



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110741082 B

(45) 授权公告日 2024.09.06

(21) 申请号 201880028016.X

(72) 发明人 J.M.威尔逊 王强 A.吉尔斯

(22) 申请日 2018.02.27

K.特纳

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

申请公布号 CN 110741082 A

专利代理人 初明明 彭昶

(43) 申请公布日 2020.01.31

(51) Int.CI.

C12N 7/01 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/864 (2006.01)

62/464748 2017.02.28 US

A61K 35/76 (2015.01)

62/591002 2017.11.27 US

A61K 48/00 (2006.01)

62/614002 2018.01.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.10.28

CN 101528916 A, 2009.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 102174574 A, 2011.09.07

PCT/US2018/019992 2018.02.27

审查员 赵二双

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/160582 EN 2018.09.07

(73) 专利权人 宾夕法尼亚州大学信托人

权利要求书2页 说明书69页

地址 美国宾夕法尼亚州

序列表29页 附图23页

(54) 发明名称

腺相关病毒 (AAV) 进化枝F载体及其用途

(57) 摘要

一种重组腺相关病毒 (rAAV) 载体, 其包含在生产系统中产生的AAVhu68衣壳, 所述生产系统包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列或与其具有至少75%同一性的序列, 其编码SEQ ID NO:2。AAVhu68衣壳包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列中的天冬酰胺-甘氨酸对中高度脱酰胺的天冬酰胺残基的亚群。还提供了含有所述rAAV的组合物及其用途。另外, 提供了具有工程化AAV衣壳的rAAV, 所述工程化AAV衣壳包含参考所述AAVhu68 vp1编号具有氨基酸位置157处的Val的vp1或vp2蛋白的至少一个亚群。

1. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) , 其包含AAVhu68衣壳和AAVhu68衣壳中的载体基因组, 其中:

(A) 所述AAVhu68衣壳包含AAVhu68 vp1蛋白的异质群, 所述AAVhu68 vp1蛋白由SEQ ID NO: 2的氨基酸1-736组成以及具有在SEQ ID NO: 2的N57、N329、N452和/或N512的至少两个中50%至100%脱酰胺的天冬酰胺; AAVhu68 vp2蛋白的异质群, 所述AAVhu68 vp2蛋白由SEQ ID NO: 2的氨基酸138-736组成以及具有在SEQ ID NO: 2的N329、N452和/或N512的至少两个中50%至100%脱酰胺的天冬酰胺; 和AAVhu68 vp3蛋白的异质群, 所述AAVhu68 vp3蛋白由SEQ ID NO: 2的氨基酸203-736组成以及具有在SEQ ID NO: 2的N329、N452和/或N512的至少两个中50%至100%脱酰胺的天冬酰胺,

其中基于SEQ ID NO: 2的编号, 所述AAVhu68 vp1蛋白包含位置67处的谷氨酸和位置157处的缬氨酸, 并且所述AAVhu68 vp2蛋白包含位置157处的缬氨酸, 并且

其中当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的编号, 在AAVhu68 vp1、AAVhu68 vp2和AAVhu68 vp3蛋白的异质群中在N57、N329、N452和/或N512的至少两个中50%至100%的天冬酰胺 (N) 被脱酰胺, 其中所述脱酰胺导致氨基酸改变, 其中所述脱酰胺的天冬酰胺被脱酰胺为天冬氨酸、异天冬氨酸或其组合; 以及

(B) 所述载体基因组包含核酸分子, 所述核酸分子包含AAV反向末端重复序列和编码产物的非AAV核酸序列, 所述非AAV核酸序列与指导所述产物在哺乳动物宿主细胞中表达的序列可操作地连接。

2. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) , 其包含AAVhu68衣壳和AAVhu68衣壳中的载体基因组, 其中所述AAVhu68衣壳包含从编码SEQ ID NO: 2的核酸序列产生的AAVhu68 vp1蛋白、AAVhu68 vp2蛋白和AAVhu68 vp3蛋白。

3. 根据权利要求1或2所述的rAAV, 其中

(i) (a) 当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的编号, 位于vp1蛋白的位置57处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少65%的天冬酰胺 (N) 被脱酰胺;

(b) 当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的残基编号, vp1、vp2和vp3蛋白的位置329处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少75%的N被脱酰胺;

(c) 当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的残基编号, vp1、vp2和vp3蛋白的位置452处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少50%的N被脱酰胺; 和/或

(d) 当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的残基编号, vp1、vp2和vp3蛋白的位置512处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少75%的N被脱酰胺;

(ii) 所述AAVhu68衣壳包含vp1蛋白, 其中当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的编号, vp1蛋白的位置57处的75%至100%的N被脱酰胺;

(iii) 所述AAVhu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白, 其中当使用质谱法测定时, 基于SEQ ID NO: 2的编号, 位置452处的75%至100%的N被脱酰胺; 和/或

(iv) 当使用质谱法测定时, 在以下的一个或多个位置处1%至40%的氨基酸被脱酰胺: N94、N113、N252、N253、Q259、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N336、N409、N410、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663或N709。

4. 根据权利要求1或2所述的rAAV, 其中所述AAVhu68 vp1蛋白、AAVhu68 vp2蛋白和AAVhu68 vp3蛋白从SEQ ID NO: 1的核酸序列, 或编码SEQ ID NO: 2的氨基酸1-736的与

SEQ ID NO: 1具有至少80%至至少99%同一性的序列产生。

5.根据权利要求1或2所述的rAAV,其中所述AAVhu68衣壳包含AAVhu68 vp1蛋白、AAVhu68 vp2蛋白和/或AAVhu68 vp3蛋白,其中当使用质谱法测定时,所述AAVhu68 vp1蛋白在SEQ ID NO: 2的氨基酸1-736的位置N57、N329、N452和N512的每个中被50%至100%脱酰胺,并且所述AAVhu68 vp2蛋白和AAVhu68 vp3蛋白在位置N329、N452和N512的每个中被50%至100%脱酰胺。

6.一种组合物,其包含重组腺相关病毒hu68 (rAAVhu68) 的混合群,其中每个rAAVhu68 独立地选自根据权利要求1所述的rAAV。

7.根据权利要求1所述的rAAV,或根据权利要求6所述的组合物,其中所述AAV ITR序列是来自AAV2的5' ITR和3' ITR。

8.根据权利要求6或7所述的组合物,其中所述组合物被配制用于

(i) 鞘内递送,并且所述载体基因组包含编码用于递送至中枢神经系统的产物的核酸序列;  
(ii) 静脉内递送;或  
(iii) 鼻内或肌肉内递送。

9.一种rAAV生产系统,其用于在细胞培养物中生产根据权利要求1所述的重组AAVhu68,其中所述生产系统包含:

(a) 编码SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的AAVhu68衣壳核酸序列;

(b) 适于包装到所述AAVhu68衣壳中的核酸分子,所述核酸分子包含至少一个AAV反向末端重复 (ITR) 和编码基因产物的非AAV核酸序列,所述非AAV核酸序列与指导所述产物在宿主细胞中表达的序列可操作地连接;和

(c) 足够的AAV rep功能和辅助功能,以允许将所述核酸分子包装到所述重组AAVhu68 衣壳中。

10.根据权利要求9所述的系统,其中

(i) 所述(a)的核酸序列为SEQ ID NO: 1,或编码SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的与SEQ ID NO: 1具有70%至99%同一性的序列;和/或

(ii) 所述系统还包含编码SEQ ID NO: 2的氨基酸203至氨基酸736的AAVhu68 vp3的SEQ ID NO: 1的nt 607至nt 2211的核酸序列。

11.根据权利要求9或10所述的系统,其中所述系统还包含在细胞培养物中的人胚肾293细胞。

12.根据权利要求9或10所述的系统,其中所述AAV rep

(i) 来自AAV2;或

(ii) 是特征在于SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的AAVhu68rep。

13.根据权利要求9或10所述的系统,其中所述AAV rep编码序列和AAVhu68衣壳核酸序列在相同的核酸分子上。

14.根据权利要求1或2所述的rAAV,其中所述AAVhu68衣壳还包含脱酰胺的谷氨酰胺,所述脱酰胺的谷氨酰胺被脱酰胺为 $\alpha$ -谷氨酸、 $\gamma$ -谷氨酸或其组合。

## 腺相关病毒 (AAV) 进化枝F载体及其用途

[0001] 关于美国联邦政府资助的研究或开发的声明

[0002] 本申请包含美国国防高级研究计划局 (Defense Advanced Research Projects Agency, DARPA) 在 W911NF-13-2-0036 下支持的工作。美国政府可拥有本发明的某些权利。

### 背景技术

[0003] 腺病毒相关病毒 (AAV) 是细小病毒科 (Parvovirus) 的成员, 是一种小的无包膜二十面体病毒, 具有约 4.7 千碱基 (kb) 长的单链线性 DNA (ssDNA) 基因组。野生型基因组包含在 DNA 链两端的反向末端重复 (ITR) 和两个开放阅读框 (ORF) : rep 和 cap。Rep 由编码 AAV 生命周期所需的 rep 蛋白的四个重叠基因组成, 并且 cap 包含衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的重叠核苷酸序列, VP1、VP2 和 VP3 自组装形成二十面体对称的衣壳。

[0004] AAV 被分配到依赖性病毒 (Dependovirus) 属, 因为该病毒被发现是纯化的腺病毒原种中的污染物。AAV 的生命周期包括潜伏期, 在此阶段 AAV 基因组在感染后特异性整合到宿主染色体中, 以及感染期, 在此阶段在腺病毒或单纯疱疹病毒感染后, 整合的基因组随后被拯救、复制并包装成感染性病毒。非致病性、感染性的广泛宿主范围 (包括非分裂细胞) 、和潜在的位点特异性染色体整合的特性使 AAV 成为基因转移的有吸引力的工具。

[0005] 已经将来自复制缺陷型人细小病毒的重组腺相关病毒 (rAAV) 载体描述为用于基因递送的合适载体。通常, 从载体中除去功能性 rep 基因和 cap 基因, 产生无复制能力的载体。这些功能在载体生产系统中提供, 但在最终载体中不存在。

[0006] 迄今为止, 已经有从人或非人灵长类动物 (NHP) 分离的多种不同的充分表征的 AAV。已经发现, 不同血清型的 AAV 表现出不同的转染效率, 并且表现出对不同细胞或组织的向性。WO 2005/033321 中描述了许多不同的 AAV 进化枝, 包括进化枝 F, 其在其中被鉴定为仅具有三个成员 AAV9、AAVhu31 和 AAVhu32。AAV9 的结构分析在 M.A. DiMatta 等人, J. Virol. (2012 年 6 月) vol. 86 no. 126947-6958 中。该文献报道了 AAV9 具有三种可变蛋白 (vp) 的 60 个拷贝 (总共), 所述可变蛋白 (vp) 由 cap 基因编码并具有重叠序列。这些包括 VP1 (87kDa)、VP2 (73kDa) 和 VP3 (62kDa), 它们分别以 1:1:10 的预测比率存在。VP3 的整个序列在 VP2 内, 并且 VP2 整个在 VP1 内。VP1 具有独特的 N 末端结构域。精细坐标 (refined coordinate) 和结构因素可在 RCSB PDB 数据库的登录号 3UX1 下获得。

[0007] 已经设计了多种不同的 AAV9 变体以去靶向 (detarget) 或靶向不同的组织。参见, 例如, N. Pulicheria, "Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer", Molecular Therapy, Vol. 19, no. 6, p. 1070-1078 (2011 年 6 月)。还报道了递送基因穿过血脑屏障的 AAV9 变体的开发。参见例如 B.E. Deverman 等人, Nature Biotech, Vol. 34, No. 2, p. 204-211 (2016 年 2 月 1 日在线发布) 和 Caltech press release, A. Wetherston, [www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/](http://www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/), accessed 10/05/2016。还参见 WO 2016/0492301 和 US 8,734,809。

[0008] 期望的是用于递送异源分子的基于AAV的构建体。

## 发明内容

[0009] 描述了新的AAVhu68衣壳和rep序列,其用于制备和用于将核酸分子递送至宿主细胞的载体。在某些实施方案中,提供了具有AAVhu68衣壳的重组AAV,所述AAVhu68衣壳由SEQ ID NO:1的核酸序列或与编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的SEQ ID NO:1具有至少70%同一性,与SEQ ID NO:1具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%同一性的核酸序列编码。

[0010] 在一个实施方案中,提供了重组腺相关病毒(rAAV),其包含:(A)AAV68衣壳,所述AAV68衣壳包含以下的一种或多种:(1)AAV hu68衣壳蛋白,其包含:自由编码SEQ ID NO:2的1至736的预测氨基酸序列的核酸序列表达所产生的AAVhu68vp1蛋白,由SEQ ID NO:1产生的vp1蛋白,或者由与编码SEQ ID NO:2的1至736的预测氨基酸序列的SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的核酸序列产生的vp1蛋白,由编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸138至736的预测氨基酸序列的核酸序列表达所产生的AAVhu68vp2蛋白,由包含SEQ ID NO:1的至少核苷酸412至2211的序列产生的vp2蛋白,或者由与编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸138至736的预测氨基酸序列的SEQ ID NO:1的至少核苷酸412至2211具有至少70%同一性的核酸序列产生的vp2蛋白,由编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸203至736的预测氨基酸序列的核酸序列表达所产生的AAVhu68vp3蛋白,由包含SEQ ID NO:1的至少核苷酸607至2211的序列产生的vp3蛋白,或者由与编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸203至736的预测氨基酸序列的SEQ ID NO:1的至少核苷酸607至2211具有至少70%同一性的核酸序列产生的vp3蛋白;和/或(2)AAV衣壳蛋白,其包含:基于SEQ ID NO:2的vp1衣壳的编号,任选地包含位置157处的缬氨酸和/或位置67处的谷氨酸的vp1蛋白的异质群、任选地包含位置157处的缬氨酸的vp2蛋白的异质群、和vp3蛋白的异质群,其中至少vp1和vp2亚群包含位置157处的缬氨酸,并且任选地还包含位置67处的谷氨酸;和/或(3)为编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的核酸序列的产物的vp1蛋白的异质群,为编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸138至736的氨基酸序列的核酸序列的产物的vp2蛋白的异质群,和为编码SEQ ID NO:2的至少氨基酸203至736的氨基酸的核酸序列的产物的vp3蛋白的异质群,其中:vp1、vp2和vp3蛋白包含具有氨基酸修饰的亚群,该亚群包含SEQ ID NO:2的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少两个高度脱酰胺的天冬酰胺(N),并且任选地还包含含有其他脱酰胺氨基酸的亚群,其中所述脱酰胺导致氨基酸改变;以及(B)所述AAVhu68衣壳中的载体基因组,所述载体基因组包含核酸分子,所述核酸分子包含AAV反向末端重复序列和编码产物的非AAV核酸序列,所述非AAV核酸序列与指导产物在宿主细胞中表达的序列可操作地连接。例如,四个残基(N57、N329、N452、N512)通常显示高水平的脱酰胺。其他残基(N94、N253、N270、N304、N409、N477和Q599)在不同批次之间也显示多至~20%的脱酰胺水平。

[0011] 在某些实施方案中,脱酰胺的天冬酰胺被脱酰胺为天冬氨酸、异天冬氨酸、互变天冬氨酸/异天冬氨酸对、或其组合。在某些实施方案中,脱酰胺的谷氨酰胺被脱酰胺为(α)-谷氨酸、γ-谷氨酸、互变(α)-谷氨酸/γ-谷氨酸对、或其组合。

[0012] 在某些实施方案中,AAVhu68衣壳包含具有以下的一种或多种的亚群:(a)基于SEQ ID NO:2的编号,位于vp1蛋白位置57处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少65%的天冬酰胺(N)

被脱酰胺；(b) 基于SEQ ID N0:2的氨基酸序列的残基编号, vp1、v2和vp3蛋白位置329的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少75%的N被脱酰胺；(c) 基于SEQ ID N0:2的氨基酸序列的残基编号, vp1、v2和vp3蛋白位置452的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少50%的N被脱酰胺；和/或 (d) 基于SEQ ID N0:2的氨基酸序列的残基编号, vp1、v2和vp3蛋白位置512的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少75%的N被脱酰胺。在某些实施方案中, hu68衣壳包含vp1的亚群, 其中如使用质谱法测定的, vp1蛋白的位置57处的75%至100%的N被脱酰胺。在某些实施方案中, hu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白的亚群, 其中如使用质谱法测定的, 基于SEQ ID N0:2的编号, 位置329处的75%至100%的N被脱酰胺。在某些实施方案中, hu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白的亚群, 其中如使用质谱法测定的, 基于SEQ ID N0:2的编号, 位置452处的75%至100%的N被脱酰胺。在某些实施方案中, hu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白的亚群, 其中基于SEQ ID N0:2的编号, 位置512处的75%至100%的N被脱酰胺。在某些实施方案中, 编码蛋白质的核酸序列是SEQ ID N0:1, 或与编码SEQ ID N0:2的氨基酸序列的SEQ ID N0:1具有至少80%至至少99%同一性的序列。在某些实施方案中, 该序列与SEQ ID N0:1具有至少80%至97%同一性。在某些实施方案中, rAAVhu68衣壳还至少包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的亚群, 该亚群具有从SEQ ID N0:2的氨基酸的修饰, 其在选自以下的至少四个位置处包含至少约50%至100%的被脱酰胺: N57、329、452、512的一个或多个, 或其组合。在某些实施方案中, hu68衣壳包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的亚群, 该亚群还在以下的至少一个或多个位置处包含1%至约40%的脱酰胺: N94、N113、N252、N253、Q259、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N336、N409、N410、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709, 或其组合。在某些实施方案中, hu68衣壳包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的亚群, 该亚群还包含一个或多个修饰, 该修饰选自以下的一种或多种中的一个或多个修饰: 乙酰化赖氨酸、磷酸化丝氨酸和/或苏氨酸、异构化天冬氨酸、氧化色氨酸和/或甲硫氨酸、或酰胺化氨基酸。在某些实施方案中, rAAVhu68包含约60个总衣壳蛋白, 其比率为约1个vp1比约1至1.5个vp2比3至10个vp3蛋白。在某些实施方案中, AAVhu68包含约60个总衣壳蛋白, 其比率为约1个vp1比约1个vp2比3至9个vp3蛋白。在某些实施方案中, 载体基因组包含来自除AAVhu68以外的AAV来源的AAV ITR序列。

[0013] 在某些实施方案中, 提供了一种组合物, 其包含重组腺相关病毒hu68 (rAAVhu68) 的混合群, 其中每个rAAVhu68独立地选自如本文所述的rAAVhu68。在某些实施方案中, 平均AAVhu68衣壳包含约60个总衣壳蛋白, 其比率为约1个vp1比约1至1.5个vp2比3至10个vp3蛋白。在某些实施方案中, 平均AAVhu68衣壳包含约60个总衣壳蛋白, 其比率为约1个vp1比约1个vp2比3至6个vp3蛋白。在某些实施方案中, 组合物被配制用于鞘内递送, 并且载体基因组包含编码用于递送至中枢神经系统的产物的核酸序列。在某些实施方案中, 组合物被配制用于静脉内递送。在某些实施方案中, 载体基因组包含编码抗HER2抗体的核酸序列。在某些实施方案中, 组合物被配制用于静脉内递送。在某些实施方案中, 组合物被配制用于鼻内或肌肉内递送。在某些实施方案中, 组合物包含至少rAAVhu68载体原液和任选的载体、赋形剂和/或防腐剂。

[0014] 在某些实施方案中, 提供了如本文所述的rAAVhu68或组合物用于将期望的基因产物递送至有需要的受试者的用途。

[0015] 在某些实施方案中, 提供了用于产生重组AAVhu68的rAAV生产系统。生产系统包

括: (a) 编码SEQ ID N0:2的氨基酸序列的AAVhu68衣壳核酸序列; (b) 适于包装到AAVhu68衣壳中的核酸分子,所述核酸分子包含至少一个AAV反向末端重复 (ITR) 和编码基因产物的非AAV核酸序列,所述非AAV核酸序列与指导产物在宿主细胞中表达的序列可操作地连接;以及 (c) 足够的AAVrep功能和辅助功能,以允许将核酸分子包装到重组AAVhu68衣壳中。在某些实施方案中, (a) 的核酸序列至少包含SEQ ID N0:1,或与编码SEQ ID N0:2的氨基酸序列的SEQ ID N0:1具有至少70%至至少99%同一性的序列。在某些实施方案中,该系统任选地还包含编码SEQ ID N0:2的约aa203至约氨基酸736的AAVhu68vp3的SEQ ID N0:1的约nt 607至约nt2211的核酸序列。在某些实施方案中。该系统包含人胚胎肾293细胞或杆状病毒系统。

[0016] 在某些实施方案中,提供了用于降低AAVhu68衣壳的脱酰胺的方法。该方法包括从含有修饰的AAVhu68vp密码子的核酸序列产生AAVhu68衣壳,该核酸序列独立地包含位于SEQ ID N0:2中的位置58、330、453和/或513处的一至三个精氨酸-甘氨酸对处的修饰的甘氨酸密码子,使得修饰的密码子编码除甘氨酸以外的氨基酸。在某些实施方案中,该方法包括从含有修饰的AAVhu68vp密码子的核酸序列产生AAVhu68衣壳,该核酸序列独立地包含位于SEQ ID N0:2中的位置57、329、452和/或512处的一至三个精氨酸-甘氨酸对处的修饰的精氨酸密码子,使得修饰的密码子编码除精氨酸以外的氨基酸。在某些实施方案中,每个修饰的密码子编码不同的氨基酸。在某些实施方案中,两个或更多个修饰的密码子编码相同的氨基酸。在某些实施方案中,如本文所述的突变AAVhu68衣壳包含精氨酸-甘氨酸对中的突变,使得甘氨酸变为丙氨酸或丝氨酸。突变AAVhu68衣壳可包含一个、两个或三个突变体,其中参考AAVhu68天然地含有四个NG对。在某些实施方案中,突变AAVhu68衣壳包含NG对中的仅单个突变。在某些实施方案中,突变AAV衣壳包含在两个不同NG对中的突变。在某些实施方案中,突变AAVhu68衣壳包含位于AAVhu68衣壳中的结构上分开的位置的两个不同的NG对中的突变。在某些实施方案中,突变不在VP1独特区域中。在某些实施方案中,突变之一在VP1独特区域中。任选地,突变AAVhu6衣壳不含NG对中的修饰,但包含突变以最小化或消除位于NG对外的一个或多个天冬酰胺或谷氨酰胺中的脱酰胺作用。

[0017] 在某些实施方案中,提供了突变rAAVhu68,其包含与未修饰的AAVhu68衣壳相比具有降低的脱酰胺的经修饰的rAAVhu68衣壳,所述突变rAAVhu68使用本文所述的方法产生。

[0018] 在另一方面,提供了用于提高重组腺相关 (rAAV) 载体的产量和/或包装效率的方法。该方法包括工程化AAV衣壳基因以表达具有在氨基酸位置157处的Val的vp1蛋白,其中氨基酸残基的编号基于AAVhu68的全长vp1[SEQ ID N0:2]。在某些实施方案中,提供了进化枝F rAAV,其基于SEQ ID N0:2的编号在氨基酸位置67处具有谷氨酸 (Glu或E)。

[0019] 在另一个实施方案中,提供了根据该方法产生的工程化rAAV。

[0020] 在另一个实施方案中,提供了表达用于治疗和/或预防HER2+癌症的抗HER2抗体的AAVhu68颗粒。

[0021] 在另一个实施方案中,提供了核酸分子,其包含在外源调节控制序列的控制下编码AAVhu68rep蛋白或其功能片段的核酸序列,所述外源调节控制序列指导其在宿主细胞中的表达。在一个实施方案中,rep蛋白具有SEQ ID N0:4的氨基酸序列或其功能片段。

[0022] 从以下对本发明的详细描述中,本发明的这些和其他方面将是显而易见的。

## 附图说明

[0023] 图1提供了显示AAVhu68的vp1衣壳蛋白的氨基酸序列[SEQ ID NO:16] (在比对中标记为hu.68.vp1) 与AAV9[SEQ ID NO:6]、AAVhu31 (在比对中标记为hu.31) [SEQ ID NO:10]和AAVhu32 (在比对中标记为hu.32) [SEQ ID NO:11]的比对。与AAV9、AAVhu31和AAVhu32相比,发现两个突变(A67E和A157V)在AAVhu68中是关键的并且在图中圈出。

[0024] 图2A-2C提供了编码AAVhu68的vp1衣壳蛋白的核酸序列与AAV9、AAVhu31[SEQ ID NO:12]和AAVhu32[SEQ ID NO:13]的比对。

[0025] 图3A-3B提供了显示AAVhu.68与AAV9相比的产量的图。如实施例2中所述进行实验。n=6。计算P值并显示在图中。

[0026] 图3A显示来自总裂解物的AAVhu.68和AAV9的产量。P值计算为0.4173并且确定不显著。

[0027] 图3B显示来自培养上清液的AAVhu.68和AAV9的产量。上清液中AAVhu.68的产量显著高于AAV9, p值为0.0003。

[0028] 图4A-4C提供了用 $5 \times 10^{11}$ GC AAVhu68.CB7.nLacZ施用的小鼠的多个器官(心脏、肝、肺和肌肉)的免疫组织化学染色。如实施例3中所述制备和处理样品。样品通过伊红复染色显示红色。显示蓝色的LacZ的阳性染色表明AAVhu68的成功转导。

[0029] 图4A提供了来自静脉内(IV)施用 $5 \times 10^{11}$ GC AAVhu68.CB7.nLacZ的小鼠的多个器官(心脏、肝、肺和肌肉)的免疫组织化学染色。所有测试的器官都显示出AAVhu68转导,同时观察到相对于肺和肌肉,有利的心脏和肝脏向性。

[0030] 图4B提供了来自肌肉内(IM)施用 $5 \times 10^{11}$ GC AAVhu68.CB7.nLacZ的小鼠的多个器官(心脏、肝、肺和肌肉)的免疫组织化学染色。心脏、肝脏和肌肉表现出AAVhu68的高转导率,而在肺中未观察到可检测的转导。

[0031] 图4C提供了来自鼻内(IN)施用 $5 \times 10^{11}$ GC AAVhu68.CB7.nLacZ的小鼠的多个器官(心脏、肝、肺和肌肉)的免疫组织化学染色。在心脏、肝脏、肌肉和肺中观察到分散的转导。

[0032] 图5A-5C提供了来自以 $1 \times 10^{10}$ GC或 $1 \times 10^{11}$ GC的剂量施用AAVhu68.GFP或AAV9.GFP的小鼠的多个脑区域(海马,图5A;运动皮层,图5B;和小脑,图5C)的荧光显微图像。如实施例4中所述制备和处理样品。来自GFP的以绿色显示的阳性信号表明AAV载体的成功转导。

[0033] 图5A提供了来自以 $1 \times 10^{10}$ GC或 $1 \times 10^{11}$ GC的剂量施用AAVhu68.GFP或AAV9.GFP的小鼠的海马载玻片的荧光显微图像。提供了用以蓝色显示的核酸染料染色的未治疗小鼠的相应样品作为阴性对照。除了来自注射 $1 \times 10^{10}$ GC AAV9.GFP的小鼠外,在所有测试样品中观察到AAV载体的转导。

[0034] 图5B提供了来自以 $1 \times 10^{10}$ GC或 $1 \times 10^{11}$ GC的剂量施用AAVhu68.GFP或AAV9.GFP的小鼠的运动皮质的荧光显微图像。观察到与AAV9相比更好的AAVhu68.GFP转导。

[0035] 图5C提供了来自以 $1 \times 10^{10}$ GC或 $1 \times 10^{11}$ GC的剂量施用AAVhu68.GFP或AAV9.GFP的小鼠的小脑载玻片的荧光显微图像。当向小鼠注射 $1 \times 10^{11}$ GC载体时,观察到AAVhu68.GFP的成功转导。

[0036] 图6A-6D提供了来自静脉内施用AAVhu68.GFP的小鼠的多个器官(肝、肾、心脏和胰腺)的显微图像。如实施例4中所述制备和处理样品。来自GFP的以绿色显示的阳性信号表明所述AAV载体的成功转导。为器官形态提供了以黑色和白色显示的明场图像,而在适用的情

况下提供相应的红色荧光通道作为阴性对照。

[0037] 图6A提供了来自静脉内施用AAVhu68.GFP的小鼠的代表性肝切片的显微图像。观察到绿色显示的阳性信号。

[0038] 图6B提供了来自静脉内施用AAVhu68.GFP的小鼠的代表性肾切片的显微图像。观察到绿色显示的阳性信号。

[0039] 图6C提供了来自静脉内施用AAVhu68.GFP的小鼠的代表性心脏切片的显微图像。观察到绿色显示的阳性信号。

[0040] 图6D提供了来自静脉内施用AAVhu68.GFP的小鼠的代表性胰腺切片的显微图像。观察到绿色显示的阳性信号。

[0041] 图7是用于脑池内递送的装置的图像,包括任选的用于同轴插入方法的引导针(introducerneedle),该装置包括10cc载体注射器、10cc预填充冲洗注射器、T型连接器延伸装置(T-connector extension set)、22Gx 5"脊柱针、任选的18Gx 3.5"引导针。

[0042] 图8A-8B说明与具有不同衣壳的载体相比,以小规模(图8A)和非常大规模(超大,图8B)制备的两种不同AAVhu68载体的产量。使用具有AAVhu68、AAV9、AAV8或AAV8triple衣壳并具有包含巨细胞病毒启动子(CMV)、萤火虫荧光素酶编码序列和SV40聚腺苷酸(CMV. ff 萤光素酶.SV40)的载体基因组的载体产生小规模载体制剂的数据。使用具有包含CMV启动子、内含子、免疫粘附素编码序列(201Ig IA)和SV40聚腺苷酸的载体基因组的AAVhu68、AAV9、AAV8或AAV8triple载体评估超大规模制备物。

[0043] 图9提供了与具有不同衣壳(包括AAV8triple、AAV9和AAV8)的载体相比以超大规模制备的AAVhu68载体的生产纯度。使用具有包含CMV启动子、内含子、免疫粘附素编码序列(201Ig IA)和SV40聚腺苷酸的载体基因组的AAVhu68、AAV9、AAV8或AAV8triple载体评估制备物。

[0044] 图10A-10B提供了与具有不同衣壳(包括AAV8triple、AAV9和AAV8)的载体相比,肌肉内注射 $3 \times 10^{11}$ GC/小鼠(图10A)或 $3 \times 10^{10}$ GC/小鼠(图10B)的载体的雄性RAGKO小鼠(n=5/组)中AAVhu68载体的转基因表达水平。由rAAV载体表达的转基因是免疫粘附素编码序列(201Ig IA)。如实施例8中详细描述的进行实验。

[0045] 图11A-11B提供了与具有不同衣壳(包括AAV8triple、AAV9和AAV8)的载体相比,肌肉内注射 $3 \times 10^{11}$ GC/小鼠的载体的雄性C57BL/6J小鼠(n=5/组)的肝脏(图11A)或肌肉(图11B)中AAVhu68载体的转基因表达水平。由rAAV载体表达的转基因是萤火虫荧光素酶。如实实施例9中详细描述的进行实验。

[0046] 图12提供了与具有不同衣壳(包括AAV8triple、AAV9和AAV8)的载体相比,肌肉内注射 $1 \times 10^{13}$ GC/kg体重的载体雄性和雌性食蟹猴AAVhu68载体的转基因表达水平。由rAAV载体表达的转基因是免疫粘附素编码序列(201Ig IA)。如实施例10中详细描述的进行实验。

## 具体实施方式

[0047] 本文提供了进化枝F内的新的分离的腺相关病毒(AAV)(其在本中称为AAVhu68)的酸序列和氨基酸。AAVhu68(此前称为AAV3G2)与另一进化枝F病毒AAV9(SEQ ID NO:5)的区别在于SEQ ID NO:2的vp1的位置67和157处的两个编码氨基酸。相反,另一个进化枝FAAV(AAV9, hu31, hu31)具有位置67处的Ala和位置157处的Ala。提供了新的AAVhu68衣壳和/或

工程化AAV衣壳,其具有基于SEQ ID NO:2的编号在位置157处的缬氨酸(Val或V)和任选的位置67处的谷氨酸(Glu或E)。在某些实施方案中,AAVhu68衣壳中vp3蛋白相对于vp1和vp2蛋白的比率低于先前对AAV9和其他进化枝F AAV的衣壳的描述。在某些实施方案中,AAVhu68衣壳由比率为约1个vp1:1至约1.5个vp2:3至约10个vp3的AAVhu68vp1蛋白、AAVhu68vp2蛋白和AAVhu68vp3蛋白构成。在某些实施方案中,rAAVhu68病毒原种或rAAVhu68群是在AAVhu68衣壳中具有平均约60个总vp1、vp2和vp3蛋白的组合物,其平均vp1:vp2:vp3比率为约1:约1:约3至6。本文所述的这些AAV衣壳用于产生提供良好产量和/或包装效率的重组AAV(rAAV)载体,并提供用于转导许多不同细胞和组织类型的rAAV载体。这样的细胞和组织类型可包括但不限于肺、心脏、肌肉、肝、胰腺、肾、脑、海马、运动皮质、小脑、鼻上皮细胞、心脏肌细胞或心肌细胞、肝细胞、肺内皮细胞、肌细胞、肺上皮细胞、胰岛细胞、腺泡细胞、肾细胞和/或运动神经元。

[0048] “重组AAV”或“rAAV”是含有两种元件的DNA酶抗性病毒颗粒:AAV衣壳和包装在AAV衣壳内的包含至少非AAV编码序列的载体基因组。除非另有说明,否则该术语可与短语“rAAV载体”互换使用。rAAV是“复制缺陷型病毒”或“病毒载体”,因为其缺少任何功能性AAVrep基因或功能性AAVcap基因并且不能产生子代。在某些实施方案中,唯一的AAV序列是AAV反向末端重复序列(ITS),其通常位于载体基因组的最5'和3'末端,以使位于ITS之间的基因和调节序列包装在AAV衣壳内。

[0049] 如本文所用,“载体基因组”是指包装在形成病毒颗粒的rAAV衣壳内的核酸序列。这样的核酸序列包含AAV反向末端重复序列(ITS)。在本文的该实例中,载体基因组至少以5'至3'包含AAV 5' ITS、编码序列和AAV 3' ITS。可以选择来自AAV2(不同于衣壳的来源AAV)的ITS或者除了全长ITS之外的ITS。在某些实施方案中,ITS来自与在生产期间提供rep功能的AAV相同的AAV来源或反式互补AAV。此外,可以使用其他ITS。此外,载体基因组包含指导基因产物表达的调节序列。本文更详细地讨论了载体基因组的合适组分。

[0050] rAAVhu68由AAVhu68衣壳和载体基因组构成。AAVhu68衣壳是vp1异质群、vp2异质群体和vp3蛋白异质群的组装体。如本文所用,当用于指vp衣壳蛋白时,术语“异质”或其任何语法变体是指由不相同的元件组成的群体,例如具有具不同的修饰的氨基酸序列的vp1、vp2或vp3单体(蛋白质)。SEQ ID NO:2提供了AAVhu68vp1蛋白的编码的氨基酸序列。

[0051] AAVhu68衣壳包含vp1蛋白内、vp2蛋白内和vp3蛋白内的亚群,其具有相对于SEQ ID NO:2中预测氨基酸残基的修饰。这些亚群至少包含某些脱酰胺的天冬酰胺(N或Asn)残基。例如,某些亚群包含SEQ ID NO:2中的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少一个、两个、三个或四个高度脱酰胺的天冬酰胺(N)位置,并且任选地还包含其他脱酰胺氨基酸,其中脱酰胺导致氨基酸变化和其他任选修饰。SEQ ID NO:14提供了修饰的AAVhu68衣壳的氨基酸序列,举例说明了可以具有一定百分比的脱酰胺或其他修饰的氨基酸的位置。本文描述了这些和其他修饰的多种组合。

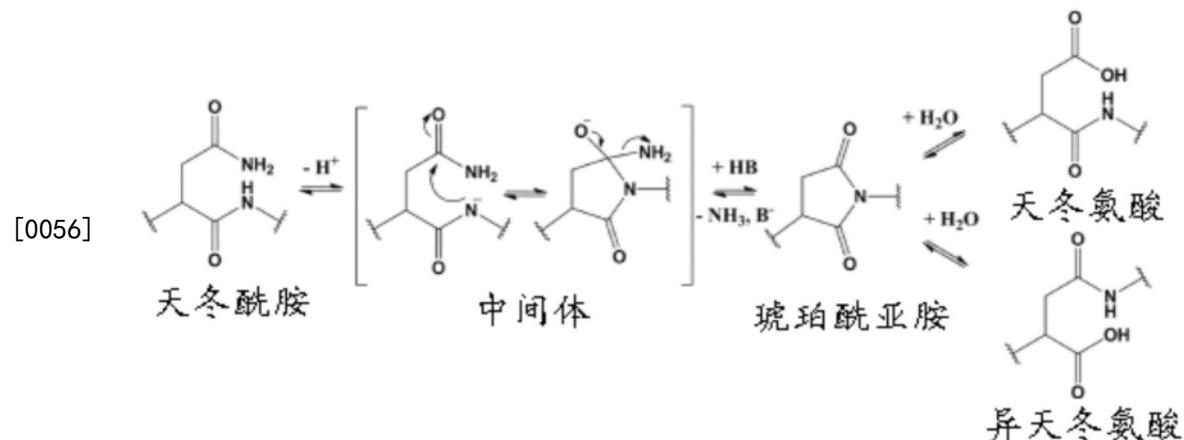
[0052] 如本文所用,除非另有说明,否则vp蛋白的“亚群”是指vp蛋白的组,其具有至少一个确定的共同特征,并且由参考组的至少一个组成员至少于全部成员组成。例如,除非另有说明,否则vp1蛋白的“亚群”是组装的AAV衣壳中的至少一(1)个vp1蛋白并且少于全部vp1蛋白。除非另有说明,否则vp3蛋白的“亚群”可以是组装的AAV衣壳中的一(1)个vp3蛋白至少于全部vp3蛋白。例如,vp1蛋白可以是vp蛋白的亚群;vp2蛋白可以是vp蛋白的单独亚群,

并且vp3是组装的AAV衣壳中vp蛋白的另一亚群。在另一个实例中, vp1、vp2和vp3蛋白可包含具有不同修饰的亚群, 例如至少一个、两个、三个或四个高度脱酰胺的天冬酰胺, 例如在天冬酰胺-甘氨酸对处。

[0053] 除非另有说明, 否则高度脱酰胺是指与参考氨基酸位置的预测氨基酸序列相比, 在参考氨基酸位置处至少45%脱酰胺、至少50%脱酰胺、至少60%脱酰胺、至少65%脱酰胺、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、97%、99%、至多约100%脱酰胺(例如基于全部vp1蛋白, SEQ ID N0:2的氨基酸57处的至少80%的天冬酰胺可以被脱酰胺, 或者基于全部vp1、vp2和vp3蛋白, SEQ ID N0:2的氨基酸409处的天冬酰胺中20%可以被脱酰胺)。可以使用2D-凝胶、质谱技术或其他合适的技术来确定这样的百分比。

[0054] 不希望受理论束缚, AAVhu68衣壳中的vp蛋白中至少高度脱酰胺残基的脱酰胺被认为在性质上主要是非酶促的, 由衣壳蛋白中使选择的天冬酰胺和较小程度上谷氨酰胺残基脱酰胺的基团引起。大多数脱酰胺vp1蛋白的有效衣壳组装表明这些事件发生在衣壳组装之后, 或者单个单体(vp1、vp2或vp3)中的脱酰胺在结构上是良好耐受的并且在很大程度上不影响组装动力学。VP1-独特(VP1-u)区域(~aa 1-137)中的广泛脱酰胺通常被认为在细胞进入之前位于内部, 表明VP脱酰胺可能发生在衣壳组装之前。

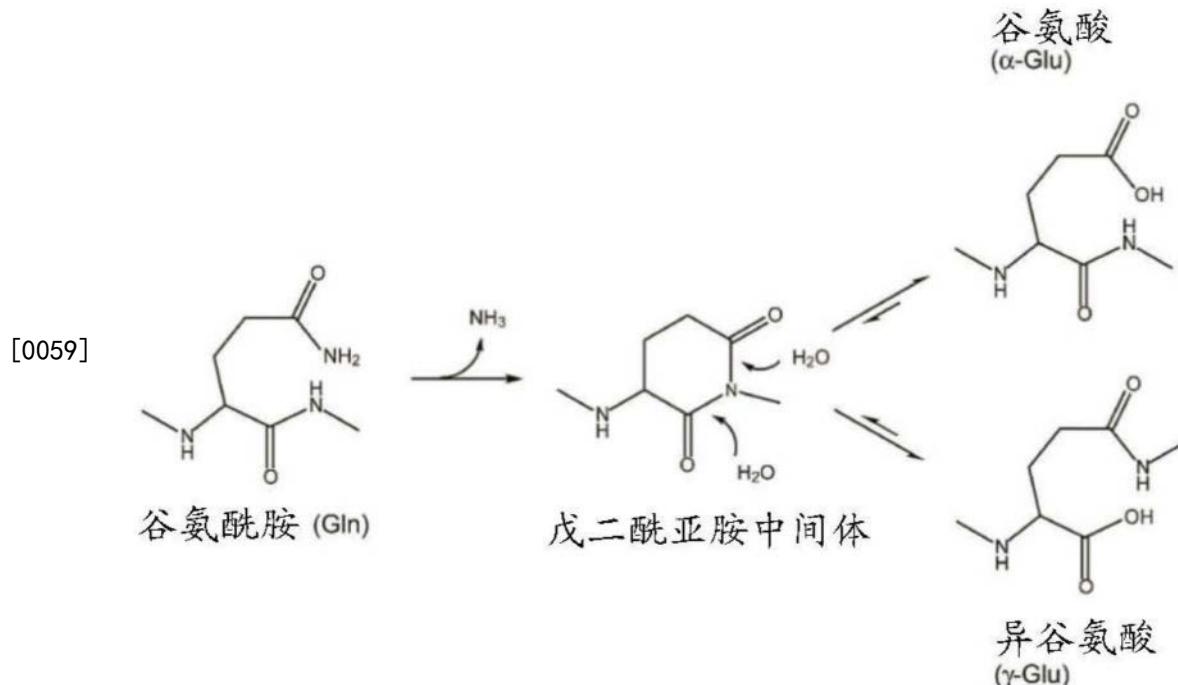
[0055] 不希望受理论束缚, 可以通过其C-末端残基的主链氮原子对Asn的侧链酰胺基团碳原子进行亲核攻击来发生N的脱酰胺。认为形成了中间体闭环琥珀酰亚胺残基。然后琥珀酰亚胺残基进行快速水解, 得到最终产物天冬氨酸(Asp)或异天冬氨酸(IsoAsp)。因此, 在某些实施方案中, 天冬酰胺(N或Asn)的脱酰胺产生Asp或IsoAsp, 其可以通过的琥珀酰亚胺中间体相互转化, 例如如下所示。



[0057] 如本文所提及, SEQ ID N0:2的每个脱酰胺N可独立地为天冬氨酸(Asp)、异天冬氨酸(isoAsp)、天冬氨酸盐(aspartate)、和/或Asp和isoAsp的互变混合物、或其组合。可以存在任何合适比率的 $\alpha$ -和异天冬氨酸。例如, 在某些实施方案中, 该比率可以为10:1至1:10的天冬氨酸比异天冬氨酸, 约50:50的天冬氨酸:异天冬氨酸, 或约1:3的天冬氨酸:异天冬氨酸, 或其他选择的比率。

[0058] 在某些实施方案中, SEQ ID N0:2中的一个或多个谷氨酰胺(Q)脱酰胺成谷氨酸(Glu), 即 $\alpha$ -谷氨酸、 $\gamma$ -谷氨酸(Glu)、或 $\alpha$ -和 $\gamma$ -谷氨酸的混合物, 其可以通过共同的戊二酰亚胺(glutarinimide)中间体进行相互转化。可以存在任何合适比率的 $\alpha$ -和 $\gamma$ -谷氨酸。例如, 在某些实施方案中, 该比率可以为10:1至1:10的 $\alpha$ 比 $\gamma$ , 约50:50的 $\alpha$ : $\gamma$ , 或约1:3的 $\alpha$ :

$\gamma$  ,或其他选择的比率。



[0060] 因此, rAAVhu68在rAAVhu68衣壳内包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的具有脱酰胺氨基酸的亚群, 其至少包含含有至少一个高度脱酰胺的天冬酰胺的至少一个亚群。此外, 其他修饰可包括异构化, 特别是在所选的天冬氨酸(D或Asp)残基位置。在另一些实施方案中, 修饰可包括Asp位置的酰胺化。

[0061] 在某些实施方案中, AAVhu68衣壳包含与SEQ ID NO:2的编码氨基酸序列相比具有至少4个至至少约25个脱酰胺氨基酸残基位置的vp1、vp2和vp3亚群, 其中至少1%至10%被脱酰胺。这些中的大多数可以是N残基。但是, Q残基也可以被脱酰胺。

[0062] 在某些实施方案中, AAV68衣壳的特征还在于以下的一种或多种。AAVhu68衣壳蛋白包含:由编码SEQ ID NO:2的1至736的预测氨基酸序列的核酸序列表达所产生的AAVhu68vp1蛋白, 由SEQ ID NO:1产生的vp1蛋白, 或者由与编码SEQ ID NO:2的1至736的预测氨基酸序列的SEQ ID NO:1具有至少70%同一性的核酸序列产生的vp1蛋白;由编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸138至736的预测氨基酸序列的核酸序列表达所产生的AAVhu68vp2蛋白, 由包含SEQ ID NO:1的至少核苷酸412至2211的序列产生的vp2蛋白, 或者由与编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸138至736的预测氨基酸序列的SEQ ID NO:1的至少核苷酸412至2211具有至少70%同一性的核酸序列产生的vp2蛋白;和/或由编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸203至736的预测氨基酸序列的核酸序列表达所产生的AAVhu68vp3蛋白, 由包含SEQ ID NO:1的至少核苷酸607至2211的序列产生的vp3蛋白, 或者由与编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸203至736的预测氨基酸序列的SEQ ID NO:1的至少核苷酸607至2211具有至少70%同一性的核酸序列产生的vp3蛋白。

[0063] 另外或可替代地, 提供了一种AAV衣壳, 其包含:任选地包含位置157处的缬氨酸的vp1蛋白的异质群、任选地包含位置157处的缬氨酸的vp2蛋白的异质群、和vp3蛋白的异质群, 其中基于SEQ ID NO:2的vp1衣壳的编号, 至少vp1和vp2亚群包含位置157处的缬氨酸, 并且任选地还包含位置67处的谷氨酸。另外或可替代地, 提供了一种AAVhu68衣壳, 其包含:

为编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的核酸序列的产物的vp1蛋白的异质群,为编码SEQ ID NO:2的至少约氨基酸138至736的氨基酸序列的核酸序列的产物的vp2蛋白的异质群,以及为编码SEQ ID NO:2的至少氨基酸203至736的核酸序列的产物的vp3蛋白的异质群,其中:vp1、vp2和vp3蛋白包含具有氨基酸修饰的亚群。

[0064] AAVhu68vp1、vp2和vp3蛋白通常表达为由编码SEQ ID NO:2的全长vp1氨基酸序列(氨基酸1至736)的相同核酸序列编码的可选剪接变体。任选地, vp1编码序列单独用于表达vp1、vp2和vp3蛋白。或者,该序列可以与以下的一种或多种共表达:编码不具有vp1独特区域(约aa 1至约aa 137)和/或vp2独特区域(约aa 1至约aa 202)的SEQ ID NO:2的AAVhu68vp3氨基酸序列(约aa 203至736)的核酸序列,或其互补链相应mRNA或tRNA(或SEQ ID NO:1的约nt 607至约nt 2211),或者与编码SEQ ID NO:2的aa 203至736的SEQ ID NO:1具有至少70%至至少99%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的序列。另外或可替选地, vp1编码序列和/或vp2编码序列可以与以下共表达:编码不具有vp1独特区域(约aa 1至约137)的SEQ ID NO:2的AAVhu68vp2氨基酸序列(约aa 138至736)的核酸序列,或其互补链相应mRNA或tRNA(SEQ ID NO:1的nt 412至22121),或与编码SEQ ID NO:2的约aa 138至736的SEQ ID NO:1具有至少70%至至少99%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的序列。

[0065] 如本文所述,rAAVhu68具有在生产系统中从编码SEQ ID NO:2的vp1氨基酸序列的AAVhu68核酸和任选的例如编码不含vp1和/或vp2独特区域的vp3蛋白的另外的核酸序列产生的rAAVhu68衣壳。使用单个核酸序列vp1产生的rAAVhu68产生了vp1蛋白、vp2蛋白和vp3蛋白的异质群。更具体地,AAVhu68衣壳包含vp1蛋白内、vp2蛋白内和vp3蛋白内相对于SEQ ID NO:2中的预测氨基酸残基具有修饰的亚群。这些亚群至少包含脱酰胺的天冬酰胺(N或Asn)残基。例如,天冬酰胺-甘氨酸对中的天冬酰胺是高度脱酰胺的。

[0066] 在一个实施方案中,AAVhu68vp1核酸序列具有SEQ ID NO:1的序列,或其互补链,例如相应的mRNA或tRNA。在某些实施方案中,vp2和/或vp3蛋白可以另外地或替代地从除vp1以外的不同核酸序列表达,例如以改变所选表达系统中vp蛋白的比率。在某些实施方案中,还提供了编码不具有vp1独特区域(约aa 1至约aa 137)和/或vp2独特区域(约aa 1至约aa 202)的SEQ ID NO:2的AAVhu68vp3氨基酸序列(约aa 203至736)的核酸序列,或其互补链相应mRNA或tRNA(或SEQ ID NO:1的约nt 607至约nt 2211)。在某些实施方案中,还提供了编码不具有vp1独特区域(约aa 1至约137)的SEQ ID NO:2的AAVhu68vp2氨基酸序列(约aa 138至736)的核酸序列,或其互补链相应mRNA或tRNA(或SEQ ID NO:1的约nt 412至2211)。

[0067] 然而,可以选择编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的其他核酸序列用于产生rAAVhu68衣壳。在某些实施方案中,核酸序列具有SEQ ID NO:1的核酸序列,或者与编码SEQ ID NO:2的SEQ ID NO:1具有至少70%至99%同一性、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%同一性的序列。在某些实施方案中,核酸序列具有SEQ ID NO:1的核酸序列,或者与编码SEQ ID NO:2的vp2衣壳蛋白(约aa 138至736)的SEQ ID NO:1的约nt 412至约nt 2211具有至少70%至99%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%同一性的序列。在某些实施方案中,核酸序列具有SEQ ID NO:1的约nt 607至约nt 2211的核酸序列,或者与编码SEQ ID NO:2的vp3衣壳蛋白(约aa 203至736)的SEQ ID NO:1具有至少70%至99%、至少75%、至少80%、至少85%、至少

90%、至少95%、至少97%、至少99%同一性序列。

[0068] 设计编码该AAVhu68衣壳的核酸序列(包括DNA(基因组或cDNA)或RNA(例如mRNA))在本领域技术范围内。在某些实施方案中,编码AAVhu68vp1衣壳蛋白的核酸序列提供在SEQ ID NO:1中。还参见图2A-1、2A-2、2B-1、2B-2和2C。在另一些实施方案中,可以选择与SEQ ID NO:1具有70%至99.9%同一性的核酸序列以表达AAVhu68衣壳蛋白。在某些另外的实施方案中,该核酸序列与SEQ ID NO:1具有至少约75%同一性、至少80%同一性、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%同一性、或至少99%至99.9%同一性。这样的核酸序列可以密码子优化以在选择的系统(即,细胞类型)中表达,这可以通过各种方法设计。可以使用可在线获得的方法(例如,GeneArt)、公开的方法或提供密码子优化服务的公司例如DNA2.0(Menlo Park, CA)来进行该优化。一种密码子优化方法描述于例如美国国际专利公开号WO 2015/012924中,其通过引用整体并入本文。还参见例如美国专利公开号2014/0032186和美国专利公开号2006/0136184。适当地,对产物的开放阅读框(ORF)的整个长度进行修饰。然而,在一些实施方案中,可以仅改变ORF的片段。通过使用这些方法之一,可以将频率应用于任何给定的多肽序列,并产生编码多肽的密码子优化编码区的核酸片段。许多选择可用于进行密码子的实际改变或用于合成如本文所述设计的密码子优化的编码区。这样的修饰和合成可以使用本领域普通技术人员熟知的标准和常规分子生物学操作进行。在一种方法中,通过标准方法合成一系列各自长度为80-90个核苷酸且跨越期望序列的长度的互补寡核苷酸对。合成这些寡核苷酸对,使得它们在退火时形成包含粘性末端的80-90个碱基对的双链片段,例如,合成对中的每个寡核苷酸以延伸超过与对中的另一寡核苷酸互补的区域3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基。每个寡核苷酸对的单链末端设计为与另一个寡核苷酸对的单链末端退火。使寡核苷酸对退火,然后使约5至6个这些双链片段通过粘性单链末端一起退火,然后将它们连接在一起并克隆到标准细菌克隆载体中,例如可从Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif获得的TOPO®载体。然后通过标准方法对构建体进行测序。制备由连接在一起的80至90个碱基对片段的5至6个片段构成的多个这些构建体(即约500个碱基对的片段),使得整个期望序列在一系列质粒构建体中表示。然后用合适的限制酶切割这些质粒的插入物并连接在一起形成最终的构建体。然后将最终构建体克隆到标准细菌克隆载体中,并测序。其他方法对于技术人员来说是显而易见的。此外,基因合成在商业上很容易获得。

[0069] 在某些实施方案中,AAVhu68vp1、vp2和vp3蛋白中的N-G对中的天冬酰胺(N)是高度脱酰胺的。在某些实施方案中,AAVhu68衣壳包含AAVvp 1、vp2和/或vp3衣壳蛋白的亚群,该亚群在AAVhu68衣壳蛋白中具有至少四个高度脱酰胺的天冬酰胺(N)位置。在某些实施方案中,约20%至50%的N-N对(不包括N-N-N三联体)表现为脱酰胺。在某些实施方案中,第一个N被脱酰胺。在某些实施方案中,第二个N被脱酰胺。在某些实施方案中,脱酰胺为约15%至约25%脱酰胺。对于AAVhu68蛋白的AAVhu68vp1、vp2和vp3衣壳蛋白,SEQ ID NO:2的位置259处的Q处的脱酰胺为约8%至约42%。

[0070] 在某些实施方案中,rAAVhu68衣壳的特征还在于vp1、vp2和vp3蛋白的D297处的酰胺化。在某些实施方案中,基于SEQ ID NO:2的编号,AAVhu68衣壳中vp1、vp2和/或vp3蛋白的位置297处的D中约70%至约75%酰胺化。

[0071] 在某些实施方案中,衣壳的vp1、vp2和/或vp3中的至少一个Asp异构化为D-Asp。基

于SEQ ID NO:2的编号,这些异构体通常以残基位置97、107、384中的一个或多个处的Asp的少于约1%的量存在。

[0072] 在某些实施方案中, rAAVhu68具有具vp1、vp2和vp3蛋白的AAVhu68衣壳,所述蛋白具有包含在下表中列出的位置处的一个、两个、三个、四个或更多个脱酰胺残基的组合的亚群。可以使用2D凝胶电泳和/或质谱法和/或蛋白质建模技术来确定rAAV中的脱酰胺。可以用Acclaim PepMap柱和与具有NanoFlex源的Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific)偶联的Thermo UltiMate 3000RSLC系统 (Thermo Fisher Scientific) 进行在线色谱法。使用Q Exactive HF的数据依赖性top-20方法获取MS数据,从调查扫描 (200-2000m/z) 动态选择最丰富的尚未测序的前体离子。通过更高能量的碰撞解离片段化 (collisional dissociation fragmentation) 进行测序,其中通过预测性自动增益对照 (predictive automatic gain control) 确定1e5离子的目标值,并且使用4m/z的窗口进行前体的分离。以m/z 200下120,000的分辨率获得调查扫描。HCD光谱的分辨率可设置为m/z 200下30,000,最大离子注入时间为50ms,标准碰撞能量为30。S-lens RF水平可以设定为50,以给出由来自消化物的肽占据的m/z区域的最佳传递。前体离子可以从片段化选择中以单个、未指定的、或六个和更高的电荷状态排除。可以使用BioPharma Finder 1.0软件 (Thermo Fisher Scientific) 分析所获得的数据。对于肽作图,使用单入口蛋白质FASTA数据库进行搜索,其中氨甲酰甲基化设定为固定修饰;氧化、脱酰胺和磷酸化设定为可变修饰,10ppm质量准确度,高蛋白酶特异性和MS/MS谱的置信水平为0.8。合适的蛋白酶的实例可包括例如胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶。脱酰胺肽的质谱鉴定相对简单,因为脱酰胺使完整分子的质量增加了+0.984Da (-OH和-NH<sub>2</sub>基团之间的质量差异)。特定肽的脱酰胺百分比是确定的脱酰胺肽的质量面积除以脱酰胺和天然肽的面积之和。考虑到可能的脱酰胺位点的数量,在不同位点脱酰胺的同量异位 (isobaric) 物质可能在单个峰中共迁移。因此,源自具有多个潜在脱酰胺位点的肽的片段离子可用于定位或区分多个脱酰胺位点。在这些情况下,观察到的同位素模式中的相对强度可用于特异地确定不同脱酰胺肽异构体的相对丰度。该方法假定所有同量异位物质的片段化效率是相同的并且独立于脱酰胺的位点。本领域技术人员将理解,可以使用这些说明性方法的许多变型。例如,合适的质谱仪可包括例如四极飞行时间质谱仪 (quadrupole time of flight mass spectrometer, QTOF),例如Waters Xevo或Agilent 6530或轨道阱 (orbitrap) 仪器,例如Orbitrap Fusion或Orbitrap Velos (Thermo Fisher)。合适的液相色谱系统包括例如来自Waters或Agilent系统的Acquity UPLC系统 (1100或1200系列)。合适的数据分析软件可包括例如MassLynx (Waters)、Pinpoint和Pepfinder (Thermo Fisher Scientific)、Mascot (Matrix Science)、Peaks DB (Bioinformatics Solutions)。还可以描述其他技术,例如X.Jin等人, Hu Gene Therapy Methods, Vol.28, No.5, pp.255-267, 2017年6月16日在线发表。

[0073]

脱酰胺 基于预测的 AAVHu68 [SEQ ID NO: 2]	基于 AAVHu68 衣壳中 VP1/VP2/VP3 蛋白的平均值%	
脱酰胺残基 + 1 (邻近 AA)	宽范围 百分比 (%)	窄范围 (%)
N57 (N-G)	78 至 100%	80 至 100、85 至 97
N66 (N-E)	0 至 5	0、1 至 5
N94 (N-H)	0 至 15,	0、1 至 15、5 至 12、8
N113 (N-L)	0 至 2	0、1 至 2
~N253 (N-N)	10 至 25	15 至 22

脱酰胺 基于预测的 AAVHu68 [SEQ ID NO: 2]	基于 AAVHu68 衣壳中 VP1/VP2/VP3 蛋白的平均值%	
脱酰胺残基 + 1 (邻近 AA)	宽范围 百分比 (%)	窄范围 (%)
Q259 (Q-I)	8 至 42	10 至 40、20 至 35
~N270 (N-D)	12 至 30	15 至 28
~N304 (N-N) (位置 303 也是 N)	0 至 5	1 至 4
N319 (N-I)	0 至 5	0、1 至 5、1 至 3
N329 * (N-G)*(位置 328 也是 N)	65 至 100	70 至 95、85 至 95、80 至 100、85 至 100
N336 (N-N)	0 至 100	0、1 至 10、25 至 100、30 至 100、30 至 95
~N409 (N-N)	15 至 30	20 至 25
N452 (N-G)	75 至 100	80 至 100、90 至 100、95 至 100,
N477 (N-Y)	0 至 8	0、1 至 5
N512 (N-G)	65 至 100	70 至 95、85 至 95、80 至 100、85 至 100,
~N515 (N-S)	0 至 25	0、1 至 10、5 至 25、15 至 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1 至 20	2 至 20、5 至 15
N628 (N-F)	0 至 10	0、1 至 10、2 至 8
N651 (N-T)	0 至 3	0、1 至 3
N663 (N-K)	0 至 5	0、1 至 5、2 至 4
N709 (N-N)	0 至 25	0、1 至 22、15 至 25
N735	0 至 40	0、1 至 35、5 至 50、

[0074]

[0075]	脱酰胺 基于预测的 AAVHu68 [SEQ ID NO: 2]	基于 AAVHu68 衣壳中 VP1/VP2/VP3 蛋白的平均值%	
	脱酰胺残基 + 1 (邻近 AA)	宽范围 百分比 (%)	窄范围 (%)
			20 至 35

[0076] 在某些实施方案中,AAVhu68衣壳的特征在于,其衣壳蛋白中在基于SEQ ID NO:2的氨基酸序列编号的位置N57、N329、N452和/或N512中的至少一处的至少45%的N残基被脱酰胺。在某些实施方案中,在这些N-G位置(即基于SEQ ID NO:2的氨基酸序列的编号,N57、N329、N452和/或N512)的一处或更多处的至少约60%、至少约70%、至少约80%、或至少90%的N残基被脱酰胺。在这些和另一些实施方案中,AAVhu68衣壳的特征还在于具有其中在以下一个或多个位置处的N残基中约1%至约20%具有脱酰胺的蛋白质群:基于SEQ ID NO:2的氨基酸序列编号,N94、N253、N270、N304、N409、N477和/或Q599。在某些实施方案中,AAVhu68至少包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的亚群,该亚群在以下的一个或多个位置处被脱酰胺:基于SEQ ID NO:2的氨基酸序列编号,N35、N57、N66、N94、N113、N252、N253、Q259、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N329、N336、N409、N410、N452、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709、N735,或其组合。在某些实施方案中,衣壳蛋白可具有一个或多个酰胺化氨基酸。

[0077] 还观察到其他修饰,其中大多数不导致一个氨基酸转化为不同的氨基酸残基。任选地,衣壳的vp1、vp2和vp3中的至少一个Lys被乙酰化。任选地,衣壳的vp1、vp2和/或vp3中的至少一个Asp异构化为D-Asp。任选地,衣壳的vp1、vp2和/或vp3中的至少一个S(Ser,丝氨酸)被磷酸化。任选地,衣壳的vp1、vp2和/或vp3中的至少一个T(Thr,苏氨酸)被磷酸化。任选地,衣壳的vp1、vp2和/或vp3中的至少一个W(trp,色氨酸)被氧化。任选地,衣壳的vp1、vp2和/或vp3中的至少一个M(Met,甲硫氨酸)被氧化。在某些实施方案中,衣壳蛋白具有一个或多个磷酸化。例如,某些vp1衣壳蛋白可在位置149处磷酸化。

[0078] 在某些实施方案中,AAVhu68衣壳包含:vp1蛋白的异质群,其是编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的核酸序列的产物,其中vp1蛋白包含位置67处的谷氨酸(Glu)和/或位置157处的缬氨酸(Val);vp2蛋白的异质群,其任选地包含位置157处的缬氨酸(Val);和vp3蛋白的异质群。AAVhu68衣壳包含至少一个亚群,其中基于SEQ ID NO:2的氨基酸序列的残基编号,位于vp1蛋白的位置57处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少65%的天冬酰胺(N)以及vp1、v2和vp3蛋白的位置329、452和/或512处的天冬酰胺-甘氨酸对中的至少70%的天冬酰胺(N)被脱酰胺,其中脱酰胺导致氨基酸改变。

[0079] 如本文更详细讨论的,脱酰胺的天冬酰胺可以被脱酰胺为天冬氨酸、异天冬氨酸、互变天冬氨酸/异天冬氨酸对、或其组合。在某些实施方案中,rAAVhu68的特征还在于以下的一种或多种:(a)每个vp2蛋白独立地是编码SEQ ID NO:2的至少vp2蛋白的核酸序列的产物;(b)每个vp3蛋白独立地是编码SEQ ID NO:2的至少vp3蛋白的核酸序列的产物;(c)编码vp1蛋白的核酸序列是SEQ ID NO:1,或与SEQ ID NO:1具有至少70%至至少99%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的编码SEQ ID NO:2的

氨基酸序列的序列。任选地,该序列单独用于表达vp1、vp2和vp3蛋白。或者,该序列可以与以下的一种或多种共表达:编码不具有vp1独特区域(约aa 1至约aa 137)和/或vp2独特区域(约aa 1至约aa202)的SEQ ID NO:2的AAVhu68vp3氨基酸序列(约aa 203至736)的核酸序列,或其互补链相应mRNA或tRNA(SEQ ID NO:1的约nt607至约nt 2211),或者与编码SEQ ID NO:2的aa 203至736的SEQ ID NO:1具有至少70%至至少99%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的序列。另外或可替选地, vp1编码序列和/或vp2编码序列可以与以下共表达:编码不具有vp1独特区域(约aa 1至约137)的SEQ ID NO:2的AAVhu68vp2氨基酸序列(约aa 138至736)的核酸序列,或其互补链相应mRNA或tRNA(SEQ ID NO:1的nt412至2211),或与编码SEQ ID NO:2的约aa 138至736的SEQ ID NO:1具有至少70%至至少99%(例如至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%)同一性的序列。

[0080] 另外或可替代地, rAAVhu68衣壳至少包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的亚群,该亚群在下一个或多个位置处被脱酰胺:基于SEQ ID NO:2的编号,N57、N66、N94、N113、N252、N253、Q259、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N329、N336、N409、N410、N452、N477、N512、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709,或其组合;(e) rAAVhu68衣壳包含vp1、vp2和/或vp3蛋白的亚群,该亚群在下一个或多个位置处包含1%至20%的脱酰胺:基于SEQ ID NO:2的编号,N66、N94、N113、N252、N253、Q259、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N336、N409、N410、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709,或其组合;(f) rAAVhu68衣壳包含vp1的亚群,其中基于SEQ ID NO:2的编号, vp1蛋白位置57处的65%至100%的N被脱酰胺;(g) rAAVhu68衣壳包含vp1蛋白的亚群,其中vp1蛋白位置57处的75%至100%的N被脱酰胺;(h) rAAVhu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白的亚群,其中基于SEQ ID NO:2的编号,位置329处的80%至100%的N被脱酰胺;(i) rAAVhu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白的亚群,其中基于SEQ ID NO:2的编号,位置452处的80%至100%的N被脱酰胺;(j) rAAVhu68衣壳包含vp1蛋白、vp2蛋白和/或vp3蛋白的亚群,其中基于SEQ ID NO:2的编号,位置512处的80%至100%的N被脱酰胺;(k) rAAV包含约60个总衣壳蛋白,其比率为约1个vp1比约1至1.5个vp2比3至10个vp3蛋白;(l) rAAV包含约60个总衣壳蛋白,其比率为约1个vp1比约1个vp2比3至9个vp3蛋白。

[0081] 在某些实施方案中,对AAVhu68进行修饰以改变天冬酰胺-甘氨酸对中的甘氨酸,以降低脱酰胺。在另一些实施方案中,将天冬酰胺改变为不同的氨基酸,例如以较慢的速率脱酰胺的谷氨酰胺;或改变成缺少酰胺基团(amide group)的氨基酸(例如,谷氨酰胺和天冬酰胺包含酰胺基团);和/或缺少氨基(amine group)的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸包含酰胺基团)。如本文所用,缺少酰胺或胺侧基的氨基酸是指例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、胱氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、或色氨酸、和/或脯氨酸。如所述的修饰可以在编码的AAVhu68氨基酸序列中发现的一个、两个或三个天冬酰胺-甘氨酸对中。在某些实施方案中,这样的修饰不是在所有四个天冬酰胺-甘氨酸对中进行的。因此,一种用于降低AAVhu68和/或工程化AAVhu68变体的脱酰胺的方法具有较低脱酰胺速率。另外或可替代的,一个或多个其他酰胺氨基酸可以改变为非酰胺氨基酸以降低AAVhu68的脱酰胺。

[0082] 这些氨基酸修饰可以通过常规遗传工程技术进行。例如,可以产生含有修饰的

AAVhu68vp密码子的核酸序列,其中编码SEQ ID NO:2(精氨酸-甘氨酸对)中位置58、330、453和/或513处的甘氨酸的一至三个密码子被修饰成编码除甘氨酸以外的氨基酸。在某些实施方案中,可以在位于SEQ ID NO:2中位置57、329、452和/或512处的一至三个精氨酸-甘氨酸对处对包含修饰的精氨酸密码子的核酸序列进行工程化,使得修饰的密码子编码除精氨酸以外的氨基酸。每个修饰的密码子可以编码不同的氨基酸。或者,一个或多个改变的密码子可以编码相同的氨基酸。在某些实施方案中,这些修饰的AAVhu68核酸序列可用于产生突变rAAVhu68,其具有比天然hu68衣壳具有更低脱酰胺的衣壳。这样的突变rAAVhu68可具有降低的免疫原性和/或提高储存稳定性,特别是以悬浮形式储存。如本文所用,“密码子”是指序列中编码氨基酸的三个核苷酸。

**[0083]** 如本文所用,“编码的氨基酸序列”是指基于被翻译为氨基酸的参考核酸序列的已知DNA密码子的翻译而预测的氨基酸。下表举例说明了DNA密码子和20种常见氨基酸,示出了单字母代码 (SLC) 和三字母代码 (3LC) 。

氨基酸	SLC	3 LC	DNA 密码子	
异亮氨酸	I	Ile	ATT, ATC, ATA	
亮氨酸	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG	
缬氨酸	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG	
苯丙氨酸	F	Phe	TTT, TTC	
甲硫氨酸	M	Met	ATG	
半胱氨酸	C	Cys	TGT, TGC	
丙氨酸	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG	
甘氨酸	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG	
脯氨酸	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG	
苏氨酸	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG	
[0084]	丝氨酸	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
	酪氨酸	Y	Tyr	TAT, TAC
	色氨酸	W	Trp	TGG
	谷氨酰胺	Q	Gln	CAA, CAG
	天冬酰胺	N	Asn	AAT, AAC
	组氨酸	H	His	CAT, CAC
	谷氨酸	E	Glu	GAA, GAG
	天冬氨酸	D	Asp	GAT, GAC
	酪氨酸	K	Lys	AAA, AAG
	精氨酸	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
	终止密码子	Stop		TAA, TAG, TGA

[0085] 在某些实施方案中,AAVhu68衣壳可能是有用的。例如,这样的衣壳可用于产生单克隆抗体和/或产生用于监测基因疗法患者中AAVhu68浓度水平的测定中的试剂。用于产生有用的抗AAVhu68抗体、标记这样的抗体或空衣壳的技术以及合适的测定形式是本领域技术人员已知的。

[0086] 在某些实施方案中,本文提供SEQ ID N0:1的核酸序列,或至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%的序列,其编码具有如本文所述的修饰(例如脱酰氨酸)的SEQ ID N0:2的vp1氨基酸序列。在某些实施方案中,vp1氨基酸序列在SEQ ID N0:14中再现。

[0087] 如本文所用,与AAV组相关的术语“进化枝(clade)”是指在系统发生上彼此相关的一组AAV,如使用Neighbor-Joining算法通过至少75%的解靴带值(bootstrap value)(至少1000个重复)和基于AAV vp1氨基酸序列比对的泊松校正距离(Poisson correction

distance) 测量不大于0.05所确定的。Neighbor-Joining算法已在文献中描述。参见,例如, M. Nei and S. Kumar, Molecular Evolution and Phylogenetics (Oxford University Press, New York (2000)。可用于实施该算法的计算机程序是可获得的。例如,MEGA v2.1程序执行改进的Nei-Gojobori方法。使用这些技术和计算机程序以及AAV vp1衣壳蛋白的序列,本领域技术人员可以容易地确定所选择的AAV是否包含在本文鉴定的一个进化枝中,在另一个进化枝中,或者在这些进化枝之外。参见,例如,G. Gao, 等人, J Virol, 2004 Jun; 78 (10): 6381-6388, 其鉴定了进化枝A、B、C、D、E和F, 并且提供了GenBank登录号AY530553至AY530629的新AAV的核酸序列。还参见WO 2005/033321。

[0088] 在一个实施方案中,本发明提供了工程化分子,其包含在AAVhu68vp1编码序列和在AAVhu68rep编码序列之间的间隔序列。该编码序列是:atgacttaaaccagg, SEQ ID NO:9。AAVhu68的rep52的编码序列在SEQ ID NO:3中再现。rep52蛋白质序列在SEQ ID NO:4中再现。

[0089] 在一个实施方案中,提供了提高rAAV产量并因此提高在细胞裂解之前或者不需要细胞裂解的上清液中存在的rAAV的量的方法。该方法涉及对AAV VP1衣壳基因进行工程化,以表达基于具有AAVhu68vp1衣壳蛋白的氨基酸编号的比对,具有在位置67处的Glu而不具有位置157处的Val的衣壳蛋白。在另一些实施方案中,该方法涉及对AAVhu68VP1衣壳基因进行工程化,以表达具有位置157处的Val,而不具有在位置67处的Glu的衣壳蛋白。这样的其他AAV可以容易地选自其他进化枝FAAV或进化枝A、B、C、D或E中的AAV。在某些实施方案中,AAV选自进化枝C、D、E或F。在另一些实施方案中,AAV选自进化枝C、D或E。

[0090] 在另一些实施方案中,所述方法涉及提高rAAV产量并因此提高在细胞裂解之前或者不需要细胞裂解的上清液中存在的rAAV的量。该方法涉及对AAV VP1衣壳基因进行工程化,以表达基于具有AAVhu68vp1衣壳蛋白的氨基酸编号的比对,具有在位置67处的Glu、位置157处的Val或者其两者的衣壳蛋白。在另一些实施方案中,该方法涉及对VP2衣壳基因进行工程化,以表达具有在位置157处的Val的衣壳蛋白。在另一些实施方案中,rAAV具有修饰的衣壳,其包含在位置67处的Glu和位置157处的Val的vp1和vp2衣壳蛋白两者。

[0091] 在另一些实施方案中,可以对AAVhu68进行工程化,以参考vp1编号[SEQ ID NO:2],具有在位置67处的Ser、Gly、Ser或Thr,同时保留位置157处的Val。在另一些实施方案中,可以对AAVhu68进行工程化,以参考vp1编号[SEQ ID NO:2],具有在位置157处的Ile或Leu。在另一个实施方案中,可以对AAVhu68进行工程化,以参考vp1编号[SEQ ID NO:2],具有在位置67处的Ser、Gly、Ser或Thr,以及位置157处的Ile或Leu。

[0092] 在另一个实施方案中,将转基因包装入到进化枝F AAV中的方法,与AAV9相比,其使包装载体的产量提高至少15%,所述方法包括:根据合适的条件培养宿主细胞培养物。在某些实施方案中,提高是产量提高至少90%。在另一些实施方案中,提高是产量提高至少200%。

[0093] 在AAVhu68和AAVrh10之间的比较中,已发现在以较低剂量(例如约 $1 \times 10^9$  GC)脑室内施用后,AAVhu68提供比AAVrh10更好的转导效率。在AAVhu68和AAV9之间的进一步比较中,已发现在脑室内施用后,AAVhu68在脑的小脑、运动皮质和海马中提供比AAV9更好的转导效率(例如约 $1 \times 10^{11}$  GC)。

[0094] 在某些实施方案中,本发明提供了AAVhu68载体,其包含表达针对HER2受体的抗体

的载体基因组。这样的载体用于治疗和/或预防癌症。

[0095] 如本文所用,“AAV9衣壳”是由多个AAV9vp蛋白构成的自组装AAV衣壳。AAV9vp蛋白通常表达为由SEQ ID N0:5的核酸序列或与其至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少99%的序列编码的可选剪接变体,其编码SEQ ID N0:6的vp1氨基酸序列(GenBank登录号:AAS99264)。这些剪接变体导致SEQ ID N0:6的不同长度的蛋白质。在某些实施方案中,“AAV9衣壳”包括具有与AAS99264具有99%同一性或与SEQ ID N0:6具有99%同一性的氨基酸序列的AAV。还参见US7906111和WO 2005/033321。如本文所用,“AAV9变体”包括例如WO2016/049230、US 8,927,514、US2015/0344911和US 8,734,809中描述的那些。

[0096] 已经描述了产生衣壳、其编码序列的方法,以及产生rAAV病毒载体的方法。参见,例如,Gao,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100(10),6081-6086(2003)和US2013/0045186A1。

[0097] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同源(substantial homology)”或“基本相似(substantial similarity)”表示当利用适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳对齐时,对齐的序列中存在至少约95%至99%的核苷酸序列同一性。优选地,同源是在全长序列、或其开放阅读框、或长度为至少15个核苷酸的另一合适片段上。本文描述了合适片段的实例。

[0098] 在核酸序列的情况下,术语“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比同一性”是指在用于最大对齐时两个序列中相同的残基。序列同一性比较的长度可以是基因组的全长、基因编码序列的全长或至少约500至5000个核苷酸的片段是期望的。然而,可能期望较小片段之间的同一性,例如至少约9个核苷酸、通常至少约20至24个核苷酸、至少约28至32个核苷酸、至少约36个或更多个核苷酸。类似地,对于氨基酸序列,可以在蛋白质的全长或其片段上容易地确定“序列同一性百分比”。合适地,片段长度为至少约8个氨基酸,并且可以多至约700个氨基酸。本文描述了合适片段的实例。

[0099] 当提及氨基酸或其片段时,术语“基本同源”或“基本相似”表示当利用适当的氨基酸插入或缺失与另一氨基酸(或其互补链)最佳对齐时,对齐的序列中存在至少约95%至99%的氨基酸序列同一性。优选地,同源是在全长序列、或其蛋白质,例如cap蛋白、rep蛋白,或长度为至少8个氨基酸,或更理想地至少15个氨基酸的其片段。本文描述了合适片段的实例。

[0100] 术语“高度保守的”是指至少80%同一性,优选至少90%同一性,更优选大于97%同一性。通过本领域技术人员已知的算法和计算机程序,本领域技术人员可以容易地确定同一性。

[0101] 通常,当提及两个不同腺相关病毒的“同一性”、“同源性”或“相似性”时,参照“比对”序列来确定“同一性”、“同源性”或“相似性”。“比对”序列或“比对物”是指多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列,与参考序列相比,其通常含有对缺失或额外碱基或氨基酸的校正。在该实例中,使用公开的AAV9序列作为参考点进行AAV比对。使用多种公开的或市售多序列比对程序中的任何一种进行比对。这些程序的示例包括“Clustal Omega”、“Clustal W”、“CAP Sequence Assembly”、“MAP”、“MEME”,其可通过因特网上的Web服务器访问。这些程序的其他来源是本领域技术人员已知的。或者,也使用Vector NTI实用程序。本领域已知的许

多算法可用于测量核苷酸序列同一性,包括上述程序中包含的那些。作为另一个实例,可以使用Fasta™(GCG Version 6.1中的程序)比较多核苷酸序列。Fasta™提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性。例如,可以使用GCGVersion 6.1中提供的Fasta™以其默认参数(单词大小为6和评分矩阵的NOMPAM因子)来确定核酸序列之间的序列同一性百分比,其通过引用并入本文。多序列比对程序也可用于氨基酸序列,例如“Clustal Omega”、“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”、和“Match-Box”程序。通常,这些程序中的任何程序都在默认设置下使用,但是本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。或者,本领域技术人员可以利用其他种算法或计算机程序,该算法或计算机程序至少提供由参考算法和程序提供的同一性水平或比对物。参见,例如,J.D.Thomson等人, Nucl.Acids.Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27 (13):2682-2690 (1999)。

[0102] I.rAAV载体

[0103] 如上所述,新的AAVhu68序列和蛋白质用于生产rAAV,并且也用于重组AAV载体,重组AAV载体可以是反义递送载体、基因疗法载体或疫苗载体。另外,本文所述的工程化AAV衣壳,例如相对于SEQ ID NO:2中vp1衣壳蛋白的编号,在位置67、157处或其两者处具有突变氨基酸的衣壳,可用于工程化rAAV载体以将多种合适的核酸分子递送至靶细胞和组织。

[0104] 包装入AAV衣壳并递送至宿主细胞的基因组序列通常至少由转基因及其调节序列和AAV反向末端重复(ITS)构成。单链AAV和自身互补(sc)AAV都包含在rAAV中。转基因是与载体序列异源的核酸编码序列,其编码目的多肽、蛋白质、功能性RNA分子(例如,miRNA、miRNA抑制剂)或其他基因产物。核酸编码序列以允许转基因在靶组织的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与调节组分可操作地连接。

[0105] 载体的AAV序列通常包含顺式作用的5'和3'反向末端重复序列(参见,例如, B.J.Carter, in “Handbook of Parvoviruses”, ed., P.Tijsser, CRC Press, pp.155168 (1990))。ITS序列长度为约145bp。优选地,基本上编码ITS的整个序列都用在分子中,然而这些序列的一些程度的微小修饰是允许的。修饰这些ITS序列的能力在本领域的技术范围内。(参见,例如文献例如Sambrook等人, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 第2版,Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989);以及K.Fisher等人, J.Virology, 70: 520532 (1996))。用于本发明的这种分子的实例是含有转基因的“顺式作用”质粒,其中所选择的转基因序列和相关的调节元件的两侧是5'和3'AAVITS序列。在一个实施方案中,ITS来自不同于提供衣壳的AAV。在一个实施方案中,ITS序列来自AAV2。已经描述了缩短版本的5'ITS,称为ΔITS,其中D序列和末端分辨率位点(terminal resolution site, trs)缺失。在另一些实施方案中,使用全长AAV 5'和3'ITS。但是,也可以选择来自其他AAV来源的ITS。在ITS的来源来自AAV2并且AAV衣壳来自另一个AAV来源的情况下,所得到的载体可以称为假型化的(pseudotyped)。然而,这些元件的其他配置可能是合适的。

[0106] 除了上面鉴定的重组AAV载体的主要元件外,载体还包含必需的常规控制元件,其以允许转基因在用质粒载体转染或用本发明产生的病毒感染的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与转基因可操作地连接。如本文所用,“可操作地连接的”序列包括与目的基因相邻的表达控制序列和反式或远距离起作用以控制目的基因的表达控制序列。

[0107] 调节控制元件通常包含启动子序列作为表达控制序列的一部分,例如位于所选择

的5' ITR序列和编码序列之间。可以使用组成型启动子、调节型启动子[参见例如WO2011/126808和WO2013/04943]、组织特异性启动子、或对生理信号有响应的启动子用于本文描述的载体中。启动子可选自不同来源,例如人巨细胞病毒(CMV)立即早期增强子/启动子、SV40早期增强子/启动子、JC多瘤病毒启动子(JC polyomavirus promoter)、髓鞘碱性蛋白(MBP)或胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子、单纯疱疹病毒(HSV-1)潜伏相关启动子(LAP)、劳斯肉瘤病毒(RSV)长末端重复(LTR)启动子、神经元特异性启动子(NSE)、血小板衍生生长因子(PDGF)启动子、hSYN、黑色素浓缩激素(MCH)启动子、CBA、基质金属蛋白启动子(MPP)和鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子。除启动子外,载体可包含一个或多个其他合适的转录起始、终止、增强子序列,有效的RNA加工信号,例如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;使细胞质mRNA稳定的序列,例如WPRE;提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及当需要时,增强编码产物分泌的序列。合适的增强子的实例是CMV增强子。其他合适的增强子包括适合期望的靶组织适应症的增强子。在一个实施方案中,表达盒包含一个或多个表达增强子。在一个实施方案中,表达盒包含两个或更多个表达增强子。这些增强子可以相同或可以彼此不同。例如,增强子可包括CMV立即早期增强子。该增强子可以以彼此相邻的两个拷贝存在。或者,增强子的双拷贝可以被一个或多个序列分开。在另一个实施方案中,表达盒还含有内含子,例如鸡 $\beta$ -肌动蛋白内含子。其他合适的内含子包括本领域已知的内含子,例如WO2011/126808中描述的内含子。合适的polyA序列的实例包括例如SV40、SV50、牛生长激素(bGH)、人生长激素和合成polyA。任选地,可以选择一种或多种序列以使mRNA稳定。这样的序列的一个实例是修饰的WPRE序列,其可以设计在polyA序列的上游和编码序列的下游[参见,例如,MAZanta-Boussif,等人,Gene Therapy(2009)16:605-619]。

[0108] 这些rAAV特别适用于基因递送以用于治疗目的和用于免疫,包括诱导保护性免疫。此外,本发明的组合物还可用于体外产生期望的基因产物。对于体外生产,可以在用包含编码期望产物的分子的rAAV转染宿主细胞并且在允许表达的条件下培养细胞培养物后,从期望培养物获得期望产物(例如蛋白质)。然后可以根据需要纯化和分离表达产物。用于转染、细胞培养、纯化和分离的合适技术是本领域技术人员已知的。

[0109] 在某些实施方案中,本文提供的rAAV或组合物不包含抗流感抗体或免疫球蛋白构建体。在某些实施方案中,本文提供的rAAV或组合物不包含SMN编码序列。

[0110] 治疗基因和基因产物

[0111] 由转基因编码的有用产物包括多种基因产物,其替代缺陷或缺乏基因,失活或“敲除”、或“敲低”或降低以不希望的高水平表达的基因的表达,或者递送具有期望治疗效果的基因产物。在大多数实施方案中,疗法将是“体细胞基因疗法”,即将基因转移至不产生精子或卵子的身体细胞。在某些实施方案中,转基因表达的蛋白质具有天然人序列的序列。然而,在另一些实施方案中,表达合成蛋白质。这样的蛋白质可用于治疗人,或者在另一些实施方案中,用于治疗动物,包括伴侣动物如犬科动物或猫科动物,或用于治疗与人接触的家畜或其他动物。

[0112] 合适的基因产物的实例可包括与家族性高胆固醇血症、肌营养不良、囊性纤维化和罕见或孤儿疾病相关的那些。这样的罕见疾病的实例可包括脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)、亨廷顿氏病(Huntington's Disease)、Rett综合征(Rett Syndrome)(例如,甲基-CpG结合蛋白2(MeCP2);UniProtKB-P51608)、肌萎缩性脊髓侧索硬

化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) 、裘馨型肌肉失养症 (Duchenne Type Muscular dystrophy) 、弗里德希氏共济失调 (Friedrichs Ataxia) (例如, 共济蛋白) 、颗粒体蛋白前体 (PRGN) (与非阿尔茨海默氏症的脑退化相关, 包括额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia, FTD) 、进行性非流利性失语症 (progressive non-fluent aphasia, PNFA) 和语义痴呆 (semantic dementia)) 等。参见, 例如, [www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search\\_List.php](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php);

[0113] [rarediseases.info.nih.gov/diseases](http://rarediseases.info.nih.gov/diseases)。

[0114] 合适基因的实例可包括例如激素和生长和分化因子, 包括但不限于胰岛素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1 (GLP1) 、生长激素 (GH) 、甲状旁腺激素 (PTH) 、生长激素释放因子 (GRF) 、卵泡刺激素 (FSH) 、黄体生成素 (LH) 、人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 、血管内皮生长因子 (VEGF) 、血管生成素、血管抑制素、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 、促红细胞生成素 (EPO) (包括例如, 人、犬或猫 EPO) 、结缔组织生长因子 (CTGF) 、神经营养因子, 包括例如碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 、酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF) 、表皮生长因子 (EGF) 、血小板-衍生生长因子 (PDGF) 、胰岛素生长因子 I 和 II (IGF-I 和 IGF-II) 、转化生长因子  $\alpha$  超家族的任一种 (包括 TGF $\alpha$ ) 、激活素、抑制素、或骨形态发生蛋白 (BMP) BMP 1-15 中的任一何、heregulin/神经营调节蛋白 ARIA/neu 分化因子 (NDF) 家族生长因子中的任一种、神经生长因子 (NGF) 、脑源性神经营养因子 (BDNF) 、神经营养因子 NT-3 和 NT-4/5、睫状神经营养因子 (CNTF) 、神经胶质细胞系衍生神经营养因子 (GDNF) 、neurturin、集聚蛋白 (agrin) 、semaphorins/collapsins 家族的任一种、轴突生长诱向因子 (netrin) -1 和轴突生长诱向因子 -2 、肝细胞生长因子 (HGF) 、ephrins、noggin、sonic hedgehog 和酪氨酸羟化酶。

[0115] 其他有用的转基因产物包括调节免疫系统的蛋白质, 包括但不限于细胞因子和淋巴因子, 例如血小板生成素 (TP0) 、白细胞介素 (IL) IL-1 至 IL-36 (包括例如人白细胞介素 IL-1、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、IL-31、IL-35) 、单核细胞趋化蛋白、白血病抑制因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、Fas 配体、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和  $\beta$  、干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  、干细胞因子、f1k-2/f1t3 配体。由免疫系统产生的基因产物也用于本发明。这些包括但不限于免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE, 嵌合免疫球蛋白、人源化抗体、单链抗体、T 细胞受体、嵌合 T 细胞受体、单链 T 细胞受体、I 类和 II 类 MHC 分子, 以及工程化免疫球蛋白和 MHC 分子。例如, 在某些实施方案中, 可以设计 rAAV 抗体以递送犬或猫抗体, 例如抗 IgE、抗 IL31、抗 CD20、抗 NGF、抗 GnRH。有用的基因产物还包括补体调节蛋白, 例如补体调节蛋白、膜辅因子蛋白 (MCP) 、衰变加速因子 (DAF) 、CR1、CF2、CD59 和 C1 酯酶抑制剂 (C1-INH) 。

[0116] 其他有用的基因产物包括激素、生长因子、细胞因子、淋巴因子、调节蛋白和免疫系统蛋白的任何一种受体。本发明包括用于胆固醇调节和/或脂质调节的受体, 包括低密度脂蛋白 (LDL) 受体、高密度脂蛋白 (HDL) 受体、极低密度脂蛋白 (VLDL) 受体和清道夫受体。本发明还包括诸如类固醇激素受体超家族成员的基因产物, 包括糖皮质激素受体和雌激素受体、维生素 D 受体和其他核受体。此外, 有用的基因产物包括转录因子, 例如 jun、fos、max、mad、血清反应因子 (SRF) 、AP-1、AP2、myb、MyoD 和 肌细胞生成素、包含 ETS-box 的蛋白质、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、SP1、CCAAT-box 结合蛋白、干扰素调节因子 (IRF-1) 、Wilms 肿瘤蛋白、ETS 结合蛋白、STAT、GATA-box 结合蛋白, 例如

GATA-3和有翅螺旋蛋白的叉头家族(forkhead family of winged helix protein)。

[0117] 其他有用的基因产物包括氨基甲酰基合成酶I、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)、精氨酸琥珀酸合成酶、用于治疗精氨酸琥珀酸裂解酶缺乏症的精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨酸酶、富马酸乙酸酯(fumarylacetate)水解酶、苯丙氨酸羟化酶、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、恒河猴甲胎蛋白(AFP)、恒河猴绒毛膜促性腺激素(CG)、葡萄糖-6-磷酸酶、胆色素原脱氨酶、胱硫醚 $\beta$ -合酶(cystathione beta-synthase)、支链酮酸脱羧酶、白蛋白、异戊酰辅酶A脱氢酶、丙酰辅酶A羧化酶、甲基丙二酰辅酶A变位酶、戊二酰辅酶A脱氢酶、胰岛素、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、丙酮酸羧酸盐、肝磷酸化酶、磷酸化酶激酶、甘氨酸脱羧酶、H蛋白、T蛋白、囊性纤维化跨膜调节因子(CFTR)序列和肌营养不良蛋白基因产物[例如、小肌营养不良蛋白或微肌营养不良蛋白]。其他有用的基因产物包括酶,例如可用于酶替代疗法,用于由酶活性不足引起的各种病症。例如,包含甘露糖-6-磷酸的酶可用于治疗溶酶体贮积病(例如,合适的基因包括编码 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)的基因)。

[0118] 在某些实施方案中, rAAV可用于基因编辑系统,该系统可涉及一种rAAV或多种rAAV原种的共同施用。例如, rAAV可以工程化以递送SpCas9、SaCas9、ARCUS、Cpf1和其他合适的基因编辑构建体。

[0119] 其他有用的基因产物包括用于治疗血友病的那些,包括血友病B(包括因子IX)和血友病A(包括因子VIII及其变体,例如异二聚体的轻链和重链和B缺失的结构域;美国专利号6,200,560和美国专利号6,221,349)。在一些实施方案中,小基因包含因子VIII重链的前57个碱基对,其编码10个氨基酸信号序列,以及人生长激素(hGH)多腺苷酸化序列。在替代实施方案中,小基因还包含A1和A2结构域,以及来自B结构域的N末端的5个氨基酸,和/或B结构域的C末端的85个氨基酸,以及A3、C1和C2结构域。在另一些实施方案中,编码因子VIII重链和轻链的核酸在由编码B结构域的14个氨基酸的42个核酸分开的单个小基因中提供[美国专利号6,200,560]。

[0120] 其他有用的基因产物包括非天然存在的多肽,例如具有含有插入、缺失或氨基酸替换的非天然存在的氨基酸序列的嵌合或杂合多肽。例如,单链工程化免疫球蛋白可用于某些免疫功能不全的患者。其他类型的非天然存在的基因序列包括反义分子和催化核酸,例如核酶,其可用于减少靶标的过表达。

[0121] 基因表达的降低和/或调节对于治疗以过度增殖细胞为特征的过度增殖病症是特别理想的,癌症和银屑病也是如此。靶多肽包括与正常细胞相比仅在过度增殖细胞中产生或在过度增殖细胞中以更高水平产生的那些多肽。靶抗原包括由癌基因(例如myb、myc、fyn)和易位基因bcr/abl、ras、src、P53、neu、trk和EGFR编码的多肽。除了作为靶抗原的癌基因产物之外,用于抗癌治疗和保护方案的靶多肽包括由B细胞淋巴瘤产生的抗体的可变区,以及T细胞淋巴瘤的T细胞受体的可变区,其在一些实施方案中也用作自身免疫疾病的靶抗原。其他肿瘤相关多肽可用作靶多肽,例如在肿瘤细胞中以较高水平存在的多肽,包括由单克隆抗体17-1A识别的多肽和叶酸结合多肽(folatebinding polypeptide)。

[0122] 其他合适的治疗性多肽和蛋白质包括可用于治疗患有自身免疫疾病和病症的个体的那些,其通过赋予针对与自身免疫相关的靶标的广泛的保护性免疫应答,包括细胞受体和产生“自身”定向抗体的细胞。T细胞介导的自身免疫疾病包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化症(MS)、Sjögren综合征、结节病、胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、自身免疫性甲状腺

腺炎、反应性关节炎、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性肌炎、皮肌炎、银屑病、血管炎、韦格纳肉芽肿病、克罗恩病和溃疡性结肠炎。这些疾病中的每一种的特征在于T细胞受体 (TCR) 与内源性抗原结合并引发与自身免疫疾病相关的炎症级联反应。

[0123] 可以通过rAAV递送的其他示例性基因包括但不限于：葡萄糖-6-磷酸酶，与糖原贮积病或缺陷1A型 (GSD1) 有关；磷酸烯醇丙酮酸-羧激酶 (PEPCK) , 与PEPCK缺乏有关；细胞周期蛋白依赖性激酶样5 (CDKL5) , 也称为丝氨酸/苏氨酸激酶9 (STK9) , 与癫痫发作和严重的神经发育障碍有关；半乳糖-1磷酸尿苷酰转移酶，与半乳糖血症有关；苯丙氨酸羟化酶，与苯丙酮尿症 (PKU) 有关；支链 $\alpha$ -酮酸脱氢酶，与枫糖尿病 (Maple syrup urine disease) 有关；富马酰乙酰乙酸水解酶 (fumarylacetoacetate) , 与1型酪氨酸血症有关；甲基丙二酰辅酶A变位酶，与甲基丙二酸血症 (methylmalonic acidemia) 有关；中链酰基辅酶A脱氢酶，与中链乙酰辅酶A缺乏有关；鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) , 与鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏有关；精氨酸琥珀酸合成酶 (ASS1) , 与瓜氨酸血症有关；卵磷脂-胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 缺乏；甲基丙二酸血症 (MMA) ; Niemann-Pick病, C1型) ; 丙酸血症 (propionic academia, PA) ; 低密度脂蛋白受体 (LDLR) 蛋白, 与家族性高胆固醇血症 (FH) 有关；UDP-glucuronosyltransferase, 与Crigler-Najjar疾病有关；腺苷脱氨酶, 与严重联合免疫缺陷病有关；次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶, 与痛风和Lesch-Nyan综合征有关；生物素酶 (biotimidase) , 与生物素酶缺乏有关； $\alpha$ -半乳糖苷酶A ( $\alpha$ -GalA) , 与法布雷病 (Fabry disease) 有关；ATP7B, 与Wilson病相关； $\beta$ -葡萄糖脑苷脂酶, 与戈谢病2型和3型相关；过氧化物酶体膜蛋白70kDa, 与Zellweger综合征有关；芳基硫酸酯酶A (ARSA) , 与异染性脑白质营养不良有关；半乳糖脑苷脂酶 (GALC) , 与Krabbe病有关； $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (GAA) , 与Pompe病有关；鞘磷脂酶 (SMPD1) 基因, 与Nieman Pick病毒A型有关；精氨基琥珀酸合酶, 与成人发病II型瓜氨酸血症 (CTLN2) 有关；氨基甲酰磷酸合酶1 (CPS1) , 与尿素循环障碍有关；生存运动神经元 (SMN) 蛋白, 与脊髓性肌萎缩有关；神经酰胺酶, 与Farber脂肪肉芽肿病有关； $\beta$ -己糖胺酶 ( $\beta$ -hexosaminidase) , 与GM2神经节苷脂病和Tay-Sachs和Sandhoff疾病有关；天冬氨酰氨基葡萄糖苷酶, 与天冬氨酰葡萄糖胺尿症有关； $\alpha$ -岩藻糖苷酶, 与岩藻糖苷病有关； $\alpha$ -甘露糖苷酶, 与 $\alpha$ -甘露糖苷病 (alpha-mannosidosis) 有关；胆色素原脱氨酶 (porphobilinogen deaminase) , 与急性间歇性卟啉症 (AIP) 有关； $\alpha$ -1抗胰蛋白酶, 用于治疗 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症 (肺气肿) ；促红细胞生成素, 用于治疗地中海贫血引起的贫血或肾衰竭；血管内皮生长因子、血管生成素-1和成纤维细胞生长因子, 用于治疗缺血性疾病；血栓调节蛋白和组织因子途径抑制剂, 用于治疗闭塞血管, 例如在动脉粥样硬化、血栓形成或栓塞中见到的；芳香族氨基酸脱羧酶 (AADC) 和酪氨酸羟化酶 (TH) , 用于治疗帕金森病； $\beta$ 肾上腺素能受体、受磷蛋白的反义或突变形式、肌质网 (内质网) 腺苷三磷酸酶-2 (SERCA2) 和心脏腺苷酸环化酶, 用于治疗充血性心力衰竭；肿瘤抑制基因如p53, 用于治疗多种癌症；细胞因子, 例如各种白细胞介素之一, 用于治疗炎症和免疫紊乱和癌症；肌营养不良蛋白或微小肌营养不良蛋白 (minidystrophin) 和utrophin或miniutrophin, 用于治疗肌营养不良症；和胰岛素或GLP-1, 用于治疗糖尿病。

[0124] 其他感兴趣的基因和疾病包括例如dystonin基因, 与疾病例如遗传学感觉和自主神经病变VI型相关 (DST基因编码dystonin; 由于蛋白质的大小 (~ 7570aa) , 可能需要双重AAV载体; SCN9A相关疾病, 其中功能丧失突变体导致无法感觉到疼痛, 功能获得突变体导致

疼痛病症,例如红斑肢痛症(erythromelalgia)。另一中种病症是由于NEFL基因(神经丝轻链)突变引起的Charcot-Marie-Tooth 1F和2E型,以进行性外周运动和感觉神经病为特征,具有可变的临床和电生理表现。

[0125] 在某些实施方案中,本文描述的rAAV可用于治疗粘多糖(mucopolysaccharidoses, MPS)病症。这样的rAAV可包含携带编码α-L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)的核酸序列,用于治疗MPS I (Hurler、Hurler-Scheie和Scheie综合征);编码艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)的核酸序列,用于治疗MPS II (Hunter综合征);编码磺酰胺酶(sulfamidase) (SGSH) 的核酸序列,用于治疗MPS III A、B、C和D (Sanfilippo综合征);编码N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯硫酸酯酶(GALNS)的核酸序列,用于治疗MPS IVA和B (Morquio综合征);编码芳基硫酸酯酶B(ARSB)的核酸序列,用于治疗MPS VI (Maroteaux-Lamy综合征);编码用于透明质酸酶的核酸序列,用于治疗MPS I IX (透明质酸酶缺乏症);和编码β-葡糖醛酸糖苷酶的核酸序列,用于治疗MPS VII (Sly综合征)。

#### [0126] 免疫原性转基因

[0127] 在一些实施方案中,通过向患有癌症的受试者施用携带rAAV载体的rAAV,包含编码与癌症相关的基因产物(例如,肿瘤抑制剂)的核酸的rAAV载体可用于治疗癌症。在一些实施方案中,通过向患有癌症的受试者施用携带rAAV载体的rAAV,包含编码抑制与癌症相关的基因产物(例如癌基因)的表达的小干扰核酸(例如,shRNA、miRNA)的核酸的rAAV载体可用于治疗癌症。在一些实施方案中,包含编码与癌症相关的基因产物的核酸(或抑制与癌症相关的基因表达的功能性RNA)的rAAV载体可用于研究目的,例如,用于研究癌症或鉴定治疗癌症的疗法。以下是已知与癌症发展相关的示例性基因的非限制性列表(例如癌基因和肿瘤抑制因子):AARS、ABCB1、ABCC4、ABI2、ABL1、ABL2、ACK1、ACP2、ACY1、ADSL、AK1、AKR1C2、AKT1、ALB、ANPEP、ANXA5、ANXA7、AP2M1、APC、ARHGAP5、ARHGEF5、ARID4A、ASNS、ATF4、ATM、ATP5B、ATP50、AXL、BARD1、BAX、BCL2、BHLHB2、BLMH、BRAF、BRCA1、BRCA2、BTK、CANX、CAP1、CAPN1、CAPNS1、CAV1、CBFB、CBLB、CCL2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CCT5、CCYR61、CD24、CD44、CD59、CDC20、CDC25、CDC25A、CDC25B、CDC2L5、CDK10、CDK4、CDK5、CDK9、CDKL1、CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2D、CEBPG、CENPC1、CGRRF1、CHAF1A、CIB1、CKMT1、CLK1、CLK2、CLK3、CLNS1A、CLTC、COL1A1、COL6A3、COX6C、COX7A2、CRAT、CRHR1、CSF1R、CSK、CSNK1G2、CTNNNA1、CTNNB1、CTPS、CTSC、CTSD、CUL1、CYR61、DCC、DCN、DDX10、DEK、DHCR7、DHRS2、DHX8、DLG3、DVL1、DVL3、E2F1、E2F3、E2F5、EGFR、EGR1、EIF5、EPHA2、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ERCC3、ETV1、ETV3、ETV6、F2R、FASTK、FBN1、FBN2、FES、FGFR1、FGR、FKBP8、FN1、FOS、FOSL1、FOSL2、FOXG1A、FOXO1A、FRAP1、FRZB、FTL、FZD2、FZD5、FZD9、G22P1、GAS6、GCN5L2、GDF15、GNA13、GNAS、GNB2、GNB2L1、GPR39、GRB2、GSK3A、GSPT1、GTF2I、HDAC1、HDGF、HMMR、HPRT1、HRB、HSPA4、HSPA5、HSPA8、HSPB1、HSPH1、HYAL1、HYOU1、ICAM1、ID1、ID2、IDUA、IER3、IFITM1、IGF1R、IGF2R、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP5、IL1B、ILK、ING1、IRF3、ITGA3、ITGA6、ITGB4、JAK1、JAK1、JAK2、JAK3、JAK4、JAK5、JAK6、JAK7、JAK8、JAK9、JAK10、JAK11、JAK12、JAK13、JAK14、JAK15、JAK16、JAK17、JAK18、JAK19、JAK20、JAK21、JAK22、JAK23、JAK24、JAK25、JAK26、JAK27、JAK28、JAK29、JAK30、JAK31、JAK32、JAK33、JAK34、JAK35、JAK36、JAK37、JAK38、JAK39、JAK40、JAK41、JAK42、JAK43、JAK44、JAK45、JAK46、JAK47、JAK48、JAK49、JAK50、JAK51、JAK52、JAK53、JAK54、JAK55、JAK56、JAK57、JAK58、JAK59、JAK60、JAK61、JAK62、JAK63、JAK64、JAK65、JAK66、JAK67、JAK68、JAK69、JAK70、JAK71、JAK72、JAK73、JAK74、JAK75、JAK76、JAK77、JAK78、JAK79、JAK80、JAK81、JAK82、JAK83、JAK84、JAK85、JAK86、JAK87、JAK88、JAK89、JAK90、JAK91、JAK92、JAK93、JAK94、JAK95、JAK96、JAK97、JAK98、JAK99、JAK100、JAK101、JAK102、JAK103、JAK104、JAK105、JAK106、JAK107、JAK108、JAK109、JAK110、JAK111、JAK112、JAK113、JAK114、JAK115、JAK116、JAK117、JAK118、JAK119、JAK120、JAK121、JAK122、JAK123、JAK124、JAK125、JAK126、JAK127、JAK128、JAK129、JAK130、JAK131、JAK132、JAK133、JAK134、JAK135、JAK136、JAK137、JAK138、JAK139、JAK140、JAK141、JAK142、JAK143、JAK144、JAK145、JAK146、JAK147、JAK148、JAK149、JAK150、JAK151、JAK152、JAK153、JAK154、JAK155、JAK156、JAK157、JAK158、JAK159、JAK160、JAK161、JAK162、JAK163、JAK164、JAK165、JAK166、JAK167、JAK168、JAK169、JAK170、JAK171、JAK172、JAK173、JAK174、JAK175、JAK176、JAK177、JAK178、JAK179、JAK180、JAK181、JAK182、JAK183、JAK184、JAK185、JAK186、JAK187、JAK188、JAK189、JAK190、JAK191、JAK192、JAK193、JAK194、JAK195、JAK196、JAK197、JAK198、JAK199、JAK200、JAK201、JAK202、JAK203、JAK204、JAK205、JAK206、JAK207、JAK208、JAK209、JAK210、JAK211、JAK212、JAK213、JAK214、JAK215、JAK216、JAK217、JAK218、JAK219、JAK220、JAK221、JAK222、JAK223、JAK224、JAK225、JAK226、JAK227、JAK228、JAK229、JAK230、JAK231、JAK232、JAK233、JAK234、JAK235、JAK236、JAK237、JAK238、JAK239、JAK240、JAK241、JAK242、JAK243、JAK244、JAK245、JAK246、JAK247、JAK248、JAK249、JAK250、JAK251、JAK252、JAK253、JAK254、JAK255、JAK256、JAK257、JAK258、JAK259、JAK260、JAK261、JAK262、JAK263、JAK264、JAK265、JAK266、JAK267、JAK268、JAK269、JAK270、JAK271、JAK272、JAK273、JAK274、JAK275、JAK276、JAK277、JAK278、JAK279、JAK280、JAK281、JAK282、JAK283、JAK284、JAK285、JAK286、JAK287、JAK288、JAK289、JAK290、JAK291、JAK292、JAK293、JAK294、JAK295、JAK296、JAK297、JAK298、JAK299、JAK2000、JAK2001、JAK2002、JAK2003、JAK2004、JAK2005、JAK2006、JAK2007、JAK2008、JAK2009、JAK2010、JAK2011、JAK2012、JAK2013、JAK2014、JAK2015、JAK2016、JAK2017、JAK2018、JAK2019、JAK2020、JAK2021、JAK2022、JAK2023、JAK2024、JAK2025、JAK2026、JAK2027、JAK2028、JAK2029、JAK2030、JAK2031、JAK2032、JAK2033、JAK2034、JAK2035、JAK2036、JAK2037、JAK2038、JAK2039、JAK2040、JAK2041、JAK2042、JAK2043、JAK2044、JAK2045、JAK2046、JAK2047、JAK2048、JAK2049、JAK2050、JAK2051、JAK2052、JAK2053、JAK2054、JAK2055、JAK2056、JAK2057、JAK2058、JAK2059、JAK2060、JAK2061、JAK2062、JAK2063、JAK2064、JAK2065、JAK2066、JAK2067、JAK2068、JAK2069、JAK2070、JAK2071、JAK2072、JAK2073、JAK2074、JAK2075、JAK2076、JAK2077、JAK2078、JAK2079、JAK2080、JAK2081、JAK2082、JAK2083、JAK2084、JAK2085、JAK2086、JAK2087、JAK2088、JAK2089、JAK2090、JAK2091、JAK2092、JAK2093、JAK2094、JAK2095、JAK2096、JAK2097、JAK2098、JAK2099、JAK20000、JAK20001、JAK20002、JAK20003、JAK20004、JAK20005、JAK20006、JAK20007、JAK20008、JAK20009、JAK200010、JAK200011、JAK200012、JAK200013、JAK200014、JAK200015、JAK200016、JAK200017、JAK200018、JAK200019、JAK200020、JAK200021、JAK200022、JAK200023、JAK200024、JAK200025、JAK200026、JAK200027、JAK200028、JAK200029、JAK200030、JAK200031、JAK200032、JAK200033、JAK200034、JAK200035、JAK200036、JAK200037、JAK200038、JAK200039、JAK200040、JAK200041、JAK200042、JAK200043、JAK200044、JAK200045、JAK200046、JAK200047、JAK200048、JAK200049、JAK200050、JAK200051、JAK200052、JAK200053、JAK200054、JAK200055、JAK200056、JAK200057、JAK200058、JAK200059、JAK200060、JAK200061、JAK200062、JAK200063、JAK200064、JAK200065、JAK200066、JAK200067、JAK200068、JAK200069、JAK200070、JAK200071、JAK200072、JAK200073、JAK200074、JAK200075、JAK200076、JAK200077、JAK200078、JAK200079、JAK200080、JAK200081、JAK200082、JAK200083、JAK200084、JAK200085、JAK200086、JAK200087、JAK200088、JAK200089、JAK200090、JAK200091、JAK200092、JAK200093、JAK200094、JAK200095、JAK200096、JAK200097、JAK200098、JAK200099、JAK2000100、JAK2000101、JAK2000102、JAK2000103、JAK2000104、JAK2000105、JAK2000106、JAK2000107、JAK2000108、JAK2000109、JAK2000110、JAK2000111、JAK2000112、JAK2000113、JAK2000114、JAK2000115、JAK2000116、JAK2000117、JAK2000118、JAK2000119、JAK2000120、JAK2000121、JAK2000122、JAK2000123、JAK2000124、JAK2000125、JAK2000126、JAK2000127、JAK2000128、JAK2000129、JAK2000130、JAK2000131、JAK2000132、JAK2000133、JAK2000134、JAK2000135、JAK2000136、JAK2000137、JAK2000138、JAK2000139、JAK2000140、JAK2000141、JAK2000142、JAK2000143、JAK2000144、JAK2000145、JAK2000146、JAK2000147、JAK2000148、JAK2000149、JAK2000150、JAK2000151、JAK2000152、JAK2000153、JAK2000154、JAK2000155、JAK2000156、JAK2000157、JAK2000158、JAK2000159、JAK2000160、JAK2000161、JAK2000162、JAK2000163、JAK2000164、JAK2000165、JAK2000166、JAK2000167、JAK2000168、JAK2000169、JAK2000170、JAK2000171、JAK2000172、JAK2000173、JAK2000174、JAK2000175、JAK2000176、JAK2000177、JAK2000178、JAK2000179、JAK2000180、JAK2000181、JAK2000182、JAK2000183、JAK2000184、JAK2000185、JAK2000186、JAK2000187、JAK2000188、JAK2000189、JAK2000190、JAK2000191、JAK2000192、JAK2000193、JAK2000194、JAK2000195、JAK2000196、JAK2000197、JAK2000198、JAK2000199、JAK2000200、JAK2000201、JAK2000202、JAK2000203、JAK2000204、JAK2000205、JAK2000206、JAK2000207、JAK2000208、JAK2000209、JAK2000210、JAK2000211、JAK2000212、JAK2000213、JAK2000214、JAK2000215、JAK2000216、JAK2000217、JAK2000218、JAK2000219、JAK2000220、JAK2000221、JAK2000222、JAK2000223、JAK2000224、JAK2000225、JAK2000226、JAK2000227、JAK2000228、JAK2000229、JAK2000230、JAK2000231、JAK2000232、JAK2000233、JAK2000234、JAK2000235、JAK2000236、JAK2000237、JAK2000238、JAK2000239、JAK2000240、JAK2000241、JAK2000242、JAK2000243、JAK2000244、JAK2000245、JAK2000246、JAK2000247、JAK2000248、JAK2000249、JAK2000250、JAK2000251、JAK2000252、JAK2000253、JAK2000254、JAK2000255、JAK2000256、JAK2000257、JAK2000258、JAK2000259、JAK2000260、JAK2000261、JAK2000262、JAK2000263、JAK2000264、JAK2000265、JAK2000266、JAK2000267、JAK2000268、JAK2000269、JAK2000270、JAK2000271、JAK2000272、JAK2000273、JAK2000274、JAK2000275、JAK2000276、JAK2000277、JAK2000278、JAK2000279、JAK2000280、JAK2000281、JAK2000282、JAK2000283、JAK2000284、JAK2000285、JAK2000286、JAK2000287、JAK2000288、JAK2000289、JAK2000290、JAK2000291、JAK2000292、JAK2000293、JAK2000294、JAK2000295、JAK2000296、JAK2000297、JAK2000298、JAK2000299、JAK2000300、JAK2000301、JAK2000302、JAK2000303、JAK2000304、JAK2000305、JAK2000306、JAK2000307、JAK2000308、JAK2000309、JAK2000310、JAK2000311、JAK2000312、JAK2000313、JAK2000314、JAK2000315、JAK2000316、JAK2000317、JAK2000318、JAK2000319、JAK2000320、JAK2000321、JAK2000322、JAK2000323、JAK2000324、JAK2000325、JAK2000326、JAK2000327、JAK2000328、JAK2000329、JAK2000330、JAK2000331、JAK2000332、JAK2000333、JAK2000334、JAK2000335、JAK2000336、JAK2000337、JAK2000338、JAK2000339、JAK2000340、JAK2000341、JAK2000342、JAK2000343、JAK2000344、JAK2000345、JAK2000346、JAK2000347、JAK2000348、JAK2000349、JAK2000350、JAK2000351、JAK2000352、JAK2000353、JAK2000354、JAK2000355、JAK2000356、JAK2000357、JAK2000358、JAK2000359、JAK2000360、JAK2000361、JAK2000362、JAK2000363、JAK2000364、JAK2000365、JAK2000366、JAK2000367、JAK2000368、JAK2000369、JAK2000370、JAK2000371、JAK2000372、JAK2000373、JAK2000374、JAK2000375、JAK2000376、JAK2000377、JAK2000378、JAK2000379、JAK2000380、JAK2000381、JAK2000382、JAK2000383、JAK2000384、JAK2000385、JAK2000386、JAK2000387、JAK2000388、JAK2000389、JAK2000390、JAK2000391、JAK2000392、JAK2000393、JAK2000394、JAK2000395、JAK2000396、JAK2000397、JAK2000398、JAK2000399、JAK2000400、JAK2000401、JAK2000402、JAK2000403、JAK2000404、JAK2000405、JAK2000406、JAK2000407、JAK2000408、JAK2000409、JAK2000410、JAK2000411、JAK2000412、JAK2000413、JAK2000414、JAK2000415、JAK2000416、JAK2000417、JAK2000418、JAK2000419、JAK2000420、JAK2000421、JAK2000422、JAK2000423、JAK2000424、JAK2000425、JAK2000426、JAK2000427、JAK2000428、JAK2000429、JAK2000430、JAK2000431、JAK2000432、JAK2000433、JAK2000434、JAK2000435、JAK2000436、JAK2000437、JAK2000438、JAK2000439、JAK2000440、JAK2000441、JAK2000442、JAK2000443、JAK2000444、JAK2000445、JAK2000446、JAK2000447、JAK2000448、JAK2000449、JAK2000450、JAK2000451、JAK2000452、JAK2000453、JAK2000454、JAK2000455、JAK2000456、JAK2000457、JAK2000458、JAK2000459、JAK2000460、JAK2000461、JAK2000462、JAK2000463、JAK2000464、JAK2000465、JAK2000466、JAK2000467、JAK2000468、JAK2000469、JAK2000470、JAK2000471、JAK2000472、JAK2000473、JAK2000474、JAK2000475、JAK2000476、JAK2000477、JAK2000478、JAK2000479、JAK2000480、JAK2000481、JAK2000482、JAK2000483、JAK2000484、JAK2000485、JAK2000486、JAK2000487、JAK2000488、JAK2000489、JAK2000490、JAK2000491、JAK2000492、JAK2000493、JAK2000494、JAK2000495、JAK2000496、JAK2000497、JAK2000498、JAK2000499、JAK2000500、JAK2000501、JAK2000502、JAK2000503、JAK2000504、JAK2000505、JAK2000506、JAK2000507、JAK2000508、JAK2000509、JAK2000510、JAK2000511、JAK2000512、JAK2000513、JAK2000514、JAK2000515、JAK2000516、JAK2000517、JAK2000518、JAK2000519、JAK2000520、JAK2000521、JAK2000522、JAK2000523、JAK2000524、JAK2000525、JAK2000526、JAK2000527、JAK2000528、JAK2000529、JAK2000530、JAK2000531、JAK2000532、JAK2000533、JAK2000534、JAK2000535、JAK2000536、JAK2000537、JAK2000538、JAK2000539、JAK2000540、JAK2000541、JAK2000542、JAK2000543、JAK2000544、JAK2000545、JAK2000546、JAK2000547、JAK2000548、JAK2000549、JAK2000550、JAK2000551、JAK2000552、JAK2000553、JAK2000554、JAK2000555、JAK2000556、JAK2000557、JAK2000558、JAK2000559、JAK2000560、JAK2000561、JAK2000562、JAK2000563、JAK2000564、JAK2000565、JAK2000566、JAK2000567、JAK2000568、JAK2000569、JAK2000570、JAK2000571、JAK2000572、JAK2000573、JAK2000574、JAK2000575、JAK2000576、JAK2000577、JAK2000578、JAK2000579、JAK2000580、JAK2000581、JAK2000582、JAK2000583、JAK2000584、JAK2000585、JAK2000586、JAK2000587、JAK2000588、JAK2000589、JAK2000590、JAK2000591、JAK2000592、JAK2000593、JAK2000594、JAK2000595、JAK2000596、JAK2000597、JAK2000598、JAK2000599、JAK2000600、JAK2000601、JAK2000602、JAK2000603、JAK2000604、JAK2000605、JAK2000606、JAK2000607、JAK2000608、JAK2000609、JAK2000610、JAK2000611、JAK2000612、JAK2000613、JAK2000614、JAK2000615、JAK2000616、JAK2000617、JAK2000618、JAK2000619、JAK2000620、JAK2000621、JAK2000622、JAK2000623、JAK2000624、JAK2000625、JAK2000626、JAK2000627、JAK2000628、JAK2000629、JAK2000630、JAK2000631、JAK2000632、JAK2000633、JAK2000634、JAK2000635、JAK2000636、JAK2000637、JAK2000638、JAK2000639、JAK2000640、JAK2000641、JAK2000642、JAK2000643、JAK2000644、JAK2000645、JAK2000646、JAK2000647、JAK2000648、JAK2000649、JAK2000650、JAK2000651、JAK2000652、JAK2000653、JAK2000654、JAK2000655、JAK2000656、JAK2000657、JAK2000658、JAK2000659、JAK2000660、JAK2000661、JAK2000662、JAK2000663、JAK2000664、JAK2000665、JAK2000666、JAK2000667、JAK2000668、JAK2000669、JAK2000670、JAK2000671、JAK2000672、JAK2000673、JAK2000674、JAK2000675、JAK2000676、JAK2000677、JAK2000678、JAK2000679、JAK2000680、JAK2000681、JAK2000682、JAK2000683、JAK2000684、JAK2000685、JAK2000686、JAK2000687、JAK2000688、JAK2000689、JAK2000690、JAK2000691、JAK2000692、JAK2000693、JAK2000694、JAK2000695、JAK2000696、JAK2000697、JAK2000698、JAK2000699、JAK2000700、JAK2000701、JAK2000702、JAK2000703、JAK2000704、JAK2000705、JAK2000706、JAK2000707、JAK2000708、JAK2000709、JAK2000710、JAK2000711、JAK2000712、JAK2000713、JAK2000714、JAK2000715、JAK2000716、JAK2000717、JAK2000718、JAK2000719、JAK2000720、JAK2000721、JAK2000722、JAK2000723、JAK2000724、JAK2000725、JAK2000726、JAK2000727、JAK2000728、JAK2000729、JAK2000730、JAK2000731、JAK2000732、JAK2000733、JAK2000734、JAK2000735、JAK2000736、J

NME2、NME3、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH4、NPM1、NQ01、NR1D1、NR2F1、NR2F6、NRAS、NRG1、NSEP1、OSM、PA2G4、PABPC1、PCNA、PCTK1、PCTK2、PCTK3、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDPK1、PEA15、PFDN4、PFDN5、PGAM1、PHB、PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIM1、PKM2、PKMYT1、PLK2、PPARD、PPARG、PPIH、PPP1CA、PPP2R5A、PRDX2、PRDX4、PRKAR1A、PRKCBP1、PRNP、PRSS15、PSMA1、PTCH、PTEN、PTGS1、PTMA、PTN、PTPRN、RAB5A、RAC1、RAD50、RAF1、RALBP1、RAP1A、RARA、RAR $\beta$ 、RASGRF1、RB1、RBBP4、RBL2、REA、REL、RELA、RELB、RET、RFC2、RGS19、RHOA、RHOB、RHOC、RHOD、RIPK1、RPN2、RPS6KB1、RRM1、SARS、SELENBP1、SEMA3C、SEMA4D、SEPP1、SERPINH1、SFN、SFPQ、SFRS7、SHB、SHH、SIAH2、SIVA、SIVATP53、SKI、SKIL、SLC16A1、SLC1A4、SLC20A1、SMO、鞘磷脂磷酸二酯酶1(SMPD1)、SNAI2、SND1、SNRPB2、SOCS1、SOCS3、SOD1、SORT1、SPINT2、SPRY2、SRC、SRPX、STAT1、STAT2、STAT3、STAT5B、STC1、TAF1、TBL3、TBRG4、TCF1、TCF7L2、TFAP2C、TFDP1、TFDP2、TGFA、TGFB1、TGFB1I、TGFBR2、TGFBR3、THBS1、TIE、TIMP1、TIMP3、TJP1、TK1、TLE1、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF6、TNFSF7、TNK1、TOB1、TP53、TP53BP2、TP5313、TP73、TPBG、TPT1、TRADD、TRAM1、TRRAP、TSG101、TUFM、TXNRD1、TYRO3、UBC、UBE2L6、UCHL1、USP7、VDAC1、VEGF、VHL、VIL2、WEE1、WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WT1、XRCC1、YES1、YWHAB、YWHAZ、ZAP70和ZNF9。

**[0128]** rAAV载体可以包含编码调节细胞凋亡的蛋白质或功能性RNA的核酸作为转基因。以下是与细胞凋亡相关的基因和编码这些基因及其同源物的产物的核酸,以及编码抑制这些基因表达的小干扰核酸(例如,shRNA、miRNA)及其同源物的核酸,其可用作本发明某些实施方案中的转基因:RPS27A、ABL1、AKT1、APAF1、BAD、BAG1、BAG3、BAG4、BAK1、BAX、BCL10、BCL2、BCL2A1、BCL2L1、BCL2L10、BCL2L11、BCL2L12、BCL2L13、BCL2L2、BCLAF1、BFAR、BID、BIK、NAIP、BIRC2、BIRC3、XIAP、BIRC5、BIRC6、BIRC7、BIRC8、BNIP1、BNIP2、BNIP3、BNIP3L、BOK、BRAF、CARD10、CARD11、NLRC4、CARD14、NOD2、NOD1、CARD6、CARDS、CARDS、CASP1、CASP10、CASP14、CASP2、CASP3、CASP4、CASP5、CASP6、CASP7、CASP8、CASP9、CFLAR、CIDEA、CIDEB、CRADD、DAPK1、DAPK2、DFFA、DFFB、FADD、GADD45A、GDNF、HRK、IGF1R、LTA、LTBR、MCL1、NOL3、PYCARD、RIPK1、RIPK2、TNF、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF10C、TNFRSF10D、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF14、TNFRSF19、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF25、CD40、FAS、TNFRSF6B、CD27、TNFRSF9、TNFSF10、TNFSF14、TNFSF18、CD40LG、FASLG、CD70、TNFSF8、TNFSF9、TP53、TP53BP2、TP73、TP63、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4和TRAF5。

**[0129]** 有用的基因产物还包括miRNA。miRNA和其他小干扰核酸通过靶RNA转录物切割/降解或靶信使RNA(mRNA)的翻译抑制来调节基因表达。miRNA天然表达,通常为最终的19-25个非翻译RNA产物。miRNA通过与靶mRNA的3'非翻译区(UTR)的序列特异性相互作用显示其活性。这些内源表达的miRNA形成发夹前体,其随后加工成miRNA双链体,并进一步加工成“成熟的”单链miRNA分子。该成熟miRNA指导多蛋白复合物miRISC,其基于它们与成熟miRNA的互补性鉴定靶mRNA的靶位点,例如在3'UTR区中。

**[0130]** 以下miRNA基因及其同源物的非限制性列表可在方法的某些实施方案中用作基因或由基因编码的小干扰核酸的靶标(例如,miRNA海绵(miRNA sponge)、反义寡核苷酸、TuD RNA):hsa-let-7a、hsa-let-7a\*、hsa-let-7b、hsa-let-7b\*、hsa-let-7c、hsa-let-7c\*、hsa-let-7d、hsa-let-7d\*、hsa-let-7e、hsa-let-7e\*、hsa-let-7f、hsa-let-7f-1\*、hsa-let-7f-2\*、hsa-let-7g、hsa-let-7g\*、hsa-let-71、hsa-let-71\*、hsa-miR-1、hsa-miR-

100、hsa-miR-100\*、hsa-miR-101、hsa-miR-101\*、hsa-miR-103、hsa-miR-105、hsa-miR-105\*、hsa-miR-106a、hsa-miR-106a\*、hsa-miR-106b、hsa-miR-106b\*、hsa-miR-107、hsa-miR-10a、hsa-miR-10a\*、hsa-miR-10b、hsa-miR-10b\*、hsa-miR-1178、hsa-miR-1179、hsa-miR-1180、hsa-miR-1181、hsa-miR-1182、hsa-miR-1183、hsa-miR-1184、hsa-miR-1185、hsa-miR-1197、hsa-miR-1200、hsa-miR-1201、hsa-miR-1202、hsa-miR-1203、hsa-miR-1204、hsa-miR-1205、hsa-miR-1206、hsa-miR-1207-3p、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1208、hsa-miR-122、hsa-miR-122\*、hsa-miR-1224-3p、hsa-miR-1224-5p、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-1226、hsa-miR-1226\*、hsa-miR-1227、hsa-miR-1228、hsa-miR-1228\*、hsa-miR-1229、hsa-miR-1231、hsa-miR-1233、hsa-miR-1234、hsa-miR-1236、hsa-miR-1237、hsa-miR-1238、hsa-miR-124、hsa-miR-124\*、hsa-miR-1243、hsa-miR-1244、hsa-miR-1245、hsa-miR-1246、hsa-miR-1247、hsa-miR-1248、hsa-miR-1249、hsa-miR-1250、hsa-miR-1251、hsa-miR-1252、hsa-miR-1253、hsa-miR-1254、hsa-miR-1255a、hsa-miR-1255b、hsa-miR-1256、hsa-miR-1257、hsa-miR-1258、hsa-miR-1259、hsa-miR-125a-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-125b、hsa-miR-125b-1\*、hsa-miR-125b-2\*、hsa-miR-126、hsa-miR-126\*、hsa-miR-1260、hsa-miR-1261、hsa-miR-1262、hsa-miR-1263、hsa-miR-1264、hsa-miR-1265、hsa-miR-1266、hsa-miR-1267、hsa-miR-1268、hsa-miR-1269、hsa-miR-1270、hsa-miR-1271、hsa-miR-1272、hsa-miR-1273、hsa-miR-127-3p、hsa-miR-1274a、hsa-miR-1274b、hsa-miR-1275、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-1276、hsa-miR-1277、hsa-miR-1278、hsa-miR-1279、hsa-miR-128、hsa-miR-1280、hsa-miR-1281、hsa-miR-1282、hsa-miR-1283、hsa-miR-1284、hsa-miR-1285、hsa-miR-1286、hsa-miR-1287、hsa-miR-1288、hsa-miR-1289、hsa-miR-129\*、hsa-miR-1290、hsa-miR-1291、hsa-miR-1292、hsa-miR-1293、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-1294、hsa-miR-1295、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-1296、hsa-miR-1297、hsa-miR-1298、hsa-miR-1299、hsa-miR-1300、hsa-miR-1301、hsa-miR-1302、hsa-miR-1303、hsa-miR-1304、hsa-miR-1305、hsa-miR-1306、hsa-miR-1307、hsa-miR-1308、hsa-miR-130a、hsa-miR-130a\*、hsa-miR-130b、hsa-miR-130b\*、hsa-miR-132、hsa-miR-132\*、hsa-miR-1321、hsa-miR-1322、hsa-miR-1323、hsa-miR-1324、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-134、hsa-miR-135a、hsa-miR-135a\*、hsa-miR-135b、hsa-miR-135b\*、hsa-miR-136、hsa-miR-136\*、hsa-miR-137、hsa-miR-138、hsa-miR-138-1\*、hsa-miR-138-2\*、hsa-miR-139-3p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141、hsa-miR-141\*、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143、hsa-miR-143\*、hsa-miR-144、hsa-miR-144\*、hsa-miR-145、hsa-miR-145\*、hsa-miR-146a、hsa-miR-146a\*、hsa-miR-146b-3p、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-147、hsa-miR-147b、hsa-miR-148a、hsa-miR-148a\*、hsa-miR-148b、hsa-miR-148b\*、hsa-miR-149、hsa-miR-149\*、hsa-miR-150、hsa-miR-150\*、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-151-5p、hsa-miR-152、hsa-miR-153、hsa-miR-154、hsa-miR-154\*、hsa-miR-155、hsa-miR-155\*、hsa-miR-15a、hsa-miR-15a\*、hsa-miR-15b、hsa-miR-15b\*、hsa-miR-16、hsa-miR-16-1\*、hsa-miR-16-2\*、hsa-miR-17、hsa-miR-17\*、hsa-miR-181a、hsa-miR-181a\*、hsa-miR-181a-2\*、hsa-miR-181b、hsa-miR-181c、hsa-miR-181c\*、hsa-miR-181d、hsa-miR-182、hsa-miR-182\*、hsa-miR-1825、hsa-miR-1826、hsa-miR-1827、hsa-miR-183、hsa-miR-183\*、hsa-miR-184、hsa-miR-185、hsa-miR-185\*、hsa-miR-186、

hsa-miR-186\*、hsa-miR-187、hsa-miR-187\*、hsa-miR-188-3p、hsa-miR-188-5p、hsa-miR-18a、hsa-miR-18a\*、hsa-miR-18b、hsa-miR-18b\*、hsa-miR-190、hsa-miR-190b、hsa-miR-191、hsa-miR-191\*、hsa-miR-192、hsa-miR-192\*、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b、hsa-miR-193b\*、hsa-miR-194、hsa-miR-194\*、hsa-miR-195、hsa-miR-195\*、hsa-miR-196a、hsa-miR-196a\*、hsa-miR-196b、hsa-miR-197、hsa-miR-198、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-199b-5p、hsa-miR-19a、hsa-miR-19a\*、hsa-miR-19b、hsa-miR-19b-1\*、hsa-miR-19b-2\*、hsa-miR-200a、hsa-miR-200a\*、hsa-miR-200b、hsa-miR-200b\*、hsa-miR-200c、hsa-miR-200c\*、hsa-miR-202、hsa-miR-202\*、hsa-miR-203、hsa-miR-204、hsa-miR-205、hsa-miR-206、hsa-miR-208a、hsa-miR-208b、hsa-miR-20a、hsa-miR-20a\*、hsa-miR-20b、hsa-miR-20b\*、hsa-miR-21、hsa-miR-21\*、hsa-miR-210、hsa-miR-211、hsa-miR-212、hsa-miR-214、hsa-miR-214\*、hsa-miR-215、hsa-miR-216a、hsa-miR-216b、hsa-miR-217、hsa-miR-218、hsa-miR-218-1\*、hsa-miR-218-2\*、hsa-miR-219-1-3p、hsa-miR-219-2-3p、hsa-miR-219-5p、hsa-miR-22、hsa-miR-22\*、hsa-miR-220a、hsa-miR-220b、hsa-miR-220c、hsa-miR-221、hsa-miR-221\*、hsa-miR-222、hsa-miR-222\*、hsa-miR-223、hsa-miR-223\*、hsa-miR-224、hsa-miR-23a、hsa-miR-23a\*、hsa-miR-23b、hsa-miR-23b\*、hsa-miR-24、hsa-miR-24-1\*、hsa-miR-24-2\*、hsa-miR-25、hsa-miR-25\*、hsa-miR-26a、hsa-miR-26a-1\*、hsa-miR-26a-2\*、hsa-miR-26b、hsa-miR-26b\*、hsa-miR-27a、hsa-miR-27a\*、hsa-miR-27b、hsa-miR-27b\*、hsa-miR-28-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-296-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-297、hsa-miR-298、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-299-5p、hsa-miR-29a、hsa-miR-29a\*、hsa-miR-29b、hsa-miR-296-1\*、hsa-miR-296-2\*、hsa-miR-29c、hsa-miR-29c\*、hsa-miR-300、hsa-miR-301a、hsa-miR-301b、hsa-miR-302a、hsa-miR-302a\*、hsa-miR-302b、hsa-miR-302b\*、hsa-miR-302c、hsa-miR-302c\*、hsa-miR-302d、hsa-miR-302d\*、hsa-miR-302e、hsa-miR-302f、hsa-miR-30a、hsa-miR-30a\*、hsa-miR-30b、hsa-miR-30b\*、hsa-miR-30c、hsa-miR-30c-1\*、hsa-miR-30c-2\*、hsa-miR-30d、hsa-miR-30d\*、hsa-miR-30e、hsa-miR-30e\*、hsa-miR-31、hsa-miR-31\*、hsa-miR-32、hsa-miR-32\*、hsa-miR-320a、hsa-miR-320b、hsa-miR-320c、hsa-miR-320d、hsa-miR-323-3p、hsa-miR-323-5p、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-325、hsa-miR-326、hsa-miR-328、hsa-miR-329、hsa-miR-330-3p、hsa-miR-330-5p、hsa-miR-331-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-335、hsa-miR-335\*、hsa-miR-337-3p、hsa-miR-337-5p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-338-5p、hsa-miR-339-3p、hsa-miR-339-5p、hsa-miR-33a、hsa-miR-33a\*、hsa-miR-33b、hsa-miR-33b\*、hsa-miR-340、hsa-miR-340\*、hsa-miR-342-3p、hsa-miR-342-5p、hsa-miR-345、hsa-miR-346、hsa-miR-34a、hsa-miR-34a\*、hsa-miR-34b、hsa-miR-34b\*、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-361-3p、hsa-miR-361-5p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-363、hsa-miR-363\*、hsa-miR-365、hsa-miR-367、hsa-miR-367\*、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-369-5p、hsa-miR-370、hsa-miR-371-3p、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-372、hsa-miR-373、hsa-miR-373\*、hsa-miR-374a、hsa-miR-374a\*、hsa-miR-374b、hsa-miR-374b\*、hsa-miR-375、hsa-miR-376a、hsa-miR-376a\*、hsa-miR-376b、hsa-miR-376c、hsa-miR-377、hsa-miR-377\*、hsa-miR-378、hsa-miR-378\*、hsa-miR-379、hsa-miR-379\*、hsa-miR-380、hsa-miR-380\*、hsa-miR-381、hsa-miR-382、hsa-miR-383、hsa-miR-384、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-

409-5p、hsa-miR-410、hsa-miR-411、hsa-miR-411\*、hsa-miR-412、hsa-miR-421、hsa-miR-422a、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-424、hsa-miR-424\*、hsa-miR-425、hsa-miR-425\*、hsa-miR-429、hsa-miR-431、hsa-miR-431\*、hsa-miR-432、hsa-miR-432\*、hsa-miR-433、hsa-miR-448、hsa-miR-449a、hsa-miR-449b、hsa-miR-450a、hsa-miR-450b-3p、hsa-miR-450b-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-452、hsa-miR-452\*、hsa-miR-453、hsa-miR-454、hsa-miR-454\*、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-455-5p、hsa-miR-483-3p、hsa-miR-483-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-485-3p、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-486-3p、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-487a、hsa-miR-487b、hsa-miR-488、hsa-miR-488\*、hsa-miR-489、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-491-5p、hsa-miR-492、hsa-miR-493、hsa-miR-493\*、hsa-miR-494、hsa-miR-495、hsa-miR-496、hsa-miR-497、hsa-miR-497\*、hsa-miR-498、hsa-miR-499-3p、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-500、hsa-miR-500\*、hsa-miR-501-3p、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-502-3p、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-503、hsa-miR-504、hsa-miR-505、hsa-miR-505\*、hsa-miR-506、hsa-miR-507、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-509-3p、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-510、hsa-miR-511、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-512-5p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-513b、hsa-miR-513c、hsa-miR-514、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-516a-5p、hsa-miR-516b、hsa-miR-517\*、hsa-miR-517a、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a-3p、hsa-miR-518a-5p、hsa-miR-518b、hsa-miR-518c、hsa-miR-518c\*、hsa-miR-518d-3p、hsa-miR-518d-5p、hsa-miR-518e、hsa-miR-518e\*、hsa-miR-518f、hsa-miR-518f\*、hsa-miR-519a、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-519d、hsa-miR-519e、hsa-miR-519e\*、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-521、hsa-miR-522、hsa-miR-523、hsa-miR-524-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-525-3p、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-526b、hsa-miR-526b\*、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539、hsa-miR-541、hsa-miR-541\*、hsa-miR-542-3p、hsa-miR-542-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-544、hsa-miR-545、hsa-miR-545\*、hsa-miR-548a-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-548b-3p、hsa-miR-5486-5p、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-548e、hsa-miR-548f、hsa-miR-548g、hsa-miR-548h、hsa-miR-548i、hsa-miR-548j、hsa-miR-548k、hsa-miR-5481、hsa-miR-548m、hsa-miR-548n、hsa-miR-548o、hsa-miR-548p、hsa-miR-549、hsa-miR-550、hsa-miR-550\*、hsa-miR-551a、hsa-miR-551b、hsa-miR-551b\*、hsa-miR-552、hsa-miR-553、hsa-miR-554、hsa-miR-555、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-556-5p、hsa-miR-557、hsa-miR-558、hsa-miR-559、hsa-miR-561、hsa-miR-562、hsa-miR-563、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-567、hsa-miR-568、hsa-miR-569、hsa-miR-570、hsa-miR-571、hsa-miR-572、hsa-miR-573、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-574-5p、hsa-miR-575、hsa-miR-576-3p、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-578、hsa-miR-579、hsa-miR-580、hsa-miR-581、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-584、hsa-miR-585、hsa-miR-586、hsa-miR-587、hsa-miR-588、hsa-miR-589、hsa-miR-589\*、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-591、hsa-miR-592、hsa-miR-593、hsa-miR-593\*、hsa-miR-595、hsa-miR-596、hsa-miR-597、hsa-miR-598、hsa-miR-

599、hsa-miR-600、hsa-miR-601、hsa-miR-602、hsa-miR-603、hsa-miR-604、hsa-miR-605、hsa-miR-606、hsa-miR-607、hsa-miR-608、hsa-miR-609、hsa-miR-610、hsa-miR-611、hsa-miR-612、hsa-miR-613、hsa-miR-614、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-615-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-616\*、hsa-miR-617、hsa-miR-618、hsa-miR-619、hsa-miR-620、hsa-miR-621、hsa-miR-622、hsa-miR-623、hsa-miR-624、hsa-miR-624\*、hsa-miR-625、hsa-miR-625\*、hsa-miR-626、hsa-miR-627、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-628-5p、hsa-miR-629、hsa-miR-629\*、hsa-miR-630、hsa-miR-631、hsa-miR-632、hsa-miR-633、hsa-miR-634、hsa-miR-635、hsa-miR-636、hsa-miR-637、hsa-miR-638、hsa-miR-639、hsa-miR-640、hsa-miR-641、hsa-miR-642、hsa-miR-643、hsa-miR-644、hsa-miR-645、hsa-miR-646、hsa-miR-647、hsa-miR-648、hsa-miR-649、hsa-miR-650、hsa-miR-651、hsa-miR-652、hsa-miR-653、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-654-5p、hsa-miR-655、hsa-miR-656、hsa-miR-657、hsa-miR-658、hsa-miR-659、hsa-miR-660、hsa-miR-661、hsa-miR-662、hsa-miR-663、hsa-miR-663b、hsa-miR-664、hsa-miR-664\*、hsa-miR-665、hsa-miR-668、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-675、hsa-miR-7、hsa-miR-708、hsa-miR-708\*、hsa-miR-7-1\*、hsa-miR-7-2\*、hsa-miR-720、hsa-miR-744、hsa-miR-744\*、hsa-miR-758、hsa-miR-760、hsa-miR-765、hsa-miR-766、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-767-5p、hsa-miR-768-3p、hsa-miR-768-5p、hsa-miR-769-3p、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-770-5p、hsa-miR-802、hsa-miR-873、hsa-miR-874、hsa-miR-875-3p、hsa-miR-875-5p、hsa-miR-876-3p、hsa-miR-876-5p、hsa-miR-877、hsa-miR-877\*、hsa-miR-885-3p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-886-3p、hsa-miR-886-5p、hsa-miR-887、hsa-miR-888、hsa-miR-888\*、hsa-miR-889、hsa-miR-890、hsa-miR-891a、hsa-miR-891b、hsa-miR-892a、hsa-miR-892b、hsa-miR-9、hsa-miR-9\*、hsa-miR-920、hsa-miR-921、hsa-miR-922、hsa-miR-923、hsa-miR-924、hsa-miR-92a、hsa-miR-92a-1\*、hsa-miR-92a-2\*、hsa-miR-92b、hsa-miR-92b\*、hsa-miR-93、hsa-miR-93\*、hsa-miR-933、hsa-miR-934、hsa-miR-935、hsa-miR-936、hsa-miR-937、hsa-miR-938、hsa-miR-939、hsa-miR-940、hsa-miR-941、hsa-miR-942、hsa-miR-943、hsa-miR-944、hsa-miR-95、hsa-miR-96、hsa-miR-96\*、hsa-miR-98、hsa-miR-99a、hsa-miR-99a\*、hsa-miR-99b和hsa-miR-99b\*。例如，靶向表达与肌萎缩侧索硬化(ALS)相关的超氧化物歧化酶(SOD1)的染色体8开放阅读框72(C9orf72)的miRNA可能是感兴趣的。

[0131] miRNA抑制其靶向的mRNA的功能，并因此抑制由mRNA编码的多肽的表达。因此，阻断(部分或完全)miRNA的活性(例如，使miRNA沉默)可以有效地诱导或恢复表达被抑制的多肽的表达(多肽去抑制)。在一个实施方案中，由miRNA的mRNA靶标编码的多肽的去抑制是通过多种方法中的任何一种抑制细胞中的miRNA活性来实现的。例如，阻断miRNA的活性可以通过与miRNA互补或基本上互补的小干扰核酸(例如，反义寡核苷酸、miRNA海绵、TuD RNA)杂交来实现，从而阻断miRNA与其靶mRNA的相互作用。如本文所用，与miRNA基本上互补的小干扰核酸是能够与miRNA杂交并阻断miRNA活性的核酸。在一些实施方案中，与miRNA基本上互补的小干扰核酸是除了1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个碱基之外与miRNA完全互补的小干扰核酸。“miRNA抑制剂”是阻断miRNA功能、表达和/或加工的药剂。例如，这些分子包括但不限于microRNA特异性反义、microRNA海绵、强诱饵RNA(TuD RNA)和抑制miRNA与Drosha复合物相互作用的microRNA寡核苷酸(双链，发夹，短寡核苷酸)。

[0132] 其他有用的基因可包括编码赋予对病原体的被动免疫免疫的球蛋白的基因。“免疫球蛋白分子”是包含共价偶联在一起的免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的免疫活性部分并且能够与抗原特异性结合的蛋白质。免疫球蛋白分子是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY),类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。

[0133] “免疫球蛋白重链”是包含免疫球蛋白的抗原结合结构域的至少一部分和免疫球蛋白重链的可变区的至少一部分或免疫球蛋白重链的恒定区的至少一部分的多肽。因此,免疫球蛋白来源的重链与免疫球蛋白基因超家族的成员具有显著的氨基酸序列同源区域。例如,Fab片段中的重链是免疫球蛋白来源的重链。

[0134] “免疫球蛋白轻链”是包含免疫球蛋白的抗原结合结构域的至少一部分和免疫球蛋白轻链的可变区的至少一部分或恒定区的至少一部分的多肽。因此,免疫球蛋白来源的轻链与免疫球蛋白基因超家族的成员具有显著的氨基酸同源区。

[0135] “免疫粘附素”是组合了结合蛋白(通常是受体、配体或细胞粘附分子)的功能结构域与免疫球蛋白恒定结构域(通常包括铰链和Fc区)的嵌合的抗体样分子。

[0136] “片段抗原结合(Fab)片段”是抗体上与抗原结合的区域。其由重链和轻链各自的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。

[0137] 基于针对寻求保护的疾病的致病因子(病原体)选择抗病原体构建体。这些病原体可以是病毒、细菌或真菌来源,并且可以用于预防人感染人疾病,或用于非人哺乳动物或其他动物以预防兽医疾病。

[0138] rAAV可包括编码针对病毒病原体的抗体、特别是中和抗体的基因。这样的抗病毒抗体可包括针对甲型流感、乙型流感和丙型流感中的一种或多种的抗流感抗体。甲型病毒是毒性最强的人病原体。甲型流感的与大流行有关的血清型包括的H1N1,其造成1918的西班牙流感和2009年的猪流感;H2N2,其造成1957的亚洲流感;H3N2,其造成1968年的中国香港流感;H5N1,其造成2004年的禽流感;H7N7;H1N2;H9N2;H7N2;H7N3;和H10N7。其他靶病原体病毒包括,沙粒病毒(arenaviruses)(包括funin、马休波病毒(machupo)和拉沙病毒(Lassa))、丝状病毒(filoviruses)(包括马堡病毒(Marburg)和埃博拉病毒(Ebola))、汉坦病毒(hantaviruses)、小核糖核酸病毒(picornoviridae)(包括鼻病毒(rhinoviruses)、埃可病毒(echovirus))、冠状病毒(coronaviruses)、副粘病毒(paramyxovirus)、麻疹病毒(morbillivirus)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)、披膜病毒(togavirus)、柯萨奇病毒(coxsackievirus)、JC病毒、细小病毒B19(parvovirus B19)、副流感病毒(parainfluenza)、腺病毒(adenoviruses)、呼肠孤病毒(reoviruses)、天花(Variola major(天花))和来自痘病毒家族的牛痘(Cowpox)、和水痘-带状疱疹(伪狂犬病)。病毒性出血热是由沙粒病毒家族的成员(拉沙热)(其家族也与淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)相关)、丝状病毒(埃博拉病毒)和汉坦病毒(puremala)引起的。小核糖核酸病毒(鼻病毒亚科)的成员与人的普通感冒有关。冠状病毒科包括许多非人病毒成员,例如感染性支气管炎病毒(家禽)、猪传染性胃肠病毒(猪)、猪血凝素脑脊髓炎病毒(porcine hemagglutinin encephalomyelitis virus)(猪)、猫感染性腹膜炎病毒(猫)、猫肠道冠状病毒(猫)、犬冠状病毒(狗)。人呼吸道冠状病毒被认为与普通感冒,非甲、乙或丙型肝炎以及突发性急性呼吸道综合征(SARS)有关。副粘病毒家族包括副流感病毒1型、副流感病毒

3型、牛副流感病毒3型、腮腺炎病毒属(rubulavirus) (腮腺炎病毒、副流感病毒2型、副流感病毒4型、新城疫病毒(鸡)、牛瘟、麻疹病毒,包括麻疹和犬瘟热(canine distemper),以及肺病毒(pneumovirus),包括呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)。细小病毒家族包括猫细小病毒(猫肠炎)、猫白细胞减少症病毒(felinepanleucopeniavirus)、犬细小病毒和猪细小病毒。腺病毒家族包括病毒(EX、AD7、ARD、O.B.)因此,在某些实施方案中,可以工程化如本文所述的rAAV载体以表达抗埃博拉抗体,例如2G4、4G7、13C6,抗流感抗体,例如FI6、CR8033,和抗RSV抗体,例如,帕利珠单抗、莫他珠单抗。

[0139] 还可以选择针对细菌病原体的中和抗体构建体用于本发明。在一个实施方案中,中和抗体构建体针对细菌本身。在另一个实施方案中,中和抗体构建体针对由细菌产生的毒素。空气传播的细菌病原体的实例包括例如脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*) (脑膜炎)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia*) (肺炎)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (肺炎)、伪鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*) (肺炎)、鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*) (肺炎)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (肺炎)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、腔隙莫拉菌(*Moraxella lacunata*)、产碱杆菌属(*Alkaligenes*)、心杆菌属(*Cardiobacterium*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*) (流感)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*) (百日咳)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*) (肺炎/发热)、肺炎军团菌(*Legionella pneumonia*) (军团病)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*) (肺炎)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*) (肺炎)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (结核(TB))、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*) (TB)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*) (肺炎)、星形诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*) (肺炎)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*) (炭疽)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (肺炎)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (猩红热)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) (肺炎)、白喉棒状杆菌(*Corynebacteria diphtheriae*) (白喉)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*) (肺炎)。

[0140] rAAV可以包括编码针对细菌病原体(例如炭疽病的致病因子,炭疽杆菌产生的毒素)的抗体、特别是中和抗体的基因。已经描述了针对保护剂(protective agent, PA)的中和抗体,保护剂是形成类毒素的三种肽之一。另外两种多肽由致死因子(LF)和水肿因子(EF)组成。已经描述抗PA中和抗体在针对炭疽的被动免疫中是有效的。参见,例如,美国专利号7,442,373; R.Sawada-Hirai等人, *J Immune Based Ther Vaccines*. 2004; 2:5 (2004年5月12日在线)。还描述了和/或可产生其他抗炭疽毒素中和抗体。类似地,针对其他细菌和/或细菌毒素的中和抗体可用于产生如本文所述的AAV递送的抗病原体构建体。

[0141] 针对感染性疾病的抗体可以由寄生虫或真菌引起,包括例如曲霉属(*Aspergillus*)物种、伞枝犁头霉(*Absidia corymbifera*)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、*Mucor plumbeus*、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、青霉(*Penicillium*)物种、干草小多孢菌(*Micropolysporafaeni*)、普通高温放线菌(*Thermoactinomyces vulgaris*)、交替链格孢(*Alternaria alternate*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)物种、长蠕孢属(*Helminthosporium*)

和葡萄穗霉属(Stachybotrys)物种。

[0142] rAAV可包括编码针对以下疾病的致病因子的抗体、特别是中和抗体的基因,例如阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease,AD)、帕金森氏病(Parkinson's disease,PD)、GBA-帕金森病(GBA-Parkinson's)、类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis,RA)、肠易激综合征(Irritable bowel syndrome,IBS)、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)、癌症、肿瘤、系统性硬化症、哮喘等疾病。这样的抗体可以是,但不限于例如,α-突触核蛋白、抗血管内皮生长因子(VEGF)(抗VEGF)、抗VEGFA、抗PD-1、抗PDL1、抗-CTLA-4、抗TNF-α、抗IL-17、抗IL-23、抗IL-21、抗IL-6、抗IL-6受体、抗IL-5、抗IL-7、抗因子XII、抗IL-2、抗HIV、抗IgE、抗肿瘤坏死因子受体-1(TNFR1)、抗notch 2/3、抗notch 1、抗OX40、抗erb-b2受体酪氨酸激酶3(ErbB3)、抗ErbB2、抗β细胞成熟抗原、抗B淋巴细胞刺激因子、抗CD20、抗HER2、抗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、抗制瘤素M(OSM)、抗淋巴细胞活化基因3(LAG3)蛋白、抗CCL20、抗血清淀粉样蛋白P成分(SAP)、抗脯氨酰羟化酶抑制剂、抗CD38、抗糖蛋白IIb/IIIa、抗CD52、抗-CD30、抗IL-1β、抗表皮生长因子受体、抗CD25、抗RANK配体、抗补体系统蛋白C5、抗CD11a、抗CD3受体、抗α-4(α4)整联蛋白、抗RSV F蛋白和抗整合素α<sub>4</sub>β<sub>7</sub>。其他病原体和疾病对于本领域技术人员而言是显而易见的。其他合适的抗体可包括用于治疗阿尔茨海默氏病的抗体、例如抗β-淀粉样蛋白(例如,crenezumab、solanezumab、aducanumab)、抗β-淀粉样蛋白原纤维、抗β-淀粉样蛋白斑、抗tau、bapineuzamab等。用于治疗多种适应症的其他合适的抗体包括例如在2016年10月27日提交的PCT/US2016/058968,公开为W02017/075119A1中描述的那些。

[0143] II.rAAV载体生产

[0144] 为了用于产生AAV病毒载体(例如重组(r)AAV),表达盒可以携带在递送至包装宿主细胞的任何合适的载体上,例如质粒。可以工程化用于本发明的质粒,使得它们适于在原核细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞等体外复制和包装。合适的转染技术和包装宿主细胞是已知的和/或可由本领域技术人员容易地设计。

[0145] 产生和分离适合用作载体的AAV的方法是本领域已知的。通常参见例如Grieger&Samulski,2005,"Adeno-associated virus as a gene therapy vector:Vector development,production and clinical applications,"Adv.Biochem.Engin/Biotechnol.99:119-145;Buning等人,2008,"Recent developments in adeno-associated virus vector technology,"J.Gene Med.10:717-733;以及下面引用的参考文献,其每一篇通过引用整体并入本文。为了将基因包装到病毒粒子中,ITR是与包含表达盒的核酸分子相同的构建体中顺式所需的唯一AAV组分。cap和rep基因可以反式提供。

[0146] 在一个实施方案中,将本文所述的表达盒工程化为遗传元件(例如穿梭质粒),其将其上携带的免疫球蛋白构建体序列转移到包装宿主细胞中以产生病毒载体。在一个实施方案中,可以通过任何合适的方法将选择的遗传元件递送至AAV包装细胞,包括转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包被的颗粒(high velocity DNA-coated pellet)、病毒感染和原生质体融合。也可以制备稳定的AAV包装细胞。或者,表达盒可用于产生除AAV以外的病毒载体,或用于在体外产生抗体混合物。用于制备这样的构建体的方法是核酸操作领域技术人员已知的,包括基因工程、重组工程和合成技术。参见,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,ed.Green and Sambrook,Cold Spring HarborPress,

Cold Spring Harbor, NY (2012)。

[0147] 术语“AAV中间体”或“AAV载体中间体”是指缺少包装在其中的期望基因组序列的组装的rAAV衣壳。这些也可称为“空”衣壳。这样的衣壳可以不包含表达盒的可检测的基因组序列,或仅包含不足以实现基因产物表达的部分包装的基因组序列。这些空衣壳对于将目的基因转移到宿主细胞是没有功能的。

[0148] 本文描述的重组腺相关病毒 (AAV) 可以使用已知的技术产生。参见,例如, WO 2003/042397; WO 2005/033321、WO 2006/110689; US 7588772B2。这样的方法包括培养包含核酸序列的宿主细胞,所述核酸序列编码编码AAV衣壳蛋白;功能性rep基因;表达盒,其至少由AAV反向末端重复 (ITR) 和转基因组成;和足够的辅助功能,以允许将表达盒包装到AAV衣壳蛋白中。已经描述了产生衣壳、其编码序列的方法,以及产生rAAV病毒载体的方法。参见,例如,Gao,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100 (10) ,6081-6086 (2003) 和US 2013/0045186A1。

[0149] 在一个实施方案中,提供了用于产生重组AAVhu68的生产细胞培养物。这样的细胞培养物包含在宿主细胞中表达AAVhu68衣壳蛋白的核酸;适于包装到AAVhu68衣壳中的核酸分子,例如载体基因组,其包含AAV ITR和编码基因产物的非AAV核酸序列,所述非AAV核酸序列与指导产物在宿主细胞中表达的序列可操作连接;和足够的AAVrep功能和腺病毒辅助功能,以允许将核酸分子包装到重组AAVhu68衣壳中。在一个实施方案中,细胞培养物由哺乳动物细胞(例如人胚肾293细胞等)或昆虫细胞(例如杆状病毒)组成。

[0150] 任选地,rep功能由除hu68以外的AAV提供。在某些实施方案中,至少一部分rep功能来自AAVhu68。参见,例如,编码SEQ ID NO:4的rep蛋白及其功能片段的rep序列。AAVrep可以由SEQ ID NO:3的核酸序列编码。在另一个实施方案中,rep蛋白是除AAVhu68rep以外的异源rep蛋白,例如但不限于AAV1rep蛋白、AAV2rep蛋白、AAV3rep蛋白、AAV4rep蛋白、AAV5rep蛋白、AAV6rep蛋白、AAV7rep蛋白、AAV8rep蛋白;或rep 78、rep 68、rep 52、rep 40、rep68/78和rep40/52;或其片段;或其他来源。任选地,rep和cap序列在细胞培养物中在相同遗传元件上。在rep序列和cap基因之间可存在间隔区。任选地,间隔区是atgacttaaaccaggt, SEQ ID NO:9。这些AAVhu68或突变AAV衣壳序列中的任何一种可以在指导其在宿主细胞中的表达的外源调节控制序列的控制下。

[0151] 在一个实施方案中,细胞在合适的细胞培养物(例如,HEK 293)细胞中制备。制备本文所述基因疗法载体的方法包括本领域熟知的方法,例如产生用于产生基因疗法载体的质粒DNA,产生载体和纯化载体。在一些实施方案中,基因疗法载体是AAV载体,并且产生的质粒是编码AAV基因组和目的基因的AAV顺式质粒,包含AAVrep和cap基因的AAV反式质粒,以及腺病毒辅助质粒。载体产生方法可以包括以下方法步骤,例如开始细胞培养,细胞传代,细胞接种,用质粒DNA转染细胞,将转染后培养基更换为无血清培养基,以及收获含有载体的细胞和培养基。收获的含有载体的细胞和培养基在本文中称为粗细胞收获物。在另一个系统中,通过用基于杆状病毒的载体感染将基因疗法载体引入昆虫细胞中。关于这些生产系统的综述,一般参见例如Zhang等人,2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929,其各自的内容通过引用整体并入本文。制备和使用这些和其他AAV生产系统的方法也在以下美国专利中有所描述,每篇专利的内容通过引用整体并入本

文:5,139,941;5,741,683;6,057,152;6,204,059;6,268,213;6,491,907;6,660,514;6,951,753;7,094,604;7,172,893;7,201,898;7,229,823;和7,439,065。

[0152] 此后,粗细胞收获物可以是以下方法步骤,例如载体收获物的浓缩,载体收获物的渗滤,载体收获物的微流化,载体收获物的核酸酶消化,微流化中间体的过滤,通过过滤的粗制物纯化,通过超速离心的粗制物纯化,通过切向流过滤的缓冲液交换,和/或配制和过滤以制备大量载体。

[0153] 可以使用高盐浓度下的两步亲和色谱纯化然后阴离子交换树脂色谱法来纯化载体药物产品并除去空衣壳。这些方法更详细描述在以下中:2016年12月9日提交的国际专利申请号PCT/US2016/065970及其优先权文件,2016年4月13日提交的美国专利申请号62/322,071和2015年12月11日提交的62/226,357,名称为“Scalable Purification Method forAAV9”,其通过引用并入本文。对于AAV8的纯化方法,2016年12月9日提交的国际专利申请PCT/US2016/065976及其优先权文件,2016年4月13日提交的美国专利申请号62/322,098和2015年12月11日提交的62/266,341,和rh10,2016年12月9日提交的国际专利申请号PCT/US16/66013及其优先权文件,2016年4月13日提交的美国专利申请号62/322,055和题为“Scalable Purification Method forAAVrh10”的同样于2015年12月11日提交的62/266,347,以及对于AAV1,2016年12月9日提交的国际专利申请号PCT/US2016/065974及其优先权文件,2016年4月13日提交的美国专利申请62/322,083和2015年12月11日提交的“Scalable Purification Method forAAV1”的62/26,351,其均通过引用并入本文中。

[0154] 为了计算空颗粒和完整颗粒含量,将所选样品的VP3带体积(例如,在本文的实施例中,碘克沙醇梯度纯化的制剂,其中GC#=颗粒#)相对于加载的GC颗粒作图。将得到的线性方程( $y=mx+c$ )用于计算测试制品峰的带体积中的颗粒数。然后将每20 $\mu$ L负载的颗粒数(pt)乘以50,得到颗粒(pt)/mL。Pt/mL除以GC/mL得到颗粒与基因组拷贝的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL得到空pt/mL。空pt/mL除以pt/mL并且x 100给出空颗粒的百分比。

[0155] 通常,用于测定空衣壳和具有包装的基因组的AAV载体颗粒的方法是本领域已知的。参见,例如,Grimm等人,Gene Therapy (1999) 6:1322-1330;Sommer等人,Molec.Ther.(2003) 7:122-128。为了测试变性衣壳,该方法包括使经处理的AAV原种经受SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,其由能够分离三种衣壳蛋白的任何凝胶组成,例如,在缓冲液中含有3-8%Tris-乙酸盐的梯度凝胶,然后运行凝胶直至样品材料分离,并将凝胶印迹到尼龙或硝酸纤维素膜上,优选尼龙。然后使用抗AAV衣壳抗体作为与变性衣壳蛋白结合的一抗,优选抗AAV衣壳单克隆抗体,最优选B1抗AAV-2单克隆抗体(Wobus等人,J.Viro1. (2000) 74:9281-9293)。然后使用二抗,其与一抗并包含用于检测与一抗结合的手段,更优选包含与其共价结合的检测分子的抗IgG抗体,最优选与辣根过氧化物酶共价连接的绵羊抗小鼠IgG抗体。将用于检测结合的方法用于半定量测定一抗和二抗之间的结合,优选能够检测放射性同位素发射、电磁辐射或比色变化的检测方法,最优选化学发光检测试剂盒。例如,对于SDS-PAGE,可以取出来自柱级分的样品并在含有还原剂(例如DTT)的SDS-PAGE上样缓冲液中加热,并且在预制的梯度聚丙烯酰胺凝胶(例如Novex)上分离衣壳蛋白。可以使用SilverXpress(Invitrogen,CA)根据制造商的说明书或其他合适的染色方法,即SYPRO红宝石或考马斯染色剂进行银染色。在一个实施方案中,可以通过定量实时PCR(Q-PCR)测量柱级分中AAV载体基因组(vg)的浓度。将样品稀释并用DNA酶I(或另一种合适的核酸酶)消化

以除去外源DNA。在核酸酶灭活后,将样品进一步稀释并使用引物和对引物之间的DNA序列特异的TaqMan<sup>TM</sup>荧光探针进行扩增。在Applied Biosystems Prism 7700序列检测系统上测量每个样品达到确定荧光水平所需的循环数(阈值循环,Ct)。含有与AAV载体中包含的序列的相同序列的质粒DNA用于在Q-PCR反应中产生标准曲线。从样品获得的循环阈值(Ct)值用于通过将其相对于质粒标准曲线的Ct值进行归一化来确定载体基因组滴度。也可以使用基于数字PCR的终点测定。

[0156] 在一个方面,使用优化的q-PCR方法,其利用广谱丝氨酸蛋白酶,例如蛋白酶K(例如可从Qiagen商购获得)。更具体地,优化的qPCR基因组滴度测定与标准测定相似,只是在DNA酶I消化之后,将样品用蛋白酶K缓冲液稀释并用蛋白酶K处理,然后加热灭活。适当地用量等于样品大小的蛋白酶K缓冲液稀释样品。蛋白酶K缓冲液可以浓缩至2倍或更高。通常,蛋白酶K处理为约0.2mg/mL,但可以在0.1mg/mL至约1mg/mL之间变化。处理步骤通常在约55°C下进行约15分钟,但可以在较低温度(例如,约37°C至约50°C)下进行较长时间段(例如,约20分钟至约30分钟),或者较高温度(例如,高至约60°C)下进行较短时间段(例如,约5至10分钟)。类似地,热灭活通常在约95°C下保持约15分钟,但温度可降低(例如,约70°C至约90°C)并延长时间(例如,约20分钟至约30分钟)。然后将样品稀释(例如,1000倍)并如标准测定中所述进行TaqMan分析。

[0157] 另外或可替代地,可以使用液滴数字PCR(ddPCR)。例如,已经描述了通过ddPCR确定单链和自身互补AAV载体基因组滴度的方法。参见,例如,M.Lock等人,Hu Gene TherapyMethods, Hum Gene TherMethods. 2014 Apr; 25 (2) : 115-25. doi:10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

[0158] 简而言之,用于使具有包装的基因组序列的rAAVhu68颗粒与缺少基因组的AAVhu68中间体分离的方法涉及对包含重组AAVhu68病毒颗粒和AAVhu68衣壳中间体的悬浮液进行快速表现液相色谱(fast performance liquid chromatography),其中AAVhu68病毒颗粒和AAVhu68中间体与在pH为10.2时平衡的强阴离子交换树脂结合,并进行盐梯度,同时在约260和约280下监测洗脱液的紫外吸收。虽然对于rAAV9hu68不太理想,但pH可为约10.0至10.4。在该方法中,当A260/A280的比率达到拐点时,从洗脱级分收集AAVhu68完整衣壳。在一个实例中,对于亲和色谱步骤,可以将渗滤的产物应用于有效捕获AAV2/hu68血清型的Capture Select<sup>TM</sup> Poros-AAV2/9亲和树脂(Life Technologies)。在这些离子条件下,显著百分比的残留细胞DNA和蛋白质流过色谱柱,而AAV颗粒被有效捕获。

[0159] III. 组合物和用途

[0160] 本文提供了包含至少一种rAAV原种(例如rAAVhu68原种或突变rAAV原种)和任选的载剂、赋形剂和/或防腐剂的组合物。rAAV原种是指多个相同的rAAV载体,例如,如下面在浓度和剂量单位的讨论中所述的量。

[0161] 如本文所用,“载剂(carrier)”包括任何和所有溶剂、分散介质、载剂、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲剂、载剂溶液、悬浮液、胶体等。将这样的介质和试剂用于药物活性物质是本领域熟知的。补充的活性成分也可以引入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不产生过敏或类似的不良反应的分子实体和组合物。递送载剂例如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等可用于将本发明的组合物引入合适的宿主细胞中。特别地,rAAV载体递送的载体基因组可以配制用于包封在脂质

颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中来递送。

[0162] 在一个实施方案中,组合物包括适于递送至受试者的最终制剂,例如,缓冲至生理学相容的pH和盐浓度的水性液体悬浮液。任选地,制剂中存在一种或多种表面活性剂。在另一个实施方案中,组合物可以作为浓缩物运输,将其稀释用于向受试者施用。在另一些实施方案中,可以将组合物冻干并在施用时重构。

[0163] 合适的表面活性剂或表面活性剂的组合可选自无毒的非离子表面活性剂。在一个实施方案中,选择终止于伯羟基的双官能嵌段共聚物表面活性剂,例如Pluronic® F68 [BASF],也称为泊洛沙姆188,其具有中性pH,平均分子量为8400。可以选择其他表面活性剂和其他泊洛沙姆,即由两侧是两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链的中央聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))疏水链构成的非离子三嵌段共聚物,SOLUTOL HS15(Macrogol-15羟基硬脂酸酯)、LABRASOL(聚氧基辛基甘油酯(Polyoxy caprylic glyceride))、聚氧基10油基醚、TWEEN(聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯)、乙醇和聚乙二醇。在一个实施方案中,制剂包含泊洛沙姆。这些共聚物通常用字母“P”(对于泊洛沙姆)跟三个数字命名:前两个数字x100给出聚氧丙烯核心的近似分子量,最后一个数字x10给出聚氧乙烯含量百分比。在一个实施方案中,选择泊洛沙姆188。表面活性剂可以以悬浮液的高至约0.0005%至约0.001%的量存在。

[0164] 以足够的量施用载体以转染细胞并提供足够水平的基因转移和表达,以提供治疗益处而没有不适当的副作用,或具有医学上可接受的生理作用,这可由医学领域的技术人员确定。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于直接递送至期望器官(例如,肝脏(任选地通过肝动脉)、肺、心脏、眼睛、肾)、口服、吸入、鼻内、鞘内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内和其他肠胃外施用途径。如果需要,施用途径可以组合。

[0165] 病毒载体的剂量主要取决于诸如所治疗的病症,患者的年龄、体重和健康等因素,并且因此可能因患者而异。例如,病毒载体的治疗有效剂量通常为约25至约1000微升至约100mL含有浓度为约 $1 \times 10^9$ 至 $1 \times 10^{16}$ 基因组病毒载体的溶液。调整剂量以平衡治疗益处与任何副作用,并且这样的剂量可根据使用重组载体的治疗应用而变化。可以监测转基因产物的表达水平以确定导致含有小基因的病毒载体、优选AAV载体的剂量频率。任选地,使用本发明的组合物,可以使用与用于治疗目的描述的剂量方案类似的剂量方案进行免疫。

[0166] 复制缺陷型病毒组合物可配制成剂量单位,以包含以下两的复制缺陷型病毒:约 $1.0 \times 10^9$ GC至约 $1.0 \times 10^{16}$ GC(以治疗体重平均70kg的受试者),包括该范围内的所有整数或分数量,并且对于人患者优选为 $1.0 \times 10^{12}$ GC至 $1.0 \times 10^{14}$ GC。在一个实施方案中,将组合物配制每剂量包含至少 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 或 $9 \times 10^9$ GC,包括该范围内的所有整数或分数量。在另一个实施方案中,将组合物配制每剂量包含至少 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 或 $9 \times 10^{10}$ GC,包括该范围内的所有整数或分数量。在另一个实施方案中,将组合物配制每剂量包含至少 $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 或 $9 \times 10^{11}$ GC,包括该范围内的所有整数或分数量。在另一个实施方案中,将组合物配制每剂量包含至少 $1 \times 10^{12}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $4 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 或 $9 \times 10^{12}$ GC,包括该范围内的所有整数或分数量。在另一个实施方案中,将组合物配制每剂量包含至少 $1 \times 10^{13}$ 、 $2 \times 10^{13}$ 、 $3 \times 10^{13}$ 、 $4 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{13}$ 、 $6 \times 10^{13}$ 、 $7 \times 10^{13}$ 、 $8 \times 10^{13}$ 或 $9 \times 10^{13}$ GC,包括该范围内的所有整数或分数量。在另一个实施方案中,将组合物配制每剂量包含至少 $1 \times 10^{14}$ 、 $2 \times 10^{14}$ 、 $3 \times 10^{14}$ 、 $4 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{14}$ 、 $6 \times 10^{14}$ 、 $7 \times 10^{14}$ 、 $8 \times 10^{14}$ 或

$9 \times 10^{14}$  GC, 包括该范围内的所有整数或分数量。在另一个实施方案中, 将组合物配制成为每剂量包含至少 $1 \times 10^{15}$ 、 $2 \times 10^{15}$ 、 $3 \times 10^{15}$ 、 $4 \times 10^{15}$ 、 $5 \times 10^{15}$ 、 $6 \times 10^{15}$ 、 $7 \times 10^{15}$ 、 $8 \times 10^{15}$ 或 $9 \times 10^{15}$  GC, 包括该范围内的所有整数或分数量。在一个实施方案中, 对于人施用, 剂量可以为每剂量 $1 \times 10^{10}$ 至约 $1 \times 10^{12}$  GC, 包括该范围内的所有整数或分数量。

[0167] 这些上述剂量可以在各种体积的载体、赋形剂或缓冲剂制剂施用: 约25至约1000微升, 或更高的体积, 包括该范围内的所有数字, 这取决于待治疗区域的大小、使用的病毒滴度、施用途径和该方法的期望效果。在一个实施方案中, 载体、赋形剂或缓冲剂的体积为至少约25 $\mu$ L。在一个实施方案中, 体积为约50 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约75 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约100 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约125 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约150 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约175 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约200 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约225 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约250 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约275 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约300 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约325 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约350 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约375 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约400 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约450 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约500 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约550 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约600 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约650 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约700 $\mu$ L。在另一个实施方案中, 体积为约700至1000 $\mu$ L。

[0168] 在某些实施方案中, 剂量可以为约 $1 \times 10^9$  GC/g脑质量至约 $1 \times 10^{12}$  GC/g脑质量。在某些实施方案中, 剂量可以为约 $3 \times 10^{10}$  GC/g脑质量至约 $3 \times 10^{11}$  GC/g脑质量。在某些实施方案中, 剂量可以为约 $5 \times 10^{10}$  GC/g脑质量至约 $1.85 \times 10^{11}$  GC/g脑质量。

[0169] 在一个实施方案中, 病毒构建体可以以至少约 $1 \times 10^9$  GC至约 $1 \times 10^{15}$ , 或约 $1 \times 10^{11}$ 至 $5 \times 10^{13}$  GC的剂量递送。用于递送这些剂量和浓度的合适体积可由本领域技术人员确定。例如, 可以选择约1 $\mu$ L至150mL的体积, 对于成人选择更高的体积。通常, 对于新生儿, 合适的体积为约0.5mL至约10mL, 对于较大的婴儿, 可以选择约0.5mL至约15mL。对于幼儿, 可以选择约0.5mL至约20mL的体积。对于儿童, 可以选择至多约30mL的体积。对于青少年和少年, 可以选择至多约50mL的体积。在另一些实施方案中, 患者可以接受鞘内施用, 体积为约5mL至约15mL, 或约7.5mL至约10mL。可以确定其他合适的体积和剂量。调整剂量以平衡治疗益处与任何副作用, 并且这样的剂量可根据使用重组载体的治疗应用而变化。

[0170] 可以根据公开的方法将上述重组载体递送至宿主细胞。优选悬浮在生理学上相容的载体中的rAAV可以施用于人或非人哺乳动物患者。在某些实施方案中, 对于对人患者施用, rAAV适合悬浮在含有盐水、表面活性剂和生理学相容的盐或盐混合物的水溶液中。合适地, 将制剂调节至生理学上可接受的pH, 例如pH 6至9、或pH 6.5至7.5、pH 7.0至7.7、或pH 7.2至7.8。由于脑脊髓液的pH为约7.28至约7.32, 对于鞘内递送, 可能需要在该范围内的pH; 而对于静脉内递送, 可能需要约6.8至约7.2的pH。然而, 可以选择最宽范围和这些子范围内的其他pH用于其他递送途径。

[0171] 在另一个实施方案中, 组合物包含载体、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。考虑到转移病毒针对的适应症, 本领域技术人员可以容易地选择合适的载体。例如, 一种合适的载体包括盐水, 其可以用各种缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)配制。其他示例性载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。缓冲剂/载体应包含防

止rAAV粘附于输注管但不干扰体内rAAV结合活性的组分。合适的表面活性剂或表面活性剂的组合可选自无毒的非离子表面活性剂。在一个实施方案中,选择终止于伯羟基的双官能嵌段共聚物表面活性剂,例如Pluronic® F68 [BASF],也称为泊洛沙姆188,其具有中性pH,平均分子量为8400。可以选择其他表面活性剂和其他泊洛沙姆,即由两侧是两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链的中央聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))疏水链构成的非离子三嵌段共聚物,SOLUTOL HS15 (Macrogol-15羟基硬脂酸酯)、LABRASOL (聚氧基辛基甘油酯(Polyoxy capryllic glyceride))、聚氧基油基醚、TWEEN(聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯)、乙醇和聚乙二醇。在一个实施方案中,制剂包含泊洛沙姆。这些共聚物通常用字母“P”(对于泊洛沙姆)跟三个数字命名:前两个数字×100给出聚氧丙烯核心的近似分子量,最后一个数字×10给出聚氧乙烯含量百分比。在一个实施方案中,选择泊洛沙姆188。表面活性剂可以以悬浮液的高至约0.0005%至约0.001%的量存在。在一个实例中,制剂可包含例如缓冲盐水溶液,其包含在水中的氯化钠、碳酸氢钠、右旋糖、硫酸镁(例如硫酸镁·7H<sub>2</sub>O)、氯化钾、氯化钙(例如氯化钙·2H<sub>2</sub>O)、磷酸二钠及其混合物中的一种或多种。适合地,对于鞘内递送,摩尔渗透压浓度在与脑脊髓液相容的范围内(例如,约275至约290);例如,参见emedicine.medscape.com/article/2093316-overview。任选地,对于鞘内递送,可以使用市售稀释剂作为助悬剂,或与另一种助悬剂和其他任选的赋形剂组合使用。参见,例如,Elliott's B®溶液[Lukare Medical]。在另一些实施方案中,制剂可包含一种或多种渗透增强剂。合适的渗透增强剂的实例可包括,例如甘露醇、甘氨胆酸钠、牛磺胆酸钠、脱氧胆酸钠、水杨酸钠、辛酸钠、癸酸钠、十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚或EDTA。

[0172] 任选地,除了rAAV和载剂之外,本发明的组合物可以包含其他常规药物成分,例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0173] 根据本发明的组合物可包含如上文所定义的药学上可接受的载剂。适合地,本文所述的组合物包含有效量的一种或多种AAV,其悬浮在药学上合适的载剂中和/或与合适的赋形剂混合,其设计用于通过注射、渗透泵、鞘内导管递送至受试者,或用于通过其他装置或路线递送。在一个实例中,组合物被配制用于鞘内递送。

[0174] 如本文所用,术语“鞘内递送”或“鞘内施用”是指通过注入椎管内,更特别地注入蛛网膜下腔的药物施用途径,以使其到达脑脊液(CSF)。鞘内递送可包括腰椎穿刺、室内(包括脑室内(ICV))、枕下/脑池内和/或C1-2穿刺。例如,可以通过腰椎穿刺引入材料以在整个蛛网膜下腔扩散。在另一个实例中,注射可以进入小脑延髓池。

[0175] 如本文所用,术语“脑池内递送”或“脑池内施用”是指药物直接进入小脑延髓池cerebellomedularis的脑脊液中的施用途径,更具体地通过枕下穿刺(suboccipital puncture)或通过直接注射到小脑延髓池中或通过永久定位管。

[0176] IV. 用于将药物组合物递送到脑脊髓液中的装置和方法

[0177] 在一个方面,本文提供的载体可以通过本节中提供并在图7中进一步描述的方法和/或装置进行鞘内施用。或者,可以选择其他装置和方法。该方法包括以下步骤:将脊柱针推进患者的小脑延髓池中,将一段柔性管连接到脊柱针的近端并连接到阀的输出口,将阀的输出口连接到柔性管的近端,在所述推进和连接步骤之后并且在允许管被患者的脑脊髓液自填充(self-

primed)之后,将含有一定量等渗溶液的第一个容器连接到阀的冲洗入口,然后将含有一定量的药物组合物的第二容器连接到阀的载体入口。在将第一和第二容器连接到阀之后,打开阀的载体入口和出口之间流体流动路径,并且将药物组合物通过脊椎针注射到患者体内,并且在注射药物组合物之后,打开通过阀的冲洗入口和出口的流体流动路径,并将等渗溶液注入脊柱针以将药物组合物冲洗到患者体内。

[0178] 在另一方面,提供了用于脑池内递送药物组合物的装置。该装置包括含有一定量药物组合物的第一容器,含有等渗溶液的第二容器,以及脊柱针,药物组合物可通过该脊柱针从该装置直接排出到患者的小脑延髓池内的脑脊髓液中。该装置还包括阀,该阀具有与第一容器互连的第一入口,与第二容器互连的第二入口,与脊椎针互连的出口,以及用于控制药物组合物和等渗溶液通过脊柱针的流动的鲁尔锁(luer lock)。

[0179] 如本文所用,术语计算机断层摄影术(CT)是指射线照相术,其中通过计算机从沿轴线制作的一系列平面横截面图像构建身体结构的三维图像。

[0180] 如图7所示的设备或医疗装置10包括:通过阀16互连的一个或多个容器12和14。容器12和14分别提供药物组合物、药物、载体等物质的新鲜来源和等渗溶液(例如生理盐水)的新鲜来源。容器12和14可以是能够将流体注入患者体内的任何形式的医疗装置。

[0181] 举例来说,每个容器12和14可以以注射器、套管等形式提供。例如,在所示的实施方案中,容器12作为含有一定量药物组合物的单独注射器提供,并在本文中称为“载体注射器”。仅出于举例的目的,容器12可含有约10cc的药物组合物等。

[0182] 同样地,容器14可以以含有一定量盐水溶液的单独注射器、套管等形式提供,并且可以称为“冲洗注射器”。仅出于示例的目的,容器14可以包含约10cc的盐水溶液。

[0183] 作为替代方案,容器12和14可以以除注射器以外的形式提供,并且可以集成到单个装置中,例如具有一对单独的腔室的集成医疗注射装置,一个腔室用于药物组合物,一个腔室用于盐水溶液。而且,可根据需要提供腔室或容器的尺寸以容纳期望量的流体。

[0184] 在所示实施方案中,阀16设置为具有旋转公鲁尔锁18的四通旋塞阀(stopcock)。阀16将容器12和14(即,在所示实施方案中的载体注射器和冲洗注射器)互连,并且旋转公鲁尔锁能够使得通过阀16的路径向容器12和14中的每一个关闭或打开。这样,通过阀16的路径可以向载体注射器和冲洗注射器两者关闭,或者可以向载体注射器和冲洗注射器中选择的一个打开。作为四通旋塞阀的替代,阀可以是三通旋塞阀或流体控制装置。

[0185] 在所示的实施方案中,阀16连接到一段延伸管20或类似的流体导管的一端。可以基于期望的长度或内部容积来选择管道20。仅举例来说,管的长度可为约6至7英寸。

[0186] 在所示实施方案中,管12的相对端22连接到T型连接器延伸装置24,后者又连接到脊椎针26。举例来说,针26可以是五英寸22或25规格脊柱针。另外,任选地,脊柱针26可以连接到引导针28,例如三英寸半18规格引导针。

[0187] 在使用中,脊柱针26和/或任选的引导针28可以朝向小脑延髓池推进到患者体内。在针推进之后,可以获得计算机断层扫描(CT)图像,其允许针26和/或28和相关软组织(例如,椎旁肌、骨、脑干和脊髓)的可视化。通过观察针毂中的脑脊液(CSF)和观察小脑池内的针尖可以确认正确的针放置。然后,可以将相对短的延伸管20连接到插入的脊柱针26,然后可以将四通旋塞阀16连接到管20的相对端。

[0188] 允许上述组件被患者的CSF“自填充”。然后,将预填充的生理盐水冲洗注射器14连

接到四通旋塞阀16的冲洗入口,然后将含有药物组合物的载体注射器12连接到四通旋塞阀16的载体入口。然后,旋塞阀16的输出口向载体注射器12打开,并且载体注射器的内容物可以通过阀16和组装好的装置缓慢注入患者体内一段时间。仅出于示例的目的,该时间段可以是约1-2分钟和/或任何其他期望的时间。

[0189] 在注射载体注射器12的内容物之后,将旋塞阀16上的旋转锁18转到第二位置,使得可以使用连接的预填充冲洗注射器14用期望量的生理盐水冲洗旋塞阀16和针组件。仅举例来说,可以使用1至2cc的生理盐水;尽管可以根据需要使用更多或更少的量。生理盐水确保所有或大部分药物组合物被迫通过组装的装置注射到患者体内,并且使得很少或没有药物组合物保留在组装的装置中。

[0190] 在用盐水冲洗组装的装置后,将组装的装置整体(包括针、延伸管、旋塞阀和注射器)从受试者中慢慢取出并放在手术托盘上,用于丢弃到生物危害废物容器或硬质容器(用于针)中。

[0191] 可由主要研究者进行最终可能导致脑池内(IC)程序的筛选过程。主要研究者可以描述过程、程序、施用程序本身以及所有潜在的安全风险,以便使受试者(或指定的护理人员)充分知情。获得或执行病史、伴随药物、体检、生命体征、心电图(ECG)和实验室测试结果,并提供给神经放射学家、神经外科医生和麻醉师,用于IC程序的受试者资格的筛选评估。

[0192] 为了有足够的时间来审查资格,可以在首次筛选访问和直到研究访问之前的一周之间的任何时间执行以下程序。例如,在“第0天”,可以获得利用和不利用钆的头/颈部磁共振成像(MRI)(即,eGFR>30mL/min/1.73m<sup>2</sup>)。除了头部/颈部MRI之外,研究者还可以通过屈曲/伸展研究确定是否需要进一步评估颈部。MRI发方案可以包T1、T2、DTI、FLAIR和CINE方案图像。

[0193] 此外,头/颈部MRA/MRV可根据机构方案获得(即,具有内部/经硬膜手术的受试者可被排除或可能需要进一步测试(例如,放射性核苷酸脑池造影)),以允许充分评估CSF流动和鉴定CSF空间之间可能的堵塞或缺乏联通。

[0194] 神经放射学家、神经外科医生和麻醉师最终根据所有可用信息(扫描、病史、体检、实验室等)讨论并确定每个受试者是否符合IC程序的资格。也可以从“第-28”到“第1天”获得手术前评估,该评估提供对MPS受试者的气道、颈部(缩短/加厚)和头部活动范围(颈部屈曲程度)、记住特殊生理需求的详细评估。

[0195] 在IC程序之前,将确认CT套间(CT Suite)存在以下设备和药物:成人腰椎穿刺(LP)试剂盒(按机构提供);BD(Becton Dickinson)22或25规格x 3-7"脊柱针(Quincke斜面);同轴引导针,由介入医生决定使用(用于引入脊柱针);带旋转(Spin)公鲁尔锁的4通小孔旋塞阀;带母鲁尔锁适配器的T型连接器延伸装置(管),长度为约6.7英寸;Omnipaque 180(碘海醇),用于鞘内施用;碘化造影剂,用于静脉内(IV)施用;注射用1%利多卡因溶液(如果成人LP试剂盒中未提供的话);预填充的10cc生理盐水(无菌)冲洗注射器;不透射线标记物;手术准备设备/剃须刀;枕头/支撑物,以允许插管受试者的正确定位;气管插管设备、全身麻醉机和机械呼吸机;术中神经生理学监测(IONM)设备(和所需人员);和含有载体的10cc注射器;根据单独的药剂手册准备并运送到CT/手术室(OR)套间。

[0196] 确认手术的知情同意书并且记录在医疗记录和/或研究文件中。根据机构要求,获

得放射学和麻醉学工作人员对该程序的单独同意。根据机构指南(例如,两个IV访问站点),受试者可以在适当的医院护理单元内进行静脉通路。静脉输液由麻醉师自行决定。根据麻醉师的判断和机构指南,可以在适当的患者护理单元、保持区域或手术/CT程序套件中诱导受试者并进行气管内插管和全身麻醉。

[0197] 进行腰椎穿刺,首先去除5cc脑脊液(CSF),然后鞘内注射造影剂(Omnipaque 180)以帮助显示小脑延髓池。可以执行适当的受试者定位操纵以促进造影剂扩散到小脑延髓池中。

[0198] 将术中神经生理学监测(Intraoperative neurophysiological monitoring, IONM)设备连接于受试者。将受试者以俯卧位或侧卧位置于CT扫描仪台上。必须存在足够的工作人员以确保运输和定位过程中受试者的安全。如果认为合适,受试者可以以这样的方式定位:提供颈部屈曲至在术前评估期间确定为安全的程度,并且在定位后记录正常的神经生理学监测信号。

[0199] 可以确认以下工作人员在现场存在并指定:执行该程序的介入医生/神经外科医生;麻醉师和呼吸技师;护士和医师助理;CT(或OR)技术人员;神经生理学技师;和现场协调员。可根据联合委员会/医院协议完成“暂停(time-out)”,以核实正确的受试者、程序、部位、定位以及房间内存在所有必要设备。然后,主要现场调查员可以与工作人员确认他/她可以继续准备该受试者。

[0200] 根据需要将受试者颅底下皮肤剃毛。如果介入医生认为有必要,则进行CT侦察图像,然后进行具有IV造影的术前计划的CT,以定位目标位置和对脉管系统成像。在确定了目标部位(小脑延髓池)和计划的针轨迹之后,根据机构指南使用无菌技术对皮肤进行准备和覆盖。根据介入医生的指示,将不透射线的标记物放置在目标皮肤位置上。通过用1%利多卡因浸润将标记物下的皮肤麻醉。然后将22G或25G脊柱针推进到小脑延髓池,可选择使用同轴引导针。

[0201] 在针推进之后,使用机构设备使用可行的最薄CT切片厚度获得CT图像(理想地≤2.5mm)。使用允许针和相关软组织(例如,椎旁肌、骨、脑干和脊髓)的充分可视化的可能的最低辐射剂量,获得连续CT图像。通过观察针毂中的CSF和小脑池内针尖的可视化来确认正确的针放置。

[0202] 介入医生确认载体注射器位于无菌区域附近,但在无菌区域外。在操作或施用载体注射器中的药物组合物之前,由无菌区域内辅助程序的工作人员佩戴手套、面罩和眼睛保护装置。

[0203] 将延伸管连接到插入的脊椎针上,然后将其连接到4通旋塞阀。一旦该装置被受试者的CSF“自填充”,将10cc预填充的生理盐水冲洗注射器连接到4通旋塞阀的冲洗入口。然后将载体注射器提供给介入医生并连接到4通旋塞阀上的载体入口。

[0204] 通过将旋塞阀的旋转锁置于第一位置,将旋塞阀的出口向载体注射器打开后,将注射器的内容物缓慢注入(约1-2分钟),注意在注射期间不要在注射器柱塞上施加过大的力。在注射了载体注射器的内容物之后,将旋塞阀的旋转锁转到第二位置,使得可以使用附接的预填充冲洗注射器用1-2cc生理盐水冲洗旋塞阀和针组件。

[0205] 就绪后,干预者然后通知工作人员从受试者中移除该装置。在单次运动中,将针、延伸管、旋塞阀和注射器从受试者中缓慢移除并放置在手术托盘上以丢弃到生物危害废物

容器或硬容器(针)中。

[0206] 检查针插入部位的出血或CSF渗漏迹象,并按研究者的指示进行处理。根据指示,使用纱布、手术胶带和/或Tegaderm敷料包扎部位。然后将受试者从CT扫描仪中移出并放置在担架上。有足够的工作人员以确保运输和定位过程中受试者的安全。

[0207] 麻醉停止并且按照麻醉后护理的机构指南对受试者进行护理。从受试者中移除神经生理学监测器。在恢复期间,受试者所在的担架头部应稍微抬起(~30度)。根据机构指南将受试者运送到合适的麻醉后护理单元。在受试者已经充分恢复意识并且状况稳定后,允许其进入适当的楼层/单元进行方案规定的评估。将按照方案进行神经学评估,主要研究者与医院和研究人员合作监督受试者的护理。

[0208] 在一个实施方案中,用于递送本文提供的组合物的方法包括以下步骤:将脊柱针推进患者的小脑延髓池中;将一段柔性管连接到脊柱针的近端毂并且将阀的输出口连接到柔性管的近端;在所述推进和连接步骤之后并且在允许管被患者的脑脊髓液自填充之后,将含有一定量的等渗溶液的第一容器连接到阀的冲洗入口,然后将含有一定量的药物组合物的第二容器连接到阀的载体入口;在将所述第一和第二容器连接到阀之后,打开阀的载体入口和出口之间流体流动路径,并将药物组合物通过脊柱针注入患者体内;在注射药物组合物之后,打开通过阀的冲洗入口和出口的流体流动路径,并将等渗溶液注入脊柱针以将药物组合物冲洗到患者体内。在某些实施方案中,该方法还包括在将管和阀连接到脊柱针的毂之前,确认脊柱针的远端尖端在小脑池内的适当放置。在某些实施方案中,确认步骤包括利用计算机断层摄影(CT)成像使小脑延髓池内的脊柱针的远端尖端可视化。在某些实施方案中,确认步骤包括观察患者脊柱针毂中脑脊髓液的存在。

[0209] 在上述方法中,阀可以是具有旋转鲁尔锁的旋塞阀,旋转鲁尔锁适于旋转到第一位置,允许从载体入口流动到出口同时阻止通过冲洗入口的流动,以及旋转到第二位置,允许从冲洗入口流到出口同时阻止通过载体入口的流动,并且其中当将所述药物组合物注射到患者体内时旋转鲁尔锁定位于所述第一位置并且当通过等渗溶液将所述药物组合物冲洗到所述患者体内时定位在所述第二位置。在某些实施方案中,在将等渗溶液注射到脊柱针中以将药物组合物冲洗到患者体内之后,将脊柱针从患者体内取出,其中管、阀以及第一和第二容器连接至其作为组件。在某些实施方案中,阀是具有旋转公鲁尔锁的四通旋塞阀。在某些实施方案中,第一和第二容器是单独的注射器。在某些实施方案中,T型连接器位于脊柱针的毂处并且将管连接到脊柱针。任选地,脊柱针包括位于脊柱针远端的引导针。脊柱针可以是5英寸22或24规格脊柱针。在某些实施方案中,引导针是3.5英寸18规格引导针。

[0210] 在某些方面,该方法使用至少由以下构成的装置:用于容纳一定量的药物组合物的第一容器;含有等渗溶液的第二容器;脊柱针,药物组合物可通过该脊柱针直接从装置中排出到患者的小脑延髓池内的脑脊髓液中;以及阀,其具有与第一容器互连的第一入口,与第二容器互连的第二入口,与脊椎针互连的出口,和用于控制药物组合物和等渗溶液通过脊柱针的流动的鲁尔锁。在某些实施方案中,阀是具有旋转鲁尔锁的旋塞阀,旋转鲁尔锁适于旋转到第一位置,允许从第一入口流到出口同时阻止通过第二入口的流动,以及旋转到第二位置,允许从第二入口流到出口同时阻止通过第一入口的流动。任选地,阀是具有旋转公鲁尔锁的四通旋塞阀。在某些实施方案中,第一和第二容器是单独的注射器。在某些实施方案中,脊柱针通过一段柔性管互连到阀。T型连接器可以将管连接到脊柱针。在某些实施

方案中,脊柱针是5英寸22或24规格脊柱针。在某些实施方案中,该装置还包括连接到脊柱针的远端的引导针。任选地,引导针是3.5英寸18规格引导针。

[0211] 该方法和该装置可各自任选地用于鞘内递送本文提供的组合物。或者,其他方法和装置可用于这种鞘内递送。

[0212] 在某些实施方案中,提供了包含rAAVhu68.抗-HER2抗体的组合物,使得AAV载体携带编码免疫球蛋白构建体的核酸表达盒和指导其免疫球蛋白在所选细胞中表达的调节序列。在将载体施用到CNS后,载体将表达盒递送至CNS并在体内表达蛋白质免疫球蛋白构建体。描述了本文所述组合物在抗肿瘤方法中的用途,以及这些组合物在抗肿瘤方案中的用途,其可任选地涉及递送一种或多种其他抗肿瘤剂或其他活性剂。

[0213] 组合物可含有如本文所述的单一类型的AAVhu68载体,其含有用于体内递送抗肿瘤免疫球蛋白构建体的表达盒。或者,组合物可含有两种或更多种不同的AAV载体,每种载体在其中包装有不同的表达盒。例如,两种或更多种不同的AAV可具有表达免疫球蛋白多肽的不同的表达盒,所述免疫球蛋白多肽在体内组装以形成单个功能性免疫球蛋白构建体。在另一个实例中,两种或更多种AAV可具有表达针对不同靶标的免疫球蛋白多肽的不同的表达盒,例如,两种提供两种功能性免疫球蛋白构建体(例如,抗Her2免疫球蛋白构建体和第二抗肿瘤免疫球蛋白构建体)。在另一个替代方案中,两种或更多种不同的AAV可以表达针对相同靶标的免疫球蛋白构建体,其中一种免疫球蛋白构建体已被修饰以消除FcRn结合,第二种免疫球蛋白构建体保留其能力或具有增强的与FcRn结合的能力。这样的组合物可用于同时提供在脑区域中具有增加的保留的抗体和用于全身递送免疫球蛋白构建体的抗体。

[0214] 任选地,本文所述的这些免疫球蛋白构建体中的一种或两种具有增强的ADCC活性。除了本文所述的一种或多种组合之外,本文所述的方案可以包含与抗肿瘤生物药物、抗肿瘤小分子药物、化学治疗剂、免疫增强剂、辐射、手术等中的一种或多种的进一步组合。如本文所述的生物药物基于肽、多肽、蛋白质、酶、核酸分子、载体(包括病毒载体)等。

[0215] 合适地,本文所述的组合物包含悬浮于药学上合适的载剂中的抗肿瘤有效量的一种或多种AAVhu68,其设计用于通过注射、渗透泵、鞘内导管递送至受试者,或通过其他装置或途径递送。在一个实例中,组合物被配制用于鞘内递送。如本文所用,鞘内递送包括注入椎管,更具体地注射到蛛网膜下腔。然而,可以选择其他递送途径和AAV组合物的药学上可接受的载剂,包括例如颅内、鼻内、脑池内、脑脊液内递送,以及其他合适的直接或全身途径,即Ommaya储库。

[0216] 可以将组合物配制成剂量单位以包含约 $1 \times 10^9$ 基因组拷贝(GC)至约 $5 \times 10^{13}$ GC(以治疗平均体重70kg的受试者)的量的AAV。在一个实施方案中,进行脊髓穿刺,其中去除约15mL(或更少)至约40mL的CSF,并且其中将载体与CSF混合和/或悬浮在相容的载剂中并递送至受试者。在一个实例中,载体浓度为约 $3 \times 10^{13}$ GC,但是其他量例如约 $1 \times 10^9$ GC、约 $5 \times 10^9$ GC、约 $1 \times 10^{10}$ GC、约 $5 \times 10^{10}$ GC、约 $1 \times 10^{11}$ GC、约 $5 \times 10^{11}$ GC、约 $1 \times 10^{12}$ GC、约 $5 \times 10^{12}$ GC、或约 $1.0 \times 10^{13}$ GC。

[0217] 在一个实施方案中,本文所述的组合物用于延缓肿瘤生长的方法中。在另一个实施方案中,本文所述的组合物可用于降低受试者的肿瘤大小。在进一步的实施方案中,本文所述的组合物可用于减少非实体肿瘤癌症中癌细胞的数量。在另一个实施方案中,本文提

供的组合物用于增加患者的总体存活和/或无进展存活的方法中。根据待治疗的肿瘤选择抗肿瘤免疫球蛋白构建体。例如,为了治疗脑中的转移性乳腺癌,可以将抗HER抗体的表达盒工程化到如本文所述的重组AAV中。任选地,如本文所述的AAV组合物在不存在另外的外在药理学或化学试剂或血脑屏障的其他物理破坏的情况下施用。在联合疗法中,在开始用另一种剂治疗之前、期间或之后,以及其任何组合,即在开始抗肿瘤疗法之前和期间,之前和之后,期间和之后,或之前、期间和之后,施用本文所述的AAV递送的免疫球蛋白构建体。例如,可以在开始放射治疗之前1至30天、优选3至20天、更优选5至12天施用AAV。在本发明的另一个实施方案中,化学治疗与AAV介导的免疫球蛋白(抗体)疗法同时或更优选地在AAV介导的免疫球蛋白(抗体)疗法之后施用。在另一些实施方案中,本发明的组合物可以与其他生物制剂例如重组单克隆抗体药物、抗体-药物缀合物等组合。此外,如上所述的不同AAV递送的免疫球蛋白构建体的组合可用于这样的方案中。任何合适的方法或途径可用于施用如本文所述的含有AAVhu68.抗-Her2的组合物,并任选地共同施用抗肿瘤剂和/或其他受体的拮抗剂。根据本发明使用的抗肿瘤剂方案包括任何被认为最适合于治疗患者肿瘤病症的方案。不同的恶性肿瘤可能需要使用特异性抗肿瘤抗体和特异性抗肿瘤剂,这将在患者和患者的基础上确定。施用途径包括例如全身、口服、静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内施用。施用的拮抗剂的剂量取决于许多因素,包括例如拮抗剂的类型,所治疗的肿瘤的类型和严重程度以及拮抗剂的施用途径。

[0218] 应注意,术语“一个(a)”或“一种(an)”是指一个或多个。因此,未用数量词限定的名词、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0219] 词语“包括”、“包含”和“含有”应包含性而非排他性地解释。词语“由...组成”及其变体应排他性地而不是包含性地解释。虽然说明书中的多个实施方案使用“包含”语言来呈现,但在其他情况下,相关实施方案也旨在使用“由.....组成”或“基本上由.....组成”语言来解释和描述。

[0220] 除非另有说明,否则本文所用的术语“约”是指与给定参考值相差10%( $\pm 10\%$ )。

[0221] 如本文所用,“疾病”、“障碍”和“病症”可互换使用,以指示受试者中的异常状态。

[0222] 除非在本说明书中另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义,并且通过参考公开的文本,其为本领域技术人员提供了本申请中使用的术语的一般指南。

[0223] 术语“表达”在本文中以其最广泛的含义使用,并且包括RNA或RNA和蛋白质的产生。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别涉及肽或蛋白质的产生。表达可以是瞬时的或可以是稳定的。

[0224] 如本文所用,术语“NAb滴度”是产生多少中和抗体(例如抗AAV Nab)的量的量度,所述抗体中和其靶向表位(例如AAV)的生理效应。抗AAV Nab滴度可以入一下中所述测量:例如,Calcedo, R., 等人, Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3):p. 381-390, 其通过引用并入本文。

[0225] 如本文所用,“表达盒”是指包含编码序列、启动子并且可包括其他调节序列的核酸分子。在某些实施方案中,载体基因组可含有两个或更多个表达盒。在另一些实施方案中,术语“转基因”可与“表达盒”互换使用。通常,这种用于产生病毒载体的表达盒包含本文

所述基因产物的编码序列,其两侧是病毒基因组的包装信号和其他表达控制序列,例如本文所述的那些。

[0226] 缩写“sc”指的是自身互补的。“自身互补AAV”是指其中由重组AAV核酸序列携带的编码区被设计形成分子内双链DNA模板的构建体。在感染时,不是等待细胞介导的第二链的合成,scAAV的两个互补半部将结合形成准备立即复制和转录的一个双链DNA(dsDNA)单元。参见,例如,D M McCarty等人,“Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”,Gene Therapy,(2001年8月),Vol 8,Number 16,Pages 1248-1254。自身互补的AAV描述于例如美国专利号6,596,535、7,125,717、和7,456,683中,每一个都通过引用整体并入本文。

[0227] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指表达控制序列与目的基因相邻以及表达控制序列反式或远距离起作用以控制目的基因的表达两种情况。

[0228] 当涉及蛋白质或核酸使用时,术语“异源”表示蛋白质或核酸包含在自然界中彼此之间没有相同的关系的两个或更多个序列或子序列。例如,核酸通常是重组产生的,具有两个或多个来自无关基因的序列,其排列以产生新的功能性核酸。例如,在一个实施方案中,核酸具有来自一个基因的启动子,其被设置为指导来自不同基因的编码序列的表达。因此,参考编码序列,启动子是异源的。

[0229] “复制缺陷型病毒”或“病毒载体”是指合成或人工病毒颗粒,其中含有目的基因的表达盒包装在病毒衣壳或包膜中,其中也包装在病毒衣壳内或包膜内的任何病毒基因组序列是复制缺陷的;即,它们不能产生子代病毒粒子但保留感染靶细胞的能力。在一个实施方案中,病毒载体的基因组不包含编码复制所需酶的基因(基因组可以工程化为是“gutless”-仅包含目的基因,其两侧是人工基因组扩增和包装所需的信号),但这些基因可能在生产过程中提供。因此,由于除非存在复制所需的病毒酶,否则不能发生子代病毒的复制和感染,所以在基因疗法中的使用被认为是安全的。

[0230] 在许多情况下,rAAV颗粒被称为DNA酶抗性。然而,除了该内切核酸酶(DNA酶)之外,其他内切核酸酶和外切核酸酶也可用于本文所述的纯化步骤,以除去污染核酸。可以选择这样的核酸酶以降解单链DNA和/或双链DNA和RNA。这些步骤可以包含单一核酸酶,或针对不同靶标的核酸酶的混合物,并且可以是内切核酸酶或外切核酸酶。

[0231] 术语“核酸酶抗性”表示AAV衣壳组装在表达盒周围,其被设计用于将基因递送至宿主细胞并保护这些包装的基因组序列在核酸酶孵育步骤期间免于降解(消化),核酸酶孵育步骤被设计用于除去可能存在于生产过程中的污染核酸。

[0232] 如本文所用,“有效量”是指rAAV组合物的量,其在靶细胞中递送和表达一定量的来自载体基因组的基因产物。可以基于动物模型而不是人患者来确定有效量。本文描述了合适的鼠模型的实例。

[0233] 在某些实施方案中,本文提供的rAAV或组合物不包含抗流感抗体或免疫球蛋白构建体。在某些实施方案中,本文提供的rAAV或组合物不包含脊髓性肌萎缩(SMA)基因或SMN编码序列。

[0234] 在本发明的上下文中,术语“翻译”涉及核糖体处的过程,其中mRNA链控制氨基酸序列的组装以产生蛋白质或肽。

[0235] 如在整个说明书和权利要求书中所使用的,术语“包含”、“含有”、“包括”及其变体包含其他组件、元件、整数、步骤等。相反,术语“由……组成”及其变体不包含其他组件、元件、整数、步骤等。

[0236] 应注意,未用数量词限定的名词是指一个/种或多个/种,例如,“增强子”,应理解为代表一个/种或多个/种增强子。因此,未用数量词限定的名词、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0237] 如上所述,除非另有说明,否则当用于修饰数值时,术语“约”表示±10%的变化。

[0238] 以下实施例仅是说明性的,并不意图限制本发明。

[0239] 实施例

[0240] 在某些实施方案中,已经观察到AAVhu68衣壳具有比同样处于进化枝F中的AAV9更好的产量。位置67处的谷氨酸(Glu)和位置157处的缬氨酸(Val)的氨基酸的一种或两种变化可这种增加的产量。在某些实施方案中,与基于AAV9的载体相比,具有AAVhu68衣壳的载体使包装载体的产量提高至少15%。在AAVhu68和AAVrh10之间的比较中,已发现在以较低剂量(例如约1x10<sup>9</sup>)脑室内施用后,AAVhu68提供比AAVrh10更好的转导效率。

[0241] 实施例1

[0242] A. AAVhu68的鉴定

[0243] 使用QIAamp柱(Qiagen)根据制造商的推荐(具有以下修改)从人组织样品中提取组织DNA作为PCR模板。如Gao等人[Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Sep 3, 99 (18): 11854-11859 (Epub 2002年8月21日)]所述,因为Q5DNA聚合酶(Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB)具有非凡的高保真度和强效率,选择所述Q5DNA聚合酶以回收样品中潜在AAV的全长VP1基因,其中引物组修改如下:使用GCTGCGYCAACTGGACCAATGAGAAC引物,prm504[SEQ ID NO:7]代替AV1NS,并且使用prm505:CGCAGAGACCAAGTTCAACTGAAACGA[SEQ ID NO:8]代替反向引物AV2CAS。PCR条件修改如下:

[0244]

	μL
水	9
prm504	1.25
prm505	1.25
模板	1
2XQ5	12.5

[0245] PCR程序

[0246]

	时间(秒)	循环
98	30	1
98	10	50
59	10	
72	93	
72	120	1

[0247] 从凝胶中切出来自PCR的~3kb的条带;用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)提取DNA,并克隆到Zero Blunt® TOPO® PCR克隆试剂盒(Thermo Fisher Scientific)中。对

质粒进行测序以获得AAVVP1基因的全长。对于大多数样品,对至少三个质粒完全测序,并且绘制共有序列作为该样品的最终AAV序列。

[0248] 获得的编码AAVhu68的vp1衣壳蛋白的核酸序列在SEQ ID NO:1中提供。还参见图2A-2C。AAVhu68的vp1氨基酸序列在图1和SEQ ID NO:2中提供。与AAV9、AAVhu31和AAVhu32相比,在AAVhu68中鉴定出两个突变(A67E和A157V)是关键的(图1中圈出)。

[0249] 该扩增方法还在vp1编码序列和rep编码序列之间提供间隔序列。该编码序列是:atgacttaaaccaggt,SEQ ID NO:9。AAVhu68的rep52的编码序列在SEQ ID NO:3中再现。rep52蛋白质序列也在SEQ ID NO:4中再现。

[0250] 然后通过将hu68的VP1基因加载到pAAV2/9骨架中代替AAV9VP1基因来制备pAAV2/hu68反式质粒,以评估包装效率、产量和转导性质。pAAV2/9质粒含有在衣壳基因两侧的AAV25'和3'ITR,并且可获自Penn Vector Core[University ofPennsylvania, Phila, PA US,pennvectorcore.med.upenn.edu]。

[0251] B.AAVhu68的表征

[0252] 虽然先前未在腺相关病毒衣壳中观察到或描述过这种现象,但已发现其他蛋白质和肽在体内和体外都易感于多种化学修饰。最常见的修饰之一是天冬酰胺的脱酰胺作用,这是一种自发的非酶促反应。通常,在生理条件下(pH7.4,37°C),天冬酰胺酰脱酰胺的半衰期为约1天至1000天。在谷氨酰胺到谷氨酸残基中发生了类似的一系列反应,但这些反应比其天冬酰胺对应部分的反应慢得多。

[0253] 在短肽中,环状中间体的形成由一级序列控制,而在蛋白质中,二级、三级和四级结构具有额外的作用。因此,每种蛋白质酰胺的脱酰胺率是唯一确定的。脱酰胺肽的质谱鉴定相对简单,因为脱酰胺作用增加了完整分子的质量+0.984Da(-OH和-NH<sub>2</sub>基团之间的质量差异)。由于脱酰胺是在气相中稳定的修饰,因此即使存在多个潜在的脱酰胺位点,MS/MS谱也可以揭示脱酰胺的位置。

[0254] 使用与本研究无关的四种载体基因组之一产生四种AAVhu68载体,每种在293细胞中使用常规三重转染方法产生。对于这些技术的一般描述,参见,例如,Bell CL,等人,“The AAV9receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice.”,J Clin Invest.2011;121:2427-2435。简单地说,通过与编码AAV2rep基因和AAVhu68cap基因的质粒和腺病毒辅助质粒(pAd Δ F6)一起三重转染HEK293细胞来包装编码两侧是AAV2反向末端重复的待包装序列(由鸡β-肌动蛋白启动子、内含子和生长激素聚腺苷酸表达的基因产物)的质粒。可以使用CsCl梯度离心纯化得到的AAV病毒颗粒,浓缩并冷冻以备后用。

[0255] 变性和烷基化:向100μg解冻的病毒制备物(蛋白质溶液)中加入2μl 1M二硫苏糖醇(DTT)和2μl 8M盐酸胍(GndHCl),并在90°C下孵育10分钟。使溶液冷却至室温,然后加入5μl新制备的1M碘乙酰胺(IAM)并在室温下黑暗中孵育30分钟。30分钟后,加入1μl 1M DTT淬灭烷基化反应。

[0256] 消化:向变性的蛋白质溶液中加入20mM的碳酸氢铵,pH 7.5-8,其体积将最终的GndHCl浓度稀释至800mM。蛋白酶与蛋白质的比率为1:20加入蛋白酶溶液(胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶),并在37°C下孵育过夜。消化后,加入TFA至最终0.5%以淬灭消化反应。

[0257] 质谱:通过UHPLC-MS/MS分析约1微克的合并的消化混合物。在UltiMate

3000RSCLnano系统(Thermo Scientific)上进行LC。流动相A是含有0.1%甲酸的MilliQ水。流动相B是含有0.1%甲酸的乙腈。LC梯度如下进行:经过15分钟从4% B至6% B,然后至10% B持续25分钟(总共40分钟),然后至30% B持续46分钟(总共86分钟)。样品直接加载到色谱柱中。柱尺寸为75cmx 15um I.D.并装有2微米C18介质(AcclaimPepMap)。LC通过使用源的nanoflex电喷雾电离与quadrupole-Orbitrap质谱仪(Q-Exactive HF, Thermo Scientific)连接。将柱加热至35°C并施加2.2kV的电喷雾电压。质谱仪被编程以获得来自顶部20个离子的串联质谱。完整的MS分辨率为120,000, MS/MS分辨率为30,000。归一化碰撞能量设置为30,自动增益控制设置为1e5,最大填充MS设置为100ms,最大填充MS/MS设置为50ms。

[0258] 数据处理:通过BioPharma Finder 1.0(Thermo Scientific)分析质谱仪RAW数据文件。简单地说,所有搜索都需要10ppm前体质量耐受,5ppm片段质量耐受,胰蛋白酶切割,至多1次遗漏切割,半胱氨酸烷基化的固定修饰,甲硫氨酸/色氨酸氧化、天冬酰胺/谷氨酰胺脱酰胺、磷酸化、甲基化和酰胺化的可变修饰。

[0259] 在下表中,T表示胰蛋白酶,C表示胰淀粉酶。

[0260]

修饰													
酶	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T	T	T	
% 覆 盖 率	93.6	92	93.1	92.5	90.2	89.7	91.1	88.9	98.9	97	94.6	92.4	
+ 脱 酰 氨 (Deamid)													
~N35													
N57+ Deamid	87.6	95.5	89.3	88.2	90.5	96.3	86.4	84.8	100.0	100.0	99.0	92.7	
N66+ Deamid	4.7												
N94+ Deamid	11.3	10.9	11.0	5.3	11.6	10.4	10.8	5.6	5.0	11.1	5.4	16.0	
N113+ Deamid			1.8										
~N253 + Deamid	17.7	22.0	21.1	15.0	17.0	22.6	20.5	15.6	4.2	5.5			
Q259+ Deamid	35.2	25.6	21.0		35.4	26.3	20.9	9.2					
~N270 + Deamid	16.4	25.1	23.2	16.6	15.9	24.9	23.5	16.1	0.2				
~N304 + Deamid	2.6	2.9	2.8	1.3	2.5	2.8	2.9	1.3	16.6	10.3			
~N314 +Deam id									6.5				
N319+ Deamid	0.3	2.8	2.8	0.2		2.9	2.8	0.2					
N329+ Deamid	72.7	85.6	89.1	86.8	71.0	87.2	88.7	84.7	85.5	79.4	78.9	91.8	
N336+ Deamid		30.8	9.3	100.0		31.0	9.2	95.7					
~N409 + Deamid	21.3	22.9	23.9	24.0	22.0	23.4	24.7	24.2					
N452+ Deamid	98.8	99.7	99.2	100.0	98.9	97.3	98.1	95.2	98.2	68.7	67.4	49.4	
N477+ Deamid	4.4	4.3	4.3	2.6	4.5	4.4	4.3	2.6			0.8		
N512+	97.5	97.9	95.3	95.7	92.2	91.8	99.2	96.1	99.7	98.2	87.9	75.7	

[0261]

Deamid												
~N515+ Deamid	8.2	21.0	16.0		8.3	21.0	16.5	0.0	2.5	3.0		15.1
~Q599+ Deamid	4.0	15.4	10.1	13.6	4.0	15.5	10.0	13.8	15.8			
N628+ Deamid	5.3		5.6		5.4	0.0	5.4	0.0				
N651+ Deamid	0.9	1.6	1.6						0.5			
N663+ Deamid	3.4		3.5	3.7	3.4	0.0	3.4	3.6				
N709+ Deamid	0.6	0.8	20.2	0.6	0.6	0.8	19.8	0.6	0.3	1.3	0.1	0.2
N735									25.0	42.7		21.7
+乙酰化(Ac):												
K332+Ac				100.0								
~K693+Ac	13.0		13.5									
~K666+Ac				93.8								
~K68+Ac		59.2										
+异构化(Iso):												
D97+Iso	0.5	0.4	0.4	0.2	0.5		0.4	0.2				
D107+Iso		0.3		0.3		0.3						
D384+Iso	0.8				0.9							
+磷酸化(Phos):												
S149+Phos	5.8	5.7	5.2	9.8	5.7	5.9	5.2	9.9				
~S499+Phos				30.6								
~T569+Phos	0.9											
~S586+Phos		3.6										
+氧化:												
~W23+Oxi		4.7	5.5			4.8	5.5					
W247+Oxi	1.5	0.4	0.7		1.4							
W247+Oxi至 犬尿氨酸		0.1				0.1						
W306+	0.7	0.9	1.6	1.8	0.7	1.0	1.6	1.8				

Oxi											
W306+ 氧化至 犬尿氨酸			0.3				0.3				
M404+ Oxi	0.1		0.2		0.1		0.2				
M436+ Oxi	4.9		10.2	23.0	4.8		10.2	22.6			
~M518 + Oxi	29.9		1.5	10.6	29.9		1.5	10.5			
~M524 + Oxi	18.8	31.6	52.7		18.4	31.1	52.5	14.2			
M559+ Oxi	19.0	21.6	19.6	20.9	19.6	21.3	20.1	20.9			
~M605 + Oxi	12.2	15.2			12.8	14.8					
W619+ Oxi	1.0		0.6	1.5	1.0		0.6	1.5			
W619+ 氧化			20.3								
~M640 + Oxi	23.5	64.2	24.6		22.4	21.1	25.6				
W695+ Oxi	0.3		0.4	0.4	0.3		0.4	0.4			
+酰胺化											
~D297 +酰胺化		72.9		73.3							

[0263] 在AAVhu68衣壳蛋白的情况下,4个残基(N57、N329、N452、N512)通常显示高水平的脱酰胺,并且大多数情况下在各批次中>90%。另外的天冬酰胺残基(N94、N253、N270、N304、N409、N477)和Q599也在各批次中显示高至~20%的脱酰胺水平。先使用胰蛋白酶消化鉴定脱酰胺水平,并用胰凝乳蛋白酶消化进行验证。

[0264] 实施例2-AAVhu68载体的产量

[0265] 产生并评估携带多种标签(例如GFP和LacZ)的AAVhu68和AAV9载体。每种载体使用三重转染技术在293细胞中产生,如Gao等人[Gao, Guang-Ping, 等人"Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18(2002):11854-11859]所述。

[0266] A. pAAVhu68反式质粒的产生

[0267] 编码vp1衣壳蛋白的核酸序列在SEQ ID NO:1中提供。

[0268] 通过将hu68的VP1基因加载到pAAV2/9骨架中代替AAV9VP1基因来制备pAAV2/hu68反式质粒,以评估包装效率、产量和转导性质。pAAV2/9质粒含有在衣壳基因两侧的AAV25'和3' ITR,并且可获自Penn Vector Core[University of Pennsylvania, Phila, PA US, pennvectorcore.med.upenn.edu]。

[0269] B.AAVhu68载体的产量

[0270] 在37°C的5%CO<sub>2</sub>气氛下,在含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠并补充有

10% 胎牛血清的DMEM, 1X (Dulbecco's Modification of Eagle's Minimum Essential Medium) 中培养和维持293细胞。如Gao等人所述 [Gao, Guang-Ping, 等人 "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002) :11854-11859.] 进行转染, 用pAAV2/hu68或pAAV2/9代替载体质粒。使用的转基因(表达盒)是CB7.CI.ff萤光素酶.RBG。将转染的细胞在6孔板中进一步培养。收集细胞的总裂解物以及上清液, 用于使用靶向转基因(表达盒)的兔 $\beta$ -珠蛋白polyA区域的探针和引物通过TaqMan (Applied Biosystems) 进行病毒定量, 如Gao等人 [Gao, Guangping, 等人 "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo." Human gene therapy 11.15 (2000) :2079-2091.] 所述。在上清液滴度和总裂解物滴度两方面, 在6孔板中头对头比较6个pAAV2/9质粒和6个pAAV2/hu.68质粒的产量。每个质粒来自单个细菌菌落。

[0271] 发现就总裂解物而言, AAVhu68的产量与AAV9的产量相似(图3A, n=6, p=0.42)。然而, 在上清液中, AAVhu68的产量显著高于AAV9的产产量(图3B, n=6, p=0.0003)。因此, 就生产而言, AAVhu68被证明是与AAV9相比更好的载体, 因为在细胞堆积规模和病毒生产期间收获上清液。

[0272] 实施例3-AAVhu68.LacZ的体内转导

[0273] 通过插入编码核定位的细菌 $\beta$ -半乳糖苷酶(nLacZ)的序列作为转基因产生AAVhu68.CB7.nLacZ(也称为AAVhu68.LacZ), 然后如实施例2中所述生产。为了评估体内AAVhu68的包装效率、产量、转导性质、转导效率和向性, 通过多种施用方法(例如静脉内、肌肉内和鼻内施用)向小鼠注射 $5 \times 10^{11}$ 个基因组拷贝的AAVhu68.LacZ载体。在载体施用后两周处死小鼠后收集肌肉、肺、肝和心脏。制备、处理和分析每个器官的冷冻切片, 作为检测LacZ基因表达的常规方案 [Bell, Peter, 等人 "An optimized protocol for detection of E.coli $\beta$ -galactosidase in lung tissue following gene transfer." Histochemistry and cell biology 124.1 (2005) :77-85.]。蓝色显示的LacZ阳性染色(图4A-4C)表明AAVhu68的成功转导。

[0274] 如图4A所示, 在通过静脉内注射(IV)将载体引入小鼠后, 所有测试的器官(心脏、肝、肺和肌肉)都显示出AAVhu68转导, 同时观察到相对于肺和肌肉, 有利的心脏和肝脏向性。在通过肌肉内注射(IM)将载体引入小鼠后, 心脏、肝脏和肌肉显示出AAVhu68的高转导率, 而未观察到肺中可检测的转导。如果进行鼻内施用, 则在心脏、肝、肌肉和肺中观察到分散的转导。

[0275] 这些结果表明AAVhu68显示出高转导效率和广泛的组织/器官向性。

[0276] 实施例4-与AAV9.GFP相比, AAVhu68.GFP的体内转导

[0277] 通过插入编码绿色荧光蛋白(GFP)的基因作为基因产生AAVhu68.GFP和AAV9.GFP, 然后如实施例2中所述生产。为了评估体内AAVhu68和AAV9的包装效率、产量、转导性质、转导效率和向性, 向小鼠施用 $1 \times 10^{10}$ GC或 $1 \times 10^{11}$ GC剂量的AAVhu68.GFP或AAV9.GFP。在载体施用两周后处死小鼠后收集脑、肌肉、肺、肝和心脏。制备每个器官的冷冻切片并处理以使GFP表达可视化, 如Wang等所述 [Wang L, 等人, Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22 (11) :1389-401; Wang L, 等人, Mol Ther. 2010 Jan; 18 (1) :126-34]。绿色显示的GFP阳性染色(图5A-5C和图

6A-6D) 表明测试载体的成功转导。

[0278] 研究了脑室内施用载体的小鼠的多个脑区(海马、运动皮层和小脑)的切片。除了来自注射 $1 \times 10^{10}$ GC的AAV9.GFP的一只小鼠外,在所有测试的海马样品中观察到AAV载体的转导。在运动皮质中观察到与AAV9的转导相比AAVhu68.GFP的更好转导。此外,仅在小鼠注射 $1 \times 10^{11}$ GC的载体时,观察到小脑中AAVhu68.GFP的转导。因此,与AAV9相比,AAVhu68在脑中显示出更高的转导效率以及更广泛的向性。

[0279] 在进一步的实验中,如Wang等人[Wang L,Calcedo R,Bell P,Lin J,Grant RL, Siegel DL,Wilson JM, Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11):1389-401; Wang L,Calcedo R, Wang H,Bell P,Grant R,Vandenbergh LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM, Mol Ther. 2010 Jan; 18(1):126-34]所述制备并处理来自静脉内施用AAVhu68.GFP的小鼠的多种器官,例如肝、肾、心脏和胰腺。绿色显示的GFP阳性染色表明所述AAV载体的成功转导。为器官形态提供以黑色和白色显示的明场图像,同时提供相应的红色荧光通道作为阴性对照。

[0280] 在肝中观察到强阳性信号,而肾、心脏和胰腺也显示载体的转导,表明AAVhu68载体的广泛组织/器官向性。

[0281] 实施例5-具有A67E和A157V突变的AAV载体的产量和体内转导

[0282] 为了提高重组腺相关(rAAV)载体的产量和/或包装效率,将表达具有在氨基酸位置67处的Glu和/或在氨基酸位置157处的Val的vp1蛋白的AAV衣壳基因工程化成AAV载体,例如AAV9、AAVhu31和AAVhu32,其中氨基酸残基的编号基于AAVhu68[SEQ ID N0:5]。

[0283] 根据实施例2产生所述AAV载体并评估每种载体的产量。如实施例3中所示通过常规方法进一步评估体内转导效率和组织/器官/区域向性。

[0284] 实施例6-鞘内AAVhu68.CMV.PI.h曲妥珠单抗。SV40用于预防人HER2+乳腺癌脑转移

AAV9	腺相关病毒 9
AAV9.曲妥珠单抗	AAV9.CMV.PI.h 曲妥珠单抗.SV40 (携带曲妥珠单抗表达盒的 AAV9)
BCA	二喹啉甲酸测定
BCBM	乳腺癌脑转移
CI	嵌合内含子
CMV (启动子)	巨细胞病毒立即早期增强子/鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子
CSF	脑脊液
ddPCR	液滴数字聚合酶链反应
DNA	脱氧核糖核酸
GC	基因组拷贝
GLP	良好实验室实践
GTP	基因疗法计划
HER2	人表皮生长因子受体 2
AAVhu68	腺相关病毒血清型 hu68
AAVhu68.曲妥珠单抗	hu68.CMV.PI.h 曲妥珠单抗.SV40 (携带曲妥珠单抗表达盒的 AAVhu68)
ICV	脑室内
ID	标识号
IT	鞘内
mAb	单克隆抗体
MED	最低必需剂量
n	动物数量

[0285]

PBS	磷酸盐缓冲盐水
qPCR	定量聚合酶链反应
RAG1 <sup>-/-</sup>	重组激活基因 1 敲除
RAG1	重组激活基因 1
rBG	兔 $\beta$ -珠蛋白聚腺苷酸序列
RPM	每分钟旋转
SD	标准偏差
SOP	标准操作流程
SV40 (聚腺苷酸信号)	猿猴病毒 40 多腺苷酸化信号

[0286]

[0287] A. 概述

[0288] 本研究的目的是测试AAVhu68.CMV.PI.h曲妥珠单抗.SV40 (AAVhu68.曲妥珠单抗) (一种含有曲妥珠单抗表达盒的血清型AAVhu68的重组腺相关病毒) 用于预防异种移植植物小

鼠模型中人HER2+乳腺癌脑转移的效力。曲妥珠单抗(Herceptin®, Roche)是当结合化学疗法静脉内使用来治疗全身HER2+疾病时,延长患者的存活的针对HER2的人源化单克隆抗体(mAb)。然而,血脑屏障使静脉内施用的Herceptin®不能进入中枢神经系统,使得其不能有效治疗HER2+乳腺癌脑转移。一些病例报告表明,鞘内施用Herceptin®可以增加HER2+软脑膜病患者的生存率或阻止HER2+局灶性转移的进展[J.C.Bendell,等人,Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma.Cancer.97,2972-2977(2003);D.J.Slamon,等人,Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2.N Engl J Med.344,783-792(2001),M.A.Cobleigh,等人,Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.J.Clin.Oncol.17,2639-2648(1999),Zagouri F,等人,(2013).Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-positive metastatic breast cancer:a systematic review and pooled analysis.Breast Cancer Res Treat,139(1):13-22.,Bousquet G,等人(2016).Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer.J Clin Oncol.34(16):e151-155]。然而,CSF迅速转换,可能会影响IT Herceptin®的治疗效力,因为CSF的药代动力学特征波动很大。AAVhu68.曲妥珠单抗治疗的目的是通过在脑实质本身中提供AAVhu68.曲妥珠单抗的局部长期表达来预防发生、减缓生长、改善存活或提高与HER2+BCBM相关的临床生活质量测量。

[0289] 在6-9周龄的RAG1<sup>-/-</sup>小鼠中,通过以脑室内注射(ICV)以四种不同剂量(1.00X 10<sup>10</sup>、3.00X 10<sup>10</sup>、1.00X 10<sup>11</sup>、和3.00X 10<sup>11</sup>GC/动物)施用AAVhu68.曲妥珠单抗。在至少21天后植入源自HER2+人导管癌细胞系的BT474.M1.ffluc细胞。每天观察小鼠并在研究终点实施安乐死。在尸检时收集脑组织以测量肿瘤体积。结论是在该实验中的所有剂量测试下,在HER2+乳腺癌脑转移的RAG1<sup>-/-</sup>异种移植模型中预防性ICV施用AAVhu68.CMV.PI.h曲妥珠单抗.SV40导致肿瘤体积显著减少。总之,这些结果证明了AAVhu68.曲妥珠单抗对改善HER2+BCBM患者存活的潜在治疗效力。

[0290] B.本研究的目的是通过研究肿瘤体积来研究AAVhu68.曲妥珠单抗在HER2+BCBM的RAG1<sup>-/-</sup>异种移植模型中用于肿瘤预防的最小必需剂量(MED)。载体是AAVhu68.CMV.PI.h曲妥珠单抗.SV40或AAVhu68.曲妥珠单抗。

[0291] ddPCR滴度:7.38X10<sup>13</sup>GC/ml

[0292] 内毒素:<2.0EU/ml

[0293] 纯度:100%

[0294] 磷酸盐缓冲盐水(PBS)(未治疗对照)

[0295] 使用HER2+BCBM的RAG1<sup>-/-</sup>鼠异种移植模型评估AAVhu68.曲妥珠单抗提供肿瘤预防的能力。免疫缺陷小鼠模型允许小鼠中人源原位肿瘤的生长,而不被小鼠免疫系统的排斥。另外,RAG1<sup>-/-</sup>小鼠不具有内在IgG,允许通过蛋白AELISA来量化曲妥珠单抗。

[0296] 表:研究设计

组号	处理	剂量 (GC/小鼠)	基因型 (n)	剂量 体积 ( $\mu$ l)	ROA	肿瘤细 胞植入
1	AAVhu68.曲妥珠单抗	$1.0 \times 10^{10}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	护理后 21 天
2	AAVhu68.曲妥珠单抗	$3.0 \times 10^{10}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
3	AAVhu68.曲妥珠单抗	$1.0 \times 10^{11}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
4	AAVhu68.曲妥珠单抗	$3.0 \times 10^{11}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
5	PBS	未治疗	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	

[0298] 用无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 将测试物品和阴性对照稀释至合适的浓度。将载体 ICV 施用于左侧脑室。

[0299] 鞘内AAV递送可以使用多种途径进行CSF接近。选择ICV途径是因为它是微创的并且不需要小鼠中的手术程序(与需要通过颈部皮肤和肌肉切开的小脑延髓途径相比)。先前在我们的实验室和其他人中已经证明,在小鼠和大型动物中单次注射AAV9载体进入脑脊液 (ICV或小脑池) 靶向整个脑的神经元[Dirren等人(2014).Intracerebroventricular Injection Of Adeno-Associated Virus 6And 9Vectors For Cell Type-Specific Transgene Expression In The Spinal Cord.Hum.Gene.Therapy 25,109-120,Snyder等人(2011).Comparison Of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes For Spinal Cord And Motor Neuron Gene Delivery.Hum.Gene Ther 22,1129-1135,Bucher等人(2014).Intracisternal Delivery OfAAV9Results In Oligodendrocyte And Motor Neuron Transduction In The Whole Central Nervous System Of Cats.Gene Therapy 21,522-528,Hinderer等人(2014).Intrathecal Gene Therapy Corrects CNS Pathology In A Feline Model Of Mucopolysaccharidosis I.Mol Ther:22,2018-2027]。

[0300] C.RAG1<sup>-/-</sup>小鼠中的肿瘤细胞植入

[0301] 为了产生HER2+BCBM的小鼠异种移植模型,使用用萤火虫荧光素酶转导的人HER2+导管细胞癌细胞系BT474-M1.ffluc。对于注射程序,用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠。修剪头皮和颈部的毛。将延时释放 (time-release) 的17- $\beta$ 雌二醇颗粒 (1.7mg, 90天释放, Innovative Research of America) 在颈背部皮下植入,并在研究期间每90天重新施用。将小鼠固定在立体定位装置中。用聚维酮碘和70%乙醇清洗暴露的皮肤。在颅骨顶部作出1cm 前-后切口。确定前囟。将气动钻放置在前囟处,然后在前囟后方移动0.8mm,左侧移动2.2mm,在颅骨上钻出钻孔。向25 $\mu$ L Hamilton注射器装载5 $\mu$ L肿瘤细胞悬浮液 (在50:50 MatriGel®:PBS 中总共100,000个细胞)。将针带到前囟并移至上述坐标,然后穿入4.0mm

进入脑实质。然后将针向上提升1.0mm,使针道向上移动,以形成注入肿瘤细胞的口袋。将针留在原位5分钟。接下来,使用机动注射装置在10分钟内注射5 $\mu$ L细胞悬浮液。注射完成后将针留在原位5分钟,然后缓慢取出。用4.0薇乔线(vicryl)缝合颅骨上的切口,并且小鼠皮下接受无菌PBS中的15mg/kg恩诺沙星(Bayer)以及无菌PBS中的0.3mg/kg丁丙诺啡。

[0302] 每天监测小鼠。当垂死时,通过过度暴露于CO<sub>2</sub>然后颈椎脱臼使小鼠安乐死。在尸检时,分离脑并通过肿瘤注射针道进行冠状切割。

[0303] 肿瘤体积:用数字游标卡尺(Thermo-Fisher)进行第35天肿瘤直径的测量。在尸体剖检时收获脑。肿瘤注射针道上的钝性解剖用于从周围脑组织中分离肿瘤。然后在3维(x,y和z)中测量肿瘤直径,并且将肿瘤体积计算为椭球体积, $4/3\pi*x/2*y/2*z/2$ 。在福尔马林中保藏右脑半球,即载体注射和肿瘤植入部位对侧的半球。按剂量队列合并解剖的肿瘤并保存在福尔马林中。使用GraphPad Prism 7中的Mann-Whitney检验进行肿瘤体积比较。

[0304] D.结果

[0305] 肿瘤体积:为了确定ITAAVhu68.曲妥珠单抗肿瘤预防是否会减缓肿瘤生长,我们在植入后35天测量肿瘤直径。来自接受最高剂量的AAVhu68.曲妥珠单抗肿瘤预防的组的肿瘤的中值体积(0.4mm<sup>3</sup>,n=10)显著小于未接受治疗的小鼠(26.1mm<sup>3</sup>,n=9)。与未治疗相比,接受较低剂量的AAVhu68.曲妥珠单抗的小鼠都具有显著更小的肿瘤。接受1.00X10<sup>10</sup>GC/小鼠的小鼠的中值肿瘤体积计算在统计学上与接受3.00X10<sup>10</sup>GC/小鼠的小鼠的中值肿瘤体积相同( $p=0.6029$ )。值得注意的是,组1中的两只小鼠、组2中的一只小鼠、组3中的三只小鼠和组4中的三只小鼠在解剖时没有明显可见的肿瘤。

组	剂量(GC/小鼠)	小鼠数量	中值肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )	与未治疗相比的p值
1	1.00X10 <sup>10</sup>	9*	6.4	0.0375
2	3.00X10 <sup>10</sup>	10	8.1	0.0053
3	1.00X10 <sup>11</sup>	9*	1.3	0.0026
4	3.00X10 <sup>11</sup>	10	0.4	<0.0001

[0307] \*这些组中每一组中有一只动物在预定的尸检日期之前被安乐死,因此不包括在分析中。

[0308] 在所有剂量下,当在使用HER2+BT474.M1人导管癌细胞系的HER2+BCBM的RAG1<sup>-/-</sup>鼠异种移植模型中预防性施用时,AAVhu68.曲妥珠单抗的IT施用导致肿瘤植入后D35的显著更小的中值肿瘤体积。在该研究中测量的AAVhu68.曲妥珠单抗MED为1.00X10<sup>10</sup>GC/小鼠。

[0309] 实施例7-AAVhu68载体的产量和纯度

[0310] 为了比较具有不同衣壳的重组腺相关(rAAV)载体的产量和/或纯度,产生并制备了具有不同衣壳(包括AAVhu68、AAV8triple、AAV8和AAV9)的两组不同的载体。

[0311] 简单地说,以小规模产生具有指定衣壳和包含巨细胞病毒启动子(CMV)、萤火虫荧光素酶编码序列和SV40聚腺苷酸(CMV.ff萤光素酶.SV40)的载体基因组的一组载体,并评估每种载体的产量。结果显示AAV9载体提供最高产量,而AAVhu68载体在其次(图8A)。AAV8和AAV8三重载体也提供高于4x10<sup>13</sup>GC的产量(图8A)。

[0312] 根据常规方法以大规模制备具有指定衣壳和包含CMV启动子、内含子、免疫粘附素

编码序列 (201Ig IA) 和 SV40 聚腺苷酸 (CMV.PI.201Ig IA.SV40) 的载体基因组的另一组载体，并评估产量和纯度。结果显示在图8B和9中。

[0313] 与小规模制备物的产量相似，AAV9载体提供约  $5.7 \times 10^{14}$  GC 的最高产量，而 AAHu68 载体在其次为  $3.8 \times 10^{14}$  GC (图8B)。AAV8载体提供约  $3.6 \times 10^{14}$  GC 并且 AAV8triple 提供约  $1.8 \times 10^{14}$  GC 产量 (图8B)。所测试制备物的纯度是相当的，范围为约 97.4% 至约 98.6%。

[0314] 实施例8-雄性RAGKO小鼠中的rAAV载体。

[0315] 使用具有不同衣壳 (包括 AAHu68、AAV8triple、AAV8 和 AAV9) 并表达分泌的转基因产物 201Ig IA 的 rAAV 载体在体内测试基因表达。

[0316] 使用 Hamilton 注射器，向 6-8 周龄 (n=5/组) 的雄性 RAGKO 小鼠肌肉内注射  $3 \times 10^{11}$  GC 小鼠或  $3 \times 10^{10}$  GC/小鼠的测试载体到腓肠肌中。每周通过下颌下出血到血清收集管中来从施用表达分泌蛋白的载体的小鼠中收集血清。通过 ELISA 测量血清中的转基因表达水平，如 Greig 等人，Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression, PLoS One. 2014 Nov 13; 9(11):e112268. doi:10.1371/journal.pone.0112268. eCollection 2014 所述。

[0317] 如图10A和10B所示，在小鼠IM注射后，AAHu68、AAV8和AAV9载体以相似水平表达转基因，而 AAV8triple 载体表达更好。在较低测试剂量 (即  $3 \times 10^{10}$  GC/小鼠) 下，AAV8triple 的表达差异很大。

[0318] 实施例9-雄性C57BL/6J小鼠中rAAV载体的转基因表达。

[0319] 使用具有不同衣壳 (包括 AAHu68、AAV8triple、AAV8 和 AAV9) 并且表达萤火虫荧光素酶 (ffLuc) 作为转基因的 rAAV 载体在体内测试肝和肌肉中的表达。

[0320] 使用 Hamilton 注射器，向 6-8 周龄 (n=5/组) 的雄性 C57BL/6J 小鼠肌肉内注射  $3 \times 10^{11}$  GC/小鼠的测试载体到腓肠肌中。如先前所述 (Greig 等人, PLoS One 2014, 上文引用) 通过每周全身生物发光成像使 ffLuc 表达可视化。

[0321] 如图11A和11B所示，AAHu68、AAV8和AAV9载体在肌肉和肝脏中以相似水平表达，而 AAV8triple 载体在肝脏中表达降低并且在肌肉中表达增强。

[0322] 实施例10-雄性和雌性食蟹猴中的rAAV载体。

[0323] 使用具有不同衣壳 (包括 AAHu68、AAV8triple、AAV8 和 AAV9) 并表达分泌的转基因 201Ig IA 的 rAAV 载体在食蟹猴中测试转基因表达。

[0324] 在研究开始时向对注射载体的 NAb 滴度 < 1:5 的雄性和雌性食蟹猴施用剂量为  $10^{13}$  GC/kg 体重的表达 201Ig IA 的载体，其来自以每千克体重 1m1 的注射 (载体浓度为  $10^{13}$  GC/m1) 肌肉内注入右腿和左腿的股外侧肌用于载体生物分布研究的四种载体质粒 (AAV8triple、AAHu68、AAV9 或 AAV8)。通过股静脉的静脉穿刺在研究前和研究期间每周采集血样。如先前所述 (Greig 等人, PLoS One 2014, 上文引用) 通过 ELISA 测量血清中的转基因表达水平。

[0325] 如图12所示，在IM注射后，与AAV9和AAV8载体相比，AAHu68和AAV8triple表达更好。

[0326] 本说明书中引用的所有公开文献均通过引用并入本文，例如 2018 年 1 月 5 日提交的美国临时专利申请号 62/614,002, 2017 年 11 月 27 日提交的美国临时专利申请号 62/591,001 和 2017 年 2 月 28 日提交的美国临时专利申请号 62/464,748。类似地，与本文一起提交并且标

记为17-7986Seq Listing\_ST25.txt的序列表以及其中的序列和文本通过引用并入本文。虽然已经参考特定实施方案描述了本发明,但是应该理解,可以在不脱离本发明的精神的情况下进行修改。这些修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0327] (序列表自由文本)

[0328] 为数字标识符<223>下包含自由文本的序列提供以下信息。

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
2	<223> 合成构建体
3	<223> 智人来源的 AAVhu68 rep 基因
4	<223> 合成构建体
5	<223> 智人来源的 AAV9 VP1 衣壳 <220> <221> CDS <222> (1)..(2208) <223> AAV9 VP1 衣壳
6	<223> 合成构建体
7	<223> 引物 prm504
8	<223> 引物 prm505
9	<223> AAVhu68 间隔序列
10	<223> AAVhu31 vp1 衣壳蛋白质
11	<223> AAVhu32 vp1 衣壳蛋白质

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
12	<223> AAVhu31 vp1 编码序列
13	<223> AAVhu32 vp1 编码序列
14	<223> 修饰的 hu68vp1
[0330]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (23)..(23)
	<223> Xaa 可以为 W(Trp, 色氨酸), 或氧化的 W.
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (35)..(35)
	<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (57)..(57)
	<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (66)..(66)
	<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (94)..(94)
	<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (97)..(97)
	<223> Xaa 可以为 D (asp, 天冬氨酸), 或异构化的

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
[0331]	<p>D</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (107)..(107)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 D (asp, 天冬氨酸), 或异构化的 D。</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (113)..(113)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (149)..(149)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (149)..(149)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (247)..(247)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W (例如犬尿氨酸)。</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (253)..(253)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (259)..(259)</p>

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
	<p>&lt;223&gt; Xaa 表示 Q, 或者 Q 脱酰胺为谷氨酸 (α-谷氨酸)、γ-谷氨酸 (Glu)、或 α-与 γ-谷氨酸的混合物</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (270)..(270)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (297)..(297)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 表示 D (Asp, 天冬氨酸), 或者 D 脱酰胺化为 N (Asn, 天冬酰胺)</p>
[0332]	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (304)..(304)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (306)..(306)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W (例如犬尿氨酸)。</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (314)..(314)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (319)..(319)</p>

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
	<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (329)..(329) <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (332)..(332) <223> Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (336)..(336) <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (384)..(384) <223> Xaa 可以为 D (asp, 天冬氨酸), 或异构化的 D。  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (404)..(404) <223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (409)..(409) <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  <220>

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
	<p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (436)..(436)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M。</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (452)..(452)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、 isoAsp、 或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (477)..(477)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、 isoAsp、 或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (499)..(499)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (512)..(512)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、 isoAsp、 或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (515)..(515)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、 isoAsp、 或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;  &lt;221&gt; MISC_FEATURE  &lt;222&gt; (518)..(518)  &lt;223&gt; Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M。</p>
[0334]	

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (524)..(524)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M。</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (559)..(559)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M。</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (569)..(569)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 T (Thr, 苏氨酸), 或磷酸化的 T</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (586)..(586)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (599)..(599)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 表示 Q, 或者 Q 脱酰胺为谷氨酸 (<math>\alpha</math>-谷氨酸)、<math>\gamma</math>-谷氨酸 (Glu)、或 <math>\alpha</math>-与 <math>\gamma</math>-谷氨酸的混合物</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (605)..(605)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M。</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (619)..(619)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W (例 如犬尿氨酸)。</p>
[0335]	

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (628)..(628)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (640)..(640)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (651)..(651)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p>
[0336]	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (663)..(663)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (666)..(666)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (689)..(689)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (693)..(693)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K</p>

SEQ ID NO: (含自由文本)	<223> 下的自由文本
[0337]	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (695)..(695) <223> Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W.  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (709)..(709) <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、 或 Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (735)..(735) <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、 或 Asp/isoAsp

## 序列表

&lt;110&gt; The Trustees of the University of Pennsylvania

<120>	腺相关病毒(AAV)进化枝F载体及其用途			
<130>	UPN-17-7986P			
<160>	14			
<170>	PatentIn version 3.5			
<210>	1			
<211>	2211			
<212>	DNA			
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>				
<223>	智人来源的AAVhu68 vp1 衣壳			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1)..(2211)			
<400>	1			
	atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt			48
	Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser			
	1	5	10	15
	gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc			96
	Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro			
	20	25	30	
[0001]	aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg			144
	Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro			
	35	40	45	
	ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg			192
	Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
	50	55	60	
	gtc aac gaa gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac			240
	Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
	65	70	75	80
	cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc			288
	Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
	85	90	95	
	gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc			336
	Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
	100	105	110	
	aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct			384
	Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
	115	120	125	
	ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg			432
	Leu Gly Leu Val Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
	130	135	140	
	cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gtg ggt att ggc			480
	Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly			

145	150	155	160	
aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act				528
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr				
165	170	175		
gac gac aca gag tca gtc ccc gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc				576
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro				
180	185	190		
gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc				624
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly				
195	200	205		
gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc				672
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser				
210	215	220		
tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc				720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile				
225	230	235	240	
acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc				768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu				
245	250	255		
tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac				816
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn				
260	265	270		
gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga				864
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg				
275	280	285		
ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg caa aga ctc atc aac aac				912
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn				
290	295	300		
aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att				960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile				
305	310	315	320	
cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gct aat				1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn				
325	330	335		
aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc				1056
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Tyr Gln Leu				
340	345	350		
ccg tac gtg ctc ggg tgc gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca				1104
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro				
355	360	365		
gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac gac ggt tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc				1152
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe				
370	375	380		
gga agc caa gcc gtg ggt cgt tgc tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc				1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe				
385	390	395	400	

[0003]	ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu 405 410 415	1248
	ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tat gct cac agc caa agc ctg Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu 420 425 430	1296
	gac cga ctc atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser 435 440 445	1344
	aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser 450 455 460	1392
	gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro 465 470 475 480	1440
	gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn 485 490 495	1488
	aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn 500 505 510	1536
	gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys 515 520 525	1584
	gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly 530 535 540	1632
	aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile 545 550 555 560	1680
	acc aac gaa gaa att aaa act acc aac cca gta gca acg gag tcc Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser 565 570 575	1728
	tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln 580 585 590	1776
	acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln 595 600 605	1824
	gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His 610 615 620	1872
	acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met 625 630 635 640	1920
	aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg	1968

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala			
645	650	655	
gat cct cca acg gct ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc			2016
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr			
660	665	670	
cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag att gag tgg gag ctg cag			2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln			
675	680	685	
aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac			2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn			
690	695	700	
tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gtt			2160
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val			
705	710	715	720
tat tct gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg			2208
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu			
725	730	735	
taa			2211
<210> 2			
<211> 736			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
[0004]			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 2			
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser			
1	5	10	15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro			
20	25	30	
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro			
35	40	45	
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50	55	60	
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65	70	75	80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
85	90	95	
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
115	120	125	
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly			
145	150	155	160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr			

	165	170	175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
180	185	190	
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
195	200	205	
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
210	215	220	
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
275	280	285	
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn			
290	295	300	
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile			
305	310	315	320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn			
325	330	335	
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu			
340	345	350	
[0005] Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro			
355	360	365	
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp			
370	375	380	
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe			
385	390	395	400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu			
405	410	415	
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu			
420	425	430	
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser			
435	440	445	
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser			
450	455	460	
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro			
465	470	475	480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn			
485	490	495	
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn			
500	505	510	
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys			
515	520	525	
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly			

	530	535	540	
	Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile			
545	550	555	560	
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser				
565	570	575		
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln				
580	585	590		
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln				
595	600	605		
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His				
610	615	620		
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met				
625	630	635	640	
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala				
645	650	655		
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr				
660	665	670		
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln				
675	680	685		
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn				
690	695	700		
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val				
705	710	715	720	
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu				
725	730	735		
<210> 3				
<211> 1866				
<212> DNA				
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)				
<220>				
<223> 智人来源的AAVhu68 rep 基因				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1)..(1866)				
<400> 3				
atg ccg ggg ttt tac gag att gtg att aag gtc ccc agc gac ctt gac				48
Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp				
1 5 10 15				
gag cat ctg ccc ggc att tct gac agc ttt gtg aac tgg gtg gcc gag				96
Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu				
20 25 30				
aag gaa tgg gag ttg ccg cca gat tct gac atg gat ctg aat ctg att				144
Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile				
35 40 45				
gag cag gca ccc ctg acc gtg gcc gag aag ctg cag cgc gac ttt ctg				192
Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu				

	50	55	60	
	acg gaa tgg cgc cgt gtg agt aag gcc ccg gag gct ctt ttc ttt gtg			240
	Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val			
65	70	75	80	
	caa ttt gag aag gga gag agc tac ttc cac atg cac gtg ctc gtg gaa			288
	Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu			
	85	90	95	
	acc acc ggg gtg aaa tcc atg gtt ttg gga cgt ttc ctg agt cag att			336
	Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile			
	100	105	110	
	cgc gaa aaa ctg att cag aga att tac cgc ggg atc gag ccg act ttg			384
	Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu			
	115	120	125	
	cca aac tgg ttc gcg gtc aca aag acc aga aat ggc gcc gga ggc ggg			432
	Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly			
	130	135	140	
	aac aag gtg gtg gat gag tgc tac atc ccc aat tac ttg ctc ccc aaa			480
	Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys			
145	150	155	160	
	acc cag cct gag ctc cag tgg gcg tgg act aat atg gaa cag tat tta			528
	Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu			
	165	170	175	
	agc gcc tgt ttg aat ctc acg gag cgt aaa cgg ttg gtg gcg cag cat			576
[0007]	Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His			
	180	185	190	
	ctg acg cac gtg tcg cag acg cag gag cag aac aaa gag aat cag aat			624
	Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn			
	195	200	205	
	ccc aat tct gat gcg ccg gtg atc aga tca aaa act tca gcc agg tac			672
	Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr			
	210	215	220	
	atg gag ctg gtc ggg tgg ctc gtg gac aag ggg att acc tcg gag aag			720
	Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys			
225	230	235	240	
	cag tgg atc cag gag gac cag gcc tca tac atc tcc ttc aat gcg gcc			768
	Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala			
	245	250	255	
	tcc aac tcg cgg tcc caa atc aag gtc gcc ttg gac aat gcg gga aag			816
	Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Val Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys			
	260	265	270	
	att atg agc ctg act aaa acc gcc ccc gac tac ctg gtg ggc cag cag			864
	Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln			
	275	280	285	
	ccc gtg gag gac att tcc agc aat cgg att tat aaa att ttg gaa cta			912
	Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu			
	290	295	300	

[0008]	aac	ggg	tac	gat	ccc	caa	tat	gcg	gct	tcc	gtc	ttt	ctg	gga	tgg	gcc	960
	Asn	Gly	Tyr	Asp	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ala	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Trp	Ala	
	305							310					315			320	
	acg	aaa	aag	ttc	ggc	aag	agg	aac	acc	atc	tgg	ctg	ttt	ggg	cct	gca	1008
	Thr	Lys	Lys	Phe	Gly	Lys	Arg	Asn	Thr	Ile	Trp	Leu	Phe	Gly	Pro	Ala	
								325				330			335		
	act	acc	ggg	aag	acc	aac	atc	gcg	gag	gcc	ata	gcc	cac	act	gtg	ccc	1056
	Thr	Thr	Gly	Lys	Thr	Asn	Ile	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	His	Thr	Val	Pro	
								340				345			350		
	ttc	tac	ggg	tgc	gta	aac	tgg	acc	aat	gag	aac	ttt	ccc	ttc	aac	gac	1104
	Phe	Tyr	Gly	Cys	Val	Asn	Trp	Thr	Asn	Glu	Asn	Phe	Pro	Phe	Asn	Asp	
								355				360			365		
	tgt	gtc	gac	aag	atg	gtg	atc	tgg	tgg	gag	gag	ggg	aag	atg	acc	gcc	1152
	Cys	Val	Asp	Lys	Met	Val	Ile	Trp	Trp	Glu	Glu	Gly	Lys	Met	Thr	Ala	
								370				375			380		
	aag	gtc	gtg	gag	tcg	aaa	gcc	att	ctc	gga	gga	agc	aag	gtg	cgc	1200	
	Lys	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Gly	Gly	Ser	Lys	Val	Arg	
								385				390			395		400
	gtg	gac	cag	aaa	tgc	aag	tcc	tcg	gcc	cag	ata	gac	ccg	act	ccc	gtg	1248
	Val	Asp	Gln	Lys	Cys	Lys	Ser	Ser	Ala	Gln	Ile	Asp	Pro	Thr	Pro	Val	
								405				410			415		
	atc	gtc	acc	tcc	aac	acc	aac	atg	tgc	gcc	gtg	att	gac	ggg	aac	tca	1296
	Ile	Val	Thr	Ser	Asn	Thr	Asn	Met	Cys	Ala	Val	Ile	Asp	Gly	Asn	Ser	
								420				425			430		
	acg	acc	ttc	gaa	cac	cac	cag	cag	ccg	ttg	caa	gac	ccg	atg	ttc	aaa	1344
	Thr	Thr	Phe	Glu	His	Gln	Gln	Pro	Leu	Gln	Asp	Arg	Met	Phe	Lys	Phe	
								435				440			445		
	gaa	ctc	acc	cgc	cgt	ctg	gat	cat	gac	ttt	ggg	aag	gtc	acc	aag	cag	1392
	Glu	Leu	Thr	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Asp	Phe	Gly	Lys	Val	Thr	Lys	Gln	
								450				455			460		
	gaa	gtc	aaa	gac	ttt	tcc	cgg	tgg	gca	aag	gat	cac	gtg	gtt	gag	gtg	1440
	Glu	Val	Lys	Asp	Phe	Phe	Arg	Trp	Ala	Lys	Asp	His	Val	Val	Glu	Val	
								465				470			475		480
	gag	cat	gaa	ttc	tac	gtc	aaa	aag	ggt	gga	gcc	aag	aaa	aga	ccc	gcc	1488
	Glu	His	Glu	Phe	Tyr	Val	Lys	Lys	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg	Pro	Ala	
								485				490			495		
	ccc	agt	gac	gca	gat	ata	agt	gag	ccc	aaa	cgg	gtg	cgc	gag	tca	gtt	1536
	Pro	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Arg	Val	Arg	Glu	Ser	Val	
								500				505			510		
	gcg	cag	cca	tcg	acg	tca	gac	gcg	gaa	gct	tcg	atc	aac	tac	gct	gac	1584
	Ala	Gln	Pro	Ser	Thr	Ser	Asp	Ala	Glu	Ala	Ser	Ile	Asn	Tyr	Ala	Asp	
								515				520			525		
	agg	tac	caa	aac	aaa	tgt	tct	cgt	cac	gtg	ggc	atg	aat	ctg	atg	ctg	1632
	Arg	Tyr	Gln	Asn	Lys	Cys	Ser	Arg	His	Val	Gly	Met	Asn	Leu	Met	Leu	
								530				535			540		
	ttt	ccc	tgc	aga	caa	tgc	gag	aga	ctg	aat	cag	aat	tca	aat	atc	tgc	1680

Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Leu Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys				
545	550	555	560	
ttc act cac ggt gtc aaa gac tgt tta gag tgc ttt ccc gtg tca gaa				1728
Phe Thr His Gly Val Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu				
565	570	575		
tct caa ccc gtt tct gtc gtc aaa aag gcg tat cag aaa ctg tgc tac				1776
Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr				
580	585	590		
att cat cac atc atg gga aag gtg cca gac gct tgc act gct tgc gac				1824
Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp				
595	600	605		
ctg gtc aat gtg gac ttg gat gac tgt gtt tct gaa caa taa				1866
Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu Gln				
610	615	620		
<210> 4				
<211> 621				
<212> PRT				
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)				
<220>				
<223> 合成构建体				
<400> 4				
Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp				
1	5	10	15	
[0009] Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu				
20	25	30		
Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile				
35	40	45		
Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu				
50	55	60		
Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val				
65	70	75	80	
Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu				
85	90	95		
Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile				
100	105	110		
Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu				
115	120	125		
Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly				
130	135	140		
Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys				
145	150	155	160	
Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu				
165	170	175		
Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His				
180	185	190		
Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn				

195	200	205
Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr		
210	215	220
Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys		
225	230	235
Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala		
245	250	255
Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Val Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys		
260	265	270
Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln		
275	280	285
Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu		
290	295	300
Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu Gly Trp Ala		
305	310	315
Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala		
325	330	335
Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Thr Val Pro		
340	345	350
Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp		
355	360	365
Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Ala		
370	375	380
Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Arg		
385	390	395
Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr Pro Val		
405	410	415
Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly Asn Ser		
420	425	430
Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe		
435	440	445
Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln		
450	455	460
Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val		
465	470	475
Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala		
485	490	495
Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val		
500	505	510
Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp		
515	520	525
Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu		
530	535	540
Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Leu Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys		
545	550	555
Phe Thr His Gly Val Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu		

	565	570	575
Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr			
580	585	590	
Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp			
595	600	605	
Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu Gln			
610	615	620	
<210> 5			
<211> 2208			
<212> DNA			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 智人来源的 AAV9 VP1 衣壳			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(2208)			
<223> AAV9 VP1 衣壳			
<400> 5			
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctt agt			48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser			
1 5 10 15			
gaa gga att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc			96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro			
20 25 30			
aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cga ggt ctt gtg ctt ccg			144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro			
35 40 45			
ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg			192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50 55 60			
gtc aac gca gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac			240
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65 70 75 80			
cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc			288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
85 90 95			
gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc			336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100 105 110			
aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct			384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
115 120 125			
ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg			432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130 135 140			
cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gcg ggt att ggc			480

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly			
145	150	155	160
aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act			528
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
165	170	175	
gac gac aca gag tca gtc cca gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc			576
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
180	185	190	
gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc			624
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
195	200	205	
gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc			672
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
210	215	220	
tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc			720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc			768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac			816
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	
gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga			864
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
275	280	285	
ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg cag cga ctc atc aac aac			912
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn			
290	295	300	
aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att			960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile			
305	310	315	320
cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gcc aat			1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn			
325	330	335	
aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc			1056
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu			
340	345	350	
ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca			1104
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro			
355	360	365	
gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac gac ggt tat ctg acg ctt aat gat			1152
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp			
370	375	380	
gga agc cag gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc			1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe			

385	390	395	400	
ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag				1248
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu				
405	410	415		
ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tac gct cac agc caa agc ctg				1296
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu				
420	425	430		
gac cga cta atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca				1344
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser				
435	440	445		
aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt				1392
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser				
450	455	460		
gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct				1440
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro				
465	470	475	480	
gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac				1488
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn				
485	490	495		
aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat				1536
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn				
500	505	510		
gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa				1584
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys				
515	520	525		
gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc				1632
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly				
530	535	540		
aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata				1680
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile				
545	550	555	560	
acc aac gaa gaa att aaa act act aac ccg gta gca acg gag tcc				1728
Thr Asn Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser				
565	570	575		
tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag				1776
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln				
580	585	590		
acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag				1824
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln				
595	600	605		
gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac				1872
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His				
610	615	620		
acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg				1920
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met				
625	630	635	640	

aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg	1968
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala	
645 650 655	
gat cct cca acg gcc ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc	2016
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr	
660 665 670	
cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag atc gag tgg gag ctg cag	2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln	
675 680 685	
aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac	2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn	
690 695 700	
tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gta	2160
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val	
705 710 715 720	
tat agt gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg	2208
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu	
725 730 735	
<210> 6	
<211> 736	
<212> PRT	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0014]	
<220>	
<223> 合成构建体	
<400> 6	
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser	
1 5 10 15	
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro	
20 25 30	
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro	
35 40 45	
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro	
50 55 60	
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp	
65 70 75 80	
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala	
85 90 95	
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly	
100 105 110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro	
115 120 125	
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg	
130 135 140	
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly	
145 150 155 160	
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr	

165                    170                    175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
 180                    185                    190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195                    200                    205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
 210                    215                    220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225                    230                    235                    240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245                    250                    255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn  
 260                    265                    270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275                    280                    285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290                    295                    300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305                    310                    315                    320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn  
 325                    330                    335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu  
 340                    345                    350

[0015] Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355                    360                    365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp  
 370                    375                    380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385                    390                    395                    400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu  
 405                    410                    415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420                    425                    430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser  
 435                    440                    445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser  
 450                    455                    460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro  
 465                    470                    475                    480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn  
 485                    490                    495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn  
 500                    505                    510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
 515                    520                    525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

	530	535	540
	Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile		
	545	550	555
	Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser		560
	565	570	575
	Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln		
	580	585	590
	Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln		
	595	600	605
	Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His		
	610	615	620
	Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met		
	625	630	635
	Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala		640
	645	650	655
	Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr		
	660	665	670
	Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln		
	675	680	685
	Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn		
	690	695	700
	Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val		
[0016]	705	710	715
	Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu		720
	725	730	735
	<210> 7		
	<211> 26		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 引物 prm504		
	<400> 7		
	gctgcgycaa ctggaccaat gagaac		26
	<210> 8		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		
	<223> 引物 prm505		
	<400> 8		
	cgcagagacc aagttcaact gaaacga		27
	<210> 9		
	<211> 16		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
	<220>		

<223>	AAVhu68 间隔序列		
<400>	9		
atgacttaaa ccaggt			16
<210>	10		
<211>	736		
<212>	PRT		
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	AAVhu31 vp1 衣壳蛋白质		
<400>	10		
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			
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 Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50	55	60	
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65	70	75	80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
85	90	95	
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
115	120	125	
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly			
145	150	155	160
Lys Ser Gly Ser Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
165	170	175	
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
180	185	190	
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
195	200	205	
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
210	215	220	
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
275	280	285	

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

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr  
 660 665 670  
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln  
 675 680 685  
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn  
 690 695 700  
 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Ser Thr Glu Gly Val  
 705 710 715 720  
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730 735  
 <210> 11  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)  
 <220>  
 <223> AAVhu32 vp1 衣壳蛋白质  
 <400> 11  
 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  
 20 25 30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 [0019] Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Gly Ser Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
275	280	285	
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn			
290	295	300	
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile			
305	310	315	320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn			
325	330	335	
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu			
340	345	350	
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro			
355	360	365	
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp			
370	375	380	
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe			
385	390	395	400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu			
405	410	415	
[0020] Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu			
420	425	430	
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser			
435	440	445	
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser			
450	455	460	
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro			
465	470	475	480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn			
485	490	495	
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn			
500	505	510	
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys			
515	520	525	
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly			
530	535	540	
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile			
545	550	555	560
Thr Asn Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser			
565	570	575	
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln			
580	585	590	
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln			

595	600	605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His		
610	615	620
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met		
625	630	635
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala		
645	650	655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr		
660	665	670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln		
675	680	685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn		
690	695	700
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val		
705	710	715
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu		
725	730	735
<210> 12		
<211> 2211		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> AAVhu31 vp1 编码序列		
<400> 12		
atggctgccc atggttatct tccagattgg ctgcaggaca accttagtga aggaattcgc	60	
gagtgggtggg ctttggaaacc tggagccctt caacccaagg caaatcaaca acatcaagac	120	
aacgctcgag gtcttgtgt tccgggttac aaataccttgc gacccggca cggactcgac	180	
aaggggggagc cggtaaacgc agcagacgcg gggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240	
cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgcccga cggcggat	300	
caggagccgc tcaaagaaga tacgtttttt gggggcaacc tggggcggc agtcttccag	360	
gcacaaaaga ggcttcttga accttgggt ctgggttggg aacggctaa gacggctcct	420	
gaaaagaaga ggctgttgc gcaatccctt caggaaccgg actcctccgc gggattggc	480	
aaatcggttgc cacagccgc taaaagaga ctcaatttgc gtcagactgg cgacacagag	540	
tcagtccttccag accctcaacc aatcgagaa cttccgcag cccctcagg tggggatct	600	
cttacaatgg ctgcgggttgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccatgg	660	
gtgggttgc ctcggaaa ttggcattgc gattccaaat ggctggggca cagatcatc	720	
accaccagca cccgaacctg gcccctcc acctacaaca atcacctcta caagcaaattc	780	
tccaaacagca catctggagg atcttcaaataat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc	840	
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcggcga	900	
ctccatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttaacattc	960	
caggtcaaag aggttacgga caacaatggaa gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc	1020	
acgggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctccgt acgtgctcggt gtcggctcac	1080	
gagggctgcc tcccgccgtt cccagggac gtttcatga ttccctcagta cgggtatctg	1140	
acgcttaatg atgaaagcca ggcgtgggt cgttcgttct ttactgcctt ggaatatttc	1200	
ccgtcgaaa tgctaaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta	1260	
ccttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc	1320	

gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacgggtt ctggacagaa tcaacaaacg	1380	
ctaaaattca gtgtggccgg acccagaac atggctgtcc aggaaagaaa ctacataacct	1440	
ggaccaggct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctaaaacaaa caacagcgaa	1500	
tttgcggc ctggagcttc ttcttgggtct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct	1560	
ggactgcta tggcagcca caaagaagga gaggacggtt ttttcctt gtctggatct	1620	
ttaattttg gcaaacaagg aactggaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata	1680	
accacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cgaggctcta tggacaagtg	1740	
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagacgg gctgggtca aaaccaagga	1800	
atactccgg gtatggtttgc agggacaga gatgtgtacc tgaaggacc catttggcc	1860	
aaaatttcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaaatg	1920	
aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaa aacacacctg tacctgcgg tccccaacg	1980	
gccttcaaca aggacaagct gaacttttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc	2040	
gtggagatcg agtggggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggAACcc ggagatccag	2100	
tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttgc tggtaatac tgaagggtta	2160	
tatagtgaac cccggccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgtaa	2211	
<210> 13		
<211> 2211		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> AAVhu32 vp1 编码序列		
<400> 13		
[0022]	atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga	60
	cagtggtgga agctcaaacc tggccacca ccaccaaagc cccgagacgc gcataaggac	120
	gacagcaggg gtcttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa cggactcgac	180
	aaggggggagc cggtaacacgc agcagacgcgc gccccctcg accacgacaa ggcctacgac	240
	cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgcccga cggcggatc	300
	caggagcggc tcaaagaaga tacgttttgggttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	360
	gccaaggaaaga ggcttcttgc accttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	420
	ggaaagaaga ggcctgttaga gcagtctcttgc accttgcgttcccttgggtac aagtacctcg	480
	aaatcgggtt cacagccgc taaaaagaaa ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag	540
	ttagtccccgc accctcaacc aatcgagaaa cctccgcac cccctcagg tgggttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	600
	cttacaatgg cttcagggttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	660
	gtgggttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	720
	accaccagca cccgaacctg ggcctgcac cccctcagg tgggttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	780
	tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggctca cggcggatc	840
	tgggggttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	900
	ctcatcaaca acaactgggg attccggctca aacgcactca acttcggctca cggcggatc	960
	caggtcaaag aggttacggca caacaatggca gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc	1020
	acgggtccagg tcttcacggca ctcagactat cagctccgt acgtgctcg gtcggctca	1080
	gagggtccagg tcccgccgtt cccagccggac gtttcatgttccctcaggta cgggtatctg	1140
	acgcttaatg atggggccca ggcctgggttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	1200
	cggcggatc tggtaacaac ttccaggta gtcacggat tgggttgcgttcccttgggtac aagtacctcg gacccggcaa	1260
	ccttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatggaa tccactcatc	1320
	gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacgggtt ctggacagaa tcaacaaacg	1380
	ctaaaattca gcgtggccgg acccagaac atggctgtcc aggaaagaaa ctacataacct	1440

ggaccaggct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaaacaa caacagcgaa	1500
tttgcggc ctggagcttc ttcttgggtt ctaatggac gtaatagctt gatgaatctt	1560
ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccctt gtctggatct	1620
ttaattttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcccacaa agtcatgata	1680
accaacgaag aagaattaa aactactaac ccggtagcggc cggagtccta tggacaagt	1740
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga	1800
atactccgg gtatggtttgcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttggcc	1860
aaaatttcctc acacggacgg caacttcac ctttccgc taatggagg gtttggaaatg	1920
aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaa aacacacctg tacctgcggc tcctccaacg	1980
gcttcaata aggacaagct gaacttttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc	2040
gtggagattg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggAACcc ggagatccag	2100
tacacttcca actattacaa gtctataat gttgaatttgcgttataac tgaaggtgt	2160
tatagtgaac cccggccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgt a	2211
<210> 14	
<211> 736	
<212> PRT	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 修饰的 hu68vp1	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (23)..(23)	
[0023] <223> Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W.	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (35)..(35)	
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (57)..(57)	
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (66)..(66)	
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (94)..(94)	
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (97)..(97)	
<223> Xaa 可以为 D (asp, 天冬氨酸), 或异构化的 D.	
<220>	
<221> MISC_FEATURE	
<222> (107)..(107)	

<223> Xaa 可以为 D (asp, 天冬氨酸), 或异构化的 D.  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (113)..(113)  
<223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (149)..(149)  
<223> Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (149)..(149)  
<223> Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (247)..(247)  
<223> Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W (例如犬尿氨酸).  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (253)..(253)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (259)..(259)  
<223> Xaa 表示 Q, 或者 Q 脱酰胺为谷氨酸  
( $\alpha$ -谷氨酸)、 $\gamma$ -谷氨酸 (Glu)、或  $\alpha$ -与  
 $\gamma$ -谷氨酸的混合物  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (270)..(270)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (297)..(297)  
<223> Xaa 表示 D (Asp, 天冬氨酸), 或者 D 胺化为 N (Asn,  
天冬酰胺)  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (304)..(304)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (306)..(306)  
<223> Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W (例如犬尿氨酸).  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (314)..(314)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (319)..(319)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (329)..(329)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (332)..(332)  
<223> Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (336)..(336)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (384)..(384)  
<223> Xaa 可以为 D (asp, 天冬氨酸), 或异构化的 D.  
<220>  
[0025] <221> MISC\_FEATURE  
<222> (404)..(404)  
<223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (409)..(409)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (436)..(436)  
<223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (452)..(452)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (477)..(477)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (499)..(499)  
<223> Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (512)..(512)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (515)..(515)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (518)..(518)  
<223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (524)..(524)  
<223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (559)..(559)  
<223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (569)..(569)  
<223> Xaa 可以为 T (Thr, 苏氨酸), 或磷酸化的 T  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (586)..(586)  
<223> Xaa 可以为 S (Ser, 丝氨酸), 或磷酸化的 S  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (599)..(599)  
<223> Xaa 表示 Q, 或者 Q 脱酰胺为谷氨酸  
( $\alpha$ -谷氨酸)、 $\gamma$ -谷氨酸 (Glu)、或  $\alpha$ -与  
 $\gamma$ -谷氨酸的混合物  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (605)..(605)  
<223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (619)..(619)  
<223> Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W (例如犬尿氨酸).  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (628)..(628)  
<223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (640).. (640)  
 <223> Xaa 可以为 M (Met, 甲硫氨酸), 或氧化的 M.  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (651).. (651)  
 <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (663).. (663)  
 <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (666).. (666)  
 <223> Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (689).. (689)  
 <223> Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (693).. (693)  
 <223> Xaa 可以为 K(lys, 赖氨酸), 或乙酰化的 K  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (695).. (695)  
 <223> Xaa 可以为 W (Trp, 色氨酸), 或氧化的 W.  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (709).. (709)  
 <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (735).. (735)  
 <223> Xaa 可以为 Asn, 或脱酰胺为 Asp、isoAsp、或 Asp/isoAsp  
 <400> 14  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Xaa Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Xaa Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Xaa Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Xaa Glu Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65                    70                    75                    80  
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Xaa His Ala  
                       85                    90                    95  
 Xaa Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Xaa Thr Ser Phe Gly Gly  
                       100                105                110  
 Xaa Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro  
                       115                120                125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                       130                135                140  
 Pro Val Glu Gln Xaa Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly  
                       145                150                155                160  
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
                       165                170                175  
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
                       180                185                190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
                       195                200                205  
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
                       210                215                220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
                       225                230                235                240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Xaa Ala Leu Pro Thr Tyr Xaa Asn His Leu  
                       245                250                255  
 [0028]                Tyr Lys Xaa Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Xaa Asp Asn  
                       260                265                270  
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
                       275                280                285  
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Xaa Trp Gln Arg Leu Ile Asn Xaa  
                       290                295                300  
 Asn Xaa Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Xaa Phe Lys Leu Phe Xaa Ile  
                       305                310                315                320  
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Xaa Gly Val Xaa Thr Ile Ala Xaa  
                       325                330                335  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu  
                       340                345                350  
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
                       355                360                365  
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Xaa  
                       370                375                380  
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
                       385                390                395                400  
 Pro Ser Gln Xaa Leu Arg Thr Gly Xaa Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu  
                       405                410                415  
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
                       420                425                430  
 Asp Arg Leu Xaa Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

435	440	445
Lys Thr Ile Xaa Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser		
450	455	460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Xaa Tyr Ile Pro		
465	470	475
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn		
485	490	495
Asn Asn Xaa Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Xaa		
500	505	510
Gly Arg Xaa Ser Leu Xaa Asn Pro Gly Pro Ala Xaa Ala Ser His Lys		
515	520	525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly		
530	535	540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Xaa Ile		
545	550	555
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Xaa Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser		
565	570	575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Xaa Ala Gln Ala Gln Ala Gln		
[0029] 580	585	590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Xaa Val Trp Gln		
595	600	605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Xaa Ala Lys Ile Pro His		
610	615	620
Thr Asp Gly Xaa Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Xaa		
625	630	635
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Xaa Thr Pro Val Pro Ala		
645	650	655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Xaa Lys Asp Xaa Leu Asn Ser Phe Ile Thr		
660	665	670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln		
675	680	685
Xaa Glu Asn Ser Xaa Arg Xaa Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn		
690	695	700
Tyr Tyr Lys Ser Xaa Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val		
705	710	715
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Xaa Leu		
725	730	735

1	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1) (1) (1) (1)	MAADGYLPDWLEDNLSSEGIREWWALKGPIPQPKANQOHQDNARGLVLPGYKYLGPNGNLDKGEPYKLNHDAEFL MAADGYLPDWLEDNLSSEGIREWWALKGPIPQPKANQOHQDNARGLVLPGYKYLGPNGNLDKGEPYKLNHDAEFL MAADGYLPDWLEDNLSSEGIREBWWKLKGPPPKPAERHKD MAADGYLPDWLEDNLSSEGIREBWWKLKGPPPKPAERHKD	100
101	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(101) (101) (101) (101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPRVEQSPQEPDSSAGKSGAQPAKKRLLNFQQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSFGVGS QERLKEDTSFGGNLGRAVQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPRVEQSPQEPDSSAGKSGAQPAKKRLLNFQQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSFGVGS QERLKEDTSFGGNLGRAVQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPRVEQSPQEPDSSAGKSGSQPAKKKLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSFGVGS QERLKEDTSFGGNLGRAVQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPRVEQSPQEPDSSAGKSGSQPAKKKLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSFGVGS	200
201	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(201) (201) (201) (201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNMWHCDSQLGLDRVITSTRTIWALPNTNNHLYKQISNSTSGGSSNDIAYFGYSTPwgYDFNRFCHFSPRDWQR LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNMWHCDSQLGLDRVITSTRTIWALPNTNNHLYKQISNSTSGGSSNDIAYFGYSTPwgYDFNRFCHFSPRDWQR LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNMWHCDSQLGLDRVITSTRTIWALPNTNNHLYKQISNSTSGGSSNDIAYFGYSTPwgYDFNRFCHFSPRDWQR LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNMWHCDSQLGLDRVITSTRTIWALPNTNNHLYKQISNSTSGGSSNDIAYFGYSTPwgYDFNRFCHFSPRDWQR	300
301	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(301) (301) (301) (301)	LINNWGFRPKRNFKLNFNQVKEVTDNNGVKTIANL.LSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPFPADVFMPHQYGLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF LINNWGFRPKRNFKLNFNQVKEVTDNNGVKTIANL.LSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPFPADVFMPHQYGLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF LINNWGFRPKRNFKLNFNQVKEVTDNNGVKTIANL.LSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPFPADVFMPHQYGLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF LINNWGFRPKRNFKLNFNQVKEVTDNNGVKTIANL.LSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPFPADVFMPHQYGLTLNDGQAVGRSSFYCLEYF	400
401	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(401) (401) (401) (401)	PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSLSDRMLNPLDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVQNNNSE PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSLSDRMLNPLDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVQNNNSE PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSLSDRMLNPLDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVQNNNSE PSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSLSDRMLNPLDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQRVSTTVQNNNSE	500

AAV9	(501)	FAWPASSWALNGRNSLMPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVAVTINHQSAAQAAQATGWWQNQG	700
hu.68.VP1	(501)	FAWPASSWALNGRNSLMPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVAVTINHQSAAQAAQATGWWQNQG	
hu.31	(501)	FAWPASSWALNGRNSLMPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVAVTINHQSAAQAAQATGWWQNQG	
hu.32	(501)	FAWPASSWALNGRNSLMPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVAVTINHQSAAQAAQATGWWQNQG	
		601	
AAV9	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHDTGNFHPSPLMGGFMKHPPQILIKNTPVADPPTAFNIKDLNSFITQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
hu.68.VP1	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHDTGNFHPSPLMGGFMKHPPQILIKNTPVADPPTAFNIKDLNSFITQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
hu.31	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHDTGNFHPSPLMGGFMKHPPQILIKNTPVADPPTAFNIKDLNSFITQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
hu.32	(601)	ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHDTGNFHPSPLMGGFMKHPPQILIKNTPVADPPTAFNIKDLNSFITQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQ	
		701	
AAV9	(701)	YTSNYYKSNNNVEFAVNTEGVYSEPRPGTRYLTRL	736
hu.68.VP1	(701)	YTSNYYKSNNNVEFAVNTEGVYSEPRPGTRYLTRL	
hu.31	(701)	YTSNYYKSNNNVEFAVNTEGVYSEPRPGTRYLTRL	
hu.32	(701)	YTSNYYKSNNNVEFAVNTEGVYSEPRPGTRYLTRL	

图2A-1

冬 2A-2

901	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(901) (901) (901) (901)	CTCATCAACAAACAACTGGGGATTCCGGCTTAAGCGACTCAACTTCAACATTCAAGGCTCTTCAACATTCAAGGACAACATGGAGTCAAGAGCCA CTCATCAACAAACAACTGGGGATTCCGGCTTAAGCGACTCAACTTCAACATTCAAGGCTCTTCAACATTCAAGGACAACATGGAGTCAAGAGCCA CTCATCAACAAACAACTGGGGATTCCGGCTTAAGCGACTCAACTTCAACATTCAAGGCTCTTCAACATTCAAGGACAACATGGAGTCAAGAGCCA CTCATCAACAAACAACTGGGGATTCCGGCTTAAGCGACTCAACTTCAACATTCAAGGCTCTTCAACATTCAAGGACAACATGGAGTCAAGAGCCA	1000
902	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1001) (1001) (1001) (1001)	TGGCCAATAACCTTACCGAACGGTCCAGGCTCTTACGGGACTCAGACTATCAGCTCCGGTAAGTGTCTGGGCTCGGCTCAAGAGGGCTGCGCTCCGGGCGTT TGGCCAATAACCTTACCGAACGGTCCAGGCTCTTACGGGACTCAGACTATCAGCTCCGGTAAGTGTCTGGGCTCGGCTCAAGAGGGCTGCGCTCCGGGCGTT TGGCCAATAACCTTACCGAACGGTCCAGGCTCTTACGGGACTCAGACTATCAGCTCCGGTAAGTGTCTGGGCTCGGCTCAAGAGGGCTGCGCTCCGGGCGTT TGGCCAATAACCTTACCGAACGGTCCAGGCTCTTACGGGACTCAGACTATCAGCTCCGGTAAGTGTCTGGGCTCGGCTCAAGAGGGCTGCGCTCCGGGCGTT	1100
903	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1101) (1101) (1101) (1101)	CCCAGGGGACGTTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGTGGTGTGCTCGCTGGAAATATTTC CCCAGGGGACGTTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGTGGTGTGCTCGCTGGAAATATTTC CCCAGGGGACGTTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGTGGTGTGCTCGCTGGAAATATTTC CCCAGGGGACGTTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGTGGTGTGCTCGCTGGAAATATTTC	1200
904	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1201) (1201) (1201) (1201)	CCGTTCGCAAATGCTAAGAACGGGTTAACACACTTCCAGTTACGAGTTGAGAACGTTACCTTCCATAGCGCTACAGGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGGACCC CCGTTCGCAAATGCTAAGAACGGGTTAACACACTTCCAGTTACGAGTTGAGAACGTTACCTTCCATAGCGCTACAGGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGGACCC CCGTTCGCAAATGCTAAGAACGGGTTAACACACTTCCAGTTACGAGTTGAGAACGTTACCTTCCATAGCGCTACAGGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGGACCC CCGTTCGCAAATGCTAAGAACGGGTTAACACACTTCCAGTTACGAGTTGAGAACGTTACCTTCCATAGCGCTACAGGCTTAATGATGAAAGCCAGGGCTGGGACCC	1300
905	AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1301) (1301) (1301) (1301)	GACTAAATGAAATCCACCTCATGGACCAAATACTTGTACTATCTCTCAAAAGACTATTACGGGTTCTGGACAGAAATCAACAAACGCTAAATTCAGTGTGGGGGG GACTAAATGAAATCCACCTCATGGACCAAATACTTGTACTATCTCTCAAAAGACTATTACGGGTTCTGGACAGAAATCAACAAACGCTAAATTCAGTGTGGGGGG GACTAAATGAAATCCACCTCATGGACCAAATACTTGTACTATCTCTCAAAAGACTATTACGGGTTCTGGACAGAAATCAACAAACGCTAAATTCAGTGTGGGGGG GACTAAATGAAATCCACCTCATGGACCAAATACTTGTACTATCTCTCAAAAGACTATTACGGGTTCTGGACAGAAATCAACAAACGCTAAATTCAGTGTGGGGGG	1400

图2B-1

AAV9	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCAGGGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAAACCGTGTCTAACCACTGTGACTCAAAACAAACAGCGAA	1500
hu.68.VP1	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCAGGGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAAACCGTGTCTAACCACTGTGACTCAAAACAAACAGCGAA	
hu.31	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCAGGGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAAACCGTGTCTAACCACTGTGACTCAAAACAAACAGCGAA	
hu.32	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGTCAGGGAAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAAACCGTGTCTAACCACTGTGACTCAAAACAAACAGCGAA	
AAV9	(1501)	TTTGCCTGGGCTGGAGCTCTCTGGGCTCTCAATGGACGTAAAGCTTGTGAATCCTGGACCTGCTATGGCAGGCCACAAAAGAAGGGAGGGACCGTT	1600
hu.68.VP1	(1501)	TTTGCCTGGGCTGGAGCTCTCAATGGACGTAAAGCTTGTGAATCCTGGACCTGCTATGGCAGGCCACAAAAGAAGGGAGGGACCGTT	
hu.31	(1501)	TTTGCCTGGGCTGGAGCTCTGGGCTCTCAATGGACGTAAAGCTTGTGAATCCTGGACCTGCTATGGCAGGCCACAAAAGAAGGGAGGGACCGTT	
hu.32	(1501)	TTTGCCTGGGCTGGAGCTCTGGGCTCTCAATGGACGTAAAGCTTGTGAATCCTGGACCTGCTATGGCAGGCCACAAAAGAAGGGAGGGACCGTT	
AAV9	(1601)	TCTTCCCTGGATGGCAACAGGAAACTGGAAAGGACAACCTGGATGGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAAGAAGAAATTAA	1700
hu.68.VP1	(1601)	TCTTCCCTGGATGGCAACAGGAAACTGGAAAGGACAACGTTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAAGAAGAAATTAA	
hu.31	(1601)	TCTTCCCTGGATGGCAACAGGAAACTGGAAAGGACAACGTTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAAGAAGAAATTAA	
hu.32	(1601)	TCTTCCCTGGATGGCAACAGGAAACTGGAAAGGACAACGTTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAAGAAGAAATTAA	
AAV9	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTGGCTCTATGGACAAGTGGCACAACCAACAGGTGCCAAGGACAGGGCTGGGTCAAAACCAAGGA	1800
hu.68.VP1	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTGGCTCTATGGACAAGTGGCACAACCAACAGGTGCCAAGGACAGGGCTGGGTCAAAACCAAGGA	
hu.31	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTGGCTCTATGGACAAGTGGCACAACCAACAGGTGCCAAGGACAGGGCTGGGTCAAAACCAAGGA	
hu.32	(1701)	AACTACTAACCCGGTAGCAACGGAGTGGCTCTATGGACAAGTGGCACAACCAACAGGTGCCAAGGACAGGGCTGGGTCAAAACCAAGGA	

图2B-2

AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1801)	1801	1900
		ATACTCCGGGTATGGTTGGAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGGACCCATTGGGCCAAAATTCTCACACGGACGGCAACTTTCAACCCCTCTCGCGC	
		ATACTCCGGGTATGGTTGGAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGGACCCATTGGGCCAAAATTCTCACACGGACGGCAACTTTCAACCCCTCTCGCGC	
		ATACTCCGGGTATGGTTGGAGGACAGAGATGTGTACCTGCAAGGGACCCATTGGGCCAAAATTCTCACACGGACGGCAACTTTCAACCCCTCTCGCGC	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1901)	1901	2000
		TGATGGGAGGGTTGGAAATGAAGCAACGGCTCTCAAGATCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGGGATCTCCAAAGGCGCTTCAAAGGGACAAGCT	
		TGATGGGAGGGTTGGAAATGAAGCAACGGCTCTCAAGATCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGGGATCTCCAAAGGCGCTTCAAAGGGACAAGCT	
		TGATGGGAGGGTTGGAAATGAAGCAACGGCTCTCAAGATCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGGGATCTCCAAAGGCGCTTCAAAGGGACAAGCT	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(1901)	1901	2100
		TGATGGGAGGGTTGGAAATGAAGCAACGGCTCTCAAGATCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGGGATCTCCAAAGGCGCTTCAAAGGGACAAGCT	
		TGATGGGAGGGTTGGAAATGAAGCAACGGCTCTCAAGATCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGGGATCTCCAAAGGCGCTTCAAAGGGACAAGCT	
		TGATGGGAGGGTTGGAAATGAAGCAACGGCTCTCAAGATCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGGGATCTCCAAAGGCGCTTCAAAGGGACAAGCT	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(2001)	2001	2200
		GAACCTTTCATACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGGGTGGGAGATGAGTGGGAGCTGCAAGAGCAAGGGAAACAGCAAGGGCTGGAAACCGGAGATGCCAG	
		GAACCTTTCATACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGGGTGGGAGATGAGTGGGAGCTGCAAGAGCAAGGGAAACAGCAAGGGCTGGAAACCGGAGATGCCAG	
		GAACCTTTCATACCCAGTATTCTACTGGCCAAGTCAGGGTGGGAGATGAGTGGGAGCTGCAAGAGCAAGGGAAACAGCAAGGGCTGGAAACCGGAGATGCCAG	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(2101)	2101	
		TACACTTCCAACATTACAAGCTAAATGTTGAATTGCTGTTAATACTGAAGGTGTTAATAGTGAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC	
		TACACTTCCAACATTACAAGCTAAATGTTGAATTGCTGTTAATACTGAAGGTGTTAATAGTGAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC	
		TACACTTCCAACATTACAAGCTAAATGTTGAATTGCTGTTAATACTGAAGGTGTTAATAGTGAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC	
AAV9 hu.68.VP1 hu.31 hu.32	(2201)	2201 2211	
		GTAATCTGTAA	
		GTAATCTGTAA	
		GTAATCTGTAA	

图2C

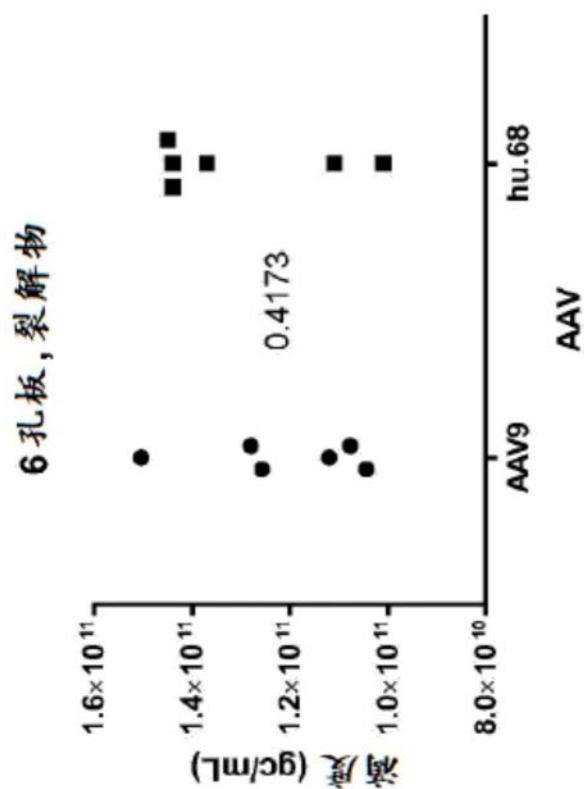


图3A

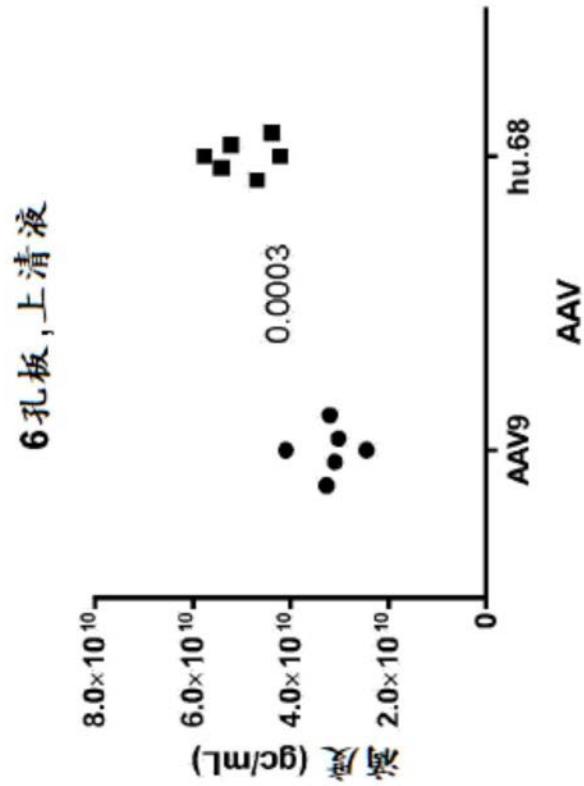


图3B

5x10<sup>11</sup>GC AAVhu68.CB7.nLacZ, IV 施用, 小鼠

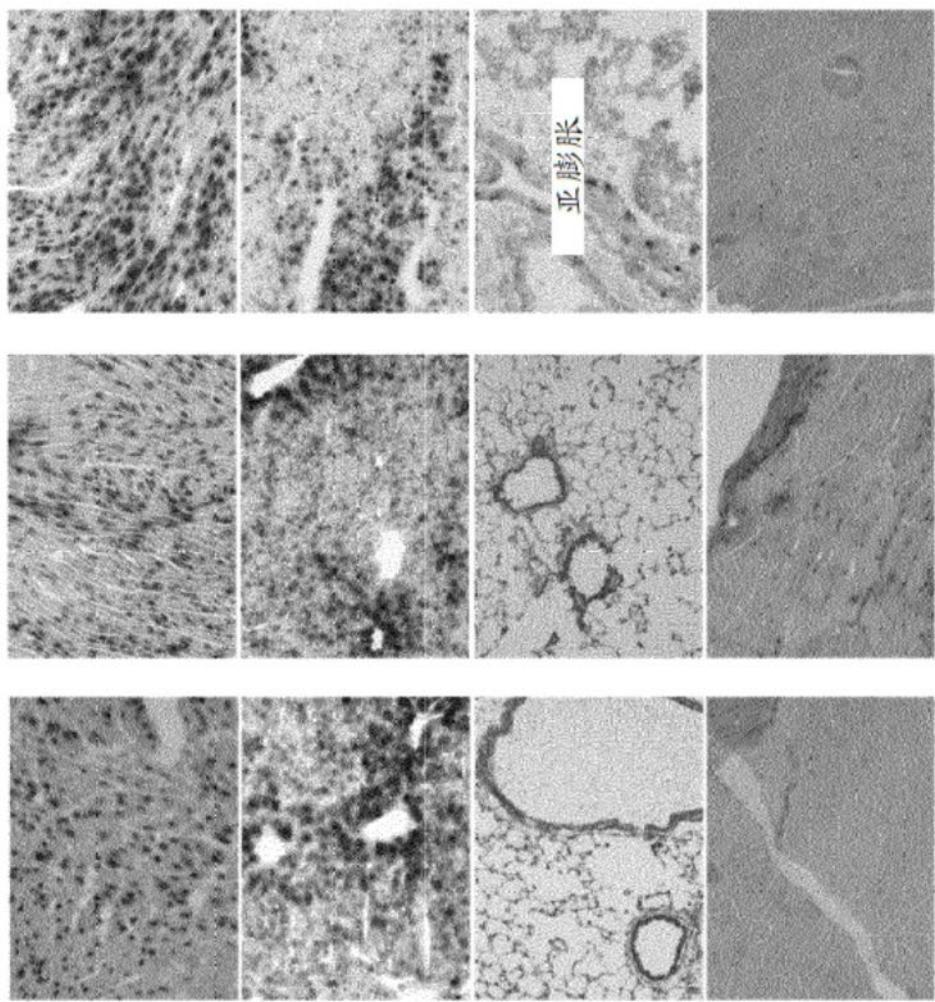
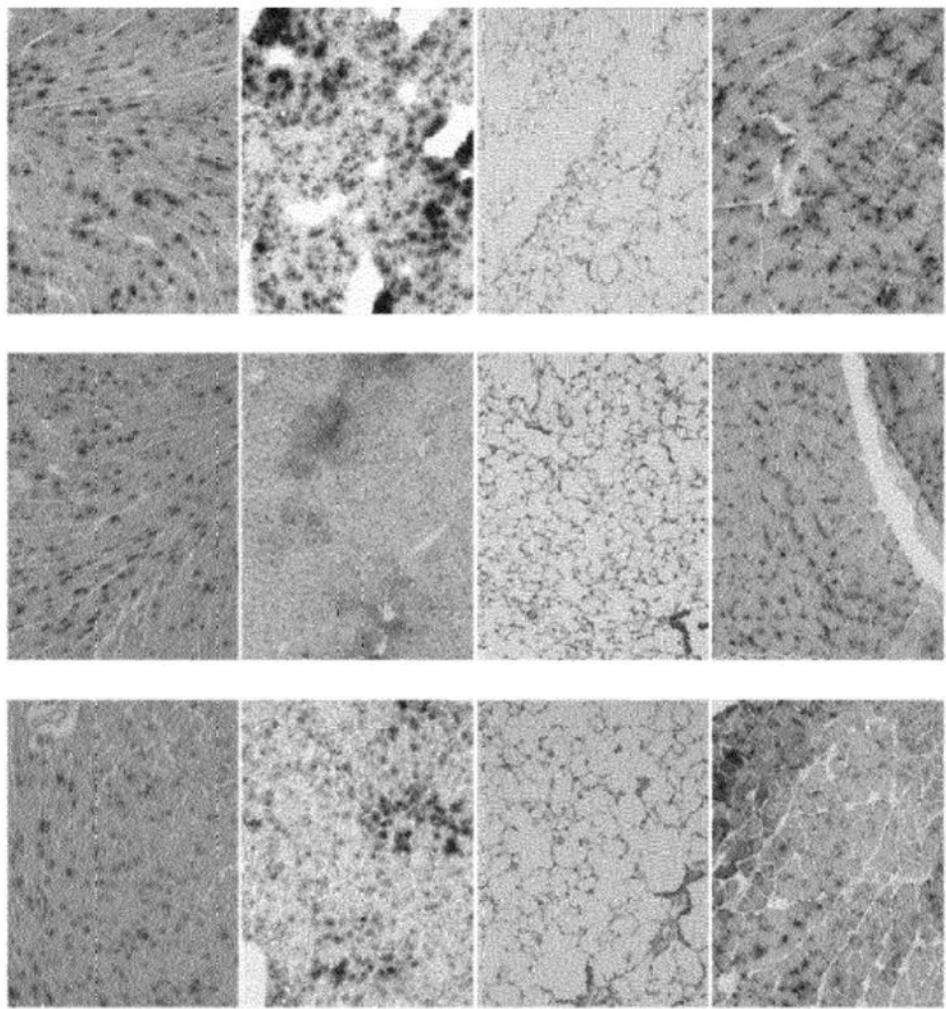


图4A

5x10<sup>11</sup>GC AAVhu68.CB7.nLacZ, IM 施用, 小鼠



肌肉 心脏 肺 肾

图4B

5x10<sup>11</sup>GC AAVhu68.CB7.LacZ, IN 施用，小鼠

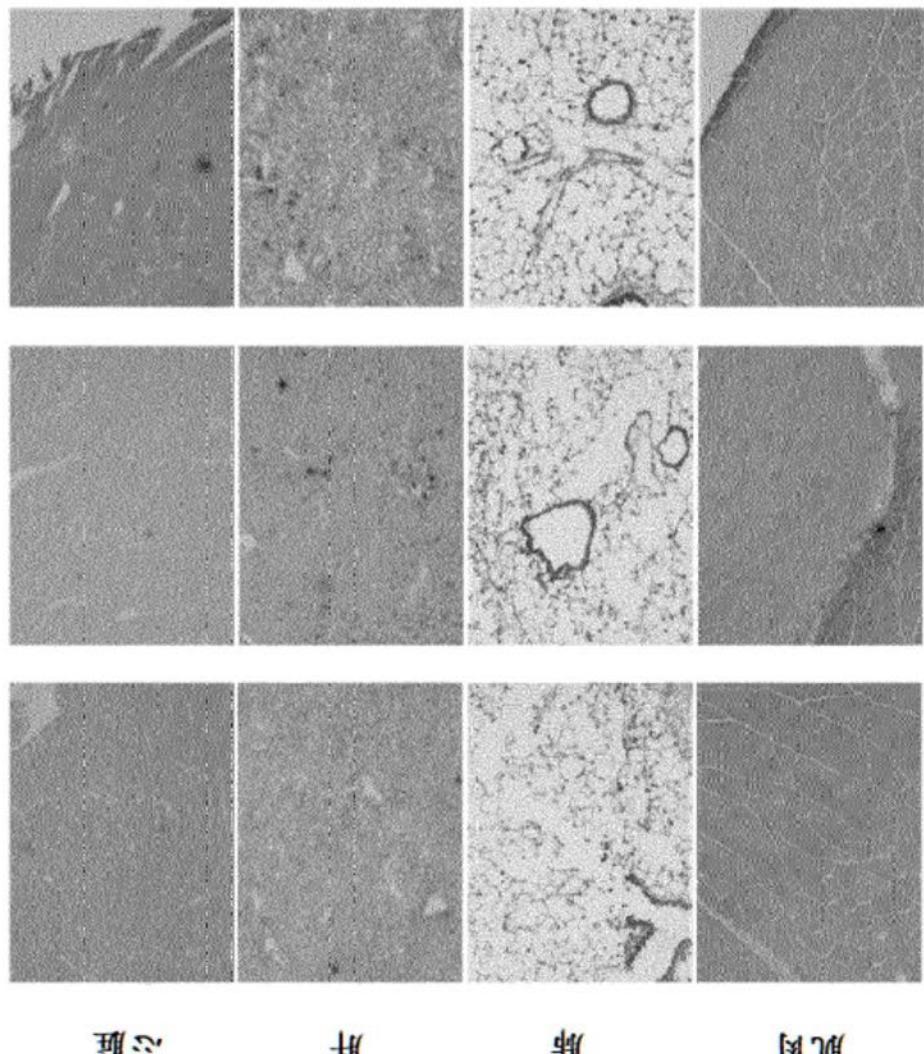


图4C

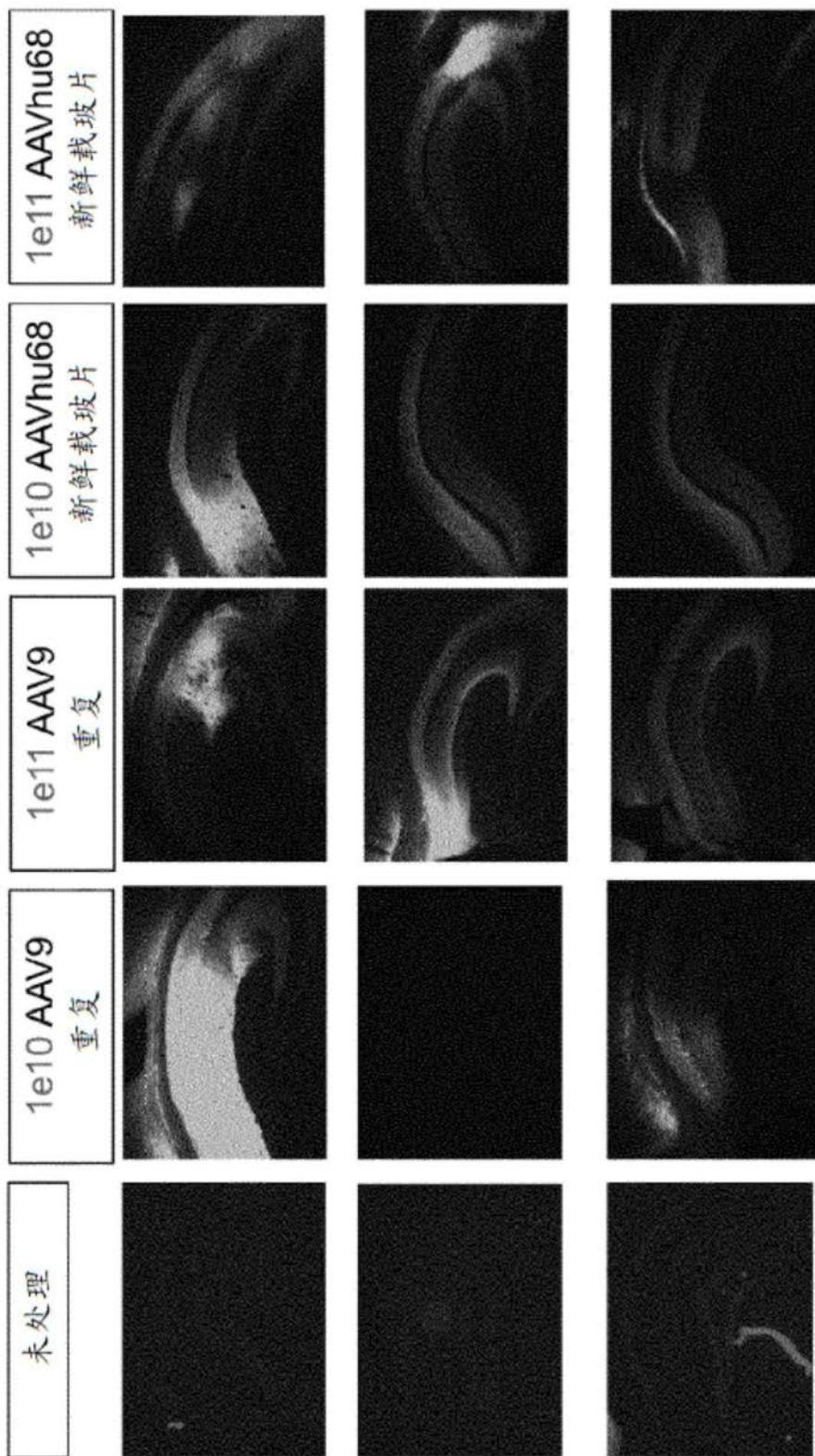


图5A

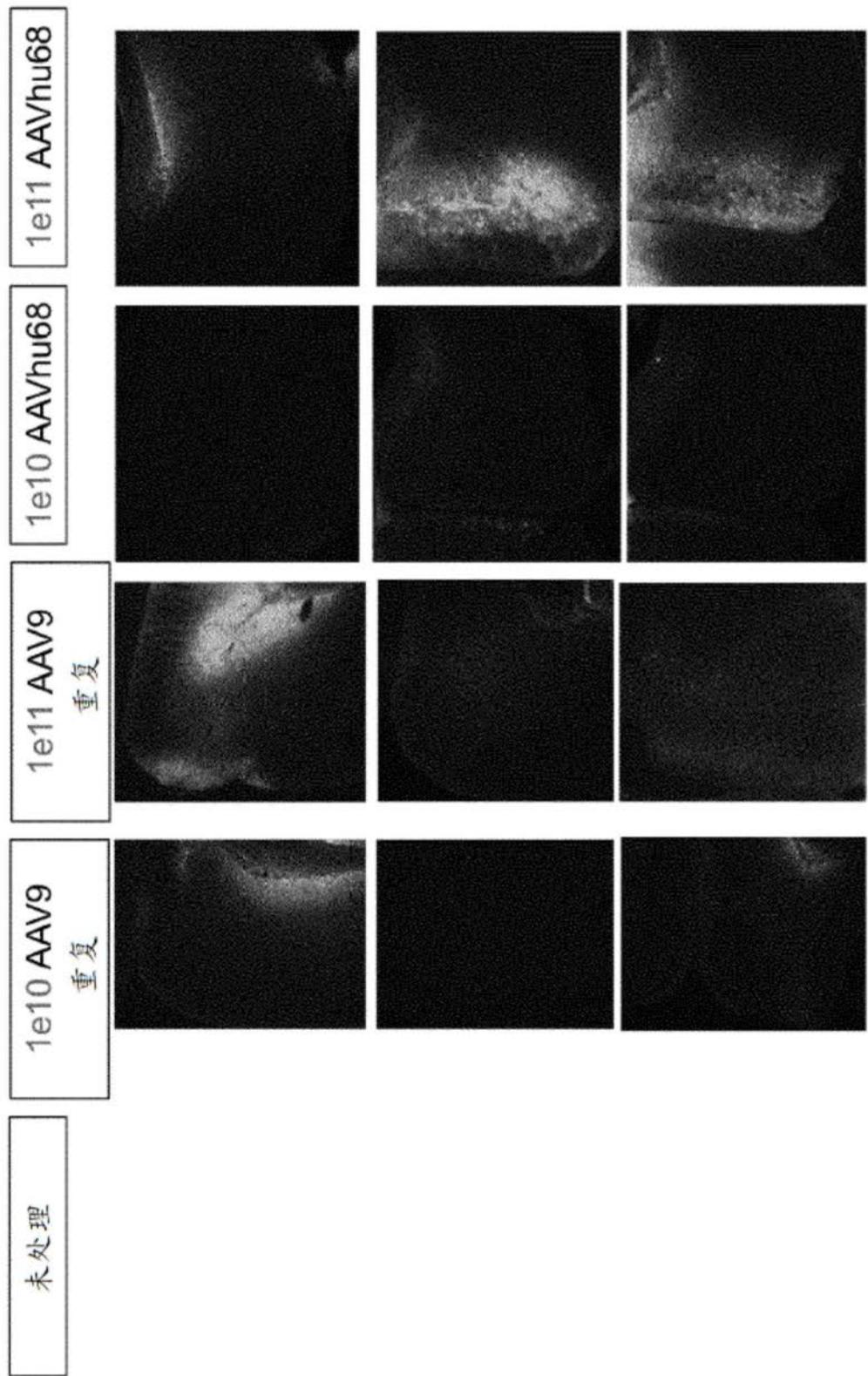


图5B

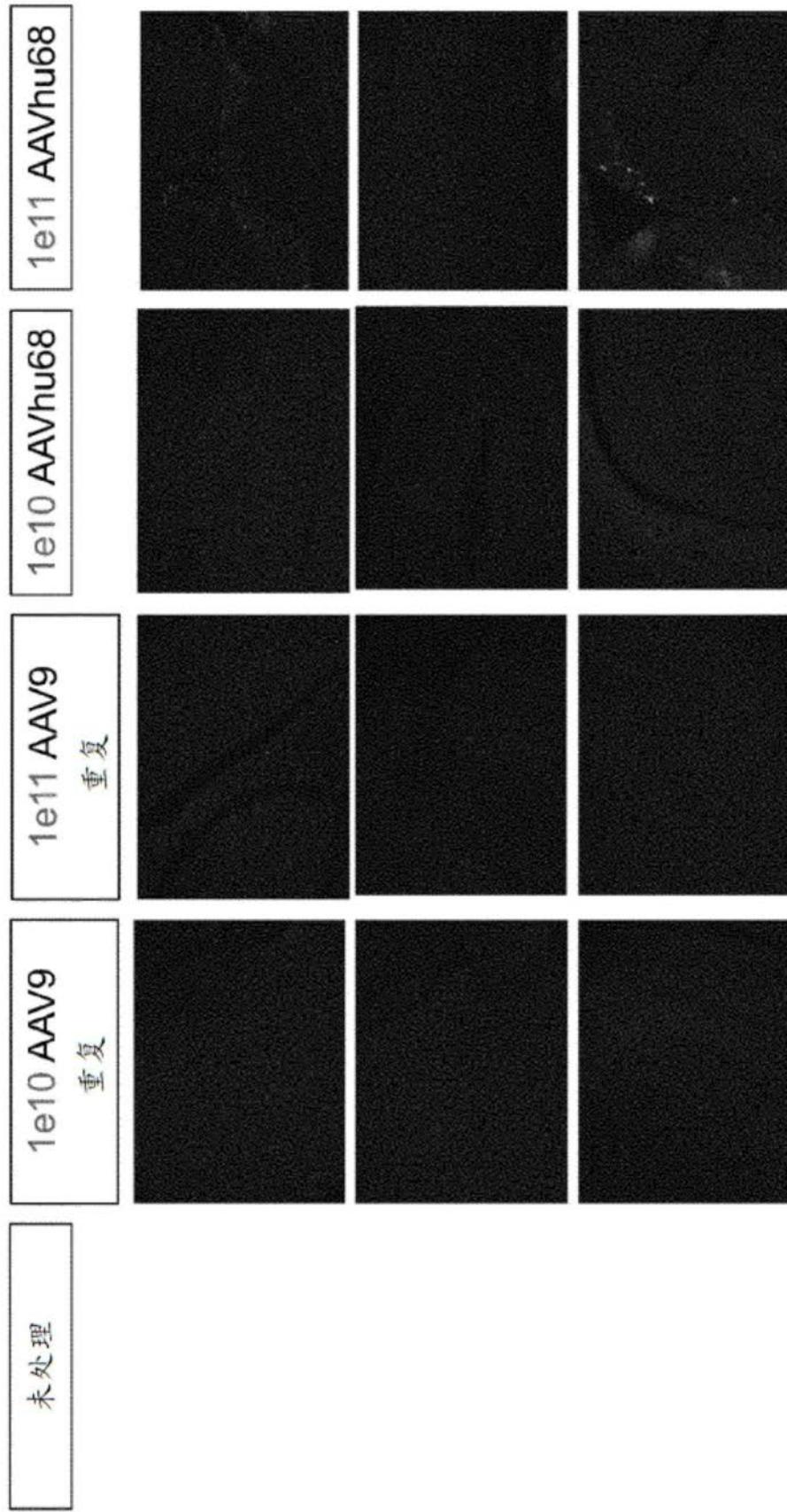


图5C

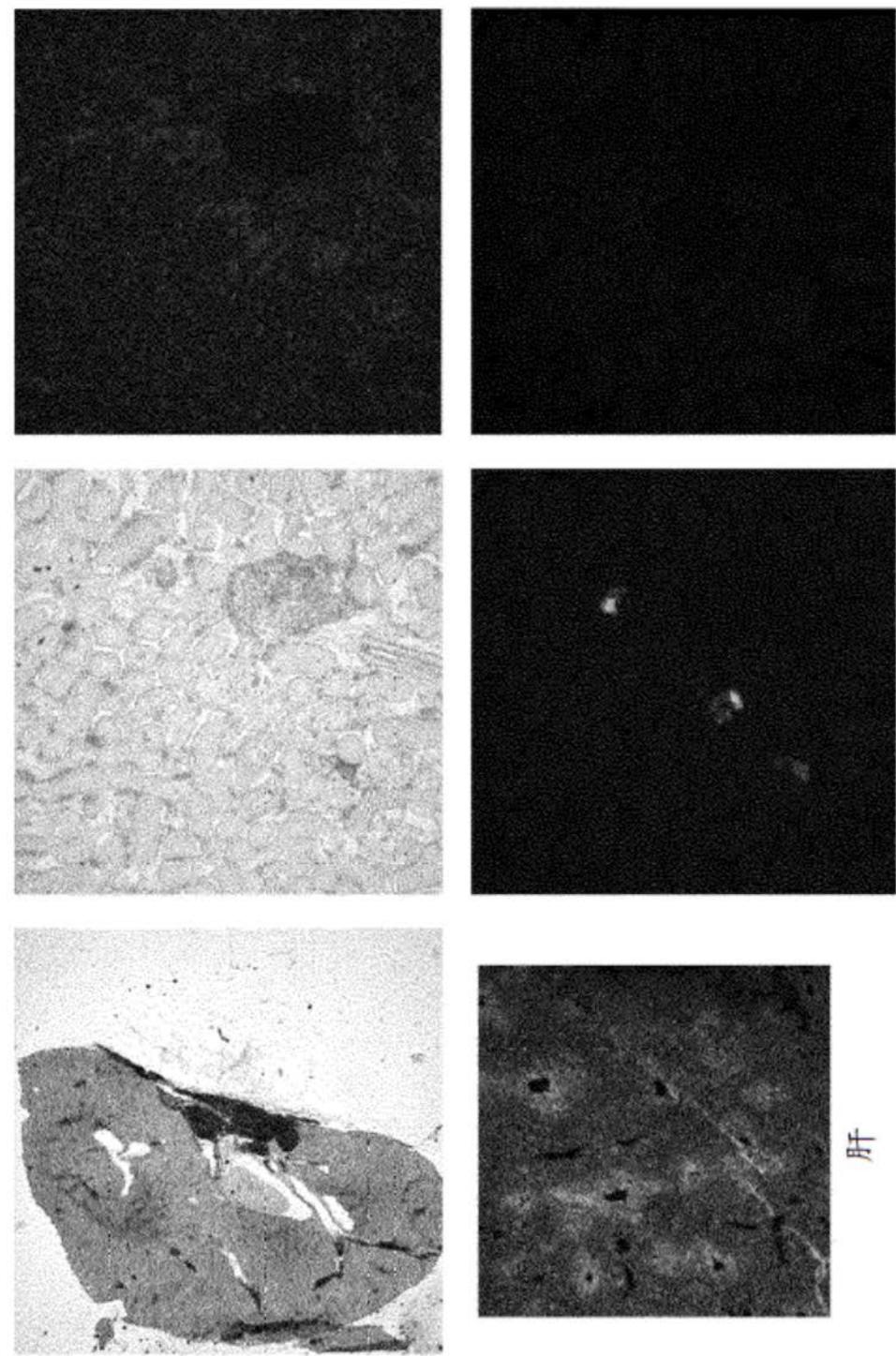


图6A

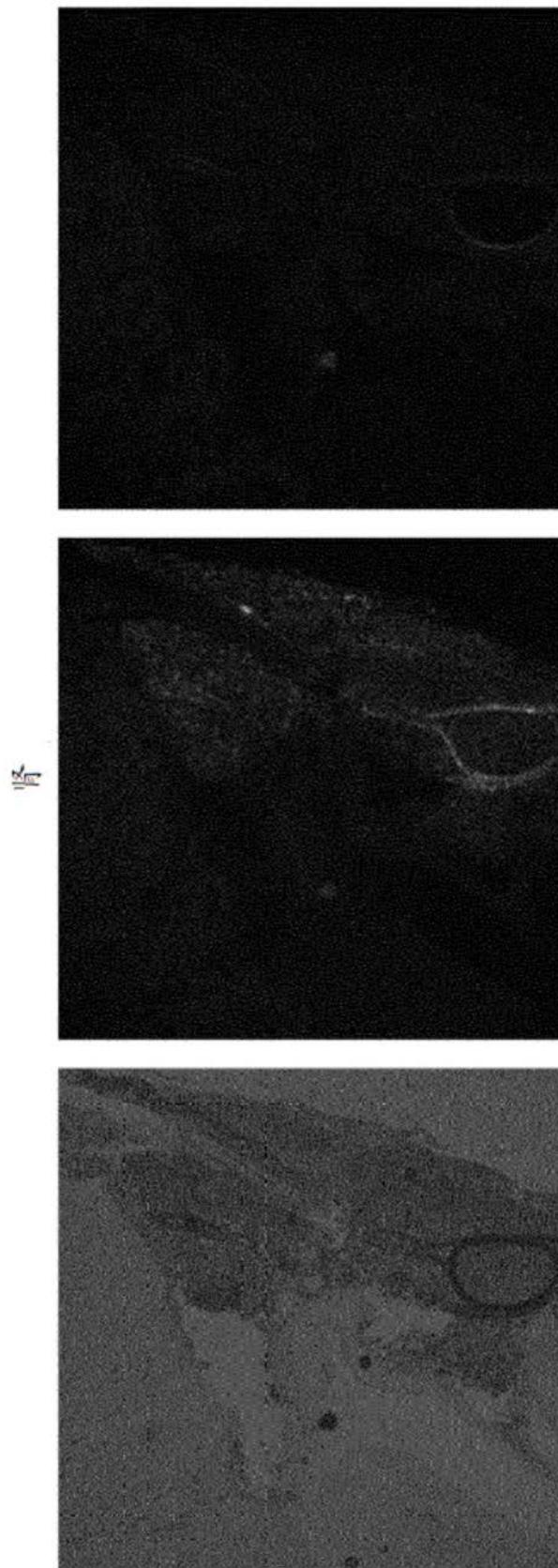


图6B

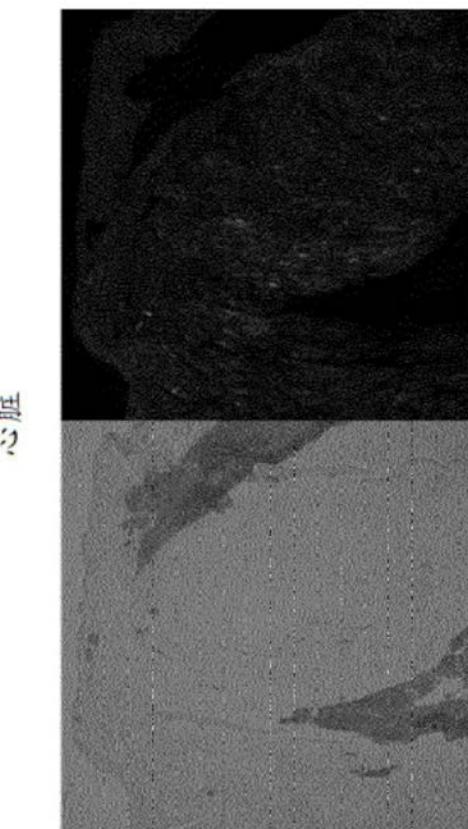


图6C

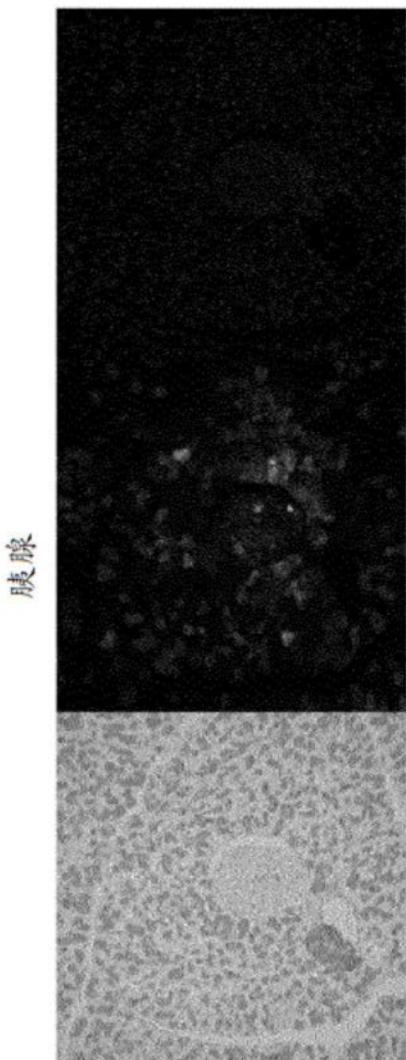


图6D

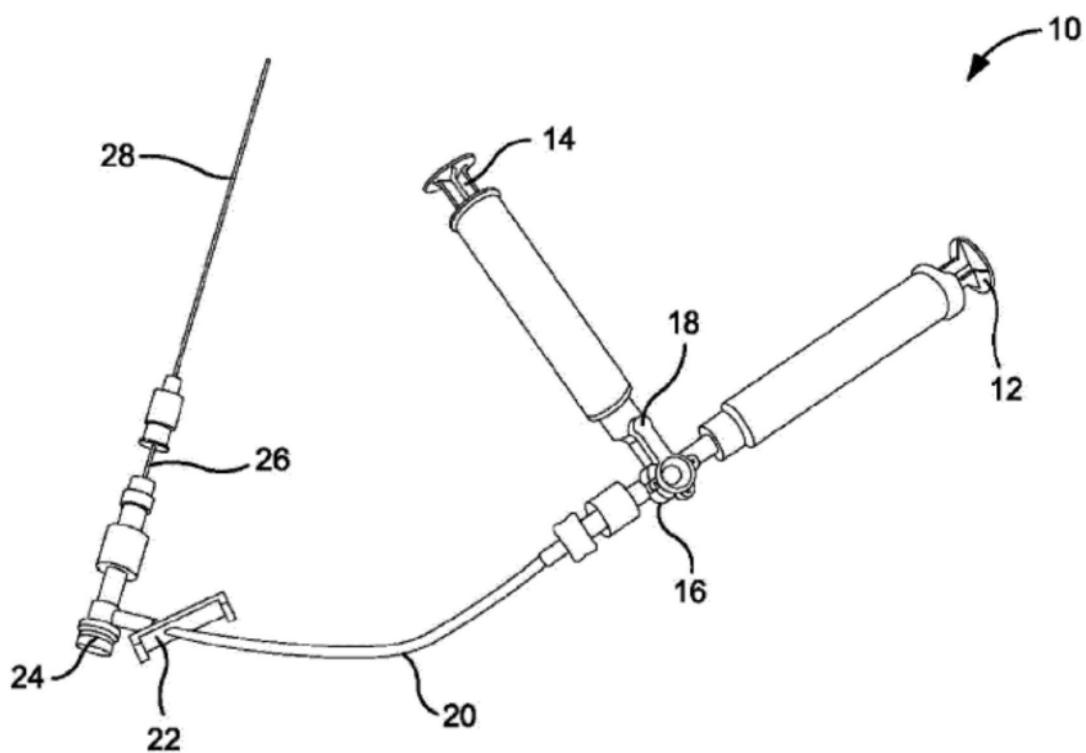


图7

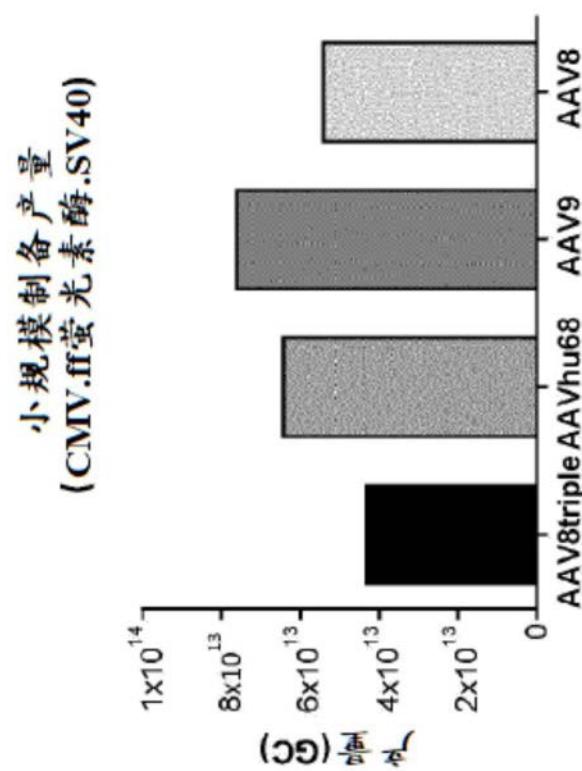


图8A

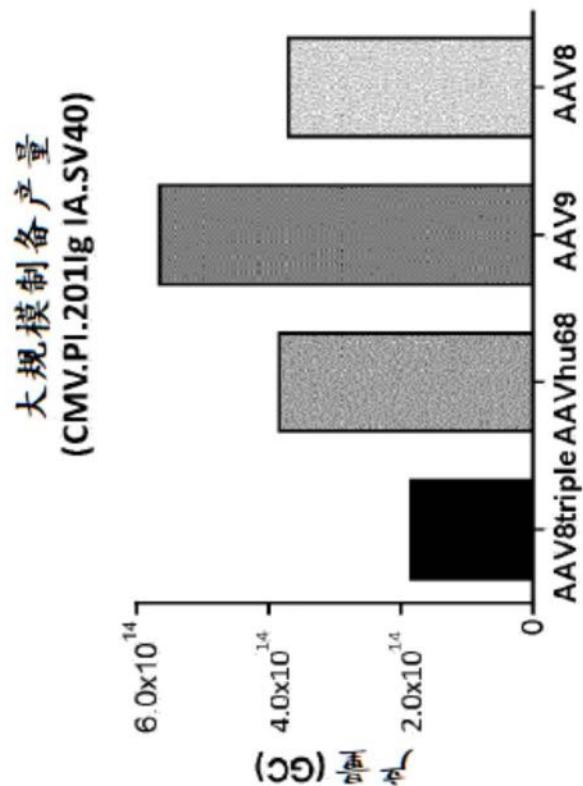


图8B

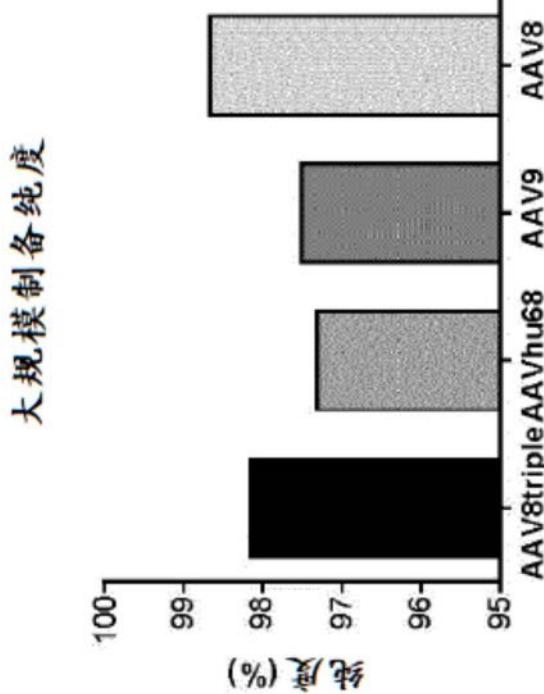


图9

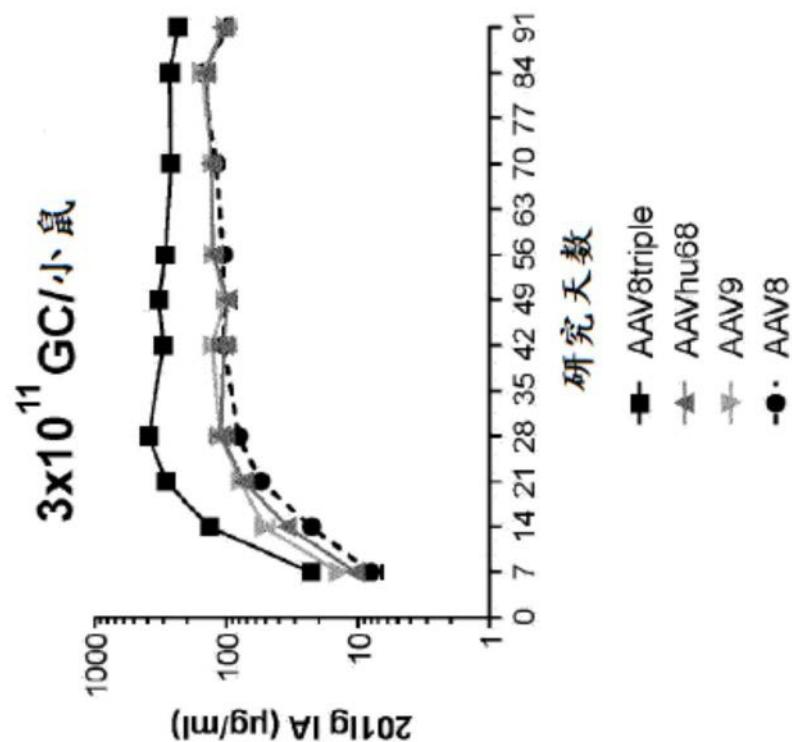


图10A

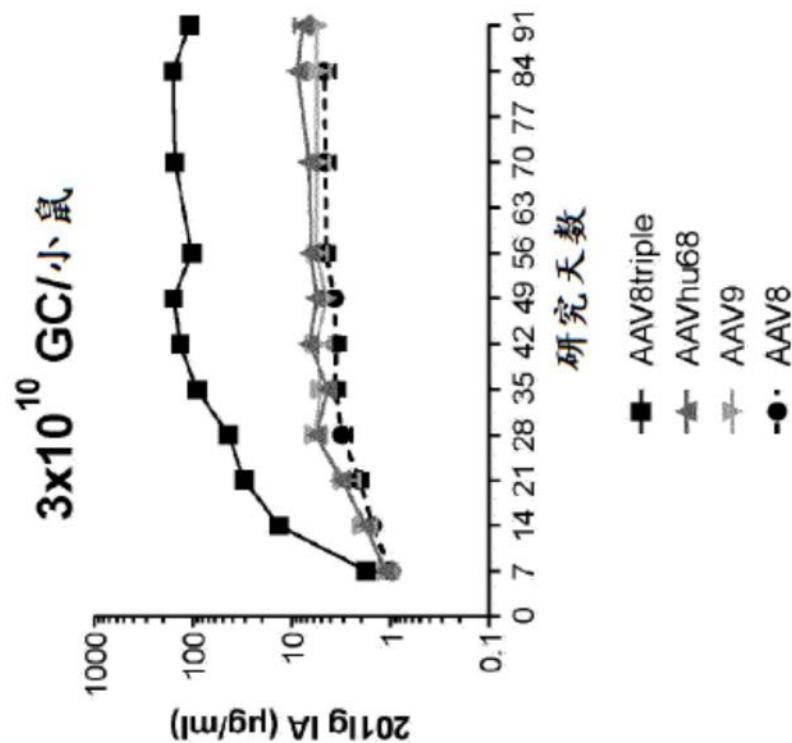


图10B

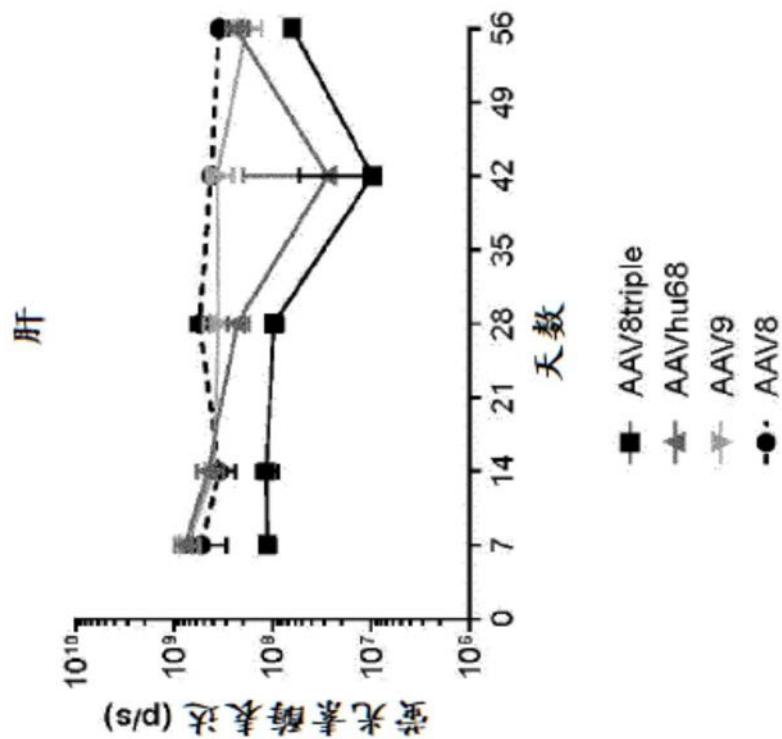


图11A

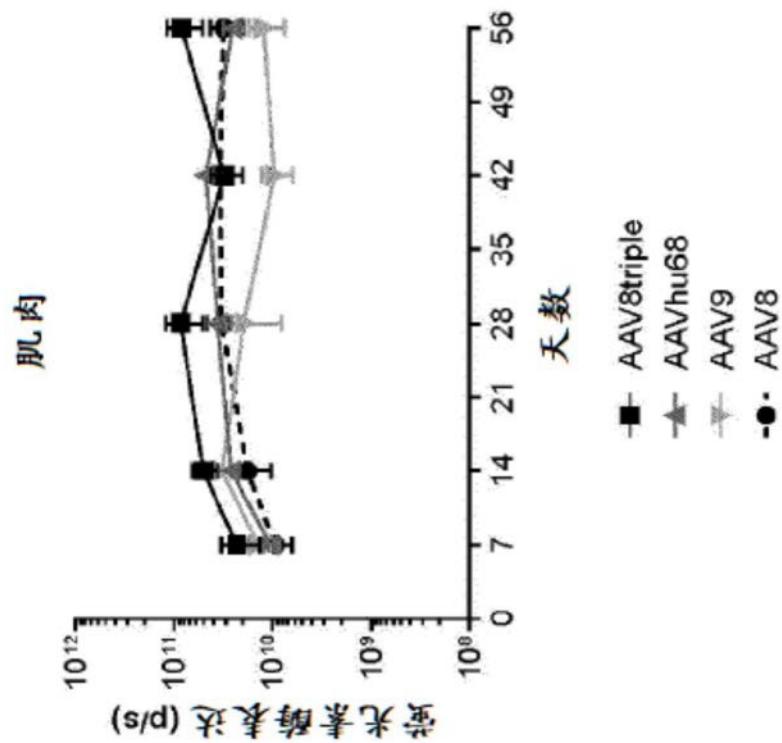


图11B

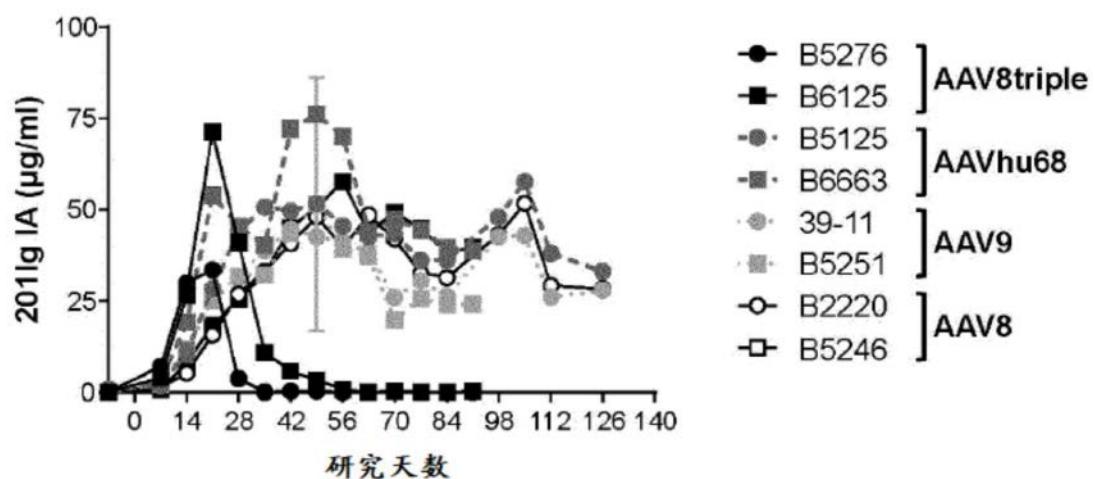


图12