



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110770346 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 12

(21) 申请号 201880031964.9

(22) 申请日 2018.03.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110770346 A

(43) 申请公布日 2020.02.07

(30) 优先权数据
62/471762 2017.03.15 US
62/520901 2017.06.16 US
62/630558 2018.02.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.11.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/022725 2018.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/170310 EN 2018.09.20

(73) 专利权人 北卡罗来纳—查佩尔山大学
地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 R.J.萨穆尔斯基 C.李

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

专利代理师 甘霖 黄希贵

(51) Int.Cl.
C12N 15/34 (2006.01)
C12N 15/869 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2004/099423 A1, 2004.11.18
EP 0766569 B1, 2006.01.11
WO 2012/112578 A2, 2012.08.23
US 2015/0023924 A1, 2015.01.22

审查员 滕文静

权利要求书1页 说明书130页
序列表75页 附图60页

(54) 发明名称

多倍体腺相关病毒载体及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了多倍体腺相关病毒(AAV)衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,其中所述衣壳蛋白VP2来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP3,其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种第二AAV血清型,并且其中在任何组合中所述第一AAV血清型中的至少一种不同于所述第二AAV血清型中的至少一种,并且不同于所述第三AAV血清型中的至少一种。

1. 一种产生腺相关病毒 (AAV) 病毒粒子的方法, 所述方法包括在用于形成 AAV 病毒粒子的条件下使细胞与第一核酸序列和第二核酸序列接触, 其中所述 AAV 病毒粒子至少由 AAV8 病毒蛋白 1 (VP1) 和 AAV2 病毒蛋白 3 (VP3) 病毒结构蛋白形成, 其中所述第一核酸编码仅来自 AAV8 血清型的 VP1 但不能表达 VP3, 并且所述第二核酸序列编码仅来自 AAV2 血清型的 VP3 且进一步不能表达 VP1, 并且其中所述 AAV 病毒粒子包含仅来自 AAV8 血清型的 VP1 和仅来自 AAV2 血清型的 VP3, 并且其中如果病毒蛋白 2 (VP2) 被表达, 则其仅来自 AAV8 血清型。

2. 通过权利要求 1 的方法产生的 AAV 病毒粒子。

3. 一种腺相关病毒 (AAV) 衣壳, 其包含 AAV8 病毒蛋白 1 (VP1)、AAV8 病毒蛋白 2 (VP2)、和 AAV2 病毒蛋白 3 (VP3), 其中所述衣壳中的 VP1 和 VP2 仅来自 AAV8, 并且所述衣壳中的 VP3 仅来自 AAV2。

4. 一种腺相关病毒 (AAV) 载体颗粒, 其包含权利要求 3 所述的 AAV 衣壳和异源核酸分子。

5. 权利要求 4 所述的 AAV 载体颗粒在制备用于递送编码多肽或功能性 RNA 的异源核酸分子以治疗和/或预防受试者的病症或疾病的药物中的用途。

6. 一种组合物, 所述组合物包含在药学上可接受的载体中的权利要求 3 的 AAV 衣壳和/或权利要求 4 的 AAV 载体颗粒。

7. 一种制备腺相关病毒 (AAV) 载体的方法, 所述方法包括:

a) 用一种或多种质粒转染宿主细胞, 所述质粒组合提供组装 AAV 颗粒所需的所有功能和基因, 其中衣壳蛋白仅由一种或多种仅表达 AAV8 病毒蛋白 1 和病毒蛋白 2 (VP1/VP2) 以及仅表达 AAV2 病毒蛋白 3 (VP3) 的质粒编码;

b) 将一种或多种核酸构建体引入包装细胞系或生产细胞系中, 以组合提供组装 AAV 颗粒所需的所有功能和基因, 包括辅助病毒序列, 其中衣壳蛋白仅由一种或多种仅表达 AAV8 VP1/VP2 和 AAV2 VP3 的核酸构建体编码;

c) 将一个或多个重组杆状病毒载体引入宿主细胞, 所述重组杆状病毒载体提供组合的组装 AAV 颗粒所需的所有功能和基因, 其中衣壳蛋白仅由一种或多种仅表达 AAV8 VP1/VP2 和 AAV2 VP3 的质粒编码; 和/或

d) 将一种或多种重组疱疹病毒载体引入宿主细胞, 所述载体组合提供组装 AAV 颗粒所需的所有功能和基因, 其中衣壳蛋白仅由一种或多种仅表达 AAV8 VP1/VP2 和 AAV2 VP3 的质粒编码。

8. 权利要求 7 所述的方法, 其中所述辅助病毒序列包含来自腺病毒、疱疹病毒、甲病毒、牛痘病毒、痘病毒、杆状病毒或其组合的序列。

9. 权利要求 7 或 8 所述的方法, 其中所述辅助病毒序列包含在质粒、病毒载体、噬菌体、酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或其组合内。

10. 通过权利要求 7-9 中任一项的方法产生的 AAV 载体。

多倍体腺相关病毒载体及其制备和使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. § 119(e)要求于2017年3月15日提交的美国临时申请序列号62/471,762、于2017年6月16日提交的美国临时申请序列号62/520,901、以及于2018年2月14日提交的美国临时申请序列号62/630,558的利益,所述美国临时申请各自的全部内容并入本文作为参考。

[0003] 关于序列表的电子提交的声明

[0004] 以ASCII文本格式的序列表,根据37 C.F.R. § 1.821提交,名称为5470-786W0_ST25.txt,大小为102,196字节,于2018年3月15日生成并经由EFS-Web提交,代替纸质拷贝提供。该序列表为了其公开内容在此并入本说明书作为参考。

发明领域

[0005] 本发明涉及与表面蛋白结合的来自腺相关病毒(AAV)颗粒、病毒粒子、病毒衣壳和病毒载体的修饰的衣壳蛋白,用于增强包含其的。特别地,本发明涉及修饰的AAV衣壳蛋白和包含其的衣壳,其可以掺入病毒载体内,以组合病毒载体中的转导以及减少的抗原性、向性和/或其它期望的表型特点。

[0006] 发明背景

[0007] 腺相关病毒(AAV)载体已用于100多项临床试验中,具有很有希望的结果,特别是用于治疗失明和血友病B。AAV是非致病性的,具有广泛的组织向性,并且可以感染分裂细胞或非分裂细胞。更重要的是,AAV载体转导已在临床前试验和临床试验中诱导长期治疗性转基因表达。目前,存在被分离用于基因递送的12种AAV血清型。在其中,AAV8已显示为对于小鼠肝靶向最优。由于在具有FIX缺乏的临床前动物中的广泛研究,在患有血友病B的患者中已使用AAV2和AAV8进行了I/II期临床试验。来自这些试验的结果是非常有希望的;然而,即使使用相同的载体剂量/kg,来自接受AAV/FIX的患者的FIX表达也与动物模型中已实现的结果不成比例。当 1×10^{11} 个编码FIX的AAV8颗粒用于FIX敲除小鼠中用于全身施用,在血液检测到160%的正常水平FIX。然而,当施用 2×10^{11} 个AAV8/FIX颗粒时,在灵长类动物中仅达到40%的FIX,并且在人中发现少于1%的FIX。这些物种中的AAV载体转导后不一致的FIX表达可能是由于不同物种中改变的肝细胞向性。来自AAV FIX临床试验的另一个有趣发现是衣壳特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答,其根除AAV转导的肝细胞,导致治疗失败。这种现象尚未在AAV递送后的动物模型中得到证实,其指出在临床前和临床研究之间的另一种变化。当使用高得多剂量的AAV/FIX载体时,使用AAV2或AAV8在两个临床试验中检测到FIX表达;然而,血液FIX水平分别在注射后第4周或第9周时降低。进一步的研究提示,AAV载体感染引发衣壳特异性CTL应答,其看起来消除了AAV转导的肝细胞。因此,来自这些临床试验的结果强调了探讨用于增强AAV转导而不增加载体衣壳负荷的有效方法的必要性。减少AAV衣壳抗原的任何载体改善也影响令人畏缩的载体生产关注,并且是可行的基因治疗药物开发的受欢迎的补充物。

[0008] 腺相关病毒(AAV),需要辅助病毒用于有效复制的非致病性依赖性细小病毒,因其

安全性和简单性用作用于基因治疗的病毒载体。AAV具有广泛的宿主和细胞类型向性,能够转导分裂细胞和非分裂细胞两者。迄今为止,已鉴定了12种AAV血清型和多于100种变体。不同血清型衣壳在组织或培养细胞中具有不同的感染性,其依赖于在细胞表面上或细胞内运输途径本身的主要受体和共受体。已确定了一些AAV血清型的主要受体,例如关于AAV2和AAV3的硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)以及关于AAV5的N联唾液酸,而AAV7和AAV8的主要受体尚未得到鉴定。有趣的是,培养细胞中的AAV载体转导效率可能并不总是转化为动物中的那种。例如,AAV8在小鼠肝中诱导比其它血清型高得多的转基因表达,但在培养细胞系中则不是。

[0009] 在12种血清型中,几种AAV血清型和变体已用于临床试验中。作为第一个表征的衣壳,AAV2已被最广泛地用于基因递送中,例如用于利伯先天性黑蒙的RPE 65和用于血友病B的因子IX(FIX)。尽管AAV载体的应用已证明是安全的并且已在这些临床试验中实现了疗效,但AAV载体的主要挑战之一是它的低感染性,其需要相对大量的病毒基因组。AAV8载体是另一种载体,其已用于患有血友病B的患者中的几项临床试验中。来自AAV8/FIX肝靶向递送的结果已证实在小鼠、非人灵长类动物和人之间的转基因表达中存在明显的物种特异性差异。虽然 10^{10} vg具有FIX基因的AAV8在FIX敲除小鼠中可以达到超生理水平(>100%)的FIX表达,但仅高剂量(2×10^{12} vg/kg体重)可以在人中诱导可检测的FIX表达。基于上述这些结果,仍然需要开发增强AAV转导的有效策略。

[0010] 大多数人已自然暴露于AAV。结果,大部分人群已在血液及其它体液中发展针对AAV的中和抗体(Nab)。Nab的存在对未临床临床试验中更广泛的AAV应用提出了另一个重大挑战。已探讨了许多方法以增强AAV转导或逃避Nab活性,尤其是基于合理设计和定向进化的AAV衣壳的遗传修饰。尽管几种AAV突变体已证实在体外或在动物模型中的高转导,连同逃避Nab的能力,但衣壳组合物的修饰提供了改变亲本AAV的细胞向性的能力。

[0011] 本发明解决了本领域对于具有组合期望特点的AAV载体的需要。

[0012] 发明概述

[0013] 在一个方面,本发明提供了包含表面结合蛋白的腺相关病毒(AAV)颗粒,其中与AAV颗粒的表面结合的蛋白质选自:(a)纤维蛋白原 α 链;(b)纤维蛋白原 β 链;(c)纤维蛋白原 γ 链;(d)纤连蛋白;(e)纤溶酶原;(f)血管性血友病因子;(g) α -1-酸性糖蛋白;(h)血小板因子4;(i)冷沉淀物;(j)因子VIII;(k)因子XIII;(l)白蛋白(例如人血清白蛋白,或来自任何其它物种例如犬、马、牛、猪的白蛋白);(m)载脂蛋白B(ApoB),(n)载脂蛋白E(ApoE);(o)转铁蛋白;(p)低密度脂蛋白;(q)免疫球蛋白;(r)任何其它血清蛋白质和融合血清蛋白质,其增加在细胞表面上的AAV结合和/或增强AAV细胞内运输;以及(s)上述(a)-(r)的任何组合。

[0014] 我们先前的研究已显示来自不同AAV血清型(AAV1至AAV5)的衣壳是相容的,以组装单倍体AAV衣壳,并且大多数分离的AAV单克隆抗体识别位于不同AAV亚基上的几个位点。另外,来自嵌合AAV衣壳的研究证实,通过引入关于主要受体的结构域或来自其它血清型的组织特异性结构域,可以实现更高的转导。将AAV9聚糖受体引入AAV2衣壳内增强AAV2转导。将来自AAV6的100氨基酸(aa)结构域取代到AAV2衣壳内增加了肌肉向性。我们推测由来自两种或更多种AAV血清型的衣壳组成的多倍体AAV载体可以利用来自个别血清型的优点用于更高转导而不消除来自亲本的向性。此外,这些多倍体病毒可能具有逃避由Nab中和的能

力,因为大多数Nab识别构象表位并且多倍体病毒体可能已改变其表面结构。

[0015] AAV2和AAV8已用于临床应用。在这项研究中,我们首先表征来自AAV2和AAV8的单倍体AAV病毒的体外和体内转导效率,以及Nab逃避能力。我们发现单倍体载体的病毒产率没有减弱,并且肝素结合概况与AAV2衣壳亚基蛋白的掺入有关。单倍体载体AAV2/8在小鼠肌肉和肝中起始更高的转导。当应用于具有FIX缺乏的小鼠模型时,与AAV8组相比,在单倍体载体处理的小鼠中观察到更高的FIX表达和改善的出血表型校正。重要的是,单倍体病毒AAV2/8对A20具有低结合亲和力,并且能够逃避来自抗AAV2血清的中和。下一个单倍体病毒AAV2/8/9由三种血清型(AAV2、8和9)的衣壳制备。已证实单倍体AAV2/8/9的中和抗体逃避能力针对用亲本血清型免疫的血清得到显著改善。

[0016] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了腺相关病毒(AAV)衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP3,其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0017] 在一些实施方案中,本发明的衣壳包含衣壳蛋白VP2,其中所述衣壳蛋白VP2来自一种或多种第三AAV血清型,其中所述一种或多种第三AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。

[0018] 在一些实施方案中,本发明的衣壳包含衣壳蛋白VP1.5,其中所述衣壳蛋白VP1.5来自一种或多种第四AAV血清型,其中所述一种或多种第四AAV中的至少一种血清型在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳蛋白可以包含衣壳蛋白VP2。

[0019] 本发明还提供了AAV衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP2,其中所述衣壳蛋白VP2来自一种或多种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0020] 在一些实施方案中,衣壳包含衣壳蛋白VP3,其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种第三AAV血清型,其中所述一种或多种第三AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳可以包含衣壳蛋白VP1.5。

[0021] 本发明进一步提供了腺相关病毒(AAV)衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP1.5,其中所述衣壳蛋白VP1.5来自一种或多种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0022] 在另外的实施方案中,本发明提供了病毒载体,其包含:(a)本发明的AAV衣壳;以及(b)包含至少一个末端重复序列的核酸,其中所述核酸被AAV衣壳包入衣壳(encapsidated)。病毒载体可以是AAV颗粒,并且本发明的衣壳蛋白、衣壳、病毒载体和/或AAV颗粒可以存在于进一步包含药学上可接受的载体的组合物中。

[0023] 本文进一步提供的是制备包含前述权利要求中任一项的AAV衣壳的AAV颗粒的方法,其包括:(a)用一种或多种质粒转染宿主细胞,所述质粒组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因;(b)将一种或多种核酸构建体引入包装细胞系或生产细胞系内,以组合提供

组装AAV颗粒所需的所有功能和基因；(c)将一种或多种重组杆状病毒载体引入宿主细胞内，所述重组杆状病毒载体组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因；和/或(d)将一种或多种重组疱疹病毒载体引入宿主细胞内，所述重组疱疹病毒载体组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因。

[0024] 在进一步的实施方案中，本发明提供了向细胞施用核酸的方法，该方法包括使细胞与本发明的病毒载体和/或本发明的组合物接触。

[0025] 本文还提供的是向受试者递送核酸的方法，该方法包括向受试者施用本发明的病毒载体和/或组合物。

[0026] 另外，本文提供的是本发明的衣壳蛋白、衣壳、病毒载体、AAV颗粒和/或组合物，用作病症或疾病的有益治疗中的药剂。

[0027] 在下文阐述的本发明的描述中更详细地解决了本发明的这些和其它方面。

[0028] 附图简述

[0029] 图1：血清对AAV转导的增强作用。(a)人血清增强来自不同血清型的AAV转导。使 1×10^8 个AAV/luc载体颗粒与1:500稀释的血清或PBS一起在4℃下温育2小时。在MOI为5的腺病毒d1309的存在下，使用AAV载体和血清的混合物转导在48孔板中的 1×10^5 个Huh7细胞。24小时后，分析来自细胞裂解产物的萤光素酶活性。通过与PBS比较，计算来自血清温育的转基因表达的增加倍数。(b) AAV与人血清的温育时间对增强的转导的作用。在ad d1309的存在下，使 1×10^8 个AAV8/luc颗粒与以1:100稀释度的人血清或PBS一起在4℃下温育不同的时间段。24小时后，从细胞裂解产物中测量萤光素酶表达。(c)全身施用后增强的AAV转导。使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与以不同稀释度的人血清一起在4℃下温育2小时。经由眼眶后注射将混合物施用到成年雌性C57BL小鼠内。在AAV注射后第3天时执行成像5分钟。上图：萤光素酶转基因表达概况的代表性活动物生物发光图像。下图：在全身施用后来自6只小鼠的增强AAV转导的萤光素酶转基因表达的定量。(d)在肌肉注射后增强的AAV转导。将来自(c)的AAV8/luc与人血清的混合物在PBS中稀释至 1×10^9 个颗粒/200 μ l，并且注射到小鼠后腿肌肉内。在注射后第2周时，获取成像5分钟。正面朝上：左腿-AAV8 + 人体血清，右腿-AAV8 + PBS。上图：代表性成像。下图：在肌肉注射后来自6只小鼠的增强AAV转导的数据。通过来自HSA温育的AAV转导与来自PBS处理的AAV的转导来计算转导的增加倍数。

[0030] 图2：人白蛋白对AAV8转导的作用。(a)转导增强与AAV和血清的直接相互作用有关。使AAV8/luc病毒与以1:100稀释度的人血清或PBS一起在4℃下温育2小时，然后就在加入与PBS预温育的AAV8之前，使用混合物在具有FBS的培养基、无血清培养基或无血清培养基加上人血清中转导Huh7细胞。24小时后，计算转基因表达的增加倍数。(b) AAV8与人白蛋白的相互作用。使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与人血清或PBS一起在4℃下温育2小时，然后将病毒和人血清或PBS的混合物施加于前Ig结合柱。在洗涤后，洗脱柱结合蛋白用于AAV8基因组拷贝数分析。(c)用白蛋白耗尽的血清的AAV8转导。使 1×10^8 个AAV8/luc颗粒与以不同稀释度的人血清或白蛋白耗尽的血清或者PBS一起在4℃下温育2小时。然后使用混合物感染在无血清培养基中的Huh7细胞。两天后，检测来自细胞裂解产物的萤光素酶，并且在与PBS相比时，计算转基因表达的增加倍数。(d)重组人白蛋白增强AAV8转导。使AAV8/luc与重组人白蛋白(50mg/ml)或以不同稀释度的人血清或PBS一起温育。48小时后检测转基因表达，并且在与PBS比较时，计算转基因表达的增加倍数。

[0031] 图3:临床级人白蛋白对AAV8转导的作用。(a) Huh7细胞中来自临床级HSA的增强AAV8转导。使 1×10^8 个AAV8/luc颗粒与5% HSA或以不同稀释度的人血清或PBS一起在4℃下温育2小时。然后使用混合物转导Huh7细胞;48小时后,测定萤光素酶表达。(b)在全身施用后来自临床级HSA的增强AAV8转导。使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与以不同稀释度的25% HSA一起温育,然后经由眼眶后注射到成年雌性C57BL小鼠内。在第7天时获取成像。上图:代表性动物图像。下图:在全身施用后来自6只小鼠的增强AAV转导的数据。(c)在肌肉注射后来自临床级HSA的增强AAV转导。使 1×10^9 个AAV8/luc颗粒与以不同稀释度的25% HSA一起温育,然后注射到C57BL小鼠的肌肉内。一周后,执行成像。上图:代表性动物图像。下图:在肌肉注射后来自6或7只小鼠的增强AAV转导的数据。

[0032] 图4:AAV载体与病毒冷冻前或解冻后的HAS一起温育具有类似的增强效应。(a) Huh7细胞中的增强转导。在病毒冷冻之前或在病毒解冻之后,使 1×10^8 个AAV/luc颗粒与以不同稀释度的临床级HSA一起在4℃下温育2小时,然后加入Huh7细胞中。48小时后,测量细胞裂解产物中的萤光素酶活性。(b)和(c)增强的肌肉转导。将 1×10^9 个AAV8/luc颗粒直接注射到小鼠的肌肉内。在注射后第7天时,进行小鼠成像(b)(左图),并且计算转基因表达的增加倍数(c)(右图,n=6)。正面朝上:左腿-HSA,右腿-PBS。

[0033] 图5:在透析之前向病毒制剂中添加HSA不损害转导增强。将由CsCl或柱纯化的AAV8/luc病毒与1%的25%HAS混合,然后施加用于针对PBS透析。在透析后,冷冻AAV病毒;两天后,执行体内转导测定。对于肝转导,经由眼眶后注射施用 1×10^{10} 个AAV/luc颗粒;在AAV注射后第3天时,对于5只小鼠获取成像(a)。对于肌肉转导,使用 1×10^9 个AAV/luc颗粒;在注射后第7天时,对于4只小鼠获取成像(a)。正面朝上:左腿-HSA,右腿-PBS。还执行了成像的定量(b)。

[0034] 图6:人白蛋白增加AAV结合能力。(a) HSA增加AAV病毒与Huh7细胞的结合。使AAV病毒与HAS一起在4℃下温育2小时,然后在4℃下加入 1×10^6 Huh7细胞中共5或15分钟。在洗涤5次后,提取总DNA用于通过q-PCR的AAV基因组拷贝数分析。(b)肝转导的成像。经由眼眶后静脉将 1×10^{11} 个AAV8/luc颗粒施用到小鼠内。24小时后,进行成像并计算成像的定量(c)。48小时后,对小鼠实施安乐死并收获肝组织;测量肝组织裂解产物中的萤光素酶活性(d),并且分析AAV基因组拷贝数(e)。在第一个24小时期间,在AAV注射后15分钟、2小时和24小时收集来自血液的血浆,并且分析AAV基因组拷贝数(f)。数据代表4只小鼠的平均值和标准差。(*)指示当用HSA处理的肝中的AAV基因组拷贝数与用PBS进行比较时,具有 $p < 0.05$ 的统计学显著差异。

[0035] 图7:人白蛋白与AAV的相互作用不阻断Nab活性。首先使AAV8/luc载体与人白蛋白一起在4℃下温育2小时,然后在4℃下再加入以不同稀释度的人IVIG共2小时。将混合物加入Huh7细胞中。在48小时,测量来自细胞裂解产物的转基因表达并计算Nab滴度。(a)人白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用对Nab活性的作用。(b)IVIG对人白蛋白增强AAV转导的作用。

[0036] 图8:使用人白蛋白温育的AAV载体改善血友病B的表型校正。使 2×10^9 个AAV8/FIX-opt载体颗粒与人HSA或PBS一起在4℃下温育2小时,然后经由尾静脉注射将AAV载体施用到成年雄性FIX缺陷小鼠内。在AAV注射后,在指定时间点收集血液用于FIX表达(a)和功能测定(b)。在AAV注射后第6周时,将小鼠应用于体内出血测定(c)。(*)指示关于HSA处理的小鼠和PBS小鼠之间的失血的统计学显著性差异,其中 $p < 0.05$ 。数据基于来自6至8只小鼠的平均

值和标准差。

[0037] 图9:小鼠血清增强体内AAV8转导。(a)在全身施用后增强的AAV转导。使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与以不同稀释度的小鼠血清一起在4℃下温育2小时。经由眼眶后注射将混合物施用到C57BL小鼠内。在AAV注射后第3天时进行成像5分钟。(b)在肌肉注射后增强的AAV转导。将与小鼠血清一起温育的 1×10^9 个AAV8颗粒注射到小鼠后腿肌肉内。在注射后第2周时,获取成像5分钟。正面朝上:左腿-AAV8 + 人血清,右腿-AAV8 + PBS。通过来自HSA温育的AAV的转导与来自PBS处理的AAV的转导来计算转导的增加倍数。上图:代表性成像。下图:来自3或4只小鼠的增强AAV转导的数据。

[0038] 图10:来自犬和灵长类动物的血清增强Huh7细胞中的AAV转导。使 1×10^8 个AAV/luc载体颗粒与来自6只犬(a)、或23只灵长类动物(b)、或胎牛(c)的1:500稀释的血清、或者PBS一起在4℃下温育2小时。在腺病毒d1309的存在下,应用AAV载体和血清的混合物以转导Huh7细胞。在24小时后,分析来自细胞裂解产物的萤光素酶活性。通过与PBS的比较计算来自血清温育的转基因表达的增加倍数。

[0039] 图11:白蛋白耗尽的血清中的人白蛋白浓度。

[0040] 图12:rHSA增强体内AAV8转导。(a)在全身施用后来自rHSA的增强AAV8转导。经由眼眶后注射,将与rHSA预温育的 1×10^{10} 个AAV8颗粒施用到C57BL小鼠内。在注射后第3天时获取图像。(b)在肌肉注射后来自rHSA的增强AAV转导。将与rHSA温育的 1×10^9 个AAV8/luc颗粒注射到后腿肌肉内。在注射后第2周时,进行成像。上图:代表性成像。下图:来自3或4只小鼠的增强AAV转导的数据。

[0041] 图13:具有临床级HSA的长期增强的AAV转导。在AAV8肌肉施用后,在指定的时间点执行成像。左图:代表性成像。右图:在肌肉注射后来自3或4只小鼠的增强AAV转导的数据。

[0042] 图14:临床级的人白蛋白对来自其它血清型的AAV转导的作用。(a)HSA增强Huh7细胞中的AAV2转导。使 1×10^8 个AAV2/luc颗粒与以不同稀释度的人血清或5%临床级HAS一起在4℃下温育2小时,然后加入Huh7中。48小时后,检测细胞裂解产物中的萤光素酶活性。(b)HSA增强Huh7细胞(c)和(d)中的AAV9转导。HSA增强来自AAV2和AAV9的C57BL小鼠中的肝或肌肉转导。来自AAV转导的成像(c)和成像的定量(d)。对于肝转导,经由眼眶后注射(n=4)施用与1倍HSA温育的 1×10^{10} 个AAV/luc颗粒,在AAV注射后第7天(AAV2)或第3天(AAV9)时获取成像。对于肌肉转导,使用与1倍HSA温育的 1×10^9 个AAV/luc颗粒(n=3);在注射后第7天执行成像。

[0043] 图15:LDL和转铁蛋白对体外AAV转导的作用。使10000个AAV8/luc载体颗粒/细胞与以不同稀释度的正常生理血浆浓度的LDL或转铁蛋白一起在4℃下温育2小时,然后加入48孔板中的Huh7(A)或293T(B)细胞。48小时后,裂解细胞并收获上清液用于萤光素酶活性分析。数据代表来自三次独立实验的平均值和标准差。

[0044] 图16:关于LDL和转铁蛋白的阻断受体影响小鼠中的AAV8转导。小鼠经由眼眶后静脉用0.5 mg LDL或1mg乳铁蛋白进行注射,并且5分钟后,全身施用 1×10^{10} 个AAV8/luc载体颗粒。在AAV注射后第1周时,获取小鼠成像(A)并计算肝中的转基因表达(B)。数据代表5只小鼠的平均值和标准差。

[0045] 图17:不同剂量的LDL或转铁蛋白对AAV8肝转导的作用。使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与以不同稀释度的正常生理血浆浓度的LDL或转铁蛋白一起在4℃下温育2小时,然后经由

眼眶后注射到C57BL小鼠内。在AAV注射后第3天时,对小鼠成像(A和C),并且定量肝中的转基因萤光素酶表达(B和D)。数据代表来自5只小鼠的平均值和标准差。

[0046] 图18:LDL和转铁蛋白增加AAV结合能力。使AAV病毒与血清蛋白质一起在4℃下温育1小时,然后在4℃下加入 1×10^6 个Huh7细胞或293T细胞中共2小时。在洗涤5次后,提取总DNA用于通过q-PCR的AAV基因组拷贝数分析。

[0047] 图19:在与LDL或转铁蛋白温育的AAV8的全身施用后,血液中的AAV载体清除的动力学。使 1×10^{11} 个AAV8/luc颗粒与500ug LDL或1 mg转铁蛋白一起在4℃下温育1小时,然后经由眼眶后注射到C57BL小鼠内。在AAV注射后第2天时,对小鼠成像(A)并且执行肝中的转基因萤光素酶表达的定量(B)。在指定的时间点,收获小鼠血浆并且通过定量PCR(C)检测AAV基因组拷贝数。数据代表5只小鼠的平均值和标准差。

[0048] 图20:LDL或转铁蛋白对AAV8载体生物分布的作用。在AAV施用后第5天时处死来自图5的小鼠,并且收获组织用于体外萤光素酶活性测定(A)和基因组拷贝数分析(B)。

[0049] 图21:血清蛋白质组合对体外AAV转导的作用。使10000个AAV8/luc载体颗粒/细胞与LDL或转移蛋白或白蛋白和两种蛋白质或三种蛋白质的组合一起在4℃下温育2小时,然后应用于293T或Huh7细胞。48小时后,分析来自细胞裂解产物的上清液的萤光素酶活性。数据代表三次独立实验的平均值和标准差。

[0050] 图22:血清蛋白质组合对小鼠中的AAV肝转导的作用。使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与以生理浓度的100倍稀释的个别血清蛋白质或所有三种蛋白质(LDL、转铁蛋白和白蛋白)的组合一起在4℃下温育2小时,然后注射到小鼠内。在AAV注射后第3天和第7天时,进行成像(A)并且分析肝转基因表达(B)。结果表示来自5只小鼠的平均值和标准差。

[0051] 图23:AAV8病毒粒子上的血清蛋白质的竞争性结合分析。对于白蛋白的竞争性测定(A),使 1×10^{10} 个AAV8/luc载体颗粒与以不同稀释度的白蛋白以及以100倍稀释的LDL、转铁蛋白或ApoB一起在4℃下温育1小时。接下来,将针对ApoB和转铁蛋白的特异性抗体加入相应的管中用于免疫沉淀。在下拉后,通过定量PCR测定病毒滴度。对于阻断测定(B),使AAV8/luc载体与以不同稀释度的白蛋白一起在4℃下温育30分钟,然后加入以100倍稀释的LDL或转铁蛋白或ApoB另外1小时。在下拉后,测定病毒滴度。结果表示三次单独实验的平均值和标准差。

[0052] 图24:纤维蛋白原增加AAV9转导。使 1×10^{10} 个AAV9/luc颗粒与3 mg纤维蛋白原一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后静脉注射到C57BL小鼠内。在AAV注射后第7天时,对小鼠成像(A)并且定量肝中的转基因萤光素酶表达(B)。数据代表4只小鼠的平均值和标准差。

[0053] 图25:在与纤维蛋白原温育的AAV9的全身施用后AAV载体的生物分布。在AAV施用后第10天时处死来自图1的小鼠,并且收获组织用于体外萤光素酶活性测定(A)和基因组拷贝数分析(B)。

[0054] 图26:纤维蛋白原剂量对AAV9转导的作用。使 1×10^{10} 个AAV9/luc颗粒与以不同稀释度的纤维蛋白原一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后注射施用到C57BL小鼠内。在AAV注射后第5天时,对小鼠成像(A)并且定量肝中的转基因萤光素酶表达(B)。数据代表4只小鼠的平均值和标准差。

[0055] 图27:在与纤维蛋白原温育的AAV9的全身施用后,血液中的AAV载体清除的动力学。使 2×10^{11} 个AAV9/luc颗粒与1mg纤维蛋白原一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后注

射施用到C57BL小鼠内。在AAV注射后第2天时,执行小鼠成像(A)并且进行肝中的转基因萤光素酶表达的定量(B)。在指定的时间点,收获小鼠血浆并且通过定量PCR检测AAV基因组拷贝数(C)。数据代表4只小鼠的平均值和标准差。

[0056] 图28:其它血清蛋白质增强AAV9肝转导。使 1×10^{10} 个AAV9/luc颗粒与以生理浓度剂量的不同蛋白质一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后静脉注射到C57BL小鼠内。在AAV注射后第3天时,执行小鼠成像(A)并且定量肝中的转基因萤光素酶表达(B)。数据代表5只小鼠的平均值和标准差。

[0057] 图29:其它血清蛋白质增强AAV9脑转导。来自图28的小鼠在AAV施用后第7天时成像(A),并且定量肝(B)和脑(C)中的转基因萤光素酶表达。在成像后,处死小鼠。在肝(D)和脑(E)中检测AAV基因组拷贝数。

[0058] 图30:在不同稀释度的生理血液浓度下的其它血清蛋白质对AAV9转导的作用。使 1×10^{10} 个AAV9/luc颗粒与以不同稀释度的其它血清蛋白质一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后注射施用到C57BL小鼠内。在AAV注射后第3天时,对小鼠进行成像(A),并且定量肝中的转基因萤光素酶表达(B)。数据代表来自5只小鼠的平均值和标准差。

[0059] 图31:通过与冷沉淀物的相互作用增强AAV9转导。使 1×10^{10} 个AAV9/luc颗粒与以不同稀释度的冷沉淀物一起在4℃下温育2小时,然后全身施用到C57BL小鼠内。在AAV注射后第3天时,对小鼠成像(A)并且定量肝中的转基因萤光素酶表达(B)。数据代表5只小鼠的平均值和标准差。

[0060] 图32:白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用对中和抗体A20抑制活性的作用。

[0061] 图33:HSA/AAV复合物的稳定性。(A)复合物在NaCl的不同浓度下的稳定性。(B)复合物在不同pH下的稳定性。

[0062] 图34:As₂O₃和蛋白酶体抑制剂对AAV2转导的作用。Balb/C小鼠同时接受 1×10^{11} 个AAV2/luc颗粒和5mg As₂O₃/kg (A)共5天,或0.5 mg硼替佐米/kg、1 mg卡非佐米/kg (B)。在AAV注射后第7天时,通过活体成像测定转导。

[0063] 图35:HSA增强AAV转导。(A)质谱法分析的结果。(B)AAV2与人白蛋白的相互作用。(C)用白蛋白耗尽的血清降低的AAV转导。(D)重组人白蛋白增强Huh7细胞中的AAV2转导。(E)在Huh7细胞中来自rHSA的增强AAV8转导。(F)在全身施用后来自rHSA的增强肝AAV8转导。上图:成像。下图:在全身注射后的增强AAV转导的数据。(G)在肌肉注射后来自rHSA的增强AAV8转导。上图:成像。正面朝上:左腿-rHSA,右腿-PBS。下图:在肌肉注射后的增强AAV转导的数据。

[0064] 图36:在AAV0VA转导后的衣壳抗原呈递在体内是剂量响应的。将各种剂量的AAV20VA/AAT载体静脉内注射到C57BL/6小鼠内,并且3天后,转移CFSE标记的OT-1 T细胞。在转移后第10天时,经由流式细胞术评价脾中的OT-1T细胞增殖。(A)代表性流式细胞术直方图。(B)4只小鼠的平均T细胞增殖和标准差。(C)平均增殖指数(PI)和标准差。与没有AAV处理的对照小鼠相比,** $p < 0.01$,* $p < 0.05$ 。

[0065] 图37:在小鼠中的AAV80VA转导后的衣壳抗原呈递的动力学。将AAV0VA/AAT病毒颗粒(1×10^{11})静脉内注射到C57BL/6小鼠内,并且在指定的时间点,转移 5×10^6 个CFSE标记的OT-1T细胞。在转移10天后,通过流式细胞术测量CD8⁺ OT-1 T细胞的增殖。(A)关于4只小鼠的平均T细胞增殖和标准差。(B)平均增殖指数(PI)和标准差。与没有AAV处理的对照小鼠相

比, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ 。

[0066] 图38:通过VIPR抑制OVA表位呈递。

[0067] 图39:在IVIG的存在下,从小鼠肝中分离的突变体。

[0068] 图40:肽对Nab活性的抑制。通过来自AAV2免疫的C57/BL或Balb/C小鼠的预定稀释度的A20和血浆与肽一起温育执行Nab测定,然后与AAV2/GFP载体一起温育。在对RC32细胞的转导后,收获细胞并且应用于流式细胞术分析。

[0069] 图41:人IVIG对AAV8肝转导的作用。使 1×10^{10} 个AAV8/luc载体颗粒与以不同浓度的IVIG或PBS一起温育,然后经由眼眶后注射施用到C57BL/6小鼠中。一周后,执行成像并且分析肝区域中的萤光素酶表达。(a)来自小鼠的萤光素酶表达的成像($n=4$)。(b)使用人IVIG抑制AAV8全身转导。数据代表四只小鼠的平均值和标准差。

[0070] 发明详述

[0071] 现在将参考附图描述本发明,在所述附图中显示了本发明的代表性实施方案。然而,本发明可以以不同的形式实施,并且不应该被解释为限于本文阐述的实施方案。相反,提供这些实施方案使得本公开内容将是彻底和完整的,并且向本领域技术人员充分传达本发明的范围。

[0072] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。本文的本发明描述中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不预期是本发明的限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、登录号和其它参考文献都整体引入本文作为参考。

[0073] 在本发明的说明书和所附权利要求中,AAV衣壳蛋白中的所有氨基酸位置的指名是关于VP1衣壳亚基编号(天然AAV2 VP1衣壳蛋白:GenBank登录号AAC03780或YP680426)。本领域技术人员将理解,如果插入AAV *cap*基因内,则本文所述的修饰可以导致VP1、VP2和/或VP3衣壳亚基的修饰。可替代地,衣壳亚基可以独立表达,以在仅一个或两个衣壳亚基(VP1、VP2、VP3、VP1 + VP2、VP1 + VP3或VP2 + VP3)中实现修饰。

[0074] 定义

[0075] 下述术语用于本文的说明书和所附权利要求中:

[0076] 除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”预期包括复数形式。

[0077] 此外,当提及可测量值如多核苷酸或多肽序列的长度、剂量、时间、温度等等的量时,如本文使用的术语“约”意欲涵盖指定量的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0078] 另外,如本文使用的,“和/或”指的是且涵盖一个或多个相关所列项目的任何和所有可能组合,以及当在以替代方案(“或”)解释时组合的缺乏。

[0079] 如本文使用的,过渡短语“基本上由……组成”意指权利要求的范围应被解释为涵盖权利要求中所述的指定材料或步骤,以及不会实质性影响本发明的基本和新型特征的材料或步骤。参见 *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (重点在原文中);还参见MPEP § 2111.03。因此,当在本发明的权利要求中使用时,术语“基本上由……组成”不应被解释为等价于“包含”。除非上下文另有说明,否则特别预期本文所述的本发明的各种特点可以以任何组合使用。

[0080] 此外,本发明还考虑了在本发明的一些实施方案中,可以排除或省略本文所述的任何特点或特点组合。

[0081] 为了进一步说明,例如,如果说明书指示特定氨基酸可以选自A、G、I、L和/或V,则该语言还指示氨基酸可以选自这些氨基酸的任何子集,例如A、G、I或L;A、G、I或V;A或G;仅L;等,如同每个此类子组合在本文中明确阐述一样。此外,这种语言还指示可以放弃指定氨基酸中的一个或多个(例如,通过否定条件)。例如,在特定实施方案中,氨基酸不是A、G或I;不是A;不是G或V;等,如同每个此类可能的放弃在本文中明确阐述一样。

[0082] 如本文使用的,术语“减少(’reduce)”、“减少(reduces)”、“减少(reduction)”和类似术语意指至少约25%、35%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或更多的降低。

[0083] 如本文使用的,术语“增强(enhance)”、“增强(enhances)”、“增强(enhancement)”和类似术语意指至少约25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的增加。

[0084] 如本文使用的,术语“细小病毒”涵盖细小病毒科(*Parvoviridae*),包括自主复制的细小病毒和依赖病毒。自主性细小病毒包括细小病毒属(*Parvovirus*)、嗜红细胞病毒属(*Erythrovirus*)、浓核病毒属(*Densovirus*)、重复病毒属(*Iteravirus*)和康特拉病毒属(*Contravirus*)。示例性自主性细小病毒包括但不限于小鼠微小病毒、牛细小病毒、犬细小病毒、鸡细小病毒、猫泛白细胞减少症病毒、猫细小病毒、鹅细小病毒、H1细小病毒、番鸭细小病毒、B19病毒以及目前已知或以后发现的任何其它自主性细小病毒。其它自主性细小病毒是本领域技术人员已知的。参见例如,BERNARD N. FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。

[0085] 如本文使用的,术语“腺相关病毒”(AAV)包括但不限于AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型(包括3A和3B型)、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV 10型、AAV 11型、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、以及目前已知或以后发现的任何其它AAV。参见例如,BERNARD N. FIELDS等人,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。许多相对新的AAV血清型和进化枝已得到鉴定(参见例如,Gao等人,(2004)*J. Virology* 78:6381-6388;Moris等人,(2004)*Virology* 33-:375- 383;以及表3)。

[0086] AAV和自主性细小病毒的各种血清型的基因组序列,以及天然末端重复(TR)、Rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。此类序列可以在文献中或在公共数据库如GenBank中找到。参见例如,GenBank登录号NC_002077、NC_001401、NC_001729、NC_001863、NC_001829、NC_001862、NC_000883、NC_001701、NC_001510、NC_006152、NC_006261、AF063497、U89790、AF043303、AF028705、AF028704、J02275、J01901、J02275、X01457、AF288061、AH009962、AY028226、AY028223、NC_001358、NC_001540、AF513851、AF513852、AY530579;其公开内容引入本文作为参考,用于教导细小病毒以及AAV核酸和氨基酸序列。还参见例如,Srivistava等人,(1983)*J. Virology* 45:555;Chiarini等人,(1998)*J. Virology* 71:6823;Chiarini等人,(1999)*J. Virology* 73:1309;Bantel-Schaal等人,(1999)*J. Virology* 73:939;Xiao等人,(1999)*J. Virology* 73:3994;Muramatsu等人,(1996)*Virology* 221:208;Shade等人,(1986)*J. Virol.* 58:921;Gao等人,(2002)*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:11854;Moris等人,(2004)*Virology* 33-:375- 383;国际专利公开WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244;以及美国专利号6,156,303;其公开内容引入本文作为参考,用于教导细小病毒以及AAV核酸和氨基酸序列。还参见表1。

[0087] 在BERNARD N. FIELDS等人, VIROLOGY, 第2卷, 第69和70章(第4版, Lippincott-Raven Publishers)中更详细地描述了自主性细小病毒和AAV的衣壳结构。还参见AAV2(Xie等人, (2002)*Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:10405-10)、AAV4(Padron等人, (2005)*J. Virol.* 79: 5047-58)、AAV5(Walters等人, (2004)*J. Virol.* 78: 3361-71)和CPV(Xie等人, (1996)*J. Mol. Biol.* 6:497-520以及Tsao等人, (1991)*Science* 251: 1456-64)的晶体结构的描述。

[0088] 如本文使用的, 术语“向性”指病毒优先进入某些细胞或组织内, 任选地随后为由病毒基因组携带的序列在细胞中的表达(例如, 转录和任选的翻译), 例如, 对于重组病毒, 目标异源核酸的表达。

[0089] 如本文使用的, “全身向性”和“全身转导”(以及等价术语)指示本发明的病毒衣壳或病毒载体显示出对于遍及全身的组织(例如脑、肺、骨骼肌、心脏、肝、肾和/或胰腺)的向性和/或转导遍及全身的组织。在本发明的实施方案中, 观察到中枢神经系统(例如脑、神经元细胞等)的全身转导。在其它实施方案中, 实现了心肌组织的全身转导。

[0090] 如本文使用的, “选择性向性”或“特异性向性”意指病毒载体对某些靶细胞和/或某些组织的递送和/或特异性转导。

[0091] 除非另有说明, 否则“有效转导”或“有效向性”或类似术语可以通过参考合适的对照(例如, 对照的转导或趋向的至少约50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、500%或更多)来确定。在特定实施方案中, 病毒载体有效转导神经元细胞和心肌细胞或具有对于神经元细胞和心肌细胞的有效向性。合适的对照取决于各种因素, 包括所需向性和/或转导概况。

[0092] 类似地, 通过参考合适的对照, 可以确定病毒是否“不能有效地转导靶组织”或“不具有对于靶组织的有效向性”或类似术语。在特定实施方案中, 病毒载体不能有效地转导肝、肾、性腺和/或生殖细胞(即, 对于其不具有有效向性)。在特定实施方案中, 组织(例如肝)的转导(例如, 不期望的转导)为所需靶组织(例如, 骨骼肌、横膈肌、心肌和/或中枢神经系统的细胞)的转导水平的20%或更少、10%或更少、5%或更少、1%或更少、0.1%或更少。

[0093] 在本发明的一些实施方案中, 包含本发明衣壳的AAV颗粒可以证实某些组织/细胞的有效转导的多重表型以及对于某些组织/细胞的非常低的转导水平(例如, 减少的转导), 所述组织/细胞的转导是不期望的。

[0094] 除非另有说明, 否则如本文使用的, 术语“多肽”涵盖肽和蛋白质两者。

[0095] “多核苷酸”是核苷酸碱基的序列, 并且可以是RNA、DNA或DNA-RNA杂合序列(包括天然存在的和非天然存在的核苷酸两者), 但在代表性实施方案中是单链或双链DNA序列。

[0096] 如本文使用的, “分离的”多核苷酸(例如, “分离的DNA”或“分离的RNA”)意指与天然存在的生物或病毒的至少一些其它组分至少部分分开的多核苷酸, 例如, 通常发现的与多核苷酸相关的细胞或病毒结构组分或者其它多肽或核酸。在代表性实施方案中, 与原材料相比, “分离的”核苷酸富集至少约10倍、100倍、1000倍、10,000倍或更多倍。

[0097] 同样地, “分离的”多肽意指与天然存在的生物或病毒的至少一些其它组分至少部分分开的多肽, 例如, 通常发现的与多肽相关的细胞或病毒结构组分或者其它多肽或核酸。在代表性实施方案中, 与原材料相比, “分离的”多肽富集至少约10倍、100倍、1000倍、10,000倍或更多倍。

[0098] “分离的细胞”指与它在其天然状态下通常与之结合的其它组分分开的细胞。例如,分离的细胞可以是培养基中的细胞和/或本发明的药学上可接受的载体中的细胞。因此,可以将分离的细胞递送至受试者和/或引入受试者内。在一些实施方案中,分离的细胞可以是受试者取出并且如本文所述离体操作然后返回给受试者的细胞。

[0099] 如本文使用的,“分离”或“纯化”(或语法等价物)病毒载体或病毒颗粒或病毒颗粒群体,意指病毒载体或病毒颗粒或病毒颗粒群体与原材料中的至少一些其它组分至少部分分开。在代表性实施方案中,与原材料相比,“分离的”或“纯化的”病毒载体或病毒颗粒或病毒颗粒群体富集至少约10倍、100倍、1000倍、10,000倍或更多倍。

[0100] “治疗性多肽”是可以缓解、减少、预防、延迟和/或稳定起因于细胞或受试者中的蛋白质缺失或缺陷的症状的多肽,和/或是在其它方面对受试者赋予益处,例如抗癌效应或移植存活率的改善或免疫应答的诱导的多肽。

[0101] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”(及其语法变体),意指受试者状况的严重性减少,至少部分改善或稳定,和/或实现至少一种临床症状中的某些缓解、减轻、降低或稳定,和/或在疾病或病症的进展中存在延迟。

[0102] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”(及其语法变体)指受试者中的疾病、病症和/或临床症状的发作预防和/或延迟,和/或相对于在不存在本发明的方法的情况下发生的那种,在疾病、病症和/或临床症状的发作严重性方面的减少。预防可以是完全的,例如疾病、病症和/或临床症状的完全缺乏。预防也可以是部分的,使得受试者中的疾病、病症和/或临床症状的发生和/或发作的严重性基本上小于在不存在本发明的方法的情况下发生的那种。

[0103] 如本文使用的,“治疗有效”量是足以对受试者提供一些改善或益处的量。换言之,“治疗有效”量是在受试者的至少一种临床症状中提供一些缓解、减轻、降低或稳定的量。本领域技术人员将了解,疗效无需是完全的或治愈的,只要对受试者提供一些益处即可。

[0104] 如本文使用的,“预防有效”量是足以预防和/或延迟受试者中的疾病、病症和/或临床症状的发作,和/或相对于在不存在本发明的方法的情况下发生的那种,减少和/或延迟受试者中的疾病、病症和/或临床症状的发作严重性的量。本领域技术人员将了解,预防水平无需是完全的,只要对受试者提供一些预防益处即可。

[0105] 术语“异源核苷酸序列”和“异源核酸分子”在本文中可互换使用,并且指并非天然存在于病毒中的核酸序列。一般地,异源核酸分子或异源核苷酸序列包含开放读码框,其编码目标多肽和/或非翻译RNA(例如,用于递送至细胞和/或受试者)。

[0106] 如本文使用的,术语“病毒载体”、“载体”或“基因递送载体”指病毒(例如AAV)颗粒,其充当核酸递送媒介物,并且包含包装在病毒粒子内的载体基因组(例如,病毒DNA [vDNA])。可替代地,在某些情况下,术语“载体”可以用于指单独的载体基因组/vDNA。

[0107] “rAAV载体基因组”或“rAAV基因组”是包含一种或多种异源核酸序列的AAV基因组(即vDNA)。rAAV载体一般仅需要以顺式的末端重复(TR)来生成病毒。所有其它病毒序列都是可有可无的,并且可以以反式提供(Muzyczka, (1992) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 158:97)。通常,rAAV载体基因组仅保留一个或多个TR序列,以便最大化可以由载体有效包装的转基因的大小。结构和非结构蛋白编码序列可以以反式提供(例如,来自载体例如质粒,或通过将序列稳定整合到包装细胞内)。在本发明的实施方案中,rAAV载体基因

组包含至少一个TR序列(例如AAV TR序列),任选地两个TR(例如,两个AAV TR),其通常位于载体基因组的5'和3'末端处,并且侧接异源核酸,但无需与其邻接。TR可以彼此相同或不同。

[0108] 术语“末端重复”或“TR”包括任何病毒末端重复或合成序列,其形成发夹结构,并且充当反向末端重复(即,介导所需功能,例如复制、病毒包装、整合和/或原病毒援救等等)。TR可以是AAV TR或非AAV TR。例如,非AAV TR序列,例如其它细小病毒(例如,犬细小病毒(CPV)、小鼠细小病毒(MVM)、人细小病毒B-19)的那些、或者任何其它合适的病毒序列(例如,充当SV40复制起点的SV40发夹)可以用作TR,其可以通过截短、取代、缺失、插入和/或添加进一步修饰。进一步地,TR可以是部分或完全合成的,例如Samulski等人的美国专利号5,478,745中所述的“双D序列”。

[0109] “AAV末端重复”或“AAV TR”可以来自任何AAV,包括但不限于血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12,或者目前已知或以后发现的任何其它AAV(参见例如表1)。AAV末端重复无需具有天然末端重复序列(例如,天然AAV TR序列可以通过插入、缺失、截短和/或错义突变来改变),只要末端重复介导所需功能,例如复制、病毒包装、整合和/或原病毒援救等等。

[0110] AAV蛋白VP1、VP2和VP3是衣壳蛋白,其一起相互作用以形成二十面体对称的AAV衣壳。VP1.5是美国公开号2014/0037585中描述的AAV衣壳蛋白。

[0111] 本发明的病毒载体可以进一步是“靶向的”病毒载体(例如,具有定向向性)和/或“杂合”细小病毒(即,其中病毒TR和病毒衣壳来自不同的细小病毒),如国际专利公开WO 00/28004和Chao等人,(2000)*Molecular Therapy* 2:619中所述。

[0112] 本发明的病毒载体可以进一步是双链体细小病毒颗粒,如国际专利公开WO 01/92551(其公开内容整体引入本文作为参考)中所述。因此,在一些实施方案中,双链(双链体)基因组可以包装到本发明的病毒衣壳内。

[0113] 进一步地,病毒衣壳或基因组元件可以含有其它修饰,包括插入、缺失和/或取代。

[0114] 如本文使用的,“嵌合”衣壳蛋白意指这样的AAV衣壳蛋白,其已通过相对于野生型,在衣壳蛋白的氨基酸序列中的一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10等)氨基酸残基中的取代,以及相对于野生型,在氨基酸序列中的一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10等)氨基酸残基中的插入和/或缺失进行修饰。在一些实施方案中,来自一种AAV血清型的完全或部分结构域、功能区、表位等可以以任何组合替换不同AAV血清型的相应野生型结构域、功能区、表位等,以产生本发明的嵌合衣壳蛋白。嵌合衣壳蛋白的产生可以根据本领域众所周知的方案进行,并且大量嵌合衣壳蛋白在文献以及本文中描述,其可以包括在本发明的衣壳中。

[0115] 如本文使用的,术语“氨基酸”涵盖任何天然存在的氨基酸、其修饰形式和合成氨基酸。

[0116] 天然存在的左旋(L-)氨基酸显示于表2中。

[0117] 可替代地,氨基酸可以是修饰的氨基酸残基(非限制性实例显示于表4中),和/或可以通过翻译后修饰(例如乙酰化、酰胺化、甲酰化、羟基化、甲基化、磷酸化或硫酸化)进行修饰的氨基酸。

[0118] 进一步地,非天然存在的氨基酸可以是如通过Wang等人,*Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49(2006)所述的“非天然”氨基酸。这些非天然氨基酸可以有利地

用于将目标分子化学连接至AAV衣壳蛋白。

[0119] 如本文使用的,术语“同源重组”意指这样的一类遗传重组,其中核苷酸序列在两个相似或相同的DNA分子之间交换。同源重组也产生DNA序列的新组合。DNA的这些新组合代表了遗传变异。同源重组也用于水平基因转移中,以交换病毒的不同毒株和物种之间的遗传材料。

[0120] 如本文使用的,术语“基因编辑”、“基因组编辑”或“基因组改造”指这样的一类基因改造,其中DNA使用改造的核酸酶或“分子剪刀”在活生物的基因组中进行插入、缺失或替换。这些核酸酶在基因组中的所需位置处产生位点特异性双链断裂(DSB)。

[0121] 如本文使用的,术语“基因递送”意指通过其将外源DNA转移至宿主细胞用于基因治疗的应用的过程。

[0122] 如本文使用的,术语“CRISPR”代表成簇的规则间隔的短回文重复(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats),其是形成关于CRISPR-Cas9基因组编辑技术的基础的细菌防御系统的标志。

[0123] 如本文使用的,术语“锌指”意指小蛋白质结构基序,其特征在于一个或多个锌离子的配位,以便稳定折叠。

[0124] 具有表面结合蛋白的修饰的AAV衣壳蛋白以及病毒衣壳和病毒载体用于增强的转导和减少的抗原性

[0125] 本发明基于以下出乎意料的发现:具有与表面结合的蛋白质的AAV病毒粒子具有增强的转导特性和/或减少的抗原性。因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含表面结合蛋白的腺相关病毒(AAV)颗粒,其中与AAV颗粒的表面结合的蛋白质选自:(a)纤维蛋白原 α 链;(b)纤维蛋白原 β 链;(c)纤维蛋白原 γ 链;(d)纤连蛋白;(e)纤溶酶原;(f)血管性血友病因子;(g) α -1-酸性糖蛋白;(h)血小板因子4;(i)冷沉淀物;(j)因子VIII;(k)因子XIII;(l)白蛋白(例如人血清白蛋白,和/或来自任何其它物种例如犬、马、牛、猪等的白蛋白);(m)载脂蛋白B(ApoB),(n)载脂蛋白E(ApoE);(o)转铁蛋白;(p)低密度脂蛋白;(q)任何融合血清蛋白质,其增加在细胞表面上的AAV结合或增强AAV细胞内运输;以及(r)上述(a)-(q)的任何组合。

[0126] 血清蛋白质与AAV颗粒的结合取决于盐浓度的浓度和pH,如本文提供的实施例节段中例证的。

[0127] 本发明的AAV颗粒可以是表10中列出的血清型或血清型的任何组合的AAV。

[0128] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以是单独或以任何组合的AAV8、AAV9、AAV2、AAV2i8、AAV9.45、或目前已知或以后鉴定的本文所述的任何AAV突变体或变体。

[0129] 在本发明的AAV颗粒的一些实施方案中,与AAV颗粒的表面结合的蛋白质可以以一定量存在于AAV颗粒表面上,所述量在约2000个蛋白质分子/AAV颗粒至约 4×10^7 个蛋白质分子/AAV颗粒的范围内(例如,2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、29,000、30,000、20,000、21,000、22,000、23,000、24,000、25,000、26,000、27,000、28,000、29,000、30,000、31,000、32,000、33,000、34,000、35,000、36,000、37,000、38,000、39,000、40,000、41,000、42,000、43,000、44,000、45,000、46,000、47,000、48,000、49,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、1 X

10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 或 4×10^7 ,包括在本文中未确阐述的在2000和 4×10^7 两者之间的任何数目)。蛋白质分子数目/AAV颗粒可以根据本领域已知并且如本文实施例节段中例证的的方案来确定。

[0130] 在一些实施方案中,相对于缺乏表面结合蛋白的AAV颗粒,包含表面结合蛋白的AAV颗粒具有增强的转导活性和/或减少的抗原性。相应地,附着至AAV颗粒的蛋白质分子数目可以是相对于缺乏表面结合蛋白的AAV颗粒,增强AAV颗粒的转导活性或减少抗原性的量。

[0131] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以包含异源核酸分子。

[0132] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以是合成的病毒载体,其设计为展示适合于不同体外和体内应用的一系列所需表型。因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含腺相关病毒(AAV)的AAV颗粒。

[0133] 本发明提供了合成病毒载体阵列,其展示了适合于不同体外和体内应用的一系列所需表型。特别地,本发明基于以下出乎意料的发现:在个别衣壳中组合来自不同AAV血清型的衣壳蛋白允许开发在每个个别衣壳中具有多重期望表型的改善的AAV衣壳。例如,通过共转染来自血清型2、8和9的AAV辅助质粒产生的本文所述的三倍体AAV2/8/9载体,具有比AAV2高得多的小鼠肝转导,类似于AAV8。重要的是,三倍体AAV2/8/9载体具有改善的能力,以逃避来自用亲本血清型免疫的血清的中和抗体。尽管AAV3在全身施用后转导小鼠全身方面较不有效,但其中VP3来自AAV3且VP1/VP2来自AAV8、9或rh10的本文所述的单倍体载体H-AAV83或H-AAV93或H-rh10-3,诱导全身转导,以及与AAV3相比在肝和其它组织中高得多的转导。

[0134] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了腺相关病毒(AAV)衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP3,其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0135] 在一些实施方案中,本发明的衣壳包含衣壳蛋白VP2,其中所述衣壳蛋白VP2来自一种或多种第三AAV血清型,其中所述一种或多种第三AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳可以包含衣壳蛋白VP1.5。VP1.5描述于美国专利公开号2014/0037585中,并且本文提供了VP1.5的氨基酸序列。

[0136] 在一些实施方案中,本发明的衣壳包含衣壳蛋白VP1.5,其中所述衣壳蛋白VP1.5来自一种或多种第四AAV血清型,其中所述一种或多种第四AAV中的至少一种血清型在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳蛋白可以包含衣壳蛋白VP2。

[0137] 本发明还提供了AAV衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP2,其中所述衣壳蛋白VP2来自一种或多种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0138] 在一些实施方案中,本发明的AAV颗粒可以包含衣壳,所述衣壳包含衣壳蛋白VP3,

其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种于一种第三AAV血清型,其中所述一种或多种于一种第三AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳可以包含衣壳蛋白VP1.5。

[0139] 本发明进一步提供了包含腺相关病毒(AAV)衣壳的AAV颗粒,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种于一种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP1.5,其中所述衣壳蛋白VP1.5来自一种或多种于一种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0140] 在一些实施方案中,衣壳包含衣壳蛋白VP3,其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种于一种第三AAV血清型,其中所述一种或多种于一种第三AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳可以包含衣壳蛋白VP1.5。

[0141] 本发明进一步提供了腺相关病毒(AAV)衣壳,其中所述衣壳包含衣壳蛋白VP1,其中所述衣壳蛋白VP1来自一种或多种第一AAV血清型,以及衣壳蛋白VP1.5,其中所述衣壳蛋白VP1.5来自一种或多种于一种第二AAV血清型,并且其中所述第一AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第二AAV血清型中的至少一种。

[0142] 在一些实施方案中,本发明的AAV衣壳包含衣壳蛋白VP3,其中所述衣壳蛋白VP3来自一种或多种于一种第三AAV血清型,其中所述一种或多种于一种第三AAV血清型中的至少一种在任何组合中不同于所述第一AAV血清型和/或所述第二AAV血清型。在一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳蛋白可以包含衣壳蛋白VP2。

[0143] 在本发明的衣壳的一些实施方案中,所述一种或多种于一种第一AAV血清型、所述一种或多种于一种第二AAV血清型、所述一种或多种于一种第三AAV血清型、以及所述一种或多种于一种第四AAV血清型选自以任何组合的表5中列出的AAV血清型。

[0144] 在本发明的一些实施方案中,本文所述的AAV衣壳缺乏衣壳蛋白VP2。

[0145] 在一些实施方案中,本发明的衣壳包含嵌合衣壳VP1蛋白、嵌合衣壳VP2蛋白、嵌合衣壳VP3蛋白和/或嵌合衣壳VP1.5蛋白。

[0146] 在一些实施方案中,本发明的AAV衣壳可以是AAV AAV2/8/9、H-AAV82、H-AAV92、H-AAV82G9、AAV2/8 3:1、AAV2/8 1:1、AAV2/8 1:3或AAV8/9,所有这些都在本文提供的实施例节段中描述。

[0147] 可以以与本文所述的其它衣壳蛋白和/或目前已知或以后开发的其它衣壳蛋白的任何组合包括在本发明的衣壳中的AAV衣壳蛋白的非限制性实例包括LK3、LK01-19、AAV-DJ、Olig001、rAAV2-retro、AAV-LiC、AAV0Kera1、AAV-Kera2、AAV-Kera3、AAV 7m8、AAV1,9、AAVr3.45、AAV克隆32、AAV克隆83、AAV-U87R7-C5、AAV ShH13、AAV ShH19、AAV L1-12、AAV HAE-1、AAV HAE-2、AAV变体ShH10、AAV2.5T、AAV LS1-4、AAV Lsm、AAV1289、AAVHSC 1-17、AAV2 Rec 1-4、AAV8BP2、AAV-B1、AAV-PHP.B、AAV9.45、AAV9.61、AAV9.47、AAVM41、AAV2展示肽、AAV2-GMN、AAV9展示肽、AAV8和AAV9展示肽、AAVpo2.1、AAVpo4、AAVpo5、AAVpo6、AAV rh、AAV Hu、AAV-Go.1、AAV-mo.1、BAAV、AAAV、AAV8 K137R、AAV Anc80L65、AAV2G9、AAV2 265插入-AAV2/265D、AAV2.5、AAV3 SASTG、AAV2i8、AAV8G9、AAV2酪氨酸突变体AAV2 Y-F、AAV8 Y-F、AAV9 Y-F、AAV6 Y-F、AAV6.2及其任何组合。

[0148] 作为非限制性实例,本发明的AAV衣壳蛋白和病毒衣壳可以是嵌合的,因为它们可

以包含来自另一种病毒,任选地另一种细小病毒或AAV的衣壳亚基的全部或一部分,例如,如国际专利公开WO 00/28004中所述。

[0149] 下文出版物描述了嵌合或变体衣壳蛋白,其可以以与野生型衣壳蛋白和/或目前已知或以后鉴定的其它嵌合或变体衣壳蛋白的任何组合掺入本发明的AAV衣壳内。

[0150] L Lisowski, AP Dane, K Chu, Y Zhang, SC Cunningham, EM Wilson等人, Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature*, 506 (2014), 第382-386页 (LK03及其它LK01-19)。

[0151] Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, Kay MA. *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.* 2008 Jun: 82(12):5887-911. (AAV-DJ)。

[0152] Powell SK, Khan N, Parker CL, Samulski RJ, Matsushima G, Gray SJ, McCown TJ. Characterization of a novel adeno-associated viral vector with preferential oligodendrocyte tropism. *Gene Ther.* 2016 Nov: 23(11):807-814. (Olig001)。

[0153] Tervo DG, Hwang BY, Viswanathan S, Gaj T, Lavzin M, Ritola KD, Lindo S, Michael S, Kuleshova E, Ojala D, Huang CC, Gerfen CR, Schiller J, Dudman JT, Hantman AW, Looger LL, Schaffer DV, Karpova AY. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron.* 2016 Oct 19: 92(2):372-382. (rAAV2-retro)。

[0154] Marsic D, Govindasamy L, Currilin S, Markusic DM, Tseng YS, Herzog RW, Agbandje-McKenna M, Zolotukhin S. Vector design Tour de Force: integrating combinatorial and rational approaches to derive novel adeno-associated virus variants. *Mol Ther.* 2014 Nov: 22(11):1900-9. (AAV-LiC)。

[0155] Sallach J, Di Pasquale G, Larcher F, Niehoff N, Rübsam M, Huber A, Chiorini J, Almarza D, Eming SA, Ulus H, Nishimura S, Hacker UT, Hallek M, Niessen CM, Büning H. Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy. *Mol Ther.* 2014 May: 22(5):929-39 (AAV-Kera1、AAV-Kera2和AAV-Kera3)。

[0156] Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV. In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med.* 2013 Jun 12: 5(189):189ra76. (AAV 7m8)。

[0157] Asuri P, Bartel MA, Vazin T, Jang JH, Wong TB, Schaffer DV. Directed evolution of adeno-associated virus for enhanced gene delivery and gene targeting in human pluripotent stem cells. *Mol Ther.* 2012 Feb: 20(2):329-38. (AAV1.9)。

[0158] Jang JH, Koerber JT, Kim JS, Asuri P, Vazin T, Bartel M, Keung A, Kwon I, Park KI, Schaffer DV. An evolved adeno-associated viral variant enhances gene delivery and gene targeting in neural stem cells. *Mol Ther.* 2011 Apr: 19(4):

667-75. doi: 10.1038/mt.2010.287. (AAV r3.45)。

[0159] Gray SJ, Blake BL, Criswell HE, Nicolson SC, Samulski RJ, McCown TJ, Li W. Directed evolution of a novel adeno-associated virus (AAV) vector that crosses the seizure-compromised blood-brain barrier (BBB). *Mol Ther*. 2010 Mar: 18(3): 570-8. (AAV克隆32和83)。

[0160] Maguire CA, Gianni D, Meijer DH, Shaket LA, Wakimoto H, Rabkin SD, Gao G, Sena-Esteves M. Directed evolution of adeno-associated virus for glioma cell transduction. *J. Neurooncol*. 2010 Feb: 96(3):337-47. (AAV-U87R7-C5)。

[0161] Koerber JT, Klimczak R, Jang JH, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. Molecular evolution of adeno-associated virus for enhanced glial gene delivery. *Mol Ther*. 2009 Dec: 17(12):2088-95. (AAV ShH13, AAV ShH19, AAV L1-12)

[0162] Li W, Zhang L, Johnson JS, Zhijian W, Grieger JC, Ping-Jie X, Drouin LM, Agbandje-McKenna M, Pickles RJ, Samulski RJ. Generation of novel AAV variants by directed evolution for improved CFTR delivery to human ciliated airway epithelium. *Mol Ther*. 2009 Dec: 17(12):2067-77. (AAV HAE-1, AAV HAE-2)。

[0163] Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Müller cells. *PLoS One*. 2009 Oct 14: 4(10):e7467. (AAV变体 ShH10)。

[0164] Excoffon KJ, Koerber JT, Dickey DD, Murtha M, Keshavjee S, Kaspar BK, Zabner J, Schaffer DV. Directed evolution of adeno-associated virus to an infectious respiratory virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Mar 10: 106(10): 3865-70. (AAV2.5T)。

[0165] Sellner L, Stiefelwagen M, Kleinschmidt JA, Laufs S, Wenz F, Fruehauf S, Zeller WJ, Veldwijk MR. Generation of efficient human blood progenitor-targeted recombinant adeno-associated viral vectors (AAV) by applying an AAV random peptide library on primary human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2008 Aug: 36(8):957-64. (AAV LS1-4, AAV Lsm)。

[0166] Li W, Asokan A, Wu Z, Van Dyke T, DiPrimio N, Johnson JS, Govindaswamy L, Agbandje-McKenna M, Leichtle S, Redmond DE Jr, McCown TJ, Petermann KB, Sharpless NE, Samulski RJ. Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol Ther*. 2008 Jul: 16(7):1252-60. (AAV1289)。

[0167] Charbel Issa P, De Silva SR, Lipinski DM, Singh MS, Mouravlev A, You Q. Assessment of tropism and effectiveness of new primate-derived hybrid recombinant AAV serotypes in the mouse and primate retina. *PLoS ONE*. 2013: 8: e60361. (AAVHSC 1-17)。

[0168] Huang W, McMurphy T, Liu X, Wang C, Cao L. Genetic Manipulation of Brown Fat Via Oral Administration of an Engineered Recombinant Adeno-associated

Viral Serotype Vector. *Mol. Ther.* 2016 Jun: 24(6):1062-9. (AAV2 Rec 1-4)。

[0169] Cronin T, Vandenbergh LH, Hantz P 等人, Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter. *EMBO Mol. Med.* 2014: 6:1175-1190. (AAV8BP2)。

[0170] Choudhury SR, Fitzpatrick Z, Harris AF, Maitland SA, Ferreira JS, Zhang Y, Ma S, Sharma RB, Gray-Edwards HL, Johnson JA, Johnson AK, Alonso LC, Punzo C, Wagner KR, Maguire CA, Kotin RM, Martin DR, Sena-Esteves M. *In Vivo* Selection Yields AAV-B1 Capsid for Central Nervous System and Muscle Gene Therapy. *Mol Ther.* 2016 Aug: 24(7):1247-57. (AAV-B1)。

[0171] Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, Wu WL, Yang B, Huber N, Pasca SP, Gradinaru V. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol.* 2016 Feb: 34(2):204-9. doi: 10.1038/nbt.3440. (AAV-PHP.B)。

[0172] Pulicherla N, Shen S, Yadav S, Debbink K, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Asokan A. Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Mol Ther.* 2011 Jun: 19(6):1070-8. (AAV9衍生的突变体-AAV9.45、AAV9.61和AAV9.47)。

[0173] Yang L, Jiang J, Drouin LM, Agbandje-McKenna M, Chen C, Qiao C, Pu D, Hu X, Wang DZ, Li J, Xiao X. A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Mar 10: 106(10):3946-51. (AAVM41)。

[0174] Körbelin J, Sieber T, Michelfelder S, Lunding L, Spies E, Hunger A, Alawi M, Rapti K, Indenbirken D, Müller OJ, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. Pulmonary Targeting of Adeno-associated Viral Vectors by Next-generation Sequencing-guided Screening of Random Capsid Displayed Peptide Libraries. *Mol Ther.* 2016 Jun: 24(6):1050-61. (AAV2展示肽)。

[0175] Geoghegan JC, Keiser NW, Okulist A, Martins I, Wilson MS, Davidson BL. Chondroitin Sulfate is the Primary Receptor for a Peptide-Modified AAV That Targets Brain Vascular Endothelium *In Vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014 Oct 14: 3:e202. (AAV2-GMN)。

[0176] Varadi K, Michelfelder S, Korff T, Hecker M, Trepel M, Katus HA, Kleinschmidt JA, Müller OJ. Novel random peptide libraries displayed on AAV serotype 9 for selection of endothelial cell-directed gene transfer vectors. *Gene Ther.* 2012 Aug: 19(8):800-9. (AAV9展示肽)。

[0177] Michelfelder S, Varadi K, Raupp C, Hunger A, Körbelin J, Pahrman C, Schrepfer S, Müller OJ, Kleinschmidt JA, Trepel M. Peptide ligands incorporated into the threefold spike capsid domain to re-direct gene transduction of AAV8 and AAV9 *in vivo*. *PLoS One.* 2011: 6(8):e23101. (AAV8和AAV9展示肽)。

- [0178] Yu CY, Yuan Z, Cao Z, Wang B, Qiao C, Li J, Xiao X. A muscle-targeting peptide displayed on AAV2 improves muscle tropism on systemic delivery. *Gene Ther.* 2009 Aug: 16(8):953-62.
- [0179] Michelfelder S, Lee MK, deLima-Hahn E, Wilmes T, Kaul F, Müller O, Kleinschmidt JA, Trepel M. Vectors selected from adeno-associated viral display peptide libraries for leukemia cell-targeted cytotoxic gene therapy. *Exp Hematol.* 2007 Dec: 35(12): 1766-76.
- [0180] Müller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol.* 2003 Sep: 21(9): 1040-6.
- [0181] Grifman M, Trepel M, Speece P, Gilbert LB, Arap W, Pasqualini R, Weitzman MD. Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol Ther.* 2001 Jun: 3(6):964-75.
- [0182] Anne Girod, Martin Ried, Christiane Wobus, Harald Lahm, Kristin Leike, Jürgen Kleinschmidt, Gilbert Deléage and Michael Hallek. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nature Medicine*, 1052-1056(1999).
- [0183] Bello A, Chand A, Aviles J, Soule G, Auricchio A, Kobinger GP. Novel adeno-associated viruses derived from pig tissues transduce most major organs in mice. *Sci Rep.* 2014 Oct 22: 4:6644. (AAVpo2.1、-po4、-po5和-po6)。
- [0184] Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 2004 Jun: 78(12):6381-8. (AAV rh和AAV Hu)。
- [0185] Arbetman AE, Lochrie M, Zhou S, Wellman J, Scallan C, Doroudchi MM等人, Novel caprine adeno-associated virus (AAV) capsid (AAV-Go.1) is closely related to the primate AAV-5 and has unique tropism and neutralization properties. *J. Virol.* 2005: 79:15238-15245. (AAV-Go.1)。
- [0186] Lochrie MA, Tatsuno GP, Arbetman AE, Jones K, Pater C, Smith PH等人, Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5. *Virology.* 2006: 353:68-82. (AAV-mo.1)。
- [0187] Schmidt M, Katano H, Bossis I, Chiorini JA. Cloning and characterization of a bovine adeno-associated virus. *J. Virol.* 2004: 78:6509-6516. (BAAV)。
- [0188] Bossis I, Chiorini JA. Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAAV particles. *J. Virol.* 2003: 77:6799-6810. (AAAV)。
- [0189] Chen CL, Jensen RL, Schnepf BC, Connell MJ, Shell R, Sferra TJ, Bartlett JS, Clark KR, Johnson PR. Molecular characterization of adeno-associated

viruses infecting children. *J. Virol.* 2005 Dec: 79(23):14781-92. (AAV变体)。

[0190] Sen D, Gadkari RA, Sudha G, Gabriel N, Kumar YS, Selot R, Samuel R, Rajalingam S, Ramya V, Nair SC, Srinivasan N, Srivastava A, Jayandharan GR. Targeted modifications in adeno-associated virus serotype 8 capsid improves its hepatic gene transfer efficiency *in vivo*. *Hum Gene Ther Methods*. 2013 Apr: 24(2):104-16. (AAV8 K137R)。

[0191] Li B, Ma W, Ling C, Van Vliet K, Huang LY, Agbandje-McKenna M, Srivastava A, Aslanidi GV. Site-Directed Mutagenesis of Surface-Exposed Lysine Residues Leads to Improved Transduction by AAV2, But Not AAV8, Vectors in Murine Hepatocytes *In Vivo*. *Hum Gene Ther Methods*. 2015 Dec: 26(6):211-20.

[0192] Gabriel N, Hareendran S, Sen D, Gadkari RA, Sudha G, Selot R, Hussain M, Dhakshnamoorthy R, Samuel R, Srinivasan N等人, Bioengineering of AAV2 capsid at specific serine, threonine, or lysine residues improves its transduction efficiency *in vitro* and *in vivo*. *Hum Gene Ther Methods*. 2013 Apr: 24(2):80-93.

[0193] Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, Shah S, Shelke R, Maurer AC, Plovie E, Xiao R, Vandenberghe LH. In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell Rep*. 2015 Aug 11: 12(6):1056-68. (AAV Anc80L65)。

[0194] Shen S, Horowitz ED, Troupes AN, Brown SM, Pulicherla N, Samulski RJ, Agbandje-McKenna M, Asokan A. Engraftment of a galactose receptor footprint onto adeno-associated viral capsids improves transduction efficiency. *J Biol Chem*. 2013 Oct 4: 288(40):28814-23. (AAV2G9)。

[0195] Li C, DiPrimio N, Bowles DE, Hirsch ML, Monahan PE, Asokan A, Rabinowitz J, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Single amino acid modification of adeno-associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles. *J. Virol.* 2012 Aug: 86(15):7752-9. (AAV2 265插入-AAV2/265D)。

[0196] Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, Li J, Wang B, Monahan PE, Rabinowitz JE等人, Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol. Ther.* 2012 Feb: 20(2):443-55. (AAV2.5)。

[0197] Messina EL, Nienaber J, Daneshmand M, Villamizar N, Samulski J, Milano C, Bowles DE. Adeno-associated viral vectors based on serotype 3b use components of the fibroblast growth factor receptor signaling complex for efficient transduction. *Hum. Gene Ther.* 2012 Oct: 23(10):1031-42. (AAV3 SASTG)。

[0198] Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, Yadav S, DiPrimio N, Nam HJ, Agbandje-McKenna M, McPhee S, Wolff J, Samulski RJ. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol*. 2010 Jan: 28

(1):79-82.(AAV2i8)。

[0199] Vance M,Llanga T,Bennett W,Woodard K,Murlidharan G,Chungfat N,Asokan A,Gilger B,Kurtzberg J,Samulski RJ,Hirsch ML. AAV Gene Therapy for MPS1-associated Corneal Blindness. *Sci Rep*. 2016 Feb 22: 6:22131.(AAV8G9)。

[0200] Zhong L,Li B,Mah CS,Govindasamy L,Agbandje-McKenna M,Cooper M,Herzog RW,Zolotukhin I,Warrington KH Jr,Weigel-Van Aken KA,Hobbs JA,Zolotukhin S,Muzyczka N,Srivastava A. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Jun 3: 105(22):7827-32.(AAV2酪氨酸突变体 AAV2 Y-F)。

[0201] Petrs-Silva H,Dinculescu A,Li Q,Min SH,Chiodo V,Pang JJ,Zhong L,Zolotukhin S,Srivastava A,Lewin AS,Hauswirth WW. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol. Ther*. 2009 Mar: 17(3):463-71.(AAV8 Y-F和AAV9 Y-F)。

[0202] Qiao C,Zhang W,Yuan Z,Shin JH,Li J,Jayandharan GR,Zhong L,Srivastava A,Xiao X,Duan D. Adeno-associated virus serotype 6 capsid tyrosine-to-phenylalanine mutations improve gene transfer to skeletal muscle. *Hum Gene Ther*. 2010 Oct: 21(10):1343-8(AAV6 Y-F)。

[0203] Carlon M,Toelen J,Van der Perren A,Vandenberghe LH,Reumers V,Sbragia L,Gijsbers R,Baekelandt V,Himmelreich U,Wilson JM,Deprest J,Debyser Z. Efficient gene transfer into the mouse lung by fetal intratracheal injection of rAAV2/6.2. *Mol. Ther*. 2010 Dec: 18(12):2130-8.(AAV6.2)。

[0204] PCT公开号W02013158879A1。(赖氨酸突变体)。

[0205] 在USPTO授权的专利和公开申请的文件包装(wrapper)中列出的下述生物学序列文件描述了嵌合或变体衣壳蛋白,其可以以与野生型衣壳蛋白和/或目前已知或以后鉴定的其它嵌合或变体衣壳蛋白的任何组合掺入本发明的AAV衣壳内(为了说明目的,美国专利申请号11/486,254对应于美国专利申请号11/486,254):11486254.raw、11932017.raw、12172121.raw、12302206.raw、12308959.raw、12679144.raw、13036343.raw、13121532.raw、13172915.raw、13583920.raw、13668120.raw、13673351.raw、13679684.raw、14006954.raw、14149953.raw、14192101.raw、14194538.raw、14225821.raw、14468108.raw、14516544.raw、14603469.raw、14680836.raw、14695644.raw、14878703.raw、14956934.raw、15191357.raw、15284164.raw、15368570.raw、15371188.raw、15493744.raw、15503120.raw、15660906.raw和15675677.raw。

[0206] 应理解VP1和VP3的任何组合,以及当存在时,来自AAV血清型的任何组合的VP1.5和VP2可以用于产生本发明的AAV衣壳。例如,来自AAV血清型的任何组合的VP1蛋白可以与来自AAV血清型的任何组合的VP3蛋白组合,并且分别的VP1蛋白可以以不同血清型的任何比率存在,并且分别的VP3蛋白可以以不同血清型的任何比率存在,并且VP1和VP3蛋白可以以不同血清型的任何比率存在。应进一步理解,当存在时,来自AAV血清型的任何组合的

VP1.5和/或VP2蛋白可以与来自AAV血清型的任何组合的VP1和VP3蛋白组合,并且分别的VP1.5蛋白可以以不同血清型的任何比率存在,并且分别的VP2蛋白可以以不同血清型的任何比率存在,并且分别的VP1蛋白可以以不同血清型的任何比率存在,并且分别的VP3蛋白可以以不同血清型的任何比率存在,并且VP1.5和/或VP2蛋白可以以不同血清型的任何比率与VP1和VP3蛋白组合存在。

[0207] 例如,分别的病毒蛋白和/或分别的AAV血清型可以以任何比率组合,其可以是A:B、A:B:C、A:B:C:D、A:B:C:D:E、A:B:C:D:E:F、A:B:C:D:E:F:G、A:B:C:D:E:F:G:H、A:B:C:D:E:F:G:H:I或A:B:C:D:E:F:G:H:I:J的比率,其中A可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;B可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;C可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;D可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;E可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;F可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;G可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;H可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;I可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等;并且J可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100等。

[0208] 还应理解,VP1、VP1.5、VP2和/或VP3衣壳蛋白中的任一种可以作为嵌合衣壳蛋白存在于本发明的衣壳中,以相对于相同蛋白质类型和/或相对于不同的衣壳蛋白的任何组合和比率。

[0209] 在进一步的实施方案中,本发明进一步提供了病毒载体,其包含以下、基本上由以下组成和/或由以下组成:(a)本发明的AAV衣壳;以及(b)包含至少一个末端重复序列的核酸分子,其中所述核酸分子被AAV衣壳包入衣壳。在一些实施方案中,病毒载体可以是AAV颗粒。

[0210] 在一些实施方案中,本发明的病毒载体可以对于骨骼肌、心肌和/或横膈肌具有全身或选择性向性。在一些实施方案中,本发明的病毒载体可以对于肝具有减少的向性。

[0211] 本发明进一步提供了组合物,其可以是药物制剂,包含本发明的衣壳蛋白、衣壳、病毒载体、AAV颗粒组合物和/或药物制剂和药学上可接受的载体。

[0212] 在一些非限制性实例中,本发明提供了AAV衣壳蛋白(VP1、VP1.5、VP2和/或VP3),其包含三倍轴环4(Opie等人,*J. Viral.* 77: 6995-7006 (2003))中的氨基酸序列的修饰、以及包含修饰的AAV衣壳蛋白的病毒衣壳和病毒载体。本发明人已发现该环中的修饰可以对包含修饰的AAV衣壳蛋白的病毒载体赋予一种或多种所需特性,包括但不限于(i)减少的肝转导,(ii)增强的跨越内皮细胞的运动,(iii)全身转导;(iv)增强的肌肉组织(例如,骨骼肌、心肌和/或横膈肌)转导,和/或(v)减少的脑组织(例如,神经元)转导。因此,本发明解决了与常规AAV载体相关的一些限制。例如,基于AAV8和rAAV9载体的载体对于全身性核酸递送是有吸引力的,因为它们容易穿过内皮细胞屏障;然而,rAAV8或rAAV9的全身施用导致大部分载体被递送至肝,从而减少其它重要靶组织如骨骼肌的转导。

[0213] 在本发明的实施方案中,心肌和/或骨骼肌(基于个别骨骼肌、多重骨骼肌或骨骼

肌的整个范围确定)的转导为肝中的转导水平的至少约五倍、十倍、50倍、100倍、1000倍或更多倍。

[0214] 在特定实施方案中,本发明的修饰的AAV衣壳蛋白包含三倍轴环4(例如,天然AAV2 VP1衣壳蛋白的氨基酸位置575至600 [包括在内]或来自另一种AAV的衣壳蛋白的相应区域)的氨基酸序列中的一个或多个修饰。如本文使用的,氨基酸序列中的“修饰”包括取代、插入和/或缺失,其各自可以涉及一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸。在特定实施方案中,修饰是取代。例如,在特定实施方案中,来自一种AAV的来自三倍轴环4的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多个氨基酸可以被取代到天然AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置575-600或来自另一种AAV的衣壳蛋白的相应位置内。然而,本发明的修饰的病毒衣壳并不限于这样的AAV衣壳,其中来自一种AAV衣壳的氨基酸被取代成另一种AAV衣壳,并且取代的和/或插入的氨基酸可以来自任何来源,并且可以进一步是天然发生的或者部分或完全合成的。

[0215] 如本文所述,来自许多AAV的衣壳蛋白的核酸序列和氨基酸序列是本领域已知的。因此,对于任何其它AAV(例如,通过使用序列比对),可以容易地确定“对应”于天然AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置575至600(包括在内)或氨基酸位置585至590(包括在内)的氨基酸。

[0216] 在一些实施方案中,本发明考虑了本发明的修饰的衣壳蛋白可以通过修饰目前已知或以后发现的任何AAV的衣壳蛋白来产生。进一步地,待修饰的AAV衣壳蛋白可以是天然存在的AAV衣壳蛋白(例如AAV2、AAV3a或3b、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或AAV12衣壳蛋白或表3中所示的任何AAV),但不限于此。本领域技术人员将理解,对AAV衣壳蛋白的各种操作是本领域已知的,并且本发明并不限于天然存在的AAV衣壳蛋白的修饰。例如,与天然存在的AAV相比,待修饰的衣壳蛋白可以已经具有改变(例如,衍生自天然存在的AAV衣壳蛋白,例如AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和/或AAV12或者目前已知或以后发现的任何其它AAV)。此类AAV衣壳蛋白也在本发明的范围内。

[0217] 例如,在一些实施方案中,待修饰的AAV衣壳蛋白可以包含直接在天然AAV2衣壳蛋白序列的氨基酸264之后的氨基酸插入(参见例如,PCT公开W0 2006/066066),和/或可以是如PCT公开W0 2009/108274中所述的具有改变的HI环的AAV,和/或可以是修饰为含有聚His序列以促进纯化的AAV。作为另一个说明性实例,AAV衣壳蛋白可以具有作为插入或取代掺入其中的肽靶向序列。进一步地,AAV衣壳蛋白可以包含来自另一种AAV的大结构域,其已被取代和/或插入衣壳蛋白内。

[0218] 因此,在特定实施方案中,待修饰的AAV衣壳蛋白可以衍生自天然存在的AAV,但进一步包含插入和/或取代到衣壳蛋白内和/或已通过一个或多个氨基酸的缺失而改变的一种或多种外源序列(例如,其对天然病毒是外源的)。

[0219] 相应地,当在本文中提及特定AAV衣壳蛋白(例如AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或AAV12衣壳蛋白,或者来自表1中所示的任何AAV的衣壳蛋白等),它预期涵盖天然衣壳蛋白以及具有除本发明的修饰外的改变的衣壳蛋白。此类改变包括取代、插入和/或缺失。在特定实施方案中,与天然AAV衣壳蛋白序列相比,衣壳蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个,小于20个,小于30个,小于40个,小于50个,小于60个或小于70个插入其中的氨基酸(除本发明的插入外)。在本发明的实施方案中,与天然AAV衣壳蛋白序列相比,衣壳蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、14、15、16、17、18、19或20个,小于20个,小于30个,小于40个,小于50个,小于60个或小于70个氨基酸取代(除根据本发明的氨基酸取代外)。在本发明的实施方案中,与天然AAV衣壳蛋白序列相比,衣壳蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个,多于20个,多于30个,多于40个,多于50个,多于60个或多于70个氨基酸的缺失(除本发明的氨基酸缺失外)。

[0220] 因此,例如,术语“AAV2衣壳蛋白”包括具有天然AAV2衣壳蛋白序列(参见GenBank登录号AAC03780)的AAV衣壳蛋白,以及在天然AAV2衣壳蛋白序列中包含取代、插入和/或缺失的那些(如前一段中描述的)。

[0221] 在特定实施方案中,AAV衣壳蛋白具有天然AAV衣壳蛋白序列,或者具有与天然AAV衣壳蛋白序列至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相似或相同的氨基酸序列。例如,在特定实施方案中,“AAV2”衣壳蛋白涵盖天然AAV2衣壳蛋白序列,以及与天然AAV2衣壳蛋白序列至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%相似或相同的序列。

[0222] 测定两个或更多个氨基酸序列之间的序列相似性或同一性的方法是本领域已知的。序列相似性或同一性可以使用本领域已知的标准技术来测定,所述标准技术包括但不限于Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2, 482 (1981) 的局部序列同一性算法, Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 443 (1970) 的序列同一性比对算法, Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444 (1988) 的相似性搜索方法, 这些算法的计算机化实现 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA), 由 Devereux 等人, *Nucl. Acid Res.* 12, 387-395 (1984) 描述的最佳拟合序列程序或检查。

[0223] 另一种合适的算法是 Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, (1990), 以及 Karlin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5787 (1993) 中描述的 BLAST 算法。特别有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序, 其得自 Altschul 等人, *Methods in Enzymology*, 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>。WU-BLAST-2 使用几个搜索参数, 其任选地设定为缺省值。参数是动态值, 并且由程序本身根据特定序列的组成和针对其待搜索目标序列的特定数据库的组成来建立; 然而, 这些值可以调整以增加灵敏度。

[0224] 进一步地, 另一种有用的算法是如由 Altschul 等人, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 报道的缺口 BLAST。

[0225] 在本发明的一些实施方案中, 可以在天然 AAV2 衣壳蛋白 (使用 VP1 编号) 的氨基酸位置 585 至 590 (包括在内) 区域、或其它 AAV (天然 AAV2 VP1 衣壳蛋白: GenBank 登录号 AAC03780 或 YP680426) 的相应位置中, 即在对应于天然 AAV2 衣壳蛋白的氨基酸位置 585 至 590 (VP1 编号) 的氨基酸处进行修饰。“对应于”天然 AAV2 衣壳蛋白的位置 585 至 590 的其它 AAV 血清型或修饰的 AAV 衣壳中的氨基酸位置对于本领域技术人员是显而易见的, 并且可以使用序列比对技术 (参见例如, WO 2006/066066 的图 7) 和/或晶体结构分析 (Padron 等人, (2005) *J. Virol.* 79: 5047-58) 容易地确定。

[0226] 为了说明, 可以将修饰引入 AAV 衣壳蛋白内, 其已经含有插入和/或缺失, 使得所有下游序列的位置位移。在这种情况下, 对应于 AAV2 衣壳蛋白中的氨基酸位置 585 至 590 的氨基酸位置对于本领域技术人员仍是可容易鉴定的。为了说明, 衣壳蛋白可以是 AAV2 衣壳蛋白, 其含有在氨基酸位置 264 之后的插入 (参见例如 WO 2006/066066)。在位置 585 至 590 处发

现的氨基酸(例如天然AAV2衣壳蛋白中的RGNRQA (SEQ ID NO: 1))目前在位置586至591处,但仍是本领域技术人员可鉴定的。

[0227] 本发明还提供了病毒衣壳,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:本发明的修饰的AAV衣壳蛋白。在特定实施方案中,病毒衣壳是细小病毒衣壳,其可以进一步是自主性细小病毒衣壳或依赖病毒衣壳。任选地,病毒衣壳是AAV衣壳。在特定实施方案中,AAV衣壳是AAV1、AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12,或表1中所示或者以其它方式已知或以后发现的任何其它AAV,和/或通过一个或多个插入、取代和/或缺失而衍生自前述中的任一种。

[0228] 修饰的病毒衣壳可以用作“衣壳媒介物”,如例如美国专利号5,863,541中已描述的。可以通过修饰的病毒衣壳包装并转移到细胞内的分子包括异源DNA、RNA、多肽、小有机分子、金属或其组合。

[0229] 异源分子定义为在AAV感染中并未天然发现的那些,例如,不由野生型AAV基因组编码的那些。进一步地,治疗上有用的分子可以与病毒衣壳的外部结合,用于将分子转移到宿主靶细胞内。此类结合分子可以包括DNA、RNA、小有机分子、金属、碳水化合物、脂质和/或多肽。在本发明的一个实施方案中,治疗上有用的分子与衣壳蛋白共价连接(即缀合或化学偶联)。共价连接分子的方法是本领域技术人员已知的。

[0230] 本发明的修饰的病毒衣壳也可用于产生针对新型衣壳结构的抗体。作为进一步的替代方案,可以将外源氨基酸序列插入修饰的病毒衣壳内,用于抗原呈递给细胞,例如,施用于受试者以产生对外源氨基酸序列的免疫应答。

[0231] 在其它实施方案中,可以施用病毒衣壳,以在递送编码目标多肽或功能性RNA的核酸的病毒载体施用之前和/或同时(例如,在彼此的数分钟或数小时内)阻断某些细胞位点。例如,可以递送本发明的衣壳,以阻断肝细胞上的细胞受体,并且可以随后或同时施用递送载体,其可以减少肝细胞的转导,并且增强其它靶(例如,骨骼肌、心肌和/或横膈肌)的转导。

[0232] 根据代表性实施方案,修饰的病毒衣壳可以在根据本发明的修饰的病毒载体之前和/或同时施用于受试者。进一步地,本发明提供了包含本发明的修饰的病毒衣壳的组合物和药物制剂;任选地,该组合物还包含本发明的修饰的病毒载体。

[0233] 本发明还提供了编码本发明的修饰的病毒衣壳和衣壳蛋白的核酸分子(任选地,分离的核酸分子)。进一步提供的是包含核酸分子的载体,以及包含本发明的核酸分子和/或载体的细胞(在体内或在培养中)。合适的载体包括但不限于病毒载体(例如,腺病毒、AAV、疱疹病毒、甲病毒、牛痘病毒、痘病毒、杆状病毒等等)、质粒、噬菌体、YAC、BAC等等。此类核酸分子、载体和细胞可以用作例如用于产生如本文所述的修饰的病毒衣壳或病毒载体的试剂(例如,辅助包装构建体或包装细胞)。

[0234] 根据本发明的病毒衣壳可以使用本领域已知的任何方法产生,例如通过由杆状病毒的表达产生(Brown等人,(1994)*Virology* 198:477-488)。

[0235] 在一些实施方案中,对本发明的AAV衣壳蛋白的修饰是“选择性”修饰。这种方法与AAV血清型之间的整个亚基或大结构域交换的先前工作形成对比(参见例如,国际专利公开WO 00/28004和Hauck等人,(2003)*J. Virology* 77:2768-2774)。在特定实施方案中,“选择性”修饰导致小于约20、18、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3或2个邻接氨基酸的插入和/或取代

和/或缺失。

[0236] 本发明的修饰的衣壳蛋白和衣壳可以进一步包含目前已知或以后鉴定的任何其它修饰。

[0237] 病毒衣壳可以是包含靶向序列(例如,取代或插入病毒衣壳中)的靶向病毒衣壳,所述靶向序列指导病毒衣壳与存在于所需靶组织上的细胞表面分子相互作用(参见例如,国际专利公开号WO 00/28004和Hauck等人,(2003)*J. Virology* 77:2768-2774);Shi等人,*Human Gene Therapy* 17:353-361(2006)[描述整联蛋白受体结合基序RGD在AAV衣壳亚基的位置520和/或584处的插入];以及美国专利号7,314,912[描述了含有在AAV2衣壳亚基的氨基酸位置447、534、573和587之后的RGD基序的P1肽插入]。耐受插入的AAV衣壳亚基内的其它位置是本领域已知的(例如,由Grifman等人,*Molecular Therapy* 3:964-975(2001)描述的位置449和588)。

[0238] 例如,本发明的一些病毒衣壳具有针对大多数目标靶组织(例如,肝、骨骼肌、心脏、横膈肌、肾、脑、胃、肠、皮肤、内皮细胞和/或肺)相对低效的向性。靶向序列可以有利地掺入这些低转导载体内,从而对病毒衣壳赋予所需向性和任选地对于特定组织的选择性向性。包含靶向序列的AAV衣壳蛋白、衣壳和载体描述于例如国际专利公开WO 00/28004中。作为另一种可能性,如由Wang等人,*Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49(2006))所述的一种或多种非天然存在的氨基酸,可以在正交位点处掺入AAV衣壳亚基内,作为将低转导载体重定向至所需靶组织的手段。这些非天然氨基酸可以有利地用于将目标分子与AAV衣壳蛋白化学连接,包括但不限于:聚糖(甘露糖-树突状细胞靶向);RGD、铃蟾肽或神经肽用于靶向递送至特定癌细胞类型;靶向特定细胞表面受体,例如生长因子受体、整联蛋白等等,选自噬菌体展示的RNA适体或肽。化学修饰氨基酸的方法是本领域已知的(参见例如,Greg T. Hermanson,*Bioconjugate Techniques*,第1版,Academic Press,1996)。

[0239] 在代表性实施方案中,靶向序列可以是病毒衣壳序列(例如,自主性细小病毒衣壳序列、AAV衣壳序列或任何其它病毒衣壳序列),其将感染导向特定细胞类型。

[0240] 作为另一个非限制性实例,肝素结合结构域(例如,呼吸道合胞病毒肝素结合结构域)可以插入或取代到衣壳亚基内,所述衣壳亚基通常不结合HS受体(例如AAV 4、AAV5),以对所得到的突变体赋予肝素结合。

[0241] B19使用红细胞糖苷脂(globoside)作为其受体感染原代红系祖细胞(Brown等人,(1993)*Science* 262:114)。B19的结构已测定至8 Å分辨率(Agbandje-McKenna等人,(1994)*Virology* 203:106)。与红细胞糖苷脂结合的B19衣壳区域已在氨基酸399-406之间进行映射(Chapman等人,(1993)*Virology* 194:419),其为β-桶结构E和F之间的环出区域。(Chipman等人,(1996)*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7502)。相应地,B19衣壳的红细胞糖苷脂受体结合结构域可以被取代到AAV衣壳蛋白内,以将包含其的病毒衣壳或病毒载体靶向红系细胞。

[0242] 在代表性实施方案中,外源靶向序列可以是编码肽的任何氨基酸序列,所述肽改变包含修饰的AAV衣壳蛋白的病毒衣壳或病毒载体的向性。在特定实施方案中,靶向肽或蛋白质可以是天然存在的,或可替代地是完全或部分合成的。示例性靶向序列包括结合细胞表面受体和糖蛋白的配体和其它肽,例如RGD肽序列、缓激肽、激素、肽生长因子(例如表皮生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子I

和II等)、细胞因子、黑素细胞刺激激素(例如 α 、 β 或 γ)、神经肽和内啡肽等等,以及其保留将细胞靶向其同源受体的能力的片段。其它说明性肽和蛋白质包括P物质、角质形成细胞生长因子、神经肽Y、胃泌素释放肽、白细胞介素2、鸡蛋清溶菌酶、促红细胞生成素、促性腺激素、皮质抑素、 β -内啡肽、亮氨酸脑啡肽、强啡肽、 α -新脑啡肽、血管紧张素、pneumadin、血管活性肠肽、神经降压素、胃动素及其如上所述的片段。作为再进一步的替代方案,来自毒素(例如,破伤风毒素或蛇毒素,如 α 银环蛇毒素等等)的结合结构域可以作为靶向序列被取代到衣壳蛋白内。在再进一步的代表性实施方案中,可以通过如由Cleves(*Current Biology* 7:R318(1997))所述的“非经典”输入/输出信号肽(例如,成纤维细胞生长因子-1和-2、白细胞介素1、HIV-1 Tat蛋白、疱疹病毒VP22等等)取代到AAV衣壳蛋白内,来修饰AAV衣壳蛋白。还涵盖的是指导由特定细胞的摄取的肽基序,例如FVFLP肽基序触发由肝细胞的摄取。

[0243] 噬菌体展示技术以及本领域已知的其它技术可以用于鉴定识别任何目标细胞类型的肽。

[0244] 靶向序列可以编码靶向细胞表面结合位点,包括受体(例如蛋白质、碳水化合物、糖蛋白或蛋白多糖)的任何肽。细胞表面结合位点的实例包括但不限于硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素及其它糖胺聚糖、粘蛋白上发现的唾液酸部分、糖蛋白和神经节苷脂、MHC I型糖蛋白、膜糖蛋白上发现的碳水化合物组分,包括甘露糖、N-乙酰基-半乳糖胺、N-乙酰基-葡萄糖胺、岩藻糖、半乳糖等等。

[0245] 在特定实施方案中,硫酸乙酰肝素(HS)或肝素结合结构域被取代到病毒衣壳内(例如,在否则不结合HS或肝素的AAV中)。本领域已知HS/肝素结合由富含精氨酸和/或赖氨酸的“基础补片(basic patch)”介导。在示例性实施方案中,在基序BXXB之后的序列,其中“B”是碱性残基,并且X是中性和/或疏水性的。作为一个非限制性实例,BXXB是RGNR。在特定实施方案中,BXXB取代天然AAV2衣壳蛋白中的氨基酸位置262至265或另一种AAV的衣壳蛋白中的相应位置。

[0246] 合适靶向序列的其它非限制性实例包括由Müller等人,*Nature Biotechnology* 21:1040-1046(2003)鉴定的靶向冠状动脉内皮细胞的肽(共有序列NSVRDLG/S(SEQ ID NO:2)、PRSVTV(P(SEQ ID NO:3)、NSVSSXS/A(SEQ ID NO:4));如由Grifman等人,*Molecular Therapy* 3:964-975(2001)所述的肿瘤靶向肽(例如,NGR、NGRAHA(SEQ ID NO:5));如由Work等人,*Molecular Therapy* 13:683-693(2006)所述的肺或脑靶向序列(QPEHSST(SEQ ID NO:6)、VNTANST(SEQ ID NO:7)、HGPMQKS(SEQ ID NO:8)、PHKPPLA(SEQ ID NO:9)、IKNNEMW(SEQ ID NO:10)、RNLDTPM(SEQ ID NO:11)、VDSHRQS(SEQ ID NO:12)、YDSKTKT(SEQ ID NO:13)、SQLPHQK(SEQ ID NO:14)、STMQQNT(SEQ ID NO:15)、TERYMTQ(SEQ ID NO:16)、QPEHSST(SEQ ID NO:6)、DASLSTS(SEQ ID NO:17)、DLPNKKT(SEQ ID NO:18)、DLTAARL(SEQ ID NO:19)、EPHQFNY(SEQ ID NO:20)、EPQSNHT(SEQ ID NO:21)、MSSWPSQ(SEQ ID NO:22)、NPKHNAT(SEQ ID NO:23)、PDGMRTT(SEQ ID NO:24)、PNNKTT(SEQ ID NO:25)、QSTTHDS(SEQ ID NO:26)、TGSKQKQ(SEQ ID NO:27)、SLKHQAL(SEQ ID NO:28)和SPIDGEQ(SEQ ID NO:29));由Hajitou等人,*TCM* 16:80-88(2006)描述的血管靶向序列(WIFPWIQL(SEQ ID NO:30)、CDCRGDCFC(SEQ ID NO:31)、CNGRC(SEQ ID NO:32)、CPRECES(SEQ ID NO:33)、GSL、CTTHWGFTLC(SEQ ID NO:34)、CGRRAGGSC(SEQ ID NO:35)、CKGGRKDC(SEQ ID NO:36)、以及CVPELGHEC(SEQ ID NO:37));如由Koivunen等人,*J. Nucl. Med.* 40:883-888(1999)描述

的靶向肽 (CRRETAWAK (SEQ ID NO:38)、KGD、VSWFSHRYSPFAVS (SEQ ID NO:39)、GYRDGYAGPILYN (SEQ ID NO:40)、XXXY*XXX [其中Y*是磷-Tyr] (SEQ ID NO:41)、Y*E/MNW (SEQ ID NO:42)、RPLPPLP (SEQ ID NO:43)、APPLPPR (SEQ ID NO:44)、DVFYPYPY ASGS (SEQ ID NO:45)、MYWYPY (SEQ ID NO:46)、DITWDQL WDLMK (SEQ ID NO:47)、CWDDG/L WLC (SEQ ID NO:48)、EWCEYLGGYLRCY A (SEQ ID NO:49)、YXCXXGPXTWXCXP (SEQ ID NO:50)、IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO:51)、LWXXY/W/F/H (SEQ ID NO:52)、XFXXYLW (SEQ ID NO:53)、SSIISHFRWGLCD (SEQ ID NO:54)、MSRPACPPNDKYE (SEQ ID NO:55)、CLRSGRGC (SEQ ID NO:56)、CHWMFSPWC (SEQ ID NO:57)、WXXF (SEQ ID NO:58)、CSSRLDAC (SEQ ID NO:59)、CLPVASC (SEQ ID NO:60)、CGFECVRQCPERC (SEQ ID NO:61)、CVALCREACGEGC (SEQ ID NO:62)、SWCEPGWCR (SEQ ID NO:63)、YSGKWGW (SEQ ID NO:64)、GLSGGRS (SEQ ID NO:65)、LMLPRAD (SEQ ID NO:66)、CSCFRDVCC (SEQ ID NO:67)、CRDVSVIC (SEQ ID NO:68)、CNGRC (SEQ ID NO:32) 和 GSL); 如由 Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, 第145-163页, Springer-Verlag, Berlin (2008) 描述的肿瘤靶向肽 (MARSG (SEQ ID NO:69)、MARAKE (SEQ ID NO:70)、MSRTMS (SEQ ID NO:71)、KCCYSL (SEQ ID NO:72)、WRR、WKR、WVR、WVK、WIK、WTR、WVL、WLL、WRT、WRG、WVS、WVA、MYWGDSHWLQYWYE (SEQ ID NO:73)、MQLPLAT (SEQ ID NO:74)、EWLS (SEQ ID NO:75)、SNEW (SEQ ID NO:76)、TNYL (SEQ ID NO:77)、WIFPWIQL (SEQ ID NO:30)、WDLAWMFRLPVG (SEQ ID NO:78)、CTVALPGGYVRVC (SEQ ID NO:79)、CVPELGHEC (SEQ ID NO:37)、CGRRAGGSC (SEQ ID NO:35)、CVAYCIEHHCWTC (SEQ ID NO:80)、CVFAHNYDYL VC (SEQ ID NO:81)、以及 CVFTSNYAFC (SEQ ID NO:82)、VHSPNKK (SEQ ID NO:83)、CDCRGDCFC (SEQ ID NO:31)、CRGDGWC (SEQ ID NO:84)、XRGCDX (SEQ ID NO:85)、P:XXS/T (SEQ ID NO:86)、CTTHWGFTLC (SEQ ID NO:34)、SGKGPRQITAL (SEQ ID NO:87)、A9A/Q (N/A) (L/Y) (TN/M/R) (R/K) (SEQ ID NO:88)、VYMSPF (SEQ ID NO:89)、MQLPLAT (SEQ ID NO:74)、ATWLPPR (SEQ ID NO:90)、HTMYHHYQHHL (SEQ ID NO:91)、SEVGCRAGPLQWLCEKYFG (SEQ ID NO:92)、CGLLPVGRPDNRVVRWLC (SEQ ID NO:93)、CKGQCDRFKGLPWEC (SEQ ID NO:94)、SGRSA (SEQ ID NO:95)、WGFP (SEQ ID NO:96)、LWXXAr [Ar=Y、W、F、H] (SEQ ID NO:97)、XF:XXYLW (SEQ ID NO:98)、AEPMPHSLNFSQYLWYT (SEQ ID NO:99)、WAY (W/F) SP (SEQ ID NO:100)、IELLQAR (SEQ ID NO:101)、DITWDQLWDLMK (SEQ ID NO:102)、AYTKCSRQWRTCMTH (SEQ ID NO:103)、PQNSKIPGPTFLDPH (SEQ ID NO:104)、SMEPALPDWWWKMFK (SEQ ID NO:105)、ANTPCGPYTHDCPVKR (SEQ ID NO:106)、TACHQHVRMVRP (SEQ ID NO:107)、VPWMEPAYQRFL (SEQ ID NO:108)、DPRATPGS (SEQ ID NO:109)、FRPNRAQDYNTN (SEQ ID NO:110)、CTKNSYLMC (SEQ ID NO:111)、C(R/Q)L/RT (G/N) XXG (AN) GC (SEQ ID NO:112)、CPIEDRPMC (SEQ ID NO:113)、HEWSYLAPYPWF (SEQ ID NO:114)、MCPKHPLGC (SEQ ID NO:115)、RMWPSSTVNLSAGRR (SEQ ID NO:116)、SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP (SEQ ID NO:117)、KSREHVNSACPSKRITAAL (SEQ ID NO:118)、EGFR (SEQ ID NO:119)、RVS、AGS、AGLGVR (SEQ ID NO:120)、GGR、GGL、GSV、GVS、GTRQGHTMRLGVSDG (SEQ ID NO:121)、IAGLATPGWSHWLAL (SEQ ID NO:122)、SMSIARL (SEQ ID NO:123)、HTFEPGV (SEQ ID NO:124)、NTSLKRISNKRIRRK (SEQ ID NO:125)、LRIKRKRKRKRKTRK (SEQ ID NO:126)、GGG、GFS、LWS、EGG、LLV、LSP、LBS、AGG、GRR、GGH 和 GTV)。

[0247] 作为再进一步的替代方案, 靶向序列可以是可用于化学偶联至靶向进入细胞内

的另一种分子的肽(例如,可以包含可以通过其R基团化学偶联的精氨酸和/或赖氨酸残基)。

[0248] 作为另一个选项,本发明的AAV衣壳蛋白或病毒衣壳可以包含如W0 2006/066066中描述的突变。例如,衣壳蛋白可以包含在天然AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置263、705、708和/或716处的选择性氨基酸取代,或来自另一种AAV的衣壳蛋白中的相应变化。另外或可替代地,在代表性实施方案中,衣壳蛋白、病毒衣壳或载体包含直接在AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置264之后的选择性氨基酸插入,或来自其它AAV的衣壳蛋白中的相应变化。“直接在氨基酸位置X之后”预期插入紧接在指示的氨基酸位置之后(例如,“在氨基酸位置264之后”指示在位置265处的点插入或例如从位置265到268的更大插入等)。本发明的前述实施方案可以用于将异源核酸递送至如本文所述的细胞或受试者。例如,修饰的载体可以用于治疗溶酶体贮积症,例如黏多糖贮积症(例如S1y综合征[β -葡糖醛酸酶]、胡勒尔综合征[α -L-艾杜糖醛酸酶]、沙伊综合征[α -L-艾杜糖醛酸酶]、胡勒尔-沙伊综合征[α -L-艾杜糖醛酸酶]、亨特氏综合征[艾杜糖硫酸酯酶]、沙费利波综合征A [乙酰肝素硫酸胺酶]、B [N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶]、C [乙酰CoA: α -氨基葡萄糖苷乙酰转移酶]、D [N-乙酰葡萄糖胺6-硫酸酯酶]、莫尔奎综合征A [半乳糖-6-硫酸酯硫酸酯酶]、B [β -半乳糖苷酶]、马罗托-拉米综合征[N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶]等)、法布里病(α -半乳糖苷酶)、戈谢氏病(葡萄糖脑苷脂酶)、或如本文所述的糖原贮积症(例如庞贝病;溶酶体酸性 α -葡萄糖苷酶)。

[0249] 本领域技术人员将了解,对于一些AAV衣壳蛋白,相应的修饰是插入和/或取代,取决于相应的氨基酸位置是部分还是完全存在于病毒中,或可替代地完全缺乏。同样地,当修饰除AAV2外的AAV时,特定氨基酸位置可以与AAV2中的位置不同(参见例如表3)。如本文其它地方讨论的,使用众所周知的技术,相应的氨基酸位置对于本领域技术人员是显而易见的。

[0250] 在代表性实施方案中,衣壳蛋白中的插入和/或取代和/或缺失导致氨基酸的插入、取代和/或重新定位,其(i)维持该区域中的亲水性环结构;(ii)改变环结构的构型的氨基酸;(iii)荷电氨基酸;和/或(iv)在AAV2衣壳蛋白中的264之后可以是磷酸化或硫酸化或通过翻译后修饰(例如,糖基化)以其它方式获得电荷的氨基酸,或者另一种AAV的衣壳蛋白中的相应变化。用于插入/取代的合适氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸或谷氨酰胺。在特定实施方案中,将苏氨酸插入或取代到衣壳亚基内。许多其它AAV中的相应位置的非限制性实例显示于表3中(位置2)。在特定实施方案中,氨基酸插入或取代是苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或苯丙氨酸(除了在该位置处分别具有苏氨酸、谷氨酸或苯丙氨酸的AAV)。

[0251] 根据本发明的这个方面,在一些实施方案中,AAV衣壳蛋白包含在AAV2、AAV3a或AAV3b衣壳蛋白中的氨基酸位置264之后,或者在AAV2、AAV3a或AAV3b衣壳蛋白中的相应位置的氨基酸插入,其已被修饰为分别包含非AAV2、AAV3a或AAV3b序列,和/或已通过一个或多个氨基酸的缺失进行修饰(即,衍生自AAV2、AAV3a或AAV3b)。对应于AAV2(或者AAV3a或AAV3b)衣壳亚基中的位置264的氨基酸在已衍生自AAV2(或者AAV3a或AAV3b)的起始病毒中可容易地鉴定,其然后可以根据本发明进一步修饰。用于插入的合适氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、

天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸或谷氨酰胺。

[0252] 在其它实施方案中, AAV衣壳蛋白包含在AAV1衣壳蛋白中的氨基酸位置265处、在AAV8衣壳蛋白中的氨基酸位置266处、或在AAV9衣壳蛋白中的氨基酸位置265处, 或者在AAV1、AAV8或AAV9衣壳蛋白中的相应位置中的氨基酸取代, 其已被修饰为分别包含非AAV1、非AAV8或非AAV9序列, 和/或已通过一个或多个氨基酸的缺失进行修饰(即, 衍生自AAV1、AAV8或AAV9)。对应于AAV1和AAV9衣壳亚基中的位置265以及AAV8衣壳亚基中的位置266的氨基酸在已衍生自AAV1、AAV8或AAV9的起始病毒中可容易地鉴定, 其然后可以根据本发明进一步修饰。用于插入的合适氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸或谷氨酰胺。

[0253] 在本发明的代表性实施方案中, 衣壳蛋白包含在AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置264(即插入)或另一种衣壳蛋白的相应位置之后的苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或苯丙氨酸。

[0254] 在其它代表性实施方案中, 本发明的修饰的衣壳蛋白或病毒衣壳进一步包含如W0 2007/089632中所述的一种或多种突变(例如, 在AAV2衣壳蛋白的氨基酸位置531或来自另一种AAV的衣壳蛋白的相应位置处的E7K突变)。

[0255] 在进一步的实施方案中, 修饰的衣壳蛋白或衣壳可以包含如W0 2009/108274中描述的突变。

[0256] 作为另一种可能性, AAV衣壳蛋白可以包含如由Zhong等人(*Virology* 381: 194-202(2008); *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105: 7827-32(2008))所述的突变。例如, AAV衣壳蛋白可以包含在氨基酸位置730处的YF突变。

[0257] 上述修饰可以与彼此和/或目前已知或以后发现的任何其它修饰组合掺入本发明的衣壳蛋白或衣壳内。

[0258] 本发明还涵盖了包含本发明的修饰的衣壳蛋白和衣壳的病毒载体。在特定实施方案中, 病毒载体是细小病毒载体(例如, 包含细小病毒衣壳和/或载体基因组), 例如AAV载体(例如, 包含AAV衣壳和/或载体基因组)。在代表性实施方案中, 病毒载体包含修饰的AAV衣壳, 其包含本发明的修饰的衣壳蛋白亚基和载体基因组。

[0259] 例如, 在代表性实施方案中, 病毒载体包含: (a) 包含本发明的修饰衣壳蛋白的修饰病毒衣壳(例如, 修饰的AAV衣壳); 以及 (b) 包含末端重复序列(例如AAV TR)的核酸, 其中包含末端重复序列的核酸被修饰的病毒衣壳包入衣壳。核酸可以任选地包含两个末端重复(例如, 两个AAV TR)。

[0260] 在代表性实施方案中, 病毒载体是重组病毒载体, 其包含编码目标多肽或功能性RNA的异源核酸。下文更详细地描述了重组病毒载体。

[0261] 在一些实施方案中, 本发明的病毒载体(i) 与通过不含本发明的修饰衣壳蛋白的病毒载体的转导水平相比, 具有减少的肝转导; (ii) 与通过不含本发明的修饰衣壳蛋白的病毒载体观察到的水平相比, 在动物受试者中显示出通过病毒载体的增强全身转导; (iii) 与通过不含本发明的修饰衣壳蛋白的病毒载体的运动水平相比, 证实跨越内皮细胞的增强运动, 和/或(iv) 在肌肉组织(例如, 骨骼肌、心肌和/或横膈肌)的转导中显示出选择性增强, 和/或(v) 与通过不含本发明的修饰衣壳蛋白的病毒载体的转导水平相比, 脑组织(例如, 神经元)的减少转导。在一些实施方案中, 病毒载体具有针对肌肉的全身转导, 例如, 它

转导遍及全身的多个骨骼肌群并且任选地转导心肌和/或横膈肌。

[0262] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,修饰的病毒载体证实靶组织的有效转导。

[0263] 本领域技术人员将理解,本发明的修饰的衣壳蛋白、病毒衣壳、病毒载体和AAV颗粒排除那些衣壳蛋白、衣壳、病毒载体和AAV颗粒,因为它们以其天然状态存在或发现。

[0264] 产生病毒载体的方法

[0265] 本发明进一步提供了产生本发明的本发明病毒载体作为AAV颗粒的方法。因此,本发明提供了制备包含本发明的AAV衣壳的AAV颗粒的方法,其包括:(a)用一种或多种质粒转染宿主细胞,所述质粒组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因;(b)将一种或多种核酸构建体引入包装细胞系或生产细胞系内,以组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因;(c)将一种或多种重组杆状病毒载体引入宿主细胞内,所述重组杆状病毒载体组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因;和/或(d)将一种或多种重组疱疹病毒载体引入宿主细胞内,所述重组疱疹病毒载体组合提供组装AAV颗粒所需的所有功能和基因。制备本发明的病毒载体的各种方法的非限制性实例描述于Clement和Grieger(“Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials” *Mol. Ther. Methods Clin Dev.* 3:16002(2016)),以及Grieger等人(“Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector” *Mol Ther* 24(2):287-297(2016))中,其全部内容引入本文作为参考。

[0266] 在一个代表性实施方案中,本发明提供了产生病毒载体的方法,该方法包括向细胞提供:(a)包含至少一个TR序列(例如AAV TR序列)的核酸模板,以及(b)足以复制核酸模板和包入AAV衣壳内的AAV序列(例如,编码本发明的AAV衣壳的AAV *rep*序列和AAV *cap*序列)。任选地,核酸模板进一步包含至少一种异源核酸序列。在特定实施方案中,核酸模板包含两个AAV ITR序列,其位于异源核酸序列(如果存在的话)的5'和3',尽管它们无需与其直接邻接。

[0267] 在这样的条件下提供核酸模板以及AAV *rep*和*cap*序列,使得在细胞中产生包含在AAV衣壳内包装的核酸模板的病毒载体。该方法可以进一步包括从细胞中收集病毒载体的步骤。可以从培养基中和/或通过裂解细胞来收集病毒载体。

[0268] 细胞可以是允许AAV病毒复制的细胞。可以采用本领域已知的任何合适的细胞。在特定实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。作为另一个选项,细胞可以是反式互补包装细胞系,其提供从复制缺陷型辅助病毒中缺失的功能,例如293细胞或其它Ela反式互补细胞。

[0269] 可以通过本领域已知的任何方法提供AAV复制和衣壳序列。当前的方案通常在单个质粒上表达AAV *rep/cap*基因。AAV复制和包装序列无需一起提供,尽管这样做可能是方便的。AAV *rep*和/或*cap*序列可以由任何病毒或非病毒载体提供。例如,*rep/cap*序列可以由杂合腺病毒或疱疹病毒载体提供(例如,插入缺陷型腺病毒载体的Ela或E3区域内)。EBV载体也可以用于表达AAV *cap*和*rep*基因。这种方法的一个优点是EBV载体是附加型的,但在连续的细胞分裂自始至终维持高拷贝数(即,作为染色体外元件稳定整合到细胞内,指名为“基于EBV的核附加体”,参见Margolski,(1992)*Curr. Top. Microbiol. Immun.* 158:67)。

[0270] 作为进一步的替代方案,*rep/cap*序列可以稳定掺入细胞内。通常,AAV *rep/cap*序列不由TR侧接,以预防这些序列的援救和/或包装。

[0271] 可以使用本领域已知的任何方法将核酸模板提供给细胞。例如,模板可以由非病毒(例如质粒)或病毒载体提供。在特定实施方案中,核酸模板由疱疹病毒或腺病毒载体供应(例如,插入缺陷型腺病毒的E1a或E3区域内)。作为另一个示例,Palombo等人,(1998)*J. Virology* 72:5025,描述了携带由AAV TR侧接的报告基因的杆状病毒载体。EBV载体也可以用于递送模板,如上文关于*rep/cap*基因所述的。

[0272] 在另一个代表性实施方案中,核酸模板由复制的rAAV病毒提供。在另外其它实施方案中,包含核酸模板的AAV原病毒稳定整合到细胞的染色体内。

[0273] 为了增强病毒滴度,可以向细胞提供促进生产性AAV感染的辅助病毒功能(例如,腺病毒或疱疹病毒)。AAV复制所必需的辅助病毒序列是本领域已知的。通常,这些序列将由辅助腺病毒或疱疹病毒载体提供。可替代地,腺病毒或疱疹病毒序列可以由另一种非病毒或病毒载体提供,例如,作为非感染性腺病毒微质粒,其携带促进有效AAV产生的所有辅助基因,如由Ferrari等人,(1997)*Nature Med.* 3:1295,以及美国专利号6,040,183和6,093,570描述的。

[0274] 进一步地,辅助病毒功能可以由包装细胞提供,其中辅助序列嵌入染色体中或作为稳定的染色体外元件维持。一般地,辅助病毒序列不能包装到AAV病毒粒子内,例如,不由TR侧接。

[0275] 本领域技术人员将了解,在单一辅助构建体上提供AAV复制和衣壳序列以及辅助病毒序列(例如,腺病毒序列)可能是有利的。这种辅助构建体可以是非病毒或病毒构建体。作为一个非限制性说明,辅助构建体可以是包含AAV *rep/cap*基因的杂合腺病毒或杂合疱疹病毒。

[0276] 在一个特定实施方案中,AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体供应。这种载体可以进一步包含核酸模板。可以将AAV *rep/cap*序列和/或rAAV模板插入腺病毒的缺失区域(例如,E1a或E3区域)内。

[0277] 在进一步的实施方案中,AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体供应。根据这个实施方案,rAAV模板可以作为质粒模板提供。

[0278] 在另一个说明性实施方案中,AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体提供,并且rAAV模板作为原病毒整合到细胞内。可替代地,rAAV模板由EBV载体提供,所述EBV载体作为染色体外元件(例如,作为基于EBV的核附加体)维持在细胞内。

[0279] 在一个进一步的示例性实施方案中,AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助物提供。rAAV模板可以作为分开的复制病毒载体提供。例如,rAAV模板可以由rAAV颗粒或第二重组腺病毒颗粒提供。

[0280] 根据前述方法,杂合腺病毒载体通常包含足以用于腺病毒复制和包装的腺病毒5'和3'顺式序列(即,腺病毒末端重复和PAC序列)。AAV *rep/cap*序列和rAAV模板(如果存在的话)嵌入腺病毒主链中,并且侧翼为5'和3'顺式序列,使得这些序列可以包装到腺病毒衣壳内。如上所述,腺病毒辅助序列和AAV *rep/cap*序列通常不由TR侧接,使得这些序列不包装到AAV病毒粒子内。

[0281] Zhang等人,((2001)*Gene Ther.* 18:704-12)描述了包含腺病毒以及AAV *rep*和*cap*基因两者的嵌合辅助物。

[0282] 疱疹病毒也可以用作AAV包装方法中的辅助病毒。

[0283] 编码AAV Rep蛋白的杂合疱疹病毒可以有利地促进可扩展的AAV载体生产方案。已描述了表达AAV-2 *rep*和*cap*基因的杂合单纯疱疹病毒I型(HSV-1)载体(Conway等人,(1999)*Gene Therapy* 6:986和WO 00/17377)。

[0284] 作为进一步的替代方案,本发明的病毒载体可以使用杆状病毒载体在昆虫细胞中产生,以递送*rep/cap*基因和rAAV模板,例如,如由Urabe等人,(2002)*Human Gene Therapy* 13:1935-43描述的。

[0285] 可以通过本领域已知的任何方法获得不含污染性辅助病毒的AAV载体。例如,可以基于大小容易地区分AAV和辅助病毒。基于对于肝素底物的亲和力,还可以将AAV与辅助病毒分开(Zolotukhin等人(1999)*Gene Therapy*6:973)。可以使用缺失的复制缺陷型辅助病毒,使得任何污染性辅助病毒都不具有复制能力。作为进一步的替代方案,可以采用缺乏晚期基因表达的腺病毒辅助物,因为仅需要腺病毒早期基因表达来介导AAV病毒的包装。对于晚期基因表达缺陷的腺病毒突变体是本领域已知的(例如,ts100K和ts149腺病毒突变体)。

[0286] 重组病毒载体

[0287] 本发明提供了向细胞施用核酸分子的方法,该方法包括使细胞与本发明的病毒载体、AAV颗粒和/或组合物或药物制剂接触。

[0288] 本发明进一步提供了将核酸递送至受试者的方法,该方法包括向受试者施用本发明的病毒载体、AAV颗粒和/或组合物或药物制剂。

[0289] 在特定实施方案中,受试者是人,并且在一些实施方案中,受试者患有病症或处于病症的危险中,所述病症可以通过基因治疗方案进行治疗。此类病症的非限制性实例包括:肌营养不良包括杜氏或贝氏肌营养不良、血友病A、血友病B、多发性硬化、糖尿病、戈谢病、法布里病、庞贝病、癌症、关节炎、肌肉消耗、心脏病包括充血性心力衰竭或外周动脉疾病、内膜增生、神经障碍包括:癫痫、亨廷顿氏病、帕金森氏病或阿尔茨海默氏病、自身免疫性疾病、囊性纤维化、地中海贫血、胡勒尔综合征、Sly综合征、沙伊综合征、胡勒尔-沙伊综合征、亨特综合征、沙费利波综合征A、B、C、D、莫尔奎综合征、马罗托-拉米综合征、克拉伯氏病、苯丙酮尿症、巴滕氏病、脊髓小脑性共济失调、LDL受体缺乏症、高氨血症、贫血、关节炎、视网膜变性病症包括黄斑变性、腺苷脱氨酶缺乏症、代谢病症和癌症包括肿瘤形成癌症。

[0290] 在本发明的方法的一些实施方案中,本发明的病毒载体、AAV颗粒和/或组合物或药物制剂可以施用于骨骼肌、心肌和/或横膈肌。

[0291] 在本文所述的方法中,本发明的病毒载体、AAV颗粒和/或组合物或药物制剂可以由全身途径(例如,静脉内、动脉内、腹膜内等)施用/递送至本发明的受试者。在一些实施方案中,病毒载体和/或组合物可以经由脑室内、脑池内、实质内、颅内和/或鞘内途径来施用于受试者。在特定实施方案中,静脉内施用本发明的病毒载体和/或药物制剂。

[0292] 本发明的病毒载体可用于在体外、离体和体内将核酸分子递送至细胞。特别地,病毒载体可以有利地用于将核酸分子递送或转移至动物细胞,包括哺乳动物细胞。

[0293] 可以在本发明的病毒载体中递送任何目标异源核酸序列。目标核酸分子包括编码多肽的核酸分子,所述多肽包括治疗性(例如,用于医学或兽医学用途)和/或免疫原性(例如用于疫苗)多肽。

[0294] 治疗性多肽包括但不限于囊性纤维化跨膜调节蛋白(CFTR)、肌营养不良蛋白(包括小肌营养不良蛋白和微肌营养不良蛋白,参见例如,Vincent等人,(1993)*Nature*

Genetics 5:130;美国专利公开号2003/017131;国际专利公开号W0/2008/088895,Wang等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13714-13719(2000);以及Gregorevic等人,*Mol. Ther.* 16:657-64(2008))、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、IGF-1、抗炎多肽如I κ B显性突变体、肌长蛋白(sarcospan)、utrophin(Tinsley等人,(1996)*Nature* 384:349)、mini-utrophin、凝血因子(例如,因子VIII、因子IX、因子X等)、促红细胞生成素、血管抑素、内皮抑素、过氧化氢酶、酪氨酸羟化酶、超氧化物歧化酶、瘦素、LDL受体、脂蛋白脂酶、鸟氨酸转氨甲酰酶、 β 珠蛋白、 α -珠蛋白、血影蛋白、 α_1 -抗胰蛋白酶、腺苷脱氨酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶、葡糖脑苷脂酶、鞘磷脂酶、溶酶体己糖胺酶A、支链酮酸脱氢酶、RP65蛋白、细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、干扰素- γ 、白细胞介素-2、白细胞介素-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等等)、肽生长因子、神经营养因子和激素(例如,生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1和2、血小板衍生的生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、神经营养因子-3和-4、脑衍生的神经营养因子、骨形态发生蛋白[包括RANKL和VEGF]、胶质细胞衍生的生长因子、转化生长因子- α 和- β 等等)、溶酶体酸性 α -葡糖苷酶、 α -半乳糖苷酶A、受体(例如,肿瘤坏死生长因子- α 可溶性受体)、S100A1、小白蛋白、腺苷酸环化酶6型、调节钙处理的分子(例如,SERCA_{2A}、PP1的抑制剂1及其片段[例如,W0 2006/029319和W0 2007/100465])、实现G蛋白偶联受体激酶2型击倒的分子例如截短的组成型活性bARKct、抗炎因子如IRAP、抗肌肉生长抑制素蛋白、天冬氨酸酰胺酶、单克隆抗体(包括单链单克隆抗体;示例性Mab是Herceptin® Mab)、神经肽及其片段(例如,甘丙肽、神经肽Y(参见美国专利号7,071,172)、血管生成抑制剂例如Vasohibin及其它VEGF抑制剂(例如,Vasohibin 2 [参见W0 JP2006/073052])。其它示例性异源核酸序列编码自杀基因产物(例如,胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素和肿瘤坏死因子)、赋予对癌症治疗中使用的药物的抗性的蛋白质、肿瘤抑制基因产物(例如,p53、Rb、Wt-1)、TRAIL、FAS-配体、以及在有此需要的受试者中具有疗效的任何其它多肽。AAV载体也可以用于递送单克隆抗体和抗体片段,例如,针对肌肉生长抑制素的抗体或抗体片段(参见例如,Fang等人,*Nature Biotechnology* 23:584-590(2005))。

[0295] 编码多肽的异源核酸序列包括编码报道多肽(例如酶)的那些。报道多肽是本领域已知的,并且包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、萤光素酶和氯霉素乙酰转移酶基因。

[0296] 任选地,异源核酸分子编码分泌性多肽(例如,在其天然状态下是分泌性多肽,或例如通过与如本领域已知的分泌信号序列可操作地结合,已被改造为分泌的多肽)。

[0297] 可替代地,在本发明的特定实施方案中,异源核酸分子可以编码反义核酸分子,核酶(例如,如美国专利号5,877,022中所述),实现剪接体介导的反式剪接的RNA(参见Puttaraju等人,(1999)*Nature Biotech.* 17:246;美国专利号6,013,487;美国专利号6,083,702),干扰RNA(RNAi)包括介导基因沉默的siRNA、shRNA或miRNA(参见,Sharp等人,(2000)*Science* 287:2431),以及其它非翻译RNA,例如“指导”RNA(Gorman等人,(1998)*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:4929;给予Yuan等人的美国专利号5,869,248)等等。示例性非翻译RNA包括针对多药抗性(MDR)基因产物的RNAi(例如,以治疗和/或预防肿瘤和/或用于施用于心脏以预防通过化学疗法的损伤)、针对肌肉生长抑制素的RNAi(例如,用于杜氏肌营养不良)、针对VEGF的RNAi(例如,以治疗和/或预防肿瘤)、针对受磷蛋白的RNAi(例

如,以治疗心血管疾病,参见例如,Andino等人,*J. Gene Med.* 10:132-142(2008),以及Li等人,*Acta Pharmacol Sin.* 26:51-55(2005);受磷蛋白抑制性或显性失活分子如受磷蛋白S16E(例如,以治疗心血管疾病,参见例如,Hoshijima等人*Nat. Med.* 8:864-871(2002))、对于腺苷激酶的RNAi(例如,用于癫痫)、以及针对致病性生物和病毒(例如,乙型肝炎病毒和/或丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、CMV、单纯疱疹病毒、人乳头状瘤病毒等)的RNAi。

[0298] 进一步地,可以递送指导可变剪接的核酸序列。为了说明,与肌营养不良蛋白外显子51的5'和/或3'剪接位点互补的反义序列(或其它抑制序列)可以与U1或U7小核(sn)RNA启动子结合递送,以诱导这个外显子的跳跃。例如,包含位于反义/抑制序列5'的U1或U7 snRNA启动子的DNA序列可以在本发明的修饰衣壳中包装且递送。

[0299] 病毒载体还可以包含异源核酸分子,其与宿主细胞染色体上的基因座共享同源性且与之重组。这种方法可以用于例如校正宿主细胞中的遗传缺陷。

[0300] 本发明还提供了表达免疫原性多肽、肽和/或表位的病毒载体,例如用于疫苗接种。核酸分子可以编码本领域已知的任何目标免疫原,包括但不限于来自人免疫缺陷病毒(HIV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、流感病毒的免疫原、HIV或SIV gag蛋白、肿瘤抗原、癌症抗原、细菌抗原、病毒抗原等等。

[0301] 细小病毒作为疫苗载体的用途是本领域已知的(参见例如,Miyamura等人,(1994) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 91:8507;给予Young等人的美国专利号5,916,563,给予Mazzara等人的美国专利号5,905,040,美国专利号5,882,652和给予Samulski等人的美国专利号5,863,541)。抗原可以存在于细小病毒衣壳中。可替代地,免疫原或抗原可以由引入重组载体基因组内的异源核酸分子表达。如本文所述和/或本领域已知的任何目标免疫原或抗原可以由本发明的病毒载体提供。

[0302] 免疫原性多肽可以是适合于引发免疫应答和/或保护受试者不受感染和/或疾病的任何多肽、肽和/或表位,包括但不限于微生物、细菌、原生动物、寄生虫、真菌和/或病毒感染和疾病。例如,免疫原性多肽可以是正粘病毒免疫原(例如,流感病毒免疫原,例如流感病毒血凝素(HA)表面蛋白或流感病毒核蛋白,或马流感病毒免疫原),或慢病毒免疫原(例如,马传染性贫血病毒免疫原,猿猴免疫缺陷病毒(SIV)免疫原,或人免疫缺陷病毒(HIV)免疫原,例如HIV或SIV包膜GP160蛋白,HIV或SIV基质/衣壳蛋白,以及HIV或SIV gag、pol和env基因产物)。免疫原性多肽也可以是沙粒病毒免疫原(例如,拉沙热病毒免疫原,例如拉沙热病毒核衣壳蛋白和拉沙热包膜糖蛋白)、痘病毒免疫原(例如牛痘病毒免疫原,例如牛痘病毒L1或L8基因产物)、黄病毒免疫原(例如,黄热病病毒免疫原或日本脑炎病毒免疫原)、丝状病毒免疫原(例如,埃博拉病毒免疫原或马尔堡病毒免疫原,例如NP和GP基因产物)、布尼亚病毒免疫原(例如,RVFPV、CCHF和/或SFS病毒免疫原)、或冠状病毒免疫原(例如,感染性人冠状病毒免疫原,例如人冠状病毒包膜糖蛋白,或猪传染性胃肠炎病毒免疫原,或禽感染性支气管炎病毒免疫原)。免疫原性多肽可以进一步是脊髓灰质炎免疫原、疱疹免疫原(例如,CMV、EBV、HSV免疫原)、腮腺炎免疫原、麻疹免疫原、风疹免疫原、白喉毒素或其它白喉免疫原、百日咳抗原、肝炎(例如,甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎等)免疫原、和/或本领域目前已知的或以后鉴定为免疫原的任何其它疫苗免疫原。

[0303] 可替代地,免疫原性多肽可以是任何肿瘤或癌细胞抗原。任选地,肿瘤或癌症抗原

在癌细胞的表面上表达。示例性癌症和肿瘤细胞抗原描述于S.A. Rosenberg (*Immunity* 10:281 (1991)) 中。其它示例性癌症和肿瘤抗原包括但不限于:BRCA1基因产物、BRCA2基因产物、gp100、酪氨酸酶、GAGE-1/2、BAGE、RAGE、LAGE、NY-ESO-1、CDK-4、 β -连环蛋白、MUM-1、半胱天冬酶-8、KIAA0205、HPVE、SART-1、PRAME、p15、黑色素瘤肿瘤抗原 (Kawakami 等人, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3515; Kawakami 等人, (1994) *J. Exp. Med.*, 180: 347; Kawakami 等人, (1994) *Cancer Res.* 54:3124)、MART-1、gp100 MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、TRP-1、TRP-2、P-15、酪氨酸酶 (Brichard 等人, (1993) *J. Exp. Med.* 178:489); HER-2/neu 基因产物 (美国专利号 4,968,603)、CA 125、LK26、FB5 (内皮唾液酸蛋白)、TAG 72、AFP、CA19-9、NSE、DU-PAN-2、CA50、SPan-1、CA72-4、HCG、STN (唾液酸Tn抗原)、c-erbB-2 蛋白、PSA、L-CanAg、雌激素受体、乳脂球蛋白、p53 肿瘤抑制蛋白 (Levine, (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:623); 粘蛋白抗原 (国际专利公开号 WO 90/05142); 端粒酶; 核基质蛋白、前列腺酸性磷酸酶; 乳头状瘤病毒抗原; 和/或目前已知或以后发现与下述癌症相关的抗原: 黑色素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤 (例如, 非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌和目前已知或以后鉴定的任何其它癌症或恶性状况 (参见例如, Rosenberg, (1996) *Ann. Rev. Med.* 47:481-91)。

[0304] 作为进一步的替代方案, 异源核酸分子可以编码在体外、离体或体内期望地在细胞中产生的任何多肽、肽和/或表位。例如, 可以将病毒载体引入培养的细胞内, 并且从中分离表达的基因产物。

[0305] 本领域技术人员将理解, 目标异源核酸分子可以与适当的控制序列可操作地结合。例如, 异源核酸分子可以与表达控制元件可操作地结合, 所述表达控制元件例如转录/翻译控制信号、复制起点、多腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点 (IRES)、启动子和/或增强子等等。

[0306] 进一步地, 例如通过选择性地阻断在特定位点处的剪接活性的寡核苷酸、小分子和/或其它化合物的存在或不存在, 通过调节不同内含子的选择性剪接, 可以在转录后水平实现目标异源核酸分子的调节表达 (例如, 如 WO 2006/119137 中所述)。

[0307] 本领域技术人员将了解, 可以使用各种启动子/增强子元件, 取决于所需的水平和组织特异性表达。启动子/增强子可以是组成型或诱导型的, 取决于所需的表达模式。启动子/增强子可以是天然的或外源的, 并且可以是天然序列或合成序列。外源预期在转录起始区引入其内的野生型宿主中未发现转录起始区。

[0308] 在特定实施方案中, 启动子/增强子元件对于待处理的靶细胞或受试者可以是天然的。在代表性实施方案中, 启动子/增强子元件对于异源核酸序列可以是天然的。

[0309] 一般这样选择启动子/增强子元件, 使得它在目标靶细胞中起作用。进一步地, 在特定实施方案中, 启动子/增强子元件是哺乳动物启动子/增强子元件。启动子/增强子元件可以是组成型或诱导型的。

[0310] 诱导型表达控制元件通常在期望提供对异源核酸序列表达的调节的那些应用中是有利的。用于基因递送的诱导型启动子/增强子元件可以是组织特异性或优选的启动子/增强子元件, 并且包括肌肉特异性或优选的 (包括心肌、骨骼肌和/或平滑肌特异性或优选的)、神经组织特异性或优选的 (包括脑特异性或优选的)、眼特异性或优选的 (包括视网膜

特异性或角膜特异性的)、肝特异性或优选的、骨髓特异性或优选的、胰腺特异性或优选的、脾特异性或优选的、以及肺特异性或优选的启动子/增强子元件。其它诱导型启动子/增强子元件包括激素诱导型和金属诱导型元件。示例性诱导型启动子/增强子元件包括但不限于Tet开/关元件、RU486诱导型启动子、蜕皮激素诱导型启动子、雷帕霉素诱导型启动子和金属硫蛋白启动子。

[0311] 在其中异源核酸序列在靶细胞中被转录然后被翻译的实施方案中,一般包括特异性起始信号用于插入的蛋白质编码序列的有效翻译。可以包括ATG起始密码子和相邻序列的这些外源翻译控制序列,可以具有天然和合成两者的各种来源。

[0312] 根据本发明的病毒载体提供了用于将异源核酸分子递送到广泛范围的细胞内的手段,所述细胞包括分裂细胞和非分裂细胞。病毒载体可以用于在体外将目标核酸分子递送至细胞,例如,以在体外产生多肽或者用于离体或体内基因治疗。病毒载体另外可用于将核酸递送至有此需要的受试者的方法中,例如,以表达免疫原性或治疗性多肽或功能性RNA。以这种方式,多肽或功能RNA可以在受试者体内产生。受试者可能需要多肽,因为受试者具有该多肽的缺乏。

[0313] 进一步地,可以实践该方法是因为受试者中多肽或功能性RNA的产生可以赋予一些有益效应。

[0314] 病毒载体还可以用于在培养的细胞或受试者中产生目标多肽或功能性RNA(例如,使用受试者作为生物反应器,以产生多肽或观察功能性RNA对受试者的作用,例如,与筛选方法结合)。

[0315] 一般而言,本发明的病毒载体可以用于递送编码多肽或功能性RNA的异源核酸分子,以治疗和/或预防递送治疗性多肽或功能性RNA对于其有益的任何病症或疾病状态。示例性疾病状态包括但不限于:囊性纤维化(囊性纤维化跨膜调节蛋白)及其它肺病、血友病A(因子VIII)、血友病B(因子IX)、地中海贫血(β -珠蛋白)、贫血(促红细胞生成素)及其它血液病症、阿尔茨海默氏病(GDF;脑啡肽酶)、多发性硬化(β -干扰素)、帕金森氏病(胶质细胞系衍生的神经营养因子[GDNF])、亨廷顿氏病(去除重复的RNAi)、肌萎缩侧索硬化、癫痫(甘丙肽、神经营养因子)、以及其它神经障碍、癌症(内皮抑素、血管抑素、TRAIL、FAS配体、细胞因子包括干扰素;RNAi包括针对VEGF或多药抗性基因产物的RNAi、mir-26a [例如,用于肝细胞癌]、糖尿病(胰岛素)、肌营养不良包括杜氏(肌营养不良蛋白、小肌营养不良蛋白、胰岛素样生长因子I、肌聚糖[例如, α 、 β 、 γ]、针对肌肉生长抑制素的RNAi、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、抗炎多肽例如I κ B显性突变体、肌长蛋白、utrophin、mini-utrophin、针对肌营养不良蛋白基因中的剪接点以诱导外显子跳跃的反义或RNAi [参见例如,WO 2003/095647]、针对U7 snRNA以诱导外显子跳跃的反义物[参见例如,WO 2006/021724]、以及针对肌肉生长抑制素或肌肉生长抑制素前肽的抗体或抗体片段)和贝氏、戈谢病(葡糖脑苷脂酶)、胡勒尔氏病(α -L-艾杜糖醛酸酶)、腺苷脱氨酶缺乏症(腺苷脱氨酶)、糖原贮积病(例如,法布里病[α -半乳糖苷酶]和庞贝病[溶酶体酸性 α -葡糖苷酶])及其它代谢病症、先天性肺气肿(α 1-抗胰蛋白酶)、莱施-尼汉综合征(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)、尼曼-匹克病(鞘磷脂酶)、戴萨克斯症(溶酶体己糖胺酶A)、枫糖尿症(支链酮酸脱氢酶)、视网膜变性疾病(以及眼和视网膜的其它疾病;例如,PDGF用于黄斑变性和/或vasohibin或VEGF的其它抑制剂或其它血管生成抑制剂,以治疗/预防视网膜病症,例如在I

型糖尿病中)、实体器官如脑的疾病(包括帕金森氏病[GDNF]、星形细胞瘤[内皮抑素、血管抑素和/或针对VEGF的RNAi]、胶质母细胞瘤[内皮抑素、血管抑素和/或针对VEGF的RNAi]、肝、肾、心脏包括充血性心力衰竭或外周动脉疾病(PAD)(例如,通过递送蛋白磷酸酶抑制剂I(I-1)及其片段(例如,I1C)、serca2a、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、Barkct、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3激酶(PI3激酶)、S100A1S100A1、小白蛋白、腺苷酸环化酶6型、实现G蛋白偶联受体激酶2型击倒的分子例如截短的组成型活性bARKct;calsarcin、针对受磷蛋白的RNAi;受磷蛋白抑制性或显性失活分子如受磷蛋白S16E等)、关节炎(胰岛素样生长因子)、关节病症(胰岛素样生长因子1和/或2)、内膜增生(例如,通过递送enos、inos)、改善心脏移植的存活(超氧化物歧化酶)、AIDS(可溶性CD4)、肌肉消耗(胰岛素样生长因子I)、肾虚(促红细胞生成素)、贫血(促红细胞生成素)、关节炎(抗炎因子如IRAP和TNF α 可溶性受体)、肝炎(α -干扰素)、LDL受体缺乏症(LDL受体)、高氨血症(鸟氨酸转氨甲酰酶)、克拉伯氏病(半乳糖脑苷脂酶)、巴滕氏病、脊髓小脑性共济失调(包括SCA1、SCA2和SCA3)、苯丙酮尿症(苯丙氨酸羟化酶)、自身免疫性疾病等等。本发明可以进一步在器官移植之后使用,以增加移植的成功和/或减少器官移植或辅助治疗的负面副作用(例如,通过施用免疫抑制剂或抑制性核酸来阻断细胞因子产生)。作为另一个实例,骨形态发生蛋白(包括BNP 2、7等,RANKL和/或VEGF)可以与骨同种异体移植物一起施用,例如,在癌症患者中的断裂或手术切除后。

[0316] 本发明还可以用于产生诱导的多能干细胞(iPS)。例如,本发明的病毒载体可以用于将干细胞相关核酸递送到非多能细胞内,例如成人成纤维细胞、皮肤细胞、肝细胞、肾细胞、脂肪细胞、心肌细胞、神经细胞、上皮细胞、内皮细胞等等。编码与干细胞相关的因子的核酸是本领域已知的。与干细胞和多能性相关的此类因子的非限制性实例包括Oct-3/4、SOX家族(例如,SOX1、SOX2、SOX3和/或SOX15)、Klf家族(例如,Klf1、Klf2、Klf4和/或Klf5)、Myc家族(例如,C-myc、L-myc和/或N-myc)、NANOG和/或LIN28。

[0317] 还可以实践本发明,以治疗和/或预防代谢病症,例如糖尿病(例如胰岛素)、血友病(例如因子IX或因子VIII)、溶酶体贮积症例如黏多糖贮积症(例如Sly综合征[β -葡糖醛酸酶]、胡勒尔综合征[α -L-艾杜糖醛酸酶]、沙伊综合征[α -L-艾杜糖醛酸酶]、胡勒尔-沙伊综合征[α -L-艾杜糖醛酸酶]、亨特氏综合征[艾杜糖硫酸酯酶]、沙费利波综合征A[乙酰肝素硫酸胺酶]、B[N-乙酰葡糖胺糖苷酶]、C[乙酰CoA: α -氨基葡糖苷乙酰转移酶]、D[N-乙酰葡糖胺6-硫酸酯酶]、莫尔奎综合征A[半乳糖-6-硫酸酯硫酸酯酶]、B[β -半乳糖苷酶]、马罗托-拉米综合征[N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶]等)、法布里病(α -半乳糖苷酶)、戈谢氏病(葡糖脑苷脂酶)、或糖原贮积症(例如庞贝病;溶酶体酸性 α -葡糖苷酶)。

[0318] 基因转移具有用于理解且提供用于疾病状态的疗法的大量潜在用途。存在其中缺陷基因是已知且已被克隆的许多遗传疾病。一般而言,上述疾病状态分为两类:通常为酶的缺乏状态,其一般以隐性方式遗传,以及不平衡状态,其可以涉及调节蛋白或结构蛋白,并且通常以显性方式遗传。对于缺乏状态疾病,基因转移可以用于将正常基因带入受影响的组织内用于替代疗法,以及使用反义突变产生关于疾病的动物模型。对于不平衡的疾病状态,基因转移可以用于在模型系统中产生疾病状态,所述模型系统然后可以用于对抗疾病状态的努力中。因此,根据本发明的病毒载体允许遗传疾病的治疗和/或预防。

[0319] 根据本发明的病毒载体也可以用于在体外或体内对细胞提供功能性RNA。例如,功

能性RNA在细胞中的表达可以减小特定靶蛋白通过细胞的表达。相应地，可以施用功能性RNA以降低有此需要的受试者中特定蛋白质的表达。功能性RNA也可以在体外施用于细胞，以调节基因表达和/或细胞生理学，例如，以优化细胞或组织培养系统或筛选方法。

[0320] 另外，根据本发明的病毒载体可用于诊断和筛选方法中，由此目标核酸在细胞培养系统中或可替代地转基因动物模型中瞬时或稳定表达。

[0321] 本发明的病毒载体还可以用于各种非治疗目的，包括但不限于在评价基因靶向、清除、转录、翻译等的方案中使用，如对于本领域技术人员显而易见的。病毒载体也可以用于评估安全性（传播、毒性、免疫原性等）的目的。例如，此类数据被美国食品和药物管理局视为在临床疗效评估之前的监管批准过程的部分。

[0322] 作为进一步方面，本发明的病毒载体可以用于在受试者中产生免疫应答。根据这个实施方案，可以向受试者施用包含编码免疫原性多肽的异源核酸序列的病毒载体，并且由受试者产生针对免疫原性多肽的主动免疫应答。免疫原性多肽如上文所述。在一些实施方案中，引发保护性免疫应答。

[0323] 可替代地，可以将病毒载体离体施用于细胞，并且将改变的细胞施用于受试者。将包含异源核酸的病毒载体引入细胞内，并且将细胞施用于受试者，在其中可以表达编码免疫原的异源核酸，并且在受试者中诱导针对免疫原的免疫应答。在特定实施方案中，细胞是抗原呈递细胞（例如，树突状细胞）。

[0324] “主动免疫应答”或“主动免疫”的特征在于“在与免疫原相遇后宿主组织和细胞的参与。它涉及淋巴网状组织中免疫活性细胞的分化和增殖，其导致抗体的合成或细胞介导的反应性的发展或两者”。Herbert B. Herscovitz, *Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation*, in *IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES* 117 (Joseph A. Bellanti编辑, 1985)。换言之，在通过感染或疫苗接种而暴露于免疫原后，由宿主产生主动免疫应答。主动免疫可以与被动免疫形成对比，所述被动免疫通过“将预先形成的物质（抗体、转移因子、胸腺移植物和白细胞介素-2）从主动免疫的宿主转移到非免疫宿主而获得”。同上。

[0325] 如本文使用的，“保护性”免疫应答或“保护性”免疫指示免疫应答对受试者赋予一些益处，因为它预防或减少了疾病的发病率。可替代地，保护性免疫应答或保护性免疫可以用于治疗和/或预防疾病，特别是癌症或肿瘤（例如，通过预防癌症或肿瘤形成，通过引起癌症或肿瘤消退和/或通过预防转移和/或通过预防转移性结节的生长）。保护作用可以是完全的或部分的，只要治疗的益处超过其任何缺点。

[0326] 在特定实施方案中，包含异源核酸分子的病毒载体或细胞可以以免疫原性有效量施用，如下文所述。

[0327] 本发明的病毒载体还可以通过施用病毒载体来施用用于癌症免疫疗法，所述病毒载体表达一种或多种癌细胞抗原（或免疫学上类似的分子）或任何其它免疫原，其产生针对癌细胞的免疫应答。为了说明，通过施用包含编码癌细胞抗原的异源核酸的病毒载体，可以在受试者中产生针对癌细胞抗原的免疫应答，例如以治疗患有癌症的患者和/或预防癌症在受试者中的发展。如本文所述，病毒载体可以在体内或通过使用离体方法施用于受试者。可替代地，癌症抗原可以表达为病毒衣壳的部分或以其它方式与病毒衣壳结合（例如，如上所述）。

[0328] 作为另一种替代方案,可以施用本领域已知的任何其它治疗性核酸(例如RNAi)或多肽(例如细胞因子),以治疗和/或预防癌症。

[0329] 如本文使用的,术语“癌症”涵盖肿瘤形成癌症。

[0330] 同样地,术语“癌组织”涵盖肿瘤。“癌细胞抗原”涵盖肿瘤抗原。

[0331] 术语“癌症”具有其在本领域中理解的含义,例如组织的不受控制的生长,其具有扩散到身体的远处部位(即,转移)的潜力。示例性癌症包括但不限于黑色素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌和目前已知或以后鉴定的任何其它癌症或恶性状况。在代表性实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防肿瘤形成癌症的方法。

[0332] 术语“肿瘤”在本领域中也理解,例如,作为多细胞生物内的未分化细胞的异常团块。肿瘤可以是恶性的或良性的。在代表性实施方案中,本文公开的方法用于预防和治疗恶性肿瘤。

[0333] 术语“治疗癌症”、“癌症的治疗”和等价术语,预期减少或至少部分消除癌症的严重性和/或减缓和/或控制疾病的进展和/或疾病得到稳定。在特定实施方案中,这些术语指示预防或减少或至少部分消除癌症的转移,和/或预防或减少或至少部分消除转移性结节的生长。

[0334] 术语“癌症的预防”或“预防癌症”和等价术语,预期该方法至少部分消除或减少和/或延迟癌症发作的发病率和/或严重性。换言之,受试者中癌症的发作可以在可能性或概率方面减少和/或延迟。

[0335] 在特定实施方案中,可以从患有癌症的受试者中取出细胞,并且与根据本发明的表达癌细胞抗原的病毒载体接触。然后将修饰的细胞施用于受试者,由此引发针对癌细胞抗原的免疫应答。该方法可以有利地用于免疫受损的受试者,其在体内不能产生足够的免疫应答(即,不能产生以足够数量的增强抗体)。

[0336] 本领域已知免疫应答可以通过免疫调节细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、 ω -干扰素、 τ -干扰素、白细胞介素-1 α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-8、白细胞介素-9、白细胞介素-10、白细胞介素-11、白细胞介素-12、白细胞介素-13、白细胞介素-14、白细胞介素-18、B细胞生长因子、CD40配体、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、单核细胞趋化蛋白-1、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和淋巴毒素)得到增强。相应地,免疫调节细胞因子(优选地,CTL诱导细胞因子)可以与病毒载体结合施用于受试者。

[0337] 细胞因子可以通过本领域已知的任何方法施用。可以向受试者施用外源细胞因子,或可替代地,可以使用合适的载体将编码细胞因子的核酸递送至受试者,并且在体内产生细胞因子。

[0338] 受试者、药物制剂和施用模式

[0339] 根据本发明的病毒载体、AAV颗粒和衣壳可用于兽医学和医学应用两者中。合适的受试者包括禽类和哺乳动物两者。如本文使用的,术语“禽类”包括但不限于鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡、雉鸡、鸚鵡、长尾小鸚鵡等等。如本文使用的,术语“哺乳动物”包括但不限于人、非人灵长类动物、牛族动物、绵羊科动物、山羊科动物、马科动物、猫科动物、犬科动物、兔类动

物等。

[0340] 人受试者包括新生儿、婴儿、青少年、成人和老年受试者。

[0341] 在代表性实施方案中,受试者“需要”本发明的方法。

[0342] 在特定实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含在药学上可接受的载体中的本发明的病毒载体和/或衣壳和/或AAV颗粒,以及任选地其它医学试剂、药物试剂、稳定剂、缓冲剂、载体、佐剂、稀释剂等。对于注射,载体通常是液体。对于其它施用方法,载体可以是固体或液体。对于吸入施用,载体是可吸入的,并且任选地可以是固体或液体微粒形式。对于对受试者或用于其它药物用途的施用,载体将是无菌的和/或生理学上相容的。

[0343] “药学上可接受的”意指其为无毒或在其它方面不期望的材料,即该材料可以施用于受试者而不引起任何不期望的生物效应。

[0344] 本发明的一个方面是在体外将核酸分子转移到细胞的方法。根据适合于特定靶细胞的标准转导方法,可以以适当的感染复数将病毒载体引入细胞内。施用的病毒载体的滴度可以根据靶细胞类型和数目以及特定的病毒载体而变,并且可以由本领域技术人员确定而无需过度实验。在代表性实施方案中,将至少约 10^3 个感染单位,任选地至少约 10^5 个感染单位引入细胞。

[0345] 病毒载体引入其内的细胞可以是任何类型,包括但不限于神经细胞(包括外周和中枢神经系统的细胞,特别是脑细胞如神经元和少突胶质细胞)、肺细胞、眼细胞(包括视网膜细胞、视网膜色素上皮细胞和角膜细胞)、上皮细胞(如肠道和呼吸道上皮细胞)、肌细胞(如骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和/或横膈肌细胞)、树突状细胞、胰腺细胞(包括胰岛细胞)、肝细胞、心肌细胞、骨细胞(如骨髓干细胞)、造血干细胞、脾细胞、角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞、前列腺细胞、生殖细胞等等。在代表性实施方案中,细胞可以是任何祖细胞。作为进一步的可能性,细胞可以是干细胞(如神经干细胞、肝干细胞)。作为再进一步的替代方案,细胞可以是癌症或肿瘤细胞。此外,如上所述,细胞可以来自任何起源的物种。

[0346] 可以在体外将病毒载体引入细胞内,用于将修饰的细胞施用于受试者的目的。在特定实施方案中,细胞已从受试者中取出,将病毒载体引入其中,然后将细胞施用回到受试者内。从受试者中取出细胞用于离体操作,然后引回到受试者内的方法是本领域已知的(参见例如美国专利号5,399,346)。可替代地,可以将重组病毒载体引入来自供体受试者的细胞、培养细胞或任何其它合适来源的细胞内,并且将细胞施用于有此需要的受试者(即“受体”受试者)。

[0347] 用于离体核酸递送的合适细胞如上所述。施用于受试者的细胞的剂量将根据受试者的年龄、状况和物种,细胞类型,待由细胞表达的核酸,施用模式等等而变。通常,在药学上可接受的载体中施用至少约 10^2 至约 10^8 个细胞或至少约 10^3 至约 10^6 个细胞/剂量。在特定实施方案中,用病毒载体转导的细胞以治疗有效量或预防有效量与药物载体组合施用于受试者。

[0348] 在一些实施方案中,将病毒载体引入细胞内,并且可以将细胞施用于受试者,以引发针对递送的多肽(例如,表达为转基因或在衣壳中)的免疫原性应答。通常,施用与药学上可接受的载体组合的、一定数量的表达免疫原性有效量的多肽的细胞。“免疫原性有效量”是表达多肽足以在药物制剂施用于其的受试者中诱发针对多肽的主动免疫应答的量。在特

定实施方案中,剂量足以产生保护性免疫应答(如上文定义的)。

[0349] 赋予的保护程度无需是完全的或永久的,只要施用免疫原性多肽的益处超过其任何缺点。

[0350] 本发明的一个进一步方面是向受试者施用病毒载体和/或病毒衣壳的方法。根据本发明的病毒载体和/或衣壳对人受试者或有此需要的动物的施用可以通过本领域已知的任何手段。任选地,病毒载体和/或衣壳以治疗有效或预防有效剂量在药学上可接受的载体中递送。

[0351] 可以进一步施用本发明的病毒载体和/或衣壳,以引发免疫原性应答(例如,作为疫苗)。通常,本发明的免疫原性组合物包含与药学上可接受的载体组合的、免疫原性有效量的病毒载体和/或衣壳。任选地,剂量足以产生保护性免疫应答(如上文定义的)。赋予的保护程度无需是完全的或永久的,只要施用免疫原性多肽的益处超过其任何缺点。受试者和免疫原如上所述。

[0352] 待施用于受试者的病毒载体和/或衣壳的剂量取决于施用模式、待治疗和/或预防的疾病或状况、各个受试者的状况、特定病毒载体或衣壳、以及待递送的核酸等等,并且可以以常规方式确定。用于实现疗效的示例性剂量是至少约 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 转导单元,任选地约 10^8 至约 10^{13} 转导单元的滴度。

[0353] 在特定实施方案中,可以采用多于一次的施用(例如,两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次等、或更多次施用),以在各种间隔的时期例如每小时、每天、每周、每月、每年等内,实现所需的基因表达水平。给药可以是单一剂量或累积的(连续给药),并且可以由本领域技术人员容易地确定。例如,疾病或病症的治疗可以包括本文公开的药物组合物病毒载体的有效剂量的一次性施用。可替代地,疾病或病症的治疗可以包括在一系列时间段内进行的病毒载体有效剂量的多重施用,例如每天一次、每天两次、每天三次、每几天一次或每周一次。施用时机可以因个体而异,取决于此类因素如个体症状的严重性。例如,本文公开的病毒载体的有效剂量可以每六个月一次施用于个体无限的时间段,或直到个体不再需要治疗。本领域普通技术人员将认识到,可以在治疗过程自始至终监测个体的状况,并且可以相应地调整所施用的本文公开的病毒载体的有效量。

[0354] 在一个实施方案中,病毒载体的施用时期为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月或更久。在一个进一步的实施方案中,在此期间停止施用的时期为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月或更久。

[0355] 示例性施用模式包括经口、直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如,经由气溶胶)、颊(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、经皮、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、肌肉内[包括对骨骼肌、横膈肌和/或心肌的施用]、皮内、胸膜内、脑内和关节内)、局部(例如,对皮肤和粘膜表面两者,包括气道表面,以及经皮施用)、淋巴管内等等、以及直接组织或器官注射(例如,对肝、骨骼肌、心肌、横膈肌或脑)。施用也可以是肿瘤(例如,在肿瘤或淋巴结中或附近)。在任何给定情况下,最合适的途径取决于待治疗和/或预防的状况的性质和严重性、以及待使用的特定载体的性质。

[0356] 根据本发明对骨骼肌的施用包括但不限于对肢体(例如,上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背部、颈部、头部(例如,舌)、胸部、腹部、骨盆/会阴、和/或手指中的骨骼肌的施用。合适的骨骼肌包括但不限于小指展肌(在手中)、小指展肌(在足中)、拇展肌、第五指展肌、拇短展肌、拇长展肌、短收肌、拇收肌、长收肌、大收肌、内收拇肌、肘肌、前斜角肌、膝关节肌、肱二头肌、股二头肌、肱肌、肱桡肌、颊肌、喙肱肌、皱眉肌、三角肌、降口角肌、降下唇肌、二腹肌、背侧骨间肌(在手中)、背侧骨间肌(在足中)、桡侧腕短伸肌、桡侧腕长伸肌、尺侧腕伸肌、伸小指肌、伸指肌、趾短伸肌、趾长伸肌、伸拇短肌、伸拇长肌、伸食指肌、拇短伸肌、拇长伸肌、桡侧屈腕肌、尺侧屈腕肌、小指短屈肌(在手中)、小指短屈肌(在足中)、趾短屈肌、趾长屈肌、指深屈肌、指浅屈肌、拇短屈肌、拇长屈肌、屈拇短肌、屈拇长肌、额肌、腓肠肌、颏舌骨肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、股薄肌、颈肋肌、腰肋肌、胸肋肌、髂肌、下孖肌、下斜肌、下直肌、冈下肌、棘突间肌、横突间肌、翼外肌、外直肌、背阔肌、提口角肌、提上唇肌、提上唇鼻翼区肌、提上睑肌、肩胛提肌、长回旋肌、头最长肌、颈最长肌、胸最长肌、头长肌、颈长肌、蚓状肌(在手中)、蚓状肌(在足中)、嚼肌、翼内肌、内直肌、中斜角肌、多裂肌、下颌舌骨肌、头下斜肌、头上斜肌、闭孔外肌、闭孔内肌、枕肌、肩胛舌骨肌、小指对掌肌、拇对掌肌、眼轮匝肌、口轮匝肌、掌侧骨间肌、掌短肌、掌长肌、趾骨肌、胸大肌、胸小肌、腓骨短肌、腓骨长肌、第三腓骨肌、梨状肌、趾侧骨间肌、跖肌、颈阔肌、膈肌、后斜角肌、旋前方肌、旋前圆肌、腰大肌、股方肌、跖方肌、头前直肌、头外直肌、头后大直肌、头后小直肌、股直肌、大菱形肌、小菱形肌、笑肌、缝匠肌、小斜角肌、半膜肌、头半棘肌、颈半棘肌、胸半棘肌、半腱肌、前锯肌、短回旋肌、比目鱼肌、头棘肌、颈棘肌、胸棘肌、头夹肌、颈夹肌、胸锁乳突肌、胸骨舌骨肌、胸骨甲状肌、茎突舌骨肌、锁骨下肌、肩胛下肌、上孖肌、上斜肌、上直肌、旋后肌、冈上肌、颞肌、阔筋膜张肌、大圆肌、小圆肌、胸肌、甲状舌骨肌、胫骨前肌、胫骨后肌、斜方肌、三头肌、二头肌、股中间肌、股外侧肌、股内侧肌、颧大肌和颧小肌、以及如本领域已知的任何其它合适的骨骼肌。

[0357] 病毒载体和/或衣壳可以通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌注(任选地,腿和/或臂的分离的肢体灌注,参见例如Arruda等人,(2005)*Blood* 105: 3458-3464)、和/或直接肌内注射递送至骨骼肌。在特定实施方案中,通过肢体灌注,任选地分离的肢体灌注(例如,通过静脉内或关节内施用),将病毒载体和/或衣壳施用于受试者(例如具有肌营养不良,例如DMD的受试者)的肢体(臂和/或腿)。在本发明的实施方案中,本发明的病毒载体和/或衣壳可以无需采用“流体动力学”技术有利地施用。现有技术载体的组织递送(例如,对肌肉)经常通过流体动力学技术(例如,以大体积的静脉内/静脉内施用)得到增强,所述流体动力学技术增加脉管系统中的压力,并且促进载体穿过内皮细胞屏障的能力。在特定实施方案中,本发明的病毒载体和/或衣壳可以在不存在流体动力学技术的情况下施用,例如高体积输注和/或升高的血管内压(例如,大于正常收缩压,例如,血管内压超过正常收缩压的小于或等于5%、10%、15%、20%、25%增加)。此类方法可以减少或避免与流体动力学技术相关的副作用,例如水肿、神经损伤和/或间隔综合征。

[0358] 对心肌的施用包括对左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜的施用。病毒载体和/或衣壳可以通过静脉内施用、动脉内施用如主动脉内施用、直接心脏注射(例如,进入左心房、右心房、左心室、右心室内)、和/或冠状动脉灌注递送至心肌。

[0359] 对横膈肌的施用可以通过任何合适的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹

膜内施用。

[0360] 还可以通过递送包含病毒载体和/或衣壳的贮库来实现对靶组织的递送。在代表性实施方案中,将包含病毒载体和/或衣壳的贮库植入骨骼肌、心肌和/或横膈肌组织内,或者可以使组织与包含病毒载体和/或衣壳的薄膜或其它基质接触。此类可植入的基质或基层描述于美国专利号7,201,898中。

[0361] 在特定实施方案中,将根据本发明的病毒载体和/或病毒衣壳施用于骨骼肌、横膈肌和/或心肌(例如,以治疗和/或预防肌营养不良、心脏病[例如,PAD或充血性心力衰竭])。

[0362] 在代表性实施方案中,本发明用于治疗 and/或预防骨骼肌、心脏和/或横膈肌的病症。

[0363] 在代表性实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防有此需要的受试者中的肌营养不良的方法,该方法包括:向哺乳动物受试者施用治疗或预防有效量的本发明的病毒载体。其中所述病毒载体包含编码以下的异源核酸:肌营养不良蛋白、小肌营养不良蛋白、微肌营养不良蛋白、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、IGF-1、抗炎多肽如I κ B显性突变体、肌长蛋白、utrophin、微肌营养不良蛋白、层粘连蛋白- α 2、 α -肌聚糖、 β -肌聚糖、 γ -肌聚糖、 δ -肌聚糖、IGF-1、针对肌肉生长抑制素或肌肉生长抑制素前肽的抗体或抗体片段、和/或针对肌肉生长抑制素的RNAi。在特定实施方案中,病毒载体可以如本文其它地方所述施用于骨骼肌、横膈肌和/或心肌。

[0364] 可替代地,可以实践本发明以将核酸递送至骨骼肌、心肌或横膈肌,其用作用于多肽(例如酶)或功能性RNA(例如RNAi、微小RNA、反义RNA)产生的平台,所述多肽通常在血液中循环或用于全身递送至其它组织,以治疗和/或预防病症(例如代谢病症,例如糖尿病[例如胰岛素]、血友病[例如因子IX或因子VIII]、黏多糖病症[例如Sly综合征、胡勒尔综合征、沙伊综合征、胡勒尔-沙伊综合征、亨特氏综合征、沙费利波综合征A、B、C、D、莫尔奎综合征、马罗托-拉米综合征等]、或溶酶体贮积症例如戈谢氏病[葡萄糖脑苷脂酶]或法布里病[α -半乳糖苷酶A]、或糖原贮积症例如庞贝病[溶酶体酸性 α 葡萄糖苷酶])。本文描述了用于治疗 and/或预防代谢病症的其它合适的蛋白质。在美国专利公开US 2002/0192189中描述了使用肌肉作为表达目标核酸的平台。

[0365] 因此,作为一个方面,本发明进一步涵盖了在有此需要的受试者中治疗和/或预防代谢病症的方法,该方法包括:将治疗或预防有效量的本发明的病毒载体施用于受试者的骨骼肌,其中所述病毒载体包含编码多肽的异源核酸,其中所述代谢病症是多肽缺乏和/或缺陷的结果。本文描述了示例性代谢病症和编码多肽的异源核酸。任选地,多肽是分泌的(例如,在其天然状态下是分泌性多肽,或例如通过与如本领域已知的分泌信号序列可操作地结合,已被改造为分泌的多肽)。不受本发明的任何特定理论的限制,根据这个实施方案,对骨骼肌的施用可以导致多肽分泌到体循环内并递送至靶组织。本文更详细地描述了将病毒载体递送至骨骼肌的方法。

[0366] 还可以实践本发明,以产生反义RNA、RNAi或其它功能性RNA(例如,核酶)用于全身递送。

[0367] 本发明还提供了在有此需要的受试者中治疗和/或预防先天性心力衰竭或PAD的方法,该方法包括向哺乳动物受试者施用治疗或预防有效量的本发明的病毒载体,其中所述病毒载体包含异源核酸,其编码例如肌浆内膜Ca²⁺-ATP酶(SERCA2a)、血管生成因子、磷酸

酶抑制剂I (I-1) 及其片段(例如I1C)、针对受磷蛋白的RNAi;受磷蛋白抑制性或显性失活分子如受磷蛋白S16E、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素受体激酶(BARK)、PI3激酶、calsarcan、 β -肾上腺素能受体激酶抑制剂(BARKct)、蛋白磷酸酶1的抑制剂1及其片段(例如I1C)、S100A1、小白蛋白、腺苷酸环化酶6型、实现G蛋白偶联受体激酶2型击倒的分子例如截短的组成型活性bARKct、Pim-1、PGC-1 α 、SOD-1、SOD-2、EC-SOD、激肽释放酶、HIF、胸腺素- β 4、mir-1、mir-133、mir-206、mir-208和/或mir-26a。

[0368] 注射剂可以以常规形式制备,作为液体溶液或悬浮液,适合于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或者作为乳液。可替代地,可以以局部而非全身方式,例如在贮库或缓释制剂中施用本发明的病毒载体和/或病毒衣壳。进一步地,病毒载体和/或病毒衣壳可以被递送附着于可手术植入的基质(例如,如美国专利公开号US2004/0013645中所述。本文公开的病毒载体和/或病毒衣壳可以通过任何合适的手段施用于受试者的肺部,任选地通过施用由病毒载体和/或病毒衣壳组成的可吸入颗粒的气溶胶悬浮液,其由受试者吸入。可吸入颗粒可以是液体或固体。包含病毒载体和/或病毒衣壳的液体颗粒的气溶胶可以通过任何合适的手段产生,例如用压力驱动的气溶胶喷雾器或超声雾化器,如本领域技术人员已知的。参见例如,美国专利号4,501,729。包含病毒载体和/或衣壳的固体颗粒的气溶胶可以同样地用任何固体微粒药剂气溶胶发生器,通过制药领域已知的技术生产。

[0369] 病毒载体和病毒衣壳可以施用于CNS的组织(例如,脑、眼),并且可以有利地导致病毒载体或衣壳比在不存在本发明的情况下观察到的更广泛的分布。

[0370] 在特定实施方案中,可以施用本发明的递送载体,以治疗CNS疾病,包括遗传病症、神经变性病症、精神病症和肿瘤。CNS的示例性疾病包括但不限于阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、卡纳万病、雷氏病、雷夫叙姆病、妥瑞症、原发性侧索硬化、肌萎缩侧索硬化、进行性肌萎缩、皮克氏病、肌营养不良、多发性硬化、重症肌无力、宾斯旺格氏病、由于脊髓或头部损伤的创伤、戴萨克斯症、莱希-尼亨病、癫痫、脑梗塞、精神障碍包括情绪障碍(例如,抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍)、精神分裂症、药物依赖(例如,酒精中毒及其它物质依赖)、神经症(例如,焦虑、强迫症、躯体形式障碍、解离性障碍、悲伤、产后抑郁症)、精神病(例如,幻觉和妄想)、痴呆、偏执、注意缺陷障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍(例如,肥胖、恶病质、神经性厌食症和暴食症)、以及CNS的癌症和肿瘤(例如,垂体肿瘤)。

[0371] CNS的病症包括涉及视网膜、后路和视神经的眼科病症(例如,视网膜色素变性、糖尿病性视网膜病变及其它视网膜变性疾病、葡萄膜炎、年龄相关性黄斑变性、青光眼)。

[0372] 大多数(如果不是全部的话)眼科疾病和病症与三类适应症中的一种或多种相关:(1)血管生成、(2)炎症和(3)退化。本发明的递送载体可以用于递送抗血管生成因子;抗炎因子;延缓细胞退化,促进细胞保留或促进细胞生长以及前述的组合的因素。

[0373] 例如,糖尿病性视网膜病变的特征在于血管生成。糖尿病性视网膜病变可以通过眼内(例如,在玻璃体内)或眼周(例如,在筋膜下区域中)递送一种或多种抗血管生成因子来治疗。一种或多种神经营养因子也可以眼内(例如,玻璃体内)或眼周共递送。

[0374] 葡萄膜炎涉及炎症。可以通过眼内(例如,玻璃体或前房)施用本发明的递送载体来施用一种或多种抗炎因子。

[0375] 相比之下,色素性视网膜炎的特征在于视网膜变性。在代表性实施方案中,色素性

视网膜炎可以通过眼内(例如,玻璃体施用)递送编码一种或多种神经营养因子的载体来治疗。

[0376] 年龄相关性黄斑变性涉及血管生成和视网膜变性两者。可以通过眼内(例如玻璃体)施用编码一种或多种神经营养因子的递送载体、和/或眼内或眼周(例如在筋膜下区域中)施用编码一种或多种抗血管生成因子的递送载体来治疗这种病症。

[0377] 青光眼的特征在于眼压升高和视网膜神经节细胞丧失。用于青光眼的治疗包括使用本发明的递送载体施用一种或多种神经保护剂,其保护细胞免于兴奋性毒性损伤。此类试剂包括眼内,任选地玻璃体内递送的N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂、细胞因子和神经营养因子。

[0378] 在其它实施方案中,本发明可以用于治疗癫痫发作,例如,以减少癫痫发作的发作、发病率或严重性。可以通过行为(例如,摇动、眼或口的抽搐)和/或电图手段(大多数癫痫发作具有标记性电图异常),来评价关于癫痫发作的治疗性处理的功效。因此,本发明还可以用于治疗癫痫,其以随着时间过去的多次癫痫发作为特征。

[0379] 在一个代表性实施方案中,使用本发明的递送载体将生长抑素(或其活性片段)施用于脑,以治疗垂体肿瘤。根据这个实施方案,编码生长抑素(或其活性片段)的递送载体通过微量输注施用到垂体内。同样地,此类治疗可以用于治疗肢端肥大症(来自垂体的异常生长激素分泌)。生长抑素的核酸(例如GenBank登录号J00306)和氨基酸(例如GenBank登录号P01166;含有加工的活性肽生长抑素-28和生长抑素-14)序列是本领域已知的。

[0380] 在特定实施方案中,载体可以包含如美国专利号7,071,172中所述的分泌信号。

[0381] 在本发明的代表性实施方案中,将病毒载体和/或病毒衣壳施用于CNS(例如,施用于脑或眼)。病毒载体和/或衣壳可以引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、脑垂体、黑质、松果体)、小脑、端脑(纹状体、大脑包括枕叶、颞叶、顶叶和额叶、皮质、基底神经节、海马和杏仁核)、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。病毒载体和/或衣壳也可以施用于眼的不同区域,例如视网膜、角膜和/或视神经。

[0382] 可以将病毒载体和/或衣壳递送到脑脊髓液内(例如,通过腰椎穿刺),用于递送载体的更分散施用。

[0383] 在其中血脑屏障已被扰动(例如,脑肿瘤或脑梗塞),病毒载体和/或衣壳可以进一步血管内施用于CNS。

[0384] 病毒载体和/或衣壳可以通过本领域已知的任何途径施用于CNS的所需区域,所述途径包括但不限于鞘内、眼内、大脑内、心室内、静脉内(例如,在糖(如甘露醇)的存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如,玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如,筋膜下区域)递送、以及对运动神经元的肌内递送伴逆行递送。

[0385] 在特定实施方案中,病毒载体和/或衣壳通过直接注射(例如,立体定向注射)在液体制剂中施用至CNS中的所需区域或区室。在其它实施方案中,病毒载体和/或衣壳可以通过局部应用提供给所需区域、或通过气溶胶制剂的鼻内施用来提供。对眼的施用可以通过液滴的局部应用。作为进一步的替代方案,病毒载体和/或衣壳可以作为固体缓释制剂施用(参见例如,美国专利号7,201,898)。

[0386] 在再另外的实施方案中,病毒载体可以用于逆行转运,以治疗和/或预防涉及运动神经元的疾病和病症(例如,肌萎缩侧索硬化(ALS);脊髓性肌萎缩(SMA)等)。例如,病毒载

体可以递送到肌肉组织,它可以由其迁移到神经元内。

[0387] 在这个实施方案的其它方面,病毒载体将疾病或病症的严重性减少例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在这个实施方案的另外其它方面,病毒载体将疾病或病症的严重性减少例如约5%至约100%、约10%至约100%、约20%至约100%、约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约10%至约90%、约20%至约90%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约10%至约80%、约20%至约80%、约30%至约80%、约40%至约80%、约50%至约80%、或约60%至约80%、约10%至约70%、约20%至约70%、约30%至约70%、约40%至约70%、或约50%至约70%。

[0388] 本文公开的病毒载体可以包含溶剂、乳液或其它稀释剂,其量足以溶解本文公开的病毒载体。在这个实施方案的其它方面,本文公开的病毒载体可以包含溶剂、乳液或稀释剂,其量例如小于约90%(v/v)、小于约80%(v/v)、小于约70%(v/v)、小于约65%(v/v)、小于约60%(v/v)、小于约55%(v/v)、小于约50%(v/v)、小于约45%(v/v)、小于约40%(v/v)、小于约35%(v/v)、小于约30%(v/v)、小于约25%(v/v)、小于约20%(v/v)、小于约15%(v/v)、小于约10%(v/v)、小于约5%(v/v)、或小于约1%(v/v)。在这个实施方案的其它方面,本文公开的病毒载体可以包含溶剂、乳液或其它稀释剂,其量在例如以下的范围内:约1%(v/v)至90%(v/v)、约1%(v/v)至70%(v/v)、约1%(v/v)至60%(v/v)、约1%(v/v)至50%(v/v)、约1%(v/v)至40%(v/v)、约1%(v/v)至30%(v/v)、约1%(v/v)至20%(v/v)、约1%(v/v)至10%(v/v)、约2%(v/v)至50%(v/v)、约2%(v/v)至40%(v/v)、约2%(v/v)至30%(v/v)、约2%(v/v)至20%(v/v)、约2%(v/v)至10%(v/v)、约4%(v/v)至50%(v/v)、约4%(v/v)至40%(v/v)、约4%(v/v)至30%(v/v)、约4%(v/v)至20%(v/v)、约4%(v/v)至10%(v/v)、约6%(v/v)至50%(v/v)、约6%(v/v)至40%(v/v)、约6%(v/v)至30%(v/v)、约6%(v/v)至20%(v/v)、约6%(v/v)至10%(v/v)、约8%(v/v)至50%(v/v)、约8%(v/v)至40%(v/v)、约8%(v/v)至30%(v/v)、约8%(v/v)至20%(v/v)、约8%(v/v)至15%(v/v)、或约8%(v/v)至12%(v/v)。

[0389] 本说明书的方面部分公开了治疗患有疾病或病症的个体。如本文使用的,术语“治疗”指在个体中减少或消除疾病或病症的临床症状;或者在个体中延迟或预防疾病或病症的临床症状的发作。例如,术语“治疗”可以意指将以疾病或病症为特征的症状减少例如至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少100%。与特定疾病或病症相关的实际症状是众所周知的,并且可以由本领域普通技术人员通过考虑因素来确定,所述因素包括但不限于疾病或病症的位置、疾病或病症的原因、疾病或病症的严重性、和/或受疾病或病症影响的组织或器官。本领域技术人员将知道与特定类型的疾病或病症相关的适当症状或指示剂,并且将知道如何确定个体是否是用于如本文所公开的治疗的候选者。

[0390] 在这个实施方案的方面,本文公开的治疗有效量的病毒载体将与疾病或病症相关的症状减少例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。在这个实施方案的其它方面,本文公开的病毒载体的治疗有效量将与

疾病或病症相关的症状减少例如至多10%、至多15%、至多20%、至多25%、至多30%、至多35%、至多40%、至多45%、至多50%、至多55%、至多60%、至多65%、至多70%、至多75%、至多80%、至多85%、至多90%、至多95%或至多100%。在这个实施方案的另外其它方面,本文公开的病毒载体的治疗有效量将与疾病或病症相关的症状减少例如约10%至约100%、约10%至约90%、约10%至约80%、约10%至约70%、约10%至约60%、约10%至约50%、约10%至约40%、约20%至约100%、约20%至约90%、约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约30%至约100%、约30%至约90%、约30%至约80%、约30%至约70%、约30%至约60%、或约30%至约50%。

[0391] 在一个实施方案中,与未接受相同治疗的患者相比,本文公开的病毒载体能够将施用于患者的病毒载体中编码的蛋白质的水平和/或量增加例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在这个实施方案的其它方面,与未接受相同治疗的患者相比,病毒载体能够将患有该疾病或病症的个体中的疾病或病症的严重性减少例如约10%至约100%、约20%至约100%、约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约10%至约90%、约20%至约90%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约10%至约80%、约20%至约80%、约30%至约80%、约40%至约80%、约50%至约80%、或约60%至约80%、约10%至约70%、约20%至约70%、约30%至约70%、约40%至约70%、或约50%至约70%。

[0392] 在这个实施方案的方面,与未接受相同治疗的个体相比,本文公开的病毒载体的治疗有效量将个体中病毒载体内编码的蛋白质的量增加至少例如至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。在这个实施方案的其它方面,本文公开的病毒载体的治疗有效量减少疾病或病症的严重性或者将个体中的疾病或病症的严重性维持在例如至多10%、至多15%、至多20%、至多25%、至多30%、至多35%、至多40%、至多45%、至多50%、至多55%、至多60%、至多65%、至多70%、至多75%、至多80%、至多85%、至多90%、至多95%或至多100%。在这个实施方案的另外其它方面,本文公开的病毒载体的治疗有效量将个体中疾病或病症的严重性降低或维持在例如约10%至约100%、约10%至约90%、约10%至约80%、约10%至约70%、约10%至约60%、约10%至约50%、约10%至约40%、约20%至约100%、约20%至约90%、约20%至约80%、约20%至约70%、约20%至约60%、约20%至约50%、约20%至约40%、约30%至约100%、约30%至约90%、约30%至约80%、约30%至约70%、约30%至约60%、或约30%至约50%。

[0393] 将病毒载体施用于个体或患者。个体或患者通常是人类,但可以是动物,包括但不限于犬、猫、鸟、牛、马、绵羊、山羊、爬行动物及其它动物,无论是否驯化。

[0394] 在一个实施方案中,本发明的病毒载体可以用于产生靶向特定组织的AAV,所述特定组织包括但不限于中枢神经系统、视网膜、心脏、肺、骨骼肌和肝。这些靶向病毒载体可以用于治疗其为组织特异性的疾病,或用于产生在特定正常组织中内源产生的蛋白质,例如因子IX(FIX)、因子VIII、FVIII及本领域已知的其它蛋白质。

[0395] 中枢神经系统疾病

[0396] 在一个实施方案中,可以使用AAV治疗中枢神经系统疾病,其中所述AAV包含可以

是任何AAV血清型的受体AAV,以及选自以下一种或多种的供体衣壳:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。在一个实施方案中,受体AAV是AAV2,并且供体衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中的一种或多种。在另一个实施方案中,受体AAV是AAV3,并且供体衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中的一种或多种。

[0397] 视网膜疾病

[0398] 在一个实施方案中,可以使用AAV治疗视网膜疾病,其中所述AAV包含可以是任何AAV血清型的受体AAV,以及选自以下一种或多种的供体衣壳:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。在一个实施方案中,受体AAV是AAV2,并且供体衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10中的一种或多种。在另一个实施方案中,受体AAV是AAV3,并且供体衣壳选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。

[0399] 心脏病

[0400] 在一个进一步的实施方案中,可以使用AAV治疗心脏病,其中所述AAV包含可以是任何AAV血清型的受体AAV,以及选自AAV1、AAV3、AAV4、AAV6或AAV9中的一种或多种的供体衣壳。在另外的实施方案中,受体AAV是AAV2,并且供体衣壳选自AAV1、AAV3、AAV4、AAV6或AAV9中的一种或多种。在另一个实施方案中,受体AAV是AAV3,并且供体衣壳选自AAV1、AAV3、AAV4、AAV6或AAV9中的一种或多种。

[0401] 肺疾病

[0402] 在一个实施方案中,可以使用AAV治疗肺疾病,其中所述AAV血清型包含可以是任何AAV血清型的受体AAV,以及选自AAV1、AAV5、AAV6、AAV9或AAV10中的一种或多种的供体衣壳。在另一个实施方案中,受体AAV是AAV2,并且供体衣壳选自AAV1、AAV5、AAV6、AAV9或AAV10中的一种或多种。在一个进一步的实施方案中,受体AAV是AAV3,并且供体衣壳选自AAV1、AAV5、AAV6、AAV9或AAV10中的一种或多种。

[0403] 骨骼肌疾病

[0404] 在一个进一步的实施方案中,可以使用AAV治疗骨骼肌疾病,其中所述AAV血清型包含可以是任何AAV血清型的受体AAV,以及选自AAV1、AAV2、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9中的一种或多种的供体衣壳。在另一个实施方案中,受体AAV是AAV2,并且供体衣壳选自AAV1、AAV2、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9中的一种或多种。在一个实施方案中,受体AAV是AAV3,并且供体衣壳选自AAV1、AAV2、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9中的一种或多种。

[0405] 肝疾病

[0406] 在一个实施方案中,可以使用AAV治疗肝疾病,其中所述AAV血清型包含可以是任何AAV的受体AAV,以及选自AAV2、AAV3、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9中的一种或多种的供体衣壳。在另外的实施方案中,受体AAV是AAV2,并且供体衣壳选自AAV2、AAV3、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9中的一种或多种。在一个进一步的实施方案中,受体AAV是AAV3,并且供体衣壳选自AAV2、AAV3、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9中的一种或多种。

实施例

[0407] 实施例1

[0408] 腺相关病毒(AAV)载体已用于100多项临床试验中,具有很有希望的结果,特别是

用于治疗失明和血友病B。AAV是非致病性的,具有广泛的组织向性,并且可以感染分裂细胞或非分裂细胞。更重要的是,AAV载体转导已在临床前试验和临床试验中诱导长期治疗性转基因表达。截止今天,存在被分离用于基因递送的12种AAV血清型。在其中,AAV8已显示为用于小鼠肝靶向最佳选择。由于在具有FIX缺乏的临床前动物中的广泛研究,在患有血友病B的患者中已使用AAV2和AAV8进行了I/II期临床试验。来自这些试验的结果是非常有希望的;然而,即使使用相同的载体剂量/kg,来自接受AAV/FIX的患者的FIX表达也与动物模型中已实现的结果不成比例。当 1×10^{11} 个编码FIX的AAV8颗粒用于FIX敲除小鼠中用于全身施用,在血液中检测到160%的正常水平FIX。然而,当施用 2×10^{11} 个AAV8/FIX颗粒时,在灵长类动物中仅达到40%的FIX,并且在人中发现少于1%的FIX。这些物种中的AAV载体转导后不一致的FIX表达可能是由于不同物种中改变的肝细胞向性。来自AAV FIX临床试验的另一个有趣发现是衣壳特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答,其根除AAV转导的肝细胞,并且因此导致治疗失败。这种现象尚未在AAV递送后的动物模型中得到证实,其指出在临床前和临床研究之间的另一种变化。当使用高得多剂量的AAV/FIX载体时,使用AAV2或AAV8在两个临床试验中检测到FIX表达;然而,血液FIX水平分别在注射后第4周或第9周时降低。进一步的研究提示,AAV载体感染引发衣壳特异性CTL应答,其看起来消除了AAV转导的肝细胞。因此,来自这些临床试验的结果强调了探讨用于增强AAV转导而不增加载体衣壳负荷的有效方法的必要性。减少AAV衣壳抗原的任何载体改善也影响令人畏缩的载体生产关注,并且是可行的基因治疗药物开发的受欢迎的补充物。

[0409] 已探讨了许多策略来增加AAV载体转导。一种策略是通过利用强启动子和/或增强子、转基因cDNA的密码子优化、有效的多腺苷酸化序列、以及可能时自互补载体基因组的使用来优化AAV载体盒。在AAV衣壳的水平上,更多的关注已集中于采用展示差异向性的天然血清型、合理设计的衣壳、或者从突变型衣壳文库中选择或筛选的衣壳。然而,这种方法的缺点是不能在人中执行相关实验,并且鉴于人数据的持续收集,继续观察到AAV衣壳向性中的种间变异。增强AAV载体转导的第三种方法依赖于经由药理学试剂改变的细胞生理学。许多药理学试剂已用于增强在各种感染水平下的AAV转导;然而,大多数这些药物用作癌症疗法并且具有严重的副作用。

[0410] 在我们先前的中和抗体研究中,发现人血清对AAV转导具有增强的作用。在这项研究中,我们已鉴定了来自人血清的几种蛋白质,所述蛋白质与AAV病毒粒子直接相互作用,并且具有影响AAV转导的潜力。在这些蛋白质中,最有趣的是人血清白蛋白(HSA),其为血液中最丰富的蛋白质,并且已广泛用于临床实践中的治疗剂。如果HSA与AAV病毒粒子的相互作用增强AAV转导,则该方法可以立即应用于AAV临床试验中。在本文中,我们证实HSA与AAV载体的相互作用增强了AAV转导,并且这种增强并不限于体外特定细胞或体内组织。实现了可比较的增强,不管在载体冷冻之前还是在解冻之后使HSA与AAV载体温育。在透析前向载体制剂中加入HSA不影响HSA对AAV转导的增强作用。机制研究提示,HSA在体外增加了AAV与靶细胞表面的结合,并且导致在全身施用后血液中的快速清除。中和抗体(Nab)分析证实白蛋白与AAV的相互作用在Nab的存在下仍增强AAV转导,并且不影响Nab活性。我们应用这种方法用于治疗FIX缺陷小鼠中的血友病。在与人白蛋白温育的AAV/FIX的全身施用后,实现了增加的转基因FIX表达和改善的表型校正。

[0411] 人血清增强AAV转导。我们先前的结果证实仅通过人血清的存在增强的AAV转导。

我们将这一发现扩展到使用10份人血清样品检查AAV转导增强,并且发现人血清与AAV的相互作用在体外以AAV衣壳非依赖性方式诱导转基因活性中的大约4倍增加(图1a)。由于AAV8已用于患有血友病的患者中的几项临床试验中,因此选择AAV8衣壳用于下述实验。尽管在较短的持续时间下观察到增强的转基因活性,但在血清与AAV病毒粒子温育 ≥ 2 小时后,实现了最大的效应(图1b)。为了确定人血清对Huh7细胞中的AAV转导的增强作用是否在体内保持真实,使AAV8/luc载体与连续稀释的血清一起温育,然后经由眼眶后或肌肉注射施用(对侧肌肉接受无血清的载体)。如图1c和1d中所示,甚至 > 3000 倍的血清稀释度仍使肝和肌肉中的AAV转导分别增强2-5倍或4-16倍。在AAV载体与来自其它物种包括小鼠、犬、灵长类动物和胎牛的血清一起温育后,也证实了AAV转导的增强(图9和10)。

[0412] 人血清白蛋白对AAV转导发挥增强作用。来自上述实验的数据强烈提示血清的一些组分在体外和体内增强AAV转导。为了检测关于转导的增强是否需要AAV病毒颗粒与血清蛋白质的直接相互作用,我们设计了5个群组:1. 完全培养基中的Huh7细胞以及与PBS一起温育的AAV,2. 完全培养基中的Huh7细胞以及与人血清一起温育的AAV,3. 无血清培养基中的Huh7细胞以及与PBS一起温育的AAV,4. 无血清培养基中的Huh7细胞以及与人血清一起温育的AAV,然后紧在病毒应用于细胞之前将相同量的血清加入培养基中,5. 无血清培养基中的Huh7细胞以及与人血清一起温育的AAV。与上述方法类似,与群组1相比,在群组2中实现了增强的转导。有趣的是,与组3相比,在具有高稀释度血清的群组4中未观察到AAV转导的增加,而在群组5中获得增加的转导(图2a)。这些结果提示人血清介导的AAV转导增强需要人血清蛋白质与AAV病毒粒子的直接相互作用。值得注意的是,在人血清的4至16倍稀释下,增加倍数在“无血清”组中明显比“完全培养基”组中大得多。这是因为完全培养基含有增强AAV转导的胎牛血清(FBS)。当将与PBS一起温育的AAV载体加入维持在完全培养基中的细胞时,AAV载体与FBS蛋白相互作用,所述FBS蛋白诱导比AAV载体应用于无血清培养基中的细胞更高的转导(数据未显示)。为了鉴定哪种血清蛋白质加强AAV转导,使人血清与AAV8载体一起温育,然后使用识别完整AAV8病毒粒子的抗体下拉AAV8结合蛋白用于质谱分析。在鉴定的蛋白质中,最有趣的是人血清白蛋白(表5)。血清白蛋白是循环中最丰富的蛋白质,并已在许多临床环境中广泛使用,并且因此,本研究的主要目的是调查HSA对AAV转导的作用。

[0413] 为了进一步确认HSA与AAV8结合的质谱数据,我们使AAV8颗粒与HSA一起温育,然后使用人白蛋白抗体来下拉白蛋白结合的AAV颗粒。然后通过Q-PCR定量AAV基因组拷贝数。如图2b中所示,与对照(同种型IgG或PBS)相比,用白蛋白特异性抗体(A80-129A, Bethyl Lab, INC)的免疫沉淀导致多达两倍的基因组被拉下。为了检查人白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用是否影响AAV转导,我们使AAV8颗粒与HSA耗尽的血清($> 99\%$ 耗尽,图11)或重组HSA一起温育。已证实来自人白蛋白耗尽的血清的转导低于完全血清处理的载体(图2c)。与重组HSA(rHSA)一起温育的AAV载体也导致更高的转导,但至与人全血清相比更低的程度(图2d)。为了探讨HSA是否增强体内AAV转导,使AAV8/luc载体与不同浓度的rHSA一起温育,然后经由眼眶后或肌肉注射施用到小鼠内。在全身施用后,用HSA预处理的载体证实增加的肝转导(1.5至8倍(图12a))。与肌肉中通过人血清的AAV转导刺激一致,在AAV8载体与rHSA一起温育后,观察到肌肉中的更高转导(2.1至11.5倍)(图12b)。这些结果暗示人血清白蛋白在体外和体内增加AAV转导。

[0414] **临床级HSA对AAV转导的增强作用。**由于HSA已广泛应用于临床中,我们随后测试了临床级HSA是否也具有增强AAV转导的能力。当5%临床级HSA(其与正常受试者的血液中的血清白蛋白浓度相同)与以不同稀释度的AAV载体一起温育时,即使在20,000倍的稀释度下也观察到在体外增加的AAV转导(图3a)。接下来,我们在眼眶后或肌肉注射之前,使AAV8/luc与以不同倍数稀释度的25% HSA一起温育。一倍稀释定义为在1ml溶液中与10 μ l 25% HAS一起温育的 1×10^{12} 个AAV颗粒。如图3b和3c中所示,临床级HAS使在肝和肌肉中的AAV8转导分别显著增加约3或5倍。接下来,在肌肉注射后的第1、2、4和7周时,记录了HSA对AAV转导的长期作用(图13)。这些结果指示临床级HSA增强肌肉中的AAV转导,用于持续转基因表达。另外,我们观察到HSA与AAV2或AAV9一起温育在体外和体内诱导了高得多的转导(图14)。

[0415] **通过冷冻/解冻不改变通过HAS的AAV转导增强。**在上述实验中,使AAV制剂解冻并且与HSA一起温育,然后施用于细胞或小鼠。在临床背景下,医务人员在注射前立即执行这种温育可能是不实际的。因此,在-80℃下贮存之前使HSA与AAV载体一起温育将简化HSA增强的AAV载体转导的翻译。为了调查这一点,我们首先使AAV载体与临床级HAS一起在4℃下温育2小时。将一半溶液在-80℃下贮存三天,而另一等分试样的AAV病毒立即以 1×10^3 个颗粒/细胞的剂量用于感染Huh7细胞。在解冻冷冻的HSA-AAV制剂后,以相同的方式在Huh7中分析载体转导。如图4a中所示,不管HSA-载体冷冻保存如何,都观察到萤光素酶活性中的类似增加。在肌肉注射后也观察到HSA在温育和冷冻保存后的AAV转导增强(图4b和4c)。

[0416] **在透析前对AAV制剂的HAS添加后的AAV转导。**在载体生产过程中,不管用于纯化的方法(CsCl或柱层析)如何,都必须执行载体透析以去除高浓度的盐。为了确定在透析过程中HSA中的AAV载体温育是否影响AAV转导,紧在透析前,使通过CsCl梯度超速离心或阴离子交换柱纯化的AAV8/luc载体,与10 μ l 25% HSA或PBS在1ml 10^{12} 个颗粒中混合。然后,使这些制剂针对PBS透析,并且经由眼眶后或直接肌肉注射在小鼠中分析AAV转导。如图5中所示,与PBS温育对照相比,在透析期间的HSA温育仍使肝和肌肉中的载体转导增加分别大于2倍或4倍。对于不同的纯化方法,增强效应是相似的。该观察暗示在以不同方式纯化的载体透析之前,可以将人白蛋白加入AAV制剂中,以便增强基因递送。

[0417] **白蛋白增加AAV与靶细胞的结合能力。**关于有效AAV转导的第一步是经由主要受体和次要受体在靶细胞上的AAV病毒粒子结合。为了检查白蛋白与AAV载体一起温育是否增加细胞结合,使AAV8/luc载体与HSA或PBS一起温育。然后,在4℃下加入Huh7细胞以预防载体内化,如我们先前的研究中所示。在充分洗涤后,回收总DNA并且通过Q-PCR测定AAV基因组拷贝数。如图6a中所示,与HSA温育使与Huh7细胞结合的AAV载体显著增加3倍。为了确定HSA是否增加载体结合和通过肝的摄取,经由眼眶后注射施用在HSA或PBS中预温育的 1×10^{11} 个AAV8/luc颗粒,并且在24小时后测定萤光素酶活性。与在Huh7细胞中观察到的结果一致,在肝中实现了更高的转导(图6b和6c)。注射后48小时,处死小鼠并且收获肝用于定量萤光素酶活性和AAV基因组拷贝数。与活体成像分析类似,与在单独的PBS中温育的AAV载体给出的那些相比,在用HSA预处理的AAV载体施用的小鼠的肝中发现更高的萤光素酶活性和AAV基因组拷贝数(图6d和6e)。对于HSA预温育通过肝的更多AAV载体摄取的结果与来自血液的载体清除相关联。在AAV载体施用后,与在注射后15分钟和24小时的对照小鼠相比,接受HSA处理的AAV载体的小鼠中存在AAV基因组拷贝数/微升血浆的略微降低($p > 0.05$)。然而,在AAV施用后2小时,在HSA群组中观察到AAV基因组拷贝数的显著减少($p < 0.05$)。这些结果提示通

过HSA增强的AAV载体转导起因于与靶细胞的颗粒结合增加。

[0418] 白蛋白与AAV的相互作用不干扰中和抗体活性。为了调查人白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用是否阻断AAV中和抗体(Nab)活性,我们在体外执行Nab测定。IVIG是来自超过1000个受试者的合并血清,并且含有针对不同血清型的AAV Nab。我们首先使AAV8/Luc病毒粒子与100倍稀释的HSA或PBS一起温育,然后加入以不同浓度的IVIG。在Huh7细胞中转导后,计算Nab滴度。如图7a中所示,不管与HSA预温育的AAV载体如何,都获得相同的Nab滴度(IVIG的1:200)。我们还研究了HSA是否仍能够在AAV Nab的存在下增强AAV转导,并且发现在不同量的IVIG的存在下,HSA与AAV一起温育以相似的效率增加AAV转导(图7b)。这些结果提示HSA与AAV的相互作用不影响AAV病毒感染机制。

[0419] 使用人白蛋白改善血友病B的表型校正以增强AAV载体转导。为了研究使用与HAS一起温育的AAV载体的表型校正,我们使用血友病B小鼠作为疾病模型和AAV8/FIX-OPT,其已用于患有血友病B的患者中的I期临床试验。在注射后,FIX浓度和功能在不同时间点测定并且在第6周时评价表型校正。如图8a中所示,在接受已温育的AAV8/FIX-OPT的小鼠中检测到的FIX水平比具有用PBS处理的相同载体的那些高超过5倍。类似地,接受用HSA处理的载体的小鼠中的血浆FIX活性高得多(图8b)。在AAV注射后6周时,使所有小鼠经历尾静脉横切出血攻击,以评价载体表达的人因子IX的体内功能。与WT对照相比,未处理的血友病B小鼠在攻击后具有深度出血(30mg血液/g小鼠体重)。与在PBS中温育的AAV载体相比,接受在HSA中温育的AAV载体的血友病B小鼠证实失血中的显著降低($p < 0.05$,图8c)。事实上,用在HSA中温育的载体处理的血友病小鼠证实与WT对照相似的失血。这些结果证实使用与HSA预温育的AAV载体改善血友病B的校正,并且还提示可能利用该制剂来增加在较低的载体剂量下用于治疗血友病及其它疾病的功效。

[0420] 在人AAV FIX试验中对以高剂量的AAV衣壳的较低FIX表达和衣壳特异性CTL应答的观察已强调需要更有效的策略,其以在较低剂量下维持有效的基因递送。我们早期的报告指出AAV转导通过人血清得到增强;然而,精确组分未得到鉴定。因此,为了寻找更有效的AAV载体,本研究的目的是鉴定来自人血清的特异性蛋白质,其与AAV病毒粒子相互作用以诱导更高的转导。在质谱分析鉴定的AAV8衣壳相互作用蛋白(表5)中,用HSA进行进一步实验。这些调查证实,AAV8与重组或临床级HSA一起温育增加AAV转导,而人白蛋白耗尽的血清降低转导。临床级HSA显著增强小鼠的肝和骨骼肌中的AAV转导。为了促进HSA在AAV载体生产和临床试验中的应用,我们的研究证实,在与人白蛋白温育后冷冻AAV载体或在透析前将HSA加入AAV制剂内仍导致增强的转导。机制研究提示,人白蛋白增加AAV载体与靶细胞表面的结合,并且导致在全身施用后更快速的血液清除速度,但不影响AAV感染途径。最后,在血友病B的临床前小鼠模型中,与白蛋白一起温育的AAV载体增加人FIX表达,并且将出血表型改善至WT水平。

[0421] 血清蛋白质能够与病毒相互作用并影响病毒感染。例如,已广泛研究腺病毒与血清蛋白质包括凝血因子和补体的相互作用,用于肝靶向。我们先前的Nab研究证实,在不含Nab活性的稀释度下的血清实际上增强AAV转导,而不管血清型如何。其它研究已发现,几种血清蛋白质经由与AAV病毒粒子的相互作用对AAV转导具有作用。Denard等人已鉴定与AAV相互作用的半乳糖凝集素3结合蛋白(G3BP)和C反应蛋白(CRP)。他们显示G3BP与AAV病毒粒子的相互作用导致阻断AAV转导的AAV聚集体的形成,并且CRP与AAV的相互作用导致更高的

转导。AAV转导的CRP增强是物种特异性和AAV血清型特异性的。在另一项研究中,Sais等人证实AAV2衣壳结合C3补体蛋白,以增强AAV的巨噬细胞摄取并诱导巨噬细胞活化。在这项研究中,AAV和临床级HSA的温育增强了在体外以及体内的转导。一般地,人白蛋白对AAV转导的增强低于全血清。这一发现暗示血清中的其它蛋白质也可以起到增强AAV转导的作用。值得研究这些蛋白质的相互作用如何影响AAV转导。

[0422] 应注意,在肌肉中用人白蛋白处理的病毒增强AAV转导一般高于肝中的AAV转导。这种现象的解释可能是血液含有非常高浓度的白蛋白,其在全身注射后在一定程度上增强转导。相比之下,较少的白蛋白位于肌肉组织中,因此在肌肉注射后,通过白蛋白增加的转导幅度大于在IV注射后观察到的那种。在AAV载体的全身施用后,AAV病毒粒子将立即与白蛋白相互作用。然而,我们的研究证实,HSA与AAV病毒粒子的较长温育诱导了更高的转导增强。这一结果指示,在全身施用后,通过HSA与AAV病毒粒子的预温育,可以实现转导的进一步增强。在这项研究中,在全身施用和直接注射后,分别在肝和肌肉中实现了来自与人血清白蛋白一起温育的AAV病毒粒子的转导增强。由于在全身施用后,肝从循环中摄取更多的AAV病毒粒子,因此可能较少的AAV载体从血液中逃出,以转导其它组织如心脏和骨骼肌。另一方面,用白蛋白处理的AAV载体增加肌肉转导。尚不清楚在与白蛋白一起温育的AAV载体全身施用后,是否可以实现在心脏或骨骼肌中增强的转导。为了在全身施用后增加心脏和骨骼肌中的AAV转导,已开发了几种肝去靶向的AAV突变体(AAV2i8和AAV9.45),正在测试在这些肝去靶向的与白蛋白一起温育的AAV载体的全身施用后是否将实现肌肉中的转导增强。

[0423] 白蛋白作为用于药物靶向和改善基于肽或蛋白质的药物的药代动力学概况的通用蛋白质载体而出现。已描述了诱导内吞作用的几种白蛋白受体。关于白蛋白内吞作用的途径是细胞类型依赖性的,并且包括网格蛋白或小窝蛋白介导的内吞作用。虽然尚不清楚AAV载体如何与白蛋白相互作用,但本研究证实AAV与白蛋白的相互作用增加了靶细胞的AAV结合能力。这可以通过以下事实来解释:白蛋白在与AAV相互作用后,经由白蛋白受体对于细胞表面上的AAV结合提供另一层。

[0424] 白蛋白在血液中具有延长的半衰期。目前已变得显而易见的是,白蛋白的稳态调节受新生儿Fc受体(FcRn)控制。FcRn通过在细胞内体区室内结合白蛋白来援救白蛋白免于细胞中的降解,其然后导致三元复合物转运至细胞膜用于将配体释放回循环内。由于白蛋白的这些特性,关于白蛋白与AAV载体的相互作用对转导的作用存在一些问题。由于白蛋白摄取是经由网格蛋白或小窝蛋白介导的内吞作用,并且AAV细胞进入是通过网格蛋白介导的内吞作用,因此尚不清楚白蛋白和AAV是否在内吞作用途径中竞争。另一个问题是白蛋白是否在内体中与AAV解离或运输到细胞核内。第三个问题是白蛋白胞吐作用或转内吞作用是否影响AAV转导。第四个问题是来自与白蛋白和AAV相互作用的增强转导对AAV衣壳特异性CTL反应的作用。尽管白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用增加AAV与靶细胞表面的结合,但可能这种相互作用可以在细胞内影响AAV运输。这些问题的进一步阐明帮助设计在AAV基因疗法中使用白蛋白的更有效方法。

[0425] 总之,我们的研究证实AAV衣壳与人血清白蛋白相互作用,其增加在体外和体内的转导。来自临床级人白蛋白的转导效率增强还允许在其它方面亚最佳剂量AAV载体的全身施用后,在血友病B小鼠模型中的表型校正。出于临床目的,在透析之前将人白蛋白加入AAV

病毒制剂中或在与白蛋白温育后冷冻AAV病毒仍导致转导增强。尽管AAV病毒粒子与人白蛋白相互作用的确切机制尚不清楚,但我们的发现对于将HSA立即纳入在耐受的载体剂量下经受欠佳转导的各种临床应用是重要的。因此,我们来自这些研究的结果强烈指示,在透析过程中应该执行临床级人白蛋白与AAV载体的温育,以增强在未来的临床试验中的AAV转导效率。

[0426] 细胞系。HEK293和Huh7细胞(来自ATCC)在37℃下在5% CO₂中维持在补充有10%胎牛血清和青霉素-链霉素的达尔贝科改良伊格尔培养基中。

[0427] AAV病毒产生。使用标准方法在HEK293细胞中用三质粒转染产生AAV载体。简言之,将AAV转基因质粒pTR/CBA-luc或pTTR/FIX-opt与AAV辅助质粒和腺病毒辅助质粒pXX6-80共转染到HEK293细胞内。60小时后,收获细胞并裂解,并且应用细胞裂解产物用于针对CsCl梯度的超离心或用柱的纯化。收集AAV病毒离子并且通过斑点印迹滴定。

[0428] 个别人血清购自Valley Biomedical (Minchester,VA),并且等分并在-80℃下贮存用于将来使用。

[0429] 体外AAV转导测定。将 1×10^5 个Huh7细胞接种到48孔板上的300 μ L含有10% FBS的DMEM或无血清培养基中。使AAV/luc与血清或rHSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 或临床级HSA (Albuminar, CSL Behring LLC, Kankakee, IL) 一起温育。然后将混合物加入指定的细胞中。48小时后,用被动裂解缓冲液 (Promega) 裂解细胞,并且用Wallac1420 Victor 2自动板阅读器测量萤光素酶活性。转基因表达的增加倍数计算为与来自PBS的转基因表达比较的来自血清或白蛋白处理组的转基因表达。

[0430] 动物实验。根据在Chapel Hill的University of North Carolina的动物委员会制定的指导原则,将所有小鼠维持在无特定病原体的设施中。所有动物实验都由University of North Carolina Institutional Animal Care and Usage Committee审查且批准。动物实验在血友病B (FIX-/-) 小鼠或正常C57BL/6小鼠(购自Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 中执行。对于全身施用,将 1×10^{10} 个AAV/luc载体颗粒与血清或人白蛋白一起在4℃下温育2小时,随后眼眶后施用到成年雌性C57BL小鼠内。在指定的时间点,在D-萤光素底物以120 mg/kg (Nanolight, Pinetop, AZ) 的腹膜内注射后,使用Xenogen IVIS Lumina成像系统 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, MA) 执行成像。使用Living Image软件分析生物发光图像。对于肌肉注射,使 1×10^9 个AAV/luc载体颗粒与血清或人白蛋白一起在4℃下温育2小时。然后将混合物直接注射到6-8周龄C57BL小鼠的后腿肌肉内。在指定的时间点,执行成像并分析生物发光图像。

[0431] 对于血友病B研究,经由尾静脉用 2×10^9 个AAV8/FIX载体颗粒注射成年雄性血友病B小鼠。在指定的时间点,在使用异氟烷的麻醉下,从眼眶后静脉丛中收集血液。在AAV8/FIX注射后第6周时,执行体内出血分析。

[0432] 人白蛋白耗尽。遵循公司说明书伴随轻微修改,使用Pierce™白蛋白耗尽试剂盒(目录# 85160, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)。简言之,在将树脂转移到柱内并以12,000rpm离心1分钟后,将柱洗涤且装载有50 μ L预测的AAV Nab阴性血清。在离心后,将流通物施加到新的树脂处理的柱上,并且重复上述步骤。为了实现白蛋白的最大耗尽,将流通物再施加两次,并且对于一个样品使用总共4个柱。向柱中加入50 μ L结合/洗涤缓冲液,以释放未结合的蛋白质且离心。使用ELISA试剂盒施加最终流通物用于检测白蛋

白。

[0433] 免疫共沉淀。用Pierce Co-Immunoprecipitation (Co-IP) 试剂盒(目录# 26149, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 执行血清蛋白质的免疫共沉淀。首先, 执行抗体固定化。在将树脂浆料加入旋转柱中且离心后, 将柱洗涤且用底部塞子插入。然后, 将稀释的抗体和氰基硼氢化钠溶液序贯地直接加入旋转柱中的树脂, 并且在室温下温育2小时。在离心和洗涤后, 将猝灭缓冲液加入柱中且离心。将猝灭缓冲液施加到树脂上, 随后加入氰基硼氢化钠溶液15分钟。在离心和洗涤后, 将AAV病毒与人血清或PBS的混合物转移到树脂中, 并且在4℃下温育2小时。在离心和洗涤后, 加入洗脱缓冲液并且温育5分钟且离心; 收集流通溶液用于质谱分析或通过Q-PCR的AAV基因组数定量。

[0434] 质谱法。使用FASP方案将蛋白质还原, 烷基化并用胰蛋白酶消化。在通过LC-MS/MS分析之前, 将肽重悬浮于2%乙腈/98%(0.1%甲酸)中。简言之, 将肽装载到长2 cm X 360 μ m o.d. \times 100 μ m i.d.用Magic 5 μ m C18AQ树脂(Michrom Biosciences, Inc.)填充的微毛细管热解法二氧化硅前置柱上。在样品装载后, 将前置柱用95%溶剂A(0.1%甲酸水溶液)/5%溶剂B(0.1%甲酸的乙腈溶液)以2 μ L/分钟的流速洗涤20分钟。然后将前置柱连接到360 μ m o.d. \times 75 μ m i.d.用22 cm的5 μ m C18树脂填充的分析柱。用Nano-Acquity HPLC溶剂递送系统(Waters Corp.), 通过将溶剂B的百分比增加至40%, 以250 nL/分钟的流速洗脱肽。LC系统通过与LTQ Orbitrap Velos离子阱质谱仪(Thermo Fisher Scientific)接口的电喷雾电离源直接连接。质谱仪由Xcalibur软件控制并且以数据依赖性模式操作, 其中初始MS扫描记录在400-2000范围内的离子质荷比(m/z)。自动选择10种最丰富的离子用于随后的碰撞激活解离。使用MASCOT(Matrix Science, Ver. 2.3.02), 经由Proteome Discoverer(Thermo., Ver. 1.3.0.339), 针对从Uniprot下载的含有人蛋白质的数据库搜索所有文件。搜索参数包括10 ppm的肽质量容许量和0.6质量单位的碎片离子容许量。该搜索允许Met的氧化和Cys的氨基甲酰基甲基的可变修饰。每个样品运行2次(R1和R2)。AAV样品和PBS之间的两倍差异被视为阳性的。

[0435] 组织中的萤光素酶表达的定量。在AAV注射后两周处死用于成像研究的动物, 并且收集下述器官: 肝、脾、肾、心脏、肺、骨骼肌(腓肠肌)和脑。将组织切碎, 并且在被动裂解缓冲液(Promega, Madison, WI)中匀浆化。将组织裂解产物以10,000rpm离心5分钟, 以去除细胞碎片。如上所述, 将上清液转移到96孔板中用于萤光素酶活性分析。使用Bradford测定(BioRad, Hercules, CA), 测量组织裂解产物中的总蛋白质浓度。

[0436] AAV基因组拷贝数分析。为了确定各种rAAV载体的血液清除率, 在rAAV载体的静脉内施用后2、6、24和48小时从小鼠获得血浆。遵循制造商的说明书, 使用DNeasy Blood & Tissue试剂盒(QIAGEN, CA), 从血浆中分离病毒DNA。通过实时PCR定量病毒基因组, 使用正向引物: 5'-AAAAGCACTCTGATTGACAAATAC-3' (SEQ ID NO:127) 和反向引物: 5'-CCTTCGCTTCAAAAAATGGAAC-3' (SEQ ID NO:128)。在LightCycler 480(Roche Diagnostics Cooperation, Indianapolis, IN)仪器上执行实时PCR。使用补充有0.2 μ M引物的SYBR绿(Roche Diagnostics Cooperation, Indianapolis, IN)混合物, 执行10 μ L最终体积的绝对定量反应。在每次运行中不包括模板对照, 以排除关于每个引物-探针组的污染可能性。反应在95℃下扩增10分钟, 随后为在95℃下10秒、在60℃下10秒和在72℃下10秒的45个循环, 随后为解链循环。每个基因一式两份进行评价。基于与质粒DNA(萤光素酶)的标准曲线的二

阶导数最大值比较执行绝对定量。

[0437] 为了检测不同组织中的AAV基因组拷贝数,在rAAV的iv注射后第2周时,处死动物并收获所选器官。在使用DNeasy Blood & Tissue试剂盒(QIAGEN,CA)的DNA分离后,对于萤光素酶基因和小鼠小家鼠(*Mus musculus*)Lamin B2基因,对每个样品执行实时PCR。用于小鼠小家鼠Lamin B2基因的引物是:5'-5'-GGACCCAAGGACTACCTCAAGGG-3'(SEQ ID NO:129)(正向)和5'-AGGGCACCTCCATCTCGGAAAC-3'(SEQ ID NO:130)(反向)。基于初始转导中使用的pTR-CBA-萤光素酶质粒和内源基因的那些,通过Lightcycler软件v.4.5(Roche Diagnostics Cooperation,Indianapolis,IN)分析基因组的拷贝。

[0438] AAV结合测定。将 5×10^{10} 个AAV/luc载体颗粒与临床级人血清白蛋白一起在4℃下温育不同的持续时间。然后将预冷的 5×10^5 个Huh细胞在4℃下加入AAV载体中30分钟。用冷PBS将细胞洗涤四次并转移到新管中。提取来自细胞的DNA并且应用于Q-PCR,以使用luc特异性引物测定AAV基因组拷贝数/细胞。

[0439] 中和抗体分析。如我们先前的研究所述,伴随轻微修改,进行Nab测定。简言之,将 1×10^8 个AAV8/Luc载体颗粒与100倍稀释的25% HAS一起在4℃下温育2小时,然后再加入以不同稀释度的IVIG 2小时。施加混合物以感染Huh7细胞。48小时后,从细胞裂解产物中分析萤光素酶活性,并且计算中和抗体滴度。

[0440] 人因子IX抗原和活性测定。如先前所述,执行人因子IX抗原一阶段人因子IX活性测定。通过将因子IX活性(U/ml)除以因子IX蛋白(因子IX抗原)的浓度(mg/ml),来计算表示为因子IX活性/毫克蛋白质的单位(U/mg)的因子IX的比活性。

[0441] 体内出血模型。如Meeks等人先前所述,伴随轻微修改,分析体内出血。在麻醉后,横切3mm的远端尾部,并且将近端尾部置于预热和预称重的管中。在尾部夹住后40分钟或在由于出血的死亡前,计算失血/克体重。

[0442] 统计分析。定量数据呈现为平均值 \pm SD。Student t检验用于执行所有统计分析。P值小于0.05被视为统计学显著差异。

[0443] 实施例2

[0444] 在腺相关病毒(AAV)载体的全身施用后,在患有血友病的患者中已成功地实现了治疗性转基因表达。众多临床前研究已证实长期转基因表达由AAV介导的递送转基因诱导。特别是对于用AAV载体的血友病治疗,虽然用AAV载体的肌肉注射在血友病动物模型中已生成了令人鼓舞的数据,并且在IM后在患有血友病B的患者的肌肉中发现了长期转基因表达,但治疗性转基因FIX在血液中无法检测到。肝是合成血友病因子(FIX和FVIII)的天然器官。在临床试验中,AAV2和AAV8两者均已用于在患有血友病B的患者中递送FIX用于肝靶向。在将AAV载体施用到血液内之后,病毒首先将遇到血清蛋白质。病毒与血清蛋白质的相互作用可能影响肝中的AAV转导。我们先前的研究已通过质谱分析鉴定了几种蛋白质,并且证实人血清白蛋白通过与AAV病毒粒子的直接相互作用增强AAV转导。然而,存在需要解决的几个问题。所有其它AAV结合血清蛋白质是否也影响AAV转导?血清蛋白质的组合是否进一步增强AAV转导?在通过质谱法鉴定的AAV8结合蛋白中,除了白蛋白外,转铁蛋白和载脂蛋白B(ApoB)是更有利的蛋白质,因为它们肝上具有受体。转铁蛋白是铁结合血浆糖蛋白,其控制血液及其它组织液中的游离铁水平。装载有铁的转铁蛋白结合转铁蛋白受体,并且通过

受体介导的内吞作用转运到细胞内。ApoB是乳糜微粒、VLDL、IDL和LDL颗粒的主要载脂蛋白,并且ApoB对于LDL颗粒的形成是必需的。在LDL颗粒上的ApoB充当LDL受体的配体,以将脂肪递送到细胞内。在下述研究中,我们研究了LDL和转铁蛋白对肝中的AAV转导的作用,以及血清蛋白质的组合对AAV肝转导的作用。我们的结果已显示,LDL或转铁蛋白与AAV8病毒粒子的相互作用增强了AAV肝转导。然而,不存在三种蛋白质(HAS、LDL、转铁蛋白)的组合对AAV转导的进一步增强的作用。

[0445] AAV8与LDL或转铁蛋白一起温育增加了Huh细胞中的转导。由于转铁蛋白和apoB可以特异性结合肝细胞上的转铁蛋白受体和LDL受体,我们推测转铁蛋白或apoB与AAV病毒粒子的相互作用能够增强转导。将编码萤火虫萤光素酶基因的AAV8/luc载体与以不同稀释度的正常血液浓度的LDL或转铁蛋白一起在4℃下温育1小时,然后转导到Huh7或293细胞上。48小时后,收集细胞裂解产物用于萤光素酶分析。如我们先前报道的,即使在1:10000的稀释度下,AAV8与人白蛋白的相互作用也增加了Huh7细胞中的AAV8转导(图15)。我们还发现转铁蛋白和LDL分别在1:1000和1:100的稀释度下在Huh7细胞中发挥AAV8转导的增强。不管不同的血清蛋白质或稀释度如何,在293细胞中未显示转基因表达的显著增加(图15)。该结果暗示LDL或转移与AAV8的相互作用加强了肝细胞中的转导。

[0446] AAV8不利用LDL或转铁蛋白受体用于肝转导。已显示LDL或转铁蛋白受体用于某些病毒的有效肝感染。用高剂量的LDL或乳铁蛋白注射阻断这些受体降低了小鼠的肝中的这些病毒感染力。已鉴定了关于其它血清型的主要受体,但尚不清楚哪种主要受体由AAV8用于有效转导。AAV8已显示为转导小鼠肝的最佳血清型。为了研究AAV8是否与LDL或转铁蛋白受体结合用于靶细胞转导,我们将0.5 mg人LDL(其使LDL受体饱和)或1mg乳铁蛋白(其使LRP以及HSPG饱和)施用到小鼠内,并且5分钟后,注射 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒。在AAV注射后三天后,获取成像。惊讶地注意到,LDL或乳铁蛋白的预注射实际上增加肝中的AAV8转导(图16)。该结果提示AAV8可能不采用LDL和转铁蛋白受体用于有效的小鼠肝转导。

[0447] AAV8与LDL或转铁蛋白的相互作用增强小鼠肝转导。AAV8与LDL或转铁蛋白一起温育增加人肝细胞系Huh7中的转导,但不增加非肝细胞系293T的转导。如上所述,为了研究LDL和转铁蛋白对小鼠中的AAV肝转导的作用,将 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与不同稀释度的LDL或转铁蛋白一起温育,然后经由眼眶后静脉注射到小鼠内。在AAV注射后第3天、第10天和第14天时,进行小鼠成像。如图17中所示,即使在关于LDL的10000倍稀释和关于转铁蛋白的1000倍稀释下,在实验自始至终也观察到肝转导的增强。

[0448] AAV8与LDL或转铁蛋白一起温育增加病毒粒子与靶细胞的结合。已显示,来自HSA的增强转导是由于AAV病毒粒子与靶细胞的结合增加。为了检查相同的机制是否适用于LDL和转铁蛋白对肝细胞中的AAV8转导的作用,我们首先在Huh7细胞中执行病毒-细胞结合分析。使AAV8病毒与以不同稀释度的正常血液浓度的LDL或TRF一起在4℃下温育1小时,然后加入Huh7细胞并且在4℃下再温育2小时。在用PBS充分洗涤后,提取来自Huh7细胞的DNA并且应用,以使用定量PCR测量AAV基因组拷贝数。与来自转基因表达的结果一致,LDL或ApoB或转铁蛋白与AAV8病毒粒子一起温育增加了AAV8与Huh7细胞的结合(图18)。HAS的10至1000倍稀释具有与Huh7细胞相似的病毒结合。相比之下,AAV8与Huh7细胞对于LDL和转铁蛋白的结合能力是剂量依赖性的。因此,与AAV载体一起温育的更多蛋白质诱导更高的病毒与Huh7细胞的结合。

[0449] 为了研究LDL和转铁蛋白对小鼠肝上的AAV结合能力的作用,我们首先研究在AAV施用后血液中的病毒清除的动力学。与以100倍稀释的LDL或转铁蛋白一起预温育的 1×10^{11} 个AAV8/luc载体颗粒经由眼眶后静脉注射到小鼠内。在AAV8注射后48小时执行小鼠成像(图19A和19B)。与如上所述的结果一致,用LDL或转铁蛋白预处理的AAV8增加了小鼠肝转导。此外,在AAV注射后5分钟、2小时、24小时和48小时,抽取血液并且在血液样品的短暂离心后收集血浆。通过定量PCR测量血浆中的AAV基因组拷贝数(图19C)。与关于与HAS一起温育的AAV8的病毒清除动力学形成对比,在AAV注射后5分钟时,接受用LDL和转铁蛋白预处理的AAV8的小鼠中发现更高的血液病毒滴度。在AAV施用后2小时不存在差异。

[0450] 为了研究血清蛋白质LDL和转铁蛋白对AAV8的生物分布的作用,在AAV施用后第7天时,处死小鼠并且收获不同的组织,用于转基因表达分析和AAV基因组拷贝数检测。如图20中所示,与接受与PBS一起温育的AAV8载体的对照小鼠相比,增加的转基因表达仅在与LDL或转铁蛋白一起预温育的AAV8载体处理的小鼠的肝中显示。与转基因表达一致,在接受具有LDL或转铁蛋白的AAV8的小鼠的肝中观察到更高的AAV基因组拷贝数。这些结果提示,AAV8与LDL或转铁蛋白一起温育不改变AAV8组织向性,而是增加肝中的AAV摄取。

[0451] 来自与血清蛋白质的组合一起温育的AAV8的转基因表达没有进一步增加。我们的先前研究和上述结果证实,个别血清蛋白质(HAS、LDL和转铁蛋白)增强肝细胞中的AAV8转导。接下来,我们想知道这些蛋白质的组合是否具有增加AAV8转导的更多潜力。使AAV8载体与两种或三种蛋白质的组合一起温育,并且转导到Huh7细胞内。与用白蛋白处理的AAV8相比,不管个别蛋白质的任何组合或任何稀释度,都没有实现转基因表达的进一步增加(图21)。

[0452] 我们还使 1×10^{10} 个AAV8/luc颗粒与以100倍稀释的个别或组合的三种蛋白质一起温育,并且经由眼眶后静脉注射到小鼠内。在AAV注射后第3天和第7天时,使小鼠成像。与Huh7细胞中的结果类似,与个别蛋白质相比,HAS、LDL和转铁蛋白的组合不增加AAV8肝转基因表达(图22)。

[0453] 血清蛋白质竞争性结合AAV8病毒粒子的相同位置。来自体外和体内实验的上述结果证实,与个别蛋白质相比,血清蛋白质的组合不具有优异的肝转导。由与HAS、或LDL或转铁蛋白一起温育的AAV8观察到肝转导的类似增强。我们假设这些蛋白质可能与AAV病毒粒子表面的相同位置结合。为了支持这一假设,我们执行了竞争测定。首先,我们使AAV8病毒与以不同稀释度的白蛋白混合物和以1:100稀释度的LDL或转铁蛋白一起温育。然后通过对于ApoB或转铁蛋白特异性的抗体下拉AAV病毒粒子,并且通过定量PCR滴定(图23A)。AAV8与含有高浓度HSA的组合一起温育完全阻断了病毒与LDL或转铁蛋白的结合。降低的HSA浓度增加了AAV8病毒粒子与其它蛋白质的结合。当使用10000倍的HSA时,未显示AAV8与LDL或转铁蛋白结合的抑制。接下来,我们进行了AAV8-蛋白结合阻断分析。使AAV8/luc与以不同稀释度的HAS一起温育30分钟,然后加入以100倍稀释的LDL或转铁蛋白1小时。在用LDL或转铁蛋白特异性抗体下拉后,类似于竞争分析,高浓度的HSA阻断了以后的AAV病毒粒子与LDL或转铁蛋白的结合(图23B)。

[0454] 总之,血清蛋白质(LDL-ApoB、转铁蛋白、白蛋白)能够经由增加AAV病毒粒子与靶细胞结合的机制来增强AAV8肝转导。这些蛋白质与AAV8病毒粒子表面上的相同位置相互作用。

[0455] 实施例3

[0456] 在12种AAV血清型中,众所周知AAV9的全身施用诱导动物模型中的总体转导。因此,已在临床试验中提出通过AAV9载体的外周输注来靶向脑和肌肉,以递送治疗性转基因。来自体外和体内研究的结果已提示AAV9载体能够经由有效的转内吞作用穿过血管内皮屏障,这促成其在全身基因递送后在肌肉、心脏及其它组织或器官中的优异转导。在全身施用后,AAV9载体首先与血清蛋白质相互作用,然后与靶细胞结合。为了阐明某些血清蛋白质是否能够与AAV9相互作用并增强其转导,我们对于AAV9结合血清蛋白质执行质谱分析,并且研究这些结合血清蛋白质对AAV9总体转导的潜在作用。

[0457] 具有血管通透性调节的血清蛋白质结合AAV9。为了鉴定哪种血清蛋白质能够结合AAV9病毒粒子表面,我们进行免疫沉淀用于质谱分析。使AAV9病毒粒子与人血清一起在4℃下温育2小时。加入仅识别完整AAV9衣壳的单克隆抗体ADK9。然后,将AAV9结合血清蛋白质下拉,并且通过质谱法进行分析。在鉴定的蛋白质中(表6),几种蛋白质可以影响血管通透性,所述蛋白质包括:纤维蛋白原(Fib)、纤连蛋白(FN)、纤溶酶原(PMG)、血管性血友病因子(vWF)、 α -1-酸性糖蛋白(AGP)和血小板因子4(PF4)(表7)。

[0458] 纤维蛋白原与AAV9的直接相互作用增强全身转导。Fib是帮助血块形成的糖蛋白。Fib是含有两组三条不同的链(α 、 β 和 γ)的六聚体,所述链通过二硫键彼此连接。纤维蛋白原由肝细胞合成,并且在血浆中的浓度为2-4mg/ml。纤维蛋白原是可溶的,具有340 kDa的分子量。质谱分析已显示Fib的所有三条链都鉴定为与AAV9结合(表7)。为了研究Fib对小鼠中的AAV9转导的作用,我们使 1×10^{10} 个AAV9颗粒与3 mg Fib一起在4℃下温育2小时,然后注射到小鼠(Fib-PBS群组)内。三天后,执行成像。当与仅接受AAV9的小鼠(PBS群组)、或紧在AAV9注射之前用Fib处理的小鼠(PBS-Fib群组)相比时,在Fib-PBS群组内的小鼠中实现了高约3倍的肝转导(图24)。此外,基于成像概况,在接受与Fib一起预温育的AAV9的小鼠中,在头部、心脏和肝旁边的其它位置中也观察到强转导。在PBS群组和PBS-Fib群组之间,在肝或全身中的转基因表达中不存在差异。该结果提示,Fib与AAV9载体一起温育能够增加AAV9血管通透性并增强AAV9全身转导,并且转导的增强需要Fib与AAV病毒粒子的直接相互作用。为了检查除肝之外的其它组织中的高转导,我们执行与Fib预温育的AAV9载体的全身施用,并且在AAV注射后第1周时,处死小鼠并收获组织,用于荧光素酶分析和基因组拷贝数检测(图25)。与成像一致,与PBS和PBS-Fib群组中的小鼠相比,Fib-PBS群组中的小鼠具有在肝、心脏、肺、肌肉和脑中更高的转基因表达(图25A)。此外,在来自Fib-PBS群组的小鼠组织中发现比来自另外两个群组的小鼠组织中更高的AAV基因组拷贝数(图25B)。当AAV9与降低剂量的Fib一起温育时,仅在1mg和100ug Fib的浓度下观察到增强的转导。具有较低剂量的Fib对AAV9转导没有作用(图26)。

[0459] 在与纤维蛋白原一起温育的AAV9的全身施用后,较高的AAV病毒粒子持续存在。已证实AAV9载体的血液清除比其它血清型的那种更慢,这可能促成增加的血管通透性用于高全身转导。为了研究Fib的温育是否影响血液中AAV9清除的动力学,我们将 2×10^{11} 个AAV9颗粒注射到小鼠内,并且在第2天时,获取小鼠成像(图27A)。与上述观察相似,与PBS群组或PBS-Fib群组的小鼠相比,在用与Fib一起预温育的AAV9处理的小鼠中显示肝中更高的转基因表达(图27B)。在不同的时间点,抽取血液并且经由定量PCR检测血浆中的AAV基因组拷贝数。在AAV注射后20分钟、2小时和24小时,与另外两个群组内的小鼠的那种相比,在接受与

Fib一起温育的AAV9的小鼠中发现在循环中显著更高的基因组拷贝数。在三个群组中的AAV施用后48小时不存在差异(图27C)。结果可以解释,在与纤维蛋白原一起预温育的AAV9载体的全身施用后,增强的全身转导可以起因于循环中较高的AAV病毒粒子。

[0460] 其它血清蛋白质与AAV9的相互作用增强转导。这项研究的主要焦点是检查哪种血清蛋白质增强AAV9全身转导。为此,与来自质谱分析的结果组合,也结合AAV9的几种其它蛋白质可以调节血管通透性,以影响AAV9全身转导,所述蛋白质包括: α -1-酸性糖蛋白2(AGP)、纤连蛋白(FN)、血管性血友病因子(vWF)、血小板因子4(PF4)和纤溶酶原(PMG)。我们使AAV9载体与在生理血液浓度下的这些蛋白质一起温育,并且注射到小鼠内。在AAV施用后第3天时,进行小鼠成像。所有这些蛋白质在用AAV9处理的小鼠中都诱导更高的肝转导(图28)。在一些组中,在AAV注射后第1周时,我们还发现在接受与AGP或FN或PF4或vWF一起预温育的AAV9的小鼠的脑中的高转基因表达(图29A和29B)。在AAV施用后第1周时处死小鼠,并且在肝和脑中检测AAV基因组拷贝数。与图像概况一致,在接受与Fib、或PF4或vWF一起预温育的AAV9的小鼠的肝中获得高3至4倍的基因组拷贝数。与肝形成对比,除了PF4之外,在接受与血清蛋白质一起预温育的AAV9的小鼠的脑中仅观察到略微更高的基因组拷贝数(图29C)。

[0461] 接下来,我们检查了在不同剂量下的血清蛋白质对增强的AAV9转导的作用。使AAV9与以不同稀释度的血清蛋白质一起温育,然后经由眼眶后静脉施用到小鼠内。如图30中所示,对于以1000倍稀释的AGP和以100倍稀释的纤连蛋白仍可见增强的转导,但不存在关于PF4和vWF的转导增加,即使使用这些蛋白质的10倍稀释(图30)。

[0462] 冷沉淀物与AAV9一起温育增强AAV9转导。基于来自上述研究的结果,几种血清蛋白质增强AAV9全身转导。接下来的问题是我们是否可以立即在临床试验中使用这些蛋白质。在临床实践中不存在可用的个别蛋白质;然而,冷沉淀物已在诊所中长时间使用。冷沉淀物是通过新鲜冷冻血浆的离心和沉淀,由血浆制备的冷冻血液产品。冷沉淀物主要含有纤维蛋白原、因子VIII、vWF、因子XIII和纤连蛋白。冷沉淀已用于治疗患有血友病、vWF疾病、低纤维蛋白原血症、纤维蛋白原缺乏血症等的患者。由于纤维蛋白原、vWF和纤连蛋白已如上所述证实增强AAV9转导,接下来我们测试了冷沉淀物是否对AAV9转导具有影响。使AAV9与以不同剂量的冷沉淀物一起温育,并且全身注射到小鼠内。对于100至10000倍稀释的冷沉淀物,肝中的AAV9转导增强是剂量依赖性的。对于100000倍稀释的冷沉淀物的剂量不存在增强(图31)。这一结果指示,当AAV9载体需要用于全身施用时,冷沉淀物可以立即用于未来的临床试验中。

[0463] 由纤维蛋白原、vWF和纤连蛋白组成的冷沉淀物可以立即应用于临床试验中,以增加血管通透性并且在AAV9的全身施用后靶向脑和肌肉。

[0464] 实施例4

[0465] 我们已执行了关于白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用对中和抗体A20抑制活性的作用的另一个实验。如表8和图32中所示,不管白蛋白的稀释度(无稀释、5倍、50倍、500倍),人白蛋白与AAV2一起温育不阻断A20抑制功能。A20中和抗体滴度(稀释在第一次时抑制AAV转导超过50%)是一致地相同的(1:640稀释)。这一结果指示白蛋白与AAV病毒粒子的相互作用不能干扰中和抗体A20与AAV衣壳的结合和阻断AAV转导。

[0466] 基于这些研究,在12.5 μ l中以20000倍稀释的5% HSA具有在体外增强AAV转导

(1×10^8 个AAV颗粒)的效应。在一个实施方案中,可以使约3000个人白蛋白分子(2830)与一种AAV病毒粒子一起温育,用于增强转导。参见下文的计算:

[0467] 人血清白蛋白分子量(kDa):66.5 kDa

[0468] $1 \text{ ng} = 15.04 \text{ fmol} = 905570676 \text{ 个分子}$

[0469] $12.5 \text{ ul } 5\% \text{ HSA}(50\text{ug/ul}) = 625 \text{ ug} = 625000 \text{ ng}$

[0470] 在12.5 ul中以20000稀释度的5% HSA仍具有增强AAV转导(1×10^8 个AAV颗粒)的效应。

[0471] 因此HSA的总分子为 $625000/20000 \times 905570676 = 282990836466$

[0472] $\text{HSA分子/AAV病毒粒子} = 282990836466/100000000 = 2830 \text{ 个分子/AAV病毒粒子}$ 。

[0473] 实施例5:白蛋白融合蛋白/AAV复合物的稳定性

[0474] 方法。将 1×10^{10} 个AAV8/luc载体颗粒装载到歧管仪器中的硝酸纤维素膜上,然后通过1%明胶封闭膜,随后为与以1:1000稀释度的25%人血清白蛋白(HSA)的30分钟温育,以允许AAV与白蛋白的直接相互作用。在用PBS洗涤后,将具有不同浓度的盐或pH的缓冲液加入歧管仪器的各个孔中。在去除不同的缓冲液后,将膜洗涤并且与HRP缀合的山羊抗人白蛋白杂交,随后为使用Immun-Star™ Chemiluminescence Kits(Bio-Rad)的显色。

[0475] 结果。如图33中所示,当加入不同浓度的NaCl时,人白蛋白从AAV/HSA复合物中解离,AAV/HAS复合物的解离取决于NaCl的浓度(图33A)。较高浓度的NaCl完全破坏了AAV8病毒粒子与HSA的相互作用。我们还发现HSA/AAV复合物在 $\text{pH} > 6$ 下是稳定的,但在 $\text{pH} \leq 5$ 下解离(图33B)。

[0476] 实施例6

[0477] 腺相关病毒(AAV)载体已成功地应用于患有血液疾病和视觉障碍的患者的临床试验中。两个关注限制了更广泛的AAV载体应用:AAV衣壳特异性细胞毒性T细胞(CTL)应答介导的AAV转导靶细胞的消除、以及中和抗体(Nab)介导的AAV转导阻断。已证实衣壳抗原呈递是剂量依赖性的,这指示用低剂量的AAV载体增强AAV转导将潜在地降低衣壳抗原负荷,并且有希望除去衣壳CTL介导的AAV转导的靶细胞的清除,而不损害转基因表达。几种方法已为此进行探讨,其包括:转基因盒的优化、AAV衣壳的修饰和AAV运输由药理学试剂的干扰。AAV衣壳的修饰可以改变AAV向性,尤其是因为AAV转导效率在人组织中是未知的。

[0478] 用于增强AAV转导的药理学试剂通常具有不希望有的副作用。必须开发理想的策略以增强AAV转导,但没有来自衣壳的修饰在向性中的改变或来自药理学治疗的负面副作用。我们已执行了先驱研究,并且发现人血清白蛋白(HSA)已通过AAV病毒粒子与白蛋白的直接相互作用,对AAV转导具有增强的作用。这些观察对于临床试验具有至关重要的意义,因为白蛋白是天然存在的,并且是循环中反弹最多的蛋白质。

[0479] 有效的AAV转导涉及下述步骤:经由受体和共受体在靶细胞表面上结合,内吞进入内体内,从内体中逃逸,核进入和AAV病毒粒子脱壳,随后为转基因表达。可以修改几个步骤以增强AAV转导,包括细胞结合、内体逃逸和核进入。我们的初步研究已显示,HSA能够直接与AAV病毒粒子相互作用并增强其转导,由于经由HSA受体在细胞表面上增加的AAV病毒结合。

[0480] 对于有效的药物或生物-货物递送,许多研究已证实众多肽(包括细胞穿透肽-CPP)已鉴定为特异性靶向肝细胞,帮助内体逃逸(内体裂解(endosomolysis))且增加核进

入。所述研究检查了这些肽与HSA的融合是否进一步增强AAV肝转导。干扰AAV病毒粒子运输用于增强转导也可能影响衣壳抗原呈递；先前的研究已证实衣壳抗原呈递依赖于蛋白酶体介导的AAV衣壳降解。许多病毒（例如，CMV、疱疹）利用VIPR肽（干扰抗原呈递的病毒蛋白，例如US6、ICP47）来阻断抗原呈递。在这些实验中，我们将研究用HSA增强的AAV转导对衣壳抗原呈递的作用，并且探讨VIPR与HSA的融合是否干扰AAV衣壳抗原呈递。通过HSA增强的AAV转导是由于在与白蛋白相互作用后，在靶表面上更多的病毒粒子结合。这一结果提示白蛋白融合肽可以用作用于AAV转导的替代受体配体，以避免AAV中和抗体（Nab）活性。已提出用于中和抗体识别的表位位于病毒粒子表面的9个可变区（VR）上。先前的研究已显示来自AAV VR的肽阻断Nab功能。衍生自AAV VR的不同肽的组合可以具有更强的阻断Nab活性的能力。我们将探讨具有衍生自AAV病毒粒子的表面可变区的肽的白蛋白融合蛋白是否干扰中和抗体活性。

[0481] 在患有血友病B的患者的I期临床试验中，腺相关病毒（AAV）载体已成功地用于转导肝细胞。然而，临床结果已提示衣壳特异性细胞毒性T淋巴细胞（CTL）消除了AAV转导的肝细胞，因此导致治疗失败。AAV转导的靶细胞中的衣壳抗原呈递是剂量依赖性的。为了避免衣壳特异性CTL介导的AAV转导的肝细胞的清除，已提出了较低剂量的AAV载体，以减少AAV转导的细胞中的衣壳抗原负荷。为了用低载体剂量获得类似转导效率，已探讨了几种方法，包括转基因优化、衣壳改变和药物处理以增强转导。许多药理学试剂已用于此目的，包括蛋白酶体抑制剂、DNA合成抑制剂和拓扑异构酶抑制剂。然而，这些药物具有严重的副作用。还已证实AAV衣壳的修饰可以增强肝转导。我们最近的研究证实，AAV9半乳糖受体结合残基植入AAV2病毒粒子（双重受体）内诱导更强的肝转基因表达。然而，其它突变体如AAV2i8（AAV2与来自AAV8的肝素结合位点交换）将其亲本的肝向性改变为肌肉向性。白蛋白是最丰富的血浆蛋白质，并且在肝中合成。白蛋白是高度可溶且稳定的蛋白质。人白蛋白的X射线晶体结构已揭示它是由67% α -螺旋和无 β -折叠组成的心形分子，并且折叠成三个同源结构域，其中每个被分成A和B亚结构域。结构域经由长柔性环连接。三个结构域各自具有疏水性结合口袋，其允许携带物质。因此，白蛋白充当分子出租车，其在血流中转运必需物质和废物，用于最佳地分配到其靶位点。已描述了几种白蛋白受体：细胞表面糖蛋白（gp）18、gp30、gp60（清蛋白激活蛋白）、magalin/cubilin复合物、酸性和富含半胱氨酸的分泌性蛋白（SPARC；也称为骨粘连蛋白）和FcRn。在白蛋白与受体结合后，它经由内吞作用被摄取。关于白蛋白内吞作用的途径是细胞类型依赖性的，并且包括网格蛋白或小窝蛋白介导的内吞作用。人血清白蛋白（HSA）在制药工业中引起了极大的兴趣，因为它可以结合显著多样的药物，影响其递送和功效，且最终改变药物的药代动力学和药效学特性。

[0482] AAV感染是多步骤过程，从病毒与细胞表面结合开始，随后为病毒摄取、细胞内运输、核定位、脱壳和第二链DNA合成。AAV2通过与其主要受体（硫酸乙酰肝素蛋白多糖-HSPG）和共受体（整联蛋白和成纤维细胞生长因子受体1）结合而引发感染。为了使AAV继续其生命周期，它必须在内吞作用后从内体中释放。在从内体逃逸后，AAV快速行进到细胞核并且在核周空间中积累，在内吞作用开始后30分钟内开始。在两小时内，可以在细胞核中检测到病毒颗粒，提示AAV颗粒在脱壳之前进入细胞核。有利的是，大多数细胞内病毒保留在稳定的核周区室中。在受体结合、内化和核进入后，AAV病毒粒子脱壳并且释放单链DNA模板，其必须在转录可以跟着发生之前转换为双链体中间产物。一些步骤是关于有效AAV转导的限速

因子,包括在靶细胞上的病毒结合能力、内体逃逸和核进入的效率。

[0483] 细胞穿透肽(CPP),也称为蛋白质转导结构域(PTD),是能够将肽、蛋白质、核酸和纳米颗粒跨越细胞膜携带到细胞内的小肽,导致完整货物的内化。CPP可以发挥不同功能,例如增强货物结合能力且增加货物从内体中逃逸和核进入。已鉴定了特异性结合肝细胞的几种肽。一种肽衍生自环孢子蛋白,其含有保守区I氨基酸(KLKQP,SEQ ID NO: 131)加上来自区域I上游的碱性氨基酸结构域(DNEKLKPKHKKLKQPADG,SEQ ID NO: 132)。另一种肽preS1结构域来自乙型肝炎病毒表面抗原(PLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNP,SEQ ID NO: 133)。第三种肽来自T7噬菌体尾纤维蛋白(KNESSTNATNTKQWRDETKGFRDEAKRFKNTAG,SEQ ID NO: 134)。一些肽具有经由不同机制促进内体膜破裂的特性:内体膜中的孔形成、pH缓冲效应(质子海绵效应)、内体膜中的融合和内体膜的光化学破坏。这些肽衍生自病毒、细菌和人/动物蛋白质以及合成的。在更高阶的生物系统中,核定位信号(NLS)对于将大分子货物靶向核是必须的。为了改善核输入效率,具有核定位序列(NLS)的CPP与DNA或基因载体的直接或间接附着已引起了很多研究兴趣。NLS是基于富含赖氨酸、精氨酸或脯氨酸的基序的短肽,其可以被核转运蛋白的输入蛋白超家族成员识别。输入蛋白- α 直接结合NLS信号,并且通过输入蛋白 β 和核孔蛋白(Nup)的相继对接,复合物通过核孔复合物(NPC)易位到核内。因此,NLS克服核膜屏障并且促进核转位。在基因治疗领域中最众所周知和广泛研究的NLS来自猿猴病毒40(SV40)的大肿瘤抗原。

[0484] 对于白蛋白介导的药物递送,内吞的货物经常变得在内体中截留,在其中它们可以被水解酶降解。对于AAV感染,在摄取后,与腺病毒相比,AAV在内体中停留长得多的时期。在从内体/溶酶体中逃逸后,仅一小部分的载体进入核用于脱壳。因此,内体逃逸和核进入变成白蛋白介导的AAV载体递送中的限制因子。CPP与白蛋白的融合增加白蛋白的摄取并且行进到肝细胞中的核。当AAV载体与这些白蛋白融合蛋白一起预温育时,由于更多的病毒与肝细胞结合以及AAV从内体中逃逸以及核进入的增加,将导致肝细胞中增强的AAV转导。因此,避免靶细胞中高剂量相关的抗原呈递,并且需要较少的劳动力来制备AAV。

[0485] 虽然白蛋白能够直接与AAV病毒粒子相互作用并因此增强AAV转导,但尚不清楚白蛋白与AAV的相互作用是否影响衣壳抗原呈递。白蛋白可以改变AAV运输途径,然后影响衣壳抗原呈递效率和动力学,尤其是当白蛋白与CPP融合时。调查白蛋白及其融合蛋白对基于衣壳的抗原呈递的作用,允许团体理解用于设计具有增强的肝转导和长期临床功效的更安全AAV载体的有效参数。使用经典的MHC-I类抗原呈递机制,通过蛋白酶体介导的衣壳降解来介导AAV衣壳交叉呈递。通过编码命名为VIPR的一组蛋白质来影响MHC I类呈递途径,一些病毒可以在宿主内对于生物的终生持续存在。这些VIPR通过与白蛋白融合用于AAV载体递送的潜在用途是这些研究的焦点。

[0486] 在一般人群中,超过95%的个体已被AAV血清型2(AAV2)感染,并且平均起来50%的受感染的个体具有NAb。为了克服AAV NAb,在实验室中已开发了几种方法。一种方法涉及使用聚合物涂层来掩蔽AAV表面并阻断NAb识别(例如,聚乙二醇)。虽然很有希望,但这种方法可能改变AAV转导概况。第二种方法使用易错PCR来生成AAV衣壳变体的文库,并且在体外在Nab的存在下选择NAb逃避突变体。这种方法已产生了新型衣壳;然而,它具有在体内生成具有未知转导效率的衣壳的潜在限制。第三种方法是使用AAV的替代血清型,其显示低或不存在的NAb交叉反应性 - 在几种动物模型中证实的方法。最后的实验室方法是合理地突变

AAV衣壳表面上的NAb结合结构域,以消耗NAb结合位点。这种策略需要关于单克隆抗体表位和AAV病毒粒子结构的信息,并且由于以下事实而固有地受限:来自人血清的NAb是多克隆的,并且不可能从人中获得代表所有生成的NAb的mAb。还已采用了几种临床背景方法:一个实例是在载体递送之前执行血浆单采。然而,由于每轮单采的相对低效率以及甚至低滴度的NAb($<1:5$)也可以取消AAV转导的事实,这种策略仅适用于较低的AAV NAb起始滴度且需要多次单采的患者。类似地,抗CD20抗体(利妥昔单抗)的使用可以实现B细胞耗尽6-9个月,但不针对(抗体产生)浆细胞,并且在具有1:1000滴度的少数受试者中有效减少AAV NAb。

[0487] 衍生自AAV VR的肽能够阻断NAV对AAV转导的活性。肝细胞特异性肽和CPP以及与HSA连接的来自AAV VR的肽的组合具有两个功能:作为用于阻断AAV中和抗体的诱饵(来自AAV的VR),以及用于有效AAV结合/细胞内运输(CPP)的另一层。该策略具有对需要AAV载体的全身施用或任何重复施用的任何状况的全局应用。

[0488] 众多研究证实下述:(1)人血清白蛋白直接与AAV病毒粒子相互作用并增强AAV转导;(2)AAV衣壳抗原呈递在体外取决于蛋白酶体介导的衣壳降解;(3)AAV衣壳抗原交叉呈递在体内是剂量依赖性的;(4)AAV病毒粒子的修饰增加肝转导;(5)药理学试剂在体内增强AAV肝转导;(6)VIPR干扰抗原呈递;以及(7)来自AAV VR的肽阻断对AAV转导的中和抗体活性。所有这些初步结果都利用HSA在AAV临床应用中的作用奠定了基础,包括AAV转导的增强、衣壳抗原呈递的干扰和Nab的逃避。

[0489] 关于AAV全身施用的临床试验中面临的两个关键问题是衣壳特异性CTL应答和AAV中和抗体。增强的AAV转导可以降低实现疗效所必需的AAV载体的剂量,同时降低衣壳抗原负荷以避免衣壳特异性CTL识别。尽管已提出了衣壳修饰和药理学试剂的应用以增强AAV转导,但AAV衣壳的突变可以改变其向性,并且具有增强的AAV转导的药物总是具有副作用。利用与CPP融合的血清蛋白质白蛋白来增强特定组织中的AAV转导是新型的,并且没有不希望有的副作用。

[0490] 用AAV突变体增强的肝转导。AAV病毒利用硫酸乙酰肝素(HS)、半乳糖(Gal)或唾液酸(Sia)作为用于细胞表面结合的主要受体。不同的AAV毒株还需要与共同受体的后续相互作用,用于细胞摄取。已鉴定了涉及通过AAV9衣壳的Gal识别的关键氨基酸残基。在AAV衣壳上的受体结合位点的修饰可以改变转基因概况或转导效率。我们已开创了AAV衣壳的合理设计研究;例如,我们已突变了关于不同血清型之间的主要受体结合位点的关键残基,并且证实AAV2/AAV8嵌合体AAV2i8展示改变的转导概况。AAV2i8以高效率选择性地转导心脏和全身骨骼肌,并且丧失肝向性。将AAV9主要受体Gal结合残基整合到AAV2衣壳内(AAV2G9)的进一步研究显示,AAV2G9具有双重受体功能,并且利用Gal和硫酸乙酰肝素受体用于感染。特别有利的是,AAV2G9保留了与AAV2相似的向性,但在小鼠中赋予更快速的发作和更高的肝转基因表达。类似地,与AAV9可比较,Gal足迹植入AAV2i8内(AAV2i8G9)也在肌肉和肝中诱导更高的转导。

[0491] 另外,我们已证实在AAV2衣壳的残基265处的修饰改变AAV2组织向性和免疫概况。在AAV2衣壳(AAV2D)的残基265处插入天冬氨酸诱导比AAV2高得多的肌肉转导。类似地,AAV2D的全身施用也诱导比AAV2更高的肝转导。残基585 Arg促成AAV2肝素结合能力,并且AAV2肝素结合位点(AAV2/585E)的突变除去AAV2肝向性。然而,在AAV2/585E衣壳的残基265处插入Asp使肝向性恢复到与使用AAV8观察到的相似的转导效率。尽管这些研究证实实现

了对于突变更高的肝转导,但组织向性也改变了。

[0492] 用化学治疗剂增强的肝转导。许多化学试剂已用于增强AAV转导,包括蛋白酶体抑制剂如MG-132和硼替佐米、DNA合成抑制剂如羟基脲(HU)和阿非迪霉素、以及拓扑异构酶抑制剂如依托泊苷和喜树碱。到目前为止,用于增强体内rAAV转导的首要候选物是蛋白酶体抑制剂硼替佐米,其已证实在大型动物研究中使转基因表达增加3至6倍。我们已进一步鉴定新型试剂三氧化二砷、以及替代蛋白酶体抑制剂卡非佐米,其也加强了AAV肝转导(图34)。

[0493] 用人血清白蛋白增强的肝转导。当我们对人血清执行AAV中和抗体分析时,即使使用非常高稀释度的血清,也观察到增强的AAV转导。为了分离能够结合AAV并增强转导的蛋白质,我们使AAV2与人血清一起温育,并且使用A20抗体下拉AAV2结合蛋白用于免疫沉淀。在用质谱法分析后,鉴定了人血清白蛋白(HSA)(图35A)。我们通过研究与Cy5标记的AAV2和Cy3标记的白蛋白的共定位,进一步确认血清白蛋白与AAV病毒粒子的直接相互作用(图35B)。为了阐明HSA对AAV转导的作用,我们在Huh7细胞中用HSA耗尽的血清和重组人白蛋白执行转导测定。用HSA耗尽的血清比完全血清发现AAV2转导的较低增强(图35C)。来自rHSA的增强AAV转导类似于来自完全血清的AAV转导(图35D)。我们还证实rHSA增强AAV8转导(图35E)。为了检查HSA对增强的AAV转导的作用是否限于特定组织,我们将与rHSA一起预温育的AAV8载体注射到不同组织内,并且发现在肝和肌肉中增强的转导(图35F和3G)。

[0494] AAV运输。使用荧光标记的AAV病毒粒子在感染后跟踪病毒,我们观察到通过网格蛋白包被小窝的AAV内化以及从早期内体的逃逸($t_{1/2} < 10$ 分钟),允许渗透到细胞溶质内。AAV然后被快速运输到细胞核,并且在内吞作用开始后30分钟内在核周空间中积累。在2小时内,可以在细胞核内检测到病毒颗粒。为了支持荧光结果,我们使用单克隆抗体A20进行免疫分析,以在受体进入后检测完整的病毒粒子。观察到类似的结果。为了进一步确定在感染期间完整病毒粒子的细胞位置,我们使用 γ -微管蛋白单克隆抗体来定位微管组织中心(MTOC),并且发现AAV病毒通过MTOC行进到核。使用单粒子跟踪以实时监测病毒运动,我们发现AAV2仅展示在微管(MT)上朝向核的单向运动。此外,电子显微镜检查分析证实AAV2颗粒在膜区室内的MT上转运,并且含有AAV2的内体的酸化通过MT的破坏而延迟。

[0495] AAV衣壳抗原呈递是剂量依赖性的并且在早期发生。为了调查在体内衣壳抗原呈递的剂量响应,将不同颗粒数目的AAV2-OVA载体注射到小鼠内,以检查OT-1T细胞刺激。当与未处理的对照相比时, 5×10^{10} 个AAV2-OVA颗粒的剂量诱导OT-1 T细胞的增殖(图36A-C)。重要的是,在AAV2-OVA的剂量小于或等于 1×10^{10} 个颗粒的组中不存在脾细胞的增殖。

[0496] 已显示在小鼠中的AAV2施用后,转基因表达逐渐增加,在第6周时达到峰值,然后长期保持稳定。为了解决体内衣壳表位的抗原呈递的动力学是否与转基因表达的动力学相对应,我们静脉内注射 1×10^{11} 个AAV2-OVA/AAT颗粒。在注射后的不同时间点,将用CFSE染料标记的脾OT-1T细胞施用于处理的小鼠。转移后10天,通过流式细胞术测量OT-1T细胞分裂。如图37中所示,在第3-12天和第21-30天内,相对于对照接受者,OT-1T细胞分裂在AAV2-OVA/AAT载体处理的动物中显著增加。然而,在第41-50天和第61-70天内,对于AAV2-OVA和对照组之间的OT-1细胞增殖没有观察到差异($p > 0.05$)。这一结果指示来自AAV2衣壳的抗原交叉呈递在AAV2全身施用后早期发生。在全身应用后,还观察到来自AAV8-OVA载体的类似抗原呈递动力学和效率。在本研究中,我们使用AAV2/OVA和AAV8/OVA载体,以调查人白蛋白

融合蛋白对小鼠模型中的全身应用后的AAV (2和8) 衣壳抗原交叉呈递的动力学和剂量响应的作用。

[0497] **蛋白酶体抑制剂对AAV衣壳抗原呈递的双重功能。**由于硼替佐米增强AAV转导,我们还研究了这种蛋白酶体抑制剂对AAV衣壳抗原呈递的作用,并且发现高浓度的硼替佐米抑制衣壳抗原呈递,伴随增强的转基因表达。相比之下,较低浓度的硼替佐米(10 nM)增加了来自AAV2-OVA转导的HepG2/kb细胞的抗原呈递,而没有增加转基因表达,并且中间剂量(100 nM)增强了转导和抗原呈递两者。

[0498] **VIPR抑制抗原呈递。**为了确定来自病毒肽的VIPR是否可以发挥抑制抗原呈递的能力,我们用OVA和H-2kb表达构建体将CMV VIPR US6或HSV VIPR ICP47共转染到293细胞内,然后使293细胞与OT-1脾细胞一起共温育用于抗原呈递测定。通过分析整个CD8亚群中CD8/CD69(对于T细胞的早期激活)或CD8/IFN- γ 双阳性细胞的百分比,在减去背景后,在ICP47或US6处理组中的CD8/CD69或CD8/IFN- γ 表达的双阳性细胞比没有VIPR处理的组低得多,用US6和ICP47证实了超过95%的OVA表位抑制(图38)。为了探讨VIPR对体内抗原呈递的抑制,用OVA、H-2kb和ICP47或GFP构建体转染293细胞,然后将0.2ml基质胶中的 1×10^7 个293细胞皮下注射到小鼠左胁腹内。同时,经由尾静脉输注体外活化的OT-1脾细胞,并且每2-3天测量肿瘤大小。在20天后,在用GFP加上OT-1脾细胞输注转染的293细胞移植的小鼠中未发现肿瘤。在用不含OT-1脾细胞输注或ICP-47的GFP转染的293细胞的异种移植后,所有其它小鼠都发展出相似大小的肿瘤,不管OT-1脾细胞的应用(表9)。

[0499] **在AAV2衣壳的残基265处具有插入的A20活性逃避。**我们的研究已证实A20抗体(其仅识别完整的AAV2病毒粒子)不能阻断AAV2.5转导(具有来自AAV1的5个aa取代的AAV2突变体)。为了评估在残基265处的插入是否也除去A20结合位点并增强肌肉转导,我们首先评估抗体结合。通过蛋白质斑点印迹分析A20结合亲和力显示通过A20没有识别突变体,类似于关于AAV2.5的结果,这突出显示了265位点在抗体-衣壳识别足迹中的重要性。为了研究在残基265处具有20种不同的单氨基酸插入的AAV2突变体的中和抗体概况,我们分析了在小鼠中来自用不同突变体免疫的血清的NAb活性。在来自突变体的肌肉转导和插入的氨基酸特性或NAb滴度和交叉反应性之间没有发现明显的关系。

[0500] **使用定向进化从小鼠肝开发IVIG Nab逃避突变体。**通过将AAV改组文库直接注射到小鼠肌肉内,我们已成功地分离了在人血清的存在下具有Nab逃避和肌肉向性能力的几种突变体。为了扩展该研究以分离具有Nab逃避的肝靶AAV突变体,我们首先将IVIG注射到小鼠内,并且3小时后,经由眼眶后静脉施用AAV文库。在AAV注射后第3天时,小鼠接受Ad d1309共2天。收获小鼠肝并且提取Hirt DNA。将来自Hirt DNA的PCR产物克隆到pSSV9内,以制备第二文库。在将上述步骤再重复两个循环后,将PCR产物克隆到pXR内并测序。已从小鼠肝中回收了四种AAV突变体(图39)。这些突变体用于包装萤光素酶,并且在经由眼眶后注射将这些突变体和AAV8施用到小鼠内后,获取成像。与AAV8(具有优异的小鼠肝转导)相比,所有突变体都诱导较低的肝转导(图39)。该发现类似于具有比AAV6更低的肌肉转导的从肌肉中分离的突变体。

[0501] **AAV肽对Nab活性的抑制。**我们对来自AAV2免疫的C57BL/6和Balb/C小鼠的血清以及单克隆抗体A20进行表位扫描。在血清或A20 Ab与肽文库一起温育后,将AAV2载体加入血清和肽的混合物中,然后将AAV2转导与对照肽进行比较。使用这种方法,已鉴定了增加关于

AAV2/GFP载体的AAV2转导的几种肽(图40)。结构分析已证实,整个肽或其一部分暴露在AAV2病毒颗粒表面上。肽p28部分包埋在含有aa 265区域的 β 折叠下,并且位于外部,但在构成三折叠轴的突起之间。p29、p32和p68的暴露部分位于5折叠孔周围。肽p67定位于5折叠孔外部的凹陷。P28也紧位于2折叠对称凹陷的外部(图10)。A20抗体最初由C57BL/6小鼠生成。在来自C57BL/6小鼠的肽库(p28、p32和p67)中鉴定了被筛选用于A20干扰的两种肽(p28和p67),这支持了该方法的有效性。这些初步结果证实来自AAV VR的肽作为诱饵抑制Nab活性的能力。

[0502] 探讨白蛋白融合蛋白以进一步增强AAV肝转导。我们的初步数据和临床结果指示AAV衣壳抗原呈递是剂量依赖性的,并且较低剂量的AAV载体减少了总体抗原呈递。因此,在使用较低载体剂量的同时,探讨有效策略以达到必要的治疗水平是合理的。为了实现这一目标,已开发了几种方法以便增强AAV肝转导,其包括不同血清型的利用、AAV衣壳的遗传修饰、以及AAV载体盒的优化、以及化学试剂的应用。然而,这些方法或改变AAV向性(AAV衣壳修饰),或具有不希望有的副作用(药理学试剂)。我们的初步研究已证实,人血清白蛋白(HSA)能够经由与AAV病毒粒子的直接相互作用来增强AAV转导。

[0503] 白蛋白已作为用于药物靶向的重要蛋白质载体出现。白蛋白是循环中最丰富的血浆蛋白质(35-50 g/L人血清)。HSA融合技术已充分建立,以改善治疗相关多肽的功效、生物利用度和安全性。该技术已在不同物种中生成白蛋白融合蛋白,并且已应用于细胞因子和生物活性肽。对于肝细胞特异性靶向,已鉴定了几种肽。另外,已积极地研究了细胞穿透肽(CPP)用于有效的药物递送。CPP是一类不同的肽,通常具有5-30个氨基酸,并且与大多数肽不同,它们可以穿过细胞膜。CPP可以在体外和体内成功地转运货物如siRNA、核酸、小分子治疗剂、蛋白质、量子点和MRI造影剂。与其它递送方法相比,这种系统具有较低的细胞毒性。CPP对于医疗应用具有吸引力,不仅是因为它们的高内化能力,而且还因为它们关于可变修饰设计的潜力。一般而言,CPP可以广泛地分为三种类型:(1)长度6-12个氨基酸的阳离子肽,主要由精氨酸、赖氨酸和/或鸟氨酸残基组成;(2)疏水性肽,如分泌性生长因子或细胞因子的前导序列;以及(3)通过将疏水性肽与NLS连接而获得的两亲肽。

[0504] 内体隔离和核进入不足是关于有效AAV转导的两个限制步骤,基于白蛋白和AAV病毒粒子之间的直接相互作用是增强转导所需的证据,我们推测具有肝细胞特异性肽和CPP的白蛋白融合蛋白通过增加肝特异性结合、内体裂解和核进入,来增强AAV肝细胞转导。

[0505] 白蛋白融合蛋白对AAV肝转导的作用。已鉴定了与肝细胞特异性结合的几种肽,其包括在T7噬菌体尾纤维蛋白(p17)卷曲螺旋杆结构域内的33氨基酸序列(KNESSTNATNTKQWRDETCKGRDEAKRFKNTAG,SEQ ID NO: 134)、来自环孢子蛋白(CSP)的肽CSPI-plus(DNEKLRKPKHKHKKLKQPADG,SEQ ID NO: 132)、以及来自乙型肝炎病毒的前S肽(PLGFFPDHQLDPAFGANSNN PDWDFNP,SEQ ID NO: 133)。内吞途径是关于AAV和白蛋白的主要摄取机制。白蛋白在摄取后诱陷入内体中,并且被溶酶体中的特定酶降解。内体中的酸性pH帮助磷脂酶的AAV暴露用于逃避。因此,实现有效AAV转导的速率限制步骤之一是促进内体逃逸,并且确保AAV载体的细胞溶质递送。为此已鉴定了衍生自病毒/细菌/植物或合成表面活性剂的众多肽。来自HA蛋白的HA2的肽(GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG,SEQ ID NO: 135)已被广泛研究用于内体逃逸(内体裂解)。在生物系统中,需要核定位信号(NLS)用于将大分子货物递送到核。来自SV40的流行的NLS(CGCGPKKKRKVG,SEQ ID NO: 136)将用于该研究中。

生物活性货物从细胞表面上的结合到核的运输涉及许多步骤,包括受体介导的内吞作用、从内体中逃逸和核进入。

[0506] 将肽(其具有在肝细胞结合、内体裂解和核进入中的作用,单独或组合)与HSA缀合,并且测定HSA融合蛋白对肝细胞中的AAV转导的作用。HSA融合蛋白盒由CMV启动子驱动,并且在293细胞中表达融合蛋白。纯化的融合蛋白用于体外和体内转导分析。体外分析包括与融合蛋白一起温育后,在人肝细胞系(Huh7和HepG2)和非肝细胞细胞系(293、HeLa、CHO、C2C12、MG87等)中的转导。体内实验由经由全身施用在肝和其它组织中的转导分析,以及通过直接肌肉注射的肌肉转导组成。测试AAV血清型2和8,因为它们已在临床试验中用于靶向肝细胞。

[0507] 白蛋白融合蛋白的克隆。PCR方法用于制备具有接头GGGGSGGGSGGGAS (SEQ ID NO: 137)的HSA融合构建体(具有His 6标签)。执行克隆的测序以保证正确的盒。

[0508] HSA-preS融合蛋白的纯化。将表达构建体pCMV-HSA或pCMV-HSA融合蛋白转染到HEK293细胞内。在转染后,将细胞在Opti-MEM® I (Invitrogen)中培养,每3天更换培养基,总共3-4次。合并上清液,并且蛋白质通过硫酸铵沉淀(60%饱和度)进行浓缩,且装载到用50 mM磷酸钠缓冲液,pH 7.5,500 mM NaCl,20 mM咪唑平衡的镍-次氨基三乙酸柱(Qiagen, Hilden,德国)上。在洗涤步骤(50 mM磷酸钠缓冲液,pH 7.5,500 mM NaCl,35 mM咪唑)后,用50 mM磷酸钠缓冲液,pH 7.5,500 mM NaCl,100 mM咪唑洗脱加上His-标签的HSA蛋白。将蛋白质级分合并并且针对PBS透析。用分光光度法测定蛋白质浓度。

[0509] AAV载体的产生。使用具有包装质粒(AAV血清型和突变体)和ITR质粒(萤光素酶)的XX6-80腺病毒辅助质粒,使用标准三重转染方法生成所有重组AAV(rAAV)病毒。使用铯梯度纯化rAAV载体,并且使用斑点印迹杂交和定量PCR来评估载体的物理滴度。

[0510] 不同细胞系中的AAV转导。使 1×10^8 个AAV/luc载体颗粒与HSA或HSA融合蛋白一起在4℃下温育2小时。然后将混合物加入无血清培养基中的 1×10^5 个细胞中两天,并且检测细胞裂解产物中的萤光素酶表达。

[0511] 在小鼠中的全身施用后的AAV转导。使编码萤光素酶转基因的AAV载体与HSA或HSA融合蛋白(单一或组合)或PBS一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后注射以 1×10^{10} 个颗粒的剂量(5×10^{12} /kg),将混合物施用到C57BL/6小鼠内。在AAV注射后的指定时间点,执行小鼠成像并且分析肝区域中的生物发光图像。在注射后第2周时,将小鼠处死用于在不同组织中的转基因表达和AAV基因组拷贝检测。

[0512] 在小鼠中的肌肉注射后的AAV转导。将与HSA一起温育的 1×10^9 个AAV/luc颗粒注射到小鼠后腿中的肌肉内。在注射后的不同时间点,进行成像。对于每种血清型,设计了六组:PBS、HSA和HSA融合蛋白(HSA-perS、HSA-HA、HSA-NLS和HSA-comb)。

[0513] 体外组织中的萤光素酶表达的定量。收集几个器官用于萤光素酶表达,其包括:肝、脾、肾、心脏、肺、骨骼肌(腓肠肌)和脑。将组织切碎并且在被动裂解缓冲液中匀浆化。将组织裂解产物以10,000 rpm短暂离心5分钟,以去除细胞碎片。用Wallac1420 Victor 2自动板阅读器,将上清液转移到96孔板中用于萤光素酶活性分析。使用Bradford测定,测量组织裂解产物中的总蛋白质浓度。

[0514] AAV载体的组织分布。为了检测不同组织中的AAV基因组拷贝数,使用Qiagen DNeasy Blood&Tissue试剂盒分离来自组织的DNA。对于萤光素酶基因和小鼠小家鼠Lamin

B2基因,对每个样品执行实时PCR。用于Lamin B2基因的引物是:5'-GGACCCAAGGACTACCTCAAGGG-3'(SEQ ID NO: 129)(正向)和5'-AGGGCACCTCCATCTCGGAAAC-3'(SEQ ID NO: 130)(反向);对于萤光素酶:正向引物:5'-AAAAGCACTCTGATTGACAAATAC-3'(SEQ ID NO: 127)和反向引物:5'-CCTTCGCTTCAAAAAATGGAAC-3'(SEQ ID NO: 128)。通过LightCycler 480仪器上的实时PCR定量病毒基因组。基于初始转导中使用的pTR-CBA-萤光素酶质粒和内源基因的那些,通过Lightcycler软件v.4.5分析基因组的拷贝。

[0515] 统计分析。所有数据都以平均值± SEM呈现。我们通过双尾Student t检验或单向ANOVA比较来自不同实验组的平均值。P值<0.05被视为显著的。

[0516] 使用HSA融合蛋白的AAV肝转导机制。为了研究HSA对AAV转导的作用机制,我们执行下述实验:AAV结合分析,使用荧光标记病毒和共聚焦显微镜检查的细胞内运输分析,以及在全身施用后在血液中的AAV清除。

[0517] AAV结合分析。使 1×10^6 个细胞与以 10^3 - 10^5 个颗粒/细胞的AAV载体一起在4℃下温育1小时,所述AAV载体与HSA或HSA融合蛋白一起预温育,并且用冷培养基洗涤以去除未结合的病毒。在洗涤后,分离AAV基因组DNA,并且通过qPCR用关于萤火虫萤光素酶的特异性引物,来定量AAV载体基因组/细胞的拷贝。

[0518] 病毒颗粒和白蛋白融合蛋白的荧光染料标记。如先前所述,使纯化的AAV病毒粒子或HSA融合蛋白,与超过衣壳蛋白或白蛋白单位10倍摩尔过量的Cy5或Cy3单N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯(GE Healthcare,Piscataway,NJ)一起在4℃下在PBS中温育1小时。标记的病毒或蛋白质针对含有5%山梨糖醇的PBS透析,以去除游离染料。

[0519] 免疫细胞化学。使Huh7细胞与以10000个颗粒/细胞的剂量的荧光标记的AAV2载体一起温育不同的时间(30分钟、2小时、4小时、8小时、16小时和24小时),所述荧光标记的AAV2载体与HSA融合蛋白一起预温育。这些细胞用2%多聚甲醛在RT下固定15分钟。在洗涤后,将细胞在预涂布有L-赖氨酸的LabTek 4室载玻片中铺平板。2小时后,在室温下用0.1% Triton X-100的PBS溶液透化细胞5分钟。将细胞洗涤,并且与针对LAMP(用于内体)或 γ -微管蛋白(用于MTOC)的一抗一起在37℃下温育1小时。在洗涤后,使细胞与Cy3缀合的二抗一起温育。在最后一次洗涤后,将细胞固定在Vectashield(Vector Laboratories; Burlingame,CA)中,并且用共聚焦激光扫描显微镜(Leica SP2)分析。

[0520] AAV的血液清除。在C57BL/6小鼠中尾静脉注射 1×10^{11} 个AAV/luc颗粒后,在2、6、24和48小时从小鼠获得血浆。使用DNeasy Blood&Tissue试剂盒,执行来自血浆的病毒DNA分离。通过实时PCR定量病毒基因组。

[0521] 在一项研究中已证实CPP在直接与AAV载体混合时增强AAV转导。使用来自单一肽或三种肽的组合的HSA融合蛋白用于在体外和体内与AAV一起温育,可以实现肝细胞中的增强AAV转导。与三种肽的组合缀合的HSA融合蛋白对AAV转导具有的增强作用比任何单一肽高得多。与内体裂解或NLS肽或组合肽缀合的HSA融合蛋白,也对非肝细胞细胞系或组织中的AAV转导发挥增强作用。与内体裂解肽(单一或组合)缀合的HSA融合蛋白能够增加AAV载体从内体中逃逸,并且降低AAV核周积累,其使用荧光染料标记的病毒和共聚焦显微镜检查来显现。当AAV载体与缀合有NLS的HSA融合蛋白一起温育时,更多的病毒在核中显现。当HSA融合蛋白与HBV preS肽缀合时,更多的AAV基因组拷贝在肝中检测到;该融合蛋白在全身施用后也诱导更快速的AAV载体的血液清除。

[0522] 调查白蛋白融合蛋白对AAV衣壳抗原呈递的作用。数据指示AAV衣壳抗原呈递是剂量依赖性的,并且较低剂量的AAV载体可以减少总体抗原呈递。进一步研究探讨了在使用较低载体剂量的同时,达到必要治疗水平的不同策略。这些包括开发AAV肝转导增强的方法,其包括不同血清型的利用、AAV衣壳的遗传修饰、以及AAV载体盒的优化、以及化学试剂的应用。

[0523] 许多病毒通过使用各种机制产生特异性肽(VIPR)以干扰抗原-MHC I呈递来逃避人免疫应答。两种VIPR(US6和ICP47)已得到充分表征,并且可以用于这一特定目的。人巨细胞病毒(HCMV)的US6基因产物,与TAP结合的23 kDa内质网(ER)-驻留I型整合膜蛋白,抑制肽易位并阻止MHC I类组装。腔结构域的C末端20个残基证实对于TAP抑制是必需的。单纯疱疹病毒(HSV)-1蛋白ICP47特异性结合TAP,由此阻断肽结合、通过TAP的易位和随后将肽装载到ER中的MHC I类分子上。发现32个氨基酸残基的短片段ICP47(aa3-34)是具有抑制肽与TAP结合的能力的最小区域。结果证实补充ICP47和US6在体外抑制抗原呈递。

[0524] 白蛋白处理对体内AAV衣壳抗原呈递的作用。为了研究衣壳抗原呈递,我们将使用我们的改造病毒,其中将OVA肽SIINFEKL整合到HI环内(AAV2/OVA和AAV8/OVA),以在肝细胞HepG2/K2b细胞系中以及在小鼠中的全身施用后执行这些研究,包括剂量-响应和动力学。

[0525] HepG2/H2kb细胞中的抗原呈递分析。使 1×10^9 个AAV/OVA载体颗粒与HSA一起在4℃下温育2小时,然后用于感染 1×10^5 个HepG2/H2kb细胞。24小时后,将来自OT-1小鼠的 1×10^6 个脾细胞加入HepG2细胞中过夜。收获细胞并且用CD8和CD69染色,用于检测早期T细胞活化。

[0526] 关于来自AAV空衣壳的抗原呈递动力学的动物实验。设计七组实验:HSA、HSA/preS、HSA/HA2、HSA/NSL、HSA/comb、媒介物处理-PBS和无AAV作为阴性对照。使AAV载体(1×10^{11} 个颗粒)与HSA或融合蛋白一起温育,然后经由尾静脉注射施用于C57BL小鼠。在不同时间点(AAV施用后第3、21、41和61天),经由IV施用将 5×10^6 个CFSE标记的OT-1脾细胞输注到这些处理的小鼠内。OT-1细胞输注10天后,处死小鼠并分析OT-1 CD8细胞的增殖。

[0527] 关于来自AAV空衣壳的AAV衣壳抗原呈递的剂量响应的动物实验。与HSA或融合蛋白一起温育的递增剂量的AAV颗粒(10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 和 10^{12})经由尾静脉注射到C57BL小鼠内。三天后,将CFSE标记的OT-1细胞输注用于OT-1 CD8增殖测定。分配六组小鼠(0、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 和 10^{12} 个AAV颗粒)。

[0528] 在衣壳抗原呈递上与VIPR融合在白蛋白。我们将使用US6来制备具有HSA(HSA-US6)和HSA-comb(HSA-comb-US6)的融合蛋白。如本文所述,在体外和体内研究US6融合蛋白对转基因表达和衣壳抗原呈递的作用。

[0529] 小鼠实验。对于转基因表达,设计四组(HSA、HSA-US6、HSA-comb、HSA-comb-US6)。对于抗原呈递的动力学,分配6组(对照、PBS、HSA、HSA-US6、HSA-comb、HSA-comb-US6)。对于抗原呈递的剂量响应,研究6个剂量(0、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 个颗粒/小鼠)。

[0530] 以高剂量的蛋白酶体抑制剂硼替佐米具有双重功能:增加的AAV转导和降低的抗原呈递。然而,当使用相对低的剂量时,AAV转导增加或不改变,但抗原呈递增加。我们先前的研究已证实有效的AAV衣壳抗原呈递需要病毒从内体中逃逸到细胞溶质内,用于泛素化和通过蛋白酶体的降解。这使得在与HSA或融合蛋白一起温育时,更多病毒能够从内体中逃逸并且迅速行进到核,结果是HSA或其融合蛋白在体外和在小鼠中的AAV全身施用后的早期时间段增加衣壳抗原呈递。与具有内体裂解和NLS肽的HSA融合蛋白结合的病毒可以更快速

地移动到核内,因此在体内后期的时间点,衣壳抗原呈递的效率应该较低或无法由HSA结合的病毒转导检测到。

[0531] 研究白蛋白融合蛋白对AAV Nab逃逸的作用。在一般人群中,超过95%的受试者被AAV病毒天然感染,并且其中一半生成中和抗体,这可能将这些受试者从有益的AAV基因治疗中排除。这特别影响患有肝病征的患者,其需要AAV载体的全身施用以靶向肝。主要寻求的是具有逃避人Nab并赋予人肝向性的能力的AAV载体。已开发了几种方法来克服AAV Nab,包括用涂布的聚合物掩蔽AAV表面、在Nab的存在下用AAV改组文库开发AAV突变体、以及使用AAV的替代血清型、由AV衣壳表面上的Nab结合结构域的合理突变生成的AAV突变体、血浆单采、抗CD20抗体(利妥昔单抗)以耗尽B细胞、以及过量的空AAV衣壳作为用于Nab的诱饵。这些方法或改变AAV向性,花费很长时间,或者具有低效率或其它负面副作用(Ig缺乏、增加的衣壳抗原负荷)。理想的方法是具有逃避Nab的能力,而无肝向性变化和严重的副作用。尽管HSA与AAV的直接相互作用增强了AAV转导,但AAV病毒粒子上HSA的结合位点的位置仍是未知的。AAV病毒粒子表面上的HSA结合位点可能是AAV用于有效结合和有效转导的位点。换言之,HSA结合位点也通过Nab靶向。为了探讨白蛋白及其融合蛋白在阻断Nab功能中的作用,我们将研究HSA是否在Nab的存在下援救AAV转导。AAV表面具有9个可变区(VR),其发挥用于AAV转导和Nab结合的作用。如果来自9种VR的肽用作诱饵,则假设AAV载体能够逃避Nab结合。这类似于空病毒粒子施加。进行实验以确定在Nab的存在下HSA或其融合蛋白是否影响肝细胞中的AAV转导。测试HSA和融合蛋白对A20单克隆抗体中和活性的作用。接下来,在来自用AAV免疫的小鼠和用阳性Nab包括IVIG免疫的人的血清的存在下,检查HSA及其融合蛋白对AAV转导的作用。

[0532] 白蛋白及其融合蛋白对Nab逃避的作用。为了研究白蛋白或白蛋白融合蛋白是否干扰Nab活性,使AAV2/luc病毒与HSA或HSA融合蛋白一起温育,然后加入Nab(A20、AAV免疫的小鼠血清和人血清或IVIG)用于中和活性测定。

[0533] Huh7细胞中的中和抗体测定。使10u1中的 1×10^8 个AAV2/luc载体颗粒与10u1 HSA或HSA-preS或PBS一起在4℃下温育2小时,然后在4℃下,将20 u1 A20或者来自小鼠或人的血清以连续稀释度再加入2小时。将AAV、HSA和Nab的混合物与 1×10^5 个Huh细胞一起在无血清培养基中共培养48小时。细胞裂解产物将用于测量萤光素酶活性。Nab滴度定义为对于其萤光素酶活性比对照低50%的最高稀释度。

[0534] 在小鼠中的免疫。将 1×10^{10} 个AAV2/萤光素酶颗粒(AAV/luc)腹膜内注射到C57BL/C小鼠内,并且在第14天时用相同的病毒加强小鼠。在指定的时间点经由眼眶后丛收集血清用于Nab测定。

[0535] 人IVIG和血浆。10%人IVIG(Gamunex-c)购自Grifols Therapeutics Inc.(Research Triangle Park,NC)。个别人血清购自Valley Biomedical(Minchester,VA)。将人IVIG和血清等分并贮存于-80℃下用于将来使用。

[0536] 与AAV VR融合白蛋白对Nab逃避的作用。AAV病毒粒子表面存在9种VR。HSA融合蛋白用每种单一VR肽和来自所有9种VR的肽的组合构建。在纯化HSA融合蛋白后,测试对Huh7细胞和小鼠肝中的AAV转导的作用,以验证HSA融合蛋白与AAV VR肽一起温育是否影响AAV转导。接下来,研究这些HSA融合蛋白的作用,以确定它们在Huh 7细胞中在来自小鼠和人的Nab的存在下对AAV转导的作用。

[0537] 小鼠实验。为了研究具有AAV2 VR的HSA融合蛋白对AAV转导的作用,使 1×10^{10} 个AAV2/luc颗粒与HSA或HSA-VR融合蛋白一起在4℃下温育2小时,然后经由眼眶后注射施用到小鼠内。在不同的时间点,获取并分析成像。设计12组:PBS、HSA、9种HSA-VR(来自单一)和HSA-VR(来自9种VR的组合)。

[0538] 具有CPP和VR的白蛋白融合蛋白对Nab逃避的作用。基于本文所述的研究,显示具有肝细胞特异性配体和两亲CPP的白蛋白融合蛋白HSA-comb,诱导比具有单一CPP的任何融合蛋白更高的AAV肝细胞转导,并且HSA-VR(含有9种VR)具有比任何单一HSA-VR更强的对Nab活性的抑制。然后测试白蛋白融合蛋白HSA-Comb-VR(其由HAS以及来自CPP和9种AAV2 VR的肽组成)对如本文所述的肝细胞转导和Nab逃避能力的作用。

[0539] 小鼠实验。对于转基因表达,分配4组(PBS、HSA-comb、HSA-VR和HSA-comb-VR)。使AAV2/luc载体与HSA-comb-VR一起在4℃下温育2小时,然后施用到小鼠内。获取并分析小鼠成像。

[0540] 已证实AAV Nab与AAV病毒粒子表面上的共同区域结合,并且不同的Nab识别不同的表位。基于这一点,基于以下理解进行测试:HSA可以与来自一些血清样品的Nab共享一些结合位点,这提示HSA与AAV2一起温育将阻断Nab活性。由于VR对于涉及AAV结合、细胞内运输等的有效AAV转导起主要作用,并且肽扫描研究已显示衍生自AAV VR的肽能够阻断Nab活性,我们预料具有来自AAV VR的肽作为诱饵的BSA融合蛋白将抑制对AAV转导的Nab活性。

[0541] 这些研究的总体目标是探讨人白蛋白在AAV基因递送中的应用,包括增强的AAV转导、压制AAV衣壳抗原呈递和阻断AAV中和抗体识别,其对于肝蛋白质合成的缺陷中的更广泛应用是关键。针对AAV载体开发的这些初步研究和持续贡献支持总体实验设计。

[0542] 尽管本发明已参考其某些实施方案的具体细节进行描述,但并不预期此类细节应该被视为对本发明范围的限制,除非且在一定程度上它们包括在所附权利要求的范围内。

[0543] 实施例7:IVIG对AAV转导的作用

[0544] 众所周知,来自AAV免疫血清的免疫球蛋白对AAV转导具有中和活性。在我们的研究中,当人IVIG用作关于AAV中和抗体分析的来源时,实际上我们证实当使用高浓度的IVIG时检测到中和效应,然而,当施加较低剂量的IVIG时,在全身施用后在肝中观察到增强的转基因表达(图41)。结果指示非中和性免疫球蛋白增加AAV转导。

[0545] 实施例8:多倍体腺相关病毒载体用于转导增强和中和抗体逃避的应用

[0546] 腺相关病毒(AAV)载体已成功地用于患有血友病和失明的患者的临床试验中。增强AAV转导且逃避中和抗体活性的有效策略的探讨仍是必要的。先前的研究已显示来自AAV血清型的衣壳和位于一个病毒粒子的不同衣壳亚基上的AAV Nab的识别位点的相容性。在本研究中,我们以不同比率(3:1、1:1和1:3)共转染AAV2和AAV8辅助质粒,以组装单倍体衣壳,并且研究它们的转导和Nab逃避活性。单倍体病毒产率与亲本病毒相似,并且硫酸肝素结合能力与AAV2衣壳输入正相关。在肌肉注射后,所有单倍体病毒都诱导比亲本AAV载体更高的转导(超过AAV2 2至9倍),其中最高的是单倍体载体AAV2/8 1:3。在全身施用后,用单倍体AAV2/8 1:3观察到肝中的转导比用单独的AAV8的那种高4倍。重要的是,我们将治疗因子IX盒包装到单倍体AAV2/8 1:3衣壳内,并且经由尾静脉将其注射到FIX敲除小鼠内。与AAV8的那种相比,用单倍体AAV2/8 1:3病毒载体实现了更高的FIX表达和改善的表型校正。另外,单倍体病毒AAV2/8 1:3能够逃避AAV2中和,并且与AAV2具有非常低的Nab交叉反应

性。

[0547] 为了改善多倍体病毒的Nab逃避能力,我们通过以1:1:1的比率共转染AAV2、AAV8和AAV9辅助质粒,而产生三倍体载体AAV2/8/9载体。在全身施用后,用三倍体载体AAV2/8/9观察到肝中的转导比用AAV8的那种高2倍。中和抗体分析证实AAV2/8/9载体能够逃避来自用亲本血清型免疫的小鼠血清的中和抗体活性。这些结果指示多倍体病毒可能潜在地从亲本血清型获得优点,用于增强转导和Nab识别的逃避。这种策略应该在具有阳性中和抗体的患者的未来临床试验中进行探讨。

[0548] 具有不同cap基因的辅助质粒的数目不受限制,并且可以基于特定治疗方案的具体要求进行混合且匹配。

[0549] 细胞系。将HEK293细胞、Huh7细胞和C2C12细胞维持在37℃下在5% CO₂中在具有10%胎牛血清和10%青霉素-链霉素的达尔贝科改良伊格尔培养基中。

[0550] 重组AAV病毒产生。通过三重质粒转染系统产生重组AAV。用9 μg AAV转基因质粒pTR/CBA-Luc、12 μg AAV辅助质粒和15 μg Ad辅助质粒XX680转染15cm培养皿的HEK293细胞。为了生成三倍体AAV2/8病毒粒子,用于转染AAV2或AAV8的每种辅助质粒的量以1:1、1:3和3:1的三种不同比率共转染。为了制备单倍体AAV2/8/9载体,关于每种血清型的辅助质粒的比率为1:1:1。转染后60小时,收集HEK293细胞并裂解。使上清液经受CsCl梯度超离心。通过定量PCR确定病毒滴度。

[0551] 蛋白质印迹和免疫印迹。根据病毒滴度,在每个泳道中装载相同量的病毒粒子,随后为在NuPage 4-10%聚丙烯酰胺Bis-Tris凝胶(Invitrogen,Carlsbad,CA)上的电泳,然后经由iBlot® 2 Dry Blotting System(Invitrogen,Carlsbad,CA)转移至PVDF膜。使膜与对AAV衣壳蛋白特异性的B1抗体一起温育。

[0552] 如先前所述进行天然免疫印迹测定。简言之,通过使用真空转渍器,将纯化的衣壳转移至Hybond-ECL膜(Amersham,Piscataway,NJ)。使膜在10%乳PBS中封闭1小时,然后与单克隆抗体A20或ADK8一起温育。使膜与过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠抗体一起温育1小时。通过Amersham Imager 600(GE Healthcare Biosciences,Pittsburg,PA)显现蛋白质。

[0553] 体外转导测定。Huh7和C2C12细胞在平底24孔板中通过重组病毒用 1×10^4 vg/细胞进行转导。48小时后,收获细胞,并且通过萤光素酶测定系统(Promega,Madison,WI)进行评估。

[0554] 肝素抑制测定。测定可溶性肝素抑制重组病毒与Huh7或C2C12细胞的结合的能力。简言之,在可溶性HS的存在或不存在下,使AAV2、AAV8、单倍体病毒AAV2/8 1:1、AAV2/8 1:3和AAV2/8 3:1在DMEM中在37℃下温育1小时。在预温育后,将重组病毒和可溶性HS的混合物加入Huh7或C2C12细胞内。在转导后48小时,收获细胞并通过萤光素酶测定进行评估。

[0555] 动物研究。在本研究中执行的动物实验用C57BL/6小鼠和FIX^{-/-}小鼠进行。如通过UNC机构动物护理和使用委员会(UNC Institutional Animal Care and Use Committee)(IACUC)批准的,根据NIH指南维持小鼠。经由眼眶后注射,用 3×10^{10} vg重组病毒注射6周龄的雌性C57BL/6小鼠。在D-萤光素底物(Nanolight Pinetop,AZ)的i.p.注射后,使用Xenogen IVIS Lumina(Caliper Lifesciences,Waltham,MA),注射后一周对萤光素酶表达进行成像。使用Living Image(PerkinElmer,Waltham,MA),分析生物发光图像。对于肌肉转导,将 1×10^{10} 个AAV/Luc颗粒注射到6周龄的C57BL/6雌性的腓肠肌内。在指定的

时间点对小鼠成像。

[0556] 经由尾静脉注射, FIX敲除雄性小鼠(FIX KO小鼠)接受 1×10^{10} vg。在注射后的不同时间点, 从眼眶后丛收集血液。在第6周时, 执行小鼠出血分析。

[0557] 肝中的荧光素酶表达的定量 在重组病毒注射后第4周时处死用于成像研究的动物, 并且收集肝。将肝切碎并且在被动裂解缓冲液中匀浆化。在离心肝裂解产物后, 检测上清液中的荧光素酶活性。使用Bradford测定(BioRad, Hercules, CA), 测量组织裂解产物中的总蛋白质浓度。

[0558] 肝中的AAV基因组拷贝数检测。通过蛋白酶K处理切碎的肝。通过PureLink Genomic DNA mini Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA), 分离总基因组DNA。通过qPCR测定检测荧光素酶基因。小鼠核纤层蛋白基因充当内部对照。

[0559] 人FIX表达、功能和尾部出血时间测定。如先前所述执行人FIX表达、一阶段hFIX活性测定和尾部出血时间测定。中和测定将Huh7细胞以对于每孔 10^5 个细胞的密度接种在48孔板中。将两倍稀释的小鼠抗体与AAV-Luc(1×10^8 vg)一起在37℃下温育1小时。将混合物加入细胞内, 并在37℃下温育48小时。用被动裂解缓冲液(Promega, Madison, WI)裂解细胞, 并测量荧光素酶活性。Nab滴度定义为对于其荧光素酶活性比无血清对照低50%的最高稀释度。

[0560] 统计分析。数据呈现为平均值 \pm SD。Student *t*检验用于进行所有统计分析。P值 < 0.05 被视为统计学显著差异。

[0561] 单倍体病毒的体外表征。我们先前的研究已证实AAV1、2、3和5衣壳中的衣壳相容性。通过用AAV转基因和腺病毒辅助细胞pXX6-80以不同比率, 从两种血清型转染AAV辅助质粒来产生单倍体病毒。与亲本载体相比, 在一些细胞系中观察到来自单倍体病毒的增强转导。AAV2因其生物学和作为基因递送媒介物而得到充分表征, 并且AAV8由于在小鼠肝中的高转导已引起了很多关注。两种血清型均已用于患有血友病的患者的几项临床试验中。为了调查AAV血清型2和8衣壳形成单倍体病毒的可能性及其转导概况, 我们以3:1、1:1和1:3的比率转染AAV2和AAV8的辅助质粒, 以制备单倍体载体。使用铯梯度纯化所有单倍体病毒, 并且通过Q-PCR滴定。单倍体病毒与亲本AAV2或AAV8之间的病毒产率中不存在显著差异。为了确定单倍体病毒的衣壳蛋白是否表达, 使用识别AAV2和AAV8的衣壳蛋白的单克隆抗体B1, 对来自纯化的单倍体病毒的等价病毒基因组执行蛋白质印迹分析。在所有单倍体病毒中, 观察到来自AAV2和AAV8的VP2衣壳的混合物, 单倍体病毒中来自AAV2或AAV8的VP2衣壳的强度与两种辅助质粒的比率相关。这些结果提示来自AAV 2和AAV8的衣壳是相容的, 并且能够集合到AAV病毒粒子内。

[0562] 为了确定通过混合衣壳蛋白是否改变单倍体病毒的向性, 通过转导人Huh7和小鼠C2C12细胞系来分析单倍体病毒的转导功效。在两种细胞系中, AAV8的转导效率均比AAV2低得多。来自所有单倍体载体的转导高于来自AAV8的转导, 并且效率与两种细胞系中AAV2衣壳的添加正相关。尽管单倍体载体转导低于Huh7细胞中的AAV2, 但单倍体载体AAV2/8 3:1在C2C12细胞中诱导的转导比AAV2高3倍。

[0563] 该体外转导数据支持病毒制备物由单倍体载体组成, 而不是个别血清型载体的混合物, 并且指示单倍体载体可以增强AAV转导。硫酸肝素蛋白多糖已被鉴定为AAV2的主要受体。接下来, 我们调查了肝素结合能力的抑制是否改变了单倍体病毒的转导。AAV载体与可

溶性肝素一起预温育将Huh7和C2C12细胞两者中的AAV2转导阻断接近100%，并且在Huh7和C2C12细胞中将AAV8转导分别阻断37%和56%。单倍体载体转导通过可溶性肝素的抑制依赖于两种细胞系中AAV2衣壳的输入。使用更多的AAV2衣壳输入观察到更高的转导抑制。这一结果提示单倍体病毒可以使用来自亲本载体的两种主要受体用于有效转导。

[0564] 单倍体病毒增加的肌肉转导。如上所述，单倍体病毒AAV2/8 3:1的转导效率高于肌细胞系C2C12中的AAV2和AAV8的转导效率。接下来，我们研究了在体外的高转导是否转化到小鼠肌肉组织内。将AAV2/8单倍体和亲本载体直接注射到C57BL/6小鼠的后腿肌肉内。作为对照，还调查了以3:1、1:1和1:3比率的AAV2和AAV8病毒的混合物。为了方便比较，一条腿用AAV2注射，且另一条腿用测试载体注射。对于每种病毒施用 1×10^{10} vg的总载体。与AAV2相比，对于AAV8实现了类似的肌肉转导。与C2C12细胞中的结果相反，从所有单倍体病毒中观察到增强的肌肉转导。

[0565] 单倍体载体AAV2/8 1:1和AAV2/8 1:3分别实现比AAV2高4倍和2倍的转导。值得注意的是，单倍体载体AAV2/8 3:1的肌肉转导比AAV2的那种高6倍。然而，所有混合病毒都具有与AAV2相似的转导效率。这些结果提示单倍体病毒能够增加肌肉转导，并且进一步支持由两种衣壳质粒的共转染产生的病毒是单倍体。

[0566] 单倍体病毒增强的肝转导。AAV2和AAV8已用于在患有血友病B的患者的几项临床试验中的肝靶向。我们还评估了单倍体病毒在小鼠肝中的转导效率。还注射与AAV2和AAV8混合的病毒作为对照。经由眼眶后静脉在C57BL小鼠中施用 3×10^{10} vg的AAV/luc载体剂量；在AAV注射后第3天时进行成像。与其它单倍体、混合病毒且甚至亲本AAV8相比，单倍体病毒AAV2/8 1:3在小鼠肝中诱导的转导效率最高。单倍体载体AAV2/8 1:3的转导效率比AAV8的那种高约4倍。来自其它单倍体病毒的肝转导低于来自亲本载体AAV8的那种，但高于AAV2。在注射后第7天时，处死小鼠，收获肝并分离基因组DNA。通过qPCR确定肝中的萤光素酶基因拷贝数。与关于肝转导效率的结果不同，在肝中发现了类似的AAV载体基因组拷贝数，不管单倍体病毒或AAV血清型2和8。当转基因表达对于基因拷贝数标准化时，与肝中的转基因表达一致，与任何其它单倍体载体和血清型相比，单倍体载体AAV2/8 1:3诱导的相对转基因表达最高。肝中的单倍体病毒的转导概况与肌肉转导中的转导概况不同，其中所有单倍体病毒都诱导比来自亲本血清型的那种更高的转基因表达，其中最佳来自AAV2/8 3:1。

[0567] 在血友病B小鼠模型中用单倍体载体加强的治疗性FIX表达和改善的出血表型校正。基于上述结果，单倍体载体AAV2/8 1:3诱导比AAV8更高的肝转导。接下来，我们进一步测试单倍体载体AAV2/8 1:3是否可以增加动物疾病模型中的治疗性转基因表达。我们使用人FIX(hFIX)作为治疗基因，并且经由尾静脉将剂量为 1×10^{10} vg/小鼠的单倍体载体AAV2/8 1:3/hFIX注射到FIX敲除(KO)小鼠内，所述单倍体载体编码人优化的FIX转基因，并且由肝特异性启动子TTR驱动。在注射后第1、2和4周时，分别通过ELISA和一阶段因子活性分析循环中的hFIX表达和活性。在第6周时，使用尾部夹住测定评估关于体内hFIX功能的失血。与在野生型C57BL/6小鼠中用单倍体AAV载体的高肝转导的观察一致，在注射后2周之后，单倍体载体AAV2/8 1:3肝靶向产生比AAV8载体多得多的hFIX。AAV2/8 1:3的较高hFIX蛋白表达与高FIX活性密切相关。关于用AAV2/8 1:3/hFIX注射的小鼠的失血与野生型C57BL/6小鼠的失血相似，并且小于KO小鼠的失血。然而，AAV8处理的小鼠具有比野生型小

鼠中的那种更多的失血。这些数据显示单倍体载体AAV2/8 1:3增加了来自肝的治疗性转基因表达,并且改善了疾病表型校正。

[0568] 单倍体病毒AAV2/8逃避中和抗体的能力。每个个别单倍体病毒病毒粒子由来自不同AAV血清型衣壳的60个亚基组成。将来自一种血清型的一些衣壳亚基插入来自不同血清型的其它衣壳亚基内,可以改变病毒粒子表面结构。众所周知,大多数AAV单克隆抗体识别一个单个病毒粒子的不同亚基上的残基。为了研究单倍体病毒是否能够逃避由亲本载体产生的Nab,我们首先通过免疫印迹测定使用单克隆抗体执行Nab结合测定。将含病毒基因组的颗粒的三个稀释度吸附到硝酸纤维素膜,并且用识别完整AAV2或AAV8的Nab A20或ADK8分别探测。所有单倍体病毒以及具有AAV2和AAV8混合物的病毒都被单克隆抗体ADK8或A20识别。通过将更多AAV2衣壳掺入单倍体病毒病毒粒子内,增加了单倍体病毒与A20的反应性。然而,不管衣壳比率如何,关于单倍体病毒中的抗AAV8 Nab ADK8的识别不存在明显变化。值得注意的是,单倍体AAV2/8 1:3与A20的结合比亲本AAV2以及病毒以1:3比率与AAV2和8的混合物的那些弱得多,这指示A20结合位点在单倍体AAV2/8 1:3病毒粒子表面上被耗尽。

[0569] 接下来,我们分析了针对来自AAV免疫小鼠的血清的单倍体病毒的免疫学概况。Nab滴度用于评估血清抑制载体转导的能力。在注射后第4周时,从用亲本病毒处理的小鼠中收集血清。如表10中所示,单倍体病毒针对A20或ADK8的中和概况与来自天然免疫印迹的数据相似。在AAV8和AAV2之间不存在Nab交叉反应性。值得注意的是,AAV8免疫的小鼠血清具有针对AAV8病毒和所有单倍体病毒相似的中和活性,不管AAV8衣壳掺入的量如何,但不同于与AAV2和AAV8混合的病毒。AAV8血清对混合病毒无抑制可以通过在测试细胞系中从AAV2到AAV8的优异转导来解释。然而,单倍体病毒部分逃避来自AAV2血清的中和。在病毒和抗AAV2血清的温育后,与亲本AAV2相比,单倍体AAV2/8 1:1的转导获得16倍降低。关于单倍体病毒逃避AAV2血清Nab的能力比与AAV2和AAV8混合的病毒的那种高得多。引人注目的是,单倍体AAV2/8 1:3几乎完全逃避了AAV2血清和A20中和,提示单倍体病毒具有用于具有抗AAV2 Nab的个体的可能性(表10)。

[0570] 用由三种血清型制备的三倍体载体改善的中和抗体逃避能力。我们的上述数据证实单倍体AAV2/8病毒不能逃避AAV8中和抗体活性,但具有逃避AAV2中和抗体的能力,这取决于来自AAV8的衣壳整合量。为了研究由更多血清型衣壳制成的多倍体病毒是否改善Nab逃避能力,我们以1:1:1的比率制备了三倍体病毒AAV2/8/9。在将三倍体载体AAV2/8/9注射到小鼠内之后,与AAV2相比,三倍体病毒AAV2/8/9在肝中诱导的转导比AAV8高2倍。在AAV8与单倍体载体AAV2/9和AAV8/9之间未观察到肝转导中的差异,其中三倍体载体由两种AAV辅助质粒以1:1的比率制成。注意到AAV9全身施用诱导比AAV8更高的肝转导。当执行中和抗体测定时,当与AAV2、8和9相比时,单倍体AAV2/8/9载体将其Nab逃避能力分别改善约20倍、32倍和8倍(表11)。

[0571] 在该研究中,多倍体AAV病毒粒子由2种血清型或3种血清型的衣壳组装。单倍体病毒与AAV2主要受体肝素的结合能力取决于AAV2衣壳输入的量。所有单倍体病毒在小鼠肌肉和肝中都获得比亲本AAV2载体更高的转导效率,而单倍体病毒AAV2/8 1:3具有比亲本AAV8载体显著增强的肝转导。与AAV8相比,递送人FIX的单倍体病毒AAV2/8 1:3的全身施用用在FIX^{-/-}小鼠中诱导高得多的FIX表达和改善的血友病表型校正。重要的是,单倍体病毒

AAV2/8 1:3能够逃避抗AAV2血清的中和。将AAV9衣壳整合到单倍体AAV2/8病毒粒子内进一步改善了中和抗体逃避能力。

[0572] AAV2的主要受体是HSPG,而AAV8的主要受体仍不清楚。为了研究单倍体病毒是否可以使用来自AAV2和AAV8两者的受体,我们执行肝素抑制测定,以测试单倍体病毒结合肝素受体基序的能力。在Huh7和C2C12细胞系中,肝素抑制结果支持单倍体病毒使用AAV2衣壳的肝素受体基序用于有效转导。在一定程度上,AAV8在肝素的存在下也显示降低的转导效率,但转导效率仍高于AAV2。

[0573] 临床试验中的有效转导的最具挑战性的方面之一是关于AAV载体的中和抗体的广泛流行。Nab介导的AAV载体清除已变成关于AAV基因转移的重复施用的限制因子。一些研究已探讨了通过中和抗体识别位点的合理突变或定向进化方法,在遗传上修饰AAV衣壳用于Nab逃避。衣壳突变可能改变AAV向性和转导效率。另外,AAV病毒粒子上的Nab结合位点的鉴定远远落后于临床试验中的载体应用,并且不可能从多聚血清中找出所有Nab结合位点。先前的研究已证实,几种AAV单克隆抗体的识别位点在一个病毒粒子的不同亚基上旋转。当AAV8衣壳被引入AAV2病毒粒子内时,来自AAV2免疫血清的A20结合能力和中和活性对于单倍体病毒急剧降低。将AAV2衣壳整合到AAV8病毒粒子内并未减少结合完整AAV8单克隆抗体ADK8的能力,并且并未逃避抗AAV8血清的中和活性(表10)。这提示来自多聚血清的所有Nab识别位点都可以位于AAV8病毒粒子的相同亚基上。另外,结果提示整合到AAV2病毒粒子内的AAV8衣壳可能在病毒细胞内运输中起主要作用。

[0574] 当三倍体病毒由三种血清型AAV2、8和9的衣壳制成时,不同于三倍体载体AAV2/8,单倍体AAV2/8/9病毒具有逃避来自AAV2、8或9免疫小鼠的血清的中和抗体活性的能力,这提示AAV8和AAV9共享相似的转导途径。

[0575] 来自该研究的几个证据支持来自两种或三种AAV辅助质粒转染的多倍体病毒粒子组装。(1)使用蛋白质印迹分析,从单倍体病毒中展示两个不同大小的VP2条带。这些VP2与来自不同血清型的大小相匹配。(2)相对于Huh7细胞,转导概况在C2C12中不同。特别地,单倍体AAV2/8 3:1载体在Huh7细胞中证实比用AAV2的那种更低的转导,但在C2C12细胞中更高。(3)与亲本载体AAV2和AAV8以及具有AAV2和AAV8混合物的病毒相比,用所有单倍体AAV2/8病毒证实更高的肌肉转导。(4)当与AAV8相比时,三倍体病毒AAV2/8 1:3具有增强的肝向性。(5)单倍体病毒与A20和ADK8的结合模式不同于具有AAV2和AAV8混合物的病毒。(6)AAV2血清中和活性的概况在单倍体病毒和混合病毒之间是不同的。(7)三倍体AAV2/8/9病毒逃避来自任何亲本血清型免疫的小鼠的血清的中和抗体活性。

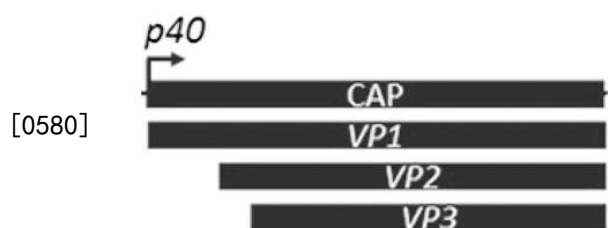
[0576] 这些多倍体病毒在体外和体内增强转导效率,并且甚至逃避来自亲本载体免疫血清的中和。递送治疗性转基因FIX的多倍体病毒的应用能够增加FIX表达,并且改善具有FIX缺乏的小鼠中的血友病表型校正。这些结果指示单倍体AAV载体具有增强转导且逃避Nab的能力。

[0577] 实施例9:通过AAV病毒粒子与来自一种AAV载体的VP1/VP2和来自另一种AAV载体的VP3的组装,增强的来自单倍体AAV载体的AAV转导

[0578] 在上述研究中,我们已证实使用多倍体载体已实现了增加的AAV转导,所述多倍体载体通过两种AAV辅助质粒(AAV2和AAV8或AAV9)或三种质粒(AAV2、AAV8和AAV9)的转染来产生。这些个别的多倍体载体病毒粒子可以由来自不同血清型的不同衣壳亚基组成。例如,

通过AAV2辅助质粒和AAV8辅助质粒的转染生成的单倍体AAV2/8,可以具有在一个病毒粒子中具有不同组合的衣壳亚基用于有效转导:来自AAV8的VP1和来自AAV2的VP2/VP3,或来自AAV8的VP1/VP2和来自AAV2的VP3,或来自AAV2的VP1和来自AAV8的VP2/VP3,或来自AAV2的VP1/VP2和来自AAV8的VP3,或来自AAV8的VP1和来自AAV2的VP3,或来自AAV2的VP1和来自AAV8的VP3,或来自AAV2的VP1/VP2/VP3,或来自AAV8的VP1/VP2/VP3。在下述研究中,我们发现增强的转导可以由单倍体载体实现,所述单倍体载体具有来自一种AAV载体衣壳的VP1/VP2和来自另一种AAV载体衣壳的VP3。

[0579] 通过不同AAV血清型生成VP1、VP2和VP3提供了两种不同的策略用于产生这些不同的蛋白质。有利的是,VP蛋白从单个CAP核苷酸序列翻译,具有关于VP1、VP2和VP3的重叠序列。



[0581] Cap基因编码3种蛋白质- VP1、VP2和VP3。如上图中所示,VP1含有VP2和VP3蛋白,且VP2含有VP3蛋白。因此,Cap基因具有3个区段,VP1的起始 - VP2的起始 - VP3的起始 - 所有3种VP蛋白的结束。

[0582] 关于VP蛋白的核苷酸序列的重叠呈现了从不同AAV血清型生成不同VP蛋白的机会。例如,如果核苷酸序列在第一区段中含有来自“A”的核苷酸,其中A是第一血清型,则“B”在第二区段中,其中B是与A和“B”分开且不同的第二血清型,并且“B”在第三区段中;所得到的VP1蛋白含有ABB区段,VP2蛋白含有BB区段,且VP3含有B区段。因此,取决于哪个区段包含哪个核苷酸序列,所得的衣壳将具有不同量的每种Cap蛋白。

[0583] 在从两种不同的AAV血清型(指定为A和B)中获得Cap基因来源的情况下,存在三种Cap蛋白的6种可能组合。

[0584]

VP1	VP2	VP3
A	B	B
A	B	A
A	A	B
B	B	A
B	A	B
B	A	A

[0585] 在从三种不同的AAV血清型(指定为A、B和C)中获得Cap基因来源的情况下,存在三种Cap蛋白的6种可能组合。

[0586]

VP1	VP2	VP3
A	B	C
A	C	B
B	A	C
B	C	A
C	A	B
C	B	A

[0587] 另外,可以用来自两种AAV血清型的特定VP蛋白的核苷酸序列的完整拷贝生成辅助质粒中的Cap基因。个别Cap基因生成与该特定AAV血清型(指定为A和B)相关的VP蛋白。

[0588]

VP1	VP2	VP3
A	B	B
A	B	A
A	A	B
B	B	A
B	A	B
B	A	A

[0589] 在3种不同的Cap基因的情况下,可以用来自三种AAV血清型的特定VP蛋白的核苷酸序列的完整拷贝生成辅助质粒中的Cap基因。个别Cap基因生成与该特定AAV血清型(指定为A、B和C)相关的VP蛋白。

[0590]

VP1	VP2	VP3
A	B	C
A	C	B
B	A	C
B	C	A
C	A	B
C	B	A

[0591] 具有来自AAV8的VP1/VP2的C末端和来自AAV2的VP3的单倍体载体增强AAV转导。已证实,以AAV2衣壳与AAV8衣壳的任何比率的单倍体载体AAV2/8,诱导比AAV2或具有以相同比率的AAV2载体和AAV8载体的混合物的病毒更高的肝转导。为了阐明个别单倍体AAV2/8载体中的哪些AAV亚基促成比AAV2更高的转导,我们制备了不同的构建体,其仅表达AAV8 VP1/VP2,仅表达AAV2 VP3,表达具有来自AAV2的N末端和来自AAV8的C末端的嵌合VP1/VP2(28m-2VP3),或表达具有来自AAV8的N末端和来自AAV2的C末端而不含VP3起始密码子的突变的嵌合AAV8/2。这些质粒用于产生具有不同组合的单倍体AAV载体。在经由眼眶后静脉在小鼠中注射这些单倍体载体的 1×10^{10} 个颗粒后,评估肝转导效率。嵌合AAV82载体(AAV82)诱导比AAV2略高的肝转导。然而,单倍体AAV82(H-AAV82)具有比AAV2高得多的肝转导。观察到用单倍体载体28m-2vp3在肝转导中的进一步增加。我们还将这些单倍体载体施用到小鼠的肌肉内。为了便于比较,当小鼠正面朝上时,右腿用AAV2载体注射,且左腿用单倍体载体注射。在AAV注射后第3周时,获取图像。与在肝中的观察一致,所有单倍体载体和嵌合载体都具有更高的肌肉转导,其中最佳来自单倍体载体28m-2vp3。这一结果指示,具有来自AAV2的N末端和来自AAV8的C末端的嵌合VP1/VP2归于单倍体AAV82载体的高肝转导。

[0592] 由具有来自其它血清型的VP1/VP2和来自AAV2的VP3的单倍体载体增强的AAV肝转导。我们已显示具有来自AAV8的VP1/VP2和来自AAV2的VP3的单倍体载体AAV82如上所述增加肝转导。接下来,我们想检查其中VP1/VP2衍生自不同血清型的其它单倍体病毒粒子是否也增加转导。在临床前研究中,AAV9已显示有效转导不同组织。我们已制备了单倍体AAV92载体(H-AAV92),其中VP1/VP2来自AAV9,且VP3来自AAV2。在全身施用后,在第1周时执行成像。用H-AAV92实现比用AAV2的那种高约4倍的肝转导。这一数据指示来自其它血清型的VP1/VP2也能够增加AAV2转导。

[0593] 由具有来自AAV2突变体或其它血清型的VP3的单倍体载体增强的AAV肝转导。AAV9

使用聚糖作为主要受体用于有效转导。在我们先前的研究中,我们已将AAV9聚糖受体结合位点移植到AAV2内,以制备AAV2G9,并且发现AAV2G9具有比AAV2更高的肝向性。在本文中我们制备了单倍体载体(H-AAV82G9),其中VP1/VP2来自AAV8且VP3来自AAV2G9。在全身注射到小鼠内之后,与AAV2G9相比,在H-AAV82G9应用后第1周和第2周时,均观察到高多于10倍的肝转导。为了研究其中VP3来自其它血清型且VP1/VP2来自不同血清型或变体的单倍体载体,我们克隆了其它构建体:仅AAV3 VP3,仅AAV rh10 VP1/VP2,并且制备了具有各种组合的不同单倍体载体(H-AAV83、H-AAV93和H-AAVrh10-3)。在全身注射到小鼠内之后,在第1周时进行成像。与从其它单倍体载体获得的结果一致,用单倍体载体(H-AAV83、H-AAV93和H-AAVrh10-3)实现比用AAV3更高的肝转导。值得注意的是,基于成像概况,这些单倍体载体还诱导了全身转导,这不同于来自具有来自AAV2的VP3的单倍体载体5的结果,所述单倍体载体5仅有效地转导肝。具有来自一种血清型的VP1/VP2和来自替代血清型的VP3的单倍体载体能够增强转导并且可能改变向性。

[0594] 实施例10:多倍体腺相关病毒载体增强转导且逃避中和抗体

[0595] 腺相关病毒(AAV)载体已成功地用于患有血友病和失明的患者的临床试验中。虽然AAV载体的应用已在这些临床试验中证明是安全的并且显示疗效,但主要挑战之一是它的低感染性,其需要相对大量的病毒基因组。另外,大部分人群具有针对血液及其它体液中的AAV的中和抗体(Nab)。Nabs的存在对未临床试验中更广泛的AAV应用提出了另一个重大挑战。增强AAV转导且逃避中和抗体活性的有效策略是高度需要的。先前的研究已显示来自AAV血清型的衣壳和位于一个病毒粒子的不同衣壳亚基上的AAV Nab的识别位点的相容性。在本研究中,我们提议研究由不同AAV辅助质粒的共转染产生的多倍体AAV病毒是否具有用于增强的AAV转导和Nab逃避的能力。我们以不同比率(3:1、1:1和1:3)共转染AAV2和AAV8辅助质粒,以组装单倍体衣壳。单倍体病毒产率与亲本病毒相似,指示这两种AAV衣壳是相容的。在Huh7和C2C12细胞系中,AAV8的转导效率比来自AAV2的转导效率低得多;然而,来自所有单倍体载体的转导高于来自AAV8的转导。关于单倍体载体的转导效率和硫酸肝素结合能力与整合的AAV2衣壳的量正相关。这些结果指示单倍体病毒载体保留了其亲代病毒特性,并且利用亲本载体用于增强的转导。在肌肉注射后,所有单倍体病毒都诱导比亲本AAV载体更高的转导(超过AAV2 2至9倍),其中最高的是单倍体载体AAV2/8 3:1。

[0596] 在全身施用后,用单倍体载体AAV2/8 1:3观察到肝中的转导比用单独的AAVS的转导高4倍。重要的是,我们将治疗因子IX盒包装到单倍体载体AAV2/8 1:3衣壳内,并且经由尾静脉将它们注射到FIX敲除小鼠内。与AAVS的那种相比,用单倍体载体AAV2/8 1:3病毒载体实现了更高的FIX表达和改善的表型校正。引人注目的是,单倍体病毒AAV2/8 1:3能够逃避AAV2中和,并且与AAV2具有非常低的Nab交叉反应性。但AAVS中和抗体可以抑制单倍体载体AAV2/8转导,效率与AAV8相同。接下来,我们通过以1:1:1的比率共转染AAV2、AAV8和AAV9辅助质粒,而产生三倍体载体AAV2/8/9载体。在全身施用后,用三倍体载体AAV2/8/9观察到肝中的转导比用AAV8的那种高2倍。中和抗体分析证实AAV2/8/9载体能够逃避来自用亲本血清型免疫的小鼠血清的中和抗体活性,不同于AAV2/8三倍体载体。结果指示多倍体病毒可能潜在地从亲本血清型中获得用于增强转导的优点,并且具有逃避Nab识别的能力。这种策略应该在具有阳性中和抗体的患者的未来临床试验中进行探讨。

[0597] 实施例11:AAV衣壳亚基的取代增强转导并且逃避中和抗体

[0598] 使用腺相关病毒(AAV)载体,在患有血液疾病和失明病症的患者的临床试验中已实现了疗效。然而,两个关注限制了AAV载体应用的拓宽:AAV衣壳特异性细胞毒性T细胞(CTL)和中和抗体(Nab)。用低剂量的AAV载体增强AAV转导将潜在地降低衣壳抗原负荷,并且有希望除去衣壳CTL介导的AAV转导的靶细胞的清除,而不损害转基因表达。目前,由于其不同的组织向性和转导效率,12种血清型和超过100种变体或突变体已对于基因递送进行探讨。已证实在AAV血清型中存在衣壳的相容性,并且将来自一种血清型的特定氨基酸整合到另一种AAV衣壳内增强了AAV转导。通过利用来自不同血清型的不同机制用于有效AAV转导,使用镶嵌病毒(mosaic virus)实现了增强的AAV转导,在所述镶嵌病毒中AAV衣壳亚基在体外和体内衍生自不同血清型。关于AAV载体与单克隆中和抗体的相互作用的最近结构研究证实,Nab与一个病毒粒子表面的几个不同亚基上的残基结合,其提示AAV病毒粒子的亚基组装的改变可能除去AAV Nab结合位点,然后逃避Nab活性。我们已证实镶嵌AAV载体能够逃避Nab活性。这些结果指示AAV衣壳亚基的取代具有增强AAV转导的潜力以及中和抗体逃避的能力。

[0599] 腺相关病毒(AAV)载体已成功地应用于患有血液疾病和失明病症的患者的临床试验中。两个关注限制了广泛的AAV载体应用:AAV衣壳特异性细胞毒性T细胞(CTL)应答介导的AAV转导靶细胞的消除、以及中和抗体(Nab)介导的AAV转导阻断。已证实衣壳抗原呈递是剂量依赖性的,这指示用低剂量的AAV载体增强AAV转导将潜在地降低衣壳抗原负荷,并且有希望除去衣壳CTL介导的AAV转导的靶细胞的清除,而不损害转基因表达。几种方法已为此进行探讨,其包括:转基因盒的优化、AAV衣壳的修饰和AAV运输由药理学试剂的干扰。AAV衣壳的修饰可以改变AAV向性,尤其是AAV转导效率在人组织中是未知的。尽管已进行了几项临床试验,但基于来自动物模型观察,凭经验选择AAV载体。用于增强AAV转导的药理学试剂通常具有不希望有的副作用。必须开发理想的策略以增强AAV转导,但不由于衣壳的修饰改变其向性且没有来自药理学治疗的副作用。目前,存在已对于基因递送进行探讨的12种血清型和超过100种变体或突变体。有效的AAV转导涉及下述步骤,其包括:经由受体和共受体在靶细胞表面上结合,内吞进入内体内,从内体中逃逸,核进入和AAV病毒粒子脱壳,随后为转基因表达。为了合理地设计用于增强转导的新型AAV载体,我们已开发了嵌合病毒:AAV2.5(其中AAV2突变体具有来自AAV1的5 aa取代)和AAV2G9(其中来自AAV9的半乳糖受体被植入AAV2衣壳内)。两种嵌合突变体分别在小鼠肌肉和肝中诱导比AAV2高得多的转导。这些观察指示这些嵌合病毒可以使用来自两种AAV血清型的特性用于增强的转导(例如AAV2G9使用两种主要受体-肝素和半乳糖用于有效的细胞表面结合)。基于来自不同AAV血清型的衣壳亚基中对于病毒组装的相容性和我们的初步结果(其证实将来自其它血清型(1或9)的特定氨基酸整合到AAV血清型2内,增强了肌肉和肝中的AAV2转导),我们合理推断来自其它血清型的一些衣壳亚基的取代能够通过利用来自不同血清型的不同机制用于有效AAV转导。另外,对于天然存在的AAV的预先存在的抗体已影响了关于血友病B及其它AAV基因转移研究的成功。在一般人群中,约50%携带中和抗体。已考虑了几种方法来设计Nab逃避的AAV载体,包括化学修饰、AAV载体的不同血清型、原位衣壳的合理设计和组合诱变、以及Nab滴度的生物耗尽(空衣壳利用、B细胞耗尽和血浆单采)。这些方法具有低效率或副作用或AAV向性的变化。关于AAV载体与单克隆中和抗体的相互作用的最近结构研究证实,Nab与一个病毒粒子表面的几个不同亚基上的残基结合,其提示AAV病毒粒子的亚基组装的改变

可能除去AAV Nab结合位点,然后逃避Nab活性。我们的结果强烈支持以下观点:新型镶嵌AAV载体具有增强各种组织中的转导的潜力,并且能够逃避中和抗体活性。

[0600] 实施例12:用来自两种或更多种不同AAV血清型的VP1/VP2/VP3治疗中枢神经系统疾病

[0601] 在第一个实验中,使用两种辅助质粒。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV4的Cap基因。第三质粒编码关于谷氨酸脱羧酶65 (GAD65) 和/或谷氨酸脱羧酶67 (GAD67) 的核苷酸序列,所述核苷酸序列插入两个ITR之间。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗帕金森氏病的GAD65和/或GAD67蛋白的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与帕金森氏病相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗帕金森病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV4组成的病毒载体。

[0602] 在一个进一步的实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV5的Cap基因。第三质粒编码关于治疗巴藤病的CLN2的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间。由三种质粒生成的单倍体AAV含有治疗巴藤病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与帕金森氏病相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗巴藤病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关中枢神经系统组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV5组成的病毒载体。

[0603] 在另一个实验中,三种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV4的Cap基因。第三辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV5的Cap基因。第四质粒编码关于治疗阿尔茨海默氏病的神经生长因子(NGF)的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间。由四种质粒生成的三倍体AAV含有治疗阿尔茨海默氏病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV4和AAV5)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与阿尔茨海默氏病相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗阿尔茨海默氏病通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关中枢神经系统组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV4或AAV5组成的病毒载体。

[0604] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。该辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV4的VP2和来自AAV5的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗卡纳万病的AAC核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV含有治疗卡纳万病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV2、AAV4和AAV5)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与卡纳万病相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗卡纳万病通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关中枢神经系统组织具有的特异性高于仅由AAV2、AAV4或AAV5组成的病毒载体。

[0605] 用来自两种或更多种不同AAV血清型的VP1/VP2/VP3治疗心脏病。在一个实验中,两种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自

AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV6的Cap基因。第三质粒编码关于治疗心脏病的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间。由三种质粒生成的单倍体AAV含有治疗心脏病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加与心脏病相关的心脏组织的特异性。事实上,为了治疗心脏病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关心脏组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV6组成的病毒载体。

[0606] 在一个进一步的实验中,两种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因。第三质粒编码关于治疗心脏病的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间。由三种质粒生成的单倍体AAV含有编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加与心脏病相关的心脏组织的特异性。事实上,为了治疗心脏病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关心脏组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV9组成的病毒载体。

[0607] 在一个实验中,三种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV6的Cap基因。第三辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因。第四质粒含有编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间。由四种质粒生成的三倍体AAV含有治疗心脏病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV6和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与心脏病相关的心脏组织的特异性。事实上,为了治疗心脏病通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关心脏组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV6或AAV9组成的病毒载体。

[0608] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。该辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV3的VP2和来自AAV9的VP3。第二质粒含有插入两个ITR之间、编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV编码治疗心脏病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV2、AAV3和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与心脏病相关的心脏组织的特异性。事实上,为了治疗心脏病通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关心脏组织具有的特异性高于仅由AAV2、AAV3或AAV9组成的病毒载体。

[0609] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。该辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV6的VP3。第二质粒含有插入两个ITR之间、编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV编码治疗心脏病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3和AAV6)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与心脏病相关的心脏组织的特异性。事实上,为了治疗心脏病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关心脏组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV6组成的病毒载体。

[0610] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。该辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV9的VP3。第

二质粒含有插入两个ITR之间、编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV编码治疗心脏病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV6和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加对于与心脏病相关的心脏组织的特异性。事实上,为了治疗心脏病通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关心脏组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV6或AAV9组成的病毒载体。

[0611] 用来自两种或更多种不同AAV血清型的VP1/VP2/VP3治疗肺疾病。在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV9的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与囊性纤维化相关的肺组织的特异性。事实上,为了治疗囊性纤维化通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV9组成的病毒载体。

[0612] 在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV10的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与囊性纤维化相关的肺组织的特异性。事实上,为了治疗囊性纤维化通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV10组成的病毒载体。

[0613] 在一个实验中,三种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因。第三辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV10的Cap基因。第四质粒编码关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列,且包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间。由四种质粒生成的三倍体AAV含有关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV9和AAV10)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与囊性纤维化相关的肺组织的特异性。事实上,为了治疗囊性纤维化通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV9或AAV10组成的病毒载体。

[0614] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有治疗囊性纤维化的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV2和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与囊性纤维化相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗囊性纤维化通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV9组成的病毒载体。

[0615] 在一个进一步的实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV10的VP2和来自AAV10的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列。由两种质

粒生成的单倍体AAV含有治疗囊性纤维化的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3和AAV10)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与囊性纤维化相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗囊性纤维化通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV10组成的病毒载体。

[0616] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV9的VP2和来自AAV10的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗囊性纤维化的CFTR的核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV含有治疗囊性纤维化的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV2、AAV9和AAV10)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与卡纳万病相关的中枢神经系统组织的特异性。事实上,为了治疗囊性纤维化通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2、AAV9或AAV10组成的病毒载体。

[0617] 用来自两种或更多种不同AAV血清型的VP1/VP2/VP3治疗骨骼肌疾病。对于下述实验,骨骼肌疾病可以是但不限于杜氏肌营养不良、肢带型肌营养不良、脑性瘫痪、重症肌无力和肌萎缩侧索硬化(ALS)。

[0618] 在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV8的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与骨骼肌疾病相关的骨骼肌的特异性。事实上,为了治疗骨骼肌疾病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关骨骼肌组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV8组成的病毒载体。

[0619] 在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV9的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与骨骼肌疾病相关的骨骼肌的特异性。事实上,为了治疗骨骼肌疾病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关骨骼肌组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV9组成的病毒载体。

[0620] 在一个实验中,三种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV8的Cap基因。第三辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因。第四质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列。由四种质粒生成的三倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV8和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与骨骼肌疾病相关的骨骼肌的特异性。事实上,为了治疗骨骼肌疾病通过这种方

法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV8或AAV9组成的病毒载体。

[0621] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有治疗骨骼肌疾病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与骨骼肌疾病相关的骨骼肌组织的特异性。事实上,为了治疗骨骼肌疾病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关骨骼肌组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV9组成的病毒载体。

[0622] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有治疗骨骼肌疾病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3和AAV8)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与骨骼肌疾病相关的骨骼肌组织的特异性。事实上,为了治疗骨骼肌疾病通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关骨骼肌组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV8组成的病毒载体。

[0623] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV8的VP2和来自AAV9的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV含有治疗骨骼肌疾病的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV8和AAV9)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与骨骼肌疾病相关的骨骼肌组织的特异性。事实上,为了治疗骨骼肌疾病通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关骨骼肌组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV8或AAV9组成的病毒载体。

[0624] 用来自两种或更多种不同AAV血清型的VP1/VP2/VP3治疗肝疾病。在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV6的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的因子IX(FIX)的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的FIX的特异性。事实上,为了治疗患有血友病B的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV6组成的病毒载体。

[0625] 在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV7的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的因子IX(FIX)的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的FIX的特异性。事实上,为了治疗患有血友病B的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV7

组成的病毒载体。

[0626] 在一个实验中,三种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV6的Cap基因。第三辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV7的Cap基因。第四质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的因子IX(FIX)的核苷酸序列。由四种质粒生成的三倍体AAV含有关于治疗血友病B的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV6和AAV7)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病B的患者的肝组织通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV6或AAV7组成的病毒载体。

[0627] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV6的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的FIX的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有治疗血友病B的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV2和AAV6)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病B的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV6组成的病毒载体。

[0628] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV7的VP2和来自AAV7的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的FIX的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有治疗血友病B的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3和AAV7)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病B的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV7组成的病毒载体。

[0629] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV7的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的FIX的核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV含有治疗血友病B的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV6和AAV7)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病B的患者的肝组织通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV6或AAV7组成的病毒载体。

[0630] 在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV6的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病A的因子VIII(FVIII)的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病A相关的FVIII的特异性。事实上,为了治疗患有血友病A的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV6组成的病毒载体。

[0631] 在一个实验中,两种辅助质粒再次与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV2的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep和来自AAV7的Cap基因。第三质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病A的FVIII的核苷酸序列。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗骨骼肌疾病的蛋白质的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病A相关的FVIII的特异性。事实上,为了治疗患有血友病A的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV7组成的病毒载体。

[0632] 在一个实验中,三种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。第一辅助质粒具有来自AAV3的Rep和Cap基因,且第二辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV6的Cap基因。第三辅助质粒具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV7的Cap基因。第四质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病A的FVIII的核苷酸序列。由四种质粒生成的三倍体AAV含有关于治疗血友病A的FVIII蛋白的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV6和AAV7)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病A的患者的肝组织通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV6或AAV7组成的病毒载体。

[0633] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV6的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病B的FVIII的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗血友病A的FVIII的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV2和AAV6)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病A相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病A的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV2或AAV6组成的病毒载体。

[0634] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV7的VP2和来自AAV7的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病A的FVIII的核苷酸序列。由两种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗血友病A的FVIII的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3和AAV7)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病B相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病A的患者的肝组织通过这种方法产生的单倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3或AAV7组成的病毒载体。

[0635] 在另一个实验中,一种辅助质粒与不同的AAV血清型一起用作Rep和Cap基因的来源。辅助质粒具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV7的VP3。第二质粒编码插入两个ITR之间、关于治疗血友病A的FVIII的核苷酸序列。由两种质粒生成的三倍体AAV含有关于治疗血友病B的FVIII的核苷酸序列,部分是根据本发明的方法,通过使用多重AAV血清型(例如AAV3、AAV6和AAV7)来获得编码VP1、VP2和VP3的蛋白质的来源,增加关于与血友病A相关的肝组织的特异性。事实上,为了治疗患有血友病A的患者的肝组织通过这种方法产生的三倍体病毒对于相关组织具有的特异性高于仅由AAV3、AAV6或AAV7组成的病毒载体。

[0636] 实施例13:本发明的AAV治疗帕金森氏病的疾病治疗用途

[0637] 患有帕金森氏病的45岁男性患者用由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系(参见例如美国专利号9,441,206),其含有具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒、以及具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV4的Cap基因的第二辅助质粒、以及编码关于谷氨酸脱羧酶65 (GAD65) 和/或谷氨酸脱羧酶67 (GAD67) 的核苷酸序列的第三质粒,所述核苷酸序列插入两个ITR之间。由三种质粒生成的单倍体AAV含有关于治疗帕金森氏病的GAD65和/或GAD67蛋白的核苷酸序列。将AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示震颤频率的减少和患者的平衡的改善。随着时间过去,患者还可见在AAV施用之前患者患有的幻觉和妄想的数目和严重性的减少。

[0638] 巴藤病的治疗。患有巴藤病的8岁男性患者用由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系(参见例如美国专利号9,441,206),其含有具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒、以及具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV5的Cap基因的第二辅助质粒。第三质粒编码关于治疗巴藤病的CLN2的核苷酸序列,其中所述CLN2基因已插入两个ITR之间。由三种质粒生成的单倍体AAV含有治疗巴藤病的核苷酸序列。将AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示精神敏锐度的增加。另外,患者可见在AAV施用之前患者患有的癫痫发作的减少以及体征和运动技能的改善。

[0639] 阿尔茨海默氏病的治疗。患有阿尔茨海默氏病的73岁女性患者用由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系(参见例如美国专利号9,441,206),其含有具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV4的Cap基因的第二辅助质粒;以及具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV5的Cap基因的第三辅助质粒。第四质粒编码关于治疗阿尔茨海默氏病的神经生长因子(NGF)的核苷酸序列,其中所述NGF已插入两个ITR之间。将三倍体AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示精神敏锐度和短期记忆的增加。患者还能够比在AAV施用之前更好地与他人交流,并且开始更独立地行使职责。

[0640] 心脏病的治疗。患有心脏病的63岁男性患者用由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系(参见例如美国专利号9,441,206),其含有以下任一:

[0641] (1) 具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV6的Cap基因的第二辅助质粒;并且第三质粒编码关于治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间;

[0642] (2) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第二辅助质粒;并且第三质粒编码关于治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间;

[0643] (3) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV6的Cap基因的第二辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第三辅助质粒;并且第四质粒含有编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列,其包含在第三质粒中并且已插入两个ITR之间;

[0644] (4) 具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV3的VP2和来自AAV9的VP3的辅助质粒;以及含有插入两个ITR之间、编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列的第二质粒;

[0645] (5) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV6的VP2和来自AAV6的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒含有插入两个ITR之间、编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列; 或,

[0646] (6) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV6的VP2和来自AAV9的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒含有插入两个ITR之间、编码治疗心脏病的蛋白质的核苷酸序列, 其中

[0647] 将多倍体AAV施用于患者, 所述患者在施用后不久显示与心脏病相关的症状的减少, 并且显示患者的心脏健康的相称改善。

[0648] **囊性纤维化的治疗。**患有囊性纤维化的19岁女性用由细胞系生成的AAV进行治疗, 所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系(参见例如美国专利号9, 441, 206), 其含有以下任一:

[0649] (1) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep和来自AAV10的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的CFTR核苷酸序列的第三质粒;

[0650] (2) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第二辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV10的Cap基因的第三辅助质粒; 以及编码关于已插入两个ITR之间的CFTR的核苷酸序列的第四质粒;

[0651] (3) 具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1, 来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3的辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的CFTR的核苷酸序列的第二质粒;

[0652] (4) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV2的VP1, 来自AAV10的VP2和来自AAV10的VP3的辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的CFTR的核苷酸序列的第二质粒; 或,

[0653] (7) 具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1, 来自AAV9的VP2和来自AAV10的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的CFTR的核苷酸序列, 其中

[0654] 将AAV施用于患者, 所述患者在施用后不久显示对患者肺的损伤增加的减缓; 肺功能丧失的增加的减少和肝受损速度的减少, 以及肝硬化严重性的增加的减缓。相同患者还可见在患者已开始患有的囊性纤维化相关糖尿病的严重性的减少。

[0655] **骨骼肌疾病 - 肌萎缩侧索硬化(ALS)的治疗。**患有肌萎缩侧索硬化(ALS)的33岁男性用由细胞系生成的AAV进行治疗, 所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系(参见例如美国专利号9, 441, 206), 其含有以下任一:

[0656] (1) 具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的超氧化物歧化酶1(SOD1)的核苷酸序列的第三质粒;

[0657] (2) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的SOD1的核苷酸序列的第三质粒;

[0658] (3) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第三辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的SOD1的核苷酸序列的第四质粒;

[0659] (4) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3的辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的SOD1的核苷酸序列的第二质粒;

[0660] (5) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的SOD1的核苷酸序列; 或,

[0661] (6) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的SOD1的核苷酸序列, 其中

[0662] 将AAV施用于患者, 所述患者在施用后不久显示与ALS相关的症状的减少, 包括对大脑和脊髓的运动神经元的损伤进展的减慢或停止, 以及患者的大脑和肌肉之间的通讯维持。

[0663] 杜氏肌营养不良。患有杜氏肌营养不良 (DMD) 的5岁男性用由细胞系生成的AAV进行治疗, 所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系, 其含有以下任一:

[0664] (1) 具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的肌营养不良蛋白的核苷酸序列的第三质粒;

[0665] (2) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的肌营养不良蛋白的核苷酸序列的第三质粒;

[0666] (3) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第三辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的肌营养不良蛋白的核苷酸序列的第四质粒;

[0667] (4) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3的辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的肌营养不良蛋白的核苷酸序列的第二质粒;

[0668] (5) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的肌营养不良蛋白的核苷酸序列; 或,

[0669] (6) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3的辅助质粒; 并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的肌营养不良蛋白的核苷酸序列, 其中

[0670] 将AAV施用于患者, 所述患者在施用后不久显示对患者骨骼肌的损伤和消耗增加的减缓, 以及由于杜氏肌营养不良由心脏和肺遭受的损伤的减缓或停止。

[0671] 重症肌无力。患有重症肌无力 (MG) 的33岁女性用由细胞系生成的AAV进行治疗, 所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系, 其含有以下任一:

[0672] (1) 具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码关于插入两个ITR之间的基因的核苷酸序列的第三质粒, 所述基因使得患者不再遭受MG;

[0673] (2) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第二辅助质粒; 以及编码插入两个ITR之间的基因的第三质粒, 所述基因使得患者不再遭受MG;

[0674] (3) 具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒; 具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第三辅助质粒; 以及编码插入两个ITR之间的基因的第四质粒, 所述基因使得患者不再遭受MG;

[0675] (4) 具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1, 来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3的辅

助质粒;以及编码插入两个ITR之间的基因的第二质粒,所述基因使得患者不再遭受MG;

[0676] (5)具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3的辅助质粒;并且第二质粒编码插入两个ITR之间的基因,所述基因使得患者不再遭受MG;或,

[0677] (6)具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV8的VP2和来自AAV的VP3的辅助质粒;并且第二质粒编码插入两个ITR之间的基因,所述基因使得患者不再遭受MG,其中

[0678] 将AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示患者身体的肌肉与神经之间的通讯的增加破坏的减缓,导致肌肉控制丧失的严重性的减慢或停止。在AAV施用后患者的活动性稳定并且不再恶化,并且在AAV施用后患者的呼吸也不恶化。

[0679] 肢带型肌营养不良。患有肢带型肌营养不良 (LGMD) 的13岁男性用由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系,其含有以下任一:

[0680] (1)具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间、具有与LGMD相关的突变的15种基因之一的核苷酸序列的第三质粒,所述基因包括但不限于myotilin、telethonin、钙蛋白酶(calpain)-3、 α -肌聚糖和 β -肌聚糖;

[0681] (2)具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第二辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间、具有与LGMD相关的突变的15种基因之一的核苷酸序列的第三质粒,所述基因包括但不限于myotilin、telethonin、钙蛋白酶-3、 α -肌聚糖和 β -肌聚糖;

[0682] (3)具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV8的Cap基因的第二辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV9的Cap基因的第三辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间、具有与LGMD相关的突变的15种基因之一的核苷酸序列的第四质粒,所述基因包括但不限于myotilin、telethonin、钙蛋白酶-3、 α -肌聚糖和 β -肌聚糖;

[0683] (4)具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV9的VP2和来自AAV9的VP3的辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间、具有与LGMD相关的突变的15种基因之一的核苷酸序列的第二质粒,所述基因包括但不限于myotilin、telethonin、钙蛋白酶-3、 α -肌聚糖和 β -肌聚糖;

[0684] (5)具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV8的VP2和来自AAV8的VP3的辅助质粒;并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间、具有与LGMD相关的突变的15种基因之一的核苷酸序列,所述基因包括但不限于myotilin、telethonin、钙蛋白酶-3、 α -肌聚糖和 β -肌聚糖;或,

[0685] (6)具有来自AAV3的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV8的VP2和来自AAV的VP3的辅助质粒;并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间、具有与LGMD相关的突变的15种基因之一的核苷酸序列,所述基因包括但不限于myotilin、telethonin、钙蛋白酶-3、 α -肌聚糖和 β -肌聚糖,其中

[0686] 将各自编码与LGMD相关的15种不同基因之一的一种或多种AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示另外的肌肉消耗和萎缩的减缓或停止。

[0687] 肝疾病 - 血友病B的治疗。患有起因于因子IX (FIX) 缺乏的血友病B的9岁男性用

由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系,其含有以下任一:

[0688] (1)具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV6的Cap基因的第二辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间、治疗血友病B的FIX的核苷酸序列的第三质粒;

[0689] (2)具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV7的Cap基因的第二辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间、治疗血友病B的FIX的核苷酸序列的第三质粒;

[0690] (3)具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV6的Cap基因的第二辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV7的Cap基因的第三辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FIX的核苷酸序列的第四质粒;

[0691] (4)具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV6的VP3的辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FIX的核苷酸序列的第二质粒;

[0692] (5)具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV7的VP2和来自AAV7的VP3的辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FIX的核苷酸序列的第二质粒;或,

[0693] (6)具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV7'的VP3的辅助质粒,并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的FIX的核苷酸序列,其中

[0694] 将AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示血友病B的严重性的减少,包括出血发作的减少。

[0695] 血友病A。患有起因于因子VIII(FVIII)缺乏的血友病B的8岁男性用由细胞系生成的AAV进行治疗,所述细胞系例如具有ATCC编号PTA 13274的分离的HEK293细胞系,其含有以下任一:

[0696] (1)具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV2的Rep基因和来自AAV6的Cap基因的第二辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FVIII的核苷酸序列的第三质粒;

[0697] (2)具有来自AAV2的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV7的Cap基因的第二辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FVIII的核苷酸序列的第三质粒;

[0698] (3)具有来自AAV3的Rep和Cap基因的第一辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV6的Cap基因的第二辅助质粒;具有来自AAV3的Rep基因和来自AAV7的Cap基因的第三辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FVIII的核苷酸序列的第四质粒;

[0699] (4)具有来自AAV2的Rep和来自AAV2的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV6的VP3的辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FVIII的核苷酸序列的第二质粒;

[0700] (5)具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV7的VP2和来自AAV7的VP3的辅助质粒;以及编码关于插入两个ITR之间的FVIII的核苷酸序列的第二质粒;或,

[0701] (6)具有来自AAV2的Rep和来自AAV3的VP1,来自AAV6的VP2和来自AAV7'的VP3的辅助质粒,并且第二质粒编码关于插入两个ITR之间的FVIII的核苷酸序列,其中

[0702] 将AAV施用于患者,所述患者在施用后不久显示血友病A的严重性的减少,包括出血发作的减少。

[0703] 最后,应理解,尽管通过参考具体实施方案突出显示了本说明书的各方面,但本领域技术人员将容易了解,这些公开的实施方案仅示出本文公开的主题的原理。因此,应该理解,所公开的主题绝不限于本文所述的特定方法、方案和/或试剂等。像这样,可以根据本文的教导做出对所公开的主题的各种修饰或改变或者替代配置,而不背离本说明书的精神。最后,这里使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不意图限制仅由权利要求限定的本发明的范围。相应地,本发明并不限于精确地如所示和所述的那些。

[0704] 本文描述了本发明的某些实施方案,包括本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。当然,在阅读前文说明书后,关于这些描述的实施方案的变化对于本领域普通技术人员将变得显而易见。本发明人期望技术人员适当地采用此类变化,并且本发明人预期以不同于本文具体描述的方式实践本发明。相应地,本发明包括如由适用法律所允许的与之所附的权利要求中所述主题的所有修饰和等价物。此外,除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本发明涵盖以其所有可能变化形式的上述实施方案的任何组合。

[0705] 本发明的替代实施方案、要素或步骤的分组不应解释为限制。每个组成员可以个别地或以与本文公开的其它组成员的任何组合提及且请求保护。出于方便和/或可专利性的原因,预料组中的一个或多个成员可以被包括在组中或从组中删除。当任何此类包括或删除发生时,该说明书被认为含有这样修饰的组,因此满足所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述书。

[0706] 除非另有说明,否则在本说明书和权利要求中使用的表示特征、项目、数量、参数、特性、术语等等的数目应理解为在所有情况下由术语“约”修饰。如本文使用的,术语“约”意指如此限定的特征、项目、数量、参数、特性或术语涵盖高于和低于所述特征、项目、数量、参数、特性或术语的值的正负百分比十的范围。相应地,除非另有说明,否则说明书和所附权利要求中所述的数目参数是可以变化的近似值。至少,并且不作为将等价原则的应用限制在权利要求的范围内的尝试,每个数目指示至少应该根据报告的有效数字的数目,并且通过应用普通的舍入技术来解释。尽管阐述本发明的广泛范围的数目范围和值是近似值,但具体实施例中所说的数目范围和值尽可能精确地报告。然而,任何数目范围或值固有地含有必然起因于其分别测试测量中发现的标准差的某些误差。在本文中值的数目范围的叙述仅预期充当个别提及落入该范围内的每个分开数值的简写方法。除非本文另有说明,否则数目范围的每个个别值掺入本说明书内,如同它在本文中个别叙述一样。

[0707] 除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法可以以任何合适的次序执行。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅预期更好地示出本发明,而不是对请求保护的本发明的范围造成限制。本说明书中的任何语言都不应解释为指示对本发明的实践必需的任何未请求保护的要素。

[0708] 本文公开的具体实施方案可以使用语言由……组成或基本上由……组成在权利要求中进一步限制。当在权利要求中使用,无论是如提交的还是按修饰添加,过渡术语“由……组成”排除权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制在指定的材料或步骤,以及不会在材料上影响基本和新型特征的那些。如此请求保护的本发明的实施方案在本文中固有地或明确地描述且实现。

[0709] 本说明书中引用且鉴定的所有专利、专利出版物及其它出版物都个别地和明确地整体引入本文作为参考,用于描述和公开例如可以与本发明结合使用的此类出版物中描述

的组合和方法的目的。提供这些出版物仅由于其公开内容在本申请的提交日期前。在这点上不应解释为承认由于本发明或由于任何其他原因,本发明人有资格先于此类公开内容。关于日期的所有声明或关于这些文件内容的表达基于申请人可获得的信息,并且不构成关于这些文件的日期或内容正确性的任何承认。

[0710] 表1:

	GenBank 登录号		GenBank 登录号		GenBank 登录号
完全基因组		HuS17	AY695376	Hu66	AY530626
腺相关病毒1	NC_002077, AF063497	HuT88	AY695375	Hu42	AY530605
腺相关病毒2	NC_001401	HuT71	AY695374	Hu67	AY530627
腺相关病毒3	NC_001729	HuT70	AY695373	Hu40	AY530603
腺相关病毒3B	NC_001863	HuT40	AY695372	Hu41	AY530604
腺相关病毒4	NC_001829	Hu T32	AY695371	Hu37	AY530600
腺相关病毒5	Y18065, AF085716	Hu T17	AY695370	Rh40	AY530559
腺相关病毒6	NC_001862	Hu LG15	AY695377	Rh2	AY243007
禽类 AAVA TCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	进化枝C		Bbl	AY243023
禽类 AAV 毒株 DA-I	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629	Bb2	AY243022
牛 AAV	NC_005889, AY388617, AAR26465	Hu JO	AY530576		
AAVII	AAT46339, AY631966	Hull	AY530577	Rh10	AY243015
AAV12	AB116639, DQ813647			Hui?	AY530582
进化枝A		Hu53	AY530615	Hu6	AY530621
AAVI	NC_002077, AF063497	Hu55	AY530617	Rh25	AY530557
AAV6	NC_001862	Hu54	AY530616	Pi2	AY530554
Hu.48	AY530611	Hu7	AY530628	Pi1	AY530553
Hu43	AY530606	Hu18	AY530583	Pi3	AY530555
Hu 44	AY530607	Hu IS	AY530580	Rh57	AY530569
Hu 46	AY530609	Hu16	AY530581	Rh50	AY530563
进化枝B		Hu25	AY530591	RM9	AY530562
Hu19	AY530584	Hu60	AY530622	Hu39	AY530601
Hu20	AY530586	Ch5	AY243021	Rh58	AY530570
Hu23	AY530589	Hu3	AY530595	Rh61	AY530572
Hu22	AY530588	Hui	AY530575	Rh52	AY530565
Hu24	AY530590	Hu4	AY530602	Rh53	AY530566
Hu21	AY530587	Hu2	AY530585	RhSI	AY530564
Hu27	AY530592	Hu61	AY530623	Rh64	AY530574

[0711]

[0712]

Hu28	AY530593	进化枝D		Rh43	AY530560
Hu 29	AY530594	Rh62	AY530573	AAV8	AF513852
Hu63	AY530624	RMB	AY530561	Rh8	AY242997
Hu64	AY530625	Rh54	AY5 30567	Rh1	AY530556
Hu13	AY530578	Rh55	AY530568	进化枝F	
Hu56	AY530618	Cy2	AY243020	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu57	AY530619	AAV7	AF5J3851	Hu31	AY530596
I-lu49	AY530612	Rh35	AY243000	Hu32	AY530597
Hu58	AY530620	Rh37	AY242998	克隆分离物	
Hu34	AY530598	Rh36	AY242999	AAVS	Y18065 , AF085716
Hu35	AY530599	Cy6	AY243016	AAV3	NC 001729
AAV2	NC 001401	Cy4	AY243018	AAV3B	NC 001863
Hu45	AY530608	Cy3	AY243019	AAV4	NC 001829
Hu47	AY5306JO	Cy5	AY243017	Rh34	AY243001
Hu51	AY530613	RJ1(3	AY243013	Rh33	AY243002
Hu52	AY530614	进化枝E		Rh32	AY243003
HuT41	AY695378	Rh38	AY530558		

[0713] 表2:氨基酸残基和缩写

[0714]

氨基酸残基	缩写	
	三字母代码	单字母代码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸 (天冬氨酸盐)	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸 (谷氨酸盐)	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0715] 表3:

[0716]

血清型	位置1	位置2
AAV1	A263X	T265X
AAV2	Q263X	-265X
AAV3a	Q263X	-265X
AAV3b	Q263X	-265X
AAV4	S257X	-259X
AAV5	G253X	V255X
AAV6	A263X	T265X
AAV7	E264X	A266X
AAV8	G264X	S266X
AAV9	S263X	S265X
其中, (X) →突变为任何氨基酸 (-) →任何氨基酸的插入 注意: 位置2插入由插入位点指示		

[0717] 表4:

[0718]

修饰的氨基酸残基 氨基酸残基缩写	缩写
2-氨基己二酸	Aad
3-氨基己二酸	bAad
β -丙氨酸, β -氨基丙酸	bAla
2-氨基丁酸	Abu
4-氨基丁酸, 哌啶酸	4Abu
6-氨基己酸	Acp
2-氨基庚酸	Ahe
2-氨基异丁酸	Aib
3-氨基异丁酸	bAib
2-氨基庚二酸	Apm
叔丁基丙氨酸	t-BuA
瓜氨酸	Cit
环己基丙氨酸	Cha
2,4-二氨基丁酸	Dbu
锁链素	Des
2,2'-二氨基庚二酸	Dpm
2,3-二氨基丙酸	Dpr
N-乙基甘氨酸	EtGly
N-乙基天冬酰胺	EtAsn
高精氨酸	hArg
高半胱氨酸	hCys
高丝氨酸	hSer
羟赖氨酸	Hyl
别羟赖氨酸	aHyl
3-羟脯氨酸	3Hyp
4-羟脯氨酸	4Hyp
异锁链素	Ide
别异亮氨酸	alle
甲硫氨酸亚砷	MSO
N-甲基甘氨酸, 肌氨酸	MeGly
N-甲基异亮氨酸	Melle
6-N-甲基赖氨酸	MeLys
N-甲基缬氨酸	MeVal
2-萘丙氨酸	2-Nal
正缬氨酸	Nva
正亮氨酸	Nle
鸟氨酸	Orn
4-氯苯丙氨酸	Phe (4-Cl)
2-氟苯丙氨酸	Phe (2-F)
3-氟苯丙氨酸	Phe (3-F)
4-氟苯丙氨酸	Phe (4-F)
苯基甘氨酸	Phg
β -2-噻吩基丙氨酸	Thi

[0719] 表5:关于AAV8结合血清蛋白质的MS结果

登录	描述	倍数变化
P02671	纤维蛋白原 α 链OS=智人GN=FGA PE=1 SV=2	1.75
P02675	纤维蛋白原 β 链OS=智人GN=FGB PE=1 SV=2	1.42857143
P02679	纤维蛋白原 γ 链OS=智人GN=FGG PE=1 SV=3	1.6
C9JU00	纤维蛋白原 γ 链（片段）OS=智人GN=FGG PE=2 SV=1	0.4173913
P02768	血清白蛋白OS=智人GN=ALB PE=1 SV=2	3.73913043
P02751	纤连蛋白OS=智人GN=FN1 PE=1 SV=4	2.5
P01857	Ig γ -1链C区OS=智人GN=IGHG1 PE=1 SV=1	3.38461538
P01871-2	Ig μ 链C区的同种型2 OS=智人GN=IGHM	3
P01834	Ig κ 链C区OS=智人GN=IGKC PE=1 SV=1	2.76923077
P01876	Ig α -1链C区OS=智人GN=IGHA1 PE=1 SV=2	2.24719101
P01009	α -1抗胰蛋白酶OS=智人GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	3.05555556
P0CG05	Ig λ -2链C区OS=智人GN=IGLC2 PE=1 SV=1	1.5
P10909-2	丛生蛋白的同种型2 OS=智人GN=CLU	2.85714286
P01860	Ig γ -3链C区OS=智人GN=IGHG3 PE=1 SV=2	6.33333333
[0720] P01877	Ig α -2链C区OS=智人GN=IGHA2 PE=1 SV=3	ND*
P01861	Ig γ -4链C区OS=智人GN=IGHG4 PE=1 SV=1	ND
P02647	载脂蛋白A-I OS=智人GN=APOA1 PE=1 SV=1	3.73684211
P01859	Ig γ -2链C区OS=智人GN=IGHG2 PE=1 SV=2	5.06024096
B9A064	免疫球蛋白 λ 样多肽5 OS=智人GN=IGLL5 PE=2 SV=2	3.3
P00739-2	结合珠蛋白相关蛋白的同种型2 OS=智人GN=HPR	2.81690141
P02766	甲状腺素运载蛋白OS=智人GN=TTR PE=1 SV=1	5.54545455
P01024	补体C3 OS=智人GN=C3 PE=1 SV=2	5.3125
P00747	纤溶酶原OS=智人GN=PLG PE=1 SV=2	1.47692308
C9JV77	α -2-HS-糖蛋白OS=智人GN=AHSG PE=2 SV=1	3.16666667
H0Y300	结合珠蛋白OS=智人GN=HP PE=2 SV=4	ND
P04275	血管性血友病因子OS=智人GN=VWF PE=1 SV=4	ND
P01620	Ig κ 链V-III区SIE OS=智人PE=1 SV=1	2.78571429
P0C0L4	补体C4-A OS=智人GN=C4A PE=1 SV=2	2.42424242
P06310	Ig κ 链V-II区PRMI 6410 OS=智人PE=4 SV=1	2.64705882
O43866	CD5抗原样OS=智人GN=CD5L PE=1 SV=1	1.2345679

[0721] 表5(续):

登录	描述	倍数变化
P01766	Ig重链V-III区BRO OS=智人PE=1 SV=1	2.46875
P01598	Igκ链V-I区EU OS=智人PE=1 SV=1	3.829787234
P02787	血清转铁蛋白OS=智人GN=TF PE=1 SV=3	ND
P04003	C4b-结合蛋白α链OS=智人GN=C4BPA PE=1 SV=2	1.527777778
P01591	免疫球蛋白J链OS=智人GN=IGJ PE=1 SV=4	2.716049383
P01619	Igκ链V-III区B6 OS=智人PE=1 SV=1	2.611111111
P02747	补体C1q亚组分亚基OS=智人GN=C1QC PE=1 SV=3	2.529411765
P02790	血红素结合蛋白OS=智人GN=HPX PE=1 SV=2	30.71428571
P05452	四连接素OS=智人GN=CLEC3B PE=1 SV=3	ND
P80748	Igλ链V-III区LOI OS=智人PE=1 SV=1	ND
P01717	Igλ链V-IV区Hil OS=智人PE=1 SV=1	2.142857143
P49908	硒蛋白P OS=智人GN=SEPP1 PE=1 SV=3	ND
P01714	Igλ链V-III区SH OS=智人PE=1 SV=1	ND
P01625	Igκ链V-IV区Len OS=智人PE=1 SV=2	5
Q9BSK4	蛋白质fem-1同系物A OS=智人GN=FEM1A PE=1 SV=1	0.264285714
K7ER74	蛋白质APOC4-APOC2 OS=智人GN=APOC4-APOC2 PE=2 SV=1	ND
P02743	血清淀粉样蛋白P组分OS=智人GN=APCS PE=1 SV=2	ND
P08603	补体因子H OS=智人GN=CFH PE=1 SV=4	ND
P02746	补体C1q亚组分亚基B OS=智人GN=C1QB PE=1 SV=3	ND
B4E1Z4	补体因子B OS=智人GN=CFB PE=2 SV=1	ND
[0722] P01597	Igκ链V-I区DEE OS=智人PE=1 SV=1	2.989690722
V9GYM3	载脂蛋白A-II OS=智人GN=APOA2 PE=4 SV=1	ND
P01774	Ig重链V-III区POM OS=智人PE=1 SV=1	2.636363636
P01019	血管紧张素原OS=智人GN=AGT PE=1 SV=1	ND
S4R460	未表征蛋白OS=智人PE=4 SV=1	ND
P19652	α-1-酸性糖蛋白2 OS=智人GN=ORM2 PE=1 SV=2	ND
P22352	谷胱甘肽过氧化物酶3 OS=智人GN=GPX3 PE=1 SV=2	2.741935484
J3KPZ1	粒状头样蛋白1同系物OS=智人GN=GRHL1 PE=2 SV=1	ND
P02749	β-2糖蛋白1 OS=智人GN=APOH PE=1 SV=3	3.428571429
P01008	抗凝血酶-III OS=智人GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	ND
登录	描述	倍数变化
P10720	血小板因子4变体OS=智人GN=PF4V1 PE=1 SV=1	0.9375
Q8IWC1	含MAP7结构域蛋白3 OS=智人GN=MAP7D3 PE=1 SV=2	ND
P02774-3	维生素D结合蛋白的同种型3 OS=智人GN=GC	ND
P02649	载脂蛋白E OS=智人GN=APOE PE=1 SV=1	1.909091
P01042	激肽原-1 OS=智人GN=KNG1 PE=1 SV=2	0.418919
P01621	Igκ链V-III区NG9 (片段) OS=智人PE=1 SV=1	ND
P01023	α-2巨球蛋白OS=智人GN=A2M PE=1 SV=3	ND
P04114	载脂蛋白B-100 OS=智人GN=APOB PE=1 SV=2	ND
P02654	载脂蛋白C-I OS=智人GN=APOC1 PE=1 SV=1	2
Q92945	远上游元件结合蛋白2 OS=智人GN=KHSRP PE=1 SV=4	ND

[0723] *ND指示在对照组中未检测到蛋白质。

[0724] 表6:关于AAV9结合血清蛋白质的MS结果

[0725]

登录	描述	倍数变化
P02671	纤维蛋白原 α 链OS=智人GN=FGA PE=1 SV=2	1.75
P02675	纤维蛋白原 β 链OS=智人GN=FGB PE=1 SV=2	1.42857143
P02679	纤维蛋白原 γ 链OS=智人GN=FGG PE=1 SV=3	1.6
C9JU00	纤维蛋白原 γ 链（片段）OS=智人GN=FGG PE=2 SV=1	0.4173913
P02768	血清白蛋白OS=智人GN=ALB PE=1 SV=2	3.73913043
P02751	纤连蛋白OS=智人GN=FN1 PE=1 SV=4	2.5
P01857	Ig γ -1链C区OS=智人GN=IGHG1 PE=1 SV=1	3.38461538
P01871-2	Ig μ 链C区的同种型2 OS=智人GN=IGHM	3
P01834	Ig κ 链C区OS=智人GN=IGKC PE=1 SV=1	2.76923077
P01876	Ig α -1链C区OS=智人GN=IGHA1 PE=1 SV=2	2.24719101
P01009	α -1抗胰蛋白酶OS=智人GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	3.05555556
P0CG05	Ig λ -2链C区OS=智人GN=IGLC2 PE=1 SV=1	1.5
P10909-2	丛生蛋白的同种型2 OS=智人GN=CLU	2.85714286
P01860	Ig γ -3链C区OS=智人GN=IGHG3 PE=1 SV=2	6.33333333
P01877	Ig α -2链C区OS=智人GN=IGHA2 PE=1 SV=3	ND*
P01861	Ig γ -4链C区OS=智人GN=IGHG4 PE=1 SV=1	ND
P02647	载脂蛋白A-I OS=智人GN=APOA1 PE=1 SV=1	3.73684211
P01859	Ig γ -2链C区OS=智人GN=IGHG2 PE=1 SV=2	5.06024096
B9A064	免疫球蛋白 λ 样多肽5 OS=智人GN=IGLL5 PE=2 SV=2	3.3
P00739-2	结合珠蛋白相关蛋白的同种型2 OS=智人GN=HPR	2.81690141
P02766	甲状腺素运载蛋白OS=智人GN=TTR PE=1 SV=1	5.54545455
P01024	补体C3 OS=智人GN=C3 PE=1 SV=2	5.3125
P00747	纤溶酶原OS=智人GN=PLG PE=1 SV=2	1.47692308
C9JV77	α -2-HS-糖蛋白OS=智人GN=AHSG PE=2 SV=1	3.16666667
H0Y300	结合珠蛋白OS=智人GN=HP PE=2 SV=4	ND
P04275	血管性血友病因子OS=智人GN=VWF PE=1 SV=4	ND
P01620	Ig κ 链V-III区SIE OS=智人PE=1 SV=1	2.78571429
P0C0L4	补体C4-A OS=智人GN=C4A PE=1 SV=2	2.42424242
P06310	Ig κ 链V-II区PRMI 6410 OS=智人PE=4 SV=1	2.64705882

[0726]

O43866	CD5抗原样OS=智人GN=CD5L PE=1 SV=1	1.2345679
P01766	Ig重链V-III区BRO OS=智人PE=1 SV=1	2.46875
P01598	Igκ链V-I区EU OS=智人PE=1 SV=1	3.829787234
P02787	血清转铁蛋白OS=智人GN=TF PE=1 SV=3	ND
P04003	C4b-结合蛋白α链OS=智人GN=C4BPA PE=1 SV=2	1.527777778
P01591	免疫球蛋白J链OS=智人GN=IGJ PE=1 SV=4	2.716049383
P01619	Igκ链V-III区B6 OS=智人PE=1 SV=1	2.611111111
P02747	补体C1q亚组分亚基OS=智人GN=C1QC PE=1 SV=3	2.529411765
P02790	血红素结合蛋白OS=智人GN=HPX PE=1 SV=2	30.71428571
P05452	四连接素OS=智人GN=CLEC3B PE=1 SV=3	ND
P80748	Igλ链V-III区LOI OS=智人PE=1 SV=1	ND
P01717	Igλ链V-IV区Hil OS=智人PE=1 SV=1	2.142857143
P49908	硒蛋白P OS=智人GN=SEPP1 PE=1 SV=3	ND
P01714	Igλ链V-III区SH OS=智人PE=1 SV=1	ND
P01625	Igκ链V-IV区Len OS=智人PE=1 SV=2	5
Q9BSK4	蛋白质fem-1同系物A OS=智人GN=FEM1A PE=1 SV=1	0.264285714
K7ER74	蛋白质APOC4-APOC2 OS=智人GN=APOC4-APOC2 PE=2 SV=1	ND
P02743	血清淀粉样蛋白P组分OS=智人GN=APCS PE=1 SV=2	ND
P08603	补体因子H OS=智人GN=CFH PE=1 SV=4	ND
P02746	补体C1q亚组分亚基B OS=智人GN=C1QB PE=1 SV=3	ND
B4E1Z4	补体因子B OS=智人GN=CFB PE=2 SV=1	ND
P01597	Igκ链V-I区DEE OS=智人PE=1 SV=1	2.989690722
V9GYM3	载脂蛋白A-II OS=智人GN=APOA2 PE=4 SV=1	ND
P01774	Ig重链V-III区POM OS=智人PE=1 SV=1	2.636363636
P01019	血管紧张素原OS=智人GN=AGT PE=1 SV=1	ND
S4R460	未表征蛋白OS=智人PE=4 SV=1	ND
P19652	α-1-酸性糖蛋白2 OS=智人GN=ORM2 PE=1 SV=2	ND
P22352	谷胱甘肽过氧化物酶3 OS=智人GN=GPX3 PE=1 SV=2	2.741935484
J3KPZ1	粒状头样蛋白1同系物OS=智人GN=GRHL1 PE=2 SV=1	ND

[0727]

P02749	β -2糖蛋白1 OS=智人GN=APOH PE=1 SV=3	3.428571429
P01008	抗凝血酶-III OS=智人GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	ND
P10720	血小板因子4变体OS=智人GN=PF4V1 PE=1 SV=1	0.9375
Q8IWC1	含MAP7结构域蛋白3 OS=智人GN=MAP7D3 PE=1 SV=2	ND
P02774-3	维生素D结合蛋白的同种型3 OS=智人GN=GC	ND
P02649	载脂蛋白E OS=智人GN=APOE PE=1 SV=1	1.909091
P01042	激肽原-1 OS=智人GN=KNG1 PE=1 SV=2	0.418919
P01621	Ig κ 链V-III区NG9（片段）OS=智人PE=1 SV=1	ND
P01023	α -2巨球蛋白OS=智人GN=A2M PE=1 SV=3	ND
P04114	载脂蛋白B-100 OS=智人GN=APOB PE=1 SV=2	ND
P02654	载脂蛋白C-I OS=智人GN=APOC1 PE=1 SV=1	2
Q92945	远上游元件结合蛋白2 OS=智人GN=KHSRP PE=1 SV=4	ND

[0728] *ND指示在对照组中未检测到蛋白质。

[0729] 表7:结合AAV9用于增加血管通透性的潜在血清蛋白质

[0730]

登录	描述	增加倍数
P02671	纤维蛋白原 α 链OS=智人GN=FGA PE=1 SV=2	4.945652
P02675	纤维蛋白原 β 链OS=智人GN=FGB PE=1 SV=2	4.974026
P02679	纤维蛋白原 γ 链OS=智人GN=FGG PE=1 SV=3	4.853614
C9JU00	纤维蛋白原 γ 链（片段）OS=智人GN=FGG PE=2 SV=1	8.362319
P02751	纤连蛋白OS=智人GN=FN1 PE=1 SV=4	5.405263
P00747	纤溶酶原OS=智人GN=PLG PE=1 SV=2	3.232278
P04275	血管性血友病因子OS=智人GN=VWF PE=1 SV=4	ND*
P19652	α -1-酸性糖蛋白2 OS=智人GN=ORM2 PE=1 SV=2	ND
P10720	血小板因子4变体OS=智人GN=PF4V1 PE=1 SV=1	1.466667

[0731] *ND指示在对照组中未检测到蛋白质。

[0732] 表8:

[0733]

A20 稀释度							
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
25% HSA	1	<1%	<1%	<1%	<1%	3%	62.83%
	1:5	<1%	<1%	<1%	<1%	4.7%	63.35%
	1:50	<1%	<1%	<1%	<1%	4.7%	56.23%
	1:500	<1%	<1%	<1%	<1%	7.5%	57.92%
	PBS	<1%	<1%	<1.7%	<7.3%	22%	52.37%

[0734] 表9:VIPR对体内抗原呈递的作用

[0735]

	293/GFP	293/GFP + OT-1	293/ICP47	293/ICP47 + OT-1
肿瘤形成	6/6	0/6	4/4	4/4
肿瘤大小 (cm ³)	0.545±0.139	0	0.612±0.198	0.483±0.157

[0736] 表10:关于三倍体病毒AAV2/8的中和抗体滴度和交叉反应性

[0737]

载体									
		AAV2	单倍体病毒 AAV2/8			混合物病毒 AAV2 和 AAV8			AAV8
			3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	
mAb	A20	512	2048	32	<2	ND	ND	ND	<2
	ADK8	<2	512	512	1024	ND	ND	ND	1024
血清	AAV2	4096	1024	256	8	4096	2048	1024	<2
	AAV8	<2	256	256	512	<2	<2	<2	512

[0738] 表11:关于单倍体病毒AAV2/8/9的中和抗体滴度和交叉反应性

[0739]

	AAV2	AAV8	AAV9	AAV2/9	AAV8/9	AAV2/8/9
血清 AAV2	>2048	<2		512		128
血清 AAV8	<2	128			32	4
血清 AAV9	<2	16	2048	512		256
血清 AAV2/8/9	8	128	128	64	512	128

序列

AAV1 (SEQ ID NO:138)

[0740]

```
1 ctctccccc tctcgcgttc gctcgcctgc tggctcgttt gggggggtgg cagctcaaag
61 agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa
121 cgcgacaggg gggagagtgc cacacttca agcaaggagg tttgtaagt ggtgatgtca
181 tatagtgtc acgcgatagt taatgattaa cagtcagggtg atgtgtgtta tccaatagga
241 tgaagcgcg cgcatgagtt ctgcgagac ttccggggta taaaggggtg agtgaacgag
301 cccgcgcga ttctctgctc tgaactgcta gaggaccctc gctgccatgg ctaccttcta
361 cgaagtcat tttcgcgtcc catitgacgt ggaggaacat ctgcctggaa ttctgacag
421 ctttgtggac tgggtaactg gtcaaatttg ggagctgcct cccgagtcag atttgaattt
481 gactctgatt gagcagcctc agctgacggt tctgacaga attcgcgcg tttcctgta
541 cgagtggaa aaatttcca agcaggaatc caaattctt gtgcagttg aaaagggatc
601 tgaatattt catctgcaca cgcttggtga gacctcggc atctctcca tggctcagg
661 ccgctacgtg agtcagatc gcgccagct ggtgaaagt gtcttcagg gaatcgagcc
721 acagatcaac gactgggtcg ccatcacaa ggtaaagaag ggcggagcca ataagtggt
781 ggattctggg tatattccg cctacctgt gccgaagtc caaccggagc ttcatgggc
841 gtggacaaac ctggacgagt ataatggc cgccctgaac ctggaggagc gcaaaggct
901 cgtcgcgag ttctggcag aatctcgcg gcgtcgcag gaggcggct cgcagcgtga
961 gttctcggt gaccgggtca taaaagcaa gacttccag aaatacatg gcctcgtca
1021 ctggtcgtg gagcagggca tcacttcca gaagcagtg atccaggaga atcaggagag
1081 ctacctctc ttcaactcca cgggcaactc tggagccaa atcaaggccg cgtcgcgaa
1141 cgcgacaaa atcatgagtc tgacaaaaag cgcggtggac tacctcgtg ggagctcgt
1201 tcccgaggac attcaaaaa acagaatctg gcaaatttt gagatgaac gctacgacc
1261 ggctacgcg ggatccatcc tctacggctg gtgtcagcgc tcttcaaca agaggaaac
1321 cgtctggctc tacggaccg ccacgaccg caagaccaac atcgcggagg ccatcgccca
1381 cactgtgcc tttacggct gctgaactg gaccaatga aacttccct ttaatgactg
1441 tgtggacaaa atgctcattt ggtgggagga gggaaagatg accaacaagg tggttgaatc
1501 cgccaaggcc atctggggg gctccaaggt cggggtcgat cagaaatga aatcctctg
1561 tcaaattgat tctaccccg tcatgtaac ttcaataca aacatgtgtg tgggtgtga
1621 tgggaattcc acgaccttg aacaccagca gccgtggag gaccgcatg tcaaattga
1681 actgactaag cggctccgc cagattttg caagattact aagcaggaag tcaaagactt
1741 tttgcttg gcaaaggta atcaggtgcc ggtgactcac gagtttaaag tcccaggga
1801 attggcgga actaaaggg cgagaaatc tctaaacgc cactgggtg acgtcacaa
1861 tactagctat aaaagtccag agaagcggc cggctctca ttgttccg agacgcctc
1921 cagttcagac gtgactgtc atccgctcc tctgcgacc ctcaattgga attcaaggta
1981 tgattgcaa tgtgaccatc atgtcaatt tgacaacatt tctgacaaat gtgatgaatg
2041 tgaatattg aatcggggca aaaatggatg tatctgtcac aatgtaact actgtcaat
2101 ttgtcacggg attccccct gggagaagga aaactgtca gattttggg attttgacga
2161 tgccaataa gaacagtaaa taaagcgagt agtcatgtct tttgtgatc accctccaga
2221 ttggttgaa gaagtgtgtg aaggtcttcg cgagttttg ggccttgaag cgggcccacc
2281 gaaaccgaaa ccaatcagc agcatcaaga tcaagcccgt ggtcttgtc tgcctggta
2341 taactatctc ggaccggga acggtctcga tggaggagag cctgtcaaca ggcagacga
2401 ggtcgcgga gagcagaca tctgtacaa cgagcagctt gagcgggag acaacccta
2461 cctcaagtac aaccacgag acgcgagtt tcaggagaag ctgcgcgac acacatcctt
2521 cgggggaaac ctggaaagg cagtcttca ggccaagaaa agggttctc aacttttgg
2581 cctggttgaa gaggtgtcta agacggcccc taccggaaag cggatagac accactttc
2641 aaaaagaaag aaggctcgga ccgaagagga ctccaagcct tccacctgt cagacgccga
2701 agctggacc agcgatccc agcagctga aatccagca caaccagcct caagtttggg
```

[0741]

2761 agctgataca atgtctgcgg gaggtggcgg ccattgggc gacaataacc aaggtgccga
2821 tggagtgggc aatgcctcgg gagattggca ttgcattcc acgtggatgg gggacagagt
2881 cgtaccaag tccaccgca cctgggtgct gcccagctac aacaaccacc agtaccgaga
2941 gatcaaaagc ggctccgtcg acggaagcaa cgccaacgcc tactttggat acagaccccc
3001 ctgggggtac ttgacttta accgcttcca cagccactgg agccccgag actggcaaag
3061 actcatcaac aactattggg gcttcagacc ccggtctctc agagtcaaaa tcttcaacat
3121 ccaagtcaaa gaggtcacgg tgcaggactc caccaccacc atcgccaaca acctcacctc
3181 caccgtccaa gtgtttacgg acgacgacta ccaactcccg tacgtcgtcg gcaacgggac
3241 cgaggggatgc ctgccggcct tcccccgca ggtctttacg ctgccgcagt acggctacgc
3301 gacgtgaac cgagacaacg gagacaacc gacagagcgg agcagcttct ttgcctaga
3361 gtactttccc agcaagatgc tgaggacggg caacaacttt gagttacct acagcttga
3421 agaggtgccc ttccactgca gcttcgcccc gagccagaac ctctttaagc tggccaacc
3481 gctgttgac cagtacgtgt accgcttctg gagcacctcg gccacgggcg ccatccagtt
3541 ccaaaagAAC ctggcgggca gatacgcaa cactacaaa aactggttcc cggggcccat
3601 gggccgaacc cagggctgga acacgagctc tggcagcagc accaacagag tcagcgtcaa
3661 caacttttc gtctcaaac ggatgaacct ggaggggggc agctaccaag tgaacccca
3721 gccaacggg atgacaaaca cgctcaagg cagcaaccgc tacgcgttg aaaacaccat
3781 gatcttcaac gtcaaaacg ccacgcccgg aactacctcg gtgtaccag aggacaatct
3841 actgtgacc agegagagcg agactcagcc cgtcaaccgg gtggcttaca acacgggcgg
3901 tcagatggcc accaacgccc agaacgccac cagggtccc acggtcggga cctacaacct
3961 ccaggaagtg ctctctggca gcgtatggat ggagagggac gtgtacctc aaggacctat
4021 ctgggccaaag atcccagaga cgggggcgca ctttaccccc tctccggcca tgggcggatt
4081 cggactcaaa caccgcccgc ccatgatgt catcaaaaac acgccggtgc ccggcaacat
4141 caccagcttc tggacgtgc ccgtcagcag cttcatcacc cagtacagca ccgggcaggt
4201 caccgtggag atggaatggg agctcaaaaa ggaaaactcc aagaggtgga accagagat
4261 ccagtacacc aacaactaca acgaccccca gtttgtggac ttgtctccag acggctccgg
4321 cgaatacaga accaccagag ccatcggaac ccgatactc acccgacccc ttaacccat
4381 tcatgtcgca taccctcaat aaaccgtgta ttctgtcag tgaaatactg cctcttgtg
4441 tcattcaatg aacatcagct tacaacatct acaaaacccc ctgtcttgag agtgtggcac
4501 tctccccct gtcggttcg ctgcctcgt ggctcgttg ggggggtggc agtcaaaaga
4561 gctgccagac gacggccctc tggcgtcgc cccccaaac gagccagcga gcgagcgaac
4621 gcgacagggg ggagag

AAV2 (SEQ ID NO:139)

1 ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc
61 cgacgcccgg gctttgcccg ggccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg
121 gccaaactca tctactgggg ttcttgagg ggtggagtcg tgactggaat tacgtcatag
181 ggttagggag gtctgtatt agaggtcacg tgagtgttt gcgacattt gcgacacat
241 gtggtcacgc tgggtattta agcccagtg agcacgcagg gtctccatt tgaagcggga
301 ggtttgaacg cgcagccgcc atgccgggt ttacagagat tgtgattaag gtccccagcg
361 accttgacga gcactgccc ggcatcttg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg
421 aatgggagtt gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga
481 ccgtggccga gaagctgcag cgcgacttgc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc
541 cggaggccct ttctttgtg caatttgaga agggagagag ctactccac atgcacgtgc
601 tcgtggaaac caccgggggtg aaatccatgg tttgggacg ttcttgagt cagattcgcg
661 aaaaactgat tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac ttgccaac tggttcgagg
721 tcacaaagac cagaaatggc gccggaggcg ggaacaagg ggtggatgag tgctacatcc
781 ccaattactt gtccccaaa acccagcctg agctccagt ggctgggact aatatggaac
841 agtatttaag gcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttgggtggc cagcatctga
901 cgcacgtgtc gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcg
961 cgtgatcag atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctgggaca
1021 aggggattac ctgggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatc atctcctca
1081 atcgggcctc caactcgagg tcccaaatca aggtgcctt ggacaatgc ggaagatta
1141 tgagcctgac taaaaccgcc ccgactacc tgggtggcca gcagcccggt gaggacattt
1201 ccagcaatcg gatttataaa atttggaaac taaacgggt cagatcccaa tatgcggctt
1261 ccgtctttct gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg
1321 ggctgcaac taccgggaag accaaccatc cggaggccat agccacact gtgccttct
1381 acgggtgcgt aaactggacc aatgagaact ttccctcaa cgactgtgtc gacaagatgg
1441 tgatctgggt ggaggagggg aagatgaccg ccaaggctgt ggagtcggcc aaagccatc
1501 tcggagggaag caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctggcccag atagaccgga
1561 ctccgtgat cgtacctcc aacaccaaca tgtgcgcctt gattgacggg aactcaacga
1621 ccttgaaca ccagcagccg ttcaagacc ggatgttcaa attgaactc accgcctgc
1681 tggatcatga ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cgttgggcaa
1741 aggatcacgt ggttgagggt gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccagaaaa
1801 gaccgcccc cagtacgca gatataagt agcccaaacg ggtgcgcgag tcagtgcgc
1861 agccatgac gtcagacgcg gaagcttga tcaactacgc agacaggtag caaaacaaat
1921 gttctcgtca cgtgggcatg aatctgatgc tgttccctg cagacaatgc gagagaatga
1981 atcagaatc aaatatctgc tctactacg gacagaaaga ctgttagag tgcttcccg
2041 tgtcagaatc tcaaccgtt tctgtcgtc aaaaggcgtc tcagaaactg tgctacatc
2101 atcatatcat gggaaagggt ccagacgctt gactgcctg cgatctgtc aatgtggat
2161 tggatgactg catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat
2221 ctccagatt ggtcagagg cactctctc gaaggaataa gacagtgtg gaagctcaa
2281 cctggcccac caccacaaa gcccgagag cggcataagg acgacagcag ggtcttctg
2341 ctctctgggt acaagtacct cggaccctc aacggactc acaaggaga gccgtcaac
2401 gaggcagac cgcgggccct cgagcacgac aaagcctac accggcagct cgacagcga
2461 gacaaccgt acctcaagta caaccacgc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaagaa
2521 gatactctt ttgggggcaa ctcggacga gcagcttcc aggcgaaaaa gaggttctt
2581 gaacctctg gcctggtga ggaacctgt aagacggctc cgggaaaaa gaggcggta
2641 gagcactct ctgtggagcc agactctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagct
2701 gcaagaaaa gattgaattt tggcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccag
2761 cctctcggac agccaccagc agcccctct ggtctggga ctaatacga ggtacaggc
2821 agtggcgac caatggcaga caataacgag ggcgcgcagc gattgggtaa ttctcggga

[0742]

[0743]

2881 aattggcatt gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag caccgaacc
2941 tgggccctgc ccacctacaa caaccacctc tacaacaaa ttccagcca atcaggagcc
3001 tcgaacgaca atcactactt tggctacage accccttggg ggtatttga cttaacaga
3061 ttccactgcc actttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaacaa ctggggattc
3121 cgaccaaga gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaagaggt cagcagaat
3181 gacggtacga cgacgattgc caataacctt accagcacgg ttcaggtgtt tactgactcg
3241 gagtaccage tcccgtactg cctcggtctg gcgcataag gatgectccc gccgttccca
3301 gcagacgtct tcatggtgcc acagtatgga tacctcacc tgaacaacgg gagtcaggca
3361 gtaggacgtct ctctatttta ctgcctggag tactttcctt ctcatgctt ggcgtaccga
3421 aacaacttta cttcagcta cactttttag gacgttctt tccacagcag ctacgtcac
3481 agccagagtc tggaccgtct catgaatcct ctcatgacc agtacctgta ttacttgagc
3541 agaacaacaa ctccaagtgg aaccaccaag cagtcaaggc ttcagtttcc tcaggccgga
3601 gcgagtgaca ttcgggacca gtctaggaac tggcttctg gaccctgtta ccgccagcag
3661 cgagtatcaa agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc
3721 aagtaccacc tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccgcccat ggcaagccac
3781 aaggacgatg aagaaaagtt ttctctcag agcgggggtc tcatcttgg gaagcaaggc
3841 tcagagaaaa caaatgtgga cattgaaaag gtcattgata cagacgaaga ggaaatcagg
3901 acaaccaatc ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc
3961 aacagacaag cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttcagg catggtctgg
4021 caggacagag atgtgtacct tcagggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga
4081 catttcacc cctctccct catgggtgga ttggactta aacaccctcc tccacagatt
4141 ctcatcaaga acaccccggt acctgcgaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt
4201 gcttcttca tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg
4261 cagaaggaaa acagcaaacg ctggaatccc gaaattcagt acattccaa ctacaacaag
4321 tctgttaatg tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt
4381 ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa ttgcttgta atcaataaac cgtttaattc
4441 gtttcagttg aactttggtc tctgcgtatt tctttctat ctagtcca tggctacgta
4501 gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgtat ggagttggcc
4561 actccctctc tgcgcgtctg ctgcctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccagcgc
4621 ccgggctttg cccgggcggc ctcatgagc gagegagcgc gcagagaggg agtggccaa

AAV3 (SEQ ID NO:140)

1 ttggccactc cctctatgcg cactcgtcg ctcgggtggg cctggcgacc aaaggtcgcc
61 agacggacgt gctttgcacg tccggcccca ccgagcgagc gagtgcgcat agagggagtg
121 gccaaactca tctactagagg tatggcagtg acgtaacgag aagcgcgcga agcgagacca
181 cgcctaccag ctgcgtcagc agtcaggatga ccttttgcg acagtttgcg acaccacgtg
241 gccgctgagg gtatatattc tcgagtgcg gaaccaggag ctccatttg acccgcaaat
301 ttgaacgagc agcagccatg ccgggggtct acgagattgt cctgaaggtc ccgagtgcac
361 tggacgagcg cctgccgggc atttctaact cgtttgtaa ctgggtggcc gagaaggaat
421 gggacgtgcc gccggattct gacatggatc cgaatctgat tgagcaggca cccctgaccg
481 tggccgaaaa gcttcagcgc gagttcctgg tggagtggcg ccgctgagt aagggcccg
541 agggcctctt tttgtccag ttcgaaaagg gggagacctt ctccacctg cactgtctga
601 ttgagaccat cgggggtcaaa tccatggtgg tggccgcta cgtgagccag attaaagaga
661 agctggtgac ccgcatctac ccgggggtcg agccgcagct tccgaactgg ttcgctgga
721 ccaaaacgag aatggcgcc gggggcgagg acaaggtggt ggacgactgc tacatccca
781 actacgtct cccaagacc cagcccgagc tccagtgggc gtgactaac atggaccagt
841 atttaagcgc ctgttgaat ctgcgggagc gtaaacggct ggtggcgag catctgacgc
901 acgtgtcgca gacgcaggag cagaacaaag agaactagaa cccaattct gacgcgccc
961 tcatcaggtc aaaaacctca gccaggatca tggagctggt cgggtggctg gtggaccgag
1021 ggatcacgtc agaaaagcaa tggattcagg aggaccaggc ctctacac tccttcaacg
1081 ccgctcccaa ctgcgggtcc cagatcaagg ccgctgtgga caatgcctcc aagatcatga
1141 gctgacaaa gacggctccg gactacctgg tggcagcaa ccgcccggag gacattacca
1201 aaaatcgat ctacaaatc ctggagctga acgggtacga tccgcagtac gcggcctccg
1261 tcttctggg ctggcgcaa aagaagtgc ggaagaggaa caccatctgg ctcttgggc
1321 cggccacgac ggttaaaacc aacatcgcg aagccatgc ccacgcccgt ccttctacg
1381 gctgcgtaaa ctggaccaat gagaacttct cttcaacga ttgcgtgac aagatggtga
1441 tctggtggga ggagggaag atgacggcca aggtcgtgga gagcgcaag gccattctgg
1501 gcggaagcaa ggtgcgcgtg gacaaaagt gcaagtacg ggcccagatc gaaccactc
1561 ccgtgatcgt cactccaac accaactgt gcgcgtgat tgacgggaac agcaccacct
1621 tcgagcatca gcagccgtg caggaccgga tgtttgaat tgaacttacc cgcgcttgg
1681 accatgactt tgggaagtc accaaacagg aagtaagga ctttccgg tgggttccg
1741 atcacgtgac tgacgtggt catgagtct acgtcagaaa ggttgagct aagaaacgcc
1801 ccgctcccaa tgacgggat gtaagcgagc caaacggga gtgcacgtca ctgcgcagc
1861 cgacaacgtc agacgggaa gcaccggcg actacggga caggatccaa acaaatgtt
1921 ctgctacgt gggcatgaat ctgatcttt ttccctgtaa aacatgcgag agaatgaatc
1981 aaatttcaa tgtctgttt acgcatggtc aaagagactg tgggaatgc ttccctggaa
2041 tgtcagaatc tcaaccgtt tctgtctca aaaagaagac ttatcagaaa ctgtgtccaa
2101 ttcatcatat cctgggaagg gcacccgaga ttgcctgttc ggctgcgat ttggccaatg
2161 tggacttggg tgactgtgt tctgagcaat aatgactta aaccaggtat ggctgctgac
2221 ggttatcttc cagattggt caggacaac cttctgaag gactcgtga gtggtgggt
2281 ctgaaacctg gactccctca accaaagcg aaccaaac accaggacaa ccgtcgggt
2341 cttgtgttc cgggttaca atacctgga ccggtaacg gactgacaa aggagagccg
2401 gtcaacgagg cggacgcggc agccctcga cagacaaaag ctacgacca gcagctcaag
2461 gccggtgaca accgtacct caagtacaac cagccgagc ccgagtttca ggagcgtctt
2521 caagaagata cgtcttttg gggcaacctt ggacagagc tctccaggc caaaaagagg
2581 atccttgagc ctcttggtc ggttgaggaa gcagctaaaa ccgtcctgg aaagaagggg
2641 gctgtagatc agtctctca ggaaccggac tcatcatctg gtgttgcaa atcgggcaaa
2701 cagctgcca gaaaagact aaattcggc cagactggag actcagagtc agtccagac
2761 cctcaacctc tcggagaacc accagcagc ccacaagt ttggatctaa tacaatggct
2821 tcaggcgggt gcgcaccaat ggcagacaat aacgagggtg ccgatggagt gggtaattcc

[0744]

[0745]

2881 tcaggaaatt ggcatgcca ttccaatgg ctggcgaca gagtcacac caccagcacc
2941 agaacctggg cctgcccac ttacaacaac catctctaca agcaaatctc cagccaatca
3001 ggagcttcaa acgacaacca ctacttggc tacagcacc cttgggggta tttgacttt
3061 aacagattcc actgccactt ctaccacgt gactggcagc gactcattaa caacaactgg
3121 ggattccggc ccaagaaact cagcttcaag ctcttcaaca tccaagttag aggggtcacg
3181 cagaacgatg gcacgacgac tattgccaat aaccttacca gcacgggtca agtggttacg
3241 gactcggagt atcagctccc gtacgtgctc gggtcggcgc accaaggctg tctcccgccg
3301 ttccagcgg acgtctcat ggtccctcag tatggatacc tcacctgaa caacggaagt
3361 caagcgggtg gacgtctatc cttttactgc ctggagtact tcccttcgca gatgctaagg
3421 actggaata acttcaatt cagctatacc ttgaggatg tacctttca cagcagctac
3481 gctcacagcc agagtttga tcgcttgatg aatctctta ttgatcagta tctgtactac
3541 ctgaacagaa cgcaaggaac aacctctgga acaaccaacc aatcacggct gctttttage
3601 caggctgggc ctgagtctat gtcttgcag gccagaaatt ggctacctgg gccctgctac
3661 cggcaacaga gacttcaaa gactgtaac gacaacaaca acagtaactt tcttggaca
3721 gcggccagca aatatcatct caatggcgcg cactcgtctg tgaatccagg accagctatg
3781 gccagtcaca aggacgatga agaaaaattt ttccctatgc acggcaatct aatatttggc
3841 aaagaaggga caacggcaag taacgcagaa ttagataatg taatgattac ggatgaagaa
3901 gagattcgta ccaccaatcc tgtggcaaca gagcagtatg gaactgtggc aaataacttg
3961 cagagctcaa atacagctcc cagcactgga actgtcaatc atcagggggc cttacctggc
4021 atgggtggc aagatcgtga cgtgtacct caaggaccta tctgggcaaa gattcctac
4081 acggatggac acttcatcc ttctctctg atgggaggct ttggactgaa acatccgct
4141 cctcaaatca tgatcaaaaa tactccggtc ccggcaaatc ctccgacgac ttccagcccg
4201 gccagtttg cttcatttat cactcagtac tccactggac aggtcagcgt ggaaattgag
4261 tgggagctac agaaagaaaa cagcaaacgt tggaatccag agattcagta cacttcaac
4321 tacaacaagt ctgttaatgt ggactttact gtagaccta atggtgttta tagtgaacct
4381 cgccctattg gaaccgggta tctcacagca aacttgtgaa tcttggttaa tcaataaacc
4441 gtttaattcg tticagtga actttggctc ttgtgcaact ctttatcttt atctgtttc
4501 catggctact gcgtagataa gcagcggcct gcggcgcttg cgcttcgagg tttaactg
4561 ctggttaata tttaactctc gccatactc tagtgatgga gttggccact ccctctatgc
4621 gcactcgtc gctcgggtgg gcctggcgac caaaggctgc cagacggacg tgctttgcac
4681 gtccggcccc accgagcgag cgagtgcgca tagagggagt ggccaa

AAV4 (SEQ ID NO:141)

1 ttggccactc cctctatgcg cgctcgctca ctactcggc cctggagacc aaaggtctcc
61 agactgccgg cctctggccg gcagggccga gtgagtgagc gagcgcgcat agagggagtg
121 gccactcca tcatctaggt ttgccactg acgtcaatgt gacgtcctag ggtagggag
181 gtccctgtat tagcagtcac gtgagtgtcg tatttcgagg agcgtagcgg agcgcatacc
241 aagctgccac gtcacagcca cgtggctcgt ttgcgacagt ttgcgacacc atgtgtgtag
301 gagggatatat aaccgcgagt gagccagcga ggagctccat ttgcccgcg aatttgaac
361 gagcagcagc catgccgggg ttctacgaga tcgtgtgtaa ggtgccagc gacctggagc
421 agcacctgcc cggcatttct gactctttt tgagctgggt ggccgagaag gaatgggagc
481 tgccgcccga ttctgacatg gacttgaatc tgattgagca ggcacccctg accgtggccg
541 aaaagctgca acgcgagttc ctggctgagt ggccgcccgt gagtaaggcc ccggaggccc
601 tcttctttgt ccagttcgag aagggggaca gctactcca cctgcacatc ctggtggaga
661 ccgtgggctg caaatccatg gtgggtgggc gctacgtgag ccagattaaa gagaagctgg
721 tgacccgcat ctaccgccc gtcgagccgc agcttccgaa ctggttcgag gtgaccaaga
781 cgcgtaatgg cgccggaggc gggaacaagg ttgtggacga ctgctacatc cccaactacc
841 tgctcccaa gacccagccc gagctccagt gggcgtggac taacatggac cagtataaa
901 ggcctgttt gaatctcgcg gagcgtaaac ggctgggtgc gcagcatctg acgcacgtgt
961 cgcagacgca ggagcagaac aaggaaaacc agaaccceaa ttctgacgag ccggtcatca
1021 ggtcaaaaac ctccgccagg tacatggagc tggctgggtg gctggtggac cgccggatca
1081 cgtcagaaaa gcaatggatc caggaggacc aggcgtccta catctcttc aacgccgct
1141 ccaactcgcg gtcacaaatc aaggccgccc tggacaatgc ctccaaaatc atgagcctga
1201 caaagacggc tccgactac ctggtgggc agaaccgcc ggaggacatt tccagcaacc
1261 gcactacccg aatctcgag atgaacgggt acgatccgca gtacgccc tccgtcttc
1321 tgggtgggc gcaaaagaag ttccggaaga ggaacacat ctggctcttt gggccggcca
1381 cgacgggtaa aaccaatc gcggaagcca tcgccacgc cgtgcccttc tacggtcg
1441 tgaactggac caatgagaac ttccgttca acgattgcgt cgacaagatg gtgatctgt
1501 gggaggaggc caagatgagc gccaggtcg tagagagcgc caaggccatc ctggcgga
1561 gcaaggtgag cgtggacca aagtcaagt catcgccca gatcgacca actccgtga
1621 tctcactc caacaccaac atgtgcgag tcactgacgg aaactcgacc acctcgagc
1681 accaacaacc actccaggac cggatgttca agttcgagct caccaagcgc ctggagcag
1741 actttggcaa ggtcaccaag caggaagtca aagactttt ccggtgggag tcagatcacg
1801 tgaccgaggt gactcacgag ttctacgta gaaagggtgg agctagaaag aggcccgccc
1861 ccaatgacgc agatataagt gagcccaagc gggcctgtcc gtcagttgag cagccatga
1921 cgtcagacgc ggaagctccg gtggactacg cggacaggtc ccaaaacaaa tgttctcgt
1981 acgtgggtat gaatctgatg cttttccct gccggcaatg cgagagaatg aatcagaatg
2041 tggacatttg cttcacgcac ggggtcatgg actgtccga gtgttcccc gtgtcagaat
2101 ctcaaccgt gtctgtcgc agaaagcgga cgtatcagaa actgtgtccg attcatcaca
2161 tcatggggag ggcgcccgag gtggcctgct cggcctgca actggccaat gtggacttg
2221 atgactgtga catggaacaa taaatgactc aaaccagata tgactgacgg ttacctcca
2281 gattggctag aggacaacct ctctgaagc gttcgagagt ggtggcgct gcaacctgga
2341 gccctaaac ccaaggcaaa tcaacaacat caggacaacg ctgggggtct tgtgtctccg
2401 ggttacaat acctcgacc cggcaacgga ctgcacaagg gggaaccctg caacgcagcg
2461 gacgcccag cctcgagca cgacaaggc tacgaccagc agctcaaggc cgtgacaac
2521 ccctacctca agtacaacca cggcagcgc gattccagc agcggttca gggcgacaca
2581 tegtgtggg gcaacctcgg cagagcagtc ttccaggcca aaaagagggt tcttgaacct
2641 cttgtgtgg ttgagcaagc ggggtgagag gctcctggaa agaagagacc gttgattgaa
2701 tccccagc agcccagctc ctccacgggt atcgcaaaa aaggcaagca gccggctaaa
2761 aagaagctcg ttctgaaga cgaaactgga gcaggcgacg gacccctga gggatcaact
2821 tccggagcca tgtctgatga cagtgatag cgtgcagcag ctggcgagc tgcagtcgag

[0746]

[0747]

2881 ggccggacaag gtgccgatgg agtgggtaat gcctcgggtg attggcattg cgattccacc
2941 tggctgagg gccacgtcac gaccaccagc accagaacct gggcttggcc cacctacaac
3001 aaccacctct acaagcgact cggagagagc ctgcagtcca acacctaca cggattctcc
3061 accccctggg gatacttga cttcaaccgc ttcactgcc acttctacc acgtgactgg
3121 cagcgactca tcaacaacaa ctggggcatg cgacccaaag ccatgcgggt caaaatcttc
3181 aacatccagg tcaaggaggt cagcagctcg aacggcgaga caacggtggc taataacctt
3241 accagcacgg ttcagatctt tgcggactcg tcgtacgaac tgcctacgt gatggtgag
3301 ggtaagagg gcagcctgcc tcttttccc aacgacgtct ttatggtgcc ccagtacggc
3361 tactgtggac tggtgaccgg caacacttcg cagcaacaga ctgacagaaa tgccttctac
3421 tgcttgaggt actttccttc gcagatgctg cggactggca acaacttga aattacgtac
3481 agttttgaga aggtgccctt cactcgatg tacgcgcaca gccagagcct ggaccggctg
3541 atgaaccctc tcatcgacca gtacctgtgg ggactgcaat cgaccaccac cggaaccacc
3601 ctgaatgccg ggactgccac caccaacttt accaagctgc ggcctacca cttttcaac
3661 tttaaaaaga actggctgcc cgggccttca atcaagcagc agggcttctc aaagactgcc
3721 aatcaaaaact acaagatccc tgccaccggg tcagacagtc tcatcaata cgagacgca
3781 agcactctgg acggaagatg gactgccctg acccccgga cccaatggc caggctgga
3841 cctgcggaca gcaagttcag caacagccag ctcatcttg cggggcctaa acagaacggc
3901 aacacggcca cgtaccggg gactcigatc ttacctctg aggaggagct ggcagccacc
3961 aacgccaccg atacggacat gtggggcaac ctacctggcg gtgaccagag caacagcaac
4021 ctgccgaccg tggacagact gacagccttg ggagccgtgc ctggaatggt ctggcaaac
4081 agagacattt actaccaggg tccatttgg gccagattc ctcataccga tggacattt
4141 caccctcac cgtgatttgg tgggtttggg ctgaaacacc cgcctctca aattttatc
4201 aagaacaccc cgttacctgc gaatcctgca acgacctca gcttactcc ggtaaactcc
4261 ttcattactc agtacagcac tggccagggt tcggtgcaga ttgactggga gatccagaag
4321 gageggtcca aacgctggaa ccccgagggt cagtttacct ccaactacgg acagcaaac
4381 tctctgtgtg gggctcccga tgcggctggg aaataactg agcctagggtc tatcggtacc
4441 cgtacctca cccaccacct gtaataacct gttatcaat aaaccggtt attcgttca
4501 gttgaacttt ggtctcctg tcttcttat ctatctctg ttcatggct actgcgtaca
4561 taagcagcgg cctgcggcgc ttgcgtctcg cggtttaca ctgccggtta atcagtaact
4621 tctggcaaac cagatgatgg agttggccac attagctatg cgcgctcgct cactcactg
4681 gccttgaga ccaaaggctt ccagactgcc ggcctctggc cggcagggcc gactgagtga
4741 gcgagcgcgc atagaggag tggccaa

AAV5 (SEQ ID NO:142)

1 ctctccccc tctcgcgttc gctcgcctgc tggctcgttt ggggggggtgg cagctcaaaag
61 agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa
121 cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggggg ttttgaagc agtgatgtca
181 taatgatgta atgcttattg tcacgcgata gttaatgatt aacagtcag tgatgtgttt
241 tatccaatag gaagaaagcg cgcgtatgag ttctcgcgag acttccgggg tataaaagac
301 cgagtgaacg agcccgccgc cattctttgc tctggactgc tagaggacce tctgtgccat
361 ggctaccttc tatgaagtca ttgttcgct cccatttgac gtggaggaaac atctgcctgg
421 aattttgac agctttgtgg actgggtaac tggtaaat tgggagctgc ctccagagtc
481 agatttaaat ttgactctgg ttgaacagcc tcagttgacg gtggctgata gaattcgccg
541 cgtgttctcg tacgagtggg acaaatcttc caagcaggag tccaaattct ttgtgcagtt
601 tgaagaggga tctgaatatt ttcatctgca cagcttgtg gagacctccg gcatctcttc
661 catgttcttc ggccgctacg tgagtcagat tgcgcccag ctggtgaaag tggcttcca
721 gggaattgaa cccagatca acgactgggt cgcctacc accggtaaaga agggcgaggc
781 caataagtg gtgattctg ggtatattcc cgcctacctg ctgccgaagg tccaaccgga
841 gcttcagtgg gcgtggacaa acctggacga gtataaattg gccgccctga atctggagga
901 gcgcaaacgg ctgctgcgcg agtttctggc agaactctcg cagcgtcgc agggagcggc
961 ttgcgagcgt gagttctcgg ctgacctggg catcaaaagc aagactccc agaaatacat
1021 ggcgctcgtc aactggctcg tggagcacgg catcacttcc gagaagcagt ggateccagga
1081 aatcaggag agctacctct ccttcaactc caccggcaac tctcgagacc agatcaaggc
1141 cgcgctcgac aacgcgacca aaattatgag tctgacaaaa agcgcggtgg actacctgt
1201 ggggagctcc gttcccagg acatttcaa aaacagaatc tggcaaat ttgagatgaa
1261 tggctacgac ccggcctacg cgggatccat cctctacggc tgggtgcagc gctccttcaa
1321 caagaggaa accgtctggc tctacggacc cgcacgacc ggcaagacca acatcgcgga
1381 ggccatcgcc cacactgtgc cctttacgg ctgcgtgaac tggaccaatg aaaacttcc
1441 ctttaatgac tgtgtggaca aaatgctcat ttggtgggag gagggaaaga tgaccaacaa
1501 ggtggttgaa tccgccaaag ccactctggg gggctcaaa gtgcgggtcg atcagaatg
1561 taaatctct gttcaaatg attctacccc tgcattgta actccaata caaacatgtg
1621 tgtggtgtg gatgggaatt ccacgacct tgaacaccag cagccgctgg aggaccgcat
1681 gttcaaatg gaactgacta agcggctccc gccagattt ggcaagatta ctaagcagga
1741 agtcaaggac tttttgctt gggcaaaagt caatcagggt ccggtgactc acgagtttaa
1801 agttcccagg gaattggcgg gaactaaagg ggcggagaaa tctctaaac gccactggg
1861 tgacgtcacc aatactagct ataaaagtct ggagaagcgg gccaggtct cattgttcc
1921 cgagacgcct cgcagttcag acgtgactgt tgatcccgct cctctcgac cgtcaattg
1981 gaattcaagg tatgattgca aatgtgacta tcagtcctaa ttgacaaca ttctaaca
2041 atgtgatgaa tctgaatatt tgaatcggg caaaatgga tgtatctgc acaatgtaac
2101 tcaactgcaa attgtcatg ggattcccc ctgggaaaag gaaaactgt cagatttgg
2161 ggattttgac gatgccaata aagaacagta aataaagcga gtatcatgt ctttgttga
2221 tcacctcca gattggttgg aagaagtgg tgaaggctt cgcgagttt tgggccttga
2281 agcgggcca ccgaaacca aaccaatca gcagcatcaa gatcaagccc gtggtcttgt
2341 gctgctggt tataactatc tggacccgg aaacggtctc gatcaggag agcctgtcaa
2401 cagggcagac gaggtcgcgc gagagcacga catctctac aacgagcagc ttgaggcggg
2461 agacaacccc tactcaagt acaaccacgc ggacgcgag ttacaggaga agctcgccga
2521 cgacacatcc ttgggggaa acctcggaaa ggcagcttt caggccaaga aaaggttct
2581 cgaaccttt ggctggttg aagaggtgc taagacggc cctaccgaa agcggataga
2641 cgaccttt ccaaaaagaa agaaggctc gaccgaagag gactccaage ctccacctc
2701 gtcagacgcc gaagctggac ccagcggatc ccagcagctg caaatcccag cccaaccagc
2761 ctcaagttg ggagctgata caatgtctc gggaggtggc ggccattgg gcgacaata
2821 ccaaggtgcc gatggagtgg gcaatgcctc gggagattgg cattgcgatt ccacgtggat

[0748]

[0749]

2881 gggggacaga gtgtcacca agtcacccg aacctgggtg ctgccagct acaacaacca
2941 ccagtaccga gagatcaaaa ggggtccgt cgacggaagc aacgccaacg cctacttgg
3001 atacagcacc cctgggggt acttgactt taaccgttc cacagccact ggagccccg
3061 agactggcaa agactcatca acaactactg gggcttcaga ccccggtccc tcagagtcaa
3121 aatcttcaac attcaagtca aagaggtcac ggtgcaggac tccaccacca ccatgccaa
3181 caacctcacc tccaccgtcc aagtgtttac ggacgacgac taccagctgc cctacgtgt
3241 cggcaacggg accgagggat gctgcccgc ctccctccg caggtcttta cgtgcccga
3301 gtacggttac ggcagctga accgcgacaa cacagaaaat cccaccgaga ggagcagctt
3361 cttctgccta gactacttc ccagcaagat gctgagaacg ggcaacaact ttgagttac
3421 ctacaactt gaggaggtgc cttccactc cagcttcgt cccagtcaga acctgttcaa
3481 gctggccaac ccgtgggtg accagtactt gtaccgttc gtgagcacia ataacactgg
3541 cggagtcag ttcaacaaga acctggccgg gagatacgc aacacctaca aaaactggtt
3601 cccggggccc atgggcccga cccagggctg gaacctgggc tccggggta accgcgccag
3661 tgtcagcgc ttcgccaga ccaataggat ggagctcgag ggcgcgagtt accaggtgcc
3721 cccgcagccg aacggcatga ccaacaacct ccagggcagc aacacctatg cctggagaa
3781 cactatgate ttcaacagcc agccggcgaa cccgggcacc accgccact acctcgaggg
3841 caacatgtc atcaccagc agagcgagac gcagccggtg aaccgcgtg cgtacaact
3901 cggcgggcag atggccacca acaaccagag ctccaccact gccccgcga ccggcacgta
3961 caacctccag gaaatgtgc ccggcagcgt gtggatggag agggacgtgt acctccaagg
4021 acccatctgg gccaatgcc cagagacggg ggcgcactt caccctctc cggccatggg
4081 cggattcgg ctaaacacc caccgccc atgtctc atcagaacgc ctgtcccgg
4141 aaatatcacc agctctcgg acgtcccgt cagcagctt atcaccagt acagcaccg
4201 gcaggtcacc gtggagatgg agtgggagct caagaaggaa aactccaaga ggtggaacc
4261 agagatccag tacacaaaca actacaacga ccccagttt gtggacttg cccggacag
4321 caccggggaa tacagaacca ccagacctat cggaaccga tacttacc gaccttta
4381 acccatcat gtgcatacc ctcaataaac cgtgtattc gtctagtaaa atactgcctc
4441 ttgtgtcat tcaatgaata acagcttaca acatctaca aacctcttg cttgagagt
4501 tggcactct cccctgtc cgttcgtc ctcgtggct cgtttgggg ggtggcagct
4561 caaagagctg ccagacgac gcctctggc cgtcgcgcc ccaaacgagc cagcgagcga
4621 gcgaacgcga caggggggag ag

AAV6 (SEQ ID NO:143)

1 ttggccactc cctctctgcg cgtcgtctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc
61 cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agaggggagt
121 gccaaactca tctaggggg ttcttgagg ggtggagtcg tgactgaat tacgtcatag
181 ggttagggag gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgttt gcgacattt gcgacacat
241 gtgttcacgc tgggtattta agcccagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga
301 ggtttgaacg cgcagcgcca tgcgggggtt ttacgagatt gtgattaagg tccccagca
361 ccttgacgag catctgccc gcaattctga cagcttctg aactgggtgg ccgagaagga
421 atgggagttg ccgccagatt ctgacatgga tctgaatctg attgagcagg caccctgac
481 cgtggccgag aagctgcagc gcgacttctt ggtccagtgg cggcgcgtga gtaaggcccc
541 ggaggccctc ttcttcttc agttcgagaa gggcgagtcc tactccacc tccatattct
601 ggtggagacc acgggggtca aatccatggt gctgggccc ttctgagtc agattagga
661 caagctggtg cagaccatct accgcgggat cgagccgacc ctgcccaact ggttcgctg
721 gaccaagacg cgtaatggcg ccggaggggg gaacaagggt gtggacgagt gctacatccc
781 caactacctc ctgcccaaga ctacggcga gctgcagtgg gcgtggacta acatggagga
841 gtatataagc ggtgttttaa acctggccga gcgcaaacgg ctctggcgc acgacctgac
901 ccacgtcagc cagaccagg agcagaacaa ggagaatctg aacccaatt ctgacgcgc
961 tgtcatccgg tcaaaaacct ccgcacgcta catggagctg gtcgggtggc tggtagccg
1021 gggcatcacc tccgagaagc agtggatcca ggaggaccag gcctcgta tctcttcaa
1081 cggcgctcc aactcgctg cccagatcaa ggccgctctg gacaatgcc gcaagatcat
1141 ggcgtgacc aaatccgcgc ccgactacct ggtaggcccc gctccggcg ccgacattaa
1201 aaccaaccgc atttaccgca tcttgagct gaacggctac gacctgcct acgcccgtc
1261 cgtctttctc ggtggggccc agaaaagggt cggaaaacgc aacaccatct ggctgtttg
1321 gccggccacc acgggcaaga ccaacatgc ggaagccatc gccacgccc tgccttcta
1381 cggtgcgtc aactggacca atgagaact tcccttcaac gattgcgtc acaagatgt
1441 gatctggtg gaggagggca agatgacggc caaggtcgtg gactccgcca aggcattct
1501 cggcggcagc aaggtgcgcg tggacaaaa gtgcaagtcg tccgccaga tcatccac
1561 cccgtgacg gtcacctca acaccaacat gtgcgcctg attgacggga acagcaccac
1621 ctctgagcag cagcagccgt tgcaggaccg gatgttcaa tttaactca cccgcctct
1681 ggagcatgac ttggcaagg tgacaaagca ggaagtcaa gattcttc gctgggcga
1741 ggatcacgtg accgaggtg cgcatgagt ctacgtcaga aagggtggag ccaacaagag
1801 accgccccg gatgacgcg ataaaagcga gcccaagcgg gcctgcccct cagtcggga
1861 tccatcgacg tcagacgcg aaggagctcc ggtggactt gccgacagg accaaaaca
1921 atgttctct cagcgggca tcttcagat gctgttccc tgcaaacat gcgagagaat
1981 gaatcagaat tcaacattt gttcacgca cgggaccaga gactgttca aatgttccc
2041 cggcgtgtca gaatcaca cggctgtcag aaagaggacg tctcgaaac tctgtgcat
2101 tcatcatctg ctggggcgg ctcccagat tcttgcctg gcctgcgac tggtaacgt
2161 ggatctggat gactgtgtt ctgagcaata aatgactta accaggtatg gctgccgatg
2221 gttatcttcc agattggctc gaggacaacc tctctgaggg catctcgag tggtaggact
2281 tgaaacctgg agccccgaaa ccaaaagcca accagcaaaa gcaggacgac ggccggggtc
2341 tgggtcttcc tggctacaag tactcggac cttcaacgg actcgacaag ggggagcccc
2401 tcaacgcggc ggatgcagc gccctcgagc acgacaaggc ctacgaccag cagctcaaag
2461 cgggtgacaa tccgtacctg cggataacc acgcccagc cgagttcag gagcgtctgc
2521 aagaagatac gtctttggg ggcaacctc ggcgagcagt ctccaggcc aagaagagg
2581 ttctgaacc tttggctg gttgaggaag gtgctaagac ggctcctgga aagaaacgtc
2641 cggtagagca gtcgccaca gagccagact cctctcggg cattggcaag acaggccagc
2701 agcccgttaa aaagagactc aattttggc agactggcga ctacagatca gtcgccgacc
2761 cacaacctct cggagaacct ccagcaaccc ccgtgctgt gggacctact acaatggctt
2821 caggcggtgg cgcaccaatg gcagacaata acgaaggcgc cgacggagtg ggtaatgctt

[0750]

[0751]

2881 caggaaattg gcattgcgat tccatggtc tgggcgacag agtcatcacc accagcacc
2941 gaacatgggc ctgcccacc tataacaacc acctctacaa gcaaattcc agtgcttcaa
3001 cggggggccag caacgacaac cactactcg gctacagcac cccctggggg tattttgatt
3061 tcaacagatt cactgccat ttctaccac gtgactggca gcgactcacc aacaacaatt
3121 ggggattccg gcccaagaga ctaacttca agctcttcaa catccaagtc aaggaggtea
3181 cgacgaatga tggcgtcacg accatcgcta ataaccctac cagcacggtt caagtctct
3241 cggactcgga gtaccagttg cgtacgtcc tgggtctgc gcaccagggc tgcctccctc
3301 cgttcccggc ggacgtgttc atgattccgc agtacggcta cctaaccgtc aacaatggca
3361 gccaggcagt gggacggtea tcttttact gcctggaata ttcccatcg cagatgtga
3421 gaacgggcaa taactttacc ttacgtaca cctcgagga cgtgccttc cacagcagct
3481 acgcgcacag ccagagcctg gaccggctga tgaatctct catcgaccag tacctgtatt
3541 acctgaacag aactcagaat cagtcggaa gtgccccaaa caaggacttg ctgtttagcc
3601 ggggggtctc agctggcatg tctgttcagc caaaaactg gctacctgga cctgttacc
3661 ggcagcagcg cgtttctaaa aaaaaacag acaacaaca cagcaacttt acctggactg
3721 gtgcttcaa atataacctt aatgggcgtg aatctataat caacctggc actgctatgg
3781 cctcacacaa agacgacaaa gacaagtct tcccatgag cgggtgcatg atttttgaa
3841 aggagagcgc cggagcttca aactgtcat tggacaatgt catgatcaca gacgaagagg
3901 aatcaaagc cactaacccc gtggccaccg aaagatttg gactgtggca gtcaatcc
3961 agagcagcag cacagacct ggcaccggag atgtgcatgt tatgggagcc ttacctggaa
4021 tgggtgtggca agacagagac gtatacctgc agggctctat ttgggcaaaa attctcaca
4081 cggatggaca ctttaccgc tctctctca tgggcggctt tggacttaag caccgcctc
4141 ctcatgctt catcaaaaac acgctgttc ctgcgaatcc tccggcagag ttctcgcta
4201 caaagtttg ttattcacc acccagttt ccacaggaca agtgagcgtg gagattgaat
4261 gggagctgca gaaagaaaac agcaaacgt ggaatccga agtcagtat acatctaact
4321 atgcaaaat tccaacgtt gatttactg tggacaaca tggactttat actgagcctc
4381 gcccattgg caccggttacc ctcaccgtc cctgttaatt gtgtgttaat caataaacg
4441 gtaattcgt gtcagttgaa ctttggctc atgtcgttat tatcttatct ggtcaccata
4501 gcaaccggtt acacattaac tgettagtt cgcttcgca ataccctag tgatggagtt
4561 gcccactccc tctatgcgcg ctgctcgtc cgggtggggc ggcagagcag agctctgccg
4621 tctgcggacc ttgtgtcgc aggccacc gagcgagcga gcgcgcatag agggagtggg
4681 caa

AAV7 (SEQ ID NO:144)

1 ttggccactc cctctatgcg cgctcgctcg ctcggtgggg cctgcggacc aaaggtccgc
61 agacggcaga gctctgctct gccggcccca ccgagcgagc gagcgcgcat agagggagtg
121 gccactcca tctaggggg taccgcgaag cgctccac gctgccgct cagcgctgac
181 gtaaatcacg tcatagggga gtggtcctgt attagctgtc acgtgagtgc tttgcgaca
241 ttttgcgaca ccacgtggcc attgaggta tatatggccg agtgagcgag caggatctcc
301 attttgaccg cgaaattga acgagcagca gccatgccgg gtttctacga gatcgtgatc
361 aaggtgccga gcgacctgga cgagcacctg ccgggcattt ctgactcgtt tgtgaactgg
421 gtggccgaga aggaatggga gctgcccccg gattctgaca tggatctgaa tctgatcgag
481 caggcacccc tgaccgtggc cgagaagctg cagcgcgact tcctgggtcca atggcgccgc
541 gtgagtaagg ccccggaggc cctgttttt gttagttcg agaaggcgga gagctacttc
601 cacttccacg ttctgggtga gaccacgggg gtcaagtcca tgggtctagg ccgttctctg
661 agtcagattc gggagaagct ggtccagacc atctaccgcg ggttcgagcc cacgtgcc
721 aactggttcg cgtgaccaaa gacgcgtaat ggccggcg cgggggaacaa ggtggtggac
781 gagtgtctaca tcccacta cctctgccc aagaccagc ccgagctgca gtggcgctgg
841 actaatatgg aggagtatat aagcgctgt ttgaacctgg ccgaacgcaa acggtcgtg
901 ggcgagcacc tgaccacgt cagccagacg caggagcaga acaaggagaa tctgaacccc
961 aattctgacg cgcccggtat caggtaaaaa acctccgcgc gctacatgga gctggtcggg
1021 tggctggtgg accggggcat cactccgag aagcagtga tccaggagga ccaggcctcg
1081 tacatctct tcaacggcg ctccaactcg cgtgccaga tcaaggccgc gctggacaat
1141 gccggcaaga tcatggcgct gacaaatcc gcgccgact acctggtggg gcctcgtg
1201 cccgcgga taaaaccaa ccgcatctac cgcctctgg agctgaacgg gtacgatct
1261 gcctacggcg gctcgtctt tctcggtgg gccagaaaa agttcgggaa gcgaacacc
1321 atctggtgt ttgggccgc caccacggc aagaccaaca ttgcggaagc catgccccac
1381 gccgtgccct tctacggctg cgtcaactgg accaatgaga actttccctt caacgattgc
1441 gtcgacaaga tggatctcg gtgggaggag ggcaagatga cggccaaggt cgtggagtcc
1501 gccaaaggca ttctggcg cgcaagggtg cgcgtggacc aaaagtcaa gtcgtccgc
1561 cagatcgacc ccaccccggt gatctcacc tccaacacca acatgtgcgc cgtgattgac
1621 gggaacagca ccaccttga gcaccagcag ccgttcagg accggatgtt caaattgaa
1681 ctacccgcc gctggagca cgacttggc aaggtgacga agcaggaagt caaagattc
1741 ttccgctggg ccagtatca cgtaccgag gtggcgcatg agttctacgt cagaaagggc
1801 ggagccagca aaagaccgc cccgatgac gcgatataa gcgagccaa ggggctgc
1861 cctcagtcg cggatccatc gacgtcagac gcggaaggag ctccggtgga ctttccgac
1921 aggtacaaa acaaatgtt tctgacgcg ggcatgattc agatgctgt tccctgcaa
1981 acgtgcgaga gaatgaatca gaattcaac attgcttca cacacgggt cagagactgt
2041 ttagagtgt tccccggt gtcagaatct caaccggtc tcagaaaaa gacgtatcg
2101 aaactctgc cgattcatca tctgctggg cgggcgcccg agattgctg ctggcctgc
2161 gacctgttca acgtggacct ggacgactgc gtttctgagc aataatgac taaaccagg
2221 tatggtgcc gatggtatc ttccagattg gtcgaggac aacctctct agggcattcg
2281 cgagtgtgtg gacctgaaac ctggagcccc gaaacccaaa gccaacgacg aaaagcagga
2341 caacggccgg ggtctgtgc ttctggcta caagtaccc ggaccttca acgactcga
2401 caagggggag cccgtcaacg cggcgagac gcggccctc gagcacgaca aggcctacga
2461 ccagcagctc aaagcgggtg acaatccgt cctgcggtat aaccacgacg acgaggtt
2521 tcaggagcgt ctgcaagaag atacgtcatt tgggggcaac ctggggcgag cagtctcca
2581 ggccaagaag cgggttctc aacctctcg tctggtgag gaaggcgcta agacggctc
2641 tgcaagaag agaccgtag agcgtcacc tcagcttcc cccgactcct ccacgggcat
2701 cggcaagaaa ggccagcagc ccgacagaaa gagactcaat ttgggtcaga ctggcgactc
2761 agagtacgt cccgacctc aacctctcg agaacctcca gcagcgccct ctagtgtggg
2821 atctgttaca gtggtcgag gcggtggcg accaatggca gacaataacg aaggtgccga

[0752]

[0753]

2881 cggagtggt aatgcctcag gaaatggca ttgcgattcc acatggctgg gcgacagagt
2941 cattaccacc agcaccgaa cctgggccct gccacctac aacaaccacc tctacaagca
3001 aatctccagt gaaactgcag gtagtacaa cgacaacacc tacttcggct acagcacc
3061 ctgggggtat ttgacttta acagattcca ctgccacttc tcaccacgtg actggcagcg
3121 actcatcaac aacaactggg gattccggcc caagaagctg cggttcaagc tcttaacat
3181 ccaggtaag gaggtcacga cgaatgacgg cgttacgacc atcgctaata acctaccag
3241 cacgattcag gtattctcgg actcgggaata ccagctgccg tacgtcctcg gctctgcga
3301 ccagggtcgc ctgcctcctg tcccggcgga cgtcttcacg attcctcagt acggctacct
3361 gactctcaac aatggcagtc agtctgtggg acgttcctcc ttctactgcc tggagtactt
3421 cccctctcag atgctgagaa cgggcaacaa ctttgagttc agctacagct tcgaggacgt
3481 gcccttccac agcagctacg cacacagcca gagcctggac cggctgatga atccctcat
3541 cgaccagtac ttgtactacc tggccagaac acagagtaac ccaggaggca cagctggcaa
3601 tcgggaactg cagttttacc agggcggggc ttcaactatg gccgaacaag ccaagaattg
3661 gttacctgga ccttgcttc ggcaacaaag agtctcaaa acgctggac aaaacaacaa
3721 cagcaacttt gcttggactg gtgccacaa atatcacctg aacggcagaa actcgttgg
3781 taatcccggc gtcgcatgg caactacaa ggacgacgag gaccgcttt tccatccag
3841 cggagtctg attttgga aaactggagc aactaacaa actacattgg aaaaatgtgt
3901 aatgacaaat gaagaagaaa ttgctctac taatcctgta gccacggaag aatacggat
3961 agtcagcagc aacttacaag cggctaatac tgcagcccag acacaagttg tcaacaacca
4021 gggagcctta cctggcatgg tctggcagaa ccgggacgtg tacctgcagg gtccatctg
4081 ggccaagatt cctcacacgg atggcaactt tcaccgtct ccttgatgg gcggcttgg
4141 acttaaacat ccgctctc agatcctgat caagaacact ccgttccc ctaatctec
4201 ggaggtgtt actcctgcca agtttgcctc gttcatcaca cagtacagca ccggacaagt
4261 cagcgtggaa atcgagtgg agctgcagaa ggaaaacagc aagcgtgga acccgagat
4321 tcagtacacc tccaacttg aaaagcagac tgggtggac ttgcccgtg acagccagg
4381 tgttactct gagcctgcc ctattggcac tegtacctc accgtaate tgtaattgca
4441 tgtaataca taaaccggtt gattcgttc agtgaactt tggctcctg tgctcttat
4501 cttatcgtt tccatagcaa ctggttacac attaatgct tgggtgcgt tcacgataag
4561 aacactgacg tcaccgcgt acccctagt atggagtgg ccaactcctc tatgcgcgt
4621 cgctcgtcg gtggggcctg cggacaaaag gtccgcagac ggcagagctc tgctctgcc
4681 gccccaccga gcgagcagc gcgcatagag ggagtggcca a

AAV8 (SEQ ID NO:145)

1 cagagaggga gtggccaact ccatactag gggtagcgcg aagcgctcc cagctgccg
61 cgtagcgct gacgtaaatt acgtcatagg ggagtggcc tgtattagct gtcacgtgag
121 tgcctttgcg gcattttgcg acaccacgtg gccatttgag gtatatatgg ccgagtggagc
181 gagcaggatc tccattttga ccgcgaaatt tgaacgagca gcagccatgc cgggcttcta
241 cgagatcgtg atcaaggtgc cgagcgacct ggacgagcac ctgccgggca ttctgactc
301 gtttgtgaac tgggtggccg agaaggaatg ggagctgcc ccggattctg acatggatcg
361 gaatctgac gagcaggcac cctgacctg ggccgagaag ctgcagcgcg acttctgtgt
421 ccaatggcgc cgcgtgagta agggcccgga ggccctcttc ttgttcagt tcgagaagg
481 cgagagctac ttacacctgc acgttctgt cgagaccacg ggggtcaagt ccatgtgtct
541 aggcgcgttc ctgagtcaga ttccggaaaa gcttgggtcca gacctctac ccgcggggtc
601 gagccccacc ttgcccaact ggctcgcggt gaccaaagac gcggtaatgg cgccggcggg
661 ggggaacaag gtgggtggac agtgctacat cccaactac ctctgcca agactcagcc
721 cgagctgcag tgggcgtgga ctaacatgga ggagtatata agcgcgtgct tgaacctggc
781 cgagcgcaaa cggctcgtgg cgcagacct gaccacgtc agccagacgc aggagcagaa
841 caaggagaat ctgaacccca attctgacgc gcccgatgc aggtcaaaaa cctccgcgcg
901 ctatatggag ctggtcgggt ggctgggtgga ccggggcacc acctccgaga agcagtggat
961 ccaggaggac caggcctcgt acatctcctt caacgcgcgc tccaactcgc ggtcccgat
1021 caaggccgcg ctggacaatg ccggcaagat catggcgctg accaaatccg cgcccgacta
1081 cctgggtggg ccctcgtgc ccgcggacat taccagaaac cgcactacc gcatctcgc
1141 tctcaacggc tacgacctg cctacgcgg ctccgtctt ctccgtggg ctcaaaaa
1201 gtccggaaa cgcaacacca tctggtgtt tggaccgcc accaccggca agaccaaat
1261 tgcggaaacc atcgccacg ccgtgccct ctacggctgc gtaactgga ccaatgaga
1321 ctttccttc aatgattgcg tcgacaagat ggtgatctgg tggaggagg gcaagatgac
1381 ggccaaggte gtggagtcg ccaaggccat tctcggcggc agcaagggtc gcgtggacca
1441 aaagtgaag tcgtccgcc agatcgacc cccccgtg atgtcacct ccaacaccaa
1501 catgtcgcc gtgattgacg ggaacagcac cacttcgag caccagcgc ctctccaga
1561 ccggtgttt aagtcgaac tcaccgcgc tctggagcac gacttggca aggtgacaaa
1621 gcaggaaatc aaagagtct tccgtgggc cagtgtcac gtgaccgagg tggcgatga
1681 gtttacgtc agaaaggcg gagccagcaa aagaccgcc ccgatgacg cggataaag
1741 cgagcccaag cgggcctgcc cctcagtcgc ggtccatgc agtcagacg cggaggagc
1801 tccgtggac ttgcccga ggtacaaaa caaatgtct cgtacgcgg gcatgttca
1861 gatgtgtt cctgcaaaa cgtcgagag aatgaatcag aattcaaca ttgtctac
1921 acacggggtc agagactgt cagagtgtt ccccgcggtg tcagaatc aaccgtgtg
1981 cagaaagagg acgtatcgga aactctgtc gattcatc ctgctggggc gggctccga
2041 gattgttgc tggcctgcg atctgtcaa cgtggacct gatgactgt ttctgagca
2101 ataatgact taaaccaggt atggctgcc atggttatc tcagattgg ctgaggaca
2161 acctcttga gggcattgc gagtgtggg cgctgaaacc tggagcccc aagcccaag
2221 ccaaccagca aaagcaggac gacggccggg gtctggtgt tctggctac aagtacctc
2281 gaccttcaa cggactcgc aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggcctc
2341 agcagcaaa ggcctacgac cagcagctgc aggcgggtga caatccgtac ctccgtata
2401 accacgccga cgccgagtt caggagcgtc tgcaagaaga tacgtcttt gggggcaacc
2461 tggggcgagc agtctccag gccagaagc ggggtctga acctctcgt ctggtgagg
2521 aaggcgctaa gacggctct ggaaagaaga gaccggtaga gccatcccc cagcttctc
2581 cagactctc tacgggcac ggcaagaaag gccacagcc cgcagaaaa agactcaat
2641 ttgtcagac tggcgactc ggtcagttc cagacctca acctctcga gaacctcag
2701 cagcgccctc tgggtggga ctaatacaa tggctcagg cgtggcgca ccaatggag
2761 acaataacga aggcgcgcg ggagtgggt gtctctcgg aaattggcat tgcgattca
2821 catggctggg cgacagagtc atcaccacca gcaccgaac ctgggcctg ccacactaca

[0754]

[0755]

2881 acaaccacct ctacaagcaa atctccaacg ggacatcggg aggagccacc aacgacaaca
2941 cctacttogg ctacagcacc cctgggggt atttgactt taacagattc cactgccact
3001 ttaccacag tgactggcag cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac
3061 tcagcttcaa gctcttcaac atccaggta aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga
3121 ccategccaa taacctcacc agcaccatcc aggtgtttac ggactcggag taccagctgc
3181 cgtacgttct cggtctgcc caccagggct gcctgcctcc gtccccggcg gacgtgtca
3241 tgattcccca gtacggctac ctacactca acaacggtag tcaggccgtg ggacgtcct
3301 ccttctactg cctggaatac ttctctcgc agatgctgag aaccggcaac aactccagt
3361 ttacttacac cttegaggac gtgcctttcc acagcagcta cgcacacagc cagagcttgg
3421 accggctgat gaatcctctg attgaccagt acctgtacta ctgtctcgg actcaaaaa
3481 caggaggcac ggcaaatac cagactctgg gcttcagcca aggtgggcct aataaatgg
3541 ccaatcaggc aaagaactgg ctgccaggac cctgtaccg ccaacaacgc gtctcaacga
3601 caaccgggca aaacaacaat agcaactttg cctggactgc tgggacaaa taccatctga
3661 atggaagaaa ttcatggct aatcctggca tcgctatggc aacacacaaa gacgacgagg
3721 agcgttttt tccagtaac gggatcctga ttttggcaa acaaatgct gccagagaca
3781 atgcggatta cagcgatgic atgctacca gcgaggaaga aatcaaaacc actaacctg
3841 tggctacaga ggaatacgg atcgtggcag ataactgca gcagcaaac acggctcctc
3901 aaattggaac tgtcaacagc cagggggcct taccgggtat ggtctggcag aaccgggacg
3961 tgtacctgca gggctccatc tggccaaga ttctcacac ggacggcaac tccaccgt
4021 ctccgtgat gggcggcttt ggctgaaac atctcgcgc tcagatcctg atcaagaaca
4081 cgcctgtacc tgcggatcct cggaccact tcaaccagtc aaagctgaac tcttcatca
4141 cgcaatacag caccggacag gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgcag aaggaaaaca
4201 gcaagecgtg gaaccccgag atccagtaca cctccaacta ctacaaatct acaagtgtgg
4261 actttgctgt taatacagaa ggcgtgtact ctgaaccccg cccattggc acccgttacc
4321 tcaccgtaa tctgtaattg cctgtaatc aataaacgg ttgattcgtt tcagttgaac
4381 ttggtctct gcg

AAV9 (SEQ ID NO:146)

1 gcccaatacg caaacgcct cccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgta
61 atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt ggcagcctg aatggcgaat
121 ggcgattccg ttcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat
181 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaagaag tattgcgaca
241 acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac
301 acttctcagg attctggcgt accgttcttg tctaaaatcc cttaacagg cctctgttt
361 agtccccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata
421 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaaagcgc ggccgggtgtg gtggtaacgc gcagcgtgac
481 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tctttctgct ttcttccctt cctttctcgc
541 cacgttcgcc ggcttcccc gtaagctct aaatcggggg ctccttttag ggttccgatt
601 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg
661 gccatgccc tgatagacgg ttttcgccc ttgacgttg gagtcacgt tcttaaatag
721 tggactcttg ttcaaaactg gaacaacact caacctatc tcggtctatt ctttggatt
781 ataagggaat ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaat
841 taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct tacaatttaa atatttgcct atacaatctt
901 cctgtttttt gggcttttct gattatcaac cgggggtacat atgattgaca tgctagtttt
961 acgattaccg ttatcgccc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggcgcgcc gggcaaaagc
1021 cgggcgctcg gcgaccttg gtcgccggcg ctcaagtgcg gagcgagcgc gcagagaggg
1081 agtggaaatc acgctggat ctgaattcaa ttacgcgtg gtacctctgg tctttacata
1141 acttacggtt aatggcccgc ctggctgacc gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat
1201 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggacttgc cattgacgtc aatgggtgga
1261 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
1321 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagt acatgacctt
1381 atgggacttt cctacttggc agtacatcta ctgaggcca cgttctgctt cactctcccc
1441 atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta tttttaatt attttgcga
1501 gcgatggggg cggggggggg ggggggggcg gcgccaggcg gggcgggggc gggcgagggg
1561 cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcg cctccgaaag
1621 ttctcttita tggcgaggcg gcggcgggcg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcg
1681 gcgggagcgg gatcagccac cgcggtggcg gcctagagtc gacgaggaac tgaaaaacca
1741 gaaagttaac tggtaagttt agtctttttg tcttttattt caggctcccg atccggtggt
1801 ggtgcaaatc aaagaactgc tctcagtgg atgttgcctt tacttctagg cctgtacgga
1861 agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtaccgc gcccgatcca ccgtccgga
1921 attcccgga tategtcgac ccacgcgtcc gggccccacg ctgcgcacc gcgggtttgc
1981 tatggcgatg agcagcggcg gcagtggtgg cggcgctccg gagcaggagg attccgtgct
2041 gttccggcg gcacaggcc agagcgatga ttctgacatt tgggatgata cagcactgat
2101 aaaagcatat gataaagctg tggcttcatt taagcatgct cttaaagaatg gtgacatttg
2161 tgaaacttgc ggtaaacca aaaccacacc taaaagaaaa cctgctaaga agaataaaag
2221 ccaaaagaag aatactgcag ctctcttaca acagtggaaa gttggggaca aatgttctgc
2281 catttggtca gaagacggtt gcatttacc agctaccatt gcttcaattg attttaagag
2341 agaaacctgt gttgtggtt acactggata tggaaataga gaggagcaaa atctgtccga
2401 tctacttcc ccaatctgtg aagtagctaa taatatagaa cagaatgctc aagagaatga
2461 aaatgaaagc caagttcaa cagatgaaag tgagaactcc aggtctctg gaaataaatc
2521 agataacatc aagcccaaat ctgctccatg gaactctttt ctcctccac caccceccat
2581 gccagggcca agactgggac caggaaagcc aggtctaaaa tcaatggcc caccaccgc
2641 accgccacca ccaccacccc acttactatc atgtggctg cctccatttc ctctggacc
2701 accaataatt cccccaccac ctcccatatg tccagattct ctgtgatg ctgatgctt
2761 gggaagtatg ttaatttcat ggtacatgag tggctatcat actggctatt atatgggtt
2821 tagacaaaat caaaaagaag gaaggtgctc acattcctta aattaaggag aatgctggc

[0756]

[0757]

2881 atagagcagc actaatgac accactaaag aaacgatcag acagatctag aaagcttate
2941 gataccgtcg actagagctc gctgatcagc ctgactgtg cttctagt ggcagccatc
3001 tgttggttgc cctcccccg tgccttctt gacctggaa ggtgccactc cactgtct
3061 ttctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctagt aggtgtcatt ctattctggg
3121 ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattggga gacaatagca ggcattgtgg
3181 ggagagatcg atctaggaa cccctagtga tggagtggc cactccctct ctgcgcgctc
3241 gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgccgacg cccgggcttt gcccgggcgg
3301 cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggcccc cccccccc cccccggcga
3361 ttctctgtt tgcctcagac tctcaggcaa tgacctgata gccctttag agacctctca
3421 aaaatagcta cctctccgg catgaattta tcagctagaa cgggtgaata tcatattgat
3481 ggtgatttga ctgtctccg ctttctcac cgtttgaat ctttacctac acattactca
3541 ggcattgcat ttaaaatata tgagggttct aaaaatttt atccttgcgt tgaataaag
3601 gcttctccc caaaagtatt acagggtcat aatgttttg gtacaaccga tttagcttta
3661 tgcctgagg cttattgt taatttct aattcttgc ctgctgtga tgattattg
3721 gatgttgaa tcgctgatg cgtatttc tcttacgca tctgtcggg atttcacac
3781 gcatatggg cactctcagt acaatctgt ctgatgccg atagttaagc cagccccgac
3841 acccgccaac actatggtg actctcagta caatctgct tgatgccga tagttaagc
3901 agccccgaca cccgccaaca ccgctgacg cgcctgacg ggttgtctg ctccggcat
3961 ccgcttacag acaagctgtg accgtctcc ggagctgcat gtgtcagagg ttaccctgt
4021 catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggc tcgtgatacg cctatttta taggttaag
4081 tcatgataa aatggttct tagacgtcag gtggcactt tcggggaaat gtgcgcggaa
4141 cccctattg ttattttc taaatacat caaatatga tccgtcatg agacaatac
4201 cctgataaat gttcaataa tattgaaaa ggaagagtat gatttcaa cattccgtg
4261 tcgcccctat tccctttt gggcattt gccttctgt tttgtcac ccagaaacg
4321 tgggtgaaat aaaagatgt gaagatcagt tgggtgcag agtgggttac atcgaactg
4381 atctcaacag cgttaagatc ctgagagt ttgccccga agaactttt ccaatgatga
4441 gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcg tattatccg tattgacgc gggcaagagc
4501 aactcggtc cgcatacac tattctaga atgacttgg tgagtactca ccagtcacag
4561 aaaagcatc tacggatggc atgacagtaa gagaattat cagtgtgcc ataaccatga
4621 gtgataaac tgcggccaac ttactctga caacgatcg aggaccgaag gagctaaccg
4681 ctttttgca caaatgggg gatcatgaa ctgccttga tctgtggga ccggagctga
4741 atgaagccat accaaacgac ggcgtgaca ccagatgcc ttagcaatg gcaacaactg
4801 tgcgcaact ataatggc gaactacta ctctagctt ccggcaaca ttaatagact
4861 ggatggaggc ggataaagt gcaggaccac ttctgcctc ggccctccg gctggctgt
4921 ttattgtga taaatctga gccggtgagc gtgggtctc cggtatcatt gcagcactg
4981 ggccagatgg taagccctc cgtatctag ttatctacac gacggggagt caggcaacta
5041 tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgctc actgattaag catttgtaac
5101 tgcagacca agttactca tatatactt agattgatt aaaactcat ttttaatta
5161 aaaggatcta ggtgaagatc cttttgata atctcatgac caaatccct taactgtagt
5221 ttctgtcca ctgagctca gacccctag aaaagatcaa aggatctct ttagatcctt
5281 ttttctgcg cgtaatctg tcttgcaaa caaaaaaac accgctacca gcggtggtt
5341 gtttccgga tcaagagcta ccaactttt tccgaagg aactggctc agcagagcg
5401 agatacaaaa tactgttct ctagttagc cgtagttag ccaccactc aagaactctg
5461 tagcaccgc tacatactc gctctgtaa tctgttacc agtggctgt gccagtggc
5521 ataagctgt tctaccggg ttgactcaa gacgatagt accggataag gcgcagcgt
5581 cgggctgaac ggggggttc tgcacacagc ccagcttga gcgaacgac tacaccgaac
5641 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccagct tcccgaagg agaaaggcgg
5701 acaggtatcc ggtaagcggc aggtcggaa caggagagc cagagggag ctccagggg
5761 gaaacgctg gtatcttat agtctgtc ggttcgcca cctctgact gagcgtcat
5821 tttgtgatg ctgtcaggg gggcggagc tatggaaaa cgccagcaac gcggccttt

5881 tacggttctt gcccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctgcg ttatcccctg
5941 attctgtgga taacctatt accgcctttg agtgagctga taccgctgc cgcagccgaa
6001 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gc

AAV10 (SEQ ID NO:147)

1 atgccgggct tctacgagat cgtgatcaag gtgccgagcg acctggacga gcacctgccg
61 ggcatttctg actcgtttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagct gccccggat
121 tctgacatgg atcggaatct gatcgagcag gcaccttga ccgtggccga gaagctgcag
181 cgcgacttcc tggteactg gcgcgcgctg agtaaggccc cggaggccct cttctttgtt
241 cagttcgaga agggcgagtc ctactttcac ctgcacgttc tggtcgagac cacgggggtc
301 aagtcacatg tctggggccg cttctgagtc cagatcagag acaggctggt gcagaccatc
361 taccgcgggg tagagccac gctgcccaac tggttcgcgg tgaccaagac gcgaaatggc
421 gccggcgggg ggaacaagggt ggtggacgag tgctacatcc ccaactacct cctgcccaag
481 acgcagcccg agctgcagtg ggcgtggact aacatggagg agtatataag cgcgtgtctg
541 aacctgcgag agcgtaaacg gtcgtggcg cagcacctga cccacgtcag ccagacgcag
601 gagcagaaca aggagaatct gaacctgaat tctgacgcgc ccgtgatcag gtcaaaaacc
661 tccgcgcgct acatggagct ggtcgggtgg ctggtggacc ggggcatcac ctccgagaag
721 cagtggatcc aggaggacca ggctcgttac atctcctca acgcccctc caactcggg
781 tcccagatca aggcgcgct ggacaatgcc ggaaagatca tggcgtgac caaatccg
841 cccgactacc tggtaggccc gtccttacc gcggacatta agccaaccg catctaccg
901 atcttgagc tcaacggcta cgaacccgc tacgcccgt ccgtcttct gggctggcg
961 cagaaaaagt tggtaaaag gaatacaatt tggctgtcg ggcccgccac caccggcaag
1021 accaacatcg cgggaagcat cgcacgcc gtccttct acggtgct caactggacc
1081 aatgagaact ttcccttcaa cgattgcgt gacaagatgg tgatctgtg ggaggaggc
1141 aagatgaccg ccaaggctgt ggagtcgcc aaggccatc tgggcggaag caaggtgcg
1201 gtcgacaaa agtgcaagtc ctgcggccag atcgaccca cgcctgcat cgtcacctc
1261 aacaccaaca tgtgcgcgt gatcgacggg aacagacca ccttcgagca ccagcagccc
1321 ctgcaggacc gcatgttcaa gttcgagtc accgcccgtc tggagcacga ctttggcaag
1381 gtgaccaagc aggaagtcaa agagttctc cgtgggctc aggatcagc gactgagtg
1441 acgcatgagt tctacgtcag aaaggcgga gccacaaaa gacccgccc cagtacgcg
1501 gatataagcg agcccaagcg ggctgcccc tcagttgagg agccatgac gtcagacgcg
1561 gaagcaccgg tggactttgc ggacaggtac caaaacaaat gttctgtca cgcgggcatg
1621 cttcagatgc tgttccctg caagacatgc gagagaatga atcagaattt caactgtgc
1681 ttcacgcacg ggttcagaga ctgtcagag tgcctcccc gcgcgtcaga atctaacct
1741 gtcgtcagaa aaaagacgta tcagaaactg tgcgcgattc atcatctgt gggcggggca
1801 cccgagattg cgtgttcggc ctgcgatct gtaacgtgg acttgatga ctgtgttct
1861 gagcaataaa tgacttaaac caggtatggc tgcgtacggt tatcttcag attggctcga
1921 ggacaacctc tctgagggca ttcgcgagtg gtgggacctg aaacctggag ccccaagcc
1981 caaggccaac cagcagaagc aggcagcgg ccggggtctg gtgcttctg gctacaagta
2041 cctcggaccc ttcaacggac tcgacaaggg ggagcccgtc aacgcggcgg acgcagcggc
2101 cctcagcagc gacaaggcct acgaccagca gctcaaacg ggtgacaatc cgtacctgcg
2161 gtataaccac gccgacgccg agtttcagga gcgtctgcaa gaagatacgt ctttggggg
2221 caacctggg cgagcagctt tccaggccaa gaagcgggt ctcgaacctc tcggtctgt
2281 tgagggaagc gtaagacgg ctctggaaa gaagagaccg gtagaacct cactcagcg
2341 tcccccgac tctccacgg gcatcgcaa gaaaggccag cagcccgtc aaaaagact
2401 gaactttgg cagactggcg agtcagagtc agtccccgac cctcaacaa tcggagaacc
2461 accagcaggc cctctgttc tgggatctg tacaatggt gcaggcgggt gcgtccaat
2521 ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagtcc tcaggaaatt ggcattgcga

[0759]

2581 ttccacatgg ctgggcgaca gagtcatcac caccagcacc cgaacctggg ccctgcccac
2641 ctacaacaac caccctaca agcaaatctc caacgggaca tggggaggaa gcaccaacga
2701 caacacctac ttgggtaca gcacccctg ggggtatit gactcaaca gattccactg
2761 ccacttctca ccaagtact ggcagcgact catcaacaac aactggggat tccggccaaa
2821 aagactcagc ttcaagctct tcaacatcca ggtcaaggag gtcacgcaga atgaaggcac
2881 caagaccatc gccataaacc ttaccagcac gattcaggta ttacggact cggaatacca
2941 gctgcegtac gtctcggct cgcgcacca gggtgcctg cctcgttc cggcggatgt
3001 ctcatgatt cccagtagc gctacctgac actgaacaat ggaagtcaag ccgtaggccg
3061 ttctcttc tactgcctgg aatatttc atctcaatg ctgcgaactg gaaacaatt
3121 tgaattcagc tacacctg aggacgtgcc ttccacagc agctacgcac acagccagag
3181 ctggaccga ctgatgaat ctctattga ccagtacct tactacttat ccagaactca
3241 gtccacagga ggaactcaag gtaccagca attgtatit tctcaagctg ggctgc aaa
3301 catgtcggct caggccaaga actggctgcc tggacctgc taccggcagc agcgagtctc
3361 cagcactg tcgcaaaaca acaacagcaa ctgtcttg actgggtcca ccaatatca
3421 cctgaacgga agagactctc tggatgaatc cgggtgcgc atggcaaccc acaaggacga
3481 cgaggaacgc ttctccctc cgagcggagt cctgatgtt ggaaaacagg gtgctggaag
3541 agacaatgtg gactacagca gcgttatgt aacaagcga gaagaaatta aaaccactaa
3601 cctgtagcc acagaacaat acggcgtggt ggctgacaac ttgcagcaag ccaatacagg
3661 gcctattgtg ggaaatgtca acagccaagg agcctacct ggcatggtc ggcagaaccg
3721 agacgtgtac ctgcagggtc ccactgggc caagattct cacacggacg gcaacttca
3781 cccgtctct ctgatggcg gcttggact taaacaccg cctccacaga tctgatcaa
3841 gaacacgccg gtacctgagg atctccaac aacgttcagc caggcgaaat tggttctt
3901 catcagcag tacagcaccg gacaggctag cgtggaaatc gaggggagc tgcagaagga
3961 gaacagcaa cgtggaacc cagagattca gtacattca aactactaca aatctacaaa
4021 tgtggacttt gctgtcaata cagaggggaa ttattctgag cctgcacca ttgtactcg
4081 ttatctgaca cgtaatctgt aa

AAV11 (SEQ ID NO:148)

1 atgccgggct tctacgagat cgtgatcaag gtgccgagcg acctggacga gcacctgccg
61 ggcatttctg atcgtttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagct gccccggat
121 tctgacatgg atcggaatct gatcgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag
181 cgcgacttcc tggtcactg gcgccgcgtg agtaaggccc cggaggccct ctctttgtt
241 cagttcgaga agggcgagtc ctactccac ctccacgttc tegtgcgac cacgggggtc
301 aagtccatgg tctgggccc ctctctgagt cagatcagag acaggctggt gcagaccatc
361 taccgcgggg tggagccca gctgcccaac tggttcgcg tgaccaagac gcgaaatggc
421 gccggcgggg ggaacaagg ggtggacgag tctacatcc ccaactacct cctgccaag
481 acccagcccc agctgcagt ggcgtggact aacatggagg agtatataag cgcgtgtcta
541 aacctcgcg agcgtaaac gctcgtggcg cagcacctga cccacgtcag ccagacgcag
601 gagcagaaca aggagaatct gaaccgaat tctgacgcgc ccgtgatcag gtcaaaaacc
661 tccgcgcgt acatggagct gtcgggtgg ctggtggacc ggggcatcac ctccgagaag
721 cagtggatcc aggaggacca ggctcgtac atctcttca acgccgcct caactcggg
781 tccagatca aggccgcgt ggacaatgc gaaagatca tggcgtgac caaatccgcg
841 cccgactacc tggtaggcc gtcttacc gcggacatta aggccaacc catctaccgc
901 atcctggagc tcaacggcta cgacccgcc tacgcgggt ccgttctct gggctggcg
961 cagaaaaagt tggtaaacg caacaccatc tggctgtt ggcccggcac caccggcaag
1021 accaaccatc cggaagccat agcccacgcc gtgccctt acggctgct gaactggacc
1081 aatgagaact tcccttcaa cgattgcgt gacaagatgg tgatctggt ggaggagggc
1141 aagatgaccg ccaaggctgt ggagtcgcc aaggccatc tggcggaag caaggtgccc
1201 gtggacaaa agtcaagtc ctggcccag atcgaccca cggcgtgat cgtcacctcc
1261 aacaccaaca tgtgcgccgt gatcgacggg aacagacca cttcgagca ccagcagccg
1321 ctgcaggacc gcatgttcaa gtgcagtc acccgccgtc tggagcacga ctttgcaag
1381 gtgaccaagc aggaagtcaa agagttctt cgtgggctc aggtacacgt gactgaggtg
1441 gcgcatgagt tctacgtcag aaaggcgga gccacaaaa gaccgcccc cagtacgcg
1501 gatataagcg agccaagcg ggctgcccc tcagttccg agccatgcag gtcagacgcg
1561 gaagcaccgg tggacttgc ggacaggtac caaaacaaat gttctgtca cgcgggcatg
1621 ctccagatgc tgttccctg caagacatgc gagagaatga atcagaatt caacgtctgc
1681 ttacgcacg ggtcagaga ctgctcagag tcttcccc gcgcgtcaga atctcaacc
1741 gtcgtcagaa aaaagacgta tcagaaactg tgcgcgattc atcatctgt gggcggggca
1801 cccgagattg cgtgttcggt ctgcgactc gtcaactgg acttgatga ctgtgttct
1861 gagcaataaa tgactaaac caggtatggc tctgacggt tatctccag attggtcga
1921 ggacaacctc tctgagggca ttcgcgagt gtgggacct aaacctggag ccccgaagcc
1981 caaggccaac cagcagaagc aggacgacgg ccggggtctg gtgcttctg gctacaagta
2041 cctcggacce ttcaacggac tcgacaagg ggagcccgtc aacgcggcg acgcagcggc
2101 cctcagcac gacaaggcct acgaccagca gctcaagcg ggtgacaatc cgtacctgcg
2161 gtataaccac gccgacgcc agtttcagga gcgtctgcaa gaagatagct ctttggggg
2221 caacctcggg cgagcagct tccaggccaa gaagagggtc ctgaaacct tggcctggt
2281 tgaagaagg gtaaaacgg ctctggaaa gaagagacc ttagagtcac cacaagagcc
2341 cgactctcc tgggcatcg gcaaaaagg caaacaacca gccagaaaga ggctcaactt
2401 tgaagaggac actggagccg gagacggacc cctgaagga tcagatacca gcgccatgc
2461 ttacagacatt gaaatgcgt cagcaccgg cggaatgct gtcgatcgg gacaagggtc
2521 cgatggagt ggtaatgcct cgggtgatt gcattgcgt tccacctggt ctgagggcaa
2581 ggtcacaaca acctcagca gaacctgggt ctgcccacc tacaacaacc actgtacct
2641 gcgtctcga acaacatcaa gcagcaacac ctacaacgga ttctccacc cctggggata
2701 tttgacttc aacagattc actgtactt ctaccacgt gactggcaaa gactcatcaa
2761 caacaactgg ggactacgac caaagccat gcgcgttaa atcttcaata tcaagttaa
2821 ggaggtcaca acgtgaacg gcgagactac ggtcgctaat aacctacca gcacggttca

[0760]

[0761]

2881 gatatttgcg gactcgtcgt atgagctccc gtacgtgatg gacgctggac aagaggggag
2941 cctgcctcct ttecccaatg acgtgttcat ggtgcctcaa tatggctact gtggcatcgt
3001 gactggcgag aatcagaacc aaacggacag aaacgcttgc tactgcctgg agtatttcc
3061 ttgcgaaatg ttgagaactg gcaacaactt tgaaatggct tacaactttg agaaggtgcc
3121 gttccactca atgtatgctc acagccagag cctggacaga ctgatgaate cctcctgga
3181 ccagtacctg tggcacttac agtcgactac ctctggagag actctgaate aaggcaatgc
3241 agcaaccaca ttggaaaaa tcaggagtgg agactttgcc tttacagaa agaactggct
3301 gcctgggcct tgtgttaaac agcagagatt ctcaaaaact gccagtcaaa attacaagat
3361 tcttgccagc gggggcaacg ctctgttaaa gtatgacacc cactatacct taaacaaccg
3421 ctggagcaac atcgcgcccg gacctcaat ggccacagcc ggacctcgg atggggactt
3481 cagtaacgcc cagcttatat tccctggacc atctgttacc ggaaatacaa caacttcagc
3541 caacaatctg ttgtttacat cagaagaaga aattgctgcc accaacccea gagacacgga
3601 catgtttggc cagattgctg acaataatca gaatgctaca actgctccca taaccggcaa
3661 cgtgactgct atgggagtgc tgcctggcat ggtgtggcaa aacagagaca ttactacca
3721 agggccaatt tgggccaaga tccacacgc ggacggacat ttcatcctt caccgctgat
3781 ttgtgggttt ggactgaaac acccgctcc ccagatatc atcaagaaca ctcccgtacc
3841 tgccaatcct gcgacaacct tactgcagc cagagtggac tcttcatca cacaatacag
3901 caccggccag gtcgctgttc agattgaatg ggaaattgaa aaggaacgct ccaaacgctg
3961 gaatcctgaa gtgcagtta cttcaaaacta tgggaaccag tcttctatgt tgtgggctcc
4021 tgatacaact gggaagtata cagagccgcg ggttattggc tctcgttatt tgactaatca
4081 ttgtaa

AAV12 (SEQ ID NO:149)

1 ttgcgacagt ttgcgacacc atgtgggtcac aagagggtata taaccgagag tgagccagcg
61 aggagctcca ttttccccgc gaagtttgaa cgagcagcag ccatgccggg gttctacgag
121 gtggtgatca aggtgccag cgacctggac gacacctgc cggcatttc tgactcctt
181 gtgaactggg tggccgagaa ggaatgggag ttcccccggt attctgacat ggtacagaat
241 ctgattgagc aggcaccctt gacctggcc gagaagctgc agcgcgagtt cctggtggaa
301 tggcgccgag tgagtaaatt tctggaggcc aagtttttg tgcagtttga aaagggggac
361 tctgactttt atttgcatat tctgattgaa attaccggcg tgaatccat ggtggtgggc
421 cgctacgtga gtcagattag ggataaactg atccagcgca tctaccgagg ggtcgagccc
481 cagctgcccc actggttcgc ggtcacaaag acccgaaatg gcgccggagg cgggaacaag
541 gtggtggacg agtgcctacat ccccaactac ctgctcccca aggtccagcc cgagcttcag
601 tgggctgga ctaacatgga ggagtatata agcgcctgtt tgaacctgc ggagcgtaaa
661 cggctcgtgg cgcagcacct gacgcacgtc tcccagaccc aggagggcga caaggagaat
721 ctgaaccgga attctgacgc gccgtggtc cgtcaaaaa cctccgccag gtacatggag
781 ctggtcgggt ggctggtgga caagggcgc acgtccgaga agcagtggt ccaggaggac
841 caggcctcgt acatctcctt caacgcggcc tccaaactcc ggtcgagat caagcgggc
901 ctggacaatg cctccaaaat catgagcctc accaaaacgg ctccggacta tctcatcggg
961 cagcagcccc tgggggacat taccaccaac cggatctaca aaatcctgga actgaacggg
1021 tacgaccccc agtacgcgc ctccgtctt ctccgctggg ccagaaaaa gtttggaag
1081 cgcaacacca tctggtgtt tgggcccgc accaccgga agaccaacat cgcggaagcc
1141 atgcccacg cggctccctt ctacgctgc gtcaactgga ccaatgagaa ctttccctc
1201 aacgactgcg tcgacaaaat ggtgatitgg tgggaggagg gcaagatgac cgcaaggte
1261 gtagagtccg ccaaggccat tctggcggc agcaagggtc gcgtggacca aaaatgcaag
1321 gctctgcgc agatcgaccc caccctcgt atcgtcacct ccaacaccaa catgtgcgc
1381 gtgattgacg ggaacagcac cacctcgag caccagcagc cctgcagga ccggtgttc
1441 aagttgaaac tcaccgccc cctcgaccac gactttggca aggtcaccaa gcaggagtc
1501 aaggactttt tccggtgggc ggctgatcac gtgactgacg tggctcatga gttttacgtc
1561 acaaaagggt gagtaagaa aaggcccgc cctctgacg aggatataag cgagcccaag
1621 cggccgcgcg tgcatttgc gcagccggag acgtcagacg cggagctcc cggagacttc
1681 gccgacaggt accaaaacaa atgtctcgt cagcgggta tgetgcagat gctcttccc
1741 tgcaagacgt gcgagagaat gaatcagaat tccaacgtct gcttcacgca cgtcagaaa
1801 gattgcgggg agtgccttc cgggtcagaa tctcaaccgg ttctgtcgt cagaaaaacg
1861 tatcagaaac tgtcatcct tcatcagctc cggggggcac ccgagatgc ctgctctgt
1921 tgcgaccaac tcaaccgga ttggacgat tgccaattg agcaataat gactgaaatc
1981 aggtatggct gctgacggt atcttcaga ttgctcgag gacaacctct ctgaaggcat
2041 tgcgagtggt tggcgctga aacctggagc tcacaaccc aaggccaacc aacagcatca
2101 ggacaacggc aggggtctt gcttcttg gtacaagtac ctccgacct tcaacggact
2161 cgacaaggga gagccgtca acgaggcaga cgcgcggcc ctgagcagc acaaggccta
2221 cgacaagcag ctgagcagg gggacaaccc gtatctcaag tacaaccag ccgagccga
2281 gttcagcag cgttggcg cgcacacctc ttttggggc aacctcgggc gagcagttt
2341 ccaggccaaa aagaggatc tgcagcctc ggtgtgtgt gaagagggcg ttaaacggc
2401 tcttgaaag aaacgccc tagaaaagac tccaaatcgg ccgaccaacc cggactctgg
2461 gaaggcccc gccaagaaa agcaaaaaga cggcgaacca gccgactctg ctagaaggac
2521 actgacttt gaagactctg gacgaggaga cggacccct gagggatcat ctccggaga
2581 aatgtctcat gatctgaga tgcgtgcgc gccaggcgga aatgctgtc aggcgggaca
2641 aggtgccgat ggagtggta atgcctccg gtattggcat tgcattcca cctggtcaga
2701 gggccgagtc accaccacca gcaccgaac ctgggtccta cccagctaca acaaccact
2761 gtacctgca atcggaacaa cggccaacag caacacctac aacggattct ccacccctg
2821 gggatactt gactttaacc gtttccact ccactttcc ccacgcgact ggcagcgact

[0762]

[0763]

2881 catcaacaac aactggggac tcaggccgaa atcgatgcgt gttaaaatct tcaacataca
2941 ggtcaaggag gtcacgacgt caaacggcga gactacggtc gctaataacc ttaccagcac
3001 gggtcagatc ttgcggatt cgacgtatga actcccatac gtgatggacg ccggtcagga
3061 ggggagcttt cctccgttc ccaacgacgt ctttatggtt cccaatacag gatactgcgg
3121 agttgtcact ggaaaaaacc agaaccagac agacagaaat gccttttact gcctggaata
3181 ctttccatcc caaatgctaa gaactggcaa caatttgaa gtcagttacc aattgaaaa
3241 agttccttcc cattcaatgt acgcgcacag ccagagcctg gacagaatga tgaatcctt
3301 actggatcag tacctgtggc atctgcaatc gaccactacc ggaaattccc ttaatcaagg
3361 aacagctacc accacgtacg ggaaaattac cactggagac ttgcctact acaggaaaaa
3421 ctgggtgcct ggagcctgca ttaacaaca aaaattttca aagaatgcc aaaaaacta
3481 caagattccc gccagcgggg gagacgcct tttaaagtat gacacgcata cactctaaa
3541 tgggcgatgg agtaacatgg ctctggacc tccaatggca accgcagggtg ccgggggactc
3601 ggattttagc aacagccagc tgatcttgc cggaccaat ccgagcggta acacgaccac
3661 atcttcaaac aattgttgt ttacctcaga agaggagatt gccacaaca acccagaga
3721 cacggacatg ttggacaga ttgcagataa taatcaaat gccaccaccg cccctcat
3781 cgctaacctg gacgctatgg gaattgttc cggaatggc tggcaaaaca gagacatcta
3841 ctaccagggc cctatttggg ccaaggtccc tcacacggac ggacacttcc acccttgc
3901 gctgatggga ggatttgac tgaacaccc gcctccacag atttcatca aaaacacccc
3961 cgtacccgcc aatcccaata ctaccttag cgctgcaagg attaattct ttctgacga
4021 gtacagcacc ggacaagtg ccgttcagat cgactgggaa attcagaagg agcattccaa
4081 acgctggaat cccgaagttc aatttacttc aaactacggc actcaaaatt ctatgctgtg
4141 ggctcccac aatgctggca actaccaga actccgggct attgggtccc gtttctcac

序列表

<110> The University of North Carolina at Chapel Hill
Li, Chengwen
Samulski, Richard Jude

<120> 多倍体腺相关病毒载体及其制备和使用方法

<130> 5470-786W0

<150> US 62/471,762
<151> 2017-03-15

<150> US 62/520,901
<151> 2017-06-16

<150> US 62/630,558
<151> 2018-02-14

<160> 149

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

[0001]

<220>
<223> 肽

<400> 1

Arg Gly Asn Arg Gln Ala
1 5

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 其中Xaa是G或S

<400> 2

Asn Ser Val Arg Asp Leu Xaa
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 3

Pro Arg Ser Val Thr Val Pro
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa是任何天然存在的氨基酸

[0002]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa是S或A

<400> 4

Asn Ser Val Ser Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 5

Asn Gly Arg Ala His Ala
1 5

<210> 6
<211> 7

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	6
	Gln Pro Glu His Ser Ser Thr	
	1	5
	<210>	7
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	7
	Val Asn Thr Ala Asn Ser Thr	
	1	5
[0003]	<210>	8
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	8
	His Gly Pro Met Gln Lys Ser	
	1	5
	<210>	9
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	9
	Pro His Lys Pro Pro Leu Ala	
	1	5
	<210>	10
	<211>	7

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	10
	Ile Lys Asn Asn Glu Met Trp	
	1	5
	<210>	11
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	11
	Arg Asn Leu Asp Thr Pro Met	
	1	5
[0004]	<210>	12
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	12
	Val Asp Ser His Arg Gln Ser	
	1	5
	<210>	13
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	13
	Tyr Asp Ser Lys Thr Lys Thr	
	1	5
	<210>	14
	<211>	7

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	14
	Ser Gln Leu Pro His Gln Lys	
	1	5
	<210>	15
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	15
	Ser Thr Met Gln Gln Asn Thr	
	1	5
[0005]	<210>	16
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	16
	Thr Glu Arg Tyr Met Thr Gln	
	1	5
	<210>	17
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	17
	Asp Ala Ser Leu Ser Thr Ser	
	1	5
	<210>	18
	<211>	7

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	18
	Asp Leu Pro Asn Lys Lys Thr	
	1	5
	<210>	19
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	19
	Asp Leu Thr Ala Ala Arg Leu	
	1	5
[0006]	<210>	20
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	20
	Glu Pro His Gln Phe Asn Tyr	
	1	5
	<210>	21
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	21
	Glu Pro Gln Ser Asn His Thr	
	1	5
	<210>	22
	<211>	7

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	22
	Met Ser Ser Trp Pro Ser Gln	
	1	5
	<210>	23
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	23
	Asn Pro Lys His Asn Ala Thr	
	1	5
[0007]	<210>	24
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	24
	Pro Asp Gly Met Arg Thr Thr	
	1	5
	<210>	25
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	25
	Pro Asn Asn Asn Lys Thr Thr	
	1	5
	<210>	26
	<211>	7

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	26
	Gln Ser Thr Thr His Asp Ser	
	1	5
	<210>	27
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	27
	Thr Gly Ser Lys Gln Lys Gln	
	1	5
[0008]	<210>	28
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	28
	Ser Leu Lys His Gln Ala Leu	
	1	5
	<210>	29
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	29
	Ser Pro Ile Asp Gly Glu Gln	
	1	5
	<210>	30
	<211>	8

	<212> PRT
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 肽
	<400> 30
	Trp Ile Phe Pro Trp Ile Gln Leu
	1 5
	<210> 31
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 肽
	<400> 31
	Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
	1 5
[0009]	<210> 32
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 肽
	<400> 32
	Cys Asn Gly Arg Cys
	1 5
	<210> 33
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 肽
	<400> 33
	Cys Pro Arg Glu Cys Glu Ser
	1 5
	<210> 34
	<211> 10

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	34
	Cys Thr Thr His Trp Gly Phe Thr Leu Cys	
	1 5 10	
	<210>	35
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	35
	Cys Gly Arg Arg Ala Gly Gly Ser Cys	
	1 5	
[0010]	<210>	36
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	36
	Cys Lys Gly Gly Arg Ala Lys Asp Cys	
	1 5	
	<210>	37
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	37
	Cys Val Pro Glu Leu Gly His Glu Cys	
	1 5	
	<210>	38
	<211>	9

	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	38
	Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Lys	
	1	5
	<210>	39
	<211>	14
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	39
	Val Ser Trp Phe Ser His Arg Tyr Ser Pro Phe Ala Val Ser	
	1	5 10
[0011]	<210>	40
	<211>	13
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	40
	Gly Tyr Arg Asp Gly Tyr Ala Gly Pro Ile Leu Tyr Asn	
	1	5 10
	<210>	41
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(3)
	<223>	Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE

<222> (5).. (7)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 41

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> Xaa是E或M

<400> 42

Tyr Xaa Asn Trp
1

[0012]

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 43

Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 44

Ala Pro Pro Leu Pro Pro Arg
1 5

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 45

Asp Val Phe Tyr Pro Tyr Pro Tyr Ala Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 46

Met Tyr Trp Tyr Pro Tyr
1 5

[0013]

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 47

Asp Ile Thr Trp Asp Gln Leu Trp Asp Leu Met Lys
1 5 10

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa是G或L

<400> 48

Cys Trp Asp Asp Xaa Trp Leu Cys
1 5

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 49

Glu Trp Cys Glu Tyr Leu Gly Gly Tyr Leu Arg Cys Tyr Ala
1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

[0014]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 50

Tyr Xaa Cys Xaa Xaa Gly Pro Xaa Thr Trp Xaa Cys Xaa Pro
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 51

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

[0015] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(4)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa是Y, W, F或H

<400> 52

Leu Trp Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 53

Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Leu Trp
1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 54

Ser Ser Ile Ile Ser His Phe Arg Trp Gly Leu Cys Asp
1 5 10

[0016]

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 55

Met Ser Arg Pro Ala Cys Pro Pro Asn Asp Lys Tyr Glu
1 5 10

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 56

Cys Leu Arg Ser Gly Arg Gly Cys
1 5

<210> 57

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 57

Cys His Trp Met Phe Ser Pro Trp Cys
1 5

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

[0017] <400> 58

Trp Xaa Xaa Phe
1

<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 59

Cys Ser Ser Arg Leu Asp Ala Cys
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 60

Cys Leu Pro Val Ala Ser Cys
1 5

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 61

Cys Gly Phe Glu Cys Val Arg Gln Cys Pro Glu Arg Cys
1 5 10

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 62

[0018]

Cys Val Ala Leu Cys Arg Glu Ala Cys Gly Glu Gly Cys
1 5 10

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 63

Ser Trp Cys Glu Pro Gly Trp Cys Arg
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 64

Tyr Ser Gly Lys Trp Gly Trp
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 65

Gly Leu Ser Gly Gly Arg Ser
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 66

[0019]

Leu Met Leu Pro Arg Ala Asp
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 67

Cys Ser Cys Phe Arg Asp Val Cys Cys
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 68

Cys Arg Asp Val Val Ser Val Ile Cys
1 5

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 69

Met Ala Arg Ser Gly Leu
1 5

<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 70

[0020]

Met Ala Arg Ala Lys Glu
1 5

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 71

Met Ser Arg Thr Met Ser
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 72

Lys Cys Cys Tyr Ser Leu
1 5

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 73

Met Tyr Trp Gly Asp Ser His Trp Leu Gln Tyr Trp Tyr Glu
1 5 10

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 74

[0021]

Met Gln Leu Pro Leu Ala Thr
1 5

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 75

Glu Trp Leu Ser
1

<210> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 76

Ser Asn Glu Trp
1

<210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 77

Thr Asn Tyr Leu
1

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 78

[0022]

Trp Asp Leu Ala Trp Met Phe Arg Leu Pro Val Gly
1 5 10

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 79

Cys Thr Val Ala Leu Pro Gly Gly Tyr Val Arg Val Cys
1 5 10

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 80

Cys Val Ala Tyr Cys Ile Glu His His Cys Trp Thr Cys
1 5 10

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 81

Cys Val Phe Ala His Asn Tyr Asp Tyr Leu Val Cys
1 5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 82

[0023]

Cys Val Phe Thr Ser Asn Tyr Ala Phe Cys
1 5 10

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 83

Val His Ser Pro Asn Lys Lys
1 5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 84

Cys Arg Gly Asp Gly Trp Cys
1 5

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 85

[0024] Xaa Arg Gly Cys Asp Xaa
1 5

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa是S或T

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 86

	Pro Xaa Xaa Xaa
	1
	<210> 87
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 肽
	<400> 87
	Ser Gly Lys Gly Pro Arg Gln Ile Thr Ala Leu
	1 5 10
	<210> 88
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> 人工的
	<220>
	<223> 肽
[0025]	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (10).. (10)
	<223> Xaa是A或Q
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (11).. (11)
	<223> Xaa是N或A
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (12).. (12)
	<223> Xaa是L或Y
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (14).. (14)
	<223> Xaa是N, M或R
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (15).. (15)
	<223> Xaa是R或K
	<400> 88
	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa
	1 5 10 15

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 89

Val Tyr Met Ser Pro Phe
1 5

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 90

Ala Thr Trp Leu Pro Pro Arg
1 5

[0026]

<210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 91

His Thr Met Tyr Tyr His His Tyr Gln His His Leu
1 5 10

<210> 92
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 92

Ser Glu Val Gly Cys Arg Ala Gly Pro Leu Gln Trp Leu Cys Glu Lys
1 5 10 15

Tyr Phe Gly

<210> 93
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 93

Cys Gly Leu Leu Pro Val Gly Arg Pro Asp Arg Asn Val Trp Arg Trp
1 5 10 15

Leu Cys

<210> 94
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

[0027]

<220>
<223> 肽

<400> 94

Cys Lys Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Gly Leu Pro Trp Glu Cys
1 5 10 15

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 95

Ser Gly Arg Ser Ala
1 5

<210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 96
Trp Gly Phe Pro
1

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(4)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
[0028] <223> Xaa是Y, W, F或H

<400> 97
Leu Trp Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(4)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 98

Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Leu Trp
1 5

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 99

Ala Glu Pro Met Pro His Ser Leu Asn Phe Ser Gln Tyr Leu Trp Tyr
1 5 10 15

Thr

<210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

[0029]

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa是W或F

<400> 100

Trp Ala Tyr Xaa Ser Pro
1 5

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 101

Ile Glu Leu Leu Gln Ala Arg
1 5

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 102

Asp Ile Thr Trp Asp Gln Leu Trp Asp Leu Met Lys
1 5 10

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 103

Ala Tyr Thr Lys Cys Ser Arg Gln Trp Arg Thr Cys Met Thr Thr His
1 5 10 15

[0030]

<210> 104
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 104

Pro Gln Asn Ser Lys Ile Pro Gly Pro Thr Phe Leu Asp Pro His
1 5 10 15

<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 105

Ser Met Glu Pro Ala Leu Pro Asp Trp Trp Trp Lys Met Phe Lys
1 5 10 15

<210> 106
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 106

Ala	Asn	Thr	Pro	Cys	Gly	Pro	Tyr	Thr	His	Asp	Cys	Pro	Val	Lys	Arg
1				5					10					15	

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 107

Thr	Ala	Cys	His	Gln	His	Val	Arg	Met	Val	Arg	Pro
1				5					10		

[0031]

<210> 108
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 108

Val	Pro	Trp	Met	Glu	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Phe	Leu
1				5					10		

<210> 109
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 109

Asp	Pro	Arg	Ala	Thr	Pro	Gly	Ser
1				5			

<210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽

<400> 110

Phe	Arg	Pro	Asn	Arg	Ala	Gln	Asp	Tyr	Asn	Thr	Asn
1				5					10		

<210> 111
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽

<400> 111

Cys	Thr	Lys	Asn	Ser	Tyr	Leu	Met	Cys
1				5				

[0032]

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa是R或Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa是L或R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa是G或N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(7)
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa是A或N

<400> 112

Cys Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Gly Cys
1 5 10

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 113

Cys Pro Ile Glu Asp Arg Pro Met Cys
1 5

[0033] <210> 114
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 114

His Glu Trp Ser Tyr Leu Ala Pro Tyr Pro Trp Phe
1 5 10

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 115

Met Cys Pro Lys His Pro Leu Gly Cys
1 5

<210> 116
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 116

Arg Met Trp Pro Ser Ser Thr Val Asn Leu Ser Ala Gly Arg Arg
1 5 10 15

<210> 117
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 117

Ser Ala Lys Thr Ala Val Ser Gln Arg Val Trp Leu Pro Ser His Arg
1 5 10 15

[0034] Gly Gly Glu Pro
20

<210> 118
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 118

Lys Ser Arg Glu His Val Asn Asn Ser Ala Cys Pro Ser Lys Arg Ile
1 5 10 15

Thr Ala Ala Leu
20

<210> 119
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

	<400>	119
	Glu Gly Phe Arg	
	1	
	<210>	120
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	120
	Ala Gly Leu Gly Val Arg	
	1	5
	<210>	121
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
[0035]	<400>	121
	Gly Thr Arg Gln Gly His Thr Met Arg Leu Gly Val Ser Asp Gly	
	1	5 10 15
	<210>	122
	<211>	15
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽
	<400>	122
	Ile Ala Gly Leu Ala Thr Pro Gly Trp Ser His Trp Leu Ala Leu	
	1	5 10 15
	<210>	123
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	肽

<400> 123

Ser Met Ser Ile Ala Arg Leu
1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 124

His Thr Phe Glu Pro Gly Val
1 5

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

[0036]

<400> 125

Asn Thr Ser Leu Lys Arg Ile Ser Asn Lys Arg Ile Arg Arg Lys
1 5 10 15

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 126

Leu Arg Ile Lys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Thr Arg Lys
1 5 10 15

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

	<400> 127 aaaagcactc tgattgacaa atac	24
	<210> 128 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
	<400> 128 ccttcgcttc aaaaaatgga ac	22
	<210> 129 <211> 23 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
	<400> 129 ggaccaagg actacctcaa ggg	23
[0037]	<210> 130 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
	<400> 130 agggcacctc catctcgga ac	22
	<210> 131 <211> 5 <212> PRT <213> 人工的	
	<220> <223> 肽	
	<400> 131 Lys Leu Lys Gln Pro 1 5	
	<210> 132 <211> 19	

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 132

Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys Leu Lys Gln Pro
1 5 10 15

Ala Asp Gly

<210> 133
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 133

[0038] Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala
1 5 10 15

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro
20 25

<210> 134
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 肽

<400> 134

Lys Asn Glu Ser Ser Thr Asn Ala Thr Asn Thr Lys Gln Trp Arg Asp
1 5 10 15

Glu Thr Lys Gly Phe Arg Asp Glu Ala Lys Arg Phe Lys Asn Thr Ala
20 25 30

Gly

<210> 135
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽

<400> 135

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
 20

<210> 136
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽

<400> 136

[0039]

Cys Gly Cys Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly
 1 5 10

<210> 137
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 肽

<400> 137

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 138
 <211> 4636
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> AAV1

<400> 138

ctctccccc tgcgcgttc gctcgtcgc tggctcgttt gggggggtgg cagctcaaag

60

[0040]	agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa	120
	cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggagg ttttgtaagt ggtgatgtca	180
	tatagttgtc acgcgatagt taatgattaa cagtcaggtg atgtgtgtta tccaatagga	240
	tgaaagcgcg cgcatgagtt ctgcgagac ttccggggta taaaggggtg agtgaacgag	300
	cccgcgcca ttctctgctc tgaactgcta gaggaccctc gctgccatgg ctaccttcta	360
	cgaagtcatt gttcgcgtcc catttgacgt ggaggaacat ctgcctggaa tttctgacag	420
	ctttgtggac tgggtaactg gtcaaatttg ggagctgcct cccgagtcag atttgaattt	480
	gactctgatt gagcagcctc agctgacggg tgctgacaga attcgccgcg tgttcctgta	540
	cgagtggaa aaattttcca agcaggaatc caaattcttt gtgcagtttg aaaagggatc	600
	tgaatatattt catctgcaca cgcttgtgga gacctccggc atctcttcca tggctcctagg	660
	ccgctacgtg agtcagattc gcgcccagct ggtgaaagtg gtcttccagg gaatcgagcc	720
	acagatcaac gactgggtcg ccatcaccaa ggtaaagaag ggcggagcca ataaggtggt	780
	ggattctggg tatattcccg cctacctgct gccgaaggte caaccggagc ttcagtgggc	840
	gtggacaaac ctggacgagt ataaattggc cgccctgaac ctggaggagc gcaaacggct	900
	cgctcgcgag tttctggcag aatcctcgca gcgctcgcag gaggcggctt cgcagcgtga	960
	gttctcggtt gacccggta tcaaaagcaa gacttcccag aaatacatgg cgctcgtcaa	1020
	ctggctcgtg gagcacggca tcacttccga gaagcagtgg atccaggaga atcaggagag	1080
	ctacctctcc ttcaactcca cgggcaactc tcggagccaa atcaaggccg cgctcgacaa	1140
	cgcgacaaa atcatgagtc tgacaaaaag cgcggtggac tacctcgtgg ggagctccgt	1200
	tcccgaggac atttcaaaaa acagaatctg gcaaattttt gagatgaacg gctacgaccc	1260
	ggcctacgcg ggatecatcc tctacggctg gtgtcagcgc tccttcaaca agaggaacac	1320
	cgtctggctc tacggaccgg ccacgaccgg caagaccaac atcgcgagg ccatcgccca	1380
	cactgtgccc ttttacggct gcgtgaactg gaccaatgaa aactttccct ttaatgactg	1440
	tgtggacaaa atgctcattt ggtgggagga gggaaagatg accaacaagg tggttgaatc	1500
	cgccaaggcc atcctggggg gctccaaggt gcgggtcgat cagaaatgta aatcctctgt	1560
	tcaaattgat tctacccccg tcattgtaac ttccaatata aacatgtgtg tgggtgtgga	1620
	tgggaattcc acgaccttg aacaccagca gccgctggag gaccgcatgt tcaaatttga	1680
	actgactaag cggtccccgc cagatttttg caagattact aagcaggaag tcaaagactt	1740

[0041]	ttttgcttgg gcaaaggtca atcaggtgcc ggtgactcac gagtttaaag ttcccaggga	1800
	attggcggga actaaagggg cggagaaatc tctaaaacgc ccactgggtg acgtcaccaa	1860
	tactagctat aaaagtccag agaagcgggc cgggtctctca tttgttcccg agacgcctcg	1920
	cagttcagac gtgactgtcg atcccgtcc tctgcgaccg ctcaattgga attcaaggta	1980
	tgattgcaaa tgtgaccatc atgtcaatt tgacaacatt tctgacaaat gtgatgaatg	2040
	tgaatatttg aatcggggca aaaatggatg tatctgtcac aatgtaactc actgtcaaat	2100
	ttgtcacggg attccccct gggagaagga aaacttgtca gattttgggg attttgacga	2160
	tgccaataaa gaacagtaaa taaagcgagt agtcatgtct tttgttgatc accctccaga	2220
	ttggttgga gaagtgtg aaggtcttcg cgagttttg gcccttgaag cgggcccacc	2280
	gaaaccgaaa cccaatcagc agcatcaaga tcaagcccgt ggtcttgtgc tgcctggta	2340
	taactatctc ggacccggaa acggtctcga tcgaggagag cctgtcaaca gggcagacga	2400
	ggtcgcgcga gagcacgaca tctcgtacaa cgagcagctt gaggcgggag acaacccta	2460
	cctcaagtac aaccacgcg acgccgagtt tcaggagaag ctcgccgacg acacatcctt	2520
	cgggggaaac ctcggaaagg cagtctttca ggccaagaaa agggttctcg aaccttttgg	2580
	cctggttgaa gaggtgcta agacggcccc taccggaaag cggatagacg accactttcc	2640
	aaaaagaaag aaggctcgga ccgaagagga ctccaagcct tccacctcgt cagacgccga	2700
	agctggacce agcggatecc agcagctgca aatcccagca caaccagcct caagtttggg	2760
	agctgataca atgtctgcgg gaggtggcgg ccatttgggc gacaataacc aagtgccga	2820
	tggagtgggc aatgcctcgg gagattggca ttgcgattcc acgtggatgg gggacagagt	2880
	cgtcaccaag tccaccgca cctgggtgct gccagctac aacaaccacc agtaccgaga	2940
	gatcaaaagc ggctccgtcg acggaagcaa cgccaacgcc tactttggat acagaccccc	3000
	ctgggggtac tttgacttta accgcttcca cagccactgg agccccgag actggcaaag	3060
	actcatcaac aactattggg gcttcagacc cgggtctctc agagtcaaaa tcttcaacat	3120
	ccaagtcaaa gaggtcacgg tgcaggactc caccaccacc atcgccaaca acctcacctc	3180
	caccgtccaa gtgtttacgg acgacgacta ccaactcccg tacgtcgtcg gcaacgggac	3240
	cgagggatgc ctgccgcct tcccccgca ggtctttacg ctgccgcagt acggctacgc	3300
	gacgtgaac cgagacaacg gagacaaccc gacagagcgg agcagcttct tttgcctaga	3360
	gtactttccc agcaagatgc tgaggacggg caacaacttt gagtttacct acagctttga	3420

	agaggtgccc ttccactgca gcttcgcccc gagccagaac ctctttaagc tggccaaccc	3480
	gctggtggac cagtacctgt accgcttcgt gagcacctcg gccacgggcg ccatccagtt	3540
	ccaaaagaac ctggcgggca gatacgccaa cacctacaaa aactggttcc cggggcccat	3600
	gggccgaacc cagggctgga acacgagctc tggcagcagc accaacagag tcagcgtaa	3660
	caacttttcc gtctcaaacc ggatgaacct ggagggggcc agctaccaag tgaaccccca	3720
	gccaacggg atgacaaaca cgtccaagg cagcaaccgc tacgcgctgg aaaacaccat	3780
	gatcttcaac gctcaaaacg ccacgccggg aactacctcg gtgtaccag aggacaatct	3840
	actgctgacc agcgagagcg agactcagcc cgtcaaccgg gtggcttaca acacgggcgg	3900
	tcagatggcc accaacgccc agaacgccac cacggctccc acggtcggga cctacaacct	3960
	ccaggaagtg cttcctggca gcgtatggat ggagagggac gtgtacctcc aaggacccat	4020
	ctgggccaaag atcccagaga cgggggcgca ctttcacccc tctccggcca tggcggtt	4080
	cggactcaaa caccgcgcg ccatgatgct catcaaaaac acgccggtgc ccggcaacat	4140
	caccagcttc tcggacgtgc ccgtcagcag cttcatcacc cagtacagca ccgggcaggt	4200
[0042]	caccgtggag atggaatggg agtcaaaaa ggaaaactcc aagaggtgga acccagagat	4260
	ccagtacacc aacaactaca acgaccccca gtttgtggac tttgctccag acggctccgg	4320
	cgaatacaga accaccagag ccatcggaac ccgatactc acccgacccc tttaacccat	4380
	tcattgtcga taccctcaat aaaccgtgta ttcgtgtcag tgaaatactg cctcttgtgg	4440
	tcattcaatg aacatcagct tacaacatct acaaaacccc cttgcttgag agtgtggcac	4500
	tctccccct gtcggttcg ctcgctcgt ggctcgttg ggggggtggc agtcaaaga	4560
	gttgccagac gacggcctc tggccgtcg cccccaaac gagccagcga gcgagcgaac	4620
	gcgacagggg ggagag	4636
	<210> 139	
	<211> 4679	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV2	
	<400> 139	
	ttggccaetc cctctctgcg cgtcgtcgt ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
	cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agaggagtg	120

[0043]	gccaactcca tcactagggg ttcctggagg ggtggagtcg tgacgtgaat tacgtcatag	180
	ggttagggag gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat	240
	gtggtcacgc tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga	300
	ggtttgaacg cgcagccgcc atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg	360
	accttgacga gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg	420
	aatgggagtt gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga	480
	ccgtggccga gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc	540
	cggaggccct tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc	600
	tcgttgaaac caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg	660
	aaaaactgat tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg	720
	tcacaaagac cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc	780
	ccaattactt gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac	840
	agtatttaag cgctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga	900
	cgcacgtgtc gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc	960
	cggatgatcag atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctggaca	1020
	aggggattac ctcgagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctcettca	1080
	atgcggcctc caactcgcgg tcccaaatca aggetgcctt ggacaatgcg ggaaagatta	1140
	tgagcctgac taaaaccgcc cccgactacc tgggtggcca gcagcccgtg gaggacattt	1200
	ccagcaatcg gatttataaa attttggaa taaacgggta cgatcccaa tatgcgctt	1260
	ccgtctttct gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggtgtttg	1320
	ggcctgcaac taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct	1380
	acgggtgcgt aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg	1440
	tgatctggtg ggaggagggg aagatgaccg ccaaggctcg ggagtcggcc aaagccattc	1500
	tcggaggaag caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcgcccag atagaccga	1560
	ctcccgtgat cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga	1620
	ccttcgaaca ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc	1680
	tggatcatga ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttct cggtgggcaa	1740
	aggatcacgt ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaaagaaa	1800

[0044]	gacccgcccc cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc	1860
	agccatcgac gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat	1920
	gttctcgtca cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga	1980
	atcagaattc aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg	2040
	tgtcagaatc tcaaccggtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc	2100
	atcatatcat gggaaagggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt	2160
	tggatgactg catctttgaa caataaatga tttaaatacag gtatggctgc cgatggttat	2220
	cttcagatt ggctcgagga cactctctct gaaggaataa gacagtgggtg gaagctcaaa	2280
	cctggcccc caccacaaa gcccgagag cggcataagg acgacagcag gggctctgtg	2340
	cttctgggtt acaagtacct cggacccttc aacggactcg acaagggaga gccggtcaac	2400
	gaggcagacg ccgcggccct cgagcacgac aaagcctacg accggcagct cgacagcgga	2460
	gacaaccgtt acctcaagta caaccacgcc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaaagaa	2520
	gatacgtctt ttgggggcaa cctcggacga gcagtcttcc aggcgaaaaa gagggttctt	2580
	gaacctctgg gcctggttga ggaacctgtt aagacggctc cgggaaaaaa gaggccggtg	2640
	gagcactctc ctgtggagcc agactcctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagcct	2700
	gcaagaaaaa gattgaattt tggtcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccccag	2760
	cctctcggac agccaccage agccccctct ggtctgggaa ctaatacgat ggctacaggc	2820
	agtggcgcac caatggcaga caataacgag ggcgccgacg gagtgggtaa ttctcggga	2880
	aattggcatt gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag caccgaacc	2940
	tgggccctgc ccacctaaa caaccacctc taaaacaaa tttccagcca atcaggagcc	3000
	tcgaacgaca atcactactt tggtacagc accccttggg ggtattttga cttcaacaga	3060
	ttcactgcc acttttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaacaa ctggggatc	3120
	cgaccaaga gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaagaggt cacgcagaat	3180
	gacggtacga cgacattgc caataacctt accagcacgg ttcagggtgtt tactgactcg	3240
	gagtaccage tcccgtagct cctcggctcg gcgcatacag gatgcctccc gccgttcca	3300
	gcagacgtct tcatggtgcc acagtatgga tacctcacc tgaacaacgg gagtacggca	3360
	gtaggacgt cttcatttta ctgcctggag tactttcctt ctcagatgct gcgtaccgga	3420
	aacaacttta ccttcagcta cacttttgag gacgttcctt tccacagcag ctacgtcac	3480

	agccagagtc tggaccgtct catgaatcct ctcacgcacc agtacctgta ttacttgagc	3540
	agaacaaaca ctccaagtgg aaccaccacg cagtcaaggc ttcagttttc tcaggccgga	3600
	gcgagtgaca ttccgggacca gtctaggaac tggcttctctg gaccctgtta ccgccagcag	3660
	cgagtatcaa agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc	3720
	aagtaccacc tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccgcccat ggcaagccac	3780
	aaggacgatg aagaaaagtt ttttcctcag agcgggggtc tcacttttgg gaagcaaggc	3840
	tcagagaaaa caaatgtgga cattgaaaag gtcatgatta cagacgaaga ggaaatcagg	3900
	acaaccaatc ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc	3960
	aacagacaag cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttccagg catggtcttg	4020
	caggacagag atgtgtacct tcaggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga	4080
	cattttcacc cctctccct catgggtgga ttccgactta aacaccctcc tccacagatt	4140
	ctcatcaaga acaccccgtt acctgcgaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt	4200
	gtttccttca tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg	4260
[0045]	cagaaggaaa acagcaaacg ctggaatccc gaaattcagt acacttccaa ctacaacaag	4320
	tctgttaatg tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt	4380
	ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa ttgcttgta atcaataaac cgtttaattc	4440
	gtttcagttg aactttggtc tctgcgtatt tctttcttat ctagtttcca tggctacgta	4500
	gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc	4560
	actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcgccacgc	4620
	ccgggctttg cccggggcgc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaa	4679
	<210> 140	
	<211> 4726	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV3	
	<400> 140	
	ttggccactc cctctatgcg cactcgtcgc ctcggtgggg cctggcgacc aaaggtcgcc	60
	agacggacgt gctttgcacg tccggcccca ccgagcgagc gagtgcgcat agagggagtg	120
	gccaaactca tcaactagagg tatggcagtg acgtaacgcg aagcgcgcga agcgagacca	180

[0046]	cgccctaccag ctgcgtcagc agtcagggtga cccttttgcg acagtttgcg acaccacgtg	240
	gccgctgagg gtatatattc tcgagtgagc gaaccaggag ctccattttg accgcgaaat	300
	ttgaacgagc agcagccatg ccgggggttct acgagattgt cctgaaggtc ccgagtgacc	360
	tggacgagcg cctgccgggc atttctaact cgtttggtta ctgggtggcc gagaaggaat	420
	gggacgtgcc gccggattct gacatggatc cgaatctgat tgagcaggca cccctgaccg	480
	tggccgaaaa gcttcagcgc gagttcctgg tggagtggcg ccgctgagt aaggccccgg	540
	aggccctctt ttttgtccag ttcgaaaagg gggagaccta cttccacctg cacgtgctga	600
	ttgagaccat cgggggtcaaa tccatggtgg tcggccgcta cgtgagccag attaaagaga	660
	agctgggtgac ccgcatctac cgcgggggtcg agccgcagct tccgaactgg ttcgcggtga	720
	ccaaaacgcg aaatggcgcc gggggcgagg acaagggtgt ggacgactgc tacatcccca	780
	actacctgt cccaagacc cagcccagc tccagtgggc gtggactaac atggaccagt	840
	atttaagcgc ctgtttgaat ctgcggagc gtaaaccgct ggtggcgag catctgacgc	900
	acgtgtcgca gacgcaggag cagaacaaag agaatcagaa cccaattct gacgcgccg	960
	tcacaggtc aaaaacctca gccaggtaca tggagctggt cgggtggctg gtggaccg	1020
	ggatcacgtc agaaaagcaa tggattcagg aggaccaggc ctctacatc tcctcaacg	1080
	ccgcctcaa ctgcggtcc cagatcaagg ccgctgga caatgcctcc aagatcatga	1140
	gcctgacaaa gacggctccg gactacctgg tgggcagcaa cccgccggag gacattacca	1200
	aaaatcgat ctaccaaatc ctggagctga acgggtacga tccgcagtac gcggcctccg	1260
	tcttcctggg ctgggcgcaa aagaagttcg ggaagaggaa caccatctgg ctctttgggc	1320
	cggccacgac gggtaaaacc aacatcgcg aagccatgc ccacgccgtg cctttctacg	1380
	gctgcgtaaa ctggaccaat gagaacttcc cttcaacga ttgcgtcgac aagatggtga	1440
	tctggtggga ggagggaag atgacggcca aggtcgtgga gagcgccaag gccattctgg	1500
	gcggaagcaa ggtgcgctg gacaaaaagt gcaagtcac ggcccagatc gaaccactc	1560
	ccgtgatcgt cactccaac accaactatg gcgccgtgat tgacgggaac agcaccacct	1620
	tcgagcatca gcagccgctg caggaccgga tgtttgaatt tgaacttacc cgccgtttgg	1680
	accatgactt tgggaaggtc accaaacagg aagtaaagga ctttttccgg tgggcttccg	1740
	atcacgtgac tgacgtggct catgagttct acgtcagaaa ggggtggagct aagaaacgcc	1800
	ccgcctcaa tgacgcggat gtaagcgagc caaaacggga gtgcacgtca cttgcgcagc	1860

[0047]	cgacaacgtc agacgcggaa gcaccggcgg actacgcgga caggtaccaa aacaaatggt	1920
	ctcgtcacgt gggcatgaat ctgatgcttt ttccctgtaa aacatgcgag agaataaatc	1980
	aaattttcaa tgtctgtttt acgcatggtc aaagagactg tggggaatgc ttccctggaa	2040
	tgtcagaatc tcaacccgtt tctgtcgtca aaaagaagac ttatcagaaa ctgtgtccaa	2100
	ttcatcatat cctgggaagg gcaccgaga ttgcctgttc ggctgcgat ttggccaatg	2160
	tggacttgga tgactgtgtt tctgagcaat aaatgactta aaccaggtat ggctgctgac	2220
	ggttatcttc cagattggct cgaggacaac ctttctgaag gcattcgtga gtggtgggct	2280
	ctgaaacctg gagtcctca acccaaagcg aaccaacaac accaggacaa ccgtcggggt	2340
	cttgtgttc cgggttacia atacctcgga cccggtaacg gactcgacaa aggagagccg	2400
	gtcaacgagg cggacgcggc agccctcgaa cagacaaaag cttacgacca gcagctcaag	2460
	gccggtgaca acccgtacct caagtacaac cagcccgacg ccgagtttca ggagcgtctt	2520
	caagaagata cgtcttttgg gggcaacctt ggagagcag tcttccaggc caaaaagagg	2580
	atccttgagc ctcttggtct ggttgaggaa gcagctaaaa cggtccttg aaagaagggg	2640
	gctgtagatc agtctctca ggaaccggac tcatcatctg gtgttgcaa atcgggcaaa	2700
	cagcctgcca gaaaaagact aaatttcggt cagactggag actcagagtc agtcccagac	2760
	cctcaacctc tcggagaacc accagcagcc cccacaagtt tgggatctaa tacaatggct	2820
	tcaggcgggt gcgcaccaat ggagacaaat aacgagggtg ccgatggagt gggtaattcc	2880
	tcaggaaatt ggcattgcga ttcccaatgg ctgggcgaca gactcatcac caccagcacc	2940
	agaacctggg cctgcccac ttacaacaac catctctaca agcaaattct cagccaatca	3000
	ggagcttcaa acgacaacca ctactttggc tacagcacc cttgggggta ttttgacttt	3060
	aacagattcc actgccatt ctcaccacgt gactggcagc gactcattaa caacaactgg	3120
	ggattccggc ccaagaaact cagcttcaag ctcttcaaca tccaagttag aggggtcacg	3180
	cagaacgatg gcacgacgac tattgccaat aaccttacca gcacggttca agtgtttacg	3240
	gactcggagt atcagctccc gtacgtgctc gggtcggcgc accaaggctg tctcccgcg	3300
	tttccagcgg acgtcttcat ggtccctcag tatggatacc tcacctgaa caacggaagt	3360
	caagcgggtg gacgtcctc cttttactgc ctggagtact tcccttcgca gatgctaagg	3420
	actggaaata acttccaatt cagctatacc ttcgaggatg taccttttca cagcagctac	3480
	gtcacagcc agagtttgga tcgcttgatg aatcctctta ttgatcagta tctgtactac	3540

[0048]	ctgaacagaa cgcaaggaac aacctctgga acaaccaacc aatcacggct gcttttttagc	3600
	caggctgggc ctccagtctat gtctttgcag gccagaaatt ggctacctgg gccctgctac	3660
	cggcaacaga gactttcaaa gactgctaac gacaacaaca acagtaactt tccttggaca	3720
	gcggccagca aatatcatct caatggccgc gactcgctgg tgaatccagg accagctatg	3780
	gccagtcaca aggacgatga agaaaaattt ttccctatgc acggcaatct aatatttggc	3840
	aaagaaggga caacggcaag taacgcagaa ttagataatg taatgattac ggatgaagaa	3900
	gagattcgta ccaccaatcc tgtggcaaca gagcagtatg gaactgtggc aaataacttg	3960
	cagagctcaa atacagctcc cagcactgga actgtcaatc atcagggggc cttacctggc	4020
	atggtgtggc aagatcgtga cgtgtacctt caaggaccta tctgggcaaa gattcctcac	4080
	acggatggac actttcatcc ttctcctctg atgggaggct ttggactgaa acatccgcct	4140
	cctcaaatca tgatcaaaaa tactccggta ccggcaaate ctccgacgac tttcagcccg	4200
	gccaaagttg cttcatttat cactcagtac tccactggac aggtcagcgt ggaaattgag	4260
	tgggagctac agaaagaaaa cagcaaacgt tggaatccag agattcagta cacttccaac	4320
	tacaacaagt ctgttaatgt ggactttact gtagacacta atggtgttta tagtgaacct	4380
	cgccctattg gaacccggta tctcacacga aacttgtgaa tcctgggttaa tcaataaacc	4440
	gtttaattcg tttcagttga actttggctc ttgtgcactt ctttatcttt atcttgtttc	4500
	catggctact gcgtagataa gcagcggcct gcggcgcttg cgcttcgcgg tttacaactg	4560
	ctggttaata tttaactctc gccatactc tagtgatgga gttggccact ccctctatgc	4620
	gcactcgctc gctcgggtggg gcctggcgac caaaggtcgc cagacggacg tgctttgcac	4680
	gtccggcccc accgagcgag cgagtgcgca tagagggagt ggccaa	4726
	<210> 141	
	<211> 4767	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV4	
	<400> 141	
	ttggccactc cctctatgcg cgctcgctca ctactcggc cctggagacc aaaggtctcc	60
	agactgccgg cctctggccg gcagggccga gtgagtgagc gagcgcgcat agagggagtg	120
	gccaaactca tcatctaggt ttgccactg acgtcaatgt gacgtcctag ggtagggag	180

[0049]	gtccctgtat tagcagtcac gtgagtgtcg tatttcgcgg agcgtagcgg agcgcatacc	240
	aagctgccac gtcacagcca cgtgggtccgt ttgcgacagt ttgcgacacc atgtgggtcag	300
	gagggtatat aaccgcgagt gagccagcga ggagctccat tttgcccgcg aattttgaac	360
	gagcagcagc catgccgggg ttctacgaga tcgtgtctgaa ggtgcccagc gacctggacg	420
	agcacctgcc cggcatttct gactcttttg tgagctgggt ggccgagaag gaatgggagc	480
	tgccgccgga ttctgacatg gacttgaatc tgattgagca ggcacccctg accgtggccg	540
	aaaagctgca acgcgagttc ctggtcagat ggccgccgct gagtaaggcc ccggaggccc	600
	tcttctttgt ccagttcgag aagggggaca gctacttcca cctgcacatc ctggtggaga	660
	ccgtgggcgt caaatccatg gtggtgggcc gctacgtgag ccagattaaa gagaagctgg	720
	tgaccgcgat ctaccgcggg gtcgagccgc agcttccgaa ctggttcgcg gtgaccaaga	780
	cgcgtaatgg cgccggaggc gggaacaagg tgggtggacga ctgctacatc cccaactacc	840
	tgctcccaa gaccagccc gagtccagt gggcgtggac taacatggac cagtatataa	900
	gcgcctgttt gaatctcgcg gagcgtaaac ggctggtggc gcagcatctg acgcacgtgt	960
	cgcagacgca ggagcagaac aagggaaaacc agaaccctaa ttctgacgcg ccggtcatca	1020
	ggtcaaaaac ctccgccagg tacatggagc tggctcgggtg gctggtggac cgcgggatca	1080
	cgtcagaaaa gcaatggatc caggaggacc aggcgtccta catctccttc aacgccgcct	1140
	ccaactcgcg gtcacaaatc aaggccgcgc tggacaatgc ctccaaaatc atgagcctga	1200
	caaagacggc tccgactac ctggtgggcc agaaccgcc ggaggacatt tccagcaacc	1260
	gcatctaccg aatcctcgag atgaacgggt acgatccgca gtacgcggcc tccgtcttcc	1320
	tgggctgggc gcaaaagaag ttcgggaaga ggaacacat ctggctcttt gggccggcca	1380
	cgcgggtaa aaccaacatc gcggaagcca tcgccacgc cgtgcccttc tacggctgcg	1440
	tgaactggac caatgagaac tttccgttca acgattgctg cgacaagatg gtgatctggt	1500
	gggaggaggg caagatgacg gccaaggctg tagagagcgc caaggccatc ctgggcggaa	1560
	gcaaggtgcg cgtggaccaa aagtcaagt catcgccca gatcgacca actcccgtga	1620
	tcgtcacctc caacaccaac atgtgcgcgg tcatcgacgg aaactcgacc accttcgagc	1680
	accaacaacc actccaggac cggatgttca agttcgagct caccaagcgc ctggagcacg	1740
	actttgcaa ggtcaccaag caggaagtca aagacttttt ccggtgggcg tcagatcacg	1800
	tgaccgaggt gactcacgag ttttacgtca gaaagggtg agctagaaag agggccgccc	1860

[0050]	ccaatgacgc agatataagt gagcccaagc gggcctgtcc gtcagttgcg cagccatcga	1920
	cgtcagacgc ggaagctccg gtggactacg cggacaggta ccaaaacaaa tgttctcgtc	1980
	acgtgggtat gaatctgatg ctttttccct gccggcaatg cgagagaatg aatcagaatg	2040
	tggacatttg cttcacgcac ggggtcatgg actgtgccga gtgcttcccc gtgtcagaat	2100
	ctcaacccgt gtctgtcgtc agaaagcgga cgtatcagaa actgtgtccg attcatcaca	2160
	tcatggggag ggcgcccag gtggcctgct cggcctgcga actggccaat gtggacttgg	2220
	atgactgtga catggaacaa taaatgactc aaaccagata tgactgacgg ttaccttcca	2280
	gattggctag aggacaacct ctctgaaggc gttcgagagt ggtgggcgct gcaacctgga	2340
	gccctaaac ccaaggcaaa tcaacaacat caggacaacg ctcggggctct tgtgcttccg	2400
	ggttacaaat acctcggaac cggcaacgga ctgcacaagg gggaacccgt caacgcagcg	2460
	gacgcggcag ccctcgagca cgacaaggcc tacgaccagc agctcaaggc cggtgacaac	2520
	ccctacctca agtacaacca cgccgacgcg gagttccagc agcggcttca gggcgacaca	2580
	tcgtttgggg gcaacctcgg cagagcagtc ttccaggcca aaaagagggt tcttgaacct	2640
	cttggtctgg ttgagcaagc gggtagacg gctcctggaa agaagagacc gttgattgaa	2700
	tccccccagc agcccgaact ctccacgggt atcggcaaaa aaggcaagca gccggctaaa	2760
	aagaagctcg ttttcgaaga cgaaactgga gcaggcgacg gaccccctga gggatcaact	2820
	tccggagcca tgtctgatga cagtgatg cgtgcagcag ctggcggagc tgcagtcgag	2880
	ggcggacaag gtgccgatgg agtgggtaat gcctcgggtg attggcattg cgattccacc	2940
	tggtctgagg gccacgtcac gaccaccagc accagaacct gggctcttgc cacctacaac	3000
	aaccacctct acaagegact cggagagagc ctgcagtcca acacctacaa cggattctcc	3060
	accccctggg gatactttga cttcaaccgc ttccactgcc acttctcacc acgtgactgg	3120
	cagcgactca tcaacaacaa ctggggcatg cgacccaaag ccatgcgggt caaaatcttc	3180
	aacatccagg tcaaggaggt cacgacgtcg aacggcgaga caacgggtggc taataacctt	3240
	accagcacgg ttcagatctt tgcggactcg tcgtacgaac tgccgtacgt gatggatgcg	3300
	ggtcaagagg gcagcctgcc tccttttccc aacgacgtct ttatggtgcc ccagtacggc	3360
	tactgtggac tggtgaccgg caacacttcg cagcaacaga ctgacagaaa tgcttcttac	3420
	tgcttgaggt actttccttc gcagatgctg cggactggca acaactttga aattacgtac	3480
	agttttgaga aggtgccttt cactcgatg tacgcgcaca gccagagcct ggaccggctg	3540

	atgaaccctc tcatcgacca gtacctgtgg ggactgcaat cgaccaccac cggaaccacc	3600
	ctgaatgccg ggactgccac caccaacttt accaagctgc ggccctaccaa cttttccaac	3660
	tttaaaaaga actggctgcc cgggccttca atcaagcagc agggcttctc aaagactgcc	3720
	aatcaaaact acaagatccc tgccaccggg tcagacagtc tcatcaaata cgagacgcac	3780
	agcactctgg acggaagatg gaggccctg acccccggac ctccaatggc cacggctgga	3840
	cctgctggaca gcaagttcag caacagccag ctcatctttg cggggcctaa acagaacggc	3900
	aacacggcca ccgtaccggg gactctgate ttacactctg aggaggagct ggcagccacc	3960
	aacgccaccg atacggacat gtggggcaac ctacctggcg gtgaccagag caacagcaac	4020
	ctgccgaccg tggacagact gacagccttg ggagccgtgc ctggaatggc ctggcaaaac	4080
	agagacattt actaccaggg tcccatttgg gccaagattc ctcataccga tggacattt	4140
	caccctcac cgctgatttg tgggtttggg ctgaaacacc cgctctctca aatttttacc	4200
	aagaacaccc cggctacctg gaatcctgca acgacctca gctctactcc ggtaaactcc	4260
	ttcattactc agtacagcac tggccagggtg tcgggtgcaga ttgactggga gatccagaag	4320
	gagcgggtcca aacgctggaa ccccagggtc cagtttacct ccaactacgg acagcaaaac	4380
[0051]	tctctgttgt gggtctccga tgcggctggg aaatacactg agcctagggc tatcggtacc	4440
	cgctacctca cccaccacct gtaataacct gttaataaat aaaccggttt attcggttca	4500
	gttgaacttt ggtctccgtg tcttcttat ctatctctgt ttccatggct actgcgtaca	4560
	taagcagcgg cctgcggcgc ttgcgcttcg cggttttacaa ctgccggtta atcagtaact	4620
	tctggcaaac cagatgatgg agttggccac attagctatg cgcgctcgct cactcactcg	4680
	gccctggaga ccaaaggctt ccagactgcc ggctcttgge cggcagggcc gaggtagtga	4740
	gcgagcgcgc atagaggag tggccaa	4767
	<210> 142	
	<211> 4642	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV5	
	<400> 142	
	ctctccccc tgctcggttc gctcgctcgc tggtctgttt gggggggtgg cagctcaaag	60
	agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa	120

[0052]	cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggggg ttttgtaagc agtgatgtca	180
	taatgatgta atgcttattg tcacgcgata gttaatgatt aacagtcattg tgatgtgttt	240
	tatccaatag gaagaaagcg cgcgtatgag ttctcgcgag acttccgggg tataaaagac	300
	cgagtgaacg agccccccgc cattctttgc tctggactgc tagaggaccc tcgctgccat	360
	ggctaccttc tatgaagtca ttgttcgcgt cccatttgac gtggaggaaac atctgcctgg	420
	aatttctgac agctttgtgg actgggtaac tgggtcaaatt tgggagctgc ctccagagtc	480
	agattttaat ttgactctgg ttgaacagcc tcagttgacg gtggctgata gaattcgccg	540
	cgtgttcctg tacgagtgga acaaattttc caagcaggag tccaaattct ttgtgcagtt	600
	tgaaaaggga tctgaatatt ttcactctgca cacgcttgtg gagacctccg gcatctcttc	660
	catggtcttc ggccgctacg tgagtcagat tcgcgcccag ctggtgaaag tggctctcca	720
	gggaattgaa ccccgatca acgactgggt cgccatcacc aaggtaaaga agggcggagc	780
	caataaggtg gtggattctg ggtatattcc cgcctacctg ctgccgaagg tccaaccgga	840
	gcttcagtgg gcgtggacaa acctggacga gtataaattg gccgccctga atctggagga	900
	gcgcaaacgg ctgcgcgcgc agtttctggc agaatectcg cagcgctcgc aggaggcggc	960
	ttcgcagcgt gaggttctcg ctgaccgggt catcaaaagc aagacttccc agaaatacat	1020
	ggcgctcgtc aactggctcg tggagcacgg catcacttcc gagaagcagt ggatccagga	1080
	aaatcaggag agctacctct cttcaactc caccggcaac tctcggagcc agatcaaggc	1140
	cgcgctcgac aacgcgacca aaattatgag tctgacaaaa agcgcggttg actacctgt	1200
	ggggagctcc gttcccgagg acatttcaaa aaacagaatc tggcaaattt ttgagatgaa	1260
	tggtctacgac ccggcctacg cgggatccat cctctacggc tgggtgtcagc gctccttcaa	1320
	caagaggaaac accgtctggc tctacggacc cgccacgacc ggcaagacca acatcgcgga	1380
	ggccatcgcc cacactgtgc ctttttacgg ctgcgtgaac tggaccaatg aaaactttcc	1440
	ctttaatgac tgtgtggaca aaatgctcat ttggtgggag gagggaaaga tgaccaacaa	1500
	ggtggttgaa tccgccaagg ccacctctgg gggctcaaag gtgcgggtcg atcagaaatg	1560
	taaatectct gttcaaattg attctacccc tgtcattgta acttccaata caaacatgtg	1620
	tgtggtggtg gatgggaatt ccacgacctt tgaacaccag cagccgctgg aggaccgcat	1680
	gttcaaattt gaactgacta agcggtcccc gccagatttt ggcaagatta ctaagcagga	1740
	agtcaaggac ttttttgctt gggcaaaggc caatcaggtg ccggtgactc acgagtttaa	1800

[0053]	agttcccagg gaattggcgg gaactaaagg ggcggagaaa tctctaaaac gccactggg	1860
	tgacgtcacc aatactagct ataaaagtct ggagaagcgg gccaggctct catttggtcc	1920
	cgagacgcct cgcagttcag acgtgactgt tgatcccgt cctctgcgac cgctcaattg	1980
	gaattcaagg tatgattgca aatgtgacta tcatgtctca tttgacaaca tttctaacaa	2040
	atgtgatgaa tgtgaatatt tgaatcgggg caaaaatgga tgtatctgtc acaatgtaac	2100
	tcactgtcaa atttgtcatg ggattcccc ctgggaaaag gaaaacttgt cagattttgg	2160
	ggattttgac gatgccaata aagaacagta aataaagcga gtagtcatgt cttttgttga	2220
	tcacctcca gattggttgg aagaagttgg tgaaggtctt cgcgagtttt tgggccttga	2280
	agcgggcccc ccgaaaccaa aacccaatca gcagcatcaa gatcaagccc gtggtcttgt	2340
	gctgcctggt tataactatc tcggaccgg aaacggtctc gatcaggag agcctgtcaa	2400
	cagggcagac gaggtcgcgc gagagcacga catctcgtac aacgagcagc ttgaggcggg	2460
	agacaacccc tacctcaagt acaaccacgc ggacgccgag tttcaggaga agctcgccga	2520
	cgacacatcc ttcgggggaa acctcgaaa ggcagtcttt caggccaaga aaagggttct	2580
	cgaacctttt ggcttggttg aagagggtgc taagacggcc cctaccggaa agcggataga	2640
	cgaccacttt ccaaaaagaa agaaggctcg gaccgaagag gactccaagc cttccacctc	2700
	gtcagacgcc gaagctggac ccagcggatc ccagcagctg caaatcccag cccaaccagc	2760
	ctcaagtttg ggagctgata caatgtctgc gggaggtggc ggccatttgg gcgacaataa	2820
	ccaaggtgcc gatggagtgg gcaatgcctc gggagatttg cattgcgatt ccacgtggat	2880
	gggggacaga gtcgtcacca agtccacccg aacctgggtg ctgcccagct acaacaacca	2940
	ccagtaccga gagatcaaaa gcggtccgt cgacggaagc aacgccaacg cctactttgg	3000
	atacagcacc ccctgggggt actttgactt taaccgcttc cacagccact ggagcccccg	3060
	agactggcaa agactcatca acaactactg gggcttcaga ccccggtccc tcagagtcaa	3120
	aatcttcaac attcaagtca aagaggtcac ggtgcaggac tccaccacca ccatcgccaa	3180
	caacctcacc tccaccgtcc aagtgtttac ggacgacgac taccagctgc cctacgtcgt	3240
	cggcaacggg accgagggat gctgcccggc cttccctccg caggtcttta cgctgccgca	3300
	gtacggttac gcgacgtga accgcgacaa cacagaaaat cccaccgaga ggagcagctt	3360
	cttctgceta gagtactttc ccagcaagat gctgagaacg ggcaacaact ttgagtttac	3420
	ctacaacttt gaggaggtgc cttccactc cagcttcgct cccagtcaga acctgttcaa	3480

[0054]	gctggccaac ccgctggtgg accagtactt gtaccgcttc gtgagcacia ataactctgg	3540
	cggagtccag ttcaacaaga acctggccgg gagatacgcc aacacctaca aaaactgggtt	3600
	cccggggccc atggggccgaa cccagggctg gaacctgggc tccgggggtca accgcgccag	3660
	tgtcagcgcc ttgccacga ccaataggat ggagctcgag ggcgcgagtt accagggtgcc	3720
	cccgagccg aacggcatga ccaacaacct ccagggcagc aacacctatg ccctggagaa	3780
	cactatgatc ttcaacagcc agccggcgaa cccgggcacc accgccacgt acctcgaggg	3840
	caacatgctc atcaccagcg agagcgagac gcagccggtg aaccgcgtgg cgtacaacgt	3900
	cggcgggcag atggccacca acaaccagag ctccaccact gcccccgca ccggcacgta	3960
	caacctccag gaaatcgtgc ccggcagcgt gtggatggag agggacgtgt acctccaagg	4020
	acctatctgg gccagatcc cagagacggg ggcgcacttt caccctctc cggccatggg	4080
	cggattcgga ctcaaacacc caccgcccac gatgctcacc aagaacacgc ctgtgcccgg	4140
	aaatatcacc agcttctcgg acgtgcccgt cagcagcttc atcaccaggt acagcaccgg	4200
	gcaggtcacc gtggagatgg agtgggagct caagaaggaa aactccaaga ggtggaaccc	4260
	agagatccag tacacaaaca actacaacga cccccagttt gtggactttg ccccgacag	4320
	caccggggaa tacagaacca ccagacctat cggaaccga taccttacc gacccttta	4380
	accattcatc gtcgcatacc ctcaataaac cgtgtattcg tgcagtaaa atactgcctc	4440
	ttgtggtcat tcaatgaata acagcttaca acatctacaa aacctccttg cttgagagtg	4500
	tggcactctc cccctgtcgc cgttcgctcg ctcgctggct cgtttggggg ggtggcagct	4560
	caaagagctg ccagacgacg gccctctggc cgtcgcccc ccaaacgagc cagcgagcga	4620
	gcgaacgcga caggggggag ag	4642
	<210> 143	
	<211> 4683	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV6	
	<400> 143	
	ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
	cgacgcccgg gctttgcccg ggccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120
	gccaaactca tcaactagggg ttcttgagg ggtggagtcg tgacgtgaat tacgtcatag	180

[0055]	ggttagggag gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat	240
	gtggtcacgc tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga	300
	ggtttgaacg cgcagcgcca tgccggggtt ttacgagatt gtgattaagg tccccagcga	360
	ccttgacgag catctgcccc gcatttctga cagctttgtg aactgggttg ccgagaagga	420
	atgggagttg ccgccagatt ctgacatgga tctgaatctg attgagcagg caccctgac	480
	cgtggccgag aagctgcagc gcgacttcct ggtccagtgg cgccgcgtga gtaaggcccc	540
	ggaggccctc ttctttgttc agttcgagaa gggcgagtcc tacttccacc tccatattct	600
	ggtggagacc acgggggtca aatccatggt gctgggccgc ttctgagtc agattaggga	660
	caagctggtg cagaccatct accgcgggat cgagccgacc ctgcccact ggttcgcggt	720
	gaccaagacg cgtaatggcg ccggaggggg gaacaagtg gtggacgagt gctacatccc	780
	caactacetc ctgcccaga ctcagcccg gctgcagtgg gcgtggacta acatggagga	840
	gtatataagc gcgtgtttta acctggccga gcgcaaacgg ctcgtggcgc acgacctgac	900
	ccacgtcagc cagaccagg agcagaacaa ggagaatctg aaccccaatt ctgacgcgcc	960
	tgtcatccgg tcaaaaacct ccgcacgcta catggagctg gtcgggtggc tgggtgaccg	1020
	gggcatcacc tccgagaagc agtggatcca ggaggaccag gcctcgtaca tctcctcaa	1080
	cgccgcctcc aactcgcggt ccagatcaa ggccgctctg gacaatgccg gcaagatcat	1140
	ggcgtgacc aaatccgcgc ccgactacct ggtaggcccc gctccgcccg ccgacattaa	1200
	aaccaaccgc atttaccgca tcttgagct gaacggctac gacctgcct acgccgctc	1260
	cgtctttctc ggctgggccc agaaaagggt cggaaaacgc aacaccatct ggctgtttgg	1320
	gccggccacc acgggcaaga ccaacatcgc ggaagccatc gcccacgccg tgcccttcta	1380
	cggctgcgtc aactggacca atgagaactt tcccttcaac gattgcgtcg acaagatggt	1440
	gatctggtgg gaggagggca agatgacggc caaggtcgtg gagtccgcca aggccattct	1500
	cggcggcagc aaggtgcgcg tggaccaaaa gtgcaagtcg tccgcccaga tcgatccac	1560
	ccccgtgac gtcacctcca acaccaacat gtgcgccgtg attgacggga acagaccac	1620
	cttcgagcac cagcagccgt tgcaggaccg gatgttcaaa ttgaaactca cccgccgtct	1680
	ggagcatgac tttggcaagg tgacaaagca ggaagtcaaa gagttcttcc gctgggcgca	1740
	ggatcacgtg accgaggtgg cgcattgagtt ctacgtcaga aagggtggag ccaacaagag	1800
	acccgcccc gatgacgcgg ataaaagcga gcccagcgg gcctgccct cagtgcgga	1860

[0056]	tccatcgacg tcagacgcgg aaggagctcc ggtggacttt gccgacaggt accaaaacaa	1920
	atgtttctcgt cacgcgggca tgcttcagat gctgtttccc tgcaaaacat gcgagagaat	1980
	gaatcagaat ttcaacatit gcttcacgca cgggaccaga gactgttcag aatgtttccc	2040
	cggcgtgtca gaatctcaac cggtcgtcag aaagaggacg tatcggaac tctgtgccat	2100
	tcatcatctg ctggggcggg ctcccagat tgcttgctcg gcctgcgatc tggtaacgt	2160
	ggatctggat gactgtgttt ctgagcaata aatgacttaa accaggtatg gctgccgatg	2220
	gttatcttcc agattggctc gaggacaacc tctctgaggg cattcgcgag tggtaggact	2280
	tgaacctgg agccccgaaa cccaaagcca accagcaaaa gcaggacgac ggccggggtc	2340
	tggtagcttc tggctacaag tacctcggac ccttcaacgg actcgacaag ggggagcccc	2400
	tcaacgcggc ggatgcagcg gccctcgagc acgacaaggc ctacgaccag cagctcaaag	2460
	cgggtgacaa tccgtacctg cggataaacc acgccgacgc cgagtttcag gagcgtctgc	2520
	aagaagatac gtcttttggg ggcaacctcg ggcgagcagt cttccaggcc aagaagaggg	2580
	ttctcgaacc ttttggctct gttgaggaag gtgctaagac ggctcctgga aagaaacgtc	2640
	cggtagagca gtcgccacaa gagccagact cctcctcggg cattggcaag acaggccagc	2700
	agcccgctaa aaagagactc aattttggtc agactggcga ctcagagtca gtccccgacc	2760
	cacaacctct cggagaacct ccagcaaccc ccgtgctgt gggacctact acaatggctt	2820
	caggcggtgg gcgaccaatg gcagacaata acgaaggcgc cgacggagtg ggtaatgcct	2880
	caggaaattg gcattgcgat tccacatggc tgggcgacag agtcatcacc accagcacc	2940
	gaacatgggc cttgcccacc tataacaacc acctctacaa gcaaattctc agtgcttcaa	3000
	cgggggcccag caacgacaac cactacttcg gctacagcac cccctggggg tattttgatt	3060
	tcaacagatt ccactgccat ttctcaccac gtgactggca gcgactcatc aacaacaatt	3120
	ggggattccg gcccagaga ctcaacttca agctcttcaa catccaagtc aaggaggtea	3180
	cgacgaatga tggcgtcacg accatcgcta ataaccttac cagcacgggt caagtcttct	3240
	cggactcgga gtaccagttg ccgtacgtcc teggtctctgc gcaccagggc tgctccctc	3300
	cgttcccggc ggacgtgttc atgattccgc agtacggcta cctaacgctc aacaatggca	3360
	gccaggcagt gggacggtea tccttttact gcctggaata tttcccatcg cagatgctga	3420
	gaacgggcaa taactttacc ttcagctaca ccttcgagga cgtgccttcc cacagcagct	3480
	acgcgcacag ccagagcctg gaccggctga tgaatctct catcgaccag tacctgtatt	3540

	acctgaacag aactcagaat cagtccggaa gtgccccaaa caaggacttg ctgttttagcc	3600
	gggggtctcc agctggcatg tctgttcagc ccaaaaactg gctacctgga ccctgttacc	3660
	ggcagcagcg cgtttctaaa acaaaaacag acaacaacaa cagcaacttt acctggactg	3720
	gtgcttcaaa atataacctt aatgggcgtg aatctataat caaccctggc actgctatgg	3780
	cctcacacaa agacgacaaa gacaagttct ttcccatgag cgggtgtcatg atttttggaa	3840
	aggagagcgc cggagcttca aacactgcat tggacaatgt catgatcaca gacgaagagg	3900
	aaatcaaagc cactaaccce gtggccaccg aaagatttgg gactgtggca gtcaatctcc	3960
	agagcagcag cacagaccct gcgaccggag atgtgcatgt tatgggagcc ttacctggaa	4020
	tgggtgtggca agacagagac gtataacctgc agggctctat ttgggcaaaa attcctcaca	4080
	cggatggaca ctttcaccgc tctcctctca tgggcggctt tggacttaag caccgcctc	4140
	ctcagatcct catcaaaaac acgcctgttc ctgcgaatcc tccggcagag ttttcggcta	4200
	caaagtttgc ttcattcatc acccagtatt ccacaggaca agtgagcgtg gagattgaat	4260
	gggagctgca gaaagaaaac agcaaacgct ggaatcccga agtgcagtat acatctaact	4320
[0057]	atgcaaaatc tgccaacggt gatttactg tggacaacaa tggactttat actgagcctc	4380
	gccccattgg caccgcgttac ctcaccgcgc cctgttaatt gtgtgttaat caataaacgc	4440
	gttaattcgt gtcagttgaa ctttggctct atgtcggtat tatcttatct ggtcaccata	4500
	gcaaccggtt acacattaac tgettagttg cgcttcgcga ataccctag tgatggagtt	4560
	gcccactccc tctatgcgcg ctgcgtcgtc cgggtggggc ggcagagcag agctctgccg	4620
	tctgcggacc tttggtccgc agggccccacc gagcgagcga gcgcgcatag agggagtggg	4680
	caa	4683
	<210> 144	
	<211> 4721	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV7	
	<400> 144	
	ttggccactc cctctatgcg cgctcgtcgc ctcgggtgggg cctgcggacc aaaggtccgc	60
	agacggcaga gctctgctct gccggcccca ccgagcgagc gagcgcgcat agagggagtg	120
	gccaaactca tcaactagggg taccgcgaag cgcctccac gctgccgcgt cagcgtgac	180

[0058]	gtaaatacag tcatagggga gtggtcctgt attagctgtc acgtgagtgc ttttgcgaca	240
	ttttgcgaca ccacgtggcc atttgaggta tatatggccg agtgagcgag caggatctcc	300
	attttgaccg cgaaatttga acgagcagca gccatgccgg gtttctacga gatcgtgac	360
	aaggtgccga gcgacctgga cgagcacctg ccgggcattt ctgactcggt tgtgaactgg	420
	gtggccgaga aggaatggga gctgcccccg gattctgaca tggatctgaa tctgatcgag	480
	caggcacccc tgaccgtggc cgagaagctg cagcgcgact tcctgggtcca atggcgccgc	540
	gtgagtaagg ccccgagggc cctgttcttt gttcagttcg agaaggcgga gagctacttc	600
	caccttcacg ttctgggtgga gaccacgggg gtcaagtcca tgggtgctagg ccgcttcctg	660
	agtcagattc gggagaagct ggtccagacc atctaccgcg gggtcgagcc cacgctgccc	720
	aactggttcg cggtgaccaa gacgcgtaat ggccgcccgc gggggaacaa ggtggtggac	780
	gagtgtctaca tccccacta cctcctgccc aagaccagc ccgagctgca gtgggcgtgg	840
	actaacatgg aggagtatat aagcgcgtgt ttgaacctgg ccgaacgcaa acggctcgtg	900
	gcgcagcacc tgaccacgt cagccagacg caggagcaga acaaggagaa tctgaacccc	960
	aattctgacg cgcccgtgat caggtcaaaa acctccgcgc gctacatgga gctggtcggg	1020
	tggctggtgg accggggcat cacctccgag aagcagtgga tccaggagga ccaggcctcg	1080
	tacatctcct tcaacgcgc ctccaactcg cgggtcccaga tcaaggccgc gctggacaat	1140
	gccggcaaga tcatggcgct gaccaaacc gcgccgact acctggtggg gccctcgctg	1200
	cccgcggaca ttaaaaccaa ccgcatctac cgcctcctgg agctgaacgg gtacgatcct	1260
	gcctacgccg gctccgtctt tctcggtggt gccagaaaa agttcgggaa gcgcaacacc	1320
	atctggctgt ttgggcccgc caccaccggc aagaccaaca ttgcggaagc catcgccac	1380
	gccgtgcctt tctacggtg cgtcaactgg accaatgaga actttccctt caacgattgc	1440
	gtcgacaaga tggatgatctg gtgggaggag ggcaagatga cggccaaggt cgtggagtcc	1500
	gccaaggcca ttctcggcgg cagcaagggt cgcggtggacc aaaagtgcaa gtcgtccgcc	1560
	cagatcgacc ccacccccgt gatcgtcacc tccaacacca acatgtgcgc cgtgattgac	1620
	gggaacagca ccaccttcga gcaccagcag ccgttgagg accggatggt caaatttgaa	1680
	ctcacccgcc gtctggagca cgactttggc aaggtgacga agcaggaagt caaagagttc	1740
	ttccgctggg ccagtgatca cgtgaccgag gtggcgcatg agttctacgt cagaaagggc	1800
	ggagccagca aaagaccgc ccccgatgac gcgatataa gcgagcccaa gcgggcctgc	1860

	ccctcagtcg cggatccatc gacgtcagac gcggaaggag ctccggtgga ctttgccgac	1920
	aggtaccaaa acaaatgttc tcgtcacgcg ggcatgattc agatgctgtt tccctgcaaa	1980
	acgtgcgaga gaatgaatca gaatttcaac atttgcttca cacacggggt cagagactgt	2040
	ttagagtgtt tccccggcgt gtcagaatct caaccggtcg tcagaaaaaa gacgtatcgg	2100
	aaactctgcg cgattcatca tctgctgggg cgggcgcccc agattgcttg ctggcctgc	2160
	gacctggtca acgtggacct ggacgactgc gtttctgagc aataaatgac ttaaaccagg	2220
	tatggctgcc gatggttatc ttccagattg gctcgaggac aacctctctg agggcattcg	2280
	cgagtgtgtg gacctgaaac ctggagcccc gaaacccaaa gccaaccagc aaaagcagga	2340
	caacggccgg ggtctggtgc ttcttggtca caagtacctc ggacccttca acggactcga	2400
	caagggggag cccgtcaacg cggcggacgc agcggccctc gagcacgaca aggcctacga	2460
	ccagcagetc aaagcgggtg acaatccgta cctgcggtat aaccacgccg acgccgagtt	2520
	tcaggagcgt ctgcaagaag atacgtcatt tgggggcaac ctcgggcgag cagtcttcca	2580
	ggccaagaag cgggttctcg aacctctcgg tctggttgag gaaggcgcta agacggctcc	2640
[0059]	tgcaaagaag agaccggtag agccgtcacc tcagcgttcc cccgactcct ccacgggcat	2700
	cggcaagaaa ggccagcagc ccgccagaaa gagactcaat ttcggtcaga ctggcgactc	2760
	agagtcagtc cccgaccctc aacctctcgg agaacctcca gcagcgccct ctagtgtggg	2820
	atctggtaca gtggtgcag gcggtggcgc accaatggca gacaataacg aagtgccga	2880
	cggagtgggt aatgcctcag gaaattggca ttgcgattcc acatggctgg gcgacagagt	2940
	cattaccacc agcacccgaa cctgggccct gccacctac aacaaccacc tctacaagca	3000
	aatctccagt gaaactgcag gtagtaccaa cgacaacacc tacttcggct acagaccccc	3060
	ctgggggtat ttgacttta acagattcca ctgccacttc tcaccacgtg actggcagcg	3120
	actcatcaac aacaactggg gattccggcc caagaagctg cggttcaagc tcttcaacat	3180
	ccaggtcaag gaggtcacga cgaatgacgg cgttacgacc atcgctaata accttaccag	3240
	cacgattcag gtattctcgg actcggaata ccagctgccg tacgtcctcg gctctgcga	3300
	ccagggtgc ctgcctccgt tcccggcgga cgtcttcatg attcctcagt acggctacct	3360
	gactctcaac aatggcagtc agtctgtggg acgttccctc ttctactgcc tggagtactt	3420
	ccccctcag atgctgagaa cgggcaacaa ctttgagtte agctacagct tcgaggacgt	3480
	gcctttccac agcagctacg cacacagcca gagcctggac cggtgatga atcccccat	3540

	cgaccagtac ttgtactacc tggccagaac acagagtaac ccaggaggca cagctggcaa	3600
	tcgggaactg cagttttacc agggcgggcc ttcaactatg gccgaacaag ccaagaattg	3660
	gttacctgga ccttgcctcc ggcaacaaag agtctccaaa acgttgatc aaaacaacaa	3720
	cagcaacttt gcttggactg gtgccaccaa atatcacctg aacggcagaa actcgttgg	3780
	taatcccggc gtcgcatgg caactcacia ggacgacgag gaccgctttt tcccatccag	3840
	cggagtctg attttttgaa aaactggagc aactaacaaa actacattgg aaaatgtgtt	3900
	aatgacaaat gaagaagaaa ttcgtcctac taatcctgta gccacggaag aatacgggat	3960
	agtcagcagc aacttacaag cggctaatac tgcagcccag acacaagttg tcaacaacca	4020
	gggagcctta cctggcatgg tctggcagaa cggggacgtg tacctgcagg gtcccatctg	4080
	ggccaagatt cctcacacgg atggcaactt tcacccgtct cctttgatgg gcggctttgg	4140
	acttaacat ccgcctcctc agatcctgat caagaacact cccgttcccg ctaatcctcc	4200
	ggaggtgttt actcctgcca agtttgcttc gttcatcaca cagtacagca ccggacaagt	4260
	cagcgtggaa atcgagtggg agctgcagaa ggaaaacagc aagcgtgga acccggagat	4320
[0060]	tcagtacacc tccaactttg aaaagcagac tgggtgtggac tttgccgttg acagccaggg	4380
	tgtttactct gagcctcgcc ctattggcac tcgttacctc acccgtaatc tgtaattgca	4440
	tgttaatcaa taaaccggtt gattcgtttc agttgaactt tgggtctctg tgcttcttat	4500
	cttatcggtt tccatagcaa ctggttacac attaaactgct tgggtgcgct tcacgataag	4560
	aaactgacg tcaccgcgtt acccctagt atggagtgg ccactccctc tatgcgcgt	4620
	cgctcgctcg gtggggcctg cggaccaaag gtccgcagac ggcagagctc tgctctgccg	4680
	gccccaccga gcgagcgagc gcgcatagag ggagtggcca a	4721
	<210> 145	
	<211> 4393	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV8	
	<400> 145	
	cagagaggga gtggccaact ccatcactag gggtagcgcg aagcgccctc cacgtgccg	60
	cgtcagcgt gacgtaaatt acgtcatagg ggagtgggtc tgtattagct gtcacgtgag	120
	tgcttttgcg gcattttgcg acaccacgtg gccatttgag gtatatatgg ccgagtgagc	180

[0061]	gagcaggatc tccatTTtga ccgcgaaatt tgaacgagca gcagccatgc cgggcttcta	240
	cgagatcgtg atcaaggtgc cgagcgacct ggacgagcac ctgccgggca tttctgactc	300
	gtttgtgaac tgggtggccg agaaggaatg ggagctgccc ccggattctg acatggatcg	360
	gaatctgata gagcaggcac ccctgacctg ggccgagaag ctgcagcgcg acttcctggt	420
	ccaatggcgc cgcgtgagta aggccccgga ggccctcttc tttgttcagt tcgagaaggg	480
	cgagagctac tttcacctgc acgttctggt cgagaccacg ggggtcaagt ccatggtgct	540
	aggccgcttc ctgagtcaga ttcgggaaaa gcttggtcca gaccatctac ccgcggggtc	600
	gagccccacc ttgcccactt ggttcgcggt gaccaaagac gcggtaatgg cgccggcggg	660
	ggggaacaag gtggtggacg agtgctacat ccccaactac ctctgcccag actcagcc	720
	cgagctgcag tgggcgtgga ctaacatgga ggagtatata agcgcgtgct tgaacctggc	780
	cgagcgcaaa cggctcgtgg cgcgagacct gacccacgtc agccagacgc aggagcagaa	840
	caaggagaat ctgaacccca attctgacgc gcccgatgac aggtcaaaaa cctccgcgcg	900
	ctatatggag ctggtcgggt ggctggtgga ccggggcctc acctccgaga agcagtggat	960
	ccaggaggac caggcctcgt acatctcctt caacgccgcc tccaactcgc ggtcccagat	1020
	caaggccgcg ctggacaatg ccggcaagat catggcgctg accaaatccg cgcccacta	1080
	cctggtgggg ccctcgtcgc ccgcggacat taccagaac cgcactctacc gcatcctcgc	1140
	tctcaacggc tacgacctg cctacgccgg ctccgtcttt ctccgctggg ctcaaaaaa	1200
	gttcgggaaa cgcaacacca tctggctggt tggacctgcc accaccggca agaccaacat	1260
	tgcggaagcc atcgcccacg ccgtgccctt ctacggctgc gtcaactgga ccaatgagaa	1320
	ctttcccttc aatgattgag tcgacaagat ggtgatctgg tgggaggagg gcaagatgac	1380
	ggccaaggtc gtggagtccg ccaaggccat tctcggcggc agcaaggtgc gcgtggacca	1440
	aaagtgaag tcgtccgccc agatcgaccc cccccctg atcgtcacct ccaacaccaa	1500
	catgtgcgcc gtgattgacg ggaacagcac caccttcgag caccagcagc ctctccagga	1560
	ccgatgtttt aagttcgaac tcaccgccg tctggagcac gactttggca aggtgacaaa	1620
	gcaggaagtc aaagagttct tccgtgggc cagtgatcac gtgaccgagg tggcgcatga	1680
	gttttacgtc agaaaggcg gagccagcaa aagacctgcc ccgatgacg cggataaaaag	1740
	cgagcccaag cgggcctgcc cctcagtcgc ggatccatcg acgtcagacg cggaaggagc	1800
	tccggtggac tttgccgaca ggtacaaaaa caaatgttct cgtcacgcgg gcatgttca	1860

[0062]	gatgctgttt ccctgcaaaa cgtgcgagag aatgaatcag aatttcaaca ttgcttcac	1920
	acacggggtc agagactgct cagagtgttt ccccggcgtg tcagaatctc aaccggtcgt	1980
	cagaaagagg acgtatcgga aactctgtgc gattcatcat ctgctggggc gggctcccga	2040
	gattgcttgc tcggcctgcg atctggtcaa cgtggacctg gatgactgtg tttctgagca	2100
	ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca	2160
	acctctctga gggcattcgc gagtgggtgg cgctgaaacc tggagccccg aagcccaaag	2220
	ccaaccagca aaagcaggac gacggccggg gtctggtgct tcctggctac aagtacctcg	2280
	gacccttcaa cggactcgac aagggggagc ccgtcaacgc ggcgagcga gcggccctcg	2340
	agcacgacaa ggcctacgac cagcagctgc aggcgggtga caatccgtac ctgcggtata	2400
	accacgccga cgccgagttt caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc	2460
	tcgggcgagc agtcttccag gccaagaagc gggttctcga acctctcggt ctggttgagg	2520
	aaggcgctaa gacggctcct ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgttctc	2580
	cagactctc tacgggcac ggcaagaaag gccaacagcc cgccagaaaa agactcaatt	2640
	ttggtcagac tggcgactca gagtcagttc cagaccctca acctctcgga gaacctccag	2700
	cagcgccctc tgggtgtgga cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgca ccaatggcag	2760
	acaataacga aggcgccgac ggagtgggta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca	2820
	catggtctgg cgacagagtc atcaccacca gcacccgaac ctgggccctg cccacctaca	2880
	acaaccacct ctacaagcaa atctccaacg ggacatcggg aggagccacc aacgacaaca	2940
	cctacttcgg ctacagcacc ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact	3000
	tttcaccacg tgactggcag cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac	3060
	tcagcttcaa gctcttcaac atccaggtea aggaggteac gcagaatgaa ggcaccaaga	3120
	ccatcgcaa taacctcacc agcaccatcc aggtgtttac ggactcggag taccagctgc	3180
	cgtacgttct cggtcttgcc caccagggtc gcctgcctcc gttcccggcg gacgtgttca	3240
	tgattcccca gtacggctac ctaacactca acaacggtag tcaggccgtg ggacgtcct	3300
	ccttctactg cctggaatac tttccttcgc agatgctgag aaccggcaac aacttccagt	3360
	ttacttacac cttcgaggac gtgcctttcc acagcagcta cgcccacagc cagagcttgg	3420
	accggctgat gaatcctctg attgaccagt acctgtacta cttgtctcgg actcaaacaa	3480
	caggaggcac ggcaaatacg cagactctgg gcttcagcca aggtgggcct aatacaatgg	3540

	ccaatcaggc aaagaactgg ctgccaggac cctgttaccg ccaacaacgc gtctcaacga	3600
	caaccgggca aaacaacaat agcaactttg cctggactgc tgggaccaa taccatctga	3660
	atggaagaaa ttcatitggct aatcctggca tegtatatggc aacacacaaa gacgacgagg	3720
	agcggttttt tcccagtaac gggatcctga tttttggcaa acaaaatgct gccagagaca	3780
	atgcggatta cagcgatgtc atgtcacca gcgaggaaga aatcaaaacc actaaccttg	3840
	tggctacaga ggaatacggc atcgtggcag ataacttgca gcagcaaac acggctcctc	3900
	aaattggaac tgtcaacagc cagggggcct taccgggtat ggtctggcag aaccgggacg	3960
	tgtacctgca gggccccatc tgggccaaga ttcttcacac ggacggcaac ttccaccctg	4020
	ctccgctgat gggcggtttt ggctgaaac atcctccgcc tcagatcctg atcaagaaca	4080
	cgctgtacc tgcggatcct ccgaccacct tcaaccagtc aaagctgaac tctttcatca	4140
	cgcaatacag caccggacag gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgcag aaggaaaaca	4200
	gcaagcgtg gaacccccgag atccagtaca cctccaacta ctacaaatct acaagtgtgg	4260
	actttgtgt taatacagaa ggctgtact ctgaaccccg cccatttggc accggttacc	4320
	tcaccgtaa tctgtaattg cctgttaate aataaacgg ttgattcgtt tcagttgaac	4380
[0063]	tttggctctc gcg	4393
	<210> 146	
	<211> 6042	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV9	
	<400> 146	
	gccaatacgc caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgta	60
	atagcgaaga ggccccgacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat	120
	ggcgattccg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat	180
	agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca	240
	acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgttg gcctcactga ttataaaaac	300
	acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt	360
	agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatagc tgctcgtcaa agcaaccata	420
	gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac	480

[0064]	cgctacactt gccagegccc tagcgcccgc tcctttcgct ttcttccctt cttttctcgc	540
	cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt	600
	tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtagtgg	660
	gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttagacgtt gagtccacgt tctttaatag	720
	tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt	780
	ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt	840
	taacgcgaat ttttaacaaa tattaacgt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt	900
	cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cgggggtacat atgattgaca tgctagtttt	960
	acgattaccg ttcategccc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggcgccc gggcaaagcc	1020
	cgggcgtcgg gcgaccttg gtcgcccggc ctcagtgage gagcgagcgc gcagagaggg	1080
	agtggaattc acgcgtggat ctgaattcaa ttcacgcgtg gtacctctgg tcgttacata	1140
	acttacggta aatggcccg ctcgctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	1200
	aatgacgtat gttcccatag taacccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	1260
	gtattttacg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc	1320
	ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt	1380
	atgggacttt cctacttggc agtacatcta ctcgaggcca cgttctgctt cactctcccc	1440
	atctcccccc cctccccacc cccaattttg tattttattt ttttttaatt attttgtgca	1500
	gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg	1560
	cggggcgggg cgaggcggag aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag	1620
	tttcttttta tggcgaggcg gcggcgggcg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg	1680
	gcgggagcgg gatcagccac cgcggtggcg gcctagagtc gacgaggaac tgaaaaacca	1740
	gaaagttaac tggtaagttt agtctttttg tcttttattt caggctcccg atccggtggt	1800
	ggtgcaaate aaagaactgc tctcagtgg atgttgctt tacttctagg cctgtacgga	1860
	agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtaccgc ggccgatcca ccggtccgga	1920
	attcccggga tatcgtegac ccacgcgtcc gggccccacg ctgcgcaccc gcgggtttgc	1980
	tatggcgatg agcagcggcg gcagtgggtg cggcgtcccg gagcaggagg attccgtgct	2040
	gttccggcgc ggcacaggcc agagcgatga ttctgacatt tgggatgata cagcactgat	2100
	aaaagcatat gataaagctg tggcttcatt taagcatgct ctaaagaatg gtgacatttg	2160

[0065]	tgaaacttcg ggtaaacc aaaccacacc taaaagaaaa cctgctaaga agaataaaag	2220
	ccaaaagaag aatactgcag cttccttaca acagtggaaa gttggggaca aatgttctgc	2280
	catttggtca gaagacgggt gcatttaccc agctaccatt gcttcaattg attttaagag	2340
	agaaacctgt gttgtgggtt aacttgata tggaataga gaggagcaaa atctgtccga	2400
	tctactttcc ccaatctgtg aagtagctaa taatatagaa cagaatgctc aagagaatga	2460
	aatgaaagc caagtttcaa cagatgaaag tgagaactcc aggtctcctg gaaataaatc	2520
	agataacatc aagcccaaat ctgctccatg gaactctttt ctccctccac cccccccat	2580
	gccagggcca agactgggac caggaaagcc aggtctaaaa ttcaatggcc caccaccgcc	2640
	accgccacca ccaccacccc acttactatc atgctggctg cctccatttc cttctggacc	2700
	accaataatt cccccaccac ctcccatatg tccagattct cttgatgatg ctgatgcttt	2760
	gggaagtatg ttaatttcat ggtacatgag tggctatcat actggctatt atatgggttt	2820
	tagacaaaat caaaaagaag gaagtgctc acattcctta aattaaggag aatgctggc	2880
	atagagcagc actaaatgac accactaaag aaacgatcag acagatctag aaagcttacc	2940
	gataccgtcg actagagctc gctgatcagc ctgactgtg cttctagtt gccagccatc	3000
	tggtgtttgc cctcccccg tgcttccctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct	3060
	ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg	3120
	gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattctgg	3180
	ggagagatcg atctgaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcctc	3240
	gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccagc cccgggcttt gccgggcgg	3300
	cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gattggcccc ccccccccc ccccggcga	3360
	ttctcttggt tgcctcagac tctcaggcaa tgacctgata gcctttgtag agacctctca	3420
	aaaatagcta cctctccgg catgaattta tcagctagaa cggttgaata tcatattgat	3480
	ggtgatttga ctgtctccgg ctttctcac cgtttgaat ctttacctac acattactca	3540
	ggcattgcat ttaaaatata tgagggttct aaaaattttt atccttgcgt tgaaataaag	3600
	gcttctccc caaaagtatt acagggtcat aatgtttttg gtacaaccga ttagcttta	3660
	tgctctgagg ctttattgct taattttgct aattctttgc cttgcctgta tgattattg	3720
	gatgttggaa tcgctgatg cgttattttc tcttacgca tctgtgcggt atttcacacc	3780
	gcataatggt cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac	3840

	acccgccaac actatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc	3900
	agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgctctg ctcccggcat	3960
	ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt	4020
	catcacgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatTTTTA taggttaatg	4080
	tcatgataat aatggTTTTt tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa	4140
	cccctatttg tttatTTTTt taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac	4200
	cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg	4260
	tcgcccttat tccctTTTTt gcggcatttt gccttctgt ttttctcac ccagaaacgc	4320
	tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg	4380
	atctcaacag cggtgaagatc cttgagagtt ttccccga agaacgtttt ccaatgatga	4440
	gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc	4500
	aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag	4560
	aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga	4620
[0066]	gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg	4680
	cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga	4740
	atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc ttagcaatg gcaacaacgt	4800
	tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact	4860
	ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggt	4920
	ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg	4980
	ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta	5040
	tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac	5100
	tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta	5160
	aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt	5220
	tttcgttcca ctgagcgtca gacccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt	5280
	tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt	5340
	gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc	5400
	agataccaaa tactgttctt ctagtgtage cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg	5460
	tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg	5520

ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg	5580
cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac	5640
ttagataacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg	5700
acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg	5760
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat	5820
ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt	5880
tacggttctt ggccctttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcttgcg ttatccccctg	5940
attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa	6000
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gc	6042

<210> 147
 <211> 4102
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> AAV10

[0067] <400> 147

atgccgggct tctacgagat cgtgatcaag gtgccgagcg acctggacga gcacctgccg	60
ggcattttctg actcgtttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagct gcccccgat	120
tctgacatgg atcggaatct gatcgagcag gcaccctga ccgtggccga gaagctgcag	180
cgcgacttcc tggtcactg gcgccgctg agtaaggccc cggaggccct cttctttgtt	240
cagttcgaga agggcgagtc ctactttcac ctgcacgttc tggtcgagac cacgggggtc	300
aagtccatgg tcctgggccc cttctgagt cagatcagag acaggctggt gcagaccatc	360
taccgcgggg tagagccac gctgccaac tggttcgcgg tgaccaagac gcgaaatggc	420
gccggcgggg ggaacaaggt ggtggacgag tgctacatcc ccaactacct cctgccaag	480
acgcagcccc agctgcagtg ggcgtggact aacatggagg agtatataag cgcgtgtctg	540
aacctcgcgg agcgtaaacg gctcgtggcg cagcacctga cccacgtcag ccagacgcag	600
gagcagaaca aggagaatct gaacccgaat tctgacgcgc ccgtgatcag gtcaaaaacc	660
tccgcgcgct acatggagct ggtcgggtgg ctggtggacc ggggcatcac ctccgagaag	720
cagtggatcc aggaggacca ggctcgtac atctccttca acgccgcctc caactcgcgg	780
tcccagatca aggccgcgct ggacaatgcc ggaaagatca tggcgtgac caaatccgcg	840

[0068]	cccgactacc tggtaggccc gtccttacct gcgacatta aggcccaaccg catctaccgc	900
	atcctggagc tcaacggcta cgaccccgcc tacgccggct ccgtcttcct gggctgggcg	960
	cagaaaaagt tcggtaaaag gaatacaatt tggctgttcg ggcccgccac caccggcaag	1020
	accaacatcg cggaagccat cgcccacgcc gtgcccttct acggctgcgt caactggacc	1080
	aatgagaact ttcccttcaa cgattgcgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggc	1140
	aagatgaccg ccaaggtegt ggagtccgcc aaggccattc tggcggaag caaggtgcgc	1200
	gtcgacaaa agtgcaagtc ctcgcccag atcgaccca cgcccgatgat cgtcacctcc	1260
	aacaccaaca tgtgcgcgt gatcgacggg aacagcacca ccttcgagca ccagcagccc	1320
	ctgcaggacc gcatgttcaa gttcgagctc acccgccgtc tggagcacga ctttggcaag	1380
	gtgaccaagc aggaagtcaa agagttcttc cgtctggctc aggatcacgt gactgagtg	1440
	acgcatgagt tctacgtcag aaaggcgga gccacaaaa gacccgcccc cagtgcgcg	1500
	gatataagcg agcccaagcg ggcctgcccc tcagttgcgg agccatcgac gtcagacgcg	1560
	gaagcaccgg tggactttgc ggacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgcgggcatg	1620
	cttcagatgc tgtttccctg caagacatgc gagagaatga atcagaattt caacgtctgc	1680
	ttcacgcacg gggtcagaga ctgctcagag tgcttccccg gcgcgtcaga atctcaacct	1740
	gtcgtcagaa aaaagacgta tcagaaactg tgcgcgattc atcatctgct ggggcgggca	1800
	cccagattg cgtgttcggc ctgcgatctc gtcaacgtgg acttgatga ctgtgtttct	1860
	gagcaataaa tgacttaaac caggtatggc tgctgacggg tatcttcag attggctcga	1920
	ggacaacctc tctgagggca ttcgcgagtg gtgggacctg aaacctggag cccccaagcc	1980
	caaggccaac cagcagaagc aggacgacgg ccggggtctg gtgcttcctg gctacaagta	2040
	cctcggacct ttcaacggac tcgacaaggg ggagcccgtc aacgcggcgg acgcagcggc	2100
	cctcgagcac gacaaggcct acgaccagca gctcaaagcg ggtgacaatc cgtacctgcg	2160
	gtataaccac gccgacgccg agtttcagga gcgtctgcaa gaagatacgt cttttggggg	2220
	caacctcggg cgagcagttt tccaggccaa gaagcgggtt ctggaacctc tcggtctggt	2280
	tgaggaagct gctaagacgg ctcttggaag gaagagaccg gtagaacctg cacctcagcg	2340
	ttccccgcac tcctccacgg gcatcgcaa gaaaggccag cagcccgtta aaaagagact	2400
	gaactttggg cagactggcg agtcagagtc agtccccgac cctcaaccaa tcggagaacc	2460
	accagcagcg ccctctggtc tgggatctgg tacaatggct gcaggcggtg gcgtccaat	2520

	ggcagacaat aacgaaggcg cgcacggagt gggtagttcc tcaggaaatt ggcattgcga	2580
	ttccacatgg ctgggcgaca ggtcatcac caccagcacc cgaacctggg ccctgcccac	2640
	ctacaacaac cacctctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggaa gcaccaacga	2700
	caacacctac ttcggtctaca gcacccctg ggggtatittt gacttcaaca gattccactg	2760
	ccactttctca ccacgtgact ggcagcgact catcaacaac aactggggat tccggccaaa	2820
	aagactcagc ttcaagctct tcaacatcca ggtcaaggag gtcacgcaga atgaaggcac	2880
	caagaccatc gccataaacc ttaccagcac gattcaggta ttacggact cggaatacca	2940
	gctgccgtac gtccctggct ccgcgcacca gggctgcctg cctccgttcc cggcggatgt	3000
	cttcatgatt cccagctacg gctacctgac actgaacaat ggaagtcaag ccgtaggccg	3060
	ttctctcttc tactgcctgg aatattttcc atctcaaatg ctgcgaactg gaaacaattt	3120
	tgaattcagc tacaccttcg aggacgtgcc ttccacagc agctacgcac acagccagag	3180
	cttgaccga ctgatgaatc ctctcattga ccagtacctg tactacttat ccagaactca	3240
	gtccacagga ggaactcaag gtaccagca attgttattt tctcaagctg ggctgcaaa	3300
[0069]	catgtcggct caggccaaga actggctgcc tggaccttgc taccggcagc agcgagtctc	3360
	cacgacactg tcgcaaaaca acaacagcaa ctttgcttgg actggtgcc ccaaatatca	3420
	cctgaacgga agagactctc tggatgaatcc cgggtgtgcc atggcaacc acaaggacga	3480
	cgaggaacgc ttcttccgt cgagcggagt cctgatgttt ggaaaacagg gtgctggaag	3540
	agacaatgtg gactacagca gcgttatgct aacaagcgaa gaagaaatta aaaccactaa	3600
	ccctgtagcc acagaacaat acggcgtggg ggctgacaac ttgcagcaag ccaatacagg	3660
	gcctattgtg ggaaatgtca acagccaagg agccttacct ggcatggtct ggcagaaccg	3720
	agacgtgtac ctgcagggtc ccatctgggc caagattcct cacacggacg gcaactttca	3780
	cccgtctct ctgatggcg gctttggact taaacacccg cctccacaga tctgatcaa	3840
	gaacacgccg gtacctgcgg atctccaac aacgttcagc caggcgaaat tggcttcctt	3900
	catcacgcag tacagcaccg gacaggtcag cgtggaaatc gaggggagc tgcagaagga	3960
	gaacagcaaa cgctggaacc cagagattca gtacacttca aactactaca aatctacaaa	4020
	tgtggacttt gctgtcaata cagagggaac ttattctgag cctcgcccca ttggtactcg	4080
	ttatctgaca cgtaatctgt aa	4102

	<210>	148	
	<211>	4087	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	AAV11	
	<400>	148	
	atgccgggct tctacgagat cgtgatcaag gtgccgagcg acctggacga gcacctgccg		60
	ggcattttctg actcgtttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagct gccccggat		120
	tctgacatgg atcggaatct gatcgagcag gcacctctga ccgtggccga gaagctgcag		180
	cgcgacttcc tggteccactg gcgccgcgtg agtaaggccc cggaggccct cttctttgtt		240
	cagttcgaga agggcgagtc ctacttccac ctccacgttc tcgtcgagac cacgggggtc		300
	aagtccatgg tcctgggccc cttctgagat cagatcagag acaggctggt gcagaccatc		360
	taccgcgggg tcgagcccac gctgcccac tggttcgcgg tgaccaagac gcgaaatggc		420
	gccggcgggg ggaacaaggt ggtggacgag tgctacatcc ccaactacct cctgcccag		480
	accagcccc agctgcagtg ggcgtggact aacatggagg agtatataag cgcgtgtcta		540
[0070]	aacctcgcgg agcgtaaacg gctcgtggcg cagcacctga cccacgtcag ccagacgcag		600
	gagcagaaca aggagaatct gaaccgaat tctgacgcgc ccgtgatcag gtcaaaaacc		660
	tccgcgcgct acatggagct ggtcgggtgg ctggtggacc ggggcatcac ctccgagaag		720
	cagtggatcc aggaggacca ggctcgtac atctcttca acgccgctc caactcgcgg		780
	tcccagatca aggccgcgct ggacaatgcc ggaaagatca tggcgtgac caaatccgcg		840
	cccactacc tggtaggccc gtccttacc gcggacatta aggccaaccg catctaccgc		900
	atcctggagc tcaacggcta cgacccgcc tacgccggt ccgtcttctt gggctgggcg		960
	cagaaaaagt tcggtaaacg caacaccatc tggtgtttt ggcccgccac caccggcaag		1020
	accaacatcg cggaagccat agcccacgcc gtgcccttct acggctgcgt gaactggacc		1080
	aatgagaact ttcccttcaa cgattgcgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggc		1140
	aagatgaccg ccaaggctgt ggagtccgcc aaggccattc tggcggaag caaggtgcgc		1200
	gtggacaaaa agtgcaagtc ctcgcccag atcgaccca cgccgtgat cgtcacctcc		1260
	aacaccaaca tgtgcgcgt gatcgacggg aacagcacca ccttcgagca ccagcagccg		1320
	ctgcaggacc gcatgttcaa gttcgagctc acccgccgtc tggagcacga ctttggcaag		1380
	gtgaccaagc aggaagtcaa agagttcttc cgctgggctc aggatcacgt gactgaggtg		1440

[0071]	gcgcatgagt tctacgtcag aaagggcgga gccacaaaa gacccgcccc cagtgcgcgc	1500
	gatataagcg agcccaagcg ggcttgcccc tcagttccgg agccatcgac gtcagacgcg	1560
	gaagcaccgg tggactttgc ggacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgcgggcatg	1620
	cttcagatgc tgtttccctg caagacatgc gagagaatga atcagaatth caacgtctgc	1680
	ttcacgcacg gggtcagaga ctgctcagag tgcttccccg gcgcgtcaga atctcaaccc	1740
	gtcgtcagaa aaaagacgta tcagaaactg tgcgcgattc atcatctgct ggggcgggca	1800
	cccagattg cgtgttcggc ctgcgatctc gtcaacgtgg acttgatga ctgtgtttct	1860
	gagcaataaa tgacttaaac caggtatggc tgctgcaggt tatcttcag attggctcga	1920
	ggacaacctc tctgagggca ttcgcgagtg gtgggacctg aaacctggag ccccgaagcc	1980
	caaggccaac cagcagaagc aggacgacgg cgggggtctg gtgcttcctg gctacaagta	2040
	cctcgacccc ttcaacggac tcgacaaggg ggagcccgtc aacgcggcgg acgcagcggc	2100
	cctcgagcac gacaaggcct acgaccagca gctcaaagcg ggtgacaatc cgtacctgcg	2160
	gtataaccac gccgacgccg agtttcagga gcgtctgcaa gaagatacgt cttttggggg	2220
	caacctcggg cgagcagtct tccaggccaa gaagagggtc ctgcaacctc tgggcctggt	2280
	tgaagaaggt gctaaaacgg ctcttggaag gaagagaccg ttagagtcac cacaagagcc	2340
	cgactcctcc tcgggcatcg gcaaaaaagg caaacaacca gccagaaaga ggctcaactt	2400
	tgaagaggac actggagccg gagacggacc cctgaagga tcagatacca gcgccatgct	2460
	ttcagacatt gaaatgcgtg cagcaccggg cggaaatgct gtcgatgcgg gacaaggttc	2520
	cgatggagtg ggtaatgcct cgggtgattg gcattgcgat tccacctggt ctgagggcaa	2580
	ggtcacaaca acctcgacca gaacctgggt cttgcccacc tacaacaacc acttgtacct	2640
	gcgtctcgga acaacatcaa gcagcaacac ctacaacgga ttctccaccc cctggggata	2700
	ttttgacttc aacagattcc actgtcactt ctaccacgt gactggcaaa gactcatcaa	2760
	caacaactgg ggactacgac caaaagccat gcgcgttaaa atcttcaata tccaagttaa	2820
	ggaggtcaca acgtcgaacg gcgagactac ggtcgttaat aaccttacca gcacggttca	2880
	gatatttgcg gactcgtcgt atgagctccc gtacgtgatg gacgctggac aagaggggag	2940
	cctgcctcct tccccaatg acgtgttcat ggtgcctcaa tatggctact gtggcatcgt	3000
	gactggcgag aatcagaacc aaacggacag aaacgctttc tactgcctgg agtattttcc	3060
	ttcgcaaatg ttgagaactg gcaacaactt tgaaatggct tacaactttg agaaggtgcc	3120

	gttcactca atgtatgctc acagccagag cctggacaga ctgatgaatc ccctcctgga	3180
	ccagtacctg tggcacttac agtcgactac ctctggagag actctgaatc aaggcaatgc	3240
	agcaaccaca tttggaaaaa tcaggagtgg agactttgcc ttttacagaa agaactggct	3300
	gcctgggcct tgtgttaaac agcagagatt ctcaaaaact gccagtcaaa attacaagat	3360
	tcctgccagc gggggcaacg ctctgttaaa gtatgacacc cactatacct taaacaaccg	3420
	ctggagcaac atcgcgcccg gacctccaat ggccacagcc ggaccttcgg atggggactt	3480
	cagtaacgcc cagcttatat tccctggacc atctgttacc ggaaatacaa caacttcagc	3540
	caacaatctg ttgtttacat cagaagaaga aattgctgcc accaacccaa gagacacgga	3600
	catgtttggc cagattgctg acaataatca gaatgctaca actgctccca taaccggcaa	3660
	cgtgactgct atgggagtgc tgcctggcat ggtgtggcaa aacagagaca tttactacca	3720
	agggccaatt tgggccaaga tcccacacgc ggacggacat tttcatcctt caccgctgat	3780
	tggtggggtt ggactgaaac acccgctcc ccagatattc atcaagaaca ctcccgtacc	3840
	tgccaatcct gcgacaacct tcaactgcagc cagagtggac tctttcatca cacaatacag	3900
	caccggccag gtcgctgttc agattgaatg ggaaattgaa aaggaaacgct ccaaacgctg	3960
[0072]	gaatcctgaa gtgcagttta cttcaacta tggaaccag tcttctatgt tgtgggctcc	4020
	tgatacaact gggaagtata cagagccgcg gggtattggc tctcggtatt tgactaatca	4080
	tttgtaa	4087
	<210> 149	
	<211> 4200	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> AAV12	
	<400> 149	
	ttgcgacagt ttgcgacacc atgtgggtcac aagaggtata taaccgcgag tgagccagcg	60
	aggagctcca ttttgcccgc gaagtttgaa cgagcagcag ccatgccggg gttctacgag	120
	gtgggtgatca aggtgcccag cgacctggac gagcacctgc ccggcatttc tgactccttt	180
	gtgaactggg tggccgagaa ggaatgggag ttgcccccg attctgacat ggatcagaat	240
	ctgattgagc aggcacccct gaccgtggcc gagaagctgc agcgcgagtt cctggtggaa	300
	tggcgccgag tgagtaaatt tctggaggcc aagttttttg tgcagtttga aaagggggac	360

[0073]	tcgtactttc atttgcatat tctgattgaa attaccggcg tgaaatccat ggtgggtgggc	420
	cgctacgtga gtcagattag ggataaactg atccagcgca tctaccgcgg ggtcgagccc	480
	cagctgcccc actggttcgc ggtcacaaag acccgaaatg gcgccggagg cgggaacaag	540
	gtgggtggacg agtgctacat ccccaactac ctgctcccca aggtccagcc cgagcttcag	600
	tgggcgtgga ctaacatgga ggagtatata agcgcctgtt tgaacctgc ggagcgtaaa	660
	cggctcgtgg cgcagcacct gacgcacgtc tcccagaccc aggagggcga caaggagaat	720
	ctgaaccgga attctgacgc gccggtgatc cgggtcaaaaa cctccgccag gtacatggag	780
	ctggtcgggt ggctgggtgga caaggcatc acgtccgaga agcagtggat ccaggaggac	840
	caggcctcgt acatctcctt caacgcggcc tccaactccc ggtcgcagat caaggcggcc	900
	ctggacaatg cctccaaaat catgagctc accaaaacgg ctccggacta tctcatcggg	960
	cagcagcccc tgggggacat taccaccaac cggatctaca aaatcctgga actgaacggg	1020
	tacgaccccc agtacgcgc ctccgtcttt ctcggtggg cccagaaaaa gtttggaaag	1080
	cgaacacca tctggtgtt tgggcccgc accaccggca agaccaacat cgcggaagcc	1140
	atgcccacg cggccccctt ctacggtgc gtcaactgga ccaatgagaa ctttccttc	1200
	aacgactcgc tcgacaaaat ggtgatttgg tgggaggagg gcaagatgac cgccaaggtc	1260
	gtagagtccg ccaaggccat tctgggcggc agcaagggtc gcgtggacca aaaatgcaag	1320
	gcctctgcgc agatcgaccc cccccctg ategtcacct ccaacaccaa catgtgcgcc	1380
	gtgattgacg ggaacagcac caccttcgag caccagcagc ccctgcagga ccgatgttc	1440
	aagtttgaac tcacccgccg cctcgaccac gactttggca aggtcaccaa gcaggaagtc	1500
	aaggactttt tccggtgggc ggtgatcac gtgactgacg tggctcatga gttttacgtc	1560
	acaaagggtg gagctaagaa aaggcccgc ccctctgacg aggatataag cgagcccaag	1620
	cggccgcgcg tgtcatttgc gcagccggag acgtcagacg cggaagctcc cggagacttc	1680
	gccgacaggt accaaaacaa atgttctcgt cacgcgggta tgctgcagat gctctttccc	1740
	tgcaagacgt gcgagagaat gaatcagaat tccaacgtct gtttcacgca cggtcagaaa	1800
	gattgcgggg agtgctttcc cgggtcagaa tctcaaccgg tttctgtcgt cagaaaaacg	1860
	tatcagaaac tgtgcatcct tcacagctc cggggggcac ccgagatgc ctgctctgct	1920
	tgcgaccaac tcaacccgga tttggacgat tgccaatttg agcaataaat gactgaaatc	1980
	aggtatggct gctgacggtt atcttcaga ttggctcgag gacaacctct ctgaaggcat	2040

[0074]	tcgcgagtgg tgggcgctga aacctggagc tccacaaccc aaggccaacc aacagcatca	2100
	ggacaacggc aggggtcttg tgcttcctgg gtacaagtac ctcgaccct tcaacggact	2160
	cgacaaggga gagccgtca acgaggcaga cgcccgggcc ctcgagcacg acaaggccta	2220
	cgacaagcag ctcgagcagg gggacaaccc gtatctcaag tacaaccacg ccgacgccga	2280
	gttccagcag cgcttggcga ccgacacctc ttttgggggc aacctcgggc gagcagtctt	2340
	ccaggccaaa aagaggattc tcgagcctct gggctctggtt gaagagggcg ttaaacggc	2400
	tcctggaaag aaacgcccac tagaaaagac tccaaatcgg ccgaccaacc cggactctgg	2460
	gaaggccccg gccaaagaaa agcaaaaaga cggcgaacca gccgactctg ctagaaggac	2520
	actcgacttt gaagactctg gagcaggaga cggaccccct gagggatcat cttccggaga	2580
	aatgtctcat gatctgaga tgcgtcggc gccaggcgga aatgctgtcg aggcgggaca	2640
	aggtgccgat ggagtgggta atgcctccgg tgattggcat tgcgattcca cctggtcaga	2700
	gggccgagtc accaccacca gcaccgaac ctgggtccta cccacgtaca acaaccacct	2760
	gtacctgcga atcgaacaa cggccaacag caacacctac aacggattct ccaccccctg	2820
	gggatacttt gactttaacc gttccactg ccacttttcc ccacgcgact ggcagcgact	2880
	catcaacaac aactggggac tcaggccgaa atcgatgctt gttaaatct tcaacataca	2940
	ggtcaaggag gtcacgacgt caaacggcga gactacggtc gctaataacc ttaccagcac	3000
	ggttcagatc tttgcggatt cgacgtatga actcccatac gtgatggacg ccggtcagga	3060
	ggggagcttt cctccgtttc ccaacgacgt ctttatggtt cccaatac gatactgcgg	3120
	agttgtcact ggaaaaaacc agaaccagac agacagaaat gccttttact gcctggaata	3180
	ctttccatcc caaatgctaa gaactggcaa caattttgaa gtcagttacc aatttgaaaa	3240
	agttcctttc cattcaatgt acgcgcacag ccagagcctg gacagaatga tgaatccttt	3300
	actggatcag tacctgtggc atctgcaatc gaccactacc ggaaattccc ttaatcaagg	3360
	aacagctacc accacgtacg ggaaaattac cactggagac tttgcctact acaggaaaaa	3420
	ctggttgctt ggagcctgca ttaaacaaca aaaattttca aagaatgcca atcaaaacta	3480
	caagattccc gccagcgggg gagacgccct tttaaagtat gacacgcata ccactctaaa	3540
	tgggcgatgg agtaacatgg ctcttgacc tccaatggca accgcaggtg ccggggactc	3600
	ggattttagc aacagccagc tgatctttgc cggacceaat ccgagcggta acacgaccac	3660
	atcttcaaac aatttgttgt ttacctcaga agaggagatt gccacaaca acccacgaga	3720

[0075]

cacggacatg	tttggacaga	ttgcagataa	taatcaaaat	gccaccaccg	cccctcacat	3780
cgctaacctg	gacgctatgg	gaattgttcc	cggaatggtc	tggaacaaaca	gagacatcta	3840
ctaccagggc	cctatttggg	ccaaggtccc	tcacacggac	ggacactttc	acccttcgcc	3900
gctgatggga	ggatttggac	tgaaacaccc	gcctccacag	attttcatca	aaaacacccc	3960
cgtacccgcc	aatcccaata	ctacctttag	cgctgcaagg	attaattctt	ttctgacgca	4020
gtacagcacc	ggacaagttg	ccgttcagat	cgactgggaa	attcagaagg	agcattccaa	4080
acgctggaat	cccgaagttc	aatttacttc	aaactacggc	actcaaaatt	ctatgctgtg	4140
ggctcccgac	aatgctggca	actaccacga	actccgggct	attgggtccc	gtttcctcac	4200

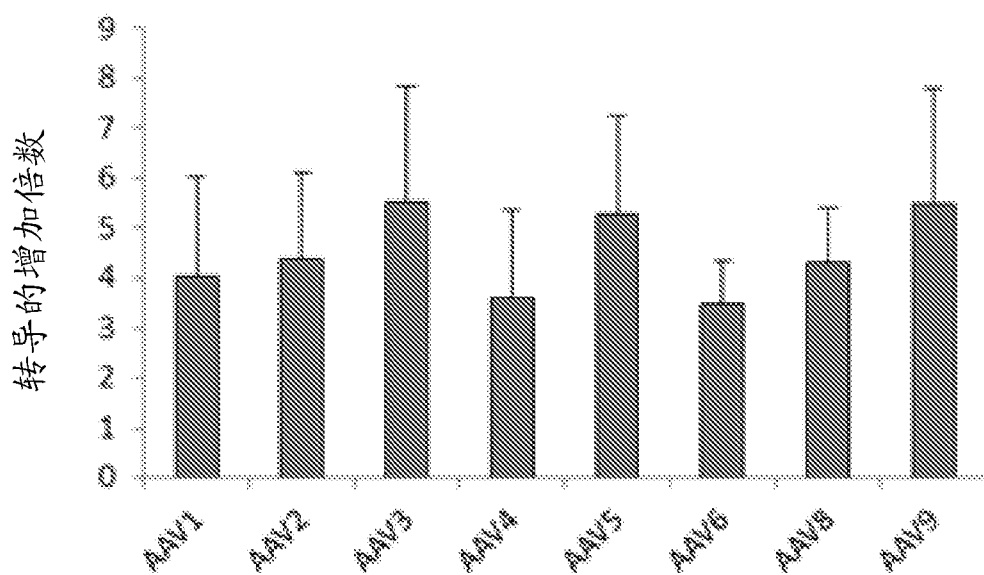


图 1a

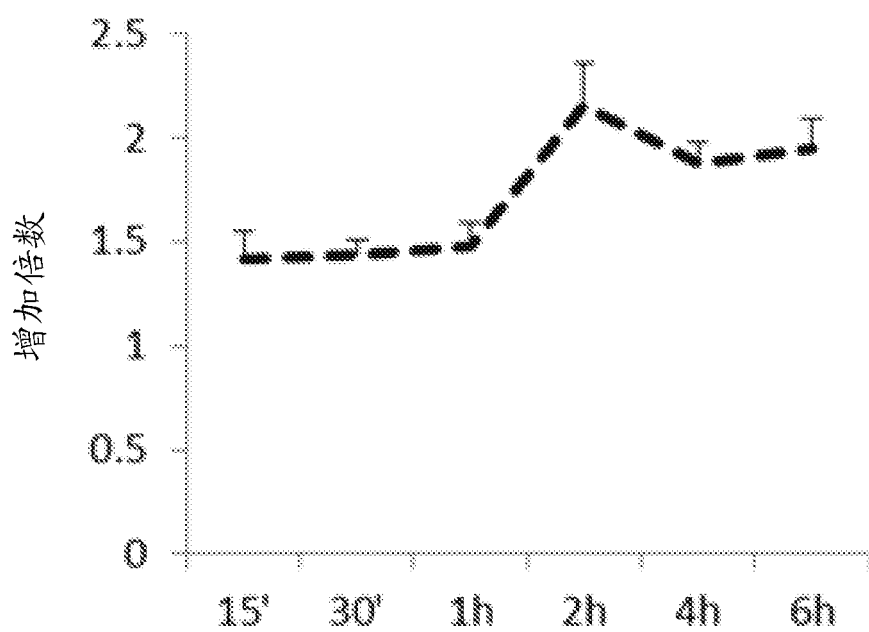


图 1b

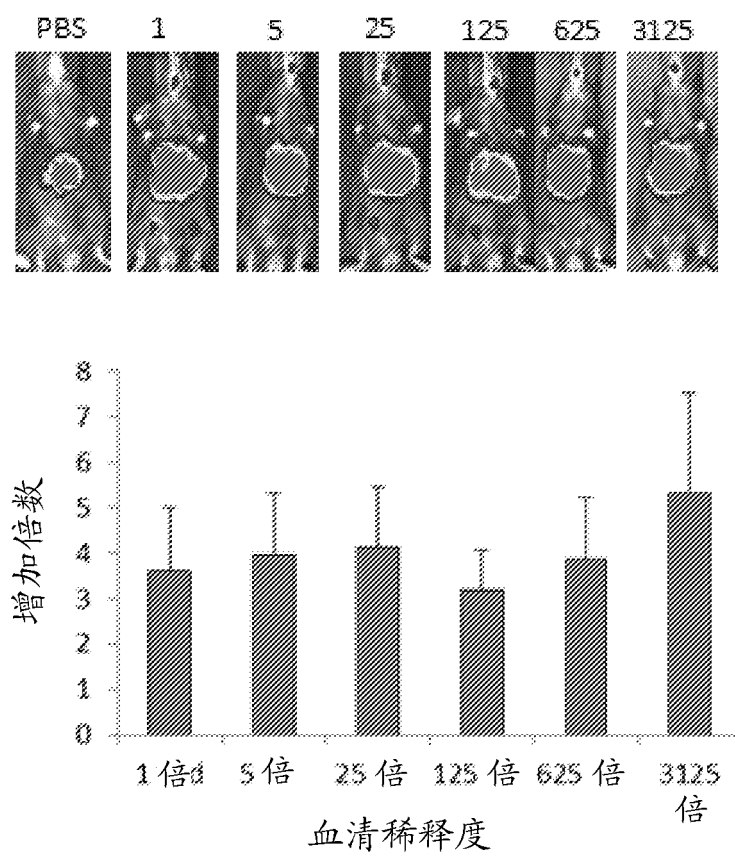


图 1c

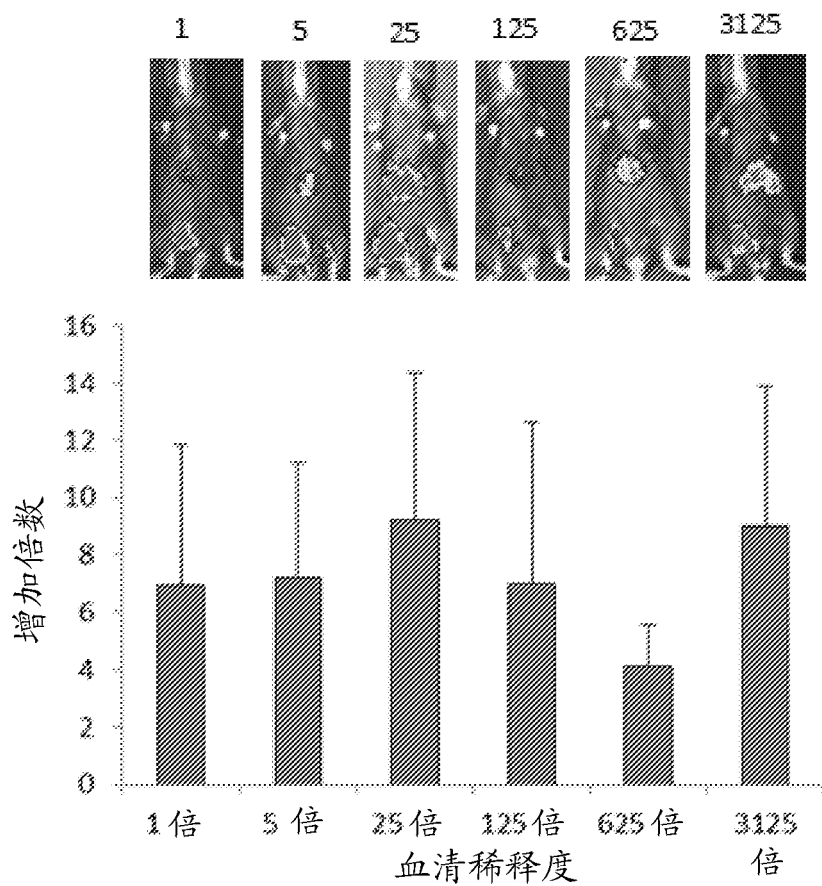


图 1d

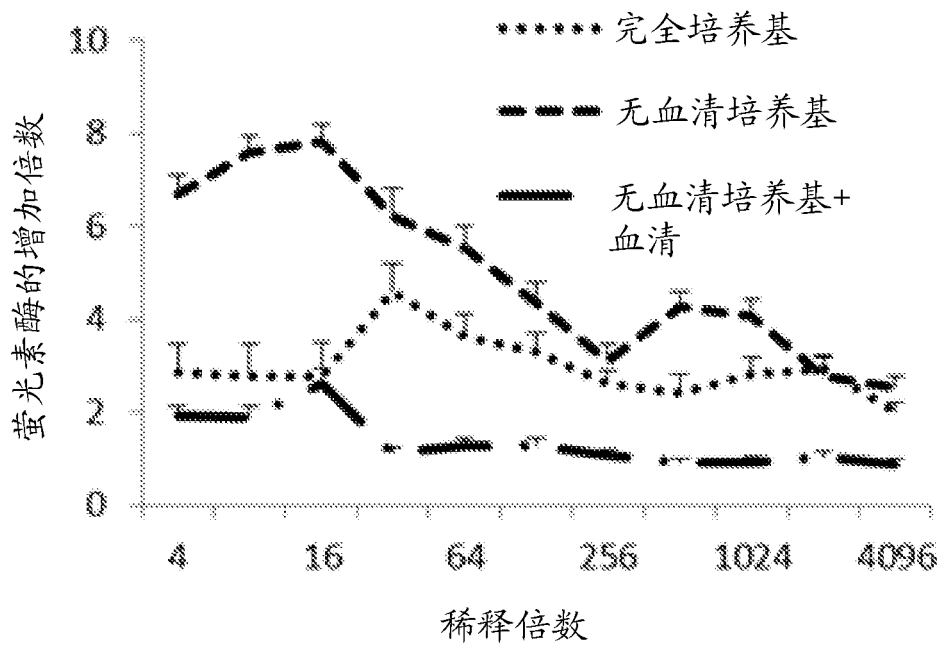


图 2a

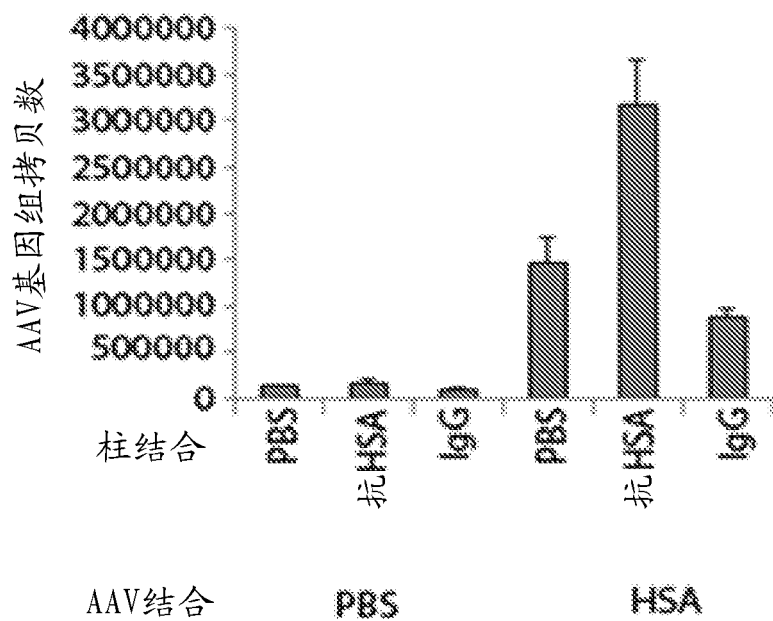


图 2b

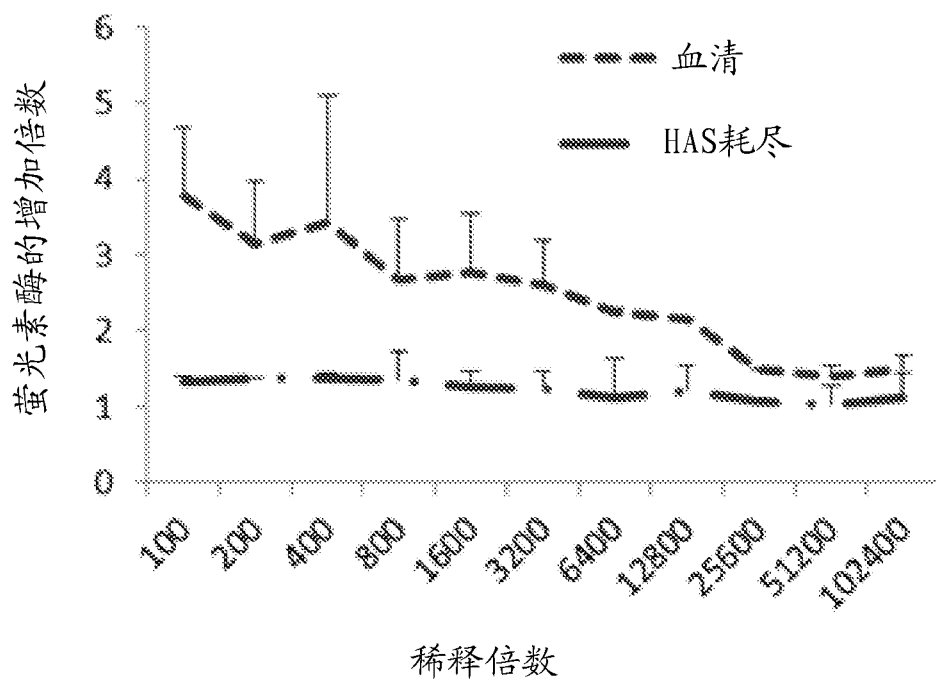


图 2c

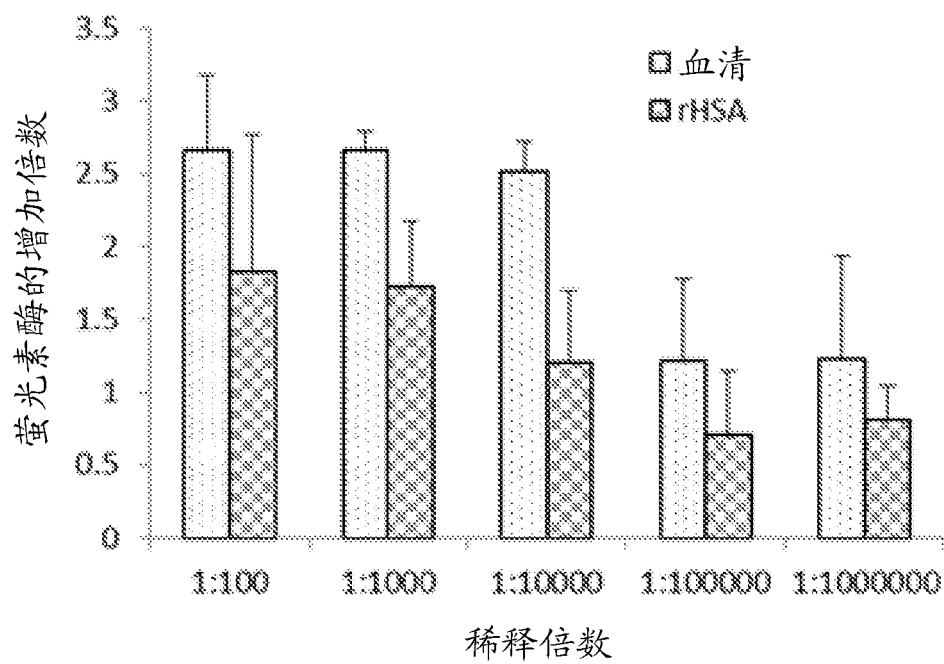


图 2d

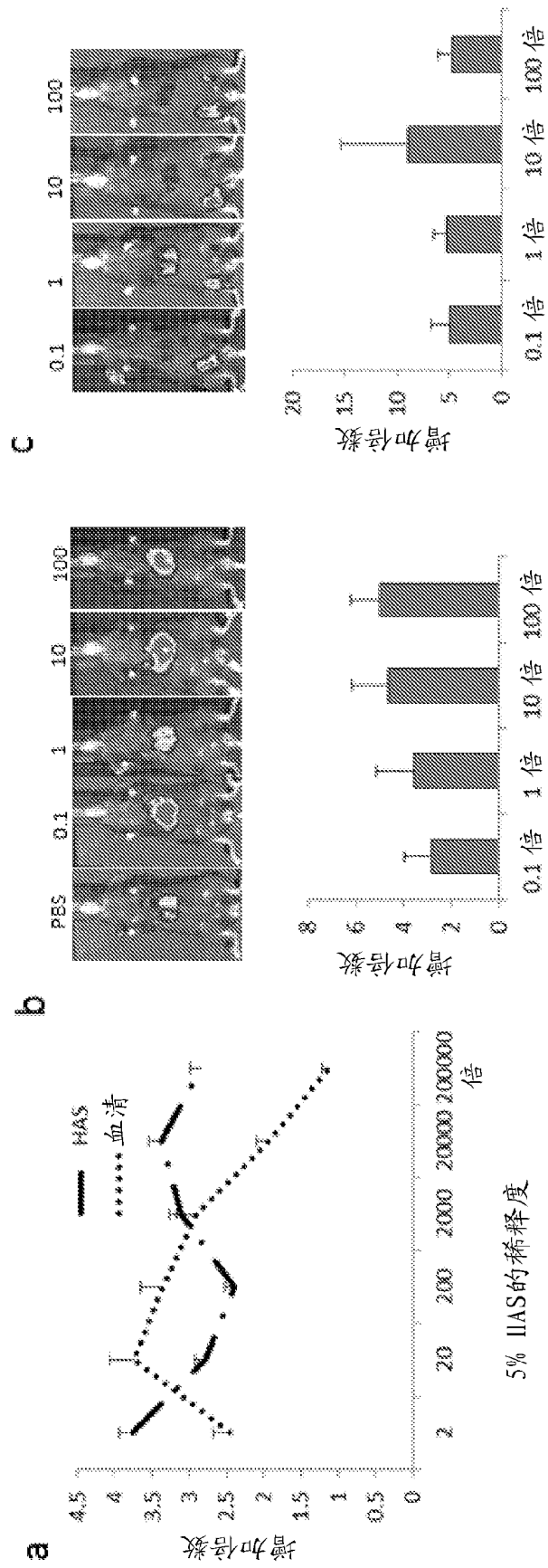


图 3

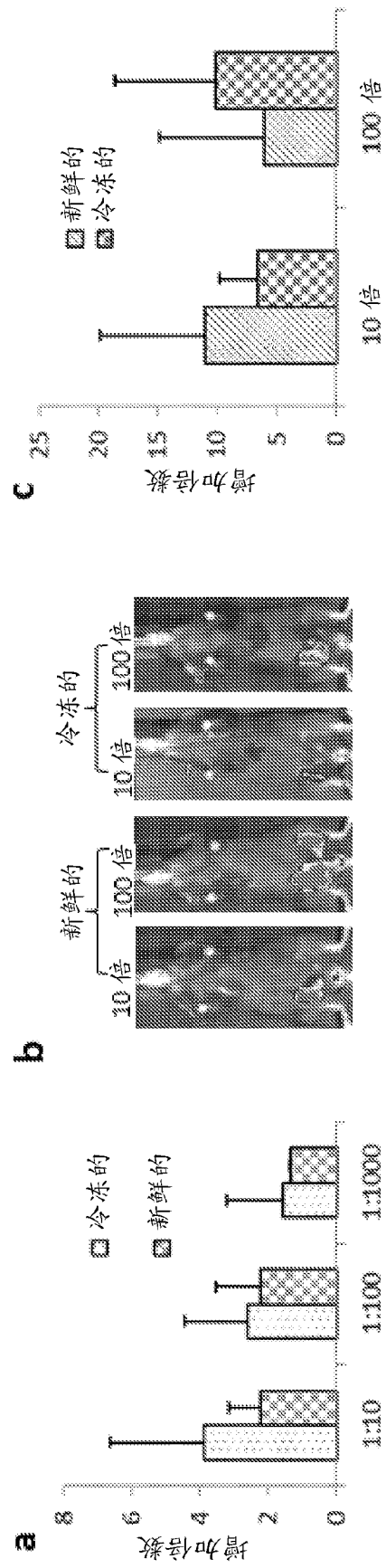


图 4

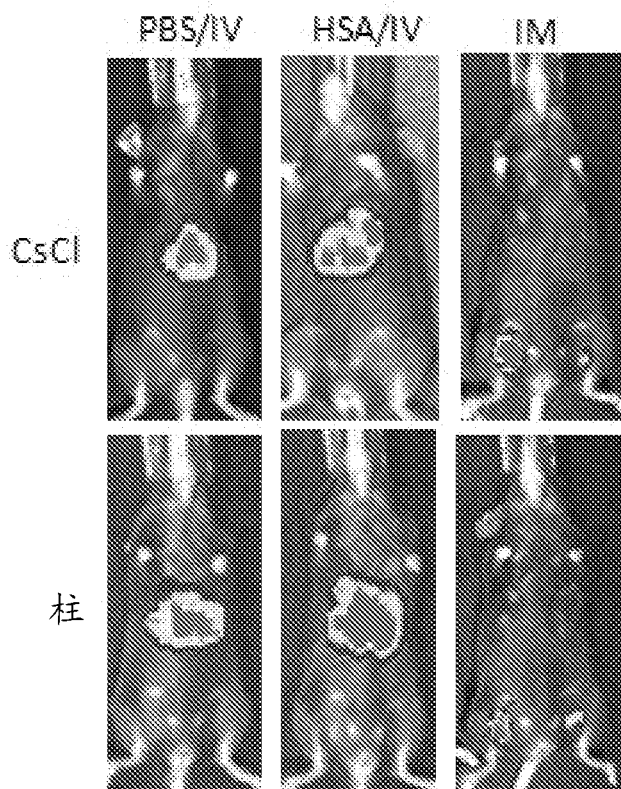


图 5a

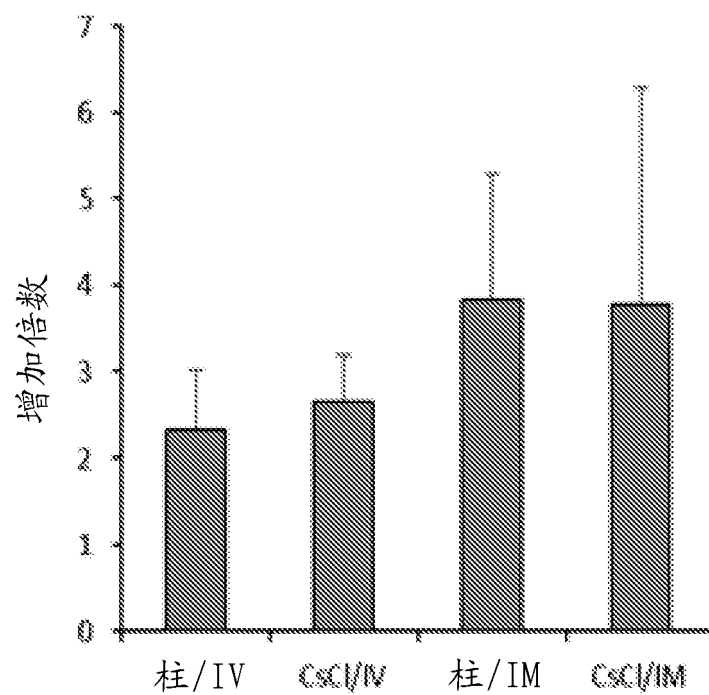


图 5b

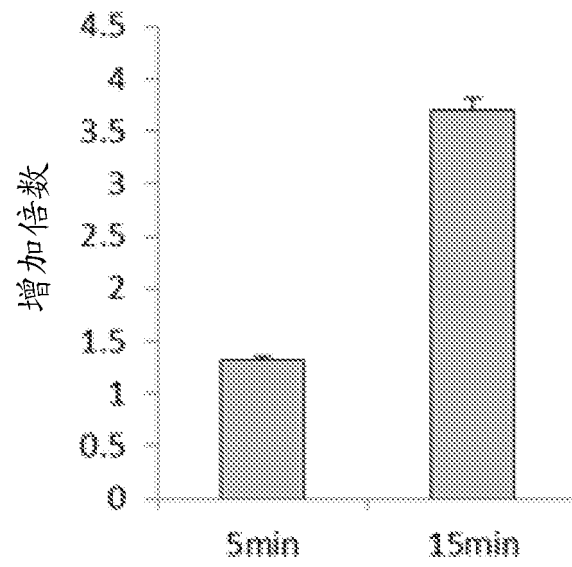


图 6a

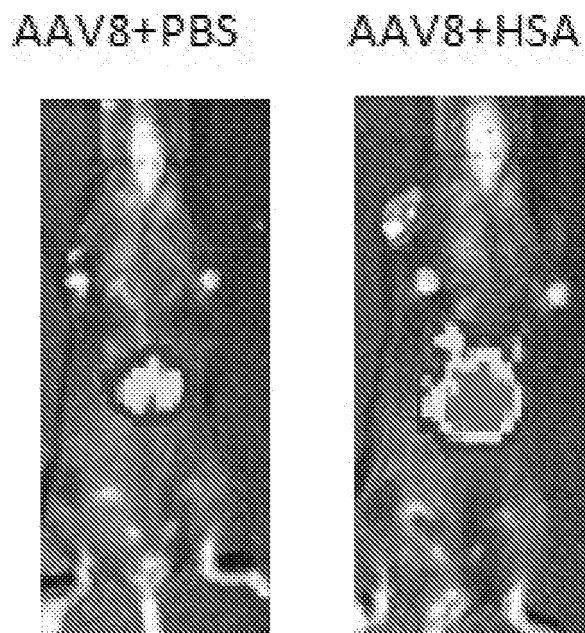


图 6b

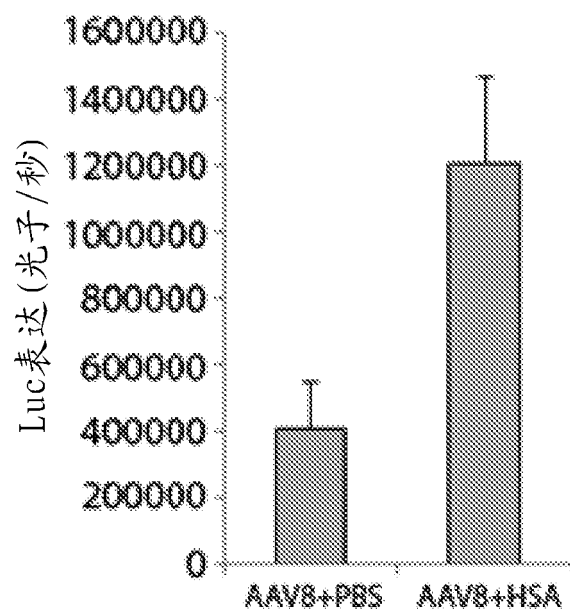


图 6c

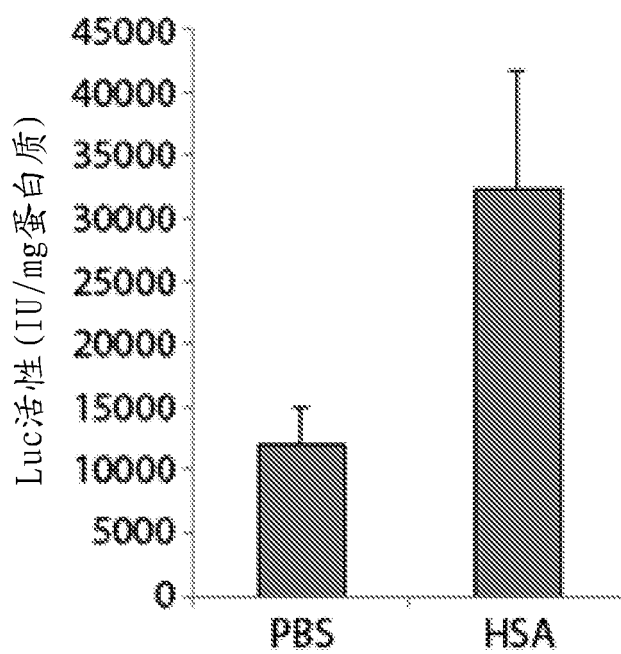


图 6d

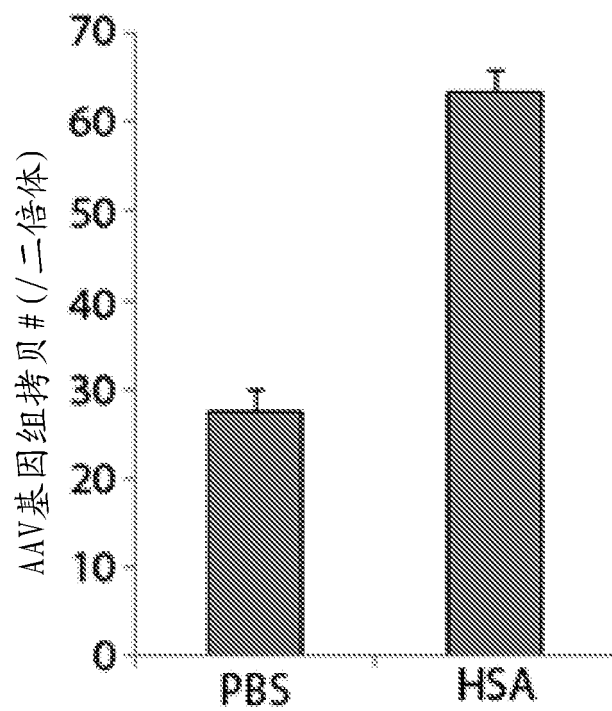


图 6e

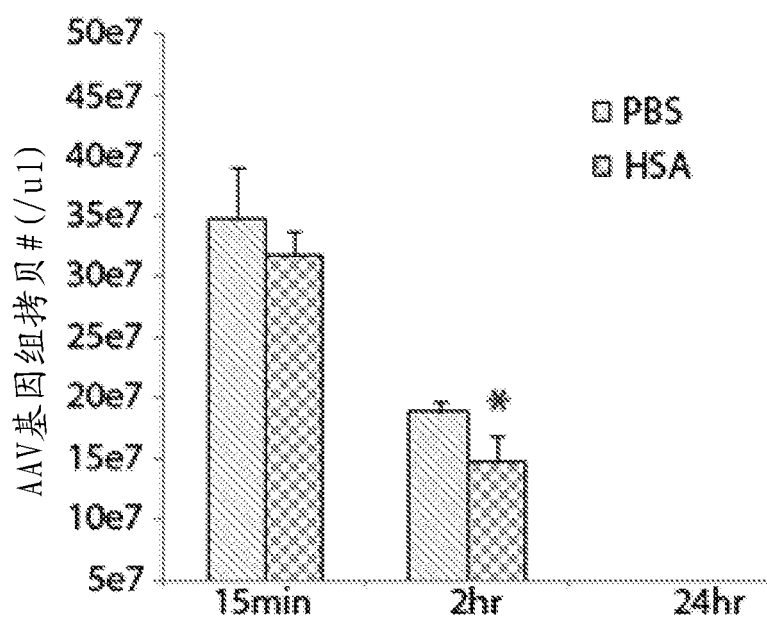


图 6f

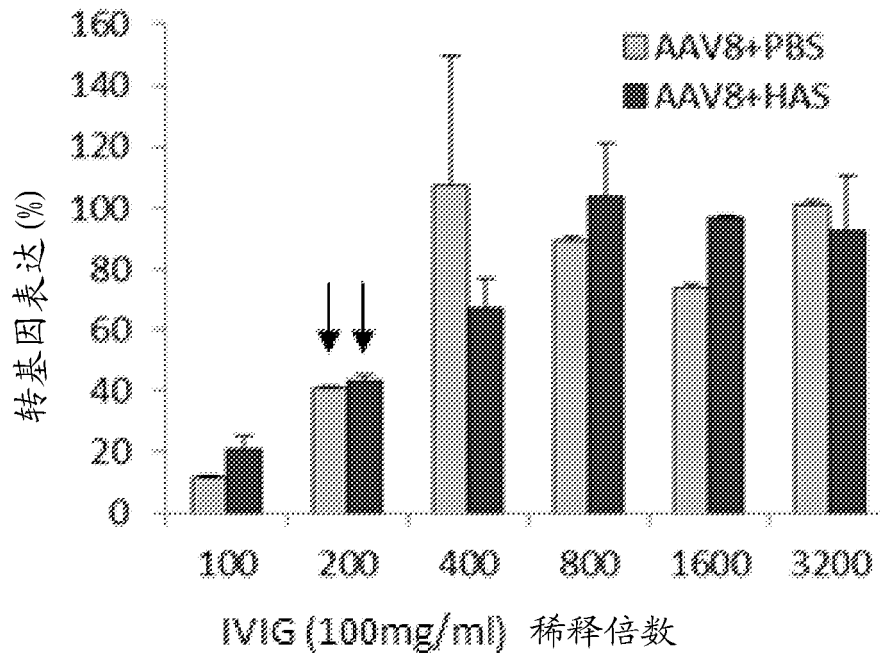


图 7a

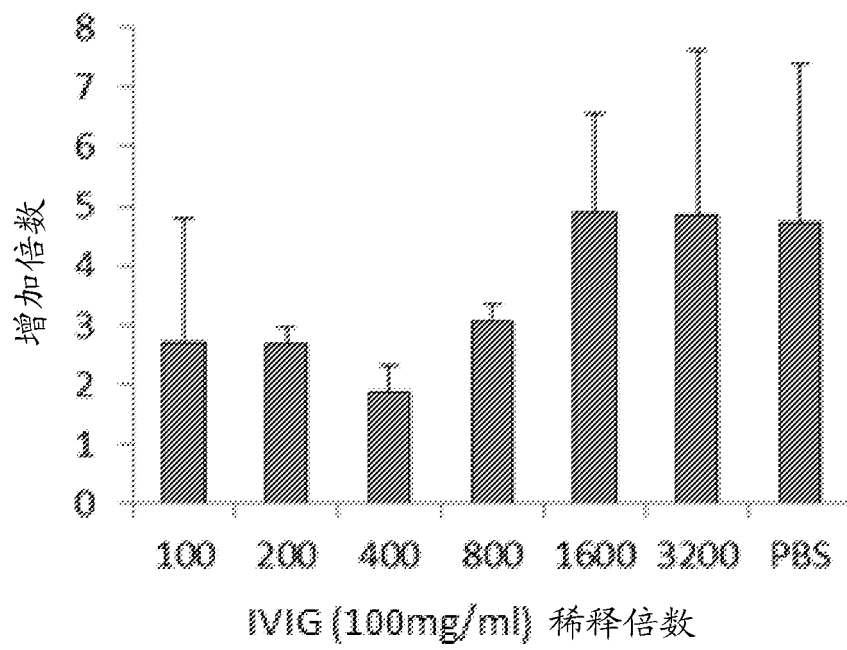


图 7b

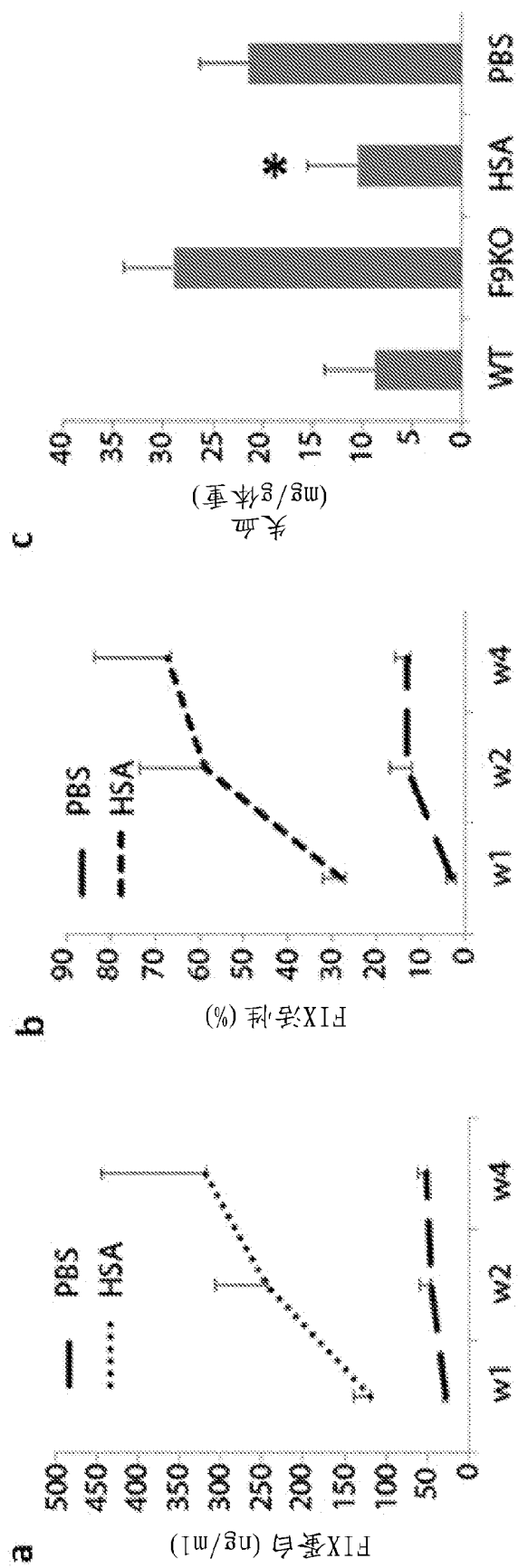


图 8

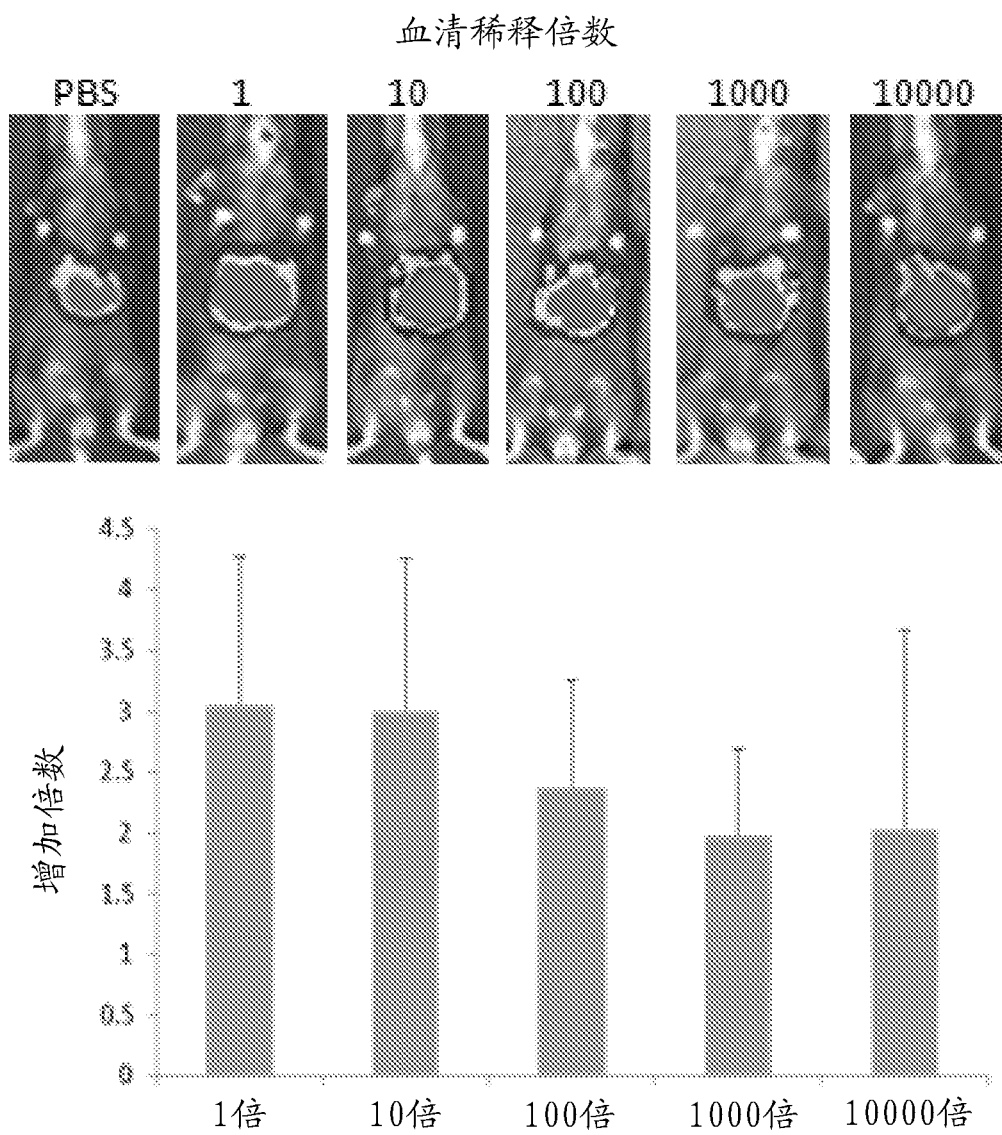


图 9a

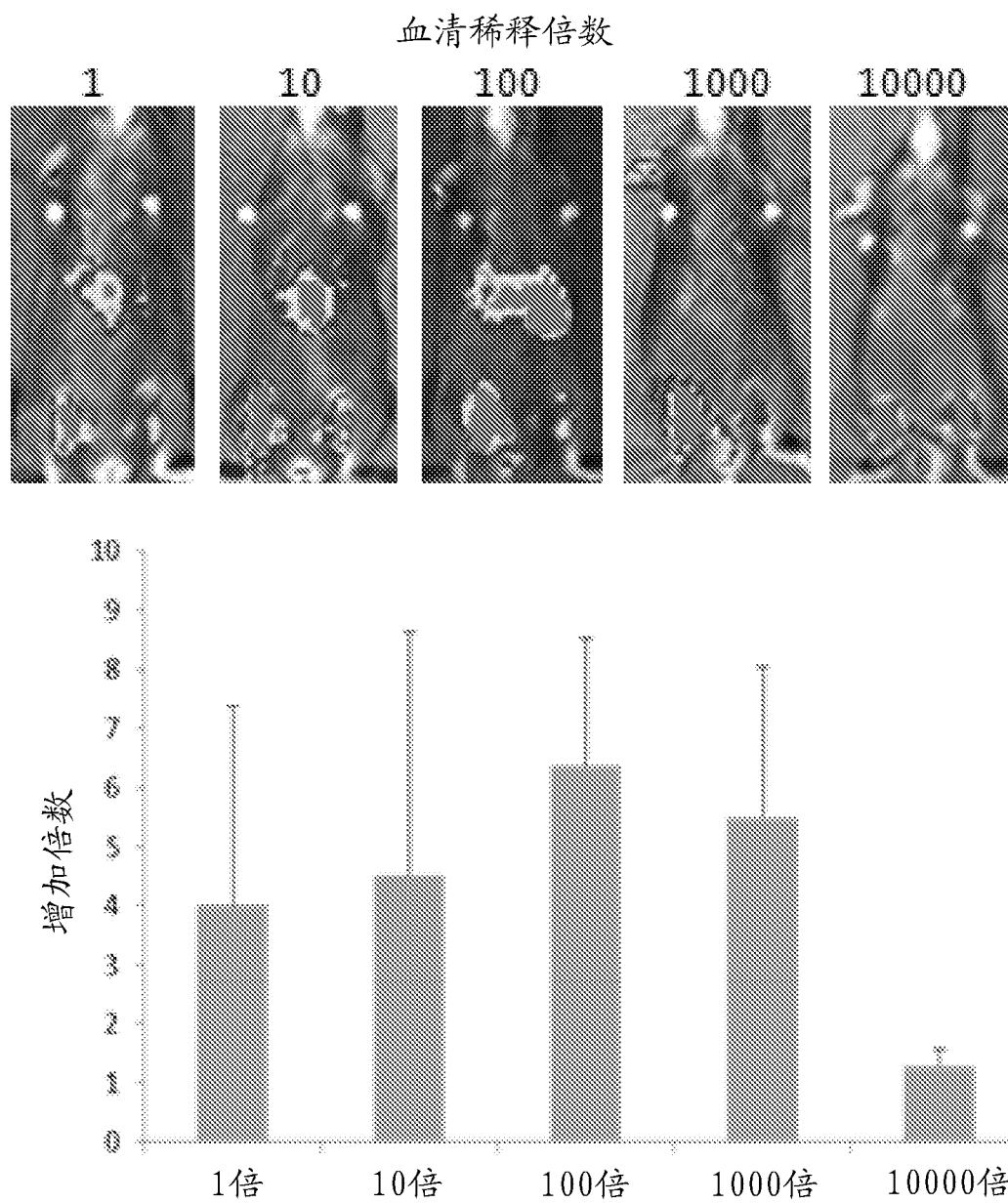


图 9b

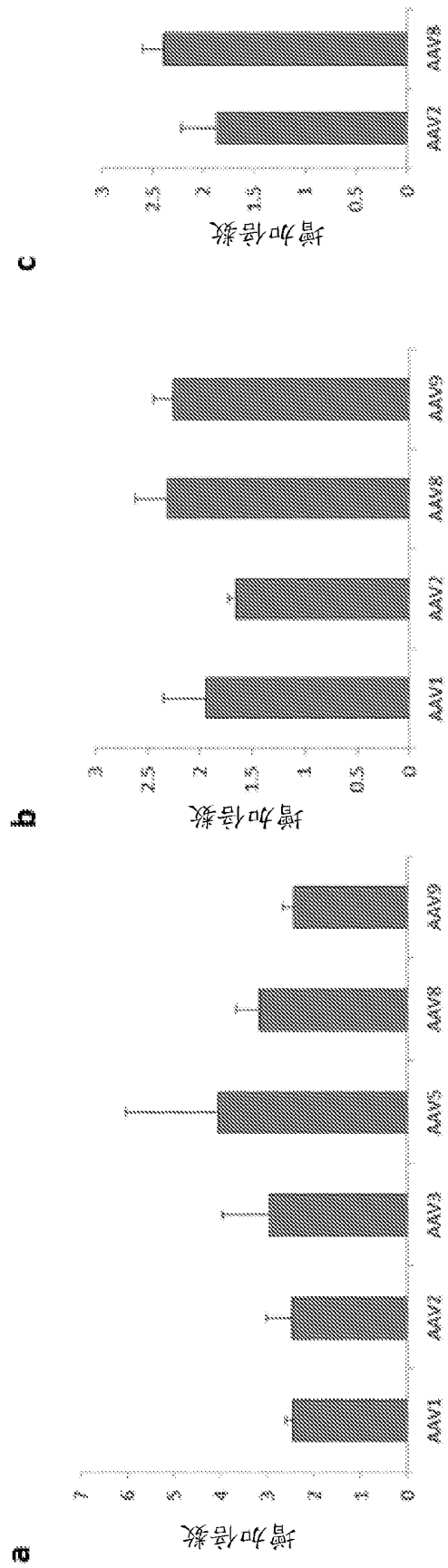


图 10

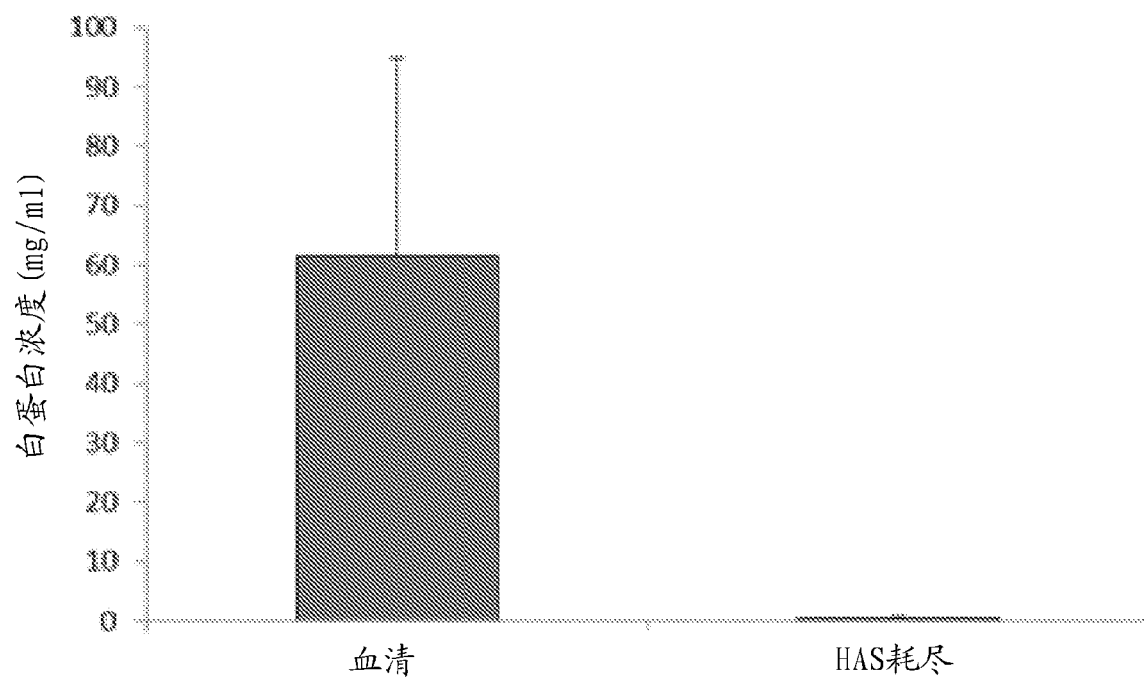


图 11

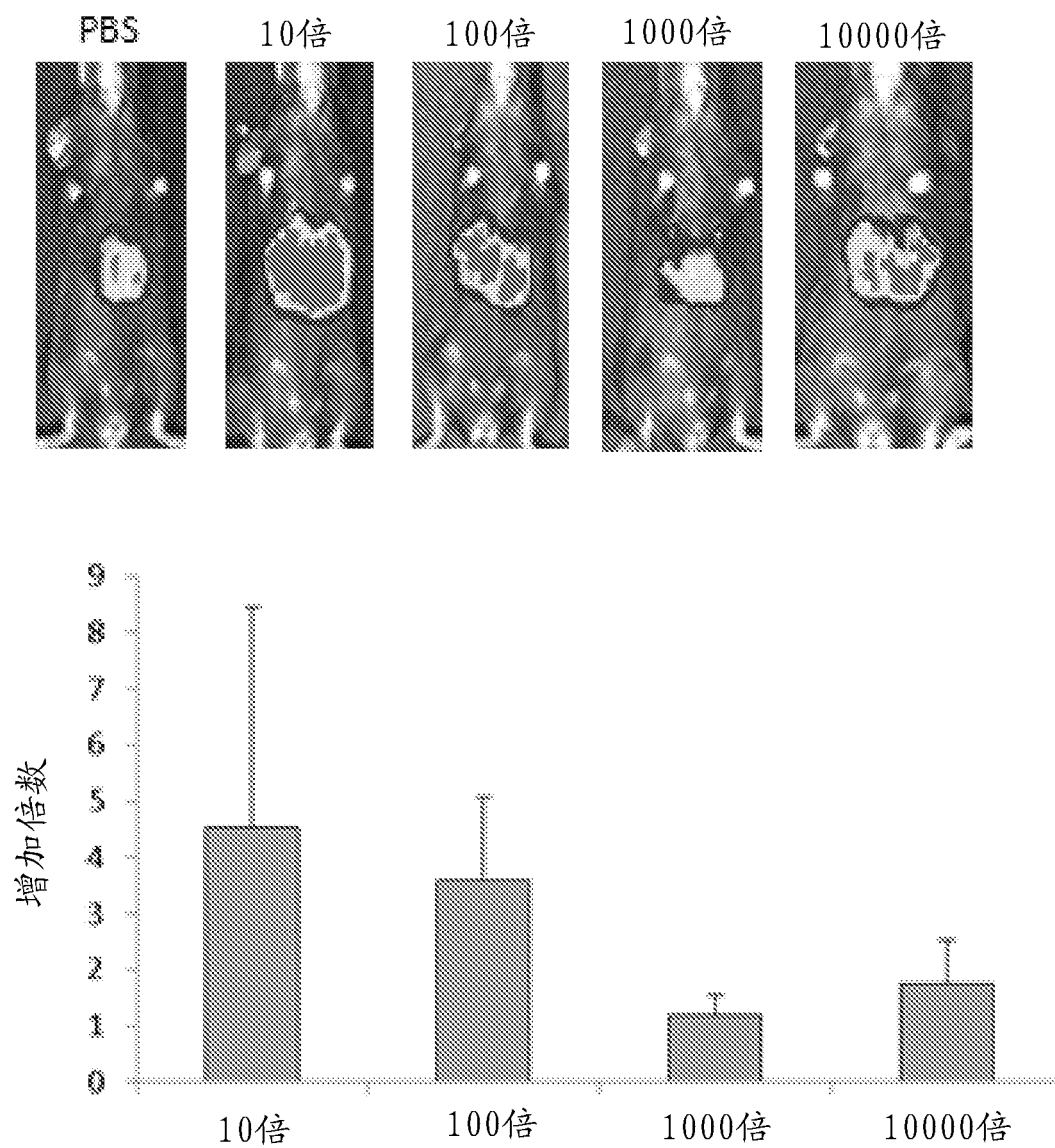


图 12a

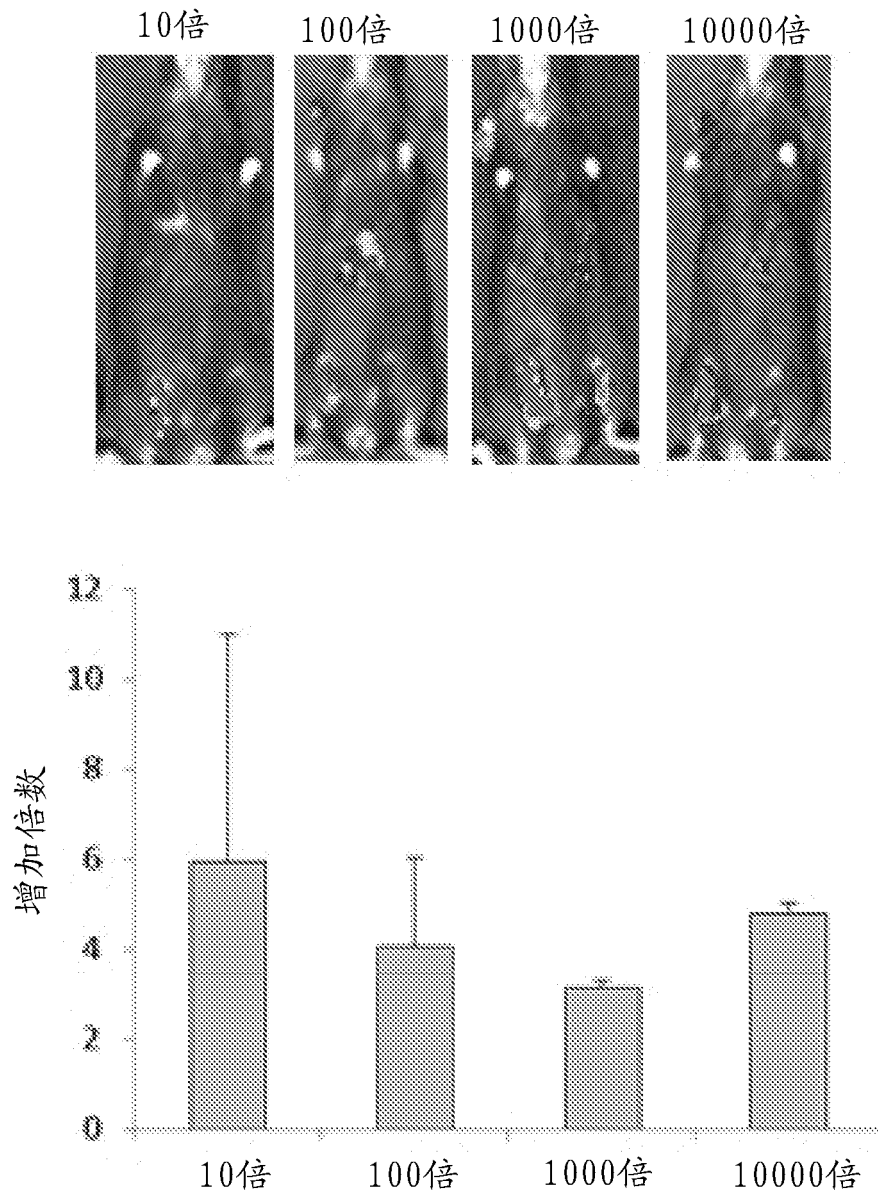


图 12b

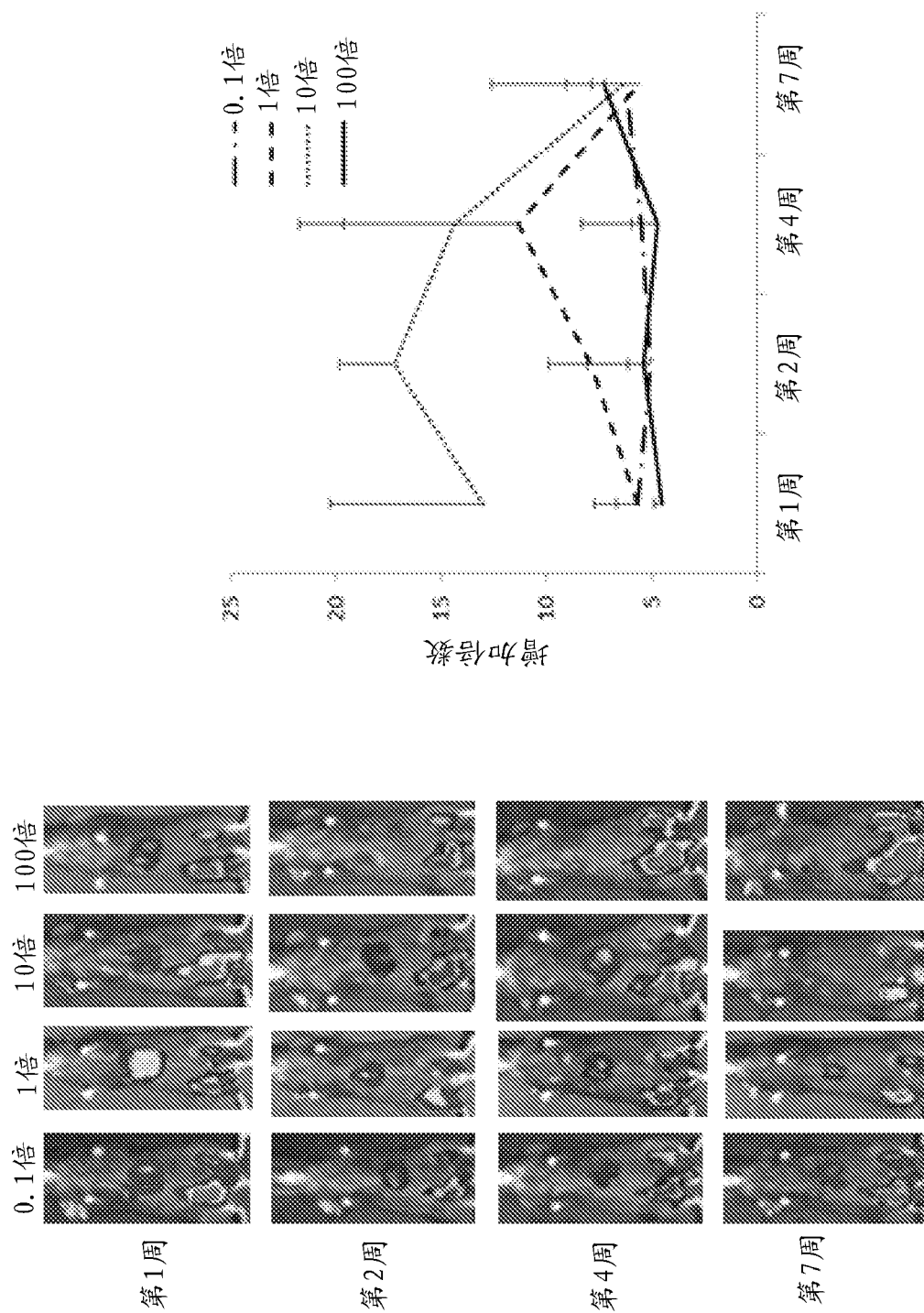


图 13

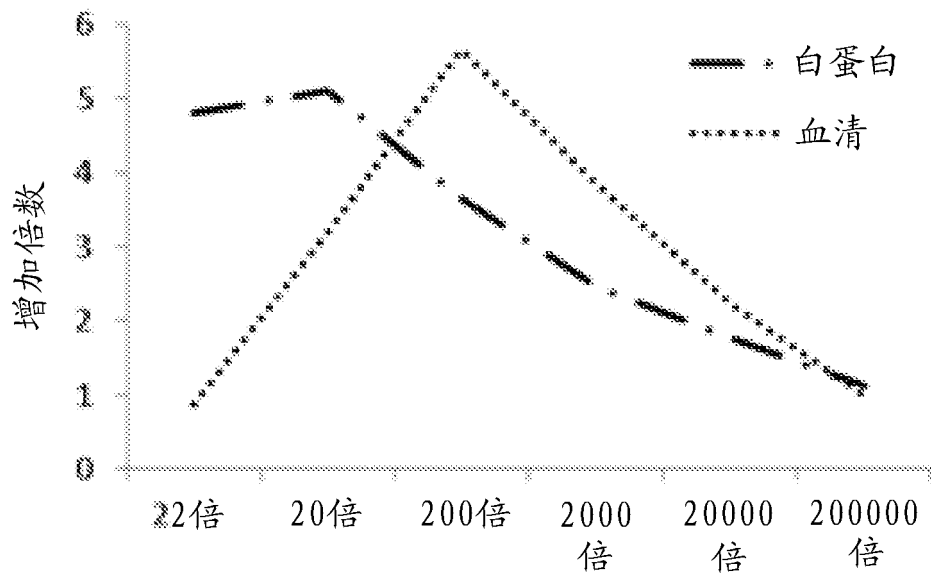


图 14a



图 14b

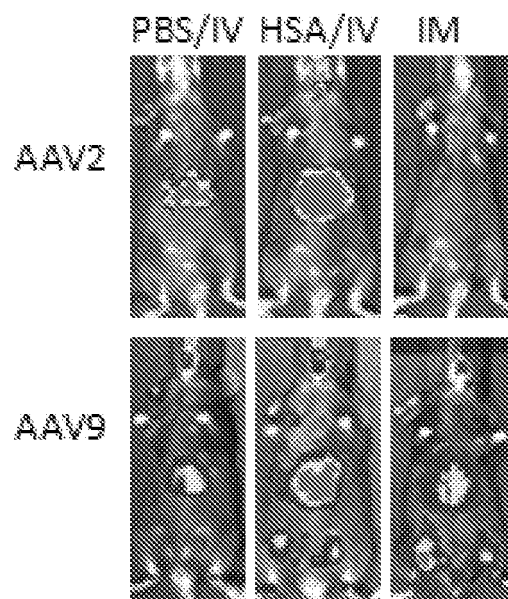


图 14c

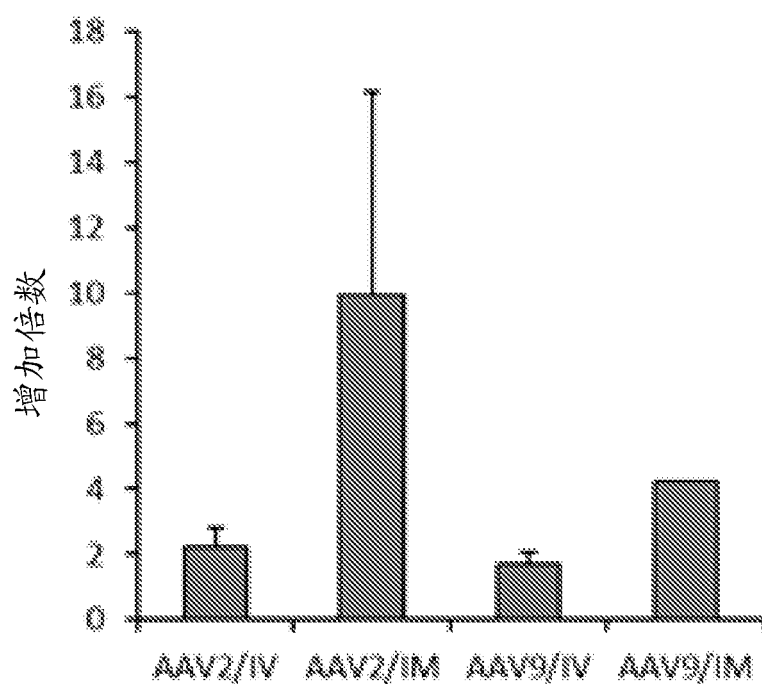


图 14d

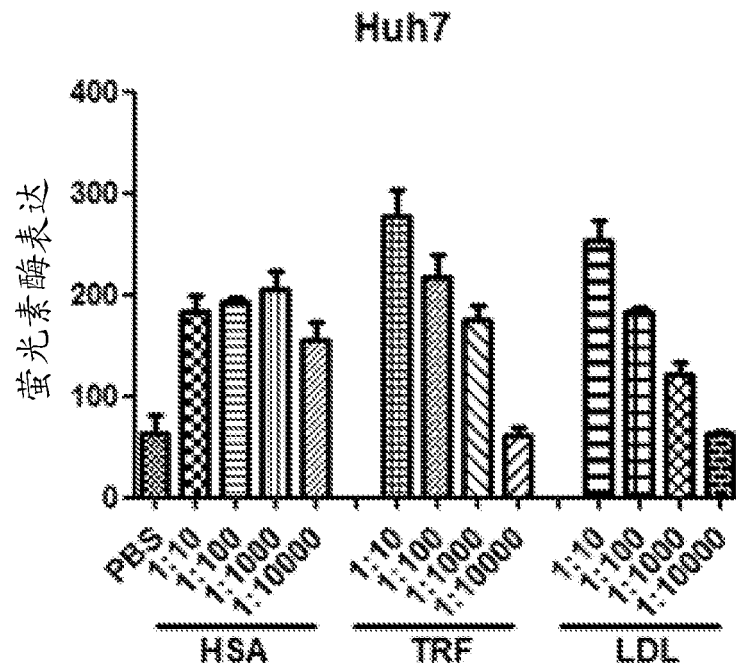


图 15A

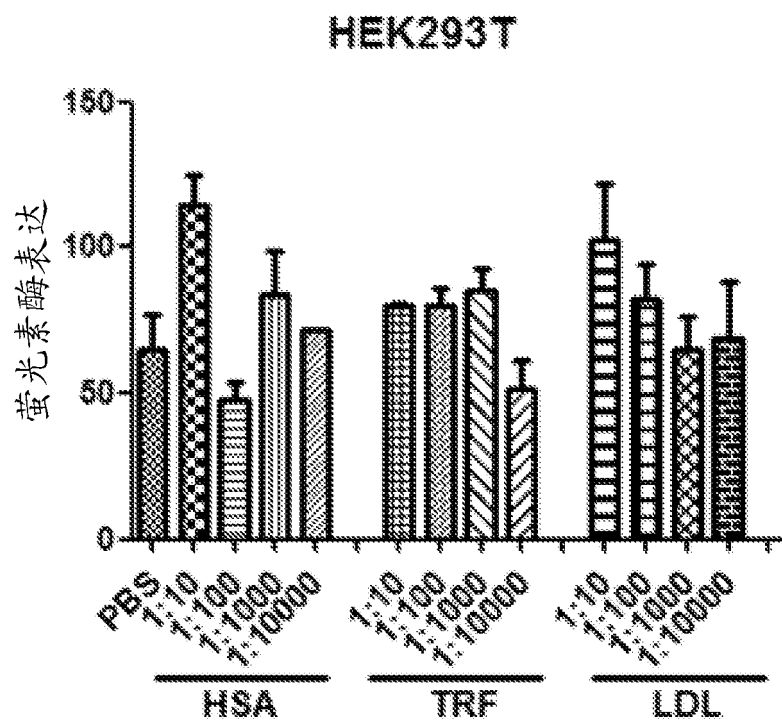


图 15B

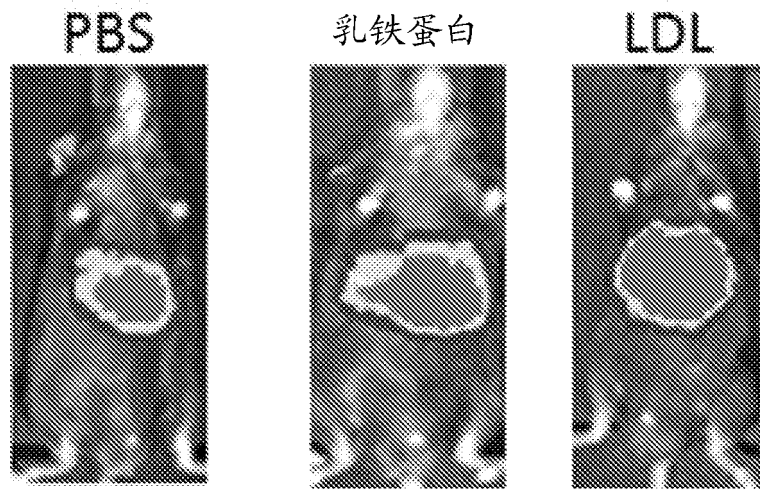


图 16A

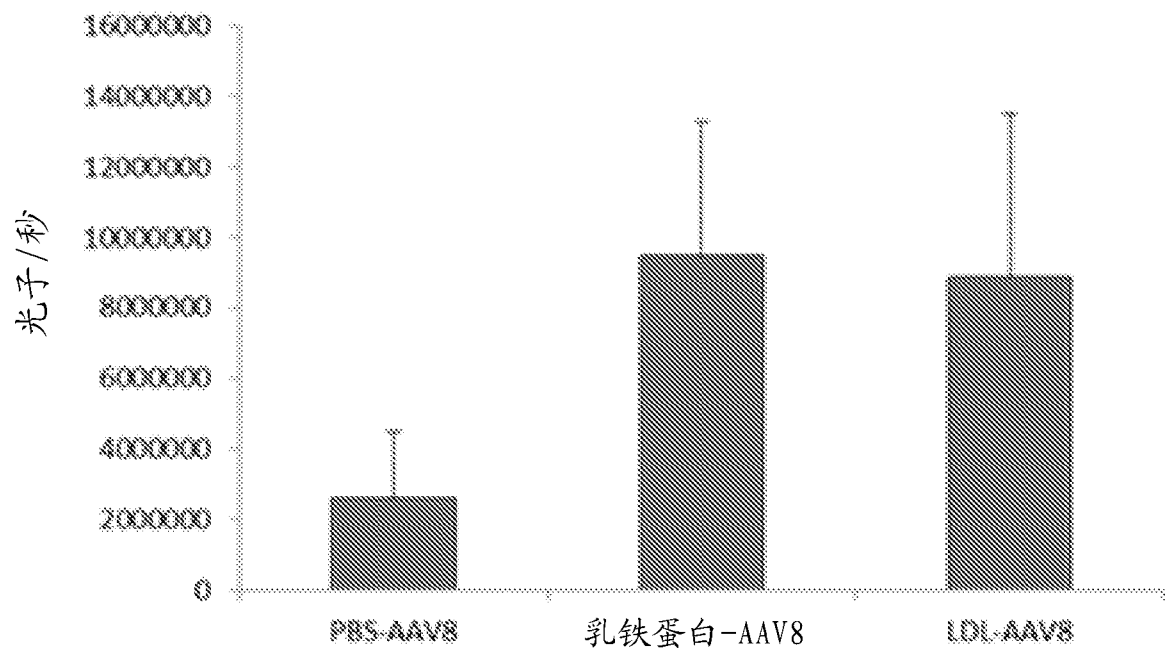


图 16B

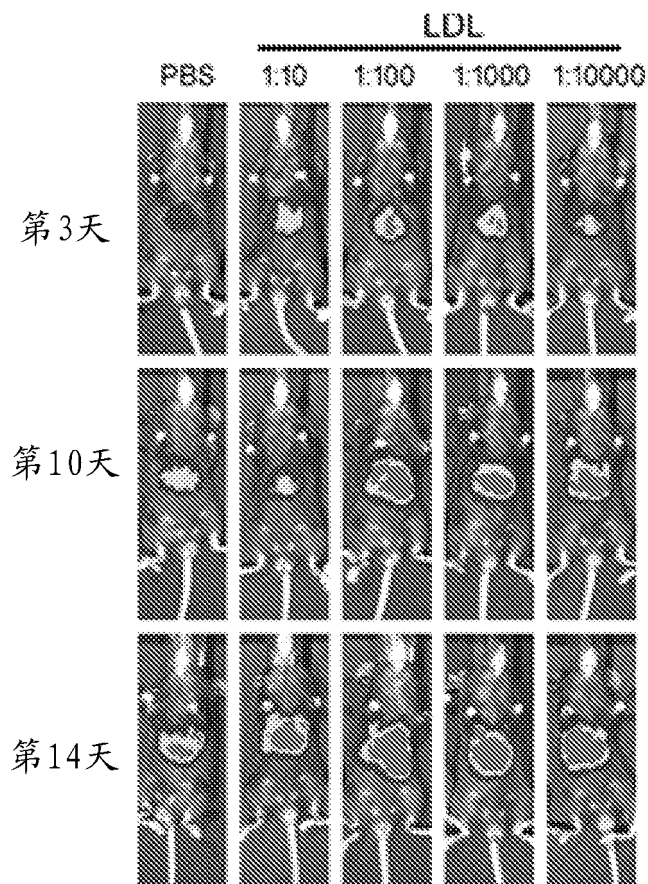


图 17A

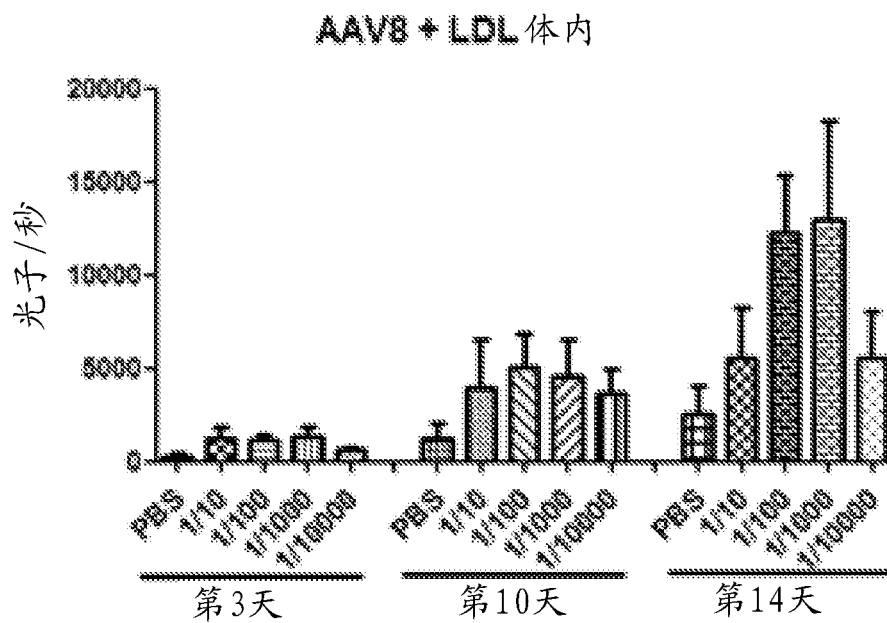


图 17B

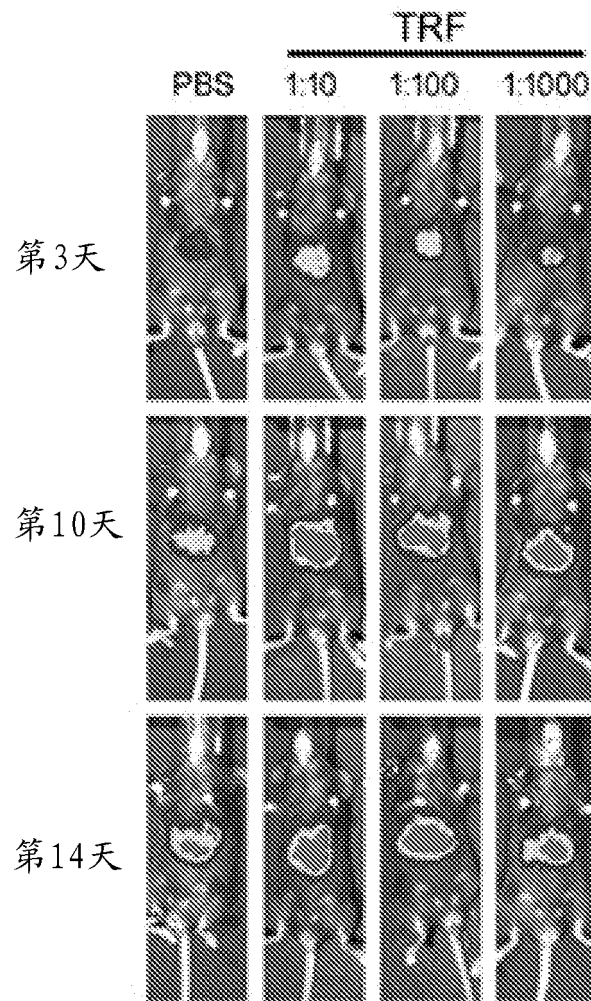


图 17C

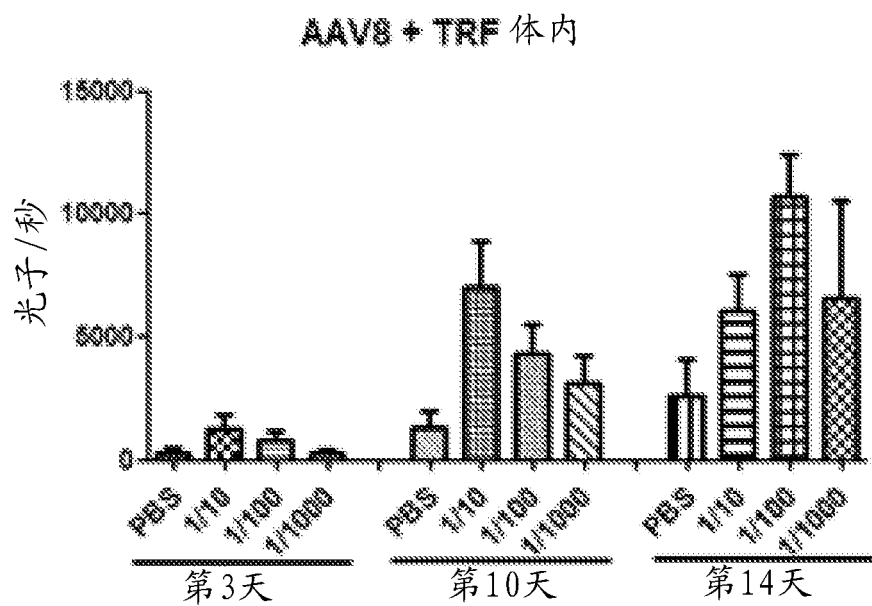


图 17D

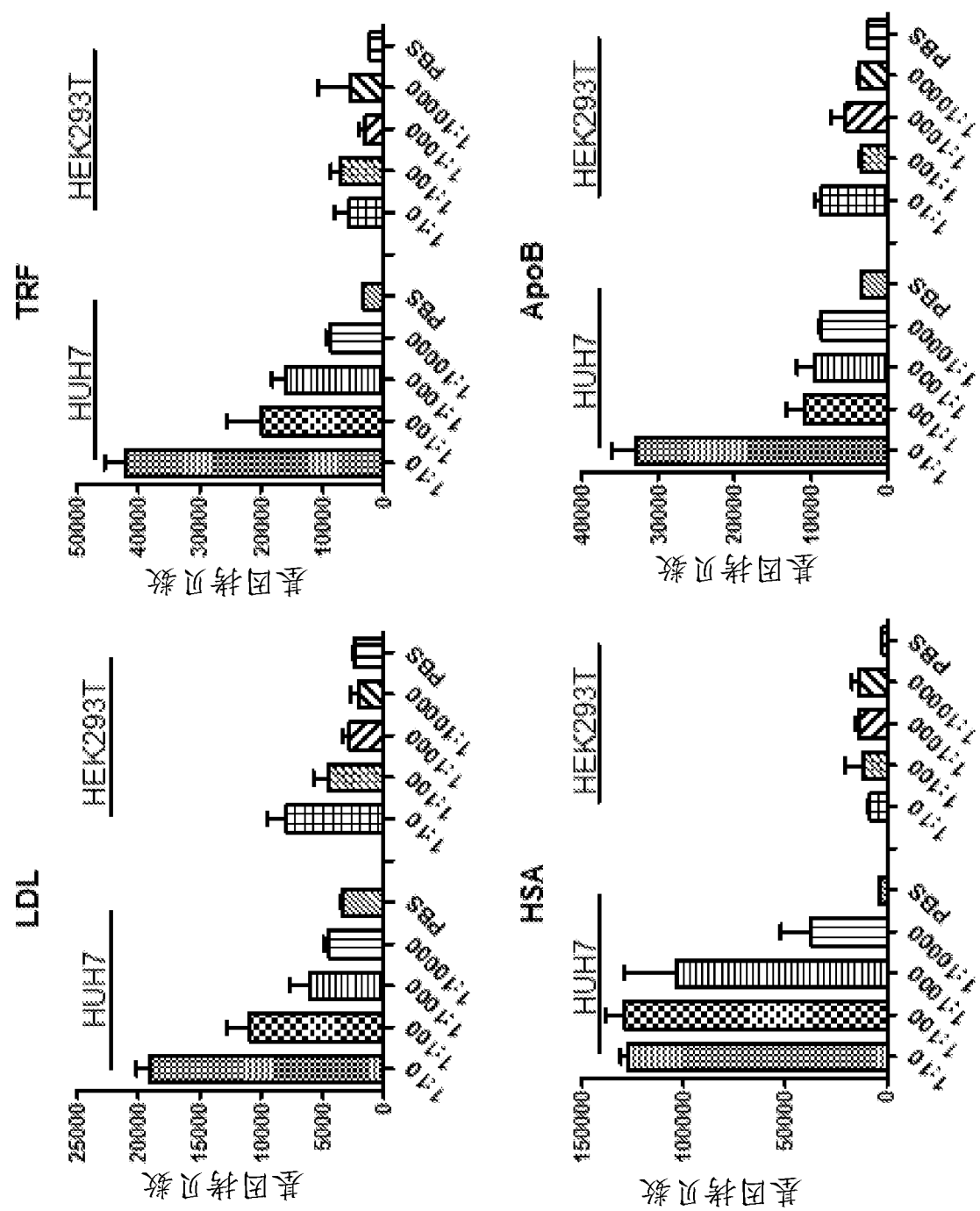


图 18

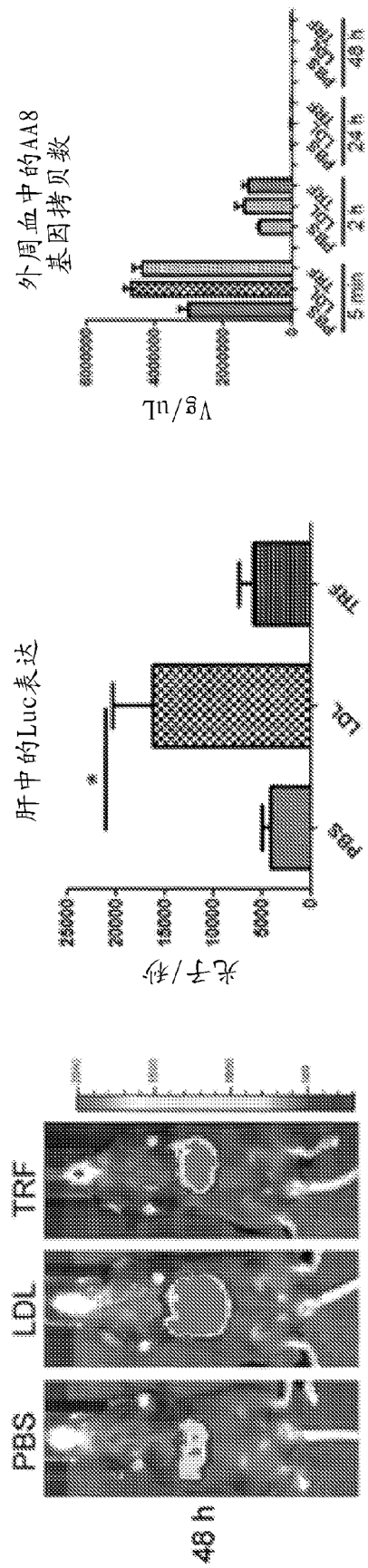
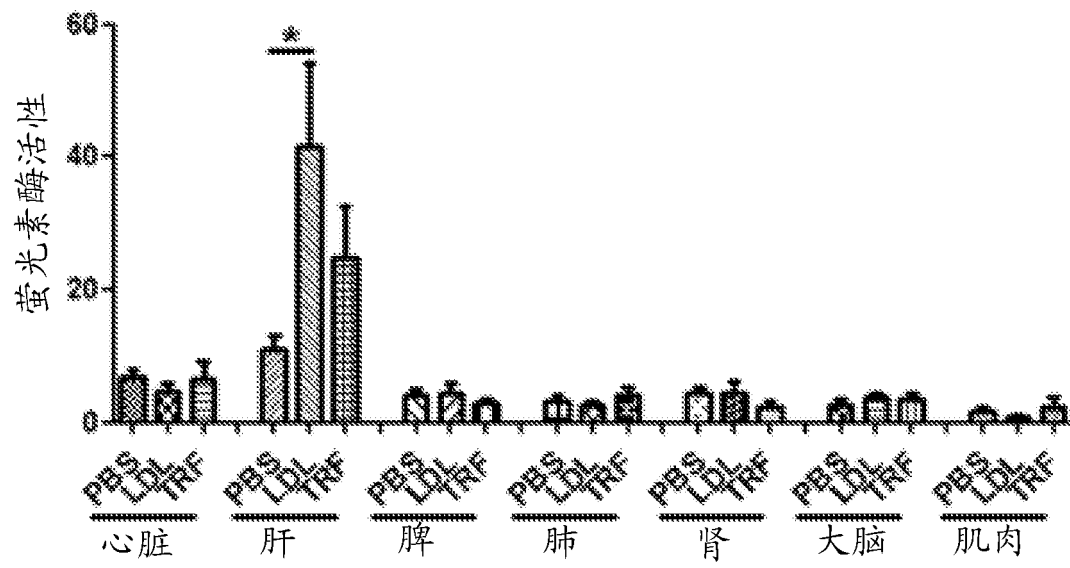


图 19

不同组织中的AA8 luc表达



不同组织中的AA8 luc基因拷贝数

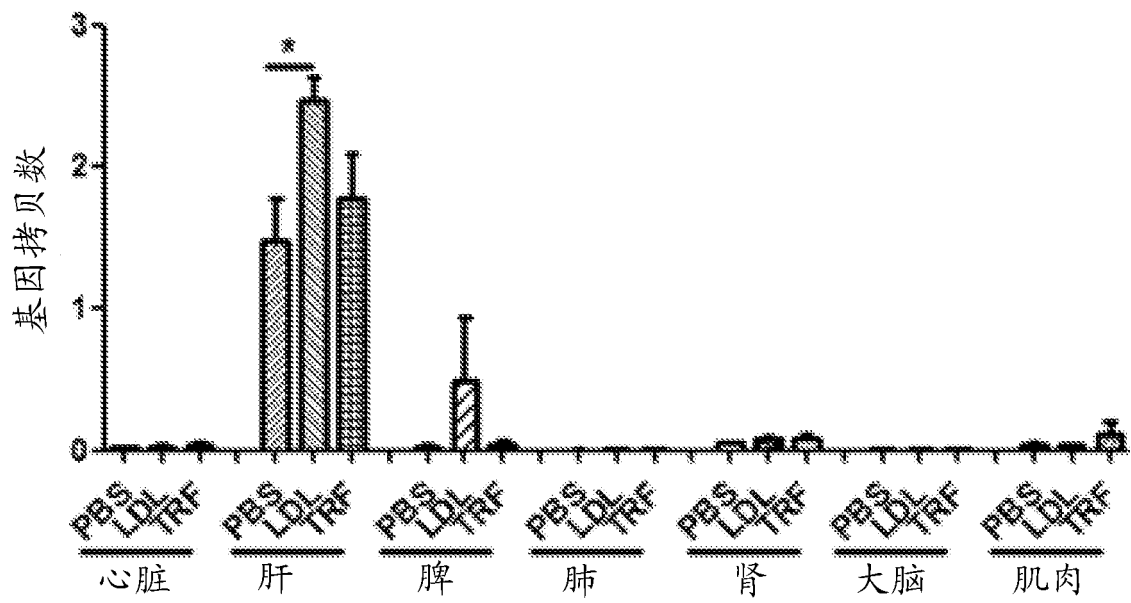


图 20

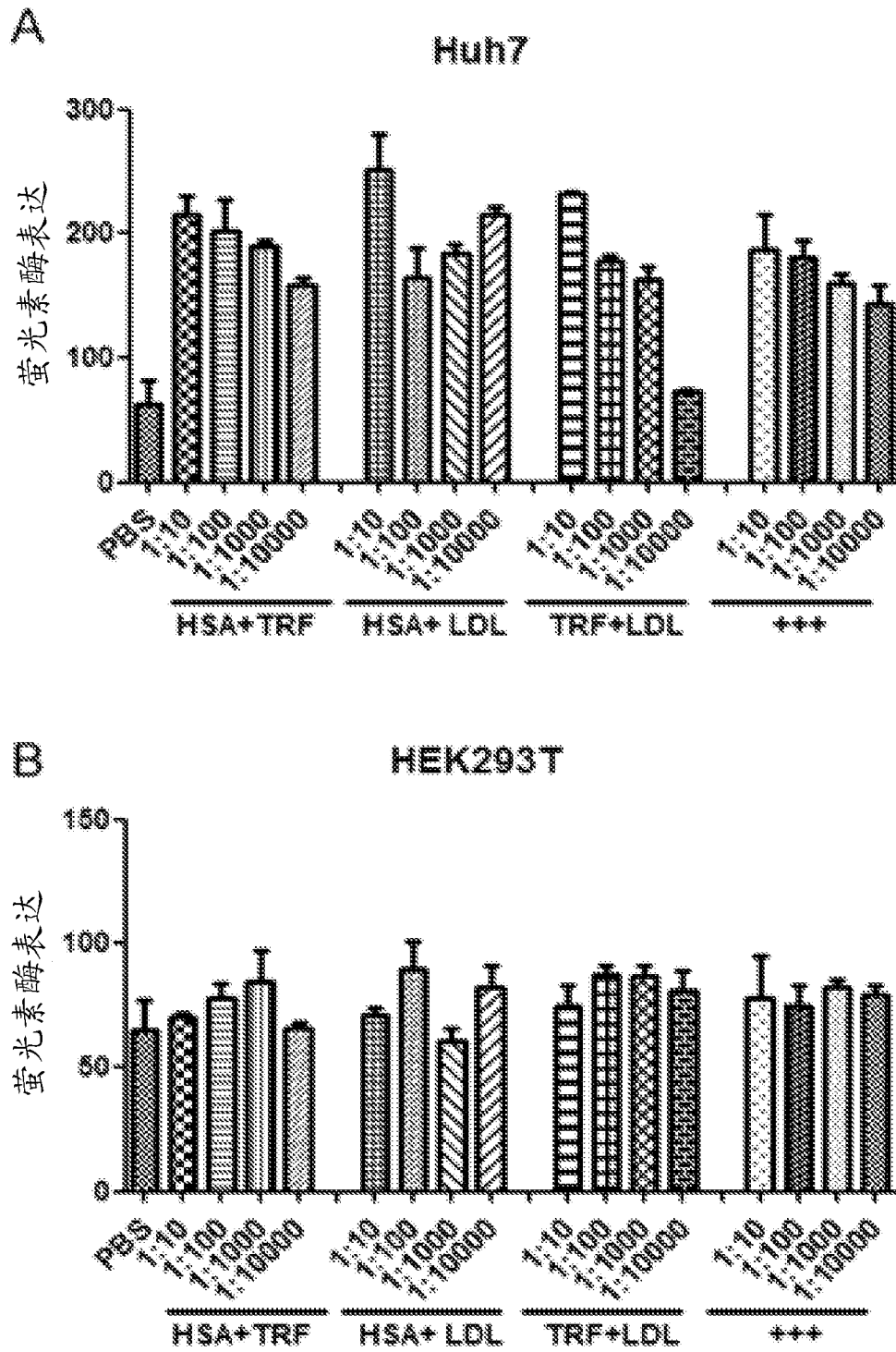


图 21

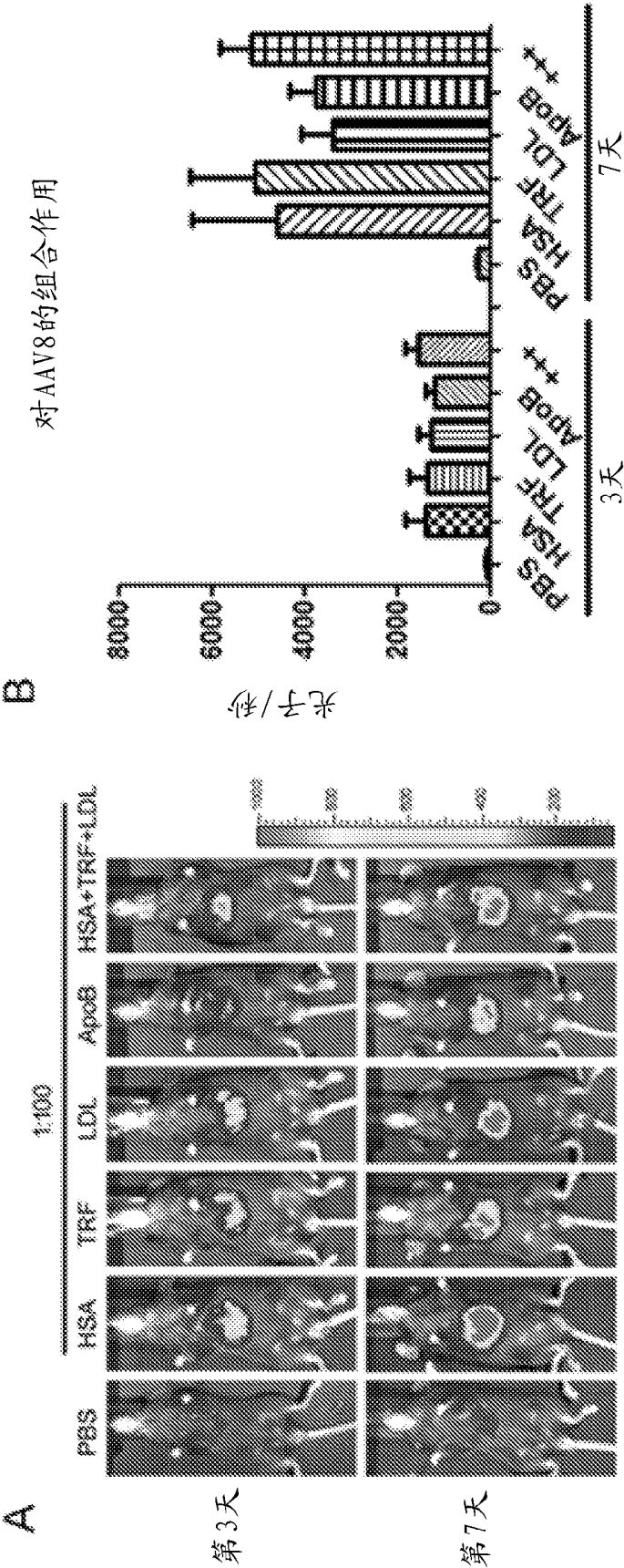


图 22

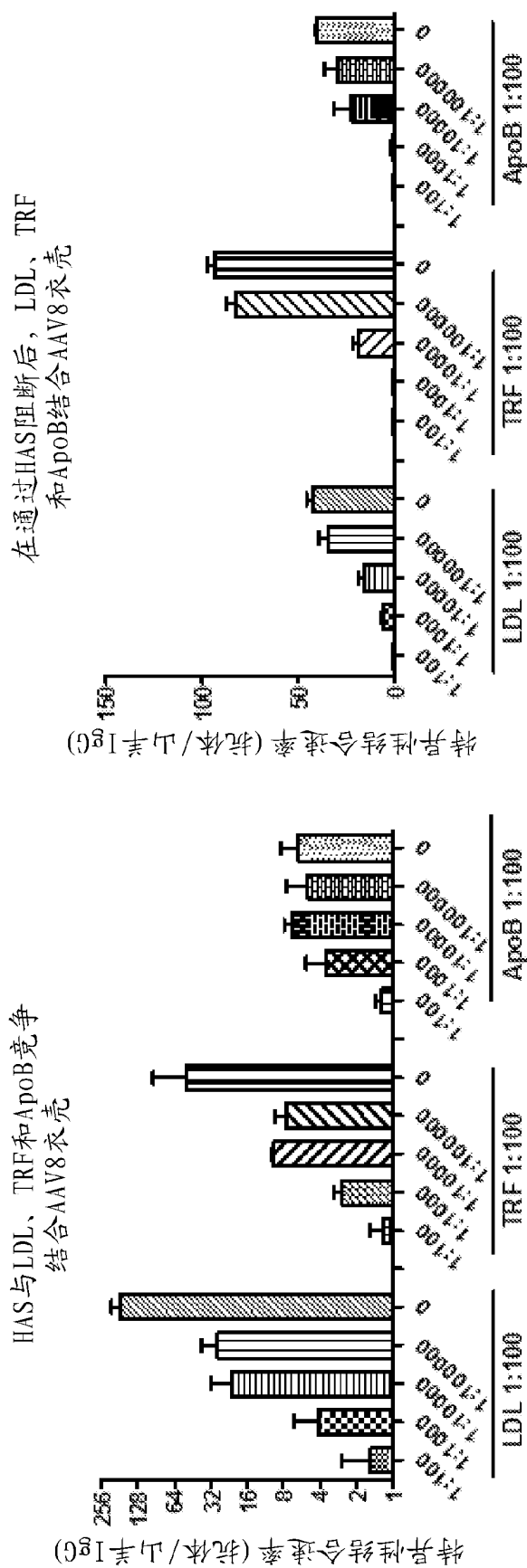


图 23

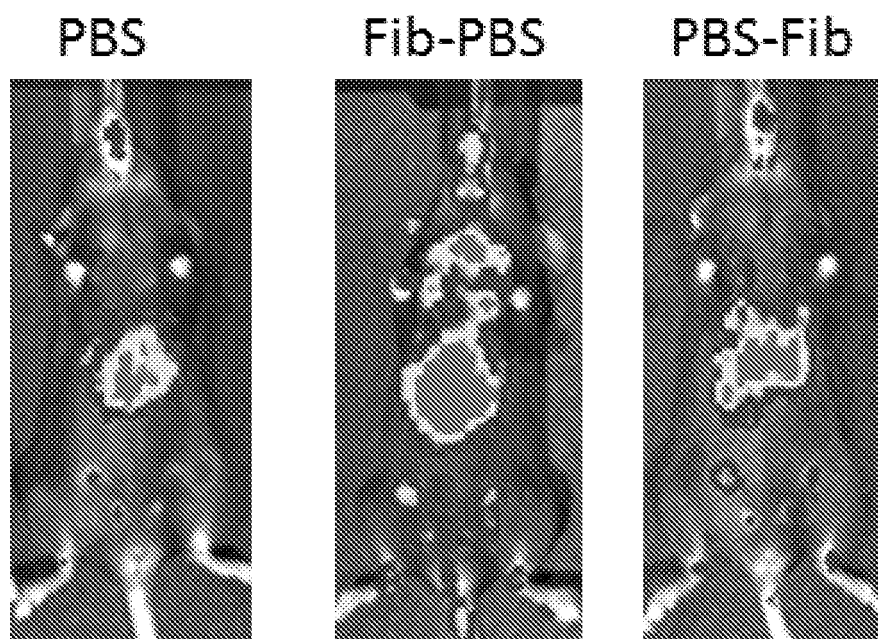


图 24A

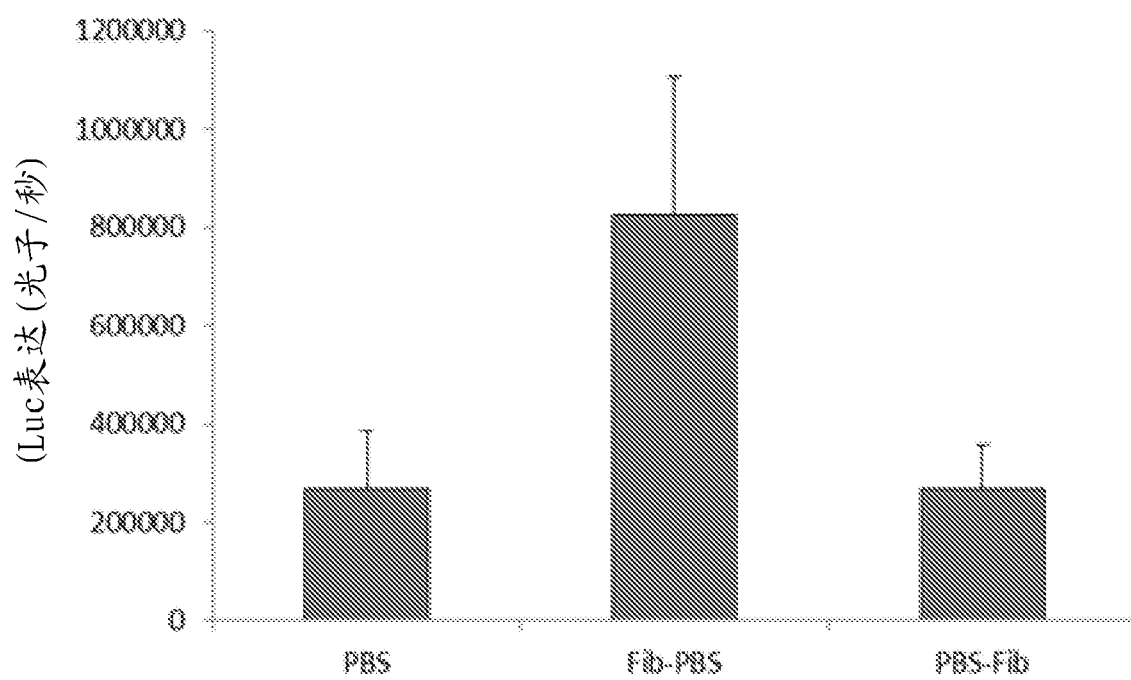


图 24B

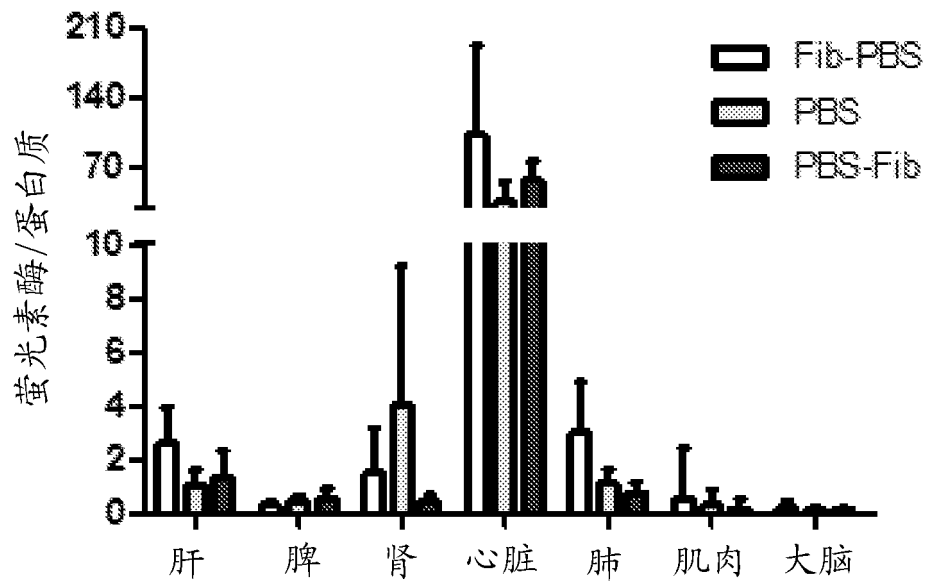


图 25A

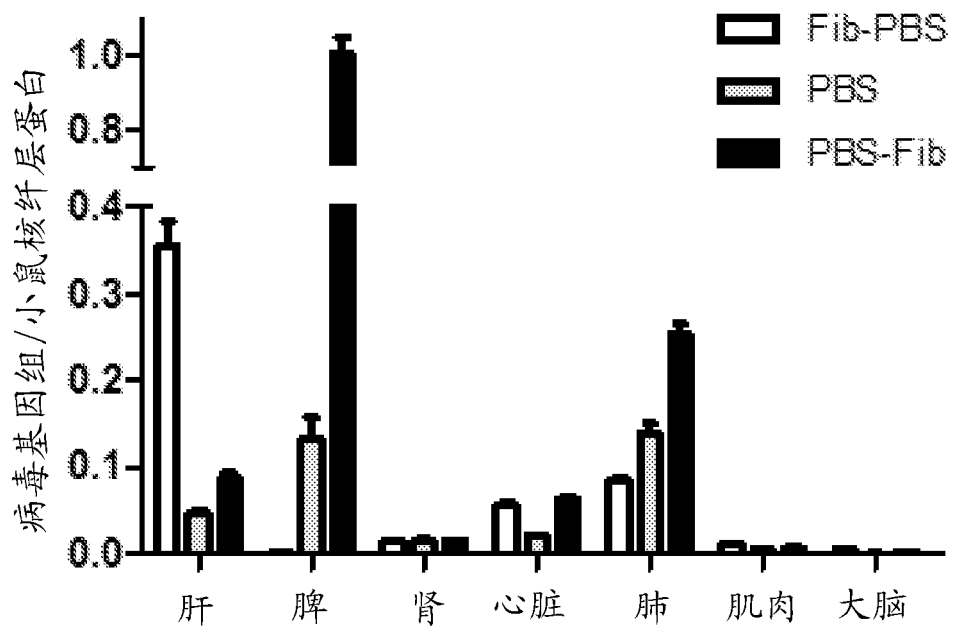


图 25B

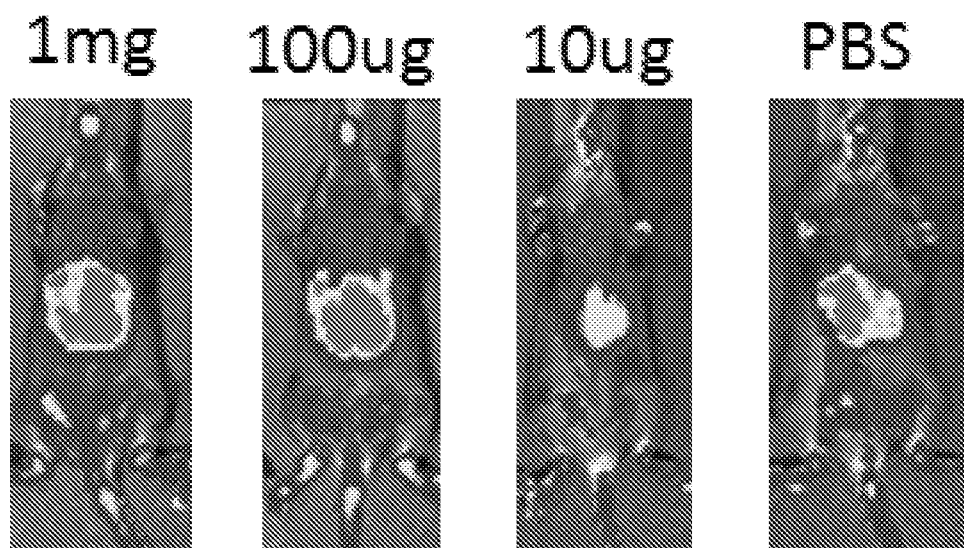


图 26A

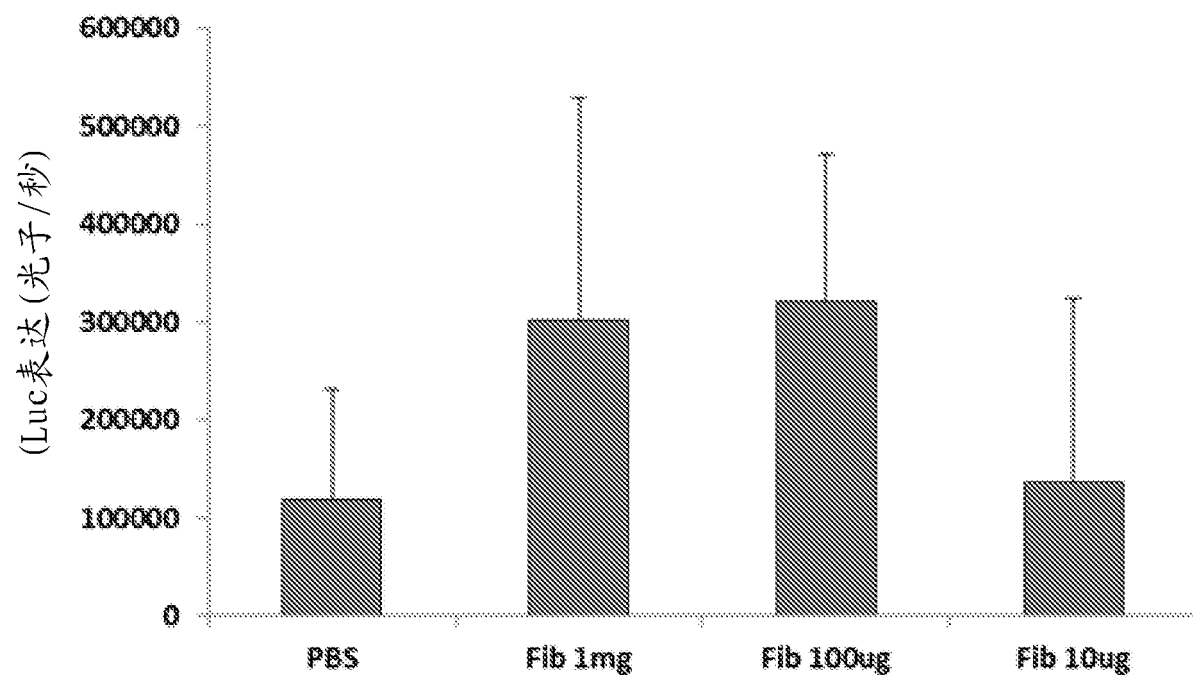


图 26B

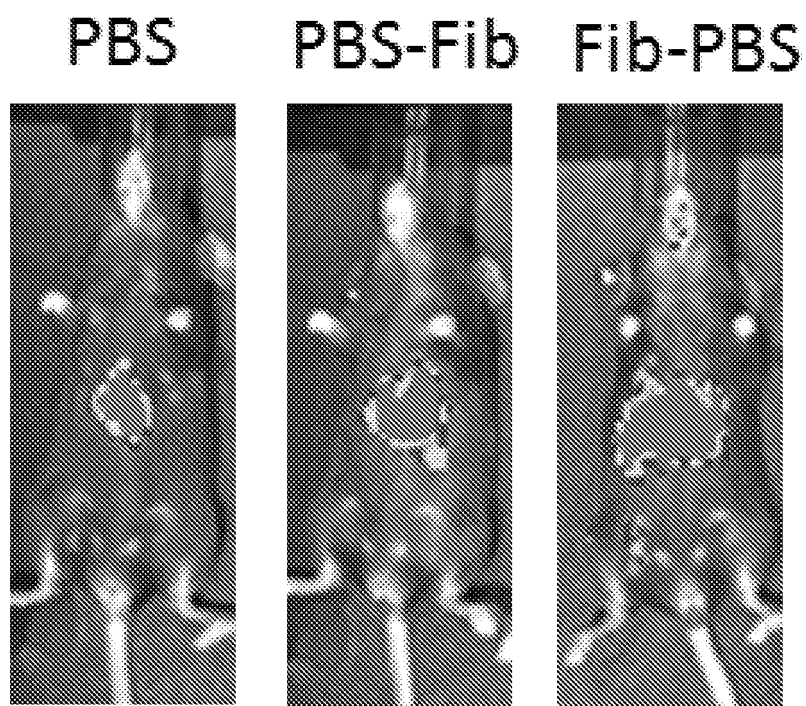


图 27A

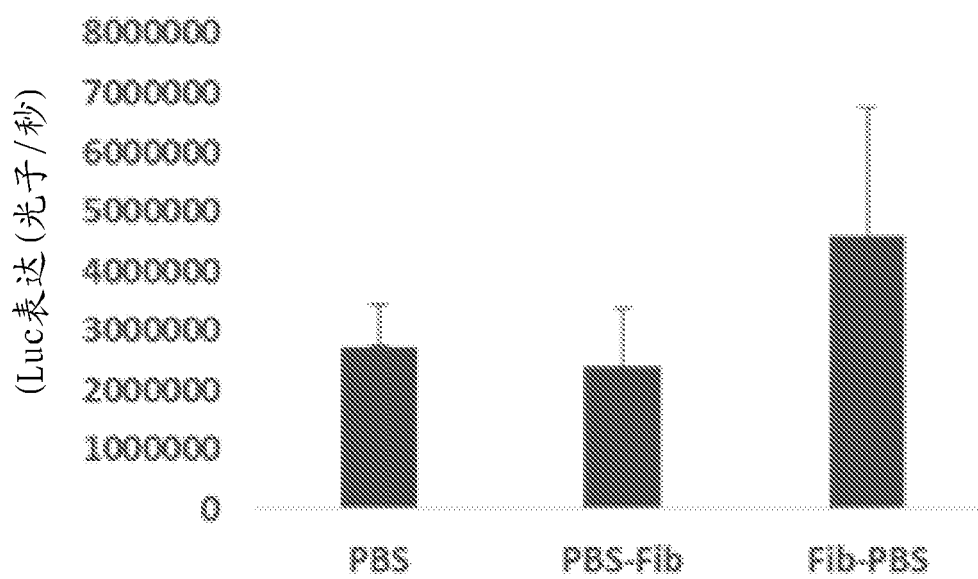


图 27B

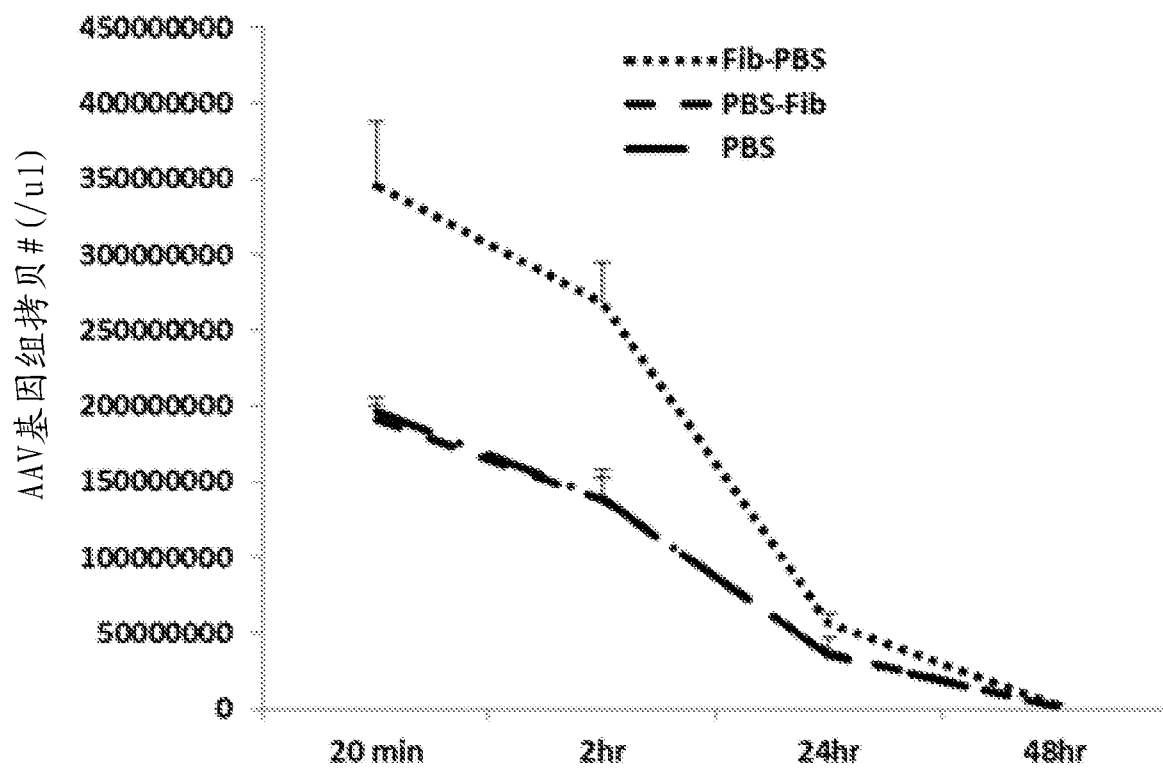


图 27C

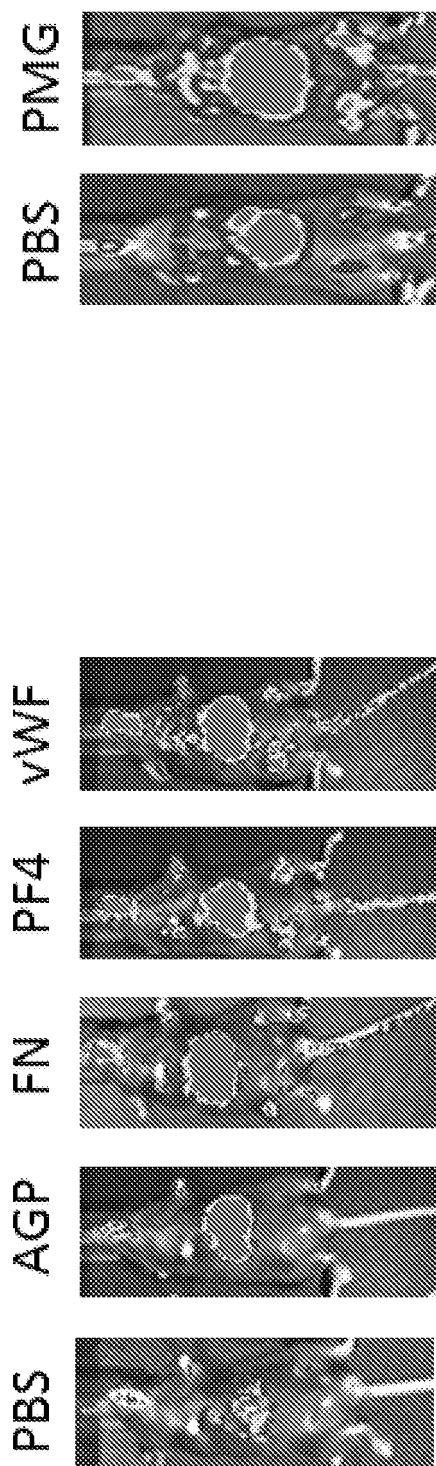


图 28A

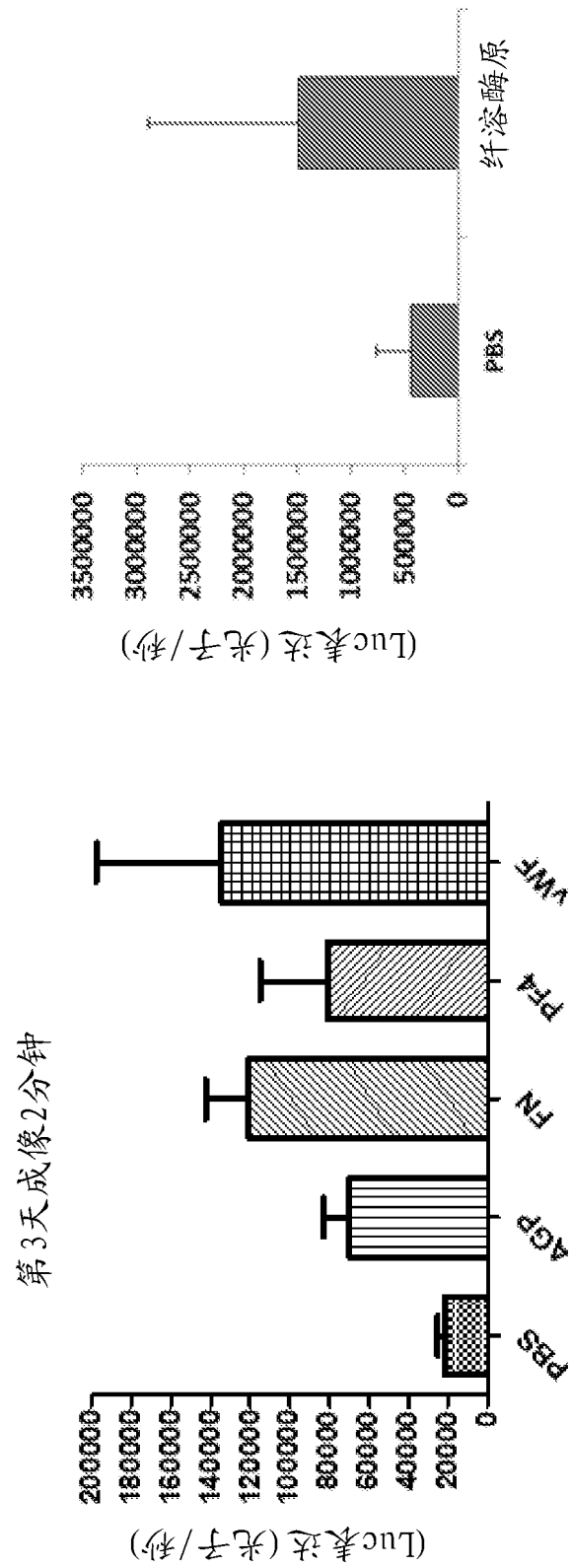


图 28B

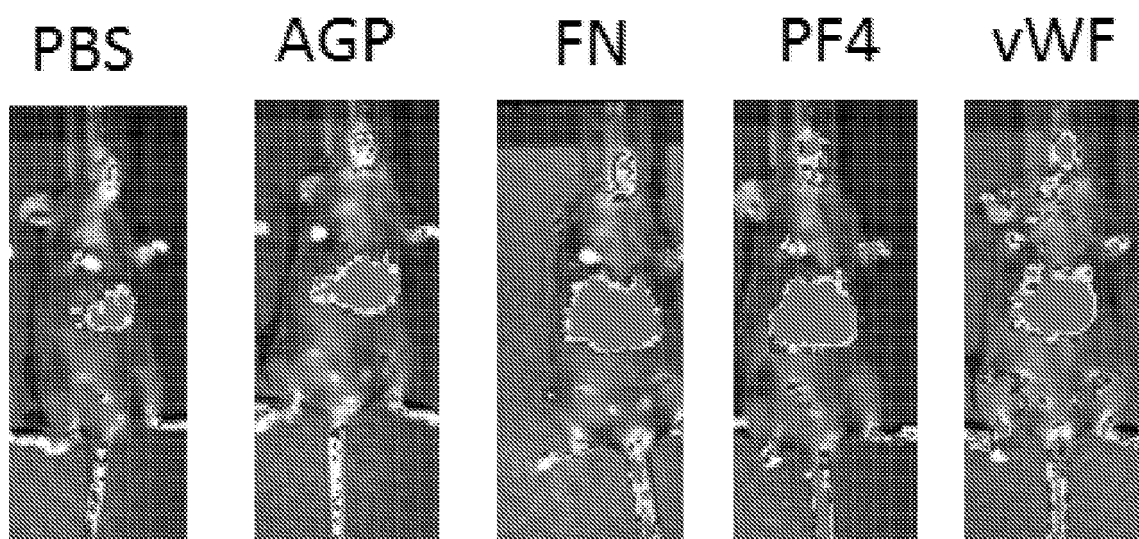


图 29A

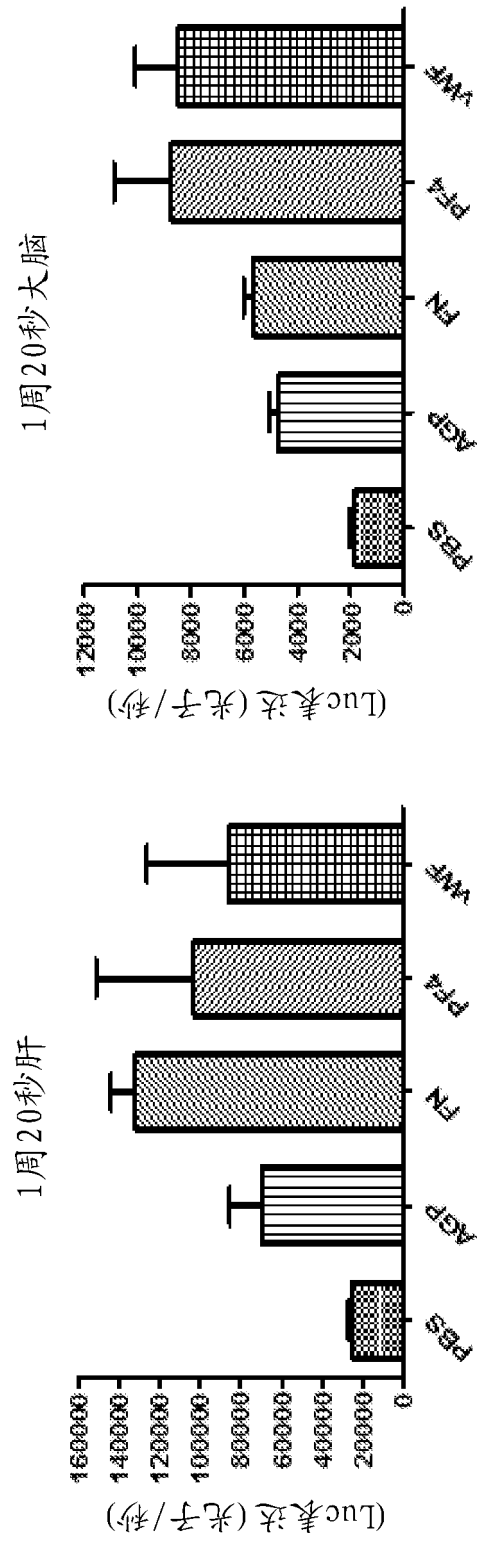


图 29B

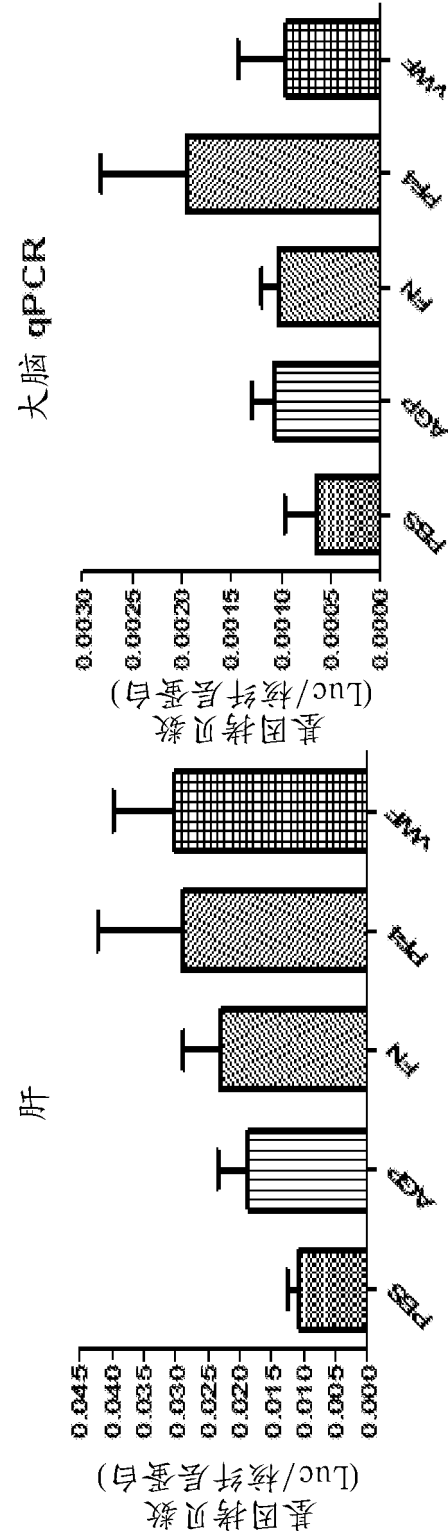


图 29C

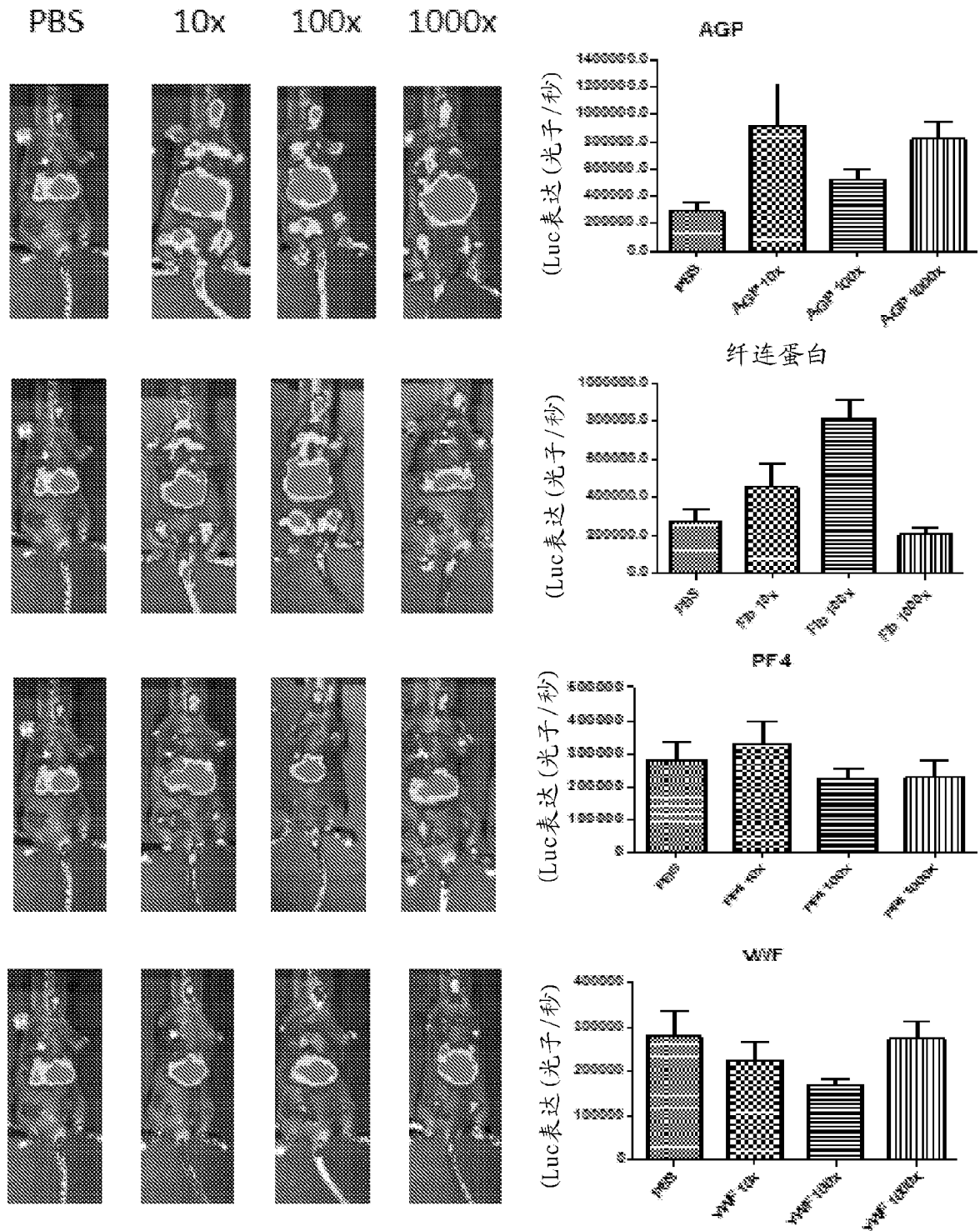


图 30

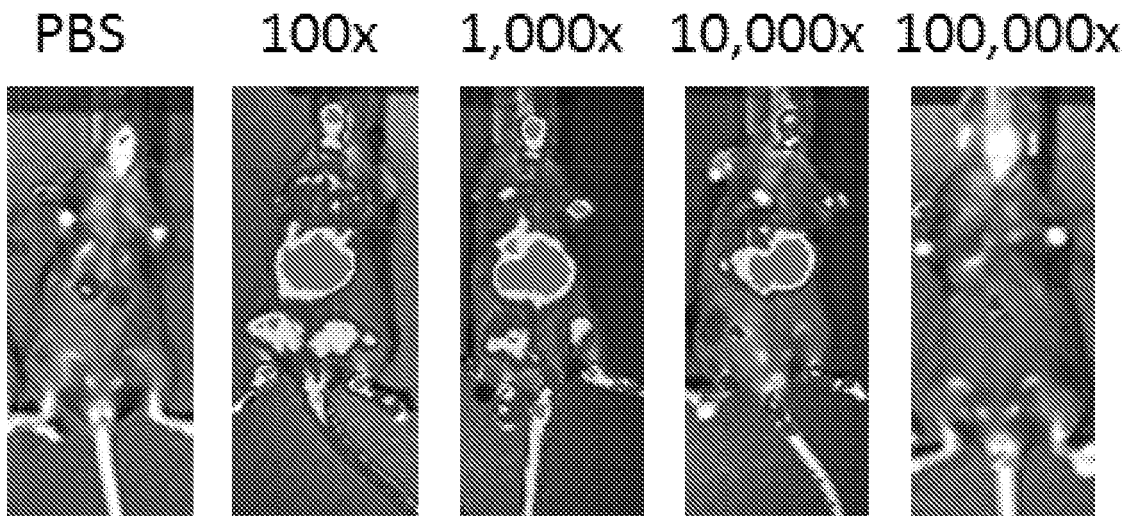


图 31A

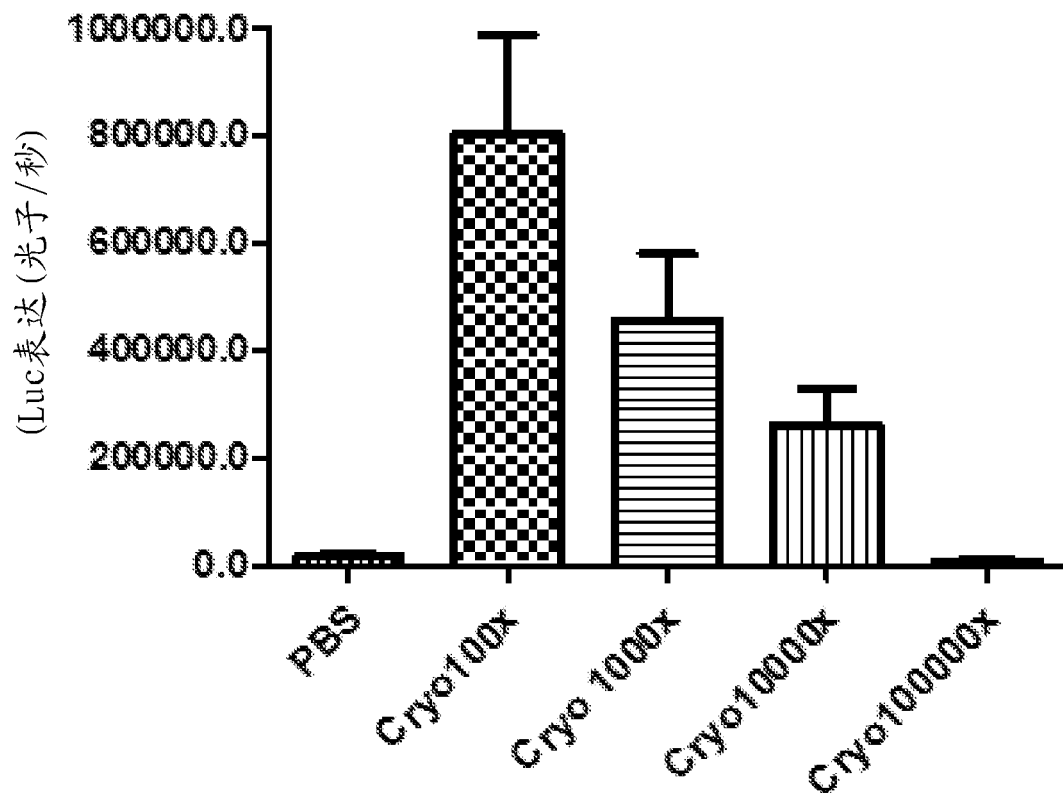


图 31B

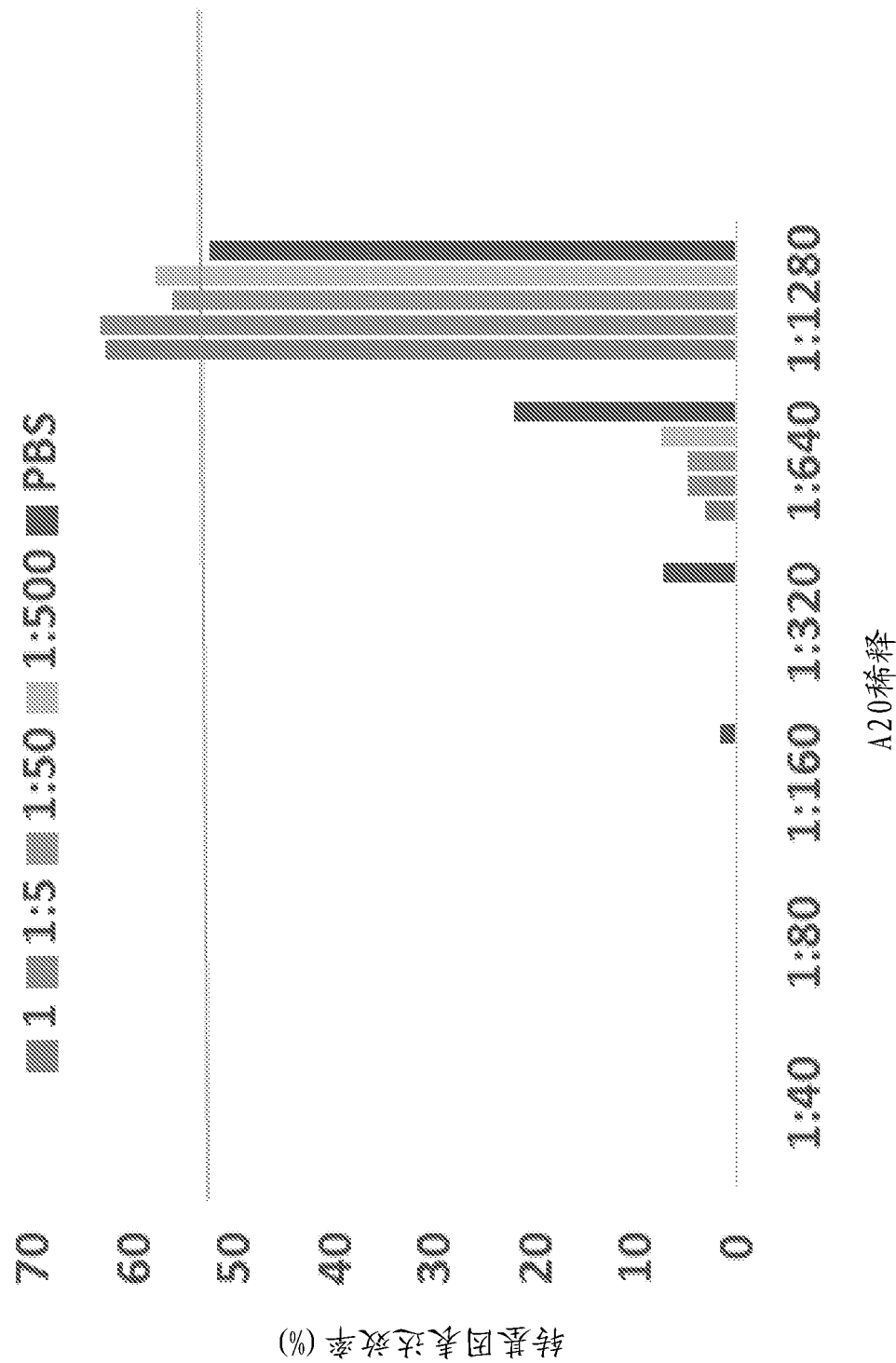


图 32

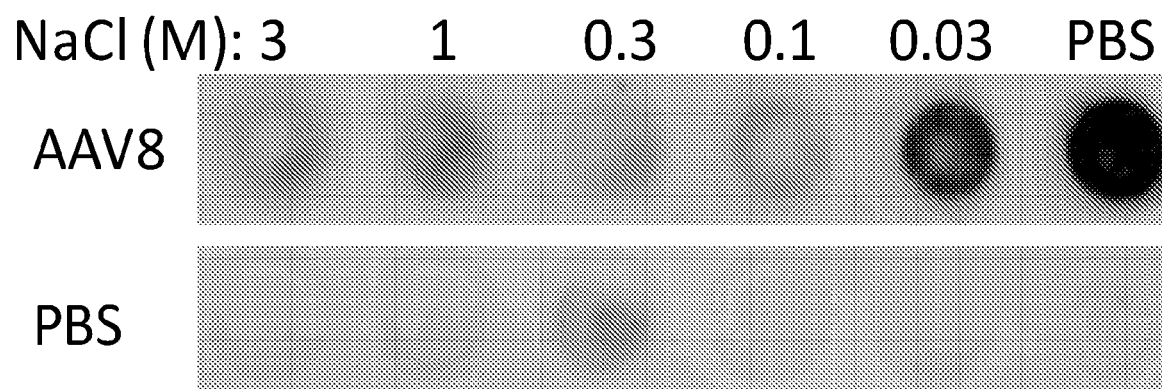


图 33A

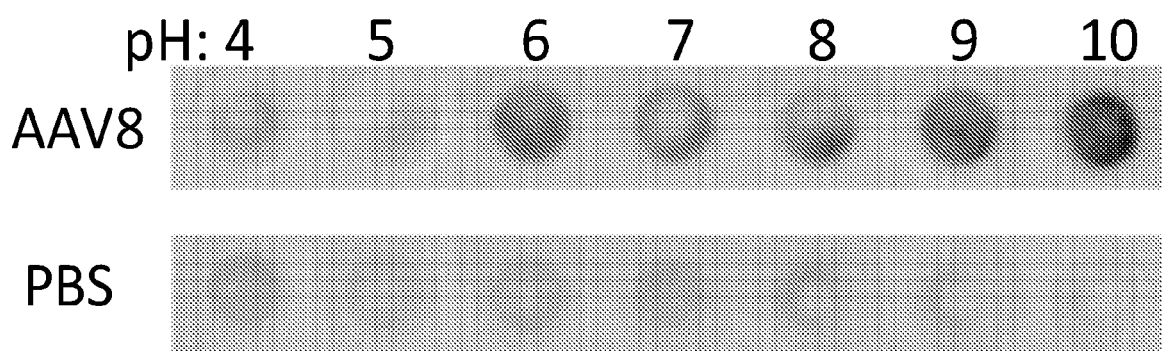


图 33B

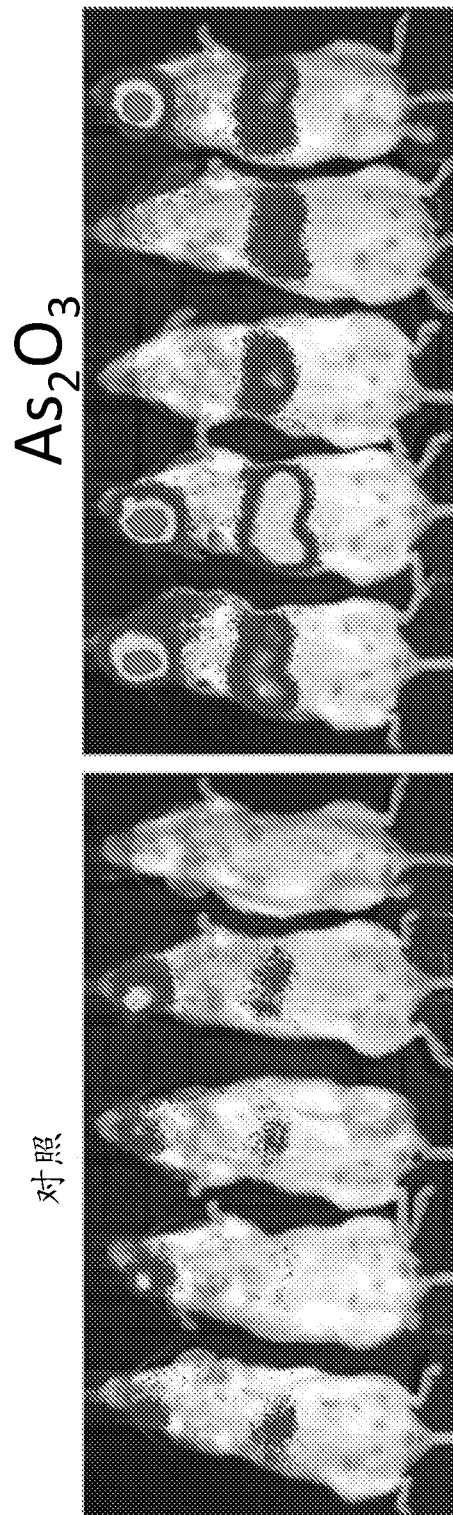
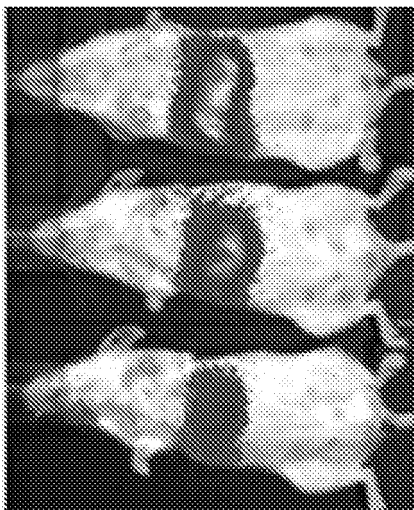
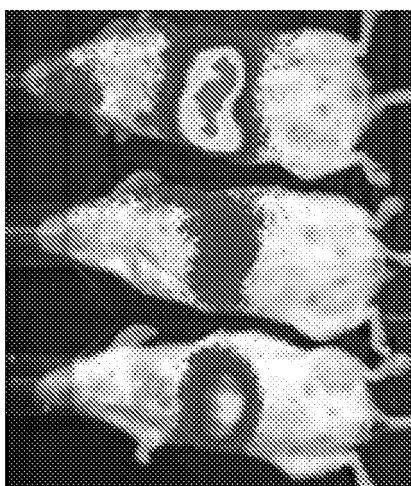


图 34A

卡非佐米



硼替佐米



对照

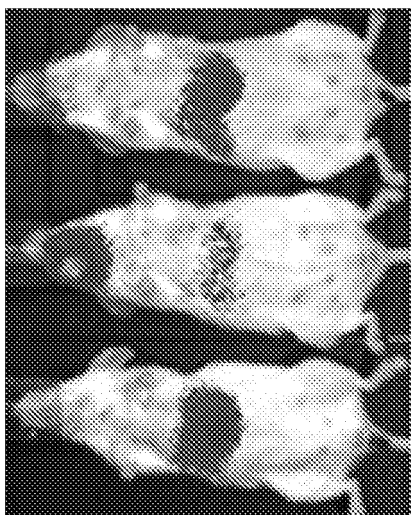


图 34B

登录	描述	Σ 覆盖	Σ #蛋白质	Σ #独特肽	Σ #肽
P02768	血清白蛋白	52.55	13	34	36

图 35A

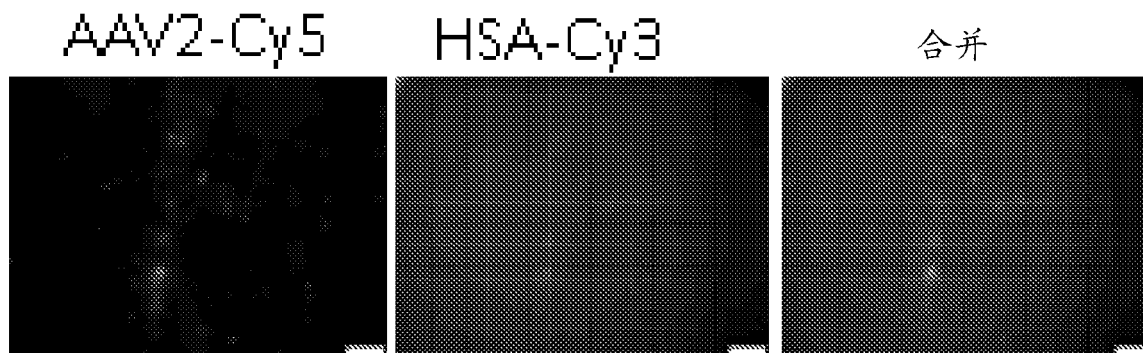


图 35B

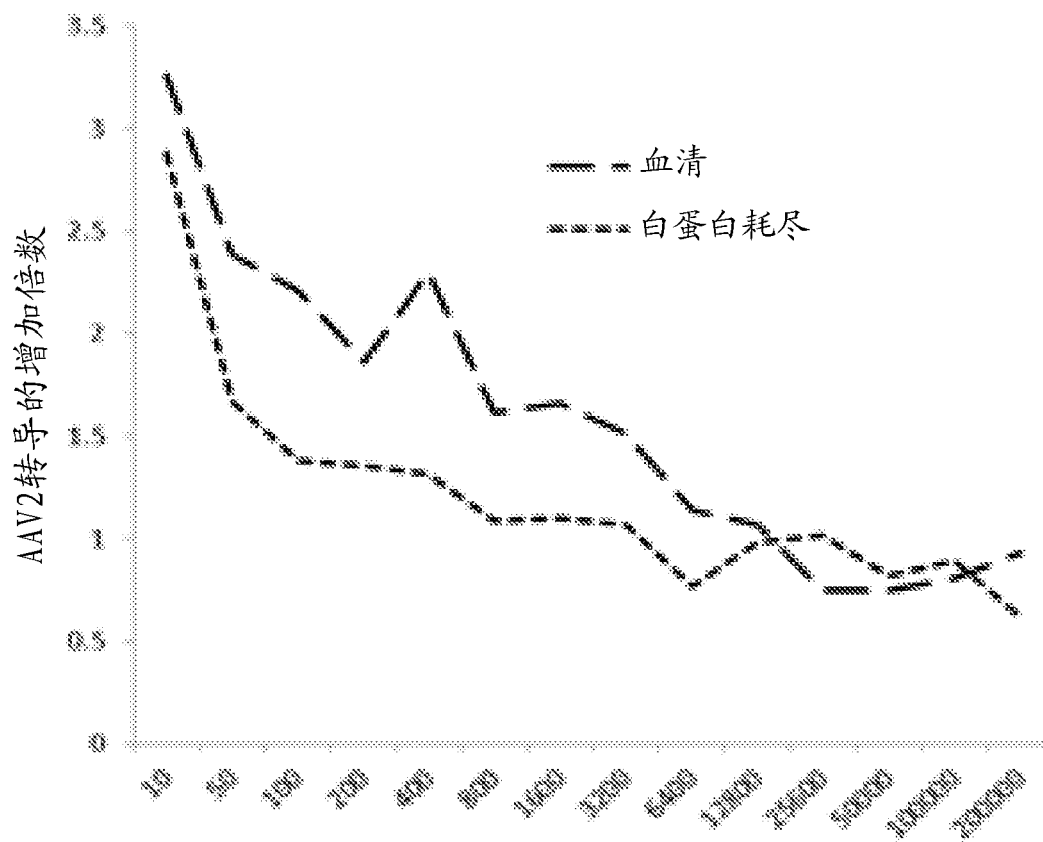


图 35C

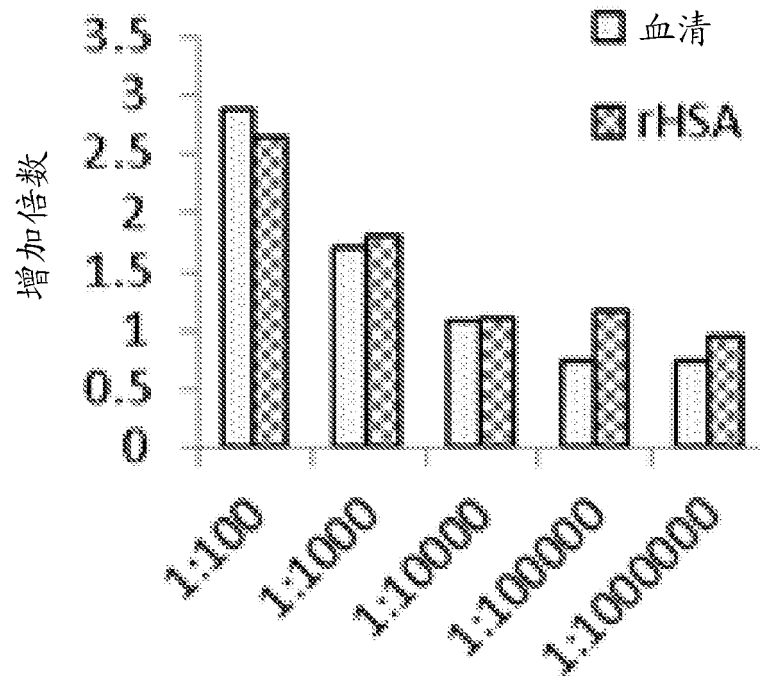


图 35D

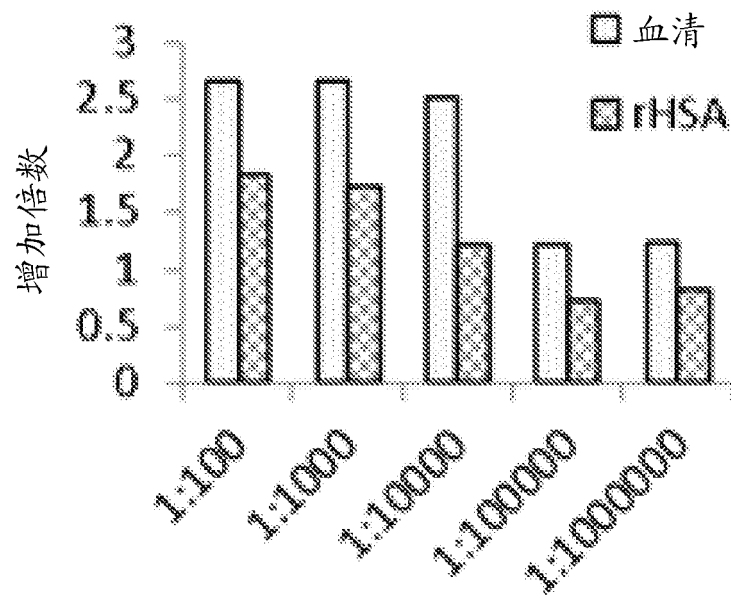


图 35E

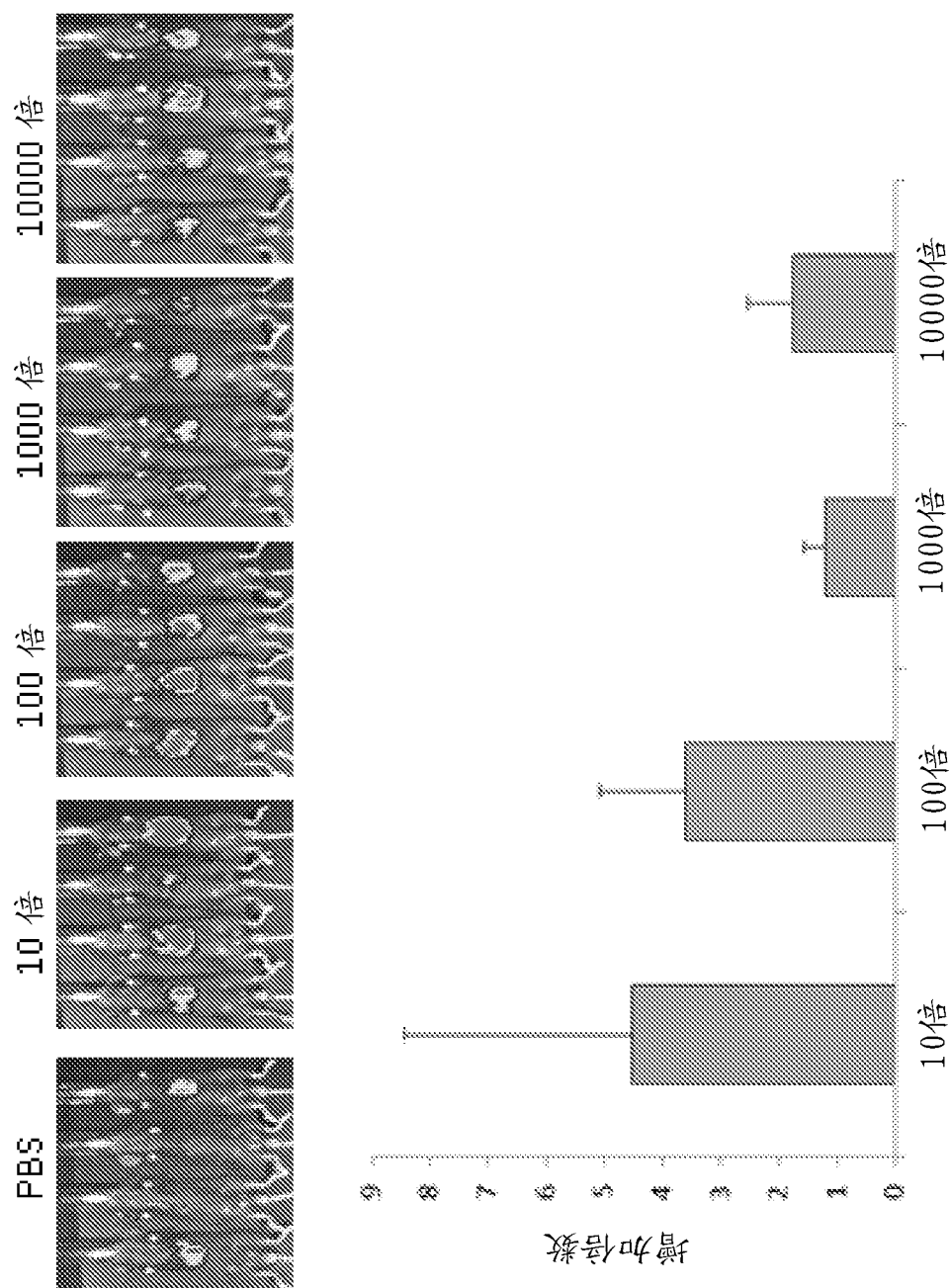


图 35F

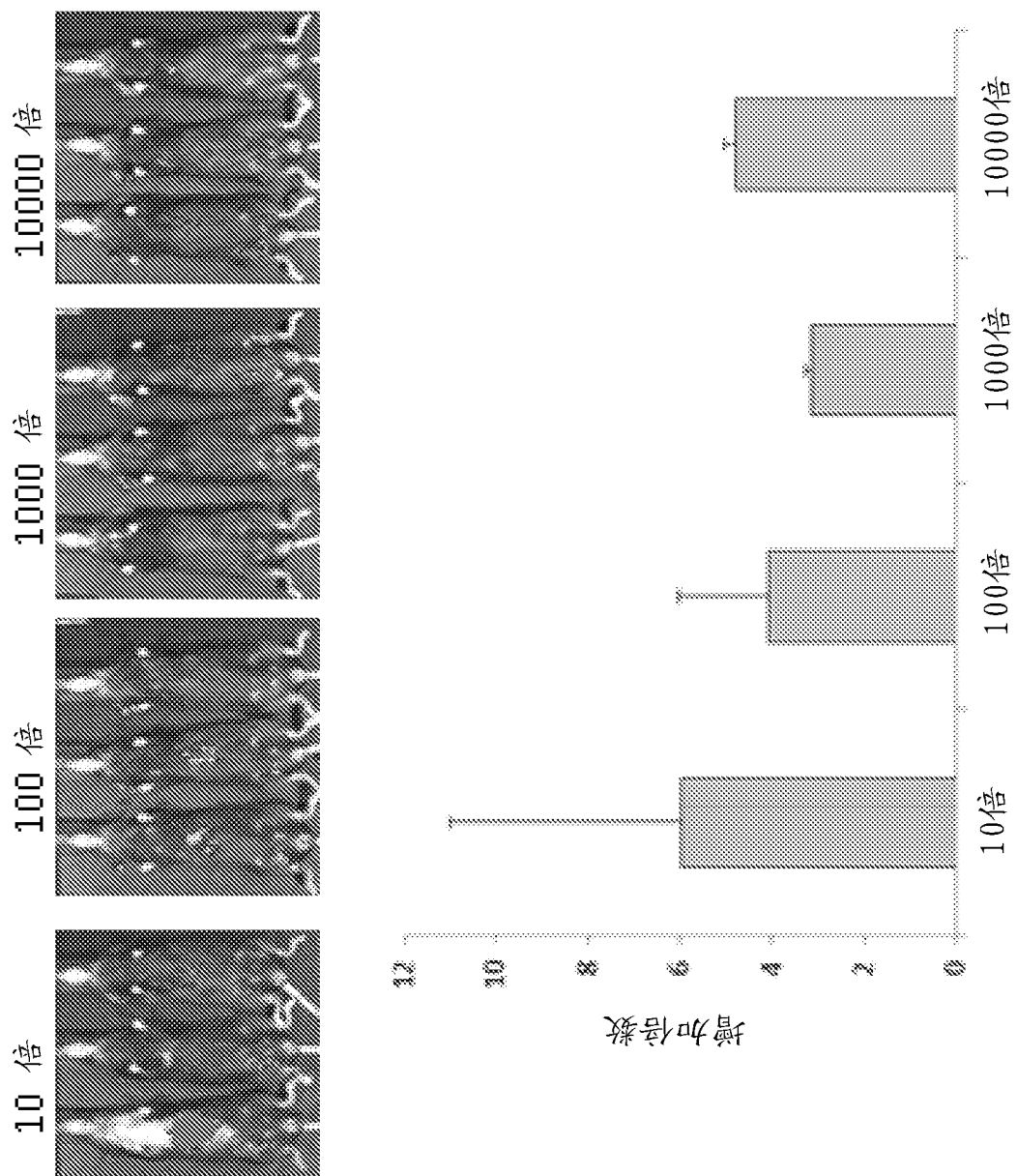


图 35G

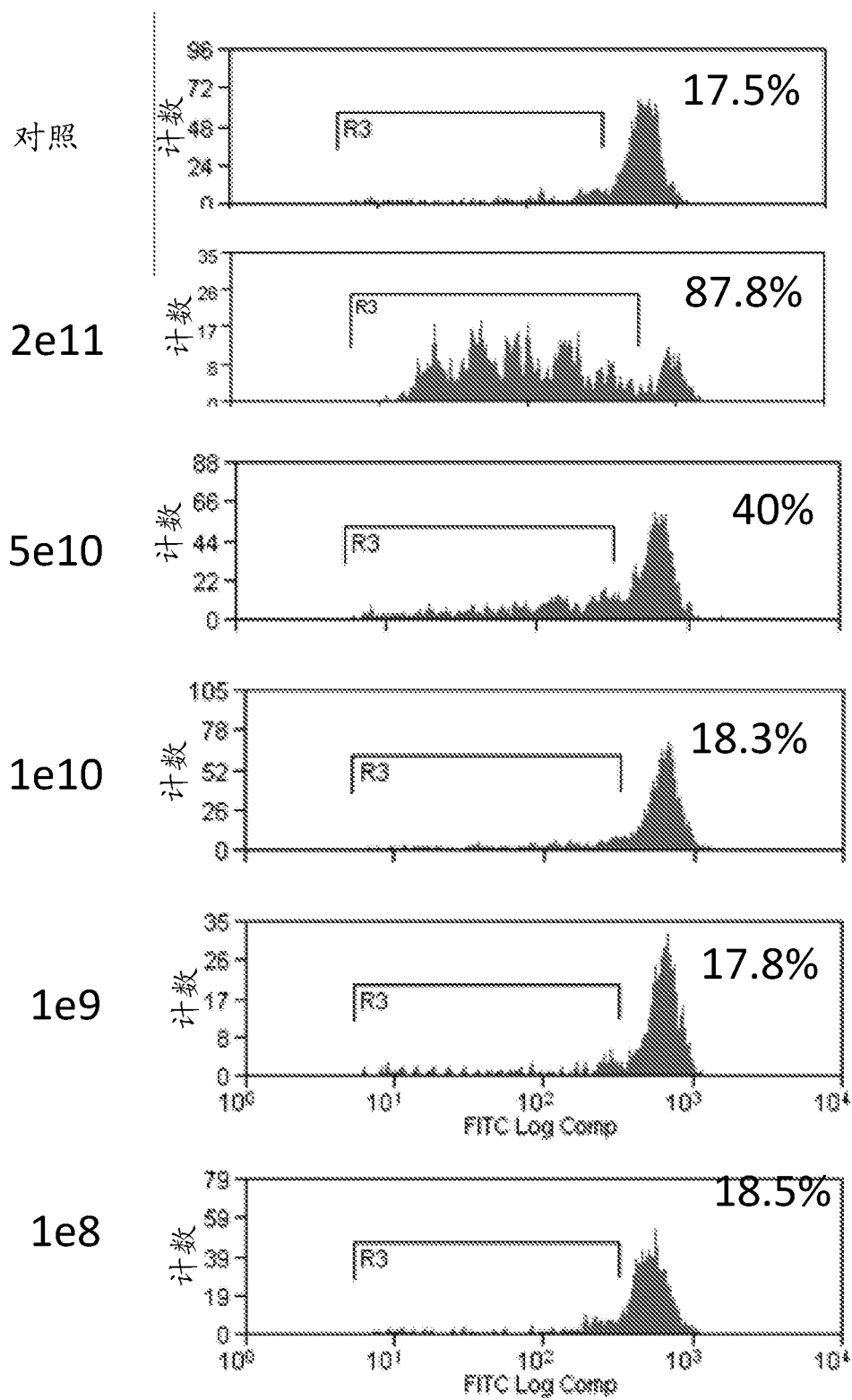


图 36A

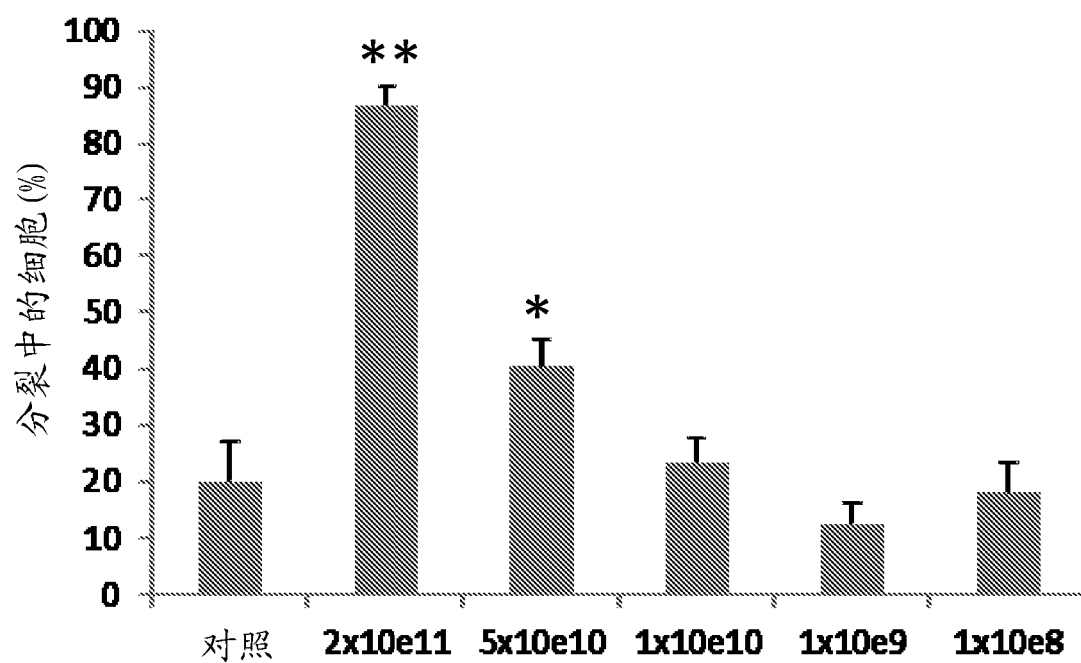


图 36B

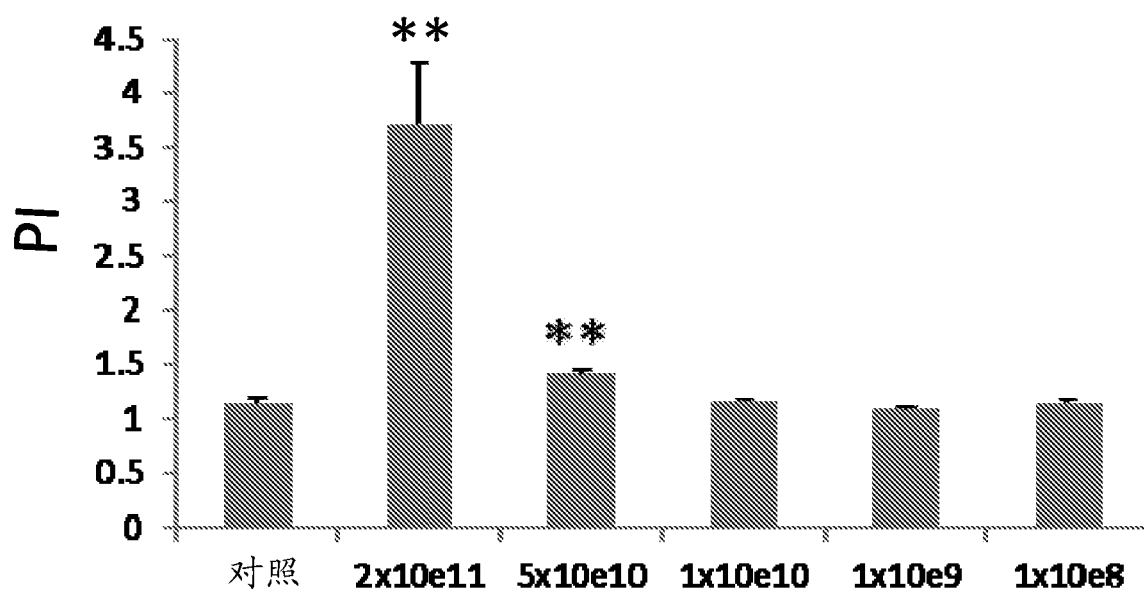


图 36C

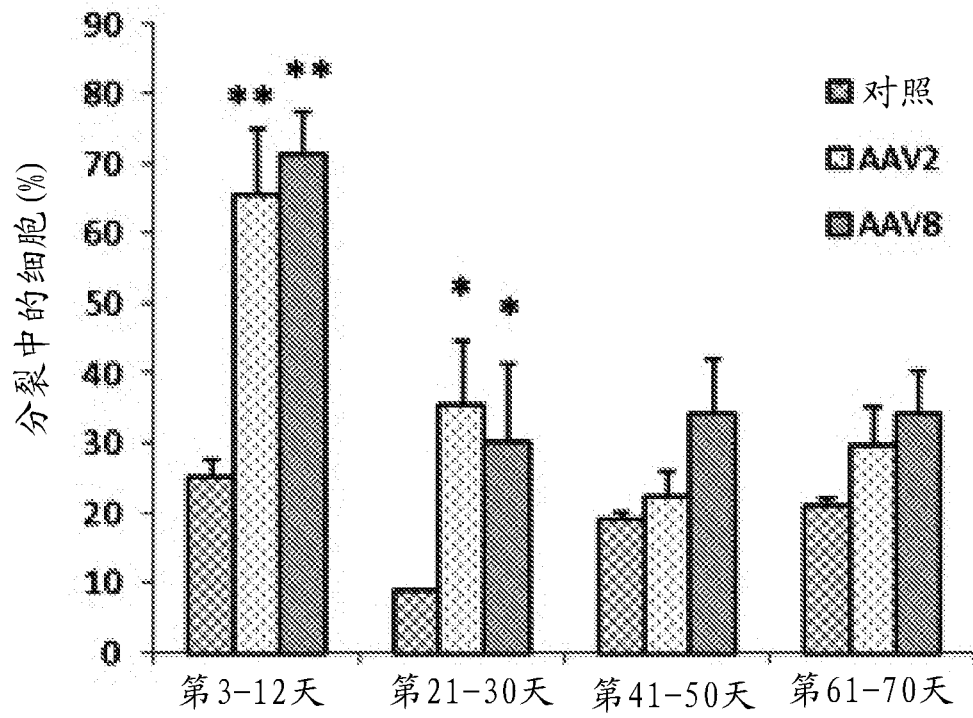


图 37A

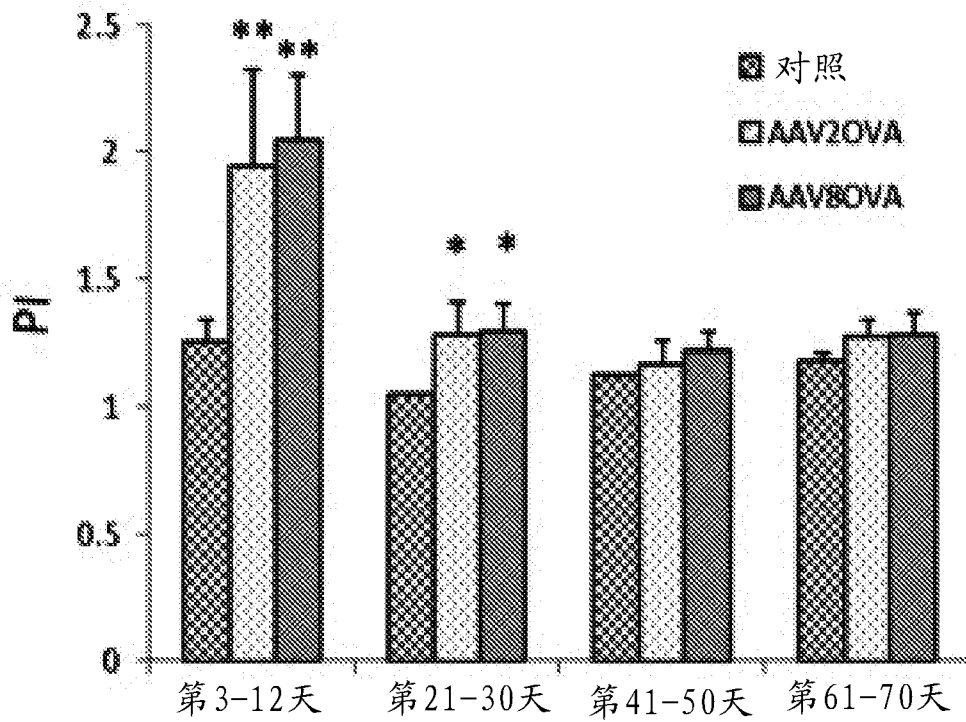


图 37B

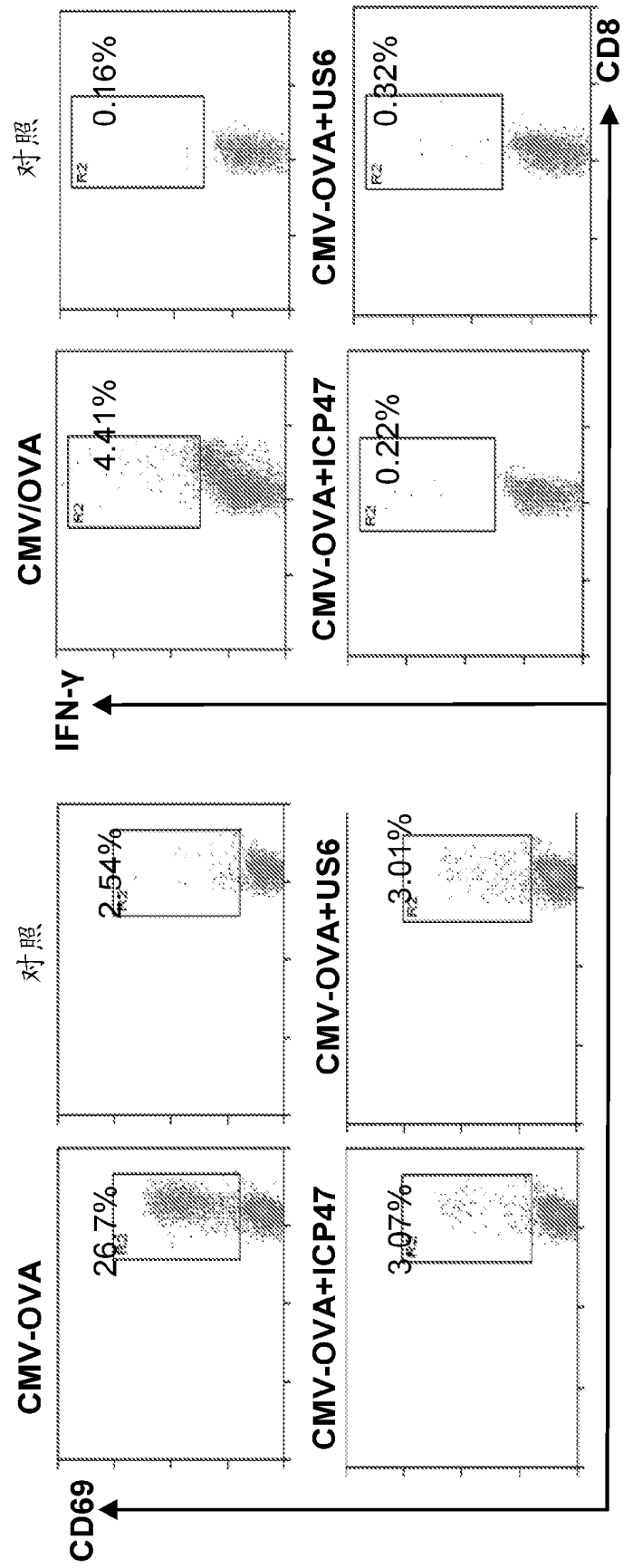


图 38

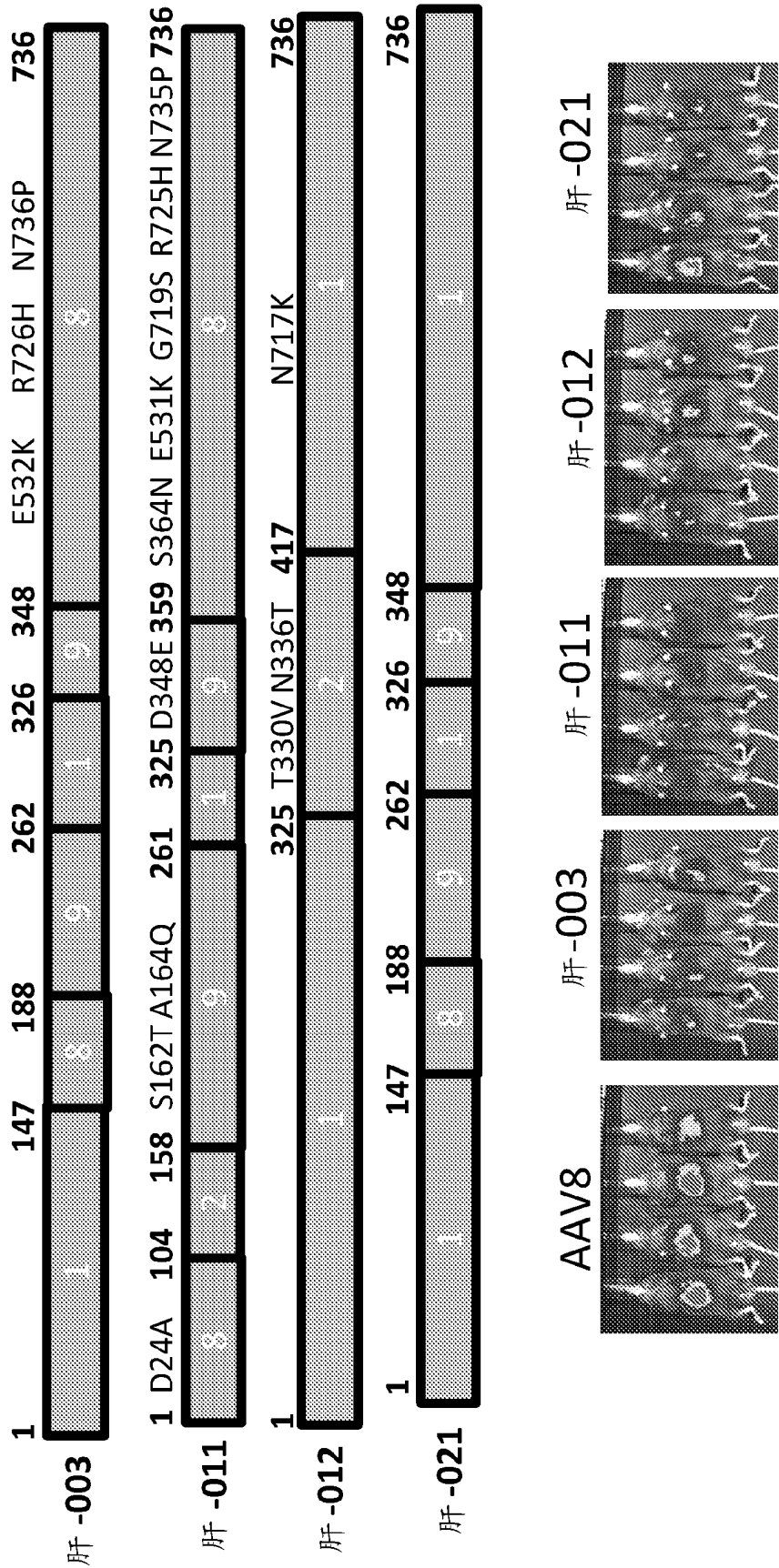


图 39

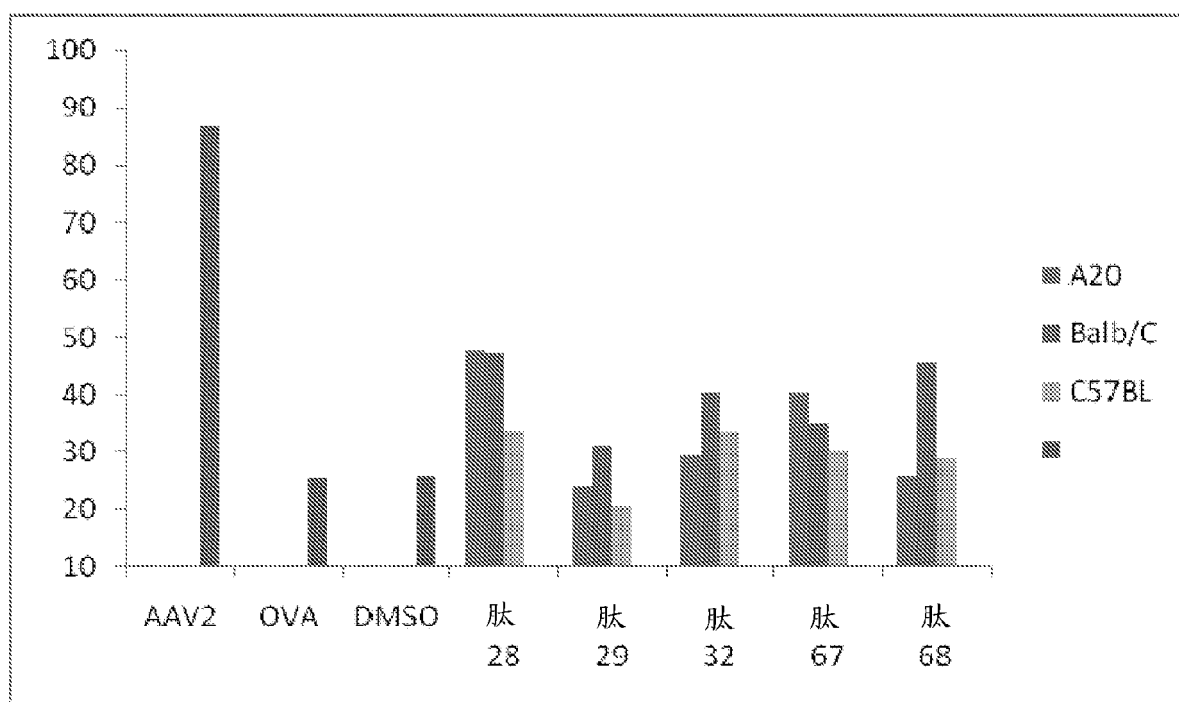


图 40

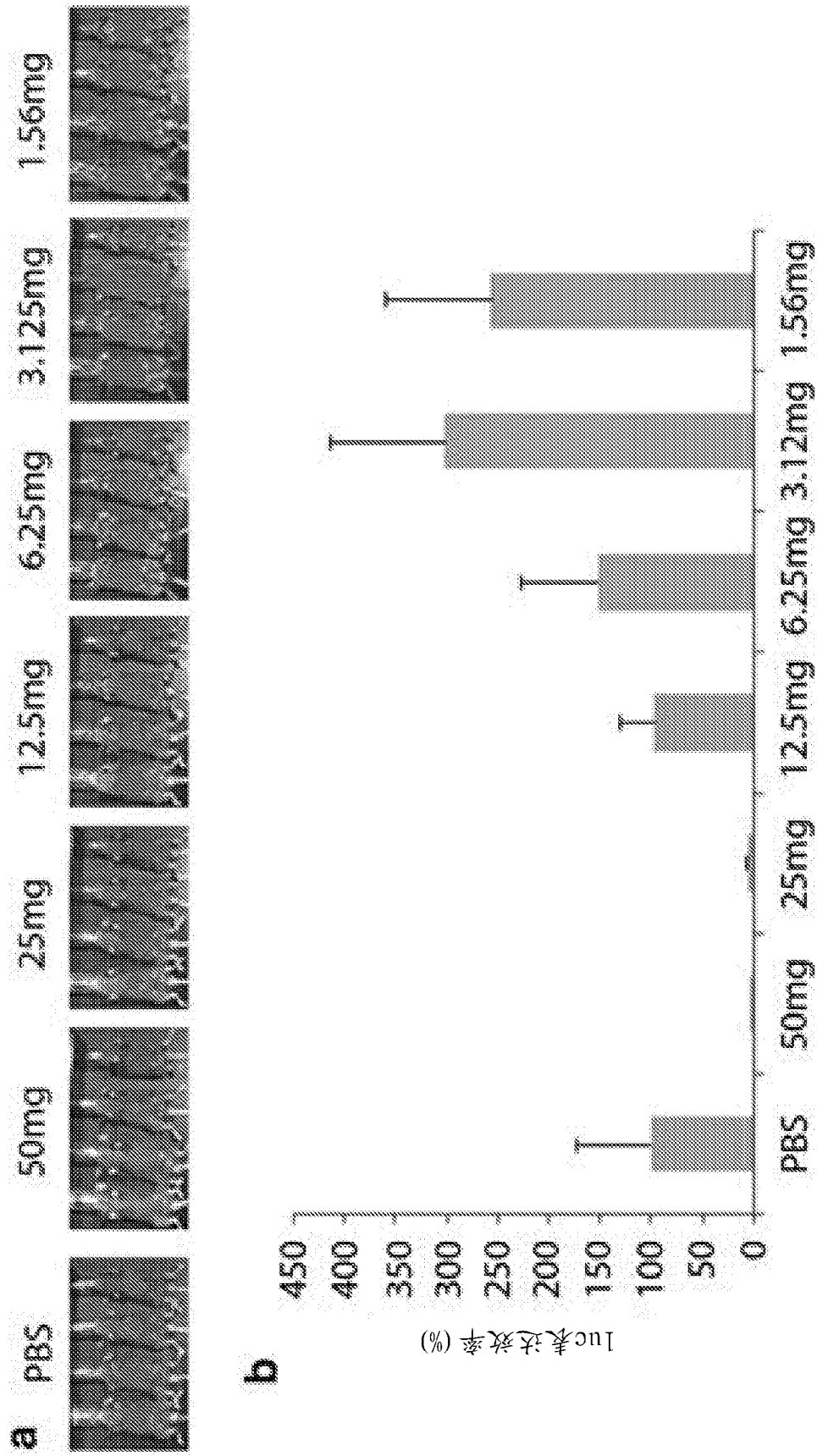


图 41