



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115698039 A

(43) 申请公布日 2023.02.03

(21) 申请号 202180025786.0

(22) 申请日 2021.03.30

(30) 优先权数据

63/003,143 2020.03.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/024837 2021.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/202494 EN 2021.10.07

(71) 申请人 马萨诸塞大学

地址 美国马萨诸塞州

申请人 四川大学

(72) 发明人 高光平 徐光超 P·戴 魏宇全

罗丽

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 吴小瑛

(51) Int.Cl.

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书2页 说明书36页

序列表12页 附图30页

(54) 发明名称

衣壳变体及其用途

(57) 摘要

本公开的多个方面涉及用于将转基因(例如,编码一种或多种基因产物的转基因)递送至靶细胞的组合物和方法。本公开部分基于特征在于对某些细胞类型(例如,神经元、肌肉细胞、骨细胞、心脏细胞等)的嗜性的腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白变体。在一些实施方案中,包含所述衣壳蛋白变体(例如,AAVv66,SEQ ID NO:1)的重组AAV(rAAV)比具有某些野生型AAV衣壳蛋白的rAAV更有效地包装。本公开还描述了递送包含所述AAV衣壳蛋白变体的rAAV的方法。

1. 一种用于将转基因递送至受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括向所述受试者颅内施用重组腺相关病毒(rAAV),所述重组腺相关病毒(rAAV)包含:

- (i) 分离的核酸,其包含编码一种或多种感兴趣的基因产物的转基因;和
- (ii) 腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白,其具有SEQ ID NO:1所示的序列。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述颅内施用包括海马体内注射。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述靶细胞是中枢神经系统(CNS)细胞。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述CNS细胞是神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞或小胶质细胞。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物,任选地其中所述哺乳动物是人。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述受试者的特征在于产生抗-AAV2抗体。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中在施用所述rAAV后,所述受试者不引发针对所述rAAV的中和免疫应答。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述分离的核酸包含所述转基因侧翼的AAV反向末端重复(ITR)。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中编码所述一种或多种基因产物的所述核酸序列与启动子有效连接。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述一种或多种基因产物包括蛋白或抑制性核酸。

11. 一种用于将转基因递送至受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内施用重组腺相关病毒(rAAV),所述重组腺相关病毒(rAAV)包含:

- (i) 分离的核酸,其包含编码一种或多种感兴趣的基因产物的转基因;和
- (ii) 腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白,其具有SEQ ID NO:1所示的序列,

其中所述施用导致所述rAAV穿过所述受试者的血脑屏障(BBB)。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述靶细胞是中枢神经系统(CNS)细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述CNS细胞是神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞或小胶质细胞。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的方法,其中与施用具有AAV2衣壳蛋白的rAAV相比,所述施用导致肝细胞的转导减少。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物,任选地其中所述哺乳动物是人。

16. 根据权利要求11至15中任一项所述的方法,其中所述受试者的特征在于产生抗-AAV2抗体。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中在施用所述rAAV后,所述受试者不引发针对所述rAAV的中和免疫应答。

18. 根据权利要求11至17中任一项所述的方法,其中所述分离的核酸包含所述转基因侧翼的AAV反向末端重复(ITR)。

19. 根据权利要求11至18中任一项所述的方法,其中编码所述一种或多种基因产物的

所述核酸序列与启动子有效连接。

20. 根据权利要求11至19中任一项所述的方法,其中所述一种或多种基因产物包括蛋白或抑制性核酸。

衣壳变体及其用途

[0001] 发明背景

[0002] 重组AAV腺相关病毒 (rAAV) 能够在靶组织中驱动稳定且持续的转基因表达, 而没有显著的毒性和宿主免疫原性。因此, rAAV是用于长期治疗性基因表达的有前景的递送媒介物。然而, 目前可用的rAAV载体的低转导效率和受限的组织嗜性可能会限制它们作为可行的有效治疗方法的应用。此外, 另一问题是来自非人体组织的主要治疗性AAV血清型的可靠临床转译。因此, 仍然需要新的用于基因递送的AAV载体。

发明内容

[0003] 本公开的多个方面涉及用于将转基因 (例如, 编码一种或多种基因产物的转基因) 递送至靶细胞的组合物和方法。本公开部分基于特征在于对某些细胞类型 (例如, 神经元、肌肉细胞、骨细胞、心脏细胞等) 的嗜性的腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白变体。在一些实施方案中, 包含所述衣壳蛋白变体的重组AAV (rAAV) 比具有某些野生型AAV衣壳蛋白的rAAV更有效地包装。本公开还描述了递送包含所述AAV衣壳蛋白变体的rAAV的方法。

[0004] 在一些方面, 本公开提供了一种用于将转基因递送至受试者中的靶细胞的方法, 所述方法包括向受试者颅内施用重组腺相关病毒 (rAAV), 所述重组腺相关病毒 (rAAV) 包含: 分离的核酸, 其包含编码一种或多种感兴趣的基因产物的转基因; 和腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白, 其具有SEQ ID NO:1所示序列。

[0005] 在一些实施方案中, 颅内施用包括海马体内注射。

[0006] 在一些实施方案中, 靶细胞是中枢神经系统 (CNS) 细胞。在一些实施方案中, CNS细胞是神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞或小胶质细胞。

[0007] 在一些实施方案中, 受试者是哺乳动物。在一些实施方案中, 受试者是人。在一些实施方案中, 受试者的特征在于产生抗-AAV2抗体。在一些实施方案中, rAAV的施用不会导致受试者出现针对rAAV的中和免疫应答。

[0008] 在一些实施方案中, 分离的核酸包含侧翼是AAV反向末端重复 (ITR) 的转基因。在一些实施方案中, 编码所述一种或多种基因产物的核酸序列与启动子有效连接。在一些实施方案中, 所述一种或多种基因产物包括蛋白或抑制性核酸。

[0009] 在一些方面, 本公开提供了一种用于将转基因递送至受试者中的靶细胞的方法, 所述方法包括向受试者静脉内施用重组腺相关病毒 (rAAV), 所述重组腺相关病毒 (rAAV) 包含: 分离的核酸, 其包含编码一种或多种感兴趣的基因产物的转基因; 和腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白, 其具有SEQ ID NO:1所示的序列, 其中所述施用导致rAAV穿过受试者的血脑屏障 (BBB)。

[0010] 在一些实施方案中, 靶细胞是中枢神经系统 (CNS) 细胞。在一些实施方案中, CNS细胞是神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞或小胶质细胞。

[0011] 在一些实施方案中, 受试者是哺乳动物。在一些实施方案中, 受试者是人。在一些实施方案中, 受试者的特征在于产生抗-AAV2抗体。在一些实施方案中, rAAV的施用不会导致受试者出现针对rAAV的中和免疫应答。

[0012] 在一些实施方案中,分离的核酸包含侧翼是AAV反向末端重复(ITR)的转基因。在一些实施方案中,编码所述一种或多种基因产物的核酸序列与启动子有效连接。在一些实施方案中,所述一种或多种基因产物包含蛋白或抑制性核酸。

[0013] 在一些实施方案中,与具有某些野生型AAV衣壳蛋白(例如,AAV2衣壳蛋白,SEQ ID NO:2)的rAAV相比,包含本文所述的衣壳蛋白变体(例如,AAVv66,SEQ ID NO:1)的重组AAV(rAAV)被更有效地包装(例如,2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍或更多倍)。

[0014] 附图详细说明

[0015] 图1A-1D显示了来自人手术样品的AAV新型前病毒衣壳序列的鉴定。图1A显示首先使用在AAV Cap ORF侧翼的引物从人手术样品中PCR扩增AAV衣壳前病毒序列。对扩增子进行单分子实时(SMRT)测序,并通过BWA-MEM与当代AAV血清型序列的比对分析所得读段,通过InDelFixer去除与PCR或SMRT测序错误相关的插入/缺失,并通过从头组装以聚集具有高序列相似性的读段。图1B显示在分析中发现变体AAVv66的帽序列是最丰富的(45%)。图1C显示了所总结的AAVv66衣壳序列中不同于AAV2的13个独特残基。(d) AAV2变体(包括AAVv66)和当代血清型的系统进化树。

[0016] 图2A-2D显示海马体内注射后rAAV2和rAAVv66的转导扩散。图2A显示通过单侧海马体内施用注射rAAV2-CB6-Egfp或rAAVv66-CB6-Egfp后的天然EGFP表达。比例尺=700 μ m。图2B显示了相对于DAPI阳性表面标准化的EGFP阳性表面的定量。数据显示为平均值 \pm SD;n=3。****P<0.0001。图2C显示冠状脑示意图,其描绘出对侧和同侧半球中感兴趣的亚解剖区域。海马安蒙角(Cornu ammonis)(CA1、CA2、CA3、CA4)、齿状回(DG)、胼胝体(CC)和皮质(CTX)。图2C显示了rAAVv66转导的亚解剖区域的高放大倍率图像。比例尺=50 μ m。

[0017] 图3A-3P显示了rAAVv66对脑的主要细胞类型的转导。图3A、3E、3I和3M显示了rAAVv66-CB6-Egfp转导的小鼠脑的冠状切片。用抗NEUN(图3A,神经元)、GFAP(图3E,星形胶质细胞)、IBA1(图3I,小胶质细胞)或OLIG2(图3M,少突胶质细胞)抗体的IF染色切片显示各细胞类型在脑中的分布。用IF染色共定位的天然EGFP表达显示出阳性转导的细胞类型。比例尺=700 μ m。图3B、3F、3J和3N显示了来自冠状剖面视图内虚线矩形框的单独代表性帧的亚解剖区域的3D渲染(上小图),以及虚线方框限定的视野的单细胞代表图(下三小图)。左小图,总面积EGFP和细胞标志物IF染色;中小图,与总细胞标志物IF染色共定位的EGFP;右小图,共定位的EGFP和细胞标志物IF染色。比例尺=50 μ m(上小图)、5 μ m(下三小图)。图3C、3G、3K和3O显示了跨所示海马体区域(x轴)的细胞类型特异性IF染色的定量,相对于DAPI信号标准化。图3D、3H、3L和3P显示了跨所示区域的细胞类型特异性转导的定量,相对于总细胞类型IF和DAPI信号标准化。数据显示为平均值 \pm SD;n=3。海马安蒙角(CA1、CA2、CA3、CA4)、齿状回(DG)、胼胝体(CC)和皮质(CTX)。

[0018] 图4A-4E显示了AAVv66的生物物理学分析。热图显示了示差扫描荧光(DSF)分析法所研究的在pH 7、6、5和4下的衣壳蛋白解折叠(解衣壳)(图4A)和DNA可及性(载体基因组挤出)(图4B)。通过定点诱变将AAVv66的每个定义性氨基酸残基转化为AAV2的那些,并检查在pH 7下的包装产量(图4C)、衣壳稳定性(图4D)和基因组释放(图4D)的变化。数值代表平均值 \pm SD。p值通过单向ANOVA确定。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。n³ 3。

[0019] 图5A-5E显示了AAVv66的冷冻电镜主要指标、图谱重建和模型生成。图5A显示了AAVv66的密度图。灰度图标示出距中心的拓扑距离(\AA)。图5B显示了细化的AAVv66衣壳单体

的带状结构。突出显示了与AAV2不同的氨基酸。标注了2倍(椭圆)、3倍(三角形)和5倍(五边形)对称性。显示了靠近(图5C) L583、R487、Y533和K532, (图5D) S446、D499和S501, 以及(图5E) N407-T414的区域的部分AAVv66电子密度(深灰色网格)和残基。

[0020] 图6显示了AAVv66和AAV2之间的结构差异。中心是AAVv66 60-聚体结构(灰色)。AAVv66特有的氨基酸残基以绿色突出显示, 而对于单个单体与AAV2相同的氨基酸残基以彩色显示。显示AAVv66和AAV2之间存在显著差异的选定区域的残基侧链的原子模型。使用AAV2(11p3)和AAVv66的单体进行比对, 其中来自相邻残基的模型化侧链以灰色显示。所示氨基酸的注释表示属于AAVv66的那些、位置编号, 然后是AAV2。

[0021] 图7A-7C显示了AAV2和AAVv66之间的差异衣壳表面静电。图7A显示了AAV2和AAVv66 60-聚体、三聚体(3倍对称)和五聚体(5倍对称的外部 and 内部)结构的表面正电荷和负电荷。AAV2 60-聚体和三聚体结构处的黑色箭头表示R585和R588在单个3倍突起处的大致位置。图7B显示了AAV2和AAVv66的585-588处的氨基酸残基的放大图。图7C显示了由zetasizer测量的纯化载体的zeta电位的条形图。数值代表平均值 \pm SD, $n=3$ 。

[0022] 图8显示了AAVv66衣壳蛋白的氨基酸序列, 其中提供了相对于AAV2的突变。突出显示了AAV2和AAVv66之间的氨基酸差异。可变区(VR)残基用短条形表示。 α H结构域由虚线划分, 形成 β 折叠的残基用黑色箭头标记。VP1、VP2和VP3的起始位置用大于号(>)标记。VP1内的PLA结构域用条形表示。

[0023] 图9显示AAVv66产生比AAV2更高的载体产量。对进行了三重转染pAAV和AAV2或AAVv66的包装质粒的HEK293细胞的培养基和细胞裂解物进行粗裂解物PCR测定。数值代表平均基因组拷贝数 \pm SD, $n=3$ 。

[0024] 图10显示AAVv66缺乏强肝素结合。肝素竞争测定显示在肝素含量增加的情况下(x轴), HEK293细胞中AAV2-CB6-FLuc和AAVv66-CB6-FLuc的转导效率。将发光值相对于缺乏肝素并设置为1的孔获得的值计量(y轴)。数值代表平均值 \pm SD, $n=3$ 。**, 通过双向ANOVA的 $p < 0.01$ 。

[0025] 图11显示了AAV2、AAV3b和AAVv66在HEK293细胞中的体外感染效率。载体包装有CB6-FLuc。感染后48小时裂解细胞, 以通过检测荧光素酶活性(RLU, 相对光单位)来评估载体的感染性。数据以对数形式显示。数值代表平均值 \pm SD, 通过单向ANOVA的*** $p < 0.0001$, $n=3$ 。

[0026] 图12A-12D显示, AAVv66载体的静脉内施用显示了肝脏的转导。全身注射AAVv66-CB6-FLuc导致肝脏的转导。通过尾静脉施用将rAAV2-CB6-FLuc或AAVv66-CB6-FLuc(1.0×10^{11} GC/小鼠)注射到小鼠体内。14天后向小鼠腹膜内注射荧光素底物, 并进行成像(图12A)。尽管荧光素酶活性的全身活体生物发光(whole-body live bioluminescence)的定量并未显示AAVv66-CB6-FLuc和AAV2-CB6-FLuc之间肝脏转导的显著差异, 但肝组织的分离和荧光素酶活性的定量以及通过qPCR检测载体基因组拷贝显示AAVv66是比AAV2显著更弱的肝脏转导子。记录所获得图像中腹部的总通量(图12B)。收获组织并测定荧光素酶活性(图12C)和通过qPCR测定载体基因组丰度(图12D)。数值代表平均值 \pm SD, $n=3$, *通过学生t检验的 $p < 0.05$ 。

[0027] 图13A-13D显示AAVv66载体的肌肉施用显示肌肉的转导。将AAVv66肌肉注射到胫骨前肌中产生的转导能力与AAV2的转导的差异非常小。AAV2-CB6-FLuc或AAVv66-CB6-FLuc

(4.0E10 GC/小鼠)通过肌肉施用至一后肢(胫骨前肌)而注射到小鼠体内。14天后向小鼠腹腔内注射荧光素底物,并进行成像(图13A)。记录所获得图像中被注射的后肢的总通量(图13B)。收获组织并测定荧光素酶活性(图13C)和通过qPCR测定载体基因组丰度(图13D)。数值代表平均值±SD,n=3。*通过学生t检验的 $p < 0.05$ 。

[0028] 图14A-14D显示了AAVv66的免疫学特征。将AAV2-CB6-Egfp载体肌肉施用至小鼠(1E11 GC/小鼠)。施用后4周,收集血清以测试针对AAV2或AAVv66感染的中和抗体(NAb)滴度。AAV2(图14A)和AAVv66(图14B)的NAb50值定义为可以阻断包装有LacZ报告基因的载体可实现的总转导的50%的滴度稀释度。左图,测试的个体动物的NAb表摘要。右图,将转导效率相对于多个血清稀释度进行作图。数值代表平均值±SD。虚线表示平均NAb50血清滴度。4周的时间过后,向小鼠的对侧后肢肌肉施用AAV2-hA1AT或AAVv66-hA1AT(1E11 GC/小鼠)。在第5、6、7和8周通过ELISA测量血清A1AT水平(图14C)。数值代表平均值±SD,n=3。通过对横截面数据点值的双向ANOVA:ns,不显著;*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$;和***, $p < 0.001$ 。图14D显示兔抗AAV血清交叉反应性。对于AAVv66和同源AAV血清型,测试针对AAV血清型产生的兔抗血清的NAb,以评估相对交叉反应性。Log2值代表达到50%转导抑制的最高抗体稀释度。

[0029] 图15A-15B显示了AAVv66的冷冻电镜主要指标、图谱重建和模型生成。图15A显示了AAVv66的低温电子显微照片。比例尺代表100 Å。图15B显示了AAVv66的偶数和奇数颗粒(FSC_part)的傅立叶壳相关性。

[0030] 图16显示了将AAVv66与AAV2或AAV3b进行比较的RMSD(Å)统计数据。AAVv66与AAV2(1LP3)或AAV3b(3KIC)之间总的区域RMSD(Å)的总结,通过PyMOL中的rms_cur函数计算的跨所有所述 α -碳对(AAV2编号)来测量。AAV2、3b和AAVv66的完整衣壳结构通过在AAVv66的冷冻电镜密度图中的优化拟合进行比对。使用PyMOL中的自定义脚本,AAV2(上)或AAV3b(下)的个体 α -碳对之间的距离值(Å)经定量转换表示为AAVv66的相应残基的颜色和径向厚度。

[0031] 发明详述

[0032] 本公开的多个方面涉及用于将转基因(例如,编码一种或多种基因产物的转基因)递送至靶细胞的组合物和方法。本公开部分基于特征在于对某些细胞类型(例如,神经元、肌肉细胞、骨细胞、心脏细胞等)具有嗜性的腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白变体。在一些实施方案中,包含所述衣壳蛋白变体的重组AAV(rAAV)比具有某些野生型AAV衣壳蛋白的rAAV更有效地包装。本公开还描述了递送包含所述AAV衣壳蛋白变体的rAAV的方法。

[0033] AAVv66衣壳蛋白

[0034] 在一些方面,本公开提供了用于将转基因递送至受试者中的靶细胞(例如,中枢神经系统(CNS)的靶细胞)的方法,所述方法包括向受试者施用(例如,颅内或静脉内)重组腺相关病毒(rAAV),所述重组腺相关病毒包含:分离的核酸,其包含编码一种或多种感兴趣的基因产物的转基因;和腺相关病毒(AAV)衣壳蛋白,其包含AAVv66衣壳蛋白或与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性(substantial homology)的衣壳蛋白。在一些实施方案中,AAVv66蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,本文所述的AAVv66衣壳蛋白相对于AAV2包含选自以下的突变:K39Q、V151A、R447K、T450A、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T和A593T。在一些实施方案中,本文所述的AAVv66衣壳蛋白相对于AAV2包含以下每一个突变:

K39Q、V151A、R447K、T450A、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T和A593T。在一些实施方案中，与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白相对于AAV2包含一个或多个选自以下的突变：K39Q、V151A、R447K、T450A、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T和A593T。在一些实施方案中，AAVv66衣壳蛋白或与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白相对于AAV2在其VP1、VP2和/或VP3区包含一个或多个突变。在一些实施方案中，AAVv66衣壳蛋白或与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白相对于AAV2在可变区 (VR) -IV、VR-V、VR-VI、VT-VII和/或VR-VIII包含一个或多个突变。在一些实施方案中，AAVv66衣壳蛋白或与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白相对于AAV2包含一个或多个如图1C所示的突变。

[0036] “同源性”是指两个多核苷酸或两个多肽实体之间的同一性百分比。当提及核酸或其片段时，术语“基本同源性”表示，当以适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳比对时，在约90至约100%的比对序列中存在核苷酸序列同一性。当提及多肽或其片段时，术语“基本同源性”表示当以适当的缺口、插入或缺失与另一多肽最佳比对时，在约90至100%的比对序列中存在核苷酸序列同一性。术语“高度保守”是指至少80%同一性，优选至少90%同一性，更优选超过97%同一性。在某些情况下，高度保守可以指100%同一性。本领域技术人员通过例如使用本领域技术人员已知的算法和计算机程序容易地确定同一性。

[0037] 如本文所述，核酸或多肽序列之间的比对使用多种公开或商业上可获得的多序列比对程序中的任何一种进行，例如“Clustal W”，可通过因特网上的Web服务器访问。或者，也可以使用Vector NTI实用程序。本领域也已知许多算法能够用于测量核苷酸序列同一性，包括上述程序中包含的那些。作为另一实例，使用BLASTN能够比较多核苷酸序列，BLASTN提供查询序列和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和百分比序列同一性。氨基酸序列的比较也有类似的程序可用，例如“Clustal X”程序、BLASTP。通常，这些程序都在默认设置下使用，但是本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。或者，本领域技术人员能够利用至少提供与所称算法和程序相同的同一性或比对水平的另外的算法或计算机程序。比对可用于鉴定两种蛋白或肽之间对应的氨基酸。“对应的氨基酸”是蛋白或肽序列上与另一种蛋白或肽序列的氨基酸对齐的氨基酸。对应的氨基酸可以同一或不同一。不同一氨基酸为对应氨基酸时可称为变体氨基酸。

[0038] 在一些方面，本公开涉及AAVv66衣壳蛋白(例如，编码AAVv66衣壳蛋白的分离的核酸、包含AAVv66衣壳蛋白的重组腺相关病毒(rAAV)等)，或与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白。在一些实施方案中，与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一。在一些实施方案中，与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白相对于SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸取代、插入或缺失。在一些实施方案中，与AAVv66衣壳蛋白具有基本同源性的衣壳蛋白相对于SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列包含多于50个氨基酸取代、插入或缺失。

[0039] 在一些方面，本公开涉及令人惊讶的发现，即包含AAVv66衣壳蛋白的rAAV与具有某些其他AAV衣壳蛋白(例如，AAV2衣壳蛋白、AAV3B衣壳蛋白等)的rAAV相比能够在哺乳动

物细胞系(例如HEK-293细胞)中以更高的量产生。在一些实施方案中,与用AAV2衣壳蛋白转导的哺乳动物生产细胞(例如,HEK)相比,转导的哺乳动物生产细胞(例如,HEK)产生的具有AAVv66衣壳的rAAV多约1.5倍至约5倍(例如,1.5、2、3、4、5倍)。在一些实施方案中,与用AAV3B衣壳蛋白转导的哺乳动物生产细胞(例如,HEK)相比,转导的哺乳动物生产细胞(例如,HEK)产生的具有AAVv66衣壳的rAAV多约5%至约50%(例如,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%等)。

[0040] 本公开的多个方面涉及相对于具有AAV2衣壳蛋白的rAAV, AAVv66衣壳蛋白(例如,包含AAVv66衣壳蛋白的rAAV)的中枢神经系统(CNS)细胞转导效率得到意料不到的提高。在一些实施方案中,与含有AAV2的rAAV相比,含有AAVv66的rAAV转导CNS细胞的效率高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、100%、200%、500%、1000%或更高。在一些实施方案中,CNS细胞包括神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞或小胶质细胞。

[0041] 本公开的多个方面涉及在血清学上不同于其他AAV衣壳蛋白(例如,AAV1、AAV2、AAV3B、AAV8、AAV9、AAVrh.8、AAVrh.10等)的某些AAV衣壳蛋白(例如,AAVv66衣壳蛋白)。不希望受任何特定理论的束缚,包含AAVv66衣壳蛋白的rAAV在针对某些其他AAV衣壳的抗体呈血清阳性的受试者中不遭受中和抗体反应。因此,在一些实施方案中,包含AAVv66衣壳蛋白的rAAV可作为二线疗法用于将转基因递送至先前已施用AAV治疗或对某些AAV衣壳中和抗体呈血清阳性的受试者。

[0042] 在一些方面,本公开涉及相对于某些野生型AAV衣壳蛋白(例如,AAV2衣壳蛋白)表现出增加的热稳定性的rAAV衣壳蛋白(例如,AAVv66衣壳蛋白)。在一些实施方案中,AAVv66衣壳蛋白在约pH 4至约pH 7的pH范围内比AAV2衣壳蛋白更具热稳定性。在一些实施方案中,热稳定性通过计算衣壳蛋白的解链温度来确定。在一些实施方案中,AAVv66衣壳蛋白的特征在于在给定pH(例如,在pH 4和pH 7之间)下的解链温度比AAV2衣壳蛋白的解链温度高约5°C至约10°C。

[0043] 分离的核酸

[0044] 在一些方面,本公开涉及编码某些AAV衣壳蛋白变体(例如,AAVv66衣壳蛋白)的分离的核酸。“核酸”序列是指DNA或RNA序列。在一些实施方案中,术语核酸捕获包括任何已知的DNA和RNA碱基类似物的序列,例如但不限于4-乙酰基胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、氮丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基-甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基-氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-氨基-甲基-2-硫尿嘧啶、β-d-甘露糖苷、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、糖苷(queosine)、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、假尿嘧啶、糖苷、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0045] 在一些实施方案中,本公开的蛋白和核酸是分离的。如本文所用,术语“分离的”是指人工获得或产生的。如本文关于核酸所用,术语“分离的”一般意指:(i)通过例如聚合酶链反应(PCR)体外扩增;(ii)通过克隆重组产生;(iii)通过裂解和凝胶分离纯化;或(iv)通

过例如化学合成合成。分离的核酸是易于通过本领域公知的重组DNA技术操作的核酸。因此,已经公开了已知其中的5'和3'限制性位点或已经公开了针对其的聚合酶链式反应(PCR)引物序列的载体中包含的核苷酸序列被认为是分离的,但是以其天然状态存在于其天然宿主中的核酸序列不被认为是分离的。分离的核酸可以是基本上纯化的,但不是必需的。例如,在克隆或表达载体中分离的核酸不是纯的,因为它可以包含其所在细胞中的仅微小百分比的物质。然而,这样的核酸在该术语在本文中使用时是分离的,因为它易于通过本领域普通技术人员已知的标准技术操作。如本文关于蛋白或肽所用,术语“分离的”一般是指人工获得或产生的蛋白或肽(例如,通过化学合成,通过重组DNA技术等)。

[0046] 应当理解的是,可以进行保守氨基酸取代以提供衣壳蛋白的功能等同变体或同源物。在一些方面,本公开包括产生保守氨基酸取代的序列改变。如本文所用,保守氨基酸取代是指不改变进行氨基酸取代的蛋白的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。变体可以根据改变本领域普通技术人员已知的多肽序列的方法制备,例如在编撰这些方法的参考文献中发现的,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,等人编,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编,John Wiley&Sons, Inc.,New York。氨基酸的保守取代包括在以下组内的氨基酸之间进行的取代:(a) M、I、L、V;(b) F、Y、W;(c) K、R、H;(d) A、G;(e) S、T;(f) Q、N;和(g) E、D。因此,可以对本文公开的蛋白和多肽的氨基酸序列进行保守氨基酸取代。

[0047] 重组AAV (rAAV)

[0048] 在一些方面,本公开提供了分离的AAV。如本文关于AAV所用,术语“分离的”是指人工获得或产生的AAV。可以使用重组方法产生分离的AAV。此类AAV在本文中称为“重组AAV”。重组AAV (rAAV) 优选具有组织特异性靶向能力,使得rAAV的转基因将被特异性递送至一种或多种预定组织。AAV衣壳是确定这些组织特异性靶向能力的重要因素。因此,可以选择具有适合于被靶向组织的衣壳的rAAV。在一些实施方案中,rAAV包含AAVv66衣壳蛋白。在一些实施方案中,rAAV包含具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的衣壳蛋白。

[0049] 获得具有所需衣壳蛋白的重组AAV的方法是本领域公知的。(参见,例如,US 2003/0138772),其内容通过引用以其整体并入本文)。通常,所述方法包括培养宿主细胞,所述宿主细胞含有编码AAV衣壳蛋白或其片段的核酸序列(例如,编码具有SEQ ID NO:1所示序列的多肽的核酸);功能性rep基因;包含AAV反向末端重复(ITR)和转基因的重组AAV载体;和足够的辅助功能,以允许将重组AAV载体包装成AAV衣壳蛋白。在一些实施方案中,衣壳蛋白是由AAV的cap基因编码的结构蛋白。在一些实施方案中,AAV包含三种衣壳蛋白,病粒蛋白1至3(命名为VP1、VP2和VP3),所有这些都可由单个cap基因表达。因此,在一些实施方案中,VP1、VP2和VP3蛋白共享共同的核心序列。在一些实施方案中,VP1、VP2和VP3的分子量分别为约87kDa、约72kDa和约62kDa。在一些实施方案中,翻译后,衣壳蛋白形成围绕病毒基因组的球形60-聚体蛋白壳。在一些实施方案中,蛋白壳主要由VP3衣壳蛋白组成。在一些实施方案中,衣壳蛋白的功能是保护病毒基因组、递送基因组和与宿主相互作用。在一些方面,衣壳蛋白以组织特异性方式将病毒基因组递送至宿主。在一些实施方案中,VP1和/或VP2衣壳蛋白可以有助于所包装的AAV的组织嗜性。在一些实施方案中,所包装的AAV的组织嗜性由VP3衣壳蛋白决定。在一些实施方案中,通过衣壳蛋白中发生的突变增强或改变AAV的组织

嗜性。

[0050] 在一些实施方案中,本文描述的AAV变体是AAV2的变体。已知AAV2有效地转导中枢神经系统(CNS)组织、肾脏组织、眼组织(例如,感光细胞和视网膜色素上皮(RPE))和其他组织。因此,在一些实施方案中,本文所述的AAV2变体可用于将基因疗法递送至CNS组织、肾脏组织或眼组织。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳蛋白可用于靶向其他组织,例如肌肉组织、肝组织或心脏组织。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳蛋白(例如,AAVv66衣壳蛋白)在静脉内或全身注射递送时能够穿过受试者的血脑屏障(BBB)。

[0051] 在一些方面,本文描述的AAV变体可用于治疗CNS相关病症。如本文所用,“CNS相关病症”是中枢神经系统的疾病或病况。CNS相关病症可影响脊髓(例如脊髓病)、脑(例如脑病)或脑和脊髓周围的组织。CNS相关病症可以是基因来源的,通过遗传或体细胞突变获得。CNS相关病症可以是心理病况或病症,例如注意力缺陷多动障碍、自闭症谱系障碍、情绪障碍、精神分裂症、抑郁症、雷特综合征等。CNS相关病症可以是自身免疫病症。CNS相关病症也可以是CNS的癌症,例如脑癌。CNS相关病症是癌症时可以是CNS的原发性癌症,例如星形细胞瘤、成胶质细胞瘤等,或者可以是转移至CNS组织的癌症,例如已经转移至脑的肺癌。CNS相关病症的其他非限制性实例包括帕金森氏病、溶酶体贮积病、缺血、神经性疼痛、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、多发性硬化症(MS)和Canavan病(CD)。

[0052] 在一些实施方案中,本文描述的AAV变体可靶向肝组织。因此,在一些实施方案中,本文描述的AAV变体可用于治疗肝病。如本文所用,“肝病”是肝的疾病或病况。肝病可以是基因来源的,通过遗传或体细胞突变获得。肝病可以是肝脏的癌症,包括但不限于肝细胞癌(HCC)、纤维板层癌、胆管癌、血管肉瘤和肝母细胞瘤。肝病的进一步非限制性实例包括Alagille综合征、Alpha 1抗胰蛋白酶缺乏症、自身免疫性肝炎、胆道闭锁、肝硬化、肝脏囊性疾病、脂肪肝病、半乳糖血症、胆结石、Gilbert综合征、血色素沉着症、妊娠肝病、新生儿肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、卟啉症、雷氏综合征、结节病、中毒性肝炎、1型糖原贮积病、酪氨酸血症、甲型病毒性肝炎、乙型病毒性肝炎、丙型病毒性肝炎、威尔逊病和血吸虫病。

[0053] 在一些实施方案中,本文所述的AAV变体可用于将基因治疗剂递送至眼组织(例如,眼的组织或细胞)。因此,在一些实施方案中,本文所述的AAV变体可用于治疗眼部病症。如本文所用,“眼部病症”是眼的疾病或病况。眼部疾病可能影响眼、巩膜、角膜、前房、后房、虹膜、瞳孔、晶状体、玻璃体液、视网膜或视神经。眼部病症可以是基因来源的,通过遗传或体细胞突变获得。眼部疾病和病症的非限制性实例包括但不限于:年龄相关性黄斑变性、视网膜病、糖尿病性视网膜病、黄斑水肿、青光眼、色素性视网膜炎和眼癌。

[0054] 在宿主细胞中培养以将rAAV载体包装在AAV衣壳中的组分可以反式提供给宿主细胞。或者,任何一种或多种所需组分(例如,重组AAV载体、rep序列、cap序列和/或辅助功能)可由稳定的宿主细胞提供,所述宿主细胞使用本领域技术人员已知的方法经工程化以含有一种或多种所需组分。最合适的是,这样的稳定的宿主细胞含有在诱导型启动子控制下的所需组分。但是,所需的组分可能处于组成型启动子的控制之下。在适合与转基因一起使用的调节元件的讨论中,本文提供了合适的诱导型和组成型启动子的实例。在另一个可选方案中,选定的稳定的宿主细胞可以含有在组成型启动子控制下的选定组分和在一种或多种诱导型启动子控制下的其他选定组分。例如,可以产生稳定的宿主细胞,其衍生自293细胞

(其含有在组成型启动子的控制下的E1辅助功能),但其含有在诱导型启动子控制下的rep和/或cap蛋白。本领域技术人员可以产生其他稳定的宿主细胞。

[0055] 可以使用任何合适的基因元件(载体)将产生本公开的rAAV所需的重组AAV载体、rep序列、cap序列和辅助功能递送至包装的宿主细胞。在一些实施方案中,编码所有三种衣壳蛋白(例如VP1、VP2和VP3)的单一核酸在单一载体中被递送到包装的宿主细胞中。在一些实施方案中,编码衣壳蛋白的核酸通过两种载体递送到包装的宿主细胞中;第一载体包含编码两种衣壳蛋白(例如VP1和VP2)的第一核酸,第二载体包含编码单一衣壳蛋白(例如VP3)的第二核酸。在一些实施方案中,将三种载体(每种载体包含编码不同衣壳蛋白的核酸)递送至包装的宿主细胞。所选择的基因元件可以通过任何合适的方法包括本文所述的那些进行递送。用于构建本公开的任何实施方案的方法是核酸操作领域技术人员已知的,包括基因工程、重组工程和合成技术。参见,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.。类似地,产生rAAV毒粒的方法是公知的,并且合适方法的选择不是对本公开的限制。参见,例如,K.Fisher等人,J.Virol.,70:520-532(1993)和美国专利号5,478,745。

[0056] 在一些实施方案中,重组AAV可以使用三重转染方法(在美国专利号6,001,650中详细描述)产生。通常,重组AAV通过用待包装成AAV颗粒的重组AAV载体(包含转基因)、AAV辅助功能载体和附属功能载体转染宿主细胞来产生。AAV辅助功能载体编码“AAV辅助功能”序列(例如rep和cap),其反式起作用以进行高效的AAV复制和衣壳化。优选地,AAV辅助功能载体支持有效的AAV载体产生,而不产生任何可检测的野生型AAV毒粒(例如含有功能性rep和cap基因的AAV毒粒)。适用于本公开的载体的非限制性实例包括描述于美国专利号6,001,650中的pHLP19和描述于美国专利号6,156,303中的pRep6cap6载体,其全部内容通过引用并入本文。附属功能载体编码AAV依赖于其进行复制的非AAV衍生的病毒和/或细胞功能(例如“附属功能”)的核苷酸序列。附属功能包括AAV复制所需的那些功能,包括但不限于参与AAV基因转录激活、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物的合成和AAV衣壳组装的那些实体。基于病毒的附属功能可以衍生自任何已知的辅助病毒,例如腺病毒、疱疹病毒(除了单纯疱疹病毒1型以外)和痘苗病毒。

[0057] 在一些方面,本公开提供了转染的宿主细胞。术语“转染”用于指细胞对外源DNA的摄取,当外源DNA被引入细胞内(例如跨细胞膜)时,细胞已被“转染”。许多转染技术通常是本领域已知的。参见,例如,Graham等人(1973)Virology,52:456;Sambrook等人(1989)Molecular Cloning,a laboratory manual,Cold Spring Harbor Laboratories,New York;Davis等人(1986)Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier;和Chu等人(1981)Gene 13:197。此类技术可用于将一种或多种外源核酸(例如核苷酸整合载体和其他核酸分子)引入合适的宿主细胞中。

[0058] “宿主细胞”是指任何携带或能够携带感兴趣的物质的细胞。宿主细胞通常是哺乳动物细胞。宿主细胞可以用作AAV辅助构建体、AAV迷你基因质粒、附属功能载体或与重组AAV的产生相关的其他转移DNA的接受者。该术语包括已经被转染的原始细胞的后代。因此,本文所用的“宿主细胞”可以指已经用外源DNA序列转染的细胞。应当理解,由于天然的、偶然的或有意的突变,单个亲本细胞的后代在形态学上或在基因组或总DNA补充物方面可能不一定与原始亲本完全相同。

[0059] 如本文所用,术语“细胞系”是指能够在体外连续或持久生长和分裂的细胞群体。通常,细胞系是源自单个祖细胞的克隆群体。本领域还已知,在此类克隆群体的储存或转移期间,核型可发生自发或诱导的变化。因此,来自所称细胞系的细胞可能与祖先细胞或培养物不完全相同,并且所称细胞系包括此类变体。

[0060] 如本文所用,术语“重组细胞”是指已经引入了外源DNA片段(例如导致生物活性多肽转录或生物活性核酸如RNA产生的DNA片段)的细胞。

[0061] 也可以用向AAV提供辅助功能的载体(例如,辅助载体)转染细胞。提供辅助功能的载体可提供腺病毒功能,包括例如E1a、E1b、E2a和E4ORF6。提供这些功能的腺病毒基因的序列可以从任何已知的腺病毒血清型获得,例如血清型2、3、4、7、12和40,并且进一步包括本领域已知的任何目前鉴定的人血清型。因此,在一些实施方案中,所述方法包括用表达AAV复制、AAV基因转录和/或AAV包装所必需的一个或多个基因的载体转染细胞。

[0062] 如本文所用,术语“载体”包括在与适当的控制元件结合时能够复制并且能够在细胞之间转移基因序列的任何基因元件,例如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、人工染色体、病毒、毒粒等。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及病毒载体。在一些实施方案中,有用的载体包括待转录的核酸片段(例如核酸序列)位于启动子的转录控制下的那些载体。“启动子”是指由启动基因特异性转录所需的细胞合成机制或引入的合成机制所识别的DNA序列。短语“有效定位”、“在控制下”或“在转录控制下”意指启动子相对于核酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的起始和基因的表达。术语“表达载体或构建体”意指含有核酸的任何类型的基因构建体,其中的部分或全部核酸编码序列能够被转录。在一些实施方案中,表达包括核酸的转录,例如,以从转录的基因产生生物活性的多肽产物或抑制性RNA(例如shRNA、miRNA、miRNA抑制物)。

[0063] 在一些实施方案中,启动子是巨细胞病毒早期增强子/鸡β肌动蛋白(CB6)启动子。

[0064] 在一些情况下,分离的衣壳基因能够使用本领域公知的方法用于构建和包装重组AAV,以确定与该基因编码的衣壳蛋白相关的功能特征。例如,分离的衣壳基因能够用于构建和包装包含报告基因(例如,B-半乳糖苷酶、GFP、萤光素酶等)的重组AAV(rAAV)。然后能够将rAAV递送至动物(例如,小鼠),并且能够通过检查报告基因在动物的各种组织(例如,心脏、肝脏、肾脏)中的表达,确定新的分离的衣壳基因的组织靶向性质。本文公开了表征新的分离的衣壳基因的其他方法,还有其他方法是本领域公知的。

[0065] 用于将重组载体包装在所需AAV衣壳中以产生本公开的rAAV的前述方法不意味着是一种限制,并且其他合适的方法对于技术人员将是显而易见的。

[0066] 重组AAV载体

[0067] 本公开的“重组AAV(rAAV)载体”通常至少包含转基因及其调节序列和5'和3' AAV反向末端重复(ITR)。这种重组AAV载体包装到衣壳蛋白中并递送至选定的靶细胞。在一些实施方案中,转基因是与载体序列异源的核酸序列,其编码感兴趣的多肽、蛋白、功能性RNA分子(例如,miRNA、miRNA抑制物)或其他基因产物。核酸编码序列以允许转基因在靶组织的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与调节组分有效连接。

[0068] 载体的AAV序列通常包含顺式作用的5'和3'反向末端重复序列(参见,例如,B.J.Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P.Tijsser, CRC Press, pp.155-168 (1990))。ITR序列的长度为约145bp。优选地,基本上编码ITR的整个序列用于分子中,尽管

这些序列的某种程度的微小修饰是允许的。修饰这些ITR序列的能力在本领域技术范围内。(参见,例如“Molecular Cloning.A Laboratory Manual”,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York (1989);和K.Fisher等人,J Virol.,70:520-532 (1996)的文本)。用于本公开的这样的分子的实例是含有转基因的“顺式作用”质粒,在该质粒中所选择的转基因序列和相关的调节元件侧翼是5'和3' AAV ITR序列。AAV ITR序列可以从任何已知的AAV获得,包括目前鉴定的哺乳动物AAV类型。

[0069] 在一些实施方案中,本公开提供了自身互补的AAV载体。如本文所用,术语“自身互补的AAV载体”(scAAV)是指含有双链载体基因组的载体,这是由于AAV的ITR中的一个ITR没有末端解链位点(terminal resolution site,TR)而产生的。TR的不存在阻止了在不存在TR的载体末端的复制起始。通常,scAAV载体产生单链反向重复基因组,其中每个末端都具有野生型(wt) AAV TR,且中间具有突变TR(mTR)。

[0070] 在一些实施方案中,本公开的rAAV是假型化的rAAV。假型化是产生与外源病毒包膜蛋白组合的病毒或病毒载体的过程。结果是假型化的病毒颗粒。使用该方法,外源病毒包膜蛋白能够用于改变宿主嗜性或增加/降低的病毒颗粒稳定性。在一些方面,假型化的rAAV包含来自两种或更多种不同AAV的核酸,其中来自一种AAV的核酸编码衣壳蛋白,并且至少一种其他AAV的核酸编码其他病毒蛋白和/或病毒基因组。在一些实施方案中,假型化的rAAV是指包含一种AAV血清型的反向末端重复(ITR)和不同AAV血清型的衣壳蛋白的AAV。例如,含有用Y的蛋白包裹的血清型X的ITR的假型化的AAV载体将被命名为AAVX/Y(例如,AAV2/1具有AAV2的ITR和AAV1的衣壳)。在一些实施方案中,假型化的rAAV可用于组合来自一种AAV血清型的衣壳蛋白的组织特异性靶向能力与来自另一种AAV血清型的病毒DNA,从而允许将转基因靶向递送至靶组织。

[0071] 除了上文鉴定的重组AAV载体的主要元件外,载体还包括常规的必要控制元件,其以允许转基因在用质粒载体转染或感染本公开产生的病毒的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与转基因有效连接。如本文所用,“有效连接”的序列包括与感兴趣的基因邻接的表达控制序列和以反式或远距离起作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列。

[0072] 表达控制序列包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,如剪接和聚腺苷酸化(polyA)信号;稳定细胞质mRNA的序列;提高翻译效率的序列(例如Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;和当需要时,增强所编码产物的分泌的序列。大量表达控制序列,包括天然的、组成型的、诱导型的和/或组织特异性的启动子,是本领域已知的并且可以被使用。

[0073] 如本文所用,当核酸序列(例如,编码序列)和调节序列以使得核酸序列的表达或转录在调节序列的影响或控制下的方式共价连接时,称它们是“有效”连接的。如果希望将核酸序列翻译成功能蛋白,则如果5'调节序列中的启动子的诱导导致编码序列的转录以及如果所述两个DNA序列之间的连接性质不会(1)导致引入移码突变,(2)干扰启动子区域指导编码序列转录的能力,或(3)干扰将相应的RNA转录物翻译成蛋白的能力,则认为两个DNA序列是有效连接的。因此,如果启动子区能够影响该DNA序列的转录,使得所得转录物可以被翻译成所需的蛋白或多肽,则启动子区域将是与核酸序列有效连接的。类似地,当两个或更多个编码区以它们从共同启动子的转录导致两种或更多种蛋白的表达已在框内翻译的方式连接时,它们是有效连接的。在一些实施方案中,有效连接的编码序列产生融合蛋白。

在一些实施方案中,有效连接的编码序列产生功能RNA(例如,shRNA、miRNA、miRNA抑制物)。

[0074] 对于编码蛋白的核酸,通常在转基因序列之后和3' AAV ITR序列之前插入多腺苷酸化序列。可用于本公开的rAAV构建体还可含有内含子,理想地位于启动子/增强子序列和转基因之间。一种可能的内含子序列源自SV-40,并且被称为SV-40T内含子序列。可以使用的另一种载体元件是内部核糖体进入位点(IRES)。IRES序列用于从单个基因转录物产生多于一种多肽。IRES序列可用于产生含有多于一条多肽链的蛋白。这些和其他常见载体元件的选择是常规的,并且许多这样的序列是可用的[参见例如Sambrook等,以及其中引用的参考文献,例如,第3.18 3.26和16.17 16.27页和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, 1989]。在一些实施方案中,口蹄疫病毒2A序列包含在多蛋白中;这是一种小肽(长度为约18个氨基酸),已被证明可介导多蛋白的裂解(Ryan, M D等人,EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M等人, J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S等人, Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; 和Halpin, C等人, The Plant Journal, 1999; 4: 453-459)。先前已在包括质粒和基因治疗载体(AAV和逆转录病毒)的人工系统中证明了2A序列的切割活性(Ryan, M D等人, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M等人, J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S等人, Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; 和Halpin, C等人, The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P等人, Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P等人, Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; 和Klump, H等人, Gene Therapy, 2001; 8: 811-817)。

[0075] 宿主细胞中基因表达所需的调节序列的确切性质可能因物种、组织或细胞类型而异,但一般来说(如所需要的)应包括分别涉及转录和翻译的起始的5'非转录序列和5'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列、增强子元件等。特别地,此类5'非转录调节序列将包括启动子区,其包括用于有效连接基因的转录控制的启动子序列。调节序列还可以根据需要包括增强子序列或上游激活子序列。本公开的载体可任选地包括5'前导序列或信号序列。适当载体的选择和设计在本领域普通技术人员的能力和自由裁量权范围内。

[0076] 组成型启动子的实例包括但不限于逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(RSV) LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地具有CMV增强子)[参见,例如Boshart等人, Cell, 41: 521-530 (1985)]、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1 α 启动子[Invitrogen]。

[0077] 诱导型启动子允许调控基因表达,并且可以通过外源提供的化合物、环境因素例如温度或特定生理状态(如急性期、细胞的特定分化状态或仅在正在复制的细胞中)的存在来调控。诱导型启动子和诱导型系统可从各种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。许多其他系统也已有描述,并且本领域技术人员可以容易地进行选择。由外源提供的启动子调控的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351 (1996));四环素阻遏系统(Gossen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992));四环素诱导系统(Gossen等人, Science, 268: 1766-1769 (1995)),另参见Harvey等人, Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518 (1998)、RU486诱导系统(Wang等人, Nat. Biotech., 15: 239-243 (1997)和Wang等人, Gene Ther., 4: 432-441 (1997))和雷帕霉素诱导系统(Magari

等人, *J.Clin.Invest.*, 100:2865-2872 (1997))。可用于本文中的其他类型的诱导型启动子是那些受特定生理状态调控的启动子, 所述生理状态例如温度、急性期、细胞的特定分化状态、或仅在正在复制的细胞中。

[0078] 在另一个实施方案中, 使用转基因的天然启动子。当希望转基因的表达模拟天然表达时, 天然启动子可是优选的。当转基因的表达必须在时间上或发育上调控, 或以组织特异性方式调控, 或响应特定转录刺激而调控时, 可以使用天然启动子。在另一个实施方案中, 其他天然表达控制元件, 例如增强子元件、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列也可用于模拟天然表达。

[0079] 在一些实施方案中, 调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下, 组织特异性调节序列结合组织特异性转录因子, 其以组织特异性方式诱导转录。此类组织特异性调节序列(例如, 启动子、增强子等)是本领域公知的。示例性组织特异性调控序列包括但不限于以下组织特异性启动子: 肝特异性甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、胰岛素启动子、胰高血糖素启动子、生长抑素启动子、胰多肽(PPY)启动子、突触蛋白-1(Syn)启动子、肌酸激酶(MCK)启动子、哺乳动物结蛋白(DES)启动子、 α -肌球蛋白重链(α -MHC)启动子、胃肠特异性粘蛋白-2启动子、眼特异性视网膜激素启动子、眼特异性K12启动子、呼吸组织特异性CC10启动子、呼吸组织特异性表面活性蛋白C(SP-C)启动子、乳腺组织特异性PRC1启动子、乳腺组织特异性RRM2启动子、泌尿道组织特异性uroplakin 2(UPII)启动子、子宫组织特异性乳铁蛋白启动子或心肌肌钙蛋白T(cTnT)启动子。其他示例性启动子包括 β -肌动蛋白启动子、乙型肝炎病毒核心启动子, Sandig等人, *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996); 甲胎蛋白(AFP)启动子, Arbuthnot等人, *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996), 骨钙素启动子(Stein等人, *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)); 骨唾液蛋白启动子(Chen等人, *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)), CD2启动子(Hansal等人, *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); 免疫球蛋白重链启动子; T细胞受体 α -链启动子, 神经元如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), 神经细丝轻链基因启动子(Piccioli等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991))和神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等人, *Neuron*, 15:373-84 (1995)), 等等, 这些对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0080] 在一些实施方案中, 组织特异性调节序列是CNS特异性启动子。CNS特异性启动子的实例包括但不限于神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993))、神经丝轻链基因启动子(Piccioli等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), 以及神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等人, *Neuron*, 15:373-84 (1995))。在一些实施方案中, CNS特异性启动子是星形胶质细胞特异性启动子, 例如胶质原纤维酸性蛋白启动子。在一些实施方案中, CNS特异性启动子是神经元启动子, 例如突触蛋白(Syn)启动子。在一些实施方案中, CNS特异性启动子是选自以下的基因的启动子: 神经元核(NeuN)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、腺瘤性结肠息肉(APC)和离子化钙结合蛋白分子1(Iba-1)。在一些实施方案中, CNS特异性启动子如在Kugler S. (2016) *Tissue-Specific Promoters in the CNS*. In: Manfredsson F. (eds) *Gene Therapy for Neurological Disorders. Methods in Molecular Biology*, vol 1382. Humana Press, New York, NY中描述。

[0081] 在一些实施方案中,将一种或多种miRNA的一个或多个结合位点并入rAAV载体的转基因中,以抑制转基因在携带该转基因的受试者的一种或多种组织中的表达(例如,以细胞类型特异性方式使转基因的表达去靶向)。本领域技术人员理解,可以选择结合位点来以组织特异性方式控制转基因的表达。例如,可以将肝特异性miR-122的结合位点并入转基因中以抑制该转基因在肝脏中的表达。mRNA中的靶位点可以在5'UTR、3'UTR或编码区中。通常,靶位点位于mRNA的3'UTR中。此外,可设计转基因使得多个miRNA通过识别相同或多个位点来调控mRNA。多个miRNA结合位点的存在可导致多个RISC的协同作用并提供高效的表达抑制。靶位点序列可包含总共5-100、10-60个或更多个核苷酸。靶位点序列可包含靶基因结合位点的序列的至少5个核苷酸。

[0082] 在一些实施方案中,转基因包含一个或多个(例如,1、2、3、4、5或更多个)miRNA结合位点,其使转基因表达从免疫细胞(例如,抗原呈递细胞(APC)、如巨噬细胞、树突细胞等)去靶向。免疫相关miRNA的miRNA结合位点的并入可以使转基因表达从抗原呈递细胞去靶向,从而减少或消除受试者中针对转基因产物产生的免疫应答(细胞和/或体液),例如如US 2018/0066279中所述,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,免疫相关miRNA选自:miR-15a、miR-16-1、miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-19b-1、miR-20a、miR-21、miR-29a/b/c、miR-30b、miR-31、miR-34a、miR-92a-1、miR-106a、miR-125a/b、miR-142-3p、miR-146a、miR-150、miR-155、miR-181a、miR-223和miR-424、miR-221、miR-222、let-7i、miR-148和miR-152。

[0083] rAAV载体的转基因序列的组成将取决于所得载体的用途。例如,一种类型的转基因序列包括报告序列,其在表达时产生可检测的信号。在另一个实例中,转基因编码治疗性蛋白或治疗性功能RNA。在另一个实例中,转基因编码旨在用于研究目的蛋白或功能性RNA,所述研究目的例如创建含有转基因的体细胞转基因动物模型,例如研究转基因产物的功能。在另一个实例中,转基因编码旨在用于创建疾病的动物模型的蛋白或功能性RNA。合适的转基因编码序列对技术人员来说将是显而易见的。

[0084] 可以在转基因中提供的报告序列包括但不限于编码 β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、萤光素酶的DNA序列和本领域公知的其他那些。当与驱动其表达的调节元件相结合时,报告序列提供的信号可通过常规手段检测,包括酶、射线照相、比色、荧光或其他光谱测定、荧光激活细胞分选测定和免疫测定,包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫分析(RIA)和免疫组化。例如,在标记序列是LacZ基因的情况下,通过对 β -半乳糖苷酶活性的测定来检测携带信号的载体的存在。在转基因是绿色荧光蛋白或萤光素酶的情况下,携带信号的载体可以通过发光计中的产生的颜色或光来目测测量。例如,此类报告分子可用于验证rAAV的组织特异性靶向能力和组织特异性启动子调节活性。

[0085] 在一些方面,本公开提供了rAAV载体,用于预防或治疗哺乳动物的一种或多种基因缺陷或功能障碍的方法,例如哺乳动物中的多肽缺乏或多肽过量,尤其是用于治疗或减少表现出与细胞和组织中此类多肽缺乏有关的一种或多种病症的人体内缺乏的严重程度或程度。所述方法包括以足以治疗患有这样的病症的受试者中的缺乏或病症的量和时间向受试者施用药学上可接受的载体中的编码一种或多种治疗性肽、多肽、siRNA、微小RNA、反义核苷酸等的rAAV载体。

[0086] 因此,本公开包括编码一种或多种肽、多肽或蛋白的rAAV载体的递送,其可用于治疗或预防哺乳动物受试者的疾病状态。示例性治疗性蛋白包括选自以下的一种或多种多肽:生长因子、白细胞介素、干扰素、抗凋亡因子、细胞因子、抗糖尿病因子、抗凋亡剂、凝血因子、抗肿瘤因子。治疗性蛋白的其他非限制性实例包括BDNF、CNTF、CSF、EGF、FGF、G-SCF、GM-CSF、促性腺激素、IFN、IFG-1、M-CSF、NGF、PDGF、PEDF、TGF、VEGF、TGF-B2、TNF、催乳素、促生长素、XIAP1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-10(187A)、病毒IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17和IL-18。

[0087] rAAV载体可包含待转移至受试者的基因,以治疗与所述基因的表达降低、缺乏表达或功能障碍相关的疾病。在一些实施方案中,rAAV载体用于治疗与中枢神经系统相关的疾病。示例性基因和相关疾病状态包括但不限于:葡萄糖-6-磷酸酶,与1A型糖原贮积缺乏相关;磷酸烯醇丙酮酸-羧激酶,与Pepck缺乏有关;半乳糖-1磷酸尿苷酰转移酶,与半乳糖血症有关;苯丙氨酸羟化酶,与苯丙酮尿症有关;支链 α -酮酸脱氢酶,与枫糖尿病有关;富马酰乙酰乙酸水解酶,与1型酪氨酸血症有关;甲基丙二酰辅酶A变位酶,与甲基丙二酸血症有关;中链酰基辅酶A脱氢酶,与中链乙酰辅酶A缺乏有关;正鸟氨酸氨甲酰转移酶,与正鸟氨酸氨甲酰转移酶缺陷有关;精氨基琥珀酸合成酶,与瓜氨酸血症有关;低密度脂蛋白受体蛋白,与家族性高胆固醇血症有关;UDP-葡萄糖醛酸基转移酶(glucouronosyltransferase),与克里格勒-纳贾尔病有关;腺苷脱氨酶,与严重联合免疫缺陷病有关;次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶,与痛风和莱施-奈恩综合征有关;生物素酶,与生物素酶缺乏有关; β -葡萄糖脑苷脂酶,与戈谢病有关; β -葡萄糖醛酸酶,与Sly综合征有关;过氧化物酶体膜蛋白70kDa,与泽尔韦格综合征有关;胆色素原脱氢酶,与急性间歇性卟啉症有关; α -1抗胰蛋白酶,用于治疗 α -1抗胰蛋白酶缺乏症(肺气肿);促红细胞生成素,用于治疗地中海贫血或肾衰竭引起的贫血;血管内皮生长因子、血管生成素-1和成纤维细胞生长因子,用于治疗缺血性疾病;血栓调节蛋白和组织因子途径抑制剂,用于治疗闭塞血管,例如动脉粥样硬化、血栓形成或栓塞所见的闭塞血管;芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)和酪氨酸羟化酶(TH),用于治疗帕金森病; β 肾上腺素能受体,受磷蛋白(反义或突变形式),肌浆内质网腺苷三磷酸酶-2(SERCA2),以及心脏腺苷酸环化酶,用于治疗充血性心力衰竭;p53等肿瘤抑制剂基因,用于治疗各种癌症;细胞因子,例如各种白细胞介素之一,用于治疗炎症和免疫病症和癌症;肌营养不良蛋白(dystrophin)或微小肌营养不良蛋白和肌营养相关蛋白(utrophin)或微小肌营养相关蛋白,用于治疗肌营养不良症;和,胰岛素,用于治疗糖尿病。

[0088] 本领域技术人员还将认识到,在编码蛋白或多肽的转基因的情况下,可以在转基因中产生导致保守氨基酸取代的突变,以提供功能等同的变体或蛋白或多肽的同源物。在一些方面,本公开包括导致转基因的保守氨基酸取代的序列改变。在一些实施方案中,转基因包含具有显性负突变的基因。例如,转基因可以表达与野生型蛋白相同元件相互作用的突变蛋白,从而阻断野生型蛋白功能的某些方面。

[0089] 有用的转基因产物还包括miRNA。miRNA和其他小干扰核酸通过靶RNA转录物切割/降解或靶信使RNA(mRNA)的翻译阻抑来调控基因表达。通常,miRNA天然表达为最终的19-25个非翻译RNA产物。miRNA通过与靶mRNA的3'非翻译区(UTR)的序列特异性相互作用显示其活性。这些内源表达的miRNA形成发夹前体,其随后加工成miRNA双链体,并进一步加工成“成熟的”单链miRNA分子。该成熟miRNA指导多蛋白复合物miRISC,其基于它们与成熟miRNA

的互补性识别靶mRNA的靶位点,例如在3'UTR区中。

[0090] 在所述方法的某些实施方案中,以下非限制性的miRNA基因列表及其同源物可用作转基因或作为转基因编码的小干扰核酸的靶标(例如,miRNA海绵、反义寡核苷酸,TuDRNA):hsa-let-7a、hsa-let-7a*、hsa-let-7b、hsa-let-7b*、hsa-let-7c、hsa-let-7c*、hsa-let-7d、hsa-let-7d*、hsa-let-7e、hsa-let-7e*、hsa-let-7f、hsa-let-7f-1*、hsa-let-7f-2*、hsa-let-7g、hsa-let-7g*、hsa-let-7i、hsa-let-7i*、hsa-miR-1、hsa-miR-100、hsa-miR-100*、hsa-miR-101、hsa-miR-101*、hsa-miR-103、hsa-miR-105、hsa-miR-105*、hsa-miR-106a、hsa-miR-106a*、hsa-miR-106b、hsa-miR-106b*、hsa-miR-107、hsa-miR-10a、hsa-miR-10a*、hsa-miR-10b、hsa-miR-10b*、hsa-miR-1178、hsa-miR-1179、hsa-miR-1180、hsa-miR-1181、hsa-miR-1182、hsa-miR-1183、hsa-miR-1184、hsa-miR-1185、hsa-miR-1197、hsa-miR-1200、hsa-miR-1201、hsa-miR-1202、hsa-miR-1203、hsa-miR-1204、hsa-miR-1205、hsa-miR-1206、hsa-miR-1207-3p、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1208、hsa-miR-122、hsa-miR-122*、hsa-miR-1224-3p、hsa-miR-1224-5p、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-1226、hsa-miR-1226*、hsa-miR-1227、hsa-miR-1228、hsa-miR-1228*、hsa-miR-1229、hsa-miR-1231、hsa-miR-1233、hsa-miR-1234、hsa-miR-1236、hsa-miR-1237、hsa-miR-1238、hsa-miR-124、hsa-miR-124*、hsa-miR-1243、hsa-miR-1244、hsa-miR-1245、hsa-miR-1246、hsa-miR-1247、hsa-miR-1248、hsa-miR-1249、hsa-miR-1250、hsa-miR-1251、hsa-miR-1252、hsa-miR-1253、hsa-miR-1254、hsa-miR-1255a、hsa-miR-1255b、hsa-miR-1256、hsa-miR-1257、hsa-miR-1258、hsa-miR-1259、hsa-miR-125a-3p、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-125b、hsa-miR-125b-1*、hsa-miR-125b-2*、hsa-miR-126、hsa-miR-126*、hsa-miR-1260、hsa-miR-1261、hsa-miR-1262、hsa-miR-1263、hsa-miR-1264、hsa-miR-1265、hsa-miR-1266、hsa-miR-1267、hsa-miR-1268、hsa-miR-1269、hsa-miR-1270、hsa-miR-1271、hsa-miR-1272、hsa-miR-1273、hsa-miR-127-3p、hsa-miR-1274a、hsa-miR-1274b、hsa-miR-1275、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-1276、hsa-miR-1277、hsa-miR-1278、hsa-miR-1279、hsa-miR-128、hsa-miR-1280、hsa-miR-1281、hsa-miR-1282、hsa-miR-1283、hsa-miR-1284、hsa-miR-1285、hsa-miR-1286、hsa-miR-1287、hsa-miR-1288、hsa-miR-1289、hsa-miR-129*、hsa-miR-1290、hsa-miR-1291、hsa-miR-1292、hsa-miR-1293、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-1294、hsa-miR-1295、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-1296、hsa-miR-1297、hsa-miR-1298、hsa-miR-1299、hsa-miR-1300、hsa-miR-1301、hsa-miR-1302、hsa-miR-1303、hsa-miR-1304、hsa-miR-1305、hsa-miR-1306、hsa-miR-1307、hsa-miR-1308、hsa-miR-130a、hsa-miR-130a*、hsa-miR-130b、hsa-miR-130b*、hsa-miR-132、hsa-miR-132*、hsa-miR-1321、hsa-miR-1322、hsa-miR-1323、hsa-miR-1324、hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-134、hsa-miR-135a、hsa-miR-135a*、hsa-miR-135b、hsa-miR-135b*、hsa-miR-136、hsa-miR-136*、hsa-miR-137、hsa-miR-138、hsa-miR-138-1*、hsa-miR-138-2*、hsa-miR-139-3p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141、hsa-miR-141*、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-143、hsa-miR-143*、hsa-miR-144、hsa-miR-144*、hsa-miR-145、hsa-miR-145*、hsa-miR-146a、hsa-miR-146a*、hsa-miR-146b-3p、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-147、hsa-miR-147b、hsa-miR-148a、hsa-miR-148a*、hsa-miR-148b、hsa-miR-148b*、hsa-miR-149、hsa-miR-149*、hsa-miR-150、hsa-miR-150*、

hsa-miR-151-3p,hsa-miR-151-5p,hsa-miR-152,hsa-miR-153,hsa-miR-154,hsa-miR-154*,hsa-miR-155,hsa-miR-155*,hsa-miR-15a,hsa-miR-15a*,hsa-miR-15b,hsa-miR-15b*,hsa-miR-16,hsa-miR-16-1*,hsa-miR-16-2*,hsa-miR-17,hsa-miR-17*,hsa-miR-181a,hsa-miR-181a*,hsa-miR-181a-2*,hsa-miR-181b,hsa-miR-181c,hsa-miR-181c*,hsa-miR-181d,hsa-miR-182,hsa-miR-182*,hsa-miR-1825,hsa-miR-1826,hsa-miR-1827,hsa-miR-183,hsa-miR-183*,hsa-miR-184,hsa-miR-185,hsa-miR-185*,hsa-miR-186,hsa-miR-186*,hsa-miR-187,hsa-miR-187*,hsa-miR-188-3p,hsa-miR-188-5p,hsa-miR-18a,hsa-miR-18a*,hsa-miR-18b,hsa-miR-18b*,hsa-miR-190,hsa-miR-190b,hsa-miR-191,hsa-miR-191*,hsa-miR-192,hsa-miR-192*,hsa-miR-193a-3p,hsa-miR-193a-5p,hsa-miR-193b,hsa-miR-193b*,hsa-miR-194,hsa-miR-194*,hsa-miR-195,hsa-miR-195*,hsa-miR-196a,hsa-miR-196a*,hsa-miR-196b,hsa-miR-197,hsa-miR-198,hsa-miR-199a-3p,hsa-miR-199a-5p,hsa-miR-199b-5p,hsa-miR-19a,hsa-miR-19a*,hsa-miR-19b,hsa-miR-19b-1*,hsa-miR-19b-2*,hsa-miR-200a,hsa-miR-200a*,hsa-miR-200b,hsa-miR-200b*,hsa-miR-200c,hsa-miR-200c*,hsa-miR-202,hsa-miR-202*,hsa-miR-203,hsa-miR-204,hsa-miR-205,hsa-miR-206,hsa-miR-208a,hsa-miR-208b,hsa-miR-20a,hsa-miR-20a*,hsa-miR-20b,hsa-miR-20b*,hsa-miR-21,hsa-miR-21*,hsa-miR-210,hsa-miR-211,hsa-miR-212,hsa-miR-214,hsa-miR-214*,hsa-miR-215,hsa-miR-216a,hsa-miR-216b,hsa-miR-217,hsa-miR-218,hsa-miR-218-1*,hsa-miR-218-2*,hsa-miR-219-1-3p,hsa-miR-219-2-3p,hsa-miR-219-5p,hsa-miR-22,hsa-miR-22*,hsa-miR-220a,hsa-miR-220b,hsa-miR-220c,hsa-miR-221,hsa-miR-221*,hsa-miR-222,hsa-miR-222*,hsa-miR-223,hsa-miR-223*,hsa-miR-224,hsa-miR-23a,hsa-miR-23a*,hsa-miR-23b,hsa-miR-23b*,hsa-miR-24,hsa-miR-24-1*,hsa-miR-24-2*,hsa-miR-25,hsa-miR-25*,hsa-miR-26a,hsa-miR-26a-1*,hsa-miR-26a-2*,hsa-miR-26b,hsa-miR-26b*,hsa-miR-27a,hsa-miR-27a*,hsa-miR-27b,hsa-miR-27b*,hsa-miR-28-3p,hsa-miR-28-5p,hsa-miR-296-3p,hsa-miR-296-5p,hsa-miR-297,hsa-miR-298,hsa-miR-299-3p,hsa-miR-299-5p,hsa-miR-29a,hsa-miR-29a*,hsa-miR-29b,hsa-miR-29b-1*,hsa-miR-29b-2*,hsa-miR-29c,hsa-miR-29c*,hsa-miR-300,hsa-miR-301a,hsa-miR-301b,hsa-miR-302a,hsa-miR-302a*,hsa-miR-302b,hsa-miR-302b*,hsa-miR-302c,hsa-miR-302c*,hsa-miR-302d,hsa-miR-302d*,hsa-miR-302e,hsa-miR-302f,hsa-miR-30a,hsa-miR-30a*,hsa-miR-30b,hsa-miR-30b*,hsa-miR-30c,hsa-miR-30c-1*,hsa-miR-30c-2*,hsa-miR-30d,hsa-miR-30d*,hsa-miR-30e,hsa-miR-30e*,hsa-miR-31,hsa-miR-31*,hsa-miR-32,hsa-miR-32*,hsa-miR-320a,hsa-miR-320b,hsa-miR-320c,hsa-miR-320d,hsa-miR-323-3p,hsa-miR-323-5p,hsa-miR-324-3p,hsa-miR-324-5p,hsa-miR-325,hsa-miR-326,hsa-miR-328,hsa-miR-329,hsa-miR-330-3p,hsa-miR-330-5p,hsa-miR-331-3p,hsa-miR-331-5p,hsa-miR-335,hsa-miR-335*,hsa-miR-337-3p,hsa-miR-337-5p,hsa-miR-338-3p,hsa-miR-338-5p,hsa-miR-339-3p,hsa-miR-339-5p,hsa-miR-33a,hsa-miR-33a*,hsa-miR-33b,hsa-miR-33b*,hsa-miR-340,hsa-miR-340*,hsa-miR-342-3p,hsa-miR-342-5p,hsa-miR-345,hsa-miR-346,hsa-miR-34a,hsa-miR-34a*,hsa-miR-34b,hsa-miR-34b*,hsa-miR-34c-3p,hsa-miR-34c-5p,hsa-miR-361-3p,hsa-miR-361-5p,hsa-miR-362-3p,hsa-miR-362-5p,hsa-miR-

363、hsa-miR-363*、hsa-miR-365、hsa-miR-367、hsa-miR-367*、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-369-5p、hsa-miR-370、hsa-miR-371-3p、hsa-miR-371-5p、hsa-miR-372、hsa-miR-373、hsa-miR-373*、hsa-miR-374a、hsa-miR-374a*、hsa-miR-374b、hsa-miR-374b*、hsa-miR-375、hsa-miR-376a、hsa-miR-376a*、hsa-miR-376b、hsa-miR-376c、hsa-miR-377、hsa-miR-377*、hsa-miR-378、hsa-miR-378*、hsa-miR-379、hsa-miR-379*、hsa-miR-380、hsa-miR-380*、hsa-miR-381、hsa-miR-382、hsa-miR-383、hsa-miR-384、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-409-5p、hsa-miR-410、hsa-miR-411、hsa-miR-411*、hsa-miR-412、hsa-miR-421、hsa-miR-422a、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-424、hsa-miR-424*、hsa-miR-425、hsa-miR-425*、hsa-miR-429、hsa-miR-431、hsa-miR-431*、hsa-miR-432、hsa-miR-432*、hsa-miR-433、hsa-miR-448、hsa-miR-449a、hsa-miR-449b、hsa-miR-450a、hsa-miR-450b-3p、hsa-miR-450b-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-452、hsa-miR-452*、hsa-miR-453、hsa-miR-454、hsa-miR-454*、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-455-5p、hsa-miR-483-3p、hsa-miR-483-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-485-3p、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-486-3p、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-487a、hsa-miR-487b、hsa-miR-488、hsa-miR-488*、hsa-miR-489、hsa-miR-490-3p、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-491-3p、hsa-miR-491-5p、hsa-miR-492、hsa-miR-493、hsa-miR-493*、hsa-miR-494、hsa-miR-495、hsa-miR-496、hsa-miR-497、hsa-miR-497*、hsa-miR-498、hsa-miR-499-3p、hsa-miR-499-5p、hsa-miR-500、hsa-miR-500*、hsa-miR-501-3p、hsa-miR-501-5p、hsa-miR-502-3p、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-503、hsa-miR-504、hsa-miR-505、hsa-miR-505*、hsa-miR-506、hsa-miR-507、hsa-miR-508-3p、hsa-miR-508-5p、hsa-miR-509-3-5p、hsa-miR-509-3p、hsa-miR-509-5p、hsa-miR-510、hsa-miR-511、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-512-5p、hsa-miR-513a-3p、hsa-miR-513a-5p、hsa-miR-513b、hsa-miR-513c、hsa-miR-514、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-516a-3p、hsa-miR-516a-5p、hsa-miR-516b、hsa-miR-517*、hsa-miR-517a、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a-3p、hsa-miR-518a-5p、hsa-miR-518b、hsa-miR-518c、hsa-miR-518c*、hsa-miR-518d-3p、hsa-miR-518d-5p、hsa-miR-518e、hsa-miR-518e*、hsa-miR-518f、hsa-miR-518f*、hsa-miR-519a、hsa-miR-519b-3p、hsa-miR-519c-3p、hsa-miR-519d、hsa-miR-519e、hsa-miR-519e*、hsa-miR-520a-3p、hsa-miR-520a-5p、hsa-miR-520b、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-520d-3p、hsa-miR-520d-5p、hsa-miR-520e、hsa-miR-520f、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-521、hsa-miR-522、hsa-miR-523、hsa-miR-524-3p、hsa-miR-524-5p、hsa-miR-525-3p、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-526b、hsa-miR-526b*、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539、hsa-miR-541、hsa-miR-541*、hsa-miR-542-3p、hsa-miR-542-5p、hsa-miR-543、hsa-miR-544、hsa-miR-545、hsa-miR-545*、hsa-miR-548a-3p、hsa-miR-548a-5p、hsa-miR-548b-3p、hsa-miR-548b-5p、hsa-miR-548c-3p、hsa-miR-548c-5p、hsa-miR-548d-3p、hsa-miR-548d-5p、hsa-miR-548e、hsa-miR-548f、hsa-miR-548g、hsa-miR-548h、hsa-miR-548i、hsa-miR-548j、hsa-miR-548k、hsa-miR-548l、hsa-miR-548m、hsa-miR-548n、hsa-miR-548o、hsa-miR-548p、hsa-miR-549、hsa-miR-550、hsa-miR-550*、hsa-miR-551a、hsa-miR-551b、hsa-miR-551b*、hsa-miR-552、hsa-miR-553、hsa-miR-554、hsa-miR-555、hsa-miR-556-3p、hsa-miR-556-5p、hsa-miR-557、hsa-miR-558、hsa-miR-559、hsa-miR-561、hsa-miR-562、hsa-miR-563、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-567、hsa-miR-568、

hsa-miR-569、hsa-miR-570、hsa-miR-571、hsa-miR-572、hsa-miR-573、hsa-miR-574-3p、hsa-miR-574-5p、hsa-miR-575、hsa-miR-576-3p、hsa-miR-576-5p、hsa-miR-577、hsa-miR-578、hsa-miR-579、hsa-miR-580、hsa-miR-581、hsa-miR-582-3p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-583、hsa-miR-584、hsa-miR-585、hsa-miR-586、hsa-miR-587、hsa-miR-588、hsa-miR-589、hsa-miR-589*、hsa-miR-590-3p、hsa-miR-590-5p、hsa-miR-591、hsa-miR-592、hsa-miR-593、hsa-miR-593*、hsa-miR-595、hsa-miR-596、hsa-miR-597、hsa-miR-598、hsa-miR-599、hsa-miR-600、hsa-miR-601、hsa-miR-602、hsa-miR-603、hsa-miR-604、hsa-miR-605、hsa-miR-606、hsa-miR-607、hsa-miR-608、hsa-miR-609、hsa-miR-610、hsa-miR-611、hsa-miR-612、hsa-miR-613、hsa-miR-614、hsa-miR-615-3p、hsa-miR-615-5p、hsa-miR-616、hsa-miR-616*、hsa-miR-617、hsa-miR-618、hsa-miR-619、hsa-miR-620、hsa-miR-621、hsa-miR-622、hsa-miR-623、hsa-miR-624、hsa-miR-624*、hsa-miR-625、hsa-miR-625*、hsa-miR-626、hsa-miR-627、hsa-miR-628-3p、hsa-miR-628-5p、hsa-miR-629、hsa-miR-629*、hsa-miR-630、hsa-miR-631、hsa-miR-632、hsa-miR-633、hsa-miR-634、hsa-miR-635、hsa-miR-636、hsa-miR-637、hsa-miR-638、hsa-miR-639、hsa-miR-640、hsa-miR-641、hsa-miR-642、hsa-miR-643、hsa-miR-644、hsa-miR-645、hsa-miR-646、hsa-miR-647、hsa-miR-648、hsa-miR-649、hsa-miR-650、hsa-miR-651、hsa-miR-652、hsa-miR-653、hsa-miR-654-3p、hsa-miR-654-5p、hsa-miR-655、hsa-miR-656、hsa-miR-657、hsa-miR-658、hsa-miR-659、hsa-miR-660、hsa-miR-661、hsa-miR-662、hsa-miR-663、hsa-miR-663b、hsa-miR-664、hsa-miR-664*、hsa-miR-665、hsa-miR-668、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-675、hsa-miR-7、hsa-miR-708、hsa-miR-708*、hsa-miR-7-1*、hsa-miR-7-2*、hsa-miR-720、hsa-miR-744、hsa-miR-744*、hsa-miR-758、hsa-miR-760、hsa-miR-765、hsa-miR-766、hsa-miR-767-3p、hsa-miR-767-5p、hsa-miR-768-3p、hsa-miR-768-5p、hsa-miR-769-3p、hsa-miR-769-5p、hsa-miR-770-5p、hsa-miR-802、hsa-miR-873、hsa-miR-874、hsa-miR-875-3p、hsa-miR-875-5p、hsa-miR-876-3p、hsa-miR-876-5p、hsa-miR-877、hsa-miR-877*、hsa-miR-885-3p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-886-3p、hsa-miR-886-5p、hsa-miR-887、hsa-miR-888、hsa-miR-888*、hsa-miR-889、hsa-miR-890、hsa-miR-891a、hsa-miR-891b、hsa-miR-892a、hsa-miR-892b、hsa-miR-9、hsa-miR-9*、hsa-miR-920、hsa-miR-921、hsa-miR-922、hsa-miR-923、hsa-miR-924、hsa-miR-92a、hsa-miR-92a-1*、hsa-miR-92a-2*、hsa-miR-92b、hsa-miR-92b*、hsa-miR-93、hsa-miR-93*、hsa-miR-933、hsa-miR-934、hsa-miR-935、hsa-miR-936、hsa-miR-937、hsa-miR-938、hsa-miR-939、hsa-miR-940、hsa-miR-941、hsa-miR-942、hsa-miR-943、hsa-miR-944、hsa-miR-95、hsa-miR-96、hsa-miR-96*、hsa-miR-98、hsa-miR-99a、hsa-miR-99a*、hsa-miR-99b和hsa-miR-99b*。

[0091] miRNA抑制其所靶向的mRNA的功能，并因此抑制由mRNA编码的多肽的表达。因此，(部分或完全)阻断miRNA的活性(例如，沉默miRNA)可以有效地诱导或恢复表达被抑制的多肽的表达(对多肽去阻遏)。在一个实施方案中，miRNA的mRNA靶标所编码的多肽的去阻遏是通过抑制细胞中的miRNA活性的多种方法中的任何一种来实现的。例如，阻断miRNA的活性可以通过利用与miRNA互补或基本上互补的小干扰核酸(例如，反义寡核苷酸、miRNA海绵、TuD RNA)的杂交，从而阻断miRNA与其靶mRNA的相互作用来实现。如本文所用，与miRNA基本上互补的小干扰核酸是能够与miRNA杂交并阻断miRNA活性的核酸。在一些实施方案中，与

miRNA基本上互补的小干扰核酸是除了1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个碱基之外与miRNA完全互补的小干扰核酸。在一些实施方案中,小干扰核酸序列与miRNA基本上互补,或者是与miRNA互补至少一个碱基的小干扰核酸序列。

[0092] “miRNA抑制剂”是阻断miRNA功能、表达和/或加工的物质。例如,这些分子包括但不限于抑制miRNA与Drosha复合物相互作用的microRNA特异性反义、microRNA海绵、坚韧诱饵RNA (TuD RNA) 和microRNA寡核苷酸(双链、发夹、短寡核苷酸)。如上所述,microRNA抑制剂能够在细胞中由rAAV载体的转基因表达。microRNA海绵通过互补的七聚体种子序列特异性地抑制miRNA (Ebert, M. S. Nature Methods, Epub 2007年8月12日)。在一些实施方案中,可以使用单个海绵序列沉默整个miRNA家族。TuD RNA实现对哺乳动物细胞中特定miRNA的有效和长期抑制(参见,例如,Takeshi Haraguchi等人, Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 6e43, 其涉及TuD RNA的内容通过引用并入本文)。用于沉默细胞中miRNA功能(miRNA靶标的去阻遏)的其他方法对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的。

[0093] 在一些实施方案中,重组RNA载体的克隆能力可限制所需的编码序列,并且可能需要完全替换病毒的4.8kb碱基基因组。因此,在某些情况下,大基因可能不适合用于标准重组AAV载体。本领域技术人员将理解,本领域中可获得用于克服有限编码能力的选择。例如,两个基因组的AAV ITR可以退火以形成头对尾的连环体,从而使载体的能力几乎加倍。剪接位点的插入允许从转录物中去除ITR。克服有限克隆能力的其他选择对于技术人员来说将是显而易见的。

[0094] 施用

[0095] 可以根据本领域已知的任何适当方法以组合物形式将rAAV递送至受试者。rAAV, 优选悬浮在生理学上相容的载体中(例如在组合物中)的rAAV, 可以施用于受试者, 例如宿主动物, 例如人、小鼠、大鼠、猫、狗、绵羊、兔、马、牛、山羊、猪、豚鼠、仓鼠、鸡、火鸡或非人灵长类动物(如猕猴)。在一些实施方案中,宿主动物不包括人。

[0096] rAAV向哺乳动物受试者的递送可以通过例如肌肉注射或通过施用于哺乳动物受试者的血流。可以通过注射到静脉、动脉或任何其他血管中来施用到血流中。在一些实施方案中,通过分离的肢体灌注的方式将rAAV施用到血流中,所述分离的肢体灌注是外科领域中公知的技术,该方法基本上使技术人员能够在施用rAAV毒粒之前将肢体与体循环分离。本领域技术人员还可以使用描述于美国专利号6,177,403中的分离的肢体灌注技术的变形将毒粒施用到分离的肢体的脉管系统中,以潜在地增强对肌肉细胞或组织的转导。此外,在某些情况下,可能需要将毒粒递送至受试者的CNS。“CNS”是指脊椎动物的脑和脊髓的所有细胞和组织。因此,该术语包括但不限于神经元细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、脑脊髓液(CSF)、间质空间、骨、软骨等。重组AAV可以直接递送至CNS或脑,通过注射到例如心室区域以及纹状体(例如,纹状体的尾状核或壳核)、脊髓和神经肌肉接合处或小脑小叶,使用针、导管或相关装置,使用本领域已知的神经外科技术,例如通过立体定向注射(参见,例如Stein等人, J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson等人, PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson等人, Nat. Genet. 3:219-223, 1993; 以及Alisky和Davidson, Hum. Gene Ther. 11: 2315-2329, 2000)。

[0097] 本公开的组合物可以单独包含rAAV, 或者与一种或多种其他病毒(例如,具有一种或多种不同转基因的第二rAAV编码)组合。在一些实施方案中,组合物包含1、2、3、4、5、6、7、

8、9、10或更多种不同的rAAV,每种rAAV具有一种或多种不同的转基因。

[0098] 本领域技术人员可以考虑rAAV所针对的适应症而容易地选择合适的载体。例如,一种合适的载体包括盐水,其可以用各种缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)配制。其他示例性载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油和水。载体的选择不是对本公开的限制。

[0099] 任选地,除了rAAV和载体之外,本公开的组合物还可以含有其他常规药物成分,例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0100] rAAV以足够的量施用,以转染所需组织的细胞,并提供足够水平的基因转移和表达,而没有过度的不利影响。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所选器官(例如,门静脉递送到肝脏)、口服、吸入(包括鼻内和气管内递送)、眼内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、瘤内、颅内(例如,海马体内)和其他肠胃外的施用途径。如果需要,可以组合施用途径。

[0101] 实现特定“治疗效果”所需的rAAV毒粒的剂量,例如以基因组拷贝/每千克体重(GC/kg)表示的剂量单位,将基于若干因素而变化,包括但不限于:rAAV毒粒施用途径,达到治疗效果所需的基因或RNA表达水平,所治疗的特定疾病或病症,以及基因或RNA产物的稳定性。基于上述因素以及本领域公知的其他因素,本领域技术人员可以容易地确定用以治疗患有特定疾病或病症的患者的rAAV毒粒的剂量范围。

[0102] rAAV的有效量是足以靶向感染动物、靶向期望组织的量。在一些实施方案中,rAAV的有效量是足以产生稳定的体细胞转基因动物模型的量。有效量主要取决于诸如物种、年龄、体重、受试者健康和待靶向组织等因素,因此可在动物或组织之间变化。例如,rAAV的有效量通常在含有约 10^9 至 10^{16} 个基因组拷贝的约1ml至约100ml的溶液的范围。在一些实施方案中,以 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 个基因组拷贝/受试者的剂量施用rAAV。在一些实施方案中,以 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 或 10^{14} 个基因组拷贝/kg的剂量施用rAAV。在一些情况下,约 10^{11} 至 10^{12} 个rAAV基因组拷贝的剂量是合适的。在某些实施方案中, 10^{12} 个rAAV基因组拷贝对靶向心脏、肝脏和胰腺组织是有效的。在一些情况中,通过多剂量的rAAV产生稳定的转基因动物。

[0103] 在一些实施方案中,配制rAAV组合物以减少组合物中AAV颗粒的聚集,尤其是在存在高rAAV浓度的情况下(例如,约 10^{13} GC/ml或更高)。用于减少rAAV聚集的方法是本领域公知的,包括例如添加表面活性剂、pH调节、盐浓度调节等。(参见,例如,Wright FR等人,Molecular Therapy (2005) 12,171-178,其内容通过引用并入本文。)

[0104] 药学上可接受的赋形剂和载体溶液的配制对于本领域技术人员来说是公知的,开发合适的剂量和治疗方案以在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物亦是如此。

[0105] 通常,这些制剂可含有至少约0.1%或更多的活性化合物,尽管活性成分的百分比(当然也)可以变化,并且可以方便地在总制剂重量或体积的约1或2%至约70%或80%或更多之间变化。当然,可以制备每种治疗可用的组合物中活性化合物的量,使得在任何给定单位剂量的化合物中获得合适的剂量。制备此类药物制剂的领域的技术人员会考虑诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑等因素,并且因

此,多种剂量和治疗方案可能是可取的。

[0106] 在某些情况下,希望通过皮下、胰腺内、鼻内、肠胃外、静脉内、颅内(例如,海马体内)、肌内、鞘内或口服、腹膜内或通过吸入来递送本文公开的适当配制的药物组合物中的基于rAAV的治疗构建体。在一些实施方案中,可以使用如美国专利号5,543,158;5,641,515和5,399,363(各自通过引用以其整体并入本文)中所述的施用模式递送rAAV。在一些实施方案中,优选的施用方式是通过门静脉注射。

[0107] 适于注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制备物含有防腐剂以防止微生物的生长。在许多情况下,所述形式是无菌的并且流动的程度易于注射。它必须在制造和储存条件下稳定,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、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/或植物油。可以保持适当的流动性,例如,通过使用包衣如卵磷脂,在分散的情况下通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等张剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,能够实现可注射组合物的延长吸收。

[0108] 例如,对于水性注射溶液的施用,可以适当地对所述溶液进行缓冲(如果需要),并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等张。这些特定的水性溶液尤其适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。就此而言,能够使用的无菌水性介质是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并且将其添加到100ml的皮下注射液中或者在建议的输注部位注射(参见例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035-1038和1570-1580页)。根据宿主的状况必然发生剂量的一些变化。在任何情况下,负责施用的人员都会确定个体宿主的适当剂量。

[0109] 通过将所需量的活性rAAV与本文列举的各种其他成分(根据需要)并入适当的溶剂中,然后过滤灭菌,来制备无菌可注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分并入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,从先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0110] 本文公开的rAAV组合物还可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成)并且与无机酸例如盐酸或磷酸,或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、杏仁酸等形成。用游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、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。在配制时,溶液将以与制剂配制相容的方式并以治疗有效的量施用。制剂易于以多种剂型施用,例如可注射溶液、药物释放胶囊等。

[0111] 如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。此类用于药物活性物质的介质和药剂的用途是本领域公知的。补充的活性成分也能够并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不产生过敏或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0112] 递送媒介物如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等可用于将本公开的组合物引入合适的宿主细胞中。特别地,可以配制递送转基因的rAAV载体用于包封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中的递送。

[0113] 此类制剂可优选用于引入本文公开的核酸或rAAV构建体的药学上可接受的制剂。脂质体的形成和使用通常是本领域技术人员已知的。最近,开发了具有改善的血清稳定性和循环半衰期的脂质体(美国专利号5,741,516)。此外,已经描述了脂质体和脂质体样制备物作为潜在药物载体的各种方法(美国专利号5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868和5,795,587)。

[0114] 脂质体已经成功地与许多细胞类型一起使用,这些细胞类型通常对其他程序的转染具有抗性。此外,脂质体没有DNA长度限制,而这些限制对于基于病毒的递送系统则是典型的。脂质体已被有效地用于将基因、药物、放射治疗剂、病毒、转录因子和变构效应物引入多种培养的细胞系和动物中。此外,已经完成了多项成功的临床试验,这些试验检验了脂质体介导的药物递送的有效性。

[0115] 脂质体由磷脂形成,磷脂分散在水性介质中并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))。MLV通常具有25nm至4 μ m的直径。MLV的超声处理导致形成直径在200至500.ANG.范围内的小单层囊泡(SUV),其在核中含有水性溶液。

[0116] 或者,可以使用rAAV的纳米胶囊制剂。纳米胶囊通常能够以稳定且可重复的方式捕获物质。为了避免由细胞内聚合物过载引起的副作用,应该使用能够在体内降解的聚合物设计这种超细颗粒(大小约0.1 μ m)。考虑使用满足这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒。

[0117] 除了上述递送方法之外,还考虑以下技术作为将rAAV组合物递送至宿主的替代方法。已经在美国专利号5,656,016中使用和描述了超声波导入(即,超声波),作为提高药物渗透进入和通过循环系统的速率和功效的装置。所考虑的其他药物递送替代物有骨内注射(美国专利号5,779,708)、微芯片装置(美国专利号5,797,898)、眼科制剂(Bourlais等人,1998)、透皮基质(美国专利号5,770,219和5,783,208)和反馈控制的递送(美国专利号5,697,899)。

实施例

[0118] 实施例1

[0119] 重组腺相关病毒(rAAV)作为安全且可靠的基因递送媒介物,最近在人类基因治疗领域引起了广泛关注。AAV2目前最常用于临床前和临床研究。然而,基于AAV2的药物Luxturna是唯一一种FDA批准的基于病毒的生物治疗药物,因此改善AAV的药学特性至关重要。

[0120] 众所周知,AAV2是载体生产的“差生产者”,并且在许多组织和细胞类型中“表现不佳”。分离出具有改进特性的病毒变体。

[0121] 一种名为AAVv66的变体被鉴定为临床胰腺肿瘤样品中最丰富的前病毒衣壳变体。AAVv66衣壳含有13个不同于AAV2的残基(相对于AAV2的突变包括:K39Q、V151A、R447K、T450A、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T和A593T)。在颅内(例如颅内下)注射后,该变体在CNS中表现出有利的嗜性。此外,AAVv66表现出比原型AAV2更好的包封

效率。使用差示扫描荧光法 (DSF), 观察到在 pH4-pH7 的 pH 范围内, AAVv66 的解链温度比 AAV2 高约 6°C。此外, DSF 分析表明, 在 pH4 时, AAVv66 相比于 AAV2 在更高的温度下清除其载体 DNA。

[0122] 还观察到 AAVv66 相比于 AAV2 赋予了更好的 CNS 转导。2.9 Å 分辨率的冷冻电镜结构揭示了 AAV2 和 AAVv66 在 3 倍突起处和 5 倍对称轴界面处的结构差异, 表明这些位置的残基在载体转导上赋予了改善的稳定性和功能。

[0123] 实施例 2

[0124] AAV 最近作为有效且经过验证的基因治疗载体引起了人们的关注。当前种类的 AAV 载体赋予稳定、长期的基因表达, 具有广泛的组织嗜性, 并表现出相对低的致病性。迄今为止, 三种血清型衣壳 (AAV1、AAV2 和 AAV9) 在患者体内的商业应用已获得监管机构批准。不幸的是, 目前发现和设计的 AAV 衣壳库不足以满足某些需要靶向特定组织或细胞类型的临床应用。此外, 患者可能通过中和抗体而对预先对载体具有免疫力, 这会限制治疗效果。此外, 已知某些衣壳在用于产生满足治疗剂量所需的高产滴度的标准生产方案时存在问题。针对这些缺点, 需要发现和开发表现出更好的载体产量、能够逃逸先天免疫并具有独特的嗜性特征的新的衣壳。

[0125] 本实施例描述了通过高通量单分子实时 (SMRT) 测序鉴定的衣壳蛋白变体 AAVv66 (SEQ ID NO:1), 尽管序列相似性高 (98%), 但其特性与 AAV2 的特性显著不同。首先, AAVv66 表现出更好的载体产量, 并且比原型 AAV2 更具热稳定性。其次, 当通过颅内注射施用, AAVv66 在脑组织内具有更好的分布扩散。最后, AAVv66 在抗原性上不同于 AAV2。

[0126] 为了更好地了解 AAVv66 如何不同于 AAV2, 进行了低温电子显微镜术 (cryo-EM), 以探索定义 AAVv66 的结构和功能特征。我们的 AAVv66 衣壳的 2.5 Å 分辨率结构揭示了与 AAV2 结构的差异, 并提供了对该衣壳功能特性的理解。这些观察结果共同描述了 AAVv66 的机械特性。

[0127] 材料和方法

[0128] DNA 提取

[0129] 通过冰冻切片检查和术中冰冻切片诊断, 在肿瘤切除术和组织病理学后从一名 71 岁女性患者获取胰腺肿瘤样品。将样品储存在液氮中直至提取 DNA。为了避免 AAV DNA 交叉污染, DNA 提取和 PCR 程序在无菌的 UV 照射的生物安全柜中进行。所有表面和设备喷洒 DNA-Exitus Plus (Applichem, 目录号: A7089), 并在 15 分钟后用 milli-Q 水擦拭干净。然后将冷冻的组织在室温下解冻, 用一次性手术刀快速切割成约 25mg 的组织并置于 2mL 管中。根据制造商推荐的程序, 使用 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, #51306) 从组织中提取 DNA。

[0130] SMRT 测序

[0131] 通过标准 PCR 程序从基因组 DNA 生成扩增子文库。为了扩增 AAV 基因组, 使用 Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) 进行 PCR, 循环条件如下: 97°C 1 分钟, 46 个循环, 每个循环为 98°C 10 秒、60°C 15 秒和 68°C 2 分 30 秒; 和 68°C 10 分钟。使用 PureLink™ PCR 纯化试剂盒 (Thermo Fisher) 对大小正确的 PCR 产物进行凝胶纯化, 并用于第二轮 15 个循环的 PCR 以加标码 (barcoding)。使用的引物对是:

[0132] 第一轮引物: CapF 5' -GACTGCATCTTTGAACAATAAATGA-3' (SEQ ID NO:3) 和 CapR 5' -GAAACGAATTAACCGGTTTATTGATTAA-3' (SEQ ID NO:4)

[0133] 第二轮引物: EF5' -CATCACTACGCTAGATGACTGCATCTTTGAACAATAAATGA-3' (SEQ ID

NO:5) 和ER5' -TAGTATATCGAGACTCGAAACGAATTAACCGGTTTATTGATTAA-3' (SEQ ID NO:6)

[0134] 对代表衣壳变体ORF的扩增子进行标准SMRT测序文库生成。测序在RSII平台上进行。SMRT测序返回17,727个DNA读段,这些读段使用BWA-MEM算法定位至AAV2 Cap ORF。为了排除人工序列,随后过滤读段以排除长度小于1,800nt和超过2,500nt的读段,然后对读段质量进行过滤(Phred得分>30)。这种过滤将读段减少到14,500个。最后,通过InDelFixer处理读段,以去除可能由易出错的PCR或测序错误导致的单核苷酸插入和缺失。为了仅考虑独特的衣壳序列并排除低置信度变体,对过滤后的读段进行从头组装(Geneious R9),以将具有99%序列相似性的读数进行聚类。只有由至少10个读段代表的读段聚类才被认为是独特的DNA衣壳序列。然后将DNA序列翻译成氨基酸序列,以定义独特的AAV衣壳的最终列表。

[0135] 从NCBI获得来自当代AAV血清型的完整AAV Cap ORF(用于AAV2/3的hu.2),并使用MUSCLE算法比对预测的氨基酸序列,迭代直到实现会聚。然后使用PhyML并使用SeaView55中的默认参数生成系统进化树,然后通过Interactive Tree of Life在线工具进行可视化。

[0136] 病毒载体生产

[0137] 使用HEK293细胞中的三重转染方法生产病毒,并通过CsCl梯度离心进行纯化。所描述的所有载体包装有任一以下:表达增强型绿色荧光蛋白的自互补AAV载体(ssAAV-CB6-EGFP)、表达萤火虫荧光素酶的单链载体(ssAAV-CB6-Fluc)、表达分泌的人 α 1-抗胰蛋白酶的单链载体(ssAAV-CB6-hA1AT),或表达LacZ的单链载体。所有转基因均由CMV早期增强子/普遍存在的鸡 β 肌动蛋白(CB6)启动子驱动。

[0138] 动物

[0139] 六至八周龄的雄性C57BL/6J小鼠(杰克逊实验室)通过静脉内(IV)、肌肉(IM)或颅内施用测试载体进行注射。向接受IV注射的小鼠施用包装有ssAAV-CB6-Fluc转基因的载体($1.0E11$ vg/小鼠),并在注射后14天处死小鼠。向接受IM注射至TA肌肉的小鼠施用包装有ssAAV-CB6-Fluc转基因的载体($4.0E10$ vg/小鼠),并在注射后28天处死小鼠。每周,直到处死时,向动物腹腔内注射D-荧光素底物并用异氟醚镇静,并使用IVIS SpectrumCT成像平台在1分钟曝光下定量荧光素酶活性。使用Living Image软件进行图像采集。向接受海马体内注射的小鼠施用包装有scAAV-CB6-Egfp转基因的载体($3.6E9$ vg/小鼠)。使用立体定位框架(Stoelting Co.Wood Dale,IL)、Hamilton注射器(1207K95,Thomas Scientific)和Hamilton针头(77602-06,Hamilton)在右半球进行单侧注射。以下相对坐标用于所有海马体内注射: $x:-1.5\text{mm},y:-2\text{mm},z:-2\text{mm}$ 。

[0140] 免疫染色

[0141] 注射后4周,用1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)和随后的4%多聚甲醛(PFA)经心脏灌注动物。提取脑并随后在4°C下将其固定在4%PFA中过夜。然后将脑在4°C下浸入30%蔗糖(在1X PBS中制备)中,直至在蔗糖混合物中平衡。将脑包埋在1:20CT(Tissue Tek,Torrance,CA)和30%蔗糖混合物中,并以40 μ m冷冻切片(Cryostar NX70,ThermoScientific,Waltham,MA)。将切片在0.5%TritonX-100中透化1小时,在5%山羊血清(10%普通山羊血清,50062Z,Life Technologies)中封闭1小时,然后在一抗(抗NeuN,1:1000,EMD Millipore MAB377;抗Gfap,1:500,EMD Millipore MAB360;抗Olig2,1:200,Abcam ab109186;抗Iba1,1:1000,Wako Chemicals NC9288364)中在4°C下孵育过夜。将切片在1X PBS中洗涤3次,并

在二抗(抗小鼠,Invitrogen A32744;或抗兔,Invitrogen A32740)中在室温下孵育1小时。将切片在1X PBS中洗涤3次,并用含有DAPI的Vectashield(Vector Laboratories, Burlingame,CA)封片。

[0142] 显微镜术

[0143] 脑切片图像在Leica SP8 Lightning High Resolution Confocal(Leica Microsystems,Wetzlar,Germany)上获得。对于每个相应的放大倍率,以相同的强度和曝光阈值收集整体脑图像(10X平铺的脑切片)和高倍率图像(63X区域特定的面积)。对于高放大倍率图像,以0.29 μ m尺寸收集40-50个z-堆叠步骤。使用Imaris 9.3软件(Bitplane Inc., Zurich,Switzerland)进行分析。每个图像都是3D渲染的,并且阈值是手动建立的。为了确保一致性,总的亚解剖EGFP体积的无偏向3D渲染与DAPI体积共定位,并且细胞类型特异性染色用作细胞计数和阳性转导细胞数量的指标。对每个同侧亚解剖区域内的不同细胞类型进行百分比定量,然后对每种细胞类型进行百分比定量。通过相对于每个区域内细胞类型特异性染色的总体积将共定位的EGFP体积标准化,来确定转导百分比。每个细胞特异性染色,分析n=3只小鼠。对图2B的统计学计算在Prism 7(GraphPad Software,Inc.,San Diego,CA)中进行,并使用学生非配对t检验进行分析。

[0144] DSF分析

[0145] 对于衣壳稳定性实验,将5 μ L SYPRO Orange 5000X(Thermo Fisher Scientific)在495 μ L PBS(Corning)中稀释,以制成50X储备液。将45 μ L病毒与5 μ L 50X SYPRO Orange混合(最终SYPRO Orange浓度为5X)。使用ViiA 7实时PCR仪器(Thermo Fisher Scientific)以以下参数对荧光进行定量:将样品在25 $^{\circ}$ C下孵育2分钟,然后是温度梯度(25 $^{\circ}$ C至99 $^{\circ}$ C,每一步0.4 $^{\circ}$ C,并在每一步保持2分钟)。为了在每个温度步骤监测SYPRO Orange的荧光,使用了ROX滤光片,没有被动参考。为了研究pH值对AAV载体解链温度的影响,将5 μ L病毒载体、5 μ L 50X SYBR Orange和40 μ L 0.6M醋酸盐缓冲液(从pH7调整至pH4)混合。本研究报告的T_m值定义为在25至95 $^{\circ}$ C之间检测到的最大Dsignal/Dtemp。为了研究载体基因组的释放,将SYBR Orange染料转换为SYBR Gold(Thermo Fisher Scientific)。

[0146] 定点诱变

[0147] 为了在AAVv66衣壳ORF中产生点突变,使用Q5定点诱变试剂盒(New England Biolabs)和以下诱变引物对:

[0148] 表1:

[0149] AAVv66 中的突变	正向引物 (小写字母 = 突变的碱基) (SEQ ID NO: 7-19)	反向引物 (SEQ ID NO: 20-32)
Q39K	AGAGCGGCATaagGACGACAGCA	GCGGGCTTTGGTGGTGGT

[0150]	A151V	GCATTCTCCTgtgGAGCCAGACT	TCTACCGCCTCTTTTTTCC
	K447R	TTACTTGAGCagaACAAACGCTC	TACAGATACTGGTCGATC
	A450T	CAAAACAAACactCCAAGCGGAAC	CTCAAGTAATACAGATACTGG
	M457Q	AACCACCACGcagTCCAGGCTTC	CCGCTTGGAGCGTTTGTT
	A492S	ATCAAAAACAtctGCGGATAACAACAACAGTG	ACTCGCTGCTGGCGGTAA
	D499E	CAACAACAGTgaaTATTCGTGGAC	TTATCCGCAGCTGTTTTTG
	Y533F	TGAAGAAAAAtttTTTCTCAGAGCGGGGTTTC	TCGTCCTTGTGGCTGGCC
	D546G	TGGAAAACAAaggcTCGGGAAAAA	AAGATGAGAACCCCGCTC
	G548E	ACAAGACTCGgagAAAATAATGTG	TTTCAAAGATGAGAACC
	S585R	CAACCTCCAGagaGGCAACACAC	GTAGATACAGAACCATACTGCTC
	T588R	GAGCGGCAACcagaCAGGCAGCCA	TGGAGGTTGGTAGATACAGAACCATACTG
	T593A	GGCAGCCACCgcaGATGTCAACA	TGTGTGTTGCCGCTCTGG

[0151] 冷冻电镜 (Cryo-EM)

[0152] 在带有花边碳支持膜 (01824G, Ted Pella, Inc.) 的网格上制备 AAVv66 用于冷冻电镜。首先, 将网格用乙酰乙酸盐洗涤并使其干燥过夜。接下来, 在 PELCO easiGlow 辉光放电单元中, 用 20mA 电流和负极性对栅极进行辉光放电 60 秒。将缓冲液中的 3 μ L 1E13 vg/mL AAVv66-CB6-Egfp 载体 (5% 山梨糖醇, 0.001% pluronic 酸 F68, 于 PBS 中) 放置在加载在 Vitrobot Mark IV (ThermoFisher) 冷冻电镜插入装置上的网格上。网格在 10 $^{\circ}$ C 和 95% 相对湿度下用 Whatman#1 滤纸封闭 6 至 6.5 秒, 然后在液体乙烷中快速冷冻。

[0153] 使用 SerialEM 在以 300kV 运行并配备 Gatan Image Filter (GIF) 和 K2 Summit 直接电子检测器 (Gatan Inc.) 的 Titan Krios 电子显微镜 (FEI) 上使用 0.5-2.2 μ m 欠焦, 收集由 2,033 个影像组成的数据集。每个影像收集 50 帧, 并且 34 帧以每帧 1.43 e-/ Å^2 使用, 样品上的总剂量为 48.62 e-/ Å^2 。样品上的像素大小为 1.0588 Å 。影像被导入 cisTEM 并与剂量过滤比对, 并确定 CTF 参数。接下来, 在 cisTEM 内自动挑选出总共 52,874 个颗粒 (特征半径和最大半径: 130 和 140 Å)。我们注意到, 包封载体转基因的颗粒和小百分比的空衣壳均用于确定最终结构。在 cisTEM 中, 使用 Ab initio 3D 重建功能从所有颗粒生成用于比对的初始参考。该参考和所有颗粒均使用自动细化进行迭代细化, 以获得如从 0.143 的 FSC_{part} 截断值确定的 2.95- Å 分辨率图谱。手动模式下的一轮每粒子 CTF 细化将图谱分辨率改善至 2.62 Å 。最后, 一轮光束倾斜细化和重建将图谱分辨率改善至 2.46 Å 。3D 分类并没有改善图谱。通过使用 PHENIX 自动锐化功能, 采用 -32.92 Å^2 的 B 因子, 对最终图谱进行 B 因子锐化。

[0154] AAV2 (PDB ID: 1LP3) 的冷冻电镜结构被用作结构细化的起始模型。使用 PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.) 对变体残基进行建模。生成的 AAVv66 模型包含 60 个 VP3 拷贝, 使用 PHENIX 59 针对低温电镜图谱进行了细化。

PHENIX中的模拟真实空间的退火和B因子细化产生了立体化学优化模型。细化结果总结在表2中。检查了模型,并使用PyMOL制备了图。

[0155] 将载体稀释至约 $1.0E9$ vg/mL的浓度,使用Zetasizer Nano ZS系统 (Malvern) 用于zeta电位分析。将500 μ L样品添加到通用浸入池 (Malvern) 中。测量前,使系统稳定2分钟。对每个样品记录三次测量。

[0156] 表2

[0157] 冷冻电镜数据收集、细化和验证统计

		#1 名称 (EMDB-20630) (PDB 6U3Q)
数据收集和加工		
	放大倍率	47,214
[0158]	电压 (kV)	300
	电子曝光 ($e^-/\text{\AA}^2$)	48.62
	散焦范围 (μm)	0.4-5.0
	像素尺寸 (\AA)	1.059
	采用的对称性	I
	初始颗粒图像 (数量)	52,874
	最终颗粒图像 (数量)	52,874

	图谱分辨率 (Å)	2.46
	FSC 阈值	0.143
	细化	
	使用的初始模型(PDB 编码)	1LP3
	模型分辨率 (Å)	2.6
	FSC 阈值	0.5
	图谱锐化 B 因子(Å ²)	32.92
	模型组成	
	非氢原子	248,280
	蛋白残基	31,140
	配体	0
[0159]	B 因子(Å ²)	
	蛋白	86.48
	配体	0
	r.m.s.偏差	
	键长 (Å)	0.009
	键角 (°)	0.603
	验证	
	MolProbity 得分	1.66
	Clash 得分	2.25
	弱的旋转异构体 (%)	4.15
	Ramachandran 作图	
	偏爱 (%)	96.91
	允许 (%)	4.15
	不允许 (%)	0.00

[0160] 免疫学研究

[0161] 将 $1.0E11$ vg/小鼠的scAAV-CB6-Egfp肌肉施用到C57BL/6J小鼠的左/右胫骨前肌中。4周后,将 $1.0E11$ vg/小鼠的ssAAVv66-CB6-hA1AT或ssAAV2-CB6-hA1AT递送至对侧腿。在第4、5、6、7和8周通过面部静脉采血收集血清,以通过ELISA评估中和抗体滴度和A1AT水平。

[0162] 将Huh-7.5 ($5.0E4$ 个细胞/孔) 接种到96孔板上,24小时后在37°C转导。然后将Ad辅助病毒以100:1的感染复数(MOI)添加至细胞单层并孵育至少一小时。在V形底96孔板中制备血清和ssAAV2-LacZ或ssAAVv66-LacZ混合溶液的系列稀释液,并在37°C下孵育1小时。然

后将血清-AAV混合溶液添加到细胞中并在37℃下孵育24小时。使用Galacto-Star One-Step Assay System (Invitrogen) 裂解细胞并用 β -半乳糖苷酶底物处理。通过Synergy HT酶标仪 (BioTek, Winooski, VT) 检测发光信号。

[0163] A1AT ELISA

[0164] 96孔板首先在4℃下用抗A1AT抗体包被过夜,然后将孔与封闭缓冲液(含1%脱脂乳和0.05% Tween-20的PBS缓冲液)在室温下孵育1小时。在96孔板中使用样品缓冲液(含0.05% Tween-20的PBS缓冲液)进行1/20、1/200和1/2,000血清稀释,同时还有阳性对照(100、50、25、12.5、6.25和3.125ng/mL A1AT)。将平板洗涤3次后,向每个孔添加血清,并在4℃下孵育过夜。然后将平板洗涤3次并与山羊抗胰蛋白酶-HRP抗体(在样品缓冲液中1:5,500稀释)孵育2小时。在与底物反应之前,将平板洗涤6次以去除所有残留的蛋白。最后,将ABTS底物添加到孔中,并通过Synergy HT酶标仪 (BioTek) 读取信号。

[0165] 通过长读段测序鉴定人体组织样品中的新AAV变体

[0166] 为了鉴定人体组织中新的全长衣壳序列,进行SMRT测序以获得跨整个衣壳开放阅读框的长DNA读段(图1A)。这种方法可以解析长DNA片段的序列,而无需短读段测序方法中所必需的序列组装。通过这种方式,可以在跨整个衣壳ORF的单个完整分子上评估由点突变和重组事件定义的衣壳多样性。为了探索AAV多样性,从约800个人类手术样品中选择了单个组织。使用在跨已知多个血清型的保守序列处的衣壳ORF侧翼的引物,产生用于SMRT测序分析的靶PCR扩增子。分离出一种衣壳序列,其占从单个组织鉴定的所有序列的约45%(图1B)。这种主要衣壳称为“变体66”(AAVv66),表现出与AAV2最接近的同源性(98%的序列相似性;图1C-1D)。观察到AAVv66含有13个不同于AAV2的氨基酸残基(图1C和图8):一个在VP1u区域内(K39Q),一个在VP2结构域内(V151A),十一个在VP3内(R447K、T450A、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T和A593T)。值得注意的是,VP3内的独特氨基酸残基均位于可变区VR-IV至VR-VIII内或附近。

[0167] 将AAVv66的VP3区与其他当代AAV血清型(AAV1-AAV9)的VP3区进行比较。最显著的差异发生在四个位置(499、533、585和588),这四个位置在AAV血清型中高度保守(图8)。在位置499,大多数血清型具有天冬酰胺,而AAVv66、AAV2、AAV4和AAV9具有带负电荷的天冬氨酸或谷氨酸。位置533处的高度保守的苯丙氨酸在AAVv66中是酪氨酸(AAV5中也是T533)。最后,AAV2在位置585和588处具有带正电荷的精氨酸残基,这定义了AAV2结合硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)的能力,而与AAV2不同,AAVv66含有S585和T588(与AAV1、AAV3、AAV5和AAV6相同)。

[0168] AAVv66的载体产生和细胞感染性与AAV2不同

[0169] AAV2对肝素的强亲和力和由其导致的强细胞表面结合作用被认为导致病毒的包装滴度相对较差。AAV2的有限载体产量被认为是由于生产过程中载体颗粒对正在包装的细胞的非生产性结合和再感染造成的。将AAVv66的载体产生和细胞感染性与AAV2和AAV3b进行比较。值得注意的是,AAV3b是与AAV2最接近的独特表亲(89%的序列相似性),但在3倍突起处使用不同的静电表面电荷来弱结合肝素。AAV3b和AAV2之间的这种差异似乎解释了由HEK生产细胞的转导导致的AAV3b的增加的包装滴度。

[0170] 通过测量细胞裂解物中包封的载体基因组的产量,将AAVv66的包装特征与AAV2和AAV3b进行比较。为此,合成了AAVv66衣壳ORF,并将其克隆到AAV2 p5启动子(pAAV2/v66)

下表达AAV2 Rep的反式质粒中。使用AAVv66、AAV2和AAV3b的小规模载体制备物来包装由普遍存在的鸡-β肌动蛋白启动子驱动的萤火虫荧光素酶转基因组成的单链载体(AAV-CB6-Fluc)。通过粗裂解物qPCR29对病毒载体产量的定量显示,AAVv66载体的包封的DNase抗性基因组的产量比AAV2产量高约2.4倍,比AAV3b产量高约30%(图9,“组合”样品)。

[0171] 接下来研究了粗裂解物中AAVv66的较高丰度是否是由于颗粒与正在包装的细胞的非生产性结合,这表现为AAVv66颗粒主要在培养基中而不是在细胞裂解物中。PCR分析显示,培养基中AAVv66的包封基因组比细胞裂解物中的丰度高约3倍(图9)。相比之下,在正在包装的细胞的培养基中检测到的AAV2颗粒非常少。为了测试AAVv66产生更多DNase抗性基因组的能力是否与正在包装的细胞因HSPG结合不良而导致的再感染性弱有关,进行了肝素竞争测定(图10)。为此,使用标准氯化铯纯化方案生产大规模AAVv66和AAV2载体(再次包装CB6-Fluc)。AAVv66的转导不受肝素存在的影响,而1.25μg/孔的肝素阻断了50%的AAV2转导,且5μg/孔的肝素完全消除了转导。这些结果表明,AAVv66生产效率的提高至少部分是由于肝素结合弱。

[0172] 为了确定与AAV2相比AAVv66对肝素的较低亲和力是否与降低的细胞转导一致,使用纯化的AAVv66、AAV2和AAV3b载体感染HEK293细胞。数据表明AAV2表现出比AAVv66(约65倍)和AAV3b(约7.5倍)更高的转导(图11)。载体化的AAVv66前病毒衣壳序列能够在体外有效地转导细胞,但其载体产生和细胞感染特性与其最接近的血清型亲属AAV2不同。

[0173] AAVv66表现出不同于AAV2的CNS转导

[0174] 测试了AAVv66通过不同施用途径转导选定靶组织的能力。为此,在小鼠中评估通过多种递送途径AAVv66的生物分布(图12A-13D)。在所有测试的途径中,最引人注目的是AAVv66在颅内递送至中枢神经系统(CNS)靶细胞后的转导谱图(图2A-2D)。为了确定AAVv66相对于AAV2是否增加了CNS中的嗜性,将由普遍存在的鸡-β肌动蛋白启动子驱动的Egfp转基因包装到AAVv66和AAV2衣壳中。载体以 $3.6E9$ vg/动物的剂量单侧注射到海马体的右半球。注射后4周,经处理的大脑的冷冻切片显示,AAVv66转导的CNS细胞比AAV2多13倍,这可以通过在整个组织中的扩散增强来证明,而AAV2倾向于停留在注射部位(图2A-2B)。对侧区域至注射部位的高倍放大成像显示,脑的所有亚解剖区域(海马安蒙角[CA1、CA2、CA3和CA4]、齿状回和胼胝体,图2C)均表现出可检测到的EGFP表达水平(图2D),这表明AAVv66可以有效传播到整个海马体半球。

[0175] 研究了由AAVv66转导的特定细胞类型。用细胞类型特异性标志物进行抗体染色:抗NEUN(神经元)、抗GFAP(星形胶质细胞)、抗IBA1(小胶质细胞)和抗OLIG2(少突胶质细胞)(图3A、3E、3I和3M)。亚解剖CNS区域的3D体积重建表明,EGFP表达与每种研究的细胞类型共定位(图3B、3J、3F、3N)。神经元是在皮层和CA1区域中发现的主要细胞类型(图3C)。有趣的是,CA2-4区域和齿状回表现出最大的转导(约20-40%)。星形胶质细胞和小胶质细胞具有相似分布模式,显示在齿状回中具有最高的富集(图3G和3K)。星形胶质细胞在所有区域表现出约1-7%的转导(图3H),而小胶质细胞表现出稍微更高的转导效率(2-12%)(图3L)。少突胶质细胞在胼胝体中富集(图3O)并且在所有区域中具有约1-7%的AAVv66转导(图3P)。这些数据表明AAVv66可以在海马体内注射后转导CNS的所有主要细胞类型。

[0176] AAVv66在血清学上与AAV2不同

[0177] 宿主免疫系统对AAV的中和是AAV载体转导效率的主要限制因素。携带针对AAV血

清型(用作治疗载体中的衣壳)的预先存在的抗体的个体面临更大的不良反应和无效治疗的风险。此外,需要重复施用AAV基因治疗的患者面临着更差的转导效率和更强的免疫应答的风险,因此需要替代载体。

[0178] 研究了是否可以通过用AAV2进行预免疫来阻断AAVv66转导的问题。为了在循环中产生预先存在的抗AAV2抗体,将AAV2-Egfp载体(1E11 vg/小鼠)肌内递送至小鼠。4周后收集血清以体外评估中和抗体(NAb)滴度(图13A-13D和图14A-14B)。需要低NAb滴度以在Huh-7.5细胞中实现50%的AAV2感染中和(NAb50)(1/1,280~1/2,560,这表明AAV2预免疫产生的抗体足以抑制AAV2转导)。相比之下,利用AAV2处理的小鼠血清进行AAVv66感染的NAb50为1/20~1/40,这表明尽管存在针对AAV2产生的NAb,但AAVv66仍能够感染细胞。

[0179] 为了在体内用分泌的治疗性转基因产品测试这些发现,我们用包装有 α -1抗胰蛋白酶转基因的AAV2或AAVv66(AAV2-A1AT或AAVv66-A1AT)对经AAV2免疫的小鼠再次给药(redose)。在第5、6、7和8周收集血清,并通过ELISA31对分泌的A1AT水平进行定量(图14C)。低A1AT表达表明由第一载体剂量产生的NAb阻止了第二载体剂量的转导。为了确定“最大”A1AT表达的基线,还以同样的方式处理未经免疫的小鼠。与未经免疫的小鼠相比,在第6周和第7周,用AAV2-Egfp和随后的AAVv66-A1AT处理的小鼠中的A1AT表达达到了约90%的A1AT表达,而再次给药AAV2-A1AT的小鼠仅达到未经免疫水平的约40%(图14C)。这些结果与在用AAV2衣壳预免疫的小鼠的血清存在下AAVv66的强感染性的体外观察结果一致。

[0180] 还测试了预免疫,以研究广泛的AAV血清型(AAV1、AAV2、AAV3b、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAVrh.8和AAVrh.10)是否会损害AAVv66载体转导。对用八种血清型分别预免疫的兔的抗血清进行AAVv66-载体中和的筛选。观察到,与AAVv66相比,AAV1、AAV3b和AAV-DJ在NAb50滴度上表现出约一个数量级的差异,而AAV2、AAV8、AAVrh.8和AAVrh.10表现出两个数量级的差异,AAV9具有三个数量级的差异(图14D)。综上,这些数据表明AAVv66在血清学上与AAV2和其他一些当代AAV衣壳不同。

[0181] 在一系列pH值范围内,AAVv66衣壳均比AAV2更具热稳定性

[0182] 衣壳的有效形成和结构稳定性对于病毒载体的生产、纯化和储存至关重要。此外,为了进行生产性感染,载体颗粒必须在整个进入过程中保持稳定,并且仅在基因组载荷的递送可导致细胞转导的条件下脱壳。尽管AAV载体已被广泛研究并因其在一系列组织中的强转导特性而被应用,但细胞内运输、内体逃逸和衣壳运送进细胞核的过程尚不完全清楚。在依赖衣壳动力学的影响AAV细胞内运输和转导的假定细胞内检查点中,内体逃逸是了解最多的。该过程被认为是由衣壳的pH依赖性结构变化触发的。内体腔的酸化导致VP1结构域的构象变化和VP1内PLA2结构域的暴露,这触发了从内体区室的逃逸。原则上,期望的是能在整个细胞内运输过程中保持稳定性的载体衣壳,并且它们可表现出高转导能力。

[0183] 为了确定AAVv66衣壳的整体稳定性,使用差示扫描荧光法(DSF)分析来测量AAVv66衣壳在一系列生理pH值(pH7-pH4)下的热稳定性(图4)。这个范围包括pH 4.5,这是在晚期内体和溶酶体的腔中观察到的。在该测定中,载体颗粒悬浮在SYPRO Orange染料中,该染料在与蛋白中的疏水残基结合时发出荧光。因此,峰值荧光信号是蛋白解折叠时暴露的最大结合疏水区的间接读数。在测试的所有pH条件下,AAVv66的解链温度(最大斜率值[D信号/D温度], T_m)比AAV2高5度以上。在pH 7时观察到最极端的差异,其中AAVv66的 T_m ($75.29 \pm 0.34^\circ\text{C}$)比AAV2的 T_m ($65.85 \pm 0.18^\circ\text{C}$)高了近10度(图4A)。因此,AAVv66衣壳比

AAV2热稳定性高且对pH抗性更好。

[0184] 研究了AAVv66衣壳稳定性对载体基因组释放的影响。测量作为温度范围函数的载体基因组释放已被用作核仁环境施加的压力驱动力的DNA挤出的指标。不同pH值下将AAVv66基因组释放的温度依赖性与AAV2进行了比较。为此,使用SYBR Gold染料进行DSF分析,该染料在与DNA结合时发出荧光。峰值荧光是包封的基因组对染料溶液的最大可及性的间接测量。观察到pH 7下的载体基因组释放伴随着衣壳稳定性,显示出AAV2的信号峰在约65°C,而AAVv66在约74°C。然而,在较低的pH值下,与未折叠衣壳蛋白的峰值荧光相比,染料可及的DNA的峰值荧光在较低的温度下检测到(图4B)。此外,AAVv66的DNA可及性比AAV2更明显——其中AAV2在pH 5和4下的峰值DNA可及性分别发生在约53°C和约42°C;而AAVv66在25°C时表现出峰值信号。这一令人惊讶的观察结果表明,在AAVv66衣壳中,在低pH(4-5)下,甚至在室温下,DNA也尤其是可及的。

[0185] 然后研究了AAVv66特异性氨基酸残基是否促成了在AAVv66和AAV2之间观察到的结构和功能差异的问题。将13个定义AAVv66的氨基酸残基突变为AAV2的那些氨基酸残基,并测试了它们在用HEK293细胞生产期间对包装载体基因组的影响(图4C)。此外,评估了突变体衣壳的衣壳热稳定性和载体基因组释放(图4D和4E)。除了四个突变(A151V、K447R、Y533F和S585R)之外,所有突变均导致DNase抗性基因组的产量较低,这与AAV2相似或更低(图4C)。值得注意的是,不涉及电荷变化的相对保守的突变D499E使包装产量降低至AAV2产量的约5%。该修饰还影响衣壳稳定性,因为D499E、S585R和S585R/T588R双突变使T_m分别降低了5.9°C、3.8°C和5.4°C(图4D),而其他突变仅影响T_m 1至2°C。相同氨基酸突变的载体基因组可及性表现出降低的峰值信号温度,而其他突变几乎未导致变化或未导致变化(图4E)。值得注意的是,纯化载体的总滴度没有受到大幅影响(表3)。因此,AAVv66的包装产量仅部分取决于衣壳稳定性,这表明部分衣壳失稳可能足以促进基因组释放。仅残基D499大幅影响了包装和衣壳稳定性。

[0186] 表3

[0187] 大规模生产和纯化后的病毒滴度

	载体名称	滴度 GC/mL
	<i>ssAAV2-CB6-FLuc</i>	1.60E+12
	<i>ssAAVv66-CB6-FLuc</i>	6.00E+12
	<i>ssAAVv66-Q39K-CB6-FLuc</i>	7.70E+12
	<i>ssAAVv66-A151V-CB6-FLuc</i>	9.00E+12
	<i>ssAAVv66-K447R-CB6-FLuc</i>	6.60E+12
	<i>ssAAVv66-A450T-CB6-FLuc</i>	8.80E+12
	<i>ssAAVv66-M457Q-CB6-FLuc</i>	1.00E+13
[0188]	<i>ssAAVv66-A492S-CB6-FLuc</i>	1.40E+13
	<i>ssAAVv66-D499E-CB6-FLuc</i>	9.00E+12
	<i>ssAAVv66-Y533F-CB6-FLuc</i>	7.10E+12
	<i>ssAAVv66-D546F-CB6-FLuc</i>	1.20E+13
	<i>ssAAVv66-G548E-CB6-FLuc</i>	7.80E+12
	<i>ssAAVv66-S585R-CB6-FLuc</i>	7.00E+12
	<i>ssAAVv66-T588R-CB6-FLuc</i>	1.30E+13
	<i>ssAAVv66-T593A-CB6-FLuc</i>	8.10E+12
	<i>ssAAVv66-S585R/T588R-CB6-FLuc</i>	1.85E+12

[0189] AAVv66和AAV2之间衣壳差异的冷冻电镜结构分析

[0190] 为了表征AAVv66的结构特性,纯化了AAV2v66-Egfp载体用于冷冻电镜分析。获得了52,874个颗粒图像,其产生了2.5 Å分辨率下的冷冻电镜图谱(图5E和图16),并获得了具有最佳真实空间拟合和立体化学参数的结构模型(表2)。总体而言,AAVv66结构与AAV2类似(原子坐标的均方根偏差(RMSD) = 0.456 Å)(图16)。因此,AAVv66表现出AAV衣壳的特征特性,包括在二倍轴(two-fold axis)上的凹陷、由三倍突起(three-fold protrusions)定义的三倍对称性(three-fold symmetry)以及由形成用于Rep结合的界面和孔的五个单体组成的五倍孔(filve-fold pore)(图5A)。值得注意的是,VP1u和VP2结构域分别代表每个颗粒的VP3结构域的约十二分之一,并且与之前的其他AAV结构类似,在我们的对称冷冻电镜图谱中没有得以解析。因此,只有残基219-736在冷冻电镜图谱中被明确解析,包括13个定义AAVv66的残基中的11个(图5B)。

[0191] AAVv66结构与AAV2结构的比较揭示了几个结构差异,这可能有助于改善DNA包装和/或衣壳稳定性。关键差异发生在位于3倍轴周围的突起处的VP3单体之间的界面处。D499,其突变为较长的谷氨酸残基导致了载体基因组包装中的显著缺陷(图4C),与S501形成静电相互作用和/或氢键(图5D)。该区域紧靠相邻的VP3单体(图5D)。这里,D499和S501的主链原子分别与对称相关的N449和T448的侧链相互作用,而S501的羟基与对称相关的S446的主链羰基形成氢键。因此,D499突变的强烈影响可能是由于VP3单体之间界面被破坏,导致衣壳不稳定。在同一区域,相邻单体的残基K447和A450消除了相应AAV2-R447和T450侧链

之间静电相互作用的可能性(图6D)。氨基酸M457位于可变区IV处AAVv66的三倍突起上,侧链朝向溶剂(图6E)。有趣的是,该甲硫氨酸在其他血清型中是一个独特的特征(图8),表明潜在的独特衣壳与细胞受体、宿主因子或抗体的相互作用。AAVv66-Y533(AAV2-F533)中的极性羟基可能使R487和K532侧链之间的极性环境稳定,并可能有助于与对称相关单体的L583的相互作用(图6A)。AAVv66-D546和G548重新分布了由AAV2-G546和E548赋予的表面电荷(图6B),这是AAVv66的另一个定义性特征。

[0192] AAV2的一个关键功能区域涉及位置585和588处带正电荷的精氨酸残基。这些残基位于三倍突起的表面并管理衣壳与HSPG受体的相互作用,这对于许多细胞类型中的附着和进入至关重要。相比之下,AAVv66衣壳中的S585和T588是带中性电荷的极性残基(图5D和图6),类似于AAV3b的S586和T589(图8)。AAV3b与HSPG的物理和功能相互作用依赖于残基R447和R594(AAV2中的R447和A593)赋予的静电相互作用⁷,但AAVv66也缺乏这些精氨酸残基(K447和T593)。这些与AAV2和AAV3b的差异表明,AAVv66与AAV进化枝B和C衣壳常用的典型细胞表面受体结合不同,这与我们的发现一致,即AAVv66缺乏肝素结合。

[0193] AAV2和AAVv66显示表面电荷差异

[0194] 由于病毒的静电特性对衣壳-受体相互作用很重要^{7,43},研究了与AAV2相关的AAVv66衣壳的正电荷净损失如何影响衣壳的静电特性。首先,比较了AAV2和AAVv66结构的计算的静电位值(图7A)。AAVv66表面的静电位分布与AAV2不同。最显著的差异在于三倍突起,其中由AAV2中的R585和R588赋予的正电荷在AAVv66中由S585和T588显著降低(图7B)。

[0195] 然后研究了AAVv66的独特结构和表面静电是否影响衣壳的电荷依赖性颗粒迁移(zeta电位)(图7C)。AAVv66的zeta电位(-10mV)与AAV2的zeta电位(-3.5mV)显著不同,这与衣壳之间的静电电位差异相一致。为了测试单个取代的贡献,测量了具有将残基转化为AAV2的相应残基的单个氨基酸取代的AAVv66的颗粒迁移(图7C)。单突变S585R和T588R导致zeta电位的最显著变化(各约3mV),使zeta电位更接近于AAV2(图7C)。这些观察结果表明,AAVv66的静电特性与AAV2不同,差异主要是由于位置585和588处的取代。因此,衣壳AAVv66与受体、抗体和其他蛋白的相互作用可能与其他密切相关的衣壳显著不同。

[0196] 所选择的序列

[0197] AAVv66氨基酸序列(SEQ ID NO:1)

[0198] MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD
AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPGKKRPV
EHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMDRVIITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLI
NNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGY
LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTNAPSGT
TTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNDRDSLVPNGPAMASHKDDEE
KYFPQSGVLIFGKQDSGKTNDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATTDVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSNNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0199] 野生型AAV2衣壳蛋白氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

[0200] MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEAD

AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPV
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRQDWRLI
NNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMVPQYGY
LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGT
TTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEE
KFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
LQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

序列表

<110> 马萨诸塞大学(University of Massachusetts), 四川大学(Sichuan University)

<120> 衣壳变体及其用途

<130> U0120.70140W000

<140> 尚未分配

<141>

<150> US 63/003,143

<151> 2020-03-31

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 735

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

```

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

```

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

465	470	475	480
Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn			
	485	490	495
Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly			
	500	505	510
Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp			
	515	520	525
Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys			
	530	535	540
Gln Asp Ser Gly Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr			
545	550	555	560
Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr			
	565	570	575
Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr			
	580	585	590
Thr Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp			
	595	600	605
Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr			
610	615	620	
Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys			
625	630	635	640
His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn			
	645	650	655
Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln			
	660	665	670
Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys			
	675	680	685
Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr			
	690	695	700
Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr			
705	710	715	720
Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu			
	725	730	735

<210> 2

<211> 735

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300

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

610	615	620																	
Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys																			
625	630	635	640																
His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn																			
	645	650	655																
Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln																			
	660	665	670																
Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys																			
	675	680	685																
Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr																			
690	695	700																	
Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr																			
705	710	715	720																
Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu																			
	725	730	735																

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

gactgcatct ttgaacaata aatga 25

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

gaaacgaatt aaccggttta ttgattaa 28

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 5

catcactacg ctagatgact gcatctttga acaataaatg a 41

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
tagtatatcg agactcgaaa cgaattaacc ggtttattga ttaa 44
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
agagcggcat aaggacgaca gca 23
<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
gcattctcct gtggagccag act 23
<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
ttacttgagc agaacaaacg ctc 23
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10

caaaacaaac actccaagcg gaac 24
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11
aaccaccacg cagtccaggc ttc 23
<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 12
atcaaaaaca tctgcggata acaacaacag tg 32
<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
caacaacagt gaatattcgt ggac 24
<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 14
tgaagaaaaa ttttttcctc agagcggggt tc 32
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 15
tggaaaacaa ggctcgggaa aaa 23
<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
acaagactcg gagaaaacta atgtg 25
<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
caacctccag agaggcaaca cac 23
<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
gagcggcaac agacaggcag cca 23
<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19
ggcagccacc gcagatgtca aca 23
<210> 20
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 20
gcgggctttg gtggtggt 18
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 21
tctaccggcc tcttttttcc 20
<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
tacagatact ggtcgatc 18
<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23
ctcaagtaat acagatactg g 21
<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 24
ccgcttgag cgtttggt 18
<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 25
actcgctgct ggcggtaa 18
<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 26
ttatccgcag ctgtttttg 19
<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 27
tcgtccttgt ggctggcc 18
<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 28
aagatgagaa ccccgctc 18
<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 29
tttccaaaga tgagaacc 18
<210> 30
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 30

gtagatacag aaccatactg ctc 23

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

tggaggttgg tagatacaga accatactg 29

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

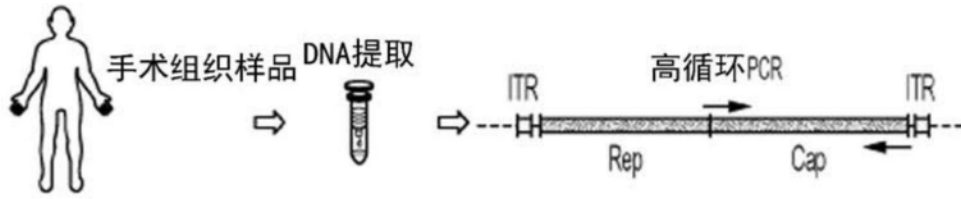
<220>

<223> 合成的

<400> 32

tgtgtgttgc cgctctgg 18

前病毒衣壳扩增



单分子，实时测序

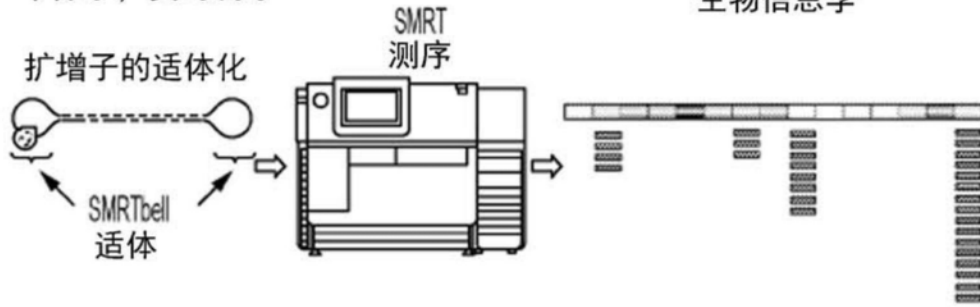


图1A

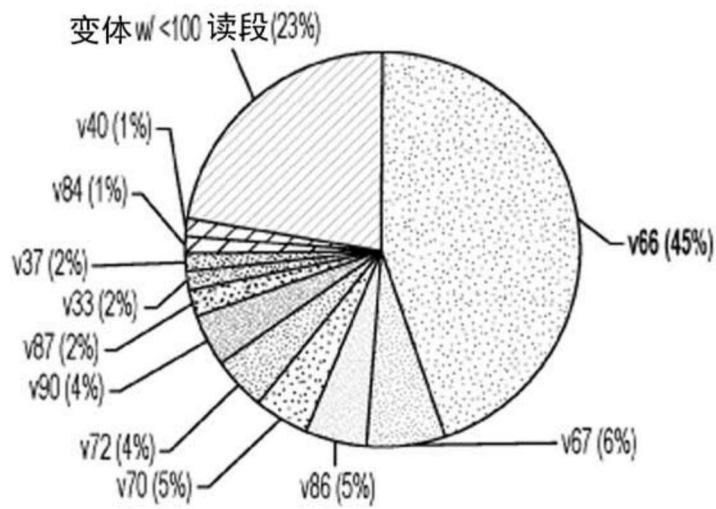


图1B

独特 AAW66 aa	衣壳结构域	可变区
K39Q	VP1	-
V151A	VP2	-
R447K	VP3	VR-IV
T450A		
Q457M		
S492A		
E499D		VR-V
F533Y		VR-VI
G546D		VR-VII
E548G		VR-VIII
R585S		
R588T		
A593T		

图1C

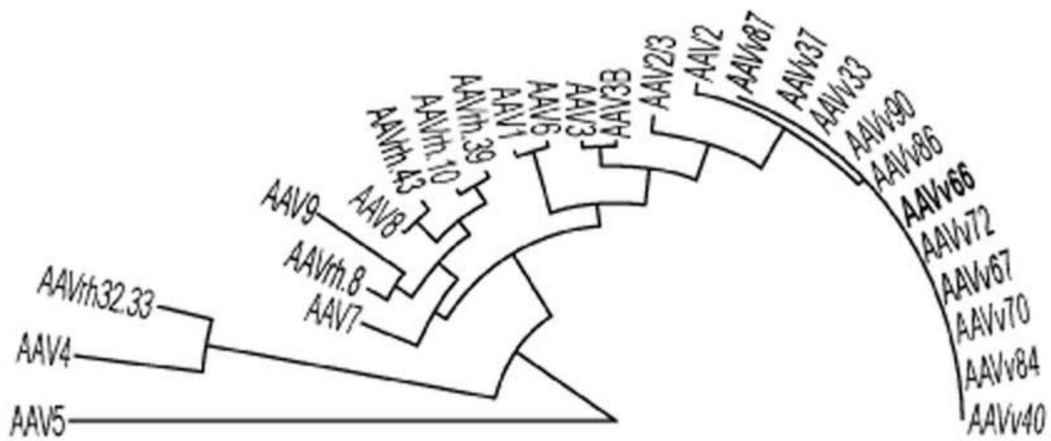


图1D

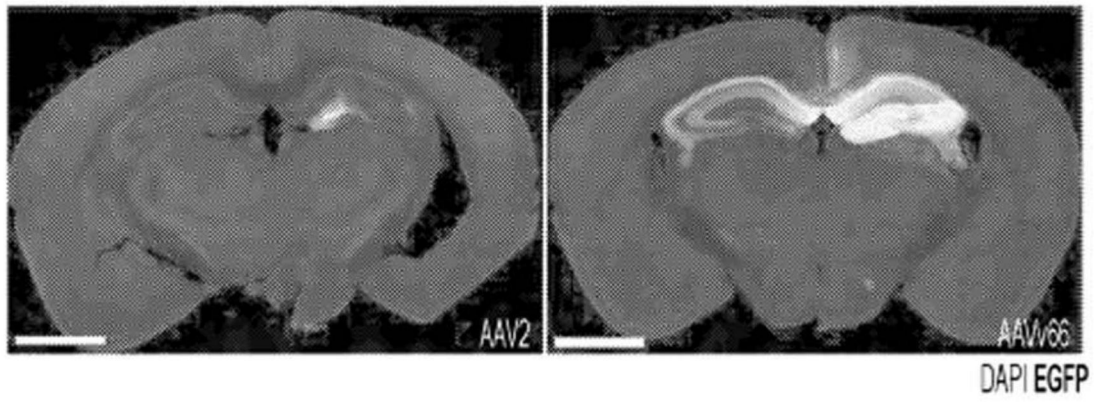


图2A

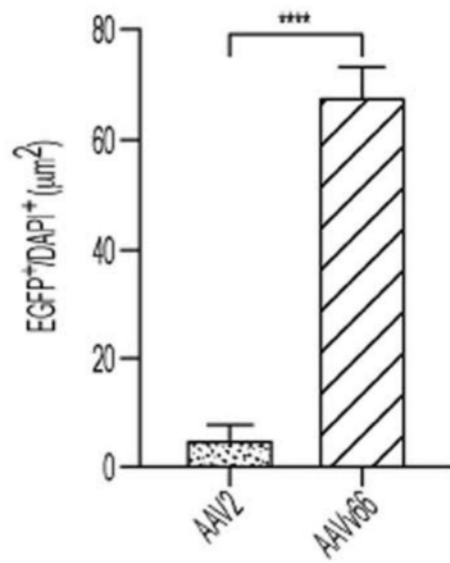


图2B

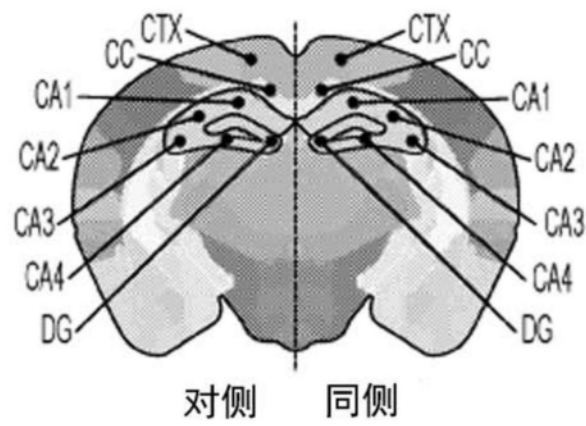


图2C

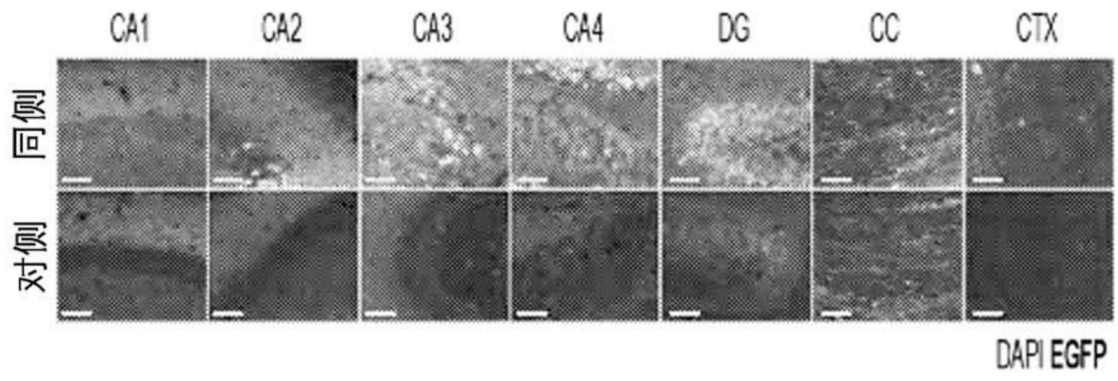


图2D



图3A

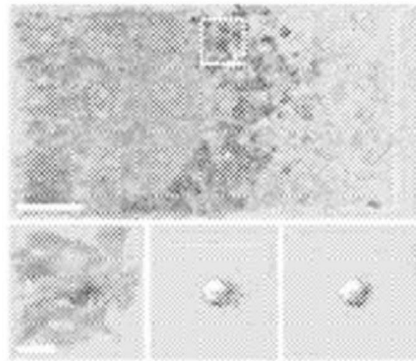


图3B

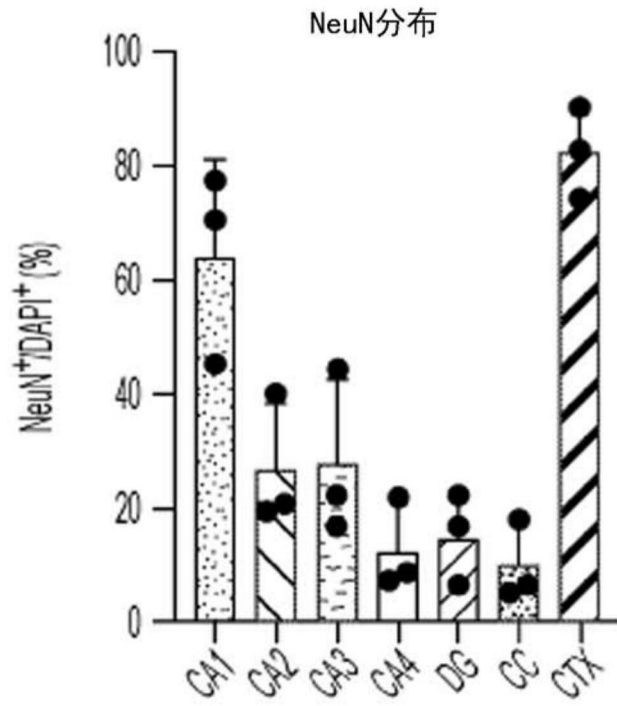


图3C

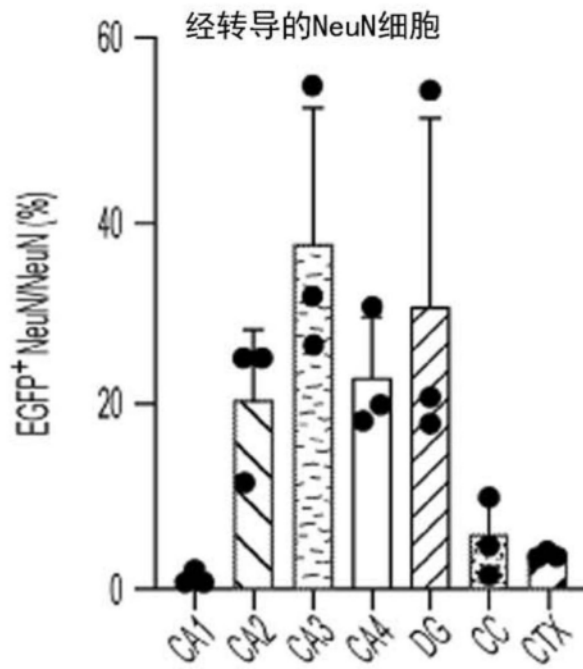


图3D



图3E

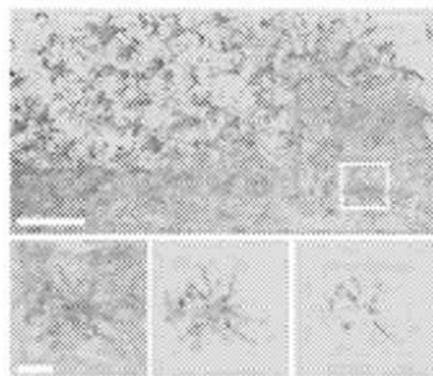


图3F

Gfap分布

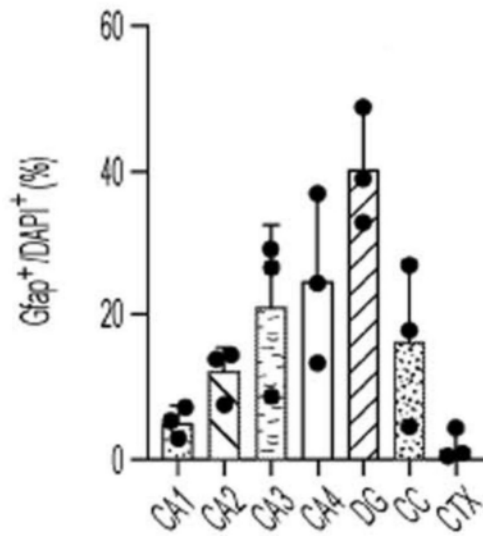


图3G

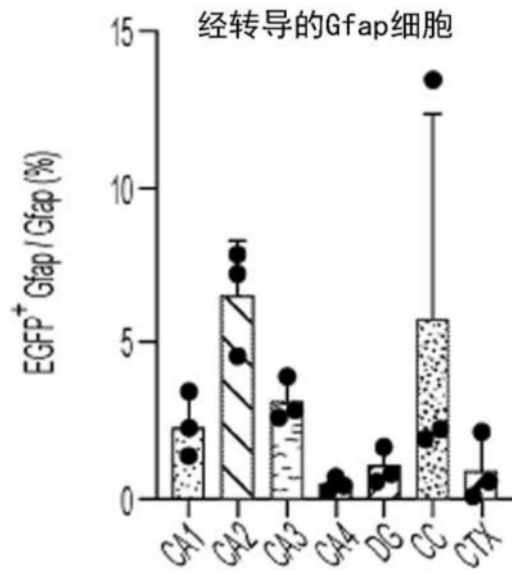


图3H

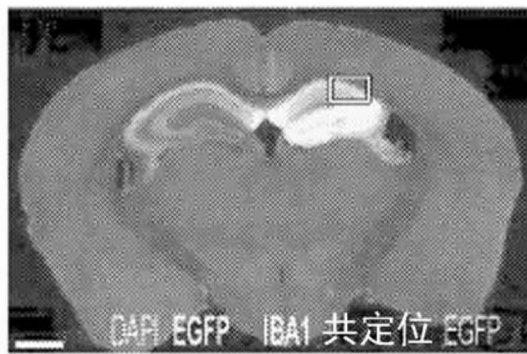


图3I

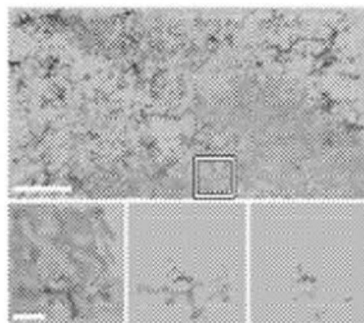


图3J

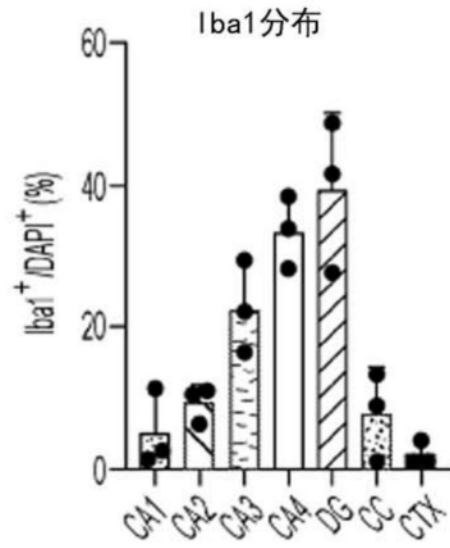


图3K

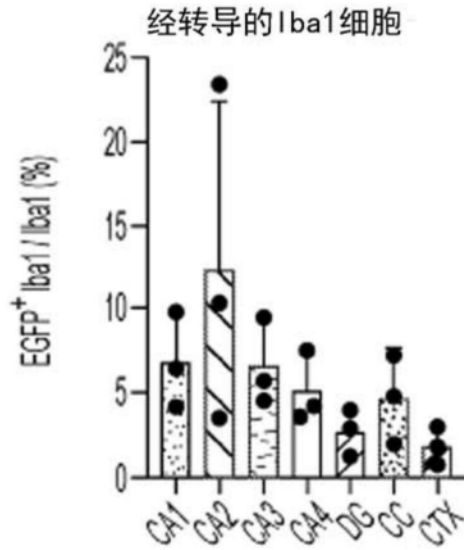


图3L

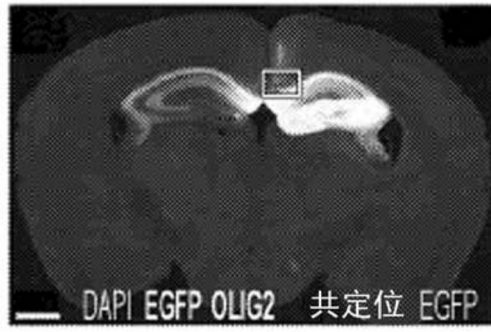


图3M

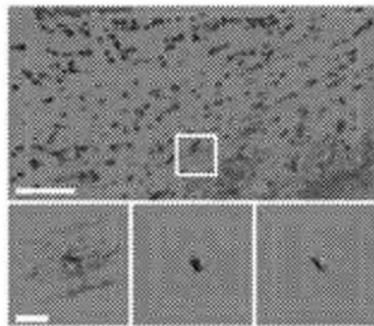


图3N

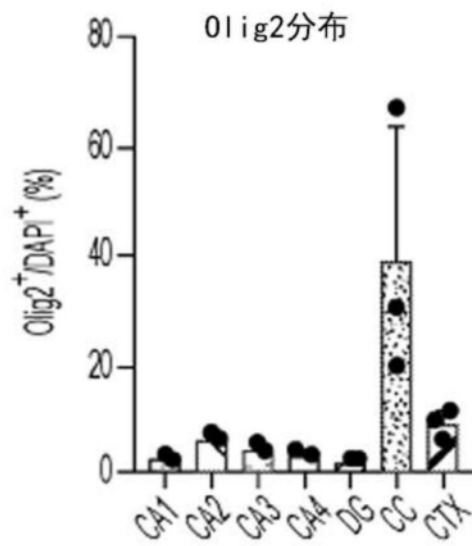


图30

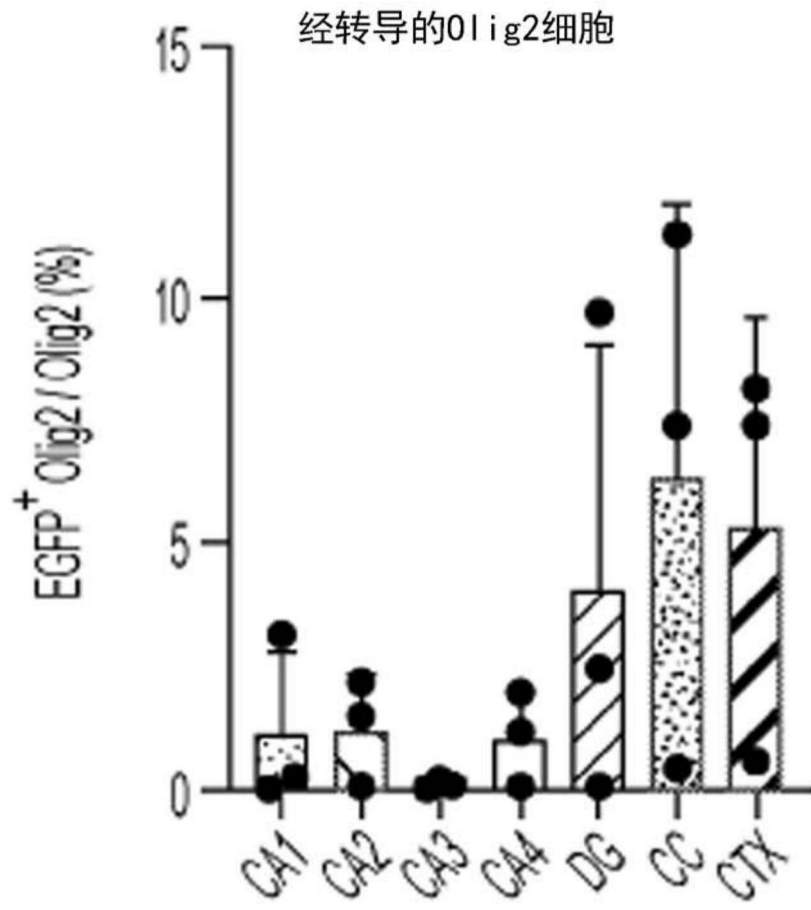


图3P

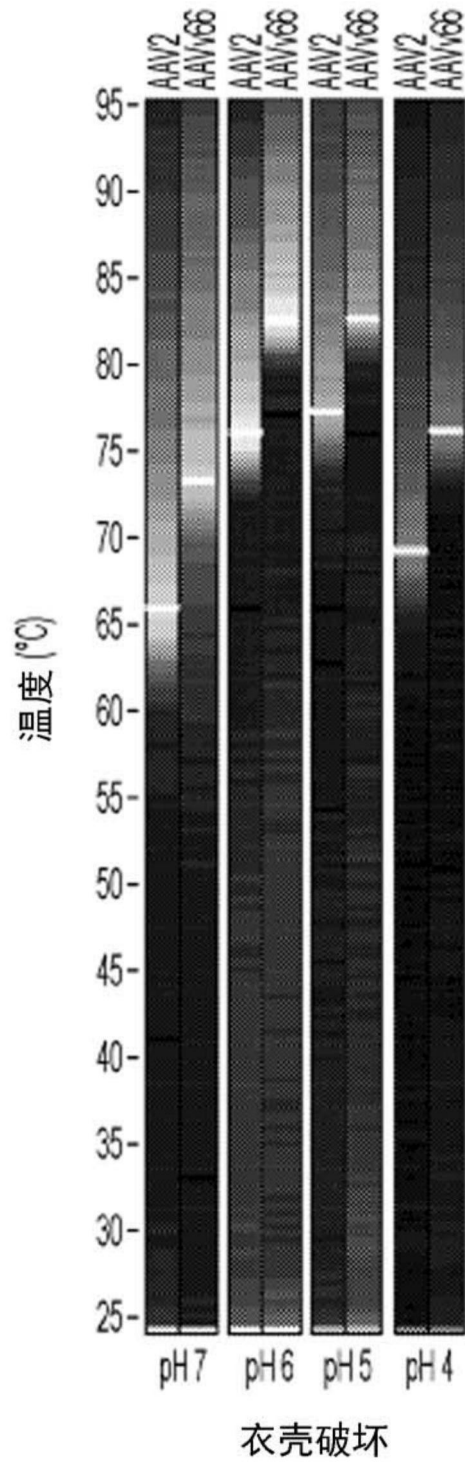


图4A

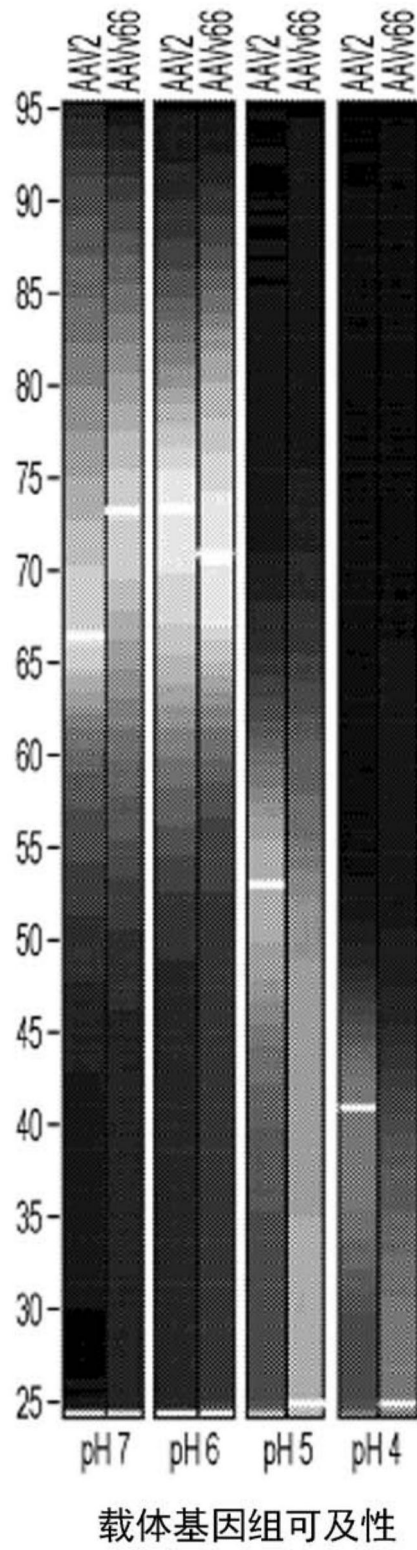


图4B

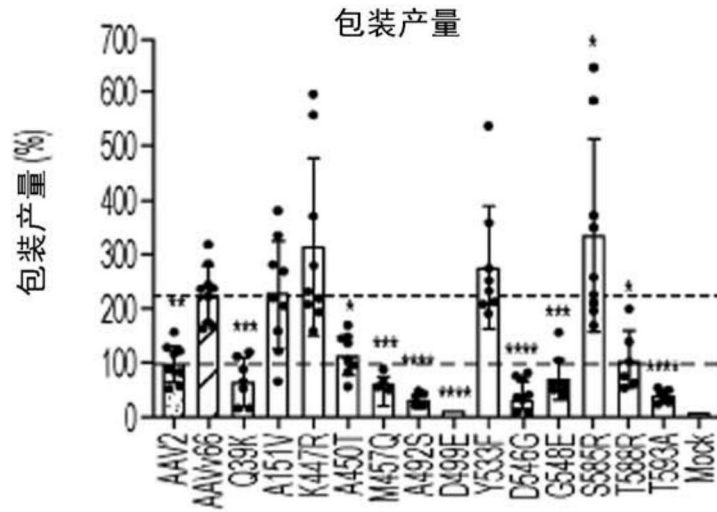


图4C

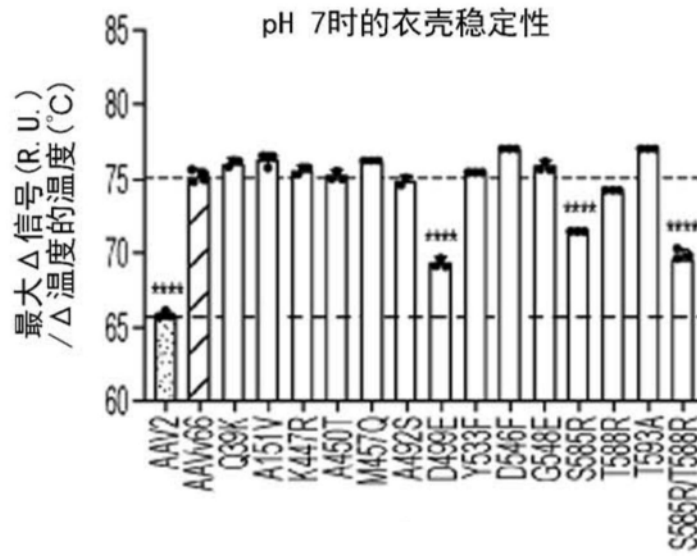


图4D

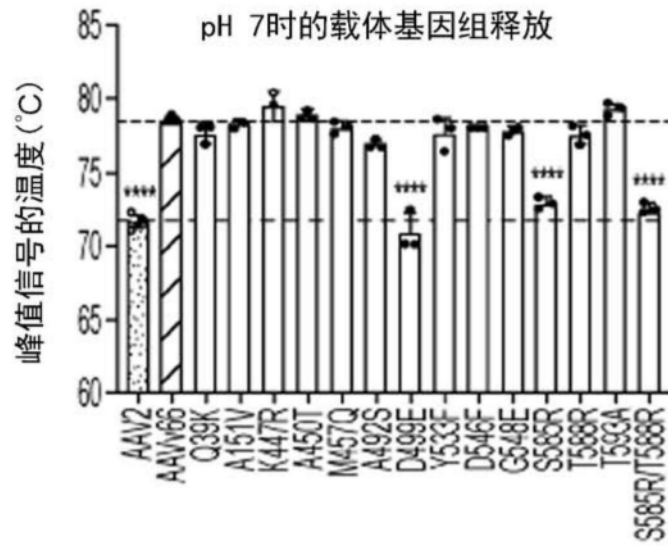


图4E

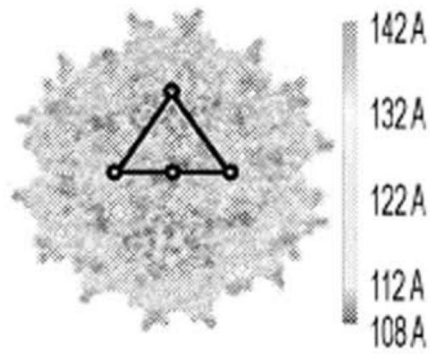


图5A

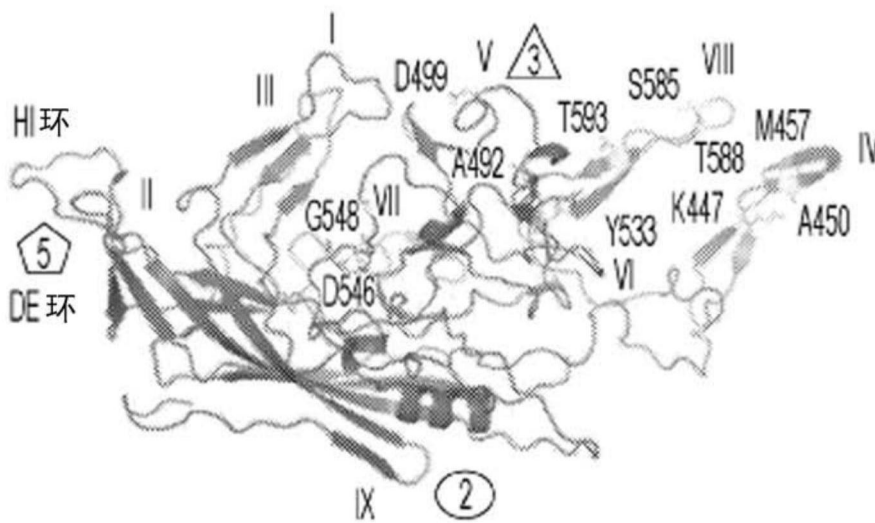


图5B

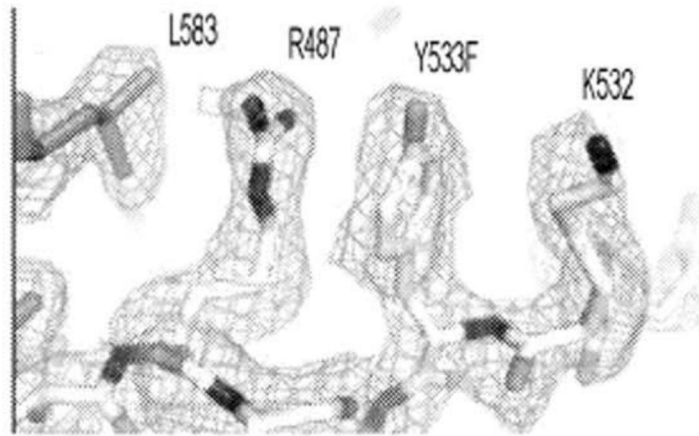


图5C

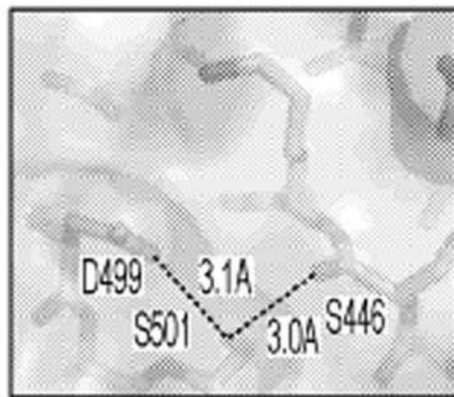


图5D

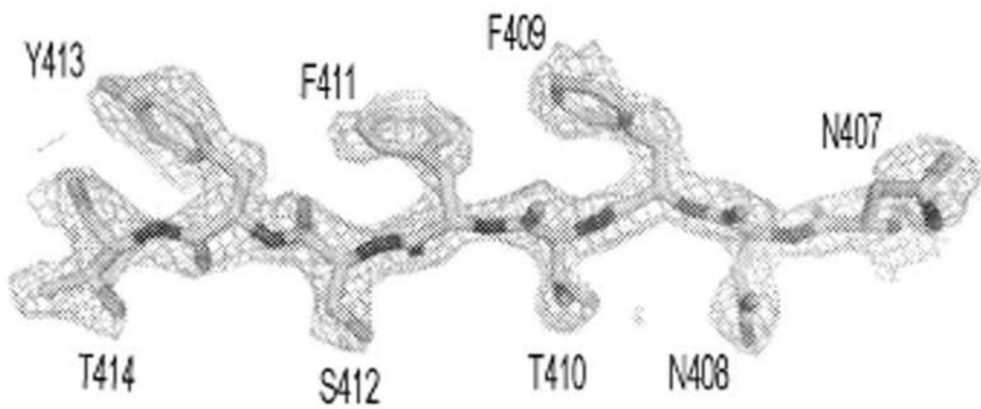


图5E

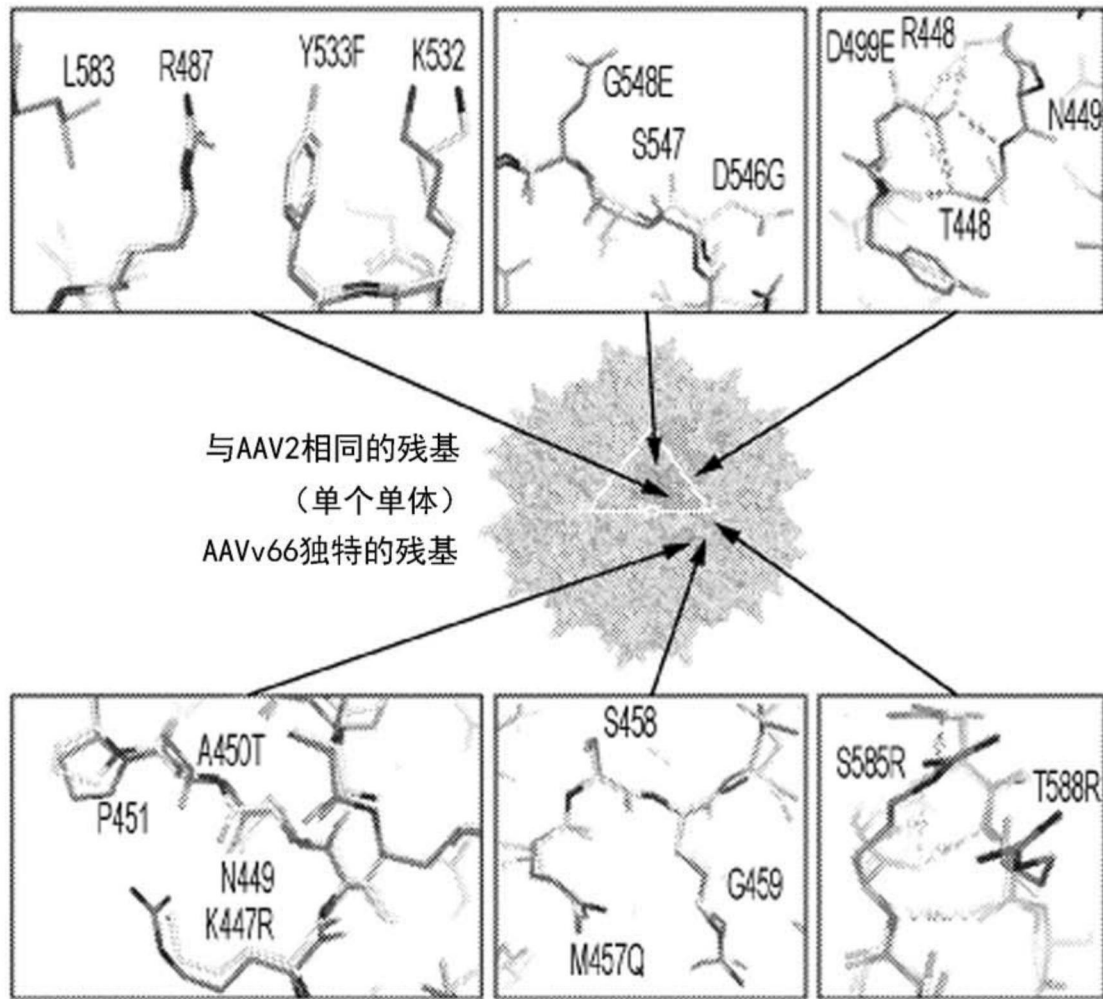


图6

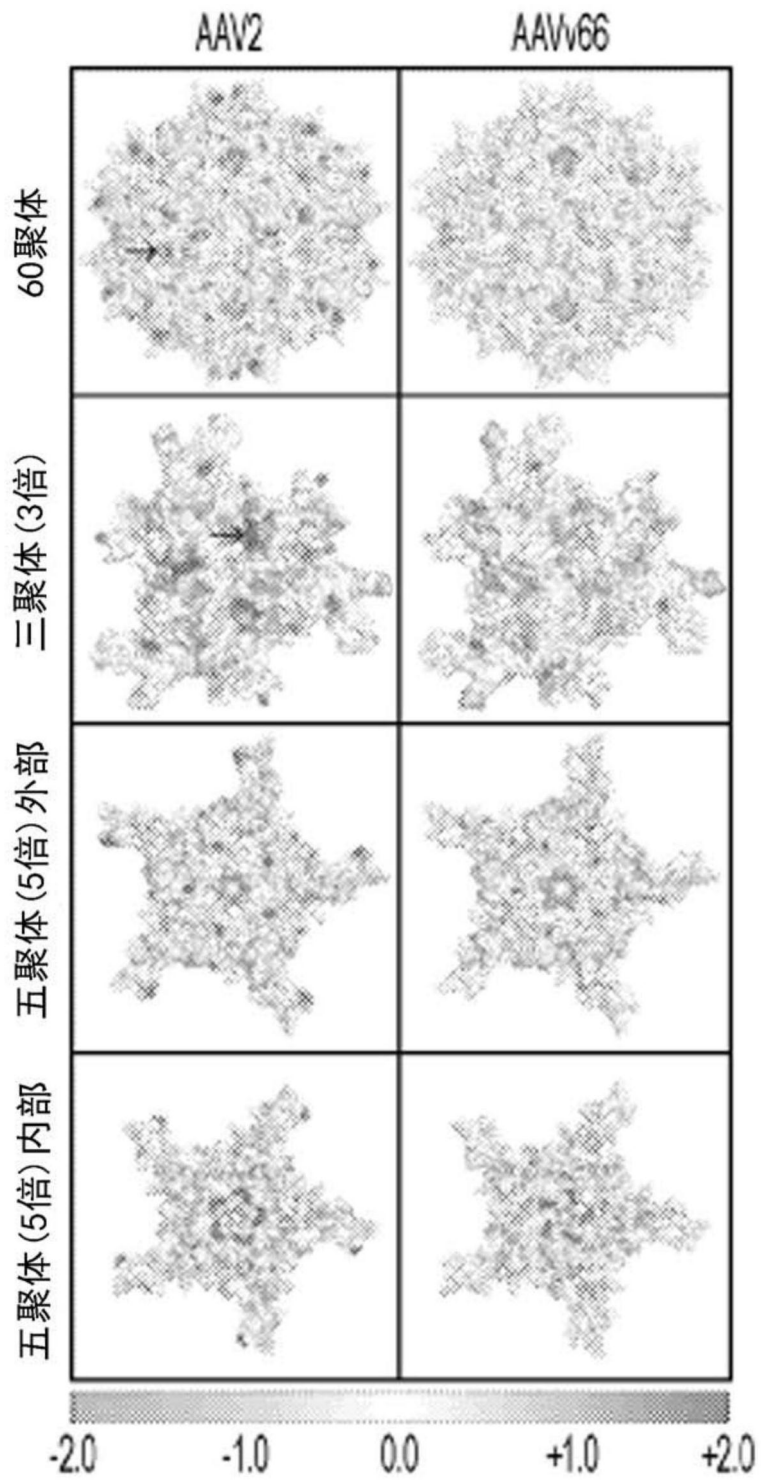


图7A

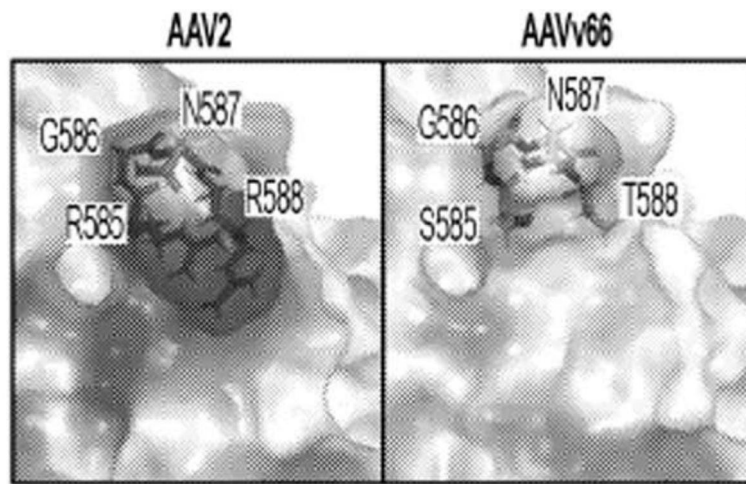


图7B

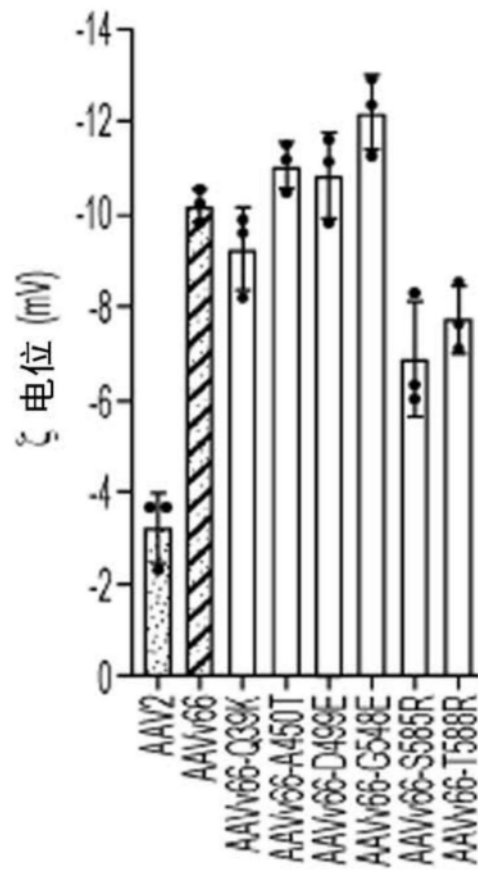


图7C



图8

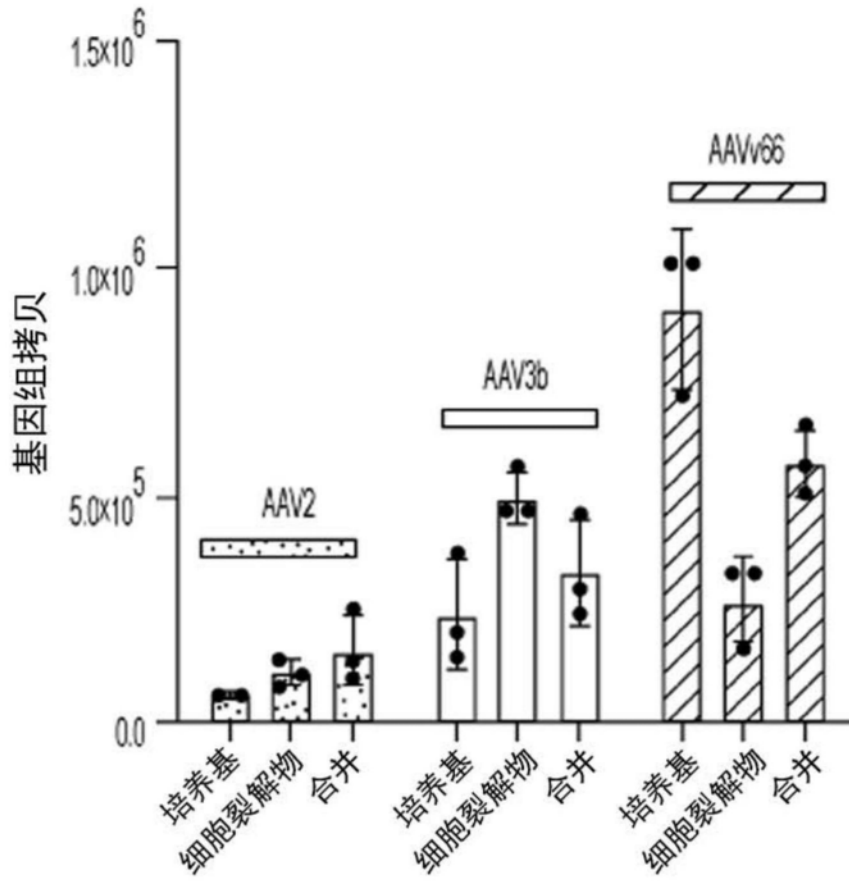


图9

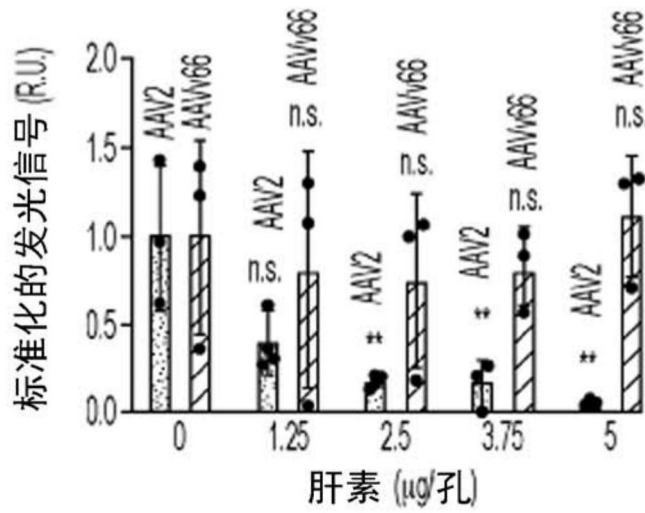


图10

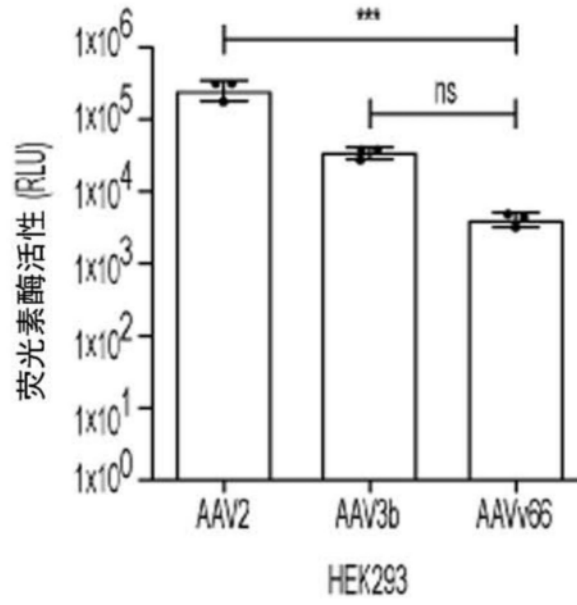


图11

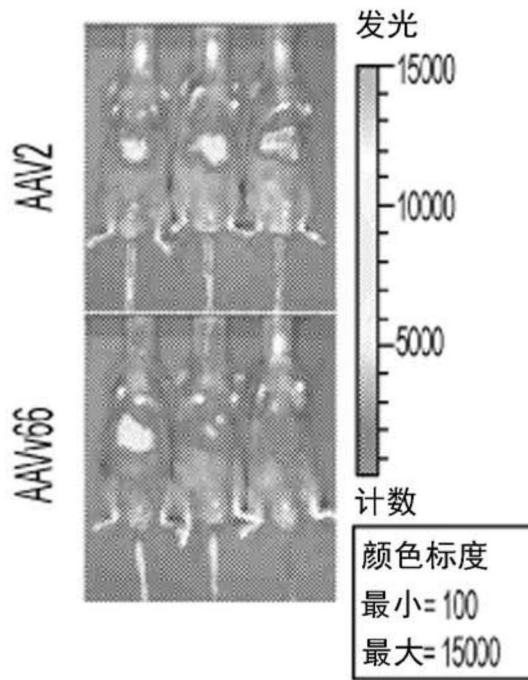


图12A

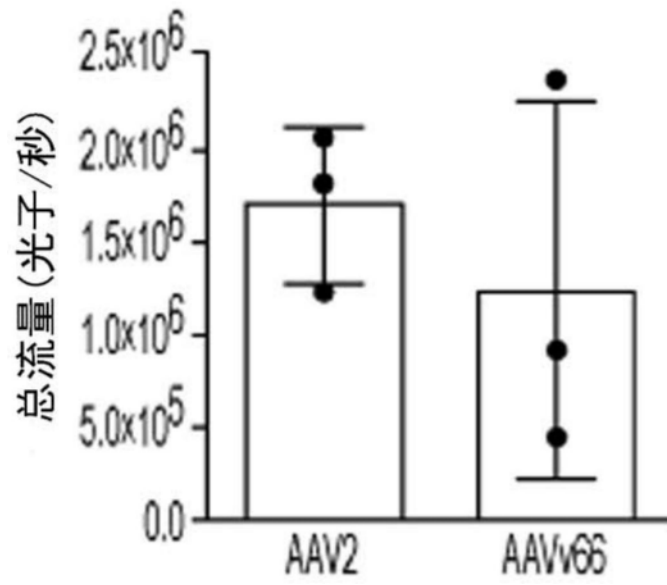


图12B

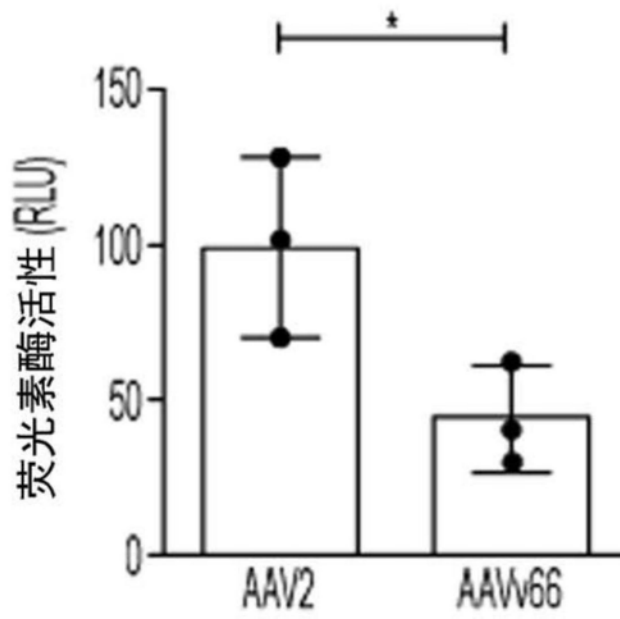


图12C

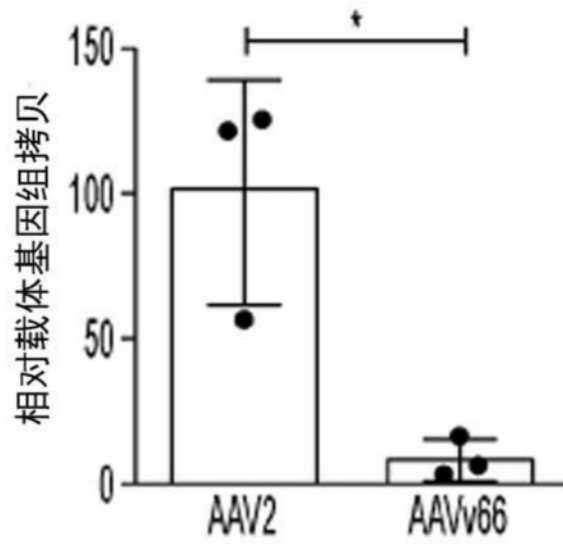


图12D

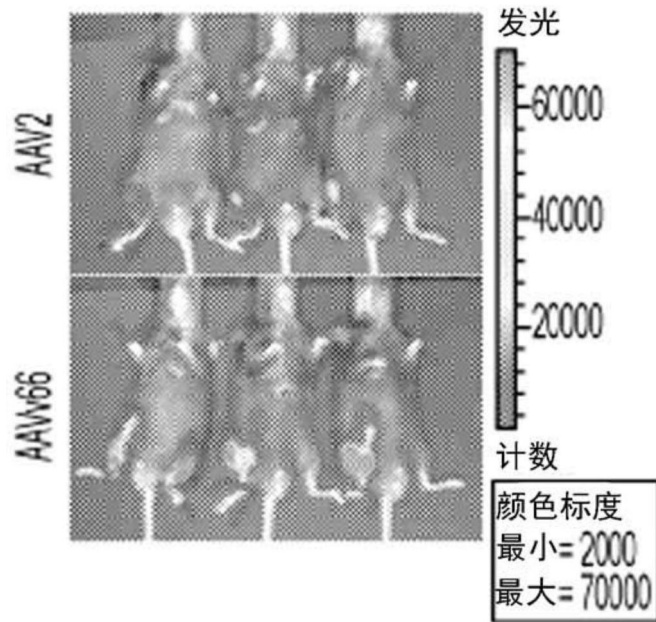


图13A

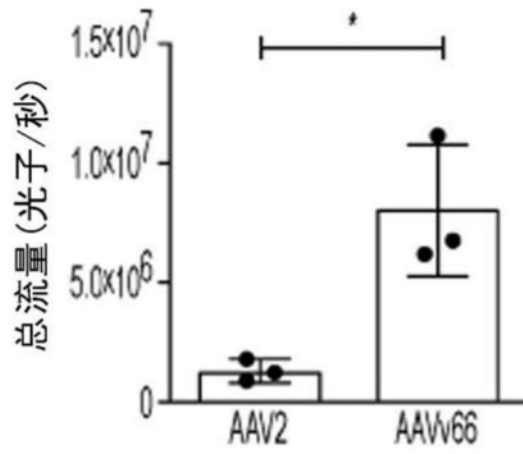


图13B

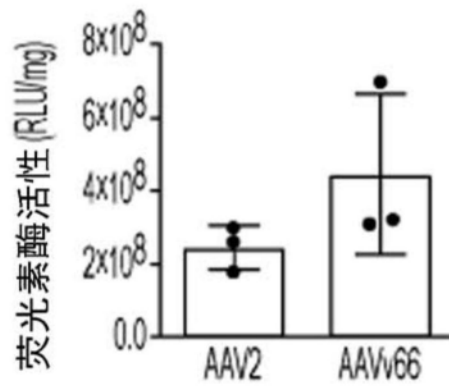


图13C

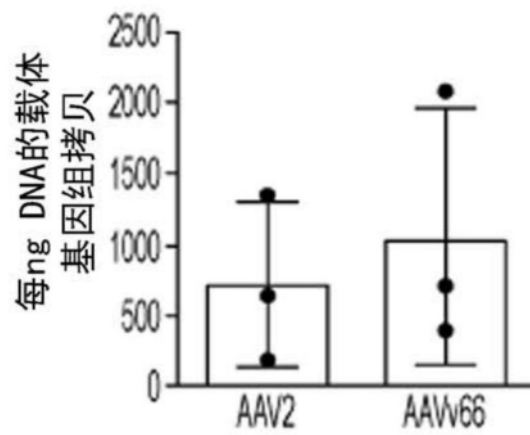


图13D

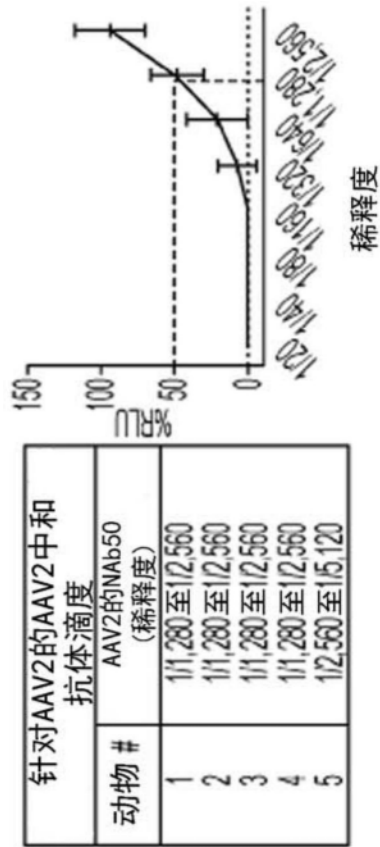


图14A

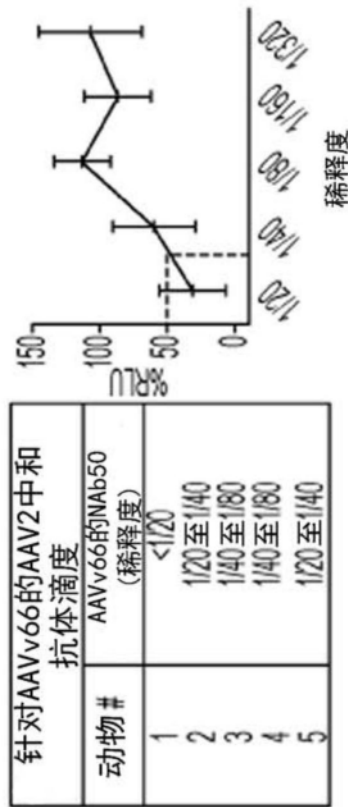


图14B

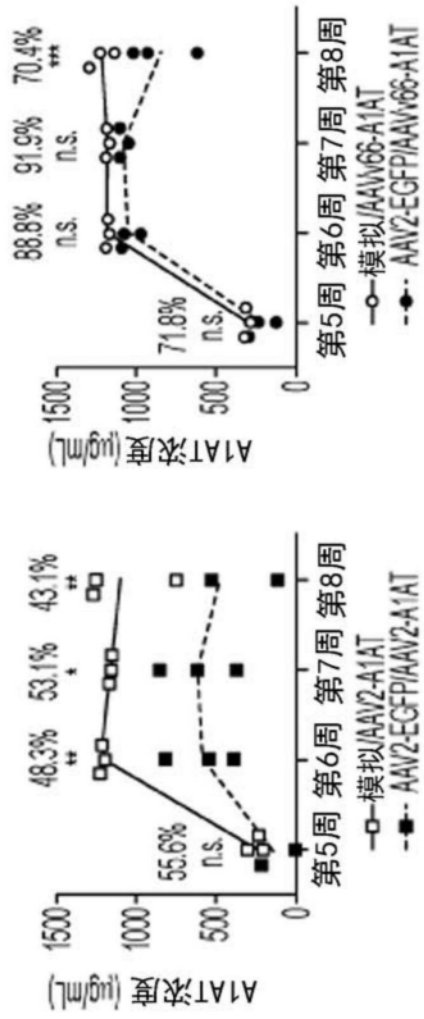
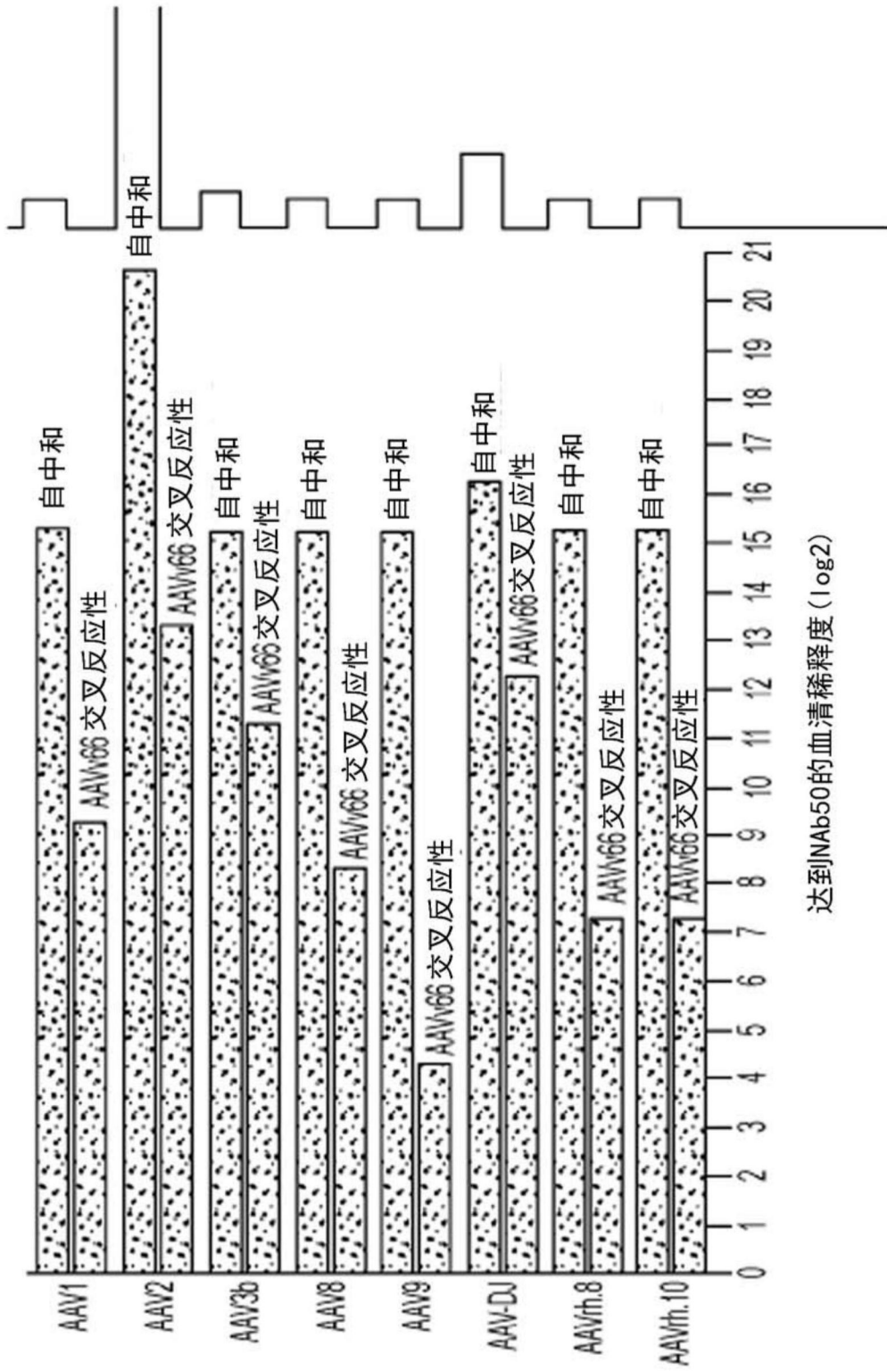


图14C



达到NAbs50的血清稀释度 (log2)

图14D

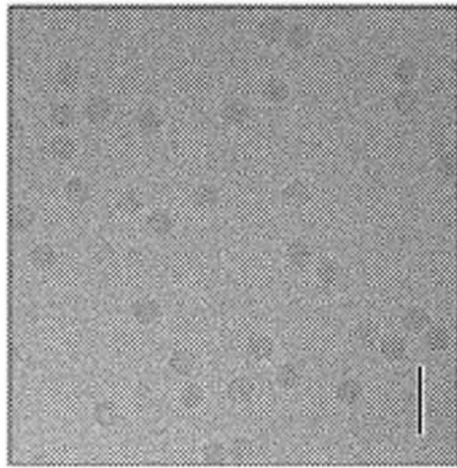


图15A

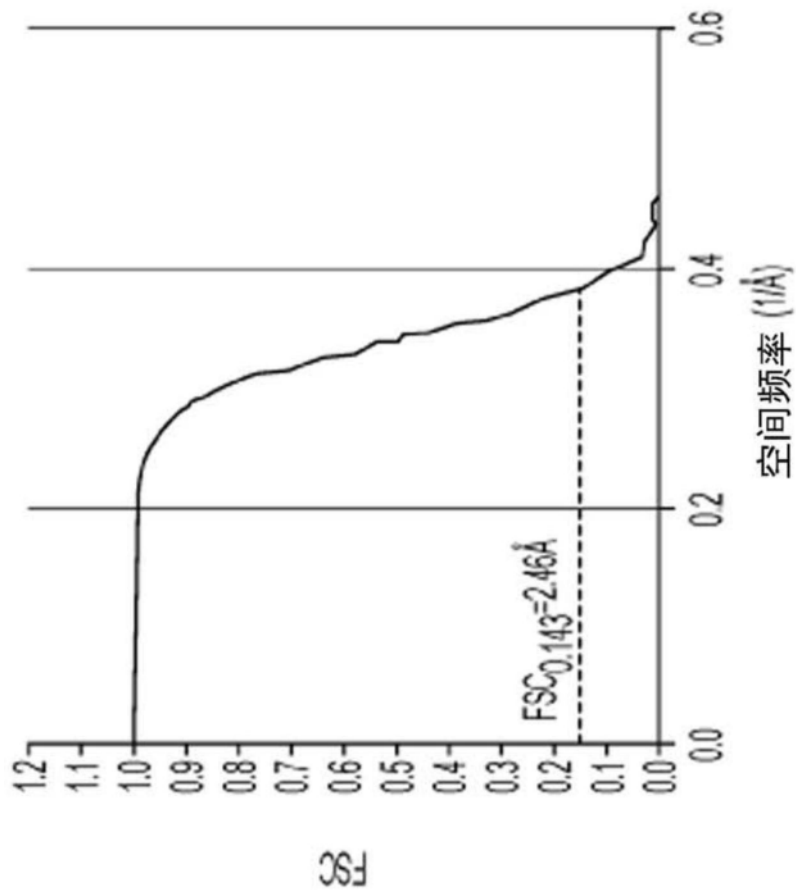


图15B

AAVv66结构比较, RMSD_{C-α} (Å)

区域:	VP3	VR I	VR II	VR III	VR IV	VR V	VR VI	VR VII	VR VIII	HI 环	VR IX
残基:	217-735	262-268	326-330	380-388	449-468	487-504	525-541	544-556	579-594	436-454	704-711
AAV2 (1LP3)	0.46	0.79	1.14	0.47	0.67	0.46	0.43	0.50	0.51	0.45	0.40
AAV3b (3KIC)	0.76	1.68	1.05	0.52	2.73	0.89	0.68	0.63	0.75	0.60	0.87

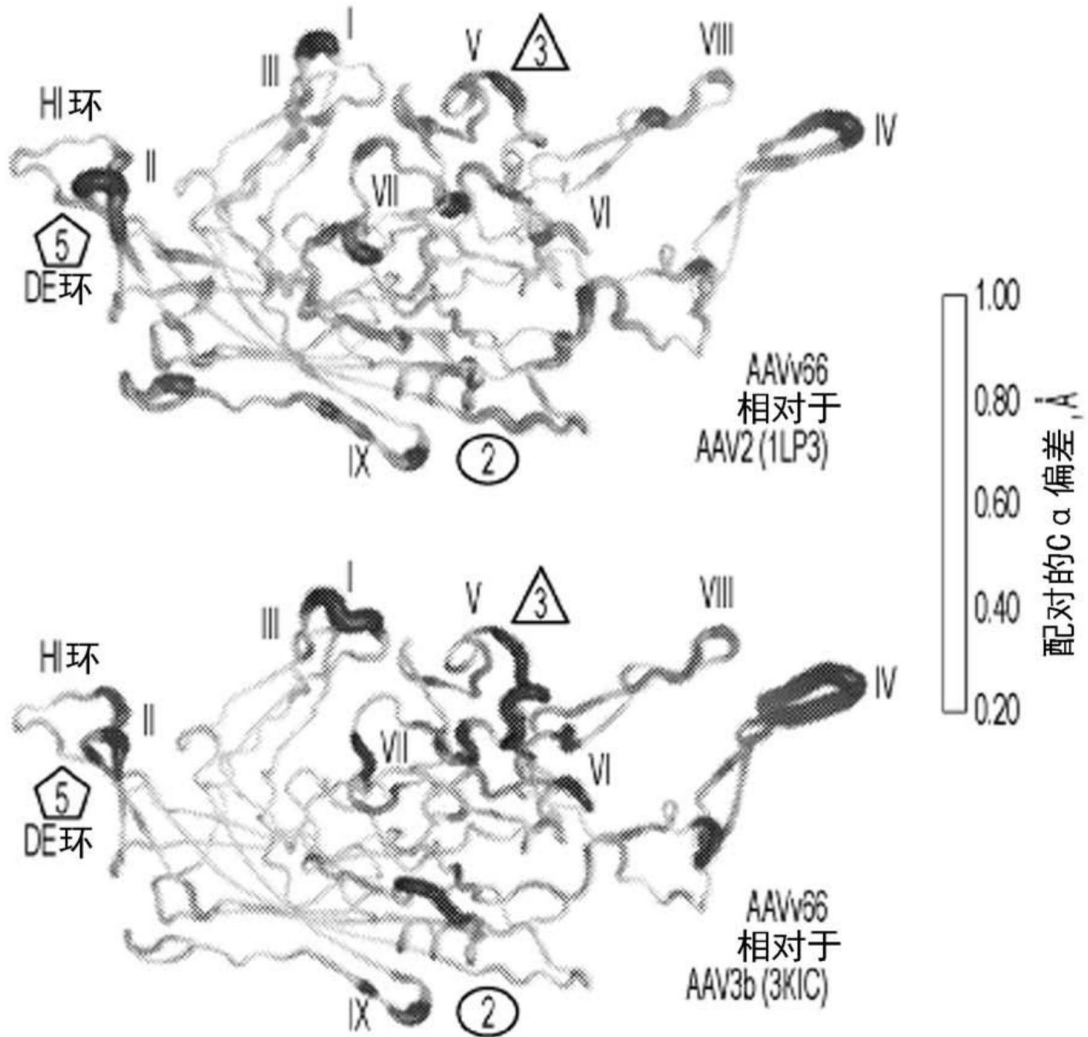


图16