



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112368391 A

(43) 申请公布日 2021. 02. 12

(21) 申请号 201980042499.3

C.昂祖 E.津恩

(22) 申请日 2019.05.10

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30) 优先权数据

代理人 易方方

62/670,543 2018.05.11 US

62/841,179 2019.04.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

C12N 15/864 (2006.01)

2020.12.23

C12N 7/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12R 1/93 (2006.01)

PCT/US2019/031851 2019.05.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/217911 EN 2019.11.14

(71) 申请人 马萨诸塞眼科耳科诊所

地址 美国马萨诸塞州

申请人 司科彭斯眼部研究学会

(72) 发明人 L.H.范登伯格 P.施密特 C.蒂珀

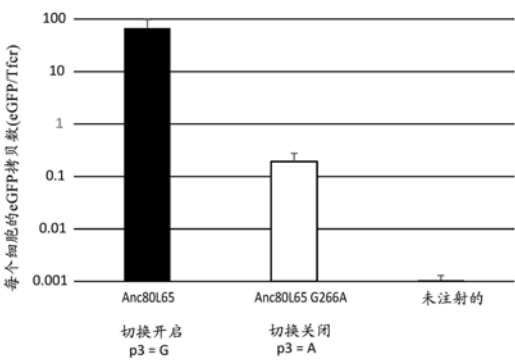
权利要求书2页 说明书15页 附图29页

(54) 发明名称

腺相关病毒的肝脏特异性嗜性

(57) 摘要

本公开内容提供了用于改变或变化腺相关病毒(AAV)的组织嗜性(例如,肝脏嗜性)的组合物和方法。



代码	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
0	K	A	A	K	Q	T	T	N	Q	A	N
1	R	S	G	R	E	E	A	S	E	S	D
Anc80L65	R	A	G	K	Q	T	T	N	E	A	D
Anc80L65 G266A	R	A	A	K	Q	T	T	N	E	A	D

1. 一种改变腺相关病毒 (AAV) 载体的组织嗜性的方法, 所述方法包括:

定位AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266或对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的氨基酸位置; 并且

将对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的的定位的位置的天然存在的氨基酸替代为甘氨酸 (G) 氨基酸残基以增强所得AAV载体的肝脏嗜性, 或替代为丙氨酸 (A) 氨基酸残基以降低所得AAV的肝脏嗜性, 或者

将对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的的定位的位置的天然存在的氨基酸替代为精氨酸 (R) 氨基酸残基以增强所得AAV载体的肝脏嗜性, 或替代为赖氨酸 (K) 氨基酸残基以降低所得AAV的肝脏嗜性。

2. 根据权利要求1所述的方法, 包括将对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的所述定位的位置的所述天然存在的氨基酸替代为G氨基酸残基以增强所述所得AAV载体的肝脏嗜性。

3. 根据权利要求1所述的方法, 包括将对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的所述定位的位置的所述天然存在的氨基酸替代为A氨基酸残基以降低所述所得AAV载体的肝脏嗜性。

4. 根据权利要求1所述的方法, 包括将对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的所述定位的位置的所述天然存在的氨基酸替代为R氨基酸残基以增强所述所得AAV载体的肝脏嗜性。

5. 根据权利要求1所述的方法, 包括将对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的所述定位的位置的所述天然存在的氨基酸替代为K氨基酸残基以降低所述所得AAV载体的肝脏嗜性。

6. 根据前述任一项权利要求所述的方法, 其中替代步骤使用定点诱变进行。

7. 根据前述任一项权利要求所述的方法, 其中所述替代步骤通过限制性消化以及现有或从头合成的DNA连接进行。

8. 根据前述任一项权利要求所述的方法, 其中所述替代步骤通过现有或从头合成的DNA的同源性介导的组装进行。

9. 根据前述任一项权利要求所述的方法, 其中定位步骤通过测序进行。

10. 一种筛选腺相关病毒 (AAV) 的肝脏嗜性水平的方法, 所述方法包括:

对编码AAV衣壳蛋白的核酸进行测序;

定位所述AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的氨基酸位置或所述AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的氨基酸位置; 并且

鉴定在对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的所述衣壳蛋白中的位置266的所述定位的位置具有G氨基酸残基或A氨基酸残基, 或者在对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的所述衣壳蛋白中的位置168的所述定位的位置具有R氨基酸残基或K氨基酸残基的AAV衣壳蛋白,

其中在对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的所述衣壳蛋白中的位置266的所述定位的位置的G氨基酸残基或在对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的所述衣壳蛋白中的位置168的所述定位的位置的R氨基酸残基表明AAV显示出肝脏嗜性, 并且其中在对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的所述衣壳蛋白中的位置266的所述定位的位置的A氨基酸残基或在对应于在Anc80 (SEQ

ID NO:1)的所述衣壳蛋白中的位置168的所述定位的位置的K氨基酸残基表明AAV显示出极低或无肝脏嗜性。

11.一种具有SEQ ID NO:1[Anc80]中所示序列的腺相关病毒(AAV),其中在位置266的X₃选自G或A,或者其中在位置168的X₁选自R或K。

12.一种具有选自下组的序列的腺相关病毒(AAV):SEQ ID NO:2[Anc80L65]、SEQ ID NO:3[Anc80L65 G266A]、SEQ ID NO:4[AAV9 G267A]、SEQ ID NO:5[AAV9 G267A S269T]、SEQ ID NO:6[AAV9 Anc80L65-VRI]、SEQ ID NO:7[AAV9 Anc80L65 G266A-VRI]、SEQ ID NO:8[AAV3B A266G]、SEQ ID NO:9[AAV3B A266G S267 N268T]、SEQ ID NO:10[AAV3B G265 A266A]、SEQ ID NO:11[AAV3B G265 A266G]、SEQ ID NO:12 AAV3B G265 A266A S268T]、SEQ ID NO:13[AAV3B G265 A266G S268T]、SEQ ID NO:14[AAV3B AAV9-VRI]、SEQ ID NO:15[AAV3B Anc80L65-VRI]、SEQ ID NO:16[AAV3B Anc80L65 G266A-VRI]和SEQ ID NO:17[Anc80L65 R168K]。

13.一种改变腺相关病毒(AAV)载体的组织嗜性的方法,所述方法包括:

定位AAV衣壳蛋白内如图14中所定义的肝脏切换(toggle)区;并且

将天然存在的肝脏切换区替代为来自异源血清型或从头衍生的序列的肝脏切换区,以增强所得AAV载体的肝脏嗜性或降低所得AAV载体的肝脏嗜性。

14.根据权利要求13所述的方法,其中,当所述异源或从头衍生的肝脏切换区在AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80(SEQ ID NO:1)的衣壳蛋白中的位置266的位置包含G氨基酸残基时,所述所得AAV载体的肝脏嗜性增强。

15.根据权利要求13所述的方法,其中,当所述异源或从头衍生的肝脏切换区在AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80(SEQ ID NO:1)的衣壳蛋白中的位置266的位置包含A氨基酸残基时,所述所得AAV载体的肝脏嗜性降低。

腺相关病毒的肝脏特异性嗜性

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年04月30日提交的美国临时申请序列号62/841,179和2018年05月11日提交的美国临时申请序列号62/670,543的优先权。

发明领域

[0003] 本公开内容总体上涉及腺相关病毒(AAV)改变的组织嗜性,并且具体地涉及控制AAV的肝脏嗜性。

背景技术

[0004] 腺相关病毒(AAV)是属于细小病毒属的细小病毒,而细小病毒属又属于细小病毒科。该病毒是一种复制缺陷型、无包膜病毒,可感染人类和某些灵长类动物,但已知不会引起疾病。AAV能够感染分裂细胞和静止细胞,并以染色体外状态持续存在,而不会整合到宿主细胞的基因组中,尽管在天然病毒中,病毒携带的基因也可能会整合到宿主基因组中。这些特征使得AAV成为用作基因疗法中的病毒载体的候选物。然而,某些AAV血清型会表现出肝脏嗜性,这可能取决于所治疗的疾病,其可能是需要的或不需要的。

[0005] 了解如何确定AAV的肝脏嗜性,并且基于该信息能够操纵AAV的嗜性,将是有益的。

发明内容

[0006] AAV的组织特异性(即,组织嗜性)由衣壳血清型决定,并且本文所述的方法和组合物能够改变特定AAV的组织嗜性,以改善由这些改变的AAV递送的疗法的特异性。例如,改变或变化AAV的肝脏嗜性可能是有益的,例如,当肝脏是所需靶点时,例如通过增强天然肝脏嗜性,还有当肝脏不是所需靶点时,例如通过降低天然肝脏嗜性。例如,当该病毒被更有效地递送至肝脏(或非肝器官)中的细胞并更有效地对其进行转染时,可以向该对象施用较低剂量的给定AAV。

[0007] 在一个方面中,本公开内容提供了改变腺相关病毒(AAV)载体的组织嗜性的方法。这种方法通常包括定位AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80(SEQ ID NO:1)的衣壳蛋白中的位置266的氨基酸位置;并且将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为甘氨酸(G)氨基酸残基,以便为所得AAV载体提供增强的肝脏嗜性,或者替代为丙氨酸(A)氨基酸残基,以降低肝脏嗜性,即为所述所得AAV提供肝脏脱靶。

[0008] 在一些实施方式中,这种方法包括将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为G氨基酸残基,以便为所述所得AAV载体提供增强的肝脏嗜性(例如,肝脏富集)。在一些实施方式中,这种方法包括将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为A氨基酸残基,以提供降低的肝脏嗜性,例如通过所述所得AAV使所述肝脏脱靶。

[0009] 在另一个方面中,本公开内容提供了改变腺相关病毒(AAV)载体的组织嗜性的方法。这种方法通常包括定位AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80(SEQ ID NO:1)的衣壳蛋白中的位置168的氨基酸位置;并且将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为精氨酸(R)氨基酸

残基,以便为所得AAV载体提供增强的肝脏嗜性,或者替代为赖氨酸(K)氨基酸残基,以提供降低的肝脏嗜性,例如,所述所得AAV肝脏脱靶。

[0010] 这种方法通常包括定位AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的氨基酸位置;并且将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为精氨酸(R) 氨基酸残基,以便为所得AAV载体提供增强的肝脏嗜性(例如,肝脏富集),或者替代为赖氨酸(K) 氨基酸残基,以提供降低的肝脏嗜性,例如,所述所得AAV肝脏脱靶。

[0011] 在一些实施方式中,这种方法包括将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为R氨基酸残基,以便为所述所得AAV载体提供肝脏富集。在一些实施方式中,这种方法可以包括将在定位的位置的天然存在的氨基酸替代为K氨基酸残基,以提供所述所得AAV降低的肝脏靶向。

[0012] 在另一个方面中,提供了改变腺相关病毒(AAV) 载体的组织嗜性的方法。这种方法通常包括定位AAV衣壳蛋白内如图14中所定义的肝脏切换(toggle) 区;并且将天然存在的肝脏切换区替代为来自异源血清型或从头衍生的序列的肝脏切换区,以改变肝脏嗜性,例如以提供所述所得AAV载体的增强或降低的肝脏靶向。

[0013] 在一些实施方式中,当所述异源或从头衍生的肝脏切换区在AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的位置包含G氨基酸残基时,提供了所述所得AAV载体的肝脏富集。在一些实施方式中,当所述异源或从头衍生的肝脏切换区在AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的位置包含A氨基酸残基时,提供了所述所得AAV载体降低的肝脏靶向。

[0014] 在一些实施方式中,替代步骤使用定点诱变,通过限制性消化以及现有或从头合成的DNA连接,通过现有或从头合成的DNA的同源性介导的组装或者其组合进行。在一些实施方式中,定位步骤通过测序进行。

[0015] 在另一个方面中,本公开内容提供了筛选向肝脏的转染被富集或降低的AAV的方法。这种方法通常包括对编码AAV衣壳蛋白的核酸进行测序;定位所述AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的氨基酸位置;并且鉴定在定位的位置具有G氨基酸残基或在定位的位置具有A氨基酸残基的AAV衣壳蛋白。在通常情况下,在定位的位置的G氨基酸残基表明AAV是向肝脏的转染被富集的AAV,而在定位的位置的A氨基酸残基表明AAV是向肝脏的转染被降低的AAV。

[0016] 在另一个方面中,本公开内容提供了筛选向肝脏的转染被富集或降低的AAV的方法。这种方法通常包括对编码AAV衣壳蛋白的核酸进行测序;定位所述AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置168的氨基酸位置;并且鉴定在定位的位置具有R氨基酸残基或在定位的位置具有K氨基酸残基的AAV衣壳蛋白。在通常情况下,在定位的位置的R氨基酸残基表明AAV是向肝脏的转染被富集的AAV,而在定位的位置的K氨基酸残基表明AAV是向肝脏的转染被降低的AAV。

[0017] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:1[Anc80] 中所示序列的AAV,其中在位置266的X₃选自G或A。

[0018] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:1[Anc80] 中所示序列的AAV,其中在位置168的X₁选自R或K。

[0019] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:2[Anc80L65] 中所示序列的

AAV。

[0020] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:3[Anc80L65G266A]中所示序列的AAV。

[0021] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:4[AAV9 G267A]中所示序列的AAV。

[0022] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:5[AAV9 G267A S269T]中所示序列的AAV。

[0023] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:6[AAV9 Anc80L65-VRI]中所示序列的AAV。

[0024] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:7[AAV9 Anc80L65 G266A-VRI]中所示序列的AAV。

[0025] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:8[AAV3B A266G]中所示序列的AAV。

[0026] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:9[AAV3B A266G S267 N268T]中所示序列的AAV。

[0027] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:10[AAV3B G265 A266A]中所示序列的AAV。

[0028] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:11[AAV3B G265 A266G]中所示序列的AAV。

[0029] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:12AAV3B G265 A266A S268T]中所示序列的AAV。

[0030] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:13[AAV3B G265 A266G S268T]中所示序列的AAV。

[0031] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:14[AAV3B AAV9-VRI]中所示序列的AAV。

[0032] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:15[AAV3B Anc80L65-VRI]中所示序列的AAV。

[0033] 在又一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:16[AAV3B Anc80L65 G266A-VRI]中所示序列的AAV。

[0034] 在另一个方面中,本公开内容提供了具有SEQ ID NO:17[Anc80L65 R168K]中所示序列的AAV。

[0035] 如在本文中所使用的,“组织嗜性”指通过特定AAV感染和/或转染细胞的天然组织特异性。例如,很多AAV显示出肝脏嗜性,这表明这些AAV优先感染和/或转染肝细胞,而非其他组织类型的细胞。组织嗜性通常基于在特定组织中的细胞表面上和/或在特定AAV的表面上发现的特定表面蛋白(例如,受体蛋白)。

[0036] 如在本文中所使用的,“切换”指与AAV的组织嗜性相关的AAV衣壳蛋白内的特定位置或区域。因此,当在如本文所述的切换位置或区域的天然存在的氨基酸被不同氨基酸替代时,该AAV的组织嗜性改变。因而,“肝脏切换”(例如,“肝脏切换1”)指能够被“转换”的残基,以使得转染主要或基本上完全发生在肝细胞中,或者主要或基本上完全不发生在肝细

胞中。

[0037] 亦如在本文中所使用的,“肝脏切换区”指位于如图14中所定义的“肝脏切换”残基“内两条 β -链之间的20个氨基酸残基。因而,“肝脏切换区”指可以通过从异源AAV导入或通过从头衍生而“转换”的一系列连续残基,以使得转染主要或基本上完全发生在肝细胞中,或者主要或基本上完全不发生在肝细胞中。肝脏切换区域可变区I (VRI) 重叠,因此所有切换区转换使用此命名法作为简写。

[0038] 如在本文中所使用的,“切换2”指独立于“切换1”的开关。因而,“肝脏切换2”指与肝脏切换1中所讨论的残基不同的另一个残基,并且能够被“转换”,以使得转染主要或基本上完全发生在肝细胞中,或者主要或基本上完全不发生在肝细胞中。”

[0039] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语与方法和物质组合物所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的含义。虽然与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于方法和物质组合物的实践或测试中,但是以下描述了合适的方法和材料。此外,材料,方法和实例仅是说明性的,并不意在进行限制。将本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以其整体并入本文作为参考。

附图说明

[0040] 本专利或申请文件包含以彩色制作的至少一幅附图。通过请求并支付必要的费用由当局提供具有彩色附图的本专利或专利申请公开文本的副本。

[0041] 图1是显示11个位置的Anc80支架序列(SEQ ID NO:1),所述位置被改变以产生用于体内筛选的 2^{11} (2048)-变体Anc80文库。已将突出显示的位置X1和X3确定为肝脏切换位置,并且对应于Anc80衣壳序列中的残基168和266。在X3处的残基是决定该载体是否有效地将基因递送至肝细胞的主要位置,因此将其称为“肝脏切换”或“切换”。在本文中将位置X1称为“切换2”。

[0042] 图2A和2B分别是Anc80L65(SEQ ID NO:2)和Anc80L65 G266A(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。除了肝脏切换以外,这两条序列是相同的。甘氨酸(G)/丙氨酸(A)肝脏切换在这两条核酸和蛋白序列中用粗体并加下划线表示。

[0043] 图3A和3B分别代表AAV9 G267A(SEQ ID NO:4)和AAV9 G267A S269T(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列。这些序列代表AAV9中鉴定和改变的肝脏切换,以及在后者中与Anc80L65中相应位置匹配的其他改变。从AAV9中改变的残基用粗体并加下划线表示。

[0044] 图4A和4B分别代表AAV9 Anc80L65-VRI(SEQ ID NO:6)和AAV9 Anc80L65 G266A-VRI(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列。这些序列代表从Anc80L65向AAV9导入肝脏富集和肝脏脱靶的肝脏切换区。导入的序列用粗体并加下划线表示。

[0045] 图5A和5B分别是AAV3B A266G(SEQ ID NO:8)和AAV3B A266G S267_N268T(SEQ ID NO:9)的序列。尽管与Anc80肝脏切换区相比缩短,使得其鉴定不确定,但是AAV3B的A266可能代表该血清型中的肝脏切换。AAV3B不能很好地转导小鼠肝脏,这表明改变A266G可能会改善这一功能。T的插入形成了与Anc80具有更高同一性的肝脏切换区。从AAV3B改变或插入的残基用粗体并加下划线表示。

[0046] 图6A和6B分别是AAV3B G265_A266A(SEQ ID NO:10)和AAV3B G265_A266G(SEQ ID NO:11)的序列。AAV3B的肝脏切换区域与Anc80的肝脏切换区相比缩短。从Anc80中的相应位

置插入肝脏富集G或肝脏脱靶A可能会导入这一功能。从AAV3B改变或插入的残基用粗体并加下划线表示。

[0047] 图7A和7B分别是AAV3B G265_A266A S268T (SEQ ID NO:12) 和AAV3B G265_A266G S268T (SEQ ID NO:13) 的序列。AAV3B的肝脏切换区域与Anc80的肝脏切换区相比缩短。从Anc80中的相应位置插入肝脏富集G或肝脏脱靶A可能会导入这一功能。在位置286处将S改变为T会建立与Anc80具有更高同一性的区域。从AAV3B改变或插入的残基用粗体并加下划线表示。

[0048] 图8A、8B和8C分别是AAV3B AAV9-VRI (SEQ ID NO:14)、AAV3B Anc80L65-VRI (SEQ ID NO:15) 和AAV3B Anc80L65 G266A-VRI (SEQ ID NO:16) 的序列。这些序列代表从AAV9、Anc80L65和Anc80L65 G266A向AAV3B导入肝脏富集和肝脏脱靶的肝脏切换区。导入的序列用粗体并加下划线表示。

[0049] 图9是显示在C57/BL6J小鼠中与病毒输入相比肝脏中2048Anc80文库成员丰度的MA图。在y轴上,零表示输入没有变化,正值和负值分别表示相对富集或脱靶。在11个切换位置中,观察到位置X3与双峰性相关。

[0050] 图10是显示在非人灵长类恒河猴中与病毒输入相比肝脏中2048Anc80文库成员丰度的MA图。在y轴上,零表示输入没有变化,正值和负值分别表示相对富集或脱靶。与小鼠肝脏一样,在11个切换位置中,观察到位置X3cn.com与双峰性相关。

[0051] 图11是图示了小鼠肝脏中Anc80肝脏切换的克隆验证的柱状图。Anc80L65 (SEQ ID NO:2) 和Anc80L65 G266A (SEQ ID NO:3) 均是通过表达eGFP的基因组CB7.CI.eGFP.FF2A.hA1AT.RGB三重转染而产生的。将这些载体以每只 1.25×10^{12} gc/kg的剂量注射至5只小鼠,三天后处死小鼠。回收的肝脏的生物分布表明,与Anc80L65 G266A切换“关闭”载体相比,在Anc80L65切换“开启”载体中每个细胞的eGFP编码基因组中富集100X。

[0052] 图12A-12K是一系列11张显微镜图像,其示出了来自图11的10小鼠外加1只未注射对照小鼠的肝脏中eGFP染色的结果。与Anc80L65 G266A切换“关闭”载体相比,注射Anc80L65切换“开启”载体的小鼠肝脏中eGFP染色显著更多。

[0053] 图13A是代表腺相关病毒2 (AAV2) VP3衣壳单体的晶体结构的示意图。肝脏切换 (“LT”) 的位置由箭头指示,并且围绕LT的区域的结构用方框表示。

[0054] 图13B是代表晶体结构的示意图,其示出了来自AAV 2、3、6、8和9的LT区域的覆盖,突出显示了定义切换位置的局部二级结构。切换区域定义为位于二级结构 β -升序 (β_a) 和 β -降序 (β_d) 之间并包括其的残基,其具有编码N末端至 α -切换 (α_t) 的2至3个残基的主要官能团。LT残基位于VR1,以 β 片层为边界的环,N末端至3残基 α 螺旋内。

[0055] 图14是AAV进化支和克隆的原型 (例如,第1、4、8-10和13行),AAV的临床相关血清型 (天然存在的和工程化的;例如,第2、3、5-7、11和12行) 以及Anc变体 (例如,第14-22行) 的序列比对。第1-22行对应于SEQ ID NO:18-39。显示了 β -升序 (β_a)、 β -降序 (β_d)、 α -切换 (α_t)、切换区和切换位置本身的定位。 β -升序 (β_a) 在保守的酪氨酸处起始, β -降序 (β_d) 在保守的丝氨酸处终止。切换表示在Anc80L65中的残基266,在AAV9中的267和在AAV5中的257,强调了在定义切换时位置编号是相对的。

[0056] 图15是肝脏切换区序列的表 (SEQ ID NO:40-55,从上到下),定位于Anc80L65、AAV3B和AAV9血清型C末端的 α -切换 (NDN),以及构建用于检测肝脏切换假设的变体。最后两

列列出了Anc80L65、AAV3B和AAV9在小鼠和灵长类肝脏中已知的“开启”或“关闭”转导效率，以及以粗体列出了本文报道的变体的体内结果。假设针对未测试变体预测的效率用斜体表示。

[0057] 图16是显示用于检测肝脏切换区对异源AAV帽可携带性的方法，以及进一步检测单一残基切换观察结果的示意图。该区域的两侧是两个保守的结构域，适于同源性导向的区域“转换”的组装。SEQ ID NO:86。

[0058] 图17是显示了具有“转换”的肝脏切换区 (SEQ ID NO:56-63, 从上到下) 变体的肝脏转导效率 (与图15类似) 预测的表。最后两列以粗体列出了本文报道的这些变体在小鼠肝脏中在体内确定的“开启”或“关闭”转导效率。假设针对未测试变体预测的效率用斜体表示。

[0059] 图18A和18B是报道了AAV9和基于AAV9的肝脏切换变体的体外转导效率的柱状图。这些变体是通过三重转染293细胞生产的，并包装在编码CMV-荧光素酶的基因组中。滴定变体，然后以100,000的感染复数 (MOI) 加入Huh7细胞。Huh7细胞是肝癌细胞系，可以将以归一化的RLU报道的转导效率解释为变体是肝脏“开启”还是“关闭”的粗略指标。与双突变体G267A S269T (SEQ ID NO:5) 一样，将天然AAV9 G267变为A (SEQ ID NO:4) 极大地降低了Huh7细胞的转导效率。尽管切换在Anc80L65 (SEQ ID NO:6) 和Anc80L65 G266A (SEQ ID NO:7) 变体的相对效率中可能是明显的，但是AAV9似乎不能很好地耐受肝脏切换区的转换。

[0060] 图19A和19B是报道了AAV3B和基于AAV3B的肝脏切换变体的体外转导效率的柱状图。这些变体是通过三重转染293细胞生产的，并包装在编码CMV-荧光素酶的基因组中。滴定变体，然后以100,000的MOI加入Huh7细胞。Huh7细胞是肝癌细胞系，可以将以归一化的RLU报道的转导效率解释为变体是肝脏“开启”还是“关闭”的粗略指标。将天然AAV3B A266改为G (SEQ ID NO:8) 出乎意料地严重降低了Huh7细胞的转导效率，但是在Anc80L65 (SEQ ID NO:9) 中的相应位置插入T可以挽救该变体，并且表现优于AAV3B。类似地，在A266之前插入A (SEQ ID NO:10) 或G (SEQ ID NO:11)，带有或不带有S268T (SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13) 改变，都会产生表现优于AAV3B的具有两种+G“开启”变体的肝脏切换样效率模式。AAV3B对肝脏切换区转换耐受良好，其在肝脏“开启”AAV9变体 (SEQ ID NO:14) 中显示出明显的切换，以及Anc80L65 (SEQ ID NO:15) 和Anc80L65G266A (SEQ ID NO:16) 变体的相对效率。

[0061] 图20A-20C是显示来自注射有AAV9和基于AAV9的变体G267A和G267A S269T的小鼠的荧光素酶体内动力学表达结果的图。对小鼠追踪57天，并在整个过程中进行活体成像。将目标区域定义为总体、肝脏和腰臀部 (大腿和臀部的主要肌群)。尽管AAV9 G267A S269T的总体总辐射率与AAV9相当，但是这两种“关闭”AAV9变体在肝脏区域内观察到的辐射率均非常低。这种双突变体可能从腰臀部区域产生了很多这种总辐射率。

[0062] 图21A-21F是支持从体内荧光素酶实验观察到的数据的柱状图。在注射后28天处死注射表达GFP的载体AAV9、AAV9 G267A或AAV9 G267A S269T的小鼠，并对含有eGFP的基因组 (DNA) 和eGFP表达 (RNA) 进行生物分布。尽管这两种肝细胞“关闭”突变体在肝脏中的DNA和RNA水平都降低了三个数量级 (图21A-21B)，但是在心脏细胞中，AAV9 G267A和AAV9 G267A S269T与AAV9相当 (图21C-21D)。值得注意的是，在股四头肌细胞中，AAV9 G267A S269T超过了AAV9的基因递送和基因表达水平 (图21E-21F)。

[0063] 图22A和22B是显示来自注射有AAV3B或基于AAV3B的变体G265_A266A、G265_

A266G、Anc80L65-VRI、Anc80L65 G266A-VRI或AAV9的小鼠的荧光素酶体内动力学表达结果的图。对小鼠追踪29天,并在整个过程中进行活体成像。将目标区域定义为总体和肝脏。AAV3B的肝脏“开启”变体与其肝脏“关闭”对应物相比发射出更高的辐射率,从而支持了切换假设。实际上,这两个肝脏“关闭”AAV3B变体在肝脏区域内观察到的辐射率非常低。有趣的是,Anc80L65-VRI突变体的表现与野生型AAV3B一样,但重要的是,简单插入甘氨酸就产生了相当于AAV9的肝脏区域信号的载体。变体再次与AAV9匹配的总信号表明大部分AAV3B G265 A266G信号来自肝脏。

[0064] 图23是序列Anc80L65 R266K(SEQ ID NO:17)。除了肝脏切换2以外,该序列与Anc80L65相同。将精氨酸(R)/赖氨酸(K)肝脏切换突出显示。

[0065] 图24是AAV进化支和克隆的原型(例如,第1、4、8-10和13行),AAV的临床相关血清型(天然存在的和工程化的;例如,第2、3、5-7、11和12行)以及Anc变体(例如,第14-22行)的序列比对。第1-22行对应于SEQ ID NO:64-85。显示了肝脏切换2的位置,保守的脯氨酸和赖氨酸的定向以及VP2的非经典起始密码子。肝脏切换2表示在Anc80L65和AAV9中的残基168和在AAV5中的151强调了在定义切换时位置编号是相对的。

[0066] 图25A和25B表示图和热图。图25A的左侧表示MA图,其显示了在这两只C57BL/6的小鼠肝细胞中2048Anc80文库成员的丰度,以及图25B的左侧表示与第28天的病毒输入相比的异种移植FRG小鼠模型的MA图。在这些细胞中富集的变体已被框出,并且在两个图中右侧的“热图”中示出了11个切换位置中每个位置的标识。在11个切换位置中,肝脏切换位置X3与富集相关。位置X1切换2的状态1也与富集相关,从而显著地具有丰度最高的变体。

[0067] 图26A-26C的左侧是三个MA图,其显示了在第28天的NHP(图26A),在第28天的异种移植FRG小鼠模型(图26B)和在第3天的人肝细胞(图26C)中在动物和体外模型中与病毒输入相比2048Anc80文库成员的丰度。在这些细胞中富集的变体已被框出,并且在每个图中右侧的“热图”中示出了11个切换位置中每个位置的标识。在11个切换位置中,肝脏切换位置X3与富集相关。位置X1切换2的状态1也与富集相关,从而显著地具有丰度最高的变体。

具体实施方式

[0068] 腺相关病毒(AAV)主要是肝脏嗜性的。尽管这种嗜性对具有肝脏病因疾病的基因疗法治疗是有益的,但有效转导该器官所需的含基因组病毒颗粒的数量仍可能给患者和提供者带来负担。由于肝脏是AAV递送的大多数治疗性物质的汇聚区,因而与非肝脏病因相关但相反的疾病治疗可能效果较差,或者需要更高剂量。此外,有希望的AAV血清型不能有效转导小鼠肝脏,严重限制了小鼠模型在临床相关性和剂量研究中的应用。

[0069] 例如,此前鉴定与嗜性相关的AAV序列的方法依赖于具有不同特征的高度相关的现存血清型的比较,不相关血清型之间的随机结构域交换或考虑高阶结构,以鉴定定义肝脏嗜性的基序。例如,通过比较高度相关的血清型,已经完成了AAV嗜性作图的决定因素。一个这样的实例是AAV1与AAV6之间的单氨基酸改变(E531K),其改善了在AAV1中的小鼠肝脏转导(Wu等,2006,J.Virol.,80(22):11393-7)。另一个实例是AAV2与AAV8之间的相互结构域交换,该结构域交换改变了嗜性,但是未能定义任何稳健的特异性组织靶向基序(Raupp等,2012,J.Virol.,86(17):9396-408)。此外,对结构的全局考虑仅强调了较好或较差的肝脏转导物之间的总体差异,这些差异在实践中更多是观察性的而不是有用的(Nam等,2007,

J.Virol.,81 (22):12260-71)。

[0070] 在AAV衣壳蛋白中肝脏切换的鉴定

[0071] 本公开内容描述了对合理设计的AAV衣壳文库的筛选,以鉴定导致双峰性小鼠肝脏嗜性(例如,“肝脏切换”)的单一位点的氨基酸改变。本公开内容还描述了AAV衣壳中的特定残基,a)如有需要,其改善在人体内的肝脏转导或使肝脏脱靶,从而使得有效剂量降低,和b)改善小鼠肝脏转导,同时最小地改变其他良好的特征,从而使得可以将这些血清型用于小鼠疾病模型中。

[0072] 如本文中所描述的,可以通过改变在Anc80 (SEQ ID NO:1) 中的位置266的一个残基改变AAV衣壳蛋白的肝脏特异性嗜性。例如,在此位置将非甘氨酸(G)氨基酸残基改变为甘氨酸(G)氨基酸残基导致AAV对肝脏的嗜性或靶向作用增强或增加;或者,在此位置将非丙氨酸(A)氨基酸残基改变为丙氨酸(A)氨基酸残基导致AAV对肝脏的嗜性或靶向作用降低(“脱靶”)。因此,可以通过将Anc80 (SEQ ID NO:1) 的AAV衣壳蛋白内位置266处的非G残基改变为G残基来增加AAV感染和/或转染肝脏的倾向,而可以通过将Anc80 (SEQ ID NO:1) 的AAV衣壳蛋白内位置266处的非A残基改变为A残基来降低AAV感染和/或转染肝脏的倾向。

[0073] 在一些实施方式中,取决于所需的肝脏特异性嗜性,可以将其他已知衣壳蛋白(例如,来自AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11)中与Anc80中位置266对应的氨基酸位置改变为G氨基酸残基或A氨基酸残基。在一些实施方式中,插入G氨基酸残基或A氨基酸残基可以根据需要改变肝脏特异性嗜性。在一些实施方式中,肝脏切换区中的其他改变、插入或缺失可以根据需要增强肝脏特异性嗜性。在一些实施方式中,可以使用异源衣壳或从头合成的序列替代包含切换残基的整个天然肝脏切换区,以实现所需的增强或降低的肝脏嗜性。

[0074] 在一些实施方式中,可以对衣壳蛋白进行基因工程改造或设计,以具有对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 中位置266的所需氨基酸残基,以使得,当与其他病毒组分组合或组装成AAV病毒颗粒时,AAV病毒颗粒在肝脏中富集或从肝脏脱靶(例如,与改变之前的衣壳序列,或在相关位置上没有G或没有A的相应衣壳序列,或在相关位置上具有A而非G或具有G而非A的相应衣壳序列相比)。

[0075] 如本文中所描述的,还可以通过改变Anc80 (SEQ ID NO:1) 中位置168处的一个残基改变AAV衣壳蛋白的肝脏嗜性。例如,在该位置将非精氨酸残基改变为精氨酸(R)氨基酸残基导致AAV的肝脏嗜性增强或增加;或者,在该位置将非赖氨酸氨基酸残基改变为赖氨酸(K)氨基酸残基导致AAV的肝脏嗜性降低(“脱靶”)。因此,可以通过将Anc80 (SEQ ID NO:1) 的AAV衣壳蛋白内位置168处的非R残基改变为R残基来增加AAV感染和/或转染肝脏的倾向,而可以通过将Anc80 (SEQ ID NO:1) 的AAV衣壳蛋白内位置168处的非K残基改变为K残基来降低AAV感染和/或转染肝脏的倾向。

[0076] 在一些实施方式中,取决于所需的肝脏特异性嗜性,可以将其他已知衣壳蛋白(例如,来自AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11)中与Anc80中位置168对应的氨基酸位置改变为R氨基酸残基或K氨基酸残基。

[0077] 应当理解的是,可以使用与本文所述的赋予嗜性的氨基酸具有相似性质(例如,极性、酸度/碱度、疏水性、电荷和/或尺寸)的氨基酸(例如,在相对于Anc80的位置266处替代G或A,或者在相对于Anc80的位置168处替代R或K)。

[0078] 如本文中所描述的,可以通过改变肝脏切换区(如图14中所定义的)内的其他残基

来改变AAV衣壳蛋白的肝脏特异性嗜性。在一些实施方式中,可以使用来自异源血清型的肝脏切换区替代天然存在的肝脏切换区,以具有所需肝脏嗜性(例如,以增强所得AAV载体的肝脏嗜性或降低所得AAV载体的肝脏嗜性)。在一些实施方式中,可以从头合成天然存在的肝脏切换区,以具有所需肝脏嗜性(例如,以增强所得AAV载体的肝脏嗜性或降低所得AAV载体的肝脏嗜性)。如本文中所描述的,当异源或从头衍生的肝脏切换区在AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的位置包含G氨基酸残基时,所得AAV载体的肝脏嗜性增强,并且当异源或从头衍生的肝脏切换区在AAV衣壳蛋白内对应于在Anc80 (SEQ ID NO:1) 的衣壳蛋白中的位置266的位置包含A氨基酸残基时,所得AAV载体的肝脏嗜性降低。

[0079] 基于本文报道的发现,显而易见的是,可以基于衣壳蛋白的序列,特别是编码对应于Anc80 (SEQ ID NO:1) 中位置266和/或168的氨基酸残基的核酸序列,筛选在肝细胞中富集或从肝细胞脱靶的那些AAV。核酸测序的方法是本领域众所周知的,并且包括但不限于链终止法(例如,Sanger测序法)或化学降解法(例如,Maxam-Gilbert测序法)。已经开发出很多变型和改进,并且在本领域中用于测序,包括自动测序方法和高通量测序方法。

[0080] 如在本文中所使用的,富集的(enriched)或富集(enrichment)指与当衣壳蛋白在Anc80 (SEQ ID NO:1) 中对应于位置266的氨基酸位置不具有G氨基酸残基,和/或对应于位置168不具有R氨基酸位置时(例如,原始或野生型序列,或者改变前的序列)的肝细胞中AAV基因组的数量相比,肝细胞中AAV基因组的数量增加。如在本文中所使用的,脱靶的(de-targeted)或脱靶(de-targeting)指与当衣壳蛋白在Anc80 (SEQ ID NO:1) 中对应于位置266的氨基酸位置不具有A氨基酸残基,和/或对应于位置168不具有K氨基酸位置时(例如,原始或野生型序列,或者改变前的序列)的肝细胞中AAV基因组的数量相比,肝细胞中AAV基因组的数量降低。

[0081] 筛选肝脏中AAV基因组数量的方法是本领域公知的,并且通常包括永生化和/或原代肝细胞的体外转导以及野生型和人源化小鼠的体内全身注射(参见,例如,Grimm等,2008,J.Virol.,82:5887-911;Lisowski等,2014,Nature,382:doi:10.1038/nature12875)。

[0082] 本文提供了赋予有效的(或增强的)肝脏嗜性或无效的(或降低的)肝脏嗜性的代表性衣壳蛋白。赋予有效的肝脏嗜性(例如,其导致肝细胞中AAV基因组富集)的代表性衣壳蛋白的序列如SEQ ID NO:2[AAV9 Anc80+266G]、SEQ ID NO:6[AAV9 Anc80+266G VRI]、SEQ ID NO:9[AAV3B A266G S267 N268T]、SEQ ID NO:11[AAV3B G265 A266G]、SEQ ID NO:13[AAV3B G265 A266G S268T]、SEQ ID NO:14[AAV3B AAV9+267G-VRI]、SEQ ID NO:15[AAV3B Anc80+266G-VRI]中所示,而赋予降低的肝脏嗜性(例如,其导致AAV颗粒对肝脏脱靶)的代表性衣壳蛋白的序列如SEQ ID NO:3[Anc80+266A]、SEQ ID NO:4[AAV9 G267A]、SEQ ID NO:5[AAV9 G267A S269T]、SEQ ID NO:7[AAV9 Anc80+266A-VRI]、SEQ ID NO:10[AAV3B G265 A266A]、SEQ ID NO:12[AAV3B G265 A266A S268T]、SEQ ID NO:16[AAV3B Anc80+266A-VRI]、SEQ ID NO:17[Anc80L65 R168K]中所示。

[0083] 如下文更详细解释的,表现出肝脏转导的双峰模式的两种AAV衣壳蛋白的序列SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3来源于具有SEQ ID NO:1中所示序列的Anc80支架序列,其中在图1中以X3表示的位置266是G或A。类似地,表现出肝脏转导的双峰模式的两种AAV衣壳蛋白的

序列SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17来源于具有SEQ ID NO:1中所示序列的Anc80支架序列,其中以X1表示的位置168是R或K。

[0084] 编码含有肝脏切换的AAV衣壳蛋白的核酸

[0085] 如本文中所描述的,在位置266的G氨基酸残基和A氨基酸残基之间在AAV衣壳蛋白中改变或插入氨基酸残基在富集和脱靶之间切换所得AAV的肝脏嗜性。类似地,在位置168的R氨基酸残基和K氨基酸残基之间在AAV衣壳蛋白中改变氨基酸残基在富集和脱靶之间切换所得AAV的肝脏嗜性。通常在核酸水平上对序列进行改变,并将所述改变翻译成编码的氨基酸序列(例如,编码的蛋白)。如在本文中所使用的,核酸可以包括DNA和RNA,包括含有一种或多种核苷酸类似物或骨架修饰的那些。核酸可以是单链的或双链的,这通常取决于其预期用途。

[0086] 可以使用各种方法将变化引入核酸,其中的很多是本领域众所周知的。例如,可以使用诱变(例如,定点诱变,PCR介导的诱变)或通过化学合成包含一个或多个所需改变的核酸分子将改变引入核酸。参见,例如,Sambrook,Fritsch&Maniatis (Molecular Cloning:a laboratory manual,1989,Ed.2) 和Dieffenbach&Dveksler (PCR primer:a laboratory manual,2003,Ed.2)。

[0087] 可以使用本领域的常规技术获得(例如,分离)核酸。例如,可以使用任何方法分离核酸,包括但不限于重组核酸技术和/或聚合酶链式反应(PCR)。例如,在PCR Primer:A Laboratory Manual,Dieffenbach&Dveksler,Eds.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995中描述了通用PCR技术。重组核酸技术包括例如限制性内切酶消化和连接,可以将其用于分离核酸。分离的核酸也可以化学合成,作为单一核酸分子或一系列寡核苷酸。

[0088] “分离的”核酸分子是不含天然地位于衍生出分离的核酸分子的生物体基因组中核酸的一个或两个末端侧翼序列的核酸分子(例如,通过PCR或限制性内切酶消化产生的cDNA或基因组DNA片段)。通常将这种分离的核酸分子引入载体(例如,克隆载体或表达载体)中,以便于操纵或产生融合核酸分子,这将在下面更详细地讨论。此外,分离的核酸分子可以包括工程化的核酸分子,如重组的或合成的核酸分子。

[0089] 可以通过公知的方法,如DEAE离子交换、凝胶过滤和羟磷灰石层析法,从天然来源(例如,生物样品)中获得(例如,纯化)多肽。例如,还可以通过在表达载体中表达核酸纯化多肽。此外,可以通过化学合成获得纯化的多肽。可以使用任何适当的方法(例如,柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC分析)来测量多肽的纯度。

[0090] 如在本文中所使用的,“纯化的”多肽是已经从天然伴随的细胞成分中分离或纯化的多肽。通常,当多肽以干重计为至少70%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或99%),不含蛋白和与其天然结合的天然存在的分子时,认为其是“纯化的”。由于化学合成的多肽本质上是与天然伴随的成分分离的,因而合成的多肽是“纯化的”。

[0091] 可以在载体内繁殖核酸。载体可以包括病毒载体或非病毒载体,也可以包括表达载体。很多载体是可商购的,并且可以使用本领域常规的重组DNA技术容易地生产载体。含有核酸的载体可以具有表达元件,在某些情况下,其可以可操作地连接至这种核酸。载体可以进一步包含诸如编码选择标记(例如,抗生素抗性基因)的那些的序列。含有核酸的载体可以编码嵌合或融合多肽(即,可操作地连接至异源多肽的多肽,其可以在该多肽的N末端或C末端)。代表性的异源多肽是可以用于纯化编码的多肽的那些(例如,6xHis标签,谷胱甘

肽S-转移酶 (GST))。

[0092] 表达元件是本领域公知的,并且包括引导和调控编码序列表达的核酸序列。表达元件的一个实例是启动子序列。表达元件还可以包括调节核酸表达的内含子、增强子序列、应答元件或诱导型元件。表达元件可以是病毒来源的,或者对于非病毒分子生物学技术(例如,质粒载体的简单生长),表达元件可以是但不限于细菌、酵母、昆虫或哺乳动物来源的,或者表达元件可以是来自不同来源的元件的组合。如在本文中所使用的,可操作地连接指以引导或调控核酸表达的方式将启动子或一种或多种其他表达元件相对于核酸定位在载体中。在某些情况下,可操作地连接意味着两条序列在框架内。

[0093] 将病毒载体引入宿主细胞的方法是本领域共知的,并且通常利用病毒的天然感染能力。将非病毒载体引入宿主细胞的方法是本领域公知的。如在本文中所使用的,“宿主细胞”指引入病毒或非病毒载体的特定细胞,并且还包括此类细胞的后代或潜在后代。宿主细胞可以适当地是原核细胞或真核细胞。例如,可以在细菌细胞(如大肠杆菌)中或在昆虫细胞中、酵母或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞)中表达核酸。其他适宜宿主细胞是本领域技术人员公知的。可以使用公知方法,在体内和体外,将非病毒核酸引入宿主细胞,诸如但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、聚乙二醇(PEG)转化、热休克、脂质转染、显微注射和病毒介导的核酸转移。

[0094] 使用含有肝脏切换的AAV衣壳蛋白的方法

[0095] AAV病毒可以包含用于向细胞递送的转基因(与其他病毒序列是顺式或反式的)。例如,转基因可以是报告基因(例如, β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸腺嘧啶激酶、绿色荧光多肽(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、或荧光素酶,或者包含抗原标签结构域(如血凝素或Myc)的融合多肽)或者治疗性基因(例如,编码激素或其受体、生长因子或其受体、分化因子或其受体、免疫系统调节剂(例如,细胞因子和白介素)或其受体、酶、RNA(例如,抑制性RNA或催化RNA)、或靶抗原(例如,癌抗原、自身免疫抗原)的基因)。

[0096] 特定治疗性基因将至少部分取决于所治疗的特定疾病或缺陷。仅举例来说,可以将基因转移或基因疗法应用于治疗血友病、色素性视网膜炎、囊性纤维化、莱伯先天性黑蒙症、溶酶体贮积症、先天性代谢错误(例如,先天性氨基酸代谢错误,包括苯丙酮尿症、先天性有机酸代谢错误,包括丙酸血症、先天性脂肪酸代谢错误,包括中链酰基CoA脱氢酶缺乏症(MCAD))、癌症、色盲、锥体杆体营养不良、黄斑变性(例如,年龄相关性黄斑变性)、脂多肽脂肪酶缺乏症、家族性高胆固醇血症、脊髓性肌萎缩、杜兴氏肌营养不良、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肥胖、炎性肠病、糖尿病、充血性心力衰竭、高胆固醇血症、听力丧失、冠心病、家族性肾脏淀粉样变性、马凡氏综合征、致死性家族性失眠、克雅氏病、镰状细胞病、亨廷顿氏病、额颞叶变性、亚瑟综合征、乳糖不耐受、脂质贮积症(例如,尼曼-皮克病,C型)、巴滕病、脉络膜炎、II型糖原贮积症(庞贝病)、共济失调毛细血管扩张症(路易斯-巴综合征)、先天性甲状腺功能减退症、重度联合免疫缺陷(SCID)和/或肌萎缩性侧索硬化(ALS)。同样以举例的方式,可以将基因转移或基因疗法应用于治疗视网膜营养不良(例如,(LUXTRNA™)(voretigene neparvovec-rzyl),这是一种一次性基因治疗产品,适用于治疗确诊为双等位基因RPE65突变相关的视网膜营养不良的患者(Spark Therapeutics Inc., Philadelphia,PA))。

[0097] 例如,治疗性基因还可以是用于免疫对象(例如,人、动物(例如,伴侣动物、农场动

物、濒危动物))的免疫原。例如,免疫原可以从生物体(例如,病原生物体)或者其免疫原性部分或组分(例如,毒素多肽或其副产物)获得。举例来说,可以从其获得免疫原性多肽的病原生物体包括病毒(例如,小核糖核酸病毒、肠病毒、正粘病毒、呼肠孤病毒、逆转录病毒)、原核生物(例如,肺炎球菌、葡萄糖球菌、李斯特菌、假单胞菌)和真核生物(例如,阿米巴病、疟疾、利什曼病、线虫)。应当理解的是,本文所述的方法和通过此类方法生产的组合物不限于任何特定转基因。

[0098] 可以使用标准技术向对象(例如,人或非人哺乳动物)施用通常混悬在生理学上相容的载体中的AAV病毒。适宜载体包括盐水,其可以与多种缓冲溶液一起配制(例如,磷酸盐缓冲盐水)、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶和水。施用足够数量的AAV病毒,以转导或感染相关细胞,并提供足够水平的基因转移和表达,以提供治疗获益,而不产生不当的副作用。常规和药学上可接受的施用途径包括但不限于直接递送至器官(比如,例如,肝脏或肺脏)、口服、鼻内、气管内、吸入、静脉内、肌内、眼内、皮下、皮内、经粘膜或者通过其他途径施用。如有需要,可以将施用途径联用。

[0099] 向对象施用的AAV病毒的剂量将主要取决于诸如所治疗的病况,以及对象的年龄、体重和健康状况等因素。例如,向人类对象施用的AAV病毒的治疗有效剂量通常在约0.1ml至约10ml溶液的范围内,所述溶液含有约 1×10^1 至 1×10^{12} 的病毒基因组拷贝(GC)(例如,约 1×10^3 至 1×10^9 GC)。转基因的转导和/或表达可以通过DNA、RNA或蛋白测定在施用后多个时间点进行监测。在一些情况下,可以监测转基因的表达水平以确定剂量的频率和/或量。还可以将类似于用于治疗目的描述的那些剂量方案用于免疫。

[0100] 根据本发明,可以采用本领域的技术范围内的常规分子生物学,微生物学,生物化学和重组DNA技术。这些技术在文献中充分解释。本发明将在以下实施例中进一步描述,所述实施例不限制权利要求书中描述的方法和组合物的范围。

[0101] 实施例

[0102] 实施例1—鉴定AAV肝脏切换的材料和方法

[0103] 通过改变Anc80支架序列(SEQ ID NO:1;图1)中的11个位置(图1中的X₁至X₁₁)产生AAV序列的2¹¹(2048)-变体Anc80文库(参见,例如,美国专利号9,695,220)。将每种变体克隆到哺乳动物表达质粒中,并与pRep和pAd Helper辅助质粒一起转染到HEK293细胞中,以产生病毒载体形式的文库。然后,将该文库用于肝脏定位(例如,富集vs.脱靶)的体内筛选。简言之,在一项实验中,用Anc80载体文库向三只小鼠注射2.7311总gc(~1e13gc/kg)。注射后第3天,处死小鼠,收集干燥并冷冻。在另一项实验中,向两只恒河猴注射1.6e12 gc/kg的Anc80载体文库,在注射后第28天终止研究并收集肝脏。从肝脏提取总基因组DNA,并通过新一代测序对组织中存在的病毒变体群进行定量。如下所述,将在图1中所示的Anc80支架序列中突出显示的位置X₃确定为肝脏切换位置。位置X₃对应于Anc80支架序列中的残基266。

[0104] 体内筛选实验的结果如图9和图10中所示。显示了示出肝脏中2048-变体Anc80文库成员(y轴)相对于病毒输入(x轴)丰度的图。在y轴上,零表示输入没有变化,正值和负值分别表示相对富集或脱靶。在11个切换位置中,观察到位置X₃与肝脏双峰性相关。

[0105] 次要但是仍与肝脏富集或脱靶相关的是在位置X₁的氨基酸残基的标识,该位置对应于在Anc80支架序列中的残基168。一种称为切换“热图”的方法能够允许以可视化形式考虑每个切换位置的标识,并通过按所需特征选择变体组,热图能够揭示影响(如果存在的

话)的多个切换位置。使用来自图9和图10的相同数据,野生型C57BL/6小鼠(图25)和恒河猴(图26)具有在大部分肝脏富集Anc80变体中存在的X3=1(G)和X1=1(R)。支持位置X1的相关性,在从FRG人肝脏异种移植小鼠模型,以及在模拟体内肝脏结构的条件下(微模式共培养,MPCC)培养的原代人肝细胞中收集的小鼠和人肝细胞中均观察到了类似模式。

[0106] 实施例2-AAV肝脏切换的产生和检测

[0107] 从2048-变体Anc80-文库(参见,例如,美国专利号9,719,070,其全部内容通过引用并入本文)产生包含肝脏切换的特定序列(图2)。Anc80L65(SEQ ID NO:2)在位置266处含有G并且显示了肝脏富集,以及Anc80L65 G266A(SEQ ID NO:3)在位置266处含有A并且显示了肝脏脱靶。在图3中突出显示并用颜色编码的G/A肝脏切换与图2中所示的颜色编码一致。

[0108] 每个单独的变体都可以通过定点诱变或等温(Gibson)克隆结合PCR产生和基因合成片段来获得。将这些变体克隆到标准rep/cap“反式”质粒中,以生产载体。然后,在Grousbeck基因治疗中心的Gene Transfer Vector Core生产表达GFP和 α -1-antitrypsin的载体变体。

[0109] 每种变体三只8周龄雄性小鼠和亲本对照注射 1×10^{11} 总基因组拷贝($\sim 5 \times 10^{12}$ gc/kg),并在第3天收集肝脏组织。通过qPCR确定肝脏中的基因组拷贝数,并以绝对值以及与亲本对照的比率表示。图11显示了在位置266含有G的Anc80L65(SEQ ID NO:2)显示出肝脏富集,以及在位置266处含有A的Anc80L65 G266A(SEQ ID NO:3)显示出肝脏脱靶。此外,图12显示,通过肝脏组织的eGFP染色观察到,与在位置266处含有A的Anc80L65 G266A(SEQ ID NO:3)相比,当利用在位置266处含有G的Anc80L65(SEQ ID NO:2)时,来自基因组的表达更加明显。

[0110] 实施例3-在其他血清型中鉴定可比的肝脏切换残基

[0111] 图13A显示了AAV2 VP3衣壳单体的晶体结构。肝脏切换(“LT”)的位置由箭头指示,并且围绕LT的区域的区域用方框表示。肝脏切换残基可以定位于处于与Anc80的位置266相当的位置的N末端至 α -切换的2-3个残基。图13B是代表晶体结构的示意图,其示出了来自AAV 2、3、6、8和9VP3的LT区域的覆盖,突出显示了定义切换位置的局部二级结构。切换区域定义为位于二级结构 β -升序(β_a)和 β -降序(β_d)之间并包括其的残基,其具有编码N末端至 α -切换(α_t)的2至3个残基的主要官能团。LT残基位于VR1,以 β 片层为边界的环,N末端至3残基 α 螺旋内。

[0112] 图14是来自包含具有在第15行定位的Anc80L65的肝脏切换的原型和临床相关血清型的主要VRI氨基酸序列的比对。突出显示了 β -升序(β_a)、 β -降序(β_d)、 α -切换(α_t)、切换区和切换位置本身的定位。 β -升序(β_a)在保守的酪氨酸处起始, β -降序(β_d)在保守的丝氨酸处终止。对于很多血清型,可以通过紧密鉴定容易地推断出与Anc80 266相当的位置。在其他病毒中,尤其是进化支B病毒AAV2和AAV3,以及相关病毒AAV4和Rh32.33,可比的位置更加模糊或不那么明显。尽管如此,可以将主要序列作为鉴定其他血清型中肝脏切换的指导。如图5中所示,切换表示在Anc80L65中的残基266,在AAV9中的267和在AAV5中的257,强调了在定义切换时位置编号是相对的。

[0113] 实施例4-在其他血清型中AAV肝脏切换的产生和检测

[0114] 类似地,图15是肝脏切换区的序列比对,定位于Anc80L65、AAV3B和AAV9血清型C末端的 α -切换(NDN),以及构建用于检测肝脏切换假设的变体。Anc80L65、AAV3B和AAV9,以及

其他变体已在小鼠 (M) 或灵长类动物 (P) 肝脏中进行了体内测试,而这些血清型的小鼠肝脏转导效率在最后两列中用“开启”或“关闭”表示。完整实验的表型以粗体表示;仍在进行的实验的表型以斜体表示。

[0115] 除了本文鉴定的单残基肝脏切换以外,肝脏切换区在整体上既可以将切换功能导入异源血清型,也可以保留肝脏切换来源血清型的其他所需特征。图16描述了一种方法,该方法通过利用位于这些残基侧翼的保守结构域来快速且容易地检测肝脏切换区的可携带性。该~100-110bp区的扩增或从头合成允许同源定向组装为异源血清型。

[0116] 图17列出了作为该研究的一部分组装的肝脏切换区交换,并且如图16中所示。最后两列要么以粗体显示本研究确定的小鼠和灵长类的体内肝脏切换功能,要么以斜体显示预测的肝脏切换功能。

[0117] Huh7肝癌细胞的体外转导在体外可用于检测所有肝脏切换变体的活力,以及提示在体内这些变体的肝脏切换“开启”或“关闭”表型。当针对滴度进行归一化时,大多数工程化的变体令人吃惊地表现出一些(即使不是稳健的)活力,如通过载体递送的荧光素酶表达所确定的,如图18和图19中所示。此外,观察到的荧光素酶活性的量与预测的肝脏切换表型相匹配,因为在与Anc80相当的位置上带有肝脏-开启“G”的那些变体与其肝脏-关闭“A”的对应物(sibling)相比具有更高的RLU值。

[0118] 重要的是,在Anc80 266的相当位置(即在AAV9中的位置267),在体内证明了切换。如图20和图21中所示,在AAV9中将G267改变为A降低活体荧光素酶信号、每个细胞的基因组拷贝数以及在肝脏中递送的标记物表达的数量级。此外,通过双突变体AAV9 G267A S269T与切换单突变体AAV9 G267A相比的优越性能,证实了改变其他切换区残基的必要性。双突变不仅显示出肝脏“关闭”表型,而且结果表明了向心脏和骨骼肌基因递送的获益。

[0119] 采用NHP、在FRG小鼠中的人肝脏异种移植模型以及体外人肝脏模型进行进一步研究,鉴定了影响AAV肝脏基因递送的第二个位点,在本文中称为“肝脏切换2”。该切换由Anc80支架中的残基X1编码,其对应于Anc80L65中的位置168。

[0120] 图22通过活体荧光素酶表达证明了通过将A266改变为G并在C末端插入两个T残基(SEQ ID NO:9),或者在A266之前插入G,并将位置268的残基由S改变为T或者不改变(SEQ ID NO:11),可以将推定的肝脏切换“关闭”病毒AAV3B变为肝脏“开启”。通过后两个变体(SEQ ID NO:10)匹配的A“关闭”插入观察到肝脏“关闭”的期望。此外,从AAV9(SEQ ID NO:14)和Anc80L65(SEQ ID NO:15)将天然AAV3B肝脏切换“关闭”区转换为肝脏切换“开启”区也可以改善小鼠肝脏转导。与其开启对应物Anc80L65(SEQ ID NO:16)相比,转换为在肝脏中切换“关闭”Anc80L65 G266A降低体内荧光素酶表达。

[0121] 图24鉴定了在临床相关血清型和AncAAV中X1的位置和局部环境。其位于靠近VP2的N末端带正电的基序中,可以通过除AAV5以外的所有AAV中的序列比对容易地识别,其VP2 N末端短17-20个残基。然而,所有血清型都可以通过其与保守侧翼残基的关系来定义肝脏切换2:N末端有两个脯氨酸残基和C末端有一个赖氨酸残基。

[0122] 图25和图26说明了肝脏切换2与肝脏富集的相关性。在图25中,实验询问了在野生型C57BL/6小鼠和人肝脏异种移植小鼠模型FRG的小鼠肝细胞组分两者中Anc80变体的富集。在图26中,实验询问了在恒河猴肝脏,来自FRG实验的倒数人肝细胞以及使用称为微模式共培养(MPCC)技术体外培养的人肝细胞中Anc80变体的富集。在每种情况下,当肝脏富集

变体选自伴随的MA图时,肝脏切换X3的相关性是明显的。此外,位置X1的相关性是明显的,随着富集由下至上等级升高,变体从切换0=K转换为切换1=R。这种模式表明,位置X1处的肝脏切换2与位置X3处的肝脏切换无关,但在X3处的切换时主要位置。

[0123] 自从发现AAV3B依靠人类肝细胞生长因子受体 (HuHGFR) 有效进入肝细胞以来,其已作为一种具有临床意义的血清型而受到欢迎 (Ling等,2010,Hum.Gen.Ther,21 (12):1741-1747)。在此发现之前,由于其在小鼠体内的肝脏递送性能较差,这种血清型已被基因治疗学家排除。尽管如此,大多数临床前疾病模型均在小鼠中,并且这些小鼠模型在例如确定基因疗法治疗的有效性、安全性和剂量确定中起着至关重要的作用。对AAV3B进行工程改造,使其在保持其理想的治疗特征的同时,将其在小鼠中的肝脏递送性能提高到与灵长类相当的水平,这对产业化将是极有价值的。与Anc80相比,AAV3B具有缩短的VRI和肝脏切换区,因而难以确定与Anc80的位置266具有可比性的残基 (参见图14和图15)。

[0124] 将位置266处的A改变为G并不能改善向Huh7细胞的基因递送;事实上,这种改变可能会产生AAV3B的功能缺失表型。为了加强在工程化所需特征中考虑整个肝脏切换区的必要性,或者在AAV3B中与Anc80相当的位置插入T,同时将A266改为G,或者将在Anc80中的相当位置插入A或G,形成在Huh7细胞和在体内均表现出肝脏“开启”和“关闭”表型的变体 (图19和图22)。此外,AAV3B似乎可以很好地耐受肝脏切换区的互换,并且从AAV9和Anc80L65导入肝脏“开启”肝脏切换区时,与单独的AAV3B相比,可以改善这些变体的Huh7和体内小鼠肝细胞基因递送。导入肝脏“关闭”Anc80L65 G266A肝脏切换区将这种能力降至接近背景水平 (图19和图22)。重要的是,在G265和A266之间单一插入G产生了基于3B的血清型,其在小鼠中的性能与AAV9一样好,如通过在肝脏中的荧光素酶信号所确定的 (图22)。

[0125] 其他实施方式

[0126] 应理解虽然本文中已经结合多个不同方面描述了方法和物质组合物,但是前述多个方面的描述旨在说明而不是限制方法和物质组合物的范围。其他方面,优点和修改均落入所附权利要求书的范围之内。

[0127] 本文公开的是方法和组合物,它们可用于公开的方法和组合物的产物,可结合公开的方法和组合物的产物使用,可用于制备公开的方法和组合物的产物或者是公开的方法和组合物的产物。在本文中公开了这些和其他物质,并且应当理解公开了这些方法和组合物的组合,亚组,相互作用,组等。即,虽然可能没有明确地公开具体提到这些组合物和方法的每个不同个体和集体组合以及替换,但每一个是本文中特别考虑并且描述的。例如,如果公开并讨论了特定的物质组合物或特定方法并且讨论了多种组合物和方法,那么除非有明确相反的指示,明确涵盖组合物和方法的每一个组合以及替换。同样,也明确涵盖和公开了这些的任何亚组或组合。

SEQ ID NO:1 Anc80

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADAAALE
HDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSSGIGKKGQQPAX₁KRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMX₂AGGGAPMADNNEGADGVG
NASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWTALPTYNNHLYKQISSQSX₃STNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRD
WQRLINNNGWFRPKX₄LNFKLFNIQVKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFM
IPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCYEFP SQMLRTGN₅NFX₅FSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQ
TTSGTAGNRX₆LQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTX₇NQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDLSLVNPGP
AMATHKDEDEKFFPMSGVLIFGKQAGAGNSNVDLDNVMITX₈EEEEIKTTNPVATEX₉YGTVATNLQX₁₀NTAPATGT
VNSQGALPGMVWQX₁₁RDVYLQGPiWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPPQILIKNTPVANPPTTTFSPAKFASF
ITQYSTGQVSVEIEWELQKENS₁₂KRWNP₁₃EIQYTSN₁₄YNKSTNVDFAVDTNGVSEPRPIGTRYLTRNL

X₁ = K/R	X ₅ = E/Q	X ₉ = Q/E
X ₂ = A/S	X ₆ = T/E	X ₁₀ = S/A
X₃ = A/G	X ₇ = A/T	X ₁₁ = N/D
X ₄ = R/K	X ₈ = S/N	

图1

SEQ ID NO:2 Anc80L65_VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALE
HDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
ASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDW
QRLINNNWGFPRPKLNFKLFIQVKEVTTNDGTTTIANNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIP
QYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQT
SGTAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTTNQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAM
ATHKDDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITNEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQSANTAPATGTVNSQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNynKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图2A

SEQ ID NO:3 Anc80L65_G266A_VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALE
HDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
ASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDWQ
RLINNNWGFPRPKLNFKLFIQVKEVTTNDGTTTIANNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTS
TAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTTNQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMAT
HKDDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITNEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQSANTAPATGTVNSQGAL
PGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQV
SVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNynKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图2B

SEQ ID NO:4 AAV9_G267A

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSS
GNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGSASSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDWQ
RLINNNWGFPRPKRLNFKLFIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQ
YGYLTNDGSGQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGS
GQNQQTLKFSVAGPSNMVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMAS
HKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAQAQTGWVQNGI
LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNynKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图3A

SEQ ID NO:5 AAV9_G267A, S269T

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNGLDKGEPVNAADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSS
GNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISN**STSGAST**NDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQ
RLNNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQ
GYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSG
GQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMAS
HKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGI
LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图3B

SEQ ID NO:6 AAV9 Anc80L65-VRI

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNGLDKGEPVNAADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSS
GNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHLYKQIS**SSQSGGST**NDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQR
LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSG
QNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASH
KEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGI
LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图4A

SEQ ID NO:7 AAV9 Anc80L65 G266A-VRI

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNGLDKGEPVNAADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSS
GNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPTYNNHLYKQIS**SSQSGAST**NDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQR
LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSG
QNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASH
KEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGI
LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图4B

SEQ ID NO:8 AAV3B_A266G

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSNNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ
RLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQ
YGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQGTT
SGTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAMAS
HKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALP
GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQV
SVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图5A

SEQ ID NO:9 AAV3B_A266G, S267_N268T

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSNNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ
QRLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTSGTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYST
GQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图5B

SEQ ID NO:10 AAV3B G265_A266A

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ
QRLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTSGTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYST
GQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图6A

SEQ ID NO:11 AAV3B G265_A266G

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDW
QRLINNNWGRFPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTS GTTNQSRLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYST
GQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图6B

SEQ ID NO:12 AAV3B G265_A266A S268T

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGAATNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDW
QRLINNNWGRFPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTS GTTNQSRLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYST
GQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图7A

SEQ ID NO:13 AAV3B G265_A266G S268T

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGATNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDW
QRLINNNWGRFPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTS GTTNQSRLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYST
GQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图7B

SEQ ID NO:14 AAV3B AAV9-VRI

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAFAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQIS**NSTSGGSS**NDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDP
WQRLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFM
VPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRT
QGTSTGTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNPGP
AMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVND
QGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQY
STGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYNKSvNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图8A

SEQ ID NO:15 AAV3B Anc80L65-VRI

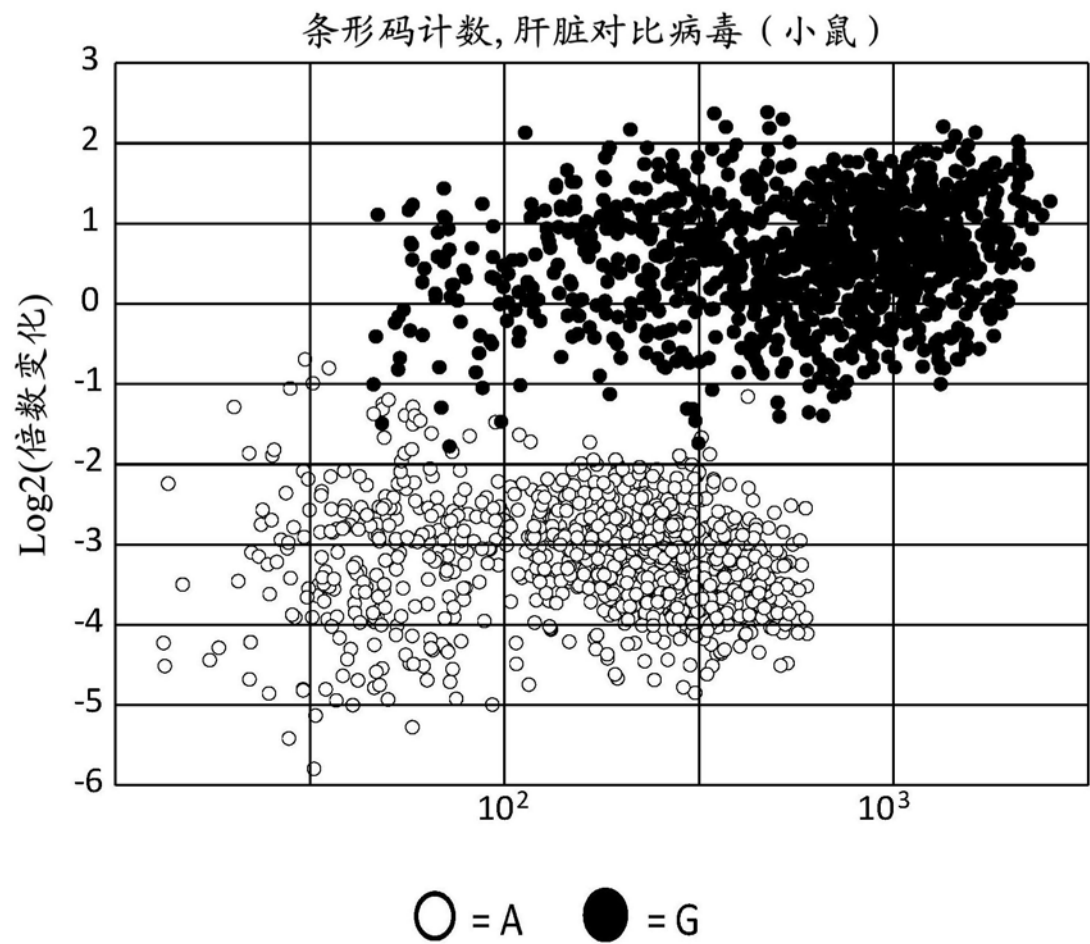
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAFAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQIS**SQSGGST**NDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDP
QRLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTSSTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNPGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYST
GQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYNKSvNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图8B

SEQ ID NO:16 AAV3B Anc80L65 G266A-VRI

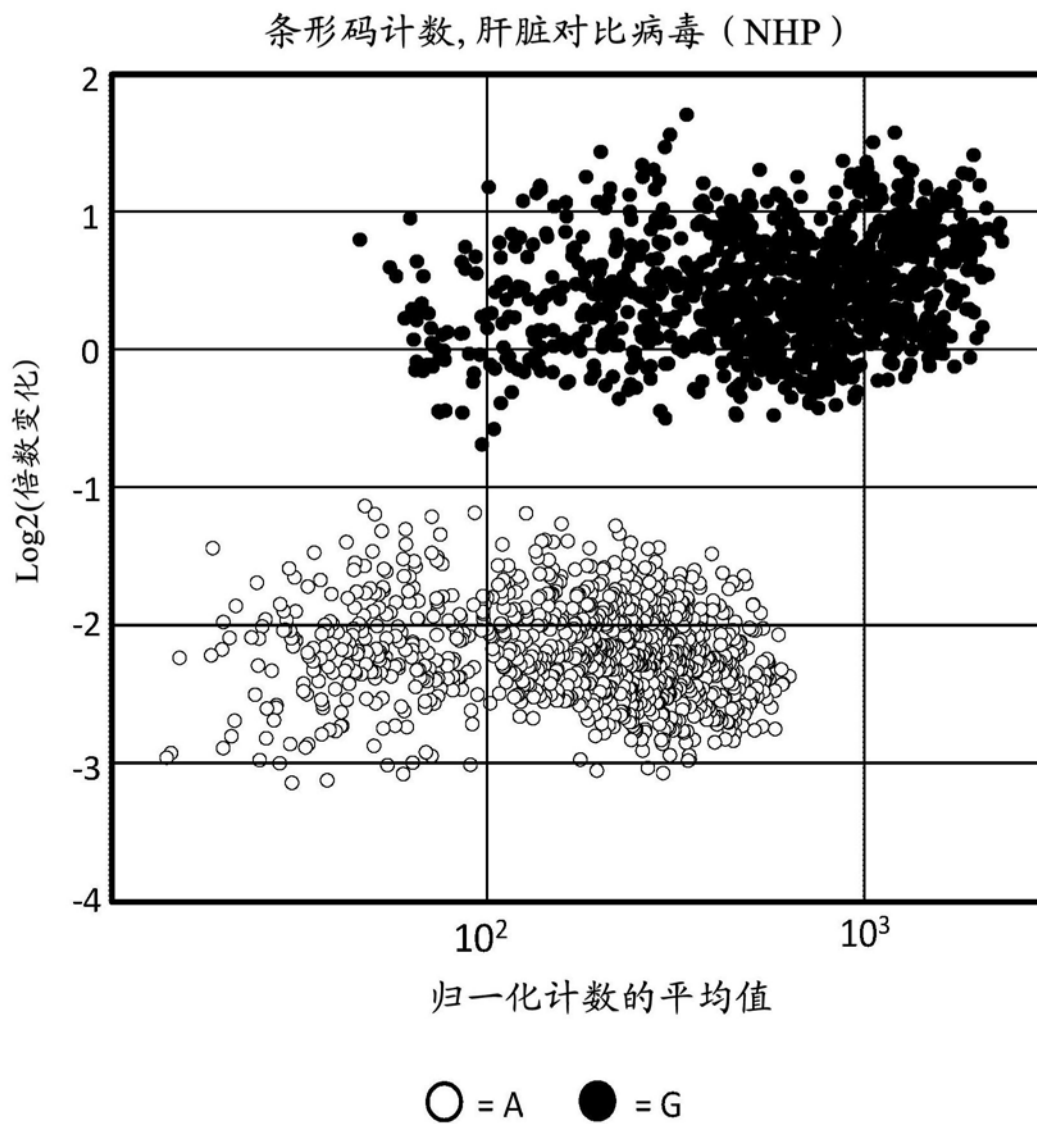
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAAL
EHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAFAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQS
PQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPTYNNHLYKQIS**SQSGAST**NDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDP
QRLINNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQG
TTSSTTNQSRLLFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNPGPAM
ASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGS
LPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYNKSvNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图8C



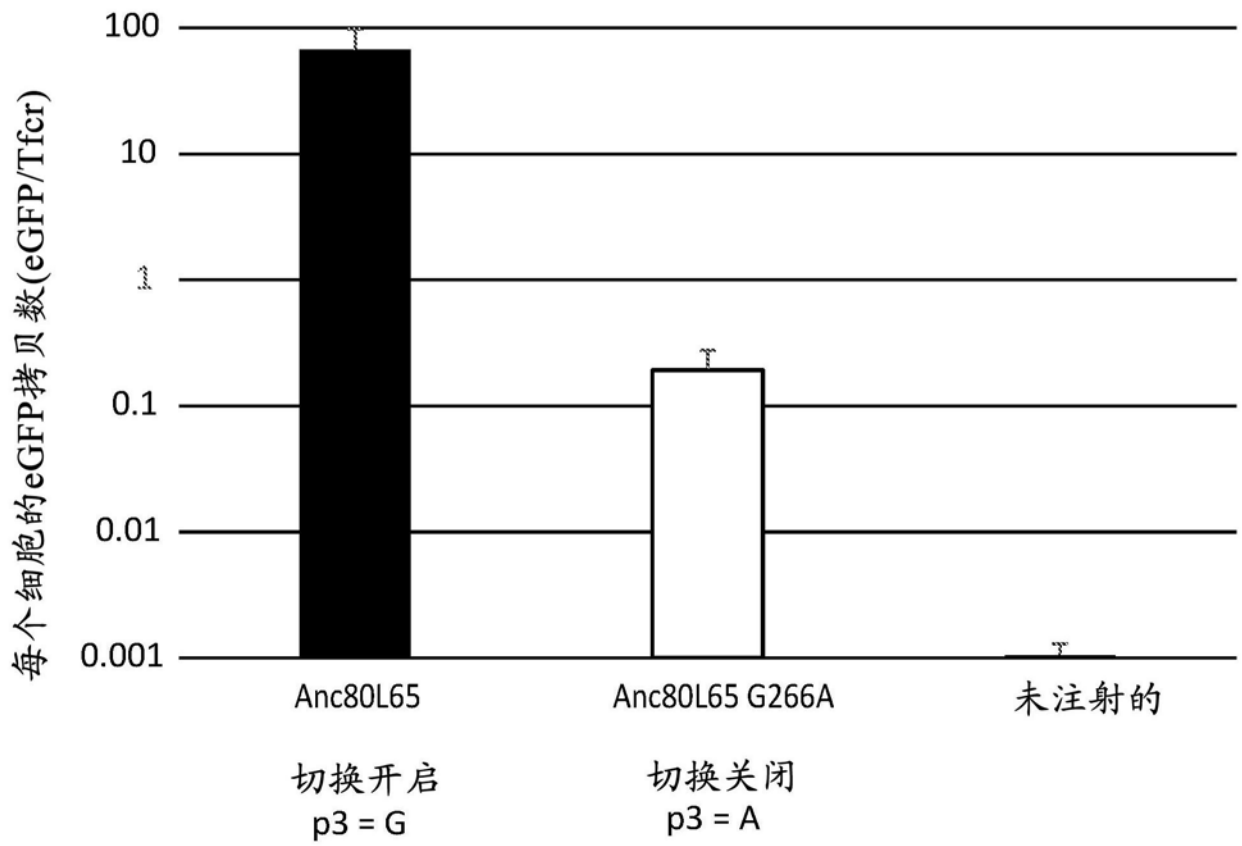
代码	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
0	K	A	A	K	Q	T	T	N	Q	A	N
1	R	S	G	R	E	E	A	S	E	S	D

图9



代码	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
0	K	A	A	K	Q	T	T	N	Q	A	N
1	R	S	G	R	E	E	A	S	E	S	D

图10



代码	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
0	K	A	A	K	Q	T	T	N	Q	A	N
1	R	S	G	R	E	E	A	S	E	S	D
Anc80L65	R	A	G	K	Q	T	T	N	E	A	D
Anc80L65 G266A	R	A	A	K	Q	T	T	N	E	A	D

图11

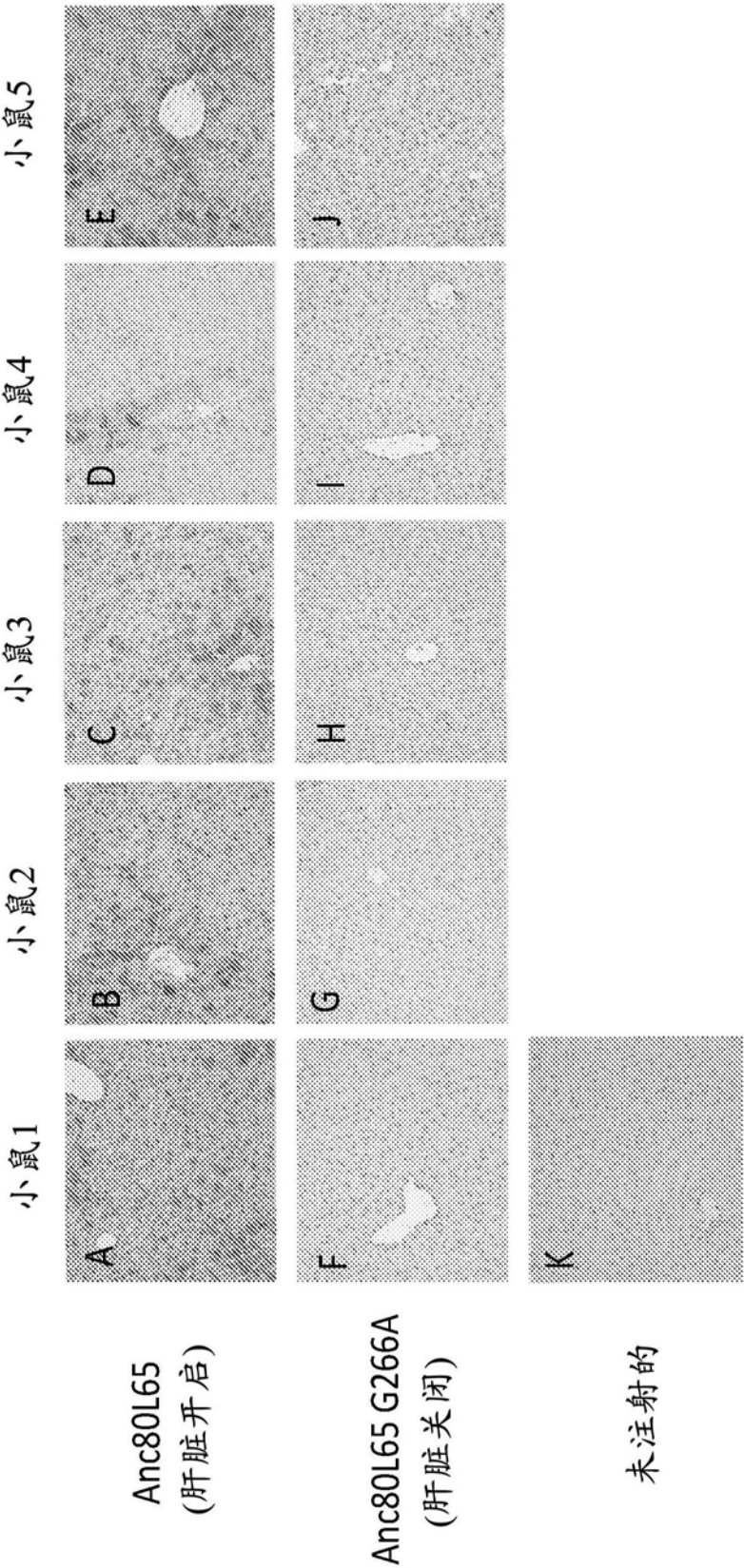


图12A-12K

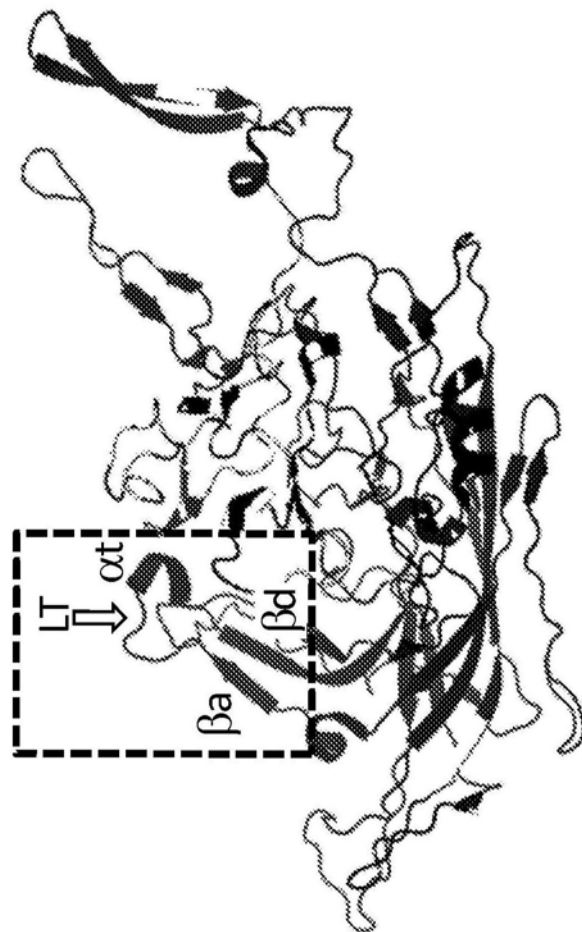


图13A

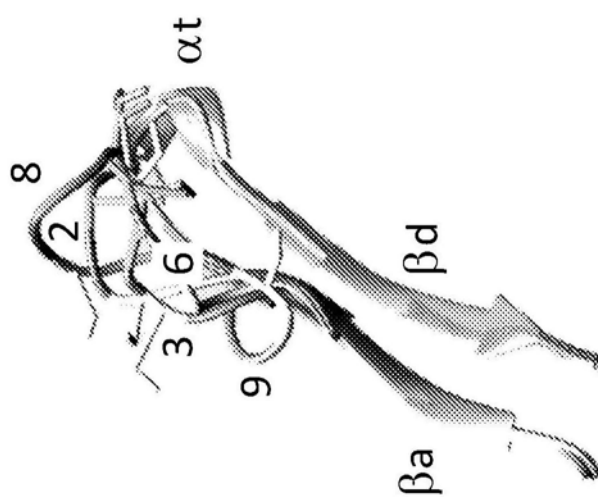


图13B

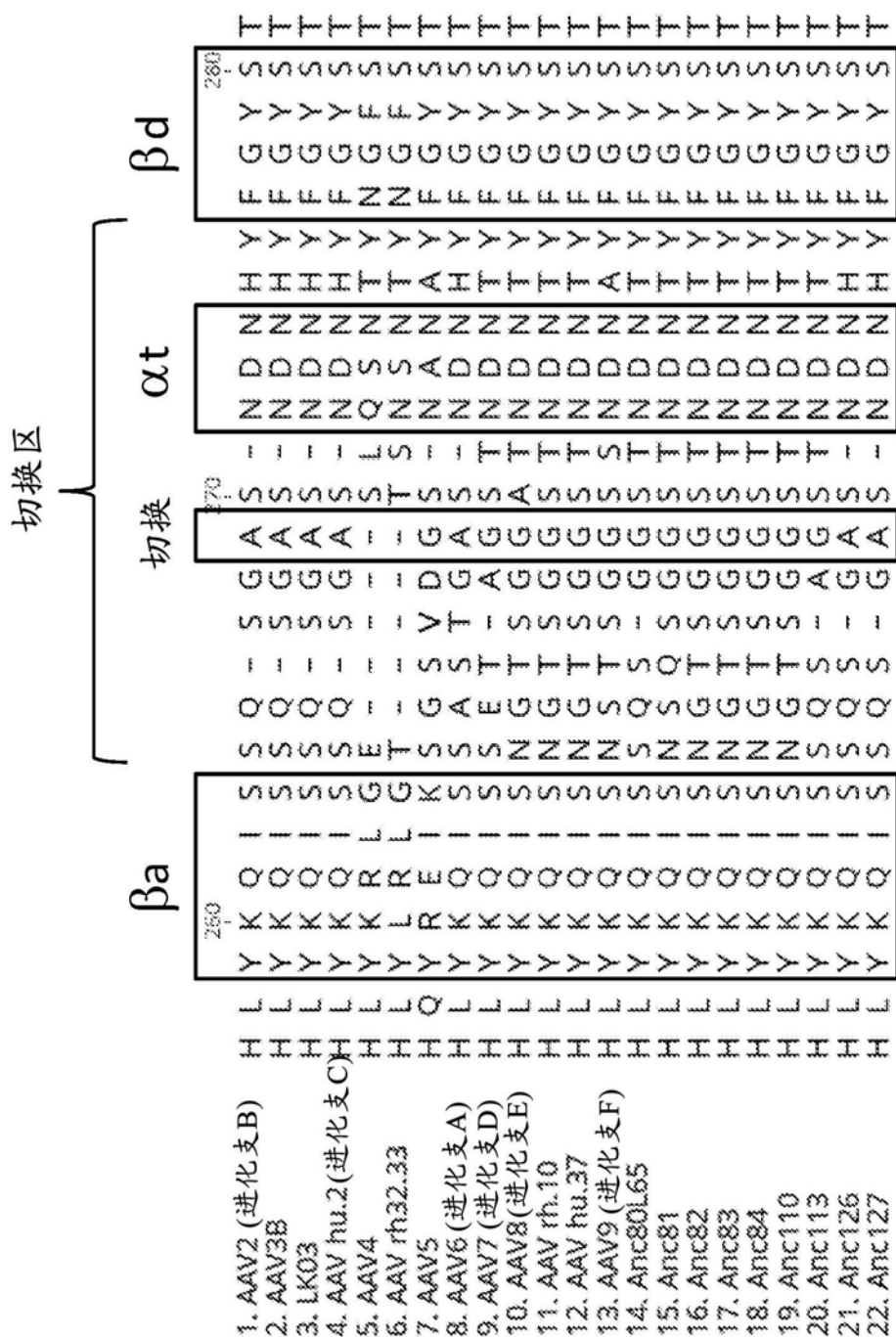


图14

血清型	切换区	Alterations	M	P
Anc80L65	-SQSGGST NDN		开启	关闭
	-SQSGAST NDN	G266A	关闭	关闭
AAV3B	-SQS-GAS- NDN		关闭	开启
	-SQSG-AS NDN	Alt.插入缺失标记比对		
	-SQS-GGS- NDN	A266G	开启	开启
	-SQSGAST NDN	S267_N268T		
	-SQSGGST NDN	A266G, S267_N268T	开启	开启
	-S-QS-GAT NDN	S268T		
	-SQSGAAS NDN	G265_A266A	关闭	关闭
	-SQSGGAS NDN	G265_A266G	开启	开启
	-SQSGAAT NDN	G265_A266A, S268T	关闭	关闭
	-SQSGGAT NDN	G265_A266G, S268T	开启	开启
AAV9	NSTSGGSS NDN		开启	开启
	NSTSGASS NDN	G267A	关闭	关闭
	NSTSGGST NDN	S269T		
	NSTSGAST NDN	G267A, S269T	关闭	关闭

图15

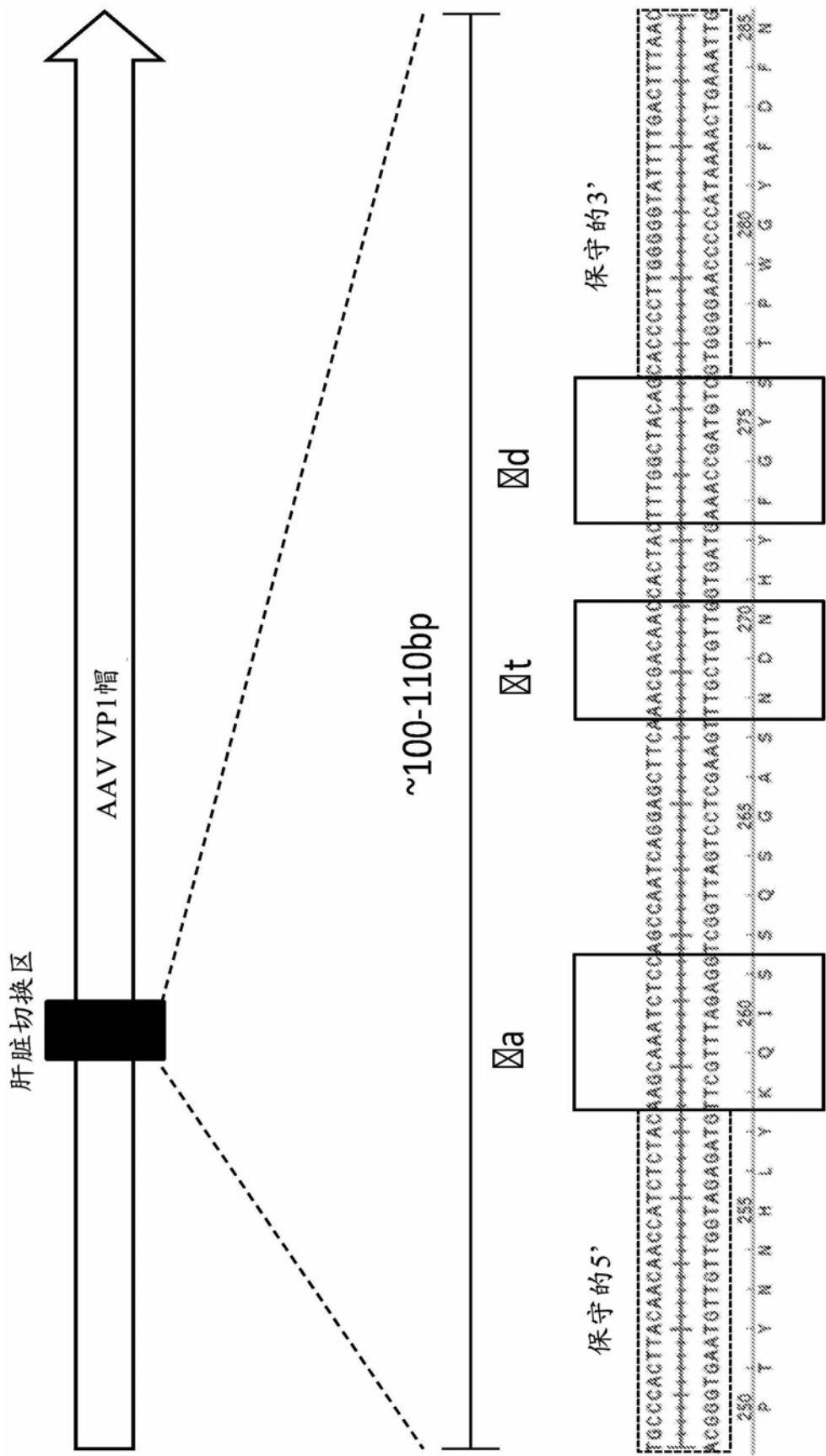


图16

血清型	切换区来源	切换区序列	M	P
AAV9	Anc80L65	-SQSGGST NDN	开启	开启
	Anc80 L65 G266A	-SQSGAST NDN	关闭	关闭
	AAV3B	-SQS-GAS- NDN	关闭	开启
AAV3B	Anc80L65	-SQSGGST NDN	开启	开启
	Anc80 L65 G266A	-SQSGAST NDN	关闭	关闭
	AAV9	NSTSGGSS NDN	开启	开启
Anc80L65	AAV9	NSTSGGSS NDN	开启	开启
	AAV3B	-SQS-GAS- NDN	关闭	关闭

图17

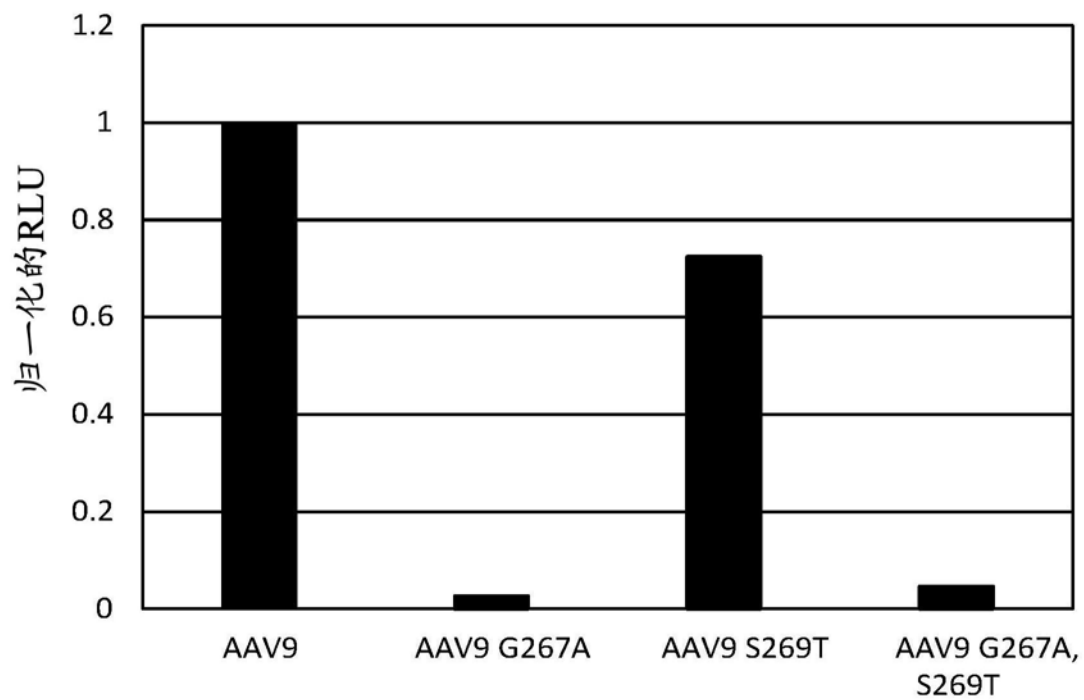


图18A

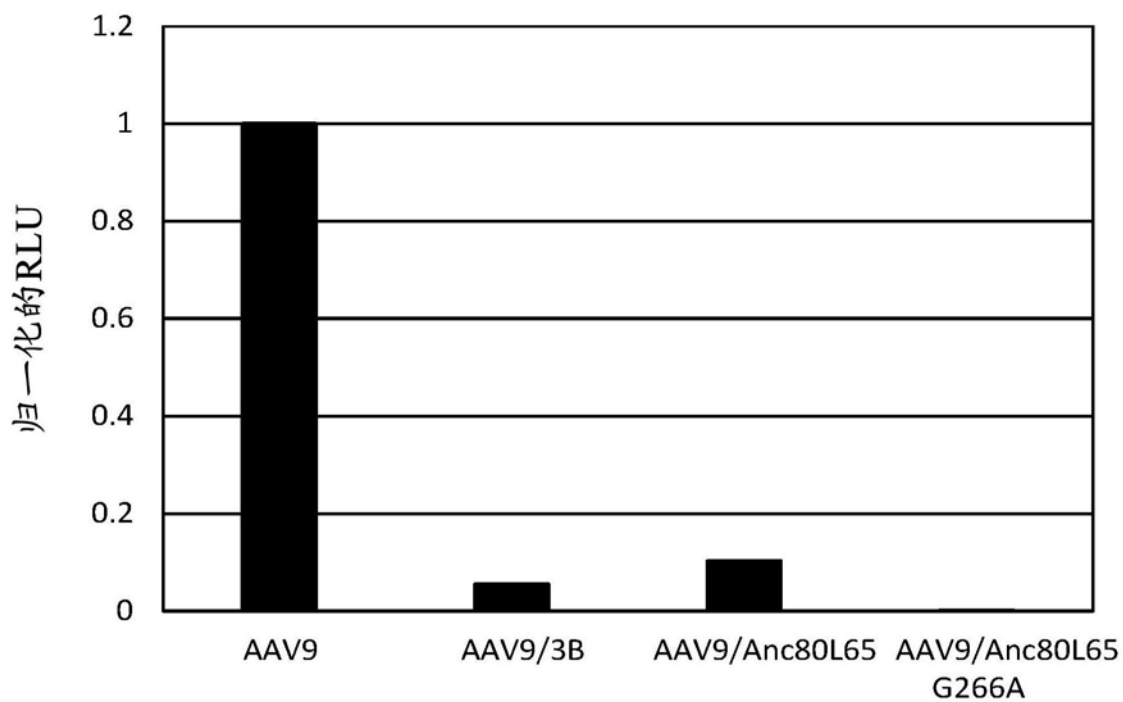


图18B

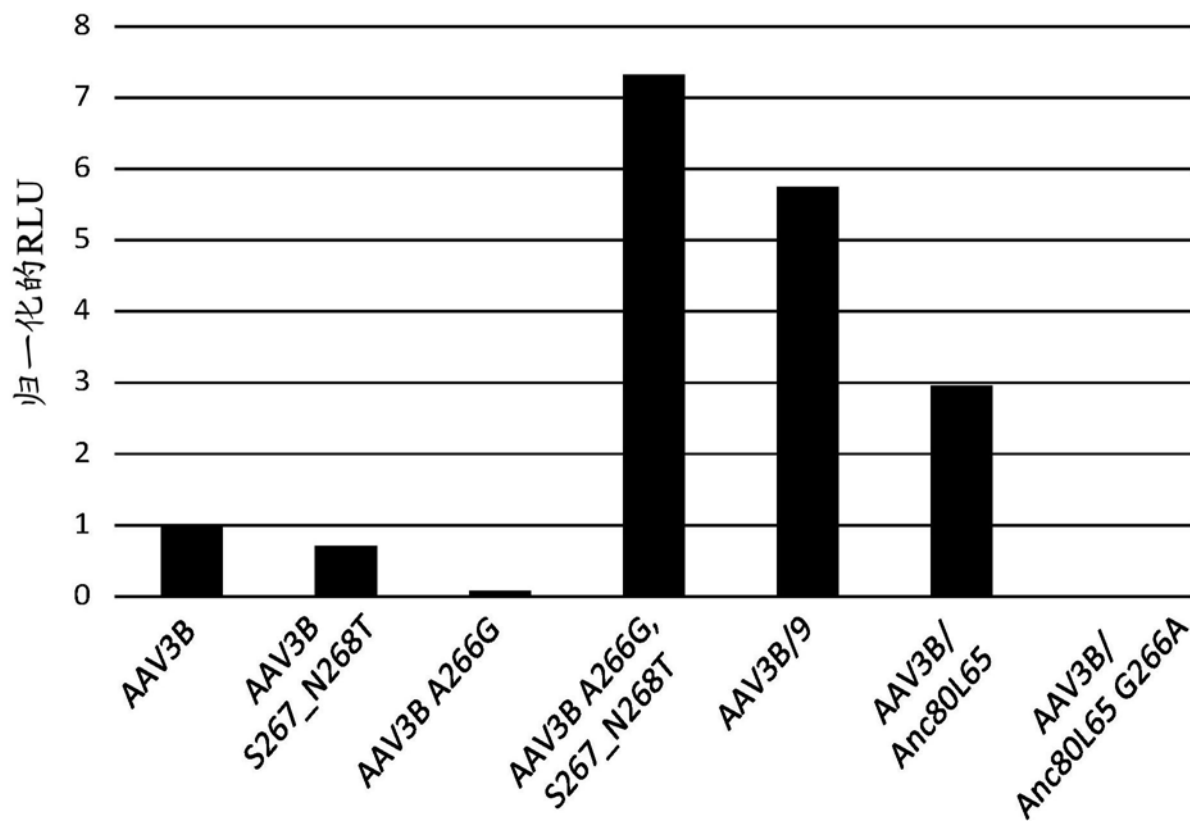


图19A

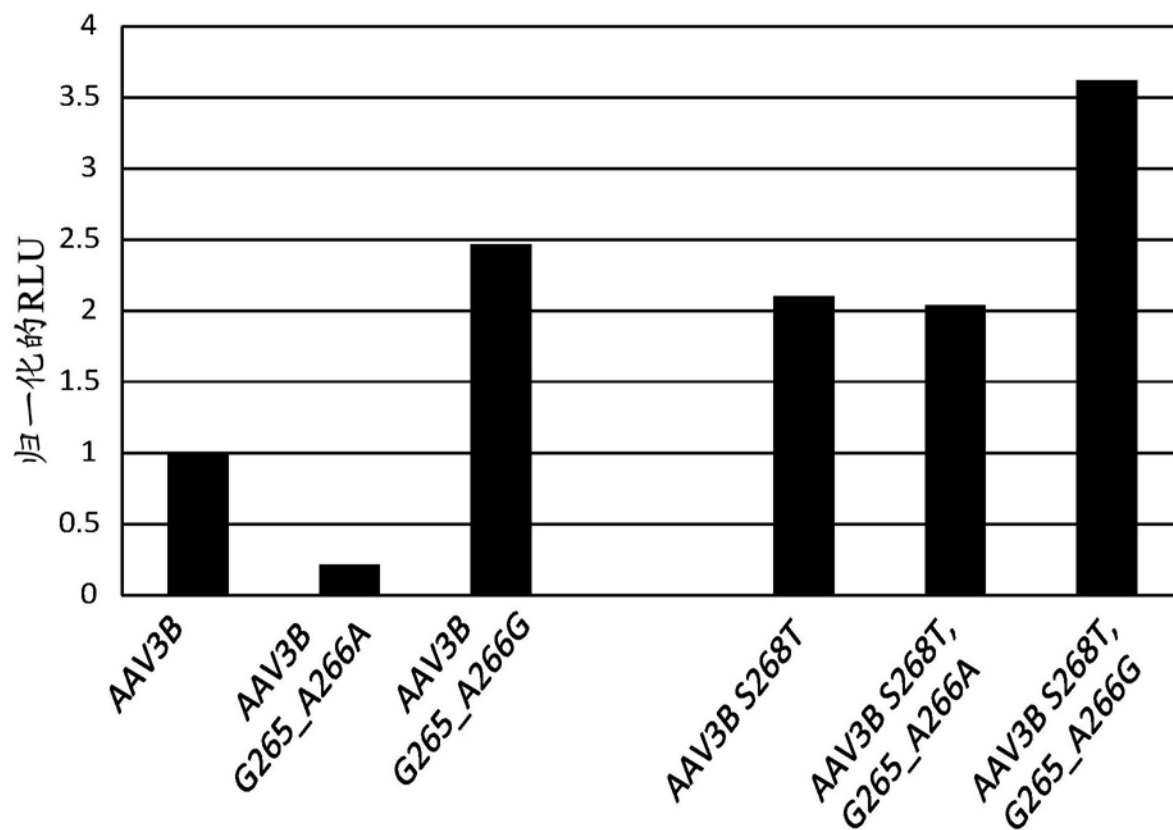


图19B

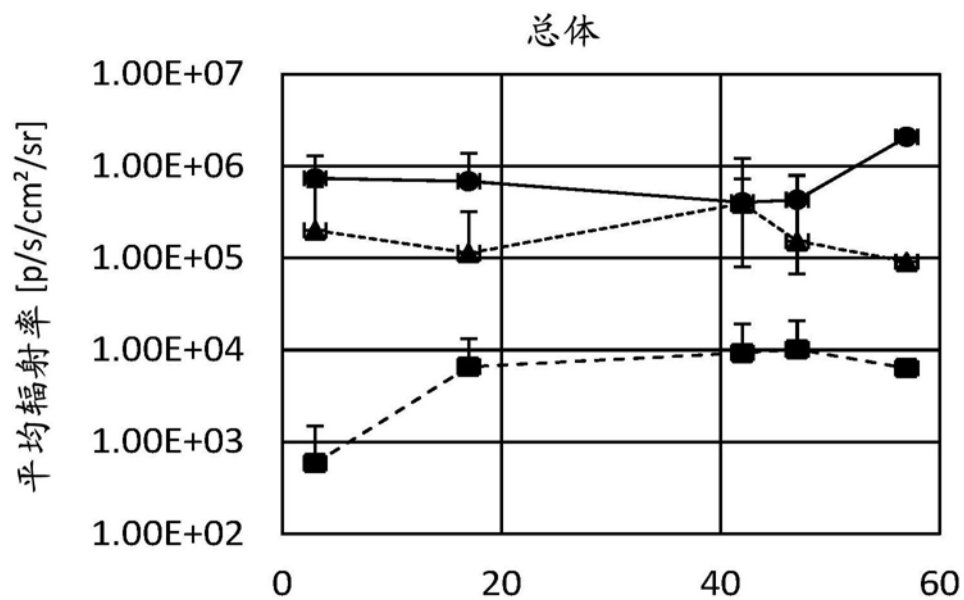


图20A

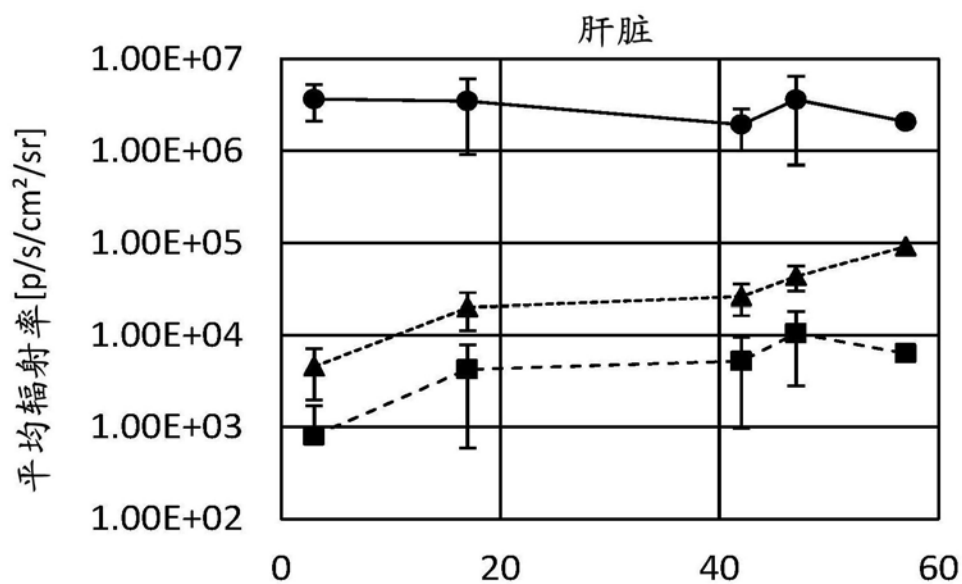


图20B

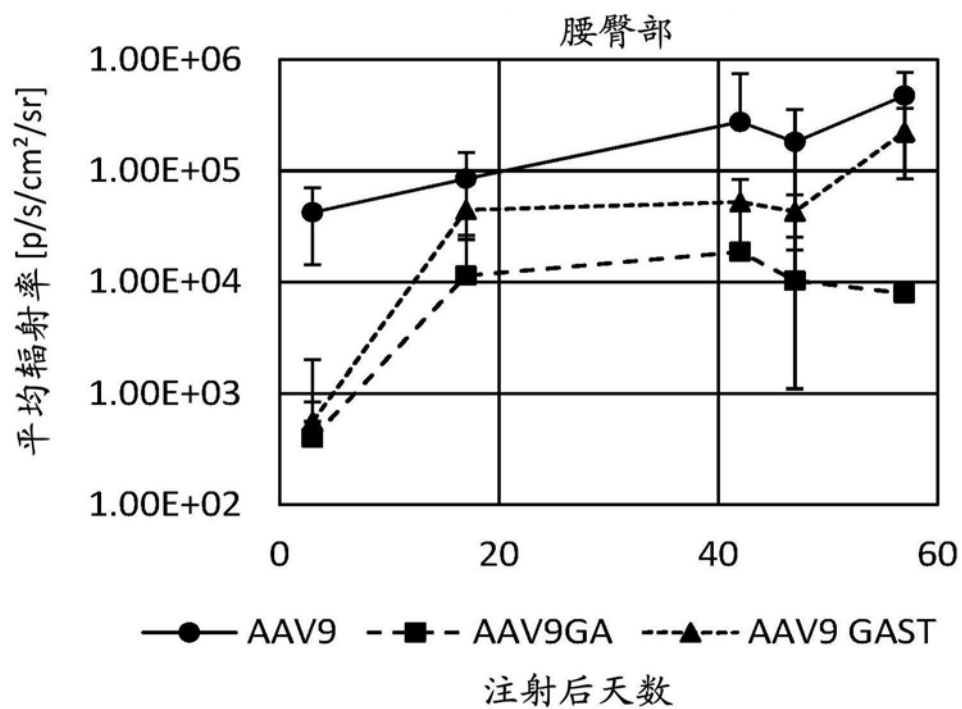


图20C

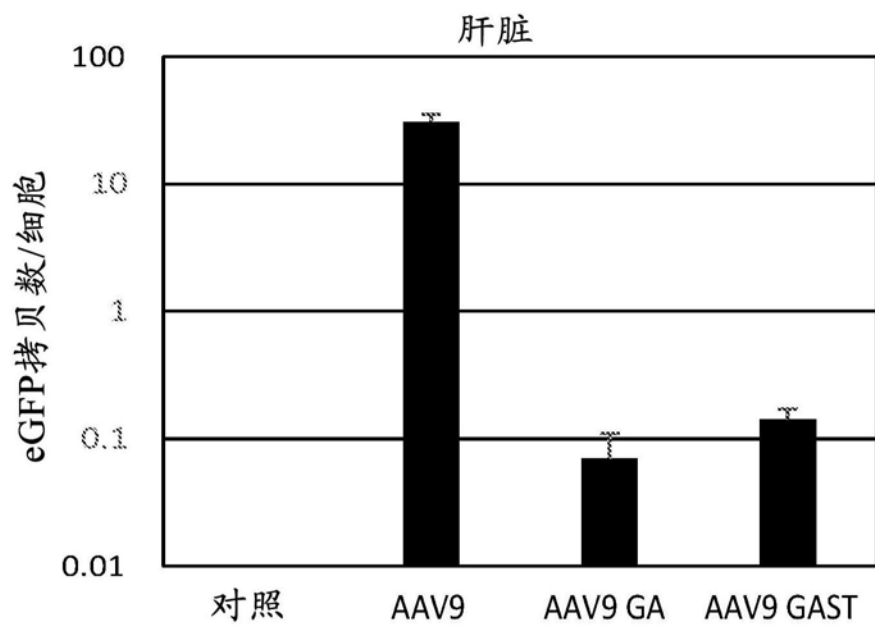


图21A

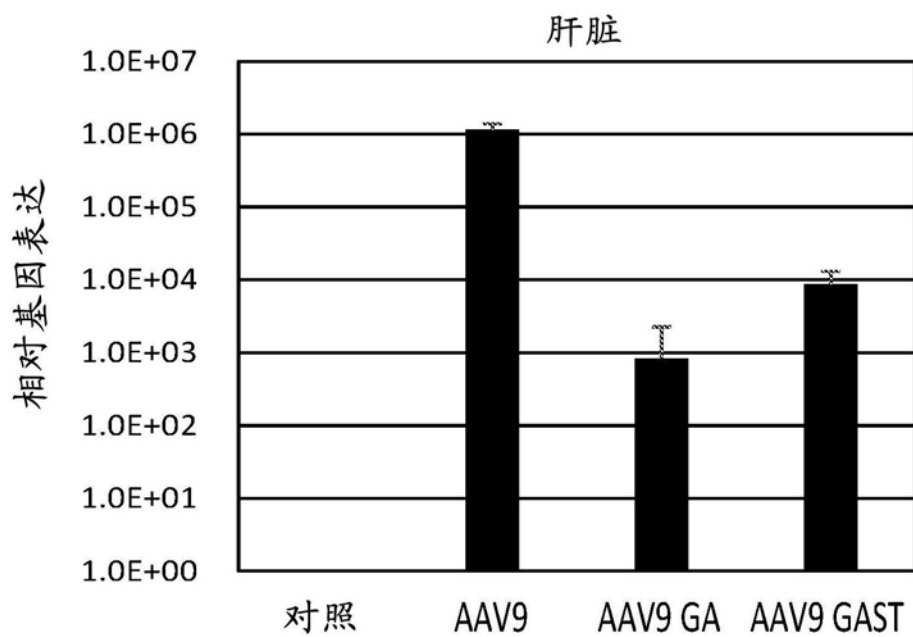


图21B

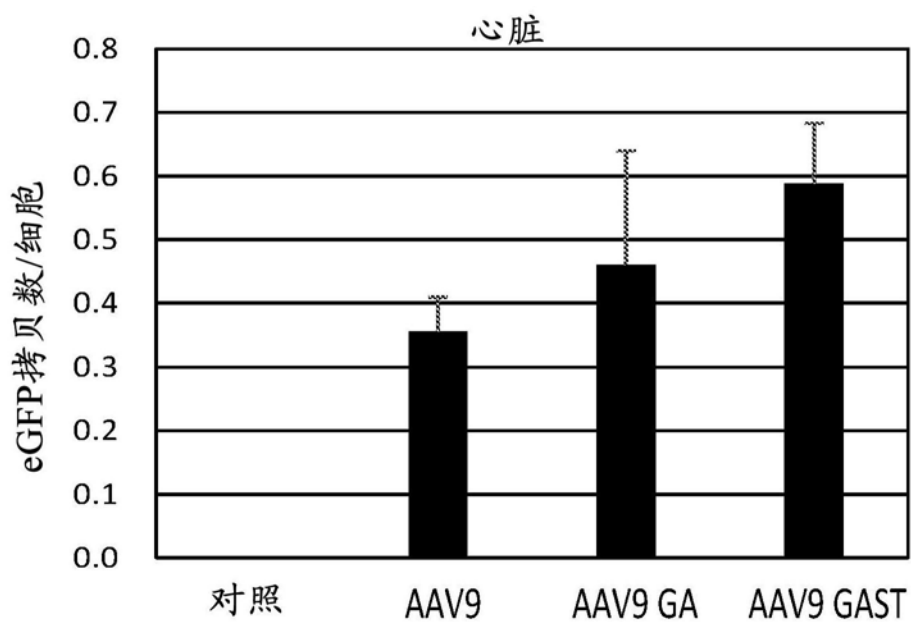


图21C

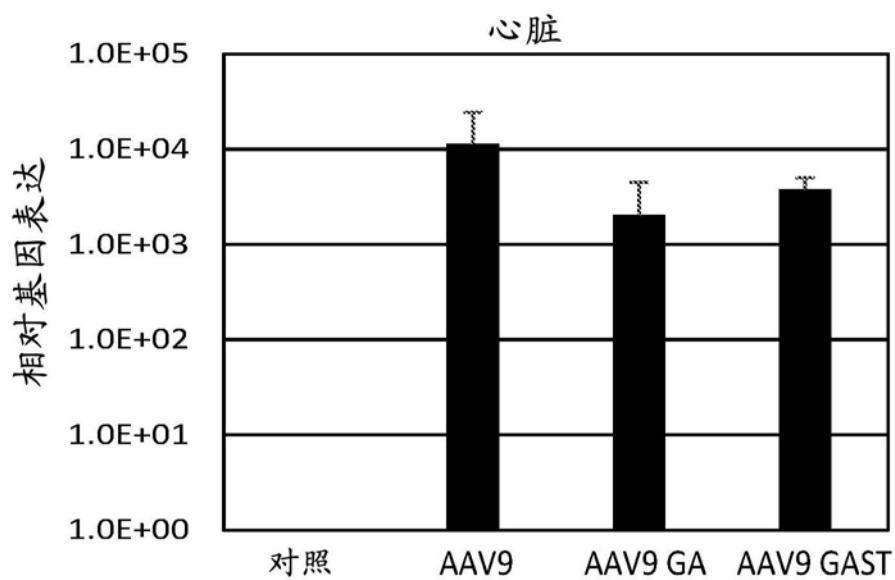


图21D

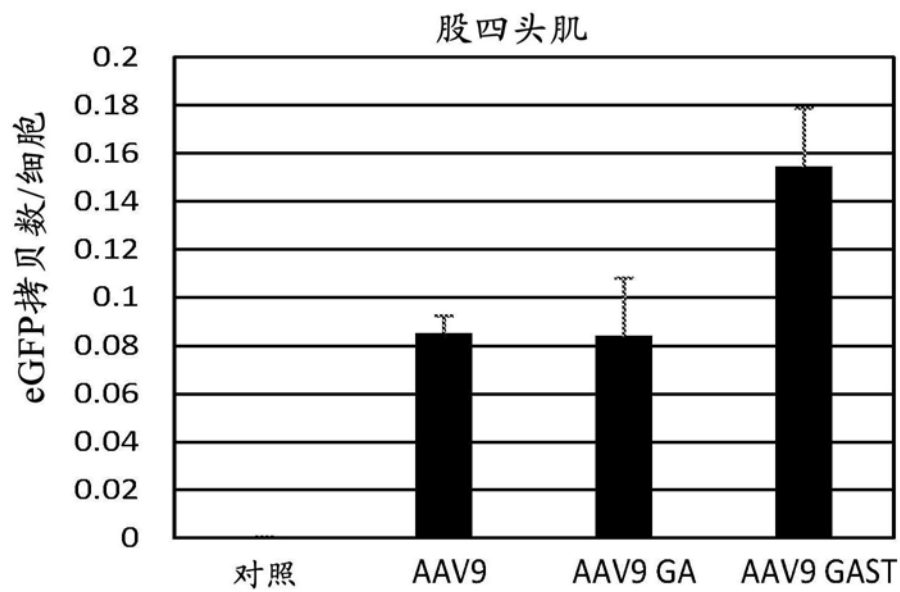


图21E

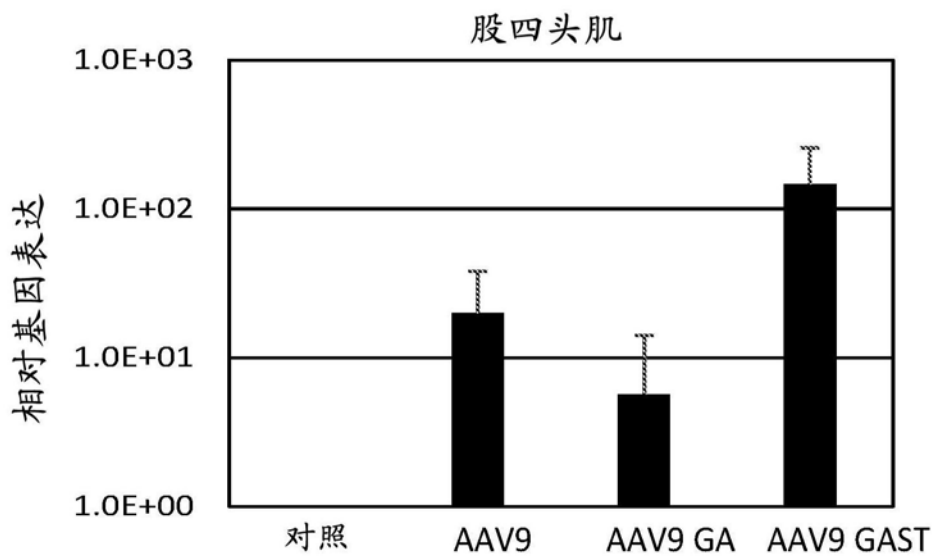


图21F

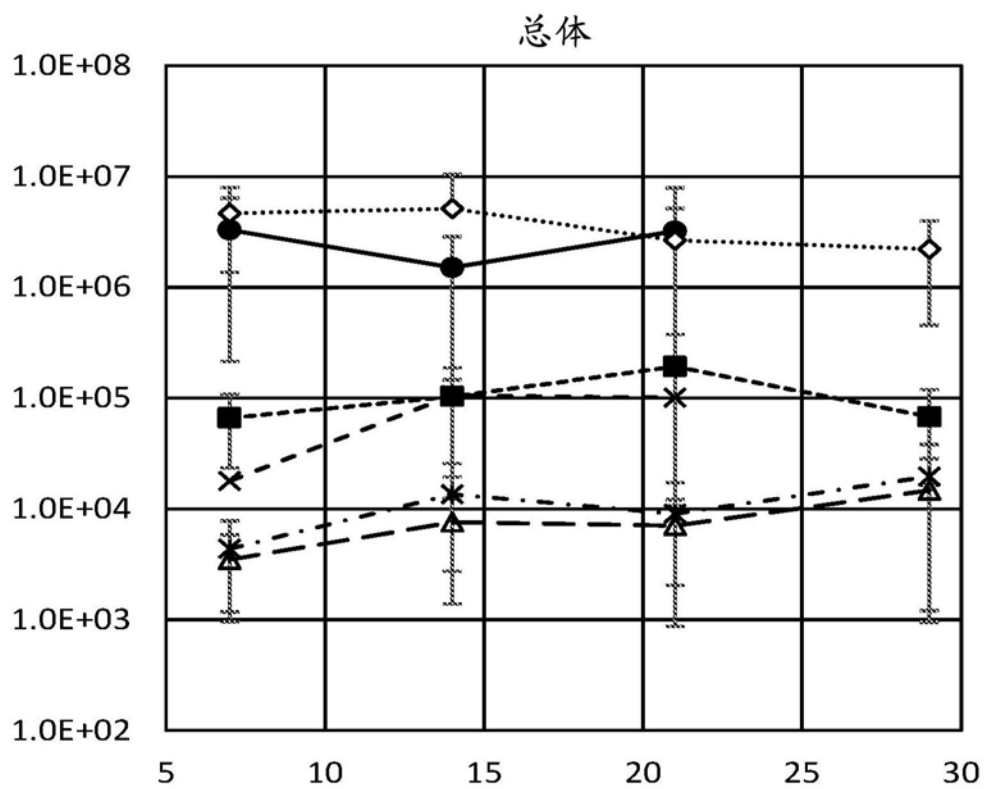


图22A

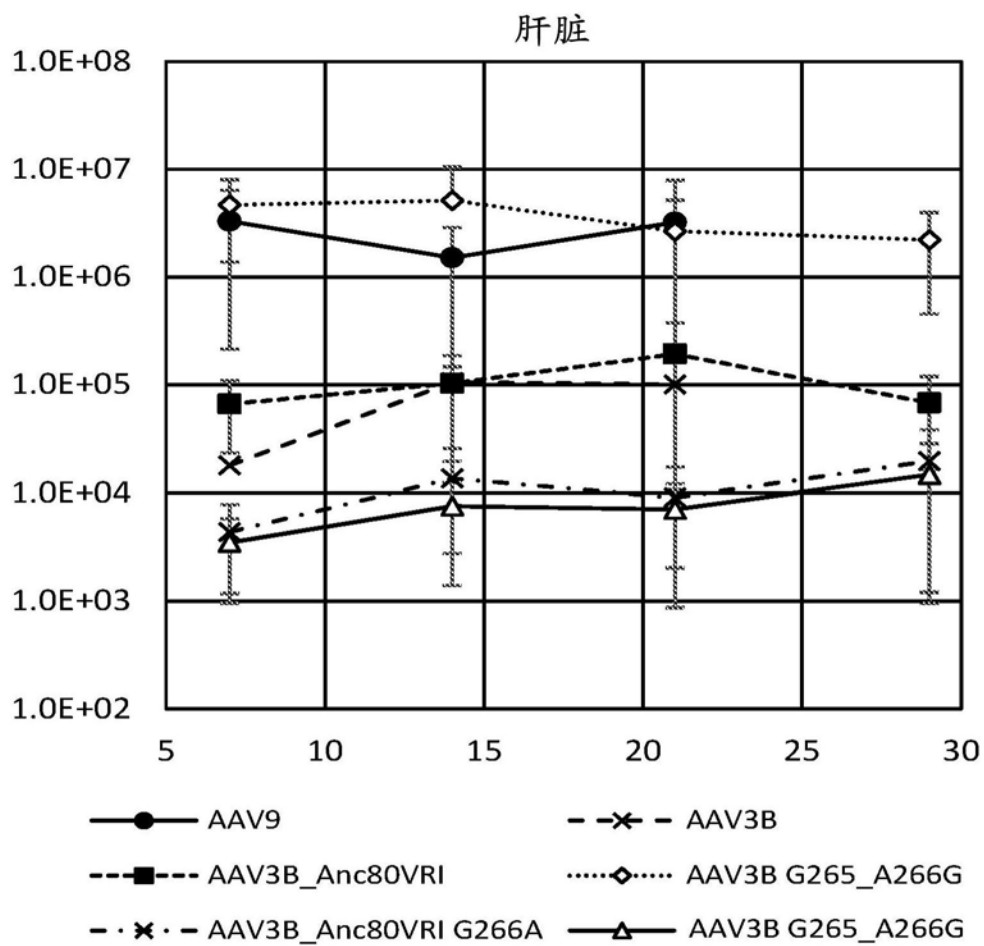


图22B

SEQ ID NO:17 Anc80L65_R168K_VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADAAALE
HDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSGIGKKGQPAK¹KRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGN
ASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ
RLINNWWGFRPKKLNFKLFNIQKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTNNGSQAVGRSSFYCYEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYL²YLSRTQTTSG
TAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTTNQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPAMPAT
HKDDEDKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITNEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQSANTAPATGTVNSQGAL
PGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQV
SVEIEWELQENSKRWNP³EIQYTSNYNKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

图23



图24

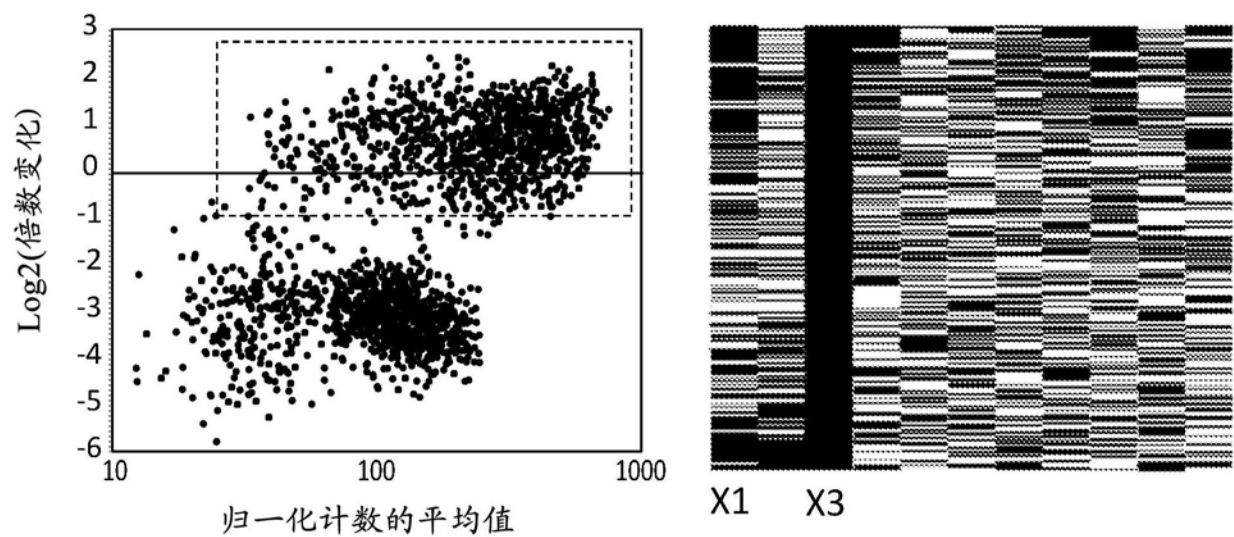
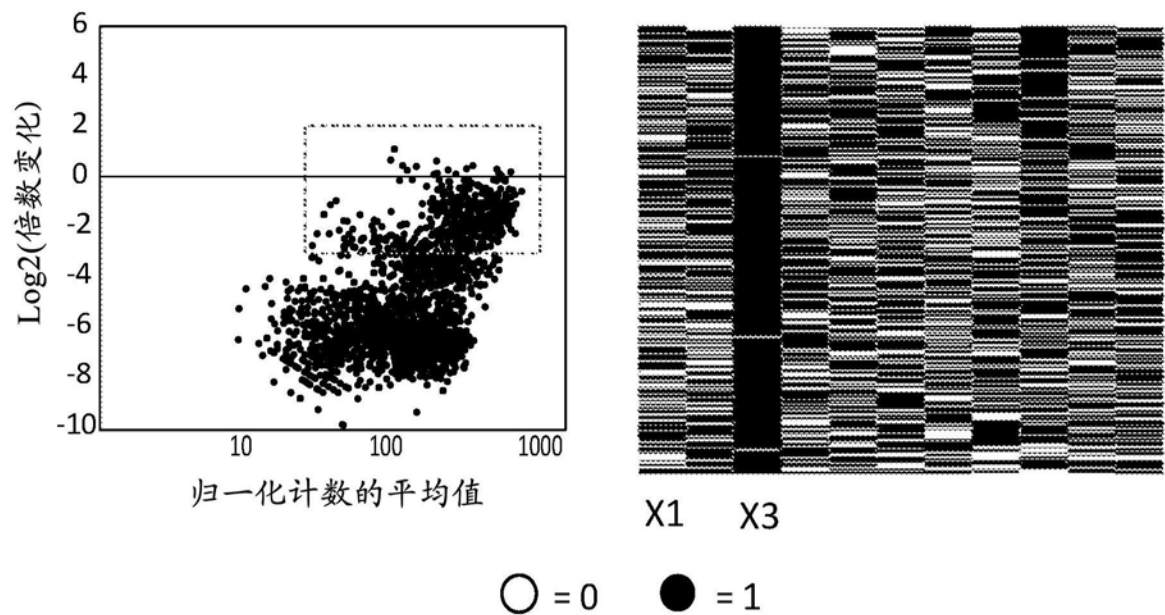


图25A



代码	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
0	K	A	A	K	Q	T	T	N	Q	A	N
1	R	S	G	R	E	E	A	S	E	S	D

图25B

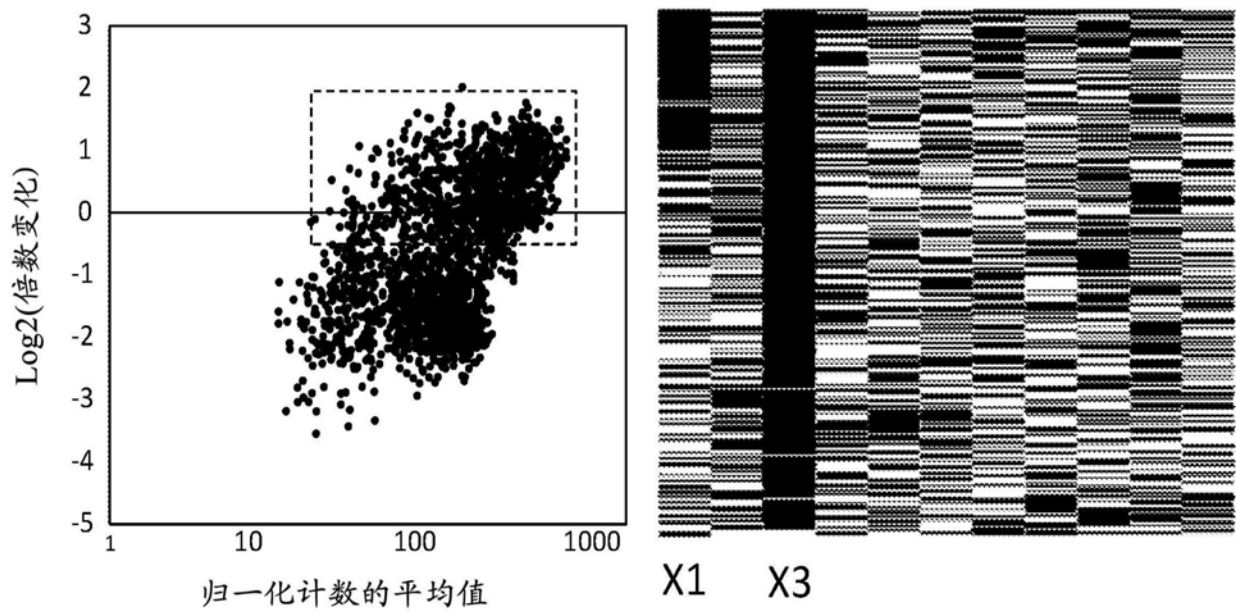


图26A

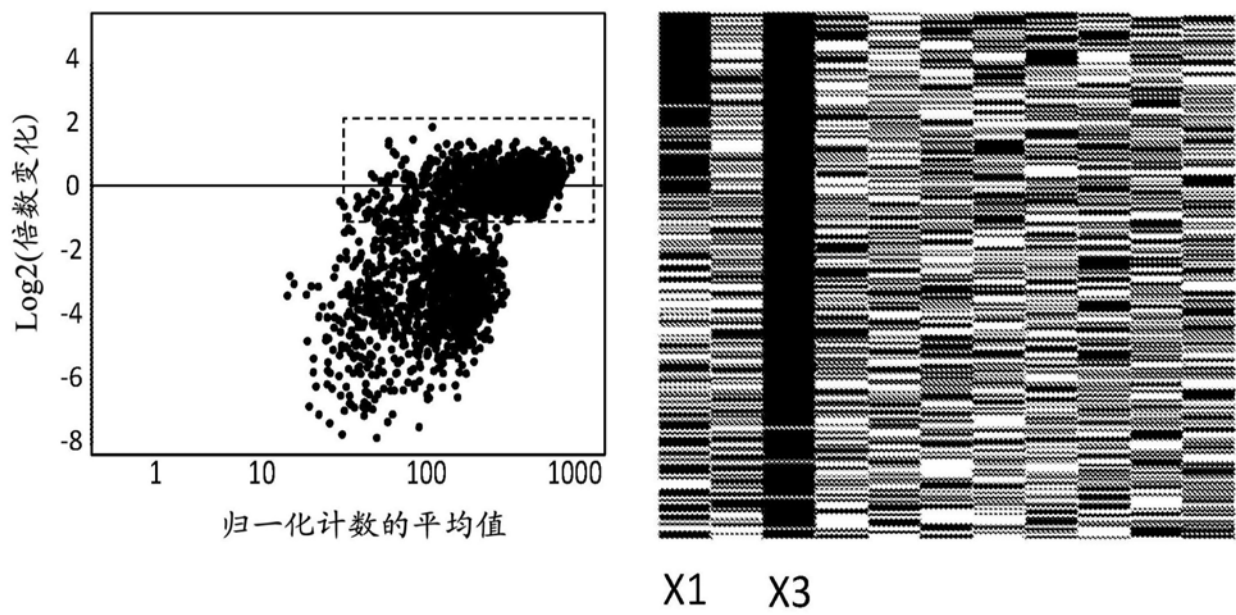


图26B

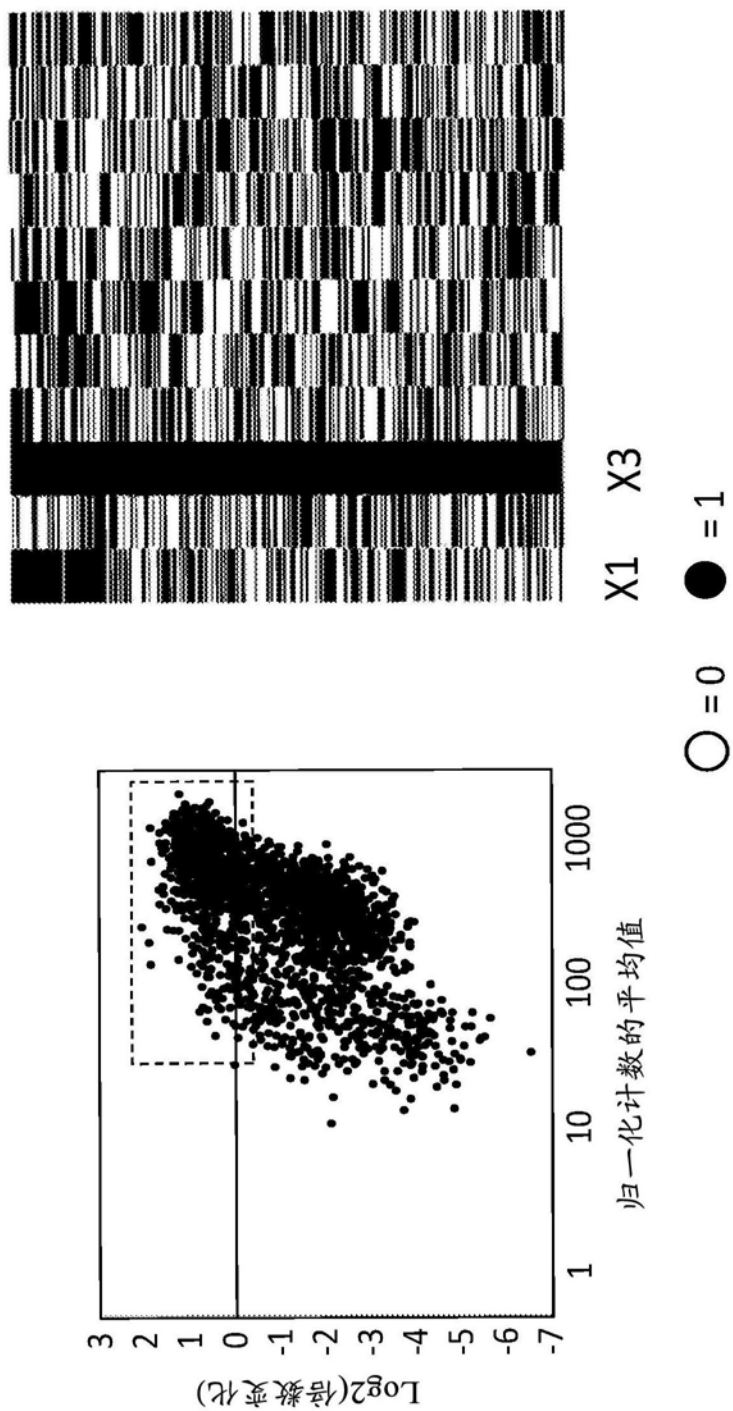


图26C