



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103561774 B

(45)授权公告日 2016.12.14

(21)申请号 201280024852.3

C12N 15/63(2006.01)

(22)申请日 2012.04.20

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103561774 A

CN 1834255 A, 2006.09.20,

US 20070020624 A1, 2007.01.25,

US 20090202490 A1, 2009.08.13,

(43)申请公布日 2014.02.05

Jae-Hyung Jang等. An Evolved Adeno-associated Viral Variant Enhances Gene

Delivery and Gene Targeting in Neural

Stem Cells.《Molecular Therapy》.2011,第19

卷(第4期),673页左栏第2段,669页左栏第2段、

图2,667页摘要、670页图4-5.

(30)优先权数据

61/478,355 2011.04.22 US

Ryan R. Klimczak等. A Novel Adeno-Associated Viral Variant for Efficient

and Selective Intravitreal Transduction

of Rat Muller Cells.《PLOS ONE》.2009,第4卷

(第10期),第1页摘要,第5页左栏第1段,图2-3和

6.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/034413 2012.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/145601 EN 2012.10.26

(73)专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚

Candace Bichsel等. Bacterial Delivery of Nuclear Proteins into Pluripotent and

Differentiated Cells.《PLOS ONE》.2011,第6

卷(第1期),1-9.

(72)发明人 D·V·谢弗 R·R·克利姆扎克

J·T·柯伯 J·G·弗兰纳里

D·达尔卡拉 穆罗 M·菲泽尔

L·C·T·伯恩

审查员 王宽

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书28页

序列表77页 附图22页

(54)发明名称

具有变异衣壳的腺相关病毒病毒体及其使用
方法

(57)摘要

本公开提供了衣壳蛋白改变的腺相关病毒
(AAV)病毒体,其中所述AAV病毒体在经玻璃体内
注射施用,与野生型AAV相比,表现出更强的视
网膜细胞感染性。本公开进一步提供了将基因产
物递送至个体的视网膜细胞的方法和治疗眼病
的方法。

1. 一种重组腺相关病毒(rAAV)病毒体,包含:

a) 变异AAV2衣壳蛋白,其中相对于相应亲本AAV2衣壳蛋白,所述变异AAV2衣壳蛋白具有肽插入,其中插入位点位于AAV2的VP1的氨基酸587和588之间,其中所述肽插入是选自下述的肽:LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60);并且其中与包含所述相应亲本AAV2衣壳蛋白的AAV病毒体对视网膜细胞的感染性相比,所述变异AAV2衣壳蛋白赋予增强的视网膜细胞感染性;和

b) 包含编码基因产物的核苷酸序列的异源核酸。

2. 根据权利要求1所述的rAAV病毒体,其中所述肽插入的氨基酸序列为LGETTRP(SEQ ID NO:13)。

3. 根据权利要求1所述的rAAV病毒体,其中所述基因产物为干扰RNA或适配体。

4. 根据权利要求1所述的rAAV病毒体,其中所述基因产物为多肽。

5. 根据权利要求4所述的rAAV病毒体,其中所述多肽为神经保护多肽、抗血管生成多肽或增强视网膜细胞功能的多肽。

6. 一种药物组合物,包含:

a) 权利要求1-5中任一项的重组腺相关病毒病毒体;和

b) 药学上可接受的赋形剂。

7. 权利要求1-5中任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)病毒体在制备用于将基因产物递送至个体的视网膜细胞的药物中的用途。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述基因产物为多肽。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述基因产物为短干扰RNA或适配体。

10. 根据权利要求8所述的用途,其中所述多肽为神经保护因子、抗血管生成多肽、抗凋亡因子或增强视网膜细胞功能的多肽。

11. 根据权利要求8所述的用途,其中所述多肽为胶质源性神经营养因子、成纤维细胞生长因子2、神经营养因子、睫状神经营养因子、神经生长因子、脑源性神经营养因子、表皮生长因子、视紫红质、X连锁凋亡抑制蛋白、视网膜劈裂蛋白、RPE65、色素性视网膜炎GTP酶相互作用蛋白-1、外周蛋白、外周蛋白-2或音猬因子。

12. 权利要求1-5中任一项所述的重组腺相关病毒(rAAV)病毒体在制备用于治疗个体中视网膜疾病的药物中的用途。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述药物用于通过眼内注射施用。

14. 根据权利要求12所述的用途,其中所述药物用于通过玻璃体内注射施用。

15. 根据权利要求12所述的用途,其中所述视网膜疾病为青光眼、色素性视网膜炎、黄斑变性、视网膜劈裂症、利伯氏先天性黑内障、糖尿病性视网膜病或色盲。

16. 根据权利要求12所述的用途,其中所述视网膜疾病为全色盲。

17. 一种编码变异腺相关病毒2(AAV2)衣壳蛋白的分离核酸,其中相对于相应亲本AAV2衣壳蛋白,所述变异AAV2衣壳蛋白具有肽插入,其中插入位点位于AAV2的VP1的氨基酸587和588之间,其中所述肽插入是选自下述的肽:LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、

RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60);并且其中当存在于AAV病毒体中时,所述变异AAV2衣壳蛋白提供AAV病毒体对视网膜细胞增强的感染性。

18.一种分离的遗传修饰的宿主细胞,其中包含根据权利要求17所述的核酸。

19.一种变异腺相关病毒2(AAV2)衣壳蛋白,其中相对于相应亲本AAV2衣壳蛋白,所述变异AAV2衣壳蛋白具有肽插入,其中插入位点位于AAV2的VP1的氨基酸587和588之间,其中所述插入是选自下组的肽:LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)。

具有变异衣壳的腺相关病毒病毒体及其使用方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2011年4月22日提交的美国临时专利申请No.61/478,355的权益,所述申请通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明通过由国立卫生研究院的国立眼科研究所授予的批准号EY016994-02和EY1018241在政府支持下进行。政府具有本发明的某些权利。

[0005] 背景

[0006] 光感受器是视网膜中接收和处理视觉信息,通过光转导将可见电磁辐射转换为超极化反应的第一个神经元。绝大多数遗传视网膜疾病直接导致这些细胞丢失,例如影响视紫红质蛋白折叠的显性突变,或间接导致这些细胞丢失,例如视网膜色素上皮细胞(RPE)中影响视网膜再循环途径的隐性突变。

[0007] AAV属于细小病毒科(Parvoviridae)和依赖病毒属(Dependovirus),其成员需要与辅助病毒例如腺病毒一起协同感染以启动复制,并且AAV在没有辅助病毒时建立了潜伏性感染。病毒体由涵盖具有两个开放阅读框:rep和cap的4.9kb单链DNA基因组的25nm二十面体外壳构成。非结构rep基因编码病毒复制所必需的4种调节蛋白,而cap编码装配成60-mer衣壳外壳的3种结构蛋白(VP1-3)。这种病毒衣壳介导AAV载体克服病毒转导的许多生物屏障的能力—包括细胞表面受体结合、胞吞作用、胞内运输和细胞核中的解包装。

[0008] 文献

[0009] 美国专利公布No.2005/0053922;美国专利公布No.2009/0202490;Allocca等(2007)J.Virol.81:11372;Boucas等(2009)J.Gene Med.11:1103。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开提供了衣壳蛋白改变的腺相关病毒(AAV)病毒体,其中所述AAV病毒体在经玻璃体内注射施用,与野生型AAV相比,表现出更强的视网膜细胞感染性。本公开进一步提供了将基因产物递送至个体的视网膜细胞的方法和治疗眼病的方法。

[0012] 附图简述

[0013] 图1提供了在氨基酸587之后含有无规七聚物的AAV2的代表性三维模型。

[0014] 图2描绘了相对于AAV2(左),AAV27M8变异体(右)的更高水平的玻璃体内转导。

[0015] 图3提供了视网膜低温切片的代表性荧光图像,显示出由携带GFP基因的7M8,在普遍存在的CAG启动子(左)或光感受器特异性Rho启动子(右)的控制下产生的绿色荧光蛋白(GFP)表达。

[0016] 图4描绘了在经7M8或载有4个酪氨酸突变(7m8.4YF)的7M8转导后,通过流式细胞术计数的每一百万个视网膜细胞的GFP⁺光感受器细胞。

[0017] 图5提供了AAV2VP1的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0018] 图6提供了与不同AAV血清型的AAV衣壳蛋白VP1的AAV2(图5)的氨基酸570-610相对应的氨基酸序列。

[0019] 图7A-I描绘了基因转移后,Rs1h^{-/-}小鼠视网膜中的结构改进。

- [0020] 图8A-D描绘了RS1基因递送后,视网膜电流图A和B波的功能性救援。
- [0021] 图9A-E描绘了7m8-rho-RS1治疗后10个月时测量的视网膜厚度持续增加。
- [0022] 图10提供了视网膜劈裂蛋白(retinoschisin)的氨基酸序列。
- [0023] 图11提供了脑源性神经营养因子的氨基酸序列。
- [0024] 图12提供了RPE65的氨基酸序列。
- [0025] 图13A-C提供了7m8-rho-RS1构建体的核苷酸序列。
- [0026] 图14提供了外周蛋白-2的氨基酸序列。
- [0027] 图15提供了外周蛋白的氨基酸序列。
- [0028] 图16提供了色素性视网膜炎GTP酶调节因子相互作用蛋白-1的氨基酸序列。
- [0029] 图17A-C提供了AAV衣壳蛋白环IV(GH环)区域的氨基酸序列的比对。插入位点用粗体和下划线示出。
- [0030] 图18A-C提供了具有异源肽插入的AAV衣壳蛋白GH环区域的氨基酸序列的比对。
- [0031] 图19提供了荧光眼底图像,显示在施用携带受连接蛋白36启动子控制的GFP的7m8后9周,灵长类动物中央视网膜中的GFP表达。
- [0032] 定义
- [0033] 术语“视网膜细胞”在本文中可指任何细胞类型,包括视网膜,例如视网膜神经节细胞、无长突细胞、水平细胞、双极细胞和光感受器细胞(包括杆状和锥状细胞)、穆勒胶质细胞和视网膜色素上皮细胞。
- [0034] “AAV”是腺相关病毒的缩写,并且可用于指病毒本身或其衍生物。除非另有需要时,所述术语包括亚型及自然存在和重组形式。缩写“rAAV”指重组腺相关病毒,也称为重组AAV载体(或“rAAV载体”)。术语“AAV”包括1型AAV(AAV-1)、2型AAV(AAV-2)、3型AAV(AAV-3)、4型AAV(AAV-4)、5型AAV(AAV-5)、6型AAV(AAV-6)、7型AAV(AAV-7)、8型AAV(AAV-8)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV和羊AAV。“灵长类AAV”指感染灵长类动物的AAV,“非灵长类AAV”指感染非灵长类哺乳动物的AAV,“牛AAV”指感染牛哺乳动物的AAV等。
- [0035] 不同亚型AAV的基因组序列,以及天然末端重复序列(TR)、Rep蛋白和衣壳亚基的序列在本领域中已知。此类序列可在文献或公用数据库例如基因库中找到。见,例如,基因库登记号NC_002077(AAV-1)、AF063497(AAV-1)、NC_001401(AAV-2)、AF043303(AAV-2)、NC_001729(AAV-3)、NC_001829(AAV-4)、U89790(AAV-4)、NC_006152(AAV-5)、AF513851(AAV-7)、AF513852(AAV-8)和NC_006261(AAV-8);其公开内容通过引用并入本文,以讲授AAV核酸和氨基酸序列。同样见,例如,Srivistava等(1983)J.Virology45:555;Chiorini等(1998)J.Virology71:6823;Chiorini等(1999)J.Virology73:1309;Bantel-Schaal等(1999)J.Virology73:939;Xiao等(1999)J.Virology73:3994;Muramatsu等(1996)Virology221:208;Shade等,(1986)J.Virol.58:921;Gao等(2002)Proc.Nat.Acad.Sci.USA99:11854;Moris等(2004)Virology33:375-383;国际专利公布W000/28061、W099/61601、W098/11244;和美国专利No.6,156,303。
- [0036] 如本文所使用,“rAAV载体”指包含非AAV起源的多核苷酸序列(即,与AAV异源的多核苷酸),通常是细胞遗传转化的目标序列的AAV载体。一般而言,异源多核苷酸两侧有至少一个,而通常有两个AAV反向末端重复序列(ITR)。术语rAAV载体涵盖rAAV载体颗粒和rAAV载体质粒。rAAV载体可为单链(ssAAV)或自身互补(scAAV)。

[0037] “AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“rAAV载体颗粒”指由至少一种AAV衣壳蛋白(通常为野生型AAV的所有衣壳蛋白)和壳体化多核苷酸rAAV载体构成的病毒颗粒。如果所述颗粒包含异源多核苷酸(即除野生型AAV基因组外的多核苷酸,例如递送至哺乳动物细胞的转基因),通常将其称为“rAAV载体颗粒”或简称为“rAAV载体”。因此,rAAV颗粒的生成必定包括rAAV载体的生成,因为在rAAV颗粒中含有这种载体。

[0038] “包装”指导致AAV颗粒装配和壳体化的一系列胞内事件。

[0039] AAV“rep”和“cap”基因指编码腺相关病毒的复制和壳体化蛋白的多核苷酸序列。本文将AAV rep和cap称为AAV“包装基因”。

[0040] AAV的“辅助病毒”指允许哺乳动物细胞复制并包装AAV(例如野生型AAV)的病毒。在本领域中已知AAV的多种此类辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒(例如牛痘)。虽然C亚类的5型腺病毒最常用,但是腺病毒涵盖许多不同亚类。已知人、非人类哺乳动物和禽类来源的许多腺病毒并且可从贮藏所例如ATCC获得。疱疹家族的病毒包括(例如)单纯疱疹病毒(HSV)和埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr viruses)(EBV)以及巨细胞病毒(CMV)和假狂犬病病毒(PRV);也可从贮藏所例如ATCC获得。

[0041] “辅助病毒功能”指辅助病毒基因组中编码的允许AAV复制和包装(连同对本文所述复制和包装的其它要求)的功能。如本文所述,可以多种方式提供“辅助病毒功能”,包括通过提供辅助病毒或为生产细胞提供(例如)编码必需功能的反式多核苷酸序列。例如,将包含编码一种或多种腺病毒蛋白的核苷酸序列的质粒或其它表达载体连同rAAV载体一起转染至生产细胞中。

[0042] “传染性”病毒或病毒颗粒是包含适当装配的病毒衣壳并且能够将多核苷酸组分递送至对其而言病毒物种是向性的细胞中的病毒或病毒颗粒。所述术语不一定暗指病毒的任何复制能力。在本公开和本领域的其它地方描述了为传染性病毒颗粒计数的测定法。可用传染性病毒颗粒与总病毒颗粒之比表示病毒感染性。在本领域中已知测定传染性病毒颗粒与总病毒颗粒之比的方法。见,例如,Grainger等(2005)Mol. Ther. 11: S337(描述了TCID50传染性滴度测定);和Zolotukhin等(1999)Gene Ther. 6: 973。同样见实施例。

[0043] “有复制能力的”病毒(例如有复制能力的AAV)指有传染性,并且也能够在受感染细胞中(即,在辅助病毒或辅助病毒功能的存在下)复制的野生表现型病毒。在AAV的情况下,复制能力通常需要功能AAV包装基因的存在。一般而言,在哺乳动物细胞中(尤其在人类细胞中),由于缺乏一个或多个AAV包装基因,如本文所述的rAAV载体无复制能力。通常,为了将通过AAV包装基因和引入rAAV载体之间重组产生有复制能力的AAV的可能性降到最低,此类rAAV载体缺乏任何AAV包装基因。在许多实施方案中,如本文所述的rAAV载体制剂是含有很少(如果有)有复制能力的AAV(rcAAV,也称为RCA)的rAAV载体制剂(例如,每 10^2 个rAAV颗粒小于约1个rcAAV,每 10^4 个rAAV颗粒小于约1个rcAAV,每 10^8 个rAAV颗粒小于约1个rcAAV,每 10^{12} 个rAAV颗粒小于约1个rcAAV或没有rcAAV)。

[0044] 术语“多核苷酸”指任何长度的核苷酸聚合形式,包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物,并且可被非核苷酸组分中断。若存在,可在聚合物装配之前或之后给予对核苷酸结构的修饰。如本文所使用,术语多核苷酸可交替地指双链和单链分子。除非另有说明或要求,本文所述为多核苷酸的本发明任何实施方案涵盖双链形式和已知或预测构成双链形式的两种互补

单链形式的每一种。

[0045] 核酸杂交反应可在不同“严格性”的条件下进行。增强杂交反应的严格性的条件众所周知并且在本领域中公开。见,例如,通过引用并入本文的Sambrook等Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989。例如, 见Sambrook等的第7.52页。相关条件的实例包括(按增强严格性的顺序): 25℃、37℃、50℃和68℃的孵育温度; 10×SSC、6×SSC、1×SSC、0.1×SSC的缓冲液浓度(其中1×SSC为0.15M NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液)及其使用其它缓冲系统的等效物; 0%、25%、50%和75%的甲酰胺浓度; 从5min至24h的孵育时间; 1个、2个或更多个洗涤步骤; 1、2或15min的洗涤孵育时间; 和6×SSC、1×SSC、0.1×SSC的洗液, 或去离子水。严格杂交条件的实例为在50℃或更高温度和0.1×SSC(15mM氯化钠/1.5mM柠檬酸钠)下杂交。严格杂交条件的另一实例是在42℃下于溶液: 50%甲酰胺、1×SSC(150mM NaCl、15mM柠檬酸钠)、50mM磷酸钠(pH7.6)、5×登哈特溶液(Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖和20μg/ml变性、剪切鲑鱼精DNA中过夜孵育, 接着在约65℃下于0.1XSSC中洗涤过滤器。再如, 严格杂交条件包括: 在65℃下于包含6X单一强度柠檬酸盐(SSC)(1XSSC为0.15M NaCl、0.015M柠檬酸钠; pH7.0)、5×登哈特溶液、0.05%焦磷酸钠和100μg/ml鲑鱼精DNA的溶液中预杂交8h至过夜; 在65℃下于含有6XSSC、1X登哈特溶液、100μg/ml酵母tRNA和0.05%焦磷酸钠的溶液中杂交18-20h; 并且在65℃下于含有0.2XSSC和0.1%SDS(十二烷基硫酸钠)的溶液中洗涤过滤器1h。

[0046] 严格杂交条件是至少与以上代表性条件一样严格的杂交条件。其它严格杂交条件在本领域中已知并且也可用于鉴定本发明这个特定实施方案的核酸。

[0047] “ T_m ”是按摄氏度计, 在实验条件下, 由在反向平行方向通过沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对氢键结合的互补链构成的50%多核苷酸双链体解离成单链的温度。可根据标准公式预测 T_m , 例如:

[0048] $T_m = 81.5 + 16.6 \log[X^+] + 0.41(\%G/C) - 0.61(\%F) - 600/L$ 。

[0049] 其中 $[X^+]$ 是以mol/L计的阳离子浓度(通常为钠离子, Na^+); (%G/C)是按双链体中总残基的百分比计, G和C残基的数量; (%F)是溶液中的甲酰胺百分比(wt/vol); 并且L是双链体每条链中核苷酸的数量。

[0050] 多核苷酸或多肽与另一多核苷酸或多肽具有一定百分比的“序列同一性”, 意味着, 比对时, 碱基或氨基酸的百分比在比较两个序列时相同。可以许多不同方式测定序列相似性。为测定序列同一性, 可使用所述方法和计算机程序, 包括万维网上在ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/可用的BLAST比对序列。另一比对算法为FASTA, 在来自Oxford Molecular Group, Inc.的全资子公司Madison, Wisconsin, USA的遗传学计算机组(GCG)包中可用。在Enzymology, 第266卷: 美国加利福尼亚圣地亚哥Harcourt Brace&Co.的分公司Academic Press, Inc., Doolittle编辑, Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis(1996)中的Methods中描述了其它比对技术。特别感兴趣的是在序列中允许有空位的比对程序。Smith-Waterman是在序列比对中允许有空位的一类算法。见Meth.Mol.Biol.70:173-187(1997)。同样, 可利用使用Needleman和Wunsch比对方法的GAP程序比对序列。见J.Mol.Biol.48:443-453(1970)。

[0051] 感兴趣的是使用Smith和Waterman的局部同源性算法(Advances in Applied

Mathematics2:482-489(1981)测定序列同一性的BestFit程序。空位生成罚分范围通常将从1到5,一般从2到4并且在许多实施方案中将为3。空位拓展罚分范围通常将从约0.01到0.20并且在许多情况下将为0.10。程序具有由输入以待比较的序列确定的缺省参数。优选地,使用由程序确定的缺省参数测定序列同一性。该程序也可从来自Madison,Wisconsin,USA的遗传学计算机组(GCG)包中获得。

[0052] 另一个感兴趣的程序是FastDB算法。在Sequence Comparison and Analysis、Macromolecule Sequencing and Synthesis、Selected Methods and Applications中的Current Methods中,第127-149页,1988,Alan R.Liss,Inc.描述了FastDB。基于下列参数通过FastDB计算序列同一性百分比:

[0053] 错配罚分:1.00;

[0054] 空位罚分:1.00;

[0055] 空位大小罚分:0.33;和

[0056] 连接罚分:30.0。

[0057] “基因”指含有至少一个能够在转录和翻译后编码特定蛋白的开放阅读框的多核苷酸。

[0058] “基因产物”是由特定基因表达产生的分子。基因产物包括(例如)多肽、适配体、干扰RNA、mRNA等。

[0059] “小干扰”或“短干扰RNA”或siRNA是靶向基因目标(“靶基因”)的核苷酸的RNA双链体。“RNA双链体”指通过RNA分子的两个区域之间互补配对形成的结构。siRNA“靶向”基因,因为siRNA的双链体部分的核苷酸序列与靶基因的核苷酸序列互补。在一些实施方案中,siRNA双链体的长度小于30个核苷酸。在一些实施方案中,双链体的长度可为29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或10个核苷酸。在一些实施方案中,双链体的长度为19-25个核苷酸。siRNA的RNA双链体部分可为发夹结构的一部分。除双链体部分外,发夹结构可含有位于形成双链体的两个序列之间的环部分。所述环的长度可改变。在一些实施方案中,所述环的长度为5、6、7、8、9、10、11、12或13个核苷酸。发夹结构也可含有3'或5'突出部分。在一些实施方案中,所述突出的长度为3'或5'突出0、1、2、3、4或5个核苷酸。

[0060] “短发夹RNA”或shRNA是可使其表达干扰RNA例如siRNA的多核苷酸构建体。

[0061] 如应用于多核苷酸,“重组”意指多核苷酸是克隆、限制或连接步骤的不同组合和产生不同于在自然界中发现的多核苷酸的构建体的其它程序的产物。重组病毒是包含重组多核苷酸的病毒颗粒。所述术语分别包括原多核苷酸构建体和原病毒构建体子代的复制品。

[0062] “控制元件”或“控制序列”是牵涉于分子相互作用,有助于多核苷酸的功能调控,包括多核苷酸的复制、重复、转录、剪接、翻译或降解的核苷酸序列。调控可影响所述过程的频率、速度或特异性,并且实际上可为增强性或抑制性。本领域已知的控制元件包括(例如)转录调控序列例如启动子和增强子。启动子是在某些条件下能够结合RNA聚合酶并且引发通常位于启动子下游(3'方向)的编码区域转录的DNA区域。

[0063] “操作性连接”或“可操作地连接”指遗传元件的并列,其中所述元件呈允许其以预期方式操作的关系。例如,如果启动子帮助引发编码序列的转录,则启动子与编码区操作性

连接。只要维持这种功能关系,在启动子和编码区域之间可能有插入残基。

[0064] “表达载体”是包含编码目标多肽的区域的载体,并且用于在预定靶细胞中实现蛋白质的表达。表达载体还包含与编码区域操作性连接以促进蛋白质在靶标中的表达的控制元件。控制元件和与之可操作地连接以便表达的基因的组合有时称为“表达盒”,许多表达盒在本领域中已知并且可用或可易于由在本领域中可用的组分构建体。

[0065] “异源”指源自和与之比较的其余实体基因型不同的实体。例如,通过基因工程技术引入源自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸为异源多核苷酸。取自其天然编码序列并且与并非发现与之天然连接的编码序列操作性连接的启动子为异源启动子。因此,例如,包括编码异源基因产物的异源核酸的rAAV是包括在自然存在的野生型AAV中一般不包括的核酸的rAAV,并且编码的异源基因产物是一般并非自然存在的野生型AAV编码的基因产物。

[0066] 术语“遗传改变”和“遗传修饰”(及其语法变型)在本文中可交换用于指其中除通过有丝分裂或减数分裂外,将遗传元件(例如,多核苷酸)引入细胞的过程。所述元件可与细胞异源,或可为细胞中已经存在的元件的另一拷贝或改良形式。例如,可通过本领域已知的任何过程,例如电穿孔、磷酸钙沉淀用重组质粒或其它多核苷酸转染细胞,或使细胞与多核苷酸-脂质体复合物接触,而实现遗传改变。例如,也可通过用DNA或RNA病毒或病毒载体转导或感染实现遗传改变。一般地,将遗传元件引入细胞内的染色体或微型染色体中;但是改变细胞及其子代的表现型和/或基因型的任何改变均包括在该术语中。

[0067] 如果在细胞体外扩大培养期间,序列可用于执行其功能,则将细胞称为经基因序列“稳定”改变、转导、遗传修饰或转化。一般地,此类细胞经“可遗传性”改变(遗传修饰),因为引入了受改变细胞的子代也可遗传的遗传改变。

[0068] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可交换用于指任何长度的氨基酸聚合物。所述术语还涵盖已经修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、磷酸化或与标记组分结合。多肽例如抗血管生成多肽、神经保护多肽等,当在将基因产物递送至哺乳动物受试者的上下文中讨论时,及其组合物,指各个完整多肽或其保留了完整蛋白质的所需生物化学功能的任何片段或基因工程衍生物。类似地,提到编码抗血管生成多肽的核酸、编码神经保护多肽的核酸和用于将基因产物递送至哺乳动物受试者的其它此类氨基酸(也可称为递送至受体细胞的“转基因”),包括编码完整多肽或其具有所需生物化学功能的任何片段或基因工程衍生物的多核苷酸。

[0069] “分离的”质粒、核酸、载体、病毒、病毒体、宿主细胞或其它物质指没有在上述物质或类似物质自然存在或最初制备时也可能存在的至少一些其它组分的物质的制剂。因此,例如,可使用纯化计数制备分离物质以使其从源混合物中富集。可绝对地测量富集物,例如每体积溶液的重量,或可相对于源混合物中存在的第二潜在干扰物质测量。逐渐多次分离本公开实施方案越来越多的富集物。在一些实施方案中纯化分离的质粒、核酸、载体、病毒、宿主细胞或其它物质,例如从约80%至约90%纯度,至少约90%纯度,至少约95%纯度,至少约98%纯度,或至少约99%纯度或更高纯度。

[0070] 如本文所使用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等指获得所需药理学和/或生理学作用。所述作用在完全或部分预防疾病或其症状方面可为预防性和/或在对疾病和/或可归因于所述疾病的副作用的部分或完全治愈方面可为治疗性。如本文所使用,“治疗”包括对哺乳动物(特别是人类)疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病在可能易患

病或有患病风险但尚未诊断为患病的受试者中出现;(b)抑制疾病,即阻止其发展;和(c)缓解疾病,即引起疾病消退。

[0071] 术语“个体”、“宿主”、“受试者”和“患者”在本文中可交换使用,并且指哺乳动物,包括但不限于人和非人灵长类动物,包括猿和人;哺乳类运动动物(例如,马);哺乳类家畜(例如,绵羊、山羊等);哺乳类宠物(狗、猫等);和啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)。

[0072] 在进一步描述本发明之前,应理解本发明不限于描述的特定实施方案,当然,同样可能变化。还应理解,本文使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案,并非旨在限制,因为本发明的范围将仅受所附权利要求的限制。

[0073] 提供值的范围时,应理解,介于该范围的上下限之间的每个居间数值(至下限单位的十分之一,除非上下文另外明确指出)以及所述范围内的任意其它规定或居间的数值涵盖在本发明内。这些较小范围的上下限可独立地包括在较小范围内,并且也涵盖在本发明内,以规定范围内明确排除的任何限值为限。规定范围包括一个或两个限值时,将那些包括的限值的任一个或两个排除在外的范围也包括在本发明中。

[0074] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义。虽然在本发明的实践和教学中也可使用与本文所述类似或等效的任何方法和材料,但现在描述优选方法和材料。本文提及的所有出版物通过引用并入本文以公开和描述连同出版物一起引用的方法和/或材料。

[0075] 必须指出的是,如本文和所附权利要求中所使用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括多个指示物。因此,例如,提到“一种重组AAV病毒体”包括多个此类病毒体而提到“所述光感受器细胞”包括提到一个或多个光感受器细胞及其本领域技术人员已知的等效物,等等。应进一步指出,权利要求可起草为排除任何任选要素。同样,该声明旨在用作使用诸如“只是”、“仅仅”等专有术语连同对权利要求要素的叙述,或使用“消极”限制的前提基础。

[0076] 应了解,为清楚起见,在独立实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见,在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征,也可单独地或以任何适合的子组合提供。本发明明确包括关于本发明的实施方案的所有组合并且在本文中公开,正如单独明确地公开每个和每种组合一样。另外,本发明还明确包括各实施方案及其要素的所有子组合并且在本文中公开,正如在本文单独明确地公开每个和每种此类子组合一样。

[0077] 本文讨论的出版物只是为了在本申请的提交日期之前公开而提供。不得将本文任何内容解释为承认无权凭借先前发明使本发明先于此出版物。进一步地,提供的出版日期可能与实际出版日期不同,可能需要单独确认。

[0078] 发明详述

[0079] 本公开提供了衣壳蛋白改变的腺相关病毒(AAV)病毒体,其中所述AAV病毒体在经玻璃体内注射施用,与野生型AAV在经玻璃体内注射施用相比,表现出更强的视网膜细胞感染性。本公开进一步提供了将基因产物递送至个体的视网膜细胞的方法和治疗眼病的方法。

[0080] 视网膜细胞可为光感受器(例如,杆状细胞、锥状细胞)、视网膜神经节细胞(RGC)、缪勒细胞(Müller cell)(缪勒胶质细胞)、双极细胞、无长突细胞、水平细胞或视网膜色素

上皮(RPE)细胞。

[0081] 变异AAV衣壳多肽

[0082] 本公开提供了一种变异AAV衣壳蛋白,其中相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,所述变异AAV衣壳蛋白在衣壳蛋白GH环或IV环中的插入位点中包含约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入,并且其中与包含所述相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对视网膜细胞的感染性相比,所述变异衣壳蛋白,当存在于AAV病毒体中时,赋予增强的视网膜细胞感染性。在一些情况下,视网膜细胞为光感受器细胞(例如,杆状细胞、锥状细胞)。在其它情况下,视网膜细胞为RGC。在其它情况下,视网膜细胞为RPE细胞。在其它情况下,视网膜细胞为穆勒细胞。其它视网膜细胞包括无长突细胞、双极细胞和水平细胞。“约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入”本文也称为“肽插入”(例如异源肽插入)。“相应亲本AAV衣壳蛋白”指无肽插入的相同AAV血清型的AAV衣壳蛋白。

[0083] 插入位点在AAV衣壳蛋白的GH环或IV环中,例如在AAV衣壳蛋白的GH环或IV环的溶剂可及部分。对于AAV衣壳的GH环/IV环,见,例如, van Vliet等(2006)Mol. Ther. 14:809; Padron等(2005)J. Virol. 79:5047;和Shen等(2007)Mol. Ther. 15:1955。例如,如图17A和17B所描绘,插入位点可在AAV衣壳蛋白的氨基酸411-650内。例如,如图6所描绘,插入位点可在AAV2的氨基酸570-611内,AAV1的氨基酸571-612内,AAV5的氨基酸560-601内,AAV6的氨基酸571-612内,AAV7的氨基酸572-613内,AAV8的氨基酸573-614内,AAV9的氨基酸571-612内,或AAV10的氨基酸573-614内。

[0084] 在一些情况下,相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,在所述衣壳蛋白的GH环或IV环中的插入位点插入约5个氨基酸至约11个氨基酸。例如,插入位点可介于AAV2的氨基酸587和588之间,或另一AAV血清型的衣壳亚基的相应位置之间。应指出的是,插入位点587/588基于AAV2衣壳蛋白。可在除AAV2外的AAV血清型(例如,AAV8、AAV9等)中的相应位点插入约5个氨基酸至约11个氨基酸。本领域的技术人员将了解,基于对不同AAV血清型的衣壳蛋白的氨基酸序列的比较,其中“与AAV2的氨基酸587-588相对应的”插入位点将在任何指定AAV血清型的衣壳蛋白中。图6中示出了不同AAV血清型中与AAV2(见图5)的衣壳蛋白VP1的氨基酸570-611相对应的序列。见,例如,基因库登记号NP_049542的AAV1;基因库登记号AAD13756的AAV5;基因库登记号AAB95459的AAV6;基因库登记号YP_077178的AAV7;基因库登记号YP_077180的AAV8;基因库登记号AAS99264的AAV9和基因库登记号AAT46337的AAV10。

[0085] 在一些实施方案中,插入位点是介于位于任何AAV血清型的VP1的氨基酸570-614之间的两个相邻氨基酸之间的单个插入位点,例如,插入位点介于位于任何AAV血清型或变异体的VP1的氨基酸570-610、氨基酸580-600、氨基酸570-575、氨基酸575-580、氨基酸580-585、氨基酸585-590、氨基酸590-600或氨基酸600-614中的两个相邻氨基酸之间。例如,插入位点可介于氨基酸580和581、氨基酸581和582、氨基酸583和584、氨基酸584和585、氨基酸585和586、氨基酸586和587、氨基酸587和588、氨基酸588和589或氨基酸589和590之间。插入位点可介于氨基酸575和576、氨基酸576和577、氨基酸577和578、氨基酸578和579或氨基酸579和580之间。插入位点可介于氨基酸590和591、氨基酸591和592、氨基酸592和593、氨基酸593和594、氨基酸594和595、氨基酸595和596、氨基酸596和597、氨基酸597和598、氨基酸598和599或氨基酸599和600之间。

[0086] 例如,插入位点可介于AAV2的氨基酸587和588之间,介于AAV1的氨基酸590和591

之间,介于AAV5的氨基酸575和576之间,介于AAV6的氨基酸590和591之间,介于AAV7的氨基酸589和590之间,介于AAV8的氨基酸590和591之间,介于AAV9的氨基酸588和589之间,或介于AAV10的氨基酸588和589之间。

[0087] 再如,如图17A所示,插入位点可介于AAV衣壳蛋白的氨基酸450和460之间。例如,如图17A所示,插入位点可在AAV2的氨基酸453、AAV1的氨基酸454、AAV6的氨基酸454、AAV7的氨基酸456、AAV8的氨基酸456、AAV9的氨基酸454或AAV10的氨基酸456处(例如,直接在其N端)。

[0088] 在一些实施方案中,主题衣壳蛋白包括包含与图18A-C所示的氨基酸有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的GH环。

[0089] 插入肽

[0090] 如上所述,长度约5个氨基酸至约11个氨基酸的肽插入AAV衣壳的GH环中。插入肽的长度为5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸或11个氨基酸。

[0091] 插入肽可包含以下提出的任一公式的氨基酸序列。

[0092] 例如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式I的插入肽:

[0093] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$

[0094] 其中:

[0095] Y_1-Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

[0096] X_1 (若存在)选自Leu、Asn和Lys;

[0097] X_2 选自Gly、Glu、Ala和Asp;

[0098] X_3 选自Glu、Thr、Gly和Pro;

[0099] X_4 选自Thr、Ile、Gln和Lys;

[0100] X_5 选自Thr和Ala;

[0101] X_6 选自Arg、Asn和Thr;

[0102] X_7 (若存在)选自Pro和Asn。

[0103] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IIa的插入肽:

[0104] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$

[0105] 其中:

[0106] Y_1-Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

[0107] X_1-X_4 的每一个为任何氨基酸;

[0108] X_5 为Thr;

[0109] X_6 为Arg;并且

[0110] X_7 为Pro。

[0111] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IIb的插入肽:

[0112] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$

[0113] 其中:

[0114] Y_1-Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

[0115] X_1 (若存在)选自Leu和Asn;

- [0116] X₂(若存在)选自Gly和Glu;
- [0117] X₃选自Glu和Thr;
- [0118] X₄选自Thr和Ile;
- [0119] X₅为Thr;
- [0120] X₆为Arg;并且
- [0121] X₇为Pro。
- [0122] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式III的插入肽:
- [0123] Y₁Y₂X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇Y₃Y₄
- [0124] 其中:
- [0125] Y₁-Y₄(若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0126] X₁(若存在)为Lys;
- [0127] X₂选自Ala和Asp;
- [0128] X₃选自Gly和Pro;
- [0129] X₄选自Gln和Lys;
- [0130] X₅选自Thr和Ala;
- [0131] X₆选自Asn和Thr;
- [0132] X₇(若存在)为Asn。
- [0133] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IV的插入肽:
- [0134] Y₁Y₂X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇Y₃Y₄
- [0135] 其中:
- [0136] Y₁-Y₄(若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0137] X₁(若存在)为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Leu、Asn、Arg、Ala、Ser和Lys;
- [0138] X₂为带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Gly、Glu、Ala、Val、Thr和Asp;
- [0139] X₃为带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Glu、Thr、Gly、Asp或Pro;
- [0140] X₄选自Thr、Ile、Gly、Lys、Asp和Gln;
- [0141] X₅为极性氨基酸、醇(具有游离羟基的氨基酸)或疏水氨基酸;或选自Thr、Ser、Val和Ala;
- [0142] X₆为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Arg、Val、Lys、Pro、Thr和Asn;并且
- [0143] X₇(若存在)为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Pro、Gly、Phe、Asn和Arg。
- [0144] 作为非限制性实例,插入肽可包含选自LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列。
- [0145] 在一些情况下,插入肽在LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的任一个的氨基末端和/或

羧基末端具有1-4个间隔氨基酸(Y₁-Y₄)。适合的间隔氨基酸包括但不限于亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸。

[0146] 例如,在一些情况下,插入肽具有下列氨基酸序列之一:LALGETTRPA(SEQ ID NO:45)、LANETITRPA(SEQ ID NO:46)、LAKAGQANNA(SEQ ID NO:47)、LAKDPKTTNA(SEQ ID NO:48)、LAKDITTTTRA(SEQ ID NO:61)、LARAGGSVGA(SEQ ID NO:62)、LAAVDTTKFA(SEQ ID NO:63)和LASTGKVPNA(SEQ ID NO:64)。再如,在一些情况下,插入肽具有下列氨基酸序列之一:AALGETTRPA(SEQ ID NO:49)、AANETITRPA(SEQ ID NO:50)、AAKAGQANNA(SEQ ID NO:51)和AAKDPKTTNA(SEQ ID NO:52)。又如,在一些情况下,插入肽具有下列氨基酸序列之一:GLGETTRPA(SEQ ID NO:53)、GNETITRPA(SEQ ID NO:54)、GKAGQANNA(SEQ ID NO:55)和GKDPKTTNA(SEQ ID NO:56)。再如,在一些情况下,插入肽包含在C端一侧为AA而在N端一侧为A的KDTDTTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDITTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的其中一个;或包含在C端一侧为G而在N端一侧为A的KDTDTTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDITTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的其中一个。

[0147] 在一些实施方案中,除相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,GH环或IV环中约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入外,主题变异AAV衣壳不包括任何其它氨基酸取代、插入或缺失。在其它实施方案中,与亲本AAV衣壳蛋白相比,除相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,GH环或IV环中约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入外,主题变异AAV衣壳包括1个至约25个氨基酸插入、缺失或取代。例如,在一些实施方案中,与亲本AAV衣壳蛋白相比,除相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,GH环或IV环中约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入外,主题变异AAV衣壳包括1个至约5个、约5个至约10个,约10个至约15个,约15个至约20个或约20个至约25个氨基酸插入、缺失或取代。

[0148] 在一些实施方案中,主题变异衣壳多肽不包括以下1、2、3或4个氨基酸取代:Y273F、Y444F、Y500F和Y730F。

[0149] 在一些实施方案中,除如上所述的插入肽外,主题变异衣壳多肽包含以下1、2、3或4个氨基酸取代:Y273F、Y444F、Y500F和Y730F。

[0150] 在一些实施方案中,变异AAV衣壳多肽为嵌合衣壳,例如,衣壳包含第一AAV血清型的AAV衣壳的一部分和第二血清型的AAV衣壳的一部分;并且相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,在GH环或IV环中包含约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入。

[0151] 在一些实施方案中,主题变异衣壳蛋白包含与图5中提供的氨基酸序列有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列;和相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,在GH环或IV环中约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入。

[0152] 在一些实施方案中,主题变异衣壳蛋白经分离,例如纯化。在一些情况下,在同样提供的AAV载体中包括主题变异衣壳蛋白。如以下所详细描述,在重组AAV病毒体中可包括主题变异衣壳蛋白。

[0153] 重组AAV病毒体

[0154] 本公开提供了一种重组腺相关病毒(rAAV)病毒体,包含:a)变异AAV衣壳蛋白,其中相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,所述变异AAV衣壳蛋白在衣壳蛋白GH环或IV环中的插入位点中包含约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入,并且其中与包含所述相应亲本AAV衣壳蛋白

的AAV病毒体对视网膜细胞的感染性相比,所述变异衣壳蛋白赋予增强的视网膜细胞感染性;和b)包含编码基因产物的核苷酸序列的异源核酸。在一些情况下,视网膜细胞为光感受器细胞(例如,杆状和/或锥状细胞)。在其它情况下,视网膜细胞为RGC细胞。在其它情况下,视网膜细胞为RPE细胞。在其它情况下,视网膜细胞为缪勒细胞。在其它情况下,视网膜细胞可包括无长突细胞、双极细胞和水平细胞。“约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入”本文也称为“肽插入”(例如,异源肽插入)。“相应亲本AAV衣壳蛋白”指无肽插入的相同AAV血清型的AAV衣壳蛋白。

[0155] 插入位点在AAV衣壳蛋白的GH环或IV环中,例如在AAV衣壳蛋白的GH环或IV环的溶剂可及部分。对于GH环,见,例如, van Vliet等(2006)Mol. Ther. 14:809; Padron等(2005) J. Virol. 79:5047; 和Shen等(2007)Mol. Ther. 15:1955。例如,插入位点在AAV2的氨基酸570-611内, AAV1的氨基酸571-612内, AAV5氨基酸的560-601内, AAV6的氨基酸571-612内, AAV7的氨基酸572-613内, AAV8的氨基酸573-614内, AAV9的氨基酸571-612内, 或AAV10的氨基酸573-614内。

[0156] 相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,在所述衣壳蛋白的GH环或IV环中的插入位点插入约5个氨基酸至约11个氨基酸。例如,插入位点可介于AAV2的氨基酸587和588之间,或另一AAV血清型的衣壳亚基的相应位置之间。应指出的是,插入位点587/588基于AAV2衣壳蛋白。可在除AAV2外的AAV血清型(例如, AAV8、AAV9等)中的相应位点插入约5个氨基酸至约11个氨基酸。本领域的技术人员将了解,基于对不同AAV血清型的衣壳蛋白的氨基酸序列的比较,其中“与AAV2的氨基酸587-588相对应的”插入位点将在任何指定AAV血清型的衣壳蛋白中。图6中示出了不同AAV血清型中与AAV2(见图5)的衣壳蛋白VP1的氨基酸570-611相对应的序列。

[0157] 在一些实施方案中,插入位点是介于位于任何AAV血清型的VP1的氨基酸570-614之间的两个相邻氨基酸之间的单个插入位点,例如,插入位点介于位于任何AAV血清型或变异体的VP1的氨基酸570-614、氨基酸580-600、氨基酸570-575、氨基酸575-580、氨基酸580-585、氨基酸585-590、氨基酸590-600或氨基酸600-610中的两个相邻氨基酸之间。例如,插入位点可介于氨基酸580和581、氨基酸581和582、氨基酸583和584、氨基酸584和585、氨基酸585和586、氨基酸586和587、氨基酸587和588、氨基酸588和589或氨基酸589和590之间。插入位点可介于氨基酸575和576、氨基酸576和577、氨基酸577和578、氨基酸578和579或氨基酸579和580之间。插入位点可介于氨基酸590和591、氨基酸591和592、氨基酸592和593、氨基酸593和594、氨基酸594和595、氨基酸595和596、氨基酸596和597、氨基酸597和598、氨基酸598和599或氨基酸599和600之间。

[0158] 例如,插入位点可介于AAV2的氨基酸587和588之间,介于AAV1的氨基酸590和591之间,介于AAV5的氨基酸575和576之间,介于AAV6的氨基酸590和591之间,介于AAV7的氨基酸589和590之间,介于AAV8的氨基酸590和591之间,介于AAV9的氨基酸588和589之间,或介于AAV10的氨基酸589和590之间。

[0159] 插入肽

[0160] 如上所述,主题rAAV病毒体包含插入AAV衣壳的GH环中的长度约5个氨基酸至约11个氨基酸的肽。插入肽的长度为5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸或11个氨基酸。

- [0161] 插入肽可包含以下提出的任一公式的氨基酸序列。
- [0162] 例如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式I的插入肽:
- [0163] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$
- [0164] 其中:
- [0165] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0166] X_1 (若存在)选自Leu、Asn和Lys;
- [0167] X_2 选自Gly、Glu、Ala和Asp;
- [0168] X_3 选自Glu、Thr、Gly和Pro;
- [0169] X_4 选自Thr、Ile、Gln和Lys;
- [0170] X_5 选自Thr和Ala;
- [0171] X_6 选自Arg、Asn和Thr;
- [0172] X_7 (若存在)选自Pro和Asn。
- [0173] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IIa的插入肽:
- [0174] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$
- [0175] 其中:
- [0176] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0177] X_1 - X_4 的每一个为任何氨基酸;
- [0178] X_5 为Thr;
- [0179] X_6 为Arg;并且
- [0180] X_7 为Pro。
- [0181] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IIb的插入肽:
- [0182] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$
- [0183] 其中:
- [0184] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0185] X_1 (若存在)选自Leu和Asn;
- [0186] X_2 (若存在)选自Gly和Glu;
- [0187] X_3 选自Glu和Thr;
- [0188] X_4 选自Thr和Ile;
- [0189] X_5 为Thr;
- [0190] X_6 为Arg;并且
- [0191] X_7 为Pro。
- [0192] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式III的插入肽:
- [0193] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$
- [0194] 其中:
- [0195] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0196] X_1 (若存在)为Lys;
- [0197] X_2 选自Ala和Asp;
- [0198] X_3 选自Gly和Pro;
- [0199] X_4 选自Gln和Lys;

- [0200] X₅选自Thr和Ala;
- [0201] X₆选自Asn和Thr;
- [0202] 若存在, X₇为Asn。
- [0203] 再如, 插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽, 其中所述插入肽是式IV的插入肽:
- [0204] Y₁Y₂X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇Y₃Y₄
- [0205] 其中:
- [0206] Y₁-Y₄(若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0207] X₁(若存在)为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Leu、Asn、Arg、Ala、Ser和Lys;
- [0208] X₂为带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Gly、Glu、Ala、Val、Thr和Asp;
- [0209] X₃为带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Glu、Thr、Gly、Asp或Pro;
- [0210] X₄选自Thr、Ile、Gly、Lys、Asp和Gln;
- [0211] X₅为极性氨基酸、醇(具有游离羟基的氨基酸)或疏水氨基酸;或选自Thr、Ser、Val和Ala;
- [0212] X₆为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Arg、Val、Lys、Pro、Thr和Asn;并且
- [0213] X₇(若存在)为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Pro、Gly、Phe、Asn和Arg。
- [0214] 作为非限制性实例, 插入肽可包含选自LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列。
- [0215] 在一些情况下, 插入肽在LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的任一个的氨基末端和/或羧基末端具有1-4个间隔氨基酸(Y₁-Y₄)。适合的间隔氨基酸包括但不限于亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸。
- [0216] 例如, 在一些情况下, 插入肽具有下列氨基酸序列之一: LALGETTRPA(SEQ ID NO:45)、LANETITRPA(SEQ ID NO:46)、LAKAGQANNA(SEQ ID NO:47)、LAKDPKTTNA(SEQ ID NO:48)、LAKDTDTTRA(SEQ ID NO:61)、LARAGGSVGA(SEQ ID NO:62)、LAAVDTTKFA(SEQ ID NO:63)和LASTGKVPNA(SEQ ID NO:64)。再如, 在一些情况下, 插入肽具有下列氨基酸序列之一: AALGETTRPA(SEQ ID NO:49)、AANETITRPA(SEQ ID NO:50)、AAKAGQANNA(SEQ ID NO:51)和AAKDPKTTNA(SEQ ID NO:52)。又如, 在一些情况下, 插入肽具有下列氨基酸序列之一: GLGETTRPA(SEQ ID NO:53)、GNETITRPA(SEQ ID NO:54)、GKAGQANNA(SEQ ID NO:55)和GKDPKTTNA(SEQ ID NO:56)。再如, 在一些情况下, 插入肽包含在C端一侧为AA而在N端一侧为A的KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的其中一个;或包含在C端一侧为G而在N端一侧为A的KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的其中一个。

[0217] 在一些实施方案中,除相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,GH环或IV环中约7个氨基酸至约10个氨基酸的插入外,主题rAAV病毒体衣壳不包括任何其它氨基酸取代、插入或缺失。在其它实施方案中,与亲本AAV衣壳蛋白相比,除相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,GH环或IV环中约7个氨基酸至约10个氨基酸的插入外,主题rAAV病毒体衣壳包括1个至约25个氨基酸插入、缺失或取代。例如,在一些实施方案中,与亲本AAV衣壳蛋白相比,除相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,GH环或IV环中约7个氨基酸至约10个氨基酸的插入外,主题rAAV病毒体衣壳包括1个至约5个、约5个至约10个、约10个至约15个、约15个至约20个或约20个至约25个氨基酸插入、缺失或取代。

[0218] 在一些实施方案中,主题rAAV病毒体衣壳不包括以下1、2、3或4个氨基酸取代:Y273F、Y444F、Y500F和Y730F。

[0219] 在一些实施方案中,除如上所述的插入肽外,主题变异衣壳多肽包含以下1、2、3或4个氨基酸取代:Y273F、Y444F、Y500F和Y730F。

[0220] 在一些实施方案中,主题rAAV病毒体衣壳为嵌合衣壳,例如,衣壳包含第一AAV血清型的AAV衣壳的一部分和第二血清型的AAV衣壳的一部分;并且相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,在GH环或IV环中包含约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入。

[0221] 在一些实施方案中,主题rAAV病毒体包含与图5中提供的氨基酸序列有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的衣壳蛋白;和相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,在GH环或IV环中约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入。

[0222] 在一些实施方案中,主题rAAV病毒体包含衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包括包含与图18A-C中提出的氨基酸序列有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的GH环。

[0223] 与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对视网膜细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的视网膜细胞感染性。

[0224] 在一些情况下,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对视网膜细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的视网膜细胞感染性。

[0225] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对光感受器细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的光感受器(杆状或锥状)细胞感染性。

[0226] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对光感受器细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的光感受器(杆状或锥状)细胞感染性。

[0227] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对RGC的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的RGC感染性。

[0228] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射

施用时对RGC的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的RGC感染性。

[0229] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对RPE细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的RPE 细胞感染性。

[0230] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对RPE细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的RPE细胞感染性。

[0231] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对缪勒细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的缪勒细胞感染性。

[0232] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对缪勒细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的缪勒细胞感染性。

[0233] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对双极细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的双极细胞感染性。

[0234] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对双极细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的双极细胞感染性。

[0235] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对无长突细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的无长突细胞感染性。

[0236] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对无长突细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的无长突细胞感染性。

[0237] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对水平细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的水平细胞感染性。

[0238] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对水平细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的水平细胞感染性。

[0239] 在一些情况下,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体穿过ILM的能力相比,主题rAAV病毒体表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的穿过内界膜(ILM)的能力。

[0240] 在一些情况下,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时穿过ILM的能力相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的穿过内界膜(ILM)的能力。

[0241] 主题rAAV病毒体可穿过ILM,并且也可经过细胞层,包括缪勒细胞、无长突细胞等,

以达到光感受器细胞或RPE细胞。例如,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时可穿过ILM,并且也可经过细胞层,包括缪勒细胞、无长突细胞等,以达到光感受器细胞或RPE细胞。

[0242] 在一些实施方案中,主题rAAV病毒体选择性感染视网膜细胞,例如,主题rAAV病毒体以比非视网膜细胞,例如眼睛外部的细胞强10倍、15倍、20倍、25倍、50倍或50倍以上的特异性感染视网膜细胞。例如,在一些实施方案中,主题rAAV病毒体选择性感染视网膜细胞,例如,主题rAAV病毒体以比非视网膜细胞,例如眼睛外部的细胞强10倍、15倍、20倍、25倍、50倍或50倍以上的特异性感染光感受器细胞。

[0243] 在一些实施方案中,主题rAAV病毒体选择性感染光感受器细胞,例如,主题rAAV病毒体以比眼部存在的非光感受器细胞,例如视网膜 神经节细胞、缪勒细胞等强10倍、15倍、20倍、25倍、50倍或50倍以上的特异性感染光感受器细胞。

[0244] 在一些实施方案中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体在经玻璃体内注射施用时对光感受器细胞的感染性相比,主题rAAV病毒体在经玻璃体内注射施用时表现出增强至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少50倍或50倍以上的光感受器细胞感染性。

[0245] 基因产物

[0246] 主题rAAV病毒体包含含编码基因产物的核苷酸序列的异源核酸。在一些实施方案中,基因产物为干扰RNA。在一些实施方案中,基因产物为适配体。在一些实施方案中,基因产物为多肽。在一些实施方案中,基因产物为提供对基因功能的位点特异性敲除的位点特异性核酸酶。

[0247] 干扰RNA

[0248] 基因产物为干扰RNA(RNAi)时,适合的RNAi包括降低细胞内凋亡或血管生成因子的水平的RNAi。例如,RNAi可为降低细胞内诱导或促进凋亡的基因产物水平的shRNA或siRNA。本文将基因产物诱导或促进凋亡的基因称为“促凋亡基因”而将那些基因的产物(mRNA;蛋白质)称为“促凋亡基因产物”。促凋亡基因产物包括(例如)Bax、Bid、Bak和Bad基因产物。见,例如,美国专利No.7,846,730。

[0249] 干扰RNA也可抗血管生成产物,例如VEGF(例如,Cand5;见,例如,美国专利公布No.2011/0143400;美国专利公布No.2008/0188437;和Reich等(2003)Mol.Vis.9:210)、VEGFR1(例如,Sirna-027;见,例如,Kaiser等(2010)Am.J.Ophthalmol.150:33;和Shen等(2006)Gene Ther.13:225)或VEGFR2(Kou等(2005)Biochem.44:15064)。同样见,美国专利No.6,649,596、6,399,586、5,661,135、5,639,872和5,639,736;和美国专利No.7,947,659和7,919,473。

[0250] 适配体

[0251] 基因产物为适配体时,示例性目标适配体包括对血管内皮生长因子(VEGF)的适配体。见,例如,Ng等(2006)Nat.Rev.Drug Discovery5:123;和Lee等(2005)Proc.Natl.Acad.Sci.USA102:18902。例如,VEGF适配体可包含核苷酸序列5'-cgcaaucagugaaugcuuauacaucg-3'(SEQ ID NO:17)。PDGF特异性适配体也适合使用,例如E10030;见,例如,Ni和Hui(2009)Ophthalmologica223:401;和Akiyama等(2006)J.Cell Physiol.207:407)。

[0252] 多肽

[0253] 基因产物为多肽时,多肽通常为增强视网膜细胞功能,例如杆状或锥状光感受器

细胞、视网膜神经节细胞、缪勒细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞或视网膜色素上皮细胞的功能的多肽。示例性多肽包括神经保护多肽(例如,GDNF、CNTF、NT4、NGF和NTN);抗血管生成多肽(例如,可溶性血管内皮生长因子(VEGF)受体;VEGF结合抗体;VEGF结合抗体片段(例如,单链抗VEGF抗体);内皮抑素(endostatin);肿瘤抑素(tumstatin);血管抑素(angiostatin);可溶性Flt多肽(Lai等(2005)Mol. Ther. 12:659);包含可溶性Flt多肽的Fc融合蛋白(见,例如,Pechan等(2009)Gene Ther. 16:10);色素上皮源性因子(PEDF);可溶性Tie-2受体等);金属蛋白酶-3的组织抑制剂(TIMP-3);光反应性视蛋白(opsin),例如视紫红质;抗凋亡多肽(例如,Bcl-2、Bcl-X1)等。适合多肽包括但不限于胶质源性神经营养因子(GDNF);成纤维细胞生长因子2;神经营养因子(neurturin)(NTN);睫状神经营养因子(CNTF);神经生长因子(NGF);神经营养蛋白-4(NT4);源性神经营养因子(BDNF;例如,包含与图11所示氨基酸序列(SEQ ID NO:11)的约200个氨基酸至247个氨基酸的连续段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽);表皮生长因子;视紫红质;X连锁凋亡抑制蛋白;和音猬因子(Sonic hedgehog)。

[0254] 适合的光反应性视蛋白包括(例如)如美国专利公布No. 2007/0261127(例如,Chr2;Chop2);美国专利公布No. 2001/0086421;美国专利公布No. 2010/0015095;和Diester等(2011)Nat. Neurosci. 14:387中描述的光反应性视蛋白。

[0255] 适合多肽还包括视网膜劈裂蛋白(例如,包含与图10所示氨基酸序列(SEQ ID NO:10)的约200个氨基酸至224个氨基酸的连续段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽)。适合多肽包括(例如)色素性视网膜炎GTP酶调节因子(RGPR)-相互作用蛋白-1(见,例如,基因库登记号Q96KN7、Q9EPQ2和Q9GLM3)(例如,包含与图16所示氨基酸序列(SEQ ID NO:21)的约1150个氨基酸至约1200个氨基酸或约1200个氨基酸至约1286个氨基酸的连续段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽);外周蛋白-2(Prph2)(见,例如,基因库登记号NP_000313(例如,包含与图14所示氨基酸序列(SEQ ID NO:19)的约300个氨基酸至346个氨基酸的连续段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽);和Travis等(1991)Genomics 10:733);外周蛋白(例如,包含与图15所示氨基酸序列(SEQ ID NO:20)的约400个氨基酸至470个氨基酸的连续段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽);视网膜色素上皮特异性蛋白(RPE65),(例如,包含与图12所示氨基酸序列(SEQ ID NO:12)的约200个氨基酸至247个氨基酸的连续段有至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列的多肽)(见,例如,基因库AAC39660;和Morimura等(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3088)等。

[0256] 适合多肽还包括:CHM(脉络膜缺损(choroideremia)(Rab护送蛋白1)),当缺损或缺失时,引起无脉络膜的一种多肽(见,例如,Donnelly等(1994)Hum. Mol. Genet. 3:1017;和van Bokhoven等(1994)Hum. Mol. Genet. 3:1041);和碎屑同源物1(CRB1),当缺损或缺失时,引起利伯氏先天性黑内障(Leber congenital amaurosis)和色素性视网膜炎的一种多肽(见,例如,den Hollander等(1999)Nat. Genet. 23:217;和基因库登记号CAM23328)。

[0257] 适合多肽还包括当缺损或缺失时,导致全色盲的多肽,其中此类多肽包括(例如)杆状光感受器cGMP-门控通道亚基 α (CNGA3)(见,例如,基因库登记号NP_001289;和Booi j等

(2011)Ophthalmology 118:160-167);杆状光感受器cGMP-门控通道 β 亚基(CNGB3)(见,例如,Kohl等(2005)Eur J Hum Genet.13(3):302);鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白)、 α 转导活性多肽2(GNAT2)(ACHM4);和ACHM5;和缺损或缺乏时,导致各种形式的色盲的多肽(例如,L-视蛋白、M-视蛋白和S-视蛋白)。见Mancuso等(2009)Nature 461(7265):784-787。

[0258] 位点特异性核酸内切酶

[0259] 在一些情况下,目标基因产物为提供对基因功能的位点特异性敲除的位点特异性核酸内切酶,例如,其中核酸内切酶敲除与视网膜疾病相关的等位基因。例如,若显性等位基因编码,野生型时,为视网膜结构蛋白和/或提供正常的视网膜功能的缺陷基因拷贝,则位点特异性核酸内切酶可靶向缺陷等位基因并敲除缺陷等位基因。

[0260] 除敲除缺陷等位基因外,位点特异性核酸酶也可用于刺激与编码缺陷等位基因编码的蛋白质的功能拷贝的供体DNA的同源重组。因此,例如,主题rAAV病毒体可用于递送敲除缺陷等位基因的位点特异性核酸内切酶,并且可用于递送缺陷等位基因的功能拷贝,引起功能拷贝修复,从而提供功能性视网膜蛋白(例如,功能性视网膜劈裂蛋白、功能性RPE65、功能性外周蛋白等)的生成。见,例如,Li等(2011)Nature 475:217。在一些实施方案中,主题rAAV病毒体包含编码位点特异性核酸内切酶的异源核苷酸序列;和编码缺陷等位基因的功能拷贝的异源核苷酸序列,其中所述功能拷贝编码功能性视网膜蛋白。功能性视网膜蛋白包括(例如)视网膜劈裂蛋白、RPE65、色素性视网膜炎GTP酶调节因子(RGPR)-相互作用蛋白-1、外周蛋白、外周蛋白-2等。

[0261] 适合使用的位点特异性核酸内切酶包括(例如)锌指核酸酶(ZFN);和转录激活因子样效应核酸酶(TALEN),其中此类位点特异性核酸内切酶并非自然存在并且经修饰为靶向特定基因。此类位点特异性核酸酶可经工程化以切割基因组内的特定位置,然后非同源末端连接可在插入或消去几个核苷酸的同时修复断裂处。然后此类位点特异性核酸内切酶(也称为“INDEL”)将蛋白质抛出框外并有效敲除基因。见,例如,美国专利公布No.2011/0301073。

[0262] 调控序列

[0263] 在一些实施方案中,编码目标基因产物的核苷酸序列与组成型启动子可操作地连接。在其它实施方案中,编码目标基因产物的核苷酸序列与诱导型启动子可操作地连接。在一些情况下,编码目标基因产物的核苷酸序列与组织特异性或细胞类型特异性调控元件可操作地连接。例如,在一些情况下,编码目标基因产物的核苷酸序列与光感受器特异性调控元件(例如,光感受器特异性启动子)可操作地连接,例如赋予光感受器细胞内可操作地连接的基因选择性表达的调控元件。适合的光感受器特异性调控元件包括(例如)视紫红质启动子;视紫红质激酶启动子(Young等(2003)Ophthalmol.Vis.Sci.44:4076); β 磷酸二酯酶基因启动子(Nicoud等(2007)J.Gene Med.9:1015);色素性视网膜炎基因启动子(Nicoud等(2007)同上);和光感受器间维甲酸结合蛋白(IRBP)基因增强子(Nicoud等(2007)同上);IRBP基因启动子(Yokoyama等(1992)Exp Eye Res.55:225)。

[0264] 药物组合物

[0265] 本公开提供了一种药物组合物,包含:a)如上所述的主题rAAV病毒体;和b)药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或缓冲液。在一些实施方案中,药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或缓冲液适合用于人类。

[0266] 此类赋形剂、载体、稀释剂和缓冲液包括可施用而无异常毒性的任何药剂。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体,例如水、盐水、甘油和乙醇。其中可包括药学上可接受的盐,例如矿物酸盐例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐例如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。另外,在此类媒介物中可存在辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。在本领域中已知多种多样的药学上可接受的赋形剂而不需要在本文中详细讨论。在多种出版物中已经详尽地描述了药学上可接受的赋形剂,包括(例如)A.Gennaro(2000)“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,”第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等编辑,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;和Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等编辑,第3版,Amer.Pharmaceutical Assoc.

[0267] 将基因产物递送至视网膜细胞的方法和治疗方法

[0268] 本公开提供了一种将基因产物递送至个体的视网膜细胞的方法,所述方法包括向所述个体施用如上所述的主体rAAV病毒体。基因产物可为如上所述的多肽或干扰RNA(例如,shRNA、siRNA等)、适配体、位点特异性核酸内切酶。将基因产物递送至视网膜细胞可提供对视网膜疾病的治疗。视网膜细胞可为光感受器、视网膜神经节细胞、穆勒细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞或视网膜色素上皮细胞。在一些情况下,视网膜细胞为光感受器细胞,例如杆状或锥状细胞。

[0269] 本公开提供了一种治疗视网膜疾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的如上所述的主体rAAV病毒体。主体rAAV病毒体可经眼内注射、通过玻璃体内注射或通过其它方便的施用模式或途径施用。其它方便的施用模式或途径包括(例如)静脉内、鼻内等。

[0270] “治疗有效量”将落在通过实验和/或临床试验确定的相对较宽的范围内。例如,对于体内注射,即直接注射至眼内而言,治疗有效剂量将相当于约 10^6 至约 10^{15} 个rAAV病毒体,例如约 10^8 至约 10^{12} 个rAAV病毒体。对于体外转导而言,待递送至细胞的rAAV病毒体的有效量将相当于约 10^8 至约 10^{13} 个rAAV病毒体。其它有效剂量可易于由本领域的普通技术人员通过确定剂量反应曲线的常规试验确定。

[0271] 在一些实施方案中,可在不同间隔期内,例如每天、每周、每月、每年采用一次以上施用(例如,2、3、4次或更多次施用),以达到所需水平的基因表达。

[0272] 可施用主题方法治疗的眼病包括但不限于急性黄斑区神经视网膜病变;白塞氏病(Behcet's disease);脉络膜新生血管;糖尿病性葡萄膜炎;组织胞浆菌病;黄斑变性,例如急性黄斑变性、非渗出性老年性黄斑变性和渗出性老年性黄斑变性;水肿,例如黄斑水肿、黄斑囊样水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;影响后眼部或位置的眼外伤;眼部肿瘤;视网膜病症,例如视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病(包括增生性糖尿病性视网膜病)、增生性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、色素层炎视网膜疾病;交感性眼炎;VogtKoyanagi-Harada(VKH)综合征;眼色素层弥漫;由眼部激光治疗引起或影响的眼后部病状;光动力疗法引起或影响的眼后部病状;光凝固法、辐射性视网膜病变;视网膜前膜病症;视网膜静脉分枝阻塞;前部缺血性视神经病变;非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍;视网膜劈裂症(retinoschisis);色素性视网膜炎;青光眼;尤塞氏

综合征(Usher syndrome);视锥-视杆细胞营养不良;斯特格氏病(Stargardt disease)(眼底黄色斑点症);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;利伯氏先天性黑内障(Leber's Congenital Amaurosis);先天性静止性夜盲;无脉络膜;巴比二氏综合征(Bardet-Biedl syndrome);黄斑毛细血管扩张;利伯氏遗传性视神经病;早产儿视网膜病;和色觉障碍,包括全色盲、红色盲、绿色盲和蓝色盲。

[0273] 核酸和宿主细胞

[0274] 本公开提供了包含编码如上所述的主题变异腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白的核苷酸序列的分离核酸,其中相对于相应亲本AAV衣壳蛋白,所述变异AAV衣壳蛋白在GH环或IV环中包含约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入,并且其中当存在于AAV病毒体中时,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒体对视网膜细胞的感染性相比,所述变异衣壳蛋白提供增强的视网膜细胞感染性。主题分离核酸可为AAV载体,例如重组AAV载体。

[0275] 插入肽

[0276] 主题核酸编码的变异AAV衣壳蛋白具有插入AAV衣壳的GH环中,长度约5个氨基酸至约11个氨基酸的插入肽。插入肽的长度为5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸或11个氨基酸。

[0277] 插入肽可包含以下提出的任一公式的氨基酸序列。

[0278] 例如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式I的插入肽:

[0279] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$

[0280] 其中:

[0281] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

[0282] X_1 (若存在)选自Leu、Asn和Lys;

[0283] X_2 选自Gly、Glu、Ala和Asp;

[0284] X_3 选自Glu、Thr、Gly和Pro;

[0285] X_4 选自Thr、Ile、Gln和Lys;

[0286] X_5 选自Thr和Ala;

[0287] X_6 选自Arg、Asn和Thr;

[0288] X_7 (若存在)选自Pro和Asn。

[0289] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IIa的插入肽:

[0290] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$

[0291] 其中:

[0292] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

[0293] X_1 - X_4 的每一个为任何氨基酸;

[0294] X_5 为Thr;

[0295] X_6 为Arg;并且

[0296] X_7 为Pro。

[0297] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IIb的插入肽:

[0298] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$

[0299] 其中:

[0300] Y_1 - Y_4 (若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

- [0301] X₁(若存在)选自Leu和Asn;
- [0302] X₂(若存在)选自Gly和Glu;
- [0303] X₃选自Glu和Thr;
- [0304] X₄选自Thr和Ile;
- [0305] X₅为Thr;
- [0306] X₆为Arg;并且
- [0307] X₇为Pro。
- [0308] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式III的插入肽:
- [0309] Y₁Y₂X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇Y₃Y₄
- [0310] 其中:
- [0311] Y₁-Y₄(若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0312] X₁(若存在)为Lys;
- [0313] X₂选自Ala和Asp;
- [0314] X₃选自Gly和Pro;
- [0315] X₄选自Gln和Lys;
- [0316] X₅选自Thr和Ala;
- [0317] X₆选自Asn和Thr;
- [0318] X₇(若存在)为Asn。
- [0319] 再如,插入肽可为长度为5-11个氨基酸的肽,其中所述插入肽是式IV的插入肽:
- [0320] Y₁Y₂X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇Y₃Y₄
- [0321] 其中:
- [0322] Y₁-Y₄(若存在)的每一个独立选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0323] X₁(若存在)为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Leu、Asn、Arg、Ala、Ser和Lys;
- [0324] X₂为带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Gly、Glu、Ala、Val、Thr和Asp;
- [0325] X₃为带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Glu、Thr、Gly、Asp或Pro;
- [0326] X₄选自Thr、Ile、Gly、Lys、Asp和Gln;
- [0327] X₅为极性氨基酸、醇(具有游离羟基的氨基酸)或疏水氨基酸;或选自Thr、Ser、Val和Ala;
- [0328] X₆为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Arg、Val、Lys、Pro、Thr和Asn;并且
- [0329] X₇(若存在)为带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Pro、Gly、Phe、Asn和Arg。
- [0330] 作为非限制性实例,插入肽可包含选自LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列。
- [0331] 在一些情况下,插入肽在LGETTRP(SEQ ID NO:13)、NETITRP(SEQ ID NO:14)、KAGQANN(SEQ ID NO:15)、KDPKTTN(SEQ ID NO:16)、KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ

ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的任一个的氨基末端和/或羧基末端具有1-4个间隔氨基酸(Y₁-Y₄)。适合的间隔氨基酸包括但不限于亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸。

[0332] 例如,在一些情况下,插入肽具有下列氨基酸序列之一:LALGETTRPA(SEQ ID NO:45)、LANETITRPA(SEQ ID NO:46)、LAKAGQANNA(SEQ ID NO:47)、LAKDPKTTNA(SEQ ID NO:48)、LAKDITTRA(SEQ ID NO:61)、LARAGGSVGA(SEQ ID NO:62)、LAAVDTTKFA(SEQ ID NO:63)和LASTGKVPNA(SEQ ID NO:64)。再如,在一些情况下,插入肽具有下列氨基酸序列之一:AALGETTRPA(SEQ ID NO:49)、AANETITRPA(SEQ ID NO:50)、AAKAGQANNA(SEQ ID NO:51)和AAKDPKTTNA(SEQ ID NO:52)。又如,在一些情况下,插入肽具有下列氨基酸序列之一:GLGETTRPA(SEQ ID NO:53)、GNETITRPA(SEQ ID NO:54)、GKAGQANNA(SEQ ID NO:55)和GKDPKTTNA(SEQ ID NO:56)。再如,在一些情况下,插入肽包含在C端一侧为AA而在N端一侧为A的KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的其中一个;或包含在C端一侧为G而在N端一侧为A的KDTDTTR(SEQ ID NO:57)、RAGGSVG(SEQ ID NO:58)、AVDTTKF(SEQ ID NO:59)和STGKVPN(SEQ ID NO:60)的其中一个。

[0333] 主题重组AAV载体可用于生成如上所述的主题重组AAV病毒体。因此,本公开提供了当引入适合细胞内,可提供主题重组AAV病毒体的生成的重组AAV载体。

[0334] 本公开进一步提供了包含主题核酸的宿主细胞,例如经分离(经遗传修饰的)宿主细胞。主题宿主细胞可为分离细胞,例如体外培养的细胞。如下所述,主题宿主细胞可用于生成主题rAAV病毒体。主题宿主细胞用于生成主题rAAV病毒体时,将其称为“包装细胞”。在一些实施方案中,主题宿主细胞经主题核酸稳定地遗传修饰。在其它实施方案中,主题宿主细胞经主题核酸暂时地遗传修饰。

[0335] 使用确定技术,包括但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质体介导的转染等,稳定或暂时地将主题核酸引入宿主细胞中。为了稳定转化,主题核酸通常将进一步包括可选标记,例如几种众所周知的可选标记的任一种,例如新霉素抗性等。

[0336] 通过将主题核酸引入多种细胞的任一种,例如哺乳动物细胞,包括(例如)鼠科动物细胞和灵长类动物细胞(例如,人类细胞)中生成主题宿主细胞。适合的哺乳动物细胞包括但不限于原代细胞和细胞系,其中适合的细胞系包括但不限于293细胞、COS细胞、HeLa细胞、Vero细胞、3T3小鼠成纤维细胞、C3H10T1/2成纤维细胞、CHO细胞等。适合宿主细胞的非限制性实例包括(例如)HeLa细胞(例如美国模式培养物保藏所(ATCC)No. CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC No. CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC No. CRL-1573)、Vero细胞、NIH3T3细胞(例如,ATCC No. CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC No. CCL10)、PC12细胞(ATCC No. CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC No. CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC No. CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC No. CRL1573)、HLHepG2细胞等。也可使用杆状病毒感染产生AAV的昆虫细胞例如Sf9细胞制备主题宿主细胞(见,例如,美国专利No. 7,271,002;美国专利公布12/297,958)。

[0337] 在一些实施方案中,除包含如上所述编码变异AAV衣壳蛋白的核苷酸序列的核酸外,经遗传修饰的主题宿主细胞还包括包含编码一种或多种AAV rep蛋白的核苷酸序列的核酸。在其它实施方案中,主题宿主细胞进一步包含rAAV载体。可使用主题宿主细胞生成

rAAV病毒体。例如,在美国专利公布No.2005/0053922和美国专利公布No.2009/0202490中描述了生成rAAV病毒体的方法。

实施例

[0338] 提出下列实施例以便为本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的全面公开和描述,并非旨在限制发明人视为其发明的范围,也并非旨在表示以下实验是全部或唯一进行的实验。已经努力确保关于所用数字(例如,数量、温度等)的精确性,但是应考虑到一些实验误差和偏差。除非另外指出,份为重量份,分子量为重均分子量,温度按摄氏度计,而压力为或接近大气压。可使用标准偏差,例如bp,碱基对;kb,千碱基对;pl,皮升;s或sec,秒;min,分;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基对;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下等等。

[0339] 实施例1:视网膜细胞转导增强的AAV变异体

[0340] 所用方法是通过聚合酶链反应(PCR)诱变将独特AvrII位点引入野生型AAV2基因组介于氨基酸587和588之间产生肽展示库。使用随机21核苷酸插入,7mer For,连同反义引物7mer Rev一起合成dsDNA插入。用NheI消化后将所得dsDNA插入克隆至基因组的AvrII位点,生成不同的7mer展示库,然后包装7mer展示库(Perabo等,2003;Muller等,2003)。生成病毒,以致将每个病毒基因组包装或壳体化于该基因组编码的衣壳蛋白变异体中。在这点上,通过选择鉴定的功能改进可能与编码病毒衣壳中所含的这种改进功能的基因组序列有关联。

[0341] 使这个库在rho-GFP小鼠体内经受阳性选择(Wensel等(2005)Vision Res.45:3445)。简言之,在第一轮选择中,为成年rho-GFP小鼠玻璃体内注射2 μ L经磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析的碘克沙醇(iodixanol)纯化库,基因组滴度为约 1×10^{12} 个病毒基因组(vg)/mL。超细30 1/2-规一次性针头穿过动物眼睛的巩膜,在中纬线处并且靠近边缘,进入玻璃体腔。通过直接观察在玻璃体腔中央的针头注射2 μ L病毒。注射1周后,摘出眼睛并使用光、木瓜蛋白酶处理离视网膜,接着荧光激活细胞分选仪(FACS)分离光感受器群体。然后由后续基因组萃取PCR扩增成功的病毒体并进一步克隆和重新包装用于注射。

[0342] 进一步进行这种选择的重复,使变异体库缩小为具有大多数允许突变的亚类。重复3次后,进行一轮易错PCR以引起变异体的进一步生成以便选择。总计,重复这个过程两代。在这点上,与自然进化相似,这个定向进化过程通过应用阳性选择和诱变产生光感受器允许型AAV变异体。

[0343] 随后,为50种变异体的空位基因测序以确定最显著和成功的变异体具有供玻璃体内光感受器转导的允许突变。50个克隆中,46个产生7mer插入的可读序列。显著地,近三分之二的克隆含有同一个不同的7mer基序($\sim^{588}$ LGETTRP $\sim$;SEQ ID NO:13)。有趣的是,次显著变异体($\sim^{588}$ NETITRP $\sim$;SEQ ID NO:14)也含有由介于极性苏氨酸和非极性脯氨酸残基之间带正电的精氨酸残基组成的类似侧面基序(TRP)。

[0344] 表1

[0345]

克隆	近似频率(%)	频率
$\sim^{588}$ LGETTRP $\sim$;SEQ ID NO:13	64	31

~ ⁵⁸⁸ NETITRP~;SEQ ID NO:14	12	5
~ ⁵⁸⁸ KAGQANN~;SEQ ID NO:15	6	3
~ ⁵⁸⁸ KDPKTTN~;SEQ ID NO:16	4	2

[0346]

~ ⁵⁸⁸ KD TDTTR~;SEQ ID NO:57		2
~ ⁵⁸⁸ RAGGSVG~;SEQ ID NO:58		1
~ ⁵⁸⁸ AVDTTKF~;SEQ ID NO:59		1
~ ⁵⁸⁸ STGKVPN~;SEQ ID NO:60		1

[0347] 表1来自定向进化的分离变异体的测序显示了病毒库中高度收敛。所有变异体源自AAV27mer库,大约64%的变异体含有同一7mer基序(~⁵⁸⁸LGETTRP~(SEQ ID NO:13))。

[0348] 在7mer插入序列中,对特定位置有适度优先,例如位置1处带正电的氨基酸;位置2处带负电的氨基酸;位置5处的醇(例如,具有醇基(游离羟基)的氨基酸,例如Thr或Ser)。

[0349] 如表2所示,7mer插入两侧为间隔区:

[0350]

克隆	频率
~ ⁵⁸⁸ LALGETTRPA~(SEQ ID NO:45)	31
~ ⁵⁸⁸ LANETTRPA~(SEQ ID NO:46)	5
~ ⁵⁸⁸ LAKAGQANNA~(SEQ ID NO:47)	3
~ ⁵⁸⁸ LAKDPKTTNA~(SEQ ID NO:48)	2
~ ⁵⁸⁸ LAKD TDTTRA~(SEQ ID NO:61)	2
~ ⁵⁸⁸ LARAGGSVGA~(SEQ ID NO:62)	1
~ ⁵⁸⁸ LAAVDTTKFA~(SEQ ID NO:63)	1
~ ⁵⁸⁸ LASTGKVPNA~(SEQ ID NO:64)	1

[0351] 图1.在氨基酸587之后含有无规七聚物(橙色所示)的AAV2的代表性三维模型。AAV2衣壳的这个区域很可能参与细胞表面受体结合。

[0352] 根据来自上述选择的高度库收敛,克隆重组形式的AAV2~⁵⁸⁸LGETTRP~(SEQ ID NO:13;昵称7M8)并且包装具有scCAG-GFP转基因的载体以使其转导性质显现。成年小鼠玻璃体内注射3周后,观察到在许多细胞类型中稳健表达,包括视网膜神经节细胞(RGC)和缪勒细胞。重要的是,观察到正如通过外核层(ONL)细胞核(红色箭头)和外节(图2,蓝色箭头)中的GFP表达所见,注射了7M8的视网膜中光感受器转导,而AAV2未显示出可辨别的光感受器表达。

[0353] 图2.相对于AAV2(左),AAV27M8变异体(右)展现出更高水平的玻璃体内光感受器转导。成年小鼠玻璃体内注射2 μ L的 1×10^{12} vg/mL的AAV27M8和AAV2scCAG GFP3周后视网膜横切面的共聚焦显微镜检查。红色箭头(上)指示光感受器细胞核而蓝色箭头(上)指示光感受器外节。

[0354] 根据视网膜细胞中的这些增益,试图通过使用含有光感受器特异性视紫红质启动子的ssRho-eGFP转基因增加表达的特异性,以更好地解决特别是在光感受器中的转导效率(图3)。实际上,光感受器特异性Rho启动子的使用将GFP表达限于光感受器。试图通过使合理的设计方法与先前的定向进化方法结合提高7M8转导效率。因此,将7M8衣壳上4个表面暴

露的酪氨酸残基诱变为苯丙氨酸(Y273F、Y444F、Y500F和Y730F),这先前已经证实提高了光感受器感染性(Petrs-Silva等,2009)。有趣的是,正如对来自受7m8或7m8-4YF感染的视网膜的GFP(+)光感受器的FAC分选(图4)所示,与原病毒相比,突变的增加使转导的光感受器数量减少。

[0355] 图3.视网膜低温切片的代表性荧光图像,显示出由携带GFP基因的7m8,在普遍存在的CAG启动子(左)或光感受器特异性Rho启动子(右)的控制下产生的GFP表达。

[0356] 图4.通过流式细胞术计数的每一百万个视网膜细胞的GFP(+)光感受器细胞。与携带4个酪氨酸突变(上)的7m8相比,7m8转导超过 $2\times$ 量的光感受器。

[0357] **实施例2:视网膜劈裂症的治疗**

[0358] 使用表达构建体7m8-rho-RS1,将功能性网膜劈裂蛋白(RS1)递送至视网膜劈裂蛋白缺陷型小鼠(Rs1h缺陷型小鼠;Rs1h为人RS1的小鼠同源物)。载体包含在视紫红质启动子的转录控制下编码功能性视网膜劈裂蛋白的核苷酸序列。见图13A-C,其中粗体和加下划线的核苷酸序列(核苷酸4013-4851)为视紫红质启动子;并且核苷酸4866-5540(起始atg和终止tga序列以粗体显示)编码人RS1蛋白。

[0359] 在P15时,经玻璃体内向Rs1h-/-小鼠施用7m8-rho-RS1构建体。如所述,通过靶向破坏Rs1h基因的外显子3产生Rs1h-/-小鼠(Weber等(2002)Proc.Natl.Acad.Sci.USA99:6222)。Rs1h-/-小鼠缺乏Rs1h蛋白产物,具有负电性ERG(例如,约化b波,而a波相对保存)和与在人类视网膜劈裂症患者中所见类似的视网膜层裂开。向Rs1h-/-注射7m8-rho-RS1载体导致视网膜内来自光感受器的高水平全视网膜RS1表达。RS1表达导致视网膜形态改进,如频域光学相干断层(SD-OCT)成像(图7A-I)中所见视网膜内腔的数量和尺寸减小,ERG b波救援(图8A-D)和视网膜的结构长期保存(图9A-E)。

[0360] 图7A-I.注射了7m8-rho-GFP(左列)、7m8-rho-RS1(中间列)或未注射的野生型动物(右列)视网膜的代表性高分辨率SD-OCT图像。通过上视网膜的内核层得到眼底图像并且将其它层排除在外(a-c)。使用视神经乳头作为标志得到上视网膜(d-f)和下视网膜(g-i)的横向图像。

[0361] 因为病理由于使内视网膜裂开的劈裂而进展,当从内界膜(ILM)到光感受器测量时,未经治疗的RS1视网膜的总厚度增加。这个过程与在不形成劈裂,但是表现出INL中进行性光感受器细胞死亡及伴随视网膜变薄和ERG振幅减小的大多数视网膜退行性疾病(RDD)中所观察到的过程不同。在RS1中,当光感受器因疾病而死时ONL变薄,但是这不同于视网膜总厚度变化。通常认为,对RS1的成功治疗将使视网膜总厚度恢复为野生型并且改善ONL中的光感受器损失。在除Rs1的大多数RDD中,以ONL变薄为特征的光感受器损失伴有通过ERG振幅测量的视网膜生理输出减少。RS1是病理使视网膜厚度增加,而伴随erg振幅减小的视网膜疾病的很少几个实例之一。总之,恢复RS1基因产物,细胞外视网膜“胶”使视网膜变薄回野生型厚度并且因为劈裂消退,erg振幅恢复至接近正常水平。

[0362] 图8a示出了未经治疗的Rs1-/-眼与注射了AAV2-rho-RS1、7m8-rho-GFP和7m8-rho-RS1的眼在注射后1个月(左)和4个月(右)功能性救援的比较。注射后1个月,7m8-rho-RS1导致大量援救ERG b波振幅,而AAV2-rho.RS1与未经治疗的眼在统计上无区别。

[0363] 4个月后,7m8-rho-RS1振幅增大至野生型振幅(右)。图8b示出了注射了7m8-rho-RS1的眼的代表性ERG轨迹,显示与注射了7m8-rho-GFP的眼相比,a波和b波振幅增大并且波

形接近于野生型眼。图8c示出了从注射后1个月开始按月在每种情况的P15时记录的由高强度($11 \log \text{ cd} \times \text{s/m}^2$)刺激产生的全视野暗视b波的振幅。记录了3次反应并计算每只眼在每个时间点的平均值。

[0364] 根据注射后的时间绘制平均ERG b波振幅。 $n=7$ 用于两种情况。图8d示出了对暗视(上轨迹,刺激范围从-3到 $11 \log \text{ cd} \times \text{s/m}^2$)和明视(下轨迹,范围从-0.9到 $1.4 \log \text{ cd} \times \text{s/m}^2$)条件下ERG反应的分析,显示在一定刺激强度范围内杆状和锥状细胞功能改善。

[0365] 图9A-E.7m8-rho-RS1治疗后10个月测量的视网膜厚度持续增加。集中在视神经乳头注射后10个月经a)7m8-rho-RS1或b)或7m8-rho-GFP治疗的视网膜的代表性横向SD-OCT图像。作为与视神经乳头的距离的函数绘制c)视网膜厚度、d)ONL厚度和e)内外节厚度的测量值。

[0366] 实施例3:用于将蛋白质递送至猕猴视网膜细胞的AAV变异体

[0367] 生成重组AAV2病毒体(携带受连接蛋白36启动子控制的GFP的7m8)。重组AAV2病毒体包括在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间有LALGETTRPA肽插入的AAV2衣壳变异体,和受连接蛋白36启动子的转录控制的在中间神经元中表达的GFP。将rAAV2病毒体经玻璃体内注射至猕猴眼内。图18中示出了数据。

[0368] 图18提供了荧光眼底图像,显示在施用携带受连接蛋白36启动子控制的GFP的7m8后9周,在视网膜后部的GFP表达。与亲本AAV2血清型(Yin等,IO VS52(5);2775)相比,在视网膜中央凹环中看到更高水平的表达,并且在视网膜中央凹外的中央视网膜中看到可见荧光。

[0369] 参考文献

[0370] Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS(2007)Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa.Arch Ophthalmol125: 151-158.

[0371] Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, Visel M, Klimczak RR等人(2009)Inner Limiting Membrane Barriers to AAV Mediated Retinal Transduction from the Vitreous.Mol Ther.

[0372] den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP(2008)Leber congenital amaurosis:genes, proteins and disease mechanisms.Prog Retin Eye Res27:391-419.

[0373] Gruter O, Kostic C, Crippa SV, Perez MT, Zografos L等人(2005)Lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse photoreceptors is impaired by the presence of a physical barrier.Gene Ther12:942-947.

[0374] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F等人(2008)Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis.N Engl J Med358:2240-2248.

[0375] Mancuso K, Hauswirth WW, Li Q, Connor TB, Kuchenbecker JA等人(2009)Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates.Nature461:784-787.

[0376] McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG(2001)Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa.Mol Ther4:622-629.

- [0377] Muller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W 等人(2003) Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* 21:1040-1046.
- [0378] Nakazawa T. 等人(2007) Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2760-8.
- [0379] Nakazawa T. 等人(2006) Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis* 12:867-78.
- [0380] Perabo L, Buning H, Kofler DM, Ried MU, Girod A 等人(2003) In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther* 8:151-157.
- [0381] Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V 等人(2009) High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther* 17:463-471.
- [0382] Reme CE, Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP (2000) Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol Sci* 15:120-124.
- [0383] Rolling F (2004) Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther* 11 Suppl 1: S26-32.
- [0384] Wensel TG, Gross AK, Chan F, Sykoudis K, Wilson JH (2005) Rhodopsin-EGFP knock-ins for imaging quantal gene alterations. *Vision Res* 45:3445-3453.
- [0385] Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M 等人(2008) Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7827-7832.
- [0386] 虽然已经参考其特定实施方案描述了本发明,但是本领域的普通技术人员应理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可做各种变化并代替等效方案。另外,可做许多修改以适应特殊情况、材料、物质组合物、工艺、一种或多种工序,对本发明的目的、精神和范围可做许多修改。旨在使所有此类修改均属于所附权利要求的范围之内。

序列表

<110> Schaffer, David V.

Klimczak, Ryan R.

Koerber, James T.

Flannery, John G.

Dalkara Mourot, Deniz

Visel, Meike

Byrne, Leah C.T.

<120> 具有变异衣壳的腺相关病毒病毒体及其使用方法

<130> BERK-160WO

<150> 61/478,355

<151> 2011-04-22

<160> 64

<170> PatentIn 3.5 版

[0001]

<210> 1

<211> 733

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-2

<400> 1

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

	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 Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr	
	260	265 270
	Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His	
	275	280 285
	Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp	
	290	295 300
	Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val	
	305	310 315 320
[0003]	Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu	
	325	330 335
	Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr	
	340	345 350
	Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp	
	355	360 365
	Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser	
	370	375 380
	Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser	
	385	390 395 400
	Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu	
	405	410 415

	Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg	
	420 425 430	
	Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr	
	435 440 445	
	Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln	
	450 455 460	
	Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly	
	465 470 475 480	
	Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn	
	485 490 495	
[0004]	Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly	
	500 505 510	
	Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp	
	515 520 525	
	Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys	
	530 535 540	
	Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr	
	545 550 555 560	
	Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr	
	565 570 575	
	Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr	
	580 585 590	

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
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

[0005]

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
725 730

<210> 2

<211> 42

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-2

<400> 2

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg

I 5 10 15

Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu

20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val

35 40

<210> 3
<211> 42
<212> PRT
<213> 腺相关病毒-AAV-1

<400> 3

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser

I 5 10 15

[0006]

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu

20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val

35 40

<210> 4
<211> 42
<212> PRT
<213> 腺相关病毒-5

<400> 4

Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser

I 5 10 15

Ser Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val

20 25 30

Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val

35

40

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-AAV-6

<400> 5

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser

1

5

10

15

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu

20

25

30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val

35

40

[0007]

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-AAV-

<400> 6

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala

1

5

10

15

Ala Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu

20

25

30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val

35

40

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-AAV-8

<400> 7

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln
1 5 10 15

Gln Asn Thr Ala Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu
20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val
35 40

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

[0008] <213> 腺相关病毒-AAV-9

<400> 8

Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu
20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
35 40

<210> 9

<211> 42

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-AAV-10

<400> 9

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln
1 5 10 15

Ala Asn Thr Gly Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu
20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val
35 40

<210> 10

<211> 224

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Met Ser Arg Lys Ile Glu Gly Phe Leu Leu Leu Leu Leu Phe Gly Tyr
1 5 10 15

[0009]

Glu Ala Thr Leu Gly Leu Ser Ser Thr Glu Asp Glu Gly Glu Asp Pro
20 25 30

Trp Tyr Gln Lys Ala Cys Lys Cys Asp Cys Gln Gly Gly Pro Asn Ala
35 40 45

Leu Trp Ser Ala Gly Ala Thr Ser Leu Asp Cys Ile Pro Glu Cys Pro
50 55 60

Tyr His Lys Pro Leu Gly Phe Glu Ser Gly Glu Val Thr Pro Asp Gln
65 70 75 80

Ile Thr Cys Ser Asn Pro Glu Gln Tyr Val Gly Trp Tyr Ser Ser Trp
85 90 95

Thr Ala Asn Lys Ala Arg Leu Asn Ser Gln Gly Phe Gly Cys Ala Trp

100	105	110
Leu Ser Lys Phe Gln Asp Ser Ser Gln Trp Leu Gln Ile Asp Leu Lys		
115	120	125
Glu Ile Lys Val Ile Ser Gly Ile Leu Thr Gln Gly Arg Cys Asp Ile		
130	135	140
Asp Glu Trp Met Thr Lys Tyr Ser Val Gln Tyr Arg Thr Asp Glu Arg		
145	150	155
160		
Leu Asn Trp Ile Tyr Tyr Lys Asp Gln Thr Gly Asn Asn Arg Val Phe		
165	170	175
Tyr Gly Asn Ser Asp Arg Thr Ser Thr Val Gln Asn Leu Leu Arg Pro		
180	185	190

[0010]

Pro Ile Ile Ser Arg Phe Ile Arg Leu Ile Pro Leu Gly Trp His Val		
195	200	205
Arg Ile Ala Ile Arg Met Glu Leu Leu Glu Cys Val Ser Lys Cys Ala		
210	215	220
<210> 11		
<211> 247		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 11		

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met		
1	5	10
		15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu		
20	25	30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp His Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

Glu Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu
85 90 95

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

[0011] Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Met Val Leu Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
245

<210> 12

<211> 533

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

[0012] Met Ser Ile Gln Val Glu His Pro Ala Gly Gly Tyr Lys Lys Leu Phe
1 5 10 15

Glu Thr Val Glu Glu Leu Ser Ser Pro Leu Thr Ala His Val Thr Gly
20 25 30

Arg Ile Pro Leu Trp Leu Thr Gly Ser Leu Leu Arg Cys Gly Pro Gly
35 40 45

Leu Phe Glu Val Gly Ser Glu Pro Phe Tyr His Leu Phe Asp Gly Gln
50 55 60

Ala Leu Leu His Lys Phe Asp Phe Lys Glu Gly His Val Thr Tyr His
65 70 75 80

Arg Arg Phe Ile Arg Thr Asp Ala Tyr Val Arg Ala Met Thr Glu Lys
85 90 95

Arg Ile Val Ile Thr Glu Phe Gly Thr Cys Ala Phe Pro Asp Pro Cys
100 105 110

Lys Asn Ile Phe Ser Arg Phe Phe Ser Tyr Phe Arg Gly Val Glu Val
115 120 125

Thr Asp Asn Ala Leu Val Asn Val Tyr Pro Val Gly Glu Asp Tyr Tyr
130 135 140

Ala Cys Thr Glu Thr Asn Phe Ile Thr Lys Ile Asn Pro Glu Thr Leu
145 150 155 160

Glu Thr Ile Lys Gln Val Asp Leu Cys Asn Tyr Val Ser Val Asn Gly
165 170 175

[0013] Ala Thr Ala His Pro His Ile Glu Asn Asp Gly Thr Val Tyr Asn Ile
180 185 190

Gly Asn Cys Phe Gly Lys Asn Phe Ser Ile Ala Tyr Asn Ile Val Lys
195 200 205

Ile Pro Pro Leu Gln Ala Asp Lys Glu Asp Pro Ile Ser Lys Ser Glu
210 215 220

Ile Val Val Gln Phe Pro Cys Ser Asp Arg Phe Lys Pro Ser Tyr Val
225 230 235 240

His Ser Phe Gly Leu Thr Pro Asn Tyr Ile Val Phe Val Glu Thr Pro
245 250 255

Val Lys Ile Asn Leu Phe Lys Phe Leu Ser Ser Trp Ser Leu Trp Gly
260 265 270

Ala Asn Tyr Met Asp Cys Phe Glu Ser Asn Glu Thr Met Gly Val Trp
275 280 285

Leu His Ile Ala Asp Lys Lys Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Asn Lys Tyr
290 295 300

Arg Thr Ser Pro Phe Asn Leu Phe His His Ile Asn Thr Tyr Glu Asp
305 310 315 320

Asn Gly Phe Leu Ile Val Asp Leu Cys Cys Trp Lys Gly Phe Glu Phe
325 330 335

Val Tyr Asn Tyr Leu Tyr Leu Ala Asn Leu Arg Glu Asn Trp Glu Glu
340 345 350

[0014] Val Lys Lys Asn Ala Arg Lys Ala Pro Gln Pro Glu Val Arg Arg Tyr
355 360 365

Val Leu Pro Leu Asn Ile Asp Lys Ala Asp Thr Gly Lys Asn Leu Val
370 375 380

Thr Leu Pro Asn Thr Thr Ala Thr Ala Ile Leu Cys Ser Asp Glu Thr
385 390 395 400

Ile Trp Leu Glu Pro Glu Val Leu Phe Ser Gly Pro Arg Gln Ala Phe
405 410 415

Glu Phe Pro Gln Ile Asn Tyr Gln Lys Tyr Cys Gly Lys Pro Tyr Thr
420 425 430

Tyr Ala Tyr Gly Leu Gly Leu Asn His Phe Val Pro Asp Arg Leu Cys
435 440 445

Lys Leu Asn Val Lys Thr Lys Glu Thr Trp Val Trp Gln Glu Pro Asp
450 455 460

Ser Tyr Pro Ser Glu Pro Ile Phe Val Ser His Pro Asp Ala Leu Glu
465 470 475 480

Glu Asp Asp Gly Val Val Leu Ser Val Val Val Ser Pro Gly Ala Gly
485 490 495

Gln Lys Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Leu Asn Ala Lys Asp Leu Ser Glu
500 505 510

Val Ala Arg Ala Glu Val Glu Ile Asn Ile Pro Val Thr Phe His Gly
515 520 525

[0015] Leu Phe Lys Lys Ser
530

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro
1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 14

Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 15

Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn

1 5

[0016]

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 16

Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn

1 5

<210> 17

<211> 27

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

	<400> 17	
	cgcaaucagu gaaugcuuau acauceg	27
	<210> 18	
	<211> 5541	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 18	
[0017]	agcttggatc caatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta	60
	actatgttgc tecttttacg ctatgtgat acgtgcttt aatgcctttg tatcatgcta	120
	ttgcttcccg tatggcttgc attttctcct ccttgataa atcctggttg ctgtctcttt	180
	atgaggagti gtggcccggt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg ttgctgaag	240
	caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg accttcgctt	300
	tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc tgcctggacag	360
	gggctcggct gtggggcact gacaattccg tgggtgtgtc ggggaagctg acgtcctttc	420
	catggctgct cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc	480
	cttcggccct caatccagcg gaccttctt cccgggcct getgcggct ctgcggcctc	540
	ttccgctct tcgagatctg cctcgaactg gccttctagt tgccagccat ctgtgtttg	600
	ccccccccc gtgccttctt tgacctgga aggtgccact cccaactgcc ttctctaata	660
	aatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt	720
	ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg gggactcgag	780
	ttaagggcga attccccatt aggatcttcc tagagcatgg ctacgtagat aagtagcatg	840
	gcgggftaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga gttggccact cctctctgc	900

	gcgctcgtc gctcactgag gccgggagac caaaggctgc ccgacgccc ggctttgcc	960
	gggcgccctc agtgagcgag cgagcgcgca gccttaatta acctaatca ctggccgtcg	1020
	ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc ctgcagcac	1080
	atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc ccttcccaac	1140
	agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatca agcgcggcgg	1200
	gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgtcctt	1260
	tcgtttctt ccttctctt ctgcccactg tcgcgggtt tccccgcaa gctctaatc	1320
	gggggctccc tttagggctc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaactg	1380
	attaggtga tggttcacgt agtgggcat cgccccgata gacggtttt cgcccttga	1440
	cgctggagtt cacttctc aatagtgac tctgttcca aactggaaca acactcaacc	1500
[0018]	ctatctcggt ctattcttt gatftataag ggattttcc gatttcggcc tattggttaa	1560
	aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaatatta acgtttataa	1620
	tttcaggtgg catcttctgg ggaaatgtc gcggaacccc tattgttta ttttctaaa	1680
	tacattcaaa tatgtatcg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt	1740
	gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttatccc tttttgcgg	1800
	catttgcct tctgtttt gtcaccag aaacgtggt gaaagtaaa gatgctgaag	1860
	atcagttggg tgcacgagt gggtacatcg aactggatct caatagtgtt aagatcctg	1920
	agagtttcg ccccgaagaa cgtttccaa tgatgagcac tttaaagtt ctgctatgtg	1980
	gcgcggtatt atcccgatt gacgccggc aagagcaact cggtcgccg atacactatt	2040
	ctcagaatga ctgggtgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttac gatggcatga	2100
	cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taactgcg gccaaactac	2160
	ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgttt ttgcacaac atgggggatc	2220

	atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc	2280
	gtgacaccac gatgcctgta gtaatggtaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac	2340
	tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag	2400
	gaccacttct gcgctcgccc ctccggctg gctggttat tctgataaa tctggagccg	2460
	gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggttag cctcccgta	2520
	tctagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatga tgaacgaaat agacagatcg	2580
	ctgagatagg tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata	2640
	tactttagat tgatttaaaa ctctattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt	2700
	ttgataatct catgacaaaa atcccctaac gtgagtttct gttccactga gcgtcagacc	2760
	ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct	2820
	tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa	2880
[0019]	ctctttttcc gaaggtaact ggttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag	2940
	tgtagecgtg gttaggecac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc	3000
	tgctaactct gtfaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggftgg	3060
	actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca	3120
	cacagcccag ctggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	3180
	gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg	3240
	tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc	3300
	ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	3360
	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc tttgctgcg	3420
	gttttgctca catgttcttt cctgcgttat ccctgatcc tgttgataac cgtattaccg	3480
	cccttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga	3540

	gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgea aaccgcctct ccccgcgcggt tggccgattc	3600
	attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa	3660
	ttaatgtgag ttagctcaact cattaggeac ccagggttt acatttatg ctccggctc	3720
	gtatgtgtg tggaattgtg agcggataac aattcacac aggaacagc tatgaccatg	3780
	attacgccag atttaattaa ggtgcgcgc togetcetc actgaggccg cccgggcaaa	3840
	gccccggcgt cgggcgacct ttggtgccc ggctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga	3900
	gggagtggc aactccatca ctagggttc ctgtagtta atgattaac cgccatgcta	3960
	cttatctacg tagccatgct ctaggaagat cggaattcgc ccttaagcta gcagatcttc	4020
	cccacctagc caectggcaa actgtcctt ctctcaaagg cccaaacatg gctcccaga	4080
	ctgcaacccc caggcagfca ggccctgtct ccacaacctc acagccacc tggacggaat	4140
[0020]	ctgtcttc ccacattga gtctctca gcccctgagc tctctgggc agggctgttt	4200
	cttccatct ttgtattccc aggggcctgc aaataaatgt ttaatgaacg aacaagagag	4260
	tgaattccaa ttcattgcaa caaggattgg gtctctgggc cctaggetat gtgtctggca	4320
	ccagaaacgg aagctgcagg ttgcagcccc tgccctcatg gagctctcc tgcagagga	4380
	gtgtggggac tggatgactc cagaggtaac ttgtggggga acgaacaggt aaggggctgt	4440
	gtgacgagat gagagactgg gagaataaac cagaaagtct ctagtgtcc agaggacata	4500
	gcacagaggc ccatggctcc tatttcaaac ccaggccacc agactgagct gggaccttgg	4560
	gacagacaag tcatgcagaa gtaggggac cttctctcc ctttcttg atggatctg	4620
	agtaacctct cctccctgac ctcagcttc ctctagtgt cacttggcc cctcttagaa	4680
	gccaattagg cctcagttt ctgcagcggg gattaatatg attatgaaca ccccaatct	4740
	cccagatgct gattcagcca ggagcttagg agggggaggt cactttataa ggtctgggg	4800
	gggtcagaac ccagatcat ccctgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcgcccgcg	4860

	ccaccatgtc acgcaagata gaaggctttt tgttattact tctctttggc tatgaagcca	4920
	cattgggatt atcgtctacc gaggatgaag gcgaggaccc ctggtaccaa aaagcatgca	4980
	agtgcgatig ccaaggagga cccaatgtct tgtggtctgc aggtgccacc tccttgact	5040
	gtataccaga atgeccatat cacaagcctc tgggtttcga gtcaggggag gtcacaccgg	5100
	accagatcac ctgctctaac cgggagcagt atgtgggctg gtattcttcg tggactgcaa	5160
	acaaggcccg gctcaacagt caaggctttg ggtgtgcctg gctctccaag ttccaggaca	5220
	gtagccagtg gttacagata gatctgaagg agatcaaagt gatttcaggg atcctcacce	5280
	aggggcgctg tgacatgat gattggatga ccaagtacag cgtgcagtac aggaccgatg	5340
	agcgctgaa ctggatttac tacaaggacc agactggaaa caaccgggtc ttctatggca	5400
	actcggaccg caccctcacg gttcagaacc tgctgeggcc ccccatcctc tcccgttca	5460
[0021]	tccgctcat cccgtggggc tggcacgtcc gcattgcat ccgatggag ctgctggagt	5520
	gcgtcagcaa gttgctctga a	5541

<210> 19

<211> 346

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Met Ala Leu Leu Lys Val Lys Phe Asp Gln Lys Lys Arg Val Lys Leu

1 5 10 15

Ala Gln Gly Leu Trp Leu Met Asn Trp Phe Ser Val Leu Ala Gly Ile

20 25 30

Ile Ile Phe Ser Leu Gly Leu Phe Leu Lys Ile Glu Leu Arg Lys Arg

35 40 45

	Ser Asp Val Met Asn Asn Ser Glu Ser His Phe Val Pro Asn Ser Leu	
	50 55 60	
	Ile Gly Met Gly Val Leu Ser Cys Val Phe Asn Ser Leu Ala Gly Lys	
	65 70 75 80	
	Ile Cys Tyr Asp Ala Leu Asp Pro Ala Lys Tyr Ala Arg Trp Lys Pro	
	85 90 95	
	Trp Leu Lys Pro Tyr Leu Ala Ile Cys Val Leu Phe Asn Ile Ile Leu	
	100 105 110	
	Phe Leu Val Ala Leu Cys Cys Phe Leu Leu Arg Gly Ser Leu Glu Asn	
	115 120 125	
[0022]	Thr Leu Gly Gln Gly Leu Lys Asn Gly Met Lys Tyr Tyr Arg Asp Thr	
	130 135 140	
	Asp Thr Pro Gly Arg Cys Phe Met Lys Lys Thr Ile Asp Met Leu Gln	
	145 150 155 160	
	Ile Glu Phe Lys Cys Cys Gly Asn Asn Gly Phe Arg Asp Trp Phe Glu	
	165 170 175	
	Ile Gln Trp Ile Ser Asn Arg Tyr Leu Asp Phe Ser Ser Lys Glu Val	
	180 185 190	
	Lys Asp Arg Ile Lys Ser Asn Val Asp Gly Arg Tyr Leu Val Asp Gly	
	195 200 205	
	Val Pro Phe Ser Cys Cys Asn Pro Ser Ser Pro Arg Pro Cys Ile Gln	
	210 215 220	

Tyr Gln Ile Thr Asn Asn Ser Ala His Tyr Ser Tyr Asp His Gln Thr
225 230 235 240

Glu Glu Leu Asn Leu Trp Val Arg Gly Cys Arg Ala Ala Leu Leu Ser
245 250 255

Tyr Tyr Ser Ser Leu Met Asn Ser Met Gly Val Val Thr Leu Leu Ile
260 265 270

Trp Leu Phe Glu Val Thr Ile Thr Ile Gly Leu Arg Tyr Leu Gln Thr
275 280 285

Ser Leu Asp Gly Val Ser Asn Pro Glu Glu Ser Glu Ser Glu Ser Gln
290 295 300

[0023] Gly Trp Leu Leu Glu Arg Ser Val Pro Glu Thr Trp Lys Ala Phe Leu
305 310 315 320

Glu Ser Val Lys Lys Leu Gly Lys Gly Asn Gln Val Glu Ala Glu Gly
325 330 335

Ala Asp Ala Gly Gln Ala Pro Glu Ala Gly
340 345

<210> 20

<211> 470

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Met Ser His His Pro Ser Gly Leu Arg Ala Gly Phe Ser Ser Thr Ser
1 5 10 15

Tyr Arg Arg Thr Phe Gly Pro Pro Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ala Phe

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

[0024]

Glu Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Ala Ala Leu Arg Gly Glu		
115	120	125
Leu Ser Gln Ala Arg Gly Gln Glu Pro Ala Arg Ala Asp Gln Leu Cys		
130	135	140
Gln Gln Glu Leu Arg Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Gly Arg		
145	150	155 160
Glu Arg Asp Arg Val Gln Val Glu Arg Asp Gly Leu Ala Glu Asp Leu		
165	170	175
Ala Ala Leu Lys Gln Arg Leu Glu Glu Glu Thr Arg Lys Arg Glu Asp		
180	185	190
Ala Glu His Asn Leu Val Leu Phe Arg Lys Asp Val Asp Asp Ala Thr		

195 200 205

Leu Ser Arg Leu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser Leu Met Asp Glu

210 215 220

Ile Glu Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu Glu Leu Arg Asp Leu Gln

225 230 235 240

Val Ser Val Glu Ser Gln Gln Val Gln Gln Val Glu Val Glu Ala Thr

245 250 255

Val Lys Pro Glu Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ile Arg Ala Gln Tyr

260 265 270

Glu Ser Ile Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys

275 280 285

[0025]

Ser Lys Tyr Ala Asp Leu Ser Asp Ala Ala Asn Arg Asn His Glu Ala

290 295 300

Leu Arg Gln Ala Lys Gln Glu Met Asn Glu Ser Arg Arg Gln Ile Gln

305 310 315 320

Ser Leu Thr Cys Glu Val Asp Gly Leu Arg Gly Thr Asn Glu Ala Leu

325 330 335

Leu Arg Gln Leu Arg Glu Leu Glu Glu Gln Phe Ala Leu Glu Ala Gly

340 345 350

Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Ala Arg Leu Glu Glu Glu Leu Arg Gln Leu

355 360 365

Lys Glu Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Asn

370 375 380

Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu

385 390 395 400

Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Val Pro Val His Ser Phe Ala Ser

405 410 415

Leu Asn Ile Lys Thr Thr Val Pro Glu Val Glu Pro Pro Gln Asp Ser

420 425 430

His Ser Arg Lys Thr Val Leu Ile Lys Thr Ile Glu Thr Arg Asn Gly

435 440 445

Glu Val Val Thr Glu Ser Gln Lys Glu Gln Arg Ser Glu Leu Asp Lys

450 455 460

[0026]

Ser Ser Ala His Ser Tyr

465 470

<210> 21

<211> 1286

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Met Ser His Leu Val Asp Pro Thr Ser Gly Asp Leu Pro Val Arg Asp

1 5 10 15

Ile Asp Ala Ile Pro Leu Val Leu Pro Ala Ser Lys Gly Lys Asn Met

20 25 30

Lys Thr Gln Pro Pro Leu Ser Arg Met Asn Arg Glu Glu Leu Glu Asp

35 40 45

Ser Phe Phe Arg Leu Arg Glu Asp His Met Leu Val Lys Glu Leu Ser
50 55 60

Trp Lys Gln Gln Asp Glu Ile Lys Arg Leu Arg Thr Thr Leu Leu Arg
65 70 75 80

Leu Thr Ala Ala Gly Arg Asp Leu Arg Val Ala Glu Glu Ala Ala Pro
85 90 95

Leu Ser Glu Thr Ala Arg Arg Gly Gln Lys Ala Gly Trp Arg Gln Arg
100 105 110

Leu Ser Met His Gln Arg Pro Gln Met His Arg Leu Gln Gly His Phe
115 120 125

[0027] His Cys Val Gly Pro Ala Ser Pro Arg Arg Ala Gln Pro Arg Val Gln
130 135 140

Val Gly His Arg Gln Leu His Thr Ala Gly Ala Pro Val Pro Glu Lys
145 150 155 160

Pro Lys Arg Gly Pro Arg Asp Arg Leu Ser Tyr Thr Ala Pro Pro Ser
165 170 175

Phe Lys Glu His Ala Thr Asn Glu Asn Arg Gly Glu Val Ala Ser Lys
180 185 190

Pro Ser Glu Leu Val Ser Gly Ser Asn Ser Ile Ile Ser Phe Ser Ser
195 200 205

Val Ile Ser Met Ala Lys Pro Ile Gly Leu Cys Met Pro Asn Ser Ala
210 215 220

His Ile Met Ala Ser Asn Thr Met Gln Val Glu Glu Pro Pro Lys Ser
225 230 235 240

Pro Glu Lys Met Trp Pro Lys Asp Glu Asn Phe Glu Gln Arg Ser Ser
245 250 255

Leu Glu Cys Ala Gln Lys Ala Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ile Lys Glu
260 265 270

Lys Val Glu Leu Ile Arg Leu Lys Lys Leu Leu His Glu Arg Asn Ala
275 280 285

Ser Leu Val Met Thr Lys Ala Gln Leu Thr Glu Val Gln Glu Ala Tyr
290 295 300

[0028]

Glu Thr Leu Leu Gln Lys Asn Gln Gly Ile Leu Ser Ala Ala His Glu
305 310 315 320

Ala Leu Leu Lys Gln Val Asn Glu Leu Arg Ala Glu Leu Lys Glu Glu
325 330 335

Ser Lys Lys Ala Val Ser Leu Lys Ser Gln Leu Glu Asp Val Ser Ile
340 345 350

Leu Gln Met Thr Leu Lys Glu Phe Gln Glu Arg Val Glu Asp Leu Glu
355 360 365

Lys Glu Arg Lys Leu Leu Asn Asp Asn Tyr Asp Lys Leu Leu Glu Ser
370 375 380

Met Leu Asp Ser Ser Asp Ser Ser Ser Gln Pro His Trp Ser Asn Glu
385 390 395 400

	Leu Ile Ala Glu Gln Leu Gln Gln Gln Val Ser Gln Leu Gln Asp Gln	
	405	410 415
	Leu Asp Ala Glu Leu Glu Asp Lys Arg Lys Val Leu Leu Glu Leu Ser	
	420	425 430
	Arg Glu Lys Ala Gln Asn Glu Asp Leu Lys Leu Glu Val Thr Asn Ile	
	435	440 445
	Leu Gln Lys His Lys Gln Glu Val Glu Leu Leu Gln Asn Ala Ala Thr	
	450	455 460
	Ile Ser Gln Pro Pro Asp Arg Gln Ser Glu Pro Ala Thr His Pro Ala	
	465	470 475 480
[0029]	Val Leu Gln Glu Asn Thr Gln Ile Glu Pro Ser Glu Pro Lys Asn Gln	
	485	490 495
	Glu Glu Lys Lys Leu Ser Gln Val Leu Asn Glu Leu Gln Val Ser His	
	500	505 510
	Ala Glu Thr Thr Leu Glu Leu Glu Lys Thr Arg Asp Met Leu Ile Leu	
	515	520 525
	Gln Arg Lys Ile Asn Val Cys Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Ala Met Met	
	530	535 540
	Thr Lys Ala Asp Asn Asp Asn Arg Asp His Lys Glu Lys Leu Glu Arg	
	545	550 555 560
	Leu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Lys Asn Asn Arg Ile Lys Gln Leu Glu	
	565	570 575

Gly Ile Leu Arg Ser His Asp Leu Pro Thr Ser Glu Gln Leu Lys Asp
580 585 590

Val Ala Tyr Gly Thr Arg Pro Leu Ser Leu Cys Leu Glu Thr Leu Pro
595 600 605

Ala His Gly Asp Glu Asp Lys Val Asp Ile Ser Leu Leu His Gln Gly
610 615 620

Glu Asn Leu Phe Glu Leu His Ile His Gln Ala Phe Leu Thr Ser Ala
625 630 635 640

Ala Leu Ala Gln Ala Gly Asp Thr Gln Pro Thr Thr Phe Cys Thr Tyr
645 650 655

[0030] Ser Phe Tyr Asp Phe Glu Thr His Cys Thr Pro Leu Ser Val Gly Pro
660 665 670

Gln Pro Leu Tyr Asp Phe Thr Ser Gln Tyr Val Met Glu Thr Asp Ser
675 680 685

Leu Phe Leu His Tyr Leu Gln Glu Ala Ser Ala Arg Leu Asp Ile His
690 695 700

Gln Ala Met Ala Ser Glu His Ser Thr Leu Ala Ala Gly Trp Ile Cys
705 710 715 720

Phe Asp Arg Val Leu Glu Thr Val Glu Lys Val His Gly Leu Ala Thr
725 730 735

Leu Ile Gly Ala Gly Gly Glu Glu Phe Gly Val Leu Glu Tyr Trp Met
740 745 750

Arg Leu Arg Phe Pro Ile Lys Pro Ser Leu Gln Ala Cys Asn Lys Arg
755 760 765

Lys Lys Ala Gln Val Tyr Leu Ser Thr Asp Val Leu Gly Gly Arg Lys
770 775 780

Ala Gln Glu Glu Glu Phe Arg Ser Glu Ser Trp Glu Pro Gln Asn Glu
785 790 795 800

Leu Trp Ile Glu Ile Thr Lys Cys Cys Gly Leu Arg Ser Arg Trp Leu
805 810 815

Gly Thr Gln Pro Ser Pro Tyr Ala Val Tyr Arg Phe Phe Thr Phe Ser
820 825 830

[0031] Asp His Asp Thr Ala Ile Ile Pro Ala Ser Asn Asn Pro Tyr Phe Arg
835 840 845

Asp Gln Ala Arg Phe Pro Val Leu Val Thr Ser Asp Leu Asp His Tyr
850 855 860

Leu Arg Arg Glu Ala Leu Ser Ile His Val Phe Asp Asp Glu Asp Leu
865 870 875 880

Glu Pro Gly Ser Tyr Leu Gly Arg Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu
885 890 895

Ala Lys Asn Glu Ser Ile Lys Gly Asp Phe Asn Leu Thr Asp Pro Ala
900 905 910

Glu Lys Pro Asn Gly Ser Ile Gln Val Gln Leu Asp Trp Lys Phe Pro
915 920 925

Tyr Ile Pro Pro Glu Ser Phe Leu Lys Pro Glu Ala Gln Thr Lys Gly
 930 935 940

Lys Asp Thr Lys Asp Ser Ser Lys Ile Ser Ser Glu Glu Glu Lys Ala
 945 950 955 960

Ser Phe Pro Ser Gln Asp Gln Met Ala Ser Pro Glu Val Pro Ile Glu
 965 970 975

Ala Gly Gln Tyr Arg Ser Lys Arg Lys Pro Pro His Gly Gly Glu Arg
 980 985 990

Lys Glu Lys Glu His Gln Val Val Ser Tyr Ser Arg Arg Lys His Gly
 995 1000 1005

[0032] Lys Arg Ile Gly Val Gln Gly Lys Asn Arg Met Glu Tyr Leu Ser
 1010 1015 1020

Leu Asn Ile Leu Asn Gly Asn Thr Pro Glu Gln Val Asn Tyr Thr
 1025 1030 1035

Glu Trp Lys Phe Ser Glu Thr Asn Ser Phe Ile Gly Asp Gly Phe
 1040 1045 1050

Lys Asn Gln His Glu Glu Glu Glu Met Thr Leu Ser His Ser Ala
 1055 1060 1065

Leu Lys Gln Lys Glu Pro Leu His Pro Val Asn Asp Lys Glu Ser
 1070 1075 1080

Ser Glu Gln Gly Ser Glu Val Ser Glu Ala Gln Thr Thr Asp Ser
 1085 1090 1095

	Asp Asp	Val Ile Val Pro Pro	Met Ser Gln Lys Tyr	Pro Lys Ala
	1100	1105	1110	
	Asp Ser	Glu Lys Met Cys Ile	Glu Ile Val Ser Leu	Ala Phe Tyr
	1115	1120	1125	
	Pro Glu	Ala Glu Val Met Ser	Asp Glu Asn Ile Lys	Gln Val Tyr
	1130	1135	1140	
	Val Glu	Tyr Lys Phe Tyr Asp	Leu Pro Leu Ser Glu	Thr Glu Thr
	1145	1150	1155	
	Pro Val	Ser Leu Arg Lys Pro	Arg Ala Gly Glu Glu	Ile His Phe
	1160	1165	1170	
[0033]	His Phe	Ser Lys Val Ile Asp	Leu Asp Pro Gln Glu	Gln Gln Gly
	1175	1180	1185	
	Arg Arg	Arg Phe Leu Phe Asp	Met Leu Asn Gly Gln	Asp Pro Asp
	1190	1195	1200	
	Gln Gly	His Leu Lys Phe Thr	Val Val Ser Asp Pro	Leu Asp Glu
	1205	1210	1215	
	Glu Lys	Lys Glu Cys Glu Glu	Val Gly Tyr Ala Tyr	Leu Gln Leu
	1220	1225	1230	
	Trp Gln	Ile Leu Glu Ser Gly	Arg Asp Ile Leu Glu	Gln Glu Leu
	1235	1240	1245	
	Asp Ile	Val Ser Pro Glu Asp	Leu Ala Thr Pro Ile	Gly Arg Leu
	1250	1255	1260	

Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Lys
1265 1270 1275

Glu Met Thr Glu Asp Leu Phe Ser
1280 1285

<210> 22

<211> 240

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-1

<400> 22

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

[0034] His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala
85 90 95

Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr
100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser
115 120 125

Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala
130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser
165 170 175

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu
180 185 190

[0035] Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
225 230 235 240

<210> 23

<211> 240

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-6

<400> 23

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala
85 90 95

[0036] Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr
100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser
115 120 125

Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala
130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu
180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
225 230 235 240

<210> 24

<211> 240

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-3

<400> 24

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
1 5 10 15

[0037]

Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
20 25 30

Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln
35 40 45

Ser Arg Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln
50 55 60

Ala Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser
65 70 75 80

Lys Thr Ala Asn Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala
85 90 95

Ser Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro

100 105 110
Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His
115 120 125

Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu
130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Asn Thr Ala Pro Thr Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu
180 185 190

[0038]

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys
225 230 235 240

<210> 25

<211> 240

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-2

<400> 25

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
1 5 10 15

	Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
	20 25 30
	Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser
	35 40 45
	Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
	50 55 60
	Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
	65 70 75 80
	Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr
	85 90 95
[0039]	Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala
	100 105 110
	Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly
	115 120 125
	Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile
	130 135 140
	Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro
	145 150 155 160
	Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly
	165 170 175
	Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro
	180 185 190

Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
195 200 205

Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met
210 215 220

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
225 230 235 240

<210> 26

<211> 243

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-8

<400> 26

[0040] Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
50 55 60

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

[0041] Gln Gln Gln Asn Thr Ala Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly
180 185 190

Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly
195 200 205

Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser
210 215 220

Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu
225 230 235 240

Ile Lys Asn

<210> 27

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 27

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
50 55 60

[0042]

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr

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

[0043]

Ile Lys Asn

<210> 28
<211> 241
<212> PRT
<213> 腺相关病毒-rh8

<400> 28

Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr
35 40 45

Gln Thr Leu Ala Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln
50 55 60

Ala Arg Asn Trp Val Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Thr Asn Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala
85 90 95

Ala Lys Phe Lys Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val
100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Asp Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser
115 120 125

[0044] Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp
130 135 140

Tyr Ser Gln Val Leu Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala
165 170 175

Ala Asn Thr Gln Ala Gln Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile
180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu
210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
225 230 235 240

Asn

<210> 29

<211> 243

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-10

<400> 29

Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

[0045] Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln
35 40 45

Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser
50 55 60

Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro
100 105 110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn
130 135 140

Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gln Ala Asn Thr Gly Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly
180 185 190

[0046] Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly
195 200 205

Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser
210 215 220

Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu
225 230 235 240

Ile Lys Asn

<210> 30

<211> 242

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-7

<400> 30

Phe Glu Phe Ser Tyr Ser Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Gly Asn Arg Glu Leu Gln Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala
50 55 60

Glu Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

[0047] Val Ser Lys Thr Leu Asp Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Val Asn Pro
100 105 110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr
130 135 140

Thr Leu Glu Asn Val Leu Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln
165 170 175

Ala Ala Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala
180 185 190

Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro
195 200 205

Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro
210 215 220

Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
225 230 235 240

Lys Asn

[0048] <210> 31
<211> 240
<212> PRT
<213> 腺相关病毒-9

<400> 31

Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln
35 40 45

Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln
50 55 60

Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser

65	70	75	80	
Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala				
	85	90	95	
Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro				
	100	105	110	
Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser				
	115	120	125	
Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp				
	130	135	140	
Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn				
	145	150	155	160
[0049]				
Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser				
	165	170	175	
Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu				
	180	185	190	
Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile				
	195	200	205	
Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu				
	210	215	220	
Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys				
	225	230	235	240
<210> 32				

<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 32

Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
35 40 45

[0050] Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
50 55 60

Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
65 70 75 80

Thr Val Thr Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
85 90 95

Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
100 105 110

Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
115 120 125

Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
130 135 140

Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
145 150 155 160

Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Gly
165 170 175

Gln Ala Gln Ala Ala Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro
180 185 190

Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
195 200 205

Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met
210 215 220

[0051] Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
225 230 235

<210> 33

<211> 240

<212> PRT

<213> 腺相关病毒-5

<400> 33

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
35 40 45

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
50 55 60

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
85 90 95

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
100 105 110

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
115 120 125

[0052] Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
130 135 140

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
145 150 155 160

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
165 170 175

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
180 185 190

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
195 200 205

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
210 215 220

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
225 230 235 240

<210> 34

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

[0053]

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala
85 90 95

Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr
100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser
115 120 125

Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala
130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser
165 170 175

Ser Ser Thr Asp Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Pro Ala
180 185 190

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
195 200 205

[0054] Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
210 215 220

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
225 230 235 240

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
245 250

<210> 35

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 35

	Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala	
	1 5 10 15	
	His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr	
	20 25 30	
	Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn	
	35 40 45	
	Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln	
	50 55 60	
	Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser	
	65 70 75 80	
[0055]	Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala	
	85 90 95	
	Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr	
	100 105 110	
	Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser	
	115 120 125	
	Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala	
	130 135 140	
	Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn	
	145 150 155 160	
	Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser	
	165 170 175	

Ser Ser Thr Asp Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Pro Ala
 180 185 190

Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 195 200 205

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 210 215 220

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 225 230 235 240

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 245 250

[0056]

<210> 36

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
 1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
 20 25 30

Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser
 35 40 45

Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
 50 55 60

	Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys	
	65	70 75 80
	Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr	
		85 90 95
	Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala	
	100	105 110
	Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly	
	115	120 125
	Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile	
	130	135 140
[0057]	Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro	
	145	150 155 160
	Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly	
	165	170 175
	Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Arg Gln Ala Ala Thr	
	180	185 190
	Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp	
	195	200 205
	Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr	
	210	215 220
	Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys	
	225	230 235 240

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 37

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 37

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

[0058]

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
50 55 60

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gln Gln Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Thr Ala
180 185 190

[0059] Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
195 200 205

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
210 215 220

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
225 230 235 240

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 38

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 38

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
50 55 60

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

[0060]

Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gly Gln Arg Gly Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Gln Ala Ala
180 185 190

Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp
195 200 205

Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
210 215 220

His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
225 230 235 240

Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

[0061]

<210> 39
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 39

Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr
35 40 45

	Gln Thr Leu Ala Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln	
	50 55 60	
	Ala Arg Asn Trp Val Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser	
	65 70 75 80	
	Thr Thr Thr Asn Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala	
	85 90 95	
	Ala Lys Phe Lys Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val	
	100 105 110	
	Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Asp Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser	
	115 120 125	
[0062]	Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp	
	130 135 140	
	Tyr Ser Gln Val Leu Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn	
	145 150 155 160	
	Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala	
	165 170 175	
	Ala Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Thr Gln Ala Gln	
	180 185 190	
	Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln	
	195 200 205	
	Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His	
	210 215 220	

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
225 230 235 240

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 40

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 40

Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

[0063]

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln
35 40 45

Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser
50 55 60

Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro
100 105 110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn
130 135 140

Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gln Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Ala Asn Thr Gly
180 185 190

[0064] Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
195 200 205

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
210 215 220

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
225 230 235 240

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 41

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 41

Phe Glu Phe Ser Tyr Ser Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Gly Asn Arg Glu Leu Gln Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala
50 55 60

[0065]

Glu Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Lys Thr Leu Asp Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Val Asn Pro
100 105 110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr
130 135 140

Thr Leu Glu Asn Val Leu Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr
145 150 155 160

Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln
165 170 175

Ala Ala Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Thr Ala Ala
180 185 190

Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp
195 200 205

Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
210 215 220

His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
225 230 235 240

Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

[0066]

<210> 42

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 42

Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln
35 40 45

Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln
50 55 60

Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala
85 90 95

Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro
100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser
115 120 125

[0067] Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp
130 135 140

Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser
165 170 175

Ala Gln Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Gln Ala Gln Thr
180 185 190

Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
195 200 205

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
210 215 220

Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys
225 230 235 240

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
245

<210> 43

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 43

[0068] Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
35 40 45

Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
50 55 60

Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
65 70 75 80

Thr Val Thr Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
85 90 95

Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
100 105 110

Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
115 120 125

Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
130 135 140

Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
145 150 155 160

Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Gly
165 170 175

Gln Ala Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Gln Ala Ala Thr Gly
180 185 190

[0069]

Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg
195 200 205

Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp
210 215 220

Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His
225 230 235 240

Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
245

<210> 44

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 44

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser

1 5 10 15

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp

20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln

35 40 45

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp

50 55 60

[0070] Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly

65 70 75 80

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu

85 90 95

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr

100 105 110

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile

115 120 125

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu

130 135 140

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg

145 150 155 160

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Leu
165 170 175

Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ala Thr
180 185 190

Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro Gly Ser Val Trp Met Glu
195 200 205

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr
210 215 220

Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
225 230 235 240

[0071] His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 45

Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 46

Leu Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 47

Leu Ala Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala

1 5 10

[0072]

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 48

Leu Ala Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala

1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 49

Ala Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 50

Ala Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5 10

[0073]

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 51

Ala Ala Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala

1 5 10

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 52

Ala Ala Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 53

Gly Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala

1 5

[0074]

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 54

Gly Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 55

Gly Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 56

Gly Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0075]

<220>

<223> 合成多肽

<400> 57

Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 58

Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 59

Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe

1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0076]

<223> 合成多肽

<400> 60

Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn

1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 61

Leu Ala Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg Ala

1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 62

Leu Ala Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0077] <220>
<223> 合成多肽

<400> 63

Leu Ala Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 64

Leu Ala Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn Ala
1 5 10

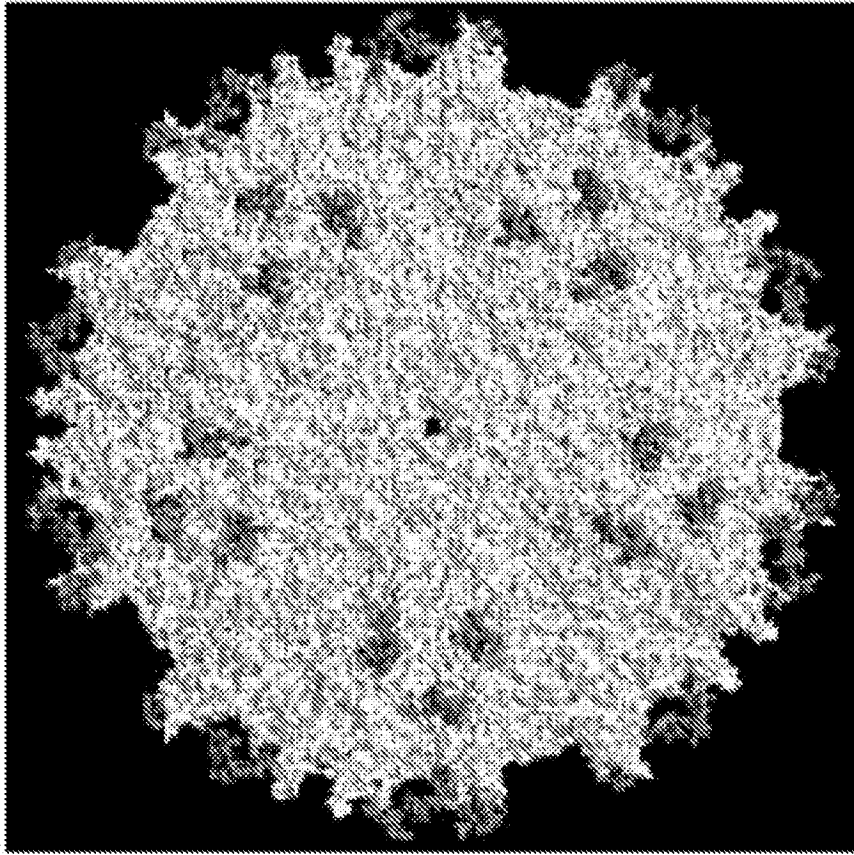


图1

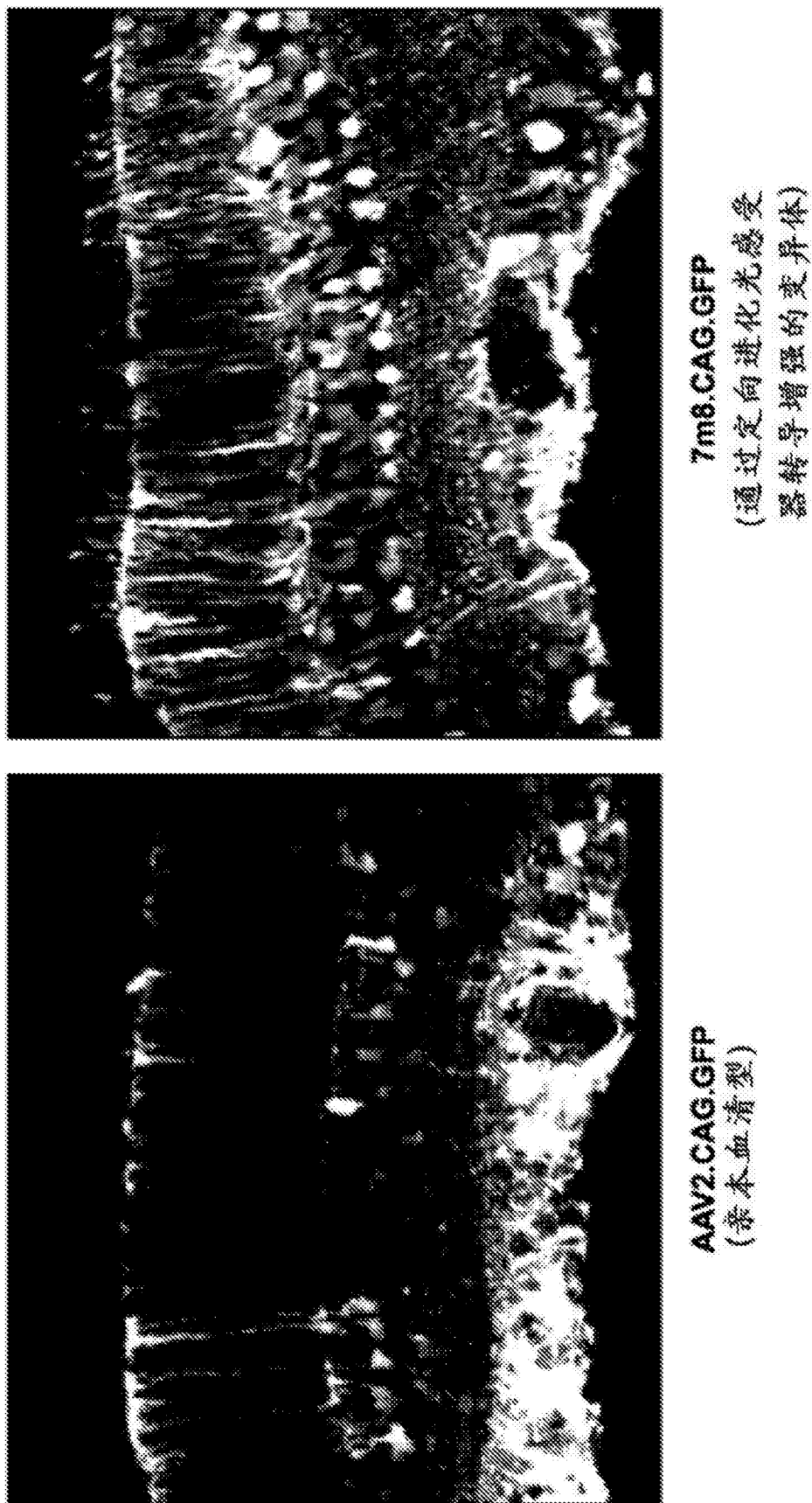


图2

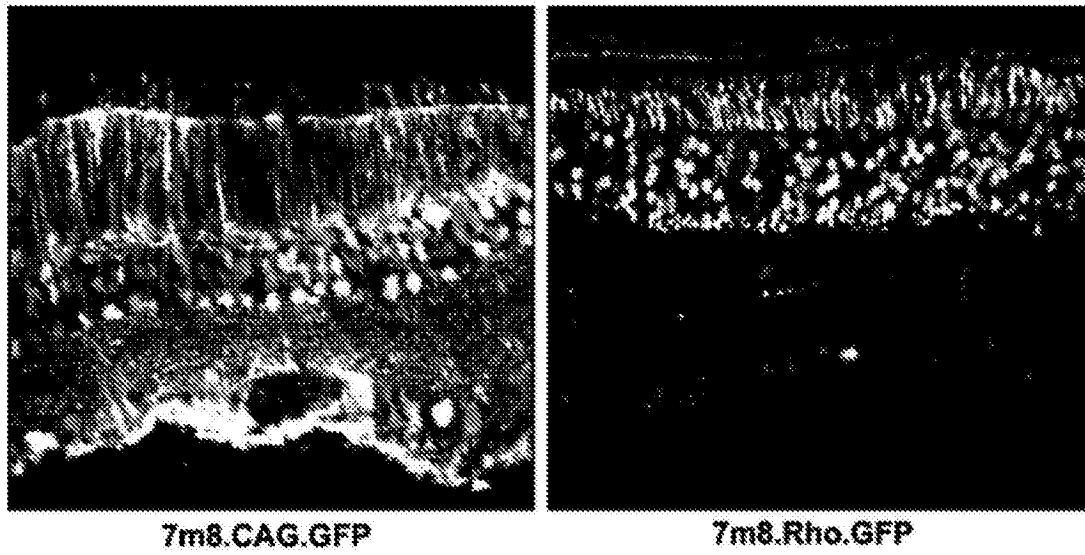


图3

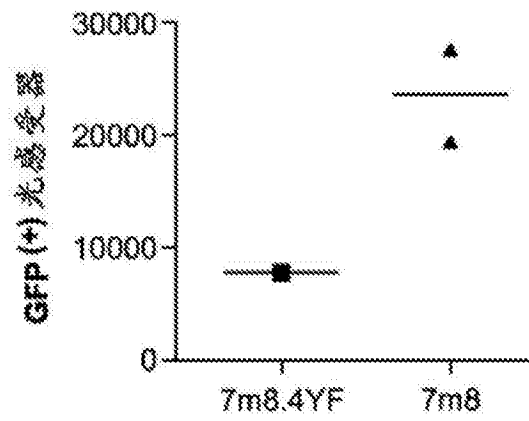


图4

```

AAV2 VP1 1  MAADGYLEPDWLEDTLSEGIRQWKLKFGEPFKPAERHKDDSRGLVLPQYKYLGFENGLO
AAV2 VP1 61  KGEFVNEADAAALEHDKAYDQDQSGDNFYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGCNLGRAVFQ
AAV2 VP1 121 AKKRVLPLGLVEEFVKTAFCQKKRVEHSEVEPDSSSGTGKAGQQFARKRLNFGQTGDAD
AAV2 VP1 181 SVEDFQPLGQFEAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWNGDRV1
AAV2 VP1 241 TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNNHYFGYSTFWGYFDNRFHCHESFRDWQRLI
AAV2 VP1 301 NNNWGFRRPKRLNFKLENIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLFYVLESAHQG
AAV2 VP1 361 CLPEPPADVFMVPOYGYLTILNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSQMLRTGNFTFSYTFEDVPE
AAV2 VP1 421 HSSYAHSQSLDELMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSEQLQFSQAGASDIRDQSENWLPG
AAV2 VP1 481 PCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWIGATKYHLNGRDSL VNEGFPAMASHKDDDEKFFEQSGVL
AAV2 VP1 541 IFCKQGSKNTNVDIEKVMITDEEIRTTNEVATEQYGSVSTNLQKGNRQCAATADVNTQGV
AAV2 VP1 601 LFCMTWQDRDVYLQGPINAKIEPHTDGHFESP LMGFGCLKHPPQILIKNTVPANFSTT
AAV2 VP1 661 FSAAKFASFITQYSTGOVSVEIEWELQKENSKEWNP EIQYTSYNKSNVVDFTVDINGVY
AAV2 VP1 721 SEPRPICRILTR (SEQ ID NO:1)

```

图5

AAV-2	570	PVATEQYGSVSTNLQRCN <u>NR</u> QAATADVNTQGVLPGMVWQDRDV	611	(SEQ ID NO:2)
AAV-1	571	PVATERFGTVAVNFOSSST <u>DP</u> ATGVDVHAMGALPGMVWQDRDV	612	(SEQ ID NO:3)
AAV-5	560	RVAYNVGGQMATNNQ <u>SS</u> TTTAPATGTYNLQEIIVPGSVNNMERDV	601	(SEQ ID NO:4)
AAV-6	571	PVATERFGTVAVNLOSSST <u>DP</u> ATGVDVHVHGALPGMVWQDRDV	612	(SEQ ID NO:5)
AAV-7	572	PVATEEYGIVSSNLQAA <u>NT</u> AACTQVVNNQGALPGMVWQNDRDV	613	(SEQ ID NO:6)
AAV-8	573	PVATEEYGIVADNLQQQ <u>NT</u> APQIGTVNSQGALPGMVWQNDRDV	614	(SEQ ID NO:7)
AAV-9	571	PVATESYGOVATNHQSA <u>QA</u> CAQTGWVQNQGILEPGMVWQDRDV	612	(SEQ ID NO:8)
AAV-10	573	PVATEQYGVVADNLQ <u>QA</u> NTGPIVGNVNSQGALPGMVWQNDRDV	614	(SEQ ID NO:9)

图6

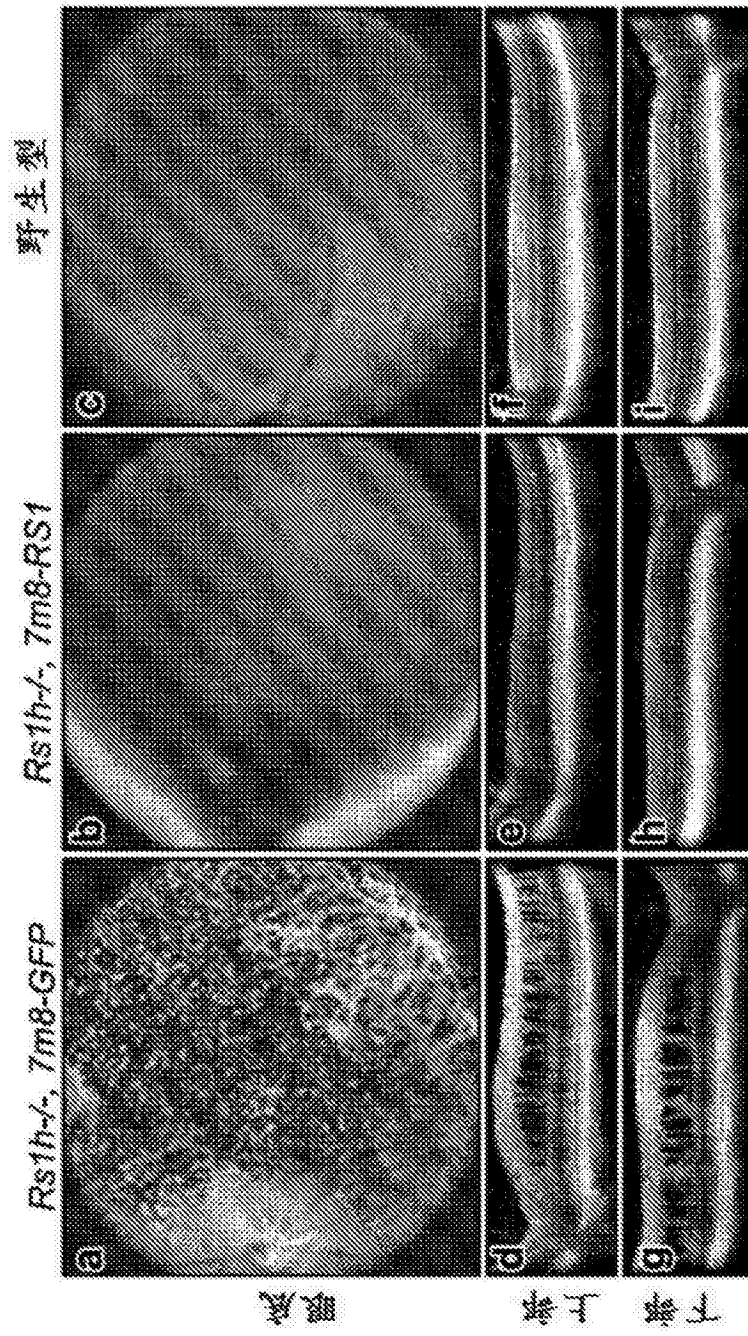


图7

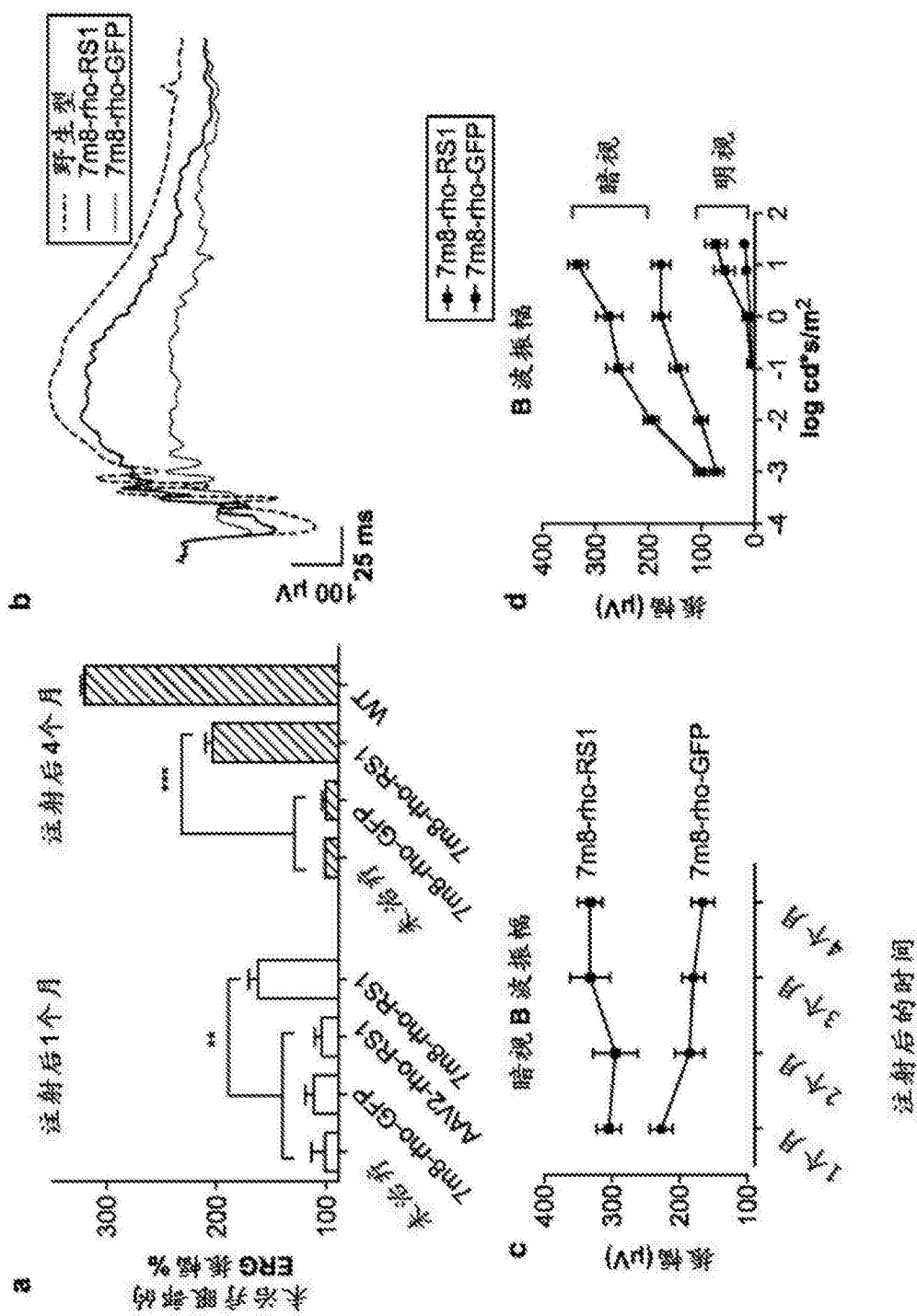


图8

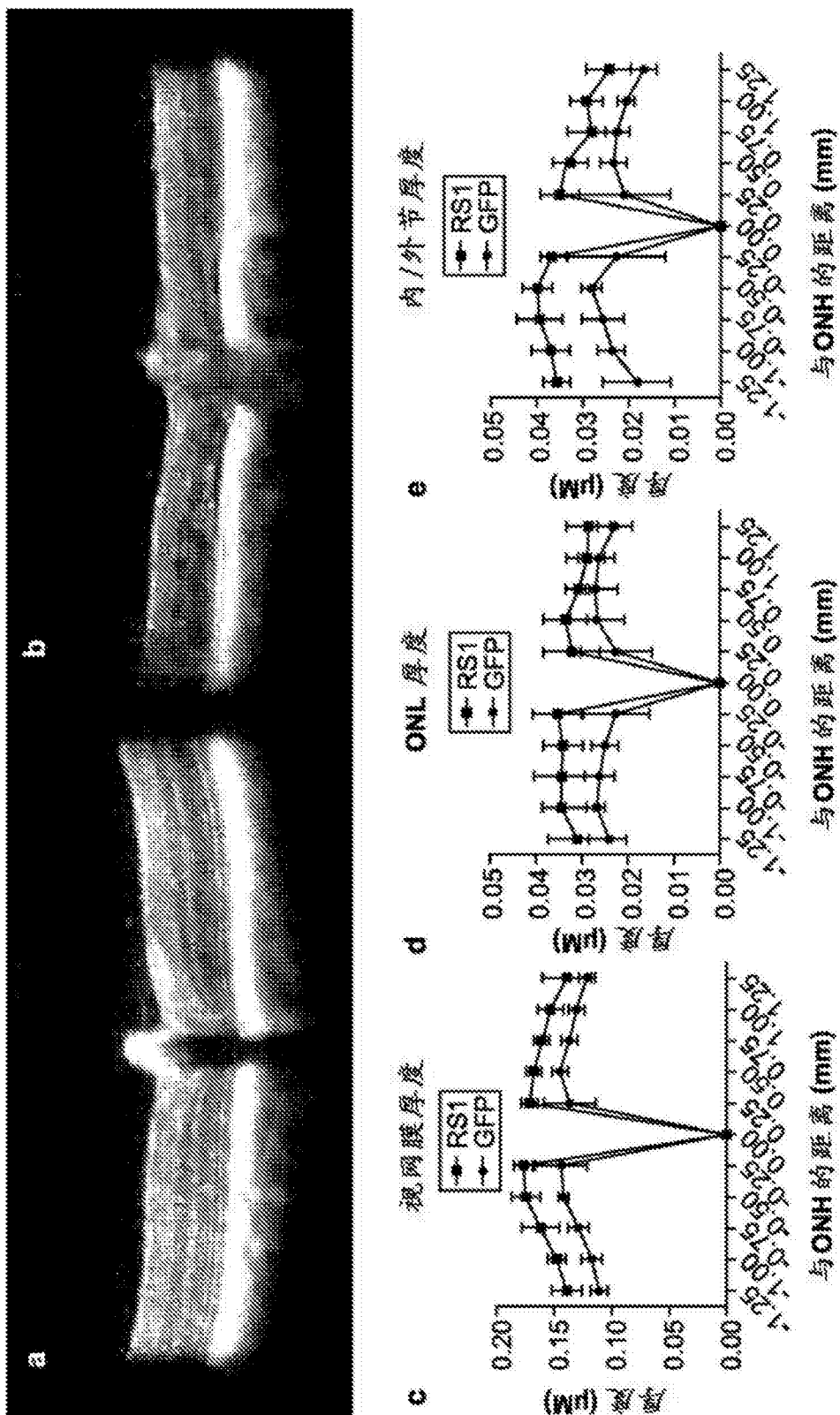


图9

视网膜劈裂蛋白-1

智人

基因库 CAI42483

```

1  msrkiegfll lllfgyeatl glstedege dpwyqkackc dcqggpnalw sagatsldci
61  pecpyhkpig fesgevtpdq itcsnpegyv gwysswtank arlnsqgfgc awlskfqds
121 qwlqidlkei kvisgiltqg rcdidewmtk ysvqyrtder lnwlyykdqt gnnrvfygns
181 drtstvtqnl rppliisfir lliplgwhvri airmellecv skca (SEQ ID NO:10)

```

图10

脑源性神经营养因子

智人

基因库 CAA62632

```

1  mtilfltmvi syfgcmkaap mkeanirgqg glaypgvrth gtlesvngpk agsrgltsla
61  dtfehvieel ldedhkvrpn eennkdadly tsrvmlssqv plepplflle eeyknyldaa
121 nmssmvlrhe dparrgelsv cdsisewvta adkktavdms ggtvtvlekv pvskgqlkqy
181 fyetkcnpmg ytkegcrgid krhwnsqcrt tqsyvraltm dskkrigwrf iridtsocvt
241 llikrgr (SEQ ID NO:11)

```

图11

RPE65

智人

基因库 AAC39660

```

1  msiqvehpag gykklfetve elsspltahv tgriplwltg slircpgglf evgsepfyhl
61  fdgqallhkf dfkeghvtyh rrfirtdayv ramtekriwi tefgtcafpd pcknifsrff
121 syfrgvevtd nalvnvypvg edyyactetn fitkinpetl etikqvdlon yvsvngatah
181 phiendgtvy nigncfqknf slayniivkip plqadkedpi ekseiivvqfp csdrfkpsyv
241 hsfgltpnyi vfvetpvkin lfklsswsl wganymdcfe snetmgvwlh iadkkrkky1
301 nnkyrtspfn lfhhintyed ngflivdlcc wkgfefvyny lylanlrenw eevkknarka
361 pqpevriryvl plnidkadtg knlvtlpntt atailcsdet iwlepevlfs gprqafefpq
421 inyqkycgkp ytyayglgn hfvpdrickl nvktketwvw gepdsypsep ifvshpdale
481 eddgvvlsvv vspgagqkpa yllilnakdl sevaraeevi nipvtfhglf kks (SEQ ID NO:12)

```

图12

1 agccttggaac caatcmaact ctggattaca aaatttgtga aaatttgtga aagattgact ggtattctctta
 61 actatgttgc tcccttttacc tatgttggat acgttgtcttc aatgttgtttg aatgttgtttg tatcatgtcta
 121 ttgctttcccg tatgttttc tatgttttc atttttttc ttctgtataa cctgtgtttg atcctgtgttg cctgtgtttt
 181 atgaggaagt gtggtgtgtt gtggtgtgtt gtggtgtgtt gtggtgtgtt gtggtgtgtt gtggtgtgtt gtggtgtgtt
 241 caacccccc ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 301 tccccctcc ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 361 ggtgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 421 catgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 481 ctccgtgtgt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 541 ttccgtgtgt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 601 cccctccccc ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 661 aaatgagga ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 721 ggtgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 781 ttaaggggga ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 841 gctgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 901 gctgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 961 ggtgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1021 ttctacaaag ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1081 atccccctt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1141 agttgtgtgt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1201 gtgtgtgtgt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1261 ttgtgtgtgt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1321 ggtgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1381 attgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1441 ggtgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1501 ctatctcgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1561 aaattgaggt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1621 ttccaggtgt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1681 taccattcaaa ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1741 gaaaaagga ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt
 1801 catctgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt ttgtgtgtt

图13A

```

1861 atcagtttggg tgcacgagtg ggttacatcg aacaggatct caatagtcgtt aagatcccttg
1921 agagtttttgg ccccgagaga cgtttttccaa tgaagagccac ttttaagttt ctgctatgtg
1981 gcgogggtatt atccggtatt gaocgcgggc aagagcaact cggctggcgc atacactatt
2041 ctacgaatga cttggttgag tactccacag tcacagaaa gcattcttao gatggcatga
2101 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtg taacctgpg gcaacttac
2161 ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttc ttgacacac atgggggagc
2221 atgtaaatcg ccttgatcgt tgggaacccg agctgaatga agccatacca aacgacgagc
2281 gtgacacac gatgcctgtg gtaatggtta caacgttcg caaacattca actggcgaaac
2341 tacttaactc agcttcccg caacaaattaa tagagtcgat ggaaggcgat aaggttgcag
2401 gaccacttct ggcctcgcc ctctcggctg cacttggttat tgcctgataa tctggagccg
2461 gtgagcgttg gcttcgctgt atcattgctg cacttggttg agatggtaag ccttccctta
2521 tctgagttat ctacacgact ggtgagtcag gatactatga tgaacgaaat agacagatatc
2581 ctgagatag tgcctcactg attaaagcatt cgttaactgtc agacaaagt cactaatata
2641 tacttttagat tgatttaaaa ctctattttt aatttaaaa gattctaggtg aagatccctt
2701 ttgataactc catgaccaaa atcccttaac gttagtttc gttccactga ggttcagaac
2761 ccytagaaaa gatcaaaagg ctacttcagg atccttttt tctgcgcgtg atctgctgct
2821 tgcaaaacaaa aaaaaccacg ctaccagcgg gaggcgagat aaccaaatat gtcccttatg
2881 ctctttttcc gaaggttaac ggtcttcagca actctgtagc accgcctaca taccctcgtc
2941 tctagccgtg gttaggccac cacttcagga actctgtagc gtggcgataa gtctgtcttt
3001 tctaatctc gttaccagtg actgctgcca gtggcgataa gtggcgataa accggtgttg
3061 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaaacgggg ggttcgtgca
3121 cacagccacg ctgggagcga acgacctaca ccgaactgag agcgtacag cgtgagctat
3181 gagaaagcgc caagcttccc gaagggagaa aggcgggacag gttaccggta agcggcaggg
3241 tggaaaacgg agagcgcaat gacttgagc gttgatttt gtggcgataa lcaagggggg
3301 ctgtcgggtt tcgcacctc tgacttgagc ctttttttct gttctggctg lcaagggggg
3361 ggagcctatg gaaaaagcc agcaacgcgg ctttttttct gttctggctg lcaagggggg
3421 gttttgtcca catgtttctt cctgcgttat cctctgatto tcttggtggc ttttggtggc
3481 cctttgagtg agctgatac gctcgcggca gccgaagac cgtggataac cgtattacg
3541 gcagaggaag ggaagagcgc ccaatacgcg gctcgcggca gccgaagac cgtattacg
3601 attaatgcag ctggcacgac aggttttccc actggaaagc actggagtcg cgtcaacgaa
3661 ttaetgtgag ttagctcaat catlagggac ccttagggctt acaactttat cttccggctc

```

图13B


```

3721 gcatgttggtg tggaaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacacg tatgacccatg
3781 attacggccag atttaattaa ggcggcggcg tccctcgttc actgagggcg cccggggcaaa
3841 gcccgggcggt cggcgagact ttggctggccc ggcctcagtg agcgagcgag cggcgagaga
3901 gggagtgggc aactccatca ctaygggttc ctgttagtta atgallaaac cggcatgtct
3961 ctatctacg tagccatgct ctagggaagt cggaaattgc cottaagcta gcatatcttc
4021 cccacctagc cacctggcaa actgctcctt ctctcaagg cccaacatg cctccccaga
4081 ctgcaacccc caggcagtc cgcctgtctt ccacaacctc acagccccc tggacggaat
4141 ctgctctctt cccatttga gtctcctca gcccctgagc tctctgggc agggctgttt
4201 ctctccatct ttgtattccc agggcctgc aaataaatgt ttaatgaag acaagagag
4261 tgaattccaa ttccatgcaa caaggatgg gtctctgggc cctaggctat gttctctggc
4321 ccagaaacgg aagctgcagg ttgcagcccc tgcctcatg gactctctcc tctcagagga
4381 gtctggggac tggatgactc cagaggtaac ttgtggggga acaaacaggt aagggctgtt
4441 gtacagagat gaagactgg gaaataaac cagaagtct ctactgtctc aagggacata
4501 gcacagaggg ccatgtctcc tatttcaaac ccaggccacc agactgagct gggaccttgg
4561 gacagacaa gtcctgcaa gttaggggac cttctctccc ctthctctgg atggatcctg
4621 agtaccttct cctccctgac ctacggcttc ctctagtgt cactttggcc cctcttagaa
4681 gccaattagg cctctagttt ctgcagcggg gattaatatg attatgaaca cccccatct
4741 cccagatgct gattcagcca ggaacttagg agggggaggt cactttataa ggtctctggg
4801 gggtcagaa ccagagtcct cccctgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcggcgcg
4861 ccaccatgt ccgcaagata gaaggcttt ttgtattact tctcttggc tatgaagcca
4921 cattgggatt atcgtctacc gaggatgaay gggaygaacc ctggtacaaa aaagcatgca
4981 agtgcgattg ccaaggagga cccaatgctc ttggtctgc aggtgcacac tctctggact
5041 gtataccaga atgcccatac cacaagcttc tgggtttoga gtcagggggag gtcaacccgg
5101 accagatcac ctgctttaac ccggagcagt atgtggggcg gtatctttcg tggactgcaa
5161 acaaggcccg gctcaacagt caaggcttg ggtgtgcctg gctctcaag ttccaggaca
5221 gtagccagt gttacagata gatctgaagg agatcaagt gatttcagg atctctaccc
5281 agggggcgctg tgcattogat gactggatga ccaatcacg cgtgcagta agaacagatg
5341 agcgcctgaa ctggattac tacaaggacc agactggaaa caacccgggtc ttctatggca
5401 actcgggacc cactccag gttcagaacc tgcctgggac cccatcctc tcccgctcca
5461 tccgctcat cccgtggc tggcagctcc gactgccc atggatggag ctgctggagt
5521 ggttcagcaa gtggtcctga a (SEQ ID NO:18)

```

图13C

外周蛋白-2

```

1  mallkvkfdq kkrvklaggl wlmwfsvla giiifslglf lkielkrsd vmnnseshfv
61  pnsliqmgvl scvfnselagk icydaldpax yarwkpwlkp ylaicvlfni ilflvalccf
121 llrgslentl ggglkngmky yrdtdtpgrc fmkkttidmlq iefkccgngg frdwfeiqwi
181 snryldfssk evkdriksnv dgrylvdgvp fecnpspr pciqqyqitnn sahysydhqt
241 eelnlwvrgc raallsyyss lmnsgvvtl liwlfvttit iglrylqtsl dgvsnpceese
301 sesqgwllr svpetwkaf1 esvkklgkgn qveaegadag qapeag (SEQ ID NO:19)

```

图14

外周蛋白

```

1  mahhpeqlra gfssteyrrt fgpppslspg afsysssarf ssarlqsa3 psssvrlqsf
61  rspragagal lrlpserldf smaenalngel latrsnekqe lqelndrfan fiekvrfleq
121 qnaalrqels qarqgepara dqicqqelre lrrelellqr erdrvqverd glaedlaalk
181 qrleeetrkr edaehnvlvf rkdvddatls rlelerkies lmdeiefkk lheeelrdlq
241 vsvescqvqq veveatvkpe ltaalrdira qyesiaaknl qeaeewyksk yadlsdaanr
301 nhealrqakq emnesrrqiq sltcevdglr gtneallrql releeqfale aggyqagaar
361 leeelrqike emarhlreyq ellnvkmald lelatyrkll egeesrisvp vhsfaslnik
421 ctvpeveppq dshsrktvll ktietrngev vtescqkeqrs eldkssahsy (SEQ ID NO:20)

```

图15

RPGR 相互作用蛋白-1

```

1  mshlvdptsg dlpvrldidai plvipaskgk nmktqpplsr mnreeledsf frlredhmlv
61  kelswkqgde ikrlrttllr ltaagrldrv aaceaplsct arrgkagwr qrlsmhqrpq
121 mhrllqghfhc vgpasprraq prvqvghrql htagapvppek pkrgprdrls ytappsfkeh
181 atnenrgeva skpselvsqs nsliisfssvi smakpiglcm pnsahimasn tmqveeppks
241 pekmpkden feqrssleca qkaaelrasi kekvelirrk kilhernas1 vmtkaqltev
301 qeayetllqk nggilssahc allkqvneir aelkeeskka vslksqledv silqmtikef
361 qervedleke rklindnydk llesmldssd sssqphwsne liaeqllqgv sglqdgldae
421 ledkrkvile lsrekagned iklevtnllq khkqevellq naatisqppd rqsepathpa
481 vlqentqlep sepknqeek lsqvlneiqv shaettllele ktrdmllilqr kinvcyqeel
541 eamtkadnd nrdhkekler ltrlldlkn rikqliegilr shdlptseq1 kdvaaygtrpl
601 slcletlpah gdedkvdis1 inhqenlfel hinhqafitsa alaqagdtqp ttftctysfyd
661 fethctplsv gpqplydfts qymetds1f lhyldceasar ldihqamase hstlaagwic
721 fdrvletvek vhglatliga ggeefgvley wmlrfrpikp slqacnkrkk aqvylstdvi
781 ggrkaqeeef rseswepqne lwieitkccq lrarwlgtpq spyavyrfft fsdhdtailp
841 aennpyfrdq arfpvlvtsd ldhyllrreal sihvfdde1 epgsylgrar vp1lplakne
901 sikgdfnlt1d paekpnqsiq vqldwkfpyi ppeflkpea qtkgkdtkds skisseeka
961 afpsqdqmas pevpieagqy rskrkpphgg erkckehqvv sysrrkhgkr igvqqknrmo
1021 ylslnilngn tpeqvnyte1w kfsetnsfig dgfkngheee entlshsalk qkeplhpvnd
1081 kessegqgsev seaqtdsd1d vi1ppmsqky pkadseknci ei1vs1atype aevmsdenik
1141 qvyveykfyd lplsetetpv slrkpragee inhffskvid ldpqeqqgr1r r1lfdmlngq
1201 dpdqghlkft vvsdpldeek keceevgyay lqlwqillesg rdileqeldi vspedlatpi
1261 grikvslqaa avlhailykem ted1fs (SEQ ID NO:21)

```

图 16

[illegible]

图 17B

AAV1	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO:22)
AAV6	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO:23)
AAV3	PQIMIK-	650	(SEQ	ID	NO:24)
AAV2	PQILIKN	650	(SEQ	ID	NO:25)
AAV8	PQILIKN	653	(SEQ	ID	NO:26)
AAV8.1	PQILIKN	653	(SEQ	ID	NO:27)
AAV8 rh8	PQILIKN	651	(SEQ	ID	NO:28)
AAV10	PQILIKN	653	(SEQ	ID	NO:29)
AAV7	PQILIKN	652	(SEQ	ID	NO:30)
AAV9	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO:31)
AAV9.1	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO:32)
AAV5	PMMLIKN	640	(SEQ	ID	NO:33)
	* ;:**				

图17C

AAV1	---TFSYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTQ--NQSGSAQNKDLLFSRGS	467
AAV6	---TFSYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTQ--NQSGSAQNKDLLFSRGS	467
AAV3	---FSYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	467
AAV2	---FSYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	466
AAV8	NFOYTYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	469
AAV8.1	NFOYTYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	469
AAV8 rh8	FQFSYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	469
AAV10	NFEFSYTFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	469
AAV7	-FEFSYSFEEDVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	469
AAV9	-FQFSYEFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	467
AAV9.1	-FQFSYEFEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	467
AAV5	NFEFTYNTEEEVDFHSSYAHQSQSLDRIMNPLIDQYLYYLNRQTGTTGTTNQSRLLFSQAG	453
AAV1	PAGMSVQEKXNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
AAV6	PAGMSVQEKXNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
AAV3	POSMSLOAKNNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
AAV2	ASDIRDQSRNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	526
AAV8	PNTMANQAKNNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	529
AAV8.1	PNTMANQAKNNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	529
AAV8 rh8	S--MANQAKNNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
AAV10	PANMSAQAKNNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	529
AAV7	PSTMAEQAKNNWLFGECYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	529
AAV9	PSNMAVQGRNYIFGFSYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
AAV9.1	PSNMAVQGRNYIFGFSYRQORVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
AAV5	ACRYANTYKNWFEFGEMERTQGNLCSGVNHSASVSAFATIRMELEGASYQVPPQPNGMTN	513

图18A

AAV1 KDEDKFFEMSGVMIIFGK--ESAGASNTALD-NVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNF 584
 AAV6 KDDKDKFFEMSGVMIIFGK--ESAGASNTALD-NVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNL 584
 AAV3 KDDEKFFFMHGNLIIFGK--EGTTASNAELD-NVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNL 584
 AAV2 KDDEKFFEQSGVLIIFGK--QGSEKTNVDIE-KVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL 583
 AAV8 KDDERFFPSNGILIFGK--QNAARDNADYS-DVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGVADNL 586
 AAV8.1 KDDERFFPSNGILIFGK--QNAARDNADYS-DVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGVADNL 586
 AAV8 rh8 KDDDDRFFPSGGVLIIFGK--QGAGNDGVDYS-QVLLTDEEEIKATNPVATEEYCAVAINN 584
 AAV10 KDDERFFPSGGVLMIFGK--QGAGRDNDVYS-SVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVADNL 586
 AAV7 KDDERFFPSGGVLIIFGK--TGAT-NKTTLE-NVLMTNEEEIRTTNPVATEEYGVSSNL 585
 AAV9 KEGEDRFFELSGSLIFGK--QGTGRDNVDAD-KVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNH 584
 AAV9.1 KEGEDRFFELSGSLIFGK--QGTGRDNVDAD-KVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNH 584
 AAV5 NLOGSNTYALENTMIFNSQANPOTATATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGQMATTN 573

AAV1 QSSSTDIALGETTRPAPATGVDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV6 QSSSTDIALGETTRPAPATGVDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV3 QSSNTAPTGTVNHQALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2 644
 AAV2 QRCNLALGETTRPARQAATAADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV8 QCCNLALGETTRPATAFOIGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV8.1 QGQGLGETTRPAQAQIGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV8 rh8 QAANLALGETTRPATQAQTGLVHNQGVIPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV10 QALALGETTRPAANTGPIVGNVNSQGALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV7 QAANLALGETTRPATQAQTQVNVNQGALPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV9 QSAQALALGETTRPAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV9.1 QSGQAALGETTRPAQAATGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPINAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNP2
 AAV5 QSLALGETTRPASTTAPATGTYNLQEIIVPGSVWNERDVYLQGPINAKIPETCAHFHESPAMGCGFGLKNP2

图18B

AAV1	PQILIK-	(SEQ ID NO:34)
AAV6	PQILIK-	(SEQ ID NO:35)
AAV3	PQIMIK-	(SEQ ID NO:24)
AAV2	PQILIKN	(SEQ ID NO:36)
AAV8	PQILIKN	(SEQ ID NO:37)
AAV8.1	PQILIKN	(SEQ ID NO:38)
AAV8 rh8	PQILIKN	(SEQ ID NO:39)
AAV10	PQILIKN	(SEQ ID NO:40)
AAV7	PQILIKN	(SEQ ID NO:41)
AAV9	PQILIK-	(SEQ ID NO:42)
AAV9.1	PQILIK-	(SEQ ID NO:43)
AAV5	PMMLIKN	(SEQ ID NO:44)

图18C

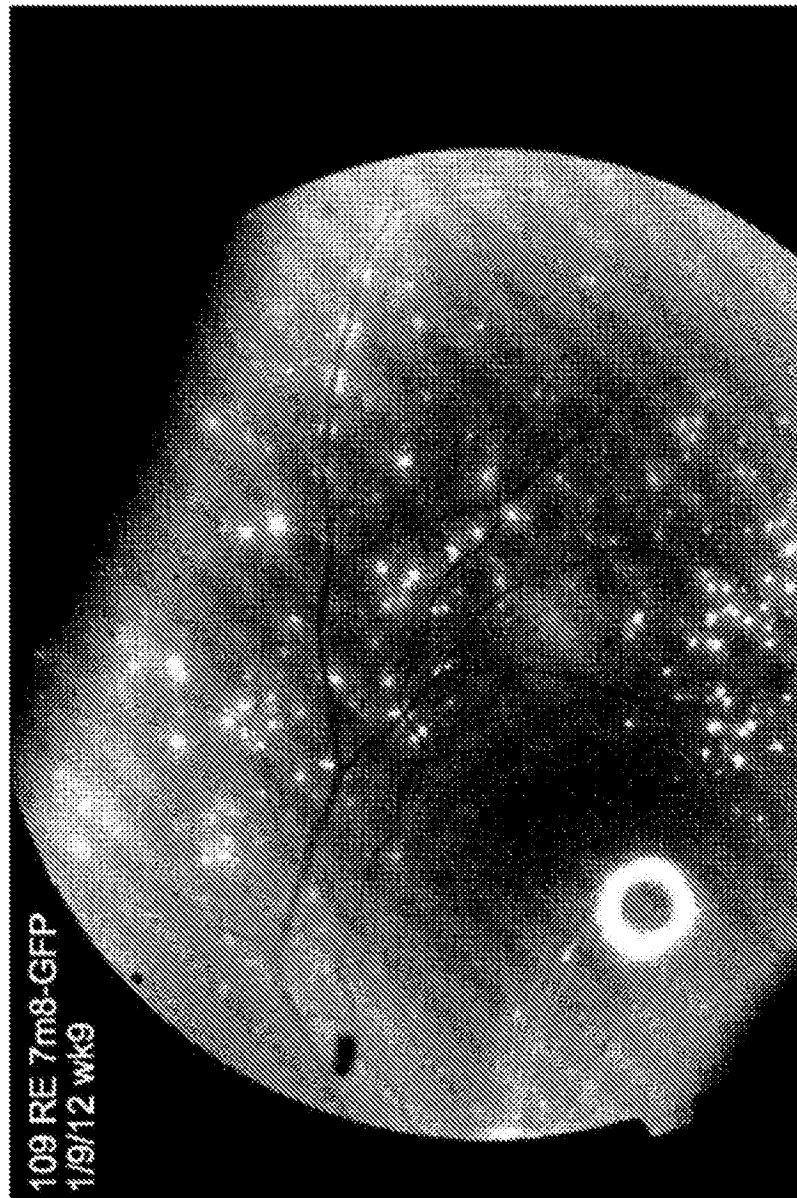


图19