



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118201643 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 14

(21) 申请号 202280073053.9

P · 萨迈

(22) 申请日 2022.11.04

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

(30) 优先权数据

专利代理师 吴瑜 顾云峰

63/275,731 2021.11.04 US

63/369,761 2022.07.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.04.30

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

PCT/US2022/079339 2022.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/081850 EN 2023.05.11

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 L · 萨宾 M · 斯特克 A · J · 莫菲

权利要求书5页 说明书80页

C · 基拉索斯 S · 莫勒-谭克

序列表 (电子公布) 附图33页

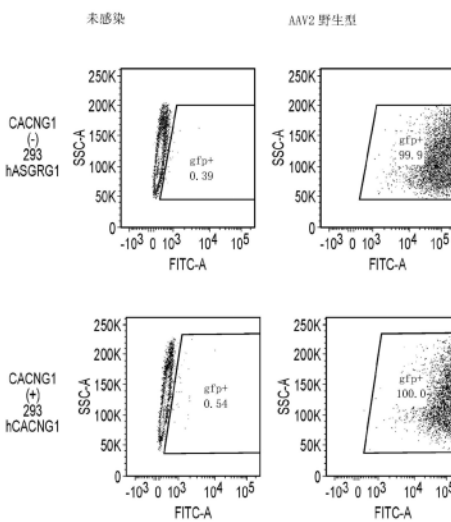
(54) 发明名称

重新靶向到骨骼肌的病毒颗粒

(57) 摘要

本文提供了使用肌特异性表面蛋白将病毒颗粒,例如腺相关病毒(AAV)颗粒重新靶向到肌细胞的组合物和方法。相应采用的AAV能够是用于治疗有需要的患者的骨骼肌相关病症(例如,X连锁肌管肌病(XLMTM)、杜氏肌营养不良(DMD)、肌强直性营养不良(DM1)、1型面肩肱型肌营养不良(FSHD)、1A型先天性肌营养不良(MDC1A)、肢带型肌营养不良、抗肌萎缩相关糖蛋白病等)的可行基因治疗平台。

A



1. 一种重组腺相关病毒 (AAV) 颗粒, 所述重组腺相关病毒颗粒包含:
 - (i) 经修饰的AAV衣壳蛋白, 和
 - (ii) 结合哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白的靶向配体,其中所述经修饰的AAV衣壳蛋白与所述靶向配体可操作地连接。
2. 如权利要求1所述的重组AAV颗粒, 其中:
 - (a) 所述经修饰的AAV衣壳蛋白包含蛋白质: 蛋白质结合对的第一成员和第二成员, 并且
 - (b) 所述蛋白质: 蛋白质结合对的所述第二成员包含结合所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白的所述靶向配体,其中所述蛋白质: 蛋白质结合对的所述第一成员和所述蛋白质: 蛋白质结合对的所述第二成员缔合以定向所述病毒颗粒对哺乳动物肌细胞的趋向性。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的重组AAV颗粒, 其中所述哺乳动物肌特异性表面蛋白是人肌细胞特异性表面蛋白。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述哺乳动物肌细胞是哺乳动物骨骼肌细胞。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的重组AAV颗粒, 所述重组AAV颗粒包含与在所述哺乳动物肌细胞的表面上表达的所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白结合的所述经修饰的AAV衣壳蛋白。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的重组AAV颗粒, 所述重组AAV颗粒包含与在所述哺乳动物肌细胞的所述表面上表达的所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白结合的所述经修饰的AAV衣壳蛋白,
 - 其中所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白是人肌细胞特异性表面蛋白, 并且
 - 其中所述哺乳动物肌细胞是经基因修饰以表达所述人肌细胞特异性表面蛋白的非人动物肌细胞。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的重组AAV颗粒, 所述重组AAV颗粒包含与所述哺乳动物肌特异性表面蛋白结合的所述AAV衣壳蛋白,
 - 其中所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白是人肌细胞特异性表面蛋白, 并且
 - 其中所述哺乳动物肌细胞是经基因修饰以表达所述人肌细胞特异性表面蛋白的啮齿动物肌细胞。
8. 如权利要求7所述的重组AAV颗粒, 其中所述啮齿动物肌细胞是大鼠肌细胞或小鼠肌细胞。
9. 如权利要求1至5中任一项所述的重组AAV颗粒, 所述重组AAV颗粒包含与所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白结合的所述AAV衣壳蛋白,
 - 其中所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白是人肌细胞特异性表面蛋白, 并且
 - 其中所述哺乳动物肌细胞是人肌细胞。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述重组AAV颗粒是体外的。
11. 如权利要求1至9中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述重组AAV颗粒是体内的。
12. 如权利要求1至11中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白是哺乳动物钙电压门控辅助亚基 $\gamma 1$ (CACNG1)。

13. 如权利要求12所述的重组AAV颗粒,其中所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白是人CACNG1。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的重组AAV颗粒,其中所述靶向配体包含分别与SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的重组AAV颗粒,其中:

(a) 所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员包含SpyTag、Isopeptag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003或其任何生物活性部分或变体,

(b) 所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第二成员包含

(i) SpyCatcher、KTag、pilin-C、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003或其任何生物活性部分或变体,和

(ii) 结合哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白的所述靶向配体,并且

(c) 所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员和所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第二成员通过异肽键连接。

16. 如权利要求15所述的重组AAV颗粒,其中:

(a) 所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员包含SpyTag或其任何生物活性部分或变体,并且

(b) 所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第二成员包含与结合所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白的所述靶向配体融合的SpyCatcher或其任何生物活性部分或变体。

17. 如权利要求2至16中任一项所述的重组AAV颗粒,所述重组AAV颗粒包含将所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员可操作地连接到所述病毒衣壳蛋白的第一和/或第二接头。

18. 如权利要求17所述的重组AAV颗粒,其中所述第一和第二接头不相同。

19. 如权利要求17所述的重组AAV颗粒,其中所述第一和第二接头是相同的。

20. 如权利要求17至19中任一项所述的重组AAV颗粒,其中所述第一接头的长度为10个氨基酸并且/或者所述第二接头的长度为10个氨基酸。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的重组AAV颗粒,其中所述经修饰的AAV衣壳蛋白包含经修饰的VP1衣壳蛋白、经修饰的VP2衣壳蛋白和/或经修饰的VP3衣壳蛋白,并且

其中所述经修饰的VP1衣壳蛋白、经修饰的VP2衣壳蛋白和/或经修饰的VP3衣壳蛋白包含蛋白质:蛋白质结合对的第一成员和/或所述靶向配体的插入,并且

并且其中包含蛋白质:蛋白质结合对的第一成员和/或所述靶向配体的所述插入的所述经修饰的VP1衣壳蛋白、经修饰的VP2衣壳蛋白和/或经修饰的VP3衣壳蛋白的一部分还包含与野生型AAV的对应衣壳蛋白具有至少90%同一性的氨基酸序列。

22. 如权利要求21所述的重组AAV颗粒,其中除了蛋白质:蛋白质结合对的第一成员和/或所述靶向配体的所述插入之外,所述经修饰的VP1衣壳蛋白、经修饰的VP2衣壳蛋白和/或经修饰的VP3衣壳蛋白还包含:

- (i) 氨基酸的取代、插入或缺失,
- (ii) 嵌合氨基酸序列, 或
- (iii) (i) 和 (ii) 的任何组合。

23. 如权利要求22所述的重组AAV颗粒, 其中氨基酸的所述取代、插入或缺失降低所述病毒颗粒的自然趋向性和/或产生可检测标记。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、表2中列出的非灵长类动物AAV以及其任何嵌合体组成的组。

25. 如权利要求1至24中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述AAV为AAV2。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述重组AAV颗粒包含经修饰的AAV2 VP1衣壳蛋白, 所述经修饰的AAV2VP1衣壳蛋白包含在氨基酸位置I-453和/或I-587处插入的蛋白质: 蛋白质结合对的第一成员, 并且任选地经由一侧或两侧上的接头连接到AAV序列。

27. 如权利要求26所述的重组AAV颗粒, 其中所述重组AAV颗粒包含经修饰的AAV2 VP1衣壳蛋白, 所述经修饰的AAV2 VP1衣壳蛋白包含任选地经由接头在位置G453处插入的所述蛋白质: 蛋白质结合对的所述第一成员,

任选地, 其中所述经修饰的AAV2 VP1衣壳蛋白还包含选自R585A、R588A、R484A、R487A、K532A及其任何组合的突变。

28. 如权利要求26或权利要求27所述的重组AAV颗粒或组合物, 其中所述重组AAV颗粒包含镶嵌AAV衣壳, 所述镶嵌AAV衣壳包含缺乏所述蛋白质: 蛋白质结合对的所述第一成员的第二组AAV2 VP1衣壳蛋白,

任选地, 其中所述第二组AAV2 VP1衣壳蛋白包含选自R585A、R588A、R484A、R487A、K532A及其任何组合的突变。

29. 如权利要求1至24中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述AAV为AAV9。

30. 如权利要求29所述的重组AAV颗粒, 其中所述病毒衣壳包含经修饰的AAV9 VP1衣壳蛋白, 所述经修饰的AAV9 VP1衣壳蛋白包含任选地经由接头在位置I-453或I-589处插入的特异性结合对的第一成员。

31. 如权利要求30所述的重组AAV颗粒, 其中所述重组AAV颗粒包含经修饰的AAV9 VP1衣壳蛋白, 所述经修饰的AAV9 VP1衣壳蛋白包含任选地经由接头在位置G453处插入的蛋白质: 蛋白质结合对的第一成员,

任选地, 其中所述经修饰的AAV9 VP1衣壳蛋白还包含选自N272A、W503A及其组合的突变。

32. 如权利要求30或权利要求31所述的重组AAV颗粒, 其中所述重组AAV颗粒是镶嵌病毒衣壳, 所述镶嵌病毒衣壳包含缺乏所述蛋白质: 蛋白质结合对的所述第一成员的第二组AAV9 VP1衣壳蛋白,

任选地, 其中所述第二组AAV9 VP1衣壳蛋白包含选自N272A、W503A及其组合的突变。

33. 如权利要求1至24中任一项所述的重组AAV颗粒, 其中所述AAV为禽类AAV (AAAV)、非灵长类哺乳动物AAV或有鳞类AAV。

34. 如权利要求33所述的重组病毒颗粒或组合物, 其中所述非灵长类动物AAV是AAAV。

35. 如权利要求34所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述病毒衣壳包含经修饰的AAAV VP1衣壳蛋白,所述经修饰的AAAV VP1衣壳蛋白包含任选地经由接头在位置I-444或I-580处插入的所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员。

36. 如权利要求33所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述非灵长类动物AAV是有鳞类AAV。

37. 如权利要求33所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述非灵长类动物AAV是鬃狮蜥AAV。

38. 如权利要求37所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述病毒衣壳包含经修饰的鬃狮蜥VP1衣壳蛋白,所述经修饰的鬃狮蜥VP1衣壳蛋白包含任选地经由接头在位置I573或I436处插入的所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员。

39. 如权利要求33所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述非灵长类动物AAV是非灵长类哺乳动物AAV。

40. 如权利要求39所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述非灵长类哺乳动物AAV是海狮AAV。

41. 如权利要求34所述的重组病毒颗粒或组合物,其中所述病毒衣壳包含经修饰的AAAV VP1衣壳蛋白,所述经修饰的AAAV VP1衣壳蛋白包含任选地经由接头在选自I429、I430、I431、I432、I433、I434、I436、I437和I565组成的组的位置处插入的所述蛋白质:蛋白质结合对的所述第一成员。

42. 如权利要求1至41中任一项所述的重组AAV颗粒,其中所述重组AAV颗粒是镶嵌病毒衣壳,任选地其中所述镶嵌病毒衣壳包含(i)第一多个参考衣壳蛋白,它们中的每一者都不与所述靶向配体缔合,和(ii)第二多个衣壳蛋白,它们中的每一者都与所述靶向配体缔合,任选地其中所述镶嵌AAV颗粒以1:7的比率包含所述第一多个参考衣壳蛋白和所述第二多个衣壳蛋白。

43. 如权利要求1至42中任一项所述的重组AAV颗粒,其中所述靶向配体是抗体或其一部分。

44. 如权利要求1至43中任一项所述的重组AAV颗粒,所述重组AAV颗粒还包含在所述病毒衣壳内衣壳化的所关注的核苷酸。

45. 如权利要求44所述的重组AAV颗粒,其中所述所关注的核苷酸是报告基因。

46. 如权利要求44或权利要求45所述的重组AAV颗粒,其中所述所关注的核苷酸编码 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)、MmGFP、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(eBFP)、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-Red、DsRed、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、黄色荧光蛋白(YFP)、增强型黄色荧光蛋白(eYFP)、Emerald、CyPet、青色荧光蛋白(CFP)、Cerulean、T-Sapphire、萤光素酶、碱性磷酸酶或其组合。

47. 如权利要求44所述的重组AAV颗粒,其中所述所关注的核苷酸编码治疗蛋白、自杀基因、抗体或其片段、CRISPR/Cas系统或其部分、反义寡核苷酸、核酶、RNAi分子或shRNA分子。

48. 一种药物组合物,所述药物组合物包含(a)如权利要求1至47中任一项所述的重组AAV颗粒和(b)药学上可接受的载体或赋形剂。

49. 一种将所关注的核苷酸递送到哺乳动物肌细胞的方法,所述方法包括使所述哺乳动物肌细胞与(a)如权利要求1至47中任一项所述的重组AAV颗粒或(b)如权利要求48所述的药物组合物接触,

其中所述肌细胞表达所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白。

50. 如权利要求49所述的方法,其中所述接触是离体进行的。

51. 如权利要求49所述的方法,其中所述接触在受试者中进行。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述受试者是灵长类动物,优选人。

53. 如权利要求49至51中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物肌细胞是哺乳动物骨骼肌细胞。

54. 如权利要求49至53中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白是CACNG1。

55. 如权利要求49至54中任一项所述的方法,其中所述所关注的核苷酸编码治疗蛋白、自杀基因、抗体或其片段、CRISPR/Cas系统或其部分、反义寡核苷酸、核酶、RNAi分子或shRNA分子。

56. 一种治疗有需要的受试者的肌肉萎缩或遗传性肌肉疾病的方法,所述方法包括向患者施用(a)如权利要求1至47中任一项所述的重组AAV颗粒或(b)如权利要求48所述的药物组合物,

其中所述病毒颗粒包含在所述病毒衣壳内衣壳化的所关注的核苷酸,并且

其中所述所关注的核苷酸编码治疗蛋白、自杀基因、抗体或其片段、CRISPR/Cas系统或其部分、反义寡核苷酸、核酶、RNAi分子或shRNA分子。

57. 如权利要求1至47中任一项所述的病毒颗粒或组合物或如权利要求48所述的药物组合物用于制备用于治疗肌肉萎缩或遗传性肌肉疾病的药物的用途。

58. 如权利要求56所述的方法或如权利要求57所述的用途,其中所述肌肉萎缩或遗传性肌肉疾病选自以下项组成的组:X连锁肌管肌病(XLMTM)、杜氏肌营养不良(DMD)、肌强直性营养不良(DM1)、1型面肩肱型肌营养不良(FSHD)、1A型先天性肌营养不良(MDC1A)、肢带型肌营养不良和抗肌萎缩相关糖蛋白病。

59. 如权利要求56至58中任一项所述的方法,其中向所述患者施用所述重组AAV颗粒或所述药物组合物不会导致肝酶(例如ALT、AST)或补体组分(例如Bb、C3a)的水平升高,所述水平比所述施用前所述肝酶或补体组分的对应水平高3倍以上,优选高1.5倍。

重新靶向到骨骼肌的病毒颗粒

技术领域

[0001] 本文的公开内容涉及制备和使用重组病毒颗粒(例如重组AAV颗粒)的方法,这些重组病毒颗粒包含重新靶向到肌特异性表面蛋白(例如钙电压门控辅助亚基 γ 1(CACNG1)或钙粘蛋白15(CAD15))的衣壳蛋白,可用于在体外或体内修饰肌肉细胞(诸如骨骼肌细胞)。

[0002] 序列表

[0003] 标题为“11074W001_xml”的xml格式的序列表创建于2022年11月4日,大小为252Kb,以引用的方式全文并入本文。

背景技术

[0004] 将基因递送至特定靶细胞中已成为用于潜在治疗多种慢性和遗传疾病的现代医学中最重要的技术之一。理想地,基因递送载体能够稳定地将遗传物质引入所需细胞中,并避免将遗传物质引入非靶细胞中。

[0005] 病毒颗粒,特别是基于腺相关病毒(AAV)的病毒颗粒,作为基因递送载体,已经成为许多研究的焦点,因为AAV能够在体内转导广泛的灵长类物种和组织,而没有毒性或致病性的证据。(Muzyczka等人(1992)《微生物学和免疫学的当前主题(Current Topics in Microbiology and Immunology)》,158:97-129)。此外,AAV安全地转导有丝分裂后组织。尽管病毒可能偶尔整合到宿主染色体中,但其很少会整合并且整合到人19号染色体中的安全港基因座中,而且只有当反式供应复制(Rep)蛋白时才会如此。AAV基因组在感染的细胞中快速循环和串联,且在感染的细胞中以稳定的游离型状态存在,以长期稳定地表达其有效负载。

[0006] 此外,近年来已经实现了将AAV感染操纵和重定向到特定细胞。使用病毒颗粒的靶向基因疗法的许多进展可以总结为病毒颗粒的非重组(非遗传)或重组(遗传)修饰,其导致病毒颗粒的自然趋向性的假型化、扩增和/或重新靶向。(综述于Nicklin和Baker(2002)《当前基因疗法(Curr. Gene Ther.)》2:273-93;Verheij和Rottier(2012)《病毒学发展(Advances Virol)》2012:1-15中)。

[0007] 在直接重组靶向方法中,靶向配体直接插入到病毒衣壳中或偶联到所述病毒衣壳,即,蛋白病毒衣壳基因被修饰以表达包括异源靶向配体的衣壳蛋白。靶向配体例如结合而不是重定向优先地或排他性地在靶细胞上表达的受体或标志物。(Stachler等人,(2006)《基因疗法(Gene Ther.)》.13:926-931;White等人,(2004)《循环(Circulation)》109:513-519;还参见Park等人,(2007)《生物科学前沿(Frontiers in Bioscience)》13:2653-59;Girod等人,(1999)《自然医学(Nature Medicine)》5:1052-56;Grifman等人,(2001)《分子疗法(Molecular Therapy)》3:964-75;Shi等人,(2001)《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》12:1697-1711;Shi和Bartlett,(2003)《分子疗法》7:515-525)。

[0008] 在间接重组方法中,将病毒衣壳用异源“支架”修饰,然后连接到包含靶向配体的衔接子。衔接子与支架和靶细胞结合。(Arnold等人,(2006)《分子疗法》5:125-132;

Ponnazhagenv等人, (2002)《病毒学杂志 (J.Virol)》.76:12900-907;还参见WO 97/05266) 支架,如(1)Fc结合分子(例如,Fc受体、蛋白质A等),所述Fc结合分子与抗体衔接子的Fc结合,(2)(链球菌)亲和素,所述(链球菌)亲和素与生物素化的衔接子结合,(3)生物素,所述生物素和与(链球菌)亲和素融合的衔接子结合,(4)可检测标记,所述可检测标记可用于检测和/或分离病毒颗粒,通过能够非共价结合可检测标记和靶分子的双特异性衔接子结合,以及最近地(5)蛋白质:蛋白质结合对,所述蛋白质:蛋白质结合对形成已被描述用于各种病毒颗粒的异肽键。(参见例如,Gigout等人, (2005)《分子疗法》11:856-865;Stachler等人, (2008)《分子疗法》16:1467-1473;Quetglas等人, (2010)《病毒研究 (Virus Research)》153:179-196;Ohno等人, (1997)《自然生物科技 (Nature Biotechnology)》15:763-767;Klimstra等人, (2005)《病毒学 (Virology)》338:9-21)。

[0009] 随着提供指导AAV感染的能力的进展,仍然需要发现将所关注的核酸特异性转移到所关注的细胞(例如哺乳动物肌细胞)的靶标。

发明内容

[0010] 本文显示,可以修饰AAV衣壳蛋白以允许将所关注的核苷酸靶向引入哺乳动物骨骼肌细胞中。

[0011] 由于本文所述的病毒衣壳或病毒衣壳蛋白包含结合肌细胞特异性表面蛋白的靶向配体,因此本文所述的病毒颗粒特别适合于将所关注的核苷酸特异性地靶向引入肌细胞中。在一些实施方案中,病毒衣壳或病毒衣壳蛋白包含结合对的第一成员,该第一成员与其结合对的同源第二成员结合,其中第二成员连接结合肌细胞特异性表面蛋白的靶向配体(例如,与该靶向配体融合)。在一些实施方案中,靶向配体任选地经由接头可操作地连接到第二成员,例如与第二成员融合。在一些实施方案中,靶向配体可以是结合部分,例如,天然配体、抗体、多特异性结合分子等。在一些实施方案中,靶向配体为抗体或其部分。在一些实施方案中,靶向配体是包含结合肌细胞上的肌特异性表面蛋白的可变结构域和重链恒定结构域的抗体。在一些实施方案中,靶向配体是包含结合靶细胞上的肌特异性表面蛋白的可变结构域和IgG重链恒定结构域的抗体。在一些实施方案中,靶向配体是包含结合靶细胞上的肌特异性表面蛋白的可变结构域和IgG重链恒定结构域的抗体,其中IgG重链恒定结构域例如经由接头可操作地连接到与第一成员形成异肽共价键的蛋白质(例如蛋白质:蛋白质结合对的第二成员)。在一些实施方案中,本文所述的衣壳蛋白包含第一成员和第二成员,该第一成员包含可操作地连接到病毒衣壳蛋白并共价连接到SpyTag的SpyTag,该第二成员包含连接到包含抗体可变结构域和IgG重链结构域的靶向配体的SpyCatcher,其中SpyCatcher和IgG重链结构域经由氨基酸接头,例如GSGESG (SEQ ID NO:253)连接。在一些实施方案中,肌特异性表面蛋白包含CACNG1。在一些实施方案中,靶向配体结合CACNG1,例如人CACNG1。在一些实施方案中,靶向配体包含含有SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组。

附图说明

[0012] 图1示出了将GFP递送到经基因修饰以表达ASGR1或CACNG1的293细胞系的基于AAV2的重新靶向病毒感染。(A)散点图是从流式细胞仪获得的,该流式细胞仪评估了在用AAV2 WT颗粒、AAV2 HBM脱靶突变颗粒、AAV2 SpyTag抗ASGR1颗粒或AAV2 SpyTag抗CACNG1颗粒感染后hASGR1表达阳性(+)的细胞的绿色荧光蛋白(GFP)表达。还示出了从流式细胞仪获得的散点图,该流式细胞仪评估了用AAV2 WT颗粒、AAV2 HBM脱靶突变颗粒、AAV2 SpyTag抗ASGR1颗粒或AAV2 SpyTag抗CACNG1颗粒感染后hCACNG1阳性(+)细胞的绿色荧光蛋白(GFP)表达。病毒表达作为转导标记的GFP。(B)该图定量了来自(A)中流式细胞图的GFP+细胞的百分比。

[0013] 图2示出了将GFP递送到经基因修饰以表达ASGR1或CACNG1的293细胞系的基于AAV9的重新靶向病毒感染。(A)散点图是从流式细胞仪获得的,该流式细胞仪评估了在用“AAV9 wt”颗粒、“AAV9脱靶突变”颗粒、“AAV9 SpyTag抗ASGR1”颗粒或“AAV9 SpyTag抗CACNG1”颗粒感染后hASGR1表达阳性(+)的细胞的绿色荧光蛋白(GFP)表达。还示出了从流式细胞仪获得的散点图,该流式细胞仪评估了用“AAV9 wt”颗粒、“AAV9脱靶突变”颗粒、“AAV9 SpyTag抗ASGR1”颗粒或“AAV9 SpyTag抗CACNG1”颗粒感染后hCACNG1阳性(+)细胞的绿色荧光蛋白(GFP)表达。病毒表达作为转导标记的GFP。(B)该图定量了来自2A中流式细胞图的GFP+细胞的百分比。

[0014] 图3示出了将萤光素酶递送至经基因修饰以表达ASGR1或CACNG1的293细胞系的基于AAV2和AAV9的重新靶向病毒感染(MOI 1×10^6)。(A)进行萤光素酶测定以评估用AAV2 WT、AAV2 HBM+抗hASGR1和AAV2 HBM+抗hCACNG1 mAb#1颗粒感染后hCACNG1阳性(+)的细胞的萤火虫萤光素酶表达。还示出了评估用AAV2 WT、AAV2 HBM+抗hASGR1和AAV2 HBM+抗hCACNG1 mAb#1颗粒感染后hASGR1阳性(+)的细胞的萤火虫萤光素酶表达的萤光素酶测定的结果。(B)进行萤光素酶测定以评估用AAV9 WT、AAV9 N272A、AAV9 N272A+抗hASGR1全抗体、AAV9 N272A+抗hASGR1 Fab、AAV9 N272A+抗CACNG1 mAb#1全抗体和AAV9 N272A+抗hCACNG1 mAb#1Fab感染后hCACNG1阳性(+)的细胞的萤火虫萤光素酶表达。还示出了评估用AAV9 WT、AAV9 N272A、AAV9 N272A+抗hASGR1全抗体、AAV9 N272A+抗hASGR1 Fab、AAV9 N272A+抗CACNG1 mAb#1全抗体和AAV9 N272A+抗hCACNG1 mAb#1Fab感染后hCACNG1阳性(+)的细胞的萤火虫萤光素酶表达的萤光素酶测定的结果。

[0015] 图4示出了人骨骼肌管的基于AAV2的重新靶向病毒转导。提供了(A)代表性免疫荧光图像和(B)在CAG启动子控制下,用 $2E+5vg$ /细胞的表达eGFP的指定AAV转导3天后,通过定量人骨骼肌管的肌球蛋白重链(MyHC)阳性区域中的平均GFP表达来评定的转导效率。通过定量肌球蛋白重链(MyHC)阳性肌管区域内的平均GFP荧光强度来评定转导效率。

[0016] 图5示出了人骨骼肌管的基于AAV9的重新靶向病毒转导。提供了(A)代表性免疫荧光图像和(B)在CAG启动子控制下,用 $2E+5vg$ /细胞的表达eGFP的指定AAV转导3天后,通过定量人骨骼肌管的肌球蛋白重链(MyHC)阳性区域中的平均GFP表达来评定的转导效率。

[0017] 图6示出了分化的小鼠C2C12肌管的基于AAV9的重新靶向病毒转导。(A)代表性免疫荧光图像和(B)通过定量在CAG启动子控制下用 $2E+5vg$ /细胞的表达eGFP的指定AAV转导3天的分化的小鼠C2C12肌管的肌球蛋白重链(MyHC)阳性区域中的平均GFP表达来评定的转导效率。

[0018] 图7示出了全身递送的重新靶向到CACNG1的AAV2证明了体内骨骼肌的抗体依赖性转导。这些图提供了来自(A)肝脏、(B)舌头、(C)膈肌或(D)股四头肌(quad)组织的发光图像的平均辐射值(光子/秒/cm²/sr),这些组织离体成像并从经基因修饰以在骨骼肌细胞上表达人CACNG1的小鼠(CACNG1人源化小鼠)和静脉注射磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)或5e11病毒基因组(vg)/动物的野生型(wt) AAV2颗粒、AAV2脱靶颗粒或SpyTagged AAV2颗粒的野生型50500小鼠中分离,这些颗粒携带有所关注的萤火虫萤光素酶核苷酸并被(1)SpyCatcher抗人ASGR1抗体或(2)SpyCatcher抗人CACNG1抗体修饰。这些AAV2病毒颗粒是由1:7比率的(a)“SpyTag”衣壳蛋白和(b)衣壳组成的镶嵌病毒颗粒,其中SpyTag直接插入残基G453之后,两侧各有10个氨基酸接头,该衣壳不含SpyTag但含有减少天然受体结合的R585A和R588A突变。病毒表达作为转导标记的萤火虫萤光素酶。IV注射后五周,使用异氟烷麻醉小鼠,注射萤光素底物,并在7-10分钟后实施安乐死。采集器官并使用IVIS光谱体内成像系统(PerkinElmer)成像。使用实时图像软件分析原始数据以确定平均辐射率(光子/秒/cm²/sr)。

[0019] 图8示出了系统性递送的重新靶向到CACNG1的AAV9证明了体内骨骼肌的抗体依赖性转导。这些图提供了来自(A)肝脏、(B)后肢、(C)股四头肌(quad)或(D)舌头组织的发光图像的平均辐射率值(光子/秒/cm²/sr),这些组织离体成像并从经基因修饰以表达人CACNG1的静脉注射磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)或5e10病毒基因组(vg)/动物的野生型(wt) AAV9颗粒、AAV9脱靶颗粒或SpyTagged AAV9颗粒的小鼠(CACNG1人源化小鼠)中分离,这些颗粒携带有所关注的萤火虫萤光素酶核苷酸并被(1)SpyCatcher抗人ASGR1全抗体、(2)SpyCatcher抗人ASGR1 Fab、(3)SpyCatcher抗人CACNG1 mAb#1全抗体或(4)SpyCatcher抗人CACNG1 mAb#1Fab修饰。这些AAV9病毒颗粒是由1:7比率的(a)“SpyTag”衣壳蛋白和(b)衣壳组成的镶嵌病毒颗粒,其中SpyTag直接插入残基G453之后,两侧都有10个氨基酸接头,该衣壳不含SpyTag,但含有减少天然受体结合的N272A突变。病毒表达作为转导标记的萤火虫萤光素酶。IV注射后三周,使用异氟烷麻醉小鼠,注射萤光素底物,并在7-10分钟后实施安乐死。采集以下器官用于离体成像:肝脏、后肢、股四头肌和舌头。使用IVIS光谱体内成像系统(PerkinElmer)对器官进行成像。使用实时图像软件分析原始数据以确定平均辐射率(光子/秒/cm²/sr)。

[0020] 图9显示了在尾静脉注射1E+11vg/小鼠的野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1(mAb#1和mAb#2)或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9后3周,在(A)CACNG1^{hu}/^{hu}、(B)WT C57BL/6和(C)D2-mdx小鼠的肝脏和股四头肌中的GFP基因表达分析。经由基于Taqman的qPCR测定对GFP表达进行定量,并将其归一化为Rp1p0作为内源性对照。对于每个组织/小鼠品系,相对于WT AAV9显示GFP mRNA表达。

[0021] 图10显示了在尾静脉注射1E+11vg/小鼠的野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1(mAb#1、mAb#2和mAb#3)或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9 N272A后3周,D2-mdx小鼠的胫骨前肌和腓肠肌/跖肌/比目鱼肌的代表性免疫荧光图像。注射WT AAV9、脱靶AAV9 N272A、与无关抗体(hASGR1)结合的AAV9以及与结合到人和猴CACNG1但不结合小鼠CACNG1的抗体(mAb#1)缀合的AAV9的D2-mdx小鼠在这些肌肉中显示出有限的GFP荧光,而注射与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#2和mAb#3)缀合的AAV9颗粒的小鼠在整个肌肉的肌纤维斑块中显示出强的GFP荧光。

[0022] 图11示出了在注射野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9 N272A后,D2-mdx小鼠的肝脏和股四头肌中eGFP表达的免疫组织化学染色。AAV9野生型颗粒可以转导D2-mdx小鼠的肝脏,而AAV9 N272A颗粒从肝脏脱靶并且在肝脏中不表达GFP。注射与无关抗体(hASGR1)缀合或与结合人和猴CACNG1但不结合小鼠CACNG1的靶向CACNG1的抗体(mAb#1)缀合的AAV9 N272A的D2-mdx小鼠在肝脏或股四头肌中显示非常少的染色。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#2和mAb#3)缀合的AAV9 N272A颗粒在肝脏中显示非常少的GFP染色,而在股四头肌中显示强的GFP染色。

[0023] 图12示出了在注射野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9 N272A后,D2-mdx小鼠的腓肠肌/跖肌/比目鱼肌中eGFP表达的免疫组织化学染色。AAV9野生型颗粒可以低水平转导D2-mdx小鼠的腓肠肌/跖肌/比目鱼肌,而AAV9 N272A颗粒以有限的效率转导腓肠肌/跖肌/比目鱼肌。注射与不相关抗体(hASGR1)缀合或与对不结合小鼠CACNG1的人CACNG1具有特异性的靶向CACNG1的抗体(mAb#1)缀合的AAV9 N272A的D2-mdx小鼠在腓肠肌/跖肌/比目鱼肌中显示非常少的染色。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#2和mAb#3)缀合的AAV9 N272A颗粒在腓肠肌/跖肌/比目鱼肌中显示非常强的GFP染色。

[0024] 图13示出了在注射野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9 N272A后,D2-mdx小鼠的胫骨前肌中eGFP表达的免疫组织化学染色。AAV9野生型颗粒可以低水平转导D2-mdx小鼠的胫骨前肌。单独注射AAV9 N272A颗粒或与无关抗体(hASGR1)缀合或与结合人和猴CACNG1但不结合小鼠CACNG1的靶向CACNG1的抗体(mAb#1)缀合的AAV9 N272A的D2-mdx小鼠在胫骨前肌中显示非常少的染色。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#2和mAb#3)缀合的AAV9 N272A颗粒在胫骨前肌周围显示非常强的GFP染色。

[0025] 图14示出了在注射野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9 N272A后,D2-mdx小鼠的心脏和舌头中eGFP表达的免疫组织化学染色。AAV9野生型颗粒可以低水平转导D2-mdx小鼠的舌头,但是可以有效转导心脏。单独注射AAV9 N272A颗粒或与无关抗体(hASGR1)缀合或与结合人和猴CACNG1但不结合小鼠CACNG1的靶向CACNG1的抗体(mAb#1)缀合的AAV9 N272A的D2-mdx小鼠在舌头中显示非常少的染色,且在心脏中显示低水平的染色。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#2和mAb#3)缀合的AAV9 N272A颗粒在舌头中显示非常强的GFP染色,且在心脏中显示低但可检测水平的染色。

[0026] 图15示出了在注射野生型AAV9、脱靶AAV9 N272A和与靶向CACNG1或hASGR1的抗体缀合作为非靶向对照的AAV9 N272A后,D2-mdx小鼠的脾脏和膈肌中eGFP表达的免疫组织化学染色。AAV9野生型颗粒可以低水平转导D2-mdx小鼠的膈肌。单独注射AAV9 N272A颗粒或与无关抗体(hASGR1)缀合或与结合人和猴CACNG1但不结合小鼠CACNG1的靶向CACNG1的抗体(mAb#1)缀合的AAV9 N272A的D2-mdx小鼠在膈肌中显示非常少的染色。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#2和mAb#3)缀合的AAV9 N272A颗粒在膈肌中显示非常强的GFP染色。正如预期的那样,用任何测试的AAV观察到非常少的脾脏转导。

[0027] 图16提供了单链(ss)病毒基因组的示意图(未按比例绘制),该基因组从5'到3'包含:141个碱基对的反向末端重复序列(ITR)、CAGG启动子、编码增强型绿色荧光蛋白(GFP)

的序列、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (WPPE)、32个碱基对的条形码、人 (h) 生长激素 (GH) 聚A尾和141个碱基对的ITR。

[0028] 图17提供了条形图,显示与包含图16中所示的病毒基因组的野生型AAV9病毒颗粒 (AAV) 相比,在施用包含图16中所示的病毒基因组的AAV9病毒颗粒后,非人类灵长类动物 (食蟹猴) 体内对各种肌肉的转导增强,每个病毒颗粒都具有独特的条形码,并用抗CACNG1抗体重新靶向。如图16所述,每个候选AAV包装有独特的条形码基因组。在IV给药12个候选条形码池之后,收集指定的组织,并使用下一代测序 (NGS) 评定从每个组织中纯化的总RNA中每个条形码的相对丰度。显示了映射到几个组织 (x轴) 中每个条形码和相关衣壳的NGS读数百分比 (Y轴): 肝脏 (左外叶) 和骨骼肌的子集 (膈肌、肱二头肌、股二头肌、趾长伸肌 (EDL)、腓肠肌、肋间肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腹横肌、三头肌、股外侧肌、腰肌、舌头); 归一化为注射的病毒池。此处显示的数据是研究中两只动物的平均值。如预期的那样,在肝脏中,单独的AAV9和与ASGR1 mAb缀合的AAV9 W503A或N272A代表了组织中存在的所有条形码的大多数。在骨骼肌组织中,与靶向CACNG1的抗体缀合的脱靶AAV9 (N272A或W503A) 衣壳代表了组织中存在的所有条形码的大多数,优于单独的AAV9,其占总条形码的一小部分。

[0029] 图18示出了使用表达uDys5的载体基因组构建体对人骨骼肌管和C2C12小鼠肌管进行的基于AAV9的重新靶向病毒转导。该图提供了在用 $2E+5$ vg/细胞的AAV9 WT或与在CK8启动子控制下表达uDys5的靶向CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的脱靶AAV9 (N272A) 转导3天后,通过定量 (A) 人肌管和 (B) C2C12小鼠肌管中的相对uDys5 mRNA表达而进行评定的转导效率。经由基于Taqman的qPCR测定对uDys5表达进行定量,并将其归一化为Hprt作为内源性对照。对于每种细胞类型,相对于WT AAV9显示uDys5 mRNA表达。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的AAV9 N272A颗粒相对于AAV9 WT在人和小鼠肌管中产生更高水平的uDys5 mRNA。

[0030] 图19显示了在尾静脉注射 $1E+12$ vg/小鼠的AAV9 WT或与在CK8启动子控制下表达uDys5的靶向CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的脱靶AAV9 (N272A) 后5周,D2-mdx小鼠的多个组织中的uDys5基因表达。经由基于Taqman的qPCR测定对uDys5 mRNA表达进行定量,并将其归一化为Rplp0作为内源性对照。对于每个组织,相对于WT AAV9显示uDys5 mRNA表达。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的AAV9 N272A颗粒如预期的那样相对于AAV9 WT显示出减少的肝脏转导,并且相对于AAV9 WT在肝脏中产生极低水平的uDys5 mRNA。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的AAV9 N272A颗粒相对于AAV9 WT在心脏中产生较低水平的uDys5 mRNA,但其水平是可检测的。与结合到人和小鼠CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的AAV9 N272A颗粒相对于AAV9 WT在所检查的所有骨骼肌中产生更高水平的uDys5mRNA。

[0031] 图20显示了在尾静脉注射 $1E+12$ vg/小鼠的野生型AAV9或与在CK8启动子控制下表达uDys5的靶向CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的脱靶AAV9 N272A颗粒后5周,野生型DBA2/J和D2-mdx小鼠的腓肠肌和心脏的代表性免疫荧光图像。注射WT AAV9的D2-mdx小鼠在腓肠肌的肌纤维膜处显示低水平的肌营养不良蛋白表达,并且在心脏中显示强表达,而注射与结合到人和小鼠CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的脱靶AAV9N272A颗粒的小鼠在腓肠肌的肌纤维膜处显示强的肌营养不良蛋白表达,并且在心脏中显示轻度表达。

[0032] 图21显示了在尾静脉注射 $1E+12$ vg/小鼠的野生型AAV9或与在CK8启动子控制下表达uDys5的靶向CACNG1的抗体 (mAb#3) 缀合的脱靶AAV9 N272A颗粒后5周,D2-mdx小鼠的股

四头肌中uDys5的蛋白质丰度。使用 β -肌动蛋白作为蛋白质负载对照,并对蛋白质丰度进行定量并绘制为任意密度测定单位(A.U.)。与注射野生型AAV9的小鼠相比,,注射与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的脱靶AAV9N272A颗粒的小鼠显示实质上更多的uDys5蛋白。

[0033] 图22显示了在尾静脉注射1E+12vg/小鼠的野生型AAV9或与在CK8启动子控制下表达uDys5的靶向CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的脱靶AAV9 N272A颗粒后4周,D2-mdx小鼠的血清肌酸激酶(CK)水平。经PBS治疗的和经野生型AAV9治疗的小鼠在治疗后没有显示血清CK降低,而用与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的脱靶AAV9 N272A颗粒治疗的所有小鼠都显示血清CK降低,表明肌肉损伤减少。

[0034] 图23显示了在尾静脉注射1E+12vg/小鼠的野生型AAV9或与在CK8启动子控制下表达uDys5的靶向CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的脱靶AAV9 N272A颗粒后12周,D2-mdx小鼠的的最大前肢握力测量结果。虚线代表年龄匹配的对照DBA/2J小鼠的握力。注射与结合到人和小鼠CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的AAV9 N272A颗粒的小鼠相对于注射WT AAV9颗粒的小鼠显示增强的最大握力。

[0035] 图24示出了在注射野生型AAV9或与在CAG启动子控制下表达eGFP的靶向CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的AAV9 N272A后,在指定时间点在非人灵长类动物(食蟹猴)中肝酶和补体路径生物标记物的血清水平。如所预期的,在给药后48小时,施用AAV9野生型颗粒导致(A) ALT、(B) AST、(C) Bb和(D) C3a升高,而施用与靶向CACNG1的抗体(mAb#3)缀合的AAV9 N272A没有导致这些标记物升高,这表明与靶向CACNG1的抗体缀合的肝脏脱靶AAV9 N272A颗粒提供了优于嗜肝野生型AAV血清型的安全性优势。

[0036] 在上述每个图中:

[0037] “WT”是指野生型,例如没有突变或修饰的AAV衣壳蛋白。

[0038] “HBM”是指包含R585A和R588A的衣壳蛋白。所有“参考”/“脱靶”AAV2衣壳蛋白,例如没有SpyTag修饰的AAV衣壳蛋白仅包含R585A和R588A。上述图中显示SpyTag与SpyCatcher融合抗体结合的所有AAV2衣壳蛋白还包含R484A、R487A、R585A、R588A和K532A突变。

[0039] “N272A”是指包含N272A突变的衣壳。在上述图中,所有“参考”/“脱靶”AAV9衣壳蛋白,例如没有SpyTag修饰的AAV9衣壳蛋白,都包含N272A突变。在上述图中,所有具有SpyTag修饰的AAV9衣壳蛋白还包含W503A突变,但不包含N272A突变。

[0040] 与AAV相关的“抗CACNG1”、“CACNG1”或“CACNG1 mAb”是指AAV病毒衣壳,其包含直接在残基G453之后插入的SpyTag肽,该残基两侧各有10个氨基酸接头,其中SpyTag肽通过异肽键与融合到特异性结合CACNG1的抗CACNG1抗体(或其Fab片段)的SpyCatcher结合。

[0041] 显示SpyTag肽通过异肽键与融合到特异性结合上述附图中的CACNG1的抗CACNG1抗体(或其Fab片段)的SpyCatcher结合的所有AAV颗粒均包含镶嵌病毒衣壳,该镶嵌病毒衣壳包含1:7比率的SpyTag修饰的病毒衣壳蛋白与“脱靶”病毒蛋白(表示为“1/8”)。

[0042] “CACNG1 mAb#1”是指结合人和猴CACNG1,但不结合小鼠CACNG1的抗CACNG1抗体。

[0043] “CACNG1 mAb#2”是指结合人、猴和小鼠CACNG1的抗CACNG1抗体。

[0044] “CACNG1 mAb#3”是指结合人、猴和小鼠CACNG1的抗CACNG1抗体。

[0045] “CACNG1 mAb#4”是指结合人、猴和小鼠CACNG1的抗CACNG1抗体。

- [0046] “CACNG1 mAb#5”是指结合人和猴但不结合小鼠CACNG1的抗CACNG1抗体。
- [0047] 与293细胞或小鼠相关的“CACNG1”分别指经基因修饰以表达人CACNG1的293细胞或小鼠。
- [0048] 包含用人Cacng1序列纯合替换的内源性Cacng1的小鼠被称为“CACNG1^{hu/hu}”。
- [0049] 与小鼠相关的“50500”是指CACNG1小鼠的品系匹配对照。
- [0050] 与AAV相关的“抗ASGR1”、“ASGR1”或“ASGR1 mAb”是指AAV病毒衣壳,其包含直接在残基G453之后插入的SpyTag肽,该残基两侧各有10个氨基酸接头,其中SpyTag肽通过异肽键与融合到特异性结合ASGR1的抗ASGR1抗体或其Fab片段的SpyCatcher结合。
- [0051] 显示SpyTag肽通过异肽键与融合到特异性结合上述附图中的ASGR1的抗ASGR1抗体(或其Fab片段)的SpyCatcher结合的所有AAV颗粒均包含镶嵌病毒衣壳,该镶嵌病毒衣壳包含1:7比率的SpyTag修饰的病毒衣壳蛋白与“脱靶”病毒衣壳蛋白(表示为“1/8”)。
- [0052] 与293细胞或小鼠相关的“ASGR1”分别指经基因修饰以表达人ASGR1的293细胞或小鼠。
- [0053] “h”是指“人类”
- [0054] “Vh”是指抗体重链
- [0055] “Vk”是指抗体轻链
- [0056] “D2-mdx”是指用于杜氏肌营养不良的小鼠模型

具体实施方式

- [0057] 骨骼肌是人体最大的器官,占全身重量的约40%。骨骼肌是人体三大重要肌肉组织之一。每块骨骼肌由成千上万条被结缔组织鞘包裹在一起的肌纤维组成。
- [0058] 骨骼肌的主要功能是经由其内在的兴奋-收缩耦联过程来实现的。当肌肉附着到骨骼肌腱时,肌肉的收缩导致骨骼的运动,从而允许执行特定运动。骨骼肌还提供结构支撑,并有助于维持身体的姿势。骨骼肌还充当氨基酸的储存源,这些氨基酸可被身体的不同器官用于合成器官特异性蛋白质。骨骼肌也以糖原的形式充当葡萄糖的储存源。骨骼肌在维持体温恒定方面也起着重要作用,并在饥饿期间充当能量来源。因此,骨骼肌在运动、体温调节和控制全身代谢中起着关键作用。
- [0059] 在许多肌肉疾病中以及在正常衰老期间,骨骼肌组织的大小和功能降低,导致功能性活动能力受损;并且在严重肌肉疾病的情况下,导致长期残疾和早期死亡。
- [0060] 肌肉萎缩和遗传性肌肉疾病的治疗通常包括广泛作用的疗法,诸如用于肌肉萎缩的睾酮疗法、用于肌营养不良的糖皮质激素以及用于治疗肌肉疾病(例如X连锁肌管肌病(XLMTM)、杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy) (DMD)、肌强直性营养不良(DM1)、1型面肩肱型肌营养不良(FSHD)、1A型先天性肌营养不良(MDC1A)、肢带型肌营养不良和抗肌萎缩相关糖蛋白病(dystroglycanopathy)等)的合成AAV递送。这些疗法的非靶向递送降低了特定肌肉摄取的效率,同时还对其他器官造成显著的有害脱靶效应。
- [0061] 为了增强治疗有效载荷的肌肉递送并减轻脱靶效应,本文描述了病毒颗粒,例如AAV病毒颗粒,该病毒颗粒靶向肌特异性表面蛋白,诸如钙电压门控辅助亚基 $\gamma 1$ (CACNG1)或哺乳动物钙粘蛋白15(CAD15)。
- [0062] 电压依赖性钙通道通常由五个亚基组成。由CACNG1基因编码的蛋白质代表这些亚

基之一。此外,由CACNG1基因编码的蛋白质 γ 是两种已知的 γ 亚基蛋白质之一。这种特殊的 γ 亚基是骨骼肌1,4-二氢吡啶敏感性钙通道的一部分,并且是一种在兴奋-收缩耦联中起作用的整合膜蛋白。该基因是PMP-22/EMP/MP20家族的功能多样的八成员蛋白质亚家族的一部分,并且与用作跨膜AMPA受体调节蛋白(TARP)的两个家族成员位于一个簇中。CACNG1在骨骼肌中高度特异性表达。编码人CACNG1(CACNG1)的基因位于17号染色体的长臂上。CACNG1包含4个外显子,并且长度为约12,244个碱基。人CACNG1基因的示例性序列被指定为NCBI登录号NM_000758.2(SEQ ID NO:241)。示例性人CACNG1蛋白被指定为UniProt登录号070578(SEQ ID NO:242)。

[0063] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

[0064] 除非上下文文明确地另外指明,否则单数形式“一”和“所述”包括复数个指代物。因此,例如提及“一种方法”包括本文所述类型的和/或在阅读本公开后对所属领域的技术人员将变得显而易见的一种或多种方法和/或一个或多个步骤。

[0065] 对于氨基酸或核苷酸序列,在蛋白质的全长或其一部分上,可以容易地确定“百分比(%)同一性”等。一部分的长度可以分别为至少约5个氨基酸或24个核苷酸,并且可以分别为至多约700个氨基酸或2100个核苷酸。通常,当提及两种不同的腺相关病毒之间的“同一性”、“同源性”或“类似性”时,参考“比对”序列来确定“同一性”、“同源性”或“类似性”。“比对”序列或“比对”是指与参考序列相比,通常含有对丢失的或另外的碱基或氨基酸的校正的多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列。

[0066] 可以使用多种公开或可商购获得的多序列比对程序中的任一种进行比对。序列比对程序可用于氨基酸序列,所述程序例如“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”“MEME”以及“Match-Box”程序。通常,这些程序中的任何程序以默认设置使用,尽管本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。可替代地,本领域技术人员可以利用另一种算法或计算机程序,所述算法或程序提供至少与通过参考算法和程序所提供的一样的水平的同一性或比对。参见例如J.D.Thomson等人,《核酸研究(Nucl.酸Res.)》,“多个序列比对的全面比较(A comprehensive comparison of multiple sequence alignments)”,27(13):2682-2690(1999)。

[0067] 多个序列比对程序也可用于核酸序列。此类程序的实例包含“Clustal W”、“CAP序列组装”、“MAP”和“MEME”,所述程序可通过因特网上的Web服务器进行访问。此类程序的其它来源是本领域技术人员已知的。可替代地,也使用了载体NTI实用程序。也存在本领域已知的可以用于测量核苷酸序列同一性的多种算法,包含上述程序中包含的那些。作为另一个实例,可以使用GCG 6.1版本的程序FASTATM比较多核苷酸序列。FastaTM提供了查询序列与搜索序列之间的最佳重叠区的比对和百分比序列同一性。例如,核酸序列之间的序列同一性百分比可以是使用如GCG 6.1版本中所提供的采用其默认参数(字号6和评分矩阵的NOPAM系数)的FASTATM所测定的,所述程序通过引用并入本文中。

[0068] “显著同一性”涵盖至少90%、例如至少93%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%或例如至少100%相同的氨基酸或核酸序列比对。

[0069] 术语“嵌合”包括分别包含来自至少两种不同AAV血清型的核酸序列或氨基酸序列的功能性基因或多肽,例如至少第一和第二AAV的基因或多肽的部分,其中至少第一和第二

部分可操作地连接以形成编码功能性氨基酸的功能性嵌合AAV核酸。除非被指定为嵌合的,否则核苷酸序列、基因、多肽和氨基酸被认为是非嵌合的,因为核苷酸序列、基因、多肽和氨基酸包含分别与单一AAV血清型的核酸序列或氨基酸序列具有显著同一性的核酸序列或氨基酸序列。

[0070] 术语“抗体”包含包括通过二硫键相互连接的四条多肽链(两条重链(H)和两条轻链(L))的免疫球蛋白分子。每条重链包括重链可变域(V_H)和重链恒定区(C_H)。重链恒定区包括至少三个域 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和任选地 CH_4 。每条轻链包括轻链可变域(C_L)和轻链恒定区(C_L)。重链和轻链可变域可以进一步细分成高变区,称为互补决定区(CDR),其间穿插有保守性更高的区域,称为构架区(FR)。每个重链和轻链可变域包含三个CDR和四个FR,其从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重链CDR可以缩写为HCDR1、HCDR2和HCDR3;轻链CDR可以缩写为LCDR1、LCDR2和LCDR3)。典型的四聚体抗体结构包括两个相同的抗原结合结构域,抗原结合域中的每一个由 V_H 和 V_L 结构域缔合形成,并且抗原结合域中的每一个与相应 C_H 和 C_L 结构域一起形成抗体Fv区。单结构域抗体包括单个抗原结合结构域,例如, V_H 或 V_L 。抗体的抗原结合结构域,例如,识别并结合到抗原的特异性结合对的第一成员的抗体的一部分也被称为“互补位”。其是抗体的Fv区的小区域(5个到10个氨基酸),片段抗原结合的一部分(Fab区),并且可以含有抗体的重链和/或轻链的一部分。当互补位以高亲和力结合特异性结合对的第一成员时,互补位特异性地结合特异性结合对的第一成员。术语“高亲和力”抗体是指相对于其特异性结合对的靶第一成员, K_D 为约 10^{-9} M或更低(例如,约 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M或约 1×10^{-12} M)的抗体。在一个实施方案中,通过表面等离子体共振,例如BIACORE™测量KD;在另一实施方案中,通过ELISA测量 K_D 。

[0071] 短语“互补决定区”或术语“CDR”包含由生物体的免疫球蛋白基因的核酸序列编码的氨基酸序列,其通常(即在野生型动物中)出现在免疫球蛋白分子(例如抗体或T细胞受体)的轻链或重链的可变区中的两个构架区之间。CDR可由例如种系序列或者重排或未重排序列,以及例如未处理或成熟的B细胞或T细胞编码。CDR可为体细胞突变的(例如,不同于动物的种系中编码的序列)、人源化的和/或用氨基酸取代、添加或缺失修饰的。在一些情况下(例如对于CDR3),CDR可由两个或更多个序列(例如,种系序列)编码,所述两个或更多个序列是不邻接的(例如,未重排的核酸序列中),但在B细胞核酸序列中是邻接的,例如由于剪接或连接序列(例如,V-D-J重组以形成重链CDR3)。

[0072] 短语“轻链”包含来自任何生物体的免疫球蛋白轻链序列,并且除非另有说明,否则包含人类k和l轻链和VpreB以及替代轻链。除非另外说明,否则轻链可变域通常包括三个轻链CDR和四个构架(FR)区。通常,全长轻链从氨基端到羧基端包括可变域和轻链恒定区,所述可变域包括FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。轻链可变域由轻链可变区基因序列编码,所述基因序列一般包括源自种系中存在的V和J区段储库的 V_L 和 J_L 区段。各种生物体的V和J轻链区段的序列、位置和命名法可见于IMGT数据库www.imgt.org中。轻链包含例如不选择性结合特异性结合对的第一或第二第一成员的那些,所述成员由它们在其中出现的特异性结合对结合蛋白的第一成员选择性结合。轻链还包含结合且识别特异性结合对的一个或多个第一成员,或帮助重链或另一轻链结合且识别所述一个或多个第一成员的那些,所述一个或多个第一成员由它们在其中出现的特异性结合对结合蛋白的第一成员选择性结合。常用或通用的轻链包含衍生自人类Vk1-39Jk基因或人类Vk3-20Jk基因的那些,且包含其体

细胞突变的(例如亲和力成熟的)型式。示例性的人 V_L 片段包括人 V_{k1} -39基因区段、人 V_{k3} -20基因区段、人 V_{l1} -40基因区段、人 V_{l1} -44基因区段、人 V_{l2} -8基因区段、人 V_{l2} -14基因区段和人 V_{l3} -21基因区段,并且包括其体细胞突变的(例如亲和力成熟的)型式。可制备包括来自一种生物体(例如人类或啮齿类动物,例如大鼠或小鼠;或禽类,例如鸡)的可变域和来自相同或不同生物体(例如人类或啮齿类动物,例如大鼠或小鼠;或禽类,例如鸡)的恒定区的轻链。

[0073] 术语“约”或“大致”包含在值的统计上有意义的范围内。此类范围可在一定数量级内,优选在给定值或范围的50%内,更优选在20%内,更优选在10%内,且更优选在5%内。术语“约”或“大致”涵盖的可允许的变化取决于研究的特定系统,并且所属领域的普通技术人员可容易地理解。

[0074] 短语“重链”或“免疫球蛋白重链”包含来自任何生物体的免疫球蛋白重链序列,包含免疫球蛋白重链恒定区序列。除非另外说明,否则重链可变结构域包括三个重链CDR和四个FR区。重链的片段包括CDR、CDR和FR以及其组合。典型重链在可变域之后具有(从N端到C端) C_H1 结构域、铰链、 C_H2 结构域和 C_H3 结构域。重链的功能片段包含能够特异性识别特异性结合对的第一成员(例如以微摩尔、纳摩尔或皮摩尔范围内的 K_D 识别特异性结合对的第一成员),即能够由细胞表达和分泌,且包括至少一个CDR的片段。重链可变结构域由可变区核苷酸序列编码,所述可变区核苷酸序列通常包括源自存在于种系中的 V_H 、 D_H 和 J_H 区段库的 V_H 、 D_H 和 J_H 区段。用于各种生物体的V、D和J重链区段的序列、位置和命名法可在IMGT数据库中找到,所述数据库可通过万维网(www)上的因特网以URL“imgt.org”访问。

[0075] 术语“仅重链的抗体”、“仅重链的抗原结合蛋白”、“单域抗原结合蛋白”、“单域结合蛋白”等是指包括免疫球蛋白样链的单体或同型二聚免疫球蛋白分子,所述免疫球蛋白样链包括可操作地连接于重链恒定区的可变域,重链恒定区不能与轻链结合,因为其通常缺乏功能性 C_H1 域。因此,术语“仅重链的抗体”、“仅重链的抗原结合蛋白”、“单域抗原结合蛋白”、“单域结合蛋白”等涵盖(i)包括免疫球蛋白样链中的一条的单体单域抗原结合蛋白,所述免疫球蛋白样链包括可操作地连接于缺少功能性 C_H1 域的重链恒定区的可变域,或(ii)包括两条免疫球蛋白样链的同型二聚单域抗原结合蛋白,每条免疫球蛋白样链包括可操作地连接于缺少功能性 C_H1 域的重链恒定区的可变域。在各种方面中,同型二聚单域抗原结合蛋白包括两条相同的免疫球蛋白样链,每条免疫球蛋白样链包括可操作地连接于缺少功能性 C_H1 域的相同重链恒定区的相同可变域。另外,单结构域抗原结合蛋白的每条免疫球蛋白样链包括可变结构域,所述可变结构域可以源自重链可变区基因区段(例如, V_H 、 D_H 、 J_H)、轻链基因区段(例如, V_L 、 J_L)或其组合,连接到重链恒定区(C_H)基因序列,所述CH基因序列包括重链恒定区基因的 C_H1 编码序列(和任选地铰链区)中的缺失或失活性突变,例如,IgG、IgA、IgE、IgD或其组合。包括衍生自重链基因区段的可变域的单域抗原结合蛋白可称为“ V_H 单域抗体”或“ V_H 单域抗原结合蛋白”,参见例如美国专利第8,754,287号;美国专利公开案第20140289876号;第20150197553号;第20150197554号;第20150197555号;第20150196015号;第20150197556号;和第20150197557号,其中的每一个以全文引用的方式并入。包括衍生自轻链基因区段的可变域的单域抗原结合蛋白可称为或“ V_L 单域抗原结合蛋白”,参见例如以全文引用的方式并入的美国公开案第20150289489号。

[0076] 短语“轻链”包含来自任何生物体的免疫球蛋白轻链序列,且除非另有说明,否则

包含人类kappa (κ) 和lambda (λ) 轻链和VpreB以及替代轻链。除非另外说明, 否则轻链可变域通常包括三个轻链CDR和四个构架 (FR) 区。一般地, 全长轻链从氨基末端到羧基末端包括可变结构域和轻链恒定区, 所述可变结构域包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4和轻链恒定区氨基酸序列。轻链可变结构域由轻链可变区核苷酸序列编码, 所述轻链可变区核苷酸序列一般包含源自种系中存在的轻链V和J基因区段储库的轻链V_L和轻链J_L基因区段。用于各种生物体的轻链V和J基因区段的序列、位置和命名法可在IMGT数据库中找到, 所述数据库可通过万维网 (www) 上的因特网以URL “imgt.org” 访问。轻链包含例如不选择性结合特异性结合对的第一或第二第一成员的那些, 所述成员由它们在其中出现的特异性结合对结合蛋白的第一成员选择性结合。轻链还包含结合且识别特异性结合对的一个或多个第一成员, 或帮助重链结合且识别所述一个或多个第一成员的那些, 所述一个或多个第一成员由它们在其中出现的特异性结合对结合蛋白的第一成员选择性结合。轻链还包含结合且识别特异性结合对的一个或多个第一成员, 或帮助重链结合且识别所述一个或多个第一成员的那些, 所述一个或多个第一成员由它们在其中出现的特异性结合对结合蛋白的第一成员选择性结合。常用或通用的轻链包含衍生自人类Vk1-39Jk5基因或人类Vk3-20Jk1基因的那些, 且包含其体细胞突变的 (例如亲和力成熟的) 型式。

[0077] 如本文所用的短语“可操作地连接”包含组分或元件的物理并列 (例如在三维空间中), 所述组分或元件彼此直接或间接相互作用, 或以其它方式彼此协调以参与生物事件, 所述并列实现或准许此类相互作用和/或协调。仅举一个例子, 当核酸中的调控元件 (例如, 表达控制序列) 相对于编码序列定位, 使得其存在或缺失影响编码序列的表达和/或活性时, 该调控元件被称为“可操作地连接”到编码序列。在许多实施方案中, “可操作连接”涉及相关组分或元件彼此共价连接。所属领域的技术人员将易于了解, 在一些实施方案中, 实现有效的可操作连接不需要共价连接。例如, 可操作地连接在一起的蛋白质可以例如经由共价键或非共价键彼此缔合。作为非限制性实例, 如本文所述的衣壳蛋白可以可操作地连接到靶向配体, 其中衣壳蛋白非共价结合到靶向配体, 或者共价结合到靶向配体, 任选地在衣壳蛋白和靶向配体之间具有或不具有支架和/或衔接子。作为另一个实例, 在一些实施方案中, 与其控制的编码序列可操作地连接的核酸调控元件与所关注的核苷酸邻接。另选地或附加地, 在一些实施方案中, 一个或多个此类调控元件以反式或一定距离起作用以控制所关注的编码序列。在一些实施方案中, 本文所用的术语“调节元件”是指对于实现与其连接的编码序列的表达和加工是必要的和/或充分的多核苷酸序列。在一些实施方案中, 调控元件可以是或包含合适的转录起始、终止、启动子和/或增强子序列; 有效的RNA加工信号, 诸如剪接和聚腺苷酸化信号; 稳定细胞质mRNA的序列; 增强翻译效率的序列 (例如, Kozak共有序列); 增强蛋白质稳定性的序列; 和/或在一些实施方案中, 增强蛋白质分泌的序列。在一些实施方案中, 一个或多个调控元件在特定宿主细胞或生物体或其类型中优先或排他地具有活性。仅举一个例子, 在原核生物中, 调控元件通常可包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列; 在真核生物中, 在许多实施方案中, 调控元件通常可包括启动子、增强子和/或转录终止序列。本领域普通技术人员将从上下文中理解, 在许多实施方案中, 术语“调控元件”是指其存在对于表达和加工至关重要的组分, 并且在一些实施方案中包括其存在有利于表达的组分 (包括例如前导序列、靶向序列和/或融合配偶体序列)。

[0078] “重新靶向”或“重定向”可以包含这样一种情况, 其中野生型颗粒靶向组织内的若

干个细胞和/或生物体内的若干个器官,并且通过插入异源氨基酸来减少或消除对组织或器官的通常靶向,并且通过与由特定细胞表达的标志物结合的靶向配体(例如,通过靶向配体)结合来实现对组织中的更多特定细胞或生物体中的特定器官的重新靶向。此类重新靶向或重定向还可以包含这样一种情况,其中野生型颗粒靶向组织,并且通过插入异源氨基酸来减少或消除组织的靶向,并且用靶向配体实现对完全不同的组织的重新靶向。

[0079] “特异性结合对”、“结合对”、“蛋白质:蛋白质结合对”等包括两个成员(例如第一成员(例如第一多肽)和第二同源成员(例如第二多肽)),它们相互作用形成键(例如,第一成员表位和识别该表位的抗体的第二成员抗原结合部分之间的非共价键;例如能够形成异肽键的蛋白质之间的共价键;通过蛋白质反式剪接的过程、介导侧翼蛋白质的连接和其自身去除来相互识别的分裂内含肽)。在一些实施方案中,术语“同源”是指共同起作用的组分。表位及其同源抗体,特别是也可以充当可检测标记(例如,c-myc)的表位在本领域是众所周知的。能够相互作用以形成共价异肽键的特定蛋白质:蛋白质结合对综述于Veggiani等人,(2014)《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》32:506中,并包括肽:肽结合对,诸如SpyTag:SpyCatcher、SpyTag002:SpyCatcher002;SpyTag:KTag;isopeptag:pilin C、SnoopTag:SnoopCatcher等及其变体,例如SpyTag003:SpyCatcher003。通常,蛋白质:蛋白质结合对的第一成员是指蛋白质:蛋白质结合对的成员,其长度通常小于30个氨基酸,并且其与第二同源蛋白质形成自发的共价异肽键,其中第二同源蛋白质通常较大,但其长度也可以小于30个氨基酸,诸如在SpyTag:KTag系统中。

[0080] 术语“异肽键”是指羧基或甲酰胺基与氨基之间的酰胺键,所述基团中的至少一个不衍生自蛋白质主链,或另一种观点,不是蛋白质主链的一部分。异肽键可形成于单一蛋白质内或可出现于两个肽或肽与蛋白质之间。因此,异肽键可分子内地形成于单一蛋白质内,或分子间,即形成于两个肽/蛋白质分子之间,例如两个肽接头之间。通常,异肽键可出现于赖氨酸残基与天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基或蛋白质或肽链的末端羧基之间,或可出现于蛋白质或肽链的 α -氨基末端与天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸之间。异肽键中涉及的对的每个残基在本文中称为反应性残基。在本发明的优选实施方案中,异肽键可形成于赖氨酸残基与天冬酰胺残基之间或赖氨酸残基与天冬氨酸残基之间。确切地说,异肽键可出现于赖氨酸的侧链胺与天冬酰胺的甲酰胺基或天冬氨酸的羧基之间。

[0081] SpyTag:SpyCatcher系统描述于美国专利第9,547,003号中,以及Zaveri等人,(2012)《美国国家科学院院刊(PNAS)》109:E690-E697,其中的每一个以全文引用的方式并入本文中,且衍生自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)纤连蛋白结合蛋白FbaB的CnaB2域。通过分割该结构域,Zakeri等人获得了具有序列AHIVMVDAYKPTK(SEQ ID NO:243)的肽“SpyTag”,该肽与其同源蛋白“SpyCatcher”形成酰胺键,该同源蛋白是具有SEQ ID NO:244中所示的氨基酸序列的112个氨基酸的多肽。(Zakeri (2012), 前述)。衍生自CnaB2域的另一特异性结合对为SpyTag:KTag,其在SpyLigase存在下形成异肽键。(Fierer (2014) PNAS 111:E1176-1181) SpyLigase是通过从SpyCatcher切除含有反应性赖氨酸的 β 链而工程化的,从而产生KTag,即具有氨基酸序列ATHIKFSKRD(SEQ ID NO:245)的蛋白质:蛋白质结合对的10个残基的第一成员。SpyTag002:SpyCatcher002系统描述于Keeble等人(2017)《应用化学国际英文版(Angew Chem Int Ed Engl)》56:16521-25中,其以全文引用的方式并入本文中。SpyTag002具有SEQ ID NO:255所示的氨基酸序列VPTIVMVDAYKRYK,并结合

SpyCatcher002.SpyTag003具有SEQ ID NO:259所示的氨基酸序列RGVPHIVMVDAYKRYK,并结合SpyCatcher003。

[0082] SnoopTag:SnoopCatcher系统描述于Veggiani (2016)《美国国家科学院院刊》113:1202-07中。RrgA的D4 Ig样结构域,来自肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的粘附物,被分割以形成SnoopTag (残基734-745) 和SnoopCatcher (残基749-860)。培育SnoopTag和SnoopCatcher产生在互补蛋白之间具有特异性的自发异肽键。Veggiani (2016)), 前述。

[0083] isopeptag:pilin-C特异性结合对衍生自来自酿脓链球菌的主要菌毛蛋白蛋白Spy0128。(Zakeir和Howarth (2010)《美国化学学会杂志 (J. Am. Chem. Soc.) 》132:4526-27)。异肽标签具有SEQ ID NO:254所示的氨基酸序列TDKDMTITFTNKKDAE,并结合菌毛蛋白-C (Spy0128的残基18-299)。培育SnoopTag和SnoopCatcher产生在互补蛋白之间具有特异性的自发异肽键。Zakeir和Howarth (2010), 前述。

[0084] 术语“可检测标记”包含作为特异性结合对的成员的多肽序列,例如,其通过非共价键以高亲和力与另一多肽序列例如抗体互补位特异性结合。示例性且非限制性的可检测标记包括六聚组氨酸标签、FLAG标签、Strep II标签、链霉亲和素结合肽 (SBP) 标签、钙调素结合肽 (CBP)、谷胱甘肽S-转移酶 (GST)、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、S-标签、HA标签和来自c-myc的myc标签 (SEQ ID NO:246)。(在Zhao等人 (2013) J. Analytical Meth. Chem. 1-8; 中综述; 所述参考文献以引用的方式并入本文)。灵长类动物AAV的常见可检测标记是B1表位 (SEQ ID NO:247)。本文所述的天然不包含B1表位的一些AAV衣壳蛋白可在本文中进行修饰以包含B1表位。通常,本文所述的AAV衣壳蛋白可包含与衣壳蛋白的最后10个氨基酸内的B1表位具有基本同源性的序列。因此,在一些实施方案中,本发明的非灵长类动物AAV衣壳蛋白可以用衣壳蛋白的最后10个氨基酸内的一个但少于五个点突变进行修饰,使得AAV衣壳蛋白包括B1表位。

[0085] 术语“靶细胞”包含在其中期望所关注的核苷酸的表达的任何细胞。优选地,靶细胞在其表面上展现允许细胞经靶向配体靶向的受体,如下所述。

[0086] 术语“转导”或“感染”等是指通过病毒颗粒将核酸引入到靶细胞核中。与转导等相关的术语效率例如“转导效率”是指在与包括所关注核苷酸的一定数量的病毒颗粒温育后表达所关注核苷酸的细胞的分数的分数 (例如,百分比)。众所周知的测定转导效率的方法包含用荧光报告基因转导的细胞的流式细胞术、用于表达所关注核苷酸的RT-PCR等。

[0087] 一般而言,“参考”病毒衣壳蛋白/衣壳/颗粒与测试病毒衣壳蛋白/衣壳/颗粒相同,但其效果的变化有待测试。例如,为了确定将特异性结合对的第一成员插入到测试病毒颗粒中例如对转导效率的影响,可以将测试病毒颗粒的转导效率 (在不存在或存在适当的靶向配体的情况下) 与参考病毒颗粒的转导效率 (如果需要的话,在不存在或存在适当的靶向配体的情况下) 进行比较,所述参考病毒颗粒的转导效率在除了存在特异性结合对的第一成员之外的每种情况下 (例如,另外的点突变、所关注核苷酸、病毒颗粒和靶细胞的数量等) 均与测试病毒颗粒的转导效率相同。在一些实施方案中,参考病毒衣壳蛋白是能够与第二病毒衣壳蛋白形成衣壳的参考病毒衣壳蛋白,所述第二病毒衣壳蛋白被修饰以至少包括蛋白质:蛋白质结合对的第一成员,其中所述参考病毒衣壳蛋白不包括蛋白质:蛋白质结合对的第一成员,优选地其中由参考病毒衣壳蛋白和经修饰的病毒衣壳蛋白形成的衣壳是镶嵌衣壳。

[0088] 腺相关病毒 (AAV)

[0089] “AAV”是腺相关病毒的缩写,并且可以用于指病毒本身或其衍生物。AAV为小的、无包膜的单链DNA病毒。一般而言,野生型AAV基因组为4.7kb,并且其特征在于两个反向末端重复序列 (ITR) 和两个开放阅读框 (ORF)、rep和cap。野生型rep阅读框对分子量78kD (“Rep78”)、68kD (“Rep68”)、52kD (“Rep52”)和40kD (“Rep 40”)的四种蛋白质进行编码。Rep78和Rep68由p5启动子转录,并且Rep52和Rep40由p19启动子转录。这些蛋白质主要用于调节AAV基因组的转录和复制。野生型cap阅读框对分子量为83-85kD (VP1)、72-73kD (VP2)和61-62kD (VP3)的三种结构(衣壳)病毒蛋白 (VP) 进行编码。AAV病毒粒子(衣壳)中80%以上的总蛋白包括VP3;在成熟的病毒粒子中发现VP1、VP2和VP3的相对丰度为约1:1:10,尽管已经报道比率为1:1:8。Padron等人,(2005)《病毒学杂志》79:5047-58。

[0090] 各种血清型AAV的基因组序列以及天然反向末端重复序列 (ITR)、Rep蛋白和衣壳亚基序列是本领域已知的。这种序列可以在文献或如GenBank等公共数据库中找到。参见例如,GenBank登录号NC_002077 (AAV1)、AF063497 (AAV1)、NC001401 (AAV-2)、AF043303 (AAV2)、NC_001729 (AAV3)、NC_001829 (AAV4)、U89790 (AAV4)、NC_006152 (AAV5)、AF513851 (AAV7)、AF513852 (AAV8)和NC_006261 (AAV8);所述文献的公开内容通过引用并入本文中以教导AAV核酸和氨基酸序列。参见例如,Srivistava等人,(1983)《病毒学杂志》45:555;Chiorini等人,(1998)《病毒学杂志》71:6823;Chiorini等人,(1999)《病毒学杂志》73:1309;Bantel-Schaal等人,(1999)《病毒学杂志》73:939;Xiao等人,(1999)《病毒学杂志》73:3994;Muramatsu等人,(1996)《病毒学 (Virology)》221:208;Shade等人,(1986)《病毒学杂志》58:921;Gao等人,(2002)《美国国家科学院院刊 (Proc. Nat. 科学院科学院院刊)》99:11854;Moris等人,(2004)《病毒学》33:375-383;美国专利公开20170130245;国际专利公开WO 00/28061、WO 99/61601和WO 98/11244;以及美国专利第6,156,303号,所述文献中的每个文献以全文引用的方式并入本文中。本文表2提供了各种非灵长类动物AAV的序列。

[0091] “AAV”包括所有亚型以及本领域众所周知的天然存在和修饰的形式。AAV包括灵长类动物AAV (例如,AAV 1型 (AAV1)、灵长类动物AAV 2型 (AAV2)、灵长类动物AAV 3型 (AAV3B)、灵长类动物AAV 4型 (AAV4)、灵长类动物AAV 5型 (AAV5)、灵长类动物AAV 6型 (AAV6)、灵长类动物AAV 7型 (AAV7)、灵长类动物AAV 8型 (AAV8)、灵长类动物AAV 9型 (AAV9)、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVDJ、Anc80L65、AAV2G9、AAV-LK03、灵长类动物AAV rh10型 (AAV rh10)、AAV h10型 (AAV h10)、AAV hu11型 (AAV hu11)、AAV rh32.33型 (AAV rh32.33)、AAV retro (AAV retro)、AAV PHP.B, AAV PHP.eB, AAV PHP.S, AAV2/8等;非灵长类动物AAV (例如禽类AAV (AAAV)) 和其他非灵长类动物AAV,诸如哺乳动物AAV (例如,蝙蝠AAV、海狮AAV、牛AAV、犬AAV、马AAA、山羊AAV和绵羊AAV等)、有鳞类AAV (例如,蛇AAV和鬃狮蜥AAV)等。“灵长类动物AAV”是指一般从灵长类动物中分离的AAV。类似地,“非灵长类动物AAV”是指从非灵长类动物中分离的AAV。

[0092] 如本文所用,与基因 (例如,rep、cap等)、衣壳蛋白 (例如,VP1衣壳蛋白、VP2衣壳蛋白、VP3衣壳蛋白等)、特定AAV的衣壳蛋白的区域 (例如PLA₂区域、VP1-u区域、VP1/VP2共同区域、VP3区域)、核苷酸序列 (例如ITR序列),例如AAV的cap基因或衣壳蛋白等相关的“[特定的]AAV”,除了分别包含本文所示的特定AAV的核酸序列或氨基酸序列的基因或多肽外,还包括基因或多肽的变体,包括包含保留一种或多种生物功能所需的最少数量的核苷酸或

氨基酸的变体。如本文所用,变体基因或变体多肽包括与本文所示的特定AAV的基因或多肽的核酸序列或氨基酸序列不同的核酸序列或氨基酸序列,其中所述差异通常不会改变基因或多肽的至少一种生物功能,和/或基因或多肽的系统发育特征,例如,差异可能是由于遗传密码的简并性、分离变异、序列的长度等。例如,如此处使用的rep基因和cap基因可以涵盖不同于野生型基因的rep和cap基因,因为基因可以分别对一个或多个Rep蛋白和Cap蛋白进行编码。在一些实施方案中,Rep基因对至少Rep78和/或Rep68进行编码。在一些实施方案中,cap基因包含那些可以不同于野生型的基因,其中一个或多个替代性起始密码子或一个或多个替代性起始密码子之间的序列被去除,使得cap基因仅对单个cap蛋白进行编码,例如,其中VP2和/或VP3起始密码子被去除或取代,使得cap基因对功能性VP1衣壳蛋白而不是VP2衣壳蛋白或VP3衣壳蛋白进行编码。因此,如本文所用,rep基因涵盖对功能性rep蛋白进行编码的任何序列。cap基因涵盖对至少一个功能性cap基因进行编码的任何序列。

[0093] 众所周知,野生型cap基因在存在于rep ORF中的p40启动子的控制下表达来自cap基因的单个开放阅读框的所有三种VP1、VP2和VP3衣壳蛋白。术语“衣壳蛋白”、“Cap蛋白”等包含作为病毒衣壳的一部分的蛋白质。对于腺相关病毒,衣壳蛋白通常被称为VP1、VP2和/或VP3,并且可以由单个cap基因编码。对于AAV,三种AAV衣壳蛋白本质上以cap ORF替代性翻译起始密码子使用的重叠方式产生,尽管所有三种蛋白质都使用共同的终止密码子。野生型cap基因的ORF从5'到3'对以下三个替代性起始密码子和一个“共同终止密码子”进行编码:“VP1起始密码子”、“VP2起始密码子”和“VP3起始密码子”。最大的病毒蛋白VP1通常从VP1起始密码子编码到“共同终止密码子”。VP2通常从VP2起始密码子编码到共同终止密码子。VP3通常从VP3起始密码子编码到共同终止密码子。因此,VP1在其N端包括不与VP2或VP3共享的序列,被称为VP1-独特区(VP1-u)。VP1-u区通常由野生型cap基因的序列进行编码,所述cap基因从VP1起始密码子开始直到“VP2起始密码子”。VP1-u包括对感染来说可能很重要的磷脂酶A2结构域(PLA₂),以及可能帮助病毒对细胞核进行靶向以进行脱壳和基因组释放的核定位信号。VP1、VP2和VP3衣壳蛋白共享构成整个VP3的相同C端序列,其在本文中也**可以被**称为VP3区。VP3区从VP3起始密码子编码到共同终止密码子。VP2具有与VP1共享的另外的约60个氨基酸。此区域被称为VP1/VP2共同区。

[0094] 在一些实施方案中,本发明的Cap蛋白中的一种或多种Cap蛋白可以由具有一个或多个ORF的一种或多种cap基因编码。在一些实施方案中,本发明的VP蛋白可以通过使用单独核苷酸序列从包括对VP1、VP2和/或VP3的任何组合进行编码的核苷酸序列的多于一个ORF表达,所述单独核苷酸序列可操作地连接到至少一个表达控制序列以用于在包装细胞中表达,所述每个细胞产生本发明的VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白中的一个或多个。在一些实施方案中,本发明的VP衣壳蛋白可以通过使用单独核苷酸序列从包括对VP1、VP2或VP3中的任一种进行编码的核苷酸序列的ORF单独地表达,所述单独核苷酸序列可操作地连接到一个表达控制序列以用于在病毒复制细胞中表达,所述每个细胞仅产生VP1、VP2或VP3衣壳蛋白中的一个。在另一个实施方案中,VP蛋白可以从包括对VP1、VP2和VP3衣壳蛋白进行编码的核苷酸序列的一个ORF表达,所述核苷酸序列可操作地连接到至少一个表达控制序列以用于在病毒复制细胞中表达,所述每个细胞产生VP1、VP2和VP3衣壳蛋白。因此,尽管本文所提供的氨基酸位置可以相对于参考的AAV的VP1衣壳蛋白提供,但本领域技术人员将能够分别且容易地确定AAV的VP2和/或VP3衣壳蛋白内相同氨基酸的位置,以及不同AAV中的氨基

酸的对应位置。

[0095] 短语“反向末端重复序列”或“ITR”包含有效复制所需的腺相关病毒的基因组中的对称核酸序列。ITR序列位于AAV DNA基因组的每一端处。ITR充当病毒DNA合成的复制起点，并且是产生AAV颗粒例如包装成AAV颗粒重要的顺式组分。

[0096] AAV ITR包括复制蛋白Rep78或Rep68的识别位点。ITR的“D”区包括DNA复制在其处起始的DNA切口位点，并且为核酸复制步骤提供方向性。在哺乳动物细胞中复制的AAV通常包括两个ITR序列。

[0097] 单个ITR可以在“A”区的两条链上和ITR回文的每一侧上的两个对称D区上用Rep结合位点进行工程化。此类双链环状DNA模板上的经工程化的构建体允许Rep78或Rep68启动的核酸复制在两个方向上进行。单个ITR足以进行圆形颗粒的AAV复制。在生产本发明的AAV病毒颗粒的方法中，rep编码序列对能够结合转移质粒上包括的ITR的Rep蛋白或Rep蛋白等效物进行编码。

[0098] 当通过包装细胞用适当的Rep蛋白表达时，本发明的Cap蛋白可以使包括所关注核苷酸和偶数个两个或更多个ITR序列的转移质粒衣壳化。在一些实施方案中，转移质粒包括一个ITR序列。在一些实施方案中，转移质粒包括两个ITR序列。

[0099] Rep78和/或Rep68中的任一者结合到ITR发夹序列上的独特和已知的位点，并作用于破坏和解开AAV基因组的末端上的发夹结构，由此提供对病毒复制细胞的复制机制的访问。众所周知，Rep蛋白可以通过使用单独核苷酸序列从包括对Rep78、Rep68、Rep52和/或Rep40的任何组合进行编码的核苷酸序列的多于一个ORF表达，所述单独核苷酸序列可操作地连接到至少一个表达控制序列以用于在病毒复制细胞中表达，所述每个细胞产生Rep78、Rep68、Rep52和/或Rep40 Rep蛋白中的一个或多个。可替代地，Rep蛋白可以通过使用单独核苷酸序列从包括对Rep78、Rep68、Rep52或Rep40中的任一个进行编码的核苷酸序列的ORF中单独地表达，单独核苷酸序列可操作地连接到一个表达控制序列以用于在包装细胞中表达，每个所述细胞仅产生一个Rep78、Rep68、Rep 52或Rep40Rep蛋白。在另一个实施方案中，Rep蛋白可以从包括对Rep78和Rep52Rep蛋白进行编码的核苷酸序列的一个ORF表达，所述核苷酸序列可操作地连接到至少一个表达控制序列以用于在病毒复制细胞中表达，所述每个细胞产生Rep78和Rep52 Rep蛋白。

[0100] 在产生本发明的AAV病毒体（例如病毒颗粒）的方法中，可以在单一包装质粒中提供本发明的rep编码序列和cap基因。然而，技术人员将认识到此类条件是不必要的。此类病毒颗粒可以包含也可以不包含基因组。

[0101] “嵌合AAV衣壳蛋白”包含AAV衣壳蛋白，所述AAV衣壳蛋白包括氨基酸序列，例如，来自两个或更多个不同AAV的部分并且能够形成和/或形成AAV病毒衣壳/病毒颗粒。嵌合AAV衣壳蛋白由嵌合AAV衣壳基因进行编码，例如，包括多个例如至少两个核酸序列的嵌合核苷酸，所述多个核酸序列中的每个核酸序列与对不同AAV的衣壳蛋白进行编码的衣壳基因的一部分相同，并且所述多个核酸序列一起对功能性嵌合AAV衣壳蛋白进行编码。嵌合衣壳蛋白与特定AAV的缔合表明衣壳蛋白包括来自所述AAV的衣壳蛋白的一个或多个部分以及来自不同AAV的衣壳蛋白的一个或多个部分。例如，嵌合AAV2衣壳蛋白包含衣壳蛋白，所述衣壳蛋白包括AAV2的VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白的一个或多个部分以及不同AAV的VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白的一个或多个部分。

[0102] 术语“一部分”是指至少5个氨基酸或至少15个核苷酸,但少于全长多肽或核酸分子,与所述部分来源的序列具有100%同一性,参见Penzes (2015)《普通病毒学杂志(J. General Virology)》.2769。“一部分”涵盖足以确定所述部分来源的多肽或核酸分子形式是“[特定的]AAV”或与特定AAV例如非灵长类动物AAV或远程AAV具有“显著同一性”的氨基酸或核苷酸的任何连续区段。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少5个氨基酸或15个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少10个氨基酸或30个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少15个氨基酸或45个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少20个氨基酸或60个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少25个氨基酸或75个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少30个氨基酸或90个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少35个氨基酸或105个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少40个氨基酸或120个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少45个氨基酸或135个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少50个氨基酸或150个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少60个氨基酸或180个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少70个氨基酸或210个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少80个氨基酸或240个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少90个氨基酸或270个核苷酸。在一些实施方案中,一部分包括与特定AAV相关的序列具有100%同一性的至少100个氨基酸或300个核苷酸。

[0103] 经修饰的病毒衣壳蛋白、病毒颗粒、病毒核酸

[0104] 在一些实施方案中, Cap蛋白(例如,如本文所述的VP1衣壳蛋白、如本文所述的VP2衣壳蛋白和/或如本文所述的VP3衣壳蛋白)被修饰成包含例如插入靶向配体、化学修饰、结合对的第一成员、可检测标记、点突变等中的任一者或组合。

[0105] 通常,对特定AAV或其变体的基因或多肽进行修饰会产生与本文所示的特定AAV的核酸序列或氨基酸序列不同的核酸序列或氨基酸序列,其中所述修饰改变、赋予或去除一种或多种生物功能,但不改变基因或多肽作为AAV基因或AAV多肽的系统发育特征。修饰可以包括以下的任一者或组合:用第二AAV血清型的序列取代第一AAV血清型的序列以产生嵌合体;化学修饰;插入结合对的第一成员和/或点突变;等等,使得衣壳蛋白的天然趋向性被降低甚至消失,衣壳蛋白的趋向性可以更容易地被重定向,和/或使得衣壳蛋白包含可检测标记。如本文所述的修饰通常不改变并且优选降低在普通群体中发现的预先存在的抗体对经修饰的衣壳的低识别至无识别,所述预先存在的抗体是在感染另一种AAV的过程中产生的,例如感染血清型如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAVDJ、Anc80L65、AAV2G9、AAV-LK03、基于此类血清型的病毒粒子、来自目前使用的AAV基因治疗模式的病毒粒子,或其组合。

[0106] 靶向配体

[0107] 本文所述的修饰可能涉及靶向配体与经修饰的衣壳蛋白和/或包含经修饰的衣壳蛋白的衣壳的缔合(例如展示、可操作连接、结合)。通常,如本文所述的靶向配体结合由哺乳动物肌细胞表达的表面蛋白,例如在哺乳动物肌细胞的表面上表达的蛋白质,例如哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白。在一些实施方案中,经修饰的衣壳蛋白和/或修饰的衣壳包含结合哺乳动物CACNG1(例如人CACNG1)的靶向配体。

[0108] [1]表1提供了可用于重定向如本文所述的AAV衣壳的非限制性和示例性抗人CACNG1单克隆抗体(mAb ID)的每个结合部分(例如,重链可变结构域(HCVR)、轻链可变结构域(LCVR)以及CDR1、CDR2和CDR3)的SEQ ID NO的概述。在一些实施方案中,如本文所述的AAV衣壳包含结合人CACNG1的靶向配体,其中所述靶向配体包含分别与SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列具有至少90%同一性的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。在一些实施方案中,如本文所述的AAV衣壳包含结合人CACNG1的靶向配体,其中所述靶向配体包含分别与SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列具有至少95%同一性的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。在一些实施方案中,如本文所述的AAV衣壳包含结合人CACNG1的靶向配体,其中所述靶向配体包含与SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列具有至少97%同一性的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。在一些实施方案中,如本文所述的AAV衣壳包含结合人CACNG1的靶向配体,其中所述靶向配体包含与SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列具有至少98%同一性的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。在一些实施方案中,如本文所述的AAV衣壳包含结合人CACNG1的靶向配体,其中所述靶向配体包含与SEQ ID NO:1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组的氨基酸序列具有99%同一性的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组。本文还描述了包含一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)的抗体或其抗原结合片段,所述CDR被包含在表1中列出的示例性抗hCACNG1抗体中的任一者所定义的HCVR/LCVR氨基酸序列对内。在一些实施方案中,如本文所述的靶

向配体包含HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3氨基酸序列组,所述氨基酸序列组被包含在选自以下各项组成的组的HCVR/LCVR氨基酸序列对内:SEQ ID NO:2/10、SEQ ID NO:18/26、SEQ ID NO:34/42、SEQ ID NO:50/58、SEQ ID NO:66/74、SEQ ID NO:82/90、SEQ ID NO:98/106、SEQ ID NO:114/122、SEQ ID NO:130/138、SEQ ID NO:146/154、SEQ ID NO:162/170和SEQ ID NO:178/186。在某些实施方案中,如本文所述的靶向配体包含HCVR/LCVR氨基酸序列对,选自由以下各项组成的组:SEQ ID NO:2/10、SEQ ID NO:18/26、SEQ ID NO:34/42、SEQ ID NO:50/58、SEQ ID NO:66/74、SEQ ID NO:82/90、SEQ ID NO:98/106、SEQ ID NO:114/122、SEQ ID NO:130/138、SEQ ID NO:146/154、SEQ ID NO:162/170和SEQ ID NO:178/186。

[0109] 表1:抗体、抗原结合片段(例如Fab)或scFv分子中可用于将AAV重新靶向至人CACNG1的结构域的SEQ ID NO。

[0110]

抗体名称	HCVR NA (AA)	HCDR1 NA (AA)	HCDR2 NA (AA)	HCDR3 NA (AA)	LCVR NA (AA)	LCDR1 NA (AA)	LCDR2 NA (AA)	LCDR3 NA (AA)
1 31929/14647/10728	1 (2)	3 (4)	5 (6)	7 (8)	9 (10)	11 (12)	13 (14)	15 (16)
2 14570/10715	17 (18)	19 (20)	21 (22)	23 (24)	25 (26)	27 (28)	29 (30)	31 (32)
3 14572/10717	33 (34)	35 (36)	37 (38)	39 (40)	41 (42)	43 (44)	45 (46)	47 (48)
4 14571/10716	49 (50)	51 (52)	53 (54)	55 (56)	57 (58)	59 (60)	61 (62)	63 (64)
5 14574/10783	65 (66)	67 (68)	69 (70)	71 (72)	73 (74)	75 (76)	77 (78)	79 (80)
6 31944	81 (82)	83 (84)	85 (86)	87 (88)	89 (90)	91 (92)	93 (94)	95 (96)
7 31265/5972	97 (98)	99 (100)	101 (102)	103 (104)	105 (106)	107 (108)	109 (110)	111 (112)
8 31941	113 (114)	115 (116)	117 (118)	119 (120)	121 (122)	123 (124)	125 (126)	127 (128)
9 7660	129 (130)	131 (132)	133 (134)	135 (136)	137 (138)	139 (140)	141 (142)	143 (144)
10 9909	145 (146)	147 (148)	149 (150)	151 (152)	153 (154)	155 (156)	157 (158)	159 (160)
11 14573/10713	161 (162)	163 (164)	165 (166)	167 (168)	169 (170)	171 (172)	173 (174)	175 (176)

[0111] 31929/10728(野生型hIgG1)/14647(hIgG1N180Q)

[0112] HCVR核酸序列(SEQ ID NO:1)

[0113] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA
GCGTCTGGAATCACCTTCAGAAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATGTGGTATGATGGAAGTAATAAGTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCGGAGACAATT
CCAAGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGGGGCACTATA
AGAACAGCTGCCCCCTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0114] HCVR氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

- [0115] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGITFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKYYADSVKGRFT
ISGDNSKVYLMNSLRAEDTAVYYCARRGTIRTAAPFDYWGQGLTVTVSS
- [0116] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:3)
- [0117] GGA ATC ACC TTC AGA AAT TAT GGC
- [0118] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)
- [0119] G I T F R N Y G
- [0120] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:5)
- [0121] ATG TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAG
- [0122] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)
- [0123] M W Y D G S N K
- [0124] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:7)
- [0125] GCG AGA AGG GGC ACT ATA AGA ACA GCT GCC CCT TTT GAC TAC
- [0126] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)
- [0127] A R R G T I R T A A P F D Y
- [0128] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:9)
- [0129] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
- [0130] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:10)
- [0131] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK
- [0132] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:11)
- [0133] CAG AGC ATT AGC AGC TAT
- [0134] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)
- [0135] Q S I S S Y
- [0136] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:13)
- [0137] GCT GCA TCC
- [0138] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)
- [0139] A A S
- [0140] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:15)
- [0141] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC
- [0142] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:16)
- [0143] Q Q S Y S T P P I T
- [0144] HC核酸序列 (SEQ ID NO:193)
- [0145] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA
GCGTCTGGAATCACCTTCAGAAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATGTGGTATGATGGAAGTAATAAGTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCGGAGACAATT

CCAAGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGGGGCACTATA
AGAACAGCTGCCCCCTTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCGTGCC
CAGCACCAGGCGGTGGCGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTA

[0146] CACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0147] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:194)

[0148] QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGITFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKYYADSVKGRFT
ISGDSNKVYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGTIRTAAPFDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL

[0149] GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPGGGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[0150] *加下划线和粗体的天冬酰胺 (N) 可以突变为谷氨酰胺 (Q), 以便通过转谷氨酰胺
酶缀合, 参见例如SEQ ID NO:269

[0151] LC核酸序列 (SEQ ID NO:195)

[0152] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0153] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:196)

[0154] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- [0155] 10715(野生型hIgG1)/14570(IgG1 N180Q):
- [0156] HCVR核酸序列(SEQ ID NO:17)
- [0157] CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGCGACCCTGTCCCGCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTTCAGTGGTTACTACTGGAAGTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATTGGGAAATCCTTCATAGTGGAAGAACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGGGAAGGATAGCAGCTCGTCACGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
- [0158] HCVR氨基酸序列(SEQ ID NO:18)
- [0159] QVQLQQWGAGLLKPSATLSRTCAVYGGSFSGYYWNWIRQSPGKGLEWIGEILHSGRTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCAGRIARHGWFDPWGQGLTVTVSS
- [0160] HCDR1核酸序列(SEQ ID NO:19)
- [0161] GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC
- [0162] HCDR1氨基酸序列(SEQ ID NO:20)
- [0163] G G S F S G Y Y
- [0164] HCDR2核酸序列(SEQ ID NO:21)
- [0165] ATC CTT CAT AGT GGA AGA ACC
- [0166] HCDR2氨基酸序列(SEQ ID NO:22)
- [0167] I L H S G R T
- [0168] HCDR3核酸序列(SEQ ID NO:23)
- [0169] GCG GGA AGG ATA GCA GCT CGT CAC GGC TGG TTC GAC CCC
- [0170] HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:24)
- [0171] A G R I A A R H G W F D P
- [0172] LCVR核酸序列(SEQ ID NO:25)
- [0173] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTACATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCTCTTGT CGGGCGAGTCAGGATATTCGCAAGTGGTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTA TGCTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTTTTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCGTTCACTTTTGCCAG GGGACCAAGCTGGAGATCAAA
- [0174] LCVR氨基酸序列(SEQ ID NO:26)
- [0175] DIQMTQSPSSVSTSVGDRVTISCRASQDIRKWLAWYQQKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYFCQQANSFPFTFGQGTKLEIK
- [0176] LCDR1核酸序列(SEQ ID NO:27)
- [0177] CAG GAT ATT CGC AAG TGG
- [0178] LCDR1氨基酸序列(SEQ ID NO:28)
- [0179] Q D I R K W
- [0180] LCDR2核酸序列(SEQ ID NO:29)
- [0181] GCT ACA TCC
- [0182] LCDR2氨基酸序列(SEQ ID NO:30)
- [0183] A T S

[0184] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:31)

[0185] CAA CAG GCT AAC AGT TTC CCG TTC ACT

[0186] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:32)

[0187] Q Q A N S F P F T

[0188] HC核酸序列 (SEQ ID NO:197)

[0189] CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGCGACCCTGTCCCGCACCTGCGCT
GTCTATGGTGGGTCTTTCAGTGGTTACTACTGGAAGTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATTGG
GGAAATCCTTCATAGTGGAAGAACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGGGAAGGATAGCA
GCTCGTCACGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCC
CAGCACCTGAGTTCTTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTCA
CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCTCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGT

[0190] GTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGG
CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG
TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATG
A

[0191] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:198)

[0192] QVQLQQWGAGLLKPSATLSRTCAVYGGSFSGYYWNWIRQSPGKGLEWIGEILHSGRTNYPNPSLKSRVTI
SVDTSKNQFSLKLTSTVAADTAVYYCAGRIARHGWFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

[0193] **GTKTYTCNV** **DKHPSNTKVDKR** **VESKYGPPCPP** **PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS**
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA **TKPREEQFN** **STYRVVSVLTVL**
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK **TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK **TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF**
SCSVMHEALHNHYTQKSLSL **SLGK**

[0194] *加下划线和粗体的天冬酰胺 (N) 可以突变为谷氨酰胺 (Q), 以便通过转谷氨酰胺酶缀合, 参见例如SEQ ID NO:269

[0195] LC核酸序列 (SEQ ID NO:199)

[0196] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTACATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCTCTTGT
CGGGCGAGTCAGGATATTGCAAGTGGTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTA
TGCTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTTTTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCGTTCACTTTTGCCAG

GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0197] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:200)

[0198] DIQMTQSPSSVSTSVGDRVITSCRASQDIRKWLAWYQQKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYFCQQANSFPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0199] 10717 (野生型hIgG1) / 14572 (hIgG1N180Q)

[0200] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:33)

[0201] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCGTCTGGATTACCTTCAGTACATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATTTGGCATGATGGAAGTGATAAATATTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATCGCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTTTATCTGCAAATGAATAGTCTGAGAGTCGAGGACACGGGTATATATTACTGTGCGAGAAGGGGT
ATACGTGGAACCGTTTTTGACCACTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0202] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:34)

[0203] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWHDGS DKYYVDSVKGRFS
IARDNSKNTLYLQMNSLRVEDTGIYYCARRGIRGTVFDHWGLGLTLVTSS

[0204] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:35)

[0205] GGA TTC ACC TTC AGT ACA TAT GGC

[0206] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:36)

[0207] G F T F S T Y G

[0208] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:37)

[0209] ATT TGG CAT GAT GGA AGT GAT AAA

[0210] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:38)

[0211] I W H D G S D K

[0212] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:39)

[0213] GCG AGA AGG GGT ATA CGT GGA ACC GTT TTT GAC CAC

[0214] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:40)

[0215] A R R G I R G T V F D H

[0216] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:41)

[0217] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCTCACTTGT
CGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAACAAGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTA
TAAGGCGTCTAATTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCGTGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

[0218] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:42)

[0219] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTLTCRASQSI SNKLAWYQQKPGKAPNLLIYKASNLESGVPSRFSGSGSGT

EFTLTISLQPDFFATYYCQQYNSYSWTFGQGTKVEIK

[0220] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:43)

[0221] CAG AGT ATT AGT AAC AAG

[0222] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:44)

[0223] Q S I S N K

[0224] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:45)

[0225] AAG GCG TCT

[0226] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:46)

[0227] K A S

[0228] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:47)

[0229] CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCG TGG ACG

[0230] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:48)

[0231] Q Q Y N S Y S W T

[0232] HC核酸序列 (SEQ ID NO:201)

[0233] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCGTCTGGATTCACCTTCAGTACATATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATTTGGCATGATGGAAGTGATAAATATTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATCGCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTTTATCTGCAAATGAATAGTCTGAGAGTCGAGGACACGGGTATATATTACTGTGCGAGAAGGGGT
ATACGTGGAACCGTTTTTGACCACTGGGGCCTGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCC
CAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCA
CCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0234] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:202)

[0235] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWHDGSDKYYVDSVKGRFS
IARDNSKNTLYLQMNSLRVEDTGIIYCARRGIRGTVFDHWGLGLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL

- [0236] GTKTYTCNV~~D~~HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
- [0237] *加下划线和粗体的天冬酰胺(N)可以突变为谷氨酰胺(Q),以便通过转谷氨酰胺酶缀合,参见例如SEQ ID NO:269
- [0238] LC核酸序列(SEQ ID NO:203)
- [0239] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCTCACTTGT
CGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAACAAGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTA
TAAGGCGTCTAATTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCA
TCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCGTGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
- [0240] LC氨基酸序列(SEQ ID NO:204)
- [0241] DIQMTQSPSTLSASVGRVTLTCRASQSI~~S~~NKLAWYQQKPGKAPNLLIYKASNLESGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISSLQPD~~F~~ATYYCQQYNSYSWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0242] 10716(野生型hIgG1)/14571(hIgG1N180Q)
- [0243] HCVR核酸序列(SEQ ID NO:49)
- [0244] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT
GTCTCTGGTGA~~C~~CTCATCAATAATTACTACTGGACCTGGCTCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG
TTATATCTATTACAGTGGGAGCGCCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCA
AGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTAAATTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCGGTC
AAGTACTTCCGGCATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
- [0245] HCVR氨基酸序列(SEQ ID NO:50)
- [0246] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSINNYWTWLRQPPGKGLEWIGYIYYSGSANYNPSLKSRTI
SVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGAVKYFRHWGQGT~~L~~TVTVSS
- [0247] HCDR1核酸序列(SEQ ID NO:51)
- [0248] GGT GAC TCC ATC AAT AAT TAC TAC
- [0249] HCDR1氨基酸序列(SEQ ID NO:52)
- [0250] G D S I N N Y Y
- [0251] HCDR2核酸序列(SEQ ID NO:53)
- [0252] ATC TAT TAC AGT GGG AGC GCC
- [0253] HCDR2氨基酸序列(SEQ ID NO:54)
- [0254] I Y Y S G S A
- [0255] HCDR3核酸序列(SEQ ID NO:55)

- [0256] GCG AGA GGG GCG GTC AAG TAC TTC CGG CAT
- [0257] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:56)
- [0258] A R G A V K Y F R H
- [0259] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:57)
- [0260] GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCGGGCACCTCTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAGACTATTAACCACAACAACCTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAACAGGGCCACTGCCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAACATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAAGTGATTCTTGTGTCAGCAGTATGGTAGCTTGCCGCTCACTTTCCGGCAGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
- [0261] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:58)
- [0262] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTINHNLAHYQQRPQAPRLLIYGASNRATAIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFEVYSCQQYGSPLTFGGGTKVEIK
- [0263] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:59)
- [0264] CAG ACT ATT AAC CAC AAC AAC
- [0265] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:60)
- [0266] Q T I N H N N
- [0267] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:61)
- [0268] GGT GCA TCC
- [0269] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:62)
- [0270] G A S
- [0271] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:63)
- [0272] CAG CAG TAT GGT AGC TTG CCG CTC ACT
- [0273] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:64)
- [0274] Q Q Y G S L P L T
- [0275] HC核酸序列 (SEQ ID NO:205)
- [0276] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGACTCCATCAATAATTACTACTGGACCTGGCTCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGTTATATCTATTACAGTGGGAGCGCCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTAAATTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCGGTCAAGTACTTCCGGCATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA

CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACA
GAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0277] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:206)

[0278] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSINNYWTWLRQPPGKLEWIGYIYYSGSANYNPSLKSRVTI
SVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGAVKYFRHWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL

GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
[0279] HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLK

[0280] *加下划线和粗体的天冬酰胺 (N) 可以突变为谷氨酰胺 (Q), 以便通过转谷氨酰胺
酶缀合, 参见例如SEQ ID NO:269

[0281] LC核酸序列 (SEQ ID NO:207)

[0282] GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCGGGCACCCCTCTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGACTATTAACCACAACAACCTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAACAGGGCCACTGCCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAAGTGATTCTTGTGACAGTATGGTAGCTTGCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0283] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:208)

[0284] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTINHNLAWYQQRPGQAPRLLIYGASNRATAIPDRFSGSGSG
TDFTLTISRLEPEDFEVYSCQQYGSPLPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0285] 10783 (野生型hIgG1) / 14574 (hIgG1N180Q)

[0286] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:65)

[0287] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCGTCAGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGATTGATGGAAGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGG
GGTATAGTAGTAGCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0288] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:66)

[0289] QVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWIWIDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGIVVAAPFDYWGQGTLLTVSS

[0290] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:67)

- [0291] GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC
- [0292] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:68)
- [0293] G F T F S S Y G
- [0294] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:69)
- [0295] ATA TGG ATT GAT GGA AGT AAT AAA
- [0296] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:70)
- [0297] I W I D G S N K
- [0298] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:71)
- [0299] GCG AGA AGG GGG GGT ATA GTA GTA GCT GCC CCC TTT GAC TAC
- [0300] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:72)
- [0301] A R R G G I V V A A P F D Y
- [0302] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:73)
- [0303] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
- [0304] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:74)
- [0305] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
- [0306] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:75)
- [0307] CAG AGC ATT AGC AGC TAT
- [0308] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:76)
- [0309] Q S I S S Y
- [0310] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:77)
- [0311] GCT GCA TCC
- [0312] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:78)
- [0313] A A S
- [0314] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:79)
- [0315] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC
- [0316] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:80)
- [0317] Q Q S Y S T P P I T
- [0318] HC核酸序列 (SEQ ID NO:209)
- [0319] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCGTCAGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATGGATTGATGGAAGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGG
GGTATAGTAGTAGCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG

ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC
CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA

[0320] AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGG
GGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCACCCTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0321] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:210)

[0322] QVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIWIDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGIVVAAPFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL

[0323] GTKTYTCNV~~D~~HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL

[0324] HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMH~~E~~ALHNHYTQKSLSL~~S~~L~~G~~K

[0325] *加下划线和粗体的天冬酰胺 (N) 可以突变为谷氨酰胺 (Q), 以便通过转谷氨酰胺
酶缀合, 参见例如SEQ ID NO:269

[0326] LC核酸序列 (SEQ ID NO:211)

[0327] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0328] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:212)

[0329] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0330] 31944

[0331] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:81)

[0332] CAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC
CTG AGA CTC TCC TGT GAA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGA AAC TAT GGC ATG CAC TGG
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATG TGG TAT GAT GGA
AGT AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT
TCC AAG AAC ACG GTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAA GAC ACG GCT GTG
TAT TAC TGT GCG AGA CGG GGT CAT ATA GCA ACA GCT GCT CCC TTT GAC TAC TGG GGC
CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

[0333] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:82)

[0334] QVQLVESGGGVVQPGRSRLRSCEASGITFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVMWYDGSNKYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARRGHIATAAPFDYWGQGTLVTVSS

[0335] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:83)

[0336] GGA ATC ACC TTC AGA AAC TAT GGC

[0337] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:84)

[0338] GITFRNYG

[0339] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:85)

[0340] atg tgg tat gat gga agt aat aaa

[0341] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:86)

[0342] MWYDGSN

[0343] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:87)

[0344] GCG AGA CGG GGT CAT ATA GCA ACA GCT GCT CCC TTT GAC TAC

[0345] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:88)

[0346] ARRGHIATAAPFD

[0347] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:89)

[0348] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCCGTAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGTAGTTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATGTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

[0349] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:90)

[0350] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVISCRAQSISYLNWYQQKPGKAPKVL MYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK

[0351] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:91)

[0352] CAG AGC ATT AGT AGT TAT

[0353] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:92)

[0354] QSISSY

[0355] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:93)

[0356] GCT GCA TCC

[0357] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:94)

[0358] AAS

[0359] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:95)

[0360] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC

[0361] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:96)

[0362] QQSYSTPPIT

[0363] HC核酸序列 (SEQ ID NO:213)

[0364] CAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGGTCC
CTG AGA CTC TCC TGT GAA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGA AAC TATGGC ATG CAC TGG
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTGGCA GTT ATG TGG TAT GAT GGA
AGT AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTGAAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT
TCC AAG AAC ACG GTG TATCTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAA GAC ACG GCT GTG
TAT TAC TGTGCG AGA CGG GGT CAT ATA GCA ACA GCT GCT CCC TTT GAC TAC TGG GGCCAG
GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGT
GGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTG
GAACTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCT
CAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAG
GTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTT
GGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACAT
GTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACA
GCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGA
CTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAA
AACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTC
ACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCT
AAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGA
AGAACTGGGTGGAAAGAAATAGTACTCCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGC
TTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA

[0365] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:214)

[0366] QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCEASGITFR NYGMHWVRQA PGKGLEWVAVMWYDGSNKYY
ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCARRGHIATAAPFDY WGQGLTVTS SAKTTAPSVPY
LAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHP
ASSTKVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPITCVVVDVSEDDPDVQISWVNN
VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM SKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM
TKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNH
HTTKSFSRTPGK

[0367] LC核酸序列 (SEQ ID NO:215)

[0368] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCCGTAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGTAGTTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCTCTGATGTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTT

AACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTG
ATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGC
AGCACCTCAGCTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAAC
TTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

[0369] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:216)

[0370] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ISCRASQSI SYLNWYQQKPKAPKVLMYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPPITFG QGTRLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS
VVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS
FNRGEC

[0371] 31265 (野生型hIgG1) / 5972 (hIgG1N180Q)

[0372] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:97)

[0373] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA
GCGTCTGGATTACCTTCCGTTCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGTC
AGTTATTTGGATTGATGGAAATAATATATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAAGACTG
GCTATAACATCAGCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0374] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:98)

[0375] QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCTASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVSIVWIDGNNIYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMSDLRAEDTAVYYCARRLAITSAAPFDYWGQGTLVTVSS

[0376] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:99)

[0377] GGA TTC ACC TTC CGT TCC TAT GGC

[0378] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:100)

[0379] G F T F R S Y G

[0380] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:101)

[0381] ATT TGG ATT GAT GGA AAT AAT ATA

[0382] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:102)

[0383] I W I D G N N I

[0384] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:103)

[0385] GCG AGA AGA CTG GCT ATA ACA TCA GCT GCC CCC TTT GAC TAC

[0386] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:104)

[0387] A R R L A I T S A A P F D Y

[0388] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:105)

[0389] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

[0390] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:106)

[0391] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT

DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

[0392] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:107)

[0393] CAG AGC ATT AGC AGC TAT

[0394] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:108)

[0395] Q S I S S Y

[0396] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:109)

[0397] GCT GCA TCC

[0398] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:110)

[0399] A A S

[0400] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:111)

[0401] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC

[0402] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:112)

[0403] Q Q S Y S T P P I T

[0404] HC核酸序列 (SEQ ID NO:217)

[0405] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA
GCGTCTGGATTACCTTCCGTTCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGTC
AGTTATTTGGATTGATGGAAATAATATATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAAGACTG
GCTATAACATCAGCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC
CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCAC
CCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT
GGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC
TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
AGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0406] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:218)

[0407] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCTASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVSVIWIIDGNNIYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARRLAITSAPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL

[0408] GTKTYTCNV~~D~~HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN~~N~~STYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[0409] *加下划线和粗体的天冬酰胺(N)可以突变为谷氨酰胺(Q),以便通过转谷氨酰胺酶缀合,参见例如SEQ ID NO:269

[0410] LC核酸序列(SEQ ID NO:219)

[0411] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0412] LC氨基酸序列(SEQ ID NO:220)

[0413] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0414] 31941

[0415] HCVR核酸序列(SEQ ID NO:113)

[0416] CAGGTTCACTGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
GCTTCTGGTTACGCCTTACCACCTATGGTATCACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAGCGCTTACAATGGAAATACAACTATGCAGAGAAGGTCCAGGGCAGATTACCATGACCACAGACACAT
CCACGAATACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCTGAGATCCGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAAAGGGT
CACTATGGTTTCGGGACTTATTATAACCCCTTTGGTTTTGATTTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTC
A

[0417] HCVR氨基酸序列(SEQ ID NO:114)

[0418] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAEKVQGRFT
MTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHYSGTYYPFGFDWGGQGMVTVSS

[0419] HCDR1核酸序列(SEQ ID NO:115)

[0420] ggt tac gcc ttc acc acc tat ggt

[0421] HCDR1氨基酸序列(SEQ ID NO:116)

[0422] GYAFTTYG

[0423] HCDR2核酸序列(SEQ ID NO:117)

[0424] atc agc gct tac aat gga aat aca

[0425] HCDR2氨基酸序列(SEQ ID NO:118)

[0426] ISAYNGN

- [0427] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:119)
- [0428] GCG AGA AAG GGT CAC TAT GGT TCG GGG ACT TAT TAT AAC CCC TTT GGT TTT
GAT TTT
- [0429] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:120)
- [0430] CARKGHYSGTYYNPFGRD
- [0431] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:121)
- [0432] GAAATTATGTTGATGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGACATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTTCTGTCTCAGCAGTATTATGGCTCACCTTGGACGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAG
- [0433] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:122)
- [0434] EIMLMQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATDIPDRFSGSGSG
TDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYYGSPWTFGQGTKVEIK
- [0435] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:123)
- [0436] cag agt gtt agc agc agc tac
- [0437] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:124)
- [0438] QSVSSSY
- [0439] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:125)
- [0440] ggt gca tcc
- [0441] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:126)
- [0442] GA
- [0443] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:127)
- [0444] cag cag tat tat ggc tca cct tgg acg
- [0445] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:128)
- [0446] CQQYYGSPW
- [0447] HC核酸序列 (SEQ ID NO:221)
- [0448] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
GCTTCTGGTTACGCCTTACCACCTATGGTATCACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAGCGCTTACAATGGAAATACAACTATGCAGAGAAGGTCCAGGGCAGATTACCATGACCACAGACACAT
CCACGAATACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCCGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAAAGGGT
CACTATGGTTTCGGGGACTTATTATAACCCCTTTGGTTTTGATTTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTC
AGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGG
GATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC
ACCTTCCCAGCTGTCTGTCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAG
CGAGACCGTACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTG
GTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCAAGGATGTGCTC
ACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGCTG
GTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAG

TCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTC
CCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCC
CAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGG
AGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAAGTACAAGAACAACCTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTC
GTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGTCCAACCTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGG
CCTGCACAACCACCATACTGAGAAGTCCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA

[0449] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:222)

[0450] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAEKVQGRFT
MTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHYSGTYNPFQDFWGGTMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTN
SMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI
VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFN
STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIKPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFP
EDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

[0451] LC核酸序列 (SEQ ID NO:223)

[0452] GAAATTATGTTGATGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGACATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGTATTATGGCTCACCTTGGACGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAATCAAGCGAGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTT
AACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTG
ATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGC
AGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAAC
TTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

[0453] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:224)

[0454] EIMLMQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATDIP
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYFCQ QYYGSPWTFGQGTKVEIK

[0455] RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMS
STLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNREGC

[0456] 7660

[0457] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:129)

[0458] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTACA
GCCTCTGGGTTGACCCTCAGTGAAGTCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTTGG
CCGTATAAGAAATAAGGCTAATAGGTACGCGACAGAATATGCTGCGTCGGTGAAAGGCAGGTTACCATTTTCAAGAG
ATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTACTAGA
AACTGGAAGATTTTCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0459] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:130)

[0460] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGLTSLDSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRNKANRYATEYAASVKGR
FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHWKIFLFDYW

[0461] GQGTLLTVSS

- [0462] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:131)
[0463] GGG TTG ACC CTC AGT GAC TCT GCT
[0464] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:132)
[0465] G L T L S D S A
[0466] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:133)
[0467] ATA AGA AAT AAG GCT AAT AGG TAC GCG ACA
[0468] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:134)
[0469] I R N K A N R Y A T
[0470] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:135)
[0471] ACT AGA AAC TGG AAG ATT TTC CTC TTT GAC TAC
[0472] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:136)
[0473] T R N W K I F L F D Y
[0474] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:137)
[0475] GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGACTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCAAATACTTAGCCTGGTTCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGACCAGTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTCAGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCTCAGCAGTATGGAAGTTCACCCTGGACGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
[0476] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:138)
[0477] EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGSKYLAWFQQKRGQAPRLLIYGASSRTSGIPDRISGSGSG
TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWFQGTKVEIK
[0478] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:139)
[0479] CAG AGT GTT GGC AGC AAA TAC
[0480] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:140)
[0481] Q S V G S K Y
[0482] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:141)
[0483] GGT GCA TCC
[0484] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:142)
[0485] G A S
[0486] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:143)
[0487] CAG CAG TAT GGA AGT TCA CCC TGG ACG
[0488] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:144)
[0489] Q Q Y G S S P W T
[0490] HC核酸序列 (SEQ ID NO:225)
[0491] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTACA
GCCTCTGGGTTGACCCTCAGTGA CTCTGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTTGG
CCGTATAAGAAATAAGGCTAATAGGTACGCGACAGAATATGCTGCGTCGGTGAAAGGCAGGTTACCATTTCAAGAG
ATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTACTAGA
AACTGGAAGATTTTCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC

ATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTG
CAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCT
GCCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCT
CGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGA
TGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCTCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGA
GATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGC
AGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0492] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:226)

[0493] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGLTSLDSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRNKANRYATEYAASVKGR
FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRNWKIFLFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSV

[0494] FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0495] LC核酸序列 (SEQ ID NO:227)

[0496] GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGACTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGCAAATACTTAGCCTGGTTCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGACCAGTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTGAGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGAAGTTCACCCTGGACGTTCCGC
CAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0497] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:228)

[0498] EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGSKYLAWFQQKRGQAPRLLIYGASSRTSGIPDRISGSGSG
TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWFQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0499] 9909

[0500] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:145)

[0501] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAACAACATATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC

ATCTATTAGTGGTAGTGGTGGTACCACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGGCAAAGGAGGA
TATTGTAGTAGTAGCGGCTGCCGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0502] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:146)

[0503] EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFNNGMSWVRQGPGLGLEWVSSISGSGGTTFYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGKGGYCSSSGCRHYGMDVWGQGTTVTVSS

[0504] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:147)

[0505] GGA TTC ACC TTT AAC AAC TAT GGC

[0506] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:148)

[0507] GFTFNNG

[0508] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:149)

[0509] ATT AGT GGT AGT GGT GGT ACC ACA

[0510] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:150)

[0511] SGSGGT

[0512] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:151)

[0513] GGC AAA GGA GGA TAT TGT AGT AGT AGC GGC TGC CGT CAC TAC GGT ATG

[0514] GAC GTC

[0515] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:152)

[0516] CGKGGYCSSSGCRH

[0517] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:153)

[0518] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCT
GGAAGCAGCTCCAACATCGAAATAATTATATATACTGGTACCAGCGGCTCCCAGGAACGACCCCCAACTCCTCAT
CTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACACCCTGAGTGGGTATGTC
TTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

[0519] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:154)

[0520] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYIYWYQRLPGTTPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDTLSGYVFGTGTKVTVL

[0521] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:155)

[0522] AGC TCC AAC ATC GGA AAT AAT TAT

[0523] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:156)

[0524] SSNIGNNY

[0525] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:157)

[0526] agg aat aat

[0527] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:158)

[0528] RN

[0529] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:159)

[0530] GCA GCA TGG GAT GAC ACC CTG AGT GGG TAT GTC

[0531] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:160)

[0532] CAAWDDTLSGY

[0533] HC核酸序列 (SEQ ID NO:229)

[0534] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAAACAACTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
ATCTATTAGTGGTAGTGGTGGTACCACATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGGCAAAGGAGGA
TATTGTAGTAGTAGCGGCTGCCGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGC
CAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGAT
GCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACC
TTCCCAGCTGTCTCGAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCA
GTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCACAA
TCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAG
ATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGA
TGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACA
GTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTC
AACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATA
TGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAAACAGGTCACCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTG
AAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCT
GATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTC
AGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA

[0535] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:230)

[0536] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMSWVRQPGKGLEWVSSISGSGGTTYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGKGGYCSSSGCRHYGMDVWGQGTTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGS
SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIE
PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIAPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTH
REDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMV
TDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFYMSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG
K

[0537] LC核酸序列 (SEQ ID NO:231)

[0538] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCT
GGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATTATATATACTGGTACCAGCGGCTCCCAGGAACGACCCCCAACTCCTCAT
CTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACACCCTGAGTGGGTATGTC
TTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCCTACGAGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGA
GCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGA
AGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGC
ATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGAC
ATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

[0539] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:232)

- [0540] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYIYWYQRLPGTTPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDTLSGYVFGTGTQVTVLRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKD
INVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRGEC
- [0541] 10713(野生型hIgG1)/14573(hIgG1 N180Q)
- [0542] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:161)
- [0543] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAACTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTACCAGCCATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGTTATTACTGGTAGAGGTTTTGACACACACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCAGAGACATTT
CCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAAAGGTCTC
TATGATTCGGGGAATTATTATATCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
- [0544] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:162)
- [0545] EVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSHAMNWVRQAPGKGLEWVSVITGRGFDTHYADSVKGRFT
ISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLYDSGNYIDYWGQGTLVTVSS
- [0546] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:163)
- [0547] GGA TTC ACC TTT ACC AGC CAT GCC
- [0548] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:164)
- [0549] G F T F T S H A
- [0550] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:165)
- [0551] ATT ACT GGT AGA GGT TTT GAC ACA
- [0552] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:166)
- [0553] I T G R G F D T
- [0554] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:167)
- [0555] GCG AAA GGT CTC TAT GAT TCG GGG AAT TAT TAT ATC GAT TAC
- [0556] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:168)
- [0557] A K G L Y D S G N Y Y I D Y
- [0558] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:169)
- [0559] CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCT
GGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTTTCTGTTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCAT
TTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG
GCATCACC GGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATCTCAGCCTGAGTTTCAATTGG
GTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
- [0560] LCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:170)
- [0561] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG
TSATLGITGLTGDEADYYCGTWDLSLSFNWVFGGGTKLTVL
- [0562] LCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:171)
- [0563] AGC TCC AAC ATT GGG AAT AAT TAT
- [0564] LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:172)
- [0565] S S N I G N N Y
- [0566] LCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:173)

- [0567] GAC AAT AAT
- [0568] LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:174)
- [0569] D N N
- [0570] LCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:175)
- [0571] GGA ACA TGG GAT CTC AGC CTG AGT TTC AAT TGG GTG
- [0572] LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:176)
- [0573] G T W D L S L S F N W V
- [0574] HC核酸序列 (SEQ ID NO:233)
- [0575] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAACTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTACCAGCCATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGTTATTACTGGTAGAGGTTTTGACACACACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACATTT
CCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAAAGGTCTC
TATGATTCGGGGAATTATTATATCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC
CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCAC
CCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT
GGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC
TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
AGCAGGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACAGAAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
- [0576] HC氨基酸序列 (SEQ ID NO:234)
- [0577] EVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSHAMNWRQAPGKGLEWVSVITGRGFDTHYADSVKGRFT
ISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLYDSGNYIDYWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GKTYTCNV~~D~~HKPSNTKVDKR~~V~~ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN~~N~~STYRVVSVLTVL
[0578] HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
- [0579] *加下划线和粗体的天冬酰胺(N)可以突变为谷氨酰胺(Q),以便通过转谷氨酰胺
酶缀合,参见例如SEQ ID NO:269
- [0580] LC核酸序列 (SEQ ID NO:235)
- [0581] CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCT
GGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTTTCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCAT

TTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGG
GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATCTCAGCCTGAGTTTCAATTGG
GTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGGCCAGCCCAAGGCCGCCCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCCCTC
CTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCTCCGACTTCTACCCCGGCGCCGTGACCGTGG
CCTGGAAGGCCGACTCTCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCTCCAAGCAGTCCAACAACAAGTAC
GCCGCCTCCTCCTACCTGTCCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGTCCCACCGGTCCTACTCCTGCCAGGTGACCCACGA
GGGCTCCACCGTGGAGAAGACCGTGGCCCCCACCAGTGCTCCTGA

[0582] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:236)

[0583] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSG
TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDL SLSFNWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0584] 7854

[0585] HCVR核酸序列 (SEQ ID NO:177)

[0586] CAGGTT CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG
GCTTCTGGTTACGCCTTACCACCTATGGTATCACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGG
ATGGATCAGCGCTTACAATGGAATACAACTATGCAGAGAAGGTCCAGGGCAGATTACCATGACCACAGACACAT
CCACGAATACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCCGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAAAGGGT
CACTATGGTTTCGGGACTTATTATAACCCCTTTGGTTTTGATTTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTC
A

[0587] HCVR氨基酸序列 (SEQ ID NO:178)

[0588] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAEKVQGRFT
MTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHYSGTYYPNPFQDFWGGQGMVTVSS

[0589] HCDR1核酸序列 (SEQ ID NO:179)

[0590] GGT TAC GCC TTC ACC ACC TAT GGT

[0591] HCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO:180)

[0592] G Y A F T T Y G

[0593] HCDR2核酸序列 (SEQ ID NO:181)

[0594] ATC AGC GCT TAC AAT GGA AAT ACA

[0595] HCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO:182)

[0596] I S A Y N G N T

[0597] HCDR3核酸序列 (SEQ ID NO:183)

[0598] GCG AGA AAG GGT CAC TAT GGT TCG GGG ACT TAT TAT AAC CCC TTT GGT TTT
GAT TTT

[0599] HCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO:184)

[0600] A R K G H Y G S G T Y Y N P F G F D F

[0601] LCVR核酸序列 (SEQ ID NO:185)

[0602] GAAATTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA

STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPCCPPCPAPEF

[0621] LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0622] LC核酸序列 (SEQ ID NO:239)

[0623] GAAATTGTGTTGACGAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGTCTTTGTATTCTGTCTCAGCAGTATTATGGCTCACCTTGGACGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0624] LC氨基酸序列 (SEQ ID NO:240)

[0625] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG
TDFTLTISRLEPEDFALYFCQQYYGSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0626] 结合CACNG1的靶向配体的非限制性实例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；
(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v) 单链Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段；和(vii) 由模拟抗体的高
变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如，分离的互补决定区(CDR)，诸如CDR3肽)或受
限制的FR3-CDR3-FR4肽。其他工程化分子，诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域
缺失抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如，单价
纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖
在本文所使用的表述“靶向配体”内。在非限制性实施方案中，如本文所述可用于重新靶向
病毒衣壳的结合CACNG1的抗CACNG1靶向配体包含包含scFv。作为非限制性实例，如本文所
述可用于重新靶向病毒衣壳的V_L-(Gly₄Ser)₃-V_H格式的scFv序列可包含分别与SEQ ID NO:
1-240中任一者所示的重链可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构
域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-
LCDR3组的氨基酸序列中的任一者具有90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的重链
可变结构域、轻链可变结构域、重链可变结构域/轻链可变结构域对、HCDR1、HCDR2、HCDR3、
LCDR1、LCDR2、LCDR3和/或HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3组。

[0627] 根据众所周知的方法，结合哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白的靶向配体可以与经
修饰的AAV衣壳蛋白和所得的AAV衣壳缔合(例如，由其展示、与其可操作地连接、与其结
合)，例如，根据众所周知的方法将靶向配体直接插入(例如，使用重组方法)的直接方法。参
见例如，Stachler等人。(2006)，前述；White等人。(2004)，前述；Girod等人。(1999)，前述；
Grifman等人。(2001)，前述；Shi等人。(2001)，前述；Shi和Bartlett(2003)，前述。结合哺乳
动物肌细胞特异性表面蛋白的靶向配体可以使用众所周知的化学接头偶联到经修饰的AAV

衣壳蛋白和所得的AAV衣壳,例如,其中AAV衣壳蛋白可以被化学修饰以包含二苯并环辛炔基(dibenzocyclooctyne group)或叠氮基,并且任选地其中如本文所述的靶向配体附接到二苯并环辛炔基或叠氮基,参见例如U.S.2022/028234,该专利以全文引用的方式并入本文;其中靶向配体例如经由-CSNH-键共价连接到AAV衣壳蛋白的一级氨基酸基团。在一些实施方案中,本文所述的经修饰的衣壳包含根据众所周知的直接重组方法直接插入或偶联的靶向配体,例如抗CACNG1抗体或其结合部分。

[0628] 结合对

[0629] 在一些实施方案中,根据间接重组方法,结合哺乳动物肌细胞特异性表面蛋白的靶向配体可与经修饰的AAV衣壳蛋白和所得的AAV衣壳缔合(例如,由其展示、与其可操作地连接、与其结合),其中所述AAV衣壳蛋白被修饰以包含结合对的第一成员(例如,异源支架),并且任选地,其中结合对的第一成员连接到(例如,共价或非共价结合到)结合对的第二同源成员(例如衔接子),进一步任选地,其中结合对的第二同源成员与靶向配体融合。非限制性和示例性结合对在Buning和Srivastava (2019)《分子治疗方法与临床开发》12:248-265中列出。

[0630] 因此,在一些实施方案中,如本文所述的衣壳蛋白的修饰包括通常由基因水平的修饰产生的那些修饰,例如经由cap基因的修饰,诸如插入结合对(例如蛋白质:蛋白质结合对、蛋白质:核酸结合对)的第一成员、可检测标记等的修饰,以供Cap蛋白展示。

[0631] 在一些实施方案中,第一成员与免疫球蛋白恒定结构域形成结合对。在一些实施方案中,第一成员与金属离子(例如 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等)形成结合对。在一些实施方案中,第一成员选自由链霉亲和素、Strep II、HA、L14、4C-RGD、LH和蛋白A组成的组。

[0632] 在一些实施方案中,结合对包含酶:核酸结合对。在一些实施方案中,第一成员包括HUH核酸内切酶或HUH标签,并且第二成员包含核酸结合结构域。在一些实施方案中,第一成员包括HUH标签。参见例如U.S.2021/0180082,该专利以全文引用的方式并入本文中。

[0633] 在一些实施方案中,本发明的衣壳蛋白至少包括肽:肽结合对的第一成员。

[0634] 在一些实施方案中,肽:肽结合对的第一成员和第二成员中的每一者包含内含肽。参见例如Wagner等人,(2021)《先进科学(Adv.Sci.)》8:2004018(第1页,共22页);Muik等人(2017)《生物材料(Biomaterials)》144:84;这些文献以全文引用的方式并入本文中。

[0635] 在一些实施方案中,第一成员是B细胞表位,例如长度为约1个氨基酸至约35个氨基酸,并且与抗体互补位(例如免疫球蛋白可变结构域)形成结合对。在一些实施方案中,本发明的衣壳蛋白可以被修饰以包含可检测标记作为结合对的第一成员。许多可检测标记是本领域已知的。(参见例如:Nilsson等人,(1997)“用于检测、纯化和固定经修饰的蛋白质的亲和融合策略(Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of modified proteins)”《蛋白质表达与纯化(Protein Expression and Purification)》11:1-16, Terpe等人,(2003)“标记蛋白融合概述:从分子和生化基础到商业系统(Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems)”《应用微生物学与生物技术(Applied Microbiology and Biotechnology)》60:523-533,以及其中的参考文献)。可检测标记包含但不限于以下:结合固定化的二价阳离子(例如, Ni^{2+})的多组氨酸可检测标记(例如,His-6、His-8或His-10)、结合固定化的亲和素的生物素部分(例如,在体内生物素化的多肽序列

上)、结合固定化的谷胱甘肽的GST(谷胱甘肽S-转移酶)序列、结合固定化的S蛋白的S标记、结合固定化的抗体或其结构域或片段的抗原(包含例如结合对应抗体的T7、myc、FLAG和B标记)、FLASH标记(偶联到特定砷基部分的可高度检测标记)、结合固定化的配体的受体或受体结构域(或反之亦然)、结合固定化的IgG的蛋白质a或其衍生物(例如,Z)、结合固定化的直链淀粉的麦芽糖结合蛋白(MBP)、结合固定化的白蛋白的白蛋白结合蛋白、结合固定化的几丁质的几丁质结合结构域、结合固定化的钙调蛋白的钙调蛋白结合肽和结合固定化的纤维素的纤维素结合结构域。另一个示例性可检测标记是SNAP-tag,可从Covalys公司(www.Covalys.com)商购获得。在一些实施方案中,本文公开的可检测标记包含由抗体互补位识别的可检测标记,其中可检测标记和抗体互补位形成蛋白质:蛋白质结合对。

[0636] 在一些实施方案中,本发明的衣壳蛋白包括蛋白质:蛋白质结合对的包括可检测标记的第一成员,所述可检测标记也可以用于检测和/或分离Cap蛋白和/或作为蛋白质:蛋白质结合对的第一成员。在一些实施方案中,可检测标记充当蛋白质:蛋白质结合对的用于结合包括多特异性结合蛋白的靶向配体的第一成员,所述多特异性结合蛋白可以结合可检测标记和由所关注细胞表达的靶标两者。在一些实施方案中,本发明的Cap蛋白包含含有c-myc(SEQ ID NO:246)的蛋白质:蛋白质结合对的第一成员。可检测标记作为蛋白质:蛋白质结合对的第一成员的用途描述于例如W02019006043中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0637] 在一些实施方案中,第一成员包含B1表位(SEQ ID NO:247)。在一些实施方案中,衣壳蛋白被修饰以在VP3区中包括B1表位。在一些实施方案中,第一成员选自由FLAG、HA和c-myc(EQKLISEEDL;SEQ ID NO:246)组成的组。

[0638] 在一些实施方案中,衣壳蛋白包括蛋白质:蛋白质结合对的第一成员,其中所述蛋白质:蛋白质结合对形成共价异肽键。在一些实施方案中,肽:肽结合对的第一成员通过异肽键与肽:肽结合对的同源第二成员共价地结合,并且任选地其中肽:肽结合对的同源第二成员与靶向配体融合,所述靶向配体结合由所关注细胞表达的靶标。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对可以选自由以下各项组成的组:SpyTag:SpyCatcher、SpyTag002:SpyCatcher002、SpyTag003:SpyCatcher003、SpyTag:KTag、Isopeptag:pilin-C和SnoopTag:SnoopCatcher。在一些实施方案中,其中第一成员是SpyTag(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是SpyCatcher(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,其中第一成员是SpyTag(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是KTag(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,其中第一成员是KTag(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是SpyTag(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,其中第一成员是SnoopTag(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是SnoopCatcher(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,其中第一成员是Isopeptag(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是Pilin-C(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,其中第一成员是SpyTag002(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是SpyCatcher002(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,其中第一成员是SpyTag003(或其生物活性部分或变体),并且蛋白质(第二同源成员)是SpyCatcher003(或其生物活性部分或变体)。在一些实施方案中,本发明的Cap蛋白包含SpyTag或其生物活性部分或变体。蛋白质:蛋白质结合对的第一成员的用途描述于

W02019006046中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0639] 在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对的第一成员和/或可检测标记通过第一接头或第二接头,例如,长度为至少一个氨基酸的氨基酸间隔子,可操作地连接到本发明的Cap蛋白(用所述Cap蛋白在框中翻译、化学连接到所述Cap蛋白和/或通过所述Cap蛋白显示)。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对的第一成员侧接有第一接头和/或第二接头,例如,第一和/或第二氨基酸间隔子,其中每个间隔子的长度为至少一个氨基酸。

[0640] 在一些实施方案中,第一和/或第二接头不相同。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一或两个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个或三个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个或四个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个或五个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个或五个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸。在一些实施方案中,第一和/或第二接头的长度各自独立地为一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸。

[0641] 在一些实施方案中,第一接头和第二接头的序列和/或长度相同,并且长度各自为一个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为一个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为两个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为三个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为四个氨基酸,例如,接头是GLSG (SEQ ID NO:248)。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为五个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为六个氨基酸,例如第一和第二接头各自包含序列GLSGSG (SEQ ID NO:249)。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为七个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为八个氨基酸,例如第一和第二接头各自包含序列GLSGLSGS (SEQ ID NO:250)。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为九个氨基酸。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为十个氨基酸,例如第一和第二接头各自包含序列GLSGLSGLSG (SEQ ID NO:251)或GLSGSGLSG (SEQ ID NO:252)。在一些实施方案中,第一和第二接头的长度相同,且长度各自为超过十个氨基酸。

[0642] 通常,如本文所描述的蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员,例如,包括特异性结合对的第一成员本身或与一个或多个接头的组合,其长度为约5个氨基酸到约50个氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为至少5个氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为6个氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为7个氨

[illegible]

中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为47个氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为48个氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为49个氨基酸。在一些实施方案中,蛋白质:蛋白质结合对氨基酸序列的第一成员的长度为50个氨基酸。

[0643] 包含经修饰的衣壳蛋白的经修饰的衣壳

[0644] 在一些实施方案中,包括如本文所描述的经修饰的病毒衣壳蛋白的病毒衣壳是镶嵌衣壳,例如,包括至少两组VP1、VP2和/或VP3蛋白,每组蛋白由不同的cap基因进行编码。本文中的镶嵌衣壳通常是指被修饰以包含结合对的第一成员的第一病毒衣壳蛋白和缺乏结合对的第一成员的第二相应病毒衣壳蛋白的镶嵌体。关于嵌合衣壳,缺乏结合对的第一成员的第二病毒衣壳蛋白可被称为由参考cap基因编码的参考衣壳蛋白。在一些镶嵌衣壳实施方案中,优选地当用蛋白质:蛋白质对的第一成员修饰的VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白不是嵌合衣壳蛋白时,VP1、VP2和/或VP3参考衣壳蛋白可包含与用结合对的第一成员修饰的病毒VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白的氨基酸序列相同的氨基酸序列,不同之处在于参考衣壳蛋白缺少结合对的第一成员。在一些镶嵌衣壳实施方案中,VP1、VP2和/或VP3参考衣壳蛋白对应于用结合对的第一成员修饰的病毒VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白,不同之处在于参考衣壳蛋白缺少结合对的第一成员。在一些实施方案中,VP1参考衣壳蛋白对应于用结合对的第一成员修饰的病毒VP1衣壳蛋白,不同之处在于参考衣壳蛋白缺少结合对的第一成员。在一些实施方案中,VP2参考衣壳蛋白对应于用结合对的第一成员修饰的病毒VP2衣壳蛋白,不同之处在于参考衣壳蛋白缺少结合对的第一成员。在一些实施方案中,VP3参考衣壳蛋白对应于用结合对的第一成员修饰的病毒VP3衣壳蛋白,不同之处在于参考衣壳蛋白缺少结合对的第一成员。在包含被进一步修饰以包含结合对的第一成员的嵌合VP1、VP2和/或VP3衣壳蛋白的一些镶嵌衣壳实施方案中,参考蛋白可以是相应的衣壳蛋白,其部分形成嵌合衣壳蛋白的一部分。作为非限制性实例,在一些实施方案中,包含被修饰以包含结合对的第一成员的嵌合AAV2/AAAV VP1衣壳蛋白的镶嵌衣壳还可包含以下衣壳蛋白作为参考:缺乏第一成员的AAV2 VP1衣壳蛋白、缺乏第一成员的AAAV VP1衣壳蛋白、缺乏第一成员的嵌合AAV2/AAAV VP1衣壳蛋白。类似地,在一些实施方案中,包含被修饰以包含结合对的第一成员的嵌合AAV2/AAAV VP2衣壳蛋白的镶嵌衣壳还可包含以下衣壳蛋白作为参考:缺乏第一成员的AAV2 VP2衣壳蛋白、缺乏第一成员的AAAV VP1衣壳蛋白、缺乏第一成员的嵌合AAV2/AAAV VP2衣壳蛋白。在一些实施方案中,包含被修饰以包含结合对的第一成员的嵌合AAV2/AAAV VP3衣壳蛋白的镶嵌衣壳还可包含以下衣壳蛋白作为参考:缺乏第一成员的AAV2 VP2衣壳蛋白、缺乏第一成员的AAAV VP1衣壳蛋白、缺乏第一成员的嵌合AAV2/AAAV VP3衣壳蛋白。在一些镶嵌衣壳实施方案中,参考衣壳蛋白可以是任何衣壳蛋白,只要它缺少结合对的第一成员并且能够与用结合对的第一成员修饰的第一衣壳蛋白形成衣壳。

[0645] 通常,可以通过将经修饰的cap基因和参考cap基因的混合物以指定比率转染到生产细胞中来产生镶嵌颗粒。颗粒中的蛋白质亚基比率,例如经修饰的VP蛋白:未修饰的VP蛋白比率可以但不一定在化学计量上反映编码用结合对的第一成员修饰的第一衣壳蛋白的至少两种cap基因和一种或多种参考cap基因,例如经修饰的cap基因:转染到包装细胞中的参考cap基因的比率。在一些实施方案中,颗粒中的蛋白质亚基比率不化学计量地反映转染到包装细胞中的经修饰的cap基因:参考cap基因的比率。

[0646] 在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率处于约1:59到约59:1的范围内。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基为至少约1:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约30个经修饰的衣壳蛋白和约30个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:2(例如,镶嵌病毒颗粒包括约20个经修饰的衣壳蛋白和约40个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约3:5。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:3(例如,镶嵌病毒颗粒包括约15个经修饰的衣壳蛋白和约45个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:4(例如,镶嵌病毒颗粒包括约12个经修饰的衣壳蛋白和48个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:5(例如,镶嵌病毒颗粒包括约10个经修饰的衣壳蛋白和50个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:6。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:7。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:8。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:9(例如,镶嵌病毒颗粒包括约6个经修饰的衣壳蛋白和约54个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:10。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:11(例如,镶嵌病毒颗粒包括约5个经修饰的衣壳蛋白和约55个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:12。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:13。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:14(例如,镶嵌病毒颗粒包括约4个经修饰的衣壳蛋白和约56个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:15。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:19(例如,镶嵌病毒颗粒包括约3个经修饰的衣壳蛋白和约57个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:29(例如,镶嵌病毒颗粒包括约2个经修饰的衣壳蛋白和约58个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约1:59。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约2:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约40个经修饰的衣壳蛋白和约20个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约5:3。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约3:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约45个经修饰的衣壳蛋白和约15个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约4:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约48个经修饰的衣壳蛋白和12个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约5:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约50个经修饰的衣壳蛋白和10个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约6:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约7:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约8:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约9:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约54个经修饰的衣壳蛋白和约6个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约10:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约11:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约55个经修饰的衣壳蛋白和约5个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约12:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约13:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少

约14:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约56个经修饰的衣壳蛋白和约4个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约15:1。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约19:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约57个经修饰的衣壳蛋白和约3个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约29:1(例如,镶嵌病毒颗粒包括约58个经修饰的衣壳蛋白和约2个参考衣壳蛋白)。在一些镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率为至少约59:1。

[0647] 在一些非镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率可以是1:0,其中非镶嵌病毒颗粒的每个衣壳蛋白用结合对的第一成员修饰。在一些非镶嵌病毒颗粒实施方案中,蛋白质亚基的比率可以是0:1,其中非镶嵌病毒颗粒的每个衣壳蛋白没有用结合对的第一成员修饰。

[0648] 插入位点

[0649] 由于至少大区段的高保守度和紧密相关的家族成员的大成员,可以通过进行氨基酸比对或通过衣壳结构比较来鉴别除列举的AAV以外的AAV的对应插入位点。关于不同AAV衣壳蛋白的示例性比对,参见例如Rutledge等人(1998)《病毒学杂志》72:309-19;Mietzsch等人,(2019)《病毒学》11,362,1-34和美国专利第9,624,274号,用于不同AAV衣壳蛋白的示例性比对,所述参考文献中的每个参考文献以全文引用的方式并入本文中。例如,Mietzsch等人,(2019)在图7处提供了来自不同依赖细小病毒的条带覆盖,描绘了可变区VR I到VR IX。使用如其中所述的这种结构分析和序列分析,技术人员可以确定可变区内的哪些氨基酸对应于AAV的氨基酸序列,该氨基酸序列可以容纳例如本文所述的靶向配体、结合对的第一成员和/或可检测标记的插入。

[0650] 通常,靶向配体、结合对的第一成员和/或可检测标记可以插入AAV衣壳蛋白的可变区或可变环、AAV衣壳蛋白的GH环等中。

[0651] 在一些实施方案中,将结合对的第一成员和/或可检测标记插入非灵长类动物AAV的VP1衣壳蛋白中,位于与选自自由AAV2衣壳蛋白VP1的G453、AAV2衣壳蛋白VP1的N587、AAV9衣壳蛋白VP1的G453和AAV9衣壳蛋白VP1的A589组成的组的氨基酸位置对应的氨基酸位置之后。在一些实施方案中,将结合对的第一成员和/或可检测标记插入非灵长类动物AAV的VP1衣壳蛋白中,位于与AAV2 VP1衣壳的N587和R588对应的氨基酸之间。非灵长类动物VP1衣壳蛋白的另外的合适的插入位点包含对应于AAV2的VP1衣壳蛋白的以下的那些插入位点:I-1、I-34、I-138、I-139、I-161、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-459、I-471、I-520、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713和I-716(Wu等人,(2000)《病毒学杂志》74:8635-8647)。本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白可以是非灵长类动物衣壳蛋白,其包含插入到与选自自由I-1、I-34、I-138、I-139、I-161、I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-459、I-471、I-520、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713、I-716及其组合组成的组的AAV2衣壳蛋白的位置对应的位置中的结合对的第一成员和/或可检测标记。非灵长类动物AAV的其他合适的插入位点包括对应于AAV1的I-587或I-590、AAV1的I-589、AAV3的I-585、AAV4的I-584或I-585以及AAV5的I-575或I-585的那些位点。在一些实施方案中,本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白可以是非灵长类动物衣壳蛋白,其包含插入到与选自自由I-587(AAV1)、I-589(AAV1)、I-585(AAV3)、I-585(AAV4)、I-585(AAV5)及其组合组成的组的位置对应的位置中的靶向配体、结合对的第一成

员和/或可检测标记。

[0652] 在一些实施方案中,将结合对的第一成员和/或可检测标记插入非灵长类动物AAV的VP1衣壳蛋白中,位于与选自由禽类AAV衣壳蛋白VP1的I444、禽类AAV衣壳蛋白VP1的I580、鬃狮蜥AAV衣壳蛋白VP1的I573、鬃狮蜥AAV衣壳蛋白VP1的I436、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I429、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I430、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I431、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I432、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I433、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I434、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I436、海狮AAV衣壳蛋白VP1的I437以及海狮AAV衣壳蛋白VP1的I565组成的组的氨基酸位置对应的氨基酸位置之后。

[0653] 本文中的命名法I-####、I#等是指用####命名相对于AAV衣壳蛋白的VP1蛋白的氨基酸编号的插入位点(I),然而,此类插入可以直接定位于N端或C端,优选地位于给定氨基酸的5个氨基酸的N端或C端,优选地给定氨基酸的3个、更优选地2个、尤其1个氨基酸的N端或C端的序列中的一个氨基酸的C端。另外,本文中所提及的位置是相对于由AAV衣壳基因编码的VP1蛋白的,并且可以通过进行由适当的AAV衣壳基因编码的VP1、VP2和VP3蛋白的序列比对而容易地鉴定由衣壳基因编码的VP2和VP3衣壳蛋白的对应位置(及其点突变)。

[0654] 因此,插入至cap基因的这些位点之一的编码核酸的对应位置中使得插入至VP1、VP2和/或VP3中,因为衣壳蛋白由具有交错起始密码子的相同基因的重叠阅读框编码。因此,对于AAV2,举例来说,根据此命名法,插入在氨基酸1与138之间为仅插入至VP1中,插入在138与203之间为插入至VP1和VP2中,且插入在203与C端之间为插入至VP1、VP2和VP3中,对于插入位点I-587情况当然也是如此。因此,本发明涵盖在VP1、VP2和/或VP3蛋白中具有对应插入的AAV的结构基因。

[0655] 本文还提供了对本发明的VP3衣壳蛋白进行编码的核酸。AAV衣壳蛋白可以但不一定由具有交错起始密码子的相同基因的重叠阅读框编码。在一些实施方案中,对本发明的VP3衣壳蛋白进行编码的核酸不也对本发明的VP2衣壳蛋白或VP1衣壳蛋白也进行编码。在一些实施方案中,对本发明的VP3衣壳蛋白进行编码的核酸也可以对本发明的VP2衣壳蛋白进行编码,但不也对本发明的VP1衣壳进行编码。在一些实施方案中,对本发明的VP3衣壳蛋白进行编码的核酸也可以对本发明的VP2衣壳蛋白和本发明的VP1衣壳进行编码。

[0656] 在一些实施方案中,包含含有结合对的第一和第二成员的经修饰的病毒衣壳蛋白的病毒衣壳(例如,其中第二成员可操作地连接到靶向配体,包含多特异性结合蛋白等)能够感染特定细胞,例如,与对照病毒衣壳相比具有增强的靶向和结合特定细胞的能力,该对照病毒衣壳与经修饰的病毒衣壳蛋白相同,不同之处在于其缺乏结合对的第一和第二成员中的一者或两者,例如包含对照衣壳蛋白。在一些实施方案中,与对照病毒衣壳的不可检测的转导效率相比,病毒衣壳具有可检测的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高10%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高20%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高30%的转导效率,所述

病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高40%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高50%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高60%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高70%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高75%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高80%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高85%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高90%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高95%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高99%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。

[0657] 在一些实施方案中,包含含有结合对的第一和第二成员的经修饰的病毒衣壳蛋白的病毒衣壳(例如,其中第二成员可操作地连接到靶向配体,包含多特异性结合蛋白等)能够感染特定细胞,例如,与对照病毒衣壳相比具有增强的靶向和结合特定细胞的能力,该对照病毒衣壳与经修饰的病毒衣壳蛋白相同,不同之处在于其缺乏结合对的第一和第二成员中的一者或两者,例如包含对照衣壳蛋白。在一些实施方案中,与对照病毒衣壳的不可检测的转导效率相比,病毒衣壳具有可检测的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高10%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高20%的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成

[illegible]

衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少6倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少7倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少8倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少9倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少10倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少20倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少30倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的合适的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少40倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少50倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少60倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少70倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少80倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少90倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,病毒衣壳具有比对照病毒衣壳的转导效率高至少100倍的转导效率,所述病毒衣壳包含如本文所述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白结合到与靶向配体连接的结合对的第一和第二成员。在一些实施方案中,与合适的对照病毒颗粒(例如,包含AAV血清型的病毒衣壳,其中一部分包含在本发明的病毒衣壳中,例如,作为包含非灵长类动物AAV、远程AAV或其组合的

衣壳蛋白的氨基酸序列的病毒衣壳蛋白的一部分)相比,本发明的病毒颗粒能够更好地逃避从人类患者分离的血清中预先存在的抗体的中和作用,所述病毒颗粒包含含有非灵长类动物AAV、远程AAV或其组合的衣壳蛋白的氨基酸序列的病毒衣壳蛋白,并且任选地包含结合对的第一和第二成员(例如,其中第二成员可操作地连接到靶向配体,包含多特异性结合蛋白等),所述对照病毒颗粒还任选地包含结合对的第一和第二成员(例如,其中第二成员可操作地连接到靶向配体,包含多特异性结合蛋白等)。在一些实施方案中,与适当的对照病毒颗粒相比,本发明的包括病毒衣壳蛋白的病毒颗粒需要至少2倍以上的总IVIG或IgG进行中和(例如,50%或更高的感染抑制),例如,(例如,本发明的病毒颗粒的IC50值是对照病毒颗粒的IC50值的至少2倍),所述病毒衣壳蛋白包括非灵长类动物AAV、远程AAV或其组合的衣壳蛋白的氨基酸序列。

[0658] 在本发明的包括可检测标记的一些实施方案中,靶向配体包括多特异性结合分子,所述多特异性结合分子包括(i)特异性地结合可检测标记的抗体互补位和(ii)特异性地结合受体的第二结合结构域,所述靶向配体可以与珠粒的(例如,用于纯化)表面缀合或由靶细胞表达。因此,包括(i)特异性地结合可检测标记的抗体互补位和(ii)特异性地结合受体的第二结合结构域的多特异性结合分子靶向病毒颗粒。此类“靶向”或“定向”可以包含这样一种情况:其中野生型病毒颗粒靶向组织内的若干个细胞和/或生物体内的若干个器官,通过插入可检测标记来减少直至消除对组织或器官的广泛靶向,并且利用多特异性结合分子实现对组织中更特定的细胞或生物体中更特定的器官的重新靶向。此类重新靶向或重定向也可以包含这样一种情况:其中野生型病毒颗粒靶向组织,通过插入可检测标记来减少直至消除对组织的靶向,并且利用多特异性结合分子实现对完全不同组织的重新靶向。如本文所描述的抗体互补位通常至少包括特异性地识别可检测标记的互补决定区(CDR),例如,重链和/或轻链可变结构域的CDR3区。在一些实施方案中,多特异性结合分子包括抗体(或其一部分),所述抗体包括特异性地结合可检测标记的抗体互补位。例如,多特异性结合分子可以包括单结构域重链可变区或单结构域轻链可变区,其中单结构域重链可变区或单结构域轻链可变区包括特异性地结合可检测标记的抗体互补位。在一些实施方案中,多特异性结合分子可以包括Fv区,例如,多特异性结合分子可以包括scFv,所述scFv包括特异性地结合可检测标记的抗体互补位。在一些实施方案中,本文所述的多特异性结合分子包含特异性结合c-myc (SEQ ID NO:246)的抗体互补位。

[0659] 本发明的一个实施方案为包括本发明的经修饰的病毒衣壳蛋白的多聚体结构。多聚体结构包括至少5个、优选地至少10个、更优选地至少30个、最优选地至少60个如本文所描述的经修饰的病毒衣壳蛋白,所述经修饰的病毒衣壳蛋白包括特异性结合对的第一成员。其可以形成常规病毒衣壳(空病毒颗粒)或病毒颗粒(使所关注核苷酸衣壳化的衣壳)。包括病毒基因组的病毒颗粒的形成是使用本文所描述的经修饰的病毒衣壳的高度优选特征。

[0660] 本发明的另外的实施方案是至少一种经修饰的病毒衣壳蛋白和/或对其进行编码的核酸的用途,优选地用于制造并用于将所关注核苷酸转移到靶细胞中的至少一种多聚体结构(例如,病毒颗粒)的用途。

[0661] 使用和制造方法

[0662] 本文所述的经修饰的病毒衣壳的另一个实施方案是它们用于将所关注的核苷酸

(例如报告基因或治疗性基因)递送至靶细胞的用途。通常,所关注的核苷酸的包装包括用所关注的基因替换AAV ITR序列之间的AAV基因组以产生转移质粒,然后根据众所周知的方法将其封装在AAV衣壳中。因此,本文所述的经修饰的病毒衣壳可以封装转移质粒和/或所关注的核苷酸,其通常可包含位于所关注的基因(例如报告基因或治疗性基因)侧翼的5'和3'反向末端重复(ITR)序列,或所关注的基因的一部分(其可以在病毒或非病毒启动子的控制下)。根据众所周知的包装AAV病毒颗粒的方法,经修饰的病毒衣壳、5' ITR和3' ITR不需要具有相同的AAV血清型。在一个实施方案中,转移质粒和/或所关注的核苷酸从5'到3'包含:5' ITR、启动子、基因(例如,报告基因和/或治疗性基因)和3' ITR。

[0663] AAV转移质粒设计的考虑因素是野生型AAV基因组为约4.7kb。因此,本文包括提供包装超过单个AAV包装能力的所关注的核苷酸的众所周知的策略。此类策略包括但不限于双载体策略,该策略利用ITR介导的重组来表达比野生型AAV基因组更大的所关注的基因,该表达是通过来自两个互补载体基因组的分子间重组ITR的转录剪接,通过同源性的载体重组、RNA反式剪接和/或经由分裂内含肽设计的蛋白质“反式剪接”来进行的。参见例如Nakai, H. 等人(2000)《自然生物科技》18:527-532;Sun, L. (2000)《自然医学》6:599-602 (2000);Ghosh, A. 等人(2008)《分子疗法》16:124-130(2008);Lai, Y (2005)《自然生物科技》23:1435-1439;Chew, W. L. 等人(2016)《自然方法》13:868-874;Li, J. (2008) Hum.《基因疗法》19:958-964,每个参考文献均以全文引用的方式并入本文中。

[0664] 已经描述了将大基因转移到靶细胞中的双AAV载体策略,其依赖于不同的机制,包括但不限于反式剪接,包括双载体中的重叠区域,以及两者的杂交体。Tornabene和Trapani (2020)《人类基因疗法》31:47-56;还参见美国专利第8,236,557号,每个参考文献以全文引用的方式并入本文中。

[0665] 反式剪接方法利用AAV ITR序列串联以重组全长基因组的能力,其中两个或更多个病毒衣壳中的每一个分别封装两个或多个转移质粒中的一个,每个转移质粒都包含所关注的基因的一部分。例如,在双载体方法中,两个转移质粒可以如下设计:5'-转移质粒包含启动子、所关注的基因的编码序列的5'部分和剪接供体(SD)信号;3'-转移质粒包含剪接受体(SA)信号、所关注的基因的3'部分和聚A信号。在两个AAV基因组首尾相连的ITR介导的串联后,SD和SA信号将允许重组基因组的剪接。

[0666] 当采用重叠区域方法时,所关注的大基因也会被分裂。在重叠区域方法中,5'和3'部分(因此5'转移质粒和3'转移质粒)共享重组序列,例如,同源区域,例如,每个部分包含重叠序列。通过由重组序列(例如,同源/重叠区域)介导的同源重组,使所关注的基因在靶细胞中完整。

[0667] 在杂交方法中,5'-转移质粒和3'-转移质粒各自包含高度重组序列,其中重组序列位于所关注的基因的编码序列的5'部分的SD信号的下流和所关注的基因的编码序列的3'部分的SA信号的上游。在这种杂交系统中,可以通过ITR介导的串联和剪接和/或通过同源重组而使所关注的基因完整。

[0668] 也可以利用RNA或蛋白质水平的反式剪接。在RNA反式剪接方法中,两个转移质粒可以分别编码大基因的前mRNA的5'和3'片段,并且共享有利于反式剪接的内含子杂交结构域,导致两个半转录物连接成完整的全长mRNA。

[0669] 蛋白质反式剪接发生在翻译后,并被称为分裂内含肽的插入蛋白质催化。分裂内

含肽在两个宿主蛋白的末端表达为两个独立的多肽(N-内含肽和C-内含肽)。N-内含肽和C-内含肽多肽在彼此相遇之前保持催化失活。当彼此相遇时,每个内含肽从宿主蛋白中精确地切除自身,同时经由肽键介导N-和C-宿主多肽的连接。分裂内含子的用途已用于对肌肉、肝脏和视网膜疾病关注的治疗性基因的基于AAV的递送。例如,在共递送与N-和C-内含肽编码序列融合的两半迷你肌营养不良蛋白cDNA时,显示了两种多肽的有效产生。Li等人(2008)《人类基因疗法》19:958-64。类似地,AAV分裂内含肽已被广泛用于成簇的规则间隔短回文重复序列(CRISPR)-Cas9核酸酶的表达和连接。

[0670] 上述双载体方法在本领域是众所周知的。参见例如Tornabene和Trapani (2020), 前述;每个专利第8,236,557号。因此,在一些实施方案中,本文所述的经修饰的病毒衣壳封装所关注的核苷酸,其中所关注的核苷酸包含所关注基因的一部分。在一些实施方案中,包含所关注的基因一部分的所关注的核苷酸还包含剪接供体信号或剪接受体信号和/或重组序列。在一些实施方案中,包含所关注的基因一部分的所关注的核苷酸包含内含子杂交结构域编码序列。在一些实施方案中,包含所关注的基因一部分的所关注的核苷酸包含N-内含肽或C-内含肽编码序列。

[0671] 转移质粒/所关注的核苷酸的设计包括包括一个或多个将控制所关注的基因的表达的调控元件,例如启动子和/或增强子元件。适用启动子的非限制性实例包含例如巨细胞病毒(CMV)启动子、脾病灶形成病毒(SFFV)启动子、延长因子1 α (EF1a)启动子(1.2kb的EF1a启动子或0.2kb的EF1a启动子)、嵌合EF 1a/IF4启动子和磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。内部增强子也可存在于病毒构筑体中,以增加所关注的基因的表达。例如,可使用CMV增强子(Karasuyama等人1989.《实验医学杂志(J. Exp. Med.)》169:13,其以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施方案中,CMV增强子可与鸡 β -肌动蛋白启动子组合使用。在一些实施方案中,组织异特性调控元件,例如肌特异性启动子和/或调控元件可用于驱动所关注的基因的表达。例如,基于肌肉肌酸激酶基因的肌特异性调控元件的用途已被用于肌肉基因疗法治疗,诸如杜氏肌营养不良(DMD)和肢带型肌营养不良(LGMD)。参见例如,Salva,M.Z.等人(2007)《分子疗法(Mol. Ther.)》15:320-329,该参考文献以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,本文的转移质粒和/或所关注的核苷酸包含肌肉肌酸激酶(MCK)的增强子和/或启动子,其中MCK的增强子和/或启动子驱动所关注的基因的表达。在一些实施方案中,本文的转移质粒和/或所关注的核苷酸包含募集RNA聚合酶II的增强子和/或启动子元件,其中MCK的增强子和/或启动子驱动所关注的基因的表达。在一些实施方案中,本文的转移质粒和/或所关注的核苷酸包含募集RNA聚合酶III的增强子和/或启动子元件,其中MCK的增强子和/或启动子驱动所关注的基因的表达。

[0672] 在一些实施方案中,双向启动子载体也已用于双重治疗性基因盒的递送。这方面的一个实例是双向鸡 β -肌动蛋白普遍存在的启动子,该启动子驱动HexA酶的己糖胺酶 α -亚基和 β -亚基的同时表达,这两个基因分别涉及泰萨氏病(Tay-Sachs)和桑霍夫病(Sandhoff disease)。Lahey等人(2020)《分子疗法》28:2150-2160,该参考文献以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,本文的转移质粒和/或所关注的核苷酸包含双向启动子,其中双向启动子驱动两种不同的所关注的基因的表达。

[0673] 可以使多种报告基因(或可检测部分)衣壳化于包括本文所描述的经修饰的病毒衣壳蛋白的多聚体结构中。示例性报告基因包含例如b-半乳糖苷酶(所编码的lacZ基因)、

绿色荧光蛋白 (GFP)、增强型绿色荧光蛋白 (eGFP)、MmGFP、蓝色荧光蛋白 (BFP)、增强型蓝色荧光蛋白 (eBFP)、mPlum、mCherry、tdTomato、mStrawberry、J-Red、DsRed、mOrange、mKO、mCitrine、Venus、YPet、黄色荧光蛋白 (YFP)、增强型黄色荧光蛋白 (eYFP)、Emerald、CyPet、青色荧光蛋白 (CFP)、Cerulean、T-Sapphire、萤光素酶、碱性磷酸酶或其组合。本文所描述的方法展现了利用报告基因对绿色荧光蛋白进行编码的用途来构建靶向颗粒,然而,技术人员在阅读本公开后将理解,本文所描述的病毒颗粒可以在不存在报告基因的情况下或在具有本领域中已知的任何报告基因的情况下产生。

[0674] 也可以使多种治疗性基因衣壳化于包括本文所描述的经修饰的病毒衣壳蛋白的多聚体结构中,例如,作为转移颗粒的一部分。治疗基因的非限制性实例包含编码毒素(例如自杀基因)、治疗抗体或其片段、CRISPR/Cas系统或其部分、反义RNA、siRNA、shRNA等的那些。

[0675] 本发明的另外的实施方案是一种制备经修饰的衣壳蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0676] a) 在合适的条件下表达对经修饰的衣壳蛋白进行编码的核酸,以及

[0677] b) 分离步骤a)的表达的衣壳蛋白。

[0678] 在一些实施方案中,如本文所述的病毒粒子包括嵌合衣壳,例如包括与参考衣壳蛋白呈某一比率的如本文所述地基因修饰(在不存在或存在与靶向配体的共价键的情况下)的衣壳蛋白的衣壳。一种用于制造此类嵌合病毒粒子的方法包括

[0679] a) 在合适的条件下以至少约60:1到约1:60,例如,2:1、1:1、3:5、1:2、1:3等比率(wt/wt)表达对经修饰的衣壳蛋白进行编码的核酸和对参考衣壳蛋白进行编码的核苷酸,以及

[0680] b) 分离步骤a)的表达的衣壳蛋白。

[0681] 在一些实施方案中,本文所描述的组合物包括以下,或本文所描述的方法将以下组合:经修饰的cap基因:参考cap基因(或参考cap基因的组合),其比率处于至少约1:60到约60:1,例如,2:1、1:1、3:5、1:2、1:3等的范围内的。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:2。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:3。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:4。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:5。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:6。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:7。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:8。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:9。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:10。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:11。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:12。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:13。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:14。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:15。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:16。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:17。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:18。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:19。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:20。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:25。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:30。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:35。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:40。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:45。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:50。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:55。在一些实施方案中,所述比率为至少约1:60。在一些实施方案中,所述比率为至少约2:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约3:1。在一些

实施方案中,所述比率为至少约4:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约5:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约6:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约7:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约8:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约9:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约10:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约11:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约12:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约13:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约14:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约15:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约16:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约17:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约18:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约19:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约20:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约25:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约30:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约35:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约40:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约45:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约50:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约55:1。在一些实施方案中,所述比率为至少约60:1。

[0682] 在一些实施方案中,镶嵌病毒颗粒中的VP蛋白亚基的比率可以但不一定化学计量地反映经修饰的cap基因:参考cap基因的比率。作为非限制性示例性实施方案,根据所述方法形成的镶嵌衣壳的经修饰的衣壳蛋白:参考衣壳蛋白比率可以被认为但不一定与用于产生镶嵌衣壳的对其进行编码的核酸的比率(wt:wt)类似。在一些实施方案中,镶嵌衣壳包括约1:59到约59:1的蛋白质亚基比率。

[0683] 本发明的另外的实施方案是一种用于改变病毒的趋向性的方法,所述方法包括以下步骤:(a)将对氨基酸序列进行编码的核酸插入到对病毒衣壳蛋白进行编码的核酸序列中,以形成对包括氨基酸序列的经基因修饰的衣壳蛋白进行编码的核苷酸序列,和/或(b)在足以产生病毒颗粒的条件下培养包装细胞,其中包装细胞包括核酸。本发明的另外的实施方案是一种用于在衣壳蛋白的表面上显示靶向配体的方法,所述方法包括以下步骤:(a)在合适的条件下表达对如本文所描述的经修饰的病毒衣壳蛋白进行编码的核酸(和任选地对参考衣壳蛋白进行编码的核苷酸),其中核酸对包括特异性结合对的第一成员的衣壳蛋白进行编码,(b)分离步骤(a)的包括特异性结合对的第一成员的经表达的衣壳蛋白或包括所述经表达的衣壳蛋白的衣壳,以及(c)在适于允许在第一成员与第二成员之间形成异肽键的条件下将衣壳蛋白或衣壳与特异性结合对的第二同源成员一起温育,其中特异性结合对的第二同源成员与靶向配体融合。

[0684] 在一些实施方案中,包装细胞进一步包括有包括所关注的核苷酸的辅助质粒和/或转移质粒。在一些实施方案中,所述方法进一步包括从培养上清液分离自互补腺相关病毒颗粒。在一些实施方案中,所述方法进一步包括裂解包装细胞以及从细胞裂解物中分离单链腺相关病毒颗粒。在一些实施方案中,所述方法进一步包括(a)清除细胞碎片;(b)用核酸酶,例如DNase I和MgCl₂处理含有病毒颗粒的上清液;(c)使病毒颗粒浓缩;(d)使病毒颗粒纯化;以及(e) (a) - (d)的任何组合。

[0685] 可用于产生本文所描述的病毒颗粒的包装细胞包含例如允许病毒的动物细胞或被修饰以允许病毒的细胞;或包装细胞构建体,例如使用如磷酸钙的转化剂。可用于产生本文所描述的病毒颗粒的包装细胞系的非限制性实例包含例如人胚肾293(HEK-293)细胞(例如美国典型培养物保藏中心[ATCC]编号CRL-1573)、含有SV40大T-抗原的HEK-293细胞

(HEK-293T或293T)、HEK293T/17细胞、人肉瘤细胞系HT-1080(CCL-121)、淋巴瘤细胞样细胞系Raji(CCL-86)、成胶质细胞瘤-星形细胞瘤上皮样细胞系U87-MG(HTB-14)、T-淋巴瘤细胞系HuT78(TIB-161)、NIH/3T3细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)(例如,ATCC编号CRL9618、CCL61、CRL9096)、HeLa细胞(例如,ATCC编号CCL-2)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC编号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC编号CCL10)、PC12细胞(ATCC编号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC编号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC编号CCLI.3)、HLHepG2细胞、CAP细胞、CAP-T细胞等。

[0686] L929细胞、概述于Cosset等人(1995)《病毒学杂志》69,7430-7436中的FLY病毒包装细胞系统、NS0(鼠类骨髓瘤)细胞、人羊水细胞(例如CAP、CAP-T)、酵母细胞(包含但不限于酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、甲醇酵母(*Pichia pastoris*))、植物细胞(包含但不限于烟草NT1、BY-2)、昆虫细胞(包含但不限于SF9、S2、SF21、Tni(例如High 5))或细菌细胞(包含但不限于大肠杆菌(*E.coli*))。

[0687] 对于另外的包装细胞和系统、用于将核酸基因组包装到假型病毒颗粒中的包装技术和颗粒,参见例如,Polo等人,《美国国家科学院院刊》,(1999)96:4598-4603。包装方法包含使用永久性表达病毒组分的包装细胞,或通过用质粒瞬时转染细胞。

[0688] 另外的实施方案包括方法,该方法包括在足以将经修饰的Cap蛋白与靶向载体可操作地连接条件下,例如在足以促进靶向载体与经修饰的Cap蛋白缔合的条件下,例如经由特异性结合对的第一和第二成员的化学连接和/或缔合,使本文所述的经修饰的Cap蛋白与靶向载体接触,其中第一成员插入到经修饰的Cap蛋白第一成员中,并且靶向载体与特异性结合对的第二成员融合。

[0689] 另外的实施方案包含将病毒重定向到靶细胞和/或将报告基因或治疗性基因递送到所述靶细胞的方法,所述方法包括用于在体外(例如离体)或在体内转导细胞的方法,所述方法包括以下步骤:使所述靶细胞与包括本文所描述的衣壳的病毒颗粒接触,其中衣壳包括特异性地结合由靶细胞表达的受体的靶向配体。在一些实施方案中,靶细胞处于体外(例如,离体)。在其它实施方案中,靶细胞在个体,例如人的体内。

[0690] 靶细胞

[0691] 可以靶向多种细胞以使用如本文所公开的经修饰的病毒颗粒递送所关注核苷酸。靶细胞一般将基于所关注的核苷酸和所需的效果来选择。

[0692] 在一些实施方案中,可递送所关注的核苷酸以使得靶细胞能够产生蛋白质,所述蛋白质补偿生物体中的缺陷,如酶缺陷或免疫缺陷,如X连锁重症综合性免疫缺陷。因此,在一些实施方案中,通常将在动物中产生蛋白质的细胞被靶向。在其它实施方案中,在其中蛋白质将最有益的区域中的细胞被靶向。

[0693] 在其它实施方案中,所关注的核苷酸,如编码siRNA的基因可抑制靶细胞中特定基因的表达。所关注的核苷酸可例如抑制病原体生命周期中涉及的基因的表达。因此,可以靶向易受病原体感染或被病原体感染的细胞。在其它实施方案中,所关注的核苷酸可抑制负责在靶细胞中产生毒素的基因的表达。

[0694] 在其它实施方案中,所关注的核苷酸可编码杀灭细胞的毒性蛋白,所关注的核苷酸表达于所述细胞中。在此情况下,可靶向肿瘤细胞或其它非所需的细胞。

[0695] 在其它实施方案中,所关注的核苷酸编码治疗蛋白。

[0696] 一旦鉴别出在其中期望所关注的核苷酸的表达的特定靶细胞群体,选择特异性表达于靶细胞群体上的靶受体。靶受体可仅表达于细胞群体上或在比其它细胞群体更大的程度上表达于细胞群体上。表达越有特异性,则可将越有特异性的递送定向至靶细胞。取决于上下文,标记(以及因此基因递送)的特异性的所需量可变化。例如,为了引入毒性基因,高特异性为最优选的,以避免杀死非靶向细胞。为了表达用于收获的蛋白质,或表达在其中期望全域影响的分泌产物,可能需要较少的标记特异性。

[0697] 如上文所论述,靶受体可为任何受体,可针对所述受体鉴别或产生靶向配体。优选地,靶受体为肽或多肽,如受体。但是,在其它实施方案中,靶受体可为碳水化合物或其它可由结合搭配物识别的分子。如果已知用于靶受体的结合搭配物,例如配体,则其可用作亲和分子。但是,如果未知结合分子,则可使用标准程序产生靶受体的抗体。抗体可接着用作靶向配体。

[0698] 因此,可以基于多种因素选择靶细胞,包含例如,(1)应用(例如,疗法、要收集的蛋白质的表达和赋予抗病性)和(2)具有所期望的特异性的量的标志物的表达。

[0699] 靶细胞不以任何方式限制且包含种系细胞和细胞系以及体细胞和细胞系。当靶细胞为种系细胞时,靶细胞优选地选自自由单细胞胚胎和胚胎干细胞(ES)组成的群组。

[0700] 药物组合物、剂型和施用

[0701] 另外的实施方案提供一种药物,所述药物包括至少一种根据本发明的经修饰的病毒衣壳蛋白和适当的靶向配体和/或根据本发明的核酸。优选地,此类药物可用于基因转移颗粒。

[0702] 本文还公开包括本文所述的病毒粒子和药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物。另外,本文公开包括本文所述的病毒粒子的药物剂型。

[0703] 如本文所论述,本文所述的病毒粒子可用于各种治疗应用(体内和离体)和用作研究工具。

[0704] 本文公开的基于病毒粒子的药物组合物可使用一种或多种生理学上可接受的载体和/或赋形剂以任何常规方式配制。病毒粒子可被配制用于通过例如注射、吸入或隔离(通过口腔或鼻子)施用,或通过经口、经颊、非经肠或经直肠施用,或通过直接施用至肿瘤。

[0705] 药物组合物可被配制用于多种施用模式,包含全身、局部或局部化施用。技术和配制物可见于例如《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》, Meade Publishing Co., Easton, Pa中。对于全身施用,注射为优选的,包含肌肉内、静脉内、腹膜内和皮下。出于注射目的,药物组合物可在液体溶液中,优选地在生理学上相容的缓冲液,如汉克氏溶液(Hank's solution)或林格氏溶液(Ringer's solution)中配制。另外,药物组合物可以固体形式配制且在使用前立即再溶解或悬浮。药物组合物的冻干形式也是合适的。

[0706] 对于经口施用,药物组合物可呈例如通过常规方式用药学上可接受的赋形剂制备的片剂或胶囊形式,所述赋形剂例如粘合剂(例如预胶凝玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如马铃薯淀粉或乙醇酸淀粉钠);或润湿剂(例如月桂基硫酸钠)。片剂也可通过所属领域中众所周知的方法包覆。用于经口施用的液体制剂可呈例如溶液、糖浆或悬浮液形式,或其可以干燥产品形式呈现,在使用之前用水或其它合适的媒剂复原。

此类液体制剂可以通过常规方式用药学上可接受的添加剂,如悬浮剂制备,(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒剂(例如,油、油性酯、乙醇或馏分的植物油);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。所述制剂在适当时还可含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

[0707] 药物组合物可被配制用于通过注射,例如通过快速注射或连续输注进行非经肠施用。用于注射的配制物可以单位剂型呈现于例如安瓿或多剂量容器中,其中任选地添加有防腐剂。药物组合物可进一步配制为油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液,且可含有其它试剂,包含悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0708] 另外,药物组合物还可配制为积存制剂。这些长效配制物可通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射施用。因此,举例来说,所述化合物可用合适的聚合材料或疏水性材料(例如呈可接受的油中的乳液形式)或离子交换树脂,或呈微溶性衍生物形式,例如呈微溶性盐形式配制。其它合适的递送系统包含微球,其使得有可能在长时段内局部非侵入性递送药物。此技术可包含具有前毛细管尺寸的微球,其可通过冠状动脉导管注射至器官的任何选定部分中而不引起发炎或缺血。施用的治疗剂从微球缓慢释放且由所选组织中存在的周围细胞吸收。

[0709] 全身施用还可通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮施用,在配制物中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂为所属领域中一般已知的,且例如对于经粘膜施用包含胆盐和梭链孢酸衍生物。此外,清洁剂可用于促进渗透。经粘膜施用可使用鼻喷雾剂或栓剂进行。对于局部施用,本文所述的病毒粒子可配制为所属领域中一般已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。也可局部使用洗涤溶液来治疗损伤或发炎,以加速愈合。

[0710] 适合于注射使用的药物形式可包含无菌水溶液或分散液;包含芝麻油、花生油或水性丙二醇的配制物;和用于无菌可注射溶液或分散液的即用型制剂的无菌粉末。在所有情况下,所述形式必须为无菌的却必须为流体。其必须在制造条件和某些储存参数(例如制冷和冷冻)下稳定,且必须保藏免受微生物,如细菌和真菌的污染作用。

[0711] 如果本文公开的配制物用作增强个体的免疫反应的治疗剂,则治疗剂可配制为中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包含酸加成盐(由蛋白质的游离氨基形成),并且其由例如盐酸或磷酸的无机酸,或如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成。由游离羧基形成的盐也可源自无机碱,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱,如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0712] 载体也可含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用如卵磷脂的涂层、通过在分散液的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可通过所属领域中已知的各种抗细菌剂和抗真菌剂实现微生物作用的预防。在许多情况下,将优选地包含等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现可注射组合物的长期吸收。

[0713] 可通过将所需量的活性化合物或构筑体与上文列举的各种其它成分一起并入适当溶剂中,视需要接着过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。

[0714] 在配制后,溶液可以与剂量配制物相容的方式并且以治疗有效的量施用。配制物易于以多种剂型施用,如上文所述的可注射溶液的类型,但也可采用缓释胶囊或微粒和微

球等。

[0715] 例如,对于在水溶液中的非经肠施用,必要时应适当地缓冲溶液,且首先用足够生理盐水或葡萄糖使液体稀释剂呈现等渗。这些特定水溶液尤其适合于静脉内、瘤内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。在此上下文中,可采用的无菌水性介质将为所属领域的技术人员鉴于本公开所已知的。例如,一个剂量可溶解于1ml等渗NaCl溶液中,且添加至1000ml皮下输液流体或注射于提出的输注部位。

[0716] 负责施用的人员将在任何情况下确定个别个体的合适剂量。例如,取决于需要或暴露于病原生物体或个体的病况(例如癌症),可持续一定时段每天或每周,或每月、每年两次或每年向个体施用本文所述的病毒粒子。

[0717] 除了被调配成用于不经肠施用,如静脉内、瘤内、皮内或肌肉内注射的化合物以外,其它药学上可接受的形式包含例如片剂或用于经口施用的其它固体;脂质体制剂;定时释放胶囊;可生物降解和当前使用任何其它形式。

[0718] 还可使用鼻内或可吸入溶液或喷雾、气溶胶或吸入剂。鼻用溶液可为被设计成以滴剂或喷雾向鼻通道施用的水溶液。可制备鼻用溶液,以使其在许多方面类似于鼻分泌物。因此,水性鼻用溶液通常为等渗的且被略微缓冲以维持5.5至7.5的pH。另外,必要时可在配制物中包含抗微生物防腐剂(与用于眼用制剂的那些类似)和适当的药物稳定剂。各种商业鼻用制剂为已知的,且可包含例如抗生素和抗组织胺且用于预防哮喘。

[0719] 口服配制物可包含赋形剂,如药物级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放配制物或粉末的形式。在某些限定的实施方案中,口服药物组合物将包含惰性稀释剂或可吸收的可食用载体,或其可封闭于硬壳或软壳明胶胶囊中,或其可压缩成片剂,或其可直接与饮食合并。对于口服治疗施用,活性化合物可与赋形剂合并且以可摄取的片剂、口含片、糖衣片、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、粉片等形式使用。

[0720] 片剂、糖衣片、丸剂、胶囊等还可含有以下:粘合剂,例如黄芪胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、褐藻酸等;润滑剂,例如硬脂酸镁;且可添加甜味剂,例如蔗糖、乳糖或糖精;或调味剂,例如胡椒薄荷、冬青油或樱桃调味剂。当单位剂型为胶囊时,除了上述类型的材料之外,其可含有液体载体。各种其它材料可以涂层形式存在或用来以其它方式调节剂量单位的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可用虫胶、糖或两者包覆。酏剂的糖浆可含有活性化合物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、染料以及调味剂,如樱桃或橙味调味剂。

[0721] 本文公开的其它实施方案可涉及与方法和组合物一起使用的试剂盒。试剂盒还可包含合适的容器,例如小瓶、管、微型或微量离心管、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器。当提供额外的组分或试剂时,试剂盒可含有一个或多个可将此试剂或组分放入其中的额外容器。本文的试剂盒通常还将包含用于容纳病毒粒子的装置和任何其它密闭的试剂容器以供商业销售。此类容器可包含注射或吹塑成型塑料容器,其中可存留所需小瓶。任选地,所述组合物可能需要一种或多种额外活性剂,如消炎剂、抗病毒剂、抗真菌剂或抗菌剂或抗肿瘤剂。

[0722] 本文公开的组合物可通过所属领域中已知的任何方式施用。例如,组合物可包含静脉内、瘤内、皮内、动脉内、腹膜内、病灶内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻

内、玻璃体内、阴道内、直肠内、局部、瘤内、肌肉内、鞘内、皮下、结膜下、囊泡内、经粘膜、心包内、脐内、眼内、经口、局部、通过吸入、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过局部灌注、通过导管、通过灌注、在乳膏中或在脂质组合物中向个体施用。

[0723] 所属领域的技术人员已知的任何方法可用于大规模产生本文所述的病毒粒子、包装细胞和粒子构筑体。例如,可在GMP条件下在合格的原代CEF中或通过其它方法制备母液和工作种子储备液。包装细胞可涂铺于大面积的烧瓶上,生长至接近汇合且纯化病毒粒子。可收获细胞且将病毒粒子释放至培养基中,分离且纯化,或通过机械破坏释放细胞内病毒粒子(细胞碎片可通过大孔深度过滤去除且用核酸内切酶消化宿主细胞DNA)。病毒粒子可随后通过切向流过滤,接着透滤来纯化和浓缩。所得浓缩的块体可通过用含有稳定剂的缓冲液稀释来配制,填充至小瓶中且冻干。组合物和配制物可储存以供后续使用。为了使用,冻干的病毒粒子可通过添加稀释剂复原。

[0724] 用于组合疗法的某些额外药剂可通过所属领域中已知的任何方法来配制和施用。

[0725] 如本文中所公开的组合物还可包含佐剂(如铝盐和其它矿物质佐剂)、表面活性剂、细菌衍生物、媒剂和细胞因子。佐剂还可具有拮抗免疫调节特性。例如,佐剂可刺激Th1或Th2免疫性。如本文中所公开的组合物和方法还可包含辅助疗法。

[0726] 骨骼肌相关病症

[0727] 本文还提供了治疗骨骼肌相关病症的方法,所述骨骼肌相关病症例如肌萎缩疾病和/或遗传性肌肉疾病,例如X连锁肌管肌病(XLMTM)、杜氏肌营养不良(DMD)、肌强直性营养不良(DM1)、1型面肩肱型肌营养不良(FSHD)、1A型先天性肌营养不良(MDC1A)、肢带型肌营养不良、抗肌萎缩相关糖蛋白病、肌肉萎缩病状、代谢疾病等。通常,此类方法包括向患有这种骨骼相关病症或处于这种骨骼相关病症风险的患者施用本文所述的病毒颗粒或药物组合物,其中病毒颗粒包含

[0728] (i) 经修饰以包含蛋白质:蛋白质结合对的第一成员的病毒衣壳,

[0729] (ii) 蛋白质:蛋白质结合对的第二成员,其中蛋白质:蛋白质结合对的第二成员包含结合在肌细胞的表面上表达的肌特异性表面蛋白(例如,CACNG1)的靶向配体,

[0730] 其中蛋白质:蛋白质结合对的第一成员和蛋白质:蛋白质结合对的第二成员缔合以定向病毒衣壳对其患者的肌细胞的趋向性,以及

[0731] (iii) 封装在病毒衣壳内的所关注的核苷酸。

[0732] 在一些实施方案中,所关注的核苷酸编码治疗蛋白、自杀基因、抗体或其片段、CRISPR/Cas系统或其部分、反义寡核苷酸、核酶、RNAi分子或shRNA分子。例如,在一些实施方案中,所关注的核苷酸可以编码生长因子、神经营养因子、疾病修饰肌肉蛋白、例如用于肌肉萎缩病状或代谢疾病的代谢蛋白。

[0733] 表2

[0734]

描述	登录号/GI 编号	ITR	编码非结构/rep 蛋白的区域 (蛋白质的登录号/GI 编号)	编码衣壳蛋白的区域 (蛋白质的登录号/GI 编号)
禽类腺相关病毒				
禽类腺相关病毒分离物 YZ-1, 完整基因组	GQ368252.1/ GI: 255710032		243-2237 (ACU30841.1/ GI:255710033)	2255-4471 (ACU30842.1/ GI:255710034)
禽类腺相关病毒分离物 ZN1, 完整基因组	KF937794.1/ GI: 588284633	1-142 4540-4682	244-2235 (AHK22792.1/ GI: 588284634)	2253-4469 (AHK22793.1/ GI: 588284635)
禽类腺相关病毒 ATCC VR-865				
禽类腺相关病毒 ATCC VR-865, 完整基因组	AY186198.1/ GI:31414777	1-142 4552-4694	244-2232 (AAO32086.1/ GI:31414778)	2250-4481 (AAO32087.1/ GI:31414779)
禽类腺相关病毒 ATCC VR-865, 完整基因组	NC_004828.1 /GI:31543992	1-142 4552-4694	244-2232 (NP_852780.1/ GI:31543993)	2250-4481 (NP_852781.1/ GI:31543994)
禽类腺相关病毒 ATCC VR-865, 完整基因组	AY629582.1/ GI:48996102	1-142 4552-4694	244-2232 (AAT48612.1/ GI:48996103)	2250-4481 (AAT48613.1/ GI:48996104)
禽类腺相关病毒株 DA-1				
禽类腺相关病毒株 DA-1, 完整基因组	AY629583.1/ GI: 48996105	1-142 4540-4682	244-2235 (AAT48614.1/ GI:48996106)	2253-4469 (AAT48615.1/ GI:48996107)
禽类腺相关病毒株 DA-1, 完整基因组	NC_006263.1	1-142	244-2235	2253-4469
1, 完整基因组	/GI:51949968	4540-4682	(YP_077182.1/ GI:51949969)	(YP_077183.1/ GI:51949970)
蝙蝠腺相关病毒 YNM				
蝙蝠腺相关病毒 YNM, 完整序列	GU226971.1/ GI:289719008		200-2041 (ADD17085.1/ GI:289719009)	2059-4233 (ADD17086.1/ GI:289719010)
蝙蝠腺相关病毒 YNM, 完整基因组	NC_014468.1 /GI:304422916		200-2041 (YP_00385857 1.1/GI: 304422917)	2059-4233 (YP_00385857 2.1/GI: 304422918)
牛腺相关病毒				
牛腺相关病毒, 完整基因组	AY388617.1/ GI:38679253		368-2200 (AAR26464 1/ GI:38679254)	2216-4426 (AAR26465.1/ GI:38679255)
牛腺相关病毒, 完整基因组	NC_005889.1 / GI:48696557		368-2200 (YP_024970.1/ GI:48696558)	2216-4426 (YP_024971.1/ GI:48696559)
牛细小病毒-2				
牛细小病毒 2 假定的非结构蛋白和假定的衣壳蛋白基因, 完整 cds。	AF406966.1/ GI: 15825370		306-1919 (AAL09671.1/ GI:15825371)	2268-5384 (AAL09672.1/ GI:15825372)

[0736] 表2-续

[0737]

牛细小病毒 2, 完整基因组	NC_006259.1 /GI:51949957		306-1919 (YP_077175.1/ GI:51949958)	2268-5384 (YP_077176.1/ GI:51949959)
加州海狮腺相关病毒 1				
加州海狮腺相关病毒 1 分离物 1136 Rep78 和 VP1 基因, 完整 cds。	JN420371.1/ GI:343458966		284-2086 (AEM37641.1/ GI:343458967)	2117-4273 (AEM37642.1/ GI:343458968)
加州海狮腺相关病毒 1 分离物 1187 Rep78 和 VP1 基因, 完整 cds。	JN420372.1/ GI:343458969		291-2093 (AEM37643.1/ GI:343458970)	2124-4280 (AEM37644.1/ GI:343458971)
鹅细小病毒				
鹅细小病毒 B 菌株, 完整基因组	(U25749.1/GI: 1113795)	1-444 4663-5106	537-2420 (AAA83229.1/ GI:1113796)	2439-4637 (AAA83230.1/ GI:1113797)
				2874-4637 (AAA83231.1/ GI:1113798) 3033-4637 (AAA83232.1/ GI:1113799)
鹅细小病毒, 完整基因组	(NC_001701. 1/GI:9628649)	1-444 4663-5106	537-2420 (NP_043514.1/ GI: 9628650)	2439-4637 (NP_043515.1/ GI: 9628651) 2874-4637 (NP_043516.1/ GI: 9628652) 3033-4637 (NP_043517.1/ GI: 9628653)

[0738]

				GI: 9628653)
鹅细小病毒株 82-0321V, 完整基因组	(EU583389.1 /GI:190888188)	1-381 4600-4980	474-2357 (ACE95848.1/ GI:190888189)	2376-4574 (ACE95849.1/ GI:190888190)
鹅细小病毒株 82-0321, 完整基因组	(EU583390.1 /GI:190888191)	1-416 4635-5050	509-2392 (ACE95850.1/ GI:190888192)	2411-4609 (ACE95851.1/ GI:190888193)
鹅细小病毒株 06-0329, 完整基因组	(EU583391.1 /GI:190888194)	1-418 4637-5054	511-2394 (ACE95852.1/ GI:190888195)	2413-4611 ACE95853.1/ GI:190888196)
鹅细小病毒株 VG32/1, 完整基因组	(EU 583392.1 /GI:190888197)	1-443 4662-5104	536-2419 (ACE95854.1/ GI:190888198)	2438-4636 (ACE95855.1/ GI:190888199)

[0739] 表2-续

[0740]

鹅细小病毒株 SH, 完整基因组	(JF333590.1/ GI:343113618)	1-444 4663-5106	537-2420 (AEL87777.1/ GI:343113619)	2439-4637 (AEL87778.1/ GI:343113620) 2874-4637 (AEL87779.1/ GI:343113621) 3033-4637 (AEL87780.1/ GI:343113622)
鹅细小病毒株 GDaGPV, 完整基因组	(HQ891825.1/ GI:359843307)	1-444 4663-5106	537-2420 (AEV89789.1/ GI:359843308)	2439-4637 (AEV89790.1/ GI:359843309) 2874-4637 (AEV89791.1/ GI:359843310) 3033-4637 (AEV89792.1/ GI:359843311)
鹅细小病毒株 SHFX1201, 完整基因组	(KC478066.1/ GI:459360514)	1-416	509-2392 (AGG56527.1/ GI: 459360515)	2411-4609 (AGG56528.1/ GI: 459360516)
鹅细小病毒株 Y, 完整基因组	(KC1785711/ GI:513129761)	1-444	537-2420 (AGO17637.1/ GI: 513129762)	2439-4637 (AGO17638.1/ GI: 513129763)
鹅细小病毒株 E, 完整基因组	(KC 184133.1/ GI:513129764)	1-443	536-2419 (AGO17639.1/ GI: 513129765)	2438-4636 (AGO17640.1/ GI: 513129766)
鹅细小病毒株 SYG61v, 完整基因组	(KC996729.1/ GI:53199721)	1-442	535-2418 (AGT62580.1/ GI: 531997218)	2437-4635 (AGT62581.1/ GI: 531997219)
鹅细小病毒株 YZ99-6, 完整基因组	(KC996730.1/ GI:531997220)	1-414	507-2390 (AGT62582.1/ GI: 531997221)	2409-4607 (AGT62583.1/ GI: 531997222)
鹅细小病毒非结构蛋白 NS (ns) 和衣壳蛋白 VP	(AF416726.1/ GI:17226299)		1-1884 (AAL37721.1/	1903-4101 (AAL37722.1/

[0741]

(vp) 基因, 完整 cds。			GI:17226300) 529-1884 (ABP93843.1/ GI:145694447)	GI:17226301)
鹅细小病毒株 DY NS 1 (NS1) 、 NS2 (NS2) 、 VP1 (VP1) 、 VP2 (VP2) 和 VP3 (VP3) 基因, 完整 cds。	(EF515837.1/ GI:145694445)		1-1884 (ABP93842.1/ GI:145694446)	1903-4101 (ABP82770.1/ GI:145573169) 2338-4101 (ABP93844.1/GI: 145694448) 2497-4101 (ABP93845.1/ GI:145694449)

[0742] 表2-续

	鹅细小病毒株 PT NS1 蛋白和 VP1 蛋白基因, 完整 cds。	(JF926695.1/ GI:354463162)		9-1892 (AER25356.1/ GI:354463163)	1911-4109 (AER25357.1/ GI:354463164)
	鹅细小病毒株 D NS1 蛋白和 VP1 蛋白基因, 完整 cds。	(JF926696.1/ GI:354463165)		6-1889 (AER25358.1/ GI:354463166)	1908-4106 (AER25359.1/ GI:354463167)
	小鼠腺相关病毒 1				
	小鼠腺相关病毒 1 rep 基因, 部分 cds; 以及 VP1 衣壳、VP2 衣壳和 VP3 衣壳基因, 完整 cds。	DQ 100362.1/ GI:73665994		1-327 (AAZ79671.1/ GI:73665995)	344-2485 (AAZ79672.1/ GI:73665996) 731-2485 (AAZ79673.1/ GI:73665997) 911-2485 (AAZ79674.1/ GI:73665998)
[0743]	番鸭细小病毒				
	野鸭细小病毒 REP 蛋白 (rep) 和三个衣壳蛋白 VP (vp) 基因, 完整 cds	U22967.1/GI: 1113784	1-457 4678-5132	548-2431 (AAA83224.1/ GI:1113785)	2450-4648 (AAA83225.1/ GI:1113786) 2885-4648 (AAA83226.1/ GI:1113787) 3044-4648 (AAA83227.1/ GI:1113788)
	番鸭细小病毒, 完整基因组	NC_006147.2 /GI:51593841	1-457 4678-5132	548-2431 (YP_068410.1/ GI: 51593842)	2450-4648 (YP_068411.1/ GI: 51593843) 2885-4648 (YP_068412.1/ GI: 51593844) 3044-4648 (YP_068413.1/ GI: 51593845)
[0744]	番鸭细小病毒株 P REP 蛋白和 VP1 蛋白基因, 完整 cds。	JF926697.1/ GI:354463168		61-1944 (AER25360.1/ GI:354463169)	1963-4161 (AER25361.1/ GI:354463170)
	番鸭细小病毒株 P1 REP 蛋白和 VP1 蛋白基因, 完整 cds。	JF926698.1/ GI:354463171		61-1944 (AER25362.1/ GI:354463172)	1963-4161 (AER25363.1/ GI:354463173)

[0745] 表2-续

	番鸭细小病毒分离物 SAAS-SHNH, 完整基因组	KC171936.1/ GI:459256867	1-381 4681-5061	512-2395 (AGG53766.1/ GI:459256868)	2414-4612 (AGG53768.1/ GI:459256870) 2849-4612 (AGG53769.1/ GI:459256871) 3008-4612 (AGG53767.1/ GI:459256869)
[0746]	蛇形腺相关病毒 2				
	蛇形腺相关病毒 2 非结构蛋白 1 和衣壳蛋白基因, 部分 cds	EU872429.1/ GI:215401981		1-642 (ACJ66590.1/ GI:215401982)	661-1297 (ACJ66591.1/ GI:215401983)
	蛇细小病毒 1				
	蛇细小病毒 1 非结构蛋白 1 (NS1) 和衣壳蛋白 (VP1) 基因, 完整 cds	AY349010.1/ GI:38017148		324-2012 (AAR07954.1/ GI:38017149)	2030-4210 (AAR07955.1/ GI:38017150)
	蛇细小病毒 1, 完整基因组	NC_006148.1 /GI:51555744		324-2012 (YP_068093.1/ GI: 51555745)	2030-4210 (YP_068094.1/ GI: 51555746)

[0747] 表3:序列表中序列的简述

	SEQ ID NO	简述
	1-240	抗人 CACNG1 抗体或其结合部分
	241	人 CACNG1 CDS
	242	人 CACNG1 蛋白
	243	SpyTag 蛋白
	244	SpyCatcher 蛋白
	245	KTag 蛋白
	246	c-myc 蛋白
	247	B1 表位蛋白
[0748]	248	GLSG 蛋白接头
	249	GLSGSG 蛋白接头
	250	GLSGLSGS 蛋白接头
	251	GLSGLSGLSG 蛋白接头
	252	GLSGGSGLSG 蛋白接头
	253	GSGESG 蛋白接头
	254	异肽蛋白
	255	SpyTag002
	256	人工 hGH pA 特异性引物
	257	人工 5'条形码引物
[0749]	258	人工 3'条形码引物
	259	SpyTag003

[0750] 实施例

[0751] 仅出于说明性目的提供以下实施例并且不打算限制本发明的范围。

[0752] 方法

[0753] 仅出于说明性目的提供以下实施例并且不打算限制本发明的范围。

[0754] AAV病毒载体的制备

[0755] 通过使用PEI Pro用以下质粒转染293T包装细胞来产生病毒:pAd辅助质粒、编码报告蛋白的含AAV2 ITR的基因组质粒以及编码AAV Rep和CAP基因的pAAV-CAP质粒,具有或

不具有编码抗体的重链和轻链的额外质粒。如W02019006046中所述,抗体重链构建体均在其C末端与SpyCatcher融合,该文献以全文引用的方式并入本文中。在不完全DMEM(无额外补充物)中制备转染复合物,并在室温下温育10分钟。

[0756] 通过用以下质粒和数量转染15cm板的293T包装细胞来产生每种病毒:

[0757] WT AAV2/HBM GFP

[0758] pAd辅助质粒 16ug

[0759] pAAV-CAG-eGFP 8ug

[0760] pAAV2-CAP WT或pAAV2 R585A R588A HBM 8ug

[0761] AAV2抗人ASGR1/抗人CACNG1 GFP

	pAd 辅助质粒	16ug
	pAAV-CAG-eGFP	8ug
[0762]	pAAV2 CAP G453 接头 10 SpyTag HBM	1 ug
	pAAV2-CAP R585A R588A HBM	7 ug

[0763] 具有

[0764] p抗ASGR1或抗CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh 1.5ug

[0765] ULC 1-39Vk 3ug

[0766] WT AAV2/HBM萤光素酶

[0767] pAd辅助质粒 16ug

[0768] pAAV-UbC-萤火虫萤光素酶 8ug

[0769] pAAV2-CAP WT或pAAV2 R585A R588A HBM 8ug

[0770] AAV2抗人ASGR1/抗人CACNG1萤光素酶

	pAd 辅助质粒	16ug
	pAAV-UbC-萤火虫萤光素酶	8ug
[0771]	pAAV2 CAP G453 接头 10 SpyTag HBM	1 ug
	pAAV2-CAP R585A R588A HBM	7 ug

[0772] 具有

[0773] p抗ASGR1或抗CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh 1.5ug

[0774] ULC 1-39Vk 3ug

[0775] WT AAV9/N272A GFP

[0776] pAd辅助质粒 16ug

[0777] pAAV-CAG-eGFP 8ug

[0778] pAAV9-CAP或pAAV9 N272A 8ug

[0779] AAV9抗人ASGR1/抗人CACNG1 GFP

	pAd 辅助质粒	16ug
	pAAV-CAG-eGFP	8ug
[0780]	pAAV9 CAP G453 接头 10 SpyTag W503A	1 ug
	pAAV9-CAP N272A	7 ug

[0781] 具有

[0782] p抗ASGR1或抗CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh 1.5ug

- [0783] ULC 1-39Vk 3ug
- [0784] WT AAV9/N297A萤光素酶
- [0785] pAd辅助质粒 16ug
- [0786] pAAV-UbC-萤火虫萤光素酶 8ug
- [0787] pAAV9-CAP或pAAV9 N272A 8ug
- [0788] AAV9抗人ASGR1/抗人CACNG1萤光素酶
- | | | |
|--------|-----------------------------------|------|
| | pAd 辅助质粒 | 16ug |
| [0789] | pAAV-UbC-萤火虫萤光素酶 | 8ug |
| | pAAV9-CAP G453 接头 10 SpyTag W503A | 1ug |
| | pAAV9-CAP N272A | 7 ug |
- [0790] 具有
- [0791] p抗ASGR1或抗CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh(或SpyCatcher Fab) 1.5ug
- [0792] ULC 1-39Vk 3ug
- [0793] WT AAV9-uDys5
- [0794] pAd辅助质粒 16ug
- [0795] pAAV-CK8-uDys5 8ug
- [0796] pAAV9-CAP 8ug
- [0797] AAV9抗人CACNG1 uDys5
- | | | |
|--------|-----------------------------|------|
| | pAd 辅助质粒 | 16ug |
| [0798] | pAAV-CK8-uDys5 | 8ug |
| | pAAV9 CAP G453 接头 10 SpyTag | 1 ug |
| | pAAV9-CAP N272A | 7 ug |
- [0799] 具有
- [0800] p抗CACNG1 10717SpyCatcher Vh 1.5ug
- [0801] p抗CACNG1 10717Vk 3.0ug
- [0802] CK8-uDys5在US10479821B2中有描述,该文献以全文引用的方式并入本文中。
- [0803] 温育后,将复合物添加到补充有10% FBS、1XNEAA、1% Pen/Strep和1% L-谷氨酰胺的DMEM中。
- [0804] 将转染的包装细胞在37°C下培育3天,接着使用标准冻融方案自细胞溶解物收集病毒。简单来说,通过刮削使包装细胞剥落且对其进行粒化。去除上清液,且将细胞再悬浮于50mM Tris-HCl;150mM NaCl;和2mM MgCl₂[pH 8.0]的溶液中。通过经由三个连续冻融循环诱导细胞溶解来释放细胞内病毒粒子,所述冻融循环由在剧烈涡旋下使细胞悬浮液在干冰/乙醇浴与37°C水浴之间穿梭组成。通过在37°C下在偶尔混合下用EMD Millipore Benzonase (50U/ml细胞溶解物)处理溶解物60分钟来降低粘度。然后通过离心沉淀碎片,并通过0.22μm PVDF Millex-GV过滤器过滤得上清液。对于要在体外测试的粗制病毒,将过滤的裂解物直接添加到带有Ultracel-100膜(100KDa MWCO)过滤器滤筒的Amicon Ultra-15离心过滤装置中。以5-10分钟的间隔对过滤装置进行离心,直到上室达到所需体积,然后将浓缩的粗制病毒移液到低蛋白结合管中,并储存在4°C下。对于要在体内测试的病毒,使用四步碘克沙醇密度梯度进一步纯化澄清的裂解物。将梯度加载到Beckman 70Ti转子中,

并使用最大加速度和减速度在10°C下以66,100rpm旋转1.5h。超速离心后,从40%-60%界面提取碘克沙醇纯化的病毒粒子。含AAV的碘克沙醇溶液在DPBS+/+.001% pluronic F68中稀释,使得碘克沙醇的浓度小于1%。然后使用100kDa MWC0 Amicon超滤装置将纯化的病毒浓缩至所需体积。

[0805] 使用已知浓度的病毒的标准曲线,通过qPCR确定滴度(每毫升病毒基因组或vg/mL)。

[0806] 细胞系:

[0807] 将所有293细胞系均维持在补充有10% FBS、1XNEAA、1%Pen/Strep和1% L-谷氨酰胺的DMEM中。通过用表达相应cDNA的载体慢病毒转导亲本293细胞系来生成293hASGR1/2和293hCACNG1细胞系。所有细胞系均获自Regeneron TC核心设施。

[0808] 人骨骼成肌细胞购自Cook Myosite (SkMDC;批号P01059-14M)并维持在补充有肌强直生长补充剂(MS-3333)的肌强直基础培养基(MB-2222)中,并在含5% CO₂的37°C培养箱中生长。

[0809] C2C12小鼠成肌细胞购自ATCC,并维持在含有10% FBS和青霉素-链霉素补充剂的DMEM中,并在含5% CO₂的37°C培养箱中生长。

[0810] AAV衣壳蛋白构筑体

[0811] 编码所需SpyTag插入、侧翼接头氨基酸和额外突变的基因块购自IDT,并根据制造商的方案(NEB)使用Gibson组装将其克隆到BsiWI和XcmI消化的pAAV9-CAP wt中。

[0812] 将SpyCatcher克隆到抗体

[0813] 编码抗体重链可变区的基因块购自IDT,并使用Gibson组装将其克隆到CMV hIgG4US Sap1 SpyCatcher主链中。

[0814] 细胞感染/转导和流式细胞分析。

[0815] 为了感染细胞,将病毒颗粒直接添加到培养细胞的培养基中,并将混合物在37°C下温育。感染后三天,将细胞用胰蛋白酶消化,重悬于含2%FBS的PBS中,并在BD FACSCanto流式细胞仪上收集GFP+细胞的百分比,并使用FlowJo软件进行分析。

[0816] 细胞感染/转导和萤光素酶测定读数

[0817] 为了感染细胞,将病毒颗粒直接添加到培养细胞的培养基中,并将混合物在37°C下温育。感染后三天,去除培养基并使用Promega Glo裂解缓冲液裂解细胞。将萤光素底物(Promega Bright Glo试剂盒)添加到裂解的细胞中,并使用光度计测量发光。

[0818] 肌管转导

[0819] 将人骨骼成肌细胞以8500个细胞/孔接种在具有透明基底和黑色壁的胶原包被的96孔板中。24小时后,将生长培养基换成肌强直分化培养基(MD-5555),并且每2天更换一次。分化4天后,形成肌管,并将补充有病毒制剂的分化培养基添加到相应的孔中。3天后,将肌管用4% PFA固定用于随后的GFP检测,或用Trizol将其裂解用于检测uDys5 mRNA。

[0820] 将C2C12细胞以10,000个细胞/孔接种在具有透明基底和黑色壁的胶原包被的96孔板中。24小时后,将生长培养基用分化培养基(含2%马血清的DMEM)替换,并置于含7.5% CO₂的37°C培养箱中。分化24小时后,使用在分化培养基中稀释的病毒制剂转导细胞。3天后,将肌管用4%PFA固定用于随后的GFP检测,或用Trizol将其裂解用于检测uDys5mRNA。

[0821] 肌管转导分析

[0822] 在室温下固定15分钟后,将细胞用PBS洗涤,然后用含0.3% Triton-X的PBS中的20%山羊血清在室温下封闭一小时。将针对肌球蛋白重链的一抗(MF20-c,发育研究杂交瘤库)在封闭缓冲液中以1:200稀释,并添加到所有孔中用于在4°C下温育过夜。然后用PBS温和洗涤孔3次,并将Alexa 647缀合的抗小鼠二抗在封闭缓冲液中以1:500稀释,并在室温下添加到所有孔中持续一小时。然后将细胞用PBS洗涤并用DAPI染色,然后使用Axio Observer显微镜(Ziess)成像。使用HALO软件(Indica Labs)分析肌球蛋白重链阳性区域内的GFP强度。

[0823] 为了分析使用uDys5的转导,根据制造商的方案,使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)分离RNA。按照制造商的方案完成RNA纯化,并用NanoDrop 2000验证RNA的数量和质量。使用SuperScript VILO cDNA synthesis MasterMix(ThermoFisher)逆转录等量的RNA,并用无核酸酶的水稀释10倍。使用Taqman引物/探针评估基因表达:AGGGTAGCTAGCATGGAAAAACA(uDys5 fwd)、GGGCTTGTGAGACATGAGTGAT(uDys5 rev)、ATTTACATTCTTATGTGCCT(uDys5探针),具有人和小鼠Hprt的内源性对照:分别为Hs02800695_m1和Mm03024075_m1(Thermo Fisher)

[0824] 小鼠品系

[0825] 人源化CACNG1小鼠(CACNG1^{hu/hu})是通过用直向同源的部分编码外显子1序列、内含子1、编码外显子2-4(和插入内含子)、完整的3'UTR和人CACNG1的3'UTR后的附加158bp替换编码外显子1、内含子1、编码外显子2-4(和插入内含子)和小鼠Cacng1的3'非翻译区(UTR)的82bp的一部分而生成的。根据W0/2019006034中描述的方法生成人源化ASGR1小鼠。品系匹配的(50500)小鼠用作对照并在室内饲养。野生型C57BL/6、DBA/2J和营养不良的D2-mdx小鼠(MDX)购自Jackson Laboratory(库存编号分别为000664、000671和013141)。

[0826] 体内分析AAV2萤光素酶载体

[0827] 对3-4月龄范围内的雄性50500和人源化CACNG1小鼠经尾静脉静脉注射PBS或5E11 vg的携带萤光素酶报告基因的野生型AAV2、AAV2HBM抗ASGR1或AAV2 HBM抗CACNG1 mAb#1。IV注射后五周,使用异氟烷麻醉小鼠,注射萤光素底物,并在7-10分钟后实施安乐死。采集肝脏、舌头、膈肌和股四头肌,并使用IVIS光谱体内成像系统进行离体成像。使用实时图像软件分析原始数据以确定平均辐射率(光子/秒/cm²/sr)。

[0828] AAV9萤光素酶载体的体内分析

[0829] 将10周龄的雌性人源化CACNG1和人源化ASGR1小鼠通过尾静脉静脉注射PBS或5E10 vg的携带萤光素酶报告基因的野生型AAV9、AAV9 N272A、AAV9 N272A抗ASGR1 mAb、AAV9抗ASGR1 Fab、AAV9 N272A抗CACNG1 mAb#1或AAV9 N272A抗CACNG1 Fab。注射后三周,使用异氟烷麻醉小鼠,注射萤光素底物,并在7-10分钟后实施安乐死。采集肝脏、后肢、股四头肌和舌头,并使用IVIS光谱体内成像系统进行离体成像。使用实时图像软件分析原始数据以确定平均辐射率(光子/秒/cm²/sr)。

[0830] AAV9 GFP载体的体内分析

[0831] 成年(3-7月龄)雄性CACNG1^{hu/hu}、WT C57BL/6和D2-mdx小鼠尾静脉注射1E+11vg/小鼠的AAV9(WT AAV9、AAV9 N272A、AAV9N272A抗ASGR1 mAb和AAV9 N272A抗CACNG1 mAb“#1”和“#2”和“#3”)。注射后3周处死小鼠,并采集以下器官用于免疫组织化学:肝脏、脾脏、心脏、舌头、膈肌、股四头肌、腓肠肌/跖肌/比目鱼肌复合物和胫骨前肌。

[0832] 对于食蟹猴中的合并AAV表征实验,使用上述方法单独产生与所示抗体缀合的对照AAV和AAV9变体,但使用条形码化的pITR-CAG-GFP-hGhPA质粒作为病毒基因组质粒;池中存在的12种病毒中的每一种都包装有pITR-CAG-GFP-hGhPA版本,该版本携带用于定量该衣壳变体的转基因表达的独特的32个核苷酸长的条形码。对两只雄性食蟹猴静脉推注 $3\text{E}+13\text{vg/kg}$ 的合并病毒混合物。注射后两周,对动物实施安乐死,并采集一组组织和器官用于条形码分析。参见例如W02018144813;Stoeckius等人(2018)《基因组生物学(Genome Biol.)》19:224;Stoeckius等人(2017)《自然方法》9:2579-10,这些参考文献各自以全文引用的方式并入本文中。表4提供了与不同病毒颗粒相关的条形码编号(BC#)(例如AAV9 cap突变和相应的抗体编号(如果适用))。

[0833] 表4

[0834]

条形码编号	AAV
1	AAV9
2	AAV9 W503A+非靶向mAb
3	AAV9 W503A+ASGR1 mAb
4	AAV9 W503A+CACNG1 mAb#3
5	AAV9 W503A+CACNG1 mAb#2
6	AAV9 N272A+非靶向mAb
7	AAV9 N272A+ASGR1 mAb
8	AAV9 N272A+CACNG1 mAb#3
9	AAV9 N272A+CACNG1 mAb#2
10	AAV9 N272A+CACNG1 mAb#4
11	AAV9 N272A+CACNG1 mAb#5
12	AAV9 N272A+CACNG1 mAb#1

[0835] 为了评定施用野生型和重新靶向的AAV后肝脏健康和补体激活(ALT、AST、Bb和C3a)的血清读数,根据上述方法制备AAV9和AAV9 N272A抗CACNG1 mAb#3,并与pAAV CAG eGFP包装在一起。给雄性食蟹猴静脉推注 $3\text{E}+13\text{vg/kg}$ 的AAV9 wt(2只动物)或AAV9 N272A抗CACNG1 mAb#3(2只动物)或生理盐水作为对照(1只动物)。在基线时(给药前10天)以及给药后30分钟、6小时、24小时和48小时收集ALT、AST、Bb和C3a的血清读数。注射后两周,对动物实施安乐死,并采集一组组织和器官用于分析。

[0836] 对于免疫组织化学染色,将组织固定在中性缓冲福尔马林溶液中,并在24小时后转移到70%乙醇。在石蜡包埋之前,将器官在室温下保存在70%乙醇中。使用5 μm 厚度的标准化平面切片对组织进行切片。使用Benchmark ULTRA Ventana IHC/ISH系统对eGFP表达进行抗GFP IHC染色。使用HALO分析软件进行图像分析。

[0837] 对于免疫荧光染色,将肌肉组织浸没在OCT包埋介质中,并在液氮冷却的异戊烷中冷冻。将组织以12 μm 厚度冷冻切片,随后用4% PFA固定并对层粘连蛋白(Sigma-Aldrich)染色,随后用Alexa 647缀合的抗兔二抗和DAPI(Thermo Fisher Scientific)染色。将载玻片用Fluoromount(Thermo Fisher Scientific)固定,并用Axioscan载玻片扫描仪(Zeiss)成像。

[0838] 对于条形码分析,根据制造商的说明书,使用用于Microarrays Total RNA分离试

试剂盒的MagMAX-96纯化从食蟹猴组织和器官中分离的总RNA。然后用Turbo DNA酶处理RNA,并使用SuperScript IV逆转录酶和hGH pA特异性引物(5'-GTCATGCATGCCTGGAATC-3';SEQ ID NO:256)进行cDNA合成。使用Q5高保真2x主混合物,用结合条形码的上游(5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGAGCGCTGCTCG AGAG-3';SEQ ID NO:257)和下游(5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTCACAGGGA TGCCAC-3';SEQ ID NO:258)的引物从cDNA样品中扩增条形码化的GFP转录物。合并的病毒混合物包括在样品中。在文库制备期间,以三次技术重复来制备每个样品。使用qubit和Tapestation对包含Illumina衔接子和独特双索引(UDI-Illumina)的扩增子进行定量,以等摩尔比合并,并使用300个循环的高输出试剂盒在Nextseq550上进行测序。

[0839] AAV9 uDys5载体的体内分析

[0840] 对6周龄雄性D2-mdx小鼠尾静脉注射 $1\text{E}+12\text{vg}$ /小鼠的WT AAV9或在CK8启动子下表达uDys5的AAV9 N272A抗CACNG1 mAb#3。注射后5周处死小鼠,并采集以下器官用于qPCR分析并储存在RNAlater(Thermo Fisher)中:肝脏、心脏、股四头肌、腓肠肌、胫骨前肌、比目鱼肌、舌头和膈肌。然后将组织在Trizol中匀浆,并使用MagMAX-96total RNA分离试剂盒(Life Technologies)纯化水相,并使用无RNA酶的DNA酶套件(Qiagen)去除gDNA。使用SuperScript VILO主混合物(Life Technologies)将mRNA逆转录成cDNA,并使用以下Taqman引物/探针进行qPCR:AGGGTAGCTAGCATGGAAAAACA(uDys5 fwd)、GGGCTTGTGAGACATGAGTGAT(uDys5 rev)、ATTTACATTCTTATGTGCCT(uDys5探针),具有内源性对照:AAGGCCGTGGTGCTGATG(Rplp0fwd)、TCTCCAGAGCTGGGTTGTTCT(Rplp0rev)、AAGAACACCATGATGCGCAAGGC(探针)。

[0841] 为了检测uDys5肌纤维膜定位,将腓肠肌和心脏的冷冻切片用4%PFA固定,并对肌营养不良蛋白(发育研究杂交瘤库)染色,然后用Alexa 546缀合的抗小鼠二抗染色。将载玻片用Fluoromount(Thermo Fisher Scientific)固定,并用Axioscan载玻片扫描仪(Zeiss)成像。

[0842] 为了检测uDys5蛋白,将股四头肌在液氮中快速冷冻,随后使用Fast Prep-24 5G匀浆器(MP Biomedicals)的小鼠腿部肌肉设置进行匀浆。然后将肌肉添加到具有含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Sigma)的裂解缓冲液(50mM Tris HCl、100mM NaCl、1mM EDTA二水合物、1% Triton100x)的裂解基质管(MP Biomedicals)中。在使用BCA测定(Thermo Fisher Scientific)进行蛋白质定量后,将裂解物与样品缓冲液和还原剂(Thermo Fisher Scientific)一起在70°C下加热10分钟。将等量的蛋白质加载到4%-20% Tris-甘氨酸凝胶(Bio-Rad)上并溶解,然后使用TurboTransfer系统(BioRad)转移到PVDF膜(BioRad)。将膜用5%脱脂牛奶(Cell Signaling)封闭,然后用以下一抗温育过夜:肌营养不良蛋白(发育研究杂交瘤库,MANHINGE1A)、 β 肌动蛋白(Abcam,ab8224)。洗涤后,将膜与合适的HRP缀合的二抗(Cell Signaling)一起温育。将膜在ECL试剂(Cell Signaling)中温育并可视化(Amersham Imager 600)。使用ImageJ对印迹图像进行定量。

[0843] 为了评定用uDys5进行肌肉转导对肌肉损伤的循环生物标记物的影响,在给药前收集血液,然后在给药后四周将血液收集到1.1mL Z-Gel微管(Sarstedt)中,并使血清凝结最少2小时。将血液在4°C下以12,000RPM旋转10分钟。然后收集上清液并在-80°C下冷冻。一旦收集所有样品,就将它们全部解冻,然后用去离子水以1:4稀释。在ADVIA® Chemistry

XPT系统上使用 **ADVIA®** Chemistry肌酸激酶 (CK_L) 试剂 (REF 10729780) 分析血清。

[0844] 为了评定用uDys5进行肌肉转导的功能效应,对6周龄雄性D2-mdx小鼠尾静脉注射 $1\text{E}+12\text{vg}$ /小鼠的WT AAV9或在CK8启动子下表达uDys5的AAV9 N272A抗CACNG1 mAb#3,并在注射后12周评定最大握力。用计算机化的握力计 (Bioseb, BIO-GS3) 通过垂直抓住小鼠的尾巴并降低直到它们抓住拉杆来评定前肢的握力。然后将小鼠慢慢向上拉,直到它们失去握力。在五次拉动后记录产生的峰值力(克),各试验之间休息3分钟。3次试验后,对试验中的最大力取平均值,并记录为最大握力。

[0845] 尽管已参照多个实施方案具体地显示和描述本发明,但本领域的技术人员应理解,可在不脱离本发明的精神和范围的情况下对本文所公开的各种实施方案的形式和细节作出修改,并且本文所公开的各种实施方案不打算用作对权利要求书范围的限制。尽管可使用与本文所述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料实践或测试本发明,但现描述一些优选的方法和材料。本文引用的所有出版物都以全文引用的方式并入本文进行描述。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

A

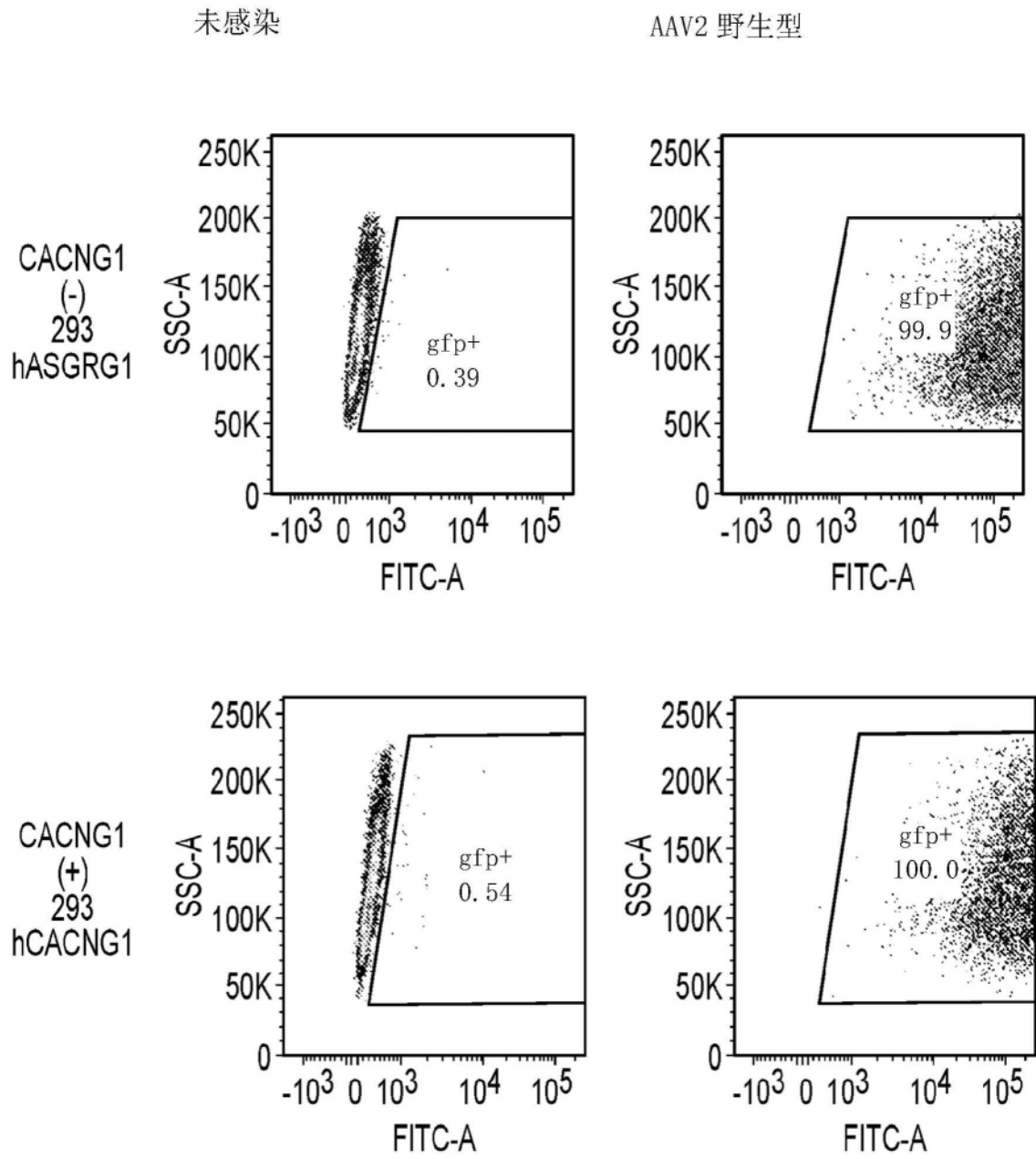


图1

A 续

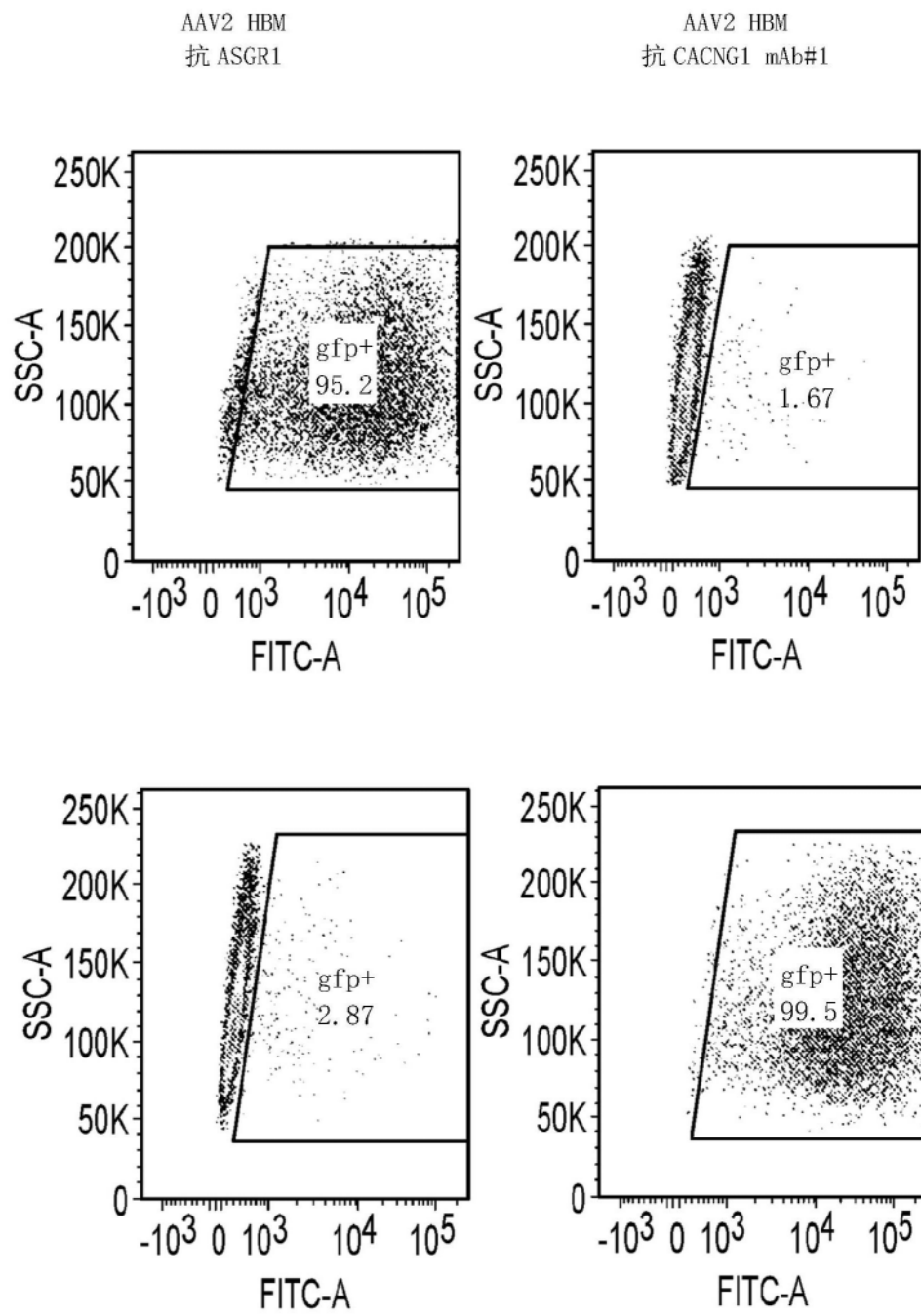


图1 (续)

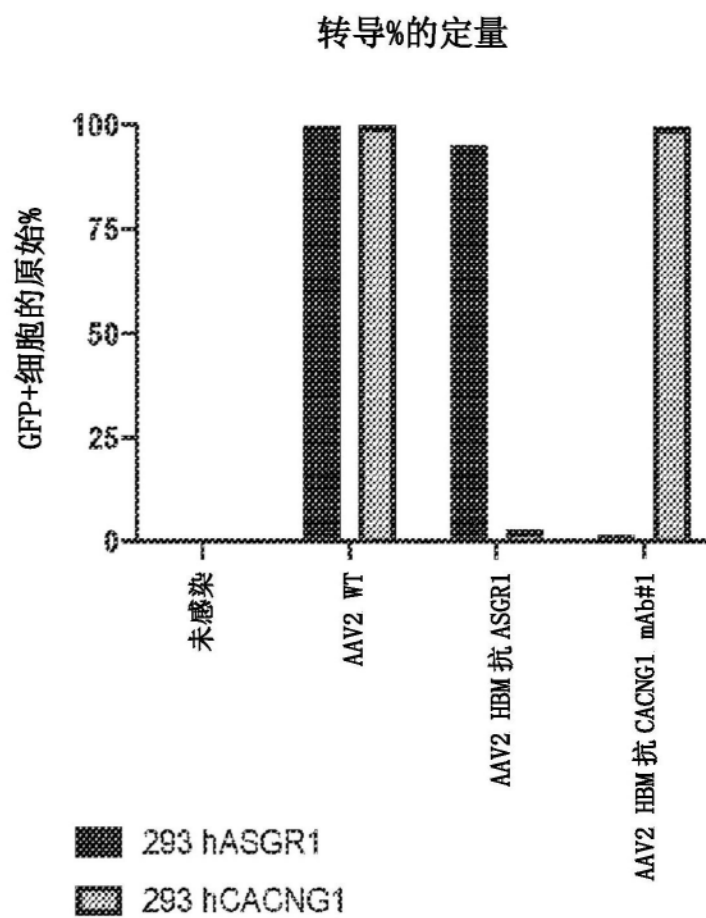
B

图1 (续)

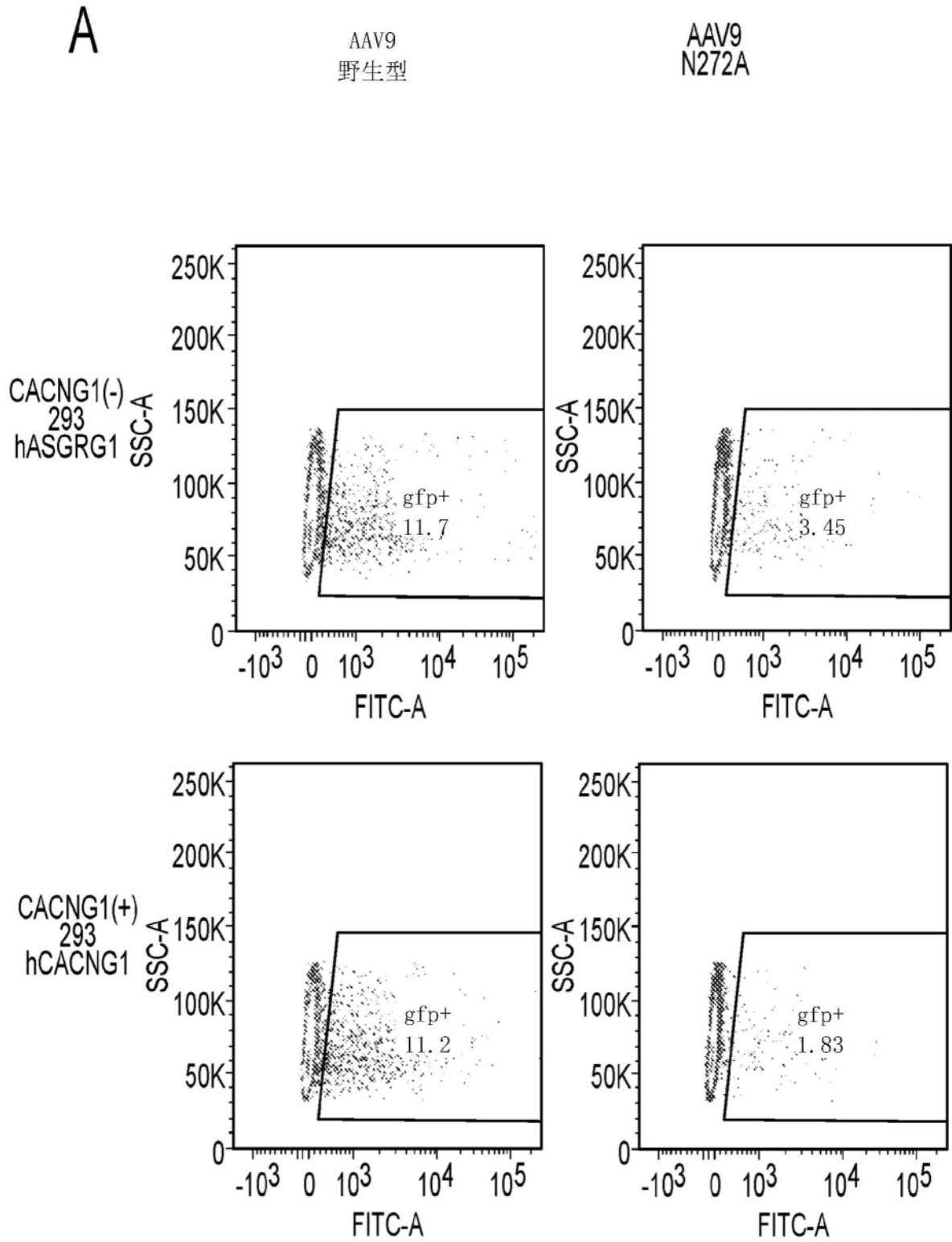


图2

A 续

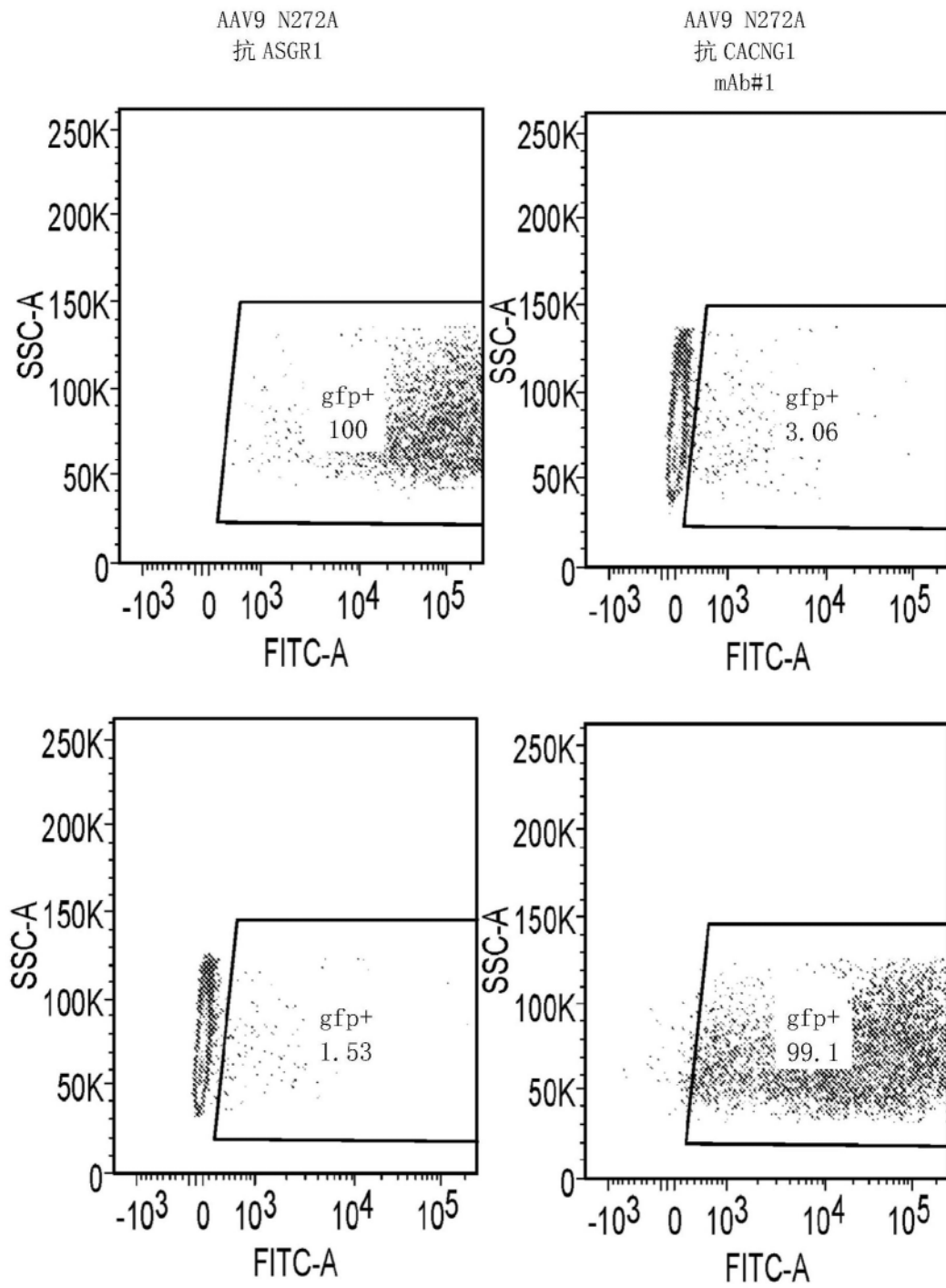


图2(续)

A 续

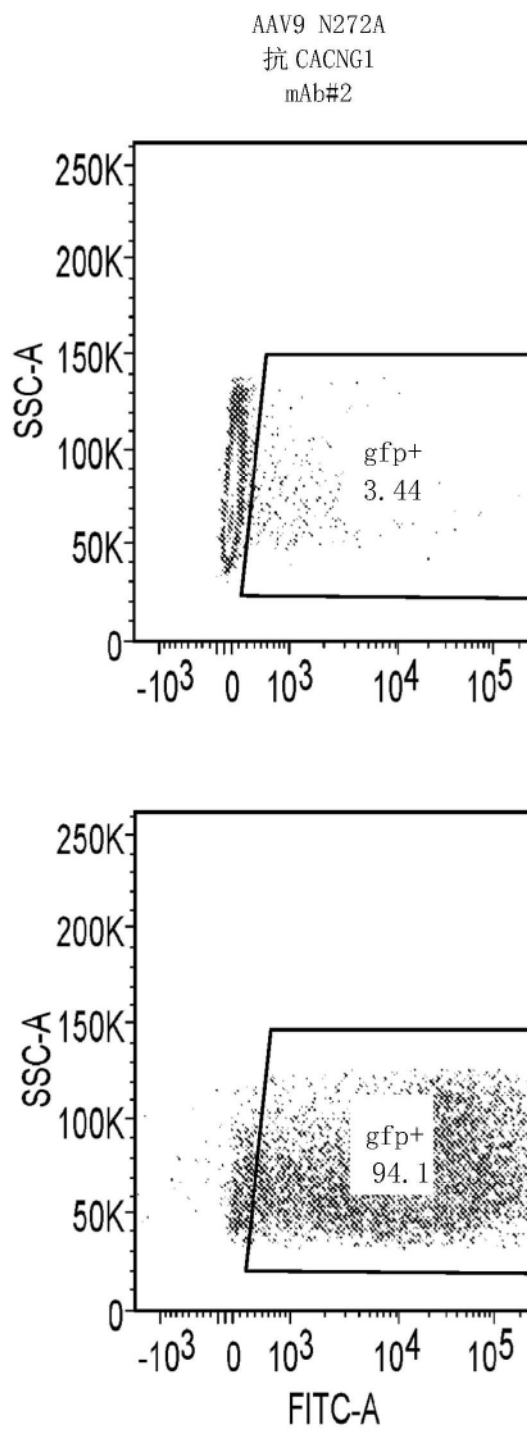


图2(续)

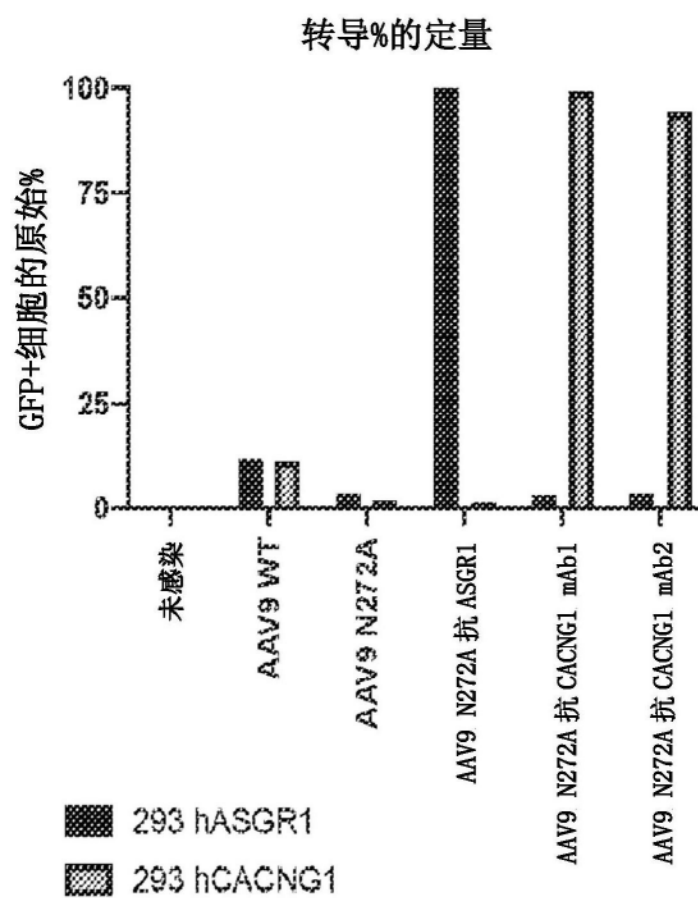
B

图2(续)

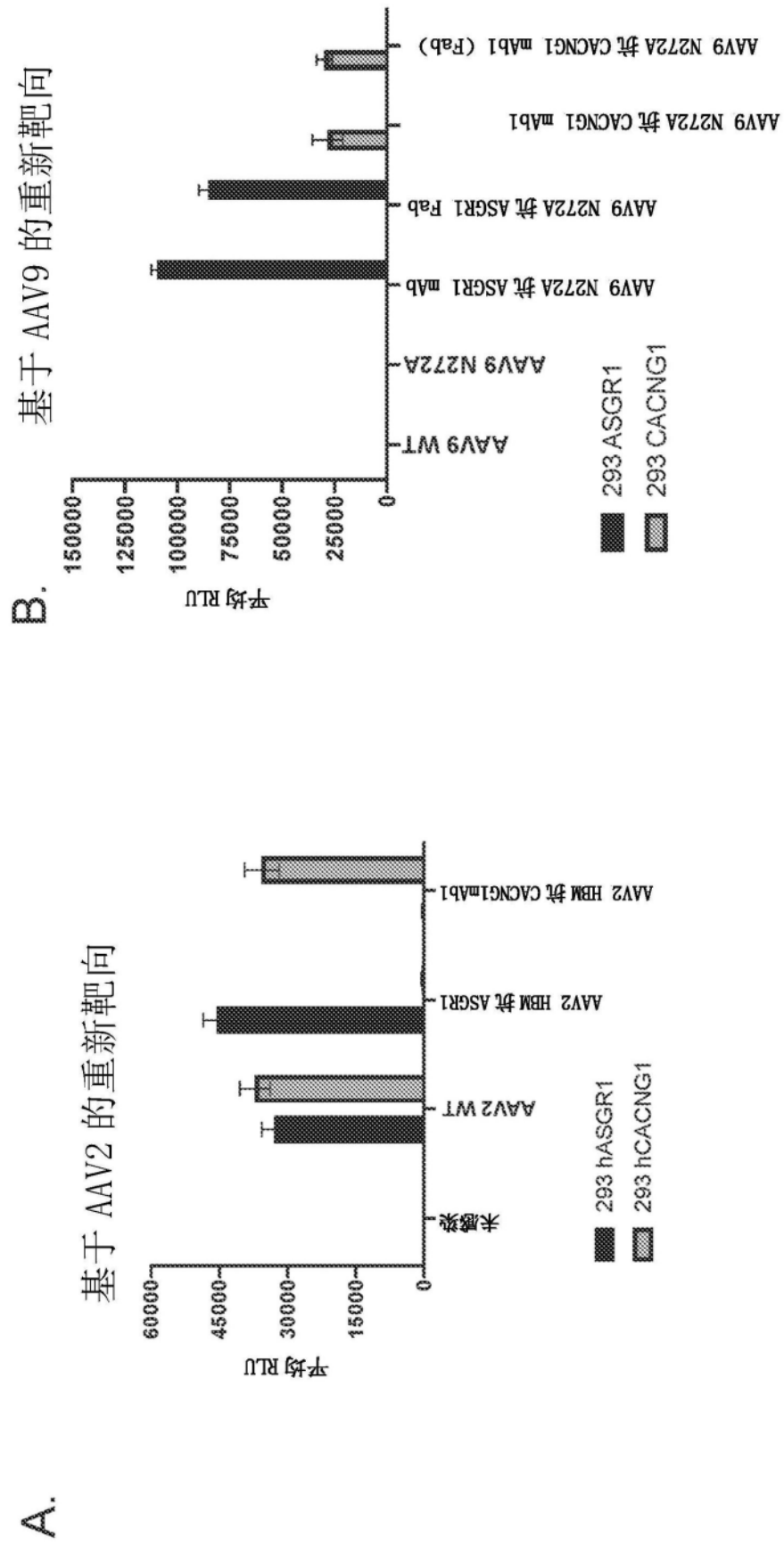


图3

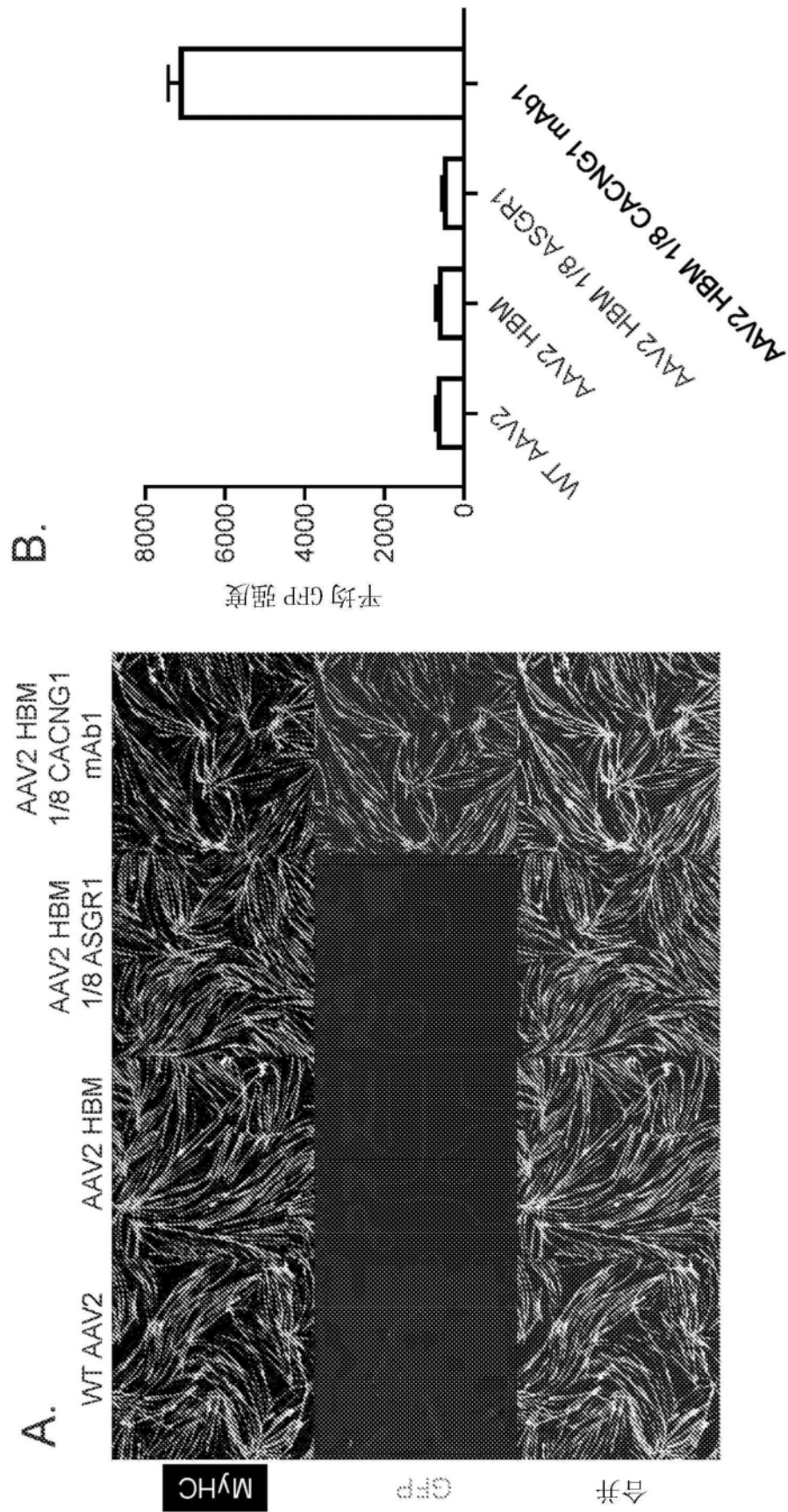


图4

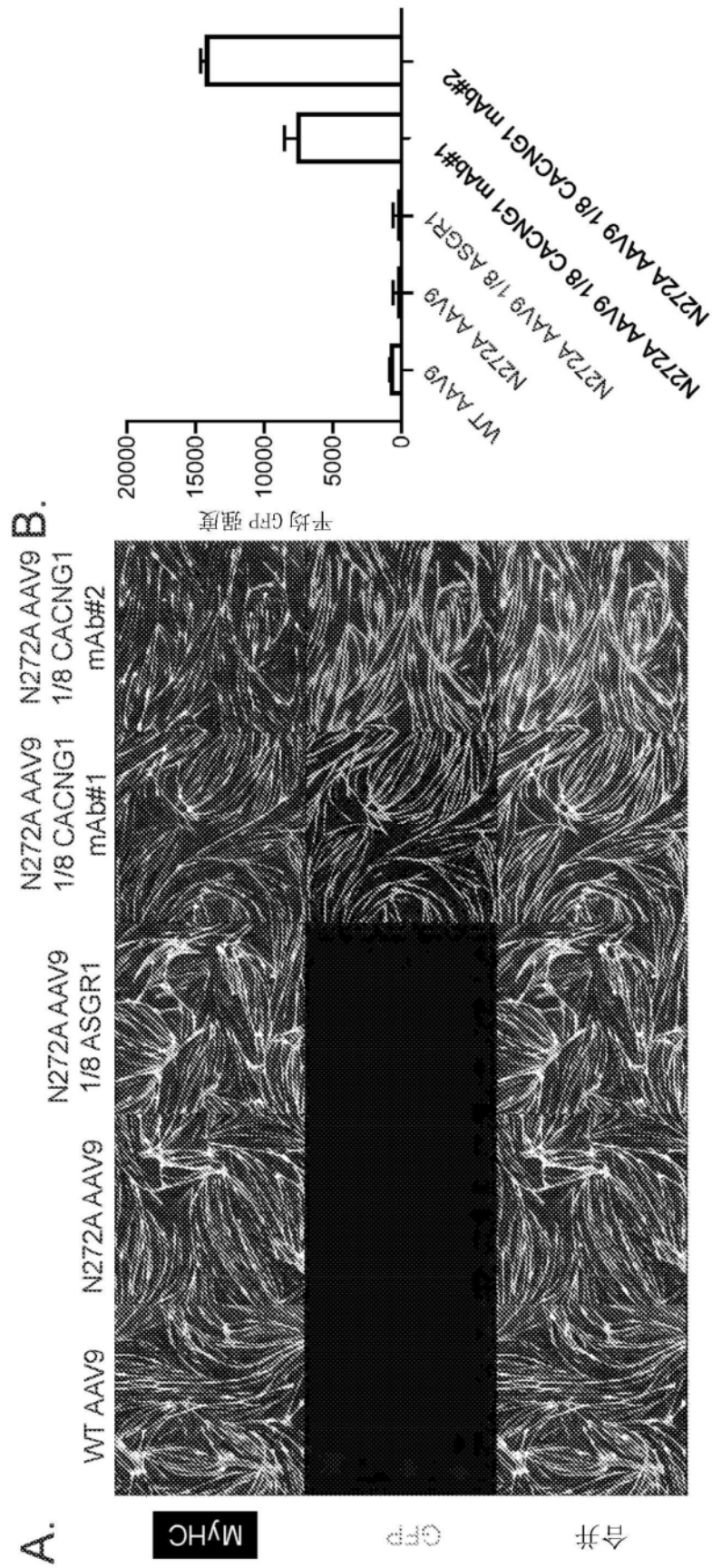


图5

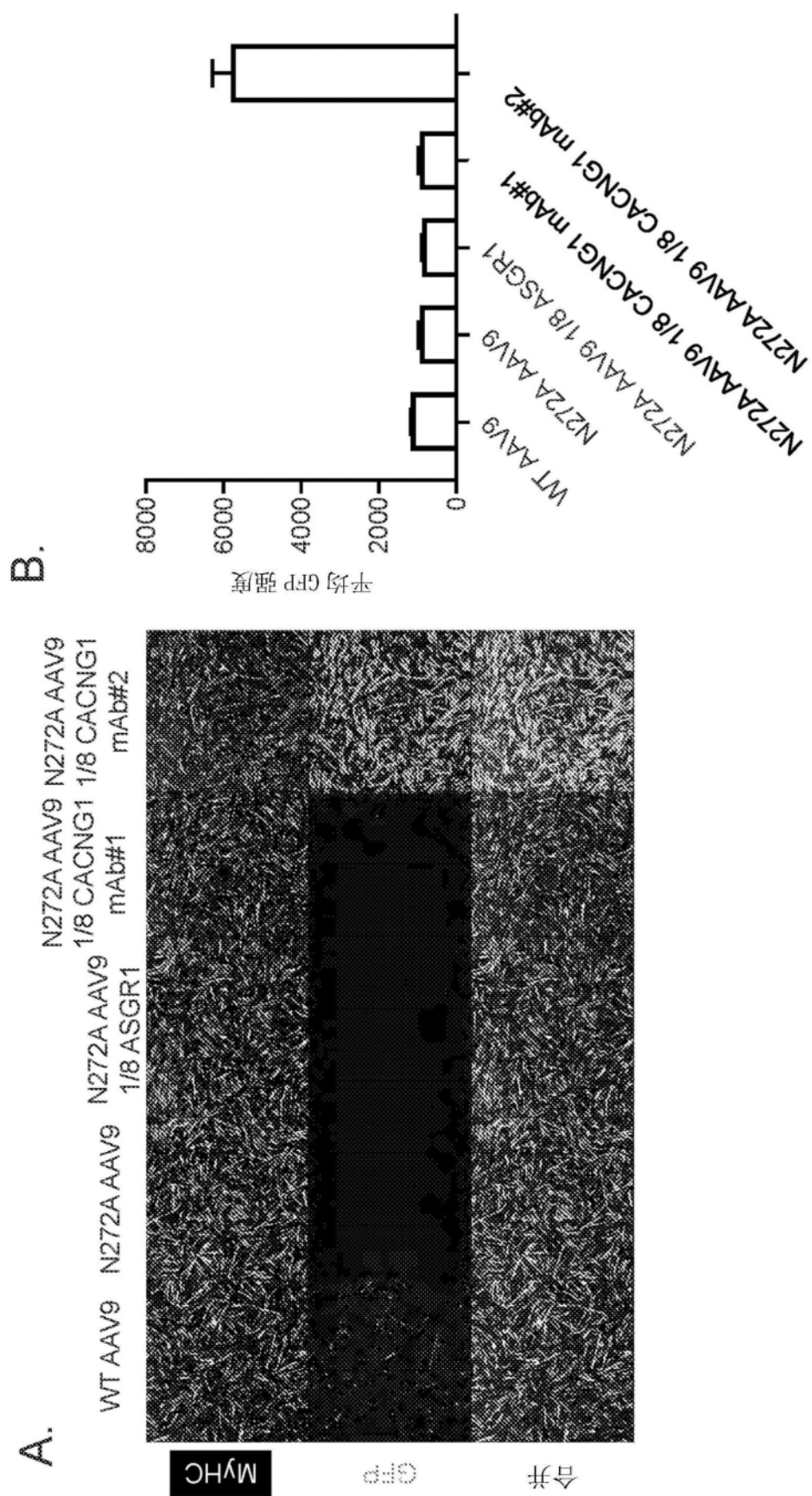


图6

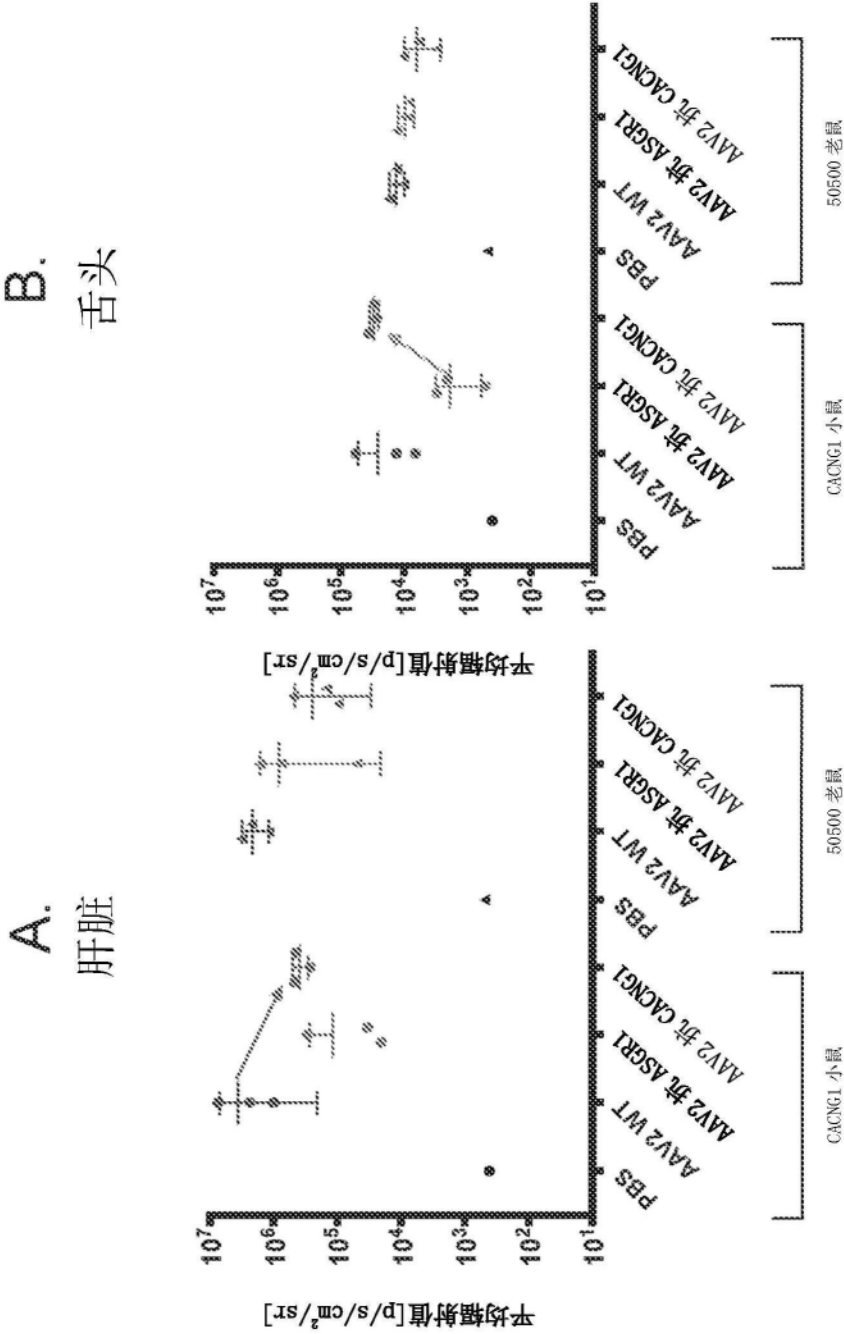


图7

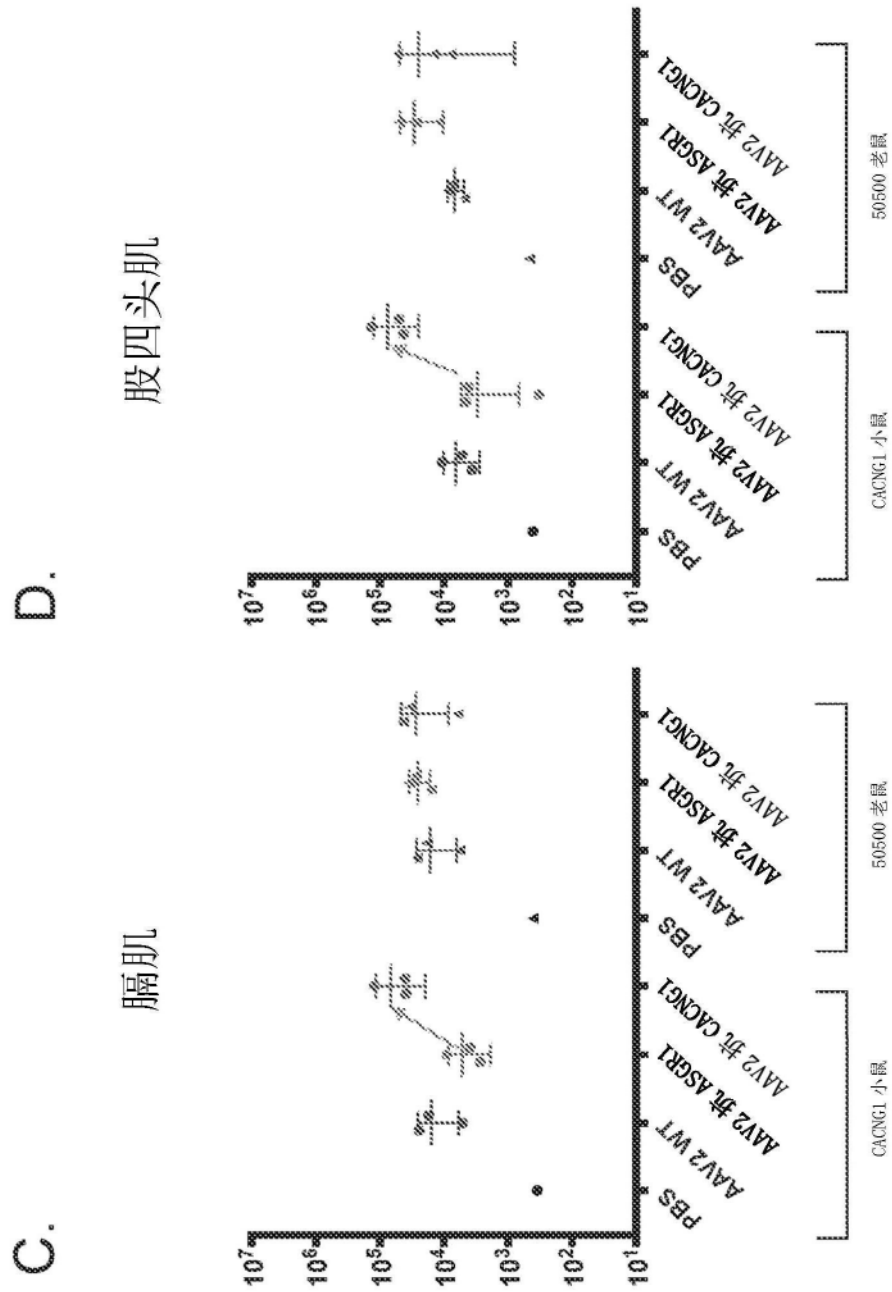


图7 (续)

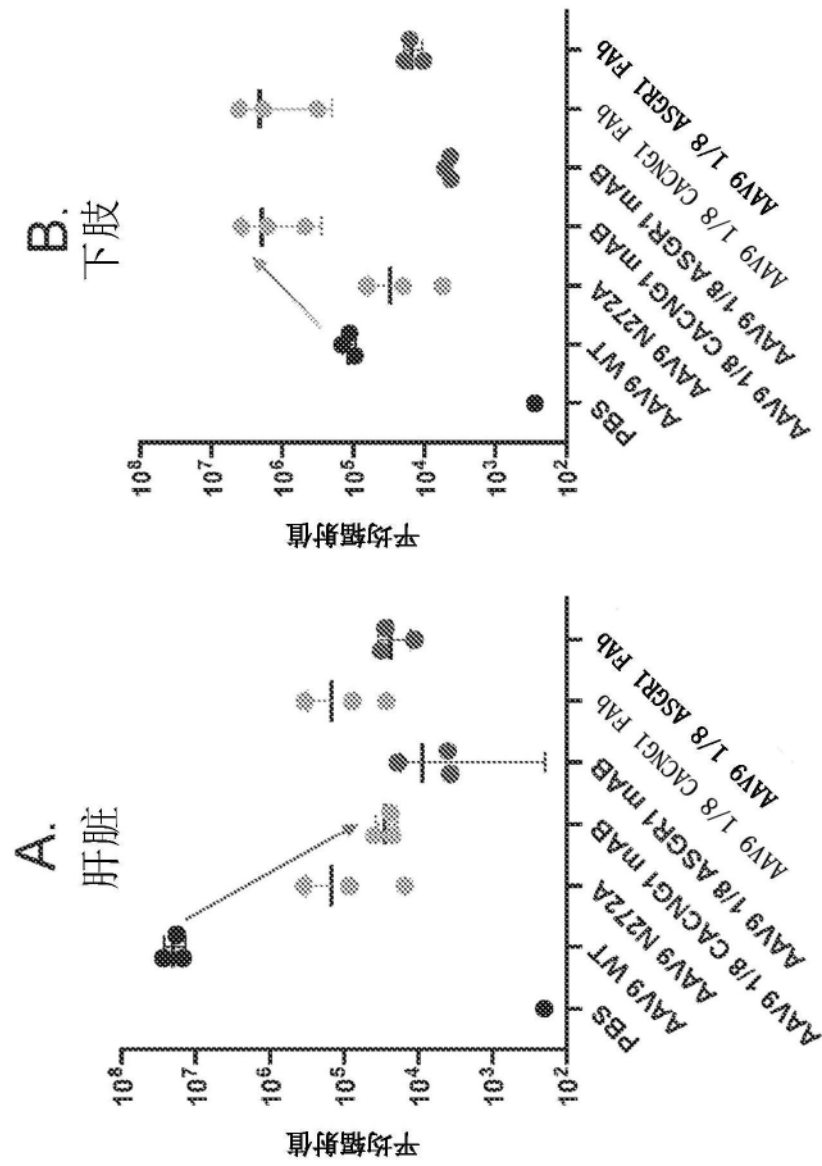


图8

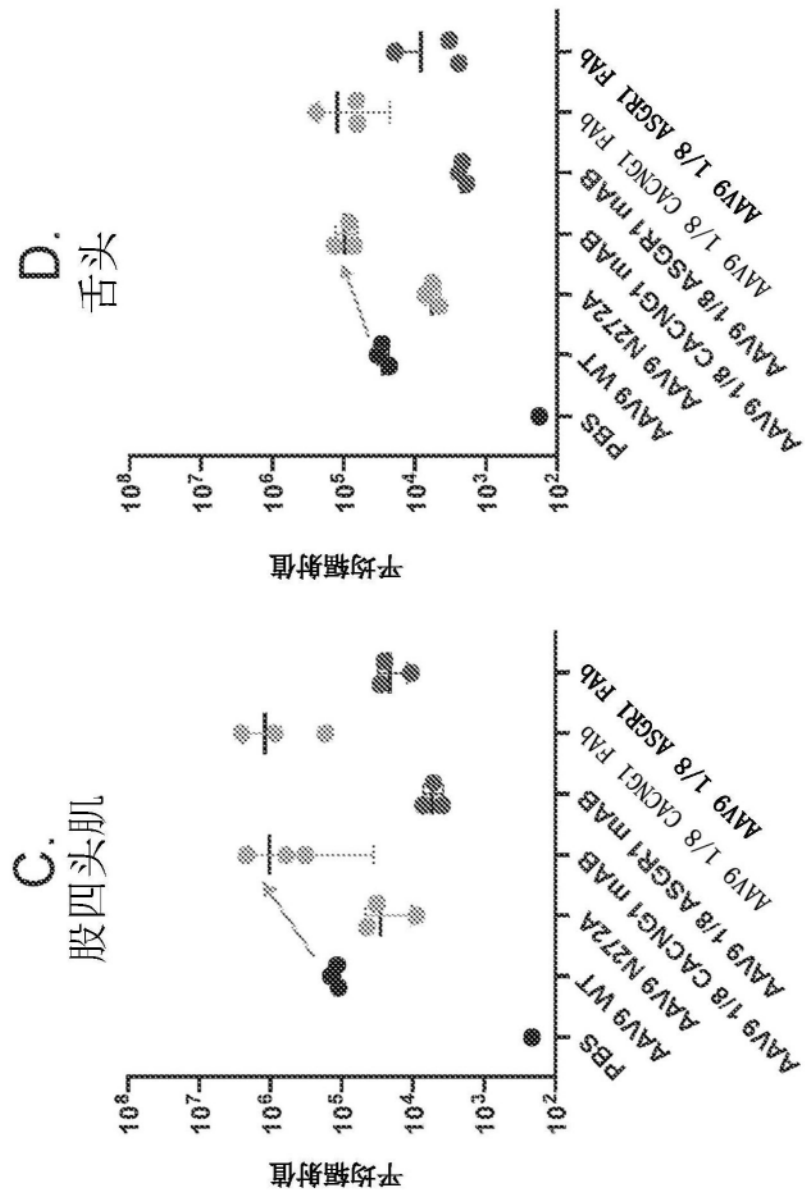


图8(续)

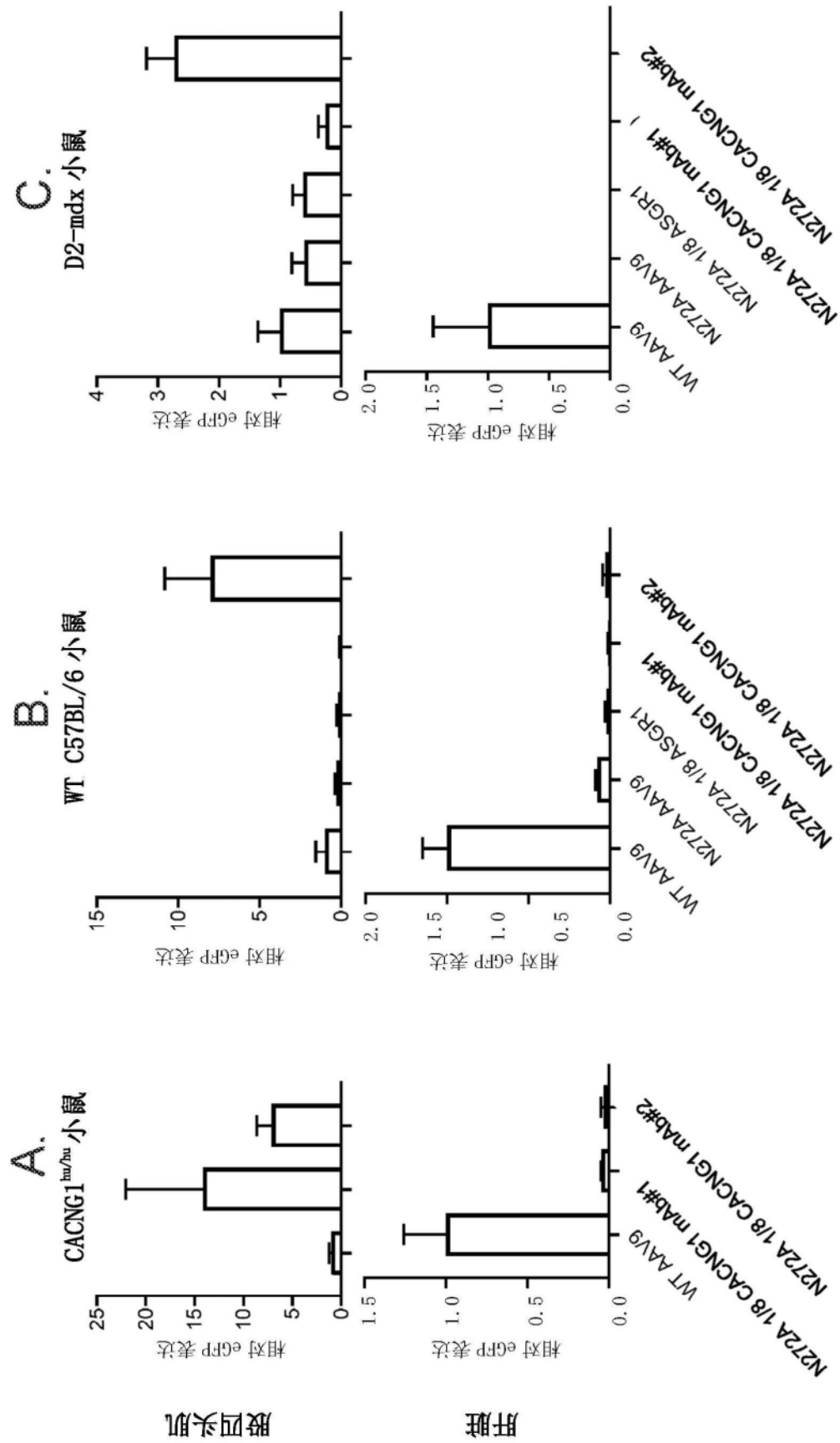


图9

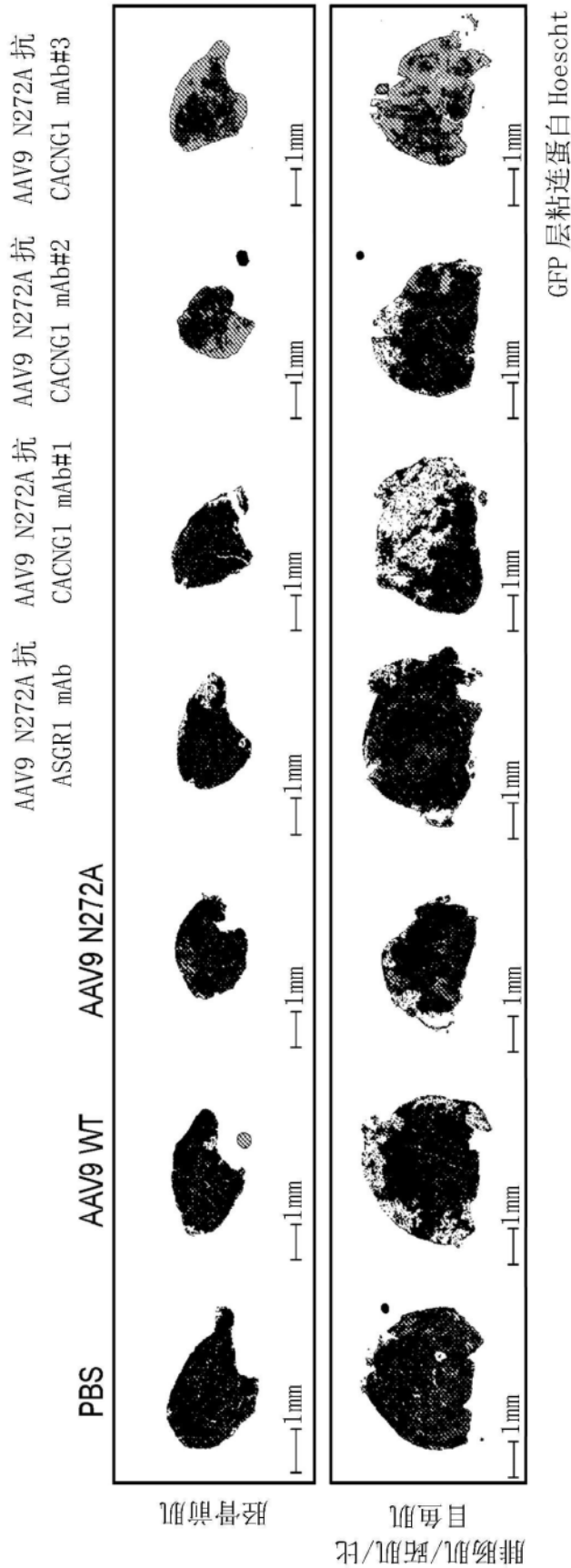


图10

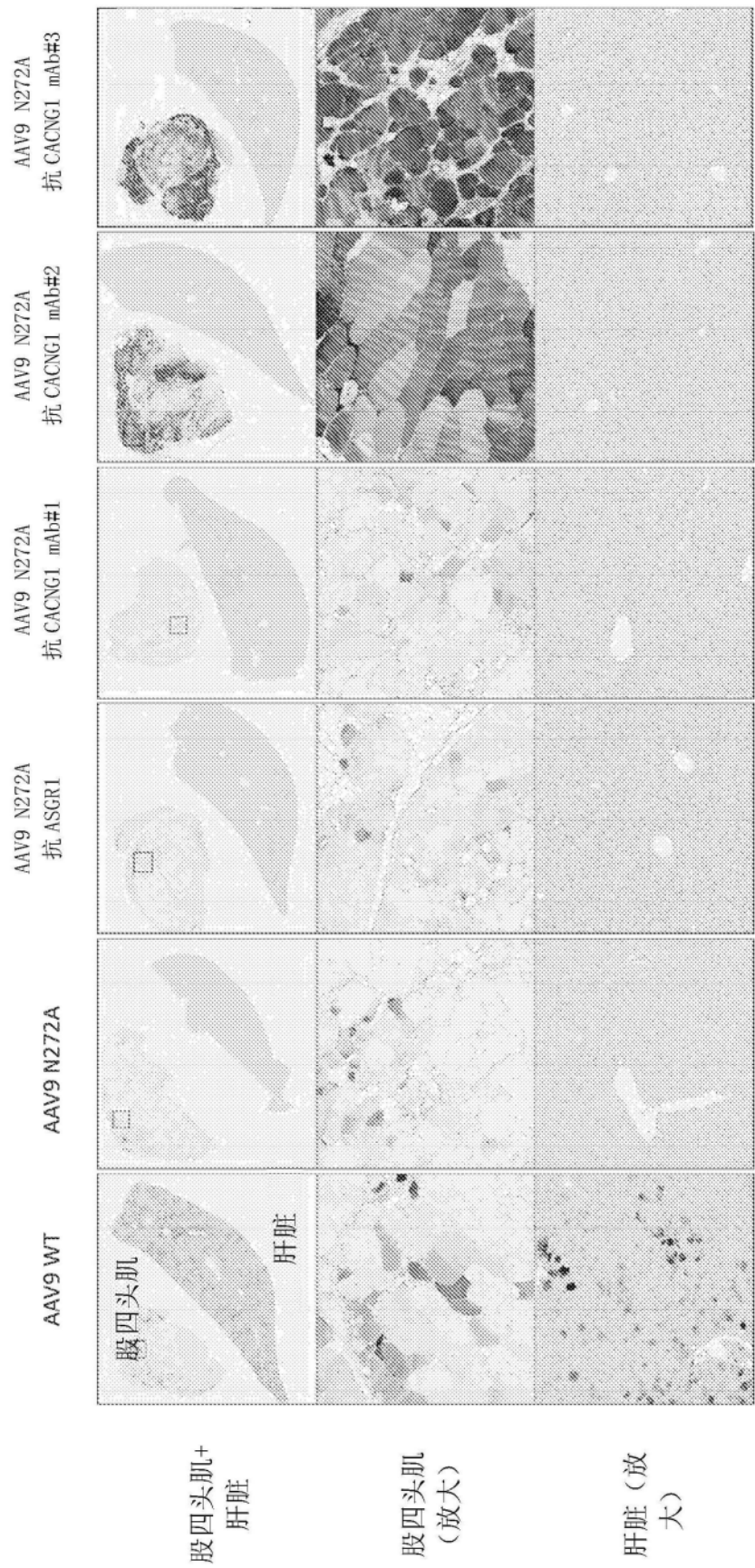


图11

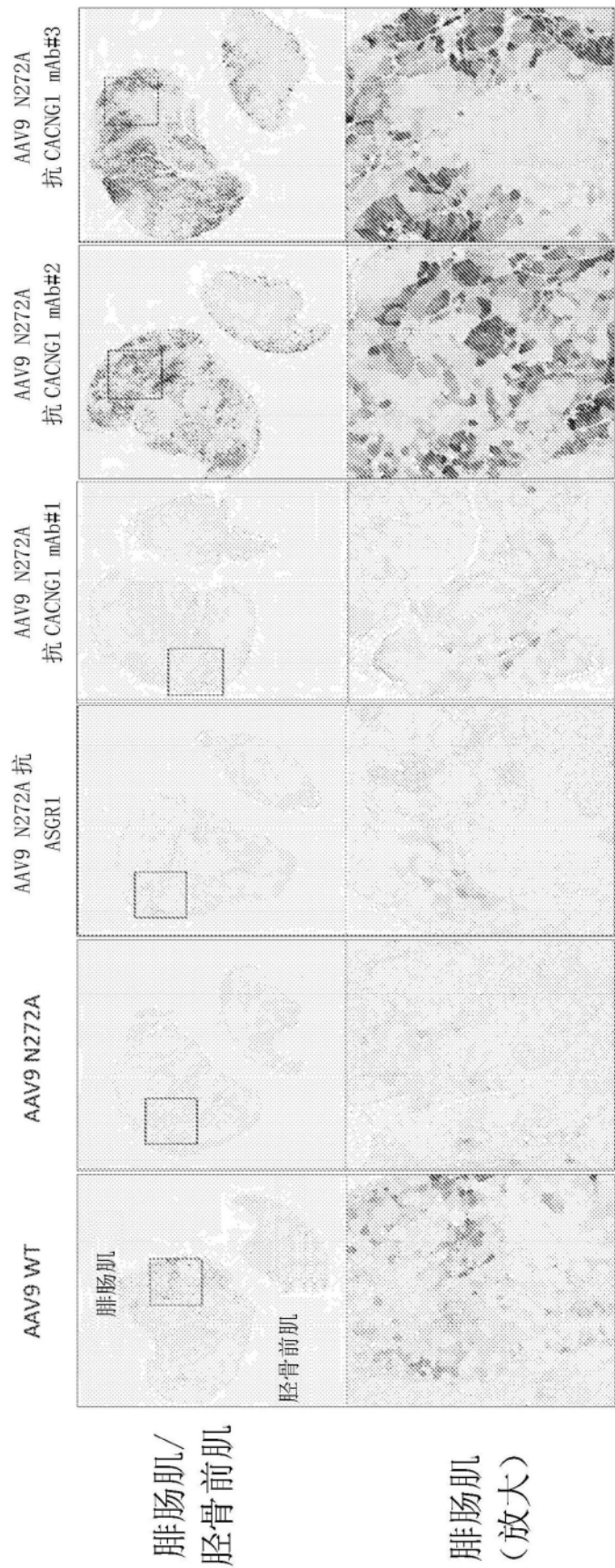


图12

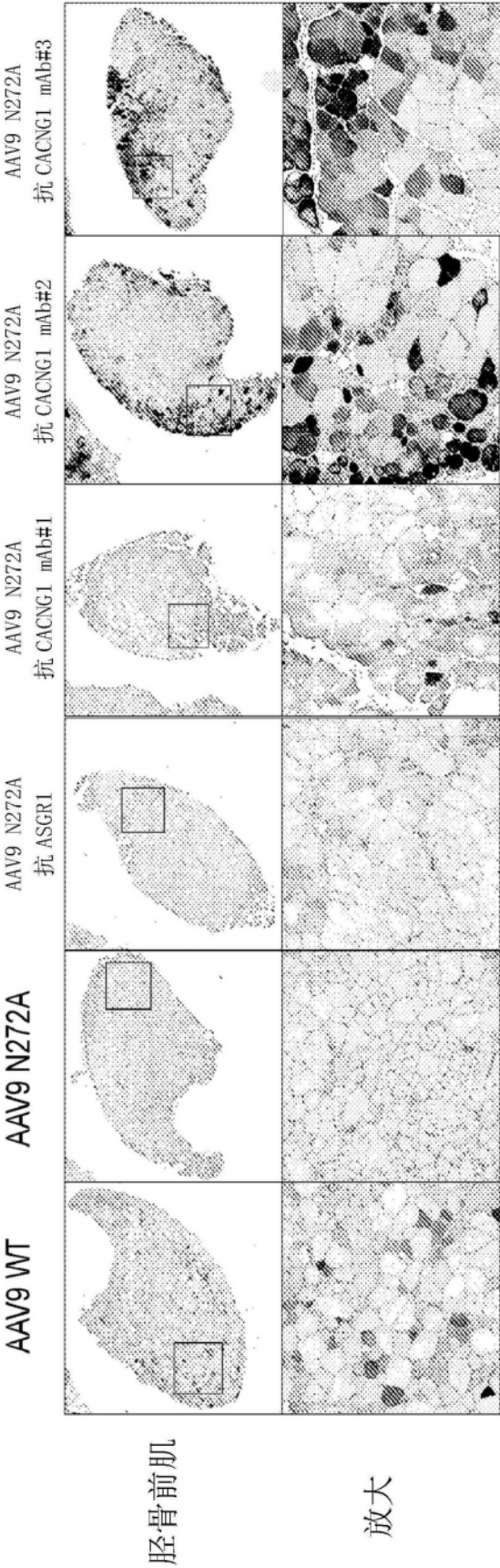


图13

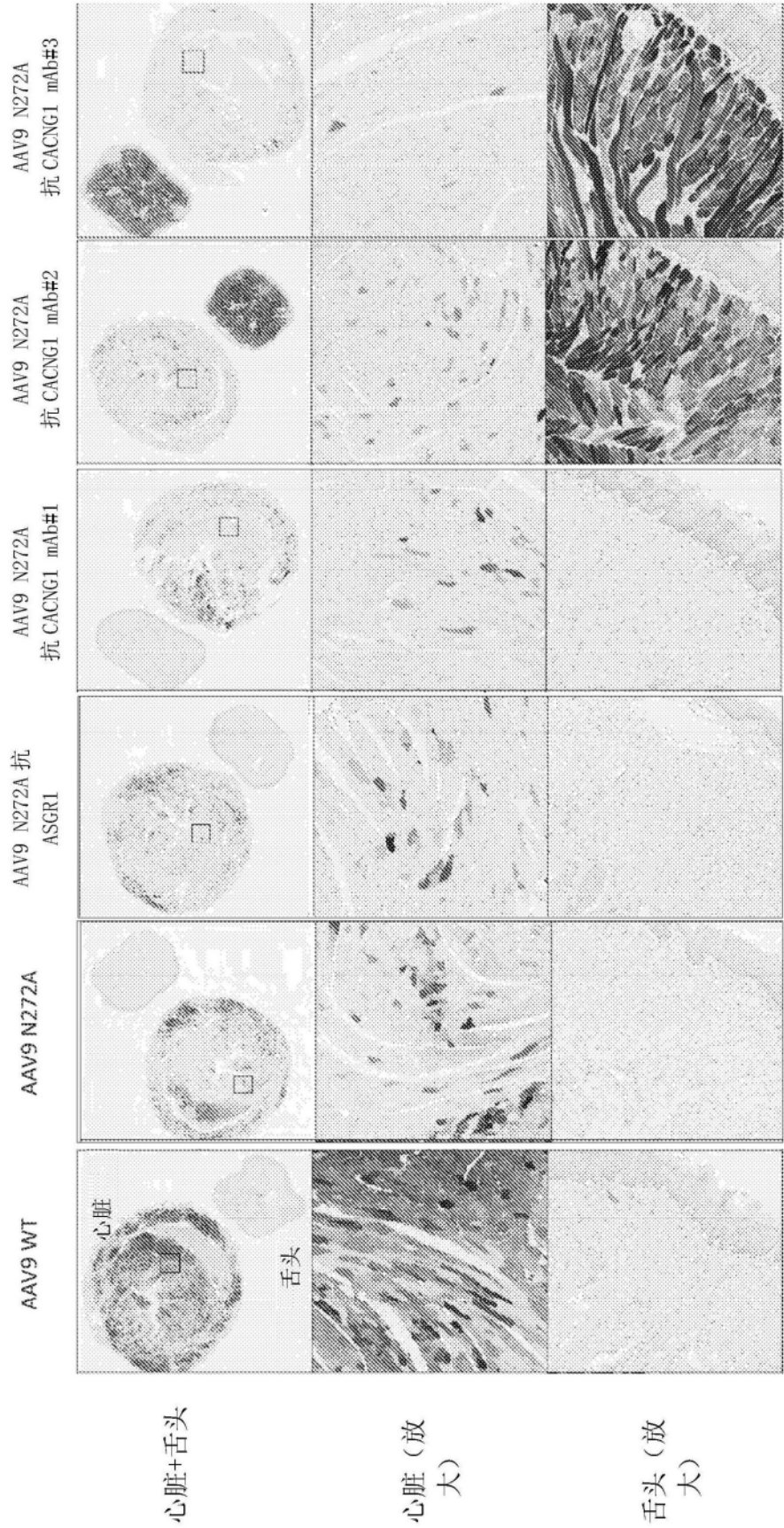


图14

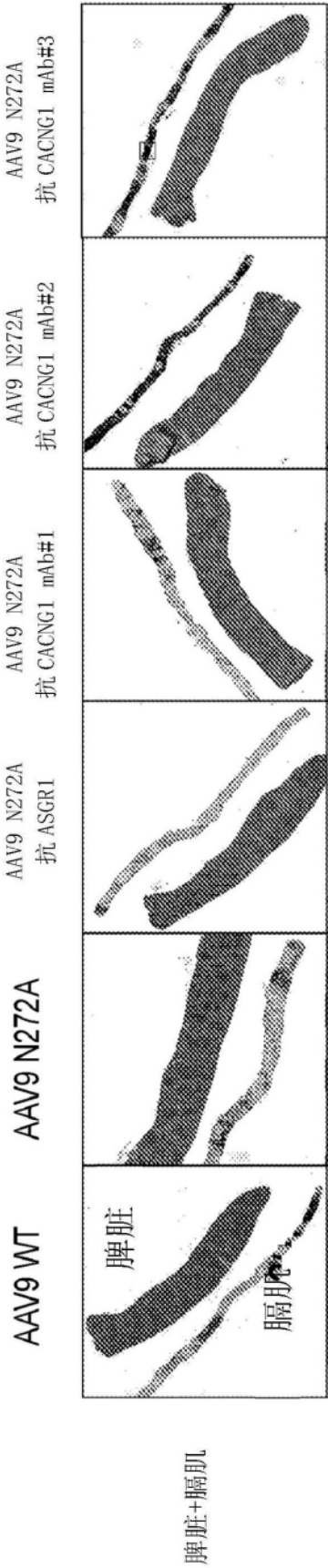


图15

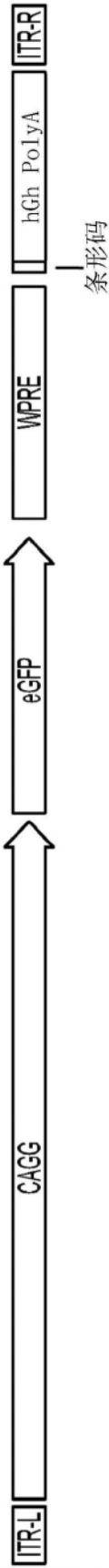


图16

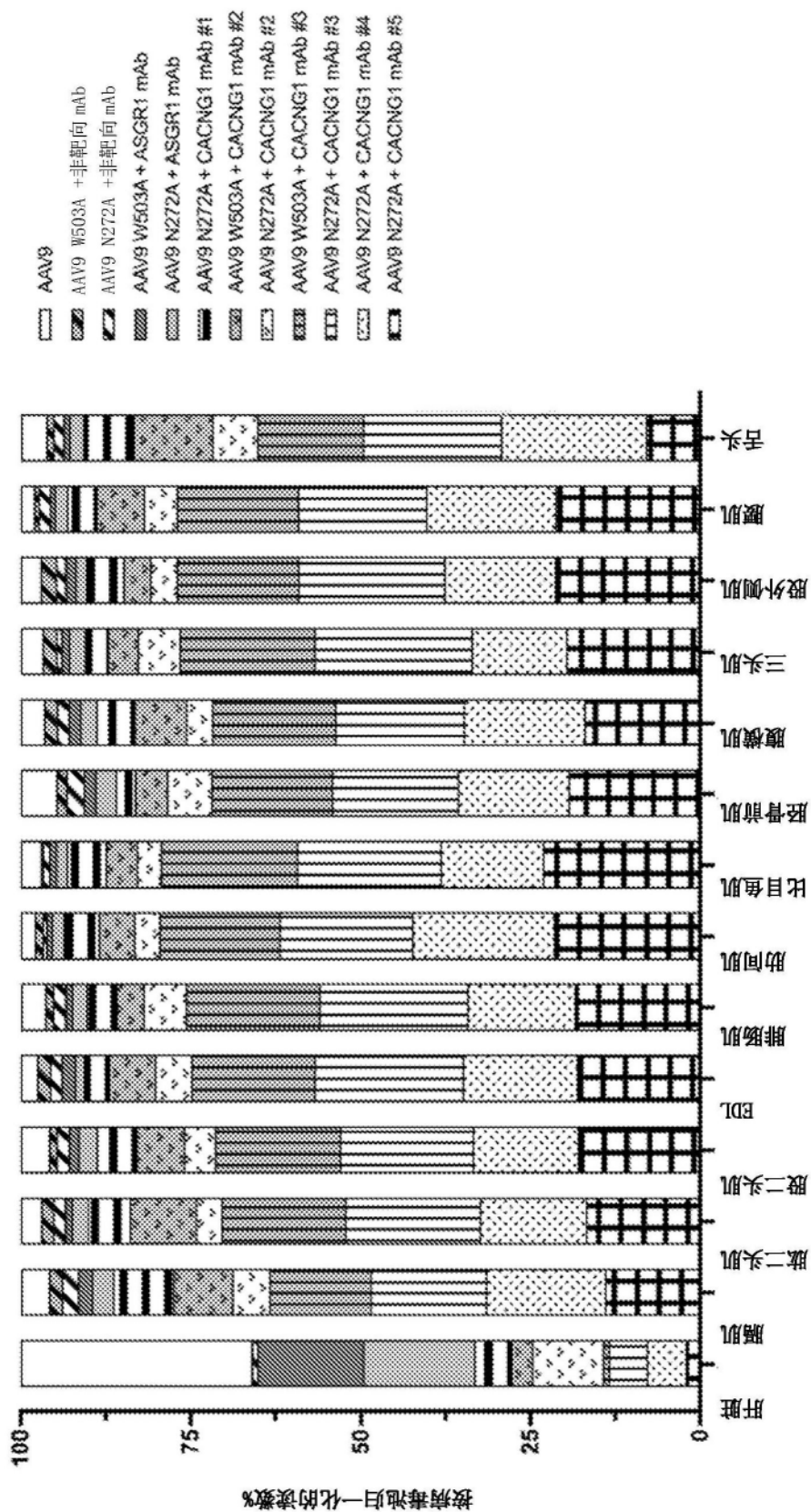


图17

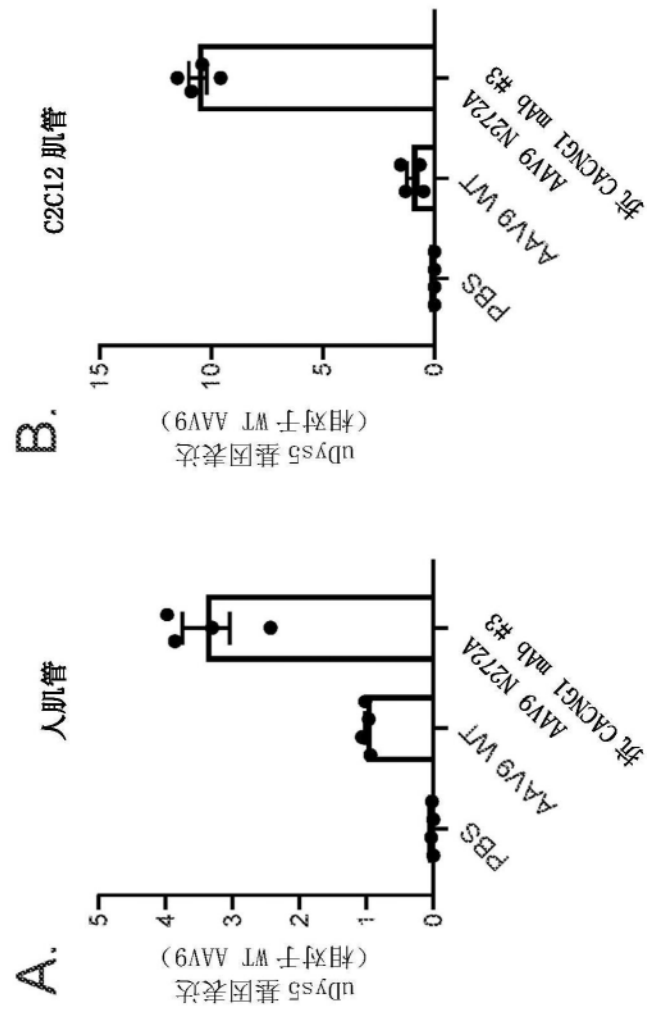


图18

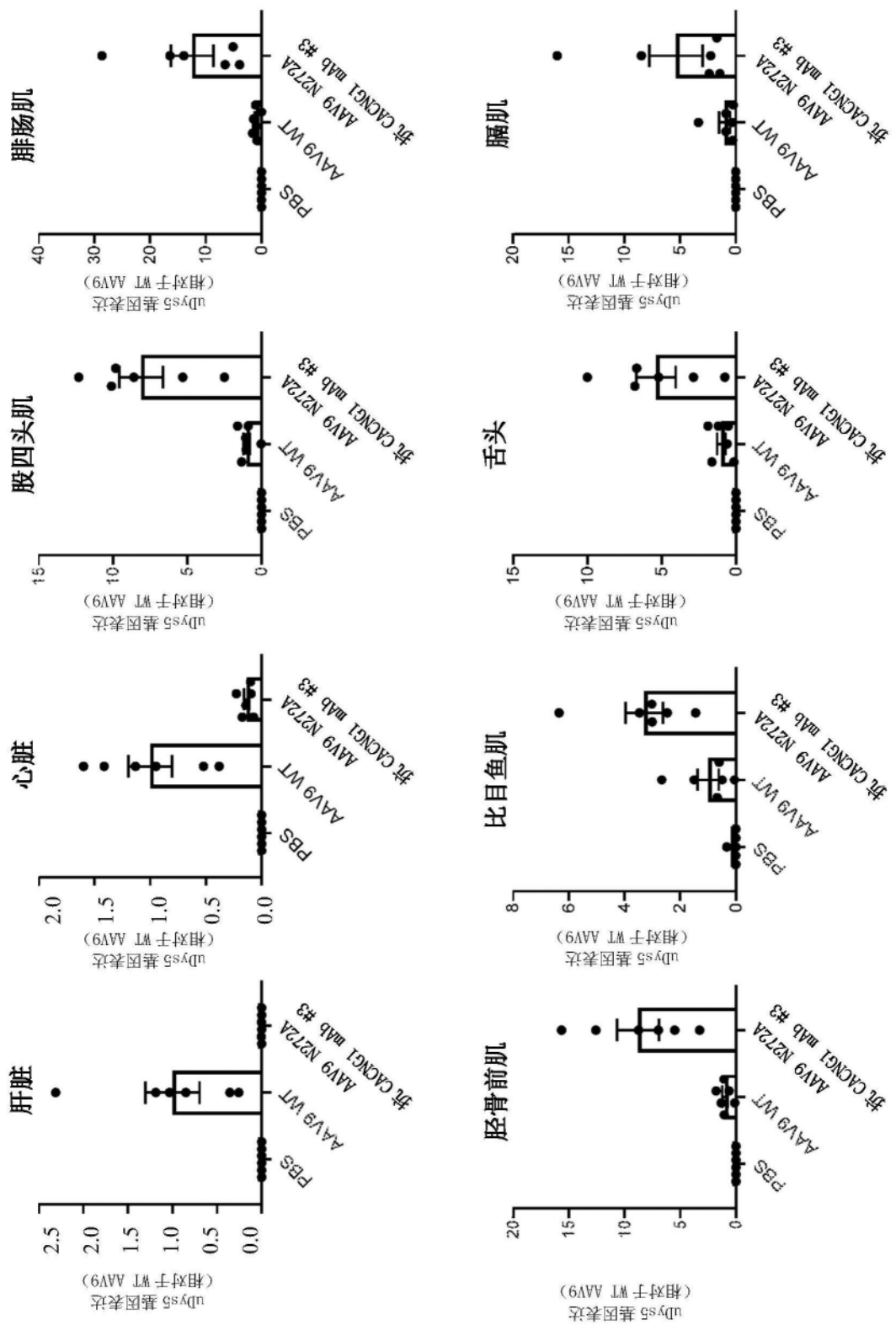


图19

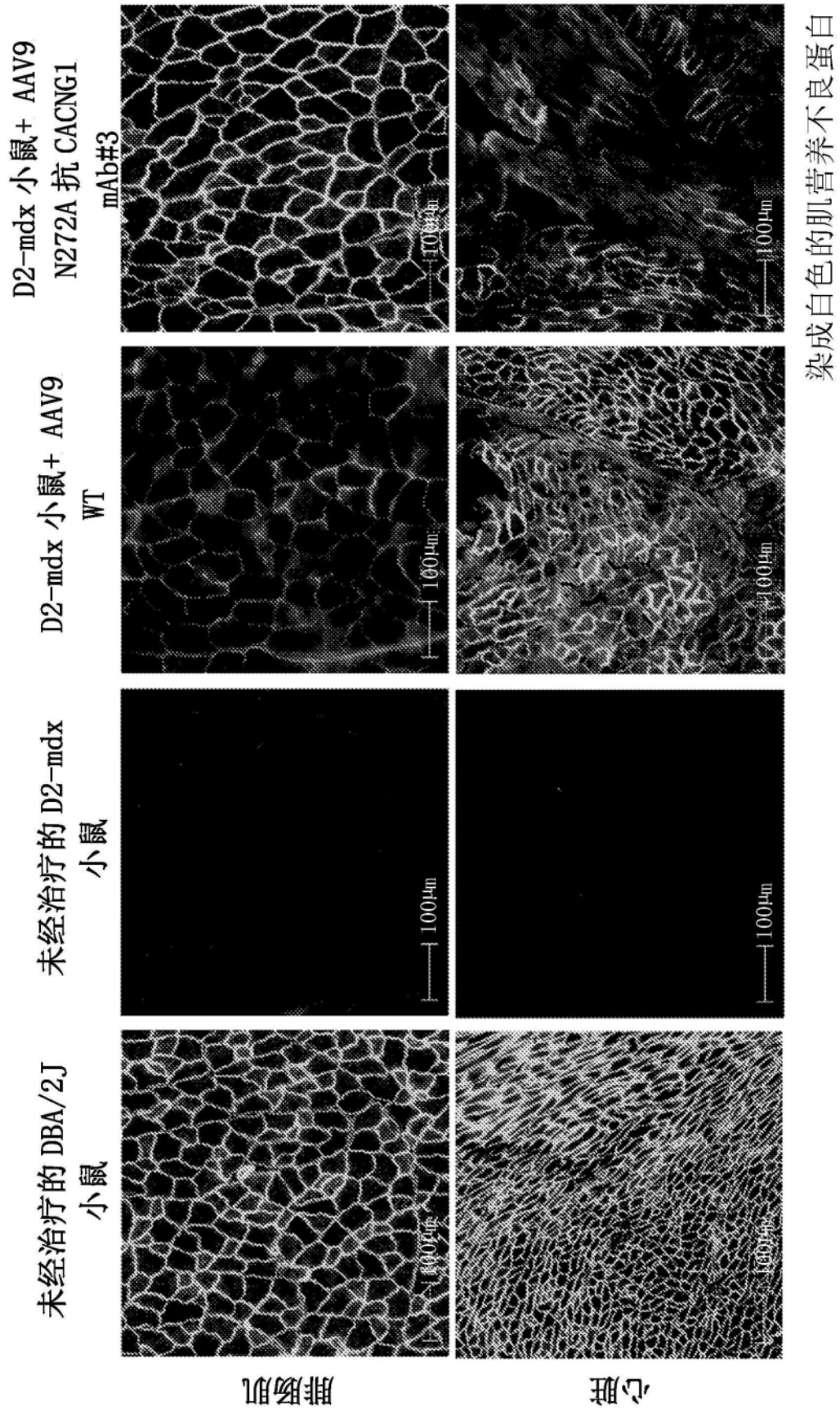


图20

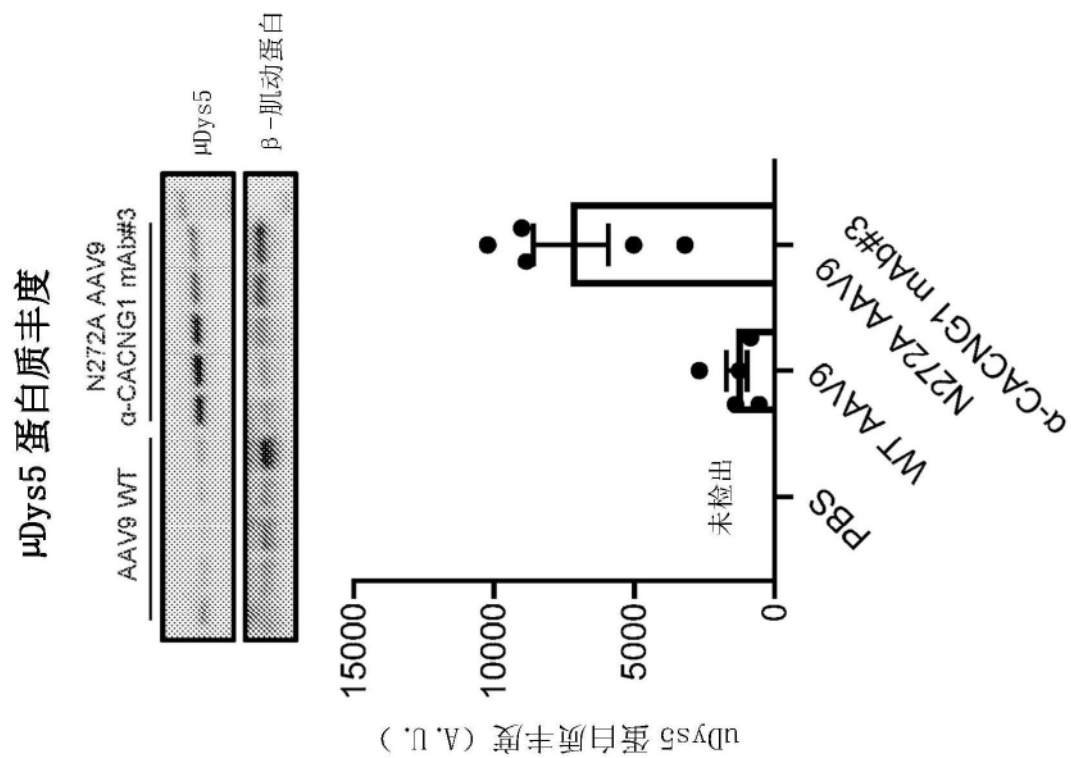


图21

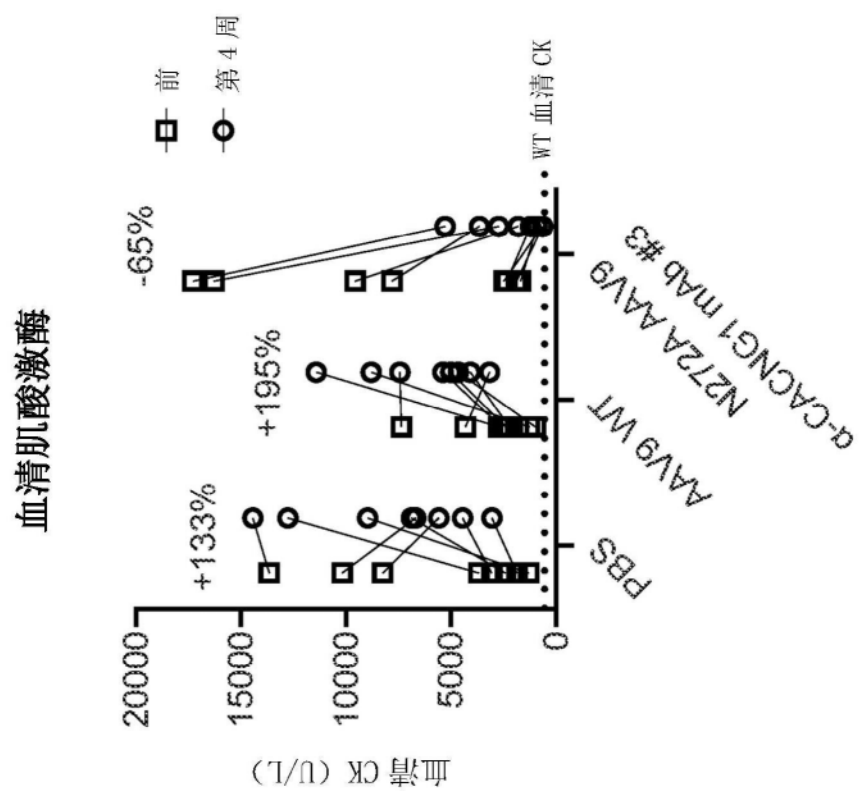


图22

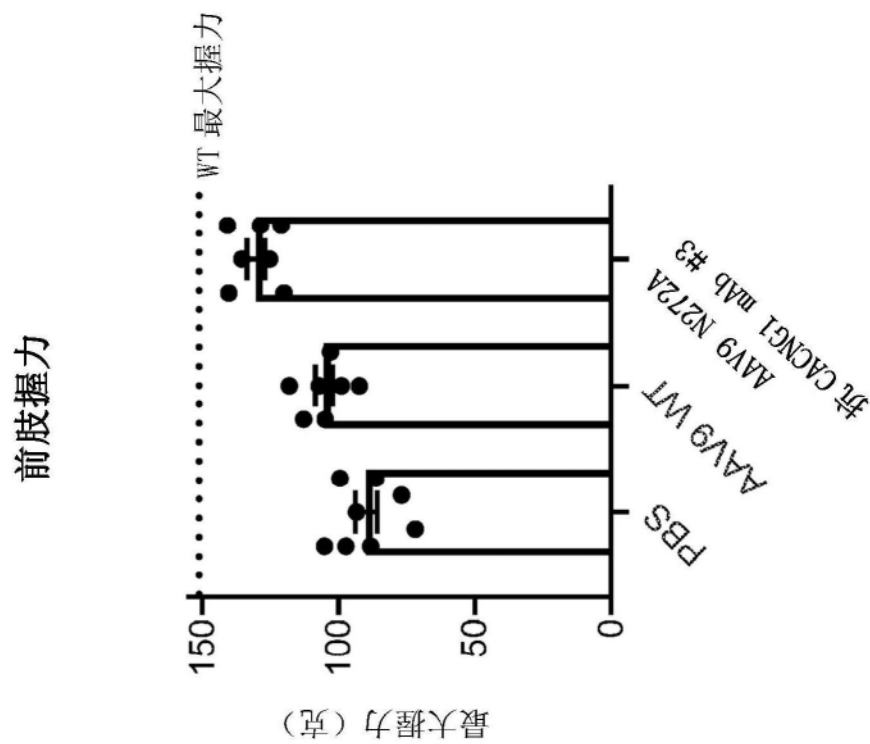


图23

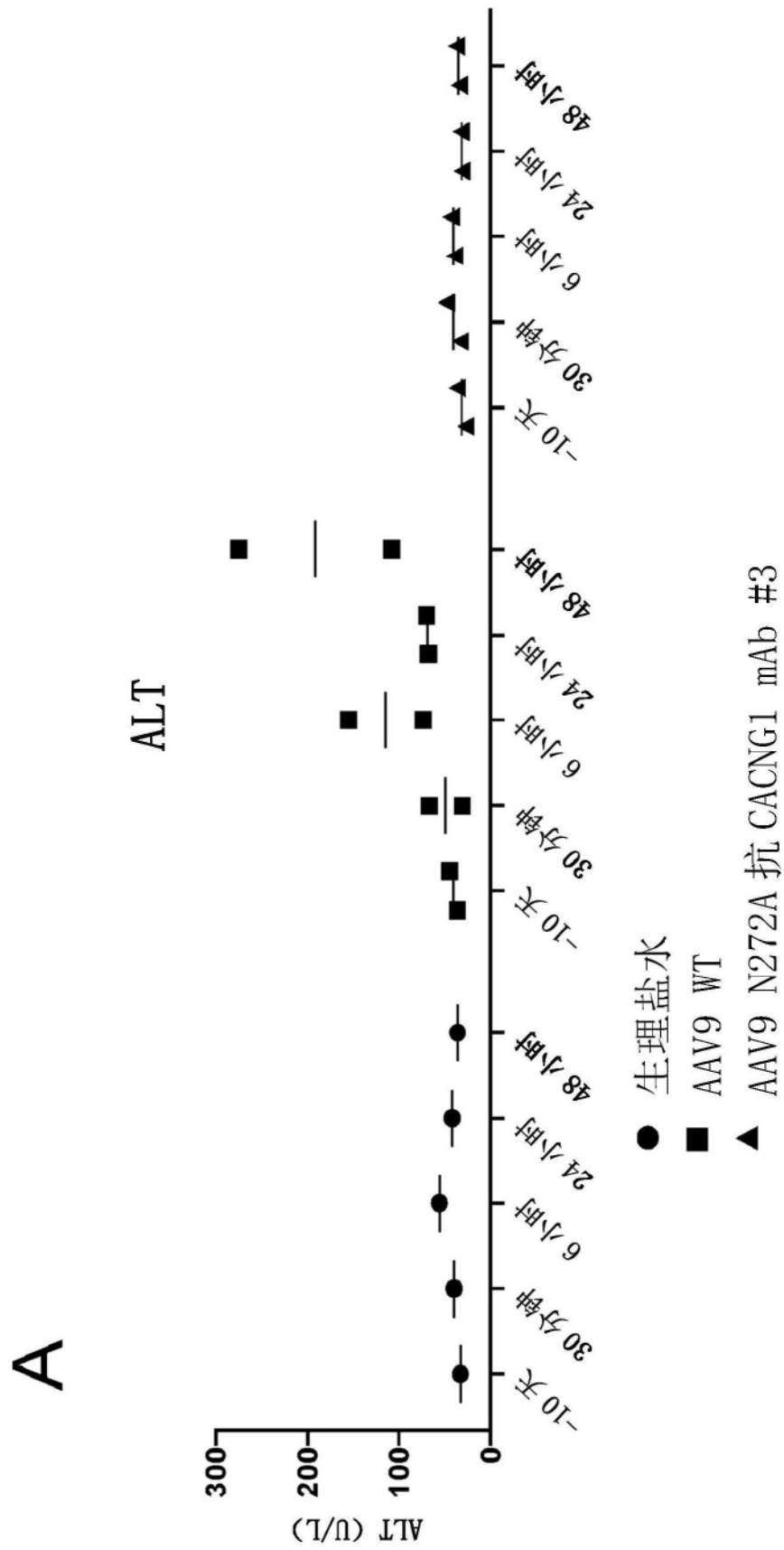


图24

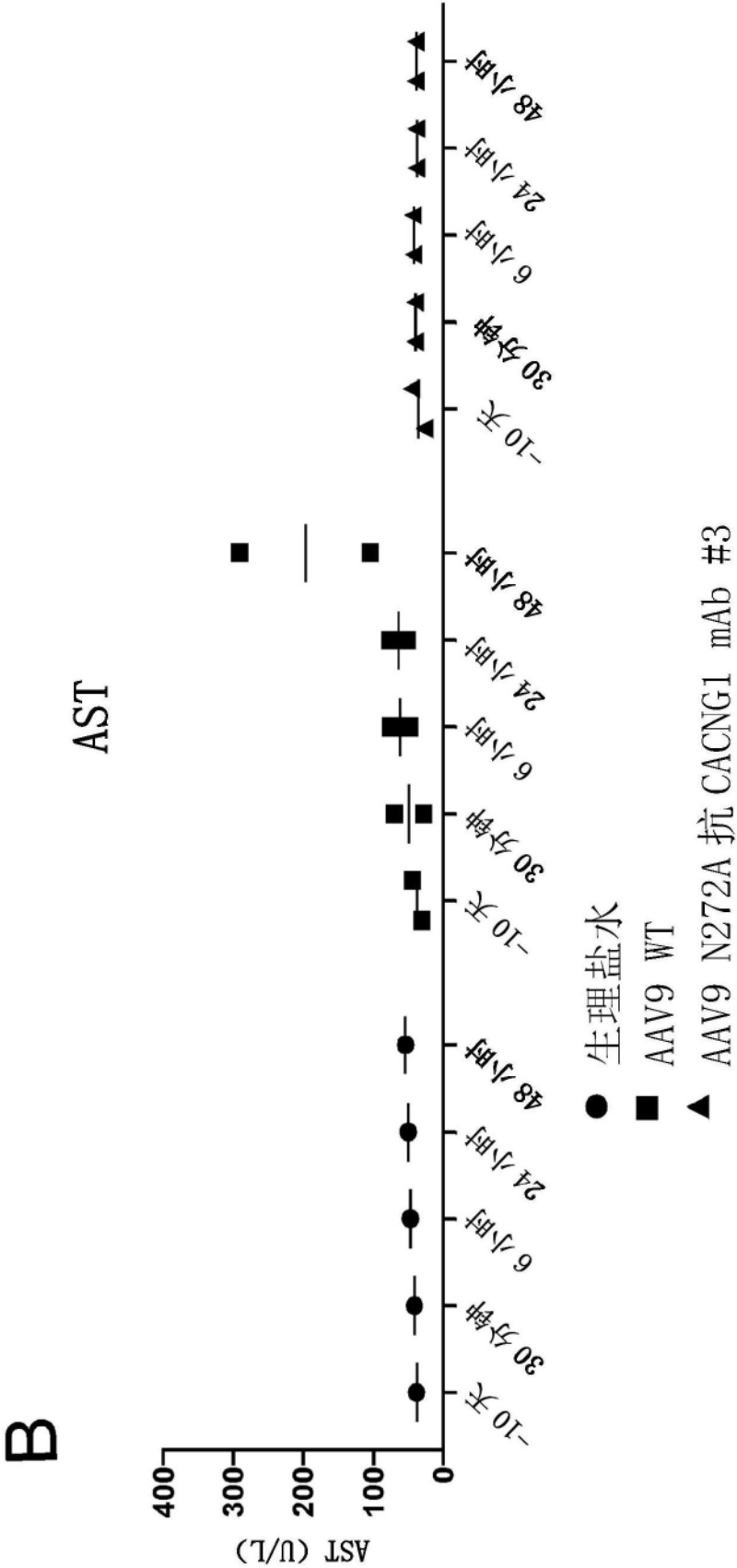


图24(续)

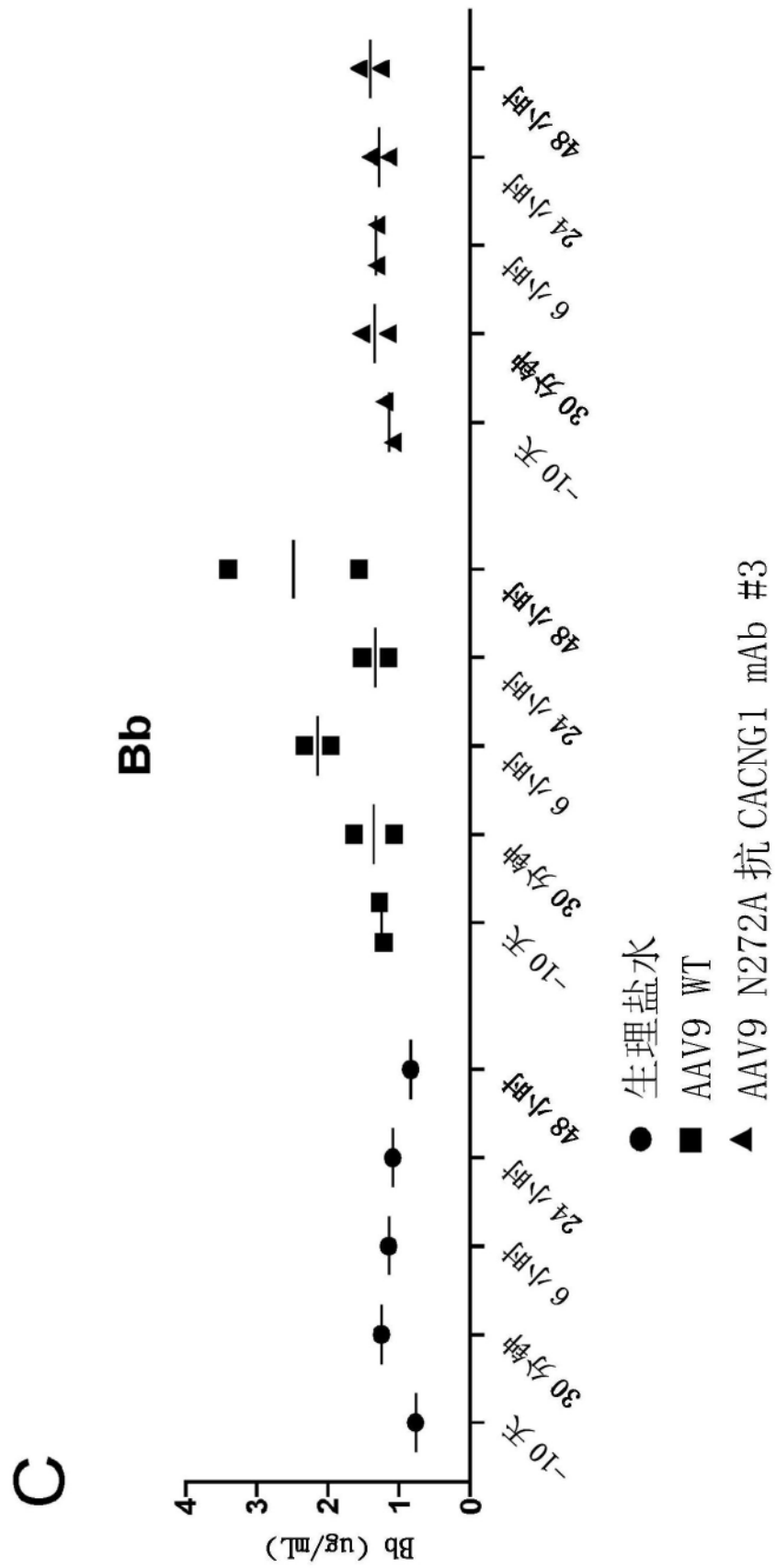


图24(续)

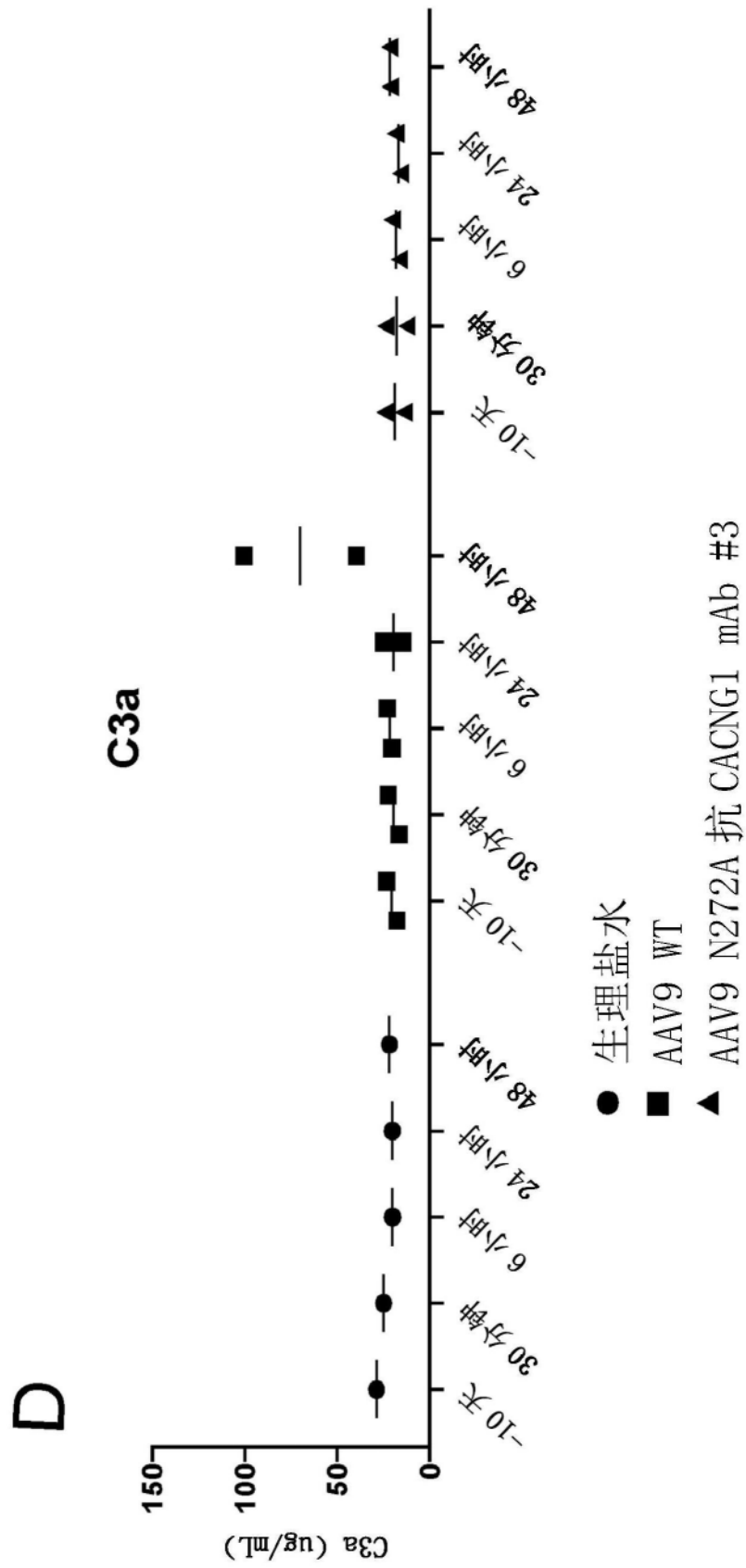


图24(续)