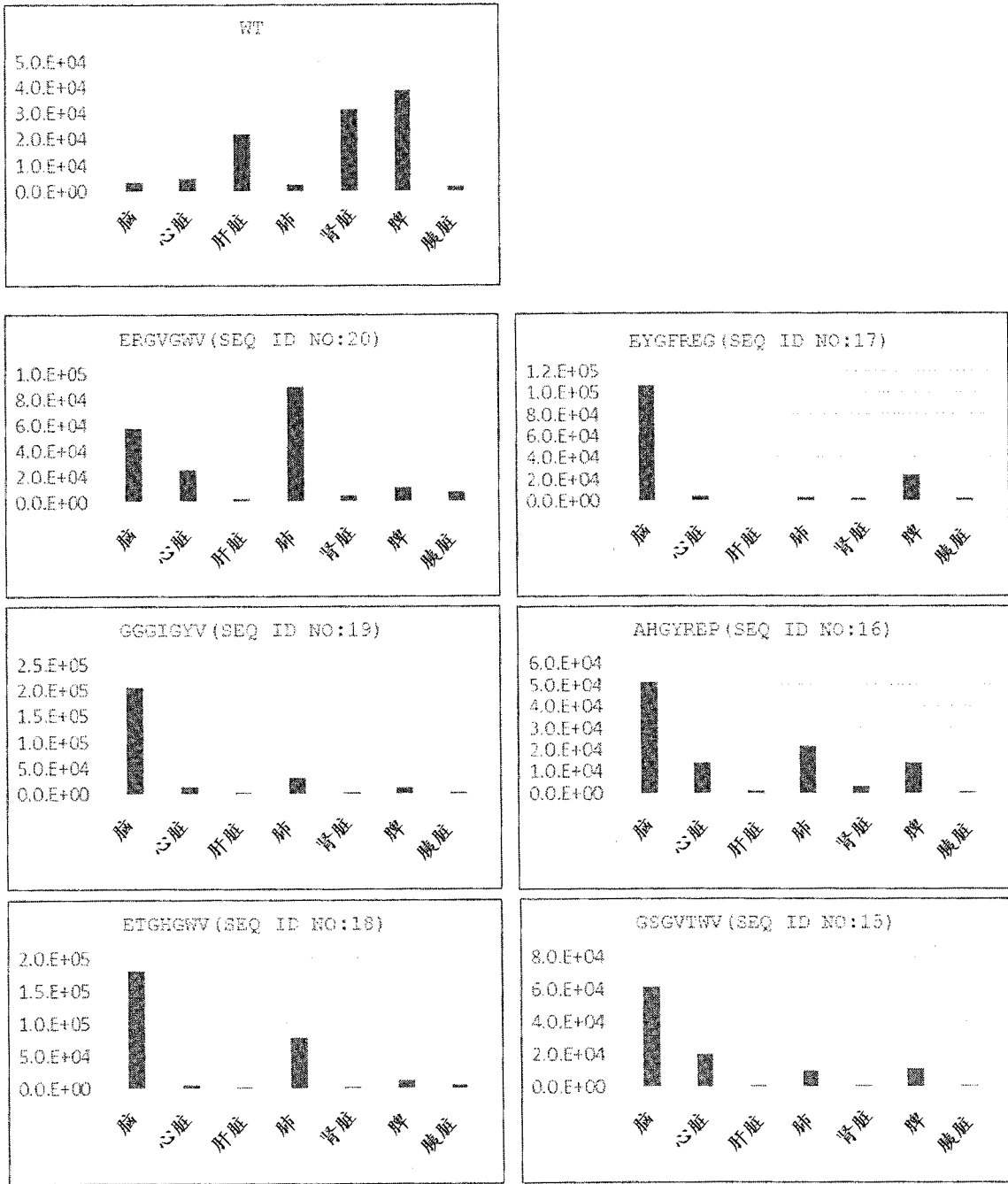


图 2