



(10) 授权公告号 CN 114746552 B

(45) 授权公告日 2024.11.08

(21) 申请号 202080081905.X

(22) 申请日 2020.11.24

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114746552 A

(43) 申请公布日 2022.07.12

(30) 优先权数据  
2019-212020 2019.11.25 JP  
2020-165229 2020.09.30 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.05.25

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2020/043691 2020.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/106882 JA 2021.06.03

(73) 专利权人 东曹株式会社  
地址 日本山口市

(72) 发明人 朝冈义晴 小林秀峰 牧野友理子  
吉田浩平 栗原健人

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11277  
专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.  
C12N 15/12 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)  
C12N 7/00 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)  
C12P 21/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2018327752 A1, 2018.11.15  
S Pillay等. An essential receptor for  
adeno-associated virus infection.  
《Nature》. 2016, 第530卷(第7588期), 第108-112  
页.

审查员 李峥

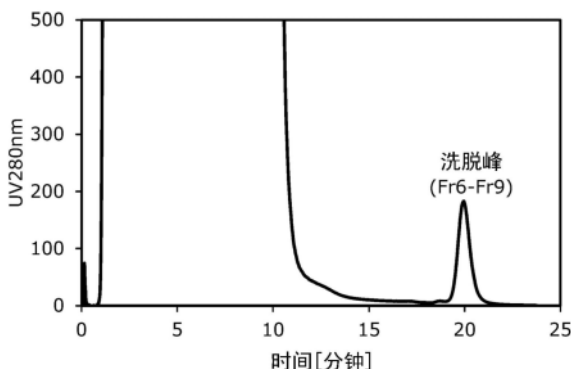
权利要求书12页 说明书43页  
序列表46页 附图3页

(54) 发明名称

改良腺相关病毒结合性蛋白、该蛋白的制造方法以及使用了该蛋白的腺相关病毒吸附剂

(57) 摘要

提供腺相关病毒(AAV)结合性蛋白的稳定性、特别是对热、酸、碱的稳定性得到改善的改良AAV结合性蛋白、该蛋白的制造方法以及使用了该蛋白的AAV吸附剂。



1. 一种腺相关病毒 (AAV) 结合性蛋白, 其序列为序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸 ~ 第500位的天冬氨酸为止的氨基酸序列, 其中, 在该第312位 ~ 第500位为止的氨基酸序列中产生了以下 (A) ~ (K) 中任一项所示的氨基酸置换;

(A) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸, 且序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸;

(A1) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第319位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸;

(A2) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第319位的异亮氨酸置换为天冬酰胺;

(A3) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第323位的赖氨酸置换为谷氨酸;

(A4) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第328位的亮氨酸置换为谷氨酰胺;

(A5) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第328位的亮氨酸置换为脯氨酸;

(A6) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第331位的酪氨酸置换为组氨酸;

(A7) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第332位的缬氨酸置换为丙氨酸;

(A8) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第332位的缬氨酸置换为谷氨酸;

(A9) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第333位的亮氨酸置换为脯氨酸;

(A10) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第337位的脯氨酸置换为谷氨酰胺;

(A11) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸, 且序列号1的第342位的酪氨酸置换为精氨酸;

(A12) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第350位的苏氨酸置换为丝氨酸;

(A13) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第383位的缬氨酸置换为丙氨酸;

(A14) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第389位的组氨酸置换为天冬氨酸;

(A15) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第394位的缬氨酸置换为丙氨酸;

(A16) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第396位的缬氨酸置换为丙氨酸;

(A17) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸, 且序列号1的第476位的丝氨酸置换为甘氨酸;

(A18) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸,且序列号1的第492位的天冬酰胺置换为天冬氨酸;

(A19) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第321位的亮氨酸置换为脯氨酸,且序列号1的第409位的异亮氨酸置换为缬氨酸;

(A20) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第328位的亮氨酸置换为脯氨酸,且序列号1的第366位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸;

(A21) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第338位的赖氨酸置换为天冬酰胺,且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸;

(A22) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第365位的谷氨酰胺置换为精氨酸,且序列号1的第392位的甘氨酸置换为半胱氨酸;

(A23) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第379位的苯丙氨酸置换为丝氨酸,且序列号1的第476位的丝氨酸置换为甘氨酸;

(A24) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸,且序列号1的第490位的苏氨酸置换为丝氨酸;

(A25) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第319位的异亮氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第320位的苏氨酸置换为异亮氨酸,且序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸;

(A26) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第336位的脯氨酸置换为谷氨酰胺、序列号1的第386位的谷氨酰胺置换为精氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸;

(B) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸,且序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸;

(C) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第319位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸,且序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸;

(D) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸;

(E) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第319位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸、序列号1的第323位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸,且序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸;

(F) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精

氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸;

(F1) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸;

(F2) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第371位的赖氨酸置换为谷氨酸;

(F3) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺;

(F4) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第376位的亮氨酸置换为脯氨酸;

(F5) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第378位的谷氨酸置换为甘氨酸;

(F6) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第392位的甘氨酸置换为半胱氨酸;

(F7) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第320位的苏氨酸置换为丙氨酸,且序列号1的第381位的缬氨酸置换为天冬氨酸;

(F8) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第326位的缬氨酸置换为谷氨酸,且序列号1的第329位的天冬酰胺置换为组氨酸;

(F9) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第326位的缬氨酸置换为丙氨酸,且序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸;

(F10) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为

精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第326位的缬氨酸替换为谷氨酸,且序列号1的第379位的苯丙氨酸替换为丝氨酸;

(F11) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第332位的缬氨酸替换为丙氨酸,且序列号1的第371位的赖氨酸替换为谷氨酸;

(F12) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第376位的亮氨酸替换为脯氨酸,且序列号1的第492位的天冬酰胺替换为天冬氨酸;

(F13) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第318位的谷氨酰胺替换为脯氨酸、序列号1的第379位的苯丙氨酸替换为酪氨酸,且序列号1的第401位的谷氨酸替换为缬氨酸;

(F14) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第324位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸,且序列号1的第499位的缬氨酸替换为谷氨酸;

(F15) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第326位的缬氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第329位的天冬酰胺替换为组氨酸,且序列号1的第378位的谷氨酸替换为缬氨酸;

(F16) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第328位的亮氨酸替换为脯氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为天冬酰胺,且序列号1的第397位的苏氨酸替换为丝氨酸,且序列号1的第406位的精氨酸替换为组氨酸;

(G) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第324位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸;

(H) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸;

(I) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天









为天冬氨酸、序列号1的第324位的天冬酰胺置换为丝氨酸,且序列号1的第357位的甘氨酸置换为半胱氨酸;

(J30) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第327位的谷氨酰胺置换为组氨酸,且序列号1的第378位的谷氨酸置换为缬氨酸;

(J31) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸,且序列号1的第327位的谷氨酰胺置换为亮氨酸;

(J32) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第329位的天冬酰胺置换为异亮氨酸,且序列号1的第499位的缬氨酸置换为异亮氨酸;

(J33) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第335位的谷氨酸置换为甘氨酸,且序列号1的第386位的谷氨酰胺置换为精氨酸;

(J34) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第335位的谷氨酸置换为缬氨酸,且序列号1的第343位的苏氨酸置换为丝氨酸;

(J35) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第341位的苏氨酸置换为脯氨酸,且序列号1的第379位的苯丙氨酸置换为丝氨酸;

(J36) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换

为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第369位的亮氨酸替换为谷氨酰胺,且序列号1的第374位的脯氨酸替换为亮氨酸;

(J37) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第372位的亮氨酸替换为脯氨酸,且序列号1的第396位的缬氨酸替换为丙氨酸;

(J38) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第378位的谷氨酸替换为甘氨酸,且序列号1的第403位的精氨酸替换为组氨酸;

(J39) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第381位的缬氨酸替换为丙氨酸,且序列号1的第382位的异亮氨酸替换为缬氨酸;

(J40) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第383位的缬氨酸替换为丙氨酸,且序列号1的第415位的谷氨酰胺替换为精氨酸;

(J41) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第346位的色氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第353位的精氨酸替换为半胱氨酸,且序列号1的第389位的组氨酸替换为精氨酸;

(J42) 序列号1的第390位的甘氨酸替换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸替换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸替换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸替换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸、序列号1的第372位的亮氨酸替换为谷氨酰胺、序列号1的第376位的亮氨酸置

换为脯氨酸,且序列号1的第394位的缬氨酸置换为天冬氨酸;

(J43) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第379位的苯丙氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第432位的谷氨酰胺置换为亮氨酸,且序列号1的第488位的丝氨酸置换为亮氨酸;

(J44) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第384位的谷氨酸置换为缬氨酸、序列号1的第432位的谷氨酰胺置换为精氨酸,且序列号1的第456位的异亮氨酸置换为缬氨酸;

(J45) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第394位的缬氨酸置换为异亮氨酸、序列号1的第395位的天冬氨酸置换为丝氨酸,且序列号1的第426位的苏氨酸置换为丙氨酸;

(J46) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第396位的缬氨酸置换为丙氨酸、序列号1的第441位的谷氨酰胺置换为精氨酸,且序列号1的第448位的赖氨酸置换为谷氨酸;

(K) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第381位的缬氨酸置换成丙氨酸、序列号1的第382位的异亮氨酸置换成缬氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换成谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换成精氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺置换成天冬氨酸。

2. 根据权利要求1中所述的AAV结合性蛋白,其序列为序列号76中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列。

3. 一种多聚核苷酸,其编码权利要求1或2中所述的多聚核苷酸。

4. 一种表达载体,其包含权利要求3中所述的多聚核苷酸。

5. 一种转化体,其是用权利要求4中所述的表达载体转化宿主而得到的。

6. 根据权利要求5中所述的转化体,其中,所述宿主为大肠杆菌。

7. 一种AAV结合性蛋白的制造方法,其包括:通过对权利要求5或6中所述的转化体进行培养而表达AAV结合性蛋白的工序;以及,从得到的培养物中回收所表达的AAV结合性蛋白

的工序。

8. 一种AAV吸附剂,其包含不溶性载体、以及固定于该载体的权利要求1或2中所述的AAV结合性蛋白。

9. 一种柱,其包含权利要求8中所述的AAV吸附剂。

10. 一种AAV的纯化方法,其包括:向权利要求9中所述的柱中添加包含AAV的溶液,使所述吸附剂吸附该AAV的工序;以及,使用洗脱液将吸附于所述吸附剂的AAV洗脱的工序。

## 改良腺相关病毒结合性蛋白、该蛋白的制造方法以及使用了 该蛋白的腺相关病毒吸附剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及对腺相关病毒(Adeno Associated Virus:AAV)具有结合性的蛋白质。更详细而言,本发明涉及对热、酸、碱的稳定性比野生型高的改良AAV结合性蛋白、该蛋白的制造方法以及使用了该蛋白的AAV吸附剂。

### 背景技术

[0002] AAV是被分类为细小病毒科、依赖病毒属的非包膜病毒。AAV外壳粒子是由约60个蛋白质分子构成的,3种蛋白质(VP1、VP2和VP3)的比率为1:1:10,呈直径20~30nm的正二十面体的形状。

[0003] 自然界的AAV缺乏自主增殖性能,复制依赖于腺病毒、疱疹病毒等辅助病毒。所述辅助病毒存在时,AAV基因组在宿主细胞内被复制,形成包含AAV基因组的完全的AAV粒子,从宿主细胞释放出AAV粒子。另一方面,所述辅助病毒不存在的情况下,AAV基因组成为维持为附加体的状态或整合于宿主染色体的状态(潜伏状态)。

[0004] AAV能够感染包括人在内的很多物种的细胞,也会感染血细胞、肌肉、神经细胞等终止了分化的非分裂细胞,由于对人没有致病性而无需担心副作用,病毒粒子物理化学性稳定,因此作为以先天性基因疾病的治疗为目的的基因导入用载体的利用价值备受瞩目。

[0005] 基因重组AAV载体(以下也简单地记作AAV载体)的制造通常如下进行:将编码AAV粒子形成所必须的要素的核酸导入至细胞,从而制作具有产生AAV能力的细胞(以下也记作产生AAV的细胞),培养该细胞使之表达AAV粒子形成所必须的要素,从而进行。通常,将以下的3种质粒导入至细胞来制作AAV:用于供给重组AAV基因组的质粒(载体质粒),所述重组AAV基因组是残留两端的ITR(Inverted Terminal Repeat、反向末端重复)序列且搭载了编码想要表达的蛋白质的多聚核苷酸而得到的;用于供给Rep蛋白质和壳体蛋白质(外壳构成蛋白质VP1、VP2和VP3)的质粒(包装质粒);仅用于供给腺病毒来源要素中的、AAV粒子形成所必须的要素的质粒(辅助质粒)。作为其他的方法,也可以使用如下方法来制作:使用预先将AAV粒子形成所必须的要导入至宿主细胞而得到的细胞的方法;使用昆虫细胞(Sf9细胞等)的方法。

[0006] 利用AAV载体进行的基因导入中,AAV载体有侵入细胞内的必要。已知在AAV侵入细胞内部的最初的步骤,与细胞表面和受体(receptor)结合,在该结合中涉及细胞表面的硫酸乙酰肝素、整联蛋白和受体的FGF(Fibro blastgrowth factors,成纤维细胞生长因子)受体、HGF(hepatocyte growth factor,肝细胞生长因子)受体等。通常,已知根据AAV载体的血清类型(Serotype)不同,侵入细胞时所结合的受体不同。

[0007] 另外,作为万能受体报告了被称为KIAA0319L的受体(AAVR)(非专利文献1)。报道了,该AAVR由5个细胞外区域结构域、跨膜区域、细胞内区域构成,与AAV的结合中重要的主要是细胞外区域的结构域2(PKD2)(非专利文献2)。AAVR能够与AAV载体结合,因此可以成为用于吸附AAV的配体。然而,AAVR是来源于人的蛋白质,因此工业上使用时存在稳定性低的

问题。

[0008] 现有技术文献

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1: Pillay S., et. al., Nature, 530, 108-112, 2016

[0011] 非专利文献2: Zhang. R., et. al., Nat. Microbiol., 4, 675-682, 2019

## 发明内容

[0012] 发明要解决的问题

[0013] 本发明的课题在于, 提供特别是对于热、酸、碱的稳定性提高了的改良AAV结合性蛋白、该蛋白的制造方法以及使用了该蛋白的AAV吸附剂。

[0014] 用于解决问题的方案

[0015] 本发明人等为了解决上述问题进行了深入研究, 结果确定了AAV结合性蛋白中的涉及稳定性提高的氨基酸残基, 发现了将该氨基酸残基置换为其他的氨基酸残基而得到的突变体对于热、酸、碱具有优异的稳定性, 至此完成了本发明。

[0016] 即, 本发明包含以下的[1] ~ [10]中记载的方式:

[0017] [1]一种AAV结合性蛋白, 其选自以下的(i) ~ (iii)的任意者:

[0018] (i)至少包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基, 其中, 在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中产生了以下(1) ~ (137)中的至少任一个氨基酸置换的、AAV结合性蛋白;

[0019] (1)序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸

[0020] (2)序列号1的第319位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸

[0021] (3)序列号1的第321位的亮氨酸置换为脯氨酸

[0022] (4)序列号1的第322位的脯氨酸置换为亮氨酸

[0023] (5)序列号1的第324位的天冬酰胺置换为天冬氨酸或丝氨酸

[0024] (6)序列号1的第327位的谷氨酰胺置换为精氨酸

[0025] (7)序列号1的第329位的天冬酰胺置换为天冬氨酸或酪氨酸

[0026] (8)序列号1的第330位的丙氨酸置换为甘氨酸

[0027] (9)序列号1的第331位的酪氨酸置换为半胱氨酸

[0028] (10)序列号1的第332位的缬氨酸置换为谷氨酰胺

[0029] (11)序列号1的第333位的亮氨酸置换为缬氨酸或脯氨酸

[0030] (12)序列号1的第334位的谷氨酰胺置换为精氨酸

[0031] (13)序列号1的第337位的脯氨酸置换为亮氨酸

[0032] (14)序列号1的第338位的赖氨酸置换为精氨酸或谷氨酸

[0033] (15)序列号1的第340位的谷氨酸置换为甘氨酸

[0034] (16)序列号1的第341位的苏氨酸置换为丙氨酸

[0035] (17)序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、组氨酸或天冬酰胺

[0036] (18)序列号1的第343位的苏氨酸置换为蛋氨酸

[0037] (19)序列号1的第344位的酪氨酸置换为组氨酸

[0038] (20)序列号1的第345位的天冬氨酸置换为天冬酰胺

- [0039] (21) 序列号1的第346位的色氨酸置换为亮氨酸或精氨酸
- [0040] (22) 序列号1的第347位的谷氨酰胺置换为亮氨酸或脯氨酸
- [0041] (23) 序列号1的第348位的亮氨酸置换为脯氨酸
- [0042] (24) 序列号1的第349位的异亮氨酸置换为苏氨酸
- [0043] (25) 序列号1的第350位的苏氨酸置换为蛋氨酸
- [0044] (26) 序列号1的第351位的组氨酸置换为亮氨酸
- [0045] (27) 序列号1的第352位的脯氨酸置换为亮氨酸
- [0046] (28) 序列号1的第353位的精氨酸置换为半胱氨酸
- [0047] (29) 序列号1的第354位的天冬氨酸置换为甘氨酸
- [0048] (30) 序列号1的第355位的酪氨酸置换为组氨酸、天冬酰胺或半胱氨酸 (31) 序列号1的第356位的丝氨酸置换为半胱氨酸
- [0049] (32) 序列号1的第357位的甘氨酸置换为半胱氨酸
- [0050] (33) 序列号1的第363位的组氨酸置换为精氨酸或亮氨酸
- [0051] (34) 序列号1的第364位的丝氨酸置换为脯氨酸
- [0052] (35) 序列号1的第365位的谷氨酰胺置换为精氨酸
- [0053] (36) 序列号1的第366位的异亮氨酸置换为苏氨酸
- [0054] (37) 序列号1的第367位的亮氨酸置换为脯氨酸
- [0055] (38) 序列号1的第368位的赖氨酸置换为精氨酸
- [0056] (39) 序列号1的第369位的亮氨酸置换为谷氨酰胺或脯氨酸
- [0057] (40) 序列号1的第370位的丝氨酸置换为丙氨酸
- [0058] (41) 序列号1的第371位的赖氨酸置换为谷氨酸
- [0059] (42) 序列号1的第373位的苏氨酸置换为丙氨酸
- [0060] (43) 序列号1的第376位的亮氨酸置换为脯氨酸
- [0061] (44) 序列号1的第377位的酪氨酸置换为半胱氨酸
- [0062] (45) 序列号1的第379位的苯丙氨酸置换为丝氨酸
- [0063] (46) 序列号1的第381位的缬氨酸置换为丙氨酸
- [0064] (47) 序列号1的第384位的谷氨酸置换为甘氨酸
- [0065] (48) 序列号1的第387位的天冬酰胺置换为丝氨酸
- [0066] (49) 序列号1的第389位的组氨酸置换为谷氨酰胺、亮氨酸或精氨酸
- [0067] (50) 序列号1的第391位的谷氨酸置换为赖氨酸
- [0068] (51) 序列号1的第393位的酪氨酸置换为半胱氨酸
- [0069] (52) 序列号1的第396位的缬氨酸置换为丙氨酸
- [0070] (53) 序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸或精氨酸
- [0071] (54) 序列号1的第406位的精氨酸置换为丝氨酸
- [0072] (55) 序列号1的第412位的缬氨酸置换为丙氨酸
- [0073] (56) 序列号1的第415位的谷氨酰胺置换为亮氨酸
- [0074] (57) 序列号1的第416位的苯丙氨酸置换为丝氨酸
- [0075] (58) 序列号1的第441位的谷氨酰胺置换为亮氨酸
- [0076] (59) 序列号1的第442位的酪氨酸置换为苯丙氨酸

- [0077] (60) 序列号1的第448位的赖氨酸替换为精氨酸
- [0078] (61) 序列号1的第453位的谷氨酸替换为甘氨酸
- [0079] (62) 序列号1的第455位的赖氨酸替换为精氨酸
- [0080] (63) 序列号1的第458位的谷氨酸替换为甘氨酸
- [0081] (64) 序列号1的第461位的丙氨酸替换为丝氨酸
- [0082] (65) 序列号1的第476位的丝氨酸替换为精氨酸
- [0083] (66) 序列号1的第477位的亮氨酸替换为脯氨酸
- [0084] (67) 序列号1的第487位的天冬酰胺替换为天冬氨酸
- [0085] (68) 序列号1的第492位的天冬酰胺替换为天冬氨酸
- [0086] (69) 序列号1的第319位的异亮氨酸替换为天冬酰胺或丝氨酸
- [0087] (70) 序列号1的第320位的苏氨酸替换为异亮氨酸
- [0088] (71) 序列号1的第323位的赖氨酸替换为谷氨酸
- [0089] (72) 序列号1的第328位的亮氨酸替换为谷氨酰胺或脯氨酸
- [0090] (73) 序列号1的第331位的酪氨酸替换为组氨酸
- [0091] (74) 序列号1的第332位的缬氨酸替换为丙氨酸或谷氨酸
- [0092] (75) 序列号1的第336位的脯氨酸替换为谷氨酰胺
- [0093] (76) 序列号1的第337位的脯氨酸替换为谷氨酰胺
- [0094] (77) 序列号1的第338位的赖氨酸替换为天冬酰胺
- [0095] (78) 序列号1的第342位的酪氨酸替换为精氨酸
- [0096] (79) 序列号1的第350位的苏氨酸替换为丝氨酸
- [0097] (80) 序列号1的第366位的异亮氨酸替换为苯丙氨酸
- [0098] (81) 序列号1的第383位的缬氨酸替换为丙氨酸
- [0099] (82) 序列号1的第386位的谷氨酰胺替换为精氨酸
- [0100] (83) 序列号1的第389位的组氨酸替换为天冬氨酸
- [0101] (84) 序列号1的第392位的甘氨酸替换为半胱氨酸
- [0102] (85) 序列号1的第394位的缬氨酸替换为丙氨酸
- [0103] (86) 序列号1的第409位的异亮氨酸替换为缬氨酸
- [0104] (87) 序列号1的第476位的丝氨酸替换为甘氨酸
- [0105] (88) 序列号1的第490位的苏氨酸替换为丝氨酸
- [0106] (89) 序列号1的第312位的丝氨酸替换为脯氨酸
- [0107] (90) 序列号1的第313位的丙氨酸替换为丝氨酸
- [0108] (91) 序列号1的第317位的缬氨酸替换为天冬氨酸
- [0109] (92) 序列号1的第318位的谷氨酰胺替换为脯氨酸
- [0110] (93) 序列号1的第320位的苏氨酸替换为丙氨酸
- [0111] (94) 序列号1的第323位的赖氨酸替换为精氨酸
- [0112] (95) 序列号1的第326位的缬氨酸替换为丙氨酸或谷氨酸
- [0113] (96) 序列号1的第327位的谷氨酰胺替换为组氨酸或亮氨酸
- [0114] (97) 序列号1的第329位的天冬酰胺替换为组氨酸或异亮氨酸
- [0115] (98) 序列号1的第332位的缬氨酸替换为丙氨酸

- [0116] (99) 序列号1的第335位的谷氨酸置换为甘氨酸或缬氨酸
- [0117] (100) 序列号1的第340位的谷氨酸置换为缬氨酸
- [0118] (101) 序列号1的第341位的苏氨酸置换为脯氨酸
- [0119] (102) 序列号1的第343位的苏氨酸置换为丝氨酸
- [0120] (103) 序列号1的第344位的酪氨酸置换为苯丙氨酸
- [0121] (104) 序列号1的第346位的色氨酸置换为半胱氨酸
- [0122] (105) 序列号1的第359位的蛋氨酸置换为亮氨酸
- [0123] (106) 序列号1的第360位的谷氨酸置换为赖氨酸或缬氨酸
- [0124] (107) 序列号1的第361位的甘氨酸置换为半胱氨酸
- [0125] (108) 序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、天冬酰胺或甘氨酸
- [0126] (109) 序列号1的第364位的丝氨酸置换为亮氨酸
- [0127] (110) 序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺或天冬氨酸
- [0128] (111) 序列号1的第372位的亮氨酸置换为脯氨酸或谷氨酰胺
- [0129] (112) 序列号1的第374位的脯氨酸置换为亮氨酸
- [0130] (113) 序列号1的第378位的谷氨酸置换为甘氨酸或缬氨酸
- [0131] (114) 序列号1的第379位的苯丙氨酸置换为酪氨酸或半胱氨酸
- [0132] (115) 序列号1的第380位的赖氨酸置换为谷氨酸
- [0133] (116) 序列号1的第381位的缬氨酸置换为天冬氨酸
- [0134] (117) 序列号1的第382位的异亮氨酸置换为缬氨酸
- [0135] (118) 序列号1的第384位的谷氨酸置换为缬氨酸
- [0136] (119) 序列号1的第394位的缬氨酸置换为天冬氨酸或异亮氨酸
- [0137] (120) 序列号1的第395位的天冬酰胺置换为丝氨酸
- [0138] (121) 序列号1的第397位的苏氨酸置换为丝氨酸
- [0139] (122) 序列号1的第401位的谷氨酸置换为缬氨酸
- [0140] (123) 序列号1的第403位的精氨酸置换为组氨酸
- [0141] (124) 序列号1的第406位的精氨酸置换为组氨酸
- [0142] (125) 序列号1的第415位的谷氨酰胺置换为精氨酸
- [0143] (126) 序列号1的第426位的苏氨酸置换为丙氨酸
- [0144] (127) 序列号1的第432位的谷氨酰胺置换为亮氨酸或精氨酸
- [0145] (128) 序列号1的第441位的谷氨酰胺置换为精氨酸
- [0146] (129) 序列号1的第443位的组氨酸置换为亮氨酸
- [0147] (130) 序列号1的第448位的赖氨酸置换为谷氨酸
- [0148] (131) 序列号1的第456位的异亮氨酸置换为缬氨酸
- [0149] (132) 序列号1的第483位的天冬氨酸置换为天冬酰胺
- [0150] (133) 序列号1的第488位的丝氨酸置换为亮氨酸
- [0151] (134) 序列号1的第499位的缬氨酸置换为谷氨酸或异亮氨酸。
- [0152] (ii) 至少包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,其中,在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中产生了所述(1)~(134)中的至少任一个氨基酸置换,进一步,在所述(1)~(134)所示的氨基酸置换以

外还产生了一个或多个位置的一个或多个氨基酸残基的置换、缺失、插入和添加中的任一个以上,且具有AAV结合活性的AAV结合性蛋白。

[0153] (iii) 包含如下氨基酸序列且具有AAV结合活性的AAV结合性蛋白,所述氨基酸序列相对于在序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸序列中产生了所述(1)~(134)中的至少任一个氨基酸置换的氨基酸序列整体具有70%以上同源性,且残留有所述至少任一个氨基酸置换。

[0154] [2]根据[1]中所述的AAV结合性蛋白,其选自以下(iv)~(vi)的任意者:

[0155] (iv) 至少包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,其中,在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中至少产生了以下(1)的氨基酸置换的、AAV结合性蛋白;

[0156] (1) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸

[0157] (v) 至少包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,其中,在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了所述(1)的氨基酸置换,进一步,在所述(1)所示的氨基酸置换以外还产生了一个或多个位置的一个或多个氨基酸残基的置换、缺失、插入和添加中的任一个以上,且具有AAV结合活性的AAV结合性蛋白。

[0158] (vi) 包含如下氨基酸序列且具有AAV结合活性的AAV结合性蛋白,所述氨基酸序列相对于在序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸序列中、至少产生了所述(1)的氨基酸置换的氨基酸序列整体具有70%以上同源性,且残留有所述(1)的氨基酸置换。

[0159] [3]根据[2]中所述的AAV结合性蛋白,其中,至少产生了以下(A)~(K)所示的任意氨基酸置换;

[0160] (A) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、且序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸

[0161] (B) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、且序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸

[0162] (C) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第319位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、且序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸

[0163] (D) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸

[0164] (E) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第319位的异亮氨酸置换为苯丙氨酸、序列号1的第323位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸,且序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸

[0165] (F) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸,序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸,且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸

[0166] (G) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第324位的天冬酰胺置

换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸

[0167] (H) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸

[0168] (I) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第324位的天冬酰胺置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸

[0169] (J) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为半胱氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第399位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换为精氨酸、且序列号1的第487位的天冬酰胺置换为天冬氨酸

[0170] (K) 序列号1的第390位的甘氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第317位的缬氨酸置换为天冬氨酸、序列号1的第342位的酪氨酸置换为丝氨酸、序列号1的第362位的赖氨酸置换为谷氨酸、序列号1的第371位的赖氨酸置换为天冬酰胺、序列号1的第381位的赖氨酸置换成丙氨酸、序列号1的第382位的异亮氨酸置换成缬氨酸、序列号1的第390位的甘氨酸置换成丝氨酸、序列号1的第399位的赖氨酸置换成谷氨酸、序列号1的第476位的丝氨酸置换成精氨酸、且序列号1的第487位的天冬酰胺置换成天冬氨酸。

[0171] [4] 根据[3]中所述的AAV结合性蛋白,其选自以下(vii)~(ix)的任意者:

[0172] (vii) 至少包含序列号18、32、34、38、42、46、53、55、59、63、69和76任意者中记载的氨基酸序列中的、第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸残基的、AAV结合性蛋白;

[0173] (viii) 至少包含序列号18、32、34、38、42、46、53、55、59、63、69和76任意者中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,其中,该第25位~第213位为止的氨基酸残基中,在所述氨基酸序列所具有的氨基酸置换以外进一步至少产生了一个或多个位置的一个或多个氨基酸残基的置换、缺失、插入和添加中的任一个以上,且具有AAV结合活性的、AAV结合性蛋白;

[0174] (ix) 至少包含序列号18、32、34、38、42、46、53、55、59、63、69和76任意者中记载的氨基酸序列中的、第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,其中,相对于该第25位~第213位为止的氨基酸序列具有70%以上的同源性,且残留有所述氨基酸序列所具有的氨基酸置换、且具有AAV结合活性的、AAV结合性蛋白。

[0175] [5] 一种多聚核苷酸,其编码[1]~[4]的任一项中所述的AAV结合性蛋白。

[0176] [6] 一种表达载体,其包含[5]中所述的多聚核苷酸。

[0177] [7] 一种转化体,其是用[6]中所述的表达载体转化宿主而得到的。

[0178] [8]根据[7]中所述的转化体,其中,宿主为大肠杆菌。

[0179] [9]一种AAV结合性蛋白的制造方法,其包括:通过对[7]或[8]中所述的转化体进行培养而表达AAV结合性蛋白的工序;以及,由得到的培养物中回收所表达的AAV结合性蛋白的工序。

[0180] [10]一种AAV吸附剂,其包含不溶性载体、以及固定于该载体的[1]~[3]的任一项中所述的AAV结合性蛋白。

[0181] [11]一种柱,其包含[10]中所述的AAV吸附剂。

[0182] [12]一种AAV的纯化方法,其包括:向[11]中所述的柱中添加包含AAV的溶液,使所述吸附剂吸附该AAV的工序;以及,使用洗脱液将吸附于所述吸附剂的AAV洗脱的工序。

[0183] 以下,对本发明详细地进行说明。其中,本发明不限于以下的实施方式,在不脱离本发明主旨的范围内,可以以任意的形态实施。

[0184] 需要说明的是,本说明书中所引用的专利公报、专利申请公开公报、以及非专利文献等可以援用其整体,可以以任何目的整合于本发明中。

[0185] 本说明书中记载的AAV结合性蛋白是指如下蛋白质:至少包含相当于序列号1中记载的KIAA0319L(官方数据库:UniProt、登录号:Q8IZA0)的氨基酸序列中的细胞外区域结构域1(PKD1)和结构域2(PKD2)的区域的、第312位的丝氨酸(Ser)~第500位的天冬氨酸(Asp)为止的氨基酸残基,且该第312位~第500位为止的氨基酸残基中产生了特定位置的氨基酸置换。因此,本发明的AAV结合性蛋白可以包含位于所述蛋白质的C末端侧的其他细胞外区域结构域(结构域3(PKD3)、结构域4(PKD4)和结构域5(PKD5))的全部或一部分,也可以包含处于PKD1的N末端侧的MANSC(Motif At N terminus with SevenCysteines)结构域等的信号序列、富含半胱氨酸的区域中的全部或一部分,也可以包含处于细胞外区域的N末端侧和/或C末端侧的跨膜区域以及细胞内区域的全部或一部分。

[0186] 所述特定位置的氨基酸置换具体而言是指,在序列号1中记载的氨基酸序列中产生了Ile319Phe(该标记表示序列号1的第319位的异亮氨酸被置换为苯丙氨酸,以下同样)、Leu321Pro、Pro322Leu、Asn324Asp、Asn324Ser、Gln327Arg、Asn329Asp、Asn329Tyr、Ala330Gly、Tyr331Cys、Val332Gln、Leu333Val、Leu333Pro、Gln334Arg、Pro337Leu、Lys338Arg、Lys338Glu、Glu340Gly、Thr341Ala、Tyr342Cys、Tyr342His、Tyr342Asn、Thr343Met、Tyr344His、Asp345Asn、Trp346Leu、Trp346Arg、Gln347Leu、Gln347Pro、Leu348Pro、Ile349Thr、Thr350Met、His351Leu、Pro352Leu、Arg353Cys、Asp354Gly、Tyr355His、Tyr355Asn、Tyr355Cys、Ser356Cys、Gly357Cys、His363Arg、His363Leu、Ser364Pro、Gln365Arg、Ile366Thr、Leu367Pro、Lys368Arg、Leu369Gln、Leu369Pro、Ser370Ala、Lys371Glu、Thr373Ala、Leu376Pro、Tyr377Cys、Phe379Ser、Val381Ala、Glu384Gly、Asn387Ser、His389Gln、His389Leu、His389Arg、Gly390Ser、Glu391Lys、Tyr393Cys、Val396Ala、Lys399Glu、Lys399Arg、Arg406Ser、Val412Ala、Gln415Leu、Phe416Ser、Gln441Leu、Tyr442Phe、Lys448Arg、Glu453Gly、Lys455Arg、Glu458Gly、Ala461Ser、Ser476Arg、Leu477Pro、Asn487Asp和Asn492Asp中的至少任一个氨基酸置换时,对热和/或酸的稳定性得到改善,因而优选。

[0187] 其中,Gly390Ser是对热和酸的稳定性特别得到提高的氨基酸置换。因此,至少产生了Gly390Ser的氨基酸置换的AAV结合性蛋白是本发明的AAV结合性蛋白优选的方式。

[0188] 另外,序列号1中记载的氨基酸序列中,产生了Ile319Asn、Ile319Ser、Thr320Ile、Lys323Glu、Leu328Gln、Leu328Pro、Tyr331His、Val332Ala、Val332Glu、Pro336Gln、Pro337Gln、Lys338Asn、Tyr342Arg、Thr350Ser、Ile366Phe、Val383Ala、Gln386Arg、His389Asp、Gly392Cys、Val394Ala、Ile409Val、Ser476Gly和Thr490Ser中的至少任一个氨基酸置换时,对热和/或酸的稳定性提高,因而优选。

[0189] 另外,序列号1中记载的氨基酸序列中,产生了Val317Asp、Gln318Pro、Thr320Ala、Val326Ala、Val326Glu、Leu328Pro、Asn329His、Val332Ala、Lys362Glu、Lys362Asn、Lys371Asn、Leu376Pro、Glu378Gly、Glu378Val、Phe379Tyr、Phe379Ser、Val381Asp、Thr397Ser、Glu401Val、Arg406His和Val499Glu中的至少任一个氨基酸置换时,对热和/或酸的稳定性提高,从而优选。

[0190] 进而,序列号1中记载的氨基酸序列中,产生了Ser312Pro、Ala313Ser、Lys323Arg、Asn324Ser、Gln327His、Gln327Leu、Asn329Ile、Glu335Gly、Glu335Val、Glu340Val、Thr341Pro、Thr343Ser、Tyr344Phe、Trp346Cys、Arg353Cys、Tyr355Cys、Ser356Cys、Gly357Cys、Met359Leu、Glu360Lys、Glu360Val、Gly361Cys、Lys362Gly、Ser364Leu、Ile366Thr、Leu369Gln、Lys371Asp、Leu372Pro、Leu372Gln、Thr373Ala、Pro374Leu、Leu376Pro、Glu378Gly、Glu378Val、Phe379Cys、Phe379Ser、Lys380Glu、Val381Ala、Ile382Val、Val383Ala、Glu384Val、Gln386Arg、His389Arg、Tyr393Cys、Val394Asp、Val394Ile、Asn395Ser、Val396Ala、Arg403His、Gln415Arg、Thr426Ala、Gln432Leu、Gln432Arg、Gln441Arg、His443Leu、Lys448Glu、Ile456Val、Asp483Asn、Ser488Leu、以及Val499Ile中的至少任一个氨基酸置换时,对热和/或碱的稳定性提高,因而优选。

[0191] 本发明的AAV结合性蛋白中,对于置换的氨基酸的个数没有特别的限制。作为一例,可列举出以下(A)~(K)所示的AAV结合性蛋白。这些AAV结合性蛋白从对热和酸的稳定性提高的观点出发而更优选。

[0192] (A)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser和Tyr342Cys的氨基酸置换。

[0193] (B)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Tyr342Cys和Ser476Arg的氨基酸置换。

[0194] (C)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Ile319Phe、Tyr342Cys和Ser476Arg的氨基酸置换。

[0195] (D)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Tyr342Cys、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0196] (E)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Ile319Phe、Lys323Glu、Tyr342Cys和Ser476Arg的氨基酸置换。

[0197] (F)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的、第312位的丝

氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Tyr342Cys、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0198] (G)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Asn324Asp、Tyr342Cys、Lys362Glu、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0199] (H)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Val317Asp、Tyr342Cys、Lys371Asn、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0200] (I)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少发生了Gly390Ser、Val317Asp、Asn324Asp、Tyr342Cys、Lys362Glu、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0201] (J)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Val317Asp、Tyr342Cys、Lys362Glu、Lys371Asn、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0202] (K)一种AAV结合性蛋白,其包含序列号1中记载的氨基酸序列中的第312位的丝氨酸~第500位的天冬氨酸为止的氨基酸残基,且在该第312位~第500位为止的氨基酸残基中,至少产生了Gly390Ser、Val317Asp、Tyr(Cys)342Ser、Lys362Glu、Lys371Asn、Val381Ala、Ile382Val、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp的氨基酸置换。

[0203] 作为本发明的AAV结合性蛋白,更具体而言,可列举出下述的AAV结合性蛋白。这些AAV结合性蛋白从对热和酸的稳定性提高这一点出发而优选。

[0204] 作为所述(A)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号18中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0205] 作为所述(B)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号32中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0206] 作为所述(C)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号34中记载的氨基酸序列中的第25位的第丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0207] 作为所述(D)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号38中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0208] 作为所述(E)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号42中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0209] 作为所述(F)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号46中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0210] 作为所述(G)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号53中记载的氨

氨基酸序列中的、第25位的丝氨酸～第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0211] 作为所述(H)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号55中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸～第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0212] 作为所述(I)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号59中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸～第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0213] 作为所述(J)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号63中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸～第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0214] 作为所述(K)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号69中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸～第231位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0215] 另外,作为本发明的AAV结合性蛋白,更具体而言,可列举出下述的AAV结合性蛋白。所述AAV结合性蛋白从对热的稳定性提高的观点出发而优选。

[0216] 作为所述(F)所示的AAV结合性蛋白的一个方式的、至少包含序列号76中记载的氨基酸序列中的、第25位的丝氨酸～第213位的天冬氨酸为止的氨基酸序列的AAV结合性蛋白。

[0217] 所述(ii)、(v)和(viii)中,“一个或多个”根据AAV结合性蛋白的立体结构中的氨基酸置换的位置、氨基酸残基的种类而不同,但作为一例是指1～50个、1～30个、1～20个、1～10个、1～9个、1～8个、1～7个、1～6个、1～5个、1～4个、1～3个、1～2个、1个的任意者。作为所述氨基酸置换的一例,可列举出物理性质和/或化学性质类似的氨基酸间产生了置换的保守性置换。本领域技术人员已知,在保守性置换的情况下,通常产生了置换者与没有产生置换者之间蛋白质的功能维持不变。作为保守性置换的一例,可列举出甘氨酸与丙氨酸之间、丝氨酸与脯氨酸之间、或谷氨酸与丙氨酸之间的置换(蛋白质的结构与功能,MEDICAL SCIENCES INTERNATIONAL,LTD.,9,2005)。另外,作为所述氨基酸置换的其他例子,可列举出用于使本发明的AAV结合性蛋白单体化的置换。具体而言,可列举出将容易构成高维结构的半胱氨酸残基置换成丝氨酸残基或蛋氨酸残基的氨基酸置换。

[0218] 另外,本说明书中,置换、缺失、插入和添加中的任一个以上还包含源自AAV结合性蛋白的差异以及基于种属差异的、天然也存在的突变(mutant或variant)。

[0219] 所述(iii)、(vi)和(ix)中的氨基酸序列的同源性可以是70%以上,也可以具有其以上的同源性(例如、80%以上、85%以上、90%以上、95%或98%以上)。需要说明的是,本说明书中的“同源性”是指类似性(Similarity)或同一性(identity),特别是指同一性。“氨基酸序列的同源性”是指相对于氨基酸序列整体的同源性。氨基酸序列之间的“同一性(identity)”是指这些氨基酸序列中的种类相同的氨基酸残基的比率(实验医学2013年2月号Vol.31No.3、羊土社)。氨基酸序列之间的“类似性(similarity)”是指这些氨基酸序列中的种类相同的氨基酸残基的比率与侧链的性质类似的氨基酸残基比率的总计(实验医学2013年2月号Vol.31No.3、羊土社)。氨基酸序列的同源性可以利用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)、FASTA等比对程序来确定。

[0220] 本发明的AAV结合性蛋白在其N末端侧或C末端侧也可以进一步添加有利于从夹杂物存在下的溶液中分离的寡肽。作为前述寡肽,可列举出多聚组氨酸、多聚赖氨酸、多聚精氨酸、多聚谷氨酸、多聚天冬氨酸等。另外,也可以在本发明的AAV结合性蛋白的N末端侧或C

末端侧进一步添加对于将本发明的AAV结合性蛋白固定于色谱用支撑体等固相时有用的、包含半胱氨酸的寡肽(例如由序列号50中记载的氨基酸序列中的第220位的半胱氨酸~第226位的甘氨酸为止的氨基酸残基构成的寡肽)。

[0221] 在AAV结合性蛋白的N末端侧或C末端侧添加的寡肽的长度,只要不有损本发明的AAV结合性蛋白的AAV结合性、稳定性,就没有特别的限制。对本发明的AAV结合性蛋白添加所述寡肽时,也可以在制作编码所述寡肽的多聚核苷酸之后,使用本领域技术人员公知的方法利用基因工程手段添加至AAV结合性蛋白的N末端侧或C末端侧,也可以使化学合成的所述寡肽与本发明的AAV结合性蛋白的N末端侧或C末端侧化学结合而添加。

[0222] 进一步,在本发明的AAV结合性蛋白的N末端侧也可以添加用于促进在宿主中的有效表达的信号肽。宿主是大肠杆菌的情况下的所述信号肽的例子,可例示出PelB、OmpA、DsbA、DsbC、MalE、TorT等这样的使蛋白质分泌至周质的信号肽(日本特开2011-097898号公报)。

[0223] 本说明书中,“对热、酸或碱的稳定性提高”可以是指与野生型的AAV结合性蛋白(至少包含序列号7中记载的氨基酸序列中的第25位的丝氨酸~第213位的天冬氨酸为止的氨基酸残基的蛋白质)相比较,对热、酸或碱的稳定性提高了,优选可以是指对热和酸或碱的稳定性提高,更优选可以是指对热、酸和碱的稳定性提高。

[0224] 作为编码本发明的AAV结合性蛋白的多聚核苷酸(以下,也称为本发明的多聚核苷酸)的制作方法的一例,可例示出:

[0225] (I) 由本发明的AAV结合性蛋白的氨基酸序列转换成核苷酸序列,人工地合成包含该核苷酸序列的多聚核苷酸的方法;

[0226] (II) 直接人工合成包含AAV结合性蛋白整体或部分序列的多聚核苷酸,或者,由AAV结合性蛋白的cDNA等使用PCR法这样的DNA扩增法进行制备、且将制备的该多聚核苷酸用适当的方法进行连接的方法。

[0227] 在前述(I)的方法中,由氨基酸序列转换为核苷酸序列时,优选考虑到所转化的宿主中的密码子的使用频率而进行转换。作为一例,当宿主为大肠杆菌(*Escherichia coli*)的情况下,精氨酸(Arg)情况下AGA/AGG/CGG/CGA的使用频率少、异亮氨酸(Ile)情况下ATA的使用频率少、亮氨酸(Leu)情况下CTA的使用频率少、甘氨酸(Gly)情况下GGA的使用频率少、脯氨酸(Pro)情况下CCC的使用频率少(因为是所谓的稀有密码子),因此可以避开这些密码子而进行转换。密码子的使用频率的解析可以利用公知的数据库(例如、Kazusa DNA Research Institute.的网站中的Codon Usage Database等)来进行。

[0228] 向本发明的多聚核苷酸中导入突变的情况下,可以使用易错PCR法。易错PCR法中的反应条件只要是能向编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸中导入所希望的突变的条件,就没有特别的限定,例如,使作为底物的4种脱氧核苷酸(dATP/dTTP/dCTP/dGTP)的浓度不均匀,以0.01~10mM(优选0.1~1mM)的浓度向PCR反应液中添加MnCl<sub>2</sub>,进行PCR,由此能够向多聚核苷酸中导入突变。另外,作为易错PCR法以外的突变导入方法,可列举出如下方法:使包含AAV结合性蛋白的整体或部分序列的多聚核苷酸与作为诱变剂的试剂接触/作用、照射紫外线、或者向多聚核苷酸中导入突变,从而进行制作。该方法中,作为诱变剂所使用的试剂,可以使用羟基胺、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍、亚硝酸、亚硫酸、胼等、本领域技术人员通常使用的诱变剂。

[0229] 使用本发明的多聚核苷酸转化宿主的情况下,可以使用本发明的多聚核苷酸其自身,更优选使用在表达载体(例如、原核细胞、真核细胞的转化中通常使用的噬菌体、粘粒、质粒等)的合适的位点插入有本发明的多聚核苷酸而成的物质。需要说明的是,该表达载体只要是能够在所转化的宿主内稳定存在且复制的表达载体就没有特别的限制,在以大肠杆菌作为宿主的情况下,可例示出pET质粒载体、pUC质粒载体、pTrc质粒载体、pCDF质粒载体。

[0230] 另外,所述合适的位点是指,不破坏与表达载体的复制功能、所希望的抗生素标记物、传导性相关的区域的位点。在向所述表达载体中插入本发明的多聚核苷酸时,优选以连接在表达中所需要的启动子这样的功能性多聚核苷酸的状态下进行插入。作为该启动子的例子,在宿主为大肠杆菌的情况下,可列举出trp启动子、tac启动子、trc启动子、lac启动子、T7启动子、recA启动子、lpp启动子。

[0231] 对于使用通过前述方法制作的、插入了本发明的多聚核苷酸的表达载体(以下记为本发明的表达载体)转化宿主,只要用本领域技术人员通常所使用的方法进行即可。例如,作为宿主选择属于埃希氏菌属的微生物(大肠杆菌JM109株、大肠杆菌BL21(DE3)株、大肠杆菌W3110株等)的情况下,通过公知的文献(例如、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 256, 1992)中记载的方法等进行转化即可。对于用前述方法转化而得到的转化体,通过用合适的方法进行筛选、从而能够得到能表达本发明的AAV结合性蛋白的转化体(以下记为本发明的转化体)。

[0232] 由本发明的转化体制备本发明的表达载体时,从培养本发明的转化体而得到的培养物中,使用碱提取法或QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN公司制)等市售的提取试剂盒进行制备即可。

[0233] 对本发明的转化体进行培养,从得到的培养物中回收本发明的AAV结合性蛋白,由此能够制造本发明的AAV结合性蛋白。需要说明的是,本说明书中,培养物除了包含所培养的本发明的转化体的细胞本身以外,还包含培养中所使用的培养基。

[0234] 本发明的蛋白质制造方法中所使用的转化体,用适合于对象宿主培养的培养基进行培养即可,宿主为大肠杆菌的情况下,作为优选的培养基的一例,可列举出补充了必要的营养源的LB(Luria-Bertani)培养基。需要说明的是,为了通过有无导入本发明的载体来选择性地使本发明的转化体增殖,优选向培养基中添加与该载体所包含的试剂抗性基因相对应的药剂进行培养。例如,该载体包含卡那霉素抗性基因的情况下,向培养基中添加卡那霉素即可。

[0235] 另外,培养基中除了碳、氮和无机盐供给源之外,还可以添加适当的营养源,根据希望还可以包含选自由谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸和二硫苏糖醇组成的一种以上的还原剂。宿主为大肠杆菌的情况下,培养温度通常是10°C~40°C,优选为20°C~37°C,更优选为25°C左右,根据所表达的蛋白质的特性进行选择即可。宿主为大肠杆菌的情况下,培养基的pH为pH6.8~pH7.4,优选为pH7.0左右。另外,本发明的载体包含有诱导性的启动子的情况下,优选在本发明的AAV结合性蛋白能够良好表达的条件下施加诱导。

[0236] 作为诱导剂,可例示出IPTG(Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside,异丙基 $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷)。宿主为大肠杆菌的情况下,测定培养液的浊度(600nm时的吸光度),在成为约0.5~1.0时,添加适当量的IPTG之后,继续进行培养,由此能够诱导AAV结合性蛋白的表达。IPTG的添加浓度从0.005~1.0mM的范围适宜选择即可,但优选为0.01~0.5mM的

范围。IPTG诱导中所涉及的各种条件只要按照该技术领域中公知的条件进行即可。

[0237] 为了从对本发明的转化体进行培养而得到的培养物中回收本发明的AAV结合性蛋白,用适合于本发明的转化体中的本发明的AAV结合性蛋白的表达形态的方法,从该培养物中分离/纯化,从而回收本发明的AAV结合性蛋白即可。例如,在培养上清中表达时,可以进行离心分离操作而分离菌体,从得到的培养上清中对本发明的AAV结合性蛋白进行纯化。另外,在细胞内(包含周质)中进行表达的情况下,可以通过离心分离操作收集菌体之后,添加酶处理剂、表面活性剂等将菌体破碎,提取本发明的AAV结合性蛋白之后进行纯化。

[0238] 为了对本发明的AAV结合性蛋白进行纯化,可以使用该技术领域中公知的方法,作为一例可列举出使用了液相色谱的分离/纯化。液相色谱中有离子交换色谱、疏水性相互作用色谱、凝胶过滤色谱、亲和色谱等,通过将 these 色谱组合而进行纯化操作,由此能够高纯度地制备本发明的AAV结合性蛋白。

[0239] 作为测定得到的本发明的AAV结合性蛋白对于AAV的结合活性的方法,例如可以使用酶联免疫吸附试验法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay法,以下记作ELISA法)、表面等离子共振等测定对于AAV的结合活性即可。作为结合活性的测定中所使用的AAV,可以是AAV载体,也可以是VLP(病毒样粒子)。另外,只要对本发明的AAV结合性蛋白显示结合活性,则可以使用任何血清类型(血清型)的AAV载体和VLP。

[0240] 本发明的AAV结合性蛋白可以用于例如AAV的纯化或分析。本发明的AAV结合性蛋白可以例如固定于不溶性载体而使用。即,AAV的纯化或分析具体而言例如可以使用AAV吸附剂来实施,所述AAV吸附剂包含不溶性载体、和固定于该不溶性载体的本发明的AAV结合性蛋白。本说明书中,也将包含不溶性载体和固定于该不溶性载体的本发明的AAV结合性蛋白的、AAV吸附剂称为本发明的AAV吸附剂。需要说明的是,AAV的纯化不限于从夹杂物共存的溶液中纯化AAV,也包括基于结构、性质或活性等纯化AAV。对于不溶性载体没有特别的限定。作为不溶性载体,可例示出:以琼脂糖、海藻酸盐(Arginate)、角叉菜胶、甲壳素、纤维素、糊精、葡聚糖、淀粉等多糖作为原料的载体;以聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚氨酯等合成高分子作为原料的载体;以二氧化硅等陶瓷作为原料的载体。其中,作为不溶性载体,优选以多糖作为原料的载体、以合成高分子作为原料的载体。作为所述优选的载体的一例,可列举出:TOYOPEARL(TOSOH CORPORATION.制)等导入了羟基的聚甲基丙烯酸酯凝胶、Sepharose(Cytiva公司制)等琼脂糖凝胶、Cellufine(JNC公司制)等纤维素凝胶。对于不溶性载体的形状,没有特别的限定。不溶性载体可以是例如能够填充于柱中的形状。不溶性载体可以是例如粒状物、单块状物、膜状物、纤维状物等。另外,不溶性载体可以是例如多孔性或非多孔性。

[0241] 本发明的AAV结合性蛋白可以例如通过共价键固定于不溶性载体。本发明的AAV结合性蛋白具体而言,例如,可以通过不溶性载体所具有的活性基团使本发明的AAV结合性蛋白与不溶性载体共价键合,从而固定于不溶性载体。即,不溶性载体可以具有活性基团。不溶性载体可以例如在其表面具有活性基团。作为活性基团,可列举出N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化酯基、环氧基、羧基、马来酰亚胺基、卤代乙酰基、三氟代乙烷磺酰基(Tresyl)、甲酰基、卤代乙酰胺基。作为具有活性基团的不溶性载体,例如可以直接使用具有活性基团的市售的不溶性载体;也可以向不溶性载体中导入活性基团而使用。作为具有活性基团的市售的载体,可例示出TOYOPEARLAF-Epoxy-650M、TOYOPEARL AF-Tresyl-650M(均为TOSOH

CORPORATION制)、HiTrap NHS-activated HP Columns、NHS-activated Sepharose 4Fast Flow、Epoxy-activated Sepharose 6B(均为Cytiva公司制)、SulfoLink Coupling Resin (Thermo Fisher Scientific Inc.制)。

[0242] 作为向载体表面导入活性基团的方法,可例示出对于存在于载体表面的羟基、环氧基、羧基、氨基等,使具有2个以上活性位点的化合物中的一个位点反应的方法。

[0243] 作为向存在于载体表面的羟基、氨基导入环氧基的化合物,可例示出表氯醇、乙二醇二缩水甘油醚、丁二醇二缩水甘油醚、己二醇二缩水甘油醚。

[0244] 另外,作为向存在于载体表面的环氧基导入羧基的化合物,可例示出2-巯基乙酸、3-巯基丙酸、4-巯基丁酸、6-巯基丁酸、甘氨酸、3-氨基丙酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸。

[0245] 作为向存在于载体表面的羟基、环氧基、羧基、氨基导入马来酰亚胺基的化合物,可例示出:N-( $\epsilon$ -马来酰亚胺己酸)酰肼、N-( $\epsilon$ -马来酰亚胺丙酸)酰肼、4-(4-N-马来酰亚胺苯基)乙酰肼、2-氨基马来酰亚胺、3-氨基马来酰亚胺、4-氨基马来酰亚胺、6-氨基马来酰亚胺、1-(4-氨基苯基)马来酰亚胺、1-(3-氨基苯基)马来酰亚胺、4-(马来酰亚胺)苯基异氰酸酯、2-马来酰亚胺乙酸、3-马来酰亚胺丙酸、4-马来酰亚胺丁酸、6-马来酰亚胺己酸、N-( $\alpha$ -马来酰亚胺乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯、(马来酰亚胺间苯甲酰基)N-羟基琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-6-氨基己酸、琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸、(马来酰亚胺对苯甲酰基)N-羟基琥珀酰亚胺酯、(马来酰亚胺间苯甲酰基)N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0246] 另外,作为向存在于载体表面的羟基、氨基导入卤代乙酰基的化合物,可例示出:氯代乙酸、溴代乙酸、碘代乙酸、氯代乙酰氯、溴代乙酰氯、碘代乙酰氯、氯代乙酸酐、溴代乙酸酐、碘代乙酸酐、2-(碘代乙酰胺)乙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、3-(溴代乙酰胺)丙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、4-(碘代乙酰基)氨基苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0247] 另外,作为向载体表面导入活性基团的方法,还可例示出使存在于载体表面的羟基、氨基与 $\omega$ -烯基烷基缩水甘油醚反应之后,用卤化剂将 $\omega$ -烯基部位卤化而进行活化的方法。作为 $\omega$ -烯基烷基缩水甘油醚,可例示出烯丙基缩水甘油醚、3-丁烯基缩水甘油醚、4-戊烯基缩水甘油醚。作为卤化剂,可例示出N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺。

[0248] 另外,作为向载体表面导入活性基团的方法,还可例示出对存在于载体表面的羧基使用缩合剂和添加剂而导入活化基团的方法。作为缩合剂,可例示出1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二酰亚胺(EDC)、二环己基碳二酰亚胺、羰基二咪唑。另外,作为添加剂,可例示出N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、4-硝基苯酚、1-羟基苯并三唑。

[0249] 本发明的AAV结合性蛋白向不溶性载体的固定例如可以在缓冲液中实施。作为缓冲液,可列举:乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、MES(2-吗啉乙磺酸)缓冲液、HEPES(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)缓冲液、Tris缓冲液(三(羟甲基)氨基甲烷)、硼酸缓冲液。使之固定时的反应温度例如可以根据活性基团的反应性、AAV结合性蛋白的稳定性等诸条件适宜设定。使之固定时的反应温度例如可以为5°C~50°C,优选为10°C~35°C。

[0250] 本发明的AAV吸附剂例如可以填充于柱中而用于AAV的纯化。具体而言,例如向填充有本发明的AAV吸附剂的柱中添加包含AAV的溶液,使所述吸附剂吸附该AAV,使吸附于所述吸附剂的AAV洗脱,由此能够纯化AAV。即,本发明提供例如一种AAV的纯化方法,其包括:

向填充有本发明的AAV吸附剂的柱中添加包含AAV的溶液,使所述吸附剂吸附该AAV的工序;以及,使吸附于所述吸附剂的AAV洗脱的工序。包含AAV的溶液可以使用例如泵等液体供应单元向柱中添加。需要说明的是,本说明书中,将向柱中添加液体也称为“将液体向柱中送液”。需要说明的是,包含AAV的溶液可以在向柱中添加之前预先使用合适的缓冲液进行溶剂置换。另外,也可以在向柱中添加包含AAV的溶液之前使用合适的缓冲液将柱平衡化。通过所述平衡化,可以期待例如能够将AAV更高纯度地纯化。作为溶剂置换、平衡化中所使用的缓冲液,可例示出磷酸缓冲液、醋酸缓冲液、MES缓冲液。这样的缓冲液中例如也可以进一步添加10mM~100mM的氯化钠等无机盐。溶剂置换中所使用的缓冲液与平衡化中所使用的缓冲液任选相同或不同。另外,包含AAV的溶液向柱中通液之后,柱中残留有夹杂物等AAV以外成分的情况下,在将吸附于AAV吸附剂的AAV洗脱之前,也可以将这样成分从柱中去除。AAV以外的成分例如可以使用合适的缓冲液从柱中去除。针对AAV以外成分的去除中所使用的缓冲液,例如,可以采用针对溶剂置换、平衡化中所使用的缓冲液的记载。吸附于AAV吸附剂的AAV可以例如通过减弱AAV与配体(本发明的AAV结合性蛋白)的相互作用来进行洗脱。作为减弱AAV与配体(本发明的AAV结合性蛋白)的相互作用的手段,可例示出:利用缓冲液改变pH、添加抗衡肽、升高温度、改变盐浓度。吸附于AAV吸附剂的AAV具体而言,例如可以使用合适的洗脱液进行洗脱。作为洗脱液,可列举出比溶剂置换、平衡化中所使用的缓冲液更靠近酸性侧的缓冲液。作为这样的缓冲液,可例示出柠檬酸缓冲液、甘氨酸盐酸缓冲液、醋酸缓冲液。洗脱液的pH可以在例如不有损AAV的功能(与抗原的结合性等)的范围内设定。

[0251] 通过这样实施AAV的纯化,例如可以得到纯化的AAV。即,AAV的纯化方法在一方式中可以是AAV的制造方法,具体而言,可以是纯化的AAV的制造方法。AAV例如可以以包含AAV的洗脱级分的形式得到。即,可以对包含洗脱的AAV的级分进行分取。AAV级分的分取例如可以按照常规方法进行。作为对AAV级分进行分取的方法,可列举出:每隔一定时间、每隔一定体积更换回收容器的方法;结合洗脱液的色谱图形状更换回收容器的方法;用自动采样仪等自动级分采集器等进行级分的分取的方法。进而,也可以从包含AAV的级分中回收AAV。从包含AAV的级分中回收AAV例如可以用蛋白质的纯化中所使用的公知的方法进行。

[0252] 发明的效果

[0253] 本发明的腺相关病毒(AAV)结合性蛋白是将AAV受体中的细胞外区域中的特定位点的氨基酸残基置换成其他氨基酸残基而得到的蛋白质。本发明的AAV结合性蛋白与野生型(氨基酸残基未置换的AAV结合性蛋白)相比较,对热、酸、碱的稳定性提高了。因此,本发明的AAV结合性蛋白作为用于纯化AAV载体的吸附剂的配体是有用的。另外,包含不溶性载体和固定于该载体的本发明的AAV结合性蛋白的AAV吸附剂,与包含不溶性载体和固定于该载体的野生型AAV结合性蛋白的AAV吸附剂相比较,能够高纯度地纯化溶液中所包含的AAV载体。

## 附图说明

[0254] 图1是示出用ELISA法对于腺相关病毒(AAV)结合性蛋白与VLP2(AAV2的病毒样粒子)的结合活性进行评价的结果的图。图中的(+)是VLP2固定于固相时的、(-)是VLP2没有固定于固相时的、各自的结果。

[0255] 图2是示出用AVR5e柱对细胞破碎液中所包含的AAV2进行了纯化的色谱图的图。洗

脱时间20分钟附近的峰是AAV2洗脱峰,对处于该峰的级分(Fr6~9、各1mL)进行了回收。

[0256] 图3是示出用SDS-PAGE对图2中回收的级分(Fr6~9)中所包含的AAV2的纯化纯度进行了确认的结果的图。图中的AP是将纯化前的样品稀释至100倍的溶液的分析结果;Fr6~Fr9是图2中得到的各级分的分析结果。VP1~VP3是相当于构成AAV的3种外壳蛋白质的条带的位置。

[0257] 图4是表示使用填充有野生型AAV结合性蛋白(Wild type)固定凝胶或AVR5eHC固定凝胶的柱,对溶液中所包含的AAV2进行了回收的结果的图。

[0258] 图5是示出使用填充有野生型的AAV结合性蛋白(Wild type)固定凝胶、AVR3HC固定凝胶或AVR8gHC固定凝胶的柱,对溶液中所包含的AAV2进行回收的结果的图。

## 实施例

[0259] 以下示出用于对本发明进一步进行详细说明书的实施例,但本发明不限于这些实施例。

[0260] 实施例1腺相关病毒(AAV)结合性蛋白表达载体的制作

[0261] (1) 将编码序列号1中记载的AAV结合性蛋白的氨基酸序列(UniProt登录号:Q8IZA0)中的、相当于细胞外结构域1和2(PKD1和PKD2)的第312位的丝氨酸(Ser)~第500位的天冬氨酸(Asp)为止的氨基酸残基的核苷酸序列的密码子由人型转换为大肠杆菌型。将密码子转换后的核苷酸序列示于序列号2。

[0262] (2) 人工全合成序列号2中记载的基因,克隆至质粒(委托EurofinsGenomics K.K.)。将制作的质粒命名为pUC-AAVR,将其作为模板,将由序列号3(5'-AAT[CCATGG]GCTCTGCAGGCGAGTCGGTTC-3')和序列号4(5'-TTA[CTCGAG]TCAATGATGATGATGATGGTCTACCGCTTTGTTGACGG-3')中记载的序列构成的寡核苷酸作为PCR引物(分别地,序列号3中的中括号表示限制性内切酶NcoI识别序列、序列号4中的中括号表示限制性内切酶XhoI识别序列),从而实施了PCR。具体而言,制备表1所示组成的反应液,对该反应液在98°C下进行5分钟热处理之后,将以98°C下10秒的第1步骤、55°C下5秒的第2步骤、72°C下90秒的第3步骤作为1个循环的反应重复进行30个循环,从而实施。

[0263] [表1]

组成	体积
模板DNA(10ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR引物(序列号3,33)	2 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR引物(序列号4)	2 $\mu$ L
5 $\times$ PrimeSTAR缓冲液(Takara Bio Inc.制)	10 $\mu$ L
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
2.5U/ $\mu$ L PrimeSTAR HS(Takara Bio Inc.制)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	定容至50 $\mu$ L

[0265] (3) 对(2)中得到的多聚核苷酸进行纯化,用限制性内切酶NcoI和XhoI消化之后,与预先用限制性内切酶NcoI和XhoI进行了消化的表达载体pET26b(MERCK MILLIPORE制)连接,使用该连接产物转化大肠杆菌BL21株(DE3)。

[0266] (4) 对(3)中得到的转化体用包含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB(Luria-Bertani)培养基

进行培养之后,使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制),对表达AAV结合性蛋白的细胞外结构域1和结构域2的载体pET-AAVRD2进行了提取。

[0267] (5) 针对(4)中制作的表达载体pET-AAVRD2中的、编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸及其周边区域,使用全自动DNA测序仪Genetic Analyzer 3500(Thermo Fisher Scientific公司制)解析了核苷酸序列。需要说明的是,在进行该解析时,使用由序列号5(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')或序列号6(5'-ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3')中记载的序列构成的寡核苷酸作为测序用引物。

[0268] 分别地,将用表达载体pET-AAVRD2表达的多肽的氨基酸序列示于序列号7,将编码该肽的多聚核苷酸的序列示于序列号8。需要说明的是,序列号7中,第1位的蛋氨酸(Met)~第22位的丙氨酸(Ala)为止是Pe1B信号肽,第25位的丝氨酸(Ser)~第213位的天冬氨酸(Asp)是AAV结合性蛋白的细胞外区域(结构域1和结构域2、序列号1的第312位~第500位为止的区域),第214位~第219位的组氨酸(His)是标签序列。

[0269] 实施例2AAV结合性蛋白的表达和与AAV的结合性评价

[0270] (1) 将实施例1中制作的用pET-AAVRD2转化的大肠杆菌株BL21(DE3)接种于包含50 $\mu$ g/mL的卡那霉素的3mL的2YT液体培养基(蛋白胨16g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L),在37 $^{\circ}$ C下、有氧振荡培养一晚,由此进行了前培养。

[0271] (2) 向100mL的带挡板烧瓶中的添加了50 $\mu$ g/mL的卡那霉素的20mL的2YT液体培养基中,接种(1)的前培养液200 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C下进行了有氧振荡培养。

[0272] (3) 培养开始2.0小时后,在冰上进行了冷却,以成为终浓度0.1mM的方式添加了IPTG(Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside,异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷),接着在25 $^{\circ}$ C下、有氧振荡培养一晚。

[0273] (4) 培养结束之后,采集培养液2mL,用离心分离进行了集菌。对得到的菌体使用200 $\mu$ L的BugBuster Protein extraction kit(MERCK MILLIPORE制),制备了包含表达的AAV结合性蛋白的蛋白质提取液。制备的蛋白质提取液用包含150mM的氯化钠的20mM Tris盐酸缓冲液(pH7.4)稀释至30倍。

[0274] (5) VLP2(AAV2的病毒样粒子)的制备

[0275] (5-1) 使用pRC2-mi342 Vector(Takara Bio Inc.制)和pHelper Vector(Takara Bio Inc.制)对大肠杆菌JM109株进行了转化。将得到的转化体分别用5L的带挡板烧瓶在37 $^{\circ}$ C下振荡培养一晚,所述烧瓶中加入有以成为100 $\mu$ g/mL的方式添加了羧苄西林的1L的2YT培养基。

[0276] (5-2) 通过对(5-1)的培养液进行离心,从而回收菌体。由得到的菌体使用Plasmid Mega Kit(QIAGEN制),大量制备了pRC2-mi342 Vector和pHelper Vector。

[0277] (5-3) 用加入了包含10%(v/v)的牛血清的D-MEM培养基(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporatio制)40mL的T-225烧瓶(Thermo fisher scientific公司制)5个对HEK293T细胞进行了培养。向其中,使用TransIT-VirusGEN Transfection Reagent(Takara Bio Inc.制),基因导入了(5-2)中制备的pRC2-mi342 Vector和pHelper Vector,在5%的二氧化碳、37 $^{\circ}$ C的条件下,静置培养了3天。

[0278] (5-4) 对(5-3)的培养后细胞进行回收,用AAVpro Purification Kit(Takara Bio Inc.制)进行提取、纯化,从而得到VLP2。从5个T-225烧瓶制备约1mL的VLP2纯化溶液。

[0279] (6) 用ELISA法对(4)中制备的蛋白质提取液中的AAV结合性蛋白与(5)中制备的VLP2的结合性进行了评价。

[0280] (6-1) 将(5)中制备的VLP2用包含150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)由200倍稀释至1000倍,以100 $\mu$ L/孔加入96孔微孔板(Thermo fisher scientific公司制)中,进行了固定(4 $^{\circ}$ C下18小时)。固定结束后,利用包含2% (w/v) 的脱脂乳(Becton Dickinson公司制)和150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)进行了封闭。

[0281] (6-2) 用清洗缓冲液(包含0.05% [w/v]的Tween20(商品名)、150mM氯化钠的20mM Tris盐酸缓冲液(pH7.4))进行清洗之后,添加用于评价VLP2结合活性的包含AAV结合性蛋白的溶液,使AAV结合性蛋白与VLP2反应(30 $^{\circ}$ C下1小时)。

[0282] (6-3) 反应结束后,用所述清洗缓冲液进行清洗、以100 $\mu$ L/孔添加了稀释至100ng/mL的Anti-6His抗体(Bethyl Laboratories公司制)。

[0283] (6-4) 在30 $^{\circ}$ C下使之反应1小时,用所述清洗缓冲液进行清洗之后,以50 $\mu$ L/孔添加TMB过氧化物酶底物(KPL公司制)。通过以50 $\mu$ L/孔添加1M的磷酸而停止显色,用酶标仪(Tecan公司制)测定了450nm的吸光度。

[0284] 将ELISA法的测定结果示于图1。在将VLP2固定于固相(VLP(+))时显示出高的吸光,因此可知本实施例中表达的AAV结合性蛋白与VLP2结合。需要说明的是,VLP2是AAV2的病毒样粒子,因此可以说本结果是和AAV结合性蛋白与AAV2结合同义的结果。

[0285] 实施例3AAV结合性蛋白的突变文库制作和筛选(其1)

[0286] 对AAV结合性蛋白表达载体pET-AAVRD2中的、编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸部分,通过易错PCR实施随机突变导入。

[0287] (1) 作为模板使用实施例1中制作的pET-AAVRD2,进行易错PCR。易错PCR如下进行:制备表2所示组成的反应液之后,将该反应液在98 $^{\circ}$ C下进行2分钟热处理,将以98 $^{\circ}$ C下30秒的第1步骤、55 $^{\circ}$ C下20秒的第2步骤、72 $^{\circ}$ C下90秒的第3步骤作为1个循环的反应进行30个循环,最后在72 $^{\circ}$ C下进行5分钟热处理。通过所述易错PCR向编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸良好地导入突变,其平均突变导入率为每1分子1.8氨基酸突变。

[0288] [表2]

[0289]

组成	体积
模板DNA (pET-AAVRD2) 10ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR引物(序列号3)	2 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR引物(序列号4)	2 $\mu$ L
10mM MnCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ L
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
10 $\times$ Ex Taq缓冲液(Takara Bio Inc.制)	5 $\mu$ L
GoTaq聚合酶(Promega Corporation制)	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	定容至50 $\mu$ L

[0290] (2) 对(1)中得到的PCR产物进行纯化之后,用限制性内切酶NcoI和XhoI进行消化,与预先用相同限制性内切酶消化的表达载体pET26b(MERCK MILLIPORE制)连接。

[0291] (3) 连接反应结束后,通过反应液转化大肠杆菌BL21(DE3),用包含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB平板培养基进行培养(37 $^{\circ}$ C下18小时)之后,将平板上所形成的菌落作为随机突变体

文库。

[0292] (4) 将(3)中制作的随机突变体文库(转化体)接种于包含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的2YT液体培养基200 $\mu$ L中,使用96孔深孔平板,在37 $^{\circ}$ C下振荡培养一晚。

[0293] (5) 将(4)中制作的培养液10 $\mu$ L移植于包含0.1mM的IPTG和50 $\mu$ g/mL卡那霉素的500 $\mu$ L的2YT液体培养基,使用96孔深孔平板,进一步在25 $^{\circ}$ C下振荡培养一晚。

[0294] (6) 对(5)的培养液进行离心分离,将得到的培养上清用包含150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)稀释至2倍。对稀释的溶液在43 $^{\circ}$ C下进行15分钟热处理。

[0295] (7) 对于进行了(6)的热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性、以及没有进行(6)的热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,用实施例2的(6)中记载的ELISA法进行测定,将进行了热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性除以没有进行热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,由此计算出残留活性。

[0296] (8) 用(7)的方法对约2700株转化体进行评价,从其中选择表达与野生型(没有氨基酸置换)AAV结合性蛋白相比较热稳定性提高的AAV结合性蛋白的转化体。对所述选择的转化体进行培养,使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制)制备了表达载体。

[0297] (9) 对于得到的表达载体中所插入的编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸区域的序列,用与实施例1的(5)中的记载相同的方法解析核苷酸序列,确定氨基酸的突变位点。

[0298] 将所述(8)中所选择的转化体表达的AAV结合性蛋白的、相对于野生型(没有氨基酸置换)AAV结合性蛋白的氨基酸置换位置和热处理后的残留活性(%)总结而示于表3。可以说,序列号1中记载的氨基酸序列中的、第312位的丝氨酸(Ser)~第500位的天冬氨酸(Asp)为止的氨基酸残基中产生了Ile319Phe(该标记表示序列号1的第319位的异亮氨酸被置换为苯丙氨酸,以下相同)、Leu321Pro、Pro322Leu、Asn324Asp、Asn324Ser、Gln327Arg、Asn329Asp、Asn329Tyr、Ala330Gly、Tyr331Cys、Val332Gln、Leu333Val、Leu333Pro、Gln334Arg、Pro337Leu、Lys338Arg、Lys338Glu、Glu340Gly、Thr341Ala、Tyr342Cys、Tyr342His、Tyr342Asn、Thr343Met、Tyr344His、Asp345Asn、Trp346Leu、Trp346Arg、Gln347Leu、Gln347Pro、Leu348Pro、Ile349Thr、Thr350Met、His351Leu、Pro352Leu、Arg353Cys、Asp354Gly、Tyr355His、Tyr355Asn、Tyr355Cys、Ser356Cys、Gly357Cys、His363Arg、His363Leu、Ser364Pro、Gln365Arg、Ile366Thr、Leu367Pro、Lys368Arg、Leu369Gln、Leu369Pro、Ser370Ala、Lys371Glu、Thr373Ala、Leu376Pro、Tyr377Cys、Phe379Ser、Val381Ala、Glu384Gly、Asn387Ser、His389Gln、His389Leu、His389Arg、Gly390Ser、Glu391Lys、Tyr393Cys、Val396Ala、Lys399Glu、Lys399Arg、Arg406Ser、Val412Ala、Gln415Leu、Phe416Ser、Gln441Leu、Tyr442Phe、Lys448Arg、Glu453Gly、Lys455Arg、Glu458Gly、Ala461Ser、Ser476Arg、Leu477Pro、Asn487Asp和Asn492Asp的任意氨基酸置换中的至少一个的AAV结合性蛋白,与野生型AAV结合性蛋白相比较,热稳定性提高了。

[0299] [表3]

[0300]

No.	氨基酸置换	残留活性[%]	No.	氨基酸置换	残留活性[%]
1	Asn324Asp	46.0	29	Leu333Val, Tyr342Cys	91.8
2	Tyr331Cys	73.4	30	Glu340Gly, Tyr342Cys	91.3
3	Lys338Glu	52.6	31	Tyr342His, Ile349Thr	66.8
4	Tyr344His	88.2	32	Tyr342Cys, Gly390Ser	97.6
5	Asp345Asn	71.4	33	Tyr344His, His363Arg	82.2
6	Trp346Leu	85.7	34	Trp346Arg, Glu458Gly	78.1
7	Leu348Pro	69.6	35	Gln347Leu, Thr375Ala	85.9
8	His351Leu	68.7	36	Tyr355His, Asn387Ser	86.6
9	Pro352Leu	71.9	37	Gln365Arg, His389Gln	70.1
10	Arg353Cys	84.3	38	Gln365Arg, Gln415Leu	65.3
11	Tyr355Asn	80.6	39	Ile366Thr, Gln441Leu	65.5
12	Ser356Cys	84.6	40	Phe379Ser, Lys455Arg	77.4
13	Gly357Cys	97.0	41	Glu453Gly, Ser476Arg	56.1
14	Gln365Arg	57.7	42	Ile319Phe, Pro322Leu, Lys448Arg	56.6
15	Leu367Pro	56.9	43	Leu321Pro, Tyr342Asn, Ala461Ser	84.1
16	Leu369Gln	92.8	44	Gln327Arg, Lys338Arg, Leu348Pro	76.1
17	Phe379Ser	80.9	45	Asn329Asp, Tyr342His, Tyr355Cys	97.2
18	Tyr393Cys	86.4	46	Asn329Asp, Ile366Thr, Lys368Arg	49.3
19	Val396Ala	62.3	47	Asn329Tyr, Tyr377Cys, Arg406Ser	92.7
20	Lys399Glu	63.3	48	Ala320Gly, Gln347Pro, Lys371Glu	88.4
21	Tyr442Phe	48.7	49	Tyr331Cys, Thr343Met, Tyr355Cys	97.7
22	Leu477Pro	79.9	50	Val332Gln, Tyr342Cys, Val412Ala	80.3
23	Asn487Asp	58.3	51	Leu333Pro, Pro337Leu, Thr350Met	66.7
24	Asn492Asp	63.2	52	Leu348Pro, Leu376Pro, Val396Ala	80.9
25	Asn324Asp, Tyr355His	77.6	53	Asp354Gly, Leu369Gln, Lys455Arg	90.5
26	Asn329Tyr, Lys399Arg	61.9	54	His363Leu, Ser364Pro, His389Leu	87.2
27	Tyr331Cys, Leu376Pro	74.4	55	Gln365Arg, Ser370Ala, Glu391Lys	65.7
28	Tyr331Cys, Glu364Gly	83.7	56	Asn324Ser, Thr341Ala, Leu369Pro, Phe416Ser	81.3
	野生型	43.4	57	Gln334Arg, Val381Ala, His389Arg, Tyr393Cys	79.0

[0301] 实施例4AAV结合性蛋白突变体(氨基酸置换体)的热稳定性评价

[0302] 从表3所示的、进行了氨基酸置换的(突变型)AAV结合性蛋白中,选择No.9(Pro352Leu置换体)、No.16(Leu369Gln置换体)、No.29(Leu333Val和Tyr342Cys置换体)、No.30(Glu340Gly和Tyr342Cys置换体)、No.32(Tyr342Cys和Gly390Ser置换体)、No.36(Tyr355His和Asn387Ser置换体)、No.43(Leu321Pro、Tyr342Asn和Ala461Ser置换体)、No.45(Asn329Asp、Tyr342His和Tyr355Cys置换体)、No.47(Asn329Tyr、Tyr377Cys和Arg406Ser置换体)、No.49(Tyr331Cys、Thr343Met和Tyr355Cys置换体)和No.53(Asp354Gly、Leu369Gln和Lys455Arg置换体),重新对热稳定性进行评价。

[0303] 需要说明的是,分别将No.9的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号9和10中,

[0304] 将No.16的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号11和12中,

[0305] 将No.29的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号13和14中,

[0306] 将No.30的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号15和16中,

[0307] 将No.32的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号17和18中,

[0308] 将No.36的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号19和20中,

[0309] 将No.43的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号21和22中,

[0310] 将No.45的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号23和24中,

[0311] 将No.47的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号25和26中,

[0312] 将No.49的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号27和28中,

[0313] 将No.53的核苷酸序列和氨基酸序列示于序列号29和30中。

[0314] 另外, No.9的氨基酸序列(序列号10)中的Pro352Leu的置换在序列号10中位于第65位,

[0315] No.16的氨基酸序列(序列号12)中的Leu369Gln的置换在序列号12中位于第82位,

[0316] No.29的氨基酸序列(序列号14)中的Leu333Val和Tyr342Cys的置换在序列号14中

位于第46位和第55位，

[0317] No.30的氨基酸序列(序列号16)中的Glu340Gly和Tyr342Cys的置换在序列号16中位于第53位和第55位，

[0318] No.32的氨基酸序列(序列号18)中的Tyr342Cys和Gly390Ser的置换在序列号18中位于第55位和第103位，

[0319] No.36的氨基酸序列(序列号20)中的Tyr355His和Asn387Ser的置换在序列号20中位于第68位和第100位，

[0320] No.43的氨基酸序列(序列号22)中的Leu321Pro、Tyr342Asn和Ala461Ser的置换在序列号22中分别位于第34位、第55位和第174位，

[0321] No.45的氨基酸序列(序列号24)中的Asn329Asp、Tyr342His和Tyr355Cys的置换在序列号24中，分别位于第42位、第55位和第68位，

[0322] No.47的氨基酸序列(序列号26)中的Asn329Tyr、Tyr377Cys和Arg406Ser的置换在序列号26中分别位于第42位、第90位和第119位，

[0323] No.49的氨基酸序列(序列号28)中的Tyr331Cys、Thr343Met、Tyr355Cys的置换在序列号30中分别位于第44位、第56位和第68位，

[0324] No.53的氨基酸序列(序列号30)中的Asp354Gly、Leu369Gln、Lys455Arg的置换在序列号28中位于第67位、第82位和第168位。

[0325] (1) 将表达所述选择的11种突变型AAV结合性蛋白的转化体、以及实施例1的(3)中得到的表达野生型AAV结合性蛋白的转化体，分别用实施例3的(4)和(5)中记载的方法进行培养之后，对培养液进行离心分离，由此分别得到包含表达的各突变型AAV结合性蛋白和野生型AAV结合性蛋白的培养上清。

[0326] (2) 使用实施例2的(6)中记载的ELISA法，对于(1)中得到的培养上清中的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性进行测定。基于作为所述测定结果的450nm处的吸光，以使该测定值相同的方式将(1)中得到的培养上清用包含150mM氯化钠的20mM的Tris缓冲液(pH7.4)进行稀释。

[0327] (3) 将稀释后的蛋白质溶液分为三份，将其中的两份使用ThermalCycler(Eppendorf SE制)，在50.3°C或66.1°C下进行15分钟加热处理，剩下的1份没有进行热处理。

[0328] (4) 对于(3)的热处理之后、或非热处理的AAV结合活性蛋白与VLP2的结合活性，通过实施例2的(6)中记载的ELISA法进行测定，将进行了热处理时的450nm的吸光度除以没有进行热处理时的450nm的吸光度，从而计算出残留活性。

[0329] 将结果示于表4。确认到了，所有突变型AAV结合性蛋白与野生型AAV结合性蛋白相比较，残留活性均变高，该突变型AAV结合性蛋白的热稳定性均提高了。

[0330] [表4]

AAV 结合性蛋白		残留活性 [%]	
No.	氨基酸置换	50.3°C	66.1°C
9	Pro352Leu	49.0	46.5
16	Leu369Gln	32.0	20.3
29	Leu333Val, Tyr342Cys	66.7	54.5
30	Glu340Gly, Tyr342Cys	65.4	52.4
32	Tyr342Cys, Gly390Ser	76.0	70.5
36	Tyr355His, Asn387Ser	74.5	51.0
43	Leu321Pro, Tyr342Asn, Ala461Ser	55.6	56.3
45	Asn329Asp, Tyr342His, Tyr355Cys	66.0	46.7
47	Asn329Tyr, Tyr377Cys, Arg406Ser	64.5	58.7
49	Tyr331Cys, Thr343Met, Tyr355Cys	77.3	57.3
53	Asp354Gly, Leu369Gln, Lys455Arg	29.8	23.5
野生型		16.1	9.6

[0332] 实施例5突变型AAV结合性蛋白的酸稳定性评价(其1)

[0333] (1) 对于实施例4中评价的表达突变型AAV结合性蛋白(即,表3的No.9、No.16、No.29、No.30、No.32、No.36、No.43、No.45、No.47、No.49和No.53中记载的突变型AAV结合性蛋白)的转化体、以及实施例1的(3)中得到的表达野生型AAV结合性蛋白的转化体,分别用实施例3的(4)和(5)中记载的方法进行培养之后,对培养液进行离心分离,分别得到包含表达的各突变型AAV结合性蛋白或野生型AAV结合性蛋白的培养上清。

[0334] (2) 使用实施例2的(6)中记载的ELISA法,对于(1)中得到的培养上清中的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性进行测定。基于作为所述测定结果的450nm处的吸光,以该测定值成为相同的方式,将(1)中得到的培养上清用纯水进行稀释。

[0335] (3) 将稀释后的蛋白质溶液分为两份,一份中混合等量的0.1M的甘氨酸盐酸缓冲液(pH2.5)。在30°C下静置2小时和24小时之后,以3:2的比例与0.5M的MES缓冲液(pH6.0)混合,由此将pH调节在6附近,用实施例2的(6)中记载的ELISA法测定与VLP2的结合活性。另一份没有进行所述酸处理,使稀释倍率与酸处理条件相同之后,以3:2的比例混合0.5M的MES缓冲液(pH6.0),由此将pH调节在6附近,用实施例2的(6)中记载的ELISA法测定与VLP2的结合活性。

[0336] (4) 将进行了(3)中记载的酸处理时的450nm的吸光度除以没有进行酸处理时的450nm的吸光度,由此计算出残留活性。

[0337] 将结果示于表5。实施例4中评价的所有突变型AAV结合性蛋白中,在30°C、pH2.5的条件下,处理2小时和24小时后的残留活性与野生型相比提高了。即,可以确认到,所述突变型AAV结合性蛋白的酸稳定性提高了。其中, No.30(Glu340Gly和Tyr342Cys置换体、序列号16)、No.32(Tyr342Cys和Gly390Ser置换体、序列号18)和No.45(Asn329Asp、Tyr342His和Tyr355Cys置换体、序列号24)与野生型AAV结合性蛋白相比较,酸稳定性显著提高了。

[0338] [表5]

AAV 结合性蛋白		pH2.5 残留活性 [%]	
No.	氨基酸置换	2 h	24 h
9	Pro352Leu	17.6	5.6
16	Leu369Gln	17.3	10.0
29	Leu333Val, Tyr342Cys	52.2	40.2
30	Glu340Gly, Tyr342Cys	70.5	56.1
32	Tyr342Cys, Gly390Ser	70.7	64.7
36	Tyr355His, Asn387Ser	16.1	8.9
43	Leu321Pro, Tyr342Asn, Ala461Ser	41.4	28.3
45	Asn329Asp, Tyr342His, Tyr355Cys	64.4	47.6
47	Asn329Tyr, Tyr377Cys, Arg406Ser	43.6	34.8
49	Tyr331Cys, Thr343Met, Tyr355Cys	52.8	16.6
53	Asp354Gly, Leu369Gln, Lys455Arg	18.2	13.2
野生型		7.9	5.1

[0339] [0340] 实施例6AAV结合性蛋白的突变文库制作与筛选(其2)

[0341] 选择实施例4和实施例5中评价的突变型AAV结合性蛋白中的No.32 (Tyr342Cys和Gly390Ser置换体;序列号18) (命名为AVR2),在编码该蛋白质的多聚核苷酸部分,通过易错PCR实施随机突变导入。

[0342] (1)以插入了编码AVR2(序列号18)的多聚核苷酸(序列号17)的质粒pET-AVR2作为模板,制备表6所示组成的反应液之后,在与实施例3的(1)相同的温度条件下进行易错PCR。通过所述易错PCR,向编码AVR2的多聚核苷酸中导入突变,其平均突变导入率为每1分子1.5氨基酸突变。

[0343] [表6]

组成	体积
10ng/ $\mu$ L模板DNA	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR引物(序列号3)	2 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR引物(序列号4)	2 $\mu$ L
10mM MnCl <sub>2</sub>	0.5 $\mu$ L
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
10 $\times$ Ex Taq缓冲液(Takara Bio Inc.制)	5 $\mu$ L
GoTaq聚合酶(Promega Corporation制)	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	定容至50 $\mu$ L

[0344] [0345] (2)对(1)中得到的PCR产物进行纯化之后,用限制性内切酶NcoI和XhoI进行消化,与预先用相同限制性内切酶消化的表达载体pET26b(MERCK MILLIPORE制)连接。

[0346] (3)连接反应结束后,通过反应液转化大肠杆菌BL21(DE3),用包含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB平板培养基进行培养(37 $^{\circ}$ C下一晚)之后,将平板上所形成的菌落作为随机突变体文库。

[0347] (4)对(3)中制作的随机突变体文库(转化体)用实施例3的(4)和(5)中记载的方法

进行了培养。

[0348] (5) 将(4)的培养液离心分离,对得到的培养上清用超纯水稀释至4倍。将稀释的培养液60 $\mu$ L与0.1M甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)60 $\mu$ L混合,在51.1 $^{\circ}$ C下进行15分钟热和酸处理。

[0349] (6) 对于进行了(5)的处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,与没有进行(5)的处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,利用实施例2的(6)中记载的ELISA法进行了测定。将进行了热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性除以没有进行热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,由此计算出残留活性。

[0350] (7) 用(6)的方法对约1800株随机突变体文库进行评价,选择其中的表达与作为母分子的AVR2相比较残留活性提高了的AAV结合性蛋白的转化体。对所述选择的转化体进行培养,使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制)制备了表达载体。

[0351] (8) 对于得到的表达载体中所插入的编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸区域的序列,用实施例1的(5)中记载的方法解析核苷酸序列,确定氨基酸的突变位点。

[0352] 将所述(7)中选择的转化体表达的AAV结合性蛋白的、相对于AVR2(Tyr342Cys和Gly390Ser置换体)的氨基酸置换位点以及热和酸处理后的残留活性(%)总结而示于表7。

[0353] 序列号1中记载的氨基酸序列中,第312位的丝氨酸(Ser)~第500位的天冬氨酸(Asp)为止的氨基酸残基中产生了Ile319Phe、Ile319Asn、Ile319Ser、Thr320Ile、Leu321Pro、Lys323Glu、Leu328Gln、Leu328Pro、Tyr331His、Val332Ala、Val332Glu、Leu333Pro、Pro336Gln、Pro337Gln、Lys338Asn、Tyr(Cys)342Arg(该标记表示序列号1的第342位的酪氨酸暂时被置换为半胱氨酸之后、进一步被置换为精氨酸,以下相同)、Thr350Ser、Gln365Arg、Ile366Phe、Phe379Ser、Val383Ala、Gln386Arg、His389Asp、Gly392Cys、Val394Ala、Val396Ala、Lys399Glu、Ile409Val、Ser476Gly、Ser476Arg、Asn487Asp、Thr490Ser和Asn492Asp的任意氨基酸置换中的至少一个的AAV结合性蛋白,与野生型AAV结合性蛋白相比较,可以说对热和酸的稳定性提高了。

[0354] [表7]

[0355]

No.	氨基酸置换	残留活性[%]	No.	氨基酸置换	残留活性[%]
58	Ile319Phe	73.9	71	His389Asp	71.9
59	Ile319Asn	26.1	72	Val394Ala	32.0
60	Lys323Glu	80.2	73	Val396Ala	48.9
61	Leu328Gln	43.5	74	Ser476Gly	63.4
62	Leu328Pro	38.8	75	Ser476Arg	96.3
63	Tyr331His	43.1	76	Asn492Asp	36.4
64	Val332Ala	41.4	77	Leu321Pro, Ile409Val	34.3
65	Val332Glu	29.4	78	Leu328Pro, Ile366Phe	55.9
66	Leu333Pro	31.8	79	Lys338Asn, Asn487Asp	73.1
67	Pro337Gln	45.6	80	Gln365Arg, Gly392Cys	49.9
68	Tyr(Cys)342Arg	70.4	81	Phe379Ser, Ser476Gly	66.3
69	Thr350Ser	49.9	82	Ser476Arg, Thr490Ser	70.6
70	Val383Ala	32.8	83	Ile319Ser, Thr320Ile, Lys399Glu	70.2
32	AVR2	25.5	84	Pro336Gln, Gln386Arg, Asn487Asp	48.4

[0356] 实施例7稳定化氨基酸置换的整合(其1)

[0357] 将实施例6中判定的与AAV结合性蛋白对热和酸稳定性提高相关的氨基酸置换整合至AVR2(序列号18),从而谋求进一步的稳定性提高。具体而言,选择表7所示的进行了氨基酸置换的(突变型)AAV结合性蛋白中的No.75(对于AVR2整合了Ser476Arg的氨基酸置换)(命名为AVR3),对于该蛋白质整合了以下(a)~(d)中任一者所示的氨基酸置换。需要说明的是,AVR3的氨基酸序列(序列号32)中的Ser476Arg的置换在序列号32中位于第189位。

[0358] (a) Ile319Phe(命名为AVR4a)

[0359] (b) Asn487Asp(命名为AVR4d)

[0360] (c) Ile319Phe和Lys323Glu(命名为AVR5b)

[0361] (d) Lys399Glu和Asn487Asp(命名为AVR5e)

[0362] 以下,对于各AAV结合性蛋白的制作方法详细地进行说明。

[0363] (a) AVR4a

[0364] 从实施例6中明确的与对热、酸的稳定性提高相关的氨基酸置换中,选择Ile319Phe,将其整合至AVR3(序列号32),从而制作AVR4a。具体而言,对于编码AVR3(序列号32)的多聚核苷酸(序列号31),进行使Ile319Phe产生的突变导入,从而制作AVR4a。

[0365] (a-1)以插入了编码AVR3的多聚核苷酸(序列号31)的质粒pET-AVR3作为模板,以由序列号4和序列号33(5'-CCATGGGCTCTGCAGGCGAGTCGGTTCAGTTTACCC-3')中记载的序列构成的寡核苷酸作为PCR引物,制备表1所示组成的反应液。将该反应液在98°C下进行5分钟热处理,将以98°C下10秒的第1步骤、55°C下5秒的第2步骤、72°C下1分钟的第3步骤作为1个循环的反应进行30个循环,最后在72°C下进行5分钟热处理,从而进行PCR。

[0366] (a-2)将扩增的PCR产物供于琼脂糖凝胶电泳,从该凝胶使用QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN公司制)进行纯化。将纯化的PCR产物命名为4ap。

[0367] (a-3)对(a-2)中得到的4ap进行纯化之后,用限制性内切酶NcoI和XhoI消化,与预先用限制性内切酶NcoI和XhoI消化的表达载体pET26b(MERCKMILLIPORE制)连接,使用该连接产物转化大肠杆菌BL21株(DE3)。

[0368] (a-4)对(a-3)中得到的转化体用添加了50μg/mL卡那霉素的LB培养基进行了培养。从回收的菌体(转化体)中提取质粒,从而得到包含编码AVR4a的多聚核苷酸的质粒pET-AVR4a,所述AVR4a相对于野生型AAV结合性蛋白进行了4位点氨基酸置换。

[0369] (a-5)用与实施例1的(5)相同的方法进行pET-AVR4a的核苷酸序列的解析。

[0370] 分别地,将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的AVR4a的氨基酸序列示于序列号34;将编码所述AVR4a的多聚核苷酸的序列示于序列号35。需要说明的是,序列号34中,第1位的蛋氨酸(Met)~第22位的丙氨酸(Ala)为止为Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸(Ser)~第213位的天冬氨酸(Asp)为AAV结合性蛋白AVR4a(结构域1和结构域2、相当于序列号1的第312位~第500位为止的区域),第214位~第219位的组氨酸(His)为标签序列。另外,在序列号34中,分别地,Ile319Phe的苯丙氨酸存在于第32位、Tyr342Cys的半胱氨酸存在于第55位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位的位置。

[0371] (b) AVR4d

[0372] 从实施例6中明确的与对热、酸的稳定性提高相关的氨基酸置换中,选择Asn487Asp,将其整合至AVR3(序列号32),从而制作AVR4d。具体而言,通过对于编码AVR3(序列号32)的多聚核苷酸(序列号31)进行产生Asn487Asp的突变导入,从而制作AVR4d。

[0373] (b-1) 将以 pET-AVR3 作为模板、以由序列号 5 和序列号 36 (5' - GATTCTGATGGCGCAACCGACTCCACCACC-3') 中记载的序列构成的寡核苷酸作为 PCR 引物, 制备表 8 所示的组成的反应液。将该反应液在 98°C 下进行 5 分钟热处理, 将以 98°C 下 10 秒的第 1 步骤、55°C 下 5 秒的第 2 步骤、72°C 下 1 分钟的第 3 步骤作为 1 个循环的反应进行 30 个循环, 最后在 72°C 下进行 5 分钟热处理, 从而进行 PCR。

[0374] [表 8]

组成	体积
10ng/ $\mu$ L 模板 DNA	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR 引物 (序列号 5, 37, 40, 44)	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR 引物 (序列号 36, 6, 41, 45)	1 $\mu$ L
5 $\times$ PrimeSTAR 缓冲液 (Takara Bio Inc. 制)	10 $\mu$ L
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
2.5 U/ $\mu$ L PrimeSTAR AR HS (Takara Bio Inc. 制)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	定容至 50 $\mu$ L

[0376] (b-2) 对扩增的 PCR 产物用与 (a-2) 同样的方法进行纯化。将纯化的 PCR 产物命名为 4dF。

[0377] (b-3) 将 pET-AVR3 作为模板, 将由序列号 6 和序列号 37 (5' - GGTGGTGGAGTCGGTTGCGCCATCAGAATC-3') 中记载的序列构成的寡核苷酸作为 PCR 引物, 除此以外, 与 (b-1) 和 (b-2) 同样地进行 PCR。将纯化的 PCR 产物命名为 4dR。

[0378] (b-4) 将 (b-2) 和 (b-3) 中得到的 2 种 PCR 产物 (4dF、4dR) 混合之后, 制备表 9 所示组成的反应液, 对该反应液在 98°C 下进行 5 分钟热处理之后, 将以 98°C 下 10 秒的第 1 步骤、55°C 下 5 秒的第 2 步骤、72°C 下 1 分钟的第 3 步骤作为 1 个循环的反应进行 30 个循环, 从而进行 PCR, 得到将 4dF 与 4dR 连接而成的 PCR 产物 4dp。

[0379] [表 9]

组成	体积
PCR 产物 (4dF)	1 $\mu$ L
PCR 产物 (4dR)	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR 引物 (序列号 5)	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M PCR 引物 (序列号 6)	1 $\mu$ L
5 $\times$ PrimeSTAR 缓冲液 (Takara Bio Inc. 制)	10 $\mu$ L
2.5mM dNTPs	4 $\mu$ L
2.5U/ $\mu$ L PrimeSTAR HS (Takara Bio Inc. 制)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	定容至 50 $\mu$ L

[0381] (b-5) 对 (b-4) 中得到的 PCR 产物 4dp 进行与 (a-3) 和 (a-4) 同样的处理, 从而得到包含编码 AVR4d 的多聚核苷酸的质粒 pET-AVR4d, 所述 AVR4d 相对于野生型 AAV 结合性蛋白进行了 4 位点氨基酸置换。

[0382] (b-6) 用与实施例 1 的 (5) 相同的方法进行 pET-AVR4d 的核苷酸序列的解析。

[0383] 分别地, 将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的 AVR4d 的氨基酸序列示于序列号 38; 将编码所述 AVR4d 的多聚核苷酸的序列示于序列号 39。需要说明的是, 序列号 38 中, 第 1

位的蛋氨酸 (Met) ~ 第22位的丙氨酸 (Ala) 为止为Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸 (Ser) ~ 第213位的天冬氨酸 (Asp) 为AAV结合性蛋白AVR4d (相当于序列号1的第312位 ~ 第500位为止的区域),第214位 ~ 第219位的组氨酸 (His) 为标签序列。另外,序列号38中,分别地, Tyr342Cys的半胱氨酸存在于第55位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位、Asn487Asp的天冬氨酸存在于第200位的位置。

[0384] (c) AVR5b

[0385] 从实施例6中明确的与对热、酸的稳定性提高相关的氨基酸置换中,选择 Ile319Phe和Lys323Glu,将其整合至AVR3 (序列号32),从而制作AVR5b。具体而言,对于编码AVR3 (序列号32)的多聚核苷酸 (序列号31)进行产生Ile319Phe和Lys323Glu的突变导入,从而制作AVR5b。

[0386] (c-1) 以 pET-AVR3 作为模板,以由序列号40 (5' - TTTT [GGTCTC] AGTTCTCCGGCAGGGTAACTGAACCGAC - 3') 和序列号41 (5' - TTTT [GGTCTC] AGAACGAAGTACAACCTGAATGCGTATGTG - 3') 中记载的序列构成的寡核苷酸 (序列号40和41中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列) 作为PCR引物,从而制备表8所示组成的反应液。将该反应液在98°C下进行5分钟热处理,将以98°C下10秒的第1步骤、55°C下5秒的第2步骤、72°C下6分钟的第3步骤作为1个循环的反应进行30个循环,最后在72°C下进行5分钟热处理,从而进行PCR。

[0387] (c-2) 对扩增的PCR产物用与 (a-2) 同样的方法进行纯化。将纯化的PCR产物命名为5bp。

[0388] (c-3) 对 (c-2) 中得到的5bp用限制性内切酶DpnI (NEB公司制) 在37°C下进行1.5小时处理。之后,在80°C下进行20分钟处理之后,将得到的基因供于琼脂糖凝胶电泳,从该凝胶中使用QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN公司制) 进行纯化。

[0389] (c-4) 对 (c-3) 中得到的DpnI处理产物,在表10所示的组成的反应液下、边用限制性内切酶BsaI (NEB公司制) 进行消化,边用T4DNA连接酶 (NEB公司制) 进行连接。

[0390] [表10]

组成	体积
PCR产物 (20ng/μL)	5μL
10×CutSmart缓冲液 (NEB公司制)	1.5μL
BsaI (NEB公司制)	1μL
T4 DNA连接酶缓冲液 (NEB公司制)	1.5μL
T4 DNA连接酶 (NEB公司制)	1μL
H <sub>2</sub> O	定容至15μL

[0392] (c-5) 使用 (c-4) 的连接产物转化大肠杆菌BL21株 (DE3)。对得到的转化体用添加了50μg/mL的卡那霉素的LB培养基进行培养。从回收的菌体 (转化体) 中提取质粒,从而得到包含编码AVR5b的多聚核苷酸的质粒pET-AVR5b,所述AVR5b相对于野生型AAV结合性蛋白进行了5位点氨基酸置换。

[0393] (c-6) 用与实施例1的 (5) 同样的方法进行pET-AVR5b的核苷酸序列的解析。

[0394] 分别地,将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的AVR5b的氨基酸序列示于序列号42;将编码所述AVR5b的多聚核苷酸的序列示于序列号43。需要说明的是,序列号42中,第1

位的蛋氨酸 (Met) ~ 第22位的丙氨酸 (Ala) 为止为Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸 (Ser) ~ 第213位的天冬氨酸 (Asp) 为AAV结合性蛋白AVR5b (相当于序列号1的第312位 ~ 第500位为止的区域),第214位 ~ 第219位的组氨酸 (His) 为标签序列。另外,在序列号42中,分别地,Ile319Phe的苯丙氨酸存在于第32位、Lys323Glu的谷氨酸存在于第36位、Tyr342Cys的半胱氨酸存在于第55位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位的位置。

[0395] (d)AVR5e

[0396] 从实施例6中明确的与对热、酸的稳定性提高相关的氨基酸置换中,选择Lys399Glu和Asn487Asp,将其整合至AVR3 (序列号32),从而制作AVR5e。具体而言,对于(b)中制作的编码AVR4d (序列号38)的多聚核苷酸 (序列号39) 进行使之产生Lys399Glu的突变导入,由此制作AVR5e。

[0397] (d-1)以(b-5)取得的pET-AVR4d作为模板、以由序列号44 (5' -TTTT[GGTCTC]ACTTGCGTGGCTCCGGTTCCACGGTAACG-3')和序列号45 (5' -TTTT[GGTCTC]ACAAGAACCGTCTCCGATCGCCATTG-3')中记载的序列构成的寡核苷酸 (序列号44和45中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列)作为PCR引物,除此之外,用与(c-1) ~ (c-5)同样的方法,得到包含编码AVR5e的多聚核苷酸的质粒pET-AVR5e,所述AVR5e相对于野生型AAV结合性蛋白进行了5位点氨基酸置换。

[0398] (d-2)用与实施例1的(5)同样的方法进行pET-AVR5e核苷酸序列的解析。

[0399] 分别地,将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的AVR5e的氨基酸序列示于序列号46;将编码所述AVR5e的多聚核苷酸的序列示于序列号47。需要说明的是,序列号46中,第1位的蛋氨酸 (Met) ~ 第22位的丙氨酸 (Ala) 为止为Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸 (Ser) ~ 第213位的天冬氨酸 (Asp) 为AAV结合性蛋白AVR5e (相当于序列号1的第312位 ~ 第500位为止的区域),第214位 ~ 第219位的组氨酸 (His) 为标签序列。另外,序列号46中,分别地,Tyr342Cys的半胱氨酸存在于第55位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Lys399Glu的谷氨酸存在于第112位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位、Asn487Asp的天冬氨酸存在于第200位的位置。

[0400] 实施例8突变型AAV结合性蛋白的酸稳定性评价 (其2)

[0401] (1)将表达实施例6中取得的突变型AAV结合性蛋白AVR3以及实施例7中制作的突变型AAV结合性蛋白 (AVR4a、AVR4d、AVR5b和AVR5e)的转化体分别用实施例3的(4)和(5)中记载的方法进行培养之后,对培养液进行离心分离,分别得到包含表达的各突变型AAV结合性蛋白的培养上清。

[0402] (2)使用实施例2的(6)中记载的ELISA法,对于(1)中得到的培养上清中的突变型AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性进行测定。基于作为所述测定结果的450nm处的吸光,以该测定值成为相同的方式,将(1)中得到的培养上清用纯水进行稀释。

[0403] (3)将稀释后的各突变型AAV结合性蛋白溶液分为4份,混合等量的0.1M的甘氨酸盐酸缓冲液 (pH3.0)。对于4份样品中的3份,以51.5°C、60.1°C、66.1°C进行15分钟加热处理,剩下的一份在室温 (25°C) 下进行15分钟静置。之后,以3:2的比例将样品与0.5M的MES缓冲液 (pH6.0) 混合,由此将pH调节为6附近,利用实施例2的(6)中记载的ELISA法,测定与VLP2的结合活性。

[0404] (4) 将进行了(3)中记载的热和酸处理时的450nm的吸光度除以室温下静置时的450nm的吸光度,由此计算出残留活性。

[0405] 将结果示于表11。实施例7中制作的突变型AAV结合性蛋白(AVR3、AVR4a、AVR4d、AVR5b、AVR5e)在任意温度下进行处理,与AVR3(表7的No.75)相比较,残留活性高。由此可知,所述5个突变型AAV结合性蛋白与野生型AAV结合性蛋白相比较,酸性条件下的热处理即对酸和热的稳定性显著提高了。

[0406] [表11]

序列号	名称	AAV 结合性蛋白 氨基酸置换	处理后的残留活性 [%]		
			51.5℃	60.1℃	66.1℃
34	AVR4a	Ile319Phe, Tyr342Cys, Gly390Ser, Ser476Arg	57	16	8
38	AVR4d	Tyr342Cys, Gly390Ser, Ser476Arg, Asn487Asp	66	35	18
42	AVR5b	Ile319Phe, Lys323Glu, Tyr342Cys, Gly390Ser, Ser476Arg	87	43	23
46	AVR5e	Tyr342Cys, Gly390Ser, Lys399Glu, Ser476Arg, Asn487Asp	77	56	43
32	AVR3	Tyr342Cys, Gly390Ser, Ser476Arg	21	3	2

[0408] 实施例9改良了C末端的突变型AAV结合性蛋白的制作

[0409] (1) 以实施例7(d)中制作的pET-AVR5e作为模板、以由序列号3和序列号48(5'-AT[CTCGAG]TCATCCGCAGGTATCGTTGCGGCAATGATGATGATGATGATGGTCTAC-3')中记载的序列构成的寡核苷酸作为PCR引物(序列号48中的中括号表示限制性内切酶XhoI识别序列),从而制备表12所示组成的反应液。将该反应液在94℃下进行2分热处理之后,将以98℃下10秒的第1步骤、52℃下30秒的第2步骤、68℃下1.5分钟的第3步骤作为1个循环的反应重复进行25个循环,由此进行PCR。

[0410] [表12]

组成	体积
10 ng/μL 模板	1 μL
10 μM PCR 引物 (序列号 3, 57, 61, 67, 71, 72, 74)	1.5 μL
10 μM PCR 引物 (序列号 48, 58, 62, 68, 73, 75)	1.5 μL
10×KOD 缓冲液( TOYOBO CO., LTD 制)	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL
1 U/μL KOD Plus ( TOYOBO CO., LTD 制)	1 μL
H <sub>2</sub> O	定容至 50 μL

[0412] (2) 将(1)中得到的PCR产物供于琼脂糖凝胶电泳,从该凝胶中使用QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN制)进行纯化,用限制性内切酶NcoI和XhoI进行消化之后,与预先用限制性内切酶NcoI和XhoI消化的表达载体pET26b(MERCK MILLIPORE制)连接,使用该连接产物转化大肠杆菌BL21株(DE3)。

[0413] (3) 将得到的转化体用包含50μg/mL卡那霉素的LB培养基进行培养之后,使用

QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN制), 得到编码在AVR5e的C末端具有固定用标签的蛋白质(命名为AVR5eHC)的质粒pET-AVR5eHC。

[0414] (4) 用与实施例1的(5)同样的方法对得到的pET-AVR5eHC的核苷酸序列进行了解析。

[0415] 分别地, 将AVR5eHC的核苷酸序列示于序列号49, 将氨基酸序列示于序列号50。需要说明的是, 序列号50中, 第1位的蛋氨酸(Met) ~ 第22位的丙氨酸(Ala)为止是PelB信号肽; 第25位的丝氨酸(Ser) ~ 第213位的天冬氨酸(Asp)为AAV结合性蛋白AVR5e; 第214位 ~ 第219位的组氨酸(His)为组氨酸标签; 第220位的半胱氨酸(Cys) ~ 第226位的甘氨酸(Gly)为止是作为固定用标签的半胱氨酸标签序列。

[0416] 实施例10改良了C末端的突变型AAV结合性蛋白的大量制备

[0417] (1) 将用实施例9的(3)中制作的pET-AVR5eHC转化大肠杆菌BL21(DE3)株而得到的、能表达AVR5eHC的转化体, 接种于加入了包含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的40mL液体培养基(Phytone蛋白胨16g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L)的200mL容积带挡板烧瓶中, 在37 $^{\circ}$ C下、有氧振荡培养10小时, 由此进行前培养。

[0418] (2) 在加入了包含葡萄糖20g/L、酵母提取物40g/L、磷酸三钠十二水合物6g/L、磷酸氢二钠十二水合物18g/L、氯化铵2g/L、硫酸镁2g/L、硫酸铁2g/L、氯化锰10g/L和硫酸卡那霉素50mg/L的液体培养基0.9L的3L发酵槽(biott制)中接种(1)的前培养液10mL之后, 在设定温度30 $^{\circ}$ C、pH6.9 ~ 7.1、通气量3VVM的条件下开始主培养。pH的控制分别使用50% (v/v) 磷酸作为酸、使用14% (w/v) 氨水作为碱, 溶解氧的控制在使用搅拌转数在下限500rpm/上限1000rpm的范围内变化, 从而进行控制。培养开始之后, 在不能测定葡萄糖浓度的时间点, 一边控制溶解氧一边加入流加培养基(葡萄糖425g/L、酵母提取物140g/L、硫酸镁七水合物12g/L)。

[0419] (3) 600nm的吸光度达到约100的时候, 控制设定温度使其在25 $^{\circ}$ C以下。确认了到达该设定温度之后, 添加0.5mM的IPTG 1.1mL, 继续在25 $^{\circ}$ C下培养。由培养开始起约42小时之后停止培养, 将培养液在4 $^{\circ}$ C、8000rpm下进行20分钟离心分离, 从而回收菌体。

[0420] (4) 将(3)中回收的菌体在包含0.5M氯化钠、20mM咪唑的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)中以成为5mL/1g(菌体)的方式悬浮之后, 使用超声波发生装置(INSONETA201M[久保田商事公司制]), 在8 $^{\circ}$ C下以约10分钟、约150W的功率进行菌体破碎。菌体破碎液在4 $^{\circ}$ C下进行两次20分钟、8000rpm的离心分离, 从而回收上清。

[0421] (5) 将(4)中得到的上清进样至预先用包含0.5M氯化钠和20mM咪唑的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)(以下也记作“平衡化液A”)进行了平衡化的、填充有NiSepharose6 Fast Flow(Cytiva制)50mL的XK26/20柱(Cytiva制)。用平衡化液A进行清洗之后, 用包含0.5M咪唑和150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)进行洗脱。

[0422] (6) 对(5)中得到的洗脱液用包含4mM咪唑和150mM氯化钠的20mM的Tris缓冲液(pH7.4)进行透析之后, 进样至用相同缓冲液进行了平衡化的填充有TALON Metal Affinity Resin(Takara Bio Inc.制)50mL的XK26/20柱(Cytiva制)中。用平衡化中所使用的缓冲液进行清洗之后, 用包含0.5M咪唑和150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)进行洗脱。

[0423] (7) 对(6)中得到的洗脱液, 用包含150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)

进行透析,制备了AVR5eHC蛋白约200mg。

[0424] 实施例11病毒载体(AAV2-EGFP)的制作

[0425] (1)设计如下核苷酸序列:分别地,在编码由序列号51中记载的氨基酸序列构成的EGFP(Enhanced green fluorescent protein,增强绿色荧光蛋白)的多聚核苷酸5'末端侧添加限制性内切酶EcoRI识别序列(GAATTC)、在3'末端侧添加了终止密码子(TAG)和BamHI识别序列(GGATTC)的核苷酸序列(序列号52)。

[0426] (2)全合成由序列号52中记载的序列构成的多聚核苷酸,克隆至质粒(委托FASMAC公司,命名为pUC-EGFP)。用pUC-EGFP转化大肠杆菌JM109株,对得到的转化体进行培养。从培养液中使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制)提取pUC-EGFP。

[0427] (3)对(2)中得到的pUC-EGFP用限制性内切酶EcoRI和BamHI消化之后,与预先用限制性内切酶EcoRI和BamHI消化的表达载体pAAV-CMV(Takara Bio Inc.制)连接,使用该连接产物转化大肠杆菌JM109株。对得到的转化体用包含100 $\mu$ g/mL羧苄西林的LB培养基进行培养之后,使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制),提取了表达EGFP的载体pAAV-EGFP。

[0428] (4)将(3)中得到的转化体用加入了包含100 $\mu$ g/mL的羧苄西林的2YT培养基1L的、5L容积带挡板烧瓶,在37 $^{\circ}$ C下振荡培养一晚。培养结束后,通过离心分离而回收了菌体。使用Plasmid Mega Kit(QIAGEN公司制),从回收的菌体中大量制备pAAV-EGFP。

[0429] (5)AAV2-EGFP的制备

[0430] (5-1)使用pRC2-mi342 Vector(Takara Bio Inc.制)和pHelper Vector(Takara Bio Inc.制)对大肠杆菌JM109株进行了转化。使用得到的转化体,进行与(4)同样的操作,从而大量制备了pRC2-mi342和pHelper。

[0431] (5-2)用加入了包含10%(v/v)的牛血清的D-MEM培养基(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporatio制)45mL的T-225烧瓶(Thermo Fisher Scientific公司制)10个对HEK293T细胞进行了培养。向其中添加(4)中制备的pAAV-EGFP、(5-1)中制备的pRC2-mi342和pHelper、以及聚乙烯亚胺(Polysciences公司制)的复合物,由此进行基因导入,在5%(v/v)的二氧化碳、37 $^{\circ}$ C的条件下进行3天静置培养。培养之后,通过离心分离回收剥离的细胞,对于每份从5个T-225烧瓶得到的细胞,在-80 $^{\circ}$ C下进行冷冻保存。

[0432] (5-3)对(5-2)中得到的冷冻细胞进行解冻,悬浮于包含0.5M的氯化钠、4mM的氯化镁和0.01%(w/v)的Tween20(商品名)的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)10mL。加入1/20量的Benzonase(MERCK MILLIPORE制),在37 $^{\circ}$ C下静置1小时之后,以13000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C进行10分钟离心分离,得到上清。对得到的上清以成为15%饱和的方式添加硫酸铵,再度在同条件下进行离心分离。将得到的上清供于孔径0.45 $\mu$ m的过滤器,去除浮游物。

[0433] (5-4)将去除了浮游物的上清进样至预先用包含0.5M氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH8.0)(以下也记作“平衡化液B”)进行了平衡化的、5mL的AVB Sepharose柱(Cytiva公司制)中。用平衡化液B清洗之后,用包含0.5M的氯化钠的0.1M醋酸缓冲液(pH2.5)进行了洗脱。向得到的洗脱液中加入1/4量的、包含20mM氯化镁的1M的Tris盐酸缓冲液(pH8.5)进行中和,取得作为AAV载体的AAV2-EGFP溶液。该溶液中的AAV2-EGFP浓度使用AAVproTitration Kit(Takara Bio Inc.制)、用qPCR进行定量。

[0434] 实施例12AAV结合性蛋白固定凝胶的制作(其1)

[0435] (1) 对分离剂用亲水性乙烯基聚合物 (TOSOH CORPORATION. 制: TOYOPEARL) 的表面的羟基实施化学修饰, 由此制备导入了马来酰亚胺基的凝胶。向所述制备的凝胶3.5g中加入实施例10中制备的AVR5eHC蛋白28mg和作为还原剂的终浓度0.1mM的TCEP(Tris(2-羧基乙基)膦), 在pH7.4、4°C的条件下振荡15小时而使之反应。由此制备固定了AVR5e的凝胶(命名为AVR5e固定凝胶)。

[0436] (2) 将(1)中制备的AVR5e固定凝胶2mL填充至Tricorn10/50柱(Cytiva公司制), 从而制作柱(命名为AVR5e柱)。将AVR5e柱与AKTAprime plus(Cytiva公司制)连接, 用包含150mM氯化钠和0.05% (w/v) Tween20(商品名)的50mM的磷酸缓冲液(pH7.4)(以下, 也记作“平衡化液C”)进行平衡化之后, 将实施例11的(5-3)中得到的包含AAV2-EGFP的细胞提取液以流速1mL/分钟进样10mL。

[0437] (3) 用平衡化液C进行清洗之后, 用包含0.5M氯化钠的0.1M的醋酸缓冲液(pH2.5), 由AVR5e柱使AAV2-EGFP洗脱。洗脱液每次分取1mL, 以级分的形式进行回收。对于回收的级分加入包含20mM氯化镁的1M的Tris盐酸缓冲液(pH8.5)250 $\mu$ L, 进行中和。

[0438] (4) 为了将(3)中得到的洗脱液与作为纯化前的样品的实施例10的(5-3)中得到的细胞提取液的纯度进行比较, 进行SDS-PAGE, 使用Pierce Silver Stain Kit(Thermo Fisher Scientific公司制)进行了银染色。

[0439] 分别将(3)中得到的利用AVR5e柱的色谱图示于图2、将(4)的SDS-PAGE的结果示于图3。AAV2-EGFP的峰在洗脱时间20分钟附近出现(图2)。将相当于该峰的级分(Fr6~Fr9)供于SDS-PAGE, 结果均仅确认到相当于构成AAV的VP1、VP2、VP3的条带(图3)。另一方面, 进样至AVR5e柱的细胞提取液除了所述条带以外, 还能够确认到源自夹杂物的无数条带(图3)。由以上的结果可知, 通过包含凝胶和固定于该凝胶的本发明AAV结合性蛋白的AAV吸附剂, 能够将AAV高纯度地纯化。

[0440] 实施例13AAV结合性蛋白的突变文库制作与筛选(其3)

[0441] 从实施例7中评价的突变型AAV结合性蛋白中选择AVR5e(Tyr342Cys、Gly390Ser、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp置换体; 序列号46), 对于编码该蛋白质的多聚核苷酸部分, 通过易错PCR实施随机突变导入。

[0442] (1) 以插入了编码AVR5e(序列号46)的多聚核苷酸(序列号47)的质粒pET-AVR5e作为模板, 制备所述表6所示组成的反应液之后, 在与实施例3的(1)相同的温度条件下进行易错PCR。通过所述易错PCR, 向编码AVR5e的多聚核苷酸中导入突变, 其平均突变导入率为每1分子1.7氨基酸突变。

[0443] (2) 将(1)中得到的PCR产物纯化之后, 通过实施例6的(2)和(3)中记载的方法制作随机突变体文库, 对该文库(转化体)用实施例3的(4)和(5)中记载的方法进行培养。

[0444] (3) 将(2)的培养液离心分离, 对得到的培养上清用超纯水稀释至32倍。将稀释的培养液60 $\mu$ L与0.1M甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)60 $\mu$ L混合, 在61.0°C下进行15分钟热和酸处理。

[0445] (4) 对于进行了(3)的处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性、以及没有进行(3)的处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性, 利用实施例2的(6)中记载的ELISA法进行测定。将进行了热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性除以没有进行热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性, 由此计算出残留活性。

[0446] (5) 用(4)的方法对约1800株随机突变体文库进行评价,选择其中的表达与作为母分子的AVR5e相比较残留活性提高了的AAV结合性蛋白的转化体。对所述选择的转化体进行培养,使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN制)制备了表达载体。

[0447] (6) 将得到的表达载体中所插入的编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸区域的序列,用实施例1的(5)中记载的方法解析核苷酸序列,确定氨基酸的突变位点。

[0448] 将所述(5)中选择的转化体表达的AAV结合性蛋白的、相对于AVR5e(Tyr342Cys、Gly390Ser、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp置换体)的氨基酸置换位点以及热和酸处理后的残留活性(%)总结而示于表13。

[0449] 序列号1中记载的氨基酸序列中,第312位的丝氨酸(Ser)~第500位的天冬氨酸(Asp)为止的氨基酸残基中产生了Val317Asp、Gln318Pro、Thr320Ala、Asn324Asp、Val326Ala、Val326Glu、Leu328Pro、Asn329His、Val332Ala、Lys362Glu、Lys362Asn、Lys371Glu、Lys371Asn、Leu376Pro、Glu378Gly、Glu378Val、Phe379Ser、Phe379Tyr、Val381Asp、Gly392Cys、Thr397Ser、Glu401Val、Arg406His、Asn492Asp和Val499Glu的任意氨基酸置换中的至少一个的AAV结合性蛋白,与野生型AAV结合性蛋白相比较,可以说对热和酸的稳定性提高了。

[0450] [表13]

No.	氨基酸置换	残留活性[%]	No.	氨基酸置换	残留活性[%]
85	Val317Asp	50.2	94	Val326Glu, Asn329His	44.9
86	Lys371Glu	41.6	95	Val326Ala, Lys362Glu	45.3
87	Lys371Asn	56.5	96	Val326Glu, Phe379Ser	60.9
88	Leu376Pro	41.7	97	Val332Ala, Lys371Glu	49.6
[0451] 89	Glu378Gly	46.1	98	Leu376Pro, Asn492Asp	47.6
90	Gly392Cys	53.3	99	Gln318Pro, Phe379Tyr, Glu401Val	54.0
91	Val317Asp, Lys371Asn	55.7	100	Asn324Asp, Lys362Glu, Val499Glu	50.1
92	Thr320Ala, Val381Asp	52.4	101	Val326Glu, Asn329His, Glu378Val	48.5
93	Asn324Asp, Lys362Glu	50.7	102	Leu328Pro, Lys362Asn, Thr397Ser, Arg406His	41.1
AVR5e		25.5			

[0452] 实施例14稳定化氨基酸置换的整合(其二)

[0453] 将实施例13中判定的与AAV结合性蛋白对热和酸稳定性提高相关的氨基酸置换整合至AVR5e(序列号46),从而谋求进一步的稳定性提高。具体而言,选择表13所示的进行了氨基酸置换的(突变型)AAV结合性蛋白中的No.93(对于AVR5e整合了Asn324Asp和Lys362Glu的氨基酸置换)(命名为AVR7a)和No.91(对于AVR5e整合了Val317Asp和Lys371Asn的氨基酸置换)(命名为AVR7b),对于该蛋白质整合了以下(a)或(b)所示的氨基酸置换。需要说明的是,分别地,AVR7a的氨基酸序列(序列号53)中的Asn324Asp的置换在序列号53中位于第37位、Lys362Glu的置换在序列号53中位于第75位。另外,分别地,AVR7b的氨基酸序列(序列号55)中,Val317Asp的置换在序列号55中位于第30位,Lys371Asn的置换在序列号55中位于第84位。

[0454] (a) AVR7a中导入Val317Asp(命名为AVR8a)

[0455] (b) AVR7b中导入Lys362Glu(命名为AVR8g)

[0456] 以下,对于各AAV结合性蛋白的制作方法详细地进行说明。

[0457] (a) AVR8a

[0458] 从实施例13中明确的与对热、酸的稳定性提高相关的氨基酸置换中,选择

Val1317Asp, 将其整合至AVR7a (序列号53), 从而制作AVR8a。具体而言, 通过对于编码AVR7a (序列号53) 的多聚核苷酸 (序列号54) 进行产生Val1317Asp的突变导入, 从而制作AVR8a。

[0459] (a-1) 以插入了编码AVR7a的多聚核苷酸 (序列号54) 的质粒pET-AVR7a作为模板, 以由序列号57 (5' -TTTT[GGTCTC]AGCAGGCGAGTCGGATCAGATTACCC-3') 和序列号58 (5' -TTTT[GGTCTC]ACTGCAGAGCCCATGGCCATCGCCGG-3') 中记载的序列构成的寡核苷酸 (序列号57和58中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列) 作为PCR引物, 制备了表12所示组成的反应液。将该反应液在98°C下进行5分钟热处理, 将以98°C下10秒的第1步骤、55°C下5秒的第2步骤、72°C下6分钟的第3步骤作为1个循环的反应进行30个循环, 最后在72°C下进行5分钟热处理, 从而进行PCR。

[0460] (a-2) 将扩增的PCR产物供于琼脂糖凝胶电泳, 从该凝胶使用QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN制) 进行纯化。将纯化的PCR产物命名为8ap。

[0461] (a-3) 对(a-2)中得到的8ap用限制性内切酶DpnI (NEB公司制) 在37°C下进行1.5小时处理。之后, 在80°C下进行20分钟处理之后, 将得到的基因供于琼脂糖凝胶电泳, 从该凝胶中使用QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN制) 进行纯化。

[0462] (a-4) 对(a-3)中得到的DpnI处理产物, 在表10所示的组成的反应液下、边用限制性内切酶BsaI (NEB公司制) 进行消化, 边用T4DNA连接酶 (NEB公司制) 进行连接。

[0463] (a-5) 使用(a-4)的连接产物转化大肠杆菌BL21株 (DE3)。对得到的转化体用添加了50μg/mL的卡那霉素的LB培养基进行培养。从回收的菌体 (转化体) 中提取质粒, 从而得到包含编码AVR8a的多聚核苷酸的质粒pET-AVR8a, 所述AVR8a相对于野生型AAV结合性蛋白进行了8位点氨基酸置换。

[0464] (a-6) 用与实施例1的(5)相同的方法进行pET-AVR8a的核苷酸序列的解析。

[0465] 分别地, 将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的AVR8a的氨基酸序列示于序列号59; 将编码所述AVR8a的多聚核苷酸的序列示于序列号60。需要说明的是, 序列号59中, 第1位的蛋氨酸 (Met) ~ 第22位的丙氨酸 (Ala) 为止为Pe1B信号肽; 第25位的丝氨酸 (Ser) ~ 第213位的天冬氨酸 (Asp) 为AAV结合性蛋白AVR8a (结构域1和结构域2、相当于序列号1的第312位 ~ 第500位为止的区域), 第214位 ~ 第219位的组氨酸 (His) 为标签序列。另外, 序列号59中, 分别地, Val1317Asp的天冬氨酸存在于第30位、Asn324Asp的天冬氨酸存在于第37位、Tyr342Cys的半胱氨酸存在于第55位、Lys362Glu的谷氨酸存在于第75位、Gly390Ser的丝氨酸位于第103位、Lys399Glu的谷氨酸位于第112位、Ser476Arg的精氨酸位于第189位、Asn487Asp的天冬氨酸位于第200位的位点。

[0466] (b) AVR8g

[0467] 从实施例13中明确的与对热、酸的稳定性提高相关的氨基酸置换中, 选择Lys362Glu, 将其整合至AVR7b (序列号55), 从而制作AVR8g。具体而言, 通过对于编码AVR7b (序列号55) 的多聚核苷酸 (序列号56) 进行产生Lys362Glu的突变导入, 从而制作AVR8g。

[0468] (b-1) 以插入了编码AVR7b的多聚核苷酸 (序列号56) 的质粒pET-AVR7b作为模板、以由序列号61 (5' -TTTT[GGTCTC]ACGAGATGGAAGGAGAACATTCGAG-3') 和序列号62 (5' -TTTT[GGTCTC]ACTCGCCGCTGTAGTCGCGAGG-3') 中记载的序列构成的寡核苷酸 (序列号61和62中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列) 作为PCR引物, 除此以外, 用与(a-1) ~ (a-5)同样的方法, 得到了包含编码相对于野生型AAV结合性蛋白进行了8位点氨基酸置换的AVR8g的

多聚核苷酸的质粒pET-AVR8g。

[0469] (b-2) 用与实施例1的(5)相同的方法进行pET-AVR8g的核苷酸序列的解析。

[0470] 分别地,将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的AVR8g的氨基酸序列示于序列号63;将编码所述AVR8g的多聚核苷酸的序列示于序列号64。需要说明的是,序列号63中,第1位的蛋氨酸(Met)~第22位的丙氨酸(Ala)为止为Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸(Ser)~第213位的天冬氨酸(Asp)为AAV结合性蛋白AVR8g(结构域1和结构域2、相当于序列号1的第312位~第500位为止的区域),第214位~第219位的组氨酸(His)为标签序列。另外,序列号63中,分别地,Val317Asp的天冬氨酸存在于第30位、Tyr342Cys的半胱氨酸存在于第55位、Lys362Glu的谷氨酸存在于第75位、Lys371Asn的天冬氨酸存在于第84位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Lys399Glu的谷氨酸存在于第112位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位、Asn487Asp的天冬氨酸存在于第200位的位置。

[0471] 实施例15突变型AAV结合性蛋白的酸稳定性评价(其3)

[0472] (1) 将表达实施例13中取得的突变型AAV结合性蛋白AVR7a以及实施例14中制作的突变型AAV结合性蛋白(AVR8a和AVR8g)的转化体分别用实施例3的(4)和(5)中记载的方法进行培养之后,对培养液进行离心分离,分别得到包含表达的各突变型AAV结合性蛋白的培养上清。

[0473] (2) 使用实施例2的(6)中记载的ELISA法,对于(1)中得到的培养上清中的突变型AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性进行测定。基于作为所述测定结果的450nm处的吸光,以该测定值成为相同的方式,将(1)中得到的培养上清用纯水进行稀释。

[0474] (3) 将稀释后的各突变型AAV结合性蛋白溶液分为3份,混合等量的0.1M的甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)。对于3份样品中的2份,以80.8°C、89.8°C进行15分钟加热处理,剩下的一份在室温(25°C)下进行15分钟静置。之后,以3:2的比例将样品与0.5M的MES缓冲液(pH6.0)混合,由此将pH调节为6附近,利用实施例2的(6)中记载的ELISA法,测定与VLP2的结合活性。

[0475] (4) 将进行了(3)中记载的热和酸处理时的450nm的吸光度除以室温下静置时的450nm的吸光度,由此计算出残留活性。

[0476] 将结果示于表14。对实施例14中制作的突变型AAV结合性蛋白(AVR8a、AVR8g)在80.8°C下进行处理时,与AVR7a(表14的No.93)相比较,残留活性高。由此可知,所述2个突变型AAV结合性蛋白与野生型AAV结合性蛋白相比较,酸性条件下的热处理即对酸和热的稳定性显著提高了。

[0477] [表14]

AAV结合性蛋白			热处理后的残留活性 [%]	
序列号	名称	氨基酸置换	80.8°C	89.8°C
[0478] 59	AVR8a	Val317Asp, Asn324Asp, Tyr342Cys, Lys362Glu, Gly390Ser, Lys399Glu, Ser476Arg, Asn487Asp	66	52
63	AVR8g	Val317Asp, Tyr342Cys, Lys362Glu, Lys371Asn, Gly390Ser, Lys399Glu, Ser476Arg, Asn487Asp	67	55
53	AVR7a	Asn324Asp, Tyr342Cys, Lys362Glu, Gly390Ser, Lys399Glu, Ser476Arg, Asn487Asp	57	54

[0479] 实施例16AAV结合性蛋白的突变文库制作与筛选(其4)

[0480] 从实施例15中评价的突变型AAV结合性蛋白中选择AVR8g (Val317Asp、Tyr342Cys、Lys362Glu、Lys371Asn、Gly390Ser、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp置换体;序列号63), 对于编码该蛋白质的多聚核苷酸部分,通过易错PCR实施随机突变导入。

[0481] (1)以插入了编码AVR8g (序列号63)的多聚核苷酸(序列号64)的质粒pET-AVR8g作为模板,制备表6所示组成的反应液之后,在与实施例3的(1)相同的温度条件下进行易错PCR。通过所述易错PCR,向编码AVR8g的多聚核苷酸中导入突变,其平均突变导入率为每1分子2.3氨基酸突变。

[0482] (2)将(1)中得到的PCR产物纯化之后,通过实施例6的(2)和(3)中记载的方法制作随机突变体文库,对该文库(转化体)用实施例3的(4)和(5)中记载的方法进行培养。

[0483] (3)将(2)的培养液离心分离,对得到的培养上清用超纯水稀释至16倍。将稀释的培养液60 $\mu$ L与0.1M甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10.0)60 $\mu$ L进行混合,在41.2 $^{\circ}$ C下进行15分钟热和碱处理。

[0484] (4)对于进行了(3)的处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性、以及没有进行(3)的处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,利用实施例2的(6)中记载的ELISA法进行测定。将进行了热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性除以没有进行热处理时的AAV结合性蛋白与VLP2的结合活性,由此计算出残留活性。

[0485] (5)用(4)的方法对约1800株随机突变体文库进行评价,选择其中的表达与作为母分子的AVR8g相比较残留活性提高了的AAV结合性蛋白的转化体。对所述选择的转化体进行培养,使用QIAprep Spin Miniprep kit(QIAGEN公司制)制备了表达载体。

[0486] (6)将得到的表达载体中所插入的编码AAV结合性蛋白的多聚核苷酸区域的序列,用实施例1的(5)中记载的方法解析核苷酸序列,确定氨基酸的突变位点。

[0487] (7)将(6)中选择的转化体表达的AAV结合性蛋白的、相对于AVR8g (Val317Asp、Tyr342Cys、Lys362Glu、Lys371Asn、Gly390Ser、Lys399Glu、Ser476Arg和Asn487Asp置换体)的氨基酸置换位点以及热和碱处理后的残留活性(%)总结而示于表15。

[0488] 序列号1中记载的氨基酸序列中,第312位的丝氨酸(Ser)~第500位的天冬氨酸(Asp)为止的氨基酸残基中产生了Ser312Pro、Ala313Ser、Lys323Arg、Asn324Ser、Gln327His、Gln327Leu、Asn329Ile、Glu335Gly、Glu335Val、Glu340Val、Thr341Pro、Thr343Ser、Tyr344Phe、Trp346Cys、Arg353Cys、Tyr355Cys、Ser356Cys、Gly357Cys、Met359Leu、Glu360Lys、Glu360Val、Gly361Cys、Lys(Glu)362Gly、Ser364Leu、Ile366Thr、Leu369Gln、Lys(Asn)371Asp、Leu372Pro、Leu372Gln、Thr373Ala、Pro374Leu、Leu376Pro、Glu378Gly、Glu378Val、Phe379Cys、Phe379Ser、Lys380Glu、Val381Ala、Ile382Val、Val383Ala、Glu384Val、Gln386Arg、His389Arg、Tyr393Cys、Val394Asp、Val394Ile、Asn395Ser、Val396Ala、Arg403His、Gln415Arg、Thr426Ala、Gln432Leu、Gln432Arg、Gln441Arg、His443Leu、Lys448Glu、Ile456Val、Asp483Asn、Ser488Leu、和Val499Ile的任意氨基酸置换中的至少一个的AAV结合性蛋白,与野生型AAV结合性蛋白相比较,可以说对热和碱的稳定性提高了。

[0489] [表15]

No.	氨基酸置换	残留活性[%]	No.	氨基酸置换	残留活性[%]
103	Glu340Val	35.0	128	Ser312Pro, Pro374Leu	74.9
104	Tyr344Phe	40.3	129	Ala313Ser, Glu378Gly	67.5
105	Arg353Cys	62.1	130	Lys323Arg, Glu384Val	63.1
106	Tyr355Cys	63.8	131	Asn324Ser, Gly357Cys	70.3
107	Ser356Cys	67.6	132	Gln327His, Glu378Val	56.5
108	Met359Leu	32.4	133	Gln327Leu, Lys(Asn)371Asp	62.1
109	Glu360Lys	40.2	134	Asn329Ile, Val499Ile	63.9
110	Glu360Val	33.3	135	Glu335Gly, Gln386Arg	36.3
111	Lys(Glu)362Gly	41.1	136	Glu335Val, Thr343Ser	38.8
112	Ser364Leu	45.3	137	Thr341Pro, Phe379Ser	86.3
113	Ile366Thr	41.4	138	Gly361Cys, Gly(Ser)390Gly	51.5
114	Leu372Pro	91.6	139	Leu369Gln, Pro374Leu	85.2
115	Leu372Gln	72.8	140	Leu372Pro, Val396Ala	92.8
116	Thr373Ala	57.8	141	Leu376Pro, Gly(Ser)390Gly	85.0
117	Leu376Pro	76.7	142	Glu378Gly, Arg403His	76.6
118	Glu378Gly	66.7	143	Val381Ala, Ile382Val	90.3
119	Phe379Ser	24.3	144	Val383Ala, Gln415Arg	65.7
120	Lys380Glu	59.5	145	Trp346Cys, Arg353Cys, His389Arg	63.5
121	Val381Ala	89.9	146	Leu372Gln, Leu376Pro, Val394Asp	81.4
122	Gln386Arg	34.9	147	Phe379Cys, Gln432Leu, Ser488Leu	79.7
123	Tyr393Cys	60.5	148	Glu384Val, Gln432Arg, Ile456Val	37.4
124	Gln441Arg	25.2	149	Val394Ile, Asp395Ser, Thr426Ala	70.5
125	His443Leu	36.5	150	Val396Ala, Gln441Arg, Lys448Glu	49.7
126	Lys448Glu	34.5	63	AVR8G	23.1
127	Asp483Asn	23.3			

[0491] 实施例17突变型AAV结合性蛋白单体化(其1)

[0492] 从实施例16中明确的对热、碱的稳定性提高的突变型AAV结合性蛋白中选择No.143(对于AVR8g整合Val1381Ala和Ile382Val的氨基酸置换)(命名为AVR10),为了使该蛋白质单体化而导入了Tyr(Cys)342Ser的氨基酸置换(命名为AVR10s)。具体而言,通过对编码AVR10(序列号65)的多聚核苷酸(序列号66)进行产生Tyr(Cys)342Ser的突变导入,从而制作AVR10s。需要说明的是,分别地,AVR10的氨基酸序列(序列号65)中的Val1381Ala的置换在序列号65中位于第94位、Ile382Val的置换在序列号65中位于第95位。

[0493] (1)以插入了编码AVR10的多聚核苷酸(序列号66)的pET26b-AVR10作为模板,以由序列号67(5'-TTTT[GGTCTC]AGAAACCTCTACGTATGACTG-3')和序列号68(5'-TTTT[GGTCTC]ATTTCCTTCGGTGG-3')中记载的序列构成的寡核苷酸(序列号67和68中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列)作为PCR引物,除此以外,用与实施例14的(a-1)~(a-5)同样的方法,得到了包含编码相对于野生型AAV结合性蛋白进行了10位点氨基酸置换的AVR10s的多聚核苷酸的质粒pET-AVR10s。

[0494] (2)用与实施例1的(5)相同的方法进行pET-AVR10s的核苷酸序列的解析。

[0495] 分别地,将添加了信号序列和多聚组氨酸标签的AVR10s的氨基酸序列示于序列号69;将编码所述AVR10s的多聚核苷酸的序列示于序列号70。需要说明的是,序列号69中,第1位的蛋氨酸(Met)~第22位的丙氨酸(Ala)为止为Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸(Ser)~第213位的天冬氨酸(Asp)为AAV结合性蛋白AVR10s(相当于序列号1的第312位~第500位为止的区域),第214位~第219位的组氨酸(His)为标签序列。另外,序列号69中,分别地,Val1317Asp的天冬氨酸存在于第30位、Tyr(Cys)342Ser的丝氨酸存在于第55位、Lys362Glu的谷氨酸存在于第75位、Lys371Asn的天冬酰胺存在于第84位、Val1381Ala的丙氨酸存在于第94位、Ile382Val的缬氨酸存在于第95位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Lys399Glu的谷氨酸存在于第112位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位、Asn487Asp的天冬氨酸存在

于第200位的位置。

[0496] 实施例18突变型AAV结合性蛋白的单体化(其2)

[0497] 为了使实施例9中制作的突变型AAV结合性蛋白AAV5eHC单体化,导入Tyr (Cys) 342Met的氨基酸置换,进一步添加PKD3(序列号1的第501位的酪氨酸~第597位的赖氨酸为止的氨基酸残基),从而制作突变型AAV结合性蛋白(命名为AVR5eMHCD3)。具体而言,对编码AVR5eHC(序列号50)的多聚核苷酸(序列号49)进行产生Tyr (Cys) 342Met的突变导入,之后添加PKD3,从而制作AVR5eMHCD3。

[0498] (1) 以pET26b-AVR5eHC作为模板,以由序列号71(5'-TTTT[GGTCTC]AGAAACCATGACGTATGACTG-3')和序列号68中记载的序列构成的寡核苷酸(序列号71和68中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列)作为PCR引物,除此以外,用与实施例14的(a-1)~(a-5)同样的方法,得到了包含编码相对于AVR5eHC导入了Tyr (Cys) 342Met的氨基酸置换的突变型AAV结合性蛋白的多聚核苷酸的质粒pET-AVR5eMHC。

[0499] (2) 以pUC-AAVR作为模板、以由序列号72(5'-TTTT[GGTCTC]AGATGTTTGTATTTTCGGGCTGAACAATC-3')和序列号73(5'-TTTT[GGTCTC]AAGACTATCCGCCGTAGCGAACGC-3')中记载的序列构成的寡核苷酸(序列号72和73中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列)作为PCR引物,除此以外,用与实施例14的(a-1)同样的方法进行了PCR。

[0500] (3) 以(1)中制作的pET26b-AVR5eMHC作为模板,以由序列号74(5'-TTTT[GGTCTC]AGTCTACCGCTTTGTTG-3')和序列号75(5'-TTTT[GGTCTC]ACATCATCATCATCAT-3')中记载的序列构成的寡核苷酸(序列号74和75中的中括号表示限制性内切酶BsaI识别序列)作为PCR引物,除此以外,用与实施例14的(a-1)同样的方法进行PCR。

[0501] (4) 将(2)和(3)中扩增的PCR产物分别供于琼脂糖凝胶电泳,从该凝胶使用QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN公司制)进行纯化。分别将纯化的(2)的PCR产物命名为D3p、将(3)的PCR产物命名为5Mvp。

[0502] (5) 对(4)中得到的D3p和5Mvp用限制性内切酶DpnI(NEB公司制)在37°C下进行1.5小时处理。之后,在80°C下进行20分钟处理之后,将得到的基因分别供于琼脂糖凝胶电泳,从该凝胶中使用QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN公司制)进行纯化。

[0503] (6) 对(5)中得到的DpnI处理产物,在表16所示的组成的反应液下、边用限制性内切酶BsaI(NEB公司制)进行消化,边用T4DNA连接酶(NEB公司制)进行连接。

[0504] [表16]

[0505]

组成	体积
20ng/ $\mu$ L PCR产物(D3p)	5 $\mu$ L
20ng/ $\mu$ L PCR产物(5Mvp)	5 $\mu$ L
10 $\times$ CutSmart缓冲液(NEB公司制)	1.5 $\mu$ L
Bsa I(NEB公司制)	1 $\mu$ L
T4 DNA连接酶缓冲液(NEB公司制)	1.5 $\mu$ L
T4 DNA连接酶(NEB公司制)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	定容至15 $\mu$ L

[0506] (7) 使用(6)的连接产物转化大肠杆菌BL21株(DE3)。对得到的转化体用添加了50 $\mu$

g/mL的卡那霉素的LB培养基进行培养。从回收的菌体(转化体)中提取质粒,从而得到包含编码将AVR5eHD单体化、进而添加了PKD3的突变型AAV结合性蛋白的多聚核苷酸的质粒pET-AVR5eMHCD3。

[0507] (8) 用与实施例1的(5)相同的方法进行pET-AVR5eMHCD3的核苷酸序列的解析。

[0508] 分别地,将AVR5eMHCD3的氨基酸序列示于序列号76,将多聚核苷酸的序列示于序列号77。需要说明的是,序列号76中,第1位的蛋氨酸(Met)~第22位的丙氨酸(Ala)为止是Pe1B信号肽;第25位的丝氨酸(Ser)~第213位的天冬氨酸(Asp)为止是AAV结合性蛋白AVR5eMHC(相当于序列号1的第312位~第500位为止的区域),第214位的酪氨酸(Tyr)~第310位的赖氨酸(Lys)为止为AAV细胞外区域结构域3(PKD3)(序列号1的第501位~第597位为止的区域),第311位~第316位的组氨酸(His)为标签序列,第317位的半胱氨酸(Cys)~第323位的甘氨酸(Gly)为止是作为固定用标签的半胱氨酸标签。另外,序列号76中,分别地,Tyr(Cys)342Met的蛋氨酸存在于第55位、Gly390Ser的丝氨酸存在于第103位、Lys399Glu的谷氨酸存在于第112位、Ser476Arg的精氨酸存在于第189位、Asn487Asp的天冬氨酸存在于第200位的位置。

[0509] 实施例19单体化突变型AAV结合性蛋白的制备(其1)

[0510] (1) 将用实施例17中制作的pET-AVR10s转化大肠杆菌株BL21(DE3)而得到的能够表达AVR10s的转化体、或用实施例18中制作的pET-AVR5eMHCD3转化大肠杆菌株BL21(DE3)而得到的能够表达AVR5eMHCD3的转化体,接种于包含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的3mL的2YT液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C下有氧振荡培养一晚,从而进行前培养。

[0511] (2) 向1L的带挡板烧瓶中的添加了50 $\mu$ g/mL的卡那霉素的200mL的2YT液体培养基中,接种(1)的前培养液2mL,在37 $^{\circ}$ C下进行了有氧振荡培养。

[0512] (3) 培养开始2.0小时后,在冰上进行了冷却,以成为终浓度0.1mM的方式添加了IPTG(异丙基-B-D-硫代吡喃半乳糖苷),接着在25 $^{\circ}$ C下、有氧振荡培养一晚。

[0513] (4) 培养结束后,将培养液在4 $^{\circ}$ C、8000rpm下进行20分钟离心分离,从而回收菌体。

[0514] (5) 将(4)中回收的菌体在包含150mM氯化钠、20mM咪唑的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)中以成为5mL/1g(菌体)的方式悬浮之后,使用超声波发生装置(INSONETA201M[久保田商事公司制]),在8 $^{\circ}$ C下以约10分钟、约150W的功率进行菌体破碎。菌体破碎液在4 $^{\circ}$ C下进行两次20分钟、8000rpm的离心分离,从而回收上清。

[0515] (6) 将(5)中得到的上清进样至预先用包含150mM氯化钠和20mM咪唑的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)(以下也记作“平衡化液D”)进行了平衡化的、填充有NiSepharose6 Fast Flow(Cytiva公司制)50mL的XK26/20柱(Cytiva公司制)。用平衡化液D进行清洗之后,用包含0.5M咪唑和150mM氯化钠的20mM的Tris盐酸缓冲液(pH7.4)进行洗脱。

[0516] (7) 对(6)中得到的洗脱液,用包含150mM氯化钠的20mM的Tris缓冲液(pH7.4)进行透析,从而制备了热稳定性评价所需要量的AVR10s蛋白质或AVR5eMHCD3蛋白质。

[0517] 实施例20突变型AAV结合性蛋白的热稳定性评价(其4)

[0518] (1) 使用实施例2的(6)中记载的ELISA法,对于实施例18中制备的AVR10s与VLP2的结合活性进行了测定。基于作为所述测定结果的450nm处的吸光,以该测定值成为相同的方式,将AVR10s溶液用纯水进行稀释。

[0519] (2) 将稀释后的AVR10s溶液分为4份,混合等量的0.1M甘氨酸盐酸缓冲液(pH3.0)。

对于4份样品中的3份,在31.7°C、41.2°C、50.0°C下进行15分钟加热处理,剩下的一份在室温(25°C)下静置15分钟。之后,以3:2的比例将样品与0.5M的MES缓冲液(pH6.0)混合,由此将pH调节为6附近,利用实施例2的(6)中记载的ELISA法,测定与VLP2的结合活性。

[0520] (3) 将进行了(2)中记载的热处理时的450nm的吸光度除以室温下静置时的450nm的吸光度,由此计算出残留活性。

[0521] (4) 作为比较对象,用与(1)~(3)相同的方法,进行野生型的AAV结合性蛋白(序列号7)的热稳定性评价。

[0522] 将结果示于表17。实施例17中制作的突变型AAV结合性蛋白AVR10s在任意温度下进行处理,与野生型AAV结合性蛋白相比较,残留活性均高。由此可知,AVR10s与野生型AAV结合性蛋白相比较,酸性条件下的热处理即对酸和热的稳定性显著提高了。

[0523] [表17]

AAV 结合性蛋白			热处理后的残留活性[%]		
序列号	名称	氨基酸置换	31.7°C	41.2°C	50.0°C
[0524] 69	AVR10s	Val317Asp, Tyr(Cys)342Ser, Lys362Glu, Lys371Asn, Val381Ala, Ile382Val, Gly390Ser, Lys399Glu, Ser476Arg, Asn487Asp	99	79	67
7	野生型		43	35	30

[0525] 实施例21突变型AAV结合性蛋白的热稳定性评价(其5)

[0526] (1) 使用实施例2的(6)中记载的ELISA法,对于实施例18中制备的AVR5eMHCD3与VLP2的结合活性进行了测定。基于作为所述测定结果的450nm处的吸光,以该测定值成为相同的方式,将AVR5eMHCD3溶液用纯水进行稀释。

[0527] (2) 将稀释后的AVR5eMHCD3溶液分为4份,用纯水进行2倍稀释。对于4份样品中的3份,在51.7°C、66.4°C、70.0°C下进行15分钟加热处理,剩下的一份在室温(25°C)下静置15分钟。之后,以3:2的比例将样品与包含150mM氯化钠的20mM Tris缓冲液(pH7.4)混合,用与实施例2的(6)中记载的ELISA法测定与VLP2的结合活性。

[0528] (3) 将进行了(2)中记载的热处理时的450nm的吸光度除以室温下静置时的450nm的吸光度,由此计算出残留活性。

[0529] (4) 作为比较对象,用与(1)~(3)相同的方法,进行野生型的AAV结合性蛋白(序列号7)的热稳定性评价。

[0530] 将结果示于表18。实施例18中制作的突变型AAV结合性蛋白AVR5eMHCD3在任意温度下进行处理,与野生型AAV结合性蛋白相比较,残留活性均高。由此可知,AVR5eMHCD3与野生型AAV结合性蛋白相比较,对热的稳定性显著提高了。

[0531] [表18]

AAV 结合性蛋白			热处理后的残留活性[%]		
序列号	名称	氨基酸置换	31.7°C	41.2°C	50.0°C
[0532] 76	AVR5eMHCD3	Tyr(Cys)342Met, Gly390Ser, Lys399Glu, Ser476Arg, Asn487Asp	96	66	54
7	野生型		72	41	34

[0533] 实施例22AAV结合性蛋白固定凝胶的制作(其2)

[0534] (1) 用与实施例12相同的方法制作野生型AAV结合蛋白固定凝胶和AVR5eHC固定凝

胶。具体而言,向导入了马来酰亚胺基的凝胶1mL中,加入实施例10中制备的AVR5eHC或野生型AAV结合性蛋白10mg以及作为还原剂的终浓度0.1mM的TCEP,在pH7.4、4°C的条件下振荡15小时而使之反应。

[0535] (2) 对(1)固定后的滤液用吸收光度计进行测定,计算出未固定蛋白质量,由此估计出对凝胶的各蛋白质固定量。AVR5eHC固定凝胶中固定有AVR5eHC 9mg/mL(凝胶),野生型AAV结合蛋白固定凝胶中固定有野生型AAV结合蛋白10mg/mL(凝胶)。

[0536] (3) 将(1)中制备的各固定凝胶0.065mL加入至Cosmo Spin Filter G(NACALAI TESQUE, INC.制),制作微型柱(分别命名为AVR5eHC固定凝胶微型柱、野生型AAV结合蛋白固定凝胶微型柱)。对于各微型柱,用包含150mM氯化钠和0.05% (w/v) Tween20(商品名)的50mM磷酸缓冲液(pH7.4)(以下也记作“溶液A”)进行平衡化之后,将实施例11中得到的AAV2-EGFP纯化品进样 $2.9 \times 10^{10}$ VG(载体基因组数)。

[0537] (4) 使用振荡培养装置M·BR-022UP(taitec公司制),以1600rpm进行5分钟振荡之后,以1000G进行2分钟离心分离,回收滤液。再度,向微型柱中加入200 $\mu$ L溶液A,同样地进行1分钟振荡后,进行离心分离,与之前的滤液合并,回收400 $\mu$ L(以下也记作“穿透”(FlowThrough))。

[0538] (5) 用溶液A以400 $\mu$ L $\times$ 2次清洗柱,将各滤液回收之后(也将第1次、第2次回收的滤液分别记作“洗涤1”(Wash1)、“洗涤2”(Wash2)),将200 $\mu$ L包含150mM氯化钠和0.05% (w/v) Tween20(商品名)的50mM的磷酸缓冲液(pH2.5)(以下也记作“溶液B”)添加至各微型柱,进行5分钟振荡后、进行离心分离,回收洗脱液。再度向微型柱中加入200 $\mu$ L溶液B,同样地进行1分钟振荡之后,进行离心分离,与之前的洗脱液合并,回收了400 $\mu$ L(以下也记作“洗脱1”(Elute1))。

[0539] (6) 进一步,加入400 $\mu$ L溶液B,进行离心分离,回收洗脱液(以下也记作“洗脱2”(Elute2))。洗脱1和洗脱2中,加入包含20mM氯化镁的1M的Tris盐酸缓冲液(pH8.5)100 $\mu$ L,进行中和。

[0540] (7) 对于(3)中得到的穿透、(5)中得到的洗涤1、洗涤2和洗脱1、以及(6)中得到的洗脱2所包含的AAV2-EGFP载体基因组数,使用AAVpro Titration Kit(Takara Bio Inc.制)、用qPCR进行定量。

[0541] 将结果示于图4。对于野生型AAV结合蛋白固定凝胶微型柱而言,在穿透级分中确认到进样的AAV中的大部分;与此相对,对于AVR5eHC固定凝胶微型柱而言,进样的AAV几乎被全部吸附于凝胶,洗脱1级分中确认到从凝胶中的洗脱。由以上的结果可知,通过包含凝胶和固定于该凝胶的本发明AAV结合性蛋白的AAV吸附剂,与使用野生型AVR的情况相比较,能够高效率地纯化AAV。

[0542] 实施例23AAV结合性蛋白固定凝胶的制作(其3)

[0543] (1) 用与实施例9相同的方法,以pET-AVR3和pET-AVR8g作为模板,得到了pET-AVR3HC和pET-AVR8gHC。进一步,用与实施例10相同的方法,制备了AVR3HC(AVR3的C末端具有固定用标签的蛋白质)以及AVR8gHC(在AVR8g的C末端具有固定用标签的蛋白质)。使用制备的蛋白质,用与实施例22相同的方法,制备了AVR3HC固定凝胶、AVR8gHC固定凝胶。或用实施例22中记载的方法制备野生型AAV结合性蛋白固定凝胶。

[0544] (2) 对(1)发固定后的滤液用吸收光度计进行测定,计算出未固定蛋白质量,由此

估计出对凝胶的各蛋白质固定量。AVR3HC固定凝胶中固定有AVR3HC3.8mg/mL(凝胶), AVR8gHC固定凝胶中固定有AVR8gHC5.7mg/mL(凝胶)。

[0545] (3) 将(1)中制备的野生型AAV结合性蛋白固定凝胶和AVR3HC固定凝胶0.065mL、AVR8gHC固定凝胶0.018mL分别填充于Cosmo Spin Filter G(NACALAI TESQUE, INC.制), 制作了微型柱(分别命名为野生型AAV结合蛋白固定凝胶微型柱、AVR3HC固定凝胶微型柱、AVR8gHC固定凝胶微型柱)。对于各微型柱, 用150mM氯化钠和50mM醋酸缓冲液(pH6.0)(以下也记作“溶液A”)进行平衡化之后, 对于穿透级分, 多次进样实施例11中得到的AAV2-EGFP纯化品, 直至能够确认到AAV2-EGFP充分漏出为止。每个柱中最终进样的AAV2-EGFP的量如下: 野生型AAV结合蛋白固定凝胶微型柱 $2.9 \times 10^{10}$ VG、AVR3HC固定凝胶微型柱 $3.9 \times 10^{10}$ VG、AVR8gHC固定凝胶微型柱 $2.4 \times 10^{11}$ VG。

[0546] (4) 为了对与凝胶结合的AAV2-EGFP进行洗脱回收, 用溶液A以200 $\mu$ L $\times$ 2次清洗柱, 对各滤液进行回收之后(以下也记作“洗涤1”), 将200 $\mu$ L的含有150mM氯化钠和50mM醋酸缓冲液(pH3.0)(以下也记作“溶液B”)添加至各微型柱, 进行5分钟振荡后, 进行离心分离而回收洗脱液。再度向微型柱中加入200 $\mu$ L溶液B, 同样地进行1分钟振荡之后, 进行离心分离, 与之前的洗脱液合并, 回收了400 $\mu$ L(以下也记作“洗脱1”(Elute1))。

[0547] (5) 进一步, 加入溶液B 400 $\mu$ L, 进行离心分离, 回收洗脱液(以下也记作“洗脱2”)。向洗脱1和洗脱2中加入包含20mM氯化镁的1M的Tris盐酸缓冲液(pH8.5)100 $\mu$ L, 从而进行中和。

[0548] (6) 对于(3)~(5)中得到的穿透、洗涤1、洗脱1、洗脱2中所包含的AAV2-EGFP载体基因组数, 使用AAVpro Titration Kit(Takara Bio Inc.制)、用qPCR进行了定量。

[0549] 将结果示于图5。可知, 结合的大部分AAV2-EGFP被洗脱回收至洗脱1级分中, 由通过洗脱回收的AAV2-EGFP量, 将与各微型柱结合的AAV2-EGFP量按照1mL固定凝胶换算的结果, 野生型AAV结合蛋白固定凝胶是 $8.6 \times 10^9$ VG/mL(凝胶); AVR3HC固定凝胶是 $2.8 \times 10^{12}$ VG/mL(凝胶); AVR8gHC固定凝胶是 $1.2 \times 10^{13}$ VG/mL(凝胶)。



[0038]	145	150	155	160
[0039]	Trp Arg Gln Ser Pro Pro Arg Ala Ala Leu Arg Pro Ala Val Ser Ser			
[0040]		165	170	175
[0041]	Ser Asp Gln Gln Ser Leu Ile Arg Lys Leu Gln Lys Arg Gly Ser Pro			
[0042]		180	185	190
[0043]	Ser Asp Val Val Thr Pro Ile Val Thr Gln His Ser Lys Val Asn Asp			
[0044]		195	200	205
[0045]	Ser Asn Glu Leu Gly Gly Leu Thr Thr Ser Gly Ser Ala Glu Val His			
[0046]		210	215	220
[0047]	Lys Ala Ile Thr Ile Ser Ser Pro Leu Thr Thr Asp Leu Thr Ala Glu			
[0048]		225	230	240
[0049]	Leu Ser Gly Gly Pro Lys Asn Val Ser Val Gln Pro Glu Ile Ser Glu			
[0050]		245	250	255
[0051]	Gly Leu Ala Thr Thr Pro Ser Thr Gln Gln Val Lys Ser Ser Glu Lys			
[0052]		260	265	270
[0053]	Thr Gln Ile Ala Val Pro Gln Pro Val Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr Ala			
[0054]		275	280	285
[0055]	Thr Pro Thr Pro Gln Ala Ser Phe Gln Ser Thr Ser Ala Pro Tyr Pro			
[0056]		290	295	300
[0057]	Val Ile Lys Glu Leu Val Val Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile Thr			
[0058]		305	310	320
[0059]	Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu Pro			
[0060]		325	330	335
[0061]	Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His Pro			
[0062]		340	345	350
[0063]	Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu Lys			
[0064]		355	360	365
[0065]	Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val Glu			
[0066]		370	375	380
[0067]	Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys Pro			
[0068]		385	390	400
[0069]	Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln Phe			
[0070]		405	410	415
[0071]	Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser Gln			
[0072]		420	425	430
[0073]	Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu Lys			
[0074]		435	440	445
[0075]	Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu Lys			
[0076]		450	455	460

[0077]	Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val Val
[0078]	465 470 475 480
[0079]	Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val Asn
[0080]	485 490 495
[0081]	Lys Ala Val Asp Tyr Pro Pro Val Ala Asn Ala Gly Pro Asn Gln Val
[0082]	500 505 510
[0083]	Ile Thr Leu Pro Gln Asn Ser Ile Thr Leu Phe Gly Asn Gln Ser Thr
[0084]	515 520 525
[0085]	Asp Asp His Gly Ile Thr Ser Tyr Glu Trp Ser Leu Ser Pro Ser Ser
[0086]	530 535 540
[0087]	Lys Gly Lys Val Val Glu Met Gln Gly Val Arg Thr Pro Thr Leu Gln
[0088]	545 550 555 560
[0089]	Leu Ser Ala Met Gln Glu Gly Asp Tyr Thr Tyr Gln Leu Thr Val Thr
[0090]	565 570 575
[0091]	Asp Thr Ile Gly Gln Gln Ala Thr Ala Gln Val Thr Val Ile Val Gln
[0092]	580 585 590
[0093]	Pro Glu Asn Asn Lys Pro Pro Gln Ala Asp Ala Gly Pro Asp Lys Glu
[0094]	595 600 605
[0095]	Leu Thr Leu Pro Val Asp Ser Thr Thr Leu Asp Gly Ser Lys Ser Ser
[0096]	610 615 620
[0097]	Asp Asp Gln Lys Ile Ile Ser Tyr Leu Trp Glu Lys Thr Gln Gly Pro
[0098]	625 630 635 640
[0099]	Asp Gly Val Gln Leu Glu Asn Ala Asn Ser Ser Val Ala Thr Val Thr
[0100]	645 650 655
[0101]	Gly Leu Gln Val Gly Thr Tyr Val Phe Thr Leu Thr Val Lys Asp Glu
[0102]	660 665 670
[0103]	Arg Asn Leu Gln Ser Gln Ser Ser Val Asn Val Ile Val Lys Glu Glu
[0104]	675 680 685
[0105]	Ile Asn Lys Pro Pro Ile Ala Lys Ile Thr Gly Asn Val Val Ile Thr
[0106]	690 695 700
[0107]	Leu Pro Thr Ser Thr Ala Glu Leu Asp Gly Ser Lys Ser Ser Asp Asp
[0108]	705 710 715 720
[0109]	Lys Gly Ile Val Ser Tyr Leu Trp Thr Arg Asp Glu Gly Ser Pro Ala
[0110]	725 730 735
[0111]	Ala Gly Glu Val Leu Asn His Ser Asp His His Pro Ile Leu Phe Leu
[0112]	740 745 750
[0113]	Ser Asn Leu Val Glu Gly Thr Tyr Thr Phe His Leu Lys Val Thr Asp
[0114]	755 760 765
[0115]	Ala Lys Gly Glu Ser Asp Thr Asp Arg Thr Thr Val Glu Val Lys Pro

[0116]	770	775	780
[0117]	Asp Pro Arg Lys Asn Asn Leu Val Glu Ile Ile Leu Asp Ile Asn Val		
[0118]	785	790	795 800
[0119]	Ser Gln Leu Thr Glu Arg Leu Lys Gly Met Phe Ile Arg Gln Ile Gly		
[0120]	805	810	815
[0121]	Val Leu Leu Gly Val Leu Asp Ser Asp Ile Ile Val Gln Lys Ile Gln		
[0122]	820	825	830
[0123]	Pro Tyr Thr Glu Gln Ser Thr Lys Met Val Phe Phe Val Gln Asn Glu		
[0124]	835	840	845
[0125]	Pro Pro His Gln Ile Phe Lys Gly His Glu Val Ala Ala Met Leu Lys		
[0126]	850	855	860
[0127]	Ser Glu Leu Arg Lys Gln Lys Ala Asp Phe Leu Ile Phe Arg Ala Leu		
[0128]	865	870	875 880
[0129]	Glu Val Asn Thr Val Thr Cys Gln Leu Asn Cys Ser Asp His Gly His		
[0130]	885	890	895
[0131]	Cys Asp Ser Phe Thr Lys Arg Cys Ile Cys Asp Pro Phe Trp Met Glu		
[0132]	900	905	910
[0133]	Asn Phe Ile Lys Val Gln Leu Arg Asp Gly Asp Ser Asn Cys Glu Trp		
[0134]	915	920	925
[0135]	Ser Val Leu Tyr Val Ile Ile Ala Thr Phe Val Ile Val Val Ala Leu		
[0136]	930	935	940
[0137]	Gly Ile Leu Ser Trp Thr Val Ile Cys Cys Cys Lys Arg Gln Lys Gly		
[0138]	945	950	955 960
[0139]	Lys Pro Lys Arg Lys Ser Lys Tyr Lys Ile Leu Asp Ala Thr Asp Gln		
[0140]	965	970	975
[0141]	Glu Ser Leu Glu Leu Lys Pro Thr Ser Arg Ala Gly Ile Lys Gln Lys		
[0142]	980	985	990
[0143]	Gly Leu Leu Leu Ser Ser Ser Leu Met His Ser Glu Ser Glu Leu Asp		
[0144]	995	1000	1005
[0145]	Ser Asp Asp Ala Ile Phe Thr Trp Pro Asp Arg Glu Lys Gly Lys		
[0146]	1010	1015	1020
[0147]	Leu Leu His Gly Gln Asn Gly Ser Val Pro Asn Gly Gln Thr Pro		
[0148]	1025	1030	1035
[0149]	Leu Lys Ala Arg Ser Pro Arg Glu Glu Ile Leu		
[0150]	1040	1045	
[0151]	<210> 2		
[0152]	<211> 567		
[0153]	<212> DNA		
[0154]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

- [0155] <220>  
[0156] <223> AAVR PKD1 和 PKD2 DNA  
[0157] <400> 2  
[0158] tctgcaggcg agtcggttca gattaccctg ccgaagaacg aagtacaact gaatgcgtat 60  
[0159] gtgctgcagg aaccaccgaa aggggaaacc tatacgtatg actggcagct tattacgcat 120  
[0160] cctcgcgact acagcggcga gatggaagga aacattcgc agattctgaa actgtccaaa 180  
[0161] ctgacgccgg gtctgtatga attcaagggt atcgttgaag gtcagaatgc acatggcgaa 240  
[0162] ggctatgtta acgttaccgt gaaaccggag ccacgcaaga accgtcctcc gatcgccatt 300  
[0163] gtttcaccgc agtttcagga gatttactg ccgaccacca gtaccgttat cgatggttcg 360  
[0164] cagtcaacgg atgacgacaa aatcgttcag taccactggg aagagctgaa aggcccctta 420  
[0165] cgcgaaagaga agatcagcga agataccgcc atcttgaaat tatcgaaact tgtgccgggt 480  
[0166] aattacacgt tcagcctgac ggtggtcgat tctgatggcg caaccaactc caccaccgcc 540  
[0167] aaccttaccg tcaacaaagc ggtagac 567  
[0168] <210> 3  
[0169] <211> 30  
[0170] <212> DNA  
[0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0172] <220>  
[0173] <223> AAVR - 正向引物  
[0174] <400> 3  
[0175] aatccatggg ctctgcaggc gagtcggttc 30  
[0176] <210> 4  
[0177] <211> 50  
[0178] <212> DNA  
[0179] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0180] <220>  
[0181] <223> AAVR - 反向引物  
[0182] <400> 4  
[0183] ttactcgagt caatgatgat gatgatgatg gtctaccgct ttgttgacgg 50  
[0184] <210> 5  
[0185] <211> 20  
[0186] <212> DNA  
[0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0188] <220>  
[0189] <223> 序列-正向引物  
[0190] <400> 5  
[0191] taatacgact cactataggg 20  
[0192] <210> 6  
[0193] <211> 21

[0194] <212> DNA  
 [0195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0196] <220>  
 [0197] <223> 序列-反向引物  
 [0198] <400> 6  
 [0199] atgctagtta ttgctcagcg g 21  
 [0200] <210> 7  
 [0201] <211> 219  
 [0202] <212> PRT  
 [0203] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0204] <220>  
 [0205] <223> PelB - AAVR PKD1 和 PKD2 - 6His AA  
 [0206] <400> 7  
 [0207] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0208] 1 5 10 15  
 [0209] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0210] 20 25 30  
 [0211] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0212] 35 40 45  
 [0213] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0214] 50 55 60  
 [0215] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0216] 65 70 75 80  
 [0217] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0218] 85 90 95  
 [0219] Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0220] 100 105 110  
 [0221] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0222] 115 120 125  
 [0223] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0224] 130 135 140  
 [0225] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [0226] 145 150 155 160  
 [0227] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [0228] 165 170 175  
 [0229] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val  
 [0230] 180 185 190  
 [0231] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [0232] 195 200 205

[0233]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His	
[0234]	210	215
[0235]	<210> 8	
[0236]	<211> 657	
[0237]	<212> DNA	
[0238]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0239]	<220>	
[0240]	<223> Pe1B - AAVR PKD1 和 PKD2 - 6His DNA	
[0241]	<400> 8	
[0242]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg	60
[0243]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcgggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa	120
[0244]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatacgta tgactggcag	180
[0245]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg	240
[0246]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat	300
[0247]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct	360
[0248]	ccgatgccca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt	420
[0249]	atcgatgggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg	480
[0250]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa	540
[0251]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac	600
[0252]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat	657
[0253]	<210> 9	
[0254]	<211> 657	
[0255]	<212> DNA	
[0256]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0257]	<220>	
[0258]	<223> AAVR 突变 No.9 DNA	
[0259]	<400> 9	
[0260]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg	60
[0261]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcgggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa	120
[0262]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatacgta tgactggcag	180
[0263]	cttattacgc atcttcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc ccagattctg	240
[0264]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat	300
[0265]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct	360
[0266]	ccgatgccca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt	420
[0267]	atcgatgggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg	480
[0268]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa	540
[0269]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac	600
[0270]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat	657
[0271]	<210> 10	

[0272] <211> 219  
 [0273] <212> PRT  
 [0274] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0275] <220>  
 [0276] <223> AAVR 突变 No.9 AA  
 [0277] <400> 10  
 [0278] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0279] 1 5 10 15  
 [0280] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0281] 20 25 30  
 [0282] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0283] 35 40 45  
 [0284] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0285] 50 55 60  
 [0286] Leu Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0287] 65 70 75 80  
 [0288] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0289] 85 90 95  
 [0290] Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0291] 100 105 110  
 [0292] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0293] 115 120 125  
 [0294] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0295] 130 135 140  
 [0296] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [0297] 145 150 155 160  
 [0298] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [0299] 165 170 175  
 [0300] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val  
 [0301] 180 185 190  
 [0302] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [0303] 195 200 205  
 [0304] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His  
 [0305] 210 215  
 [0306] <210> 11  
 [0307] <211> 657  
 [0308] <212> DNA  
 [0309] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0310] <220>

[0311] <223> AAVR 突变 No.16 DNA  
 [0312] <400> 11  
 [0313] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 [0314] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtgcaa 120  
 [0315] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatacgta tgactggcag 180  
 [0316] cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [0317] aaacagtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttattgttga aggtcagaat 300  
 [0318] gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [0319] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [0320] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [0321] aaaggccctt tacgcaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [0322] cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggtcg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0323] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0324] <210> 12  
 [0325] <211> 219  
 [0326] <212> PRT  
 [0327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0328] <220>  
 [0329] <223> AAVR 突变 No.16 AA  
 [0330] <400> 12  
 [0331] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0332] 1 5 10 15  
 [0333] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0334] 20 25 30  
 [0335] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0336] 35 40 45  
 [0337] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0338] 50 55 60  
 [0339] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0340] 65 70 75 80  
 [0341] Lys Gln Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0342] 85 90 95  
 [0343] Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0344] 100 105 110  
 [0345] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0346] 115 120 125  
 [0347] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0348] 130 135 140  
 [0349] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu

[0350] 145 150 155 160  
 [0351] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [0352] 165 170 175  
 [0353] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val  
 [0354] 180 185 190  
 [0355] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [0356] 195 200 205  
 [0357] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His  
 [0358] 210 215  
 [0359] <210> 13  
 [0360] <211> 657  
 [0361] <212> DNA  
 [0362] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0363] <220>  
 [0364] <223> AAVR 突变 No.29 DNA  
 [0365] <400> 13  
 [0366] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctcgtctgc ccagccggcg 60  
 [0367] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa 120  
 [0368] ctgaatgcgt atgtggtgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180  
 [0369] cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [0370] aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300  
 [0371] gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [0372] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [0373] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [0374] aaaggcccct tacgcaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [0375] cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggtcg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0376] tccaccaccg ccaaccttac cgtaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0377] <210> 14  
 [0378] <211> 219  
 [0379] <212> PRT  
 [0380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0381] <220>  
 [0382] <223> AAVR 突变 No.29 AA  
 [0383] <400> 14  
 [0384] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0385] 1 5 10 15  
 [0386] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0387] 20 25 30  
 [0388] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Val Gln Glu



[0428] cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acgggtggtcg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0429] tccaccaccg ccaaccttac cgtaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0430] <210> 16  
 [0431] <211> 219  
 [0432] <212> PRT  
 [0433] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0434] <220>  
 [0435] <223> AAVR 突变 No.30 AA  
 [0436] <400> 16  
 [0437] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0438] 1 5 10 15  
 [0439] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0440] 20 25 30  
 [0441] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0442] 35 40 45  
 [0443] Pro Pro Lys Gly Gly Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0444] 50 55 60  
 [0445] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0446] 65 70 75 80  
 [0447] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0448] 85 90 95  
 [0449] Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0450] 100 105 110  
 [0451] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0452] 115 120 125  
 [0453] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0454] 130 135 140  
 [0455] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [0456] 145 150 155 160  
 [0457] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [0458] 165 170 175  
 [0459] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val  
 [0460] 180 185 190  
 [0461] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [0462] 195 200 205  
 [0463] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His  
 [0464] 210 215  
 [0465] <210> 17  
 [0466] <211> 657

[0467] <212> DNA  
 [0468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0469] <220>  
 [0470] <223> AAVR 突变 No.32(AVR2) DNA  
 [0471] <400> 17  
 [0472] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 [0473] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120  
 [0474] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180  
 [0475] cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [0476] aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300  
 [0477] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [0478] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [0479] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [0480] aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [0481] cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0482] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0483] <210> 18  
 [0484] <211> 219  
 [0485] <212> PRT  
 [0486] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0487] <220>  
 [0488] <223> AAVR 突变 No.32(AVR2) AA  
 [0489] <400> 18  
 [0490] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0491] 1 5 10 15  
 [0492] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0493] 20 25 30  
 [0494] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0495] 35 40 45  
 [0496] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0497] 50 55 60  
 [0498] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0499] 65 70 75 80  
 [0500] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0501] 85 90 95  
 [0502] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0503] 100 105 110  
 [0504] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0505] 115 120 125

[0506]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser
[0507]	130 135 140
[0508]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu
[0509]	145 150 155 160
[0510]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu
[0511]	165 170 175
[0512]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val
[0513]	180 185 190
[0514]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[0515]	195 200 205
[0516]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His
[0517]	210 215
[0518]	<210> 19
[0519]	<211> 657
[0520]	<212> DNA
[0521]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0522]	<220>
[0523]	<223> AAVR 突变 No.36 DNA
[0524]	<400> 19
[0525]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
[0526]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa 120
[0527]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatacgta tgactggcag 180
[0528]	cttattacgc atcctcgcga ccacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240
[0529]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagagt 300
[0530]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360
[0531]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagttccag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420
[0532]	atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480
[0533]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540
[0534]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600
[0535]	tccaccaccg ccaaccttac cgtaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657
[0536]	<210> 20
[0537]	<211> 219
[0538]	<212> PRT
[0539]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0540]	<220>
[0541]	<223> AAVR 突变 No.36 AA
[0542]	<400> 20
[0543]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
[0544]	1 5 10 15

[0545]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile
[0546]	20                          25                          30
[0547]	Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu
[0548]	35                          40                          45
[0549]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His
[0550]	50                          55                          60
[0551]	Pro Arg Asp His Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu
[0552]	65                          70                          75                          80
[0553]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val
[0554]	85                          90                          95
[0555]	Glu Gly Gln Ser Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys
[0556]	100                          105                          110
[0557]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln
[0558]	115                          120                          125
[0559]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser
[0560]	130                          135                          140
[0561]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu
[0562]	145                          150                          155                          160
[0563]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu
[0564]	165                          170                          175
[0565]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val
[0566]	180                          185                          190
[0567]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[0568]	195                          200                          205
[0569]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His
[0570]	210                          215
[0571]	<210> 21
[0572]	<211> 657
[0573]	<212> DNA
[0574]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0575]	<220>
[0576]	<223> AAVR 突变 No.43 DNA
[0577]	<400> 21
[0578]	atgaaataacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgtgc ccagccggcg 60
[0579]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc cgccgaagaa cgaagtacaa 120
[0580]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa ccaatacgtg tgactggcag 180
[0581]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240
[0582]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300
[0583]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360

[0584] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [0585] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [0586] aaaggcccct tacgcaaga gaagatcagc gaagatacct ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [0587] cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggtcg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0588] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0589] <210> 22  
 [0590] <211> 219  
 [0591] <212> PRT  
 [0592] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0593] <220>  
 [0594] <223> AAVR 突变 No.43 AA  
 [0595] <400> 22  
 [0596] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0597] 1 5 10 15  
 [0598] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0599] 20 25 30  
 [0600] Thr Pro Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0601] 35 40 45  
 [0602] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Asn Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0603] 50 55 60  
 [0604] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0605] 65 70 75 80  
 [0606] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0607] 85 90 95  
 [0608] Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0609] 100 105 110  
 [0610] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0611] 115 120 125  
 [0612] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0613] 130 135 140  
 [0614] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [0615] 145 150 155 160  
 [0616] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ser Ile Leu  
 [0617] 165 170 175  
 [0618] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val  
 [0619] 180 185 190  
 [0620] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [0621] 195 200 205  
 [0622] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His

[0623]	210	215	
[0624]	<210> 23		
[0625]	<211> 657		
[0626]	<212> DNA		
[0627]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0628]	<220>		
[0629]	<223> AAVR 突变 No.45 DNA		
[0630]	<400> 23		
[0631]	atgaaataacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg	60	
[0632]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa	120	
[0633]	ctggatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cccatacgtg tgactggcag	180	
[0634]	cttattacgc atcctcgcga ctgcagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg	240	
[0635]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat	300	
[0636]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct	360	
[0637]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt	420	
[0638]	atcgatggtt cgcagtcaac ggacgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg	480	
[0639]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcga	540	
[0640]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac	600	
[0641]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat	657	
[0642]	<210> 24		
[0643]	<211> 219		
[0644]	<212> PRT		
[0645]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0646]	<220>		
[0647]	<223> AAVR 突变 No.45 AA		
[0648]	<400> 24		
[0649]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala		
[0650]	1 5 10 15		
[0651]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile		
[0652]	20 25 30		
[0653]	Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asp Ala Tyr Val Leu Gln Glu		
[0654]	35 40 45		
[0655]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr His Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His		
[0656]	50 55 60		
[0657]	Pro Arg Asp Cys Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu		
[0658]	65 70 75 80		
[0659]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val		
[0660]	85 90 95		
[0661]	Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys		

[0662]	100	105	110
[0663]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln		
[0664]	115	120	125
[0665]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser		
[0666]	130	135	140
[0667]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu		
[0668]	145	150	155
[0669]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu		
[0670]	165	170	175
[0671]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val		
[0672]	180	185	190
[0673]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val		
[0674]	195	200	205
[0675]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His		
[0676]	210	215	
[0677]	<210> 25		
[0678]	<211> 657		
[0679]	<212> DNA		
[0680]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0681]	<220>		
[0682]	<223> AAVR 突变 No.47 DNA		
[0683]	<400> 25		
[0684]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60		
[0685]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120		
[0686]	ctgtatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatacgtg tgactggcag 180		
[0687]	cttattacgc atcctcgcga ctacacgggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240		
[0688]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtgt gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300		
[0689]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaacagtcct 360		
[0690]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccggt 420		
[0691]	atcgatgggt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480		
[0692]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540		
[0693]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcgaccaac 600		
[0694]	tccaccaccg ccaaccttac cgtaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657		
[0695]	<210> 26		
[0696]	<211> 219		
[0697]	<212> PRT		
[0698]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0699]	<220>		
[0700]	<223> AAVR 突变 No.47 AA		

[0701]	<400> 26
[0702]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
[0703]	1                    5                    10                    15
[0704]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile
[0705]	20                    25                    30
[0706]	Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Tyr Ala Tyr Val Leu Gln Glu
[0707]	35                    40                    45
[0708]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His
[0709]	50                    55                    60
[0710]	Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu
[0711]	65                    70                    75                    80
[0712]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Cys Glu Phe Lys Val Ile Val
[0713]	85                    90                    95
[0714]	Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys
[0715]	100                    105                    110
[0716]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Ser Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln
[0717]	115                    120                    125
[0718]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser
[0719]	130                    135                    140
[0720]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu
[0721]	145                    150                    155                    160
[0722]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu
[0723]	165                    170                    175
[0724]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val
[0725]	180                    185                    190
[0726]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[0727]	195                    200                    205
[0728]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His
[0729]	210                    215
[0730]	<210> 27
[0731]	<211> 657
[0732]	<212> DNA
[0733]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0734]	<220>
[0735]	<223> AAVR 突变 No.49 DNA
[0736]	<400> 27
[0737]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctctgctgc ccagccggcg 60
[0738]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120
[0739]	ctgaatgcgt gtgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatatgta tgactggcag 180

[0740] cttattacgc atcctcgcga ctgcagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [0741] aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300  
 [0742] gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [0743] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [0744] atcgaatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [0745] aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [0746] cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0747] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0748] <210> 28  
 [0749] <211> 219  
 [0750] <212> PRT  
 [0751] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0752] <220>  
 [0753] <223> AAVR 突变 No.49 AA  
 [0754] <400> 28  
 [0755] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0756] 1 5 10 15  
 [0757] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [0758] 20 25 30  
 [0759] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Cys Val Leu Gln Glu  
 [0760] 35 40 45  
 [0761] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Met Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0762] 50 55 60  
 [0763] Pro Arg Asp Cys Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0764] 65 70 75 80  
 [0765] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0766] 85 90 95  
 [0767] Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0768] 100 105 110  
 [0769] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0770] 115 120 125  
 [0771] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0772] 130 135 140  
 [0773] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [0774] 145 150 155 160  
 [0775] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [0776] 165 170 175  
 [0777] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val  
 [0778] 180 185 190

[0779]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[0780]	195 200 205
[0781]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His
[0782]	210 215
[0783]	<210> 29
[0784]	<211> 657
[0785]	<212> DNA
[0786]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0787]	<220>
[0788]	<223> AAVR 突变 No.53 DNA
[0789]	<400> 29
[0790]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
[0791]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcgggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120
[0792]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctatacgta tgactggcag 180
[0793]	cttattacgc atcctcgcgg ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240
[0794]	aaacagtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300
[0795]	gcacatggcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360
[0796]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420
[0797]	atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480
[0798]	aaaggcccct tacgcaaga gaggatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540
[0799]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagcctg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600
[0800]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657
[0801]	<210> 30
[0802]	<211> 219
[0803]	<212> PRT
[0804]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0805]	<220>
[0806]	<223> AAVR 突变 No.53 AA
[0807]	<400> 30
[0808]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
[0809]	1 5 10 15
[0810]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile
[0811]	20 25 30
[0812]	Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu
[0813]	35 40 45
[0814]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His
[0815]	50 55 60
[0816]	Pro Arg Gly Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu
[0817]	65 70 75 80

[0818]	Lys Gln Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val
[0819]	85 90 95
[0820]	Glu Gly Gln Asn Ala His Gly Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys
[0821]	100 105 110
[0822]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln
[0823]	115 120 125
[0824]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser
[0825]	130 135 140
[0826]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu
[0827]	145 150 155 160
[0828]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Arg Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu
[0829]	165 170 175
[0830]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Thr Val
[0831]	180 185 190
[0832]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[0833]	195 200 205
[0834]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His
[0835]	210 215
[0836]	<210> 31
[0837]	<211> 657
[0838]	<212> DNA
[0839]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0840]	<220>
[0841]	<223> AAVR 突变 AVR3 DNA
[0842]	<400> 31
[0843]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
[0844]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa 120
[0845]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180
[0846]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240
[0847]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300
[0848]	gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360
[0849]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420
[0850]	atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480
[0851]	aaaggccctt tacggaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540
[0852]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600
[0853]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657
[0854]	<210> 32
[0855]	<211> 219
[0856]	<212> PRT

[0857]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0858]	<220>	
[0859]	<223>	AAVR 突变 AVR3 AA
[0860]	<400>	32
[0861]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
[0862]	1	5 10 15
[0863]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile	
[0864]		20 25 30
[0865]	Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu	
[0866]		35 40 45
[0867]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His	
[0868]		50 55 60
[0869]	Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu	
[0870]		65 70 75 80
[0871]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val	
[0872]		85 90 95
[0873]	Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys	
[0874]		100 105 110
[0875]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln	
[0876]		115 120 125
[0877]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser	
[0878]		130 135 140
[0879]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu	
[0880]		145 150 155 160
[0881]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu	
[0882]		165 170 175
[0883]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val	
[0884]		180 185 190
[0885]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val	
[0886]		195 200 205
[0887]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His	
[0888]		210 215
[0889]	<210>	33
[0890]	<211>	36
[0891]	<212>	DNA
[0892]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0893]	<220>	
[0894]	<223>	引物 I319F-F
[0895]	<400>	33

[0896] ccatgggctc tgcaggcgag tcggttcagt ttaccc 36  
 [0897] <210> 34  
 [0898] <211> 219  
 [0899] <212> PRT  
 [0900] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0901] <220>  
 [0902] <223> AAVR 突变 AVR4a AA  
 [0903] <400> 34  
 [0904] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [0905] 1 5 10 15  
 [0906] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Phe  
 [0907] 20 25 30  
 [0908] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [0909] 35 40 45  
 [0910] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [0911] 50 55 60  
 [0912] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [0913] 65 70 75 80  
 [0914] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [0915] 85 90 95  
 [0916] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys  
 [0917] 100 105 110  
 [0918] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [0919] 115 120 125  
 [0920] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [0921] 130 135 140  
 [0922] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [0923] 145 150 155 160  
 [0924] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [0925] 165 170 175  
 [0926] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val  
 [0927] 180 185 190  
 [0928] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [0929] 195 200 205  
 [0930] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His  
 [0931] 210 215  
 [0932] <210> 35  
 [0933] <211> 657  
 [0934] <212> DNA

- [0935] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0936] <220>  
 [0937] <223> AAVR 突变 AVR4a DNA  
 [0938] <400> 35  
 [0939] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 [0940] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagtttacc tgccgaagaa cgaagtacaa 120  
 [0941] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180  
 [0942] cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [0943] aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300  
 [0944] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [0945] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [0946] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [0947] aaaggccctt tacggaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [0948] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600  
 [0949] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [0950] <210> 36  
 [0951] <211> 29  
 [0952] <212> DNA  
 [0953] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0954] <220>  
 [0955] <223> 引物 N487D R  
 [0956] <400> 36  
 [0957] gattctgatg gcgcaaccga ctccaccacc 30  
 [0958] <210> 37  
 [0959] <211> 30  
 [0960] <212> DNA  
 [0961] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0962] <220>  
 [0963] <223> 引物 N487D R  
 [0964] <400> 37  
 [0965] ggtggtggag tcggttgcgc catcagaatc 30  
 [0966] <210> 38  
 [0967] <211> 219  
 [0968] <212> PRT  
 [0969] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0970] <220>  
 [0971] <223> AAVR 突变 AVR4d AA  
 [0972] <400> 38  
 [0973] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

[0974]	1	5	10	15
[0975]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile			
[0976]		20	25	30
[0977]	Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu			
[0978]		35	40	45
[0979]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His			
[0980]		50	55	60
[0981]	Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu			
[0982]		65	70	75
[0983]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val			
[0984]		85	90	95
[0985]	Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys			
[0986]		100	105	110
[0987]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln			
[0988]		115	120	125
[0989]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser			
[0990]		130	135	140
[0991]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu			
[0992]		145	150	155
[0993]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu			
[0994]		165	170	175
[0995]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val			
[0996]		180	185	190
[0997]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val			
[0998]		195	200	205
[0999]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His			
[1000]		210	215	
[1001]	<210> 39			
[1002]	<211> 657			
[1003]	<212> DNA			
[1004]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1005]	<220>			
[1006]	<223> AAVR 突变 AVR4d DNA			
[1007]	<400> 39			
[1008]	atgaaataacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctctgctgc ccagccggcg	60		
[1009]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgcgaagaa cgaagtacaa	120		
[1010]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag	180		
[1011]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg	240		
[1012]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat	300		

[1013] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [1014] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccggt 420  
 [1015] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [1016] aaaggcccct tacgcaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [1017] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggteg attctgatgg cgcaaccgac 600  
 [1018] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [1019] <210> 40  
 [1020] <211> 38  
 [1021] <212> DNA  
 [1022] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1023] <220>  
 [1024] <223> 引物 I319F-K323E-F  
 [1025] <400> 40  
 [1026] ttttggctctc agttctccgg cagggtaact gaaccgac 38  
 [1027] <210> 41  
 [1028] <211> 39  
 [1029] <212> DNA  
 [1030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1031] <220>  
 [1032] <223> 引物 I319F-K323E-R  
 [1033] <400> 41  
 [1034] ttttggctctc agaacgaagt acaactgaat gcgtatgtg 39  
 [1035] <210> 42  
 [1036] <211> 219  
 [1037] <212> PRT  
 [1038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1039] <220>  
 [1040] <223> AAVR 突变 AVR5b AA  
 [1041] <400> 42  
 [1042] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [1043] 1 5 10 15  
 [1044] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Phe  
 [1045] 20 25 30  
 [1046] Thr Leu Pro Glu Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [1047] 35 40 45  
 [1048] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [1049] 50 55 60  
 [1050] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [1051] 65 70 75 80

[1052]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val
[1053]	85 90 95
[1054]	Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Lys
[1055]	100 105 110
[1056]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln
[1057]	115 120 125
[1058]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser
[1059]	130 135 140
[1060]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu
[1061]	145 150 155 160
[1062]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu
[1063]	165 170 175
[1064]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val
[1065]	180 185 190
[1066]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asn Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[1067]	195 200 205
[1068]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His
[1069]	210 215
[1070]	<210> 43
[1071]	<211> 657
[1072]	<212> DNA
[1073]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1074]	<220>
[1075]	<223> AAVR 突变 AVR5b DNA
[1076]	<400> 43
[1077]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
[1078]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagtttacc tgccggagaa cgaagtacaa 120
[1079]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180
[1080]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240
[1081]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300
[1082]	gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtgaaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360
[1083]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420
[1084]	atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480
[1085]	aaaggccctt tacggaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540
[1086]	cttgtgcccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccaac 600
[1087]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657
[1088]	<210> 44
[1089]	<211> 39
[1090]	<212> DNA

[1091] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1092] <220>  
 [1093] <223> 引物 K399E-F  
 [1094] <400> 44  
 [1095] ttttgggtctc acttgcgtgg ctccggttcc acggtaacg 39  
 [1096] <210> 45  
 [1097] <211> 37  
 [1098] <212> DNA  
 [1099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1100] <220>  
 [1101] <223> 引物 K399E-R  
 [1102] <400> 45  
 [1103] ttttgggtctc acaagaaccg tctcgcgatc gccattg 37  
 [1104] <210> 46  
 [1105] <211> 219  
 [1106] <212> PRT  
 [1107] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1108] <220>  
 [1109] <223> AAVR 突变 AVR5e AA  
 [1110] <400> 46  
 [1111] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [1112] 1 5 10 15  
 [1113] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [1114] 20 25 30  
 [1115] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [1116] 35 40 45  
 [1117] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [1118] 50 55 60  
 [1119] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [1120] 65 70 75 80  
 [1121] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [1122] 85 90 95  
 [1123] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu  
 [1124] 100 105 110  
 [1125] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [1126] 115 120 125  
 [1127] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [1128] 130 135 140  
 [1129] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu

[1130]	145	150	155	160
[1131]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu			
[1132]		165	170	175
[1133]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val			
[1134]		180	185	190
[1135]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val			
[1136]		195	200	205
[1137]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His			
[1138]		210	215	
[1139]	<210> 47			
[1140]	<211> 657			
[1141]	<212> DNA			
[1142]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1143]	<220>			
[1144]	<223> AAVR 突变 AVR5e DNA			
[1145]	<400> 47			
[1146]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctctgctgc ccagccggcg	60		
[1147]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa	120		
[1148]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag	180		
[1149]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg	240		
[1150]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat	300		
[1151]	gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct	360		
[1152]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt	420		
[1153]	atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg	480		
[1154]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa	540		
[1155]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac	600		
[1156]	tccaccaccg ccaaccttac cgtaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat	657		
[1157]	<210> 48			
[1158]	<211> 56			
[1159]	<212> DNA			
[1160]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1161]	<220>			
[1162]	<223> 引物 AVR-D2R HT1			
[1163]	<400> 48			
[1164]	atctcgagtc atccgcaggt atcgttgcgg caatgatgat gatgatgatg gtctac	56		
[1165]	<210> 49			
[1166]	<211> 678			
[1167]	<212> DNA			
[1168]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			

[1169] <220>  
 [1170] <223> AAVR 突变 AVR5eHC DNA  
 [1171] <400> 49  
 [1172] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 [1173] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120  
 [1174] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180  
 [1175] cttattacgc atcctcgcga ctacacgggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [1176] aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300  
 [1177] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [1178] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [1179] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [1180] aaaggccctt tacgcaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [1181] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600  
 [1182] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcattgc 660  
 [1183] cgcaacgata cctgcgga 678  
 [1184] <210> 50  
 [1185] <211> 226  
 [1186] <212> PRT  
 [1187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1188] <220>  
 [1189] <223> AAVR 突变 AVR5eHC AA  
 [1190] <400> 50  
 [1191] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [1192] 1 5 10 15  
 [1193] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [1194] 20 25 30  
 [1195] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [1196] 35 40 45  
 [1197] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [1198] 50 55 60  
 [1199] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [1200] 65 70 75 80  
 [1201] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [1202] 85 90 95  
 [1203] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu  
 [1204] 100 105 110  
 [1205] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [1206] 115 120 125  
 [1207] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser

[1208]	130	135	140
[1209]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu		
[1210]	145	150	155
[1211]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu		
[1212]	165	170	175
[1213]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val		
[1214]	180	185	190
[1215]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val		
[1216]	195	200	205
[1217]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His Cys Arg Asn Asp Thr		
[1218]	210	215	220
[1219]	Cys Gly		
[1220]	225		
[1221]	<210> 51		
[1222]	<211> 239		
[1223]	<212> PRT		
[1224]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1225]	<220>		
[1226]	<223> 增强的绿荧光蛋白 AA		
[1227]	<400> 51		
[1228]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu		
[1229]	1	5	10
[1230]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly		
[1231]	20	25	30
[1232]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile		
[1233]	35	40	45
[1234]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr		
[1235]	50	55	60
[1236]	Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys		
[1237]	65	70	75
[1238]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu		
[1239]	85	90	95
[1240]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu		
[1241]	100	105	110
[1242]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly		
[1243]	115	120	125
[1244]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
[1245]	130	135	140
[1246]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn		

[1247]	145	150	155	160
[1248]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
[1249]		165	170	175
[1250]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
[1251]		180	185	190
[1252]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
[1253]		195	200	205
[1254]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
[1255]		210	215	220
[1256]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
[1257]	225	230	235	
[1258]	<210> 52			
[1259]	<211> 492			
[1260]	<212> DNA			
[1261]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1262]	<220>			
[1263]	<223> 增强的绿荧光蛋白 DNA			
[1264]	<400> 52			
[1265]	gaattcatgg tgagcaaagg cgaggaactg tttactggtg tagtccccat actggtgga 60			
[1266]	cttgatgggg atgtcaatgg tcacaaattt agcgtgtcag gagaaggcga aggagatgcg 120			
[1267]	acgtacggca agctgaccct taagttcatt tgtaccacgg gtaagttgcc tgttccttgg 180			
[1268]	cccacacttg tgacaaccct gacctatgga gtgcaatgct tctccagata tccagaccac 240			
[1269]	atgaagcagc atgacttctt caaatccgcc atgccagaag gctatgtgca ggaaaggacc 300			
[1270]	atcttcttta aggacgacgg aaactacaaa actcgtgctg aggtgaagtt cgaaggagac 360			
[1271]	acactggtga atcgaatcga gctgaaaggg attgacttta aggaggacgg gaatattctg 420			
[1272]	ggccataagc tggagtacaa ctacaactct cacaatgtgt acatcatggc cgacaaacag 480			
[1273]	aagaacggga ttaaggtcaa cttaagatt cgccacaaca tcgaggatgg tagtgtacag 540			
[1274]	ctcgtgacc attaccagca gaatactccc ataggcgatg gaccagtttt gctgcctgac 600			
[1275]	aaccattatc tgtcaacca atctgccctg agcaaagatc cgaatgagaa acgggatcac 660			
[1276]	atggttctct tggagtttgt cacagcagca gggatcactc tcggcatgga tgagctctat 720			
[1277]	aatagggat cc 732			
[1278]	<210> 53			
[1279]	<211> 219			
[1280]	<212> PRT			
[1281]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1282]	<220>			
[1283]	<223> AAVR 突变 No.93(AVR7a) AA			
[1284]	<400> 53			
[1285]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala			

[1286]	1	5	10	15
[1287]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile			
[1288]		20	25	30
[1289]	Thr Leu Pro Lys Asp Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu			
[1290]		35	40	45
[1291]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His			
[1292]		50	55	60
[1293]	Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Glu His Ser Gln Ile Leu			
[1294]	65	70	75	80
[1295]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val			
[1296]		85	90	95
[1297]	Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu			
[1298]		100	105	110
[1299]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln			
[1300]		115	120	125
[1301]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser			
[1302]		130	135	140
[1303]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu			
[1304]	145	150	155	160
[1305]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu			
[1306]		165	170	175
[1307]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val			
[1308]		180	185	190
[1309]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val			
[1310]		195	200	205
[1311]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His			
[1312]		210	215	
[1313]	<210> 54			
[1314]	<211> 657			
[1315]	<212> DNA			
[1316]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1317]	<220>			
[1318]	<223> AAVR 突变 No.93(AVR7a) DNA			
[1319]	<400> 54			
[1320]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tctctgctgc ccagccggcg	60		
[1321]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagga cgaagtacaa	120		
[1322]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag	180		
[1323]	cttattacgc atccacgcga ctacagcggc gagatggaag gagaacattc gcagattctg	240		
[1324]	aaactgtcca aactgacgcc gggtttgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat	300		

[1325] gcacatagcg aaggctatgt taatgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [1326] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [1327] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [1328] aaaggcccct tacgcaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attgtcgaaa 540  
 [1329] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggteg attctgatgg cgcaaccgac 600  
 [1330] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [1331] <210> 55  
 [1332] <211> 219  
 [1333] <212> PRT  
 [1334] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1335] <220>  
 [1336] <223> AAVR 突变 No.91(AVR7b) AA  
 [1337] <400> 55  
 [1338] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [1339] 1 5 10 15  
 [1340] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Asp Gln Ile  
 [1341] 20 25 30  
 [1342] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [1343] 35 40 45  
 [1344] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [1345] 50 55 60  
 [1346] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [1347] 65 70 75 80  
 [1348] Lys Leu Ser Asn Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [1349] 85 90 95  
 [1350] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu  
 [1351] 100 105 110  
 [1352] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [1353] 115 120 125  
 [1354] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [1355] 130 135 140  
 [1356] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [1357] 145 150 155 160  
 [1358] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [1359] 165 170 175  
 [1360] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val  
 [1361] 180 185 190  
 [1362] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [1363] 195 200 205

- [1364] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His  
 [1365] 210 215  
 [1366] <210> 56  
 [1367] <211> 657  
 [1368] <212> DNA  
 [1369] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1370] <220>  
 [1371] <223> AAVR 突变 No.91(AVR7b) DNA  
 [1372] <400> 56  
 [1373] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
 [1374] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggat cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa 120  
 [1375] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180  
 [1376] cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240  
 [1377] aaactgtcca atctgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300  
 [1378] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
 [1379] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
 [1380] atcgatggtt cgcagtcac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
 [1381] aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
 [1382] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600  
 [1383] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
 [1384] <210> 57  
 [1385] <211> 36  
 [1386] <212> DNA  
 [1387] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1388] <220>  
 [1389] <223> 引物 V317D-R  
 [1390] <400> 57  
 [1391] ttttggctctc agcaggcgag tcggatcaga ttacc 36  
 [1392] <210> 58  
 [1393] <211> 36  
 [1394] <212> DNA  
 [1395] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1396] <220>  
 [1397] <223> 引物 V317D-F  
 [1398] <400> 58  
 [1399] ttttggctctc actgcagagc ccatggccat cgccgg 36  
 [1400] <210> 59  
 [1401] <211> 219  
 [1402] <212> PRT

[1403]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1404]	<220>	
[1405]	<223>	AAVR 突变 AVR8a AA
[1406]	<400>	59
[1407]	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
[1408]	1	5 10 15
[1409]	Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Asp Gln Ile	
[1410]		20 25 30
[1411]	Thr Leu Pro Lys Asp Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu	
[1412]		35 40 45
[1413]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His	
[1414]		50 55 60
[1415]	Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Glu His Ser Gln Ile Leu	
[1416]		65 70 75 80
[1417]	Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val	
[1418]		85 90 95
[1419]	Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu	
[1420]		100 105 110
[1421]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln	
[1422]		115 120 125
[1423]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser	
[1424]		130 135 140
[1425]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu	
[1426]		145 150 155 160
[1427]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu	
[1428]		165 170 175
[1429]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val	
[1430]		180 185 190
[1431]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val	
[1432]		195 200 205
[1433]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His	
[1434]		210 215
[1435]	<210>	60
[1436]	<211>	657
[1437]	<212>	DNA
[1438]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1439]	<220>	
[1440]	<223>	AAVR 突变 AVR8a DNA
[1441]	<400>	60

- [1442] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
- [1443] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggat cagattaccc tgccgaagga cgaagtacaa 120
- [1444] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180
- [1445] cttattacgc atccacgcga ctacagcggc gagatggaag gagaacattc gcagattctg 240
- [1446] aaactgtcca aactgacgcc gggtttgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300
- [1447] gcacatagcg aaggctatgt taatgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360
- [1448] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420
- [1449] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480
- [1450] aaaggccctt tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attgtcgaaa 540
- [1451] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600
- [1452] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657
- [1453] <210> 61
- [1454] <211> 36
- [1455] <212> DNA
- [1456] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1457] <220>
- [1458] <223> 引物 K362E-R
- [1459] <400> 61
- [1460] ttttggctctc acgagatgga aggagaacat tcgcag 36
- [1461] <210> 62
- [1462] <211> 32
- [1463] <212> DNA
- [1464] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1465] <220>
- [1466] <223> 引物 K362E-F
- [1467] <400> 62
- [1468] ttttggctctc actcgccgct gtagtcgcga gg 32
- [1469] <210> 63
- [1470] <211> 219
- [1471] <212> PRT
- [1472] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1473] <220>
- [1474] <223> AAVR 突变 AVR8g AA
- [1475] <400> 63
- [1476] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
- [1477] 1                    5                    10                    15
- [1478] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Asp Gln Ile
- [1479]                    20                    25                    30
- [1480] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu

[1481]	35	40	45
[1482]	Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His		
[1483]	50	55	60
[1484]	Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Glu His Ser Gln Ile Leu		
[1485]	65	70	75
[1486]	Lys Leu Ser Asn Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val		
[1487]	85	90	95
[1488]	Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu		
[1489]	100	105	110
[1490]	Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln		
[1491]	115	120	125
[1492]	Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser		
[1493]	130	135	140
[1494]	Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu		
[1495]	145	150	155
[1496]	Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu		
[1497]	165	170	175
[1498]	Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val		
[1499]	180	185	190
[1500]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val		
[1501]	195	200	205
[1502]	Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His		
[1503]	210	215	
[1504]	<210> 64		
[1505]	<211> 657		
[1506]	<212> DNA		
[1507]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1508]	<220>		
[1509]	<223> AAVR 突变 AVR8g DNA		
[1510]	<400> 64		
[1511]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60		
[1512]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggat cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120		
[1513]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctgtacgta tgactggcag 180		
[1514]	cttattacgc atcctcgcga ctacagcggc gagatggaag gagaacattc gcagattctg 240		
[1515]	aaactgtcca atctgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300		
[1516]	gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360		
[1517]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420		
[1518]	atcgatggtt cgcagtcac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480		
[1519]	aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540		

[1520] cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acgggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600  
 [1521] tccaccaccg ccaaccttac cgtaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcacat 657  
 [1522] <210> 65  
 [1523] <211> 219  
 [1524] <212> PRT  
 [1525] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1526] <220>  
 [1527] <223> AAVR 突变 AVR10 AA  
 [1528] <400> 65  
 [1529] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [1530] 1 5 10 15  
 [1531] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Asp Gln Ile  
 [1532] 20 25 30  
 [1533] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [1534] 35 40 45  
 [1535] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Cys Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [1536] 50 55 60  
 [1537] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Glu His Ser Gln Ile Leu  
 [1538] 65 70 75 80  
 [1539] Lys Leu Ser Asn Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Ala Val Val  
 [1540] 85 90 95  
 [1541] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu  
 [1542] 100 105 110  
 [1543] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [1544] 115 120 125  
 [1545] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [1546] 130 135 140  
 [1547] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [1548] 145 150 155 160  
 [1549] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [1550] 165 170 175  
 [1551] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val  
 [1552] 180 185 190  
 [1553] Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val  
 [1554] 195 200 205  
 [1555] Asn Lys Ala Val Asp His His His His His His  
 [1556] 210 215  
 [1557] <210> 66  
 [1558] <211> 657

- [1559] <212> DNA  
[1560] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1561] <220>  
[1562] <223> AAVR 突变 AVR10 DNA  
[1563] <400> 66  
[1564] atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60  
[1565] atggccatgg gctctgcagg cgagtcggat cagattaccc tgccgaagaa cgaagtacaa 120  
[1566] ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa cctcgacgta tgactggcag 180  
[1567] cttattacgc atcctcgcga ctacacgggc gagatggaag gagaacattc gcagattctg 240  
[1568] aaactgtcca atctgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ctgtcgttga aggtcagaat 300  
[1569] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
[1570] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
[1571] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
[1572] aaaggcccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
[1573] cttgtgccgg gtaactacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600  
[1574] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
[1575] <210> 67  
[1576] <211> 31  
[1577] <212> DNA  
[1578] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1579] <220>  
[1580] <223> 引物 C342S\_F  
[1581] <400> 67  
[1582] ttttggctctc agaaacctct acgtatgact g 31  
[1583] <210> 68  
[1584] <211> 27  
[1585] <212> DNA  
[1586] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1587] <220>  
[1588] <223> 引物 C342S\_R  
[1589] <400> 68  
[1590] ttttggctctc atttcccctt tcggtgg 27  
[1591] <210> 69  
[1592] <211> 219  
[1593] <212> PRT  
[1594] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1595] <220>  
[1596] <223> AAVR 突变 AVR10s AA  
[1597] <400> 69



- [1637] aaactgtcca atctgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ctgtcgttga aggtcagaat 300  
[1638] gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360  
[1639] ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420  
[1640] atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480  
[1641] aaaggcccct tacgcaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540  
[1642] cttgtgccgg gtaactacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600  
[1643] tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagacc atcatcatca tcatcat 657  
[1644] <210> 71  
[1645] <211> 31  
[1646] <212> DNA  
[1647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1648] <220>  
[1649] <223> 引物 M5\_F  
[1650] <400> 71  
[1651] ttttggctctc agaaaccatg acgtatgact g 31  
[1652] <210> 72  
[1653] <211> 40  
[1654] <212> DNA  
[1655] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1656] <220>  
[1657] <223> 引物 D3\_F  
[1658] <400> 72  
[1659] ttttggctctc agatgtttgt tattttcggg ctgaacaatc 40  
[1660] <210> 73  
[1661] <211> 35  
[1662] <212> DNA  
[1663] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1664] <220>  
[1665] <223> 引物 D3\_R  
[1666] <400> 73  
[1667] ttttggctctc aagactatcc gccggtagcg aacgc 35  
[1668] <210> 74  
[1669] <211> 27  
[1670] <212> DNA  
[1671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[1672] <220>  
[1673] <223> 引物 M5D3 Vector\_F  
[1674] <400> 74  
[1675] ttttggctctc agtctaccgc tttgttg 27

[1676] <210> 75  
 [1677] <211> 29  
 [1678] <212> DNA  
 [1679] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1680] <220>  
 [1681] <223> 引物 M5D3 Vector\_R  
 [1682] <400> 75  
 [1683] ttttgggtctc acatcatcat catcatcat 29  
 [1684] <210> 76  
 [1685] <211> 323  
 [1686] <212> PRT  
 [1687] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [1688] <220>  
 [1689] <223> AAVR 突变 AVR5eMHCD3 AA  
 [1690] <400> 76  
 [1691] Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
 [1692] 1 5 10 15  
 [1693] Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Gly Ser Ala Gly Glu Ser Val Gln Ile  
 [1694] 20 25 30  
 [1695] Thr Leu Pro Lys Asn Glu Val Gln Leu Asn Ala Tyr Val Leu Gln Glu  
 [1696] 35 40 45  
 [1697] Pro Pro Lys Gly Glu Thr Met Thr Tyr Asp Trp Gln Leu Ile Thr His  
 [1698] 50 55 60  
 [1699] Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Glu Met Glu Gly Lys His Ser Gln Ile Leu  
 [1700] 65 70 75 80  
 [1701] Lys Leu Ser Lys Leu Thr Pro Gly Leu Tyr Glu Phe Lys Val Ile Val  
 [1702] 85 90 95  
 [1703] Glu Gly Gln Asn Ala His Ser Glu Gly Tyr Val Asn Val Thr Val Glu  
 [1704] 100 105 110  
 [1705] Pro Glu Pro Arg Lys Asn Arg Pro Pro Ile Ala Ile Val Ser Pro Gln  
 [1706] 115 120 125  
 [1707] Phe Gln Glu Ile Ser Leu Pro Thr Thr Ser Thr Val Ile Asp Gly Ser  
 [1708] 130 135 140  
 [1709] Gln Ser Thr Asp Asp Asp Lys Ile Val Gln Tyr His Trp Glu Glu Leu  
 [1710] 145 150 155 160  
 [1711] Lys Gly Pro Leu Arg Glu Glu Lys Ile Ser Glu Asp Thr Ala Ile Leu  
 [1712] 165 170 175  
 [1713] Lys Leu Ser Lys Leu Val Pro Gly Asn Tyr Thr Phe Arg Leu Thr Val  
 [1714] 180 185 190

[1715]	Val Asp Ser Asp Gly Ala Thr Asp Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Val
[1716]	195 200 205
[1717]	Asn Lys Ala Val Asp Tyr Pro Pro Val Ala Asn Ala Gly Pro Asn Gln
[1718]	210 215 220
[1719]	Val Ile Thr Leu Pro Gln Asn Ser Ile Thr Leu Phe Gly Asn Gln Ser
[1720]	225 230 235 240
[1721]	Thr Asp Asp His Gly Ile Thr Ser Tyr Glu Trp Ser Leu Ser Pro Ser
[1722]	245 250 255
[1723]	Ser Lys Gly Lys Val Val Glu Met Gln Gly Val Arg Thr Pro Thr Leu
[1724]	260 265 270
[1725]	Gln Leu Ser Ala Met Gln Glu Gly Asp Tyr Thr Tyr Gln Leu Thr Val
[1726]	275 280 285
[1727]	Thr Asp Thr Ile Gly Gln Gln Ala Thr Ala Gln Val Thr Val Ile Val
[1728]	290 295 300
[1729]	Gln Pro Glu Asn Asn Lys His His His His His His Cys Arg Asn Asp
[1730]	305 310 315 320
[1731]	Thr Cys Gly
[1732]	<210> 77
[1733]	<211> 969
[1734]	<212> DNA
[1735]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1736]	<220>
[1737]	<223> AAVR 突变 AVR5eMHCD3 DNA
[1738]	<400> 77
[1739]	atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60
[1740]	atggccatgg gctctgcagg cgagtcggtt cagattacc tgccgaagaa cgaagtacaa 120
[1741]	ctgaatgcgt atgtgctgca ggaaccaccg aaaggggaaa ccatgacgta tgactggcag 180
[1742]	cttattacgc atcctcgcga ctacacggc gagatggaag gaaaacattc gcagattctg 240
[1743]	aaactgtcca aactgacgcc gggctctgtat gaattcaagg ttatcgttga aggtcagaat 300
[1744]	gcacatagcg aaggctatgt taacgttacc gtggaaccgg agccacgcaa gaaccgtcct 360
[1745]	ccgatcgcca ttgtttcacc gcagtttcag gagatttcac tgccgaccac cagtaccgtt 420
[1746]	atcgatggtt cgcagtcaac ggatgacgac aaaatcgttc agtaccactg ggaagagctg 480
[1747]	aaaggccct tacgcgaaga gaagatcagc gaagataccg ccatcttgaa attatcgaaa 540
[1748]	cttgtgccgg gtaattacac gttcagactg acggtggctg attctgatgg cgcaaccgac 600
[1749]	tccaccaccg ccaaccttac cgtcaacaaa gcggtagact atccgccgt agcgaacgca 660
[1750]	gggccgaate aagttattac cctccctcag aatagtatca cctgtttgg aaatcagagc 720
[1751]	acggacgatc acggcattac atcgtacgag tggagtctgt caccgtcacc gaaagggaaa 780
[1752]	gtcgtggaag tgcaaggtgt gcgtacgcc acacttcagt taagcgcac gcaggagggc 840
[1753]	gattatactt accaattgac cgtaacagac actattggtc agcaggctac agcgaagtg 900

---

[1754] acagtgattg ttcagcccga aaataacaaa catcatcacc atcatcattg ccgcaacgat 960  
[1755] acctgcgga 969

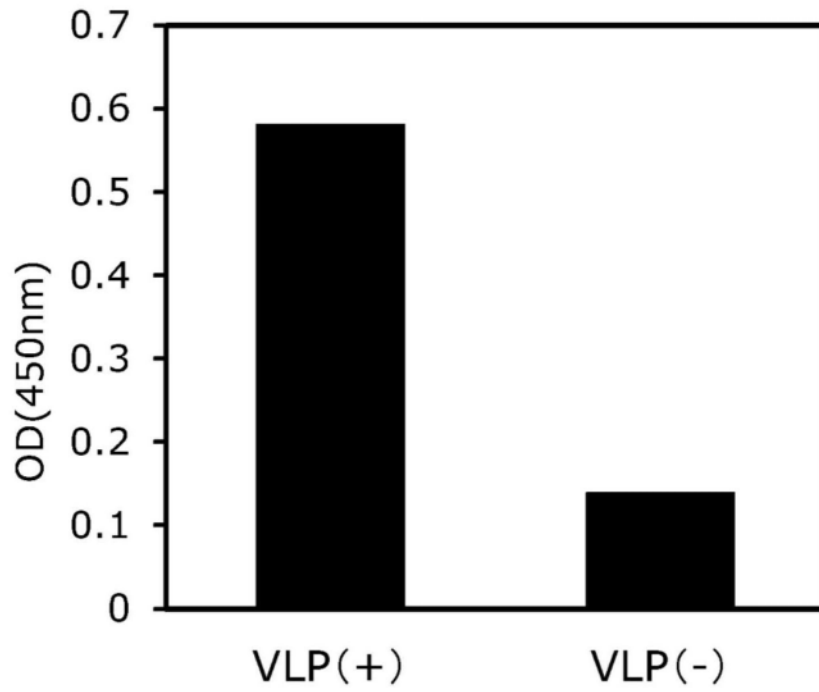


图1

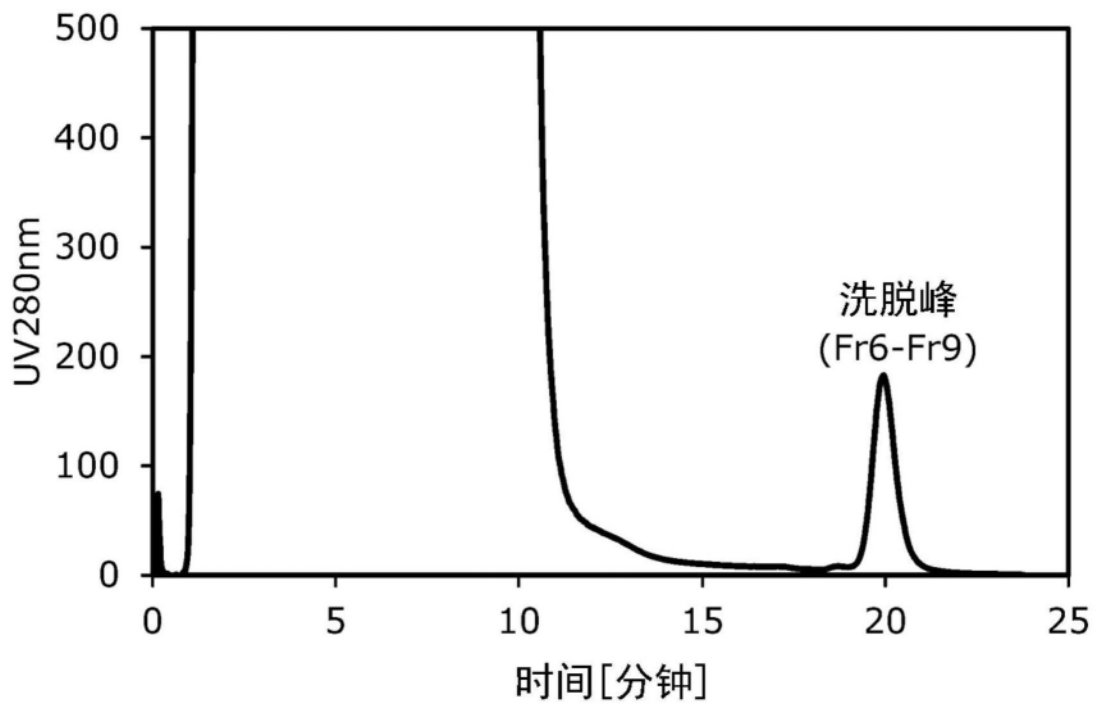


图2

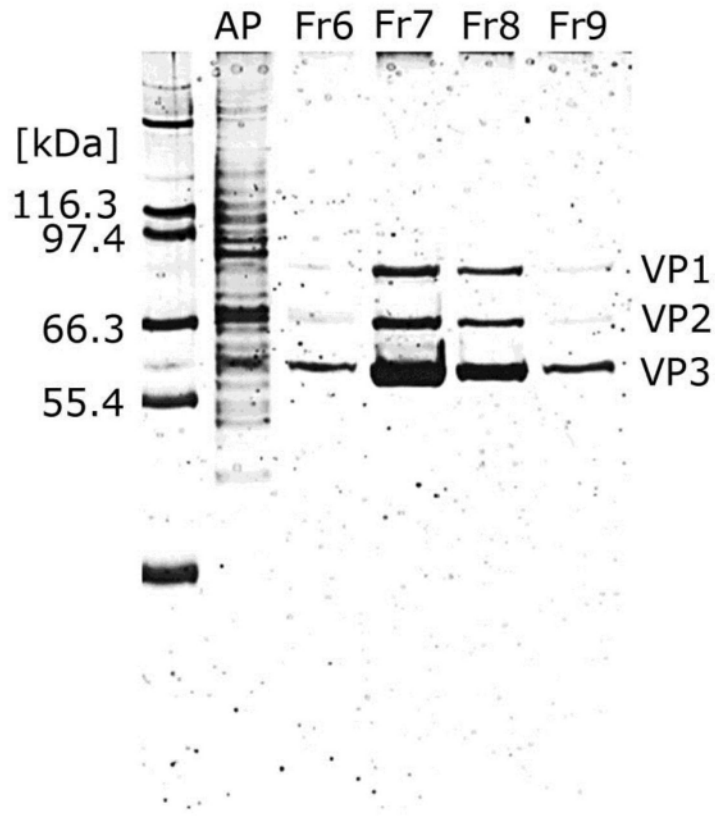


图3

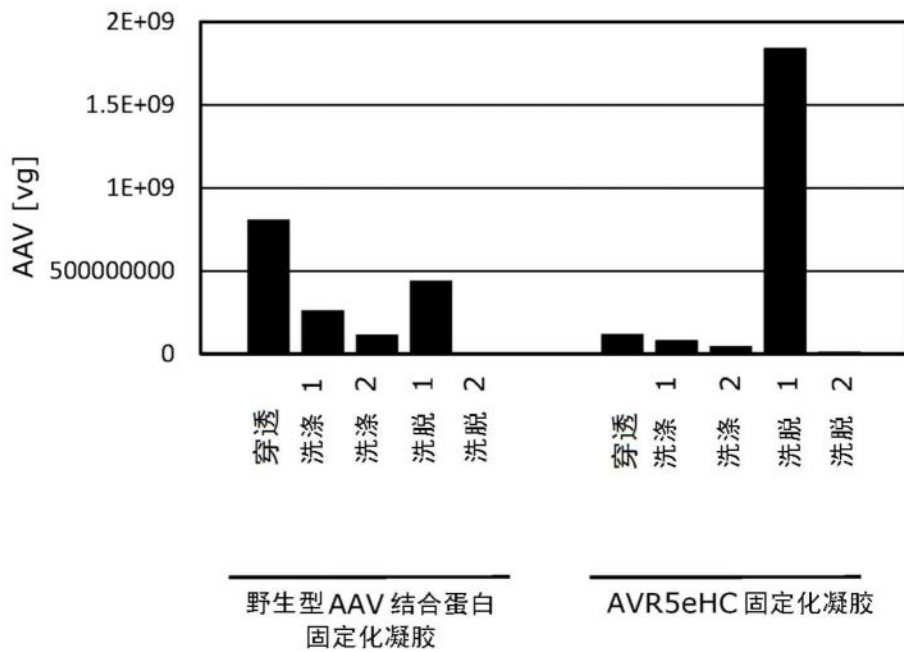


图4

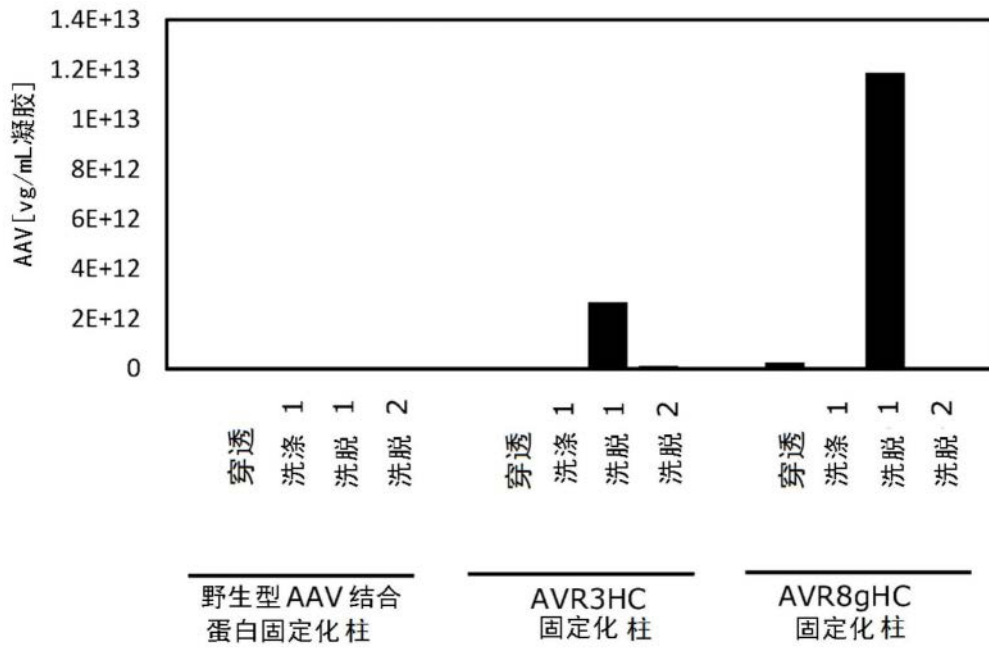


图5