



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110650733 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201880025324.7

(22)申请日 2018.02.28

(30)优先权数据

62/464,878 2017.02.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/020215 2018.02.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/160686 EN 2018.09.07

(71)申请人 阿德夫拉姆生物技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 安娜希塔·喀拉瓦拉

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 9/48(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

A61K 39/23(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/86(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

权利要求书3页 说明书37页

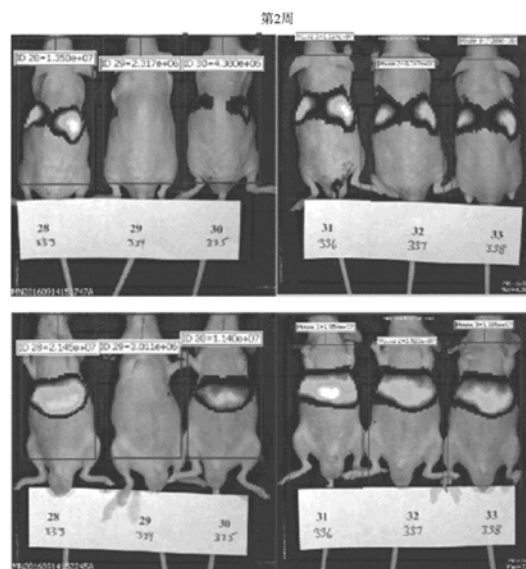
序列表16页 附图59页

### (54)发明名称

经过修饰的AAV衣壳和其用途

### (57)摘要

本公开提供了具有改变的衣壳蛋白的经过修饰的腺相关病毒(AAV)病毒粒子,其中所述经过修饰的AAV病毒粒子在施用于眼睛时对视网膜细胞表现出更大的感染性或在静脉内施用时对肝细胞表现出更大的感染性。本公开进一步提供了将基因产物递送到个体的视网膜细胞的方法、治疗眼部疾病和病症的方法、将基因产物递送到个体的肝脏的方法以及治疗肝脏疾病和病症的方法。



1. 一种非天然存在的经过修饰的腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白, 其包括相对于对应的亲本 AAV 衣壳蛋白的肽插入, 其中所述肽插入包括氨基酸序列 LGETTRP (SEQ ID NO: 6) 或氨基酸序列 LALGETTRPA (SEQ ID NO: 14), 其中插入位点位于 AAVShH10 的 VP1 的氨基酸残基 456 与 457、氨基酸残基 457 与 458 或氨基酸残基 458 与 459 之间或者另一个 AAV 血清型的衣壳蛋白中的对应位置处。

2. 根据权利要求 1 所述的经过修饰的 AAV 衣壳蛋白, 其中所述 AAV 是 AAVShH10、AAV1 或 AAV6。

3. 一种多核苷酸, 其包括对根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的经过修饰的 AAV 衣壳蛋白进行编码的核酸序列。

4. 一种表达载体, 其包括根据权利要求 3 所述的多核苷酸, 其中对所述经过修饰的 AAV 衣壳蛋白进行编码的所述核酸序列与启动子序列可操作地连接。

5. 一种细胞, 其包括根据权利要求 4 所述的表达载体。

6. 根据权利要求 5 所述的细胞, 其进一步包括对治疗性蛋白进行编码的多核苷酸。

7. 根据权利要求 5 或权利要求 6 所述的细胞, 其进一步包括对 rep 蛋白进行编码的多核苷酸。

8. 一种重组病毒或病毒载体, 其包括根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的经过修饰的衣壳蛋白。

9. 根据权利要求 8 所述的重组病毒或病毒载体, 其中所述重组病毒或病毒载体是 AAV。

10. 根据权利要求 9 所述的重组病毒或病毒载体, 其中所述 AAV 是 AAVShH10、AAV1 或 AAV6。

11. 根据权利要求 8 到 10 中任一项所述的重组病毒或病毒载体, 其中所述重组病毒在约 0.2M 到约 0.4M 的盐浓度下从类肝素柱中洗脱。

12. 根据权利要求 8 到 11 中任一项所述的重组病毒或病毒载体, 其中当玻璃体内注射到哺乳动物中时, 所述重组病毒或病毒载体能够结合并穿过内界膜 (ILM)。

13. 根据权利要求 8 到 12 中任一项所述的重组病毒或病毒载体, 其中所述重组病毒或病毒载体包括对治疗性基因产物进行编码的多核苷酸序列。

14. 根据权利要求 13 所述的重组病毒或病毒载体, 其中所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子 (抗 VEGF) 剂。

15. 根据权利要求 13 所述的重组病毒或病毒载体, 其中所述治疗性基因产物是  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、因子 IX、因子 VIII、C1 酯酶抑制剂、 $\beta$  珠蛋白或  $\gamma$  珠蛋白。

16. 根据权利要求 8 到 15 中任一项所述的重组病毒或病毒载体, 其中与 AAVShH10 或 AAV6 相比, 所述重组病毒或病毒载体具有改变的细胞向性。

17. 根据权利要求 8 到 16 中任一项所述的重组病毒或病毒载体, 其中与 AAVShH10、AAV1 或 AAV6 相比, 所述重组病毒或病毒载体对视网膜细胞或肝细胞具有更高的感染性。

18. 一种药物组合物, 其包括药学上可接受的赋形剂和根据权利要求 13 到 17 中任一项所述的重组病毒或病毒载体。

19. 一种治疗或预防有需要的受试者的眼部疾病的方法, 其包括通过玻璃体内注射向所述受试者施用根据权利要求 18 所述的药物组合物。

20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述重组病毒或病毒载体包括经过修饰的

AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白。

21. 一种治疗或预防有需要的受试者的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用:

(i) 第一药物组合物,所述第一药物组合物包括药学上可接受的赋形剂和第一重组病毒或病毒载体,所述第一重组病毒或病毒载体包括:

(a) 第一经过修饰的衣壳蛋白,其中所述第一经过修饰的衣壳蛋白是经过修饰的AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白,所述经过修饰的AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白包括相对于对应的亲本AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白的肽插入,其中所述肽插入包括氨基酸序列LGTTTRP (SEQ ID NO:6),并且其中插入位点位于所述AAVShH10衣壳蛋白的VP1的氨基酸残基456与457、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459之间或者所述AAV1或AAV6衣壳蛋白的对应残基之间,以及

(b) 对第一治疗性基因产物进行编码的第一多核苷酸序列;以及

(ii) 第二药物组合物,所述第二药物组合物包括药学上可接受的赋形剂和第二重组病毒或病毒载体,所述第二重组病毒或病毒载体包括:

(a) 第二经过修饰的衣壳蛋白,其中所述第二经过修饰的衣壳蛋白不是所述经过修饰的AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白;以及

(b) 对第二治疗性基因产物进行编码的第二多核苷酸序列。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第二经过修饰的衣壳蛋白是AAV2衣壳蛋白或经过修饰的AAV2衣壳蛋白,任选地,AAV2.7m8衣壳蛋白。

23. 根据权利要求21或权利要求22所述的方法,其中所述第一药物组合物和所述第二药物组合物按任一顺序依次施用,并且其中所述依次施用之间经过了一定时间段。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述时间段为至少一个月、至少3个月、至少6个月、至少一年、至少18个月、至少两年或至少三年。

25. 根据权利要求21到24中任一项所述的方法,其中所述第一治疗性基因产物和所述第二治疗性基因产物相同或不同。

26. 根据权利要求21到25中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症是一种眼部疾病或病症,并且所述第一药物组合物和所述第二药物组合物通过玻璃体内施用。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述第一治疗性基因产物和所述第二治疗性基因产物中的一个或两个是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)剂。

28. 根据权利要求26或权利要求27所述的方法,其中所述疾病或病症选自以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、视网膜新生血管、脉络膜新生血管、糖尿病性视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变和糖尿病性视网膜水肿。

29. 根据权利要求21到25中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症是肝脏疾病或病症,并且所述第一药物组合物和所述第二药物组合物肠胃外,任选地静脉内施用。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述第一治疗性基因产物和所述第二治疗性基因产物中的一个或两个是 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、因子IX、因子VIII、C1酯酶抑制剂、 $\beta$ 珠蛋白或 $\gamma$ 珠蛋白。

31. 根据权利要求29或权利要求30所述的方法,其中所述疾病或病症选自以下组成

的组： $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏、血友病B、血友病A、遗传性血管水肿或 $\beta$ -地中海贫血。



## 经过修饰的AAV衣壳和其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年2月28日提交的美国临时申请序列号62/464,878的权益,所述美国临时申请的全部公开内容通过全文引用的方式并入本文中。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供以代替纸质副本并且通过全文引用的方式并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是AVBI\_012\_01WO\_ST25.txt。文本文件为22KB,创建于2018年2月27日并且通过EFS-Web以电子方式提交。

### 技术领域

[0005] 本公开的实施例涉及包含经过修饰的AAV衣壳蛋白在内的经过修饰的病毒衣壳蛋白、包括经过修饰的AAV衣壳蛋白的病毒和病毒载体、以及使用这些病毒和病毒载体向细胞递送多肽的方法。

### 背景技术

[0006] 一种有希望治疗和预防遗传以及其它疾病和病症的方法是递送具有如病毒载体等基因治疗载体的治疗剂。适于基因治疗的病毒载体的说明性实例包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、甲病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体。

[0007] AAV是一种4.7kb的单链DNA病毒。基于AAV的重组载体具有优良的临床安全性,因为野生型AAV是非致病性的并且与任何已知疾病都没有病因关系。另外,AAV提供了在包含眼睛、肌肉、肺和脑在内的许多组织中进行非常高效的基因递送和持续的转基因表达的能力。此外,AAV在人类临床试验中显示出前景,包含莱伯氏先天性黑朦试验(Leber's congenital amaurosis trial),在所述莱伯氏先天性黑朦试验中,用通过单次视网膜下施用rAAV载体递送的治疗剂进行治疗的受试者从治疗开始之日起的四年多时间里持续临床受益于治疗剂的表达。

[0008] 关于设计用于基因治疗的病毒载体仍存在的某些挑战包含优化病毒细胞向性和组织特异性递送。因此,需要用于表达选定的哺乳动物细胞类型和组织中的基因的经过优化的载体。本发明通过提供有利于将病毒载体递送到期望的细胞和组织的经过修饰的AAV衣壳蛋白解决了这一需求。

### 发明内容

[0009] 本发明总体上涉及基因治疗领域,并且具体地,涉及可用于将对包含治疗剂在内的各种药剂(例如肽、多肽、核酶和催化性RNA分子)进行编码的核酸区段递送到脊椎动物的选定细胞和组织的病毒载体。具体地,本发明的各个方面包含经过修饰的衣壳蛋白,所述经过修饰的衣壳蛋白可用于基因治疗载体中以将药剂递送到期望的细胞或组织例如视网膜或肝脏并治疗哺乳动物的疾病、病症和功能障碍,所述基因治疗载体包含例如单纯疱疹病毒(HSV)、甲病毒(AV)和AAV载体。在某些实施例中,本发明的病毒载体是ShH10的变体,所述

ShH10是具有比许多其它AAV血清型更好的中和抗体曲线的AAV。因此,本发明的变体AAV提供的优点是保持这种良好的中和抗体曲线,同时具有不同的向性,例如改变的硫酸类肝素结合、视网膜特异性向性或肝脏特异性向性。

[0010] 所公开的组合物可以用于各种调查、诊断和治疗方案,包含预防和治疗各种人类疾病。

[0011] 在某些实施例中,本发明包含一种非天然存在的经过修饰的AAV衣壳蛋白,包括一个或多个氨基酸修饰。在某些实施例中,所述经过修饰的AAV衣壳蛋白包括氨基酸或肽插入,所述氨基酸或肽插入包括与氨基酸序列LGETTRP (SEQ ID NO:6) 至少80%、至少85%或至少90%同源的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,所述经过修饰的AAV衣壳蛋白包括氨基酸或肽插入,所述氨基酸或肽插入包括与氨基酸序列LALGETTRPA (SEQ ID NO:14) 至少80%、至少85%或至少90%同源的氨基酸序列或所述氨基酸序列的包括所述氨基酸序列的至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或至少九个连续氨基酸的片段或者由其组成,其中插入被称为7m8氨基酸插入。在某些实施例中,所述AAV是AAVShH10,并且所述7m8氨基酸插入位于所述AAVShH10衣壳蛋白的氨基酸残基456与457之间、氨基酸残基457与458之间或氨基酸残基458与459之间。除非另外指示,否则本文所引用的衣壳蛋白氨基酸序列是VP1序列。本领域技术人员将理解,VP2衣壳蛋白氨基酸序列和VP3衣壳蛋白氨基酸序列中存在等价序列,并且本公开还包含具有本文所描述的任何修饰(例如插入)的经过修饰的VP2衣壳蛋白和VP3衣壳蛋白。在某些实施例中,AAV是不同的AAV,如例如AAV1、AAV2、AAV6、AAV8、AAV9或AAV10,并且7m8氨基酸插入在这些其它AAV的衣壳蛋白中位于与AAVShH10衣壳蛋白的氨基酸残基456和457、氨基酸残基457和458或氨基酸残基458和459相对应的氨基酸残基之间。应理解,其它AAVs中的对应残基可以具有不同的氨基酸数。本领域技术人员可以基于序列比对、晶体结构和硫酸类肝素蛋白多糖结合位点来确定这些残基。在特定实施例中,插入接近但不完全破坏HSPG结合位点的活性。在某些实施例中,插入与被鉴定为对HSPG结合很重要的氨基酸残基相邻。

[0012] 在相关实施例中,本发明包含一种多核苷酸,其包括对本文所描述的经过修饰的AAV衣壳蛋白进行编码的核酸序列。在某些实施例中,对所述经过修饰的AAV衣壳蛋白进行编码的核酸序列与启动子序列可操作地连接。在特定实施例中,所述多核苷酸进一步包括对rep蛋白进行编码的核酸序列。

[0013] 本发明的另外的相关实施例包含一种细胞,其包括本文所描述的表达载体。在另外的实施例中,所述细胞包括对治疗性蛋白进行编码的多核苷酸。

[0014] 另一个实施例是一种重组病毒或病毒载体,其包括本文所描述的经过修饰的衣壳蛋白。本发明的AAV病毒粒子相对于AAVShH10可以对硫酸类肝素结合表现出改变的亲和性。在特定实施例中,所述重组病毒或病毒载体在约0.2M到约0.4M例如约0.2M、约0.3M或约0.4M的盐浓度下从硫酸类肝素柱中洗脱。在一些实施例中,当玻璃体内注射到哺乳动物中时,所述重组病毒或病毒载体能够结合并穿过内界膜(ILM)。在某些实施例中,所述重组病毒或病毒载体包括对治疗性蛋白进行编码的多核苷酸序列。在特定实施例中,所述治疗性蛋白是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)剂。在特定实施例中,所述治疗性蛋白是 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、因子IX、因子VIII、C1酯酶抑制剂、 $\beta$ 珠蛋白或 $\gamma$ 珠蛋白。在某些实施例中,治疗性蛋白是在全身表达时发挥其治疗作用的蛋白质,例如其中病毒载体对肝脏进行转到,这样然后产

生治疗性蛋白,从而使治疗性蛋白被全身递送。

[0015] 在某些实施例中,本文所描述的重组病毒或病毒载体与具有野生型衣壳蛋白的对应病毒或病毒载体相比具有改变的细胞向性,所述野生型衣壳蛋白即没有7m8插入的相同衣壳蛋白。在一些实施例中,重组病毒或病毒载体对视网膜细胞或肝细胞有更大的向性。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基456与457之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基457与458之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基458与459之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。

[0016] 在另外的相关实施例中,本发明包含一种药物组合物,其包括本文所描述的重组病毒或病毒载体。

[0017] 本发明还包含一种向受试者的视网膜提供蛋白质的相关方法,其包括例如通过玻璃体内注射向所述受试者的眼睛施用本文所描述的重组病毒或病毒载体或药物组合物,其中所述重组病毒或病毒载体包括对所述蛋白质进行编码的多核苷酸序列。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基456与457、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。

[0018] 本发明还包括一种向受试者的肝脏提供蛋白质的相关方法,其包括向受试者例如静脉内施用本文所描述的重组病毒或病毒载体或药物组合物,其中所述重组病毒或病毒载体包括对所述蛋白质进行编码的多核苷酸序列。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基456与457、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。

[0019] 本发明还包含一种向有需要的受试者的视网膜提供治疗性基因产物(例如治疗性蛋白)的方法,其包括例如通过玻璃体内注射向所述受试者施用包括本文所描述的重组病毒或病毒载体的药物组合物,其中所述重组病毒或病毒载体包括对所述治疗性基因产物进行编码的多核苷酸。在特定实施例中,受试者已被诊断为患有或被认为有罹患眼部疾病或病症的风险。在特定实施例中,所述受试者已被诊断为患有或被怀疑有发生选自以下组成的组的一种或多种病症的风险:年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、视网膜新生血管、脉络膜新生血管、糖尿病性视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变和糖尿病性视网膜水肿。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基456与457、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。

[0020] 本发明还包含一种向有需要的受试者的肝脏提供治疗性基因产物(例如治疗性蛋白)的方法,其包括向所述受试者例如静脉内施用包括本文所描述的重组病毒或病毒载体的药物组合物,其中所述重组病毒或病毒载体包括对所述治疗性基因产物进行编码的多核苷酸。在特定实施例中,受试者已被诊断为患有或被认为有罹患肝脏疾病或病症的风险。在特定实施例中,所述受试者已被诊断为患有或被怀疑有发生选自以下组成的组的一种或多种病症的风险: $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏、血友病B、血友病A、遗传性血管水肿和 $\beta$ -地中海贫血。在一个实施例中,重组病毒或病毒载体包括在氨基酸残基456与457、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459之间有7m8插入的AAVShH10衣壳。

[0021] 本发明进一步提供了一种改变AAVShH10、AAV1或AAV6病毒或病毒载体的向性的方法,其包括将7m8插入引入到所述病毒或病毒载体的衣壳蛋白中,例如在氨基酸残基456与457、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459中的任何氨基酸残基之间。

## 附图说明

[0022] 本公开的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考阐述了说明性实施例的以下详细描述以及附图,将获得对本发明的这些特征和优势的更好理解,在所述说明性实施例中利用了本发明的原理。

[0023] 图1A-1F示出了未转导(图1A)或在 $3 \times 10^5$ 的MOI下用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的AAV.7m8(图1B)、ShH10(图1C)、ShH10/7m8(457)(图1D)、ShH10/7m8(458)(图1E)或ShH10/7m8(459)(图1F)病毒转导的HEK293细胞的免疫荧光图像。

[0024] 图2A-2F提供了示出未转导(图2A)或用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的ShH10(图2B)、AAV.7m8(图2C)、ShH10/7m8(457)(图2D)、ShH10/7m8(458)(图2E)或ShH10/7m8(459)(图2F)病毒转导的HEK293细胞的流式细胞术分析的结果的图表。

[0025] 图3A-3C提供了根据未转导或用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的ShH10、AAV.7m8、ShH10/7m8(457)、ShH10/7m8(458)或ShH10/7m8(459)病毒转导的HEK293细胞的流式细胞术分析生成的数据。图3A示出了GFP阳性细胞相对于每种病毒的平均百分比;图3B示出了每种病毒的平均荧光强度(MFI),并且图3C是总结了图3A和图3B所示结果的表。每个图表中的误差条示出了标准偏差。

[0026] 图4A-4D示出了在 $3 \times 10^5$ 的MOI下用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的ShH10(图4A)、ShH10/7m8(457)(图4B)、ShH10/7m8(458)(图4C)或ShH10/7m8(459)(图4D)病毒转导的U87细胞的免疫荧光(左图)和光学显微镜(右图)图像。

[0027] 图5A-5F提供了示出未转导(图5A)或用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的ShH10(图5B)、ShH10/7m8(457)(图5C)、ShH10/7m8(458)(图5D)或ShH10/7m8(459)(图5E)病毒转导的U87细胞的流式细胞术分析的结果以及总结每种病毒的表达GFP的细胞的百分比和MFI的表(图5F)的图表。

[0028] 图6A-6D示出了在 $3 \times 10^5$ 的MOI下用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的ShH10(图6A)、ShH10/7m8(457)(图6B)、ShH10/7m8(458)(图6C)或ShH10/7m8(459)(图6D)病毒转导的HepG2细胞的免疫荧光(左图)和光学显微镜(右图)图像。

[0029] 图7A-7E提供了示出用对绿色荧光蛋白(GFP)进行编码的ShH10(图7A)、ShH10/7m8(457)(图7B)、ShH10/7m8(458)(图7C)或ShH10/7m8(459)(图7D)病毒转导的HepG2细胞的流式细胞术分析的结果以及总结每种病毒的表达GFP细胞的百分比和MFI的表(图7E)的图表。

[0030] 图8A-8F概述了肝素结合测定(图8A)并且示出了来自AAV.7m8(图8B)、ShH10(图8C)、ShH10/7m8(457)(图8D)、ShH10/7m8(458)(图8E)或ShH10/7m8(459)(图8F)的硫酸类肝素柱级分的斑点印迹结果。洗脱液E1到E10具有增大的盐浓度:0.1M(E1)、0.2M(E2)、0.3M(E3)、0.4M(E4)、0.5M(E5)、0.6M(E6)、0.7M(E7)、0.8M(E8)、0.9M(E9)和1.0M(E10)。

[0031] 图9是示出了在CMV启动子控制下表达GFP的ShH10/7m8(458)载体的中和抗体曲线的图表。在对293T细胞进行转导之前,将ShH10/7m8(458)载体与不同稀释度的IVIG一起培育,然后再培育3天,随后分析GFP表达。

[0032] 图10A-10P示出了用表达GFP的ShH10/7m8 (457) 或亲本ShH10病毒在 $4 \times 10^4$ 的MOI下感染两周后来自猪外植体的视网膜细胞的免疫荧光图像。图10A-10D示出了从用经过GFAP (用于检测Müller细胞) (图10A)、DAPI (用于检测细胞核) (图10B)、CHX10 (用于检测双极细胞) (图10C) 和GFP (图10D) 染色的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 转导的猪视网膜外植体取得的单通道免疫荧光图像。图10E-10H示出了从用经过视紫红质 (用于检测视杆细胞) (图10E)、DAPI (用于检测细胞核) (图10F)、CHX10 (用于检测双极细胞) (图10G) 或GFP (图10H) 染色的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 转导的猪视网膜外植体取得的单通道免疫荧光图像。图10I-10L示出了从用经过TuJ1 (用于检测视网膜神经节细胞) (图10I)、DAPI (用于检测细胞核) (图10J)、CHX10 (用于检测双极细胞) (图10K) 和GFP (图10L) 染色的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 转导的猪视网膜外植体取得的单通道免疫荧光图像。图10M-10P示出了从用经过DAPI (用于检测细胞核) (图10M)、视紫红质 (用于检测视杆细胞) (图10N)、GEAP (用于检测Müller细胞) (图10O) 和GFP (图10P) 染色的表达GFP的ShH10转导的猪视网膜外植体取得的单通道免疫荧光图像。

[0033] 图11A-11E示出了在用 $2 \times 10^{10}$ vg/眼的表达GFP的亲本ShH10或ShH10/7m8 (457) 病毒转导之后沙鼠视网膜中的视网膜细胞的图像。图11A描绘了用表达GFP的ShH10转导的沙鼠视网膜的荧光眼底图像。图11B描绘了用表达GFP的ShH10/7m8 (457) 转导的沙鼠视网膜的荧光眼底图像。图11C-11E描绘了用ShH10 (顶图) 或ShH10/7m8 (457) (底图) 转导的沙鼠视网膜的横切面的单通道免疫荧光图像, 细胞进行DAPI (用于检测细胞核) (图11C)、视紫红质 (用于检测视杆细胞) (图11D) 和GFP (图11E) 染色。

[0034] 图12A-12D示出了在玻璃体内施用 $2 \times 10^{12}$ vg/眼的表达GFP的ShH10 (图12A-12B) 或ShH10/7m8 (457) (图12C-12D) 之后十二周使用非洲绿猴 (AGM) 视网膜的海德堡光谱 (Heidelberg Spectralis) 获得的OCT图像。

[0035] 图13提供了在玻璃体内施用 $2 \times 10^{12}$ vg/眼的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 之后十二周提取的平整固定的AGM视网膜的实时荧光图像。可以在中心凹 (箭头) 以及在视网膜外围看到稳健表达。

[0036] 图14A-E提供了在玻璃体内施用 $2 \times 10^{12}$ vg/眼的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 之后十二周在AGM视网膜的中央凹取得的横切面的DIC图像 (图14A) 和单通道免疫荧光图像。单通道图像示出了DAPI (用于检测细胞核) (图14B)、钙结合蛋白 (用于检测双极细胞) (图14C)、s-视蛋白 (用于检测s-视锥细胞) (图14D) 和GFP (图14E) 染色。

[0037] 图15A-15E提供了在玻璃体内施用 $2 \times 10^{12}$ vg/眼的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 之后十二周在AGM视网膜外围取得的横切面的DIC图像 (图15A) 和单通道免疫荧光图像。单通道图像示出了DAPI (用于检测细胞核) (图15B)、PNA (用于检测视锥细胞) (图15C)、波形蛋白 (用于检测Müller细胞) (图15D) 和GFP (图15E) 染色。

[0038] 图16A-16D示出了在静脉内施用在CAG启动子驱动下表达荧光素酶的ShH10病毒之后两周、四周和六周, 用 $1 \times 10^{11}$ vg/小鼠的所述病毒转导的小鼠的荧光素酶的实时成像的结果。图16A、图16B和图16C分别示出了在两周、四周和6周时染色的小鼠, 并且图16D是在不同时间点处绘制编号为16、17、18、19、20和21的每个单独的小鼠的RLU (反射光单位) 以及媒剂对照物的图表。

[0039] 图17A-17D示出了在玻璃体内施用在CAG启动子驱动下表达荧光素酶的ShH10/7m8

(458) 病毒之后两周、四周和六周,用 $1 \times 10^{11}$ vg/小鼠的所述病毒转导的小鼠的荧光素酶的染色结果。图17A、图17B和图17C分别示出了小鼠在两周、四周和六周的实时图像,并且图17D是示出编号为28-33的每个单独的小鼠的RLU以及媒剂对照物的图表。

[0040] 图18A-18C提供了示出在用 $1 \times 10^{11}$ vg/小鼠的表达荧光素酶的ShH10或ShH10/7m8 (458) 病毒或用媒剂对照物转导之后两周、四周和六周时小鼠的总荧光素酶表达(组合的背部表达和腹部表达)(图18A)或背部表面表达(图18B)和腹部表面表达的图表。

[0041] 图19是示出了在对表达荧光素酶的所指示病毒进行转导之后六周时基于IVIS(体内成像系统)的总荧光素酶表达的图表。

[0042] 图20A-20C示出了从通过注射表达荧光素酶的所指示病毒转导的动物中获得的肝组织样本中的荧光素酶和对照GAPDH的mRNA和蛋白水平。在这些图中,“ShH10/7m8”是指ShH10/7m8 (458)。图20A示出了在从肝组织样本中分离mRNA、将mRNA转换为cDNA、然后使用特定于荧光素酶或GAPDH的引物进行PCR扩增、随后进行凝胶电泳之后获得的含有PCR产物的代表性凝胶;图20B示出了如通过逆转录酶定量PCR(RT-qPCR)分析确定的相对于媒剂的倍数变化;并且图20C示出了在从肝组织样本中提取的蛋白质中检测到的荧光素酶信号。

[0043] 图21A和图21B示出了从通过注射表达荧光素酶的所指示病毒转导的动物中获得的心脏组织样本中的荧光素酶和对照GAPDH的mRNA水平。在这些图中,“ShH10/7m8”是指ShH10/7m8 (458)。图21A示出了在从心脏组织样本中分离mRNA、将mRNA转换为cDNA、然后使用特定于荧光素酶或GAPDH的引物进行PCR扩增、随后进行凝胶电泳之后获得的含有PCR产物的代表性凝胶;并且图21B示出了如通过RT-qPCR分析确定的荧光素酶mRNA相对于媒剂的倍数变化。

[0044] 图22A和图22B示出了从通过注射表达荧光素酶的所指示病毒转导的动物中获得的脑组织样本中的荧光素酶和对照GAPDH的mRNA水平。在这些图中,“ShH10/7m8”是指ShH10/7m8 (458)。图22A示出了在从心脏组织样本中分离mRNA、将mRNA转换为cDNA、然后使用特定于荧光素酶或GAPDH的引物进行PCR扩增、随后进行凝胶电泳之后获得的含有PCR产物的代表性凝胶;并且图22B示出了如通过RT-qPCR分析确定的荧光素酶mRNA相对于媒剂的倍数变化。

## 具体实施方式

[0045] 本公开提供了经过修饰的衣壳蛋白以及具有一种或多种经过修饰的或改变的衣壳蛋白的病毒粒子和病毒载体,其中在各个实施例中,病毒粒子与包括其天然或野生型衣壳蛋白而不是本文所公开的经过修饰的衣壳蛋白的对应病毒粒子相比,表现出:(1) 视网膜细胞或肝细胞的感染性增加;(2) 向性改变;(3) 与一个或多个其它细胞或组织相比,对视网膜细胞或肝细胞的组织特异性增加;(3) 与类肝素或硫酸类肝素蛋白多糖和/或内界膜(ILM)的结合增加;当玻璃体内施用感染和/或递送治疗性基因产物穿过ILM的能力(4)降低和/或(5)增加。还提供了药物组合物以及用于使用上文所公开的任何组合物来促进基因在个体的细胞例如视网膜细胞中表达例如以用于治疗或预防疾病或病症的方法。在阅读如下文更全面地描述的组合物和方法的细节后,本发明的这些和其它目的、优点和特征对本领域技术人员而言将变得显而易见。

[0046] 定义

[0047] 如本文所使用的,“载体”是指包括多核苷酸或与多核苷酸缔合并且可以用于介导多核苷酸到细胞的递送的大分子或大分子的缔合物。说明性载体包含例如质粒、病毒载体、脂质体和其它基因递送媒介。

[0048] 术语“AAV”是腺相关病毒的缩写并且可以用于指病毒本身或其衍生物。除非另有要求,否则所述术语涵盖所有亚型以及天然存在的形式和重组形式两者。术语“AAV”包含 AAV 1型(AAV-1)、AAV 2型(AAV-2)、AAV 3型(AAV-3)、AAV 4型(AAV-4)、AAV 5型(AAV-5)、AAV 6型(AAV-6)、AAV 7型(AAV-7)、AAV 8型(AAV-8)、禽类AAV、牛类AAV、犬类AAV、马类AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV和绵羊类AAV。“灵长类AAV”是指感染灵长类动物的AAV,“非灵长类AAV”是指感染非灵长类哺乳动物的AAV,“牛类AAV”是指感染牛类哺乳动物的AAV,等等。

[0049] 各种血清型AAV的基因组序列以及天然末端重复(TR)序列、Rep蛋白序列和衣壳亚基序列是本领域已知的。这种序列可以在文献或如GenBank等公共数据库中找到。参见例如GenBank登录号NC\_002077(AAV-1)、AF063497(AAV-1)、NC\_001401(AAV-2)、AF043303(AAV-2)、NC\_001729(AAV-3)、NC\_001829(AAV-4)、U89790(AAV-4)、NC\_006152(AAV-5)、AF028704和AAB95450(AAV-6)、AF513851(AAV-7)、AF513852(AAV-8)和NC\_006261(AAV-8),其公开内容通过引用的方式并入本文中以用于教导AAV核酸和氨基酸序列。参见例如,Srivistava等人(1983)《病毒学杂志(J.Virology)》45:555;Chiorini等人(1998)《病毒学杂志》71:6823;Chiorini等人(1999)《病毒学杂志》73:1309;Bantel-Schaal等人(1999)《病毒学杂志》73:939;Xiao等人(1999)《病毒学杂志》73:3994;Muramatsu等人(1996)《病毒学杂志》221:208;Shade等人(1986)《病毒学杂志》58:921;Gao等人(2002)《美国科学院院报(Proc.Nat.Acad.Sci.USA)》99:11854;以及Moris等人(2004)《病毒学(Virology)》33:375-383;国际专利出版物WO 00/28061、WO 99/61601和WO 98/11244;以及美国专利第6,156,303号。另外,基于包含密码子优化序列在内的氨基酸序列和已知的遗传密码,可以容易地生成对任何衣壳蛋白进行编码的多核苷酸序列。

[0050] “AAV病毒”、“AAV病毒颗粒”或“rAAV载体颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白(通常由野生型AAV的所有衣壳蛋白构成)和衣壳化的多核苷酸rAAV载体构成的病毒颗粒。如果颗粒包括异源多核苷酸(即,除野生型AAV基因组以外的多核苷酸,如待递送到哺乳动物细胞的转基因),则颗粒通常被称为“rAAV载体颗粒”或简称为“rAAV载体”。因此,rAAV粒子的产生必然包含rAAV载体的产生,如此rAAV载体颗粒内含有载体。

[0051] 如本文所使用的关于本发明的AAV病毒载体的术语“复制缺陷”意味着AAV载体无法独立地复制和包装其基因组。例如,当受试者的细胞感染了rAAV病毒粒子时,异源基因表达在受感染细胞中,然而,由于受感染细胞缺乏AAV rep和cap基因以及辅助功能基因,因此rAAV不能进一步复制。

[0052] 如本文所使用的,“AAV变体”或“AAV突变体”是指由以下构成的病毒颗粒:(a)变体AAV衣壳蛋白,其中变体AAV衣壳蛋白相对于对应的亲本AAV衣壳蛋白包括至少一个氨基酸差异(例如氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),其中AAV衣壳蛋白与天然存在的AAV衣壳蛋白的氨基酸序列不对应;以及任选地,(b)包括对异源基因产物进行编码的核苷酸序列的异源核苷酸,其中与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子的结合相比,变体AAV衣壳蛋白赋予了与类肝素或硫酸类肝素蛋白多糖的增加结合。在某些实施例中,变体衣壳蛋白赋予了:(a)与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子的视网膜细胞的感染性相比,增

加的视网膜细胞感染性；(b) 与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子的向性相比，改变的细胞向性；和/或(c) 与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子相比，增加的结合和/或穿过ILM的能力。

[0053] 缩写“rAAV”是指重组腺相关病毒，也被称为重组AAV载体(或“rAAV载体”)。如本文所使用的，“rAAV载体”是指包括不属于AAV来源的多核苷酸序列(即，与AAV异源的多核苷酸)的AAV载体，所述多核苷酸序列通常是对细胞进行基因转化时所关注的序列。通常，异源多核苷酸侧接有至少一个并且通常有两个AAV反向末端重复序列(ITR)。术语rAAV载体涵盖rAAV载体颗粒和rAAV载体质粒两者。

[0054] “包装”是指导致AAV颗粒进行组装和衣壳化的一系列细胞内事件。

[0055] AAV“rep”和“cap”基因是指对腺相关病毒的复制和衣壳化蛋白进行编码的多核苷酸序列。AAV rep和cap在本文中被称为AAV“包装基因”。

[0056] AAV的“辅助病毒”是指允许AAV(例如野生型AAV)被哺乳动物细胞复制和包装的病毒。AAV的各种这种辅助病毒是本领域已知的，包含腺病毒、疱疹病毒和如牛痘等痘病毒。腺病毒涵盖许多不同的亚群，但是最常用的是C亚群中的腺病毒5型。人类、非人类哺乳动物和禽类来源的许多腺病毒是已知的并且可从如ATCC等贮藏机构获得。疱疹家族的病毒包含例如单纯疱疹病毒(HSV)和艾巴氏病毒(EBV)以及巨细胞病毒(CMV)和假狂犬病病毒(PRV)；所述病毒也可以从如ATCC等贮藏机构获得。

[0057] “一种或多种辅助病毒功能”是指在辅助病毒基因组中编码的允许AAV复制和包装的一种或多种功能(结合本文所描述的关于复制和包装的其它要求)。如本文所描述的，“辅助病毒功能”可以以多种方式提供，包含通过以反式向生产细胞提供辅助病毒或提供例如对一种或多种必需的功能进行编码的多核苷酸序列。例如，包括对一个或多个腺病毒蛋白进行编码的核苷酸序列的质粒或其它表达载体连同rAAV载体一起转染到生产细胞中。

[0058] “感染性”病毒或病毒颗粒是包括适合地组装的病毒衣壳并且能够将多核苷酸组分递送到病毒种类具有向性的细胞中的病毒或病毒颗粒。所述术语不一定暗示病毒有任何复制能力。在本公开和本领域的其它地方描述了用于对感染性病毒颗粒进行计数的测定。病毒感染性可以表达为感染性病毒颗粒与总病毒颗粒之比。确定感染性病毒颗粒与总病毒颗粒之比的方法是本领域已知的。参见例如Grainger等人(2005)《分子疗法(Mol. Ther.)》11:S337(描述了TCID50感染滴度测定)；Zolotukhin等人(1999)《基因疗法(Gene Ther.)》6:973。还参见实例。

[0059] “有复制能力的(replication-competent)”病毒(例如，有复制能力的AAV)是指具有感染性并且能够在受感染细胞中复制(即在辅助病毒或辅助病毒功能存在的情况下)的表型野生型病毒。在AAV的情况下，复制能力通常要求存在功能性AAV包装基因。通常，由于缺少一个或多个AAV包装基因，本文所描述的rAAV载体在哺乳动物细胞(尤其是在人类细胞中)是有复制能力的，即使在存在辅助功能的情况下。通常，这种rAAV载体缺乏任何AAV包装基因序列，以便将通过在AAV包装基因与进入的rAAV载体之间进行重组生成有复制能力的AAV的可能性降到最低。在许多实施例中，如本文所描述的rAAV载体制剂是含有很少(如果有的话)有复制能力的AAV(rcAAV，也称为RCA)(例如，少于约1rcAAV/10<sup>2</sup>rAAV颗粒、少于约1rcAAV/10<sup>4</sup>rAAV颗粒、少于约1rcAAV/10<sup>8</sup>rAAV粒子、少于约1rcAAV/10<sup>12</sup>rAAV颗粒或无rcAAV)的那些。



[0060] 术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式或其类似物,包含脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。多核苷酸可以包括经过修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和核苷酸类似物,并且可以被非核苷酸组分打断。如果存在,则对核苷酸结构的修饰可以在组装聚合物之前或之后进行。如本文所使用的,术语多核苷酸可互换地指双链分子和单链分子。除非另外指明或需要,否则是多核苷酸的本文所描述的本发明的任何实施例既涵盖双链形式,也涵盖已知或预测构成双链形式的两种互补的单链形式的每种单链形式。

[0061] 多核苷酸或多肽与另一种多核苷酸或多肽有一定的“序列一致性”百分比,这意味着在进行比对时,当比较这两个序列时,碱基或氨基酸的百分比是相同的。序列相似性可以通过多种不同的方式来确定。为了确定序列一致性,可以使用包含可通过万维网 [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 获得的BLAST在内的方法和计算机程序来比对序列。另一种比对算法是FASTA,可从牛津分子集团有限公司(Oxford Molecular Group, Inc.)的全资子公司、来自美国威斯康星州麦迪逊市(Madison, Wis., USA)的遗传学计算集团(Genetics Computing Group)(GCG)的软件包获得。用于比对的其它技术描述于以下中:《酶学方法(Methods in Enzymology)》,第266卷:用于大分子序列分析的计算机方法(Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis)(1996),Doolittle编,学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.),美国加利福尼亚州圣地亚哥哈考特布瑞斯公司(Harcourt Brace&Co., San Diego, Calif., USA)的分公司。特别关注了允许序列中有空位的比对程序。Smith-Waterman是允许序列比对中有空位的一种类型的算法。参见《分子生物学方法(Meth. Mol. Biol.) 70:173-187 (1997)》。而且,可以利用使用Needleman和Wunsch比对方法的GAP程序来比对序列。参见《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 48:443-453 (1970)》。

[0062] 关注了使用Smith和Waterman的局部同源性算法(《应用数学进展(Advances in Applied Mathematics) 2:482-489 (1981)》)来确定序列一致性的BestFit程序。空位生成罚分的范围通常将为1到5,经常为2到4并且在许多实施例中将为3。空位生成罚分的范围通常将为0.01到0.20并且在许多情况下将为0.10。程序具有由输入以进行比较的序列确定的默认参数。优选地,序列统一性是使用由程序确定的默认参数来确定的。这个程序也可从牛津分子集团有限公司的全资子公司、来自美国威斯康星州麦迪逊市的遗传学计算集团(GCG)的软件包获得。

[0063] 关注的另一个程序是FastDB算法。以下中描述了FastDB:现代序列比较与分析方法(Current Methods in Sequence Comparison and Analysis),《大分子测序与合成所选方法与应用(Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications)》,第127-149页,1988,Alan R. Liss有限公司。基于以下参数通过FastDB来计算序列一致性百分比:不匹配罚分:1.00;空位罚分:1.00;空位大小罚分:0.33;以及连接罚分:30.0。

[0064] “基因”是指含有至少一个开放读码框的能够在转录并且有时翻译后对特定基因产物进行编码的多核苷酸。术语“基因”或“编码序列”是指对基因产物进行编码的体外或体内核苷酸序列。在一些情况下,基因由编码序列组成或基本上由编码序列组成,所述编码序列即对基因产物进行编码的序列。在其它情况下,基因包括另外的非编码序列。例如,基因可以包含或不包含在编码区域之前和之后的区域例如5'未翻译的(5'UTR)或“前导”序列和3'UTR或“尾”序列、以及各个编码区段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0065] “基因产物”是由特定基因的表达产生的分子。基因产物包含例如多肽、适配体、干扰RNA、mRNA等。在特定实施例中，“基因产物”是多肽、肽、蛋白质或干扰RNA，包含短干扰RNA (siRNA)、miRNA或小发夹RNA (shRNA)。在特定实施例中，基因产物是治疗性基因产物，例如治疗性蛋白。

[0066] 如本文所使用的，“治疗性基因”是指在表达时产生治疗性基因产物的基因，所述治疗性基因产物对治疗性基因产物所存在于的细胞或组织或者对表达了其中的基因的哺乳动物赋予了有益效果。有益效果的实例包含改善病状或疾病的体征或症状、预防或抑制病状或疾病或者赋予期望的特性。治疗性基因包含但不限于校正细胞或哺乳动物中的遗传缺陷的基因。

[0067] 如本文所使用的，“转基因”是由载体递送到细胞的基因。

[0068] 如应用于多核苷酸的“重组”意味着多核苷酸是克隆、限制或连接步骤的各种组合与产生不同于在自然界中发现的多核苷酸的构建体的其它程序的产物。重组病毒是包括重组多核苷酸的病毒颗粒。所述术语分别包含原始多核苷酸构建体的复制物和原始病毒构建体的子代。

[0069] “控制元件”或“控制序列”是参与分子的相互作用的核苷酸序列，所述相互作用有助于对多核苷酸进行功能调节，包含多核苷酸的复制、重复、转录、剪接、翻译或降解。调节会影响过程的频率、速度或特异性并且在本质上会具有增强或抑制性。本领域中已知的控制元件包含例如转录调节序列，如启动子和增强子。启动子是在某些条件下能够结合RNA聚合酶并且启动对通常位于启动子下游(沿3'方向)的编码区进行转录的DNA区域。

[0070] “操作性地连接”或“可操作地连接”是指遗传元件的并列，其中元件处于允许其按预期方式操作的关系中。例如，如果启动子帮助启动对编码序列进行转录，则启动子与编码区域操作性地连接。只要维持这一功能关系，启动子与编码区域之间就会存在插入残基。

[0071] “表达载体”是包括对关注的基因产物进行编码的区域的载体并且用于在预期靶细胞中实现基因产物的表达。表达载体还包括与编码区域操作性地连接的以促进基因产物在靶标中表达的控制元件。控制元件和与其可操作地连接以供表达的一个或多个基因的组合有时被称为“表达盒”，许多表达盒在本领域中是已知且可获得的或者可以由本领域中可获得的组分容易地构建。

[0072] “异源”意指源自与其所比较的实体的其余部分的基因型不同的实体。例如，通过基因工程技术引入到源自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸是异源多核苷酸。从启动子的天然编码序列中移除并且与未发现与启动子有天然连接的编码序列操作性地连接的启动子是异源启动子。因此，例如，包含对异源基因产物进行编码的异源核酸的rAAV是包含天然存在的野生型AAV中通常不包含的核酸的rAAV，并且编码后的异源基因产物是通常不由天然存在的野生型AAV编码的基因产物。

[0073] 如本文所使用的，术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸的聚合物。所述术语还涵盖已被修饰的氨基酸聚合物；例如，二硫键形成、糖基化、脂化、磷酸化或与标记组分缀合。

[0074] “包括”意味着，列举的要素是例如组合物、方法、试剂盒等中所需的，但是可以包含其它要素以形成在权利要求书的范围内的例如组合物、方法、试剂盒等。例如，“包括”对与启动子可操作地连接的治疗性多肽进行编码的基因的表达盒是除基因和启动子以外可

以包含其它元件的表达盒,其它元件例如聚腺苷酸化序列、增强子元件、其它基因、接口结构域等。

[0075] “基本上由……组成”意味着将所描述的例如组合物、方法、试剂盒等的范围限于不实质地影响例如组合物、方法、试剂盒等的一个或多个基本和新颖特性的指定材料或步骤。例如,“基本上由对与启动子可操作地连接的治疗性多肽进行编码的基因以及聚腺苷酸化序列组成”的表达盒可以包含另外的序列,例如接头序列,只要所述序列不实质地影响基因的转录或翻译即可。作为另一个实例,“基本上由列举的序列组成”的变体或突变多肽片段具有列举的序列的、基于全长初始多肽在序列的边界处加上或减去约10个氨基酸残基的氨基酸序列,例如比列举的结合氨基酸残基少10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个残基或者比列举的结合氨基酸残基多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个残基,所述氨基酸序列源自全长初始多肽。

[0076] “由……组成”意味着不包括具有权利要求书中未指定的任何要素、步骤或成分的组合物、方法或试剂盒。例如,“由对与启动子可操作地连接的治疗性多肽进行编码的基因以及聚腺苷酸化序列组成”的表达盒仅由启动子、对治疗性多肽进行编码的多核苷酸序列和聚腺苷酸化序列组成。作为另一个实例,“由列举的序列组成”的多肽只含有列举的序列。

[0077] 如本文所使用的,“表达载体”涵盖载体,例如如上文所讨论的或如本领域中已知的质粒、微环、病毒载体、脂质体等,并且用于在预期靶细胞中实现基因产物的表达,所述载体包括对关注的基因产物进行编码的多核苷酸。表达载体还包括与编码区域操作性地连接的以促进基因产物在靶标中表达的控制元件。控制元件例如启动子、增强子、UTR、miRNA靶向序列等和与其可操作地连接以供表达的一个或多个基因的组合有时被称为“表达盒”。许多这种控制元件在本领域中是已知且可获得的或者可以由本领域中可获得的组分容易地构建。

[0078] 如本文所使用的,“启动子”涵盖引导RNA聚合酶的结合并且从而促进RNA合成的DNA序列,即足以直接转录的最小序列。启动子和对应的蛋白质或多肽表达可以是普遍存在的,这意味着在广泛范围的细胞、组织和物种中具有强活性或者细胞类型特异性、组织特异性或物种特异性。启动子可以是“组成型”,这意指持续活跃或“诱导型”,从而意味着启动子可以通过生物因子或非生物因子的存在或不存在而激活或失活。本发明的核酸构建体或载体中还包含可以或可以不与启动子序列邻接的增强子序列。增强子序列影响启动子依赖性基因表达并且可以位于天然基因的5'区或3'区。

[0079] 如本文所使用的,“增强子”涵盖刺激或抑制相邻基因的转录的顺式作用元件。抑制转录的增强子也被称为“沉默子”。增强子可以在距编码序列以及距转录区域下游几个千碱基对(kb)的距离内沿任一取向起作用(即可以与编码序列缔合)。

[0080] 如本文所使用的,“终止信号序列”涵盖使RNA聚合酶终止转录的任何遗传元件,例如多腺苷酸化信号序列。

[0081] 如本文所使用的,“多腺苷酸化信号序列”涵盖对RNA转录物进行内切核酸酶切割所必需的识别区域,所述识别区域后面是多腺苷酸化共有序列AATAAA。多腺苷酸化信号序列提供“聚A位点”,即RNA转录物上的将通过转录后多腺苷酸化来添加腺嘌呤残基的位点。

[0082] 如本文所使用的,术语“操作性地连接”或“可操作地连接”是指遗传元件例如启动子、增强子、终止信号序列、多腺苷酸化序列等的并列,其中元件处于允许其以预期方式操

作的关系中。例如,如果启动子帮助启动对编码序列进行转录,则启动子与编码区域操作性地连接。只要维持这一功能关系,启动子与编码区域之间就会存在插入残基。如本文所使用的,术语“异源”意指源自与其所比较的实体的其余部分的基因型不同的实体。例如,通过基因工程技术引入到源自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸是异源多核苷酸。作为另一个实例,从启动子的天然编码序列中移除并且与未发现与启动子有天然连接的编码序列操作性地连接的启动子是异源启动子。因此,例如,包含对异源基因产物进行编码的异源核酸的rAAV是包含天然存在的野生型AAV中通常不包含的核酸的rAAV,并且编码后的异源基因产物是通常不由天然存在的野生型AAV编码的基因产物。

[0083] 如本文所使用的关于核苷酸分子或基因产物的术语“内源性”是指核酸序列例如基因或遗传元件或者基因产物例如RNA、蛋白质天然存在于宿主病毒或细胞中或者与宿主病毒或细胞缔合。

[0084] 如本文所使用的,术语“天然”是指核苷酸序列例如基因或者基因产物例如RNA、蛋白质存在于野生型病毒或细胞中。如本文所使用的,术语“变体”是指参考多核苷酸或多肽序列的突变体,例如天然多核苷酸或多肽序列,即与参考多核苷酸或多肽序列具有小于100%的序列一致性。换句话说,变体相对于参考多核苷酸序列包括至少一个氨基酸差异(例如,氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失),例如天然多核苷酸或多肽序列。例如,变体可以是与全长天然多核苷酸序列有70%或更高序列一致性的多核苷酸,例如与全长天然多核苷酸序列有75%、80%或更高一致性,如85%、90%、95%或更高,例如98%或99%一致性。作为另一个实例,变体可以是与全长天然多肽序列有70%或更高序列一致性的多肽,例如与全长天然多肽序列有75%、80%或更高一致性,如85%、90%、95%或更高,例如98%或99%一致性。变体还可以包含与参考例如天然序列的片段共享70%或更高序列一致性的所述序列的变体片段,例如与天然序列有75%、80%或更高一致性,如85%、90%、95%或更高,例如98%或99%一致性。

[0085] 如本文所使用的,术语“生物活性(biological activity/biologically active)”是指归因于细胞中的特定生命元素的活性。例如,“免疫球蛋白”、“抗体”或其片段或变体的“生物活性”是指结合抗原决定簇并且从而促进免疫功能的能力。作为另一个实例,多肽或其功能片段或变体的生物活性是指多肽或其功能片段或变体能够实施其天然功能例如结合、酶活性等。作为第三实例,基因调节元件例如启动子、增强子、kozak序列等的生物活性是指调节元件或其功能片段或变体能够调节即分别促进、增强或激活其所可操作地连接的基因的表达的翻译。

[0086] 如本文所使用的,术语“施用”或“引入”是指将用于重组基因或蛋白表达的载体递送到细胞、受试者的细胞和/或器官或者受试者。这种施用或引入可以在体内、在体外或离体地发生。用于表达基因产物的载体可以通过以下引入到细胞中:转染,其通常意指通过物理手段(例如,磷酸钙转染、电穿孔、微注射或脂质转染)将异源DNA插入到细胞中;感染,其通常是指通过感染剂即病毒引入;或者转导,其通常意指用细胞稳定感染细胞或将来自一个微生物的基因材料通过病毒剂(例如细菌噬菌体)转移到另一个微生物。

[0087] “转化”通常用于指包括异源DNA的细菌或表达致癌基因并且已经转换为连续生长模式的细胞,如肿瘤细胞。用于“转化”细胞的载体可以是质粒、病毒或其它媒剂。

[0088] 根据用于将异源DNA(即载体)施用、引入或插入到细胞中的方式,细胞通常被称为

“转导”、“感染”、“转染”或“转化”。术语“转导”、“转染”和“转化”可以在本文中可互换地使用,不考虑异源DNA的引入方法。

[0089] 如本文所使用的,术语“宿主细胞”是指已经用载体转导、感染、转染或转化的细胞。载体可以是质粒、病毒颗粒、噬菌体等。如温度、pH等培养条件是先前与被选定以用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,并且对于本领域技术人员而言将是显而易见的。应了解,术语“宿主细胞”是指最初转导、感染、转染或转化的细胞和其子代。

[0090] 术语“治疗(treatment、treating等)”在本文中通常用于意指获得期望的药理学和/或生理学效果。效果在完全或部分地预防疾病或其症状方面可以是预防性的,例如降低受试者体内发生疾病或其症状的可能性,和/或在部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良反应方面可以是治疗性的。如本文所使用的,“治疗”覆盖对哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包含:(a)防止疾病在可能倾向于患有疾病但尚未被诊断为患有疾病的受试者身上发生;(b)抑制疾病,即,中止疾病发展;或者(c)缓解疾病,即,使疾病消退。可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂。特别关注了对发展中的疾病的治疗,其中所述治疗稳定或减少了患者的不期望的临床症状。理想的是,在受影响组织的功能完全丧失之前执行这种治疗。理想的是,将在疾病的症状期期间并且在一些情况下在疾病的症状期之后施用主题治疗。

[0091] 术语“个体”、“宿主”、“受试者”和“患者”在本文中可互换地使用,并且是指哺乳动物,包括但不限于人类和非人类灵长类动物,包含:猿猴和人类;哺乳类运动动物(例如马);哺乳类农场动物(例如绵羊、山羊等);哺乳类宠物(狗、猫等);以及啮齿动物(例如小鼠、大鼠等)。

[0092] 下面描述了本发明的各种组合物和方法。尽管本文中例证了特定的组合物和方法,但是应当理解,多个替代性组合物和方法中的任何替代性组合物和方法均是适用的并且适于用于实践本发明。还应当理解,可以使用本领域中标准的程序对本发明的表达构建体和方法进行评估。

[0093] 除非另有指示,否则本发明的实践将采用细胞生物学、分子生物学(包含重组技术)、微生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述常规技术在本领域技术人员的范围内。这种技术在文献中进行了充分解释,如《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) 第二版》(Sambrook等人,1989);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(M.J.Gait编,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.I.Freshney编,1987);《酶学方法(Methods in Enzymology)》(学术出版社有限公司);《实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)》(D.M.Weir&C.C.Blackwell编);《哺乳动物细胞基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)》(J.M.Miller&M.P.Calos编,1987);《分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》(F.M.Ausubel等人编,1987);《PCR:聚合酶链反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)》(Mullis等人编,1994);以及《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》(J.E.Coligan等人编,1991),上述文献中的每个文献通过引用的方式并入本文中。

[0094] 下文参考用于说明的示例应用描述了本发明的若干个方面。应当理解,阐述了许多具体的细节、关系和方法以提供对本发明的全面理解。然而,相关领域普通技术人员将容

易认识到,可以在没有具体细节中的一个或多个具体细节的情况下或者通过其它方法实践本发明。本发明不限于动作或事件的所展示排序,因为一些动作可以按不同的顺序和/或与其它动作或事件同时发生。此外,实施根据本发明的方法不需要所有所展示动作或事件。

[0095] 本文中使用的术语只是为了描述特定实施例,而不旨在限制本发明。如本文所使用的,除非上下文另外清楚地指示,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”旨在也包含复数形式。此外,在详细描述和/或权利要求书中使用了术语“包含(including)”、“包含(include)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“具有(with)”、或其变体的情况下,这种术语旨在以类似于术语“包括(comprising)”的方式是包含性的。

[0096] 术语“约(about)”或“大约(approximately)”意指在如由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分地取决于值是如何测量或确定的,即,测量系统的局限性。例如,“约”可以意指根据本领域的实践在1个或大于1个标准偏差内。可替代地,“约”可以意指给定值的高达20%、优选地高达10%、更优选地高达5%并且还更优选地高达1%的范围。可替代地,特别是对于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的数量级内,优选地在5倍内并且更优选地在2倍内。在于本申请和权利要求书中描述特定值的情况下,除非另有说明,否则应当假设术语“约”意指在特定值的可接受误差范围内。

[0097] 本文所提及的所有出版物均通过引用的方式并入本文中,以公开和描述引用出版物时结合的方法和/或材料。应当理解,在存在矛盾的情况下,本公开代替并入的出版物的任何公开内容。

[0098] 进一步地,应注意,权利要求书的撰写可以不包含任何任选的要素。这样,本陈述旨在用作与权利要求元素的叙述结合地使用如“单独”、“仅”等排他性术语或者使用“负”限制的前提基础。

[0099] 仅提供本文所讨论的出版物在本申请的提交日期之前的公开内容。本文中的任何内容均不应被视为承认本发明由于现有发明而无权先于这种出版物。进一步地,所提供的公开日期可能与实际公开日期不同,实际公开日期可能需要独立地确认。

[0100] 除非另有指示,否则本文所使用的所有术语具有与本领域技术人员含义相同的含义,并且本发明的实践将采用在本领域技术人员的知识范围内的微生物学常规技术和重组DNA技术。

[0101] 变体AAV衣壳多肽

[0102] 本公开提供了变体AAV衣壳蛋白,例如VP1蛋白,其中变体AAV衣壳蛋白与对应的野生型AAV或亲本AAV相比包括一个或多个氨基酸修饰。在特定实施例中,变体AAV衣壳蛋白包括在AAV衣壳蛋白的两个相邻氨基酸残基之间的氨基酸插入。在特定实施例中,变体AAV衣壳蛋白包括在属于以下的衣壳蛋白例如VP1内的插入:AAV 1型(AAV-1)、AAV 2型(AAV-2)、AAV 3型(AAV-3)、AAV 4型(AAV-4)、AAV 5型(AAV-5)、AAV 6型(AAV-6)、AAV 7型(AAV-7)、AAV 8型(AAV-8)、AAV 9型(AAV-9)、AAV 10型(AAV-10)、AAV rh.10、禽类AAV、牛类AAV、犬类AAV、马类AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、牛类AAV、AAV.7m8、AAVShH10、AAV2.5T、AAV2.5T/7m8、AAV9/7m8、和AAV5/7m8。AAV2.5T衣壳蛋白和病毒粒子描述于美国专利第9,233,131号中,所述美国专利中提供AAV2.5T的VP1编码氨基酸序列作为SEQ ID NO:42和图10A-B。AAV.7m8衣壳蛋白描述于美国专利第9,193,956号中。AAV.7m8包含在野生型AAV2基因组的氨基酸587与588之间的7m8插入。AAV2.5T/7m8衣壳蛋白与AAV2.5T衣壳蛋白相对应,进一步

包括7m8插入。

[0103] 在某些实施例中,亲本AAV衣壳蛋白是AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白。美国专利申请公开第20120164106号中的SEQ ID NO:3和图8A-8C示出了AAVShH10衣壳蛋白的氨基酸序列,所述氨基酸序列还描述于Klimczak, R.R. 等人,《公共科学图书馆-综合 (PLOS One)》4 (10):e7467 (2009年10月14日)中。AAV1衣壳蛋白的氨基酸序列可以通过GENBANK登录号NP\_049542 (SEQ ID NO:31) 找到。AAV6衣壳蛋白的氨基酸序列可以通过GENBANK登录号AAB95450 (SEQ ID NO:32) 找到。当在本文中参考使用与AAVShH10VP1衣壳蛋白对应的氨基酸编号的衣壳蛋白的氨基酸修饰(包含特定氨基酸插入)时,应当理解,这些氨基酸修饰中的任何氨基酸修饰还可以引入到其它血清型AAV的衣壳蛋白中,例如在与AAVShH10的位置相对应的位置处。

[0104] 在特定实施例中,当存在于AAV病毒粒子中时,与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,变体衣壳蛋白赋予了视网膜细胞或肝细胞增加的感染性。在一些情况下,视网膜细胞是感光细胞(例如,视杆细胞或视锥细胞)。在其它情况下,视网膜细胞是RGC。在其它情况下,视网膜细胞是RPE细胞。在其它情况下,视网膜细胞是Muller细胞。其它视网膜细胞包含无长突细胞、双极细胞和水平细胞。在特定实施例中,当存在于AAV病毒粒子中时,与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对视网膜细胞的向性相比,变体衣壳蛋白赋予了改变的向性。在特定实施例中,当存在于AAV病毒粒子中时,与包括对应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子相比,变体衣壳蛋白赋予了与类肝素或硫酸类肝素的增加结合和/或在玻璃体内注射后结合和穿过内界膜的增加能力。

[0105] 在某些实施例中,变体衣壳蛋白,例如VP1,包含长度为约5个氨基酸到约11个氨基酸的肽的插入。在特定实施例中,插入肽的长度为5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸或11个氨基酸。这些插入被统称为“7m8插入”。

[0106] 在某些实施例中,7m8插入肽包括具有本文所列出的式中的任何一个式的氨基酸序列。例如,插入肽可以是长度为5个到11个氨基酸的肽,其中插入肽具有式I:

[0107]  $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$  (SEQ ID NO:1)

[0108] 其中:

[0109]  $Y_1$ - $Y_4$ 中的每一个独立地不存在或存在,并且如果存在,则独立地选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;

[0110]  $X_1$ 不存在或存在,并且如果存在,则选自Leu、Asn和Lys;

[0111]  $X_2$ 选自Gly、Glu、Ala和Asp;

[0112]  $X_3$ 选自Glu、Thr、Gly和Pro;

[0113]  $X_4$ 选自Thr、Ile、Gln和Lys;

[0114]  $X_5$ 选自Thr和Ala;

[0115]  $X_6$ 选自Arg、Asn和Thr;并且

[0116]  $X_7$ 不存在或存在,并且如果存在,则选自Pro和Asn。

[0117] 作为另一个实例,7m8插入肽可以是长度为5个到11个氨基酸的肽,其中插入肽具有式IIa:

[0118]  $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$  (SEQ ID NO:2)

[0119] 其中:

- [0120] Y<sub>1</sub>-Y<sub>4</sub>中的每一个独立地不存在或存在,并且如果存在,则选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0121] X<sub>1</sub>-X<sub>4</sub>中的每一个是任何氨基酸;
- [0122] X<sub>5</sub>是Thr;
- [0123] X<sub>6</sub>是Arg;并且
- [0124] 并且X<sub>7</sub>是Pro。
- [0125] 作为另一个实例,插入肽可以是长度为5个到11个氨基酸的肽,其中插入肽具有式IIb:
- [0126] Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub> (SEQ ID NO:3)
- [0127] 其中:
- [0128] Y<sub>1</sub>-Y<sub>4</sub>中的每一个独立地不存在或存在,并且如果存在,则独立地选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0129] X<sub>1</sub>不存在或存在,并且如果存在,则选自Leu和Asn;
- [0130] X<sub>2</sub>不存在或存在,并且如果存在,则选自Gly和Glu;
- [0131] X<sub>3</sub>选自Glu和Thr;
- [0132] X<sub>4</sub>选自Thr和Ile;
- [0133] X<sub>5</sub>是Thr;
- [0134] X<sub>6</sub>是Arg;并且
- [0135] X<sub>7</sub>是Pro。
- [0136] 作为另一个实例,7m8插入肽可以是长度为5个到11个氨基酸的肽,其中插入肽具有式III:
- [0137] Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub> (SEQ ID NO:4)
- [0138] 其中:
- [0139] Y<sub>1</sub>-Y<sub>4</sub>中的每一个独立地不存在或存在,并且如果存在,则选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0140] X<sub>1</sub>不存在或存在,并且如果存在,则为Lys;
- [0141] X<sub>2</sub>选自Ala和Asp;
- [0142] X<sub>3</sub>选自Gly和Pro;
- [0143] X<sub>4</sub>选自Gln和Lys;
- [0144] X<sub>5</sub>选自Thr和Ala;
- [0145] X<sub>6</sub>选自Asn和Thr;并且
- [0146] X<sub>7</sub>不存在或存在,并且如果存在,则为Asn。
- [0147] 作为另一个实例,插入肽可以是长度为5个到11个氨基酸的肽,其中插入肽具有式IV:
- [0148] Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub> (SEQ ID NO:5)
- [0149] 其中:
- [0150] Y<sub>1</sub>-Y<sub>4</sub>中的每一个独立地不存在或存在,并且如果存在,则独立地选自Ala、Leu、Gly、Ser和Thr;
- [0151] X<sub>1</sub>不存在或存在,如果存在,则是带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或者选自



Leu、Asn、Arg、Ala、Ser和Lys；

[0152] X<sub>2</sub>是带负电的氨基酸或不带电的氨基酸；或者选自Gly、Glu、Ala、Val、Thr和Asp；

[0153] X<sub>3</sub>是带负电的氨基酸或不带电的氨基酸；或者选自Glu、Thr、Gly、Asp或Pro；

[0154] X<sub>4</sub>选自Thr、Ile、Gly、Lys、Asp和Gln；

[0155] X<sub>5</sub>是极性氨基酸、醇（具有自由羟基的氨基酸）或疏水氨基酸；或者选自Thr、Ser、Val和Ala；

[0156] X<sub>6</sub>是带正电的氨基酸或不带电的氨基酸；或者选自Arg、Val、Lys、Pro、Thr和Asn；并且

[0157] X<sub>7</sub>不存在或存在，并且如果存在，则是带正电的氨基酸或不带电的氨基酸；或者选自Pro、Gly、Phe、Asn和Arg。

[0158] 作为非限制性实例，7m8插入肽可以包括选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成：LGETTRP (SEQ ID NO:6)、NETITRP (SEQ ID NO:7)、KAGQANN (SEQ ID NO:8)、KDPKTTN (SEQ ID NO:9)、KDTDTTR (SEQ ID NO:10)、RAGGSVG (SEQ ID NO:11)、AVDTTKF (SEQ ID NO:12) 和STGKVPN (SEQ ID NO:13)。

[0159] 在一些情况下，7m8插入肽在LGETTRP (SEQ ID NO:6)、NETITRP (SEQ ID NO:7)、KAGQANN (SEQ ID NO:8)、KDPKTTN (SEQ ID NO:9)、KDTDTTR (SEQ ID NO:10)、RAGGSVG (SEQ ID NO:11)、AVDTTKF (SEQ ID NO:12) 和STGKVPN (SEQ ID NO:13) 中的任何一个氨基酸序列的氨基端和/或羧基端处具有1个到4个间隔氨基酸 (Y<sub>1</sub>-Y<sub>4</sub>)。适合的间隔氨基酸包含但不限于亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸。

[0160] 例如，在一些情况下，7m8插入肽具有以下氨基酸序列中的一个氨基酸序列：LALGETTRPA (SEQ ID NO:14)、LANETITRPA (SEQ ID NO:15)、LAKAGQANNA (SEQ ID NO:16)、LAKDPKTTNA (SEQ ID NO:17)、LAKDTDTTRA (SEQ ID NO:18)、LARAGGSVGA (SEQ ID NO:19)、LAAVDTTKFA (SEQ ID NO:20) 和LASTGKVPNA (SEQ ID NO:21)。作为另一个实例，在一些情况下，7m8插入肽具有以下氨基酸序列中的一个氨基酸序列：AALGETTRPA (SEQ ID NO:22)、AANETITRPA (SEQ ID NO:23)、AAKAGQANNA (SEQ ID NO:24) 和AAKDPKTTNA (SEQ ID NO:25)。在又一个实例中，在一些情况下，7m8插入肽具有以下氨基酸序列中的一个氨基酸序列：GLGETTRPA (SEQ ID NO:26)、GNETITRPA (SEQ ID NO:27)、GKAGQANNA (SEQ ID NO:28) 和GKDPKTTNA (SEQ ID NO:29)。作为另一个实例，在一些情况下，插入肽包括在C端侧接AA并且在N端侧接A的KDTDTTR (SEQ ID NO:10)、RAGGSVG (SEQ ID NO:11)、AVDTTKF (SEQ ID NO:12) 和STGKVPN (SEQ ID NO:13) 中的一个氨基酸序列；或者包括在C端侧接G并且在N端侧接A的KDTDTTR (SEQ ID NO:10)、RAGGSVG (SEQ ID NO:11)、AVDTTKF (SEQ ID NO:12) 和STGKVPN (SEQ ID NO:13) 中的一个氨基酸序列。在某些实施例中，7m8是具有五个到12个氨基酸残基的随机序列。

[0161] 在某些实施例中，7m8氨基酸插入包括以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成：LGETTRP (SEQ ID NO:6)。在特定实施例中，7m8插入包括以下氨基酸序列或其片段或者由以下氨基酸序列或其片段组成：LALGETTRPA (SEQ ID NO:14)，所述片段包括至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或至少九个连续氨基酸。在特定实施例中，7m8插入包括与以下氨基酸序列至少80%、至少85%或至少90%同源的氨基酸序列或其片段或者由其组成：LALGETTRPA (SEQ ID NO:14)，所述片段包括至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或至

少九个连续氨基酸。在一些实施例中,衣壳蛋白包含m78插入,所述m78插入包括与选自LG2TRP (SEQ ID NO:6) 和LALGETTRPA (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列一致性的氨基酸序列。在特定实施例中,这些插入中的任何插入均存在于AAVShH10、AAV1或AAV6的氨基酸残基450-464中,例如在C端立即插入到氨基酸残基450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463或464。

[0162] 在一些实施例中,除了相对于对应的亲本AAV衣壳蛋白的7m8插入,主题变体AAV衣壳不包含任何其它氨基酸取代、插入或缺失。在其它实施例中,除了相对于对应的亲本AAV衣壳蛋白的7m8插入之外,主题变体AAV衣壳还包含与亲本AAV衣壳蛋白相比1个到约25个氨基酸插入、缺失或取代。在一些实施例中,主题变体衣壳多肽不包含以下氨基酸取代中的一个、二个、三个或四个氨基酸取代:Y273F、Y444F、Y500F和Y730F。在一些实施例中,除了7m8插入肽之外,主题变体衣壳多肽还包括以下氨基酸取代中的一个、二个、三个或四个氨基酸取代:Y273F、Y444F、Y500F和Y730F。

[0163] 在一些实施例中,变体AAV衣壳多肽是嵌合衣壳,例如,衣壳包括第一AAV血清型AAV衣壳的一部分和第二血清型AAV衣壳的一部分;并且包括相对于对应的亲本AAV衣壳蛋白的7m8插入。

[0164] 在一些实施例中,主题变体衣壳蛋白包括:与野生型或亲本衣壳蛋白有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的氨基酸序列一致性的氨基酸序列,例如VP1;以及相对于对应的野生型或亲本AAV衣壳蛋白的7m8插入。

[0165] 在一些实施例中,分离例如纯化主题变体衣壳蛋白。在一些情况下,主题变体衣壳蛋白包含在同样提供的AAV载体中。如下文详细描述,主题变体衣壳蛋白可以包含在重组AAV病毒粒子中。

[0166] 7m8插入可以插入到AAV衣壳蛋白内的不同位点。在特定实施例中,变体衣壳蛋白是AAVShH10衣壳蛋白,例如VP1,并且7m8插入位点位于AAVShH10衣壳蛋白的可变区IV中。与野生型AAV6或AAV2相比,源自来自改组(ShH)库的AAV6亲本血清型的AAVShH10已经被示出为有增加的特异性和效率来转导Müller细胞。(Klimczak, R.R. 等人,《公共科学图书馆-综合》4 (10):e7467 (2009年10月14日))。AAVShH10衣壳在本文中可替代地称为“ShH10”;所述术语可互换地使用。野生型AAV1病毒与AAV6密切相关,具有相同的衣壳氨基酸序列,但有5个氨基酸取代。AAV1 VP1蛋白的氨基酸序列可以通过GENBANK登录号NP\_049542 (SEQ ID NO:31) 找到,并且AAV6 VP1蛋白的氨基酸序列可以通过GENBANK登录号AAB95450 (SEQ ID NO:32) 找到。在某些其它实施例中,变体衣壳是AAV1、AAV6或任何其它AAV血清型或衍生物,包含但不限于本文所述的那些,以及7m8插入,如果7m8插入存在于AAV的与AAVShH10的可变区IV相对应的区域中的话。在某些实施例中,7m8插入存在于3倍突出的尖端处或附近、在碱基氨基酸残基459处或附近、或者在AAVShH10衣壳蛋白的硫酸类肝素蛋白多糖结合位点或另一种AAV血清型或衍生物的对位位置处或附近。在特定实施例中,“附近”指示在所指示的氨基酸或位点的两个氨基酸残基内、三个氨基酸残基内、四个氨基酸残基内或五个氨基酸残基内。例如,7m8插入位点可以位于AAVShH10衣壳蛋白的氨基酸450-460或氨基酸450-464内,例如位于选自AAVShH10衣壳蛋白例如VP1的450与451、451与452、452与453、453与454、454与455、455与456、456与457、457与458、458与459、459与460、460与461、461与462、462与

463或463与464的两个相邻氨基酸之间,或者位于任何其它AAV衣壳蛋白例如VP1中的对应的氨基酸残基内。在特定实施例中,插入位于AAVShH10的氨基酸残基457与458(ShH10/7m8(457))、458与459(ShH10/7m8(458))或459与460(ShH10/7m8(459))之间。

[0167] 在特定实施例中,经过修饰的衣壳蛋白未公开于以下中:U.S.9,441,244、U.S.9,233,131、U.S.200160017295、U.S.7,220,577、WO 2015/168666、U.S.7,867,484、U.S.8,802,080、U.S.20150005369、U.S.7,172,893、WO 2015/134643、U.S.6,962,815、U.S.7,749,492、U.S.20160040137、U.S.20090317417、U.S.20140336245、U.S.7,629,322、WO 2016/133917、WO 2015/121501、U.S.9,409,953、U.S.8,889,641或U.S.20150152142。

[0168] 本公开还包含对本文所描述的一个或多个变体衣壳进行编码的多核苷酸。在特定实施例中,多核苷酸是表达载体,并且表达载体包括对与启动子序列可操作地连接的本文所描述的变体衣壳进行编码的多核苷酸序列,所述启动子序列例如驱动多核苷酸表达在细胞中的启动子序列。在特定实施例中,启动子序列是组织特异性启动子,所述组织特异性启动子优先驱动表达在一个或多个组织或细胞类型中,例如视网膜、肝、视网膜细胞或肝细胞。

[0169] 本公开还包含包括对本文所描述的变体衣壳进行编码的多核苷酸或载体的细胞。在特定实施例中,多核苷酸是一种表达载体,并且所述表达载体包括对与启动子序列可操作地连接的本文所描述的变体衣壳进行编码的多核苷酸序列,所述启动子序列例如驱动多核苷酸在细胞中表达的启动子序列。在某些实施例中,多核苷酸或载体进一步包括对rep蛋白,例如AAV2 rep蛋白进行编码的序列。在某些实施例中,细胞是辅助细胞或宿主细胞,例如可以用于产生包括变体衣壳蛋白的病毒粒子的HEK293细胞。在制备主题rAAV组合物时,可以采用用于产生rAAV病毒粒子的任何宿主细胞,包含例如哺乳动物细胞(例如293细胞)、昆虫细胞(例如Sf9细胞)、微生物和酵母。宿主细胞也可以是包装细胞或生产细胞,在所述包装细胞中,AAV rep和cap基因稳定地维持在宿主细胞中,在所述生产细胞中,AAV载体基因组稳定地维持和包装。示例性包装细胞和生产细胞源自Sf-9、293、A549或HeLa细胞。AAV载体使用本领域已知的标准技术进行纯化和配制。

[0170] 重组病毒粒子和病毒载体

[0171] 本发明包含重组病毒或病毒粒子,例如包括本公开的变体衣壳蛋白的基因递送载体或基因治疗载体。

[0172] 在某些实施例中,病毒或病毒粒子是源自病毒的病毒载体,所述病毒例如腺病毒、腺相关病毒(AAV)、慢病毒、疱疹病毒、甲病毒或逆转录病毒,例如莫洛尼鼠白血病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病毒(GaLV)、猫白血病毒(FLV)、泡沫病毒、弗兰德鼠白血病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯氏肉瘤病毒(RSV)或慢病毒。虽然下面更详细地描述了涵盖腺相关病毒的用途的实施例,但是期望本领域普通技术人员应了解,本领域中的类似知识和技术也可以用于非AAV基因治疗载体。例如,参见例如美国专利第7,585,676号和美国专利第8,900,858号中对逆转录病毒载体的讨论以及例如美国专利第7,858,367号中对腺病毒载体的讨论,所述美国专利的全部公开内容通过引用的方式并入本文中。在某些实施例中,重组病毒或病毒粒子具有感染性。在某些实施例中,重组病毒粒子或病毒具有复制能力。在某些实施例中,重组病毒或病毒粒子不具有复制能力。在特定实施例中,病毒粒子是包括本文所描述的

经过修饰的衣壳蛋白的AAVShH10、AAV1或AAV6。

[0173] 在一些实施例中,重组病毒粒子或病毒是例如进一步包括多核苷酸盒的AAV,所述多核苷酸盒包括对基因产物例如治疗性基因产物进行编码的序列。在某些实施例中,对基因产物进行编码的序列与启动子序列可操作地连接。在某些实施例中,多核苷酸盒在5'端和3'端侧接功能性AAV反向末端重复(ITR)序列。“功能性AAV ITR序列”意味着ITR序列用于旨在挽救、复制和包装AAV病毒粒子。因此,本发明的基因递送载体中使用的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列并且可以通过核苷酸的插入、删除或取代来改变,或者AAV ITR可以从几种AAV血清型中的任何一种得到,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10。某些AAV载体在野生型REP和CAP基因方面全部或部分缺失,但保留了功能性侧接ITR序列。

[0174] 在某些实施例中,本文所描述的重组病毒或病毒粒子包括异源核酸,所述异源核酸包括对基因产物例如治疗性基因产物进行编码的核苷酸序列。在一些实施例中,基因产物是干扰RNA。在一些实施例中,基因产物是适配体。在一些实施例中,基因产物是多肽。在一些实施例中,基因产物是提供用于对基因功能进行位点特异性敲低的位点特异性核酸酶。

[0175] 在基因产物是干扰RNA (RNAi) 的情况下,适合的RNAi包含减少低细胞中凋亡因子或血管生成因子的水平的RNAi。例如, RNAi可以是降低细胞中诱导或促进凋亡的基因产物的水平的shRNA或siRNA。其基因产物诱导或促进凋亡的基因在本文中被称为“促凋亡基因”,并且这些基因(mRNA;蛋白质)的产物被称为“促凋亡基因产物”。促凋亡基因产物包含例如Bax、Bid、Bak和Bad基因产物。参见例如美国专利第7,846,730号。

[0176] 干扰RNA也可以是针对血管生成产物的,例如VEGF(例如Cand5;参见例如美国专利公开第2011/0143400号;美国专利公开第2008/0188437号;以及Reich等人(2003)《分子视觉(Mol.Vis.)》9:210)、VEGFR1(例如Sirna-027;参见例如Kaiser等人(2010)《美国眼科学杂志(Am.J.Ophthalmol.)》150:33;以及Shen等人,(2006)《基因治疗(Gene Ther.)》13:225)或VEGFR2(Kou等人(2005)《生物化学(Biochem.)》44:15064)。参见例如美国专利第6,649,596号、第6,399,586号、第5,661,135号、第5,639,872号和第5,639,736号;以及美国专利第7,947,659号和第7,919,473号。

[0177] 在基因产物是适配体的情况下,所关注的示例性适配体包含针对血管内皮生长因子(VEGF)的适配体。参见例如Ng等人(2006)《自然评论:药物发现(Nat.Rev.Drug Discovery)》5:123;以及Lee等人(2005)《美国科学院院报》102:18902。例如,VEGF适配体可以包括核苷酸序列5'-cgcaaucagugaaugcuuauacauccg-3'(SEQ ID NO:30)。同样适于使用的是PDGF特异性适配体,例如E10030;参见例如Ni和Hui(2009)《眼科学报(Ophthalmologica)》223:401;以及Akiyama等人(2006)《细胞生理学杂志(J.Cell Physiol.)》207:407)。

[0178] 在基因产物为多肽的情况下,在某些实施例中,多肽可以增强视网膜细胞的功能,例如,视杆或视锥感光细胞、视网膜神经节细胞、Muller细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞或视网膜色素上皮细胞的功能。示例性多肽包含:神经保护多肽(例如,GDNF、CNTF、NT4、NGF和NTN);抗血管生成多肽(例如可溶性血管内皮生长因子(VEGF)受体;VEGF结合抗体;VEGF结合抗体片段(例如,单链抗VEGF抗体);内皮抑素;肿瘤抑素;血管抑素;可溶性Flt

多肽 (Lai等人 (2005)《分子治疗 (Mol. Ther.)》12:659);包括可溶性Flt多肽的Fc融合蛋白 (参见例如Pechan等人 (2009)《基因治疗 (Gene Ther.)》16:10);色素上皮衍生因子 (PEDF);可溶性Tie-2受体;等等);组织金属蛋白酶抑制剂-3 (TIMP-3);光响应性视蛋白,例如视紫红质;抗凋亡多肽 (例如Bcl-2、Bcl-X1);等等。适合的多肽包括但不限于:神经胶质源性神经营养因子 (GDNF);成纤维细胞生长因子2;神经秩蛋白 (neurturin) (NTN);睫状神经营养因子 (CNTF);神经生长因子 (NGF);神经营养蛋白-4 (NT4);脑源性神经营养因子 (BDNF);表皮生长因子;视紫红质;X连接的凋亡抑制剂;以及音猬因子,以及这些多肽中的任何多肽的功能性变体和片段,包含与这些多肽中的任何多肽有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的序列一致性的变体、以及包括这些多肽或其变体中的任何多肽或其变体的至少20%、至少30%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的片段。

[0179] 适合的光响应性视蛋白包含例如如以下所描述的光响应性视蛋白:美国专利公开第2007/0261127号 (例如,ChR2;Chop2);美国专利公开第2001/0086421号;美国专利公开第2010/0015095号;以及Diester等人 (2011)《自然神经科学 (Nat. Neurosci.)》14:387。

[0180] 适合的多肽还包含例如:视网膜劈裂蛋白 (retinoschisin)、视网膜色素变性GTP酶调节剂 (RGPR) 相互作用蛋白-1 (参见例如GenBank登录号Q96KN7、Q9EPQ2和Q9GLM3);外周蛋白-2 (Prph2) (参见例如GenBank登录号NP.sub.--000313;外周蛋白;视网膜色素上皮特异性蛋白 (RPE65) (参见例如GenBank AAC39660;以及Morimura等人 (1998)《美国科学院院报》95:3088);

[0181] CHM (choroideremia (Rab护送蛋白1)), 当有缺陷或缺失时会引起无脉络膜的多肽 (参见例如Donnelly等人 (1994)《人类分子遗传学 (Hum. Mol. Genet.)》3:1017;以及van Bokhoven等人 (1994)《人类分子遗传学》3:1041);以及Crumbs同系物1 (CRB1), 当有缺陷或缺失时会引起莱伯先天性黑朦和视网膜色素变性的多肽 (参见例如den Hollander等人 (1999)《自然遗传学 (Nat. Genet.)》23:217;以及GenBank登录号CAM23328)。

[0182] 适合的多肽还包含:当有缺陷或缺失时导致全色盲的多肽,其中这种多肽包含例如锥形感光器cGMP门控通道 $\alpha$ 亚基 (CNGA3) (参见例如GenBank登录号NP\_001289;以及Booi j等人 (2011)《眼科学 (Ophthalmology)》118:160-167);锥形感光器cGMP门控阳离子通道 $\beta$ 亚基 (CNGB3) (参见例如kohl等人 (2005)《欧洲人类遗传学杂志 (EUR J Hum Genet.)》13 (3): 302);鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (G蛋白)、 $\alpha$ 转导活性多肽2 (GNAT2) (ACHM4);以及ACHM5;以及当有缺陷或缺失时导致各种形式的色盲的多肽 (例如,L-视蛋白、M-视蛋白和S-视蛋白)。参见例如Mancuso等人 (2009)《自然 (Nature)》461 (7265):784-787。

[0183] 在一些情况下,所关注的基因产物是提供用于对基因功能进行位点特异性敲低的位点特异性内切核酸酶,例如,其中内切核酸酶敲除了与视网膜疾病相关的等位基因。例如,在显性等位基因对当属于野生型时是视网膜结构蛋白和/或提供正常的视网膜功能的基因的缺陷副本进行编码的情况下,位点特异性内切核酸酶可以靶向到缺陷等位基因并且敲除缺陷等位基因。

[0184] 除了敲除缺陷等位基因之外,还可以使用位点特异性核酸酶来刺激与对由缺陷等位基因编码的蛋白质的功能性副本进行编码的供体DNA的同源重组。因此,例如,主题rAAV病毒粒子既可以用于递送敲除缺陷等位基因的位点特异性内切核酸酶,并且还可以用于递送缺陷等位基因的功能副本,从而使修复缺陷等位基因,由此提供了功能性视网膜蛋白 (例

如功能性视网膜劈裂蛋白、功能性RPE65、功能性外周蛋白等)的产生。参见例如Li等人(2011)《自然(Nature)》475:217。在一些实施例中,主题rAAV病毒粒子包括:对位点特异性内切核酸酶进行编码的异源核苷酸序列;以及对缺陷等位基因的功能性副本进行编码的异源核苷酸序列,其中所述功能性副本对功能性视网膜蛋白进行编码。功能性视网膜蛋白包含例如视网膜劈裂蛋白、RPE65、视网膜色素变性GTP酶调节剂(RGPR)相互作用蛋白-1、外周蛋白、外周蛋白-2等。

[0185] 适于使用的位点特异性内切核酸酶包含例如:锌指核酸酶(ZFNs);以及转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs),其中这种位点特异性内切核酸酶是非天然存在的并且被修饰以靶向特定基因。这种位点特异性核酸酶可以被工程化以在基因组中切割特定位置,并且非同源端连接然后可以在插入或缺失多个核苷酸的同时修复断裂。这种位点特异性内切核酸酶(也被称为“INDEL”)然后将蛋白质从框架中抛出并且有效地敲除基因。参见例如美国专利公开第2011/0301073号。

[0186] 在一些实施例中,对基因产物进行编码的核苷酸序列与组成型启动子可操作地连接。在其它实施例中,对关注的基因产物进行编码的核苷酸序列与诱导型启动子可操作地连接。在一些情况下,对关注的基因产物进行编码的核苷酸序列与组织特异性或细胞类型特异性调节元件可操作地连接。在某些实施例中,启动子选自巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)启动子、MMT启动子、EF-1 $\alpha$ 启动子、UB6启动子、鸡 $\beta$ -肌动蛋白启动子、CAG启动子、RPE65启动子和视蛋白启动子。

[0187] 例如,在一些情况下,对关注的基因产物进行编码的核苷酸序列与感光器特异性调节元件(例如,感光器特异性启动子)可操作地连接,例如赋予了在感光细胞中选择性地表达可操作地连接的基因的调节元件。适合的感光器特异性调节元件包含例如:视紫红质启动子;视紫红质激酶启动子(Young等人(2003)《眼科研究与视光学(Ophthalmol.Vis.Sci.)》44:4076); $\beta$ 磷酸二酯酶基因启动子(Nicoud等人(2007)《基因医学(Gene Med.)》9:1015);视网膜色素变性基因启动子(NiCoad等人(2007)同上);内感光器类视黄醇结合蛋白(IRBP)基因增强子(NiCoad等人(2007)同上);IRBP基因启动子(Yokoyama等人(1992)《实验眼科研究(Exp Eye Res.)》55:225)。

[0188] 例如,在一些情况下,对关注的基因产物进行编码的核苷酸序列与肝脏或肝细胞特异性调节元件(例如,肝脏特异性启动子)可操作地连接,例如赋予了在肝细胞(liver cell)例如肝细胞(hepatocyte)中选择性地表达可操作地连接的基因的调节元件。适合的肝脏特异性调节元件包含例如:载脂蛋白E/C-I肝控制区,其是单独的或与人类 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶核心启动子组合的; $\alpha$ 1微球蛋白/二库宁肽(bikunin)增强子的一个或两个副本,其与人类甲状腺素结合球蛋白(TBG)核心启动子偶联;或启动子区,其被称为“ET”并且被描述为与小鼠甲状腺素运载蛋白启动子连接的随机组装的肝细胞特异性转录因子结合位点,如Kattenhorn,L.M.等人,《人类基因治疗(Human Gene Therapy)》,2016年12月1日;27(12):947-961中总结的。表达可以通过包含土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)而进一步稳定。

[0189] 可以使用标准方法生产包括本文所描述的变体衣壳蛋白的重组病毒载体(例如,rAAV病毒粒子)以及任选地,本公开的包封多核苷酸盒。例如,在rAAV病毒粒子的情况下,包括多核苷酸盒的AAV表达载体可以被引入到生产细胞中,随后引入AAV辅助构建体,所述AAV

辅助构建体包括对本文所描述的变体衣壳蛋白进行编码的多核苷酸序列,并且其中所述辅助构建体包含AAV编码区,所述AAV编码区能够表达在生产者细胞中并且补充AAV载体中缺少的AAV辅助功能。随后将辅助病毒和/或另外的载体引入到生产细胞中,其中辅助病毒和/或另外的载体提供了能够支持高效rAAV病毒生产的辅助功能。然后培养生产细胞以生产rAAV。这些步骤是使用标准方法实施的。包括本文所描述的变体衣壳蛋白的复制缺陷型AAV病毒粒子使用AAV包装细胞和包装技术通过本领域已知的标准技术制成。这些方法的实例可以在例如通过全文引用的方式明确地并入本文中的美国专利第5,436,146号、第5,753,500号、第6,040,183号、第6,093,570号和第6,548,286号中找到。用于包装的另外的组合物和方法描述于也通过全文引用的方式并入的Wang等人(US 2002/0168342)中。

[0190] 如所附实例中公开的,本文所描述的变体衣壳蛋白赋予了包括变体衣壳蛋白的病毒粒子增强的或改变的细胞向性。因此,变体衣壳可以用于增强或改变病毒或病毒粒子的向性,以增强其对期望的细胞类型的向性。

[0191] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体例如与不包含本文所公开的变体衣壳蛋白的对应病毒粒子或病毒载体相比,以至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍的亲和力与类肝素或硫酸类肝素蛋白多糖(HSPG)结合。

[0192] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体例如与不包含本文所公开的变体衣壳蛋白的对应病毒粒子或病毒载体相比,以至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍的亲和力与ILM结合。

[0193] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体的免疫原性例如与不包含本文所公开的变体衣壳蛋白的对应病毒粒子或病毒载体相比,降低小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%或小于10%。

[0194] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体能够在经由玻璃体内注射递送时将基因产物递送到视网膜,例如,其中所述病毒粒子或病毒载体与不包含本文所公开的变体衣壳蛋白的对应病毒粒子或病毒载体相比,产生了对至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍基因产物的表达。在某些实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的这些病毒粒子或病毒载体能够以其转导一种或多种其它眼部细胞类型的更高水平选择性地转导视网膜细胞。

[0195] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体能够在经由静脉内注射或输注递送时将基因产物递送到肝脏,例如,其中所述病毒粒子或病毒载体与不包含本文所公开的变体衣壳蛋白的对应病毒粒子或病毒载体相比,产生了对至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍基因产物的表达。在某些实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的这些病毒粒子或病毒载体能够以其转导如心脏等一种或多种其它器官的更高水平选择性地转导肝细胞。

[0196] 在某些实施例中,病毒粒子或病毒载体以结合亲和力结合类肝素或硫酸类肝素,使得病毒粒子或病毒载体在约0.2M到约0.4M例如0.2M、0.3M或0.4M的盐浓度下从类肝素柱中洗脱,如所附实例中描述的。

[0197] 药物组合物

[0198] 还公开了包括包含本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体以及一种或多种药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的药物组合物。主题病毒粒子或载体可以与可用于制备通常是安全、无毒且期望的并且包含可接受以供灵长类动物使用的赋形剂的调配物的药学上可接受的载剂、稀释剂和赋形剂组合。这种赋形剂可以是固体、液体、半固体或在气雾组合物的情况下气体。这种载剂或稀释剂的实例包含但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。补充性活性化合物也可以并入调配物中。用于调配物的溶液或悬浮液可以包含：无菌稀释剂，如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌化合物，如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合化合物，如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂，如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；洗涤剂，如用于防止聚合的吐温20(Tween 20)；以及用于调节张力的化合物，如氯化钠或右旋糖。可以用如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调整pH。在特定实施例中，药物组合物是无菌的。对于要在体内接触眼部细胞的情况，可以适当地处理主题多核苷酸盒或包括主题多核苷酸盒的基因递送载体，以便递送到眼睛。

[0199] 药物组合物可以进一步包含无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用，适合的载剂包含生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些情况下，组合物是无菌的并且应当具有易于注射的程度的流动性。在某些实施例中，组合物在制造和储存条件下是稳定的，并且抵抗如细菌和真菌等微生物的污染作用进行保存。载剂体可以是例如含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其适合的混合物的溶剂或分散介质。例如，通过使用如卵磷脂等包衣、通过在分散体的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂，可以维持恰当的流动性。通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，可以实现防止微生物的作用。在许多情况下，优选在组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的药剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以实现对内部组合物的延长吸收。

[0200] 无菌溶液可以通过根据需要将所需量的载体或病毒粒子与上文所列举的成分中的一种成分或其组合并入适当的溶剂中、随后过滤灭菌来制备。通常，通过将活性化合物并入无菌媒剂中来制备分散液，所述无菌媒剂含有基础分散介质和来自上文所列举的那些成分的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法是真空干燥和冷冻干燥，所述干燥产生了活性成分加上来自其先前无菌过滤溶液的任何另外的期望成分的粉末。

[0201] 在一个实施例中，药物组合物与保护病毒粒子或载体免于从体内快速消除的载剂一起制备，如控释调配物，包含植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物，如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这种调配物的方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。材料也可以商购获得。脂质体悬浮液(包含用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载剂。这些可以根据本领域技术人员已知的方法来制备，例如如美国专利第4,522,811号中所描述的。

[0202] 以单位剂型配制口服、眼部或肠胃外组合物以易于施用和剂量统一可以是有利的。如本文所使用的，单位剂型是指适于作为单一剂量用于待治疗的受试者的物理离散单



位；每个单位含有经计算与所需药物载剂关联产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的单位剂型的规格由活性化合物的独特特性和待实现的特定治疗效果以及本领域中在混配这种活性化合物以用于治疗个体时固有的局限性决定并且直接依赖于此。

[0203] 可以制备出适于有效地转导哺乳动物细胞的任何浓度的病毒颗粒。例如，病毒颗粒的浓度可以配置成每毫升 $10^8$ 个载体基因组或更多，例如每毫升 $5 \times 10^8$ 个载体基因组；每毫升 $10^9$ 个载体基因组；每毫升 $5 \times 10^9$ 个载体基因组、每毫升 $10^{10}$ 个载体基因组、每毫升 $5 \times 10^{10}$ 个载体基因组；每毫升 $10^{11}$ 个载体基因组；每毫升 $5 \times 10^{11}$ 个载体基因组；每毫升 $10^{12}$ 个载体基因组；每毫升 $5 \times 10^{12}$ 个载体基因组；每毫升 $10^{13}$ 个载体基因组；每毫升 $1.5 \times 10^{13}$ 个载体基因组；每毫升 $3 \times 10^{13}$ 个载体基因组；每毫升 $5 \times 10^{13}$ 个载体基因组；每毫升 $7.5 \times 10^{13}$ 个载体基因组；每毫升 $9 \times 10^{13}$ 个载体基因组；每毫升 $1 \times 10^{14}$ 个载体基因组、每毫升 $5 \times 10^{14}$ 个载体基因组或更多，但是通常不多于每毫升 $1 \times 10^{15}$ 个载体基因组。

[0204] 主题病毒载体可以配制成任何适合的单位剂量，包括但不限于 $1 \times 10^8$ 个载体基因组或更多，例如 $1 \times 10^9$ 个、 $1 \times 10^{10}$ 个、 $1 \times 10^{11}$ 个、 $1 \times 10^{12}$ 个或 $1 \times 10^{13}$ 个载体基因组或更多，在某些情况下 $1 \times 10^{14}$ 个载体基因组，但通常不多于 $4 \times 10^{15}$ 个载体基因组。在一些情况下，单位剂量至多约为 $5 \times 10^{15}$ 个载体基因组，例如 $1 \times 10^{14}$ 个载体基因组或更少，例如 $1 \times 10^{13}$ 个、 $1 \times 10^{12}$ 个、 $1 \times 10^{11}$ 个、 $1 \times 10^{10}$ 个或 $1 \times 10^9$ 个载体基因组或更少，在某些情况下为 $1 \times 10^8$ 个载体基因组或更少，并且通常不少于 $1 \times 10^8$ 个载体基因组。在一些情况下，单位剂量为 $1 \times 10^{10}$ 个到 $1 \times 10^{11}$ 个载体基因组。在一些情况下，单位剂量为 $1 \times 10^{10}$ 个到 $3 \times 10^{12}$ 个载体基因组。在一些情况下，单位剂量为 $1 \times 10^9$ 个到 $3 \times 10^{13}$ 个载体基因组。在一些情况下，单位剂量为 $1 \times 10^8$ 个到 $3 \times 10^{14}$ 个载体基因组。

[0205] 在一些情况下，可以使用感染复数(MOI)测量药物组合物的单位剂量。MOI意指载体或病毒基因组与核酸可以递送到的细胞的比率或倍数。在一些情况下，MOI可以为 $1 \times 10^6$ 。在一些情况下，MOI可以为 $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^7$ 。在一些情况下，MOI可以为 $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^8$ 。在一些情况下，本公开的重组病毒的MOI至少为约 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 和 $1 \times 10^{18}$ 。在一些情况下，本公开的重组病毒的MOI为 $1 \times 10^8$ 到 $3 \times 10^{14}$ 。在一些情况下，本公开的重组病毒的MOI至多约为约 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 和 $1 \times 10^{18}$ 。

[0206] 在一些方面，药物组合物的量包括约 $1 \times 10^8$ 个到约 $1 \times 10^{15}$ 个重组病毒、约 $1 \times 10^9$ 个到约 $1 \times 10^{14}$ 个重组病毒、约 $1 \times 10^{10}$ 个到约 $1 \times 10^{13}$ 个重组病毒或约 $1 \times 10^{11}$ 个到约 $3 \times 10^{12}$ 个重组病毒。

[0207] 药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中，分配器例如注射器，例如载药注射器。

[0208] 本发明的药物组合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或这种酯的盐、或在施用于包括人的动物时能够(直接或间接)提供生物活性代谢物或其残留物的任何其它化合物。

[0209] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的生理学上可接受的盐和药学上可接受的盐：即，保留了亲本化合物的期望生物活性并且不对亲本化合物产生不期望的毒理效果的盐。各种药学上可接受的盐是本领域已知的并且描述于例如以下中：《雷明顿药

大全 (Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第17版,Alfonso R.Gennaro(编),美国宾夕法尼亚州伊斯顿Mark出版公司(Mark Publishing Company,Easton,PA,USA),1985(以及其最近的版本);《制药技术百科全书(Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology)》,第3版,James Swarbrick(编),美国纽约州美国英富曼卫生保健(有限公司)(Informa Healthcare USA(Inc.),NY,USA),2007;以及《制药科学(J.Pharm.Sci.)》66:2(1977)。此外,关于适合的盐,参见Stahl和Camille的《药用盐手册:性质、选择与使用(Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use)》(Wiley-VCH公司,2002)。

[0210] 用如碱金属和碱土金属或有机胺等金属或胺形成药学上可接受的碱加成盐。用作阳离子的金属包括钠、钾、镁、钙等。胺包括n-N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、二环己胺、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺和普鲁卡因(参见例如Berge等人,药用盐(Pharmaceutical Salts),《药学杂志(J.Pharm.Sci)》,1977,66,119)。酸性化合物的碱加成盐是通过使游离酸形式与足量的期望的碱相接触以常规方式产生盐来制备的。游离酸形式可以通过使盐形式与酸相接触并且以常规方式分离游离酸来再生。游离酸形式在某些物理性质方面如在极性溶剂中的溶解度与其各自的盐形式略有不同,但是出于本发明的目的,盐等同于其各自的游离酸。

[0211] 主题多核苷酸盒或基因递送载体例如重组病毒(病毒粒子)可以并入药物组合物中以施用于哺乳动物患者,特别是灵长类动物并且更特别地是人类。主题多核苷酸盒或基因递送载体例如病毒粒子可以在无毒的惰性的药学上可接受的水性载剂中配制,优选地,pH的范围为3到8,更优选地,范围为6到8。这种无菌组合物将包括含有对在重建后溶解在具有可接受的pH值的水性缓冲液中的治疗分子进行编码的核酸的载体或病毒粒子。

[0212] 在一些实施例中,本文所提供的药物组合物包括与药学上可接受的载剂和/或赋形剂混合的治疗有效量的载体或病毒粒子,药学上可接受的载剂和/或赋形剂例如盐水、磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐和氨基酸、聚合物、多元醇、糖、缓冲剂、防腐剂和其蛋白质。示例性氨基酸、聚合物和糖等是辛基苯氧基聚乙氧基乙醇化合物、聚乙二醇单硬脂酸酯化合物、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、蔗糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、右旋糖酐、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、木糖醇、乳糖、海藻糖、牛或人血清白蛋白、柠檬酸盐、乙酸盐、林格氏溶液和汉克氏溶液、半胱氨酸、精氨酸、肉毒碱、丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、缬氨酸、亮氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯和乙二醇。优选地,这一调配物在4℃下在至少六个月内是稳定的。

[0213] 在一些实施例中,本问所提供的药物组合物包括缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或磷酸钠/硫酸钠、tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、无菌水以及本领域普通技术人员已知的其它缓冲液,如Good(1966)《生物化学(Biochemistry)》5:467中描述的那些缓冲液。在特定实施例中,缓冲液的pH的范围可以为6.5到7.75,优选地为7到7.5并且最优选地为7.2到7.4。药物组合物可以配制用于各种类型的递送,包含例如眼部递送、玻璃体内注射、眼内注射、视网膜注射、视网膜下注射、肠胃外施用、静脉内注射或输液以及注射到肝脏中。

[0214] 增强或改变病毒向性的方法

[0215] 如所附实例中公开的,本文所描述的变体衣壳蛋白赋予了包括变体衣壳蛋白的病毒粒子增强的或改变的细胞向性或组织特异性。例如,本文所描述的某些变体衣壳蛋白与视网膜或肝脏的增加的感染性、视网膜或肝脏中基因产物的增加的表达水平或者与ILM的

增加的结合有关。

[0216] 本文所公开的变体衣壳可以用于增强或改变病毒或病毒粒子的向性,以增强其对期望的细胞类型的向性。

[0217] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体被用于将基因产物递送到视网膜。在特定实施例中,病毒粒子对视网膜神经节细胞(RGC)或Muller细胞具有增加的向性。

[0218] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体被用于递送基因产物穿过ILM。

[0219] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体被用于例如通过静脉内注射或输液或者通过直接注射到肝脏中来将基因产物递送到肝脏。

[0220] 在特定实施例中,包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体被用于例如通过静脉内注射经由全身递送将基因产物递送到肝脏。

[0221] 在某些实施例中,本公开提供了改变病毒(例如AAVShH10、AAV1或AAV6病毒)的向性的方法,所述方法包括在本文所描述的位置处将一个或多个7m8插入引入到病毒的衣壳蛋白中。在相关实施例中,所述方法包括改变病毒的向性的方法,包括将本文所公开的变体衣壳蛋白并入病毒中。

[0222] 表达基因产物的方法和治疗疾病或病症的方法

[0223] 本文所描述的包括本文所描述的变体衣壳蛋白的病毒粒子和病毒载体可以用于将转基因递送到细胞,例如动物的细胞。例如,病毒粒子和病毒载体可以用于研究,例如以便确定基因对细胞活力和/或功能的作用。作为另一个实例,病毒粒子和病毒载体可以用于医学,例如以便例如通过将治疗性基因产物传送到细胞或组织来治疗病症。因此,在本发明的一些方面,提供了在细胞中表达基因的方法,所述方法包括使细胞与本公开的组合物相接触。在一些实施例中,在体外发生接触。在一些实施例中,在体内发生接触,即,向受试者施用主题组合物。在特定实施例中,病毒载体是肠胃外施用的,例如,静脉内、口服或通过注射。在某些实施例中,病毒载体通过注射施用于眼睛,例如施用于视网膜、视网膜下或玻璃体。在某些实施例中,病毒载体通过视网膜注射、视网膜下注射或玻璃体内注射施用。在某些实施例中,病毒载体是肠胃外施用的,例如经由静脉内注射或输液。在某些实施例中,病毒载体局部或直接施用于关注的组织或器官,例如经由注射到肝脏中。

[0224] 例如,在哺乳动物细胞与包括本文所公开的变体衣壳蛋白的主题病毒粒子或载体载体要在体外接触的特定实施例中,细胞可以来自任何哺乳动物物种,例如啮齿动物(例如小鼠、大鼠、沙鼠、松鼠)、兔、猫科动物、犬科动物、山羊、绵羊科动物、猪、马科动物、牛科动物、灵长类动物和人类。细胞可以来自自己建立的细胞系,例如WERI细胞和661W细胞,或者细胞可以是原代细胞,其中“原代细胞”、“原代细胞系”和“原代培养物”在本文中可互换地用于指源自受试者并且允许培养物在体外生长有限数量的传代即分裂的细胞和细胞培养物。例如,原代培养物是可以传代0次、1次、2次、4次、5次、10次或15次,但次数不足以渡过危机期的培养物。通常,本公开的原代细胞系在体外维持少于10代。

[0225] 如果细胞是原代细胞,则可以通过任何方便的方法从哺乳动物中收获细胞,例如整体移植、活检等。可以使用适当的溶液来分散或悬浮收获的细胞。这种溶液通常会平衡盐溶液,例如生理盐水、PBS、汉克氏平衡盐溶液等,所述平衡盐溶液方便地补充有胎牛血清

或其它天然存在的因子、与通常有5-25mM的低浓度的可接受缓冲液结合。方便的缓冲溶液包含HEPES、磷酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液等。细胞可以立即使用,或者细胞可以长时间储存、冷冻,从而解冻并并且能够再使用。在这种情况下,细胞通常会被冷冻在10%DMSO、50%血清、40%缓冲介质或如本领域中常用的其它某种溶液中以将细胞保存在这种冷冻温度下,并且以本领域中已知的用于解冻冷冻培养细胞的方式解冻。

[0226] 在某些实施例中,为了促进转基因的表达,包括变体衣壳蛋白的主题病毒粒子或基因递送载体与细胞接触约30分钟到24小时或更长,例如1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、12小时、16小时、18小时、20小时、24小时等。包括变体衣壳蛋白的主题病毒粒子或基因递送载体可以提供到主题细胞一次或多次,例如一次、两次、三次或多于三次,并且细胞可以被允许在每个接触事件例如16-24小时之后与一种或多种药剂一起培育某个时间量,在所述时间量之后,用新鲜培养基替换培养基并且进一步培养细胞。接触细胞可以在任何培养基中和在促进细胞存活的任何培养条件下发生。例如,细胞可以悬浮在方便的任何适合的营养培养基中,如Iscove改良DMEM或RPMI 1640,所述适合的营养培养基补充有胎牛血清或热灭活山羊血清(约5-10%)、L-谷氨酰胺、硫醇,特别是2-巯基乙醇、以及抗生素,例如青霉素和链霉素。培养物可以含有细胞对其有响应的生长因子。如本文所定义的,生长因子是能够通过对跨膜受体的特定作用促进细胞在培养物或完整组织中存活、生长和/或分化的分子。生长因子包含多肽和非多肽因子。

[0227] 在某些实施例中,提供有效量的包括变体衣壳蛋白的病毒粒子或基因递送载体,以产生转基因在细胞中的表达。在特定实施例中,有效量可以根据经验容易地确定,例如,通过检测转基因产物的存在或水平、通过检测对细胞的活力或功能的作用等。在某些实施例中,作用量的包括变体衣壳蛋白的主题病毒粒子或基因递送载体与相同量的本领域中已知的参考病毒粒子或病毒载体例如AAV2.5T或AAV7m8相比,将促进细胞中转基因的同等或更大的表达。在某些实施例中,相对于来自参考、对照病毒粒子或病毒载体的表达,表达增强了2倍或更多,例如3倍、4倍或5倍或更多,在一些情况下为10倍、20倍或50倍或更多,例如100倍。在某些实施例中,增强的表达发生在特定的细胞类型中,例如本文所描述的任何眼部细胞。

[0228] 例如,对于细胞在体内与包括本文所描述的变体衣壳蛋白的主题病毒粒子或基因递送载体相接触的情况,受试者可以是任何哺乳动物,例如,啮齿动物(例如小鼠、大鼠、沙鼠)、兔、猫科动物、犬科动物、山羊、绵羊科动物、猪、马科动物、牛科动物或灵长类动物。本公开的方法和组合物可用于治疗可以至少部分地通过细胞基因治疗解决的任何病状。因此,本公开的组合物和方法可用于治疗需要细胞治疗的个体。细胞包含但不限于血液、眼睛、肝脏、肾脏、心脏、肌肉、胃、肠、胰腺和皮肤。

[0229] 在某些实施例中,本公开提供了将基因产物提供到受试者的眼睛例如视网膜的方法,所述方法包括通过眼部注射向受试者施用包括本文所描述的重组病毒粒子或载体的药物组合物,其中重组病毒包括本文所公开的变体衣壳和对基因产物进行编码的多核苷酸序列。在某些实施例中,视网膜细胞可以是感光细胞、视网膜神经节细胞、Muller细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞或视网膜色素上皮细胞。在一些情况下,视网膜细胞是感光细胞,例如视杆细胞或视锥细胞。在一些实施例中,递送是通过玻璃体内注射、视网膜注射或视网膜下注射进行的。

[0230] 在某些实施例中,本公开提供了治疗或预防有需要的受试者的眼部疾病或病症的方法,所述方法包括例如通过玻璃体内注射向受试者的一只或两只眼睛施用包括本文所描述的重组病毒粒子或载体的药物组合物,其中重组病毒包括本文所公开的变体衣壳和对治疗性基因产物进行编码的多核苷酸序列。治疗性基因产物可以是任何治疗性基因产物,包括但不限于本文所描述的那些治疗性基因产物中的任何治疗性基因产物。

[0231] 可以使用主题方法治疗的眼部疾病包括但不限于:急性黄斑神经视网膜病变;白塞氏病;脉络膜新生血管;糖尿病性葡萄膜炎;组织胞浆菌病;黄斑变性,如急性黄斑变性、非渗出性年龄相关性黄斑变性和渗出性年龄相关性黄斑变性;水肿,如黄斑水肿、黄斑囊样水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;眼外伤,其影响眼睛后部位点或位置;眼部肿瘤;视网膜病症,如视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变(包含增生性糖尿病视网膜病变)、增生性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉闭塞性疾病、视网膜脱离和葡萄膜炎性视网膜疾病;交感性眼炎;伏格特-小柳-原田三氏(Vogt Koyanagi-Harada) (VKH) 综合征;葡萄膜扩散;由眼部激光治疗引起的或受其影响的眼后病状;由光动力学治疗引起或受其影响的眼后病状;光凝固法、放射性视网膜病变;视网膜前膜病症;视网膜分支静脉阻塞;前部缺血性视神经病变;非视网膜病变糖尿病视网膜功能障碍;视网膜劈裂症;视网膜色素变性;青光眼;乌谢尔综合征、锥体-杆体营养不良;斯图加特氏疾病(眼底黄色斑点症);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;莱伯先天性黑朦;先天性静止性夜盲;无脉络膜;巴比二氏综合征;黄斑毛细血管扩张症;莱伯遗传性视神经病变;早产儿视网膜病变;以及色觉病症,包含全色盲、红色盲、绿色盲和蓝色盲。

[0232] 在特定实施例中,受试者已经被诊断为患有或被怀疑有发生选自以下组成的组的一种或多种疾病或病症的风险:年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、视网膜新生血管、脉络膜新生血管、糖尿病性视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变和糖尿病性视网膜水肿。在某些实施例中,基因产物抑制受试者的视网膜内的新生血管,例如脉络膜新生血管(CNV)。已经发现,许多细胞因子在调节CNV生成方面起到重要作用,其中可能包含但不限于血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体(VEGFR)、血小板源性生长因子(PDGF)、缺氧诱导因子(HIF)、血管生成素(Ang)和其它细胞因子,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)。在特定实施例中,基因产物抑制这些细胞因子中的一种或多种细胞因子。

[0233] 在特定实施例中,基因产物是抗VEGF蛋白或VEGF拮抗剂,诸如但不限于在美国专利第5,712,380号、第5,861,484号和第7,071,159号中公开的VEGF结合蛋白或其功能片段以及美国专利第7,635,474号中公开的VEGF结合融合蛋白。抗VEGF蛋白还可以包含如美国专利申请公开第2013/0323302号中描述的sFLT-1蛋白。

[0234] 本公开的重组病毒粒子和病毒载体可以包括对抗VEGF蛋白或VEGF拮抗剂进行编码的序列,VEGF拮抗剂是指部分地或充分降低或抑制VEGF的活性或产生的药剂。VEGF拮抗剂可以直接或间接地降低或抑制如VEGF<sub>165</sub>等特异性VEGF的活性或产生。此外,符合“拮抗剂”的上述定义的VEGF拮抗剂包含作用于VEGF配体或其同源受体以减少或抑制VEGF相关受体信号的药剂。VEGF拮抗剂的实例包含:靶向VEGF核酸的反义分子、核酶或RNAi;抗VEGF适配体、针对VEGF本身或其受体的抗VEGF抗体、或防止VEGF与其同源受体结合的可溶性VEGF

受体诱饵;靶向同源VEGF受体(VEGFR)核酸的反义分子、核酶或RNAi;与同源VEGFR受体结合的抗VEGFR适配体或抗VEGFR抗体;以及VEGFR酪氨酸激酶抑制剂。

[0235] 术语“VEGF”是指诱导血管生成或血管生成过程的血管内皮生长因子。如本文所使用的,术语“VEGF”包含通过例如替代性地剪接VEGF-A/VPF基因产生的各种亚型的VEGF(也称为血管通透因子(VPF)和VEGF-A)(参见美国专利申请公开第20120100136号的图2(A)和(B)),包含VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>165</sub>和VEGF<sub>189</sub>。进一步地,如本文所使用的,术语“VEGF”包含VEGF相关血管生成因子,如PIGF(胎盘生长因子)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和VEGF-E,所述VEGF相关血管生成因子通过同源VEGF受体(即VEGFR)起作用以诱导血管生成或血管生成过程。术语“VEGF”包含与VEGF受体结合的一类生长因子的任何成员,如VEGFR-1(Flt-1)(参见美国专利申请公开第20120100136号的图4(A)和(B))、VEGFR-2(KDR/Flk-1)(参见美国专利申请公开第20120100136号的图4(C)和(D))或VEGFR-3(FLT-4)。术语“VEGF”可以用于指“VEGF”多肽或对基因或核酸进行编码的“VEGF”。

[0236] 在一个实施例中,VEGF拮抗剂是VEGF-A拮抗剂。

[0237] 在一个实施例中,VEGF拮抗剂是兰尼单抗(ranibizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、阿柏西普(aflibercept)、KH902 VEGF受体-Fc融合蛋白、2C3抗体、ORA102、哌加他尼钠(pegaptanib)、贝伐西尼(bevasiranib)、SIRNA-027、紫花前胡素(decursin)、紫花前胡醇(decursinol)、苦鬼白脂素(picropodophyllin)、没药甾酮(guggulsterone)、PLG101、类二十烷酸LXA4、PTK787、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)、CDDO-Me、CDDO-Imm、紫草素(shikonin)、β-羟异戊酰紫草素(beta-hydroxyisovalerylshikonin)、或神经节苷脂GM3、DC101抗体、Mab25抗体、Mab73抗体、4A5抗体、4E10抗体、5F12抗体、VA01可抗体、BL2的抗体、VEGF相关蛋白、sFLT01、sFLT02、肽B3、TG100801、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、G6-31抗体、或其药学上可接受的盐。

[0238] 在一个实施例中,VEGF拮抗剂是抗体兰尼单抗或其药学上可接受的盐(关于重链和轻链可变区序列,参见通过全文引用的方式并入本文的美国专利第7,060,269号(图1))。兰尼单抗可以商标 **Lucentis®** (罗氏集团(Roche Group)成员美国基因泰克有限公司(Genentech USA, Inc.)) 商购获得。

[0239] 在另一个实施例中,VEGF拮抗剂是抗体贝伐单抗或其药学上可接受的盐(关于重链和轻链可变区序列,参见通过全文引用的方式并入本文中的美国专利第6,054,297号(图1))。贝伐单抗可以商标 **Avastin®** (罗氏集团成员美国基因泰克有限公司) 商购获得。

[0240] 在另一个实施例中,VEGF拮抗剂是阿柏西普或其药学上可接受的盐(Do等人(2009)《英国眼科学杂志(Br J Ophthalmol.)》93:144-9,其通过全文引用的方式并入本文中)。阿柏西普可以商标 **Eylea®** (再生元制药有限公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)) 商购获得。

[0241] 在另一个实施例中,VEGF拮抗剂是天然存在的蛋白质sFlt-1,如美国专利第5,861,484号所描述的并且所述序列由SEQ ID NO:109描述。VEGF拮抗剂还包含但不限于其功能片段,包含sFlt-1结构域2的序列或美国专利申请公开第2013/0323302号的SEQ ID NO:121中列出的那些序列、以及相关构建体,如美国专利第7,635,474号中公开的VEGF结合融合蛋白。抗VEGF蛋白也可以包含美国专利申请公开第2013/0323302号中描述的任何sFLT-1蛋白、其变体或片段。更具体地说,VEGF结合结构域(结构域2)或可替代地sFLT-1的结构域2

加上来自sFLT1、KDR或另一个家族成员的结构域3可以用于结合和灭活VEGF。这些功能片段描述于Wiesmann等人,1997;《细胞(Cell)》91:695-704中,其通过全文引用的方式并入本文中。术语“sFLT-1”和“sFLT-1的功能片段”是等效的并且在此可互换地使用。“sFlt-1蛋白”在本文中是指与天然存在的人sFLT-1序列至少90%或更高同源,使得sFlt-1蛋白或多肽与VEGF和/或VEGF受体结合的多肽序列或其功能片段。

[0242] 这些序列可以从使用遗传密码对这种序列进行编码的DNA表达,这是本领域技术人员所理解的标准技术。如本领域技术人员可以了解到的,由于遗传密码的简并性,抗VEGF蛋白序列可以从多个不同的DNA序列容易地表达。

[0243] VEGF拮抗剂进一步包含与本文所描述的任何VEGF拮抗剂同源的核酸或多肽以及任何VEGF拮抗剂或同系物的功能片段。同源是指包含但不限于功能片段的两个序列之间的比对的残基的保守性%,序列包括插入、缺失、取代、假片段、假基因、剪接变体或人工优化序列。在一些情况下,VEGF拮抗剂可以与天然存在的或亲本VEGF拮抗剂至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%同源。在一些情况下,VEGF拮抗剂可以与天然存在的或亲本序列至多约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%同源。

[0244] 在某些实施例中,包括赋予了病毒粒子或病毒载体改变的向性的变体衣壳蛋白的病毒粒子或病毒载体被用于治疗向性或病毒粒子或病毒载体增加的细胞的疾病或病症,例如视网膜神经节细胞(RGC)、Mueller细胞,或者将治疗性基因产物递送到Mueller细胞。在某些实施例中,病毒粒子或病毒载体被用于治疗选自以下组成的组的视网膜细胞的疾病或病症:感光细胞、视网膜神经节细胞、Muller细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞或视网膜色素上皮细胞。在一些情况下,视网膜细胞是感光细胞,例如视杆细胞或视锥细胞。

[0245] 在某些实施例中,本公开提供了将基因产物提供到受试者的肝脏的方法,所述方法包括例如通过静脉内注射向受试者肠胃外施用包括本文所描述的重组病毒粒子或载体的药物组合物,其中重组病毒包括本文所公开的变体衣壳和对基因产物进行编码的多核苷酸序列。

[0246] 在某些实施例中,本公开提供了治疗或预防有需要的受试者的肝脏疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者例如肠胃外或静脉内施用包括本文所描述的重组病毒粒子或载体的药物组合物,其中重组病毒包括本文所公开的变体衣壳和对治疗性基因产物进行编码的多核苷酸序列。

[0247] 在特定实施例中,受试者已经被诊断为患有或被怀疑有发生选自以下组成的组的一种或多种疾病或病症的风险:遗传性代谢缺陷、慢性病毒性肝炎、肝硬化、原发性和转移性肝癌、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏、血友病B、血友病A、遗传性血管水肿或 $\beta$ -地中海贫血。到肝脏的基因转移也可以用来将这个器官转换成治疗不影响肝脏本身的病状所需的分泌性蛋白的工厂。

[0248] 在一些方面,本公开提供用于在需要治疗的人类受试者中以每3个月、每6个月、每9个月、每12个月、每18个月、每24个月或每36个月至少一次的频率施用包括本文所描述的病毒载体或病毒粒子的药物组合物。在一些方面,本公开提供用于在需要治疗的人类受试者中以每3个月、每6个月、每9个月、每12个月、每18个月、每24个月或每36个月至多一次的频率施用包括本文所描述的病毒载体或病毒粒子的药物组合物。在一些方面,本公开提供



了在人类受试者中以少于3次、每年少于两次、每年少于一次、每两年少于一次或每三年少于一次的频率施用包括本文所描述的病毒载体或病毒粒子的药物组合物。

[0249] 本发明还提供了用于治疗或预防疾病或病症例如眼部疾病或病症或者肝脏疾病或病症的方法,所述方法包含结合一种或多种另外的治疗剂,向有需要的受试者施用如本文所描述的包括经过修饰的衣壳并且对治疗性基因产物进行编码的病毒载体或病毒粒子。

[0250] 在某些实施例中,本发明的病毒载体与另外的治疗剂同时地或在重叠的时间段期间施用,而在其它实施例中,先施用病毒载体或先递送另外的治疗剂,允许经过一定时间段,并且然后施用病毒载体或另外的药剂中的另一者。在特定实施例中,时间段为至少一天、至少一周、至少两周、至少一个月、至少两个月、至少四个月、至少六个月、至少一年、至少十八个月、至少两年或至少三年。

[0251] 在特定实施例中,另外的治疗剂是抗VEGF剂或抗PDGF剂,例如兰尼单抗、贝伐单抗、sFlt01或阿柏西普。在特定实施例中,另外的治疗剂是抗肿瘤剂或抗炎剂。

[0252] 在某些实施例中,另外的治疗剂是包括对另外的治疗剂进行编码的多核苷酸序列的病毒载体或病毒粒子,即另外的病毒载体或病毒粒子。在某些实施例中,另外的病毒载体或病毒粒子包括衣壳蛋白,例如VP1,所述衣壳蛋白与本发明的病毒载体或病毒中存在的经过修饰的衣壳蛋白例如VP1不同。这种方法可以用于降低在施用第一病毒载体或病毒粒子(无论所述第一病毒载体或病毒粒子是本发明的病毒载体或病毒粒子还是另外的病毒载体或病毒粒子)之后,当受试者已经对病毒颗粒或衣壳蛋白产生先天性或适应性免疫应答时出现不期望的免疫应答的可能性,使得第二次施用相同的病毒载体或衣壳蛋白会在受试者中产生不期望的免疫应答。在某些实施例中,受试者被施用本文所描述的AAVShH10/7m8病毒载体、结合不同的病毒载体,例如AAV 1型(AAV-1)、AAV 2型(AAV-2)、AAV 3型(AAV-3)、AAV 4型(AAV-4) AAV 5型(AAV-5)、AAV 6型(AAV-6)、AAV 7型(AAV-7)、AAV 8型(AAV-8)、AAV 9型(AAV-9)、AAV 10型(AAV-10)、AAV rh.10、禽类AAV、牛类AAV、犬类AAV、马类AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、牛乐类AAV、AAV.7m8、AAVShH10、AAV2.5T、AAV2.5T/7m8、AAV9/7m8或AAV5/7m8。在某些实施例中,受试者被施用本文所描述的AAVShH10/7m8病毒载体、结合AAV2载体或其变体,例如以用于治疗眼部疾病或病症。在某些实施例中,受试者被施用本文所描述的AAVShH10/7m8病毒载体、结合AAVrh10载体,例如以用于表达肝脏中的一种或多种治疗性蛋白。

[0253] 在某些实施例中,本发明包含治疗或预防有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括结合第二药物组合物向受试者施用第一药物组合物,所述第一药物组合物包括药学上可接受的赋形剂和第一重组病毒或病毒载体,所述第一病毒或载体包括:(a) 第一经过修饰的衣壳蛋白,其中所述第一经过修饰的衣壳蛋白是经过修饰的AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白,所述经过修饰的AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白包括相对于对应的亲本AAVShH10、AAV1或AAV6衣壳蛋白的肽插入,其中所述肽插入包括氨基酸序列LGETTRP (SEQ ID NO:6),并且其中插入位点位于AAVShH10衣壳蛋白VP1的氨基酸残基456与457之间、氨基酸残基457与458或氨基酸残基458与459之间或者AAV1或AAV6衣壳蛋白的对应残基之间;以及(b) 对第一治疗性基因产物进行编码的第一多核苷酸序列;所述第二药物组合物包括药学上可接受的赋形剂和第二重组病毒或病毒载体,所述第二病毒或载体包括:(a) 第二经过修饰的衣壳蛋白,其中所述经过修饰的衣壳蛋白不是经过修饰的AAVShH10、AAV1或AAV6衣



壳蛋白;以及(b)对第二治疗性基因产物进行编码的第二多核苷酸序列。在某些实施例中,第二经过修饰的衣壳蛋白是AAV2衣壳蛋白或经过修饰的AAV2衣壳蛋白,任选地,AAV2.7m8衣壳蛋白。第一治疗性基因产物和第二治疗性基因产物相同或不同。在某些实施例中,疾病或病症是眼部疾病或病症,并且第一药物组合物和第二药物组合物是例如玻璃体内施用于眼睛的。在特定实施例中,第一治疗性基因和第二治疗性基因产物中的一者或两者是抗血管内皮生长因子(anti-VEGF)剂。在特定实施例中,疾病或病症选自自由以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、视网膜新生血管、脉络膜新生血管、糖尿病性视网膜病变、增生性糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变和糖尿病性视网膜水肿。

[0254] 在一些实施例中,疾病或病症是肝脏疾病或病症,并且第一药物组合物和第二药物组合物是肠胃外,任选地,静脉内施用的。在各个实施例中,第一药物组合物和第二药物组合物按任一顺序依次施用,其中依次施用之间经过一定时间段。例如,时间段可以为至少一个月、至少3个月、至少6个月、至少一年、至少18个月、至少两年或至少三年。在特定实施例中,第一治疗性基因产物和第二治疗性基因产物中的一者或两者是 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、因子IX、因子VIII、C1-酯酶抑制剂、 $\beta$ -珠蛋白或 $\gamma$ -珠蛋白。在某些实施例中,疾病或病症选自自由以下组成的组: $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏、血友病B、血友病a、遗传性血管水肿或 $\beta$ -地中海贫血。

[0255] 在一些实施例中,主题方法产生了治疗益处,例如预防了疾病的发生、使疾病的进展停止、逆转了疾病的进展等。在一些实施例中,主题方法包括检测到治疗益处已经实现的步骤。本领域内普通技术人员应了解,治疗功效的这种量度将适用于正被修饰的特定疾病,并且应认识到用于测量治疗功效的适当检测方法。

[0256] 在一些情况下,例如如通过测量基因产物的水平、通过测量治疗功效等检测到的转基因的表达可以在施用后两个月或更短观察到,例如在施用后4周、3周或2周或更短,例如在施用主题组合物后1周。也期望转基因的表达随着时间的推移而持续。因此,在一些情况下,例如如通过测量基因产物的水平、通过测量治疗功效等检测到的转基因的表达可以在施用主题组合物后2个月或更长观察到,例如4个月、6个月、8个月或10个月或更长,在一些情况下1年或更长,例如2年、3年、4年或5年,在某些情况下超过5年。

[0257] 在特定实施例中,受试者的一只眼睛或两只眼睛各自被施用约 $1 \times 10^8$ 个载体基因组或更多,在一些情况下 $1 \times 10^9$ 个、 $1 \times 10^{10}$ 个、 $1 \times 10^{11}$ 个、 $1 \times 10^{12}$ 个或 $1 \times 10^{13}$ 个载体基因组或更多,在某些情况下 $1 \times 10^{14}$ 个载体基因组或更多。在一些情况下,递送的载体基因组的量至多为约 $1 \times 10^{15}$ 个载体基因组,例如 $1 \times 10^{14}$ 个载体基因组或更少,例如 $1 \times 10^{13}$ 个、 $1 \times 10^{12}$ 个、 $1 \times 10^{11}$ 个、 $1 \times 10^{10}$ 个或 $1 \times 10^9$ 个载体基因组或更少,在某些情况下 $1 \times 10^8$ 个载体基因组,并且有时不少于 $1 \times 10^8$ 个载体基因组。在一些情况下,递送的载体基因组的量为 $1 \times 10^{10}$ 个到 $1 \times 10^{11}$ 个载体基因组。在一些情况下,递送的载体基因组的量为 $1 \times 10^{10}$ 个到 $3 \times 10^{12}$ 个载体基因组。在一些情况下,递送的载体基因组的量为 $1 \times 10^9$ 个到 $3 \times 10^{13}$ 个载体基因组。在一些情况下,递送的载体基因组的量为 $1 \times 10^8$ 个到 $3 \times 10^{14}$ 个载体基因组。

[0258] 在一些情况下,可以使用感染复数(MOI)测量要施用的药物组合物的量。在一些情况下,MOI可以是指载体或病毒基因组与核酸可以递送到的细胞的比率或倍数。在一些情况下,MOI可以为 $1 \times 10^6$ 。在一些情况下,MOI可以为 $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^7$ 。在一些情况下,MOI可以为1

$\times 10^4$ 到 $1 \times 10^8$ 。在一些情况下,本公开的重组病毒的MOI至少为约 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 和 $1 \times 10^{18}$ 。在一些情况下,本公开的重组病毒的MOI为 $1 \times 10^8$ 到 $3 \times 10^{14}$ 。在一些情况下,本公开的重组病毒的MOI至多为约 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 和 $1 \times 10^{18}$ 。

[0259] 在一些方面,药物组合物的量包括约 $1 \times 10^8$ 个到约 $1 \times 10^{15}$ 个重组病毒粒子或病毒、约 $1 \times 10^9$ 个到约 $1 \times 10^{14}$ 个重组病毒粒子或病毒、约 $1 \times 10^{10}$ 个到约 $1 \times 10^{13}$ 个重组病毒粒子或病毒、或者约 $1 \times 10^{11}$ 个到约 $3 \times 10^{12}$ 个重组病毒粒子或病毒。

[0260] 在一些方面,在施用所述药物组合物后7天、14天、21天或30天并未在人类受试者的泪液、血液、唾液或尿液样本中检测到病毒粒子或载体。在一些方面,病毒载体的存在是通过如本领域内已知的qPCR或ELBA检测到的。

[0261] 在一些方面,在本文所描述的治疗方法之后,受试者的最佳矫正视力(BCVA)提高了1行、2行、3行、4行、5行或更多行,以下描述的治疗方法。

[0262] 在一些方面,如通过荧光素血管造影术(FA)评估的新生血管的减少遵循施用步骤。

[0263] 在一些情况下,可以测量视网膜厚度以检查治疗的效果。在一些情况下,在用本公开的药物组合物治疗之后,人类受试者的视网膜中央厚度在12个月内并未增加多于50微米、100微米或250微米。在一些情况下,在用本公开的药物组合物治疗之后,人类受试者的视网膜中央厚度在3个月、6个月、9个月或12个月内至少减少50微米、100微米、200微米、250微米、300微米、400微米、500微米、600微米。将时间点处的中央视网膜厚度与在施用本公开的药物组合物的1天、3天、7天或10天时或内取得的基线测量相比较,可以测量人类受试者的视网膜中央厚度的减少。

[0264] 本说明书中提及的和/或在申请数据表中列出的所有上述美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过全文引用的方式并入本文中。

[0265] 根据上文,应了解,尽管出于在本发明中出于说明的目的已经描述了具体实施例,但是可以在不背离本发明的精神或范围的情况下作出各种修改。因此,本发明仅由所附权利要求书限制。

[0266] 实例

[0267] 提出以下实例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何进行并使用本发明的完整公开和说明、并且既不旨在限制发明人认为是其发明的范围,也不旨在表示下文中的实验就是所执行的全部或仅有的实验。已经进行了努力以确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但应当考虑到一些实验误差和偏差。除非另有指示,否则份数是重量份数、分子量是重均分子量、温度是以摄氏度为单位并且压力是处于或接近于大气压。

[0268] 分子和细胞生物化学的通用方法可以在如以下等标准教科书中找到:《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)第3版》(Sambrook等人,港口实验室出版社(HaRBor Laboratory Press)2001);《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)第4版》(Ausubel等人编,约翰威利父子公司(John

Wiley&Sons) 1999);《蛋白质方法 (Protein Methods)》(Bollar等人, 约翰威利父子公司 1996);《基因治疗非病毒载体 (Nonviral Vectors for Gene Therapy)》(Wagner等人编, 学术出版社1999);《病毒载体 (Viral Vectors)》(Kaplift&Loewy编, 学术出版社1995);《免疫学方法手册 (Immunology Methods Manual)》(I.Lefkovits编, 学术出版社1997);以及《细胞和组织培养: 生物技术实验室步骤 (Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology)》(Doyle&Griffiths, 约翰威利父子公司1998), 所述标准教科书的公开内容通过引用的方式并入本文中。本公开中提及的用于基因操纵的试剂、克隆载体和试剂盒可从如BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich和ClonTech等商业供应商获得。

#### [0269] 实例1

##### [0270] ShH10突变体的构建

[0271] 使用定点诱变和重组DNA技术来生成ShH10的变体, 所述变体包含由ShH10 VP1衣壳蛋白中的LALGETTRPA (SEQ ID NO:14) 组成的在氨基酸残基456与457之间 (“ShH10/7m8 (457)”)、氨基酸残基457与458之间 (“ShH10/7m8 (458)”) 之间或氨基酸残基458与459之间 (“ShH10/7m8 (459)”) 的7m8插入。

[0272] ShH10变体是用以下通过细胞的三次转染生成的: 包括ITR侧接转基因的表达盒 (例如, GFP或荧光素酶) 的第一质粒; 对Rep/Cap基因进行编码的第二质粒; 以及含有腺病毒辅助功能的第三质粒, 随后进行超速离心以分离出空的和完整的衣壳。

[0273] 用定量PCR对ShH10变体病毒进行表征以建立滴度和包装, 并且进行蛋白印记分析, 以确保VP1、VP2和VP3衣壳蛋白的正确比率。包装所有ShH10/7m8变体, 从而产生高滴度 ( $\sim 1E14$  vg/ml), 并且蛋白印记示出了VP1、VP2和VP3的正确比率。

#### [0274] 实例2

##### [0275] HEK293细胞、U87细胞和HepG2细胞的转导

[0276] 在MOI为 $3 \times 10^5$ 的情况下, 对HEK293细胞、U87细胞和HepG2细胞执行体外转导五天。在研究结束时, 捕获图像并且执行流式细胞术, 以评估转导细胞的百分比和中位荧光强度。

[0277] ShH10/7m8变体以与亲本ShH10类似的水平转导HEK293细胞、HepG2细胞和U87细胞。这些研究的结果示出在图1-3 (HEK293细胞)、图4-5 (U87细胞) 和图6-7 (HepG2细胞) 中。

#### [0278] 实例3

##### [0279] AAVShH10/7m8的类肝素结合亲和力

[0280] 通过使用预先包装的GE类肝素柱进行类肝素结合测定来确定AAVShH10/7m8变体ShH10/7m8 (457)、ShH10/7m8 (458) 和ShH10/7m8 (459) 结合HSPG的能力。将载体装载在柱上, 然后洗涤并且最后用增加浓度的NaCl (100mM到1M) 洗脱。如图8A所概述的, 收集级分加载物 (Load)、穿透流 (Flow-through)、洗涤物 (Wash) 和洗脱物 (Elution) 并且使用B1抗体通过斑点印迹进行分析。

[0281] AAVShH10/7m8变体在与类肝素柱的结合亲和力方面表现出与AAV.7m8 (7m8) 和亲本ShH10类似的水平。图8B-8F示出了如通过斑点印迹确定的对照AAV.7m8和ShH10 (图8B和图8c) 以及ShH10/7m8 (457) (图8D)、ShH10/7m8 (458) (图8E) 和ShH10/7m8 (459) (图8F) 的结合洗脱曲线。

#### [0282] 实例4

[0283] 使用IVIG的中和抗体曲线

[0284] 将3倍稀释系列的静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 与每个ShH10/7m8变体混合并且然后加入到293T细胞。将这些细胞培育3天,随后使用读板仪测量转基因表达 (GFP)。在当在IVIG存在的情况下观察到50%的转基因表达抑制时的水平下生成IC<sub>50</sub>值。

[0285] 图9示出了ShH10/7m8 (458) 的IC<sub>50</sub>值为~58,其优于用AAV.7m8观察到的值(~125)(数据未示出)。

[0286] 实例5

[0287] 猪视网膜外植体的表达和向性

[0288] 在 $4 \times 10^4$ 的MOI下用亲本ShH10病毒或变体病毒ShH10/7m8 (457) 转导维持在转导孔(trans-well)上的体外猪视网膜外植体,所述病毒各自表达GFP。在转导后两周,将外植体冷冻切片并进行探测以检测视紫红质(用于检测视杆细胞)、GFAP(用于检测Muller细胞)、TuJ1(用于检测视网膜神经节细胞)、CHX10(用于检测双极细胞)和GFP。捕获ShH10/7m8 (457) (图10A-10L) 和ShH10 (图10M-10P) 的免疫荧光图像。

[0289] ShH10/7m8 (457) 对外植体的转导优于亲本ShH10。通过这一变体转导各个细胞层。具体地,在Muller神经胶质细胞和感光细胞中观察到通过Shh10/7m8 (457) 的转导介导的高水平GFP表达。在视网膜神经节细胞和双极细胞中也观察到表达。

[0290] 实例6

[0291] 沙鼠视网膜的体内表达

[0292] 以 $2 \times 10^{10}$ vg/眼向沙鼠玻璃体内 (IVT) 注射表达GFP的ShH10或ShH10/7m8 (457)。在各个时间点捕获眼底图像,包含第12周。第12周的数据示出了来自亲本ShH10 (图11A) 以及ShH10/7m8 (457) (图11B) 的高水平转基因表达。在处死后,分离出沙鼠视网膜并且用于进行免疫荧光标记,以确定被转导的细胞。免疫荧光图像示出了表达GFP的各种视网膜细胞类型,包含感光器、内外核层和RGC (图11C-11E)。

[0293] 实例7

[0294] 非洲绿猴视网膜的体内表达

[0295] 非洲绿猴接受 $2 \times 10^{12}$ vg/眼的表达GFP的ShH10/7m8 (457) 或ShH10的玻璃体内注射。在转导后4周、8周和12周,使用海德堡光谱机器捕获OCT图像。ShH10和ShH10/7m8 (457) 的第12周图像分别呈现在图12A-12B和图12C-12D中。基于对图像的视觉评估,ShH10/7m8 (457) 看起来介导了更高水平的转导,从而产生了更多的转基因表达。

[0296] 12周后,将猴处死,并且取出视网膜。图13提供了用ShH10/7m8 (457) 转导的猴的平整固定的视网膜的实时荧光图像。GFP在非人灵长类动物视网膜的中心凹和外围均有明显的表达。在实时成像之后,对视网膜进行冷冻切片,并且探测来自中央凹和外围的切片的DAPI(用于检测细胞核) (图14B、15B)、钙结合蛋白(用于检测双极细胞) (图14C)、s-视蛋白(用于检测s-视锥细胞) (图14D)、PNA(用于检测视锥细胞) (图15C)、波形蛋白(用于检测Muller细胞) (图15D) 和绿GFP (图14E、15E)。将GFP表达主要与钙结合蛋白且在更小的程度上与中心凹处的S视蛋白共定位,从而指示所述区域中的双极细胞和s-视锥细胞以及Muller神经胶质细胞的转导,并且主要与波形蛋白且在更小的程度上与外围处的PNA共定位,从而指示Muller细胞和视锥细胞的转导。

[0297] 实例8

[0298] 全身递送后小鼠的体内表达

[0299] 用剂量为 $1 \times 10^{11}$ vg的以下病毒中的一种病毒对雄性无毛SKH-1小鼠进行静脉内注射: AAV.7m8、AAV2.5T、ShH10、2.5T/7m8(-3)、ShH10/7m8(458)、AAV9/7m8、AAV5/7m8、AAVrh10或AAV3。每个载体表达由普遍存在的CAG启动子驱动的荧光素酶。在第2周、第4周和第6周,使用IVIS光谱执行体内实时成像,以评估荧光素酶表达动力学。用ShH10和ShH10/7m8(458)处理的小鼠的IVIS图像分别描绘于图16A-17C和17A-17C中,并且分别以图16D和17D中的图呈现。每种病毒基于转导后六周时IVIS成像的总荧光素酶表达描绘于图19中。在第6周时将动物处死,并且使用超清洁程序采集血液、肝脏、心脏、脑、肺、脾、胰腺、肾脏、四头肌和性腺。使用逆转录酶定量PCR(RT-qPCR)对如肝脏、脑、心脏等组织进行分析以确定荧光素酶mRNA的水平,并且最后对蛋白质提取物中的荧光素酶活性水平进行评估。

[0300] 不同时间点的IVIS数据显示,ShH10/7m8(458)介导的荧光素酶表达水平比ShH10亲本衣壳高4倍(图18A-18C)。例如,ShH10在第6周时的平均表达为 $5.5 \times 10^6$ RLU,而ShH10/7m8(458)为 $1.9 \times 10^7$ RLU。

[0301] 与ShH10相比,ShH10/7m8(458)介导的载体的荧光素酶转基因的mRNA水平以及在肝脏中的荧光素酶蛋白表达高~4倍(图20A-20C)。

[0302] 在分析的任何其它组织中观察到,与ShH10介导的荧光素酶表达相比,ShH10/7m8(458)介导的转基因表达极低到无表达(图21A-21B和图22A-22B)。这意外地表明,ShH10/7m8(458)比亲本ShH10更具有组织特异性,尤其是对肝脏而言。

## 序列表

<110> Adverum生物技术有限公司(Adverum Biotechnologies, Inc.)

阿娜希塔·克拉瓦拉(Keravala, Annahita)

<120> 经过修饰的AAV衣壳和其用途

<130> AVBI-012/01W0 307702-2090

<150> US 62/464,878

<151> 2017-02-28

<160> 32

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 7m8插入序列基序

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (2)

<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3) .. (6)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10) .. (11)

<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Pro Xaa Xaa

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 7m8插入序列基序

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (2)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (6)  
<223> Xaa是任何氨基酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (11)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<400> 2  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Pro Xaa Xaa  
1 5 10  
<210> 3  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 7m8插入序列基序  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (2)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是Leu、Asn或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Gly、Glu或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Glu或Thr  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Thr或Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (11)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<400> 3  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Pro Xaa Xaa  
1 5 10  
<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 7m8插入序列基序  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (2)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是Lys或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Ala或Asp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Gly或Pro  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Gln或Lys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Thr或Ala  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE



<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Asn或Thr  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa是Asn或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10) .. (11)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<400> 4  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10  
<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 7m8插入序列基序  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (2)  
<223> Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Leu、Asn、Arg、Ala、Ser和Lys;或不存在  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Gly、Glu、Ala、Val、Thr和Asp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是带负电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Glu、Thr、Gly、Asp或Pro  
<220>

&lt;221&gt; MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (6) \dots (6)$ 

<223> Xaa选自Thr、Ile、Gly、Lys、Asp和Gln

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (7) \dots (7)$ 

<223> Xaa是极性氨基酸、醇(具有自由羟基的氨基酸)或疏水氨基酸;  
或选自Thr、Ser、Val和Ala

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (8) \dots (8)$ 

<223> Xaa是带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Arg、Val、Lys、Pro、Thr和Asn

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (9) \dots (9)$ 

<223> Xaa是带正电的氨基酸或不带电的氨基酸;或选自Pro、Gly、Phe、Asn和Arg;或不存在

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (10) \dots (11)$ 

〈223〉 Xaa是Ala、Leu、Gly、Ser、Thr或不存在

 $\langle 400 \rangle$  5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1                      5                      10

 $\langle 210 \rangle$  6

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

### 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$ 

### 〈223〉 合成的7m8插入肽

 $\langle 400 \rangle$  6

Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro

1 5

7

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

### 〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 7

Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 8

Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 9

Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 10

Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 11

Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly

1 5  
<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 12  
Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe  
1 5  
<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 13  
Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn  
1 5  
<210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 14  
Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala  
1 5 10  
<210> 15  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 15  
Leu Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala  
1 5 10  
<210> 16  
<211> 10

<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 16  
Leu Ala Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala  
1 5 10  
<210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 17  
Leu Ala Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala  
1 5 10  
<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 18  
Leu Ala Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg Ala  
1 5 10  
<210> 19  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的7m8插入肽  
<400> 19  
Leu Ala Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly Ala  
1 5 10  
<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 20

Leu Ala Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 21

Leu Ala Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn Ala

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 22

Ala Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 23

Ala Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 24

Ala Ala Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala

1	5	10
<210> 25		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成的7m8插入肽		
<400> 25		
Ala Ala Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala		
1	5	10
<210> 26		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成的7m8插入肽		
<400> 26		
Gly Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala		
1	5	
<210> 27		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成的7m8插入肽		
<400> 27		
Gly Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala		
1	5	
<210> 28		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成的7m8插入肽		
<400> 28		
Gly Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala		
1	5	
<210> 29		
<211> 9		

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的7m8插入肽

<400> 29

Gly Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala

1 5

<210> 30

<211> 27

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 在实验室中制成—合成的适配体序列

<400> 30

cgcaaucagu gaaugcuuau acauccg 27

<210> 31

<211> 736

<212> PRT

<213> 腺相关病毒1

<400> 31

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly 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 Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln 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 Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly



145	150	155	160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
	165	170	175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro			
	180	185	190
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
	195	200	205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala			
	210	215	220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
	245	250	255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His			
	260	265	270
Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe			
	275	280	285
His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn			
	290	295	300
Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln			
305	310	315	320
Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn			
	325	330	335
Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro			
	340	345	350
Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala			
	355	360	365
Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly			
	370	375	380
Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro			
385	390	395	400
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe			
	405	410	415
Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp			
	420	425	430
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg			
	435	440	445
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser			
450	455	460	

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

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 736

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 腺相关病毒6

&lt;400&gt; 32

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

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

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



图1A

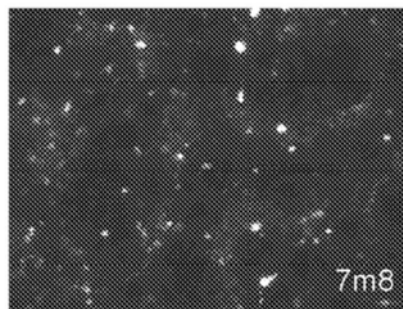


图1B

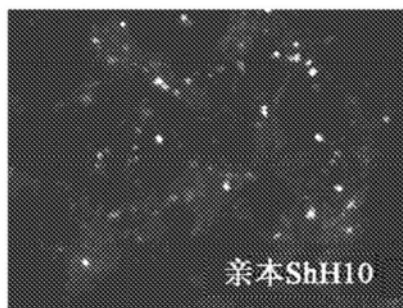


图1C

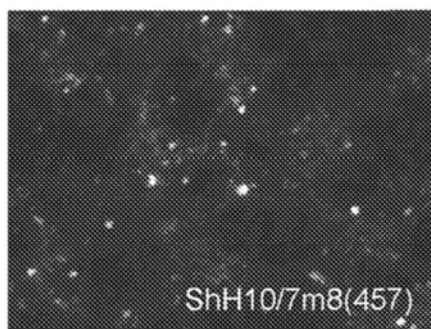


图1D

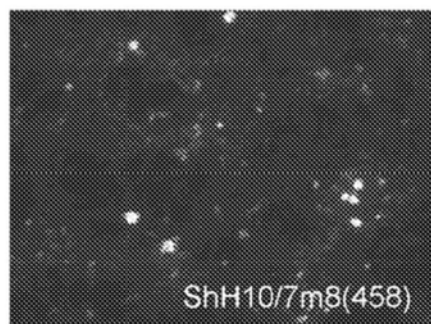


图1E

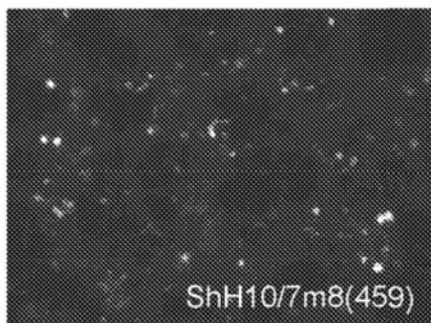


图1F

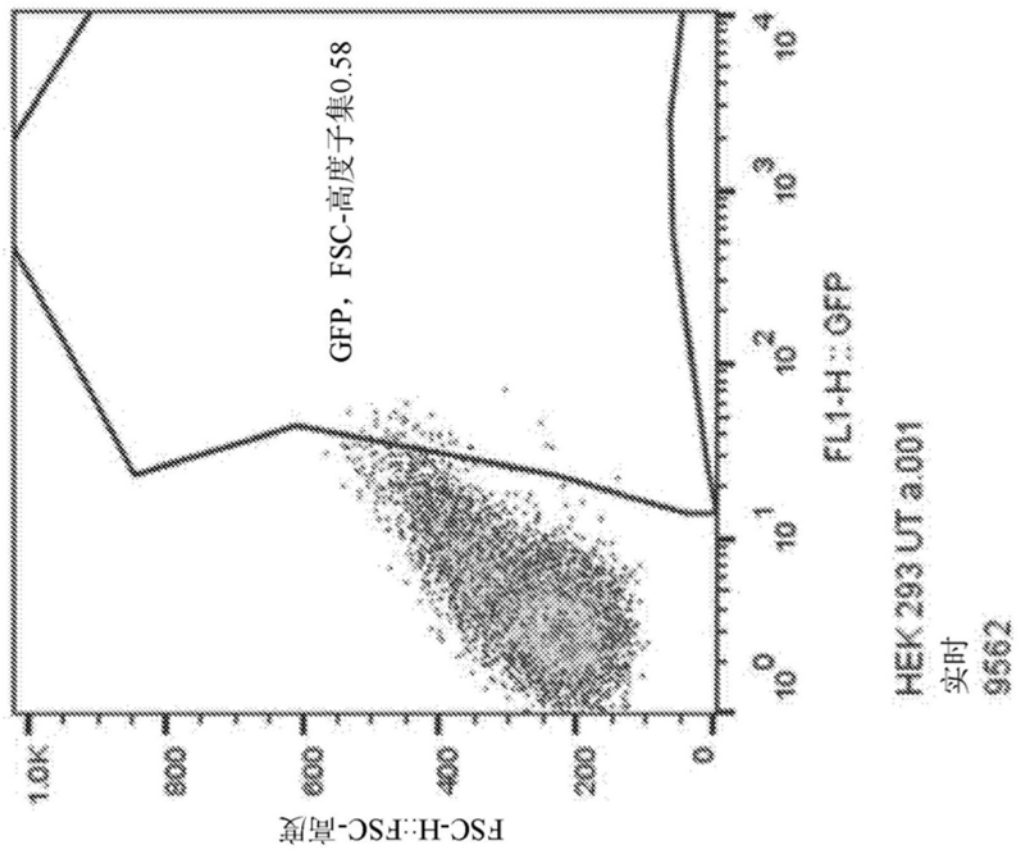


图2A



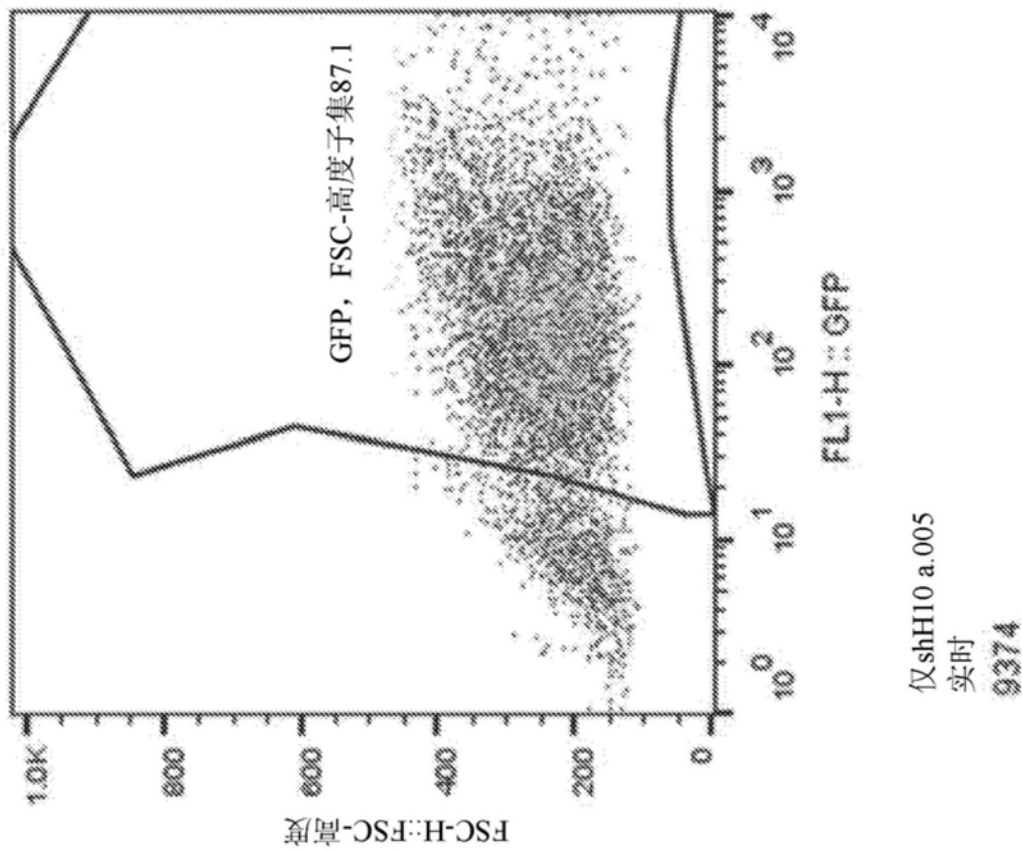


图2B

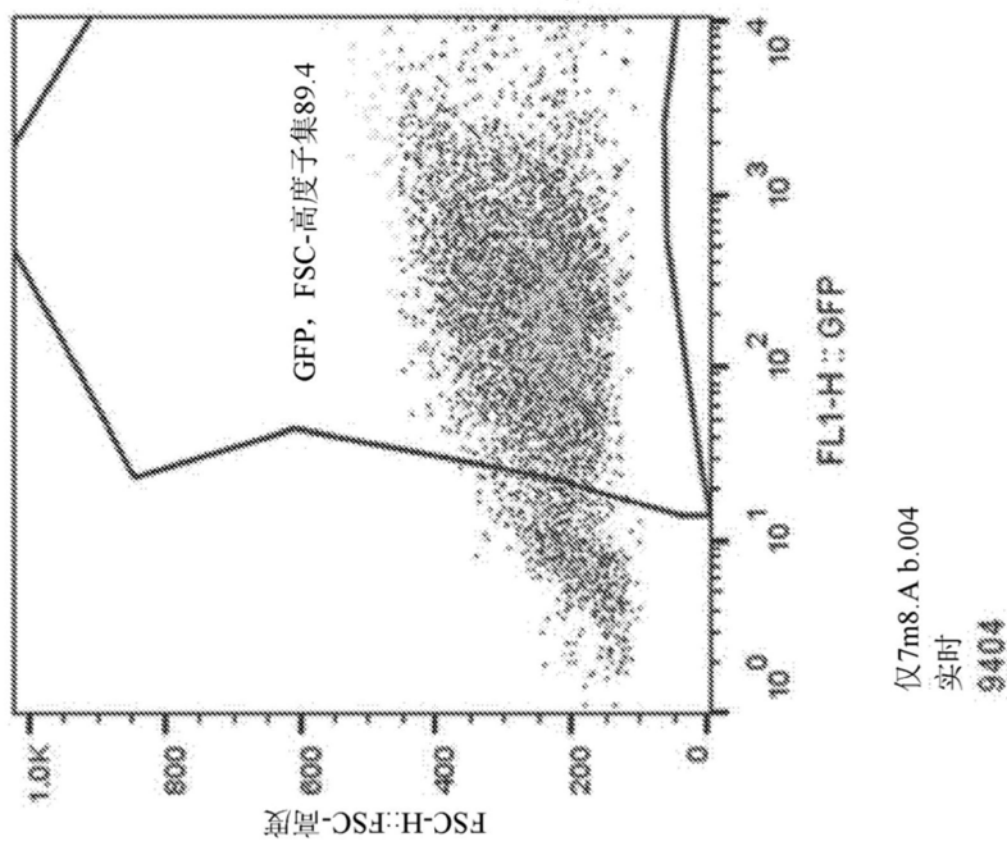


图2C

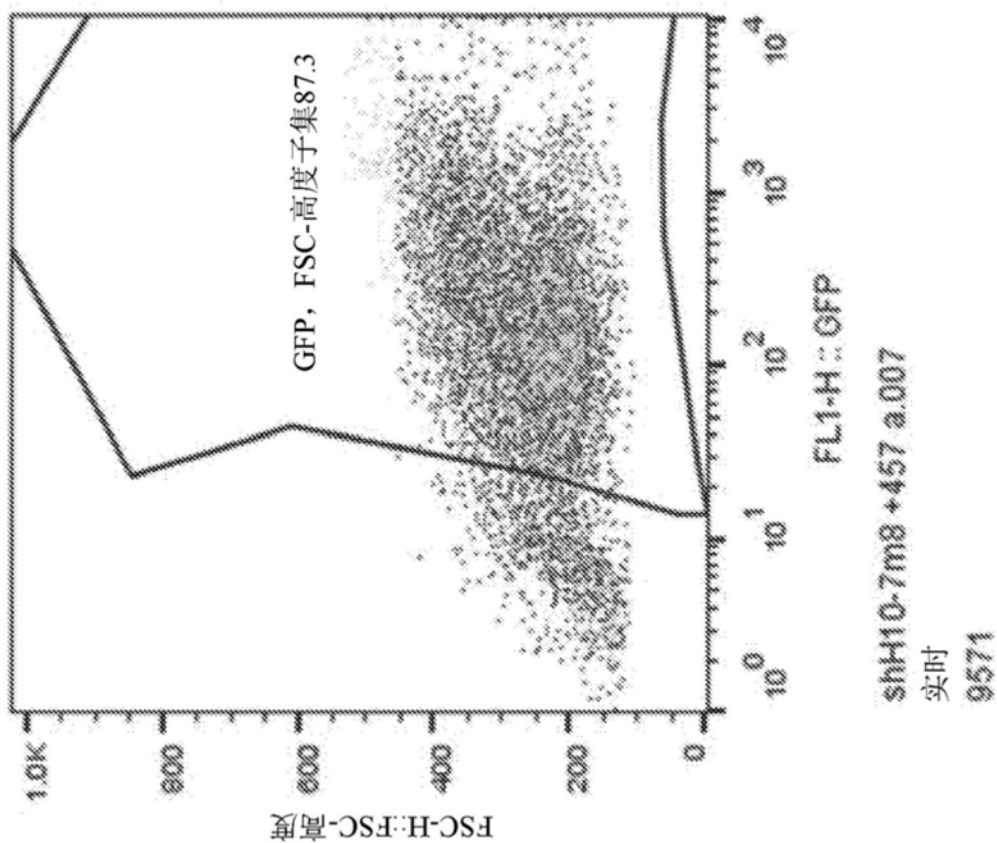


图2D

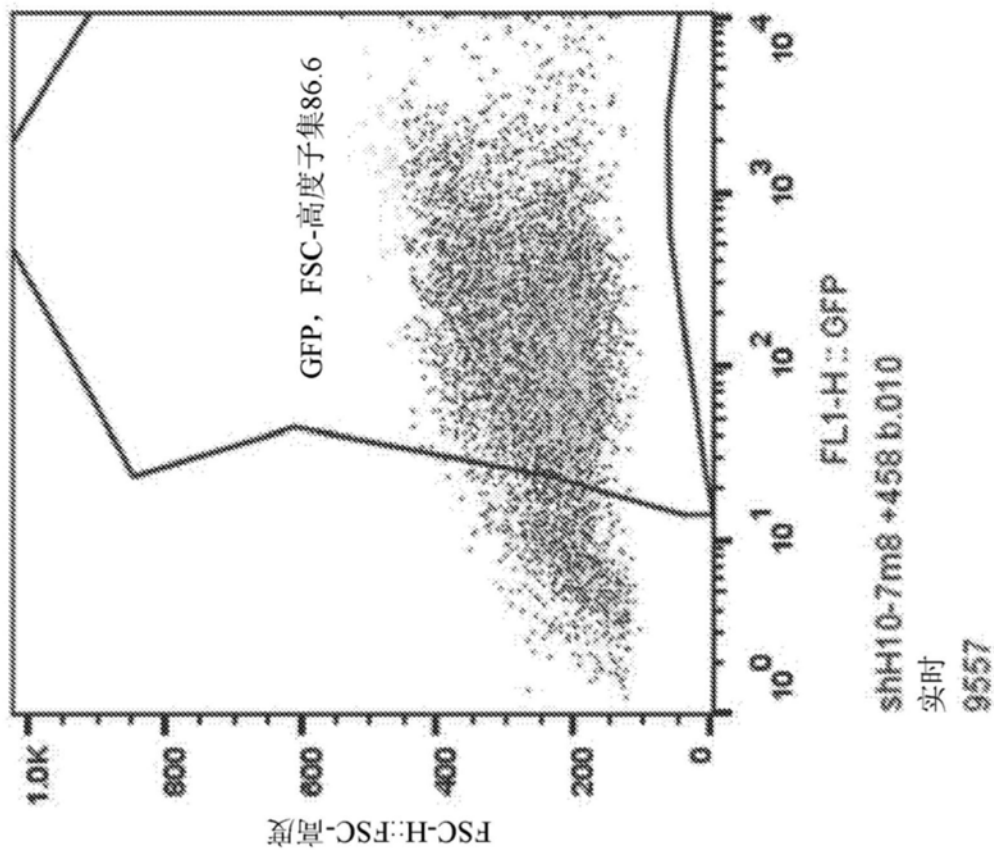


图2E

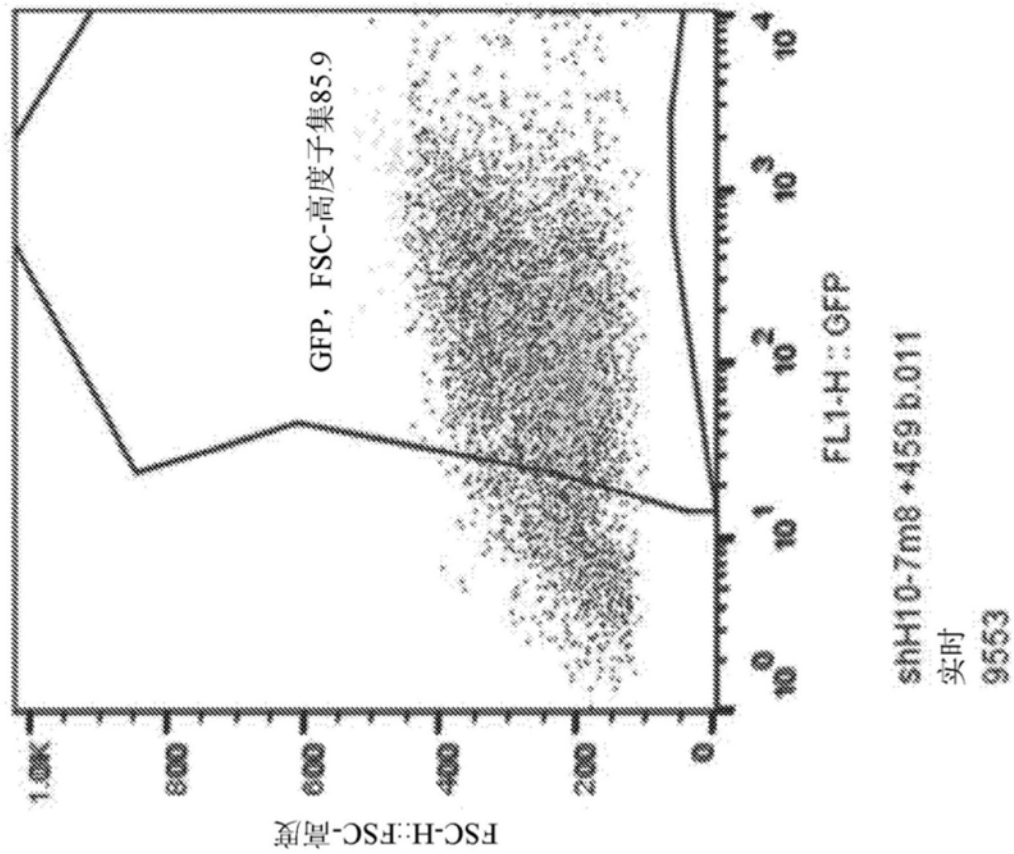


图2F

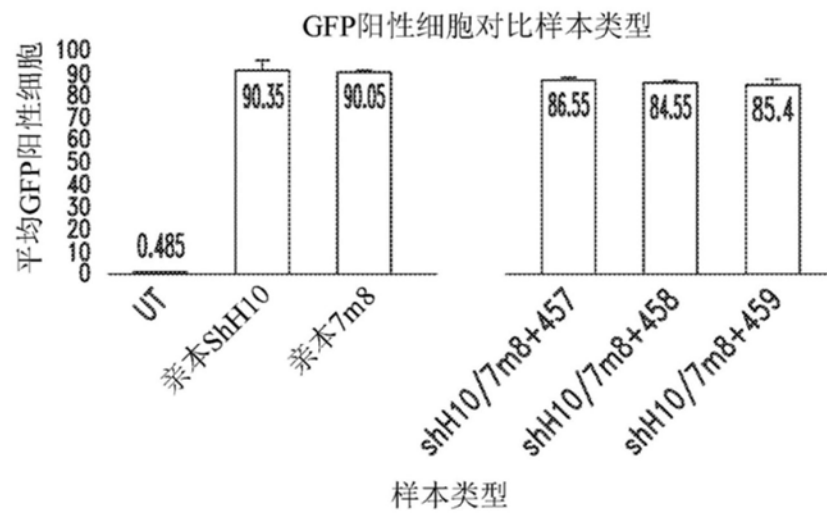


图3A

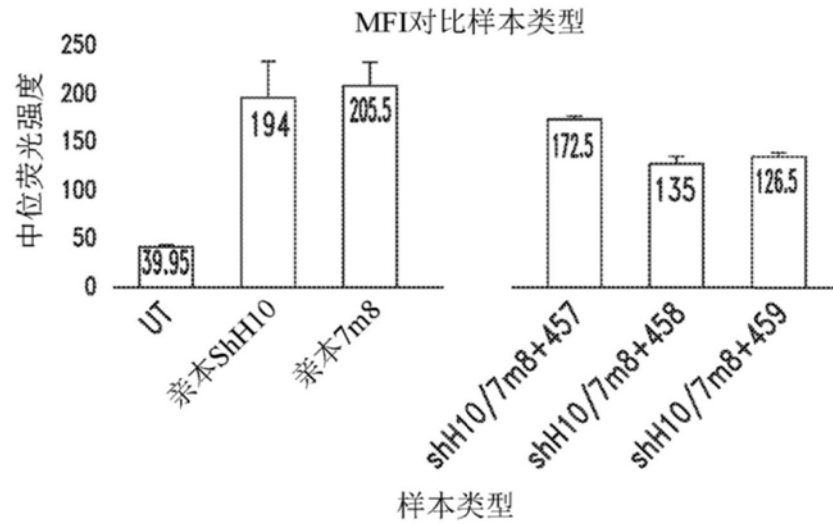


图3B

样本类型	GFP阳性	MFI
HEK293 UT	0.48	39.95
亲本ShH10	90.35	194
亲本7m8	90.05	205.5
ShH10-/7m8(457)	86.55	172.5
ShH10-/7m8(458)	84.55	135
ShH10-/7m8(459)	85.4	126.5

图3C

亲本ShH10

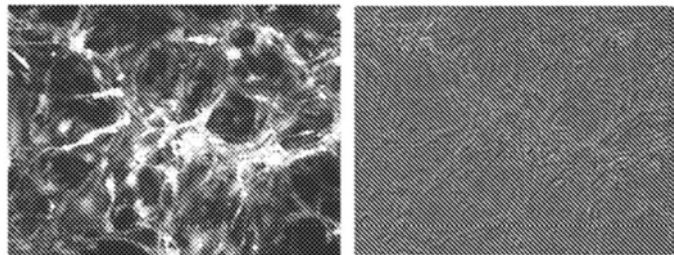


图4A

ShH10/7m8(457)

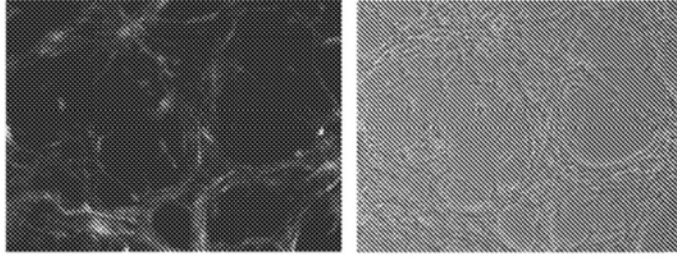


图4B

ShH10/7m8(458)

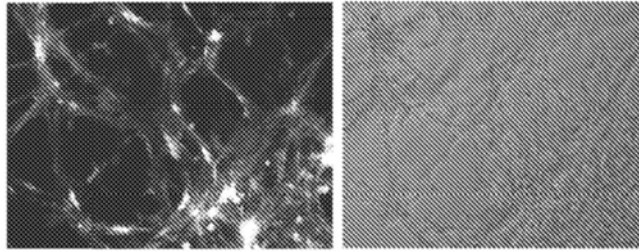


图4C

ShH10/7m8(459)

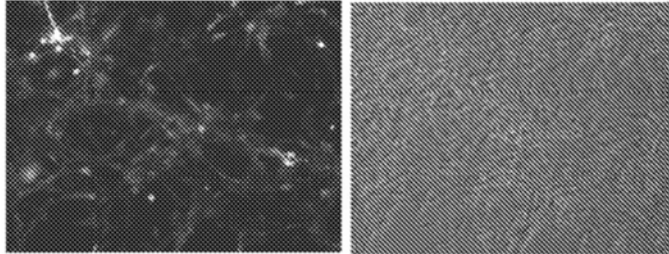


图4D

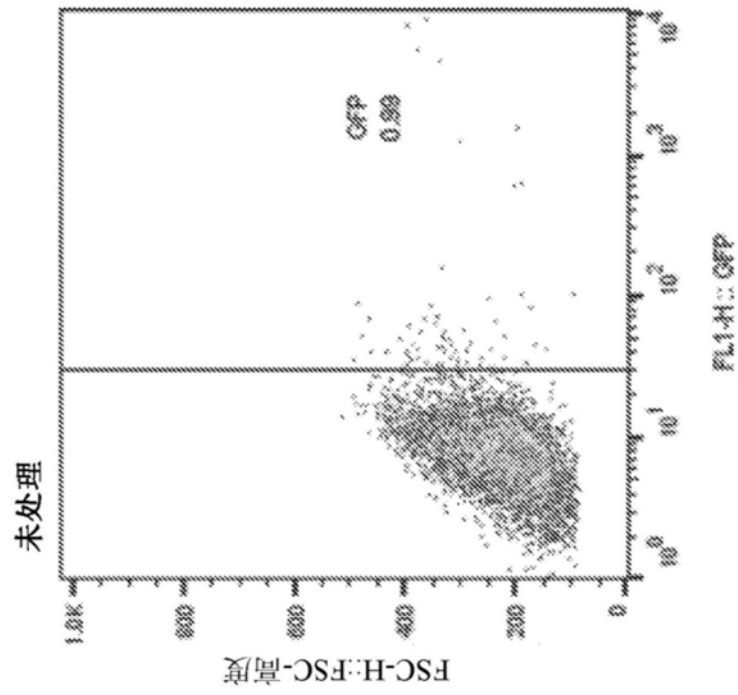


图5A



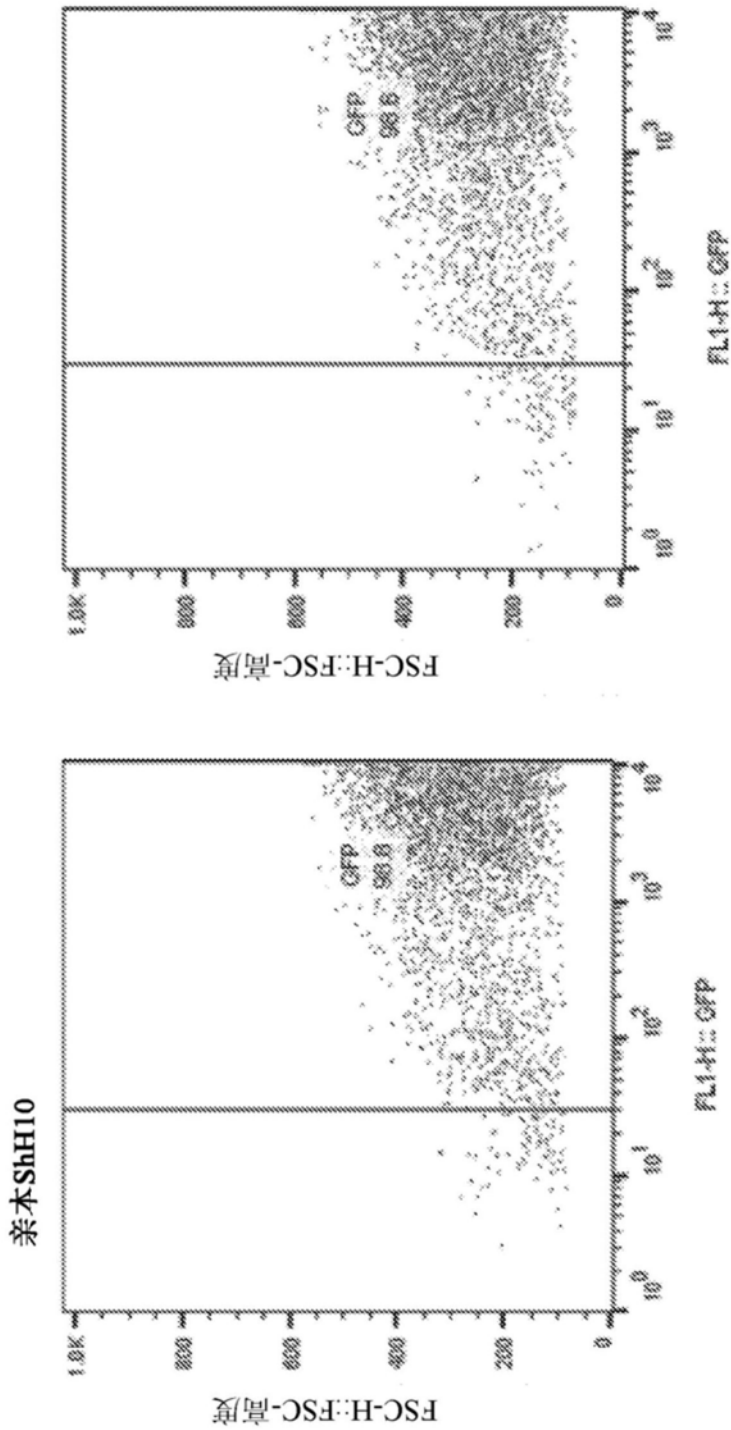


图5B

ShH10/7m8(457)

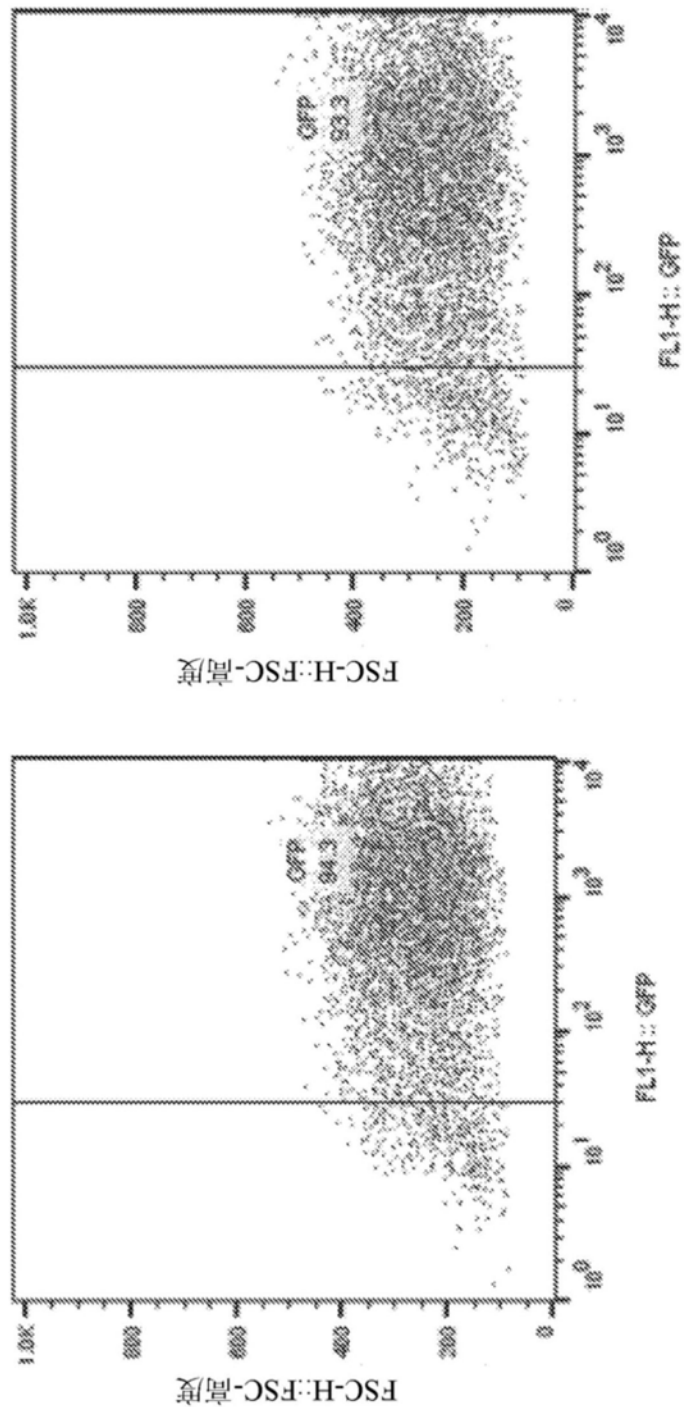


图5C

ShH10/7m8(458)

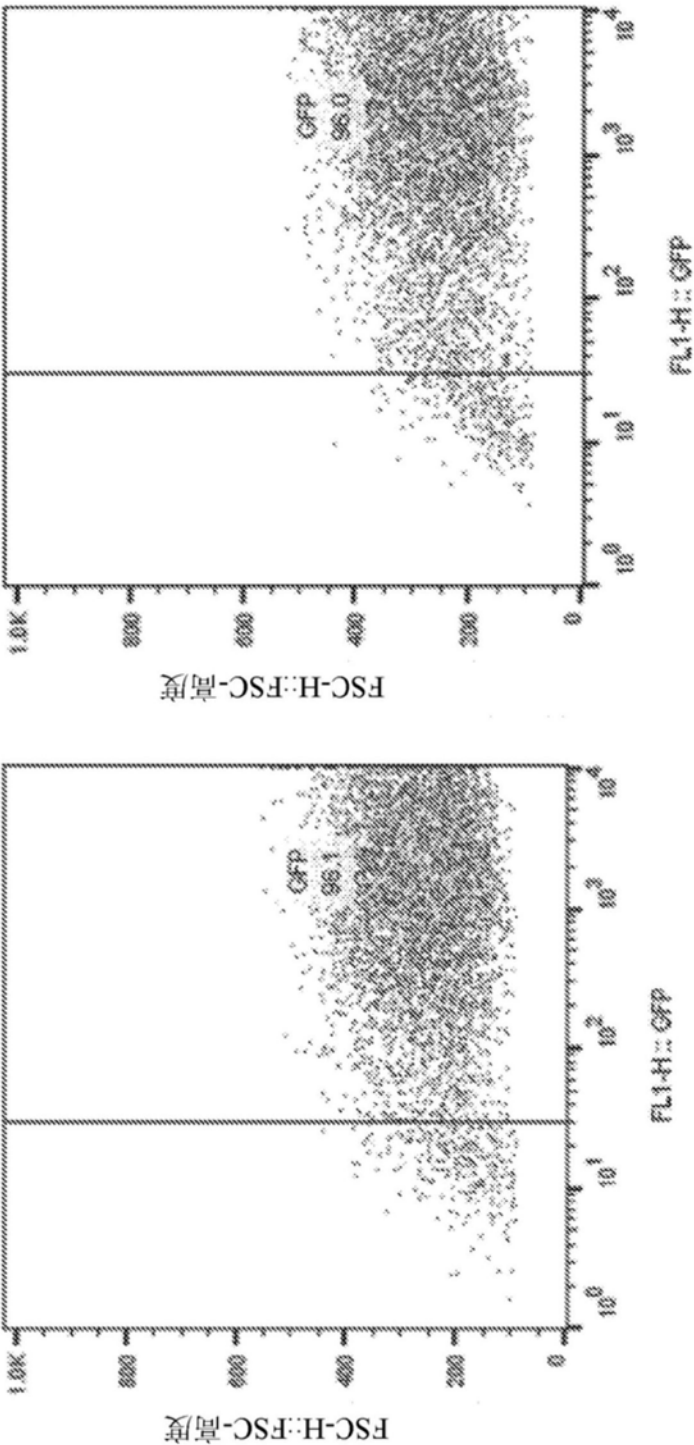


图5D

ShH10/7m8(459)

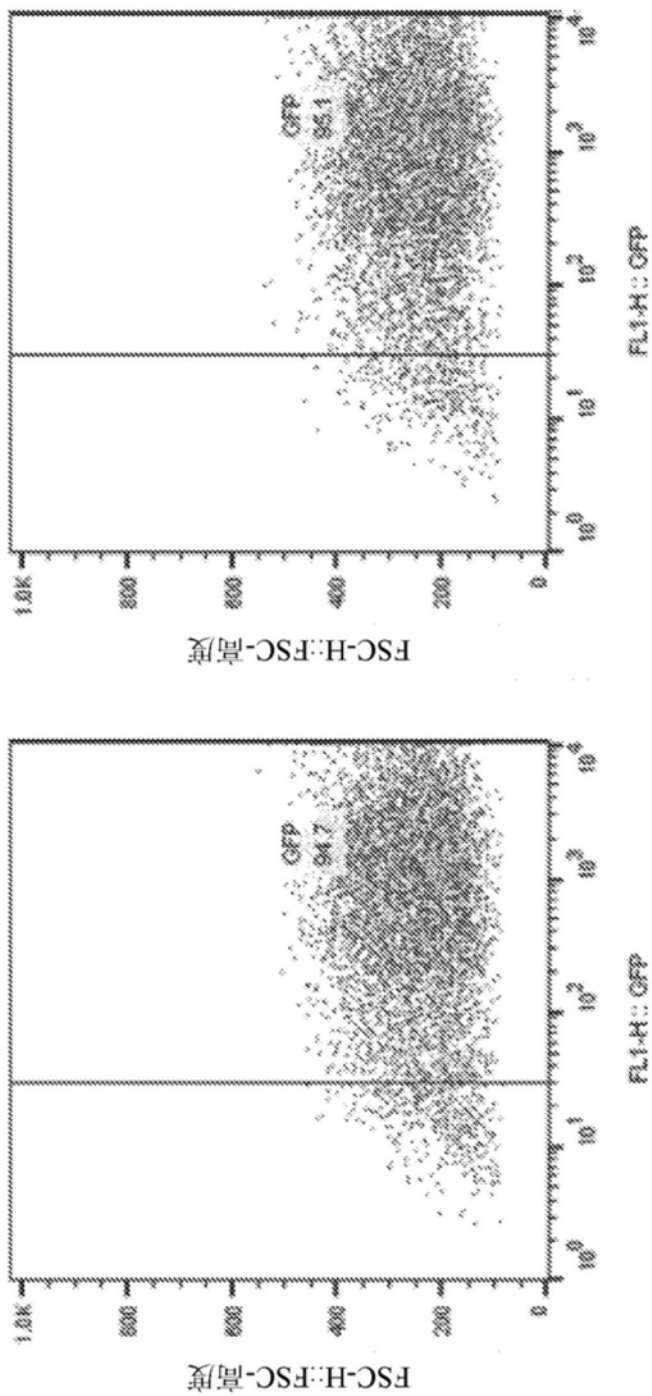


图5E

病毒载体	U87中的GFP%	U87中的MFI
未转导	0.99	41
ShH10	98.7	7827
ShH10- /7m8(457)	93.8	961
ShH10- /7m8(458)	96.05	1665
ShH10- /7m8(459)	94.9	980

图5F

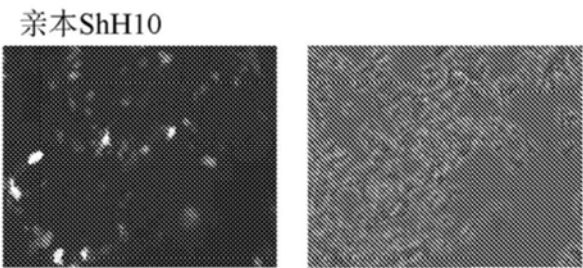


图6A

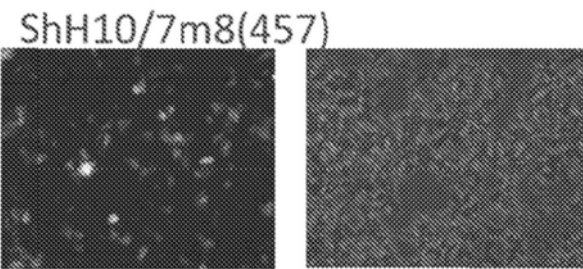


图6B

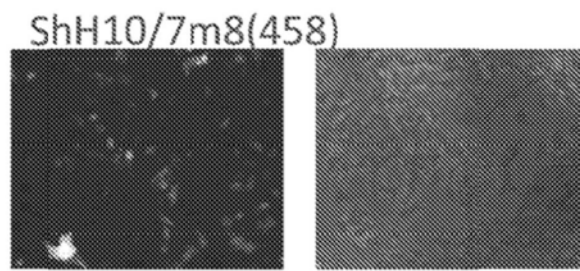


图6C

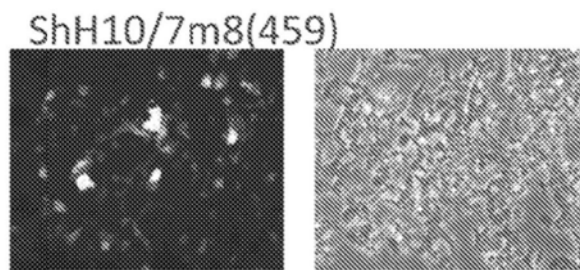


图6D

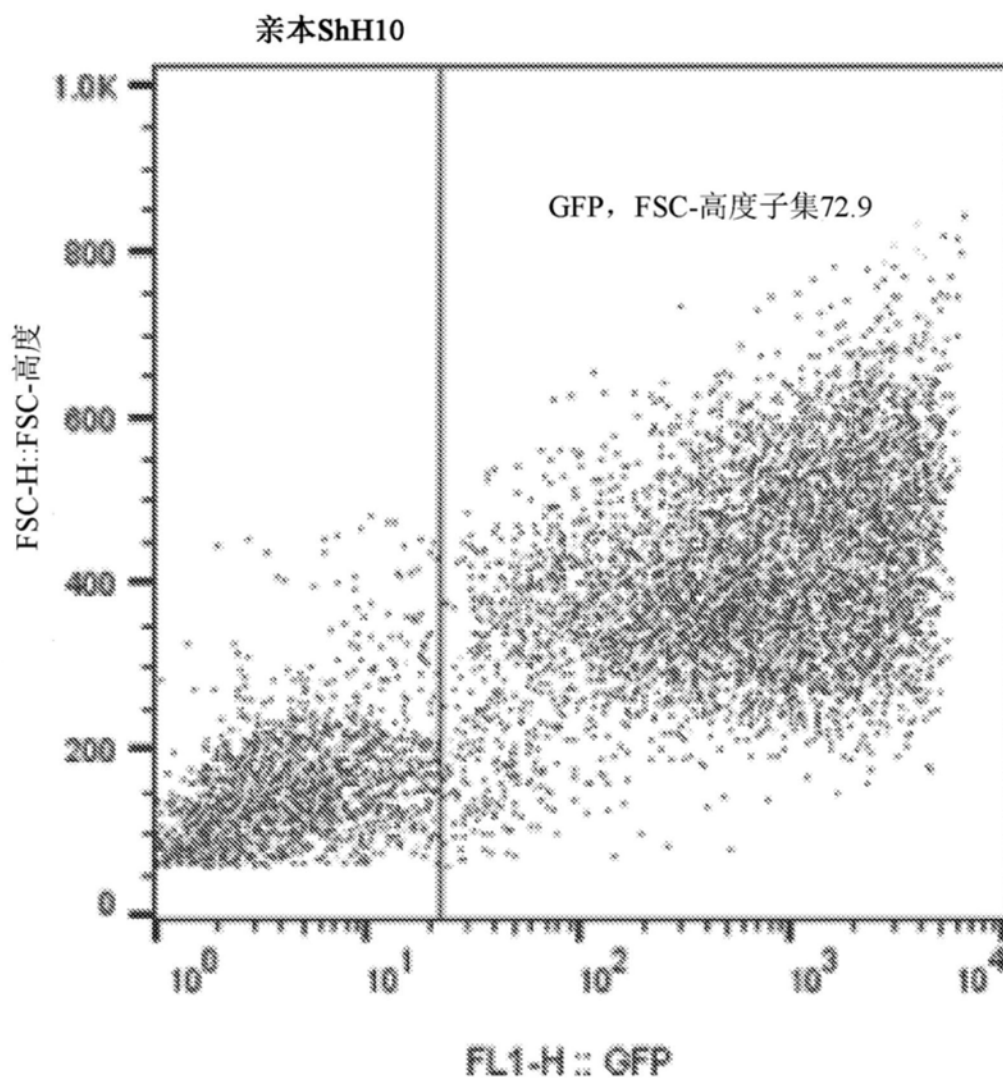


图7A

# ShH10/7m8(457)

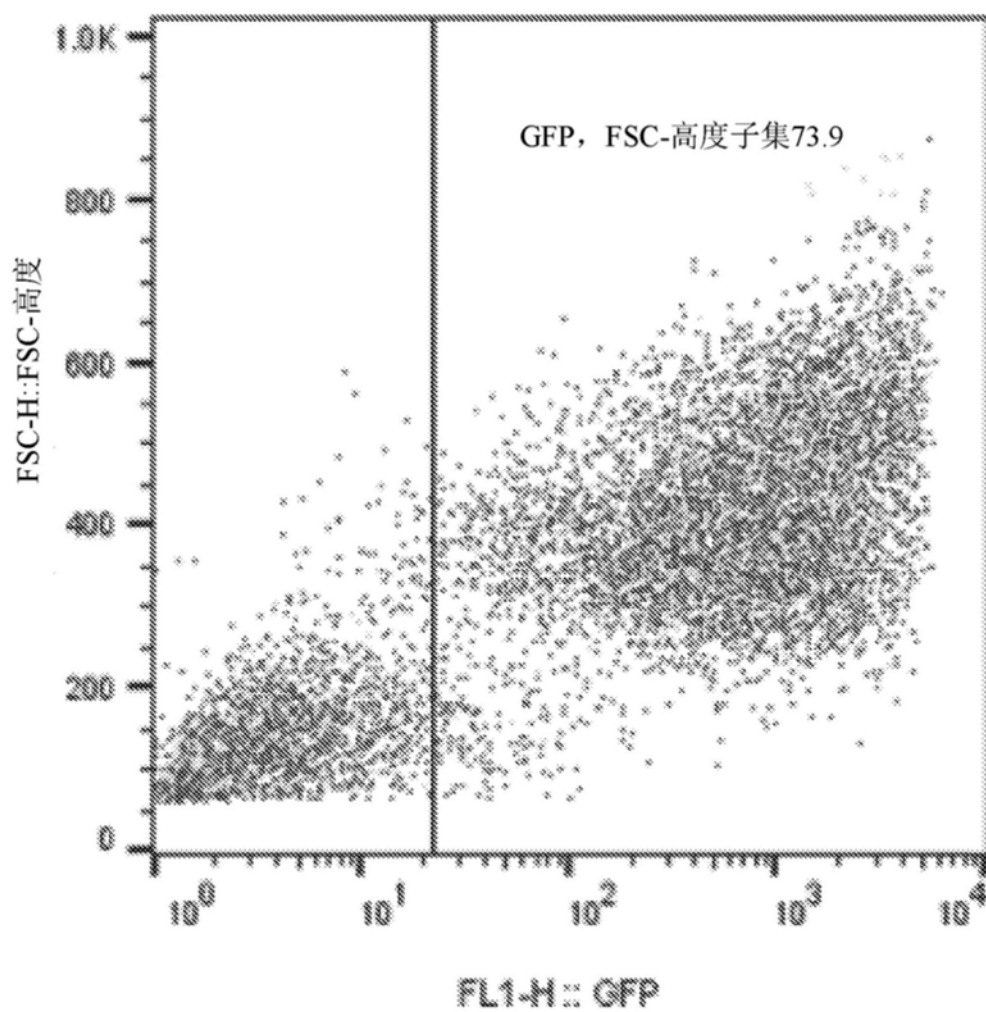


图7B



# ShH10/7m8(458)

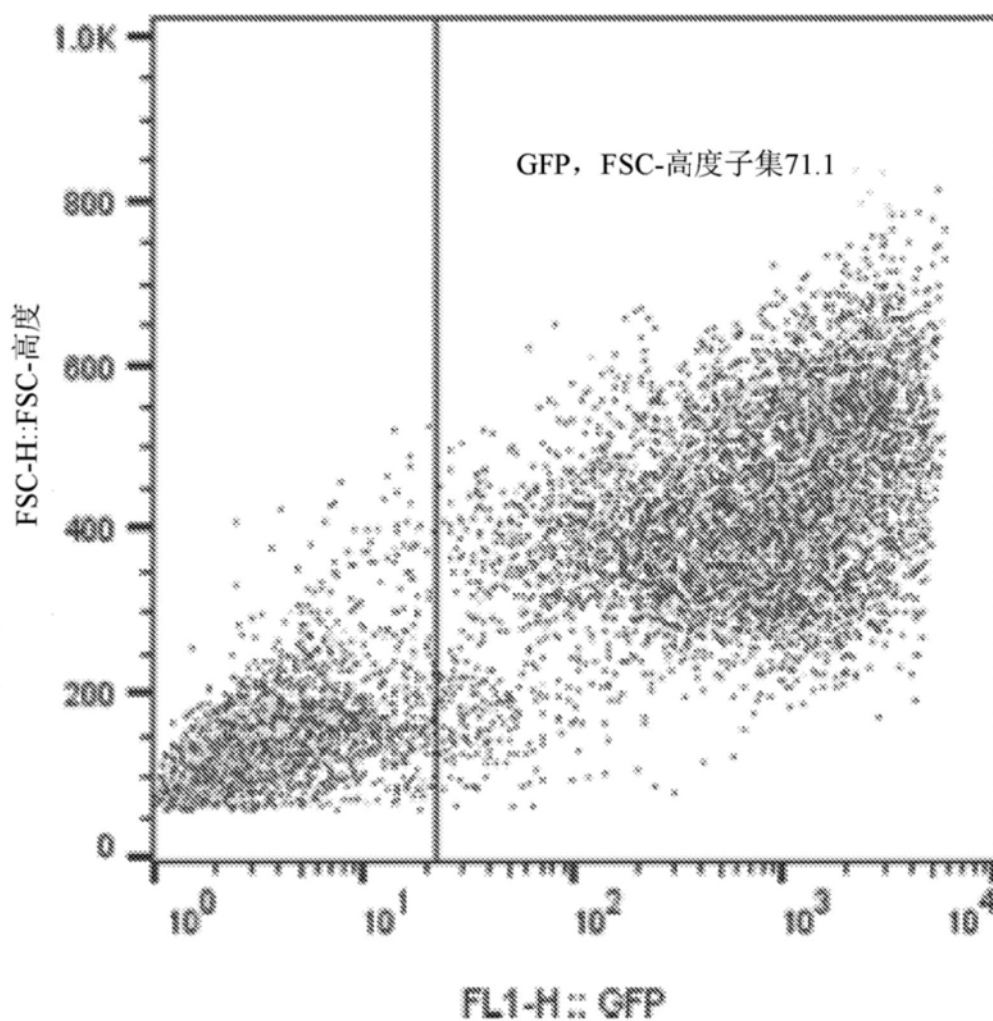


图7C

# ShH10/7m8(459)

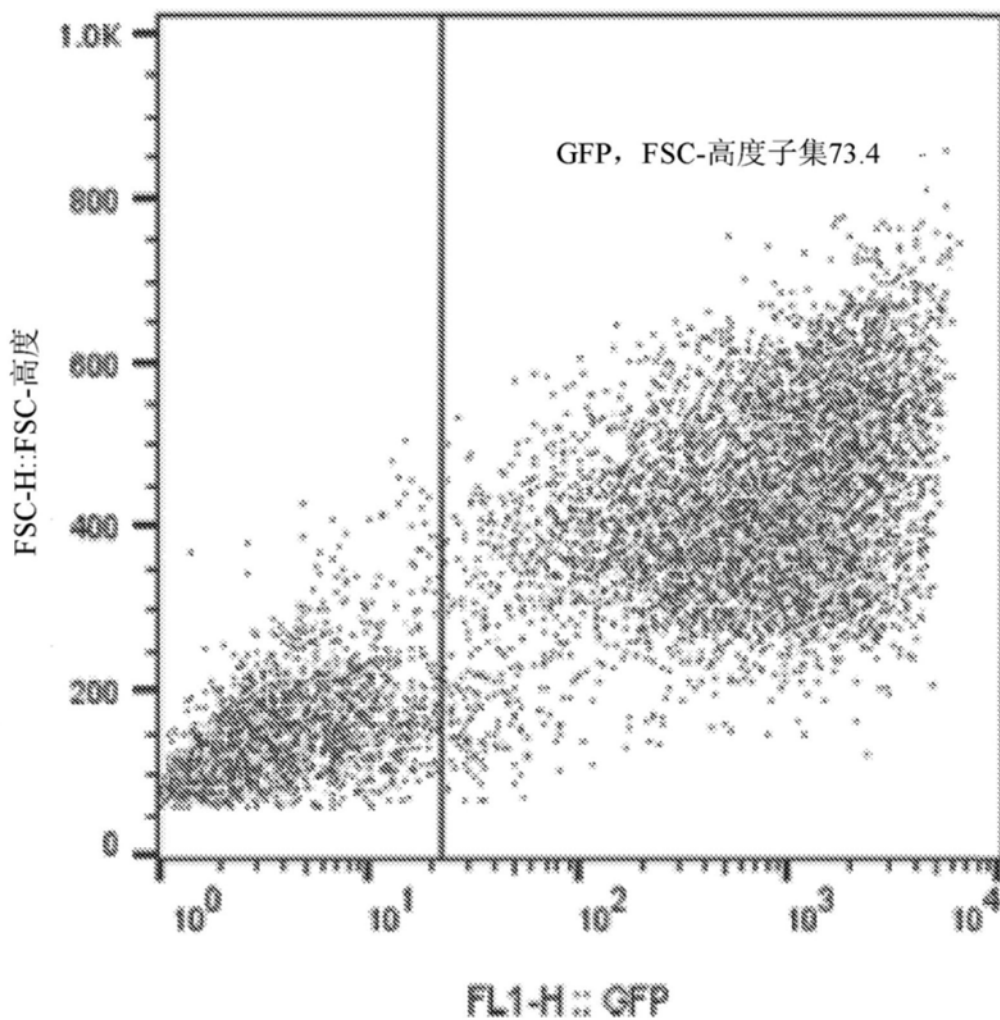


图7D

样本	% GFP (n=2)	MFI (n=2)
仅HepG2	0.35	246
ShH10	72.9	1269
ShH10- /7m8(457)	74.2	1137
ShH10- /7m8(458)	72.0	1135
ShH10- /7m8(459)	73.45	1204

图7E

加载物：病毒样本对照物，未穿过柱

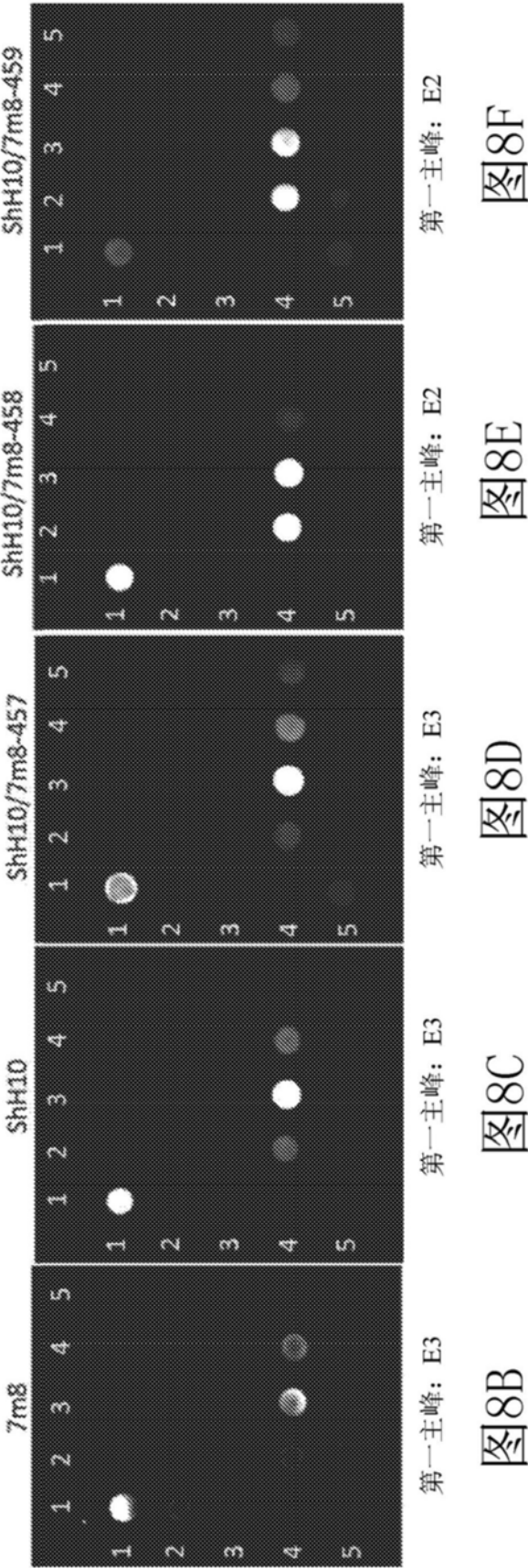
FT：将病毒加载到柱时收集的穿透流

W：用PBS洗涤加载有样本的柱时收集的洗涤物，收集5个级分，每个级分1 ml

E：用100 mM到1 M的NaCl步长梯度洗脱加载有样本的柱时收集的洗脱物，（所述梯度对应于收集的级分E1到E10，每个级分1 ml）

	1	2	3	4	5
1	加载物				
2	FT				
3	W1	W2	W3	W4	W5
4	E1	E2	E3	E4	E5
5	E6	E7	E8	E9	E10

图8A



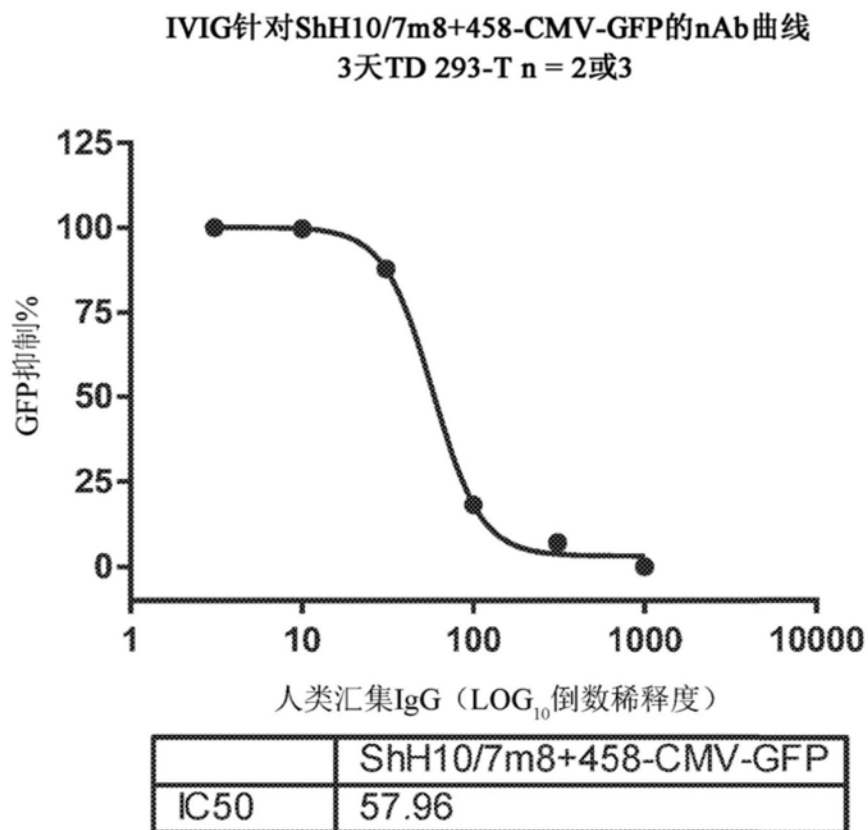


图9

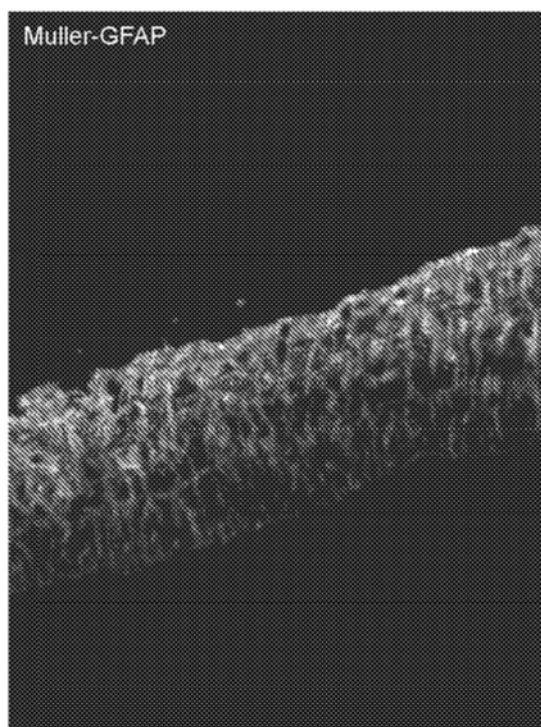


图10A

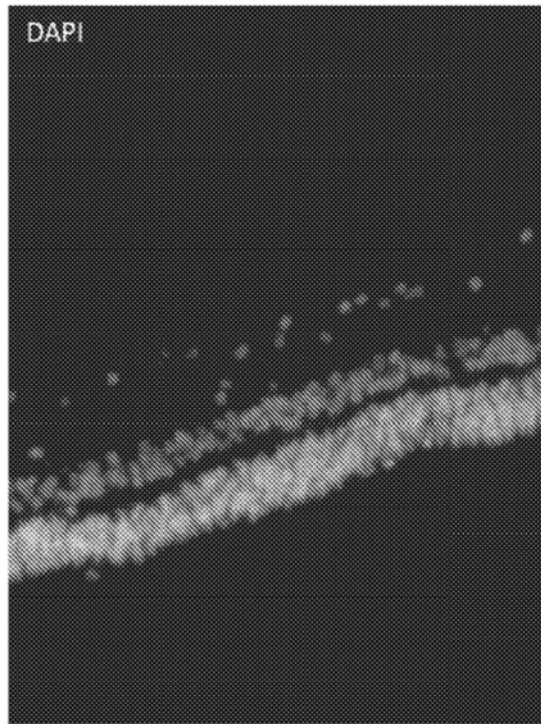


图10B

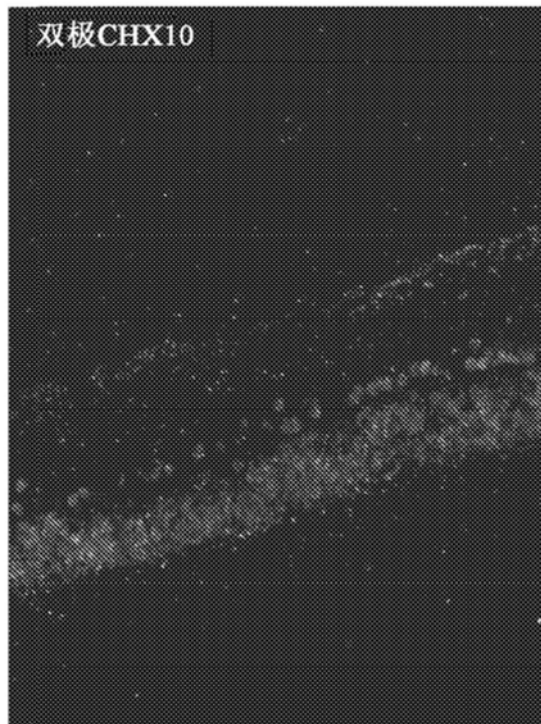


图10C

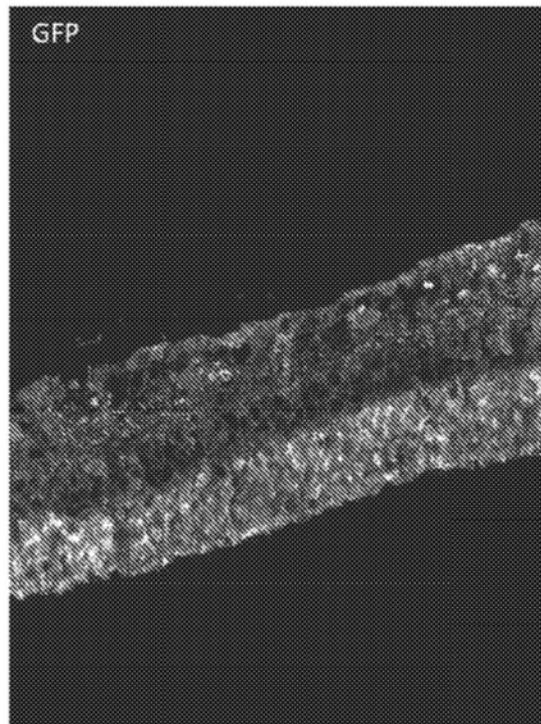


图10D

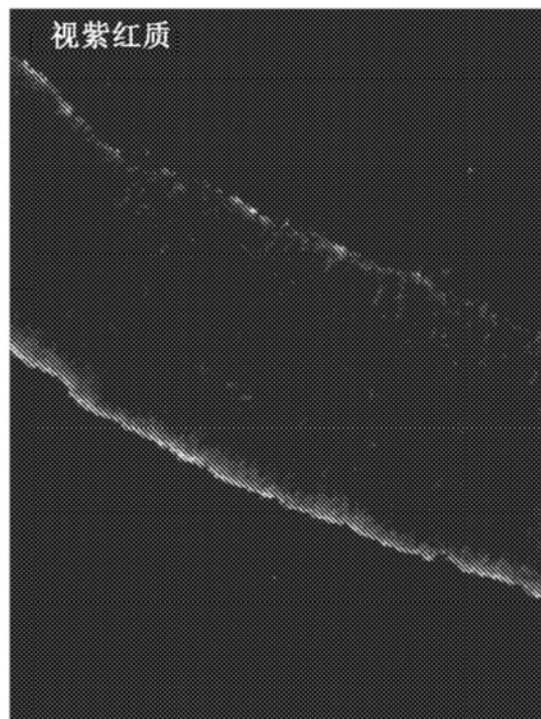


图10E



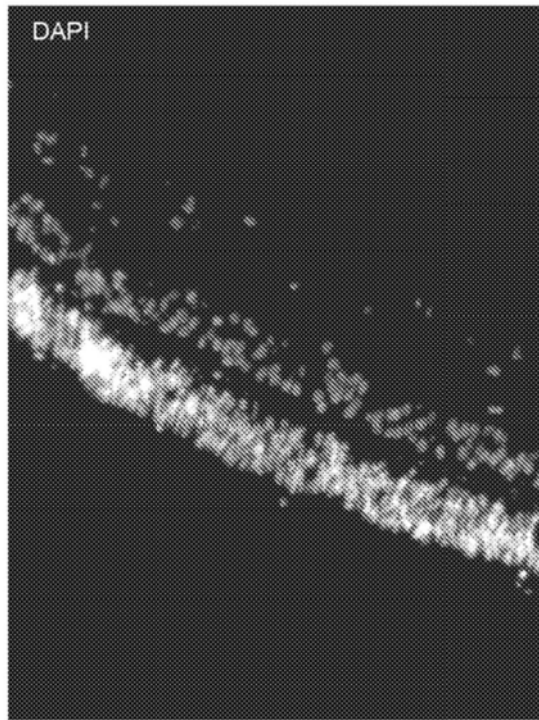


图10F

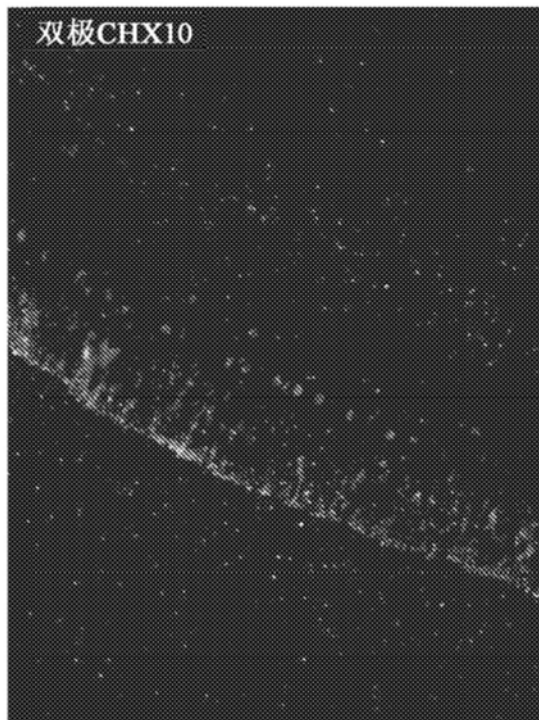


图10G

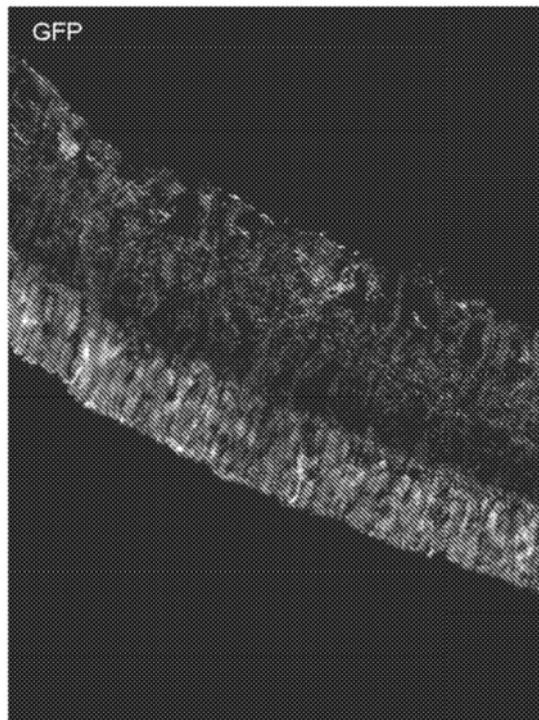


图10H

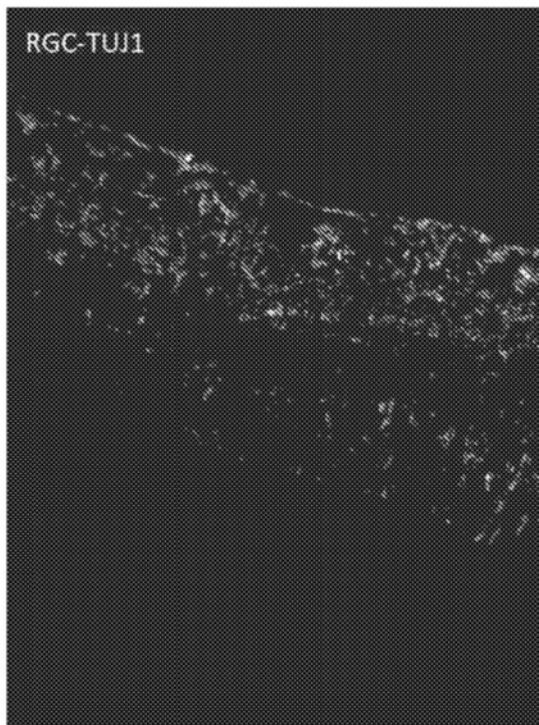


图10I

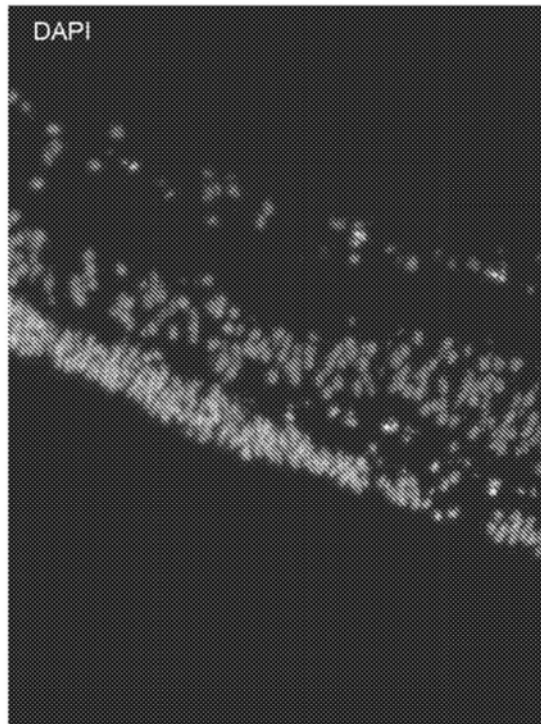


图10J

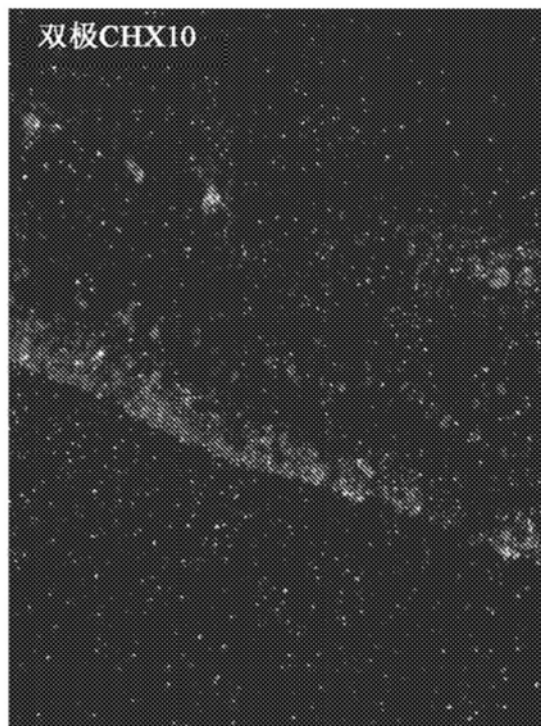


图10K

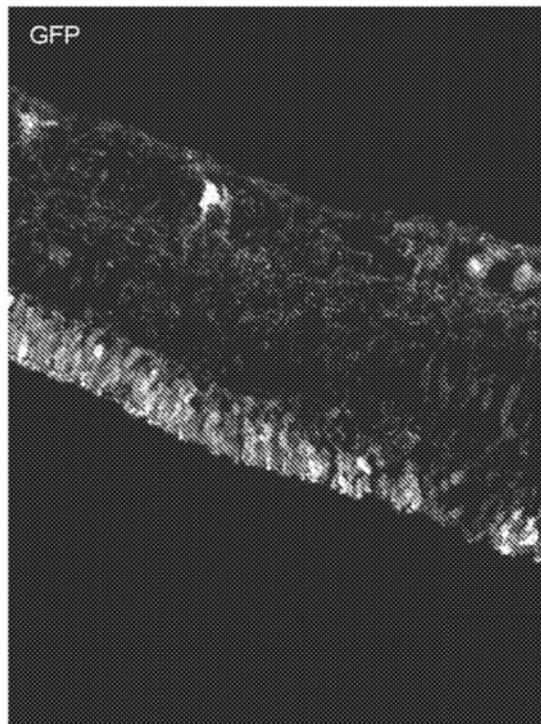


图10L

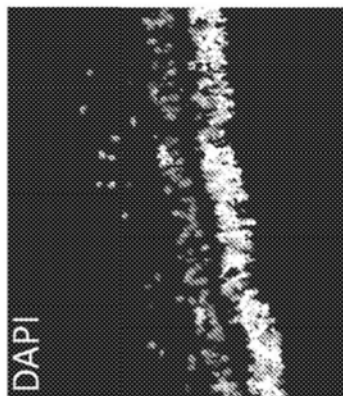


图10M

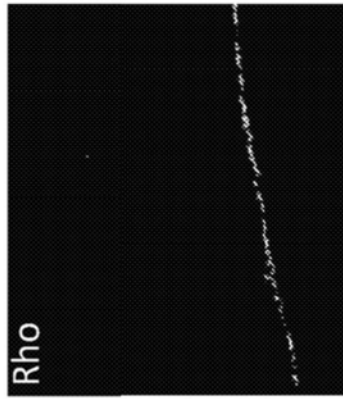


图10N

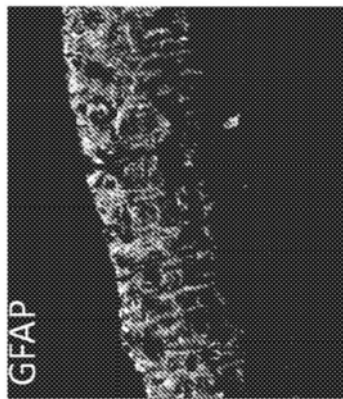


图100

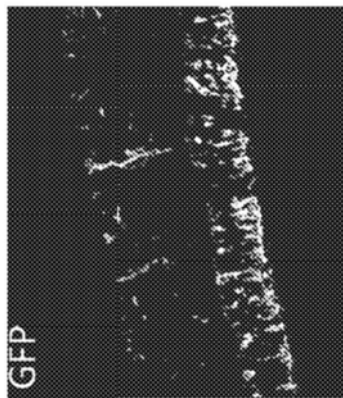


图10P

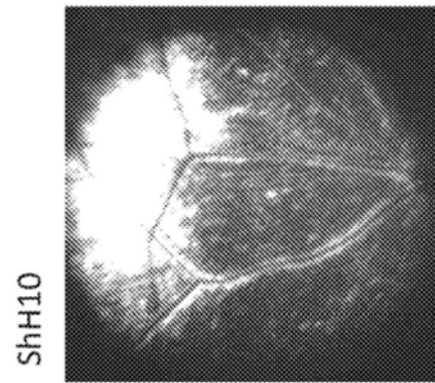


图11A

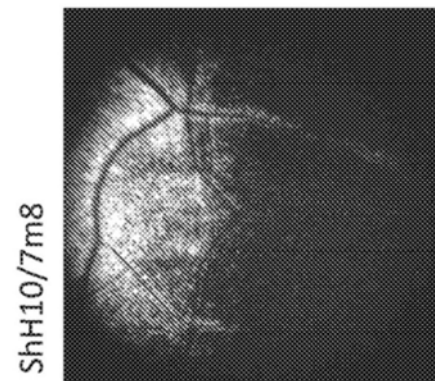
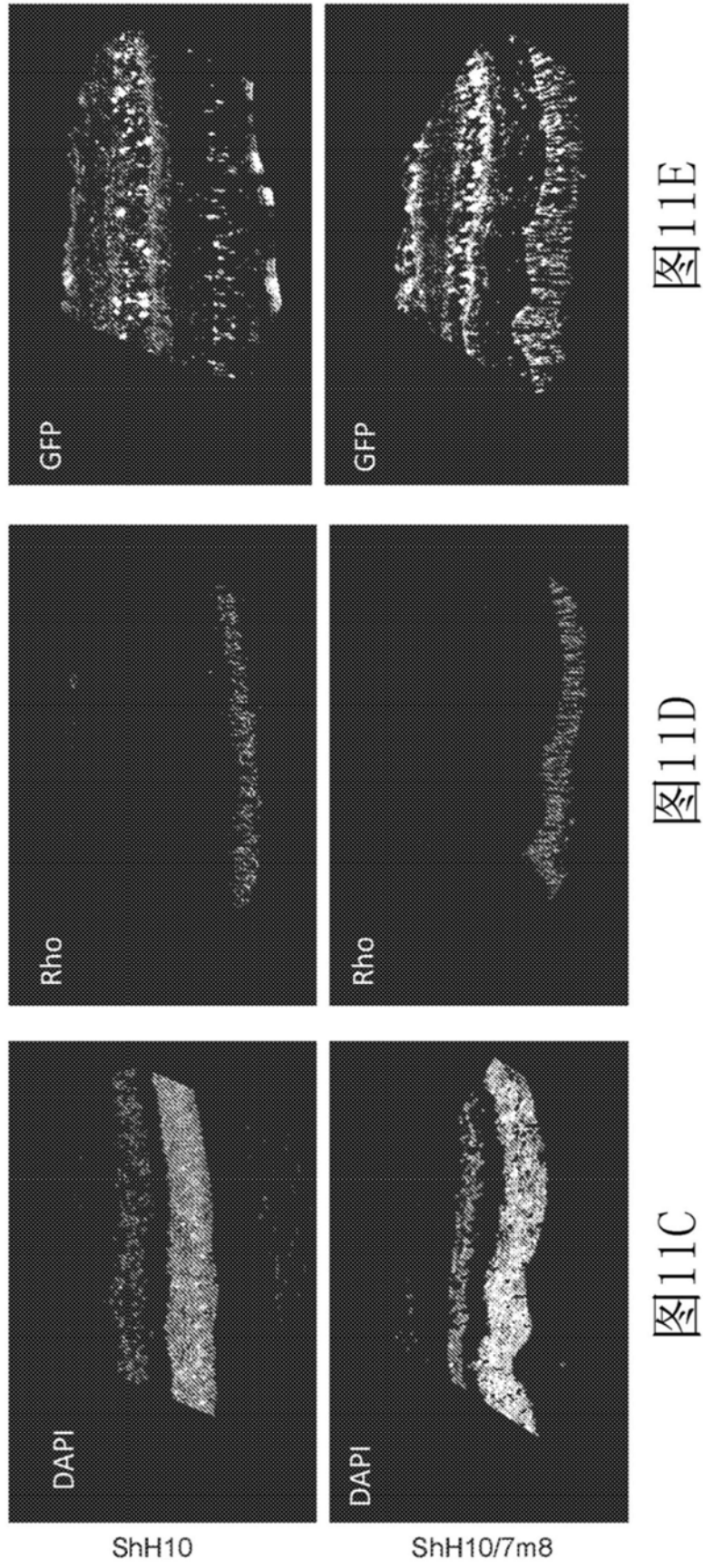


图11B





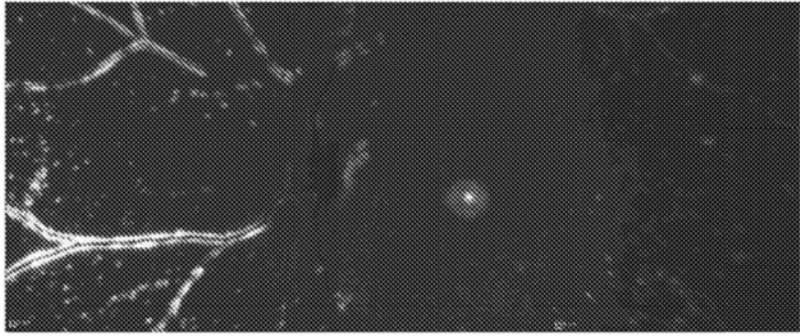


图12A



图12B

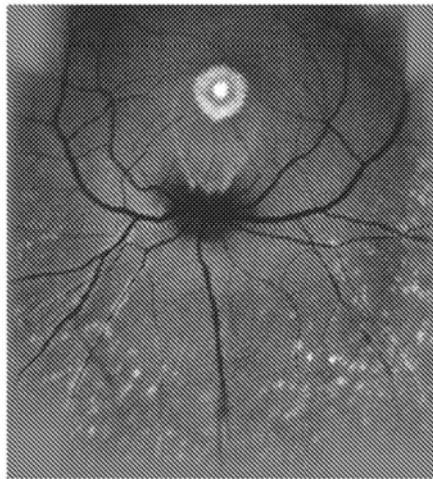


图12C



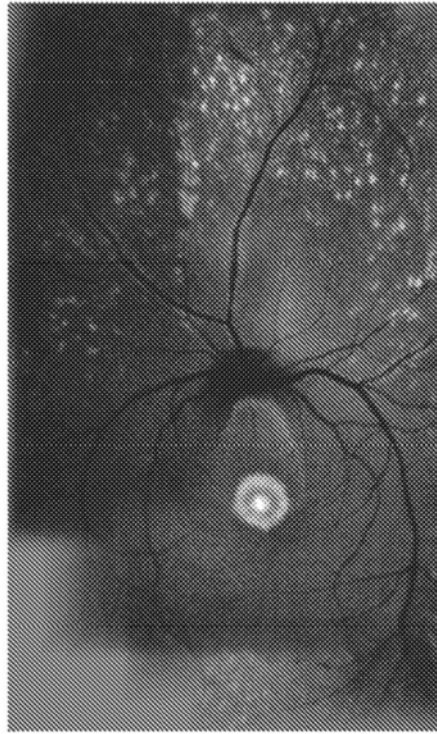


图12D

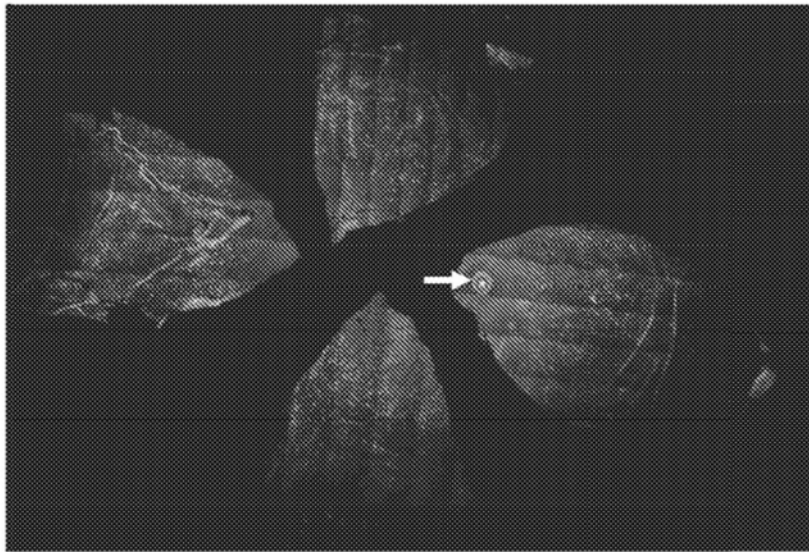


图13

DIC

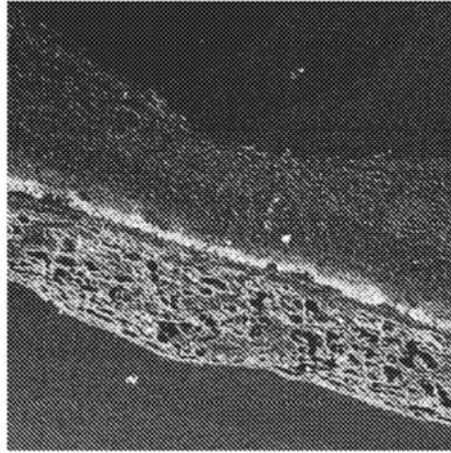


图14A

DAPI

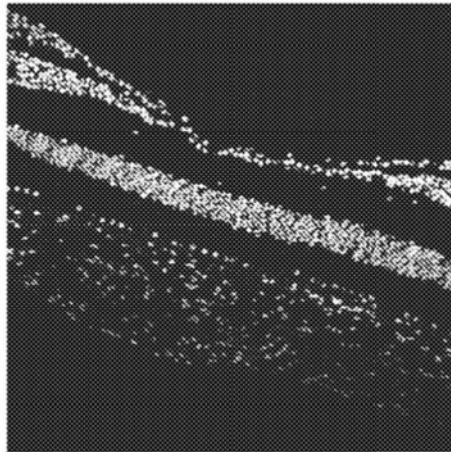


图14B

钙结合蛋白

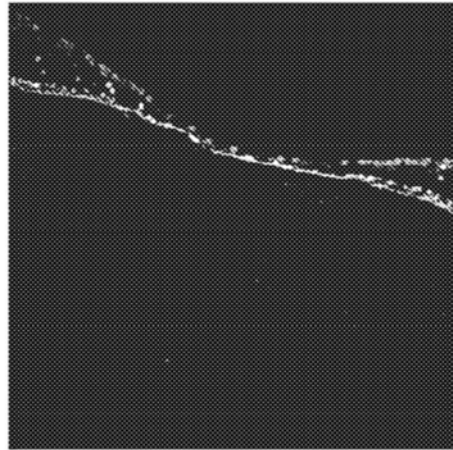


图14C

S视蛋白

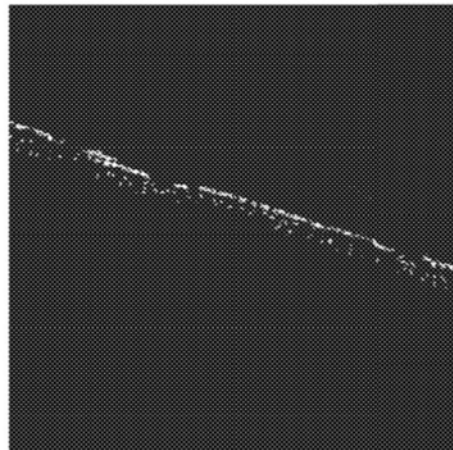


图14D

GFP

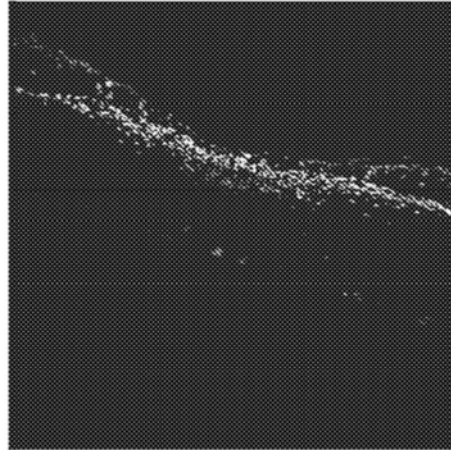


图14E

DIC

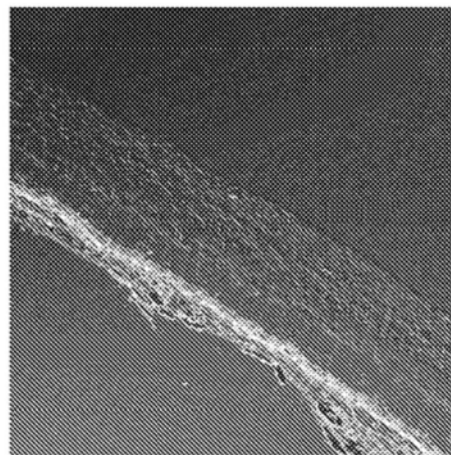


图15A

DAPI

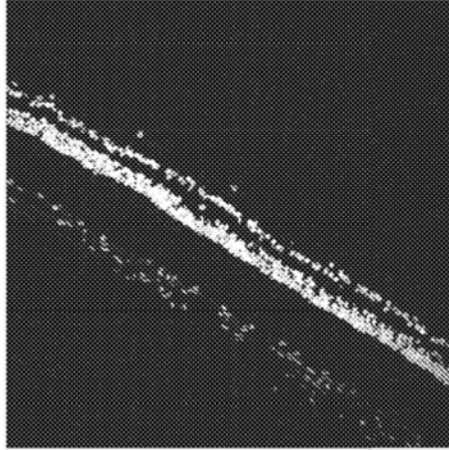


图15B

PNA

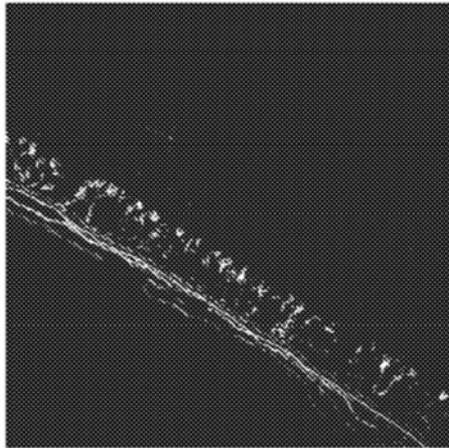


图15C

波形蛋白

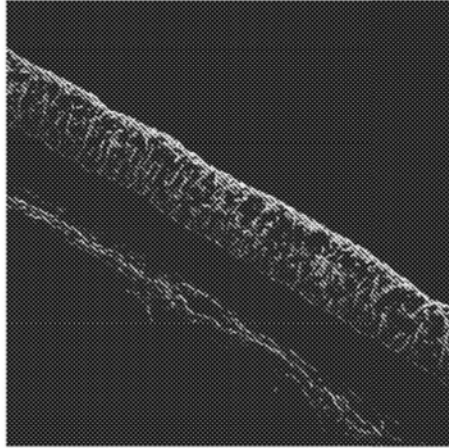


图15D

GFP

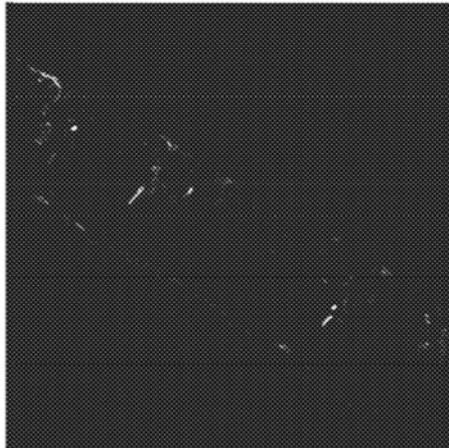


图15E

第2周

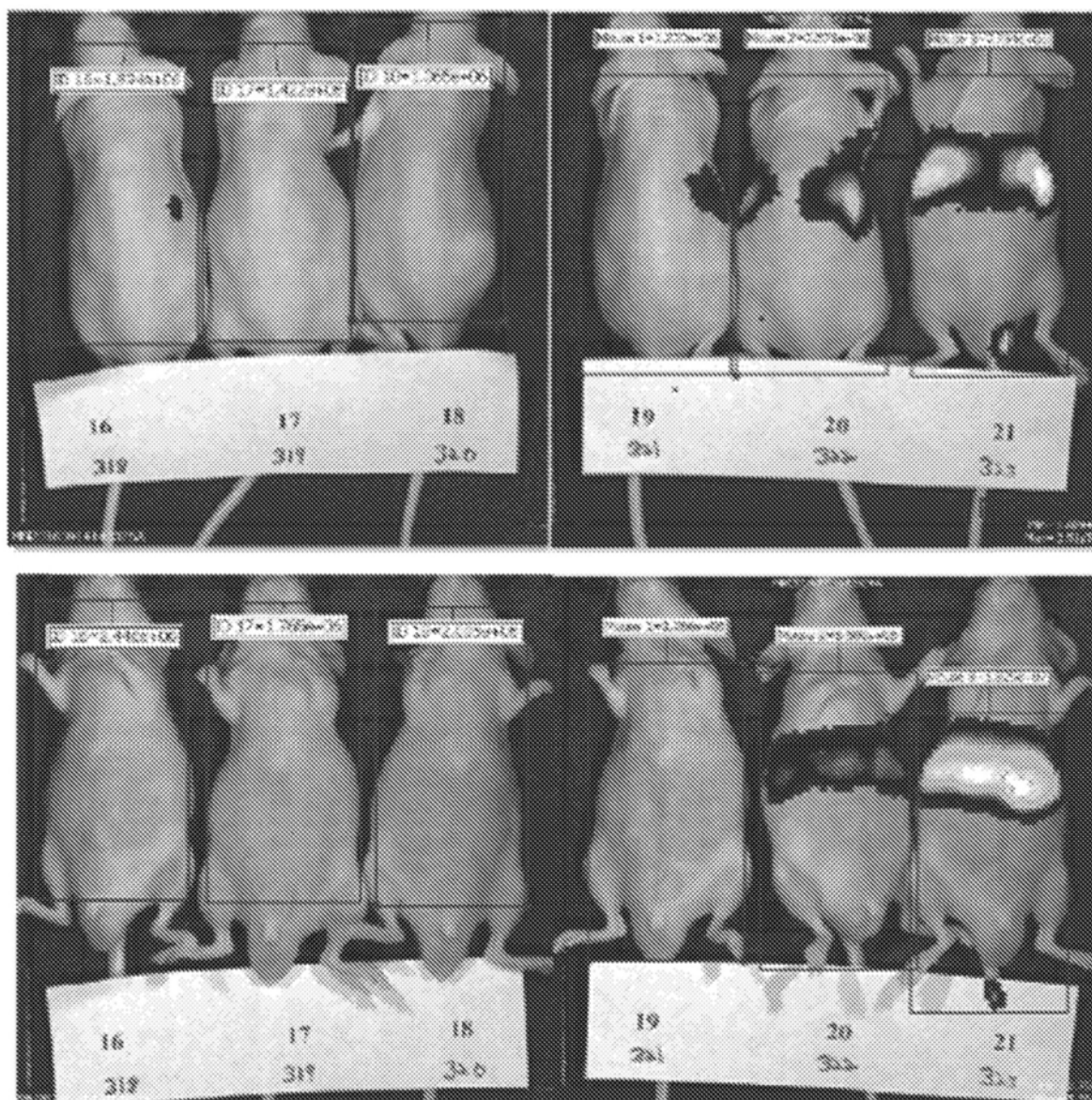


图16A



第4周

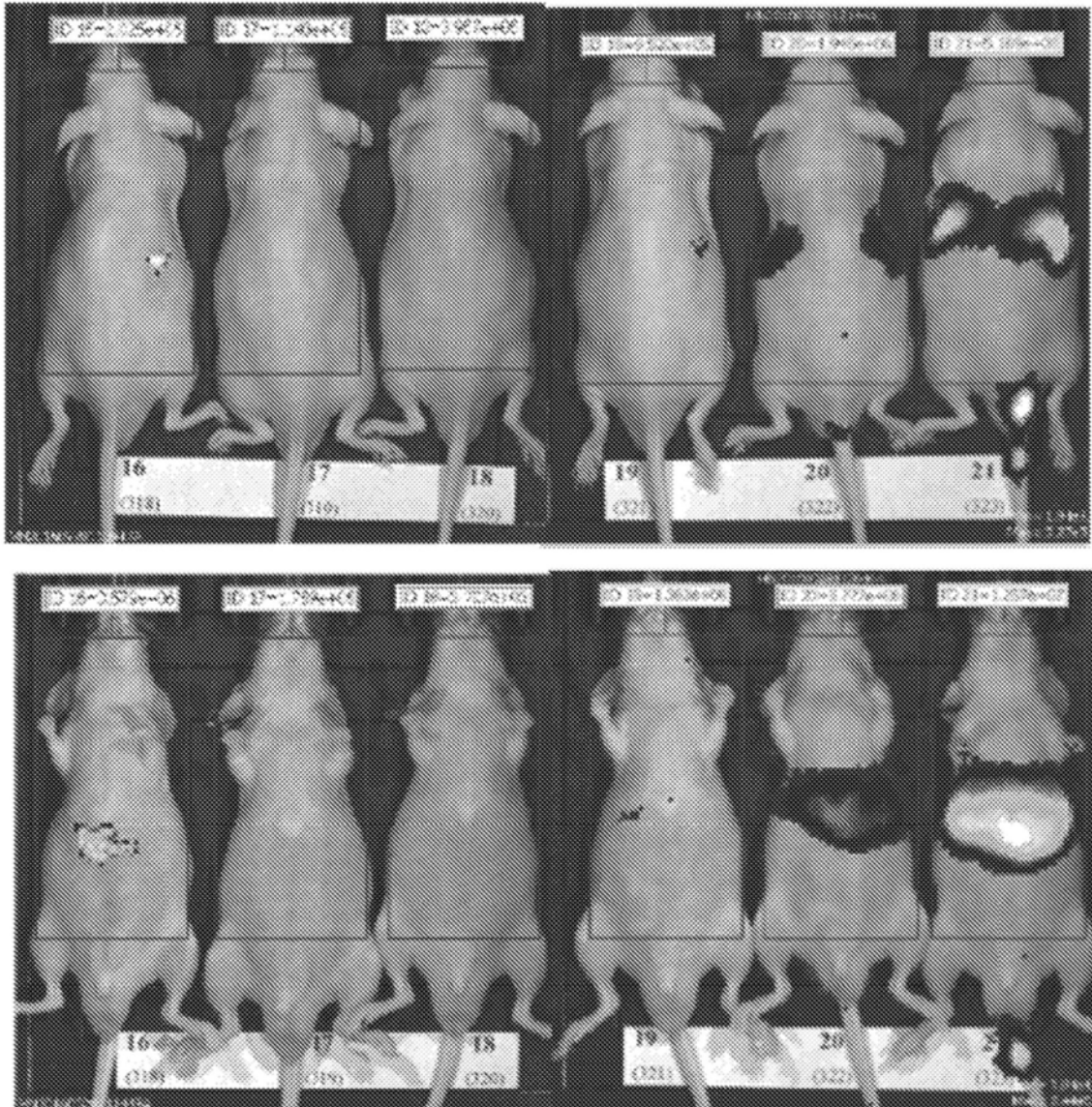


图16B



第6周

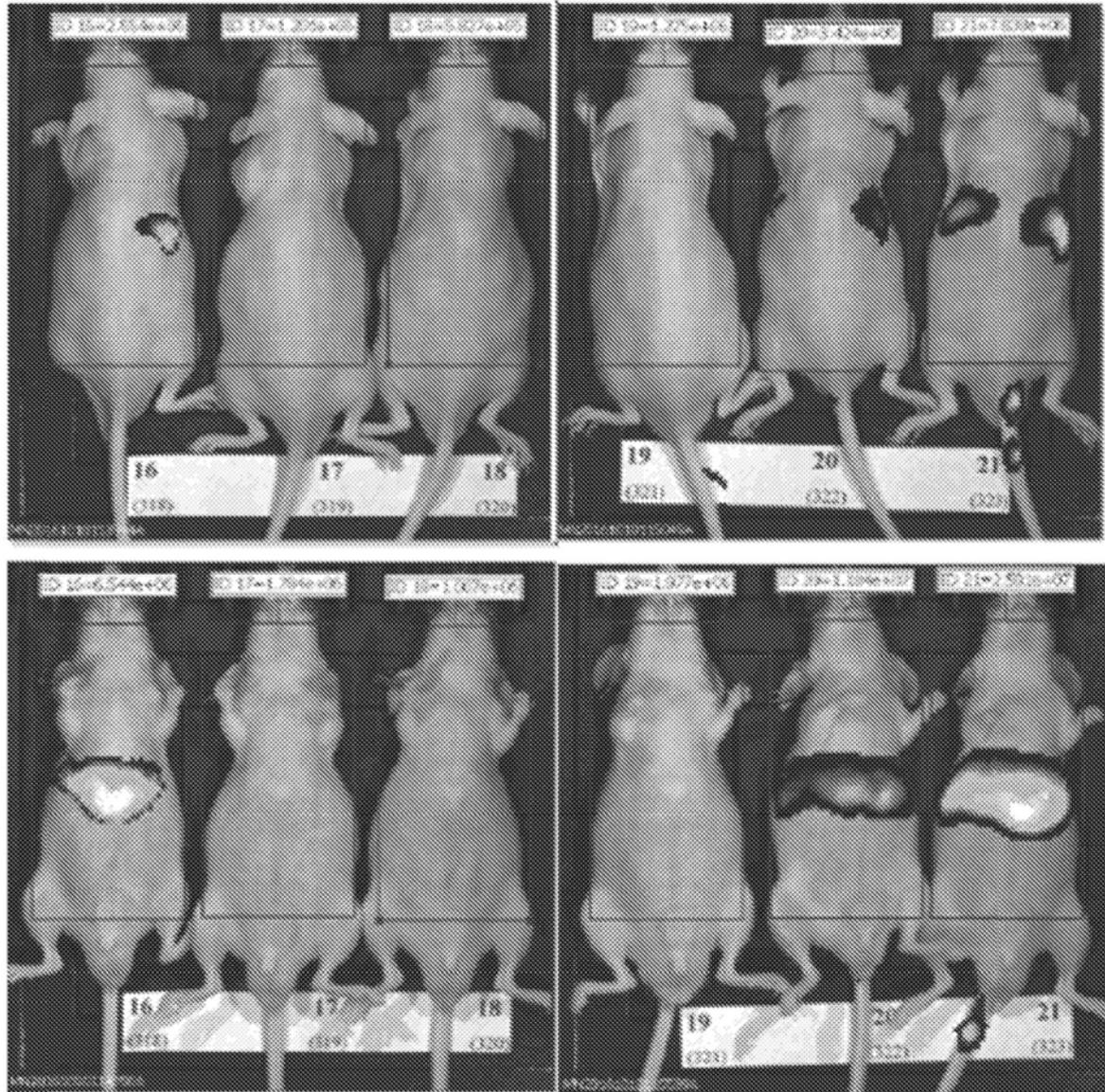


图16C

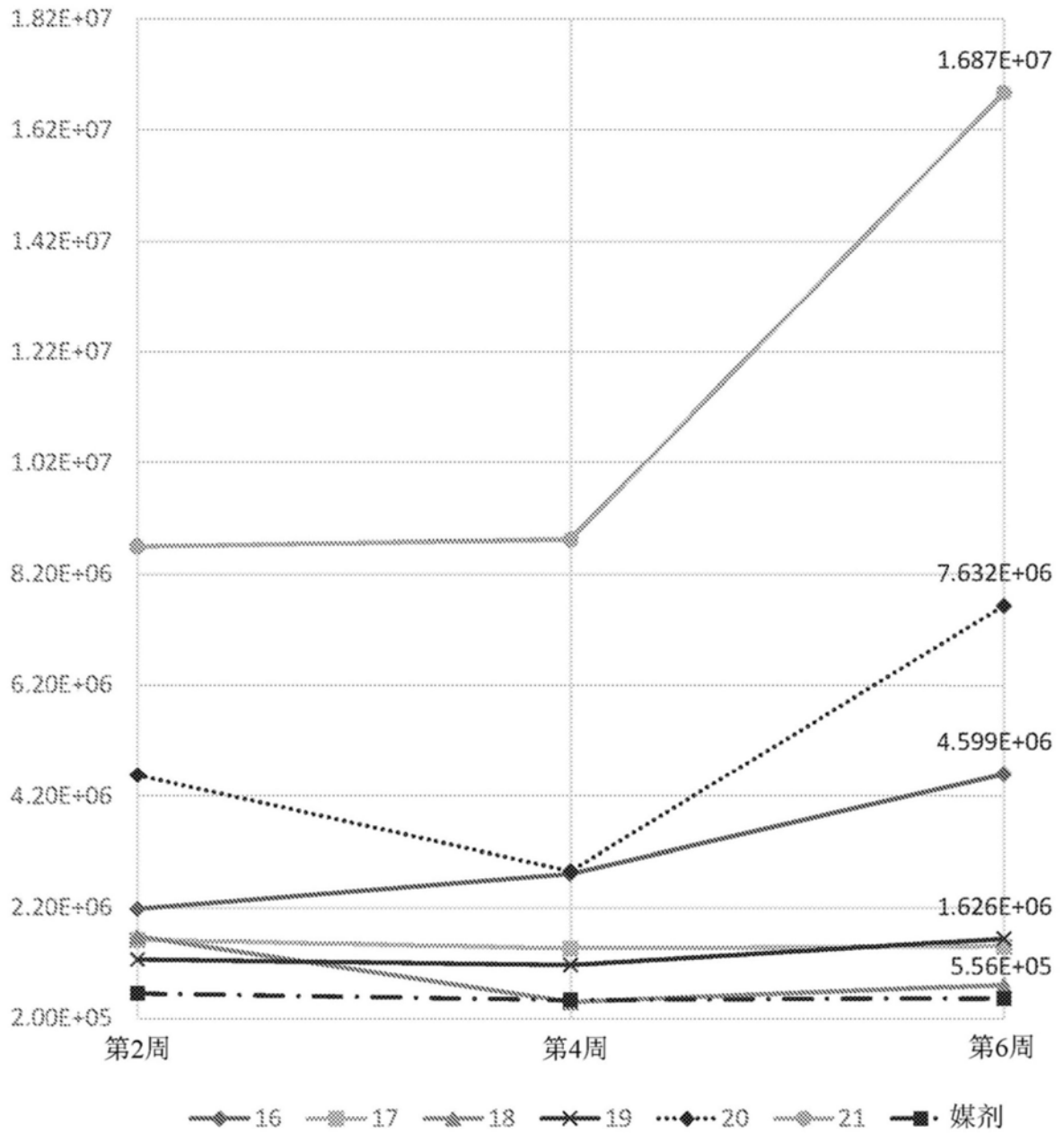


图16D

第2周

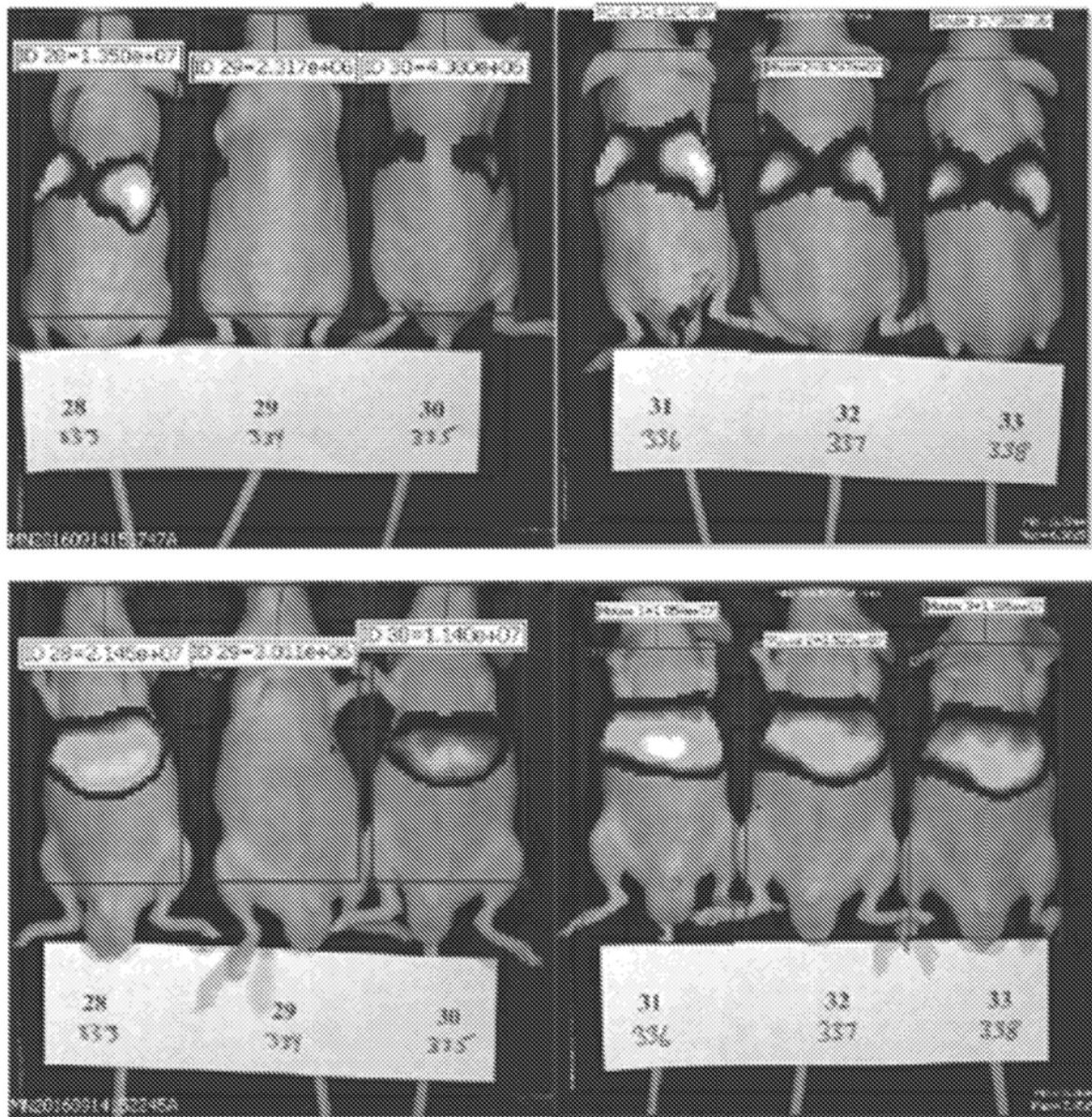


图17A

第4周

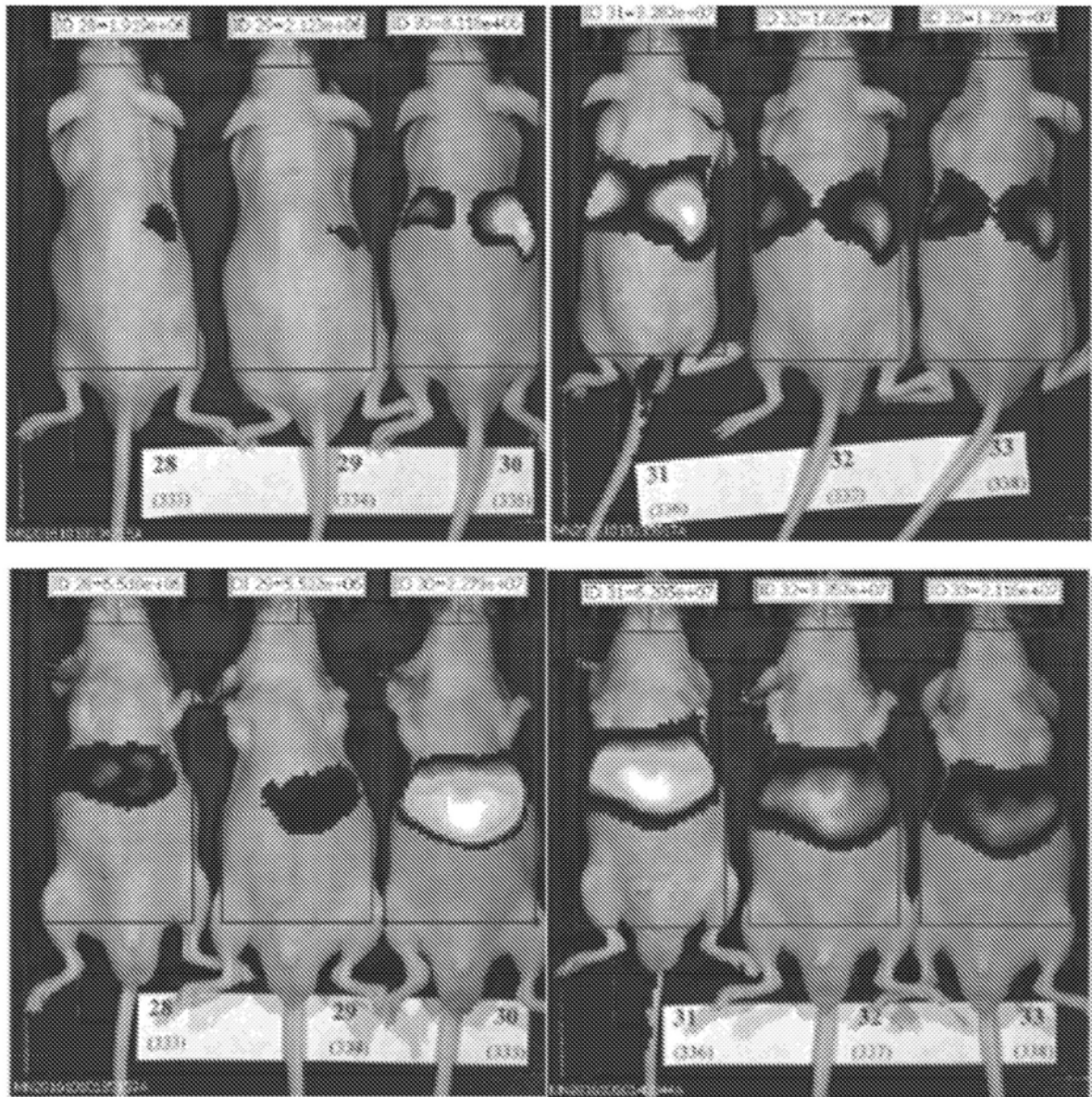


图17B



第6周

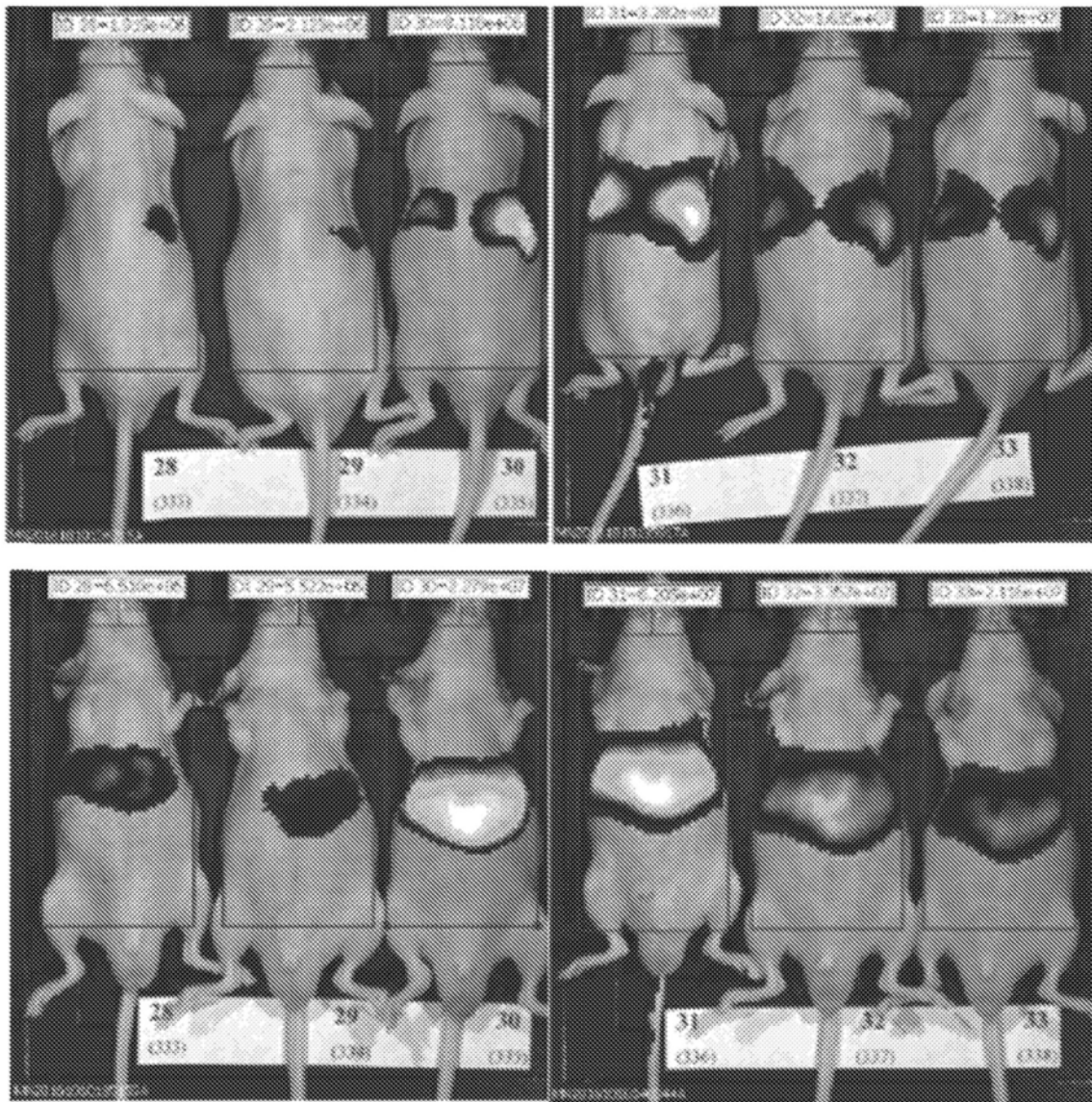


图17C

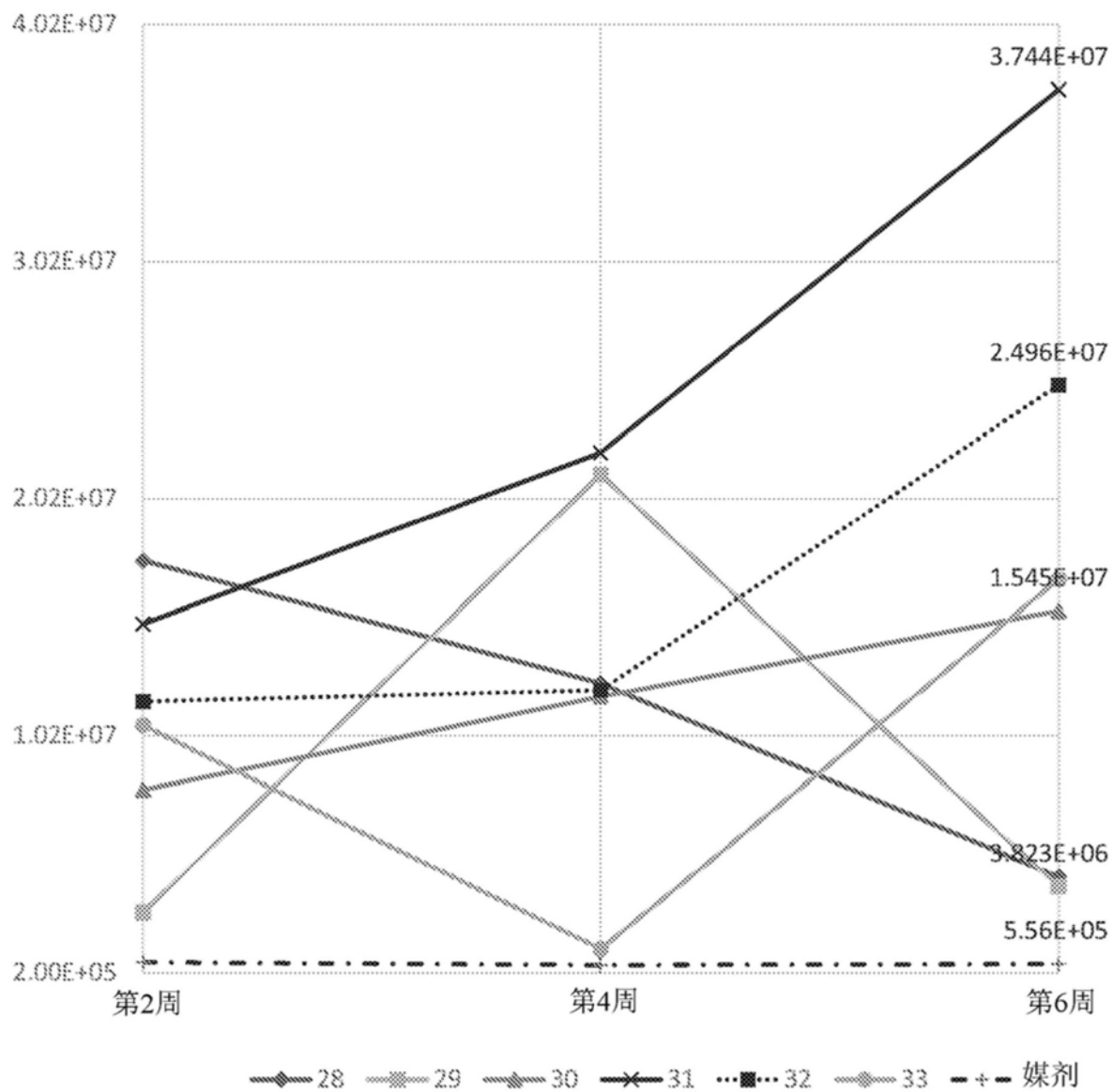


图17D

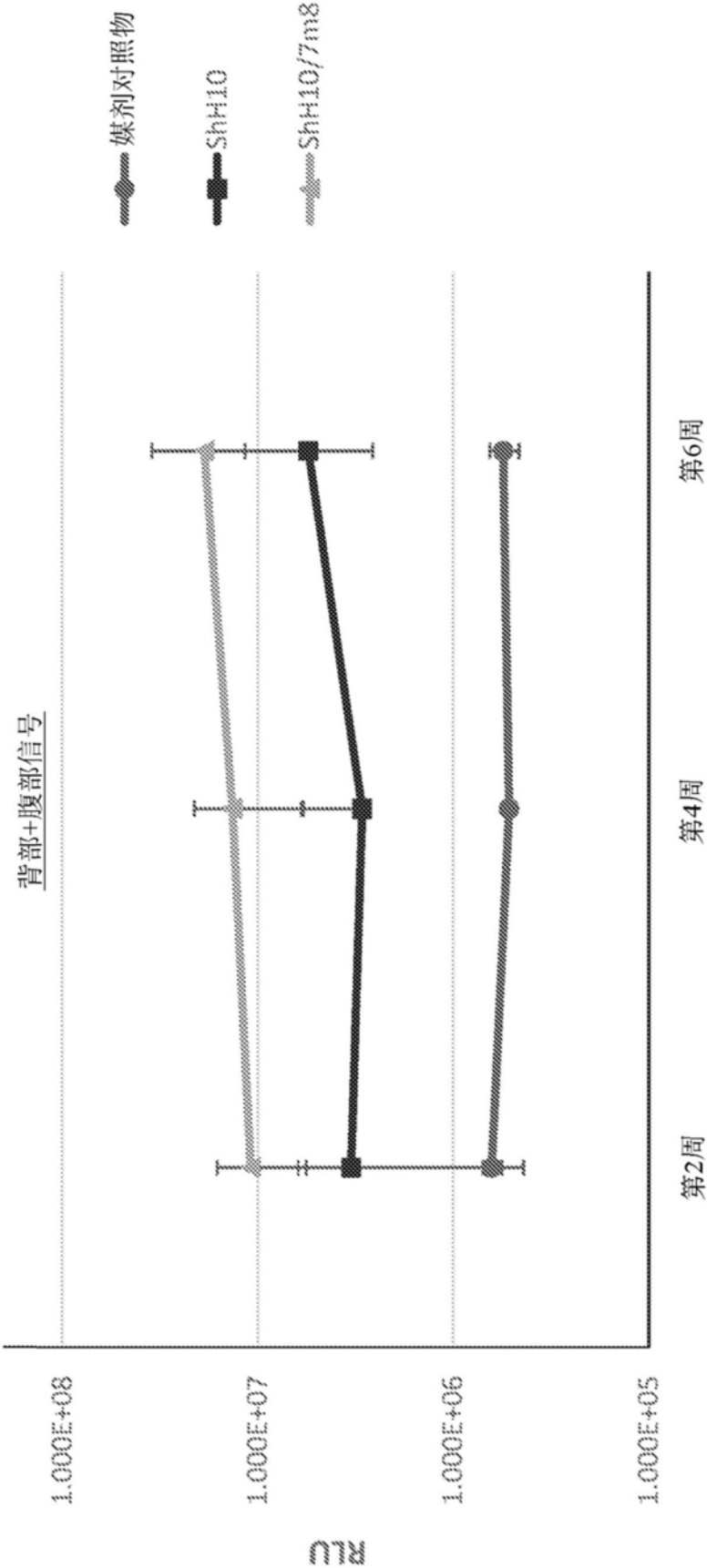


图18A

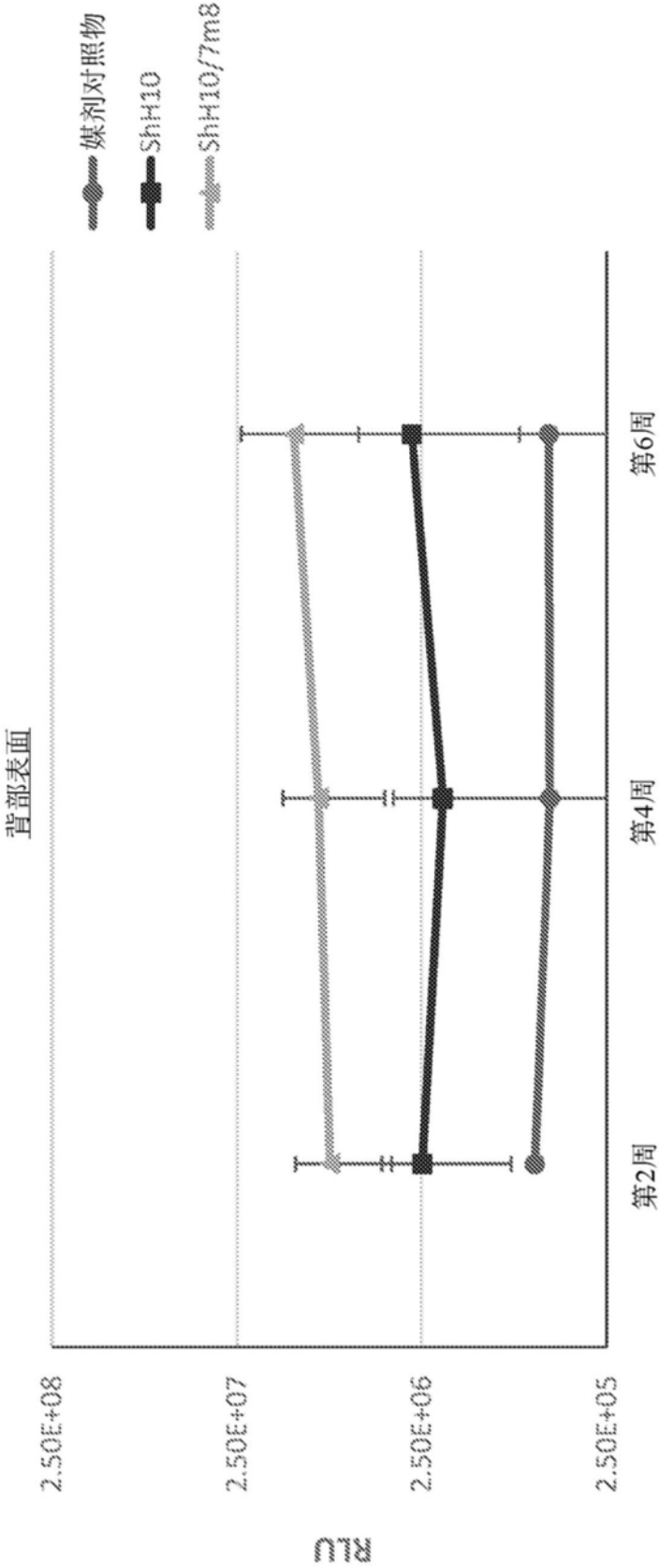


图18B



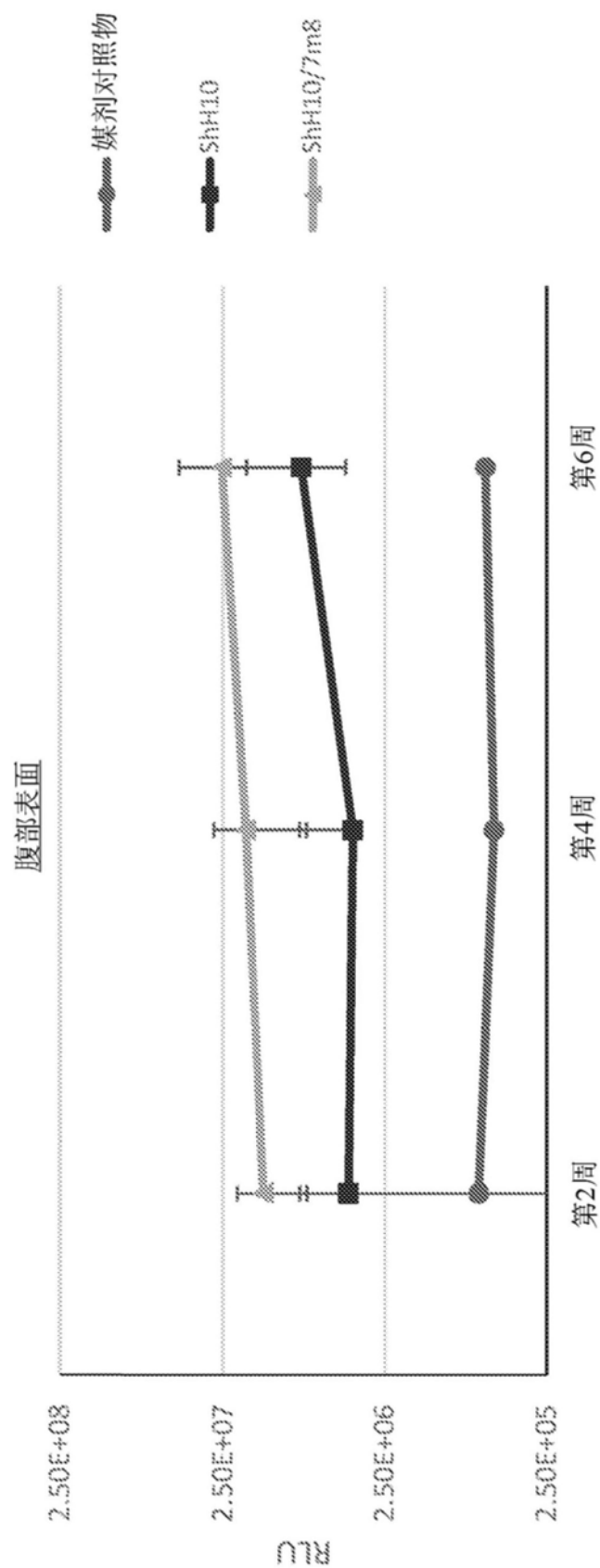


图18C

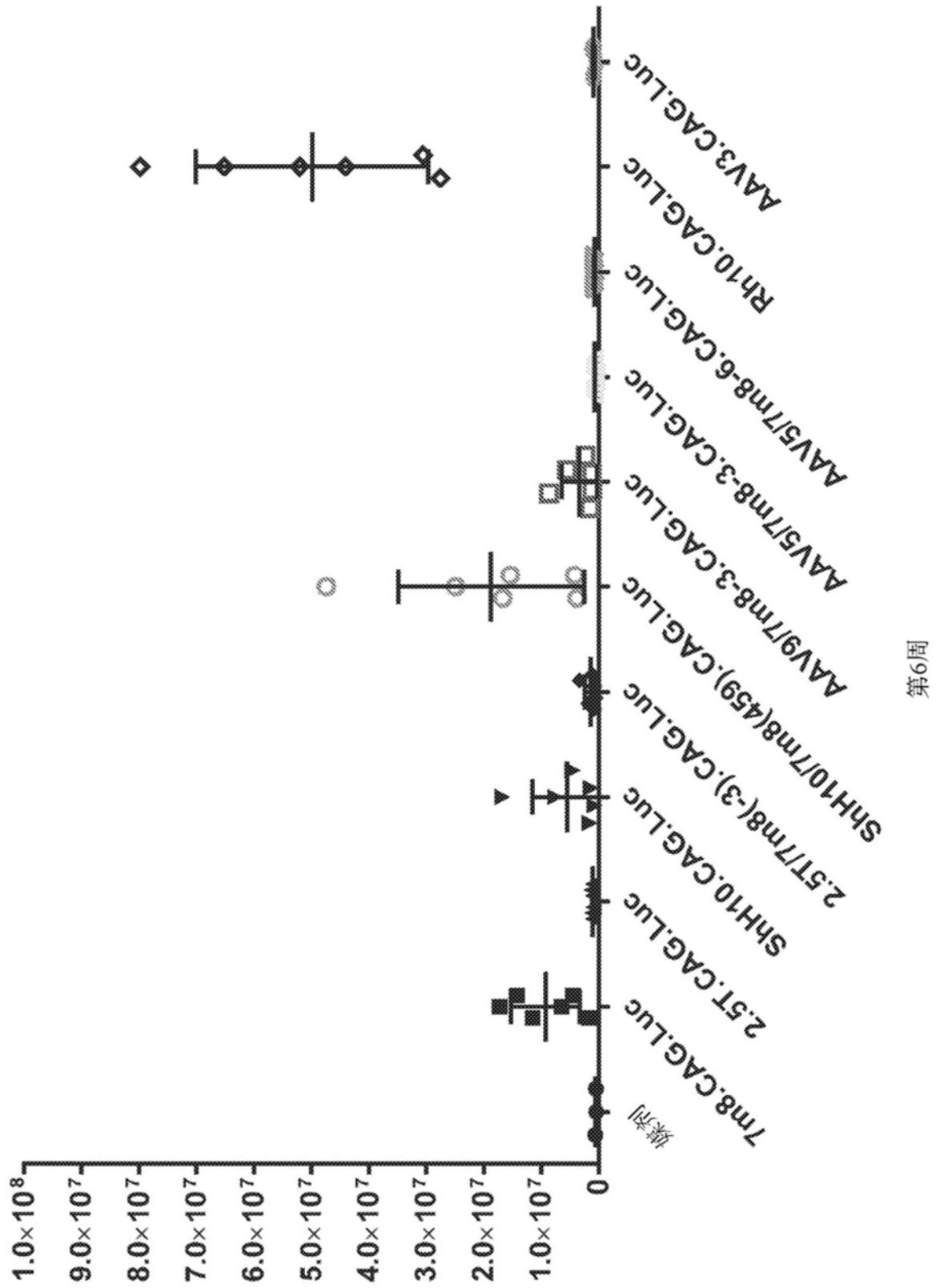


图19

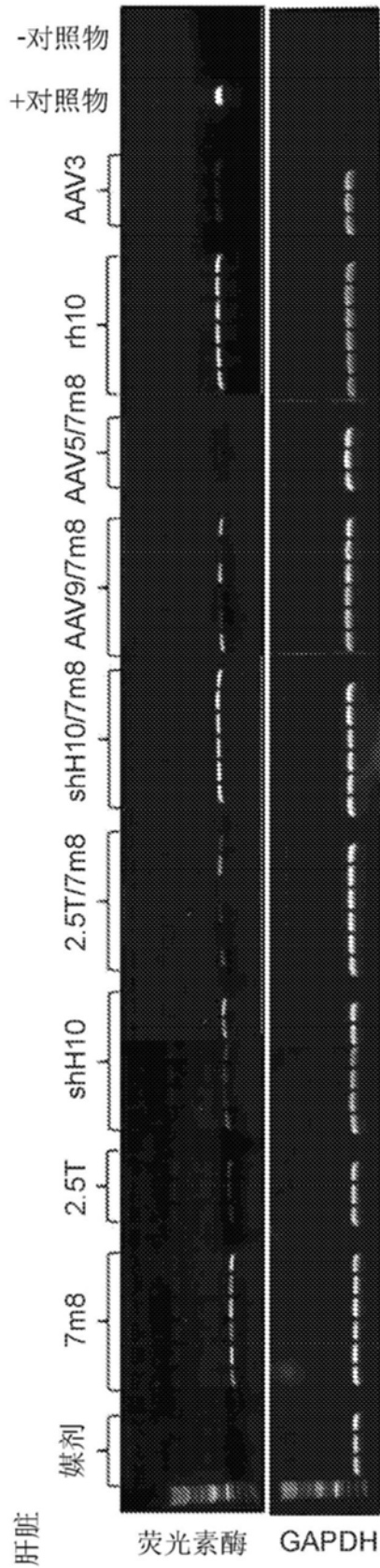


图20A

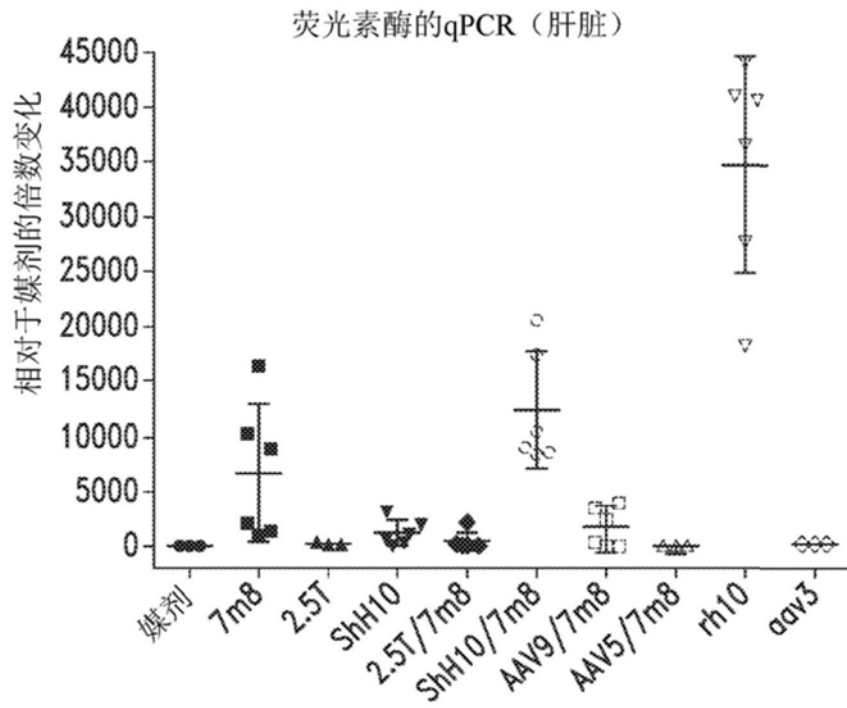


图20B

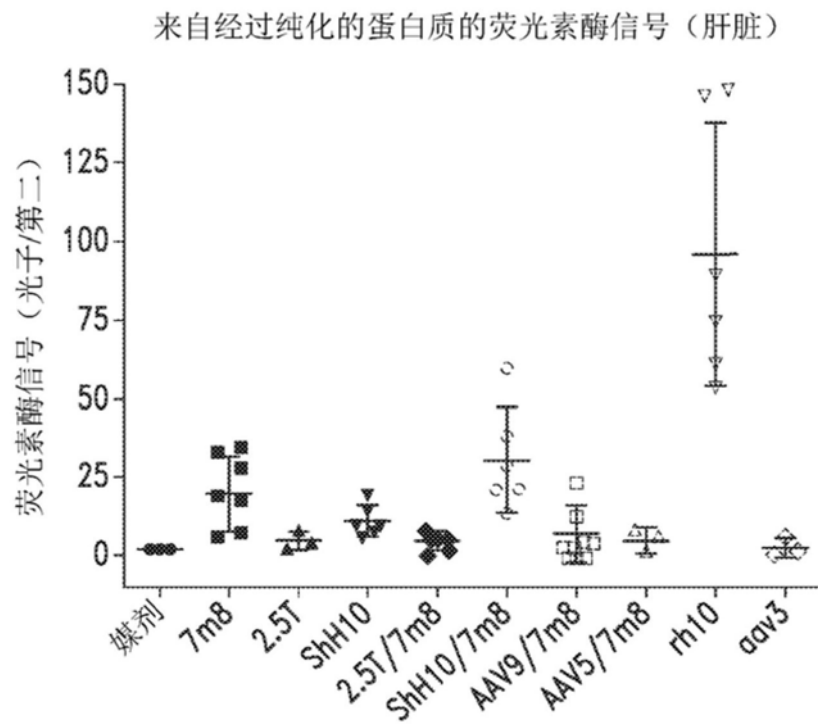


图20C

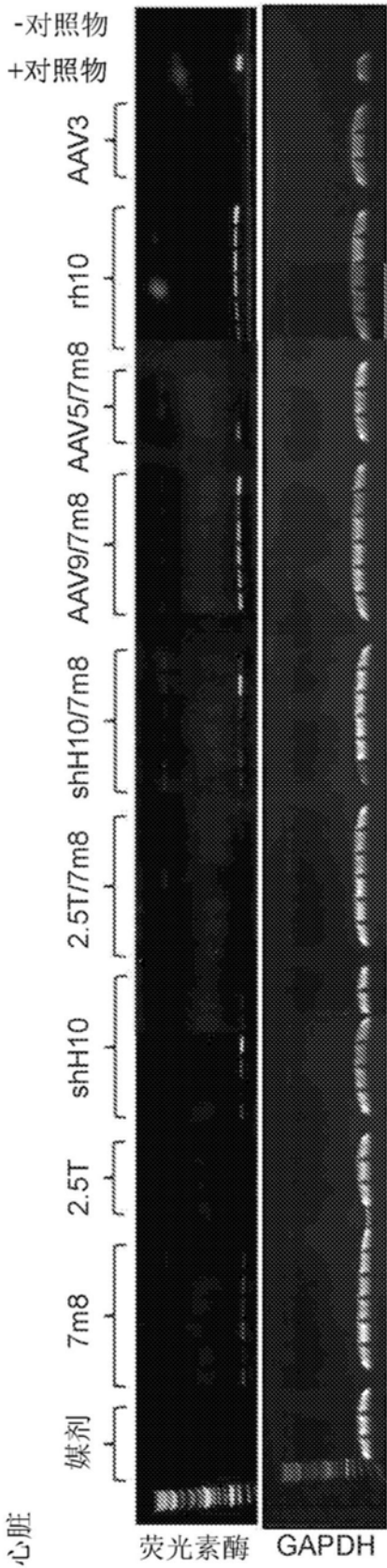


图21A

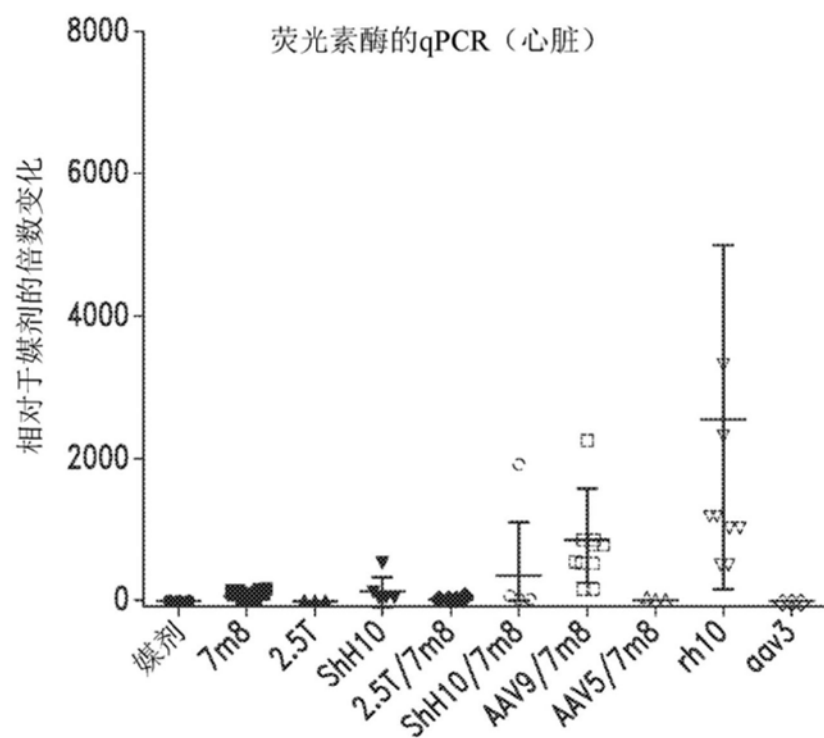


图21B

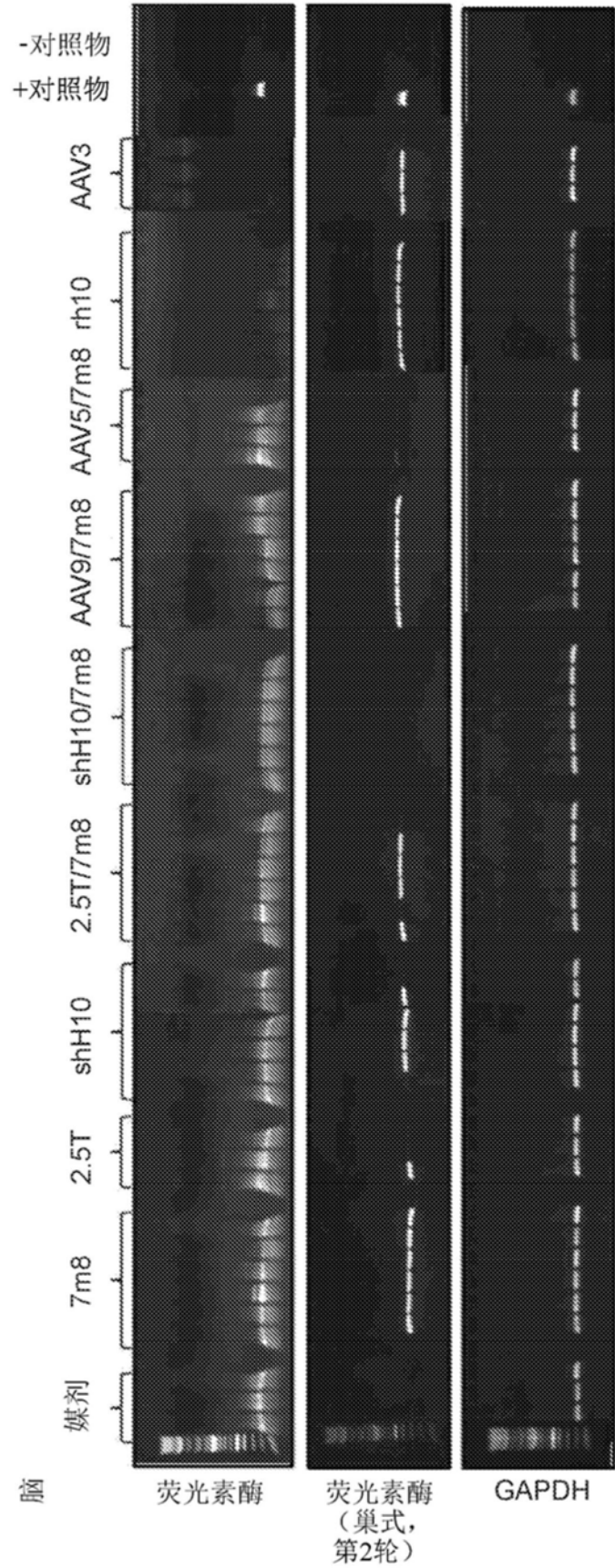


图22A

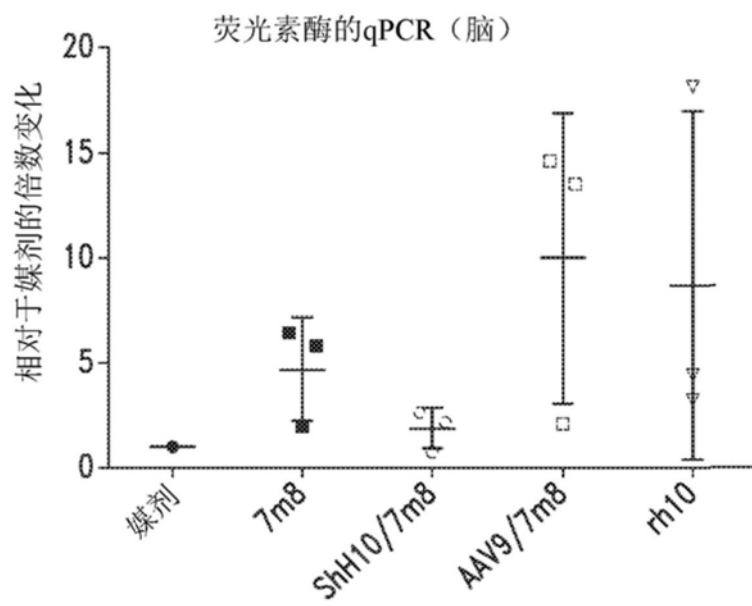


图22B