



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118974284 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202380032256.8

(22) 申请日 2023.05.04

(30) 优先权数据

63/364,287 2022.05.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/054639 2023.05.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/214346 EN 2023.11.09

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 A·奇里洛 H·艾伯斯巴赫

M·侯赛因

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 高飞 黄革生

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6897 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

权利要求书4页 说明书136页

序列表(电子公布) 附图30页

(54) 发明名称

新型重组AAV VP2融合多肽

(57) 摘要

本披露涉及腺相关病毒(AAV) VP2融合多肽, 这些腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体。本披露进一步涉及包含此类AAV VP2融合多肽和编码此类AAV VP2融合多肽的核酸文库的rAAV病毒粒子、包含此类rAAV病毒粒子的药物组合物、以及相关的方法和用途。

1. 一种腺相关病毒 (AAV) VP2融合多肽, 所述腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体, 其中所述多肽配体与所述AAV VP2衣壳多肽的N末端融合, 并且选自自由以下组成的组: GP2多肽、Sso7d多肽和亲和体。

2. 如权利要求1所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述多肽配体选自自由以下组成的组: SEQ ID NO: 1的Sso7d多肽和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

3. 如权利要求2所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述多肽配体选自自由以下组成的组: SEQ ID NO: 1的Sso7d多肽, 其中位置21、23、25、28、30、32、40、42和44处的氨基酸残基X独立地选自D、R、H、N、A、I、Y和W; 和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

4. 如前述权利要求中任一项所述的AAV VP2融合多肽, 所述AAV VP2融合多肽进一步包含在所述多肽配体与所述AAV VP2衣壳多肽之间的肽接头, 特别地其中所述肽接头选自自由以下组成的组: 甘氨酸-丝氨酸 (GS) 接头和丙氨酸-脯氨酸-丝氨酸 (APS) 接头, 更特别地其中所述GS接头具有式[GGGS]<sub>n</sub>, 并且所述APS接头具有式[APS]<sub>n</sub>, 其中n是在1至10范围内的整数, 特别地其中n是1、2、3、4、5或6, 更特别地其中对于所述GS接头, n是1、2、3或4, 并且对于所述APS接头, n是2、3、4或5。

5. 如前述权利要求中任一项所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述AAV VP2衣壳多肽具有选自自由以下组成的组的AAV血清型: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5, 特别地选自自由以下组成的组: AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。

6. 如权利要求5所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述AAV VP2衣壳多肽在其天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变, 特别地其中a) 所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV6, 并且在其VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合, 特别地其中所述AAV VP2融合多肽包含以下氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 3的VP1氨基酸序列的ai) K531E和V473D; aii) K531E、K459S、V473D和N500E; aiii) G266A和N269Q; aiv) G266A、N269Q和D590A; av) K531E、V473D、G266A和N269Q; 或avi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A;

其中b) 所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV8, 并且在其VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合, 特别地其中所述AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的bi) G268E和N271Q; bii) S387A; biii) G268E、N271Q和S387A; biv) A592Q; 或bv) A592D;

其中c) 所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV9, 并且在其VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合, 特别地其中所述AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的ci) W503A; cii) N562A和E563A; ciii) Q590A和W503A; 或civ) Q590A、W503A、N562A和E563A;

其中d) 所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV2, 并且在其VP3区内包含相对于SEQ ID NO: 6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A; 或者

其中e) 所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1, 并且在其VP3区内包含选自自由以下

组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的ei) V473D和N500E;eii) R514A;或eiii) V473D、N500E和R514A。

7. 如前述权利要求中任一项所述的AAV VP2融合多肽,其中a) 所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,或者其中b) 所述AAV VP2融合多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N。

8. 如权利要求7所述的AAV VP2融合多肽,其中所述AAV VP2融合多肽进一步包含相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的氨基酸取代V473D和N500E。

9. 一种分离的核酸,所述分离的核酸编码如前述权利要求中任一项所述的AAV VP2融合多肽。

10. 一种细胞,所述细胞包含如权利要求1至8中任一项所述的AAV VP2融合多肽或如权利要求9所述的核酸,特别地其中所述细胞选自以下组成的组:昆虫细胞(例如,Sf9细胞)和HEK293细胞。

11. 一种重组AAV (rAAV) 病毒粒子,所述重组AAV病毒粒子包含如权利要求1至8中任一项所述的AAV VP2融合多肽。

12. 如权利要求11所述的rAAV病毒粒子,所述rAAV病毒粒子进一步包含编码如权利要求1至8中任一项所述的AAV VP2融合多肽的核酸序列,特别地其中包含在所述rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽和由所述核酸序列编码的AAV VP2融合多肽是相同的。

13. 如权利要求11所述的rAAV病毒粒子,所述rAAV病毒粒子进一步包含编码治疗性核酸、治疗性蛋白或治疗性抗体或抗体片段的核酸序列。

14. 如权利要求11至13中任一项所述的rAAV病毒粒子,其中所述病毒粒子进一步包含AAV VP1和VP3多肽,特别地其中所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有相同的AAV血清型,所述AAV血清型选自以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5,特别地选自以下组成的组:AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。

15. 如权利要求14所述的rAAV病毒粒子,其中所述AAV VP1、VP2和VP3多肽在所述AAV VP1、VP2和VP3衣壳多肽的天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变,特别地其中所述AAV VP1、VP2和VP3多肽在每个AAV衣壳多肽的共享VP3区内包含相同的至少一个突变,更特别地其中

a) 所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV6,并且各自在共享VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的ai) K531E和V473D;aii) K531E、K459S、V473D和N500E;aiii)

G266A和N269Q; aiv) G266A、N269Q和D590A; av) K531E、V473D、G266A和N269Q; 或avi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A;

其中b)所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV8,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的bi) G268E和N271Q; bii) S387A; biii) G268E、N271Q和S387A; biv) A592Q; 或bv) A592D;

其中c)所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV9,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的ci) W503A; cii) N562A和E563A; ciii) Q590A和W503A; 或civ) Q590A、W503A、N562A和E563A;

其中d)所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV2,并且各自在共享VP3区内包含相对于SEQ ID NO:6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A;或者

其中e)所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV1,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的ei) V473D和N500E; eii) R514A; 或eiii) V473D、N500E和R514A。

16. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求11和13至15中任一项所述的rAAV病毒粒子和药学上可接受的赋形剂。

17. 如权利要求11和13至15中任一项所述的rAAV病毒粒子或如权利要求16所述的药物组合物,用作药物。

18. 一种文库构建体,所述文库构建体包含编码AAV VP2融合多肽的核酸序列,所述AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,例如由其组成,其中所述多肽配体与所述AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中所述多肽配体选自由以下组成的组:GP2多肽、Sso7d多肽和亲和体。

19. 如权利要求18所述的文库构建体,其中所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1的Sso7d多肽和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽,特别地其中所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1的Sso7d多肽,其中位置21、23、25、28、30、32、40、42和44处的氨基酸残基X独立地选自D、R、H、N、A、I、Y和W;和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

20. 一种文库,所述文库包含多个如权利要求18或19所述的文库构建体,特别地其中所述文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或 $10^9$ 个独特的文库构建体。

21. 如权利要求20所述的文库,其中每个文库构建体都存在于rAAV病毒粒子内,特别地其中所述rAAV病毒粒子包含如权利要求2或3所述的AAV VP2融合多肽,并且其中包含在给定rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽和由存在于所述给定rAAV病毒粒子中的文库构建体

编码的AAV VP2融合多肽是相同的。

22. 一种产生具有至少一种所希望的特征的AAV VP2融合多肽的方法,所述方法包括以下步骤:b)使如权利要求20或21所述的文库与多个细胞接触,c)从所述细胞的至少一部分中分离核酸分子,以及d)确定在步骤b)中分离的至少一种核酸分子的编码所述多肽配体或其片段的序列的至少一部分,特别地其中步骤b)中的所述多个细胞存在于非人模型动物内。

23. 一种AAV VP2融合多肽,所述AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,其中所述多肽配体与所述AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中所述多肽配体的分子量高达10kDa。

24. 一种AAV VP2融合多肽,所述AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,其中所述多肽配体与所述AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中所述AAV VP2衣壳多肽包含消除或减少与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)和/或唾液酸(SIA)的结合的一个或多个突变。

25. 一种AAV VP2衣壳多肽,其中a)所述AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合,特别地其中所述AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,或者其中b)所述AAV VP2衣壳多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自由以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N。

26. 一种rAAV病毒粒子,所述rAAV病毒粒子包含如权利要求25所述的AAV VP2衣壳多肽。

## 新型重组AAV VP2融合多肽

### 技术领域

[0001] 本披露提供了用于在基因疗法方法中改善AAV的靶向的腺相关病毒(AAV)VP2融合多肽,这些腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体。本披露进一步提供了包含此类AAV VP2融合多肽和编码此类AAV VP2融合多肽的核酸文库的rAAV病毒粒子,以及相关的组合物、方法和用途。

[0002] 序列表

[0003] 本申请含有已经以ASCII格式电子递交并且通过援引以其全文特此并入的序列表。所述ASCII副本(创建于2022年5月5日)被命名为PAT059281-US-PSP\_SL,并且大小为54,417字节。

### 背景技术

[0004] 腺相关病毒(AAV)载体由于其优异的安全性和功效谱而是最有希望的基因转移载体之一。将AAV载体与其他载体区分开的它们的已确立的特征包括稳定的长期表达、广泛的宿主范围、转导增殖细胞和有丝分裂后细胞的能力、组织培养物中产生的AAV载体的高滴度、来自非致病性病毒的衍生以及野生型病毒和重组载体两者的低免疫原性。

[0005] 然而,由于其广泛的嗜性,许多靶器官的转导功效低,并且因此需要应用高载体剂量。已经变得越来越清楚的是,此载体系统的全部潜力将仅用展现出改善的细胞转导率和特异性从而导致安全性谱改善的经修饰的AAV载体来实现。

[0006] 重靶向尝试一直集中于形成突起的环的可变区,这是由于其暴露位置及其在受体结合中的功能。然而,这些位点仅接受小肽的插入。US20180163229披露了变体AAV衣壳多肽,其包含与AAV VP2的N末端融合的DARPin。

[0007] 对于可以介导用于基因疗法的改善的AAV特征(诸如在至少一种组织或细胞类型中增加的转导和/或增加的嗜性、改善的细胞类型选择性和/或靶向特异性)的另外的变体AAV衣壳多肽仍然存在高度未满足的需求。

### 发明内容

[0008] 本披露提供了腺相关病毒(AAV)VP2融合多肽,这些腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,例如其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端直接或经由肽接头融合。该多肽接头的分子量高达10kDa。当典型地与AAV VP1和/或VP3衣壳多肽一起用于rAAV病毒粒子组装时,本文提供的AAV VP2融合多肽可以显示出良好的装饰水平,这意味着令人满意数目的AAV VP2融合多肽被掺入rAAV病毒粒子中。

[0009] 相对于未与所述多肽配体融合但在其他方面与包含在该AAV VP2融合多肽中的VP2衣壳多肽相同的AAV VP2衣壳多肽,本文所述的AAV VP2融合多肽可以介导至少一种组织或细胞类型中改善的转导和/或增加的嗜性。至少一种组织或细胞类型中改善的转导和/或增加的嗜性可以由该多肽配体介导,该多肽配体可以具有与该至少一种组织或细胞类型上表达的细胞表面分子结合的能力。因此,包含本文提供的AAV VP2融合多肽并且在其表面

上展示该多肽配体的rAAV病毒粒子可以用于在治疗应用和基础研究应用期间的细胞类型特异性基因递送,因为它们提供了允许有限的生物分布和安全的基因转移的高细胞类型选择性和/或靶向特异性。

[0010] 因此,在一方面,本文提供了腺相关病毒(AAV) VP2融合多肽,这些腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,例如由其组成,其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中该多肽配体的分子量高达10kDa。

[0011] 在其他方面,本文提供了编码此类AAV VP2融合多肽的核酸和包含此类AAV VP2融合多肽或编码此类AAV VP2融合多肽的核酸的细胞。

[0012] 在其他方面,本文提供了包含本文披露的AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子和包含此类rAAV病毒粒子的药物组合物。

[0013] 在其他方面,本文提供了编码本文披露的AAV VP2融合多肽的核酸构建体文库和使用这样的文库产生具有有所希望的特征的AAV VP2融合多肽的方法。

[0014] 在其他方面,本文提供了使用包含本文披露的AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子和包含此类rAAV病毒粒子的药物组合物的治疗方法。

[0015] 在另一方面,本文提供了一种AAV VP2衣壳多肽,其中a) 该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,或者其中b) 该AAV VP2衣壳多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自由以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N,特别地其中bi) 该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型8,并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D214A、K163R和/或P192N,或者其中bii) 该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型9,并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、S162R和/或P191N。

## 具体实施方式

[0016] 定义

[0017] 如在说明书和权利要求中所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该/这些”包括复数指示物。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0018] 所有数字表达(例如,pH、温度、时间、浓度和分子量)(包括范围)都是近似值,其以0.1的增量变化(+)或(-)。应理解,尽管并非总是明确说明,但所有数字表达前面都有术语“约”。与数值X相关的术语“约”意指例如 $X \pm 15\%$ ,包括此范围内的所有值。还应理解,尽管并非总是明确说明,但本文所述的试剂仅是实例,并且其等效物是本领域已知的。

[0019] 在整个本说明书和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,除非另有说明,否则

单词“包含/包括(comprise)”和变体诸如“包含/包括(comprises)”和“包含/包括(comprising)”在本文中以其开放式且非限制性的意义使用。

[0020] 当在本文中使用时,“由……组成”不包括在方面、实施例和/或权利要求部分中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由……组成”不排除不实质上影响方面、实施例和/或权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0021] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽典型地含有至少两个氨基酸或氨基酸变体,并且对可以包含在蛋白质或多肽序列中的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此相连的两个或更多个氨基酸或变体的任何肽或蛋白质。这些术语包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0022] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换地使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式。它们可以包含核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸中的一种或多种。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA),基因组DNA,cDNA,DNA-RNA杂合体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、经化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基(例如,天然核苷酸的类似物,这些类似物具有与参考核酸类似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢)的聚合物,锁核酸(LNA),肽核酸(PNA)。除非另有指示,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其经保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生这样的序列来实现,在这些序列中,一个或多个所选(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes[分子和细胞探针]8:91-98(1994))。

[0023] 术语“序列同一性”和“序列同源性”在本文中可互换地使用,并且如与多核苷酸或多肽结合所用,是指当比较或比对多核苷酸或多肽的两个序列时,相同且处于相同的相对位置的碱基或氨基酸的百分比。因此,当这两个分子中的亚基位置被相同的单体亚基占据时,例如,如果两个DNA分子中的每一个中的位置都被腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源的或相同的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数的直接函数,例如,如果两个序列中一半的位置(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的,则这两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)是匹配的或同源的,则这两个序列是90%同源的。可以以许多不同的方式确定序列同一性。例如,可以通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性”的百分比,其中比较窗口中的氨基酸序列的片段可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比的添加或缺失(例如,空位或突出端)以使这两个序列最佳比对。可以通过以下方式计算百分比:确定在这两个序列中出现相同氨基酸残基的位置数以产生匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数,并且将结果乘以100,以产生序列同一性的百分比。输出是主题序列相对于查询序列的百分比同一性。可以使用各种方法和计算机程序(例如,BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFT等)比对序列。参见例如,Altschul等人,(1990)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],215:403-10。

[0024] 如本文所用,如应用于例如核酸、多肽、细胞或生物体的术语“天然存在的”或“未

经修饰的”是在自然界中发现的核酸、多肽、细胞或生物体。例如,存在于生物体(诸如病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的,无论是存在于该生物体中还是从生物体的一种或多种组分中分离的。

[0025] 关于多核苷酸或多肽的术语“变体”是指与亲本多核苷酸或多肽(也称为非变体多核苷酸或多肽序列)的差异在于至少一个残基(即,对于多核苷酸为至少一个核苷酸,并且对于多肽为至少一个氨基酸)的多核苷酸或多肽。

[0026] 涉及本文讨论的核酸、多肽或病毒的术语“分离的”是指已经与在其自然环境中通常存在的与其相关的一种或多种组分分开的核酸、多肽或病毒。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽是“分离的”。分开可以包括从较大的核酸(例如,从基因或染色体)或从通常与核酸或蛋白接触的其他蛋白质或分子中去除。该术语涵盖但不要求完全分离。因此,分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境(例如像宿主细胞)中。

[0027] 如本文所用,包含“异源核酸序列”的分离的核酸是指包含在天然环境中发现通常不与分离的核酸的一种或多种其他组分可操作地连接的部分(即,异源核酸部分)的分离的核酸。例如,异源核酸可以包含最初未在分离的核酸的其他组分(例如,启动子)天然来源的细胞、细菌细胞、病毒或生物体中发现的核酸序列,或者其中发现分离的核酸的其他组分(例如,启动子)不与细胞、细菌细胞、病毒或生物体中的异源核酸天然地可操作地连接的核酸序列。在一些实施例中,异源核酸包括转基因。如本文所用,“转基因”是最初与核酸分子的一种或多种组分不相关的编码目的分子(例如,治疗性蛋白、治疗性RNA分子或报告蛋白)的核酸序列。在一些实施例中,异源核酸序列编码人蛋白。在一些实施例中,异源核酸序列编码RNA序列,例如shRNA。

[0028] 如本文所用,术语“报告序列”是指编码报告蛋白(诸如荧光蛋白或氧化酶)的核酸序列,这使得可以用包含这样的报告序列的rAAV载体的感染可视化,即以基于报告蛋白的表达来监测靶细胞或靶组织的成功转导。优选的氧化酶是萤火虫萤光素酶;示例性荧光蛋白包括GFP及其变体(诸如eGFP)和sfCherry。除了治疗性转基因或编码本文披露的AAV VP2融合多肽的核酸之外或者代替治疗性转基因或编码本文披露的AAV VP2融合多肽的核酸,可以将报告序列包装到rAAV病毒粒子中。

[0029] 如本文所用,术语“条形码序列”是指具有特别的序列的独特寡核苷酸序列(例如,5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、50、75、100个核苷酸),其用作鉴定它掺入其中的核酸序列的手段。例如,条形码可以用作区分或鉴定文库中的单独成员(例如,变体)的手段。

[0030] “编码”特定RNA的DNA序列或DNA多核苷酸序列是能够转录为RNA的DNA序列。DNA多核苷酸可以编码翻译成蛋白质的RNA(mRNA),或者DNA多核苷酸可以编码不翻译成蛋白质的RNA(例如,tRNA、rRNA或指导RNA;也称为“非编码”RNA或“ncRNA”)。DNA序列或DNA多核苷酸序列还可以“编码”特定的多肽或蛋白质序列,其中,例如,DNA直接编码可以翻译成多肽或蛋白质序列的mRNA。“蛋白质编码序列”或编码特定蛋白质或多肽的序列是当置于适当的调节序列的控制下时能够在体外或体内转录为mRNA(在DNA的情况下)和翻译(在mRNA的情况下)成多肽的核酸序列。可以由5'末端(N末端)的起始密码子和3'末端(C末端)的翻译终止无义密码子确定编码序列的边界。编码序列可以包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列和合成核酸。转录终止序列将通常位于编码序

列的3'。

[0031] 如本文所用的术语“启动子”或“启动子序列”是例如通过结合RNA聚合酶能够促进可操作地连接的编码或非编码序列(例如,下游(3'方向)编码或非编码序列)的转录(例如,能够引起可检测水平的转录和/或增加可检测水平的转录(相对于在启动子不存在的情况下提供的水平))的DNA调节序列。在一些实施例中,启动子序列在其3'末端以转录起始位点为界,并且延伸到上游(5'方向),以包括最小数目的碱基或元件以启动高于背景的可检测水平的转录。在一些实施例中,启动子序列可以包含转录起始位点以及负责结合RNA聚合酶的蛋白质结合结构域。除了足以启动转录的序列之外,启动子还可以包含参与调节转录的其他调节元件(例如,增强子、科扎克序列和内含子)的序列。各种启动子(包括诱导型启动子和组成型启动子)都可以用于驱动从本文披露的载体的表达。本领域已知的可以在一些实施例中(例如,在本文披露的核酸分子和载体中)使用的启动子的实例包括CMV启动子、173CMV启动子、HCMV启动子、CBh启动子、CAG启动子、mCCT启动子、CBA启动子、smCBA启动子和源自免疫球蛋白基因、SV40或其他组织特异性基因(例如:RLBP1、RPE、VMD2)的那些启动子。此外,通过混合和匹配已知的调节元件产生功能性启动子的标准技术是本领域已知的。也可以使用启动子的片段,例如保留至少最小数目的碱基或元件以启动高于背景的可检测水平的转录的那些片段。

[0032] 在一些实施例中,启动子可以是组成型活性启动子(即,在任何细胞类型中和/或在任何条件下都组成性地驱动表达的启动子)。在其他实施例中,启动子可以是在特定组织环境中(例如,在神经元、心肌细胞等中)的组成型活性启动子。在其他实施例中,启动子可以是诱导型启动子(即,其活性受外部刺激(例如,存在特定温度、化合物或蛋白质)控制的启动子)。在一些实施例中,启动子可以是空间限制型启动子,其可以驱动或不驱动活性,这取决于启动子所在的物理环境。空间限制型启动子的非限制性实例包括组织特异性启动子、细胞类型特异性启动子等。在一些实施例中,启动子可以是时间限制型启动子,其驱动表达,这取决于启动子所在的时间背景。例如,时间限制型启动子可以仅在胚胎发育的特定阶段或生物过程的特定阶段期间驱动表达。时间限制型启动子的非限制性实例包括小鼠中的毛囊周期启动子。

[0033] 在一些实施例中,启动子是组织特异性的,使得在多细胞生物体中,启动子仅在特定细胞的子集中驱动表达。例如,组织特异性启动子包括但不限于神经元特异性启动子、脂肪细胞特异性启动子、心肌细胞特异性启动子、平滑肌特异性启动子、光感受器特异性启动子等。神经元特异性启动子是指这样的启动子,当例如外周地直接施用到中枢神经系统(CNS)或递送到神经元细胞中(包括体外、离体或体内)时,与非神经元细胞中的表达相比,其优先驱动或调节神经元中可操作地连接的异源核酸(例如,编码目的蛋白或肽或shRNA的异源核酸)的表达。

[0034] 术语“可操作地连接的”是指两个或更多个多核苷酸(例如,DNA)区段之间的功能性关系。典型地,该术语是指转录调节序列与待转录序列的功能性关系。例如,如果启动子或增强子序列例如在适当的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,则它与编码序列可操作地连接。通常,与序列可操作地连接的启动子转录调节序列与该序列邻接或者由短间隔子序列分开,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调节序列(诸如增强子)不需要在物理上邻接或定位地极为接近它们增强其转录的编码序列。

[0035] 在本文中可互换地使用的术语“DNA调节序列”、“控制元件”和“调节元件”是指提供和/或调节非编码序列(例如,短发夹RNA)或编码序列(例如,转基因)的转录和/或调节编码多肽的翻译的转录和翻译控制序列,诸如启动子、增强子、沉默子、多腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0036] 术语“多腺苷酸化(聚A)信号序列”和“多腺苷酸化序列”是指为转录终止和向RNA转录物的3'端添加腺苷均聚链提供信号的调节元件。多腺苷酸化信号可以包含终止信号(例如,AAUAAA序列或其他非经典序列)以及任选地侧接辅助元件(例如,富含GU的元件)和/或与有效切割和多腺苷酸化相关的其他元件。多腺苷酸化序列可以包含一系列通过多腺苷酸化附接到mRNA的3'端的腺苷。示例性聚A信号序列是BGH和SV40聚A信号序列。在一些实施例中,DNA调节序列或控制元件是组织特异性调节序列。

[0037] 术语“转录后调节元件”(“PRE”)是指当转录为mRNA时,在mRNA转录水平上调节基因表达的一个或多个调节元件。此类转录后调节元件的实例可以包括编码微RNA结合位点、RNA结合蛋白结合位点等的序列。可以与本文披露的核酸分子和载体一起使用的转录后调节元件的实例包括土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)和肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。

[0038] 术语“内含子”是指一个或多个核酸序列(例如,在开放阅读框内的那些核酸序列),其不编码从核酸表达的多肽转录物(例如,目的蛋白)的一个或多个氨基酸。内含子序列可以从DNA转录为RNA(即,可以存在于前mRNA中),但是可以例如通过剪接在蛋白质从成熟mRNA表达之前被去除。

[0039] 术语“外显子”是指一个或多个核酸序列(例如,在开放阅读框(ORF)内的那些核酸序列),其编码从核酸表达的转录物(例如,目的蛋白)的一个或多个氨基酸。外显子序列可以从DNA转录为RNA(即,可以存在于前mRNA中),并且也可以存在于翻译成多肽的成熟mRNA(即,RNA的处理形式(例如,在剪接之后))中。

[0040] 在一些实施例中,“载体”是含有能够在宿主细胞中表达的目的核酸(例如,转基因)(例如,在适合于递送到细胞、组织和/或生物体中的较大核酸序列或结构内的目的核酸)的任何遗传元件(例如,DNA、RNA或其混合物),诸如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒粒子等。例如,载体可以包含插入物(例如,包含编码待表达的基因或该基因的开放阅读框的转基因的异源核酸)和一个或多个另外的适合于递送或控制插入物表达的元件。例如当与适当的控制元件相关时,载体可以能够复制和/或表达,并且它可以能够在细胞之间传递遗传信息。在一些实施例中,载体可以是适合于在宿主细胞中表达的载体,例如AAV载体。在一些实施例中,载体可以是适合于例如在细胞或生物反应器中表达和/或复制的质粒。在一些实施例中,专门设计用于在靶细胞中表达异源核酸序列(例如,编码目的蛋白、shRNA等的转基因)的载体可以被称为表达载体,并且通常具有驱动转基因表达的启动子序列。在其他实施例中,载体(例如,转录载体)可以能够转录但不翻译,这意味着它们可以在靶细胞中复制但不表达。转录载体可以用于扩增其插入物。

[0041] 术语“表达载体”是指包含多核苷酸的载体,该多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。单独或与宿主细胞提供的或在体外表达系统中的其他用于表达的元件组合,表达载体可以包含足够的用于表达的顺式作用元件。表达载体包括例如掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、

逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0042] 术语“质粒”是指包含完整“复制子”的非染色体(并且典型地为双链)DNA序列,使得质粒在宿主细胞中复制。质粒可以是环状核酸。当将质粒置于单细胞生物体内时,该生物体的特征由于质粒的DNA而发生改变或转变。例如,携带四环素抗性(TcR)基因的质粒将先前对四环素敏感的细胞转化为对它具有抗性的细胞。

[0043] 如本文所用的术语“重组病毒”旨在指代包含转基因或其他异源核酸的非野生型和/或人工产生的重组病毒(例如,细小病毒、腺病毒、慢病毒或腺相关病毒等)。重组病毒可以包含包装在病毒(例如:AAV)衣壳内的重组病毒载体(例如,包含转基因)。重组病毒的特定类型可以是“重组腺相关病毒”或“rAAV”。包装在病毒衣壳中的重组病毒基因组可以是病毒载体。在一些实施例中,本文披露的重组病毒包含病毒载体(例如,包含目的转基因,例如如本文所述)。病毒载体的实例包括但不限于腺相关病毒(AAV)载体、嵌合AAV载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、DNA病毒载体、单纯疱疹病毒载体、杆状病毒载体或其任何突变体或衍生物。

[0044] “AAV”是腺相关病毒的缩写,并且可以用于指代病毒本身或其衍生物。除非另有明确说明,否则该术语涵盖所有亚型以及天然存在的形式和重组的形式两者。术语“rAAV”是指重组腺相关病毒或重组AAV载体。

[0045] 如本文所用,术语“AAV载体”是指源自腺相关病毒血清型的载体或包含源自腺相关病毒血清型的一个或多个核酸序列的载体,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5病毒载体。AAV载体可以具有一个或多个整体或部分缺失的AAV野生型基因,例如rep和/或cap基因,同时保留例如功能性侧接反向末端重复(“ITR”)序列。在一些实施例中,AAV载体可以包装在例如包含一种或多种AAV衣壳蛋白的蛋白质外壳或“衣壳”中,该蛋白质外壳或“衣壳”可以提供用于将载体核酸递送到靶细胞的细胞核中的媒介物。在一些实施例中,AAV载体包含一个或多个AAV ITR序列(例如,AAV2 ITR序列)。在一些实施例中,AAV载体包含一个或多个AAV ITR序列(例如,AAV2 ITR序列),但是不含任何另外的病毒核酸序列。在一些实施例中,AAV载体组分(例如,ITR)源自与rAAV衣壳不同的血清型病毒(例如,AAV载体可以包含源自AAV2的ITR,并且AAV载体可以包装到AAV9衣壳中)。这些载体构建体的实施例提供于例如WO 2019/094253(PCT/US2018/058744)中,将其通过援引以其全文并入本文。

[0046] rAAV载体包括单链AAV载体和自互补AAV载体(scAAV)。scAAV被称为“自互补的”,因为scAAV的载体的至少一部分(例如,编码区的至少一部分)形成分子内双链DNA。在一些实施例中,rAAV是scAAV。在其他实施例中,rAAV是单链AAV。在一些实施例中,病毒载体从天然存在的腺相关病毒(AAV)工程化以提供用于基因疗法的scAAV。这些载体构建体的实施例及其制备和纯化方法提供于例如WO 2019/094253(PCT/US2018/058744)中,将其通过援引以其全文并入本文。

[0047] 如本文所用,“病毒”或“病毒粒子”指示包含病毒载体(例如,单独或与一种或多种另外的组分(诸如一种或多种病毒衣壳)组合)的病毒颗粒。例如,AAV病毒可以包含例如与AAV衣壳蛋白外壳相关的线性单链AAV核酸基因组。

[0048] 在一些实施例中,诸如“病毒”、“病毒粒子”、“AAV病毒”、“重组AAV病毒粒子”、

“rAAV病毒粒子”、“AAV载体颗粒”、“完整衣壳”、“完整颗粒”等的术语是指感染性、复制缺陷型病毒,例如包含AAV蛋白质外壳的那些病毒,该AAV蛋白质外壳包裹例如在一侧或两侧侧接AAV ITR的病毒载体中的目的异源核苷酸序列。rAAV病毒粒子可以在合适的宿主细胞中产生,该rAAV病毒粒子包含单独或与编码AAV辅助功能和附带功能(诸如rep和cap基因)的核酸组合(例如,在相同或另外的质粒上)的指定AAV载体的序列,例如一个或多个质粒。在一些实施例中,使得宿主细胞能够编码AAV多肽,其用于实现将AAV载体(含有目的重组核苷酸序列)包装到感染性重组病毒粒子颗粒中以用于后续基因递送。

[0049] “包装”是指一系列细胞内事件,其导致包裹核酸序列的AAV病毒粒子或AAV颗粒的组装。包装可以指代将核酸序列包裹到包含本文披露的AAV VP2融合多肽的衣壳中。

[0050] “感染性”病毒粒子、病毒或病毒颗粒是包含可递送到对病毒物种具有嗜性的细胞中的多核苷酸组分的病毒粒子、病毒或病毒颗粒。该术语不一定允许关于病毒的复制能力的任何结论。如本文所用,“感染性”病毒或病毒颗粒是在接近靶细胞后可以感染靶细胞并且可以在靶细胞中表达异源核酸的病毒或病毒颗粒。因此,“感染性”是指病毒颗粒接近靶细胞、感染靶细胞并在靶细胞中表达异源核酸的能力。感染性可以指代体外感染性或体内感染性。用于计数感染性病毒颗粒的测定是本领域熟知的。病毒感染性可以表示为感染性病毒颗粒与总病毒颗粒的比率。总病毒颗粒可以表示为病毒基因组拷贝数。病毒颗粒在细胞中表达异源核酸的能力可以被称为“转导”。可以使用许多技术测定病毒颗粒在细胞中表达异源核酸的能力,这些技术包括评估标记基因,诸如绿色荧光蛋白(GFP)测定(例如,其中病毒包含编码GFP的核苷酸序列),其中GFP在用病毒颗粒感染的细胞中产生并且被检测和/或测量;或测量产生的蛋白质,例如通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或荧光激活细胞分选(FACS)。

[0051] “有复制能力的”病毒粒子或病毒(例如,有复制能力的AAV)是指在受感染的细胞中(即,在存在辅助病毒或辅助病毒功能的情况下)可复制的感染性病毒。在AAV的情况下,复制能力通常需要存在功能性AAV包装基因,即cap和rep基因。在一些实施例中,如本文所述,AAV载体缺乏一个或多个AAV包装基因,并且在哺乳动物细胞(诸如在人细胞中)中是无复制能力的。在一些实施例中,AAV载体缺乏任何AAV包装基因序列,使通过AAV包装基因与进入AAV载体之间的重组产生有复制能力的AAV的可能性最小化。

[0052] 术语“反向末端重复”或“ITR”是指可以例如在腺相关病毒(AAV)和/或重组腺相关病毒载体(rAAV)中形成T形回文结构的一段核苷酸序列。Muzyczka等人,(2001)Fields Virology[费氏病毒学],第29章,Lippincott Williams&Wilkins[利平科特、威廉姆斯和威尔金斯出版社]。在重组AAV载体中,这些序列可以在基因组包装和第二链合成中发挥功能性作用。在一些实施例中,AAV载体包含被突变或截短的一个或多个ITR。

[0053] 术语“cap基因”或“衣壳基因”是指编码形成病毒的衣壳或蛋白质外壳或有助于形成病毒的衣壳或蛋白质外壳的核酸序列。在AAV的情况下,衣壳蛋白典型地是VP1、VP2和VP3。对于其他细小病毒,衣壳蛋白的名称和数目可以不同。如本文所用的术语“AAV VP1衣壳多肽”、“AAV VP2衣壳多肽”和“AAV VP3衣壳多肽”包括野生型AAV衣壳多肽及其变体和片段,特别是其功能性变体和片段。在AAV衣壳组装中可以使用功能性AAV衣壳多肽变体和片段。

[0054] 术语“rep基因”是指编码AAV复制和产生所需的非结构蛋白(rep78、rep68、rep52

和rep40)的核酸序列。

[0055] 术语“AAV辅助功能”是指可以被表达以提供AAV基因产物的AAV来源编码序列,例如以反式发挥功能以用于生产性AAV复制的那些。例如,AAV辅助功能可以包括两种主要的AAV开放阅读框(ORF),即rep和cap。已经表明Rep表达产物具有许多功能,尤其包括:AAV的DNA复制起点的识别、结合和切断;DNA解旋酶活性;和来自AAV(或其他异源)启动子的转录的调节。Cap表达产物提供必要的包装功能。在本文中AAV辅助功能可以用于以反式补充AAV载体中缺失的AAV功能。

[0056] 术语“AAV辅助构建体”通常是指包含提供或编码这样的蛋白质或核酸的核苷酸序列的核酸分子,这些蛋白质或核酸提供从AAV载体(例如,用于将目的核苷酸序列递送到靶细胞或组织中的载体)中缺失的AAV功能。AAV辅助构建体通常用于提供AAV rep和/或cap基因的瞬时表达,以补充AAV复制所缺失的AAV功能。典型地,辅助构建体缺乏AAV ITR,并且既不能自己复制也不能自己包装。AAV辅助构建体可以呈质粒、噬菌体、转座子、粘粒、病毒或病毒粒子的形式。已经披露了许多AAV辅助构建体,诸如编码Rep和Cap表达产物两者的常用质粒pAAV/Ad和p1M29+45。参见例如, Samulski等人, (1989) J. Virol. [病毒学杂志], 63: 3822-3828; McCarty等人, (1991) J. Virol. [病毒学杂志], 65: 2936-2945。已经披露了许多其他编码Rep和/或Cap表达产物的载体。参见例如, 美国专利号5,139,941和6,376,237。这些载体构建体的实施例及其制备和纯化方法提供于例如WO 2019/094253 (PCT/US 2018/058744) 中, 将其通过援引以其全文并入本文。

[0057] AAV的“辅助病毒”是指允许AAV在哺乳动物细胞中复制和包装的病毒。AAV的多种此类辅助病毒是本领域已知的, 包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒(诸如牛痘)。腺病毒涵盖许多不同的亚群, 尽管亚群C的5型腺病毒最常用作辅助病毒。

[0058] 术语“一种或多种辅助病毒功能”是指在辅助病毒基因组中编码的允许AAV在哺乳动物细胞中复制和包装的一种或多种功能。辅助病毒功能例如包括腺病毒辅助功能。此类辅助病毒功能可以以许多方式提供, 包括通过提供辅助病毒或通过AAV制造中向生产者宿主细胞提供例如编码一种或多种所需功能的核酸序列来提供。

[0059] 术语“嗜性”和“转导”是相互联系的, 但是存在差异。如本文所用的术语“嗜性”是指AAV载体或病毒粒子感染一种或多种指定的细胞类型的能力, 但是还可以涵盖载体如何发挥功能以转导一种或多种指定的细胞类型中的细胞; 即嗜性是指AAV载体或病毒粒子优先进入某一种或多种细胞或组织类型和/或优先与细胞表面相互作用, 这促进进入某些细胞或组织类型, 任选地且优选地随后在细胞中表达(例如, 转录以及任选地翻译)由AAV载体或病毒粒子携带的序列, 例如对于重组病毒, 表达一个或多个异源核苷酸序列。如本文所用, 术语“转导”是指AAV载体或病毒粒子感染一种或多种特定细胞类型的能力; 即转导是指AAV载体或病毒粒子进入细胞, 并且将AAV载体或病毒粒子内所含的遗传物质转移到细胞中以获得载体基因组的表达。在一些情况但不是所有情况下, 转导和嗜性可能相关。

[0060] 如本文所用的术语“嗜性谱”是指一种或多种靶细胞、组织和/或器官的转导模式。不同的AAV血清型展现出偏离的嗜性谱, 并且嗜性可以例如通过衣壳工程化而改变。

[0061] 术语“宿主细胞”表示包含目的外源核酸的细胞, 例如一种或多种微生物、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。例如, 宿主细胞可以包含AAV辅助构建体、AAV载体质粒、附带功能载体和/或其他转移DNA。该术语包括已经转染的原始细胞的子代。由于自然的、偶然的

或故意的突变,单个亲本细胞的子代在形态或基因组或总DNA互补方面可能不一定与原始亲本完全相同。

[0062] 如本文所用,术语“细胞系”是指能够在体外继续或延长生长和分裂的细胞群体。在某些情况下,在储存或转移此类克隆群体期间,核型可能发生自发或诱导的变化。因此,源自所提到的细胞系的细胞可能与祖先细胞或培养物不完全相同,并且所提到的细胞系包含此类变体。

[0063] 术语“转染”用于指代细胞对外来DNA的摄取,使得一旦已经将外源DNA引入细胞膜内侧,细胞就已经被“转染”。参见例如,Graham等人,(1973) Virology[病毒学],52:456; Sambrook等人,(1989) Molecular Cloning, a laboratory manual[分子克隆:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratories[冷泉港实验室],纽约;Davis等人,(1986) Basic Methods in Molecular Biology[分子生物学基本方法],Elsevier[爱思唯尔公司];Chu等人,(1981) Gene[基因],13:197。此类技术可以用于将一个或多个外源DNA部分引入合适的宿主细胞中。在一些实施例中,术语“转导”用于指代细胞对外来DNA的摄取,其中外来DNA由病毒或病毒载体提供。因此,当已经将外源DNA引入细胞膜内侧时,细胞就已经被“转导”。在一些实施例中,术语“转化”用于指代细菌细胞对外来DNA的摄取。

[0064] 如本文所用,术语“抗体”是指源自与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆的、多链或单链的或完整的免疫球蛋白,并且可以源自天然来源或来自重组来源。天然存在的“抗体”是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域(CH1、CH2和CH3)构成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域(CL)构成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。抗体可以是但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼源化抗体或嵌合抗体。抗体可以属于任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在整个本文件中,除非上下文另有指示,否则术语“抗体”或“抗体分子”还包括其任何片段及其任何衍生物。

[0065] 术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是指抗体的至少一部分,其保留与抗原表位特异性相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定/去稳定、空间分布)的能力。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv片段、scFv抗体片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、线性抗体、单结构域抗体诸如sdAb(VL或VH)、骆驼科VHH结构域、由抗体片段(诸如包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段)形成的多特异性抗体和分离的CDR或抗体的其他表位结合片段。还可以将抗原结合片段掺入单结构域抗体、大型抗体(maxibody)、微型抗体(minibody)、纳米抗体、胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如,Hollinger和Hudson, Nature Biotechnology[自然·生物技术]23:1126-1136,2005)。还可以将抗原结合片段移植到基于多肽诸如纤连蛋白III型(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白

多肽微型抗体)。术语“scFv”是指融合蛋白,其包含至少一个含有轻链可变区的抗体片段和至少一个含有重链可变区的抗体片段,其中轻链可变区和重链可变区例如经由合成接头(例如,短柔性多肽接头)连续连接并且能够表达为单链多肽,并且其中scFv保留衍生出它的完整抗体的特异性。除非有说明,否则如本文所用,scFv可以例如相对于多肽的N末端和C末端以任何顺序具有VL和VH可变区,scFv可以包含VL-接头-VH或者可以包含VH-接头-VL。

[0066] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区内的赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸序列。例如,一般来说,在每个重链可变区中存在三个CDR(例如,HCDR1、HCDR2和HCDR3),并且在每个轻链可变区中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。可以使用许多熟知的方案中的任一种确定给定CDR的精确氨基酸序列边界,这些方案包括由以下文献描述的那些方案:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列]”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health[美国国立卫生研究院,公共卫生事业部],贝塞斯达,马里兰州(“卡巴特(Kabat)”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997)JMB[微生物学与生物技术杂志]273,927-948(“乔西亚(Chothia)”编号方案),或其组合,和免疫遗传学(ImMunoGenTics,IMGT)编号(Lefranc,M.-P.,The Immunologist[免疫学家],7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学],27,55-77(2003);Lefranc等人,(2015)Nucleic Acids Res.[核酸研究]43,D413-422) (“IMGT”编号方案)。在针对给定CDR区(例如,HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3)的组合卡巴特和乔西亚编号方案中,在一些实施例中,CDR对应于定义为卡巴特CDR的一部分的氨基酸残基以及定义为乔西亚CDR的一部分的氨基酸残基。如本文所用,根据“乔西亚”编号方案定义的CDR有时也被称为“高变环”。根据IMGT,可以使用程序IMGT/DomainGap Align确定抗体的CDR区。通常,除非有特别指示,否则抗体分子可以包含一个或多个卡巴特CDR和/或乔西亚CDR的任何组合。

[0067] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白特异性结合或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(诸如氨基酸或碳水化合物或糖侧链)组成,并且可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象的”。构象表位和线性表位的区别例如在于:在存在变性溶剂的情况下,与前者(而不是后者)的结合丧失。

[0068] 如本文所用的短语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有基本上相同的氨基酸序列或源自相同的遗传来源的多肽,包括抗体、双特异性抗体等。此术语还包括具有单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物展示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0069] 如本文所用,短语“人抗体”包括具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区两者都源自人来源的序列。恒定区也源自人序列(例如,人种系序列或突变形式的人种系序列),或含有源自人框架序列分析的共有框架序列的抗体,例如如描述于Knappik等人(2000.J Mol Biol[分子生物学杂志]296,57-86)。免疫球蛋白可变结构域(例如,CDR)的结构和位置可以使用熟知的编号方案来定义,这些编号方案例如卡巴特编号方案、乔西亚编号方案或卡巴特和乔西亚的组合和免疫遗传学(IMGT)编号(参见例如,Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],U.S.Department of Health

and Human Services[美国卫生与公众服务部](1991),编辑Kabat等人;Al Lazikani等人,(1997) J.Mol.Bio.[分子生物学杂志]273:927-948;Kabat等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质序列],第5版,NIH公开号91-3242 U.S.Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部];Chothia等人,(1987) J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917;Chothia等人,(1989) Nature[自然]342:877-883;和Al-Lazikani等人,(1997) J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]273:927-948;Lefranc,M.-P.,The Immunologist[免疫学家],7,132-136(1999);Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学],27,55-77(2003);Lefranc等人,(2015) Nucleic Acids Res.[核酸研究]43,D413-422)。

[0070] 人抗体可以包含不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变或保守取代引入的突变以促进稳定性或制造)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不旨在包括源自另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经移植到人框架序列上的抗体。

[0071] 如本文所用,短语“重组抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有抗体,并且包括重组人抗体,诸如从对于人免疫球蛋白基因是转基因的或转染色体的动物(例如,小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体;从转化以表达人抗体的宿主细胞中(例如,从转染瘤中)分离的抗体;从重组、组合人抗体文库中分离的抗体;和通过任何其他的涉及将全部或部分的人免疫球蛋白基因、序列剪接到其他DNA序列的手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有可变区,其中框架区和CDR区源自人种系免疫球蛋白序列。然而,在某些实施例中,可以对此类重组人抗体进行体外诱变(或者当使用对于人Ig序列是转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是虽然源自人种系VH和VL序列且与其相关但可能在体内人抗体种系库中不天然存在的序列。

[0072] 如本文所用,术语“亲和力”是指在单个抗原位点处抗体与抗原之间的相互作用强度。在每个抗原位点内,抗体的可变区通过弱非共价力在许多位点处与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。如本文所用,针对IgG抗体或其片段(例如,Fab片段)的术语“高亲和力”是指抗体对靶抗原具有 $10^{-8}\text{M}$ 或更小、 $10^{-9}\text{M}$ 或更小、或 $10^{-10}\text{M}$ 、或 $10^{-11}\text{M}$ 或更小、或 $10^{-12}\text{M}$ 或更小、或 $10^{-13}\text{M}$ 或更小的亲和力。然而,对于其他抗体同种型,高亲和力结合可以变化。例如,对于IgM同种型的“高亲和力”结合是指抗体具有 $10^{-7}\text{M}$ 或更小或 $10^{-8}\text{M}$ 或更小的亲和力。

[0073] 如本文所用的术语“结合特异性”或“特异性结合”是指单独抗体结合位点与一种抗原决定簇而不与不同的抗原决定簇反应的能力。抗体的结合位点位于分子的Fab部分中,并且由重链和轻链的高变区构建。抗体的结合亲和力是单一抗原决定簇与抗体上的单个结合位点之间的反应强度。它是在抗原决定簇与抗体的结合位点之间运行的吸引力和排斥力的总和。

[0074] 术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中目的是减缓不希望的生理变化或障碍。出于本发明的目的,有益或所希望的临床结果包括但不限于减轻症状、降低疾病程度、疾病状态稳定(即,不恶化)、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态以及缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可以意指与不接受治疗的预期存活期相比延长存活期。

[0075] 术语任何特定疾病或障碍的“预防(prevention)”、“预防(prevent)”和“预防(preventing)”是指预防的(prophylactic)或预防性(preventive)措施,诸如在该疾病或障碍的任何症状出现之前向受试者施用本发明的化合物。

[0076] 术语“受试者”是指向其提供根据本发明的方法的治疗的动物(人或非人)。考虑了兽医应用和非兽医应用。该术语包括但不限于哺乳动物,例如人、其他灵长类动物、猪、啮齿动物(诸如小鼠和大鼠)、兔、豚鼠、仓鼠、牛、马、猫、狗、绵羊和山羊。典型的受试者包括人、农场动物和家养宠物(诸如猫和狗)。在一些优选的实施例中,受试者是人。

[0077] 术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”在本文中可互换地使用,并且是指适合于一种或多种施用途、体内递送或接触的生物学上可接受的配制品(气体、液体或固体)。“药学上可接受的”或“生理学上可接受的”组合物是并非生物学上或在其他方面不希望的材料,例如,可以在不引起实质性不希望的生物效应的情况下将材料施用于受试者。因此,这样的药物组合物可以用于例如向受试者施用如本文披露的rAAV病毒粒子。

[0078] “有效量”是指足以实现有益或所希望的结果的量。例如,治疗量是达到所希望的治疗效果的量。此量可以与预防有效量相同或不同,预防有效量是预防疾病或疾病症状的发作所需的量。有效量可以以一次或多次施用、应用或一个或多个剂量来施用。治疗性化合物的“治疗有效量”(即,有效剂量)取决于所选择的治疗性化合物。组合物可以以每天一次或多次至每周一次或多次施用;包括每隔一天一次。熟练技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时程,这些因素包括但不限于疾病或障碍的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的本文所述的治疗性化合物对受试者进行的治疗可以包括单次治疗或一系列治疗。

[0079] 如本文所用,“体外”进行的过程是指在正常生物环境之外进行的过程,例如在试管、烧瓶、培养皿、人工培养基中进行的研究。“体内”进行的过程是指在活生物体或细胞内进行的过程,例如在细胞培养物或小鼠中进行的研究。“离体”进行的研究是指在外部环境(例如,具有对自然条件的最小改变)中在来自生物体的组织中或来自生物体的组织进行的研究,例如允许在比体内实验更受控的条件下操作生物体的细胞或组织。

[0080] 如本文所用的术语“文库”是指多种(即,至少两种)不同的变体线性核酸、质粒、病毒颗粒或病毒载体等。

[0081] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料类似或等同的方法和材料可以用于实践本发明,但下文描述了合适的方法和材料。将本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过援引以其全文并入。在有冲突的情况下,以包括定义在内的本说明书为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的,而不旨在是限制性的。

[0082] 本发明的一个或多个实施例的细节陈述于附图和下文的描述中。根据说明书和附图以及根据权利要求,本发明的其他特征、目标和优点将是明显的。

[0083] AAV VP2融合多肽

[0084] 本文提供了AAV VP2融合多肽,这些AAV VP2融合多肽从N末端到C末端包含多肽配体、任选地肽接头和AAV VP2衣壳多肽。包含所述AAV VP2融合多肽并且在其表面上展示多肽配体的rAAV病毒粒子可以用于在治疗应用和基础研究应用期间的细胞类型特异性基因递送,因为它们提供了允许有效的生物分布和安全的基因转移的高细胞类型选择性和/或

高靶向特异性。

[0085] 当典型地与AAV VP1和/或VP3衣壳多肽一起用于rAAV病毒粒子组装时,AAV VP2融合多肽可以显示出良好的装饰水平,这意味着令人满意数目的AAV VP2融合多肽被掺入rAAV病毒粒子中。出乎意料地发现,通过将分子量高达10kDa的多肽配体与AAV VP2衣壳多肽进行N末端融合可以达到良好的装饰水平。包含分子量高于10kDa的N末端定位的多肽配体的AAV VP2融合多肽的装饰水平降低。包含分子量高于15kDa的N末端定位的多肽配体(诸如分子量约18kDa的darpin)的AAV VP2融合多肽显示没有或仅有极少的装饰。不希望受理论的束缚,认为由于AAV VP2衣壳多肽对于衣壳组装不是必需的,因此提供具有不利结构的AAV VP2衣壳多肽(诸如包含庞大多肽配体的AAV VP2融合多肽)可能导致AAV VP2衣壳多肽不用于衣壳组装,导致rAAV病毒粒子没有或具有非常低的AAV VP2融合多肽装饰,唯一地或主要地由AAV VP1和VP3衣壳多肽构成。

[0086] 相对于未与所述多肽配体融合但在其他方面与包含在该AAV VP2融合多肽中的VP2衣壳多肽相同的AAV VP2衣壳多肽,本文所述的AAV VP2融合多肽可以介导至少一种组织或细胞类型中改善的转导和/或增加的嗜性。至少一种组织或细胞类型中改善的转导和/或增加的嗜性可以由多肽配体介导,该多肽配体可以具有与至少一种组织或细胞类型上表达的细胞表面分子结合的能力。分子量低于10kDa的合适多肽配体包括但不限于GP2和Sso7d配体和亲和体。

[0087] 本发明部分地基于通过将高度多样的多肽配体文库(例如,高度多样的Sso7d文库)与AAV VP2衣壳多肽的N末端融合来将这些文库掺入rAAV病毒粒子中。产生这样的AAV文库,这些AAV文库包含多个rAAV病毒粒子,其包含在其衣壳中的AAV VP2融合多肽并且包含编码包封在所述衣壳内的AAV VP2融合多肽的核酸。AAV文库具有高度多样性和功能滴度,并且可以用于具有所希望的特征的AAV VP2融合多肽的体内选择。本文提供了通过体内选择富集具有特定细胞类型的高转导的AAV衣壳而获得的AAV VP2融合多肽。

[0088] 本文提供的AAV VP2融合多肽可以用于产生重组AAV载体。此类重组AAV载体适合于将异源核酸(诸如治疗性转基因)递送到靶细胞中。

[0089] 因此,在一方面,本文提供了腺相关病毒(AAV)VP2融合多肽,这些腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体。多肽配体与AAV VP2衣壳多肽的N末端直接或经由接头融合。多肽配体的分子量高达10kDa,包括高达9kDa、高达8kDa、高达6kDa或高达5kDa,例如从3至10kDa、从4至8kDa或从5至7kDa。

[0090] 在一方面,本文提供了包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体的AAV VP2融合多肽,其中多肽配体与AAV VP2衣壳多肽的N末端融合;并且其中AAV VP2衣壳多肽包含消除或减少与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)和/或唾液酸(SIA)的结合的一个或多个突变。在一些实施例中,多肽配体的分子量高达10kDa。

[0091] “AAV”是腺相关病毒的缩写,并且可以用于指代病毒本身或其衍生物。除非另有要求,否则该术语涵盖所有亚型以及天然存在的形式和重组的形式两者。术语“AAV”包括例如AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV 6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)、AAV 9型(AAV9)、AAV 10型(AAV10,包括AAVrh10)、AAV 12型(AAV12)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV和绵羊AAV。“灵长类动物AAV”是指感染灵长类动物的AAV,“非灵长类动物AAV”是指感染非灵长类

哺乳动物的AAV,“牛AAV”是指感染牛哺乳动物的AAV,以此类推。

[0092] 各种血清型AAV的基因组序列以及天然反向末端重复(ITR)、Rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。此类序列可见于文献中或在诸如GenBank的公共数据库中。参见例如,GenBank登录号NC-002077(AAV1)、AF063497(AAV1)、NC-001401(AAV2)、AF043303(AAV2)、NC-001729(AAV3)、NC-001829(AAV4)、U89790(AAV4)、NC-006152(AAV5)、AF513851(AAV7)、AF513852(AAV8)和NC-006261(AAV8);或在诸如WO 2005033321(AAV1-9)的公开中,将其披露内容通过援引并入本文。还参见例如,Srivistava等人(1983)J.Virology[病毒学杂志]45:555;Chiorini等人(1998)J.Virology[病毒学杂志]71:6823;Chiorini等人(1999)J.Virology[病毒学杂志]73:1309;Bantel-Schaal等人(1999)J.Virology[病毒学杂志]73:939;Xiao等人(1999)J.Virology[病毒学杂志]73:3994;Muramatsu等人(1996)Virology[病毒学]221:208;Shade等人,(1986)J.Virol.[病毒学杂志]58:921;Gao等人(2002)Proc.Nat.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]99:11854;Moris等人(2004)Virology[病毒学]33:375-383;国际专利公开WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244;和美国专利号6,156,303。

[0093] 在一些实施例中,所述多肽配体与至少一种组织或细胞类型上表达的细胞表面分子特异性结合。在一些实施例中,相对于不包含所述多肽配体但在其他方面与包含在AAV VP2融合多肽中的VP2衣壳多肽相同的AAV VP2衣壳多肽,所述AAV VP2融合多肽介导至少一种组织或细胞类型中增加的转导和/或增加的嗜性。

[0094] 在一些实施例中,至少一种组织或细胞类型的转导增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%。在一些实施例中,相对于不包含所述多肽配体但在其他方面与包含在AAV VP2融合多肽中的VP2衣壳多肽相同的AAV VP2衣壳多肽,AAV VP2融合多肽介导至少一种组织或细胞类型中增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或多于1000倍的转导。在一些实施例中,至少一种组织或细胞类型中的嗜性增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%。

[0095] 在一些实施例中,所述AAV VP2融合多肽介导以下细胞的增加的转导和/或增加的嗜性:全血细胞、脑细胞、肝细胞、脾细胞、肾细胞、骨骼肌细胞、心脏细胞、肺细胞或骨髓细胞、或多能祖细胞(MPP)(诸如多能造血祖细胞)、或造血干细胞(HSC)(诸如长期造血干细胞(LT-HSC))。

[0096] 在一方面,本文提供了包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体的AAV VP2融合多肽,其中多肽配体与AAV VP2衣壳多肽的N末端直接或经由接头融合,并且选自由以下组成的组:GP2多肽、Sso7d多肽和亲和体。

[0097] 如本文所用的术语“GP2多肽”是指源自45个残基的T7噬菌体基因2蛋白(GP2)的多肽支架。此多肽含有与 $\beta$ 片层相对的 $\alpha$ 螺旋,具有两个适合突变的相邻环。此支架的诱变可以产生高亲和力靶标特异性结合物。

[0098] 如本文所用的术语“Sso7d多肽”是指源自来自超嗜热古生菌硫磺矿硫化叶菌的Sso7d蛋白的多肽。由于其小尺寸(7kDa)、高热稳定性( $T_m$ 为98°C)以及不存在半胱氨酸和糖

基化位点,此蛋白质是有吸引力的结合支架。在一些实施例中,Sso7d多肽源自硫磺矿硫化叶菌 Sso7d 蛋白的电荷中和变体,特别是源自 Traxlmayr 等人 (DOI 10.1074/jbc.M116.741314) 中描述的电荷降低的 Sso7d (rcSso7d) 变体。如本文所用,Sso7d 多肽还涵盖在其全长上与野生型 Sso7d 或 Traxlmayr 等人 (DOI 10.1074/jbc.M116.741314) 中描述的 rcSso7d 变体具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的多肽。

[0099] 在一些实施例中,所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1 的 Sso7d 多肽和与其具有至少 80%、85%、90% 或 95% 序列同一性的 Sso7d 多肽。

[0100] 在一些实施例中,所述多肽配体选自任选地具有至多 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸取代的 SEQ ID NO:1 的 Sso7d 多肽。

[0101] 在一些实施例中,所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1 的 Sso7d 多肽,其中位置 21、23、25、28、30、32、40、42 和 44 处的氨基酸残基 X 独立地选自 D、R、H、N、A、I、Y 和 W;和与其具有至少 80%、85%、90% 或 95% 序列同一性的 Sso7d 多肽。

[0102] 在一些实施例中,所述多肽配体选自 SEQ ID NO:1 的 Sso7d 多肽,其中位置 21、23、25、28、30、32、40、42 和 44 处的氨基酸残基 X 独立地选自 D、R、H、N、A、I、Y、W 和氨基酸取代,并且其中 SEQ ID NO:1 任选地具有至多 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸取代。

[0103] 在一些实施例中,AAV VP2 融合多肽进一步包含位于多肽配体与 AAV VP2 衣壳多肽之间的肽接头。在一些实施例中,所述肽接头选自由以下组成的组:甘氨酸-丝氨酸 (GS) 接头和丙氨酸-脯氨酸-丝氨酸 (APS) 接头。GS 接头可以例如具有式 [GGGS]<sub>n</sub>,其中 n 是在 1 至 10 范围内的整数,例如其中 n 是 1、2、3、4、5 或 6,特别地其中 n 是 1、2、3 或 4。APS 接头可以例如具有式 [APS]<sub>n</sub>,其中 n 是在 1 至 10 范围内的整数,例如其中 n 是 1、2、3、4、5 或 6,特别地其中 n 是 2、3、4 或 5。

[0104] 在一些实施例中,包含在 AAV VP2 融合多肽中的 AAV VP2 衣壳多肽具有选自由以下组成的组的 AAV 血清型:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛 AAV 或 禽 AAV.5。在具体实施例中,包含在 AAV VP2 融合多肽中的 AAV VP2 衣壳多肽具有选自由以下组成的组的 AAV 血清型:AAV1、AAV6、AAV8 和 AAV9。

[0105] 在一些实施例中,包含在 AAV VP2 融合多肽中的 AAV VP2 衣壳多肽在包含 AAV VP2 衣壳多肽的 AAV 病毒粒子的靶细胞上存在的其天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变。如本文所用,术语“天然受体”是指例如硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG),已经表明其是血清型 2 的 AAV 的主要细胞受体;是指含有 N 连接的唾液酸的聚糖,已经表明其是血清型 1、5 和 6 的 AAV 的主要细胞受体;是指含有 O 连接的唾液酸的聚糖,已经表明其是血清型 4 和 9 的 AAV 的主要细胞受体;是指  $\alpha$ v $\beta$ 5 整合素、 $\alpha$ 5 $\beta$ 1 整合素、CD9 和肝细胞生长因子受体,其充当血清型 2 的 AAV 的次级受体或更确切地辅助受体;是指碱性成纤维细胞生长因子受体和 37/67kDa 层粘连蛋白受体 (LamR),其充当血清型 2、3、8 和 9 的 AAV 的次级受体或更确切地辅助受体;和/或是指血小板源性生长因子受体 (PDGFR),其充当血清型 AAV-5 的次级受体或更确切地辅助受体。在一些实施例中,AAV VP2 衣壳多肽的天然受体的至少一个必需结合位点被突变。在一些实施例中,AAV VP2 衣壳多肽的天然受体的所述至少一个结合位点位于 AAV VP2 衣壳多肽的 VP3 区内,即在 VP1、VP2 与 VP3 衣壳多肽之间共享的区域内。编码 VP1 和 VP2 蛋白的

区域代表编码VP3蛋白的区域的N末端延伸。因此,编码VP1、VP2和VP3的区域的阅读框是重叠的,使得VP3区中的突变存在于所有三种衣壳蛋白中。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV6,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV6,并且包含以下氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的i) K531E和V473D; ii) K531E、K459S、V473D和N500E; iii) G266A和N269Q; iv) G266A、N269Q和D590A; v) K531E、V473D、G266A和N269Q;或vi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A。

[0106] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV8,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV8,并且包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的i) G268E和N271Q; ii) S387A; iii) G268E、N271Q和S387A; iv) A592Q;或v) A592D。

[0107] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV9,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV9,并且包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的i) W503A; ii) N562A和E563A; iii) Q590A和W503A;或iv) Q590A、W503A、N562A和E563A。

[0108] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV2,并且在其VP3区内包含相对于SEQ ID NO:6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A。

[0109] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的i) V473D和N500E; ii) R514A;或iii) V473D、N500E和R514A。

[0110] 在一些实施例中,包含在AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽包含相对于其相应的野生型AAV VP2衣壳多肽的至少一个氨基酸取代。诸位发明人已经证明AAV VP2衣壳多肽中的某些氨基酸取代可以导致改善的受体结合,例如包含突变的AAV VP2衣壳多肽的AAV VP2融合多肽与包含在AAV VP2融合多肽中的配体的受体的改善的结合。AAV VP2衣壳多肽中的氨基酸取代也可以导致改善的转导。不希望受理论的束缚,假设由诸位发明人鉴定为改善受体结合和/或转导的氨基酸取代导致存在于AAV病毒粒子中的VP2 N末端的较高部分面向病毒颗粒的外部。在自然条件下,存在于AAV病毒粒子中的大部分VP2 N末端面向AAV衣壳的内部,从而限制具有与VP2 N末端融合的配体的AAV病毒粒子的装饰水平。通过增加存在于AAV病毒中的VP2 N末端面向病毒颗粒的外部的部分(即,通过增加AAV病毒粒子的VP2暴露)增加与VP2 N末端融合的配体的装饰水平,这可以导致改善的受体结合和转导水平。

[0111] 因此,在一些实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合。在特定的此类实施例中,AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,特别地,AAV VP2融合

多肽包含以下所有三个氨基酸取代:D213A、T162R和P191N。

[0112] 在一些实施例中,AAV血清型AAV1的AAV VP2融合多肽进一步包含相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的氨基酸取代V473D和N500E。

[0113] 在其他实施例中,AAV VP2融合多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N。在特定的此类实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型8,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合。特别地,AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D214A、K163R和/或P192N,特别是以下所有三个氨基酸取代:D214A、K163R和P192N。

[0114] 在其他此类实施例中,AAV VP2融合多肽具有AAV血清型9,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合。在特定的此类实施例中,AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、S162R和/或P191N,特别是以下所有三个氨基酸取代:D213A、S162R和P191N。

[0115] 在一些实施例中,编码AAV VP2融合多肽的核酸不包含AAV VP2衣壳多肽的天然起始密码子。AAV VP2衣壳多肽的天然起始密码子可以被突变(例如,缺失),以通过抑制VP2开放阅读框的转录来避免天然VP2多肽的表达。优选地,突变不改变阅读框。在一些实施例中,包含在AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽缺失其第一个天然氨基酸,例如对应的野生型AAV VP2衣壳多肽的第一个苏氨酸。

[0116] 在一些实施例中,包含在AAV VP2融合多肽中的多肽配体包含至多3个半胱氨酸残基、至多2个半胱氨酸残基、至多1个半胱氨酸残基,或不包含半胱氨酸残基。

[0117] 编码AAV VP2融合多肽的核酸和AAV货物核酸序列

[0118] 在一方面,本文提供了编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸。编码AAV VP2融合多肽的核酸可以是RNA,诸如mRNA;或DNA,诸如cDNA、线性DNA或环状DNA(例如,质粒DNA)。

[0119] 本文还提供了可以被包含本文所述的AAV VP2融合多肽的AAV衣壳包封的核酸和包含此类核酸的rAAV病毒粒子。这些核酸在本文中被称作“AAV基因组”、“AAV载体基因组”、“AAV载体”、“AAV载体核酸”、“AAV货物”或“货物质粒”,这些术语在本文中可互换地使用。此类AAV货物或AAV载体基因组典型地包含两个AAV反向末端重复序列。AAV货物可以编码本文所述的AAV VP2融合多肽和/或可以包含报告序列和/或条形码序列,或者AAV货物可以编码治疗性RNA或蛋白质(包括治疗性抗体或其片段)。

[0120] AAV载体基因组可以是单链的或自互补的。“自互补AAV”或“scAAV”是指这样的构建体,其中由重组AAV核酸序列携带的编码区已经被设计为形成分子内双链DNA模板。不受理论的束缚,在感染时,未等待细胞介导的第二条链合成,而是两条互补的半scAAV可以缔合以形成易于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[自互补重组腺相关病毒(scAAV)载体独立于DNA合成促进有效转导]”,Gene Therapy[基因疗法],(2001年8月),第8

卷,第16期,第1248-1254页(通过援引以其全文并入)。自互补AAV描述于例如以下美国专利号中:6,596,535;7,125,717;和7,456,683,将其中的每一个通过援引以其全文并入本文。例如,5' ITR可以被突变,例如通过缺失末端解析位点以允许基因组的发夹形成。

[0121] 在一些实施例中,本文披露的rAAV载体缺乏一个或多个(例如,所有)AAV rep和/或cap基因。AAV载体可以(例如,在其ITR中)包含来自任何合适的AAV血清型的核酸序列(例如,DNA)。合适的AAV血清型包括但不限于AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5。例如,AAV载体(例如,scAAV载体)可以包含来自AAV-2的核酸序列,例如来自AAV-2的ITR序列。AAV载体(例如,scAAV载体)还可以包含来自多于一种血清型的核酸。AAV血清型的基因组的核苷酸序列是本领域已知的。例如,AAV-1的完整基因组在GenBank登录号NC\_002077中提供;AAV-2的完整基因组在GenBank登录号NC\_001401和Srivastava等人,Viol. [病毒学],45:555-564(1983)中提供;AAV-3的完整基因组在GenBank登录号NC\_1829中提供;AAV-4的完整基因组在GenBank登录号NC\_001829中提供;AAV-5基因组在GenBank登录号AF085716中提供;AAV-6的完整基因组在GenBank登录号NC\_001862中提供;至少部分AAV-7和AAV-8基因组分别在GenBank登录号AX753246和AX753249中提供;AAV-9基因组在Gao等人,J.Viol. [病毒学杂志],78:6381-6388(2004)中提供;AAV-10基因组在Williams,(2006)Mol. Ther. [分子疗法]13(1):67-76中提供;并且AAV-11基因组在Mori等人,(2004)Virology [病毒学],330(2):375-383中提供。

[0122] 在一些实施例中,功能性反向末端重复(ITR)序列可以用于支持例如AAV病毒粒子的拯救、复制和包装。因此,本文披露的AAV载体可以包含用于实现病毒的复制和包装的呈顺式的序列(例如,功能性ITR)。ITR可以但无需是野生型核苷酸序列,并且可以改变,例如通过核苷酸的插入、缺失或取代,只要序列实现功能性拯救、复制和包装即可。ITR可以来自可以衍生出重组病毒的任何AAV血清型,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5。

[0123] 在一些实施例中,本文披露的rAAV载体包含一个或多个ITR(例如,两个ITR,其中一个在异源核酸(例如,编码本文所述的AAV VP2融合多肽和/或报告蛋白或治疗性RNA或蛋白质)的上游并且另一个在其下游)和/或上文讨论的其他核酸元件。在一些实施例中,本文披露的核酸(例如,在scAAV载体中)包含布置在其他载体元件的5'的第一ITR和布置在其他载体元件的3'的第二ITR,其中ITR独立地是在其他元件的5'和/或3'的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、50、100、150、200、250个核苷酸。ITR序列可以是野生型的,或者它可以包含一个或多个突变,例如,只要它保留野生型ITR的一种或多种功能即可。在一些实施例中,野生型ITR可以被修饰以包含末端解析位点的缺失。在一些实施例中,如本文披露的scAAV可以包含两个ITR序列,其中两者都独立地是野生型、变体或经修饰的AAV ITR序列。在一些实施例中,至少一个ITR序列是野生型、变体或经修饰的AAV ITR序列。在一些实施例中,这两个ITR序列都是野生型、变体或经修饰的AAV ITR序列。在一些实施例中,“左”或5'-ITR是经修饰的AAV ITR序列,其允许自互补基因组的产生,并且“右”或3'-ITR是野生型AAV ITR序列。在一些实施例中,“右”或3'-ITR是经修饰的AAV ITR序列,其允许自互补基因组的产生,并且“左”或5'-ITR是野生型AAV ITR序列。在一些实施例中,两

个ITR都是AAV2ITR(任选地,其中一个野生型的,并且另一个被修饰以去除末端解析位点,或者两者都是野生型的)。WO/2019/094253(PCT/US 2018/058744)(将其通过援引以其全文并入本文)中提供的AAV ITR的实施例也可以用于本文披露的任何AAV ITR。

[0124] 可以通过从头合成(例如,固相DNA合成)或通过使用现有序列作为模板的PCR来产生多核苷酸序列。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,这些方法诸如Narang等人,1979,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:90的磷酸三酯方法;Brown等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:109,1979的磷酸二酯方法;Beaucage等人,Tetra.Lett.[四面体快报],22:1859,1981的二乙基亚磷酰胺方法;和美国专利号4,458,066的固相支持方法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如例如以下文献中所述进行:PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification[PCR技术:用于DNA扩增的原理和应用],H.A.Erlich(编辑),Freeman Press[弗里曼出版社],纽约,纽约州,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications[PCR方案:方法和应用指南],Innis等人(编辑),Academic Press[学术出版社],圣地亚哥,加利福尼亚州,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]19:967,1991;和Eckert等人,PCR Methods and Applications[PCR方法和应用]1:17,1991。

[0125] 本文还提供了载体(例如,表达载体),这些载体包含编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸和/或包含报告序列和/或包含条形码序列或者包含编码治疗性RNA或蛋白质(包括治疗性抗体或其片段)的核酸。此类载体可以用于在例如体外、离体或体内的细胞中,例如在生物体的一种或多种目的组织中表达和/或产生目的RNA或蛋白质(诸如AAV VP2融合多肽)。各种表达载体可以用于表达目的RNA或蛋白质(诸如本文所述的AAV VP2融合多肽)。基于病毒的表达载体和非病毒表达载体两者都可以用于在细胞(例如,哺乳动物细胞)中产生目的RNA或蛋白质。非病毒载体和系统包括质粒、附加型载体(典型地具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)和人类人工染色体(参见例如,Harrington等人,Nat Genet.[自然·遗传学]15:345,1997)。可以使用本领域已知的转染或转导方法(例如,使用脂质(例如,lipofectamine)、电穿孔、机械细胞膜变形等)将此类非病毒载体递送到目的细胞中。术语“表达载体”是指载体核酸分子,其中可以插入所希望的编码序列以引入可以表达它的细胞中。载体可以是DNA载体、RNA载体、质粒、粘粒、或病毒载体、或人工染色体(参见例如,Harrington等人,Nat Genet[自然·遗传学]15:345,1997)。例如,可用于在哺乳动物(例如,人)细胞中表达目的RNA和蛋白质(诸如本文所述的AAV VP2融合多肽)的非病毒载体包括pThioHis A、B和C;pcDNA3.1/His;pEBVHis A、B和C(英杰公司(Invitrogen),加利福尼亚州圣地亚哥);MPSV载体;和本领域已知的用于表达蛋白质的许多其他载体。例如,一类载体利用源自动物病毒的DNA元件,这些动物病毒例如像牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录酶病毒(劳斯肉瘤病毒、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一类载体利用源自RNA病毒的RNA元件,这些RNA病毒诸如塞姆利基森林病毒、东部马脑炎病毒和黄病毒。有用的病毒载体包括基于以下病毒中的任一种的载体:逆转录酶病毒(例如,慢病毒)、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒(HSV))、基于SV40的载体、乳头状瘤病毒、HBP EB病毒、牛痘病毒、辛德毕斯病毒、流感病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒(NDV)、麻疹病毒、水疱性口炎病毒(VSV)、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、塞内卡谷病毒(Seneca Valley virus)、柯萨奇病毒、肠病毒、粘液瘤病毒、马拉巴病毒(maraba virus)或塞姆利基

森林病毒(SFV)。参见,Brent等人,同上;Smith,Annu.Rev.Microbiol.[微生物学年度评论] 49:807,1995;和Rosenfeld等人,Cell[细胞]68:143,1992。在一些实施例中,载体是腺相关病毒(AAV)载体,例如重组AAV(rAAV)载体。

[0126] 在一些实施例中,载体可以是重组DNA分子,其包含编码如本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸和/或包含报告序列和/或包含条形码序列或者包含编码治疗性RNA或蛋白质(包括治疗性抗体或其片段)的核酸。如本文所用的“重组”意指载体、多核苷酸、多肽或细胞是克隆、限制或连接步骤(例如,涉及其中包含的多核苷酸或多肽)和/或产生与自然界中发现的产物不同的构建体的其他程序的各种组合的产物。重组病毒或载体是包含重组多核苷酸的病毒颗粒。该术语分别包括原始多核苷酸构建体的复制和原始病毒构建体的子代。

[0127] 重组载体典型地包含与待表达的核酸序列可操作地连接的一个或多个调节序列。术语“调节序列”包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。本领域技术人员容易地认识到,靶细胞中载体的一种或多种组分的表达可能需要调节序列。调节序列包括指导核苷酸序列的组成型表达的那些序列以及组织特异性调节和/或诱导序列。表达载体还可以包含被设计为优化信使RNA在宿主细胞中的稳定性和翻译性的元件和/或用于建立表达如本文所述的AAV VP2融合多肽的永久稳定的细胞克隆的药物选择标记。表达载体的设计可以取决于诸如以下的因素:待转化的宿主细胞的选择、所希望的蛋白质的表达水平等。用于产生此类重组表达载体的通用方法可见于以下文献中: Sambrook和Russell编辑(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版;系列Ausubel等人编辑(2007年更新至2010年)Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验指南];以及本领域已知的其他方法。

[0128] 编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。众所周知,起始密码子必须与所希望的编码序列的阅读框“同框(in-frame)”以确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含合适的转录增强子元件可以提高表达效率。

[0129] 表达可以采用本领域已知的任何适当的宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。原核和真核表达系统两者都是广泛可用的。在一些实施例中,表达系统是哺乳动物细胞表达(诸如HEK293表达)系统。在一些实施例中,可以对核酸进行密码子优化以促进在所希望的宿主细胞中的表达。将重要的是采用这样的启动子和/或增强子,其有效指导DNA区段在选择用于表达的细胞类型、细胞器和生物体中的表达。分子生物学领域的技术人员通常知道使用启动子、增强子和细胞类型组合用于蛋白质表达,例如,参见Sambrook等人(2001)。

[0130] 真核RNA分子可以经历RNA剪接以从初级转录物中去除内含子。含有基因组真核序列的载体可能需要供体和/或受体剪接位点以确保用于蛋白质表达的转录物的正确处理(参见Chandler等人,1997,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],94(8):3596-601)。

[0131] 本披露的载体或构建体通常将包含至少一个终止信号。“终止信号”或“终止子”由参与通过RNA聚合酶来特异性终止RNA转录物的DNA序列构成。因此,在某些实施例中,考虑了终止RNA转录物产生的终止信号。在体内可能需要终止子以达到所希望的信息水平。在真

核系统中,终止子区还可以包含特定的DNA序列,其允许新转录物的位点特异性切割,以便暴露多腺苷酸化位点。这表示专门的内源聚合酶在转录物的3'端添加一段约200A残基(聚A)。用此聚A尾修饰的RNA分子似乎更稳定并且更有效地翻译。因此,在涉及真核生物的其他实施例中,优选的是终止子包含用于切割RNA的信号,并且更优选的是终止子信号促进mRNA的多腺苷酸化。终止子和/或多腺苷酸化位点元件可以用于提高mRNA水平和/或使从盒到其他序列的连读最小化。考虑用于本披露的终止子包括本文所述或本领域普通技术人员已知的任何已知的转录终止子,包括但不限于例如基因的终止序列(例如像牛生长激素终止子)或病毒终止序列(例如像SV40终止子)。在某些实施例中,终止信号可以是缺乏可转录或可翻译的序列,诸如由于序列截短。

[0132] 在表达、特别是真核表达中,典型地将包括多腺苷酸化信号以实现转录物的正确多腺苷酸化。不认为多腺苷酸化信号的性质对于本披露的成功实践是至关重要的,和/或可以采用任何这样的序列。优选的实施例包括方便和/或已知在各种靶细胞中良好地发挥功能的SV40多腺苷酸化信号和/或牛生长激素多腺苷酸化信号。多腺苷酸化可以增加转录物的稳定性或可以促进细胞质转运。

[0133] 为了在宿主细胞中繁殖载体,它可以含有一个或多个复制位点起点(通常称为“ori”),其是复制启动的特定核酸序列。可替代地,如果宿主细胞是酵母,则可以采用自主复制序列(ARS)。

[0134] 在本披露的某些实施例中,可以通过在表达载体中包含标记来在体外或在体内鉴定含有本披露的核酸构建体的细胞。此类标记将赋予细胞可鉴定的变化,允许容易地鉴定含有表达载体的细胞。通常,可选择标记是赋予允许选择的属性的标记。阳性可选择标记是标记的存在允许其选择的标记,而阴性可选择标记是其存在阻止其选择的标记。阳性可选择标记的实例是药物抗性标记。

[0135] 通常,包含药物选择标记有助于克隆和鉴定转化体,例如,赋予对卡那霉素、新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、吉欧霉素和组氨酸的抗性的基因是有用的可选择标记。除了赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标记之外,还考虑了其他类型的标记,包括可筛选的标记(诸如GFP),其是基于比色分析。可替代地,可以利用可筛选的酶,诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还将知道可能结合FACS分析如何采用免疫标记。所使用的标记不被认为是重要的,只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。可选择和可筛选的标记的另外的实例是本领域技术人员熟知的。

[0136] 表达载体的选择取决于待表达载体的一种或多种组分的预期细胞。典型地,载体含有一个或多个调节序列,诸如启动子和其他调节序列(例如,增强子),这些调节序列与AAV VP2融合多肽开放阅读框可操作地连接。

[0137] “启动子”是作为核酸序列的区域的控制序列,在该区域处控制转录的起始和速率。它可以含有遗传元件,在这些元件上调节蛋白和分子可以结合诸如RNA聚合酶和其他转录因子。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“受控制”和“受转录控制”意指启动子处于与核酸序列相关的正确功能位置和/或方向以控制该序列的转录起始和/或表达。可以将启动子与“增强子”结合或不结合使用,“增强子”是指参与核酸序列转录激活的顺式作用调节序列。

[0138] 启动子可以是与基因或序列天然相关的启动子,如可以通过分离位于编码区段和/或外显子的上游的5'非编码序列而获得。这样的启动子可以被称为“内源的”。类似地,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于该序列的下游或上游。可替代地,通过将编码核酸区段定位在重组或异源启动子的控制下将获得某些优点,重组或异源启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子也指代在其天然环境中通常不与核酸序列相关的增强子。此类启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子、和从任何其他原核、病毒或真核细胞中分离的启动子或增强子、和不“天然存在”的启动子或增强子(即,含有不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变)。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列之外,可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术(例如,PCR)结合本文披露的组合物产生序列(参见US 4683202、US 5928906)。此外,考虑也可以采用指导序列在非核细胞器(诸如线粒体、叶绿体等)内的转录和/或表达的控制序列。

[0139] 所采用的启动子可以是组成型的、诱导型的、合成的、组织或细胞特异性的,和/或在适当的条件下可用于指导所引入的DNA区段的高水平表达,诸如有利于大规模产生重组蛋白和/或肽。此外,还可以掺入其他调节元件以改善编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸的表达,例如增强子、核糖体结合位点、转录终止序列等。

[0140] 在一些实施例中,采用组成型启动子来提供本文所述的AAV VP2融合多肽或报告序列或由包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的核酸编码的治疗性RNA或蛋白质的恒定表达。组成型启动子的实例包括但不限于即刻早期巨细胞病毒(CMV)启动子、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EB病毒即刻早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子和人基因启动子(诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子)。

[0141] 在一些实施例中,采用遍在启动子。遍在启动子的非限制性实例包括CMV、CBA(包括衍生物CAG、CBh等)、EF-1a、PGK、UBC、GUSB(hGBp)和UCOE(HNRPA2B1-CBX3的启动子)。

[0142] 在一些实施例中,采用诱导型启动子来防止插入的序列在诱导条件之外的条件下表达。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够当需要它可操作地连接的多核苷酸序列的表达时启动这种表达,或者当不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于例如阿拉伯糖启动子、lacZ启动子、四环素启动子、金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子或热激启动子。

[0143] 在一些实施例中,采用组织或细胞特异性启动子来提供本文所述的AAV VP2融合多肽或报告蛋白、由本文所述的rAAV病毒粒子所包含的核酸编码的治疗性RNA或蛋白质仅在特定组织或细胞中的表达。组织或细胞特异性启动子或元件的特性以及表征其活性的测定是本领域技术人员熟知的。实例包括人LIMK2基因(Nomoto等人1999, Gene[基因], 236(2):259-271)、生长抑素受体2基因(Kraus等人,1998, FEES Lett.[FEES快报], 428(3):165-170)、鼠附睾视黄酸结合基因(Lareyre等人,1999, J.Biol.Chem.[生物化学杂志], 274(12):8282-8290)、人CD4(Zhao-Emonet等人,1998, Biochim.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学报], 1442(2-3):109-119)、小鼠 $\alpha 2$ (XI)胶原(Tsumaki等人,1998, J.Biol.Chem.[生物化学杂志], 273(36):22861-22864)、D1A多巴胺受体基因(Lee等人,1997, J.Auton.Nerv.Syst.[自主神经系统杂志], 74(2-3):86-90)、胰岛素样生长因子II(Wu等

人,1997,Biochem.Biophys.Res.Comm.[生物化学与生物物理研究通讯],233(1):221-226)、人血小板内皮细胞粘附分子-1(Almendo等人,1996,J.Immunol.[免疫学杂志],157(12):5411-5421)、肌肉肌酸激酶(MCK)启动子(Wang等人,Gene Ther.[基因疗法]2008年11月;15(22):1489-99)。

[0144] 在一些实施例中,采用非细胞特异性的启动子。在一些实施例中,采用强启动子或弱启动子(根据其对RNA聚合酶和/或 $\sigma$ 因子的亲和力和其他启动子对RNA聚合酶和/或 $\sigma$ 因子的亲和力分类)。

[0145] 在一些实施例中,采用合成启动子来提供本文所述的AAV VP2融合多肽或由本文所述的rAAV病毒粒子所包含的核酸编码的治疗性RNA或蛋白质的表达。合成启动子可以大大超过天然启动子的转录效力。例如,可以选择不被内源细胞机器或因子关闭或降低活性的合成启动子。可以将其他元件(包括反式作用因子结合位点和增强子)插入合成启动子中以改善转录效率。合成启动子可以被合理设计和化学合成,以结合合成启动子和生物启动子两者的最佳特征。使合成的寡核苷酸退火并通过若干过程连接以产生全长化学合成的启动子。合成启动子可以是诱导型或细胞类型特异性启动子。

[0146] 在一些实施例中,与AAV VP2融合多肽ORF、或编码治疗性核酸或蛋白质的核酸序列、或报告序列可操作地连接的启动子选自173CMV启动子、HCMV启动子、CBh启动子、CAG启动子和mCCT启动子。

[0147] 本领域技术人员容易地认识到,特异性启动子尤其适合于在靶细胞中表达如本文所述的AAV VP2融合多肽、报告序列或治疗性RNA或蛋白质,包括但不限于物种特异性的、诱导型的、组织特异性的或细胞周期特异性的启动子(Parr等人,Nat.Med.[自然·医学]3:1145-9(1997);将其内容通过援引以其全文并入本文)。

[0148] 在一些实施例中,与本文所述的AAV VP2融合多肽、报告序列或由包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的核酸编码的治疗性RNA或蛋白质可操作地连接的启动子小于1kb。启动子的长度可以为200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或多于800bp。启动子的长度可以在200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800bp之间。

[0149] 在一个实施例中,与本文所述的AAV VP2融合多肽、报告序列或由包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的核酸编码的治疗性RNA或蛋白质可操作地连接的启动子可以是相同或不同启动子(诸如但不限于CMV和CBA)的两个或更多个组分、区域或序列的组合。每种组分的长度可以为200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或多于800bp。每种组分的长度可以在200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-

700、500-800、600-700、600-800或700-800bp之间。

[0150] 在一些实施例中,与本文所述的AAV VP2融合多肽、报告序列或由包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的核酸编码的治疗性RNA或蛋白质可操作地连接的启动子是CMV增强子序列(例如,即刻/早期CMV增强子序列(例如,382个核苷酸的CMV增强子序列))和鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子序列(例如,260个核苷酸的CBA启动子序列)的组合。

[0151] 除了启动子之外,本文所述的AAV VP2融合多肽或报告蛋白、由包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的核酸编码的治疗性RNA或治疗性蛋白的有效表达还可能需要或期望其他调节元件。这些元件包括ATG起始密码子和相邻核糖体结合位点或其他序列。此外,通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子可以提高表达效率(参见例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.[细胞分化中的结果和问题]20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0152] 在一些实施例中,本文提供的AAV载体包含内含子,任选地布置在启动子元件与待表达的多核苷酸之间。不受理论的束缚,包含5'内含子可以提高表达的mRNA的水平和稳态。内含子的非限制性实例包括SV40来源内含子、CBA-MVM来源内含子、MVM(67-97bp)、FIX截短的内含子1(300bp)、 $\beta$ -珠蛋白SD/免疫球蛋白重链剪接受体(250bp)、腺病毒剪接供体/免疫球蛋白剪接受体(500bp)、SV40晚期剪接供体/剪接受体(19S/16S)(180bp)和杂合腺病毒剪接供体/IgG剪接受体(230bp)。

[0153] 在一个实施例中,内含子或内含子部分的长度可以是100-500个核苷酸。内含子的长度可以为80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500。内含子的长度可以在80-100、80-120、80-140、80-160、80-180、80-200、80-250、80-300、80-350、80-400、80-450、80-500、200-300、200-400、200-500、300-400、300-500或400-500个核苷酸之间。

[0154] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置以与待表达的蛋白质形成融合蛋白。更经常地,编码待表达的蛋白质的插入的序列在包含在载体中之前与信号序列连接。

[0155] 表达载体的产生可以利用包含多克隆位点(MCS)的载体,多克隆位点是含有多个限制酶位点的核酸区域,可以将其中的任一个与标准重组技术结合使用以消化载体。参见Carbonelli等人,1999;Levenson等人,1998;和Coccea,1997。“限制酶消化”是指用仅在核酸分子中的特定位置发挥功能的酶催化切割核酸分子。许多这些限制酶是可商购的。本领域技术人员广泛理解此类酶的用途。通常,使用在MCS内切割的限制酶使载体线性化或片段化,以使得外源序列能够与载体连接。“连接”是指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程,这两个核酸片段可以彼此邻接或可以彼此不邻接。涉及限制酶和连接反应的技术是重组技术领域技术人员熟知的。

[0156] 在一些实施例中,编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸进一步包含调节序列。在一些实施例中,编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸进一步包含启动子。在一些实施例中,编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸包含有效驱动靶细胞中的表达的调节序列、特别是启动子。

[0157] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽的开放阅读框与所述启动子可操作地连接。在

一些实施例中,启动子选自HCMV启动子、173CMV启动子、CAG启动子、CBh启动子和mCCT启动子。在一些实施例中,核酸进一步包含多腺苷酸化信号,其可以例如选自BGH或SV40多腺苷酸化信号。在一个实施例中,核酸包含SEQ ID NO:8的序列。

[0158] 在一些实施例中,编码AAV VP2融合多肽的核酸进一步包含报告序列。在一些实施例中,报告序列与启动子(例如,第二启动子)可操作地连接。在一些实施例中,报告序列编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白。许多报告蛋白是本领域已知的,并且包括绿色荧光蛋白(GFP)、绿色荧光蛋白的变体(GFP10)、增强型GFP(eGFP)、TurboGFP、GFPS66T、TagGFP2、mUKGEmerald GFP、Superfolder GFP、GFPuv、不稳定EGFP(dEGFP)、Azami Green、mWasabi、Clover、mClover3、mNeonGreen、NowGFP、Sapphire、T-Sapphire、mAmetrine、光激活GFP(PA-GFP)、Kaede、Kikume、mKikGR、tdEos、Dendra2、mEosFP2、Dronpa、蓝色荧光蛋白(BFP)、eBFP2、azunte BFP、mTagBFP、mKalamal、mTagBFP2、shBFP、青色荧光蛋白(CFP)、eCFP、Cerulean CFP、SCFP3A、不稳定ECFP(dECFP)、CyPet、mTurquoise、mTurquoise2、mTFPI、光开关CFP2(PS-CFP2)、TagCFP、mTFPI、mMidonishi-Cyan、aquamane、mKeima、mBeRFP、LSS-mKate2、LSS-mKate1、LSS-mOrange、CyOFP 1、Sandercyanin、红色荧光蛋白(RFP)、eRFP、mRaspberry、mRuby、mApple、mCardinal、mStable、mMaroon1、mGarnet2、tdTomato、mTangerine、mStrawberry、TagRFP、TagRFP667、TagRFP675、mKate2、HcRed、t-HcRed、HcRed-Tandem、mPlum、mNeptune、NirFP、Kindling、远红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白(YFP)、eYFP、不稳定EYFP(dEYFP)、TagYFP、Topaz、Venus、SYFP2、mCherry、PA-mCherry、sfCherry、sfCherry2、Citrine、mCitrine、Ypet、IANRFP-AS83、mPapaya1、mCyRFPI、mHoneydew、mBanana、mOrange、Kusabira Orange、Kusabira Orange 2、mKusabira Orange、mOrange 2、mKOv、mKO2、mGrapel、mGrape2、zsYellow、eqFP611、Sirius、Sandercyanin、shBFP-N168S/L1731、近红外蛋白、iFP1.4、iRFP713、iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP720、iFP2.0、mIFP、TDsmURFP、miRFP670、Brilliant Violet (BV) 421、BV 605、BV 510、BV 711、BV786、PerCP、PerCP/Cy5.5、DsRed、DsRed2、mRFPI、pocilloporin、Renilla GFP、Monster GFP、paGFP或Phycobihprotein或其任一种的生物活性变体或片段。报告蛋白可以例如选自以下组成的组:EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶(nanoluciferase),特别地选自EGFP和sfCherry2。

[0159] 在一些实施例中,载体(例如,表达载体)是腺相关载体(AAV)。在一些实施例中,AAV载体包含编码本文所述的AAV VP2融合多肽的开放阅读框,其在一侧或两侧侧接反向末端重复(ITR)序列。核酸可以另外地包含一个或多个另外的元件,例如像启动子、增强子、一个或多个内含子序列、聚(A)序列、填充序列(例如,HPRT内含子来源填充序列)及其组合。在一些实施例中,载体包含编码如本文所述的AAV VP2融合多肽的多核苷酸AAV载体,其包封在AAV衣壳中。

[0160] 在一些实施例中,载体包含编码本文所述的AAV VP2融合多肽的开放阅读框,其与至少一个靶细胞相容性调节序列(例如,启动子)可操作地连接。在一些实施例中,启动子选自173CMV启动子、HCMV启动子、CBh启动子、CAG启动子和mCCT启动子。

[0161] 在一些实施例中,AAV载体中的ITR源自相同的AAV血清型。在一些实施例中,AAV载体中的ITR源自不同的AAV血清型。在一些实施例中,ITR是相同的。在一些实施例中,ITR是

不同的。

[0162] 在一些实施例中, AAV载体中的ITR源自与AAV衣壳相同的AAV血清型。在一些实施例中, AAV载体中的ITR源自不同于AAV衣壳的血清型的血清型。在一些实施例中, ITR源自AAV2, 并且AAV衣壳源自除AAV2之外的血清型, 例如AAV9。

[0163] 在一些实施例中, 编码AAV VP2融合多肽的核酸包含位于AAV VP2融合多肽开放阅读框的上游和下游的两个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。在一些实施例中, 这两个ITR序列位于核酸分子的5' 末端和3' 末端。在一些实施例中, 核酸进一步包含报告序列。报告序列可以例如编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白。例如, 报告蛋白可以选自由以下组成的组: EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶, 特别地选自EGFP和sfCherry2。在一些实施例中, 报告序列与第二启动子可操作地连接。在一些实施例中, 编码AAV VP2融合多肽的核酸进一步包含转录后调节元件, 例如WPRE或其衍生物。在一些实施例中, 核酸进一步包含多腺苷酸化信号, 例如选自BGH和SV40多腺苷酸化信号。在一个实施例中, 编码AAV VP2融合多肽的核酸包含SEQ ID NO:2的序列。

[0164] 在一方面, 本文提供了包含编码所述AAV VP2融合多肽的分离的核酸的试剂盒。

[0165] 宿主细胞和AAV制造

[0166] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达运载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如, 氯化钙转染通常用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电穿孔可以用于其他细胞宿主 (通常参见Sambrook等人, 同上)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、冲击法/基因枪、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、与疱疹病毒结构蛋白VP22融合、药剂增强的DNA摄取、离体转导、原生质体融合、逆转录病毒转导、病毒转染、基于脂质的转染或其他常规技术。在原生质体融合的情况下, 使细胞在培养基中生长并筛选适当的活性。对于重组蛋白的长期高产量产生, 通常将需要稳定的表达。例如, 可以使用含有病毒复制起点或内源表达元件和可选择标记基因的表达载体来制备稳定表达多肽的细胞系。在引入载体之后, 可以允许细胞在富集培养基中生长1-2天, 然后将它们转换到选择性培养基。可选择标记的目的是赋予选择抗性, 并且其存在允许成功表达引入的序列的细胞在选择性培养基中生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖抗性、经稳定转染的细胞。用于培养所得的经转染的细胞和回收产生的抗体的方法和条件是本领域技术人员已知的, 并且可以基于本说明书根据所采用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞而变化或优化。

[0167] 在一方面, 本文提供了包含本文所述的AAV VP2融合多肽或编码该AAV VP2融合多肽的核酸的细胞。此类细胞可以例如是宿主细胞或治疗性细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换地使用, 其不仅指代特定的受试细胞, 而且指代这样的细胞的子代或潜在子代。因为某些修饰可能在后代中由于突变或环境影响而发生, 这样的子代可能在事实上与亲代细胞不同, 但是仍然包括在如本文所用的术语的范围内。

[0168] 宿主细胞可以用于产生或表达AAV VP2融合多肽, 并且任选地组装包含该AAV VP2融合多肽的AAV病毒粒子。因此, 本披露的特征还在于用于产生AAV VP2融合多肽的方法和用于使用宿主细胞产生包含AAV VP2融合多肽的AAV病毒粒子的方法。在一些实施例中, 这些方法包括在合适的培养基中培养宿主细胞 (其中已经引入了编码AAV VP2融合多肽的重

组表达载体),使得产生AAV VP2融合多肽。在一些实施例中,该方法进一步包括从培养基或宿主细胞中分离AAV VP2融合多肽或包含该AAV VP2融合多肽的AAV病毒粒子。

[0169] 在一个实施例中,对宿主细胞进行基因工程化以包含编码AAV VP2融合多肽的核酸。在一个实施例中,通过使用表达盒对宿主细胞进行基因工程化。短语“表达盒”是指这样的核苷酸序列,其能够影响在与此类序列相容的宿主中的基因的表达。此类盒可以包含启动子、具有或不具有内含子的开放阅读框和终止信号。还可以使用在实现表达中必需或有帮助的另外的因子,例如像诱导型启动子。

[0170] 宿主细胞可以是但不限于真核细胞或原核细胞,诸如细菌细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞(诸如人细胞)。大肠杆菌是一种可用于克隆并表达多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌(诸如枯草芽孢杆菌)和其他肠杆菌科(诸如沙门氏菌属、沙雷氏菌属)以及各种假单胞菌属物种。在这些原核宿主中,还可以复制表达载体,其典型地含有与宿主细胞相容的控制序列(例如,复制起点)。此外,将存在任何数目的多种熟知的启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 $\beta$ -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 $\lambda$ 的启动子系统。启动子典型地任选地用操纵子序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等,以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物(诸如酵母)也可以用于表达本文所述的AAV VP2融合多肽。已经开发了能够分泌完整异源蛋白的真核宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。合适的真核宿主细胞包括但不限于Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞和MDCK II细胞。使用哺乳动物组织细胞培养表达多肽通常在例如Winnacker, From Genes to Clones[从基因到克隆], VCH Publishers[VCH出版商], 纽约, 纽约州, 1987中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包含表达控制序列, 诸如复制起点、启动子和增强子(参见例如, Queen等人, Immunol. Rev. [免疫学评论] 89: 49-68, 1986); 以及必要的处理信息位点, 诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有源自哺乳动物基因或源自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP pol III启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(诸如人即刻早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0171] 在一些实施例中, 宿主细胞适合于AAV病毒粒子组装。因此, 本文还披露了产生rAAV病毒粒子的方法。

[0172] 天然存在的AAV包含指导病毒DNA复制(rep)、包裹/包装和宿主细胞染色体整合的不同序列。典型地, 三个AAV启动子(根据其相对图谱位置被命名为p5、p19和p40)驱动野生型病毒中编码rep和cap基因的两个AAV内部开放阅读框的表达。两个rep启动子(p5和p19)与单个AAV内含子的差异性剪接(在核苷酸2107和2227处)结合可以导致自rep基因产生四种rep蛋白(rep 78、rep 68、rep 52和rep 40)。rep蛋白具有最终负责复制病毒基因组的多酶学特性。cap基因典型地由p40启动子表达。可变剪接和非共有翻译起始位点负责产生三种相关的衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。单个共有多腺苷酸化位点位于AAV基因组的图谱位置95处。AAV的生命周期和遗传学综述于Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Imm. [微生物学和免疫学的当前主题], 158: 97-129中。

[0173] 在一些实施例中,使用编码AAV VP2融合多肽的核酸(例如,质粒)产生rAAV病毒粒子。在一些实施例中,在制备rAAV病毒粒子中使用包含AAV rep基因和/或AAV cap基因的至少一种另外的核酸(例如,质粒)。在一些实施例中, cap基因中的VP2起始密码子被突变,由此编码AAV VP2融合多肽的核酸是VP2亚基的唯一来源,并且因此产生的rAAV病毒粒子中的所有VP2衣壳多肽都与多肽配体融合。本文还披露了包含至少一个腺病毒辅助功能基因的核酸序列,例如质粒。在一些实施例中,编码AAV rep、AAV cap和/或腺病毒辅助基因的核酸可以存在于相同的结构(例如,单个质粒)中,或者它们可以存在于单独的结构中。在一些实施例中,将一种或多种质粒与货物核酸(即,待包封在rAAV病毒粒子内的核酸)共转染到感受态细胞中,然后培养细胞以产生rAAV病毒粒子。在一些情况下,将包含待包封的核酸序列(“AAV基因组”)的货物质粒和包含AAV rep和/或cap基因的一种或多种质粒转移到允许感染AAV辅助病毒(例如,腺病毒、E1缺失的腺病毒或疱疹病毒)的细胞中。用于产生rAAV颗粒(其中将待包装的AAV基因组、rep和cap基因以及辅助病毒功能提供给细胞)的技术是本领域已知的,并且可以包括例如电穿孔。在一些实施例中,rAAV的产生涉及存在于单个细胞(在本文中表示为包装细胞)内的以下组分:rAAV载体、与rAAV载体分离(即,不在rAAV载体中)的AAV rep和cap基因以及辅助病毒功能。假型rAAV的产生披露于例如WO 01/83692中,将其通过援引以其全文并入本文。在各个实施例中,AAV衣壳蛋白可以被修饰以增强重组载体的递送。对衣壳蛋白的修饰通常是本领域已知的。参见例如,US2005/0053922和US2009/0202490,将其披露内容通过援引以其全文并入本文。

[0174] 在各个实施例中,产生病毒载体的一般原理可以用于产生本文披露的载体和病毒,例如rAAV。Carter, (1992) Curr. Opinions Biotech. [生物技术当前述评], 1533-539; Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbial. Immunol. [微生物学和免疫学的当前主题], 158:97-129。各种方法披露于以下文献中:Ratschin等人, (1984) Mol. Cell. Biol. [分子细胞生物学], 4:2072; Henonnat等人, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 81:6466; Tratschin等人, (1985) Mol. Cell. Biol. [分子细胞生物学], 5:3251; McLaughlin等人, (1988) J. Virol. [病毒学杂志], 62:1963; Lebkowski等人, (1988) Mol. Cell. Biol. [分子细胞生物学], 7:349; Samulski等人 (1989) J. Virol. [病毒学杂志], 63:3822-3828; 美国专利号5,173,414; WO 95/13365和对应的美国专利号5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin等人, (1995) Vaccine [疫苗], 13:1244-1250; Paul等人, (1993) Hum. Gene Ther. [人类基因疗法], 4:609-615; Clark等人 (1996) Gene Therapy [基因疗法], 3:1124-1132; 美国专利号5,786,211; 美国专利号5,871,982; 和美国专利号6,258,595。将以上文件通过援引以其全文特此并入本文,其中特别强调的是文件中涉及rAAV产生的那些章节。

[0175] 产生包装细胞的示例性方法是产生对于AAV颗粒产生而言稳定表达一些或所有必需组分的细胞系。例如,将编码缺乏AAV rep和cap基因的rAAV载体、与rAAV载体分离的AAV rep和cap基因以及可选择标记(诸如新霉素抗性基因)的一个质粒(或多个质粒)整合到细胞的基因组中。AAV基因组已经通过诸如GC拖尾(Samulski等人, (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 79:2077-2081)、添加含有限制性内切核酸酶切割位点的合成接头(Laughlin等人, (1983) Gene [基因], 23:65-73)或通过直接钝端

连接(Senapathy等人, (1984) J. Biol. Chem. [生物化学杂志], 259:4661-4666)的程序引入细菌质粒中。然后用辅助病毒(诸如腺病毒)和/或编码辅助病毒的质粒感染包装细胞系。此方法的优点在于,细胞是可选择的,并且适合于rAAV的大规模产生。合适的方法的其他实例采用腺病毒或杆状病毒而不是质粒来将rAAV载体和/或rep和cap基因引入包装细胞中。

[0176] 在一些实施例中,产生重组病毒的方法包括提供待包装的核酸。在一些实施例中,核酸是质粒。在其他实施例中,核酸包含插入在第一AAV末端重复与第二AAV末端重复之间的异源核酸序列。在一些实施例中,异源核酸编码本文所述的AAV VP2融合多肽和/或报告蛋白。在一些实施例中,异源核酸编码治疗性RNA或治疗性蛋白(包括治疗性抗体)。在一些实施例中,在异源核酸不编码AAV VP2融合多肽的情况下,产生重组病毒的方法包括提供编码AAV VP2融合多肽的另外的核酸。在一些实施例中,产生重组病毒的方法包括提供一个或多个另外的核酸。在一些实施例中,一个或多个另外的核酸包含AAV rep基因和/或AAV cap基因。在一些实施例中,一个或多个另外的核酸包含源自AAV血清型1、AAV血清型2、AAV血清型3、AAV血清型4、AAV血清型5、AAV血清型6、AAV血清型7、AAV血清型8或AAV血清型9的AAV rep基因。在一些实施例中,一个或多个另外的核酸包含源自AAV血清型1、AAV血清型2、AAV血清型3、AAV血清型4、AAV血清型5、AAV血清型6、AAV血清型7、AAV血清型8或AAV血清型9的AAV cap基因。在一些实施例中,一个或多个另外的核酸包含一个或多个腺病毒辅助功能基因。

[0177] 在一些实施例中,将核酸共转染到感受态细胞或包装细胞中。共转染的方法是本领域已知的,并且包括但不限于通过lipofectamine、电穿孔和聚乙烯亚胺进行的转染。感受态细胞或包装细胞可以是悬浮培养的非贴壁细胞或贴壁细胞。在一个实施例中,可以使用任何合适的包装细胞系,诸如HeLa细胞、HEK293细胞和PerC.6细胞(同源293系)。在一个实施例中,包装细胞是人细胞。在一个实施例中,包装细胞是HEK293细胞。在一个实施例中,包装细胞是昆虫细胞。在一个实施例中,包装细胞是Sf9细胞。在一些实施例中,该方法包括培养经转染的细胞以产生重组病毒。在一些实施例中,该方法包括回收重组病毒。回收重组病毒的方法包括例如在美国专利号6,143,548和美国专利号9,408,904中披露的那些方法。在一些实施例中,重组病毒分泌到细胞培养基中并从培养基中纯化。在一些实施例中,裂解包装细胞,并且纯化内容物以回收重组病毒。在一些实施例中,通过过滤或离心从包装细胞中回收病毒。在一些实施例中,通过色谱法从包装细胞中回收病毒。

[0178] 在一些实施例中,使用哺乳动物宿主细胞来表达AAV VP2融合多肽并且将其掺入AAV病毒粒子中,典型地与AAV VP1和VP3多肽一起。为此目的,可以用编码AAV VP2融合多肽的核酸以及编码AAV VP1、VP2和rep多肽的核酸转染HEK293或其衍生物(诸如HEK293T/17或AAV293细胞)。在一些实施例中,进一步用编码用于AAV复制的腺病毒辅助功能(诸如腺病毒E2、E4和/或VA基因产物)的核酸转染HEK293细胞。在一些实施例中,用以下核酸分子共转染HEK293细胞:一种编码AAV VP2融合多肽的核酸分子;一种编码AAV VP1、VP2和rep多肽的核酸分子,特别地其中AAV VP1和VP2多肽由AAV cap基因编码,更特别地其中AAV cap基因中的AAV VP2起始密码子被突变;一种编码用于AAV复制的至少一种、至少两种、至少三种或至少四种腺病毒辅助功能的核酸分子,特别地其中所述核酸分子编码腺病毒E2、E4和VA基因产物;以及任选地编码治疗性RNA或蛋白质的另外的核酸分子。在一些实施例中,将编码治疗性RNA或蛋白质的核酸分子包封在由AAV VP2融合多肽以及AAV VP1和VP3多肽构成的AAV

衣壳中。在这些实施例中,编码治疗性RNA或蛋白质的核酸分子典型地进一步包含侧接AAV ITR序列。在其他实施例中,将编码AAV VP2融合多肽的核酸分子包封在由AAV VP2融合多肽以及AAV VP1和VP3多肽构成的AAV衣壳中。在这些实施例中,编码AAV VP2融合多肽的核酸分子进一步包含侧接AAV ITR序列。在其他实施例中,将包含条形码序列和侧接AAV ITR序列的核酸分子包封在由AAV VP2融合多肽以及AAV VP1和VP3多肽构成的AAV衣壳中。

[0179] 在一些实施例中,产生rAAV病毒粒子的方法包括转染昆虫细胞。合适的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。在一些实施例中,该方法包括用包含如本文披露的核酸的杆状病毒转染昆虫细胞。在一些实施例中,该方法包括用包含这样的核酸的杆状病毒转染昆虫细胞,该核酸包含插入在第一AAV末端重复与第二AAV末端重复之间的异源核酸序列。在一些实施例中,该方法包括用包含一个或多个另外的核酸的杆状病毒转染昆虫细胞。在一些实施例中,一个或多个另外的核酸包含AAV rep基因和/或AAV cap基因。在一些实施例中,一个或多个另外的核酸包含一个或多个腺病毒辅助功能基因。在一些实施例中,在异源核酸不编码本文所述的AAV VP2融合多肽的情况下,该方法进一步包括用编码本文所述的AAV VP2融合多肽的另外的核酸转染昆虫细胞。在一些实施例中,在适合产生重组病毒条件下培养昆虫细胞。在一些实施例中,从昆虫细胞中回收病毒。在一些实施例中,通过过滤或离心从昆虫细胞中回收病毒。在一些实施例中,通过色谱法从昆虫细胞中回收病毒。

[0180] 在一些实施例中,细胞选自哺乳动物细胞,包括但不限于鼠细胞、非人灵长类动物细胞或人细胞。哺乳动物细胞可以选自以下组成的组:肝细胞、脑细胞、脾细胞、肾细胞、血细胞、肺细胞、肌肉细胞、心脏细胞、骨髓细胞、多能祖细胞(MPP)(诸如多能造血祖细胞)和造血干细胞(HSC)(诸如长期造血干细胞(LT-HSC))。

[0181] 包含AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子

[0182] 在一方面,本文提供了包含本文所述的AAV VP2融合多肽的重组AAV(rAAV)病毒粒子。

[0183] 缩写“rAAV”是指重组腺相关病毒。如本文所用的“rAAV载体”是指包含非AAV来源的多核苷酸序列(即,与AAV异源的多核苷酸)的AAV载体,该多核苷酸序列典型地是用于细胞遗传转化的目的序列。在一些实施例中,异源核酸编码本文所述的AAV VP2融合多肽。在一些实施例中,异源核酸编码治疗性核酸、治疗性蛋白或治疗性抗体或抗体片段。在一些实施例中,异源多核苷酸可以侧接至少一个(有时两个)AAV反向末端重复(ITR)序列。术语rAAV载体涵盖rAAV载体颗粒和rAAV载体核酸两者。rAAV载体可以是单链的(ssAAV)或自互补的(scAAV)。“AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“AAV病毒粒子”是指由至少一种AAV衣壳蛋白(典型地由一种或多种野生型AAV的所有衣壳蛋白或源自一种或多种野生型AAV的衣壳蛋白构成)和包封的多核苷酸rAAV载体构成的病毒颗粒。如果颗粒包含异源多核苷酸(即,除野生型AAV基因组之外的多核苷酸,诸如待递送到哺乳动物细胞中的转基因),则其典型地被称为“rAAV载体颗粒”、“rAAV病毒粒子”或简称为“rAAV载体”。

[0184] 在一些实施例中,本文披露的AAV病毒粒子包含一种或多种AAV衣壳蛋白。典型地,在AAV中,三种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3多聚化以形成衣壳。本文披露的rAAV病毒粒子包含AAV VP2融合多肽,并且任选地进一步包含AAV VP1和/或VP3多肽。典型地,本文披露的rAAV病毒粒子的衣壳由VP1、VP3和VP2融合多肽亚基构成。典型地,本文披露的rAAV病毒粒子的衣壳不包含未与多肽配体融合的AAV VP2衣壳多肽,这意味着典型地,所有VP2亚基都是如

本文所述的AAV VP2融合多肽。包含在本文披露的rAAV病毒粒子中的AAV衣壳多肽可以来自可以衍生出重组病毒的任何AAV血清型,包括但不限于AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5,或其任何变体或例如在VP1、VP2和/或VP3衣壳多肽的全长上具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的其变体。

[0185] 衣壳蛋白的多肽序列是本领域已知的,并且也可以源自AAV的基因组。这些可以用作本文披露的AAV病毒组合物中的示例性衣壳。

[0186] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以是独立地选自下组的天然存在的或突变体/变体衣壳多肽,该组包括但不限于AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV 12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-1 1/rh.53、AAV4-8/r 11.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、AAV A3.3、AAV A3.4、AAV A3.5、AAV A3.7、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、

AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、AAAV、BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhEr1.14、AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhEr1.23、AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-前miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、AAV Shuffle 100-1、AAV Shuffle 100-3、AAV Shuffle 100-7、AAV Shuffle 10-2、AAV Shuffle 10-6、AAV Shuffle 10-8、AAV Shuffle100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.1、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV(ttAAV)、UPEN AAV 10和/或日本AAV 10衣壳多肽,或例如在VP1、VP2和/或VP3衣壳多肽的全长上具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的其变体。

[0187] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以具有或源自如美国公开号US20030138772(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV1(US20030138772的SEQ ID NO:6和64)、AAV2(US 20030138772的SEQ ID NO:7和70)、AAV3(US20030138772的SEQ ID NO:8和71)、AAV4(US20030138772的SEQ ID NO:63)、AAV5(US20030138772的SEQ ID NO:114)、AAV6(US20030138772的SEQ ID NO:65)、AAV7(US20030138772的SEQ ID NO:1-3)、AAV 8(US20030138772的SEQ ID NO:4和95)、AAV9(US20030138772的SEQ ID NO:5和100)、AAV10(US20030138772的SEQ ID NO:117)、AAV11(US20030138772的SEQ ID NO:118)、AAV 12(US20030138772的SEQ ID NO:119)、AAVrh10(US20030138772的SEQ ID NO:81的氨基酸1至738)、AAV16.3(US20030138772 SEQ ID NO:10)、AAV29.3/bb.1(US20030138772 SEQ ID NO:11)、AAV29.4(US 20030138772SEQ ID NO:12)、AAV29.5/bb.2(US20030138772 SEQ ID NO:13)、AAV1.3(US 20030138772 SEQ ID NO:14)、AAV13.3(US 20030138772 SEQ ID NO:15)、AAV24.1(US 20030138772 SEQ ID NO:16)、AAV27.3(US 20030138772 SEQ ID NO:17)、AAV7.2(US 20030138772 SEQ ID NO:18)、AAVC1(US 20030138772 SEQ ID NO:19)、AAVC3(US 20030138772 SEQ ID NO:20)、AAVC5(US 20030138772 SEQ ID NO:21)、AAVF1(US 20030138772 SEQ ID NO:22)、AAVF3(US 20030138772 SEQ ID NO:23)、AAVF5(US 20030138772 SEQ ID NO:24)、AAVH6(US 20030138772 SEQ ID NO:25)、AAVH2(US 20030138772 SEQ ID NO:26)、AAV42-8(US 20030138772 SEQ ID NO:27)、AAV42-15(US 20030138772 SEQ ID NO:28)、AAV42-5b(US

20030138772 SEQ ID NO:29)、AAV42-1b(US 20030138772 SEQ ID NO:30)、AAV42-13(US 20030138772 SEQ ID NO:31)、AAV42-3a(US 20030138772 SEQ ID NO:32)、AAV42-4(US 20030138772 SEQ ID NO:33)、AAV42-5a(US 20030138772 SEQ ID NO:34)、AAV42-10(US 20030138772 SEQ ID NO:35)、AAV42-3b(US 20030138772 SEQ ID NO:36)、AAV42-11(US 20030138772 SEQ ID NO:37)、AAV42-6b(US 20030138772 SEQ ID NO:38)、AAV43-1(US 20030138772 SEQ ID NO:39)、AAV43-5(US 20030138772 SEQ ID NO:40)、AAV43-12(US 20030138772 SEQ ID NO:41)、AAV43-20(US 20030138772 SEQ ID NO:42)、AAV43-21(US 20030138772 SEQ ID NO:43)、AAV43-23(US 20030138772 SEQ ID NO:44)、AAV43-25(US 20030138772 SEQ ID NO:45)、AAV44.1(US 20030138772 SEQ ID NO:46)、AAV44.5(US 20030138772 SEQ ID NO:47)、AAV223.1(US 20030138772 SEQ ID NO:48)、AAV223.2(US 20030138772 SEQ ID NO:49)、AAV223.4(US 20030138772 SEQ ID NO:50)、AAV223.5(US 20030138772 SEQ ID NO:51)、AAV223.6(US 20030138772 SEQ ID NO:52)、AAV223.7(US 20030138772 SEQ ID NO:53)、AAV A3.4(US 20030138772 SEQ ID NO:54)、AAV A3.5(US 20030138772 SEQ ID NO:55)、AAV A3.7(US20030138772 SEQ ID NO:56)、AAV A3.3(US 20030138772SEQ ID NO:57)、AAV42.12(US20030138772 SEQ ID NO:58)、AAV44.2(US20030138772 SEQ ID NO:59)、AAV42-2(US 20030138772SEQ ID NO:9)或其变体。

[0188] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以具有或源自美国公开号US20150159173(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV2(US20150159173的SEQ ID NO:7和23)、rh20(US 20150159173的SEQ ID NO:1)、rh32/33(US20150159173的SEQ ID NO:2)、rh39(US20150159173的SEQ ID NO:3、20和36)、rh46(US 20150159173的SEQ ID NO:4和22)、rh73(US20150159173的SEQ ID NO:5)、rh74(US20150159173的SEQ ID NO:6)、AAV6.1(US 20150159173的SEQ ID NO:29)、rh.8(US20150159173的SEQ ID NO:41)、rh.48.1(US20150159173的SEQ ID NO:44)、hu.44(US20150159173的SEQ ID NO:45)、hu.29(US20150159173的SEQ ID NO:42)、hu.48(US20150159173的SEQ ID NO:38)、rh54(US20150159173的SEQ ID NO:49)、AAV2(US20150159173的SEQ ID NO:7)、cy.5(US 20150159173的SEQ ID NO:8和24)、rh.10(US20150159173的SEQ ID NO:9和25)、rh.13(US20150159173的SEQ ID NO:10和26)、AAV1(US20150159173的SEQ ID NO:11和27)、AAV3(US20150159173的SEQ ID NO:12和28)、AAV6(US20150159173的SEQ ID NO:13和29)、AAV7(US20150159173的SEQ ID NO:14和30)、AAV 8(US 20150159173的SEQ ID NO:15和31)、hu.13(US20150159173的SEQ ID NO:16和32)、hu.26(US20150159173的SEQ ID NO:17和33)、hu.37(US20150159173的SEQ ID NO:18和34)、hu.53(US20150159173的SEQ ID NO:19和35)、rh.43(US20150159173的SEQ ID NO:21和37)、rh2(US20150159173的SEQ ID NO:39)、rh.37(US20150159173的SEQ ID NO:40)、rh.64(US20150159173的SEQ ID NO:43)、rh.48(US20150159173的SEQ ID NO:44)、ch.5(US20150159173的SEQ ID NO:46)、rh.67(US20150159173的SEQ ID NO:47)、rh.58(US 20150159173的SEQ ID NO:48),或其变体,包括但不限于Cy5R1、Cy5R2、Cy5R3、Cy5R4、rh.13R、rh.37R2、rh.2R、rh.8R、rh.48.1、rh.48.2、rh.48.1.2、hu.44R1、hu.44R2、hu.44R3、hu.29R、ch.5R1、rh64R1、rh64R2、AAV6.2、AAV6.1、AAV6.12、hu.48R1、hu.48R2和hu.48R3。

[0189] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以具有或源自如美国专利号US 7198951(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV9(US 7198951的SEQ ID NO:1-3)、AAV2(US 7198951的SEQ ID NO:4)、AAV1(US 7198951的SEQ ID NO:5)、AAV3(US 7198951的SEQ ID NO:6)和AAV 8(US 7198951的SEQ ID NO:7)。

[0190] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以源自这样的AAV血清型,其可以是或具有如N Pulicherla等人(Molecular Therapy[分子疗法]19(6):1070-1078(2011),通过援引以其全文并入本文)所描述的AAV9序列中的突变,诸如但不限于AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84。在一些实施例中,AAV衣壳包含一个或多个被工程化以递送载体穿过血脑屏障的序列(参见例如,B.E.Deverman等人,Nature Biotech[自然·生物技术],第34卷,第2期,第204-211页(2016年2月1日在线公开);和加州理工学院新闻稿,A.Wetherston, www.neurology-cenfrd.com/2016/02/10/successfd/brain-barrier;还参见W0 2016/0492301和US 8,734,809(将这些中的每一个的内容通过援引以其全文并入))。

[0191] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以具有或源自如美国专利号US 6156303(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV3B(US 6156303的SEQ ID NO:1和10)、AAV6(US 6156303的SEQ ID NO:2、7和11)、AAV2(US 6156303的SEQ ID NO:3和8)、AAV3A(US 6156303的SEQ ID NO:4和9)或其衍生物。

[0192] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1多肽和/或AAV VP3多肽可以具有或源自如美国公开号US20140359799(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV 8(US20140359799的SEQ ID NO:1)、AAVDJ(US 20140359799的SEQ ID NO:2和3)或其变体。

[0193] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自这样的AAV血清型,其选自AAVDJ或其变体,诸如AAVDJ8(或AAV-DJ8),如Grimm等人(Journal of Virology[病毒学杂志]82(12):5887-5911(2008),通过援引以其全文并入本文)所述。AAVDJ8的氨基酸序列可以包含两个或更多个突变以去除肝素结合结构域(HBD)。作为非限制性实例,在美国专利号7,588,772(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述为SEQ ID NO:1的AAV-DJ序列可以包含以下两个突变:(1)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)改变为谷氨酰胺(Q;Gln);和(2)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)改变为苏氨酸(T;Thr)。作为另一个非限制性实例,可以包含以下三个突变:(1)K406R,其中氨基酸406处的赖氨酸(K;Lys)改变为精氨酸(R;Arg);(2)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)改变为谷氨酰胺(Q;Gln);和(3)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)改变为苏氨酸(T;Thr)。

[0194] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如国际公开号W0 1998011244(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV4(W0 1998011244的SEQ ID NO:1-20)。

[0195] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自这样的AAV血清型,其可以是或具有如国际公开号W0 2014144229(通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV2序列中的突变以产生AAV2G9。

[0196] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如国际公开号W0 2005033321(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV3-3(W0 2005033321的SEQ ID NO:217)、AAV1(W0 2005033321的SEQ ID NO:219和202)、AAV106.1/hu.37(W0 2005033321的SEQ ID No:10)、AAV114.3/hu.40(W0 2005033321的SEQ ID No:11)、AAV127.2/hu.41(W0 2005033321的SEQ ID NO:6和8)、AAV128.3/hu.44(W0 2005033321的SEQ ID No:81)、AAV130.4/hu.48(W0 2005033321的SEQ ID NO:78)、AAV145.1/hu.53(W0 2005033321的SEQ ID No:176和177)、AAV145.6/hu.56(W0 2005033321的SEQ ID NO:168和192)、AAV16.12/hu.11(W0 2005033321的SEQ ID NO:153和57)、AAV16.8/hu.10(W0 2005033321的SEQ ID NO:156和56)、AAV161.10/hu.60(W0 2005033321的SEQ ID No:170)、AAV161.6/hu.61(W0 2005033321的SEQ ID No:174)、AAV1-7/rh.48(W0 2005033321的SEQ ID NO:32)、AAV1-8/rh.49(W0 2005033321的SEQ ID NO:103和25)、AAV2(W0 2005033321的SEQ ID NO:211和221)、AAV2-15/rh.62(W0 2005033321的SEQ ID No:33和114)、AAV2-3/rh.61(W0 2005033321的SEQ ID NO:21)、AAV2-4/rh.50(W0 2005033321的SEQ ID No:23和108)、AAV2-5/rh.51(W0 2005033321的SEQ ID NO:104和22)、AAV3.1/hu.6(W0 2005033321的SEQ ID NO:5和84)、AAV3.1/hu.9(W0 2005033321的SEQ ID NO:155和58)、AAV3-1 1/rh.53(W0 2005033321的SEQ ID NO:186和176)、AAV3-3(W0 2005033321的SEQ ID NO:200)、AAV33.12/hu.17(W0 2005033321的SEQ ID NO:4)、AAV33.4/hu.15(W0 2005033321的SEQ ID No:50)、AAV33.8/hu.16(W0 2005033321的SEQ ID No:51)、AAV3-9/rh.52(W0 2005033321的SEQ ID NO:96和18)、AAV4-19/rh.55(W0 2005033321的SEQ ID NO:117)、AAV4-4(W0 2005033321的SEQ ID NO:201和218)、AAV4-9/rh.54(W0 2005033321的SEQ ID NO:116)、AAV5(W0 2005033321的SEQ ID NO:199和216)、AAV52.1/hu.20(W0 2005033321的SEQ ID NO:63)、AAV52/hu.19(W0 2005033321的SEQ ID NO:133)、AAV5-22/rh.58(W0 2005033321的SEQ ID No:27)、AAV5-3/rh.57(W0 2005033321的SEQ ID NO:105)、AAV5-3/rh.57(W0 2005033321的SEQ ID No:26)、AAV58.2/hu.25(W0 2005033321的SEQ ID No:49)、AAV6(W0 2005033321的SEQ ID NO:203和220)、AAV7(W0 2005033321的SEQ ID NO:222和213)、AAV7.3/hu.7(W0 2005033321的SEQ ID No:55)、AAV 8(W0 2005033321的SEQ ID NO:223和214)、AAVH-1/hu.1(W0 2005033321的SEQ ID No:46)、AAVH-5/hu.3(W0 2005033321的SEQ ID No:44)、AAVhu.1(W0 2005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.10(W0 2005033321的SEQ ID NO:156)、AAVhu.11(W0 2005033321的SEQ ID NO:153)、AAVhu.12(W0 2005033321 SEQ ID NO:59)、AAVhu.13(W0

2005033321的SEQ ID NO:129)、AAVhu.14/AAV9(WO 2005033321的SEQ ID NO:123和3)、AAVhu.15(WO 2005033321的SEQ ID NO:147)、AAVhu.16(WO 2005033321的SEQ ID NO:148)、AAVhu.17(WO 2005033321的SEQ ID NO:83)、AAVhu.18(WO 2005033321的SEQ ID NO:149)、AAVhu.19(WO 2005033321的SEQ ID NO:133)、AAVhu.2(WO 2005033321的SEQ ID NO:143)、AAVhu.20(WO 2005033321的SEQ ID NO:134)、AAVhu.21(WO 2005033321的SEQ ID NO:135)、AAVhu.22(WO 2005033321的SEQ ID NO:138)、AAVhu.23.2(WO 2005033321的SEQ ID NO:137)、AAVhu.24(WO 2005033321的SEQ ID NO:136)、AAVhu.25(WO 2005033321的SEQ ID NO:146)、AAVhu.27(WO 2005033321的SEQ ID NO:140)、AAVhu.29(WO 2005033321的SEQ ID NO:132)、AAVhu.3(WO 2005033321的SEQ ID NO:145)、AAVhu.31(WO 2005033321的SEQ ID NO:121)、AAVhu.32(WO 2005033321的SEQ ID NO:122)、AAVhu.34(WO 2005033321的SEQ ID NO:125)、AAVhu.35(WO 2005033321的SEQ ID NO:164)、AAVhu.37(WO 2005033321的SEQ ID NO:88)、AAVhu.39(WO 2005033321的SEQ ID NO:102)、AAVhu.4(WO 2005033321的SEQ ID NO:141)、AAVhu.40(WO 2005033321的SEQ ID NO:87)、AAVhu.41(WO 2005033321的SEQ ID NO:91)、AAVhu.42(WO 2005033321的SEQ ID NO:85)、AAVhu.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:160)、AAVhu.44(WO 2005033321的SEQ ID NO:144)、AAVhu.45(WO 2005033321的SEQ ID NO:127)、AAVhu.46(WO 2005033321的SEQ ID NO:159)、AAVhu.47(WO 2005033321的SEQ ID NO:128)、AAVhu.48(WO 2005033321的SEQ ID NO:157)、AAVhu.49(WO 2005033321的SEQ ID NO:189)、AAVhu.51(WO 2005033321的SEQ ID NO:190)、AAVhu.52(WO 2005033321的SEQ ID NO:191)、AAVhu.53(WO 2005033321的SEQ ID NO:186)、AAVhu.54(WO 2005033321的SEQ ID NO:188)、AAVhu.55(WO 2005033321的SEQ ID NO:187)、AAVhu.56(WO 2005033321的SEQ ID NO:192)、AAVhu.57(WO 2005033321的SEQ ID NO:193)、AAVhu.58(WO 2005033321的SEQ ID NO:194)、AAVhu.6(WO 2005033321的SEQ ID NO:84)、AAVhu.60(WO 2005033321的SEQ ID NO:184)、AAVhu.61(WO 2005033321的SEQ ID NO:185)、AAVhu.63(WO 2005033321的SEQ ID NO:195)、AAVhu.64(WO 2005033321的SEQ ID NO:196)、AAVhu.66(WO 2005033321的SEQ ID NO:197)、AAVhu.67(WO 2005033321的SEQ ID NO:198)、AAVhu.7(WO 2005033321的SEQ ID NO:150)、AAVhu.8(WO 2005033321 SEQ ID NO:12)、AAVhu.9(WO 2005033321的SEQ ID NO:155)、AAVLG-10/rh.40(WO 2005033321的SEQ ID No:14)、AAVLG-4/rh.38(WO 2005033321的SEQ ID NO:86)、AAVLG-4/rh.38(WO 2005033321的SEQ ID No:7)、AAVN721-8/rh.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:163)、AAVN721-8/rh.43(WO 2005033321的SEQ ID No:43)、AAVpi.1(WO 2005033321 SEQ ID NO:28)、AAVpi.2(WO 2005033321 SEQ ID NO:30)、AAVpi.3(WO 2005033321 SEQ ID NO:29)、AAVrh.38(WO 2005033321的SEQ ID NO:86)、AAVrh.40(WO 2005033321的SEQ ID NO:92)、AAVrh.43(WO 2005033321的SEQ ID NO:163)、AAVrh.44(WO 2005033321 SEQ ID NO:34)、AAVrh.45(WO 2005033321 SEQ ID NO:41)、AAVrh.47(WO 2005033321 SEQ ID NO:38)、AAVrh.48(WO 2005033321的SEQ ID NO:115)、AAVrh.49(WO 2005033321的SEQ ID NO:103)、AAVrh.50(WO 2005033321的SEQ ID NO:108)、AAVrh.51(WO 2005033321的SEQ ID NO:104)、AAVrh.52(WO 2005033321的SEQ ID NO:96)、AAVrh.53(WO 2005033321的SEQ ID NO:97)、AAVrh.55(WO 2005033321 SEQ ID NO:37)、AAVrh.56(WO 2005033321的SEQ ID NO:152)、AAVrh.57(WO 2005033321的SEQ ID NO:105)、AAVrh.58(WO 2005033321的SEQ ID NO:106)、AAVrh.59(WO 2005033321SEQ ID

NO:42)、AAVrh.60(WO 2005033321 SEQ ID NO:31)、AAVrh.61(WO 2005033321的SEQ ID NO:107)、AAVrh.62(WO 2005033321的SEQ ID NO:114)、AAVrh.64(WO 2005033321的SEQ ID NO:99)、AAVrh.65(WO 2005033321 SEQ ID NO:35)、AAVrh.68(WO 2005033321SEQ ID NO:16)、AAVrh.69(WO 2005033321 SEQ ID NO:39)、AAVrh.70(WO 2005033321 SEQ ID NO:20)、AAVrh.72(WO2005033321SEQ ID NO:9),或其变体,包括但不限于AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVcy.6、AAVrh.12、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AAVrh.25、AAVrh.25/42 15、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh14。变体的非限制性实例包括WO 2005033321(将其内容通过援引以其全文并入本文)的SEQ ID NO:13、15、17、19、24、36、40、45、47、48、51-54、60-62、64-77、79、80、82、89、90、93-95、98、100、101、109-113、118-120、124、126、131、139、142、151、154、158、161、162、165-183、202、204-212、215、219、224-236。

[0197] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如国际公开号WO 2015168666(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAVrh8R(WO 2015168666的SEQ ID NO:9)、AAVrh8R A586R突变体(WO 2015168666的SEQ ID NO:10)、AAVrh8R R533A突变体(WO 2015168666的SEQ ID NO:11)或其变体。

[0198] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如国际公开号WO2018/160582(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAVhu68(例如,WO 2018160582的SEQ ID NO:2)或其变体。

[0199] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如美国专利号US 9233131(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAVhE1.1(US 9233131的SEQ ID NO:44)、AAVhEr1.5(US 9233131的SEQ ID NO:45)、AAVhEr1.14(US 9233131的SEQ ID NO:46)、AAVhEr1.8(US 9233131的SEQ ID NO:47)、AAVhEr1.16(US 9233131的SEQ ID NO:48)、AAVhEr1.18(US 9233131的SEQ ID NO:49)、AAVhEr1.35(US 9233131的SEQ ID NO:50)、AAVhEr1.7(US 9233131的SEQ ID NO:51)、AAVhEr1.36(US 9233131的SEQ ID NO:52)、AAVhEr2.29(US 9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr2.4(US 9233131的SEQ ID NO:54)、AAVhEr2.16(US 9233131的SEQ ID NO:55)、AAVhEr2.30(US 9233131的SEQ ID NO:56)、AAVhEr2.31(US 9233131的SEQ ID NO:58)、AAVhEr2.36(US 9233131的SEQ ID NO:57)、AAVhEr1.23(US 9233131的SEQ ID NO:53)、AAVhEr3.1(US 9233131的SEQ ID NO:59)、AAV2.5T(US 9233131的SEQ ID NO:42)或其变体。

[0200] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如美国专利公开号US 20150376607(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV-PAEC(US20150376607的SEQ ID NO:1)、AAV-LK01(US20150376607的SEQ ID NO:2)、AAV-LK02(US 20150376607的SEQ ID NO:3)、AAV-LK03

(US20150376607的SEQ ID NO:4)、AAV-LK04 (US20150376607的SEQ ID NO:5)、AAV-LK05 (US20150376607的SEQ ID NO:6)、AAV-LK06 (US20150376607的SEQ ID NO:7)、AAV-LK07 (US20150376607的SEQ ID NO:8)、AAV-LK08 (US20150376607的SEQ ID NO:9)、AAV-LK09 (US20150376607的SEQ ID NO:10)、AAV-LK10 (US20150376607的SEQ ID NO:11)、AAV-LK11 (US20150376607的SEQ ID NO:12)、AAV-LK12 (US20150376607的SEQ ID NO:13)、AAV-LK13 (US20150376607的SEQ ID NO:14)、AAV-LK14 (US20150376607的SEQ ID NO:15)、AAV-LK15 (US20150376607的SEQ ID NO:16)、AAV-LK16 (US20150376607的SEQ ID NO:17)、AAV-LK17 (US20150376607的SEQ ID NO:18)、AAV-LK18 (US20150376607的SEQ ID NO:19)、AAV-LK19 (US20150376607的SEQ ID NO:20)、AAV-PAEC2 (US 20150376607的SEQ ID NO:21)、AAV-PAEC 4 (US20150376607的SEQ ID NO:22)、AAV-PAEC6 (US20150376607的SEQ ID NO:23)、AAV-PAEC7 (US20150376607的SEQ ID NO:24)、AAV-PAEC 8 (US 20150376607的SEQ ID NO:25)、AAV-PAEC11 (US20150376607的SEQ ID NO:26)、AAV-PAEC 12 (US20150376607的SEQ ID NO:27) 或其变体。

[0201] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如美国专利号US9163261 (将其内容通过援引以其全文并入本文) 中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV-2-前miRNA-101 (US 9163261的SEQ ID NO:1) 或其变体。

[0202] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如美国专利公开号US 20150376240 (将其内容通过援引以其全文并入本文) 中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAV-8h (US20150376240的SEQ ID NO:6)、AAV-8b (US20150376240的SEQ ID NO:5)、AAV-h (US20150376240的SEQ ID NO:2)、AAV-b (US20150376240的SEQ ID NO:1) 或其变体。

[0203] 在一些实施例中,本发明的AAV颗粒可以包含或源自这样的AAV血清型,其可以是或具有如美国专利公开号US20160017295 (将其内容通过援引以其全文并入本文) 中描述的序列,诸如但不限于AAV SM 10-2 (US20160017295的SEQ ID NO:22)、AAV Shuffle 100-1 (US 20160017295的SEQ ID NO:23)、AAV Shuffle 100-3 (US20160017295的SEQ ID NO:24)、AAV Shuffle 100-7 (US20160017295的SEQ ID NO:25)、AAV Shuffle 10-2 (US20160017295的SEQ ID NO:34)、AAV Shuffle10-6 (US20160017295的SEQ ID NO:35)、AAV Shuffle 10-8 (US 20160017295的SEQ ID NO:36)、AAV Shuffle 100-2 (US20160017295的SEQ ID NO:37)、AAV SM 10-1 (US20160017295的SEQ ID NO:38)、AAV SM 10-8 (US20160017295的SEQ ID NO:39)、AAV SM 100-3 (US20160017295的SEQ ID NO:40)、AAV SM 100-10 (US 20160017295的SEQ ID NO:41) 或其变体。

[0204] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如美国专利公开号US 20150238550 (将其内容通过援引以其全文并入本文) 中描述的AAV血清型,诸如但不限于BNP61 AAV (US20150238550的SEQ ID NO:1)、BNP62 AAV (US20150238550的SEQ ID NO:3)、BNP63 AAV (US 20150238550的SEQ ID NO:4) 或其变体。

[0205] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/

或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如美国专利公开号US 20150315612(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于AAVrh.50(US20150315612的SEQ ID NO:108)、AAVrh.43(US20150315612的SEQ ID NO:163)、AAVrh.62(US 20150315612的SEQ ID NO:114)、AAVrh.48(US20150315612的SEQ ID NO:115)、AAVhu.19(US20150315612的SEQ ID NO:133)、AAVhu.11(US20150315612的SEQ ID NO:153)、AAVhu.53(US20150315612的SEQ ID NO:186)、AAV4-8/rh.64(US20150315612的SEQ ID No:15)、AAVLG-9/hu.39(US20150315612的SEQ ID No:24)、AAV54.5/hu.23(US20150315612的SEQ ID No:60)、AAV54.2/hu.22(US20150315612的SEQ ID No:67)、AAV54.7/hu.24(US20150315612的SEQ ID No:66)、AAV54.1/hu.21(US20150315612的SEQ ID No:65)、AAV54.4R/hu.27(US20150315612的SEQ ID No:64)、AAV46.2/hu.28(US20150315612的SEQ ID No:68)、AAV46.6/hu.29(US20150315612的SEQ ID No:69)、AAV128.1/hu.43(US20150315612的SEQ ID No:80)或其变体。

[0206] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以具有或源自如国际公开号WO 2015121501(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的AAV血清型,诸如但不限于真型AAV(ttAAV)(WO 2015121501的SEQ ID NO:2)、“UPenn AAV10”(WO 2015121501的SEQ ID NO:8)、“日本AAV10”(WO 2015121501的SEQ ID NO:9)或其变体。

[0207] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1衣壳多肽和/或AAV VP3衣壳多肽可以选自国际公开号WO 2015191508(将其内容通过援引以其全文并入本文)中披露的衣壳多肽。

[0208] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有杂合血清型,其具有特定目的细胞类型中的增强的转导或嗜性、延长的转基因表达和/或改善的安全性谱。杂合血清型可以通过衣壳转化、双特异性抗体吸附至衣壳表面、镶嵌衣壳和嵌合衣壳和/或其他衣壳蛋白修饰来产生。

[0209] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以通过衣壳蛋白的合理诱变(参见例如,Pulicherla等人,Mol Ther[分子疗法],2011,19:1070-1078)、肽配体掺入衣壳中以及定向进化针对特定的治疗应用进行进一步修饰以产生新的AAV变体。

[0210] 包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有这样的AAV血清型,其可以选自或源自多种物种,包括但不限于人、非人灵长类动物、禽和牛。在一个实施例中,AAV可以是禽AAV(AAAV)。AAAV血清型可以是或具有如美国专利号US 9238800(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的序列,诸如但不限于AAAV(US 9,238,800的SEQ ID NO:1、2、4、6、8、10、12和14)或其变体。

[0211] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有这样的AAV血清型,其可以是或源自牛AAV(BAAV)。BAAV血清型可以是或具有如美国专利号US 9,193,769(将其

内容通过援引以其全文并入本文)中描述的序列,诸如但不限于BAAV(US 9193769的SEQ ID NO:1和6)或其变体。BAAV血清型可以是或具有如美国专利号US7427396(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的序列,诸如但不限于BAAV(US 7427396的SEQ ID NO:5和6)或其变体。

[0212] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有这样的AAV血清型,其可以是或源自山羊AAV。山羊AAV血清型可以是或具有如美国专利号US7427396(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的序列,诸如但不限于山羊AAV(US 7427396的SEQ ID NO:3)或其变体。

[0213] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有这样的AAV血清型,其可以被工程化为来自两种或更多种亲本血清型的杂合AAV。在一些实施例中,血清型可以是包含来自AAV2和AAV9的序列的AAV2G9。AAV2G9 AAV血清型可以是或具有如美国专利公开号US20160017005(将其内容通过援引以其全文并入本文)中描述的序列。

[0214] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有这样的AAV血清型,其可以由AAV9衣壳文库产生,具有如Pulicherla等人(Molecular Therapy[分子疗法]19(6):1070-1078(2011),将其内容通过援引以其全文并入本文)所描述的在氨基酸390-627(VP1编号)中的突变。血清型以及对应的核苷酸和氨基酸取代可以是但不限于AAV9.1(G1594C;D532H)、AAV6.2(T1418A和T1436X;V473D和I479K)、AAV9.3(T1238A;F413Y)、AAV9.4(T1250C和A1617T;F417S)、AAV9.5(A1235G、A1314T、A1642G、C1760T;Q412R、T548A、A587V)、AAV9.6(T1231A;F411I)、AAV9.9(G1203A、G1785T;W595C)、AAV9.10(A1500G、T1676C;M559T)、AAV9.11(A1425T、A1702C、A1769T;T568P、Q590L)、AAV9.13(A1369C、A1720T;N457H、T574S)、AAV9.14(T1340A、T1362C、T1560C、G1713A;L447H)、AAV9.16(A1775T;Q592L)、AAV9.24(T1507C、T1521G;W503R)、AAV9.26(A1337G、A1769C;Y446C、Q590P)、AAV9.33(A1667C;D556A)、AAV9.34(A1534G、C1794T;N512D)、AAV9.35(A1289T、T1450A、C1494T、A1515T、C1794A、G1816A;Q430L、Y484N、N98K、V606I)、AAV9.40(A1694T、E565V)、AAV9.41(A1348T、T1362C;T450S)、AAV9.44(A1684C、A1701T、A1737G;N562H、K567N)、AAV9.45(A1492T、C1804T;N498Y、L602F)、AAV9.46(G1441C、T1525C、T1549G;G481R、W509R、L517V)、9.47(G1241A、G1358A、A1669G、C1745T;S414N、G453D、K557E、T582I)、AAV9.48(C1445T、A1736T;P482L、Q579L)、AAV9.50(A1638T、C1683T、T1805A;Q546H、L602H)、AAV9.53(G1301A、A1405C、C1664T、G1811T;R134Q、S469R、A555V、G604V)、AAV9.54(C1531A、T1609A;L511I、L537M)、AAV9.55(T1605A;F535L)、AAV9.58(C1475T、C1579A;T492I、H527N)、AAV.59(T1336C;Y446H)、AAV9.61(A1493T;N498I)、AAV9.64(C1531A、A1617T;L511I)、AAV9.65(C1335T、T1530C、C1568A;A523D)、AAV9.68(C1510A;P504T)、AAV9.80(G1441A;G481R)、AAV9.83(C1402A、A1500T;P468T、E500D)、AAV9.87(T1464C、T1468C;S490P)、AAV9.90(A1196T;Y399F)、AAV9.91(T1316G、A1583T、C1782G、T1806C;L439R、K528I)、AAV9.93(A1273G、A1421G、A1638C、C1712T、G1732A、A1744T、A1832T;S425G、Q474R、Q546H、P571L、G578R、T582S、D611V)、AAV9.94(A1675T;M559L)和AAV9.95(T1605A;F535L)。

[0215] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以包含国际公开号W0 2014160092(将其内容通过援引以其全文并入本文)的SEQ ID NO:1和3的衣壳序列。

[0216] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以包含国际公开号W0 2014052789(将其内容通过援引以其全文并入本文)的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2至4的AAV衣壳序列。

[0217] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以具有增加的穿过CNS中的血脑屏障的能力,如美国专利号8,927,514(将其内容通过援引以其全文并入本文)中所披露。此类衣壳蛋白的氨基酸序列和核酸序列可以分别包括但不限于美国专利号8,927,514的SEQ ID NO:2-17和SEQ ID NO:25-33。

[0218] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽是AAV5衣壳蛋白或其变体,例如美国专利号7,056,502(将其内容通过援引以其全文并入本文)的那些衣壳蛋白或其变体。

[0219] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以是AAV6衣壳蛋白或其变体。

[0220] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以是AAV8衣壳蛋白或其变体,例如包含美国专利号8,318,480(将其内容通过援引以其全文并入本文)的SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以是AAV9衣壳蛋白或其变体,例如包含美国专利号7,198,951(将其内容通过援引以其全文并入本文)的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或如美国专利公开号US20130224836(将其内容通过援引以其全文并入本文)中披露的SEQ ID NO:2、4或6的序列,其中氨基酸序列中的至少一个表面暴露的酪氨酸残基被另一个氨基酸残基取代。

[0222] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以是被工程化以获得特定特性的变体衣壳蛋白。用于获得工程化衣壳的此类方法描述于例如专利公开W0 2011038187中,将其内容通过援引以其全文并入本文。此类方法和载体还描述于例如专利公开W0 2012112832和专利申请公开W0 2015054653中,将其内容通过援引以其全文并入本文。此类变体衣壳包含例如W0 2015054653的SEQ ID NO:23或其变体。另外的变体衣壳包含例如专利公开W02017/019994(将其内容通过援引以其全文并入)中描述的那些衣壳序列。在实施例中,AAV衣壳多肽可以包含Anc80 AAV衣壳序列(例如,W0 2017019994的SEQ ID NO:1),例如Anc80L65(例如,W0 2017019994的SEQ ID NO:23);或例如Anc110(例如,W0 2017019994的SEQ ID NO:42)。

[0223] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以是AAVrh10衣壳蛋白或其变体,例如包含欧洲专利号2341068的SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0224] 在一些实施例中,包含在本文所述的AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽和/或包含在本文所述的rAAV病毒粒子中的AAV VP1和/或VP3多肽可以是AAVDJ衣壳蛋白、AAVDJ/8衣壳蛋白或其变体。在一些实施例中,AAVDJ衣壳蛋白和/或AAVDJ/8衣壳蛋白可以包含这样的氨基酸序列,其包含源自第一AAV血清型(例如,AAV2)的第一区域、源自第二AAV血清型(例如,AAV8)的第二区域和源自第三AAV血清型(例如,AAV9)的第三区域,其中第一、第二和第三区域可以包含本说明书中披露的任何氨基酸序列。

[0225] 在一些实施例中,AAV衣壳多肽的血清型可以取决于所希望的分布、转导效率和所需的细胞靶向。如Sorrentino等人(comprehensive map of CNS transduction by eight adeno-associated virus serotypes upon cerebrospinal fluid administration in pigs[在脑脊液施用于猪后通过八种腺相关病毒血清型进行CNS转导的综合图谱],Molecular Therapy[分子疗法]2015年12月7日在线接受的文章预览];doi:10.1038/mt.2015.212;将其内容通过援引以其全文并入本文)所述,AAV血清型提供了不同的分布、转导效率和细胞靶向。为了提供所希望的功效,需要选择这样的AAV血清型,其不仅最佳匹配待靶向的细胞,而且还匹配所希望的转导效率和分布。

[0226] 在一些实施例中,相对于包含相同然而未与所述多肽配体融合的AAV VP2衣壳多肽的rAAV病毒粒子,rAAV病毒粒子展现出至少一种组织或细胞类型中增加的转导和/或增加的嗜性。

[0227] 在一些实施例中,至少一种组织或细胞类型的转导增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%。在一些实施例中,相对于包含相同然而未与所述多肽配体融合的AAV VP2衣壳多肽的rAAV病毒粒子,rAAV病毒粒子展现出至少一种组织或细胞类型中增加至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少1000倍或多于1000倍的转导。在一些实施例中,至少一种组织或细胞类型中的嗜性增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%。

[0228] 在一些实施例中,包含在所述rAAV病毒粒子中的所有AAV VP2衣壳多肽都与多肽配体直接或经由接头融合。

[0229] 在一些实施例中,rAAV病毒粒子进一步包含选自由以下组成的组的核酸序列:非编码核酸、蛋白质或RNA编码序列、表达盒、多表达盒、用于同源重组的序列和基因组基因靶向盒。

[0230] 在一些实施例中,rAAV病毒粒子进一步包含编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸序列。在一些这些实施例中,包含在rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽和由包含在rAAV病毒粒子中的所述核酸序列编码的AAV VP2融合多肽是相同的。

[0231] 在一些实施例中,rAAV病毒粒子包含编码治疗性核酸、治疗性蛋白或治疗性抗体或抗体片段的核酸序列。

[0232] 治疗性核酸可以选自由以下组成的组:mRNA、siRNA、miRNA、shRNA和反义寡核苷

酸。

[0233] 抗体片段可以例如选自由以下组成的组: Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、单结构域抗体(dAb)和单链可变片段(scFv)。

[0234] 在一些实施例中,包含AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子进一步包含AAV VP1和VP3多肽。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有独立地选自由以下组成的组的AAV血清型: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有选自由以下组成的组的AAV血清型: AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。在一些这些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有相同的AAV血清型。

[0235] 在一些实施例中,包含在rAAV病毒粒子中的AAV VP1、VP2和VP3多肽在由所述AAV VP1、VP2和VP3多肽构成的AAV病毒粒子的靶细胞上存在的其天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变。在特定实施例中,天然受体的至少一个必需结合位点在AAV VP1、VP2和VP3多肽中被突变。在一些实施例中,AAV VP1、VP2和VP3多肽在每个AAV衣壳多肽的共享VP3区中包含相同的至少一个突变。在一些这些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV6,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合。在一些这些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的i) K531E和V473D; ii) K531E、K459S、V473D和N500E; iii) G266A和N269Q; iv) G266A、N269Q和D590A; v) K531E、V473D、G266A和N269Q; 或vi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A。

[0236] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV8,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合。在一些这些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的i) G268E和N271Q; ii) S387A; iii) G268E、N271Q和S387A; iv) A592Q; 或v) A592D。

[0237] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV9,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合。在一些这些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的i) W503A; ii) N562A和E563A; iii) Q590A和W503A; 或iv) Q590A、W503A、N562A和E563A。

[0238] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV2,并且各自在共享VP3区内包含相对于SEQ ID NO:6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A。

[0239] 在一些实施例中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV1,并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合。在一些这些实施例

中,AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的i)V473D和N500E;ii)R514A;或iii)V473D、N500E和R514A。

[0240] 在一方面,本文提供了包含本文所述的rAAV病毒粒子的细胞。

[0241] 在一些实施例中,细胞是宿主细胞。在一些实施例中,rAAV病毒粒子在所述宿主细胞中组装。宿主细胞可以选自由以下组成的组:昆虫细胞(例如,Sf9细胞)和HEK293细胞或其衍生物(诸如HEK293T/17细胞或AAV293细胞)。

[0242] 在一些实施例中,细胞选自哺乳动物细胞,包括但不限于鼠细胞、非人灵长类动物细胞或人细胞。在一些实施例中,哺乳动物细胞选自由以下组成的组:肝细胞、脑细胞、脾细胞、肾细胞、血细胞、肺细胞、肌肉细胞、心脏细胞、骨髓细胞、多能祖细胞(MPP)(诸如多能造血祖细胞)和造血干细胞(HSC)(诸如长期造血干细胞(LT-HSC))。

[0243] 药物组合物 and 治疗方法

[0244] 在一方面,本文提供了包含本文所述的rAAV病毒粒子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0245] 可以配制本文所述的rAAV病毒粒子以制备药学上有用的组合物。示例性配制品包括例如在美国专利号9,051,542和美国专利号6,703,237(将其通过援引以其全文并入)中披露的那些配制品。可以配制本披露的组合物用于向哺乳动物受试者(例如,人)施用。在一些实施例中,可以配制递送系统用于肌肉、皮内、粘膜、皮下、静脉内、鞘内、可注射贮库型装置或局部施用。

[0246] 在一些实施例中,当递送系统被配制为溶液或悬浮液时,递送系统在可接受的载体(例如,水性载体)中。可以使用多种水性载体,例如水、缓冲水、0.8%生理盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可以经灭菌和/或无菌过滤。可以将所得水性溶液包装按原样使用或冻干。在一些实施例中,将冻干制剂在施用前与无菌溶液组合。

[0247] 在一些实施例中,组合物(例如,药物组合物)可以含有药学上可接受的辅助物质以模拟生理条件,诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。在一些实施例中,药物组合物包含防腐剂。在一些其他实施例中,药物组合物不包含防腐剂。

[0248] 典型地,药物组合物被配制与预期的施用途径相容。施用途径的非限制性实例包括肠胃外,例如静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、鞘内、肌肉或注射或输注施用。配制合适的药物组合物的方法是本领域已知的,参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药学科学与实践],第21版,2005;和在系列Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series of Textbooks and Monographs[药物和药物科学:一系列教科书和专著](Dekker,纽约州)中的书籍。

[0249] 本文还提供了rAAV病毒粒子或包含这些rAAV病毒粒子的药物组合物,用作药物。例如,可以施用本文披露的rAAV病毒粒子以将编码治疗性RNA或蛋白质的异源核酸递送到靶细胞中。因此,如本文所用的术语“治疗应用”或“治疗”包括用于治疗或预防疾病的基因疗法,其中术语“基因疗法”可以广泛地定义为将外来遗传物质定向引入细胞、组织或器官中用于校正缺陷基因的概念,目的是改善患者的临床状态。例如,异源核酸可以替换靶细胞中的被突变或丢失从而导致遗传疾病的基因。施用本文披露的rAAV病毒粒子可以用于治

疗、预防、延迟、减缓或改善这样的遗传疾病。在一些实施例中，“基因疗法”仅指代“体细胞疗法”，而不指代将诱导代代相传的遗传变化的“种系疗法”，其中体细胞疗法将治疗效果限制在被治疗的个体上。可以在体内或离体施用本文所述的rAAV病毒粒子。如本文所用的术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”包括向有需要的动物(包括人)施用有效剂量或有效多剂量的包含本文披露的rAAV病毒粒子的组合物的步骤。如果在障碍/疾病发生前施用剂量，则施用是预防性的。如果在障碍/疾病发生之后施用剂量，则施用是治疗性的。在一些实施例中，有效剂量是可检测地减轻(消除或减少)至少一种与所治疗的障碍/疾病状态相关的症状的剂量、减缓或防止进展至障碍/疾病状态的剂量、减缓或防止障碍/疾病状态进展的剂量、降低疾病程度的剂量、导致疾病缓解(部分或全部)的剂量和/或延长存活期的剂量。该术语涵盖但不要求完全治疗(即，治愈)和/或预防。

[0250] 在一方面，本文提供了将转基因递送到细胞中的方法，该方法包括使细胞与本文所述的rAAV病毒粒子或包含该rAAV病毒粒子的药物组合物接触。

[0251] 在一方面，本文提供了将转基因递送到细胞中的方法，其中细胞表达所述多肽配体特异性结合的细胞表面分子。

[0252] 在一些实施例中，细胞在活受试者中。在一些实施例中，受试者是哺乳动物受试者，例如人。

[0253] 在一方面，本文提供了在治疗性治疗方案中使用本文所述的rAAV病毒粒子或包含该rAAV病毒粒子的药物组合物的方法或使用本文所述的rAAV病毒粒子或包含该rAAV病毒粒子的药物组合物作为疫苗的方法。

[0254] 在一方面，本文提供了在减少治疗方法中向受试者施用的总rAAV病毒粒子的量的方法中使用本文所述的rAAV病毒粒子或包含该rAAV病毒粒子的药物组合物的方法，该方法包括向受试者施用与包含相同然而未与所述多肽配体融合的AAV VP2衣壳多肽的rAAV的施用量相比减少量的总rAAV病毒粒子，这能够实现类似的治疗效果。

[0255] 在一方面，本文提供了在增加治疗方法中向受试者施用的rAAV病毒粒子的转导效率的方法中使用本文所述的rAAV病毒粒子或包含该rAAV病毒粒子的药物组合物的方法，该方法包括向受试者施用一定量的rAAV病毒粒子，其中与包含相同然而未与所述多肽配体融合的AAV VP2衣壳多肽的rAAV病毒粒子相比，包含AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子能够以更高的速率转导细胞类型或组织。

[0256] AAV VP2融合多肽文库

[0257] 在一方面，本文提供了文库构建体，该文库构建体包含编码AAV VP2融合多肽的核酸序列，该AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体，例如由其组成，其中多肽配体与AAV VP2衣壳多肽的N末端融合，并且其中多肽配体的分子量高达10kDa。

[0258] 在一些实施例中，由文库构建体编码的多肽配体在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸位置处包含随机化氨基酸。

[0259] 在一方面，本文提供了文库构建体，该文库构建体包含编码AAV VP2融合多肽的核酸序列，该AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体，例如由其组成，其中多肽配体与AAV VP2衣壳多肽的N末端融合，并且其中所述多肽配体选自由以下组成的组：GP2多肽、Sso7d多肽和亲和体。

[0260] 在一些实施例中，所述多肽配体选自由以下组成的组：SEQ ID NO:1的Sso7d多肽

和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

[0261] 在一些实施例中,多肽配体选自任选地具有至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代的SEQ ID NO:1的Sso7d多肽。

[0262] 在一些实施例中,所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1的Sso7d多肽,其中位置21、23、25、28、30、32、40、42和44处的氨基酸残基X独立地选自D、R、H、N、A、I、Y和W;和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

[0263] 在一些实施例中,多肽配体选自SEQ ID NO:1的Sso7d多肽,其中位置21、23、25、28、30、32、40、42和44处的氨基酸残基X独立地选自D、R、H、N、A、I、Y、W和氨基酸取代,并且其中SEQ ID NO:1任选地具有至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代。

[0264] 在一些实施例中,编码的AAV VP2融合物进一步包含多肽配体与AAV VP2衣壳多肽之间的肽接头。在一些这些实施例中,所述肽接头选自由以下组成的组:甘氨酸-丝氨酸(GS)接头和丙氨酸-脯氨酸-丝氨酸(APS)接头。在一些这些实施例中,GS接头具有式[GGGGS]<sub>n</sub>,其中n是在1至10范围内的整数,例如其中n是1、2、3、4、5或6,特别地其中n是1、2、3或4。在一些实施例中,APS接头具有式[APS]<sub>n</sub>,其中n是在1至10范围内的整数,例如其中n是1、2、3、4、5或6,特别地其中n是2、3、4或5。

[0265] 在一些实施例中,编码AAV VP2融合多肽的核酸不包含AAV VP2衣壳多肽的天然起始密码子。AAV VP2衣壳多肽的天然起始密码子可以被突变,例如缺失。在一些实施例中,包含在AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽缺失其第一个天然氨基酸,例如对应的野生型AAV VP2衣壳多肽的第一个苏氨酸。

[0266] 在一方面,本文提供了包含多个本文所述的文库构建体的文库。在一些实施例中,文库包含至少两个不同的本文所述的文库构建体。在一些实施例中,包含在文库中的至少两个不同的文库构建体在编码多肽配体的核酸序列方面不同。

[0267] 在一些实施例中,文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或 $10^9$ 个独特的文库构建体。在一些实施例中,文库包含 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^4$ - $10^5$ 、 $10^5$ - $10^6$ 、 $10^6$ - $10^7$ 、 $10^7$ - $10^8$ 或 $10^8$ - $10^9$ 个独特的文库构建体。

[0268] 在一些实施例中,文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 或 $10^{10}$ 个成员。在一些实施例中,文库包含 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^4$ - $10^5$ 、 $10^5$ - $10^6$ 、 $10^6$ - $10^7$ 、 $10^7$ - $10^8$ 、 $10^8$ - $10^9$ 或 $10^9$ - $10^{10}$ 个成员。

[0269] 在一些实施例中,文库包含编码多肽配体的所有可能变体的文库构建体。

[0270] 在一些实施例中,文库构建体是RNA分子,例如mRNA分子;或DNA分子,例如cDNA分子、线性DNA分子或环状DNA分子(例如,质粒DNA分子)。在一些实施例中,文库构建体进一步包含启动子。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽的开放阅读框与所述启动子可操作地连接。

[0271] 在一些实施例中,文库构建体是质粒DNA分子,其包含与启动子可操作地连接的编码所述AAV VP2融合多肽的所述核酸序列。在一些实施例中,文库构建体进一步包含报告序列。在一些实施例中,报告序列编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白。在一些实施例中,报告蛋白选自由以下组成的组:EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶。

[0272] 在一些实施例中,文库构建体进一步包含条形码序列。在一些这些实施例中,每个

特定的AAV VP2融合多肽序列都被分配特定的条形码序列,这意味着每个特定的条形码序列对应于一个特定的AAV VP2融合多肽序列。

[0273] 在一些实施例中,文库是AAV文库,这意味着每个文库构建体都存在于rAAV病毒粒子内。

[0274] 在一些实施例中,rAAV病毒粒子例如在其衣壳中包含本文所述的AAV VP2融合多肽。在一些实施例中,包含在给定rAAV病毒粒子中(例如,在其衣壳中)的AAV VP2融合多肽与由存在于所述给定rAAV病毒粒子中的文库构建体编码的AAV VP2融合多肽是相同的。在一些实施例中,大多数rAAV病毒粒子包含编码AAV VP2融合多肽的文库构建体,该AAV VP2融合多肽与包含在给定rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽是相同的。这被称为AAV文库的基因型-表型联系或衣壳-基因组相关性。

[0275] 在一些实施例中,AAV文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或 $10^9$ 个独特的AAV变体。在一些实施例中,AAV文库包含 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^4$ - $10^5$ 、 $10^5$ - $10^6$ 、 $10^6$ - $10^7$ 、 $10^7$ - $10^8$ 或 $10^8$ - $10^9$ 个独特的AAV变体。

[0276] 在一些实施例中,AAV文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 或 $10^{10}$ 个AAV成员。在一些实施例中,AAV文库包含 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^4$ - $10^5$ 、 $10^5$ - $10^6$ 、 $10^6$ - $10^7$ 、 $10^7$ - $10^8$ 、 $10^8$ - $10^9$ 或 $10^9$ - $10^{10}$ 个AAV成员。

[0277] 本文所述的AAV文库可以用于具有所希望的特征的衣壳多肽(例如,AAV VP2融合多肽)的表型选择。从复制AAV基因组顺式编码AAV VP2融合多肽。这允许在表型选择之后回收衣壳DNA。因此,需要在病毒文库的产生期间使壳粒的随机混合和非匹配病毒基因组的包裹最小化。这可以例如通过选择用于rAAV病毒粒子产生的适当条件(例如,通过使用适当比率的编码AAV VP2融合多肽的核酸分子和编码AAV VP1和VP3衣壳多肽的核酸分子用于转染用于rAAV病毒粒子产生的宿主细胞)来实现。典型地,在转染反应中相对于AAV VP2融合多肽编码核酸过量使用VP1和VP3编码核酸。以这样的量使用AAV VP2融合多肽编码核酸,使得平均仅用单个AAV VP2融合多肽编码核酸转染每个宿主细胞。

[0278] 在一些实施例中,包含在AAV文库的rAAV病毒粒子中的所有AAV VP2衣壳多肽都与多肽配体直接或经由接头融合。

[0279] 在一些实施例中,AAV文库的每个文库构建体都包含两个AAV反向末端重复(ITR)序列,其位于AAV VP2融合多肽开放阅读框的上游和下游,例如在文库构建体的5'和3'末端。在一些实施例中,AAV VP2融合多肽开放阅读框与启动子可操作地连接。在一些实施例中,文库构建体进一步包含报告序列。在一些实施例中,报告序列编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白。在一些实施例中,报告蛋白选自以下组成的组:EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶。在一些实施例中,报告序列与启动子(例如,文库构建体所包含的第二启动子)可操作地连接。

[0280] 在一些实施例中,AAV文库的rAAV病毒粒子包含本文所述的AAV VP2融合多肽并且进一步包含AAV VP1和VP3多肽。在一些实施例中,包含在rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有独立地选自以下组成的组的AAV血清型:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5。在一些实施例中,包含在rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多

肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有独立地选自以下组成的组的AAV血清型: AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。在一些实施例中, 包含在rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有相同的AAV血清型。

[0281] 在一些实施例中, 包含在AAV文库的rAAV病毒粒子中的AAV VP1、VP2和VP3多肽在由所述AAV VP1、VP2和VP3多肽构成的AAV病毒粒子的靶细胞上存在的其天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变。在特定实施例中, 天然受体的至少一个必需结合位点在AAV VP1、VP2和VP3多肽中被突变。在一些实施例中, AAV VP1、VP2和VP3多肽在每个AAV衣壳多肽的共享VP3区中包含相同的至少一个突变。

[0282] 在一些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV6, 并且各自在共享VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合。在一些这些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 3的VP1氨基酸序列的i) K531E和V473D; ii) K531E、K459S、V473D和N500E; iii) G266A和N269Q; iv) G266A、N269Q和D590A; v) K531E、V473D、G266A和N269Q; 或vi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A。

[0283] 在一些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV8, 并且各自在共享VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合。在一些这些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的i) G268E和N271Q; ii) S387A; iii) G268E、N271Q和S387A; iv) A592Q; 或v) A592D。

[0284] 在一些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV9, 并且各自在共享VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合。在一些这些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的i) W503A; ii) N562A和E563A; iii) Q590A和W503A; 或iv) Q590A、W503A、N562A和E563A。

[0285] 在一些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV2, 并且各自在共享VP3区内包含相对于SEQ ID NO: 6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A。

[0286] 在一些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV1, 并且各自在共享VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合。在一些这些实施例中, AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的i) V473D和N500E; ii) R514A; 或iii) V473D、N500E和R514A。

[0287] 在一些实施例中, 包含在AAV文库的rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1, 并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合。

特别地, AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D213A、T162R和/或P191N, 特别是以下所有三个氨基酸取代: D213A、T162R和P191N。

[0288] 在其他实施例中, 包含在AAV文库的rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽具有除AAV1之外的AAV血清型, 并且包含对应于选自由以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N。

[0289] 在特定的此类实施例中, 包含在所述rAAV病毒粒子中的所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型8, 并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合。特别地, AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D214A、K163R和/或P192N, 特别是以下所有三个取代: D214A、K163R和P192N。

[0290] 在其他此类实施例中, 包含在所述rAAV病毒粒子中的所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型9, 并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合。特别地, AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D213A、S162R和/或P191N, 特别是以下所有三个氨基酸取代: D213A、S162R和P191N。

[0291] 在一方面, 本文提供了包含多个rAAV病毒粒子的文库, 每个rAAV病毒粒子都包含如本文所述的变体AAV VP2融合多肽。

[0292] 在一些实施例中, 文库包含至少两个不同的rAAV病毒粒子, 每个rAAV病毒粒子都包含如本文所述的变体AAV VP2融合多肽。在一些实施例中, 至少两个不同的rAAV病毒粒子在包含在AAV VP2融合多肽中的多肽配体方面不同。

[0293] 在一些实施例中, AAV文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或 $10^9$ 个独特的rAAV病毒粒子。在一些实施例中, AAV文库包含 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^4$ - $10^5$ 、 $10^5$ - $10^6$ 、 $10^6$ - $10^7$ 、 $10^7$ - $10^8$ 或 $10^8$ - $10^9$ 个独特的rAAV病毒粒子。

[0294] 在一些实施例中, AAV文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 或 $10^{10}$ 个rAAV病毒粒子成员。在一些实施例中, AAV文库包含 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^4$ - $10^5$ 、 $10^5$ - $10^6$ 、 $10^6$ - $10^7$ 、 $10^7$ - $10^8$ 、 $10^8$ - $10^9$ 或 $10^9$ - $10^{10}$ 个rAAV病毒粒子成员。

[0295] 在一些实施例中, 包含在所述文库中的rAAV病毒粒子包含含有条形码序列的核酸。在一些实施例中, 每种特定的AAV VP2融合多肽都被分配特定的条形码序列, 这意味着包含给定氨基酸序列的AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子包含含有对应的条形码序列的核酸。条形码序列可以例如包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18个或更多个核苷酸。

[0296] 鉴定AAV VP2融合多肽变体的方法

[0297] 在一方面, 本文提供了产生具有至少一种所希望的特征的AAV VP2融合多肽的方法, 该方法包括针对具有所述至少一种所希望的特征的编码的AAV VP2融合多肽对本文所述的文库进行筛选。

[0298] 在一些实施例中, 所述至少一种所希望的特征是相对于不包含所述多肽配体但在其他方面与包含在AAV VP2融合多肽中的AAV VP2衣壳多肽相同的AAV VP2衣壳多肽, 由所述AAV VP2融合多肽介导的至少一种组织或细胞类型中增加的转导和/或增加的嗜性。

[0299] 在一方面,本文提供了产生具有至少一种所希望的特征的AAV VP2融合多肽的方法,这些方法包括以下步骤:b)使本文所述的文库与多个细胞接触,c)从所述细胞的至少一部分中分离核酸分子,以及d)确定在步骤b)中分离的至少一种核酸分子的编码多肽配体或其片段的序列的至少一部分。在一些实施例中,步骤b)中的多个细胞存在于非人模型动物(例如,鼠模型或非人灵长类动物模型)内。

[0300] 在一些实施例中,该方法进一步包括在步骤b)之前提供如本文所述的AAV文库的步骤a)。在一些实施例中,将文库包装在HEK293细胞或HEK293衍生细胞中,其中以反式提供辅助功能(例如,E2A、E4、VA、E1A和E1B)。在一些实施例中,AAV rep功能包含rep78、rep 68、rep 52和rep40基因产物。在一些实施例中,以反式提供rep基因。在一些实施例中,将rep78和/或rep68开放阅读框的起始密码子从ACG改变为ATG,以增加含有反向末端重复(ITR)的衣壳文库构建体的复制,从而改善AAV文库制造产量。在一些实施例中,以反式提供cap基因。在一些实施例中,cap基因受p40启动子控制,使得它仅在制造期间在存在辅助病毒功能的情况下在HEK293细胞中表达。在一些实施例中,以反式提供的cap基因中VP2开放阅读框的起始密码子被突变。在一些实施例中,在AAV制造中,将编码AAV VP2融合多肽的核酸作为有效载荷提供给生产细胞系。

[0301] 在一些实施例中,提供AAV文库的步骤a)包括ai)用编码AAV rep的核酸序列、编码AAV VP1衣壳多肽的核酸序列、编码AAV VP3衣壳多肽的核酸序列和编码本文所述的AAV VP2融合多肽的核酸文库转染细胞,其中每个文库构建体都进一步包含在其5'和3'末端的两个AAV反向末端重复(ITR)序列,以及a ii)将细胞在适合于AAV病毒粒子形成的条件下孵育,任选地其中细胞是哺乳动物细胞、特别是HEK293细胞,或昆虫细胞、特别是Sf9细胞。

[0302] 在一些实施例中,所述AAV VP1衣壳多肽和所述AAV VP3衣壳多肽由包含AAV cap基因的相同核酸序列编码,特别地其中cap基因中VP2的起始密码子被突变。

[0303] 在一些实施例中,步骤b)中的多个细胞存在于非人模型动物内。在一些实施例中,经由静脉内、颅内或鞘内注射,或通过经由一些其他途径(例如,鼻、肝、脑室内、脑池内、玻璃体内、耳蜗内等),用AAV文库处理动物。在AAV运输至所希望的组织或器官的足够时间(例如,7、10、14、18、21、24、28、30天或更长时间)之后,处死动物,并且收获目的组织/器官。在一些实施例中,收获的目的组织/器官选自CNS、脑、心脏、肺、气管、食道、肌肉、骨、软骨、骨髓、胃、胰腺、肠、肝、脾、膀胱、肾、输尿管、尿道、子宫、输卵管、卵巢、睾丸、前列腺、眼、血液、淋巴和口腔粘膜。在一些实施例中,收获的目的组织/器官选自全血、脑、肝、脾、肾、骨骼肌、心脏、肺和骨髓。

[0304] 在一些实施例中,监测组织中的细胞中的报告序列在细胞的细胞质中或在目的细胞器中的表达。在一些实施例中,目的细胞器是细胞核。在一些实施例中,从组织中分离包含AAV有效载荷的细胞器(如通过报告序列的表达所证明)。在一些实施例中,细胞器是细胞核。在一些实施例中,该方法进一步包括选择所述报告序列在其中表达的细胞的步骤。

[0305] 在一些实施例中,在步骤c)中,分离来自预定义组织或细胞类型的细胞的核酸。在一些实施例中,预定义组织的细胞选自来自以下的细胞:CNS、脑、心脏、肺、气管、食道、肌肉、骨、软骨、骨髓、胃、胰腺、肠、肝、脾、膀胱、肾、输尿管、尿道、子宫、输卵管、卵巢、睾丸、前列腺、眼、血液、淋巴和口腔粘膜。在一些实施例中,预定义组织的细胞选自全血、脑、肝、脾、肾、骨骼肌、心脏、肺和骨髓。在一些实施例中,预定义细胞类型的细胞选自多能祖细胞

(MPP) (诸如多能造血祖细胞) 和造血干细胞 (HSC) (诸如长期造血干细胞 (LT-HSC))。在一些实施例中, 在使多个细胞与所述文库接触之后1-21天、1-14天、7-21天、2-10天、2-5天分离预定义组织或细胞类型的所述细胞。

[0306] 在一些实施例中, 从细胞器 (例如, 细胞核) 中提取核酸。在一些实施例中, 提取的核酸是RNA, 而在一些实施例中, 提取的核酸是DNA。在一些实施例中, 使提取的RNA经受逆转录以产生cDNA, 然后对其进行扩增。在一些实施例中, 在扩增中使用对条形码化的区域具有特异性的引物。在一些实施例中, 对编码可变多肽配体的序列的至少一部分进行扩增。在一些实施例中, 对扩增的cDNA进行测序。在一些实施例中, 在体内选择之后观察特定AAV变体在特定组织/器官中的富集。

[0307] 在一些实施例中, 步骤c) 包括从所述细胞的至少一部分中分离RNA, 并且步骤d) 包括子步骤di) 对所述分离的RNA进行逆转录, dii) 从步骤di) 中产生的cDNA对编码多肽配体或其片段的序列的至少一部分进行PCR扩增, 以及diii) 例如通过下一代测序对多肽配体序列的至少一部分进行测序。

[0308] 在一些实施例中, 该方法进一步包括步骤e): 确定在一种组织或细胞类型中特定多肽配体序列相对于所述组织或细胞类型中多肽配体序列的总数的相对出现。

[0309] 在一些实施例中, 可以在1、2、3、4、5轮或更多轮中进行AAV VP2融合多肽变体的体内选择, 在每种情况下, 合并从前一轮获得的AAV变体或合成富集的变体的子集以及在体外或体内进行重新选择。

[0310] 在一些实施例中, 该方法进一步包括步骤f): 从步骤c) 中分离的核酸分子产生编码AAV VP2融合多肽的核酸序列的第二文库, 以及用所述第二文库重复步骤b)、c)、d) 以及任选地a) 和e)。

[0311] 在一些实施例中, 在所希望的次数的选择轮次之后, 分析获得的变体。在一些实施例中, 在体内使用单独变体来将转基因 (诸如报告基因) 递送到所希望的细胞或器官中。在分析变体的递送能力之后, 选择最佳候选物用于将来使用。

[0312] 在一些实施例中, 对所选候选物进行通过随机诱变的功能成熟, 以及具有改善的特征 (诸如特定细胞类型或组织的细胞的改善的转导) 的变体的体内或体外选择。

[0313] 在一方面, 本文提供了通过本文所述的方法产生的AAV VP2融合多肽。

[0314] 本文还提供了包含通过本文所述的方法产生的AAV VP2融合多肽的rAAV病毒粒子和包含这些rAAV病毒粒子的药物组合物。所述rAAV病毒粒子和药物组合物可以用作药物。

[0315] 具有改善的受体结合和/或转导水平的AAV VP2衣壳多肽

[0316] 在一方面, 本文提供了具有AAV血清型AAV1的AAV VP2衣壳多肽, 这些AAV VP2衣壳多肽包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合。在一些实施例中, AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D213A、T162R和/或P191N, 特别是以下所有三个氨基酸取代: D213A、T162R和P191N。

[0317] 在另一方面, 本文提供了具有除AAV1之外的AAV血清型的AAV VP2衣壳多肽, 这些AAV VP2衣壳多肽包含对应于选自以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N。

[0318] 在一些实施例中, AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型8, 并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合。特别地, AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D214A、K163R和/或P192N, 特别是以下所有三个氨基酸取代: D214A、K163R和P192N。

[0319] 在其他实施例中, AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型9, 并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合。特别地, AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D213A、S162R和/或P191N, 特别是以下所有三个氨基酸取代: D213A、S162R和/或P191N。

[0320] 本文还提供了包含以上列出的AAV VP2衣壳多肽之一和多肽配体的AAV VP2融合多肽, 其中多肽配体与AAV VP2衣壳多肽的N末端融合。

[0321] 实施例

[0322] 1. 一种腺相关病毒(AAV)VP2融合多肽, 该腺相关病毒VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体, 例如由其组成, 其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端融合, 并且其中该多肽配体的分子量高达10kDa。

[0323] 2. 如实施例1所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述多肽配体与至少一种组织或细胞类型上表达的细胞表面分子特异性结合, 和/或其中相对于不包含所述多肽配体的AAV VP2衣壳多肽, 所述AAV VP2融合多肽介导至少一种组织或细胞类型中增加的转导和/或增加的嗜性。

[0324] 3. 如实施例1或2所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述多肽配体选自以下组成的组: GP2多肽、Sso7d多肽和亲和体。

[0325] 4. 如实施例3所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述多肽配体选自以下组成的组: SEQ ID NO: 1的Sso7d多肽和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

[0326] 5. 如实施例4所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述多肽配体选自以下组成的组: SEQ ID NO: 1的Sso7d多肽, 其中位置21、23、25、28、30、32、40、42和44处的氨基酸残基X独立地选自D、R、H、N、A、I、Y和W; 和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

[0327] 6. 如前述实施例中任一项所述的AAV VP2融合多肽, 该AAV VP2融合多肽进一步包含在该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽之间的肽接头, 特别地其中所述肽接头选自以下组成的组: 甘氨酸-丝氨酸(GS)接头和丙氨酸-脯氨酸-丝氨酸(APS)接头, 更特别地其中该GS接头具有式[GGGS]<sub>n</sub>, 并且该APS接头具有式[APS]<sub>n</sub>, 其中n是在1至10范围内的整数, 特别地其中n是1、2、3、4、5或6, 更特别地其中对于该GS接头, n是1、2、3或4, 并且对于该APS接头, n是2、3、4或5。

[0328] 7. 如前述实施例中任一项所述的AAV VP2融合多肽, 其中所述AAV VP2衣壳多肽具有选自以下组成的组的AAV血清型: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5, 特别地选自以下组成的组: AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。

[0329] 8.如实施例7所述的AAV VP2融合多肽,其中该AAV VP2衣壳多肽在其天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变,特别地其中

[0330] a) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV6,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的ai) K531E和V473D;aii) K531E、K459S、V473D和N500E;aiii) G266A和N269Q;aiv) G266A、N269Q和D590A;av) K531E、V473D、G266A和N269Q;或avi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A;其中

[0331] b) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV8,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的bi) G268E和N271Q;bii) S387A;biii) G268E、N271Q和S387A;biv) A592Q;或bv) A592D;其中

[0332] c) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV9,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的ci) W503A;cii) N562A和E563A;ciii) Q590A和W503A;或civ) Q590A、W503A、N562A和E563A;其中

[0333] d) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV2,并且在其VP3区内包含相对于SEQ ID NO:6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A;或者其中

[0334] e) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1,并且在其VP3区内包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的ei) V473D和N500E;eii) R514A;或eiii) V473D、N500E和R514A。

[0335] 9.如前述实施例中任一项所述的AAV VP2融合多肽,其中a) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,或者其中b) 该AAV VP2融合多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N,特别地其中bi) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型8,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D214A、K163R和/或P192N,或者其中bii) 该AAV VP2融合多肽具有AAV血清型9,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、S162R和/或P191N。

[0336] 10.如实施例9a)所述的AAV VP2融合多肽,其中该AAV VP2融合多肽进一步包含相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的氨基酸取代V473D和N500E。

[0337] 11.如前述实施例中任一项所述的AAV VP2融合多肽,其中所述AAV VP2衣壳多肽缺乏对应的野生型AAV VP2衣壳多肽的第一个苏氨酸。

[0338] 12.如前述实施例中任一项所述的AAV VP2融合多肽,其中所述多肽配体包含至多3个半胱氨酸残基、特别地至多2个半胱氨酸残基、更特别地至多1个半胱氨酸残基,最特别地不包含半胱氨酸残基。

[0339] 13.一种分离的核酸,该分离的核酸编码如前述实施例中任一项所述的AAV VP2融合多肽。

[0340] 14.如实施例13所述的分离的核酸,该分离的核酸进一步包含启动子。

[0341] 15.如实施例13或14所述的分离的核酸,该分离的核酸进一步包含位于该AAV VP2融合多肽开放阅读框(ORF)的上游和下游的两个AAV反向末端重复(ITR)序列,并且任选地进一步包含报告序列,特别地其中该报告序列编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白,更特别地其中该报告蛋白选自由以下组成的组:EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶。

[0342] 16.一种细胞,该细胞包含如实施例1至12中任一项所述的AAV VP2融合多肽或如实施例13至15中任一项所述的核酸。

[0343] 17.如实施例16所述的细胞,其中该细胞选自由以下组成的组:昆虫细胞(例如,Sf9细胞)和HEK293细胞。

[0344] 18.如实施例16所述的细胞,其中该细胞选自哺乳动物细胞,包括但不限于鼠细胞、非人灵长类动物细胞或人细胞,选自由以下组成的组:肝细胞、脑细胞、脾细胞、肾细胞、血细胞、肺细胞、肌肉细胞、心脏细胞、骨髓细胞、多能祖细胞(MPP)(诸如多能造血祖细胞)和造血干细胞(HSC)(诸如长期造血干细胞(LT-HSC))。

[0345] 19.一种重组AAV(rAAV)病毒粒子,该重组AAV病毒粒子包含如实施例1至12中任一项所述的AAV VP2融合多肽。

[0346] 20.如实施例19所述的rAAV病毒粒子,其中所有AAV VP2衣壳多肽都与所述多肽配体融合。

[0347] 21.如实施例19或20所述的rAAV病毒粒子,该rAAV病毒粒子进一步包含选自由以下组成的组的核酸序列:非编码核酸、蛋白质或RNA编码序列、表达盒、多表达盒、用于同源重组的序列和基因组基因靶向盒。

[0348] 22.如实施例21所述的rAAV病毒粒子,其中所述表达盒编码如实施例1至12中任一项所述的AAV VP2融合多肽,特别地其中包含在该rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽和由所述表达盒编码的AAV VP2融合多肽是相同的。

[0349] 23.如实施例21所述的rAAV病毒粒子,其中所述表达盒编码治疗性核酸,包括但不限于治疗性RNA、mRNA、siRNA、miRNA、shRNA和反义寡核苷酸;治疗性蛋白或治疗性抗体或抗体片段。

[0350] 24.如实施例19至23中任一项所述的rAAV病毒粒子,其中该病毒粒子进一步包含AAV VP1和VP3多肽,特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有相同的AAV血清型,该AAV血清型选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、

AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5,特别地选自自由以下组成的组:AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。

[0351] 25.如实施例24所述的rAAV病毒粒子,其中该AAV VP1、VP2和VP3多肽在该AAV VP1、VP2和VP3衣壳多肽的天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变,特别地其中该AAV VP1、VP2和VP3多肽在每个AAV衣壳多肽的共享VP3区内包含相同的至少一个突变,更特别地其中

[0352] a) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV6,并且各自在共享VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:3的VP1氨基酸序列的ai) K531E和V473D;aii) K531E、K459S、V473D和N500E;aiii) G266A和N269Q;aiiv) G266A、N269Q和D590A;av) K531E、V473D、G266A和N269Q;或avi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A;其中

[0353] b) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV8,并且各自在共享VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的bi) G268E和N271Q;bii) S387A;biii) G268E、N271Q和S387A;biv) A592Q;或bv) A592D;其中

[0354] c) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV9,并且各自在共享VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的ci) W503A;cii) N562A和E563A;ciii) Q590A和W503A;或civ) Q590A、W503A、N562A和E563A;其中

[0355] d) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV2,并且各自在共享VP3区内包含相对于SEQ ID NO:6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A;或者其中

[0356] e) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV1,并且各自在共享VP3区内包含选自自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的ei) V473D和N500E;eii) R514A;或eiii) V473D、N500E和R514A。

[0357] 26.一种药物组合物,该药物组合物包含如实施例19至21和23至25中任一项所述的rAAV病毒粒子和药学上可接受的赋形剂。

[0358] 27.如实施例19至21和23至25中任一项所述的rAAV病毒粒子或如实施例26所述的药物组合物,用作药物。

[0359] 28.一种将转基因递送到细胞中的方法,该方法包括使该细胞与如实施例19至21和23至25中任一项所述的rAAV病毒粒子或如实施例26所述的药物组合物接触。

[0360] 29.如实施例28所述的方法,其中该细胞在活受试者中,特别地其中该受试者是哺

乳动物受试者,更特别是人。

[0361] 30.一种在治疗性治疗方案中使用如实施例19至21和23至25中任一项所述的rAAV病毒粒子或如实施例26所述的药物组合物的方法或使用如实施例19至21和23至25中任一项所述的rAAV病毒粒子或如实施例26所述的药物组合物作为疫苗的方法。

[0362] 31.一种文库构建体,该文库构建体包含编码AAV VP2融合多肽的核酸序列,该AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,例如由其组成,其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中该多肽配体的分子量高达10kDa。

[0363] 32.如实施例31所述的文库构建体,其中该多肽配体在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸位置处包含随机化氨基酸。

[0364] 33.如实施例31或32所述的文库构建体,其中所述多肽配体选自由以下组成的组:GP2多肽、Sso7d多肽和亲和体。

[0365] 34.如实施例33所述的文库构建体,其中所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1的Sso7d多肽和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

[0366] 35.如实施例34所述的文库构建体,其中所述多肽配体选自由以下组成的组:SEQ ID NO:1的Sso7d多肽,其中位置21、23、25、28、30、32、40、42和44处的氨基酸残基X独立地选自D、R、H、N、A、I、Y和W;和与其具有至少80%、85%、90%或95%序列同一性的Sso7d多肽。

[0367] 36.一种文库,该文库包含多个如实施例31至35中任一项所述的文库构建体。

[0368] 37.如实施例36所述的文库,其中该文库包含至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或 $10^9$ 个独特的文库构建体。

[0369] 38.如实施例36或37所述的文库,其中这些文库构建体是质粒DNA分子,这些质粒DNA分子包含与启动子可操作地连接的编码所述AAV VP2融合多肽的所述核酸序列,并且任选地进一步包含报告序列,特别地其中该报告序列编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白,更特别地其中该报告蛋白选自由以下组成的组:EGFP、mCherry、sfCherry、sfCherry2、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶。

[0370] 39.如实施例36或37所述的文库,其中每个文库构建体都存在于rAAV病毒粒子内,特别地其中所述rAAV病毒粒子包含如实施例4或5所述的AAV VP2融合多肽,并且其中包含在给定rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽和由存在于所述给定rAAV病毒粒子中的文库构建体编码的AAV VP2融合多肽是相同的。

[0371] 40.如实施例39所述的文库,其中每个文库构建体都进一步包含启动子、位于该启动子的上游和位于编码该AAV VP2融合多肽的核酸序列的下游的两个AAV反向末端重复(ITR)序列以及任选地报告序列,特别地其中该报告序列编码荧光报告蛋白或发光报告蛋白,更特别地其中该报告蛋白选自由以下组成的组:EGFP、mCherry、sfCherry、mClover3、mRuby3、mApple、iRFP、tdTomato、mVenus、YFP、RFP、萤火虫萤光素酶和纳米萤光素酶。

[0372] 41.如实施例39或40所述的文库,其中所述rAAV病毒粒子包含如实施例4或5所述的AAV VP2融合多肽,并且进一步包含AAV VP1和VP3多肽,特别地其中包含在所述rAAV病毒粒子中的AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有相同的AAV血清型,该AAV血清型选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVrh.8、AAVrh.10、AAVrh.32.33、牛AAV或禽AAV.5,特别地选自由以

下组成的组: AAV1、AAV6、AAV8和AAV9。

[0373] 42. 如实施例41所述的文库, 其中包含在所述rAAV病毒粒子中的AAV VP1、VP2和VP3多肽在该AAV VP1、VP2和VP3衣壳多肽的天然受体的至少一个结合位点中包含至少一个突变, 特别地其中该AAV VP1、VP2和VP3多肽在每个AAV衣壳多肽的共享VP3区内包含相同的至少一个突变, 更特别地其中

[0374] a) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV6, 并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 3的VP1氨基酸序列的K531E、V473D、K459S、N500E、G266A、N269Q和D590A或其任何组合, 特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 3的VP1氨基酸序列的ai) K531E和V473D; aii) K531E、K459S、V473D和N500E; aiii) G266A和N269Q; aiv) G266A、N269Q和D590A; av) K531E、V473D、G266A和N269Q; 或avi) K531E、K459S、V473D、N500E、G266A、N269Q和D590A; 其中

[0375] b) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV8, 并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的G268E、N271Q、S387A、A592Q和A592D或其任何组合, 特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 4的VP1氨基酸序列的bi) G268E和N271Q; bii) S387A; biii) G268E、N271Q和S387A; biv) A592Q; 或bv) A592D; 其中

[0376] c) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV9, 并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的Q590A、W503A、N562A和E563A或其任何组合, 特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 5的VP1氨基酸序列的ci) W503A; cii) N562A和E563A; ciii) Q590A和W503A; 或civ) Q590A、W503A、N562A和E563A; 其中

[0377] d) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV2, 并且各自在共享VP3区内包含相对于SEQ ID NO: 6的VP1氨基酸序列的氨基酸取代R585A; 或者其中

[0378] e) 该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽具有AAV血清型AAV1, 并且各自在共享VP3区内包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的V473D、N500E和R514A或其任何组合, 特别地其中该AAV VP2融合多肽以及所述AAV VP1和VP3多肽各自包含以下一个或多个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的ei) V473D和N500E; eii) R514A; 或eiii) V473D、N500E和R514A。

[0379] 43. 如实施例41所述的文库, 其中a) 包含在所述rAAV病毒粒子中的所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型AAV1, 并且包含选自由以下组成的组的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合, 特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代: D213A、T162R和/或P191N, 或者其中b) 包含在所述rAAV病毒粒子中的所述AAV VP2融合多肽具有除AAV1之外的AAV血清型, 并且包含对应于选自由以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代: 相对于SEQ ID NO: 7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N, 特别地其中bi) 包含在所述rAAV病毒粒子中的所述AAV

VP2融合多肽具有AAV血清型8,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D214A、K163R和/或P192N,或者其中bii)包含在所述rAAV病毒粒子中的所述AAV VP2融合多肽具有AAV血清型9,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2融合多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、S162R和/或P191N。

[0380] 44.一种产生具有至少一种所希望的特征的AAV VP2融合多肽的方法,该方法包括针对具有所述至少一种所希望的特征的编码的AAV VP2融合多肽对如实施例36至43中任一项所述的文库进行筛选。

[0381] 45.如实施例44所述的方法,其中所述至少一种所希望的特征是相对于不包含所述多肽配体的AAV VP2衣壳多肽,由所述AAV VP2融合多肽介导的至少一种组织或细胞类型中增加的转导和/或增加的嗜性。

[0382] 46.如实施例44或45所述的方法,该方法包括以下步骤:b)使如实施例36至43中任一项所述的文库与多个细胞接触,c)从所述细胞的至少一部分中分离核酸分子,以及d)确定在步骤b)中分离的至少一种核酸分子的编码该多肽配体或其片段的序列的至少一部分。

[0383] 47.如实施例46所述的方法,该方法进一步包括在步骤之前提供如实施例39所述的文库的步骤a),通过ai)用包含AAV rep基因的核酸序列、编码AAV VP1衣壳多肽的核酸序列、编码AAV VP3衣壳多肽的核酸序列和如实施例36所述的文库转染细胞,其中每个文库构建体都进一步包含位于编码AAV VP2融合多肽的核酸序列的上游和下游的两个AAV反向末端重复(ITR)序列,以及a ii)将该细胞在适合于AAV病毒粒子形成的条件下孵育,任选地其中这些细胞是哺乳动物细胞、特别是HEK293细胞,或昆虫细胞、特别是Sf9细胞。

[0384] 48.如实施例47所述的方法,其中所述AAV VP1衣壳多肽和所述AAV VP3衣壳多肽由包含AAV cap基因的相同核酸序列编码,特别地其中该cap基因中VP2的起始密码子被突变。

[0385] 49.如实施例46至48中任一项所述的方法,其中步骤b)中的该多个细胞存在于非人模型动物内。

[0386] 50.如实施例49所述的方法,其中在步骤c)中,分离来自预定义组织或细胞类型的细胞的核酸,特别地其中在使该多个细胞与所述文库接触之后1-21天、1-14天、7-21天、2-10天、2-5天分离预定义组织或细胞类型的所述细胞。

[0387] 51.如实施例44至50中任一项所述的方法,该方法进一步包括选择所述报告序列在其中表达的细胞的步骤。

[0388] 52.如实施例46至51中任一项所述的方法,其中步骤c)包括从所述细胞的至少一部分中分离RNA,并且步骤d)包括子步骤di)对所述分离的RNA进行逆转录,dii)从步骤di)中产生的cDNA对编码该多肽配体或其片段的序列的至少一部分进行PCR扩增,以及diii)特别地通过下一代测序对该多肽配体序列的至少一部分进行测序。

[0389] 53.如实施例46至52中任一项所述的方法,该方法进一步包括步骤e):确定在一种组织或细胞类型中特定多肽配体序列相对于所述组织或细胞类型中多肽配体序列的总数

的相对出现。

[0390] 54.如实施例46至53中任一项所述的方法,该方法进一步包括步骤f):从步骤c)中分离的核酸分子产生编码AAV VP2融合多肽的核酸序列的第二文库,以及用所述第二文库重复步骤b)、c)、d)以及任选地a)和e)。

[0391] 55.一种AAV VP2融合多肽,该AAV VP2融合多肽通过如实施例44至54中任一项所述的方法产生。

[0392] 56.一种产生包含AAV VP2融合多肽的AAV病毒粒子的方法,该方法包括用如实施例14或15所述的核酸转导包装细胞,其中所述方法导致该包装细胞产生该AAV病毒粒子。

[0393] 57.一种产生包含AAV VP2融合多肽的AAV病毒粒子的方法,该方法包括培养如实施例16或17所述的细胞,其中所述方法导致该包装细胞产生该AAV病毒粒子。

[0394] 58.一种AAV病毒粒子,该AAV病毒粒子通过如实施例56或57所述的方法产生。

[0395] 59.一种制备包含如实施例53或58所述的AAV病毒粒子的药物组合物的方法,该方法包括用药学上可接受的载体配制该AAV病毒粒子。

[0396] 60.一种试剂盒,该试剂盒包含如实施例13至15中任一项所述的分离的核酸。

[0397] 61.一种AAV VP2融合多肽,该AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中该多肽配体的分子量高达10kDa。

[0398] 62.一种AAV VP2融合多肽,该AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中该AAV VP2衣壳多肽包含消除或减少与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)和/或唾液酸(SIA)的结合的一个或多个突变。

[0399] 63.如实施例62所述的AAV VP2融合多肽,其中该多肽配体的分子量高达10kDa。

[0400] 64.一种AAV VP2融合多肽,该AAV VP2融合多肽包含AAV VP2衣壳多肽和多肽配体,其中该多肽配体与该AAV VP2衣壳多肽的N末端融合,并且其中a)该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型AAV1,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,或者其中b)该AAV VP2衣壳多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N,特别地其中bi)该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型8,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D214A、K163R和/或P192N,或者其中bii)该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型9,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、S162R和/或P191N。

[0401] 65.如实施例64a)所述的AAV VP2融合多肽,其中该AAV VP2衣壳多肽进一步包含相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的氨基酸取代V473D和N500E。

[0402] 66.一种AAV VP2衣壳多肽,其中a)该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型AAV1,并且

包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、T162R和/或P191N,或者其中b) 该AAV VP2衣壳多肽具有除AAV1之外的AAV血清型,并且包含对应于选自以下组成的组的氨基酸取代中的至少一个的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:7的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、M211V、G199R、D213A、T162R和P191N,特别地其中bi) 该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型8,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:4的VP1氨基酸序列的E147S、P186G、P167R、M212V、G200R、D214A、K163R和P192N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D214A、K163R和/或P192N,或者其中bii) 该AAV VP2衣壳多肽具有AAV血清型9,并且包含选自以下组成的组的至少一个氨基酸取代:相对于SEQ ID NO:5的VP1氨基酸序列的E147S、P185G、P166R、G199R、D213A、S162R和P191N或其任何组合,特别地其中该AAV VP2衣壳多肽包含以下一个或多个氨基酸取代:D213A、S162R和/或P191N。

[0403] 67. 一种rAAV病毒粒子,该rAAV病毒粒子包含如实施例66所述的AAV VP2衣壳多肽。

## 附图说明

[0404] 本专利或申请文件包含至少一张以彩色绘制的附图。带有一张或多张彩色附图的本专利或专利申请公布的副本在请求并支付必要的费用后将由专利局提供。

[0405] 图1是实例1中产生的AAV VP2融合多肽表达质粒的示意图表示。

[0406] 图2是货物表达质粒pNN001的示意图表示。

[0407] 图3示出了与CTR w.t.AAV8相比的经Darpin、VHH和小蛋白装饰的AAV8制剂的SDS-PAGE (变性)。如通过MS所确认的,在样品4中观察到少量VP2 w.t.污染(可能是由于来自AAV8 trans-VP2产生的亲和纯化溢出)。

[0408] 图4示出了使用经装饰的AAV8制剂,对EGFR和TIGIT重组蛋白的AAV夹心ELISA。

[0409] 图5示出了与不同支架融合的VP2的AAV8装饰水平。

[0410] 图6示出了经装饰的AAV8对EGFR过表达HKB11细胞系的体外感染性。示出了完整颗粒数与受感染的(EGFP+)细胞的百分比的关系。

[0411] 图7示出了抗EGFR Sso7d-AAV8 VP2融合物对GBM神经球(EGFR增强的克隆HF-2927)的体外感染性。

[0412] 图8示出了经装饰的AAV8对受体过表达细胞系的体外感染性。

[0413] 图9示出了经装饰的AAV6Si12对EGFR过表达HKB11和HKB11w.t.细胞系的体外感染性。

[0414] 图10示出了经抗EGFR Sso7 VP2融合物装饰的AAV9对GBM神经球的体外感染性。

[0415] 图11示出了经装饰的AAV1Si11对EGFR过表达HKB11和HKB11w.t.细胞系的体外感染性。

[0416] 图12示出了在Lib8 Sso7d噬菌体质粒文库上的靶位置处的氨基酸频率。结果表示关于500-700K个过滤的读段(Q>30)的MiSeq NGS结果。

[0417] 图13示出了在第三轮选择之后对Lib8 Sso7d文库的出现分析的结果。

- [0418] 图14示出了六种Sso7d构建体在EGFR过表达细胞和EGFR敲除细胞上的FACS分析的结果。
- [0419] 图15是货物质粒SK0033的示意图表示。
- [0420] 图16示出了在Lib8 Sso7d-AAV1Si11质粒文库(SK0037)中的随机化位置处的氨基酸频率。
- [0421] 图17A示出了对Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11的出现分析的结果。
- [0422] 图17B示出了在Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11质粒文库上的靶位置处的氨基酸频率。
- [0423] 图17C示出了在Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11 AAV文库上的靶位置处的氨基酸频率。
- [0424] 图17D示出了靶位置处的Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11 AAV文库产生偏差。
- [0425] 图18示出了人源化小鼠的不同组织中人细胞的百分比。
- [0426] 图19示出了Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11和未经装饰的对照在人源化小鼠中的生物分布。
- [0427] 图20示出了RT-PCR反应物(预期大小:403bp)的快速凝胶分析。
- [0428] 图21示出了单个rcSso7d变体序列在来自注射Lib8 Sso7d-VP2AAV1Si11的小鼠的不同器官/细胞中的分布。
- [0429] 图22示出了富集的苗头物(hit)在不同器官中的分布。
- [0430] 图23是实例8中产生的条形码化的货物质粒的示意图表示。
- [0431] 图24A示出了从单个条形码化的Sso7d-AAV1Si11获得的完整颗粒的产量和百分比。
- [0432] 图24B示出了在单个条形码化的Sso7d-AAV1Si11和未经装饰的对照上VP2融合物和VP1的比例。
- [0433] 图25示出了经Sso7d装饰的AAV1Si11对HEK293悬浮细胞的体外感染性。
- [0434] 图26示出了用于小鼠注射的输入AAV-471制剂中的文库分布。
- [0435] 图27示出了条形码化的Sso7d-VP2 AAV1Si11文库在不同组织中的分布。
- [0436] 图28示出了RT-PCR反应物(预期大小:403pb)的快速凝胶分析。
- [0437] 图29示出了用于NGS的扩增子片段(预期大小:243bp)的快速凝胶分析。
- [0438] 图30示出了在使用Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11文库对人源化小鼠进行三轮选择之后鉴定的前12个富集的苗头物在LT-HSC群体中的组织分布。
- [0439] 图31是实例10中产生的受体货物质粒的示意图表示。
- [0440] 图32示出了RT-PCR反应物(预期大小:608-668bp)的快速凝胶分析。
- [0441] 图33示出了扩增子PCR反应物(预期大小:484-529bp)的快速凝胶分析。
- [0442] 图34示出了V-Exp文库选择计数分布。
- [0443] 图35示出了在阳性和阴性选择之后对V-Exp靶位置的变异分析(数据表示每个给定位置处的w.t.氨基酸的百分比)。
- [0444] 图36示出了在阳性选择之后优先的VP2位置处的氨基酸分布(数据表示在前九个优先位置处的氨基酸的百分比-给所选AA突变加框)。
- [0445] 图37示出了在阳性选择之后优先的VP2位置处的接头和氨基酸变异。
- [0446] 图38示出了描绘EGFR过表达细胞与敲除细胞中EGFP阳性细胞的EC50值之间的倍数变化的条形图。

[0447] 图39示出了描绘经不同抗EGFR Sso7d装饰的AAV1 Si11 VP2变体与EGFR的结合的条形图(在5E+11vp下去除背景的ELISA信号)。

[0448] 图40示出了经抗EGFR Sso7d装饰的ssAAV1Si11对HKB11野生型细胞的体外感染性。

[0449] 图41示出了经抗EGFR Sso7d装饰的ssAAVSi11对受体过表达的HKB11细胞的体外感染性。

[0450] 实例

[0451] 实例1:使用与VP2 N末端基因融合的VHH、DARPIN和小蛋白支架初步评价AAV8衣壳中的AAV VP2融合多肽装饰水平

[0452] 为了评价VP2 N末端基因融合产生经装饰的AAV(如Munch等人,Nat Commun[自然·通讯]6,6246(2015)中所述)的可行性,将不同的支架克隆到在VP2开放阅读框的N末端缺乏编码苏氨酸的起始密码子的AAV8 VP2表达质粒AgC1159(VP2 DT1)中。所得AAV VP2融合多肽表达质粒(其中AAV VP2融合多肽开放阅读框与HCMV启动子可操作地连接)以图形方式描绘于图1中。

[0453] 将支架克隆到VP2表达质粒中:

[0454] 在金尔特公司(GeneArt)作为串DNA订购表1中列出的支架序列,添加了适合于基于吉布森的克隆的5'和3'延伸。在VHH的情况下,使用内部表达质粒作为模板通过PCR对序列进行扩增。将片段克隆到HindIII-AgeI消化的VP2表达质粒AgC1159中,并且通过桑格测序确认正确的组装。

[0455] 表1:实例1中使用的支架和接头的列表。在所有构建体的N末端都添加strep-TagII-GS序列并且在C末端都添加G4S接头。

[0456]

| 支架 ID                             | 参考                                                                                                | *最终支架序列                                                                                                                                                                                                          | 最终支架的<br>分子量(kDa) |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 抗 Her2<br>Darpin (9_29)           | <a href="https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085">https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085</a> | MRGSAWSHPQFEKGS <del>DLGKKLLEAA</del><br>RAGQDDEVRLMANGADVNAHDFY<br>GITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGAD<br>VNAFDYDNTPLHLAADAGHLEIVEV<br>LLKYGADVNASDRDGHTPLHLAARE<br>GHLEIVEVLLKNGADVNAQDKFGKT<br>AFDISIDNGNEDLAEILQGGGGS | 18.7              |
| 抗 EGFR<br>(ErbB1)<br>Darpin(E_01) | <a href="https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085">https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085</a> | MRGSAWSHPQFEKGS <del>DLGKKLLEAA</del><br>RAGQDDEVRLMANGADVNA <del>DDTW</del><br>GWTPLHLAAYQGHLEIVEVLLKNGA<br>DVNAYDYIGWTPHLAADGHLEIVE                                                                            | 18.7              |

[0457]

|                              |                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                    |      |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|                              |                                                                                       | <b>VLLKNGADVNASDYIGDTPLHLAAH<br/>NGHLEIVEVLLKHGADVNAQDKFGK<br/>TAFDISIDNGNEDLAEILQGGGGS</b>                                                                                                                        |      |
| 抗 MBP<br>Darpin (Off7)       | <a href="https://doi.org/10.1038/nature1962">https://doi.org/10.1038/nature1962</a>   | <b>MRGSAWSHPQFEKGSDLGRKLLEAA<br/>RAGQDDEVRLMANGADVNAADNT<br/>GTTPLHLAAAYSGHLEIVEVLLKHGA<br/>DVDASDVFGYTPLHLAAYWGHLEIV<br/>EVLLKNGADVNAMDSGMTPLHLA<br/>AKWGYLEIVEVLLKHGADVNAQDK<br/>FGKTAFDISIDNGNEDLAEILQGGGGS</b> | 18.5 |
| 抗 TIGIT<br>VHH<br>(NEG974)   | 内部                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                    | 15.6 |
| 抗 GPR126<br>VHH<br>(NEG1713) | 内部                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                    | 15.3 |
| 抗 HA 小蛋白                     | <a href="https://doi.org/10.1038/nature23912">https://doi.org/10.1038/nature23912</a> | <b>MRGSAWSHPQFEKGSTSGVRATSKFA<br/>ALIAAEIAREFGYTVDVQEKNGEWR<br/>VVFDGGGGS</b>                                                                                                                                      | 6.4  |

[0458] \*不含N末端或C末端添加物的原始序列加粗

[0459] 经装饰的AAV产生:

[0460] 将产生的VP2融合质粒与rep/cap VP2 K0质粒(包含AAV2 rep基因和在VP2开放阅读框起始密码子中具有突变(因此编码AAV8 VP1和VP3,但不编码VP2)的AAV8 cap基因)、pHelper(编码腺病毒蛋白E2A、E4和VA RNA)和作为货物的HCMVprom-EGFP-SV40pA scAAV(pNN001;在HCMV启动子的控制下编码eGFP并侧接AAV2ITR,并且示意性地示于图2中)一起转染到悬浮HEK293T/17F细胞中。

[0461] 简言之,将100ml(对于AAV8 w.t.产生为350ml)HEK293T/17F悬浮细胞稀释至 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/ml,并且使用PEI MAX(PEI:DNA比率=3:1)以 $0.8 \mu\text{g}$  DNA混合物/ $1 \times 10^6$ 个细胞进行转染。质粒混合物由等摩尔量的如表2所述的三种或四种质粒构成。转染后六天,将样品在4000rpm下离心20min,并且将上清液以4ml/min加载到安装在AKTA Pure仪器上的POROS GoPure AAVX 1ml 0.5cm x 5cm(赛默飞世尔公司(ThermoFisher)#A36652)上。将结合的AAV颗粒用10个柱体积(CV)的洗涤缓冲液(pH 7.3)(50mM Tris-Cl,0.5M NaCl,0.01% Pluronic F-68)洗涤,并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液(pH 2.7)(0.1M甘氨酸,0.2M NaCl,0.25M L-精氨酸)洗脱。将洗脱级分(0.25ml)立即用 $25 \mu\text{l}$  1M Tris-Cl(pH 10)中和。将含有

AAV的级分(如通过UV280信号所评估)合并,并且使用Float-A-Lyzer透析装置100kDa (Spectrum™ #G235071) 用PBS (pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68透析过夜。

[0462] 使用qPCR方法来评估完整颗粒浓度(vg/ml)。使用KAPA探针快速qPCR试剂盒和表3中列出的SV40pA寡核苷酸组,在Qiagen RotorGene仪器上对经DNA酶预处理的样品进行qPCR。将质粒pNN001用于标准曲线生成。qPCR结果总结于表4中。

[0463] 表2:此实例中使用的除了pHelper和pNN001货物之外的rep/cap VP2 KO和VP2表达质粒的列表

| 样品 ID                 | Rep/Cap 质粒                        | VP2 表达质粒                                       |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| AAV8 w.t.             | pRep2Cap8                         | 无                                              |
| AAV8 VP2 KO           | * (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO | 无                                              |
| [0464] AAV8 trans-VP2 | (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO   | (AgC1159) pR5a_AAV8 VP2 (无融合)                  |
| AAV8-抗 EGFR Darpin    | (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO   | (AgC1168)pR5a_抗 ErbB1(E_01) DARPin_AAV8 VP2    |
| AAV8-抗 MBP            | (AgC1157) pAAV                    | (AgC1169) pR5a_抗 MBP Off7                      |
| Darpin                | rep2_cap8 VP2 KO                  | DARPin_AAV8 VP2                                |
| AAV8-抗 Her2 Darpin    | (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO   | (AgC1170) pR5a_抗 HER2 9_29 Darpin_AAV8 VP2     |
| [0465] AAV8-抗 HA 小蛋白  | (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO   | (AgC1171) pR5a_抗 HA 小蛋白_AAV8 VP2               |
| AAV8-抗 TIGIT VHH      | (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO   | (AgC1172) pR5a_抗 TIGIT VHH (NEG974)_AAV8 VP2   |
| AAV8-抗 GPR126 VHH     | (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO   | (AgC1173) pR5a_抗 GPR126 (NEG1731) VHH_AAV8 VP2 |

[0466] \*通过使VP2的第一个苏氨酸突变为丙氨酸(T138A)来产生VP2 KO rep2/Cap8质粒(AgC1157)

[0467] 表3:用于通过qPCR来测量AAV基因组浓度(vg/ml)的寡核苷酸组

| 寡核苷酸 ID       | 5'-3'序列                                        |
|---------------|------------------------------------------------|
| SV40pA 区-For  | AGCAATAGCATCACAAATTTACAA                       |
| SV40pA 区-Rev  | CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT                  |
| SV40pA 区 - 探针 | FAM-AGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC-BHQ1 |

[0469] 表4:经装饰的AAV8的qPCR结果

| 样品 ID              | vg/ml    | 产量 (vg/细胞) |
|--------------------|----------|------------|
| AAV8 w.t.          | 7.10E+13 | 1.62E+05   |
| AAV8 VP2 KO        | 1.61E+13 | 1.29E+05   |
| AAV8 trans-VP2     | 2.39E+13 | 1.91E+05   |
| AAV8-抗 EGFR Darpin | 1.07E+13 | 8.56E+04   |
| AAV8-抗 MBP Darpin  | 3.03E+12 | 2.42E+04   |
| AAV8-抗 Her2 Darpin | 4.88E+12 | 3.90E+04   |
| AAV8-抗 HA 小蛋白      | 1.12E+13 | 8.96E+04   |
| AAV8-抗 TIGIT VHH   | 3.19E+12 | 2.55E+04   |
| AAV8-抗 GPR126 VHH  | 6.06E+12 | 4.85E+04   |

[0472] 不存在VP2 (样品AAV8 VP2 KO) 和以反式提供VP2 (样品AAV8trans-VP2) 对AAV滴度仅具有微小影响。各种支架与VP2 N末端的基因融合导致AAV滴度降低2-7倍。

[0473] 装饰水平的评价:

[0474] 通过SDS-PAGE在变性条件下分析20 $\mu$ l亲和纯化的AAV制剂,以评估VP2融合物的存在。SDS page示于图3中。只能在经小蛋白装饰的样品中观察到VP2的分子量变化,而其他样品(VHH和Darpin融合物)都没有显示出可检测水平的VP2融合物。

[0475] 另外,进行CE-SDS分析(Agilent 2200Tapestation系统,P200蛋白试剂盒,使用变性条件),以便以半定量方式评价经纯化的样品中不同VP蛋白的相对量。结果确认AAV8-抗HA小蛋白样品中VP2有分子量变化,而在其他样品中没有VP2融合物的可检测存在。AAV8-抗HA小蛋白样品显示出与AAV8 w.t.样品类似的相对量的不同VP蛋白。在AAV8 trans-VP2样品中观察到略微增加量的VP2。结果总结于表5中。

[0476] 表5:经Darpin、VHH和小蛋白装饰的AAV8制剂的VP的分子量和估计的相对量(Tapestation)

[0477] 表5a:观察到的VP的MW (kDa)

[0478]

| 样品 ID              | VP3  | VP2  | VP1  |
|--------------------|------|------|------|
| AAV8 w.t.          | 61   | 70.4 | 93.5 |
| AAV8 VP2 KO        | 61.9 |      | 94.2 |
| AAV8 trans-VP2     | 61.5 | 70.8 | 94.2 |
| AAV8-抗 EGFR Darpin | 61.9 |      | 95.1 |
| AAV8-抗 MBP Darpin  | 61.8 |      | 94.7 |
| AAV8-抗 Her2 Darpin | 62.3 |      | 95.2 |
| AAV8-抗 HA 小蛋白      | 62.2 | 78.7 | 94.2 |

[0479]

|                   |      |  |      |
|-------------------|------|--|------|
| AAV8-抗 TIGIT VHH  | 61.6 |  | 94.3 |
| AAV8-抗 GPR126 VHH | 61.6 |  | 93.8 |

[0480] 表5b:VP分布 (假设每个AAV颗粒总共60个VP)

[0481]

| 样品ID              | VP3  | VP2 | VP1 |
|-------------------|------|-----|-----|
| AAV8 w.t.         | 50.6 | 6.1 | 3.3 |
| AAV8 VP2 KO       | 56.8 |     | 3.2 |
| AAV8 trans-VP2    | 48.3 | 8.6 | 3.1 |
| AAV8-抗EGFR Darpin | 56.0 |     | 4.0 |
| AAV8-抗MBP Darpin  | 55.7 |     | 4.3 |
| AAV8-抗Her2 Darpin | 56.6 |     | 3.4 |
| AAV8-抗HA小蛋白       | 51.7 | 6.0 | 2.2 |
| AAV8-抗TIGIT VHH   | 56.6 |     | 3.4 |
| AAV8-抗GPR126VHH   | 55.4 |     | 4.6 |

[0482] 质谱分析:

[0483] 由于VHH和Darpin VP2融合物与VP1条带的潜在共迁移,使用LC-MS分析所有制剂。将5 $\mu$ l未经处理的AAV样品加样到与Synapt G2S (沃特斯公司 (WATERS)) 四极飞行时间质谱仪连接的UPLC-I级上。使样品在柱上变性,并且在Waters Bioresolve RP 1x 50mm柱上对其进行色谱分离。将柱保持在80℃下,梯度由经40min的30%至38%的有机流动相组成,并且流速为0.1ml/min。水性流动相由在水中的0.1%甲酸组成,并且有机相由在乙腈中的0.1%甲酸组成。

[0484] 可以在所有测试的样品中确认VP1和VP3的预期质量,仅在AAV8w.t.、AAV8 trans-VP2和AAV8-抗HA小蛋白样品中确认VP2 w.t.或VP2融合物的存在,确认了SDS和CE-SDS结果。

[0485] AAV8夹心ELISA:

[0486] 为了进一步评估VP2融合支架的装饰效率和正确暴露,进行更灵敏的夹心ELISA测

定。使用5 $\mu$ g/ml的hEGFR和hTIGIT胞外结构域(ECD)重组蛋白来包被96孔板。在过夜孵育并且用3% BSA/TBST缓冲液封闭之后,将不同量的经装饰的AAV vg添加到孔中,并且在室温下孵育2h。在洗涤步骤(3次)之后,将孔在室温(RT)下用抗AAV8单克隆mIgG2(傲锐基因公司(Origene)AM32478SU-N)孵育1h。将孔再次洗涤(3次),用缀合的抗小鼠IgG-AP(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)A5153)孵育,另外洗涤(3次),并且使用Attophos底物(罗氏公司(Roche)00000011681982001)使信号显影。结果示于图4中。

[0487] 与MS和CE-SDS相比,AAV8夹心Elisa在组装的AAV表面上检测到Darpin和VHH。怀疑产生的AAV仅有微小部分掺入与这两个支架中的任一个融合的VP2,这仅可通过夹心Elisa检测到,而无法通过MS和CE-SDS检测到。

[0488] 实例2:使用与VP2 N末端基因融合的小支架评价AAV8装饰水平

[0489] 如实例1中所观察到的,AAV8-抗HA小蛋白显现是唯一具有野生型样VP2装饰水平的经装饰的AAV制剂。为了评估此现象是否是由于支架的小尺寸,我们将如表6中列出的不同抗EGFR结合结构域克隆到AAV8 VP2表达质粒AgC1159中。

[0490] 表6:此实例中使用的支架ID和接头的列表

[0491]

| 支架 ID                  | 参考                                                                                                | *最终支架序列                                                                                                                                                                                  | AAV8-VP2 融合<br>表达质粒 ID                                    | 最终支架<br>的分子量<br>(kDa) |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------|
| 抗 EGFR<br>Darpin(E_01) | <a href="https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085">https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085</a> | MRGSAWSHPQFEKGSDDL<br>GKKLLEAARAGQDDEV<br>RILMANGADVNAADDTW<br>GWTPLHLAAYQGHLEI<br>VEVLLKNGADVNAAYDYI<br>GWTPLHLAADGHLEIVE<br>VLLKNGADVNASDYIGD<br>TPLHLAAHNGHLEIVEV<br>LLKHGADVNAQDKFGK | (AgC1168)<br>pR5a_抗 ErbB1<br>(E_01)<br>DARPin_AAV8<br>VP2 | 18.5                  |

[0492]

|                                                   |                                                                  |                                                                                                                                                        |                                                           |      |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
|                                                   |                                                                  | <b>TAFDISIDNGNEDLAEIL<br/>QGGGGS</b>                                                                                                                   |                                                           |      |
| 抗 EGFR 纤连<br>蛋白(E.6.2.6)                          | doi:10.101<br>6/j.jmb.20<br>10.06.004                            | <b>MVSDVPRDLEVVAATPT<br/>SLLISWFDYAVTYRITY<br/>GETGGNSPVQEFTVPG<br/>WISTATISGLKPGVDYTI<br/>TVYAVTDNSRWPFSTP<br/>ISTNYRTEIDKPPQGGGG<br/>SGGGGSGGGGS</b> | (AgC1275)<br>_pRS5a_抗<br>EGFR_纤连蛋白<br>_G4Sx3_AAV8_V<br>P2 | 11.9 |
| 抗 EGFR<br>Sso7d<br>(E.18.4.5)                     | DOI<br>10.1074/jb<br>c.M116.74<br>1314                           | <b>MATVKLTYQGEEKQVD<br/>ISKITYVDRAGQFIWFEY<br/>DEGGGALGTGWVSEKD<br/>APKELLQMLEKQGGGG<br/>SGGGGSGGGGS</b>                                               | (AgC1274)<br>_pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_G4S<br>x3_AAV8_VP2    | 7.8  |
| **抗 EGFR 亲<br>和体<br>(Z <sub>EGFR</sub> -1907<br>) | doi:10.101<br>6/j.jmb.20<br>07.12.060                            | <b>MVDNKFNKEMWAAWE<br/>EILHLPNLNGWQMTAFI<br/>ASLVDDPSQSANLLAEA<br/>KKLNDQAAPKGGGGSG<br/>GGGSGGGGS</b>                                                  | (AgC1276)<br>_pRS5a_抗<br>EGFR_亲和体<br>_G4Sx3_AAV8_V<br>P2  | 7.4  |
| 抗 EGFR GP2<br>(GaEGFR <sub>2.2</sub><br>3)        | http://dx.d<br>oi.org/10.1<br>016/j.che<br>mbiol.201<br>5.06.012 | <b>MKFWATVSRGDSYWFE<br/>VPVYAETLDEALELAER<br/>QPYMYHIYYVTRVRPGG<br/>GGSGGGGSGGGGS</b>                                                                  | (AgC1273)<br>_pRS5a_抗<br>EGFR_GP2_G4Sx<br>3_AAV8_VP2      | 6.7  |
| 抗 HA 小蛋白                                          | https://doi.<br>org/10.103<br>8/nature23<br>912                  | <b>MRGSAWSHPQFEKGSTS<br/>GVRATSKFAALIAAEIAR<br/>EFGYTVDVQEKNGEWR<br/>VVFDGGGGS</b>                                                                     | (AgC1171)<br>pR5a_抗 HA 小蛋<br>白_AAV8 VP2                   | 6.4  |

[0493] \*不含N末端或C末端添加物的原始序列加粗

[0494] \*\*在最终产生步骤期间,抗EGFR亲和体(Z<sub>EGFR</sub>-1907)样品部分损失;不可能进行准确的产量评价。基于亲和纯化期间的峰高,预期产量与其他经纯化的制剂类似

[0495] 经装饰的AAV产生:

[0496] 如实例1中所述进行经装饰的不同AAV8颗粒制剂的克隆、表达、纯化和病毒浓度的评估,有以下例外:

[0497] • 每个样品的转染体积为300ml

[0498] • 转染后4天收集细胞加上清液

[0499] • 将终浓度为0.5%的Triton、2mM的MgCl<sub>2</sub>和12.5U/ml的全能核酸酶 (Benzonase) 添加到大量 (bulk) 收获物中;在37℃下进行2h裂解,之后添加0.5M NaCl,将样品在3500g下离心30min。将裂解物过滤、澄清,然后加载到POROS AAVx 1ml树脂上。

[0500] 作为对照,以类似的方式平行产生AAV8-抗EGFR Darpin和AAV8-抗HA小蛋白的新制剂。使用如实例1中所述的qPCR来评估完整颗粒浓度 (vg/ml)。结果总结于表7c中。

[0501] 装饰水平和总AAV产量的评价:

[0502] 进行CE-SDS分析 (在变性条件下使用Agilent 2100生物分析仪系统和蛋白230试剂盒) 以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0503] 总AAV颗粒/ml (vp/ml) 和VP比率的计算

[0504] • 将ng/ $\mu$ l (=μg/ml) 值除以观察到的MW,然后乘以1E+06 (μg到g的换算) 以计算摩尔/ml值

[0505] • 将摩尔/ml值乘以6.022E+23 (阿伏伽德罗常数) 以计算分子数/ml

[0506] • VP分布:基于分子/ml值计算,假设一个AAV由总共60个VP组成

[0507] • AAV颗粒/ml (vp/ml):将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0508] 结果总结于表7和图5中。

[0509] 表7:经装饰的AAV8样品的生物分析仪结果

[0510] 表7a:观察到的VP的MW (kDa)

| 样品 ID                | VP3  | VP2 | VP1   |
|----------------------|------|-----|-------|
| 抗 EGFR Darpin (E_01) | 76.5 |     | 108.8 |

|                                       |      |       |       |
|---------------------------------------|------|-------|-------|
| 抗 EGFR 纤连蛋白 (E.6.2.6)                 | 76.8 | 105.8 | 109.2 |
| 抗 EGFR Sso7d (E.18.4.5)               | 76.7 | 99.6  | 109.4 |
| 抗 EGFR 亲和体 (Z <sub>EGFR</sub> -1907)  | 77.3 | 99.4  | 109.5 |
| 抗 EGFR GP2 (GaEGFR <sub>2.2.3</sub> ) | 76.5 | 98.5  | 109.2 |
| 抗 HA 小蛋白                              | 77.3 | 97.9  | 109.4 |
| AAV8 w.t.                             | 77.0 | 91.6  | 109.8 |

[0513] 表7b:VP分布 (假设每个AAV颗粒总共60个VP)

| 样品ID                                 | VP3  | VP2  | VP1  |
|--------------------------------------|------|------|------|
| 抗EGFR Darpin (E_01)                  | 53.1 | *(1) | *6.9 |
| 抗EGFR纤连蛋白 (E.6.2.6)                  | 50.6 | 3.5  | 6.0  |
| 抗EGFR Sso7d (E.18.4.5)               | 49.6 | 5.8  | 4.6  |
| 抗EGFR亲和体 (Z <sub>EGFR</sub> -1907)   | 49.0 | 5.9  | 5.1  |
| 抗EGFR GP2 (GaEGFR <sub>2.2.3</sub> ) | 44.5 | 10.7 | 4.7  |
| 抗HA小蛋白                               | 45.8 | 9.1  | 5.1  |
| AAV8 w.t.                            | 46.0 | 9.1  | 4.9  |

[0515] \*对于Darpin样品,VP1和VP2融合物可能潜在地共迁移,并且不能为VP2单元数分配确切切值。基于VP1值的略微增加,为每个AAV分配1个VP2融合物的任意值。

[0516] 表7c:病毒基因组 (vg) 和病毒颗粒 (vp) 产量/经转染的细胞

| 样品ID                                 | vg/细胞    | vp/细胞    |
|--------------------------------------|----------|----------|
| 抗EGFR Darpin (E_01)                  | 2.32E+04 | 4.04E+04 |
| 抗EGFR纤连蛋白 (E.6.2.6)                  | 2.96E+04 | 1.20E+05 |
| 抗EGFR Sso7d (E.18.4.5)               | 2.29E+04 | 8.54E+04 |
| 抗EGFR GP2 (GaEGFR <sub>2.2.3</sub> ) | 2.77E+04 | 1.49E+05 |
| 抗HA小蛋白                               | 1.34E+04 | 8.20E+04 |
| AAV8 w.t.                            | 3.69E+04 | 1.20E+05 |

[0518] VP2融合多肽成功掺入AAV衣壳显现和与VP2多肽融合的支架的分子量相关。使用低于10kDa的支架获得令人满意的装饰水平(>60%的w.t.VP2水平)。高于此阈值,观察到VP2融合物掺入的下降,在18kDa darpin的情况下特别严重。在此实验中使用的测试的抗EGFR支架的情况下都观察到产量的微小下降(与w.t.相比<2倍)。

[0519] 经装饰的AAV8对EGFR过表达细胞系的体外感染性:

[0520] 为了评价经抗EGFR装饰的AAV8制剂的不同装饰水平的影响,在稳定过表达hEGFR的HKB11细胞(HKB11\_EGFR)上进行感染性测定。在感染当天,将细胞重悬于DMEM中至5E+05个细胞/ml,并且将50μl/孔接种于96孔板中(2.5E+04个细胞/孔)。将经装饰的AAV8制剂在DMEM培养基中稀释,并且将基于总vp的范围从2E+06至1.56E+04moi的不同浓度施加到接种的细胞(终体积100μl)。转导后四天,分离细胞,并且进行FACS分析以计算EGFP阳性细胞的百分比。反算完整颗粒(vg)。图6描绘了完整颗粒数与受感染的(EGFP+)细胞的百分比的关系。

[0521] 具有高装饰水平的抗EGFR VP2融合多肽在HKB11\_EGFR细胞中显示出增加的摄取(Sso7d>亲和体>GP2)。相比之下,与未经装饰的AAV8 w.t.对照相比,抗EGFR DARPIn和纤连蛋白支架融合物没有显示出感染性的增加,这可能是由于用这两个支架获得的装饰水平低。

[0522] 经装饰的AAV8对多形性胶质母细胞瘤(GBM)神经球的体外感染性:

[0523] GBM神经球培养物获得自亨利福特医疗集团(Henri Ford Health System),并且使其在37℃和5% CO2下在补充有Gibco N2补充物(100x;#17202-048)、BSA(西格玛公司(Sigma)#A4919;终浓度0.5mg/ml)、庆大霉素(吉布科公司(Gibco)#15710-064;终浓度0.025mg/ml)、抗生素-抗真菌剂(100x)(英杰公司#15240-062)、EGF(派普泰克公司(Peprotech)#100-15,终浓度20ng/ml)和FGF(派普泰克公司#100-18B,终浓度20ng/ml)的DMEM/HamF12(吉布科公司#11039-021)中悬浮生长。为了验证在EGFR过表达HKB11细胞系中获得的感染性结果,使用抗EGFR Sso7d (E.18.4.5)-AAV8来感染具有增强的EGFR表达的GBM神经球细胞系(HF-2927)。在不破坏神经球的情况下,将GBM细胞以大约40'000个细胞/孔接种在96孔板中(通过取200μl细胞株并破坏球体以估计细胞浓度来确定细胞数)。将接种的神经球用1E+06和1E+05moi经抗EGFR Sso7d装饰的AAV8感染,并且与含有相同EGFP货物的未经装饰AAV8和AAV9 w.t.制剂进行比较。转导后三天,使用Zoe荧光细胞成像仪(伯乐公司(Bio-Rad))监测EGFP信号。代表性神经球的照片示于图7中。

[0524] 与未经装饰的AAV8和AAV9制剂相比,展示抗EGFR Sso7d VP2融合多肽的AAV颗粒在EGFR过表达细胞系HF-2927的GBM神经球培养物中显示出显著增加的细胞摄取。

[0525] 实例3:使用与VP2 N末端基因融合的另外的GP2和亲和体结合物评价AAV8装饰水平

[0526] 引言:

[0527] 从文献中提取另外的示例性GP2和亲和体序列,并且如实例1中所述将其克隆到AAV8 VP2表达质粒中。

[0528] 表8:此实例中使用的支架ID和接头的列表

[0529]

| 支架 ID                              | 参考                                        | *最终支架序列                                                                                | AAV8-VP2 融合表达质粒 ID                                     | 支架的分子量 (kDa) |
|------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|
| 抗 Her2 亲和体<br>( <i>ZHER2:342</i> ) | DOI:<br>10.1158/0008-5472.CA<br>N-05-3521 | MVDNKFNKEMRNAYWE<br>IALLPNLNNQQKRAFIRS<br>LYDDPSQSANLLAEAKK<br>LNDAQAPKGGSGGGSG<br>GGG | (SK0046)<br>pR5a_抗<br>PDGFR_亲和体<br>_3xG4S-AAV8_<br>VP2 | 7.6          |
| 抗 PDGFRb 亲和体<br>( <i>Z02483</i> )  | DOI:<br>10.1016/j.jmb.2011.01.<br>033     | MVDNKFNKELVKAAAEI<br>DALPNLNRQWNAFIKS<br>LVDDPSQSANLLAEAKK<br>LNDAQAPKGGSGGGSG         | (SK0047)<br>pR5a_抗 HER2_亲和体<br>_3xG4S-AAV8_            | 7.3          |

[0530]

|                 |                                           |                                                                            |                                             |     |
|-----------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|
|                 |                                           | GGG                                                                        | VP2                                         |     |
| 抗 InsR GP2 (#1) | doi:<br>10.1158/1535-7163.MC<br>T-16-0685 | MKFWATVCSGHDGYCF<br>EVPVYAETLDEALELAE<br>WQYDSTYYDYAVTRVRP<br>GGGSGGGSGGGG | (SK0048)<br>pR5a_GP2_C11_3xG4S_AAV8_<br>VP2 | 6.7 |
| 抗 InsR GP2 (#5) | doi:<br>10.1158/1535-7163.MC<br>T-16-0685 | MKFWATVDCLYNDTAF<br>EVPVYAETLDEALELAE<br>WQYDPNYCIVTRVRPGG<br>GSGGGSGGGG   | (SK0049)<br>pR5a_GP2_C15_3xG4S_AAV8_<br>VP2 | 6.5 |

[0531] \*不含N末端或C末端添加物的原始序列加粗

[0532] 经装饰的AAV8产生:

[0533] 制备含有等摩尔比率的pHelper、(DL144)CAG-EGFP-NOX单链货物、上述 (AgC1157) pAAV rep2\_cap8 VP2 KO和AAV8 VP2融合表达质粒的DNA混合物,并且使用FectoVIR-AAV转染试剂(宝利普拉斯公司(Polyplus) #101000022) (DNA:FectoVIR=1 $\mu$ g:1 $\mu$ l) 将其转染到200ml浓度为2E+06vc/ml的HEK293悬浮细胞中(1.1 $\mu$ g总DNA/1E+06个细胞)。在转染之后,将终浓度为2g/l的葡萄糖添加到转染混合物中,并且将混合物在37℃、110rpm、6% CO<sub>2</sub>下孵育。还用未经装饰的AAV1Si11与其对应的条形码化的货物质粒(A02)组合再进行两次转染。

转染后三天,将至终浓度为 $0.1\text{U}/\mu\text{l}$ 的全能核酸酶和 $20\text{ml}$ 裂解缓冲液( $500\text{mM}$  HEPES, $10\%$  Tween 20, $20\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ )添加到转染反应物中,并且将混合物在 $37^\circ\text{C}$ 下在搅动中孵育 $3\text{h}$ 。在此孵育步骤之后,将 $24\text{ml}$ 蔗糖盐溶液( $5\text{M}$   $\text{NaCl}$ , $7\%$  蔗糖)添加到裂解物中,并且再孵育 $20\text{min}$ 。将样品在 $3500\text{g}$ 下离心 $15\text{min}$ ,将上清液使用 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤,补充终浓度为 $5\text{mM}$ 的EDTA,并且以 $1\text{ml}/\text{min}$ 加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱( $0.5\times 5\text{cm}$ , $1\text{ml}$ ) (赛默飞世尔公司#A36652)上。将结合的AAV颗粒用 $10\text{CV}$ 的洗涤缓冲液( $\text{pH } 7.3$ ) ( $50\text{mM}$  Tris-Cl, $0.5\text{M}$   $\text{NaCl}$ , $0.01\%$  Pluronic F-68)洗涤,并且用 $5\text{CV}$ 的甘氨酸洗脱缓冲液( $\text{pH } 2.7$ ) ( $0.1\text{M}$ 甘氨酸, $0.2\text{M}$   $\text{NaCl}$ , $0.25\text{M}$  L-精氨酸)洗脱。将洗脱级分( $0.25\text{ml}$ )立即用 $25\mu\text{l}$   $1\text{M}$  Tris-Cl ( $\text{pH } 10$ )中和。将含有AAV的级分(如通过UV280信号所评估)合并,并且使用Float-A-Lyzer透析装置 $100\text{KD}$  (Spectrum™#G235071)用PBS ( $\text{pH } 7.4$ ) +  $0.001\%$  Pluronic F-68透析过夜,然后使其通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器单元。

[0534] 滴度和装饰水平确定:

[0535] 使用表3中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组,使用QX200微滴式数字PCR (ddPCR)系统(伯乐公司)来确定AAV载体的滴度。如下预处理经纯化的制剂:将 $5\mu\text{l}$  AAV与1单位DNA酶和 $1\times$  DNA酶缓冲液(默克公司(Merck) #04716728001)以 $20\mu\text{l}$ 总体积在 $37^\circ\text{C}$ 下一起孵育 $30\text{min}$ 。将 $1\mu\text{l}$ 的 $20\text{mg}/\text{ml}$ 的蛋白酶K(生命技术公司(Life technologies) #E00491)添加到混合物中,并且在 $55^\circ\text{C}$ 下孵育 $1\text{h}$ ,随后在 $95^\circ\text{C}$ 下进行 $15\text{min}$ 的灭活步骤。在 $1\times$  PCR缓冲液II(生命技术公司#N8080010)、 $2.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.05\%$  Pluronic F-68(西格玛-奥德里奇公司#K4894)、 $2\text{ng}/\mu\text{l}$ 剪切鲑鱼精子DNA(英杰公司#15632011)中制备经处理的制剂的不同 $1/10$ 连续稀释液,并且将其用作PCR扩增的模板。

[0536] 如下产生微滴:将 $5.5\mu\text{l}$ 经预处理的AAV稀释液、各 $900\text{nM}$ 的正向和反向SV40 pA引物、 $125\text{nM}$  SV40 pA探针和 $11\mu\text{l}$   $2\times$  ddPCR探针用超混液(伯乐公司#1863024)以 $22\mu\text{l}$ 终体积混合。对每个样品进行技术重复。将 $20\mu\text{l}$ 每种ddPCR测定混合物加载到一次性微滴发生器盒(伯乐公司)中。然后,将 $70\mu\text{L}$ 微滴产生探针用油(伯乐公司#1863005)加载到八个油孔中的每一个中。然后将盒置于QX200微滴发生器(伯乐公司)内部。当微滴产生完成时,使用多道移液管将 $40\mu\text{l}$ 体积转移到96孔PCR板中。

[0537] 将板用箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司)中。热循环条件如下:在 $95^\circ\text{C}$ 下持续 $10\text{min}$ ,然后是在 $95^\circ\text{C}$ 下持续 $30\text{s}$ 并且在 $60^\circ\text{C}$ 下持续 $1\text{min}$ 的40个循环,随后在 $98^\circ\text{C}$ 下孵育 $10\text{min}$ ,并且在 $4^\circ\text{C}$ 下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列)进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司)进行分析。为了计算AAV滴度,通过乘以相应的总稀释因子并且另外乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)来转换微滴数。

[0538] 进行CE-SDS分析(Agilent 2100生物分析仪系统,蛋白230试剂盒,使用变性条件)以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0539] 总AAV颗粒/ $\text{ml}$  (vp/ $\text{ml}$ )和VP比率的计算

[0540] • 将 $\text{ng}/\mu\text{l}$  ( $=\mu\text{g}/\text{ml}$ )值除以观察到的MW,然后乘以 $1\text{E}+06$  ( $\mu\text{g}$ 到 $\text{g}$ 的换算)以计算摩尔/ $\text{ml}$ 值

[0541] • 将摩尔/ $\text{ml}$ 值乘以 $6.022\text{E}+23$  (阿伏伽德罗常数)以计算分子数/ $\text{ml}$

[0542] • VP分布:基于分子/ $\text{ml}$ 值计算,假设一个AAV由总共60个VP组成

[0543] • AAV颗粒/ml (vp/ml) :将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0544] ddPCR和CE-SDS结果报告于表9中。

[0545] 表9:对经亲和体和GP2装饰的AAV8制剂的QC

| [0546] | 样品 ID                                                | VP2 融合物/AAV | vg/细胞    | vp/细胞    |
|--------|------------------------------------------------------|-------------|----------|----------|
|        | (AAV-701)<br>ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-抗<br>PDGFRb-亲和体 | 15.7        | 1.04E+04 | 2.72E+05 |
|        | (AAV-702)<br>ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-抗 HER2-<br>亲和体  | 12.2        | 2.85E+03 | 5.65E+04 |
|        | (AAV-703)<br>ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-GP2_C11         | 18.5        | 7.88E+03 | 7.77E+04 |
|        | (AAV-704)<br>ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-GP2_C15         | 14.1        | 9.65E+03 | 1.19E+05 |

[0547] 经装饰的AAV8对受体过表达细胞系的体外感染性:

[0548] 为了评价经装饰的AAV8制剂的受体特异性,在过表达人PDGFRb (HKB11 PDGFR+) 或人HER2 (HKB11 Her2+) 的HKB11细胞和过表达人胰岛素受体的NIH3T3细胞 (NiH3T3 InsR+) 上进行感染性测定。在感染当天,将细胞重悬于DMEM中至 $5E+05$ 个细胞/ml,并且将 $50\mu\text{l}$ /孔接种于96孔板中 ( $2.5E+04$ 个细胞/孔)。将使用相同货物和方法在单独的实验中产生的经装饰的AAV8制剂和未经装饰的AAV8对照在DMEM培养基中稀释,并且将基于病毒基因组浓度的范围从 $1E+06$ 至 $4.57E+02\text{moi}$ 的不同浓度施加到接种的细胞 (终体积 $100\mu\text{l}$ )。转导后四天,分离细胞,并且进行FACS分析以计算EGFP阳性细胞的百分比和EGFP MFI。图8描绘了完整颗粒数与受感染的 (EGFP+) 细胞的百分比或EGFP MFI的关系。

[0549] 与未经装饰的对照相比,与AAV8 VP2融合的所有测试的亲和体和GP2序列都显示出增强对受体过表达细胞系的转导。

[0550] 实例4:Sso7d支架在不同AAV骨架上作为VP2融合物的评价

[0551] 此实验的目的是评估使用N末端VP2融合物将配体支架移植到不同AAV血清型中的可能性。在此实例中,将功能性抗EGFR Sso7d序列用作配体支架。

[0552] Sso7d-AAV6Si12评估:

[0553] 首先,使用AAV6Si12。此骨架含有一组总结于表10中的突变,以消除或减少与作为AAV6的主要附接位点的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG) 和唾液酸 (SIA) 的结合。如表10和11中所述,将列出的突变掺入rep2/cap6 VP2 K0质粒 (T138A) 和抗EGFR Sso7d (E.18.4.5) VP2融合表达质粒 (抗EGFR Sso7d经由G4S或 (G4S) 3与VP2 N末端融合) 两者中。如实例2中所述

进行不同制剂的克隆、表达、纯化和病毒浓度的评估,有以下例外:

[0554] • 使用CAG-EGFP-NOX单链货物 (DL144)

[0555] • 转染后3天收获样品

[0556] 为了评价经装饰的AAV6Si12制剂的功能性,使用实例2中所述的相同方案 (1E+05 作为以vg计的起始moi) 在HKB11野生型 (w.t.) 和HKB11\_EGFR过表达细胞系上进行感染性测定。结果报告于图9中。

[0557] 表10:AAV6Si12突变组的概述

|        | 血清型  | 沉默 ID     | 沉默突变                                | 预期的受阻途径       | 参考                                                                                                                                   |
|--------|------|-----------|-------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0558] | AAV6 | AAV6_Sil2 | K531E、<br>K459S、<br>V473D、<br>N500E | HSPG 和<br>SIA | DOI: 10.1128/JVI.00161-16 和<br><a href="https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.011">https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.011</a> |

[0559] 表11:此实例中使用的除了pHelper和DL144货物之外的rep/cap VP2 KO和VP2表达质粒 (AAV6\_Sil2) 的列表

|        | 样品 ID                                            | Rep/Cap 质粒                     | VP2 表达质粒                                                     |
|--------|--------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|        | AAV6 w.t.                                        | pRep2Cap6                      | 无                                                            |
|        | AAV6 Sil2                                        | (AgC1227)<br>pR2_C6_Sil2       | 无                                                            |
| [0560] | AAV6 Sil2-<br>抗 EGFR<br>Sso7d G4S                | (AgC1248)<br>pR2_C6_VP2KO_Sil2 | * (AgC1281) _pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_G4Sx1_AAV6_VP2_Sil2_D590A |
|        | AAV6 Sil2-<br>抗 EGFR<br>Sso7d (G4S) <sub>3</sub> | (AgC1248)<br>pR2_C6_VP2KO_Sil2 | * (AgC1278) _pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_G4Sx3_AAV6_VP2_Sil2_D590A |

[0561] \*D590A突变无意地存在于VP2表达质粒中,仅蛋白的VP2中的此突变不影响转导,如在图9中所示的HKB11 w.t.感染性谱分析中所确认

[0562] 与亲本序列相比,AAV6骨架 (AAV6\_Sil2突变组) 上的HSPG和唾液酸相互作用的消除将体外病毒摄取减少了大约100倍。用抗EGFR Sso7d支架装饰AAV6\_Sil2骨架恢复了AAV6 w.t.对EGFR过表达细胞系的感染性。在此实验中测试的Sso7d与VP2之间的两个接头显现对感染性没有影响。

[0563] Sso7d-AAV9评估:

[0564] 评价的第二个骨架是AAV9。再次,产生两种不同的衣壳表达质粒,rep2/Cap9 VP2

KO (T138A) 和抗EGFR Sso7d (E.18.4.5) AAV9 VP2融合表达质粒 (抗EGFR Sso7d在通过 (G4S) 3连接的AAV9 VP2的N末端融合), 如表12中所概述。如此实例中针对AAV6Si12所述进行不同制剂的克隆、表达、纯化和病毒浓度的评估 (收获时间: 转染后2天)。为了评价经装饰的AAV9制剂的功能性, 在GBM细胞上进行感染性测定 (如实例2中所述)。在此实验中, 我们使用了分别具有EGFR增强表达 (HF-2927) 和基础EGFR水平 (HF-2561) 的两种不同的克隆。为了进行感染性测定, 在384孔板 (康宁公司 (Corning), #3830) 的每个孔中接种350个HF-2561细胞或500个HF-2927细胞。为了调整不同神经球细胞系之间的生长差异, 在球体形成后接种之后两天, 每种细胞系接种16个额外的孔以确定每种培养物的平均细胞计数。在培养两天之后, 将这些孔用Hoechst 33342染色, 以定量每个孔的细胞 (1h, 用10µg/ml; 西格玛公司B2261)。用Opera Phenix高含量筛选系统 (珀金埃尔默公司 (PerkinElmer)) 确定细胞数, 并且将病毒制剂添加到未染色球体的培养基中以达到每种细胞系所希望的MOI (无病毒, MOI 10E4、10E5、10E6)。在感染之后5天, 将球体用Hoechst染色1h, 并且用Opera Phenix针对Hoechst (细胞计数) 和GFP (病毒感染) 成像。用10倍空气物镜以共焦模式进行成像, 以覆盖Z中的10mm (18个平面)。用Harmony软件对最大投影进行图像分析, 并且在核分割之后确定GFP阳性细胞的百分比 (GFP+细胞具有>1500个核GFP信号)。结果报告于图10中。

[0565] 表12: 此实例中使用的除了pHelper和DL144货物之外的rep/cap VP2 KO和VP2表达质粒 (AAV9) 的列表

| [0566] | 样品 ID                    | Rep/Cap 质粒           | VP2 表达质粒              |
|--------|--------------------------|----------------------|-----------------------|
|        | AAV9 w.t.                | pRep2Cap9            | 无                     |
|        | AAV9-抗 EGFR              | (NC036)              | (NC043) pRS5a_G4Sx3_抗 |
|        | Sso7d (G4S) <sub>3</sub> | pRep2_p5_Cap9_VP2 KO | EGFR_Sso7d_AAV9-VP2   |

[0567] 抗EGFR Sso7d在AAV9的VP2 N末端融合导致具有高EGFR表达的GBM神经球 (HF-2927) 中的感染性增加, 但是使用具有基础EGFR表达的克隆 (HF-2561) 没有显示出改善。

[0568] Sso7d-AAV1Si11评估:

[0569] 最后, 我们测试了AAV1Si11作为骨架通过VP2 N末端融合进行配体装饰。此骨架含有如表13中所述的一组突变以消除或减少与作为AAV1的主要附接位点的唾液酸 (SIA) 的结合。将列出的突变掺入rep2/cap1 VP2 KO表达质粒 (T138A) 以及此实验中使用并且在表14和表15中列出的不同抗EGFR Sso7d-VP2融合表达质粒 (不同的抗EGFR Sso7d序列与通过 (G4S) 3连接的AAV1 VP2 N末端融合) 两者中。如实例2中所述进行不同制剂的克隆、表达、纯化和病毒浓度的评估。为了评价经装饰的AAV1Si11制剂的功能性, 使用与实例2中所述相同的方案在HKB11 w.t.和HKB11\_EGFR过表达细胞系上进行感染性测定。结果以图形方式描绘于图11中。

[0570] 表13: AAV1Si11突变组的概述

[0571]

| 血清型  | 沉默 ID     | 沉默突变        | 预期的受阻断途径 | 参考                           |
|------|-----------|-------------|----------|------------------------------|
| AAV1 | AAV1_Sil1 | V473D、N500E | SIA      | DOI:<br>10.1128/JVI.00161-16 |

[0572] 表14:此实例中使用的抗EGFR Sso7d序列的表位/亲和力特征;序列、表位和亲和力数据来自Traxlmayr等人(DOI 10.1074/jbc.M116.741314)和Salzer等人(doi.org/10.1038/s41467-020-17970-3):

[0573]

| 克隆 ID           | 表位                 | 与 AAV1SH1 VP2 N 末端融合的最终序列                                                                | 在 A431 上的 Kd | 在 Jurkat 上的 Kd |
|-----------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|
| *E18.4.5        | 与西妥昔单抗 (D3 结合剂) 竞争 | MATVKLTYYQGEKQVDSKITYVDR<br>AGQFIWFYDEGGGALGTGWVSEK<br>DAPKELLQMLEKQGGGSGGGGSG<br>GGGS   | 19 nM        | n.a            |
| E11.8           | 不与西妥昔单抗和 E18.6 竞争  | MATVKFTYYQGEKQVDSKIKRVDR<br>YGQSIHFNYDEGGGAYGWGWVSEK<br>DAPKELLQMLEKQGGGSGGGGSG<br>GGGS  | 67 nM        | n.a            |
| E18.6           | 不与西妥昔单抗和 E11.8 竞争  | MATVKFTYYQGEKQVDSKIKNVLR<br>YGQQIVFSYDEGGGAGGNGFVSEKD<br>APKELLQMLEKQGGGSGGGGSGG<br>GGGS | 73 nM        | n.a            |
| E11.4.1         | 与西妥昔单抗 (D3 结合剂) 竞争 | MATVKFTYYQGEKQVDSKIMYVIR<br>GGQRIAFGYDEGDGAWGDGIVSEK<br>DAPKELLQMLEKQGGGSGGGGSG<br>GGGS  | 17 nM        | 13 nM          |
| E11.4.1<br>G25A | 与西妥昔单抗 (D3 结合剂) 竞争 | MATVKFTYYQGEKQVDSKIMYVIR<br>AGQRIAFGYDEGDGAWGDGIVSEK<br>DAPKELLQMLEKQGGGSGGGGSG<br>GGGS  | n.a          | 125 nM         |
| E11.4.1<br>G32A | 与西妥昔单抗 (D3 结合剂) 竞争 | MATVKFTYYQGEKQVDSKIMYVIR<br>GGQRIAFAYDEGDGAWGDGIVSEK<br>DAPKELLQMLEKQGGGSGGGGSG<br>GGGS  | n.a          | 877 nM         |

[0574] \*此实验中未使用

[0575] 表15:此实例中使用的除了pHelper和DL144货物之外的rep/cap VP2 KO和VP2表达质粒 (AAV1Sil1)的列表

[0576]

| 样品 ID                                           | Rep/Cap 质粒                                   | VP2 表达质粒                                                           |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| AAV1 Sil1                                       | (NC056)<br>\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_V473D_N500E | 无                                                                  |
| AAV1 Sil1<br>抗 EGFR<br>Sso7d E11.8              | (NC057)<br>\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO      | (HS0004) pRS5a_抗 EGFR<br>Sso7d E11.8_(G4S3)_AAV1<br>Sil1 VP2       |
| AAV1 Sil1<br>抗 EGFR<br>Sso7d E18.6              | (NC057)<br>\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO      | (HS0005) pRS5a_抗 EGFR<br>Sso7d E18.6_(G4S3)_AAV1<br>Sil1 VP2       |
| AAV1 Sil1<br>抗 EGFR<br>Sso7d<br>E11.4.1         | (NC057)<br>\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO      | (HS0001) pRS5a_抗 EGFR<br>Sso7d E11.4.1_(G4S3)_AAV1<br>Sil1 VP2     |
| AAV1 Sil1<br>抗 EGFR<br>Sso7d<br>E11.4.1<br>G25A | (NC057)<br>\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO      | (HS0002) pRS5a_抗 EGFR<br>Sso7d E11.4.1<br>G25A_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP |
| AAV1 Sil1<br>抗 EGFR<br>Sso7d<br>E11.4.1<br>G32A | (NC057)<br>\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO      | (HS0003) pRS5a_抗 EGFR<br>Sso7d E11.4.1<br>G32A_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP |

[0577] 与未经装饰的亲本细胞相比,与AAV1Sil1 VP2融合的所有测试的抗EGFR Sso7d支架变体都显示出增加的对EGFR过表达细胞系的转导。

[0578] 实例5:Sso7d噬菌体文库的产生和在入EGFR上的噬菌体展示:

[0579] 实例5.1.文库制备:

[0580] 选择具有Amber终止和氨苄青霉素抗性的pPD7-1\_ompA\_Sso7d\_APP作为噬菌体展示载体。

[0581] 如下设计Sso7d文库 (Lib8):通过在每个位置处相等地呈现的八个氨基酸 (D、R、H、N、A、I、Y和W) 将相对于包含第一个甲硫氨酸的rcSso7d多肽序列的rcSso7d位置22、24、26、

29、31、33、41、43和45随机化。另外,避免推定的糖基化(N<sub>x</sub>S N<sub>x</sub>T-x不是P)、整合素结合(RGD、RYD、KGD、NGR、LDV、DGE)和CD11c/CD18结合(GPR)基序以减少翻译后修饰事件和非特异性结合,并且出于克隆原因从设计中去除AgeI、BamHI和BsaI限制性位点。下文示出了用于随机化的rcSso7d骨架:

[0582] (M)ATVKFTYQGEKQVDISKIKXVXRQGXIXFXIDEGGGAXG XGXVSEKDAPKELLQMLEKQ

[0583] 加下划线的位置:与Traxlmayr等人(DOI 10.1074/jbc.M116.741314)中所述的w.t.Sso7d序列相比的rcSso7d取代K7T、K9Q、K28Q、Q40A加KK C末端截短。X表示随机化位置。

[0584] 使用Q5热启动高保真DNA聚合酶(新英格兰生物实验室公司(NEB),M0493L)通过PCR引入NruI和EcoRI限制性位点来对文库插入物进行扩增。

[0585] PCR反应物每25μl反应体积含有5μl 5x Q5反应缓冲液、0.5μl 50mM dNTP、250pg Sso7d文库的模板DNA、10pmol每种引物和0.25μl Q5热启动高保真DNA聚合酶。使用以下循环方案对265bp片段进行扩增:初始变性步骤在98℃下持续30s;在98℃下变性7s,在62℃下退火15s,在72℃下延伸15秒,持续25个循环;最终在72℃下延伸2分钟。为了去除潜在剩余的模板DNA和引物,将PCR反应物加载到2%TAE琼脂糖凝胶上。切下正确的条带,并且将其用Wizard®SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司(Promega),A9281)纯化。

[0586] 将扩增的Sso7d文库用限制酶NruI-HF(新英格兰生物实验室公司R3192L)和EcoRI-HF(新英格兰生物实验室公司R3101L)在37℃下消化3h。为了去除消化的突出端,用上文提及的Wizard试剂盒进行另一个清除步骤。

[0587] 为了制备具有Amber终止的噬菌体展示载体pPD7-1\_ompA\_Sso7d\_APP,将载体DNA用EcoRI-HF/NruI-HF在37℃下消化3h。为了分离载体和插入片段,将消化的载体加载到1%TAE琼脂糖凝胶上,并且在电泳之后,切下具有4482bp正确大小的载体条带。如上所述进行解链和清除。

[0588] 将2μg消化的载体DNA和434ng消化的插入DNA使用1.6U T4DNA连接酶(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),编号15224041)/μg载体DNA(其对应于4倍摩尔过量的插入DNA)连接。在16℃下进行16h连接,随后在65℃下进行10分钟的热灭活步骤。

[0589] 用糖原(超纯糖原,赛默飞世尔公司,编号10814-010)和2-丁醇(西格玛公司,编号19440)沉淀、随后是用70%乙醇的洗涤步骤进行连接文库的脱盐。然后将连接的DNA溶解于ddH<sub>2</sub>O中。

[0590] 在BioRad Genepulser Xcell仪器上使用以下设置,每次转化用66.7ng连接的载体和25μl细胞,在Gene Pulser/MicroPulser电穿孔杯(0.1cm间隙,编号1652089,伯乐公司)中进行使用电转感受态TG1[F' traD36proAB lacIqZ Δ M15] supE thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM) 5(rK-mK-) (卢西根公司(Lucigen),编号60502-2)的30个转化反应:1.8kV, 6000hm, 10μF。在转化之后,每次转化将细胞重悬于2.5ml预温热的Terrific Broth回收培养基(TB改良的,含有1.2%细菌用胰蛋白胨、2.4%酵母提取物、54mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、16mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.4%甘油)中。在振荡培养箱中,在37℃下,回收时间为1h。将文库在含有100μg/ml羧苄青霉素和1%葡萄糖的1.5l LB培养基中在21℃下伴随220rpm振荡扩增15h。过夜培养物的起始OD<sub>600 nm</sub>为0.23;在15h之后,在OD<sub>600nm</sub>为1.86时进行最终收获。

[0591] 作为质量控制,通过仅用连接酶连接载体片段(没有插入片段)和转化来确定载体

背景。

[0592] 在1h的回收时间之后通过在LB/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/葡萄糖琼脂板上铺板进行稀释系列来鉴定文库大小和载体背景。确定最终文库大小为 $2.67 \times 10^9$ 个成员,这对应于具有 $1.34 \times 10^8$ 个成员的文库的理论多样性的20倍过采样。确定载体背景非常低,为0.08%。

[0593] 文库的94个克隆的桑格测序显示出94个不同的Sso7d序列,并且没有载体骨架序列。

[0594] 通过离心步骤收获文库,并且将沉淀物重悬于LB/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/1%葡萄糖/20%甘油中。然后将等分试样(含有约8倍文库多样性)在液氮中快速冷冻,然后在-80℃下储存。

[0595] 使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司(Illumina))上对文库进行测序。将生成的fastq文件最初按质量(Q>30,其中Q指示Phred质量得分)和长度(120-130bp)过滤。在质量修整之后,处理序列,旨在映射Sso7d特定边界(DISK到DAPK)。在最终过滤的序列上评估靶位置处的氨基酸分布:评估约500-700K个读段。结果示于图12中。

[0596] 随机化位置处的氨基酸分布如预期的那样,用于随机化的八个氨基酸中的每一个的频率都为约12.5%。

[0597] 实例5.2使用Sso7d质粒文库制备噬菌体:

[0598] 将含有约8倍文库多样性的甘油原液接种在200ml 2YT/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/1%葡萄糖中,起始OD<sub>600 nm</sub>为0.24。使细胞在37℃和220rpm下生长直到OD<sub>600</sub>为0.59。通过以20的MOI(感染复数)添加Hyperphage(M13 K07  $\Delta$  pIII,培罗成公司(Progen),PRHYPE),首先在37℃的水浴中不振荡,然后在37℃的水浴中伴随220rpm振荡,来进行辅助噬菌体感染。在制备作为感染对照的稀释系列(Hyperphage为受感染的大肠杆菌细胞赋予卡那霉素抗性)并且将不同的稀释液在琼脂板LB/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/1%葡萄糖和LB/50 $\mu$ g/ml卡那霉素/1%葡萄糖两者上铺板之后,将培养物离心以去除任何剩余的Hyperphage,并且将含有受辅助噬菌体感染的大肠杆菌的沉淀物重悬于11 2xYT/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/50 $\mu$ g/ml卡那霉素/0.25mM IPTG中,并且在振荡器中在22℃下孵育过夜。

[0599] 在第二天,对照琼脂板在两种抗生素抗性上显示出几乎相同数目的菌落,这证明辅助噬菌体感染是有效的。

[0600] 将培养物离心,并且通过以下方式将噬菌体从上清液中沉淀:用1/4体积的冰冷的20% PEG6000/2.5M NaCl(聚乙二醇/NaCl)进行3h的孵育步骤,离心,并且在4℃下重悬并用PBS溶解过夜之后,进行第二沉淀步骤。在室温下进行2h的在PBS中的第二重悬步骤,以使所有噬菌体完全溶解。为了去除仍剩余的细胞碎片,在4℃下进行另一个离心步骤。

[0601] 通过感染TG1F<sup>-</sup>确定噬菌体滴度。为了确定滴度,一般来说,需要使TG1F<sup>-</sup>细胞在感染之前在M9琼脂板(含有200ml 5x M9-最少盐,780ml细菌用琼脂溶液,2ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 0.1ml 1M CaCl<sub>2</sub>, 20ml 20%葡萄糖,400 $\mu$ l 1%盐酸硫胺素)上生长,以形成它们的F<sup>-</sup>菌毛,其是噬菌体感染所必需的。然后,从M9板接种这些细胞在2xYT培养基中的液体培养物,因为它们需要呈指数生长(直到OD<sub>600 nm</sub>为0.6-0.8)用于滴度确定。在制备噬菌体的稀释系列之后,添加生长的TG1F<sup>-</sup>,并且在37℃下30分钟的感染时间之后,将稀释液在LB/30 $\mu$ g/ml羧

苜青霉素/1%葡萄糖板上铺板。

[0602] 在第二天,对不同的稀释液的菌落进行计数,并且计算滴度。在添加20%甘油进行冷冻之后,确定噬菌体滴度为 $3.5 \times 10^{12}$ 个噬菌体/ml。将等分试样在-80℃下储存。

[0603] 实例5.3在人EGFR上的噬菌体展示:

[0604] 为了评估文库质量,进行噬菌体展示活动。选择人EGFR作为靶标。进行三轮差异细胞淘选。在第一轮和第三轮淘选中使用用人EGFR稳定转染的HKB11悬浮细胞(活力>98%)。在第二轮中,使用与Fc融合的生物素化的人EGFR蛋白。在适当的培养基中进行细胞培养,添加200μg/ml吉欧霉素和1% FBS,每周分裂3次至 $3 \times 10^5$ 个细胞/ml。

[0605] 为了进行第一轮和第三轮的细胞淘选,通过三个洗涤和离心步骤用预冷却的PBS/5% FBS制备 $1 \times 10^7$ 个细胞。在用相同的缓冲液将噬菌体和靶细胞封闭两小时的时间之后,将细胞与噬菌体一起离心并重悬并且再孵育2h。输入噬菌体的量等于文库多样性的至少约500倍或前一轮淘选的输出物的量。在噬菌体孵育之后,在第一轮细胞淘选中,将细胞在没有任何孵育时间的情况下洗涤并离心两次,在第三轮中,进行三个洗涤步骤,每次孵育时间为5分钟。在两种情况下,使用100mM甘氨酸-HCl/500mM NaCl (pH 2.2) 和100mM三乙胺 (pH 11.5) 在低pH和高pH下进行洗脱。在每个步骤之后进行直接中和。除了在室温下进行噬菌体的最终洗脱之外,用于细胞淘选的所有步骤都在4℃下进行。

[0606] 用与Fc标签融合的生物素化的人EGFR蛋白进行第二轮淘选。将预封闭的噬菌体与500nM生物素化的蛋白质直接一起孵育1h。然后将具有结合的噬菌体的生物素化的hEGFR-Fc蛋白在经中性抗生物素蛋白包被的板中再捕获一小时。在没有任何孵育时间段的情况下,将孔用PBS+0.05% Tween 20洗涤3次,然后用3x PBS洗涤。以与细胞淘选相同的方式进行洗脱。

[0607] 如上针对噬菌体制备所述确定输出物的噬菌体滴度。结果总结于表16中。

[0608] 表16. 淘选轮次中的噬菌体滴度

|        | 第 1 轮              |                        | 第 2 轮                     |                        | 第 3 轮              |    |
|--------|--------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------|----|
|        | 输入                 | 输出                     | 输入                        | 输出                     | 输入                 | 输出 |
| [0609] | <b>EGFR</b>        |                        | <b>LP</b>                 |                        | <b>WCP</b>         |    |
|        | (HKB11-经 EGFR 转染的) |                        | (中性抗生物素蛋白+hsEGFR_hFc1P)   |                        | (HKB11-经 EGFR 转染的) |    |
|        | <b>噬菌体滴度</b>       | 6.9E+10 <b>5.6E+06</b> | 1.6E+10 <b>5.4E+06</b>    | 4.5E+10 <b>3.2E+09</b> |                    |    |
|        | <b>噬菌体的预</b>       |                        | 中性抗生物                     |                        |                    |    |
| [0610] | <b>封闭</b>          |                        | 素蛋白                       |                        |                    |    |
|        | <b>洗涤条件</b>        | <b>低严格性</b>            | <b>低严格性</b>               | <b>标准</b>              |                    |    |
|        |                    | 2x FACS 缓冲液, 快速        | 3x PBST, 快速<br>3x PBS, 快速 | 3x FACS 缓冲液, 5 min     |                    |    |

[0611] 输出物的噬菌体感染和准备进行以下淘选轮次:

[0612] 为了使噬菌体进一步扩增,将OD600 nm为0.6-0.8的呈指数生长的TG1F`在水浴中在37℃下用噬菌体输出物感染45分钟,TG1F`体积相对于洗脱体积10-20倍过量。在将TG1F`沉淀的离心步骤之后,将具有受感染的细菌的沉淀物转移到100ml含有100μg/ml羧苄青霉素和1%葡萄糖的2xYT培养基中,并且使其在摇瓶中在220rpm振荡下在25℃下生长过夜。在第二天,在离心步骤之后,通过将沉淀物重悬于另外含有20%甘油的新鲜培养基中来制备甘油原液,并且从甘油原液开始新的噬菌体制备。

[0613] 为此,将含有2YT/100μg/ml羧苄青霉素/1%葡萄糖的新的10ml培养物用甘油原液接种至OD600 nm为0.2-0.3。使培养物在37℃下在振荡培养箱中在220rpm下生长30-60分钟。在37℃的水浴中在不振荡的情况下在5ml培养物中以20的moi进行30分钟Hyperphage感染,然后在振荡器中在37℃和220rpm下再进行30分钟。通过将50μl受感染的溶液在LB/50μg/ml卡那霉素/1%葡萄糖琼脂板上铺板来控制此过程。在用于去除Hyperphage的离心步骤之后,将所得沉淀物转移到10ml2xYT/100μg/ml羧苄青霉素/50μg/ml卡那霉素/0.25mM IPTG培养基中,并且在22℃和220rpm下在振荡下孵育过夜用于噬菌体产生。

[0614] 在第二天,通过琼脂板上的菌苔证明了成功的感染。通过离心步骤将含有噬菌体的培养上清液与大肠杆菌细胞分离,并且将携带Sso7d的噬菌体用约1/4体积的冰冷的20% PEG6000/NaCl在冰上沉淀30分钟。将悬浮液在预冷却的离心机中在4℃下在16000xg下离心30分钟,弃去上清液,并且将沉淀的噬菌体重悬于PBS中。通过在Eppendorf离心机中在16000rpm下持续行5分钟的另一个离心步骤去除剩余的细胞碎片。如上所述进行滴度确定。

[0615] 在第三轮淘选和输出物的过夜扩增之后,使用Qiagen小提试剂盒(编号27106)根据其推荐的方案进行DNA小量制备。

[0616] 实例5.4:通过NGS评估Sso7d文库组成

[0617] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0618] 在三轮淘选之后,在使用含有因美纳公司的适配体的引物的一个单次PCR反应中,从输出物的DNA制剂产生扩增子文库。将正向引物与含有Illumina TruSeq索引的反向引物组合使用,以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表表示于表17中。

[0619] 表17:此实例中使用的引物的列表

| 样品 ID                | 引物序列 5'-3'                                                                                    |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| LC0034<br>(正向<br>引物) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCT<br>CTTCCGATCTcaggtggacatcagcaagatcaag        |
| LC0086<br>(反向<br>引物) | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTACGGTGACTGGAGTTCAGAC<br>GTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |

[0621] 使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和在第3轮淘选之后的100ng DNA制剂作为模板以25μl总反应体积准备PCR反应。用以下循环方案进行PCR:在98℃下持续2min;在98℃下持续10s、在55℃下持续15s、在72℃下持续25s的15个循环;随后在72℃下进行2min的最终扩增,然后在4℃下保持。通过在Sybr-Safe

预染色的1.5%琼脂糖凝胶上进行琼脂糖凝胶电泳来分离PCR产物(在120V下跑胶30min)。然后切割预期大小的条带,并且将其使用Qiaquick凝胶提取试剂盒(凯杰公司(Qiagen)#28704)纯化,并且在50 $\mu$ l水中洗脱。在Qubit仪器上测量DNA浓度,同时使用Agilent生物分析仪2100(Agilent DNA1000试剂盒)评估产物的纯度和大小。在定量之后,将文库以8pM的终浓度等摩尔合并,并且使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司)上进行测序。

[0622] 使用定制脚本进行数据分析:

[0623] 将生成的fastq文件最初按质量(Q>30,其中Q指示Phred质量得分)和长度(120-130bp)过滤。在质量修整之后,处理序列,旨在映射Sso7d特定边界(DISK到DAPK)。在最终过滤的序列上评估靶位置处的单序列出现和AA分布。结果示于图13中。

[0624] NGS显示出一些文库构建体的高富集,最富集的文库构建体的出现率为4.56%。NGS还证明9个随机化位置中的氨基酸残基是相对保守的,尤其是在一些位置(突变位置中的位置1、3、6、8和9,对应于包含第一个甲硫氨酸的Sso7d肽序列的位置22、26、33、43和45)中。

[0625] 实例5.5:FACS筛选

[0626] 在来自安捷伦公司(Agilent)的BL21(DE3)细胞(编号200131)(基因型大肠杆菌B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal $\lambda$ (DE3))中通过IPTG诱导进行小规模蛋白质表达。

[0627] 根据用户方案,通过热脉冲将DNA转化到化学感受态BL21(DE3)细胞中。使细胞在对应的LB/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/1%葡萄糖琼脂板上生长过夜。在第二天,挑取4x96个单菌落,并且将其转移到主板中的2xYT/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/1%葡萄糖中,并且使其在37 $^{\circ}$ C下在板振荡器中生长过夜。在第二天,添加另外含有30%甘油的相同培养基用于储存,并且将主板在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0628] 以100 $\mu$ l规模进行用于FACS筛选的蛋白质表达。将含有2xYT/100 $\mu$ g/ml羧苄青霉素/0.1%葡萄糖的培养板用来自解冻的主板的复制物接种,并且在37 $^{\circ}$ C下在板振荡器中生长直到OD<sub>600 nm</sub>为约0.6。在用终浓度为0.25mM的IPTG诱导之后,将板在22 $^{\circ}$ C(室温)下在板振荡器上进一步孵育过夜。在第二天,用BEL缓冲液进行裂解,该缓冲液由2xBBS/EDTA(天惠华公司(Teknova),编号B0205)和溶菌酶(默克公司,编号10837059001)组成。孔中的终浓度为200mM硼酸,150mM NaCl,2.5mM EDTA和2.5mg/ml溶菌酶。在振荡器上孵育1h时间段之后,将板离心,并且测试含有分泌的和可溶性Sso7d蛋白的BEL提取物的细胞结合。

[0629] 为了进行FACS分析,在EGFR阳性和阴性细胞系上测试所挑取的克隆。阳性细胞系与如针对细胞淘选所述(即,用人EGFR稳定转染的HKB11细胞)相同。作为阴性对照,使用自制的HKB11 EGFR敲除细胞系能够排除HKB11细胞上的交叉反应性(因为EGFR在HKB11野生型细胞上内源地表达)。在具有高通量取样器的FACS Calibur仪器(BD生物科学公司(BD Biosciences))上以96孔形式进行FACS分析。作为FACS缓冲液,使用含有5% FBS和0.04% NaN<sub>3</sub>的PBS进行所有洗涤和孵育步骤。细胞活力>98%。如针对淘选所述用三个洗涤和离心步骤制备5x10E5个细胞/孔。所有步骤都在4 $^{\circ}$ C下进行。

[0630] 在第一染色步骤中,在板振荡器上将50 $\mu$ l BEL提取物与终浓度为24 $\mu$ g/ml的内部产生的小鼠抗APP抗体一起预孵育1h。在第二步中,添加5x 10E5个细胞/孔,并且进一步再孵育一小时。在用冷FACS缓冲液进行2个洗涤步骤之后,将细胞重悬于山羊抗小鼠IgG-RPE

抗体R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗小鼠IgG(F(ab')<sub>2</sub>片段特异性的)(min X Hu,Bov,Hrs Sr Prot)(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch),编号115-116-072)的1:100稀释液中,并且在板振荡器上再孵育30分钟。在两个最终洗涤步骤之后,将染色的细胞重悬于冷PBS中,并且用FACS Calibur仪器测量5000个细胞/孔。

[0631] 与对照EGFR敲除细胞系相比,384个测试的克隆中有81个主要的苗头物在EGFR过表达细胞上显示出>10的中值(55个中值为10-30,17个中值为30-60,并且9个中值为60-887)。序列分析显示出发现的一些序列的富集高达十倍。最后,可以鉴定出41个不同的新型序列。对于这些中的大约一半,可以在另一FACS中或在生物素化的蛋白质上的ELISA中确认结合。

[0632] 为了确认所选Sso7d变体与经EGFR转染的HKB11细胞的特异性结合,进行六种EGFR结合Sso7d构建体的小规模大肠杆菌蛋白质表达和纯化。在20ml培养物中在新鲜转化的BL21(DE3)中进行表达。使细胞在37℃下在振荡培养箱中生长,将其用0.25mM IPTG诱导,并且在22℃下在振荡下进一步孵育过夜。在第二天,将培养物离心,将沉淀物在-80℃下冷冻两天,并且仅从沉淀物中纯化可溶性级分。

[0633] 为了进行蛋白质纯化,在Poly-Prep色谱柱(伯乐公司,编号731-1550)中准备抗APP柱(抗APP抗体与琼脂糖树脂偶联,诺华股份有限公司(Novartis)内部生产),每个柱的柱体积为0.5ml。

[0634] 用含有不含EDTA的complete蛋白酶抑制剂混合物(罗氏公司,11873580001)、全能核酸酶(诺瓦根公司(Novagen),编号70746)和DNA酶(罗氏公司,编号04 536 282 001)的3.5ml Bugbuster预混液(密理博公司(Millipore),编号71456-3)在旋转器上在室温下进行30分钟裂解。在通过离心和无菌过滤步骤分离细胞碎片和表达的Sso7d之后,将样品用PBS以1:10稀释,然后加载到柱上,以避免Bugbuster对APP柱的任何潜在的损害作用。

[0635] 用PBS(pH 7.4)进行平衡和洗涤步骤,并且用1-1.5ml 100mM甘氨酸(pH 3)进行洗脱。用Amicon®Ultra-4离心过滤器单元(3kDa MWC0,编号UFC800324)进行缓冲液交换和经纯化的蛋白质的浓缩。用蛋白质凝胶分析经纯化的蛋白质的质量。

[0636] 可以通过FACS分析确认所有六种经纯化的Ss07d构建体的特异性细胞结合。结果示于图14中。所选克隆表征于表18中。

[0637] 在所有六种Sso7d构建体的FACS分析中,都可以确认特异性细胞结合。

[0638] 表18:选择用于FACS分析的Sso7d构建体。第6列中的氨基酸位置是指不含第一个甲硫氨酸的Ss07d的AS位置。

[0639]

| 纯化<br>编号 | 样品<br>名称  | 苗头物<br>名称 (在<br>MP 上的<br>位置)           | 在板上<br>发现的<br>克隆 | 在 NGS 中发现<br>(前 30 个)  | 5 | 20 | 21 | 23 | 25 | 28 | 30 | 32 | 40 | 42 | 44 |
|----------|-----------|----------------------------------------|------------------|------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1        | EGF<br>R  | 4.1A02                                 | 1x               | 否                      | F | K  | I  | D  | Y  | W  | H  | N  | Y  | W  | W  |
| 2        | EGF<br>R  | 4.1A03                                 | 4x               | 苗头<br>物编 2.18%<br>号 3  | F | K  | I  | D  | Y  | Y  | H  | R  | N  | W  | W  |
| 4        | EGF<br>R  | 4.1H02                                 | 2x               | 否                      | F | K  | I  | D  | Y  | W  | H  | R  | D  | W  | W  |
| 5        | EGF<br>R  | 4.2A08                                 | 4x               | 苗头<br>物 1 4.56%<br>NGS | F | K  | I  | D  | Y  | N  | H  | Y  | N  | W  | W  |
| 6        | EGF<br>R  | 4.2B11                                 | 10x              | 苗头<br>物编 0.89%<br>号 24 | F | K  | I  | D  | Y  | N  | H  | N  | W  | W  | W  |
| 7        | EGF<br>R  | 4.4E10                                 | 3x               | 否                      | F | K  | I  | D  | Y  | Y  | H  | Y  | D  | W  | W  |
| 10<br>PC | C201<br>3 | pPD7-1_<br>Sso7d-E<br>GFR_AP<br>P      |                  |                        | L | T  | Y  | D  | A  | F  | W  | E  | L  | T  | W  |
| 11<br>NC | C201<br>4 | pPD7-1_<br>Sso7d-wt<br>-libr.8_A<br>PP |                  |                        | F | K  | K  | W  | V  | M  | S  | T  | T  | R  | A  |

[0640] 实例6:Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11文库产生

[0641] 实例6.1:Lib8 Sso7d-AAV1Si11质粒文库产生

[0642] Sso7d支架与VP2 N末端的基因融合提供了产生AAV文库的可能性,这些文库可以用于体内和体外选择。在产生最终Sso7d文库之前,产生货物构建体SK033。SK033包含经由G4S接头与AAV1Si11 VP2的N末端融合的抗EGFR Sso7d(E.18.4.5)。在CDS之后添加小形式的WPRES元件(WPRE3),以增强细胞表达中的VP2融合。融合多肽与小173CMV启动子可操作地连接。此外,将在小173CMV启动子的控制下的sfCherry2盒和短SV40聚A(SV40L)添加到构建体中,允许使用FACS进行直接选择/验证。基于与其他货物设计相比良好的产量、完整AAV颗粒的百分比以及改善的感染性谱选择SK033货物设计。主要出于HEK293T/17细胞中的高病毒产量以及由于唾液酸结合的不存在/减少导致的潜在降低的体内脱靶活性而选择AAV1Si11。SK033货物设计示意性地表示于图15中。

[0643] 通过将存在于SK0033中的完整抗EGFR Sso7d (E.18.4.5) 序列加AAV1 Si11 VP2的初始序列用以相反方向放置的双BsaI限制性位点替换来产生受体质粒SK0036。将35pb同源臂添加到下述文库片段插入物的两端。

[0644] 在特韦斯特生物科学公司(Twist Bioscience) 订购Sso7 (Lib8) 片段。它包含35bp 5' UTR区、随机化rcSso7d支架(经人密码子使用优化的)、G4S接头和AAV1 VP2 (DT1,即具有编码苏氨酸的VP2起始密码子的缺失)的前182bp。

[0645] 如下设计Sso7d文库 (Lib8):通过在每个位置处相等地呈现的八个氨基酸(D、R、H、N、A、I、Y和W) 将rcSso7d位置22、24、26、29、31、33、41、43和45(相对于包含被切割的第一个甲硫氨酸的rcSso7d多肽序列) 随机化,另外避免推定的糖基化(NxS NxT-x不是P)、整合素结合(RGD、RYD、KGD、NGR、LDV、DGE) 和CD11c/CD18结合(GPR) 基序以减少翻译后修饰事件和非特异性结合,并且出于克隆原因从设计中去掉AgeI、BamHI和BsaI限制性位点。下文示出了用于随机化的rcSso7d骨架。

[0646] 用于文库产生的rcSso7d骨架序列

[0647] (M)ATVKFTYQGEKQVDISKIKXVXRGXQXIXFXFYDEGGGAXGXGXVSEKDAPKELLQMLEKQ

[0648] 加下划线的位置:与Traxlmayr等人(DOI 10.1074/jbc.M116.741314)中所述的w.t.Sso7d序列相比的rcSso7d取代K7T、K9Q、K28Q、Q40A加KK C末端截短。X表示随机化位置。第一个甲硫氨酸被切割

[0649] 将在每个随机化位置处含有TGA终止密码子的片段用作文库合成的模板,产生451bp的片段,最终复杂性为 $1.34E+08$ 个变体。为了去除片段的每个末端的Twist侧接序列,使用LC0052(5' CCCGGGGAACCTCCTCCCAGTCGAAATTCGCCACC 3') 和LC0053(5' GTTGCTGGAGGTTCTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG 3') 引物对文库进行PCR扩增。使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和10ng TWIST片段作为模板以25 $\mu$ l总反应体积按以下循环方案准备4x PCR反应:在95 $^{\circ}$ C下持续2min;10个循环,在98 $^{\circ}$ C下持续10s;在65 $^{\circ}$ C下持续15s;在72 $^{\circ}$ C下持续30s;随后在72 $^{\circ}$ C下持续2min。为了产生Lib8 Sso7d-AAV1Si11质粒文库,使用NEBuilder HiFi DNA组装预混液(新英格兰生物实验室公司;E2621)以400 $\mu$ l的终体积组装520ng PCR产物(403bp)和4 $\mu$ g BsaI消化的SK0036受体质粒。然后将反应产物用质粒安全(PS)DNA酶(阿霖震中公司(Epicentre);E3105K)处理以消化任何未组装的片段,并且使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#A9280)纯化。此反应产生570ng组装的质粒(如通过在PSDNA酶消化步骤之后剩余的DNA量所定义)。在42x50 $\mu$ l小瓶中用组装的质粒文库转化One Shot TOP10电转感受态大肠杆菌(赛默飞世尔公司;C4040-52)(约10ng DNA/小瓶)。从烧瓶中取出100 $\mu$ l合并的转化物,并且将不同的稀释液在LB+卡那霉素板上铺板。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。发现如通过琼脂板上的CFU数确定的文库实际大小为 $4.12E+08$ 。然后将菌落用于使用NucleoSpin 96质粒试剂盒(马歇雷-纳格尔公司(Macherey-Nagel)#740625.4)提取质粒DNA(n=192),并且使用在VP2区开始处的反向寡核苷酸映射通过桑格测序进行分析。结果总结于表19和图16中。将剩余的TopTen转化样品直接接种在500ml TB+卡那霉素培养基中,并且在37 $^{\circ}$ C下过夜生长之后使用大提试剂盒(凯杰公司#12163)提取质粒DNA,产生(SK0037) pCargo\_173CMV\_SSo7d\_lib8\_AAV1si11-VP2\_173CMV\_sfCherry质粒文库。

[0650] 表19:在Lib8 Sso7d-AAV1Si11质粒文库(SK0037)上的桑格QC和AA频率

|        |            |             |
|--------|------------|-------------|
| [0651] | 参数         | 克隆数 (%)     |
|        | 可读序列       | 181         |
|        | 框内/预期序列    | 173 (95.6%) |
|        | SK0036骨架   | 0 (0%)      |
|        | 具有终止/移码的序列 | 8 (4.4%)    |
|        | 独特序列       | 181 (100%)  |

[0652] 桑格测序显示出高水平的框内序列 (95.6%), 文库中没有冗余, 并且八个所选氨基酸在随机化位置处的分布良好。在实例5.4中使用NGS测序进行更深入的分析。

[0653] 实例6.2: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11文库产生和QC

[0654] 使用PEI Max试剂 (3:1PEI:DNA) 用pHelper (约30K个质粒/细胞)、(NC057) pRep2\_Cap1\_AAV1 Si11\_VP2 KO (约30K个质粒/细胞) 和SK0037质粒文库 (420个质粒/细胞) 以0.8μg总DNA/1E+06个细胞转染16升HEK293T/17悬浮细胞 (1.6E+10个总活细胞)。以低量采用货物质粒以避免嵌合现象并改善表型-基因型联系。基于内部经验和外部参考, 约400个质粒/细胞被鉴定为实现AAV文库的良好质量的最佳量。转染后两天 (如通过FACS所测量, 产生约35%cherry阳性细胞), 将细胞沉淀, 并且在5l 50mM Tris (pH 7.5)、0.5% Triton、0.01% Pluronic F-68、2mM MgCl<sub>2</sub>和12.5U/ml核酸酶 (赛默飞世尔公司#88702) 中裂解。在37℃下2h之后, 添加NaCl至终浓度为0.5M, 将裂解物再孵育30min并且在3500g下离心30min。将澄清的裂解物使用0.22μm过滤器单元过滤, 并且以10ml/min加载到安装在AKTA Pure仪器上的POROS<sup>TM</sup>GoPure<sup>TM</sup>AAVX预填充柱 (0.8x 10cm, 5ml) (赛默飞世尔公司#A36651) 上。将结合的AAV颗粒用10CV的洗涤缓冲液 (pH7.3) (50mM Tris-Cl, 0.5M NaCl, 0.01% Pluronic F-68) 洗涤, 并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液 (pH 2.7) (0.1M甘氨酸, 0.2M NaCl, 0.25M L-精氨酸) 洗脱。将洗脱级分 (0.25ml) 立即用25μl 1M Tris-Cl (pH10) 中和。由于在第一次亲和纯化之后的高产量, 将流过物再加载两次, 并且收集另外的级分。将含有AAV颗粒的级分 (如通过UV280信号所评估) 合并 (Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11\_池), 并且将完整颗粒和空颗粒在碘克沙醇超速离心梯度上分离, 并且使用Amicon Ultra-15 MWC0 100,000过滤器单元 (默克公司#UFC910008) 在PBS (pH 7.4)+0.001%Pluronic F-68中浓缩/缓冲液交换, 然后使其通过0.22μm过滤器单元 (终体积=1ml)。

[0655] 使用CE-SDS和ddPCR测定来评估装饰水平以及总颗粒浓度和完整颗粒浓度。简言之, 使用表20中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组, 使用QX200微滴式数字PCR (ddPCR) 系统 (伯乐公司) 来确定AAV载体的滴度。如下预处理经纯化的制剂: 将5μl AAV与1单位DNA酶和1x DNA酶缓冲液 (默克公司#04716728001) 以20μl总体积在37℃下一起孵育30min。将1μl的20mg/ml的蛋白酶K (生命技术公司#E00491) 添加到混合物中, 并且在55℃下孵育1h, 随后在95℃下进行15min的灭活步骤。在1x PCR缓冲液II (生命技术公司#N8080010)、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Pluronic F-68 (西格玛-奥德里奇公司#K4894)、2ng/μl剪切鲑鱼精子DNA (英杰公司#15632011) 中制备经处理的制剂的不同1/10连续稀释液, 并且将其用作PCR扩增的模板。

[0656] 如下产生微滴: 将5.5μl经预处理的AAV稀释液、各900nM的正向和反向SV40 pA引物、125nM SV40 pA探针和11μl 2x ddPCR探针用超混液 (伯乐公司#1863024) 以22μl终体积混合。对每个样品进行技术重复。将20μl每种ddPCR测定混合物加载到一次性微滴发生器盒

(伯乐公司)中。然后,将70 $\mu$ l微滴产生探针用油(伯乐公司#1863005)加载到八个油孔中的每一个中。然后将盒置于QX200微滴发生器(伯乐公司)内部。当微滴产生完成时,使用多道移液管将40 $\mu$ l转移到96孔PCR板中。

[0657] 将板用箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司)中。热循环条件如下:在95℃下持续10min,然后是在95℃下持续30s并且在60℃下持续1min的40个循环,随后在98℃下孵育10min,并且在4℃下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列)进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司)进行分析。为了计算AAV滴度,通过乘以相应的总稀释因子并且另外乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)来转换微滴数。

[0658] 使用如先前所述的CE-SDS(生物分析仪)来评估装饰水平和总颗粒浓度。结果总结于表21中。

[0659] 表20:用于通过ddPCR来测量AAV基因组浓度(vg/ml)的寡核苷酸组

| [0660] | 寡核苷酸 ID       | 5'-3'序列                                                |
|--------|---------------|--------------------------------------------------------|
|        | SV40pA133-For | TGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT                            |
|        | SV40pA133-Rev | CCCTGAACCTGAAACATAAAATGA                               |
|        | SV40pA133-P   | FAM-TGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACA<br>ACA-BHQ1 |

[0661] 表21:Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1文库的生物分析仪和ddPCR结果

[0662] 表21a:观察到的VP的MW(kDa)

| [0663] | 样品 ID                        | VP3  | VP2  | VP1   |
|--------|------------------------------|------|------|-------|
|        | Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (池)  | 66.2 | 89.0 | 99.1  |
|        | Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (完整) | 66.5 | 89.7 | 99.7  |
|        | Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (空)  | 67.2 | 90.8 | 100.8 |

[0664] 表21b:VP分布(假设每个AAV颗粒总共60个VP)

| [0665] | 样品 ID                        | VP3  | VP2 | VP1 |
|--------|------------------------------|------|-----|-----|
|        | Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (池)  | 54.5 | 0.5 | 5.0 |
|        | Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (完整) | 53.3 | 1.5 | 5.2 |
|        | Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (空)  | 55.6 | 0.4 | 4   |

[0666] 表21c:病毒基因组(vg)和病毒颗粒(vp)产量/经转染的细胞

[0667]

| 样品 ID                               | vg/细胞    | vp/细胞    | 完整%   |
|-------------------------------------|----------|----------|-------|
| Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (池)         | 4.29E+02 | 6.49E+04 | 0.7%  |
| <b>Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (完整)</b> | 3.04E+02 | 1.41E+03 | 21.5% |
| Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (空)         | 1.33E+01 | 9.19E+03 | 0.1%  |

[0668] AAV-260;Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1(完整)

[0669] 浓度=4.87E+12vg/ml

[0670] 装饰水平=\*1.5Sso7d/AAV

[0671] 完整%=21.5%

[0672] 在UC之后的病毒基因组回收率=71%

[0673] 在UC之后的完整颗粒富集=32.6倍

[0674] \*由于存在约80%的空的未经装饰的AAV而可能被低估

[0675] 通过转染的rep/Cap VP2 K0和pHelper质粒的大量过量来解释完整颗粒的低百分比。大多数细胞仅含有这两种质粒但不含货物质粒,并且因此产生未经装饰的空颗粒的子代。这也解释了观察到的相对较低的装饰水平,因为CE-SDS在不考虑存在未经装饰/空AAV的情况下估计装饰的平均数目。

[0676] 实例6.3:通过NGS评估Lib8 Sso7d-AAV1Sil1原始文库组成

[0677] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0678] 在使用含有因美纳公司的适配体的两个不同引物组的一个单次PCR反应中,从质粒(SK037)和AAV(AAV-260)文库产生扩增子文库。将正向引物与含有Illumina TruSeq索引的反向引物组合使用,以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表表示于表22中。

[0679] 表22:此实例中使用的引物的列表(粗体:索引,加下划线:退火区)

[0680]

| 样品 ID                       | 引物序列 5'-3'                                                                                     |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LC0034<br>(正向引物)            | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACA<br>CGACGCTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG         |
| LC0038<br>(反向引物<br>/AAV 文库) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCAGACAC |
| LC0042<br>(反向引物/<br>质粒文库)   | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAAGTGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCAGACAC |

[0681] 使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和100ng质粒文库或对于AAV文库的5E+10个病毒基因组(对应于大约123ng dsDNA)作为模

板以25 $\mu$ l总反应体积准备PCR反应。用以下循环方案进行PCR:在95 $^{\circ}$ C下持续2min;在98 $^{\circ}$ C下持续10s、在55 $^{\circ}$ C下持续15s、在72 $^{\circ}$ C下持续25s的20个循环;随后在72 $^{\circ}$ C下进行2min的最终扩增,然后在4 $^{\circ}$ C下保持。通过在Sybr-Safe预染色的1.5%琼脂糖凝胶上进行琼脂糖凝胶电泳来分离PCR产物(在120V下跑胶30min)。然后切割预期大小(243bp)的条带,并且将其使用Qiaquick凝胶提取试剂盒(凯杰公司#28704)纯化,并且在50 $\mu$ l水中洗脱。在Qubit仪器上测量DNA浓度,同时使用Agilent生物分析仪2100(Agilent DNA1000试剂盒)评估产物的纯度和大小。在定量之后,将文库以8pM的终浓度等摩尔合并,并且使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司)上进行测序。

[0682] 使用定制脚本进行数据分析:

[0683] 将生成的fastq文件最初按质量(Q>30,其中Q指示Phred质量得分)和长度(120-130bp)过滤。在质量修整之后,处理序列,旨在映射Sso7d特定边界(DISK到DAPK)。在最终过滤的序列上评估靶位置处的单序列出现和氨基酸分布:评估约400K个读段(对于质粒文库)和约700K个读段(对于AAV文库)。结果示于图17A-图17D中。

[0684] 单序列出现分析显示,大约90%的序列在质粒和AAV文库两者中是独特的,这表明在AAV产生期间良好的文库多样性和最小偏差。

[0685] NGS分析显示出在质粒文库中随机化位置处的预期氨基酸分布。如预期的那样,与质粒文库相比,AAV文库展现出略微更强的偏差,然而对于AAV文库来说,这被认为是微小的。

[0686] 实例7.Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11的体内选择

[0687] 将Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11文库注射到人源化(hCD34)小鼠中,并且对从不同组织中提取的DNA/RNA进行生物分布/NGS分析,目的是鉴定不同器官中富集的AAV货物序列。

[0688] 实例7.1:动员的人源化小鼠注射和组织处理。

[0689] 为了进行体内筛选,利用移植了人脐带血来源CD34+细胞的NSG小鼠。使用流式细胞术在移植后12周的NSG小鼠的外周血中通过观察在总CD45+细胞(小鼠和人)中有至少30%的人CD45+细胞确认小鼠的人源化。在施用Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11文库或未经装饰的AAV1Si11(ssCAG-EGFP-HPRE\_NOX作为货物:DL144)病毒前,使用5天剂量方案动员小鼠的HSC。简言之,以125 $\mu$ g/kg的剂量通过皮下注射一天施用两次G-CSF,持续连续四天。在第5天的早晨,以5mg/kg的剂量通过皮下注射施用一次AMD3100。在注射AMD3100后一小时内,以1.2E+13vg/kg的剂量通过尾静脉注射施用对照(未经装饰的AAV1Si11\_ssCAG EGFP\_NOX;3只小鼠)或文库(Lib8 Sso7d-VP2AAV1Si11;12只小鼠)病毒。

[0690] 注射病毒后五天,处死小鼠,并且收集以下组织:全血、脑、肝、脾、肾、骨骼肌、心脏、肺和骨髓。对于全血,合并来自同一组中所有小鼠的全部血液(对照n=3,文库n=12)。将合并的血液在室温下以500g旋转10min,去除血浆,并且将沉淀物以等分试样在-80 $^{\circ}$ C下储存。对于除了骨髓之外的所有其他组织,切下每种组织的小段(3mm),并且将每组合并。使用锋利的剃刀将合并的组织切成小块,并且将其以等分试样在-80 $^{\circ}$ C下储存。将每种合并的冷冻组织(全血、脑、肝、脾、肾、骨骼肌、心脏、肺)的一个等分试样在Qiagen组织研磨机II中使用5mm不锈钢珠在PBS中匀浆。使用QIAmp DNA小提试剂盒(凯杰公司,51306)从匀浆的裂解物中纯化DNA。类似地,将每种组织的一个等分试样使用组织研磨机II在RLT缓冲液中匀浆,并且使用RNeasy Plus小提试剂盒(凯杰公司,74134)提取RNA。为了收集骨髓,使用锋利

的剃刀切割干净的骨端,并且将其在4℃下以8000g旋转1min。将来自同一组的所有小鼠的骨髓合并,并且在FACS缓冲液(1xPBS,0.5%BSA,2mM EDTA)中使其通过100μm粗滤器。将合并的骨髓细胞的等分试样(100万个细胞)沉淀并作为输入物在-80℃下储存,并且将剩余的细胞(对于对照为2亿个,对于Sso7d文库为9亿个)用于使用磁珠缀合的抗人CD34抗体(美天旎公司(Miltenyi),130-097-047)用LS柱根据制造商的说明来纯化人CD34+细胞。将经纯化的CD34+细胞的等分试样(30万个细胞)沉淀并作为输入物在-80℃下储存,并且将剩余的细胞(对于对照为360万个,对于Sso7d文库为6400万个)用每百万个细胞以下抗体的抗体混合物染色:20μl抗人CD34-FITC(BD Pharmagin公司,555821)、2.5μl抗小鼠CD45-eFluor610(赛默公司(Thermo),61045182)、5μl抗人CD45-V450(BD Pharmagin公司,560367)、5μl抗人CD90-APC(BD Pharmagin公司,559869)、5μl抗人CD38-PE(BD Pharmagin公司,555460)、5μl抗人CD45RA-BV605(BD Pharmagin公司,562886)。使用自动分选仪(BD FACS ARIA II)针对以下群体对细胞进行分选:对于对照组为两个群体1)mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+,2)mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-;对于文库组为四个群体1)mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+,2)mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-,3)mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38+hCD90-,4)mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90+(LT-HSC)。将分选的群体在4℃下在350g下离心5min,并且作为干燥沉淀物在-80℃下储存。将冷冻的沉淀物用于使用Allprep DNA/RNA小提试剂盒(凯杰公司,80204)纯化DNA和RNA两者。使用UV分光光度计确定洗脱的DNA/RNA的浓度。结果总结于表23中。

[0691] 表23:从人源化小鼠组织中提取的DNA和RNA的浓度

[0692]

| 组织来源        | 组织描述                                                        | 细胞数      | RNA<br>洗脱<br>液( $\mu$ l) | RNA 浓<br>度(ng/ $\mu$ l) | DNA<br>洗脱<br>液( $\mu$ l) | DNA 浓<br>度(ng/ $\mu$ l) |
|-------------|-------------------------------------------------------------|----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+ hCD45RA+<br>(MPP1)                  | 2.00E+06 | 30                       | 37                      | 50                       | 53                      |
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+ hCD45RA-<br>(MPP2)                  | 1.26E+05 | 30                       | 4                       | 50                       | 21                      |
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+ hCD45RA-<br>hCD38+ hCD90-<br>(MPP3) | 3.40E+05 | 30                       | 5                       | 50                       | 21                      |
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+ hCD45RA-<br>hCD38- hCD90+           | 8.00E+03 | 30                       | 0.4                     | 50                       | 1.7                     |

[0693]

|         |                                            |           |    |     |     |    |
|---------|--------------------------------------------|-----------|----|-----|-----|----|
|         | (LT-HSC)                                   |           |    |     |     |    |
| 对照分选的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+ hCD45RA+<br>(MPP1) | 1.50E+06  | 30 | 40  | 50  | 21 |
| 对照分选的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+ hCD45RA-<br>(MPP2) | 1.16E+05  | 30 | 1.7 | 50  | 30 |
| 文库      | 从完整骨髓纯化的<br>hCD34+(BM_hCD34+)              | 3.00E+05  | 30 | 6.7 | 50  | 32 |
| 对照      | 从完整骨髓纯化的<br>hCD34+(BM_hCD34+)              | 3.00E+05  | 30 | 7.8 | 50  | 20 |
| 文库      | 完整骨髓                                       | 1.00E+06  | 30 | 50  | 50  | 27 |
| 对照      | 完整骨髓                                       | 1.00E+06  | 30 | 67  | 50  | 28 |
| 文库      | 12 只小鼠的合并的心脏组织                             | 代表性的合并的组织 | 30 | 135 | 200 | 43 |
| 对照      | 3 只小鼠的合并的心脏组织                              | 代表性的合并的组织 | 30 | 35  | 200 | 31 |
| 文库      | 12 只小鼠的合并的肌肉组织                             | 代表性的合并的组织 | 30 | 16  | 200 | 20 |
| 对照      | 3 只小鼠的合并的肌肉组织                              | 代表性的合并的组织 | 30 | 4   | 200 | 12 |
| 文库      | 12 只小鼠的合并的肺组织                              | 代表性的合并的组织 | 30 | 442 | 200 | 44 |

[0694]

|    |               |           |    |      |     |     |
|----|---------------|-----------|----|------|-----|-----|
| 对照 | 3 只小鼠的合并的肺组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 470  | 200 | 18  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的全血  | 代表性的合并的组织 | 30 | 47   | 200 | 82  |
| 对照 | 3 只小鼠的合并的全血   | 代表性的合并的组织 | 30 | 358  | 200 | 17  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的肾组织 | 代表性的合并的组织 | 30 | 431  | 200 | 70  |
| 对照 | 3 只小鼠的合并的肾组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 157  | 200 | 49  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的脾组织 | 代表性的合并的组织 | 30 | 1122 | 200 | 132 |
| 对照 | 3 只小鼠的合并的脾组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 1251 | 200 | 557 |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的脑组织 | 代表性的合并的组织 | 30 | 96   | 200 | 43  |
| 对照 | 3 只小鼠的合并的脑组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 443  | 200 | 21  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的肝   | 代表性的      | 30 | 753  | 200 | 233 |

|        |    |              |           |    |      |     |     |
|--------|----|--------------|-----------|----|------|-----|-----|
|        |    | 组织           | 合并的组织     |    |      |     |     |
| [0695] | 对照 | 3 只小鼠的合并的肝组织 | 代表性的合并的组织 | 30 | 1290 | 200 | 100 |

[0696] 实例7.2:对注射Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11的小鼠的生物分布研究提取的DNA样品的多重ddPCR:

[0697] 使用QX200微滴式数字PCR (ddPCR) 系统 (伯乐公司) 来定量提取的DNA样品上每个细胞的AAV基因组拷贝数,将其相对于RPP30基因归一化。由于存在人和小鼠来源基因组DNA两者,使用小鼠或人特异性RPP30寡核苷酸组进行两个不同的实验。为了检测AAV基因组,使用表20中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组。将可商购的hRPP30和mRPP30 HEX测定 (分别为伯乐公司#10031243和#10042962) 用于归一化。

[0698] 以含有25ng基因组DNA、900nM正向和反向SV40 pA引物、125nM SV40 pA探针、1 $\mu$ l 20x小鼠或人RPP30 HEX测定、10 $\mu$ l 2X ddPCR探针用超混液 (伯乐公司) 和0.5单位SphI-HF (新英格兰生物实验室公司#R3182) 的20 $\mu$ l体积进行PCR。对每个样品进行技术重复。在室温下孵育15min之后,将每种ddPCR测定混合物加载到一次性微滴发生器盒 (伯乐公司) 中。然后,将70 $\mu$ L微滴产生探针用油 (伯乐公司) 加载到八个油孔中的每一个中。然后将盒置于QX200微滴发生器 (伯乐公司) 内部。当微滴产生完成时,使用多道移液管将微滴转移到96孔PCR板中。

[0699] 将板用箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪 (伯乐公司) 中。热循环条件如下:在95 $^{\circ}$ C下持续10min,然后是在95 $^{\circ}$ C下持续30s并且在60 $^{\circ}$ C下持续1min的40个循环,随后在98 $^{\circ}$ C下孵育10min,并且在4 $^{\circ}$ C下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号 (标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列) 和HEX荧光信号 (标记每个微滴中的RPP30基因序列) 进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件 (伯乐公司) 进行分析。

[0700] 数据转换:

[0701] 计算每个反应的技术重复平均值 (对于人和小鼠RPP30为两个,对于SV40 pA为四个) 和标准差。通过将小鼠和人RPP30平均微滴求和并除以2来计算每个反应中二倍体细胞的总数。通过将人细胞 (hRPP30) 的平均数除以细胞总数 (hRPP30+mRPP30) 的平均数来计算不同组织中人细胞的表示。在不同样品中观察到高变异性,这表明通过UV分光光度计进行的初始DNA定量不准确。

[0702] 通过将SV40 pA的微滴的平均数除以反应中的细胞总数 (hRPP30+mRPP30) 来计算每个细胞的AAV基因组数。

[0703] 为了考虑误差传播,使用在线GraphPad工具 ([www.graphpad.com/quickcalcs/ErrorProp1.cfm](http://www.graphpad.com/quickcalcs/ErrorProp1.cfm)) 计算每个转换值的标准差。

[0704] 结果示于图18和图19中。

[0705] ddPCR确认用于Sso7d文库选择的小鼠的人源化水平良好 (基于来自血液和骨髓的数据,等于50%-60%)。

[0706] 在脾中观察到的人来源细胞(>10%)可能是在动员之后迁移到此器官的结果。

[0707] 生物分布分析确认AAV基因组在所有测试的器官中都存在。AAV基因组水平在脾和脑中低(<1个拷贝/细胞),并且在肾、肝和血液中较高(10-30个拷贝/细胞)。如对于唾液酸KO AAV1(Si11)预期的那样,肝显现不是AAV感染的主要汇点。

[0708] 实例7.3:对从注射Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11的小鼠制备的cDNA的NGS分析

[0709] 从提取的RNA样品制备cDNA:

[0710] 使用**OneTaq®**一步RT-PCR试剂盒(新英格兰生物实验室公司#E5315)、10pmol实例6.1中所述的LC0052/LC0053引物和10 $\mu$ l总RNA或对于RNA浓度>100 $\mu$ g/ $\mu$ l的样品的1 $\mu$ g总RNA作为模板(参见表24)以50 $\mu$ l总反应体积制备cDNA。用以下循环方案进行RT-PCR:在48°C下持续30min,在94°C下持续2min;在94°C下持续15s、在55°C下持续30s、在68°C下持续30s的40个循环;随后在68°C下进行2min的最终扩增,然后在4°C下保持。使用快速凝胶系统(快速凝胶DNA盒,2.2%,龙沙公司(Lonza) #57031)在1 $\mu$ l RT-PCR反应物上评估产物的大小。结果示于图20中。将反应物使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(凯杰公司#28104)纯化,并且在50 $\mu$ l水中洗脱。

[0711] 表24:用于RT-PCR反应的样品描述和RNA量

[0712]

| 样品 ID | 描述                                                   | 所使用的量     |
|-------|------------------------------------------------------|-----------|
| L1    | mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)                 | 370 ng    |
| L2    | mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)                 | 40 ng     |
| L3    | mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)   | 50 ng     |
| L4    | mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC) | 4 ng      |
| L5    | BM hCD34+                                            | 67 ng     |
| L6    | 骨髓                                                   | 500 ng    |
| L7    | 心脏                                                   | 1 $\mu$ g |
| L8    | 肌肉                                                   | 160 ng    |
| L9    | 肺                                                    | 1 $\mu$ g |
| L10   | 血液                                                   | 1 $\mu$ g |
| L11   | 肾                                                    | 1 $\mu$ g |
| L12   | 脾                                                    | 1 $\mu$ g |
| L13   | 脑                                                    | 1 $\mu$ g |
| L14   | 肝                                                    | 1 $\mu$ g |

[0713] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0714] 在使用含有因美纳公司的适配体的一组引物的一个单次PCR反应中,如上所述从由提取的RNA制备的cDNA产生扩增子文库。将正向引物与含有Illumina TruSeq索引的反向引物组合使用,以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表表示于表25中。

[0715] 表25:此实例中使用的引物的列表(粗体:索引,加下划线:退火区)

[0716]

| 名称                       | 引物序列 5'-3'                                                                                     |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LC0034<br>(正向引物)         | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACA<br>CGACGCTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG         |
| LC0076<br>(反向引物<br>/L14) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0077<br>(反向引物<br>/L12) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0078<br>(反向引物<br>/L11) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGACTGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0079<br>(反向引物<br>/L10) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAAGTGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0080<br>(反向引物<br>/L9)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACATGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0081<br>(反向引物<br>/L8)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACGGGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |

[0717]

|                          |                                                                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LC0082<br>(反向引物<br>/L7)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GCGG</b> ACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0083<br>(反向引物<br>/L6)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC          |
| LC0084<br>(反向引物<br>/L5)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GGCC</b> ACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0085<br>(反向引物<br>/L3)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGAA</b> ACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0086<br>(反向引物<br>/L2)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGTAC</b> GGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0087<br>(反向引物<br>/L1)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CCACT</b> CGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0088<br>(反向引物<br>/L13) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>ATCAG</b> TGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0089<br>(反向引物<br>/L4)  | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>AGGA</b> ATGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |

[0718] 使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和10 $\mu$ l经纯化的cDNA样品作为模板以25 $\mu$ l总反应体积准备PCR反应。用以下循环方案进行PCR:在95℃下持续2min;20个循环,在98℃下持续10s;在55℃下持续15s;在72℃下持续25s;随后在72℃下孵育2min,然后在4℃下保持。对于L8和L13样品,由于用20个循环获得的产量低,再添加10个循环。通过在SybrSafe预染色的1.5%琼脂糖凝胶上进行琼脂糖凝胶电泳来分离PCR产物(在100V下跑胶30min)。然后切割预期大小(243bp)的条带,并且将其使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#9280)纯化,并且在30 $\mu$ l水中洗脱。在使用Qubit仪器定量(所有样品都在7-11ng/ $\mu$ l之间,除了L13样品为1.6ng/ $\mu$ l之外)之后,将文库

以8pM的终浓度等摩尔合并,并且使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司)上进行测序。所得读段数总结于表26中。

[0719] 使用定制脚本进行数据分析:

[0720] 将生成的fastq文件最初按质量( $Q>30$ ,其中Q指示Phred质量得分)和长度(110-130bp)过滤。在质量修整之后,处理序列,旨在映射Sso7d特定边界(ISKI到DAPK)。最终过滤的读段数报告于表26中。在最终过滤的序列上评估单个序列在不同器官中的分布。结果总结于图21(前10'000个苗头物)和图22中。在实例7中选择用于苗头物确认的序列以红色示出。

[0721] 表26:初始和过滤的NGS读段计数

| 名称               | 初始读段    | 过滤的读段   |
|------------------|---------|---------|
| L1-MPP1          | 875435  | 688058  |
| L2-MPP2          | 797296  | 633132  |
| L3-MPP3          | 790629  | 607226  |
| [0722] L4-LT_HSC | 897598  | 683457  |
| L5-BM_hCD34+     | 702645  | 562366  |
| L6-骨髓            | 676977  | 522455  |
| L7-心脏            | 720362  | 568901  |
| L8-肌肉            | 1548187 | 1271261 |
|                  |         |         |
| L9-肺             | 1421675 | 1110392 |
| L10-血液           | 1167265 | 895851  |
| [0723] L11-肾     | 1122478 | 868355  |
| L12-脾            | 994747  | 633132  |
| L13-脑            | 1059484 | 862151  |
| L14-肝            | 778890  | 606519  |

[0724] 在第一轮体内选择之后,可以在脑、肌肉、LT-HSC和MPP1中观察到明显的序列富集,但是在其他组织中没有观察到。在脑、肌肉、LT-HSC和MPP1中富集的序列显现是特异性的,并且在其他测试的样品中没有富集。

[0725] 在脑中的特异性序列的富集可能是由AAV在此器官中的低渗透性促进的。在HSC中,由于分选的细胞量低(8K)和每个细胞的基因组数低(约1个基因组/细胞),预期复杂性低。在肌肉中,尽管中间基因组数为约2个基因组/细胞,我们仍观察到扩增cDNA的困难,这表明AAV在这些细胞中可能有非最佳核运输。

[0726] 实例8.使用条形码化的文库方法对来自第1轮选择的所选苗头物进行体内确认

[0727] 通过将RNA条形码化与多重下一代测序组合,通过以高通量并且在同一动物中直接并排比较含有货物条形码化的序列的经修饰的AAV衣壳来进行实例7中所述的人源化小鼠中的来自第1轮选择的富集的Sso7d-AAV1Si11变体的确认。简言之,将不同的9聚体条形码克隆到由遍在活性CAG启动子驱动红色荧光蛋白(sfCherry2)报告物的3'非翻译区中,并且随后是转录后调节元件HPRE (NOX)。将单链AAV基因组用填充序列(HPRT内含子)填充,使其大小为4476个碱基,接近最大AAV容量。此实例中使用的条形码化的货物质粒示意性地表示于图23中。将来自LT-HSC (n=9)、MPP1 (n=2)、脑(n=2)和肌肉(n=2)的居首富集的Sso7d变体克隆到单独质粒的AAV1Si11 VP2的N末端,并且与表27中列出的所选独特的条形码化的货物质粒组合用于AAV组装。在AAV组装和纯化之后,将不同AAV制剂等摩尔混合,从而产生条形码化的AAV1Si11文库。然后将条形码化的文库注射到人源化小鼠中,并且对从不同组织中提取的DNA/RNA进行生物分布/NGS分析。下文更详细地描述了使用此条形码化的文库方法对所选苗头物的体内确认。

[0728] 实例8.1条形码化的质粒设计和AAV产生

[0729] 条形码化的货物质粒产生:

[0730] 将包含在CAG启动子的控制下的sfCherry2和HPRE元件(NOX)的AgC1295质粒(pCargo\_CBa\_sfcherry2\_HPRe\_SV40pA)用作用于利用正好在sfCherry2 CDS之后存在的AgeI限制性位点和在R-ITR之前存在的BglIII限制性位点产生条形码化的货物的骨架。使用JKU\_1\_fw(5'-GAG CCG AGG CCA GAC ACT CTA CAT AAC CGG TNN NNN NNN NAA CAG GCC TAT TGA TTG GAA AGT ATG-3')和JKU\_2\_rev(5'-GAT TAA CCT GAT AGA TCT CTC GAC TTG GGC AAC AAA AGT GAA ACT CCA TC-3')寡核苷酸从称为(AgC1294)pCargo\_ss\_173CMVp\_EGFP\_HPRe\_SV40pA\_填充物的内部质粒扩增含有HPRE(NOX)、SV40pA(L)和HPRT1填充物的2634bp片段。正向寡核苷酸含有与AgeI消化的AgC1295同源的一段25个碱基、AgeI限制性位点、一段9个随机化核苷酸(N,条形码)、随后是充当与模板的退火区的26个碱基。反向寡核苷酸含有与BglIII消化的AgC1295同源的一段25个碱基、BglIII限制性位点、随后是充当与模板的退火区的32个碱基。使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和10ng AgC1294质粒作为模板以50μl总反应体积用以下循环方案准备PCR反应:在98℃下持续30s;25个循环,在98℃下持续10s;在66℃下持续15s;在72℃下持续1min 30s;随后在72℃下孵育2min。为了产生条形码化的sfCherry货物质粒,使用NEBuilder HiFi DNA组装预混液(新英格兰生物实验室公司;E2621)以20μl的终体积组装200ng PCR产物(2634bp)和100ng AgeI-BglIII消化的AgC1295受体质粒,并且将其在50℃下孵育2h。将一小瓶One Shot TOP10化学感受态大肠杆菌细胞(赛默飞世尔公司#C404010)用2μl组装反应物转化,并且在LB+卡那霉素板上涂布。然后将96个菌落用于使用NucleoSpin 96质粒试剂盒(马歇雷-纳格尔公司#740625.4)单独提取质粒DNA,并且通过桑格测序进行分析。

[0731] 使用Geneious Prime软件比对所有序列的条形码区,并且使用以下参数过滤目的条形码区,产生表27中列出的41个条形码:

[0732] • 排除包含长于3nt的均聚物的条形码。

[0733] • 保留在至少三个位置中与所有其他条形码具有区别的条形码

[0734] 使用NucleoBond Xtra Midi plus试剂盒(马歇雷-纳格尔公司#740410)扩增(upscale)并纯化41个所选条形码化的货物质粒。通过桑格测序确认每种质粒制剂的条形码身份,并且通过用SrfI(新英格兰生物实验室公司#R0629)限制性消化来确认AAV ITR的完整性。

[0735] 表27:所选条形码的列表

[0736]

| ID  | 条形码        | 分配到             |
|-----|------------|-----------------|
| A02 | ACAGGTCCGA | 未经装饰的 CTR       |
| A04 | CTTGCAATGT |                 |
| A06 | GCGTGCGAG  | HSC-Sso7dL8-001 |
| A07 | AGATCAACT  |                 |
| A08 | GGCGCAGTT  | HSC-Sso7dL8-002 |
| A09 | GGAGTGCGT  |                 |
| B02 | GCTGAGATA  | HSC-Sso7dL8-003 |
| B05 | TTAAGTTGG  |                 |
| B06 | GCCTCTACG  | HSC-Sso7dL8-004 |
| B07 | TGGAGAGGC  |                 |
| B10 | TCAGTGGAT  | HSC-Sso7dL8-005 |
| B12 | TGAACTAAG  |                 |

[0737]

|     |           |                  |
|-----|-----------|------------------|
| C01 | GGTCTTCGG | HSC-Sso7dL8-006  |
| C03 | ATTGCTTGG |                  |
| C05 | CTGCGCTGG |                  |
| C08 | ACATGCCTG | HSC-Sso7dL8-007  |
| C09 | AGGAGAACG |                  |
| D02 | TCGCCCACA |                  |
| D04 | ACCATGTGG |                  |
| D10 | CGGTGGTGT |                  |
| E07 | GGATTATAC |                  |
| E08 | TATAGATCT |                  |
| E09 | CTGCGGCTA |                  |
| E10 | TACTCGAGT |                  |
| E11 | GCTCGAAGG |                  |
| F04 | AATATTATA |                  |
| F06 | TAGAATTGA |                  |
| F10 | GGATGTGAG |                  |
| F11 | GATCTGCGT |                  |
| G03 | TTAGGCTTA | HSC-Sso7dL8-008  |
| G04 | TTCCTGAGG | MPP1-Sso7dL8-001 |
| G06 | CAGAATAAG | HSC-Sso7dL8-009  |
| G07 | TATGAGCAG | 肌肉-Sso7dL8-001   |
| G08 | TAATAACGA | MPP1-Sso7dL8-002 |
| G10 | ACGTTAAGT |                  |
| G11 | CGTTGTATG |                  |
| G12 | AGGATGAAT | 肌肉-Sso7dL8-002   |
| H05 | TATTGCCAA | 脑-Sso7dL8-001    |
| H07 | AGTGCGCCG | 脑-Sso7dL8-002    |

|        |     |           |  |
|--------|-----|-----------|--|
| [0738] | H09 | GTGACAATT |  |
|        | H11 | TTCGCGCGA |  |

[0739] 将所选Sso7d序列克隆到AAV1Si11 VP2表达质粒中:

[0740] 将来自第一轮体内选择的15个所选苗头物的位置22、24、26、29、31、33、41、43和45 (相对于包含第一个甲硫氨酸的Sso7d序列) 中鉴定的突变经由计算机模拟移植到实例6.1中所述的rcSso7支架 (在其C末端含有G4S接头) 中。在金尔特公司 (赛默飞世尔公司) 作为串DNA订购突变的序列, 向每个末端添加了适合于基于吉布森克隆到HindIII-AgeI消化的AAV1 Si11 VP2表达质粒 (NC058) 中的25bp同源性。

[0741] 为了产生Sso7d-AAV1Si11 VP2表达质粒, 使用NEBuilder HiFi DNA组装预混液 (新英格兰生物实验室公司; E2621) 以20 $\mu$ l的终体积组装10ng等摩尔混合的串DNA和100ng AgeI-HindIII消化的NC058受体质粒, 并且将其在50 $^{\circ}$ C下孵育2h。将一小瓶One Shot TOP10化学感受态大肠杆菌细胞 (赛默飞世尔公司#C404010) 用2 $\mu$ l组装反应物转化, 并且在LB+卡那霉素板上涂布。然后使用NucleoSpin 96质粒试剂盒 (马歇雷-纳格尔公司#740625.4), 使用96个菌落来单独提取质粒DNA, 并且通过桑格测序确认序列身份。

[0742] 使用NucleoBond Xtra Midi plus试剂盒 (马歇雷-纳格尔公司#740410) 扩增并纯化所选表达质粒, 并且通过桑格测序确认每种质粒制剂的身份。

[0743] 条形码化的Sso7d-AAV1Si11文库产生:

[0744] 对于来自第一轮选择的所选苗头物中的每一种, 制备含有等摩尔比率的pHelper、(NC057)pRep2\_Cap1\_AAV1 Si11\_VP2 KO、相应的Sso7d AAV1Si11 VP2表达质粒和对应的条形码化的货物 (参见表27) 的单独的DNA混合物, 并且使用FectoVIR-AAV转染试剂 (宝利普拉斯公司#101000022) (DNA:FectoVIR=1 $\mu$ g:1 $\mu$ l) 将其转染到200ml浓度为2E+06vc/ml的HEK293悬浮细胞中 (1.1 $\mu$ g总DNA/1E+06个细胞)。在转染之后, 将终浓度为2g/l的葡萄糖添加到转染混合物中, 并且将混合物在37 $^{\circ}$ C、110rpm、6% CO<sub>2</sub>下孵育。还用未经装饰的AAV1Si11与其对应的条形码化的货物质粒 (A02) 组合再进行两次转染。

[0745] 转染后三天, 将终浓度至0.1U/ $\mu$ l的全能核酸酶和20ml裂解缓冲液 (500mM HEPES, 10% Tween 20, 20mM MgCl<sub>2</sub>) 添加到转染反应物中, 并且将混合物在37 $^{\circ}$ C下在搅动下孵育3h。在此孵育步骤之后, 将24ml蔗糖盐溶液 (5M NaCl, 7% 蔗糖) 添加到裂解物中, 并且将样品再孵育20min。然后将样品在3500g下离心15min, 将上清液使用0.22 $\mu$ m过滤器过滤, 补充终浓度为5mM的EDTA, 并且以1ml/min加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱 (0.5x5cm, 1ml) (赛默飞世尔公司#A36652) 上。将结合的AAV颗粒用10CV的洗涤缓冲液 (pH 7.3) (50mM Tris-Cl, 0.5M NaCl, 0.01% Pluronic F-68) 洗涤, 并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液 (pH 2.7) (0.1M甘氨酸, 0.2M NaCl, 0.25M L-精氨酸) 洗脱。将洗脱级分 (0.25ml) 立即用25 $\mu$ l 1M Tris-Cl (pH 10) 中和。将含有AAV的级分 (如通过UV280信号所评估) 合并, 并且使用Float-A-Lyzer透析装置100KD (Spectrum<sup>TM</sup>#G235071) 用PBS (pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68透析过夜, 然后使其通过0.22 $\mu$ m过滤器单元。

[0746] 使用如实例6.2中所述的CE-SDS (生物分析仪) 和ddPCR测定来评估装饰水平以及总颗粒浓度和完整颗粒浓度。结果示于图24A和图24B中。

[0747] 经Sso7d装饰的AAV1Si11对HEK293悬浮细胞的体外感染性:

[0748] 进行感染性评估以确保不同条形码对mRNA表达没有影响。在感染当天,将HEK293悬浮细胞重悬于DMEM培养基中,并且接种于96孔板中(1.5E+04个细胞/孔)。将经装饰的AAV1Si11制剂在DMEM培养基中稀释,并且将不同浓度施加到接种的细胞。转导后3h,向每个孔中添加终浓度为5%的FBS。基于病毒基因组,AAV浓度范围从5.0E+05至4.6E+01moi。转导后三天,分离细胞,并且进行FACS分析以计算sfCherry2阳性细胞的百分比。图25示出了完整颗粒(vg)的数目与受感染的细胞(sfCherry2+)的百分比的关系。

[0749] 最终合并的条形码化的文库(AAV-471)产生:

[0750] 将4E+11vg每种单一条形码化的Sso7d-AAV1 Si11制剂(除了Sso7dL8-004和Sso7dL8-005之外,它们使用1.5E+11vg)与未经装饰的对照混合,使用Amicon Ultra-15 MWC0 100,000过滤器单元(默克公司#UFC910008)浓缩,然后使其通过0.22μm过滤器单元(终体积=1.1ml)。

[0751] 使用如实例6.2中所述的CE-SDS和ddPCR测定来评估装饰水平以及总颗粒浓度和完整颗粒浓度。结果示于表28中。

[0752] 表28:条形码化的文库AAV-471QC

[0753]

| 文库 ID   | 体积<br>(ml) | vg/ml<br>(ddPCR) | vp/ml (生<br>物分析仪) | 完整颗<br>粒% | VP3<br>/AAV | VP2 融合<br>物/AAV | VP1<br>/AAV |
|---------|------------|------------------|-------------------|-----------|-------------|-----------------|-------------|
| AAV-471 | 1.1        | 3.89E+12         | 3.69E+13          | 11%       | 43.9        | 13.1            | 3.0         |

[0754] 实例8.2:动员的人源化小鼠注射和组织处理。

[0755] 为了对条形码化的Sso7d文库进行体内转导评估,利用移植了人脐带血来源CD34+细胞的NSG小鼠。使用流式细胞术在移植后12周的NSG小鼠的外周血中通过观察在总CD45+细胞(小鼠和人)中有至少30%的人CD45+细胞确认小鼠的人源化。在施用条形码化的Sso7d AAV1Si11文库病毒前,使用5天剂量方案动员小鼠的HSC。简言之,以125μg/kg的剂量通过皮下注射一天施用两次G-CSF,持续连续四天。在第5天的早晨,以5mg/kg的剂量经由皮下注射施用一次AMD3100。在注射AMD3100后一小时内,以1.2E+13vg/kg的剂量通过尾静脉注射施用文库病毒。给总共10只人源化NSG小鼠注射病毒文库。

[0756] 注射病毒后五天,处死小鼠,并且收集以下组织:全血、脑、肝、脾、肾、骨骼肌、心脏、肺和骨髓。对于全血,合并所有小鼠的血液(n=10)。将合并的血液在室温下以500g旋转10min,去除血浆,并且将沉淀物以100μl等分试样在-80℃下储存。对于除了骨髓之外的所有其他组织,切下每个组织的小段(3mm),并且将其合并。使用锋利的剃刀将合并的组织切成小块,并且将其以等分试样在-80℃下储存。将每种合并的冷冻组织(全血、脑、肝、脾、肾、骨骼肌、心脏、肺)的一个等分试样在Qiagen组织研磨机II中使用5mm不锈钢珠在RLT缓冲液(凯杰公司)中匀浆。将匀浆的组织以1000g旋转2min,并且将上清液转移到新管中并且在-80℃下储存直到进一步处理。为了收集骨髓,使用锋利的剃刀切割干净的骨端,并且将其在4℃下以8000g旋转1min。将来自所有小鼠的骨髓合并,并且在FACS缓冲液(1xPBS,0.5% BSA,2mM EDTA)中使其通过100μm粗滤器。将合并的骨髓细胞的等分试样(100万个细胞)沉淀并作为输入物在-80℃下储存,并且将剩余的细胞(2.73亿个)用于使用磁珠缀合的抗人CD34抗体(美天旎公司,130-097-047)用LS柱根据制造商的说明来纯化人CD34+细胞。将经纯化的CD34+细胞的等分试样(5万个细胞)沉淀并作为输入物在-80℃下储存,并且将剩余

的细胞(1200万个)用每400万个细胞以下抗体的抗体混合物染色:10 $\mu$ l抗人CD34-FITC (BD Pharmagin公司,555821)、1 $\mu$ l抗小鼠CD45-BV650(百进公司(BioLegend),563410)、1 $\mu$ l抗人CD45-PE-Cy7 (BD生物科学公司,557748)、2 $\mu$ l抗人CD90-APC (研究与诊断系统公司(R&D Systems),FAB2067A-025)、1 $\mu$ l抗人CD38-PE (BD生物科学公司,567146)、1 $\mu$ l抗人CD45RA-BV605 (BD生物科学公司,562886)、1 $\mu$ l Lin-混合物-V450 (定制)和活力-APC-Cy7 (e生物科学公司(eBioscience),65-0865-14)。使用自动分选仪 (BD FACS ARIA II) 针对以下四个群体对细胞进行分选:1) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+ (MPP1), 2) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90- (MPP2), 3) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38+hCD90- (MPP3), 4) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90+ (LT-HSC)。将分选的群体在4℃下在350g下离心5min,并且在-80℃下在RLT缓冲液中储存直到进一步处理。使用Allprep DNA/RNA小提试剂盒 (凯杰公司,80204),从匀浆的组织裂解物中纯化DNA和RNA,并且将其在-80℃下储存。使用UV分光光度计确定洗脱的DNA/RNA的浓度。结果总结于表29中。

[0757] 表29:从人源化小鼠组织中提取的DNA和RNA的浓度

[0758]

| 组织来源        | 组织描述                                                             | 细胞数      | RNA 洗脱液<br>( $\mu\text{L}$ ) | RNA 浓度<br>( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) | DNA 洗脱液<br>( $\mu\text{L}$ ) | DNA 浓度<br>( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) |
|-------------|------------------------------------------------------------------|----------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+<br>hCD45RA+<br>(MPP1)                    | 5.50E+06 | 30                           | 41                                    | 50                           | 76                                    |
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+<br>hCD45RA-<br>hCD38- hCD90-<br>(MPP2)   | 7.76E+03 | 11                           | 0.5                                   | 20                           | Undet                                 |
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+<br>hCD45RA-<br>hCD38+ hCD90-<br>(MPP3)   | 2.72E+04 | 11                           | 1.34                                  | 20                           | Undet                                 |
| 文库分选<br>的细胞 | mCD45- hCD45+<br>hCD34+<br>hCD45RA-<br>hCD38- hCD90+<br>(LT-HSC) | 1.13E+03 | 11                           | 3.89                                  | 20                           | Undet                                 |
| 文库          | 从完整骨髓纯化的<br>hCD34+<br>(BM_hCD34+)                                | 5.00E+04 | 30                           | 16                                    | 50                           | 10.2                                  |

[0759]

|    |                |           |    |      |    |      |
|----|----------------|-----------|----|------|----|------|
| 文库 | 合并的完整骨髓        | 1.00E+06  | 30 | 375  | 50 | 250  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的心脏组织 | 代表性的合并的组织 | 30 | 24   | 50 | 32   |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的肌肉组织 | 代表性的合并的组织 | 30 | 3    | 50 | 29.4 |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的肺组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 276  | 50 | 58   |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的全血   | 代表性的合并的组织 | 10 | 5    | 40 | 11   |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的肾组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 18.3 | 50 | 126  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的脾组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 188  | 50 | 488  |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的脑组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 70   | 50 | 57.7 |
| 文库 | 12 只小鼠的合并的肝组织  | 代表性的合并的组织 | 30 | 418  | 50 | 71   |

[0760] Undet:未确定

[0761] 实例8.3:对来自注射条形码化的Sso7d-VP2 AAV1Si11文库的小鼠的总DNA的NGS分析

[0762] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0763] 在使用含有因美纳公司的适配体的一组引物的一个单次PCR反应中,如上所述从提取的总DNA产生扩增子文库。将正向引物与含有Illumina TruSeq索引的反向引物组合使用,以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表表示于表23中。

[0764] 表23:此实例中使用的引物的列表(粗体:索引,加下划线:退火区)

[0765]

| 名称                     | 引物序列 5'-3'                                                                                                |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| JKU_35_F<br>(正向引物)     | ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACCG<br>ACGCTCTTCCGATCTGGATATCAAGCTGGACATCACC                        |
| JKU_11_R1<br>(反向引物/肌肉) | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>CGTGAT</b> GTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |
| JKU_12_R2<br>(反向引物/心脏) | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>ACATCGG</b> TGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |
| JKU_13_R3<br>(反向引物/肾)  | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>GCCTAAG</b> TGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |
| JKU_14_R4<br>(反向引物/脑)  | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>TGGTCAG</b> TGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |
| JKU_15_R5<br>(反向引物/脾)  | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>CACTGTG</b> TGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |
| JKU_16_R6<br>(反向引物/肺)  | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>ATTGGCG</b> TGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |
| JKU_17_R7<br>(反向引物/肝)  | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>GATCTGG</b> TGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br>GACATAC |

[0766]

|                                     |                                                                                                                   |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| JKU_18_R8<br>(反向引物<br>/LT-HSC)      | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATT <b>CAAGT</b> GTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |
| JKU_19_R9<br>(反向引物/CD38+<br>CD90-)  | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>CTGAT</b> CGTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |
| JKU_20_R10<br>(反向引物/CD38-<br>CD90-) | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATA <b>AAGCT</b> AGTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u> |
| JKU_21_R11<br>(反向引物<br>/CDRA+)      | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>GTA</b> GCCGTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |
| JKU_22_R12<br>(反向引物/骨髓)             | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATT <b>ACAAG</b> GTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |
| JKU_23_R13<br>(反向引物/CD34+)          | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATT <b>TGACT</b> GTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |
| JKU_24_R14<br>(反向引物/血液)             | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT <b>GGA</b> ACTGTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |
| JKU_25_R15<br>(反向引物<br>/AAV-471)    | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATT <b>GACAT</b> GTGACTGGA<br>GTTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTT<br><u>GACATAC</u>  |

[0767] 使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和提取的总DNA样品作为模板(所使用的量示于表31中;在AAV-471的情况下,将5 $\mu$ l经纯化的AAV制剂用作模板)以25 $\mu$ l总反应体积准备PCR反应。用以下循环方案进行PCR:在95℃下持续2min;40个循环,在98℃下持续10s;在55℃下持续15s;在72℃下持续25s;随后在72℃下孵育2min,然后在4℃下保持。将反应物加载到琼脂糖凝胶上以确认扩增产物的存在。除了肺样品之外,在所有其他样品中都可以观察到约267bp的预期条带,没有非特异性扩增的迹象。对于肺样品,后来发现缺乏扩增是由于所使用的反向寡核苷酸的性能低。将PCR产物使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(#28104)纯化,并且在50 $\mu$ l水中洗脱。在使用Qubit仪器定量

之后,将文库以8pM的终浓度等摩尔合并,并且使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司)上进行测序。

[0768] 表31:用于PCR扩增的样品和总DNA的列表

[0769]

| 组织 - DNA 样品                   | DNA<br>(ng/μl) | 预稀释 | 用于 PCR<br>的 μl | 用于 PCR<br>的 ng |
|-------------------------------|----------------|-----|----------------|----------------|
| CD34+ CD45+ CDRA+             | 76             | 否   | 1              | 76             |
| CD34+ CD45+ CDRA- CD38- CD90- | 0.22           | 否   | 5              | 1.1            |
| CD34+ CD45+ CDRA- CD38+ CD90- | 1.07           | 否   | 5              | 5.4            |
| LT-HSC                        | 0.06           | 否   | 5              | 0.3            |
| 骨髓                            | 250            | 10x | 1              | 25             |
| hCD34+                        | 10.2           | 否   | 5              | 51             |
| 血液                            | 11             | 否   | 5              | 55             |
| 肌肉                            | 29.4           | 否   | 1              | 29.4           |
| 心脏                            | 32             | 否   | 1              | 32             |
| 肾                             | 126            | 10x | 2              | 25.2           |
| 脑                             | 57.7           | 否   | 1              | 57.7           |
| 脾                             | 488            | 10x | 1              | 48.8           |
| 肺                             | 58             | 否   | 1              | 58             |
| 肝                             | 71             | 否   | 1              | 71             |

[0770] 使用定制脚本进行数据分析:

[0771] 将生成的fastq文件最初按质量(Q>30,其中Q指示Phred质量得分)过滤,然后进行处理,旨在将条形码特定边界映射到每个样品的100,000个苗头物上。将不同组织中独特的条形码的百分比通过以下方式归一化:对于每种给定组织,首先除以在输入AAV文库AAV-417中发现的百分比(参见图26),然后除以对应于未经装饰的AAV1Si11对照的条形码的百分比。结果示于图27中。

[0772] NGS分析确认用于产生条形码化的Sso7d-VP2 AAV1Si11文库(AAV-471)的16个样品的分布类似。

[0773] 与未经装饰的对照相比,HSC-Sso7dL8-006在LT-HSC中显示出15倍的富集。发现相同克隆在两种其他组织(脑和肾)中部分富集。将需要另外的实验来确认这些数据。对于其他测试的变体,没有观察到特异性富集。

[0774] 实例9.Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11的体内选择(第二轮和第三轮)

[0775] 引言:

[0776] 在第一轮选择之后,使用条形码化的文库方法不能确认大多数所鉴定的苗头物,这可能是由于RT-PCR步骤期间由来自LT-HSC细胞的初始RNA输入物量低和/或所使用的RT-

PCR试剂盒的性能次优引起的PCR偏差。再进行两轮选择。

[0777] 实例9.1:在第一轮选择之后从骨髓CD34+细胞总RNA产生富集文库

[0778] 由于从LT-HSC群体获得的RNA产量低,将来自第一轮选择的大量CD34+来源RNA用作富集文库产生的模板。

[0779] 对从骨髓CD34+细胞中提取的RNA的RT-PCR:

[0780] 使用LunaScript多重一步RT-PCR试剂盒(新英格兰生物实验室公司#E1555)、12.5pmol LC0052(5' CCCGGGGAAGTCTCTCCGAGTC GAAATTCGCCACC 3')/LC0053(5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAG GTTGTGGGTCGGG 3')引物和约35ng来自BM\_hCD34+样品的总RNA以50μl总反应体积进行RT-PCR。用以下循环方案进行RT-PCR:在55℃下持续10min,在98℃下持续1min;在98℃下持续10s、在55℃下持续20s、在72℃下持续30s的40个循环;随后在72℃下进行5min的最终扩增,然后在4℃下保持。使反应物在琼脂糖凝胶上跑胶,并且切下403bp的预期条带。然后使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#A9281)提取DNA,并且将其在50μl水中洗脱,基于Qubit测量,终浓度为1.63ng/μl。为了增加插入物量,使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、各10pmol LC052和LC053引物以及5ng凝胶提取的RT-PCR片段作为模板以50μl总反应体积用以下循环方案通过PCR对其进行扩增:在98℃下持续30s;15个循环,在98℃下持续10s;在55℃下持续20s;在72℃下持续20s;随后在72℃下持续2min,然后在4℃下保持。将PCR产物使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(凯杰公司#28104)纯化,并且在50μl水中洗脱。基于Nanodrop分光光度计测量,发现浓度为47ng/μl。

[0781] 质粒文库克隆:

[0782] 为了产生第一轮富集的Sso7d-AAV1Si11质粒文库(NC109),使用NEBuilder HiFi DNA组装预混液(新英格兰生物实验室公司;E2621)以100μl的终体积使129ng PCR产物(403bp)和1μg BsaI消化的SK0036受体质粒退火,并且在50℃下孵育3小时。然后将反应产物用质粒安全(PS)DNA酶(阿霹震中公司;E3105K)在37℃下处理1h以消化任何未组装的片段,并且使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#A9280)纯化。此反应产生约250ng组装的质粒(如通过在PSDNA酶消化步骤之后剩余的DNA量所定义)。在5x50μl小瓶中使用组装的质粒文库转化One Shot TOP10电转感受态大肠杆菌(赛默飞世尔公司;C4040-52)(约20ng DNA/小瓶)。将反应物合并,并且转移到含有200ml TB+卡那霉素培养基的11摇瓶中。然后从烧瓶中取出100μl,将不同的稀释液在LB+卡那霉素板上铺板,并且在37℃下孵育过夜。发现如通过琼脂板上的CFU数确定的文库实际大小为2.72E+08。在37℃下生长过夜之后使用大提试剂盒(凯杰公司#12163)从200ml培养物中提取质粒DNA,产生(NC109)pCargo\_173CMV\_SSo7dL8-CD34-AAV1Si11-VP2\_173CMV\_sfCherry质粒文库。

[0783] 第一轮选择AAV文库产生和QC:

[0784] 使用FectoVIR-AAV转染试剂(宝利普拉斯公司#101000022)用pHelper(约40K个质粒/细胞)、(NC080)pAAV\_Rep2Cap1\_Si11[V473D\_N500E]VP2\_KO[T138A]\_KanR(约40K个质粒/细胞)和(NC109)pCargo\_173CMV\_SSo7dL8-CD34-AAV1Si11-VP2\_173CMV\_sfCherry质粒文库(650个质粒/细胞)以1.1μg总DNA/1E+06个细胞转染2.8升浓度为2E+06vc/ml的HEK293悬浮细胞。DNA:FectoVIR的比率为1μg:1μl。在转染之后,将至终浓度为2g/l的葡萄糖添加到转染混合物中,并且将混合物在37℃、110rpm、6%CO<sub>2</sub>下孵育。

[0785] 转染后两天,将全能核酸酶添加到裂解缓冲液(500mM HEPES,10% Tween 20,20mM  $\text{MgCl}_2$ )中的转染反应物中至终浓度为 $0.1\text{U}/\mu\text{l}$ ,并且体积等于总体积的10%。在 $37^\circ\text{C}$ 下的3h孵育时间段之后,将体积等于总体积10%的蔗糖盐溶液(5M NaCl,7%蔗糖)添加到裂解物中,并且将混合物在 $37^\circ\text{C}$ 下在搅动中孵育3h。在此孵育步骤之后,添加体积等于总体积10%的盐蔗糖溶液(5M NaCl,7%蔗糖),并且再孵育20min。将样品在3500g下离心15min,并且将上清液使用 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤,补充终浓度为5mM的EDTA。接下来,将澄清的裂解物以 $1\text{ml}/\text{min}$ 加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱( $0.5\times 5\text{cm}$ ,1ml)(赛默飞世尔公司#A36652)上。将结合的AAV颗粒用10CV的洗涤缓冲液(pH 7.3)(50mM Tris-Cl,0.5M NaCl,0.01% Pluronic F-68)洗涤,并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液(pH 2.7)(0.1M甘氨酸,0.2M NaCl,0.25M L-精氨酸)洗脱。将洗脱级分(0.25ml)立即用 $25\mu\text{l}$  1M Tris-Cl(pH 10)中和。将含有AAV的级分(如通过UV280信号所评估)合并,并且使用Float-A-Lyzer透析装置100KD(Spectrum<sup>TM</sup>#G235071)用PBS(pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68透析过夜,然后使其通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器单元。将完整颗粒和空颗粒在碘克沙醇超速离心梯度上分离,并且使用Amicon Ultra-15 MWC0 100,000过滤器单元(默克公司#UFC910008)在PBS(pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68中浓缩/缓冲液交换,然后使其通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器单元(终体积=2.2ml)。

[0786] AAV文库滴度和装饰水平确定:

[0787] 使用表3中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组,使用QX200微滴式数字PCR(ddPCR)系统(伯乐公司)来确定AAV载体的滴度。如下预处理经纯化的制剂:将 $5\mu\text{l}$  AAV与1单位DNA酶和1x DNA酶缓冲液(默克公司#04716728001)以 $20\mu\text{l}$ 总体积在 $37^\circ\text{C}$ 下一起孵育30min。将 $1\mu\text{l}$ 的20mg/ml的蛋白酶K(生命技术公司#E00491)添加到混合物中,并且在 $55^\circ\text{C}$ 下孵育1h,随后在 $95^\circ\text{C}$ 下进行15min的灭活步骤。在1x PCR缓冲液II(生命技术公司#N8080010)、2.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.05% Pluronic F-68(西格玛-奥德里奇公司#K4894)、 $2\text{ng}/\mu\text{l}$ 剪切鲑鱼精子DNA(英杰公司#15632011)中制备经处理的制剂的不同1/10连续稀释液,并且将其用作PCR扩增的模板。

[0788] 通过将 $5.5\mu\text{l}$ 经预处理的AAV稀释液与各900nM正向和反向SV40pA引物、125nM SV40 pA探针和 $11\mu\text{l}$  2x ddPCR探针用超混液(伯乐公司#1863024)组合以 $22\mu\text{l}$ 的终体积制备ddPCR反应混合物。对每个样品进行技术重复。将 $20\mu\text{l}$ 每种ddPCR反应混合物加载到一次性微滴发生器盒(伯乐公司)中。然后,将 $70\mu\text{L}$ 微滴产生探针用油(伯乐公司#1863005)加载到八个油孔中的每一个中。接下来,将盒置于QX200微滴发生器(伯乐公司)内部。在微滴产生之后,使用多道移液管将 $40\mu\text{l}$ 转移到96孔PCR板中。

[0789] 将板用可穿透箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司)中。热循环条件如下:在 $95^\circ\text{C}$ 下持续10min,然后是在 $95^\circ\text{C}$ 下持续30s并且在 $60^\circ\text{C}$ 下持续1min的40个循环,随后在 $98^\circ\text{C}$ 下孵育10min,并且在 $4^\circ\text{C}$ 下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列)进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司)进行分析。为了计算AAV滴度,通过乘以相应的总稀释因子并且另外乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)来转换微滴数。

[0790] 进行CE-SDS分析(Agilent 2100生物分析仪系统,蛋白230试剂盒,使用变性条件)以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0791] 总AAV颗粒/ml (vp/ml) 和VP比率的计算:

[0792] • 将ng/ $\mu$ l (=  $\mu$ g/ml) 值除以观察到的MW, 然后乘以1E+06 ( $\mu$ g到g的换算) 以计算摩尔/ml值

[0793] • 将摩尔/ml值乘以6.022E+23 (阿伏伽德罗常数) 以计算分子数/ml

[0794] • VP分布: 基于分子/ml值计算, 假设一个AAV由总共60个VP组成

[0795] • AAV颗粒/ml (vp/ml): 将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0796] ddPCR和CE-SDS结果报告于表32中。

[0797] 表32: 对第1轮 (BM\_CD34+) 富集文库制剂的QC

| 样品 ID                                                                   | VP2 融合物<br>/AAV | vg/ml    | vp/ml    | 完整颗粒%  |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|----------|--------|
| (AAV-583) ssAAV1Sil1_文库<br>_173CMV_VP2-Sso7dL8-CD34<br>_173CMV_sfCherry | 3.1             | 7.95E+12 | 3.65E+13 | 21.79% |

[0799] 实例9.2: 第二轮动员的人源化小鼠注射和组织处理

[0800] 使用 (AAV-583) ssAAV1Sil1\_文库\_173CMV\_VP2-Sso7dL8-CD34\_173CMV\_sfCherry 以2.4E+13vg/kg的剂量对NSG小鼠 (n=15) 进行第二次体内选择。使用与实例7.1中所述相同的动员、注射和组织处理程序。

[0801] 使用Qubit荧光计确定洗脱的RNA的浓度。结果总结于表33中。

[0802] 表33: 从人源化小鼠组织中提取的RNA的浓度

[0803]

| 组织                           | 描述                                                                                 | Qubit 浓度<br>[ng/ $\mu$ l] |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 大量 CD34+                     | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+                           | 23.5                      |
| CD38+祖细胞                     | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38+                    | 35.3                      |
| CD38-<br>CD45RA+<br>CD90-祖细胞 | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA+<br>hCD90- | 43.4                      |
| 多能祖细胞                        | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA-<br>hCD90- | < 0.1                     |
| LT-HSC                       | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA-<br>hCD90+ | < 0.1                     |
| 完整骨髓                         | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | 12.3                      |
| 血液                           | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | 77.0                      |
| 肌肉                           | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | < 0.1                     |
| 肺                            | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | 0.8                       |
| 肝                            | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | < 0.1                     |
| 肾                            | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | 1.14                      |
| 心脏                           | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | < 0.1                     |
| 脑                            | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | 7.84                      |
| 脾                            | (AAV-583)Sso7d 文库分选的群体(15 只小鼠的池)                                                   | 10.7                      |

[0804] 实例9.3:在第二轮选择之后从骨髓LT-HSC细胞总RNA产生富集文库

[0805] 对从骨髓LT-HSC细胞中提取的RNA的RT-PCR:

[0806] 使用LunaScript多重一步RT-PCR试剂盒(新英格兰生物实验室公司#E1555)、12.5pmol LC0052 (5' CCCGGGGA ACTCTCCCGAGTCGA AATTCGCCACC 3')/LC0053 (5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGT TGTGGGTCGGG 3')引物和5 $\mu$ l (<0.5ng) 来自BM\_LT-HSC样品的总RNA以50 $\mu$ l总反应体积进行RT-PCR。用以下循环方案进行RT-PCR:在55℃下持续10min,在98℃下持续1min;在98℃下持续10s、在55℃下持续20s、在72℃下持续30s的35个循环;随后在72℃下进行5min的最终扩增,然后在4℃下保持。使反应物在琼脂糖凝胶上跑胶,并且切

下403bp的预期条带。然后使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#A9281)提取DNA,并且将其在50 $\mu$ l水中洗脱,基于Qubit测量,终浓度为0.41ng/ $\mu$ l。为了增加插入物量,使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、各10pmol LC052和LC053引物以及8ng凝胶提取的RT-PCR片段作为模板以50 $\mu$ l总反应体积用以下循环方案通过PCR对其进行扩增:在98 $^{\circ}$ C下持续30s;15个循环,在98 $^{\circ}$ C下持续10s;在55 $^{\circ}$ C下持续20s;在72 $^{\circ}$ C下持续20s;随后在72 $^{\circ}$ C下持续2min,然后在4 $^{\circ}$ C下保持。将PCR产物使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(凯杰公司#28104)纯化,并且在50 $\mu$ l水中洗脱。基于Nanodrop分光光度计测量,发现浓度为46ng/ $\mu$ l。

[0807] 质粒文库克隆:

[0808] 为了产生第二轮富集的Sso7d-AAV1Si11质粒文库(NC110),使用NEBuilder HiFi DNA组装预混液(新英格兰生物实验室公司;E2621)以100 $\mu$ l的终体积使129ng PCR产物(403bp)和1 $\mu$ g BsaI消化的SK0036受体质粒退火,并且在50 $^{\circ}$ C下孵育3小时。然后将反应产物用质粒安全(PS)DNA酶(阿露震中公司;E3105K)在37 $^{\circ}$ C下处理1h以消化任何未组装的片段,然后使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#A9280)纯化。反应产生约200ng组装的质粒(如通过在PSDNA酶消化步骤之后剩余的DNA量所定义)。在3x50 $\mu$ l小瓶中用组装的质粒文库转化One Shot TOP10电转感受态大肠杆菌(赛默飞世尔公司;C4040-52)(约14ng DNA/小瓶)。将反应物合并,并且转移到含有200ml TB+卡那霉素培养基的11摇瓶中。然后从烧瓶中取出100 $\mu$ l,将不同的稀释液在LB+卡那霉素板上铺板,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。发现如通过琼脂板上的CFU数确定的文库实际大小为4.34E+07。在37 $^{\circ}$ C下生长过夜之后使用大提试剂盒(凯杰公司#12163)从200ml培养物中提取质粒DNA,产生(NC110) pCargo\_173CMV\_SS07dL8-LT-HSC-2\_AA1Si11-VP2\_173CMV\_sfCherry质粒文库。

[0809] 第二轮选择AAV文库产生和QC:

[0810] 使用FectoVIR-AAV转染试剂(宝利普拉斯公司#101000022)用pHelper(约40K个质粒/细胞)、(NC080) pAAV\_Rep2Cap1\_Si11[V473D\_N500E]VP2\_KO[T138A]\_KanR(约40K个质粒/细胞)和(NC110) pCargo\_173CMV\_SS07dL8-LT-HSC-2\_AA1Si11-VP2\_173CMV\_sfCherry质粒文库(1300个质粒/细胞)以1.1 $\mu$ g总DNA/1E+06个细胞转染2.8升浓度为2E+06vc/ml的HEK293悬浮细胞。DNA:FectoVIR的比率为1 $\mu$ g:1 $\mu$ l。在转染之后,将葡萄糖添加到转染混合物中至终浓度为2g/l,并且将混合物在37 $^{\circ}$ C、110rpm、6% CO2下孵育。

[0811] 转染后两天,将全能核酸酶添加到裂解缓冲液(500mM HEPES,10% Tween 20,20mM MgCl<sub>2</sub>)中的转染反应物中至终浓度为0.1U/ $\mu$ l,并且体积等于总体积的10%。在37 $^{\circ}$ C下的3h孵育时间段之后,将体积等于总体积10%的蔗糖盐溶液(5M NaCl,7%蔗糖)添加到裂解物中,并且将混合物在37 $^{\circ}$ C下在搅动中孵育3h。在此孵育步骤之后,添加体积等于总体积10%的盐蔗糖溶液(5M NaCl,7%蔗糖),并且将样品再孵育20min。然后将样品在3500g下离心15min,将上清液使用0.22 $\mu$ m过滤器过滤,并且补充EDTA至终浓度为5mM。接下来,将澄清的裂解物以1ml/min加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱(0.5x 5cm,1ml)(赛默飞世尔公司#A36652)上。将结合的AAV颗粒用10CV的洗涤缓冲液(pH 7.3)(50mM Tris-Cl,0.5M NaCl,0.01% Pluronic F-68)洗涤,并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液(pH 2.7)(0.1M甘氨酸,0.2M NaCl,0.25M L-精氨酸)洗脱。将洗脱级分(0.25ml)立即用25 $\mu$ l 1M Tris-Cl(pH 10)中和。将含有AAV的级分(如通过UV280信号所评估)合并,并且使用Float-

A-Lyzer透析装置100KD(Spectrum™#G235071)用PBS(pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68透析过夜,然后使其通过0.22μm过滤器单元。将完整颗粒和空颗粒在碘克沙醇超速离心梯度上分离,并且使用Amicon Ultra-15 MWC0 100,000过滤器单元(默克公司#UFC910008)在PBS(pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68中浓缩/缓冲液交换,然后使其通过0.22μm过滤器单元(终体积=2.2ml)。

[0812] AAV文库滴度和装饰水平确定:

[0813] 使用表3中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组,使用QX200微滴式数字PCR(ddPCR)系统(伯乐公司)来确定AAV载体的滴度。如下预处理经纯化的制剂:将5μl AAV与1单位DNA酶和1x DNA酶缓冲液(默克公司#04716728001)以20μl总体积在37℃下一起孵育30min。将1μl的20mg/ml的蛋白酶K(生命技术公司#E00491)添加到混合物中,并且在55℃下孵育1h,随后在95℃下进行15min的灭活步骤。在1x PCR缓冲液II(生命技术公司#N8080010)、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Pluronic F-68(西格玛-奥德里奇公司#K4894)、2ng/μl剪切鲑鱼精子DNA(英杰公司#15632011)中制备经处理的制剂的不同1/10连续稀释液,并且将其用作PCR扩增的模板。

[0814] 通过将5.5μl经预处理的AAV稀释液与各900nM正向和反向SV40pA引物、125nM SV40 pA探针和11μl 2x ddPCR探针用超混液(伯乐公司#1863024)组合以22μl的终体积制备ddPCR反应混合物。对每个样品进行技术重复。将20μl每种ddPCR反应混合物加载到一次性微滴发生器盒(伯乐公司)中。然后,将70μL微滴产生探针用油(伯乐公司#1863005)加载到八个油孔中的每一个中。接下来,将盒置于QX200微滴发生器(伯乐公司)内部。在微滴产生之后,使用多道移液管将40μl转移到96孔PCR板中。

[0815] 将板用可穿透箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司)中。热循环条件如下:在95℃下持续10min,然后是在95℃下持续30s并且在60℃下持续1min的40个循环,随后在98℃下孵育10min,并且在4℃下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列)进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司)进行分析。为了计算AAV滴度,通过将它乘以相应的总稀释因子并且另外乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)来转换微滴数。

[0816] 进行CE-SDS分析(Agilent 2100生物分析仪系统,蛋白230试剂盒,使用变性条件)以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0817] 总AAV颗粒/ml(vp/ml)和VP比率的计算:

[0818] • 将ng/μl(=μg/ml)值除以观察到的MW,然后乘以1E+06(μg到g的换算)以计算摩尔/ml值

[0819] • 将摩尔/ml值乘以6.022E+23(阿伏伽德罗常数)以计算分子数/ml

[0820] • VP分布:基于分子/ml值计算,假设一个AAV由总共60个VP组成

[0821] • AAV颗粒/ml(vp/ml):将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0822] ddPCR和CE-SDS结果报告于表34中。

[0823] 表34:对第2轮(BM\_LT-HSC)富集文库制剂的QC

| 样品 ID                                                                      | VP2 融合物 | vg/ml    | vp/ml    | 完整颗粒%  |
|----------------------------------------------------------------------------|---------|----------|----------|--------|
|                                                                            | /AAV    |          |          |        |
| [0824] (AAV-682) ssAAV1Si11_文库_173CMV_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2_173CMV_sfCherry | 3.3     | 2.05E+13 | 4.61E+13 | 44.55% |

[0825] 实例9.4:第三轮动员的人源化小鼠注射和组织处理

[0826] 使用 (AAV-682) ssAAV1Si11\_文库\_173CMV\_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2\_173CMV\_sfCherry以 $2.4 \times 10^{13}$ vg/kg的剂量对NSG小鼠 (n=15) 进行第三次体内选择。使用与实例7.1中所述相同的动员、注射和组织处理程序。

[0827] 使用Qubit荧光计确定洗脱的RNA的浓度。结果总结于表35中。

[0828] 表35:从人源化小鼠组织中提取的RNA的浓度

[0829]

| 组织                   | 描述                                                                                   | Qubit 浓度<br>ng/ $\mu$ l |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 大量 CD34+             | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+                           | 20                      |
| CD38+祖细胞             | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38+                    | 41.3                    |
| CD38- CD45RA+<br>祖细胞 | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA+           | 7.1                     |
| 多能祖细胞                | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90-    | < 0.1                   |
| LT-HSC               | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)<br>mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA-<br>hCD90+ | < 0.1                   |
| 完整骨髓                 | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 86                      |
| 血液                   | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 128                     |
| 肌肉                   | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 419                     |
| 肺                    | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 250                     |
| 肝                    | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 1370                    |
| 肾                    | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 4560                    |
| 心脏                   | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 890                     |
| 脑                    | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 1930                    |
| 脾                    | (AAV-682) Sso7d 文库分选的群体 (15 只小鼠的池)                                                   | 2960                    |

[0830] 实例9.5:对在第三轮选择之后提取的RNA的NGS分析

[0831] 对从骨髓LT-HSC细胞中提取的RNA的RT-PCR:

[0832] 使用LunaScript多重一步RT-PCR试剂盒(新英格兰生物实验室公司#E1555)、12.5pmol LC0052 (5' CCCGGGGAAGTCTCCCGAGTCGA AATTCGCCACC 3')/LC0053 (5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGA GGTGTGGGTCGGG 3')引物和第三轮选择之后从不同组织中提取的总RNA(关于所使用的量,参见表36)以25 $\mu$ l总反应体积进行RT-PCR。用以下循环方案进行RT-PCR:在55℃下持续10min,在98℃下持续1min;在98℃下持续10s、在55℃下持续20s、在72℃下持续30s的30个循环;随后在72℃下进行5min的最终扩增,然后在4℃下保持。

[0833] 表36:用于RT-PCR反应的总RNA量

[0834]

| 样品 ID            | RT-PCR 反应中使用的 RNA 的总 ng |
|------------------|-------------------------|
| 大量 CD34+         | 20                      |
| CD38+祖细胞         | 41.3                    |
| CD38- CD45RA+祖细胞 | 7.1                     |
| 多能祖细胞            | < 0.1                   |
| LT-HSC           | < 0.1                   |
| 完整骨髓             | 86                      |
| 血液               | 128                     |
| 肌肉               | 419                     |
| 肺                | 250                     |
| 肝                | 1370                    |
| 肾                | 4560                    |
| 心脏               | 890                     |
| 脑                | 1930                    |
| 脾                | 2960                    |

[0835] 使用快速凝胶系统 (快速凝胶DNA盒, 1.2%, 龙沙公司#57031, 使用快速DNA梯状标志, 新英格兰生物实验室公司#N3238S) 在2 $\mu$ l RT-PCR反应物上评估产物大小, 如图28所示。将PCR产物使用Qiaquick PCR纯化试剂盒 (凯杰公司#28104) 纯化, 并且在50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O中洗脱。

[0836] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0837] 在使用含有因美纳公司的适配体的一组引物的一个单次PCR反应中, 如上所述从由提取的RNA制备的cDNA产生扩增子文库。将正向引物与含有Illumina TruSeq索引的不同反向引物组合使用, 以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表表示于表37中。另外, 还从用于进行第三轮选择的输入AAV制剂制备以下扩增子文库: (AAV-682) ssAAV1Si11\_文库\_173CMV\_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2\_173CMV\_sfCherry。

[0838] 表37: 此实例中使用的引物的列表 (粗体: 索引, 斜体: 退火区)

[0839]

| 名称                               | 引物序列 5'-3'                                                                                    |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| LC0034<br>(通用正向引物)               | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACG<br>CTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG        |
| LC0074<br>(反向引物/完整骨髓)            | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGATCGTGACTGGAGTTCAG<br>ACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0075<br>(反向引物/大量CD34+)         | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGCTAGTGACTGGAGTTCAG<br>ACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0076<br>(反向引物/CD38+祖细胞)        | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0077<br>(反向引物/CD38-CD45RA+祖细胞) | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCAG<br>ACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0078                           | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTGACTGTGACTGGAGTTCAG                                                 |

[0840]

|                              |                                                                                                |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (反向引物/多能祖细胞)                 | ACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC                                                   |
| LC0079<br>(反向引物/LT-HSC)      | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAAGTGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0080<br>(反向引物/肌肉)          | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACATGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0081<br>(反向引物/肺)           | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACGGGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0082<br>(反向引物/肝)           | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGGACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0083<br>(反向引物/肾)           | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0084<br>(反向引物/心脏)          | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGCCACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0085<br>(反向引物/脑)           | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAAACGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0086<br>(反向引物/脾)           | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTACGGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0087<br>(反向引物/血液)          | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCACTCGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |
| LC0088<br>(反向引物/AAV-682 输入物) | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCAGTGTGACTGGAGTTCA<br>GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC |

[0841] 使用Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和10 $\mu$ l经纯化的cDNA样品作为模板以25 $\mu$ l总反应体积准备PCR反应。用以下循环方案进行PCR:在95℃下持续2min;10个循环,在98℃下持续10s;在55℃下持续15s;在72℃下持续25s;随后在72℃下孵育2min,然后在4℃下保持。对于L8和L13样品,由于用20个循环获得的产量低,再添加10个循环。将PCR产物使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(凯杰公司#28104)纯化,并且在50 $\mu$ l水中洗脱。使用快速凝胶系统(快速凝胶DNA盒,1.2%,龙沙公司#57031,使用快速DNA梯状标志,新英格兰生物实验室公司#N3238S)在2 $\mu$ l RT-PCR反应物上评估产物的大小,如图29所示。

[0842] 在使用Qubit荧光计定量之后,将文库以8pM的终浓度等摩尔合并,并且使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司)上进行测序。所得读段数总结于表38中。

[0843] 表38:NGS读段计数

| 名称              | 初始读段   |
|-----------------|--------|
| 完整骨髓            | 813307 |
| 大量CD34+         | 812827 |
| CD38+祖细胞        | 597680 |
| CD38-CD45RA+祖细胞 | 716979 |
| 多能祖细胞           | 725102 |
| LT-HSC          | 548883 |
| 肌肉              | 799938 |
| 肺               | 832640 |
| 肝               | 706881 |
| 肾               | 831601 |
| 心脏              | 838244 |
| 脑               | 922195 |
| 脾               | 866037 |
| 血液              | 761597 |
| AAV-682输入物      | 700553 |

[0845] 使用定制脚本进行数据分析:

[0846] 将生成的fastq文件最初按质量(Q>30,其中Q指示Phred质量得分)和长度(110-130bp)过滤。在此质量修整之后,处理序列,旨在映射Sso7d特定边界(ISKI到DAPK),并且所有样品都检索100'000个。在最终过滤的序列上评估单个序列在不同器官中的分布,并且结果总结于图30中,集中于在LT-HSC样品中鉴定的前十二个苗头物。

[0847] 大多数苗头物显现对LT-HSC具有高特异性,而其中一些(例如,Seq#5、Seq#7、Seq#9和Seq#11)在非靶器官/细胞中显示出非特异性富集。

[0848] 实例10:具有增加的N末端暴露的VP2变体的鉴定

[0849] 引言:

[0850] 已经提出VP1和VP2两者都参与在空AAV颗粒和完整AAV颗粒的衣壳内部形成小球,如经由低温电子显微术所示。衣壳内部小球的存在与衣壳外部N末端结构域的低可及性有关(Kronenberg等人,Journal of Virology[病毒学杂志],2005)。根据这些观察结果,假设VP2 N末端在衣壳壳上天然面向内部的事实可能减少与其融合的Sso7d支架的暴露。

[0851] 在此实例中,采用对用不同接头序列与抗EGFR Sso7d融合的AAV1Si11 VP2的前79个非结构化氨基酸的位点饱和诱变。通过感染HKB11 EGFR过表达细胞对AAV文库进行阳性选择,并且通过感染HKB11 EGFR敲除细胞进行阴性选择,以鉴定特异性改善受体介导的摄取的突变。

[0852] 实例10.1AAV1Si11 VP2 N末端位点饱和诱变(SSM)文库产生

[0853] 受体质粒产生:

[0854] 在第一步中,产生含有以下八种不同接头中的一种的受体质粒:柔性的- $G_4S$ 、 $(G_4S)_2$ 、 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_4$ -,或刚性的- $(APS)_2$ 、 $(APS)_3$ 、 $(APS)_4$ 、 $(APS)_5$ 。在金尔特公司作为片段DNA订购这些接头序列,并且使用AgeI-BsiWI并去除VP2的前面的氨基酸直到D270(AAV1 VP1坐标),如先前所述将其克隆到骨架SK033\_pCargo\_173\_CMV\_Sso7d\_EGFR\_AAV1sil VP2\_173\_CMV\_sfCherry中。在下一节中描述的受体质粒和文库片段两者都含有BsaI限制性位点,以适应IIS型克隆(参见图31和表39)。

[0855] 表39:受体质粒ID和添加的接头

| 质粒 ID                                                                      | 所使用的接头 |
|----------------------------------------------------------------------------|--------|
| (HS0012)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x2_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | APSx2  |
| (HS0013)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x3_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | APSx3  |
| (HS0014)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x4_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | APSx4  |
| (HS0015)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x5_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | APSx5  |
| (HS0016)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry   | G4S    |
| (HS0017)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)x2_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | G4Sx2  |
| (HS0018)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)x3_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | G4Sx3  |
| (HS0019)<br>pCargo_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)x4_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry | G4Sx4  |

[0857] 79AA SSM文库克隆(V-Exp文库):

[0858] 在特韦斯特生物科学公司订购79AA SSM文库片段。它包含在其5'处用于与存在于HS0012-HS0019中的不同接头直接融合的BsaI位点、从A139至G217(AAV1 VP1坐标)的位点饱和文库、编码AAV1的A218至N271的一段碱基和用于克隆到先前提及的受体质粒中的第二个BsaI位点。除了半胱氨酸之外的所有氨基酸都被考虑用于SSM(79个位置,19个氨基酸各自仅由1个密码子编码,产生1501个变体的总复杂性)。

[0859] 为了产生V-Exp质粒文库,将160ng 79AA SSM文库片段和80ng等摩尔合并的HS0012至HS0019受体质粒与40单位BsaI-HF v2(新英格兰生物实验室公司;E3733)、2000单位T4 DNA连接酶(新英格兰生物实验室公司;M0202T)和1x组装缓冲液(1x CutSmart缓冲液

+1mM ATP)以50 $\mu$ l的终体积混合。然后如下处理反应混合物:在37 $^{\circ}$ C下孵育30min;30个循环,在37 $^{\circ}$ C下持续5min,随后在16 $^{\circ}$ C下持续5min;以及在37 $^{\circ}$ C下持续1h的最终步骤。在开始最后一步之前,将另外20单位BsaI-HF v2添加到混合物中。接下来,将反应产物用质粒安全(PS)DNA酶(阿霖震中公司;E3105K)处理以消化任何未组装的片段,并且使用Wizard SV凝胶和PCR纯化系统(普洛麦格公司#A9280)纯化。反应产生1.5ng组装的质粒(如通过在PSDNA酶消化步骤之后剩余的DNA量所定义)。用0.1ng每种组装的质粒文库转化2x 50 $\mu$ l One Shot TOP10电转感受态大肠杆菌(赛默飞世尔公司;C4040-52)。将反应物合并,并且在1h SOC孵育之后添加到100ml TB+卡那霉素培养基中。然后从烧瓶中取出100 $\mu$ l,将不同的稀释液在LB+卡那霉素板上铺板,并且在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。发现琼脂板上的CFU数为1.5E+05,是1.2E+04的论文文库复杂性(8种接头x 1501SSM文库大小)的大约10倍。在37 $^{\circ}$ C下生长过夜之后使用大提试剂盒(凯杰公司#12163)从原始100ml培养物中提取质粒DNA,产生(HS0026) pCargo LTM V-Exp文库\_173\_CMV\_Sso7d\_EGFR\_AAV1sil\VP2\_173\_CMV\_sfCherry。

[0860] ssAAV1Sil1 V-Exp文库产生和QC:

[0861] 使用FectoVIR-AAV转染试剂(宝利普拉斯公司#101000022)用pHelper(约40K个质粒/细胞)、(NC080) pAAV\_Rep2Cap1\_Sil1[V473D\_N500E]VP2\_K0[T138A]\_KanR(约40K个质粒/细胞)和(HS0026)\_pCargo V-Exp lib\_CMV\_Sso7d\_EGFR\_AAV1sil\VP2\_CMV\_sfCherry质粒文库(1300个质粒/细胞)以1.1 $\mu$ g总DNA/1E+06个细胞转染一升浓度为2E+06vc/ml的HEK293悬浮细胞。DNA:FectoVIR的比率为1 $\mu$ g:1 $\mu$ l。在转染之后,将葡萄糖添加到转染混合物中至终浓度为2g/l,并且将混合物在37 $^{\circ}$ C、110rpm、6% CO<sub>2</sub>下孵育。

[0862] 转染后两天,将在裂解缓冲液(500mM HEPES,10% Tween 20,20mM MgCl<sub>2</sub>)中的全能核酸酶添加到转染反应物中至终浓度为0.1U/ $\mu$ l,并且体积等于总体积的10%。在37 $^{\circ}$ C下的3h孵育时间段之后,将体积等于总体积10%的蔗糖盐溶液(5M NaCl,7%蔗糖)添加到裂解物中,并且将混合物在37 $^{\circ}$ C下在搅动中孵育3h。在此孵育步骤之后,添加体积等于总体积10%的盐蔗糖溶液(5M NaCl,7%蔗糖),并且再孵育20min。将样品在3500g下离心30min,将上清液使用0.22 $\mu$ m过滤器过滤,并且补充EDTA至终浓度为5mM。接下来,将澄清的裂解物以1ml/min加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱(0.5x 5cm,1ml)(赛默飞世尔公司#A36652)上。将结合的AAV颗粒用10CV的洗涤缓冲液(pH 7.3)(50mM Tris-Cl,0.5M NaCl,0.01% Pluronic F-68)洗涤,并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液(pH 2.7)(0.1M甘氨酸,0.2M NaCl,0.25M L-精氨酸)洗脱。将洗脱级分(0.25ml)立即用25 $\mu$ l 1M Tris-Cl(pH 10)中和。将含有AAV的级分(如通过UV280信号所评估)合并,并且使用Float-A-Lyzer透析装置100KD(Spectrum<sup>TM</sup>#G235071)用PBS(pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68透析过夜,然后使其通过0.22 $\mu$ m过滤器单元。将完整颗粒和空颗粒在碘克沙醇超速离心梯度上分离,并且使用Amicon Ultra-15 MWC0 100,000过滤器单元(默克公司#UFC910008)在PBS(pH 7.4)+0.001% Pluronic F-68中浓缩/缓冲液交换,然后使其通过0.22 $\mu$ m过滤器单元(终体积=1ml)。

[0863] 滴度和装饰水平确定:

[0864] 使用表3中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组,使用QX200微滴式数字PCR(ddPCR)系统(伯乐公司)来确定AAV载体的滴度。如下预处理经纯化的制剂:将5 $\mu$ l AAV与1单位DNA酶和1x DNA酶缓冲液(默克公司#04716728001)以20 $\mu$ l总体积在37 $^{\circ}$ C下一起孵育30min。将1

$\mu\text{l}$ 的20mg/ml的蛋白酶K(生命技术公司#E00491)添加到混合物中,并且在55℃下孵育1h,随后在95℃下进行15min的灭活步骤。在1x PCR缓冲液II(生命技术公司#N8080010)、2.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.05% Pluronic F-68(西格玛-奥德里奇公司#K4894)、2ng/ $\mu\text{l}$ 剪切鲑鱼精子DNA(英杰公司#15632011)中制备经处理的制剂的不同1/10连续稀释液,并且将其用作PCR扩增的模板。

[0865] 通过将5.5 $\mu\text{l}$ 经预处理的AAV稀释液与各900nM正向和反向SV40pA引物、125nM SV40 pA探针和11 $\mu\text{l}$  2x ddPCR探针用超混液(伯乐公司#1863024)组合以22 $\mu\text{l}$ 的终体积制备ddPCR反应混合物。对每个样品进行技术重复。将20 $\mu\text{l}$ 每种ddPCR反应混合物加载到一次性微滴发生器盒(伯乐公司)中。然后,将70 $\mu\text{L}$ 微滴产生探针用油(伯乐公司#1863005)加载到八个油孔中的每一个中。接下来,将盒置于QX200微滴发生器(伯乐公司)内部。在微滴产生之后,使用多道移液管将40 $\mu\text{l}$ 转移到96孔PCR板中。

[0866] 将板用可穿透箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司)中。热循环条件如下:在95℃下持续10min,然后是在95℃下持续30s并且在60℃下持续1min的40个循环,随后在98℃下孵育10min,并且在4℃下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列)进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司)进行分析。为了计算AAV滴度,通过将它们乘以相应的总稀释因子并且另外乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)来转换微滴数。

[0867] 进行CE-SDS分析(Agilent 2100生物分析仪系统,蛋白230试剂盒,使用变性条件)以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0868] 总AAV颗粒/ml (vp/ml)和VP比率的计算:

[0869] • 将ng/ $\mu\text{l}$  (=  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 值除以观察到的MW,然后乘以1E+06 ( $\mu\text{g}$ 到g的换算)以计算摩尔/ml值

[0870] • 将摩尔/ml值乘以6.022E+23(阿伏伽德罗常数)以计算分子数/ml

[0871] • VP分布:基于分子/ml值计算,假设一个AAV由总共60个VP组成

[0872] • AAV颗粒/ml (vp/ml):将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0873] ddPCR和CE-SDS结果报告于表40中。

[0874] 表40:UC后对ssAAV1Si11 V-Exp文库的QC

| 样品 ID                                         | VP2 融合物/AAV | vg/ml    | vp/ml    | 完整颗粒% |
|-----------------------------------------------|-------------|----------|----------|-------|
| [0875] (AAV-540)ssAAV1Si11_V-Exp lib-sfCherry | 3.7         | 6.85E+12 | 8.65E+12 | 79%   |

[0876] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0877] 使用覆盖LTM文库所插入的区域的一组引物从原始质粒和原始文库产生扩增子文库。为此目的,将50ng质粒DNA或5 $\mu\text{l}$  AAV样品与13 $\mu\text{l}$  2x Q5 HiFi热启动即用型混合液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol Sme0001f (5' CAGTGAAGCTGACATACCAGGGC 3')/Sme0002r (5' ATTGTTGTTGATGAGTCGCTGC 3')引物以50 $\mu\text{l}$ 的总体积混合。接下来,用新鲜产生的扩增子和含有因美纳公司的适配体的一组引物进行第二次PCR反应。在此组中,反向引物

还含有Illumina TruSeq索引,以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表可见于表41中。

[0878] 表41:此实例中用于索引PCR的引物的列表(粗体:索引,斜体:退火区)

| 靶标                    | 引物名称    | 序列 (5'-3')                                  |
|-----------------------|---------|---------------------------------------------|
| [0879]<br>HS0026      | Sme0009 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC  |
|                       | _NGS_f  | GACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGATGGGTGTCC;       |
|                       | Sme0015 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGT   |
|                       | _NGS_r  | TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGGTGATGACTCTGTCCG |
| [0880]<br>AAV-5<br>40 | (R5)    |                                             |
|                       | Sme0009 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC  |
|                       | _NGS_f  | GACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGATGGGTGTCC;       |
|                       | Sme0017 | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGGTCAGTGACTGGAG    |
|                       | _NGS_r  | TTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGGTGATGACTCTGTCC |
|                       | (R4)    | C                                           |

[0881] 实例10.2用于改善N末端暴露的体外选择(采用NGS结果)

[0882] ssAAV1Si11\_V-Exp lib-sfCherry文库转导和RNA提取:

[0883] 将HKB11 EGFR过表达细胞(EGFR+)和HKB11 EGFR敲除细胞(KO)使用补充有1% FBS和200μg/ml吉欧霉素(EGFR+)或2% FBS(EGFR KO)的V3培养基悬浮培养,并且在37℃、110rpm、6% CO2下孵育。在转导当天,将细胞以5E+05个细胞/ml接种在125ml摇瓶中的不含添加剂的20ml V3培养基中(4个摇瓶/细胞系)。将ssAAV1Si11\_V-Exp lib-sfCherry(AAV-540)文库以10、100、1'000和10'000的感染复数添加到两种细胞系中,并且在37℃、110rpm、6% CO2下孵育(转导后三小时,在每个摇瓶中添加补充物)。转导后三天,对细胞进行计数,并且将1E+07个细胞沉淀,用PBS洗涤,并且用于使用Allprep DNA/RNA小提试剂盒(凯杰公司,80204)纯化DNA和RNA两者。使用Qubit荧光计确定RNA浓度,每个样品产生大约100-200ug。

[0884] 对提取的RNA样品的RT-PCR:

[0885] 使用LunaScript多重一步RT-PCR试剂盒(新英格兰生物实验室公司#E1555)、12.5pmol Sme0001f(5' CAGTGAAGCTGACATACCAGGGC 3')/Sme0002r(5' ATTGTTGTTGATGAGTCGCTGC 3')引物和100ng总RNA以50μl总反应体积进行RT-PCR。用以下循环方案进行RT-PCR:在55℃下持续10min,在98℃下持续1min;在98℃下持续10s、在55℃下持续20s、在72℃下持续30s的30个循环;随后在72℃下进行5min的最终扩增,然后在4℃下保持。将反应物使用MinElute PCR纯化试剂盒(凯杰公司#28004)纯化,并且在30μl水中洗脱。基于Nanodrop分光光度计测量,浓度范围从10ng/ul至30ng/ul。使用快速凝胶系统(快速凝胶DNA盒,1.2%,龙沙公司#57031)在1μl RT-PCR反应物上评估产物的大小,如图32所

示。

[0886] 文库制备和在因美纳公司的MiSeq上的NGS:

[0887] 使用含有因美纳公司的适配体的一组引物从不同的经纯化的RT-PCR反应物产生扩增子文库。将正向引物与含有Illumina TruSeq索引的反向引物组合使用,以允许鉴定单独样品。此实例中使用的引物的列表表示于表42中。

[0888] 表42:用于扩增子文库的引物的列表(粗体:索引,斜体:退火区)

[0889]

| 靶标                | 引物名称                                       | 序列                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EGFR+<br>MOI 10   | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0010_NGS_r<br>(R1) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>CGTG</b> ATGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTTCGC |
| EGFR+<br>MOI 100  | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0011_NGS_r<br>(R3) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>GCCTA</b> AGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTTCGC |
| EGFR+<br>MOI 1000 | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0017_NGS_r<br>(R4) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <b>TGGTC</b> AGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTTCGC |
| EGFR+             | Sme0009_NGS_f                              | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT                                                                                                                                                                 |

[0890]

|                      |                                             |                                                                                                                                                                                           |
|----------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MOI 10000            | Sme0015_NGS_r<br>(R5)                       | CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTGCGC                                       |
| EGFR KO<br>MOI 10    | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0012_NGS_r<br>(R8)  | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCAAGTGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTGCGC |
| EGFR KO<br>MOI 100   | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0013_NGS_r<br>(R9)  | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGATCGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTGCGC |
| EGFR KO<br>MOI 1000  | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0016_NGS_r<br>(R6)  | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGGCGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTGCGC |
| EGFR KO<br>MOI 10000 | Sme0009_NGS_f<br><br>Sme0014_NGS_r<br>(R10) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT<br>CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAACAGGA<br>TGGGTGTCC;<br>CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTAGTG<br>ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG<br>GTGATGACTCTGTGCGC |

[0891] 通过合并Q5热启动高保真预混液(新英格兰生物实验室公司#M0494)、10pmol每种引物和5ng经纯化的RT-PCR样品作为模板以25μl总反应体积准备PCR反应。用以下循环方案进行PCR:在95℃下持续2min;15个循环,在98℃下持续10s;在55℃下持续15s;在72℃下持续25s;随后在72℃下孵育2min,然后在4℃下保持。将反应物用MinElute PCR纯化试剂盒(凯杰公司#28004)纯化,并且在30μl水中洗脱。使用快速凝胶系统(快速凝胶DNA盒,1.2%,龙沙公司#57031)在1μl经纯化的扩增子PCR反应物上评估产物的大小和质量,如图33所示。

[0892] 在用Qubit荧光计定量(全部都在15-30ng/ $\mu$ l之间)之后,将文库以8pM的终浓度等摩尔合并,并且使用Illumina MiSeq试剂盒v3(150个循环,#MS-102-3001)在MiSeq系统(因美纳公司)上进行测序。

[0893] 使用定制脚本进行数据分析:

[0894] 将生成的fastq文件最初按质量( $Q>30$ ,其中Q指示Phred质量得分)过滤,并且将对应的正向和反向读段合并。在此质量修整之后,处理合并的序列,旨在映射Sso7d特定边界(MLEK到ADGV)。最终过滤的读段数报告于表43中。

[0895] 表43:初始和过滤的NGS读段计数

| 名称                | 过滤的读段  |
|-------------------|--------|
| EGFR+MOI 10       | 162628 |
| EGFR+MOI 100      | 166839 |
| EGFR+MOI 1000     | 126648 |
| EGFR+MOI 10000    | 192245 |
| EGFR KO MOI 10    | 162596 |
| EGFR KO MOI 100   | 164315 |
| EGFR KO MOI 1000  | 149681 |
| EGFR KO MOI 10000 | 153137 |

[0897] 使用出现分析进行MOI选择:

[0898] 绘制每个样品中出现的分布,以产生在EGFR+和EGFR KO细胞中转导ssAAV1Si11\_V-Exp lib-sfCherry文库期间施加的选择压力的图形表示。对于两种细胞系,在moi 10时观察到的更宽的分布(如图34所描绘)可能是所施加的正确选择压力的潜在指示,并且因此被选择用于接下来的分析步骤。

[0899] 影响细胞转导的VP2 N末端变体的鉴定和优先次序:

[0900] 在序列上的每个靶位置处进行变异分析,这些序列在EGFR+细胞( $n=87$ )中以moi 10转导V-exp文库时显示出至少0.1%的频率。对于阳性(EGFR+)和阴性(EGFR KO)选择两者,计算在每个给定位置处的亲本氨基酸的百分比和每个单个变体的百分比(参见图35和图36)。基于在EGFR+与EGFR KO之间观察到的高差异(深色框)或对于高绝对富集(浅色框,还参见图37),九个位置优先。

[0901] 在优先的VP2位置中没有观察到不同接头的明显富集,但是可以观察到对小接头(G4Sx1、APsx2和APsx3)的一般偏好。

[0902] 实例10.3:所鉴定的单个VP2 N末端变体的体外验证

[0903] 引言:

[0904] 旨在增加N末端VP2暴露的LTM文库的体外选择导致鉴定出九个单点突变(如第10.2节所述)。将每个点突变克隆到骨架NC070\_pRS5a\_AAV1 Si11 VP2\_(G4S)x3\_抗EGFR Sso7d中,保留抗EGFR Sso7d E18.4.5序列,但是将(G4S)x3接头用(APS)x2、(APS)x3或(G4S)x2替换(参见表44)。VP2质粒的克隆和扩增外包给金尔特公司。产生AAV样品,并且评价它们在EGFR OE和KO细胞中的感染性潜力。还评估与Sso7d靶标(EGFR)的结合,以研究突变对此方面的影响。

[0905] 表44:具有所鉴定的点突变的VP2表达质粒的列表

| [0906] | 质粒 ID                                                               | 点突变   |
|--------|---------------------------------------------------------------------|-------|
|        | (HS0035) _pRS5a_ 抗<br>EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_N172V_VP2 | N172V |
| [0907] | (HS0036) _pRS5a_ 抗                                                  | E147S |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_E147S_VP2                       |       |
|        | (HS0037) _pRS5a_ 抗                                                  | P166R |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_P166R_VP2                       |       |
|        | (HS0038) _pRS5a_ 抗                                                  | P185G |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_P185G_VP2                       |       |
|        | (HS0039) _pRS5a_ 抗                                                  | G199R |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_G199R_VP2                       |       |
|        | (HS0040) _pRS5a_ 抗                                                  | M211V |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_M211V_VP2                       |       |
|        | (HS0041) _pRS5a_ 抗                                                  | D213A |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_D213A_VP2                       |       |
|        | (HS0042) _pRS5a_ 抗                                                  | P191N |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(G4S)x2_AAV1Sil1_P191N_VP2                       |       |
|        | (HS0043) _pRS5a_ 抗                                                  | T162R |
|        | EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_T162R_VP2                       |       |

[0908] 经装饰的AAV1-Sil1产生:

[0909] 将质粒DNA以等摩尔比率的pHelper、(AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE单链货物、(NC080) pAAV Rep2Cap1 Sil1 VP2 KO和来自以上列表的AAV1 VP2表达质粒混合。使用FectoVIR-AAV转染试剂(宝利普拉斯公司#101000022) 转染200ml细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的Expi293F细胞( $1.1 \mu\text{g}$ 总DNA/ $1 \times 10^6$ 个细胞)。DNA:FectoVIR的比率为 $1 \mu\text{g}:1 \mu\text{l}$ 。在转染步骤中还包括具有未经修饰的VP2的经Sso7d装饰的对照。转染后,将葡萄糖添加到细胞悬浮液中至终浓度为 $2 \text{g/l}$ ,并且将混合物在 $37^\circ\text{C}$ 、 $110 \text{rpm}$ 、 $6\% \text{ CO}_2$ 下孵育。转染后三天,将在裂解缓冲液( $500 \text{mM}$  HEPES,  $10\%$  Tween 20,  $20 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ )中的全能核酸酶添加到经转染的细胞悬浮液中至终浓度为 $0.1 \text{U}/\mu\text{l}$ ,并且体积等于总体积的 $10\%$ 。在 $37^\circ\text{C}$ 下的 $3 \text{h}$ 孵育时间段之后,将体积等于总体积 $10\%$ 的蔗糖盐溶液( $5 \text{M}$  NaCl,  $7\%$  蔗糖)添加到裂解物中,并且将混合物在 $37^\circ\text{C}$ 下在搅动中孵育 $3 \text{h}$ 。在此孵育步骤之后,添加体积等于总体积 $10\%$ 的盐蔗糖溶液( $5 \text{M}$  NaCl,  $7\%$  蔗糖),并且再孵育 $20 \text{min}$ 。将样品在 $3500 \text{g}$ 下离心 $15 \text{min}$ 。将上清液通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤,并且补充EDTA至终浓度为 $5 \text{mM}$ 。接下来,将澄清的裂解物以 $1 \text{ml}/\text{min}$ 加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱( $0.5 \times 5 \text{cm}$ ,  $1 \text{ml}$ ) (赛默飞世尔公司#A36652)上。将结合

的AAV颗粒用10CV的洗涤缓冲液(pH 7.3) (50mM Tris-Cl, 0.5M NaCl, 0.01% Pluronic F-68) 洗涤, 并且用5CV的甘氨酸洗脱缓冲液(pH 2.7) (0.1M甘氨酸, 0.2M NaCl, 0.25M L-精氨酸) 洗脱。将洗脱级分(0.25ml) 立即用25 $\mu$ l 1M Tris-Cl(pH 10) 中和。将含有AAV的级分(如通过UV280信号所评估) 合并, 并且用Float-A-Lyzer透析装置100KD(Spectrum™#G235071) 用配制缓冲液(20mM Tris碱, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM NaCl, 0.005% Pluronic F-68, pH 8.1) 透析过夜, 然后使其通过0.22 $\mu$ m过滤器单元。

[0910] 滴度和装饰水平确定:

[0911] 使用表3中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组用QX200微滴式数字PCR(ddPCR) 系统(伯乐公司) 确定AAV载体滴度。经纯化的AAV样品的预处理由以下组成: 将5 $\mu$ l AAV与1单位DNA酶和1x DNA酶缓冲液(默克公司#04716728001) 以20 $\mu$ l总体积在37℃下一起孵育30min。接下来, 将1 $\mu$ l的20mg/ml的蛋白酶K(生命技术公司#E00491) 添加到反应混合物中, 并且在55℃下孵育1h, 随后在95℃下进行15min的灭活步骤。在1x PCR缓冲液II(生命技术公司#N8080010)、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Pluronic F-68(西格玛-奥德里奇公司#K4894)、2ng/ $\mu$ l剪切鲑鱼精子DNA(英杰公司#15632011) 中制备经处理的样品的不同1/10连续稀释液, 并且将其用作PCR扩增的模板。通过将5.5 $\mu$ l经预处理的AAV稀释液与各900nM正向和反向SV40 pA引物、125nM SV40pA探针和11 $\mu$ l 2x ddPCR探针用超混液(伯乐公司#1863024) 组合以22 $\mu$ l的终体积制备ddPCR反应混合物。每个样品都包括技术重复。将ddPCR反应混合物加载到半裙边96孔板(伯乐公司#12001925) 中, 并且置于自动微滴发生器(伯乐公司#1864101) 中。使用伯乐公司的专有DG32自动微滴发生器盒(#1864108) 和自动微滴产生探针用油(伯乐公司#1864110) 自动产生微滴。在微滴产生之后, 装置自动将产生的微滴沉积在新的半裙边96孔板中。

[0912] 将板用可穿透箔热封, 并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司) 中。热循环条件如下: 在95℃下持续10min, 然后是在95℃下持续30s并且在60℃下持续1min的40个循环, 随后在98℃下孵育10min, 并且在4℃下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列) 进行计数, 并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司) 进行分析。为了计算AAV滴度, 将微滴数乘以相应的总稀释因子, 然后乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)。

[0913] 进行CE-SDS分析(Agilent 2100生物分析仪系统, 蛋白230试剂盒, 使用变性条件) 以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0914] 总AAV颗粒/ml(vp/ml) 和VP比率的计算:

[0915] • 将ng/ $\mu$ l(= $\mu$ g/ml) 值除以观察到的MW, 然后乘以1E+06( $\mu$ g到g的换算) 以计算摩尔/ml值

[0916] • 将摩尔/ml值乘以6.022E+23(阿伏伽德罗常数) 以计算分子数/ml

[0917] • VP分布: 基于分子/ml值计算, 假设一个AAV由总共60个VP组成

[0918] • AAV颗粒/ml(vp/ml): 将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0919] ddPCR和CE-SDS结果报告于表45中。

[0920] 表45: 对经装饰的ssAAV1Si11的QC

[0921]

| 样品 ID                                                                      | VP2 融合物/AAV | vg/细胞    | vp/细胞    |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------|----------|----------|
| (AAV-637) ssAAV1Sil1_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(G4S)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 7.1         | 2.92E+04 | 5.41E+04 |

[0922]

|                                                                                   |      |          |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|----------|----------|
| (AAV-674) ssAAV1-Sil1_N172V_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x2-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 8.3  | 1.31E+04 | 9.84E+04 |
| (AAV-639) ssAAV1-Sil1_E147S_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x2-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 9.3  | 3.73E+04 | 6.34E+04 |
| (AAV-640) ssAAV1-Sil1_P166R_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 9.0  | 3.14E+04 | 9.80E+04 |
| (AAV-641) ssAAV1-Sil1_P185G_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 7.1  | 3.33E+04 | 9.40E+04 |
| (AAV-647) ssAAV1-Sil1_G199R_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMV_eGFP_HRPE  | 13.8 | 2.36E+04 | 1.36E+05 |
| (AAV-648) ssAAV1-Sil1_M211V_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 11.0 | 1.58E+04 | 6.05E+04 |
| (AAV-649) ssAAV1-Sil1_D213A_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 13.8 | 1.99E+04 | 7.43E+04 |
| (AAV-650) ssAAV1-Sil1_P191N_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(G4S)x2-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 12.7 | 1.90E+04 | 7.99E+04 |
| (AAV-651) ssAAV1-Sil1_T162R_抗 EGFR Sso7d<br>E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE | 12.2 | 1.83E+04 | 9.96E+04 |

[0923] 经装饰的AAV1Sil1对受体过表达细胞系和敲除细胞系的体外感染性:

[0924] 为了评估单突变是否改善经装饰的衣壳感染细胞的能力,对EGFR过表达(OE)细胞和敲除(KO)细胞进行感染性测定。将V3培养基中浓度为 $6.06 \times 10^5$ /mL的细胞接种在平底96孔板中(33 $\mu$ L细胞悬浮液/孔)。将经装饰的AAV在V3培养基中稀释,并且以范围从 $1 \times 10^6$ 至 $4.6 \times 10^1$ 的MOI感染细胞。在孔中的终体积为100 $\mu$ L的情况下,将板在37℃下孵育3h,随后添加100 $\mu$ L具有10% FBS的V3培养基。转染后三天,分离细胞,并且通过FACS测量eGFP荧光。基于过表达细胞和敲除细胞两者中每个AAV样品的eGFP阳性细胞的百分比计算EC50值。接下来,将来自EGFR KO条件的EC50值除以来自EGFR OE条件的对应EC50值。在图38中,描绘了由上述计算得到的倍数变化。

[0925] 通过ELISA评估VP2点突变对靶标结合的影响:

[0926] 将黑色Maxisorp 384孔板(默克公司#P6366-1CS)用5 $\mu$ g/mL的hEGFR胞外结构域重组蛋白或用BSA包被。在4℃下孵育过夜之后,将板用TBST缓冲液(TBS+0.05% Tween20)洗涤,并且用3% BSA/TBST缓冲液封闭。在下一步中,将在不相关产生轮次中产生的经装饰的AAV和未经装饰的AAV1Sil1对照的连续稀释液添加到经包被的板上。在室温下的2h孵育步骤之后,将板用TBST洗涤三次,然后用抗AAVx生物素化的抗体(赛默飞世尔科技公司#7103522100)在室温下孵育1h。将板用TBST洗涤(4次),并且用链霉亲和素-AP缀合物(罗氏公司#11089161001)在室温下孵育30min。将板再次洗涤四次,并且将AttoPhos底物(罗氏公司#00000011681982001)添加到每个孔中。从EGFR板信号中减去BSA板信号。结果示于图39中,集中于5E+11vp AAV浓度。

[0927] 在大多数优先的单个VP2突变体的情况下可以观察到EGFR过表达细胞上的转导和蛋白质结合的增强。不希望受理论的束缚,假设这种改善与对于这些样品观察到的Sso7d的暴露更好有关和/或潜在地与对于这些样品观察到的Sso7d融合物的量略微更高有关。

[0928] 实例10.4组合的VP2 N末端变体体外确认

[0929] 引言:

[0930] 在前一节中,VP2 M末端突变P191N、T162R和D213A被鉴定为居首候选物。为了检查这些VP2点突变是否对衣壳的转导效力具有加性效应,设计含有所有三个突变的新的VP2质粒。将编码表46中所述的突变的串DNA克隆到骨架NC070\_pRS5a\_AAV1 Sil1 VP2\_(G4S)x3\_抗EGFR Sso7d中,保留抗EGFR Sso7d E18.4.5序列,但是将(G4S)x3接头用(APS)x2、(APS)x3或(G4S)x2替换(参见表46)。另外,还研究接头对感染性和靶标结合的影响,将柔性的(G4S)x2和(G4S)x3接头与更刚性的(APS)x2进行比较。产生AAV样品,并且评价它们在EGFR OE和KO细胞中的感染性潜力。还评估与Sso7d靶标(EGFR)的结合,以研究突变对此方面的影响。

[0931] 表46:具有相应的点突变和接头的VP2表达质粒的列表

| 质粒 ID                                                                     | VP2 突变                    | 接头      |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------|
| (NC079) pAAV_rep2cap1_AAV1-Sil1[V473D,N500E]_KanR                         | 无                         | 无 Sso7d |
| (NC070) pRS5a_AAV1 Sil1 VP2_(G4S)x3_抗 EGFR Sso7d                          | 无                         | (G4S)x3 |
| (SK0050) _pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1_Sil1_VP2             | 无                         | (APS)x2 |
| [0932] (SK0058) _pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_VP2_P191N | P191N                     | (APS)x2 |
| (SK0051) _pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1_Sil1_Ra_VP2          | P191N、<br>T162R、<br>D213A | (APS)x2 |
| (HS0042) _pRS5a_抗<br>EGFR_Sso7d_E18.4.5_(G4S)x2_AAV1Sil1_P191N_VP2        | P191N                     | (G4S)x2 |

[0933] 经装饰的AAV1-Sil1产生:

[0934] 将质粒DNA以等摩尔比率的pHelper、(AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE单链货物、(NC080)pAAV Rep2Cap1 Sil1 VP2 K0和来自以上列表的AAV1 VP2表达质粒混合。对于未经装饰的AAV对照,使用以下质粒:pHelper、(AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE单链货物和(NC079)pAAV\_rep2cap1\_AAV1-Sil1[V473D,N500E]\_KanR。将Expi293F细胞以 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的细胞密度重悬于新鲜培养基中,并且使用FectoVIR-AAV转染试剂(宝利普拉斯公司#101000022)进行转染( $1.1 \mu\text{g}$ 总DNA/ $1 \times 10^6$ 个细胞)。DNA:FectoVIR的比率为 $1 \mu\text{g}:1 \mu\text{l}$ 。在转染之后不久,将葡萄糖添加到细胞悬浮液中至终浓度为 $2 \text{g/l}$ ,并且将混合物在 $37^\circ\text{C}$ 、 $110 \text{rpm}$ 、 $6\% \text{CO}_2$ 下孵育。转染后三天,将在裂解缓冲液( $500 \text{mM}$  HEPES,  $10\%$  Tween 20,  $20 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ )中的全能核酸酶添加到经转染的细胞悬浮液中至终浓度为 $0.1 \text{U}/\mu\text{l}$ ,并且体积等于总体积的 $10\%$ 。在 $37^\circ\text{C}$ 下的 $3 \text{h}$ 孵育时间段之后,将体积等于总体积 $10\%$ 的蔗糖盐溶液( $5 \text{M}$  NaCl,  $7\%$  蔗糖)添加到裂解物中,并且将混合物在 $37^\circ\text{C}$ 下在搅动中孵育 $3 \text{h}$ 。在此孵育步骤之后,添加体积等于总体积 $10\%$ 的盐蔗糖溶液( $5 \text{M}$  NaCl,  $7\%$  蔗糖),并且再孵育 $20 \text{min}$ 。将样品在 $3500 \text{g}$ 下离心 $15 \text{min}$ 。将上清液通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤,并且补充EDTA至终浓度为 $5 \text{mM}$ 。接下来,将澄清的裂解物以 $1 \text{ml}/\text{min}$ 加载到安装在AKTA Pure仪器上的AAVX预填充柱( $0.5 \times 5 \text{cm}$ ,  $1 \text{ml}$ ) (赛默飞世尔公司#A36652)上。将结合的AAV颗粒用 $10 \text{CV}$ 的洗涤缓冲液( $\text{pH } 7.3$ ) ( $50 \text{mM}$  Tris-Cl,  $0.5 \text{M}$  NaCl,  $0.01\%$  Pluronic F-68)洗涤,并且用 $5 \text{CV}$ 的甘氨酸洗脱缓冲液( $\text{pH } 2.7$ ) ( $0.1 \text{M}$  甘氨酸,  $0.2 \text{M}$  NaCl,  $0.25 \text{M}$  L-精氨酸)洗脱。将洗脱级分( $0.25 \text{ml}$ )立即用 $25 \mu\text{l}$   $1 \text{M}$  Tris-Cl ( $\text{pH } 10$ )中和。将含有AAV的级分(如通过UV280信号所评估)合并,并且用Float-A-Lyzer透析装置 $100 \text{KD}$  (Spectrum™ #G235071)用配制缓冲液( $20 \text{mM}$  Tris碱,  $1 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $200 \text{mM}$  NaCl,  $0.005\%$  Pluronic F-68,  $\text{pH } 8.1$ )透析过夜,然后使其通过 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器单元。

[0935] 滴度和装饰水平确定:

[0936] 使用表3中所述的SV40 pA特异性寡核苷酸组用QX200微滴式数字PCR(ddPCR)系统(伯乐公司)确定AAV载体滴度。经纯化的AAV样品的预处理由以下组成:将 $5 \mu\text{l}$  AAV与1单位DNA酶和 $1 \times$  DNA酶缓冲液(默克公司#04716728001)以 $20 \mu\text{l}$ 总体积在 $37^\circ\text{C}$ 下一起孵育 $30 \text{min}$ 。接下来,将 $1 \mu\text{l}$ 的 $20 \text{mg}/\text{ml}$ 的蛋白酶K(生命技术公司#E00491)添加到反应混合物中,并且将混合物在 $55^\circ\text{C}$ 下孵育 $1 \text{h}$ ,随后在 $95^\circ\text{C}$ 下进行 $15 \text{min}$ 的灭活步骤。在 $1 \times$  PCR缓冲液II(生命技术公司#N8080010)、 $2.5 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.05\%$  Pluronic F-68(西格玛-奥德里奇公司#K4894)、 $2 \text{ng}/\mu\text{l}$ 剪切鲑鱼精子DNA(英杰公司#15632011)中制备经处理的样品的不同 $1/10$ 连续稀释液,并且将其用作PCR扩增的模板。通过将 $5.5 \mu\text{l}$ 经预处理的AAV稀释液与各 $900 \text{nM}$ 正向和反向SV40pA引物、 $125 \text{nM}$  SV40 pA探针和 $11 \mu\text{l}$   $2 \times$  ddPCR探针用超混液(伯乐公司#1863024)组合以 $22 \mu\text{l}$ 的终体积制备ddPCR反应混合物。每个样品都包括技术重复。将ddPCR反应混合物加载到半裙边96孔板(伯乐公司#12001925)中,并且置于自动微滴发生器(伯乐公司#1864101)中。使用伯乐公司的专有DG32自动微滴发生器盒(#1864108)和自动微滴产生探针用油(伯乐公司#1864110)自动产生微滴。在微滴产生之后,装置自动将产生的微滴沉积在新的半裙边96孔板中。

[0937] 将板用可穿透箔热封,并且置于C1000 Touch热循环仪(伯乐公司)中。热循环条件如下:在 $95^\circ\text{C}$ 下持续 $10 \text{min}$ ,然后是在 $95^\circ\text{C}$ 下持续 $30 \text{s}$ 并且在 $60^\circ\text{C}$ 下持续 $1 \text{min}$ 的40个循环,随后在 $98^\circ\text{C}$ 下孵育 $10 \text{min}$ ,并且在 $4^\circ\text{C}$ 下无限期保持。使用QX200数字微滴读取器对FAM荧光信

号(标记每个微滴中的AAV基因组DNA序列)进行计数,并且通过QuantaSoft分析软件(伯乐公司)进行分析。为了计算AAV滴度,将微滴数乘以相应的总稀释因子,然后乘以因子2(以考虑单链基因组的可能的重退火)。

[0938] 进行CE-SDS分析(Agilent 2100生物分析仪系统,蛋白230试剂盒,使用变性条件)以评价经纯化的样品中的VP分布和总VP产量。

[0939] 总AAV颗粒/ml (vp/ml) 和VP比率的计算:

[0940] • 将 $\text{ng}/\mu\text{l}$  ( $=\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 值除以观察到的MW,然后乘以 $1\text{E}+06$  ( $\mu\text{g}$ 到 $\text{g}$ 的换算)以计算摩尔/ml值

[0941] • 将摩尔/ml值乘以 $6.022\text{E}+23$  (阿伏伽德罗常数)以计算分子数/ml

[0942] • VP分布:基于分子/ml值计算,假设一个AAV由总共60个VP组成

[0943] • AAV颗粒/ml (vp/ml):将VP1+VP2+VP3分子总和/ml除以60

[0944] ddPCR和CE-SDS结果报告于表47中。

[0945] 表47:对经装饰的ssAAV1Si11的QC

[0946]

| 样品 ID                                                                       | 缩写 ID             | VP2 融合物 /AAV | vg/细胞    | vp/细胞    |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------|----------|----------|
| (PPB-26864) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP                                         | 未经装饰的             | 0            | 2.71E+04 | 4.93E+04 |
| (PPB-26865) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_(G4S)3         | w.t. VP2 (G4Sx3)  | 6.9          | 1.80E+04 | 4.48E+04 |
| (PPB-26866) _ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_(APS)2        | w.t.VP2 (APSx2)   | 8.2          | 1.77E+04 | 4.82E+04 |
| (PPB-26867) _ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_P191N_(APS)2  | P191N VP2 (APSx2) | 9.5          | 1.46E+04 | 4.23E+04 |
| (PPB-26868) _ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-抗 EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_P191N_(G4S)2_ | P191N VP2 (G4Sx2) | 9.7          | 1.59E+04 | 4.05E+04 |
| (PPB-26869) _ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-NOX-抗 EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_RA_(APS)2 | Ra VP2 (APSx2)    | 10.8         | 2.04E+04 | 5.21E+04 |

[0947] 经装饰的AAV1Si11对受体过表达细胞系和敲除细胞系的体外感染性:

[0948] 为了评估单突变是否改善经装饰的衣壳感染细胞的能力,对EGFR过表达(OE)细胞和敲除(KO)细胞进行感染性测定。将V3培养基中浓度为 $6.06\text{E}+05/\text{mL}$ 的细胞接种在平底96孔板中( $33\mu\text{L}$ 细胞悬浮液/孔)。将经装饰的AAV在V3培养基中稀释,并且以范围从 $1\text{E}+06$ 至 $4.6\text{E}+01$ 的MOI感染细胞。在孔中的终体积为 $100\mu\text{l}$ 的情况下,将板在 $37^\circ\text{C}$ 下孵育3h,随后添加 $100\mu\text{L}$ 具有10% FBS的V3培养基。转染后三天,分离细胞,并且通过FACS测量eGFP荧光。由

于在此实验中观察到的高转导水平,在MFI水平上进行分析,如图40和图41所示。

[0949] 与w.t.VP2和单个P191N突变体两者相比,VP2序列上的组合突变(P191N、T162R、D213A=Ra)改善抗EGFR Sso7d靶向性AAV1Si11的转导效率。不能观察到所使用的不同接头对转导的明显影响。

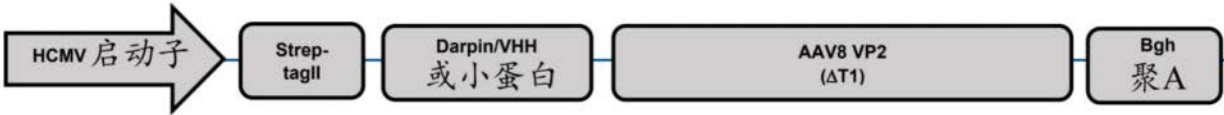


图1



图2

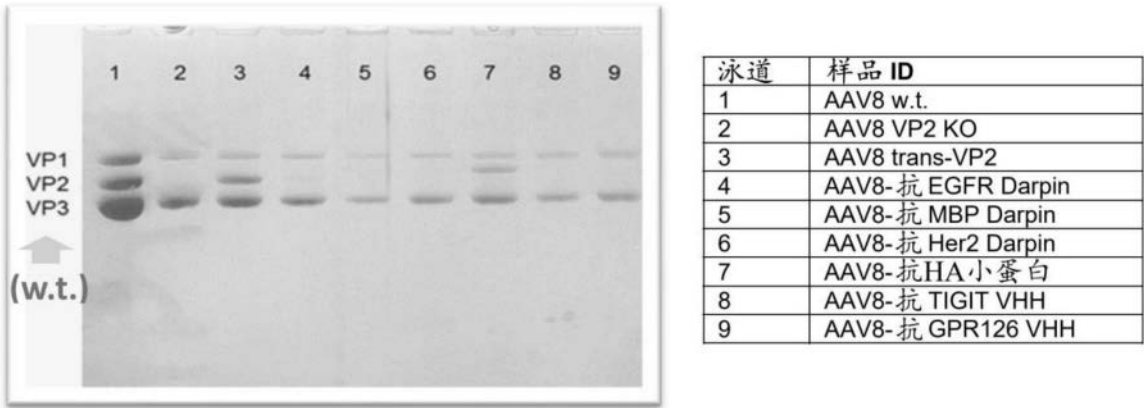


图3

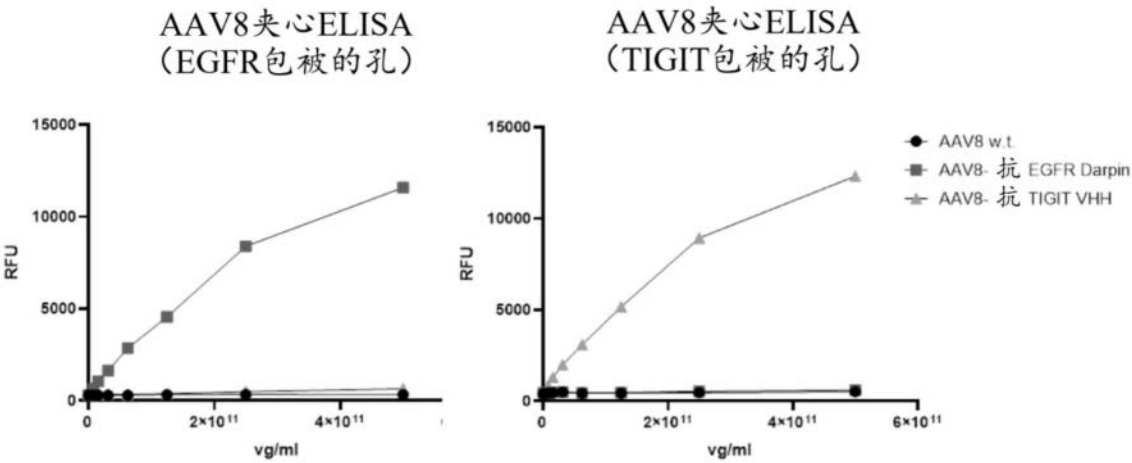


图4

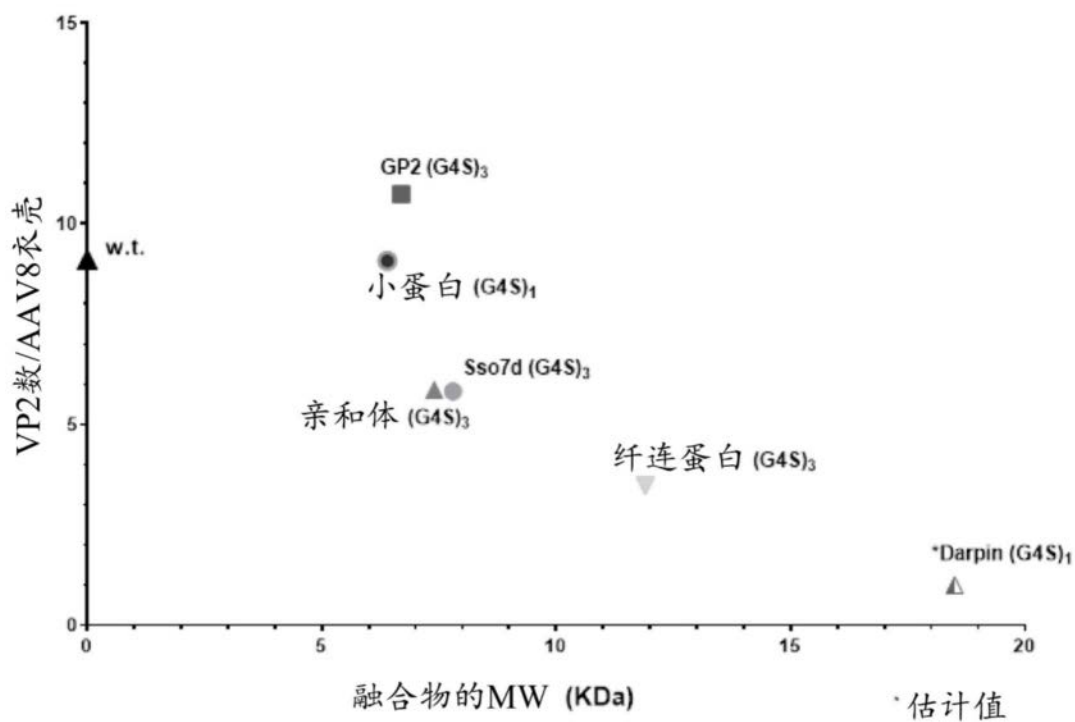
使用与不同支架融合的VP2的  
经装饰的AAV8%

图5

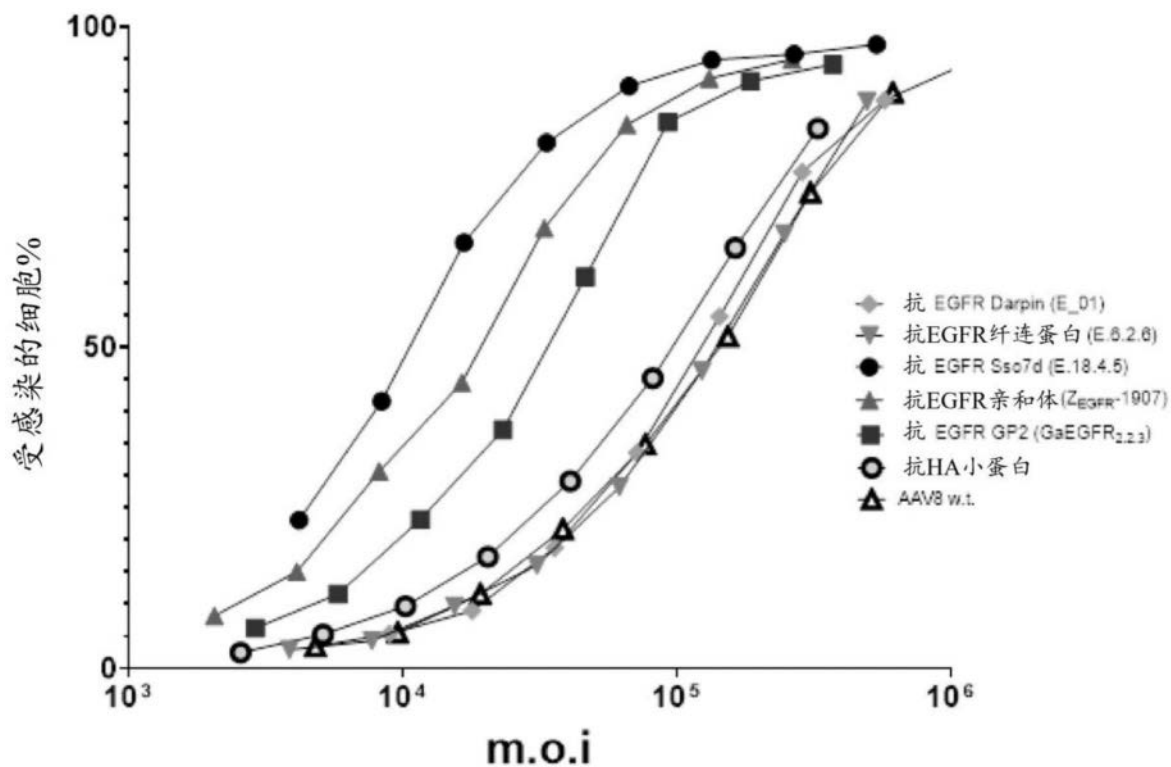


图6

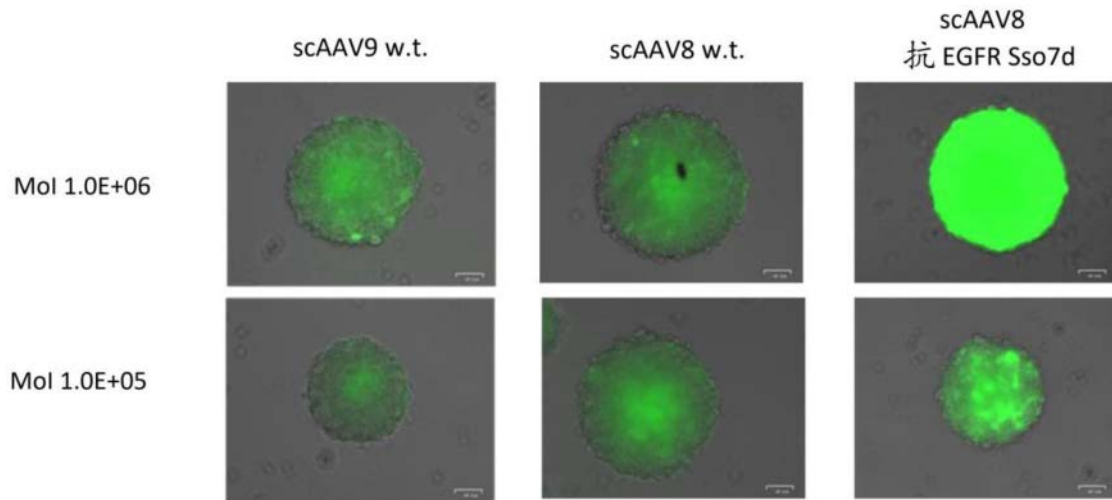


图7

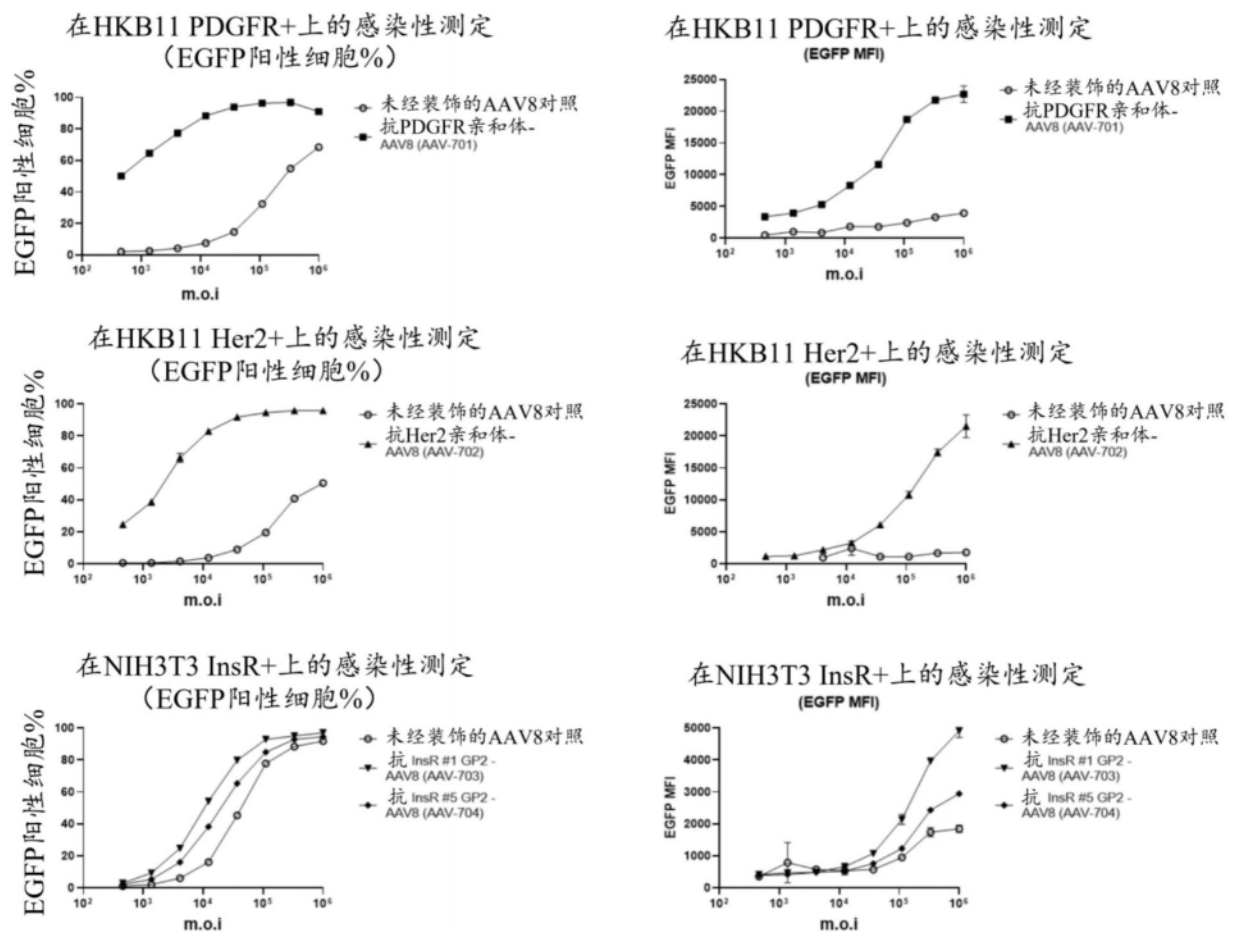


图8

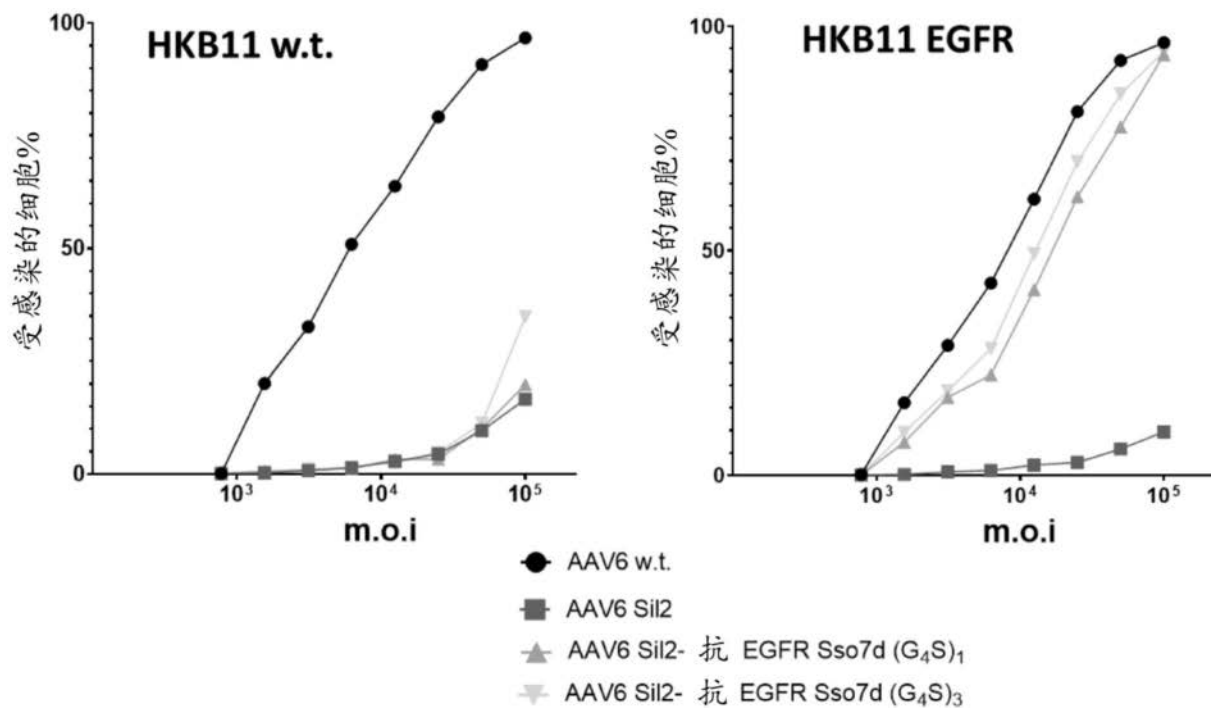


图9

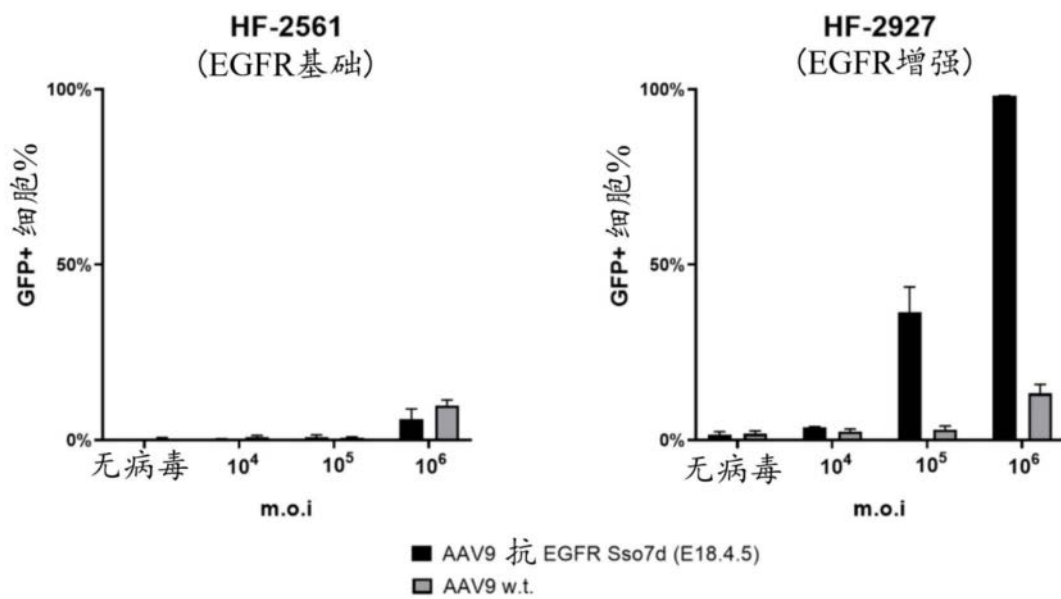


图10

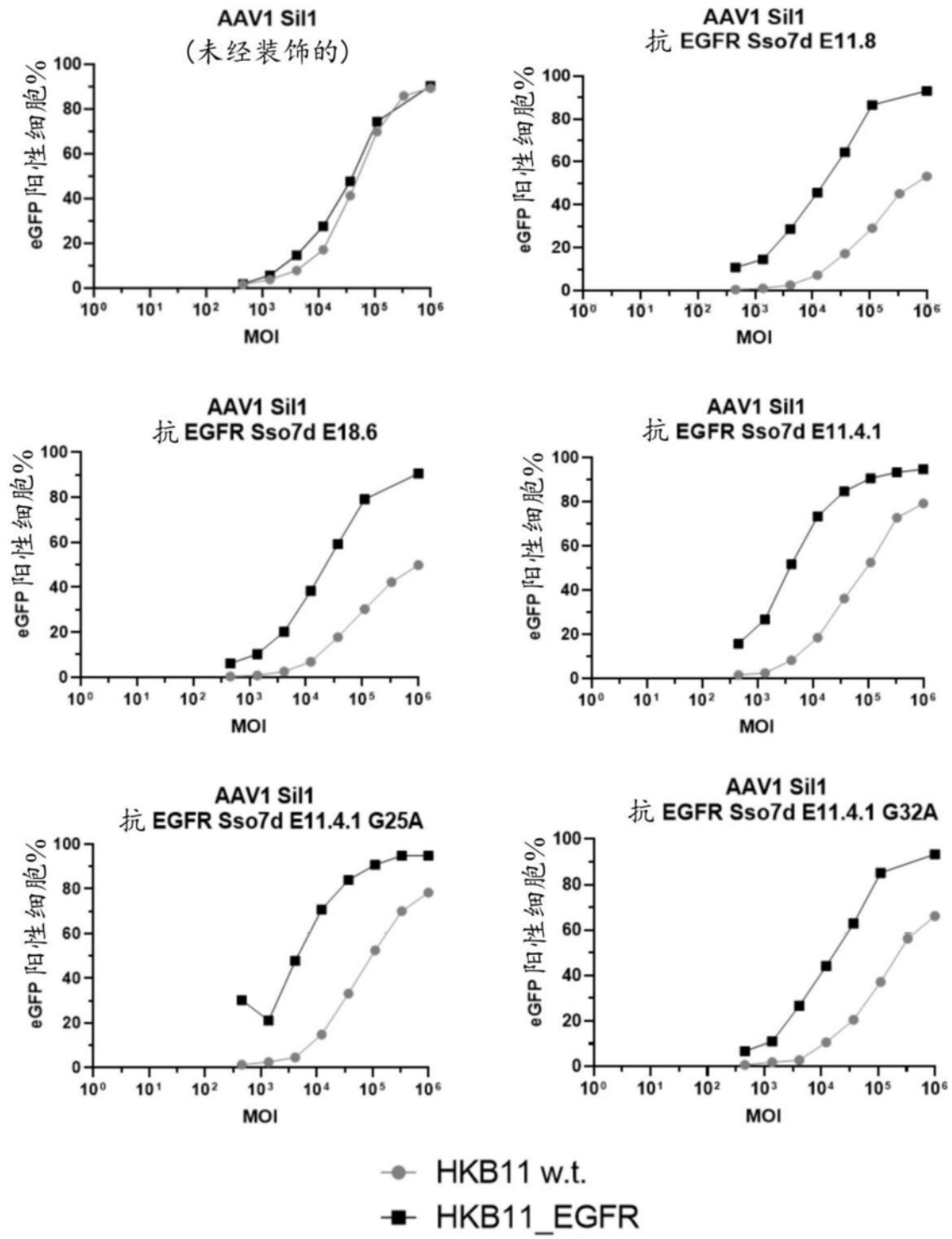


图11

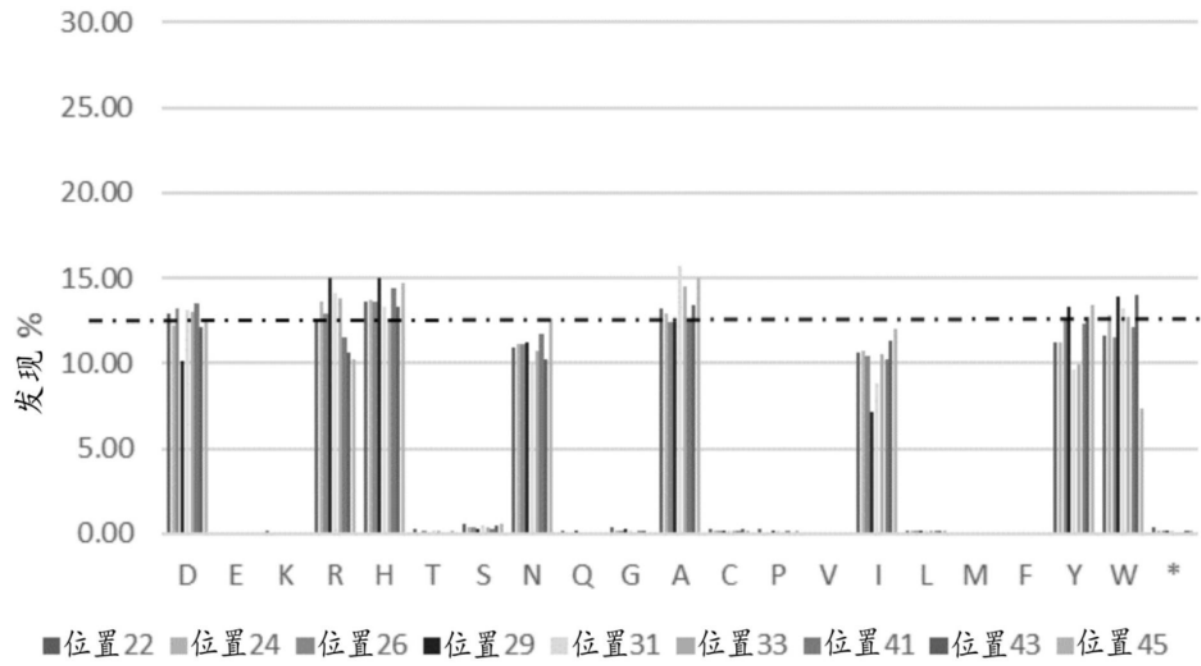


图12

| 占<br>767937<br>个苗头<br>物的% | 22<br>置位 | 24<br>置位 | 26<br>置位 | 29<br>置位 | 31<br>置位 | 33<br>置位 | 41<br>置位 | 43<br>置位 | 45<br>置位 |
|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 4.56                      | I        | D        | Y        | N        | H        | Y        | N        | W        | W        |
| 2.59                      | I        | D        | Y        | Y        | H        | R        | D        | W        | W        |
| 2.18                      | I        | D        | Y        | Y        | H        | R        | N        | W        | W        |
| 2.10                      | I        | D        | Y        | A        | H        | R        | D        | W        | W        |
| 1.97                      | I        | D        | Y        | R        | H        | N        | W        | W        | W        |
| 1.95                      | I        | N        | Y        | A        | H        | N        | Y        | W        | Y        |
| 1.90                      | W        | N        | Y        | D        | D        | W        | W        | N        | I        |
| 1.54                      | I        | D        | Y        | D        | H        | Y        | D        | W        | W        |
| 1.42                      | I        | N        | Y        | N        | H        | N        | W        | W        | W        |
| 1.39                      | I        | D        | Y        | W        | H        | N        | Y        | W        | Y        |
| 1.36                      | I        | D        | Y        | A        | H        | R        | A        | W        | Y        |
| 1.32                      | I        | N        | Y        | N        | H        | N        | Y        | W        | W        |
| 1.23                      | I        | D        | Y        | D        | H        | N        | H        | W        | W        |
| 1.07                      | I        | D        | Y        | N        | H        | N        | I        | W        | W        |
| 1.05                      | I        | N        | Y        | A        | H        | H        | N        | W        | Y        |
| 1.04                      | I        | D        | Y        | N        | H        | R        | A        | W        | W        |
| 0.96                      | I        | D        | Y        | N        | H        | W        | N        | W        | W        |
| 0.96                      | Y        | D        | A        | F        | W        | E        | L        | T        | W        |
| 0.94                      | I        | D        | Y        | N        | H        | N        | W        | W        | Y        |
| 0.93                      | I        | D        | Y        | W        | H        | R        | D        | W        | W        |
| 0.93                      | I        | D        | Y        | D        | H        | N        | Y        | W        | Y        |
| 0.93                      | I        | D        | Y        | N        | H        | N        | Y        | W        | Y        |
| 0.92                      | I        | D        | Y        | N        | H        | R        | D        | W        | W        |
| 0.89                      | I        | D        | Y        | N        | H        | N        | W        | W        | W        |
| 0.86                      | I        | D        | Y        | N        | H        | Y        | A        | W        | W        |
| 0.82                      | W        | N        | Y        | Y        | D        | W        | W        | N        | Y        |
| 0.80                      | I        | D        | Y        | D        | H        | N        | W        | W        | W        |
| 0.78                      | R        | D        | Y        | A        | H        | N        | W        | W        | W        |
| 0.77                      | I        | D        | Y        | N        | H        | N        | D        | W        | W        |
| 0.77                      | R        | D        | Y        | D        | H        | N        | Y        | W        | W        |

图13

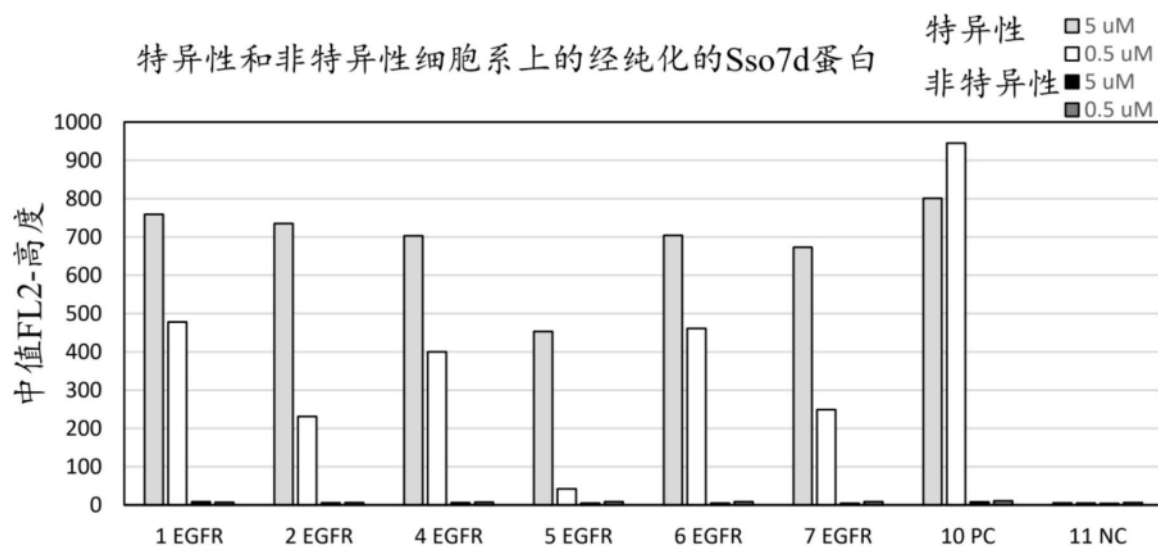


图14



图15

|   | 位置 22 | 位置 24 | 位置 26 | 位置 29 | 位置 31 | 位置 33 | 位置 41 | 位置 43 | 位置 45 | 平均值  |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| D | 13.8  | 14.5  | 13.8  | 11.6  | 14.5  | 10.9  | 10.1  | 10.1  | 13.8  | 12.6 |
| R | 13.0  | 14.5  | 9.4   | 15.9  | 8.7   | 15.9  | 15.9  | 6.5   | 14.5  | 12.7 |
| H | 12.3  | 10.9  | 10.9  | 11.6  | 13.8  | 13.0  | 11.6  | 15.2  | 16.7  | 12.9 |
| N | 15.9  | 8.7   | 12.3  | 13.0  | 10.9  | 8.7   | 5.1   | 13.0  | 9.4   | 10.8 |
| A | 7.2   | 11.6  | 10.1  | 12.3  | 13.0  | 19.6  | 21.7  | 16.7  | 16.7  | 14.3 |
| I | 9.4   | 13.8  | 15.2  | 7.2   | 12.3  | 8.0   | 8.7   | 13.0  | 12.3  | 11.1 |
| Y | 18.1  | 11.6  | 13.8  | 13.0  | 7.2   | 10.1  | 15.2  | 11.6  | 10.9  | 12.4 |
| W | 10.1  | 14.5  | 14.5  | 15.2  | 19.6  | 13.8  | 11.6  | 13.8  | 5.8   | 13.2 |

图16

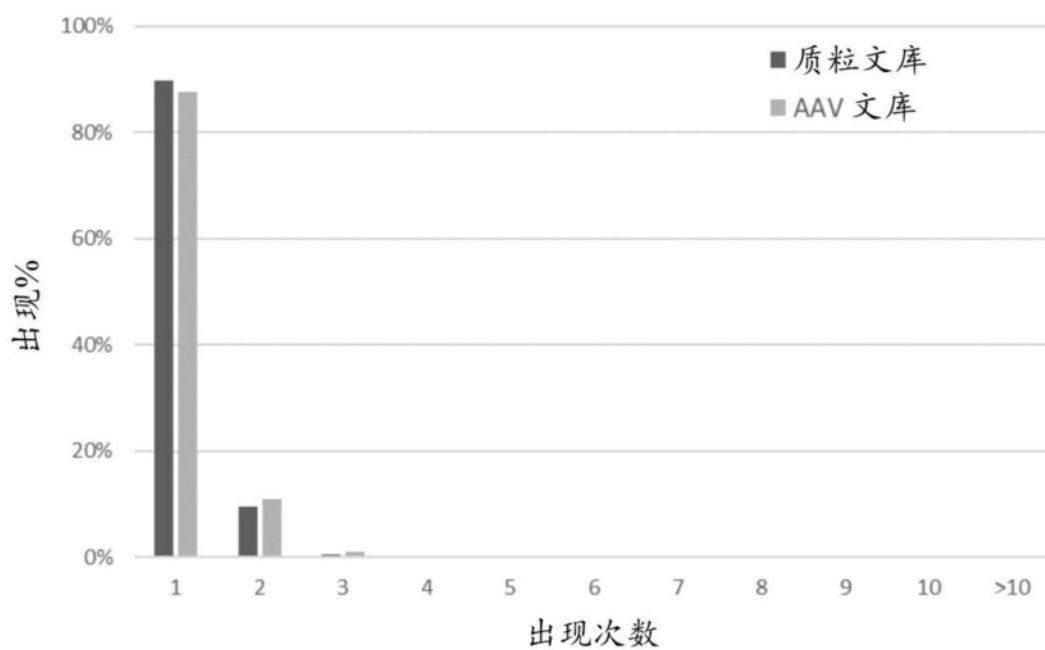


图17A

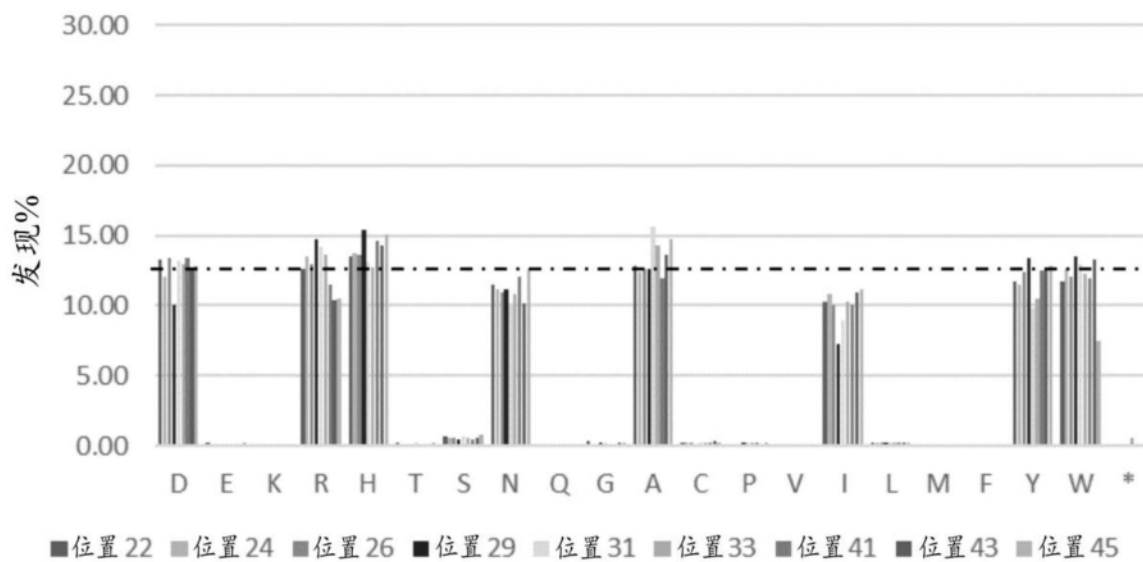


图17B

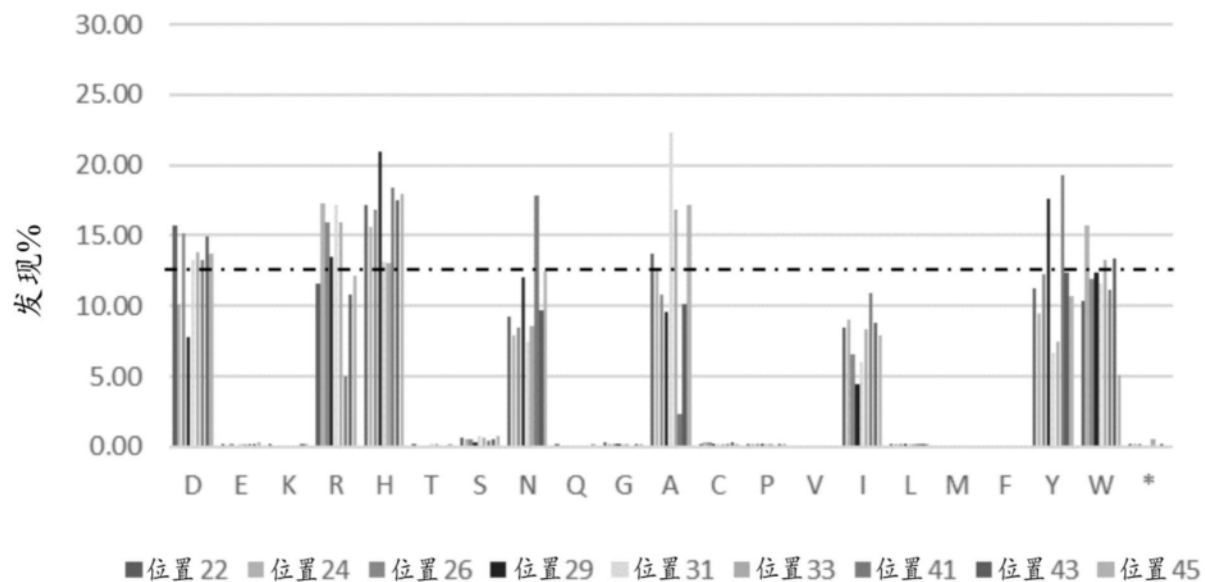


图17C

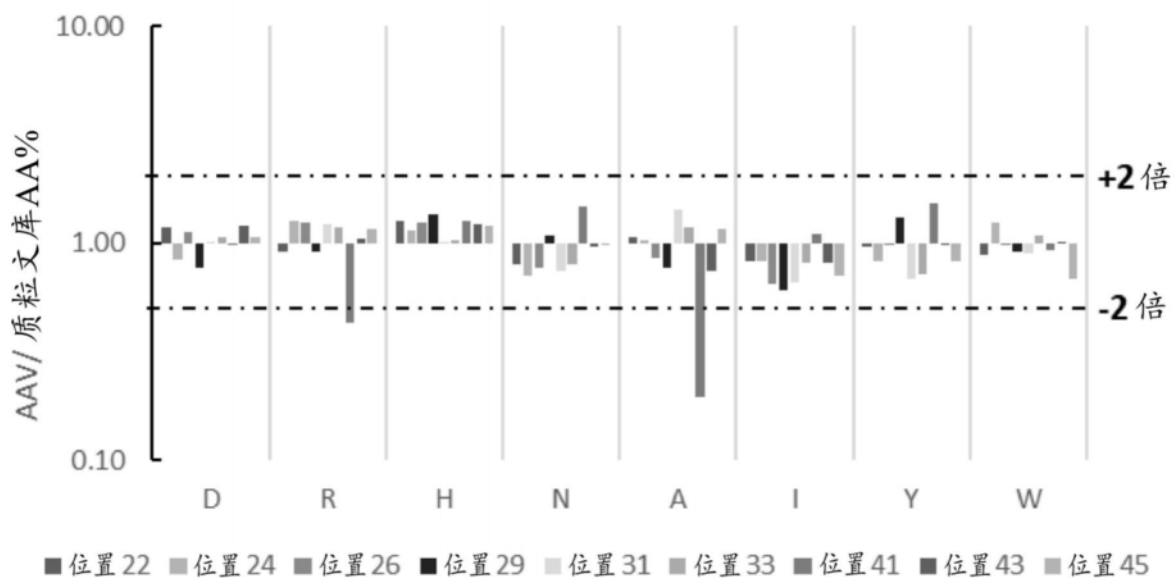
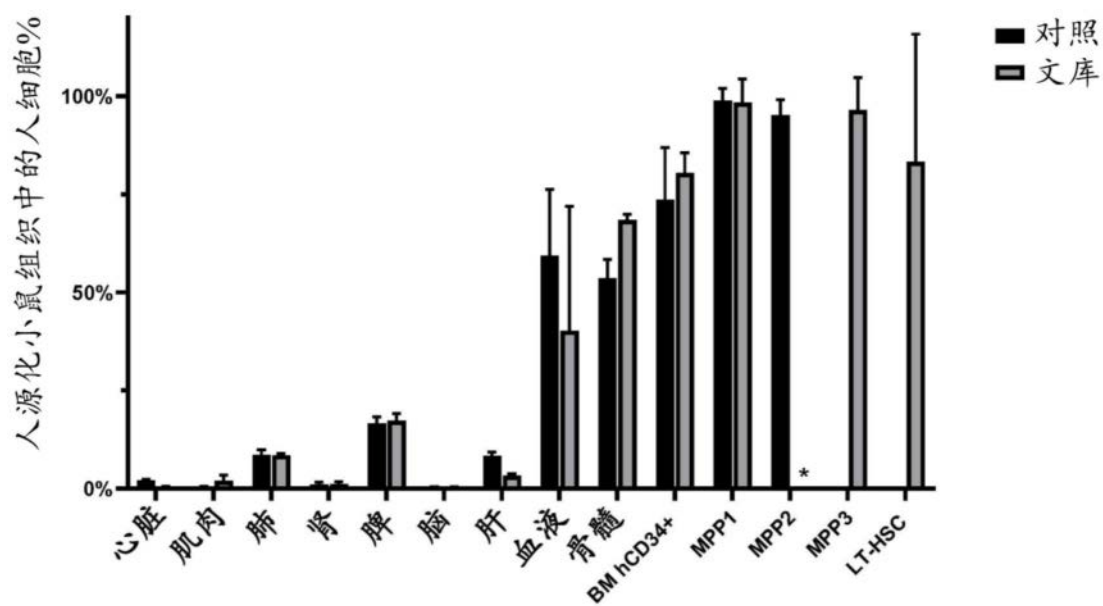


图17D



\*在小鼠RPP30重复的情况下变异高

图18

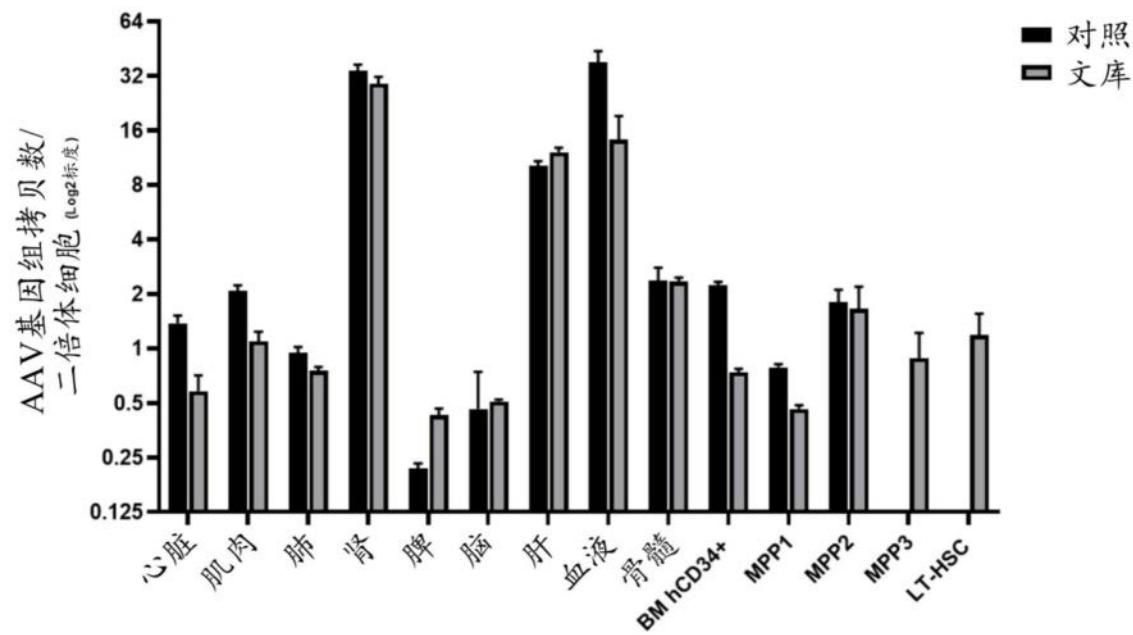


图19

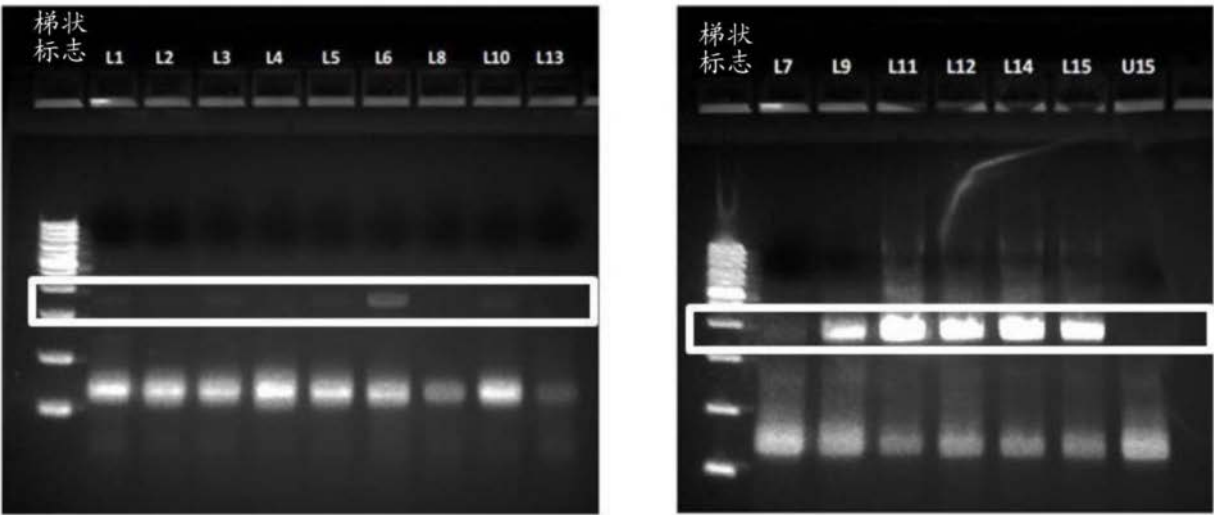


图20

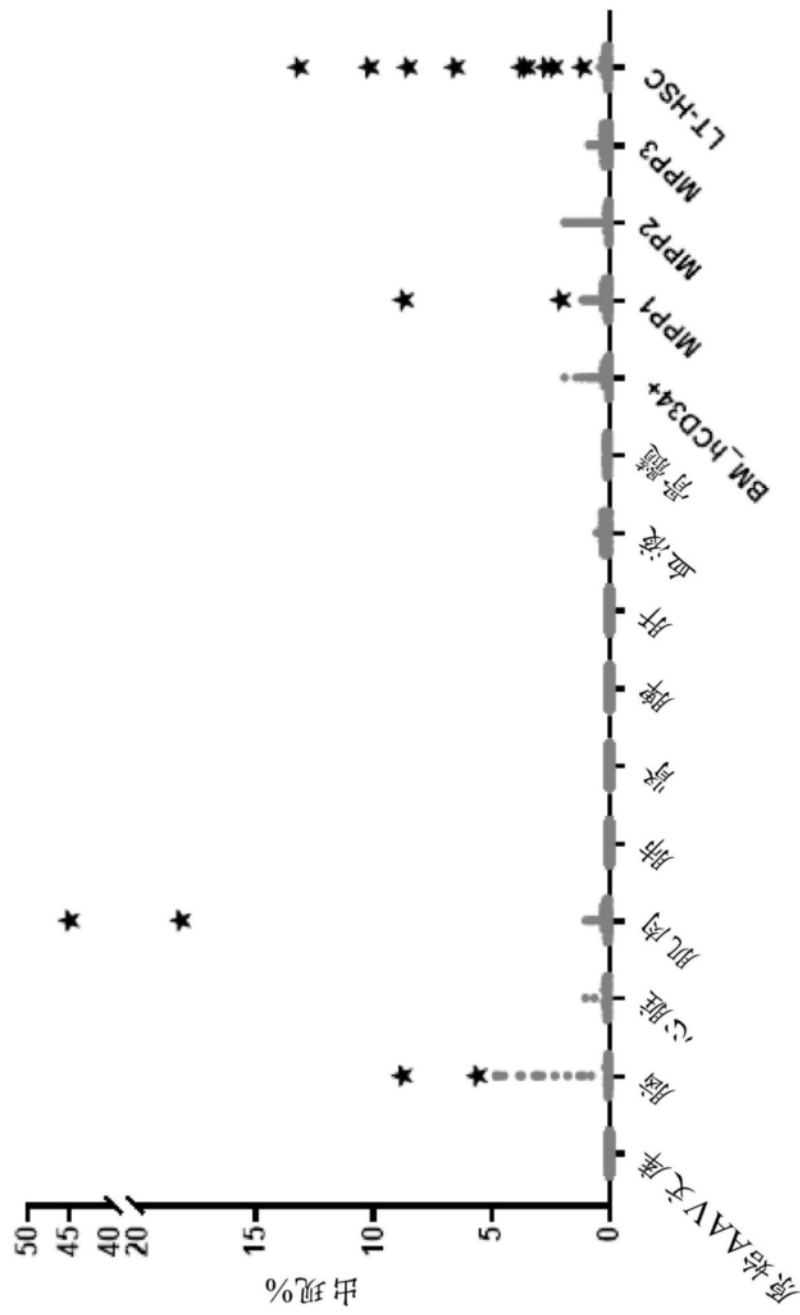


图21

| 候选物 ID           | 脑     | 心脏    | 肌肉     | 肺     | 肾     | 脾     | 肝     | 血液    | 骨髓    | BM_<br>hCD34+ | MPP1  | MPP2  | MPP3  | LT-HSC |
|------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|-------|--------|
| 脑-Sso7dL8-001    | 8.77% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.01%  |
| 脑-Sso7dL8-002    | 5.59% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.01%  |
| 脑-Sso7dL8-003    | 4.82% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-004    | 4.81% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.01%  |
| 脑-Sso7dL8-005    | 4.66% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-006    | 4.50% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.01%  |
| 脑-Sso7dL8-007    | 3.82% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-008    | 3.73% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.01% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-009    | 3.18% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-010    | 3.11% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-011    | 3.10% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-012    | 3.02% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-013    | 2.87% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-014    | 2.32% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-015    | 1.79% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-016    | 1.29% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 脑-Sso7dL8-017    | 1.29% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| 肌肉-Sso7dL8-001   | 0.01% | 0.09% | 45.00% | 0.05% | 0.03% | 0.01% | 0.03% | 0.06% | 0.06% | 0.02%         | 0.03% | 0.07% | 0.01% | 0.01%  |
| 肌肉-Sso7dL8-002   | 0.00% | 0.04% | 18.18% | 0.02% | 0.01% | 0.01% | 0.01% | 0.03% | 0.02% | 0.01%         | 0.02% | 0.02% | 0.00% | 0.00%  |
| MPP1-Sso7dL8-001 | 0.00% | 0.01% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 8.71% | 0.00% | 0.01% | 0.00%  |
| MPP1-Sso7dL8-002 | 0.00% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 2.06% | 0.00% | 0.00% | 0.00%  |
| HSC-Sso7dL8-001  | 0.01% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.01% | 13.18% |
| HSC-Sso7dL8-002  | 0.01% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 10.18% |
| HSC-Sso7dL8-003  | 0.01% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 8.56%  |
| HSC-Sso7dL8-004  | 0.01% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.01% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 6.55%  |
| HSC-Sso7dL8-005  | 0.00% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 3.72%  |
| HSC-Sso7dL8-006  | 0.00% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 3.53%  |
| HSC-Sso7dL8-007  | 0.01% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 2.70%  |
| HSC-Sso7dL8-008  | 0.00% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 2.37%  |
| HSC-Sso7dL8-009  | 0.00% | 0.00% | 0.00%  | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00%         | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 1.15%  |

图22

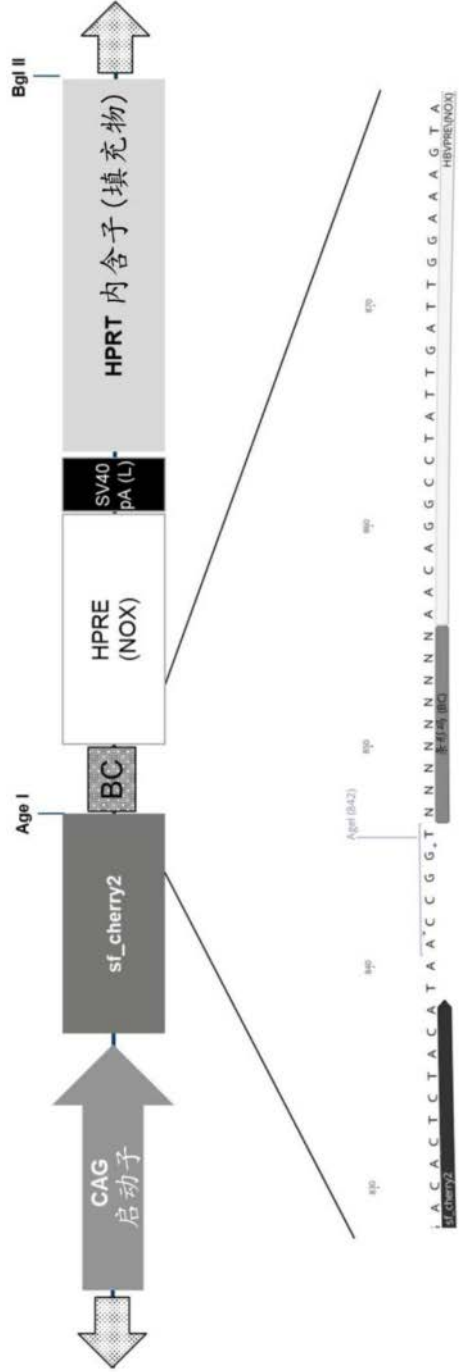


图23

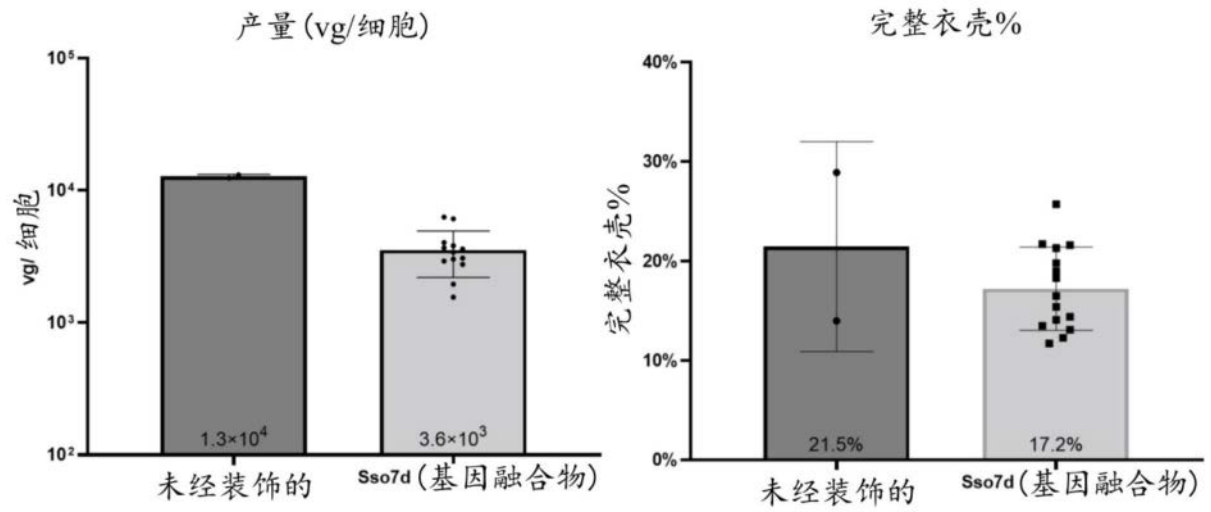


图24A

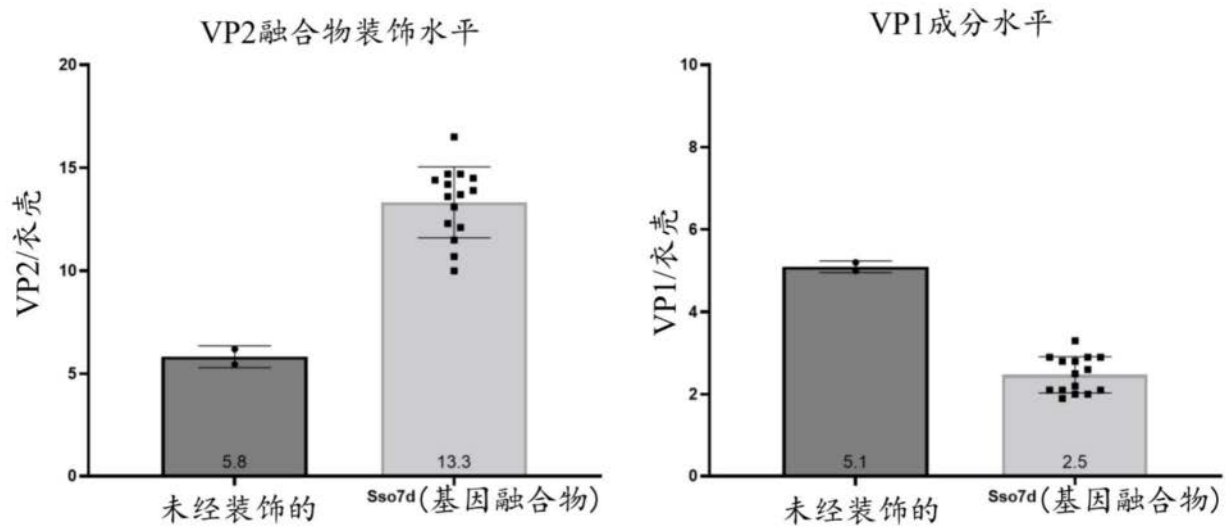


图24B

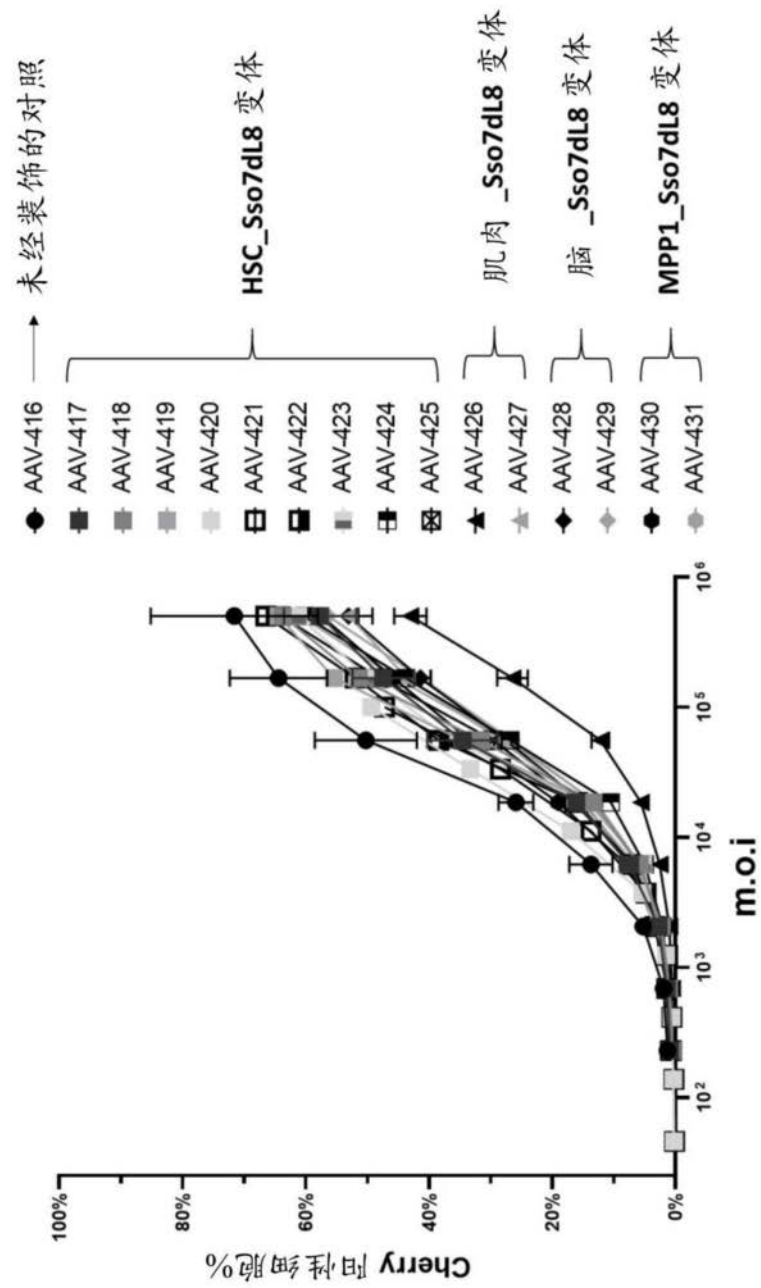


图25

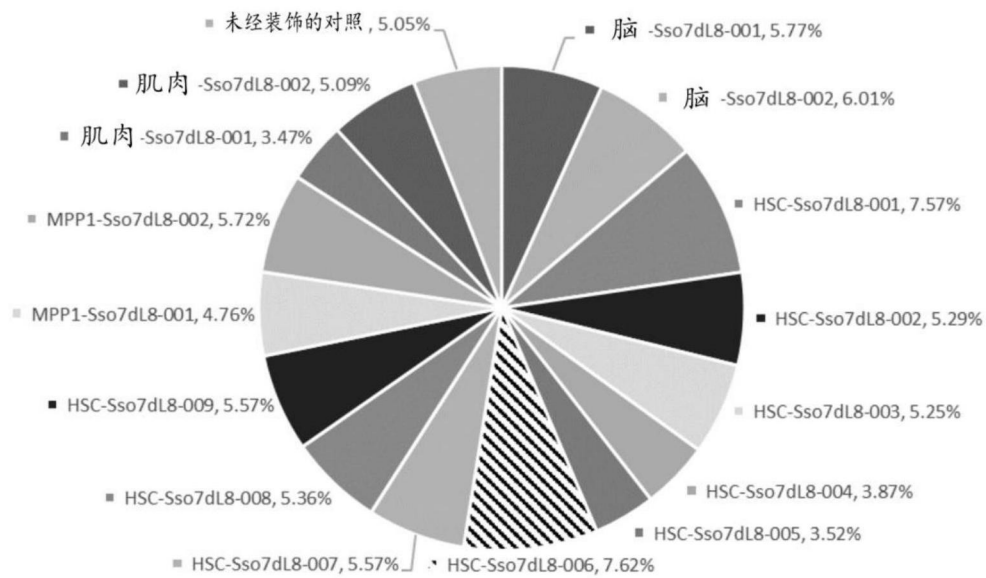


图26

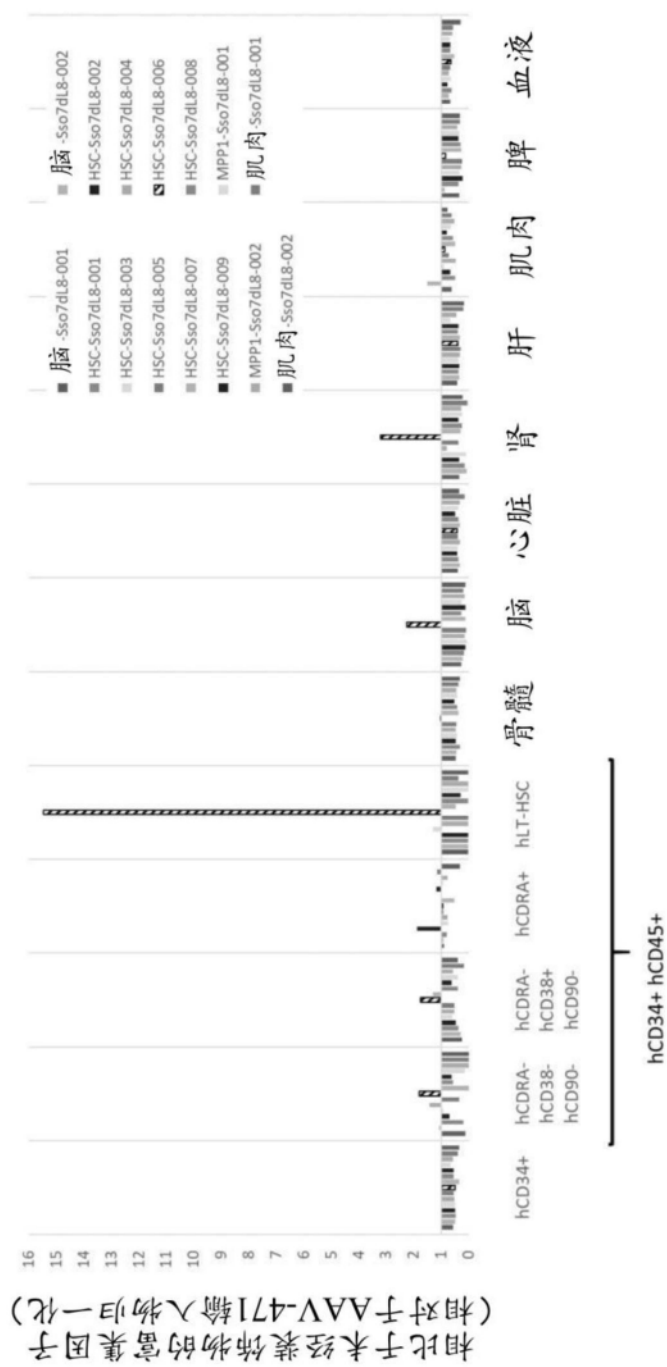


图27

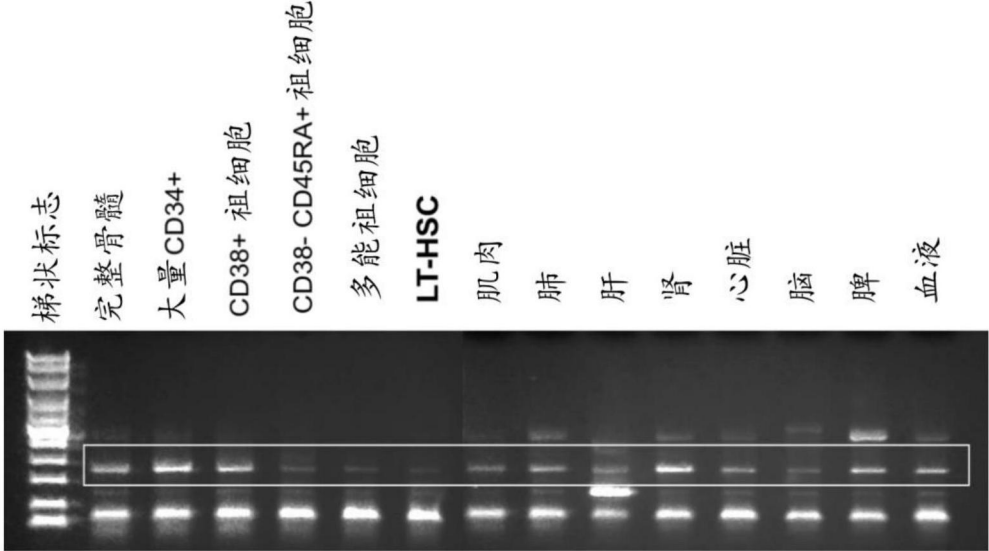


图28

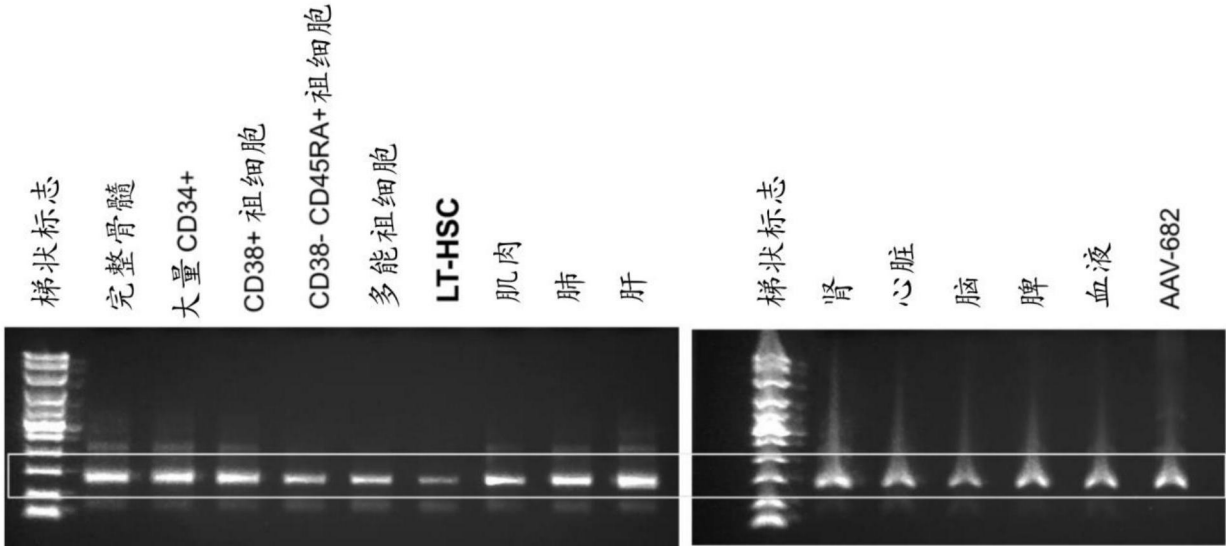


图29

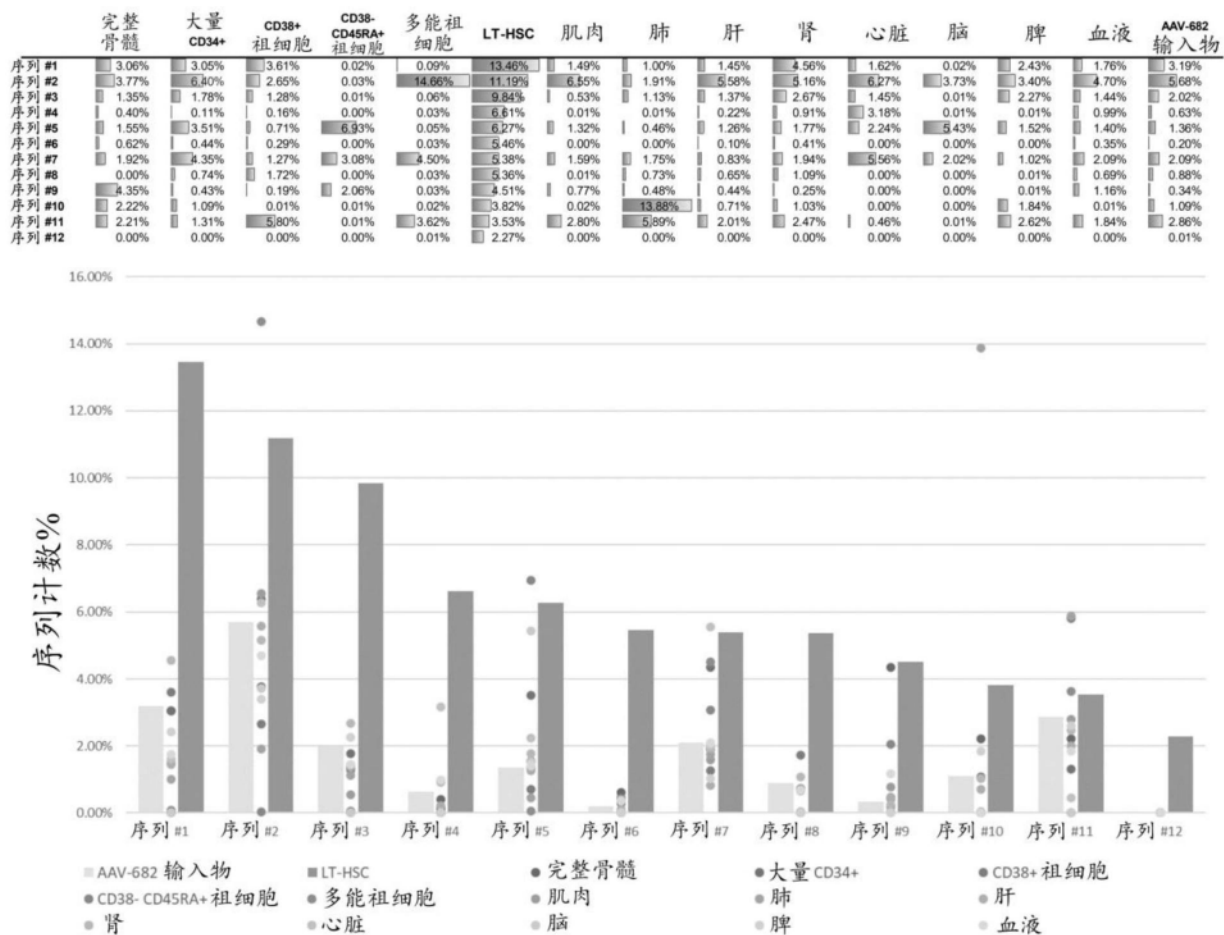


图30

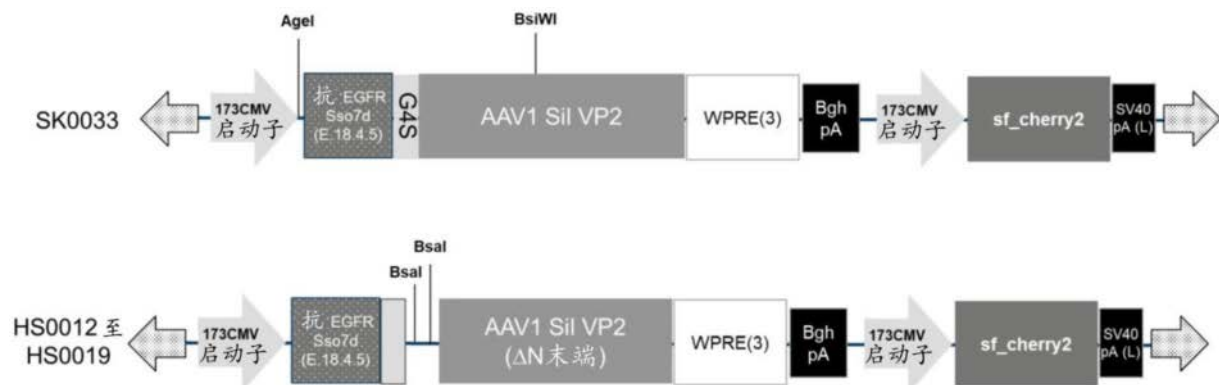
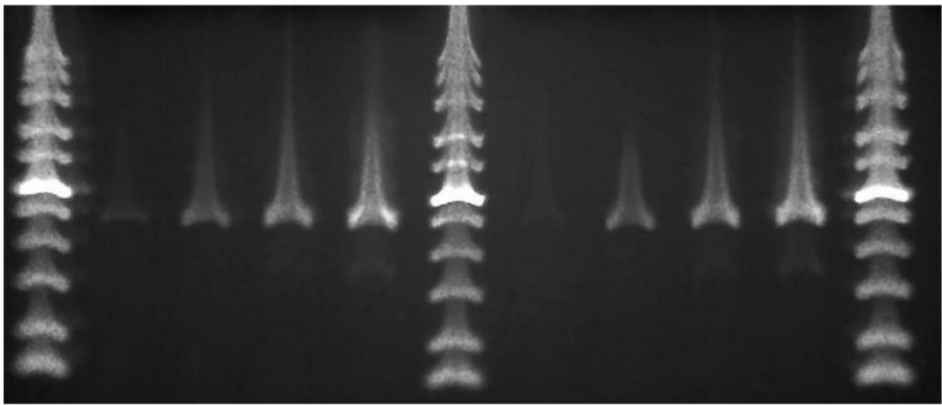
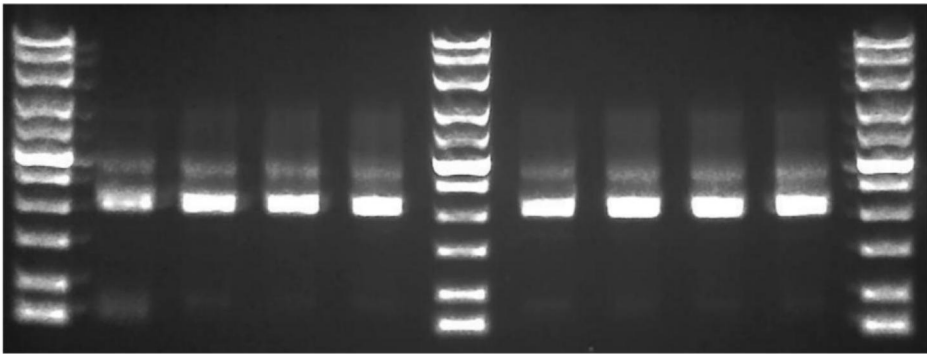


图31



| 泳道 | 样品                     | 泳道 | 样品                       |
|----|------------------------|----|--------------------------|
| 1  | NEB 快速DNA梯状标志          | 6  | NEB 快速DNA梯状标志            |
| 2  | HKB11 EGFR+ MOI 10     | 7  | HKB11 EGFR KO MOI 10     |
| 3  | HKB11 EGFR+ MOI 100    | 8  | HKB11 EGFR KO MOI 100    |
| 4  | HKB11 EGFR+ MOI 1000   | 9  | HKB11 EGFR KO MOI 1000   |
| 5  | HKB11 EGFR+ MOI 10 000 | 10 | HKB11 EGFR KO MOI 10 000 |

图32



| 泳道 | 样品                     | 泳道 | 样品                       |
|----|------------------------|----|--------------------------|
| 1  | NEB 快速DNA梯状标志          | 6  | NEB 快速DNA梯状标志            |
| 2  | HKB11 EGFR+ MOI 10     | 7  | HKB11 EGFR KO MOI 10     |
| 3  | HKB11 EGFR+ MOI 100    | 8  | HKB11 EGFR KO MOI 100    |
| 4  | HKB11 EGFR+ MOI 1000   | 9  | HKB11 EGFR KO MOI 1000   |
| 5  | HKB11 EGFR+ MOI 10 000 | 10 | HKB11 EGFR KO MOI 10 000 |

图33

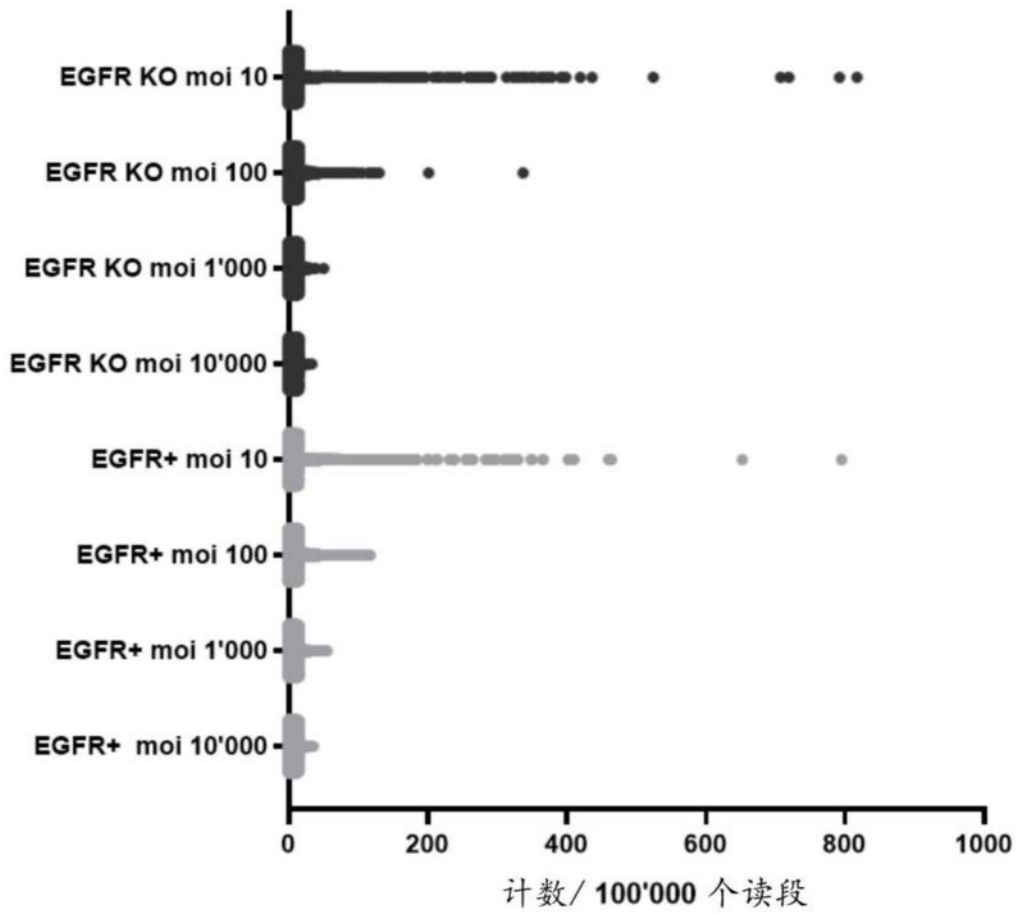


图34

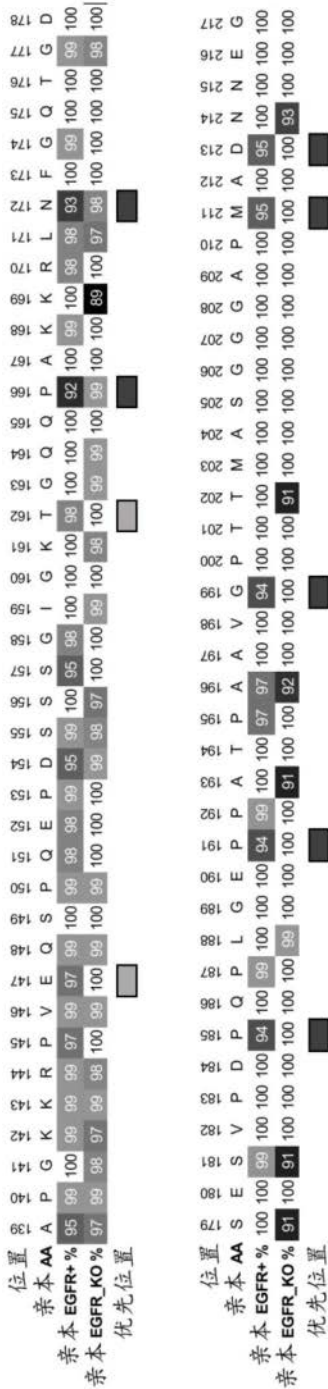


图35

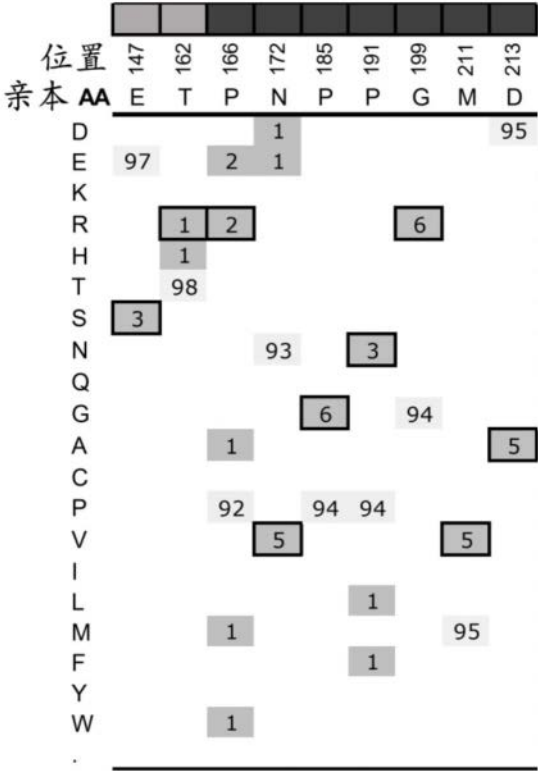


图36

| EGFR + | EGFR KO | 接头     | E147 | T162 | P166 | N172 | P185 | P191 | G199 | M211 | D213 |
|--------|---------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0.65%  | 0.00%   | (APS)2 |      |      |      | V    |      |      |      |      |      |
| 0.46%  | 0.00%   | (APS)3 |      | R    |      |      |      |      |      |      |      |
| 0.41%  | 0.00%   | (APS)2 | S    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 0.40%  | 0.00%   | (G4S)1 | S    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 0.35%  | 0.00%   | (APS)2 |      |      |      | D    |      |      |      |      |      |
| 0.33%  | 0.00%   | (APS)3 |      |      | R    |      |      |      |      |      |      |
| 0.30%  | 0.00%   | (APS)2 |      |      |      | E    |      |      |      |      |      |
| 0.29%  | 0.00%   | (APS)3 |      |      |      |      | G    |      |      |      |      |
| 0.24%  | 0.01%   | (APS)5 |      | H    |      |      |      |      |      |      |      |
| 0.18%  | 0.00%   | (APS)3 |      |      |      |      |      |      | R    |      |      |
| 0.18%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      |      | G    |      |      |      |      |
| 0.18%  | 0.00%   | (G4S)3 |      |      |      |      | G    |      |      |      |      |
| 0.17%  | 0.00%   | (G4S)4 | S    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 0.16%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      |      |      |      |      | V    |      |
| 0.16%  | 0.00%   | (APS)3 |      |      |      |      |      |      |      | V    |      |
| 0.15%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      |      |      | N    |      |      |      |
| 0.15%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      |      |      |      | R    |      |      |
| 0.15%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      |      |      | G    |      |      |      |      |
| 0.15%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      |      |      |      |      | R    |      |      |
| 0.15%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      |      |      |      |      |      | V    |      |
| 0.14%  | 0.00%   | (G4S)3 |      |      |      |      |      |      | R    |      |      |
| 0.14%  | 0.00%   | (APS)2 |      |      |      |      | G    |      |      |      |      |
| 0.14%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      | V    |      |      |      |      |      |
| 0.14%  | 0.00%   | (G4S)3 |      |      |      |      |      |      |      | V    |      |
| 0.14%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      |      |      |      |      |      | A    |
| 0.14%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      |      | V    |      |      |      |      | A    |
| 0.13%  | 0.00%   | (APS)3 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 0.13%  | 0.00%   | (APS)3 |      |      |      |      |      | L    |      |      |      |
| 0.13%  | 0.00%   | (APS)2 |      |      |      |      |      |      | R    |      |      |
| 0.13%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      | R    |      |      |      |      |      |      |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      | M    |      |      |      |      |      |      |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      |      |      |      | F    |      |      |      |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)3 |      |      |      | V    |      |      |      |      |      |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      |      |      |      | N    |      |      |      |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)1 |      |      |      |      |      |      |      |      | A    |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)3 |      |      |      |      |      | N    |      |      |      |
| 0.12%  | 0.00%   | (G4S)3 |      |      |      |      |      |      |      |      | A    |
| 0.11%  | 0.00%   | (G4S)4 |      |      | A    |      |      |      |      |      |      |
| 0.11%  | 0.00%   | (G4S)4 |      |      | E    |      |      |      |      |      |      |
| 0.11%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      | E    |      |      |      |      |      |      |
| 0.10%  | 0.00%   | (G4S)2 |      |      | W    |      |      |      |      |      |      |

图37

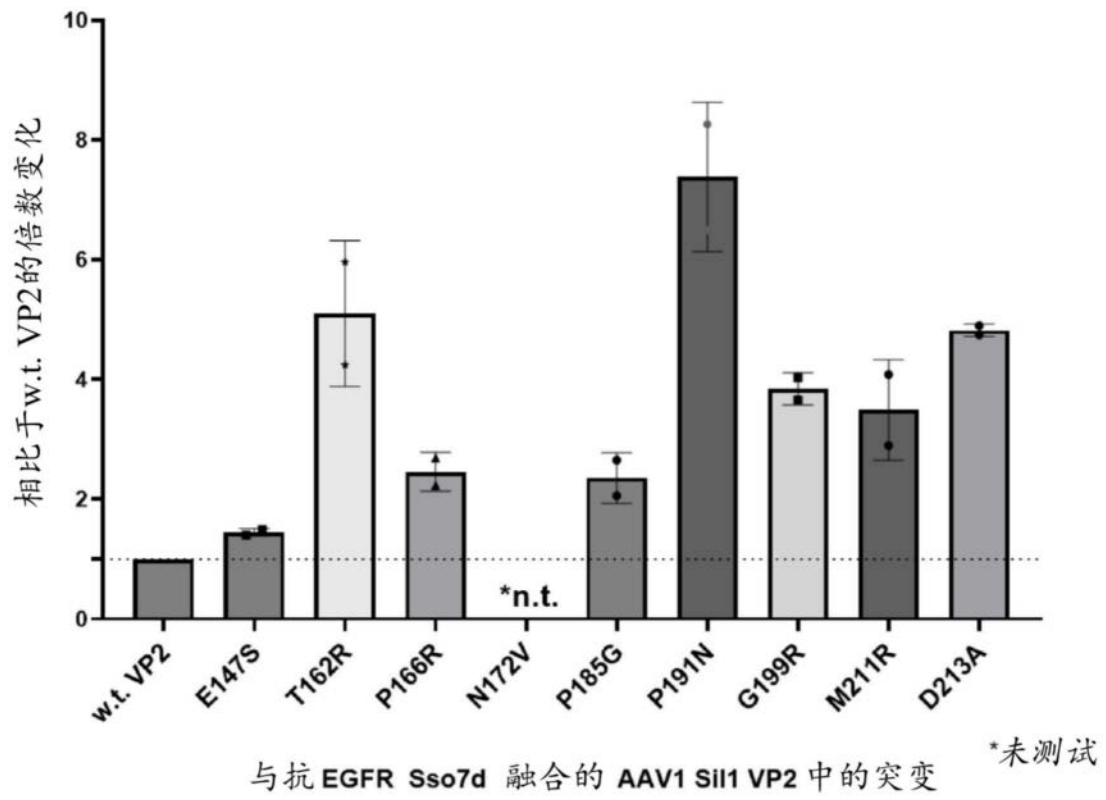
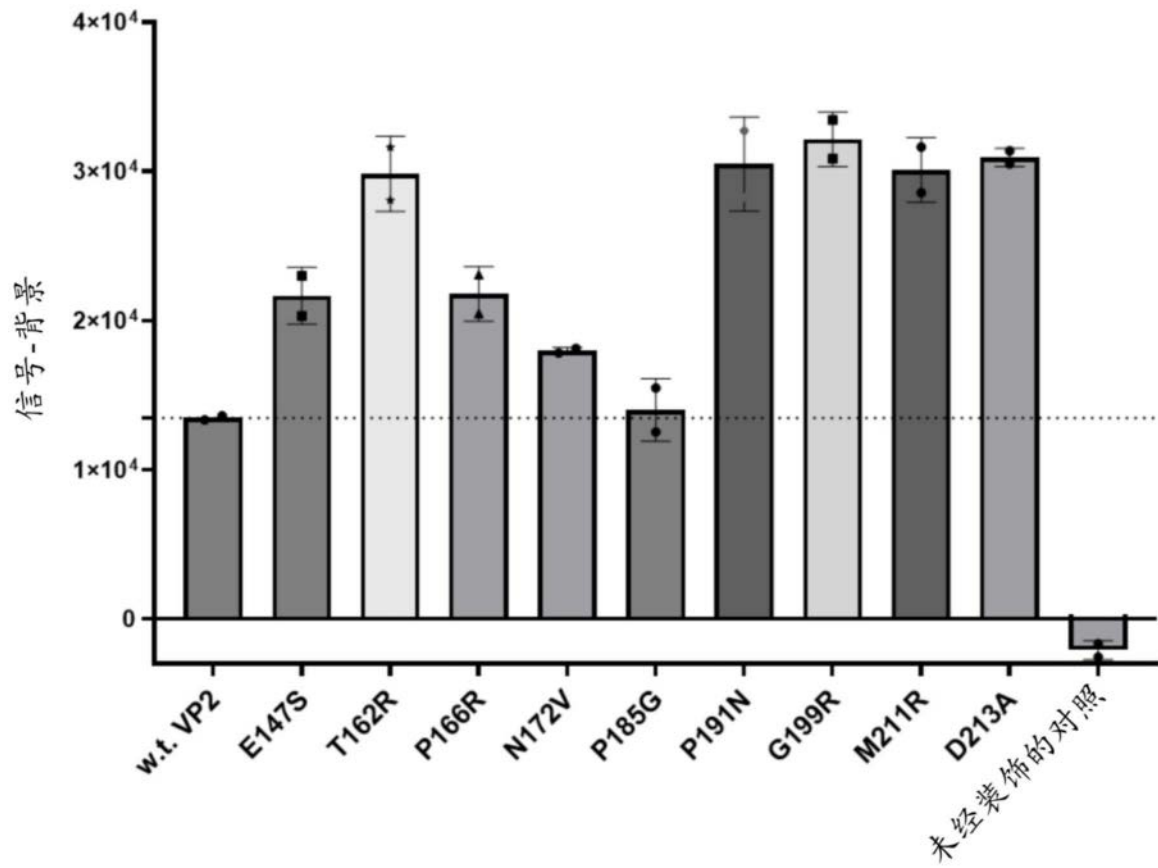


图38



与抗EGFR Sso7d融合的 AAV1 Si11 VP2 中的突变

图39

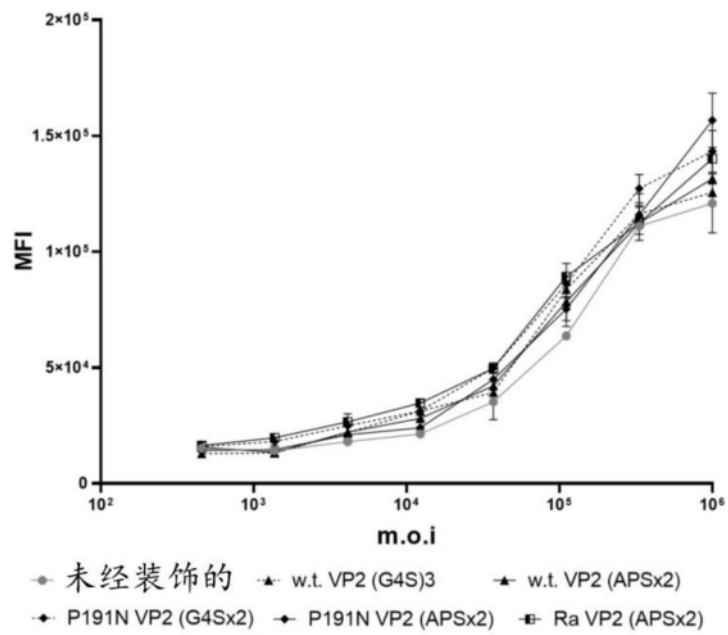


图40

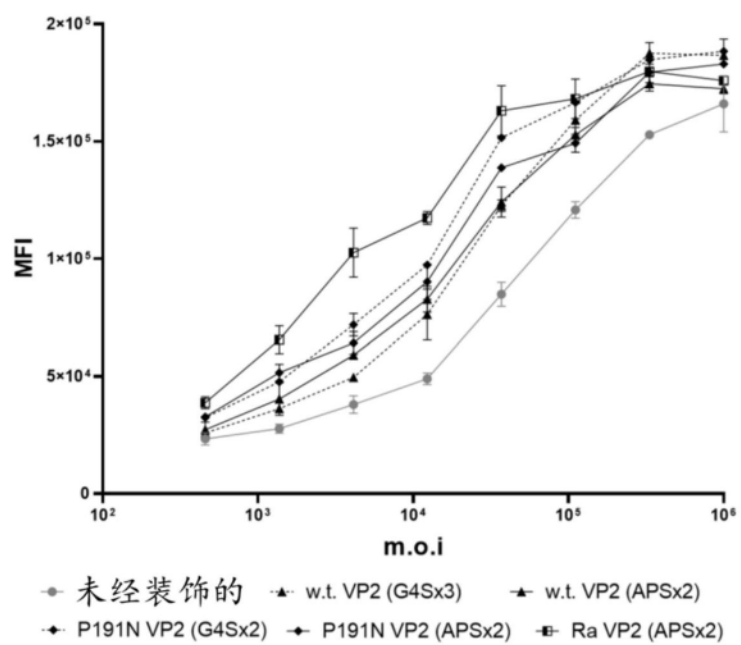


图41