(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119213135 A
(43)申请公布日 2024.12.27

(21)申请号 202380038590.4

(22)申请日 2023.03.06

(30)优先权数据
63/317450 2022.03.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/063789 2023.03.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/172873 EN 2023.09.14

(71)申请人 4D分子治疗有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P·弗朗西斯 M·A·科特曼 J·奈 R·克罗兹

(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 权陆军 彭昶

(51)Int.Cl.
C12N 15/861(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)

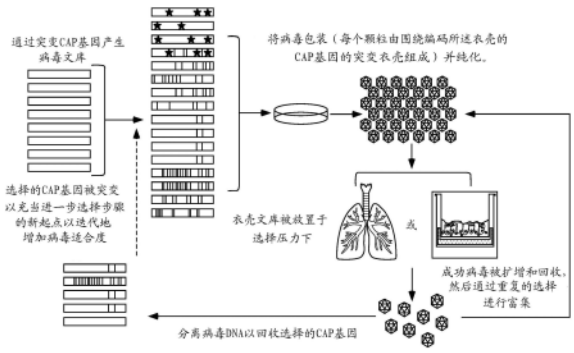
权利要求书6页 说明书56页
序列表（电子公布） 附图16页

(54)发明名称

具有改善的肺向性的腺伴随病毒变体衣壳及其用途

(57)摘要

本公开内容提供了赋予对肺细胞的向性的变体AAV衣壳蛋白,和包含所述变体AAV衣壳蛋白的重组腺伴随病毒,和包含其的药物组合物,和它们在将异源核酸递送至肺细胞用于治疗肺病症中的用途。



CN 119213135 A

1.变体腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白,其包含相对于相应亲本AAV衣壳蛋白的肽插入,其中所述肽插入包含选自DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)和NSTRHTD(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的变体AAV衣壳蛋白,其中插入位点位于所述衣壳蛋白的GH-环内。

3.根据权利要求2所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述插入位点位于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸570和611之间的位置或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置的两个相邻氨基酸之间,优选地,其中所述插入位点位于对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸587和588的氨基酸之间或位于对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸588和589的氨基酸之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述肽插入包含选自Y_1Y_2DNTVTRSY_3 Y_1Y_2SNSVQSIY_3和Y_1Y_2NSTRHTDY_3的氨基酸序列,其中Y_1-Y_3中的每一个独立地选自Ala、Leu、Gly、Ser、Thr和Pro。

5.根据权利要求4所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述肽插入包含选自LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)和LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)的氨基酸序列。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述插入位点位于对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸587和588的氨基酸之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白进一步包含相对于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的一个或多个氨基酸取代或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的一个或多个相应取代,其中所述一个或多个氨基酸取代任选地选自Y6F、S16Y、G18E、P30L、R37L、H38Q、V65A、L91I、E99D、R103L、R103C、S109T、V118A、Q120H、E133D、E134Q、P135A、V136G、K137E、T138R、T200I、D213Y、G220R、P250S、D283E、N312K、T344S、E347D、G376A、P399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705S和V708I,编号与SEQ ID NO:2一致。

8.根据权利要求7所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白包含相对于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)或另一AAV血清型的衣壳蛋白中相应位置的V708I氨基酸取代。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白与SEQ ID Nos:70-72中任一个所示的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述AAV衣壳蛋白包含SEQ ID Nos:70-72中任一个所示的氨基酸序列。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的变体AAV衣壳,其中与包含野生型AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对肺细胞的感染性相比,所述衣壳蛋白赋予感染性rAAV病毒粒子对肺细胞增加的感染性。

13.根据权利要求12所述的变体AAV衣壳蛋白,其中与包含相应的亲本AAV衣壳蛋白的

AAV相比,所述衣壳蛋白进一步赋予感染性rAAV病毒粒子对通过中和抗体的中和的增加的抗性。

14.分离的核酸,其包含编码根据权利要求1-13中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白的核苷酸序列。

15.感染性重组AAV(rAAV)病毒粒子,其包含根据权利要求1-13中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白。

16.根据权利要求15所述的rAAV病毒粒子,其进一步包含异源核酸,所述异源核酸包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列。

17.根据权利要求16所述的rAAV病毒粒子,其中所述基因产物是蛋白、小干扰RNA、微小RNA、短发夹RNA或反义RNA。

18.根据权利要求16或17所述的rAAV病毒粒子,其中所述编码一种或多种基因产物的核苷酸序列可操作地连接到表达控制序列。

19.根据权利要求18所述的rAAV,其中所述表达控制序列包括遍在的启动子。

20.根据权利要求18所述的rAAV,其中所述表达控制序列包括组织特异性启动子。

21.根据权利要求16-20中任一项所述的rAAV,其中所述异源核酸包含编码CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列。

22.宿主细胞,其包含根据权利要求15-21中任一项所述的rAAV。

23.药物组合物,其包含根据权利要求15-21任一项所述的rAAV和药学上可接受的载体。

24.将异源核酸递送至肺细胞的方法,其包括使所述肺细胞与rAAV病毒粒子接触,所述rAAV病毒粒子包含(i)变体衣壳蛋白,所述变体衣壳蛋白包含选自以下的肽插入:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)和(ii)异源核酸,所述异源核酸包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列,优选地,其中所述rAAV病毒粒子通过肺、支气管内、鼻内、气管内和/或支气管内施用给哺乳动物主体施用。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述肽插入包含选自Y_1Y_2HDITKNIY_3、Y_1Y_2NQDYTKTY_3、Y_1Y_2DNTVTRSY_3、Y_1Y_2SNSVQSIY_3、Y_1Y_2NSTRHTDY_3和Y_1Y_2TNRTSPDY_3的氨基酸序列,其中Y_1-Y_3中的每一个独立地选自Ala、Leu、Gly、Ser、Thr和Pro。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述肽插入包含选自LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)的氨基酸序列。

27.根据权利要求24-26中任一项所述的方法,其中所述插入位点位于衣壳蛋白的GH环内,优选在AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸570和611之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置,优选地,其中所述插入位点位于对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸587和588的氨基酸之间或对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸588和589的氨基酸之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置,更优选在对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸587和588的氨基酸之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置。

28.根据权利要求24-26中任一项所述的方法,其中所述变体AAV衣壳蛋白进一步包含相对于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的一个或多个氨基酸取代或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的一个或多个相应取代,其中所述一个或多个氨基酸取代任选地选自Y6F、S16Y、G18E、P30L、R37L、H38Q、V65A、L91I、E99D、R103L、R103C、S109T、V118A、Q120H、E133D、E134Q、P135A、V136G、K137E、T138R、T200I、D213Y、G220R、P250S、D283E、N312K、T344S、E347D、G376A、P399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705S和V708I,编号与SEQ ID NO:2一致。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述变体AAV衣壳蛋白包含相对于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)或另一AAV血清型的衣壳蛋白中相应位置的V708I氨基酸取代。

30.根据权利要求24-29中任一项所述的方法,其中所述变体AAV衣壳蛋白与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

31.根据权利要求24-30中任一项所述的方法,其中所述变体AAV衣壳蛋白与SEQ ID Nos:70-72中任一个所示的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

32.根据权利要求24-30中任一项所述的方法,其中所述变体AAV衣壳蛋白包含SEQ ID Nos:70-72中任一个所示的氨基酸序列或由其组成。

33.根据权利要求24-32中任一项所述的方法,其中所述肺细胞是上呼吸道上皮细胞,肺泡上皮细胞,初级、次级或三级支气管上皮细胞,气管上皮细胞,纤毛呼吸道上皮细胞、肺泡上皮1型(AECI)或2型(AECII)细胞,平滑肌细胞,或内皮细胞。

34.用于治疗肺病的方法,其包括向有需要的主体施用治疗有效量的rAAV病毒粒子,所述rAAV病毒粒子包含(i)变体衣壳蛋白,所述变体衣壳蛋白包含选自HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)的肽插入,和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸,或包含所述rAAV病毒粒子和药学上可接受的载体的药物组合物。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述肺病选自慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPF)、囊性纤维化、肺动脉高压、肺性高血压、肺癌(原发性、继发性和转移性)、表面活性剂缺乏、病毒和/或细菌感染、急性支气管炎、肺炎(包括病毒性、细菌性和真菌性肺炎)、呼吸道感染(包括咽炎、哮吼、曲霉、coccidiomycosis、汉塔病毒性肺综合征和组织胞浆菌病)、化学性和过敏性肺炎、结核病和其他分枝杆菌感染(包括但不限于鸟分枝杆菌)、结节病、呼吸道合胞病毒、肺水肿、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、尘肺(包括黑肺病、石棉肺和矽肺)、间质性肺病(包括结节病和自身免疫病)、肺栓塞、胸腔积液、胸膜炎、间皮瘤、气胸、急性支气管炎、细支气管炎(包括闭塞性细支气管炎)、婴儿猝死综合征、睡眠呼吸暂停、支气管扩张、支气管肺发育不良、隐源性机化性肺炎、电子烟使用相关性肺损伤(EVALI)、中东呼吸综合征(MERS)、原发性睫运动障碍、重症急性呼吸综合征(SARS)、α-1-抗胰蛋白酶缺乏、哮喘、间质性肺病和COVID-19(冠状病毒病2019)。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述肺病是COPD。

37.根据权利要求36所述的方法,其中所述异源核酸包含编码α-1-抗胰蛋白酶、α-1-抗

胰凝乳蛋白酶、α-1-巨球蛋白、基质金属蛋白酶1(MMP1)、基质金属蛋白酶12(MMP12)、微粒体环氧化物酶、CYP1A1、谷胱甘肽S-转移酶、血红素加氧酶-1、TGF-β-1、TNF-α、IL-1复合物、IL-8、IL-13、人白细胞抗原(HLA-B7和Bw16)、维生素D结合蛋白和/或β-2-肾上腺素能受体或其生物活性部分的基因的核苷酸序列。

38.根据权利要求35所述的方法,其中所述肺病是IPF。

39.根据权利要求38所述的方法,其中所述异源核酸包含编码SFTPA1(表面活性剂A1)和窖蛋白-1或其生物活性部分的核苷酸序列。

40.根据权利要求35所述的方法,其中所述肺病是α-1-抗胰蛋白酶缺乏。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述异源核酸包含编码α-1-抗胰蛋白酶或其生物活性部分的核苷酸序列。

42.根据权利要求35所述的方法,其中所述肺病是囊性纤维化。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述异源核酸包含选自SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31的核苷酸序列或与其至少80%、至少90%、至少95%或至少99%相同的序列。

44.根据权利要求34-43中任一项所述的方法,其中通过吸入将所述rAAV或药物组合物施用于主体。

45.根据权利要求44所述的方法,其中通过吸入包含所述rAAV的气溶胶悬浮液将所述rAAV或药物组合物施用给主体,优选地其中所述气溶胶悬浮液由液体雾化器产生。

46.感染性rAAV,其包含(i)变体衣壳蛋白,所述变体衣壳蛋白包含选自以下的肽插入:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)以及(ii)包含编码选自CFTR或其生物活性部分和SERPINA1或其生物活性部分的基因的核苷酸序列的异源核酸。

47.根据权利要求46所述的感染性rAAV,其中所述核苷酸序列编码可操作地连接到遍在的启动子的CFTR或其生物活性部分。

48.根据权利要求47所述的感染性rAAV,其中所述核苷酸序列选自SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:103或者与SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:103至少80%、至少90%、至少95%或至少99%相同的序列。

49.根据权利要求46所述的感染性rAAV,其中所述核苷酸序列编码α-1-抗胰蛋白酶并且可操作地连接到遍在的启动子。

50.药物组合物,其包含根据权利要求46-49中任一项所述的rAAV和药学上可接受的载体。

51.根据权利要求1-13中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV相比,所述变体AAV衣壳蛋白赋予感染性rAAV病毒粒子对通过中和抗体中和的增加的抗性,优选地至少1.5-倍增加的抗性,优选地其中所述亲本AAV衣壳蛋白是血清型2的衣壳蛋白。

52.变体腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白,其包含相对于相应亲本AAV衣壳蛋白的肽插入,其中所述肽插入包含选自以下的氨基酸序列:QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI

(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67)。

53.根据权利要求52所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述肽插入包含选自Y_1Y_2DNTVTRSY_3、Y_1Y_2SNSVQSIY_3和Y_1Y_2NSTRHTDY_3的氨基酸序列,其中Y_1-Y_3中的每一个独立地选自Ala、Leu、Gly、Ser、Thr和Pro。

54.根据权利要求52或53所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述插入位点位于衣壳蛋白的GH环内,优选在AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸570和611之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置,更优选在对应于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的氨基酸587和588或588和589的氨基酸之间或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置。

55.根据权利要求52-54中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白进一步包含相对于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)的一个或多个氨基酸取代或另一AAV血清型的衣壳蛋白中的一个或多个相应取代,其中所述一个或多个氨基酸取代任选地选自Y6F、S16Y、G18E、P30L、R37L、H38Q、V65A、L91I、E99D、R103L、R103C、S109T、V118A、Q120H、E133D、E134Q、P135A、V136G、K137E、T138R、T200I、D213Y、G220R、P250S、D283E、N312K、T344S、E347D、G376A、P399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705S和V708I,编号与SEQ ID NO:2一致。

56.根据权利要求54所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白包含相对于AAV2的VP1(SEQ ID NO:2)或另一AAV血清型的衣壳蛋白中相应位置的V708I氨基酸取代。

57.根据权利要求52-56中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白,其中所述变体AAV衣壳蛋白与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

58.根据权利要求52-57中任一项所述的变体AAV衣壳,其中与包含野生型AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对肺细胞的感染性相比,所述衣壳蛋白赋予感染性rAAV病毒粒子对肺细胞增加的感染性。

59.根据权利要求58所述的变体AAV衣壳蛋白,其中与包含相应的亲本AAV衣壳蛋白的AAV相比,所述衣壳蛋白进一步赋予感染性rAAV病毒粒子对通过中和抗体的中和的增加的抗性。

60.分离的核酸,其包含编码根据权利要求52-59中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白的

核苷酸序列。

61.感染性重组AAV(rAAV)病毒粒子,其包含根据权利要求52-59中任一项所述的变体AAV衣壳蛋白。

62.根据权利要求61所述的rAAV病毒粒子,其进一步包含异源核酸,所述异源核酸包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列。

63.根据权利要求62所述的rAAV病毒粒子,其中所述基因产物是蛋白、小干扰RNA、微小RNA、短发夹RNA或反义RNA。

64.根据权利要求62或63所述的rAAV病毒粒子,其中所述编码一种或多种基因产物的核苷酸序列可操作地连接到表达控制序列。

65.根据权利要求64所述的rAAV,其中所述表达控制序列包括遍在的启动子。

66.根据权利要求64所述的rAAV,其中所述表达控制序列包括组织特异性启动子。

67.根据权利要求62-66中任一项所述的rAAV,其中所述异源核酸包含编码CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列。

68.宿主细胞,其包含根据权利要求61-67中任一项所述的rAAV。

69.药物组合物,其包含根据权利要求62-67任一项所述的rAAV和药学上可接受的载体。

70.将异源核酸递送至肺细胞的方法,其包括使所述肺细胞与根据权利要求62-67中任一项所述的rAAV接触,优选地,其中所述rAAV病毒粒子通过肺、支气管内、鼻内、气管内和/或支气管内施用给哺乳动物主体施用。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述肺细胞是上呼吸道上皮细胞,肺泡上皮细胞,初级、次级或三级支气管上皮细胞,气管上皮细胞,纤毛呼吸道上皮细胞、肺泡上皮1型(AECI)或2型(AECII)细胞,平滑肌细胞,或内皮细胞。

72.通过向有需要的主体施用治疗有效量的根据权利要求69所述的药物组合物治疗肺病症的方法。

73.根据权利要求72所述的方法,其中所述药物组合物通过吸入施用于所述主体。

74.根据权利要求73的方法,其中通过吸入包含所述rAAV的气溶胶悬浮液将所述药物组合物施用给主体,优选地其中所述气溶胶悬浮液由液体雾化器产生。

具有改善的肺向性的腺伴随病毒变体衣壳及其用途

[0001] 与相关申请的相互参照

本申请要求于2022年3月7日提交的美国临时专利申请序列号63/317,450的利益,其全部公开内容引入本文作为参考。

[0002] 经由EFS-WEB提交序列表

创建于2023年3月3日或左右的名为“090400-5019-WO-Sequence-Listing”、文件大小约为144,000字节的个计算机可读的XML文件含有本申请的序列表,且特此整体引入本文作为参考。

[0003] 发明背景

基于腺伴随病毒(AAV)的基因递送载体在针对几种疾病靶的临床前疾病模型以及最近人临床试验两者中都显示有前途。基于AAV的载体极其安全,这是因为野生型AAV不致病并且与任何已知疾病均无病因学关联。此外,AAV在包括肝、肌肉、肺、视网膜和脑的多种组织中提供高效的基因递送和持续的转基因表达的能力。

[0004] AAV是单链DNA病毒,其含有两个可读框,rep和cap。第一个基因编码对基因组复制而言必需的四种蛋白(Rep78、Rep68、Rep52和Rep40),且第二个基因表达可装配以形成病毒衣壳的三种结构蛋白(VP1-3)。如其名称所暗示的,AAV依赖于辅助病毒如腺病毒或疱疹病毒的存在用于活性复制。在不存在辅助病毒的情况下,其确立潜伏状态,其中其基因组以游离型维持或整合到宿主染色体中。已鉴定了多种同源灵长类动物AAV血清型和多种非人类灵长类动物血清型。AAV2是作为基因递送媒介物最好地表征的。

[0005] AAV在越来越多的临床试验中产生了有希望的结果(Bainbridge等人,2008;Carpentier等人,2012;Gaudet等人,2010;MacLaren等人,2014;A.M.Maguire等人,2009;A.Maguire&Simonelli,2008;Nathwani等人,2011,2014;Stroes等人,2008)。然而,存在可能限制AAV的效用的基因递送障碍,例如抗衣壳免疫应答、某些组织的有限转导、不能靶向递送至特定细胞类型以及相对低的包装能力。在许多情况下,使得能够有效地进行有能力改善AAV的合理设计的机制知识不足。作为备择方案,定向进化已成为产生满足特定生物医学需要的新AAV变体的策略。定向进化策略利用遗传多样化和选择过程以使得能够积累逐步改善生物分子的功能的有益突变。在所述过程中,使用几种不同的方法使野生型AAV cap基因多样化,以产生大的基因文库,所述基因文库被包装以生成病毒颗粒文库,且然后施加选择压力以分离可以克服基因递送障碍的新变体。

[0006] 以前,概念验证(proof-of-concept)应用已表明,AAV定向进化可用于产生用于在体外基因递送至人肺上皮或在体内基因递送至猪肺的最优化的AAV变体。这些较早的研究证实,针对肺上皮转导进行最优化的AAV变体当在对其进行选择的模型的背景中评价时可导致显著改善的CF的基因疗法治疗。然而,对这些载体的评价已显示了猪肺上皮和人肺上皮之间的物种差异,其导致对于猪肺上皮转导而进化的载体对人肺上皮的有限转导。

[0007] 本领域存在开发具有向人肺细胞例如人肺上皮的改善的递送用于治疗肺病症的新AAV变体的需要。

发明内容

[0008] 本文提供了变体腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白,其相对于亲本AAV衣壳蛋白具有氨基酸序列中的一个或多个修饰,当存在于AAV病毒粒子中时,与包含未修饰的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对肺细胞的感染性相比,所述变体AAV衣壳蛋白赋予对一种或多种类型的肺细胞增加的感染性。还提供了重组AAV病毒粒子和其包含如本文所描述的变体AAV衣壳蛋白的药物组合物,制备变体rAAV衣壳蛋白和病毒粒子的方法,以及在研究中和在临床实践中,例如在将核酸序列递送至肺的一个或多个细胞用于治疗肺病症和疾病中使用这些rAAV衣壳蛋白和病毒粒子的方法。

[0009] 在本公开内容的一些方面,提供了变体腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白,这些变体AAV衣壳蛋白相对于亲本AAV衣壳具有氨基酸序列中的一个或多个修饰,当存在于AAV病毒粒子中时,与包含不包含氨基酸序列修饰的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对肺细胞的感染性相比,所述变体AAV衣壳蛋白赋予对一种或多种类型的肺细胞(例如,呼吸道上皮细胞,包括但不限于肺泡上皮细胞、支气管(初级、次级或三级)上皮细胞或气管上皮细胞、纤毛呼吸道上皮细胞、肺泡上皮1型(AECI)或2型(AECII)细胞、平滑肌或内皮细胞)增加的感染性。

[0010] 在本公开内容的一些方面,提供了重组AAV(rAAV)病毒粒子,这些rAAV病毒粒子包含如本文所述的变体衣壳蛋白,其中所述rAAV病毒粒子表现出相对于包含相应未修饰的亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对肺细胞的感染性对一种或多种类型的肺细胞的增加的感染性。在一些实施方案中,所述rAAV病毒粒子相对于包含亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子,表现出对所有肺细胞的增加的感染性。在其它实施方案中,所述rAAV病毒粒子相对于包含亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子,表现出对肺的某些细胞类型而不是其它细胞类型的增加的感染性。换句话说,所述rAAV病毒粒子表现出对肺的某些细胞类型而不是对其它细胞类型优先的增加的感染性,例如,rAAV表现出优先地对一种或多种肺上呼吸道细胞的增加的感染性,但未表现出对所有细胞类型的增加的感染性。在一些方面,如本文所述的变体衣壳蛋白赋予这些rAAV病毒粒子对人AAV中和抗体的增加的抗性。

[0011] 在一些实施方案中,rAAV病毒粒子包含异源核酸。在一些这种实施方案中,异源核酸对编码多肽的RNA进行编码。在其它这种实施方案中,异源核酸序列对不编码多肽的RNA进行编码,例如,异源核酸序列RNA干扰剂、针对核酸酶的指导RNA等。在一些实施方案中,异源核酸包含编码多肽的核苷酸和编码干扰RNA的核苷酸序列。

[0012] 本文还提供了包含主题感染性rAAV病毒粒子和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物被配制为适合气溶胶化递送的液体/悬浮液。在相关实施方案中,将药物组合物作为主体吸入的包含rAAV病毒粒子的可呼吸颗粒的气溶胶悬浮液施用。可呼吸颗粒可能是液体或固体。包含rAAV病毒粒子的液体颗粒的气溶胶可以通过任何合适的方法产生,例如使用压力驱动的气溶胶雾化器或超声波雾化器。可以用任何固体颗粒气溶胶发生器产生包含rAAV病毒粒子的固体颗粒的气溶胶。

[0013] 还提供了包含如本文所述的变体衣壳蛋白的rAAV病毒粒子在通过使靶细胞与rAAV病毒粒子接触而将异源核酸递送到靶细胞(例如肺细胞)的方法中的用途。在一些实施方案中,靶细胞是在体内的,例如在需要治疗肺疾病的个体的肺中。在其它实施方案中,靶细胞是在体外的。

[0014] 还提供了通过向需要这种治疗的主体施用有效量的rAAV病毒粒子或包含有效量

的rAAV病毒粒子的药物组合物来治疗肺疾病的方法,所述rAAV病毒粒子包含如本文所述的变体衣壳蛋白。

[0015] 还提供了分离的核酸和包含所述分离的核酸的宿主细胞,所述分离的核酸包含编码如本文所述的变体AAV衣壳蛋白的序列。在又其它实施方案中,分离的核酸和/或分离的宿主细胞包含rAAV。

[0016] 在一些方面,变体AAV衣壳蛋白相对于相应的亲本AAV衣壳蛋白包含所述衣壳蛋白的GH-环中,优选GH-环的表面暴露的区域中约5个氨基酸至约20个氨基酸的插入("异源肽"或"肽插入"),其中当存在于AAV病毒粒子中时,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对视网膜细胞的感染性相比,所述变体衣壳蛋白赋予对视网膜细胞增加的感染性。在一些实施方案中,所述肽包含选自下述的序列、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67)。

[0017] 在一些方面,变体AAV衣壳蛋白相对于相应的亲本AAV衣壳蛋白包含衣壳蛋白的GH-环中的肽插入,并且相对于相应的亲本AAV衣壳蛋白进一步包含一个或多个氨基酸取代,其中当存在于AAV病毒粒子中时,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子对肺细胞的感染性相比,所述变体衣壳蛋白赋予对肺细胞增加的感染性。在一些优选的方面,变体AAV衣壳蛋白包含选自下述的序列、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、

NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ IDNO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),并且进一步包含相对于AAV2的VP1的V708I取代。

[0018] 本文还公开了用于制造和/或递送包含如本文中公开的变体AAV衣壳的rAAV的方法。另外,本文提供了包括rAAV且供本文所述的方法之用的试剂盒,所述rAAV包含如本文所公开的变体AAV衣壳。

[0019] 在其它实施方案中,前面段落中的包含变体衣壳蛋白的AAV病毒粒子可以包含任何前面或后来公开的实施方案。实际上,应理解的是,为清楚起见在分开的实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见而在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何适合的子组合(sub-combination)提供。与本发明有关的实施方案的所有组合都被本发明具体包括,并且在本文中公开,就好像每个组合都被个别且明确地公开一样。此外,各种实施方案和其要素的所有子组合都被本发明具体包括,并且在本文中公开,就好像每个这种子组合都在本文中个别且明确地公开一样。

附图说明

[0020] 图1举例说明了用于鉴定赋予改善的呼吸道转导的变体AAV衣壳的定向进化过程。

[0021] 图2是模型系统决策树(decision tree)的示意图。决策基于第二轮和第三轮NHP递送后进行的测序分析。

[0022] 图3A-B图3a举例说明了衣壳文库的估计的遗传多样性,其中总多样性为>10亿个变体。图3b举例说明了衣壳文库的生产力,所有衣壳文库都在足以生产用于体内治疗用载体进化过程的材料的水平制造。所施用的病毒基因组(vg)代表靶剂量,不计及与递送设备和施用途径相关的损失。

[0023] 图4举例说明了第1-3轮选择过程的施用衣壳文库的NHPs的气管和初级、次级和三级支气管中存在的病毒基因组的ddPCR定量。

[0024] 图5举例说明了第3轮测序分析中“命中”的频率。测序分析基于每个区域测序的群体内的总频率。左图(气管和初级支气管)频率如下:(i)点突变体#1=13%;(ii)肽插入#1=11%;(iii)肽插入#2=4%;(iv)肽插入#3=6%;(v)AAV2点突变体=11%;(vi)AAV2肽插入=40%;(vii)嵌合体=7%;(viii)其他=8%。右图(次级和三级支气管)频率如下:(i)点突变体#1=9%;(ii)肽插入#1=3%;(iii)肽插入#2=10%;(iv)肽插入#3=3%;

(v)肽插入#4＝7％;(vi)AAV2点突变体＝9％;(vii)AAV2肽插入＝54％;(viii)其他＝5％。

[0025] 图6A-B举例说明了第4轮选择(图6a)和第5轮选择(图6b)的在没有和有人IVIG的情况下来自施用的衣壳文库的人上呼吸道ALI培养物中存在的病毒基因组的ddPCR定量。

[0026] 图7举例说明了第5轮测序分析中“命中”的频率。测序分析基于在有和没有IVIG的情况下选择的测序群体内的总频率进。左图(体外第5A轮-IVIG)频率如下:(i)点突变体#1＝10％:(ii)肽插入#1＝17％;(iii)肽插入#2＝8％;(iv)肽插入#3＝1％;(v)肽插入#4＝4％;(vi)肽插入#5＝9％;(vi)肽插入#6＝15％;(vii)AAV2肽插入＝35％;(viii)其他＝1％。右图(体外第5B轮+IVIG)频率如下:(i)点突变体#1＝6.7％:(ii)肽插入#1＝11.5％;(iii)肽插入#2＝9.6％;(iv)肽插入#3＝2.9％;(v)肽插入#4＝1.9％;(vi)肽插入#5＝16.3％;(vi)肽插入#6＝10.6％;(vii)AAV2肽插入＝40.4％。

[0027] 图8A-C使用荧光显微镜检术通过报道基因EGFP表达测量的肺上呼吸道上皮ALI培养物中的AAV衣壳转导效率。图8a-b显示了与AAV2、AAV5和AAV101相比,六种新变体的人(图8a)和NHP(图8b)顶端转导。图8c显示了与AAV2、AAV5和AAV101相比,六种新型变体的人基部转导。腺伴随病毒(AAV)、空气液体界面(ALI)、非转导的(NT)、感染复数(MOI)。

[0028] 图9A-C通过免疫细胞化学(图9a、9b)和ddPCR(图9c)与AAV2和AAV101相比的最高的新衣壳的二次分析。使用荧光显微镜检术通过报道基因EGFP表达测量肺上呼吸道上皮ALI培养物中的AAV衣壳转导效率(图9a)。显微照片像素强度的定量(图9b)。转导后的转录物定量(图9c)。腺伴随病毒(AAV)、空气液体界面(ALI)、非转导的(NT)、感染复数(MOI)、平均荧光强度(MFI)、持家(housekeeper)(HK)。误差棒＝标准差。每个条件n＝3。

[0029] 图10A-B举例说明了在有或没有黏液的情况下,用携带包含可操作地连接到CAG启动子的EGFP报道基因的核酸的指定AAV衣壳转导后,人呼吸道上皮细胞培养物中的EGFP表达。培养物在空气液体界面中生长≥30天;感染后时间7天;-黏液,无黏液;+黏液,有黏液;顶端转导;感染复数(MOI)25,000。

[0030] 发明详述

定义

如在说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数参考,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0031] 如本文所用的,术语“包含”意图意指组合物和方法包括所记载的要素,但不排除其他要素。“基本上由……组成”当用于定义组合物和方法时,应意指排除对于用于预期用途的组合具有任何重要意义的其他要素。例如,基本上由如本文所定义的要素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体,例如磷酸缓冲盐水、防腐剂等。“由……组成”应意指排除不止其他成分的痕量要素以及用于施用本文公开的组合物的实质方法步骤。这些过渡术语的每一个所定义的方面均在本公开内容的范围内。

[0032] 腺伴随病毒是不致病的细小病毒,其由无包膜的二十面体衣壳内的4.7kb单链DNA基因组组成。基因组含有三个侧接有作为病毒复制起点和包装信号发挥功能的反向末端重复序列(ITR)的可读框(ORF)。rep ORF编码四种非结构蛋白,这四种非结构蛋白在病毒复制、转录调节、位点特异性整合和病毒粒子装配中发挥作用。cap ORF编码三种结构蛋白(VP

1-3),这三种结构蛋白装配以形成60-聚体病毒衣壳。最后,作为cap基因内的另起读框存在的ORF产生装配激活蛋白(AAP),一种将AAV衣壳蛋白定位于核仁并在衣壳装配过程中发挥作用的病毒蛋白。

[0033] 存在AAV的几种天然存在的("野生型")血清型和超过100种已知的变体,其各自在氨基酸序列中,特别是在衣壳蛋白的高变区内,且因此在其基因递送性质中不同。没有AAV已与任何人疾病相关,从而使得重组AAV对临床应用具有吸引力。

[0034] 为了本文公开内容起见,术语"AAV"是腺伴随病毒的缩写,包括但不限于病毒本身和其衍生物。除另有说明之外,所述术语指所有亚型或血清型以及具有复制能力的和重组形式两者。术语"AAV"包括但不限于AAV1型(AAV-1或AAV1)、AAV2型(AAV-2或AAV2)、AAV3A型(AAV-3A或AAV3A)、AAV3B型(AAV-3B或AAV3B)、AAV4型(AAV-4或AAV4)、AAV5型(AAV-5或AAV5)、AAV6型(AAV-6或AAV6)、AAV7型(AAV-7或AAV7)、AAV型8(AAV-8或AAV8)、AAV9型(AAV-9或AAV9)、AAV10型(AAV-10或AAV10或AAVrh10)、禽类AAV、牛科动物AAV、犬科动物AAV、山羊AAV、马科动物AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV和绵羊AAV。"灵长类动物AAV"指感染灵长类动物的AAV,"非灵长类动物AAV"指感染非灵长类哺乳动物的AAV,"牛科动物AAV"指感染牛科动物哺乳动物的AAV等。

[0035] AAV的各种血清型的基因组序列以及天然末端重复序列(TRs)、Rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。这种序列可以在文献中或在诸如GenBank的公共数据库中找到。参见,例如,GenBank检索号NC_002077.1(AAV1)、AF063497.1(AAV1)、NC_001401.2(AAV2)、AF043303.1(AAV2)、J01901.1(AAV2)、U48704.1(AAV3A)、NC_001729.1(AAV3A)、AF028705.1(AAV3B)、NC_001829.1(AAV4)、U89790.1(AAV4)、NC.__.006152.1(AAV5)、AF085716.1(AAV-5)、AF028704.1(AAV6)、NC_006260.1(AAV7)、AF513851.1(AAV7)、AF513852.1(AAV8)NC_006261.1(AAV-8)、AY530579.1(AAV9)、AAT46337(AAV10)和AA088208(AAVrh10);对于教导AAV核酸和氨基酸序列,其公开内容引入本文作为参考。还参见,例如,Srivistava等人(1983)J.Virology 45:555;Chiorini等人(1998)J,Virology 71:6823;Chiorini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;和美国专利No.6,156,303。

[0036] 与AAV血清型有关的天然存在的cap(衣壳)蛋白的序列是本领域已知的并且包含本文作为AAV1(SEQ ID NO:1)、AAV2(SEQ ID NO:2)、AAV3A(SEQ ID NO:3)、AAV3B(SEQ ID NO:4)、AAV4(SEQ ID NO:5)、AAV5(SEQ ID NO:6)、AAV6(SEQ ID NO:7)、AAV7(SEQ ID NO:8)、AAV8(SEQ ID NO:9)、AAV9(SEQ ID NO:10)和AAV10(SEQ ID NO:11)公开的那些。术语"变体AAV衣壳蛋白"或"AAV变体"指包含氨基酸序列的AAV衣壳蛋白,所述氨基酸序列相对于天然存在的或"野生型"AAV衣壳蛋白序列(例如如本文SEQ ID NO:1-11中所述的)包含至少一个修饰或取代(包括缺失、插入、点突变等)。变体AAV衣壳蛋白可以与野生型衣壳蛋白的氨基酸序列具有约80%同一性或更高,例如与野生型衣壳蛋白的氨基酸序列具有85%同一性或更高、90%同一性或更高或95%同一性或更高,例如与野生型衣壳蛋白具有98%或99%同一性。变体AAV衣壳蛋白可能不是野生型衣壳蛋白。

[0037] 为了本文公开内容起见,“AAV病毒粒子”或“AAV病毒颗粒”指由至少一种AAV衣壳蛋白和包衣壳的AAV多核苷酸构成的病毒颗粒。

[0038] 为了本文公开内容起见,术语“rAAV”是指重组腺伴随病毒的缩写。当应用于多核苷酸时“重组”意指多核苷酸是克隆、限制或连接步骤,以及导致不同于在自然中发现的多核苷酸的构建体的其它程序的各种组合的产物。重组病毒是包含重组多核苷酸的病毒颗粒。所述术语分别包括原始多核苷酸构建体的复制和原始病毒构建体的后代。

[0039] 术语“rAAV载体”包括rAAV病毒粒子rAAV病毒颗粒)(例如,感染性rAAV病毒粒子),其通过定义包括rAAV多核苷酸;并且还包括编码rAAV的多核苷酸(例如,编码rAAV的单链多核苷酸(ss-rAAV);编码rAAV的双链多核苷酸(ds-rAAV),例如编码rAAV的质粒;等等)。

[0040] 如果AAV病毒粒子包含异源多核苷酸(即,除野生型AAV基因组以外的多核苷酸,例如,待递送到靶细胞的转基因、待递送到靶细胞的RNAi剂或CRISPR剂等),其一般被称为“重组AAV(rAAV)病毒粒子”或“rAAV病毒颗粒”。通常,异源多核苷酸侧接至少一个,并且通常两个AAV反向末端重复序列(ITRs)。

[0041] 术语“包装”指导致AAV颗粒的装配和包衣壳的一系列细胞内事件。AAV“rep”和“cap”基因指编码腺伴随病毒的复制和包衣壳蛋白的多核苷酸序列。AAV rep和cap在本文中称为AAV“包装基因”。

[0042] 术语AAV的“辅助病毒”指允许AAV(例如,野生型AAV)被哺乳动物细胞复制和包装的病毒。用于AAV的各种各样的这种辅助病毒是本领域已知的,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒如牛痘。腺病毒包括许多不同的亚组,尽管亚组C的腺病毒5型是最常用的。人、非人哺乳动物和禽类起源的许多腺病毒是已知的并且可从诸如ATCC的保藏机构获得。疱疹家族的病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)和EB病毒(EBV)、以及巨细胞病毒(CMV)和假性狂犬病病毒(PRV);这些也可以从诸如ATCC的保藏机构获得。

[0043] 术语“一个或多个辅助病毒功能”指在辅助病毒基因组中编码的一个或多个功能,其允许AAV复制和包装(连同本文所述的复制和包装的其它要求)。如本文所述的,“辅助病毒功能”可以以多种方式提供,包括通过提供辅助病毒或反式向生产者细胞提供编码一个或多个必要功能的多核苷酸序列。例如,将包含编码一种或多种腺病毒蛋白的核苷酸序列的质粒或其它表达载体与rAAV载体一起转染到生产者细胞中。

[0044] 术语“感染性”病毒或病毒颗粒是包含有能力地装配的病毒衣壳并且能够将多核苷酸组分递送到病毒物种有向性的细胞中的病毒或病毒颗粒。所述术语不必定意味着病毒的任何复制能力。在本公开内容的其他地方和本领域中描述了用于计数感染性病毒颗粒的测定。病毒感染性可以表示为感染性病毒颗粒与总病毒颗粒的比率。确定感染性病毒颗粒与总病毒颗粒的比率的方法是本领域已知的。参见,例如,Grainger等人,(2005)Mol,Ther.11:S337(描述TCID50感染性滴度测定);和Zolotukhin等人(1999)Gene Ther.6:973。还参见实施例。

[0045] 如本文所用的术语“向性”指病毒(例如,AAV)优先靶向特定宿主物种的细胞或宿主物种内的特定细胞类型。例如,相对于仅可能感染肺和肌肉细胞的病毒,可以感染心、肺、肝和肌肉细胞的病毒具有更宽(即,增加的)的向性。向性还可以包括病毒对宿主的特定类型的细胞表面分子的依赖性。例如,一些病毒可以只感染具有表面糖胺聚糖的细胞,而其它病毒可以只感染具有唾液酸的细胞(这种依赖性可以使用缺乏特定类别分子的各种细胞系

作为病毒感染的潜在宿主细胞进行测试)。在一些情况下,病毒的向性描述了病毒的相对偏好。例如,第一种病毒可能能够感染所有细胞类型,但在感染具有表面糖胺聚糖的那些细胞中成功得多。如果第二种病毒也更喜欢相同的特征(例如,第二种病毒在感染具有表面糖胺聚糖的那些细胞中也更成功),则可以认为第二种病毒具有与第一种病毒相似(或相同)的向性,即使绝对转导效率不相似。例如,第二种病毒在感染每种测试的给定细胞类型时可能比第一种病毒更有效,但如果相对偏好相似(或相同),则第二种病毒仍可被认为具有与第一种病毒相似(或相同)的向性。在一些实施方案中,相对于天然存在的病毒粒子,包含主题变体AAV衣壳蛋白的病毒粒子的向性没有改变。在一些实施方案中,相对于天然存在的病毒粒子,包含主题变体AAV衣壳蛋白的病毒粒子的向性被扩展(即,变宽)。在一些实施方案中,相对于天然存在的病毒粒子,包含主题变体AAV衣壳蛋白的病毒粒子的向性降低。

[0046] 术语“具有复制能力的”病毒(例如,具有复制能力的AAV)指具有感染性并且还能够在受感染的细胞中复制(即在存在辅助病毒或辅助病毒功能的情况下)的表型野生型病毒。在AAV的情况下,复制能力通常需要存在功能性AAV包装基因。通常,由于缺乏一种或多种AAV包装基因,如本文所述的rAAV载体在哺乳动物细胞(尤其是在人细胞中)中是不能复制的。一般,这种rAAV载体缺乏任何AAV包装基因序列,以最小化通过AAV包装基因与进入rAAV载体之间的重组产生有复制能力的AAV的可能性。在许多实施方案中,如本文所述的rAAV载体制剂是那些含有很少(如果有的话)具有复制能力的AAV(rcAAV,也称为RCA)的那些rAAV载体制剂(例如,每10^2个rAAV颗粒小于约1rcAAV、每10^4个rAAV颗粒小于约1rcAAV、每10个rAAV颗粒小于约1rcAAV、每10^{12}个rAAV颗粒小于约1rcAAV或没有rcAAV)。

[0047] 术语“多核苷酸”指任何长度的聚合形式的核苷酸,包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物,并且可以被非核苷酸组分中断。如果存在的话,那么对核苷酸结构的修饰可以在聚合物装配之前或之后给予。如本文所用的,术语多核苷酸可互换地指双链和单链分子。除非另有具体说明或要求,否则本文包含多核苷酸的任何实施方案包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种互补单链形式中的每一种两者。

[0048] 多核苷酸或多肽与另一多核苷酸或多肽具有一定百分比的“序列同一性”,从而意味着当比对时,所述百分比的碱基或氨基酸在比较两个序列时是相同的。序列相似性可以以多种不同方式确定。为了确定序列同一性,可以使用包括可在万维网上于nebi.nlm.nih.gov/BLAST/获得的BLAST的方法和计算机程序对序列进行比对。另一种比对算法是PASTA,其可从来自作为Oxford Molecular Group,Inc.的全资子公司的美国Madison,Wis.的Genetics Computing Group(GCG)软件包中获得。其它用于比对的技术描述于Methods in Enzymology,第266卷:Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis(1996),Doolittle编,Academic Press,Inc.,Harcourt Brace&Co.,San Diego,Calif.,USA的部门。特别感兴趣的是允许序列中的缺口的比对程序。Smith-Waterman是一种允许序列比对中的缺口的算法。参见Meth.Mol.Biol.70:173-187(1997)。同样,使用Needleman和Wunsch比对方法的GAP程序可以用于比对序列,参见J.Mol.Biol.48:443-453(1970)。

[0049] 术语“基因”指在细胞中发挥某种类型功能的多核苷酸。例如,基因可以含有能够编码基因产物的可读框。基因产物的一个实例是从基因转录和翻译的蛋白。基因产物的另

一个实例是被转录但不翻译的RNA,例如,功能性RNA产物,例如,适配体、干扰RNA、核糖体RNA(rRNA)、转移RNA(tRNA)、非编码RNA(ncRNA)、核酸酶的指导RNA等。

[0050] 术语“基因表达产物”或“基因产物”是由如上文所限定的特定基因的表达产生的分子。基因表达产物包括例如多肽、适配体、干扰RNA、信使RNA(mRNA)、rRNA、tRNA、非编码RNA(ncRNA)等。

[0051] 术语“siRNA剂”(“小干扰”或“短干扰RNA”(或siRNA))是靶向感兴趣的基因(“靶基因”)的核苷酸的RNA双链体。“RNA双链体”指通过RNA分子的两个区域之间的互补配对而形成的结构,从而形成双链RNA(dsRNA)区域。siRNA“靶向”基因,这是因为siRNA的双链体部分的核苷酸序列与靶向的基因的核苷酸序列互补。在一些实施方案中,siRNA的双链体的长度小于30个核苷酸。在一些实施方案中,双链体的长度可以是29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或10个核苷酸。在一些实施方案中,双链体的长度为19-25个核苷酸。在一些实施方案中,siRNA-介导的基因靶向是通过使用DNA-指导的RNA干扰(ddRNAI)实现的,所述ddRNAI是利用DNA构建体以激活动物细胞的内源性RNA干扰(RNAi)途径的基因沉默技术。这种DNA构建体被进行设计以表达一旦被加工就引起一个靶基因或多个靶基因沉默的自身互补的双链RNAs,一般是短发夹RNAs(shRNA)。包括内源性mRNAs或病毒RNAs的任何RNA可以通过将构建体进行设计以表达与期望mRNA靶互补的双链RNA而被沉默。因此,siRNA剂的RNA双链体部分可以是被称为shRNA的短发夹结构的一部分。除了双链体部分之外,发夹结构可以含有位于形成双链体的两个序列之间的环部分。所述环的长度可以变化。在一些实施方案中,环的长度为5、6、7、8、9、10、11、12或13个核苷酸。发夹结构还可以含有3’或5’突出端部分。在一些实施方案中,突出端是长度为0、1、2、3、4或5个核苷酸的3’或5’突出端。通常,靶基因的表达产物(例如,mRNA、多肽等)的水平被含有具体双链核苷酸序列的siRNA剂(例如,siRNA、shRNA等)降低,所述具体双链核苷酸序列与靶基因转录物的长度至少为19-25个核苷酸的区段(例如,2021个核苷酸序列)互补,包括5’非翻译(UT)区、ORF或3’UT区。在一些实施方案中,短干扰RNA的长度为约19-25nt。参见,例如,PCT申请WO0144895、WO99/32619、WO01/75164、WO01/92513、WO01/29058、WO01/89304、WO02/16620和WO02/29858;以及描述siRNA技术的美国专利公开No.20040023390。siRNA和/或shRNA可以由核酸序列编码,并且核酸序列还可以包括启动子。核酸序列还可以包括多腺苷酸化信号。在一些实施方案中,多腺苷酸化信号是合成的最小多腺苷酸化信号。

[0052] 术语“反义RNA”包括与基因表达产物互补的RNA。例如,靶向具体mRNA的反义RNA是与所述mRNA互补的基于RNA的试剂(或可以是修饰的RNA),其中反义RNA与mRNA的杂交改变mRNA的表达(例如,经由改变RNA的稳定性、改变RNA的翻译等)。“反义RNA”中还包括编码反义RNA的核酸。

[0053] 关于“CRISPR/Cas9剂”,术语“CRISPR”包括规律间隔成簇短回文重复序列/CRISPR相关(Cas)系统,其通过使用CRISPR RNAs(crRNAs)以指导侵入核酸沉默而进化以向细菌和古细菌提供针对病毒和质粒的适应性免疫。Cas9蛋白(或其功能等同物和/或其变体,即,Cas9-样蛋白)天然含有DNA核酸内切酶活性,其依赖于蛋白与被称为crRNA和tracrRNA(也称为指导RNAs)的两种天然存在的或合成的RNA分子的缔合。在一些情况下,两个分子共价连接以形成单个分子(也称为单个指导RNA(“sgRNA”))。因此,Cas9或Cas9-样蛋白与DNA-靶向RNA(所述术语包括两分子指导RNA构型和单分子指导RNA构型两者)缔合,所述DNA-靶向

RNA激活Cas9或Cas9-样蛋白并将所述蛋白指导到靶核酸序列。

[0054] 如果Cas9或Cas9-样蛋白保留其天然酶促功能,则它将切割靶DNA以产生双链断裂,这可导致基因组改变(即,编辑:缺失、插入(当存在供体多核苷酸时)、置换等),从而改变基因表达。Cas9的一些变体(其变体被术语Cas9-样包括)已被改变,从而使得它们具有降低的DNA切割活性(在一些情况下,它们切割靶DNA的单链而不是两条链,而在其它情况下,它们严重减少到没有DNA切割活性)。具有降低的DNA切割活性(甚至没有DNA切割活性)的Cas9-样蛋白仍然可以被指导到靶DNA以阻断RNA聚合酶活性。另一方面,Cas9或Cas9-样蛋白可以通过将VP64转录激活结构域与Cas9蛋白融合并将所述融合蛋白与MS2-P65-HSF1辅助蛋白和在四核苷酸环和茎环上包含MS2 RNA适配体的单一指导RNA共同递送来修饰以形成激活转录的细胞中的协同激活介质(Cas9-SAM)复合物。因此,酶促失活的Cas9-样蛋白可以通过DNA-靶向RNA被靶向靶DNA中的特定位置,以阻断或激活靶DNA的转录。如本文所用的术语“CRISPR′Cas9剂”包括如上所述或本领域已知的所有形式的CRISPR/Cas9。

[0055] 关于CRISPR剂的详细信息可以例如在以下文献中找到:(a)Jinek等人,Science.2012年8月17日;337(6096):816-21:“Aprogrammabledual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity”;(b)Qi等人,Cell.2013年228日;152(5):1173-83:“Repurposing CRISPR.as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”,和(c)美国专利申请序列号13/842,859和PCT申请号PCT/US13/32589;其全部特此整体引入作为参考。因此,如本文所使用的术语“CRISPR剂”包括可以在基于Cas9的系统(例如,Cas9或Cas9-样蛋白;DNA-靶向RNA的任何组分,例如crRNA-样RNA、tracrRNA-样RNA、单一指导RNA等;供体多核苷酸;等)中使用的任何试剂(或编码这种试剂的核酸),包括天然存在和/或合成的序列。

[0056] 所谓“锌指核酸酶”(ZFNs)指的是通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而产生的人工DNA内切核酸酶。ZFNs可以被人工改造以靶向期望的DNA序列,并且这使得锌指核酸酶能够切割独特的靶序列。当引入细胞中时,ZFNs可以用于通过诱导双链断裂来编辑细胞中的靶DNA(例如,细胞的基因组)。关于使用ZFNs的更多信息,请参见,例如:Asuri等人,Mol Ther.2012年2月;20(2):329-38;Bibikova等人Science.2003年5月2日;300(5620):764;Wood等人Science.2011年7月15日;333(6040):307;Ochiai等人Genes Cells.2010年8月;15(8):875-85;Takasu等人,Insect Biochem Mol 2010年10月;40(10):759-65;Ekker等人,Zebrafish 2008年夏;5(2):121-3;Young等人,Proc Natl Acad Sci US A.2011年4月26日;108(17):7052-7;Goldberg等人,Cell.2010年3月5日;140(5):678-91;Geurts等人,Science.2009年7月24日;325(5939):433;Flisikowska等人,PLoS One.2011;6(6):e21045.doi:10.1371/journal.pone.0021045.Epub 2011年6月13日;Flauschild等人,Proc Nati Acad Sci U S A.2011年7月19日;108(29):12013-7;和Yu等人,Cell Res.2011年11月;21(11):1638-40;对于其与ZFNs相关的教导,其全部引入本文作为参考。术语“ZFN剂”包括锌指核酸酶和/或包含编码锌指核酸酶的核苷酸序列的多核苷酸。

[0057] 术语“转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease)”或“TALEN”剂指转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)是通过将TAL(转录激活因子样)效应物DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而产生的人工DNA内切核酸酶。TALENS

可以被快速人工改造以实际上结合任何期望的DNA序列,并且当引入细胞中时,TALENs可以通过诱导双链断裂来编辑细胞中的靶DNA(例如,细胞的基因组)。关于使用TALENs的更多信息,请参见,例如:Hockemeyer等人Nat Biotechnol.2011年7月7日;29(8):731-4;Wood等人Science.2011年7月15日;333(6040):307;Tesson等人Nat Biotechnol,2011年8月5日;29(8):695-6;和Huang等人,Nat Biotechnol.2011年8月5日;29(8):699-700;对于其与TALENs相关的教导,其全部引入本文作为参考。术语“TALEN剂”包括TALEN和/或包含编码TALEN的核苷酸序列的多核苷酸。

[0058] 术语“控制元件”或“控制序列”指与分子相互作用有关的核苷酸序列,所述核苷酸序列有助于多核苷酸的功能调节,包括多核苷酸的复制、重复、转录、剪接、翻译或降解。所述调节可以影响过程的频率、速度或特异性,并且在性质上可能是增强或抑制的。本领域中已知的控制元件包括例如转录调节序列,如启动子和增强子。启动子是能够在某些条件下与RNA聚合酶结合并且起始通常位于启动子下游(3'方向)的编码区的转录的DNA区域。启动子可以是遍在地起作用的,即,在许多细胞类型中有活性,例如CAG或CMV启动子;或是组织或细胞特异性的。

[0059] 术语“可操作地连接的(operatively linked)”或“可操作地连接的(operably linked)”指遗传元件的并列,其中所述元件处于允许其以预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子有助于起始编码序列的转录,则启动子可操作地连接到编码区。在启动子和编码区之间可以存在间插残基,只要保持所述功能关系即可。

[0060] 术语“表达载体”包括包含编码感兴趣多肽的多核苷酸区域的载体,并且用于实现蛋白在预期的靶细胞中的表达。表达载体还可以包含与编码区可操作地连接的控制元件,以促进蛋白在靶中的表达。控制元件以及与其可操作地连接以用于表达的一个基因或多个基因的组合有时被称为“表达盒”,其中许多是本领域已知的并可获得的,或者可以容易地由在本领域可获得的组分构建。

[0061] 术语“异源的”意指衍生自与其进行比较的实体的剩余部分的基因型不同的实体。例如,通过遗传工程技术引入到衍生自不同物种的质粒或载体中的多核苷酸是异源多核苷酸。从其天然编码序列中除去并与天然未发现连接的编码序列可操作地连接的启动子是异源启动子。因此,例如,包含编码异源基因产物的异源核酸序列的rAAV是包含正常不包括在天然存在的野生型AAV中的多核苷酸的rAAV,并且编码的异源基因产物是正常不由天然存在的野生型AAV编码的基因产物。

[0062] 术语“遗传改变”和“遗传修饰”(和其语法变化形式)在本文中可互换使用以指其中除通过有丝分裂或减数分裂之外遗传元件(例如,多核苷酸)被引入细胞中的过程。所述元件对于细胞可以是异源的,或者它可以是已经存在于细胞中的元件的额外拷贝或改进版本。遗传改变可以例如通过用重组质粒或其它多核苷酸通过本领域中已知的任何方法转染细胞来实现,如电穿孔、磷酸钙沉淀或与多核苷酸-脂质体复合物接触。遗传改变还可以例如通过用DNA或RNA病毒或病毒载体转导或感染来实现。通常,遗传元件被引入细胞中的染色体或微型染色体中;但是任何改变细胞和其后代的表型和/或基因型的改变都包括在所述术语中。

[0063] 关于细胞修饰,术语由外源性DNA(例如,经由重组病毒)“遗传修饰的”或“转化的”或“转染的”或“转导的”指当这种DNA已引入细胞内时。外源DNA的存在导致永久或瞬时的遗

传变化。转化DNA可以或可以不整合(共价连接)到细胞的基因组中。“克隆”是通过有丝分裂从单个细胞或共同祖先衍生的细胞群体。“细胞系”是能够在体外稳定生长许多代的原代细胞的克隆。

[0064] 如本文所用的,如果遗传序列可用于在体外延长的细胞培养期间和/或在体内延长的时间段执行其功能,则称细胞被“稳定地”用所述序列改变、转导、遗传修饰或转化。通常,这种细胞被“可遗传地”改变(遗传修饰),这是因为引入了还可通过改变的细胞的后代遗传的遗传改变。

[0065] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文可互换使用以指任何长度的氨基酸的聚合物。所述术语还包括已修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化(lipidation)、磷酸化或与标记组分的缀合。当在向哺乳动物主体递送基因产物的背景下讨论时,多肽如抗血管生成多肽、神经保护多肽等和其组合物指保留了完整蛋白所期望的生化功能的各自的完整多肽或其任何片段或遗传工程衍生物。类似地,提及编码抗血管生成多肽的核酸、编码神经保护多肽的核酸和其它用于将基因产物递送到哺乳动物主体的这种核酸(其可以被称为待递送到受体细胞的“转基因”),包括编码完整多肽或具有期望的生化功能的任何片段或遗传工程衍生物的多核苷酸。

[0066] 如本文所用的,“分离的”质粒、核酸、载体、病毒、病毒粒子、宿主细胞、蛋白或其它物质指缺乏至少一些其它组分的物质的制剂,在物质或类似物质天然存在或最初由其制备的场合,所述其它组分也可以存在。因此,例如,可以通过使用纯化技术来制备分离的物质以从来源混合物中富集所述分离的物质。富集可以在绝对基础上测量,如每体积溶液的重量,或者可以相对于来源混合物中存在的第二种潜在干扰物质进行测量。本公开内容的实施方案的逐渐增加的富集是越来越分离的。在一些实施方案中,分离的质粒、核酸、载体、病毒、宿主细胞或其它物质是纯化的,例如,约80%至约90%纯、至少约90%纯、至少约95%纯、至少约98%纯或至少约99%纯或更高。

[0067] 如本文所用的,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等指获得期望的药理学和/或生理学效果。所述效果就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的副作用而言可以是治疗性的。如本文所用的,“治疗”包括哺乳动物,特别是人的疾病的任何治疗,并且包括:(a)在主体中预防疾病(和/或由疾病引起的症状)的发生,所述主体可能易患所述疾病或有患病风险但尚未被诊断为患有所述疾病;(b)抑制疾病(和/或由疾病引起的症状),即,抑制其发展;以及(c)减轻疾病(和/或由疾病引起的症状),即,引起疾病(和/或由疾病引起的症状)消退,即,改善疾病和/或疾病的一种或多种症状。例如,主题组合物和方法可以涉及肺疾病的治疗。

[0068] 术语“个体”,“宿主”,“主体”和“患者”在本文中可互换使用,并且指哺乳动物,包括但不限于人;非人类灵长类动物,包含猿猴;哺乳动物运动动物(如,马);哺乳动物农场动物(如,绵羊,山羊等);哺乳动物宠物(狗,猫等);和啮齿类动物(例如,小鼠,大鼠等)。

[0069] 在一些实施方案中,个体是以前已经天然暴露于AAV并且因此携带抗-AAV抗体(即,AAV中和抗体)的人。在一些实施方案中,个体是以前已经施用AAV载体(并且因此可能携带抗-AAV抗体)并且需要重新施用载体用于治疗不同状况或进一步治疗相同状况的人。基于涉及将AAV基因递送到例如肝、肌肉和视网膜——受针对所述媒介物的中和抗体影响的所有组织——的临床试验中的阳性结果,存在许多这种治疗应用/疾病靶。

[0070] 如本文所用的术语“有效量”是足以实现有益或期望的临床结果的量。有效量可以在一次或多次施用中施用。为了本公开内容起见,有效量的化合物(例如,感染性rAAV病毒粒子)是足以减轻、改善、稳定、逆转、预防、减缓或延迟特定疾病状态(例如,肺疾病)(和/或与其有关的症状)的进展的量。因此,有效量的感染性rAAV病毒粒子是能够将异源核酸有效递送到个体的靶细胞(或多个靶细胞)的感染性rAAV病毒粒子的量。有效量可以通过例如使用本领域熟知的技术例如RT-PCR、蛋白印迹、ELISA、荧光或其它报道分子示值读数等在细胞或组织中检测由异源核酸序列编码的基因产物(RNA,蛋白)来临床前确定。有效量可以通过例如使用本领域已知的方法检测疾病的发作或进展的变化来临床确定。

[0071] 术语“定向进化”指体外和/或体内衣壳人工改造方法,其通过迭代轮次的遗传多样化和选择过程模仿自然进化,从而积累逐渐改善生物分子的功能的有益突变。定向进化经常涉及被称为“生物淘选(biopanning)”的体内方法,其用于从文库中选择AAV变体,所述变体具有感兴趣的细胞或组织类型的更有效水平的感染性。

[0072] 术语“干扰RNA”包括小干扰RNAs和微小RNAs(miRNAs)两者,包括人工miRNAs。

[0073] “2A肽”指约20个氨基酸的“自切割”肽,其从同一mRNA产生等摩尔水平的多个基因,且可代替多顺反子载体中的IRES元件使用。非限制性例子包括T2A、P2A、E2A和F2A肽序列。在其中异源核酸包含编码多个基因产物的核苷酸序列的实施方案中,多个(例如,2个)基因产物的表达可以由多个(例如,2个)独立启动子介导,或者可以由单个启动子介导,其中多个转基因由内部核糖体进入位点(IRES)或2A肽序列隔开。

[0074] 所谓“增加的抗性”指的是主题感染性rAAV病毒粒子在有人抗-AAV抗体的情况下表现出增加的感染性。病毒感染性可以表示为感染性病毒颗粒与总病毒颗粒的比率。因此,增加的感染性意指增加的感染性病毒颗粒与总病毒颗粒的比率。为了确定AAV对人抗-AAV抗体的抗性,在有各种浓度的人抗-AAV抗体的情况下测量AAV的感染性,以获得将基因递送效率(即,感染性)降低至在没有人抗-AAV抗体的情况下的50%所需的抗体浓度(例如,血清浓度、IVIG浓度等)(mg/mL)。据称需要更高抗体浓度以将基因递送效率降低至在没有人抗-AAV抗体的情况下的50%的病毒具有增加的对抗体中和的抗性。因此,抗性中的两倍增加意指将基因递送效率降低至在没有人抗-AAV抗体的情况下的50%所需的抗体浓度的两倍增加。在一些实施方案中,主题感染性rAAV病毒粒子表现出的对人AAV中和抗体的抗性为野生型AAV(例如,AAV2(野生型AAV血清型2))或包含野生型衣壳蛋白的AAV表现出的抗性的至少约1.5-倍(例如,至少约1.5-倍、至少约2-倍、至少约3-倍、至少约4-倍、至少约5-倍、至少约7.5-倍、至少约10-倍、至少约12-倍、至少约15-倍、至少约17-倍、至少约20-倍、至少约25-倍、至少约30-倍、至少约40-倍、至少约50-倍、至少约75-倍、至少约100-倍、至少约150-倍、至少约200-倍、至少约250-倍、至少约300-倍等)。

[0075] 可以说在有人AAV中和抗体的情况下,主题感染性rAAV病毒粒子表现出对哺乳动物细胞的增加的转导。在一些实施方案中,在有人AAV中和抗体的情况下,主题感染性rAAV病毒粒子表现出的对哺乳动物细胞的转导为由野生型AAV(例如,AAV2(野生型AAV血清型2))或包含野生型衣壳蛋白的AAV表现出的转导的至少约1.5-倍(例如,至少约1.5-倍、至少约2-倍、至少约3-倍、至少约4-倍、至少约5-倍、至少约7.5-倍、至少约10-倍、至少约12-倍、至少约15-倍、至少约17-倍、至少约20-倍、至少约25-倍、至少约30-倍、至少约40-倍、至少约50-倍、至少约75-倍、至少约100-倍、至少约150-倍、至少约200-倍、至少约250-倍、至少

约300-倍等)。

[0076] 在一些实施方案中,主题感染性rAAV病毒粒子表现出与结合野生型AAV衣壳蛋白的中和抗体的降低的结合。例如,与抗体对野生型AAV衣壳蛋白的结合亲和力相比,主题感染性rAAV病毒粒子可以表现出与结合野生型AAV衣壳蛋白的中和抗体的至多约1/1.5(至多约1/1.5、至多约1/2、至多约1/3、至多约1/4、至多约1/5、至多约1/7.5、至多约1/10、至多约1/12、至多约1/15、至多约1/17、至多约1/20、至多约1/25、至多约1/30、至多约1/40、至多约1/50、至多约1/75、至多约1/100、至多约1/150、至多约1/200、至多约1/250、至多约1/300等)的降低的结合(例如,降低的亲和力)。

[0077] 在一些实施方案中,抗-AAV中和抗体与主题感染性rAAV病毒粒子以小于约10^{-7}M、小于约5×10^{-6}M、小于约10^{-6}M、小于约5×10^{-5}M、小于约10^{-5}M、小于约10^{-4}M或更低的亲和力结合。

[0078] 腺伴随病毒(AAVs)是具有包含在无包膜衣壳内的4.7kb的单链DNA基因组的细小病毒家族。天然存在的AAV的病毒基因组具有侧接2个主要可读框(ORF):rep(编码在病毒复制、转录调节、位点特异性整合和病毒粒子装配中起作用的蛋白)和cap的2个反向末端重复序列(ITR)-其作为病毒复制起点和包装信号起作用。cap ORF编码3种结构蛋白,这3种结构蛋白装配以形成60-聚体病毒衣壳。已经分离出许多天然存在的AAV变体和血清型,并且没有一种与人疾病有关。

[0079] AAV的重组版本可以用作基因递送载体,其中感兴趣的标记或治疗用基因代替rep和cap插入ITRs之间。已经显示这些载体在体外和体内转导分裂和非分裂细胞两者,并且可以在有丝分裂后组织中导致好多年稳定的转基因表达。参见例如,Knipe D M,Howley PM,Fields'Virology.Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,Pa.,USA,2007;Gao G-P,Alvira M R,Wang L,Calcedo R,Johnston J,Wilson S M.Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy.Proc Nati Acad Sci USA 2002;99:11854-9;Atchison R W,Casty B C,Hammon W M.Adenovirus-Associated Defective Virus Particles,Science 1965;149:754-6;Hoggan M D,Blacklow N R,Rowe W P.Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations:physical,biological,and immunological characteristics,Proc NatlAcad USA 1966;55:1467-74;Blacklow N R,Hoggan M D,Rowe WP.Isolation ofadenovirus-associated viruses from man.Proc NatlAcad Sci USA 1967;58:1410-5;Bantel-Schaal U,zur Hauser"H.Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site.Virology 1984;134:52-63;Mayor H D,Melnick J L.Small deoxyribonucleic acid-containing viruses(picodnavirus group).Nature 1966;210:331-2;Mori S,Wang L,Takeuchi T,Kanda T.Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey:pseudotyping characterization ofcapsidprotein.Virology 2004;330:375-83;Flotte T R.Gene therapy progress and prospects:recombinant adeno-associated virus (rAAV)vectors.Gene Ther 2004;11:805-10。

[0080] 重组AAV(在本文中可互换地称为"AAV"或"rAAV")已在越来越多数目的临床试验中产生了有希望的结果。然而,存在可能限制AAV的效用的基因递送障碍,例如抗衣壳免疫

应答、某些组织的低转导、不能靶向递送至特定细胞类型以及相对低的携带能力。在许多情况下,使得能够有效地进行有能力改善AAV的合理设计的机制知识不足。作为备择方案,定向进化已成为产生满足特定生物医学需要的新AAV变体的策略。定向进化策略利用遗传多样化和选择过程以使得能够积累逐步改善生物分子的功能的有益突变。在所述过程中,通过几种方法使野生型AAV cap基因多样化,以产生大的基因文库,所述基因文库被包装以生成病毒颗粒文库,且然后施加选择压力以分离可以克服基因递送障碍的新变体。重要的是,对于功能的定向进化不需要知道构成基因递送问题基础的机制基础,这可以因此加速增强的载体的开发。

[0081] 一般,本文公开的变体是通过使用一个AAV文库和/或多个AAV文库产生的。通过病毒基因组工程领域的技术人员已知且可容易获得的一系列定向进化技术,通过使编码AAV衣壳的结构蛋白的基因cop基因突变而产生这种一个AAV文库或多个AAV文库。参见例如,Bartel等人Am.Soc.Gene Cell Then.15thAnnu.Meet.20,5140(2012);Bowles,D.等人J.Virol.77,423-432(2003);Gray等人Mol.Ther.18,570-578(2010);Grimm,D.等人J.Virol.82,5887-5911;Koerber,J.T.等人Mol.Then.16,1703-1709(2008);Li W.等人Mol.Ther.16,1252-1260(2008);Koerber,J.T.等人Methods Mol.Biol,434,161-170(2008);Koerber,J.T.等人Hum.Gene Then.18,367-378(2007);和Koerber,J.T.等人Mol.Ther.17,2088-2095(2009)。这种技术非限制性地如下:i)易错PCR以于预定的可修改的速率将随机点突变引入AAV cap可读框(ORF);ii)体外或体内病毒重组或“DNA混编”,以产生AAV cap基因的随机嵌合体,以产生具有多种AAV血清型的基因文库;iii)通过在cap ORF中连接简并寡核苷酸而在衣壳的限定位点处的随机肽插入;iv)使用转座酶诱变将肽编码序列限定插入AAV cap ORF的随机位置;v)用基于天然AAV血清型和变体中每个氨基酸位置的保守水平而生物信息学地设计的肽序列文库替换AAV衣壳的表面环,以产生“环交换(loop-swap)”文库;vi)在AAV血清型之间的简并性位置处的随机氨基酸取代以产生祖先变体的文库(Santiago-Ortiz等人,2015);和其这种技术的组合。

[0082] DNA混编产生嵌合体,所述嵌合体以独特且经常有益的方式组合其亲本性质;然而,一些可能不能包装,这实际上降低文库的多样性。通过肽插入技术实现文库的多样性浓缩,例如但不限于上述iii-iv)。文库的多样性也在诸如上述v)的技术中浓缩,并且这种浓缩指向位于AAV衣壳的表面暴露的环上的多个高变区。虽然许多技术产生变体衣壳,其中只有衣壳的小区域突变,但这些技术可以与额外的诱变策略配对以修饰完整的衣壳。

[0083] 一旦产生一个AAV文库或多个AAV文库,病毒然后就被包装,从而使得每个AAV颗粒由围绕编码突变衣壳的cap基因的突变衣壳组成,并纯化。然后使文库的变体经受AAV领域中的技术人员已知的并且容易获得的体外和/或体内选择性压力技术。参见例如,Maheshri,N.等人Nature Biotech,24,198-204(2006);Dalkara,D.等人Sci.Tran.sl.Med.5,189ra76(2013);Lisowski,L.等人Nature.506,382-286(2013);Yang,L.等人1PNAS,106,3946-3951(2009);Gao,G.等人Mol.Them.13,77-87(2006);和Bell,P.等人Hum.Gene.Ther.22,985-997(2011)。例如但非限制性地,可以使用以下选择AAV变体:i)亲和柱,其中不同级分的洗脱产生具有改变的结合性质的变体;ii)原代细胞-其从模仿人体细胞行为的组织样品或无限增殖细胞系分离-其产生具有提高的效率和/或组织特异性的AAV变体;iii)动物模型-其模仿临床基因治疗环境-其产生已成功感染靶组织的AAV变

体;iv)人异种移植模型,其产生已感染移植的人细胞的AAV变体;和/或其选择技术的组合。

[0084] 一旦选择了病毒,就可以通过已知技术回收它们,例如但不限于腺病毒介导复制、PCR扩增、下一代测序和克隆等。然后通过重复轮次的选择技术富集病毒克隆,并分离AAV DNA以回收所选择的感兴趣的变体cap基因。这种选择的变体可以经受进一步的修饰或突变,并且因此充当进一步选择步骤的新起点以迭代地增加AAV病毒适合度,然而,在某些情况下,已经在没有额外的突变的情况下生成了成功的衣壳。

[0085] 本文公开的AAV变体至少部分地通过使用体内定向进化方法例如上述技术产生,所述方法涉及在气溶胶施用后使用灵长类动物肺筛选(screens)。因此,本文公开的AAV变体衣壳包含氨基酸序列中的一个或多个修饰,其赋予比相应的亲本AAV衣壳蛋白对灵长类动物肺细胞更有效的转导。如本文所用的,“相应的亲本AAV衣壳蛋白”指与主题变体AAV衣壳蛋白相同的野生型或变体AAV血清型的AAV衣壳蛋白,但不包含主题变体AAV衣壳蛋白的一个或多个氨基酸序列修饰。

[0086] 在一些实施方案中,主题变体AAV衣壳蛋白相对于相应的亲本AAV衣壳蛋白包含通过共价连接插入AAV衣壳蛋白GH环或环IV中的约5个氨基酸至约20个氨基酸的异源肽。所谓AAV衣壳蛋白的“GH环”或环IV指的是本领域中称为AAV衣壳蛋白的OH环或环IV的溶剂可及部分。对于AAV衣壳的OH环/环IV,参见,例如,van Viet等人,(2006)Mol.Ther.14:809;Padron等人(2005)J.Virol,79:5047;和Shen等人,(2007)Mol.Ther.15:1955,因此,例如,插入位点可以在AAV VP1衣壳蛋白的约氨基酸411-650内。例如,插入位点可以在AAV1 VP1的氨基酸571-612内、在AAV2 VP1的氨基酸570-611内、在AAV3AVP1的氨基酸571-612内、在AAV3B VP1的氨基酸571-612内、在AAV4 VP1的氨基酸569-610内、在AAV5 VP1的氨基酸560-601内、在AAV6 VP1的氨基酸571-612内、在AAV7 VP1的氨基酸572-613内、在AAV8 VP1的氨基酸573-614内、在AAV9 VP1的氨基酸571-612内、或在AAV10 VP1的氨基酸573-614内、或其任何变体的相应氨基酸。基于各种AAV血清型的衣壳蛋白的氨基酸序列的比较,本领域技术人员将知道“对应于AAV2的氨基酸”的插入位点将在任何给定AAV血清型的衣壳蛋白中的什么地方。对于野生型AAV SEQ ID NOS:1-11的比对还参见美国申请公开No 2019/0255192的图6,其提供野生型(天然存在的)血清型AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B和AAV4-10之间和跨过其的氨基酸位置,其完整内容引入本文作为参考。

[0087] 在某些实施方案中,插入位点是位于任何野生型AAV血清型或AAV变体的VP1的氨基酸570-614之间的两个相邻氨基酸之间的单个插入位点,例如,插入位点在位于任何AAV血清型或变体的VP1的氨基酸570-610、氨基酸580-600、氨基酸570-575、氨基酸575-580、氨基酸5809585、氨基酸585-590、氨基酸590-600或氨基酸600-614中的两个相邻氨基酸之间。例如,插入位点可以在氨基酸580与581之间、氨基酸581与582之间、氨基酸583与584之间、氨基酸584与585之间、氨基酸585与586之间、氨基酸586与587之间、氨基酸587与588之间、氨基酸588与589之间或氨基酸589与590之间。插入位点可以在氨基酸575与576之间、氨基酸576与577之间、氨基酸577与578之间、氨基酸578与579之间或氨基酸579与580之间。插入位点可以在氨基酸590与591之间、氨基酸591与592之间、氨基酸592与593之间、氨基酸593与594之间、氨基酸594与595之间、氨基酸595与596之间、氨基酸596与597之间、氨基酸597与598之间、氨基酸598与599之间或氨基酸599与600之间。例如,插入位点可以在AAV2的氨基酸587与588之间、AAV1的氨基酸590与591之间、AAV3A的氨基酸588与589之间、AAV3B的氨

基酸588与589之间、AAV4的氨基酸584与585之间、AAV5的氨基酸575与576之间、AAV6的氨基酸590与591之间、AAV7的氨基酸589与590之间、AAV8的氨基酸590与591之间、AAV9的氨基酸588与589之间或AAV10的氨基酸588与589之间。在某些实施方案中,插入位点位于AAV2的氨基酸587和588之间或位于AAV2的氨基酸588和589之间。

[0088] 在一些实施方案中,本文公开的肽插入具有5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸、10个氨基酸、11个氨基酸、12个氨基酸、13个氨基酸、14氨基酸、15个氨基酸、16个氨基酸、17个氨基酸、18个氨基酸、19个氨基酸或20个氨基酸的长度。在另一个实施方案中,本文公开的肽插入在本文公开的肽插入中的任何一种的氨基末端(N-末端)和/或羧基末端(C-末端)包含1至4个间隔氨基酸。示例性间隔氨基酸包括但不限于亮氨酸(L)、丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和脯氨酸(P)。在某些实施方案中,肽插入包含在N-末端处的2个间隔氨基酸和在C-末端处的2个间隔氨基酸。在其它实施方案中,肽插入包含在N-末端处的2个间隔氨基酸和在C-末端处的1个间隔氨基酸。

[0089] 在一些实施方案中,插入肽包含选自以下的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)。

[0090] 在其他优选实施方案中,插入肽在选自以下的氨基酸序列的氨基和/或羧基末端包含1至3个间隔氨基酸(Y_1-Y_3)、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)。在某些这种实施方案中,插入肽选自LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID

NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67)。

[0091] 在一些实施方案中,主题变体AAV衣壳蛋白不包含除GH环或环IV中约5个氨基酸至约20个氨基酸的肽插入之外的任何其它氨基酸序列修饰。例如,在一些实施方案中,主题变体AAV衣壳蛋白包含包含选自以下的氨基酸序列的肽插入、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),并且变体AAV衣壳不包含任何其它氨基酸取代、插入或缺失(即,变体AAV衣壳蛋白包含所述插入,并且在其它方面与相应的AAV衣壳蛋白相同)。换句话说,包含所述插入的变体AAV衣壳蛋白在其它方面与肽已插入其中的亲本AAV衣壳蛋白相同。作为另一个实例,主题变体AAV衣壳蛋白包含具有选自以下的氨基酸序列的肽插入、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、

LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),其中肽插入位于AAV2衣壳的VP1的氨基酸587与588或另一种亲本AAV的VP1的相应氨基酸之间,例如在AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588与589之间、在AAV4的VP1的氨基酸586与587之间、在AAV5的VP1的氨基酸577与578之间、在AAV7的VP1的氨基酸589与590之间、在AAV8或AAV10的VP1的氨基酸590到591之间等,其中变体AAV衣壳蛋白序列在其它方面与相应的亲本AAV衣壳蛋白序列例如SEQ ID NOs:1-12中的任何一个相同。

[0092] 在其它实施方案中,除了包含GH环中例如如本文公开的或如本领域所已知的肽插入外,主题变体AAV衣壳蛋白与亲本AAV衣壳蛋白相比包含约1至约100个氨基酸取代或缺失,例如,1个至约5个、约2个至约4个、约2个至约5个、约5个至约10个、约10个至约15个、约15个至约20个、约20个至约25个、约25个至约50个、约50个至约100个氨基酸取代或缺失。因此,在一些实施方案中,主题变体衣壳蛋白包含与相应的亲本AAV衣壳例如SEQ ID NOs:1-12中所述的野生型衣壳蛋白具有85%或更高、90%或更高、95%或更高、或98%或更高例如或99%或更高同一性的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题变体衣壳蛋白包含与AAV2衣壳蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0093] 在进一步的实施方案中,一个或多个氨基酸取代位于如在肽插入之前编号的AAV2VP1衣壳蛋白的氨基酸残基1、6、15、16、18、30、34、37、38、57、65、66、81、91、99、101、103、109、118、120、133、134、135、136、137、138、144、164、176、188、196、200、213、220、226、236、240、250、283、312、344、347、363、368、371、376、399、428、436、449、451、456、463、469、472、484、491、524、532、535、551、585、591、593、594、608、641、688、698、705、708、719、721和/或735,或另一种AAV衣壳蛋白的一个或多个相应氨基酸残基处。在一些这种实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自如在肽插入之前编号的AAV2 VP1衣壳蛋白的Y6F、S16Y、G18E、P30L、R37L、H38Q、V65A、L91I、E99D、R103L、R103C、S109T、V118A、Q120H、E133D、E134Q、P135A、V136G、K137E、T138R、T200I、D213Y、G220R、P250S、D283E、N312K、T344S、E347D、G376A、P399H、G406E、Q428H、P436H、N449D、P451Q、N469D、D472N、T491I、K532E、K544E、R585K、A591D、A593E、D594N、D608N、H641N、K688R、N705S和V708I,或另一种AAV衣壳蛋白的一个或多个相应氨基酸残基。在其他这种实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自如在肽插入之前编号的AAV2 VP1衣壳蛋白的M1L、L15P、P34A、N57D、N66K、R81Q、Q101R、S109T、R144K、R144M、Q164K、T176P、L188I、S196Y、G226E、G236V、I240T、P250S、N312K、P363L、D368H、N449D、I456K、S463Y、D472N、R484C、A524T、P535S、N551S、A593E、I698V、V708I、V719M、S721L和L735Q,或另一种AAV衣壳蛋白的一个或多个相应氨基酸残基。在一些优选的实施方案中,主题变体衣壳蛋白包含AAV2 VP1衣壳蛋白(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基708处的氨基酸取代。在特别优选的实施方案中,主题变体衣壳蛋白包含相对于AAV2 VP1衣壳蛋白(SEQ ID NO:2)的V708I氨基酸取代,并且任选地进一步包含本文描述的一个或多

个氨基酸取代。

[0094] 在一些实施方案中,主题变体AAV衣壳蛋白赋予rAAV对一种或多种肺细胞类型增加的感染性,并且与由AAV2(野生型AAV血清型2)所表现出的抗性相比,还赋予rAAV对人AAV中和抗体增加的抗性。在一些情况下,与由AAV2(野生型AAV血清型2)表现出的抗性相比,rAAV对人AAV中和抗体表现出增加的抗性。在一些情况下,rAAV表现出的对人AAV中和抗体的抗性是由AAV2表现出的抗性的至少约1.5-倍(例如,至少约3-倍、至少约5-倍、至少约-10倍、至少约-30倍等)。在一些情况下,与由野生型AAV血清型2(AAV2)表现出的哺乳动物细胞转导相比,rAAV在有人AAV中和抗体的情况下表现出对一种或多种哺乳动物肺细胞类型的增加的转导。

[0095] 在优选的实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含a)衣壳蛋白GH-环中的肽插入,其中所述肽插入包含选自以下的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NHDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和b)与AAV2的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)相比以下氨基酸取代中的一个或多个或另一种AAV亲本血清型(即除了AAV2之外)中的相应取代,其中一个或多个取代的氨基酸不天然存在于相应位置:M1L、L15P、P34A、N57D、N66K、R81Q、Q101R、S109T、R144K、R144M、Q164K、T176P、L1881、S196Y、G226E、G236V、I2401、P250S、N312K、P363L、D368H、N449D、T456K、S463Y、D472N、R484C、A5241、P535S、N551S、A593E、I698V、V708I、V719M、S721L、L735Q和其组合。在优选实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括V708I取代。优选地,肽插入位点位于AAV2衣壳的氨基酸587与588之间或另一种AAV血清型的衣壳蛋白中的相应位置。

[0096] 在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的氨基酸587与588或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入、基本上由其组成或由其组成,所述肽插入包含氨基酸序列HDITKNI(SEQ ID NO:12),或包含氨基酸序列LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、基本上由

其组成或由其组成,并且进一步在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处包含V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或更高的氨基酸序列同一性。在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳具有与下述氨基酸序列(AAV102)具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%序列同一性、至少约99%序列同一性或100%相同的氨基酸序列:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LAHDITKNIA**RQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK
NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNYN
KSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:68)

在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含下述、基本上由其组成或由其组成:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)和HDITKNI(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列基本上由其组成或由其组成,以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在AAV1或AAV6的位置709处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列的肽插入,所述氨基酸序列包含HDITKNI(SEQ ID NO:12)、由其组成或基本上由其组成,包含氨基酸序列LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、由其组成或基本上由其组成,和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸取代。

[0097] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列HDITKNI(SEQ ID NO:12)、由其组成或基本上由其组成,或者包含氨基酸序列LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、基本上由其组成或由其组成的肽插入,并且在其他方面与

SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0098] 在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的氨基酸587与588或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列NQDYTKT(SEQ ID NO:13)由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、基本上由其组成或由其组成,并且进一步在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处包含V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或更高的氨基酸序列同一性。在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳具有与下述氨基酸序列(AAV103)具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%序列同一性、至少约99%序列同一性或100%相同的氨基酸序列:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LANQDYTKTA**RQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI
KNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:69)

在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)和NQDYTKT(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在AAV1或AAV6的位置709处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列,或包含NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、由其组成或基本上由其组成,和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸

取代。

[0099] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列NQDYTKT(SEQ ID NO:13)或者包含氨基酸序列LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、基本上由其组成或由其组成的肽插入,并且在其他方面与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0100] 在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的氨基酸587与588或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列DNTVTRS(SEQ ID NO:14)由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、基本上由其组成或由其组成,并且进一步在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处包含V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或更高的氨基酸序列同一性。在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳具有与下述氨基酸序列(AAV104)具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%序列同一性、至少约99%序列同一性或100%相同的氨基酸序列:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LADNTVTRSA**RQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI
KNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:70)

在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)和DNTVTRS(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成,以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在AAV1或AAV6的位置709处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白

包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列,或包含DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、由其组成、基本上由其组成,包含氨基酸序列LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、由其组成或基本上由其组成,和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸取代。

[0101] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、由其组成或基本上由其组成,或者包含氨基酸序列LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、基本上由其组成或由其组成的肽插入,并且在其他方面与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0102] 在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的氨基酸587与588或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、基本上由其组成或由其组成,并且进一步在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处包含V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或更高的氨基酸序列同一性。在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳具有与下述氨基酸序列(AAV105)具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%序列同一性、至少约99%序列同一性或100%相同的氨基酸序列:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LASNSVQSIA**RQAATAD
VNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK
NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNYN
KSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:71)

在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)和SNSVQSI(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成,以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在

AAV1或AAV6的位置709处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列,或包含SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、由其组成或基本上由其组成,和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸取代。

[0103] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、由其组成或基本上由其组成,或者包含氨基酸序列LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、基本上由其组成或由其组成的肽插入,并且在其他方面与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0104] 在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的氨基酸587与588或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、基本上由其组成或由其组成,并且进一步在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处包含V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或更高的氨基酸序列同一性。在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳具有与下述氨基酸序列(AAV106)具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%序列同一性、至少约99%序列同一性或100%相同的氨基酸序列:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LANSTRHTDA**RQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI
KNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:72)

在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)和NSTRHTD(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成,以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在AAV1或AAV6的位置709处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列,或包含NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、由其组成或基本上由其组成,和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸取代。

[0105] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、由其组成或基本上由其组成,或者包含氨基酸序列LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、基本上由其组成或由其组成的肽插入,并且在其他方面与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0106] 在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的氨基酸587与588或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、基本上由其组成或由其组成,并且进一步在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处包含V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或更高的氨基酸序列同一性。在特别优选的实施方案中,变体AAV衣壳具有与下述氨基酸序列(AAV107)具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%序列同一性、至少约99%序列同一性或100%相同的氨基酸序列:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLG
PFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDT
SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAG
QQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQN
DGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN
NGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL
IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSA
DNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LATNRTSPDA**RQAATA
DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILI
KNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:73)

在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)和TNRTSPD(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成,以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在AAV1或AAV6的位置709处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含氨基酸序列,或包含TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、由其组成或基本上由其组成,或包含氨基酸序列LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、由其组成或基本上由其组成,和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸取代。

[0107] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间包含氨基酸序列TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、由其组成或基本上由其组成,或者包含氨基酸序列LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、基本上由其组成或由其组成的肽插入,并且在其他方面与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0108] 在其它实施方案中,变体AAV衣壳包含AAV2的VP1的587和588氨基酸或另一种AAV衣壳的相应氨基酸之间的肽插入由其组成或基本上由其组成,所述肽插入包含选自以下的氨基酸序列:ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、

PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)和SPGATTN(SEQ ID NO:39),或者包含选自以下的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成:LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),并且进一步包含相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的一个或多个氨基酸取代。在一些方面,一个或多个氨基酸取代包括在相对于AAV2衣壳的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的残基708或另一种AAV衣壳的相应残基处的V708I氨基酸取代。变体AAV衣壳可以与SEQ ID NO:2中所述的氨基酸序列或相应的亲本AAV衣壳的整个长度具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%或更高的氨基酸序列同一性。

[0109] 在相关实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含:a)位于AAV1、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV9的VP1的氨基酸588和589、AAV4的氨基酸586和587、AAV5的氨基酸577和578、AAV7的氨基酸589和590或AAV8或AAV10的氨基酸590至591之间的肽插入,所述肽插入包含选自下述的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),以及b)在AAV3A或AAV3B的氨基酸709处的缬氨酸至异亮氨酸取代、在AAV1或AAV6的位置709

处的丙氨酸至异亮氨酸取代、在AAV4的氨基酸707或AAV9的氨基酸709处的天冬酰胺至异亮氨酸取代、或在AAV7的氨基酸710或AAV8或AAV10的氨基酸711处的苏氨酸至异亮氨酸取代、或在AAV5的氨基酸697处的谷氨酰胺至异亮氨酸取代,并且任选地在其他方面与SEQ ID NOs:1和3-12中的任一个相同。在优选的实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含选自下述的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)和SPGATTN(SEQ ID NO:39),或由选自下述的氨基酸序列组成:LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和b)与AAV2的氨基酸序列相比,在氨基酸708处缬氨酸至异亮氨酸的氨基酸取代,其中变体衣壳蛋白包含2至5个、5至10个或10至15个氨基酸取代。

[0110] 在又另一个实施方案中,变体衣壳蛋白包含a)在AAV2衣壳的氨基酸587和588之间的肽插入,所述肽插入包含选自下述的氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)和SPGATTN(SEQ ID NO:39),或者由选自下述的氨基酸序列组成:LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),并且在其他方面与SEQ ID NO:2的氨基酸序列相同。

[0111] 在另一个实施方案中,提供了变体AAV衣壳蛋白,其包含SEQ ID NO:2的wt AAV2的

氨基酸586-597的取代,包含下述氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:VPTGaEtLNvnG(SEQ ID NO:74);小写字母对应于野生型AAV2序列中的氨基酸)。换句话说,变体AAV衣壳蛋白相对于AAV2包含如下氨基酸取代:G586V、N587P、R588T、Q589、A591E、A593L、D594N和T597G。变体AAV衣壳蛋白可包含上述氨基酸取代,并且在其他方面与SEQ ID NO:2相同,或者可与SEQ ID NO:2至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

[0112] 在另一个实施方案中,提供了具有改善的对一种或多种肺细胞的向性的变体AAV衣壳蛋白,其包含SEQ ID NO:2的wt AAV2的氨基酸588-597的取代,包含下述氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成:LAPDFTTLDA(SEQ ID NO:75)。换句话说,变体AAV衣壳蛋白相对于AAV2包含如下氨基酸取代:R588L、Q589A、A590P、A591D、T592F、A593T、D594T、V595L、N596D和T597A。变体AAV衣壳蛋白可包含上述氨基酸取代,并且在其他方面与SEQ ID NO:2相同,或者可与SEQ ID NO:2至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

[0113] 在另一个实施方案中,提供了具有改善的对一种或多种肺细胞的向性的变体AAV衣壳蛋白,其包含具有选自以下的氨基酸序列的SEQ ID NO:6的wt AAV5的氨基酸575-586(SSTTAPATGTYN;SEQ ID NO:76)的取代、由其组成或基本上由其组成:TGRQNPDMSGLS(SEQ ID NO:77)TGQRALDLRGLS(SEQ ID NO:78)、TGWMSNQWLGLS(SEQ ID NO:79)、TGVSQEPWAGLS(SEQ ID NO:80)、TGVSLLVPSGLS(SEQ ID NO:81)、TGGMGSWHSGLS(SEQ ID NO:82)、TGSPLVFQAGLS(SEQ ID NO:83)、TGLYDNSHVGLS(SEQ ID NO:84)、TGDGDVGgGGLS(SEQ ID NO:85)、TGPSpNPYtGLS(SEQ ID NO:86)、TGNSGLAEAGLS(SEQ ID NO:87)和TGLYSPNDGGLS(SEQ ID NO:88)。变体AAV衣壳蛋白可以包含前述氨基酸取代,并且在其他方面与SEQ ID NO:6相同,或者可以与SEQ ID NO:6至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

[0114] 在另一个实施方案中,提供了具有改善的对一种或多种肺细胞的向性的变体AAV衣壳蛋白,其包含具有选自以下的氨基酸序列的SEQ ID NO:6的wt AAV5的氨基酸533-545(PANPGTTATYLEG;SEQ ID NO:89)的取代、由其组成或基本上由其组成:FSPTYPSVWWFQR(SEQ ID NO:90)、VMPWgLVFVCFDF(SEQ ID NO:91)、CMTAWPVDASFLN(SEQ ID NO:92)、IYLRLGIYWCAGV(SEQ ID NO:93)、GLGGSStGSRTSA(SEQ ID NO:94)、LFICFCCFYA(l)FF(SEQ ID NO:95)、IDDDCSVaGyRSW(SEQ ID NO:96)、SNGITFKDRRCLL(SEQ ID NO:97)、FMIGNKVPIA(l)Pg(SEQ ID NO:98)和IYLRLGIYWCAGN(SEQ ID NO:99)。在相关实施方案中,提供了具有改善的对一种或多种肺细胞的向性的变体AAV衣壳蛋白,其包含将SEQ ID NO:6的wt AAV5的氨基酸533-544(PANPGTTATYLE;SEQ ID NO:100)取代为以下氨基酸序列:LSTpFIVaGSGI(SEQ ID NO:101)。每个序列中的小写字母对应于野生型AAV5序列中的氨基酸。变体AAV衣壳蛋白可以包含前述氨基酸取代,并且在其他方面与SEQ ID NO:6相同,或者可以与SEQ ID NO:6至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同。

[0115] 本文公开的AAV变体通过使用体内定向进化生成,包括在气溶胶施用后使用灵长类动物肺筛选。在一些实施方案中,本文公开的变体衣壳蛋白在存在于AAV病毒粒子中时,与包含相应亲本AAV衣壳蛋白或野生型AAV的AAV病毒粒子对肺细胞的转导相比,赋予增加的肺细胞的转导。例如,在一些实施方案中,当存在于AAV病毒粒子中时,本文公开的变体衣壳蛋白比包含相应亲本AAV衣壳蛋白或野生型AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子赋予对灵长类动物肺细胞更有效的转导,例如,肺细胞接受比包含亲本AAV衣壳蛋白或野生型AAV的AAV病毒粒子更多的包含主题变体AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子。在一些这种实施方案中,与通过野

生型AAV病毒粒子或包含相应亲本AAV衣壳蛋白的rAAV转导肺细胞相比,AAV变体病毒粒子或变体rAAV表现出至少2-倍、至少5-倍、至少10-倍、至少-15倍、至少20-倍、至少25-倍、至少50-倍或不止50-倍的增加的肺细胞转导。在某些这种实施方案中,当存在于AAV病毒粒子中时,本文公开的变体衣壳蛋白比包含相应亲本AAV衣壳蛋白或野生型AAV衣壳蛋白的AAV病毒粒子赋予对灵长类动物肺细胞更广泛的转导。换句话说,变体AAV病毒粒子转导未被包含相应亲本AAV衣壳蛋白的病毒粒子转导的细胞类型,且因此在肺中转导比相应亲本AAV病毒粒子更多类型的细胞。在一些实施方案中,AAV变体病毒粒子优先转导肺细胞,例如,主题rAAV病毒粒子感染一种肺细胞的特异性为另一种肺细胞或非肺细胞例如肺外面的细胞的2-倍、5-倍、10-倍、15-倍、20-倍、25-倍、50-倍或不止50-倍。在一些实施方案中,转导的肺细胞是上呼吸道细胞。在一些实施方案中,肺细胞是上呼吸道上皮细胞。在一些实施方案中,肺细胞是肺泡上皮细胞。在一些实施方案中,肺细胞是初级、次级或三级支气管上皮细胞。在一些实施方案中,肺细胞是气管上皮细胞。在一些实施方案中,肺细胞是纤毛呼吸道上皮细胞。在一些实施方案中,肺细胞是肺泡上皮1型(AECI)细胞或2型(AECII)细胞。在一些实施方案中,肺细胞是平滑肌细胞。在一些实施方案中,肺细胞是内皮细胞。通过任何数目的本领域中用于测量基因表达的方法,可以容易地在体外或体内评估肺细胞转导的增加,例如,增加的转导效率、更广泛的转导、更优先的转导等。例如,AAV可以与包含表达盒的基因组一起包装,所述表达盒包含在遍在的或组织特异性启动子的控制下的报道基因,例如荧光蛋白,并且通过由例如荧光显微镜检术检测荧光蛋白来评估转导程度。作为另一个实例,AAV可以与包含加条形码的核酸序列的基因组一起包装,并且通过由例如PCR检测核酸序列来评估转导程度。作为另一个实例,AAV可以与包含表达盒的基因组一起包装,所述表达盒包含用于治疗肺疾病的治疗用基因,并且通过检测施用AAV的受折磨的患者中肺疾病的治疗来评估转导程度。

[0116] 本文提供了将异源核酸递送至肺细胞的方法,包括使所述肺细胞与rAAV病毒粒子接触,所述rAAV病毒粒子包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ IDNO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、

LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸。在一些实施方案中,方法是体外或先体外后体内方法。在一些实施方案中,异源核酸编码蛋白和/或短干扰RNA。在一些优选实施方案中,肺细胞是肺或气管的任何细胞。在其他优选实施方案中,肺细胞是呼吸道上皮细胞,包括但不限于肺泡上皮细胞、支气管(初级、次级或三级)上皮细胞或气管上皮细胞。在一些优选的方面,肺细胞是纤毛呼吸道上皮细胞。在一些优选的方面,肺细胞是肺泡上皮1型(AECI)或2型(AECII)细胞。在其他实施方案中,肺细胞是平滑肌或内皮细胞。在其他实施方案中,肺细胞是基细胞、杯形细胞或卵母细胞。

[0117] 本文还提供了将异源核酸递送至主体(例如,人主体)的肺的方法,包括向所述主体施用rAAV病毒粒子,所述rAAV病毒粒子包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ IDNO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸。在一些实施方案中,异源核酸编码蛋白和/或短干扰RNA。在相关实施方案中,将异源核酸递送至主体(例如,人主体)的上呼吸道、鼻咽、窦、口/颊区和/或唾液腺的方法包括向所述主体施用rAAV病毒粒子,所述rAAV病毒粒子包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:

29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ IDNO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸。在相关方面,rAAV或包含其的药物组合物通过肺、支气管内、鼻内、气管内和/或支气管内施用给所述主体施用。在优选的方面,将异源核酸递送至主体的肺将一种或多种编码的基因产物递送至所述主体的肺。基因产物的用途包括,但不限于,增强细胞中因子的水平、通过因子的分泌增强邻近细胞中因子的水平、降低细胞中因子的水平或通过因子的分泌降低邻近细胞中因子的水平。基因产物可被进行设计以补充缺陷或缺失的基因产物的水平(例如,基因产物可以是治疗用替代基因)、降低缺陷基因产物的水平(例如,基因产物可以是干扰RNA,例如siRNA或miRNA,其减少缺陷基因产物的表达)、引入新的支持性基因产物、补充支持性基因产物的水平、降低阻碍性基因产物的水平或降低阻碍性基因产物的水平和引入或补充支持性基因产物的水平两者。

[0118] 本文还提供了用于治疗肺病的方法,包括向有需要的主体施用治疗有效量的重组AAV(rAAV),所述重组AAV包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ IDNO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、

LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸,所述一种或多种基因产物可操作地连接到启动子。本文还提供了重组AAV(rAAV)用于治疗肺病的用途,所述重组AAV包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ IDNO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸,所述一种或多种基因产物可操作地连接到启动子。本文还提供了重组AAV(rAAV)在制备用于治疗肺病的药物中的用途,所述重组AAV包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID

NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)包含编码一种或多种基因产物的核苷酸序列的异源核酸,所述一种或多种基因产物可操作地连接到启动子。在一些方面,异源核酸包含编码多个基因产物的核苷酸序列,在这种情况下,所述多个(例如,2个)基因产物的表达可以由多个(例如,2个)独立的启动子介导,或者可以由单个启动子介导,其中多个转基因由内部核糖体进入位点(IRES)或2A肽序列隔开。在优选实施方案中,异源核酸编码治疗用蛋白和/或治疗用短干扰RNA。在相关方面,由rAAV递送的一种或多种基因产物降低阻碍性基因产物的水平和/或引入或补充支持性基因产物的水平。

[0119] 可使用本文公开的变体rAAV载体或病毒粒子和/或方法治疗的肺病包括,但不限于,单基因病、复杂遗传病、后天性疾病和创伤性损伤。在一些方面,肺病选自慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPF)、囊性纤维化、肺动脉高压、肺性高血压、肺癌(原发性、继发性和转移性)、表面活性剂缺乏、病毒和/或细菌感染、急性支气管炎、肺炎(包括病毒性、细菌性和真菌性肺炎)、呼吸道感染(包括咽炎、哮吼、曲霉、coocidiomycosis、汉塔病毒性肺综合征和组织胞浆菌病)、化学性和过敏性肺炎、结核病和其他分枝杆菌感染(包括但不限于鸟分枝杆菌)、结节病、呼吸道合胞病毒、肺水肿、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、尘肺(包括黑肺病、石棉肺和矽肺)、间质性肺病(包括结节病和自身免疫病)、肺栓塞、胸腔积液、胸膜炎、间皮瘤、气胸、急性支气管炎、细支气管炎(包括闭塞性细支气管炎)、婴儿猝死综合征、睡眠呼吸暂停、支气管扩张、支气管肺发育不良、隐源性机化性肺炎、电子烟使用相关性肺损伤(EVALI)、中东呼吸综合征(MERS)、原发性睫运动障碍、重症急性呼吸综合征(SARS)、α-1-抗胰蛋白酶缺乏、哮喘、间质性肺病和COVID-19(冠状病毒病2019)。

[0120] 在某些方面,可以被靶向用于治疗IPF的基因包括,但不限于,SFTPA1(表面活性剂A1)和窖蛋白-1。可以被靶向用于治疗COPD的基因包括,但不限于,编码α-1-抗胰蛋白酶、α-1-抗胰凝乳蛋白酶、α-1-巨球蛋白、基质金属蛋白酶1(MMP1)、基质金属蛋白酶12(MMP12)、微粒体环氧化物酶、CYP1A1、谷胱甘肽S-转移酶、血红素加氧酶-1、TGF-β-1、TNF-α、IL-1复合物、IL-8、IL-13、人白细胞抗原(HLA-B7和Bw16)、维生素D结合蛋白和β-2-肾上腺素能受体或其生物活性部分的基因。

[0121] 在一些方面,提供了治疗COVID-19的方法,包括向有需要的主体施用治疗有效量的重组AAV(rAAV),所述重组AAV包含(i)主题变体AAV衣壳蛋白和(ii)异源核酸,所述异源核酸包含可操作地连接到一个或多个启动子的编码一种或多种基因产物的核苷酸序列,或包含所述rAAV的药物组合物,其中所述一种或多种基因产物敲低、修饰和/或超表达病毒基因产物或宿主细胞基因以降低或消除病毒在肺或鼻咽中的致病性或复制和/或表达针对病毒上表位的中和抗体。

[0122] 在一些方面,提供了治疗IPF的方法,包括向有需要的主体施用治疗有效量的重组AAV(rAAV),所述重组AAV包含(i)主题变体AAV衣壳蛋白和(ii)异源核酸,所述异源核酸包含可操作地连接到一个或多个启动子的编码一种或多种基因产物的核苷酸序列,或包含所述rAAV的药物组合物。在一些优选实施方案中,提供了用于治疗IPF的rAAV,所述rAAV包含

主题变体AAV衣壳蛋白和核酸,所述核酸包含编码SFTPA1和/或窖蛋白-1或其生物活性部分的核苷酸序列。

[0123] 在一些方面,提供了治疗COPD的方法,包括向有需要的主体施用治疗有效量的重组AAV(rAAV),所述重组AAV包含(i)主题变体AAV衣壳蛋白和(ii)异源核酸,所述异源核酸包含可操作地连接到一个或多个启动子的编码一种或多种基因产物的核苷酸序列,或包含所述rAAV的药物组合物。在一些优选实施方案中,提供了用于治疗COPD的rAAV,所述rAAV包含主题变体AAV衣壳蛋白和核酸,所述核酸包含编码α-1-抗胰蛋白酶或其生物活性部分的核苷酸序列。

[0124] 在一些优选的方面,提供了包含主题变体AAV衣壳和编码CFTR或其生物活性部分的核酸的rAAV,其用于治疗如本文所述的囊性纤维化或与其有关的肺疾病,或用于制备用于治疗囊性纤维化或与其有关的肺疾病的药物。优选地,编码CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列可操作地连接到表达控制序列。在一些实施方案中,编码人CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列编码天然人CFTR蛋白并且具有以下序列或与其至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列:

ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTTCAGC
TGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCAGA
CATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGA
AAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAATG
CCCTTCGGCGATGTTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTT
AGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTT
CCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATA
GGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTTG
GCCTTCATCACATTGGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATA
AGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAGTATTGGACAA
CTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTG
GCACATTTCGTGTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATC
TGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCCTGATAGTCCTT
GCCCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAG
AGCTGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATTGAAAATA
TCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAA
AACTTAAGACAAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATA
CTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTG
CTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATC
TCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTA
CAAACATGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACA
AAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGA
TGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAA
GCAAAACAAAACAATAACAATAGAAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTT
CTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAAGATATTAATTTCAAG
ATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGAC
TTCACTTCTAATGGTGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAATTA
AGCACAGTGGAAGAATTTCATTCTGTTCTCAGTTTTCCTGGATTATGCCTGGCA

CCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGATACAGAA
GCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAA
GACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGC
AAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGA
CTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGAAAGCTG
TGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGA
ACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATT
TTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAAC
TCATGGGATGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCAATCC
TAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGA
CAGAAACAAAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAG
GAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTTCCATTGTGCA
AAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTTAG
AGAGAAGGCTGTCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGGAGAGGCGATACTGCCT
CGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTC
TGTCCTGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAA
AGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAGGCAAACTTGACT
GAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAAGAAACTGGCTTGGAAATAAG
TGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCTTTTTTGATGATATGGAGA
GCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCGATATATTACTGTCCACA
AGAGCTTAATTTTTGTGCTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGG
CTGCTTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAG
GGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACC
AGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCT
ATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTCGAAA
ATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTC
AACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGCAAT
TTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATT
GTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCA
ACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCTCCAAACC
TCACAGCAACTCAAACAACTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCA
TCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCC
TTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTT
CTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGT

CATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTTAACAACAGGAGAAGGAGA
AGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCA
GTGGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATCTGTGAGCC
GAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACC
AAACCATACAAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACA
CGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATC
TCACAGCAAAATACACAGAAGGTGGAAATGCCATATTAGAGAACATTTCCTTC
TCAATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAA
GAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCA
GATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCT
TTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACT
TGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAG
GTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTT
GTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGC
TAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCTCA
TTTGGATCCAGTAACATACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTTG
CTGATTGCACAGTAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGC
CAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAAGTGCGGCAGTACGATTCCATCCA
GAAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACA
GGGTGAAGCTCTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCCAG
ATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATACAAGGCTTT
AG (SEQ ID NO:102)

在优选实施方案中,编码人CFTR或生物活化的截短的CFTR蛋白的核苷酸序列经过密码子优化用于在人中表达。在一些实施方案中,核苷酸序列编码缺乏氨基酸708-759的生物活性截短的人CFTR蛋白并且包含以下核苷酸序列或与其至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%相同的序列:

ATGCAGCGCAGCCCACTGGAGAAGGCAAGCGTGGTGTCCAAGCTGTTCTTTTC
CTGGACCAGGCCTATCCTGAGGAAGGGATACAGGCAGCGGCTGGAGCTGAGC
GACATCTATCAGATCCCTTCTGTGGACAGCGCCGATAATCTGTCCGAGAAGCTG
GAGAGAGAGTGGGATAGGGAGCTGGCCTCTAAGAAGAACCCAAAGCTGATCA

ATGCCCTGCGGAGATGCTTCTTTTGGCGGTTCATGTTCTACGGCATCTTCCTGTA
TCTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCACTGCTGCTGGGCAGAATCATCG
CCTCTTACGACCCCGATAACAAGGAGGAGAGGAGCATCGCCATCTATCTGGGC
ATCGGCCTGTGCCTGCTGTTTATCGTGAGGACACTGCTGCTGCACCCAGCCATC
TTCGGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGAGAATCGCCATGTTCAGCCTGATC
TACAAGAAGACCCTGAAGCTGAGCTCCAGGGTGCTGGACAAGATCTCCATCGG
CCAGCTGGTGTCCCTGCTGTCTAACAATCTGAACAAGTTTGATGAGGGACTGGC
CCTGGCACACTTCGTGTGGATCGCACCACTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCT
GATCTGGGAGCTGCTGCAGGCAAGCGCCTTTTGCGGACTGGGCTTCCTGATCGT
GCTGGCCCTGTTCCAGGCAGGACTGGGACGCATGATGATGAAGTACAGAGACC
AGAGGGCCGGCAAGATCTCTGAGCGGCTGGTCATCACCAGCGAGATGATCGAG
AACATCCAGTCCGTGAAGGCCTATTGTTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGAT
CGAGAATCTGCGCCAGACAGAGCTGAAGCTGACCAGAAAGGCCGCCTACGTG
AGGTACTTCAACTCTAGCGCCTTCTTTTTCTCTGGCTTTTTCGTGGTGTTCCTGA
GCGTGCTGCCATACGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGCGGAAGATCTTTACCA
CAATCTCCTTCTGCATCGTGCTGAGAATGGCCGTGACAAGGCAGTTTCCCTGGG
CCGTGCAGACCTGGTATGACTCTCTGGGCGCCATCAATAAGATCCAGGATTTCC
TGCAGAAGCAGGAGTACAAGACACTGGAGTATAACCTGACCACAACCGAGGT
GGTCATGGAGAATGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTTGGCGAGCTGTTCG
AGAAGGCCAAGCAGAACAATAACAATCGCAAGACATCTAACGGCGACGATAG
CCTGTTTTTCAGCAATTTTTCCCTGCTGGGCACCCCCGTGCTGAAGGACATCAA
CTTCAAGATCGAGAGGGGACAGCTGCTGGCAGTGGCAGGCTCCACAGGCGCCG
GCAAGACCTCTCTGCTGATGATGATCATGGGCGAGCTGGAGCCAAGCGAGGGC
AAGATCAAGCACTCCGGCCGGATCTCTTTTTGCAGCCAGTTCTCCTGGATCATG
CCCGGCACCATCAAGGAGAATATCATCTTTGGCGTGTCCTACGATGAGTACAG
ATATAGGTCTGTGATCAAGGCCTGTCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTCG
CCGAGAAGGATAACATCGTGCTGGGCGAGGGCGGCATCACACTGAGCGGAGG
ACAGAGGGCAAGGATCTCCCTGGCCAGAGCCGTGTACAAGGACGCCGATCTGT
ATCTGCTGGACAGCCCCTTTGGCTATCTGGATGTGCTGACCGAGAAGGAGATCT
TCGAGTCCTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAATAAGACAAGGATCCTGGTGACC
TCTAAGATGGAGCACCTGAAGAAGGCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGG
CTCCTCTTACTTTTATGGCACATTCAGCGAGCTGCAGAATCTGCAGCCTGACTT
CAGCTCCAAGCTGATGGGCTGTGACTCCTTTGATCAGTTCTCTGCCGAGAGGCG
CAACTCCATCCTGACAGAGACCCTGCACAGATTCTCTCTGGAGGGCGACGCAC

CCGTGAGCTGGACAGAGACCAAGAAGCAGTCCTTTAAGCAGACCGGCGAGTTC
GGCGAGAAGAGGAAGAATTCTATCCTGAACCCTATCAATAGCACACTGCAGGC
CCGGAGAAGGCAGTCTGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCC
AGAATATCCACAGAAAGACAACCGCCAGCACAAGGAAGGTGTCCCTGGCACCT
CAGGCAAACCTGACCGAGCTGGACATCTACTCCCGCCGGCTGTCTCAGGAGAC
CGGACTGGAGATCTCTGAGGAGATCAATGAGGAGGATCTGAAGGAGTGCTTTT
TCGACGATATGGAGAGCATCCCAGCCGTGACAACCTGGAACACATACCTGCGC
TATATCACCGTGCACAAGTCCCTGATCTTTGTGCTGATCTGGTGTCTGGTCATCT
TCCTGGCAGAGGTGGCAGCATCTCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACA
CCCCTGCAGGACAAGGGCAATTCTACCCACAGCCGCAACAATTCCTACGCCGT
GATCATCACATCTACCTCTAGCTACTACGTGTTCTACATCTATGTGGGCGTGGC
CGATACACTGCTGGCCATGGGCTTTTTCCGGGGCCTGCCCCTGGTGCACACACT
GATCACCGTGAGCAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGG
CCCCTATGTCCACACTGAACACCCTGAAGGCCGGCGGCATCCTGAATCGGTTTT
CCAAGGACATCGCCATCCTGGACGATCTGCTGCCTCTGACCATCTTTGATTTCA
TCCAGCTGCTGCTGATCGTGATCGGAGCAATCGCAGTGGTGGCCGTGCTGCAG
CCTTACATCTTCGTGGCCACAGTGCCAGTGATCGTGGCCTTTATCATGCTGCGC
GCCTATTTCCTGCAGACCAGCCAGCAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCCG
GTCCCCTATCTTTACACACCTGGTGACCTCCCTGAAGGGACTGTGGACACTGAG
GGCCTTCGGCCGGCAGCCATACTTTGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCT
GCACACAGCCAATTGGTTTCTGTATCTGAGCACCCTGCGCTGGTTTCAGATGCG
GATCGAGATGATCTTCGTGATCTTTTTCATCGCCGTGACCTTCATCTCCATCCTG
ACAACCGGAGAGGGAGAGGGAAGAGTGGGAATCATCCTGACACTGGCCATGA
ACATCATGTCTACCCTGCAGTGGGCCGTGAATTCCTCTATCGACGTGGATAGCC
TGATGAGATCTGTGAGCAGGGTGTTTAAGTTCATCGACATGCCCACAGAGGGC
AAGCCTACAAAGAGCACCAAGCCATACAAGAACGGCCAGCTGTCCAAAGTGA
TGATCATCGAGAATTCTCACGTGAAGAAGGACGATATCTGGCCATCCGG (SEQ
ID NO:103)

优选地,编码CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列可操作地连接到表达控制序列。在一些方面,启动子是组成型启动子,任选地是截短的巨细胞病毒立即/早期(CMVie)增强子/启动子,并且可操作地连接到编码人CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列。在其他方面,启动子是组织特异性启动子,优选地,其中所述启动子指导核酸在肺细胞中的优先表达,并且可操作地连接到编码人CFTR或其生物活性部分的核苷酸序列。在优选实施方案中,启动子是截短的CMVie启动子并且可操作地连接到编码人CFTR或其生物活性部分的核苷酸

序列。在特别优选的实施方案中,CMVie启动子是具有以下序列或与其至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的序列的CMV173:

ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTT
GGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
TTTAGTGAACCGT (SEQ ID NO:104)

在特别优选的实施方案中,rAAV载体包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)从5'到3'包含下述的核酸:(a)AAV2末端重复序列(b)启动子(c)编码人囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)蛋白或缺少人CFTR蛋白序列的氨基酸708-759的生物活性截短的CFTR蛋白的核苷酸序列(d)聚腺苷酸化序列以及(e)AAV2末端重复序列。

[0125] 在一些方面,向主体施用有效改善囊性纤维化的一个或多个特征的一定量的rAAV,所述特征的非限制性例子包括上呼吸道和下呼吸道炎症、异常上皮细胞因子信号传导和升高的IgE水平。在其他方面,本文提供了用于治疗与囊性纤维化有关的肺疾病的方法,包括但不限于与囊性纤维化有关的上呼吸道疾病、下呼吸道疾病、鼻咽疾病、窦炎和/或唾液疾病,包括向主体施用治疗有效量的感染性rAAV,所述感染性rAAV包含(i)衣壳蛋白,所述衣壳蛋白包含选自以下的肽插入、由其组成或基本上由其组成:HDITKNI(SEQ ID NO:12)、NQDYTKT(SEQ ID NO:13)、DNTVTRS(SEQ ID NO:14)、SNSVQSI(SEQ ID NO:15)、NSTRHTD(SEQ ID NO:16)、TNRTSPD(SEQ ID NO:17)、ISDQTKH(SEQ ID NO:18)、QADTTKN(SEQ ID NO:19)、NAVKTDF(SEQ ID NO:20)、TNQTLSA(SEQ ID NO:21)、ENRTTSN(SEQ ID NO:22)、PQQDTTH(SEQ ID NO:23)、NATNHVI(SEQ ID NO:24)、TNNSKPD(SEQ ID NO:25)、SKLTLNN(SEQ ID NO:

26)、VTAGMGA(SEQ ID NO:27)、PNSTTNN(SEQ ID NO:28)、NSTSRID(SEQ ID NO:29)、VASHTNN(SEQ ID NO:30)、RSHQEIP(SEQ ID NO:31)、LNTTKDI(SEQ ID NO:32)、IIDATKN(SEQ ID NO:33)、NHISQTN(SEQ ID NO:34)、SNSAHIT(SEQ ID NO:35)、STHQSNN(SEQ ID NO:36)、KTPNLTS(SEQ ID NO:37)、SNTPALS(SEQ ID NO:38)、SPGATTN(SEQ ID NO:39)、LAHDITKNIA(SEQ ID NO:40)、LANQDYTKTA(SEQ ID NO:41)、LADNTVTRSA(SEQ ID NO:42)、LASNSVQSIA(SEQ ID NO:43)、LANSTRHTDA(SEQ ID NO:44)、LATNRTSPDA(SEQ ID NO:45)、LAISDQTKHA(SEQ ID NO:46)、LAQADTTKNA(SEQ ID NO:47)、LANAVKTDFA(SEQ ID NO:48)、LATNQTLSAA(SEQ ID NO:49)、LAENRTTSNA(SEQ ID NO:50)、LAPQQDTTHA(SEQ ID NO:51)、LANATNHVIA(SEQ ID NO:52)、LATNNSKPDA(SEQ ID NO:53)、LASKLTLNNA(SEQ ID NO:54)、LAVTAGMGAA(SEQ ID NO:55)、LAPNSTTNNA(SEQ ID NO:56)、LANSTSRIDA(SEQ ID NO:57)、LAVASHTNNA(SEQ ID NO:58)、LARSHQEIPA(SEQ ID NO:59)、LALNTTKDIA(SEQ ID NO:60)、LAIIDATKNA(SEQ ID NO:61)、LANHISQTNA(SEQ ID NO:62)、LASNSAHITA(SEQ ID NO:63)、LASTHQSNNA(SEQ ID NO:64)、LAKTPNLTSA(SEQ ID NO:65)、LASNTPALSA(SEQ ID NO:66)和LASPGATTNA(SEQ ID NO:67),和(ii)核酸,其包含可操作地连接到启动子的编码人囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)蛋白或缺少人CFTR蛋白序列的氨基酸708-759的生物活性截短的CFTR蛋白的核苷酸序列。

[0126] 可以通过多种方式将包含主题变体衣壳蛋白的本发明的rAAV基因治疗载体施用于患者,以在靶细胞(例如,上呼吸道细胞)中实现和维持治疗有效水平的基因产物(例如,CFTR或其生物活性部分)。在一些方面,将感染性rAAV以一个或多个剂量施用于主体(例如,患有囊性纤维化的主体),每个剂量包含约$1x10^{13}$-约$1x10^{15}$载体基因组(vg)、约$1x10^{13}$-约$1x10^{14}$vg、约$1x10^{14}$-约$1x10^{15}$vg或约$1x10^{15}$-约$5x10^{15}$vg。在一些优选方面,每个剂量包含约$1x10^{14}$vg或约$1x10^{15}$vg的rAAV。在其他方面,向主体施用至少一剂约10^{12}-10^{14}载体基因组(vg)/kg的rAAV以治疗肺病。在相关方面,向主体施用约$1x10^{11}$-约$1x10^{14}$vg/kg、约$1x10^{12}$-约$9x10^{13}$vg/kg、约$1x10^{12}$vg/kg-约$9x10^{12}$vg/kg,优选约$2x10^{12}$vg/kg-约$3x10^{12}$vg/kg,更优选约$2.6x10^{12}$vg/kg、约$2.7x10^{12}$vg/kg、约$2.8x10^{12}$vg/kg、约$2.9x10^{12}$vg/kg约$3.0x10^{12}$vg/kg或约$3.1x10^{12}$vg/kg。

[0127] 在一些方面,治疗包括向主体不多于单剂量施用并有效实现基因产物(例如,CFTR或其生物活性部分)的持久和维持的治疗浓度。在相关方面,治疗包括向人(例如,患有囊性纤维化的人)通过吸入约$1x10^{13}$-约$1x10^{15}$噬斑块形成单位(pfu)、病毒颗粒(vp)或病毒基因组(vg)的rAAV的不多于单剂量施用,所述rAAV包含主题变体衣壳蛋白和编码基因产物的异源核酸。在其他方面,剂量治疗可以是多剂量时间表。Kay等人以前已描述了关于将AAV载体施用于人的方法(2000,Nat Genet 24:257-261),其整个内容引入本文作为参考。在一些优选的实施方案中,通过肺、支气管内、鼻内、气管内和/或支气管内施用将感染性rAAV施用于主体。在一些优选的实施方案中,通过吸入包含rAAV的气溶胶悬浮液(例如,经由雾化器)来施用感染性rAAV。

[0128] 为了本发明起见,本文的公开内容提供了分离的核酸,其包含编码如上所述的主题变体AAV衣壳蛋白的核苷酸序列。分离的核酸可以是AAV载体,例如重组AAV载体。

[0129] 本文的公开内容进一步提供了宿主细胞,例如但不限于包含主题核酸的分离的(基因修饰的)宿主细胞。本文公开的根据本发明的宿主细胞可以是分离的细胞,如来自体

外细胞培养物的细胞。如本文所述的,这种宿主细胞用于产生主题rAAV变体病毒粒子。在一个实施方案中,用核酸对这种宿主细胞进行稳定地基因修饰。在其它实施方案中,用核酸对宿主细胞进行瞬时基因修饰。使用确立的技术将这种核酸稳定地或瞬时地引入宿主细胞中,所述技术包括但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、脂质体介导的转染等。对于稳定转化,核酸将通常进一步包含选择标记,例如,几种众所周知的选择标记中的任何一种,如新霉素抗性等。通过将核酸引入多种细胞中的任何一种中来产生这种宿主细胞,所述多种细胞例如哺乳动物细胞,包括例如鼠细胞和灵长类动物细胞(例如,人细胞)。示例性的哺乳动物细胞包括,但不限于,原代细胞和细胞系,其中示例性的细胞系包括,但不限于,293细胞、COS细胞、HeLa细胞、Vero细胞、3T3小鼠成纤维细胞、C3H10T1/2成纤维细胞、CHO细胞等。示例性的宿主细胞包括,但不限于,HeLa细胞(例如,美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)No.CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC Nos.CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC No.CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC No.CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC No.CCL10)、PC12细胞(ATCC No.CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC No.CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC No.CCL1.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCCNo.CRL1573)、HLHepG2细胞等等。还可以使用杆状病毒感染昆虫细胞如Sf9细胞来制备宿主细胞,其产生AAV(参见,例如,美国专利号7,271,002;美国专利申请序列号12/297,958)。在一些实施方案中,除了如上所述包含编码变体AAV衣壳蛋白的核苷酸序列的核酸之外,基因修饰宿主细胞包含核酸,所述核酸包含编码一种或多种AAV rep蛋白的核苷酸序列。在其它实施方案中,宿主细胞进一步包含rAAV变体载体。可以使用这种宿主细胞产生rAAV变体病毒粒子。在例如美国专利公开号2005/0053922和美国专利公开号2009/0202490中描述了产生rAAV病毒粒子的方法。

[0130] 在本文公开的变体rAAV载体的一些实施方案中,编码感兴趣的基因产物的核苷酸序列可操作地连接到组成型启动子。合适的组成型启动子包括例如巨细胞病毒启动子(CMV)(Stinski等人,(1985)Journal of Virology 55(2):431-441)、CMV早期增强子/鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子/兔β-珠蛋白内含子(CAG)(Miyazaki等人(1989)Gene 79(2):269-277、C^{SB}(Jacobson等人(2006)Molecular Therapy 13(6):1074-1084)、人延伸因子1α启动子(EF1α)(Kim等人(1990)Gene 91(2):217-223)、人磷酸甘油酸激酶启动子(PGK)(Singer-Sam等人(1984)Gene 32(3):409-417、线粒体重链启动子(Loderio等人(2012)PNAS109(17):6513-6518)、泛素启动子(Wulff等人(1990)FEBS Letters 261:101-105)。在其他实施方案中,编码感兴趣的基因产物的核苷酸序列可操作地连接到诱导型启动子。在一些情况下,编码感兴趣的基因产物的核苷酸序列可操作地连接到组织特异性或细胞类型特异性的调节元件。例如,在一些情况下,编码感兴趣的基因产物的核苷酸序列可操作地连接到肺特异性调节元件,例如,赋予可操作地连接的基因在肺细胞中选择性表达的调节元件。肺特异性启动子包括,但不限于,表面活性蛋白B(SPB)基因启动子和表面活性蛋白C(SPC)启动子。

[0131] 本文还提供了药物组合物,其包含:a)包含主题变体AAV衣壳蛋白和编码一种或多种基因产物的异源核酸的rAAV;和b)药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或缓冲剂。在一些优选实施方案中,核酸包含编码治疗用基因和/或编码干扰RNA的核苷酸序列。在一些实施方案中,药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或缓冲剂适合于在人或非人患者中使用。

这种赋形剂、载体、稀释剂和缓冲剂包括可以在没有过度毒性的情况下施用的任何药学试剂。药学上可接受的赋形剂包括,但不局限于,液体,例如水、盐水、甘油以及乙醇。其中可以包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。此外,在这种媒介物中可以存在辅助物质,如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等。多种药学上可接受的赋形剂是本领域已知的,且无需在本文详细讨论。已在多种出版物中详细描述了药学上可接受的赋形剂,包括,例如A.Gennaro(2000)"Remington:The Science and Practice ofPharmacy,"第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等人,编,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;和Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等人,编,第3版Amer.PharmaceuticalAssoc.。

[0132] 在一些实施方案中,药物组合物包含$1x10^{8}$-$1x10^{15}$载体颗粒或载体基因组,$1x10^{10}$-$1x10^{13}$载体颗粒或载体基因组,或约$1x10^{10}$、约$2x10^{10}$、$3x10^{10}$、约$4x10^{10}$、约$5x10^{10}$、约$6x10^{10}$、约$7x10^{10}$、约$8x10^{10}$、约$9x10^{10}$、约$1x10^{11}$、约$2x10^{11}$、约$3x10^{11}$、约$4x10^{11}$、约$5x10^{11}$、约$6x10^{11}$、约$7x10^{11}$、约$8x10^{11}$、约$9x10^{11}$、约$1x10^{12}$、约$2x10^{12}$、约$3x10^{12}$、约$4x10^{12}$、约$5x10^{12}$、约$6x10^{12}$、约$7x10^{12}$、约$8x10^{12}$、约$9x10^{12}$或约$1x10^{13}$载体颗粒或载体基因组。在一些方面,药物组合物包含约$1x10^{11}$-约$1x10^{12}$载体颗粒或载体基因组。

实施例

以下实施例举例说明了本发明的优选实施方案,但不意图以任何方式限制本发明的范围。尽管已经关于其优选实施方案描述了本发明,但是对于本领域技术人员来说,根据阅读本申请,其各种修改将是显而易见的。

[0134] 实施例1

采用定向进化筛选来鉴定AAV衣壳变体,所述AAV衣壳变体能够赋予在向非人灵长类动物(NHP)进行气管内气溶胶施用后更有效的灵长类动物肺转导和增强的向灵长类动物肺上呼吸道细胞的基因递送效率。选择过程包括向体内NHP肺和体外人肺培养物递送的使用。

[0135] 方法

治疗用载体进化

采用定向进化过程来发现能够在气溶胶施用后广泛转导灵长类动物肺中上呼吸道细胞的AAV衣壳变体(图1)。简而言之,使用各种分子生物学技术和几种不同的AAV血清型作为模板,从37个不同的专有子文库产生了约10亿个独特的合成变体AAV衣壳序列的文库。所述文库被包装在HEK293T细胞中以产生病毒颗粒,从而使得每个病毒颗粒由围绕编码相同衣壳的病毒基因组的合成衣壳壳组成。然后使文库内的变体经受在NHP和人细胞培养物中的体内和体外选择压力技术,以模仿临床基因疗法治疗。对于第一轮选择注射所有合成文库。从肺组织或细胞培养物收获DNA后,然后如上所述包装从组织扩增的衣壳基因组,作为下一轮选择的起始文库。所述过程进行了总共五个循环。

[0136] 当满足某些选择标准时,基序被宣布为"命中":(1)基序代表两个或更多个连续轮次的选择中一定百分比的测序的群体,或(2)基序代表一个或多个轮次的选择中一定百分

比的测序的群体。

[0137] 模型系统从体内NHP转变为体外近端呼吸道器官型培养的点基于第二轮和第三轮NHP递送后进行的测序分析的结果(图2)。简而言之,当(1)最频繁的命中代表了一定百分比的测序的群体,且(2)少于一定百分比的测序的克隆代表独特序列时,发生向体外人ALI模型系统的转变。

[0138] 当满足以下选择完成标准时,选择被认为完成:在轮次中鉴定了少于两个新的"命中",并且(1)组合的"命中"代表一定百分比的测序的群体和/或(2)单个"命中"代表一定百分比的群体。

[0139] 细胞系和文库生产

HEK293T细胞获自美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA)。细胞在补加了10%胎牛血清(FBS;Gibco,Carlsbad,CA)和1%青霉素/链霉素(Invitrogen,Carlsbad,CA)的Dulbecco改良的Eagle培养基中于37℃和5%CO_2培养。采用三重转染在HEK293T细胞中产生病毒文库,并通过碘克沙醇梯度离心[19,21]和Amicon过滤纯化病毒。如以前所述的,经由定量PCR(qPCR)测定DNA酶抗性基因组滴度。[19,21]

气管内注射和组织收获

对于每一轮选择,给单只年龄为4-6岁并且体重为5.5-7.1kg的雄性食蟹猴(食蟹猴(Macacafascicularis))给药。用肌内(IM)递送的10mg/kg氯胺酮和15μg/kg右美托咪啶对动物进行麻醉。将5mL文库与1.75mg/mL人静脉注射免疫球蛋白(IVIG)预先复合,并如下所述进行施用。每只动物都用5mm的气管导管插管,其中管尖位于锁骨水平(隆突上方约5cm),并通过荧光镜透视确认其位置。将动物以坐姿放置于椅子上用于进行施用。

[0140] 对于第一轮选择,将雾化器设备连接到气管导管远端,并使用鸟牌呼吸器(bird respirator)以20cm H_2O的压力于15±1次呼吸/分钟的速度递送呼吸。对于第二轮和第三轮选择,将AeroEclipse II雾化器设备连接到气管导管的远端,并使用鸟牌呼吸器以15-20cm H_2O的压力于12-14次呼吸/分钟的速度递送呼吸。给药完成后,每只动物被拔管,并IM接受0.15mg/kg阿替美唑(atipamezole)以逆转镇静。在放回其居住笼之前,对动物进行视觉监控,直到它们从麻醉中完全恢复为止。

[0141] 于第15±1天由受过培训的兽医人员使用静脉内递送的100mg/kg戊巴比妥钠进行安死术。取出肺包括气管并解剖,如下文所详述的。从上呼吸道细胞分离DNA,并贮藏于-20℃,直至病毒基因组扩增为止。

[0142] 上呼吸道上皮细胞分离

用磷酸缓冲盐水(PBS;Gibco,Carlsbad,CA)冲洗NHP或人肺,以去除过量的黏膜分泌物和残留血液。将气管和初级、次级和三级支气管与实质肺组织分离。过量的支持组织和淋巴结被去除。将气管和支气管切成2-4cm的碎片,并放置到酶溶液中以释放上皮细胞(链霉蛋白酶,1.4mg/mL和DNA酶,0.1mg/mL)。将气管和初级支气管一起处理,且将次级和三级支气管细胞溶液于4℃温育48小时,其中每天倒置管两次。通过添加最多到总体积的10%的FBS,使酶失活。然后纵向切开切片并从软骨上刮下上皮层。收集细胞并以300x g离心10分钟。用PBS漂洗细胞沉淀两次。将沉淀在含5%FBS的具有添加物的呼吸道上皮细胞基础培养基(ATCC,Manassas,Virginia)中重悬浮,并将细胞平板接种到组织培养物处理的10cm皿中,以允许成纤维细胞贴壁,从而进一步纯化细胞分离物为呼吸道上皮细胞。接种后两至四

小时,收集具有非贴壁细胞的培养基,并以300x g离心10分钟。将沉淀的细胞裂解以提取文库DNA或将其在PBS中重悬浮,计数并接种用于体外选择轮次。

[0143] 体外文库转导

将人ALI培养物在人胎盘胶原蛋白IV型(Sigma)上接种后30天进行转导。在转导当天,将三个小室(inserts)与胰蛋白酶-EDTA 0.05%(ThermoFisher)于37℃温育10分钟。使用确定成分胰蛋白酶抑制剂(Defined Trypsin Inhibitor)(ThermoFisher)使胰蛋白酶失活。从小室收集细胞并在血细胞计数器上计数。确定每个小室的平均细胞数,并用于计算每个小室所需的总病毒基因组。在病毒转导之前,通过用PBS洗涤去除培养物产生的黏液。使用第4轮为50,000,且第5轮为10,000、25,000和50,000的感染复数(MOI)。每一轮均以两个平行组运行,一组在细胞施用前将文库与人IVIG的1:10稀释物预先复合30分钟,且另一组则没有IVIG预先复合。将细胞用文库顶端暴露24小时。感染后四天,从培养物分离DNA并贮藏于-20℃直到病毒基因组扩增为止。

[0144] DNA定量、DNA扩增和测序分析

使用DNeasy血液和组织(DNeasy Blood&Tissue)试剂盒(Qiagen)从上述细胞分离DNA。通过数字式液滴(digital droplet)聚合酶链反应(ddPCR)对AAV文库基因组进行定量。通过PCR扩增AAV变体cap基因。使用NotI和HindIII将cap基因插入pSub2文库包装质粒。然后通过第三方DNA测序机构对Cap基因进行测序。使用Geneious软件(Biomatters)分析测序文件。

[0145] 结果

递送设备参数和上呼吸道细胞分离的中试研究

采用两种递送设备,Valley Biosystem的内部雾化器和AeroEclipse II呼吸驱动的雾化器(Trudell Medical International),以使得能够与多种可临床转化设备具有下游兼容性。在递送伊文思蓝(Evans blue)染料的中试研究中对两种递送设备进行了评价,以确保通气参数导致向所有肺叶和肺泡囊的充分分布。Valley Biosystem的内部雾化器对所有肺叶包括肺泡区室均显示良好的分布,其中在附属叶(dependent lobe)中观察到更厚的染料。在第一轮选择的同时,进行了额外的方法开发和呼吸道递送设备测试,以成功改造和开发了AeroEclipse II呼吸驱动的雾化器,以向插管的NHPs递送气溶胶化的AAV颗粒。通过染料分布研究,证明了向所有六个NHP肺叶包括两个前叶的卓越的、非依赖性的递送。然后使用AeroEclipse II雾化器用于第2轮和第3轮选择。

[0146] 使用总共6个NHP肺最优化上呼吸道细胞分离规程。规程最优化导致来自从治疗用载体进化期间使用的所有三组NHP肺分离的气管和初级、次级和三级支气管的细胞的高得率和纯度。

[0147] 文库生成与生产

在治疗用载体进化程序的第1轮起始之前,合成、制造和表征所有37个衣壳文库。如图3a中所示的,估计质粒文库的多样性以每个文库包括约$1x10^6$至>$1x10^8$个独特变体,达到>10亿个遗传变异序列的总多样性。这代表了高质量、高度多样的AAV变体起始文库。接下来,完成每个个别文库的生产,以产生用于第一轮选择的足够的材料。如图3b中所示的,所有文库都在足以产生用于体内治疗用载体进化选择的材料的水平制造。在生产之后和文库施用之前,通过桑格测序法评估来自所有文库的序列的非功能性突变(即,移码突变或终止

密码子)的存在以及独特序列的频率。大多数文库具有最小频率的非功能性突变,并且所有文库都被包括到对NHP的第一轮施用中。

[0148] 气溶胶递送至NHP肺

对于第一轮选择,将所有文库组合并使用Valley Biosystems的内部雾化器系统经由单剂量气溶胶施用成功地施用于单个NHP。施用前,将文库与1.75mg/mL人IVIG温育。这代表了人NAbs的较高但生理相关的肺黏液浓度。所施用的$1.7x10^{12}$vg的文库剂量代表约为基于制造考虑当前最大可行剂量的1/100的剂量。因此,这代表了严格的选择压力,以使得能够发现能够转导气管和支气管中上呼吸道细胞的载体。施用后两周收获NHP肺。从单独的气管/初级支气管和次级/三级支气管样品中的肺分离细胞,并从细胞分离DNA。从两个区域都获得了高总细胞得率和高乙酰化微管蛋白+细胞群体。使用逐渐较低的病毒文库剂量将所述过程重复额外两轮。

[0149] 从每一轮选择进行DNA分离后,通过ddPCR对AAV病毒文库基因组进行定量,以确认文库载体成功定位至感兴趣的细胞类型。上呼吸道中存在的病毒基因组的量存在剂量依赖性减少,从而与每轮施用的较低剂量相对应(图4)。

[0150] 除了通过ddPCR进行定量之外,来自组织的衣壳基因扩增代表文库载体成功定位到感兴趣的细胞类型。从NHPs中每轮选择扩增的衣壳被克隆到AAV文库包装质粒中用于序列分析并起始后来的选择轮次。对文库中的各个克隆进行测序,以确定群体内变体的频率。每轮对来自气管/初级支气管和次级/三级支气管样品的最低限度90个克隆进行测序。评估变体的测序数据内基序的存在。基于在多个序列中出现的统一变异(例如,衣壳内一致位置中的特定点突变或特定肽插入序列)的存在,将变体分组为基序。如果基序代表两个或更多个连续轮次的选择中一定百分比的测序的群体或者一个或多个轮次的选择中一定百分比的测序的群体,则所述基序被指定为命中。

[0151] 气管/初级支气管区域内的两个基序(点突变#1、肽插入#1(SEQ ID NO:40)和次级/三级支气管区域内的一个基序(肽插入#2(SEQ ID NO:41)在体内第3轮后被指定为命中(图5)。此外,额外两个感兴趣的基序(肽插入#3(SEQ ID NO:42),肽插入#4(SEQ ID NO:43)被鉴定为将被监控以确定在进一步的体外治疗用载体进化轮次之后其中一个或两个是否可以被指定为命中的基序。气管/初级支气管区域中的点突变#1和次级/三级支气管区域中的肽插入#2是每个区域中最频繁的命中,并且这些命中中的每一个都代表所述区域一定百分比的测序的AAV群体(图5)。在总测序的群体中,一定百分比的测序的AAV克隆代表独特的AAV序列。因此,基于对治疗用载体进化程序的第3轮进行的测序分析,模型系统从体内NHP转变为体外近端呼吸道器官型培养用于选择过程的剩余部分。

[0152] 向人ALI培养物的顶端递送

对于体外第4轮和第5轮选择,来自三个人肺供体的细胞被合并并在transwell系统中以多层空气液体界面(ALI)培养进行培养。细胞形成有条纹层并产生黏液。在文库转导之前,通过免疫细胞化学分析,使用针对乙酰化微管蛋白(纤毛细胞的标记)、细胞角蛋白5(基细胞的标记)和黏蛋白(杯形细胞的标记)的抗体在解冻后30天评估人先体外后体内肺上皮呼吸道培养物的细胞培养物组成。

[0153] 对于第4轮和第5轮,AAV文库分别以50,000和10,000的MOI被施用到近端呼吸道器官型培养系统的顶侧。与体内选择部分类似,在体外从每一轮进行DNA分离后,通过ddPCR对

AAV病毒文库的基因组进行定量,以确认文库载体成功定位至感兴趣的细胞类型。与体内选择部分不同,各轮之间没有观察到剂量依赖性(图6a),这可能归因于体外使用的高MOIs。此外,与人IVIG预温育看来似乎不对转导后的基因组存在具有显著影响(图6b)。

[0154] 如以前那样,来自组织的衣壳基因扩增代表文库载体成功定位到感兴趣的细胞类型。从每轮体外选择扩增的衣壳再次被克隆到AAV文库包装质粒中用于序列分析并起始后来的选择轮次。再次对文库中的各个克隆进行测序,以确定群体内的变体频率。每轮对来自有和没有人IVIG的条件的最低限度89个克隆进行测序。

[0155] 在体内选择部分期间鉴定的命中(点突变#1、肽插入#1、肽插入#2)在两轮体外选择后保持相对较高的频率(图7)。感兴趣的变体之一(肽插入#3)频率降低并且从未满足被指定为命中的标准。在第3轮之后监控的另一个变体(肽插入#4)在第4轮之后确实满足被指定为命中的标准,但其在第5轮中的频率也降低(图7)。在第4轮之后,两个额外的基序(肽插入#5(SEQ ID NO:44)、肽插入#6(SEQ ID NO:45)被指定为命中。第5轮中未鉴定新的命中,且合并的命中代表测序的群体的大于50%(图7)。因此,基于对治疗用载体进化程序第5轮进行的测序分析,所述发现程序被认为是完成的。

[0156] 结果

在使用雾化器对文库进行单一轮次气管内气溶胶施用后,从分离自来自NHPs中三个顺序轮次的选择的气管和初级、次级和三级支气管的分离的上呼吸道细胞群体成功扩增了AAV衣壳。人体外ALI培养物被用于两个后来的选择轮次。从NHP肺或人ALI培养物成功扩增病毒基因组后,对文库中的各个克隆进行了测序。基于统一变异的存在将各个序列分组为基序,并基于测序分析中的频率和变异的多样性进行评价。分析后,出现了六个变体序列作为被指定用于进一步表征的命中。这六个变体(AAV102-AAV107,SEQ ID Nos:68-73)是基于AAV2的衣壳,其各自含有插入环区域的肽和V708I氨基酸取代。

[0157] 下表1提供了上述每个选择轮次的肽插入基序的频率的总结:

表1

肽插入	SEQ ID NO:	轮次 1 T/1°	轮次 1 2/3°	轮次 2 T/1°	轮次 2 2/3°	轮次 3 T/1°	轮次 3 2/3°	轮次 4 (+ IVIG)	轮次 4 (- IVIG)	轮次 5 (+ IVIG)	轮次 5 (- IVIG)
LAHDITXNIA	40					10.78%	3.03%	9.7%	10.8%	11.7%	17.1%
LANQDYTKTA	41			0.34%		3.92%	10.10%	6.8%	8.9%	9.7%	7.6%
LADNTVTRSA	42			1.63%		5.88%	3.03%	0.5%	2.3%	2.9%	1.0%
LASNSVQSIA	43			0.34%		0.98%	7.07%	6.3%	4.2%	4.9%	3.8%
LANSTRHTDA	44					0.98%	3.03%	10.6%	4.7%	16.5%	9.3%
LATNRTSXDA	45			0.34%			1.01%	10.1%	9.9%	10.7%	15.2%
LAISDQTKHA	46		1.10%	0.34%		0.98%	4.04%		1.9%	2.9%	1.0%
LAQADTTKNA	47		1.10%			2.94%	2.02%	2.4%	3.3%	1.0%	2.9%
LANAVKTDFA	48					0.98%		1.9%	3.8%	2.9%	2.9%
LATNQTLSAA	49					1.96%	1.01%	3.9%	3.3%	3.9%	1.9%
LAENRTTSNA	50					3.92%	2.02%	3.4%	3.3%		3.8%
LAPQQDTTHA	51					0.98%	4.04%	2.4%	3.3%	4.9%	1.0%
LANATNHVIA	52					1.96%		1.0%	2.3%		1.9%
LATNNSKXDA	53							1.4%	2.3%	1.0%	
LASKLTLNNA	54			0.34%			1.01%	0.5%	0.5%		1.0%
LAVTAGMGAA	55						3.03%	1.9%	0.9%		
LAPNSTTNNA	56			0.34%		0.98%	1.01%	0.5%	1.9%		
LANSTSRIDA	57						2.02%	3.4%	1.4%	3.9%	2.9%
LAVASHTNNA	58			1.09%			4.04%	0.5%	0.5%		1.0%
LARSHQXIPA	59					1.96%	1.01%	0.5%	1.4%	1.0%	1.0%
LALNTTXDIA	60						2.02%	1.0%	0.9%	4.9%	
LAIIDATKNA	61					0.98%	1.01%	0.5%	1.9%	1.0%	4.8%
LANHISQTNA	62			0.34%		2.94%		1.4%	0.5%	1.0%	
LASNSAHITA	63					1.96%		0.5%	1.4%		
LASTHQSNNA	64			1.09%		0.98%	4.04%	1.0%	0.5%		
LAKTPNLTSA	65			1.09%		2.94%		1.0%	0.9%		1.0%
LASNTPALSA	66			0.34%		0.98%	1.01%	1.4%	1.4%		1.9%
LASPGATTNA	67							1.4%	0.9%	1.0%	

T/1°＝气管/初级支气管

2/3°＝次级/三级支气管

IVIG＝人静脉注射免疫球蛋白(1:10)

从定向进化筛选鉴定的测序的克隆包括仅具有肽插入(例如,SEQ ID No:40、41、42、43、44或45)并且在其他方面与SEQ ID NO:2相同的变体衣壳,以及具有与多种氨基酸取代组合的肽插入的变体衣壳。表2提供了从定向进化筛选鉴定的测序的克隆中与表1的插入肽组合耐受的氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:2进行编号)的总结(在每种情况下,变体AAV衣壳蛋白在其他方面与SEQ ID NO:2相同):

表2

插入	SEQ ID NO	一种或多种取代	插入	SEQ ID NO	一种或多种取代
LAHDITKNIA	40	V708I	LAQADTTKNA	47	S109T
LAHDITKNIA	40	E99D + V708I	LAQADTTKNA	47	R585K
LAHDITKNIA	40	E347D	LAQADTTKNA	47	R585K + V708I
LAHDITKNIA	40	K532E + V708I	LAQADTTKNA	47	R103L + K532E
LAHDITKNIA	40	D283E + V708I	LAQADTTKNA	47	E133D
LAHDITKNIA	40	G18E + G220R + V708I	LAQADTTKNA	47	T491I + K532E
LAHDITKNIA	40	T138R	LAQADTTKNA	47	R585K + V708I
LAHDITKNIA	40	R37L + H38Q + V708I	LANAVKTDFA	48	D608N + V708I
LANQDYTKTA	41	V708I	LANAVKTDFA	48	Q120H + V708I
LANQDYTKTA	41	N449D + D472N + V708I	LAENRTTSNA	50	V708I
LANQDYTKTA	41	P436H	LAENRTTSNA	50	T138R
LANQDYTKTA	41	K544E	LAENRTTSNA	50	S109T
LANQDYTKTA	41	K532E + V708I	LAENRTTSNA	50	S109T + V708I
LANQDYTKTA	41	P250S + V708I	LARSHQEIPA	59	G376A + V708I
LANQDYTKTA	41	S109T + N312K + H641N + V708I	LAIIDATKNA	61	T138R + G376A + Q428H + V708I
LANQDYTKTA	41	N705S + V708I	LATNNSKPDA	53	K532E
LANQDYTKTA	41	K532E + K688R + V708I	LATNNSKPDA	53	V118A + M371I
LANQDYTKTA	41	P451Q + A593E + V708I	LANSTSRIDA	57	K532E + V708I
LASNSVQSIA	43	D213Y + V708I	LASPGATTNA	67	Y6F
LASNSVQSIA	43	T200I	LAISDQTKHA	46	E134Q + P135A +

					V136G + K137E + V708I
LASNSVQSIA	43	T344S + E347D			
LASNSVQSIA	43	V708I			
LADNTVTRSA	42	V708I			
LANSTRHTDA	44	L91I			
LANSTRHTDA	44	P30L + A593E + V708I			
LANSTRHTDA	44	P250S + V708I			
LANSTRHTDA	44	V708I			
LATNQTLSAA	49	R103C + V708I			
LATNQTLSAA	49	V118A + V708I			
LAPQQDTTHA	51	S109T + V708I			
LAPNSTTNNA	56	S16Y + V708I			
LAPQQDTTHA	51	N469D + V708I			
LATNRTSPDA	45	A591D + V708I			
LATNRTSPDA	45	V708I			

实施例2

表现出对上呼吸道上皮细胞转导的偏好的上面鉴定的六种变体衣壳序列(AAV102-AAV107;SEQ ID Nos:68-73)在非人类灵长类动物(NHP)和人先体外后体内肺上呼吸道空气液体界面(ALI)培养中在一系列感染复数(MOIs)下进行了体外表征。

[0158] 简而言之,制造了重组AAV(rAAV),其各自包含含有具有驱动EGFP的遍在启动子(CMV增强子、鸡β-肌动蛋白启动子和兔β-珠蛋白剪接受体位点,CAG)的报道基因盒的AAV102-AAV107的cap变体序列。在四种感染复数(12,500、25,000、50,000和100,000)下,体外评估了六种变体AAV衣壳、AAV101和天然血清型AAV2和AAV5的转导。

[0159] 被人工改造用于在体外器官型ALI培养中增强的呼吸道上皮转导的第一代衣壳变体(AAV101)已显示优于天然存在的AAV衣壳(参见美国专利公开号2021/0395772的SEQ ID NO:12,其内容引入本文作为参考)。然而,进行了额外的发现以鉴定可以以足以在囊性纤维化(CF)中实现临床益处的水平体外和体内两者都有效转导的载体。

[0160] 方法

AAV制造

利用三重质粒转染方法生产包含变体衣壳蛋白AAV101-AAV107和天然血清型AAV2和AAV5的每一种的rAAV,所述方法利用可商购获得的转染试剂和在浅皿中培养的人胚肾293(HEK293)细胞。连同上清液一起收获转染的细胞,且接着用核酸酶处理并通过0.2μm过滤器澄清。使用亲和层析(AVB Sepharose HP,Cytiva Life Sciences)纯化澄清的收获物,并将其缓冲液更换到具有0.005%Pluronic F68的DPBS中。在0.2μm过滤后,将原料药物质(BDS)等分到冷冻小瓶(Corning)中并贮藏于-80℃。

[0161] 用于AAV滴度分析的数字式液滴PCR(ddPCR)

病毒基因组滴度通过ddPCR进行确定。测试样品被稀释,并用DNA酶处理,然后进一步稀释到具有0.02%Pluronic F68、ddPCR Supermix和对应于SV40PolyA序列的引物/FAM-标记的探针的DPBS中。使用Bio-Rad自动液滴发生器将20μL样品分成液滴,经受PCR,然后在Bio-Rad QX200液滴读出器上读取,所述读出器个别测量每个液滴的荧光信号。使用Bio-

Rad QuantaSoft软件分析数据,所述软件使用正液滴和负液滴的泊松统计分析以提供靶序列的绝对定量。无模板对照用于设置样本的阴性基线。使用内部ddPCR参考标准病毒作为参考标准对照。

[0162] 上呼吸道上皮细胞分离和培养

按照公开的规程(Karp等人,2002)从自移植排斥的NHP和人供体肺(Donor Network West)的气管和初级至三级支气管分离呼吸道上皮细胞。分离的细胞被冷冻并贮藏在液氮中。

[0163] 将呼吸道上皮细胞解冻到transwell小室(0.4μm,0.32cm^2,Corning,Corning,NY)上的在支气管上皮细胞生长试剂盒(ATCC,Manassas,VA)中具有生长添加物的呼吸道上皮细胞基础培养基中的人胎盘胶原蛋白IV(60μg/mL,MilliporeSigma,Burlington,MA)上。接种后两天,将培养基从小室和基底室吸出。基底室用具有提供的生长添加物的PneumaCult ALI基础培养基(Stem Cell Technologies,Vancouver,加拿大)进行补充。每2-3天更换基础培养基。每天吸出transwell顶侧的液体,直到获得空气液体界面(ALI)为止。在细胞表征和转导之前,使细胞成熟30天。

[0164] AAV转导

在培养中至少30天后,对细胞进行彻底洗涤以去除积累的黏液。收获每个种类的三个小室并进行细胞计数。基于AAV滴度和每个种类的平均细胞计数,病毒体积被稀释以达到12,500、25,000、50,000和100,000的MOI。使用稀释剂使体积均衡,以得到每个种类的每个小室100μl转导体积。人细胞被顶端和基部转导,并且NHP细胞在黏液洗涤后被用AAV顶端转导,每种条件下n=1。感染后24小时吸出小室上的液体并更换基底室培养基。感染后七天固定细胞用于免疫细胞化学。

[0165] 免疫细胞化学

于室温用4%低聚甲醛固定细胞20分钟。然后使用Zeiss Axio Observer D.1荧光显微镜对细胞进行成像,以显示细胞上自顶向下观看的EGFP。然后将含有细胞的小室包埋入最佳切割温度(optimal cutting temperature)介质(OCT,ThermoFisher,Waltham,MA)中,并在CryoStar恒冷切片机上以20μm的切片进行切片。将含有小室横断面的载玻片于PBS中的2%山羊血清、5%牛血清清蛋白和0.02%triton X-100中于室温封闭1小时。然后将载玻片于室温与第一抗体温育2小时,用0.02%triton X-100洗涤三次,并于室温与第二抗体温育1小时。然后于室温用DAPI(细胞核染色剂)对载玻片复染五分钟,洗涤三次,并用Prolong Gold抗褪色浸片剂(ThermoFisher)用盖玻片密封。然后使用Zeiss Axio Observer D.1荧光显微镜对细胞进行成像。

[0166] 用于AAV转录物检测的数字式液滴聚合酶链反应(ddPCR)

根据制造商的说明,使用Qiagen RNeasy Plus Mini试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)从每个小室提取RNA。对RNA进行定量,并根据制造商的说明,使用iScript cDNA合成试剂盒生成2μg cDNA(40μL总体积,Bio-Rad,Hercules,CA)。以在水中1:10和1:100制备cDNA的稀释物至50μL的总体积,每个测定平板孔添加2μL。主混合物由最多到每孔总体积18μL的2×Supermix ddPCR™(无dUTPs,Bio-Rad)和ddPCR相容的引物/探针混合物(HPRT1HEK-持家,20×ID Bio-Rad和SV40 FAM ID(Furuta-Hanawa,Yamaguchi,&Uchida,2019))制备。SV40引物/探针是用于测量EGFP转基因转录物水平的替代物,这是因为SV40聚腺苷酸化位

点被包括作为病毒递送的转基因盒的一部分。根据制造商的说明,将主混合物(Mastermix)和cDNA组合在ddPCR™ 96-孔测定平板中,并装载到QX200™ AutoDG Droplet Digital™ PCR系统中。生成液滴,且将平板转移到C1000 Touch热循环仪上以运行PCR。ThermoCycler条件如下:94℃10分钟,94℃30秒,60℃1分钟(重复步骤2-3,39x),98℃10分钟,保持在12℃。然后将平板转移到QX200™液滴读出器上,其中设置参数以在FAM和HEK通道中读取。数据在QuantaSoft软件中以3000的阈值进行分析,且然后转移到Excel文件,在那里完成进一步的分析。使用具有可行读数的最低稀度,使用SV40与持家值的比率创建图表。

[0167] 平均荧光强度计算

对于每个ALI转导的孔,使用Zeiss Axio Observer D.1荧光显微镜的10×物镜每个孔拍摄3张图像。以从一个孔到另一个孔一致且无偏的模式选择成像的区域。使用标准AAV2 MOI 25,000转导孔设置每个图像的曝光时间。成像后,所有图像均使用ImageJ软件进行处理。减去背景荧光,且然后使用“测量平均灰度值(Measure Mean Gray Value)”工具以产生MFI值。对每个孔的三张图像取平均值,以得到每个孔的最终MFI值。然后对一个条件内的每个孔取平均值,并计算标准差,以产生最终的图表(图3b)。

[0168] 结果

新衣壳的AAV制造

通过在CellSTACKs上培养的HEK293细胞中的三重转染来制造包含变体衣壳蛋白和野生型血清型的rAAV,并使用亲和层析进行纯化。上清液和细胞收获后,通过ddPCR分析测量上游生产力(以log病毒基因组(vg)/平方厘米细胞培养物表面积的单位报道)(表1,上游生产力)。所有新衣壳均能够包装GFP有效负载,并表现出与使用浅皿生产工艺生产的其他AAV载体类似的生产力。亲和纯化和缓冲液更换后,通过ddPCR确定下游得率(作为回收的vgs的%报道)(表3,下游得率)。表3还显示了用于生产力和得率比较的AAV101-EGFP的初始包装和得率数据。

[0169] 表3

载体	肽插入片段*	氨基酸取代*	上游生产力 (log vg/cm²)	下游得率 (%回收的 vgs)
AAV101-EGFP	N/A	N/A	9.97	42%
AAV102-EGFP	LAHDITKNIA (SEQ ID NO:40)	V708I	9.95	46%
AAV103-EGFP	LANQDYTKTA (SEQ ID NO:41)	V708I	10.02	40%
AAV104-EGFP	LADNTVTRSA (SEQ ID NO:42)	V708I	10.02	61%

载体	肽插入片段*	氨基酸取代*	上游生产力 (log vg/cm²)	下游得率 (%回收的 vgs)
AAV105-EGFP	LASNSVQSIA (SEQ ID NO:43)	V708I	9.82	56%
AAV106-EGFP	LANSTRHTDA (SEQ ID NO:44)	V708I	10.01	57%
AAV107-EGFP	LATNRTSPDA (SEQ ID NO:45)	V708I	9.88	52%

*相对于SEQ ID NO:2的AAV2衣壳

AAV新变体的转导效率

将实施例1中鉴定的六种新变体的转导效率与AAV对照:AAV2、AAV5和AAV101进行了比较。每个衣壳都含有具有驱动EGFP的遍在启动子(CAG)的盒。人和NHP上呼吸道上皮细胞在去除黏液后进行转导。感染后七天,使用落射荧光显微镜对细胞自顶向下成像,以显示EGFP。

[0170] 对于顶端转导的人细胞,在AAV2和AAV5对照中检测到最低限度的EGFP表达。如通过荧光显微镜检术所分析的,在六种新变体中,AAV102和AAV103转导效率在较低剂量高于AAV2、AAV5和AAV101(图8a)。于MOI 100,000的AAV103转导是低的,可能归因于所述孔的无效黏膜洗涤。AAV106转导高于AAV2和AAV5。

[0171] 在顶端转导的NHP细胞中,EGFP模式在孔内(intrawell)是可变的。在transwell的外缘周围反复观察到环模式的增强的转导,而在transwell的中央为有限的转导。总的说来,新变体表现出比AAV2、AAV5和AAV101更强的转导效率。AAV102和AAV104表达了最高水平的EGFP(图8b)。NHP转导模式并不像人培养物中那么明显,这可能归因于边缘效应。对于NHP转导显示的所有图像都拍摄了孔的边缘的一部分,以显示转导。

[0172] 对于基部转导的人细胞,出现了不同的模式。AAV104具有最高的转导效率,高于AAV2、AAV5和AAV101(图8c)。AAV102和AAV103未表现出与当它们顶端施用时相同的优越的转导。总的说来,基部转导看来似乎低于顶端转导。考虑到这些衣壳变体是通过对NHP体内和人ALI体内进行顶端施用而选择的,与顶端施用相比基部施用后相对缺乏转导不令人惊异。NHP体外培养物未被基部转导。

[0173] 解冻后30天,使用针对乙酰化微管蛋白(Ac-tub;纤毛细胞)、细胞角蛋白5(KRT5;基细胞)和黏蛋白(MUC5ac;杯形细胞)的抗体通过免疫细胞化学分析评估人先体外后体内肺上皮呼吸道培养物的细胞培养物组成。完成了对人顶端和基部转导的细胞的横断面分析,并得出了关于所述ALI系统内特定细胞变体向性的非结论性结果(数据未显示)。需要更多分析以正确理解所述异质培养系统中每个衣壳的特定向性。额外的体内研究也可能有助于更好地表征每个衣壳的细胞特异性转导。

[0174] 完成了后续研究,以进一步检查AAV102和AAV103,与AAV2和AAV101相比来自人ALI培养中初始顶端转导筛选的表现最佳的变体。图9a显示了描绘EGFP的免疫细胞化学分析。根据每个孔三幅图像、每个条件下三个孔的数据对平均荧光强度计算平均值并绘制图表(图9b)。最后,数字式液滴PCR确定了每个变体的转录物水平(图9c)。全部三项分析均证实,当在低MOIs进行顶端转导时,在先体外后体内呼吸道培养物的转导效率中AAV102和AAV103优于AAV2。

[0175] 完成了额外的后续研究,以比较在有和没有黏液的情况下,与AAV2、AAV5、AAV6和AAV101相比,通过AAV102-AAV107的每一种对ALI培养物中人呼吸道上皮细胞的顶端转导。简而言之,人肺上皮细胞培养物在空气液体界面中生长至少30天。在有或没有黏液的情况下,用携带由CAG启动子驱动的EGFP报道基因的AAV102-AAV107或对照衣壳转导细胞(MOI=25,000)。转导后七天,拍摄了EGFP的图像作为衣壳的转导效率的代表。当在没有黏液的情况下转导时,与野生型AAV血清型相比,以及与AAV101对照相比,衣壳AAV102-AAV107的每一种均表现出更强的转导效率(图10A和10B,顶部图)。在有黏液的情况下进行的转导降低了每种衣壳的转导效率(除AAV5外,其在没有黏液的情况下不显示转导)(将图10A和10B的顶部图与底部图进行比较)。

[0176] 通过根据实施例1使用气溶胶递送技术在NHP中的选择以及向人先体外后体内上呼吸道上皮ALI培养物的顶端施用鉴定的最高的AAV衣壳变体的六种的体外分析证实,与AAV101和野生型AAV血清型相比,具有变体衣壳蛋白的rAAV在转导人和NHP先体外后体内上呼吸道上皮ALI培养物中更优越。不同的变体表现出对依赖于施用途径的转导的偏好。AAV102和AAV103在较低MOIs对人体外上呼吸道上皮ALI培养物的顶端转导比AV101和WT血清型更好。在基部转导的人细胞中,AAV104具有最高的转导效率。

[0177] 实施例3

在NHP内的中和抗体筛选和体内载体表征中检查了新AAV衣壳变体。

[0178] 尽管已经根据优选实施方案描述了本发明的材料和方法,但对于本领域技术人员来说将显而易见的是,可以在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下对本文描述的方法应用变化。对于本领域技术人员而言显而易见的所有这种类似替代和修改均被视为在本发明的精神、范围和概念之内。

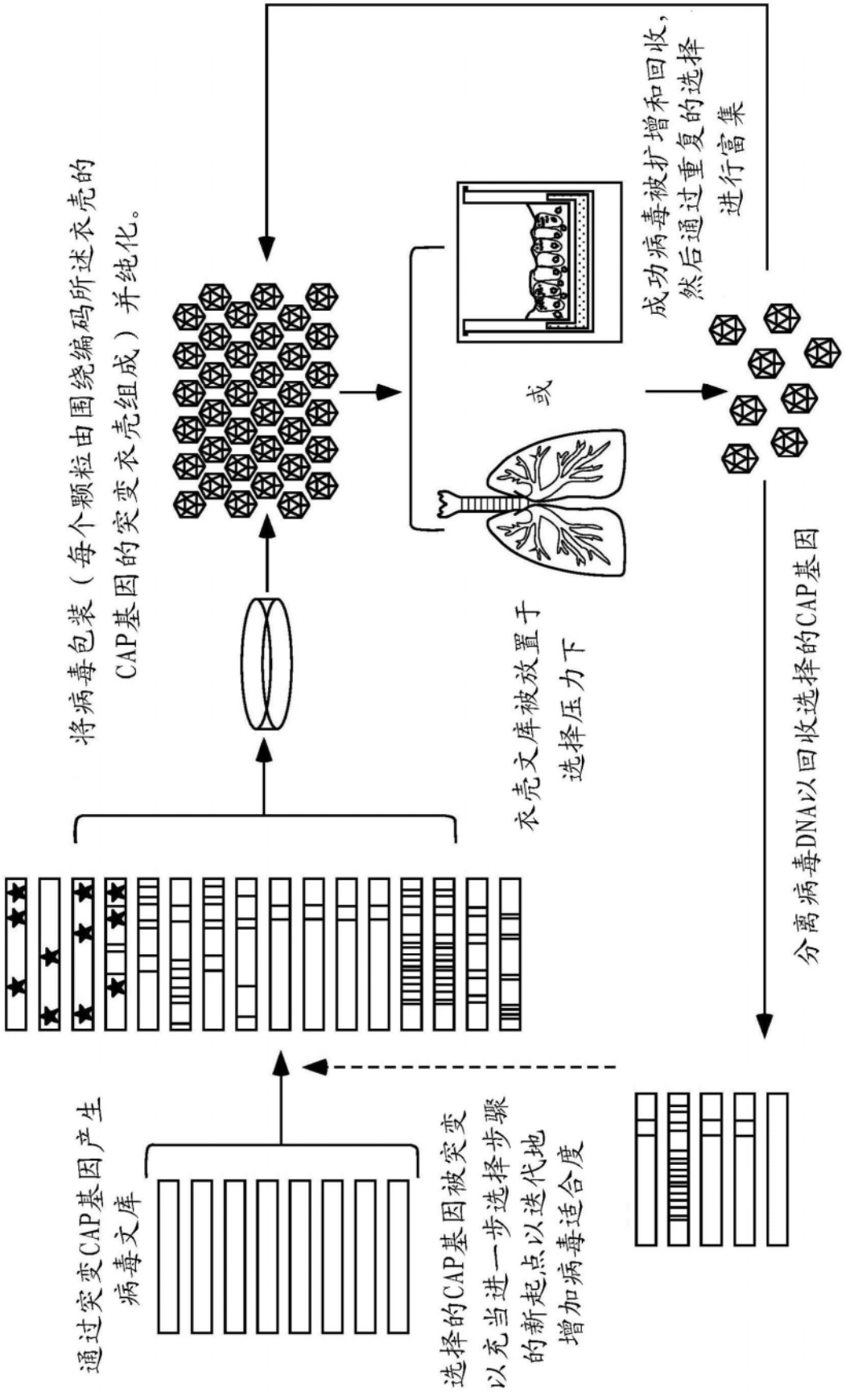

通过突变CAP基因产生
病毒文库
选择的CAP基因被突变
以充当进一步选择步骤
的新起点以迭代地
增加病毒适合度
将病毒包装（每个颗粒由围绕编码所述衣壳的
CAP基因的突变衣壳组成）并纯化。
衣壳文库被放置于
选择压力下
或
成功病毒被扩增和回收，
然后通过重复的选择
进行富集
分离病毒DNA以回收选择的CAP基因

图1

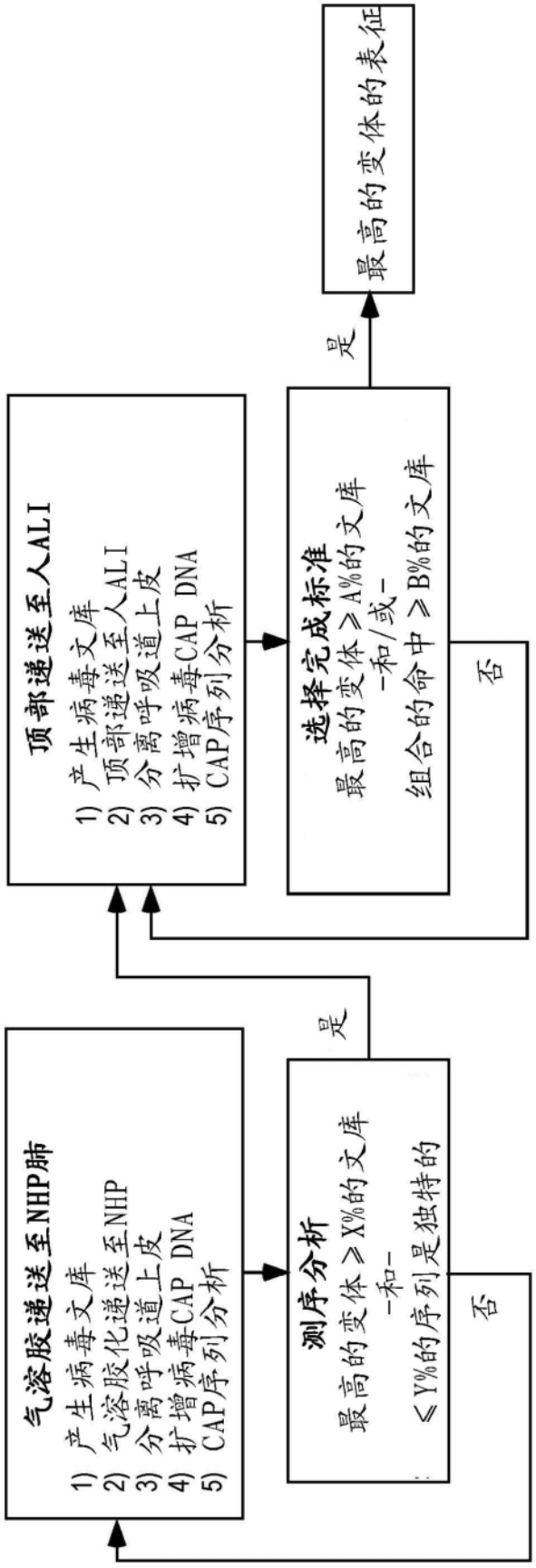

气溶胶递送至NHP肺
1) 产生病毒文库
2) 气溶胶化递送至NHP
3) 分离呼吸道上皮
4) 扩增病毒CAP DNA
5) CAP序列分析
测序分析
最高的变体≥X%的文库
-和-
≤Y%的序列是独特的
是
否
顶部递送至人ALI
1) 产生病毒文库
2) 顶部递送至人ALI
3) 分离呼吸道上皮
4) 扩增病毒CAP DNA
5) CAP序列分析
选择完成标准
最高的变体≥A%的文库
-和/或-
组合的命中≥B%的文库
是
否
最高的变体的表征

图2

Lib00 1
Lib00 3
Lib00 5
Lib00 7
Lib00 9
Lib00 12
Lib00 14
Lib00 16
Lib00 18
Lib00 20
Lib00 22
Lib00 24
Lib00 26
Lib00 28
Lib00 30
Lib00 32
Lib00 34
Lib00 36
1.E+05
1.E+06
1.E+07
1.E+08
1.E+09
文库递送

图3A

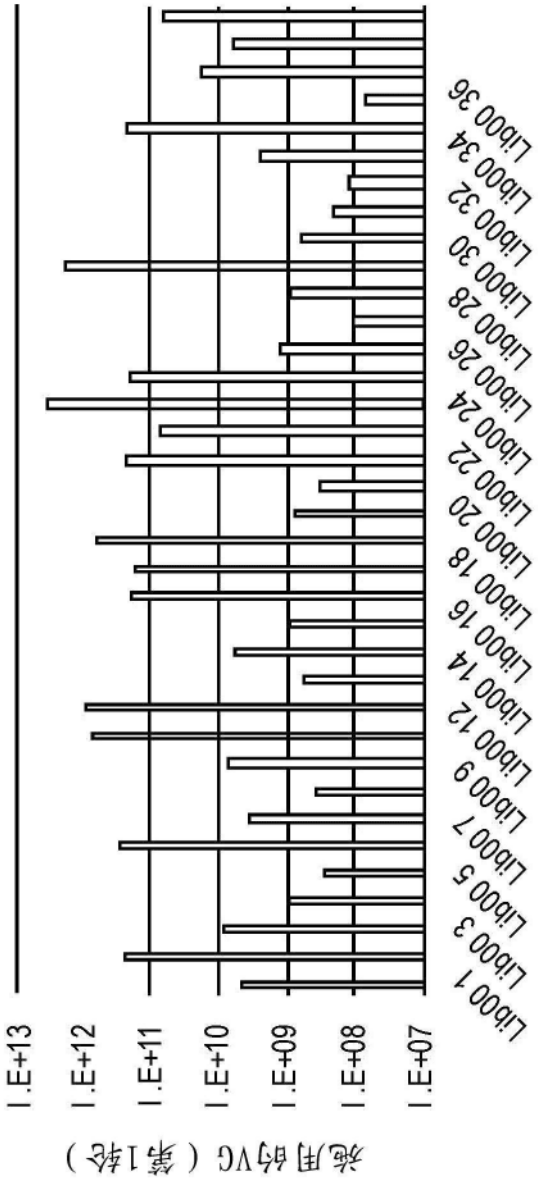

Libdd 1
Libdd 3
Libdd 5
Libdd 7
Libdd 9
Libdd 12
Libdd 14
Libdd 16
Libdd 18
Libdd 20
Libdd 22
Libdd 24
Libdd 26
Libdd 28
Libdd 30
Libdd 32
Libdd 34
Libdd 36
1.E+07
1.E+08
1.E+09
1.E+10
1.E+11
1.E+12
1.E+13
施用的VG（第1轮）

图3B

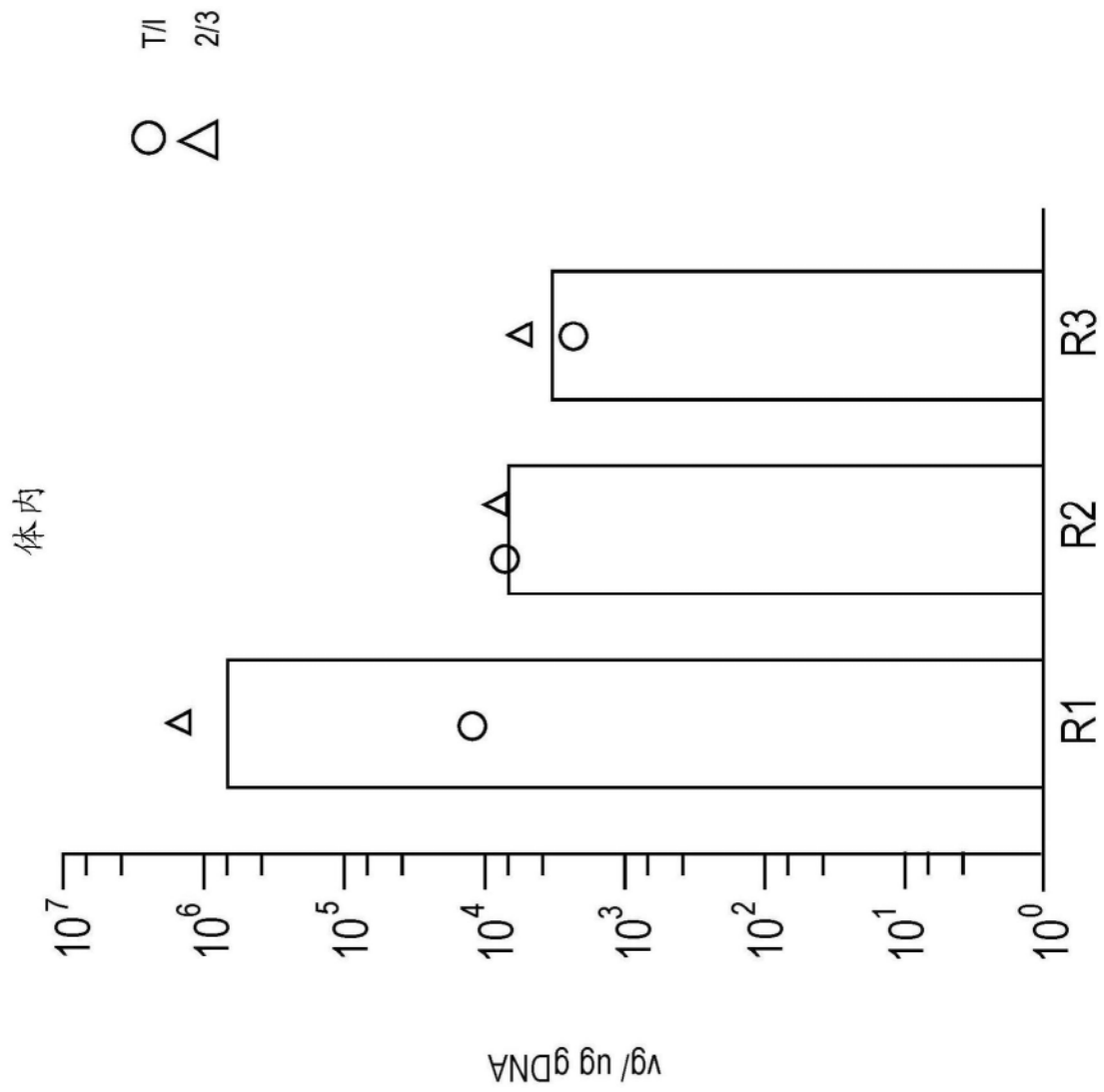


图4

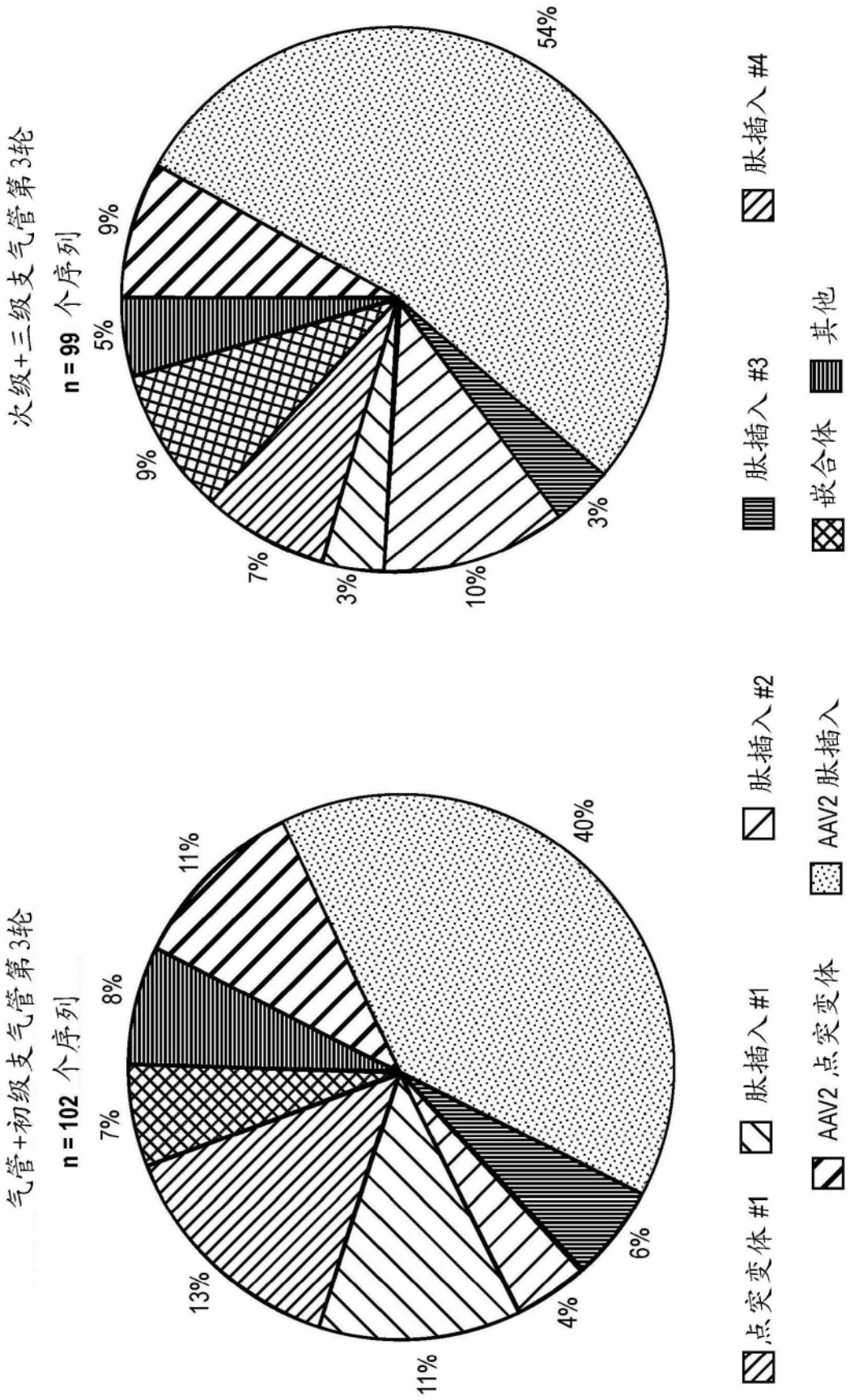

次级+三级支气管第3轮
n = 99 个序列
54%
3%
10%
3%
7%
9%
5%
9%
肽插入 #3
肽插入 #4
嵌合体
其他
气管+初级支气管第3轮
n = 102 个序列
40%
6%
4%
11%
13%
7%
8%
11%
点突变体 #1
肽插入 #1
肽插入 #2
AAV2 点突变体
AAV2 肽插入

图5

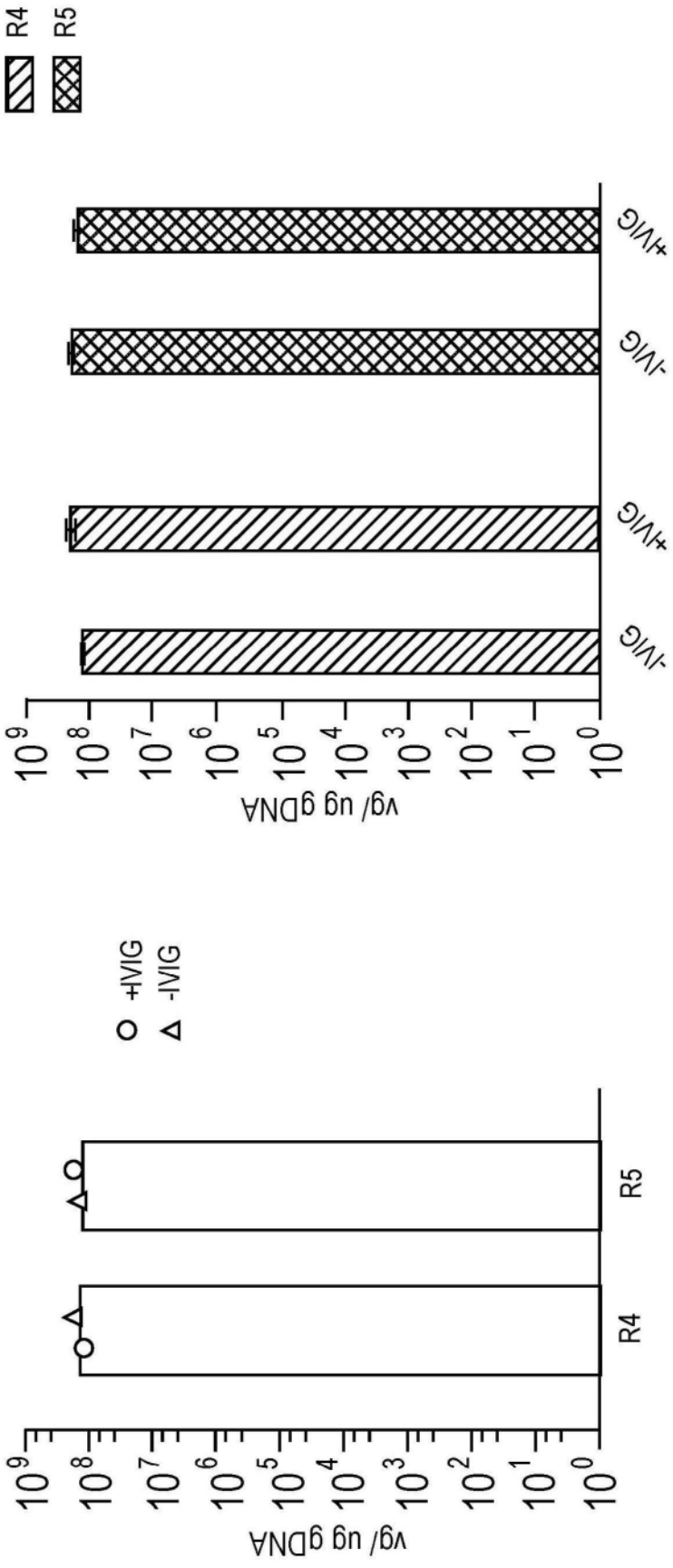

R4
R5
+IVIG
-IVIG
+IVIG
-IVIG
vg/ ug gDNA
10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0
+IVIG
-IVIG
R5
R4
vg/ ug gDNA
10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0

图6

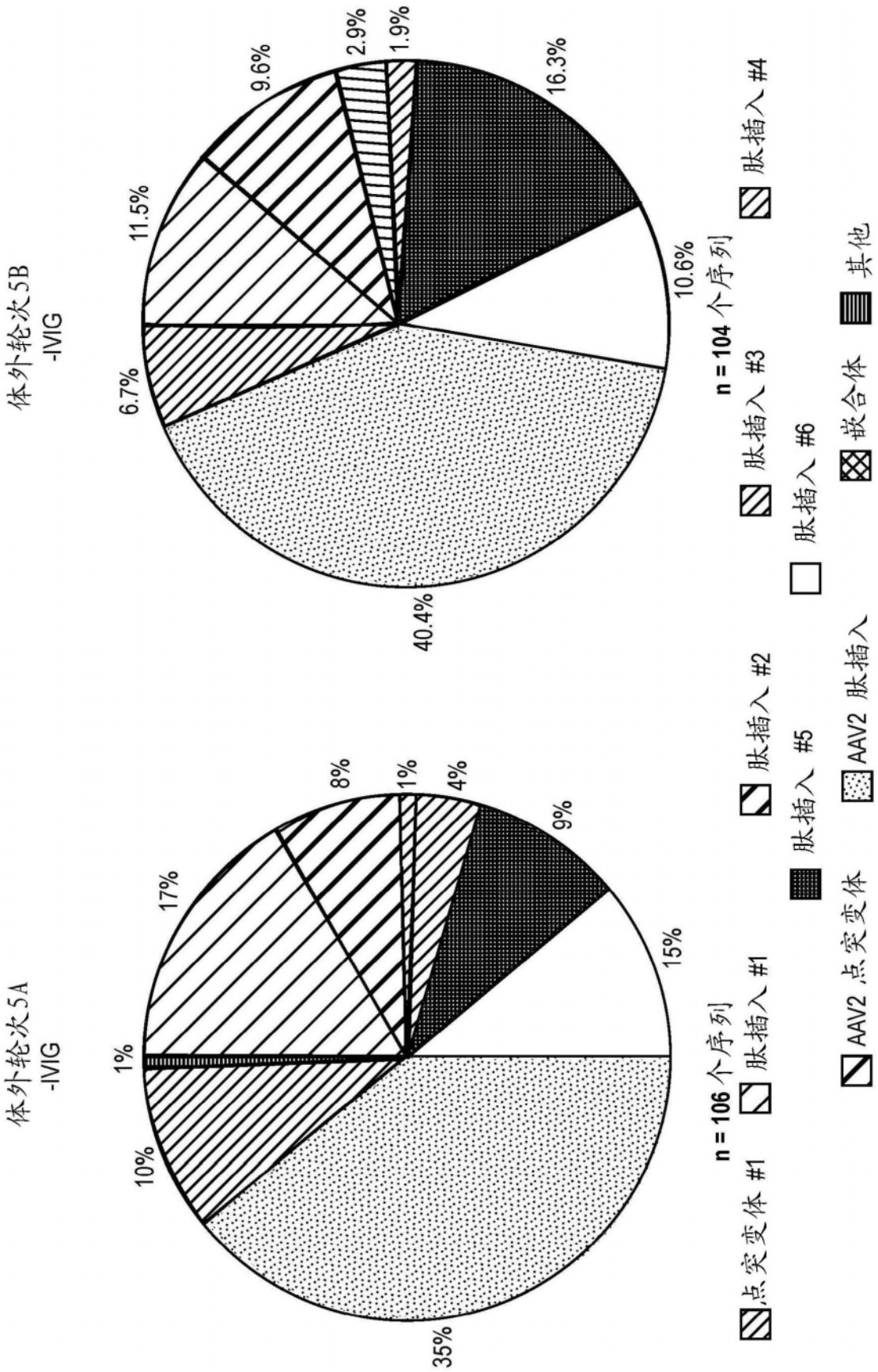

体外轮次5B
-IVIG
16.3%
10.6%
40.4%
6.7%
11.5%
9.6%
2.9%
1.9%
n = 104 个序列
肽插入 #4
肽插入 #3
肽插入 #6
嵌合体
其他
体外轮次5A
-IVIG
9%
15%
35%
10%
1%
17%
8%
1%
4%
n = 106 个序列
点突变体 #1
肽插入 #1
肽插入 #2
肽插入 #5
AAV2 点突变体
AAV2 肽插入

图7

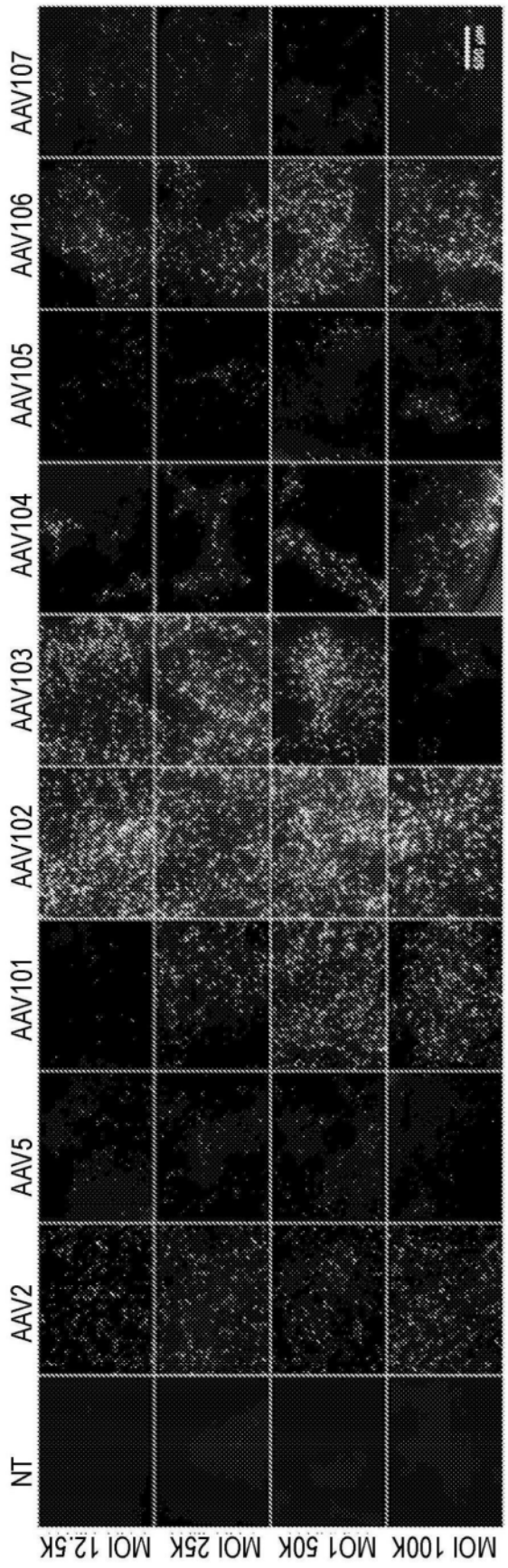

AAV107
AAV106
AAV105
AAV104
AAV103
AAV102
AAV101
AAV5
AAV2
NT
MOI 12.5K
MOI 25K
MOI 50K
MOI 100K

图8A

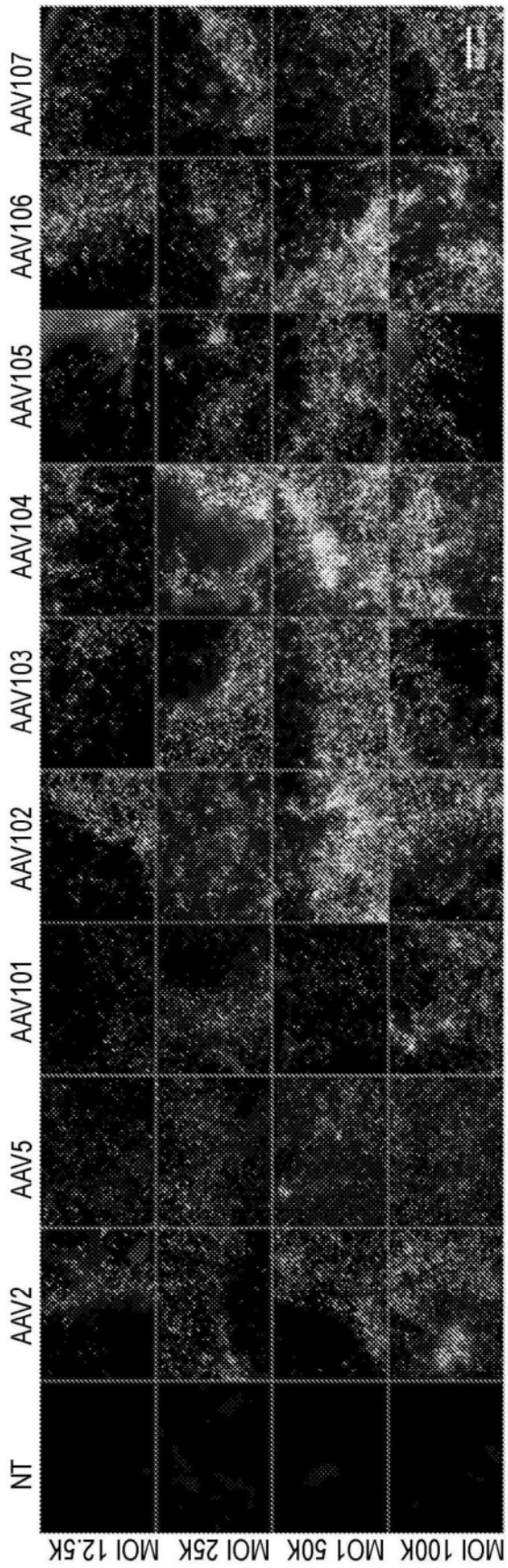

AAV107
AAV106
AAV105
AAV104
AAV103
AAV102
AAV101
AAV5
AAV2
NT
MOI 12.5K
MOI 25K
MOI 50K
MOI 100K

图8B

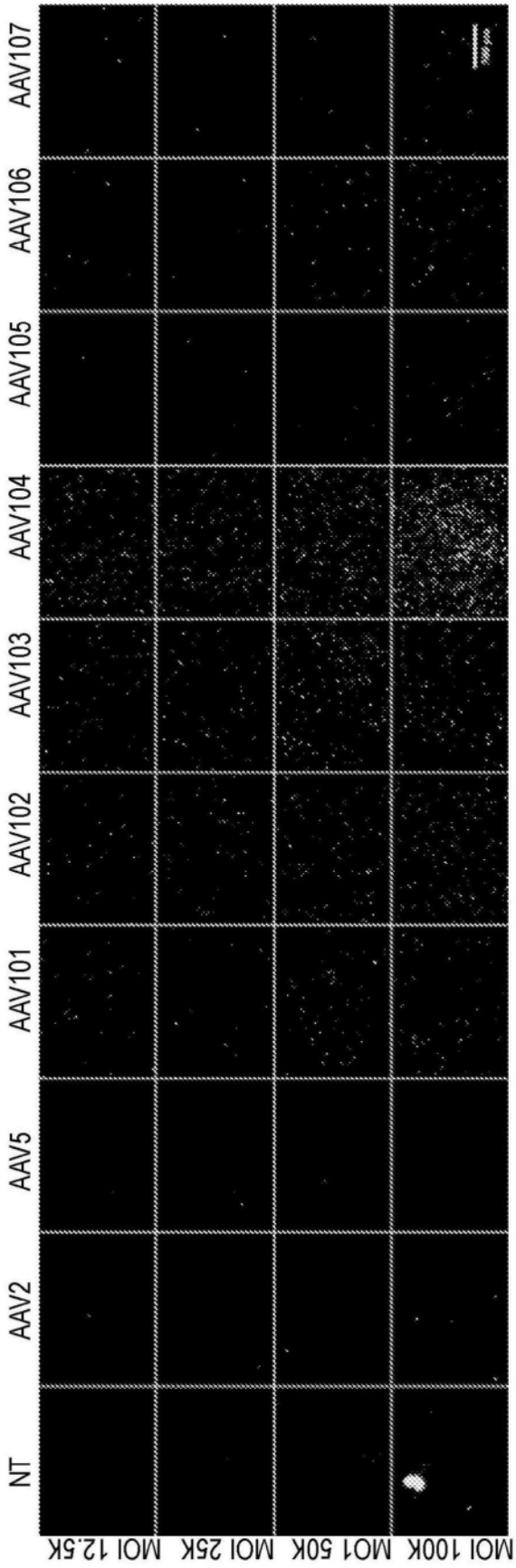

AAV107
AAV106
AAV105
AAV104
AAV103
AAV102
AAV101
AAV5
AAV2
NT
MOI 12.5K
MOI 25K
MOI 50K
MOI 100K

图8C

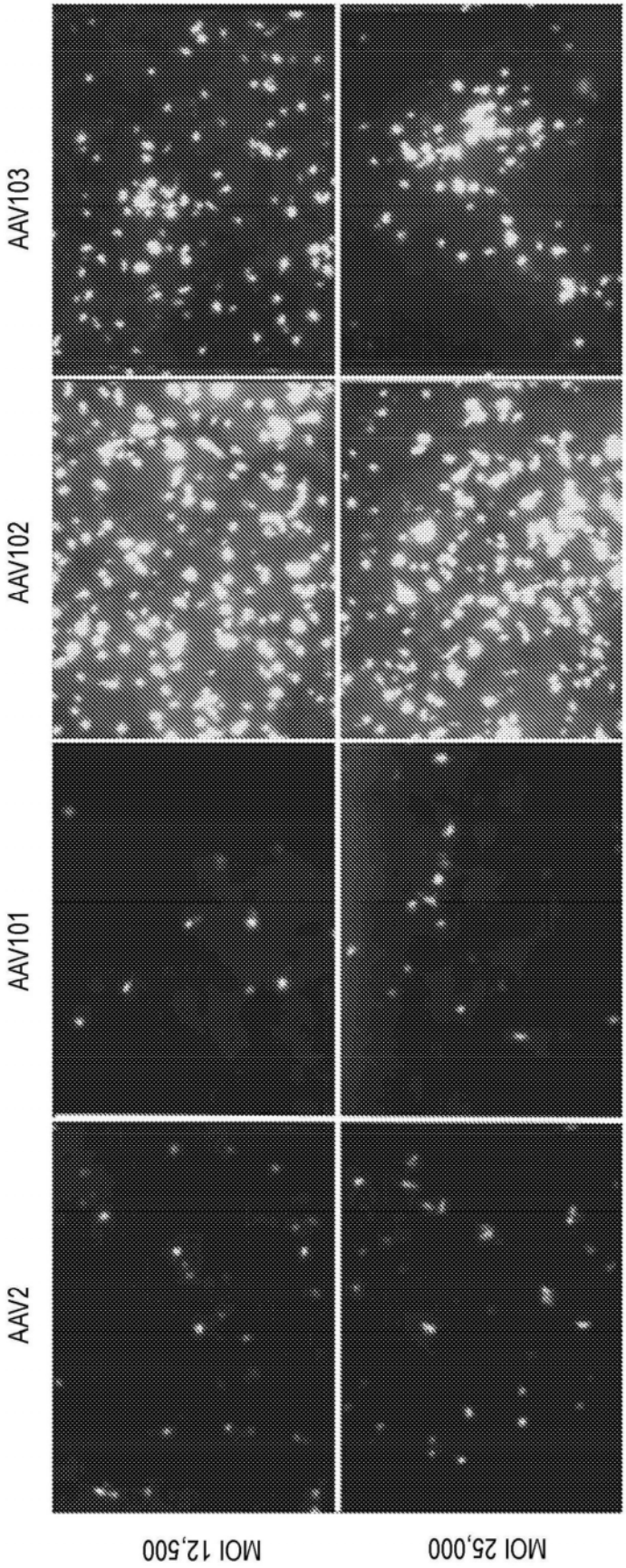


图9A

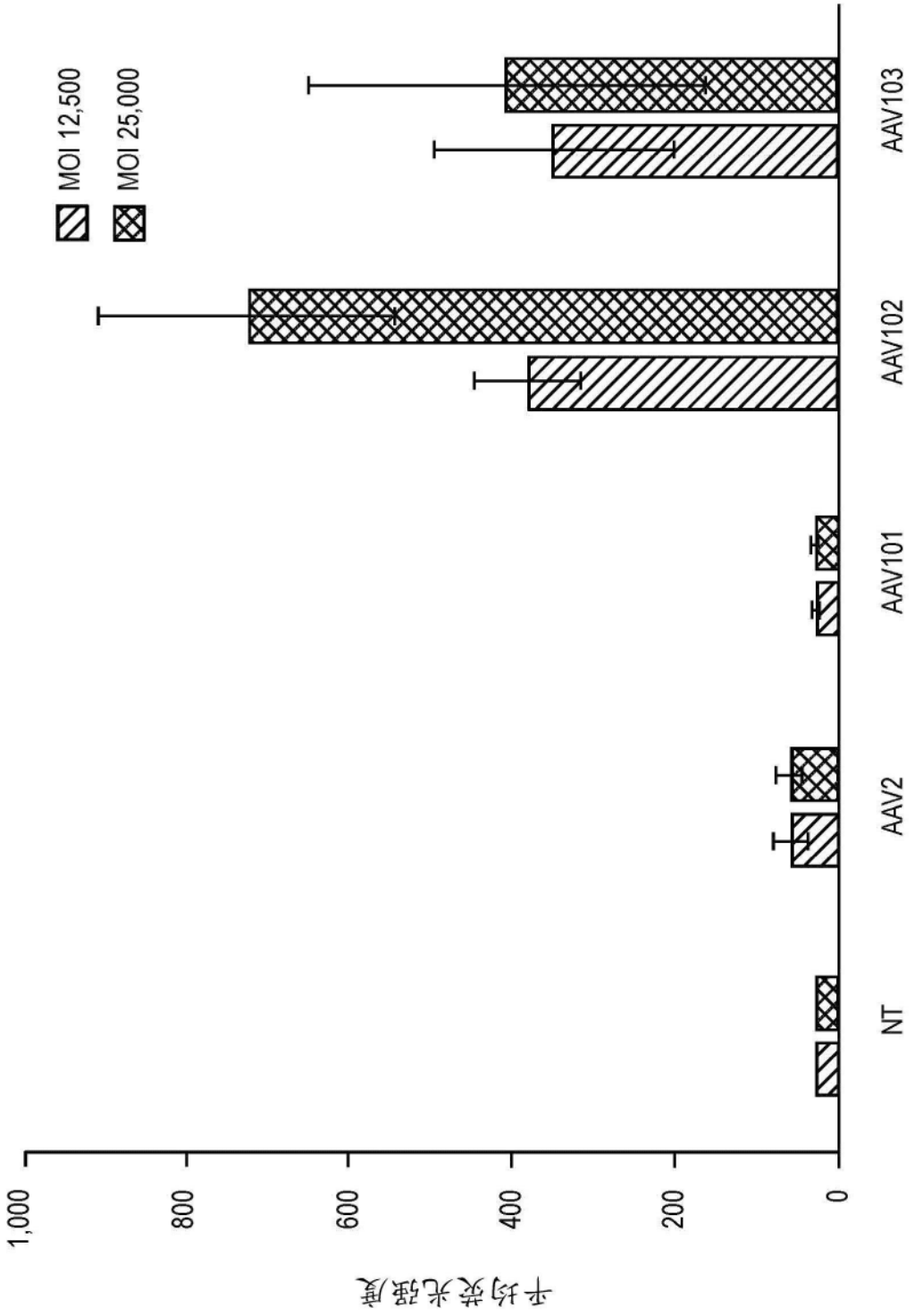

MOI 12,500
MOI 25,000
AAV103
AAV102
AAV101
AAV2
NT
0
200
400
600
800
1,000
平均荧光强度

图9B

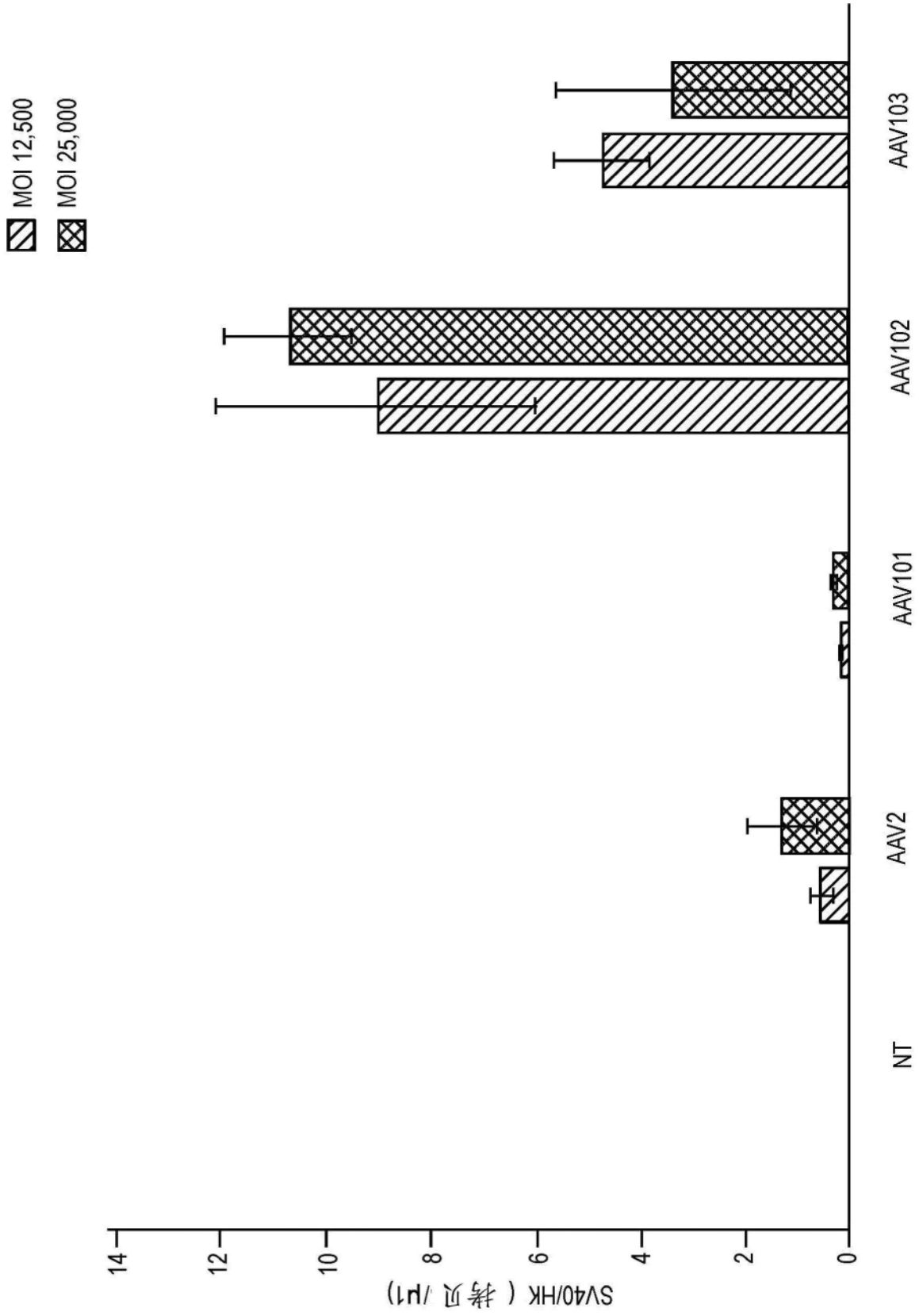

MOI 12,500
MOI 25,000
AAV103
AAV102
AAV101
AAV2
NT
0
2
4
6
8
10
12
14

图9C

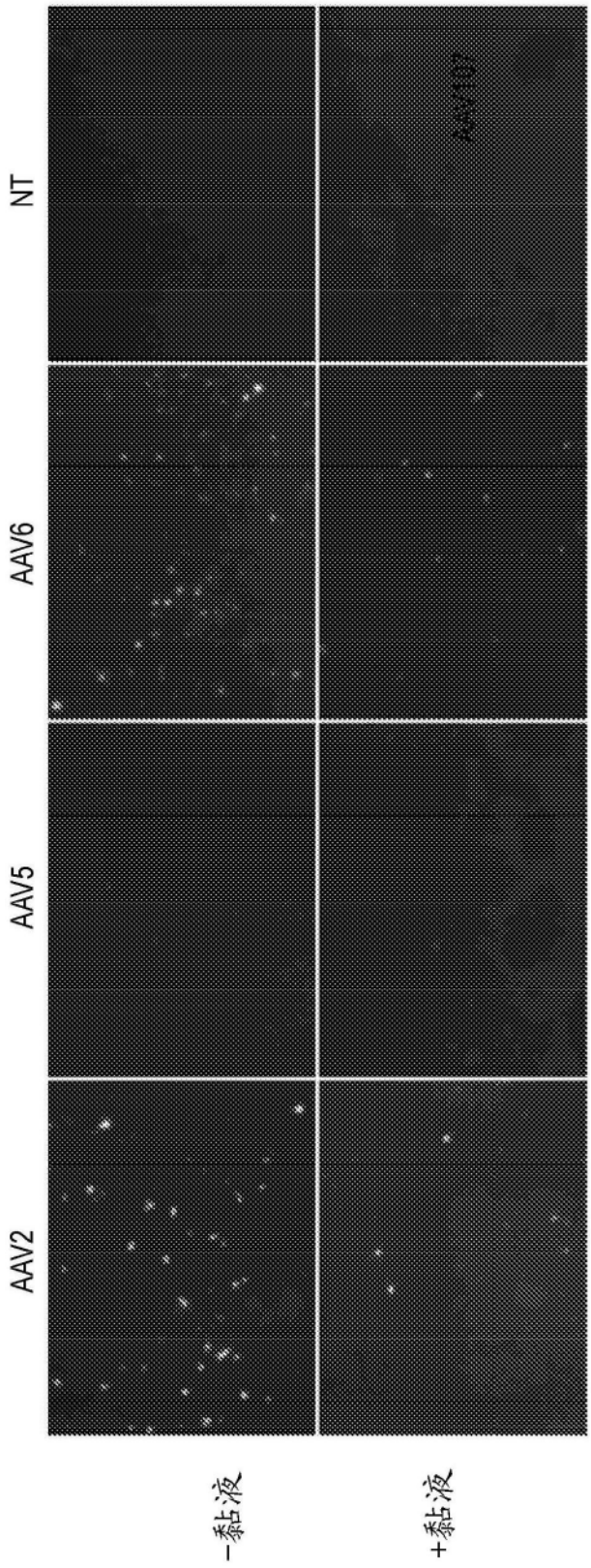


图10A

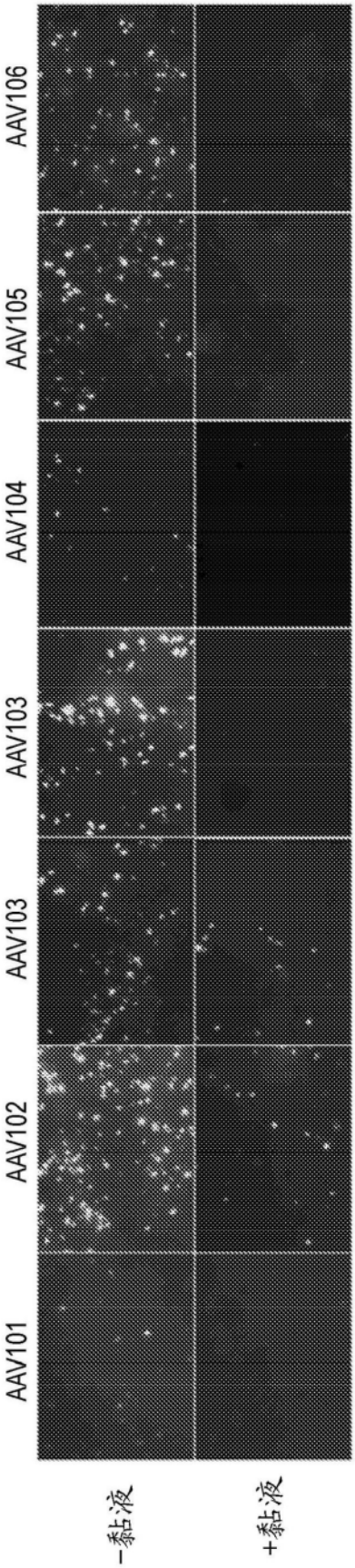


图10B