



(10) 授权公告号 CN 113766934 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 08

(21) 申请号 202080031274.0

(22) 申请日 2020.04.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113766934 A

(43) 申请公布日 2021.12.07

(30) 优先权数据
62/839,548 2019.04.26 US
62/923,924 2019.10.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/029895 2020.04.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/219933 EN 2020.10.29

(73) 专利权人 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 A·凯拉瓦拉 D·塞佩达
M·盖斯米

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 陈文平 刘盈盈

(51) Int.Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2018075798 A1, 2018.04.26
W0 2017197355 A2, 2017.11.16
审查员 胡百灵

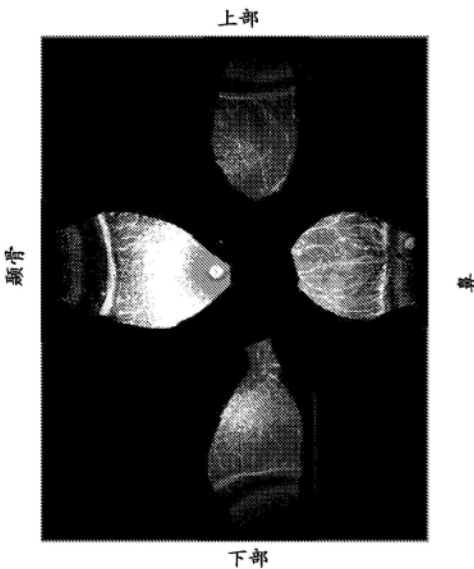
权利要求书3页 说明书42页
序列表19页 附图41页

(54) 发明名称

用于玻璃体内递送的变体AAV衣壳

(57) 摘要

提供了变体腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白和具有一个或多个变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子。还提供了使用重组AAV病毒粒子诸如用于治疗或预防疾病或病症的组合物和方法。



1. 一种重组腺相关病毒 (AAV) 病毒粒子, 其包含:
 - (a) 变体 AAV 衣壳蛋白, 其包含相对于亲本 AAV 衣壳蛋白在氨基酸残基 571-580 处被置换的修饰的序列, 其中所述修饰的序列为 LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3), 其中所述亲本 AAV 衣壳蛋白是氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5 的 AAV2.5T VP1 衣壳蛋白; 和
 - (b) 编码治疗性基因产物的多核苷酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述变体 AAV 衣壳蛋白包含 SEQ ID NO: 7 所示的 VP1 衣壳序列。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述 rAAV 病毒粒子是变体 AAV2.5T 病毒粒子。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述重组 AAV 病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导视网膜的细胞。
5. 根据权利要求 4 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述重组 AAV 病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导以下一者或多者: 光感受器、视网膜神经节细胞、Müller 细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞和视网膜色素上皮细胞。
6. 根据权利要求 4 或权利要求 5 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述重组 AAV 病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导视网膜色素上皮细胞。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述治疗性基因产物是 siRNA、miRNA 或蛋白。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子 (抗 VEGF) 基因产物。
9. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述治疗性基因产物是视蛋白 (opsin)。
10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中编码所述治疗性基因产物的多核苷酸的侧翼是一个或多个 AAV ITR。
11. 根据权利要求 10 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述一个或多个 AAV ITR 是 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、或 AAV10 ITR 或其变体。
12. 根据权利要求 10 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述一个或多个 AAV ITR 是灵长类 AAV、或非灵长类 AAV ITR 或其变体。
13. 根据权利要求 10 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述一个或多个 AAV ITR 是禽类 AAV ITR 或其变体。
14. 根据权利要求 10 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述一个或多个 AAV ITR 是牛 AAV、犬 AAV、马 AAV、或绵羊 AAV ITR 或其变体。
15. 根据权利要求 10 所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述一个或多个 AAV ITR 是 AAV2 ITR 或 AAV5 ITR。
16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子, 其中所述重组 AAV 病毒粒子与 AAV2.5T 相比具有改变的细胞趋向性。
17. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-16 中任一项所述的重组 AAV 病毒粒子。
18. 一种用于生产重组 rAAV 病毒粒子的方法, 其包括:
 - (a) 在产生重组 rAAV 病毒粒子的条件下培养宿主细胞, 其中所述宿主细胞包含:

(i) 多核苷酸,其编码包含相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基571-580处被置换的修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白,其中所述修饰的序列为LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3),其中所述亲本AAV衣壳蛋白是氨基酸序列为SEQ ID NO:5的AAV2.5T VP1衣壳蛋白;

(ii) 编码rep蛋白的多核苷酸;

(iii) 多核苷酸表达盒,所述多核苷酸表达盒包含侧翼为至少一个AAV ITR的编码治疗性基因产物的序列;和

(iv) AAV辅助功能;和

(b) 回收由所述宿主细胞产生的所述重组rAAV病毒粒子。

19. 权利要求1-16中任一项所述的重组AAV病毒粒子或权利要求17所述的药物组合物在制备用于向受试者的视网膜提供治疗性基因产物的玻璃体内注射用药物中的用途。

20. 权利要求1-16中任一项所述的重组AAV病毒粒子或权利要求17所述的药物组合物在制备用于治疗有需要的受试者的视网膜疾病或病症的玻璃体内注射用药物中的用途。

21. 根据权利要求1-16中任一项所述的重组AAV病毒粒子在制备用于治疗受试者的视网膜疾病或病症的药物中的用途。

22. 一种变体AAV衣壳蛋白,其包含相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基571-580处被置换的修饰的序列,其中所述修饰的序列为LAHKFKSGDA (SEQ ID NO: 3),其中所述亲本AAV衣壳蛋白是氨基酸序列为SEQ ID NO:5的AAV2.5T VP1衣壳蛋白。

23. 根据权利要求22所述的变体AAV衣壳蛋白,其包含SEQ ID NO:7所示的VP1衣壳序列。

24. 一种核酸,其包含编码权利要求22或23所述的变体AAV衣壳蛋白的核酸序列。

25. 一种包含权利要求24所述的核酸的表达载体,其中编码所述变体AAV衣壳蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子序列。

26. 根据权利要求25所述的表达载体,其进一步包含编码rep蛋白的核酸。

27. 一种细胞,其包含权利要求25或权利要求26所述的表达载体。

28. 根据权利要求27所述的细胞,其进一步包含编码治疗性基因产物的核酸。

29. 根据权利要求28所述的细胞,其中所述治疗性基因产物是siRNA、miRNA或蛋白。

30. 根据权利要求28或权利要求29所述的细胞,其中所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)基因产物。

31. 根据权利要求28或权利要求29所述的细胞,其中治疗性基因产物是视蛋白。

32. 根据权利要求28-31中任一项所述的细胞,其中编码所述治疗性基因产物的多核苷酸的侧翼是一个或多个AAV ITR。

33. 根据权利要求32所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、或AAV10 ITR或其变体。

34. 根据权利要求32所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是灵长类AAV、或非灵长类AAV ITR或其变体。

35. 根据权利要求32所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是禽类AAV ITR或其变体。

36. 根据权利要求32所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是牛AAV、犬AAV、马AAV、或绵羊AAV ITR或其变体。

37. 根据权利要求32所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是AAV2 ITR或AAV5 ITR。

用于玻璃体内递送的变体AAV衣壳

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年04月26日提交的美国临时申请62/839,548和2019年10月21日提交的美国临时申请62/923,924的权益,所述美国临时申请的全部内容各自通过引用并入本文中。

[0003] 以ASCII文本文件提交的序列列表

[0004] 以下以ASCII文本文件提交的全部内容通过引用并入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:627002001140SEQLIST.TXT,记录日期:2020年04月21日,大小:49KB)。

背景技术

[0005] 一种有希望治疗和预防遗传以及其他疾病和病症的方法是递送具有如病毒粒子等基因治疗载体的治疗剂。适于基因治疗的病毒粒子的说明性实例包括但不限于逆转录病毒粒子、慢病毒粒子、腺病毒粒子、疱疹病毒粒子、甲病毒粒子和腺相关病毒(AAV)离子。AAV是一种4.7kb的单链DNA病毒。基于AAV的重组病毒粒子(rAAV病毒粒子)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提供了在包括眼睛、肌肉、肺和脑在内的很多组织中进行非常高效的基因递送和持续转基因表达的能力。

[0006] 在设计用于基因治疗的病毒粒子方面仍然存在某些挑战,包括优化病毒细胞趋向性,尤其是在眼的基因治疗方面,优化向视网膜的递送。因此,需要优化病毒粒子以在选定的哺乳动物细胞中表达基因。本发明通过提供有利于将重组AAV病毒粒子递送至所需细胞和组织的修饰的AAV衣壳蛋白解决了这一需求。

发明内容

[0007] 本文提供了重组腺相关病毒(AAV)病毒粒子,其包含:(a)包含修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含HKFKSGD(SEQ ID NO:1),并且其中所述氨基酸残基编号对应于AAV5 VP1衣壳蛋白;和(b)编码治疗性基因产物的多核苷酸序列。

[0008] 在一些实施方式中,所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白或AAV5和AAV2杂合衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白。

[0009] 在一些实施方式中,所述修饰的序列包含LAHKFKSGDA(SEQ ID NO:3)。在一些实施方式中,所述变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少85%同源性的衣壳序列。在一些实施方式中,所述变体AAV衣壳蛋白包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的衣壳序列。

[0010] 在一些实施方式中,所述rAAV病毒粒子是变体AAV5或变体AAV2和AAV5杂合病毒粒子。在一些实施方式中,所述rAAV病毒粒子是变体AAV2.5T病毒粒子。

[0011] 在一些实施方式中,所述重组AAV病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中能

够转导视网膜的细胞。在一些实施方式中,所述重组AAV病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导以下一者或多者:光感受器、视网膜神经节细胞、Müller细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞和视网膜色素上皮细胞。在一些实施方式中,所述重组AAV病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导视网膜色素上皮细胞。

[0012] 在一些实施方式中,所述治疗性基因产物是siRNA、miRNA或蛋白。在一些实施方式中,所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)基因产物。在一些实施方式中,所述治疗性基因产物是视蛋白(opsin)。

[0013] 在一些实施方式中,编码所述治疗性基因产物的多核苷酸的侧翼是一个或多个AAV ITR。在一些实施方式中,所述一个或多个AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、或绵羊AAV ITR或其变体。在一些实施方式中,所述一个或多个AAV ITR是AAV2 ITR或AAV5 ITR。

[0014] 在一些实施方式中,所述重组AAV病毒粒子与AAV2.5T相比具有改变的细胞趋向性。

[0015] 在一些实施方式中,本文公开的重组AAV病毒粒子是用于治疗有需要的受试者的视网膜疾病或病症的方法,其中所述方法包括通过玻璃体内注射向受试者施用包含重组AAV病毒粒子的药物组合物。在一些实施方式中,本文公开的重组AAV病毒粒子用于制备治疗受试者视网膜疾病或病症的药物。在一些实施方式中,所述疾病或病症是年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、视网膜新生血管生成、脉络膜新生血管生成、糖尿病性视网膜病变、增殖性糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、分支性视网膜静脉阻塞、糖尿病黄斑水肿、糖尿病视网膜缺血、缺血性视网膜病变或糖尿病性视网膜水肿。

[0016] 本文还提供了药物组合物,其包含本文公开的重组AAV病毒粒子。

[0017] 本文还提供了用于生产rAAV病毒粒子的方法,其包括:(a)在产生rAAV病毒粒子的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含:(i)编码包含修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白的多核苷酸,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含HKFKSGD(SEQ ID NO:1);(ii)编码rep蛋白的多核苷酸;(iii)多核苷酸表达盒,所述多核苷酸表达盒包含侧翼为至少一个AAV ITR的编码治疗性基因产物的序列;和(iv)AAV辅助功能;和(b)回收由所述宿主细胞产生的所述rAAV病毒粒子。

[0018] 本文还提供了向受试者的视网膜提供治疗性基因产物的方法,其包括通过玻璃体内注射向所述受试者施用本文公开的重组AAV病毒粒子或者本文公开的药物组合物。

[0019] 在一些实施方式中,所述受试者已被诊断为或疑似具有选自以下的一种或多种病况:急性黄斑神经视网膜病变、白塞氏病、脉络膜新生血管形成、糖尿病性葡萄膜炎、组织胞浆菌病、黄斑变性、水肿、多灶性脉络膜炎、影响眼后部部位或位置的眼外伤、眼肿瘤、视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎、Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征、葡萄膜扩散、眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况、由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况、光凝、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、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变、非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍、视网膜劈裂症、视网膜色素变性、青光眼、Usher综合征、锥杆营养不良、Stargardt病、遗传性黄斑变性、脉络膜视网膜变性、Leber先天性黑蒙、先天性静止性夜盲、脉络膜血症、Bardet-Biedl综合征、黄斑毛细血管扩张症、Leber遗传性视神经病变、早产儿视网膜病变和色觉障碍。

[0020] 本文还提供了治疗有需要的受试者的视网膜疾病或病症的方法,其包括通过玻璃体内注射向所述受试者施用本文公开的重组AAV病毒粒子或者本文公开的药物组合物。

[0021] 在一些实施方式中,所述疾病或病症是急性黄斑神经视网膜病变、白塞氏病、脉络膜新生血管形成、糖尿病性葡萄膜炎、组织胞浆菌病、黄斑变性、水肿、多灶性脉络膜炎、影响眼后部部位或位置的眼外伤、眼肿瘤、视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎、Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征、葡萄膜扩散、眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况、由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况、光凝、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、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变、非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍、视网膜劈裂症、视网膜色素变性、青光眼、Usher综合征、锥杆营养不良、Stargardt病、遗传性黄斑变性、脉络膜视网膜变性、Leber先天性黑蒙、先天性静止性夜盲、脉络膜血症、Bardet-Biedl综合征、黄斑毛细血管扩张症、Leber遗传性视神经病变、早产儿视网膜病变或色觉障碍。

[0022] 本文还提供了包含修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含HKFKSGD (SEQ ID NO:1),并且其中所述氨基酸残基编号对应于AAV5 VP1衣壳蛋白。

[0023] 在一些实施方式中,所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白或AAV5和AAV2杂合衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白。

[0024] 在一些实施方式中,所述修饰的AAV衣壳蛋白相对于所述亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579包含LAHKFKSGDA (SEQ ID NO:3)。在一些实施方式中,所述变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少85%同源性的衣壳序列。在一些实施方式中,所述变体AAV衣壳蛋白包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的衣壳序列。

[0025] 本文还提供了核酸,其包含编码本文公开的变体AAV衣壳蛋白的核酸序列。

[0026] 本文还提供了包含本文公开的核酸的表达载体,其中编码所述变体AAV衣壳蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子序列。在一些实施方式中,所述表达载体进一步包含编码rep蛋白的核酸。

[0027] 本文还提供了包含本文公开的表达载体的细胞。在一些实施方式中,所述细胞进一步包含编码治疗性基因产物的核酸。在一些实施方式中,所述治疗性基因产物是siRNA、miRNA或蛋白。在一些实施方式中,所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)基因产物。在一些实施方式中,所述治疗剂是视蛋白。

[0028] 在一些实施方式中,编码所述治疗性基因产物的所述多核苷酸的侧翼是一个或多个AAV ITR。在一些实施方式中,所述一个或多个AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、或

绵羊AAV ITR或其变体。在一些实施方式中,所述一个或多个AAV ITR是AAV2 ITR或AAV5 ITR。

[0029] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请书和出版物的全部内容各自通过引用并入。

附图说明

[0030] 图1A显示了视网膜和同心样品穿孔位置的示意图。穿孔1包含黄斑(小圆形凹痕);穿孔2包含中央凹;剩余组织包含周边视网膜,包括血拱(blood arcade)。

[0031] 图1B-1E显示了在选择过程不同阶段的衣壳变体的相对丰度。图1B显示了原始文库中前100个变体的百分比;图1C显示了第二轮筛选中在旁中央凹、黄斑或周边视网膜区域中识别出的前100个变体的百分比。图1D显示了前50个进化变体的百分比,其成功地转导了来源于副中央凹的第二轮文库中的副中央凹和RPE细胞。图1E显示了成功转导来源于副中央凹的第二轮文库中的黄斑+周边细胞的前50个进化变体的百分比。

[0032] 图2显示了来自AAV2.5T和变异衣壳AAV2.5T.LSV1的肝素柱级分的斑点印迹结果。洗脱液E1至E10的NaCl浓度逐渐增加,分别为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)。

[0033] 图3显示了使用 2×10^{10} vg(即, 2×10^{10} vg)或 4×10^{10} vg(即, 4×10^{10} vg)编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子感染后在第7天或第14天在6mm猪视网膜外植体中GFP表达的实时图像。

[0034] 图4A-4C提供了在玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后在第14天(图4A)、第21天(图4B)和第28天(图4C)的非洲绿猴视网膜的OTC自发荧光图像,显示中央凹和血拱内GFP的表达。

[0035] 图4D-4E提供了在玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后在第28天非洲绿猴左侧(图4D)和右侧(图4E)视网膜的海德堡光谱图像,显示中央凹和血拱内GFP的表达。

[0036] 图5A-5B玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴平置(flat-mounted)视网膜的荧光图像。

[0037] 图5C-5D提供了在玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴的平置视网膜荧光图像,左眼(图5C)和右眼(图5D)。

[0038] 图5E提供了在图5C-5D中所示眼的黄斑到睫状体的距离上绘制的GFP强度分布图。视网膜区域位置是根据与中央凹中心相关的平均距离计算的。

[0039] 图6A-6C提供了在玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的中央凹至睫状体荧光图像。图6A显示了GFP表达。图6B显示了细胞核的DAPI染色。图6C是图6A和图6B的合成图。

[0040] 图7提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的中央凹中表达的GFP的荧光图像。

[0041] 图8提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的中央凹中表达的GFP的荧光图像。

[0042] 图9A-9D提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的

中央凹的荧光图像。图9A显示了图9B-9D的合成图。图9B显示了细胞核的DAPI染色。图9C显示了GFP表达。图9D显示了视杆细胞的视紫红质抗体标记。

[0043] 图10A-10D提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的中央凹的荧光图像。图10A显示了图10B-10D的合成图。图10B显示了细胞核的DAPI染色。图10C显示了GFP表达。图10D显示了Müller细胞的谷氨酰胺合成酶抗体标记。

[0044] 图11提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜中表达的GFP的荧光图像。

[0045] 图12A-12C提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图12A是图12B和图12C的合成图。图12B显示了细胞核的DAPI染色。图12C显示了GFP表达。

[0046] 图13A-13D提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图13A显示了图13B-13D的合成图。图13B显示了细胞核的DAPI染色。图13C显示了GFP表达。图13D显示了Müller细胞的谷氨酰胺合成酶抗体标记。

[0047] 图14A-14D提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图14A显示了图14B-14D的合成图。图14B显示了细胞核的DAPI染色。图14C显示了GFP表达。图14D显示了Müller细胞的谷氨酰胺合成酶抗体标记。

[0048] 图15A-15D提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图15A显示了图15B-15D的合成图。图15B显示了细胞核的DAPI染色。图15C显示了GFP表达。图15D显示了Müller细胞的谷氨酰胺合成酶抗体标记。

[0049] 图16A-16E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图16A显示了图16B-16E的合成图。图16B显示了细胞核的DAPI染色。图16C显示了GFP表达。图16D显示了双极细胞的PCK α 抗体标记。图16E显示了视网膜神经节轴突末端通路的TUJ-1抗体标记。

[0050] 图17A-17D提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图17A显示了图17B-17D的合成图。图17B显示了细胞核的DAPI染色。图17C显示了GFP表达。图17D显示了双极细胞的PCK α 抗体标记。

[0051] 图18A-18E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图18A显示了图18B-18E的合成图。图18B显示了细胞核的DAPI染色。图18C显示了GFP表达。图18D显示了视锥细胞的锥体抑制蛋白抗体标记。图18E显示了视杆细胞的视紫红质抗体标记。

[0052] 图19A-19E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图19A显示了图19B-19E的合成图。图19B显示了细胞核的DAPI染色。图19C显示了GFP表达。图19D显示了视锥细胞的锥体抑制蛋白抗体标记。图19E显示了视杆细胞的视紫红质抗体标记。

[0053] 图20A-20E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的荧光图像。图20A显示了图20B-20E的合成图。图20B显示了细胞核的DAPI染色。图20C显示了GFP表达。图20D显示了视锥细胞的锥体抑制蛋白抗体标记。图20E显示了视杆细胞的视紫红质抗体标记。

[0054] 图21A-21E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼

的视网膜色素上皮 (RPE) 的荧光图像。图21A显示了图21B-21E的合成图。图21B显示了细胞核的DAPI染色。图21C显示了无抗体标记的天然GFP表达。图21D显示了视锥细胞的RPE65抗体标记。图21E显示了在647nm处的GFP表达。

[0055] 图22A-22E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜色素上皮 (RPE) 的荧光图像。图22A显示了图22B-22E的合成图。图22B显示了细胞核的DAPI染色。图22C显示了无抗体标记的天然GFP表达。图22D显示了视锥细胞的RPE65抗体标记。图22E显示了在647nm处的GFP表达。

[0056] 图23A-23E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜色素上皮 (RPE) 的平面荧光图像。图23A显示了图23B-23E的合成图。图23B显示了细胞核的DAPI染色。图23C显示了无抗体标记的天然GFP表达。图23D显示了视锥细胞的RPE65抗体标记。图23E显示了在647nm处的GFP表达。

[0057] 图24A-24E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜色素上皮 (RPE) 的平面荧光图像。图24A显示了图24B-24E的合成图。图24B显示了细胞核的DAPI染色。图24C显示了无抗体标记的天然GFP表达。图24D显示了视锥细胞的RPE65抗体标记。图24E显示了在647nm处的GFP表达。

[0058] 图25A-25E提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜色素上皮 (RPE) 的平面荧光图像。图25A显示了图25B-25E的合成图。图25B显示了细胞核的DAPI染色。图25C显示了无抗体标记的天然GFP表达。图25D显示了视锥细胞的RPE65抗体标记。图25E显示了在647nm处的GFP表达。

[0059] 图26A-26C提供了玻璃体内施用编码GFP的AAV2.5T.LSV1病毒粒子后非洲绿猴眼的视网膜的各个区域中GFP阳性双极细胞 (图26A)、视锥细胞 (图26B) 和RPE细胞 (图26C) 的平均百分比。

[0060] 图27A-27B提供了针对AAV2.5T.LSV1和AAV2的中和抗体 (nAB) 曲线。合并的人IgG抗体 (Gammagard IVIG) 与AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP或AAV2-CMV-GFP组合。293T细胞用混合物转导并在测量GFP表达之前孵育3天。图27A显示了针对AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP的IVIG中和抗体曲线 (针对每个稀释度N=3)。图27B显示了针对AAV2-CMV-GFP的IVIG中和抗体曲线 (针对每个稀释度N=2或3)。

具体实施方式

[0061] 本公开内容提供了变体AAV衣壳蛋白以及具有一个或多个变体AAV衣壳蛋白的重组腺相关病毒 (AAV) 病毒粒子。在一些实施方式中,与包含其天然、野生型和/或亲本衣壳蛋白而非本文公开的修饰的衣壳蛋白的相应病毒载体相比,重组AAV病毒粒子显示出一种或多种以下性质:1) 视网膜细胞的感染性增加;2) 趋向性改变;3) 与肝素和/或硫酸乙酰肝素蛋白多糖和/或内限膜 (ILM) 的结合增加;和4) 当玻璃体内施用时,感染和/或递送治疗性基因产物穿过ILM的能力增加。还提供了使用本文公开的任何组合物在个体的细胞 (例如,视网膜细胞) 中促进治疗性基因产物的表达例如以治疗或预防疾病或病症的组合物和方法。

[0062] I. 定义

[0063] 除非另有定义,否则本申请所使用的所有技术术语具有与本领域普通技术人员通

常理解的含义相同的含义。

[0064] 本申请所使用的术语仅用于描述特定情况的目的并且并非旨在是限制性的。如在本申请中所使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式的“一个/一种(a/an)”和“所述/该(the)”还旨在包括复数形式。此外,对于在详细说明书和/或权利要求书中使用术语“包括(including/includes)”、“具有(having/has)”、“有(with)”或其变体的程度,这样的术语旨在以与术语“包含(comprising)”类似的方式是包含性的(inclusive)。如本申请所使用的术语“包含(comprising)”与“包括(including)”或“含有(containing)”同义,并且是包含性的或开放式的。

[0065] 除非另有说明,否则本申请中对“或”的任何提及旨在涵盖“和/或”。

[0066] 此处对“约”值或参数的引用包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0067] 在本发明的一些实施方式中,“个体”或“受试者”指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如,奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如,人和非人类灵长类动物,如猴)、家兔和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方式中,个体或受试者是人。

[0068] 如在本申请中所使用的,术语“处理/治疗(treat/treating/treatment)”、“改善(ameliorate/ameliorating)”以及其他语法等同物指减轻、减少或改善眼部疾病或病症或眼部疾病或病症的症状,预防眼部疾病或病症另外的症状,改善症状的潜在代谢原因,抑制眼部疾病或病症,例如阻止眼部疾病或病症的发展、缓解眼部疾病或病症、引起眼部疾病或病症的消退,或停止眼部疾病或病症的症状。该术语还包括实现治疗性益处。术语“治疗性益处”是指根除或改善所治疗的眼部疾病或病症。此外,治疗性益处通过根除或改善与眼部疾病或病症相关的一种或多种生理症状而实现,使得在患者、受试者或个体中观察到改善,尽管在一些实施方式中,患者、受试者或个体仍患有该眼部疾病或病症。

[0069] 在一些实施方式中,本发明的方法提供了预防性益处;例如,向处于发生眼部疾病或病症的风险的患者、受试者或个体或者向报告眼部疾病或病症的一种或多种生理症状的患者、受试者或个体施用药物组合物,即使尚未做出对该疾病或病症的诊断。

[0070] 术语“施用(administer/administering/administration)”等,如在本申请中所使用的,可以指用于使得能够将治疗或药物组合物递送至生物作用的期望部位的方法。这些方法包括向眼部玻璃体内或视网膜下注射。

[0071] 术语“有效量”、“治疗有效量”或“药学上的有效量”,如在本申请中所使用的,可以指所施用的足量的至少一种药物组合物或化合物,其将在某种程度上缓解所治疗的眼部疾病或病症的一种或多种症状。药物组合物的“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”可以作为单位剂量(如本文别处进一步详细描述)给予有需要的受试者。

[0072] 术语“药学上可接受的”,如在本申请中所使用的,可以指物质,如载体或稀释剂,其不消除本申请所公开的化合物的生物活性或性质,并且是相对无毒的(即,当向个体施用该物质时,其既不引起不期望的生物学效应,也不以有害的方式与含有其的组合物中的任何组分发生相互作用)。

[0073] 术语“药物组合物”,如在本申请中所使用的,可以指生物活性化合物,其任选地与至少一种药学上可接受的化学成分(例如,但不限于载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、混悬剂、增稠剂、赋形剂等)混合。

[0074] 如在本申请中所使用的,“AAV”载体或“rAAV载体”指腺相关病毒(AAV)载体或重组AAV(rAAV)载体,其包含非AAV来源的多核苷酸序列(即,与AAV异源的多核苷酸,如编码治疗性转基因(例如,阿柏西普)的核酸序列)用于转导进入靶细胞或靶组织。通常,异源多核苷酸的侧翼是至少一个,通常是两个AAV反向末端重复序列(ITR)。术语rAAV载体包括rAAV载体颗粒和rAAV载体质粒两者。rAAV载体可以是单链的(ssAAV)或自身互补的(scAAV)。

[0075] “AAV病毒”或“AAV病毒颗粒”或“rAAV载体颗粒”或“rAAV颗粒”或“重组AAV病毒颗粒”指包含至少一种AAV衣壳蛋白和多核苷酸rAAV载体的病毒颗粒。如果颗粒包含异源多核苷酸(即,野生型AAV基因组之外的多核苷酸,如待向靶细胞或靶组织递送的转基因),则其通常称为“rAAV载体颗粒”或简称为“rAAV载体”。

[0076] 术语“包装”如在本申请中所使用的可以指一系列细胞内事件,其可导致rAAV颗粒的组装和衣壳化。

[0077] AAV“rep”和“cap”基因指编码腺相关病毒的复制和衣壳化蛋白的多核苷酸序列。AAV rep和cap在本申请中称为AAV“包装基因”。

[0078] 术语“多肽”或“蛋白”可以互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性或支链的,其可以包含修饰的氨基酸,并且其可以被非氨基酸中断。该术语还包括经过天然或经干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记成分或毒素缀合。定义中还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)的多肽,以及本领域公知的其他修饰。

[0079] 术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式,包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和核苷酸类似物,并且可以被非核苷酸成分中断。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。如本文所用,术语多核苷酸可以指双链或单链分子。

[0080] 如本文所用,“重组体”可以指生物分子,例如基因或蛋白,其(1)已从其天然存在的环境中移除,(2)不与在自然界中所述基因在其中被发现的多核苷酸的全部或部分相关联,(3)与其在自然界中不与之连接的多核苷酸可操作地连接,或者(4)在自然界中不存在。术语“重组体”可以用于指克隆的DNA分离物,化学合成的多核苷酸类似物,或由异源系统生物合成的多核苷酸类似物,以及由这样的核酸编码的蛋白和/或mRNA。因此,例如,由微生物合成的蛋白是重组的,例如,如果其是由细胞中存在的重组基因合成的mRNA合成的。

[0081] 术语“抗VEGF基因产物”包括任何治疗剂,包括蛋白、多肽、肽、融合蛋白、多聚体蛋白、抗体、人单克隆抗体、抗体片段、适体、激酶抑制剂、受体或受体片段、或核酸分子,其可以减少、干扰、破坏、阻断和/或抑制内源性VEGF和/或内源性VEGF受体(VEGFR)的活性或功能,或体内VEGF-VEGFR相互作用或通路。抗VEGF基因产物可以是任何一种已知的治疗性基因产物,其在体内递送至细胞、组织或受试者时可减少新血管生长或形成和/或水肿或肿胀,如雷珠单抗、布罗珠单抗或贝伐单抗。在一些实施方式中,抗VEGF基因产物可以是天然存在的、非天然存在的或合成的。在一些实施方式中,抗VEGF基因产物可以源自天然存在的分子,该分子随后被修饰或突变以赋予抗VEGF活性。在一些实施方式中,抗VEGF基因产物是融合蛋白或嵌合蛋白。在此类蛋白中,功能性结构域或多肽被人工融合至部分或多肽以制备可在体内隔离VEGF或充当VEGFR诱饵的融合蛋白或嵌合蛋白。在一些实施方式中,抗VEGF基因产物是一种融合蛋白或嵌合蛋白,可阻止内源性VEGFR与其配体相互作用。

[0082] 如本文所用,“VEGF”可以指VEGF或VEGF家族成员的任何同种型,除非另有要求,包括但不限于VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F、胎盘生长因子(PGF)或其任何组合,或任何功能片段或变体。如本文所用,“VEGF受体”或“VEGFR”或“VEGF-R”可用于指任何一种VEGF受体,包括但不限于VEGFR-1(或Flt-1)、VEGFR-2(或Flk-1/KDR)和VEGFR-3(或Flt-4)。VEGFR可以是膜结合或可溶形式,或者受体的功能片段或截短。

[0083] 如本文所用,“sFlt-1蛋白”是指与天然存在的人sFLT-1序列具有至少90%或更多同源性的多肽序列或其功能片段,使得sFlt-1蛋白或多肽结合至VEGF和/或VEGF受体,除非另有明确说明。同源性是指两条序列之间比对的残基保守%。天然存在的人sFLT-1蛋白可以包括sFLT-1的任何适宜的变体,包括但不限于功能性片段、包含插入、缺失、置换、假片段、假基因、剪接变体或人工优化序列的序列。

[0084] “可操作地连接的(operatively linked/operably linked)”或“缀合的(coupled)”可以指遗传元件的并置,其中所述元件处于允许其以预期的方式操作的关系中。例如,如果启动子有助于启动编码序列的转录,则启动子可以与编码区可操作地连接。在启动子与编码区之间可以存在间插残基,只要其功能性关系保持即可。

[0085] 如本文所用,“表达载体”包括载体,例如,如上所述或本领域公知的质粒、小环、病毒载体、脂质体等,包含编码目标基因产物的多核苷酸,并用于在预期的靶细胞中实现基因产物的表达。表达载体还可包含与编码区有效连接的控制元件,以促进基因产物在靶点中的表达。控制元件的组合,例如,启动子、增强子、UTR、miRNA靶向序列等的组合,并且其可操作地连接以用于表达的一个或多个基因有时称为“表达盒”。很多这样的控制元件在本领域中是公知的和可用的,或者可以容易地由本领域中可用的组件构成。

[0086] “基因产物”是由特定基因表达产生的分子。基因产物包括例如多肽、适体、干扰RNA、mRNA等。在特定实施方式中,“基因产物”是多肽、肽、蛋白或包括小干扰RNA(siRNA)在内的干扰RNA、miRNA或小发夹RNA(shRNA)。在特定实施方式中,基因产物是治疗性基因产物,例如,治疗性蛋白。

[0087] 术语“异源的”可以指遗传型不同于与之比较的其余实体的实体。例如,通过基因工程技术引入到来自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸可以是异源多核苷酸。从其天然编码序列中移除并与未天然发现其与之连接的编码序列可操作地连接的启动子可以是异源启动子。

[0088] 除非另有说明,否则本文所述的方法、组合物和试剂盒可以采用分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学、免疫化学和眼科技术的常规技术和描述,其在本领域技术人员的技能范围内。此类常规技术包括观察和分析受试者的视网膜或视力、重组病毒的克隆和繁殖、药物组合物的制剂以及生物化学纯化和免疫化学的方法。适宜技术的具体说明可以参考本文的实施例。然而,当然也可以使用等效的常规程序。此类常规技术和描述可以在标准实验室手册中找到,如Green等编著,Genome Analysis:A Laboratory Manual Series(Vols.I-IV)(1999);Weiner等编著,Genetic Variation:A Laboratory Manual(2007);Dieffenbach,Dveksler编著,PCR Primer:A Laboratory Manual(2003);Bowtell和Sambrook,DNA Microarrays:A Molecular Cloning Manual(2003);Mount,Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis(2004);Sambrook和Russell,Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2006);以及Sambrook和

Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002) (均来自 Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L., Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); Nelson 和 Cox, Lehninger, Principles of Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2000); 以及 Berg 等, Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002), 出于所有目的, 所有这些都通过引用整体并入本文。

[0089] 如本文所用, “变体 AAV 衣壳蛋白” 指 AAV 衣壳蛋白, 其中 AAV 衣壳蛋白相对于相应的亲本 AAV 包含至少一个氨基酸差异 (例如, 氨基酸置换、氨基酸插入、氨基酸缺失) 的衣壳蛋白, 其中 AAV 衣壳蛋白不对应于天然存在的 AAV 衣壳蛋白中存在的氨基酸序列。在一些实施方式中, 与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒粒子的结合相比, 变体 AAV 衣壳蛋白赋予了与肝素和/或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖增加的结合。在某些实施方式中, 变体 AAV 衣壳蛋白赋予以下: a) 与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比, 视网膜细胞的感染性增加; b) 与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒粒子的趋向性相比, 细胞趋向性改变; 和/或 c) 与包含相应亲本 AAV 衣壳蛋白的 AAV 病毒粒子相比, 结合和/或穿过 ILM 的能力增加。

[0090] 如本文所用, “修饰的序列” 指与亲本 AAV 或亲本 AAV 衣壳蛋白的相应序列相比包含一个或多个置换、插入和/或缺失的序列。

[0091] 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 等保藏机构获得。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 等保藏机构获得。

[0092] “一种或多种辅助功能”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他要求)。如本文所描述的, “辅助功能”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。

[0093] “感染性”病毒粒子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趋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他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公知的。参见例如, Grainger 等, (2005) Mol. Ther. 11: S337 (描述了 TCID₅₀ 感染性滴度测定); 和 Zolotukhin 等, (1999) Gene Ther. 6: 973。

[0094] II. 变体 AAV 衣壳蛋白

[0095] 本文提供了变体腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白。在一些实施方式中, 本文公开的变体 AAV 衣壳蛋白包含修饰的序列, 所述修饰的序列相对于亲本 AAV 衣壳蛋白在氨基酸残基 570-579 内包含一个或多个氨基酸置换, 其中所述修饰的序列包含 HKFKSGD (SEQ ID NO: 1), 并且其中所述氨基酸残基编号对应于 AAV5 VP1 衣壳蛋白。在一些实施方式中, 变体 AAV 衣壳蛋白

包含修饰的序列,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含 $X_1X_2HKFKSGDX_3$ (SEQ ID NO:2),并且其中所述氨基酸残基编号对应于AAV5 VP1衣壳蛋白,其中 X_{1-3} 可以独立地是任何氨基酸。在一些实施方式中,每个 X_{1-3} 独立地选自A、L、G、S和T。在一些实施方式中,每个 X_{1-3} 独立地选自A、L、G、S和T。在一些实施方式中, X_1 是L。在一些实施方式中, X_2 是A。在一些实施方式中, X_3 是A。在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含修饰的序列,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含LAHKFKSGDA (SEQ ID NO:3),与SEQ ID NO:3具有至少80%或至少90%同源性的序列;与SEQ ID NO:3具有至少80%或至少90%同一性的序列;或者具有SEQ ID NO:3内四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个或者九个或更多个连续的氨基酸,并且其中所述氨基酸残基编码对应于AAV5 VP1衣壳蛋白。在一些实施方式中,修饰的序列包含LAHKFKSGDA (SEQ ID NO:3)。

[0096] 虽然本文参考了使用对应于AAV5 VP1衣壳蛋白的氨基酸编号的衣壳蛋白的氨基酸修饰(包括特定的氨基酸置换和插入),但应当理解,这些氨基酸修饰中的任何一个也可以被引入到其他血清型的AAV衣壳蛋白中,例如,在对应于AAV5 VP1的那些位置处。AAV蛋白序列具有显著的同源性和相似的氨基酸编号,并且技术人员可以容易地确定对应于本文针对AAV5 VP1具体描述的那些的其他AAV血清型中的氨基酸残基。

[0097] 在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是野生型AAV衣壳蛋白,例如AAV 1型(AAV1)、AAV 2型(AAV2)、AAV 3型(AAV3)、AAV 4型(AAV4)、AAV 5型(AAV5)、AAV 6型(AAV6)、AAV 7型(AAV7)、AAV 8型(AAV8)、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是VP1、VP2或VP3衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV5 VP1衣壳蛋白。

[0098] 在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是变体AAV衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV5 VP1衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是与SEQ ID NO:4具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的AAV5 VP1衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是与SEQ ID NO:4具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的AAV5 VP1衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是杂合衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2衣壳蛋白和AAV5衣壳蛋白的杂合。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T衣壳蛋白,或者与AAV2.5T衣壳蛋白具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的其变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV 2.5T衣壳蛋白,或者与AAV2.5T衣壳蛋白具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV 2.5T衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是VP1、VP2或VP3衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白,或者与AAV2.5T VP1衣壳蛋白 (SEQ ID NO:5) 具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的其变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白,或者与AAV2.5T VP1衣壳蛋白 (SEQ

ID N0:5) 具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其变体。

[0099] 在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:5所示的氨基酸序列具有至少85%同源性的衣壳序列。在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:5所示的氨基酸序列具有至少85%序列同一性的衣壳序列。在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID N0:6或SEQ ID N0:7所示的氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%同源性的衣壳蛋白。在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID N0:6或SEQ ID N0:7所示的氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的衣壳蛋白。在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含SEQ ID N0:6或SEQ ID N0:7。在一些实施方式中,变体AAV衣壳蛋白包含SEQ ID N0:7。

[0100] 在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,变体AAV衣壳蛋白当存在于重组AAV病毒粒子中时,赋予视网膜细胞增加的感染性。在特定实施方式中,与当通过玻璃体内注射施用包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染型相比,变体AAV衣壳蛋白当存在于重组AAV病毒粒子中时通过玻璃体内注射施用会增加视网膜细胞的感染性。在一些实施方式中,视网膜细胞是光感受器(例如,视杆细胞;视锥细胞)、视网膜神经节细胞(RGC)、视网膜色素上皮(RPE)细胞、Müller细胞、无长突细胞、双极细胞和水平细胞的一种或多种。在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子的趋向性相比,变体AAV衣壳蛋白当存在于重组AAV病毒粒子中时,赋予重组AAV病毒粒子改变的趋向性。在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子相比,变体AAV衣壳蛋白当存在于重组AAV病毒粒子中时在玻璃体内注射后赋予增加的与肝素和/或硫酸乙酰肝素的结合,和/或增加的结合和穿过内限界膜(ILM)的能力。

[0101] III. 多核苷酸和细胞

[0102] 本文还提供了编码一种或多种本文所述的变体AAV衣壳蛋白的多核苷酸。在特定实施方式中,多核苷酸是表达载体。在一些实施方式中,表达载体包含编码与启动子序列可操作地连接的本文所述的修饰的衣壳蛋白的多核苷酸序列,例如,驱动多核苷酸在细胞中表达的启动子序列。在某些实施方式中,细胞是宿主细胞。宿主细胞可以用于生产包含修饰的衣壳蛋白的病毒粒子。示例性宿主细胞包括哺乳动物细胞(例如,HEK293细胞)、昆虫细胞(例如,SF9细胞)、微生物和酵母。在一些实施方式中,细胞包含AAV rep基因,如编码AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV rep蛋白或其变体的AAV rep基因。在一些实施方式中,AAV rep基因在细胞中稳定维持。

[0103] 本文还提供了包含多核苷酸或载体的细胞,所述多核苷酸或载体编码本文所述的修饰的衣壳蛋白。在特定实施方式中,多核苷酸是表达载体,并且所述表达载体包含编码与启动子序列可操作地连接的本文所述的变体衣壳蛋白的多核苷酸,例如,驱动多核苷酸在细胞中表达的启动子序列。在一些实施方式中,多核苷酸或载体在细胞中稳定维持。在一些实施方式中,所述细胞进一步包含AAV rep基因。在一些实施方式中,AAV rep基因在细胞中稳定维持。在某些实施方式中,多核苷酸或载体进一步包含编码rep蛋白的序列,例如,AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、

灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV rep蛋白或其变体。

[0104] 在一些实施方式中,所述细胞进一步包含多核苷酸表达盒,所述多核苷酸表达盒包含编码基因产物的序列,例如,治疗性基因产物,如本文所述的治疗性基因产物。在某些实施方式中,多核苷酸表达盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复序列(ITR)。在某些实施方式中,多核苷酸表达盒在5'和3'末端侧翼是AAV ITR。在一些实施方式中,一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR或其变体。在一些实施方式中,一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR。在一些实施方式中,一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR,其包含一个或多个核苷酸插入、缺失和/或置换。

[0105] IV.病毒粒子以及生产其的方法

[0106] 本文还提供了病毒粒子(例如,重组AAV病毒粒子),其包含本文所述的变体AAV衣壳蛋白。

[0107] 在一些实施方式中,重组AAV病毒粒子进一步包含多核苷酸表达盒,所述多核苷酸表达盒包含编码基因产物的序列,例如治疗性基因产物,如本文所述的治疗性基因产物。在某些实施方式中,多核苷酸表达盒的侧翼是一个或多个AAV反向末端重复序列(ITR),如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR或其变体。在某些实施方式中,多核苷酸表达盒在5'和3'末端侧翼是AAV ITR。在一些实施方式中,一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR或其变体。在一些实施方式中,一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR,其包含一个或多个核苷酸插入、缺失和/或置换。在一些实施方式中,一个或多个ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV ITR。

[0108] 在某些实施方式中,基因产物抑制受试者视网膜中的新生血管形成,例如,脉络膜新生血管形成(CNV)。已发现很多细胞因子在CNV生成的调控中发挥重要作用,其中可能包括但不限于血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体(VEGFR)、血小板衍生生长因子(PDGF)、缺氧诱导因子(HIF)、血管生成素(Ang)和其他细胞因子、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)。在一些实施方式中,基因产物是VEGF、VEGFR、PDGF、HIF、Ang和MAPK的一种或多种的抑制剂。

[0109] 在某些实施方式中,基因产物抑制受试者视网膜中的新生血管形成,例如,脉络膜新生血管形成(CNV)。已发现很多细胞因子在CNV生成的调控中发挥重要作用,其中可能包括但不限于血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体(VEGFR)、血小板衍生生长因子(PDGF)、缺氧诱导因子(HIF)、血管生成素(Ang)和其他细胞因子、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)。在一些实施方式中,基因产物是VEGF、VEGFR、PDGF、HIF、Ang和MAPK的一种或多种的抑制剂。

[0110] 在一些实施方式中,基因产物是干扰RNA、适体或蛋白。在一些实施方式中,治疗性基因产物是干扰RNA、适体或蛋白。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是siRNA、miRNA或蛋白。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是位点特异性核酸

酶,其提供基因功能的位点特异性敲低。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是干扰RNA。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是siRNA或miRNA。

[0111] 在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是抗VEGF基因产物。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是抗VEGF干扰RNA。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是抗VEGF siRNA或miRNA。

[0112] 在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是适体。示例性目标适体包括针对血管内皮生长因子(VEGF)的适体。参见,例如,Ng等,(2006)Nat.Rev.Drug Discovery 5:123;和Lee等,(2005)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:18902。同样适合使用的是PDGF特异性适体,例如,E10030;参见,例如,Ni和Hui(2009)Ophthalmologica 223:401;和Akiyama等,(2006)J.Cell Physiol.207:407。

[0113] 在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是蛋白。蛋白通常是增强视网膜细胞功能的蛋白,例如,视杆细胞或视锥细胞、视网膜神经节细胞、Müller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。示例性蛋白包括神经保护多肽(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蛋白(Lai等,(2005)Mol.Ther.12:659);包含可溶性Flt蛋白的Fc融合蛋白(参见,例如,Pechan等,(2009)Gene Ther.16:10);色素上皮衍生因子(PEDF);可溶性Tie-2受体等);金属蛋白酶组织抑制剂-3(TIMP-3);视蛋白,例如,视紫红质;抗凋亡多肽(例如,Bcl-2、Bcl-X1)等。适宜的多肽包括但不限于神经胶质衍生的神经营养因子(GDNF);成纤维细胞生长因子2;神经营养因子(NTN);睫状神经营养因子(CNTF);神经生长因子(NGF);神经营养因子-4(NT4);脑源性神经营养因子(BDNF);表皮生长因子;视紫红质;X-连锁细胞凋亡抑制剂;和音猬因子。

[0114] 适宜的视蛋白包括例如光响应性视蛋白,如在美国专利公开号2007/0261127(例如,ChR2;Chop2);美国专利公开号2001/0086421;美国专利公开号2010/0015095;和Diester等,(2011)Nat.Neurosci.14:387.中所描述的。

[0115] 适宜的蛋白还包括视黄质。适宜的多肽包括例如视网膜色素变性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_000313;和Travis等,(1991)Genomics 10:733);外周蛋白;视网膜色素上皮特异性蛋白(RPE65)(参见,例如,GenBank AAC39660;和Morimura等,(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:3088)等。

[0116] 适宜的蛋白还包括:CHM(无脉络膜血症(Rab护送蛋白1)),当有缺陷或缺失时,会导致无脉络膜血症的多肽(参见,例如,Donnelly等,(1994)Hum.Mol.Genet.3:1017;和van Bokhoven等,(1994)Hum.Mol.Genet.3:1041);以及Crumbs同源物1(CRB 1),当有缺陷或缺失时,会导致Leber先天性黑蒙和视网膜色素变性的多肽(参见,例如,den Hollander等,(1999)Nat.Genet.23:217;和GenBank登录号CAM23328)。

[0117] 适宜的蛋白还包括当有缺陷或缺失时导致全色盲的蛋白,其中此类多肽包括例如锥形光感受器cGMP门控通道亚基 α (CNGA3)(参见,例如,GenBank登录号NP_001289;和Booi j等,(2011)Ophthalmology 118:160-167);锥形光感受器cGMP门控通道亚基 β (CNGB3)(参见,例如,Kohl等,(2005)Eur J Hum Genet.13(3):302);鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白); α

转导活性多肽2 (GNAT2) (ACHM4); 和ACHM5; 以及当有缺陷或缺乏时, 会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Mancuso等, (2009) Nature 461 (7265): 784-787。

[0118] 在一些实施方式中, 基因产物 (或治疗性基因产物) 是抗VEGF蛋白。在一些实施方式中, 抗VEGF蛋白是sFlt-1蛋白或其片段或者抗VEGF抗体或其片段。在一些实施方式中, 抗VEGF蛋白视抗VEGF抗体或其片段, 如阿柏西普、雷珠单抗和贝伐单抗或其片段。在一些实施方式中, 抗VEGF蛋白是sFlt-1蛋白。

[0119] VEGF受体FLT-1的可溶性截短形式sFLT-1是唯一已知的内源性VEGF特异性抑制剂。在自然界中, 其是由选择性mRNA剪接产生的, 缺乏近膜免疫球蛋白样结构域、跨膜区和细胞内酪氨酸激酶结构域。在结构上, FLT-1和sFLT-1蛋白都可以包含多个功能性结构域。在一些变体中, FLT和sFLT蛋白通常共享6个相互连接的结构域; 3个结构域参与蛋白的二聚化, 3个结构域参与配体的结合, 如VEGF。sFLT-1不限于细胞膜。未结合的sFLT-1可以在细胞外空间或溶液中自由扩散。

[0120] sFLT-1和VEGF受体之间的相互作用是特异性的, 可以与100倍过量的未标记VEGF竞争。在一些情况下, sFLT-1的血管抑制活性可能是由两种机制抑制VEGF引起的: i) 螯合VEGF, 其以高亲和性结合, 和ii) 与VEGF受体FLt-1和FLK-1/KDR的跨膜异构体形成无活性的异源二聚体。如本领域公知的, 体外结合测定表明sFLT-1以高亲和性结合VEGF, 并且还可以抑制VEGF驱动的人脐静脉内皮细胞增殖。在癌症动物模型中, sFLT-1抑制肿瘤生长。在一些情况下, sFLT-1可能以亚化学计量或显性负性方式发挥作用, 因为细胞外空间中过量的VEGF可能被阻止结合并随后激活VEGF受体。已在Kendall和Thomas, 1993; Proc Natl Acad Sci. 90:10705-10709中描述了sFLT-1的这些性质, 其全部内容通过引用并入本文。sFLT-1的功能片段可用于代替全长蛋白。更具体地, VEGF结合结构域 (结构域2), 或者sFLT-1的结构域2加上来自sFLT1、KDR或其他家族成员的结构域3, 可用于结合和失活VEGF。在Wiesmann等, 1997; Cell, 91:695-704中描述了此类功能性片段, 其全部内容通过引用并入本文。

[0121] 在一些实施方式中, sFlt-1蛋白是天然存在的蛋白sFlt-1, 如在美国专利号5, 861, 484中所述的和在US2013/0323302的SEQ ID NO: 109中公开了序列。本文以SEQ ID NO: 13公开了示例性sFlt-1氨基酸序列。其还包括但不限于其功能性片段, 包括sFlt-1结构域2的序列或在美国专利申请公开号2013/0323302的SEQ ID NO: 121中所示的那些, 以及相关构建体, 如在美国专利号7, 635, 474中公开的VEGF结合融合蛋白。本文以SEQ ID NO: 14公开了示例性sFlt-1功能性片段。在一些实施方式中, sFLT-1蛋白与SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 14至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%同源。在一些实施方式中, sFLT-1蛋白与SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 14具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%序列同一性。抗VEGF蛋白还可以包括在美国专利申请公开号2013/0323302中所述的任何sFLT-1蛋白、其变体或片段。

[0122] 在一些实施方式中, sFLT-1蛋白与天然存在的人sFLT-1蛋白序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%同源。在一些实施方式中, sFLT-1蛋白与天然存在的人sFLT-1蛋白序列至多约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%同源。在一些实施方式中,

sFLT-1蛋白与天然存在的人sFLT-1蛋白序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%序列同一性。在一些实施方式中，sFLT-1蛋白与天然存在的人sFLT-1蛋白序列具有至多约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%序列同一性。在一些实施方式中，sFLT-1蛋白与天然存在的人sFLT-1蛋白构象是至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%在空间上同源的。在一些情况下，sFLT-1蛋白与天然存在的人sFLT-1蛋白构象是至多约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或100%在空间上同源的。

[0123] 在一些实施方式中，抗VEGF蛋白是抗VEGF抗体。在一些实施方式中，抗VEGF蛋白是雷珠单抗（以商标**Lucentis**[®]销售（Genentech, San Francisco, CA），针对雷珠单抗的重链和轻链可变区序列参见美国专利号7,060,269的图1）；贝伐单抗（以商标**Avastin**[®]销售（Genentech, San Francisco, CA），针对贝伐单抗的重链和轻链可变区序列参见美国专利号6,054,297的图1）；阿柏西普（以商标**Eylea**[®]销售（Regeneron, Tarrytown, NY））；或者布罗珠单抗，参见美国专利号10,035,850。在某些实施方式中，贝伐单抗分别包含以下重链和轻链可变结构域序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT YAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWFYFDVWGQGT（SEQ ID NO:8）和；DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIKRTV（SEQ ID NO:9）。在某些实施方式中，雷珠单抗分别包含以下重链和轻链可变结构域序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGK GLEWVGWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWFYFDVWGQGT（SEQ ID NO:10）；和DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIKRTV（SEQ ID NO:11）。在某些实施方式中，阿柏西普包含以下氨基酸序列：MVSYWDTGVLALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPE I IHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNY LTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO:12）。在某些实施方式中，阿柏西普包含以下氨基酸序列：EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASG VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTCLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDIPDDDPYYATWAKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGGQTLVTSS（SEQ ID NO:15）。

[0124] 这些序列可以使用遗传密码从编码这些序列的DNA表达，遗传密码是本领域技术人员理解的标准技术。本领域技术人员可以理解，由于遗传密码的简并性，抗VEGF蛋白序列可以容易地从很多不同的DNA序列表达。

[0125] 在一些情况下，基因产物（或治疗性基因产物）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。

[0126] 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,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,(2011) *Nature* 475:217。在一些实施方式中,病毒载体包括: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。

[0127] 适于使用的位点特异性内切核酸酶包含例如:锌指核酸酶(ZFN);以及转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN),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号2011/0301073。

[0128] 在一些实施方式中,编码基因产物的序列可操作地连接至启动子。在一些实施方式中,编码基因产物的序列可操作地连接至组成型启动子。在其他实施方式中,编码目标基因产物的核苷酸序列可操作地连接至诱导性启动子。在一些实例中,编码基因产物的序列可操作地连接至组织特异性或细胞特异性调控元件。例如,在一些实例中,编码基因产物的序列可操作地连接至感光器特异性调控元件(例如,感光器特异性启动子),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控元件。适合的感光器特异性调控元件包括,例如:视紫红质启动子;视紫红质激酶启动子(Young等,(2003) *Ophthalmol.Vis.Sci.*44:4076); β 磷酸二酯酶基因启动子(Nicoud等,(2007) *J. Gene Med.*9:1015);视网膜色素变性基因启动子(Nicoud等,(2007) 同上);内感光器类视黄醇结合蛋白(IRBP)基因增强子(Nicoud等,(2007) 同上);IRBP基因启动子(Yokoyama等,(1992) *Exp Eye Res.*55:225)。

[0129] 在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子相比,重组AAV病毒粒子能够结合至肝素和/或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG),例如,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倍的亲和性。在特定实施方式中,与AAV5病毒粒子相比,重组AAV病毒粒子能够结合至肝素和/或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG),例如,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倍的亲和性。在特定实施方式中,与AAV2.5T病毒粒子相比,重组AAV病毒粒子能够结合至肝素和/或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG),例如,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倍的亲和性。

[0130] 在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子相比,重组AAV病毒粒子能够结合至内限界膜(ILM),例如,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倍的亲和性。在特定实施方式中,与AAV5病毒粒子相比,重组AAV病毒粒子能够结合至内限界膜(ILM),例如,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倍的亲和性。在特定实施方式中,与AAV2.5T病毒粒子相比,重组AAV病毒粒子能够结合至内限界膜(ILM),例如,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倍的亲和性。

[0131] 在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性增加。在特定实施方式中,重组AAV病毒粒子能够穿过ILM。在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性增加,并且能够穿过ILM。在特定实施方式中,与AAV5病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性增加。在特定实施方式中,与AAV2.5T病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性增加。在特定实施方式中,当玻璃体内注射到哺乳动物中时,重组AAV病毒粒子能够转导视网膜细胞。在特定实施方式中,重组AAV病毒粒子能够穿过ILM。在特定实施方式中,当通过玻璃体内注射施用,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子在通过玻璃体内注射施用对视网膜细胞的感染性增加。在特定实施方式中,与通过玻璃体内注射施用AAV5病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子在通过玻璃体内注射给药对视网膜细胞的感染性增加。在特定实施方式中,与通过玻璃体内注射施用AAV2.5T病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,重组AAV病毒粒子在通过玻璃体内注射给药对视网膜细胞的感染性增加。在一些实施方式中,视网膜细胞是光感受器细胞(例如,视杆细胞;视锥细胞)、视网膜神经节细胞(RGC)、视网膜色素上皮(RPE)细胞、Müller细胞、无长突细胞、双极细胞和水平细胞的一种或多种。在一些实施方式中,视网膜细胞是Müller细胞、视锥细胞、视杆细胞、双极细胞和/或RPE细胞。在一些实施方式中,视网膜细胞是Müller细胞。在一些实施方式中,视网膜细胞是视锥细胞。在一些实施方式中,视网膜细胞是双极细胞。在一些实施方式中,视网膜细胞是RPE细胞。

[0132] 在特定实施方式中,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,当通过玻璃体内注射时,包含本文所述的变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子能够向视网膜递送基因产物(如治疗性基因产物),例如,所得表达至少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倍更高。在特定实施方式中,与AAV5和/或AAV2.5T载体相比,当通过玻璃体内注射时,包含本文所述的变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子能够向视网膜递送基因产物(如治疗性基因产物),例如,所得表达至少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倍更高。

[0133] 本领域公知很多用于生产重组AAV病毒粒子的方法,包括转染、稳定细胞系生产和感染性杂合病毒生产系统,其包括腺病毒-AAV杂合、疱疹病毒-AAV杂合(Conway, JE等, (1997) J. Virology 71 (11): 8780-8789)和杆状病毒-AAV杂合。用于生产rAAV病毒颗粒的rAAV生产培养物都需要;1) 适宜宿主细胞,2) 适宜辅助病毒功能,3) AAV rep和cap基因;4) 侧翼为至少一个AAV ITR序列(例如,超大rAAV载体基因组)的核酸(如编码基因产物的序列);和5) 支持rAAV生产的适宜培养基和培养基组分。在一些实施方式中,适宜宿主细胞是灵长类宿主细胞。在一些实施方式中,适宜宿主细胞是人源细胞系,如HeLa、A549、293或

Perc.6细胞。

[0134] 在一些实施方式中,适宜辅助功能由野生型或突变型腺病毒(如温度敏感腺病毒)、疱疹病毒(HSV)、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供。在一些实施方式中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施方式中,AAV辅助功能由杆状病毒提供,并且宿主细胞是昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9)细胞)。

[0135] 在一些实施方式中,本文所述的AAV病毒粒子在昆虫细胞中生产。在一些实施方式中,本文所述的AAV病毒粒子在草地贪夜蛾(Sf9)细胞中生产。在一些实施方式中,本文所述的AAV病毒粒子在人源细胞系中生产的。在一些实施方式中,本文所述的AAV病毒粒子是在HeLa、A549、293或Perc.6细胞中生产的。在一些实施方式中,本文所述的AAV病毒粒子是在HEK-293细胞中生产的。

[0136] 在一些实施方式中,AAV rep基因可以来自任何AAV血清型。一般来说,但不是必须的,AAV rep基因与AAV载体基因组的IIR是相同血清型,只要rep基因编码的rep蛋白可以复制和包装rAAV基因组即可。

[0137] 本领域公知的适宜培养基可用于生产rAAV载体。这些培养基包括但不限于由Hyclone Laboratories和JRH生产的培养基,包括改良的Eagle培养基(MEM)、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、定制配方,如在美国专利号6,566,118中描述的那些,以及Sf-900 II SFM培养基,如在美国专利号6,723,551中描述的那些,其每一个的全部内容均通过引用并入本文,特别是关于用于生产重组AAV载体的定制培养基配方。

[0138] 一种产生rAAV病毒粒子的方法是三重转染方法。简言之,可以将含有rep基因和衣壳基因的质粒,例如编码本文公开的变体AAV衣壳蛋白的多核苷酸,连同辅助腺病毒质粒一起转染(例如,使用磷酸钙法)到细胞系(例如,HEK-293细胞)中,以及可以收集并任选地纯化病毒粒子。这样,在一些实施方式中,rAAV病毒粒子是通过将载体基因组、编码AAV rep和cap的核酸(如编码本文公开的变体衣壳蛋白的多核苷酸)和编码AAV辅助功能的核酸三重转染到宿主细胞中而产生的,其中核酸转染进入宿主细胞产生能够生产rAAV病毒粒子的宿主细胞。

[0139] 在一些实施方式中,rAAV病毒粒子可以通过生产细胞系方法生产,如在Martin等,(2013)Human Gene Therapy Methods 24:253-269;美国专利公开号US2004/0224411;和Liu,X.L.等,(1999)Gene Ther.6:293-299中描述的示例性生产细胞系方法。简言之,细胞系(例如,HeLa、293、A549或Perc.6细胞)可以用包含rep基因、衣壳基因(如编码本文公开的变体衣壳蛋白的多核苷酸)的质粒和载体基因组稳定转染。可以筛选细胞系以选择用于rAAV生产的先导克隆,然后可以将其扩展到生产生物反应器并感染辅助病毒(例如,腺病毒或HSV)以启动rAAV生产。随后可以收获病毒粒子,可以灭活(例如,通过加热)和/或去除腺病毒,并且可以纯化rAAV病毒粒子。这样,在一些实施方式中,rAAV病毒粒子由生产细胞系生产,所述生产细胞系包含编码rAAV基因组的核酸、编码AAV rep的核酸、编码本文公开的变体衣壳蛋白的多核苷酸和编码AAV辅助功能的核酸中的一种或多种。

[0140] 在一些实施方式中,编码AAV rep基因、AAV cap基因和/或rAAV基因组的核酸稳定维持在生产细胞系中。在一些实施方式中,将编码AAV rep基因、AAV cap基因和/或rAAV基因组的核酸引入细胞系中的一个或多个质粒中以产生生产细胞系。在一些实施方式中,将AAV rep基因、AAV cap基因和rAAV基因引入细胞中的同一质粒上。在其他实施方式中,将

AAV rep基因、AAV cap基因和rAAV基因引入细胞中的两个或更多个不同质粒上。在一些实施方式中,用质粒稳定转染的细胞系在细胞系的多次传代中保持质粒(例如,细胞系的5、10、20、30、40、50或次超过50次传代)。例如,质粒可以随着细胞复制而复制,或者质粒可以整合到细胞基因组中。已经鉴定了使用质粒能够在细胞(例如,人细胞)中自主复制的多种序列(参见,例如,Krysan,P.J.等,(1989)Mol.Cell Biol.9:1026-1033)。在一些实施方式中,质粒可以包含允许选择维持质粒的细胞的选择性标志物(例如,抗生素抗性标志物)。通常用于哺乳动物细胞中的选择性标志物包括但不限于杀稻瘟素、G418、潮霉素B、博来霉素、嘌呤霉素及其衍生物。将核酸引入细胞的方法是本领域公知的,包括但不限于病毒转导、阳离子转染(例如,使用阳离子聚合物,如DEAE-葡聚糖或阳离子脂质,如脂质体)、磷酸钙转染、显微注射、粒子轰击、电穿孔和纳米颗粒转染(更多细节参见,例如,Kim,T.K.和Eberwine,J.H.(2010)Anal.Bioanal.Chem.397:3173-3178)。

[0141] 在一些实施方式中,将编码AAV rep基因、AAV cap基因和/或rAAV基因组的核酸稳定整合到生产细胞系的基因组中。在一些实施方式中,将编码AAV rep基因、AAV cap基因和/或rAAV基因组的核酸引入细胞系中的一个或多个质粒上以产生生产细胞系。在一些实施方式中,将AAV rep基因、AAV cap基因和rAAV基因组引入细胞中的相同质粒上。在其他实施方式中,将AAV rep基因、AAV cap基因和rAAV基因组引入细胞中的两个或更多个不同质粒上。在一些实施方式中,质粒可以包含允许选择维持质粒的细胞的选择性标志物(例如,抗生素抗性标志物)。将核酸稳定整合到多种宿主细胞系中的方法是已知的。例如,重复选择(例如,通过使用选择性标志物)可用于选择已整合包含选择性标志物(和AAV cap基因、AAV rep基因和/或rAAV基因组)的核酸的细胞。在其他实施方式中,核酸可以位点特异性方式整合到细胞系中以产生生产细胞系。若干位点特异性重组系统是本领域公知的,如FLP/FRT(参见,例如,O'Gorman,S.等,(1991)Science 251:1351-1355)、Cre/loxP(参见,例如,Sauer,B.and Henderson,N.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:5166-5170)和phi C31-att(参见,例如,Groth,A.C.等,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.97:5995-6000)。

[0142] 在一些实施方式中,生产细胞系来自灵长类细胞系(例如,非人灵长类细胞系,如Vero或FRhL-2细胞系)。在一些实施方式中,细胞系来自人细胞系。在一些实施方式中,生产细胞系来自HeLa、293、A549或PERC.6[®](CruCell)细胞。例如,在将编码AAV rep基因、AAV cap基因和/或rAAV基因组的核酸引入和/或稳定维持/整合到细胞系以产生生产细胞系之前,细胞系是HeLa、293、A549或PERC.6[®](CruCell)细胞系或其衍生物。

[0143] 在一些实施方式中,生产细胞系适于悬浮生长。众所周知,贴壁依赖性细胞通常不能在无基质(如微载体珠)的情况下悬浮生长。使细胞系适应悬浮生长可以包括例如在带有搅拌桨的旋转培养中培养细胞系,使用不含钙离子和镁离子的培养基以防止结块(和任选地消泡剂),使用涂覆有硅化合物的培养容器,并在每次传代时选择培养物中的细胞(而非在大块中或在容器侧壁上)。关于进一步的描述,参见,例如,ATCC常见问题文件(可在www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx获得)以及其中引用的参考文献。

[0144] 在一些方面中,提供了一种用于生产如本文所公开的rAAV病毒粒子的方法,其包括(a)在产生rAAV病毒离子的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含(i)编码本文公

开的变体AAV衣壳蛋白的多核苷酸；(ii) 编码rep蛋白的多核苷酸；(iii) 包含编码基因产物（例如，侧翼为至少一个AAV ITR的治疗性基因产物）的序列的多核苷酸表达盒；和(iv) AAV辅助功能；以及(b) 回收由宿主细胞生产的rAAV病毒粒子。在一些实施方式中，所述至少一个AAV ITR选自以下：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV血清型ITR等。在一些实施方式中，所述方法进一步包括纯化rAAV病毒粒子。

[0145] 本发明的适宜rAAV生产培养基可以补充0.5% -20% (v/v或w/v) 水平的血清或血清来源的重组蛋白。或者，如本领域公知的，rAAV病毒粒子可在无血清条件下生产，也可以将其称为无动物来源产物的培养基。本领域普通技术人员可以理解，设计用于支持rAAV病毒粒子生产的商业或定制培养基也可以补充一种或多种本领域已知的细胞培养成分，包括但不限于葡萄糖、维生素、氨基酸和/或生长因子，以增加生产培养物中rAAV的滴度。

[0146] rAAV生产培养物可以在适合于所使用的特定宿主细胞的各种条件下（在很宽的温度范围内、不同的时间长度等）下生长。如本领域公知的，rAAV生产培养物包括附着依赖性培养物，其可以在适宜的附着依赖性容器，例如滚瓶、中空纤维滤器、微载体和填充床或流化床生物反应器中培养。rAAV生产培养物还可以包括悬浮适应宿主细胞，例如HeLa、293和SF-9细胞，其可以通过多种方式进行培养，包括，例如，旋转培养瓶、搅拌罐生物反应器和一次性系统，如Wave袋系统。

[0147] V. 组合物

[0148] 本文还提供了包含本文公开的重组AAV病毒粒子的组合物，所述病毒粒子包含本文所述的变体AAV衣壳蛋白。在一些实施方式中，所述组合物是药物组合物，其包含本文公开的重组AAV病毒粒子和一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

[0149] 重组AAV病毒粒子可以与药学上可接受的载体、稀释剂和试剂组合，这些载体、稀释剂和试剂可用于制备通常安全、无毒和合乎需要的制剂，并且包含灵长类动物可接受的赋形剂。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。在特定实施方式中，药物组合物是无菌的。例如，在体内接触眼细胞的情况下，重组AAV病毒粒子可以进行适当的处理以递送至眼。

[0150] 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。在某些实施方式中，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。在一些实施方式中,药物组合物包含一种或多种等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。在一些实施方式中,药物组合物包含延迟吸收的药剂,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0151] 无菌溶液可以通过根据需要将所需量的重组AAV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他成分。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。

[0152] 在一些实施方式中,药物组合物与保护病毒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。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,例如,如美国专利号4,522,811中所描述的。

[0153] 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。

[0154] 可以制备出适于有效地转导哺乳动物细胞的任何浓度的重组AAV病毒粒子。例如,重组AAV病毒粒子的浓度可以配置成每毫升 10^8 个载体基因组或更多,例如每毫升约 5×10^8 个载体基因组;每毫升约 10^9 个载体基因组;每毫升约 5×10^9 个载体基因组、每毫升约 10^{10} 个载体基因组、每毫升约 5×10^{10} 个载体基因组;每毫升约 10^{11} 个载体基因组;每毫升约 5×10^{11} 个载体基因组;每毫升约 10^{12} 个载体基因组;每毫升约 5×10^{12} 个载体基因组;每毫升约 10^{13} 个载体基因组;每毫升约 1.5×10^{13} 个载体基因组;每毫升约 3×10^{13} 个载体基因组;每毫升约 5×10^{13} 个载体基因组;每毫升约 7.5×10^{13} 个载体基因组;每毫升约 9×10^{13} 个载体基因组;每毫升约 1×10^{14} 个载体基因组、每毫升约 5×10^{14} 个载体基因组或更多。在一些实施方式中,可以以不多于每毫升约 1×10^{15} 个载体基因组配制病毒颗粒。

[0155] 重组AAV病毒粒子可以配制成任何适合的单位剂量,包括但不限于约 1×10^8 个载体基因组或更多,例如约 1×10^9 个、约 1×10^{10} 个、约 1×10^{11} 个、约 1×10^{12} 个或约 1×10^{13} 个载体基因组或更多,在某些情况下约 1×10^{14} 个载体基因组。在一些实施方式中,重组AAV病毒粒子可以配制成不多于约 4×10^{15} 个载体基因组的任何适宜单位剂量。在一些情况下,单位剂量至多为约 5×10^{15} 个载体基因组,例如约 1×10^{14} 个载体基因组或更少,例如约 1×10^{13} 个、约 1×10^{12} 个、约 1×10^{11} 个、约 1×10^{10} 个或约 1×10^9 个载体基因组或更少,在某些情况下为 1×10^8 个载体基因组或更少。在一些实施方式中,重组AAV病毒粒子可以配制成不少于约 1×10^8 个载体基因组的任何适宜单位剂量。在一些情况下,单位剂量为约 1×10^{10} 个到约 1×10^{11} 个载体基因组。在一些情况下,单位剂量为约 1×10^{10} 个到约 3×10^{12} 个载体基因组。在一些情况下,单位剂量为约 1×10^9 个到约 3×10^{13} 个载体基因组。在一些情况下,单位剂量为约 1×10^8 个到约 3×10^{14} 个载体基因组。

[0156] 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是指病毒基因组与核酸可递送至的细胞的比率或倍数。在一些情况下,MOI可以是约 1×10^6 。在一些情况下,MOI可以是约 1×10^5 至约 1×10^7 。在一些情况下,MOI可以是约 1×10^4 至约 1×10^8 。在一些情况下,本公开内容的重组病毒粒子是至少约 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 和 1×10^{18} MOI的任何一个。在一些情况下,本公开内容的重组AAV病毒粒子是约 1×10^8 至约 3×10^{14} MOI。在一些情况下,本公开内容的重组病毒粒子是至多约 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 和 1×10^{18} MOI的任何一个。

[0157] 在一些方面中,药物组合物的量包含约 1×10^8 个至约 1×10^{15} 个重组AAV病毒粒子、约 1×10^9 个至约 1×10^{14} 个重组AAV病毒粒子、约 1×10^{10} 个至约 1×10^{13} 个重组AAV病毒粒子或者约 1×10^{11} 个至约 3×10^{12} 个重组AAV病毒粒子。

[0158] 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,例如预充式注射器。

[0159] 在一些实施方式中,药物组合物包含药学上可接受的盐。各种药学上可接受的盐是本领域公知的并且描述于例如以下中:“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第17版,Alfonso R.Gennaro(编著),Mark Publishing Company,Easton,PA,USA,1985(及其最新版本)、“Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology”,第3版,James Swarbrick(编著),Informa Healthcare USA(Inc.),NY,USA,2007和J.Pharm.Sci.66:2(1977)。此外,关于适宜的盐的综述,参见Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection, and Use by Stahl and Wermuth(Wiley-VCH,2002)。

[0160] 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,“Pharmaceutical Salts,”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。

[0161] 可以将药物组合物配制用于向哺乳动物施用,如灵长类,如人。在一些实施方式中,药物组合物包含水性载体,如无毒、惰性、药学上可接受的水性载体。在一些实施方式中,水性载体的pH是约3至约8。在一些实施方式中,水性载体的pH是约6至约8。

[0162] 在一些实施方式中,本文所提供的药物组合物包含与药学上可接受的载剂和/或赋形剂混合的治疗有效量的本文公开的重组AAV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、防腐剂和其他蛋白。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Hank's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。在一些实施方式中,药物组合物在4℃下在至少

6个月内是稳定的。

[0163] 在一些实施方式中,本文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公知的其他缓冲液,如Good等,(1966)Biochemistry 5:467描述的那些。

[0164] 本文还提供了包含本文公开的重组AAV病毒粒子的组合物,所述重组AAV病毒粒子包含用于本文所述的方法中的本文所述的变体AAV衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述组合物是包含本文公开的重组AAV病毒粒子的重组AAV病毒粒子以及一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

[0165] 本文还提供了包含编码本文所述的变体AAV衣壳蛋白的本文所述的多核苷酸的组合物。在一些实施方式中,所述组合物用于本文公开的方法中,如制备包含变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子的方法。

[0166] VI.方法和用途

[0167] 如所附实施例所公开的,本文所述的修饰的衣壳蛋白赋予了包含变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子增强的或改变的细胞趋向性。例如,本文所述的某些变体AAV衣壳蛋白与增加的视网膜感染性或视网膜中的基因产物的增加的表达量、增加的与ILM的结合、玻璃体内注射后增加的视网膜感染性和/或玻璃体内注射后视网膜中的基因产物的增加的表达相关。

[0168] 可被本文所述病毒粒子转染的视网膜细胞组分的实例可以包括但不限于星形胶质细胞、Müller细胞、RGC、RGC轴突、光感受器、双极细胞、无长突细胞、水平细胞及其组合。在一些实例中,将细胞标志物用于测量编码基因产物的核酸向视网膜细胞组分的转导。细胞标志物可以包括但不限于GFAP、波形蛋白、Fox、β-微管蛋白、视紫红质、PKCa、小白蛋白、钙结合蛋白及其组合。下表1描述了示例性细胞标志物和相应的视网膜细胞组分。

[0169] 表1:细胞标志物和细胞类型总结

[0170]

标志物	细胞类型
GFAP	星形胶质细胞
波形蛋白	Müller细胞
Fox	RGC
β-微管蛋白	RGC轴突
视紫红质 (Rho)	Rod光感受器
PKCa	双极细胞
小白蛋白	无长突细胞
钙结合蛋白	水平细胞

[0171] 在一些实例中,rAAV病毒粒子转导基因产物的能力可以通过报告蛋白的表达来测量。在一些实施方式中,报告蛋白可以包括GFP、YFP、red cherry、β-半乳糖苷酶或本领域公知的其他报告蛋白。

[0172] 在一些实例中,报告蛋白随时间的表达可以通过在不同时间点捕获眼的图像来确定。例如,GFP的表达可以与荧光的增加相关联。给定时间点的荧光量可用于定量基因产物的表达。

[0173] 在一些实施方式中,免疫荧光可用于确定转导基因在本文所述的视网膜细胞区室

中的定位。可以通过使用对本文公开的细胞标志物特异抗体来标记视网膜细胞区室。在一些实例中,抗体与荧光团偶联。在一些实例中,二抗可用于检测一抗的结合。转导的视网膜可以在与针对目标细胞标志物的抗体孵育之前进行冷冻切片,从而允许对结合的抗体进行成像。然后可以使用抗体对冷冻切片进行标记,以检测转基因的转导、目标细胞标志物的存在以及两者之间的重叠区域。

[0174] 因此,本文提供了增强或改变重组AAV病毒粒子的趋向性的方法,所述方法包括将本文公开的变体AAV衣壳蛋白引入重组AAV病毒粒子。本文还提供了增强或改变重组AAV病毒粒子趋向性的方法,所述方法包括使用包含HKFKSGD (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列置换亲本AAV衣壳的氨基酸残基570-579,以产生变体AAV衣壳蛋白,并将所述变体AAV衣壳蛋白引入重组AAV病毒粒子,其中所述氨基酸残基编号对应于AAV5 VP1衣壳蛋白。在一些实施方式中,所述方法包括使用包含 $X_1X_2HKFKSGDX_3$ (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列置换氨基酸残基570-579,其中 X_{1-3} 可以独立地是任何氨基酸。在一些实施方式中,每个 X_{1-3} 独立地选自A、L、G、S和T。在一些实施方式中, X_1 是L。在一些实施方式中, X_2 是A。在一些实施方式中, X_3 是A。在一些实施方式中,所述方法包括使用氨基酸序列置换氨基酸残基570-579,所述氨基酸序列包含LAHKFKSGDA (SEQ ID NO:3);与SEQ ID NO:3具有至少80%或至少90%同源性;与SEQ ID NO:3具有至少80%或至少90%序列同一性;或者在SEQ ID NO:3中具有四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个连续的氨基酸。在一些实施方式中,所述氨基酸序列包含LAHKFKSGDA (SEQ ID NO:3)。

[0175] 在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是野生型AAV衣壳蛋白,例如AAV 1型 (AAV1)、AAV 2型 (AAV2)、AAV 3型 (AAV3)、AAV 4型 (AAV4)、AAV 5型 (AAV5)、AAV 6型 (AAV6)、AAV 7型 (AAV7)、AAV 8型 (AAV8)、AAV 9型 (AAV9)、AAV 10型 (AAV10)、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是VP1、VP2或VP3衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV5 VP1衣壳蛋白。

[0176] 在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是变体AAV衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV或绵羊AAV衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV5 VP1衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是与SEQ ID NO:4具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的AAV5 VP1衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白与SEQ ID NO:4具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的AAV5 VP1衣壳蛋白的变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是杂合的。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2和AAV5的杂合。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV 2.5T,或者与AAV2.5T衣壳蛋白具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的其变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV 2.5T,或者与AAV2.5T衣壳蛋白具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV 2.5T。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是VP1、VP2或VP3衣壳蛋白。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白,或者与AAV2.5T VP1衣壳蛋白 (SEQ ID NO:5) 具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同源性的其变体。在一些实施方式中,亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白,或者

与AAV2.5T VP1衣壳蛋白(SEQ ID NO:5)具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的其变体。

[0177] 包含本文所述的变体AAV衣壳蛋白的本文所述的重组AAV病毒粒子可以用于向细胞(例如,哺乳动物细胞)递送基因产物。例如,其可以用于研究,例如,确定基因产物对细胞活力和/或功能的影响。作为另一个实例,其可以用于医学,例如,治疗病症,例如,通过向细胞或组织递送治疗性基因产物。因此,在一些实施方式中,本文提供了在细胞中表达基因产物的方法,所述方法包括将细胞与包含重组AAV病毒粒子的组合物接触,所述AAV病毒粒子包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码基因产物的序列的多核苷酸表达盒。在一些实施方式中,接触发生在体外。在一些实施方式中,接触发生在体内,即,向受试者施用所述组合物。在特定实施方式中,组合物经胃肠外施用,例如,静脉内、口服或通过注射。在某些实施方式中,组合物通过注射向眼施用,例如,向视网膜、视网膜下或玻璃体施用。在某些实施方式中,所述组合物通过视网膜注射、视网膜下注射或玻璃体内注射施用。在某些实施方式中,所述组合物通过玻璃体内注射施用。

[0178] 在哺乳动物细胞将在体外与包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子接触的特定实施方式中,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)、家兔、猫、犬、山羊、绵羊、猪、马、牛、灵长类动物、人类。细胞可以来自已建立的细胞系,例如,WERI细胞、661W细胞或者细胞可以是原代细胞。

[0179] 在某些实施方式中,为促进基因产物的表达,将细胞与重组AAV病毒粒子接触约30分钟至约24小时或更长时间,例如,约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小时或24小时等中的任一者。可以将细胞与重组AAV病毒粒子接触一次或多次,例如,一次、两次、三次或者三次以上,并且在每个接触事件之后使得细胞与重组AAV病毒粒子一起赋予一定时间量,例如,约16-24小时。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,细胞可以悬浮在任何适当的方便的营养培养基中,如Iscove改良的DMEM或RPMI 1640,其补充了胎牛血清或热灭活的山羊血清(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。培养物可以包含细胞对其有应答的生长因子。如本文所定义的,生长因子是能够通过跨膜受体的特异性作用促进细胞在培养物中或完整组织中的存活、生长和/或分化的分子。生长因子包括多肽和非多肽因子。

[0180] 在某些实施方式中,提供有效量的包含变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子以在细胞中产生基因产物的表达。在特定实施方式中,有效量可以凭经验确定,例如通过检测基因产物的存在或水平,通过检测对细胞活力或功能的影响等。在某些实施方式中,有效量的重组AAV病毒粒子与相同量的参考病毒载体(如包含亲本AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒粒子)相比,促进基因产物在细胞中的表达相等或更高。在某些实施方式中,相对于参考病毒载体的表达,表达增强约2倍或更多;例如,约3倍、4倍或5倍或更多倍的任一者,在一些情况下,约10倍、20倍或50倍或更多倍的任一者,例如,100倍。在某些实施方式中,增强的表达发生在特定细胞类型中,例如,本文所述的任何眼部细胞。

[0181] 例如,在细胞与组合物在体内接触的情况下,所述组合物包含包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白的重组AAV病毒体和包含编码基因产物的序列的多核苷酸表达盒,所述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)、家兔、猫、犬、山羊、绵羊、

猪、马、牛或灵长类(例如,人或非人灵长类)。本公开内容的方法和组合物可用于治疗可至少部分通过细胞基因疗法解决的任何病况。因此,本公开内容的组合物和方法可用于治疗需要细胞疗法的个体。细胞包括但不限于血液、眼、肝、肾、心脏、肌肉、胃、肠、胰腺和皮肤。

[0182] 本文还提供了将基因产物递送至视网膜的方法,包括通过玻璃体内注射施用包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码基因产物的序列的多核苷酸表达盒的重组AAV病毒粒子。在一些实施方式中,本文提供了将基因产物递送穿过ILM的方法,包括通过玻璃体内注射施用重组AAV病毒粒子,所述重组AAV病毒粒子包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码基因产物的序列的多核苷酸表达盒。在某些实施方式中,本公开内容提供了向受试者的视网膜提供基因产物的方法,包括通过玻璃体内注射向受试者施用包含本文所述的重组AAV病毒粒子的药物组合物,其中重组AAV病毒体包含本文提供或公开的变体AAV衣壳和编码基因产物的多核苷酸序列。

[0183] 在特定实施方式中,所述受试者已被诊断为或疑似具有选自以下的一种或多种疾病或病症:急性黄斑神经视网膜病变;白塞氏病;脉络膜新生血管形成;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、囊样黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;影响眼后部部位或位置的眼外伤;眼肿瘤;视网膜病症,如视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变(包括增殖性糖尿病性视网膜病变)、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎;Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征;葡萄膜扩散;眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况;由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况;光凝、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;糖尿病性视网膜缺血;缺血性视网膜病变;非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍;视网膜劈裂症;视网膜色素变性;青光眼;Usher综合征、锥杆营养不良;Stargardt病(眼底黄斑);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;Leber先天性黑蒙;先天性静止性夜盲;脉络膜血症;Bardet-Biedl综合征;黄斑毛细血管扩张症;Leber遗传性视神经病变;早产儿视网膜病变;和色觉障碍,包括全色盲、远视、深视和三视。

[0184] 在特定实施方式中,所述受试者处于发展成选自以下的一种或多种疾病或病症的风险中:急性黄斑神经视网膜病变;白塞氏病;脉络膜新生血管形成;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、囊样黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;影响眼后部部位或位置的眼外伤;眼肿瘤;视网膜病症,如视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变(包括增殖性糖尿病性视网膜病变)、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎;Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征;葡萄膜扩散;眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况;由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况;光凝、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;糖尿病性视网膜缺血;缺血性视网膜病变;非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍;视网膜劈裂症;视网膜色素变性;青光眼;Usher综合征、锥杆营养不良;Stargardt病(眼底黄斑);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;Leber先天性黑蒙;先天性静止性夜盲;脉络膜血症;Bardet-Biedl综合征;黄斑毛细血管扩张症;Leber遗传性视神经病变;早产儿视网膜病变;和色觉障碍,包括全色盲、远视、深视和三视。

[0185] 本文还提供了在有需要的受试者中治疗视网膜疾病或病症的方法,包括通过玻璃体内注射施用包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码治疗性基因产物的序列的多核苷酸表达盒的重组AAV病毒粒子。本文还提供了在有需要的受试者的视网膜中预防性治疗疾病或病症的方法,包括通过玻璃体内注射施用包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码治疗性基因产物的序列的多核苷酸表达盒的重组AAV病毒粒子。本文还提供了在有需要的受试者的视网膜中治疗已确定或已确诊的疾病或病症的方法,包括通过玻璃体内注射施用包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码治疗性基因产物的序列的多核苷酸表达盒的重组AAV病毒粒子。在一些实施方式中,所述方法包括施用包含重组AAV病毒粒子的药物组合物,所述重组AAV病毒粒子包含本文公开的变体AAV衣壳蛋白和包含编码治疗性基因产物的序列的多核苷酸表达盒。

[0186] 在一些实施方式中,所述疾病或病症选自以下:急性黄斑神经视网膜病变;白塞氏病;脉络膜新生血管形成;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、囊样黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;影响眼后部部位或位置的眼外伤;眼肿瘤;视网膜病症,如视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变(包括增殖性糖尿病性视网膜病变)、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎;Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征;葡萄膜扩散;眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况;由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况;光凝、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;糖尿病性视网膜缺血;缺血性视网膜病变;非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍;视网膜劈裂症;视网膜色素变性;青光眼;Usher综合征、锥杆营养不良;Stargardt病(眼底黄斑);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;Leber先天性黑蒙;先天性静止性夜盲;脉络膜血症;Bardet-Biedl综合征;黄斑毛细血管扩张症;Leber遗传性视神经病变;早产儿视网膜病变;和色觉障碍,包括全色盲、远视、深视和三视。

[0187] 在特定实施方式中,所述受试者处于发展成一种或多种选自以下的疾病或病症的风险中:急性黄斑神经视网膜病变;白塞氏病;脉络膜新生血管形成;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、囊样黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿;多灶性脉络膜炎;影响眼后部部位或位置的眼外伤;眼肿瘤;视网膜病症,如视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变(包括增殖性糖尿病性视网膜病变)、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎;Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征;葡萄膜扩散;眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况;由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况;光凝、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;糖尿病性视网膜缺血;缺血性视网膜病变;非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍;视网膜劈裂症;视网膜色素变性;青光眼;Usher综合征、锥杆营养不良;Stargardt病(眼底黄斑);遗传性黄斑变性;脉络膜视网膜变性;Leber先天性黑蒙;先天性静止性夜盲;脉络膜血症;Bardet-Biedl综合征;黄斑毛细血管扩张症;Leber遗传性视神经病变;早产儿视网膜病变;和色觉障碍,包括全色盲、远视、深视和三视。

[0188] 在某些实施方式中,基因产物抑制受试者视网膜中的新血管形成,例如,脉络膜新

血管形成 (CNV)。已经发现很多细胞因子在CNV生成的调控中发挥重要作用,其中可以包括但不限于血管内皮生长因子 (VEGF)、VEGF受体 (VEGFR)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、缺氧诱导因子 (HIF)、血管生成素 (Ang) 等细胞因子,以及丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)。在一些实施方式中,基因产物是VEGF、VEGFR、PDGF、HIF、Ang和MAPK的一种或多种的抑制剂。

[0189] 在一些实施方式中,基因产物是本文公开的基因产物或治疗性基因产物。在一些实施方式中,基因产物是干扰RNA、适体或蛋白。在一些实施方式中,治疗性基因产物是干扰RNA、适体或蛋白。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是siRNA、miRNA或蛋白。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是位点特异性核酸酶,其提供基因功能的位点特异性敲低。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是干扰RNA。在一些实施方式中,基因产物(或治疗性基因产物)是siRNA或miRNA。

[0190] 在一些实施方式中,所述方法产生治疗益处,例如,预防疾病或病症的发展、阻止疾病或病症的进展、逆转疾病或病症的进展等。在一些实施方式中,所述方法包括检测已经实现治疗益处的步骤。

[0191] 在一些实例中,可在施用之后两个月或少于两个月,例如,在施用之后约4、3或2周或少于2周,例如,在施用本发明组合物之后1周观察到基因产物的表达,例如通过由测量基因产物的含量,通过测量治疗有效性等来检测。还预期基因产物的表达随时间保持。因此,在一些实例中,可在施用本发明组合物之后2个月或多于2个月,例如,约4、6、8或10个月或多于10个月,在一些情况下约1年或多于1年,例如,2、3、4或5年,在某些情况下超过5年观察到基因产物的表达,例如如通过测量基因产物的含量、通过测量治疗有效性等来检测。

[0192] 在特定实施方式中,向一只眼睛或向两只眼睛中的每一者施用约 1×10^8 个载体基因组或更多,在一些情况下约 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 或 1×10^{13} 个载体基因组或更多中的任一者,在某些情况下,约 1×10^{14} 个载体基因组或更多。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为至多约 1×10^{15} 个载体基因组,例如, 1×10^{14} 个载体基因组或更少,例如约 1×10^{13} 、 1×10^{12} 、 1×10^{11} 、 1×10^{10} 或 1×10^9 个载体基因组或更少中的任一者,在某些情况下 1×10^8 个载体基因组,且有时不少于 1×10^8 个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为约 1×10^{10} 个至约 1×10^{11} 个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为约 1×10^{10} 个至约 3×10^{12} 个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为约 1×10^9 个至约 3×10^{13} 个载体基因组。在一些情况下,所递送的载体基因组的量为约 1×10^8 个至约 3×10^{14} 个载体基因组。

[0193] 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是指病毒基因组与核酸可递送至的细胞的比率或倍数。在一些情况下,MOI可以是约 1×10^6 。在一些情况下,MOI可以是约 1×10^5 至约 1×10^7 。在一些情况下,MOI可以是约 1×10^4 至约 1×10^8 。在一些情况下,本公开内容的重组病毒粒子是至少约 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 和 1×10^{18} MOI的任何一个。在一些情况下,本公开内容的重组AAV病毒粒子是约 1×10^8 至约 3×10^{14} MOI。在一些情况下,本公开内容的重组病毒粒子是至多约 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 1×10^{17} 和 1×10^{18} MOI的任何一个。

[0194] 在一些方面中,药物组合物的量包含约 1×10^8 个至约 1×10^{15} 个重组AAV病毒粒子、

约 1×10^9 个至约 1×10^{14} 个重组AAV病毒粒子、约 1×10^{10} 个至约 1×10^{13} 个重组AAV病毒粒子或者约 1×10^{11} 个至约 3×10^{12} 个重组AAV病毒粒子。

[0195] 在一些实施方式中,可以采用多于一次施用(例如,两次、三次、四次或更多次施用)以在各种时间间隔(例如,每天、每周、每月、每年等)内实现所需的基因表达水平。

[0196] 在一些方面中,在施用所述药物组合物后约7、约14、约21或约30天,在人类受试者的泪液、血液、唾液或尿液样品中未检测到重组AAV病毒粒子。在一些方面中,通过qPCR或ELBA检测重组AAV病毒粒子的存在与否。

[0197] 在一些方面中,按照本文所述的治疗方法,受试者的最佳矫正视力(BCVA)提高约1、2、3、4、5行或更多行。

[0198] 在一些方面中,在施用步骤之后,通过荧光素血管造影术(FA)评估的新生血管形成减少。

[0199] 在一些情况下,可以测量视网膜厚度以检查治疗效果。在一些情况下,在用本公开内容的药物组合物治疗后约12个月内,人类受试者的中央视网膜厚度增加不超过约50微米、约100微米或约250微米。在一些情况下,在本发明的药物组合物治疗之后约3个月、约6个月、约9个月或约12个月内,人类受试者的中央视网膜厚度降低至少约50微米、约100微米、约200微米、约250微米、约300微米、约400微米、约500微米或约600微米。可将一个或多个时间点处的中央视网膜厚度与在施用本发明的药物组合物的约1、3、7或10天时或在施用本发明的药物组合物的约1、3、7或10天内获得的基线测量值进行比较,来测量人类受试者的中央视网膜厚度的降低。

[0200] 从上文可以理解,虽然为了说明的目的已经在本文中描述了本发明的特定实施方式,但是在不偏离本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改。因此,本发明不受所附权利要求的限制。

[0201] VII. 示例性实施方式

[0202] 所提供的实施方式包括:

[0203] 1. 一种重组腺相关病毒(AAV)病毒粒子,其包含:

[0204] (a) 包含修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含HKFKSGD (SEQ ID NO:1),并且其中所述氨基酸残基编号对应于AAV5 VP1衣壳蛋白;和

[0205] (b) 编码治疗性基因产物的多核苷酸序列。

[0206] 2. 根据实施方式1所述的重组AAV病毒粒子,其中所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白或AAV5和AAV2杂合衣壳蛋白。

[0207] 3. 根据实施方式1或实施方式2所述的重组AAV病毒粒子,其中所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T衣壳蛋白。

[0208] 4. 根据实施方式1-3中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白。

[0209] 5. 根据实施方式1-4中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述修饰的序列包含LAHKFKSGDA (SEQ ID NO:3)。

[0210] 6. 根据实施方式1-5中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述变体AAV衣壳蛋白包含与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少85%同源性的衣壳序列。

[0211] 7. 根据实施方式1-6中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述变体AAV衣壳蛋白包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的衣壳序列。

[0212] 8. 根据实施方式1-7中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述rAAV病毒粒子是变体AAV5或变体AAV2和AAV5杂合病毒粒子。

[0213] 9. 根据实施方式1-8中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述rAAV病毒粒子是变体AAV2.5T病毒粒子。

[0214] 10. 根据实施方式1-9中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述重组AAV病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导视网膜的细胞。

[0215] 11. 根据实施方式10所述的重组AAV病毒粒子,其中所述重组AAV病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导以下一者或多者:光感受器、视网膜神经节细胞、Müller细胞、双极细胞、无长突细胞、水平细胞和视网膜色素上皮细胞。

[0216] 12. 根据实施方式10或实施方式11所述的重组AAV病毒粒子,其中所述重组AAV病毒粒子当以玻璃体内注射至哺乳动物中时能够转导视网膜色素上皮细胞。

[0217] 13. 根据实施方式1-12中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述治疗性基因产物是siRNA、miRNA或蛋白。

[0218] 14. 根据实施方式1-13中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)基因产物。

[0219] 15. 根据实施方式1-13中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述治疗性基因产物是视蛋白(opsin)。

[0220] 16. 根据实施方式1-15中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中编码所述治疗性基因产物的多核苷酸的侧翼是一个或多个AAV ITR。

[0221] 17. 根据实施方式16所述的重组AAV病毒粒子,其中所述一个或多个AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、或绵羊AAV ITR或其变体。

[0222] 18. 根据实施方式16或实施方式17所述的重组AAV病毒粒子,其中所述一个或多个AAV ITR是AAV2 ITR或AAV5 ITR。

[0223] 19. 根据实施方式1-18中任一项所述的重组AAV病毒粒子,其中所述重组AAV病毒粒子与AAV2.5T相比具有改变的细胞趋向性。

[0224] 20. 一种药物组合物,其包含实施方式1-19中任一项所述的重组AAV病毒粒子。

[0225] 21. 一种用于生产rAAV病毒粒子的方法,其包括:

[0226] (a) 在产生rAAV病毒粒子的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含:

[0227] (i) 编码包含修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白的多核苷酸,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含HKFKSGD(SEQ ID NO:1);

[0228] (ii) 编码rep蛋白的多核苷酸;

[0229] (iii) 多核苷酸表达盒,所述多核苷酸表达盒包含侧翼为至少一个AAV ITR的编码治疗性基因产物的序列;和

[0230] (iv) AAV辅助功能;和

[0231] (b) 回收由所述宿主细胞产生的所述rAAV病毒粒子。

[0232] 22. 一种向受试者的视网膜提供治疗性基因产物的方法, 其包括通过玻璃体内注射向所述受试者施用实施方式1-19中任一项所述的重组AAV病毒粒子或实施方式20所述的药物组合物。

[0233] 23. 根据实施方式22所述的方法, 其中所述受试者已被诊断为或疑似具有选自以下的一种或多种病况: 急性黄斑神经视网膜病变、白塞氏病、脉络膜新生血管形成、糖尿病性葡萄膜炎、组织胞浆菌病、黄斑变性、水肿、多灶性脉络膜炎、影响眼后部部位或位置的眼外伤、眼肿瘤、视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎、Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征、葡萄膜扩散、眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况、由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况、光凝、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、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变、非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍、视网膜劈裂症、视网膜色素变性、青光眼、Usher综合征、锥杆营养不良、Stargardt病、遗传性黄斑变性、脉络膜视网膜变性、Leber先天性黑蒙、先天性静止性夜盲、脉络膜血症、Bardet-Biedl综合征、黄斑毛细血管扩张症、Leber遗传性视神经病变、早产儿视网膜病变和色觉障碍。

[0234] 24. 一种治疗有需要的受试者的视网膜疾病或病症的方法, 其包括通过玻璃体内注射向所述受试者施用实施方式1-19中任一项所述的重组AAV病毒粒子或实施方式20所述的药物组合物。

[0235] 25. 根据实施方式24所述的方法, 其中所述疾病或病症是急性黄斑神经视网膜病变、白塞氏病、脉络膜新生血管形成、糖尿病性葡萄膜炎、组织胞浆菌病、黄斑变性、水肿、多灶性脉络膜炎、影响眼后部部位或位置的眼外伤、眼肿瘤、视网膜中央静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜脱离、葡萄膜炎性视网膜病、交感神经性眼炎、Vogt Koyanagi-Harada (VKH) 综合征、葡萄膜扩散、眼部激光治疗引起或影响的后眼部病况、由光动力学疗法引起或受光动力学疗法影响的后眼部病况、光凝、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、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病变、非视网膜病变糖尿病性视网膜功能障碍、视网膜劈裂症、视网膜色素变性、青光眼、Usher综合征、锥杆营养不良、Stargardt病、遗传性黄斑变性、脉络膜视网膜变性、Leber先天性黑蒙、先天性静止性夜盲、脉络膜血症、Bardet-Biedl综合征、黄斑毛细血管扩张症、Leber遗传性视神经病变、早产儿视网膜病变或色觉障碍。

[0236] 26. 根据实施方式1-19中任一项所述的重组AAV病毒粒子, 其用于治疗有需要的受试者的视网膜疾病或病症的方法中, 其中所述方法包括通过玻璃体内注射向所述受试者施用包含所述重组AAV病毒粒子的药物组合物。

[0237] 27. 根据实施方式1-19中任一项所述的重组AAV病毒粒子, 其用于制备用于治疗受试者的视网膜疾病或病症的药物。

[0238] 28. 根据实施方式26或实施方式27所述的重组AAV病毒粒子, 其中所述疾病或病症是年龄相关性黄斑变性(AMD)、湿性AMD、干性AMD、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性视网膜病变、增殖性糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞、分支性视网膜静脉阻塞、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、缺血性视网膜病

变或糖尿病性视网膜水肿。

[0239] 29.一种包含修饰的序列的变体AAV衣壳蛋白,所述修饰的序列相对于亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579内包含一个或多个氨基酸置换,其中所述修饰的序列包含HKFKSGD(SEQ ID NO:1),并且其中所述氨基酸残基编号对应于AAV5 VP1衣壳蛋白。

[0240] 30.根据实施方式29所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV5衣壳蛋白或AAV5和AAV2杂合衣壳蛋白。

[0241] 31.根据实施方式29或实施方式30所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T衣壳蛋白。

[0242] 32.根据实施方式29-31中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述亲本AAV衣壳蛋白是AAV2.5T VP1衣壳蛋白。

[0243] 33.根据实施方式29-32中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述修饰的AAV衣壳蛋白相对于所述亲本AAV衣壳蛋白在氨基酸残基570-579包含LAHKFKSGDA(SEQ ID NO:3)。

[0244] 34.根据实施方式29-33中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其包含与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列具有至少85%同源性的衣壳序列。

[0245] 35.根据实施方式29-34中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的衣壳序列。

[0246] 36.一种核酸,其包含编码实施方式29-35中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白的核酸序列。

[0247] 37.一种包含实施方式36所述的核酸的表达载体,其中编码所述变体AAV衣壳蛋白的核酸序列可操作地连接至启动子序列。

[0248] 38.根据实施方式37所述的表达载体,其进一步包含编码rep蛋白的核酸。

[0249] 39.一种细胞,其包含实施方式37或实施方式38所述的表达载体。

[0250] 40.根据实施方式39所述的细胞,其进一步包含编码治疗性基因产物的核酸。

[0251] 41.根据实施方式40所述的细胞,其中所述治疗性基因产物是siRNA、miRNA或蛋白。

[0252] 42.根据实施方式40或实施方式41所述的细胞,其中所述治疗性基因产物是抗血管内皮生长因子(抗VEGF)基因产物。

[0253] 43.根据实施方式40或实施方式41所述的细胞,其中治疗剂是视蛋白。

[0254] 44.根据实施方式40-43中任一项所述的细胞,其中编码所述治疗性基因产物的所述多核苷酸的侧翼是一个或多个AAV ITR。

[0255] 45.根据实施方式44所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、或绵羊AAV ITR或其变体。

[0256] 46.根据实施方式44或实施方式45所述的细胞,其中所述一个或多个AAV ITR是AAV2 ITR或AAV5 ITR。

[0257] 实施例

[0258] 实施例1:AAV2.5T突变体文库的构建

[0259] AAV2.5T是包含来自AAV2和AAV5的区域的杂合衣壳,在美国专利号9,441,244中有

所描述,其全部公开内容并入本文。AAV2.5T在视网膜下递送时能够转导视网膜,但在玻璃体内注射时则不能。AAV2.5T转导可以被富含硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (HSPG) 的内界限膜 (ILM) 阻断。

[0260] AAV2.5T的表面暴露结构域与AAV5的相同,除了AAV2.5T的aa582 (AAV5的aa581) 中的A到T的单一置换以外,这种突变似乎增加了哺乳动物细胞的感染性,而不会影响AAV5的典型唾液酸受体结合。AAV5和AAV2.5T与硫酸乙酰肝素的结合可以忽略不计,而AAV2对硫酸乙酰肝素具有高亲和性。

[0261] 为了开发一种在通过玻璃体内注射递送时具有增强的穿过ILM和转导视网膜细胞的能力的新的AAV变体,从AAV2.5T衣壳中与AAV2的HSPG结合区类似的区域产生具有环取代和插入的AAV突变文库,如氨基酸比对所确定的。

[0262] 通过合成具有随机7个氨基酸环的DNA片段产生两个突变文库。由于7个氨基酸位置中的每一个都有20个可能的氨基酸,因此这些片段文库的理论多样性约为 1×10^9 个独特变体。这些突变环的5'端侧接氨基酸LA,3'端侧接A。

[0263] 使用这些片段文库,通过在受体结合区中AAV2.5T衣壳序列的第577位插入10个氨基酸环来生成环插入文库 (LIL)。

[0264] 通过用氨基酸571和580之间的环变体序列 (从VP1的第一个氨基酸编号) 替换衣壳表面暴露区域中的序列来产生第二文库。将该文库称为环置换文库 (LSL)。

[0265] 这些AAV变体衣壳被克隆到质粒中以制作单个病毒包装细胞文库 (通过以1:50的比率 (质粒:phiC31) 瞬时转染phiC31整合酶,如W02017112868A1中所述)。由此产生的包装细胞文库产生由载体基因组组成的突变AAV病毒粒子,该载体基因组包含包装在该基因组编码的衣壳蛋白内的突变Cap基因,具有低水平的交叉包装。为确定细胞文库的多样性,从每个文库分离gDNA并进行NGS。所述多样性在LIL中为约725,000个独特变体和LSL中为约558,000个独特变体。

[0266] 实施例2:在NHP眼中的AAV文库筛选

[0267] 为了研究突变AAV衣壳穿过ILM的能力,在体内筛选了变体AAV病毒粒子文库,以确定其通过内界限膜 (ILM) 并感染非人类灵长类动物 (NHP) 眼中的视网膜细胞的能力。

[0268] 将LIL和LSL突变体AAV衣壳文库玻璃体内注射到3只非洲绿猴 (*Chlorocebus sabaeus*) 的眼中,每只眼的剂量在 6×10^9 和 9×10^9 vg之间。注射后四到六周,处死动物并分离每只动物的视网膜组织外植物。分离具有脉络膜亚组织的玻璃体和视网膜,沿角膜缘切下眼球,丢弃眼睛的前部。然后除去玻璃体,同时将视网膜附着在洗眼杯 (eyecup) 中。将洗眼杯转移至CO₂非依赖性培养基中。将视网膜和RPE/脉络膜切割成视网膜平片 (flat-mount)。将整个平片 (光感受器层向下) 置于10cm Trans-well培养板的聚碳酸酯插入膜上,所述培养板含有10mL的CO₂非依赖性培养基。当视网膜平缓沉降于插入物上时,除去培养基以使得视网膜暴露于大气。

[0269] 通过在组织顶部添加Ad5溶液2小时,用1000感染复数 (MOI) 的人Ad5病毒 (在无抗生素或抗真菌剂的Neurobasal-A培养基中稀释) 转导视网膜。Ad5病毒的共感染用于增加视网膜组织中存在的突变AAV病毒粒子的Cap RNA的表达,从而增加感染细胞中突变衣壳RNA的数量,用于后续检测。

[0270] 在初始孵育之后,将Neurobasal-A+ (B27补充剂,1X GlutaMAX,1X抗生素-抗真菌

剂)培养基添加到孔底部,以使得其与插入物的底部接触但没有覆盖组织(~10ml),组织外植物与CO₂在37℃下孵育2天。孵育之后,从培养板取下插入物,置于干净平坦的表面上,如图1A中所示制备3个穿孔。简言之,从黄斑获取具有RPE/脉络膜的神经视网膜的5mm穿孔,随后使用10mm穿孔制备第二个同心穿孔以分离在血拱内的黄斑周边的视网膜和RPE/脉络膜区域,将其称为旁中央凹。随后收集剩余周边视网膜和RPE/脉络膜。

[0271] 然后从每个组织穿孔中提取RNA,并通过RT-PCR和一轮PCR将RNA转化为cDNA。然后将得到的PCR产物克隆回质粒并测序,以确定能够成功穿过ILM并感染猴眼视网膜细胞的突变AAV衣壳的序列。

[0272] 对于第二轮和第三轮筛选,将从每个单独的视网膜位置(穿孔)中提取的LIL和LSL变体混合在一起,为每个位置建立一个变体库。然后将这些文库混合物用于生成细胞和AAV衣壳文库,将这些文库分别注射到非洲绿猴(AGM)的眼中,并使用与上述相同的视网膜穿孔策略进行收集。此外,在一种情况下,将视网膜色素上皮分离出来,并从该组织中回收变体。

[0273] 使用NGS分析,鉴定AAV2.5T.LSV1。AAV2.5T.LSV1是来源于LSL文库的环置换变体,其具有下述氨基酸环序列:LAHKFKSGDA(SEQ ID NO:3)。AAV2.5T.LSV1是在第2轮筛选中黄斑区丰度排在第48位的变体。在第3轮筛选中,AAV2.5T.LSV1是在副中央凹中发现的丰度排在第2位的变体,也是在RPE区域中发现的丰度最高的变体。在每轮筛选时名列前茅的变体的相对丰度如图1B-1E中所示。

[0274] 实施例3:在HEK293细胞中生产AAV2.5T.LSV1

[0275] 在HEK293细胞中使用三重转染方法生产AAV2.5T.LSV1以用于进一步表征。所得AAV2.5T.LSV1的滴度高于 1×10^{13} vg/ml,表明AAV2.5T.LSV1具有良好的包装能力。

[0276] 实施例4:AAV2.5T.LSV1的肝素结合亲和性

[0277] AAV2.5T.LSV1结合至HSPG的能力是通过使用预装填GE肝素柱进行肝素结合测定来评估的。将AAV2.5T.LSV1的乙酰肝素结合与AAV2.5T和上述筛选中产生的两种其他变体进行比较。将载体上样到柱上,然后洗涤,最后用增加浓度的NaCl(100mM-1M)洗脱。使用B1抗体通过斑点印迹收集和分析上样、流过、洗涤和洗脱的级分。

[0278] 如图2中所示,AAV2.5T未与肝素结合。而相反的是,AAV2.5T.LSV1具有结合肝素的能力。

[0279] 实施例5:在猪视网膜外植物中的表达和趋向性

[0280] 如在PCT/US2017/030636中所述,将离体猪视网膜外植物保持在trans-well中,其全部公开内容并入本文,并用GFP报告基因转导以 2×10^{10} vg或 4×10^{10} vg包装到AAV2.5T.LSV1衣壳中。在转导后的1周和2周捕获实时荧光图像。图3显示了猪视网膜外植物的实时图像。这些图像提示AAV2.5T.LSV1能够有效转导培养物中的猪视网膜的至少一些细胞。

[0281] 实施例6:玻璃体内施用至非人灵长类视网膜后的表达

[0282] 在非洲绿猴(*Chlorocebus sabaeus*)中进行了体内研究,在广泛启动子的控制下,以 5×10^{11} vg/眼将非洲绿猴玻璃体内注射携带GFP表达盒的AAV2.5T.LSV1。通过眼底荧光和海德堡光谱成像每周检测眼中的表达,如图4A-4E中所示。AAV2.5T.LSV1-GFP的玻璃体内递送导致黄斑和血拱内的GFP表达。视网膜的血拱区域具有最厚的ILM,认为在玻璃体内注射时其会阻止大多数AAV对视网膜细胞的转导。

[0283] 实施例7:玻璃体内施用后表达的评价

[0284] IVT注射后,在非人灵长类中评价了AAV2.5T.LSV1的视网膜趋向性。

[0285] 非洲绿猴 (*Chlorocebus sabaeus*) 玻璃体内 (IVT) 注射 5×10^{11} vg/眼的 AAV2.5T.LSV1, 该AAV2.5T.LSV1携带在普遍存在的启动子控制下的GFP表达盒, 以评估 AAV2.5T.LSV1的趋向性。

[0286] 在IVT注射后第35天处死猴子并摘除眼。摘除眼球后,眼在4%多聚甲醛中固定24小时,然后用30%蔗糖/索伦森磷酸盐缓冲液冷冻过夜。将眼解剖成象限,并从巩膜中取出视网膜,包括RPE和脉络膜。视网膜象限平装在载玻片上,盖上30%蔗糖/索伦森磷酸盐缓冲液。使用Zeiss Axio.Z1获得天然GFP的5X平铺扫描,并使用Zeiss Zen Blue软件拼接。AAV2.5T.LSV1-GFP的所得实时荧光图像如图5A-5D中所示。

[0287] GFP强度分布是从图5C-5D中所示的平装视网膜部分的5X扫描中获得的。从最靠近视神经的黄斑边缘到睫状体进行测量。从黄斑到睫状体的距离上绘制了大约20,000个测量点,总长度为20mm(图5E)。

[0288] 视网膜平片包埋在OCT封固剂中并在异戊烷上冷冻。通过中央凹、中周边和周边以10 μ m的厚度收集冷冻切片,并对载玻片进行染色以进行免疫荧光标记 (IFL)。RPE的平面图像是通过将RPE从平装视网膜的一部分中的脉络膜剥离,然后反转切片,使RPE面朝下放在载玻片上,然后进行IFL染色来制作的。0.1% Triton-x透化30min后进行IFL,然后在索伦森磷酸盐缓冲液中用5%正常驴血清/6%牛血清白蛋白封闭血清蛋白1小时。在4 $^{\circ}$ C下过夜,使用在表2中所示的染色和抗体进行IFL。

[0289] 表2:染色和抗体

[0290]

标志物类型	一抗或染色	一抗或染色的供应商	一抗或染色的浓度	二抗	二抗的供应商	二抗的浓度
基因产物表达	GFP	Abcam cat# ab13970	1:1000	驴抗鸡 488	Jackson Immuno Research Cat# 703-545-155	5μg/ml
视杆光感受器细胞	视紫红质	Millipore sigma Cat# MABN15	1:2500	驴抗小鼠 Alexa Flour 555	Thermo Scientific Cat# A-31570	5μg/ml
Müller 细胞	谷氨酰胺合成酶	Sigma Cat# G2781	1:20000	驴抗家兔 Alexa Flour 647	Thermo Scientific Cat# A-31573	5μg/ml
双极细胞	PKC-α	Invitrogen Cat# MA1-157	1:50	驴抗小鼠 Alexa Flour 555	Thermo Scientific Cat# A-31570	5μg/ml
视网膜神经节细胞体	γ 突触核蛋白	Abcam Cat#	1:100	驴抗家兔 Alexa Flour 647	Thermo Scientific Cat# A-31573	5μg/ml
视椎光感受器细胞	视锥抑制蛋白	Millipore Sigma Cat# AB15282	1:500	驴抗家兔 Alexa Flour 647	Thermo Scientific Cat# A-31573	5μg/ml
视网膜神经	抗 βIII 微管	Abcam Cat# ab7751	1:500	驴抗小鼠	Thermo Scientific	5μg/ml

[0291]

节轴突末端 路径	蛋白 (Tuj-1)			Alexa Flour 555	Cat# A-31570	
视网膜色素 上皮 (RPE)	RPE-65	Abcam cat# ab78036	1:200	驴抗小鼠 Alexa Flour 555	Thermo Scientific Cat# A-31570	5μg/ml
细胞核	DAPI	Invitrogen Cat# D21490	5μg/ml			

[0292] 使组织切片成像并且所得图像如图6A-25E中所示。表明细胞类型AAV2.5T.LSV1病毒粒子的趋向性的总结显示在表3中。

[0293] 表3:病毒粒子的趋向性

[0294]

	中央凹	视网膜
Müller 细胞	是	Yes
光感受器	视锥细胞	视锥细胞>视杆细胞
双极细胞	是	是
内丛状层内的轴突末端	双极细胞	双极细胞
视网膜色素上皮		是

[0295] GFP阳性细胞的百分比通过与细胞特异性标志物共定位的手动细胞计数来量化。在视网膜各区域中GFP阳性双极细胞、视锥细胞和RPE细胞的数量分别如图26A-26C中所示,并总结在表4中。GFP阳性细胞的数量因视网膜中的位置而异。

[0296] 表4:GFP阳性细胞的百分比

[0297]

细胞类型 (位置)	占总数%
视锥细胞 (中央凹)	14-16%
光感受器 (中间和周边视网膜)	25-55%
双极细胞 (中间和周边视网膜)	25-50%
RPE细胞 (中间和周边视网膜)	2.5-4%

[0298] 实施例8中和抗体曲线的确定

[0299] 通过体外测定确定AAV2.5T.LSV1和AAV2.5T病毒的中和抗体 (nAB) 曲线。简言之,将混合人IgG抗体 (Gammaguard IVIG) 的系列稀释液与表达GFP的AAV2.5T.LSV1或AAV2.5T载体组合,用于转导293T细胞。随后测量GFP表达并且使用GFP表达的抑制来计算IC₅₀。

[0300] 实施例9:AAV2.5T.LSV1和AAV2的中和抗体曲线的比较

[0301] 通过体外测定确定AAV2.5T.LSV1和AAV2病毒的中和抗体 (nAB) 曲线。简言之,制备人IgG抗体 (Gammaguard IVIG) 的3倍系列稀释液并与表达GFP的AAV2.5T.LSV1或AAV2载体组合 (分别为AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP或AAV2-CMV-GFP)。然后,将混合物用于转导293T细胞。将细胞孵育3天,随后测量GFP表达。使用GFP表达的抑制来计算IC₅₀。IC₅₀报告为混合的人IgG抗体样品的倒数稀释,此时GFP表达降低了50% (例如,IC₅₀为100表明以1:100稀释的IVIG将GFP表达降低了50%)。较大的IC₅₀值表明混合的人IgG抗体中存在的抗体对AAV转导的抑制增加。

[0302] AAV2.5T.LSV1和AAV2的抑制曲线如图27A-27B中所示。AAV2计算的IC₅₀为103.8,和AAV2.5T.LSV1计算的IC₅₀为9.3。

[0303] 序列

[0304]

#	序列	附注
1	HKFKSGD	LSV1 插入 1
2	X ₁ X ₂ HKFKSGDX ₃	LSV1 插入 2
3	LAHKFKSGDA	LSV1 插入 3
4	MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQAR GLVLPGYNYLGPNGLDLRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEA GDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSGGNGLGKAVFQAKKRVL EPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAE AGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGV GNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLP SYN NHQYREIKS GSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINN YWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDD DYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPT ERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNL KLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWF PGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSATFNRMELGASYQVPP QPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLI TSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIV PGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHSPAMGGFGLKHPP	AAV5 VP1

[0305]

	PMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKK ENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYL TRPL	
5	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDS RGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQL DSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV LEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDA EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADG VGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSEYNNHQQYREI KSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLIN NYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTD DDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTEN PTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPHSSFAPSQNL FKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSATFATNRMELEGASYQVPP QPNGMTNNLQGSNTYALNTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLI TSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPTGTYNLQEI GVSWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHSPAMGGFGLKHPPP PMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKK ENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYL TRPL	AAV2.5T VP1
6	MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQAR GLVLPGYNYLGPFGNLDKGEPVNRADDEVAREHDSYNEQLEA GDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSGGNLKGAVFQAKKRV EPFGLVEEGAKTAPTGKRIDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAE AGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGV GNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSEYNNHQQYREIKS GSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLIN YWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDD DYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPT ERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPHSSFAPSQNL FKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWF FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSATFATNRMELEGASYQVPP QPNGMTNNLQGSNTYALNTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLI TSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFKSGDAPATGTYNLQEI PGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHSPAMGGFGLKHPPP PMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKK ENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYL TRPL	AAV5.LSV1 VP1
7	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDS RGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQL DSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV LEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDA EAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADG VGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSEYNNHQQYREI KSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLIN NYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTD DDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTEN PTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPHSSFAPSQNL FKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW	AAV2.5T.LSV1 VP1

[0306]

	FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSATFNRMELEGASYQVPP QPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLI TSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFSGDAPTTGTYNLQEIV PGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHP PMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKK ENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYL TRPL	
8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGT	贝伐单抗重链 可变结构域
9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV	贝伐单抗轻链 可变结构域
10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPYGGTSHWYFDVWGQGT	雷珠单抗重链 可变结构域
11	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAP KVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV	雷珠单抗轻链 可变结构域
12	MVSYWDTGVLLCALLSCLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEII HMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTI DVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVNVDGFWVEYPSK HGHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYT CAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTI SKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	阿柏西普
13	MVSYWDTGVLLCALLSCLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIA GQTLHLQCRGEAAMQHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNG KQFCSTLTNLTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFIS DTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLD TLIPDGKRIIWD SRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTN YLTHRQTNTI DVQISTPRPVKLLRGHTLVNCTATTPLNTRVQM TWSYPDEKNKRASVRRRIDQNSHANIFYSVLTIDKMQNKDK GLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLET VAGKRSYRLSMKVKA FPSPEVVWLKDGLPATEKSARYL TRGYSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVK PQIYEKAVS SFPDPALYPLGSRQ	sFlt-1
14	IYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLK KFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHL YKTNYLTHRQTNTI	sFlt-1 片段
15	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAP KLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD DFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFS LTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDPPDDPYATWAKGRFTIS RDN SKNTLYLQM	布罗珠单抗

[0307]

	NSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGLVTVSS	
16	TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQI PAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHC DSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSTNNHQQYREIKSGSVDGSNAN AYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLR VKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLSTVQVFTDDDDYQLPYVVG NGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEY FPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVVPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQY LYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFGPMGRTQG WNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNL QGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPV NRVAYNVGGQMLAHKFKSGDAPTTGTYNLQEIVPGSVWMER DVYLQGPWAKIPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMMLIKNTP VPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNP EIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL	AAV5.LSV1 VP2
17	MSAGGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVT KSTRTWVLPSTNNHQQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYF DFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTV QDSTTTIANNLSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQ VFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSSFFCLEYFPSKMLRTGNNF EFTYNFEEVVPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLYRFVSTNNTG GVQFNKNLAGRYANTYKNWFGPMGRTQGWNLGSGVNRAS VSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENT MIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQ MLAHKFKSGDAPTTGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPWAK IPETGAHFHPSAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVP VSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNP EIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL*	AAV5.LSV1 VP3

序列表

<110> 阿德夫拉姆生物技术股份有限公司

<120> 用于玻璃体内递送的变体 AAV 衣壳

<130> 62700-20011.40

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/923,924

<151> 2019-10-21

<150> US 62/839,548

<151> 2019-04-26

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001] <220>

<223> 合成构建体

<400> 1

His Lys Phe Lys Ser Gly Asp

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 10

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 2

Xaa Xaa His Lys Phe Lys Ser Gly Asp Xaa

1 5 10

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 3
 Leu Ala His Lys Phe Lys Ser Gly Asp Ala
 1 5 10

<210> 4
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 4
 Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
 1 5 10 15
 [0002] Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30
 Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly
 35 40 45
 Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
 50 55 60
 Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp
 85 90 95
 Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn
 100 105 110
 Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe
 115 120 125
 Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile
 130 135 140
 Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
 145 150 155 160
 Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
 165 170 175
 Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
 180 185 190
 Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
 195 200 205
 Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp

	210		215		220
	Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro				
	225		230		235
	Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp				240
		245		250	255
	Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr				
		260		265	270
	Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln				
		275		280	285
	Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val				
		290		295	300
	Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr				
	305		310		315
	Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp				320
		325		330	335
	Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys				
		340		345	350
	Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr				
		355		360	365
	Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser				
		370		375	380
	Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn				
	385		390		395
	Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser				
		405		410	415
[0003]	Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp				
		420		425	430
	Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln				
		435		440	445
	Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp				
		450		455	460
	Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly				
	465		470		475
	Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu				
		485		490	495
	Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr				
		500		505	510
	Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile				
		515		520	525
	Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu				
		530		535	540
	Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg				
	545		550		555
	Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser				
		565		570	575
	Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro				
		580		585	590
	Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp				
		595		600	605
	Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met				
	610		615		620

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

<210> 5

<211> 725

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

[0004]

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg
 130 135 140
 Ile Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp
 145 150 155 160
 Ser Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser
 165 170 175
 Gln Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp
 180 185 190
 Thr Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly
 195 200 205

[0005]

Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr		
210	215	220
Trp Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu		
225	230	235 240
Pro Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val		
245	250	255
Asp Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly		
260	265	270
Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp		
275	280	285
Gln Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg		
290	295	300
Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser		
305	310	315 320
Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr		
325	330	335
Asp Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly		
340	345	350
Cys Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly		
355	360	365
Tyr Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser		
370	375	380
Ser Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly		
385	390	395 400
Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser		
405	410	415
Ser Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val		
420	425	430
Asp Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val		
435	440	445
Gln Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn		
450	455	460
Trp Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser		
465	470	475 480
Gly Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met		
485	490	495
Glu Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met		
500	505	510
Thr Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met		
515	520	525
Ile Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu		
530	535	540
Glu Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn		
545	550	555 560
Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser		
565	570	575
Ser Thr Thr Ala Pro Thr Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val		
580	585	590
Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile		
595	600	605
Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala		

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

<210> 6

<211> 724

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

[0006]

<400> 6

Met Ser Phe Val Asp	His Pro Pro Asp	Trp Leu Glu Glu Val	Gly Glu
1	5	10	15
Gly Leu Arg Glu Phe	Leu Gly Leu Glu	Ala Gly Pro Pro	Lys Pro Lys
20	25	30	
Pro Asn Gln Gln His	Gln Asp Gln Ala	Arg Gly Leu Val	Leu Pro Gly
35	40	45	
Tyr Asn Tyr Leu Gly	Pro Gly Asn Gly	Leu Asp Arg Gly	Glu Pro Val
50	55	60	
Asn Arg Ala Asp Glu	Val Ala Arg Glu	His Asp Ile Ser	Tyr Asn Glu
65	70	75	80
Gln Leu Glu Ala Gly	Asp Asn Pro Tyr	Leu Lys Tyr Asn	His Ala Asp
85	90	95	
Ala Glu Phe Gln Glu	Lys Leu Ala Asp	Asp Thr Ser Phe	Gly Gly Asn
100	105	110	
Leu Gly Lys Ala Val	Phe Gln Ala Lys	Lys Arg Val Leu	Glu Pro Phe
115	120	125	
Gly Leu Val Glu Glu	Gly Ala Lys Thr	Ala Pro Thr Gly	Lys Arg Ile
130	135	140	
Asp Asp His Phe Pro	Lys Arg Lys Lys	Ala Arg Thr Glu	Glu Asp Ser
145	150	155	160
Lys Pro Ser Thr Ser	Asp Ala Glu Ala	Gly Pro Ser Gly	Ser Gln
165	170	175	
Gln Leu Gln Ile Pro	Ala Gln Pro Ala	Ser Ser Leu Gly	Ala Asp Thr
180	185	190	
Met Ser Ala Gly Gly	Gly Gly Pro Leu	Gly Asp Asn Asn	Gln Gly Ala

	195		200		205
Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp					
210		215		220	
Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro					
225		230		235	240
Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp					
	245		250		255
Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr					
	260		265		270
Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln					
	275		280		285
Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val					
	290		295		300
Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr					
305		310		315	320
Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp					
	325		330		335
Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys					
	340		345		350
Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr					
	355		360		365
Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser					
	370		375		380
Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn					
385		390		395	400
[0007] Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser					
	405		410		415
Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp					
	420		425		430
Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln					
	435		440		445
Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp					
	450		455		460
Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly					
465		470		475	480
Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu					
	485		490		495
Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr					
	500		505		510
Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile					
	515		520		525
Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu					
	530		535		540
Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg					
545		550		555	560
Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Leu Ala His Lys Phe Lys Ser					
	565		570		575
Gly Asp Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro					
	580		585		590
Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp					
	595		600		605

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

<210> 7
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0008]

<400> 7
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg
 130 135 140
 Ile Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp
 145 150 155 160
 Ser Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser
 165 170 175
 Gln Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp
 180 185 190

[0009]

```

Thr Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly
    195                      200                      205
Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr
    210                      215                      220
Trp Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu
    225                      230                      235                      240
Pro Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val
    245                      250                      255
Asp Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly
    260                      265                      270
Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp
    275                      280                      285
Gln Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg
    290                      295                      300
Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser
    305                      310                      315                      320
Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr
    325                      330                      335
Asp Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly
    340                      345                      350
Cys Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly
    355                      360                      365
Tyr Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser
    370                      375                      380
Ser Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly
    385                      390                      395                      400
Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser
    405                      410                      415
Ser Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val
    420                      425                      430
Asp Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val
    435                      440                      445
Gln Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn
    450                      455                      460
Trp Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser
    465                      470                      475                      480
Gly Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met
    485                      490                      495
Glu Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met
    500                      505                      510
Thr Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met
    515                      520                      525
Ile Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu
    530                      535                      540
Glu Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn
    545                      550                      555                      560
Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Leu Ala His Lys Phe Lys
    565                      570                      575
Ser Gly Asp Ala Pro Thr Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val
    580                      585                      590
Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile

```

```

          595          600          605
Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala
  610          615          620
Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys
  625          630          635          640
Asn Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val
          645          650          655
Ser Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met
          660          665          670
Glu Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile
          675          680          685
Gln Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro
          690          695          700
Asp Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr
  705          710          715          720
Leu Thr Arg Pro Leu
          725

```

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0010] <220>
 <223> 合成构建体

```

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
          20          25          30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
          50          55          60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
  65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
          100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          115

```

<210> 9
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
          35           40           45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
          100          105          110

```

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

[0011]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 11

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
          35           40           45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
          100           105           110

```

<210> 12

<211> 458

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

```

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

```

					165						170					175
	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe
					180					185					190	
	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu
				195				200					205			
	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr
				210				215					220			
	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	225					230						235			240	
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
					245					250					255	
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				260					265					270		
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
				275				280					285			
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				290				295					300			
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	305					310					315				320	
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				325						330					335	
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				340					345					350		
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
				355					360					365		
[0013]	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				370				375					380			
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
	385					390					395				400	
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				405					410						415	
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				420					425					430		
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
				435				440					445			
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
		450					455									

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

1

5

10

15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro

	20	25	30
	Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Ala Gly Gln Thr Leu His		
	35	40	45
	Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Met Gln His Lys Trp Ser Leu Pro		
	50	55	60
	Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala		
	65	70	75
	Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr		
	85	90	95
	Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val		
	100	105	110
	Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile		
	115	120	125
	Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu		
	130	135	140
	Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val		
	145	150	155
	Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr		
	165	170	175
	Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe		
	180	185	190
	Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu		
	195	200	205
	Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg		
	210	215	220
[0014]	Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val		
	225	230	235
	Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr		
	245	250	255
	Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys		
	260	265	270
	Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His		
	275	280	285
	Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys		
	290	295	300
	Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys		
	305	310	315
	Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val		
	325	330	335
	Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser		
	340	345	350
	Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val		
	355	360	365
	Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu		
	370	375	380
	Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala		
	385	390	395
	Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys		
	405	410	415
	Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu		
	420	425	430

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
 435 440 445
 Arg Gln
 450

<210> 14
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 14
 Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr
 1 5 10 15
 Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val
 20 25 30
 Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys
 35 40 45
 Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp
 50 55 60
 Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly
 65 70 75 80
 [0015] Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn
 85 90 95
 Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile
 100 105

<210> 15
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 15
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr

	145		150		155		160
	Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys						
		165		170		175	
	Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr						
		180		185		190	
	Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val						
		195		200		205	
	Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val						
		210		215		220	
	Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr						
		225		230		235	
	Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro						
		245		250		255	
	Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe						
		260		265		270	
	Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe						
		275		280		285	
	Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser						
		290		295		300	
	Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg						
		305		310		315	
	Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr						
		325		330		335	
	Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala						
		340		345		350	
[0017]	Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val						
		355		360		365	
	Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr						
		370		375		380	
	Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro						
		385		390		395	
	Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu						
		405		410		415	
	Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln						
		420		425		430	
	Met Leu Ala His Lys Phe Lys Ser Gly Asp Ala Pro Thr Thr Gly Thr						
		435		440		445	
	Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp						
		450		455		460	
	Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala						
		465		470		475	
	His Phe His Pro Ser Pro Ala Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro						
		485		490		495	
	Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr						
		500		505		510	
	Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr						
		515		520		525	
	Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser						
		530		535		540	
	Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro						
		545		550		555	
						560	

Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr
 565 570 575
 Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
 580 585

<210> 17
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 17
 Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
 20 25 30
 Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
 35 40 45
 Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
 50 55 60
 Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 65 70 75 80
 [0018] Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 85 90 95
 Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
 100 105 110
 Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
 115 120 125
 Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 130 135 140
 Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
 145 150 155 160
 Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
 165 170 175
 Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
 180 185 190
 Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
 195 200 205
 Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 210 215 220
 Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 225 230 235 240
 Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 245 250 255
 Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 260 265 270
 Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 275 280 285

[0019]

Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	Phe	Ala	Thr	Thr	Asn	Arg	Met	Glu
290						295						300			
Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Tyr	Gln	Val	Pro	Pro	Gln	Pro	Asn	Gly	Met	Thr
305					310					315				320	
Asn	Asn	Leu	Gln	Gly	Ser	Asn	Thr	Tyr	Ala	Leu	Glu	Asn	Thr	Met	Ile
			325						330					335	
Phe	Asn	Ser	Gln	Pro	Ala	Asn	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Leu	Glu
			340						345					350	
Gly	Asn	Met	Leu	Ile	Thr	Ser	Glu	Ser	Glu	Thr	Gln	Pro	Val	Asn	Arg
		355					360					365			
Val	Ala	Tyr	Asn	Val	Gly	Gly	Gln	Met	Leu	Ala	His	Lys	Phe	Lys	Ser
370						375					380				
Gly	Asp	Ala	Pro	Thr	Thr	Gly	Thr	Tyr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Val	Pro
385					390					395				400	
Gly	Ser	Val	Trp	Met	Glu	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp
			405						410					415	
Ala	Lys	Ile	Pro	Glu	Thr	Gly	Ala	His	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Ala	Met
			420				425					430			
Gly	Gly	Phe	Gly	Leu	Lys	His	Pro	Pro	Pro	Met	Met	Leu	Ile	Lys	Asn
		435					440					445			
Thr	Pro	Val	Pro	Gly	Asn	Ile	Thr	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Pro	Val	Ser
	450					455					460				
Ser	Phe	Ile	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Thr	Val	Glu	Met	Glu
465					470					475				480	
Trp	Glu	Leu	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln
			485						490				495		
Tyr	Thr	Asn	Asn	Tyr	Asn	Asp	Pro	Gln	Phe	Val	Asp	Phe	Ala	Pro	Asp
			500					505				510			
Ser	Thr	Gly	Glu	Tyr	Arg	Thr	Thr	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu
		515					520					525			
Thr	Arg	Pro	Leu												
530															

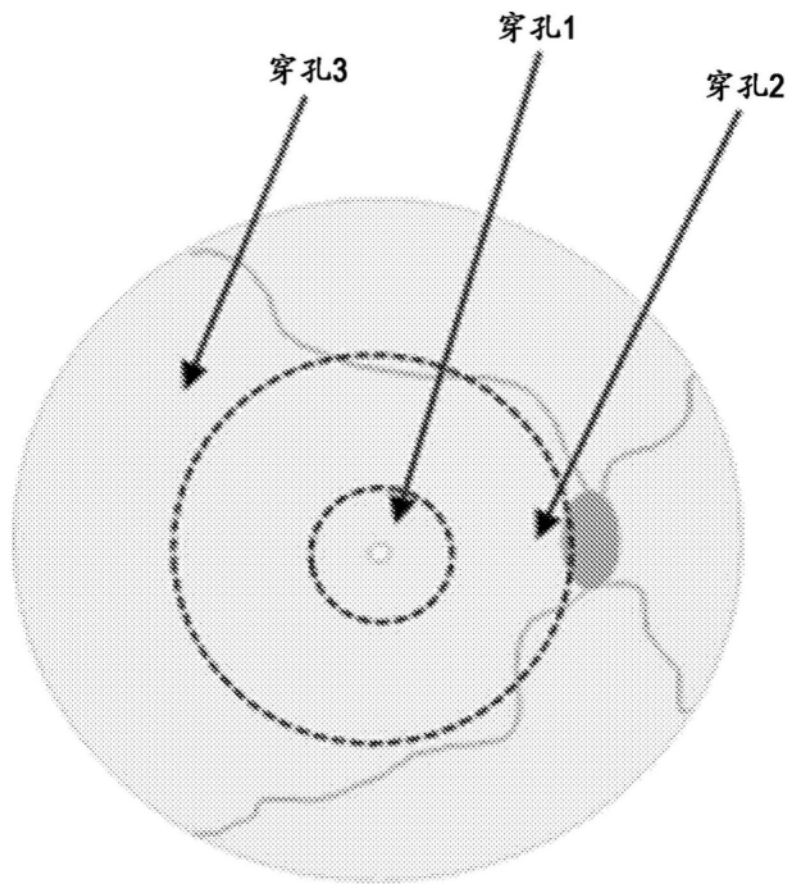
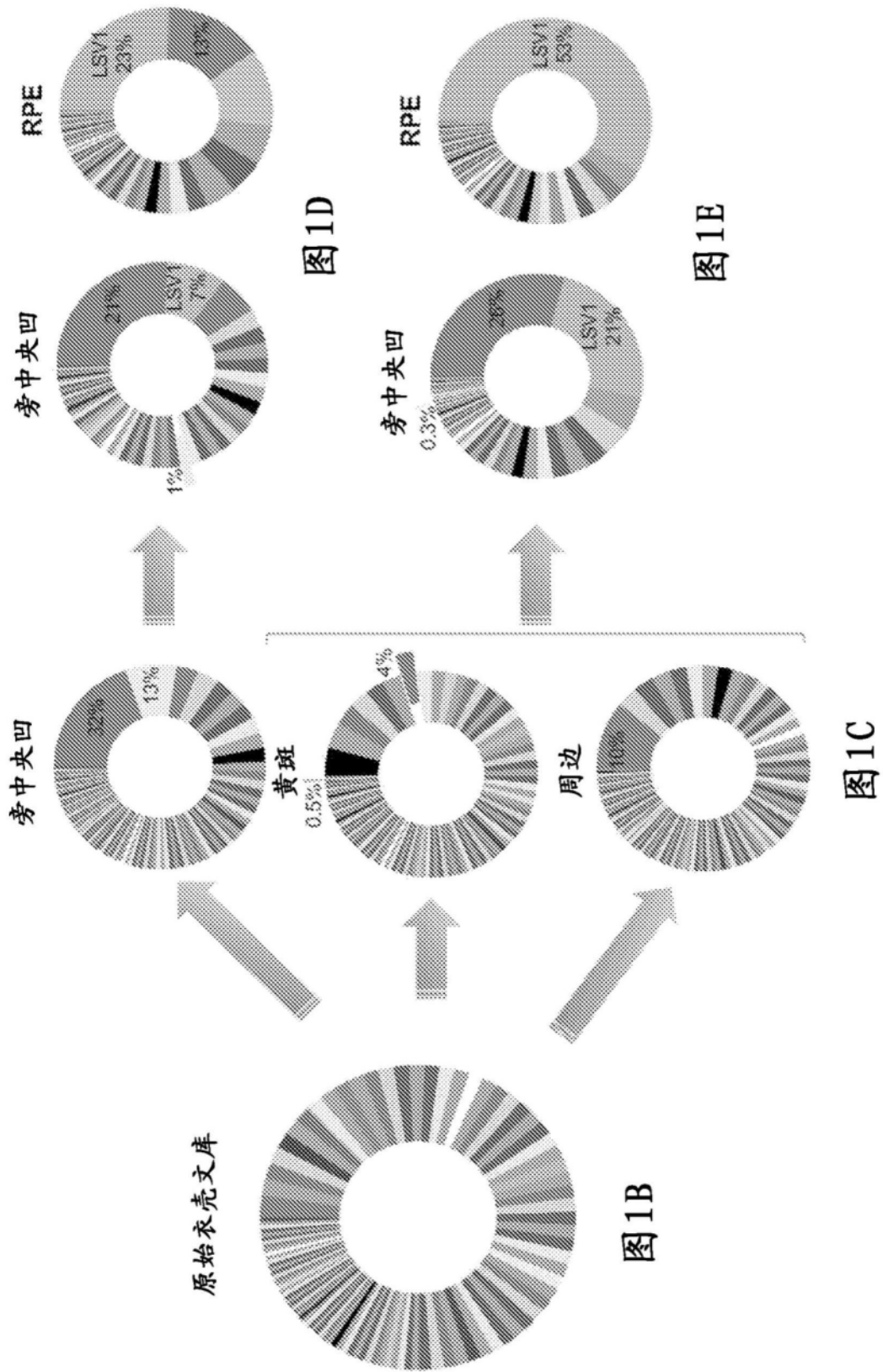


图1A



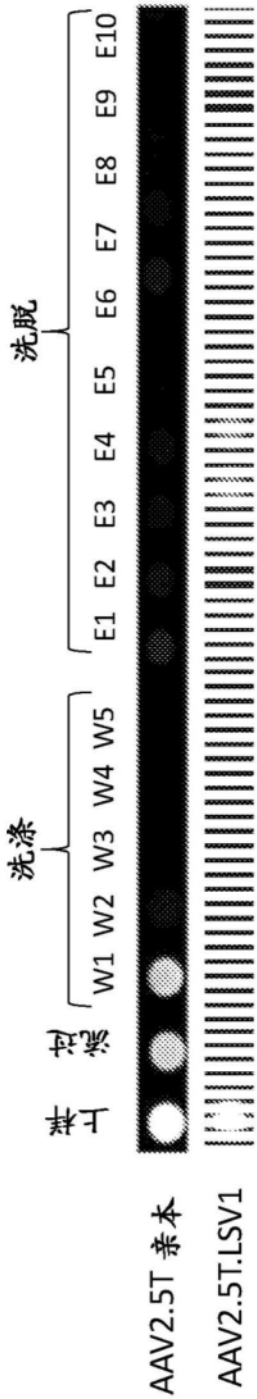


图2

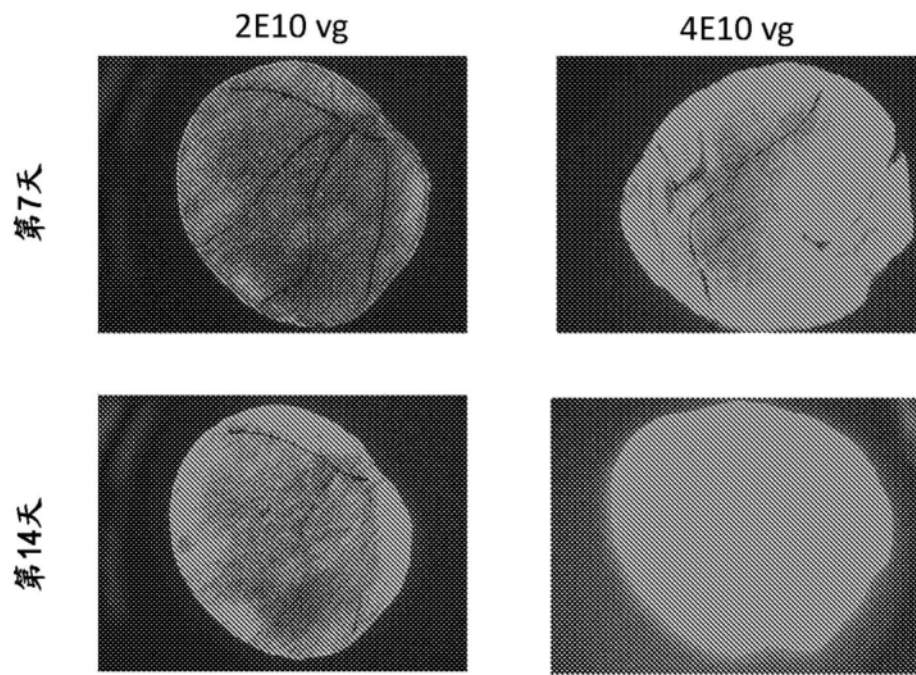
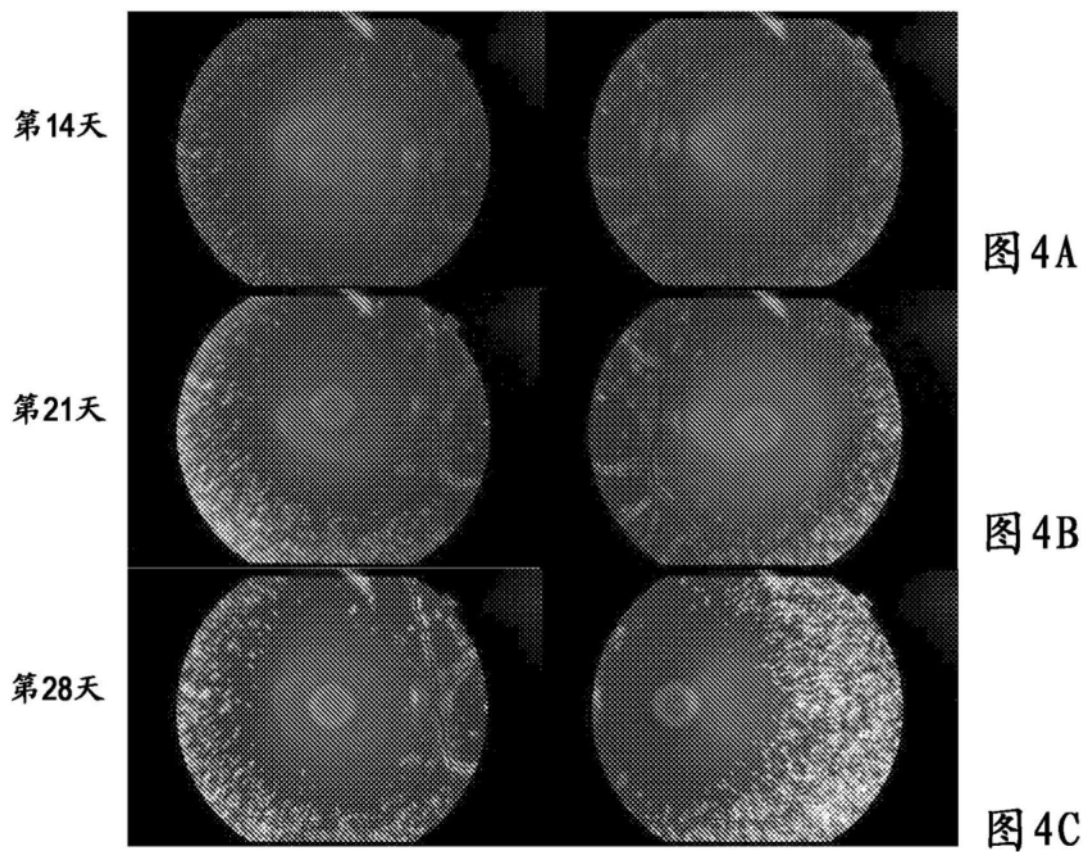


图3



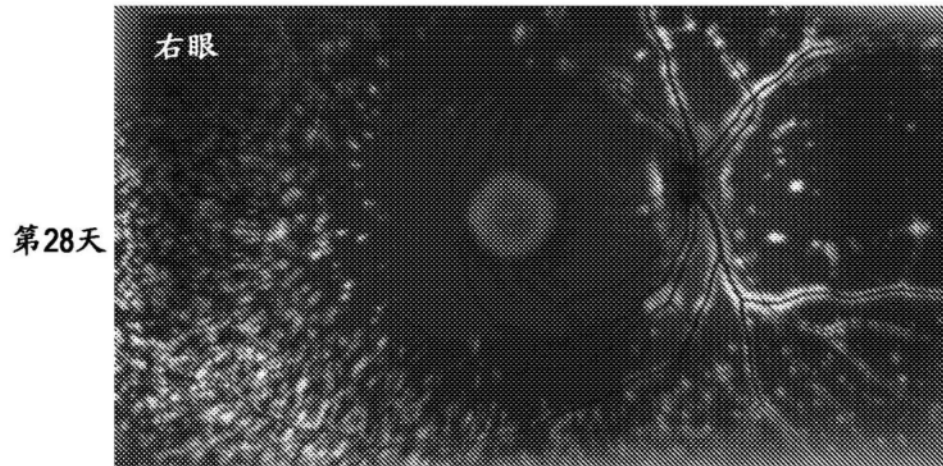


图4D

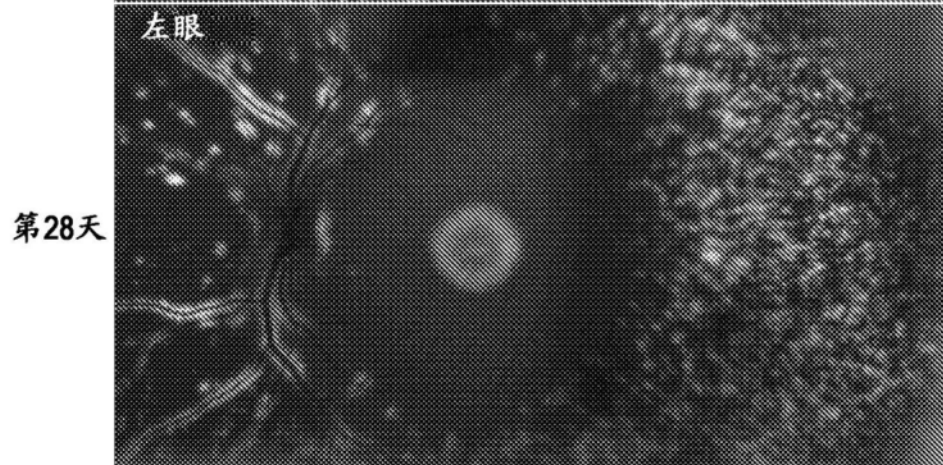


图4E

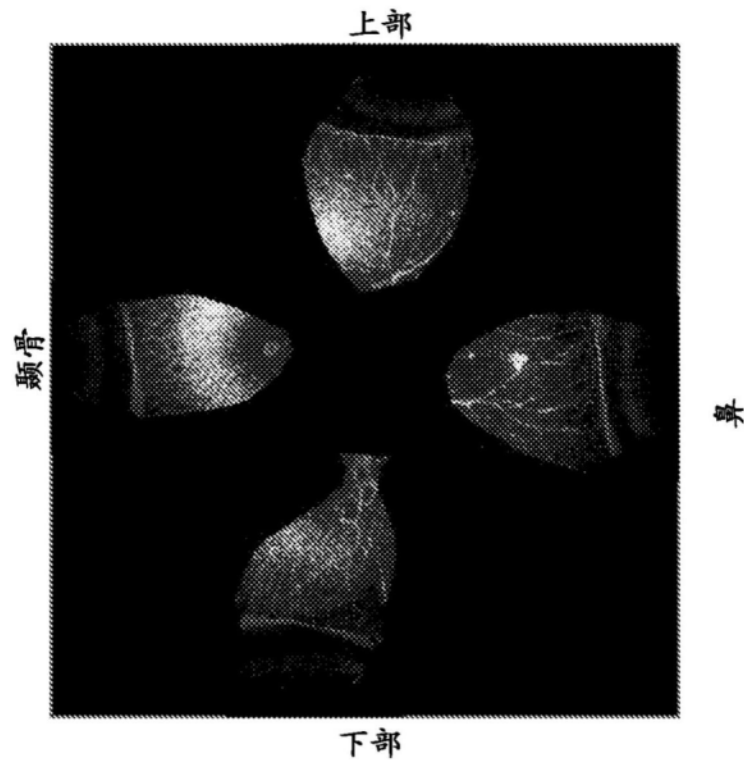


图5A

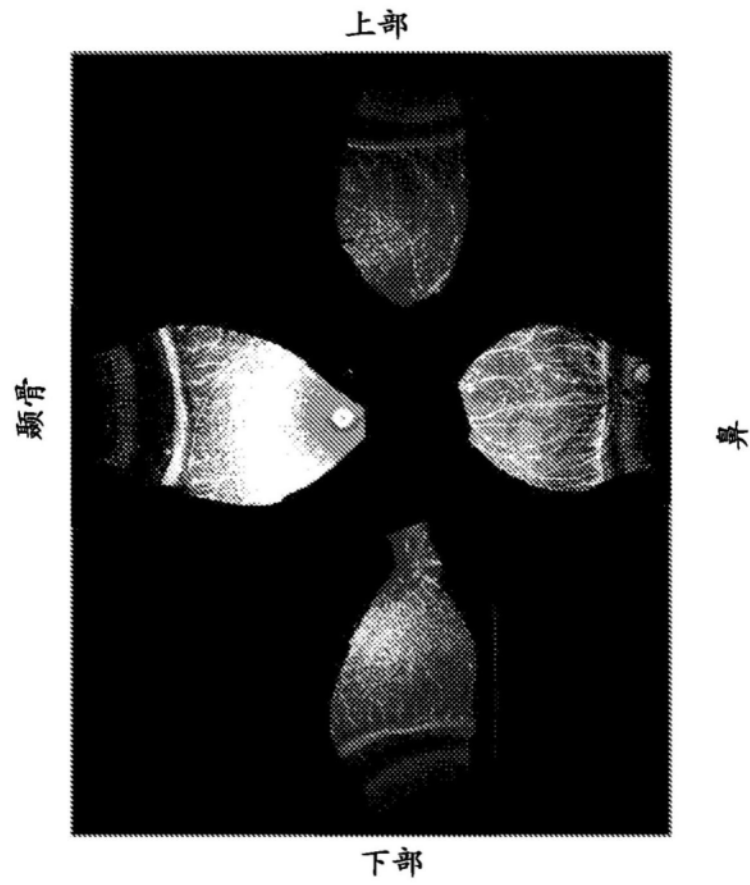


图5B

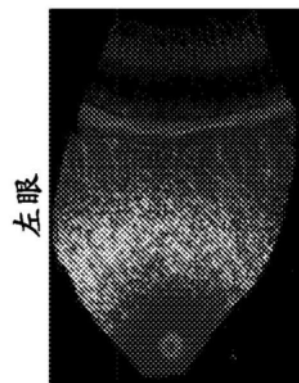


图5C

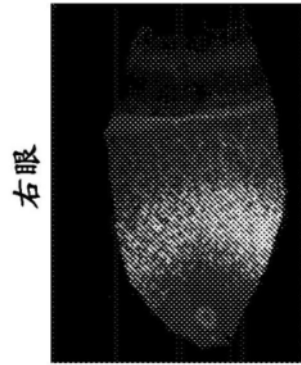


图5D

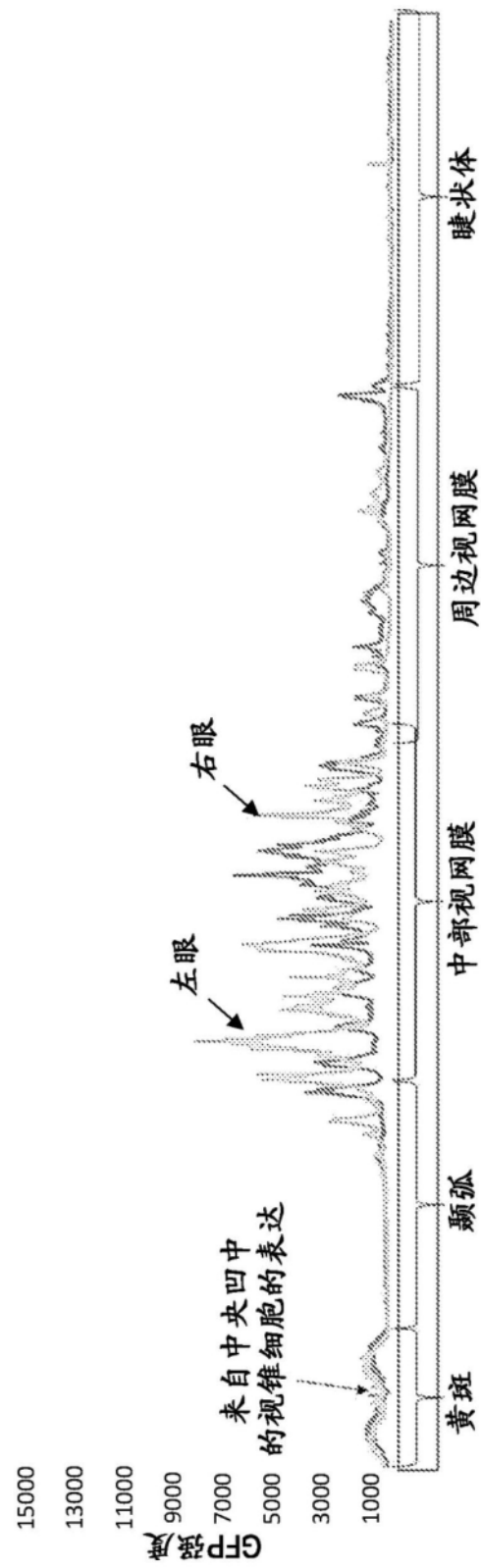
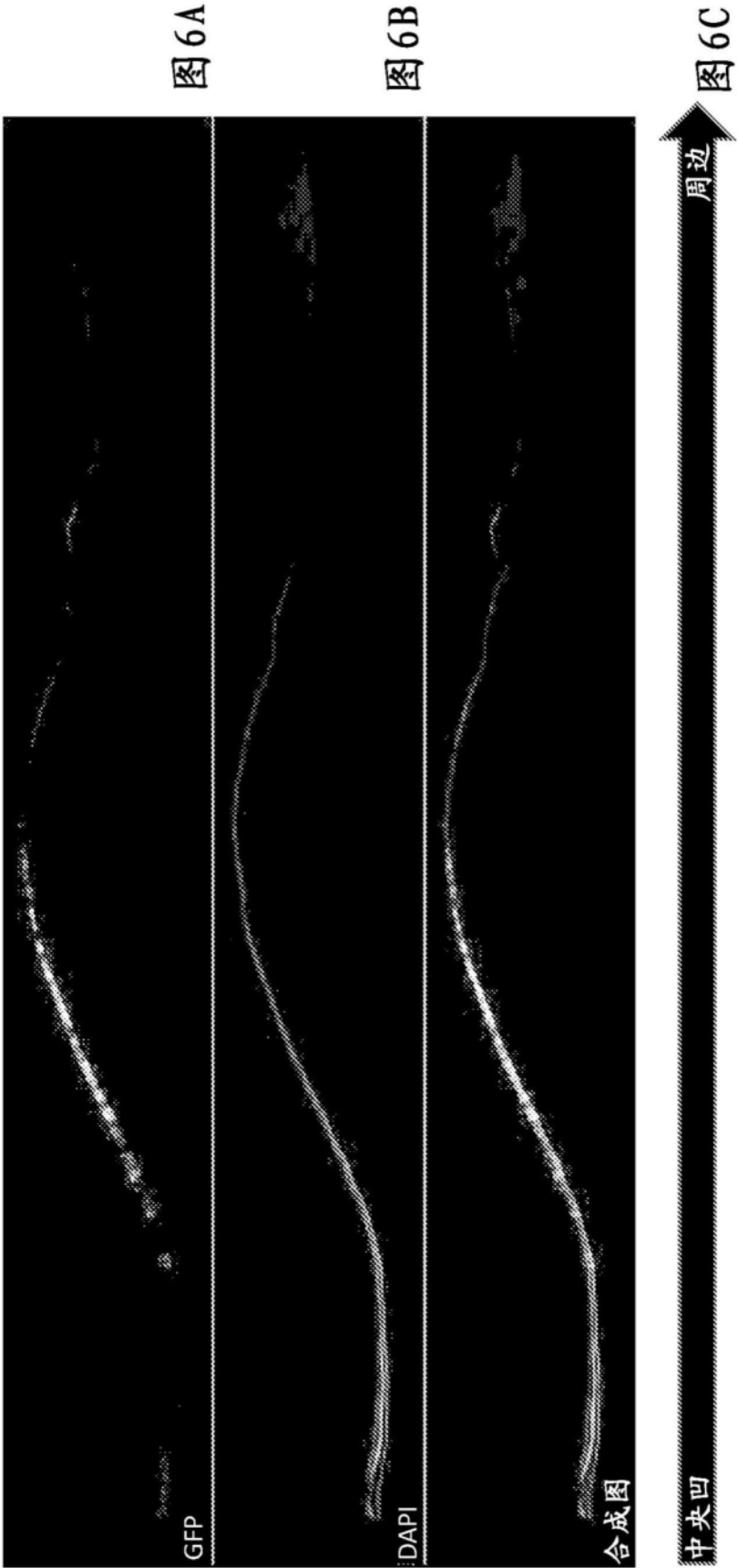


图5E



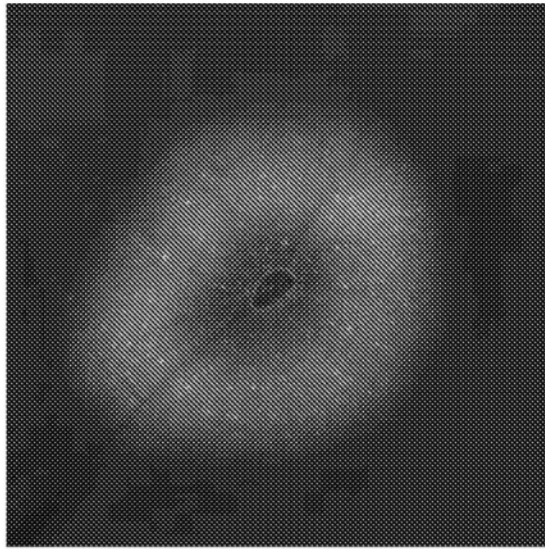


图7

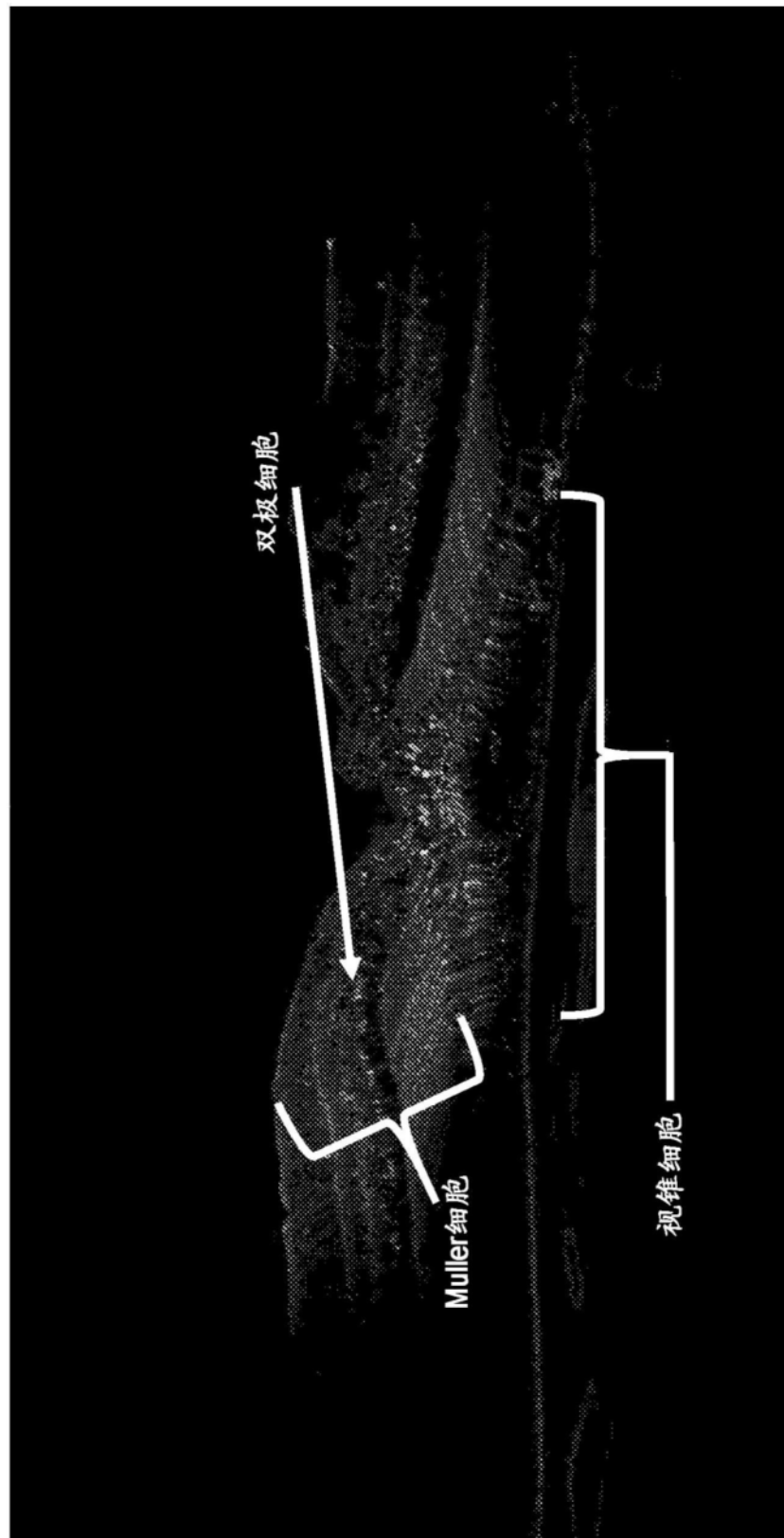


图8

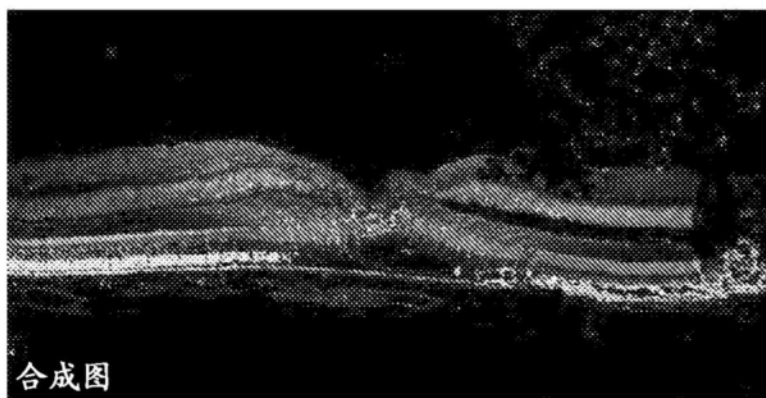


图9A

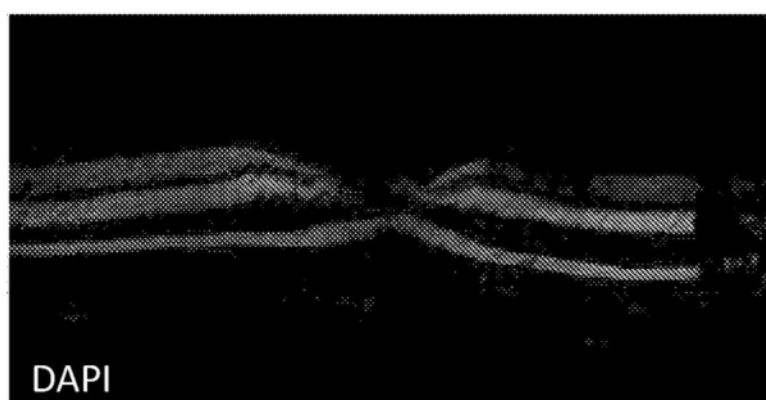


图9B

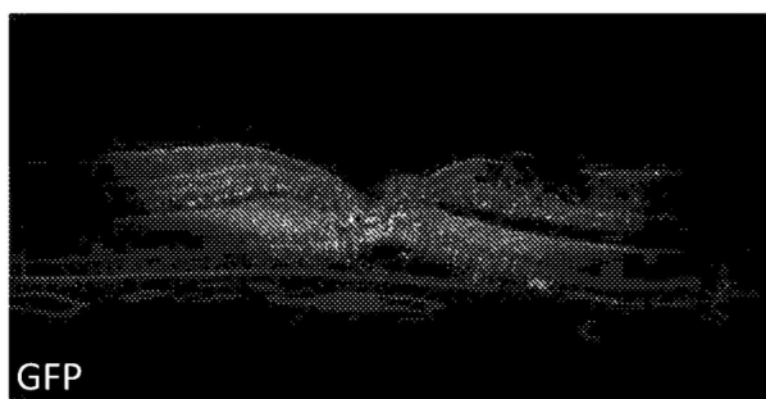


图9C

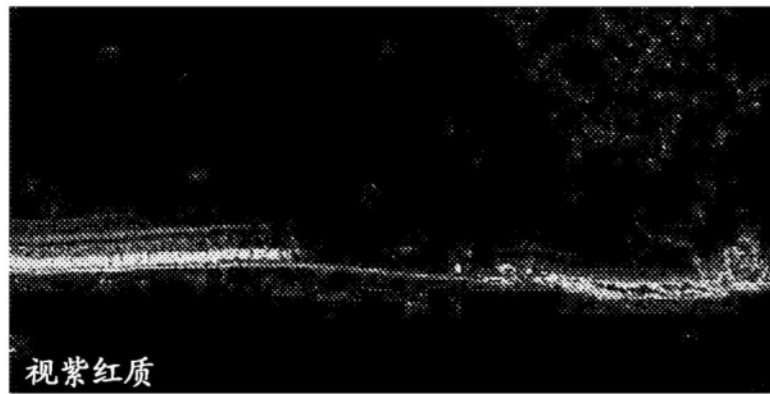


图9D

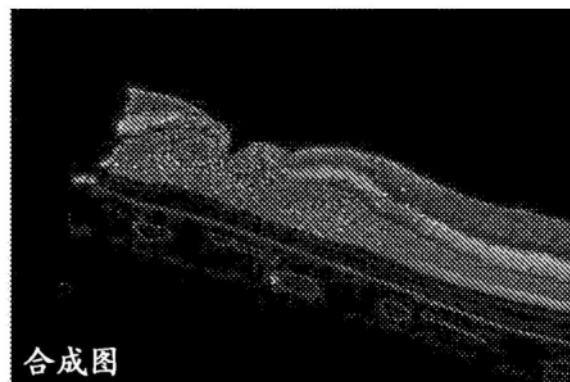


图10A

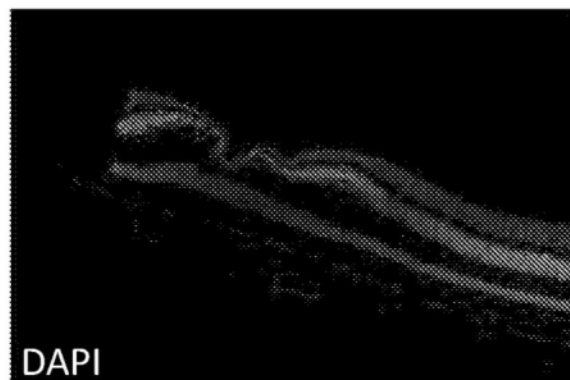


图10B

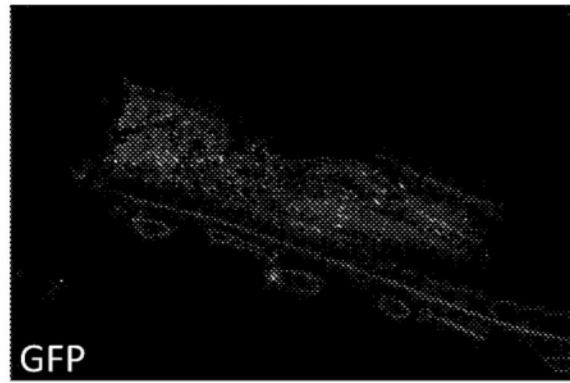


图10C

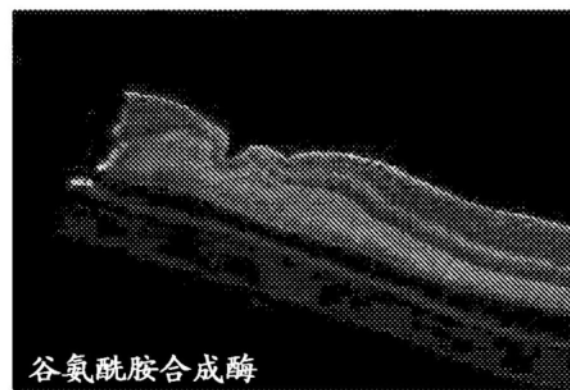


图10D

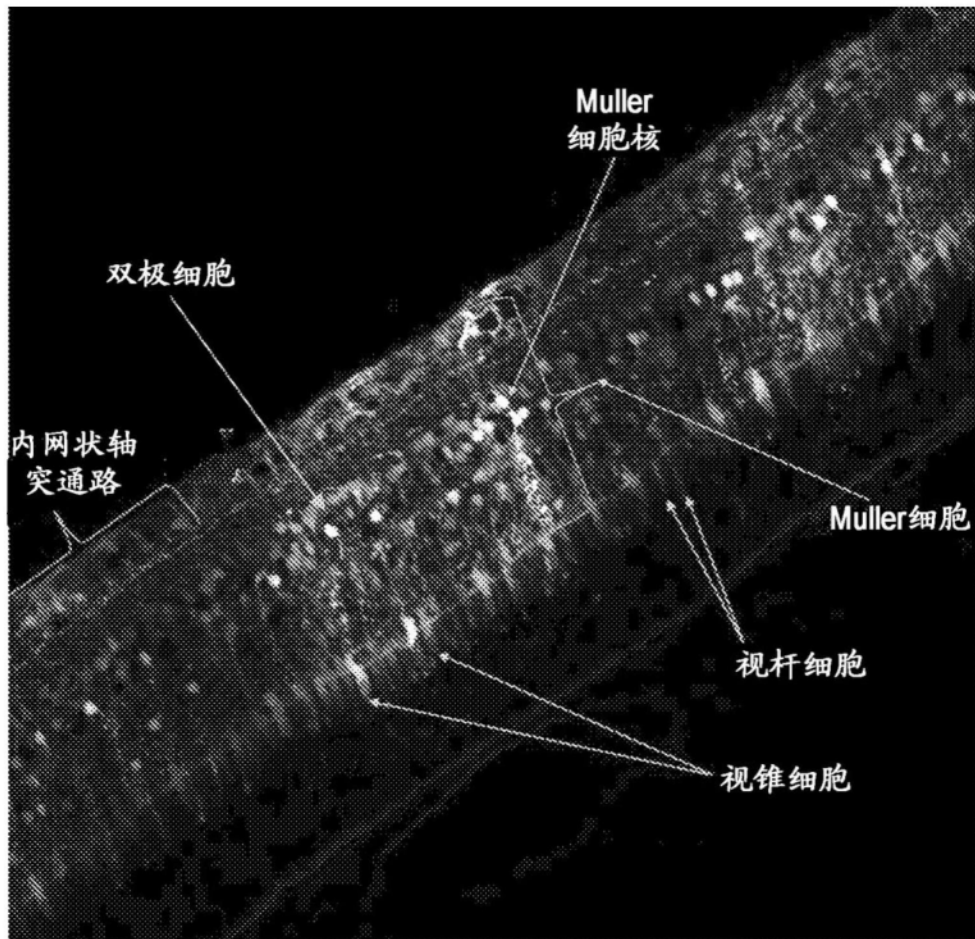


图11

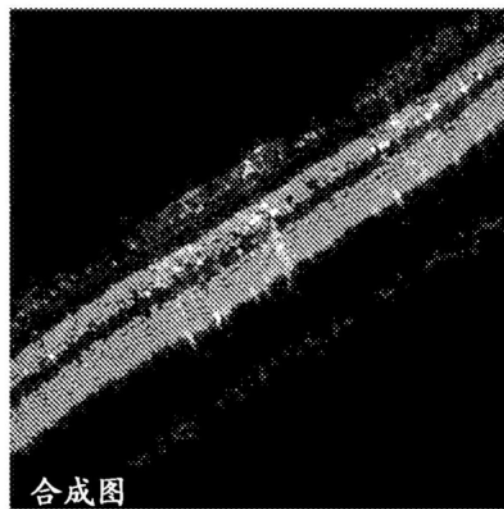


图12A

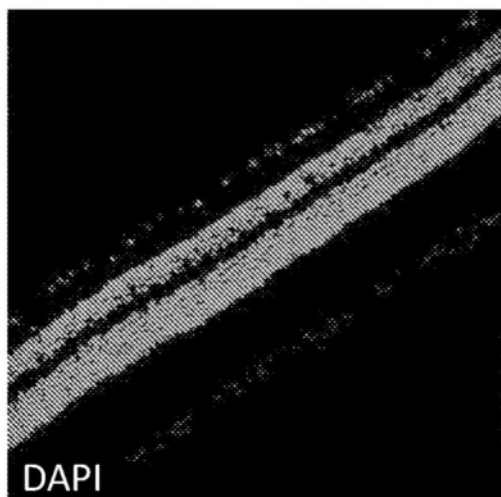


图12B

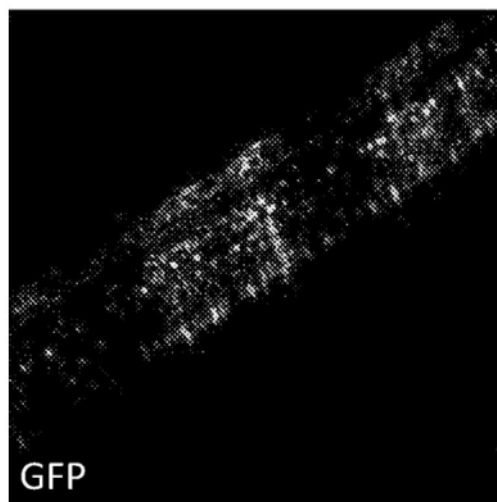


图12C

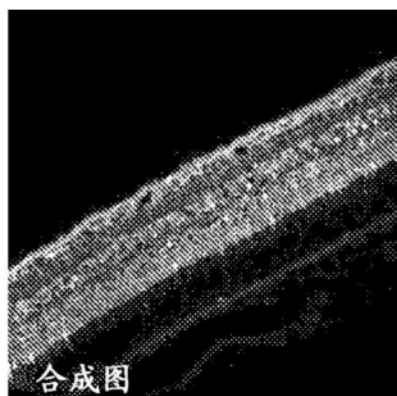


图13A

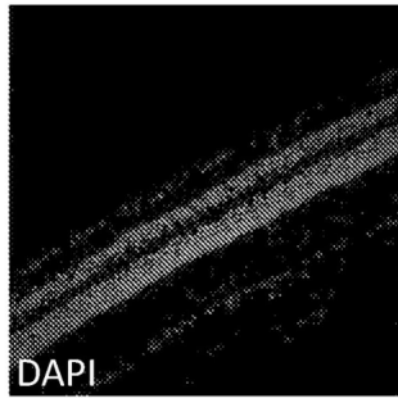


图13B

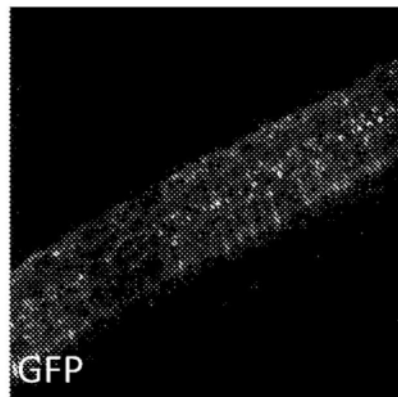


图13C

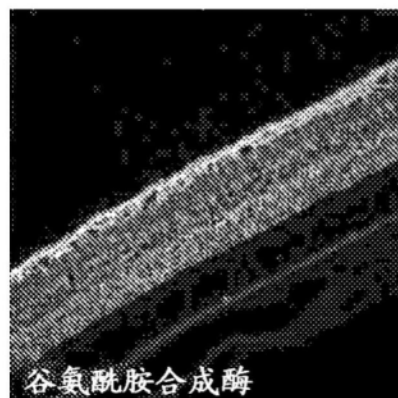


图13D

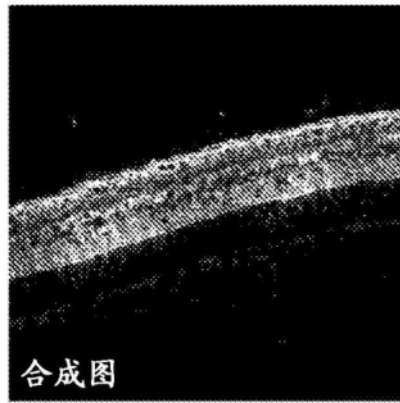


图14A

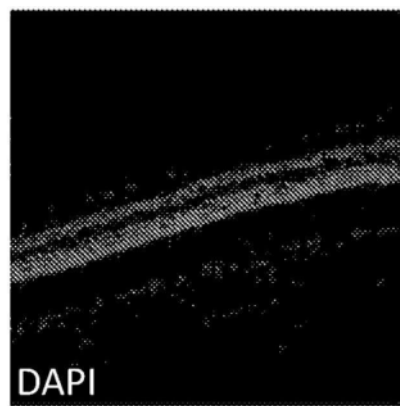


图14B

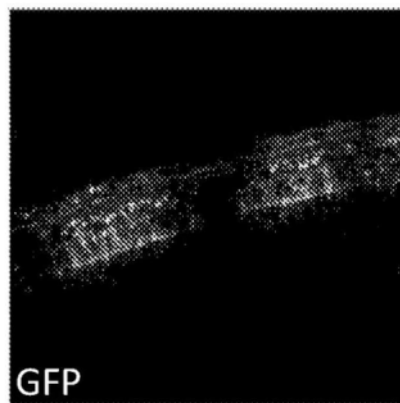


图14C

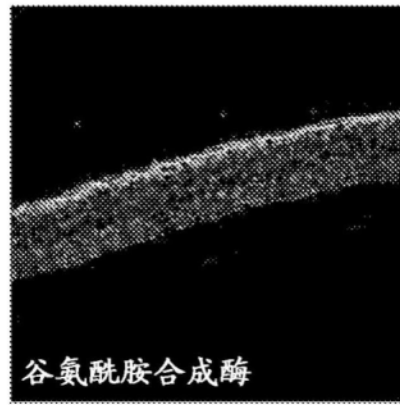


图14D

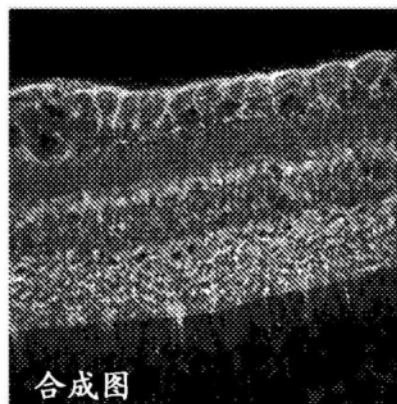


图15A

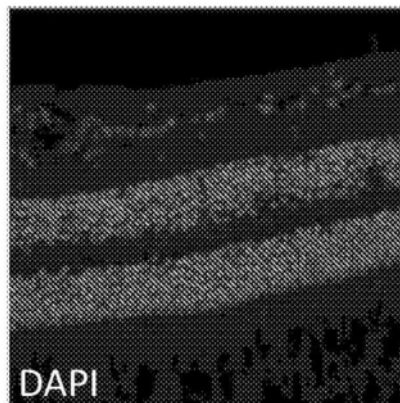


图15B

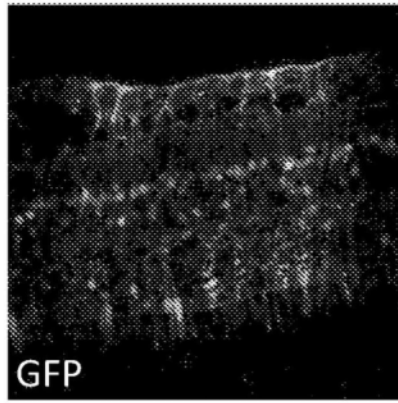


图15C

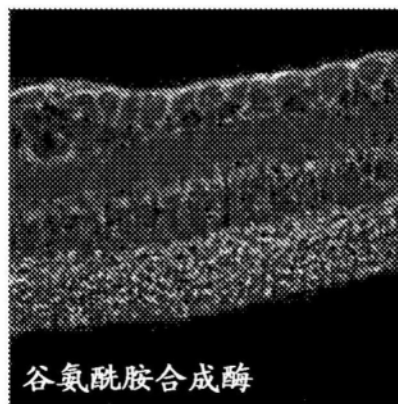


图15D

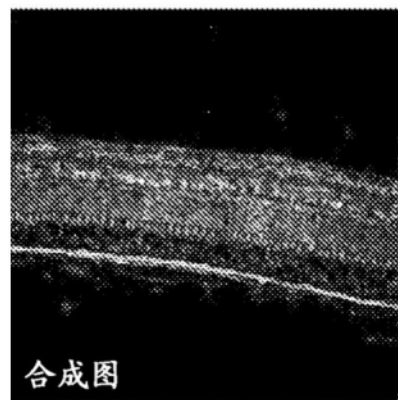


图16A

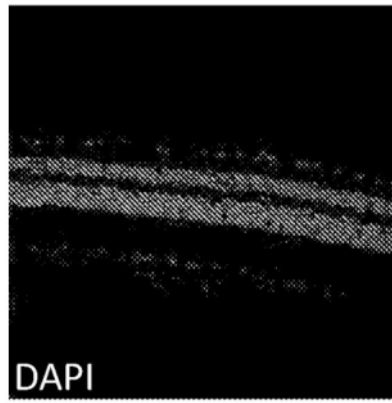


图16B

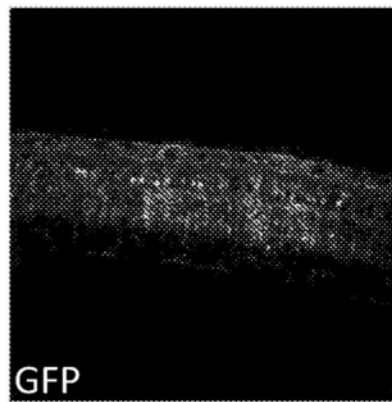


图16C

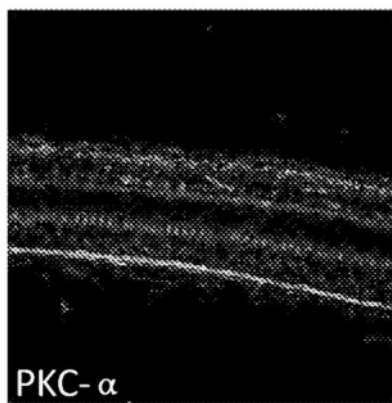


图16D

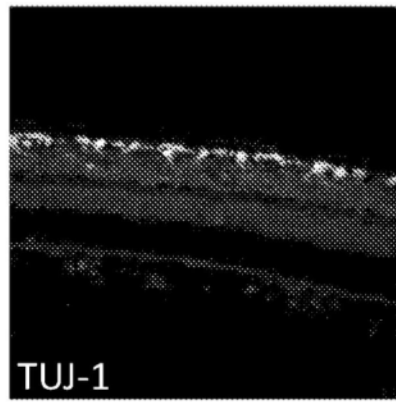


图16E

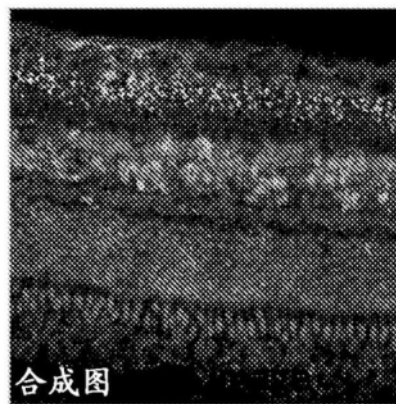


图17A

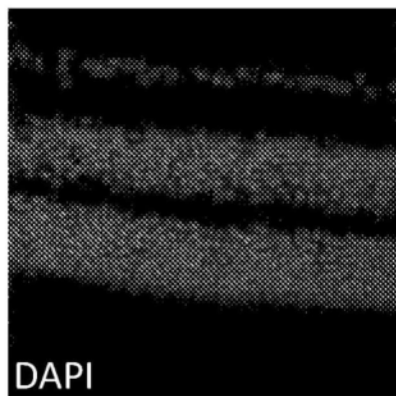


图17B

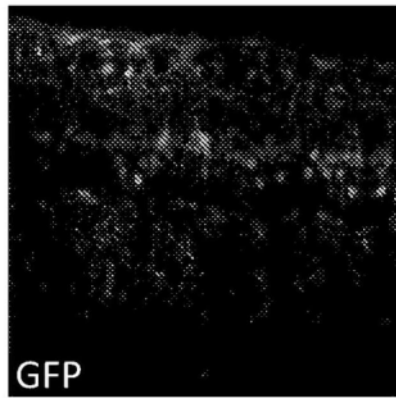


图17C

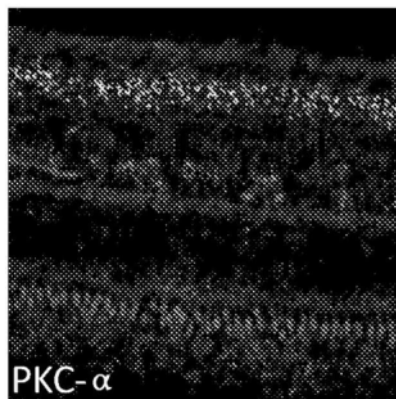


图17D

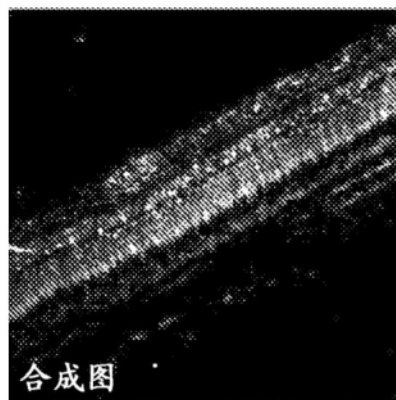


图18A

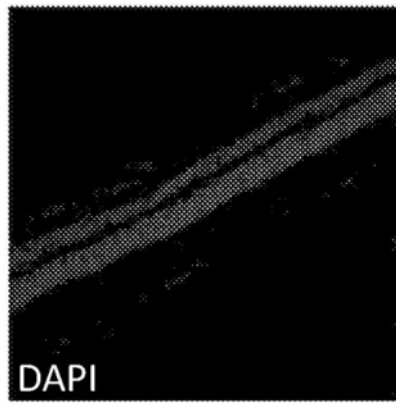


图18B

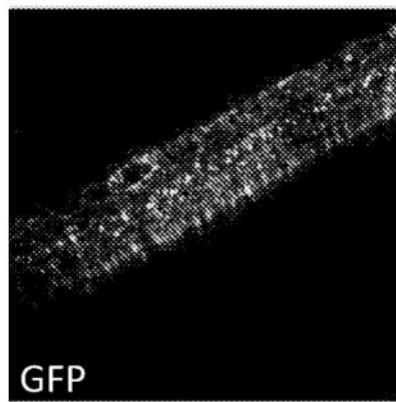


图18C

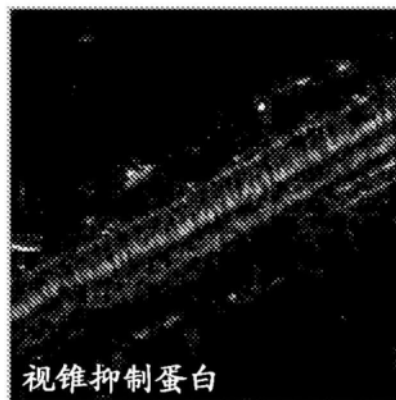


图18D

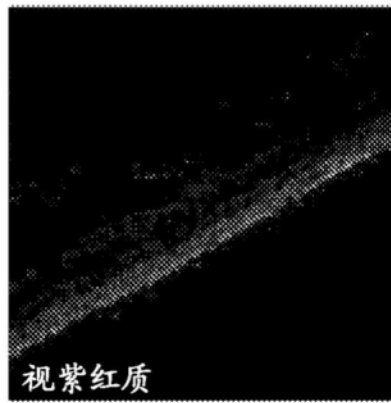


图18E

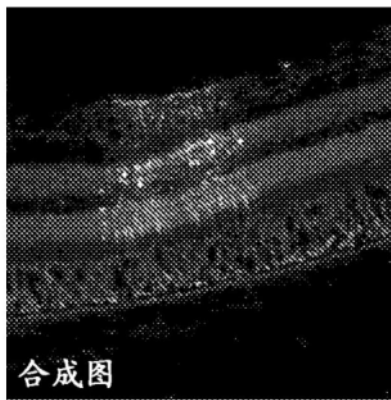


图19A

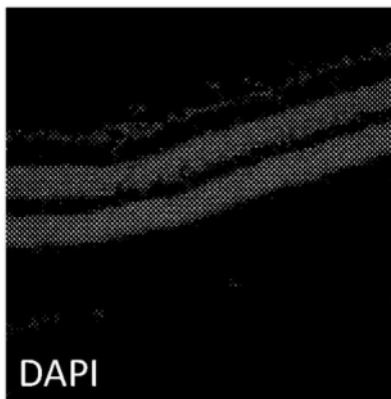


图19B

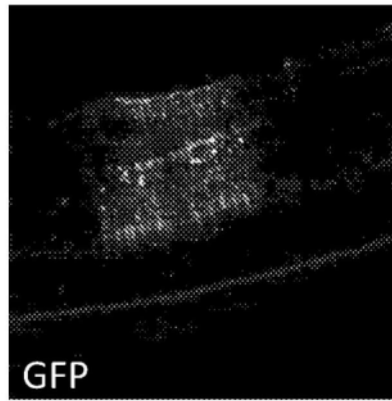


图19C

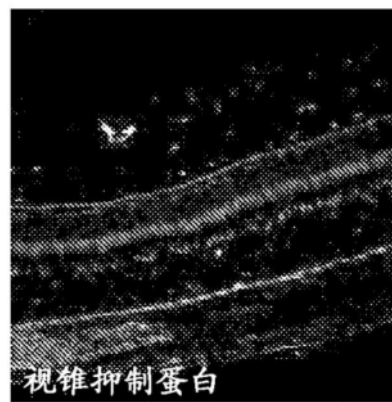


图19D

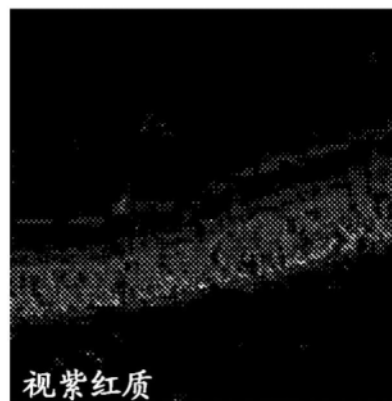


图19E

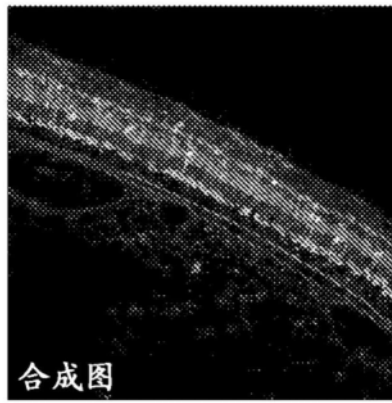


图20A

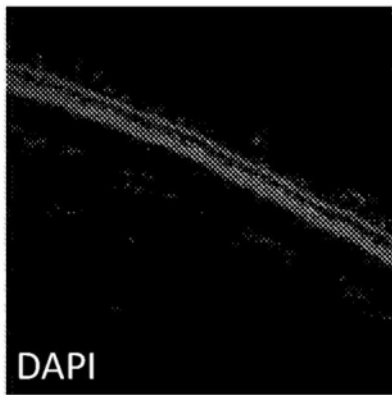


图20B

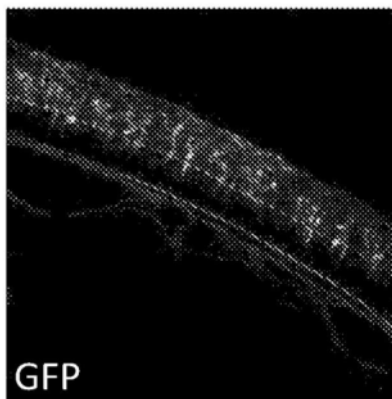


图20C

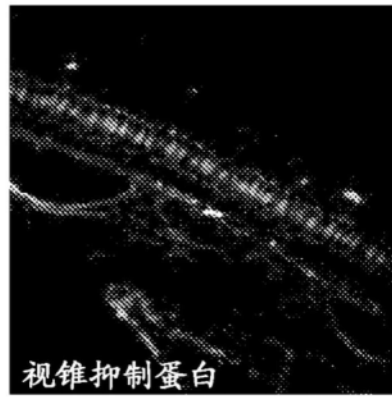


图20D

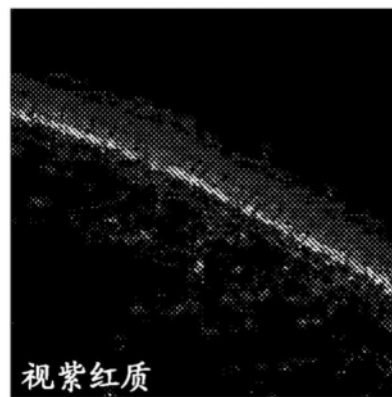


图20E

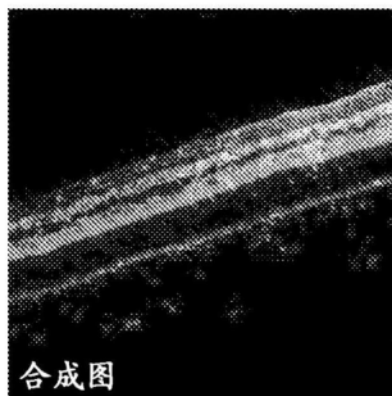


图21A

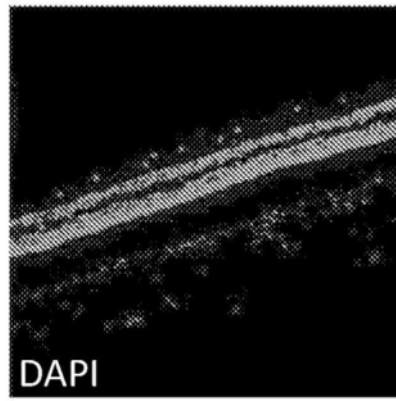


图21B

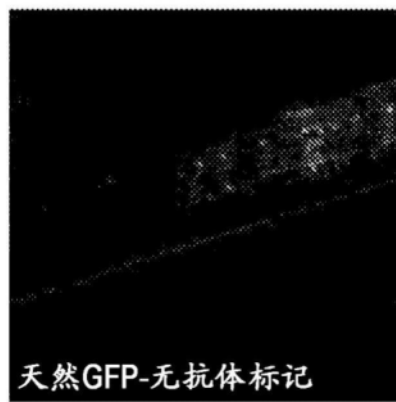


图21C

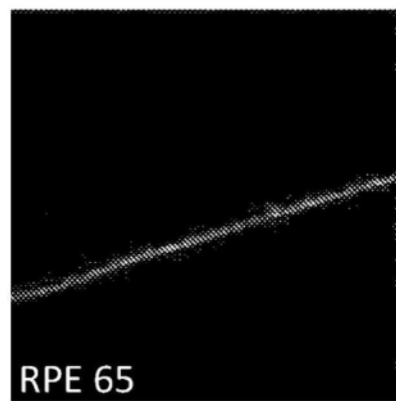


图21D

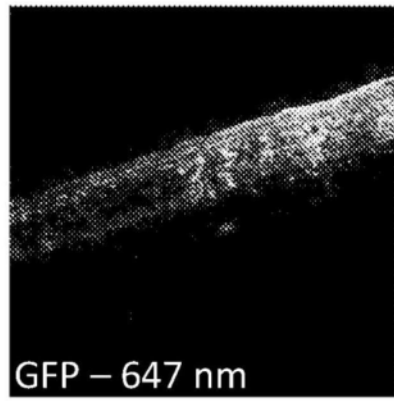


图21E

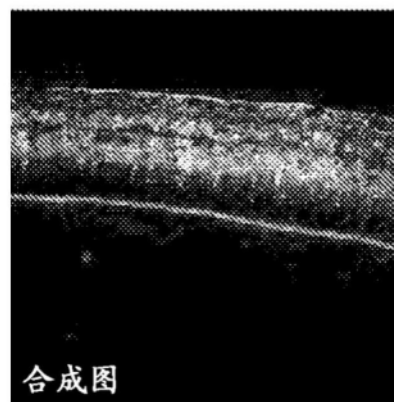


图22A

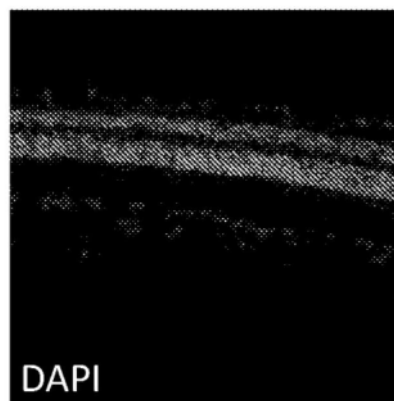


图22B

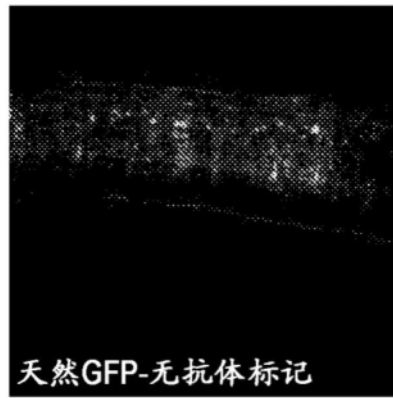


图22C

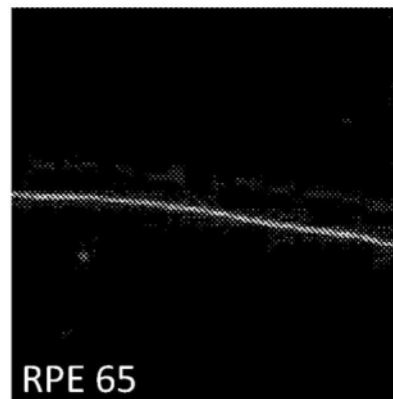


图22D

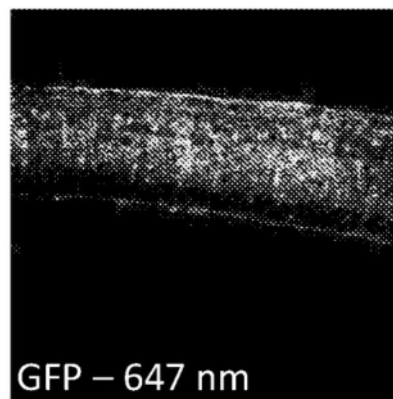


图22E

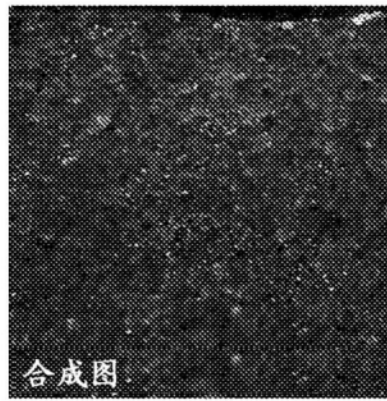


图23A

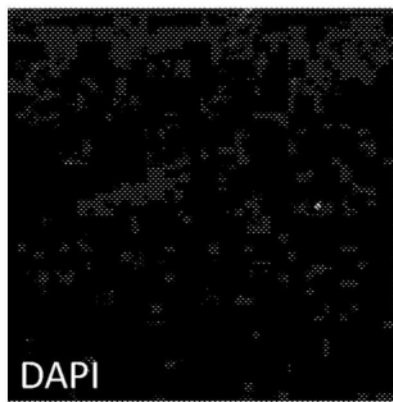


图23B



图23C

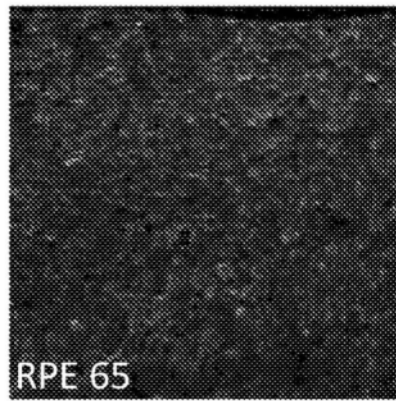


图23D

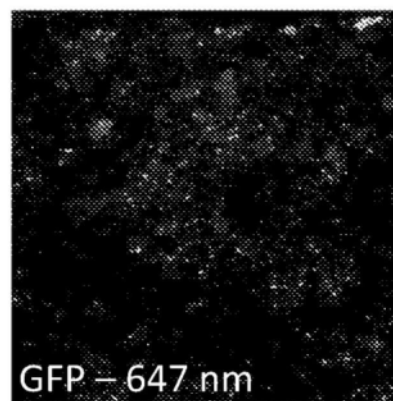


图23E

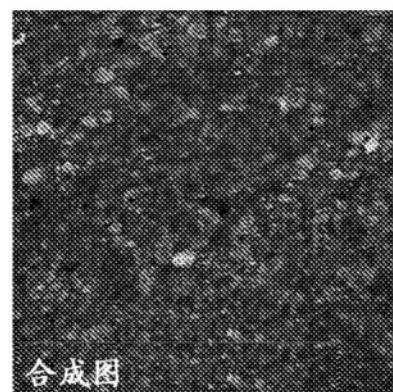


图24A

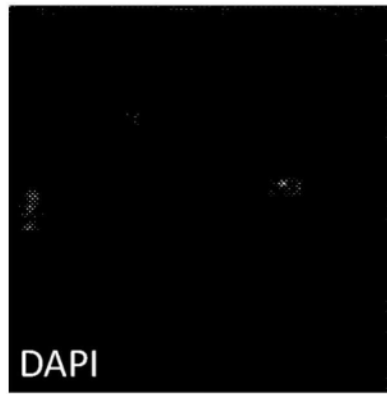


图24B

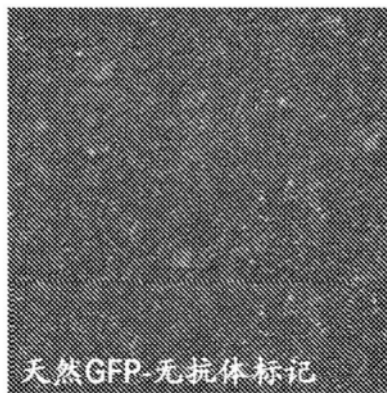


图24C

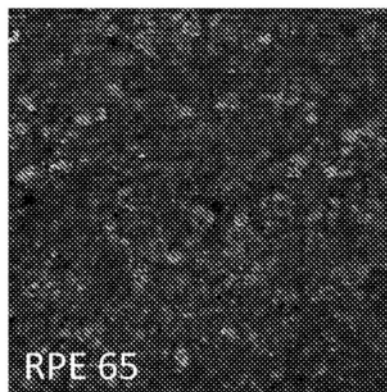


图24D

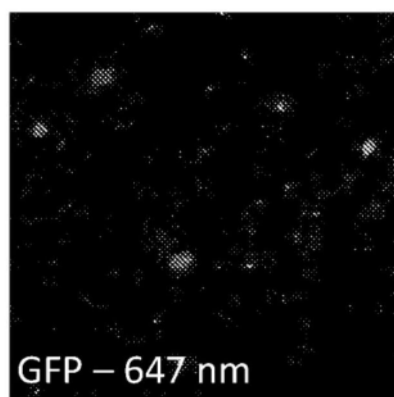


图24E

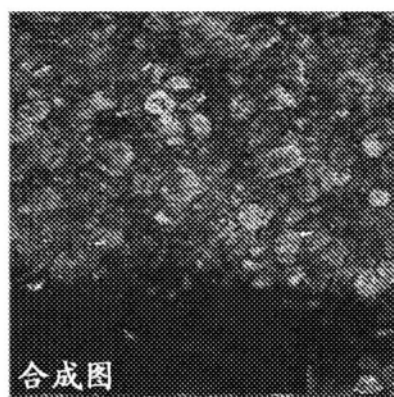


图25A

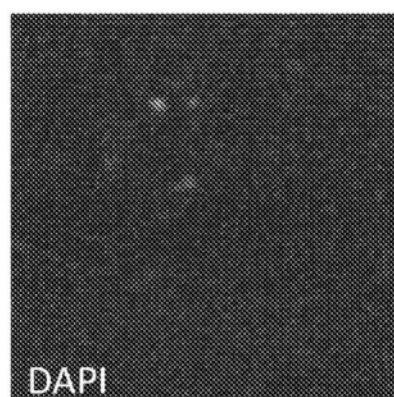


图25B

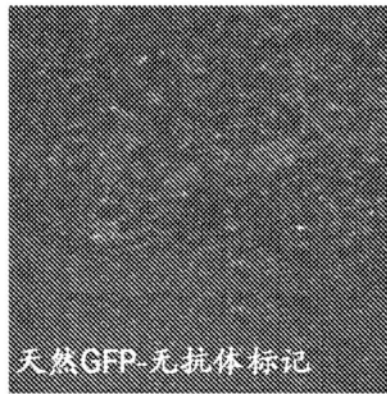


图25C

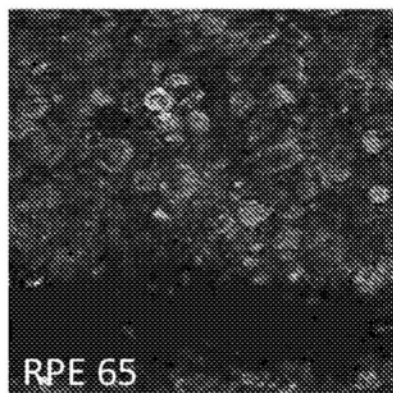


图25D

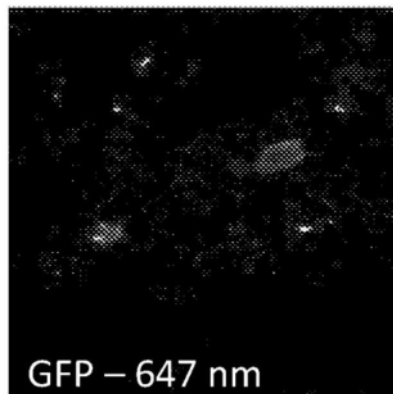


图25E

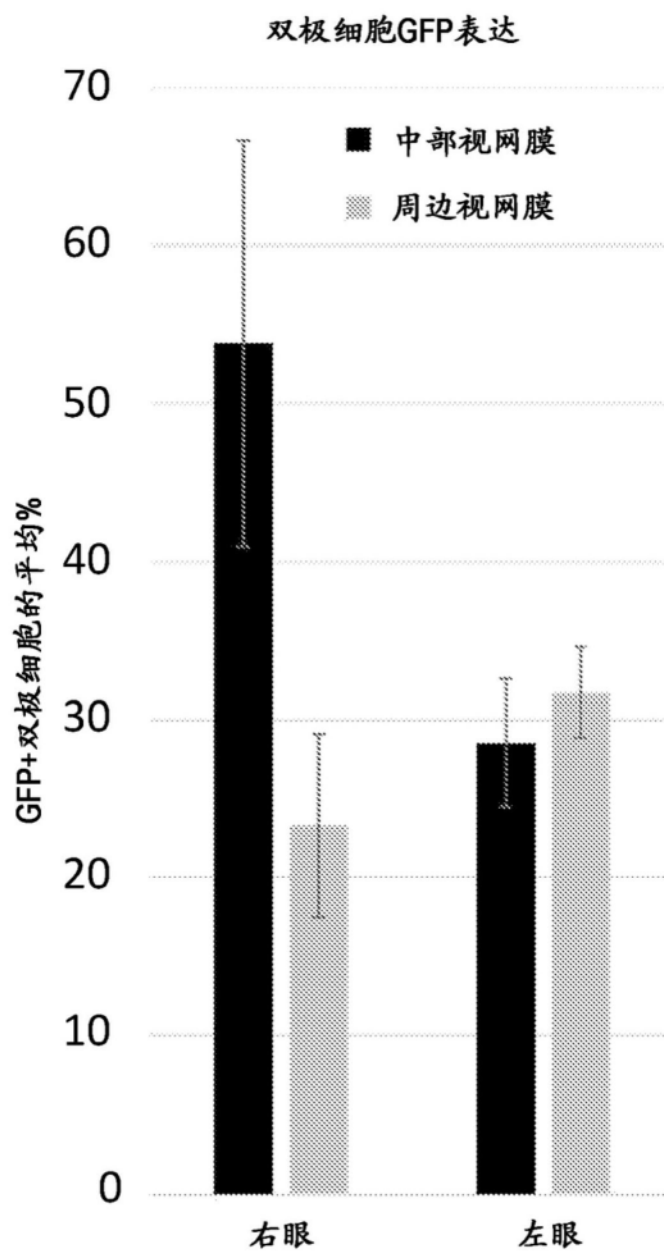


图26A

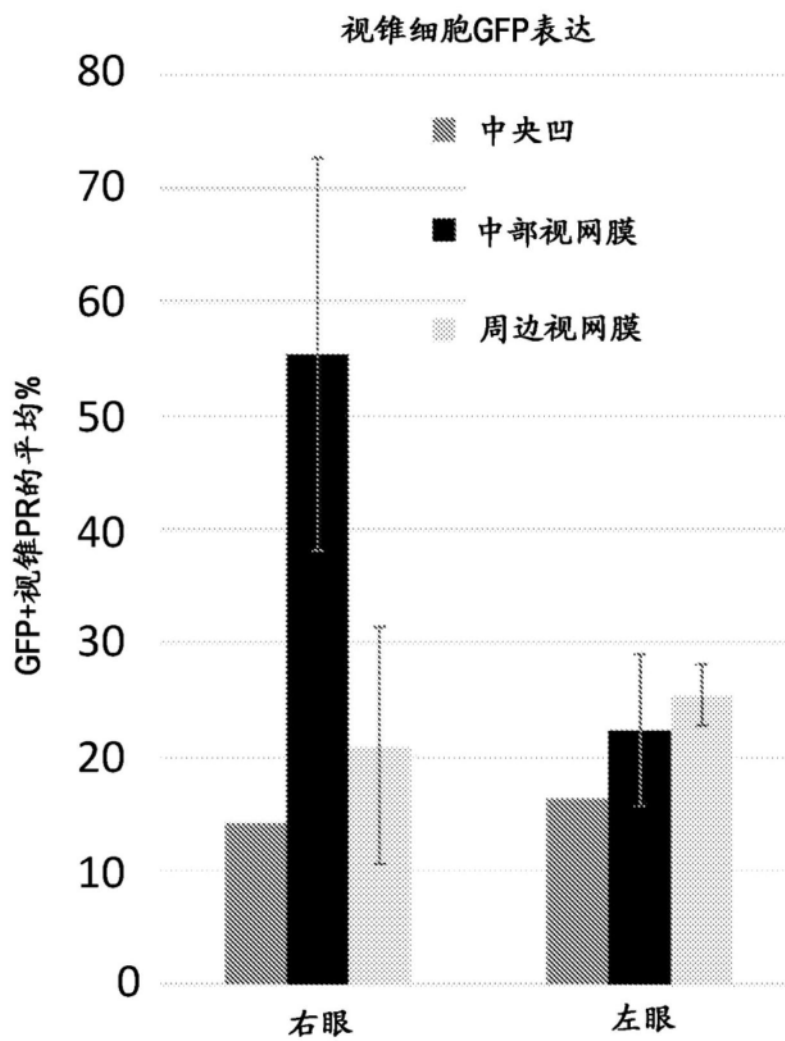


图26B

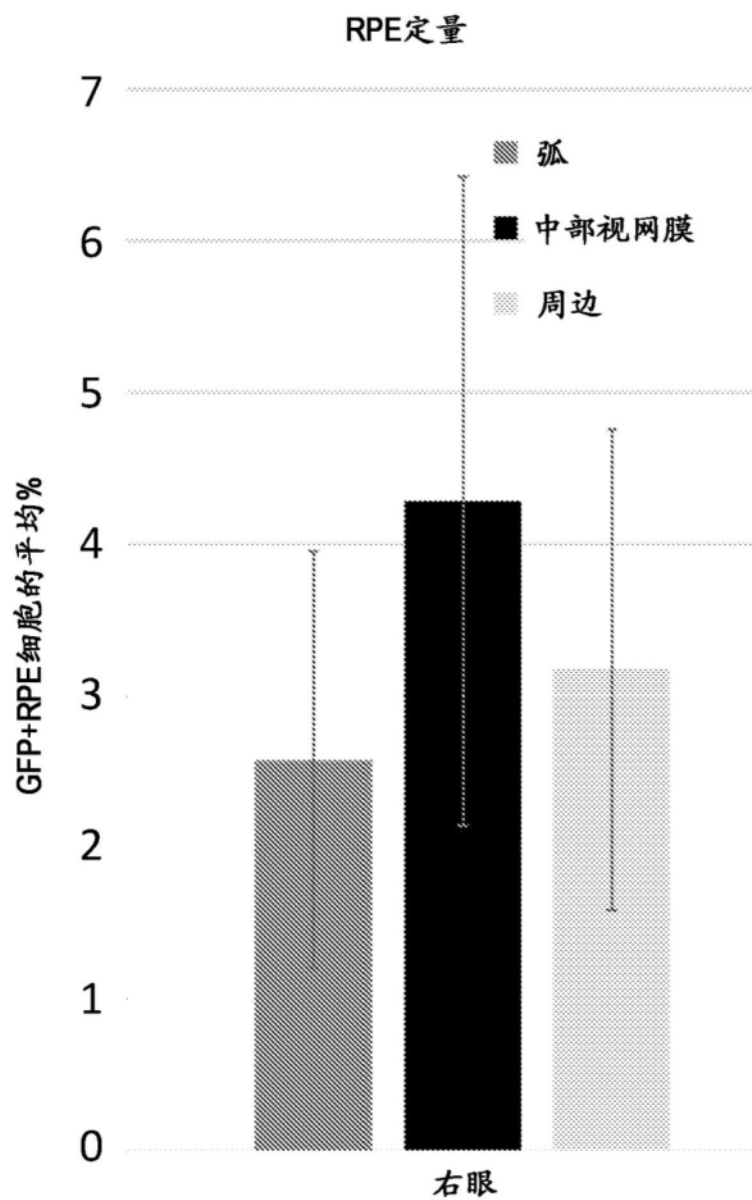


图26C

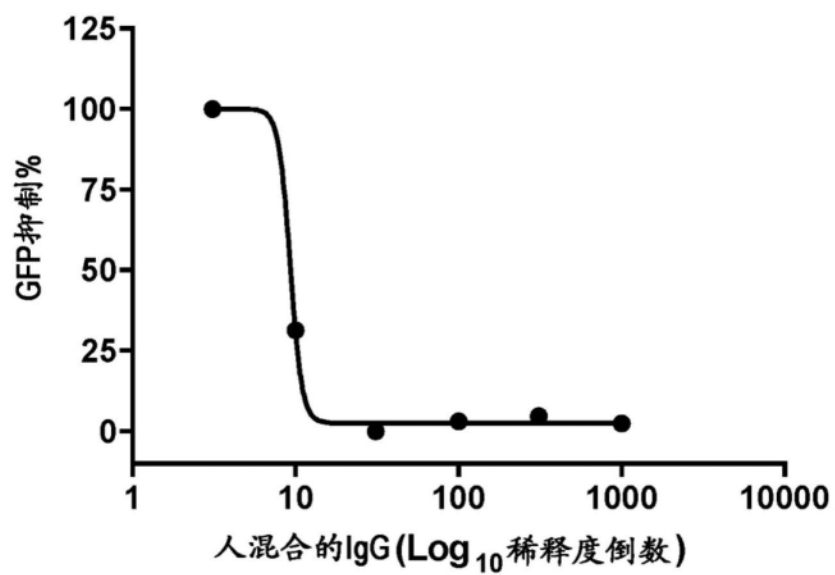


图27A

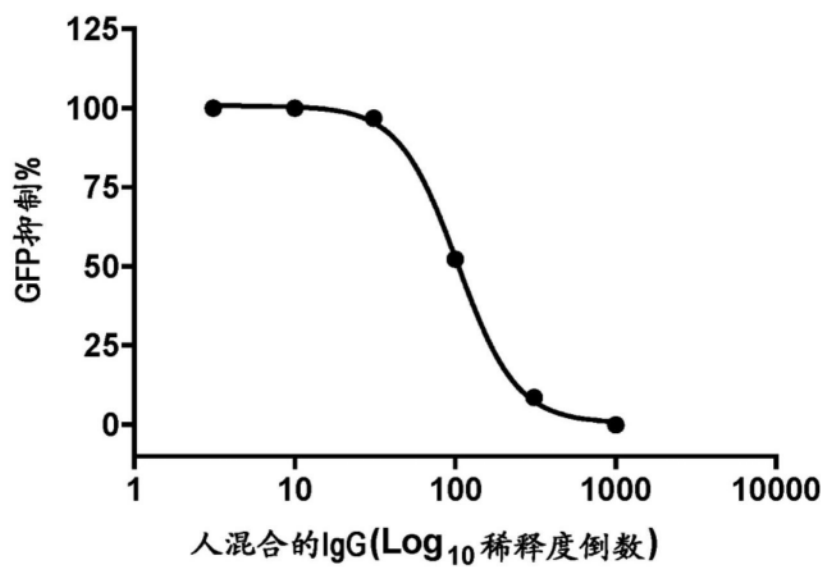


图27B