



(10) 授权公告号 CN 112004544 B

(45) 授权公告日 2024.08.06

(21) 申请号 201980020100.1

(22) 申请日 2019.01.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112004544 A

(43) 申请公布日 2020.11.27

(30) 优先权数据
18152133.7 2018.01.17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/051128 2019.01.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/141765 EN 2019.07.25

(73) 专利权人 梅里特斯英国第二有限公司
地址 英国伦敦
专利权人 海德堡大学

(72) 发明人 J·D·芬 D·格林 K·贝尔纳
S·A·斯内克 N·布雷克斯特拉
S·M·G·范德桑登

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 罗文锋 黄希贵

(51) Int.Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/68 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(56) 对比文件
AU 2010201278 A1, 2010.04.22
CN 104107438 A, 2014.10.22

审查员 竹怀婷

权利要求书2页 说明书30页
序列表36页 附图17页

(54) 发明名称

用于基因疗法的修饰的rAAV衣壳蛋白

(57) 摘要

本发明涉及用于基因疗法的重组的腺相关病毒(rAAV)病毒体,其中所述rAAV病毒体包含新型衣壳蛋白。具体地,本发明涉及此类病毒体在基因疗法中用于治疗关节炎疾病诸如类风湿性关节炎或其症状的用途,优选地通过关节内施用。

1. 包含修饰的衣壳蛋白的重组的腺相关病毒rAAV病毒体在制备用于治疗或预防痛风、强直性脊柱炎或关节炎或用于治疗或预防与痛风、强直性脊柱炎、关节炎或关节置换相关的症状的药物中的用途,其中所述症状是关节痛或者一个或多个关节炎关节的炎症,

其中所述修饰的衣壳蛋白包含下式II:

$$EEEIxxxxPVATExxGxxxxNxQy-Z-(x)_n_LPGMVWQxRDVYLQGPIWAKIPHTDG$$

其中Z是 $y-G-Q-x-G-(x)_3-R-(x)_3-y-A-Q-A-A$;

其中x表示单个氨基酸残基;

其中y表示0、1或2个氨基酸残基;

其中n为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15;和

其中修饰的衣壳蛋白由以下序列表示:

- a) SEQ ID NO:13,其中残基588-593被包含SEQ ID NO:11的插入序列取代;
- b) SEQ ID NO:14,其中残基585-591被包含SEQ ID NO:10的插入序列取代;
- c) SEQ ID NO:15,其中残基587-592被包含SEQ ID NO:9的插入序列取代;
- d) SEQ ID NO:16,其中残基586-591被包含SEQ ID NO:8的插入序列取代;
- e) SEQ ID NO:17,其中残基588-593被包含SEQ ID NO:9的插入序列取代;
- f) SEQ ID NO:17,其中残基588-593被包含SEQ ID NO:8的插入序列取代;或
- g) SEQ ID NO:18,其中残基587-593被包含SEQ ID NO:12的插入序列取代。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述痛风是假性痛风;或者所述关节炎是类风湿性关节炎、骨关节炎、脊柱关节炎、银屑病性关节炎、化脓性关节炎、幼年特发性关节炎或斯蒂尔病。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述关节炎是幼年型类风湿性关节炎。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述修饰的衣壳蛋白由选自SEQ ID NO:1-7组成的组的氨基酸序列表示。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述rAAV病毒体包含:

- i) 包含至少一个AAV反向末端重复ITR序列的核苷酸序列,以及
- ii) 编码目标基因产物的核苷酸序列。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述编码目标基因产物的所述核苷酸序列位于两个AAV ITR序列之间。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述目标基因产物治疗、预防或抑制与关节炎疾病相关的症状。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述目标基因产物选自以下组成的组:免疫调节剂、抗体、shRNA、miRNA、向导RNA、生长因子、肽类、抑制剂、酶以及其组合。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述目标基因产物选自以下组成的组:白介素、蛋白酶、核苷酸酶/核苷酶、蛋白酶抑制剂以及其组合。

10. 根据权利要求7所述的用途,其中所述目标基因产物为CD39、CD73和IFN- β 中的至少一种。

11. 根据权利要求5所述的用途,其中所述目标基因产物为肿瘤坏死因子 α (TNF α)抑制剂。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述TNF α 抑制剂选自依那西普、英夫利昔单抗、

阿达木单抗、培塞利珠单抗和戈利木单抗。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述TNF α 抑制剂为依那西普。

14. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述rAAV病毒体包含以下各项中的至少一个:

(i) 包含编码至少一个向导RNA的序列的多核苷酸,其中各向导RNA与基因组中的一个或多个靶多核苷酸序列互补;以及

(ii) 包含编码核酸酶的序列的多核苷酸,其中所述核酸酶与所述向导RNA形成核糖核酸酶复合物,并且其中所述核糖核酸酶复合物在所述基因组中产生位点特异性双链DNA断裂DSDB。

15. rAAV组合物在制备用于治疗或预防痛风、强直性脊柱炎或关节炎或用于治疗或预防与痛风、强直性脊柱炎、关节炎或关节置换相关的症状的药物中的用途,其中所述症状是关节痛或者一个或多个关节炎关节的炎症,其中所述rAAV组合物包含如权利要求1-14中任一项所定义的rAAV病毒体和药学上可接受的载剂。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述痛风是假性痛风;或者所述关节炎是湿性关节炎、骨关节炎、脊柱关节炎、银屑病性关节炎、化脓性关节炎、幼年特发性关节炎或斯蒂尔病。

17. 根据权利要求15所述的用途,其中所述关节炎是幼年型类风湿性关节炎。

18. 根据权利要求15所述的用途,其中所述rAAV组合物还以至少1:1的空衣壳与rAAV病毒体比率包含空衣壳。

19. rAAV组合物和免疫抑制剂在制备用于治疗或预防痛风、强直性脊柱炎或关节炎或用于治疗或预防与痛风、强直性脊柱炎、关节炎或关节置换相关的症状的药物中的用途,其中所述症状是关节痛或者一个或多个关节炎关节的炎症,其中所述rAAV组合物如权利要求15或18中任一项所定义并且其中所述治疗或预防包括向个体施用所述rAAV组合物和施用所述免疫抑制剂。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述痛风是假性痛风;或者所述关节炎是湿性关节炎、骨关节炎、脊柱关节炎、银屑病性关节炎、化脓性关节炎、幼年特发性关节炎或斯蒂尔病。

21. 根据权利要求19所述的用途,其中所述关节炎是幼年型类风湿性关节炎。

22. 根据权利要求1-3和15-19中任一项所述的用途,其中所述药物用于治疗或预防类风湿性关节炎或用于治疗或预防与类风湿性关节炎相关的症状。

23. 根据权利要求1-3和15-19中任一项所述的用途,其中所述rAAV病毒体或所述rAAV组合物全身和/或局部施用。

24. 根据权利要求19所述的用途,其中所述rAAV组合物和所述免疫抑制剂中的至少一种局部施用。

25. 根据权利要求23所述的用途,其中所述局部施用是关节内施用。

用于基因疗法的修饰的rAAV衣壳蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及基于重组的腺相关病毒 (rAAV) 的基因疗法的领域,具体地涉及突变衣壳rAAV在治疗或预防关节炎疾病中的用途。

背景技术

[0002] 重组的腺相关病毒 (rAAV) 载体已经展示出在人体内递送基因的优异的安全性和功效特征。因此,rAAV载体广泛用于体内基因疗法并显示对临床前模型以及临床试验安全有效。rAAV载体已在一系列疾病的多种基因疗法临床试验中取得成功,所述疾病包括血友病B、血友病A、囊肿性纤维化、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症、脊髓性肌萎缩 (SMA)、帕金森病、杜兴氏肌肉营养不良症和莱伯氏先天性黑蒙症 (Selot等人,Current Pharmaceutical Biotechnology,2013,14,1072-1082)。阿利泼金 (Alipogene tiparvovec) (Glybera®, uniQure) 作为治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症 (LPLD) 的基因疗法已在欧洲获得销售许可。随后,对治疗皮肤癌的基于疱疹病毒的Talimogene laherparepvec (T-Vec, Imlygic®, Amgen) 和治疗ADA-SCID (GSK) 的基于离体干细胞逆转录病毒的基因疗法Strimvelis授予了基因疗法药物许可。

[0003] 基于rAAV载体的基因疗法也应用于类风湿性关节炎 (RA) 中,这是影响~1%人群的慢性炎症性疾病。RA病理遍布滑膜关节。关节的局部性质使得体内基因疗法非常有吸引力。已应用了提供抗炎蛋白的疗法,旨在使RA平衡向抗炎状态偏移。

[0004] 许多工作把重点放在了开发具有期望特性的AAV衣壳蛋白上。此类特性可以包括更高的转导效率、组织/器官趋性、非期望组织/器官的脱靶,或预先存在的中和抗体的避免。

[0005] 然而,在本领域中仍然需要进一步改善rAAV基因疗法载体。具体地,需要改善rAAV基因疗法载体在关节炎疾病中的使用,并且更精确地,需要改善向靶向组织,诸如滑膜关节或滑膜关节内的特定细胞类型,优选地成纤维样滑膜细胞 (FLS) 递送遗传物质的效率。

发明内容

[0006] 在第一方面,本发明涉及一种用于治疗或预防关节炎疾病或用于治疗或预防与关节炎疾病相关的症状的包含修饰的衣壳蛋白的重组的腺相关病毒 (rAAV) 病毒体,其中修饰的衣壳蛋白在所述蛋白质的C末端部分中包含氨基酸序列Z,所述氨基酸序列Z的残基暴露在衣壳蛋白的表面上。优选地,氨基酸序列Z:

[0007] 包含下式I的氨基酸残基的序列或由其组成:

[0008] y -G-Q-x-G-(x)₃-R-(x)₃-y-A-Q-A-A

[0009] 其中x表示单个氨基酸残基或其中y表示0、1或2个氨基酸残基,并且

[0010] 存在于与野生型AAV衣壳蛋白的从C末端起第100-200位,优选地第120-180位,更优选地第130-170位,更优选地第140-160位氨基酸残基相对应的位置处。

[0011] 优选地,式I的氨基酸残基暴露在衣壳蛋白的表面上。在一个优选实施方案中,序

列Z在修饰的衣壳蛋白中被包含在由下式II表示的位置处:

[0012] $EEEI_{xxxx}PVATE_{xx}G_{xxxx}NxQy-Z-(x)_nLPGMVWQ_xRDVYLQGPiWAKIPHTDG$

[0013] 其中Z、x和y如上文所定义;并且其中n为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。

[0014] 在一个优选实施方案中,本发明涉及一种用于治疗或预防关节炎疾病或用于治疗或预防与关节炎疾病相关的症状的包含修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体,其中衣壳蛋白包含选自以下组成的组的氨基酸序列:i)与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:1的第588-602位氨基酸与SEQ ID NO:11具有至少80%序列同一性;ii)与具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:2的第585-599位氨基酸与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性;iii)与具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:3的第587-601位氨基酸与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性;iv)与具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:4的第586-600位氨基酸与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性;v)与具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:5的第588-602位氨基酸与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性;vi)与具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:6的第588-602位氨基酸与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性;以及vii)与具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且其中SEQ ID NO:7的第587-601位氨基酸与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性;其中当在相同条件下测试时,与具有选自SEQ ID NO:13-19组成的组的氨基酸序列的未修饰的衣壳蛋白相比,修饰的衣壳蛋白提供表达的至少两倍增加,其中优选地,未修饰的衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有与修饰的衣壳蛋白相同的血清型。

[0015] 在一个优选实施方案中,当在相同条件下测试时,与具有选自SEQ ID NO:13-19组成的组的氨基酸序列的未修饰的衣壳蛋白相比,修饰的衣壳蛋白提供在人FLS细胞中的表达的至少两倍增加,其中优选地,未修饰的衣壳蛋白包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或具有与修饰的衣壳蛋白相同的血清型。

[0016] 可选地,或与前述实施方案中的任一个相组合,在本发明的一个优选实施方案中,衣壳蛋白包含选自SEQ ID NO:1-7组成的组的氨基酸序列,或由其组成。

[0017] 可选地,或与前述实施方案中的任一个相组合,在本发明的一个优选实施方案中,rAAV病毒体包含包括至少一个AAV反向末端重复(ITR)序列的核苷酸序列。优选地,病毒体还包含编码目标基因产物的核苷酸序列。甚至更优选地,编码目标基因产物的核苷酸序列位于两个AAV ITR序列之间。

[0018] 在一个优选实施方案中,目标基因产物治疗、预防或抑制与关节炎疾病相关的症状,其中优选地,目标基因产物选自以下组成的组:白介素、免疫调节剂、抗体、shRNA、miRNA、向导RNA、lncRNA、生长因子、蛋白酶、核苷酸酶/核苷酶、肽类、蛋白酶抑制剂、抑制剂、酶以及其组合,并且其中更优选地,目标基因产物为CD39、CD73和IFN- β 中的至少一种。

[0019] 可选地,或与前述实施方案中的任一个相组合,在本发明的一个优选实施方案中,rAAV病毒体包含以下各项中的至少一个:(i)包含编码至少一个向导RNA的序列的多核苷酸;其中所述或各向导RNA与基因组中的一个或多个靶多核苷酸序列基本上互补;以及(ii)

包含编码核酸酶的序列的多核苷酸;其中核酸酶与向导RNA形成核糖核酸酶复合物,并且其中核糖核酸酶复合物在基因组中产生位点特异性双链DNA断裂(DSDB)。

[0020] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗或预防关节炎疾病或用于治疗或预防与关节炎疾病相关的症状的rAAV组合物,其中rAAV组合物包含根据本发明的rAAV病毒体和药学上可接受的载剂。在一个实施方案中,rAAV组合物还以至少1:1、至少5:1或至少10:1的空衣壳与rAAV病毒体比率包含空衣壳。

[0021] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗或预防关节炎疾病或用于治疗或预防与关节炎疾病相关的症状的rAAV组合物和免疫抑制剂,其中rAAV组合物是根据本发明的rAAV组合物并且优选地,其中治疗或预防包括向个体施用rAAV组合物和施用免疫抑制剂。

[0022] 可选地,或与前述实施方案中的任一个相组合,在本发明的一个优选实施方案中,关节炎疾病选自自由以下组成的组:类风湿性关节炎(RA)、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎(OA)、痛风、假性痛风、脊柱关节炎(SpA)、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、化脓性关节炎、关节炎、幼年特发性关节炎、钝伤、关节置换和斯蒂尔病(Still's disease)。

[0023] 可选地,或与前述实施方案中的任一个相组合,在本发明的一个优选实施方案中,rAAV病毒体或rAAV组合物全身和/或局部施用。在一个优选实施方案中,rAAV组合物和免疫抑制剂中的至少一种局部施用。优选地,局部施用是关节内施用。

[0024] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗、预防或抑制与关节炎疾病相关的症状的方法,其中所述方法包括关节内施用包含有效量的根据本发明的rAAV病毒体或rAAV组合物的药物的步骤。

具体实施方式

[0025] 发明人已经发现,包含修饰的衣壳蛋白的重组的腺相关病毒(rAAV)病毒体在转导细胞方面惊人地有效,并且在转导滑膜关节的细胞方面尤其有效。因为成纤维样滑膜细胞(FLS)在关节炎疾病(诸如类风湿性关节炎)的治疗中通常是关节中的主要靶细胞,因此本发明的目的是提供在一个或多个以下特性中有所改善的衣壳蛋白:i)在滑膜组织,尤其是FLS中的更高表达水平;ii)改善的滑膜组织趋性,尤其是改善的对FLS的趋性;和/或iii)与本领域已知的衣壳蛋白相比,在rAAV施用后改善的对非期望组织/器官的脱靶。具体地,相比于未修饰的衣壳蛋白,优选地与修饰的衣壳蛋白和/或AAV5衣壳蛋白相同血清型的野生型衣壳蛋白,本发明的包含修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体的这些特性有所改善。先前已经确定,当与其他AAV血清型相比时,AAV5衣壳产生最高的FLS表达水平(Adriaansen等人(2005)AnnRheumDis 64:1677-1684;Apparailly等人(2005)Hum.Gene Ther.16:426-434)。因为它是赋予组织/细胞趋性特性的衣壳,本发明描述的修饰衣壳具有增强的FLS转导潜力特性,优选地在与未修饰的AAV5相比时。具体地,优选的是,与未修饰的衣壳蛋白(即,待测试的、优选地与修饰的衣壳蛋白相同血清型的不具有修饰的相同衣壳蛋白),优选地野生型的未修饰衣壳蛋白(优选地与修饰的衣壳蛋白相同血清型),更优选地未修饰的AAV5或wtAAV5衣壳蛋白相比,本发明的衣壳蛋白提供在滑膜组织,尤其是FLS中的更高表达水平,优选地在关节内施用后。

[0026] 因此,在第一方面,本发明涉及包含修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体。如本文所定义的rAAV病毒体尤其可用于在基因疗法中使用。

[0027] 如本文所用,“基因疗法”是将核酸序列(诸如如下文所定义的转基因(也称为编码目标基因产物的核苷酸序列))插入个体的细胞和/或组织中,以治疗或预防疾病或病症,或治疗或预防疾病或病症的症状。

[0028] AAV可以感染分裂和静止期细胞,并且感染通过衣壳蛋白与细胞膜受体的相互作用以及随后AAV病毒体的内吞作用发生。AAV属于依赖病毒属,其继而属于细小病毒亚科,也称为细小病毒,其能够感染脊椎动物。细小病毒属于小DNA动物病毒科,即细小病毒科。如由其属名可推断,依赖病毒成员的独特性在于其通常需要与辅助病毒诸如腺病毒或疱疹病毒共感染,以在细胞培养物中有效感染。依赖病毒属包括通常感染人的AAV和感染其他温血动物的相关病毒(例如,牛、犬、马和羊腺相关病毒)。关于细小病毒和细小病毒科的其他成员的进一步信息描述于Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," 第69章Fields Virology(第3版1996)。为方便起见,本文参考AAV在进一步例示和描述本发明。然而,应当理解,本发明不限于AAV,而是可同样应用于其他细小病毒。

[0029] 所有已知的AAV血清型的基因组组织形式(genomic organization)非常相似。AAV的基因组是长度少于约5,000个核苷酸(nt)的线性、单链DNA分子。反向末端重复(ITR)侧接于非结构复制(Rep)蛋白和结构(VP)蛋白的独特编码核苷酸序列。VP蛋白(VP1、-2和-3)在组装活化蛋白(AAP)(对于一些血清型)的帮助下形成衣壳或蛋白外鞘(shell),所述组装活化蛋白在与VP2/VP3重叠的替代性开放阅读框中编码。末端核苷酸自身互补并且被组织化成使得可形成能量稳定的分子内双链体,其形成T形发夹。末端核苷酸的大小是血清型依赖性的。例如,在末端145nt的AAV2的情况下,125nt自身互补并且其余20nt保持为单链。这些发夹结构的功能是作为病毒DNA复制起点,用作细胞DNA聚合酶复合物的引物。在哺乳动物细胞中的野生型AAV(wtAAV)感染之后,Rep蛋白(即Rep78和Rep52)由分别通过p5启动子和p19启动子转录的mRNA表达。两种Rep蛋白均在病毒基因组的复制中起作用。Rep ORF中的剪接事件导致实际上四种Rep蛋白(即,Rep78、Rep68、Rep52和Rep40)的表达。然而,已经显示,哺乳动物细胞中由未间接的mRNA编码的Rep78和Rep52蛋白对于AAV载体产生是足够的。哺乳动物细胞中wtAAV或rAAV的产生还依赖于两个剪接受体位点的交替使用和对于VP2次优利用的ACG起始密码子的组合,这确保了所有三种衣壳蛋白以大约1:1:10比率(VP1:VP2:VP3)恰当表达。

[0030] 如本文所用的“rAAV病毒体”(也称为“rAAV载体”或“rAAV转基因载体”)是指包含非天然核酸序列的AAV衣壳。rAAV中的这一序列通常侧接有ITR序列,优选地来自wtAAV,并且优选地编码目标基因产物,诸如转基因或同源臂。换个说法,rAAV病毒体是指被衣壳蛋白包裹的rAAV基因组,其包含(i)编码目标基因产物的核苷酸序列,和(ii)至少一个AAV ITR序列。rAAV基因组可缺失一个或优选所有wtAAV基因,但是可仍包含功能性ITR核酸序列。优选地,rAAV病毒体不包含编码病毒蛋白的任何核苷酸序列,诸如AAV的rep(复制)或cap(衣壳)基因。因此,rAAV病毒体区别于wtAAV病毒体,因为所有或部分病毒基因组已替换为编码目标基因产物的核苷酸序列,其相对于AAV核酸序列而言是非天然核酸,如本文进一步定义。

[0031] 在一个优选实施方案中,包含本发明的修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体用于治疗或预防关节炎疾病或用于治疗或预防与关节炎疾病相关的症状。本文所述的医疗用途(例如,

用于治疗或预防关节炎疾病(与其相关的症状)的基因疗法)被配制为根据本发明的rAAV病毒体,以作用于预防或治疗本文限定的一种或多种疾病和/或病症的药物,但是可同样配制为(i)预防或治疗本文限定的一种或多种疾病和/或病症或其症状的方法,其包括向有需要的受试者施用足够或有效量的根据本发明的rAAV病毒体,(ii)用于制备用以预防或治疗本文限定的一种或多种疾病和/或病症的药物的根据本发明的rAAV病毒体,或(iii)根据本发明的rAAV病毒体用于预防或治疗本文限定的一种或多种疾病和/或病症的用途。本发明设想了所有此类医疗用途。优选地,修饰的衣壳蛋白在所述蛋白质的C末端部分包含氨基酸序列Z,所述氨基酸序列Z的残基暴露在衣壳蛋白的表面上。

[0032] 如本文所用,术语“治疗(treat、treatment或treating)”是指向患有有关节炎疾病的受试者应用或施用本发明的rAAV病毒体,其中目标是治愈、部分或完全逆转、缓解、减轻、抑制、延迟、遏制、减缓或停止关节炎疾病或与关节炎疾病相关的症状的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或缓解关节炎疾病的至少一种不良影响或症状。如果一种或多种症状或临床标志物得以减少,那么治疗通常是“有效的”。可选地,如果关节炎疾病的进展减少或中止,那么治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,而且还包括停止或至少减缓在不存在治疗的情况下将预期的症状的进展或恶化。有益的或期望的临床结果包括但不限于一种或多种症状的减轻、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或缓和,以及缓解(无论是部分缓解还是全部缓解),无论是可检测还是不可检测的。关节炎疾病的术语“治疗”还包括提供关节炎疾病的症状或副作用的舒缓(包括姑息治疗)。如本文所用,术语“预防(prevent、prevention或preventative)”(也称为预防性(prophylactic))是指向具有患关节炎疾病倾向的受试者应用或施用根据本发明的rAAV病毒体,其目的是延迟或预防未来关节炎疾病的一种或多种症状或特征的发作、减轻、改善、缓解、抑制其进展,降低其严重程度,和/或减少其发病率。因此,可将根据本发明的rAAV病毒体施用给未表现出关节炎疾病迹象的受试者和/或仅表现出关节炎疾病的早期迹象的受试者,优选地以用于降低发展与关节炎疾病相关的病理的风险。

[0033] 如本文所用的术语“治愈(cure或curing)”是指完全缓解关节炎疾病的一种或多种,优选地全部症状或特征。如本文所用的术语“延迟(delay或delaying)”是指延迟关节炎疾病的一种或多种症状或特征的发作和/或抑制其进展和/或减小其严重程度。

[0034] 在一个优选实施方案中,当在相同条件下测试时,与未修饰的衣壳蛋白相比,本发明的修饰的衣壳蛋白提供表达的至少两倍增加。优选地,未修饰的衣壳蛋白是与修饰的衣壳蛋白相同血清型但不具有待测试的修饰的衣壳蛋白。更优选地,未修饰的衣壳蛋白是与修饰的衣壳蛋白相同血清型的野生型(wt)衣壳蛋白,其中wt衣壳蛋白优选地具有选自SEQ ID NO:13-19组成的组的氨基酸序列。可选地,优选的是,未修饰的衣壳蛋白具有选自SEQ ID NO:13-19组成的组的氨基酸序列。最优选地,未修饰的衣壳蛋白具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。优选的未修饰的衣壳蛋白可取决于rAAV病毒体将靶向的组织。例如,具有AAV5衣壳蛋白的rAAV似乎是用于FLS细胞的所选病毒体(Apparailly等人(2005) Human Gene Therapy 16(4):426-434;Adriaansen等人(2005) Ann.Rheum.Dis.64(12):1677-1684),并且因此-无论rAAV突变病毒体的原始血清型如何-rAAV对照病毒体优选地包含AAV5衣壳蛋白,更优选地野生型AAV5(wtAAV5)衣壳蛋白,更优选地AAV5衣壳蛋白具有SEQ

ID NO:19所示的氨基酸序列,甚至更优选地,rAAV对照病毒体是rAAV5病毒体。rAAV对照病毒体是代替修饰的衣壳蛋白,包含如本文定义的未修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体。在一个优选实施方案中,使用如实施例2/3中所述的方法,与代替修饰的衣壳蛋白,具有如本文所定义的未修饰的衣壳蛋白的相同rAAV病毒体相比,在来自类风湿性关节炎患者的成纤维样滑膜细胞(RA-FLS)和/或HEK 293(优选地HEK293T)细胞中体外转导后,rAAV病毒体(包含修饰的衣壳蛋白)提供更高的表达。换句话说,除衣壳蛋白之外,rAAV病毒体和rAAV对照病毒体优选地是相同的。优选地,转导效率在体外转导测定中检测:通过测量由转基因编码的报告基因(诸如GFP、YFP和/或荧光素酶)的表达水平。在一个优选实施方案中,用于确定表达的测试是如实施例2/3中所述的体外转导测定。简而言之,将RA-FLS(如van de Sande MG等人,(2011) Ann Rheum Dis 70:423-427中所述进行分离)以2500个细胞/孔或将HEK293T细胞(人胚胎肾细胞)以40,000个细胞/孔涂板在96孔板(DMEM-GlutaMAX-I(Gibco,ref.31966-021)、10%FBS(热失活的(HI)Bovine Serum Gold,Gibco ref.A15-151)、100 μ g/ml青霉素/100 μ g/ml链霉素(Sigma-Aldrich,ref.P0781;37 $^{\circ}$ C/5%CO₂)中。24小时后,移除上清液并且替换为培养基(DMEM-glutaMAX-I(Gibco,ref.31966-021)、0.001%普朗尼克(pluronic)F68(Sigma,ref.p5559)),所述培养基含有rAAV突变病毒体或rAAV对照病毒体-所有均在巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下表达黄色荧光蛋白(yFP)和/或荧光素酶-感染复数(MOI)为10,000、20,000和100,000。可以使用粗裂解物(即,用rAAV产生所需且含有报告基因表达病毒体的所有质粒转染的细胞的非纯化上清液)或纯化的AAV(优选地基于碘克沙醇纯化或氯化铯(CsCl)密度梯度纯化)。转导之后四小时,添加含有多柔比星(Sigma,ref.D1515;最终浓度0.4 μ M)、FBS(最终浓度1%)的培养基(DMEM-GlutaMAX-I、10%FBS 100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素)。48小时(HEK293T)或4-6天(RA-FLS)后,通过荧光显微术或流式细胞术针对表达YFP或荧光素酶的细胞的百分比对细胞进行测定。优选地,利用分离自不同患者的FLS,诸如分离自2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多位患者的FLS多次进行体外转导测定。

[0035] “血清型”传统上在抗体与一种病毒之间相较于另一种病毒缺乏交叉反应性的基础上定义。此类交叉反应性差异通常归因于衣壳蛋白序列/抗原决定簇的差异(例如,归因于AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3序列差异)。在传统定义下,血清型意味着目标病毒已经针对对所有现有且表征的血清型具有特异性的血清测试了中和活性,并且没有发现中和目标病毒的抗体。随着更多天然存在的病毒分离物的发现和衣壳突变体的生成,可或可不与任何现有血清型存在血清学差异。因此,在新的AAV没有血清学差异的情况下,这种新的AAV将是对应血清型的亚组或变体。在许多情况下,血清学测试中和活性尚需要在具有衣壳序列修饰的突变病毒上进行,以确定其是否根据传统血清型定义属于另一血清型。因此,为方便起见且避免重复,术语“血清型”广义上指血清学上不同的病毒(例如,AAV)以及可能在给定血清型的亚组或变体内的非血清学不同的病毒(例如,AAV)。

[0036] “转导”是指通过病毒载体将转基因转移到受体宿主细胞中。通过本发明的rAAV病毒体转导靶细胞导致将所述rAAV病毒体内包含的转基因转移到转导细胞中。“宿主细胞”或“靶细胞”是指其中发生DNA递送的细胞,诸如个体的滑膜细胞(synoviocyte或synovial cell),或诸如来自患者的分离的FLS细胞或HEK293T细胞(在体外转导测定的情况下)。AAV载体能够转导分裂和非分裂细胞。在包含目标基因产物(诸如GFP)的细胞中,已经通过细胞的rAAV“转导”引入/转移/转导了目标基因产物。已向其中引入转基因的细胞称为“转导”细

胞。

[0037] 其中转导了转基因的受体宿主细胞优选地为感染待治疗疾病的细胞,诸如滑膜细胞,更具体地在关节炎疾病的情况下为FLS、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞、T淋巴细胞、树突细胞、浆细胞、肥大细胞、B淋巴细胞。如本文所用的“滑膜”或“滑膜组织”或“滑膜细胞”是指覆盖滑膜关节的非软骨表面的细胞衬里,如进一步描述于Tak (2000, Examination of the synovium and synovial fluid. 在: Firestein GS, Panyani GS, Wollheim FA 编. Rheumatoid Arthritis. New York: Oxford Univ. Press, Inc. 55-68中) 且通过引用并入本文。滑膜由内膜衬里层(或滑膜衬里层)和融入关节囊的滑膜衬里下层(滑膜下层(subsynovium))组成。内膜衬里层包含内膜巨噬细胞(或巨噬细胞样滑膜细胞或A型滑膜细胞)和FLS(或B型滑膜细胞)。因此,“滑膜”可由“滑膜组织”替换,或与其同义。滑膜细胞可以包括存在于滑膜中的任何细胞,包括FLS和巨噬细胞样滑膜细胞。滑膜细胞还可以是嗜中性粒细胞、T、B细胞和/或结缔组织细胞,它们都可存在于滑膜中。

[0038] “成纤维样滑膜细胞”(FLS)是间充质来源的细胞,其表现出与成纤维细胞一样的许多特征,诸如特定蛋白质(诸如若干类型的胶原)的表达。然而,FLS还分泌通常在其他成纤维细胞谱系中不存在的蛋白质,诸如润滑素。此外,FLS表达对于细胞粘附的介导而言重要的分子,诸如钙粘素-11、VCAM-1、若干整联蛋白以及其受体。对FLS特异性的是CD55的表达,并且因此该蛋白通常用于通过免疫组织化学鉴定滑膜中的FLS。FLS代表位于滑膜中的关节内部的特殊细胞类型,其细胞在慢性炎性疾病诸如类风湿性关节炎(RA)的发病机理中起到关键作用。术语“类风湿性滑膜”或“类风湿性滑膜细胞”或“类风湿性滑膜组织”是指患有RA的个体的关节的发炎滑膜。类风湿性滑膜的特征在于内膜衬里增生以及FLS、T细胞、浆细胞、巨噬细胞、B细胞、自然杀伤细胞和树突细胞在滑膜衬里下层中的积聚。这些积聚的细胞包括在类风湿性滑膜细胞的定义之内。在RA进展期间,滑膜组织成为发生恒定炎性过程的地方,其可最终导致软骨损伤以及关节破坏和变形。在RA期间存在于滑膜中的FLS已被报道为相比于正常组织中存在的FLS表现出改变的表型。例如,类风湿性滑膜中的FLS丧失“接触抑制”,即,它们丧失了当更多的细胞彼此接触时停止其生长的特性。此外,它们丧失了粘附表面生长的依赖性。因此,患病粘膜中的FLS数量增加。通过若干促炎性信号传导分子,尤其是白介素IL-6和IL-8、前列腺素类和基质金属蛋白酶(MMP)的产生进一步增强炎症。

[0039] 可选地,或与另一个实施方案相组合,在本发明的另一个优选实施方案中,与包含如本文所定义的未修饰的衣壳蛋白,优选地具有选自由SEQ ID NO:13-19组成的组的氨基酸序列的未修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体相比,当在相同条件下测试时,包含根据本发明的修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体提供转基因在人FLS中的表达的至少两倍增加,其中优选地,未修饰的衣壳蛋白具有与修饰的衣壳蛋白相同的血清型或具有SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。

[0040] 更优选地,与rAAV对照病毒体相比,本发明的rAAV病毒体导致如上所述在体外转导后转基因在人FLS细胞中的表达水平增加,表达水平增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50倍。

[0041] 还优选的,或除了上文之外,与rAAV对照病毒体相比,优选地与包含wtAAV5衣壳蛋白的rAAV病毒体相比,所述rAAV病毒体在体内施用给气囊滑膜(APS)小鼠模型(由Edwards等人(1981) J Pathol 134:147-156改编,如实施例4中所述)后提供增加的转基因表达,前提

条件是rAAV在其他地方相同(除其衣壳蛋白之外)。优选地,使用包含本发明的方法的突变衣壳蛋白的rAAV,转基因的表达增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35倍。示例性方法在实施例中提供。

[0042] 还优选的,或除了上文之外,与包含相同血清型的未修饰的,优选野生型的AAV衣壳蛋白的相同rAAV病毒体相比,包含修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体提供类似或较低的中和抗体(nAb)滴度。已知WtAAV5衣壳具有有吸引力的nAb特征谱,并且因此,与wtAAV5相比,包含根据本发明的修饰的衣壳蛋白的rAAV的类似或较低的nAb滴度是优选的。

[0043] 可选地,体外转导测定可以如上文所述类似地,但是在与FLS不同的细胞类型/细胞系中进行,这取决于待靶向的细胞类型,诸如在选自以下组成的组的细胞中:原代肝细胞、肝细胞系(例如,HuH、HepG2、HepA1-6)、心脏细胞、骨骼肌细胞、肺细胞诸如细胞系A549、CNS细胞、眼细胞、胃肠道细胞、骨髓细胞和血细胞,诸如细胞系THP-1。这还可需要不同的AAV血清型作为优选对照,取决于野生型衣壳蛋白的趋性。一般而言,对照载体优选地包含天然靶向所选组织的野生型衣壳蛋白。如技术人员将认识到的,这还可取决于施用模式:局部或全身。例如,作为得到最广泛检查的AAV的AAV2呈现出朝向骨骼肌细胞、神经元、血管平滑肌细胞和肝细胞的趋性;AAV6呈现出朝向气道上皮细胞的趋性;AAV7呈现出朝向骨骼肌细胞的趋性;AAV8呈现出朝向肝细胞的趋性;AAV1和AAV5呈现出朝向血管内皮细胞的趋性。在全身施用后,AAV 1-3和5-9具有朝向肝的趋性,其中利用AAV9、8、7、6、1以及在较小程度上5和2观察到高蛋白水平;通过AAV4、6、7、8和9转导心脏;对于AAV4和6,观察到胸表达(Zincarelli等人(2008)Molecular Therapy 16(6):1073-1080)。

[0044] 不受理论的束缚,我们相信,与rAAV对照病毒体相比,由包含本发明的修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体实现的增加的表达是由rAAV在细胞中的转导改善(可能由趋性改变造成)造成的,从而导致(i)被转导的细胞群内细胞数量增加,和/或(ii)每个细胞的表达水平增加,例如,由于更好的病毒体摄取和/或细胞内处理。

[0045] 具有根据本发明的修饰的衣壳蛋白的rAAV病毒体的另一个优点可以优选地是其改善,诸如可能避免预先存在的中和抗体。

[0046] 在本发明的一个优选实施方案中,修饰的衣壳蛋白包含氨基酸序列Z,优选地,氨基酸序列Z包含在蛋白质的C末端部分中。优选地,序列Z长12-18个氨基酸残基(在本文还称为“环区”和“插入序列”)。在一个优选实施方案中,序列Z位于衣壳蛋白的C末端部分中,优选地处于与野生型衣壳蛋白的从C末端起100-200、优选地120-180、更优选地130-170、更优选地140-160、最优选地约150个氨基酸处的位置相对应的位置处,诸如SEQ ID NO:13-19中所示。氨基酸序列Z的残基优选地暴露在衣壳蛋白的表面上,诸如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个残基暴露在衣壳蛋白的表面上(所谓的“环”)。在一个优选实施方案中,序列Z长14-18个氨基酸残基,更优选地,长15、16、17或18个残基,最优选地,长15、17或18个氨基酸残基。与未修饰的,诸如野生型,衣壳蛋白序列相比,序列Z可替换一些氨基酸残基。优选地,插入序列替换相同但不具有插入序列的序列,优选地未修饰的,更优选地野生型序列的3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基,更优选地6或7个氨基酸残基。除序列Z/插入序列之外,因此在框架中,衣壳蛋白可包含另外的修饰,诸如氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)或框架衣壳蛋白可以与野生型氨基酸序列相同。其中包含插入序列的框架AAV可以属于任何血清型,诸如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、

AAV11、AAVrh10或AAVDJ。优选地,其中包含序列Z的框架AAV选自由AAV1、AAV2、AAV7、AAV9、AAVrh10、AAVDJ组成的组,更优选地选自具有如SEQ ID NO:13-19中任一个所示的氨基酸序列的未修饰的衣壳蛋白。根据本发明的插入序列优选地包含在衣壳蛋白的C末端部分中,优选地处于与野生型衣壳蛋白的从C末端起100-200、优选地120-180、更优选地130-170、更优选地140-160、最优选地大约150个氨基酸残基相对应的位置处,诸如SEQ ID NO:13-19中所示,其中插入序列的位置通过下式II表示:

[0047] $EEEEI_{xxxx}PVATE_{xx}G_{xxxx}NxQy-Z-(x)_nLPGMVWQxRDVYLQGPIWAKIPHTDG$

[0048] 其中x表示单个氨基酸残基,其中y表示0、1或2个氨基酸残基(因此可能不存在),并且其中n为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15,优选地8、9或10,或其中插入序列的位置通过与式II具有至少90%、93%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列表示。优选地,本发明的序列Z的N末端前面的最后三个氨基酸残基为NLQ、NHQ或NFQ。优选地,y表示0或2个氨基酸残基。在一些情况下,y表示2个氨基酸残基,因此两个另外的氨基酸残基,优选地两个丝氨酸残基,可存在于NxQ基序与本发明的插入序列之间。这优选地是其中NxQ基序为NFQ的情况,例如如果AAV衣壳为如SEQ ID NO:1中所示的AAV1衣壳序列的话。技术人员将能够确定这些基序和插入序列定位于其中的这一区域,以及其是否携带一些变异,诸如氨基酸取代或缺失,这也涵盖在本发明的范围内。

[0049] 在一个优选实施方案中,基于图4和5中示出的比对,插入序列(序列Z)包含下式的序列或由其组成: $x_1-G-Q-x_2-G-x_3-x_4-x_5-R-x_6-x_7-x_8-x_9-x_{10}-x_{11}-x_{12}-x_{13}-x_{14}-x_{15}$,其中 x_1 为Q或不存在, x_2 为S或R, x_3 为N或C, x_4 为D、Y或E, x_5 为C、V、S或A, x_6 为G、S或V, x_7 为不存在、A、V或R, x_8 为D、N或E, x_9 为C或A, x_{10} 为F或Q, x_{11} 为不存在、C或A, x_{12} 为不存在或A, x_{13} 为不存在或Q, x_{14} 为不存在或A并且 x_{15} 为不存在或A。可选地,插入序列(序列Z)包含下式的序列或由其组成: $y_1-G-Q-y_2-G-y_3-y_4-y_5-R-y_6-y_7-y_8-y_9-y_{10}-A-y_{11}-y_{12}-y_{13}$,其中 y_1 为Q或不存在, y_2 为S或R, y_3 为N或C, y_4 为D、Y或E, y_5 为C、V、S或A, y_6 为G、S或V, y_7 为不存在或D, y_8 为不存在或C, y_9 为A、V、R或F, y_{10} 为N、D、E或C, y_{11} 为不存在或Q, y_{12} 为不存在或A, y_{13} 为不存在或A。在另一个替代方案中,在最优选的实施方案中,基于图6和7中示出的比对,插入序列(序列Z)包含以下通式I的序列或由其组成:

[0050] $y-G-Q-x-G-(x)_3-R-(x)_3-y-A-Q-A-A$

[0051] 其中x表示单个氨基酸残基并且其中y表示0、1或2个氨基酸残基(因此可能不存在)。优选地,(i)如果N末端的y表示0个氨基酸,那么式I内的其他y表示0个氨基酸残基,或(ii)如果N末端的y表示1个氨基酸残基,那么式I内的其他y表示2个氨基酸残基。更优选地,插入序列(序列Z)包含更具体的下式的序列或由其组成:

[0052] $z_0-G-Q-z_1-G-z_2-z_3-z_4-R-z_5-z_6-z_7-z_8-z_9-A-Q-A-A$

[0053] 其中 z_0 为不存在或Q, z_1 为R或S, z_2 为C或N, z_3 为D、E或Y, z_4 为C、A、S或V, z_5 为G、V或S, z_6 为d或不存在, z_7 为C或不存在, z_8 为F、R、V或A, z_9 为C、D、N或E。更优选地,如果 z_0 不存在,那么 z_6 和 z_7 均表示不存在。

[0054] 更优选地,序列Z/插入序列包含与选自由SEQ ID NO:8-12组成的组的氨基酸序列中的任一个具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,更优选地100%序列同一性的氨基酸序列,或由其组成。优选的是,序列Z/插入序列包含由以上式子中的任一个表示且与选自由SEQ ID NO:8-12组成的组的氨基酸序列中的

任一个具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%，更优选地100%序列同一性的氨基酸序列，或由其组成。

[0055] 在哺乳动物细胞中，处于正确化学计量的三种AAV衣壳蛋白 (VP1、VP2和VP3) 的表达依赖于两个剪接受体位点的交替使用和对于VP2次优利用的ACG起始密码子的组合，这通过昆虫细胞不能正确重现。正确的化学计量对于AAV颗粒的感染性非常重要。对于在昆虫细胞中以正确的化学计量产生三种AAV衣壳蛋白而言，本领域通常使用被转录成单个多顺反子信使的构建体，其能够表达所有三种VP蛋白而不需要剪接。为了实现这一点，代替ATG，VP1蛋白可处于次优翻译起始密码子的控制下。这种次优翻译起始密码子的实例为ACG、TTG、CTG和GTG(Urabe等人(2002)Human Gene Therapy 13:1935-1943;US 20030148506;US 20040197895;WO 2007/046703)。可选地，在昆虫细胞中产生rAAV时，可使用核酸盒表达VP1、VP2和VP3蛋白，其中这些蛋白质由包含重叠开放阅读框(ORF)的核酸序列编码，如欧洲专利号2,061,891B1中所述，其中公开了VP表达盒，其在VP2 ACG起始密码子之前包括包含启动子的内含子。本发明的修饰的衣壳蛋白参考VP1衣壳蛋白的蛋白质序列进行定义。然而，由于序列Z/插入序列位于VP1蛋白的C末端部分，本发明中包括的是，VP2和VP3蛋白也携带序列Z/插入序列并且因此是修饰的(不考虑产生rAAV的方法，诸如在昆虫细胞中还是在哺乳动物细胞中)。

[0056] 可选地，或与另一个实施方案相组合，在本发明的另一个优选实施方案中，根据本发明的修饰的衣壳蛋白包含选自由以下组成的组的氨基酸序列或由其组成：i) 与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:1的第588-602位氨基酸与SEQ ID NO:11具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性，ii) 与具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:2的第585-599位氨基酸与SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性，iii) 与具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:3的第587-601位氨基酸与SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性，iv) 与具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:4的第586-600位氨基酸与SEQ ID NO:8具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性，v) 与具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:5的第588-602位氨基酸与SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性，vi) 与具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少70%、75%、

80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:6的第588-602位氨基酸与SEQ ID NO:8具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性，以及vii)与具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%序列同一性的氨基酸序列，并且其中SEQ ID NO:7的第587-601位氨基酸与SEQ ID NO:12具有至少80%、85%、87%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%，最优选地具有100%的序列同一性。优选地，其中包含插入序列的框架AAV衣壳蛋白具有野生型AAV衣壳，诸如AAV5、AAV1、AAV2、AAV7、AAV9、AAVrh10或AAVDJ的氨基酸序列，或包含保守氨基酸取代的氨基酸序列。更优选地，其中包含插入序列的框架AAV衣壳蛋白具有wtAAV5衣壳的氨基酸序列，或包含保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0057] “序列同一性”在本文定义为两个或更多个氨基酸(多肽或蛋白质)序列或者两个或更多个核酸(多核苷酸)序列之间的关系，通过比较所述序列确定。在一个优选实施方案中，序列同一性基于两个给定的SEQ ID NO的全长或其部分计算。其部分优选地是指两个SEQ ID NO的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在本领域中，“同一性”还表示氨基酸或核酸序列之间序列关联的程度，根据具体情况，它由此类序列的序列串之间的匹配程度确定。除非本文另外指明，否则关于SEQ ID NO的同一性或相似性是指基于所述序列的全长(即，在其整个长度上或整体上)的同一性或相似性。

[0058] 两个氨基酸序列之间的“相似性”通过将—个多肽的氨基酸序列及其保守氨基酸取代与第二多肽的序列相比较来确定。“同一性”和“相似性”可以通过已知方法容易地计算，包括但不限于(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第I部分, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991; 以及 Carillo, H. 和 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073(1988)) 中描述的那些。

[0059] 设计确定同一性的优选方法以得到所测试序列之间的最大匹配。确定同一性和相似性的方法在可公开获得的计算机程序中被编成了代码。用于确定两个序列之间的同一性和相似性的优选的计算机程序方法包括，例如，GCG程序包(Devereux, J. 等人, Nucleic Acids Research 12(1):387(1984))、BestFit、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul, S.F. 等人, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))。BLAST X程序可从NCBI和其他来源公开获得(BLAST Manual, Altschul, S. 等人, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. 等人, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))。众所周知的Smith Waterman算法也可用于确定同一性。

[0060] 用于多肽序列比较的优选参数包括以下：算法：Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453(1970)；比较矩阵：来自Hentikoff和Hentikoff的BLOSSUM62, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919(1992)；空位罚分：12；以及空位长度罚分：4。这种程序可作为“Ogap”程序从位于Madison, WI的Genetics Computer Group公开获得。上文提及的参数是用于氨基酸比较的默认参数(以及末端空位无罚分)。

[0061] 用于核酸比较的优选参数包括以下:算法:Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970); 比较矩阵:匹配=+10, 错配=0; 空位罚分:50; 空位长度罚分:3。可作为Gap程序获自位于Madison, Wis的Genetics Computer Group (www.biology.wustl.edu/gcg/gap)。上文给出用于核酸比较的默认参数。

[0062] 任选地,在确定氨基酸相似性程度时,技术人员还可考虑所谓的“保守”氨基酸取代,如技术人员将明白的。保守氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的可互换性。例如,具有脂族侧链的氨基酸的组为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有脂族-羟基侧链的氨基酸的组为丝氨酸和苏氨酸;具有含酰胺侧链的氨基酸的组为天冬酰胺和谷氨酰胺;具有芳族侧链的氨基酸的组为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;具有碱性侧链的氨基酸的组为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;并且具有含硫侧链的氨基酸的组为半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基团为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸,以及天冬酰胺-谷氨酰胺。本文公开的氨基酸序列的取代变体是所公开序列中至少一个残基被移除并且在其位置插入不同残基的那些。优选地,氨基酸变化是保守的。各天然存在的氨基酸的优选的保守取代如下:Ala到Ser; Arg到Lys; Asn到Gln或His; Asp到Glu; Cys到Ser或Ala; Gln到Asn; Glu到Asp; Gly到Pro; His到Asn或Gln; Ile到Leu或Val; Leu到Ile或Val; Lys到Arg、Gln或Glu; Met到Leu或Ile; Phe到Met、Leu或Tyr; Ser到Thr; Thr到Ser; Trp到Tyr; Tyr到Trp或Phe; 以及Val到Ile或Leu。

[0063] 可选地,或与另一个实施方案相组合,在本发明的另一个优选实施方案中,衣壳蛋白包含选自自由SEQ ID NO:1-7组成的组,更优选地选自自由SEQ ID NO:1、2、3、4、6和7组成的组,甚至更优选地选自自由SEQ ID NO:3、4和6组成的组,更优选地选自自由SEQ ID NO:4和6组成的组,更优选地SEQ ID NO:4的氨基酸序列,或由其组成。

[0064] 功能性ITR序列是rAAV病毒体的复制、拯救和包装所必需的。ITR序列可以是野生型序列,或可与野生型序列具有至少80%、85%、90%、95%或100%的序列同一性,或可通过,例如,核苷酸的插入、突变、缺失或取代进行改变,只要它们保持功能性即可。在此上下文中,功能性是指将基因组直接包装到衣壳外鞘中并且接着允许在待转导的宿主细胞或靶细胞中表达的能力。通常,野生型AAV基因组的ITR保留在rAAV-载体中。ITR可以由AAV病毒基因组克隆或从包含AAV ITR的载体中切除。ITR核苷酸序列可以使用标准分子生物学技术如本文所定义在任一末端连接至转基因,或可以将ITR之间的野生型AAV序列替换为期望的核苷酸序列。rAAV-载体优选地至少包含一种AAV血清型的ITR区域的核苷酸序列,或与其基本上相同的核苷酸序列,以及插入两个ITR之间的编码治疗性蛋白质(在合适的调控元件的控制下)的至少一个核苷酸序列。大部分现用rAAV-载体使用来自AAV血清型2的ITR序列。rAAV-载体中存在的最优选ITR属于AAV2血清型。其他优选的ITR属于AAV1、AAV3、AAV5或AAV6血清型(Grimm等人(2006) *J Virol* 80(1):426-439)。rAAV基因组可以包含单链或双链(自身互补)DNA。单链核酸分子是正义或反义链,因为两种极性同样能够包装到AAV衣壳中。单链rAAV-载体可利用野生型AAV血清型2(AAV2) ITR序列,并且双链(自身互补)rAAV-载体可利用ITR的修饰型式。可选地,在一个实施方案中,双链载体包含一个ITR,所述ITR来自AAV4。rAAV-载体还可包含本领域已知的标志物或报告基因,诸如例如编码抗生素抗性基因、荧光蛋白(例如,gfp)的基因或编码以化学、酶促或其他方式可检测和/或可选择的产物(例如,lacZ、碱性磷酸酶(AP)、SEAP、Luc、Neo、Bla等)的基因。

[0065] 包括AAV血清型衣壳和AAV基因组ITR的任何可能组合的rAAV-载体使用本领域已知的方法产生,例如使用哺乳动物rAAV生产系统或昆虫细胞rAAV生产系统。本领域已知的方法例如描述于Pan等人(J.ofVirology(1999)73:3410-3417)、Clark等人(Human Gene Therapy(1999)10:1031-1039)、Wang等人(Methods Mol.Biol.(2011)807:361-404)、Grimm(Methods(2002)28(2):146-157),并且昆虫细胞系统基于Urabe等人(Human Gene Therapy(2002)13:1935-1943)、Kohlbrenner等人(Molecular Therapy(2005)12(6):1217-1225)、国际专利公布W0 2007/046703、国际专利公布W0 2007/148971、国际专利公布W0 2009/014445、国际专利公布W0 2009/104964、国际专利公布W0 2009/154452、国际专利公布W0 2011/112089、国际专利公布W0 2013/036118、美国专利号6,723,551B,所述参考文献通过引用并入本文。简而言之,所述方法通常可包括(a)将rAAV基因组构建体引入宿主细胞中,(b)将AAV辅助构建体引入宿主细胞中,其中辅助构建体包含野生型rAAV基因组中缺少的病毒功能,以及(c)将辅助病毒构建体引入宿主细胞中。用于rAAV载体复制和包装的所有功能必须存在,以实现rAAV基因组在rAAV载体中的复制和包装。引入宿主细胞中可以使用标准分子生物学技术进行并且可以同时或顺序进行。最后,培养宿主细胞以产生rAAV载体,然后使用标准技术诸如CsCl梯度(Xiao等人1996,J.Virol.70:8098-8108)或碘克沙醇纯化对所述载体进行纯化。纯化的rAAV载体接着通常备用于所述方法。可以实现每ml多于 10^{12} 个颗粒的高滴度和高纯度(不含可检测的辅助和野生型病毒)(参见,例如Clark等人同上和Flotte等人1995,Gene Ther.2:29-37)。在ITR区域之间插入rAAV载体中的转基因的总体大小通常小于5千碱基(kb)。

[0066] 在本发明的上下文中,衣壳蛋白外鞘可与rAAV-基因组属于不同血清型,其包含(i)编码目标基因产物的核苷酸序列,和(ii)至少一个AAV ITR序列。本发明的rAAV-基因组因此可由本发明的衣壳蛋白外鞘,即二十面体衣壳包裹,其包括根据本发明的衣壳蛋白(VP1、VP2和/或VP3),例如根据本发明的AAV衣壳蛋白的突变体,而包含在所述rAAV-载体中的ITR序列可以是上文所述的AAV血清型中的任一种,包括例如AAV2或AAV5。在一个实施方案中,rAAV病毒体中存在的rAAV基因组或ITR衍生自AAV血清型2或AAV血清型5或AAV血清型8。AAV5和其他AAV血清型的完整基因组已经测序(Chiorini等人1999,J.of Virology第73卷,第2期,第1309-1319页)并且AAV5的核苷酸序列可在GenBank中获得(登录号AF085716)。AAV2和AAV5的ITR核苷酸序列因此是技术人员易得的。AAV2的完整基因组可在NCBI中获得(NCBI参考序列NC_001401.2)。它们可以克隆,或例如使用例如Applied Biosystems Inc.(Fosters,CA,USA)供应的寡核苷酸合成仪通过本领域已知的化学合成,或通过标准分子生物学方法制备。

[0067] 可选地,或与另一个实施方案相组合,在本发明的另一个优选实施方案中,rAAV载体包含编码目标基因产物的核苷酸序列。

[0068] 术语“转基因”或“目标基因产物”在本文可互换使用并且是指相对于AAV核酸序列而言的非天然核酸。它们用于指可以引入细胞或生物体中的多核苷酸。目标基因产物包括任何多核苷酸,诸如编码多肽或蛋白质的基因,转录成抑制性多核苷酸的多核苷酸,或未转录的多核苷酸(例如,缺乏表达控制元件,诸如驱动转录的启动子)。本发明的目标基因产物可包含彼此不同或编码不同的治疗性分子的至少两个核苷酸序列。至少两个不同的核苷酸序列可通过IRES(内部核糖体进入位点)元件连接,从而提供在单个启动子控制下的双顺反

子转录物。合适的IRES元件描述于例如Hsieh等人(1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:910-917)中。此外,编码不同的(治疗性)多肽或蛋白质的至少两个不同的核苷酸序列可通过病毒2A序列连接,以允许由单个启动子有效表达两种转基因。2A序列的实例包括来自口蹄疫病毒、马甲型鼻炎病毒、东亚细亚病毒(Thosesignavirus)和猪捷申病毒1(porcine teschovirus-1)的那些(Kim等人, *PLoS One* (2011) 6(4):e18556)。目标基因产物优选地插入rAAV基因组内或ITR序列之间。目标基因产物还可以是包含表达调控元件诸如可操作地连接至编码序列的启动子或转录调控序列以及3'终止序列的表达构建体。目标基因产物可以是替换或补充缺陷基因的功能性突变等位基因。基因疗法还包括插入为抑制性的转基因,即,其抑制、降低或减少内源性或外源性基因或蛋白质(诸如不期望或异常的(例如,致病的)基因或蛋白质)的表达、活性或功能。此类转基因可以是外源性的。外源性分子或序列被理解成在待处理的细胞、组织和/或个体中不天然存在的分子或序列。获得性和先天性疾病均可适合基因疗法。

[0069] “基因”或“编码序列”是指“编码”特定蛋白质的DNA或RNA区域。当置于适当的调控区域,诸如启动子的控制下时,编码序列被转录(DNA)和翻译(RNA)成多肽。基因可包含若干可操作地连接的片段,诸如启动子、5'前导序列、内含子、编码序列和3'非翻译序列,包括聚腺苷酸化位点或信号序列。嵌合或重组基因是在自然界中通常不存在的基因,诸如其中例如启动子在自然界中不与转录DNA区域的部分或全部缔合的基因。“基因的表达”是指其中基因转录成RNA和/或翻译成活性蛋白质的过程。

[0070] 如本文所用,术语“启动子”或“转录调控序列”是指用于控制一个或多个编码序列的转录的核酸片段,并且相对于编码序列的转录起始位点的转录方向位于上游,并且通过DNA依赖性RNA聚合酶的结合位点的存在、转录起始位点和任何其他DNA序列在结构上进行鉴定,包括但不限于转录因子结合位点、抑制和激活蛋白结合位点,以及本领域技术人员已知直接或间接地用于调控来自启动子的转录量的任何其他核苷酸序列。“组成型”启动子是在大部分生理和发育条件下在大部分组织中有活性的启动子。“诱导型”启动子是受生理或发育调控的启动子,例如通过化学诱导剂的应用。优选的诱导型启动子是在炎症后可诱导的NF- κ B响应性启动子。“组织特异性”启动子优先在特定类型的组织或细胞中具有活性。适当的启动子序列的选择通常取决于选定用于表达DNA区段的宿主细胞。本发明的rAAV和/或转基因内的优选启动子序列是在类风湿性滑膜的细胞中,诸如在内膜巨噬细胞和/或FLS和/或其他滑膜细胞,诸如但不限于T细胞中赋予表达的启动子。优选的启动子是例如,已知在滑膜细胞中表达的基因的启动子,诸如CMV启动子,IL-6基因的启动子或SV40启动子,或如本文早前鉴定的NF- κ B诱导型启动子,以及易由技术人员确定的其他启动子。可选地,转基因可操作地连接至允许有效的系统表达的启动子。合适的启动子序列是CMV启动子、CBA(鸡 β -肌动蛋白),或肝特异性启动子,诸如人 α -1抗胰蛋白酶(hAAT)或TBG(甲状腺素结合球蛋白)。优选地,rAAV和/或转基因内的启动子不是类固醇诱导型启动子。更优选地,rAAV和/或转基因内的启动子不是地塞米松诱导型启动子。

[0071] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指以功能关系连接多核苷酸(或多肽)元件。当核酸置于与另一个核酸序列的功能关系中时,所述核酸被“可操作地连接”。例如,如果转录调控序列影响编码序列的转录,那么所述转录调控序列可操作地连接至编码序列。“可操作地连接”是指所连接的DNA序列通常是连续的,并且在必要时连续并在阅读框中连接两个

蛋白质编码区。

[0072] “目标基因产物”可以是“治疗性多肽”或“治疗性蛋白质”，其在本文应理解为可以对个体产生有益效果的多肽或蛋白质，优选地，所述个体是人，更优选地，所述人患有疾病。此类治疗性多肽可选自但不限于由以下组成的组：酶、辅因子、细胞因子、抗体、生长因子、激素和抗炎蛋白。

[0073] 可选地，或与另一个实施方案相组合，在本发明的另一个优选实施方案中，编码目标基因产物的核苷酸序列位于两个AAV ITR序列之间。换句话说，编码目标基因产物的核苷酸序列侧接有两个AAV ITR序列，即，一个ITR处于编码目标基因产物的核苷酸序列的任一末端。

[0074] 可选地，或与另一个实施方案相组合，在本发明的另一个优选实施方案中，目标基因产物治疗、预防或抑制与关节炎疾病相关的症状，其中优选地，目标基因产物选自由以下组成的组：白介素、免疫调节剂、抗体、shRNA、miRNA、生长因子、蛋白酶、核苷酸酶/核苷酶、肽类、蛋白酶抑制剂、抑制剂、酶及其组合，并且其中更优选地，目标基因产物为CD39、CD73和IFN- β 中的至少一种。这些的实例为：白介素1 (IL-1) 抑制剂(例如，阿那白滞素、康纳单抗 (canakinumab)、利纳西普 (rilonacept))、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 抑制剂(例如，依那西普 (etanercept)、英夫利昔单抗 (infliximab)、阿达木单抗 (adalimumab)、培塞利珠单抗 (certilizumab pegol)、戈利木单抗 (golimumab))、IL-1受体拮抗剂、可溶性IL-1受体、IL-17抑制剂(例如，苏金单抗 (secukinumab)、布罗达单抗 (brodalumab)、依奇珠单抗 (ixekizumab)、IL-12/IL-23抑制剂(优特克单抗 (ustekinumab)、瑞莎珠单抗 (risankizumab)、古塞库单抗 (guselkumab)、替拉珠单抗 (tildrakizumab))、T细胞共刺激抑制剂(例如阿巴西普)、B细胞消耗和抑制剂(例如，利妥昔单抗 (rituximab)、贝利木单抗 (belimumab)、ianalumab、tabalumab)、IL-15抑制剂(例如AMG-714)、IL-22抑制剂(例如非扎奴单抗 (Fezakunimab))、GM-CSF的抑制剂(lenzilumab、那米鲁单抗 (namilumab))、胰岛素样生长因子 (IGF-1)、成纤维细胞生长因子 (FGF) (例如rhFGF-18/sprifermin)、核因子 κ -B配体受体激活剂 (RANKL) 抑制剂(例如地诺单抗 (denosumab))、补体5a抑制剂(例如C5aR-151)、骨形态发生蛋白家族成员 (BMP)、转化生长因子- β (TGF- β)、生长分化因子家族 (GDF)、白介素-18抑制剂(例如Tadekinig alfa/IL-18结合蛋白)、IL-2抑制剂(例如巴利昔单抗 (basiliximab)、达克珠单抗 (daclizumab))、可溶性TNF α (sTNF α) 受体p55或sTNF α 受体p75、与IgG融合的sTNF α 受体、TNF α 受体p55的抑制剂、sTNF α 受体p75的抑制剂、显性负性I κ B-激酶 (dn-IKK- β)、白介素-4 (IL-4)、白介素-10 (IL-10) (F8IL10/Dekavil)、白介素-13 (IL-13)、 β 干扰素 (IFN- β)、MMP家族的组织抑制剂 (TIMP)、纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin)、信号传导分子/转录因子(例如，SMAD、Sox9、I κ B)、细胞外基质组分(例如，胶原、软骨寡聚基质蛋白 (COMP)、蛋白聚糖、弹性蛋白)、血管活性肠肽 (VIP)、分化簇39 (CD39) 和分化簇73 (CD73)、超氧化物歧化酶 (SOD) 以及其组合。

[0075] 用于在本发明的所有实施方案中使用的功能性基因组编辑系统是本领域技术人员已知的并且包括：转录激活物样效应物核酸酶 (TALEN, Gaj等人 (2013) Trends Biotechnol. 31 (7) :397-405)、锌指核酸酶 (ZFN, Gaj等人 (2013) 同上)、大范围核酸酶诸如 I-SceI (Arnould等人 (2007) J Mol Biol 371 (1) :49-65; Takeuchi等人 (2011) PNAS USA 108 (32) :13077-13082)、RNA引导的核酸内切酶系统如CRISPR/Cas (Mali等人 (2013) Nat

methods 10 (10) :957-963;Mali等人 (2013) Nat Biotechnol 31 (9) :833-838; Cong等人 (2013) Science 339 (6121) :819-823) 和CRISPR/Cpf1 (Zetsche等人 (2015) Cell 163 (3) :759-771)、三链体形成分子 (triplex-forming molecule)、合成聚酰胺和设计师锌指蛋白 (designer zinc-finger protein) (Uil等人 (2003) Nucleic Acids Res 31 (21) :6064-6078)。功能性基因组编辑系统采用核酸酶,其在基因组中的期望位置处产生位点特异性双链断裂。诱导的双链断裂通过非同源末端连接或同源重组进行修复。因此,获得靶向突变。通过这些方法中的任一种用其天然位置上的正常等位基因替换缺陷基因 (导致疾病或病症) 是有利的,因为在仅需要改变基因的一小部分时,不需要将完整编码序列和调控序列包括在rAAV病毒体中。部分替换基因的表达也被认为比病毒体携带的完整基因与正常细胞生物学更为一致。优选的基因编辑系统是CRISPR (包括CRISPR/Cpf1和CRISPR-Cas),因为它比其他方法更加快速和便宜。主要优点还有,使用CRISPR单向导RNA,可以容易地将CRISPR的目标重新设置为靶向不同的DNA序列。因此,可选地,或与另一个实施方案相组合,在本发明的另一个优选实施方案中,rAAV基因组包含以下各项中的至少一个:(i) 包含编码至少一个向导RNA (gRNA) 的序列的多核苷酸;其中向导RNA与基因组中的一个或多个靶多核苷酸序列基本上互补-优选地互补;以及(ii) 包含编码核酸酶的序列的多核苷酸;其中核酸酶与向导RNA形成核糖核酸酶复合物,并且其中核糖核酸酶复合物在基因组中产生位点特异性双链DNA断裂。

[0076] 在第二方面,本发明涉及一种用于治疗、预防或抑制与关节炎疾病相关的症状的rAAV组合物,其中rAAV组合物包含本发明的rAAV病毒体以及药学上可接受的载剂、稀释剂、增溶剂、填充剂、防腐剂 and/或赋形剂,优选地药学上可接受的载剂。此类药学上可接受的载剂、稀释剂、增溶剂、填充剂、防腐剂和/或赋形剂可以例如见于Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第20版. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000。任何合适的药学上可接受的载剂、稀释剂、增溶剂、填充剂、防腐剂和/或赋形剂可以在本发明的组合物中使用 (参见例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, 1997年4月)。优选的药物形式将与无菌盐水、右旋糖溶液或缓冲液,或其他药学上可接受的无菌流体相组合。可选地,可使用固体载剂,诸如微载体珠。

[0077] 药物组合物通常是无菌的并且在制造和储存条件下是稳定的。药物组合物可配制为溶液、微乳液、脂质体,或适于适应高药物浓度的其他有序结构。载剂可为溶剂或分散介质,其含有,例如,水、乙醇、多元醇 (例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等) 以及其合适的混合物。可例如通过使用包衣诸如卵磷脂、通过在分散液的情况下维持所需要的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在很多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖类、诸如甘露糖醇、山梨糖醇的多元醇或氯化钠。可以通过在组合物中包含例如单硬脂酸盐和明胶的延长吸收的试剂实现可注射组合物的延长吸收。细小病毒病毒体可作为大丸剂或以控释制剂的形式施用,例如以组合物的形式,所述组合物包含缓慢释放聚合物或将保护化合物避免快速释放的其他载剂,包括植入物和微胶囊化的递送系统。可使用例如可生物降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸聚乙醇酸共聚物 (PLG)。如本文所用,“药学上可接受的载剂”或“赋形剂”优选地包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸

收延迟剂等。药学上可接受的载剂包括无菌水性溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。这样的介质和试剂对药物活性物质的用途在本领域中是熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则涵盖其在本发明的药物组合中的用途。

[0078] 以易于施用和实现剂量均匀性的剂量单位形式配制肠胃外组合物可以是有利的。如本文所用,“剂量单位形式”是指适合用作用于待治疗受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有计算用于产生期望治疗效果的预先确定量的活性化合物以及所需的药物载剂。本发明的剂量单位形式的规格可由活性化合物的独特特征和待实现的具体治疗效果,以及现有技术中内在的对配伍这种用于治疗个体病状的活性化合物的限制决定。

[0079] 本发明的药物组合物中还可以掺入补充活性化合物。对共同施用另外治疗剂的指导可见于例如加拿大药剂师协会(Canadian Pharmacists Association)的加拿大药典(Compendium of Pharmaceutical and Specialties(CPS))。

[0080] 在一个实施方案中,rAAV组合物还包含空颗粒(即,只有衣壳的颗粒,因此不包含rAAV基因组)。因此,可选地,或与另一个实施方案相组合,在本发明的另一个实施方案中,本发明的rAAV组合物还以至少1:1,更优选地至少5:1,甚至更优选地至少10:1的空衣壳与rAAV病毒体比率包含空衣壳。rAAV组合物可以包含如上文所定义的rAAV病毒体和空衣壳,诸如WO 2016/055437(以引用方式并入本文)中所定义,并且如Aalbers等人(2017) Hum. Gene Ther. 28(2):168-178中所描述。与本发明的组合物的rAAV-转基因载体相比,空衣壳可以属于相同的血清型或不同的血清型。优选地,空衣壳属于与rAAV病毒体相同的血清型。在这种rAAV组合物内,空衣壳和rAAV病毒体的衣壳可以包含本发明的修饰的衣壳蛋白,优选地相同类型的修饰的衣壳蛋白。然而,还涵盖的是其中与rAAV病毒体的修饰的衣壳蛋白相比,空衣壳具有不同的血清型或为不同修饰的衣壳蛋白的rAAV组合物。还涵盖的是其中空衣壳具有血清型的混合物,诸如但不限于AAV2和AAV5衣壳的混合物的rAAV组合物。发明人报道了,在关节内施用与大量空衣壳掺混的rAAV-病毒体之后关节中转基因表达的效果增加。优选地,rAAV-病毒体和空衣壳以至少1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、15:1、20:1、50:1、100:1或1000:1,优选地至少5:1(即,空衣壳的量为rAAV-转基因载体的量的至少5倍)的空衣壳与rAAV-病毒体比率存在于组合物内。优选地,所述组合物以至多10000:1、5000:1、4000:1、3000:1、2000:1、1000:1、500:1、400:1、300:1、200:1、100:1、90:1、80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、15:1、10:1或5:1,优选地至多1000:1的空衣壳与rAAV-转基因载体比率包含rAAV-病毒体和空衣壳。优选地,所述组合物以介于1:1至100:1、2:1至100:1、5:1至100:1、1:1至20:1、2:1至20:1之间,或优选地介于5:1至20:1之间的空衣壳与rAAV-病毒体比率包含rAAV-病毒体和空衣壳。

[0081] 上文提供了其中rAAV-病毒体和空衣壳存在于单一组合物中的实施方案。还涵盖在本发明内的是其中rAAV-病毒体和空衣壳存在于(至少两种或更多种)分开的不同组合物中的替代实施方案。在此替代实施方案中,rAAV-病毒体和空衣壳可以按时间(例如,顺序地)和/或定位分开施用,其中定位应理解为施用部位。此外,rAAV-病毒体和空衣壳可以同时施用,例如以基本上相同的定时,任选地在分开的位置。

[0082] 在第三方面,本发明涉及一种用于治疗或预防关节炎疾病或用于治疗或预防与关节炎疾病相关的症状的rAAV组合物和免疫抑制剂,其中rAAV组合物如上文所定义并且其中

治疗或预防包括向个体施用rAAV组合物和施用免疫抑制剂。以引用方式并入本文的W02016/055437公开了,当用免疫抑制剂和rAAV-病毒体两者治疗受试者时,免疫抑制剂对AAV转基因表达的效果增加。此外,W02016/055437公开了免疫抑制剂与空载体一起对rAAV转基因表达的令人惊讶的协同效应。在一个实施方案中,免疫抑制剂与rAAV组合物分开应用,分开意指在位置和/或时间上分开。在这一实施方案中,免疫抑制剂和rAAV组合物可存在于分开且不同的组合物中。免疫抑制剂、rAAV-病毒体以及任选地空载体可以甚至各自存在于分开的不同组合物中。在另一个实施方案中,免疫抑制剂和rAAV组合物可存在于单一组合物中。在另一个实施方案中,rAAV-病毒体和免疫抑制剂存在于单一组合物中,并且优选地,此组合物在治疗中与包含空衣壳的单独组合物一起使用。在甚至另一个实施方案中,免疫抑制剂和空衣壳存在于单一组合物中,并且优选地,此组合物在治疗中与包含rAAV-病毒体的单独组合物一起使用。因此,本发明还提供了一种包含如本文所定义的空衣壳和免疫抑制剂的组合物,一种包含如本文所定义的rAAV-病毒体和免疫抑制剂的组合物,以及一种包含如本文所定义的rAAV组合物和免疫抑制剂的组合物。

[0083] 优选地,用于本发明的免疫抑制剂是固有免疫细胞抑制剂,优选巨噬细胞抑制剂。固有免疫细胞在本文定义为嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或树突细胞,所述细胞具有参与对外源物质的炎性应答的潜力。固有免疫细胞抑制剂在本文定义为导致固有免疫细胞活性和/或固有免疫细胞数量降低的药剂。巨噬细胞抑制剂在本文定义为导致巨噬细胞活性和/或巨噬细胞数量降低的药剂。“巨噬细胞”在本文理解为在称为吞噬作用的过程中吞没并消化细胞碎片、外源物质、微生物和癌细胞的固有免疫细胞。优选地,本发明的固有免疫细胞或巨噬细胞抑制剂导致与处理之前固有免疫细胞或巨噬细胞的初始数量或活性相比,固有免疫细胞或巨噬细胞的数量或活性降低至少1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、45%、55%、65%、75%、85%、95%或优选地100%。固有免疫细胞或巨噬细胞活性和/或数量可以通过本领域技术人员已知的任何合适的测定进行检测,诸如但不限于用于测试巨噬细胞体外细胞毒活性的MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑鎓溴化物)比色测定,如Ferrari等人(*Journal of Immunological Methods*, 131(1990) 165-172)所述,通过测量细胞因子水平(例如,CCL2、TNF),通过组织学和组织化学检测方法,例如,通过CD68标记或通过体内磁共振成像(MRI)检测巨噬细胞摄取的超顺磁性氧化铁(SPIO),优选地在静脉内施用SPIO之后,如Yi-Xiang J. Wang (*Quant. Imaging Med Surg* (2011) 1:35-40)所综述。检测可以在体外或体内。优选地,体内检测是在动物模型,优选地大鼠或鼠模型中。

[0084] 优选地,免疫抑制剂是糖皮质激素和/或二膦酸盐,优选地脂质体二膦酸盐。糖皮质激素的具体非限制性实例是皮质醇、可的松、强的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸去氧皮质酮和醛甾酮。优选地,免疫抑制剂是曲安西龙。二膦酸盐的具体非限制性实例为依替膦酸盐、氯屈膦酸盐(clodronate)、替鲁膦酸盐、帕米膦酸盐(pamidronate)、奈立膦酸盐(neridronate)、奥帕膦酸盐、阿仑膦酸盐(alendronate)、伊班膦酸盐、利塞膦酸盐和唑来膦酸盐(zoledronate)。优选地,二膦酸盐是脂质体包封的二膦酸盐或脂质体二膦酸盐,优选脂质体氯膦酸盐。优选地,糖皮质激素不是地塞米松。应理解,本发明的炎性或巨噬细胞抑制剂不限于糖皮质激素和/或二膦酸盐。例如,本发明的炎性或巨噬细胞抑制剂还可以是炎性或巨噬细胞消耗抗

体,诸如抗F4/80抗体。优选地,这种抗体是人或人源化抗体。待用于本发明的另外的相关免疫抑制剂为细胞稳定药(cytostatic drug)(例如烷化剂和/或抗代谢物诸如甲氨蝶呤)、修饰嘌呤能信号传导途径的药物(例如甲氨蝶呤、腺苷类似物、腺苷受体拮抗剂或激动剂)、非固醇类抗炎药(NSAIDs,例如布洛芬、双氯芬酸、美洛昔康、萘普生、乙酰水杨酸)、生物制剂诸如TNF阻断剂(例如英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗、戈利木单抗)、IL-6阻断剂(例如托珠单抗(tocilizumab))、IL-2阻断剂(例如巴利昔单抗(basiliximab)、达利珠单抗(daclizumab))、IL-1 β 阻断剂(例如阿那白滞素、利纳西普、康纳单抗)、IL-17(苏金单抗、柏达鲁单抗(brodalumab)、ixekinumab)、抗IL-12/IL-23(优特克单抗)、PDE4抑制剂(阿普斯特)莫罗单抗(muromonab)、阿巴西普和/或利妥昔单抗,和/或其他化合物诸如羟氯喹、氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢霉素、金盐(gold salt)、mTOR抑制剂(例如雷帕霉素/西罗莫司、依维莫司)和青霉胺。

[0085] 优选地,所述rAAV组合物和/或包含空衣壳的组合物和/或包含免疫抑制剂的组合物还包含如本文其他地方所定义的药学上可接受的载剂、稀释剂、增溶剂、填充剂、防腐剂 and/或赋形剂。

[0086] 优选地,根据本发明的基因疗法还包括施用如本文所定义的免疫抑制剂,其存在于rAAV组合物内或包含在分开的不同组合物内,即与rAAV组合物分开且不同。在施用,将本发明的rAAV组合物和/或空衣壳和/或免疫抑制剂递送给个体、所述个体的细胞、组织或器官,优选患有如本文所定义的症状或疾病的个体。优选地,rAAV组合物和免疫抑制剂同时施用。同时施用在本文应理解为在大致同一时间施用,优选时间间隔不超过15分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、12小时或24小时,优选时间间隔不超过15分钟。在另一个实施方案中,rAAV组合物和免疫抑制剂顺序施用,其中优选地免疫抑制剂在rAAV组合物之前施用。优选地,免疫抑制剂在rAAV组合物施用前至少1小时、3小时、12小时、24小时、2天、4天或1周施用。在rAAV-病毒体和空衣壳存在于分开的组合物的情况下,免疫抑制剂可与空衣壳同时或在所述空衣壳之前至少15分钟、1小时、2小时、3小时、1天、2天或1周内施用,并且空衣壳继而与rAAV-病毒体同时或在所述rAAV-病毒体之前至少15分钟、1小时、2小时、3小时、1天、2天或3天内施用。

[0087] 在本文所定义的实施方案内,免疫抑制剂可重复施用,即在rAAV组合物之前和/或与其同时。如上文所指出,优选地rAAV组合物包含大量空衣壳。此外,本发明涵盖施用处于分开的不同组合物中的rAAV-转基因载体和空衣壳,其在本发明的方法或使用中可同时或顺序施用。如果包含在分开的组合物中,则rAAV-转基因载体和空衣壳优选同时施用。在另一个实施方案中,空衣壳在rAAV-转基因载体施用前至多3天、2天、1天、24小时、12小时、3小时、2小时、1小时、30分钟、15分钟或5分钟施用,优选至多24小时。此外,如果包含在分开的组合物中,则rAAV-转基因载体和空衣壳优选地在同一部位施用。

[0088] 免疫抑制剂剂量取决于免疫抑制剂的类型。有效剂量是技术人员已知的。曲安西龙的优选治疗有效剂量如上文所指出。脂质体氯膦酸盐的优选治疗有效剂量优选地是如技术人员已知的治疗有效剂量,例如优选关节内80-320mg/剂,更优选关节内160mg/剂(Barrera等人2000,Arthritis&Rheumatism第43(9)卷,第1951-1959页)。

[0089] 一般而言,关节病症被称为关节病,并且当涉及一个或多个关节的炎症时,所述病症被称为关节炎。大多数关节病症涉及关节炎,然而,由外部物理创伤造成的关节损伤通常

不称为关节炎。如本文所用,术语“关节炎疾病”,也称为“关节炎”,在本文定义为涉及一个或多个关节的炎症的关节病症形式。当前,估计存在超过一百种不同形式的关节炎。关节炎疾病在本文理解为是指“关节痛”或“关节疾病”。在一个优选实施方案中,关节炎疾病选自由以下组成的组:成人斯蒂尔病(Adult-onset Still's disease)、强直性脊柱炎、关节炎、背痛、贝歇氏病(Behçet's disease)、钝伤、粘液囊炎、焦磷酸钙沉积病(CPPD)、腕管综合征、髌骨软化症、慢性疲劳综合征、复杂区域疼痛综合征、冷吡啉相关周期性综合征(cryopyrin-associated periodic syndromes, CAPS)、椎间盘退变性疾病、发育性髋关节发育不良、Ehlers-Danlos、家族性地中海热、纤维肌痛症、第五病、巨细胞动脉炎、痛风、色素沉着病、感染性关节炎、炎性关节炎、炎性肠病、关节置换、幼年型关节炎、幼年型皮肌炎(JD)、幼年特发性关节炎(JIA)、幼年型类风湿性关节炎、幼年硬皮病、川崎病、狼疮、儿童和青少年狼疮、莱姆病、混合性结缔组织病、肌炎(包括多肌炎、皮肌炎)、骨关节炎(OA)、骨质疏松症、佩吉特病、复发性风湿病、髌股疼痛综合征、儿童风湿性疾病、儿童SLE、风湿性多肌痛症、假性痛风、银屑病性关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、反射交感性营养不良、莱特尔氏综合征、风湿热、风湿病、类风湿性关节炎、硬皮病、化脓性关节炎、干燥综合征(Sjögren's disease)、椎管狭窄、脊柱关节炎、斯蒂尔病、全身性幼年特发性关节炎、全身性红斑狼疮、儿童和青少年全身性红斑狼疮、全身性硬化症、颞动脉炎、肌腱炎、血管炎和韦格纳肉芽肿病。在另一个优选实施方案中,关节炎疾病选自由以下组成的组:类风湿性关节炎(RA)、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎(OA)、痛风、假性痛风、脊柱关节炎(SpA)、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、化脓性关节炎、关节炎、幼年特发性关节炎、钝伤、关节置换和斯蒂尔病。在更优选的实施方案中,关节炎疾病是涉及一个或多个关节的炎症的关节病症。优选地,关节炎疾病选自由以下组成的组:类风湿性关节炎(RA)、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎(OA)、痛风、假性痛风、脊柱关节炎(SpA)、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎、化脓性关节炎、关节炎、幼年特发性关节炎和斯蒂尔病。

[0090] 可选地,或与另一个实施方案相组合,在本发明的一个优选实施方案中,rAAV病毒体或rAAV组合物全身和/或局部施用。本发明的rAAV组合物和/或空衣壳和/或免疫抑制剂可使用本领域已知的合适手段直接或间接施用。本发明的方法和使用包括全身、区域或局部,或通过任何途径例如注射、输注、口服(例如摄入或吸入)或局部(例如经皮)递送和施用rAAV组合物和/或空衣壳和/或免疫抑制剂。示例性施用和递送途径包括静脉内(i.v.)、关节内、腹膜内(i.p.)、动脉内、肌内、肠胃外、皮下、胸膜内、局部、皮、皮内、经皮、肠胃外例如跨粘膜、颅内、脊柱内、口服(消化)、粘膜、呼吸系统、鼻内、插管、肺内、胸腔灌输、颊部、舌下、血管内、鞘内、腔内、电离子透入、眼内、眼部、光学、腺内、器官内、淋巴管内。考虑到迄今已实现的进步,预期向个体或所述个体的细胞、组织、器官提供本发明的rAAV组合物和/或空衣壳和/或免疫抑制剂的手段得到改善。这种未来改善当然可并入以实现本发明所提及的效果。当施用本发明的rAAV组合物和/或空衣壳和/或免疫抑制剂时,优选的是,这种组合和/或组合物溶于与递送方法相容的溶液中。对于静脉内、皮下、肌内、鞘内、关节内和/或心室内施用,优选的是,溶液是生理盐溶液。在免疫抑制剂存在于本发明的rAAV组合物内的情况下,免疫抑制剂在与rAAV组合物相同的部位施用,即优选如上文所指示的位置。在其中免疫抑制剂包含在不同于rAAV组合物的分开的组合物内的实施方案中,免疫抑制剂可全身施

用,优选肌内或静脉内。rAAV组合物还可局部施用,优选在包含大量如本文所定义的巨噬细胞的身体的部位,并且免疫抑制剂全身施用,优选肌内或静脉内。本发明还涵盖其中免疫抑制剂和rAAV组合物即使存在于不同组合物中,也在同一部位施用的实施方案,优选局部,更优选关节内。如本文进一步指出,此类不同组合物的施用可以是同时或顺序施用。在本发明的一个优选实施方案中,rAAV组合物和免疫抑制剂中的至少一种局部施用。更优选地,局部施用是关节内施用。“关节内注射”(也称为“关节注射”或“关节内注射”)在本文定义为注射或输注到关节中。关节内注射通常用于将抗炎剂施用到受炎症影响的关节中。

[0091] 在另一方面,本发明涉及一种rAAV组合物,其包含本发明的rAAV病毒体以及药学上可接受的载剂、稀释剂、增溶剂、填充剂、防腐剂 and/或赋形剂,优选地如本文所定义的药学上可接受的载剂。在一个优选实施方案中,所述组合物还包含如本文所定义的空衣壳和/或如本文所定义的免疫抑制剂。

[0092] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗、预防或抑制与关节炎疾病相关的症状的方法,其中所述方法包括关节内施用包含有效量的如权利要求1-8中任一项所定义的rAAV病毒体或如上文所定义的rAAV组合物的药物的步骤。

[0093] “治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望治疗结果的量。核酸、核酸构建体、rAAV病毒体或药物组合物的治疗有效量可根据多种因素而变化,诸如待治疗的受试者的疾病状态、年龄、性别和体重,以及核酸、核酸构建体、rAAV病毒体或药物组合物在受试者中引发期望响应的能力。可以调整剂量方案以提供最佳治疗响应。治疗有效量还通常是其中核酸、核酸构建体、rAAV病毒体或药物组合物的治疗有益作用远大于任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的预防结果(诸如预防或抑制各种病状)的量。预防剂量可在疾病的早期阶段之前或在该阶段在受试者中使用,并且预防有效量在一些情况下可多于或少于治疗有效量。待施用的剂量在很大程度上可取决于正在治疗的受试者的病状和体型,以及治疗性制剂、治疗频率和施用途径。用于继续疗法的方案,包括剂量、制剂和频率,可由初始响应和临床判断指导。

[0094] 术语“受试者”或“患者”在本文可互换使用并且是指用本发明的组合物和/或rAAV可治疗的动物,包括人类。因此,术语“受试者”或“患者”包括但不限于人、非人灵长类动物诸如黑猩猩,以及其他猿和猴物种,或任何哺乳动物,诸如狗、猫、马、绵羊、猪、牛等。在本发明的一个优选实施方案中,用根据本发明的rAAV治疗的受试者为哺乳动物,更优选人、狗、猫或马,最优选人。

[0095] 在此文档及其权利要求中,动词“包括(to comprise)”及其词形变化以其非限制性意义用于指包括跟在该词语后面的项目,但是不排除未具体提及的项目。此外,通过不定冠词“一个”或“一种”提及要素时,不排除存在多于一个所述要素的可能性,除非上下文明确要求有且仅有一个所述要素。因此,不定冠词“一个”或“一种”通常是指“至少一个/种”。

[0096] 当与数值关联使用时,词语“大约”或“约”(大约10、约10)优选地是指所述值可以是给定值10,加减所述值的10%。

[0097] 本说明书引用的所有专利和文献参考资料据此通过引用全文并入。

[0098] 仅出于说明目的提供以下实施例,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。

附图说明

[0099] 下文将参考附图更详细地讨论本发明:

[0100] 图1:在HEK293T和FLS细胞上筛选衣壳血清型。使用含有表达黄色荧光蛋白(YFP)的7种突变衣壳血清型(外加AAV5)的粗裂解物转导HEK293T细胞或3种不同的FLS细胞系(各自来自不同的RA患者)。72小时(HEK293T)或6天(FLS)后,通过流式细胞术针对表达YFP的细胞的百分比对细胞进行测定。图A示出表达YFP的HEK293T细胞的%;图B示出3种不同的FLS细胞系中表达YFP的细胞的%;图C示出HEK 293T细胞中的平均荧光强度(MFI);图D示出3种不同的FLS细胞系(所有细胞)中的MFI;图E示出3种不同的FLS细胞系(仅阳性群)中的MFI。样品图例描绘于表2中。

[0101] 图2:在FLS细胞中,相对于wt-AAV5,衣壳突变体显示出增加的荧光素酶表达。使用表达YFP-Luc融合蛋白的纯化AAV(4种突变血清型或AAV5)转导来自不同RA患者的三种不同的FLS细胞系:BB5498(FLS 1)、BB5540(FLS 2)和BB7144(FLS 3),使用两种MOI(每个细胞20000或100000个rAAV颗粒)完成。4天后,将细胞裂解并测量荧光素酶表达。数据作为绝对荧光素酶表达水平(RLU;白色条柱),或相对于AAV5的倍数增加(黑色条柱)给出。图A示出MOI20K下的FLS 1;图B示出MOI 100K下的FLS 1;图C示出MOI 20K下的FLS 2;图D示出MOI 100K下的FLS 2;图E示出MOI 20K下的FLS 3;并且图F示出MOI 100K下的FLS 3。空条柱(Openbar)示出荧光素酶(RLU)并且填充条柱示出相对于AAV5的“倍数增加”。在一个不同的实验中,用表达荧光素酶的AAV(7种突变血清型或AAV5)转导来自RA患者的三种另外的FLS细胞系:BB4308(FLS 4)、BX 1592(FLS 5)和BB4426(FLS 6),使用2种MOI(每个细胞10K或100K个rAAV颗粒)完成。图G示出MOI 10K下的FLS 4;图H示出MOI 100K下的FLS 4;图I示出MOI 10K下的FLS 5;图J示出MOI 100K下的FLS 5;图K示出MOI 10K下的FLS 6;并且图L示出MOI 100K下的FLS 3。

[0102] 7种突变血清型或AAV5(MOI 100K)的转导效率也在HEK293T细胞中评估(图M)。空条柱示出荧光素酶表达(RLU)并且填充条柱示出相对于AAV5的“倍数增加”。

[0103] 图3A:衣壳突变体在体内表现出增加的基因表达。使用气囊滑膜模型将两种衣壳突变体(AAV9-A2和AAV7-A6)与wtAAV5相比较。在气囊形成后第0天施用表达荧光素酶的载体,并且在转导后第3天通过活体动物成像(IVIS)测量荧光素酶表达。所示数据是气囊中的荧光(光子/秒/平方厘米m²/球面度),以平均值+SEM计。

[0104] 图3B:在第二实验中,将5种选定衣壳突变体(AAV1-P4、AAV7-A6、AAV9-A2、AAVrh10-A2、AAVrh10-A6)和wtAAV5注射到小鼠的膝关节中。在第0天注射表达荧光素酶的载体并且在施用之后的指示时间点通过活体成像(IVIS)测量表达。所示数据是荧光(光子/秒/平方厘米m²/球面度)(左图),以平均值+SEM计。在第14天,相对于wtAAV5,**P<0.05,***P<0.01,****P<0.00001。图3C:相对于wtAAV5的倍数增加。

[0105] 图4:通过MAFFT FFT-NS-I(v7.215)获得的CLUSTAL格式比对。比对下方是表示保守残基(*)和非保守残基(.)的缩略记号。

[0106] 图5:通过MUSCLE(3.8)获得的CLUSTAL多序列比对。比对下方是表示保守残基(*)、保守突变(:)、半保守突变(.)和非保守突变(.)的缩略记号。

[0107] 图6:通过MAFFT FFT-NS-I(v7.215)获得的插入序列P4、A2、A6、P2和QR-P2(SEQ ID NO:8-12)的CLUSTAL格式比对。比对下方是表示保守残基(*)和非保守残基(.)的缩略记号。

[0108] 图7:通过MUSCLE (3.8) 获得的插入序列P4、A2、A6、P2和QR-P2 (SEQ ID NO:8-12) 的CLUSTAL多序列比对。比对方是表示保守残基(*)和非保守残基()的缩略记号。

[0109] 序列表

[0110] 表1提供与SEQ ID No相关的序列参考的解释说明。

[0111] 表1:序列参考的解释说明

| SEQ ID NO: | 血清型 | 修饰的衣壳/插入序列/野生型 |
|------------|------------|----------------|
| 1 | AAV1 | 修饰的衣壳 |
| 2 | AAV2 | 修饰的衣壳 |
| 3 | AAV7 | 修饰的衣壳 |
| 4 | AAV9 | 修饰的衣壳 |
| 5 | AAVrh10 | 修饰的衣壳 |
| 6 | AAVrh10 | 修饰的衣壳 |
| 7 | AAV DJ-QR | 修饰的衣壳 |
| 8 | 插入序列 A2 | 插入序列 |
| [0112] 9 | 插入序列 A6 | 插入序列 |
| 10 | 插入序列 P2 | 插入序列 |
| 11 | 插入序列 P4 | 插入序列 |
| 12 | 插入序列 QR-P2 | 插入序列 |
| 13 | AAV1 | 野生型衣壳 |
| 14 | AAV2 | 野生型衣壳 |
| 15 | AAV7 | 野生型衣壳 |
| 16 | AAV9 | 野生型衣壳 |
| 17 | AAVrh10 | 野生型衣壳 |
| 18 | AAV DJ-QR | 合成衣壳 |
| 19 | AAV5 | 野生型衣壳 |

[0113] 实施例

[0114] 实施例1

[0115] 衣壳文库的初始筛选

[0116] 1.1. 材料和方法

[0117] 用含有来自91种不同的AAV衣壳血清型的AAV的粗裂解物点样(并随后干燥)的96孔板获自海德堡大学(University of Heidelberg)的Dirk Grimm和Kathleen Börner。各载体编码由CMV启动子驱动YFP转基因。因为FLS是关节中的主要靶细胞,因此针对显示出在从类风湿性关节炎患者的关节中分离的人FLS中的表达增加的血清型对AAV衣壳突变体文库进行筛选(如van de Sande MG等人,(2011) AnnRheumDis 70:423-427中所述)。将RA-FLS直接涂板(2500/孔,37°C/5%CO₂)到点样板(DMEM-GlutaMAX-I (Gibco,ref.31966-021)、10%FBS(热失活的(HI) Bovine Serum Gold,Gibco,refA15-151)、10mM HEPES (Gibco,ref.15630-056)、50μg/ml庆大霉素(Gibco,ref.15710-049)、100U/ml青霉素/100μg/ml链霉素(Sigma-Aldrich,ref.P0781)上并且在6天后通过荧光显微术针对YFP表达将所有孔可视化。

[0118] 1.2. 结果

[0119] 相对于WT-AAV5,衣壳突变体在来自RA患者的FLS中的转导效率。

[0120] 在91种衣壳突变体的筛选中,虽然总体表达水平低,但是发明人鉴定了显示出高于wtAAV5的表达的7种不同血清型:AAV9-A2、AAV7-A6、AAV1-P4、AAVDJ-QR-P2、AAVrh10-A6、AAVrh10-A2和AAV2-P2(氨基酸序列SEQ ID NO:1-7;wtAAV5 SEQ ID NO:19)。

[0121] 所有7种载体的粗裂解物用于在3种不同患者FLS细胞系和HEK293T细胞中进行体外转导测定(实施例2)。

[0122] 表2:图1的样品图例

| 样品 | 衣壳血清型 | 插入序列/修饰序列 | 插入序列 | 在VP1中的位置 | SEQ ID NO: |
|----|-----------|----------------------|-------|----------|------------|
| 5 | 5 | 无 | 无 | - | 19 |
| 61 | AAV1 | GQSGNDVRSANAQAA | P4 | 588-602 | 1 |
| 33 | AAV9 | GQRGNYSRQVDAQAA | A2 | 586-600 | 4 |
| 34 | AAVrh10 | GQRGNYSRQVDAQAA | A2 | 588-602 | 6 |
| 50 | AAV2 | QGQSGCDCRGDCFCA(QAA) | P2 | 585-599 | 2 |
| 88 | AAV-DJ-QR | QGQSGCDCRGDCFCA(QAA) | QR-P2 | 587-601 | 7 |
| 43 | AAV7 | GQRGNYSRQVDAQAA | A6 | 587-601 | 3 |
| 46 | AAVrh10 | GQRGNYSRQVDAQAA | A6 | 588-602 | 5 |

[0124] 实施例2

[0125] 7种选定突变体的粗裂解物的表达

[0126] 2.1.材料和方法

[0127] AAV制备

[0128] 制备粗AAV裂解物的细节可见于Grosse等人(J.Virol,2017,doi:10.1128/JVI.01198-17)。

[0129] 使用选定的7种衣壳突变体(外加作为对照的wtAAV5)中的每一种的粗裂解物的等分试样转导细胞(HEK293T或分离自RA患者的3种不同的FLS细胞系)并且在转导之后3天(HEK293T)-5天(FLS),通过流式细胞术测量YFP表达。详细地讲,将HEK293T以每孔45000个细胞接种在96孔板(GreinerBio-One,ref.655180)中。将RA-FLS以每孔2500个细胞接种在96孔板中。过夜孵育之后,用含有0.001%普朗尼克F68溶液(Sigma P5556)的40 μ l DMEM-glutaMAX-I(Gibco31966-021)替换细胞上清液。10 μ l/孔一式两份添加病毒裂解物。4小时后,向孔中添加在含有FBS(热失活的(HI)Bovine Serum Gold,Gibco,refA15-151),最终浓度1%的DMEM-glutaMAX-I中的多柔比星(最终浓度0.4 μ M)(Sigma D1515)(50 μ l/孔)。第二天,移除FLS的培养基并且添加DMEM-glutaMAX-I(10%FBS(热失活的(HI)Bovine Serum Gold,Gibco,refA15-151)、10mM HEPES(Gibco,ref.15630)、50 μ g/ml庆大霉素(Gibco ref.15710-049)、100U/ml青霉素/100 μ g/ml链霉素(Sigma-Aldrich,ref.P0781))(200 μ l/孔)。HEK293T细胞的培养基不变。转导之后三天(HEK293T细胞)或6天(FLS),使用在PBS(Gibco,ref.10010)中的0.5%胰蛋白酶/EDTA(Gibco ref.15400-054)对细胞进行胰蛋白酶处理,并且通过流式细胞术(FACSCanto II,BD Biosciences)分析YFP表达。确定表达细胞的百分比和所有细胞的平均荧光强度(MFI)。

[0130] 2.2.结果

[0131] 所有7种载体的粗裂解物用于在3种不同的患者FLS细胞系和HEK293T细胞中进行体外转导测定。通过荧光显微术(数据未示出)或流式细胞术(图1,图A-E)针对表达YFP的细胞的百分比对细胞进行测定。虽然在细胞类型之间存在一些可变性,但是所有突变衣壳均在FLS和HEK293T细胞中得到高于AAV5-WT的表达(图1)。表2提供图1的样品图例。基于这些结果,选择四种衣壳突变体进行进一步研究(参见实施例3)。

[0132] 实施例3

[0133] 衣壳突变体在HEK293T和FLS中的体外测试

[0134] 3.1材料和方法

[0135] 3.1.1对突变衣壳蛋白中的四种,即AAV9-A2、AAV7-A6、AAV1-P4和AAVDJ-QR-P2,进行进一步研究。生成表达YFP-荧光素酶融合蛋白(以允许可视化(YFP)以及通过荧光素酶测定进行定量)的纯化载体(碘克沙醇梯度)。以2次载体剂量(MOI 20,000或100,000),用每种血清型转导分离自类风湿性关节炎患者(如van de Sande MG等人,(2011) Ann Rheum Dis 70:423-427中所述)的三种不同的原代FLS系,并且在4天后,收获细胞并通过荧光素酶测定(Promega荧光素酶测定试剂盒)对基因表达进行定量。

[0136] 详细地讲,将RA-FLS以2500个细胞/孔涂板于96孔板(Greiner Bio-One, ref.655207)中的培养基(DMEM-GlutaMAX(Gibco ref.31966-021)、10%FBS(热失活的(HI) Bovine Serum Gold,ref A15-151)、10mM HEPES(Gibco ref.15630-056)、50 μ g/ml庆大霉素(Gibco,ref 15710-049)、100u/ml青霉素/100 μ g/ml链霉素(Sigma-Aldrich Merckref.P0781)中。48h后,移除培养基并且以20,000或100,000的MOI添加病毒(处于含有0.001%普朗尼克-68(Sigma,ref.p5556)的DMEM-Glutamax中)。4h后,添加含有多柔比星(Sigma,ref.D1515,最终浓度0.4 μ M)和FBS(最终浓度1%)的培养基。

[0137] 24h后,将培养基替换为DMEM-GlutaMAX(10%FBS、10mM HEPES、50 μ g/ml庆大霉素、100u/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素)。转导后四天,用1x 100 μ l PBS(Gibco,ref.10010)洗涤细胞并且使用ONE GloTM荧光素酶测定系统(Promega,ref.E6110)确定荧光素酶活性:添加100 μ l裂解缓冲液并且将细胞置于摇床上,在900rpm、RT下持续10'。随后,将20 μ l裂解物转移到白色96孔板中,添加80 μ l底物,持续3'(黑暗),并且在光度计上确定荧光素酶活性(1秒/孔,synergyHT,Biotek)。

[0138] 3.1.2.在类似实验中,用含有荧光素酶基因的AAV5和来自与3.1.1所述不同的AAV制剂的7种衣壳突变体(AAV9-A2、AAV1-P4、AAV7-A6、AAVDJ-QR-P2、AAVrh10-A6、AAVrh10-A2、AAV2-P2)转导分离自类风湿性关节炎患者的三种另外的FLS细胞系(MOI10,000和100,000)。空颗粒的数量在AAV制剂之间有所不同。为了排除可能对转导功效造成的影响,通过添加AAV5空颗粒以均衡每种制剂中空颗粒的百分比来进行空颗粒校正。

[0139] 3.1.3.来自与3.1.2所述的相同制剂的7种衣壳突变体也在HEK293T细胞中测试。详细地讲,将HEK293T以每孔50000个细胞接种在96孔板(GreinerBio-One,ref.655180)中。过夜孵育之后,用含有0.001%普朗尼克F68溶液(Sigma P5556)的DMEM-glutaMAX-I(Gibco 31966-021)替换细胞上清液。以100,000的MOI一式两份添加不同的载体。在此方案中,如针对3.1.2所述进行空衣壳校正。4小时后,向孔中添加在含有FBS(热失活的(HI) Bovine Serum Gold,Gibco,refA15-151),最终浓度1%的DMEM-glutaMAX-I中的多柔比星(最终浓度0.4 μ M)(Sigma D1515)。转导之后三天,收获细胞并且在光度计(BMG Labtech Fluostar

Omega) 上通过荧光素酶测定 (Promega 荧光素酶测定试剂盒) 对基因表达定量。

[0140] 3.2. 结果

[0141] 3.2.1 使用包含4种突变衣壳中的一种的重组AAV (以及作为对照的AAV5, 以相同方式制备), 按照3.1.1中所述的方案进行三种不同的FLS细胞系的体外转导。当与AAV5相比时, 所有4种血清型均显示出增加的表达水平, 增加范围为2倍至35倍, 取决于所用的血清型和细胞系 (图2A-F)。

[0142] 3.2.2 在另一系列的实验中, 在3种FLS细胞系中评估7种突变衣壳 (以及AAV5对照, 以相同方式制备) 的体外转导功效。当与AAV5相比时, 所有7种血清型均显示出增加的荧光素酶表达水平, 增加范围为6倍至55倍, 取决于所用的血清型和细胞系 (图2G-L)。

[0143] 3.2.3 在HEK293T细胞中进行类似实验。用所有7种血清型进行转导导致与wtAAV5相比增强的荧光素酶表达, 增加范围为2倍至12倍 (图2M)。

[0144] 实施例4

[0145] 气囊滑膜模型中的体内研究

[0146] 4.1. 材料和方法

[0147] 动物

[0148] 将雌性Balb/c小鼠 (8-10周龄且重20-25g; (Harlan, Boxmeer, the Netherlands)) 饲养在Academic Medical Center, Amsterdam的动物设施的独立通风笼具中。食物和水可随意获得。所有动物实验均根据阿姆斯特丹大学 (University of Amsterdam) 的动物研究伦理委员会 (Animal Research Ethics Committee) 的指导原则进行。

[0149] 气囊滑膜 (APS) 模型

[0150] 将两种血清型AAV9-A2和AAV7-A6与wtAAV5相比较。气囊滑膜模型改编自Edwards等人 (1981; JPathol 134:147-156)。在第0天, 将3ml空气皮下注射到7-9周龄雌性Balb/c01aHsd小鼠 (Harlan) 的背部皮肤中 (第0天)。形成气囊之后立即移除1ml空气并且向气囊中直接添加1ml的AAV (在含有0.001% 普朗尼克F68 (Sigma, ref. p5556) 的PBS (Gibco, ref. 10010) 中的2e10载体基因组/小鼠。转导之后三天, 通过体内动物成像测量基因表达。

[0151] 荧光素酶表达的成像

[0152] 在第3天测量荧光素酶表达。最初计划在载体施用后持续最多3个月继续监测表达, 然而, 动物设施的细小病毒感染导致所有正在进行实验的提前终止。腹膜内注射D-荧光素钾盐底物 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) (150mg/kg体重, 大约200 μ l体积)。在持续5分钟施用底物后, 10分钟后使用冷却电荷耦合装置 (CCD) 摄像系统 (Photon Imager, Biospace Lab, Paris, France) 获取光子计数并且使用M3 Vision (Biospace Lab) 进行图像处理 and 信号强度定量和分析。计算每秒每平方厘米每球面度的发射光子数作为荧光素酶活性的量度。

[0153] 一般动物情况和道德声明

[0154] 气囊形成、载体施用和体内成像在异氟烷麻醉 (3% 异氟烷和氧) 下进行。实验结束时, 在异氟烷麻醉下通过心脏穿刺然后颈椎脱臼来处死动物。研究由阿姆斯特丹大学动物护理和使用委员会评审和批准, 并严格根据荷兰动物福利法 (Dutch: "Wet op Dierproeven") 的建议进行。动物维持在阿姆斯特丹大学无病原体条件下的动物设施中。

[0155] 4.2. 结果

[0156] 基于这些有希望的结果,使用气囊滑膜 (APS) 模型进行初步体内研究,其中将两种血清型AAV9-A2和AAV7-A6与wtAAV5相比较。由于动物设施的不幸感染迫使本研究提前终止,我们仅能获得来自单个时间点,即载体施用后第3天的数据。在此时间点,清楚的是,当与AAV5相比时,衣壳突变体产生增加的基因表达,其中AAV7-A6显示出表达增加~6倍并且AAV9-A2增加~22倍(图3A)。

[0157] 实施例5:

[0158] 体内研究:在健康动物中的关节内注射

[0159] 5.1.材料和方法

[0160] 动物

[0161] 将雄性DBA1/J小鼠(12周龄,Envigo)饲养在阿姆斯特丹学术医学中心(Academic Medical Center,Amsterdam)的动物设施的独立通风笼具中。食物和水可随意获得。所有动物实验均在荷兰阿姆斯特丹大学的动物实验中央委员会(Central Commission Animal Experiments,CCD)和动物研究伦理委员会的批准之后进行。

[0162] 表达研究

[0163] 将包含衣壳突变体的五种rAAV,即AAV9-A2、AAV1-P4、AAV7-A6、AAVrh10-A6和AAVrh10-A2,与wtAAV5相比较。因为衣壳负载可能影响表达(Aalbers CJ等人,Hum Gene Ther 2017;28(2):168-178),因此通过添加wtAAV5空颗粒针对衣壳负载校正rAAV制剂。健康小鼠(n=9/组)在两膝接受携带荧光素酶基因的AAV载体的关节内注射(7.5×10^9 病毒基因组/膝)。在载体施用后的若干时间点通过体内成像确定基因表达。

[0164] 荧光素酶表达的成像

[0165] 在指示的时间点确定荧光素酶表达(图3B)。在每个时间点,腹膜内注射D-荧光素钾盐底物(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA,USA)(150mg/kg体重,大约200 μ l体积)。在持续5分钟底物施用后,15分钟后使用冷却电荷耦合装置(CCD)摄像系统(Photon Imager,Biospace Lab,Paris,France)获取光子计数。使用M3 Vision(Biospace Lab)进行图像处理和信号强度定量和分析。计算每秒每平方厘米每球面度的发射光子数作为荧光素酶活性的量度。

[0166] 一般动物情况和道德声明

[0167] 载体施用和体内成像在异氟烷麻醉(4%异氟烷和氧)下进行。研究严格根据荷兰动物福利法(Dutch:“Wet op Dierproeven”)的建议进行。动物维持在阿姆斯特丹大学无病原体条件下的动物设施中。

[0168] 5.2.结果

[0169] 在第一时间点,即第3天,在所有组中检测膝中AAV介导的表达,并且其随时间的推移而增加(图3B)。除AAV1-P4之外的所有衣壳突变体相对于wtAAV5显示出增加的表达,其中AAV9-A2显示出最高表达(在第14天,相对于wtAAV5,增加~5倍)(图3C)。第14天的表达水平从高到低:AAV9-A2>AAVrh10-A2>AAVrh10-A6>AAV7-A6>wtAAV5>AAV1-P4。在第7天,相对于wtAAV5,AAVrh10-A2、AAV9-A2和AAVrh10-A6显示出显著增加的表达(在第14天,相对于wtAAV5,**P<0.05,***P<0.01,****P<0.00001)。(图3B)。

[0170] 实施例6:

[0171] 在人血清中确定针对衣壳突变体的中和抗体滴度

[0172] 6.1材料和方法

[0173] 将HEK293T细胞涂板于96孔透明底部板中的含有9%FBS、0.9%青霉素/链霉素的DMEM中。在转导之前,将细胞静置24小时(在37°C、5%CO₂下)。如下稀释人血清样品(获自法国血液研究所(French bloodinstitute)):纯净的未稀释血清-1:4-1:16-1:64-1:256-1:1,024(纯净血清是指1体积的血清中有1体积的病毒)。如下在FBS中对汇集的小鼠血浆样品(来自10只DBA/1小鼠,在关节内注射AAV5-载体之后42天获取)进行连续稀释:1:10-1:50-1:250-1:6,250-1:31,250。将人静脉内免疫球蛋白的溶液(IVig, Sanquin, 批号15D30H4560A)从1:10下至1:10,000进行连续半对数稀释。将样品和对照与适当的衣壳突变体或wtAAV5载体一起以2,500的MOI(如先前所确定)在35-38°C下孵育30' ±5分钟。48±2小时后,添加荧光素酶试剂并且使用VictorX微板读数器测量荧光发射。转导抑制滴度确定为与可检测的中和活性,即中和活性>50%仍然相关的血清的最高稀释度。

[0174] 6.2结果

[0175] 如表3所示,70%-85%的样品不含针对wtAAV5或7种衣壳突变体的中和抗体。大多数样品共享对七种衣壳突变体的反应性,因此对野生型AAV5衣壳具有反应性的血清样品也与其他衣壳反应。就响应水平而言,它们在衣壳突变体之间也是相当的。对于每种衣壳突变体,指明不反应的样品的数量(ND=未检测)。这些数据仅作为信息给出,因为非常难以比较使用不同载体时的滴度。关于来自关节内注射的关节的汇集小鼠血清样品,其仅与用于对动物免疫的WT AAV5衣壳反应,而未观察到对突变衣壳的响应(表3)。通过IVIg(滴度>100)中和所有衣壳突变体和WT AAV5(数据未示出)。

[0176]

表3: 对于各血清样品以及汇集的小鼠血浆, 报告了抑制滴度并且其与仍然与可检测中和活性相关的最高稀释度相对应。滴度> 8被视为血清反应阳性。阳性信号以粗体/斜体突出显示。ND = 不可检测

| | AAV5 | AAV9A2 | AAV-DJ-QR-P2 | AAVrh10-A2 | AAV1-P4 | AAV2-P2 | AAV7-A6 | AAVrh10-A6 |
|------|------------|------------|--------------|------------|---------------|------------|---------------|---------------|
| 样品1 | 256 | 256 | 256 | 256 | > 1024 | 256 | > 1024 | > 1024 |
| 样品2 | 4 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品3 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品4 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品5 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品6 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品7 | 64 | 64 | 64 | 256 | 256 | 64 | 256 | 256 |
| 样品8 | 16 | 16 | 16 | 64 | 16 | 64 | 64 | 64 |
| 样品9 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品10 | 4 | 4 | 16 | 4 | 64 | 64 | 64 | 64 |
| 样品11 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品12 | ND | ND | ND | ND | ND | 1 | ND | ND |
| 样品13 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品14 | ND | 1 | ND | ND | 4 | 1 | ND | 1 |
| 样品15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品16 | 1 | 1 | 4 | 4 | 4 | 16 | 1 | 1 |

[0177]

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----|-----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|
| 样品17 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品18 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品19 | ND | ND | ND | 4 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 样品20 | 4 | 256 | 64 | 4 | ND | 256 | ND | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| %阴性 样品 | 85 | 80 | 75 | 85 | 80 | 70 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 |
| 小鼠 血浆 | 256 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

[0178] 上文已经参考如附图所示的多个示例性实施方案描述了本发明。一些部分或要素的修改和替代实施方式是可能的,并且包括在如随附权利要求中限定的保护范围中。

序列表

<110> 阿罗根有限公司(Arthrogen B.V.)
海德堡大学(Universität Heidelberg)

<120> 用于基因疗法的修饰的 rAAV 衣壳蛋白

<130> P6057598PCT

<150> EP 18152133.7

<151> 2018-01-17

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 745

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 具有插入序列 P4 的 AAV1

<400> 1

[0001]

```

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 Asp 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 Lys 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 Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130          135          140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145          150          155          160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165          170          175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180          185          190
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195          200          205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
210          215          220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225          230          235          240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245          250          255

```

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
 260 265 270
 Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
 275 280 285
 His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
 290 295 300
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
 325 330 335
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Gly Gln Ser Gly Asn
 580 585 590
 Asp Val Arg Ser Ala Asn Ala Gln Ala Ala Gly Asp Val His Ala Met
 595 600 605
 Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln
 610 615 620
 Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro
 625 630 635 640
 Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile
 645 650 655

[0002]

Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser
 660 665 670
 Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val
 675 680 685
 Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp
 690 695 700
 Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val
 705 710 715 720
 Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile
 725 730 735
 Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
 740 745
 <210> 2
 <211> 746
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 具有插入序列 P2 的 AAV2
 <400> 2
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys 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 Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

[0003]

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 Ser Glu Thr Ala Gly Ser Thr Asn Asp Asn
 260 265 270
 Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Arg Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ser Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Ser
 405 410 415
 Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala
 [0006] 435 440 445
 Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln
 450 455 460
 Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala Glu Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp
 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 Asn Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile
 530 535 540
 Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu
 545 550 555 560
 Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu
 565 570 575
 Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Gly Gln Arg Gly Asn Glu
 580 585 590
 Ala Arg Val Arg Glu Ala Gln Ala Ala Gln Thr Gln Val Val Asn Asn
 595 600 605
 Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu
 610 615 620
 Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His
 625 630 635 640

Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln
 645 650 655
 Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Pro Glu Val Phe
 660 665 670
 Thr Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln
 675 680 685
 Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg
 690 695 700
 Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Phe Glu Lys Gln Thr Gly
 705 710 715 720
 Val Asp Phe Ala Val Asp Ser Gln Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro
 725 730 735
 Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 740 745
 <210> 4
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 具有插入序列 A2 的 AAV9
 <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 Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly 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 Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

[0007]

| | | | | | | |
|---|--|-----|--|-----|--|-----|
| 225 | | 230 | | 235 | | 240 |
| Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu | | | | | | |
| | | 245 | | 250 | | 255 |
| Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn | | | | | | |
| | | 260 | | 265 | | 270 |
| Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg | | | | | | |
| | | 275 | | 280 | | 285 |
| Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn | | | | | | |
| | | 290 | | 295 | | 300 |
| Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile | | | | | | |
| 305 | | 310 | | 315 | | 320 |
| Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn | | | | | | |
| | | 325 | | 330 | | 335 |
| Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu | | | | | | |
| | | 340 | | 345 | | 350 |
| Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro | | | | | | |
| | | 355 | | 360 | | 365 |
| Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp | | | | | | |
| | | 370 | | 375 | | 380 |
| Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe | | | | | | |
| 385 | | 390 | | 395 | | 400 |
| Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu | | | | | | |
| | | 405 | | 410 | | 415 |
| Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu | | | | | | |
| | | 420 | | 425 | | 430 |
| Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser | | | | | | |
| | | 435 | | 440 | | 445 |
| Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser | | | | | | |
| | | 450 | | 455 | | 460 |
| Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro | | | | | | |
| 465 | | 470 | | 475 | | 480 |
| Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn | | | | | | |
| | | 485 | | 490 | | 495 |
| Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn | | | | | | |
| | | 500 | | 505 | | 510 |
| Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys | | | | | | |
| | | 515 | | 520 | | 525 |
| Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly | | | | | | |
| | | 530 | | 535 | | 540 |
| Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile | | | | | | |
| 545 | | 550 | | 555 | | 560 |
| Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser | | | | | | |
| | | 565 | | 570 | | 575 |
| Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Gly Gln Arg Gly Asn Tyr Ser | | | | | | |
| | | 580 | | 585 | | 590 |
| Arg Gly Val Asp Ala Gln Ala Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln | | | | | | |
| | | 595 | | 600 | | 605 |
| Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln | | | | | | |
| | | 610 | | 615 | | 620 |
| Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro | | | | | | |

[0008]

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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 [0010] Gln 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 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
 545 550 555 560
 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 Gly Gln Arg Gly Asn
 580 585 590
 Glu Ala Arg Val Arg Glu Ala Gln Ala Ala Ile Val Gly Ala Val Asn
 595 600 605
 Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr
 610 615 620

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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 [0012] Gln 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 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
 545 550 555 560
 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 Gly Gln Arg Gly Asn
 580 585 590
 Tyr Ser Arg Gly Val Asp Ala Gln Ala Ala Ile Val Gly Ala Val Asn
 595 600 605
 Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr

```

        610                615                620
Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe
625                630                635                640
His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro
        645                650                655
Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr
        660                665                670
Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly
        675                680                685
Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys
        690                695                700
Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr
705                710                715                720
Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg
        725                730                735
Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
        740                745
<210> 7
<211> 748
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 具有具有插入序列 QR-P2 的 AAVDJ
<400> 7
[0013] Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
1                5                10                15
Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20                25                30
Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                70                75                80
Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85                90                95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100               105               110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115               120               125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130               135               140
Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
145               150               155               160
Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165               170               175
Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180               185               190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ala Gly Gly Gly
195               200               205

```

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr
 405 410 415
 Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445
 Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Thr Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe
 450 455 460
 Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu
 465 470 475 480
 Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp
 485 490 495
 Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu
 500 505 510
 Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His
 515 520 525
 Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe
 530 535 540
 Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met
 545 550 555 560
 Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu
 565 570 575
 Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Gln Gly Gln Arg Gly Cys
 580 585 590
 Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Ala Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val
 595 600 605

[0014]

Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
 610 615 620
 Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His
 625 630 635 640
 Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro
 645 650 655
 Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
 660 665 670
 Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
 675 680 685
 Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
 690 695 700
 Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
 705 710 715 720
 Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
 725 730 735
 Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 740 745

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 插入序列 A2

<400> 8

[0015]

Gly Gln Arg Gly Asn Tyr Ser Arg Gly Val Asp Ala Gln Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 插入序列 A6

<400> 9

Gly Gln Arg Gly Asn Glu Ala Arg Val Arg Glu Ala Gln Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 插入序列 P2

<400> 10

Gln Gly Gln Ser Gly Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Ala Gln
 1 5 10 15

Ala Ala

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 插入序列 P4
 <400> 11
 Gly Gln Ser Gly Asn Asp Val Arg Ser Ala Asn Ala Gln Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 插入序列 QR-P2
 <400> 12
 Gln Gly Gln Arg Gly Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Ala Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala
 <210> 13
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒 1 (adeno-associated virus 1)
 <400> 13
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 [0016] 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 Asp 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 Lys 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 Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
 210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
 260 265 270
 Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
 275 280 285
 His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
 290 295 300
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
 325 330 335
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 [0017] Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640
 Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700
 Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
 705 710 715 720
 Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
 725 730 735
 <210> 14
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒 2 (adeno-associated virus 2)
 <400> 14
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys 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 Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

[0018]

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 245 250 255
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 260 265 270
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 275 280 285
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 290 295 300
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 305 310 315 320
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 325 330 335
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 340 345 350
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 355 360 365
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 370 375 380
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 385 390 395 400
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 405 410 415
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
 420 425 430
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 435 440 445
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 450 455 460
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 465 470 475 480
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 485 490 495
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 500 505 510
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 515 520 525
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 530 535 540
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 545 550 555 560
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 565 570 575
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 580 585 590
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 595 600 605
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 610 615 620
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 625 630 635 640

[0019]

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| | Pro | Ser | Thr | Thr | Phe | Ser | Ala | Ala | Lys | Phe | Ala | Ser | Phe | Ile | Thr | Gln |
| | | | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | |
| | Tyr | Ser | Thr | Gly | Gln | Val | Ser | Val | Glu | Ile | Glu | Trp | Glu | Leu | Gln | Lys |
| | | | | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | |
| | Glu | Asn | Ser | Lys | Arg | Trp | Asn | Pro | Glu | Ile | Gln | Tyr | Thr | Ser | Asn | Tyr |
| | | | | | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | |
| | Asn | Lys | Ser | Val | Asn | Val | Asp | Phe | Thr | Val | Asp | Thr | Asn | Gly | Val | Tyr |
| | | | | | 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | 720 |
| | Ser | Glu | Pro | Arg | Pro | Ile | Gly | Thr | Arg | Tyr | Leu | Thr | Arg | Asn | Leu | |
| | | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | |
| | <210> | 15 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 737 | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | 腺相关病毒 7 (adeno-associated virus 7) | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 15 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 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 | |
| [0020] | Val | Asn | Ala | Ala | Asp | Ala | Ala | Ala | Leu | Glu | His | Asp | Lys | Ala | Tyr | Asp |
| | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| | Gln | Gln | Leu | Lys | 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 | Glu | Gly | Ala | Lys | Thr | Ala | Pro | Ala | 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 | Arg | Lys | Arg | Leu | Asn | Phe | Gly | Gln |
| | | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | 175 | |
| | Thr | Gly | Asp | Ser | Glu | Ser | Val | Pro | Asp | Pro | Gln | Pro | Leu | Gly | Glu | Pro |
| | | | | | 180 | | | | | | 185 | | | | 190 | |
| | Pro | Ala | Ala | Pro | Ser | Ser | Val | Gly | Ser | Gly | Thr | Val | Ala | Ala | Gly | Gly |
| | | | | | 195 | | | | | | 200 | | | | 205 | |
| | Gly | Ala | Pro | Met | Ala | Asp | Asn | Asn | Glu | Gly | Ala | Asp | Gly | Val | Gly | Asn |
| | | | | | 210 | | | | | | 215 | | | | 220 | |
| | Ala | 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 | Ser | Glu | Thr | Ala | Gly | Ser | Thr | Asn | Asp | Asn |
| | | | | | 260 | | | | | | 265 | | | | 270 | |

Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Arg Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ser Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Ser
 405 410 415
 Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala
 435 440 445
 Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln
 450 455 460
 Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala Glu Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp
 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 Asn Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile
 530 535 540
 Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu
 545 550 555 560
 Met Thr Asn Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu
 565 570 575
 Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala Ala Asn Thr Ala Ala
 580 585 590
 Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp
 595 600 605
 Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
 610 615 620
 His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro
 645 650 655
 Ala Asn Pro Pro Glu Val Phe Thr Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile
 660 665 670

[0021]

Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu
 675 680 685
 Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser
 690 695 700
 Asn Phe Glu Lys Gln Thr Gly Val Asp Phe Ala Val Asp Ser Gln Gly
 705 710 715 720
 Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn
 725 730 735

Leu

<210> 16

<211> 736

<212> PRT

<213> 腺相关病毒 9 (adeno-associated virus 9)

<400> 16

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 Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly 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 Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

[0022]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 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 | 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 | | | | | 400 | |
| | Phe | Pro | Ser | Gln | Met | Leu | Arg | Thr | Gly | Asn | Asn | Phe | Glu | Phe | Ser | Tyr | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | | 415 | |
| | Gln | 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 | |
| [0025] | 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 | | | | | 560 | |
| | 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 | Ser | 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 Asp
 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> 18
 <211> 737
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> AAV DJ-QR
 <400> 18

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ala Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

[0026]

290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr
 405 410 415
 Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445
 Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Thr Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe
 450 455 460
 Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu
 465 470 475 480
 Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp
 485 490 495
 [0027] Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu
 500 505 510
 Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His
 515 520 525
 Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe
 530 535 540
 Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met
 545 550 555 560
 Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu
 565 570 575
 Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala
 580 585 590
 Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp
 595 600 605
 Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
 610 615 620
 His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro
 645 650 655
 Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe Ile
 660 665 670
 Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu
 675 680 685
 Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
 305 310 315 320
 Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 325 330 335
 Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
 340 345 350
 Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
 370 375 380
 Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
 385 390 395 400
 Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 405 410 415
 Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 420 425 430
 Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 435 440 445
 Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 450 455 460
 Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 485 490 495
 Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 [0029] 500 505 510
 Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 515 520 525
 Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 530 535 540
 Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 545 550 555 560
 Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
 565 570 575
 Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
 580 585 590
 Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
 595 600 605
 Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
 610 615 620
 Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
 625 630 635 640
 Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
 645 650 655
 Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
 660 665 670
 Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
 675 680 685
 Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
 690 695 700

- <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 表示单个氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 表示单个氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa 表示单个氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa 表示单个氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa 表示单个氨基酸残基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa 表示 0、1 或 2 个氨基酸残基
 <400> 23
 [0031] Xaa Gly Gln Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 序列 Z 的替代式
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 为 Q 或不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 为 S 或 R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 为 N 或 C
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 为 D、Y 或 E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 为 C、V、S 或 A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa 为 G、S 或 V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa 为不存在、A、V 或 R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa 为 D、N 或 E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa 为 C 或 A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa 为 F 或 Q
 <220>
 [0032] <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa 为不存在、C 或 A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa 为不存在或 A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa 为不存在或 Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa 为不存在或 A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa 为不存在或 A
 <400> 24
 Xaa Gly Gln Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa
 <210> 25

- <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 序列 Z 的替代式
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa 为 Q 或不存在
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 为 S 或 R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 为 N 或 C
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 为 D、Y 或 E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 为 C、V、S 或 A
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa 为 G、S 或 V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa 为不存在或 D
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa 为不存在或 C
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa 为 A、V、R 或 F
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa 为 N、D、E 或 C
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa 为不存在或 Q
 <220>

[0033]

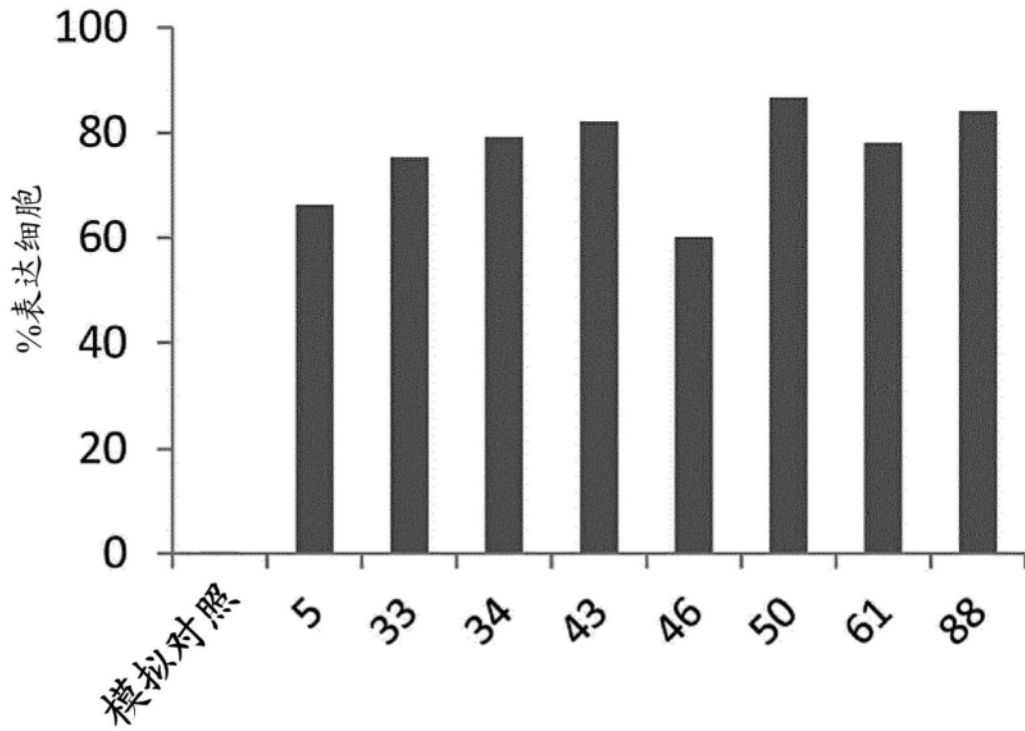


图1A

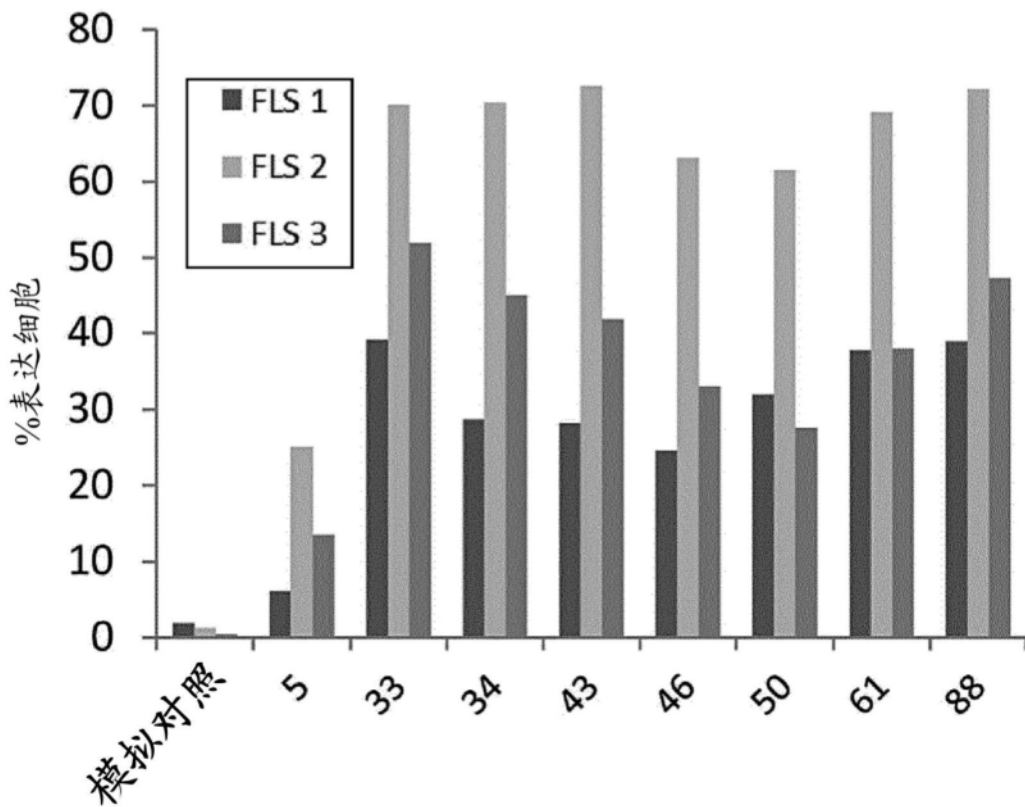


图1B

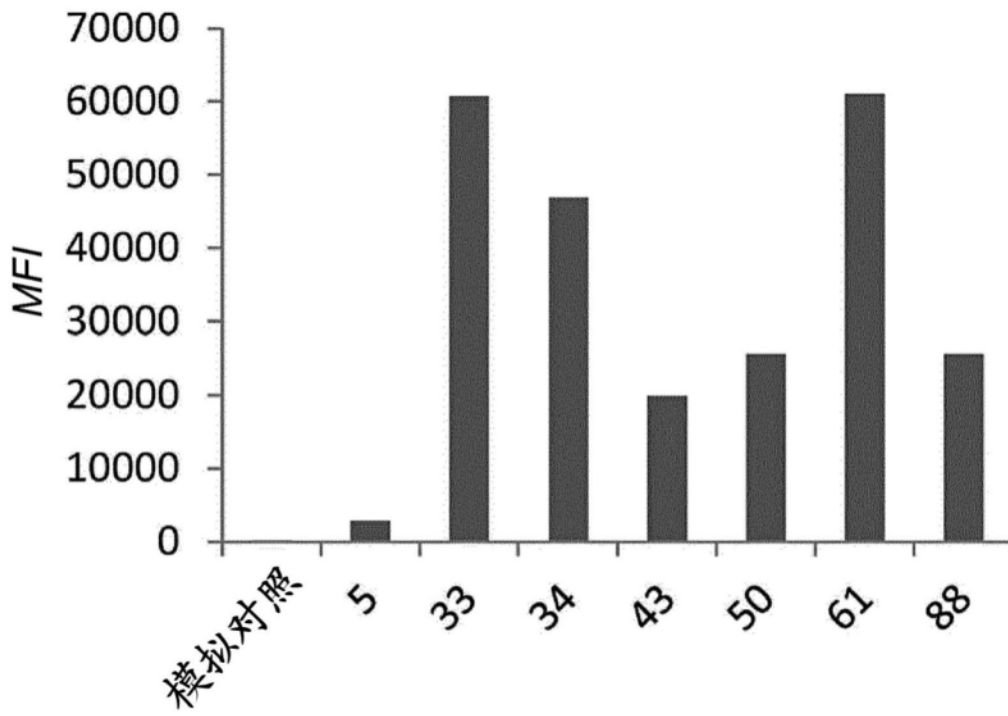


图1C

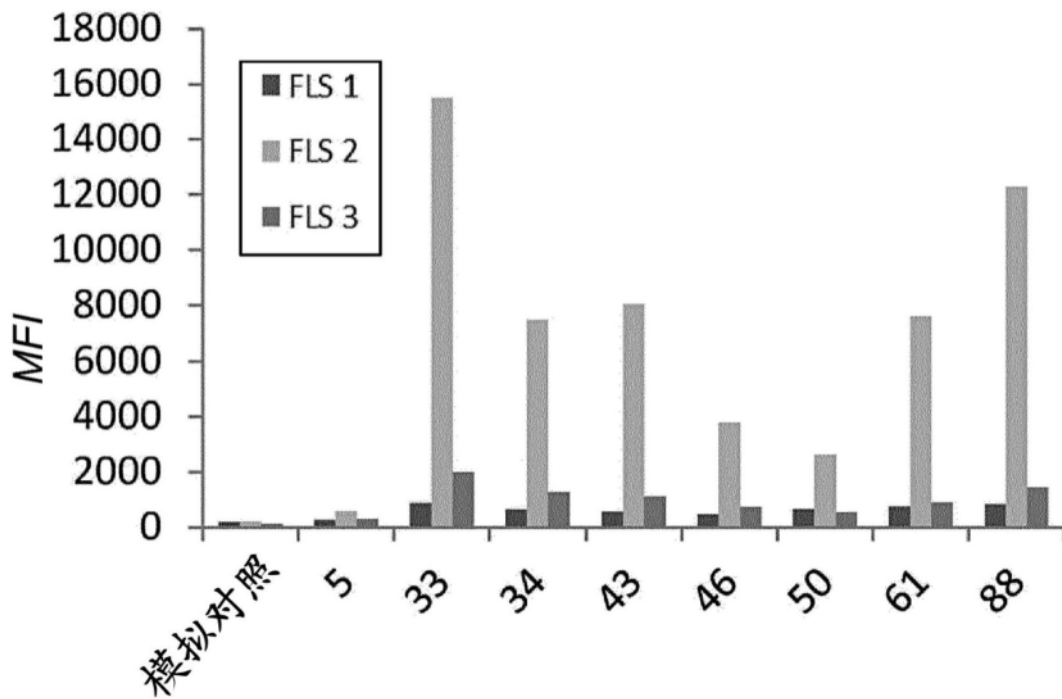


图1D

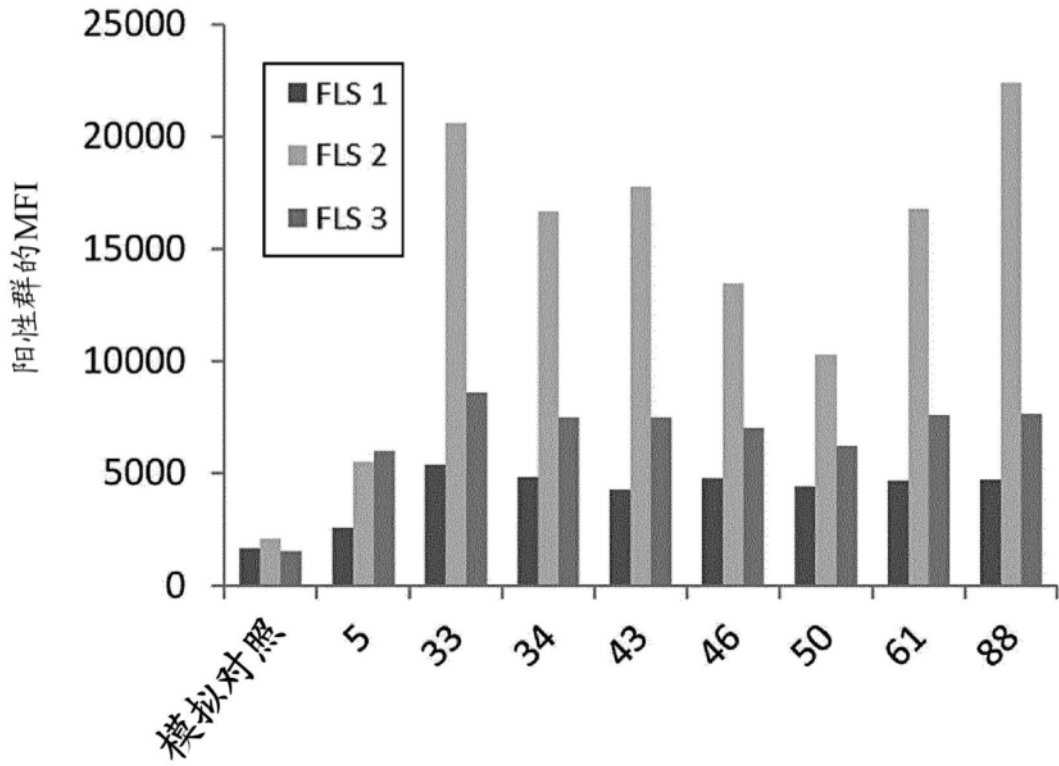


图1E

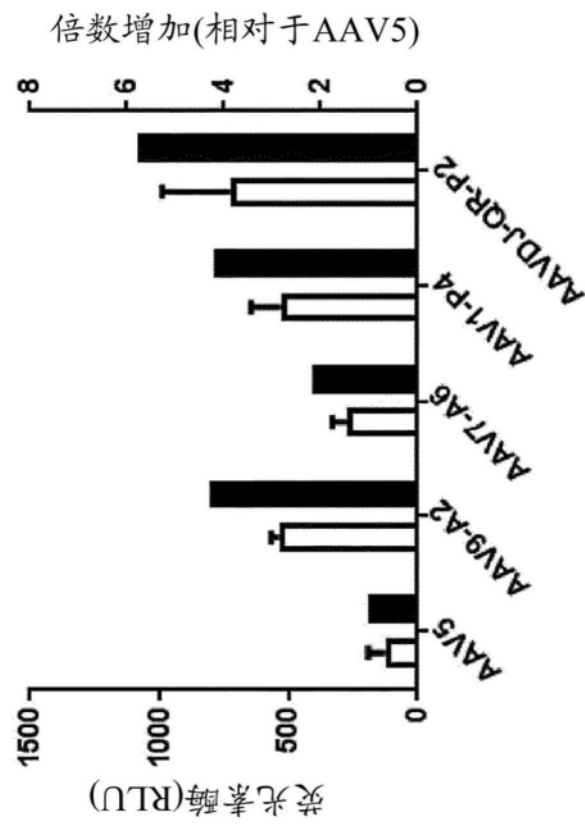


图2A

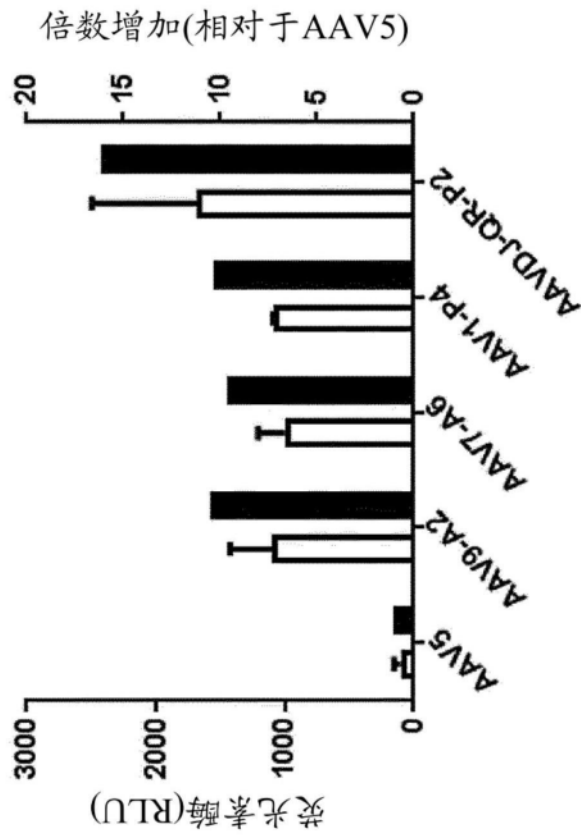


图2B

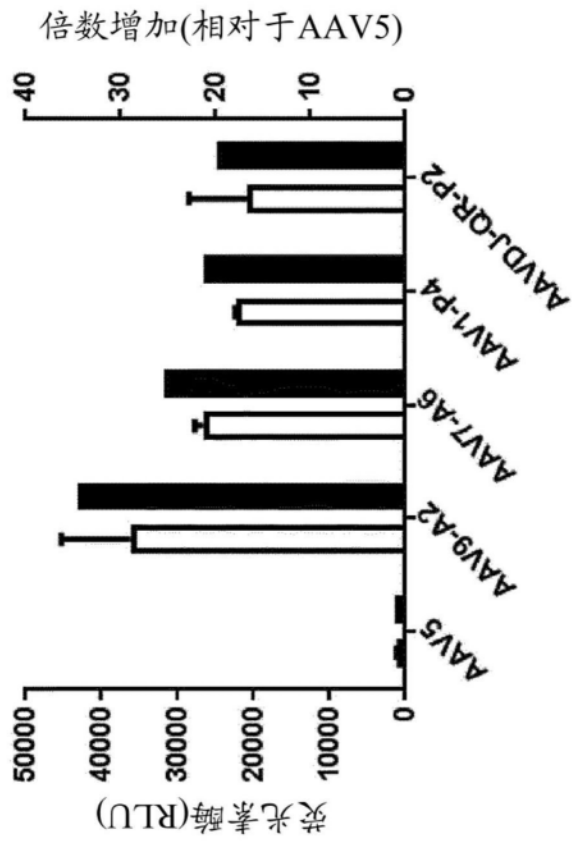


图2C

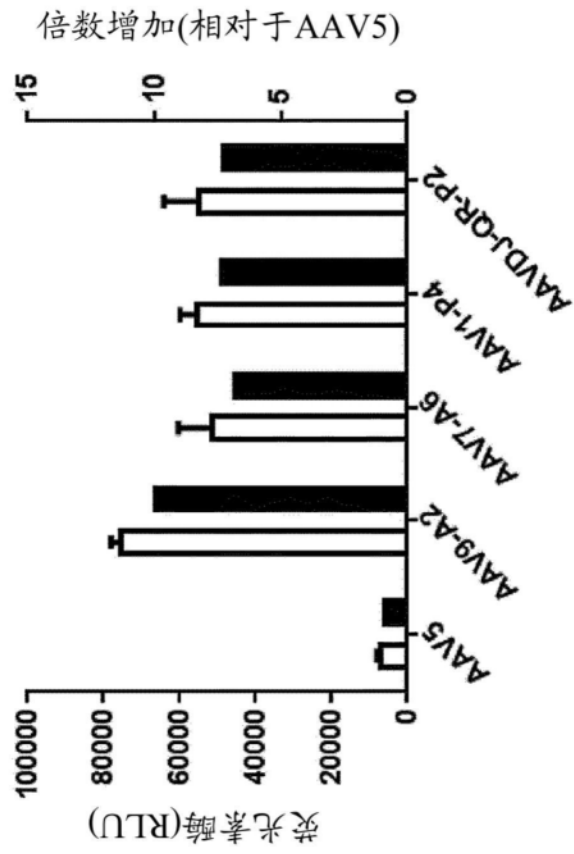


图2D

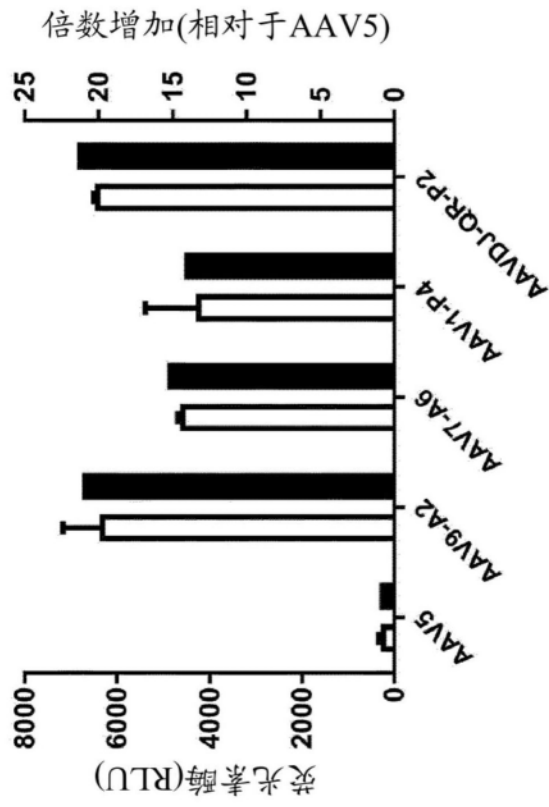


图2E

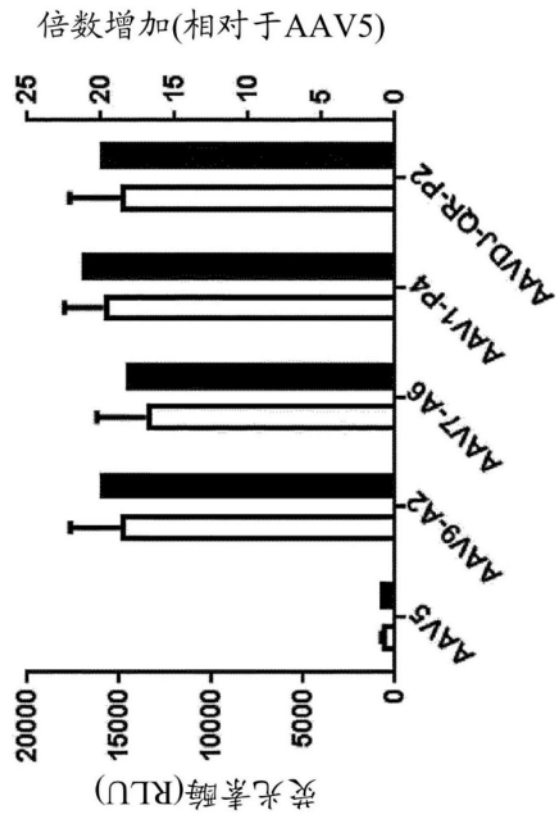


图2F

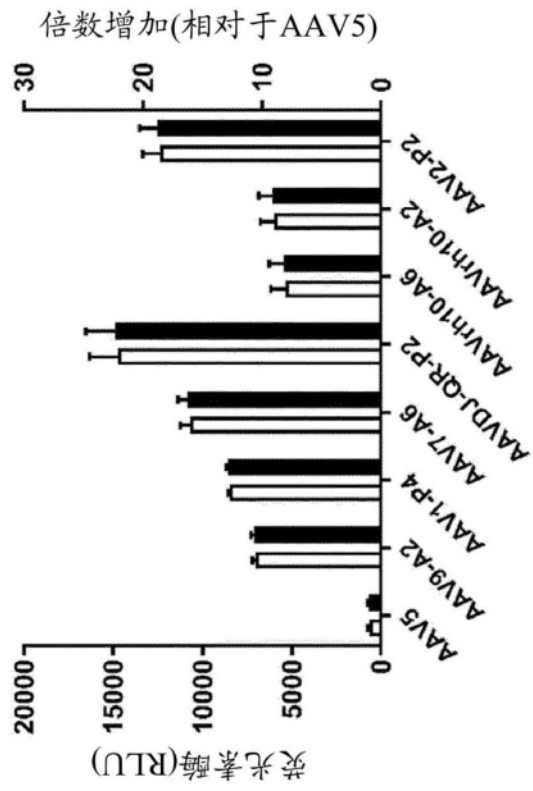


图2G

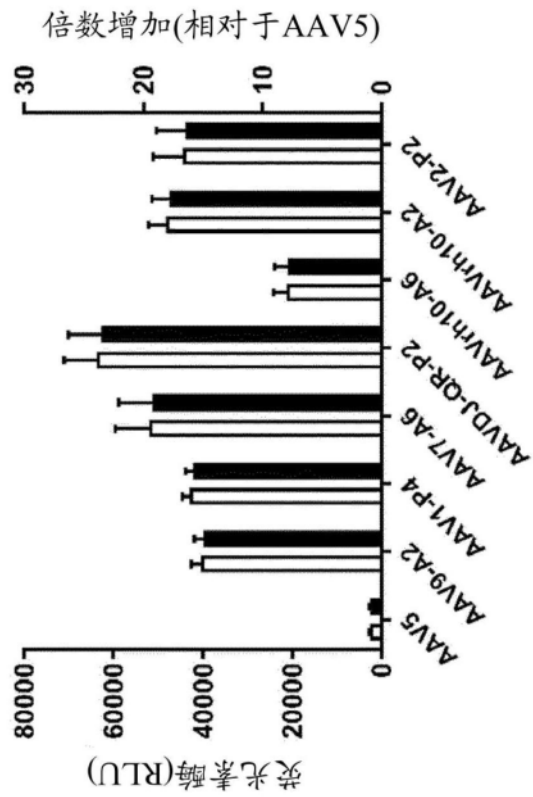


图2H

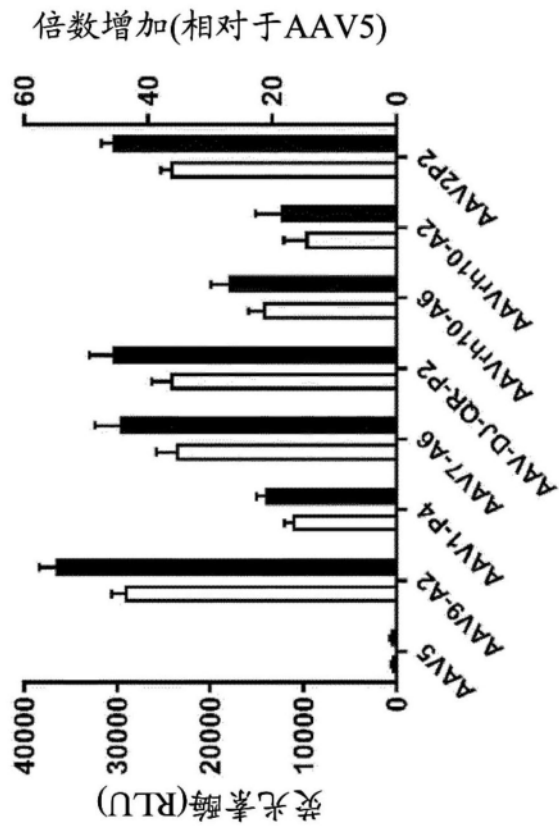


图2I

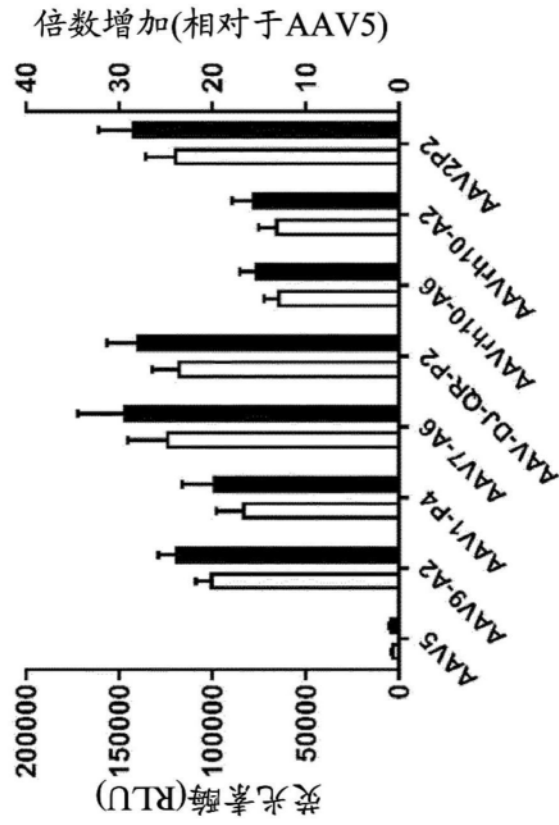


图2J

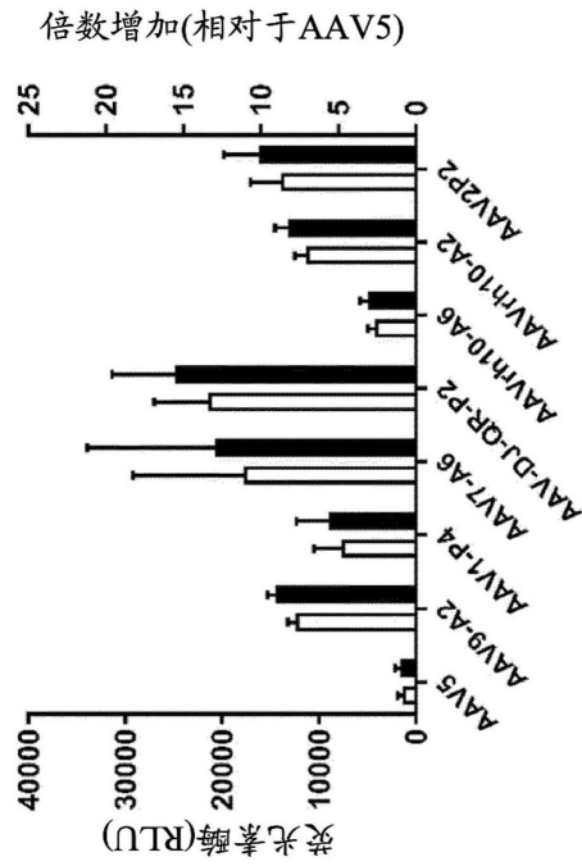


图2K

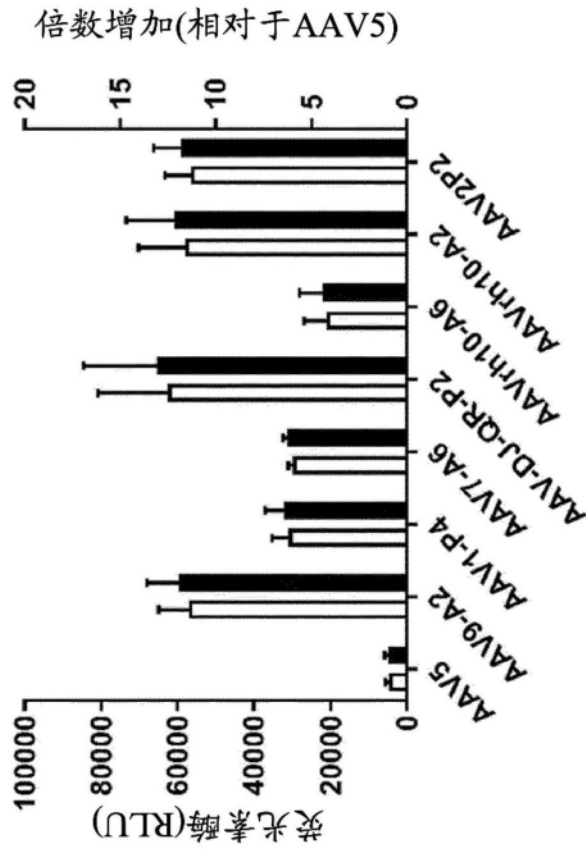


图2L

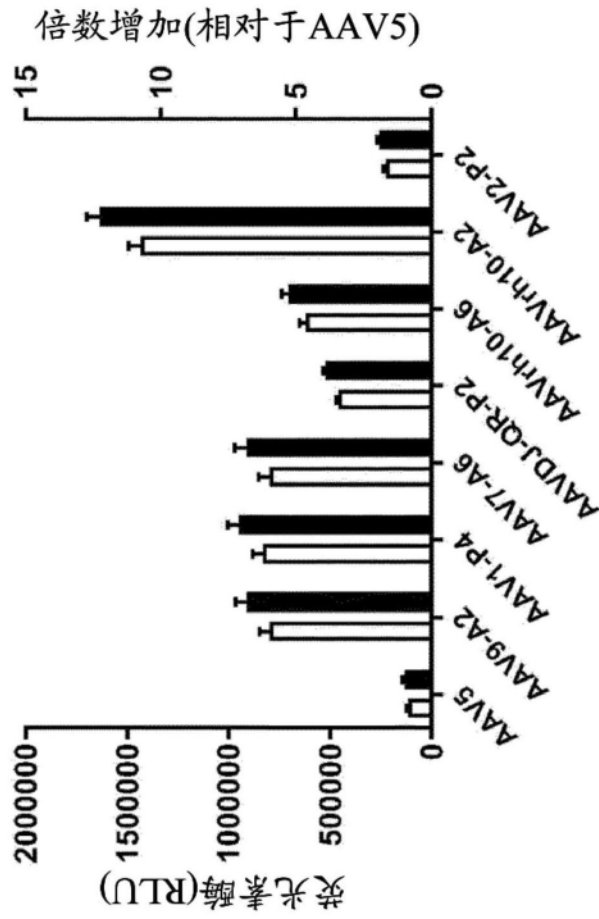


图2M

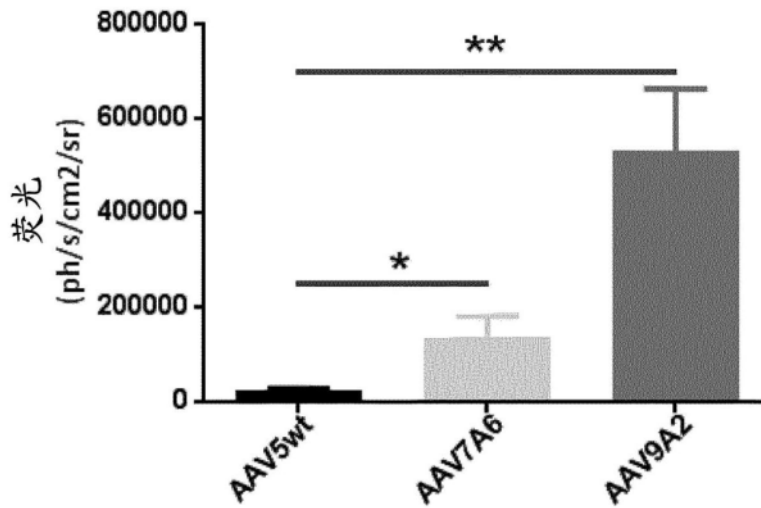


图3A

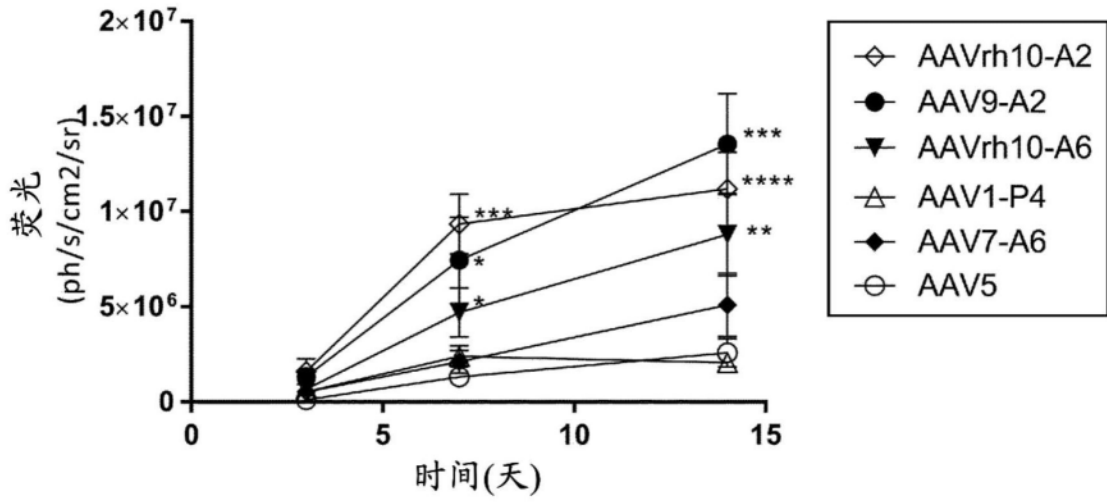


图3B

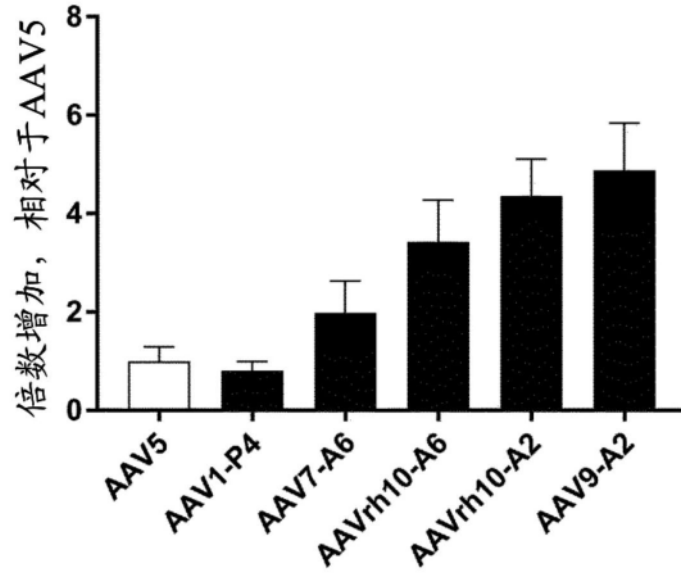


图3C

通过MAFFT FFT-NS-i (v7.215)获得的CLUSTAL格式比对

```

AAV1P4          -gqsgndvrs--anaqaa
AAV9A2          -gqrgnysrg--vdaqaa
AAVrh10A2      -gqrgnysrg--vdaqaa
AAV7A6          -gqrgnearv--reaq--
AAV7A6+        -gqrgnearv--reaqaa
AAV10A6        -gqrgnearv--reaqaa
AAV2P2          qqsgcdcrgcdcfca---
AAV-DJ-QR-P2   qqrgcdcrgcdcfca---
AAV2P2+        qqsgcdcrgcdcfcaqaa
AAV-DJ-QR-P2+  qqrgcdcrgcdcfcaqaa
                ** * * *

```

图4

通过MUSCLE (3.8)获得的多序列比对

```

AAV2P2          QGQSGCDCRG-DCFCA---
AAV2P2+        QGQSGCDCRG-DCFCAQAA
AAV-DJ-QR-P2   QGQSGCDCRG-DCFCA---
AAV-DJ-QR-P2+  QGQSGCDCRG-DCFCAQAA
AAV1P4          -GQSGNDVRSANAQAA---
AAV9A2          -GQRGNYSRGVDAQAA---
AAVrh10A2      -GQRGNYSRGVDAQAA---
AAV7A6          -GQRGNEARVREAQ-----
AAV7A6+        -GQRGNEARVREAQAA---
AAV10A6        -GQRGNEARVREAQAA---
                ** * * :.

```

图5

通过MAFFT FFT-NS-i (v7.215)获得的CLUSTAL格式比对

```

插入序列P4      -gqsgndvrs--anaqaa
插入序列A2      -gqrgnysrg--vdaqaa
插入序列A6      -gqrgnearv--reaqaa
插入序列P2      qqsggcdcrqdcfcaqaa
插入序列QR - P2 qqrggcdcrqdcfcaqaa
                  ** *      *      ****

```

图6

通过MUSCLE (3.8)获得的多序列比对

```

插入序列P2      QQQSGCDCRGDCFCAQAA
插入序列QR - P2 QQQSGCDCRGDCFCAQAA
插入序列P4      -GQSGNDVRS--NAQAA
插入序列A2      -GQRGNYSRGV--DAQAA
插入序列A6      -GQRGNEARVR--EAQAA
                  ** *      *      ****

```

图7