



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102341406 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201080010540. 8	代理人 曹津燕 李渤
(22) 申请日 2010. 03. 04	(51) Int. Cl.
(30) 优先权数据	C07K 14/015(2006. 01)
61/157, 436 2009. 03. 04 US	C12N 7/04(2006. 01)
61/306, 205 2010. 02. 19 US	C12N 15/35(2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 39/23(2006. 01)
2011. 09. 05	(56) 对比文件
(86) PCT国际申请的申请数据	US 20020052040 A1, 2002. 05. 02,
PCT/EP2010/001343 2010. 03. 04	WO 02053703 A2, 2002. 07. 11,
(87) PCT国际申请的公布数据	MAINUL HOQUE 等. Nuclear Transport of
W02010/099960 EN 2010. 09. 10	the Major Capsid Protein Is Essential for
(73) 专利权人 德国癌症研究中心	Adeno-Associated Virus Capsid Formation.
地址 德国海德堡	《JOURNAL OF VIROLOGY》. 1999, 第 73 卷 (第 9
专利权人 麦迪金股份公司	期),
(72) 发明人 佛罗莱恩·桑塔格	审查员 王翔宇
尤尔根·克莱舒密特 马库斯·奥雷	
克斯廷·勒克斯	
(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理	权利要求书6页 说明书75页
事务所 (普通合伙) 11382	序列表48页 附图42页

(54) 发明名称

组装活化蛋白(AAP) 及其用于制备基本上由VP3 组成的细小病毒颗粒的应用

(57) 摘要

本发明涉及编码新的细小病毒蛋白“组装活化蛋白”(AAP) 的核酸, 编码的多肽, 生产多肽的方法, AAP 特异性抗体, 核酸在多肽制备中的应用, 核酸或多肽在制备细小病毒颗粒中的应用, 以及在细胞中通过提供除细小病毒结构蛋白 VP3 的编码序列之外的序列片段 Z/AAP 编码核酸, 并且在 rep- 非依赖性启动子控制下表达 VP3 和片段 Z 来生产基本上由 VP3 组成的细小病毒颗粒的方法。此外, 本发明涉及基本上由 VP3 组成的和 / 或通过上述方法获得的细小病毒颗粒, 以及包括 (i) 异源启动子和 (ii) VP3 编码序列和 / 或片段 Z 的表达盒。本发明进一步涉及包括细小病毒颗粒或表达盒的药物, 尤其是疫苗, 以及它们的应用。

1. 一种核酸, 所述核酸编码由选自以下的氨基酸序列组成的多肽:

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22, 其中所编码的多肽能够将VP3蛋白组装成衣壳, 并且其中所述核酸不能表达功能蛋白VP1、VP2和Rep中的任何一种。

2. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸包括多于378个的VP3ORF的核苷酸。

3. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸包括直接位于VP3起始密码子5'端上游的邻近VP2-编码核苷酸的至少44个核苷酸, 或者其特征在于, 所述核酸的起始密码子为位于VP3起始密码子下游4个核苷酸处的ATG。

4. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸能够表达启动VP3衣壳组装的蛋白。

5. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸源自AAV2, 并且所述核酸的翻译起始密码子为C₂₇₂₉TG、A₂₇₃₅CG、A₂₇₁₇TT或T₂₇₂₀TG, 或者所述核酸源自另一种细小病毒, 并且所述核酸的翻译起始密码子位于AAV2的翻译起始密码子的同源位点。

6. 根据权利要求1所述的核酸, 所述核酸包括产生ATG起始密码子的突变从而能够改进开放阅读框翻译。

7. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸的多肽编码序列之后为poly(A)信号。

8. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸包括驱动多肽-编码序列转录的启动子。

9. 根据权利要求8所述的核酸, 其特征在于, 所述驱动多肽-编码序列转录的启动子是异源启动子。

10. 根据权利要求1所述的核酸, 其特征在于, 所述核酸源自腺相关病毒(AAV)、鹅细小病毒、鸭细小病毒和蛇细小病毒。

11. 根据权利要求10所述的核酸, 其特征在于, 所述AAV选自牛AAV(b-AAV)、犬AAV(CAAV)、小鼠AAV1、山羊AAV、大鼠AAV、禽AAV(AAAV)、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAV13。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的核酸, 所述核酸包括于表达盒、构建体、载体或细胞系中。

13. 一种由权利要求1至11中任一项所述核酸编码的多肽。

14. 根据权利要求13所述的多肽, 其中所述多肽为组装活化蛋白(AAP)。

15. 一种生产权利要求13所述多肽的方法, 所述方法包括在宿主细胞中表达权利要求1至11中任一项所述的核酸。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其特征在于, 所述宿主细胞选自哺乳动物细胞系、用于杆状病毒感染的细胞系、细菌菌株和酵母菌株。

17. 一种特异性结合由SEQ ID NO:1编码的多肽的抗体。

18. 根据权利要求17所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体特异性结合AAV2的AAP。

19. 根据权利要求1至11中任一项所述核酸在制备权利要求13或14所述的多肽中的应用。

20. 根据权利要求1至11中任一项所述核酸、或者根据权利要求13或14所述多肽在制备细小病毒颗粒中的应用。

21. 根据权利要求20所述的应用, 其特征在于, 所述细小病毒颗粒不包括功能蛋白VP1、VP2和Rep中的任何一种。

22. 一种生产细小病毒颗粒的方法, 所述方法包括以下步骤:

i. 提供能够由细小病毒的VP3-编码序列(cds)表达VP3的细胞, 其中所述VP3在rep-非依赖性启动子控制下, 并且表达由根据权利要求1至11中任一项所述的核酸编码的蛋白,

ii. 在有利于VP3表达和由根据权利要求1至11中任一项所述的核酸的表达蛋白的条件下孵育细胞, 从而生产细小病毒颗粒, 以及

iii. 任选地从细胞中纯化细小病毒颗粒,

其中每个细胞形成至少 10^5 个病毒颗粒,

没有功能性VP1、VP2和Rep蛋白被表达, 并且

其中所述细小病毒颗粒的衣壳被组装成至少98%的VP3, 这意味着仅1/50或更少的组装衣壳的蛋白为VP3的N-末端延伸的形式或不同的细小病毒蛋白。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述每个细胞形成至少 10^6 个病毒颗粒。

24. 根据权利要求22或23所述的方法, 其中所述功能蛋白VP1、VP2和Rep在细胞中的蛋白表达被关闭。

25. 根据权利要求22所述的方法, 其中提供的根据权利要求1至12中任一项所述的核酸相对于VP3cds为顺式。

26. 根据权利要求22所述的方法, 其中提供的根据权利要求1至12中任一项所述的核酸相对于VP3cds为反式。

27. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述细小病毒颗粒不包含功能性Rep蛋白中的任何一种。

28. 根据权利要求22所述的方法, 其中最多1/50的表的结构蛋白是根据权利要求13所述的多肽。

29. 根据权利要求22所述的方法, 其中最多1/100的颗粒包含DNA。

30. 根据权利要求22所述的方法, 其中没有颗粒包含DNA。

31. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述VP3cds包括一种或多种突变, 其中所述VP3cds的突变是一个或多个插入至选自以下的一个或多个位点的插入: I-261、I-266、I-447、I-453、I-459、I-534、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591和I-664。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述VP3cds的一个或多个突变导致位于VP3VLP表面上的一个或多个突变。

33. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述一个或多个插入是两个插入, 其插入至选自以下的两个位点: I-261、I-453、I-534、I-573和I-587。

34. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述突变是VP3三个位点的突变。

35. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述VP3包括至少一个与病毒异源的表位。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述VP3蛋白的表位为B-细胞表位。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述B-细胞表位被插入至AAV1、AAV2或AAV4的I-453和/或I-587。

38. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述VP3被包括于融合蛋白中。

39. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述VP3包括至少一个用于与配体结合的标签。

40. 根据权利要求22至39中任一项所述方法获得的细小病毒颗粒。

41. 一种仅由VP3组成的细小病毒颗粒,

i. 其中所述VP3任选地包括一个或多个突变, 和

ii. 其中所述VP3不包含异源的核定位信号, 并且

iii. 其中所述颗粒不包含任何一种功能性Rep蛋白。

42. 根据权利要求40或41所述的细小病毒颗粒, 其中所述颗粒不包含Rep40、Rep52、Rep68和Rep78。

43. 根据权利要求40所述的细小病毒颗粒, 其中所述VP3的突变是如权利要求31至39中任一项所述的突变。

44. 一种VP3表达盒A, 所述表达盒A包括异源启动子和如权利要求22至39中任一项所述的VP3cds, 其中所述VP3的转录由异源启动子驱动, 并且其中所述表达盒能够基本上仅表达VP3, 这意味着仅1/50或更少的蛋白为VP3的N-末端延伸的形式或不同的细小病毒蛋白。

45. 一种组合型表达盒, 所述表达盒包括异源启动子、如权利要求22至39中任一项所述的VP3cds和如权利要求1至11中任一项所述的核酸, 其中所述VP3的表达和如权利要求13至14中任一项所述的多肽的表达由所述一个异源启动子驱动。

46. 一种试剂盒, 所述试剂盒包括至少一种根据权利要求44所述的VP3表达盒A和至少一种根据权利要求12所述的核酸。

47. 一种试剂盒, 所述试剂盒包括至少一种根据权利要求45所述的组合型表达盒和手册。

48. 用作药物的根据权利要求40至43中任一项所述的细小病毒颗粒。

49. 根据权利要求48所述的细小病毒颗粒, 其中所述药物还包括一种或多种赋形剂。

50. 根据权利要求48或49所述的细小病毒颗粒, 其中所述药物为疫苗。

51. 根据权利要求50所述的细小病毒颗粒, 其中所述疫苗还包括一种或多种佐剂。

52. 根据权利要求48至51中任一项所述的细小病毒颗粒, 其用于预防或治疗自体免疫性疾病、传染性疾病、肿瘤疾病、过敏性疾病、代谢性疾病、慢性炎性疾病、神经性疾病、成瘾或者被用于眼科。

53. 根据权利要求52所述的细小病毒颗粒, 其中所述自体免疫性疾病和/或慢性炎性疾病选自类风湿性关节炎、银屑病和克罗恩病。

54. 根据权利要求52所述的细小病毒颗粒, 其中所述肿瘤疾病是适合用单克隆抗体治疗的。

55. 根据权利要求52所述的细小病毒颗粒, 其中所述过敏性疾病选自哮喘、过敏和过敏性鼻炎。

56. 根据权利要求52所述的细小病毒颗粒, 其中所述神经性疾病为阿尔茨海默病。

57. 根据权利要求52所述的细小病毒颗粒, 其中所述代谢性疾病为动脉硬化症。

58. 根据权利要求52所述的细小病毒颗粒, 其中所述眼科疾病为与年龄相关的黄斑变

性。

59. 根据权利要求48至58中任一项所述的细小病毒颗粒,其用于阻断B-细胞耐受性的方法中。

60. 根据权利要求48至59中任一项所述的细小病毒颗粒,其中所述细小病毒突变的结构蛋白在基因治疗中不作为载体使用。

61. 如权利要求48至49和52至59中任一项所述的细小病毒颗粒在制备用于基因治疗的药物中的应用。

62. 一种生产仅由VP3组成的细小病毒颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:

i. 在rep-非依赖性启动子的控制下,于细胞中由来自细小病毒的VP3编码序列(cds)表达VP3,

ii. 在rep-非依赖性启动子控制下,于细胞中表达DNA序列片段(片段Z),所述DNA序列片段包括

(1)VP3起始密码子上游至少44个核苷酸,和

(2)从起始密码子开始的多于242个的VP3cds核苷酸,其源自

a)细小病毒,或者

b)可以用于反式互补实验以引起VP3VLP组装的核酸序列,

iii. 于适合VP3表达的条件下孵育细胞,以及

iv. 从细胞中纯化细小病毒颗粒,

其中每个细胞形成 10^5 个病毒颗粒,

并且没有VP1、VP2和Rep蛋白被表达,

其中片段Z包括AAV2的SEQ ID NO:45的序列或不同于AAV2的任何AAV的相应序列。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中每个细胞形成 10^6 个病毒颗粒。

64. 根据权利要求62所述的方法,其中每个细胞形成 10^7 个病毒颗粒。

65. 根据权利要求62至64中任一项所述的方法,其中所述片段Z的序列与VP3cds不重叠。

66. 根据权利要求62所述的方法,其中所述VP1、VP2和Rep的蛋白表达被关闭。

67. 根据权利要求62所述的方法,其中所述片段Z的DNA序列之后为poly(A)信号。

68. 根据权利要求62所述的方法,其中所述片段Z包括VP3起始密码子上游至少44个核苷酸。

69. 根据权利要求62所述的方法,其中所述片段Z包括从起始密码子开始的VP3cds的多于242个核苷酸。

70. 根据权利要求62所述的方法,其中所述片段Z包括从起始密码子开始的VP3cds的多于445个核苷酸。

71. 根据权利要求62所述的方法,其中所述片段Z包括至少一种突变。

72. 根据权利要求70所述的方法,其中所述片段Z的突变包括至少一个用于蛋白翻译的终止密码子。

73. 根据权利要求62所述的方法,其中提供的所述片段Z相对于VP3cds为顺式。

74. 根据权利要求62所述的方法,其中提供的所述片段Z相对于VP3cds为反式。

75. 根据权利要求62所述的方法,其中所述细小病毒颗粒不包含Rep蛋白。

76. 根据权利要求62所述的方法, 其中没有结构蛋白是VP3的N-末端延伸形式。
77. 根据权利要求62所述的方法, 其中没有颗粒包含任何一种病毒DNA。
78. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述细小病毒是腺相关病毒(AAV)。
79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述AAV选自: 牛AAV(b-AAV)、犬AAV(CAAV)、禽AAV(AAAV)、AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11和AAV-12。
80. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述VP3cds还包括一种或多种突变, 其中所述VP3cds的突变是一个或多个插入至选自以下的一个或多个位点的插入: I-261、I-266、I-447、I-453、I-459、I-534、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591和I-664。。
81. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述VP3cds包括一个或多个沉默突变。
82. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述VP3cds的一种或多种突变导致位于VP3VLP表面上的一个或多个突变。
83. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述VP3cds的一种或多种突变导致位于VP3N-末端的一个或多个突变。
84. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述两个插入是插入至选自以下的两个位点: I-261、I-453、I-534、I-573和I-587。
85. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述VP3包括至少一种与病毒异源的表位。
86. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述VP3蛋白的表位为B-细胞表位。
87. 根据权利要求86所述的方法, 其中所述B-细胞表位被插入至AAV-1、AAV-2或AAV-4的I-453和/或I-587。
88. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述VP3被融合至第二蛋白或多肽。
89. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述VP3包括至少一种用于与配体结合的标签。
90. 仅由VP3组成的细小病毒颗粒,
- i. 其中所述VP3包括一种或多种突变, 和
 - ii. 其中所述VP3不包含异源的核定位信号(NLS), 和
 - iii. 其中所述颗粒不包含Rep蛋白。
91. 根据权利要求90所述的细小病毒颗粒, 其中所述VP3的突变是如权利要求80至89中任一项所述的突变。
92. 表达盒A, 所述表达盒A包括异源启动子和根据权利要求62和80至89中任一项所述的VP3cds, 其中所述VP3的转录由异源启动子驱动, 并且其中所述表达盒基本上仅表达VP3, 这意味着仅1/50或更少的蛋白是VP3的N-末端延伸形式或不同的细小病毒蛋白。
93. 一种药物, 所述药物包括根据权利要求90或91所述的细小病毒颗粒。
94. 根据权利要求93所述的药物, 其还包括一种或多种赋形剂。
95. 根据权利要求93或94所述的药物, 其中所述药物为疫苗。
96. 根据权利要求95所述的药物, 其还包括一种或多种佐剂。
97. 根据权利要求93所述的药物, 其用于预防或治疗自体免疫性疾病、肿瘤疾病、过敏性疾病、代谢性疾病、炎性疾病、神经性疾病, 或者被用于眼科。
98. 根据权利要求93所述的药物, 其用于阻断免疫耐受。
99. 根据权利要求97所述的药物, 其中所述疾病不是传染性疾病。

100. 根据权利要求93所述的药物, 其中所述细小病毒突变的结构蛋白在基因治疗中不作为载体使用。

101. 如权利要求90或91所述的细小病毒颗粒在制备疫苗中的应用。

102. 如权利要求90或91所述的细小病毒颗粒在制备疫苗中的应用, 所述疫苗用于预防或治疗自体免疫性疾病和/或慢性炎性疾病。

组装活化蛋白(AAP)及其用于制备基本上由VP3组成的细小病毒颗粒的应用

[0001] 本发明涉及编码新的细小病毒蛋白“组装活化蛋白”(AAP)的核酸,编码的多肽,生产多肽的方法,AAP特异性抗体,核酸在多肽制备中的应用,核酸或多肽在制备细小病毒颗粒中的应用,以及通过提供除细小病毒结构蛋白VP3的编码序列之外的序列片段Z来生产基本上由VP3组成的细小病毒颗粒的方法,所述序列片段Z为细胞中编码AAP和表达VP3的核酸,并且片段Z处在rep-非依赖性启动子的控制下。此外,本发明涉及基本上由VP3组成和/或通过上述方法可获得的细小病毒颗粒,以及包括(i)异源启动子和(ii)VP3编码序列和/或片段Z的表达盒。本发明进一步涉及包括细小病毒颗粒或表达盒的药物,尤其是疫苗,以及它们的应用。

[0002] 基于突变的细小病毒结构蛋白的病毒样颗粒(VLP)已被证明是合适的疫苗候选物(WO 2008/145401,在此引入参考)。基于这种突变的细小病毒结构蛋白,生成用于呈递耐受原或小抗原或甚至是单独的表位的VLP。当B细胞耐受性被破坏从而对患者产生疗效时,这些VLP被证明是特别有益的。

[0003] 对于基于VLP的疫苗的临床开发,生成理想的基于单一活性化合物/蛋白且尽可能纯的产物一般是必须的。就VLP而言,这时的问题一般在于病毒通常由超过一种的蛋白组成,并且能够包装特定的病毒DNA或来自宿主细胞的非特定DNA。因此,期望获得包含尽可能少的不同蛋白且优选没有核酸的“纯”VLP。在文献中,为有效生产这样的颗粒,已经进行了几次尝试。

[0004] Rabinowitz等(如Rabinowitz等,1999)已经通过接头蛋白插入诱变改变了AAV2的结构基因,以明确病毒体组装和传染性的关键组分。他们生成了突变体H2634,突变体H2634包含rep和cap ORF,以及在2634位点的HaeIII限制性位点处的插入。重要的是,由于rep ORF的存在,这种插入突变体表达各自的Rep蛋白。它组装完整的病毒体,并且衣壳似乎仅由VP3组成。作者认为,在细胞裂解物或纯化的病毒体中检测不到VP1 和VP2的表达是检测限的问题。

[0005] Warrington等(2004)和WO 2004/027019还解决了在衣壳形成中单独的衣壳蛋白的特定作用的问题,即限定全长肽可以被插入至AAV衣壳ORF而不破坏关键结构域的位置。生成包含rep和cap ORF的构建体,其中VP1、VP2和/或VP3的起始密码子突变,这样在Rep存在下仅表达单一或两个衣壳蛋白,Warrington等证明只要VP3蛋白存在就会形成包含基因组的颗粒。因此,表达VP1和/或VP2作为单一衣壳蛋白或一起作为衣壳蛋白的突变体不形成颗粒。于是他们从该结果中得出的结论是,VP1对于病毒感染是必须的,但是对于衣壳组装和颗粒形成来说不重要,而VP2对于病毒传染性来说似乎是不必要的。此外,他们观察到由具有突变的VP1和VP2起始密码子的构建体的单独VP3的表达足以形成VLP。

[0006] 同样地,Grieger等(2007)利用AAV2辅助质粒pXR2(包含rep和cap基因,Li等(2008))通过VP1和VP2起始密码子的诱变生成仅有VP3的颗粒。在Rep存在下,只要它们缺少VP1亚单位,仅有VP3的构建体以及仅有VP2/VP3的构建体的表达就会形成非感染性病毒颗粒。

[0007] 根据他们的结果,即一旦在Rep存在下,由表达VP3的突变体形成作为仅有的衣壳蛋白的包含基因组的AAV-样颗粒,这些颗粒似乎就可以容易地获得。

[0008] 以上描述的全部表达构建体表达的Rep蛋白不应当被考虑用于组装优选由一种蛋白组成且没有DNA的VLP。Rep不仅呈递附着于VLP的另外的蛋白,还具有将病毒基因组和非特异性DNA包装到预制的衣壳的作用(King等,2001)。应避免DNA的包装,因为VLP很可能进入患者的细胞,从而转染这种有害DNA,可能导致各种不利的效果。

[0009] 为确保仅有VP3被表达,Hoque等(1999a,1999b)和Handa等(JP2001169777)在异源启动子控制下,在任何一种Rep cds不存在下,生成仅包括VP3编码序列(cds)的表达构建体。令人惊奇的是,他们由这些表达构建体中不能产生病毒颗粒。通过分析在VP3起始密码子的不同5'位点开始表达的VP2的一系列缺失突变体,他们鉴定了对于VP3的核转移来说必须的区域,并且发现衣壳蛋白的核定位效率与VLP的形成效率密切相关。他们观察到只要位于VP2的cds中29和34位氨基酸之间的区域被呈递,或换句话说只要VP3的5'延伸的区域被呈递,就会形成病毒颗粒。该区域的氨基酸基序为PARKRL,由此他们得出的结论是,它的功能是作为核定位信号(NLS),其对于VP3易位进入核仁是重要的。

[0010] 可选择地,如果猿猴病毒40(SV40)大T抗原的NLS被融合至VP3蛋白的N-末端(NLS_{SV40}-VP3),也可以获得衣壳。这种融合蛋白可以形成VLP,表明位于蛋白N-末端侧的VP2-特异性区域不是结构所需的。由于该发现,作者推论VP3具有足够的VLP形成信息,并且VP2仅对于衣壳蛋白的核转移是必须的,其又是VLP形成的先决条件。

[0011] 由于他们使用的突变体构建的方法,全部构建体直接由位于编码序列5'末端的ATG起始密码子开始。因为“位置效应”(Kozak,2002)一般将引起转录体的第一(最上游)ATG起始密码子启动翻译,要被表达的主要蛋白和形成的颗粒将是N-末端延伸的VP3。仅小部分翻译将从VP3另外的下游ATG起始密码子开始。

[0012] 与Hoque等(如上文)和Handa等(如上文)相一致,使用他们描述的构建体,我们利用AAV2滴定ELISA(根据制造商Progen(Heidelberg,Germany)的说明书定量,图15B),既不在哺乳动物细胞也不昆虫细胞中,在组成型启动子控制下,不能由仅包括VP3的cds的表达构建体以定量的量(意味着存在 $<10^{10}$,尤其是 $<10^8$ 衣壳/ml)检测到仅由VP3组成的VLP。在组成型启动子控制下,我们不能由仅包括各自的cds、以ATG密码子开始的表达构建体检测到仅表达VP1或VP2的AAV-样颗粒。在Rep表达存在或不存在时,以及在腺病毒辅助基因的共递送存在或不存在时,单独的或以不同比率的进行不同组合的全部构建体的衣壳生产效率处于AAV2滴定ELISA的较低检测限($<10^8$ 衣壳/ml,见上文)。

[0013] 我们证实,VLP可以由包括一些VP3起始密码子5'序列和VP3编码序列的表达构建体生成,但是与Hoque等的结果相反,我们不能利用NLS_{SV40}-VP3融合构建体以可检测的量定量衣壳组装($\geq 10^8$ 衣壳/ml,参见实施例8)。因此,Hoque等的方法不适用于生产适合于商业化接种疫苗目的的大量纯VLP。

[0014] 综合来看,为了获得商业上可行的工艺或产品,现有技术在Rep存在时利用表达系统不可避免地导致Rep和DNA的包装,或者在Rep不存在时VP3VLP的产量太低。

[0015] 因此,本发明的目的是提供避免了以上的一个或多个缺点,用作基于VLP的疫苗的颗粒,以及生产所述颗粒的方法。特别地,期望基本上仅由一种类型的病毒蛋白组成的VLP不包含DNA或仅包含非常少量的DNA,和/或它们可以以经济的方式,如以高产量生产。

[0016] 该问题是通过提供基本上由VP3组成、基本上没有VP1、VP2和Rep蛋白的细小病毒颗粒来解决的。它们可以这样来产生,即在rep-非依赖性启动子控制下在细胞中由细小病毒结构蛋白VP3(VP3cds)的VP3编码序列(cds)表达VP3。此外,在该方法中,编码新鉴定的多肽的DNA序列片段(片段Z)(部分地)被表达,该多肽被命名为“组装活化蛋白”(AAP),该DNA序列片段能够得到高产量,例如每个细胞将形成大约 10^5 左右,优选大约 10^6 ,并且更优选大约 10^7 个病毒颗粒。就一般的细小病毒衣壳组装而言,这种新的蛋白的鉴定是全新的概念,特别是对于VP3衣壳,因为作为假定,在VP2蛋白,如假定的“PARKRL”基序或者用于VP3的异源核定位序列内没有序列基序是必需的(Hoque等,1999a,1999b)。

[0017] 与本领域的描述相反,这些VLP不包含异源NLS或VP2蛋白。一旦在VP3中的一个或几个优选位点插入表位,就成功地组装成呈递表位的颗粒用于疫苗开发。采用这种方法,每毫升粗裂解物中形成 10^{11} ,优选大约 10^{12} ,并且更优选大约 10^{13} 个病毒颗粒,因此产量足够用于商业上可行的产品。

[0018] 令人惊奇地并且符合其编码多肽的功能,可以以顺式或者反式提供序列片段Z,以组装基本上由VP3组成的衣壳。进一步地,片段Z和VP3可以源自细小病毒科的相同或不同的属,各自相互反式互补用于VP3颗粒组装。

[0019] 以下定义解释了在涉及本发明的产品、方法和应用的上下文中如何解释特定的术语。

[0020] “AA”用作氨基酸的缩写,“nt”用作核苷酸的缩写。

[0021] 根据本发明,“细小病毒”或“细小病毒的”涉及细小病毒科成员,其中所述野生型表达VP1、VP2和VP3作为衣壳蛋白。细小病毒科包含以下2个亚科分出的几个属:细小病毒亚科(Parvovirinae)(细小病毒属(Parvovirus)、红病毒属(Erythrovirus)、依赖病毒属(Dependovirus)、阿留申水貂病毒属(Amdovirus)和博卡病毒属(Bocavirus)和浓核病毒亚科(Densovirinae)(浓核病毒属(Densovirus)、艾特拉病毒属(Iteravirus)、环星黑烟浓核病毒属(Pefudensovirus)和康特拉病毒属(Contravirus)(领域:病毒学,第四版,2001年,第2卷,第69和70章,Lippincott Williams Wilkins,Philadelphia;<http://virus.stanford.edu/parvo/parvovirus.html>; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_parvo.htm#SubFamily1)。野生型衣壳由三种结构蛋白VP1、VP2和VP3组装而成,它们以1:1:8的比率形成AAV衣壳的60个亚单位(Kronenberg等,2001)。因此,术语“VP3”代表病毒蛋白3。天然存在的细小病毒颗粒由包围单链DNA基因组的二十面体衣壳组成。优选的细小病毒是依赖病毒属,包括AAV。

[0022] 在本发明的上下文中,术语“血清型”代表以它们的特征抗原集来区分的一组密切相关病毒中的一类病毒。因此,血清型通过血清学分型(检测在病毒表面上可识别的抗原)来表征。因此,AAV还可以选自源于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11至AAV12和AAV13,特别是AAV2的血清型。

[0023] 细小病毒颗粒“基本上由VP3组成”或“基本上仅由VP3组成”意味着衣壳被组装成至少98%,优选至少99%,更优选至少99.6%,并且基本上至少99.8%的VP3。这意味着仅1/50,优1/100,更优1/250,并且基本上仅1/500或更少的蛋白组装衣壳为VP3的N-末端延伸的形式或完全不同的蛋白。在优选的实施方案中,衣壳被组装成至少98%,优选至少99%,更优选至少99.6%,并且基本上至少99.8%的VP3,意味着仅1/50,优1/100,更优1/250和基本

上仅1/500或更少的蛋白组装衣壳为VP3的N-末端延伸的形式或不同的细小病毒蛋白。特别优选的是,细小病毒衣壳仅由一种蛋白组成,该蛋白为其野生型序列的VP3或其突变形式。

[0024] “编码序列”或“cds”是指直接确定其产物氨基酸(AA)序列的基因部分。因此,“VP3编码序列”或“VP3cds”限定了cap基因的一部分,根据该部分基因密码子被翻译成VP3的氨基酸(AA)序列,可以是野生型或如本发明进一步限定的突变的。VP3cds位于cap ORF的3'末端,并且由编码蛋氨酸的ATG核苷酸三联体开始。根据所选择的细小病毒个体,VP3cds被翻译成大约533个Aas。以AAV2为例,主要衣壳蛋白VP3的cds可以根据Ruffing等(1994)从NCBI登记号(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)NC_001401(核苷酸2809-4410)获得,AA序列来自相应的NCBI登记号YP_680428。根据本发明的方法,本发明的VP3cds编码能够形成颗粒的VP3蛋白。N-末端延伸的VP3蛋白包括VP2的一个或多个各自的Aas。因此,与其N-末端插入异源序列的VP3相比,VP2可以被看作是N-末端延伸的VP3,所述异源序列如下文进一步限定的标签(Tag)或表位。

[0025] 基因密码子限定了三核苷酸序列之间的排布,被称为“密码子”和Aas。核酸序列中的三联密码子通常确定一个AA。

[0026] “阅读框”是DNA或RNA中连续的且不重叠的三核苷酸密码子组。在mRNA链中有三种可能的阅读框,而在双链DNA分子中有六种可能的阅读框,这事因为由双链进行转录是可能的。“开放阅读框”(ORF)是包含起始密码子、通常具有三核苷酸倍数长度的后续区域和由终止密码子终止的阅读框。ORF可以编码蛋白。一个或两个核苷酸的插入明显导致移动至不同的阅读框(移码突变)。通常,ATG用作起始密码子。然而,来自AAV的VP2的已知的非典型起始密码子有时也被使用。

[0027] “突变”是生物体遗传物质的核苷酸序列的改变。这种突变可能导致编码的蛋白的改变,因而根据它们发生在哪儿以及它们是否改变编码蛋白的结构和/或功能,可能有不同的影响。在结构上,突变可以分为点突变,添加一个或多个额外的nt至DNA/添加一个或多个额外的AA至蛋白的插入,或者移走一个或多个nt/AA的缺失。nt/AA的“插入”通常是指将至少一个异源nt/AA插入至本发明的细小病毒蛋白的序列。在本文中“异源”是指与细小病毒蛋白的来源病毒相比是异源的。以细小病毒结构蛋白为例,插入的Aas可以简单地被插入在细小病毒结构蛋白的两个特定Aas之间。Aas的插入还可以与在插入位点处的细小病毒结构蛋白的特定Aas的缺失一起导致细小病毒结构蛋白的Aas全部替换(如10个特定Aas被10个或更多个插入的Aas替换)或部分替换(如10个特定Aas被8个插入的Aas替换)。

[0028] 为启动蛋白合成,除了开放阅读框由接近其5'末端的起始密码子开始外,在起始密码子局部环境中必须满足一些另外的序列要求。其中一种是“Kozak序列”。由特定mRNA合成的蛋白的量取决于Kozak序列的活力。对于“强”共有序列,相对于被称作第1号的翻译起始密码子而言。在位点+4(即共有序列中的G)和-3(即共有序列中的A或G)处的核苷酸必须都与共有序列相匹配(没有第0号位点)。“适当的”共有序列仅有1个这样的位点,而“弱”共有序列两者都没有。在-1和-2的cc并不保守,但是对于总体的强度是有贡献的。还有证据表明在-6位点的G在翻译启动中是重要的。

[0029] 术语“同一性百分比”是关于两个序列,特别是氨基酸序列的,其显示在两个序列比对中有多少个氨基酸或碱基是相同的。为了标准化,可以使用更长序列、更短序列或比对栏占两种序列的长度。通常,使用序列比对软件以确定序列的同一性百分比。用于一般序

列比对工作的常见软件工具包括例如用于比对的ClustalW和T-coffee,以及用于数据检索的BLAST和FASTA3x。技术人员在评估同一性百分比时,将能够选择合适的方法或软件及适当的设置。

[0030] “核酸分子”可以为RNA形式,如mRNA或cRNA,或者为DNA形式,包括例如通过克隆获得或化学合成技术产生或它们的组合获得的cDNA和基因组DNA。DNA可以是三链、双链或单链的。单链DNA可以是编码链,又被称为有义链,或者可以是非编码链,又被称为无义链。

[0031] “Rep-非依赖性启动子”是在Rep蛋白不存在时可以被活化的启动子,在本发明的上下文中,Rep代表由细小病毒编码的非结构蛋白,尤其是如Muzyczka and Berns(2001)所描述的Rep40、Rep52、Rep68和Rep78。这些启动子包括例如异源的组成型启动子和诱导型启动子。

[0032] “基因表达”是来自基因,如DNA序列的遗传信息被转变成功能性基因产物,如蛋白或核酸的过程。因此,基因表达总是包括转录,但不必须包括翻译成蛋白。rRNA和tRNA基因是分别被表达成rRNA和tRNA,并且不翻译成蛋白的非蛋白编码基因的实例。为了发生基因表达,优选地,启动子必须存在于基因附近以提供结合位点和募集酶以开始转录。

[0033] 基因表达的“关闭”是指基因表达被阻断。其可以通过基因修饰(DNA序列的变化,包括其表达所必需的起始密码子、至少部分cds或至少部分序列元件,如启动子的突变或缺失),或者通过用试剂,如短DNA或RNA寡核苷酸处理进行,该寡核苷酸具有与mRNA转录体或基因互补的序列。优选地,后者用于瞬时关闭。

[0034] “Poly(A)”位于转录体的3'末端,指示在转移到细胞质之前的RNA处理过程中添加一系列腺嘌呤。这些所谓的poly(A)尾增强了RNA的稳定性。

[0035] “序列片段Z”或“片段Z”是DNA片段,其包括

[0036] (i)VP3起始密码子上游的至少44个核苷酸和

[0037] (ii)从起始密码子开始的超过242个的VP3cds核苷酸,其源自

[0038] (a)细小病毒,或

[0039] (b)与源自AAV2(序列1,图2)的片段Z的核苷酸序列至少60%,优选80%,更优选90%,特别是99%并且有利的是100%相同的核苷酸序列,或

[0040] (c)在65°C下,于4x SSC、0.1%SDS中,与AAV2的片段Z DNA分子的互补链杂交的核酸序列,或

[0041] (d)可以用于反式互补实验从而引发VP3 VLP组装的核酸序列。

[0042] 这意味着片段Z的序列同时代表VP2和VP3cds的一部分,因为AAV衣壳基因由相同ORF的重叠序列、利用可选的mRNA剪切和可选的翻译起始密码子编码。因此,VP2基因包含具有特定的5'区域的全部VP3基因序列(图1中的图示)。

[0043] 要求保护的多肽或核酸的“功能活性变体”是指本发明上下文中所称的多肽或核酸,其为通过如本文详细描述的一种或多种突变获得的变体,其具有功能活性是因为该变体保持了其生物功能,如其启动VP3组装的能力。生物活性可以在反式互补实验中确定,其中由这样的核酸表达这样的多肽能够启动由VP3编码构建体组装VP3 VLP,而所述VP3编码构建体在适合条件下的表达不足以用于VP3衣壳组装。适合的不足的AAV2 VP3编码构建体为pCMV-VP3/2809或pCI-VP3。适合的实验在实例,如实施例3中描述。优选地,保持生物功能被定义为具有天然存在的AAP的至少50%,优选至少60%,更优选至少70%,80%或90%,还

更优选95%的活性。

[0044] 如实施例3所描述的,可以进行互补实验,并且通过ELISA(实施例1.5)或通过免疫荧光(1.6)分析。两种实验都是基于通过单克隆抗体与组装状态中的病毒衣壳相结合来检测病毒颗粒。例如单克隆抗体A20(Progen, Heidelberg, Germany)与AAV2和一些其他AAV血清型的病毒衣壳相结合,对于相关性较远的血清型可商购特异性抗体。如果没有可用的特异性抗体,可以通过电子显微镜检(例如参见Hoque等(1999b)),或蔗糖密度梯度分析(实施例1.3.2.)检测病毒衣壳。

[0045] “VP3的延伸形式”包括一般几个Aas在N-末端的延伸。这些N-末端延伸代表用于编码VP2但不编码VP3的序列的3'部分,因为AAV衣壳基因由相同ORF的重叠序列利用不同的起始密码子(图1)编码。因此,N-末端延伸的VP3与N-末端截短的VP2相同,意味着部分VP2可以存在于VP3的N-末端延伸内,但没有完全和完整的野生型VP2蛋白被表达,如Ruffing等(1994)给出的例子和可从NCBI(登录号:NC_001401)得到的。根据本发明,颗粒基本上由VP3组成(如所定义的),因此VP3的延伸形式非常稀少,而天然存在的颗粒包括的VP1:VP2:VP3的比率为1:1:8(Kronenberg等,2001)。

[0046] 为确定表达于特定样品中的衣壳蛋白组成,可以使用蛋白免疫印迹(Western blot)分析。细胞裂解物或纯化的VLP可以利用蔗糖梯度来分离,由凝胶电泳分析分离产物并转移到硝化纤维素膜,其中可以利用特异性针对靶蛋白的结合剂探测它们。单克隆抗体B1与全部三种衣壳蛋白反应且可以被用于检测VP3,而单克隆抗体A69仅与VP1和VP2反应且可以被用于检测截短的VP2。

[0047] 在本发明上下文中,“有效的颗粒形成”是指在粗裂解液中形成大约 10^{11} ,优选大约 10^{12} 并且更优选大约 10^{13} 个颗粒/ml的高颗粒滴度(对应于每个转染的细胞大约 10^5 ,优选大约 10^6 并且更优选大约 10^7 个颗粒)。

[0048] 术语“大约”是指根据本发明,一般误差范围为 $\pm 20\%$,特别是 $\pm 10\%$,尤其是 $\pm 5\%$ 。

[0049] 病毒颗粒滴度可以利用可商购的滴度ELISA试剂盒,由转染的细胞(见上文)的裂解物以其未稀释形式或稀释形式来定量,所述滴度ELISA试剂盒是基于单克隆抗体A20与组装状态的病毒衣壳的结合来测量病毒浓度的。如上文已经描述的,如果抗体A20不与例如不同病毒血清型的衣壳相结合,颗粒滴度可以由电子显微镜显像并由计数定量(Grimm等,1999,Grimm和Kleinschmidt,1999,Mittereder等,1996)。

[0050] 为分析蛋白表达和估计它的量,转染的细胞的相同部分的细胞裂解物可以经处理用于SDS-PAGE。通过凝胶电泳和转移到硝化纤维素膜,可以利用特异性针对靶蛋白的结合剂(如单克隆抗体B1、A69、抗-GFP)来探测蛋白。蛋白翻译的量可以由与蛋白特异性结合的结合剂的量来估算。这些复合物可以通过例如免疫组化染色、免疫荧光染色或放射性标记来显像和定量。

[0051] 术语“结合剂”是指与它各自的结合对象特异性相结合的分子。常规使用的结合剂是抗体,特别是单克隆抗体、如单链抗体或抗体片段的抗体衍生物。原则上,可以使用所有类别的抗体,优选IgG抗体。同样可以使用抗体的片段或多聚体。常规使用的片段是单链抗体、Fab-或(Fab)₂-片段。其它合适的结合剂实例为蛋白支架,如anticalin或lipocalin(Nygren和Skerra,2004)、受体或其部分(如可溶性T-细胞受体)、锚定蛋白、微体或核酸适

体(aptamer)。

[0052] 术语“特异性结合”是指两种分子A和B,优选蛋白,相互结合从而生成复合物AB,该复合物的亲和力($K_D = k_{off}/k_{on}$)为至少 $K_D = 1 \times 10^{-5} \text{mol/l}$,优选至少 $1 \times 10^{-7} \text{mol/l}$,更优选至少 $1 \times 10^{-8} \text{mol/l}$,尤其是至少 $1 \times 10^{-9} \text{mol/l}$ 。

[0053] “表位”是由免疫系统,特别是抗体、B-细胞或T-细胞识别的大分子的一部分。

[0054] “模拟表位”是由源自结构蛋白的线性序列的不同区域的几个Aas组成的非线性结构表位,这些区域由于衣壳的整体三级结构而位置紧密相邻,或者“模拟表位”是由源自非肽结构,如碳水化合物残基、核酸或脂质的几个Aas组成的非线性结构表位,上述非线性结构表位被抗体特异性结合。因此,通过模拟表位的结构,模拟表位引起的抗体响应与由表位激起的抗体响应相同。在本发明的上下文中,模拟表位可以由单独插入的肽序列组成(部分),或者可以由插入的肽和细小病毒核颗粒AA残基组成。

[0055] 在此所使用的术语“B-细胞表位”是指还包括模拟表位。因此,表位可以是线性的和结构的。

[0056] 在涉及本发明的产品、方法和应用的上下文中,术语“抗原”是指与将诱导的免疫反应所针对的任何靶抗原。这种靶抗原通常是易引发体液免疫反应的抗原。它们通常是可以被翻译后修饰的蛋白,例如糖基化蛋白。

[0057] 术语“免疫球蛋白”(缩写Ig)是指在血清中天然存在的任何糖蛋白,其在对免疫抗原入侵的响应中被诱导,并且通过根除病原体来保护宿主。总之,已知有五种属于这类蛋白的人抗体: IgM、IgG、IgA、IgD和IgE。

[0058] 第一方面,本发明涉及一种核酸,所述核酸编码包括选自以下氨基酸序列的多肽: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22,或者编码包括这些氨基酸序列中任何一种的功能活性变体的多肽,其中所述功能活性变体

[0059] (i)具有与SEQ ID NO:1至22的氨基酸序列中任何一种至少60%相同的氨基酸序列,和/或

[0060] (ii)由cDNA编码,所述cDNA与选自以下的核酸序列: SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44,或者与SEQ ID NO:23至44的核酸序列中任何一种互补的核酸序列在6x SSC、5x Denhardt's溶液、0.5% SDS中,于40°C下杂交2至12小时;和/或

[0061] (iii)由细小病毒基因组的一部分编码,所述细小病毒基因组的以部分包括的开放阅读框(ORF)未在编码VP1、VP2和VP3的框内,包括多于378个的VP3ORF核苷酸,

[0062] 其中所述核酸不能表达任何一种功能性Rep蛋白,尤其是不能表达Rep40、Rep52、Rep68、Rep78、VP1、VP2和VP3。

[0063] 已证明AAV2cap基因的目前未鉴定的产物的共表达有效启动了VP3组装成二十面体衣壳。这种被命名为组装活化蛋白或AAP的蛋白由cap基因的ORF2编码(其中第一ORF编码

VP1、VP2和VP3),并且分子量大约为23kDa。由蛋白免疫印迹估算的AAP分子量更大(约30kDa)可能是由于翻译后修饰。它的细胞定位是在核仁中,并且它指引VP蛋白到发生衣壳组装的核仁。然而,单独的VP3核仁定位不足以形成衣壳,表明AAP还在全长AAV基因组内提供了额外的分子伴侣-类型、支架和/或成核作用。

[0064] 针对不同的细小病毒可以鉴别同源的多肽。图28中显示了这种源自不同细小病毒cap基因的ORF2的预测的AAP蛋白序列的比对。因此,根据本发明的核酸优选以编码包括SEQ ID NO:1(AAV2)、SEQ ID NO:2(AAV1)的氨基酸序列,或者SEQ ID NO:5(AAV5)的氨基酸序列的多肽为特征。

[0065] 本发明设想天然存在的AAP可以被修饰且保持功能活性。例如为增加表达、稳定性和/或活性,或者为利于更容易克隆构建体,可以生成这种功能活性变体。因此,本发明还涉及功能活性变体,所述功能活性变体具有的氨基酸序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的氨基酸序列中任何一种至少65%,更优选至少70%,更优选至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,更优选至少95%,最优选至少99%,并且特别是100%相同,和/或所述功能活性变体由cDNA编码,所述cDNA与SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44的核酸序列中的任何一种互补的核酸序列在6x SSC、5x Denhardt's溶液、0.5%SDS中,于45°C,更优选50°C,更优选55°C,更优选60°C,尤其是65°C,并且有利地68°C下杂交。优选地,所述功能活性变体由cDNA编码,所述cDNA与SEQ ID NO:23的核酸序列或与SEQ ID NO:23的核酸序列互补的核酸序列在6x SSC、5x Denhardt's溶液、0.5%SDS中,在上述特定的条件下杂交。

[0066] 在本发明优选的实施方案中,所述核酸编码由选自以下氨基酸序列组成的多肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22,或者编码由这些氨基酸序列中的任何一种的功能活性变体组成的多肽,其中所述功能活性变体的定义同上。更优选地,所述核酸编码由选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:22的氨基酸序列组成的多肽。

[0067] 由于采用AAP的N-末端和C-末端截短实验已发现,就AAV2的AAP的3'-末端而言,从ATG₂₈₀₉开始与VP3ORF重叠378nt,不能支持VP3衣壳组装,而VP3ORF的445个核苷酸在衣壳生产中与wt AAV大致同样有效。因此,本发明的核酸的特征在于其包括多于378个的VP3ORF核苷酸(如多于378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399个核苷酸),优选至少400个核苷酸(如至少400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424个核苷酸),更优选至少425个核苷酸(如至少 425、426、427、428、429、430、431、

432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444或445个核苷酸),和尤其是至少445个核苷酸(如445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487或488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500或更多个核苷酸)。

[0068] 关于AAV2的AAP的5'-末端,由具有VP3起始密码子上游的44个核苷酸延伸的核酸编码的N-末端截短的AAP在衣壳生产中与wt AAV大致同样有效,条件是翻译由框中插入的ATG开始至ORF2,并且若无ATG起始密码子被插入效率更低(数据未给出)。由在2858位点代替ACG的ATG开始的核酸编码的N-末端截短的AAP未形成可检测的衣壳。对于AAV4和AAV9,已证实起始于各自的VP3起始密码子的VP3 cds表达构建体足以用于进行可检测的衣壳组装,因而还编码功能性AAP(变体)(数据未给出)。

[0069] 因此,本发明的核酸的特征在于其包括位于VP3起始密码子的5'端直接延续处的邻接VP2-编码核苷酸的至少44个核苷酸(如44、45、46、47、48、49或50个核苷酸)、优选至少20个核苷酸(如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42或43个核苷酸)、更优选至少5个核苷酸(如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个核苷酸)。

[0070] 核酸编码AAP或其变体可以正好从VP3的3'起始密码子起始,如从AAV4和AAV9(上文)可以看出的。因而,在另一个优选的实施方案中,本发明的核酸的特征在于其起始密码子为VP3起始密码子下游的4个核苷酸,优选24个核苷酸,并且更优选44个核苷酸处的ATG。

[0071] 因而,在优选的实施方案中,本发明的核酸包括的核苷酸从VP3起始密码子上游至少44个核苷酸和下游445个核苷酸(计算包括ATG)开始,优选从VP3起始密码子上游至少20个核苷酸(如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43或44个核苷酸)和下游425个核苷酸(如425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444或445个核苷酸),并且尤其是从VP3起始密码子上游至少5个核苷酸(如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个核苷酸)和下游400个核苷酸(如400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423或424个核苷酸)开始。因此,本发明核酸的总长度为至少489nt(如489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500或更多nt),优选至少445nt(如445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487或488nt),和并且尤其是至少405nt(如405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443或444nt)。

[0072] 本发明的核酸能够表达启动VP3衣壳组装的蛋白。它的特征在于它源自AAV2,并且它的翻译起始密码子(在野生型AAV2序列中发现)为C₂₇₂₉TG、A₂₇₃₅CG、A₂₇₁₇TT或T₂₇₂₀TG,或者它源自另一种细小病毒并且它的翻译起始密码子位于与AAV2的翻译起始密码子同源的位点。另外的细小病毒的同源起始密码子可以通过特定的比对(参见图27)并且寻找由可能的非典型起始密码子编码的氨基酸而容易地确定。这种可能的非典型起始密码子可以通过突

变分析容易地鉴定,如实施例14中对AAV2C₂₇₂₉TG所做的分析。对于图27中未给出的细小病毒,这种序列可以容易地被添加到特定的比对中。

[0073] 在优选的实施方案中,AAP编码ORF突变的方式是为了生成能够改进开放阅读框翻译的ATG起始密码子,而“改进的”是指与各自的野生型序列相比,AAP或其突变体的表达更高。优选地,AAV2或其他细小病毒的同源位点的翻译起始密码子中的一个突变成ATG起始密码子。由典型起始密码子ATG开始翻译通常会获得最优化的AAP或其变体的表达,因此当AAP或其变体不是最优化的时,导致衣壳组装的产量增加。如果表达系统转变成各自病毒并不适应的细胞,这就变得特别有益。可以假定AAP或其变体在非宿主细胞内的表达将不是最优化的。例如,本发明可以预见为得到高的衣壳产量,在昆虫细胞或适合于杆状病毒感染的其它细胞,酵母或细菌中制备衣壳时,AAP或其变体的最优化表达可能是非常有益的或至关重要的。

[0074] 然而,处在顺式情况下,这种AAP起始密码子向ATG的突变可能减少衣壳的形成(其中AAP由与编码VP3的ORF1重叠的核酸编码),这种突变在反式情况下特别有益,其中AAP的编码不依赖于编码VP3的ORF1(实施例14)。

[0075] 在本领域内和本发明的一部分中已熟知的是,核酸的特征在于核酸的多肽编码序列之后为poly(A)信号。

[0076] 在本发明的一方面,本发明的核酸包括驱动多肽-编码序列转录的启动子。在优选的实施方案中,使用异源启动子,即并不存在于AAP-编码核酸来源的病毒中的启动子,或优选不存在于任何细小病毒野生型基因组中的启动子。在本文描述的方法中可以使用的启动子并不限于本文描述的实例。可以是任何已知的或随后发现的一种启动子。组成型启动子,例如连续转录的早期巨细胞病毒(CMV)启动子(US 4,168,062),在本发明中可以作为诱导型启动子,如抗生素特异性或细胞特异性启动子来使用。对于在哺乳动物细胞系统中的表达,使用CMV启动子是特别优选的,例如利用转染方法在制备工艺中使用,而在昆虫细胞中多角体蛋白启动子(Po1H)的使用是优选的。诱导型异源启动子是特别优选的,因为它们可以被用于建立稳定的VP3生产细胞。

[0077] 由于细小病毒中基因组组织的高度保守,本发明可以容易地转用到其他细小病毒成员。在细小病毒中,作为本发明的核酸来源的优选病毒是腺相关病毒(AAV)、鹅细小病毒、鸭细小病毒和蛇细小病毒。优选的AAV选自牛AAV(b-AAV)、犬AAV(CAAV)、小鼠AAV1、山羊AAV、大鼠AAV、禽AAV(AAAV)、AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAV13,特别是AAV2。

[0078] 在另一方面,本发明的核酸包括于表达盒、构建体、载体或细胞系中。构建体,一般为质粒,通常是包括本发明的核酸和其他序列,如多克隆位点、复制起点、选择标记基因等的核酸。表达盒通常是一旦其位于细胞内就能通过细胞转录和翻译机制产生由本发明的核酸编码的蛋白的构建体。表达构建体被设计成包含用作增强子或启动子区域并且使得本发明的核酸有效转录的调控序列。它还通常包括poly(A)-位点,其随后被多聚腺苷酸化,这对于核输出、mRNA翻译和稳定来说很重要。载体是用于将本发明的核酸引入细胞的构建体。依据被转染的细胞,根据技术人员的技术来构建载体。这些载体可以是用于磷酸钙转染或脂质体转染的质粒,或病毒载体,如杆状病毒。细胞系是适合用于表达AAP或其变体或者复制AAP(变体)编码质粒的实验室细胞系。

[0079] 本发明的另一方面是由本发明的核酸编码的多肽。主要的天然存在的多肽被称为组装活化蛋白(AAP)。因此,由本发明的核酸编码的这种多肽变体被称为AAP变体。例如,包括AAP蛋白和一种或多种其它肽的变体被称为包括AAP的多肽。由ORF2(具有限定ORF1的VP3起始密码子)表达蛋白AAP,计算的分子量大约为23kDa,并且能够在核仁中提供VP3的衣壳组装。于全AAV基因组内形成衣壳也是重要的。它将VP蛋白引向核仁并在那里发挥启动组装反应的额外作用。

[0080] 本发明的另一方面是通过在宿主细胞中表达本发明的核酸来生产本发明的多肽,即AAP或AAP变体的方法。这种生产一般适合于启动细小病毒的衣壳形成,并且特别是包括VP3但没有VP1和VP2和Rep蛋白的衣壳形成。合适的宿主细胞可以由技术人员根据自己的需要和偏好选择。优选的宿主细胞选自哺乳动物细胞系、特别是人细胞系,用于杆状病毒感染的细胞系,细菌菌株和酵母菌株组成的目录。

[0081] 本发明的另一方面是一般特异性结合AAP的抗体或结合剂。特别地,抗体特异性结合SEQ ID NO:1至22的序列中的任何一种。这些抗体可以被用于进一步研究AAP的功能,或者当在异源表达系统中用作反式作用因子时,用以鉴定并且最优化AAP表达水平,用于商业生产的细小病毒DNA或病毒样颗粒。优选的抗体的特征在于其特异性结合AAV2的AAP(SEQ ID NO:1)。本发明的抗体可以是多克隆或单克隆的。本发明进一步包含相应的抗体片段,如单链抗体、scFvS、Fab片段、纳米抗体(nanobodies)或类似物,或者抗体多聚体。

[0082] 本发明的另一方面是本发明的核酸在制备本发明的多肽,包括AAP和AAP变体中的应用。

[0083] 本发明的另一方面是本发明的核酸或多肽在制备细小病毒和细小病毒颗粒中的应用。AAP的鉴定使得制备这些病毒成为可能,这是以前未知的,因为为了增加产量或为了生成诱导型生产系统,利用稳定的转染的生产细胞系将表达构建体单独最优化。可以通过使用异源启动子而增强表达。特别地,可以在功能性Rep和VP1和VP2编码序列不存在时制备颗粒,这样能够制备不包括任何功能性蛋白VP1、VP2、Rep40、Rep52、Rep68 和Rep78的细小病毒颗粒。在关于形成这种病毒和颗粒的有效、快速和廉价生产系统的上下文中,所有这些因素都是重要的。

[0084] 本发明的一方面是生产基本上由VP3组成的细小病毒颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:(i)提供能够由来自细小病毒VP3-编码序列(cds)表达VP3的细胞,其中所述VP3受rep-非依赖性启动子控制,并且表达本发明的核酸编码的蛋白,(ii)在有利于VP3和来自本发明的核酸的蛋白表达的条件下孵育细胞,从而产生细小病毒颗粒,以及(iii)任选地由细胞纯化细小病毒颗粒,其中每个细胞形成至少 10^5 个病毒颗粒,并且没有功能性VP1、VP2、Rep40、Rep52、Rep68和Rep78蛋白表达。利用片段Z代替本发明的核酸同样适用这种方法。

[0085] 本发明的另一方面提供生产基本上由VP3组成的细小病毒颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:

[0086] i. 在rep-非依赖性启动子控制下,于细胞中由来自细小病毒的VP3编码序列(cds)的表达VP3,

[0087] ii在rep-非依赖性启动子控制下,于细胞中表达DNA序列片段(片段Z),该DNA序列片段包括

[0088] (1)VP3起始密码子上游的至少44个核苷酸,和

[0089] (2)从起始密码子开始的多于242个的VP3cds核苷酸,其源自

[0090] a)细小病毒,或者

[0091] b)与源自AAV2的片段Z的核苷酸序列(序列1,图2)至少60%,优选80%,更优选90%,特别是99%,并且有利的是100%相同的核苷酸序列,或者

[0092] c)与AAV2的片段Z DNA分子(序列2)的互补链在4x SSC、0.1%SDS中,于65℃下杂交的核酸序列,或者

[0093] d)可以用于反式互补实验以引起VP3VLP组装的核酸序列,

[0094] iii.在适合于VP3表达的条件下孵育细胞,以及

[0095] iv.由细胞纯化细小病毒颗粒,

[0096] 其中每个细胞形成大约 10^5 个,优选大约 10^6 个,并且更优选大约 10^7 个病毒颗粒,并且基本上没有VP1、VP2和Rep蛋白(尤其是Rep40、Rep52、Rep68和Rep78)被表达。

[0097] 这些方法发明是基于由细小病毒科的病毒生成的颗粒,其中所述野生型表达VP1、VP2和VP3作为衣壳蛋白。基本上由VP3组成的细小病毒颗粒可以通过在基本上不存在功能性VP1、VP2和Rep,尤其是Rep40、Rep52、Rep68和Rep78蛋白表达时,表达细小病毒VP3cds来生成。结果,纯化的细小病毒颗粒基本上仅由一种衣壳蛋白组成。由于颗粒中不存在Rep,Rep-介导的DNA包装完全被避免。本发明提供了高滴度的基本上由VP3组成的细小病毒颗粒,除了别的之外,其适合用于疫苗开发。

[0098] 本领域内熟知的是,单独的VP3不能组装成衣壳。在本发明的上下文中,编码被命名为AAP的新的多肽的核酸、序列元件Z(片段Z)分别被鉴定,如果它们在细胞中表达,就介导VP3颗粒的组装,并且VP3并不需要另外的病毒蛋白用于衣壳组装。

[0099] 几条证据线索得出的结论是,VP3需要源自cap基因的RNA用于衣壳组装。可以以反式提供的VP3衣壳组装所需的这种因子在融合至gfp的cap基因片段(VP2N-gfp)中。由这种cap基因片段(编码VP1、VP2和VP3的ORF)的第一ORF表达蛋白不是必须的,因为在cap基因的相关区域中包含终止密码子的几个构建体也提供辅助作用。通过蛋白免疫印迹分析不能检测来自通读转录体的VP2N-gfp的表达。这种蛋白表达从非常规的翻译起始位点开始并且之后是终止密码子,这种蛋白表达的可能性很小且它们的量非常低。这种VP2N-gfp的蛋白表达还不足以激发VP3的衣壳组装。这已通过利用替代密码子表达这种蛋白导致高VP2N-gfp蛋白水平,但未导致VP3衣壳组装而明确地证明。由于这种密码子的改变暗示核苷酸序列的改变,因此清楚地显示出正确的核苷酸序列对于组装辅助作用来说是必须的,而不是第一ORF表达的蛋白。最终,通过质粒提供不能在第一ORF中转录的正确核苷酸序列也不能形成衣壳组装,这对正确的核苷酸序列的转录是必需的提出了质疑。

[0100] 如图2所示,片段Z包括VP3起始密码子上游至少44个核苷酸和下游多于242个核苷酸。优选地,片段Z不包括全长VP3cds。片段Z的序列可以源自图2中所列出的许多不同细小病毒中的一种,图2中给出细小病毒AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV10、AAV11和b-AAV的片段Z的各自区域的核苷酸序列的一些实例。该列表并不限于此处给出的细小病毒。另外的序列可以容易地通过其VP3起始密码子的位置来比对并被选择作为片段Z。核苷酸序列还可以通过它与源自AAV2的片段Z的核苷酸序列(SEQ ID NO:45,见下文)至少60%,优选80%,更优选90%,特别是99%,并且有利的是100%的序列同一性来选 择作为片段Z。此外,在4x SSC、0.1%SDS中,于65℃下与AAV2的片段Z DNA分子(SEQ ID NO:46,

见下文)的互补链杂交的核苷酸序列也可以用于反式互补实验中,以作为片段Z引发VP3VLP的组装。特别优选的是片段Z源自AAV2,并且包括SEQ ID NO:45。

[0101] 源自AAV2的DNA序列片段Z的核苷酸序列(SEQ ID NO:45,在图2中也给出):

[0102] 1tcggacagcc accagcagcc ccctctggtc tgggaactaa tacgatggct

[0103] 5lacaggcagtgc ggcaccaat ggcagacaat aacgagggcg ccgacggagt

[0104] 10lgggtaattcc tcgggaaatt ggcattgcga ttccacatgg atgggcgaca

[0105] 15lgagtcattcac caccagcacc cgaacctggg ccctgcccac ctacaacaac

[0106] 20lcacctctaca aacaaatttc cagccaatca ggagcctcga acgacaatca

[0107] 25lctactttggc tacagcaccc cttgggggta ttttgac

[0108] 可以被用于杂交实验以鉴定未知的DNA片段作为片段Z的SEQ ID NO:45的反式和互补序列(SEQ ID NO:46):

[0109] 1gtcaaaatac cccaagggg tgctgtagcc aaagtagtga ttgtcgttcg

[0110] 5laggtcctga ttggtggaa atttgtttgt agagggtggtt gttgtaggtg

[0111] 10lggcagggccc aggttcgggt gctggtggtg atgactctgt cgcccatcca

[0112] 15ltgtggaatcg caatgccaat ttcccgagga attaccact ccgtcggcgc

[0113] 20lcctcgttatt gtctgccatt ggtgcgccac tgccgttagc catcgtatta

[0114] 25lgttcccagac cagagggggc tgctggtggc tgtccga

[0115] 为了启动VP3cds和片段Z序列或本发明的核酸的转录,选择一种或两种“Rep-非依赖性启动子”。为了表达VP3和片段Z,在不存在细小病毒因子Rep时使用rep-非依赖性启动子,避免存在细小病毒因子Rep是因为Rep具有将病毒基因组和非特异性DNA包装到细小病毒颗粒中的作用。出于本发明的目的,避免病毒或非特异性DNA的包装,因为细小病毒颗粒可以无意地被用作为基因治疗载体。通过将“Rep-非依赖性启动子”用于VP3表达和片段Z或本发明核酸的转录,RNA聚合酶在不存在Rep蛋白表达时可以启动转录,使得在不存在Rep蛋白尤其是Rep40、Rep52、Rep68和Rep78时能够制备衣壳。例如,Rep-非依赖性启动子是异源组成型或诱导型启动子。

[0116] 因此,在本发明的一方面中,本发明的核酸包括驱动多肽-编码序列转录的启动子。在优选的实施方案中,使用不存在于任何一种细小病毒野生型基因组的异源启动子。可以用于在此描述方法的启动子并不限于在此描述的实例。可以是已知的或随后发现的任何一种启动子。组成型启动子,例如连续转录的早期巨细胞病毒(CMV)启动子(US 4,168,062)在本发明中可以作为诱导型启动子,如抗生素特异性或细胞特异性启动子。对于在哺乳动物细胞系统中的表达,使用CMV启动子是特别优选的,例如利用转染方法在制备工艺中使用,而在昆虫细胞中使用多角体蛋白启动子(Po1H)是优选的。诱导型异源启动子是特别优选的,因为它们可以被用于建立稳定的VP3生产细胞。

[0117] 用于VP表达的适合条件是本领领域内所熟知的,并且原则上可以被转变成仅表达VP3。为产生细小病毒或特定的细小病毒颗粒,各自的DNA序列必须被转染至细胞中。在实施例中描述了一个方案。然而,不同的转染方法,不同的细胞或稳定转染的细胞可以替换使用。例如Grimm等(2002)以及Grieger和Samulski(2005)描述了不同的生产方法。

[0118] 本发明的方法得到高产量的细小病毒颗粒,其中每个转染的细胞形成大约 10^5 ,优选大约 10^6 ,并且更优选大约 10^7 个病毒颗粒。这些数字对应于每毫升粗裂解物大约 10^{11} ,优

选大约 10^{12} 并且更优选大约 10^{13} 个颗粒。VP3颗粒的商业应用需要提供高产量颗粒的有效生产方法。

[0119] 所述颗粒可以通过本文和现有技术公开的方法来纯化。

[0120] 特别优选的是,片段Z的序列或本发明的核酸和VP3cds以使得产生仅由VP3组成的细小病毒颗粒的方式被安排和表达。在上下文中,“仅由.....组成”是指没有其他蛋白质分子作为颗粒的一部分可以通过常规方法,如蛋白免疫印迹被检测到。这种颗粒可以包括其他分子或盐,如水和其它缓冲液组分。此外,所述颗粒可以包括颗粒在组装期间被偶然封装在细胞内的分子。

[0121] 根据本发明的一种实施方案,片段Z或本发明的核酸的序列不与VP3cds重叠,使得细小病毒颗粒仅由VP3组成。这避免在颗粒中存在亚化学计量数量的N-末端延伸的VP3蛋白(参见实施例4)。这种少量的N-末端延伸的VP3蛋白最有可能不影响颗粒的活性或产量。然而,在药物控制方面,得到单一蛋白产物是有利的。

[0122] 因此,特别优选的是,本发明的细小病毒颗粒仅是由VP3组装的。为此目的,通过本领域人员熟知的方法将VP1、VP2和Rep,尤其是Rep40、Rep52、Rep68和Rep78在细胞中的表达关闭,因为例如各自起始密码子的缺失或突变,蛋白的特定cds的缺失(全部或部分),或者蛋白的特定cds的突变,阻碍功能性基因产物的表达(实例在例如Warrington等(2004)中描述)。

[0123] 对大部分真核mRNA中翻译启动位点的选择似乎通过扫描机制进行,其预测与5'末端的接近程度在确定起始密码子中发挥主要作用。这种“位置效应”导致转录体的第一(大多是上游的)ATG起始密码子启动翻译(Kozak,2002)。

[0124] 就细小病毒/AAV衣壳蛋白的表达而言,这意味着较少的剪切的转录体主要用于由第一ATG合成VP1,然而VP3的翻译主要由它的ATG起始密码子启动,该ATG起始密码子是主要的剪切的转录体的大部分上游ATG。这种主要的剪切的RNA还编码VP3起始位点的上游的VP2的不常见ACG起始密码子。因此,除由主要的剪切的转录体有效合成的VP3之外,VP2在一定程度上被表达(Becerra等,1988;Becerra等,1985)。

[0125] 通常,位置效应在突变失活或移除正常起始位点和翻译转移至下游起始位点的情况下也是明显的。因此,沉默的内在ATG密码子可以被活化,并且翻译效率被提高,这是在一些疾病状态中熟知的问题(Kozak,2002)。

[0126] 考虑到这些知识,诱变VP1和VP2起始密码子以使它们的表达失活,可以活化截短蛋白由在野生型中沉默的下游位点开始的翻译(如Warrington等(2004)所描述,以及实施例2.2中观察到的)。

[0127] 因而,除已知用于衣壳蛋白的主要起始密码子外,这种替代起始密码子优选是缺失或突变的,以确保VP3是唯一被表达的衣壳蛋白。仅表达VP3而关闭其他任何衣壳蛋白可以通过所描述的蛋白免疫印迹来控制。

[0128] 在进一步优选的实施方案中,用于VP1和VP2的编码序列(并不编码VP3序列)完全从编码VP3的表达盒中缺失,而VP1和VP2的编码序列并不编码VP3序列。在这种情况下,以反式提供片段Z或本发明的核酸从而能够产生VP3衣壳。

[0129] 在本发明优选的实施方案中,片段Z或本发明的核酸的DNA序列之后为poly(A)信号。所述poly(A)信号能够恢复多聚腺苷酸化机制,一旦基因转录结束,就在RNA分子上添加

延伸的腺嘌呤(poly(A)尾)。这种处理步骤增强在细胞内由片段Z转录的因子的稳定性。Poly(A)信号如来自SV40大T-抗原的poly(A)是本领域内所熟知的,并且常规应用于各种表达盒和构建体中。

[0130] 我们分析了在VP3起始密码子5'的不同位点开始表达的一系列缺失突变体,分析表明突变体pCMV-VP3/2765仍然能够引起衣壳组装(实施例2)。因而,如上文已经描述的,片段Z必须包括VP3起始密码子上游至少44个核苷酸。由于通过利用5'端延伸了一些核苷酸的片段Z提高了颗粒形成的效率,优选的是片段Z分别包括VP3起始密码子上游至少113个核苷酸,或特别至少198个核苷酸。在我们的实验中,我们选择的提供AAV2的片段Z的构建体从核苷酸2696(对应于VP3起始密码子上游的113个核苷酸)开始。在图2中列出了与加下划线的VP3起始密码子相关的不同血清型的序列。根据在各自的NCBI登录号给出的核苷酸序列,可以容易地在5'或3'方向延伸序列(比较图2的图例)。

[0131] 如果片段Z的5'延伸序列包括ORF1、ORF2或ORF3中的VP1和/或VP2的翻译起始密码子或者任何其它ATG起始密码子,它们必须通过突变或缺失被失活,以表达VP3作为唯一的衣壳蛋白。

[0132] 进一步地,片段Z必须包括多于242个的VP3起始密码子下游核苷酸。优选的是,片段Z包括从起始密码子开始的VP3cds的多于大约275个核苷酸、多于大约300个核苷酸、多于大约325个核苷酸、多于大约350个核苷酸、多于大约375个核苷酸、多于大约400个核苷酸、多于大约425个核苷酸,并且最优选多于大约445个核苷酸。特别优选的片段Z在大约核苷酸3254处(对应于VP3起始密码子下游大约445个核苷酸)终止。

[0133] 由片段Z编码的活性分子最有可能是扩散性分子,即命名为AAP的蛋白。基于简并基因密码子,我们最优化了片段Z的序列以得到能在Z内编码的推定扩散性蛋白潜在的更高表达,Z处在还编码衣壳蛋白VP1、VP2和VP3的第一阅读框(ORF1)中,从而保持在ORF1中编码的蛋白的AA序列未改变,但是通过修饰DNA序列干扰由其它ORF编码的蛋白序列。然而,这种密码子-最优化的片段不能介导颗粒形成,因为不再有病毒颗粒还可以被检测到(实施例5,图6)。另一方面,在片段Z内将终止密码子插入至ORF1,使得ORF1的蛋白合成被关闭,但是仅导致ORF1的DNA序列有较小的改变,并且不干扰ORF2的蛋白合成,仍然能够有效形成颗粒(实施例6,图8)。

[0134] 特别优选的是,片段Z的突变包括在第一或第三阅读框中至少一个用于蛋白翻译的一个终止密码子。结果,没有具有18AA或以上长度的蛋白可以由这些片段Z的阅读框翻译,尤其是没有生成VP2蛋白或其部分。因而,其主要优点在于没有VP2或其部分包括于颗粒中。

[0135] 作为本发明的优选实施方案,在片段Z或本发明的核酸内的VP3的主要翻译起始密码子ATG(AA 203,根据AAV2的VP1编号(Girod等,1999))突变。进一步优选的是,VP3的较少的替代起始密码子(AA 211和AA 235(Warrington等,2004))中的一个或两个也突变。在更优选的实施方案中,可以被用于VP3翻译起点的全部ATG密码子突变(许多可能的那些列于Warrington等,2004),以完全避免由提供片段Z的表达构建体翻译VP3。

[0136] 由于片段Z的产物和本发明核酸的编码功能以反式作用元件为特征,意味着片段Z和本发明的核酸编码扩散性分子,片段Z或本发明核酸的序列可以在相同或不同的核酸分子上作为cap基因或其部分,如VP3cds提供给细胞。

[0137] 在优选的实施方案中,提供的片段Z或本发明的核酸相对于VP3cds为“顺式”。如果提供片段Z/本发明的核酸相对于用于编码VP3的表达盒为“顺式”,意味着片段Z/本发明的核酸和VP3的表达由相同的一个启动子驱动。片段Z/本发明的核酸的序列可以位于VP3cds的上游或下游。用于编码片段Z和VP3的序列可以直接连接可变数量的核苷酸或被其分开(图3.1)。

[0138] 在本发明的更多特定实施方案中,片段Z/本发明的核酸直接位于VP3cds的上游。由于片段Z/本发明的核酸包括多于242个的VP3起始密码子下游核苷酸,并且这种序列不必然重复存在,直接跟随的VP3cds必然仅提供VP3ORF的剩余DNA序列(图3.1.a中给出图解)。在这种情况下,亚化学计量数量的N-末端延伸的VP3被表达并且存在于衣壳中(实施例4)。为了不增加这部分N-末端延伸的VP3,不在片段Z/本发明的核酸5'末端或上游分别添加新的或缺失现有的起始密码子是本发明的一项重要实施方案。

[0139] 此外,仅有与片段Z/本发明的核酸不重叠的VP3-特异性cds可以被容易地突变。与片段Z/本发明的核酸重叠的VP3cds的突变还能改变由片段Z/本发明的核酸编码的扩散性分子的序列。结果,在一些情况下,扩散性分子将不再有活性。这种情况下的突变包括沉默突变以及例如表位的插入。为了增加VP3cds突变的可能性,使重叠最小化,即分开片段Z/本发明的核酸和VP3cds是有益的。这可以以顺式方式进行,其中一个启动子驱动不包含对于片段Z来说重要的VP3起始密码子上游44个核苷酸的VP3cds的表达,和位于这种VP3cds之前或之后的单独的片段Z的表达。

[0140] 特别优选的是,提供的片段Z/本发明的核酸相对于VP3cds为“反式”。如果提供的片段Z/本发明的核酸相对于用于编码VP3的表达盒为“反式”,意味着片段Z/本发明的核酸和VP3的表达由各自的启动子驱动(与“顺式”相反,见上文)。片段Z的序列/本发明的核酸可以位于相同构建体上的VP3cds的上游或下游,或者与VP3cds不同的表达构建体上(实例列于图3.2中)。

[0141] 在这种情况下,片段Z仅包括VP3cds的5'末端,因此它主要的优点在于没有N-末端延伸的VP3(见下文)可以被表达并且整合到衣壳中。因此,如果提供的用于编码VP3和片段Z的序列为反式,推测可以获得更多纯的颗粒组合物,优选仅由结构蛋白VP3组成。

[0142] 反式构型的一个优点在于VP3cds可以容易被修饰,例如最优化其用于表达细胞系的密码子使用,以进一步增加产量而不改变片段Z/本发明的核酸的序列。还可以进行其它修饰,如突变、插入、标签等而不影响片段Z/本发明的核酸。可以假设在之前尝试确定片段Z和VP3cds的重叠序列中的VP3内的插入位点时,可能有用的插入位点未被确定为也干扰片段Z的表达或干扰AAP的功能的插入位点。因此,这些序列的功能或者以无重叠的顺式设置,或者优选以反式设置来分开,使得VP3编码序列能够进行非依赖性诱变。这种诱变具有多种商业应用。在生产新的基因治疗载体的过程中,形成嵌合型细小病毒Cap序列的限制可以被克服。几个研究组尝试直接开发AAV,其涉及在一种血清型上随机诱变而成的病毒库的形成(Koerber等,2008),利用已知的AAV血清型衣壳序列,通过使用STEP和shuffling方法来形成多种随机组合的衣壳(Ward和Walsh,2009,Li等,2008)。以相似的方法,AAP的非依赖性表达可以被用于确定耐受配体(被用于以其他细胞为靶点)、B-细胞表位(被用于生成表位特异性疫苗)或缺失/替换(被用于病毒的去靶向或减少病毒的抗原性)的另外的插入位点。

[0143] 片段Z/本发明的核酸和VP3cds的反式构型的另一个优点在于,一种构建体可以被稳定地转染至生产细胞系,而其它构建体可以被瞬时转染/转导。例如,包括片段Z/本发明核酸的表达盒可以稳定地被转染至适合于VP3有效表达的细胞系,形成单一生产细胞系。然后,这种生产细胞系被特异性VP3cds瞬时转染/转导(如用病毒感染),致使这种VP3表达和各自的颗粒形成。因此,一种生产细胞系可以被用于生产不同的颗粒。给出确定用于制备药物的生产细胞系所需的时间和费用,这形成相当大的调节优势。出于这个原因,特别优选的是,在各自的表达构建体上提供片段Z/本发明的核酸和VP3cds。

[0144] 通过以反式向细胞提供用于编码特定血清型的VP3的表达盒,这种设置可以另外被用于例如生成不同血清型的AAV/细小病毒颗粒,所述细胞已经被一种血清型的片段Z/本发明的核酸稳定地转染。一般地,特异性针对选自以下的AAV血清型的VP3cds可以被用于转染已经用仅一种血清型如AAV2的片段Z/本发明的核酸稳定转染的细胞:AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAV13。从而,可以容易地生成由所选择的血清型如AAV1颗粒的VP3组成的AAV颗粒。对于AAV1和AAV2,我们证明片段Z/本发明核酸的表达介导VP3的衣壳组装,所述VP3不仅由从相同血清型克隆的构建体表达,而且由从其它血清型,即分别为AAV2和AAV1克隆的构建体表达(实施例21)。然而,一般不能期望各个血清型彼此互补,但是在如在此所描述的反式互补实验中,本领域技术人员可以容易地鉴定来自一种细小病毒/血清型的AAP与来自不同种细小病毒/血清型的VP3的各自的配对,以得到VP3VLP的组装。例如,如果已获得可以被用于生产来自不同细小病毒或AAV血清型的VP3VLP的表达特异性AAP的稳定细胞系,可以使用交叉互补。可以选择用于时间和成本效益高的高滴度VLP生产的各种组合。

[0145] 同样地,其它的方法是可能的,并且一种特定的VP3cds可以以反式被表达盒转染,所述表达盒提供选自用于编码片段Z的许多不同序列的片段Z/本发明的核酸,如选自不同的AAV血清型/细小病毒的。

[0146] 在本发明的另一个优选实施方案中,细小病毒颗粒不包含Rep蛋白,尤其是任何功能性Rep40、Rep52、Rep68和Rep78蛋白。在此通过说明书给出了这种实施方案的详细内容。

[0147] 在本发明的另一个优选的实施方案中,仅/最多1/50的表的结构蛋白,优选最多1/100,更优选最多1/250,并且基本上仅/最多1/500的结构蛋白是VP3的N-末端延伸形式。特别优选的是不包含任何具有VP3的N-末端延伸形式的结构蛋白的细小病毒颗粒,或者反之亦然,没有结构蛋白是VP3的N-末端延伸形式。如果片段Z和VP3cds的序列重叠,并且在相同启动子(顺式形式)的控制下表达,VP3cds的ATG起始密码子主要被用作蛋白翻译的起始,而仅很小比例的蛋白翻译开始于上游。除了VP3cds外,所得到的小部分蛋白包含对应于编码VP2而不是VP3的序列的3'部分的几个Aas的N-末端延伸。综合来看,这些VP3的5'延伸形式的表达在蛋白免疫印迹(实施例4)中是可见的,但是仅占结构蛋白的1/50,优选占细小病毒颗粒结构蛋白的1/100,更优选1/250,并且基本上仅1/500。

[0148] 在本发明的另一个优选的实施方案中,仅/最多1/50的表的结构蛋白,优选最多1/100,更优选最多1/250,并且基本上仅/最多1/500的结构蛋白是本发明的多肽,即AAP或其变体。然而没有在宿主细胞上显示出对AAP的特定影响,可能对细小病毒载体或颗粒的医药应用有影响,原则上尽可能少的杂质是有益的。

[0149] 病毒Rep蛋白与基因组和病毒DNA相结合,并且被认为在DNA包装中发挥作用。为了

将AAV作为疫苗使用,并且避免对抗包装的DNA的非特异性反应或不期望的基因转移,细小病毒颗粒尽可能不含DNA是特别优选的。因此,细小病毒颗粒于不存在Rep蛋白表达时在细胞中产生。由此,在本发明的另一个优选实施方案中,仅1/100的颗粒,优选1/1,000,并且更优选仅1/10,000的颗粒包含DNA。特别优选的是,没有细小病毒颗粒包含DNA。优选最多1/100,更优选仅/最多1/1,000,甚至更优选仅/最多1/10,000的颗粒包含任何DNA。结果,在实现接种疫苗目的之前,破坏包装的DNA的失活步骤(如 γ -辐射或UV-辐射)不是必须的。

[0150] 根据本发明,细小病毒优选选自腺相关病毒(AAV)、牛AAV(b-AAV)、犬AAV(CAAV)和禽AAV(AAAV)。

[0151] 特别优选的AAV选自:AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12和AAV13,特别是AAV-2。AAV1至AAV12指明了限定的腺相关病毒(AAV)血清型。

[0152] 如在此更详细地描述的,特别优选的是,VP3cds进一步包括至少一种突变。所述突变是与各自的野生型细小病毒序列相比较,优选选自一种或多种缺失、一种或多种插入,一种或多种替代以及这些突变的组合。

[0153] 在本发明的实施方案中,VP3cds包括一种或多种沉默突变。通过引入不引起VP3蛋白的AA序列改变的DNA突变,最优化VP3cds的密码子使用是可能的,如增强它的表达。由于基因密码子的简并性,一种AA可以由多于一种的密码子确定,例如AA谷氨酸由密码子GAA和GAG确定。因此,对于结构蛋白VP3的各种AA,可以分别选择以更高效率被翻译和突变cds的那些密码子。如已论述的,这些突变不改变蛋白的AA序列,这是为什么它们被称为沉默的,但是这些突变当然改变了包括由片段Z/本发明的核酸编码的扩散性分子的核苷酸序列。由于这个原因,本发明特别优选的实施方案是,仅部分VP3cds由插入或使用密码子最优化来修饰,例如以得到在选择条件下VP3的更高表达,该选择条件是指与片段Z的序列不重叠,或如上文任何部分所描述的,以反式形式处在VP3cds内。

[0154] 在优选的实施方案中,VP3cds的一种或多种突变导致位于VP3VLP表面的一种或多种突变。结构蛋白的表面定位区域可以通过分析晶体结构来确定,这对于AAV2是已知的(Xie等,2002)。如果所选择血清型的晶体结构还不可用,所选择的VP3序列可以与具有已知晶体结构的至少一种不同血清型的VP3序列进行比对,以鉴别感兴趣的同源区域。比对可以使用可商购的软件,例如Multialign(Corpet,1988)和其所描述的标准参数进行。

[0155] 在进一步优选的实施方案中,VP3cds的一种或多种突变导致位于VP3的N-末端的一种或多种突变。优选地,N-末端被定义为各自VP3的N-末端10个氨基酸,优选N-末端5个氨基酸,特别是N-末端2个氨基酸。特别优选的是位于N-或C-末端的插入或者对应于N-或C-末端的直接插入的插入,优选直接在AA 203(I-203)的C-末端的插入。

[0156] 根据本发明,优选的插入是插入至选自以下位点的一个或多个位点:I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713和I-716,优选I-261、I-453、I-534、I-570、I-573和I-587,特别是I-587。

[0157] 所使用的命名I-###涉及插入位点,其中###指定相对于AAV-2的VP1蛋白的AA编号,然而这意味着插入可以直接位于特定AA的N-或C-末端,优选直接位于特定AA的5Aas N-或C-末端的序列中一种AA的C-末端,优选特定AA的N-或C-末端的3种AA,更优选2种AA,特别

是1种AA。对于除了AAV-2之外的细小病毒,如果可用的话,相应的插入位点可以通过进行AA比对或通过比较衣壳结构来鉴别。这种比对在细小病毒AAV-1、AAV-2、AAV-3b、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-10、AAV-11、b-AAV、GPV、B19、MVM、FPV和CPV(WO 2008/145400的图3)中进行。

[0158] 其后引入插入并且指定位置的AA位点被加上下划线。同样地,能够将插入引入至紧邻下划线AA的5个直接邻近的Aas,因为这些同样位于AAV2衣壳中的环(loop)内。

[0159] 例如,插入位点I-587对应于以下突出标示的Aas中的一种之前和/或之后的插入:

[0160] AAV1的FQSSSTDPAT,

[0161] AAV2的LQRGN₅₈₇RQAAT,

[0162] AAV-3b的LQSSNTAPTT,

[0163] AAV-6的LQSSSTDPAT,

[0164] AAV-7的LQAANTAAQT,

[0165] AAV-8的LQQQNTAPQI

[0166] AAV10的LQQANTGPIV,

[0167] AAV11的NQNATTAPIT和

[0168] AAV-5的NQSSTTAPAT。

[0169] 进一步地,插入位点I-453对应于以下各10个Aas的N-或C-末端的直接插入,优选突出标示的AA的C-末端的直接插入:

[0170] AAV-1的QNQSGSAQNK,

[0171] AAV-2的NTPSG₄₅₃TTTQS,

[0172] AAV-3b的GTTSGTTNQS,

[0173] AAV-6的QNQSGSAQNK,

[0174] AAV-7的SNPGGTAGNR,

[0175] AAV-8的QTTGGTANTQ,

[0176] AAV-10的QSTGGTQGTQ,

[0177] AAV-11的SGETLNQGNA,以及

[0178] AAV-5的FVSTNNTGGV。

[0179] 涉及AAV2序列,AAV和本发明包括的其它细小病毒的插入位点列于表1。

[0180] 表1:用于细小病毒的插入位点

[0181]

插入位点	对应 AA/ AAV2 的序列		参考文献
I-261	S ₂₆₁	YKQIS ₂₆₁ SQSGA	(Girod 等, 1999)
I-266	A ₂₆₆	SQSGA ₂₆₆ SNDNH	(Wu 等, 2000)
I-381	N ₃₈₁	YLTLN ₃₈₁ NGSQA	(Girod 等, 1999)
I-447	R ₄₄₇	YYLSR ₄₄₇ TNTPS	(Girod 等, 1999; Wu 等, 2000)
I-448	T ₄₄₈	YLSRT ₄₄₈ NTPSG	(Grifman 等, 2001)
I-453	G ₄₅₃	NTPSG ₄₅₃ TTTQS	WO 2008/145400
I-459	R ₄₅₉	TTQSR ₄₅₉ LQFSQ	(Shi 等, 2001; Arnold 等, 2006)
I-471	R ₄₇₁	ASDIR ₄₇₁ DQSRN	(Asokan 和 Samulski, 2006, Moskalenko 等, 2000)
I-534	F ₅₃₄	EEKFF ₅₃₄ PQSGV	(Girod 等, 1999)
I-570	P ₅₇₀	RTTNP ₅₇₀ VATEQ	
I-573	T ₅₇₃	NPVAT ₅₇₃ EQYGS	(Girod 等, 1999)
I-584	Q ₅₈₄	STNLQ ₅₈₄ RGNRQ	(Shi 等, 2001; Shi 和 Bartlett, 2003)
I-587	N ₅₈₇	LQRGN ₅₈₇ RQAAT	(Girod 等, 1999; Shi 等, 2001; Maheshri 等, 2006; Ried 等, 2002; Grifman 等, 2001; Nicklin 等, 2001; Arnold 等, 2006)
I-588	R ₅₈₈	QRGNR ₅₈₈ QAATA	(Shi 和 Bartlett, 2003)
I-591	A ₅₉₁	NRQAA ₅₉₁ TADV N	(Wu 等, 2000)
I-657	P ₆₅₇	VPANP ₆₅₇ STTFS	
I-664	A ₆₆₄	TFSA A ₆₆₄ KFASF	(Wu 等, 2000)
I-713	T ₇₁₃	NVDFT ₇₁₃ VDTNG	
I-716	T ₇₁₆	FTVDT ₇₁₆ NGVYS	(Maheshri 等, 2006)

[0182] I-570特别适合作为插入位点,其带来细小病毒结构蛋白在插入位点的特定Aas的缺失,导致完全替换。在这种情况下,Aas RTTNPVATEQ可以由表位或模拟表位替换。

[0183] 已成功插入除AAV2外的AAV-血清型中。

[0184] 表2:除AAV2外的AAV-血清型的插入

[0185]

AAV 血清型	序列	插入位点/相对于 AAV2 的 AA		参考文献
AAV1	FQSSS ₅₈₈ TDPAT	I-587	N ₅₈₇	无信息
AAV1	SSSTD ₅₉₀ PATGD	I-589	Q ₅₈₉	(Arnold 等 , 2006 ; Stachler 和 Bartlett, 2006)
AAV-3	NNLQS ₅₈₆ -SNTAP	I-585	R ₅₈₅	(Arnold 等 , 2006)
AAV-4	GGDQS ₅₈₄ -NSNLP	I-585		(Arnold 等 , 2006)
AAV-5	TNNQS ₅₇₅ -STTAP	I-585		(Arnold 等 , 2006)

[0186] 最优选的插入位点是：

[0187] i) I-587, 因为已在AAV2的N587(LQRGN₅₈₇RQAAT)周围的AA延伸中进行了各种插入。在这种延伸内, 将各种肽插入至AAV2中的Aas Q₅₈₄、N₅₈₇、R₅₈₈和A₅₉₁的C-末端和对应于AAV2的R₅₈₅和Q₅₈₉的其它AAV-血清型的Aas的C-末端。

[0188] ii) I-453, 因为表位已成功插入至AAV2中G₄₅₃的C-末端。

[0189] iii) AAV1的FQSSS₅₈₈TDPAT或SSSTD₅₉₀PATGD。

[0190] iv) I-261, 因为根据本发明, 表位已成功插入至AAV2中S₂₆₁的C-末端。

[0191] v) I-534, 因为根据本发明, 表位已成功插入至AAV2中F₅₃₄的C-末端。

[0192] vi) I-570, 因为根据本发明, 表位已成功插入至AAV2中P₅₇₀的C-末端。

[0193] vii) I-573, 因为根据本发明, 表位已成功插入至AAV2中T₅₇₃的C-末端。

[0194] 在此指明的用于本文所公开细小病毒的全部插入位点的相应Aas可以从W0 2008/145400的图3中的比对得到。对于那些没有在其中列出的细小病毒, 可以在其中使用的标准参数下与所提供的这种细小病毒AA序列进行比对, 并根据这种比对得到的对应的AA。

[0195] 根据本发明, 两种插入可能是优选的, 并且在选自以下位点的两个位点进行: I-261、I-453、I-534、I-570、I-573和I-587, 优选I-261与I-587的组合、I-261与I-453的组合、或者I-453与I-587的组合。关于三种插入, 优选的组合是在VP3的三个位点进行, 优选位点453的插入与位点587的插入相组合并与另外的突变组合, 更优选位点I-453、I-587与I-534、I-570和I-573中的一种的组合。

[0196] 尤其是对于接种疫苗应用而言, 必须生成呈递所选择的表位的AAV颗粒。因此, 优选的是, VP3cds包括至少一种与病毒异源的表位。

[0197] 进一步优选的是, VP3蛋白的表位为B-细胞表位。优选B-细胞表位是抗原的一部分。优选的抗原是血清蛋白、在血液中至少某些条件(如疾病状态)下存在的蛋白、膜蛋白, 特别是受体蛋白(如CD20、乙酰胆碱受体、IL13R、EGFR), 以及感染原的表面抗原, 优选不是

这种表面抗原的免疫显性表位。特别优选的抗原是IgE、肿瘤-抗原(如Melan A、高分子量黑素瘤相关抗原(HMW MAA)、CA125、IL13R、Her2/NEU、L1细胞粘附分子)、VEGF、EGFR、CD20、IL1、IL4、IL5、IL6、IL9、IL13、IL17、IL18、IL33、TSLP(胸腺基质淋巴细胞生成素)、CETP(胆固醇脂转移蛋白)、TNF-家族成员(如TNF- α)或 β -淀粉样蛋白。

[0198] 在进一步的实施方案中,VP3包括至少一种与细小病毒异源的B-细胞表位,优选与病原体不同,尤其是与病原体的B-细胞表位不同,其中所述B-细胞表位位于病毒的表面。在优选的实施方案中,VP3能够诱导能与B-细胞表位来源的抗原相结合的免疫球蛋白。

[0199] 在优选的实施方案中,B-细胞表位被插入至I-453和/或I-587,特别是AAV1、AAV2或AAV4的I-453和/或I-587。

[0200] 特别优选的是,相同的B-细胞表位在两个或更多个不同的插入位点被插入,条件是将大量相同肽最优化地呈递于衣壳表面上是关键,特别是在B-细胞的T-细胞非依赖性启动和B细胞对自体-抗原耐受的阻断应当需要直接B-细胞受体交联的情况下。更高密度的B-细胞表位增加最佳的肽-特异性B-细胞受体交联的可能性,其需要限定B-细胞受体之间的距离,因而各自的B-细胞表位被呈递于细小病毒衣壳上。

[0201] 此外,大量插入的B-细胞表位减少了针对细小病毒骨架的不期望的免疫反应的可能性,因为i)天然细小病毒B-细胞表位/模拟表位的包埋,和/或ii)微小的结构衣壳变化,致使这些天然B-细胞表位/模拟表位的免疫原性更弱。因此,包括至少三个插入的细小病毒结构蛋白是特别优选的。

[0202] 综合来看,用于表位的表面呈递的优选插入位点是对应于AAV2氨基酸编号:I-261、I-266、I-381、I-447、I-448、I-453、I-459、I-471、I-534、I-570、I-573、I-584、I-587、I-588、I-591、I-657、I-664、I-713和I-716,特别是I-261、I-453、I-534、I-570、I-573、I-587和I-588,最优选I-453和I-587的氨基酸之后的位点

[0203] 在进一步的实施方案中,无论末端或中间的插入都与一种或多种氨基酸的缺失相组合,导致氨基酸由不同的氨基酸部分或1:1替换,其中所述部分替换是指如8个氨基酸由6个不同氨基酸替换,以及1:1替换是指如8个氨基酸由8个不同氨基酸替换。

[0204] 在本发明的一个实施方案中,VP3被包括于融合蛋白中,如与第二蛋白或肽融合的融合蛋白。在特别优选的实施方案中,B-细胞表位特别是大于20个氨基酸的表位与VP3的N-末端融合。

[0205] 在一个特定实施方案中,VP3包括用于与配体结合的至少一种标签。在特别优选的实施方案中,所述标签通过另外的突变被引入至细小病毒突变的结构蛋白中。这些标签是本领域内所熟知的,表3。

[0206] 表3:标签和相应的配体

[0207]

标签	配体
AU1	抗AU1单克隆抗体
HIS	镍
GST	谷胱甘肽
蛋白A	IgG
生物素或Strep	链亲合素

钙调蛋白-结合肽	钙调蛋白
IgG的Fc肽	蛋白A
Flag	GLAG-或3xFLAG肽
HA(红细胞凝集素)	HA肽

[0208] 在本发明的另一个实施方案中,VP3包括至少一种另外的突变。所述突变可以是任何一种合适的突变,如以上所定义的任何突变。

[0209] 例如,VP3的一种或几种另外的突变可以足以例如i)引入另外的或甚至与相同靶抗原一样的B-细胞表位,和/或ii)一种或更多种另外的靶蛋白的B-细胞表位(多靶疫苗)、另外的启动期望的T-细胞免疫响应的T-细胞表位、以抗原-呈递细胞为靶向和/或活化抗原-呈递细胞的肽序列,或足以获得具有降低免疫原性的核颗粒的衣壳突变体。后者可能是设定有效引发/促进方案的一种可能性。

[0210] 此外,细小病毒突变的结构蛋白在不同位点的另外的突变可以被用于组成更复杂的模拟表位,以修饰病毒体的某些特征,如它可以被用于修饰其天然抗原性(如Huttner等,2003,和WO 01/05990),修饰其色谱性能(如WO 01/05991),插入第二B-细胞表位,插入T-辅助表位,或插入CTL表位。这样另外的突变选自:点突变、内部或末端缺失、插入和替换。优选地,另外的(第二)插入为内在发生的,如通过N-或C-末端的融合。

[0211] 本发明的另一方面是由以上所公开的任何方法获得的细小病毒颗粒。基于以上所描述的方法,我们能够生产基本上仅由VP3组成且不包括异源核定位信号(NLS)的细小病毒颗粒。这种颗粒不包含Rep蛋白,尤其是 Rep40、Rep52、Rep68和Rep78。所描述的方法能够实现足够数量/产量的生产用于以商业规模制备药物。

[0212] 本发明的另一方面涉及基本上由VP3组成的细小病毒颗粒,其中所述VP3与相应的野生型VP3相比,任选地包括一种或多种突变,并且其中所述VP3不包含异源核定位信号(NLS),且其中所述颗粒不包含Rep蛋白,尤其是功能性Rep40、Rep52、Rep68和Rep78。

[0213] 特别优选的是其中衣壳仅由VP3组成的细小病毒颗粒。

[0214] 关于一种或多种突变,是指前面所描述的突变。

[0215] 本发明的一个进一步的方面是包括如前面所定义的VP3cds和异源启动子的表达盒A,其中所述VP3的转录由异源启动子驱动,并且其中所述表达盒能够基本上仅表达VP3。特别优选的是仅表达VP3的表达盒。根据本发明,构建体被用于表达突变的VP3。VP3的序列可以如所描述的被突变。如本领域技术人员的理解的,表达盒还包括poly(A)序列。

[0216] 本发明的另一方面是包括如前面所定义的片段Z和异源启动子的表达盒B,其中所述片段Z的转录由异源启动子驱动。根据本发明,构建体用于表达片段Z。片段Z的序列可以如所描述的突变。任选地,这种表达盒还包括poly(A)序列。

[0217] 本发明的进一步的方面是包括(i)如前面所定义的VP3cds和如前面所定义的片段Z,和(ii)异源启动子的表达盒C,其中所述VP3和片段Z的表达由所述一种异源启动子驱动。

[0218] 在本发明的进一步的方面,表达盒包括异源启动子、如前面所描述的VP3cds和本发明的核酸的组合,其中所述由核酸(AAP或AAP变体)编码的VP3和多肽的表达由所述一种异源启动子驱动。任选地,这种表达盒还包括poly(A)序列。

[0219] 在一个进一步的方面,至少一种表达盒A/VP3表达盒和至少一种表达盒B/包括本发明的核酸的表达盒被组合于试剂盒中。根据本发明,通过组合VP3cds的细小病毒VP3的表

达和片段Z/本发明的核酸的表达,能够生成基本上仅由VP3组成的颗粒。

[0220] 另一方面涉及包括至少一种VP3表达盒A和至少一种本发明的核酸的试剂盒,或者包括至少一种表达盒C的试剂盒,其用于VP3和片段Z在细胞中组合和同时表达并生成VP3VLP。这种试剂盒优选另外包含手册。

[0221] 本发明的又一方面涉及包括本发明的细小病毒颗粒的药物。根据本发明,药物具有许多优于现有技术的优点。哺乳动物的免疫系统专门产生对抗病毒衣壳蛋白的强抗体响应,因为哺乳动物一方面与其免疫系统共同进化,另一方面与病毒共同进化。强抗体响应是指在标准ELISA中测量的滴度为1,000至 $>100,000$ 。由于病毒的相似性、抗原的重复性和高度结构性模式以及这些颗粒被抗原-呈递细胞的有效吸收,病毒-样颗粒具有高免疫原性。病毒体的大小、B-细胞表位的密度和对称顺序以及任何两种B-细胞表位之间大约50至100Å的最佳距离在非常强的T-细胞非依赖性B-细胞响应中发挥主要作用,该响应由各自的B-细胞受体直接交联介导,甚至阻断针对自体抗原或耐受原的B-细胞耐受(Szomolanyi-Tsuda和Welsh,1998,Szomolanyi-Tsuda等,1998,Szomolanyi-Tsuda等,2000,Szomolanyi-Tsuda等,2001,Zinkernag等,2002,Bachmann等,1993)。

[0222] 综合来看,这样的药物能够诱导对抗某些B-细胞表位的多克隆免疫响应,导致主动免疫响应,获得高和持久的抗体滴度。病毒体的多聚体结构包含大量的密集包装的相同表位,其在B-细胞上直接交联各自的受体,从而诱导T-细胞非依赖性B-细胞响应。所述药物的微粒结构进一步通过被抗原-呈递细胞有效吸收而支持免疫响应,其活化T-细胞,最终触发IgG类别转换和活性B-细胞的高频突变,导致高亲和力IgG抗体的持续释放和B-细胞分化成记忆细胞。

[0223] 使用本发明的方法,这样的药物可以容易地生产。

[0224] 本发明的药物可以进一步另外包括一种或多种赋形剂。所述赋形剂是药学上可接受的载体和/或赋形剂。赋形剂是常规的并且可以包括缓冲液、稳定剂、稀释剂、防腐剂和增溶剂。在E.W.Martin的雷氏药学大全(Remington's Pharmaceutical Sciences),Mack出版公司,Easton,PA,第15版(1975)描述了适合用于本文所公开的(微小)病毒颗粒的药物递送的组合物或制剂。一般地,载体或赋形剂的性质取决于要采用的特定给药方式。例如,肠胃外制剂通常包括可注射的流体,其包括药学上和生理上可接受的流体,如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为载体。对于固体组合物(如粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式)来说,常规的无毒固体载体可以包括例如药品级的pitope、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性载体外,要被给药的药物组合物可以包含少量的无毒辅助物质,如湿润剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如醋酸钠或山梨醇 酐单月桂酸酯。

[0225] 在进一步的实施方案中,所述药物是疫苗。一般地,疫苗是由致病体的抗原组成的制剂,当其被引入身体时,刺激特异性抗体或改变的细胞的产生。作为活性成分,其通常产生免疫响应。特别地,VP3组装的细小病毒颗粒包括至少一种与细小病毒异源的B-细胞表位,优选用于预防或治疗自体免疫疾病(如1型糖尿病)、肿瘤(例子:黑素瘤,如HMW MAA,多形性胶质母细胞瘤,如CA125、抗-IL13R,结肠癌,如CA125或抗-EGFAND/OR,乳腺癌,如Her2/NEU,卵巢癌,如L1粘附分子,B-细胞淋巴瘤,如CD20)、过敏性疾病(哮喘,过敏,如过敏性鼻炎,靶点的例子:IgE、IL4、IL5、IL9、IL13、IL18、IL33、TSLP),代谢性疾病(如高胆固醇、干预胆固醇代谢(靶点的例子:CETP),肥胖症,高血压(靶点的例子:血管紧张素II),炎性疾病

(如类风湿性关节炎、克罗恩(Crohn's)病,靶点的例子:IL6、IL17和TNF- α),神经疾病(如阿尔茨海默(Alzheimer's)病,靶点的例子: β -淀粉样蛋白)或被用于眼科(如AMD,靶点的例子:VEGF)。

[0226] 本发明还包括用于接种疫苗和/或用于治疗或预防在此指明的疾病的方法,所述方法通过向患者给予有效量的本发明的细小病毒颗粒和/或用于编码本发明的VP3VLP的表达构建体。

[0227] 在优选的实施方案中,所述疫苗进一步包括一种或多种佐剂,尤其是作为免疫刺激物。所述佐剂可以基于给药方法来选择,并且可以包括基于矿物油的佐剂,如弗氏(Freund's)完全和不完全佐剂,Montanide不完全Seppic佐剂,如ISA,水包油型乳化佐剂,如Ribi佐剂体系,包含胞壁酰二肽的syntax佐剂制剂,或铝盐佐剂。

[0228] 本发明的一个实施方案是用于预防或治疗自体免疫疾病、传染性疾病、肿瘤、过敏性疾病、代谢性疾病、(慢性)炎性疾病、神经性疾病、成瘾,或者被用于眼科的药物。优选的自体免疫疾病和/或慢性炎性疾病是类风湿性关节炎、银屑病和克罗恩病。优选的肿瘤是适合用单克隆抗体如曲妥珠单抗(trastuzumab)治疗的疾病。优选的过敏性疾病是哮喘和过敏,如过敏性鼻炎。优选的过敏原的实例是桦树花粉、屋尘螨和禾草花粉。优选的神经性疾病是阿尔茨海默病。优选的代谢性疾病是动脉硬化症。优选的眼科疾病是与年龄相关的黄斑变性。在进一步优选的实施方案中,所述细小病毒颗粒或药物被用于阻断B-细胞耐受的方法中,意味着诱导对抗自体抗原的抗体。

[0229] 在进一步特别的实施方案中,由药物治疗的疾病不是感染性疾病。

[0230] 此外,所述药物的细小病毒突变结构蛋白在基因治疗中不用作载体。

[0231] 在另一个实施方案中,本发明的细小病毒颗粒被用于基因治疗。

[0232] 根据本发明,实施方案是如以上所定义的细小病毒颗粒的应用,优选如以上所定义的药物应用,其包括与用于制备疫苗的细小病毒异源的至少一种B-细胞表位,优选用于预防或治疗自体免疫疾病和/或慢性炎性疾病,优选类风湿性关节炎和/或克罗恩病、肿瘤、过敏性疾病、哮喘、阿尔茨海默病、动脉硬化症、代谢性疾病、炎性疾病、神经性疾病或被用于眼科。

[0233] 在本文中,通过引用将所有引用的文献内容包括在内。

[0234] 以下实施例和附图意在更详细地解释本发明而不限本发明。

[0235] 附图

[0236] 图1:AAV衣壳基因的示意性结构。

[0237] 第一条线示出cap基因的编码DNA,以下面的线示出Cap蛋白VP1、VP2和VP3。核苷酸序号对应于由Ruffing等人(1994年)提供的AAV-2的基因组序列,其可得自NCBI(登记号:NC_001401)。根据AAV2的VP1(Girod等人,1999年)对氨基酸(AA)序列进行编号。标出了EcoNI和BsiWI的限制性位点。未按比例。

[0238] 图2:不同AAV的片段Z的核苷酸序列。

[0239] 提供了细小病毒AAV1(NC_002077)、AAV2(AF043303)、AAV3b(AF028705)、AAV4(U89790)、AAV5(NC_006152)、AAV6(AF028704)、AAV7(AF513851)、AAV8(AF513852)、AAV10(AY631965)、AAV11(AY631966)和b-AAV(NC_005889)的片段Z的核苷酸序列(括号中提供了根据NCBI的核苷酸登记号)。+1表示编码VP3的ATG起始密码子的第一个核苷酸的位置。示出

了+1位的上游44个核苷酸和下游242个核苷酸。用下划线标出了VP3的ATG起始密码子。

[0240] 图3:适用于组装VP3颗粒的不同表达构建体的图示。

[0241] 用所示的不同方框示出了在构建片段Z序列和VP3cds设置中的不同的六种可能的表达构建体。如圆圈所示,在顺式情况下,它们在同一个启动子下表达,而在反式情况下,两个分开的启动子驱动它们的表达。+1表示编码VP3的ATG起始密码子的第一个核苷酸的位置。方框中的片段Z的DNA包含+1位的上游至少44个核苷酸和下游超过242个的核苷酸(比较图2)。+1602标出了VP3cds的3'末端处TAA终止密码子的最后一个核苷酸的编号(如图1中列出的)。核苷酸的任意编号可以将VP3编码序列和片段Z分开,并且以||标出。未按比例。

[0242] 图4:rep和cap基因的示意性结构,以及用于克隆表达构建体的不同限制性位点的位置。

[0243] 细小病毒基因组中的rep和cap基因的图示。标出了用于克隆不同表达构建体的限制性位点R1至R5的位置,以及3种衣壳蛋白的翻译起始密码子的位置。未按比例。

[0244] 图5:使用不同VP蛋白表达构建体进行衣壳组装的比较。

[0245] A)用于分析VP蛋白表达和研究衣壳组装的cap基因表达构建体的图示。质粒pCMV-VP3/1882至pCMV-VP3/2809源自质粒pVP3。编号表示根据Ruffing等人1994年(同上)的AAV2基因组的核苷酸位置。箭头代表VP蛋白的翻译起始位点,用“×”标记突变的翻译起始位点。在右栏中提供了由这些构建体表达的蛋白组装衣壳的能力(对应于C中的定量,++对应衣壳的峰值滴度,-表示无法检测到衣壳,+表示可检测到衣壳组装。B)使用检测所有三种衣壳蛋白的抗体B1或仅检测VP1和VP2的抗体A69进行表达的VP蛋白的蛋白质印迹分析。不同的表达构建体被分在各电泳道中,根据A命名。C)通过基于单克隆抗体A20的ELISA对衣壳形成进行定量。示出了至少3次独立实验的平均值+/-标准差;星号表示无法检测到衣壳的构建体。

[0246] 图6:VP2N-gfp对VP3衣壳组装的互补。

[0247] A)如所示出的,融合构建体pVP2N-gfp以及其转录体VP2N-gfp、VP3N-gfp、GFP的图示。B)如所示出的,pVP3/2809共转染(1)和pVP2N-gfp的量减少(1、1/5、1/50、1/500、表示为0的del)后,在HeLa细胞中VP3(B1抗体)、VP3N-gfp融合蛋白(抗gfp抗体)和VP2N-gfp(A69抗体)表达的蛋白质印迹检测。C)通过使用抗体A20的间接免疫荧光法对HeLa细胞中的衣壳形成的检测,所述HeLa细胞共转染了B中标示和显示的不同比率的pVP3/2809和pVP2N-gfp。D)使用基于A20的衣壳ELISA对HeLa细胞中的衣壳形成的定量,所述HeLa细胞共转染了不同比率的pVP3/2809和pVP2N-gfp。并且,标出了不同质粒的比率且该不同质粒比率对应于B和C中所显示的。对于每个实验,示出了至少2个独立实验的衣壳平均浓度+/-标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0248] 图7:在顺式情况下,在VP3颗粒中引入亚化学计量的截短的VP2。

[0249] 源自与pVP2N-gfp反式互补的pVP3/2696或pVP3/2809的纯化的wt AAV和衣壳的蛋白质印迹分析。用抗体A69检测VP1和VP2。将如所示出的不同量的衣壳装载到凝胶上,以对不同信号比率进行定量评估(VP2tru=截短的VP2)。

[0250] 图8:带有替代使用密码子的辅助质粒pVP2Ncm-gfp的表征。

[0251] A)构建体pVP2N-gfp(详见图6A)和pVP2Ncm-gfp各自的wt(VP2N,SEQ ID NO:145)和经密码子修饰的VP2N(VP2Ncm,SEQ ID NO:146)DNA序列的比对。

[0252] B)转染所示出的质粒后,用单克隆抗体A69对293-T细胞提取物进行的蛋白质印

迹。C)转染了pVP2N-gfp的HeLa细胞的荧光图像:左上图和左下图代表总GFP荧光。右上图和右下图表示VP2N-gfp中的VP2部分的间接免疫荧光,其中通过A69抗体和相应的Cy3-标记的山羊抗小鼠的二抗显像。D)使用基于A20的衣壳ELISA对293-T细胞中的衣壳形成的定量,所述293-T细胞共转染了pCMV-VP3/2809和所示出的质粒。示出了至少3个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0253] 图9:在反式互补构建体中的终止密码子突变

[0254] A)在VP2N阅读框中4个不同位置处具有翻译终止密码子的pVP2N-gfp构建体的图示。被替代核苷酸的编号是指AAV2基因组的核苷酸位置。在pVP2N/stopA中,在核苷酸2770处起始并编码谷氨酰胺的cag-密码子已被突变为tag;在pVP2N/stopB中,在核苷酸2797处起始并编码甘氨酸的gga-密码子已被突变为tga;在pVP2N/stopC中,在核苷酸2821处起始并编码丝氨酸的agt-密码子已被突变为tga;而在pVP2N/stopD中,在核苷酸2878处起始并编码甘氨酸的gga-密码子已被突变为tga。B)使用单克隆抗体B1和A69对共转染了pCMV-VP3/2809和所示出的质粒后的293-T细胞提取物进行的蛋白质印迹。C)使用基于A20的衣壳ELISA对293-T细胞中的衣壳形成的定量,所述293-T细胞共转染了pCMV-VP3/2809和所示出的质粒。示出了至少3个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0255] 图10:通过表达不同cap基因突变体获得的衣壳蛋白和衣壳的细胞定位。

[0256] 通过使用检测总衣壳蛋白(VP)的多克隆兔抗血清和检测组装的衣壳的抗体A20的双免疫荧光,对在HeLa细胞中由不同构建体表达的衣壳蛋白的定位进行了显像。在左侧示出了被转染的质粒。

[0257] 采用A20抗体对转染的HeLa细胞进行的免疫荧光染色,示出了突变体pCMV-VP3/2696RKR168-170AAA的VP蛋白在衣壳组装中和wt AAV一样有效。对于构建体pCMV-VP3/2696RKR168-170AAA,通过转换RKR肽(AA168-170)突变了假设的NLS。

[0258] 图11:通过NLS或人血清白蛋白的N末端延伸修饰的VP3的衣壳组装。

[0259] A)用于分析衣壳组装的NLS-VP3和HSA-VP3的图示。B)转染了图像上面所示出的质粒的HeLa细胞的间接双重免疫荧光,使用多克隆VP抗血清(VP)以定位表达的总衣壳蛋白(上一行),检测组装的衣壳的抗体A20(下一行)。VP2N-egfp是pVP2N-gfp的同义词。C)对获自在蔗糖梯度分离的COS-1细胞提取物的分离物的免疫斑点印迹分析。在转染了左侧所示出的质粒后48小时收获细胞。注意:在非变性条件下进行和A20抗体的反应以检测组装的衣壳,而与B1抗体的反应在衣壳变性之后进行以检测单一的衣壳蛋白。示出了病毒衣壳的沉淀常数(60S)。

[0260] 图12:在昆虫细胞中的VP3颗粒产生。

[0261] A)用于在昆虫细胞中产生AAV的构建体的图示。B)使用抗体SA7885(1:10000稀释度)、之后的二抗抗兔IgG-HRP 1:2500(Dianova, Hamburg, Germany)对表达的VP蛋白的蛋白质印迹分析,所述抗体SA7885为检测所有3种衣壳蛋白的多克隆兔血清。

[0262] 图13:不同AAV1构建体的蛋白质印迹分析

[0263] 在转染了不同的AAV1构建体pCI_VP2/2539_AAV1、pCI_VP3/2539_AAV1mutACG、pCI_VP3/2634_AAV1mutACG和pUCAV1的293细胞的粗裂解物中表达的VP蛋白的蛋白质印迹分析。使用B1抗体(稀释度:1:250)(Progen Heidelberg, Germany)、之后使用二抗抗小鼠IgG-HRP1:2500(Dianova, Hamburg, Germany)进行VP蛋白的检测。

[0264] 根据AAV1衣壳ELISA(Progen Heidelberg, Germany)测得的AAV1滴度装载2E10颗粒/构建体。

[0265] 蛋白质印迹显示,构建体pUCAV1表达3种衣壳蛋白VP1、VP2和VP3(第5泳道),而pCI_VP2/2539_AAV1使得VP2和VP3的表达(第2泳道),并且仅可在转染了pCI_VP3/2539_AAV1mutACG和pCI_VP3/2634_AAV1mutACG的细胞裂解物中检测到VP3(第3和第4泳道)。

[0266] 图14:采用AAV2的pVP2N-gfp的AAV1VP2构建体的反式互补。

[0267] 细胞提取物的蛋白质印迹分析,所述细胞提取物在经或不经pVP2N-gfp共转染的情况下转染了AAV2pCMV-VP3/2809或AAV1pCMV-AAV1VP3/2828(在图中分别示出为AAV2或AAV1)的VP3表达构建体。通过抗体B1(Progen, Heidelberg, Germany)检测AAV1和AAV2VP3,所述抗体B1识别在AAV1和AAV2之间完全保守的表位。通过抗体A69(Progen, Heidelberg, Germany)检测VP2N-gfp蛋白。

[0268] 图15:使用不同的pCMV-VP表达载体的颗粒产生效率的比较

[0269] A)构建体的图示。通过PCR扩增各自的VP编码区克隆pCI-VP、pCI-VP2和pCI-VP3,使用具有XhoI(5'-)和NotI(3'-)突出的引物,并且将经XhoI-/NotI-消化的PCR产物亚克隆到经XhoI-/NotI-消化的载体pCI(PROMEGA)中。在pCI-VP2的情况下,VP2的起始密码子同时从ACG改变为ATG。

[0270] 对于构建体pCI-VP2mutACG、pCMV-NLS-VP3和pCMV-VP3/2696的克隆,请参考其它部分。

[0271] B)为了进行转染,将 5.0×10^5 的293-T细胞接种到6孔细胞培养板的每个孔中,总体积为3ml培养基(DMEM含有10%FCS和ABAM)。在加湿气氛中、在37°C和5%CO₂下培养细胞24小时。然后,如US 2004/0053410中所公开的,使用磷酸钙转染方法转染细胞。简言之,为转染一孔的293-T细胞,将6μg所示出的质粒(分别为pCI-VP、pCI-VP2、pCI-VP3、1:10摩尔比的pCI-VP2和pCI-VP3、pCMV-NLS-VP3、pCI-VP2mutACG和pCMV-VP3/2696)混合于150μl的270mM CaCl₂中。向混合物中加入150μl的2×BBS(50mM BES(pH 6.95)、280mM NaCl和1.5mM Na₂HPO₄),然后通过抽吸小心地混合形成的溶液。室温下孵育溶液20分钟,然后逐滴加入到细胞中。在加湿的气氛中、在35°C、3%CO₂下孵育细胞18小时。在35°C和3%CO₂下18h后,将细胞在加湿气氛中、37°C、5%CO₂下再培养3天。

[0272] 然后,通过3轮的冷冻(-80°C)和解冻(37°C)循环在培养基中裂解293-T细胞。通过离心使裂解物(总体积3ml)澄清,使用可商购的ELISA(AAV滴度ELISA, Progen)测定VIP衣壳滴度。用各自的误差棒图示出了每个构建体4至6次独立转染的平均值。

[0273] 值得注意的是,采用构建体pCMV-NLS-VP3的颗粒产生效率低于检测限值(大约 1×10^9 /ml),因此,相比本发明描述的最佳VP3颗粒产生载体(pCI-VP2mutACG和pCMV-VP3/2696)低至少3-4log。

[0274] C)为进行转染,将 5.0×10^5 的293-T细胞接种到6孔细胞培养板的每个孔中,总体积为3ml培养基(DMEM含有10%FCS和ABAM)。在加湿的气氛中、在37°C和5%CO₂下培养细胞24小时。然后,如US 2004/0053410中所公开的,使用磷酸钙转染方法转染细胞。简言之,为转染一孔的293-T细胞,将6μg的所示出的质粒(分别为pCI-VP、pCI-VP2、pCI-VP3、1:10摩尔比的pCI-VP2和pCI-VP3、pCMV-NLS-VP3、pCI-VP2mutACG和pCMV-VP3/2696)混合于150μl的270mM CaCl₂中。向混合物中加入150μl的2×BBS(50mM BES(pH 6.95)、280mM NaCl和1.5mM

Na₂HPO₄),然后通过抽吸小心地混合得到的溶液。室温下孵育溶液20分钟,然后逐滴加入到细胞中。在加湿的气氛中,在35℃、3%CO₂下孵育细胞18小时。在35℃和3%CO₂下18h后,将细胞在加湿气氛中在37℃、5%CO₂下再培养3天。

[0275] 然后,去除293-T细胞的上清,用PBS洗涤细胞,最后在300μl的RIPA缓冲液(25mM Tris.Cl pH 7.4、150mM NaCl、1%IGEPAL、1%Na.DOC、0.1%SDS)中裂解细胞。加入100μl的3×Geba样品缓冲液(Gene Bio-Application Ltd)和25mM DTT,将样品在95℃下加热10分钟。离心样品,然后将30μl澄清的上清液进行SDS page(10%GeBa gels, Gene Bio-Application Ltd)。将蛋白转移至硝化纤维素膜上(1小时,230mA),然后在室温下封闭该膜1小时。采用抗体B1,通过在封闭缓冲液(1:500稀释度)中在4℃下过夜孵育,之后洗涤,并用二抗(抗小鼠IgG-HRP,在封闭缓冲液中1:2500)孵育,从而检测VP蛋白。最后,再次洗涤膜,并在室温下用super signal pico west底物(Pierce)孵育5分钟。如所期望的由不同的VP表达载体表达AAV衣壳蛋白。

[0276] 图16:AAV衣壳基因的示意性结构。

[0277] 相对于Cap蛋白VP1、VP2和VP3的翻译起始密码子的位置以及EcoNI和BsiWI限制性位点示出了ORF2的位置和所编码的蛋白AAP(如图1中更为详细地提供和描述的)。箭头标出了翻译起始位点并指示了VP1、VP2 和VP3由同一个阅读框(本文命名为第一ORF,即ORF1)翻译,而AAP由不同的阅读框(ORF2)翻译。针对VP1、VP2和VP3,提供了清楚限定的翻译起始点的编号。

[0278] 图17:AAV2的ORF2核苷酸序列和AAP的蛋白序列。

[0279] 提供了AAV2(NCBI登记号NC_001401)从2717位至3343位的ORF2的核苷酸序列(包括tga终止密码子),以及经从ORF2的第一个核苷酸开始翻译ORF2获得的AAP的相应蛋白质序列。2809标出了VP3的ATG起始密码子的核苷酸位置,其用下划线标出并以粗体显示。编码L(亮氨酸)的预测的AAP翻译起始密码子CTG同样用下划线并以粗体显示。

[0280] 图18:ORF1cm和ORF2cm的序列。

[0281] A)经密码子修饰的EcoNI-BsiWI限制性片段ORF1cm的DNA序列。

[0282] B)经密码子修饰的EcoNI-BsiWI限制性片段ORF2cm的DNA序列。

[0283] 用下划线标出了VP2和VP3的翻译起始密码子。(↓)标出了ORF2的起点,并用方框突出显示了ORF2cm中保留的预测的非经典AAP翻译起始密码子CTG的位置。并且/或者,在ORF1cm中,将AAP的翻译起始密码子突变为CCG。

[0284] 图19:具有pVP2N-gfp的VP3表达质粒的反式互补。

[0285] A)含有源自AAV2基因组和gfp-盒的EcoNI-BsiWI片段的构建体pVP2N-gfp的图示

[0286] B)以等摩尔比开始,将VP2N-gfp与量减少的pCMV-VP3/2809p一起共转染到293-T细胞中,从而互补质粒pCMV-VP3/2809的VP3表达。为了比较,转染了空载体pBS(可商购的Bluescript载体)或质粒pCMV-VP3/2696。通过使用单克隆抗体B1的蛋白质印迹分析样品以检测VP3,并且通过使用单克隆抗体A69的蛋白质印迹分析样品以检测VP2N-gfp和VP2tru(截短的VP2)。

[0287] C)通过基于单克隆抗体A20的ELISA定量衣壳的形成。示出了至少3个独立实验的平均值+/-标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0288] 图20:采用pVP2N/ORF1cm和pVP2N/ORF2cm对VP3表达质粒进行的反式互补。

[0289] 除了构建体pVP2N/ORF1cm和pVP2N/ORF2cm的区别外,将和如图19所述的相同实验设置用于反式互补。经密码子修饰的DNA序列(图18提供详细序列)以图A)中的带阴影方框表示。

[0290] 图21:采用pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1和pORF2/TTG-AU1对VP3表达质粒进行的反式互补。

[0291] 除了构建体pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1和pORF2/TTG-A的区别外,将和如图19所述的相同实验设置用于反式互补。它们包括融合至AU1-标签编码序列的cap基因的整个ORF2(如图17提供的)。此外,将预测的AAP翻译起始密码子(CTG)突变为ATG和TTG。

[0292] 单克隆抗体抗AU1用于检测AAP-AU1,或者多克隆抗AAP血清用于检测AAP-AU1或C末端截短的AAP(AAPtru)。

[0293] 图22:采用pVP2N/ORF2stopA、pVP2N/ORF2stopB、和pVP2N/ORF2stopC对VP3表达质粒进行的反式互补。

[0294] 将在cap基因片段的ORF2中携带终止密码子的pVP2N-gfp衍生物和VP3表达质粒pCMV-VP3/2809一起共转染到293-T细胞中。

[0295] A)构建体pVP2N/ORF2stopA、pVP2N/ORF2stopB、和pVP2N/ORF2stopC各自的图示,所述构建体分别在所示出的位置包含cap基因片段的ORF2中的终止密码子。在pVP2N/ORF2stopA中,在核苷酸2810处起始的tgg-密码子已被突变为tag;在pVP2N/ORF2stopB中,在核苷酸2831处起始的caa-密码子已被突变为taa;在pVP2N/ORF2stopC中,在核苷酸2879处起始的gaa-密码子已被突变为tga。所有的突变都没有破坏ORF1。

[0296] B)通过使用单克隆抗体B1的蛋白质印迹分析样品以检测VP3,并且通过使用单克隆抗体A69的蛋白质印迹分析样品以检测VP2N-gfp。

[0297] C)通过基于单克隆抗体A20的ELISA定量衣壳的形成。示出了至少3个独立实验的平均值+/-标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0298] 图23:采用不同构建体对AAP表达缺陷的全长AAV2基因组进行的反式互补。

[0299] A)携带野生型AAV2基因组的质粒pTAV2.0和含有cap基因的经ORF1密码子修饰的EcoNI/BsiWI片段(阴影方框)的质粒pTAV/ORF1cm的图示。

[0300] B)将质粒与所示出的构建体一起共转染到293-T细胞中。使用单克隆抗体B1进行VP蛋白质表达的蛋白印迹分析。采用多克隆抗AAP血清检测AAP和截短的AAP(AAPtru)。

[0301] C)和D)通过基于单克隆抗体A20的ELISA定量经所示出的质粒共转染的293-T细胞中的衣壳形成。示出了至少3个独立实验的平均值+/-标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0302] 图24:通过wt基因组对在cap基因的ORF2中含有终止密码子的全长AAV2基因组进行的反式互补。

[0303] A)携带wtAAV2基因组的质粒pTAV2.0和在cap基因的ORF2中含有终止密码子(和质粒pVP2N/ORF2stopB中的相同位置,图22)的质粒pTAV/ORF2stopB的图示。

[0304] B)将质粒与空载体pBS或与pVP2N-gfp(如所示出的)一起共转染到293-T细胞中。使用单克隆抗体B1进行VP蛋白表达的蛋白质印迹分析。采用多克隆抗AAP血清检测AAP和AAPtru。

[0305] C)通过基于单克隆抗体A20的ELISA定量经所示出的质粒共转染的293-T细胞中的

衣壳形成。示出了至少3个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0306] 图25:用于VP3和NoLS-VP3以及组装的衣壳的细胞内定位的免疫荧光图像。

[0307] A)用于表达融合至HIV Rev的核仁定位信号的VP3(NoLS-VP3)的构建体和由于VP3融合至SV40大T-抗原的核定位信号而表达NLS-VP3的构建体(如图11中所用)相比较的图示。

[0308] B)转染了左边所示出的质粒的HeLa细胞的间接双重免疫荧光,其中使用多克隆VP抗血清(VP)以定位表达的全部衣壳蛋白(左图),使用抗体A20以检测组装的衣壳(右图)。

[0309] C)转染了左边所示出的质粒的HeLa细胞的间接双重免疫荧光,其中使用针对AU1-标签的单克隆抗体(抗AU1)以定位表达的AAP(左图),并且使用多克隆核仁纤维蛋白抗体(抗核仁纤维蛋白)作为标志物进行核仁定位(中图)。右侧示出了同一部分的相衬图像。

[0310] 图26:VP3、NLS-VP3和NoLS-VP3的表达和衣壳组装活性。

[0311] A)使用单克隆抗体B1进行的293-T细胞提取物蛋白质印迹分析,所述293-T细胞提取物表达所示出的VP3或VP3融合蛋白。

[0312] B)通过基于单克隆抗体A20的ELISA定量293-T细胞中的衣壳形成。示出了至少3个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差;星号表示未能检测到衣壳的样品。

[0313] 图27:细小病毒AAP蛋白序列的比对。

[0314] 源自不同细小病毒cap基因ORF2的预测的AAP蛋白序列的比对。下行的线条示出了在至少60%比对序列中100%相同的保守氨基酸。用框突出显示了预测的AAV2AAP翻译起始的位置。还包括了潜在的翻译起始密码子的上游非翻译序列。在表8中列出了对应DNA序列的NCBI登记号。

[0315] 图28:AAV2空颗粒制剂的EM分析。

[0316] 如所示出的由VP1、VP2和VP3(VP1,2,3VLP)组装或仅由VP3(VP3VLP)组装的病毒样颗粒。

[0317] 图29:经反式互补的衣壳组装

[0318] 通过基于单克隆抗体A20对所示出的293-T细胞中的由下述构建体形成的衣壳进行了定量:AAV2(AAV2-VP3)的构建体pCMV_VP3/2809、来自AAV1(AAV1-VP3)的pCMV_AAV1VP3/2829和与来自AAV2、AAV1和AAV5的pVP2N-gfp一起共转染的对应的AAV5VP3构建体。Bluescript载体(pBS)用作阴性对照。星号指示未能检测到衣壳的样品。

[0319] 氨基酸序列

[0320] SEQ ID NO:1

[0321] ILVRLETQTQ YLTPSLSDSH QQPPLVWELI RWLQAVAHQW QTITRAPTEW VIPREIGIAI

[0322] PHGWATESSP PAPEPGPCPP TTTTSTNKFP ANQEPRTTIT TLATAPLGGI LTSTDSTATF

[0323] HHVTGKDSST TTGDS DPRDS TSSSLTFKSK RSRRMTVRRR LPITLPARFR CLLTRSTSSR

[0324] TSSARRIKDA SRRSQQTSSW CHSMDTSP

[0325] SEQ ID NO:2

[0326] SSRHKSQTPP RASARQASSP LKRDSILVRL ATQSQSPIHN LSENLQQPPL LWDLLQWLQA

[0327] VAHQWQTITK APTEWVMPQE IGIAIPHGWA TESSPPAPAP GPCPPTITTS TSKSPVLQRG

[0328] PATTTTTSAT APPGGILIST DSTATFHHTV GSDSSTTIGD SGPRDSTSNS STSKSRRSRR

[0329] MMASQPSLIT LPARFKSSRT RSTSFRTSSA LRTRAASLRS RRTCS

[0330] SEQ ID NO:3
[0331] ISVRLATQSQ SQTNLSENH QQPPQVWDLI QWLQAVAHQW QTITRVPMEW VIPQEIGIAI
[0332] PNGWATESSP PAPEGPCPL TTTISTSKSP ANQELQTTTT TLATAPLGGI LTLTDSTATS
[0333] HHVTGSDSLT TTGDSGPRNS ASSSSTSKLK RSRRTMARRL LPITLPAFK CLTRSISSR
[0334] TCSGRRTKAV SRRFQRTSSW SLSMDTSP
[0335] SEQ ID NO:4
[0336] LNPPSSPTPP RVSAKKASSR LKRSSFSTK LEQATDPLRD QLPEPCLMTV RCVQQLAELQ
[0337] SRADKVPMEW VMPRVIGIAI PPGLRATSRP PAPEPGSCPP TTTTSTSDSE RACSPTPTTD
[0338] SPPPGDTLTS TASTATSHHV TGSDSSTTTG ACDPKPCGSK SSTSRRRSR RRTARQRWLI
[0339] TLPARFRSLR TRRTNCRT
[0340] SEQ ID NO:5
[0341] TTTQKERRL GPKRTPSLPP RQTPKLDPAD PSSCKSQPNQ PQVWELIQCL REVAAHWATI
[0342] TKVPMEWAMP REIGIAIPRG WGTSSPSP EPGCCPATT TSTERSKAAP STEATPTPTL
[0343] DTAPPGTTLT LTASTATGAP ETGKDSSTTT GASDPGPSES KSSTFKSKRS RCRTPPPPSP
[0344] TTSPPPSKCL RTTTTSCPTS SATGPRDACR PSLRRSLRCR STVTRR
[0345] SEQ ID NO:6
[0346] SSRHSQTPP RALARQASSP LKRDSILVRL ATQSQSPHN LSENQQPPL LWDLLQWLQA
[0347] VAHQWQTITK APTEWVMPQE IGIAIPHWG TESSPPAPEH GPCPPITTS TSKSPVLQRG
[0348] PATTTTTSAT APPGGILIST DSTAISHHV TGSDSSTTIGD SGPRDSTSSS STSKSRRSR
[0349] MMASRPSLIT LPAFKSSRT RSTSCRTSSA LRTRAASLRS RRTCS
[0350] SEQ ID NO:7
[0351] SRHLSVPPTP PRASARKASS PPERDSISVR LATQSQSPTL NLENLQQRP LVWDLVQWLQ
[0352] AVAHQWQTIT KVPTEWVMPQ EIGIAIPHWG ATESSLPAPE PGPCPPTTTT STSKSPVKLQ
[0353] VVPTTTPTSA TAPPGILT TDSTATSHHV TGSDSSTTTG DSGPRSCGSS SSTSRRRSR
[0354] RMTALRPSLI TLPARFRYSR TRNTSCRTSS ALRTRAACL SRRTSS
[0355] SEQ ID NO:8
[0356] SHHPSVLQTP LRASARKANS PPEKDSILVR LATQSQFQTL NLENLQQRP LVWDLIQWLQ
[0357] AVAHQWQTIT KAPTEWVVR EIGIAIPHWG ATESSLPAPE PGPCPPTTTT STSKSPTGHR
[0358] EEPPTTTPTS ATAPPGILT LTDSTATFHH VTGSDSSTTT GDSGPRDSAS SSSTSRRRS
[0359] RRMKAPRPSP ITSPAPSRCL RTRSTSCRTF SALPTRAACL RSRRTCS
[0360] SEQ ID NO:9
[0361] SLLRNRTTP RVLANRVHSP LKRDSISVRL ATQSQSQTIN QSENLPQPPQ VWDLLQWLQV
[0362] VAHQWQTITK VPMWVVPRE IGIAIPNGWG TESSPPAPEP GPCPPTTITS TSKSPTAHLE
[0363] DLQMTTPTSA TAPPGILTS TDSTATSHHV TGSDSSTTTG DSGLDSTSS SSTFRSKRLR
[0364] TTMSRPSPI TLPARSRRS QTISSRTCS GRLTRAASRR SQRTFS
[0365] SEQ ID NO:10
[0366] TLGRLASQSQ SPTLNQSENH QQAPLVWDLV QWLQAVLQW QTITKAPTEW VVPQEIGIAI
[0367] PHGWATESSP PAPEGPCPP TTTTSTSKSP TGHREEPTT TPTSATAPPG GILTSTDSTA
[0368] TSHHVTGSDS STTTGDSGQK DSASSSSTR SRRSRMKAP RPSPITLPAF FRYLRTRNTS

[0369] CRTSSAPRTR AACLRSRMS S
[0370] SEQ ID NO:11
[0371] SHHSPTPPR ASAKKANNQP ERGSTLKRTL EPETDPLKDQ IPAPCLQTLK CVQHRAEMLS
[0372] MRDKVPMWV MPRVIGIAIP PGLRARSQQP RPEPGSCPPT TTTCTCVSEQ HQAATPTTDS
[0373] PPPGDILTST DSTVTSHHVT GKDSSTTTGD YDQKPCALKS SISKLRRSQR RTARLRSLIT
[0374] LPARFRYLRT RRMSSRT
[0375] SEQ ID NO:12
[0376] KRLQIGRPTR TLGRPRPRKS KKTANQPTLL EGHSTLKTLE QETDPLRDHL PEKCLMMLRC
[0377] VRRQAEMLSR RDKVPMWVM PPVIGIAIPP GQRAESPAPA PEPGSPPTT TTCTCESEQR
[0378] PTATPTTDSPP PGDTLTTLTA STATFPHATG SDSSTTTGDS GRNRCVLKSS TYRSRRSRRQ
[0379] TARLRSLITL PARFRSLRIR RMNSHT
[0380] SEQ ID NO:13
[0381] SRVLKSQTPR AELARKANSL PERDSTLTTN LEPETGLPQK DHLPELCLLR LKCVQQLAEM
[0382] VAMRDKVPRE WVMPPVIGIA IPLGQRATSP PPQPAPGSCR PTTTTCTCGS ARATPATPST
[0383] DSPPPGDTLT LTASTATSRL ETGKGSSTTT GDCAPKACKS ASSTSKLRRS RRLTGRRPYP
[0384] TTSPARSRL RTARTSSRT
[0385] SEQ ID NO:14
[0386] VKPSSRPKRG FSNPLVWWKT QRRLRPETSG KAKTNLVCPT LLHRLPRKTR SLARKDLPAG
[0387] QKIRAKAPLP TLEQQHPPLV WDHLSWLKEV AAQWAMQARV PMEWAIPPEI GIAIPNGWKT
[0388] ESSLEPPEPG SCPATTTTCT NESKDPAEAT TTTNSLDSAP PGDTLTIDS TATFPRETGN
[0389] DSSTTTGASV PKRCALDSLTL SRLKRSRST STPPSATTSP VRSRSLRTRT TNCRTSSDRL
[0390] PKAPSRRSQR ISTRSRSTGT AR
[0391] SEQ ID NO:15
[0392] ILVRLATQSQ SQTLNHSDNL PQPPLVWDL QWLQAVAHQW QTITRVPMEW VIPQEIGIAI
[0393] PNGWATESSP PAPAPGPCPP TTITSTSKSP ANQEPPTTTT TLATAPPGGI LTSTDSTATF
[0394] HHVTGKDSST TTGSDPRDS TSSSLTFKSK RSRMTVRRR LPITLPAFR CLLTPSTSSR
[0395] TSSARRIRDA SRRSQQTSSW SHSMDTSP
[0396] SEQ ID NO:16
[0397] TRRTVSSLPL QRRPKLEALP PPAIWDLVWR LEAVARQSTT ARMVPMEWAM PREIGIAIPH
[0398] GWTTVSSPEP LGPGICQPTT TTSTNDSTER PPETKATSDS APPGDTLTST ASTVISPLET
[0399] GKDSSTITGD SDQRAYGSKS LTFKLKKSRR KTQRRSSPIT LPARFRYLRT RSTSSRT
[0400] SEQ ID NO:17
[0401] LNNPTTRPGP GRSVPNASTT FSRKRRRPRP SKAKPLLKRA KTPEKEPLPT LDQAPPLVWD
[0402] HLSWLKEVAV QWAMQAKVPT EWAIPREIGI AIPNGWTTES LPEPLEPGSC PATTTTCTSG
[0403] SKDREPTPT INSLDSAPPG GTLTTTDDSTA TSPPETGNDS STTTGASDPK RCALDSLTSR
[0404] LKKSLSKTPT PPSPTTSPAR SKSLRTRTTS CRTSSDRLQR APSRRSQRIS TRSRSMVTAR
[0405] SEQ ID NO:18
[0406] TTTTFQKERRL GPKRTPSLPP RQTPKLPAD PSSCKSQHNQ PQVWELIQCL REVAAHWATI
[0407] TKVPMEWAMP REIGIAIPRG WGTESSPSPP APGCCPATT TSTERSKAAP STEATPTPTL

[0408] DTAPPGGTLT LTASTATGAP ETGKDSSTTI GASDPGLSES KSSTSKSKRS RCRTPPPPSP
 [0409] TTSPPPSKCL RTTTTNSRTS SATGPRDACR PSPRRSLRCR STATRR
 [0410] SEQ ID NO:19
 [0411] ASRSRSWLLQ SSVHTRPRKP QRTRRVSRDR IPGRRPRRGS SSPISLDLQQ TYLHPHNSPS
 [0412] LPQGFVWFL VRCLQEEALQ WTMLNKVPTE WAMPREIGIA IPNGWATEFS PDPPGPGCCP
 [0413] ATTTTCTSRs QTPPACTASP GADTLATAPP GGTSTSIASAT ATSRPETGSA SSITTGASDP
 [0414] RDCESNSSTS RSRRSRLIR RPRSPTTSRA RSRSSQTTST SCRTSAATPP RDACRRSPRT
 [0415] SSRCRSTATR R
 [0416] SEQ ID NO:20
 [0417] KTEPPRRAP NLWHLKWQR EEAELWATLQ GVPMEWVMR EIGIAIPNGW ETQSSQRPPE
 [0418] PGSCQATTTT STKQLPVEPL KMQMSSMQDT VPPGGTLIST ASTATSPLET GRDLSTTIGE
 [0419] SDPNLLNSRS SMSKSKKSQR RIKQRPLQTI SPQRFKSLRM MSINSRMSWA RLRKAPCRRS
 [0420] RRMSMPCRST GTAQCTPTRM EHGSMTVVHS TA
 [0421] SEQ ID NO:21
 [0422] KSLNYLKKTL LHPVIVEEKQ VQLPPKAPNL WQHLTWQREE AELWATLQGV PMEWVMPQEI
 [0423] GIAIPNGWET QSLPRLQEPG SCQATTTTST KPSQAEQTQT QIPNMLDTAP PGGTLISTDS
 [0424] TAISLQETGR DSSTTIGGLD RKHSNSRYSM CKLKKSRRT RQRLLLTLP LQSRYSRIMN
 [0425] TSCPMFWARP RRGRCHRSPQ MCMPCPSTAT AQCTPTRVEL DSMTEVPSIA
 [0426] SEQ ID NO:22
 [0427] TNTILKLKRP NKACRYQLHL KAEKKLHRH NLEGAQQVPI LAAHLSWLQE EAVRWQTITR
 [0428] APREWVIPQV IGIAIPSGWE TTSLQSQPEL GCSPLTGIIS TGLSTLTAPQ VRVLMQPMQD
 [0429] TRLPGGTLTS IDSIATSPPE TGKDSSTTTQ ASGRKDSKSK SLTSKSKKLQ HKIQRKQLPT
 [0430] ISPAPYRSLR TRTTYHMY
 [0431] SEQ ID NO:143
 [0432] LNNPTTRPGP GRSVPNASTT FSRKRRRPRP SKAKPLLKRA KTPEKEPLPT LDQAPPLVWD
 [0433] HLSWLKEVAV QWAMQAKVPT EWAIPREIGI AIPNGWTTES LPEPLEPGSC PATTTTCTSG
 [0434] SKDREEPTPT INSLDSAPPG GTLTTTDDSTA TSPPETGNDS STTTGASDPK RCALDSLTSR
 [0435] LKKSLSKTPT PPSPTTSPAR SKSLRTRTTS CRTSSDRLQR APSRRSQRIS TRSRSMVTAR
 [0436] 核苷酸序列
 [0437] SEQ ID NO:23
 [0438] ATTTTGGTCA GACTGGAGAC GCAGACTCAG TACCTGACCC CCAGCCTCTC GGACAGCCAC
 [0439] CAGCAGCCCC CTCTGGTCTG GGAACATAA CGATGGCTAC AGGCAGTGGC GCACCAATGG
 [0440] CAGACAATAA CGAGGGCGCC GACGGAGTGG GTAATTCCTC GGGAAATTGG CATTGCGATT
 [0441] CCACATGGAT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCCACCT
 [0442] ACAACAACCA CCTCTACAAA CAAATTTCCA GCCAATCAGG AGCCTCGAAC GACAATCACT
 [0443] ACTTTGGCTA CAGCACCCCT TGGGGGTATT TTGACTTCAA CAGATTCCAC TGCCACTTTT
 [0444] CACCACGTGA CTGGCAAAGA CTCATCAACA ACAACTGGGG ATTCCGACCC AAGAGACTCA
 [0445] ACTTCAAGCT CTTTAACATT CAAGTCAAAG AGGTCACGCA GAATGACGGT ACGACGACGA
 [0446] TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTTCAGG TGTTTACTGA CTCGGAGTAC CAGCTCCCGT

[0447] ACGTCCTCGG CTCGGCGCAT CAAGGATGCC TCCC GCCGTT CCCAGCAGAC GTCTTCATGG
[0448] TGCCACAGTA TGGATACCTC ACCCTGA
[0449] SEQ ID NO:24
[0450] AGCAGTCGCC ACAAGAGCCA GACTCCTCCT CGGGCATCGG CAAGACAGGC CAGCAGCCCCG
[0451] CTA AAAAGAG ACTCAATTTT GGTCAGACTG GCGACTCAGA GTCAGTCCCC GATCCACAAC
[0452] CTCTCGGAGA ACCTCCAGCA ACCCCCGCTG CTGTGGGACC TACTACAATG GCTTCAGGCG
[0453] GTGGCGCACC AATGGCAGAC AATAACGAAG GCGCCGACGG AGTGGGTAAT GCCTCAGGAA
[0454] ATTGGCATTG CGATTCCACA TGGCTGGGCG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGCACCT
[0455] GGGCCTTGCC CACCTACAAT AACCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAGTGCT TCAACGGGGG
[0456] CCAGCAACGA CAACCACTAC TTCGGCTACA GCACCCCTG GGGGTATTTT GATTTCAACA
[0457] GATTCCACTG CCACTTTTCA CCACGTGACT GGCAGCGACT CATCAACAAC AATTGGGGAT
[0458] TCCGGCCCAA GAGACTCAAC TTCAAACCTCT TCAACATCCA AGTCAAGGAG GTCACGACGA
[0459] ATGATGGCGT CACAACCATC GCTAATAACC TTACCAGCAC GGTTCAGTC TTCTCGGACT
[0460] CGGAGTACCA GCTTCCGTAC GTCCTCGGCT CTGCGCACCA GGGCTGCCTC CCTCCGTTCC
[0461] CGGCGGACGT GTTCATGA
[0462] SEQ ID NO:25
[0463] ATTTGGGTCA GACTGGCGAC TCAGAGTCAG TCCCAGACCC TCAACCTCTC GGAGAACCAC
[0464] CAGCAGCCCC CACAAGTTTG GGATCTAATA CAATGGCTTC AGGCGGTGGC GCACCAATGG
[0465] CAGACAATAA CGAGGGTGCC GATGGAGTGG GTAATTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
[0466] CCCAATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCAG AACCTGGGCC CTGCCACTT
[0467] ACAACAACCA TCTCTACAAG CAAATCTCCA GCCAATCAGG AGCTTCAAAC GACAACCACT
[0468] ACTTTGGCTA CAGCACCCCT TGGGGGTATT TTGACTTTAA CAGATTCCAC TGCCACTTCT
[0469] CACCACGTGA CTGGCAGCGA CTCATTAACA ACAACTGGGG ATTCCGGCCC AAGAACTCA
[0470] GCTTCAAGCT CTTCAACATC CAAGTTAAAG AGGTCACGCA GAACGATGGC ACGACGACTA
[0471] TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTCAAG TGTTTACGGA CTCGGAGTAT CAGCTCCCGT
[0472] ACGTGCTCGG GTCGGCGCAC CAAGGCTGTC TCCC GCCGTT TCCAGCGGAC GTCTTCATGG
[0473] TCCCTCAGTA TGGATACCTC ACCCTGA
[0474] SEQ ID NO:26
[0475] TTGAATCCCC CCAGCAGCCC GACTCCTCCA CGGGTATCGG CAAAAAAGGC AAGCAGCCGG
[0476] CTA AAAAGAA GCTCGTTTTT GAAGACGAAA CTGGAGCAGG CGACGGACCC CCTGAGGGAT
[0477] CAACTTCGG AGCCATGTCT GATGACAGTG AGATGCGTGC AGCAGCTGGC GGAGCTGCAG
[0478] TCGAGGGCGG ACAAGGTGCC GATGGAGTGG GTAATGCCTC GGGTGATTGG CATTGCGATT
[0479] CCACCTGGTC TGAGGGCCAC GTCACGACCA CCAGCACCAG AACCTGGGTC TTGCCACCT
[0480] ACAACAACCA CCTCTACAAG CGACTCGGAG AGAGCCTGCA GTCCAACACC TACAACGGAT
[0481] TCTCCACCCC CTGGGGATAC TTTGACTTCA ACCGCTTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG
[0482] ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACA ACTGGG GCATGCGACC CAAAGCCATG CGGGTCAAAA
[0483] TCTTCAACAT CCAGGTCAAG GAGGTCACGA CGTCGAACGG CGAGACAACG GTGGCTAATA
[0484] ACCTTACCAG CACGGTTCAG ATCTTTGCGG ACTCGTCGTA CGAACTGCCG TACGTGA
[0485] SEQ ID NO:27

[0486] ACGACCACTT TCCAAAAAGA AAGAAGGCTC GGACCGAAGA GGA CTCCAAG CCTTCCACCT
[0487] CGTCAGACGC CGAAGCTGGA CCCAGCGGAT CCCAGCAGCT GCAAATCCCA GCCCAACCAG
[0488] CCTCAAGTTT GGGAGCTGAT ACAATGTCTG CGGGAGGTGG CGGCCCAT TG GCGACAATA
[0489] ACCAAGGTGC CGATGGAGTG GGCAATGCCT CGGGAGATTG GCATTGCGAT TCCACGTGGA
[0490] TGGGGGACAG AGTCGTCACC AAGTCCACCC GAACCTGGGT GCTGCCCAGC TACAACAACC
[0491] ACCAGTACCG AGAGATCAAA AGCGGCTCCG TCGACGGAAG CAACGCCAAC GCCTACTTTG
[0492] GATACAGCAC CCCCTGGGGG TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACAGCCAC TGGAGCCCCC
[0493] GAGACTGGCA AAGACTCATC AACAACTACT GGGGCTTCAG ACCCCGGTCC CTCAGAGTCA
[0494] AAATCTTCAA CATTCAAGTC AAAGAGGTCA CGGTGCAGGA CTCCACCACC ACCATCGCCA
[0495] ACAACCTCAC CTCCACCGTC CAAGTGTTTA CGGACGACGA CTACCAGCTG CCCTACGTCG
[0496] TCGGCAACGG GACCGAGGGA TGCCTGCCGG CCTTCCCTCC GCAGGTCTTT ACGGTGCCGC
[0497] AGTACGGTTA CGCGACGCTG A
[0498] SEQ ID NO:28
[0499] AGCAGTCGCC ACAAGAGCCA GACTCCTCCT CGGGCATTGG CAAGACAGGC CAGCAGCCCCG
[0500] CTAAAAAGAG ACTCAATTTT GGTCAGACTG GCGACTCAGA GTCAGTCCCC GACCCACAAC
[0501] CTCTCGGAGA ACCTCCAGCA ACCCCGCTG CTGTGGGACC TACTACAATG GCTTCAGGCG
[0502] GTGGCGCACC AATGGCAGAC AATAACGAAG GCGCCGACGG AGTGGGTAAT GCCTCAGGAA
[0503] ATTGGCATTG CGATTCCACA TGGCTGGGCG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGAACAT
[0504] GGGCCTTGCC CACCTATAAC AACCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAGTGCT TCAACGGGGG
[0505] CCAGCAACGA CAACCACTAC TTCGGCTACA GCACCCCTG GGGGTATTTT GATTTCACAA
[0506] GATTCCACTG CCATTTCTCA CCACGTGACT GGCAGCGACT CATCAACAAC AATTGGGGAT
[0507] TCCGGCCCAA GAGACTCAAC TTCAAGCTCT TCAACATCCA AGTCAAGGAG GTCACGACGA
[0508] ATGATGGCGT CACGACCATC GCTAATAACC TTACCAGCAC GGTTCAGTC TTCTCGGACT
[0509] CGGAGTACCA GTTGCCGTAC GTCCTCGGCT CTGCGCACCA GGGCTGCCTC CCTCCGTTCC
[0510] CGGCGGACGT GTTCATGA
[0511] SEQ ID NO:29
[0512] AGCCGTCACC TCAGCGTTCC CCCGACTCCT CCACGGGCAT CGGCAAGAAA GGCCAGCAGC
[0513] CCGCCAGAAA GAGACTCAAT TTCGGTCAGA CTGGCGACTC AGAGTCAGTC CCCGACCTC
[0514] AACCTCTCGG AGAACCTCCA GCAGCGCCCT CTAGTGTGGG ATCTGGTACA GTGGCTGCAG
[0515] GCGGTGGCGC ACCAATGGCA GACAATAACG AAGGTGCCGA CGGAGTGGGT AATGCCTCAG
[0516] GAAATTGGCA TTGCGATTCC ACATGGCTGG GCGACAGAGT CATTACCACC AGCACCCGAA
[0517] CCTGGGCCCT GCCCACCTAC AACAAACCACC TCTACAAGCA AATCTCCAGT GAAACTGCAG
[0518] GTAGTACCAA CGACAACACC TACTTCGGCT ACAGCACCCC CTGGGGGTAT TTTGACTTTA
[0519] ACAGATTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACTGGG
[0520] GATTCCGGCC CAAGAAGCTG CGGTTCAAGC TCTTCAACAT CCAGGTCAAG GAGGTCACGA
[0521] CGAATGACGG CGTTACGACC ATCGCTAATA ACCTTACCAG CACGATTGAG GTATTCTCGG
[0522] ACTCGGAATA CCAGCTGCCG TACGTCTCG GCTCTGCGCA CCAGGGCTGC CTGCCTCCGT
[0523] TCCCGGCGGA CGTCTTCATG A
[0524] SEQ ID NO:30

[0525] AGCCATCACC CCAGCGTTCT CCAGACTCCT CTACGGGCAT CGGCAAGAAA GGCCAACAGC
[0526] CCGCCAGAAA AAGACTCAAT TTTGGTCAGA CTGGCGACTC AGAGTCAGTT CCAGACCCCTC
[0527] AACCTCTCGG AGAACCTCCA GCAGCGCCCT CTGGTGTGGG ACCTAATACA ATGGCTGCAG
[0528] GCGGTGGCGC ACCAATGGCA GACAATAACG AAGGCGCCGA CGGAGTGGGT AGTTCCTCGG
[0529] GAAATTGGCA TTGCGATTCC ACATGGCTGG GCGACAGAGT CATCACCACC AGCACCCGAA
[0530] CCTGGGCCCT GCCCACCTAC AACAACCACC TCTACAAGCA AATCTCCAAC GGGACATCGG
[0531] GAGGAGCCAC CAACGACAAC ACCTACTTCG GCTACAGCAC CCCCTGGGGG TATTTTGACT
[0532] TTAACAGATT CCACTGCCAC TTTTCACCAC GTGACTGGCA GCGACTCATC AACAACAAC
[0533] GGGGATTCCG GCCCAAGAGA CTCAGCTTCA AGCTCTTCAA CATCCAGGTC AAGGAGGTCA
[0534] CGCAGAATGA AGGCACCAAG ACCATCGCCA ATAACCTCAC CAGCACCATC CAGGTGTTTA
[0535] CGGACTCGGA GTACCAGCTG CCGTACGTTT TCGGCTCTGC CCACCAGGGC TGCCTGCCTC
[0536] CGTTCCCGGC GGACGTGTTC ATGA
[0537] SEQ ID NO:31
[0538] AGCAGTCTCC TCAGGAACCG GACTCCTCCG CGGGTATTGG CAAATCGGGT GCACAGCCCG
[0539] CTAAAAAGAG ACTCAATTTT GGTGAGACTG GCGACACAGA GTCAGTCCCA GACCCTCAAC
[0540] CAATCGGAGA ACCTCCCGCA GCCCCCTCAG GTGTGGGATC TCTTACAATG GCTTCAGGTG
[0541] GTGGCGCACC AGTGGCAGAC AATAACGAAG GTGCCGATGG AGTGGGTAGT TCCTCGGGAA
[0542] ATTGGCATTG CGATTCCCAA TGGCTGGGGG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGAACCT
[0543] GGGCCCTGCC CACCTACAAC AATCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAACAGC ACATCTGGAG
[0544] GATCTTCAAA TGACAACGCC TACTTCGGCT ACAGCACCCC CTGGGGGTAT TTTGACTTCA
[0545] ACAGATTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACGGG
[0546] GATTCCGGCC TAAGCGACTC AACTTCAAGC TCTTCAACAT TCAGGTCAAA GAGGTTACGG
[0547] ACAACAATGG AGTCAAGACC ATCGCCAATA ACCTTACCAG CACGGTCCAG GTCTTCACGG
[0548] ACTCAGACTA TCAGCTCCCG TACGTGCTCG GGTCGGCTCA CGAGGGCTGC CTCCCGCCGT
[0549] TCCCAGCGGA CGTTTTTCATG A
[0550] SEQ ID NO:32
[0551] ACTTTGGGCA GACTGGCGAG TCAGAGTCAG TCCCCGACCC TCAACCAATC GGAGAACCAC
[0552] CAGCAGGCC CTCTGGTCTG GGATCTGGTA CAATGGCTGC AGGCGGTGGC GCTCCAATGG
[0553] CAGACAATAA CGAAGGCGCC GACGGAGTGG GTAGTTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
[0554] CCACATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCCACCT
[0555] ACAACAACCA CCTCTACAAG CAAATCTCCA ACGGGACATC GGGAGGAAGC ACCAACGACA
[0556] ACACCTACTT CGGCTACAGC ACCCCCTGGG GGTATTTTGA CTTCAACAGA TTCCACTGCC
[0557] ACTTCTCACC ACGTGAAGTGG CAGCGACTCA TCAACAACAA CTGGGGATTC CGGCCAAAAA
[0558] GACTCAGCTT CAAGCTCTTC AACATCCAGG TCAAGGAGGT CACGCAGAAT GAAGGCACCA
[0559] AGACCATCGC CAATAACCTT ACCAGCACGA TTCAGGTATT TACGGACTCG GAATACCAGC
[0560] TGCCGTACGT CCTCGGCTCC GCGCACCAGG GCTGCCTGCC TCCGTTCCCG GCGGATGTCT
[0561] TCATGA
[0562] SEQ ID NO:33
[0563] AGTCACCACA AGAGCCCGAC TCCTCCTCGG GCATCGGCAA AAAAGGCAAA CAACCAGCCA

[0564] GAAAGAGGCT CAACTTTGAA GAGGACACTG GAGCCGGAGA CGGACCCCCT GAAGGATCAG
[0565] ATACCAGCGC CATGTCTTCA GACATTGAAA TGCGTGCAAG ACCGGGCGGA AATGCTGTCTG
[0566] ATGCGGGACA AGGTTCCGAT GGAGTGGGTA ATGCCTCGGG TGATTGGCAT TCGGATTCCA
[0567] CCTGGTCTGA GGGCAAGGTC ACAACAACCT CGACCAGAAC CTGGGTCTTG CCCACCTACA
[0568] ACAACCACTT GTACCTGCGT CTCGGAACAA CATCAAGCAG CAACACCTAC AACGGATTCT
[0569] CCACCCCCTG GGGATATTTT GACTTCAACA GATTCCACTG TCACTTCTCA CCACGTGACT
[0570] GGCAAAGACT CATCAACAAC AACTGGGGAC TACGACCAAA AGCCATGCGC GTTAAAAATCT
[0571] TCAATATCCA AGTTAAGGAG GTCACAACGT CGAACGGCGA GACTACGGTC GCTAATAACC
[0572] TTACCAGCAC GGTTCAGATA TTTGCGGACT CGTCGTATGA GCTCCCGTAC GTGA
[0573] SEQ ID NO:34
[0574] AAAAGACTCC AAATCGGCCG ACCAACCCGG ACTCTGGGAA GGCCCCGGCC AAGAAAAAGC
[0575] AAAAAGACGG CGAACCAGCC GACTCTGCTA GAAGGACACT CGACTTTGAA GACTCTGGAG
[0576] CAGGAGACGG ACCCCCTGAG GGATCATCTT CCGGAGAAAT GTCTCATGAT GCTGAGATGC
[0577] GTGCGGCGCC AGGCGGAAAT GCTGTGAGG CGGGACAAGG TGCCGATGGA GTGGGTAATG
[0578] CCTCCGGTGA TTGGCATTGC GATTCCACCT GGTGAGAGG CCGAGTCACC ACCACCAGCA
[0579] CCCGAACCTG GGTCTACCC ACGTACAACA ACCACCTGTA CCTGCGAATC GGAACAACGG
[0580] CCAACAGCAA CACCTACAAC GGATTCTCCA CCCCTGGGG ATACTTTGAC TTAAACCGCT
[0581] TCCACTGCCA CTTTTCCCA CGCGACTGGC AGCGACTCAT CAACAACAAC TGGGGACTCA
[0582] GGCCGAAATC GATGCGTGTT AAAATCTTCA ACATACAGGT CAAGGAGGTC ACGACGTCAA
[0583] ACGGCGAGAC TACGGTCGCT AATAACCTTA CCAGCACGGT TCAGATCTTT GCGGATTCTGA
[0584] CGTATGAACT CCCATACGTG A
[0585] SEQ ID NO:35
[0586] AGCAGAGTCC TCAAGAGCCA GACTCCTCGA GCGGAGTTGG CAAGAAAGGC AAACAGCCTG
[0587] CCAGAAAGAG ACTCAACTTT GACGACGAAC CTGGAGCCGG AGACGGGCCT CCCCCAGAAG
[0588] GACCATCTTC CGGAGCTATG TCTACTGAGA CTGAAATGCG TGCAGCAGCT GCGGAAATG
[0589] GTGGCGATGC GGGACAAGGT GCCGAGGGAG TGGGTAATGC CTCCGGTGAT TGGCATTGCG
[0590] ATTCCACTTG GTCAGAGAGC CACGTCACCA CCACCTCAAC CCGCACCTGG GTCCTGCCGA
[0591] CCTACAACA CCACCTGTAC CTGCGGCTCG GCTCGAGCAA CGCCAGCGAC ACCTTCAACG
[0592] GATTCTCCAC CCCCTGGGGA TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACTGCCAC TTCTCGCCAA
[0593] GAGACTGGCA AAGGCTCATC AACAACCACT GGGGACTGCG CCCCCAAAGC ATGCAAGTCC
[0594] GCATCTTCAA CATCCAAGTT AAGGAGGTCA CGACGTCTAA CGGGGAGACG ACCGTATCCA
[0595] ACAACCTCAC CAGCACGGTC CAGATCTTTG CGGACAGCAC GTACGAGCTC CCGTACGTGA
[0596] SEQ ID NO:36
[0597] GTAAAGCCAT CTTCCAGGCC AAAAAGAGGG TTCTCGAACC CTTTGGTCTG GTGGAAGACT
[0598] CAAAGACGGC TCCGACCGGA GACAAGCGGA AAGGCGAAGA CGAACCTCGT TTGCCCAGCA
[0599] CTTCTTCA CA GACTCCCAAG AAAACAAGA AGCCTCGCAA GGAAAGACCT TCCGGCGGGG
[0600] CAGAAGATCC GGGCGAAGGC ACCTCTTCCA ACGCTGGAGC AGCAGCACCC GCCTCTAGTG
[0601] TGGGATCATC TATCATGGCT GAAGGAGGTG GCGGCCAGT GGGCGATGCA GGCCAGGGTG
[0602] CCGATGGAGT GGGCAATTCC TCCGAAATT GGCATTGCGA TTCCCAATGG CTGGAAAACG

[0603] GAGTCGTCAC TCGAACCACC CGAACCTGGG TCTTGCCCAG CTACAACAAC CACCTGTACA
[0604] AACGAATCCA AGGACCCAGC GGAGGCGACA ACAACAACAA ATTCTTTGGA TTCAGCACCC
[0605] CCTGGGGATA CTTTGACTAC AATCGATTCC ACTGCCACTT TTCCCCGCGA GACTGGCAAC
[0606] GACTCATCAA CAACAACCTGG GGCATCCGTC CCAAAGCGAT GCGCTTTAGA CTCTTTAACA
[0607] TCCAGGTAA AGAGGTCACG GTCCAAGACT TCAACACCAC CATCGGCAAC AACCTCACCA
[0608] GTACGGTCCA GGTCTTTGCG GACAAGGACT ACCAACTGCC GTACGTCCTC GGATCGGCTA
[0609] CCGAAGGCAC CTTCCCGCGG TTCCCAGCGG ATATCTACAC GATCCCGCAG TACGGGTACT
[0610] GCACGCTAA
[0611] SEQ ID NO:37
[0612] ATTTTGGTCA GACTGGCGAC ACAGAGTCAG TCCCAGACCC TCAACCACTC GGACAACCTC
[0613] CCGCAGCCCC CTCTGGTGTG GGATCTACTA CAATGGCTTC AGGCGGTGGC GCACCAATGG
[0614] CAGACAATAA CGAGGGTGCC GATGGAGTGG GTAATTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
[0615] CCCAATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG CACCTGGGCC CTGCCACCT
[0616] ACAACAATCA CCTCTACAAG CAAATCTCCA GCCAATCAGG AGCCACCAAC GACAACCACT
[0617] ACTTTGGCTA CAGCACCCCC TGGGGGTATT TTGACTTCAA CAGATTCCAC TGCCACTTTT
[0618] CACCACGTGA CTGGCAAAGA CTCATCAACA ACAACTGGGG ATTCCGACCC AAGAGACTCA
[0619] ACTTCAAGCT CTTTAACATT CAAGTCAAAG AGGTCACGCA GAATGACGGT ACGACGACGA
[0620] TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTTCAAG TGTCTTACTGA CTCCGAGTAC CAGCTCCCGT
[0621] ACGTCCTCGG CTCGGCGCAT CAGGGATGCC TCCCAGCGTT CCCAGCAGAC GTCTTCATGG
[0622] TCCCACAGTA TGGATACCTC ACCCTGA
[0623] SEQ ID NO:38
[0624] ACGAGGAGGA CCGTGAGTTC GCTGCCGCTG CAGCGGAGAC CGAAACTGGA AGCGCTCCCC
[0625] CCACCGGCAA TTTGGGACCT GGTACGATGG CTGGAGGCGG TAGCGCGCCA ATCGACGACG
[0626] GCTCGTATGG TGCCGATGGA GTGGGCAATG CCTCGGGAGA TTGGCATTGC GATTCCACAT
[0627] GGCTGGACAA CTGTGTCATC ACCCGAACCA CTCGGACCTG GAATCTGCCA ACCTACAACA
[0628] ACCACATCTA CAAACGACTC AACGGAACGA CCTCCGAGA CCAAAGCTAC TTCGGATTCA
[0629] GCACCCCTG GGGATACTTT GACTTCAACC GCTTCCACTG TCATTTCTCC CCTCGAGACT
[0630] GGCAAAGACT CATCAACAAT AACTGGGGAC TCCGACCAA GAGCCTACGG TTCAAAATCT
[0631] TTAACATTCA AGTTAAAGAA GTCACGACGC AAGACTCAAC GAAGATCATC TCCAATAACC
[0632] TTACCAGCAC GGTTCAGGTA TTTGCGGACA CGGAGTACCA GCTCCCGTAC GTGA
[0633] SEQ ID NO:39
[0634] TTGAACAACC CGACAACACG GCCGGGACCG GGGAGAAGCG TCCGAAACGC GTCGACGACT
[0635] TTTTCCCGAA AAAGAAGAAG GCCAAGACCG AGCAAGGCAA AGCCCCTGCT CAAACGGGCG
[0636] AAGACCCCGG AGAAGGAACC TCTTCCAACG CTGGATCAAG CGCCCCCTCT AGTGTTGGGAT
[0637] CATCTGTCAT GGCTGAAGGA GGTGGCGGTC CAATGGGCGA TGCAGGCCAA GGTGCCGACG
[0638] GAGTGGGCAA TTCCTCGGGA AATTGGCATT GCGATTCCCA ATGGCTGGAC AACGGAGTCG
[0639] TTACCCGAAC CACTCGAACC TGGGTCTGTC CCAGCTACAA CAACCACTTG TACAAGCGGA
[0640] TCCAAGGACC GGGAGGAACC GACCCCAACA ATAAATTCTT TGGATTGAGC ACCCCCTGGG
[0641] GGTACTTTGA CTACAACCGA TTCCACTGCC ACTTCTCCCC CCGAGACTGG CAACGACTCA

[0642] TCAACAACAA CTGGGGCATC CGACCCAAAG CGATGCGCTT TAGACTCTTT AACATCCAGG
[0643] TTAAAGAAGT CACTGTCCAA GACTCCAACA CCACCATCGC CAACAACCTC ACCAGCACGG
[0644] TCCAAGTCTT TGCGGACAAG GACTACCAGC TGCCGTACGT CCTCGGATCG GCTACAGAGG
[0645] GCACCTTCCC GCCGTTCCCA GCGGATATCT ACACGATCCC GCAGTATGGT TACTGCACGC
[0646] TAA
[0647] SEQ ID NO:40
[0648] ACGACCACTT TCCAAAAAGA AAGAAGGCTC GGACCGAAGA GGACTCCAAG CCTTCCACCT
[0649] CGTCAGACGC CGAAGCTGGA CCCAGCGGAT CCCAGCAGCT GCAAAATCCCA GCACAACCAG
[0650] CCTCAAGTTT GGGAGCTGAT ACAATGTCTG CGGGAGGTGG CGGCCATTG GGCAGACAATA
[0651] ACCAAGGTGC CGATGGAGTG GGCAATGCCT CGGGAGATTG GCATTGCGAT TCCACGTGGA
[0652] TGGGGGACAG AGTCGTCACC AAGTCCACCC GCACCTGGGT GCTGCCCAGC TACAACAACC
[0653] ACCAGTACCG AGAGATCAAA AGCGGCTCCG TCGACGGAAG CAACGCCAAC GCCTACTTTG
[0654] GATACAGCAC CCCCTGGGGG TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACAGCCAC TGGAGCCCCC
[0655] GAGACTGGCA AAGACTCATC AACAACCTATT GGGGCTTCAG ACCCCGGTCT CTCAGAGTCA
[0656] AAATCTTCAA CATCCAAGTC AAAGAGGTCA CGGTGCAGGA CTCCACCACC ACCATCGCCA
[0657] ACAACCTCAC CTCCACCGTC CAAGTGTTTA CGGACGACGA C
[0658] SEQ ID NO:41
[0659] GCGTCGAGGA GCCGGAGCTG GCTCCTCCAG TCAAGCGTCC ACACTCGCCC GAGAAAACCC
[0660] CAGAGAACCA GAAGGGTCAG CCGCGACCGG ATCCCCGGAC GCCGGCCAAG AAGAGGCTCG
[0661] AGTTCTCCGA TCAGCCTGGA TCTTCAGCAG ACTTACCTGC ATCCTCACAA CAGTCCCAGC
[0662] CTCCCGCAGG GGTTCCTGGT GTGGTTCTCTG GTACGATGTC TGCAGGAGGA GGCCTCCAG
[0663] TGGACGATGC TCAACAAGGT GCCGACGGAG TGGGCAATGC CTCGGGAGAT TGGCATTGCG
[0664] ATTCCAAATG GCTGGGCAAC CGAGTTCTCA CCCGATCCAC CCGGACCTGG GTGCTGCCCA
[0665] GCTACAACAA CCACCTGTAC AAGCAGATCT CAGACGCCTC CGGCGTGCAC AGCCTCCCCG
[0666] GGAGCCGATA CTTTGGCTAC AGCACCCCTT GGGGGTACTT CGACTTCAAT CGCTTCCACT
[0667] GCCACTTCTC GCCCAGAGAC TGGCAGCGCC TCGTCAATAA CCACTGGGGC TTCCGACCCA
[0668] AGAGACTGCG AGTCAAATC TTCAACATCC AGGTCAAGGA GGTACGACT ACTGATTGCA
[0669] CGACCACGGT CTCCAACAAC CTCACGAGCA CGGTCCAGGT CTTACAGAC GACGAGTACC
[0670] AGCTGCCGTA CGTCTGCGGC AACGCCACCG AGGGATGCCT GCCGCGTTC CCCCCGGACG
[0671] TCTTCACGCT GCCGAGTAC GGCTACGCGA CGCTGA
[0672] SEQ ID NO:42
[0673] AAGACGGAGG AGCCACCGCG GAGGGCACCG AACCTGTGGC AGCATCTGAA ATGGCAGAGG
[0674] GAGGAGGCGG AGCTATGGGC GACTCTTCAG GGGGTGCCGA TGGAGTGGGT AATGCCTCGG
[0675] GAAATTGGCA TTGCGATTCC CAATGGATGG GAAACACAGT CATCACAAAG ACCACCAGAA
[0676] CCTGGGTCTT GCCAAGCTAC AACAACCACA TCTACAAAGC AATTACCAGT GGAACCTCTC
[0677] AAGATGCAAA TGTCCAGTAT GCAGGATACA GTACCCCTG GGGGTACTTT GATTTCACCC
[0678] GCTTCCACTG CCACTTCTCC CCTAGAGACT GGCAGAGACT TATCAACAAC CATTGGGGAA
[0679] TCCGACCCAA ATCTCTTAAA TTCAAGATCT TCAATGTCCA AGTCAAAGAA GTCACAACGC
[0680] AGGATCAAAC AAAGACCATT GCAAACAATC TCACCTCAAC GATTCAAGTC TTTACGGATG

[0681] ATGAGCATCA ACTCCCGTAT GTCCTGGGCT CGGCTACGGA AGGCACCATG CCGCCGTTCC
[0682] CGTCGGATGT CTATGCCCTG CCGCAGTACG GGTACTGCAC AATGCACACC AACCAGAATG
[0683] GAGCACGGTT CAATGACCGT AGTGCATTCT ACTGCTTAG
[0684] SEQ ID NO:43
[0685] AAAAGCCTAA ATTATCTGAA GAAAACTCTC CTTACCCAG TAATAGTGGA GGAGAAGCAA
[0686] GTGCAGCTGC CACCGAAGGC TCCGAACCTG TGGCAGCACC TAACATGGCA GAGGGAGGAA
[0687] GCGGAGCTAT GGGCGACTCT GCAGGGGGTG CCGATGGAGT GGGTAATGCC TCAGGAAATT
[0688] GGCATTGCGA TTCCAATGG CTGGGAGACA CAGTCATTAC CAAGACTACA AGAACCTGGG
[0689] TCCTGCCAAG CTACAACAAC CACATCTACA AAGCCATCAC AAGCGGAACA AACCCAGACA
[0690] CAAATACCCA ATATGCTGGA TACAGCACCC CCTGGGGGTA CTTTGATTTC AACAGATTCC
[0691] ACTGCCATTT CTCTCCAAGA GACTGGCAGA GACTCATCAA CAACCATTGG GGGATTAGAC
[0692] CGAAAGCACT CAAATTCAAG ATATTCAATG TGCAAGTTAA AGAAGTCACG ACGCAAGACC
[0693] AGACAAAGAC TATTGCTAAC AACCTTACCT CTACAATCCA GATATTACG GATAATGAAC
[0694] ACCAGCTGCC CTATGTTCTG GGCTCGGCCA CGGAGGGGAC GATGCCACCG TTCCCCTCAG
[0695] ATGTGTATGC CTTGCCCCAG TACGGCTACT GCACAATGCA CACCAACCAG AGTGGAGCTA
[0696] GATTCAATGA CAGAAGTGCC TTCTATTGCT TAG
[0697] SEQ ID NO:44
[0698] ACGAATACTA TCCTAAAGCT AAAAAGGCCA AACAAGGCTT GCAGATACCA GCTCCACCTA
[0699] AAGGCGGAGA AGAAGAAGCT ACATCGTCAC AATCTGGAGG GAGCCCAGCA GGTTCGGATA
[0700] CTAGCGGCAC ATCTGTCATG GCTACAGGAG GAGGCGGTCC GATGGCAGAC GATAACCAGG
[0701] GCGCCGAGGG AGTGGGTAAT TCCTCAGGTG ATTGGCATTG CGATACCAAG TGGATGGGAG
[0702] ACCACGTCAT TACAAAGTCA ACCAGAACTT GGGTGCTCCC CACTTACGGG AATCATCTCT
[0703] ACGGGCCTAT CAACTTTGAC GGCACCACAG GTTCGGGTGC TAATGCAGCC TATGCAGGAT
[0704] ACAAGACTCC CTGGGGGTAC TTTGACTTCA ATCGATTCCA TTGCCACTTC TCCCCCGAG
[0705] ACTGGCAAAG ACTCATCAAC AACCACACAG GCATCAGGCC GAAAGGACTC AAAATCAAAG
[0706] TCTTTAACGT CCAAGTCAAA GAAGTTACAA CACAAGATTC AACGAAAACA ATTGCCAACA
[0707] ATCTCACCAG CACCGTACAG ATCTTTGCGG ACGAGAACTA CGACTTACCA TATGTATTAG
[0708] SEQ ID NO:142
[0709] TTGAACAACC CGACAACACG GCCGGGACCG GGGAGAAGCG TCCCGAACGC GTCGACGACT
[0710] TTTTCCCGAA AAAGAAGAAG GCCAAGACCG AGCAAGGCAA AGCCCCTGCT CAAACGGGCG
[0711] AAGACCCCGG AGAAGGAACC TCTTCCAACG CTGGATCAAG CGCCCCCTCT AGTGTGGGAT
[0712] CATCTGTCAT GGCTGAAGGA GGTGGCGGTC CAATGGGCGA TGCAGGCCAA GGTGCCGACG
[0713] GAGTGGGCAA TTCCTCGGGA AATTGGCATT GCGATTCCCA ATGGCTGGAC AACGGAGTCG
[0714] TTACCCGAAC CACTCGAACC TGGGTCTGTC CCAGCTACAA CAACCACTTG TACAAGCGGA
[0715] TCCAAGGACC GGGAGGAACC GACCCCAACA ATAAATTCTT TGGATTGAGC ACCCCCTGGG
[0716] GGTACTTTGA CTACAACCGA TTCCACTGCC ACTTCTCCCC CCGAGACTGG CAACGACTCA
[0717] TCAACAACAA CTGGGGCATC CGACCCAAAG CGATGCGCTT TAGACTCTTT AACATCCAGG
[0718] TTAAAGAAGT CACTGTCCAA GACTCCAACA CCACCATCGC CAACAACCTC ACCAGCACGG
[0719] TCCAAGTCTT TGCGGACAAG GACTACCAGC TGCCGTACGT CCTCGGATCG GCTACAGAGG

[0720] GCACCTTCCC GCCGTTCCCA GCGGATATCT ACACGATCCC GCAGTATGGT TACTGCACGC

[0721] TAA

[0722] 实施例

[0723] 下列实施例列举了关于AAV、尤其是关于AAV2的发明。由于腺相关病毒和其它细小病毒结构的一般相似性,本发明可以容易地转用至编码3种病毒衣壳蛋白的其它细小病毒。

[0724] 1.一般方法

[0725] 1.1AAV(样颗粒)在昆虫细胞中的产生

[0726] 为了在Sf9细胞(在Graces(JHR Bioscience,USA)/10%FCS中培养)中产生AAV颗粒,采用载体质粒pVL_VP1_MOD4、pVL_VP2或pVL_VP3转染细胞,所述载体质粒是基于pVL1393多角体蛋白启动子的杆状病毒转移载体(Bioscience, San Jose, CA, USA)的衍生物,其携带经修饰的AAVVP1开放阅读框。(pVL_VP1_MOD4、pVL_VP2和pVL_VP3的克隆描述于实施例9)。

[0727] 使用BaculoGold™转染试剂盒,根据厂商的说明书(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)进行转染。转染后将细胞在27℃下孵育。转染后5天,经终点稀释试验(EPDA)将上清液用于单克隆分离。为此,在96孔板中培养Sf9细胞(2×10^4 细胞/孔),并用转染上清液的系列稀释液感染。在27℃下孵育7天后,将上清液转移至新的96孔板(主板)中,并2-8℃下储存。用氢氧化钠裂解EPDA的细胞,用乙酸钠中和,并用蛋白酶K处理。在用DIG-DNA洗涤液和封闭缓冲液试剂盒(Roche, Mannheim, Germany)进行免疫检测后,可以检测到单克隆。

[0728] 为了扩增单克隆,将主板的相应孔用于感染Sf9细胞。通过若干次传代进行重组杆状病毒的扩增。在使用上清液感染用于下一次传代的细胞之前,将每代细胞在27℃下孵育3天。在第1次传代中,用取自主板相应孔的50μl上清液感染 1.2×10^5 个Sf9细胞(12孔板)。将上清液用于感染 2×10^6 个Sf9细胞(T25培养瓶)(第1B代)。为了再传代,采用来自第1B代的1ml上清液感染 2×10^7 个Sf9细胞(T175培养瓶)。

[0729] 经终点稀释试验分析第2代(P2)的上清液的病毒滴度。为了产生AAV,采用P2的上清液依据感染复数(MOI)为1感染 1×10^6 个Sf9/孔(6孔板)。在27℃下孵育培养物2-3天。收获细胞,通过冷冻和解冻处理破坏细胞,并分析AAV的产生。使用可商购的AAV2滴度ELISA试剂盒(Progen, Heidelberg, Germany)根据厂商的说明书分析AAV2滴度。

[0730] 1.2AAV(样颗粒)在哺乳动物细胞中的产生

[0731] 1.2.1.质粒

[0732] ●Ad辅助质粒

[0733] 将编码腺病毒蛋白E2、E4和VAI-VAII的Ad辅助质粒用于在293或293-T细胞中制备AAV。通过将编码腺病毒(Ad)E2的BamHI限制性片段和E4-ORF6从pAdEasy-1(Stratagene, La Jolla, USA)亚克隆到pUC19(Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)的BamHI位点中,构建辅助质粒pUCAdE2/E4-VAI-VAII。产生的质粒被称为pUCAdE2/E4。通过使用下述引物的PCR从pAdVantage™(Promega, Mannheim, Germany)扩增VAI-VAII片段:

[0734] XbaI-VAI-780-3':5'-TCT AGA GGG CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG-3'(SEQ ID NO:59)和

[0735] XbaI-VAII-1200-5':5'-TCT AGA GCA AAA AAG GGG CTC GTC CCT GTT TCC-3'(SEQ ID NO:60),

[0736] 克隆到pTOP0(Invitrogen, Carlsbad, USA)中,然后亚克隆到pUCAdE2/E4的XbaI位点。此质粒命名为pUCAdV。

[0737] ●AAV编码质粒

[0738] 在US6,846,665中详细描述了pUCAV2的构建。质粒pTAV2.0描述于(Heilbronn等人,1990年),pVP3描述于(Warrington等人,2004年)。其它AAV病毒蛋白编码质粒描述于各自的实施例中。

[0739] 1.2.2.用于大规模生产病毒的转染

[0740] 在转染前24小时将293-T细胞(ATCC, Manassas, USA)接种于15cm培养皿(即直径15cm的培养皿, 7.5×10^6 /培养皿)中(在DMEM/10%FCS中培养)。通过描述于US2004/0053410的磷酸钙沉淀法转染细胞。

[0741] 在AAV启动子p40依赖性转录的情况下,进行和腺病毒辅助质粒的共转染。为了共转染AAV编码质粒和pUCAdV,选择1:1的质粒摩尔比。为了转染一个培养板的293-T细胞,如上所述使用磷酸钙转染方法,使用12 μ g AAV Cap编码质粒(分别为pUCAV2、pTAV2.0和pVP3)和24 μ g pUCAdV。在p40非依赖性转录的情况下,采用各AAV VP1、VP2和/或VP3编码质粒转染细胞。为了转染一个培养板的293-T细胞,使用如公开于US2004/0053410的磷酸钙转染方法,将36 μ g总DNA混合于875 μ l的270mM CaCl₂中。简言之,向混合物中加入875 μ l的2 $\times$ BBS(50mM BES(N,N-二-(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸)(pH 6.95)、280mM NaCl和1.5mM Na₂HPO₄),通过抽吸小心地混合形成的溶液。室温(RT)下孵育溶液20分钟,然后逐滴添加到细胞培养板中。在加湿的气氛中、在35 $^{\circ}$ C和3%CO₂下孵育细胞18小时后,将培养基换成无血清DMEM(Invitrogen Carlsbad, USA),然后在加湿的气氛中、在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下再培养细胞3天。用细胞铲收获293-T细胞,转移到50ml塑料管(Falcon)中,在4 $^{\circ}$ C下以3000g离心10分钟。将细胞团重悬于0.5ml裂解缓冲液(150mM NaCl, 50mM Tris, pH 8.5)/15cm培养皿中,然后进行3轮的冷冻和解冻循环(液氮/37 $^{\circ}$ C)。通过2次离心步骤(3700g, 4 $^{\circ}$ C, 20分钟)使细胞裂解物澄清。或者,将整个培养皿进行冷冻和解冻循环(-50 $^{\circ}$ C/RT)。收集剩余的上清液,并如1.3所述进一步纯化。

[0742] 1.2.3.小规模转染和病毒上清液的制备

[0743] 在转染前24小时将细胞接种于6cm培养皿中(5×10^5 个/培养皿)。通过如US2004/0053410所述的磷酸钙沉淀法转染293-T细胞。对于HeLa和COS-1细胞,使用Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, USA)根据厂商的说明书进行转染。在cap基因的启动子p40依赖性转录的情况下(pTAV2.0、其衍生物和pVP3),采用5型腺病毒(Ad5)感染细胞(MOI=10)。再孵育24-48小时后,在培养基中收获细胞,并通过3次冷冻-解冻循环(-80 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C)裂解。在56 $^{\circ}$ C下孵育裂解物30分钟以使Ad5失活。通过10000g离心5分钟去除细胞碎片。

[0744] 1.2.4.细胞培养

[0745] 在达氏改良伊氏培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)中,在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下维持HeLa和293-T细胞,该达氏改良伊氏培养基补充了10%热灭活的胎牛血清、100U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素和2mM L-谷氨酰胺。

[0746] 1.3.纯化

[0747] 1.3.1切向流过滤(TFF)和Benzonase处理

[0748] 收获经澄清的细胞后,使用切向流过滤装置(Sartoflow Slice 200台式切向流系

统,Sartorius Biotech GmbH, Göttingen, Germany)并使用100kDa截留值的膜(SARTOCON Slice 200)进一步浓缩培养基。将产生的TFF浓缩物和上清液(如1.2中所述获得)收集在一起,并立刻在37℃下用100U/ml benzonase(Merck,Darmstadt,Germany)处理2小时。benzonase处理后,通过在4℃下以3700g离心20分钟从而使细胞裂解物澄清。使用尺寸排阻色谱法纯化经澄清的上清液(ÄKTA explorer系统,GE Healthcare,Munich,Germany)。

[0749] 1.3.2尺寸排阻色谱法(SEC)

[0750] 通过装填了Superdex 200(制备级)的XK 50色谱柱(高250mm,直径50mm;GE Healthcare,Munich,Germany)分离经澄清的上清液。收集SEC的分离物(各5ml),并使用AAV2衣壳特异性A20ELISA(Progen,Heidelberg,Germany,产品编号:PRATV)测定衣壳滴度。收集含有AAV2颗粒的SEC的分离物,并使用碘克沙醇或蔗糖密度超速离心进一步纯化。

[0751] (i)通过使用碘克沙醇的密度梯度离心纯化AAV颗粒

[0752] 将含病毒的SEC收集液转移至Qickseal超速离心管(26×77mm,Beckman Coulter,Marseille,France)。不同浓度的碘克沙醇溶液(购自Sigma,Deisenhofen,Germany)分层置于含病毒的裂解物下面。据此,形成了具有下述组成的碘克沙醇梯度:底部6ml 60%、5ml 40%、6ml 25%和9ml 15%的碘克沙醇,病毒溶液在上面。在18℃下以416000g的超速离心旋转此梯度1小时。然后用套管通过在40%相下部穿入此管,并使得溶液滴入收集管中直到25%相到达,从而提取含有AAV颗粒的40%相。

[0753] (ii)蔗糖密度梯度分析

[0754] 在转染前24小时将 1.5×10^6 个细胞接种于10cm培养皿中。转染后48小时收获细胞,并在300μl PBS-MK(磷酸盐缓冲盐水溶液:18.4mM Na₂HPO₄、10.9mM KH₂PO₄、125mM NaCl,并补充了1mM MgCl₂、2.5mM KCl)中通过5次冷冻-解冻循环(-80℃和37℃)裂解。在37℃下用50U/ml Benzonase(Sigma,Deisenhofen,Germany)处理30分钟并以3700g离心20分钟后,将上清液装载于异质同晶聚合物离心管(14×89mm;Beckman Coulter,Marseille,France)中的11ml的5-30%或10-30%蔗糖梯度(蔗糖在PBS-MK、10mM EDTA中,含有一片不含EDTA的complete mini蛋白酶抑制剂(Roche,Mannheim,Germany))上。在4℃下以160000g离心2小时(SW41转子;Beckman)后,从管的底部收集500μl分离产物。作为参考,在另外的梯度中分析空AAV2衣壳(60S)。为了进行免疫斑点印迹试验,使用真空转印仪,将50μl的热变性的(99℃下10分钟)或未变性的分离产物的等分试样转移至Protran硝化纤维素膜(Schleicher & Schuell,Dassel,Germany)上。在含有10%脱脂奶粉的PBS中封闭膜1小时,然后用单克隆抗体B1(Progen,Heidelberg,Germany,商品编号:65158)孵育1小时,以检测变性的衣壳蛋白,或用单克隆抗体A20孵育1小时以检测未变性的衣壳。抗体B1和A20以1:10稀释度使用。用PBS洗涤膜若干次,然后用过氧化酶偶联的山羊抗小鼠抗体(1:5000稀释度)(Dianova,Hamburg,Germany)孵育1小时。然后再次洗涤膜,使用增强的化学发光检测试剂盒(Amersham,Braunschweig,Germany)使抗体反应显像。为了进行蛋白质印迹分析,将15μl的每种分离产物进行处理以用于SDS-PAGE,然后用单克隆抗体A69(Progen,Heidelberg,Germany,商品编号:65157)或B1探测。

[0755] (iii)通过色谱法纯化AAV颗粒

[0756] 空wtVP3[#]和经修饰的AAVLP^{*}的纯化

[0757] 标记[#]和^{*}是指在wtAAV[#]和经修饰的AAVLP^{*}之间在纯化方法上的微小差别。相应地

标出了缓冲液成分。

[0758] 阳离子交换色谱法(**ÄKTA**explorer系统)

[0759] 通过进行3次冷冻解冻循环(-54℃/37℃)获得含有空wtAAV[#]和经修饰的AAVLP*的总裂解物。通过在4℃下以4100rpm离心20分钟(MULTIFUGE L-R; Heraeus, Hanau, Germany)使总裂解物澄清。将产生的经澄清的上清液的pH调节为6。此外,通过加入无菌水将盐的电导率降低至大约10mS/cm。

[0760] 装填Fractogel EMD SO₃⁻(M)色谱柱(高100mm;直径15mm,XK16,GE Healthcare,München,Germany),然后用5CV电泳缓冲液平衡,该电泳缓冲液由80mM NaCl、2%蔗糖、50mM HEPES(pH 6.0)、2.5mM MgCl₂组成。

[0761] 平衡后,将经澄清的上清液通过Fractogel EMD SO₃⁻(M)填充的色谱柱进行分离(流速10ml/分钟)。分离后,使用5CV的上述电泳缓冲液洗柱。结合的颗粒(wtAAV或经修饰的AAVLP)在氯化钠浓度为350mM(峰1 ≈ 45ml)时得到有效洗脱。

[0762] 缓冲液交换(**ÄKTA**explorer系统)

[0763] 为了调节进行连续阳离子交换色谱法的洗脱蛋白(峰1)的pH和盐浓度,使用Sephadex G25填充的色谱柱(高500mm;直径15mm,XK26,GE Healthcare,München,Germany)(流速10ml/分钟)进行缓冲液交换。使用3CV SOURCE 15Q电泳缓冲液(由25mM Tris(pH 8.2)、150mM NaCl[#]/100mM NaCl^{*}、2.5mM MgCl₂组成)进行柱平衡后,通过该柱分离了峰1。收集蛋白分离产物(≈ 120ml)。

[0764] 阴离子交换色谱法(**ÄKTA**explorer系统)

[0765] 使用5CV SOURCE 15Q电泳缓冲液(由25mM Tris(pH 8.2)、150mM NaCl[#]/100mM NaCl^{*}、2.5mM MgCl₂组成)平衡SOURCE 15Q色谱柱(高500mm;直径15mm,XK26,GE Healthcare,München,Germany)。平衡后,将缓冲液交换后获得的蛋白分离产物(约120ml)加到色谱柱,并通过色谱柱进行分离(流速10ml/分钟)。收集含有90%的颗粒的流出液(约120ml)。

[0766] 使用离心式过滤装置进行的颗粒浓缩

[0767] 使用Centricon Plus-70(截留值100kDa)的离心式过滤装置(Millipore)浓缩含有wtVP3[#]或经修饰的AAVLP*的流出液。使用浮桶式转子(MULTIFUGE L-R; Heraeus, Hanau, Germany)在20℃下以3500g进行浓缩。将产生的浓缩物(约45ml)立即通过尺寸排阻色谱法进行分离。

[0768] 尺寸排阻色谱法(**ÄKTA**explorer系统)

[0769] 装填Superdex 200(制备级)色谱柱(高500mm;直径50mm,XK50,GE Healthcare,München,Germany),然后用2CV电泳缓冲液平衡,该电泳缓冲液由200mM NaCl、2%蔗糖、50mM HEPES(pH 6.0)、2.5mM MgCl₂组成。将上述浓缩物(约45ml)通过该柱进行分离(流速10ml/分钟)。首先洗脱颗粒(SEC分离产物编号1-13;每份5ml)。收集颗粒纯度大于95%的SEC分离产物,无菌过滤(0.2μm)(Minisart; Sartoriusstedim),然后于-84℃下储存。

[0770] 1.4.通过蛋白质印迹分析蛋白质表达

[0771] 处理等份的收获的细胞或等量的经纯化颗粒以进行SDS-PAGE。通过使用如之前(Wistuba等人,1995年)所描述的单克隆抗体A69、B1(Progen,Heidelberg,Germany)、抗AU1(Covance,Emeryville,USA)、抗GFP(克隆B-2;Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,

USA)或多克隆抗体抗AAP(见图17)的蛋白质印迹试验分析蛋白表达。在各自的实施例的描述中示出了方法的变化。

[0772] 1.5.滴度分析

[0773] 使用可商购的AAV2滴度ELISA试剂盒(Progen,Heidelberg,Germany,商品编号:PRATV)或各自的AAV1滴度ELISA试剂盒(Progen,Heidelberg,Germany,商品编号:PRAAV1),根据厂商的说明书测定衣壳滴度。

[0774] 1.6.免疫荧光分析

[0775] 为了进行免疫荧光分析,将HeLa细胞在盖玻片上培养24小时,转染,并且在cap基因的启动子p40依赖性转录的情况下(pTAV2.0和pVP3),采用Ad5(MOI=4)转染。20-48小时后,将细胞与100%甲醇(10分钟,-20℃)混合,然后用PBS(磷酸盐缓冲盐溶液:18.4mM Na₂HPO₄、10.9mM KH₂PO₄、125mM NaCl)洗涤。用一抗在室温下孵育1小时或在4℃下孵育过夜。作为一抗,杂交瘤上清液A20或A69分别用于检测组装的衣壳或VP2。不经稀释使用A20和A69(Progen,Heidelberg,Germany)。为了检测未组装的衣壳,以1:500稀释度使用兔多克隆血清,从而标记所有3种游离的VP蛋白。用PBS洗涤盖玻片3次,之后在室温下用合适的二抗(1:400稀释度的Cy3标记的山羊抗小鼠或1:150的FITC标记的山羊抗兔,购自Dianova,Hamburg,Germany或Molecular Probes,Leiden,The Netherlands)孵育1小时。再次洗涤盖玻片,浸入100%乙醇中,并嵌入Permafluor封固介质(Beckman Coulter,Marseille,France)中。采用Leica TCS SP2激光扫描显微镜获得共聚焦图像(0.3μm切片),并使用Adobe Photoshop CS软件进一步处理。在各自的实施例的描述中示出了方法的变化。

[0776] 为了使GFP表达显像,用2%多聚甲醛固定细胞15分钟,用50mM NH₄Cl淬灭2次,淬灭5分钟,然后用0.2%Triton X-100渗透10分钟。

[0777] 1.7.多克隆抗体的制备

[0778] 按照标准程序,通过用包含缀合至KLH(匙孔血蓝蛋白)的序列GKDSSTTTGDS DPRDSTS(SEQ ID NO:61)的肽免疫豚鼠,产生多克隆AAP抗血清(抗AAP)。

[0779] 1.8.用于电子显微术的病毒颗粒负染

[0780] 为了进行电子显微术,根据(Grimm等人,1999年;Grimm和Kleinschmidt,1999年;Mittereder等人,1996年),如下文详述的进行病毒颗粒的负染。

[0781] 将5μl的样品(约5×10¹⁰个病毒颗粒)施加到载网的新制大气辉光放电碳涂覆的一侧上,然后孵育2分钟。通过在Whatman滤纸上吸干载网的边缘来去除多余溶液。为了避免盐沉淀,用3滴水继而用4滴2%(w/v)醋酸铀酰溶液洗涤载网。在吸干和风干之前,将最后一滴染色溶液在载网上停留5分钟。采用Morgagni 268D FEI显微镜以100kV获得电子显微照片。

[0782] 2.通过VP2的N末端缺失分析进行VLP形成的分析

[0783] 我们以及之前的研究(比较上文)报道了当VP3由仅包含VP3cds的的构建体表达时,缺少衣壳组装。由于VP3的表达不足以形成VLP,我们尝试鉴别可以克服此缺陷的其它序列。在此实验中,我们考察了VP3cds的上游序列是否是VLP形成所必需的。如果是,则应该表征该序列。

[0784] 2.1.缺失突变体的克隆

[0785] 之前已描述了质粒pTAV2.0(Heilbronn等人,1990年)、pVP3(Warrington等人,2004年)、pCMV-VP(Wistuba等人,1997年)和pKEX-VP3(Ruffing等人,1992年)。从质粒pVP3

克隆缺失突变体pCMV-VP3/1882、pCMV-VP3/2193、pCMV-VP3/2596、pCMV-VP3/2611、pCMV-VP3/2696、pCMV-VP3/2765和pCMV-VP3/2809。pCMV-VP3质粒名称后面的数字指示根据Ruffing等人(1994年)的AAV2基因组中的核苷酸位置。在图5A中示意性示出构建体。

[0786] 为了克隆缺失突变体,将pVP3的HindIII/BsiWI片段(带有突变的VP1和VP2翻译起始密码子)亚克隆到pCMV-VP的HindIII/BsiWI骨架中,从而产生构建体pCMV-VP3/1882(图5)。通过将来自pVP3的DraI/BsiWI或EcoNI(平末端)/BsiWI片段亚克隆到pCMV-VP的HindIII(平末端)/BsiWI骨架中(EcoNI和HindIII位点通过单链突出的消化而平端化)(相对于基因组序列的用于克隆的不同限制性位点的位置示于图4)生成构建体pCMV-VP3/2193和pCMV-VP3/2596。为进行进一步缺失,将pVP3用作定点突变反应的模板。使用QuickChange定点突变试剂盒(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)根据厂商的说明书进行突变。对于每一个突变,设计了2个互补的PCT引物,以在指定区域产生新的HindIII限制性位点。引物序列:

[0787] 5'-CCTCTGGTCTGGGAAGCTTATGGCTACAGGCAGTGGCG-3' (SEQ ID NO:62)

[0788] 5'-CGCCACTGCCTGTAGCCATAAGCTTAGTTCCCAGACCAGAGG-3' (SEQ ID NO:63)

[0789] 将来自突变质粒的HindIII/BsiWI片段亚克隆到pCMV-VP的HindIII/BsiWI骨架中,从而产生构建体pCMV-VP3/2611、pCMV-VP3/2696、pCMV-VP3/2765和pCMV-VP3/2809(图5A)。

[0790] 2.2.通过蛋白质印迹和ELISA分析构建体

[0791] 为分析蛋白质表达,处理等份的收获的细胞以进行SDS-PAGE。

[0792] 如图5B中所示,用图5A中所列的除pTAV2.0(wt AAV)和pCMV-VP之外的所有构建体转染293-T细胞,当通过使用与所有3种衣壳蛋白反应的抗体B1的蛋白质印迹分析时,其仅导致VP3的表达。在转染了pTAV2.0(wt AAV)或pCMV-VP的对照细胞中,除VP3外都明显检测到VP1和VP2,所述pTAV2.0(wt AAV)或pCMV-VP中相应的翻译起始位点未被突变的质粒)。

[0793] 抗体B1与比VP3迁移得慢的例如针对突变质粒pKEX-VP3、pCMV-VP3/2765和pCMV-VP3/2809的2个多肽条带反应。至少对于质粒pKEX-VP3和pCMV-VP3/2809来说,相应的多肽不能含有VP1或VP2氨基酸序列,这是因为编码VP1或VP2的核苷酸序列完全缺失。并且,使用抗体A69无法经全部3个突变体质粒的表达检测到VP1和VP2。因此,VP1和VP2在这些样品中的存在可以被明确排除。我们得出这样的结论:迁移得比VP3慢的2个多肽条带是未完全变性的较高VP3水平的结果。

[0794] 但是,当用仅检测VP1和VP2的抗体A60探测转染了pVP3的细胞提取物并因此省略了与多余VP3的反应时,可以在VP1和VP2的区域检测到微弱的条带,所述条带不存在于转染了pKEX-VP3的细胞提取物中。这一结果说明pVP3构建体的转染使得少量的VP1和VP2或者VP1-和VP2-样蛋白表达。它们可能是从替代翻译起始密码子或者通过在突变的VP1和VP2翻译起始位点处的计划外的起始而翻译的。

[0795] 抗体A69在pVP3至pCMV-VP3/2696的所有缺失突变体中都显示了一个或若干个多肽条带,只有转染了pCMV-VP3/2765和pCMV-VP3/2809的细胞提取物的蛋白质印迹未显示和A69的反应,这是因为在这些蛋白中抗体表位已经缺失。

[0796] 通过基于抗体A20的衣壳ELISA证实了衣壳组装(图5C)。相比之下,通过pKEX-VP3的VP3表达没有产生可检测量的衣壳(图5C),尽管表达的VP3蛋白的量甚至比pVP3高(图

5B)。

[0797] 和我们之前的结果相同,仅通过转染pCMV-VP3/2809的VP3的表达未形成可检测的衣壳,所述pCMV-VP3/2809和pKEX-VP3等同(图5C)。通过在蔗糖梯度上分析细胞提取物,然后通过用B1抗体进行蛋白质印迹排除了可能不与A20ELISA反应的衣壳的形成(数据未示出)。有趣的是,分析不同缺失突变体的衣壳组装效率,检测到衣壳组装效率在经一定程度的缺失而下降之前,从一个缺失突变体至下一个先提高。在突变体pCMV-VP3/2596和pCMV-VP3/2611中可见衣壳组装的峰值效率(图5A和C)。

[0798] 2.3结论

[0799] 该结果表明了N末端延伸的VP3序列(由于存在VP3起始密码子上游的DNA序列)的存在和衣壳组装之间的明显联系。我们鉴别了VP3cds上游的约44个核苷酸的DNA序列,除了VP3cds之外,VP3VLP的形成需要该DNA序列存在。此44个核苷酸应用于构建体pCMV-VP3/2765,其仍然能够引起衣壳组装。

[0800] 2765'位点上游存在某个更多DNA的序列提高了衣壳组装效率,其与在核苷酸2717位处起始的ORF2和可能位于核苷酸2717和2765之间的全长AAP的推定起点相一致。

[0801] 3.cap基因的序列片段能够反式诱发衣壳组装

[0802] 在实施例2中,我们鉴别了VP3起始密码子(由片段Z组成)上游的某些序列,除VP3编码序列外,需要其存在以形成颗粒。为了证明片段Z的产物短暂地且以反式起作用的这一假设,我们测试了包含融合至GFPcds的EcoNI/BsiWI限制性片段的衣壳序列片段是否可以解决VP3的衣壳组装缺陷。

[0803] 3.1.用于反式互补的pVP2N-gfp的克隆

[0804] 为生成构建体pVP2N-gfp,将EcoNI和BsiWI限制性位点引入到载体pEGFP-N1(BD Biosciences,Erembodegem,Belgium)的多克隆位点中。之后,将来自pTAV2.0(图4提供限制性位点的位置)的EcoNI/BsiWI片段插入到CMV启动子的下游和GFPcds及其poly(A)信号的上游。根据如图6A中示意性示出的VP2、VP3或GFP的3种现有起始密码子之一处的转录起点,此融合构建体pVP2N-gfp的表达产生3种转录体VP2N-gfp、VP3N-gfp和GFP。

[0805] 在各图中示意性示出了源自pVP2N-gfp的含有例如密码子修饰或终止密码子的多个衍生物。它们都包括GFPcds,并相应地进行了命名(通过添加-gfp)。为了简化,此后缀(-gfp)从一些图(如图20、22、23)中的各构建体的名称中去除。

[0806] 3.2.反式功能取代的分析

[0807] 在HeLa细胞中进行下述实验。以不同摩尔比共转染质粒pCMV-VP3/2809和pVP2N-gfp并分析所述质粒的基因表达和衣壳组装(图6)。尽管蛋白质印迹分析证实了在以各摩尔比的2种质粒转染的细胞提取物中的VP3的量相同(用抗体B1检测,图6B上部分),仅可在分别以1:1或1:1/5比率转染后可以检测VP2N-gfp(用抗体A69检测,图6B下部分)。以1:1或1:1/5比率,抗体抗gfp(图6B,中间)还检测来自示意性示出于图6A中的融合构建体pVP2N-gfp表达的全部3种转录体,即VP2N-gfp、VP3N-gfp和GFP。由于VP3的强起始密码子并且对应于体内位置,VP3N-gfp的转录体为主要的。令人惊讶地,可以通过免疫荧光法观察直到pCMV-VP3/2809与GFP-融合-质粒的比率为1:1/50的衣壳组装(图6C)。使用基于抗体A20的衣壳ELISA对衣壳形成的定量显示,补充了pVP2N-gfp的突变体pCMV-VP3/2809和突变体pCMV-VP3/2696的衣壳形成效率相似,其中所述突变体pCMV-VP3/2696共表达了N末端延伸的VP3

(图6D)。

[0808] 3.3. 结论

[0809] 此结果表明,以反式存在的cap基因的EcoNI-BsiWI限制性片段解决了仅表达衣壳蛋白VP3的构建体的衣壳组装问题。由于甚至在降低50倍量的共转染的pVP2N-gfp质粒时仍可检测到组装,因此可以假定辅助因子对于VP3衣壳组装为亚化学计量性作用。

[0810] 4.以亚化学计量的量表达C末端截短的VP2蛋白并掺入到衣壳中。

[0811] 本文研究了所产生的AAV样颗粒是否仅由VP3组成。由质粒pCMV-VP3/2696或在共转染pCMV-VP/2809和pVP2N-GFP的反式互补试验中产生了空颗粒。经蔗糖垫法纯化颗粒,所述蔗糖垫法的根据为Steinbach等人(1997年)并由Kronenberg等人(2001年)进行所述的修改,并且其中修改为不由腺病毒感染而转染293细胞,并在48小时后收获细胞。通过蛋白质印迹分析截短的VP2蛋白的掺入(图7)。

[0812] 以 5×10^{11} 个颗粒的最大上样量无法检测pVP2N-GFP。但是转染pCMV-VP3/2696,检测到A69信号,其表明截短的VP2亚化学计量地被掺入到衣壳中。

[0813] 4.1. 结果

[0814] 得出结论的是,在反式情况下仅产生VP3的颗粒。相比之下,在顺式情况下,亚化学计量地掺入了截短的VP2。由蛋白质印迹可知,来自 2×10^9 个wt AAV颗粒的VP1信号强度和来自pCMV-VP3/2696产生的 1×10^{11} 个颗粒的信号大约相同。这意味着截短的VP2的量约低于VP1的量50倍。假设在wt衣壳中的VP1:VP2:VP3的化学计量比率为1:1:10,则存在比VP3少大约500倍的截短的VP2。由于一个衣壳由60个VP亚单位组成,必需还存在仅由VP3组成的衣壳。

[0815] 4.2. 结论

[0816] 此结果强化了下述结论:截短的VP2蛋白本身并不是衣壳自身所需的。

[0817] 5.用于反式互补的构建体的密码子修饰可以抑制反式互补过程

[0818] 为研究片段Z的反式互补试剂的性质,将pVP2N-gfp内的VP2N部分(限制性位点EcoNI和BsiWI之间的部分)进行了密码子修饰。这意味着改变了第一ORF的DNA序列,而未改变其氨基酸序列。由GENEART(Regensburg, Germany)进行密码子修饰。将密码子修饰为优先用于哺乳动物细胞的密码子。图8A示出序列。pVP2N-gfp相对于经密码子修饰的pVP2N-gfp(cm, pVP2Ncm-gfp)的DNA序列的序列同一性为71%,而蛋白质的序列同一性为100%。

[0819] 在蛋白质印迹分析中(图8B)并通过在转染的293细胞中的免疫荧光(图8C)比较了pVP2Ncm-gfp的蛋白表达。在如实施例3中所述的反式互补试验中测试了解决pCMV-VP3/2809衣壳形成问题的能力(图8D)。以1:1的摩尔比共转染质粒。

[0820] 结果和结论

[0821] 蛋白质印迹表明,来自经密码子修饰的构建体(pVP2Ncm-gfp)的蛋白表达甚至高于来自未经修饰的构建体(pVP2N-gfp)的蛋白表达,这并不意外,因为密码子修饰是针对哺乳动物细胞而优化的(图8B)。并且,经密码子修饰的蛋白在细胞内的定位与未经修饰的蛋白并无不同(图8C)。令人惊讶地, pVP2Ncm-gfp失去了其解决pCMV-VP3/2809的衣壳形成问题的能力(图8D)。

[0822] 为排除大量的pVP2Ncm-gfp蛋白对衣壳组装的负面影响,我们共转染了经密码子修饰的pVP2Ncm-gfp和pCMV-VP3/2696。在此组合中,衣壳组装是正常的,表明组装活性未被

大量的pVP2Ncm-gfp抑制(数据未示出)。通过转染降低量的质粒pVP2Ncm-gfp和pCMV-VP3/2809而表达降低量的pVP2Ncm-gfp,也没有解决衣壳组装问题(数据未示出)。

[0823] 此结果强化了下述假设:由第一ORF翻译的蛋白不是反式互补活性的成因。

[0824] 6.向用于反式互补的构建体中插入终止密码子不抑制反式互补过程

[0825] 为了进一步分析反式互补试剂的性质,将终止密码子插入在EcoNI-BsiWI限制性片段内。进行了点突变以插入终止密码子。

[0826] 6.1.将终止密码子插入到pVP2N-gfp中

[0827] 为构建pVP2N/stopA-gfp(还命名为pVP2N/ORF1stopA-gfp)、pVP2N/stopB-gfp(同于pVP2N/ORF1stopB-gfp)、pVP2N/stopC-gfp(还命名为pVP2N/ORF1stopC-gfp)和pVP2N/stopD-gfp(同于pVP2N/ORF1stopD-gfp),使用模板pVP2N-gfp和2个互补PCR引物进行定点突变反应(QuickChange定点突变试剂盒,Stratagene),所述引物包括期望的替换。在每种情况下,然后将EcoNI/BsiWI片段克隆到pVP2N-gfp的EcoNI/BsiWI骨架中。

[0828] 为产生StopA,将核苷酸2770位处的胞嘧啶替换为胸腺嘧啶,从而产生tag终止密码子。为产生StopB,将核苷酸2797位处的腺嘌呤替换为胸腺嘧啶,从而产生tga终止密码子。StopC是这样产生的:将核苷酸2821位处的腺嘌呤替换为胸腺嘧啶和将2823位处的胸腺嘧啶取代为腺嘌呤,从而产生tga终止密码子。StopD是这样产生的:将核苷酸2878位处的鸟嘌呤取代为胸腺嘧啶,从而产生tga终止密码子。位置是根据Ruffing等人(1994)。

[0829] 用于在pVP2N-gfp内的4个不同位点处插入终止密码子的引物对

[0830] StopA 5'-CCA GCC TCT CGG ATA GCC ACC AGC AGC C-3'(SEQ ID NO:64)

[0831] i-StopA 5'-GGC TGC TGG TGG CTA TCC GAG AGG CTG G-3'(SEQ ID NO:65)

[0832] StopB 5'-GCC CCC TCT GGT CTG TGA ACT AAT ACG ATG GC-3'(SEQ ID NO:66)

[0833] i-StopB 5'-GCC ATC GTA TTA GTT CAC AGA CCA GAG GGG GC-3'(SEQ ID NO:67)

[0834] StopC 5'-CGA TGG CTA CAG GCT GAG GCG CAC CAA TGG C-3'(SEQ ID NO:68)

[0835] i-StopC 5'-GCC ATT GGT GCG CCT CAG CCT GTA GCC ATC G-3'(SEQ ID NO:69)

[0836] StopD 5'-GGA GTG GGT AAT TCC TCG TGA AAT TGG CAT TGC G-3'(SEQ ID NO:70)

[0837] i-StopD 5'-CGC AAT GCC AAT TTC ACG AGG AAT TAC CCA CTC C-3'(SEQ ID NO:71)

[0838] 图9A中描述了插入的终止密码子的图示。在pVP2N/stopA-gfp中,已将核苷酸c₂₇₇₀突变为t,因此将编码谷氨酰胺的cag-密码子变为tag(在ORF2中的沉默突变);在pVP2N/stopB-gfp中,已将核苷酸g₂₇₉₇突变为t,因此将编码甘氨酸的gga-密码子变为tga(在ORF2中的Trp→Cys突变);在pVP2N/stopC-gfp中,已将核苷酸a₂₈₂₁突变为t(在ORF2中沉默)并已已将核苷酸t₂₈₂₃突变为a,因此将编码丝氨酸的agt-密码子变为tga(在ORF2中的Val→Glu突变);并且在pVP2N/stopD-gfp中,已将核苷酸g₂₈₇₈突变为t,因此将编码甘氨酸的gga-密码子变为tga(在ORF2中沉默)。位置根据Ruffing等人(1994年)而定。所有替换都没有破坏ORF2。将产生的pVP2N-gfp终止构建体用于如实施例3中所述的构建体pCMV-VP3/2809的反式互补。以1:1的摩尔比共转染质粒pCMV-VP3/2809和相应的pVP2N/stop-gfp构建体。

[0839] 通过使用A69抗体的蛋白质印迹分析测试终止构建体的进一步蛋白表达。

[0840] 6.2. 结果和结论

[0841] 蛋白质印迹分析证实了VP3在所有样品中表达(通过图9B中的单克隆抗体B1检测)。如预期地, Bluescript载体(pBS)没有在反式互补试验中引起衣壳组装, 因此用作阴性对照(图9C)。有趣的是, 尽管相比pVP2N-gfp构建体, 没有检测到pVP2N/stop-gfp构建体的蛋白质表达(图9B), 终止密码子的插入没有影响cap基因的EcoNI-BsiWI限制性片段的反式互补活性。可以容易地组装VP3颗粒(图9C)。通过突变体pVP2N/stopB-gfp和pVP2N/stopC-gfp获得的病毒滴度的降低可以归因于由产生各突变而引入的核苷酸改变(在ORF1中的stopB造成ORF2中的Trp→Cys突变; 在ORF1中的stopC造成在ORF2中的Val→Glu突变)。这些实验共同表明, EcoNI-BsiWI片段的核酸序列是衣壳组装辅助活性的基础, 并非来自第一ORF的表达蛋白, 这是因为所有的突变体都在第一ORF中含有终止密码子。尽管在ORF 1产生终止密码子的替换没有终止由ORF2合成AAP的氨基酸, 但是, 衣壳滴度的差别显示AAP的功能性受到了影响。

[0842] 7. 假设的NLS不是VLP形成所必需的

[0843] 尽管突变体pCMV-VP3/2696形成高衣壳水平, 稍短的突变体pCMV-VP3/2765组装的衣壳的量明显降低(图5C)。这一较短突变体缺少一组氨基酸, 已经表明这组起到AAV VP2蛋白的NLS作用(Hoque等人, 1999a), 并显示VP蛋白的核转运降低(图10)。为了测试假设的NLS是否是此差别的成因, 我们通过在构建体pCMV-VP3/2696中将RKP肽(氨基酸168-170)转化成AAA从而替代了相应的序列元件, 目的是通过定点突变破坏假设的NLS活性, 所述定点突变根据标准程序, 使用包括期望的替代的2个互补性PCR引物进行的。用于AAA替代RKR的引物:

[0844] BC3-ala正向: 5'-GGC GGG CCA GCA GCC TGC AGC AGC AGC ATT GAA TTT TGG TCA GAC TGG-3' (SEQ ID NO:72)

[0845] BC3-ala反向: 5'-CCA GTC TGA CCA AAA TTC AAT GCT GCT GCT GCA GGC TGC TGG CCC GCC-3' (SEQ ID NO:73)

[0846] 采用A20抗体(图10)和衣壳ELISA(数据未示出)针对转染的HeLa细胞的荧光表明, 突变体pCMV-VP3/2696RKR168-170AAA的VP蛋白在衣壳组装中具有和wtAAV一样的活性。

[0847] 这支持了这种解释: 在此情况下, 包含RKR168-170的序列元件不作為NLS起作用, 并且可能在衣壳组装中起不同的作用。

[0848] 8. VP蛋白的核定位(及N末端延伸)不足以进行衣壳组装

[0849] 已报道了源自SV40大T抗原的NLS与VP3的融合将VP3转移到核中, 并且导致衣壳组装(Hoque等人, 1999a)。我们重复了此实验, 并且观察到VP3蛋白的有效核积累, 但是不存在用抗体A20可检测的衣壳组装(图11A、11B和15B)。

[0850] 此外, 检测到VP3上游的异源N末端延伸(HSA)恢复了VP3的组装能力。

[0851] 在293细胞中转染了其它若干构建体, 以比较蛋白表达和组装效率。

[0852] 8.1. 构建体的克隆

[0853] pCI-VP、pCI-VP2和pCI-VP3是这样克隆的: 使用具有XhoI(5'-)和NotI(3'-)突出的引物通过PCR扩增各VP编码区, 并且将经XhoI-/NotI-消化的PCR产物亚克隆到经XhoI-/NotI-消化的载体pCI(PROMEGA)中。在pCI-VP2的情况下, 用于VP2的起始密码子同时从ACG改变为ATG。

[0854] 使用构建体pCMV-VP3/2809作为模板和下述互补的PCR引物,通过定点突变反应进行构建体pCMV-NLS-VP3的克隆:

[0855] 5'-GGAAT TCGAT ATCAA GCTTG CCATG GCACC ACCAA AGAAG AAGCG AAAGG TTATG GCTAC AGGCA GTGG-3'(SEQ ID NO:74)和5'-CCACT GCCTG TAGCC ATAAC CTTTC GCTTC TTCTT TGGTG GTGCC ATGGC AAGCT TGATA TCGAA TTCC-3'(SEQ ID NO:75)。

[0856] 然后将HindIII/BsiWI片段从扩增子亚克隆到pCMV-VP3/2809的HindIII/BsiWI骨架中。cap基因产物NLS-VP3在VP3的N末端含有SV40NLS MAPPKKKRKV的氨基酸序列。

[0857] 构建体pCMV-HSA-VP3还基于pCMV-VP3/2809并且含有编码人血清白蛋白(HSA)的氨基酸25-28的核酸序列,该核酸序列直接处在VP3cds的上游。通过基因合成(Geneart, Regensburg, Germany)获得下述片段(在两个末端都具有HindIII限制性位点):

[0858] 5'-GGTAC CAAGC TTACG GACGC CCACA AGAGC GAGGT GGCCC ACCGG TTCAA GGACC TGGGC GAGGA AAAC TCAAG GCCCT GGTGC TGATC GCCTT CGCCC AGTAC CTGCA GCAGT GCAAG CTTGA GCTC-3'(SEQ ID NO:76)。

[0859] 在相应载体的HindIII消化后,将形成的111bp的片段亚克隆到经HindIII线性化的pCMV-VP3/2809骨架中。VP3的翻译在标准的ATG起始密码子处起始,而HSA-VP3(在VP3N末端处带有37个氨基酸延伸)的翻译在ACG起始密码子处起始。

[0860] 8.2.通过免疫荧光和蔗糖梯度分析构建体

[0861] 我们用下述不同构建体转染了HeLa细胞:单独的pCMV-NLS-VP3或pCMV-VP3/2809,或者它们与pVP2N-GFP共转染。此外,转染了pCMV-HSA-VP3。如上所述,通过使用多克隆VP抗血清或单克隆A20抗体的免疫荧光分析衣壳蛋白的表达和衣壳的形成。在下列蔗糖梯度中分析其它衣壳形成。

[0862] 结果

[0863] 正如Hoque等人(1999a)以及与野生型(wt)和由N末端截短的构建体pCMV/2696表达的蛋白相当的,我们可以由构建体pCMV-NLS-VP3表达VP3,并且观察到VP3蛋白的有效核积累。然而,相比wt和N末端截短的构建体pCMV/2696,我们使用抗体A20未能检测到衣壳组装(图11B)。

[0864] 如所预期的,通过抗体染色可以检测到VP3蛋白(HSA-VP3)的表达,该VP3蛋白具有延长的N末端,该延长的N末端由人血清白蛋白的36个氨基酸组成,在长度上等于突变体pCMV-VP3/2696的VP3N末端延伸(图11B)。相比pCMV-NLS-VP3的表达产物,突变体pCMV-HSA-VP3的表达产物显示出细胞质染色的更深的部分。同样,我们使用抗体A20未能检测到衣壳组装(图11B)。

[0865] pVP2N-gfp的共转染诱发衣壳组装,通过抗体A20可以容易地检测到(图11B)。

[0866] 通过蔗糖密度梯度沉淀发分析可能的组装产物,该组装产物不与A20抗体反应,表明有极低量的含VP蛋白的物质(在整个梯度范围内沉淀),其与抗体B1反应(图11C)。这显示了以相当低、难以检测的量形成的不正确组装的或聚集的VP蛋白。

[0867] 8.3.通过蛋白质印迹和ELISA分析构建体

[0868] 在蛋白质印迹中分析一组不同构建体的基因表达,并在ELISA中分析其衣壳组装(图15A):

[0869] ●pCI-VP2:将AAV2的VP2序列克隆到pCI(Promega, Mannheim, Germany)的多克隆

位点中。将VP2起始密码子ACG改变为ATG。

[0870] ●pCI-VP3:将野生型VP3序列克隆到pCI中。

[0871] ●pCI-VP:将完整的cap ORF克隆到pCI中。未突变VP2和VP3的起始密码子。

[0872] ●pCMV-NLS-VP3:(描述于实施例8且由Hoque等人(1999a)描述)

[0873] ●pCI-VP2mutACG:此是pCI VP2的修饰形式:破坏了VP2起始密码子并被GAG密码子替代

[0874] ●pCMV-VP3/2696(描述于实施例2)

[0875] 结果

[0876] 蛋白质印迹分析示出了不同构建体的类似的衣壳蛋白表达,其具有预期大小的VP蛋白(图15C)。然而,衣壳组装的效率相当不同(图15B)。用类似于Hoque等人(pCMV-NLS-VP3)的克隆的构建体获得的颗粒滴度低于检测限。这同样意味着,在VP3颗粒形成效率方面,偏好的构建体pCI-VP2mutACG或pCMV-VP3/2696其效率比Hoque构建体pCMV-NLS-VP3高大于3log。构建体pCI-VP2和pCMV-VP3/2611相对应,区别在于在pCI-VP2中小ACG起始密码子突变为ATG,而在pCMV-VP3/2611中ACG密码子则完全缺失。构建体pCI-VP2的衣壳形成效率被显著降低(图15B)。我们没有分析从pCI-VP2获得的颗粒是否主要由VP2、VP3或这两种蛋白的混合物组成。图15C表明VP3仍由此构建体表达,虽然效率显著低于VP2(约10倍)。我们假设获得的颗粒主要由VP3组成。通过i)相比pCMV-VP3/2611来自pCI-VP2的降低10倍量的VP3来解释低滴度。此外,我们推测pCI-VP2中的ATG起始密码子干扰AAP表达,因为ATG可能控制AAP的非经典起始密码子。如所预期的,pCI-VP3显示出衣壳形成效率很低。颗粒组装的效率问题可以部分由以10:1的比率共转染pCI-VP3和pCI-VP2解决(图15B)。然而,相比pCI-VP2mutACG或pCMV-VP3/2696,总衣壳形成仍然降低了1-2log,这支持了我们的假设,即pCI-VP2的VP2编码区中的ATG起始密码子干扰AAP表达。与pCMV-VP相比时,pCI-VP的衣壳形成要低得多(图5)。这解释如下:pCI-VP由于缺少剪切供体位点而不同于pCMV-VP。因此,从主要表达VP1的pCI-VP仅转录一种信使RNA,而从pCMV-VP转录两种信使RNA。少量转录体主要表达VP1,而大量转录体以1:8的比率编码VP2和VP3。因此,pCMV-VP以1:1:8的预期比率表达VP1:VP2:VP3,而用构建体pCI-VP,VP2和VP3几乎不能或根本不能检测得到,如果有的话。

[0877] 结论

[0878] 结果表明仅VP3的核积累不足以进行衣壳组装,并且VP3上游的异源N末端延伸无法使VP3具有组装能力。

[0879] 此外,我们的偏好构建体pCI-VP2mutACG或pCMV-VP3/2696获得比Hoque等人(1999a)描述的NLS-VP3融合构建体高出大于3log的VP3颗粒滴度。这些实验还证明了VP3N末端融合构建体可以组装成VLP。因此,I-203是外源肽序列的合适的插入位点。

[0880] 9.可以在昆虫细胞中实现VP3衣壳组装

[0881] 9.1.VP1突变体“修饰4”的克隆

[0882] 产生构建体pVL_VP1_MOD4,从而在无任何Rep表达的情况下产生基本由衣壳蛋白VP3组成的病毒颗粒。

[0883] 详细来说,将pUC19AV2(详述于US 6,846,665)用作模板,在下述引物存在下,根据标准PCR条件扩增VP1:

[0884] Insect_mod_4_s:5'-CAC CCG CGG GGA TCC GCC GCT GCC GAC GGT TAT CTA CCC

GAT TGG CTC-3' (SEQ ID NO:77),和

[0885] E_VP2_rev:5'-CGC GAA TTC CTA TTA CAG ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO:78)

[0886] 从而,将VP1的野生型翻译起始密码子ATG(编码甲硫氨酸)改变为GCC(丙氨酸)并失活。将产生的EcoRI/BamHI片段克隆到pBSIIKS(Stratagene,La Jolla,CA,USA)中。根据QuickChange II定点突变试剂盒(Stratagene)的说明,使用下述引物,通过定点突变将此载体用于使VP2的翻译起始密码子失活:

[0887] Insect-muta_4_s:5'-ACC TGT TAA GAC AGC TCC GGG AAA AAA G-3' (SEQ ID NO:79)

[0888] Insect-muta_4_as:5'-CTT TTT TCC CGG AGC TGT CTT AAC AGG T-3' (SEQ ID NO:80)

[0889] 由此,将VP2的野生型翻译起始密码子ACG改变为ACA(都编码苏氨酸)。用限制性酶BamHI和EcoRI消化产生的构建体,并克隆到杆状病毒转移载体pVL1393中。结果,构建体含有带有VP1和VP2起始密码子突变的完整AAV cap基因且无rep编码序列(图12)。

[0890] 9.2.pVL_VP2的克隆

[0891] 使用下文列出的引物E_VP2_for和E_VP2_rev扩增AAV2VP2。由此,将野生型VP2翻译起始密码子ACG(编码苏氨酸)改变为ATG(甲硫氨酸)。引物:

[0892] E_VP2_for:5'-CAC CCG CGG GGA TCC ACT **ATG**GCT CCG GGA AAA AAG AGG-3' (SEQ ID NO:81)

[0893] E_VP2_rev:5'-CGC GAA TTC CTA **TTACAG** ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO:82)

[0894] 将产生的构建体克隆到杆状病毒转移载体pVL1393中。

[0895] 9.3.pVL_VP3的克隆

[0896] 使用下文列出的引物E_VP3_for和E_VP3_rev扩增AAV2 VP3。引物:

[0897] E_VP3_for:5'-CAC CCG CGG GGA TCC ACT **ATG**GCT ACA GGC AGT GGC GCA C-3' (SEQ ID NO:83)

[0898] E_VP2_rev:5'-CGC GAA TTC CTA **TTACAG** ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO:84)

[0899] 将产生的构建体克隆到杆状病毒转移载体pVL1393中。

[0900] 9.4.颗粒生产的分析

[0901] 如1.1中所述生产AAV颗粒。通过蛋白质印迹分析研究细胞裂解物的蛋白质表达。pVL_VP1_MOD4示出了仅VP3表达,pVL_VP2示出了VP2表达,而pVL_VP3示出了除VP3外的较小的降解信号(图12B)。通过A20 ELISA获得滴度。观察到修饰4构建体的滴度为 1×10^{12} 个颗粒/ml,而VP2 pVL_VP2示出了 9×10^8 个颗粒/ml的滴度,并且pVL_VP3的滴度仅为 1×10^8 个颗粒/ml(图12C)。

[0902] 结论

[0903] 此结果表明在昆虫细胞中,AAV VLP可以和在哺乳动物细胞中一样有效产生。数据表明在昆虫细胞中,VP3的N末端序列同样看起来低于有效VP3衣壳组装是需要的且足够的。而且,VP2起始密码子从ACG改变为ATG的变化伴随着衣壳组装的效率损失(图12C)。我们推

测, pVL_VP2的颗粒组装伴随着从VP3 ATG起始的少量VP3表达, 该VP3 ATG在构建体中是保持完好的。

[0904] 10. 基本上由VP3组成的衣壳耐受多肽的插入

[0905] 10.1. 在I-587位处含有表位的病毒样颗粒(VLP)的产生

[0906] 为克隆编码由在I-587位处含有颗粒表位序列的VP3衣壳蛋白组成的VLP的表达载体, 首先将表位序列在对应于I-587(相对于AAV-2的VP1蛋白的氨基酸编号)的位点处克隆到pUCAV2的VP编码序列中, 并且随后亚克隆到载体pCIVP2mutACG中。

[0907] 载体pUCAV2的产生详述于US 6,846,665。基本上, 此载体含有克隆到pUC19的BamHI限制性位点的源自pAV2(Laughlin等人, 1983年)的完整AAV2基因组(BgIII片段)。通过引入NotI和AscI限制性位点进一步修饰pUCAV2, NotI和AscI限制性位点能够在AAV2衣壳的I-587位处插入表位序列(PCT/EP2008/004366)。此外, 通过定点突变, 将位于453位(相对于AAV-2的VP1蛋白的氨基酸编号)和I-587之间的FseI限制性位点以框架引入到载体的VP编码序列中。

[0908] 为将表位序列克隆到经修饰的pUCAV2中, 设计正义和反义寡核苷酸, 其编码具有丙氨酸或甘氨酸接头序列的相应表位且含有5'-位点延伸。设计寡核苷酸的5'-位点延伸, 使得正义和反义寡核苷酸的退火产生具有5'-位点和3'-位点突出的dsDNA, 所述突出与通过NotI和AscI限制性酶切经修饰的pUCAV2而产生的突出并存。寡核苷酸的序列和相应的表位序列总结于表4中。各插入表位的侧翼为根据下图的接头(Xn代表表位序列):

[0909] I型接头: (Ala)₂-(Gly)₃-Xn-(Gly)₄-Ala

[0910] II型接头: (Ala)₂-(Gly)₄-Xn-(Gly)₄-Ala

[0911] III型接头: (Ala)₃-(Gly)₅-Xn-(Gly)₅-(Ala)₂

[0912] IV型接头: (Ala)₅-Xn-(Ala)₅

[0913] 为了使寡核苷酸退火, 将50.0μg正义寡核苷酸和50.0μg反义寡核苷酸混合于总体积200μl的1×PCR-缓冲液(Qiagen)中, 并在恒温混合器中在95℃下孵育3分钟。在95℃下3分钟后, 关闭恒温混合器, 再将管放在孵育器中2小时, 以使得寡核苷酸在孵育器的冷却期间退火。为将退火的寡核苷酸在I-587处克隆到pUCAV2中, 通过用NotI和AscI限制性酶切将载体线性化, 然后使用快速DNA连接试剂盒(Roche)进行克隆反应。简而言之, 将退火的寡核苷酸于1×DNA稀释缓冲液中稀释10倍, 并在50℃下孵育5分钟。将100ng退火的寡核苷酸和50ng Not || AscI线性化的载体pUCAV2用于连接反应, 所述连接反应根据快速DNA连接试剂盒(Roche)的厂商说明书进行。用等分的连接反应物试样转化大肠杆菌XL1blue或DH5α, 然后铺在LB-Amp琼脂板上。根据标准程序制备质粒并通过测序分析。

[0914] 为产生由在I-587处含表位序列的VP3蛋白组成的空VLP, 根据标准方法, 将在I-587处含表位的pUCAV2的BsiWI/XcmI限制性片段亚克隆到载体pCIVP2mutACG中。载体pCIVP2mutACG含有克隆到pCI(Promega)的XhoI/NotI位点中的重叠的AAV2 VP2和VP3编码序列。在pCIVP2mutACG中, 破坏了VP2的ACG起始密码子, 并且由GAG密码子替代。使用VP2特异性引物和质粒pCIVP2作为模板(载体pCIVP2含有克隆到pCI的多接头中的野生型VP2和VP3编码序列), 通过PCR扩增AAV2 VP2和VP3编码序列进行替换。用于PCR的正向引物退火到VP2编码序列的5'位点, 并含有替代VP2ACG起始密码子的GAG密码子。此外, 正向引物在5'-位点处含有XhoI识别序列。反向引物退火到VP2/VP3编码序列的3'末端, 且在其5'-位点处

含有NotI识别序列。将产生的PCR产物克隆到pCI的XhoI/NotI位点中。

[0915] 通过转染293-T细胞,将产生的载体用于生产VLP。在转染前24小时将细胞接种于6cm培养皿中(5×10^5 个/培养皿)。通过如US 2004/0053410中所述的磷酸钙沉淀法转染293-T细胞。之后,在培养基中通过3轮冷冻(-80°C)和解冻(37°C)循环裂解293-T细胞。通过离心使裂解物澄清(总体积3ml),然后使用可商购的ELISA(AAV滴度ELISA;Progen, Heidelberg, Germany)测定VLP衣壳滴度。VLP滴度范围为 $2.1\text{E}+12$ 至 $9.8\text{E}+12$ 个衣壳/ml(表5)。将VLP TP18克隆直接用于大规模包装(如实施例1中所述)。其在粗裂解物中含有 $1.2\text{E}+13$ 个衣壳/ml(表5)。

[0916] 10.2. 在衣壳的I-587和I-453位处含有表位的病毒样颗粒(VLP)的产生

[0917] 为克隆编码由在I-587和I-453位(相对于AAV-2的VP1蛋白的氨基酸编号)处含有表位序列的VP3衣壳蛋白组成的VLP的表达载体,将第一表位序列在对应于上述I-587的位点克隆到pCIVP2mutACG中。

[0918] 开始,将第二表位序列克隆到载体pCIVP2-I453-NotI-AscI(描述于W0 2008/145400)的NotI/AscI限制性位点中。简而言之,通过PCR扩增AAV2VP2基因并将相应的PCR产物克隆到载体pCI(Promega)的XhoI/NotI位点中,从而产生载体pCI-VP2-I453-Not-AscI。通过定点突变,破坏克隆位点的NotI限制性位点,从而修饰产生的载体pCIVP2。通过引入能够在AAV2衣壳的I-453位处插入表位序列的新的单个NotI和AscI限制性位点而进一步修饰该载体。此外,通过定点突变,将位于I-453和I-587之间的FseI位点以框架引入到pCIVP2-I453-NotI-AscI的VP编码序列中。为将表位序列克隆到载体的NotI/AscI位点中,设计正义和反义寡核苷酸,所述寡核苷酸编码具有丙氨酸/甘氨酸接头序列的相应表位并且含有5'-位点延伸。设计寡核苷酸的5'-位点延伸,使得正义和反义的寡核苷酸的退火产生具有5'-位点和3'-位点突出的dsDNA,所述突出与通过NotI和AscI限制性酶切pCIVP2-I453-Not-AscI而产生的突出并存。如上所述进行退火的寡核苷酸的克隆。

[0919] 寡核苷酸的序列和相应的表位序列总结于表6中。各插入表位的侧翼为根据下图的接头(Xn代表表位序列):

[0920] $(\text{Ala})_2-(\text{Gly})_3-\text{Xn}-(\text{Gly})_4-\text{Ala}$

[0921] 为产生在I-453和I-587处显示表位(鼠TNF α 或IL-17表位)的二价VLP,将含有在I-453处插入的给定表位的pCIVP2-I453-NotI-AscI的BsiWI/FseI片段亚克隆到含有插入到I-587中的特定表位的载体pCIVP2mutACG(上文所述)中。如上文(实施例1.2)(6孔板规模)所述通过转染293-T细胞,将产生的载体用于生产二价VLP。通过ELISA(AAV2滴度ELISA; Progen)分析颗粒生产。结果示于表7中。这些数据证明了可以以高衣壳滴度生产由在I-453和I-587处具有表位插入的VP3蛋白组成的VLP。

[0922] 表4:用于将表位序列克隆到I-587中的寡核苷酸

[0923]

名称/肽序列	类型	正义寡核苷酸	反义寡核苷酸	接头
CETP TP18 DISVTGAP VITATYL	兔 CETP 表位	5' GGCCGGCGGAGGTGACATCA GCGTGACCGGTGCACCCGTGAT CACCGCCACCTACCTGGGGGGT GGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 85)	5' CGCGCACCGCCACCCCCCA GGTAGGTGGCGGTGATCACGG GTGCACCGGTACGCTGATGT CACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 86)	I 型
3Dipi-3 DSNPRGVS AYLSR	人 IgE 表位	5' GGCCGGCGGAGGTGGTGACA GCAACCCTAGAGGCGTGAGCGC CTACCTGAGCAGAGGGGGTGGC GGTG 3' (SEQ ID NO: 87)	5' CGCGCACCGCCACCCCCCTC TGCTCAGGTAGGCGCTCACGC CTCTAGGGTTGCTGTCACCAC CTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 88)	II 型
Kricek VNLTWSRA SG	人 IgE 表位	5' GGCCGCAGCGGCGGTGAACC TGACCTGGAGCAGAGCCTCCGG CGCGGCGGCGGCGG 3' (SEQ ID NO: 89)	5' CGCGCCGCGCCGCGCGCGC CGGAGGCTCTGCTCCAGGTCA GGTTCACCGCCGCTGC3' (SEQ ID NO: 90)	IV 型
TNFα-V1 SSQNSSDK PVAHVVAN HQVE	鼠 TNF α 表位	5' GGCCGGCGGAGGTAGCAGCC AGAACAGCAGCGACAAGCCCGT GGCCACGTGGTGGCTAACCAC CAGGTGGAGGGGGGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 91)	5' CGCGCACCGCCACCCCCCT CCACCTGGTGGTTAGCCACCA CGTGGGCCACGGGCTTGTCGC TGCTGTTCTGGCTGCTACCTC CGCC 3' (SEQ ID NO: 92)	I 型
IL-17-V1 NAEGKLD HHMNSVL	鼠 IL-17 表位	5' GGCCGGCGGAGGTAACGCCG AGGGCAAGCTTGACCACCACAT GAACAGCGTGCTGGGGGGTGGC GGTG 3' (SEQ ID NO: 93)	5' CGCGCACCGCCACCCCCCA GCACGCTGTTTATGTGGTGGT CAAGCTTGCCCTCGGCGTTAC CTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 94)	I 型
IL-6-V2 LEEFLKVT LRS	鼠 IL-6 表位	5' GGCCGGCGGAGGTCTGGAGG AATTCCTGAAGGTGACCCTGAG AAGCGGGGGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 95)	5' CGCGCACCGCCACCCCCGC TTCTCAGGGTCACCTTCAGGA ATTCTCCAGACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 96)	I 型

[0924]

名称/肽序列	类型	正义寡核苷酸	反义寡核苷酸	接头
Aβ (1-9) DAEFRHDS G	人淀 粉样 蛋白 -β表 位	5' GGCCGCAGGCGGAGGGGGAG GCGACGCCGAGTTCAGACACGA CAGCGGCGGCGGAGGGGGAGGC GCGG 3' (SEQ ID NO: 97)	5' CGCGCCGCGCCTCCCCCTC CGCCGCCGCTGTCGTGTCTGA ACTCGGCGTCGCCTCCCCCTC CGCCTGC 3' (SEQ ID NO: 98)	III 型

[0925] 表5:小规模产生不同VLP

[0926]

名称	在 I-587 处的表位	滴度 (衣壳/ml)
VLP-TP18	CETP TP18 DISVTGAPVITATYL (SEQ ID NO: 99)	1.2 E+13 (*)
VLP-3Depi3	3Depi-3 DSNPRGVSAAYLSR (SEQ ID NO: 100)	2.1 E+12
VLP-Kricek	Kricek VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 101)	2.6 E+12
VLP-TNFα	TNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE (SEQ ID NO: 102)	9.8 E+12
VLP-IL-17	IL-17-V1 NAEGKLDHMHNSVL (SEQ ID NO: 103)	5.6 E+12
VLP-IL-6	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 104)	5.6 E+12
VLP-Aβ	Aβ (1-9) DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 105)	6.2 E+12

[0927] (*)大规模包装

[0928] 表6:用于将表位序列克隆到I-453中的寡核苷酸

[0929]

名称/肽序列	类型	正义寡核苷酸	反义寡核苷酸
TNFα-V1 SSQNSSDKPVA HVVANHQVE	鼠 TNF α 表位	5' GGCCGCCGGTGGAGGCAGCAG CCAGAACAGCAGCGACAAGCCCG TGGCCCACGTGGTGGCTAACCAC CAGGTGGAGGGCGGTGGAGGG 3' (SEQ ID NO: 106)	5' CGCGCCCTCCACCGCCCTCCAC CTGGTGGTTAGCCACCACGTGGGC CACGGGCTTGTCGCTGCTGTTCTG GCTGCTGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 107)
IL-17-V1 NAEGKLDHHM NSVL	鼠 IL-17 表位	5' GGCCGCCGGTGGAGGCAACGC CGAGGGCAAGCTTGACCACCACA TGAACAGCGTGCTGGGCGGTGGA GGG 3' , (SEQ ID NO: 108)	5' CGCGCCCTCCACCGCCCAGCAC GCTGTTCATGTGGTGGTCAAGCTT GCCCTCGGCGTTGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 109)
IL-6-V2 LEEFLKVTLRS	鼠 IL-6 表位	5' GGCCGCCGGTGGAGGCCTGGA GGAATTCCTGAAGGTGACCCTGA GAAGCGGCGGTGGA GGG 3' (SEQ ID NO: 110)	5' CGCGCCCTCCACCGCCGCTTCT CAGGGTCACCTTCAGGAATTCCTC CAGGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 111)

[0930] 表7:在I-453和I-587处携带表位的VLP的生产

[0931]

组合	在 I-453 处的表位	在 I-587 处的表位	滴度 (衣壳/ml)
TNF-α / IL-17	TNF α-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQV E (SEQ ID NO: 112)	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 113)	7.9E+12
TNF-α / IL-6	TNF α-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQV E (SEQ ID NO: 114)	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 115)	8.5E+12
IL-17 / TNF-α	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 116)	TNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQ VE (SEQ ID NO: 117)	1.0E+13
IL-6 / TNF-α	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 118)	TNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQ VE (SEQ ID NO: 119)	1.0E+13
IL-17 / IL-6	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 120)	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 121)	3.9E+12
IL-6 / IL-17	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 122)	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 123)	8.9E+12

[0932] 10.3. 结论

[0933] VP3颗粒耐受插入,因此可以用作药物,诸如如通过插入B-细胞表位的疫苗。

[0934] 11. 不同AAV血清型的VP3衣壳组装

[0935] 11.1. AAV1缺失构建体

[0936] 为分析这些发现是否可以应用于其它血清型,测试了用于AAV1构建体的类似设定。

[0937] 克隆了下述构建体:

[0938] ●pCI_VP2/2539_AAV1:将完整的AAV1 VP2和95bp的VP1克隆到 pCI(Promega, Mannheim,Germany)中。未突变VP2ACG起始密码子。

[0939] ●pCI_VP3/2539_AAV1mutACG:将完整的AAV1VP2和95bp的VP1克隆到pCI中。将VP2ACG起始密码子突变为ACC。

[0940] ●pCI_VP3/2634_AAV1mutACG:完全缺失VP1部分并将VP2ACG起始密码子突变为ACC。

[0941] 克隆

[0942] 使用经修饰的引物通过定点突变标准方法进行所有构建体的克隆(下面列出了用于定点突变的引物)。

[0943] 通过在VP2ACG起始密码子的上游95bp处插入NheI位点和在VP3终止密码子下游插入XmaI位点产生pCI_VP2/2539_AAV1。所有突变都在pUCrep/fs/cap_AAV1_I588(描述于PCT/EP2008/004366)中产生。用NheI和XmaI消化产生的质粒。将产生的片段克隆到pCI-VP2载体(描述于PCT/EP2008/004366)中。引物:

[0944] AAV1 NheI VP2plus95bp:5'-GAG CGT CT **G CTA GCA** GAT ACC TCT TTT GGG G-3'(SEQ ID NO:124)

[0945] AAV1 VP3 Xma rev:5'-GAA ACG AAT CAC CCG GGT TAT TGA TTA AC-3'(SEQ ID NO:125)

[0946] 通过在pCIVP2/2539_AAV1将ACG起始密码子突变为ACC而产生pCI_VP3/2539_AAV1mutACG。引物:

[0947] AAV1 VP2ko正向:5'-GGC GCT AAG ACC GCT CCT GGA AAG-3'(SEQ ID NO:126)

[0948] AAV1 VP2ko反向:5'-CTT TCC AGG AGC GGT CTT AGC GCC-3'(SEQ ID NO:127)

[0949] 通过在pCIVP2_AAV1中直接地缺失VP2ACG起始密码子上游的95bp并通过同一步骤将ACG起始密码子突变为ACC而产生pCI_VP3/2634_AAV1mutACG。引物:

[0950] AAV1 VP2ko_VP1del正向:5'-ACG ACT CAC TAT AGG CTA GCA GGC GCT AAG ACC GCT CCT GGA AAG-3'(SEQ ID NO:128)

[0951] AAV1 VP2ko_VP1del反向:5'-CTT TCC AGG AGC GGT CTT AGC GCC TGC TAG CCT ATA GTG AGT CGT-3'(SEQ ID NO:129)

[0952] 在用相应质粒转染293细胞后,在粗裂解物中控制AAV1衣壳的组装。通过AAV1滴度ELISA(Progen,Heidelberg,Germany)根据厂商的说明书测定衣壳滴度。3种AAV1构建体的组装效率相当。构建体pCI_VP3/2634_AAV1mutACG具有 10^{13} 个颗粒/ml的滴度,证实了这一事实:AAV1颗粒的衣壳产生通常比AAV2颗粒更有效。在蛋白质印迹分析中,对于构建体pCI_VP2/2539_AAV1,VP2和VP3蛋白都是可检测的;而分别对于pCI_VP3/2539_AAV1mutACG和pCI_VP3/2634_AAV1mutACG,仅VP3是可检测的(图13)。

[0953] 作为衣壳蛋白表达的对照,转染了pUCAV1。pUCAV1含有编码AAV1的VP1、VP2和VP3的完整的AAV1Cap开放阅读框。pUCAV1详细描述于PCT申请PCT/EP2008/004366(此处称为“pUCAV1_AgeI”)。

[0954] 11.2.pCMV驱动的AAV1VP3构建体的反式互补

[0955] 为确定实施例5中所述的反式互补实验是否可应用于其它血清型,克隆了用于AAV1的pCMV-VP3/2809(AAV2)的类似构建体。

[0956] 11.2.1.克隆

[0957] 按以下方法克隆pCMV_AAV1VP3/2829:使用下文所示的引物,通过突变将HindIII限制性位点直接引入到质粒pUCrep/fs/cap_AAV1的VP3ATG起始密码子之前(描述于PCT/EP2008/004366)。用AgeI消化产生的质粒。用Klenow聚合酶末端钝化Age I位点,随后用HindIII消化构建体。将生成的片段克隆到HindIII/HincII-消化的pBSCMV骨架中。通过将650bpBamHI CMV启动子片段插入到Wistuba等人1997年描述的BlueskriptII SK+载体(Stratagene,Amsterdam,Netherlands)的BamHI位点,从而生成pBSCMV。引物Hind III突

变:

[0958] 正向:5'-CGC TGC TGT GGG ACC T **AA GCT TAT** GGC TTC AGG CGG TGG CG-3'
(SEQ ID NO:130)

[0959] 反向:5'-CGC CAC CGC CTG AAG CCA T **AA GCT TAG** GTC CCA CAG CAG CG-3'
(SEQ ID NO:131)

[0960] 11.2.2.反式互补实验

[0961] 采用如实施例3描述的来自AAV2的pVP2N-gfp构建体进行反式互补。在经或不经共转染pVP2N-gfp的情况下,采用AAV2的质粒pCMV-VP3(pCMV_VP3/2809)或AAV1的质粒pCMV-VP3(pCMV_AAV1VP3/2829)转染细胞(图14)。转染了相同摩尔比的VP3构建体和pVP2N-gfp。通过蛋白质印迹分析蛋白质表达,并通过ELISA测定颗粒形成效率。

[0962] 11.2.3.结果和结论

[0963] 通过AAV1ELISA(Progen,Heidelberg)分析表明,AAV1的颗粒组装问题被采用源自AAV2的pVP2N-gfp的反式互补解决。无法给出解决效率,因为我们没有对pCMV_AAV1VP3/2829和pVP2N-gfp的共转染与pCIVP3/2634_AAV1mutACG的转染(见上文的章节11.1)进行比较。我们也没有克隆和测试AAV1反式互补质粒pVP2N-Gfp。

[0964] 反式互补的AAV2VP3的测定的颗粒滴度为2.1E11。对于AAV1VP3而言,获得的滴度为3.4E10(由于使用了不同的ELISA,无法进行AAV1和AAV2滴度的直接比较)。

[0965] 结果表明,AAV1利用了和AAV2相同的衣壳组装机制,并且对于不同的AAV血清型,片段Z和VP3是可互换的。

[0966] 11.3.在AAV1I588中插入多肽是耐受的

[0967] 本文研究了基本由VP3颗粒组成的空AAV1是否耐受在氨基酸位置588处的插入。

[0968] 为将表位序列克隆到pUCAV1-AgeI-I588(描述于PCT/EP2008/004366)中,设计了正义和反义寡核苷酸,该寡核苷酸编码具有甘氨酸接头序列的相应表位。经两个寡核苷酸的杂交,产生5'-和3'-突出,所述突出与通过NotI和AscI限制性酶切pUCAV1-AgeI-I588而产生的突出共存。研究的寡核苷酸的序列和相应的表位序列总结于表4中。各插入表位的侧翼为根据下图的接头(Xn代表表位序列):Ser(588)-(Ala)₂-(Gly)₅-Xn-(Gly)₅-Thr(589)

[0969] 用于克隆人IgE表位“Kricek”的寡核苷酸

[0970] 氨基酸序列:VNLTWSRASG

[0971] 正义寡核苷酸:5'-g gcc gca gcc gca gtc aac ctg acc tgg agc aga gcc tcc ggc gcg gca gct gca gct-3'(SEQ ID NO:132)

[0972] 反义寡核苷酸:5'-c gcg agc tgc agc tgc cgc gcc gga ggc tct gct cca ggt cag gtt cac tgc ggc tgc-3'(SEQ ID NO:133)

[0973] 用于克隆人IgE表位“3Depi-3”的寡核苷酸

[0974] 氨基酸序列:DSNPRGV SAYLSR

[0975] 正义寡核苷酸:5'-GGCC GGC GGT GGA GGC GGT GAC AGC AAC CCT AGA GGC GTG AGC GCC TAC CTG AGC AGA GGA GGC GGT GGA GGG-3'(SEQ ID NO:134)

[0976] 反义寡核苷酸:5'-CGCG CCC TCC ACC GCC TCC TCT GCT CAG GTA GGC GCT CAC GCC TCT AGG GTT GCT GTC ACC GCC TCC ACC GCC-3'(SEQ ID NO:135)

[0977] 使用的精确克隆方法对应于实施例10中描述的用于将表位插入到AAV2I587中的

方法。

[0978] 为产生基本上由在I-588处含有表位序列的VP3蛋白组成的空AAV1VLP,根据标准方法,将在I-588处携带表位的pUCAV1-AgeI-I588的BsiWI/SphI限制性片段亚克隆到载体pCIVP3/2634_AAV1mutACG(描述于实施例11.1)中。

[0979] 如上文所述通过转染293-T细胞(实施例1.2.)将产生的载体用于产生AAV1VLP。

[0980] 通过商业AAV1ELISA(Progen,Heidelberg,Germany)测定滴度。获得了 3.6×10^{13} /ml (Kricek)和 9.2×10^{13} /ml (3Depi-3)的高滴度,表明在AAV1588(与AAV2587同源)中的插入被良好地耐受,并且AAV1VP3颗粒可用作疫苗载体。

[0981] 12. ORF2包含片段Z并编码AAP。

[0982] 详细序列分析表明片段Z编码新的“组装活化蛋白”(AAP)的重要部分。图16提供了概述,图17更详细地示出了ORF2和所编码的蛋白AAP相对于cap基因的位置,和Cap蛋白VP1、VP2和VP3的翻译起始密码子的位置,以及片段Z和EcoNI和BsiWI限制性位点的位置。这3种Cap蛋白VP1、VP2和VP3从cap基因的同个ORF(也称为第一ORF,ORF1)翻译,而AAP从不同的阅读框(称为第二ORF,ORF2)翻译。对于VP1、VP2和VP3,给出了清楚限定的翻译起始点的编号,而对于AAP,还未明确了解。

[0983] 在图17中,给出了如从NCBI登记号NC_001401取得的AAV2的ORF2的序列(627个核苷酸,SEQ ID NO:23)和相应的AAP蛋白序列(208个氨基酸,SEQ ID NO:1)。

[0984] 从在NCBI数据库中可得的衣壳基因序列中,得到了一些其它细小病毒各自的开放阅读框和蛋白质的序列,并详细提供于如列于表8的SEQ ID Nos 2-44中。

[0985] 表8:NCBI登记号和AAP编码核苷酸的相应SEQ ID的编号和来自不同细小病毒的蛋白质序列。

[0986]

细小病毒	NCBI 的核苷酸登记号	各自的 ORF2	ORF2 的长度/核苷酸	编码的蛋白 AAP	AAP 的长度/AA
AAV2	NC_001401	SEQ ID NO: 23	627	SEQ ID NO: 1	208
AAV1	NC_002077	SEQ ID NO: 24	678	SEQ ID NO: 2	225
AAV3b	AF028705	SEQ ID NO: 25	627	SEQ ID NO: 3	208
AAV4	NC_001829	SEQ ID NO: 26	597	SEQ ID NO: 4	198
AAV5	NC_006152	SEQ ID NO: 27	681	SEQ ID NO: 5	226
AAV6	AF028704	SEQ ID NO: 28	678	SEQ ID NO: 6	225
AAV7	NC_006260	SEQ ID NO: 29	681	SEQ ID NO: 7	226
AAV8	NC_006261	SEQ ID NO: 30	684	SEQ ID NO: 8	227
AAV9	AY530579	SEQ ID NO: 31	681	SEQ ID NO: 9	226
AAV10	AY631965	SEQ ID NO: 32	606	SEQ ID NO: 10	201
AAV11	AY631966	SEQ ID NO: 33	594	SEQ ID NO: 11	197
AAV12	DQ813647	SEQ ID NO: 34	621	SEQ ID NO: 12	206
b-AAV (牛)	NC_005889	SEQ ID NO: 35	600	SEQ ID NO: 13	199
禽 AAV					
ATCC	AY186198	SEQ ID NO: 36	789	SEQ ID NO: 14	262
VR-865					
禽 AAV 株				SEQ ID NO:	
DA-1	AY629583	SEQ ID NO: 142	723	143	240
AAV13	EU285562	SEQ ID NO: 37	627	SEQ ID NO: 15	208
小鼠 AAV1	DQ100362	SEQ ID NO: 38	534	SEQ ID NO: 16	177
禽 AAV 株					
DA-1	AY629583	SEQ ID NO: 39	723	SEQ ID NO: 17	240
山羊 AAV1					
分离株	AY724675	SEQ ID NO: 40	581	SEQ ID NO: 18	226
AAV-Go.1					
大鼠 AAV1	DQ100363	SEQ ID NO: 41	756	SEQ ID NO: 19	251
鹅细小病毒					
株 DB3	EU088102	SEQ ID NO: 42	639	SEQ ID NO: 20	212

[0987]

鸭细小病毒株 90-0219	AY382892	SEQ ID NO: 43	693	SEQ ID NO: 21	230
蛇细小病毒 1	AY349010	SEQ ID NO: 44	600	SEQ ID NO: 22	199

[0988] 为进行序列比较,在图27中提供了源自一些细小病毒的cap基因的ORF的预测AAP蛋白序列的比对。

[0989] 在构建体pVP2N-gfp中,将来自pTAV2.0的EcoNI/BsiWI片段插入到载体pEGFP-N1的CMV启动子下游和GFP编码序列上游(实施例3.1/图6A和实施例13/图19A)。由于BsiWI位点位于ORF2的3'末端上游约90个核苷酸处,载体pVP2N-gfp编码C末端截短的AAP(称为AAPtru),在反式互补中,其和由全长ORF2表达的AAP具有一样的活性(例如见图21)。

[0990] 13. 密码子修饰证实了ORF2的功能性蛋白的表达是反式互补所必需的

[0991] 为研究ORF2的反式互补活性的性质,对EcoNI/BsiWI限制性片段之间的序列进行了密码子修饰(cm)。

[0992] 将第一突变体DNA序列命名为ORF1cm。以下列方式改变该突变体的DNA序列,即编码衣壳蛋白的第一阅读框保持不变,而改变编码AAP的第二阅读框。结果,序列编码野生型衣壳蛋白,但是不再编码有功能活性的AAP。pVP2N-gfp相对pVP2N/ORF1cm-gfp的DNA序列的同一性为71%,而第一阅读框中蛋白质同一性为100%。

[0993] 将第二突变体DNA序列命名为ORF2cm并且其在第一阅读框中被改变,这意味着其不再编码有功能活性的衣壳蛋白,但是可以表达功能完整的AAP。pVP2N-gfp相对pVP2N/ORF2cm-gfp的DNA序列同一性为79%,而第二阅读框中蛋白质同一性为100%。

[0994] 在图18A和18B中分别提供了ORF1cm和ORF2cm的序列。如已在实施例5中所述,由GENEART(Regensburg, Germany)进行密码子修饰。将密码子修饰为优先用于哺乳动物细胞中的密码子。

[0995] 如实施例3.1中所述,通过将pTAV2.0的EcoNI/BsiWI限制性片段插入到pEGFP-N1的多克隆位点中产生pVP2N-gfp。除了将经密码子修饰的EcoNI/BsiWI片段插入到相应的载体骨架中的区别外,以相同的方式生成构建体pVP2N/ORF1cm-gfp和pVP2N/ORF2cm-gfp。

[0996] 在蛋白质印迹分析中,将pVP2N/ORF1cm-gfp和pVP2N/ORF2cm-gfp的蛋白表达(图20A)与未经修饰的pVP2N-gfp的蛋白表达进行比较(图20B)。如实施例3中所述,在反式互补试验中测试了解决pCMV-VP3/2809的衣壳形成问题的能力。以1:1的摩尔比共转染质粒(图20C)。

[0997] 结果和结论

[0998] 如已在实施例3所述和在图6中所示出的,使用单克隆抗体A69的蛋白质印迹分析证实,在GFP融合构建体pVP2N-gfp(图19A)中表达了包含VP2N末端的衣壳蛋白(VP2N-gfp,图19B)。在293-T细胞中,用对应于量递减的共转染pVP2N-gfp的不同摩尔比的pVP2N-gfp互补质粒pCMV-VP3/2809,经过其定量,示出了衣壳组装减少(图19C)。组装的衣壳数量的测定还揭示了与pVP2N-gfp共转染的缺失突变体pCMV-VP3/2809在衣壳组装上和突变体pCMV-VP3/2696几乎同样有效,突变体pCMV-VP3/2696即显示出正常衣壳形成的缺失突变体(图5)。甚至在共转染pVP2N-gfp质粒的量减少500倍的情况下可检测到组装。

[0999] 因此,明确的是可以以反式提供组装促进活性,该活性与含有VP3翻译起始位点上

游的cap基因序列的构建体有关。

[1000] 如实施例5、图8B中所描述的经密码子-修饰的构建体pVP2N/ORF1cm,经密码子修饰的构建体的蛋白表达甚至高于未经修饰的构建体pVP2N-gfp的蛋白表达,这是因为密码子修饰是针对哺乳动物细胞而优化的(图8B)。共表达的pCMV-VP3/2809的VP3水平是正常的。但是,当使用辅助构建体pVP2N/ORF1cm时,未检测到衣壳组装(图20C)。同样,通过转染较低量的pVP2N/ORF1cm而得到的相应蛋白的表达减少不支持VP3的衣壳形成(数据未示出)。

[1001] 相比之下,使用辅助构建体pVP2N/ORF2cm可以检测到组装的衣壳(图20C)。如上所述,仅ORF2cm表达功能完整的AAP,而在pVP2N/ORF1cm中,AAP的序列不具有功能,并且此经密码子修饰的构建体仅编码衣壳蛋白。相应地,仅pVP2N/ORF2cm以反式互补解决了衣壳组装问题。

[1002] 此结果明确显示,通过片段Z在ORF2中编码蛋白而介导其反式互补活性。密码子修饰实验证实了在ORF1中的功能性衣壳蛋白的表达并不是反式互补所必需的,而是在ORF2中表达功能性AAP所必需的。

[1003] 14. 预测的AAP翻译起始密码子的突变

[1004] 详细分析了如在图17中提供的ORF2的序列以进一步表征AAP介导的衣壳组装。ORF2在VP3起始密码子之前不含有ATG。假定其利用了非经典起始密码子,该非经典起始密码子处在2765位核苷酸处的片段Z的限定最小5'末端上游。考虑到如Kozak(2002年)定义的起始密码子的局部环境中的序列需要,我们预测在2729-2731位处的第5个密码子为用于翻译AAP的非经典起始密码子,所述第5个密码子为CTG并编码亮氨酸(在图17中以下划线标出)。为了观察其对表达效率的影响,将该位点突变为ATG和TTG。

[1005] 在蛋白质印迹分析中,比较了ORF2的AU1标记形式,即pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1和pORF2/TTG-AU1(图21A)和未经修饰的pVP2N-gfp的蛋白表达(图21B)。如实施例3中所述,在反式互补试验中测试了pCMV-VP3/2809解决衣壳形成问题的能力。以1:1的摩尔比共转染质粒(图21C)。

[1006] 构建体pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1和pORF2/TTG-AU1包含融合至编码AU1-标签的序列的cap基因的完整ORF2(AAV2核苷酸2717-3340)(图21A)。

[1007] 为生成构建体pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1和pORF2/TTG-AU1,用模板pTAV2.0和下述正向引物以及反向引物进行PCR:

[1008] 正向引物:

[1009] 5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCC-3'(SEQ ID NO:136)、

[1010] 5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGAATGGAGACGCAGACTCAG-3'(SEQ ID NO:137)或

[1011] 5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGATTGGAGACGCAGACTCAG-3'(SEQ ID NO:138)

[1012] 反向引物:

[1013] 5'-GCGGTGTCTCGAGTTATATATAGCGATAGGTGTGCGGTGAGGTATCCATACTGTGGCACCATGAAGAC-3'(SEQ ID NO:139)。

[1014] 将经HindIII/XhoI消化的扩增产物插入到pBS-CMVsense的HindIII/XhoI骨架中,所述pBS-CMVsense通过将来自pHCMV-Luci(由K.Butz,German Cancer Research Center,

Heidelberg, Germany友情提供)的 560bp的BamHI人巨细胞病毒(CMV)启动子片段插入到质粒Bluescript IISK+(pBS, Stratagene, La Jolla, CA, USA)的BamHI位点中而生成。

[1015] 结果和结论

[1016] 使用针对构建体pORF2/CTG-AU1和pORF2/ATG-AU1的AU1-标签的单克隆抗体(抗AU1)可以证实所推定的蛋白的表达,而构建体pORF2/TTG的表达低于检测水平。和VP3表达质粒pCMV-VP3/2809一起共转染含ORF2的质粒pORF2/CTG-AU1、pORF2/ATG-AU1和pORF2/TTG-AU1实现衣壳形成(图21C),其中每个体积测量的组装的衣壳的数量与从蛋白质印迹估算的表达的蛋白的量相关。转染pORF2/ATG-AU1和pCMV-VP3/2809后获得的衣壳滴度与共转染pVP2N-gfp和pCMV-VP3/2809后获得的衣壳滴度相类似。相反,与pVP2N-gfp质粒相比,TTG起始密码子编码质粒刺激衣壳组装要小大约 10^3 倍的量。针对ORF2的肽的多克隆抗血清明确显示出AAP的表达,并且除了AU1标记的全长AAP以外,还检测由pVP2N-gfp表达的C末端截短的AAP(AAPtru)(图21B)。

[1017] 总的来说,将推定的非经典CTG起始密码子突变为强ATG起始密码子促进了蛋白合成和衣壳组装,而突变为在正常情况下为非优选蛋白合成起始密码子的密码子显著降低了蛋白水平和组装的衣壳的数量。此结果不仅确证了我们关于ORF2的蛋白产物促进衣壳组装过程的结论,该结果还进一步显示了非经典CTG起始密码子可能用作翻译的起始,原因在于其突变为TTG造成AAP表达的显著减少。

[1018] 15. 在ORF2中插入终止密码子证实功能性AAP的表达是反式互补所必需的

[1019] 此外,通过将终止密码子引入到ORF2中在AAP编码阅读框中进行突变,以证实功能性AAP的表达是反式互补所必需的。

[1020] 通过使用包括所需替换的两种互补PCR引物,对模板pVP2N-gfp进行定点突变(QuickChange定点突变试剂盒, Stratagene),从而产生质粒pVP2N/ORF2stopA-gfp、pVP2N/ORF2stopB-gfp和pVP2N/ORF2stopC-gfp。在pVP2N/ORF2stopA-gfp中,已经将密码子tgg₂₈₁₁突变为tag;在pVP2N/ORF2stopB-gfp中,已经将密码子c_{2831aa}突变为taa;在pVP2N/ORF2stopC-gfp中,已经将密码子g_{2879aa}突变为tga(图22A)。位置是根据Ruffing等人(1994年)的描述。所有突变都没有破坏ORF1。在每种情况下,将EcoNI/BsiWI片段克隆到pVP2N-gfp的EcoNI/BsiWI骨架中。

[1021] 结果和结论

[1022] 蛋白质印迹分析证实了在所有样品中都表达VP3(在图22B中通过单克隆抗体B1检测)。同样,在反式互补试验中,Bluescript载体(pBS)没有引起衣壳组装(图22C)。将终止密码子在3个不同位点引入到cap基因的ORF2中(如图22A所示)没有影响VP2N-gfp的表达(图22B),而所有在ORF2中携带终止密码子的突变体都没有显示出任何衣壳组装活性(图22C)。

[1023] 因此,在反式互补试验中,pVP2n-gfp的Cap表达不足以进行衣壳组装。此结果明确证明存在的由覆盖cap基因的不同阅读框(ORF2)表达的AAP提供了衣壳组装辅助功能。

[1024] 16. 在AAV基因组范围内,功能性AAP的表达解决衣壳组装问题

[1025] 接下来我们想要分析在全AAV基因组范围内,新发现的“组装活化蛋白”AAP的表达是否是衣壳组装所必需的。因此,通过将pVP2N/ORF1cm-gfp的EcoNI/BsiWI片段(实施例13)克隆到pTAV2.0的EcoNI/BsiWI骨架(实施例1.2.1.)中产生构建体pTAV/ORF1cm。因此,质粒pTAV/ORF1cm(示意性地示于图23A)编码已知的AAV2衣壳和Rep蛋白,但在合成AAP方面将是

缺陷的,这是因为在第二个阅读框(ORF2)中cap的密码子被修饰,但没有改变编码Cap蛋白的第一个阅读框(ORF1)。

[1026] 结果和结论

[1027] 事实上,正确地表达了4种Rep蛋白(Rep40、Rep52、Rep68和Rep78)(数据未示出)。蛋白质印迹分析表明略微改变了3种VP蛋白的表达模式。使用多克隆抗AAP血清直接证明了来自野生型质粒pTAV2.0而非来自经密码子修饰的质粒pTAV/ORF1cm的内源性AAP的表达(图23B)。如所预期的,利用pVP2N-gfp的共表达可检测截短的AAP。

[1028] 在野生型质粒pTAV2.0和经密码子修饰的质粒pTAV/ORF1cm与空Bluescript载体(pBS)或与pVP2N-gfp共转染后,比较了两个构建体的衣壳组装。如所预期的,pTAV/ORF1cm与pBS的转染没有显示可检测的衣壳形成,因为pTAV/ORF1cm表达所有3种衣壳蛋白,但是pTAV/ORF1cm和pBS都不表达有功能活性的AAP。相比之下,pTAV/ORF1cm与pVP2N-gfp的转染至少部分恢复了衣壳组装(图23C),因为由pVP2N-gfp表达了C末端截短但有活性的AAP。

[1029] 用突变体质粒如pVP2N/ORF1cm-gfp(如实施例13中所述)和pVP2N/ORF2stopA-gfp(见实施例15)互补在表达有功能活性的AAP方面有缺陷的pTAV/ORF1cm,也没有引起衣壳形成,所述pVP2N/ORF1cm-gfp和pVP2N/ORF2stopA-gfp二者都无法表达AAP蛋白(分别由于密码子修饰或引入终止密码子)。相比之下,除了pVP2N-gfp,可以由质粒pVP2N/ORF2cm-gfp(描述于实施例13)、pORF2/CTG-AU1和pORF2/ATG-AU1(见实施例14)表达有功能活性的AAP,并以反式互补解决衣壳组装问题(图23D)。

[1030] 总的来说,在完整病毒基因组的范围内,衣壳形成依赖于内源性或互补的AAP的表达。

[1031] 17.在AAV基因组的范围内,功能性AAP的表达是衣壳组装所必需的

[1032] 为进一步证实在全AAV基因组范围内AAP是衣壳组装所必需的,将终止密码子引入到ORF2中以破坏AAP氨基酸序列。

[1033] 因此,通过将pVP2N/ORF2stopB-gfp(详见实施例15)的EcoNI/BsiWI片段克隆到pTAV2.0的EcoNI/BsiWI骨架(实施例1.2.1)中,从而生成构建体pTAV/ORF2stopB。在pVP2N/ORF2stopB-gfp中,将在2831位核苷酸处起始的caa密码子突变为taa终止密码子。因此,质粒pTAV/ORF2stopB(示意性地示于图24A)编码已知的AAV2衣壳和Rep蛋白,而由于该插入的终止密码子在合成AAP中将是有缺陷的。

[1034] 结果和结论

[1035] 同样,在蛋白质印迹分析中可以检测到4种Rep蛋白的正确表达(数据未示出)以及3种VP蛋白的略微改变的表达模式。使用多克隆抗AAP血清直接证明了来自野生型质粒pTAV2.0而非来自含有终止密码子的质粒的内源性AAP的表达(图24B)。

[1036] 在野生型质粒pTAV2.0和突变体质粒pTAV/ORF2stopB与空Bluescript载体(pBS)或与pVP2N-gfp共转染后,比较了2个构建体的衣壳组装。如所预期的,pTAV/ORF2stopB和pBS的转染显示无可检测的衣壳形成,这是因为pTAV/ORF2stopB表达所有3种衣壳蛋白,但是pTAV/ORF2stopB和pBS都不表达有功能活性的AAP。相比之下,pTAV/ORF2stopB和pVP2N-gfp的转染至少部分恢复了衣壳组装(图24C),这是因为由pVP2N-gfp表达C末端截短但有活性的AAP。

[1037] 此结果进一步证实了在完整病毒基因组情况下,衣壳形成依赖于功能性AAP的表

达。

[1038] 18. “组装活化蛋白”AAP将VP蛋白引向核仁。

[1039] 除实施例8以外,在293-T细胞中转染了若干个构建体,以比较所表达的蛋白在转染细胞中的定位和组装效率。

[1040] 18.1. 构建体的克隆

[1041] 构建体pCMV-NLS-VP3的克隆描述于实施例8.1。除了下述所使用的互补引物对的区别外,用于生成pCMV-NoLS-VP3的方案与用于生成pCMV-NLS-VP3的方案是一致的:

[1042] 5'-GGAAT TCGAT ATCAA GCTTG CCATG GCACG GCAGG CCCGG CGGAA TAGAC GGAGA CGGTG GCGGG AACGG CAGCG GATGG CTACA GGCAG TGG-3' (SEQ ID NO:140)和

[1043] 5'-CCACT GCCTG TAGCC ATCCG CTGCC GTTCC CGCCA CCGTC TCCGT CTATT CCGCC GGGCC TGCCG TGCCA TGGCA AGCTT GATAT CGAAT TCC-3' (SEQ ID NO:141)。

[1044] 相应地,cap基因产物NoLS-VP3在VP3的N末端含有HIV Rev的核仁定位信号的氨基酸序列MARQARRNRWRERQR。两个构建体都示意性地示于图25A。

[1045] 18.2. 通过免疫荧光分析构建体

[1046] 类似于实施例8中所述的实验设定,用所示出的不同构建体转染HeLa细胞。通过如上所述的免疫荧光法,使用多克隆VP抗血清或单克隆A20抗体分析衣壳蛋白的表达和衣壳形成。

[1047] 18.3. 结果和结论

[1048] 从分析产生性AAV感染的文献(例如Wistuba等人,1997年)已知,首先可在受感染细胞的核仁中检测到衣壳组装。在HeLa细胞中pCMV-VP3/2809表达的衣壳蛋白VP3分布在整个细胞核和细胞质中,并被排除在核仁之外(如图11B中所示),经采用衣壳特异性的单克隆抗体A20染色,在这些细胞中没有检测到衣壳。但是,如果AAP由共转染pVP2N-gfp共表达,大量的VP3蛋白转移到核仁中,并且可以检测到衣壳的形成。

[1049] 如实施例8所述,我们表达了构建体pCMV-NLS-VP3并观察到融合至SV40核定位信号(NLS)的VP3的大量核积累,然而其被排除在核仁之外且未引起衣壳组装(图11B)。但是,质粒pVP2N-gfp的AAP的共表达再次将部分NLS-VP3蛋白引向至核仁,在该处可以检测到衣壳形成。

[1050] 有趣的是,由pORF2/ATG-AU1(描述于实施例14)表达并且被抗AU1抗体染色的AAP蛋白和核仁纤维蛋白一起定位至核仁(图25C,右侧的相衬图像证实了在染色位置上的核仁的定位)。

[1051] 此结果说明AAP将VP蛋白共转移至核仁,这是后续的衣壳组装的前提。

[1052] 当表达构建体pCMV-NoLS-VP3时,我们观察到融合至源自HIV REV的核仁定位信号的VP3的至少部分核仁定位,但是令人惊讶的是,没有检测到衣壳组装(图25B)。因此,看起来VP蛋白向核仁的转移不足以进行衣壳形成。并且,pVP2N-gfp的AAP共表达促进衣壳形成,证明了AAP不仅将VP蛋白引向至核仁,而且在组装反应中起额外的积极作用。这一实施例还表明VP3N末端插入(I-203)被耐受,即使带有高正电荷的17mer的NoLS-序列似乎部分干扰VLP滴度。

[1053] 19. 功能性AAP的表达是衣壳组装所必需的。

[1054] 除了见于实施例18的免疫荧光图像以外,我们在蛋白质印迹上分析了各突变构建

体pCMV-NLS-VP3和pCMV-NoLS-VP3的蛋白表达。此外,我们通过单克隆抗体A20衣壳ELISA对各构建体的衣壳组装活性进行了定量。

[1055] 结果和结论

[1056] 蛋白质印迹分析证实了pCMV-VP3/2809的VP3和分别来自pCMV-NLS-VP3和pCMV-NoLS-VP3的稍微较长的蛋白NLS-VP3和NoLS-VP3的表达(图26A)。

[1057] 如已在实施例8中所观察到的,经与Bluescript载体(pBS)共转染,NLS-VP3和NoLS-VP3都不解决衣壳形成问题,而在存在AAP表达(来自pVP2N-gfp)的情况下,可以检测到衣壳形成(图26B)。

[1058] 此结果证实了AAP不仅将VP蛋白引向至核仁(其还通过不产生衣壳组装的NoLS-VP3融合构建体实现),而且还在组装反应本身中起重要作用。

[1059] 20. 野生型和VP3VLP的组装

[1060] 为比较由VP1、VP2和VP3组装的病毒样颗粒(VP1,2,3VLP)和仅由VP3组装的病毒样颗粒(VP3VLP)的形态,如上所述,使用2%醋酸 铀酰进行负染后通过电子显微术研究各样品。

[1061] 在293-T细胞中通过表达完整的cap基因产生了对应于野生型衣壳的由VP1、VP2和VP3组装的病毒样颗粒。通过共转染pCMV-VP3/2809和pVP2N-gfp产生仅由VP3组装的VLP(VP3VLP)。

[1062] 结果和结论

[1063] 电子显微图像证实了由VP1、VP2和VP3组装的病毒样颗粒(VP1,2,3VLP)和仅由VP3组装的VLP(VP3VLP,图28)的形态相类似。在两张图片中,内部染色都不可见,因此明确证实了所有颗粒都是空的。完整(含DNA)的颗粒和空颗粒的图像的比较显示在例如Xie等人(2004年)中。

[1064] 21. 从不同血清型克隆的AAP和VP3的反式互补

[1065] 为证实从一种细小病毒表达AAP能够介导来自另一种细小病毒的VP3的衣壳组装,我们在反式互补试验中使用了AAV1、AAV2和AAV5各自的序列。

[1066] 类似于AAV2(比较3.1)进行AAV1和AAV5的pVP2N-gfp的克隆,其区别在于,选择引物对以扩增分别如SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:27中提供的AAV1和AAV5各自的序列。为进行反式互补,在经或不经共转染各AAV血清型的pVP2N-gfp情况下,用如上所述的AAV2的质粒pCMV-VP3(pCMV_VP3/2809)、AAV1的质粒pCMV-VP3(pCMV_AAV1VP3/2829)或相应的AAV5VP3表达构建体转染细胞(图29)。转染了相同摩尔比的VP3构建体和pVP2N-gfp。通过ELISA测定颗粒形成效率。

[1067] 结果和结论

[1068] 在分别共转染从AAV2和AAV1克隆的pVP2N-gfp或Bluescript载体后,比较了分别克隆自AAV1、AAV2和AAV5的VP3的衣壳组装(见图29)。如所预期的,在不存在任何其它病毒蛋白(pBS对照)的情况下,不论其来源,VP3的表达都显示无可检测的衣壳形成。相比之下,从血清型AAV1的AAP的表达(由相应的pVP2N-gfp构建体表达)完全恢复了AAV2VP3组装(相比由来自AAV2的AAP介导的组装)。反过来也一样,来自AAV2的AAP完全恢复了AAV1VP3组装(相比由来自AAV1的AAP介导的组装)。来自AAV5的AAP仅能部分地互补AAV2VP3组装,且无法互补AAV1VP3组装。此外,AAV2和AAV1AAP无法互补AAV5VP3 组装。关于AAV5构建体的反式互

补的失败可能是由于这一事实：在这些实验中，AAP融合至GFP，导致AAP的短C末端缺失，这可能干扰来源更远的细小病毒的互补，而活性对于紧密相关的血清型是足够的。另一个可能的解释是来源更远的血清型就VP3组装而言仅能够部分地彼此互补。而来自AAV1和AAV2的AAP具有71.5%的序列同一性和81.0%的序列相似性(Smith-Waterman比对)，AAV2和AAV5仅具有56.2%的序列同一性和60.8%的序列相似性。就AAV1比较AAV5而言，这些数字则更低(53.8%的序列同一性和58.1%的序列相似性)。相应地，技术人员将能够通过了解AAP的序列同一性/序列相似性从不同的血清型选择有功能活性的AAP和/或其它有功能活性的变体。

[1069] 并且，除了实施例11以外，这些结果证实了除AAV外的细小病毒编码功能性AAP并利用相同的衣壳组装机理。此外，原则上AAP和VP3在不同细小病毒之间是可互换的，特别是在紧密相关的病毒之间。

[1070] 参考文献

[1071] ARNOLD,G.S.,SASSER,A.K.,STACHLER,M.D.&BARTLETT,J.S.(2006)Metabolic biotinylation provides a unique platform for the purification and targeting of multiple AAV vector serotypes.Mol Ther,14,97-106.

[1072] ASOKAN,A.&SAMULSKI,R.J.(2006)AAV does the shuffle.Nat Biotechnol,24,158-60.

[1073] BACHMANN,M.F.,ROHRER,U.H.,KUNDIG,T.M.,BURKI,K.,HENGARTNER,H.&ZINKERNAGEL,R.M.(1993)The influence of antigen organization on B cell responsiveness.Science,262,1448-51.

[1074] BECERRA,S.P.,KOCZOT,F.,FABISCH,P.&ROSE,J.A.(1988)Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript.J Virol,62,2745-54.

[1075] BECERRA,S.P.,ROSE,J.A.,HARDY,M.,BAROUDY,B.M.&ANDERSON,C.W.(1985)Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C:a possible ACG initiation codon.Proc Natl Acad Sci U S A,82,7919-23.

[1076] CORPET,F.(1988)Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.Nucleic Acids Res,16,10881-90.

[1077] GIROD,A.,RIED,M.,WOBUS,C.,LAHM,H.,LEIKE,K.,KLEINSCHMIDT,J.,DELEAGE,G.&HALLEK,M.(1999)Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2.Nat Med,5,1438.

[1078] GRIEGER,J.C.,JOHNSON,J.S.,GURDA-WHITAKER,B.,AGBANDJE-MCKENNA,M.&SAMULSKI,R.J.(2007)Surface-exposed adeno-associated virus Vp1-NLS capsid fusion protein rescues infectivity of noninfectious wild-type Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids but not that of fivefold pore mutant virions.J Virol,81,7833-43.

[1079] GRIEGER,J.C.&SAMULSKI,R.J.(2005)Adeno-associated virus as a gene therapy vector:vector development,production and clinical applications.Adv Biochem Eng Biotechnol,99,119-45.

- [1080] GRIFMAN,M.,TREPEL,M.,SPEECE,P.,GILBERT,L.B.,ARAP,W.,PASQUALINI,R.& WEITZMAN,M.D.(2001)Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids.Mol Ther,3,964-75.
- [1081] GRIMM,D.(2002)Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes.Methods,28,146-57.
- [1082] GRIMM,D.,KERN,A.,PAWLITA,M.,FERRARI,F.,SAMULSKI,R.&KLEINSCHMIDT,J.(1999)Titration of AAV-2particles via a novel capsid ELISA:packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2.Gene Ther,6,1322-30.
- [1083] GRIMM,D.&KLEINSCHMIDT,J.A.(1999)Progress in adeno-associated virus type 2vector production:promises and prospects for clinical use.Hum Gene Ther,10,2445-50.
- [1084] HEILBRONN,R.,BURKLE,A.,STEPHAN,S.&ZUR HAUSEN,H.(1990)The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification.J Virol,64,3012-8.
- [1085] HOQUE,M.,ISHIZU,K.,MATSUMOTO,A.,HAN,S.I.,ARISAKA,F.,TAKAYAMA,M.,SUZUKI,K.,KATO,K.,KANDA,T.,WATANABE,H.& HANDA,H.(1999a)Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation.J Virol,73,7912-5.
- [1086] HOQUE,M.,SHIMIZU,N.,ISHIZU,K.,YAJIMA,H.,ARISAKA,F.,SUZUKI,K.,WATANABE,H.&HANDA,H.(1999b)Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus.Biochem Biophys Res Commun,266,371-6.
- [1087] HUTTNER,N.A.,GIROD,A.,PERABO,L.,EDBAUER,D.,KLEINSCHMIDT,J.A.,BUNING,H.&HALLEK,M.(2003)Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies.Gene Ther,10,2139-47.
- [1088] KING,J.A.,DUBIELZIG,R.,GRIMM,D.&KLEINSCHMIDT,J.A.(2001)DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2genomes into preformed capsids.Embo J,20,3282-91.
- [1089] KOERBER,J.T.,JANG,J.H.&SCHAFFER,D.V.(2008)DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny.Mol Ther,16,1703-9.
- [1090] KOZAK,M.(2002)Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation.Gene,299,1-34.
- [1091] KRONENBERG,S.,KLEINSCHMIDT,J.A.&BOTTCHER,B.(2001)Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2empty capsids.EMBO Rep,2,997-1002.
- [1092] LAUGHLIN,C.A.,TRATSCHIN,J.D.,COON,H.&CARTER,B.J.(1983)Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids.Gene,23,65-73.

- [1093] LI, W., ASOKAN, A., WU, Z., VAN DYKE, T., DIPRIMIO, N., JOHNSON, J. S., GOVINDASWAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., LEICHTLE, S., REDMOND, D. E., JR., MCCOWN, T. J., PETERMANN, K. B., SHARPLESS, N. E. & SAMULSKI, R. J. (2008) Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol Ther*, 16, 1252-60.
- [1094] MAHESHRI, N., KOERBER, J. T., KASPAR, B. K. & SCHAFFER, D. V. (2006) Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol*, 24, 198-204.
- [1095] MITTEREDER, N., MARCH, K. L. & TRAPNELL, B. C. (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol*, 70, 7498-509.
- [1096] MOSKALENKO, M., CHEN, L., VAN ROEY, M., DONAHUE, B. A., SNYDER, R. O., MCARTHUR, J. G. & PATEL, S. D. (2000) Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol*, 74, 1761-6.
- [1097] MUZYCZKA, N. & BERNIS, K. I. (2001) Parvoviridae: the viruses and their replication. IN KNIPE, T. M. & HOWLEY, P. M. (Eds.) *Fields Virology*. Fourth Edition ed. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- [1098] NICKLIN, S. A., BUENING, H., DISHART, K. L., DE ALWIS, M., GIROD, A., HACKER, U., THRASHER, A. J., ALI, R. R., HALLEK, M. & BAKER, A. H. (2001) Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther*, 4, 174-81.
- [1099] NYGREN, P. A. & SKERRA, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods*, 290, 3-28.
- [1100] RABINOWITZ, J. E., XIAO, W. & SAMULSKI, R. J. (1999) Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology*, 265, 274-85.
- [1101] RIED, M. U., GIROD, A., LEIKE, K., BUNING, H. & HALLEK, M. (2002) Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol*, 76, 4559-66.
- [1102] RUFFING, M., HEID, H. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1994) Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J Gen Virol*, 75(Pt 12), 3385-92.
- [1103] RUFFING, M., ZENTGRAF, H. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1992) Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol*, 66, 6922-30.
- [1104] SHI, W., ARNOLD, G. S. & BARTLETT, J. S. (2001) Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum Gene Ther*, 12, 1697-711.

- [1105] SHI,W.&BARTLETT,J.S.(2003)RGD inclusion in VP3provides adeno-associated virus type 2(AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism.Mol Ther,7,515-25.
- [1106] STACHLER,M.D.&BARTLETT,J.S.(2006)Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells.Gene Ther,13,926-31.
- [1107] STEINBACH,S.,WISTUBA,A.,BOCK,T.&KLEINSCHMIDT,J.A.1997Assembly of adeno-associated virus type 2capsids in vitro.J Gen Virol,78(Pt 6),1453-62.
- [1108] SZOMOLANYI-TSUDA,E.,BRIEN,J.D.,DORGAN,J.E.,GARCEA,R.L.,WOODLAND,R.T.&WELSH,R.M.(2001)Antiviral T-cell-independent type 2antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells.Virology,280,160-8.
- [1109] SZOMOLANYI-TSUDA,E.,BRIEN,J.D.,DORGAN,J.E.,WELSH,R.M.&GARCEA,R.L.(2000)The role of CD40-CD154 interaction in antiviral T cell-independent IgG responses.J Immunol,164,5877-82.
- [1110] SZOMOLANYI-TSUDA,E.,LE,Q.P.,GARCEA,R.L.&WELSH,R.M.(1998)T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles.J Virol,72,6665-70.
- [1111] SZOMOLANYI-TSUDA,E.&WELSH,R.M.(1998)T-cell-independent antiviral antibody responses.Curr Opin Immunol,10,431-5.
- [1112] WARD,P.&WALSH,C.E.(2009)Chimeric AAV Cap sequences alter gene transduction.Virology,386,237-48.
- [1113] WARRINGTON,K.H.,JR.,GORBATYUK,O.S.,HARRISON,J.K.,OPIE,S.R.,ZOLOTUKHIN,S.&MUZYCZKA,N.(2004)Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertiohs at its N terminus.J Virol,78,6595-609.
- [1114] WISTUBA,A.,KERN,A.,WEGER,S.,GRIMM,D.&KLEINSCHMIDT,J.A.(1997)Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2assembly.J Virol,71,1341-52.
- [1115] WISTUBA,A.,WEGER,S.,KERN,A.&KLEINSCHMID T,J.A.(1995)Intermediates of adeno-associated virus type 2assembly:identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins.J Virol,69,5311-9.
- [1116] WU,P.,XIAO,W.,CONLON,T.,HUGHES,J.,AGBANDJE-MCKENNA,M.,FERKOL,T.,FLOTTE,T.&MUZYCZKA,N.2000Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2(AAV2)capsid gene and construction of AAV2vectors with altered tropism.J Virol,74,8635-47.
- [1117] XIE,Q.,BU,W.,BHATIA,S.,HARE,J.,SOMASUNDARAM,T.,AZZI,A.&CHAPMAN,M.S.(2002)The atomic structure of adeno-associated virus(AAV-2),a vector for human gene therapy.Proc Natl Acad Sci U S A,99,10405-10.

- [1118] XIE,Q.,HARE,J.,TURNIGAN,J.&CHAPMAN,M.S.(2004)Large-scale production, purification and crystallization of wild-type adeno-associated virus-2.J Virol Methods,122,17-27.
- [1119] ZINKERNAGEL,R.M.(2002)Uncertainties-discrepancies in immunology.Immunological Reviews,185,103-125.

- <110> 麦迪金股份公司等
 <120> 组装活化蛋白 (AAP) 及其用于制备基本上由 VP3 组成的细小病毒颗粒的应用
 <130> LC1131006P
 <140> PCT/EP2010/001343
 <141> 2010-03-04
 <150> US 61/157,436
 <151> 2009-03-04
 <150> US 61/306,205
 <151> 2010-02-19
 <160> 146
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒2
 <400> 1

Ile Leu Val Arg Leu Glu Thr Gln Thr Gln Tyr Leu Thr Pro Ser Leu
1 5 10 15

Ser Asp Ser His Gln Gln Pro Pro Leu Val Trp Glu Leu Ile Arg Trp
20 25 30

[0001]

Leu Gln Ala Val Ala His Gln Trp Gln Thr Ile Thr Arg Ala Pro Thr
35 40 45

Glu Trp Val Ile Pro Arg Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp
50 55 60

Ala Thr Glu Ser Ser Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Cys Pro Pro
65 70 75 80

Thr Thr Thr Thr Ser Thr Asn Lys Phe Pro Ala Asn Gln Glu Pro Arg
85 90 95

Thr Thr Ile Thr Thr Leu Ala Thr Ala Pro Leu Gly Gly Ile Leu Thr
100 105 110

Ser Thr Asp Ser Thr Ala Thr Phe His His Val Thr Gly Lys Asp Ser
115 120 125

Ser Thr Thr Thr Gly Asp Ser Asp Pro Arg Asp Ser Thr Ser Ser Ser
130 135 140

Leu Thr Phe Lys Ser Lys Arg Ser Arg Arg Met Thr Val Arg Arg Arg
145 150 155 160

Leu Pro Ile Thr Leu Pro Ala Arg Phe Arg Cys Leu Leu Thr Arg Ser
165 170 175

Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Ala Arg Arg Ile Lys Asp Ala Ser Arg
180 185 190

Arg Ser Gln Gln Thr Ser Ser Trp Cys His Ser Met Asp Thr Ser Pro
195 200 205

<210> 2
<211> 225
<212> PRT
<213> 腺相关病毒1

<400> 2

Ser Ser Arg His Lys Ser Gln Thr Pro Pro Arg Ala Ser Ala Arg Gln
1 5 10 15

Ala Ser Ser Pro Leu Lys Arg Asp Ser Ile Leu Val Arg Leu Ala Thr
20 25 30

Gln Ser Gln Ser Pro Ile His Asn Leu Ser Glu Asn Leu Gln Gln Pro
35 40 45

Pro Leu Leu Trp Asp Leu Leu Gln Trp Leu Gln Ala Val Ala His Gln
50 55 60

Trp Gln Thr Ile Thr Lys Ala Pro Thr Glu Trp Val Met Pro Gln Glu
65 70 75 80

Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp Ala Thr Glu Ser Ser Pro Pro
85 90 95

Ala Pro Ala Pro Gly Pro Cys Pro Pro Thr Ile Thr Thr Ser Thr Ser
100 105 110

[0002]

Lys Ser Pro Val Leu Gln Arg Gly Pro Ala Thr Thr Thr Thr Ser
115 120 125

Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile Leu Ile Ser Thr Asp Ser Thr Ala
130 135 140

Thr Phe His His Val Thr Gly Ser Asp Ser Ser Thr Thr Ile Gly Asp
145 150 155 160

Ser Gly Pro Arg Asp Ser Thr Ser Asn Ser Ser Thr Ser Lys Ser Arg
165 170 175

Arg Ser Arg Arg Met Met Ala Ser Gln Pro Ser Leu Ile Thr Leu Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Lys Ser Ser Arg Thr Arg Ser Thr Ser Phe Arg Thr Ser
195 200 205

Ser Ala Leu Arg Thr Arg Ala Ala Ser Leu Arg Ser Arg Arg Thr Cys
210 215 220

Ser
225

<210> 3
<211> 208
<212> PRT
<213> 腺相关病毒3b

<400> 3

Ile Ser Val Arg Leu Ala Thr Gln Ser Gln Ser Gln Thr Leu Asn Leu
1 5 10 15

Ser Glu Asn His Gln Gln Pro Pro Gln Val Trp Asp Leu Ile Gln Trp
20 25 30

Leu Gln Ala Val Ala His Gln Trp Gln Thr Ile Thr Arg Val Pro Met
35 40 45

Glu Trp Val Ile Pro Gln Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro Asn Gly Trp
50 55 60

Ala Thr Glu Ser Ser Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Cys Pro Leu
65 70 75 80

Thr Thr Thr Ile Ser Thr Ser Lys Ser Pro Ala Asn Gln Glu Leu Gln
85 90 95

Thr Thr Thr Thr Thr Leu Ala Thr Ala Pro Leu Gly Gly Ile Leu Thr
100 105 110

Leu Thr Asp Ser Thr Ala Thr Ser His His Val Thr Gly Ser Asp Ser
115 120 125

Leu Thr Thr Thr Gly Asp Ser Gly Pro Arg Asn Ser Ala Ser Ser Ser
130 135 140

[0003]

Ser Thr Ser Lys Leu Lys Arg Ser Arg Arg Thr Met Ala Arg Arg Leu
145 150 155 160

Leu Pro Ile Thr Leu Pro Ala Arg Phe Lys Cys Leu Arg Thr Arg Ser
165 170 175

Ile Ser Ser Arg Thr Cys Ser Gly Arg Arg Thr Lys Ala Val Ser Arg
180 185 190

Arg Phe Gln Arg Thr Ser Ser Trp Ser Leu Ser Met Asp Thr Ser Pro
195 200 205

<210> 4

<211> 198

<212> PRT

<213> 腺相关病毒4

<400> 4

Leu Asn Pro Pro Ser Ser Pro Thr Pro Pro Arg Val Ser Ala Lys Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ser Arg Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ser Lys Thr Lys Leu Glu
20 25 30

Gln Ala Thr Asp Pro Leu Arg Asp Gln Leu Pro Glu Pro Cys Leu Met
35 40 45

Thr Val Arg Cys Val Gln Gln Leu Ala Glu Leu Gln Ser Arg Ala Asp
50 55 60

Lys Val Pro Met Glu Trp Val Met Pro Arg Val Ile Gly Ile Ala Ile
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Leu Arg Ala Thr Ser Arg Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly
 85 90 95
 Ser Cys Pro Pro Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ser Asp Ser Glu Arg Ala
 100 105 110
 Cys Ser Pro Thr Pro Thr Thr Asp Ser Pro Pro Pro Gly Asp Thr Leu
 115 120 125
 Thr Ser Thr Ala Ser Thr Ala Thr Ser His His Val Thr Gly Ser Asp
 130 135 140
 Ser Ser Thr Thr Thr Gly Ala Cys Asp Pro Lys Pro Cys Gly Ser Lys
 145 150 155 160
 Ser Ser Thr Ser Arg Ser Arg Arg Ser Arg Arg Arg Thr Ala Arg Gln
 165 170 175
 Arg Trp Leu Ile Thr Leu Pro Ala Arg Phe Arg Ser Leu Arg Thr Arg
 180 185 190
 Arg Thr Asn Cys Arg Thr
 195

[0004]

<210> 5
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒5
 <400> 5

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

Leu Thr Leu Thr Ala Ser Thr Ala Thr Gly Ala Pro Glu Thr Gly Lys
130 135 140

Asp Ser Ser Thr Thr Thr Gly Ala Ser Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser
145 150 155 160

Lys Ser Ser Thr Phe Lys Ser Lys Arg Ser Arg Cys Arg Thr Pro Pro
165 170 175

Pro Pro Ser Pro Thr Thr Ser Pro Pro Pro Ser Lys Cys Leu Arg Thr
180 185 190

Thr Thr Thr Ser Cys Pro Thr Ser Ser Ala Thr Gly Pro Arg Asp Ala
195 200 205

Cys Arg Pro Ser Leu Arg Arg Ser Leu Arg Cys Arg Ser Thr Val Thr
210 215 220

Arg Arg
225

<210> 6
<211> 225
<212> PRT
<213> 腺相关病毒6

<400> 6

[0005]

Ser Ser Arg His Lys Ser Gln Thr Pro Pro Arg Ala Leu Ala Arg Gln
1 5 10 15

Ala Ser Ser Pro Leu Lys Arg Asp Ser Ile Leu Val Arg Leu Ala Thr
20 25 30

Gln Ser Gln Ser Pro Thr His Asn Leu Ser Glu Asn Leu Gln Gln Pro
35 40 45

Pro Leu Leu Trp Asp Leu Leu Gln Trp Leu Gln Ala Val Ala His Gln
50 55 60

Trp Gln Thr Ile Thr Lys Ala Pro Thr Glu Trp Val Met Pro Gln Glu
65 70 75 80

Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp Ala Thr Glu Ser Ser Pro Pro
85 90 95

Ala Pro Glu His Gly Pro Cys Pro Pro Ile Thr Thr Thr Ser Thr Ser
100 105 110

Lys Ser Pro Val Leu Gln Arg Gly Pro Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ser
115 120 125

Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile Leu Ile Ser Thr Asp Ser Thr Ala
130 135 140

Ile Ser His His Val Thr Gly Ser Asp Ser Ser Thr Thr Ile Gly Asp
145 150 155 160

Ser Gly Pro Arg Asp Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ser Lys Ser Arg
165 170 175

Arg Ser Arg Arg Met Met Ala Ser Arg Pro Ser Leu Ile Thr Leu Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Lys Ser Ser Arg Thr Arg Ser Thr Ser Cys Arg Thr Ser
195 200 205

Ser Ala Leu Arg Thr Arg Ala Ala Ser Leu Arg Ser Arg Arg Thr Cys
210 215 220

Ser
225

<210> 7
<211> 226
<212> PRT
<213> 腺相关病毒7

<400> 7

Ser Arg His Leu Ser Val Pro Pro Thr Pro Pro Arg Ala Ser Ala Arg
1 5 10 15

Lys Ala Ser Ser Pro Pro Glu Arg Asp Ser Ile Ser Val Arg Leu Ala
20 25 30

Thr Gln Ser Gln Ser Pro Thr Leu Asn Leu Ser Glu Asn Leu Gln Gln
35 40 45

[0006]

Arg Pro Leu Val Trp Asp Leu Val Gln Trp Leu Gln Ala Val Ala His
50 55 60

Gln Trp Gln Thr Ile Thr Lys Val Pro Thr Glu Trp Val Met Pro Gln
65 70 75 80

Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp Ala Thr Glu Ser Leu Pro
85 90 95

Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Cys Pro Pro Thr Thr Thr Thr Ser Thr
100 105 110

Ser Lys Ser Pro Val Lys Leu Gln Val Val Pro Thr Thr Thr Pro Thr
115 120 125

Ser Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile Leu Thr Leu Thr Asp Ser Thr
130 135 140

Ala Thr Ser His His Val Thr Gly Ser Asp Ser Ser Thr Thr Thr Gly
145 150 155 160

Asp Ser Gly Pro Arg Ser Cys Gly Ser Ser Ser Thr Ser Arg Ser
165 170 175

Arg Arg Ser Arg Arg Met Thr Ala Leu Arg Pro Ser Leu Ile Thr Leu
180 185 190

Pro Ala Arg Phe Arg Tyr Ser Arg Thr Arg Asn Thr Ser Cys Arg Thr

	195	200	205
	Ser Ser Ala Leu Arg Thr Arg Ala Ala Cys Leu Arg Ser Arg Arg Thr 210 215 220		
	Ser Ser 225		
<210>	8		
<211>	227		
<212>	PRT		
<213>	腺相关病毒8		
<400>	8		
	Ser His His Pro Ser Val Leu Gln Thr Pro Leu Arg Ala Ser Ala Arg 1 5 10 15		
	Lys Ala Asn Ser Pro Pro Glu Lys Asp Ser Ile Leu Val Arg Leu Ala 20 25 30		
	Thr Gln Ser Gln Phe Gln Thr Leu Asn Leu Ser Glu Asn Leu Gln Gln 35 40 45		
	Arg Pro Leu Val Trp Asp Leu Ile Gln Trp Leu Gln Ala Val Ala His 50 55 60		
	Gln Trp Gln Thr Ile Thr Lys Ala Pro Thr Glu Trp Val Val Pro Arg 65 70 75 80		
[0007]	Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp Ala Thr Glu Ser Ser Pro 85 90 95		
	Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Cys Pro Pro Thr Thr Thr Thr Ser Thr 100 105 110		
	Ser Lys Ser Pro Thr Gly His Arg Glu Glu Pro Pro Thr Thr Thr Pro 115 120 125		
	Thr Ser Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile Leu Thr Leu Thr Asp Ser 130 135 140		
	Thr Ala Thr Phe His His Val Thr Gly Ser Asp Ser Ser Thr Thr Thr 145 150 155 160		
	Gly Asp Ser Gly Pro Arg Asp Ser Ala Ser Ser Ser Ser Thr Ser Arg 165 170 175		
	Ser Arg Arg Ser Arg Arg Met Lys Ala Pro Arg Pro Ser Pro Ile Thr 180 185 190		
	Ser Pro Ala Pro Ser Arg Cys Leu Arg Thr Arg Ser Thr Ser Cys Arg 195 200 205		
	Thr Phe Ser Ala Leu Pro Thr Arg Ala Ala Cys Leu Arg Ser Arg Arg 210 215 220		
	Thr Cys Ser 225		

<210> 9
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒9

<400> 9

Ser Ser Leu Leu Arg Asn Arg Thr Pro Pro Arg Val Leu Ala Asn Arg
 1 5 10 15

Val His Ser Pro Leu Lys Arg Asp Ser Ile Ser Val Arg Leu Ala Thr
 20 25 30

Gln Ser Gln Ser Gln Thr Leu Asn Gln Ser Glu Asn Leu Pro Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Val Trp Asp Leu Leu Gln Trp Leu Gln Val Val Ala His Gln
 50 55 60

Trp Gln Thr Ile Thr Lys Val Pro Met Glu Trp Val Val Pro Arg Glu
 65 70 75 80

Ile Gly Ile Ala Ile Pro Asn Gly Trp Gly Thr Glu Ser Ser Pro Pro
 85 90 95

Ala Pro Glu Pro Gly Pro Cys Pro Pro Thr Thr Ile Thr Ser Thr Ser
 100 105 110

[0008]

Lys Ser Pro Thr Ala His Leu Glu Asp Leu Gln Met Thr Thr Pro Thr
 115 120 125

Ser Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile Leu Thr Ser Thr Asp Ser Thr
 130 135 140

Ala Thr Ser His His Val Thr Gly Ser Asp Ser Ser Thr Thr Thr Gly
 145 150 155 160

Asp Ser Gly Leu Ser Asp Ser Thr Ser Ser Ser Thr Phe Arg Ser
 165 170 175

Lys Arg Leu Arg Thr Thr Met Glu Ser Arg Pro Ser Pro Ile Thr Leu
 180 185 190

Pro Ala Arg Ser Arg Ser Ser Arg Thr Gln Thr Ile Ser Ser Arg Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Arg Leu Thr Arg Ala Ala Ser Arg Arg Ser Gln Arg Thr
 210 215 220

Phe Ser
 225

<210> 10
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒10

<400> 10

[0009]

Thr Leu Gly Arg Leu Ala Ser Gln Ser Gln Ser Pro Thr Leu Asn Gln
 1 5 10 15
 Ser Glu Asn His Gln Gln Ala Pro Leu Val Trp Asp Leu Val Gln Trp
 20 25 30
 Leu Gln Ala Val Ala Leu Gln Trp Gln Thr Ile Thr Lys Ala Pro Thr
 35 40 45
 Glu Trp Val Val Pro Gln Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp
 50 55 60
 Ala Thr Glu Ser Ser Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Pro Cys Pro Pro
 65 70 75 80
 Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ser Lys Ser Pro Thr Gly His Arg Glu Glu
 85 90 95
 Ala Pro Thr Thr Thr Pro Thr Ser Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile
 100 105 110
 Leu Thr Ser Thr Asp Ser Thr Ala Thr Ser His His Val Thr Gly Ser
 115 120 125
 Asp Ser Ser Thr Thr Thr Gly Asp Ser Gly Gln Lys Asp Ser Ala Ser
 130 135 140
 Ser Ser Ser Thr Ser Arg Ser Arg Arg Ser Arg Arg Met Lys Ala Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ser Pro Ile Thr Leu Pro Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Arg Thr
 165 170 175
 Arg Asn Thr Ser Cys Arg Thr Ser Ser Ala Pro Arg Thr Arg Ala Ala
 180 185 190
 Cys Leu Arg Ser Arg Arg Met Ser Ser
 195 200
 <210> 11
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒11
 <400> 11
 Ser His His Lys Ser Pro Thr Pro Pro Arg Ala Ser Ala Lys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn Asn Gln Pro Glu Arg Gly Ser Thr Leu Lys Arg Thr Leu Glu Pro
 20 25 30
 Glu Thr Asp Pro Leu Lys Asp Gln Ile Pro Ala Pro Cys Leu Gln Thr
 35 40 45
 Leu Lys Cys Val Gln His Arg Ala Glu Met Leu Ser Met Arg Asp Lys
 50 55 60
 Val Pro Met Glu Trp Val Met Pro Arg Val Ile Gly Ile Ala Ile Pro

	65	70	75	80
	Pro Gly Leu Arg Ala Arg Ser Gln Gln Pro Arg Pro Glu Pro Gly Ser	85	90	95
	Cys Pro Pro Thr Thr Thr Thr Cys Thr Cys Val Ser Glu Gln His Gln	100	105	110
	Ala Ala Thr Pro Thr Thr Asp Ser Pro Pro Pro Gly Asp Ile Leu Thr	115	120	125
	Ser Thr Asp Ser Thr Val Thr Ser His His Val Thr Gly Lys Asp Ser	130	135	140
	Ser Thr Thr Thr Gly Asp Tyr Asp Gln Lys Pro Cys Ala Leu Lys Ser	145	150	155
	Ser Ile Ser Lys Leu Arg Arg Ser Gln Arg Arg Thr Ala Arg Leu Arg	165	170	175
	Ser Leu Ile Thr Leu Pro Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Arg Thr Arg Arg	180	185	190
	Met Ser Ser Arg Thr	195		
[0010]	<210> 12			
	<211> 206			
	<212> PRT			
	<213> 腺相关病毒12			
	<400> 12			
	Lys Arg Leu Gln Ile Gly Arg Pro Thr Arg Thr Leu Gly Arg Pro Arg	1	5	10
	Pro Arg Lys Ser Lys Lys Thr Ala Asn Gln Pro Thr Leu Leu Glu Gly	20	25	30
	His Ser Thr Leu Lys Thr Leu Glu Gln Glu Thr Asp Pro Leu Arg Asp	35	40	45
	His Leu Pro Glu Lys Cys Leu Met Met Leu Arg Cys Val Arg Arg Gln	50	55	60
	Ala Glu Met Leu Ser Arg Arg Asp Lys Val Pro Met Glu Trp Val Met	65	70	75
	Pro Pro Val Ile Gly Ile Ala Ile Pro Pro Gly Gln Arg Ala Glu Ser	85	90	95
	Pro Pro Pro Ala Pro Glu Pro Gly Ser Tyr Pro Arg Thr Thr Thr Thr	100	105	110
	Cys Thr Cys Glu Ser Glu Gln Arg Pro Thr Ala Thr Pro Thr Thr Asp	115	120	125
	Ser Pro Pro Pro Gly Asp Thr Leu Thr Leu Thr Ala Ser Thr Ala Thr	130	135	140

	Phe	Pro	His	Ala	Thr	Gly	Ser	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Gly	Asp	Ser	
	145					150					155					160	
	Gly	Arg	Asn	Arg	Cys	Val	Leu	Lys	Ser	Ser	Thr	Tyr	Arg	Ser	Arg	Arg	
					165					170					175		
	Ser	Arg	Arg	Gln	Thr	Ala	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Ile	Thr	Leu	Pro	Ala	
				180					185					190			
	Arg	Phe	Arg	Ser	Leu	Arg	Ile	Arg	Arg	Met	Asn	Ser	His	Thr			
		195						200					205				
	<210>	13															
	<211>	199															
	<212>	PRT															
	<213>	牛腺相关病毒															
	<400>	13															
	Ser	Arg	Val	Leu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Lys	
	1				5					10					15		
	Ala	Asn	Ser	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	Ser	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	
				20				25						30			
	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Pro	Gln	Lys	Asp	His	Leu	Pro	Glu	Leu	Cys	Leu	
		35					40						45				
[0011]	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	Val	Gln	Gln	Leu	Ala	Glu	Met	Val	Ala	Met	Arg	
	50						55					60					
	Asp	Lys	Val	Pro	Arg	Glu	Trp	Val	Met	Pro	Pro	Val	Ile	Gly	Ile	Ala	
	65					70				75						80	
	Ile	Pro	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ser	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Pro	
					85					90					95		
	Gly	Ser	Cys	Arg	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser	Ala	Arg	
				100					105					110			
	Ala	Thr	Pro	Ala	Thr	Pro	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly	Asp	Thr	
		115						120					125				
	Leu	Thr	Leu	Thr	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Arg	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	
		130					135					140					
	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Gly	Asp	Cys	Ala	Pro	Lys	Ala	Cys	Lys	Ser	
	145					150					155					160	
	Ala	Ser	Ser	Thr	Ser	Lys	Leu	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Arg	
					165				170						175		
	Arg	Pro	Tyr	Pro	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Arg	Ser	Arg	Ser	Leu	Arg	Thr	
				180					185					190			
	Ala	Arg	Thr	Ser	Ser	Arg	Thr										
		195															

<210> 14
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> 鸟腺相关病毒ATCC VR-865

<400> 14

Val Lys Pro Ser Ser Arg Pro Lys Arg Gly Phe Ser Asn Pro Leu Val
 1 5 10 15

Trp Trp Lys Thr Gln Arg Arg Leu Arg Pro Glu Thr Ser Gly Lys Ala
 20 25 30

Lys Thr Asn Leu Val Cys Pro Thr Leu Leu His Arg Leu Pro Arg Lys
 35 40 45

Thr Arg Ser Leu Ala Arg Lys Asp Leu Pro Ala Gly Gln Lys Ile Arg
 50 55 60

Ala Lys Ala Pro Leu Pro Thr Leu Glu Gln Gln His Pro Pro Leu Val
 65 70 75 80

Trp Asp His Leu Ser Trp Leu Lys Glu Val Ala Ala Gln Trp Ala Met
 85 90 95

Gln Ala Arg Val Pro Met Glu Trp Ala Ile Pro Pro Glu Ile Gly Ile
 100 105 110

[0012]

Ala Ile Pro Asn Gly Trp Lys Thr Glu Ser Ser Leu Glu Pro Pro Glu
 115 120 125

Pro Gly Ser Cys Pro Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Asn Glu Ser Lys
 130 135 140

Asp Pro Ala Glu Ala Thr Thr Thr Thr Asn Ser Leu Asp Ser Ala Pro
 145 150 155 160

Pro Gly Asp Thr Leu Thr Thr Ile Asp Ser Thr Ala Thr Phe Pro Arg
 165 170 175

Glu Thr Gly Asn Asp Ser Ser Thr Thr Thr Gly Ala Ser Val Pro Lys
 180 185 190

Arg Cys Ala Leu Asp Ser Leu Thr Ser Arg Leu Lys Arg Ser Arg Ser
 195 200 205

Lys Thr Ser Thr Pro Pro Ser Ala Thr Thr Ser Pro Val Arg Ser Arg
 210 215 220

Ser Leu Arg Thr Arg Thr Thr Asn Cys Arg Thr Ser Ser Asp Arg Leu
 225 230 235 240

Pro Lys Ala Pro Ser Arg Arg Ser Gln Arg Ile Ser Thr Arg Ser Arg
 245 250 255

Ser Thr Gly Thr Ala Arg
 260

<210> 15
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 腺相关病毒13

<400> 15

Ile Leu Val Arg Leu Ala Thr Gln Ser Gln Ser Gln Thr Leu Asn His
 1 5 10 15

Ser Asp Asn Leu Pro Gln Pro Pro Leu Val Trp Asp Leu Leu Gln Trp
 20 25 30

Leu Gln Ala Val Ala His Gln Trp Gln Thr Ile Thr Arg Val Pro Met
 35 40 45

Glu Trp Val Ile Pro Gln Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro Asn Gly Trp
 50 55 60

Ala Thr Glu Ser Ser Pro Pro Ala Pro Ala Pro Gly Pro Cys Pro Pro
 65 70 75 80

Thr Thr Ile Thr Ser Thr Ser Lys Ser Pro Ala Asn Gln Glu Pro Pro
 85 90 95

Thr Thr Thr Thr Thr Leu Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Ile Leu Thr
 100 105 110

Ser Thr Asp Ser Thr Ala Thr Phe His His Val Thr Gly Lys Asp Ser
 115 120 125

[0013]

Ser Thr Thr Thr Gly Asp Ser Asp Pro Arg Asp Ser Thr Ser Ser Ser
 130 135 140

Leu Thr Phe Lys Ser Lys Arg Ser Arg Arg Met Thr Val Arg Arg Arg
 145 150 155 160

Leu Pro Ile Thr Leu Pro Ala Arg Phe Arg Cys Leu Leu Thr Pro Ser
 165 170 175

Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Ala Arg Arg Ile Arg Asp Ala Ser Arg
 180 185 190

Arg Ser Gln Gln Thr Ser Ser Trp Ser His Ser Met Asp Thr Ser Pro
 195 200 205

<210> 16
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 小鼠腺相关病毒1

<400> 16

Thr Arg Arg Thr Val Ser Ser Leu Pro Leu Gln Arg Arg Pro Lys Leu
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Pro Pro Pro Ala Ile Trp Asp Leu Val Arg Trp Leu Glu
 20 25 30

Ala Val Ala Arg Gln Ser Thr Thr Ala Arg Met Val Pro Met Glu Trp
 35 40 45

Ala Met Pro Arg Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro His Gly Trp Thr Thr
50 55 60

Val Ser Ser Pro Glu Pro Leu Gly Pro Gly Ile Cys Gln Pro Thr Thr
65 70 75 80

Thr Thr Ser Thr Asn Asp Ser Thr Glu Arg Pro Pro Glu Thr Lys Ala
85 90 95

Thr Ser Asp Ser Ala Pro Pro Gly Asp Thr Leu Thr Ser Thr Ala Ser
100 105 110

Thr Val Ile Ser Pro Leu Glu Thr Gly Lys Asp Ser Ser Thr Ile Thr
115 120 125

Gly Asp Ser Asp Gln Arg Ala Tyr Gly Ser Lys Ser Leu Thr Phe Lys
130 135 140

Leu Lys Lys Ser Arg Arg Lys Thr Gln Arg Arg Ser Ser Pro Ile Thr
145 150 155 160

Leu Pro Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Arg Thr Arg Ser Thr Ser Ser Arg
165 170 175

Thr

[0014]

<210> 17
<211> 240
<212> PRT
<213> 鸟腺相关病毒株DA-1
<400> 17

Leu Asn Asn Pro Thr Thr Arg Pro Gly Pro Gly Arg Ser Val Pro Asn
1 5 10 15

Ala Ser Thr Thr Phe Ser Arg Lys Arg Arg Arg Pro Arg Pro Ser Lys
20 25 30

Ala Lys Pro Leu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Pro Glu Lys Glu Pro Leu
35 40 45

Pro Thr Leu Asp Gln Ala Pro Pro Leu Val Trp Asp His Leu Ser Trp
50 55 60

Leu Lys Glu Val Ala Val Gln Trp Ala Met Gln Ala Lys Val Pro Thr
65 70 75 80

Glu Trp Ala Ile Pro Arg Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro Asn Gly Trp
85 90 95

Thr Thr Glu Ser Leu Pro Glu Pro Leu Glu Pro Gly Ser Cys Pro Ala
100 105 110

Thr Thr Thr Thr Cys Thr Ser Gly Ser Lys Asp Arg Glu Glu Pro Thr
115 120 125

Pro Thr Ile Asn Ser Leu Asp Ser Ala Pro Pro Gly Gly Thr Leu Thr
130 135 140

Thr Thr Asp Ser Thr Ala Thr Ser Pro Pro Glu Thr Gly Asn Asp Ser
145 150 155 160

Ser Thr Thr Thr Gly Ala Ser Asp Pro Lys Arg Cys Ala Leu Asp Ser
165 170 175

Leu Thr Ser Arg Leu Lys Lys Ser Leu Ser Lys Thr Pro Thr Pro Pro
180 185 190

Ser Pro Thr Thr Ser Pro Ala Arg Ser Lys Ser Leu Arg Thr Arg Thr
195 200 205

Thr Ser Cys Arg Thr Ser Ser Asp Arg Leu Gln Arg Ala Pro Ser Arg
210 215 220

Arg Ser Gln Arg Ile Ser Thr Arg Ser Arg Ser Met Val Thr Ala Arg
225 230 235 240

<210> 18
<211> 226
<212> PRT
<213> 公山羊腺相关病毒1分离株腺相关病毒Go. 1

<400> 18

[0015]

Thr Thr Thr Phe Gln Lys Glu Arg Arg Leu Gly Pro Lys Arg Thr Pro
1 5 10 15

Ser Leu Pro Pro Arg Gln Thr Pro Lys Leu Asp Pro Ala Asp Pro Ser
20 25 30

Ser Cys Lys Ser Gln His Asn Gln Pro Gln Val Trp Glu Leu Ile Gln
35 40 45

Cys Leu Arg Glu Val Ala Ala His Trp Ala Thr Ile Thr Lys Val Pro
50 55 60

Met Glu Trp Ala Met Pro Arg Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro Arg Gly
65 70 75 80

Trp Gly Thr Glu Ser Ser Pro Ser Pro Pro Ala Pro Gly Cys Cys Pro
85 90 95

Ala Thr Thr Thr Thr Ser Thr Glu Arg Ser Lys Ala Ala Pro Ser Thr
100 105 110

Glu Ala Thr Pro Thr Pro Thr Leu Asp Thr Ala Pro Pro Gly Gly Thr
115 120 125

Leu Thr Leu Thr Ala Ser Thr Ala Thr Gly Ala Pro Glu Thr Gly Lys
130 135 140

Asp Ser Ser Thr Thr Ile Gly Ala Ser Asp Pro Gly Leu Ser Glu Ser
145 150 155 160

Lys Ser Ser Thr Ser Lys Ser Lys Arg Ser Arg Cys Arg Thr Pro Pro
 165 170 175

Pro Pro Ser Pro Thr Thr Ser Pro Pro Pro Ser Lys Cys Leu Arg Thr
 180 185 190

Thr Thr Thr Asn Ser Arg Thr Ser Ser Ala Thr Gly Pro Arg Asp Ala
 195 200 205

Cys Arg Pro Ser Pro Arg Arg Ser Leu Arg Cys Arg Ser Thr Ala Thr
 210 215 220

Arg Arg
 225

<210> 19
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 大鼠腺相关病毒1

<400> 19

Ala Ser Arg Ser Arg Ser Trp Leu Leu Gln Ser Ser Val His Thr Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Lys Pro Gln Arg Thr Arg Arg Val Ser Arg Asp Arg Ile Pro
 20 25 30

Gly Arg Arg Pro Arg Arg Gly Ser Ser Ser Pro Ile Ser Leu Asp Leu
 35 40 45

[0016]

Gln Gln Thr Tyr Leu His Pro His Asn Ser Pro Ser Leu Pro Gln Gly
 50 55 60

Phe Pro Val Trp Phe Leu Val Arg Cys Leu Gln Glu Glu Ala Leu Gln
 65 70 75 80

Trp Thr Met Leu Asn Lys Val Pro Thr Glu Trp Ala Met Pro Arg Glu
 85 90 95

Ile Gly Ile Ala Ile Pro Asn Gly Trp Ala Thr Glu Phe Ser Pro Asp
 100 105 110

Pro Pro Gly Pro Gly Cys Cys Pro Ala Thr Thr Thr Thr Cys Thr Ser
 115 120 125

Arg Ser Gln Thr Pro Pro Ala Cys Thr Ala Ser Pro Gly Ala Asp Thr
 130 135 140

Leu Ala Thr Ala Pro Pro Gly Gly Thr Ser Thr Ser Ile Ala Ser Thr
 145 150 155 160

Ala Thr Ser Arg Pro Glu Thr Gly Ser Ala Ser Ser Ile Thr Thr Gly
 165 170 175

Ala Ser Asp Pro Arg Asp Cys Glu Ser Asn Ser Ser Thr Ser Arg Ser
 180 185 190

Arg Arg Ser Arg Leu Leu Ile Arg Arg Pro Arg Ser Pro Thr Thr Ser

	195	200	205
	Arg Ala Arg Ser Arg Ser	Ser Gln Thr Thr Ser	Thr Ser Cys Arg Thr
	210	215	220
	Ser Ala Ala Thr Pro Pro	Arg Asp Ala Cys Arg	Arg Ser Pro Arg Thr
	225	230	235 240
	Ser Ser Arg Cys Arg Ser	Thr Ala Thr Arg Arg	
	245	250	
<210>	20		
<211>	212		
<212>	PRT		
<213>	鹅细小病毒株DB3		
<400>	20		
	Lys Thr Glu Glu Pro Pro	Arg Arg Ala Pro Asn	Leu Trp Gln His Leu
	1	5	10 15
	Lys Trp Gln Arg Glu Glu	Ala Glu Leu Trp Ala	Thr Leu Gln Gly Val
	20	25	30
	Pro Met Glu Trp Val Met	Pro Arg Glu Ile Gly	Ile Ala Ile Pro Asn
	35	40	45
	Gly Trp Glu Thr Gln Ser	Ser Gln Arg Pro Pro	Glu Pro Gly Ser Cys
	50	55	60
[0017]	Gln Ala Thr Thr Thr	Thr Ser Thr Lys Gln	Leu Pro Val Glu Pro Leu
	65	70	75 80
	Lys Met Gln Met Ser Ser	Met Gln Asp Thr Val	Pro Pro Gly Gly Thr
	85	90	95
	Leu Ile Ser Thr Ala Ser	Thr Ala Thr Ser Pro	Leu Glu Thr Gly Arg
	100	105	110
	Asp Leu Ser Thr Thr	Ile Gly Glu Ser Asp	Pro Asn Leu Leu Asn Ser
	115	120	125
	Arg Ser Ser Met Ser Lys	Ser Lys Lys Ser Gln	Arg Arg Ile Lys Gln
	130	135	140
	Arg Pro Leu Gln Thr	Ile Ser Pro Gln Arg	Phe Lys Ser Leu Arg Met
	145	150	155 160
	Met Ser Ile Asn Ser Arg	Met Ser Trp Ala Arg	Leu Arg Lys Ala Pro
	165	170	175
	Cys Arg Arg Ser Arg	Arg Met Ser Met Pro	Cys Arg Ser Thr Gly Thr
	180	185	190
	Ala Gln Cys Thr Pro	Thr Arg Met Glu His	Gly Ser Met Thr Val Val
	195	200	205
	His Ser Thr Ala		
	210		

<210> 21
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> 鸭细小病毒株90-0219

<400> 21

Lys Ser Leu Asn Tyr Leu Lys Lys Thr Leu Leu His Pro Val Ile Val
 1 5 10 15

Glu Glu Lys Gln Val Gln Leu Pro Pro Lys Ala Pro Asn Leu Trp Gln
 20 25 30

His Leu Thr Trp Gln Arg Glu Glu Ala Glu Leu Trp Ala Thr Leu Gln
 35 40 45

Gly Val Pro Met Glu Trp Val Met Pro Gln Glu Ile Gly Ile Ala Ile
 50 55 60

Pro Asn Gly Trp Glu Thr Gln Ser Leu Pro Arg Leu Gln Glu Pro Gly
 65 70 75 80

Ser Cys Gln Ala Thr Thr Thr Thr Ser Thr Lys Pro Ser Gln Ala Glu
 85 90 95

Gln Thr Gln Thr Gln Ile Pro Asn Met Leu Asp Thr Ala Pro Pro Gly
 100 105 110

[0018]

Gly Thr Leu Ile Ser Thr Asp Ser Thr Ala Ile Ser Leu Gln Glu Thr
 115 120 125

Gly Arg Asp Ser Ser Thr Thr Ile Gly Gly Leu Asp Arg Lys His Ser
 130 135 140

Asn Ser Arg Tyr Ser Met Cys Lys Leu Lys Lys Ser Arg Arg Lys Thr
 145 150 155 160

Arg Gln Arg Leu Leu Leu Thr Thr Leu Pro Leu Gln Ser Arg Tyr Ser
 165 170 175

Arg Ile Met Asn Thr Ser Cys Pro Met Phe Trp Ala Arg Pro Arg Arg
 180 185 190

Gly Arg Cys His Arg Ser Pro Gln Met Cys Met Pro Cys Pro Ser Thr
 195 200 205

Ala Thr Ala Gln Cys Thr Pro Thr Arg Val Glu Leu Asp Ser Met Thr
 210 215 220

Glu Val Pro Ser Ile Ala
 225 230

<210> 22
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> 蛇细小病毒1

<400> 22

	Thr Asn Thr Ile Leu Lys Leu Lys Arg Pro Asn Lys Ala Cys Arg Tyr	
	1 5 10 15	
	Gln Leu His Leu Lys Ala Glu Lys Lys Lys Leu His Arg His Asn Leu	
	20 25 30	
	Glu Gly Ala Gln Gln Val Pro Ile Leu Ala Ala His Leu Ser Trp Leu	
	35 40 45	
	Gln Glu Glu Ala Val Arg Trp Gln Thr Ile Thr Arg Ala Pro Arg Glu	
	50 55 60	
	Trp Val Ile Pro Gln Val Ile Gly Ile Ala Ile Pro Ser Gly Trp Glu	
	65 70 75 80	
	Thr Thr Ser Leu Gln Ser Gln Pro Glu Leu Gly Cys Ser Pro Leu Thr	
	85 90 95	
	Gly Ile Ile Ser Thr Gly Leu Ser Thr Leu Thr Ala Pro Gln Val Arg	
	100 105 110	
	Val Leu Met Gln Pro Met Gln Asp Thr Arg Leu Pro Gly Gly Thr Leu	
	115 120 125	
	Thr Ser Ile Asp Ser Ile Ala Thr Ser Pro Pro Glu Thr Gly Lys Asp	
	130 135 140	
[0019]	Ser Ser Thr Thr Thr Gln Ala Ser Gly Arg Lys Asp Ser Lys Ser Lys	
	145 150 155 160	
	Ser Leu Thr Ser Lys Ser Lys Lys Leu Gln His Lys Ile Gln Arg Lys	
	165 170 175	
	Gln Leu Pro Thr Ile Ser Pro Ala Pro Tyr Arg Ser Leu Arg Thr Arg	
	180 185 190	
	Thr Thr Thr Tyr His Met Tyr	
	195	
	<210> 23	
	<211> 627	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒2	
	<400> 23	
	at tt t g g t c a g a c t g g a g a c g c a g a c t c a g t a c c t g a c c c c a g c c t c t c g g a c a g c c a c	60
	c a g c a g c c c c c t c t g g t c t g g g a a c t a a t a c g a t g g e t a c a g g c a g t g g c g c a c c a a t g g	120
	c a g a c a a t a a c g a g g g c g c c g a c g g a g t g g g t a a t t c c t c g g g a a a t t g g c a t t g c g a t t	180
	c c a c a t g g a t g g g c g a c a g a g t c a t c a c c a c c a g c a c c c g a a c c t g g g c c c t g c c c a c c t	240
	a c a a c a a c c a c c t c t a c a a a c a a a t t t c c a g c c a a t c a g g a g c c t c g a a c g a c a a t c a c t	300
	a c t t t g g c t a c a g c a c c c c t t g g g g t a t t t t g a c t t c a a c a g a t t c a c t g c c a c t t t t	360
	c a c c a c g t g a c t g g c a a a g a c t c a t c a a c a a c a a c t g g g a t t c c g a c c c a a g a g a c t c a	420
	a c t t c a a g c t c t t t a c a t t c a a g t c a a a g a g g t c a g c a g a t g a c g g t a c g a c g a c g a	480
	t t g c c a a t a a c c t t a c c a g c a c g g t t c a g g t g t t t a c t g a c t c g g a g t a c c a g t c c c g t	540

	acgtcctcgg ctcggcgcat caaggatgcc tcccgccgtt cccagcagac gtcttcatgg	600
	tgccacagta tggatacctc accctga	627
	<210> 24	
	<211> 678	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒1	
	<400> 24	
	agcagtcgcc acaagagcca gactcctcct cgggcacatgg caagacaggc cagcagcccg	60
	ctaaaaagag actcaatttt ggtagacttg gcgactcaga gtcagtcccc gatccacaac	120
	ctctcggaga acctccagca acccccgtg ctgtgggacc tactacaatg gcttcaggcg	180
	gtggcgacac aatggcagac aataacgaag gcgccgacgg agtgggtaat gcctcaggaa	240
	attggcattg cgattccaca tggctgggag acagagtcac caccaccagc acccgcacct	300
	gggccttgcc cacctacaat aaccacctct acaagcaaat ctccagtgtc tcaacggggg	360
	ccagcaacga caaccactac ttgggtaca gacccccctg ggggtatttt gatttcaaca	420
	gattccactg ccacttttca ccacgtgact ggcagcgact catcaacaac aattggggat	480
	tccggcccaa gagactcaac ttcaaacctt tcaacatcca agtcaaggag gtcacgacga	540
	atgatggcgt cacaaccatc gctaataacc ttaccagcac ggttcaagtc ttctcggact	600
	cggagtacca gttccgtac gtctcgggt ctgcgcacca gggtgcctc cctccgttcc	660
	cgccggacgt gtccatga	678
[0020]	<210> 25	
	<211> 627	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒3	
	<400> 25	
	atttcggtea gactggcgac tcagagtcag tcccagacc tcaacctctc ggagaaccac	60
	cagcagcccc cacaagtttg ggatctaata caatggcttc aggcgggtggc gcaccaatgg	120
	cagacaataa cgagggtgcc gatggagtgg gtaattctc aggaaattgg cattgcgatt	180
	cccaatgget gggcgacaga gtcacacca ccagcaccag aacctgggac ctgccactt	240
	acaacaacca tctctacaag caaatctcca gccaatcagg agcttcaaac gacaaccact	300
	actttggcta cagcacccct tgggggtatt ttgactttaa cagattccac tgccacttct	360
	caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg attccggccc aagaaactca	420
	gcttcaagct cttaacatc caagttaaag aggtcacgca gaacgatggc acgacgacta	480
	ttgccaataa ccttaccage acggttcaag tgtttacgga ctggagtat cagctccgt	540
	acgtgctcgg gtcggcgac caagctgtc tcccgccgtt tccagcggac gtcttcatgg	600
	tccctcagta tggatacctc accctga	627
	<210> 26	
	<211> 597	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒4	
	<400> 26	
	ttgaatcccc ccagcagccc gactcctcca cgggtatcgg caaaaaaggc aagcagccgg	60
	ctaaaaagaa gctcgttttc gaagacgaaa ctggagcagg cgacggacce cctgagggat	120
	caacttccgg agccatgtct gatgacagtg agatgcgtgc agcagctggc ggagctgcag	180

	tcgagggcgg acaaggtgcc gatggagtgg gtaatgcctc gggtgattgg cattgcgatt	240
	ccacctggtc tgagggccac gtcacgacca ccagcaccag aacctgggtc ttgccacac	300
	acaacaacca cctctacaag cgactcggag agagcctgca gtccaacacc tacaacggat	360
	tctccacccc ctggggatac ttgacttca accgcttcca ctgccacttc tcaccacgtg	420
	actggcagcg actcatcaac aacaactggg gcatgcgacc caaagccatg cgggtcaaaa	480
	tcttcaacat ccaggtcaag gaggtcacga cgtcgaacgg cgagacaacg gtggctaata	540
	acettaccag cacggttcag atctttgcgg actcgtcgta cgaactgccg tacgtga	597
	<210> 27	
	<211> 681	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒5	
	<400> 27	
	acgaccactt tccaaaaaga aagaaggctc ggaccgaaga ggactccaag ccttccacct	60
	cgtcagacgc cgaagctgga ccagcggat ccagcagct gcaaatccca gccaaccag	120
	cctcaagttt gggagctgat acaatgtctg cgggaggtgg cggccattg ggcgacaata	180
	accaaggtgc cgatggagtg ggcaatgcct cgggagattg gcattcgat tccacgtgga	240
	tgggggacag agtcgtcacc aagtccacc gaacctgggt gctgccaccg tacaacaacc	300
	accagtaccg agagatcaaa agcggctccg tcgacggaag caacgccaac gcctactttg	360
	gatacagcac cccctggggg tactttgact ttaaccgctt ccacagccac tggagccccc	420
	gagactggca aagactcatc aacaactact ggggcttcag accccggtcc ctacagagtc	480
[0021]	aaatcttcaa cattcaagtc aaagaggta cgtgcagga ctccaccacc accatcgcca	540
	acaacctcac ctccaccgtc caagtgttta cggacgacga ctaccagctg ccctacgtcg	600
	tcggcaacgg gaccgagga tgccctcccg ccttccctcc gcaggtcttt acgtgccgc	660
	agtacggtta cgcgacgtg a	681
	<210> 28	
	<211> 678	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒6	
	<400> 28	
	agcagtcgcc acaagagcca gactcctect cgggcattgg caagacaggc cagcagcccg	60
	ctaaaaagag actcaatttt ggteagactg gcgactcaga gtcagtcccc gaccacaac	120
	ctctcgaga acctccagca acccccgtg ctgtgggacc tactacaatg gcttcaggcg	180
	gtggcgacc aatggcagac aataacgaag gcgccgacgg agtgggtaat gcctcaggaa	240
	attggcattg cgattccaca tggtggggcg acagagtcac caccaccagc accggaacat	300
	gggccttgcc cactataac aaccacctct acaagcaaata ctccagtgt tcaacggggg	360
	ccagcaacga caacctact ttggtctaca gcacccctg ggggtatttt gatttcaaca	420
	gattccactg ccatttctca ccacgtgact ggcagcgact catcaacaac aattggggat	480
	tccggcccaa gagactcaac ttcaagctct tcaacatcca agtcaaggag gtcacgacga	540
	atgatggcgt cagcaccatc gctaataacc ttaccagcac ggttcaagtc ttctcgact	600
	cggagtacca gttgccgtac gtccctggct ctgcgcacca gggtgcctc cctccgttcc	660
	cggcggacgt gttcatga	678

<210> 29
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> 腺相关病毒7

<400> 29
 agccgtcacc tcagcgttcc cccgactcct ccacgggcat cggcaagaaa ggccagcagc 60
 ccgccagaaa gagactcaat ttcggtcaga ctggcgactc agagtcagtc cccgaccctc 120
 aacctctcgg agaacctcca gcagcgccct ctagtgtggg atctggtaca gtggctgcag 180
 gcggtggcgc accaatggca gacaataacg aagggtccga cggagtgggt aatgcctcag 240
 gaaattggca ttgcgattcc acatggctgg gcgacagagt cattaccacc agcacccgaa 300
 cctgggcccct gccacctac aacaaccacc tctacaagca aatctccagt gaaactgcag 360
 gtagtaccaa cgacaacacc tacttggct acagacccc ctgggggtat ttgacttta 420
 acagattcca ctgccacttc tcaccacgtg actggcagcg actcatcaac aacaactggg 480
 gattccggcc caagaagctg cggttcaagc tctcaacat ccaggtaag gaggtcagc 540
 cgaatgacgg cgttacgacc atcgctaata acctaccag cagattcag gtattctcgg 600
 actcggaata ccagctgcg tacgtcctcg gctctgcga ccagggtgc ctgcctcgt 660
 tcccggcgga cgtcttcattg a 681

<210> 30
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> 腺相关病毒8

[0022] <400> 30
 agccatcacc ccagcgttct ccagactcct ctacgggcat cggcaagaaa ggccaacagc 60
 ccgccagaaa aagactcaat ttggtcaga ctggcgactc agagtcagtt ccagaccctc 120
 aacctctcgg agaacctcca gcagcgccct ctggtgtggg acctaatata atggctgcag 180
 gcggtggcgc accaatggca gacaataacg aaggcgccga cggagtgggt agttcctcgg 240
 gaaattggca ttgcgattcc acatggctgg gcgacagagt catcaccacc agcacccgaa 300
 cctgggcccct gccacctac aacaaccacc tctacaagca aatctccaac gggacatcgg 360
 gaggagccac caacgacaac acctacttcg gctacagcac cccctggggg tattttgact 420
 ttaacagatt ccaactgccac ttttcaccac gtgactggca gcgactcatc aacaacaact 480
 ggggattccg gcccaagaga ctacgttca agctcttcaa catccagtc aaggaggta 540
 cgagaatga aggcaccaag acctcgcca ataacctcac cagcaccatc cagggtgtta 600
 cggactcgga gtaccagctg ccgtacgttc tcggctctgc ccaccagggc tgcctgcctc 660
 cgttcccggc ggacgtgttc atga 684

<210> 31
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> 腺相关病毒9

<400> 31
 agcagtcctc tcaggaaccg gactcctccg cgggtattgg caaatcgggt gcacagcccg 60
 ctaaaaagag actcaatttc ggtagactg gcgacacaga gtcagtecca gacctcaac 120
 caatcgaga acctcccga gccccctcag gtgtgggac tcttacaatg gcttcaggtg 180

	gtggcgccac agtggcagac aataacgaag gtgccgatgg agtgggtagt tctcgggaa	240
	attggcattg cgattcccaa tggctggggg acagagtcac caccaccagc acccgaaact	300
	gggcccctgcc caccataaac aatcacctct acaagcaaat ctccaacagc acatctggag	360
	gatcttcaaa tgacaacgcc tacttcggct acagcaccac ctgggggtat ttgacttca	420
	acagattcca ctgccacttc tcaccacgtg actggcagcg actcatcaac aacaactggg	480
	gattccggcc taagegactc aactteaage tcttcaacat tcaggtaaaa gaggttacgg	540
	acaacaatgg agtcaagacc atcgccaata acctaccag cagggtccag gtcttcacgg	600
	actcagacta tcagctcccg tacgtgctcg ggctggctca cgagggtgc ctcccgcgt	660
	tcccagcgga cgttttcatg a	681
	<210> 32	
	<211> 606	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒10	
	<400> 32	
	actttgggca gactggcgag tcagagtcag tccccgacc tcaaccaatc ggagaaccac	60
	cagcaggccc ctctggctcg ggatctggta caatggctgc aggcgggtgc gctccaatgg	120
	cagacaataa cgaaggcgcc gacggagtgg gtagttctc aggaaattgg cattgcgatt	180
	ccacatggct gggcgacaga gtcacacca ccagcacccg aacctgggcc ctgcccacct	240
	acaacaacca cctctacaag caaatctcca acgggacatc gggaggaagc accaacgaca	300
	acacctactt cggctacagc accccctggg ggtattttga cttcaacaga ttccactgcc	360
[0023]	acttctcacc acgtgactgg cagcgactca tcaacaacaa ctggggattc cgcccaaaaa	420
	gactcagctt caagctcttc aacatccagg tcaaggaggt cagcagaat gaaggacca	480
	agaccatcgc caataacctt accagcacga ttcaggtatt tacggactcg gaataccagc	540
	tgcgtagctt cctcggtccc gcgcaccagg gctgcctgcc tccgttcccg gcggatgtct	600
	tcatga	606
	<210> 33	
	<211> 594	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒 11	
	<400> 33	
	agtcaccaca agagcccagc tctctctcgg gcatcggcaa aaaaggcaaa caaccagcca	60
	gaaagaggct caactttgaa gaggacactg gagccggaga cggaccccct gaaggatcag	120
	ataccagcgc catgtcttca gacattgaaa tgcgtgcagc accgggcgga aatgctgtcg	180
	atgcgggaca aggttcgat ggagtgggta atgcctcggg tgattggcat tgcgattcca	240
	cctggctcga gggcaaggct acaacaacct cgaccagaac ctgggtcttg cccacctaca	300
	acaaccactt gtacctgcgt ctcggaacaa catcaagcag caacacctac aacggattct	360
	ccaccccctg gggatatattt gacttcaaca gattccactg tcacttctca ccactgact	420
	ggcaagact catcaacaac aactggggac tacgacaaa agccatgcgc gttaaaatct	480
	tcaatatcca agttaaggag gtcacaacgt cgaacggcga gactacggtc gctaataacc	540
	ttaccagcac ggttcagata ttgcggact cgtcgtatga gctcccgtaac gtga	594
	<210> 34	

<211>	621	
<212>	DNA	
<213>	腺相关病毒12	
<400>	34	
	aaaagactcc aaatcggccg accaaccgga actctgggaa ggccccggcc aagaaaaagc	60
	aaaaagacgg cgaaccagcc gactctgcta gaaggacact cgactttgaa gactctggag	120
	caggagacgg accccctgag ggatcatctt cggagaaaat gtctcatgat gctgagatgc	180
	gtgcggcgcc aggcggaaat gctgtcgagg cgggacaagg tgccgatgga gtgggtaatg	240
	cctccggtag ttggcattgc gattccacct ggtagaggc ccgagtcacc accaccagca	300
	cccgaacctg ggtcctaccc acgtacaaca accacctgta cctgcgaatc ggaacaacgg	360
	ccaacagcaa cacctacaac ggattctcca ccccctgggg atactttgac tttaaccgct	420
	tccactgcca cttttcccca cgcgactggc agcgactcat caacaacaac tggggactca	480
	ggccgaatc gatgctgtt aaaatcttca acatacaggt caaggaggtc acgacgtcaa	540
	acggcgagac tacggctgct aataacctta ccagcacggt tcagatcttt gcggattcga	600
	cgtatgaact ccatacgtg a	621
<210>	35	
<211>	600	
<212>	DNA	
<213>	牛腺相关病毒	
<400>	35	
	agcagagtcc tcaagagcca gactcctcga gcggagttag caagaaaggc aaacagcctg	60
	ccagaaagag actcaacttt gacgacgaac ctggagccgg agacgggcct cccccaagag	120
[0024]	gaccatcttc cggagctatg tctactgaga ctgaaatgcg tgcagcagct ggcggaaatg	180
	gtggcgatgc gggacaaggt cccgagggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgcg	240
	attccacttg gtcagagagc cagtcacca ccacctcaac ccgcacctgg gtctgtccga	300
	cctacaacaa ccacctgtac ctgcggctcg gctcgagcaa cggcagcgac accttaacg	360
	gattctccac cccctgggga tactttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttctcgccaa	420
	gagactgcea aaggctcacc aacaacctt ggggactgcg ccccaaaagc atgcaagtcc	480
	gcatcttcaa catccaagtt aaggaggta cgacgtctaa cggggagacg accgtatcca	540
	acaacctcac cagcacggtc cagatctttg cggacagcac gtacgagctc ccgtacgtga	600
<210>	36	
<211>	789	
<212>	DNA	
<213>	鸟腺相关病毒ATCC VR-865	
<400>	36	
	gtaaagccat cttccaggcc aaaaagaggg ttctcgaacc ctttggtctg gtggaagact	60
	caaagacggc tccgaccgga gacaagcgga aaggcgaaga cgaacctcgt ttccccgaca	120
	ctttttcaca gactcccaag aaaaacaaga agcctcgaa ggaaagacct tccggcgggg	180
	cagaagatcc gggcgaaggc accttttcca acgtggagc agcagcaccg gcctctagt	240
	tgggatcacc tatcatggct gaaggagggt gcggcccagt gggcgatgca ggccagggtg	300
	ccgatggagt gggcaattcc tccgaaatt ggcatgcca ttcccaatgg ctgaaaacg	360
	gagtcgtcac tcgaaccacc cgaacctggg tcttgcccag ctacaacaac cacctgtaca	420
	aacgaatcca aggaccagc ggaggcgaca acaacaacaa attctttgga ttcagacccc	480

	cctggggata ctttgactac aatcgattcc actgccactt ttccccgcga gactggcaac	540
	gactcatcaa caacaactgg ggcatccgtc ccaaagcgat gcgcittaga ctctttaaca	600
	tccagggttaa agagggtcac gtccaagact tcaacaccac catcggaac aacctacca	660
	gtacgggtcca ggtctttgcg gacaaggact accaactgcc gtacgtcttc ggatcggtta	720
	ccgaaggcac cttccccgcg ttcccagcgg atatctacac gatccccgag tacgggtact	780
	gcacgctaa	789
	<210> 37	
	<211> 627	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒13	
	<400> 37	
	attttggtca gactggcgac acagagtcag tcccagaccc tcaaccactc ggacaacctc	60
	ccgcagcccc ctctgggtgtg ggatctacta caatggcttc aggcgggtggc gcaccaatgg	120
	cagacaataa cgagggtgcc gatggagtgg gtaattcttc aggaaattgg cattgcgatt	180
	cccaatggct gggcgacaga gtcatcacca ccagcaccgc cactgggcc ctgcccacct	240
	acaacaatca cctctacaag caaatctcca gccaatcagg agccaccaac gacaaccact	300
	actttggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccactttt	360
	caccacgtga ctggcaaaga ctcatcaaca acaactgggg attccgaccc aagagactca	420
	acttcaagct ctttaacatt caagtcaaag aggtcacgca gaatgacggt acgacgacga	480
	ttgccaataa ccttaccagc acggttcagg tgtttactga ctccgagtac cagctcccg	540
[0025]	acgtcctcgg ctcgccgcac cagggtatgc tcccgcggtt cccagcagac gtcttcatgg	600
	tcccacagta tggatacttc accctga	627
	<210> 38	
	<211> 534	
	<212> DNA	
	<213> 小鼠腺相关病毒1	
	<400> 38	
	acgaggagga ccgtgagttc gctgccgtg cagcggagac cgaaactgga agcgtcccc	60
	ccaccggcaa tttgggacct ggtacgatgg ctggaggcgg tagcgcgcca atcgacgacg	120
	gctcgtatgg tgccgatgga tggggcaatg cctcgggaga ttggcattgc gattccacat	180
	ggctggacaa ctgtgtcatc acccgaaaca ctcgacctg gaatctgcca acctacaaca	240
	accacatcta caaacgactc aacggaacga cctccggaga ccaaagctac ttcggattca	300
	gcacccccctg gggatacttt gacttcaacc gcttccactg tcatttctcc cctcgagact	360
	ggcaaagact catcaacaat aactggggac tccgacaaa gagcctacgg ttcaaaatct	420
	ttaacattca agttaagaa gtcacgacgc aagactcaac gaagatcatc tccaataacc	480
	ttaccagcac gggtcaggta ttgcggaca cggagtacca gctcccgtag gtga	534
	<210> 39	
	<211> 723	
	<212> DNA	
	<213> 鸟腺相关病毒株DA-1	
	<400> 39	
	ttgaacaacc cgacaacacg gccgggaccg gggagaagcg tcccgaacgc gtcgacgact	60

	ttttcccgaa aaagaagaag gccaaagaccg agcaaggcaa agccccctgct caaacgggcg	120
	aagaccccgga agaaggaacc ttttccaacg ctggatcaag cgccccctct agtgtgggat	180
	catctgtcat ggctgaagga ggtggcggtc caatgggcga tgcaggccaa ggtgccgacg	240
	gagtgggcaa ttctcggga aattggcatt gcgattccca atggctggac aacggagtcg	300
	ttacccgaac cactcgaacc tgggtcctgc ccagctacaa caaccacttg tacaagcgga	360
	tccaaggacc gggaggaacc gacccaaca ataaattctt tggattcagc accccctggg	420
	ggtactttga ctacaaccga ttccactgcc acttctcccc ccgagactgg caacgactca	480
	tcaacaacaa ctggggcacc cgacccaaag cgatgcgctt tagactcttt aacatccagg	540
	ttaaagaagt cactgtccaa gactccaaca ccaccatgc caacaacctc accagcacgg	600
	tccaagtctt tgcggacaag gactaccagc tgccgtacgt cctcggatcg gctacagagg	660
	gcaccttccc gccgttccca gcggatatct acacgatccc gcagtatggt tactgcacgc	720
	taa	723
	<210> 40	
	<211> 581	
	<212> DNA	
	<213> 山羊腺相关病毒1分离株腺相关病毒Go. 1	
	<400> 40	
	acgaccactt tcaaaaaaga aagaaggctc ggaccgaaga ggactccaag ctttccacct	60
	cgtcagacgc cgaagctgga cccagcggat cccagcagct gcaaatccca gcacaaccag	120
	cctcaagttt gggagctgat acaatgtctg cgggaggttg cggccattg ggcgacaata	180
[0026]	accaaggtgc cgatggagtg ggcaatgcct cgggagattg gcattgcgat tccacgtgga	240
	tgggggacag agtcgtcacc aagtccacc gcacctgggt gctgcccagc tacaacaacc	300
	accagtaccg agagatcaaa agcggctccg tcgacggaag caacgccaac gcctactttg	360
	gatacagcac cccctggggg tactttgact ttaaccgctt ccacagccac tggagccccc	420
	gagactggca aagactcatc aacaactatt ggggcttcag accccggtct ctcagagtca	480
	aaatcttcaa catccaagtc aaagaggtca cggtcagga ctccaccacc accatcgcca	540
	acaacctcac ctccaccgtc caagtgttta cggacgacga c	581
	<210> 41	
	<211> 756	
	<212> DNA	
	<213> 大鼠腺相关病毒1	
	<400> 41	
	gcgtcgagga gccggagctg gctctctcag tcaagcgtcc acactcggcc gagaaaacc	60
	cagagaacca gaagggtcag ccgcgaccgg atccccggac gccggccaag aagaggctcg	120
	agttctccga tcagcctgga tcttcagcag acttacctgc atctcaca cagtcccagc	180
	ctcccgagg ggttcccggt gtggttctg gtacgatgc tgcaggagga ggcgtccag	240
	tggacgatgc tcaacaaggt gccgacggag tgggcaatgc ctccggagat tggcattgcg	300
	attccaaatg gctgggcaac cgagttctca ccgatccac ccggacctgg gtgctgcca	360
	gctacaacaa ccacctgtac aagcagatct cagacgcctc cggcgtgcac agcctccccg	420
	ggagccgata ctttggctac agcaccctt ggggttactt cgacttcaat cgcttccact	480
	gccacttctc gccagagac tggcagcgcc tcgtcaataa ccactggggc ttccgacca	540

agagactgcg agtcaaactc ttcaacatcc aggtcaagga ggtcacgact actgattcga 600
 cgaccacggt ctccaacaac ctacagagca cggteccaggt cttcacagac gacgagtiacc 660
 agctgccgta cgtctgcggc aacgccaccg agggatgcct gccgcggttc cccccggacg 720
 tcttcacgct gccgcagtac ggctacgcga cgctga 756

<210> 42
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 鹅细小病毒株DB3

<400> 42
 aagacggagg agccaccgcg gagggcaccg aacctgtggc agcatctgaa atggcagagg 60
 gaggaggcgg agctatgggc gactcttcag ggggtgccga tggagtgggt aatgcctcgg 120
 gaaattggca ttgcgattcc caatggatgg gaaacacagt catcacaag accaccagaa 180
 cctgggtcct gccaaagctac aacaaccaca tctacaaagc aattaccagt ggaacctctc 240
 aagatgcaaa tgtccagtat gcaggatata gtacccctg ggggtacttt gatttcaacc 300
 gcttccactg ccacttctcc cctagagact ggcagagact tatcaacaac cattggggaa 360
 tccgacccaa atctcttaaa ttcaagatct tcaatgtcca agtcaaagaa gtcacaacgc 420
 aggatcaaac aaagaccatt gcaacaatc tcacctcaac gattcaagtc ttacggatg 480
 atagcatca actcctgtat gtcttgggtc cggtacgga aggcaccatg ccgccgttcc 540
 cgtcggatgt ctatgccctg ccgcagtacg ggtactgcac aatgcacacc aaccagaatg 600
 gagcacgggt caatgaccgt agtgcattct actgcttag 639

[0027]

<210> 43
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> 鸭细小病毒株90-0219

<400> 43
 aaaagcctaa attatctgaa gaaaactctc cttcacccag taatagtgga ggagaagcaa 60
 gtgcagctgc caccgaagcg tccgaacctg tggcagcacc taacatggca gagggaggaa 120
 gccgagctat gggcgactct gcaggggtg ccgatggagt gggtaatgcc tcaggaaatt 180
 ggcatctgca ttcccaatgg ctgggagaca cagtcatcac caagactaca agaacctggg 240
 tcttgccaag ctacaacaac cacatctaca aagccatcac aagcgaaca aaccagaca 300
 caaataccca atatgttgga tacagcacc cctgggggta ctttgatttc aacagattcc 360
 actgccattt ctctccaaga gactggcaga gactcatcaa caaccattgg gggattagac 420
 cgaaagcact caaattcaag atattcaatg tgcaagttaa agaagtcacg acgcaagacc 480
 agacaaagac tattgtaac aaccttacct ctacaateca gatattcacg gataatgaac 540
 accagctgcc ctatgttctg ggctcggcca cggaggggac gatgccaccg ttccccctcag 600
 atgtgtatgc cttgccccag tacggctact gcacaatgca caccaaccag agtggageta 660
 gattcaatga cagaagtgcc ttctattgct tag 693

<210> 44
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 蛇细小病毒1

<400> 44
 acgaatacta tcttaaagct aaaaaggcca aacaaggctt gcagatacca gctccaccta 60

aaggcggaga agaagaagct acatcgtcac aatctggagg gagcccagca ggttccgata	120
ctagcggcac atctgtcatg gctacaggag gaggcgggcc gatggcagac gataaccagg	180
gcgccgaggg agtgggtaat tcttcagggtg attggcattg cgataccaag tggatgggag	240
accacgtcat tacaagtica accagaactt gggtgctccc cacttacggg aatcatctct	300
acgggcctat caactttgac ggcaccacag gttcgggtgc taatgcagcc tatgcaggat	360
acaagactcc ctgggggtac ttgacttca atcgattcca ttgccacttc tcccccgag	420
actggcaaa actcatcaac aaccacacag gcatcaggcc gaaaggactc aaaatcaaag	480
tctttaacgt ccaagtcaaa gaagttacaa cacaagattc aacgaaaaca attgccaaca	540
atctcaccag caccgtacag atctttgagg acgagaacta cgacttacca tatgtattag	600
<210> 45	
<211> 287	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 源自腺相关病毒2的片段Z	
<400> 45	
tcggacagcc accagcagcc ccctctgggc tgggaactaa tacgatggct acaggcagtg	60
gcgcaccaat ggcagacaat aacgagggcg ccgacggagt gggtaattcc tcgggaaatt	120
ggcattcgca ttccacatgg atgggcgaca gagtcacac caccagcacc cgaacctggg	180
ccctgcccac ctacaacaac caccctaca aacaaatttc cagccaatca ggagcctcga	240
acgacaatca ctactttggc tacagcacc cttgggggta ttttgac	287
[0028]	
<210> 46	
<211> 287	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 作为腺相关病毒的片段Z的未知DNA片段	
<400> 46	
gtcaaaatac cccaagggg tgctgtagcc aaagtagtga ttgtcgttcg aggtcctga	60
ttggctggaa atttgtttgt agaggtggtt gttgtagggt ggcagggccc aggttcgggt	120
gtcgtgtgtg atgactctgt cgccateca tgtggaatcg caatgccaat ttcccgagga	180
attaccact ccgtcggcgc cctcgttatt gtctgccatt ggtgcgccac tgcctgtagc	240
catcgtatta gttcccagac cagagggggc tgetggtggc tgtccga	287
<210> 47	
<211> 286	
<212> DNA	
<213> 腺相关病毒1	
<400> 47	
tcggagaacc tccagcaacc ccgcgtctg tgggacctac tacaatggct tcaggcgggtg	60
gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtaatgcc tcaggaaatt	120
ggcattcgca ttccacatgg ctgggcgaca gagtcacac caccagcacc cgcacctggg	180
ccttgcceac ctacaataac caccctaca agcaaatctc cagtgttca acgggggcca	240
gcaacgacaa ccactacttc ggctacagca cccctgggg gtattt	286

[0029]	<210>	48	
	<211>	286	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒3b	
	<400>	48	
		tcggagaacc accagcagcc cccacaagtt tgggatctaa tacaatggct tcaggcgggtg	60
		gcgcaccaat ggcagacaat aacgaggggtg ccgatggagt gggtaattcc tcaggaaatt	120
		ggcattgcga ttccaatgg ctgggcgaca gagtcacac caccagcacc agaacctggg	180
		ccctgcccac ttacaacaac catctctaca agcaaattct cagccaatca ggagcttcaa	240
		acgacaacca ctactttggc tacagcacc cttgggggta ttttga	286
	<210>	49	
	<211>	286	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒4	
	<400>	49	
		cccttgaggg atcaacttcc ggagccatgt ctgatgacag tgagatgcgt gcagcagctg	60
		gcggagctgc agtcgagggc ggacaagggtg ccgatggagt gggtaattcc tcgggtgatt	120
		ggcattgcga ttccacctgg tctgagggcc acgtcacgac caccagcacc agaacctggg	180
		tcttcccac ctacaacaac cactctaca agcgactcgg agagagcctg cagtccaaca	240
		cctacaacgg attctccacc ccctggggat actttgactt caaccg	286
	<210>	50	
	<211>	286	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒5	
	<400>	50	
		tgcaaatccc agcccacca gcctcaagtt tgggagctga tacaatgtct gcgggaggtg	60
		ggggccatt gggcgacaat aaccaagggtg ccgatggagt gggcaatgcc tcgggagatt	120
		ggcattgcga ttccacgtgg atgggggaca gagtcgtcac caagtccacc cgaacctggg	180
		tgctgcccag ctacaacaac caccagtacc gagagatcaa aagcggtccc gtcgacggaa	240
		gcaacgcaa cgctacttt ggatacagca cccctgggg gtactt	286
	<210>	51	
	<211>	286	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒6	
	<400>	51	
		tcggagaacc tccagcaacc cccgtgctg tgggacctac tacaatggct tcaggcgggtg	60
		gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtaattcc tcaggaaatt	120
		ggcattgcga ttccacatgg ctgggcgaca gagtcacac caccagcacc cgaacatggg	180
		ccctgcccac ctataacaac cactctaca agcaaattct cagtgttca acgggggcca	240
		gcaacgacaa ccactacttc ggctacagca cccctgggg gtattt	286
	<210>	52	
	<211>	286	
	<212>	DNA	
	<213>	腺相关病毒7	
	<400>	52	
		ctagtgtggg atctgtgtaca gtggctgcag gcggtggcgc accaatggca gacaataacg	60

	aagggtgccga cggagtggtt aatgcctcag gaaattggca ttgcgattcc acatggctgg	120
	gcgacagagt cattaccacc agcacccgaa cctgggccct gccacacctac aacaaccacc	180
	tctacaagca aatctccagt gaaactgcag gtagtaccac cgacaacacc tacttcggct	240
	acagcacccc ctgggggtat ttgacttta acagattcca ctgcca	286
	<210> 53	
	<211> 286	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒8	
	<400> 53	
	tcggagaacc tccagcagcg ccctctggtg tgggacctaa tacaatggct gcagcggtg	60
	gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagtcc tcgggaaatt	120
	ggcattgcga ttccacatgg ctgggcgaca gagtcacac caccagcacc cgaacctggg	180
	ccctgcccac ctacaacaac cactctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggag	240
	ccaccaacga caacacctac ttcggtaca gcacccctg ggggta	286
	<210> 54	
	<211> 286	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒10	
	<400> 54	
	tcggagaacc accagcagcg ccctctggtc tgggatctgg tacaatggct gcagcggtg	60
	gcgctccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagtcc tcaggaaatt	120
	ggcattgcga ttccacatgg ctgggcgaca gagtcacac caccagcacc cgaacctggg	180
	ccctgcccac ctacaacaac cactctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggaa	240
	gcaccaacga caacacctac ttcggtaca gcacccctg ggggta	286
[0030]	<210> 55	
	<211> 286	
	<212> DNA	
	<213> 腺相关病毒11	
	<400> 55	
	ccctgaagg atcagatacc agcgccatgt cttcagacat tgaaatgcgt gcagcaccgg	60
	gcggaaatgc tgtcgatgcg ggacaagggt ccgatggagt gggtaatgcc tcgggtgatt	120
	ggcattgcga ttccacctgg tctgagggca aggtcacac aacctcgacc agaacctggg	180
	tcttcccac ctacaacaac cacttgatcc tgcgtctcgg aacaacatca agcagcaaca	240
	ctacaacgg attctccacc ccctggggat attttgactt caacag	286
	<210> 56	
	<211> 286	
	<212> DNA	
	<213> 牛腺相关病毒1	
	<400> 56	
	ccccagaagg accatcttcc ggagctatgt ctactgagac tgaaatgcgt gcagcagctg	60
	gcggaaatgg tggcgatgcg ggacaagggt ccgagggagt gggtaatgcc tccggtgatt	120
	ggcattgcga ttccacttgg tcagagagcc acgtcaccac cactcaacc cgcacctggg	180
	tcctgccac ctacaacaac cacttgatcc tgcggctcgg ctcgagcaac gccagcgaca	240
	ccttcaacgg attctccacc ccctggggat actttgactt taaccg	286

<210> 57
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> ORF1cm

<400> 57
 ttgaggaacc tgtaagacg gcccctggca agaaacggcc cgtggagcac agccccgtgg 60
 agcccgacag cagcagcggc accggcaagg ccggacagca gcccgccaga aagcggctga 120
 acttcggcca gaccggcgac gctgatatcg tgcccgaccc tcagcccttg ggccagcctc 180
 ctgctgtccc tagcggcctc ggcaccaaca ccatggccac cggcagcggg gcccccatgg 240
 ccgataacaa tgaaggggca gacggcgttg gcaacagctc cggcaactgg cactgcgaca 300
 gcacctggat gggagatcgg gtgatcaca cctccaccg gacatgggct ctccctactt 360
 ataataatca cctgtacaag cagatcagca gccagagcgg cgcagcaat gataaccact 420
 acttcgggta ctctacacc tggggctact tcgatttcaa tcggtttcac tgtaacttca 480
 gccccagaga ctggcagcgg ctgattaata ataattgggg ctcccgcccc aagcggctga 540
 atttcaagct gttcaatatc caggtgaagg aagtgacca gaacgatggc accaccacaa 600
 tcgccaacaa cctgacctca accgtgcagg tgttcaccga cagcgagtac cagctgccgt 660
 ac 662

[0031]

<210> 58
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> ORF2cm

<400> 58
 ttgaggaacc tgtaagacg gctccgggaa aaaagaggcc ggtagagcac tctcctgtgg 60
 agccagactc ctctcggga accggaaagg cgggccagca gcctgcaaga aaaagattga 120
 attttggtca gactggagac gcagactcag tacctgaccc ccagcctctc ggacagccac 180
 cagcagcccc ctctggcttg ggaactaata cgatggctgc aggccgtggc ccaccagtgg 240
 cagaccatca ccagagcccc caccgagtgg gtgatccctc gggagatcgg cattgccatc 300
 cctcacggct gggccacaga gtctagccct ccagcccttg agcctggccc ttgtccccct 360
 accaccacca cctccacaa caagttcccc gccaccagg aaccccgac caccatcacc 420
 aacttgcca cagccctctt gggcggcctc ctgaccagca ccgacagcac cgccaccttt 480
 caccacgtga ccggcaagga cagcagcacc accaccggcg acagcgaccc cagagacagc 540
 accagctcca gcctgacctt caagagcaag cggagcagac ggatgaccgt gcggcggaga 600
 ctgcctatca ccctgcccgc cagattccgg tgctgtctga ccagaagcac cagcagccgt 660
 ac 662

<210> 59
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>

	<223> pAdVantage的VAI-VAII片段的XbaI-VAI-780-3' 引物	
	<400> 59	
	tctagagggc actcttccgt ggtctggtgg	30
	<210> 60	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> pAdVantage的VAI-VAII片段的XbaI-VAII-1200-5' 引物	
	<400> 60	
	tctagagcaa aaaaggggct cgtccctgtt tcc	33
	<210> 61	
	<211> 18	
	<212> PRT	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于产生多克隆AAP抗血清（抗AAP）的肽	
	<400> 61	
	Gly Lys Asp Ser Ser Thr Thr Thr Gly Asp Ser Asp Pro Arg Asp Ser	
	1 5 10 15	
	Thr Ser	
[0032]	<210> 62	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于产生新HindIII限制性位点的引物	
	<400> 62	
	cctctggtct gggaactaag cttatggcta caggcagtgg cg	42
	<210> 63	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于产生新HindIII限制性位点的引物	
	<400> 63	
	cgccactgcc ttagccata agcttagttc ccagaccaga gg	42
	<210> 64	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> pVP2N-gfp中StopA的引物	
	<400> 64	
	ccagcctctc ggatagccac cagcagcc	28
	<210> 65	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中i-StopA的引物	
	<400>	65	
		ggctgctggg ggctatccga gaggctgg	28
	<210>	66	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中StopB的引物	
	<400>	66	
		gccccctctg gtctgtgaac taatacgatg gc	32
	<210>	67	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中i-StopB的引物	
	<400>	67	
		gccatcgtat tagttcacag accagagggg gc	32
	<210>	68	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
[0033]	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中StopC的引物	
	<400>	68	
		cgatggctac aggctgaggc gcaccaatgg c	31
	<210>	69	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中i-StopC的引物	
	<400>	69	
		gccattggtg cgcctcagcc tgtagccatc g	31
	<210>	70	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中StopD的引物	
	<400>	70	
		ggagtgggta attcctcgtg aaattggcat tgcg	34
	<210>	71	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	pVP2N-gfp中i-StopD的引物	

[0034]	<400> 71 cgcaatgcc aattcacgag gaattaccca ctcc	34
	<210> 72 <211> 48 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> BC3-ala正向引物	
	<400> 72 ggcgggcccag cagcctgcag cagcagcatt gaattttggt cagactgg	48
	<210> 73 <211> 48 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> BC3 ala反向引物	
	<400> 73 ccagcttgac caaaattcaa tgctgctgct gcaggtgct ggccccgcc	48
	<210> 74 <211> 69 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> pCMV-VP3/2809作模板的pCMV-NLS-VP3的引物	
	<400> 74 ggaattcgat atcaagcttg ccatggcacc accaaagaag aagcgaaagg ttatggctac	60
	aggcagtg	69
	<210> 75 <211> 69 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> pCMV-VP3/2809作模板的pCMV-NLS-VP3的引物	
	<400> 75 ccactgcctg tagccataac ctttcgcttc ttctttggtg gtgccatggc aagcttgata	60
	tcgaattcc	69
	<210> 76 <211> 129 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> VP3编码序列上游紧邻的人血清白蛋白(HSA)的片段	
	<400> 76 ggtaccaagc ttacggacgc ccacaagagc gaggtggccc accggttcaa ggacctgggc	60
	gaggaaaact tcaaggccct ggtgctgac gccttcgccc agtacctgca gcagtgcag	120
	cttgagctc	129
	<210> 77 <211> 48 <212> DNA <213> 人工	

[0035]	<220>			
	<223>	VP1的引物Insect_mod_4_s		
	<400>	77		
		cacccgctggg gatccgccgc tgccgacggg tatctaccgc attggctc	48	
	<210>	78		
	<211>	31		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	VP1的引物E_VP2_rev		
	<400>	78		
		cgccaattcc tattacagat tacgagtcag g	31	
	<210>	79		
	<211>	28		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	VP2定点突变的引物Insect-muta_4_s		
	<400>	79		
		acctgttaag acagctccgg gaaaaaag	28	
	<210>	80		
	<211>	28		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	VP2定点突变的引物Insect-muta_4_as		
	<400>	80		
		cttttttccc ggagctgtct taacagggt	28	
	<210>	81		
	<211>	39		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	腺相关病毒2 VP2的引物E_VP2_for		
	<400>	81		
		cacccgctggg gatccactat ggctccggga aaaaagagg	39	
	<210>	82		
	<211>	31		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	腺相关病毒2 VP2的引物E_VP2_rev		
	<400>	82		
		cgccaattcc tattacagat tacgagtcag g	31	
	<210>	83		
	<211>	40		
	<212>	DNA		
	<213>	人工		
	<220>			
	<223>	腺相关病毒2 VP3的引物E_VP3_for		
	<400>	83		

	cacccgcggg gatccactat ggctacaggc agtggcgcac	40
	<210> 84	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 腺相关病毒2 VP3的引物E_VP2_rev	
	<400> 84	
	cgcgattcc tattacagat tacgagtcag g	31
	<210> 85	
	<211> 71	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-587中的兔CETP表位TP18正义寡核苷酸	
	<400> 85	
	ggccggcgga ggtgacatca gcgtgacggg tgcacccgtg atcaccccca cctacctggg	60
	gggtggcggt g	71
	<210> 86	
	<211> 71	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-587中的兔CETP表位TP18反义寡核苷酸	
[0036]	<400> 86	
	cgcgcaccgc cccccccag gtaggtggcg gtgatcacgg gtgcaccggt cacgctgatg	60
	tcacctcgc c	71
	<210> 87	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-587中的人IgE表位3Depi-3正义寡核苷酸	
	<400> 87	
	ggccggcgga ggtggtgaca gcaaccctag aggcgtgagc gcctacctga gcagaggggg	60
	tggcggtg	68
	<210> 88	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-587中的人IgE表位3Depi-3反义寡核苷酸	
	<400> 88	
	cgcgcaccgc cccccctct gctcaggtag gcgctcacgc ctctagggtt gctgtcacca	60
	cctccgcc	68
	<210> 89	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

	<220>		
	<223>	用于将表位序列克隆到I-587中的人IgE表位Kricek正义寡核苷酸	
	<400>	89	
		ggccgcagcg gcggtgaacc tgacctggag cagagcctcc ggcgcggcgg cggcgg	56
	<210>	90	
	<211>	56	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	用于将表位序列克隆到I-587中的人IgE表位Kricek反义寡核苷酸	
	<400>	90	
		cgcgcgcgcg ccgcgcgcgc ggaggtctctg ctccaggtca ggttcaccgc cgtctgc	56
	<210>	91	
	<211>	86	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	用于将表位序列克隆到I-587中的鼠TNFalpha表位TNFalpha-V1正义寡核苷酸	
	<400>	91	
		ggccggcgga ggtagcagcc agaacagcag cgacaagccc gtggcccacg tgggtggctaa	60
		ccaccaggtg gaggggggtg gcggtg	86
	<210>	92	
	<211>	86	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
[0037]	<220>		
	<223>	用于将表位序列克隆到I-587中的鼠TNFalpha表位TNFalpha-V1反义寡核苷酸	
	<400>	92	
		cgcgcaccgc cccccctc cacctggtgg ttagccacca cgtgggccac gggtttgtcg	60
		ctgctgttct ggctgtctacc tccgcc	86
	<210>	93	
	<211>	68	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	用于将表位序列克隆到I-587中的鼠IL-17表位IL-17-V1正义寡核苷酸	
	<400>	93	
		ggccggcgga ggtaacgcgc agggcaagct tgaccaccac atgaacagcg tgctgggggg	60
		tggcgggtg	68
	<210>	94	
	<211>	68	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	用于将表位序列克隆到I-587中的鼠IL-17表位IL-17-V1反义寡核苷酸	
	<400>	94	
		cgcgcaccgc cccccccag cacgtgttc atgtggtggt caagcttgcc ctcgcggtta	60
		cctccgcc	68
	<210>	95	

	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-587中的鼠IL-6表位IL-6-V2正义寡核苷酸	
	<400> 95	
	ggcgcgcgga ggtctggagg aattcctgaa ggtgaccctg agaagcgggg gtggcggtg	59
	<210> 96	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-587中的鼠IL-6表位IL-6-V2反义寡核苷酸	
	<400> 96	
	cgcgcaccgc cacccecgct tctcagggtc accttcagga attcctccag acctccgcc	59
	<210> 97	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人淀粉样蛋白-bata表位Abata(1-9)正义寡核苷酸	
	<400> 97	
	ggccgcaggc ggagggggag gcgacgccga gttcagacac gacagcggcg gcggaggggg	60
	aggcgcgg	68
[0038]	<210> 98	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人淀粉样蛋白-bata表位Abata(1-9)反义寡核苷酸	
	<400> 98	
	cgcgcgcgcg ctccectcc gccgcgctg tcgtgtctga actcggcgtc gectceccct	60
	ccgcctgc	68
	<210> 99	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> I-587处的CETP TP18表位	
	<400> 99	
	Asp Ile Ser Val Thr Gly Ala Pro Val Ile Thr Ala Thr Tyr Leu	
	1 5 10 15	
	<210> 100	
	<211> 13	
	<212> PRT	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> I-587处的3Dapi-3表位	
	<400> 100	
	Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg	

	1	5	10
	<210> 101 <211> 10 <212> PRT <213> 人工 <220> <223> I-587处的Kricek表位 <400> 101 Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly 1 5 10		
	<210> 102 <211> 20 <212> PRT <213> 人工 <220> <223> I-587处的TNFalpha-V1表位 <400> 102 Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn 1 5 10 15		
	His Gln Val Glu 20		
[0039]	<210> 103 <211> 14 <212> PRT <213> 人工 <220> <223> I-587处的IL-17-V1表位 <400> 103 Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu 1 5 10		
	<210> 104 <211> 11 <212> PRT <213> 人工 <220> <223> I-587处的IL-6-V2表位 <400> 104<150> US61/157, 436 <151> 2009-03-04 Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser 1 5 10		
	<210> 105 <211> 9 <212> PRT <213> 人工 <220> <223> I-587处的A?1-9)表位 <400> 105 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly 1 5		

	<210> 106	
	<211> 88	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-453中的鼠TNFalpha表位TNFalpha-V1正义寡核苷酸	
	<400> 106	
	ggccgccggt ggaggcagca gccagaacag cagcgacaag cccgtggccc acgtggtggc	60
	taaccaccag gtggagggcg gtggaggg	88
	<210> 107	
	<211> 88	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-453中的鼠TNFalpha表位TNFalpha-V1反义寡核苷酸	
	<400> 107	
	cgcgcctcc accgccctcc acctggtggt tagccaccac gtgggccacg ggcttgtcgc	60
	tgtgtttctg gctgctgcct ccaccggc	88
	<210> 108	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-453中的鼠IL-17表位IL-17-V1正义寡核苷酸	
[0040]	<400> 108	
	ggccgccggt ggaggcaacg ccgagggcaa gcttgaccac cacatgaaca gcgtgctggg	60
	cgggtggaggg	70
	<210> 109	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-453中的鼠IL-17表位IL-17-V1反义寡核苷酸	
	<400> 109	
	cgcgcctcc accgccacg acgctgttca tgtggtggtc aagcttgccc tcggcgttgc	60
	ctccaccggc	70
	<210> 110	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于将表位序列克隆到I-453中的鼠IL-6表位IL-6-V2正义寡核苷酸	
	<400> 110	
	ggccgccggt ggaggcctgg aggaattcct gaaggtgacc ctgagaagcg gcggtggagg	60
	g	61
	<210> 111	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工	

<220>
<223> 用于将表位序列克隆到I-453中的鼠IL-6表位IL-6-V2反义寡核苷酸

<400> 111
cgcgccctcc accgcgcgtt ctcagggtca ccttcaggaa ttctctccagg cctccaccgg 60
c 61

<210> 112
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-453处的TNFalpha-V1表位

<400> 112

Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn
1 5 10 15

His Gln Val Glu
20

<210> 113
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-587处的IL-17-V1表位

<400> 113

[0041] Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu
1 5 10

<210> 114
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-453处的TNFalpha-V1表位

<400> 114

Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn
1 5 10 15

His Gln Val Glu
20

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-587处的IL-6-V2表位

<400> 115

Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 116
<211> 14

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-453处的IL-17-V1表位

<400> 116

Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu
1 5 10

<210> 117
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-587处的TNFa-V1表位

<400> 117

Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn
1 5 10 15

His Gln Val Glu
20

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工

[0042]

<220>
<223> I-453处的IL-6-V2表位

<400> 118

Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser
1 5 10

<210> 119
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-587处的TNFalpha-V1表位

<400> 119

Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn
1 5 10 15

His Gln Val Glu
20

<210> 120
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> I-453处的IL-17-V1表位

<400> 120

Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu
1 5 10

	<210>	121	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	I-587处的IL-6-V2表位	
	<400>	121	
	Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser		
	1 5 10		
	<210>	122	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	I-453处的IL-6-V2表位	
	<400>	122	
	Leu Glu Glu Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser		
	1 5 10		
	<210>	123	
	<211>	14	
	<212>	PRT	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	I-587处的IL-17-V1表位	
	<400>	123	
[0043]	Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Leu		
	1 5 10		
	<210>	124	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	腺相关病毒1 NheI VP2plus95bp引物	
	<400>	124	
	gagcgtctgc tagcagatac ctccttttggg g	31	
	<210>	125	
	<211>	29	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	腺相关病毒1 VP3 Xma rev引物	
	<400>	125	
	gaaacgaatc acccgggtta ttgattaac	29	
	<210>	126	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	腺相关病毒1 VP2ko正向引物	
	<400>	126	
	ggcgctaaga ccgctcctgg aaag	24	

	<210> 127	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 腺相关病毒1 VP2ko反向引物	
	<400> 127	
	ctttccagga gcggtcttag cgcc	24
	<210> 128	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 腺相关病毒1 VP2ko_VP1del正向引物	
	<400> 128	
	acgactcact ataggctagc aggcgctaag accgctcctg gaaag	45
	<210> 129	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 腺相关病毒1 VP2ko_VP1del反向引物	
	<400> 129	
	ctttccagga gcggtcttag cgctgctag cctatagtga gtcgt	45
[0044]	<210> 130	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> HindIII突变的正向引物	
	<400> 130	
	cgctgctgtg ggacctaaagc ttatggcttc aggcggtggc g	41
	<210> 131	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> HindIII突变的反向引物	
	<400> 131	
	cgccaccgcc tgaagccata agcttaggtc ccacagcagc g	41
	<210> 132	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆人IgE表位“Kricek”的正义寡核苷酸	
	<400> 132	
	ggccgcagcc gcagtgaacc tgacctggag cagagcctcc ggcgcggcag ctgcagct	58
	<210> 133	
	<211> 58	
	<212> DNA	

	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆人IgE表位"Kricek"的反义寡核苷酸	
	<400> 133	
	cgcgagctgc agctgccgcg ccggaggctc tgctccaggt caggttcact gcggctgc	58
	<210> 134	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆人IgE表位"3Depi-3"的正义寡核苷酸	
	<400> 134	
	ggccggcggt ggagcggtg acagcaacc tagaggcgtg agcgctacc tgagcagagg	60
	aggcggtgga ggg	73
	<210> 135	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 用于克隆人IgE表位"3Depi-3"的反义寡核苷酸	
	<400> 135	
	cgcgccctcc accgcctcct ctgctcaggt aggcgctcac gcctctaggg ttgctgtcac	60
	cgcctccacc gcc	73
[0045]	<210> 136	
	<211> 53	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 融合至编码AU1-标签的序列的cap基因ORF2(AAV2 nt 2717-3340)的正向引物I	
	<400> 136	
	ggatcgcaag cttatttttg tcagactgga gacgcagact cagtacctga ccc	53
	<210> 137	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 融合至编码AU1-标签的序列的cap基因ORF2(AAV2 nt 2717-3340)的正向引物II	
	<400> 137	
	ggatcgcaag cttatttttg tcagaatgga gacgcagact cag	43
	<210> 138	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 融合至编码AU1-标签的序列的cap基因ORF2(AAV2 nt 2717-3340)的正向引物III	
	<400> 138	
	ggatcgcaag cttatttttg tcagattgga gacgcagact cag	43
	<210> 139	
	<211> 68	
	<212> DNA	

<213>	人工	
<220>		
<223>	融合至编码AU1-标签的序列的cap基因ORF2 (AAV2 nt 2717-3340)的反向引物	
<400>	139	
	gcgggtgtctc gagttatata tagcgatagg tgtcgggtga ggtatccata ctgtggcacc	60
	atgaagac	68
<210>	140	
<211>	93	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	用于克隆pCMV-NLS-VP3的引物I	
<400>	140	
	ggaattgat atcaagcttg ccatggcacg gcaggcccgg cggaatagac ggagacggtg	60
	gcgggaacgg cagcggatgg ctacaggcag tgg	93
<210>	141	
<211>	93	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	用于克隆pCMV-NLS-VP3的引物II	
<400>	141	
	ccactgcctg tagccatccg ctgccgttcc cgccaccgtc tccgtctatt ccgccgggcc	60
	tgccgtgcca tggcaagctt gatatcgaat tcc	93
[0046]		
<210>	142	
<211>	723	
<212>	DNA	
<213>	禽腺相关病毒DA-1	
<400>	142	
	ttgaacaacc cgacaacacg gccgggaccg gggagaagcg tcccgaacgc gtcgacgact	60
	ttttcccgaa aaagaagaag gccaaagaccg agcaaggcaa agccccctgt caaacgggcg	120
	aagaccccg agaaggaacc tttccaacg ctggatcaag cccccctct agtgtgggat	180
	catctgtcat ggctgaagga ggtggcggtc caatgggcga tgcaggccaa ggtgccgacg	240
	gagtgggcaa ttctcggga aattggcatt gcgattccca atggctggac aacggagtcg	300
	ttaccegaac cactegaacc tgggtctctc ccagctacaa caaccacttg tacaagcgga	360
	tccaaggacc gggaggaacc gacccaaca ataaattctt tggattcagc accccctggg	420
	gtactttga ctacaaccga ttccactgcc acttctcccc ccgagactgg caacgactca	480
	tcaacaacaa ctggggcatc cgacccaaag cgatgcgctt tagactcttt aacatccagg	540
	ttaaagaagt cactgtccaa gactccaaca ccaccatgc caacaacctc accagcacgg	600
	tccaagtctt tgcggacaag gactaccagc tgccgtacgt cctcggatcg gctacagagg	660
	gcaccttccc gccgttccca gcggatatct acacgatccc gcagtatggt tactgcacgc	720
	taa	723
<210>	143	
<211>	240	
<212>	PRT	
<213>	禽腺相关病毒DA-1	

<400> 143

Leu Asn Asn Pro Thr Thr Arg Pro Gly Pro Gly Arg Ser Val Pro Asn
1 5 10 15

Ala Ser Thr Thr Phe Ser Arg Lys Arg Arg Arg Pro Arg Pro Ser Lys
20 25 30

Ala Lys Pro Leu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Pro Glu Lys Glu Pro Leu
35 40 45

Pro Thr Leu Asp Gln Ala Pro Pro Leu Val Trp Asp His Leu Ser Trp
50 55 60

Leu Lys Glu Val Ala Val Gln Trp Ala Met Gln Ala Lys Val Pro Thr
65 70 75 80

Glu Trp Ala Ile Pro Arg Glu Ile Gly Ile Ala Ile Pro Asn Gly Trp
85 90 95

Thr Thr Glu Ser Leu Pro Glu Pro Leu Glu Pro Gly Ser Cys Pro Ala
100 105 110

Thr Thr Thr Thr Cys Thr Ser Gly Ser Lys Asp Arg Glu Glu Pro Thr
115 120 125

Pro Thr Ile Asn Ser Leu Asp Ser Ala Pro Pro Gly Gly Thr Leu Thr
130 135 140

[0047]

Thr Thr Asp Ser Thr Ala Thr Ser Pro Pro Glu Thr Gly Asn Asp Ser
145 150 155 160

Ser Thr Thr Thr Gly Ala Ser Asp Pro Lys Arg Cys Ala Leu Asp Ser
165 170 175

Leu Thr Ser Arg Leu Lys Lys Ser Leu Ser Lys Thr Pro Thr Pro Pro
180 185 190

Ser Pro Thr Thr Ser Pro Ala Arg Ser Lys Ser Leu Arg Thr Arg Thr
195 200 205

Thr Ser Cys Arg Thr Ser Ser Asp Arg Leu Gln Arg Ala Pro Ser Arg
210 215 220

Arg Ser Gln Arg Ile Ser Thr Arg Ser Arg Ser Met Val Thr Ala Arg
225 230 235 240

<210> 144

<211> 286

<212> DNA

<213> 腺相关病毒2

<400> 144

tcggacagcc accagcagcc cccctctgggtc tgggaactaa tacgatggct acaggcagtg 60

gcgcaccaat ggcagacaat aacgagggcg ccgacggagt gggtaattcc tcgggaaatt 120

ggcattgcga ttccacatgg atgggcgaca gagtcacac caccagcacc cgaacctggg 180

ccctgcccac ctacaacaac cacctetaca aacaaatttc cagccaatca ggagcctcga 240

	acgacaatca ctactttggc tacagcaccc cttgggggta ttttga	286
<210>	145	
<211>	646	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	VP2N	
<400>	145	
	acggctccgg gaaaaaagag gccggtagag cactctcctg tggagccaga ctcctcctcg	60
	ggaaccggaa aggcggggcca gcagcctgca agaaaaagat tgaatttttg tcagactgga	120
	gacgcagact cagtacctga cccccagcct ctcggacagc caccagcagc cccctctggt	180
	ctgggaacta atacgatggc tacaggcagt ggcgcacca tggcagacaa taacgagggc	240
	gccgacggag tgggtaattc ctcgggaaat tggcattgcg attccacatg gatgggcgac	300
	agagtcatca ccaccagcac ccgaacctgg gccctgccc cctacaacaa ccacctctac	360
	aaacaaattt ccagccaatc aggagcctcg aacgacaatc actactttgg ctacagcacc	420
	ccttgggggt attttgactt caacagattc cactgccact tttcaccag tgactggcaa	480
	agactcatca acaacaactg gggattccga cccaagagac tcaacttcaa gctctttaac	540
	attcaagtca aagaggtcac gcagaatgac ggtacgacga cgattgcaa taaccttacc	600
[0048]	agcacggttc aggtgtttac tgactggag taccagctcc cgtacg	646
<210>	146	
<211>	646	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	VP2Ncm	
<400>	146	
	acggccctg gcaagaaacg gcccgtagag cacagcccg tggagccga cagcagcagc	60
	ggcaccggca aggcgggaca gcagcccgcc agaaagcggc tgaacttcgg ccagaccggc	120
	gacgtgata gcgtgcccga cccctagccc ctgggccagc ctcctgctgc tcctagcggc	180
	ctcggcacca acaccatggc caccggcagc ggagcccca tggccgataa caatgaaggg	240
	gcagacggcg tgggcaacag ctccggcaac tggcactgcg acagcacctg gatgggagat	300
	cgggtgatca caacctcac ccggacatgg gctctcccta cttataataa tcacctgtac	360
	aagcagatca gcagccagag cggcgccagc aatgataacc actacttcgg gtactctaca	420
	ccctggggct acttegattt caatcggttt cactgtcact tcagccccag agactggcag	480
	cggctgatta ataataattg gggttcgg cccaagcggc tgaatttcaa gctgttcaat	540
	atccaggtga aggaagtgac ccagaacgat ggcaccacca caatcgccaa caacctgacc	600
	tcaacctgac aggtgttcac cgacagcgag taccagctgc cgtacg	646

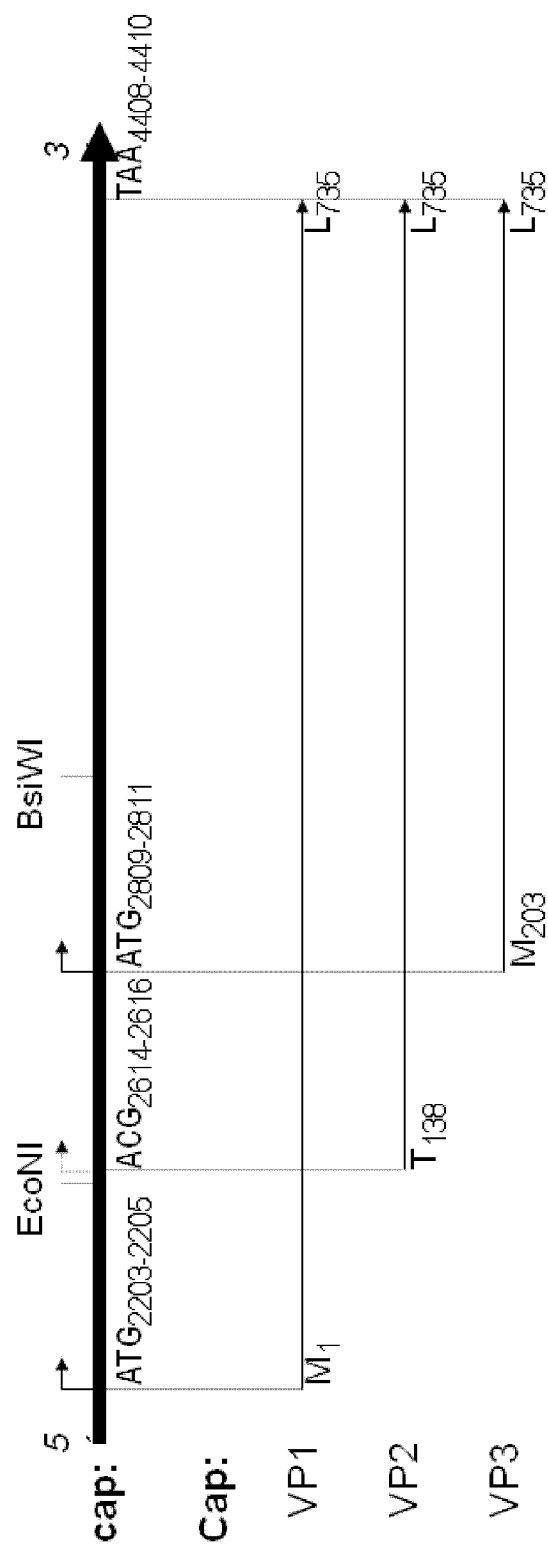


图1

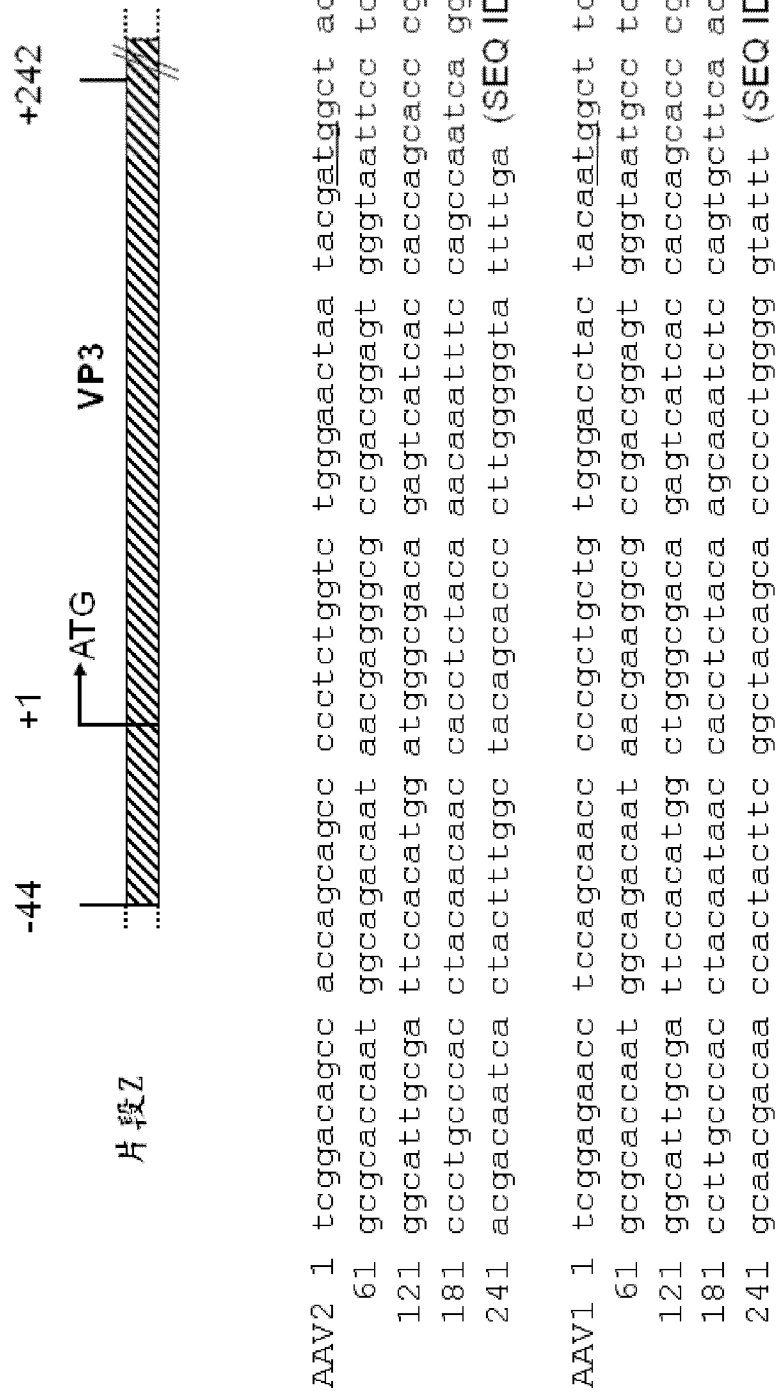


图2-1

```

AAV3b 1 tcggagaacc accagcagcc ccacaagtt tgggatctaa tacaatggct tcaggcgggtg
      61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaggggtg ccgatggagt gggtaatcc tcaggaaatt
      121 ggcatatgcga ttcccaatgg ctgggcgaca gagtcatcac caccagcacc agaacctggg
      181 ccctgcccac ttacaacaac catctctaca agcaaatctc cagccaatca ggagcttcaa
      241 acgacaacca ctactttggc tacagcacc cttgggggta ttttga (SEQ ID NO: 48)

AAV4 1 ccctgaggg atcaacttc ggagccatgt ctgatgacag tgagatggct gcagcagctg
      61 gcggagctgc agtcgagggc ggacaagggtg ccgatggagt gggtaatgcc tcgggtgatt
      121 ggcatatgcga ttccacctgg tctgagggcc acgtcacgac caccagcacc agaacctggg
      181 tcttgcccac ctacaacaac cacctctaca agcgactcgg agagagcctg cagtccaaca
      241 cctacaacgg attctccacc ccctggggat actttgaatt caaccg (SEQ ID NO: 49)

AAV5 1 tgcaaatccc agcccaacca gcctcaagtt tgggagctga tacaatgtct gcgggaggtg
      61 gcggcccat gcgggacatt ggcgacaat aaccaagggtg ccgatggagt gggaatgcc tcgggagatt
      121 ggcatatgcga ttccacgtgg atgggggaca gagtctcac caagtccacc cgaacctggg
      181 tgctgcccag ctacaacaac caccagtacc gagagatcaa aagcggctcc gtcgacggaa
      241 gcaacgcca cgcctacttt ggatacagca cccctgggg gtactt (SEQ ID NO: 50)

AAV6 1 tcggagaacc tcagcaacc ccgctgctg tgggacctac tacaatggct tcaggcgggtg
      61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtaatgcc tcaggaaatt
      121 ggcatatgcga ttccacatgg ctgggcgaca gagtcatcac caccagcacc cgaacatggg
      181 ccttgcccac ctataacaac cacctctaca agcaaatctc cagtgttca acgggggcca
      241 gcaacgacaa ccactacttc ggctacagca cccctgggg gtattt (SEQ ID NO: 51)

```

图2-2

AAV7 1 ctagtgtggg atctggtaca gtggctgcag gcggtggcgc accaatggca gacaataacg
 61 aaggtgccga cggagtgggt aatgcctcag gaaatggca ttgcgattcc acatggctgg
 121 ggcacagagt cattaccacc agcaccgaa cctgggcct gccacctac aacaaccacc
 181 tctacaagca aatctccagt gaaactgcag gtagtaccaa cgacaacacc tacttcggct
 241 acagcaccct ctgggggtat tttgacttta acagattcca ctgcc (SEQ ID NO: 52)

AAV8 1 tcggagaacc tcagcagcg cctctggtg tgggacctaa tacaatggct gcaggcggctg
 61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagttcc tcgggaaatt
 121 ggcattgcga ttccacatgg ctgggcgaca gagtcatcac caccagcacc cgaacctggg
 181 cctgcccac ctacaacaac cacctctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggag
 241 ccaccaacga caacacctac ttcggctaca gcacccctg ggggta (SEQ ID NO: 53)

AAV10 1 tcggagaacc accagcaggc ccctctggtc tgggatctgg tacaatggct gcaggcggctg
 61 gcgctccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagttcc tcaggaaatt
 121 ggcattgcga ttccacatgg ctgggcgaca gagtcatcac caccagcacc cgaacctggg
 181 cctgcccac ctacaacaac cacctctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggaa
 241 gcaccaacga caacacctac ttcggctaca gcacccctg ggggta (SEQ ID NO: 54)

AAV11 1 cccctgaagg atcagatacc agcgccatgt cttcagacat tgaaatggct gcagcacccg
 61 gcggaaatgc tgtcgatgcg ggacaagggt ccgatggagt gggtaatgcc tcgggtgatt
 121 ggcattgcga ttccacctgg tctgagggca aggtcacaac aacctcgacc agaacctggg
 181 tcttggcccac ctacaacaac cacttgtaac tgcgtctcgg aacaacatca agcagcaaca
 241 cctacaacgg attctccacc cctggggat atttgactt caacag (SEQ ID NO: 55)

b-AAV 1 ccccgaaagg accatcttcc ggagctatgt ctactgagac tgaaatggct gcagcagctg
 61 gcggaaatgg tggcgatgcg ggacaagggt ccgagggagt gggtaatgcc tcgggtgatt
 121 ggcattgcga ttccacttgg tcagagagcc acgtcacccac cacctcaacc cgcacctggg
 181 tctgcccac ctacaacaac cacctgtacc tggggctcgg ctgagcaac gccagcgaca
 241 ccttcaacgg attctccacc cctggggat actttgactt taaccg (SEQ ID NO: 56)

图2-3

图2-4

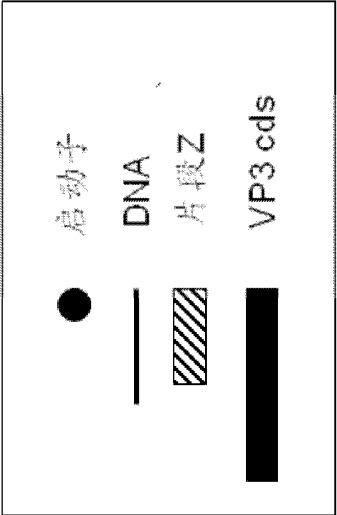
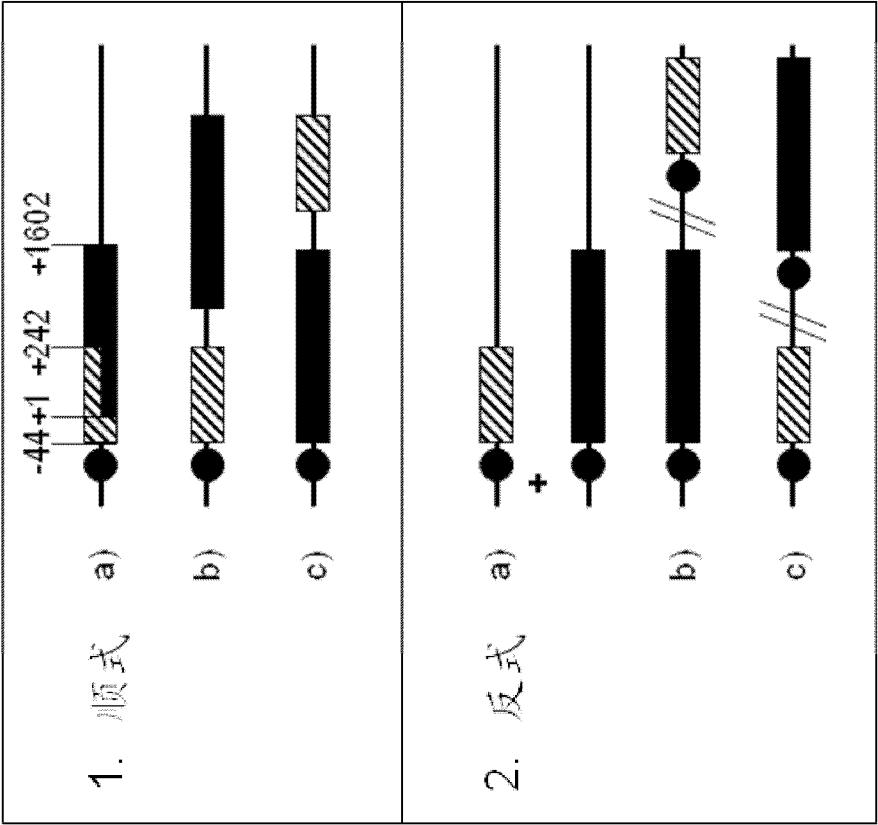


图3

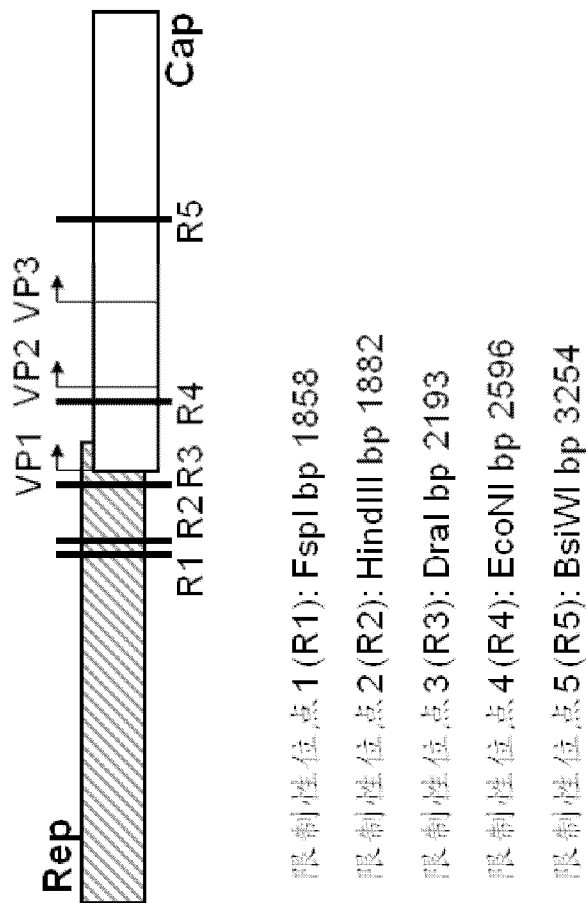


图4

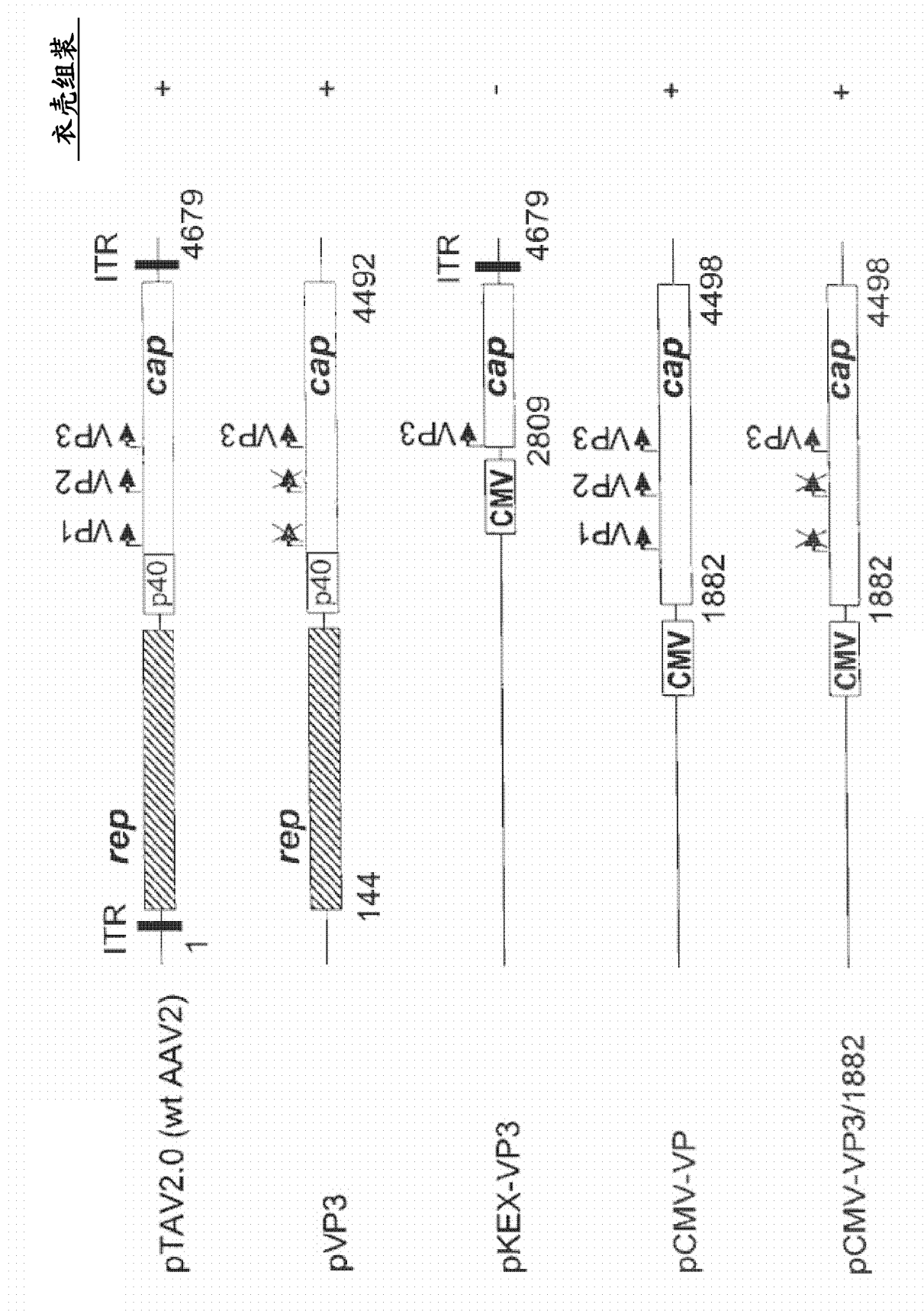


图5A1)

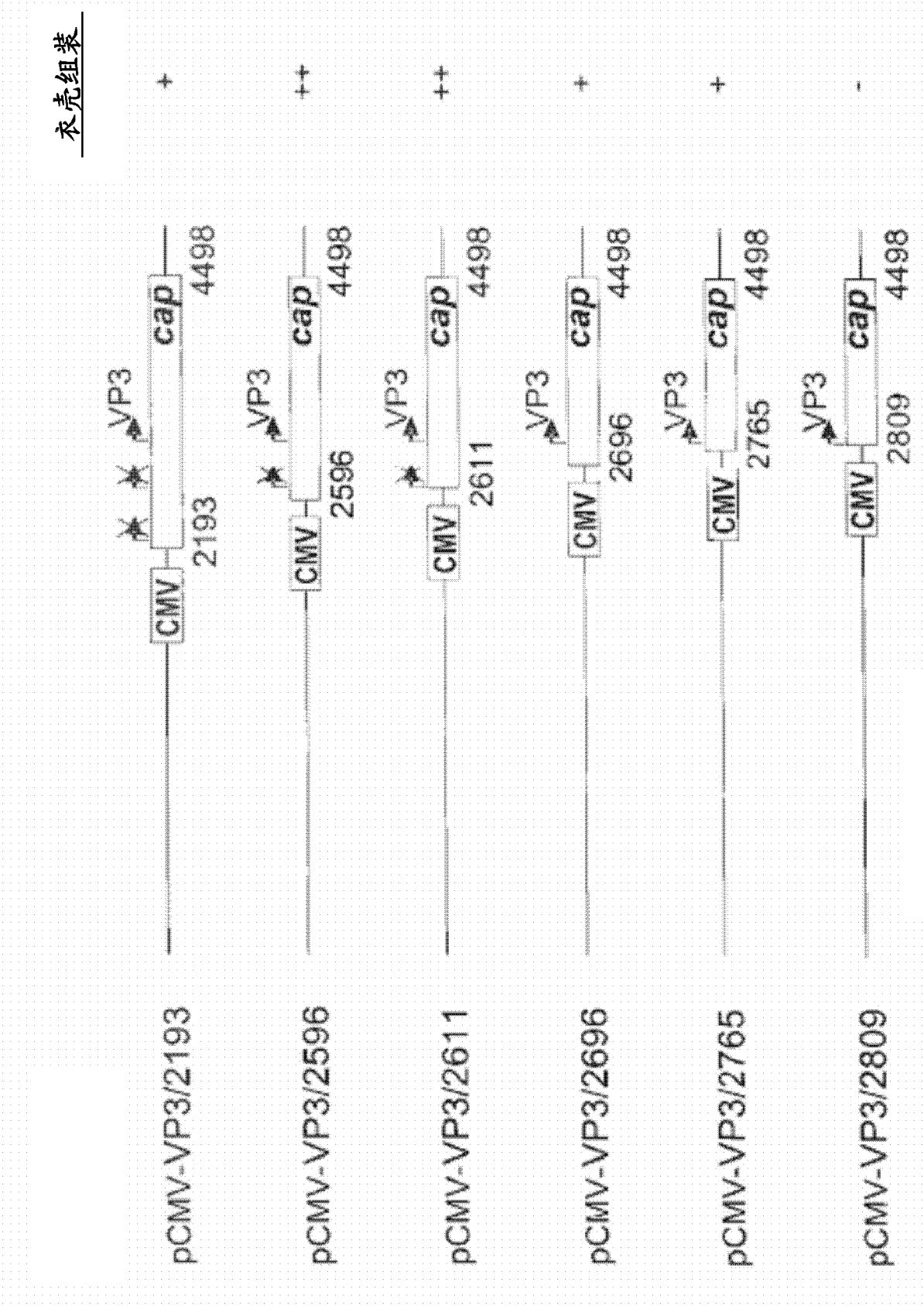


图5A2)

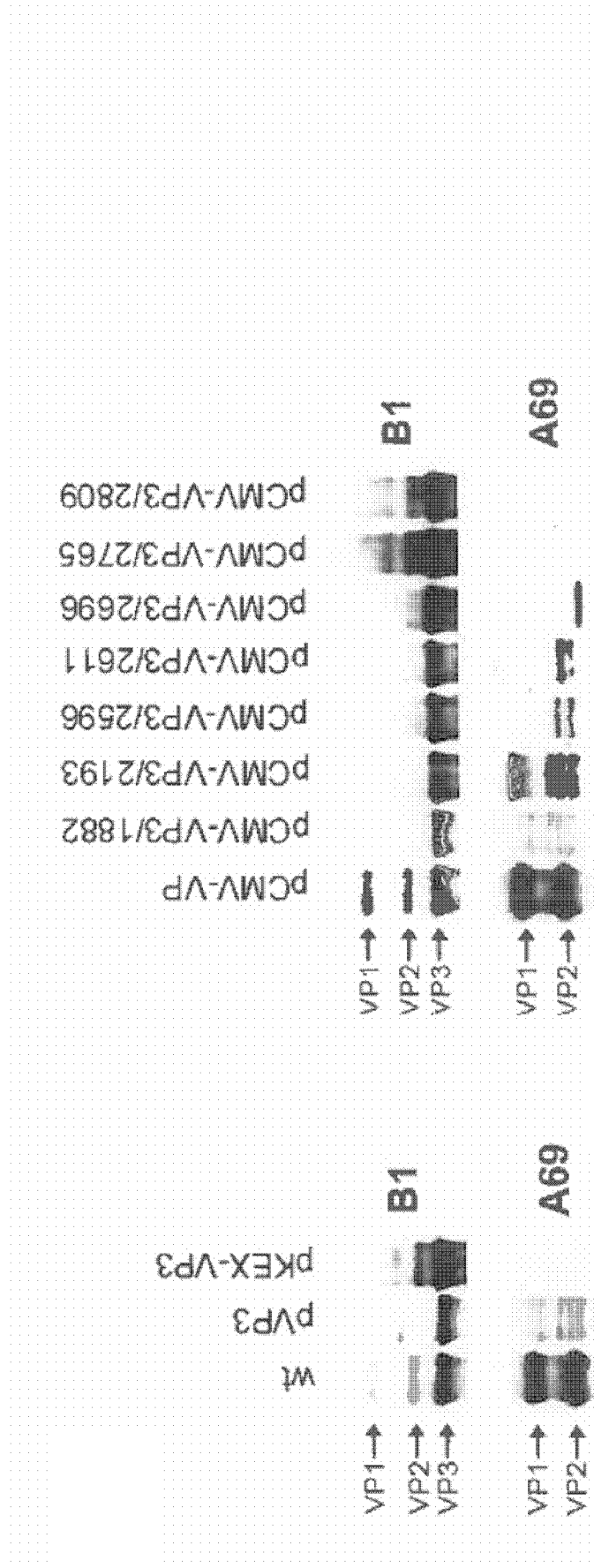


图5B)

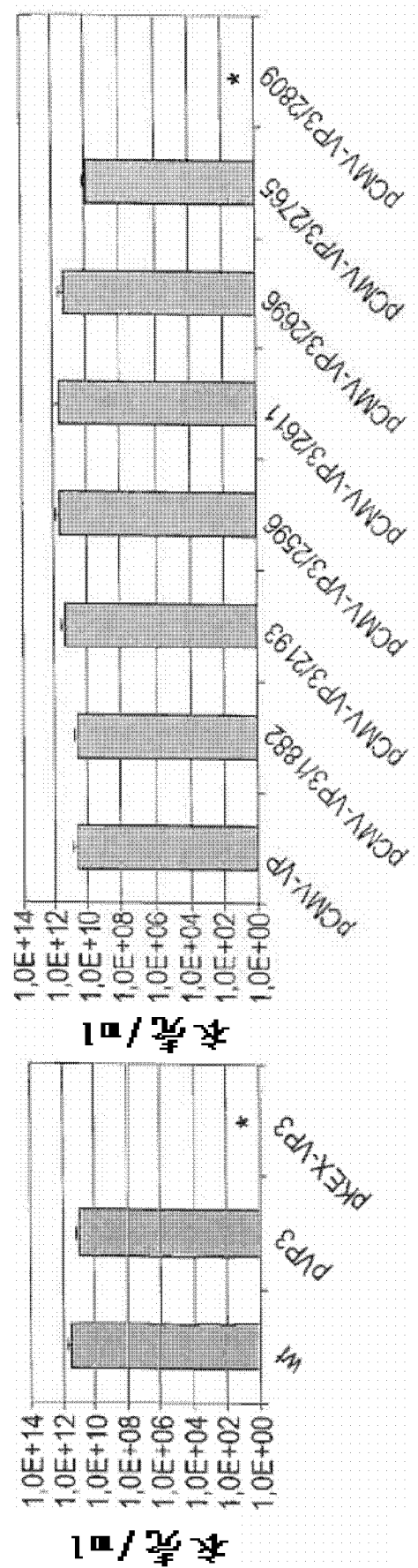
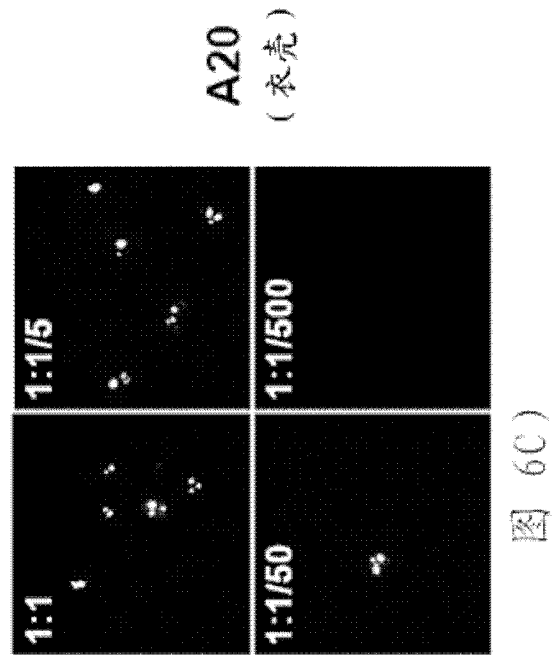
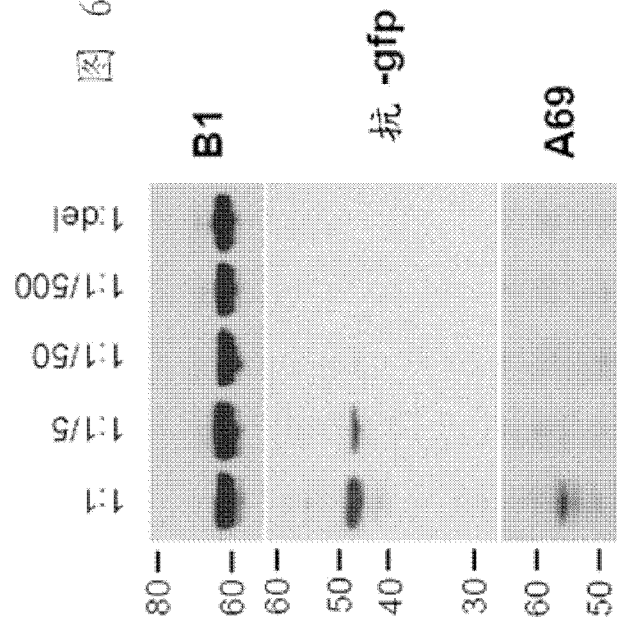
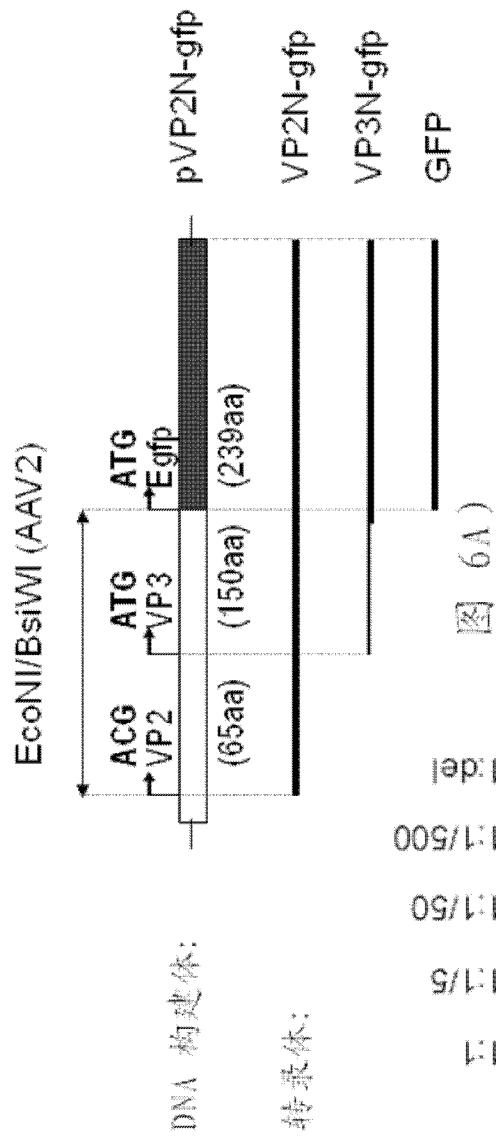


图5C)



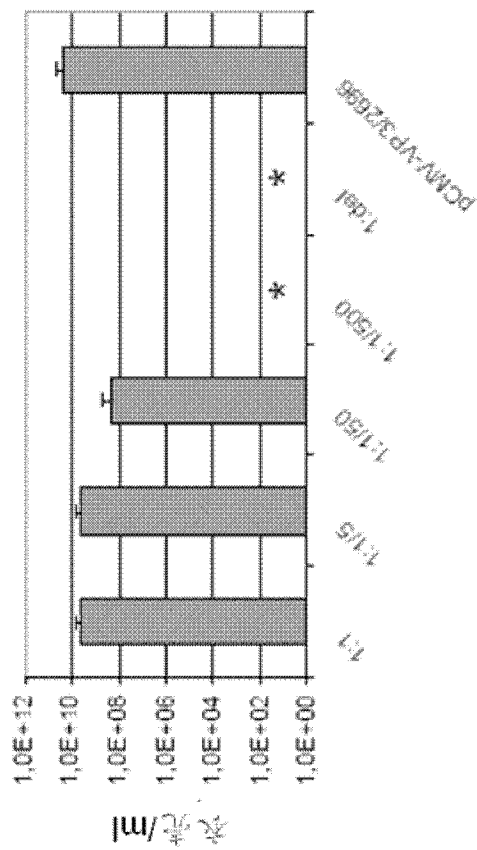


图6D)

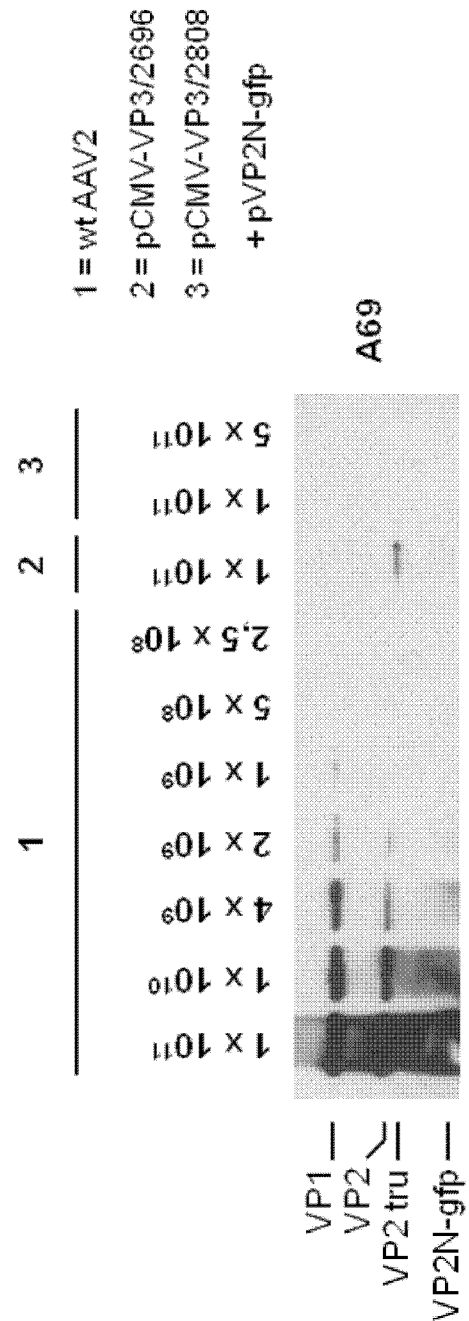


图7

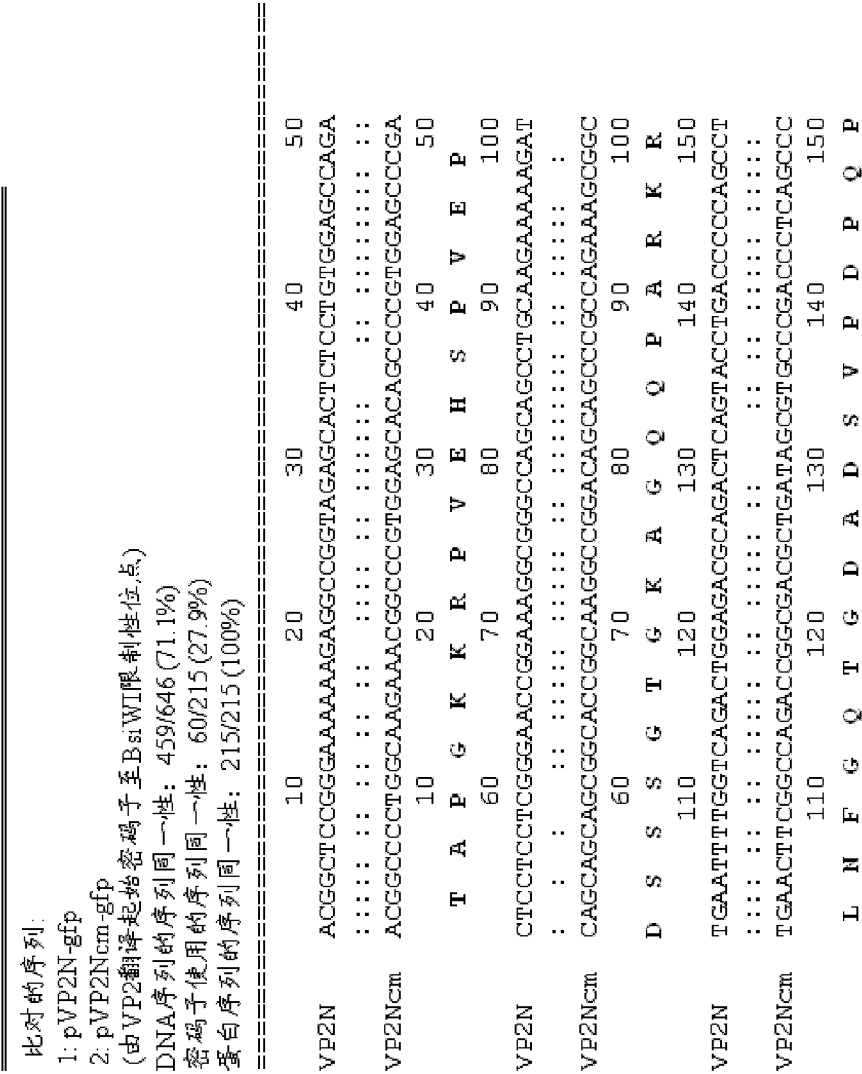


图8A-1

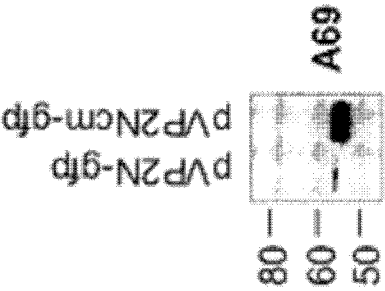


图8B)

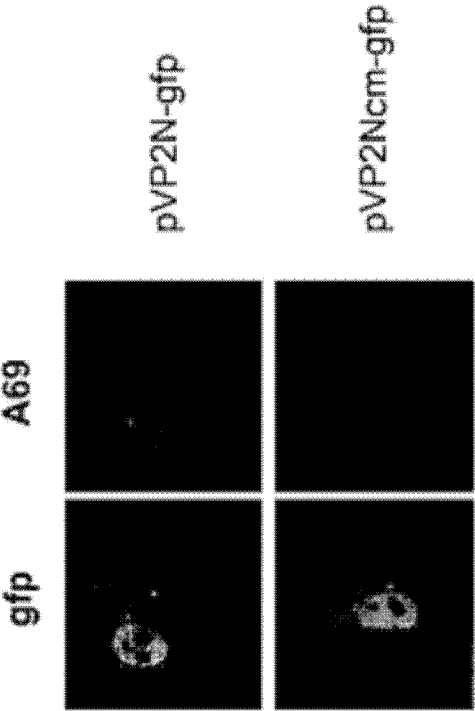


图8C)

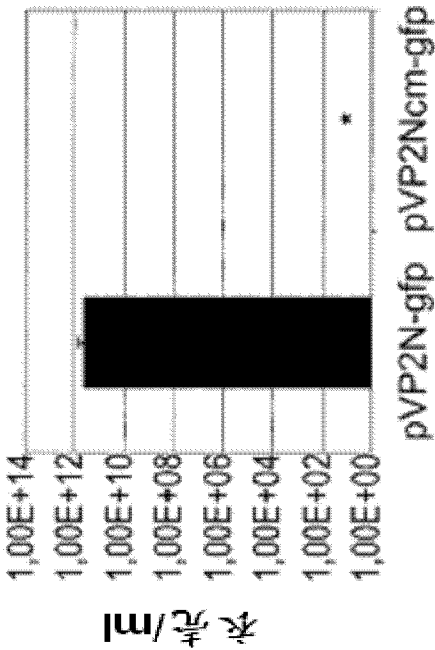


图8D)

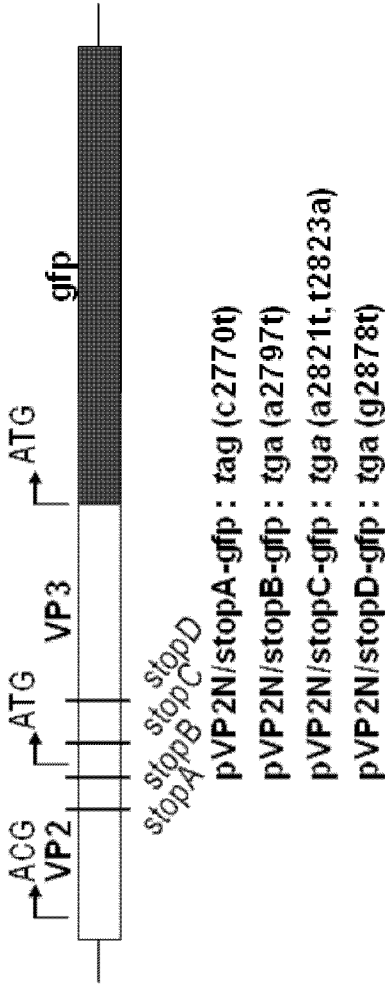


图9A)

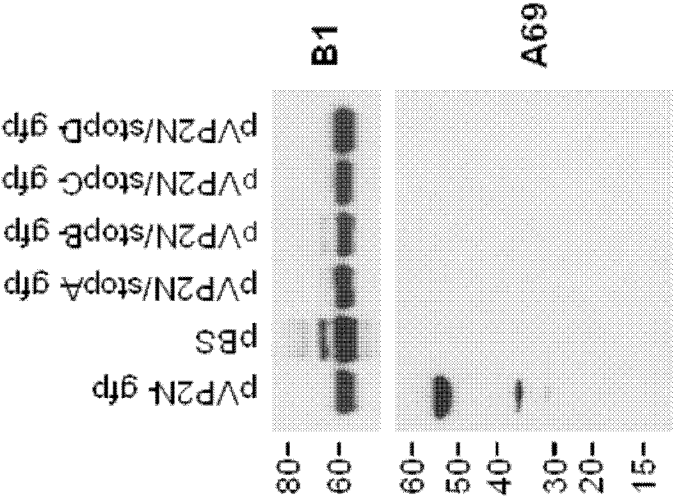


图9B)

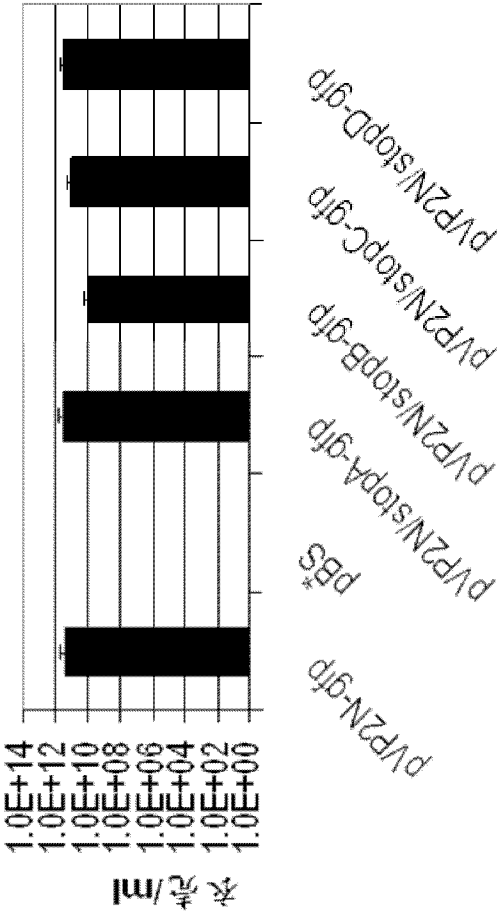


图9C)

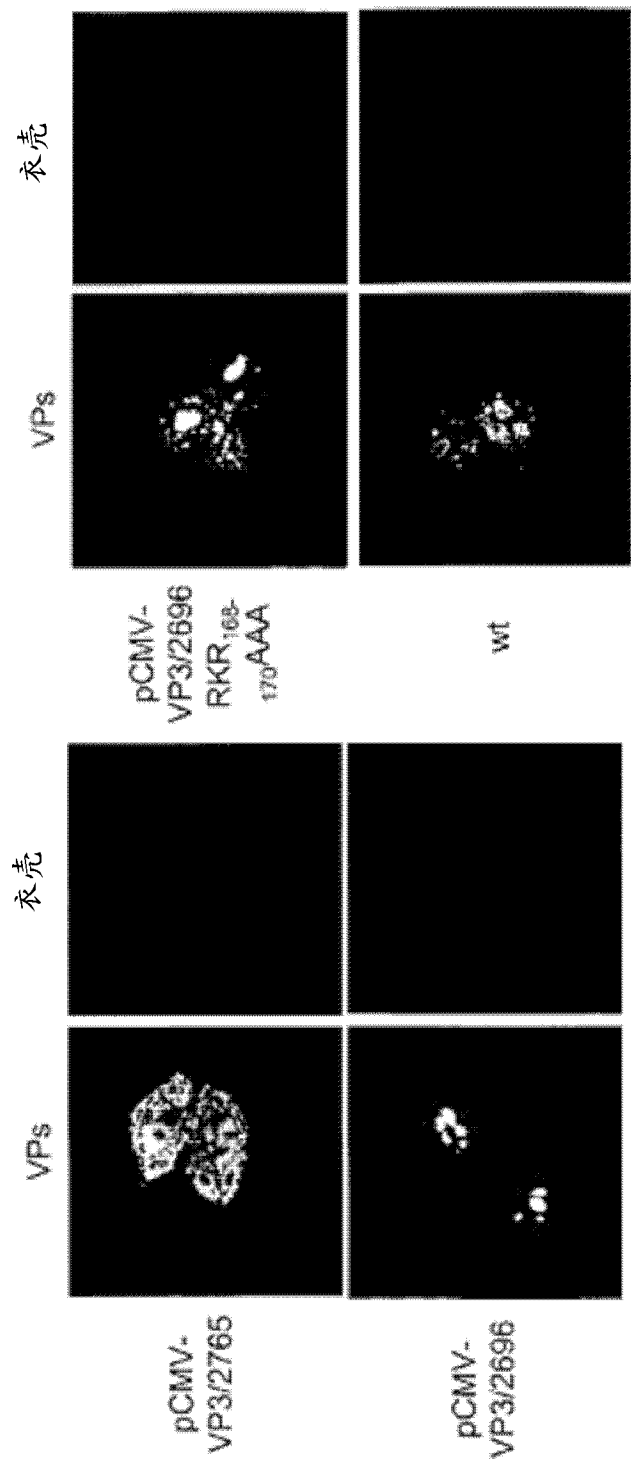


图10

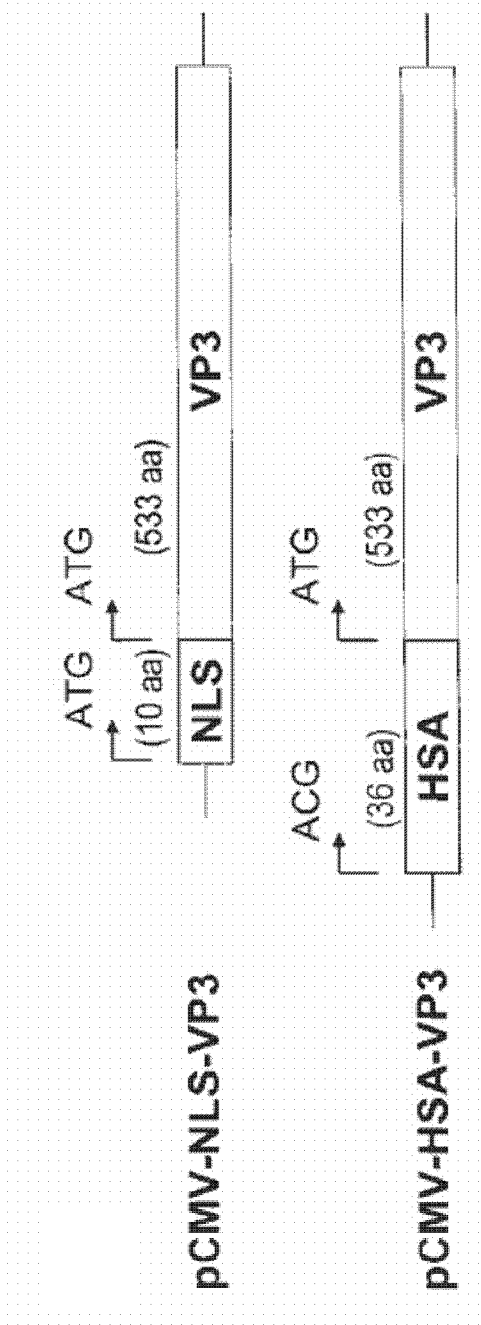


图11A)

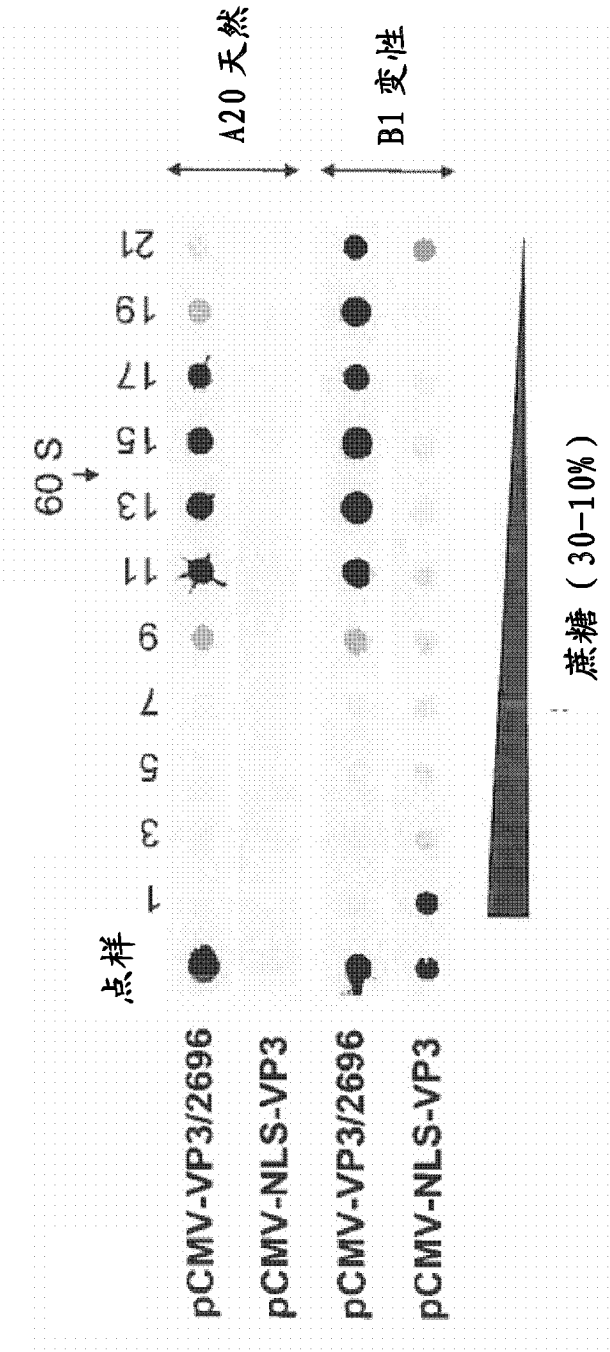


图11C)

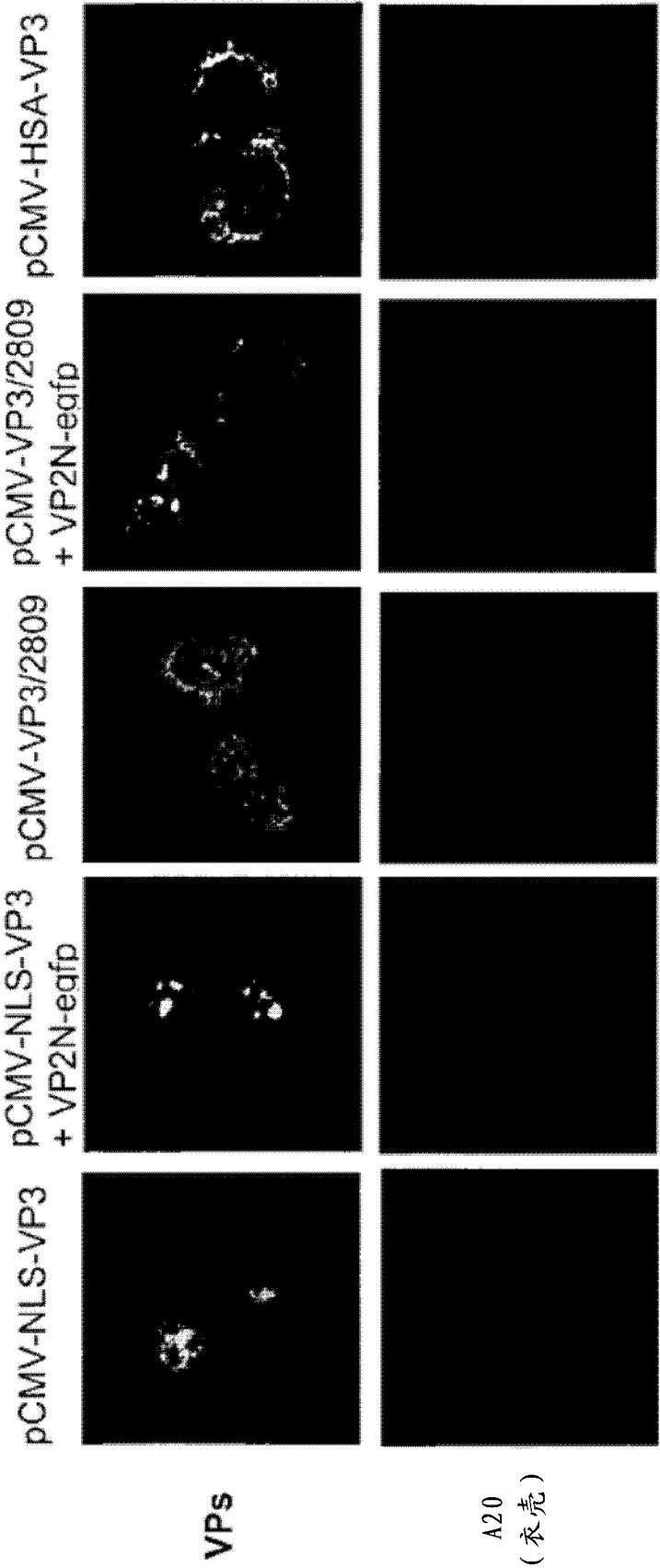


图11B)

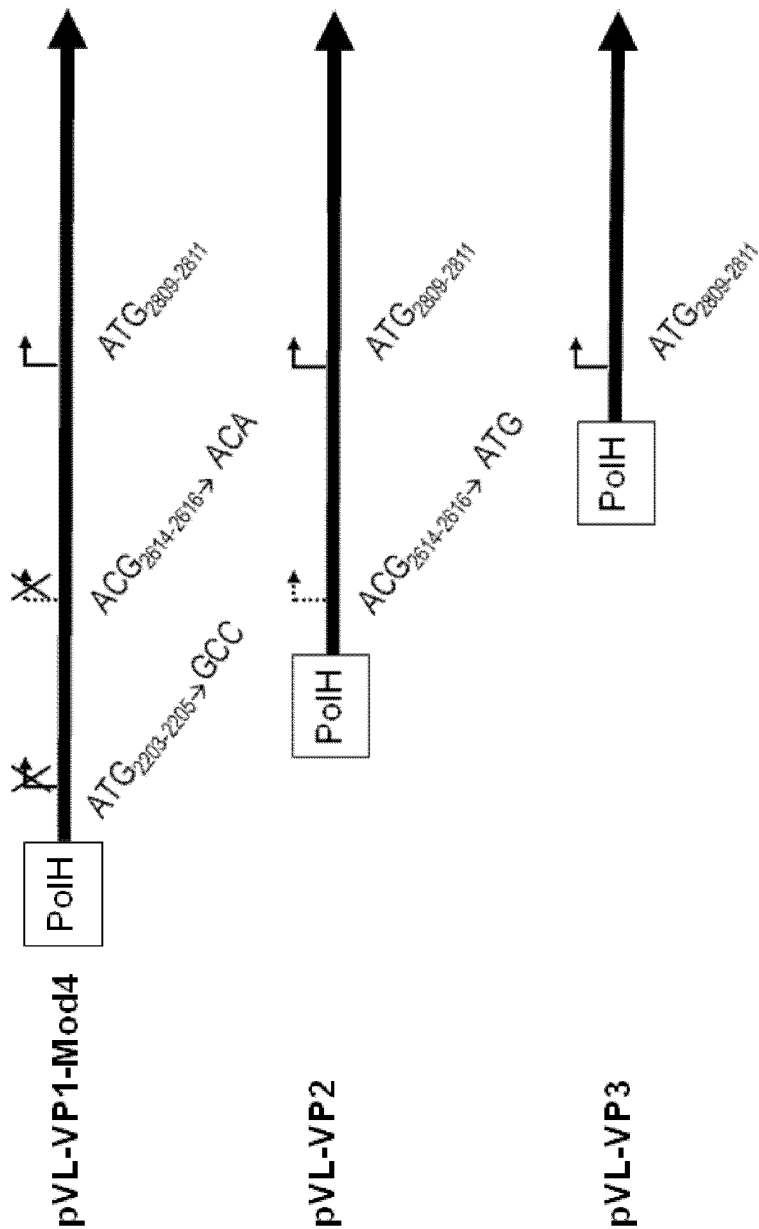


图12A)

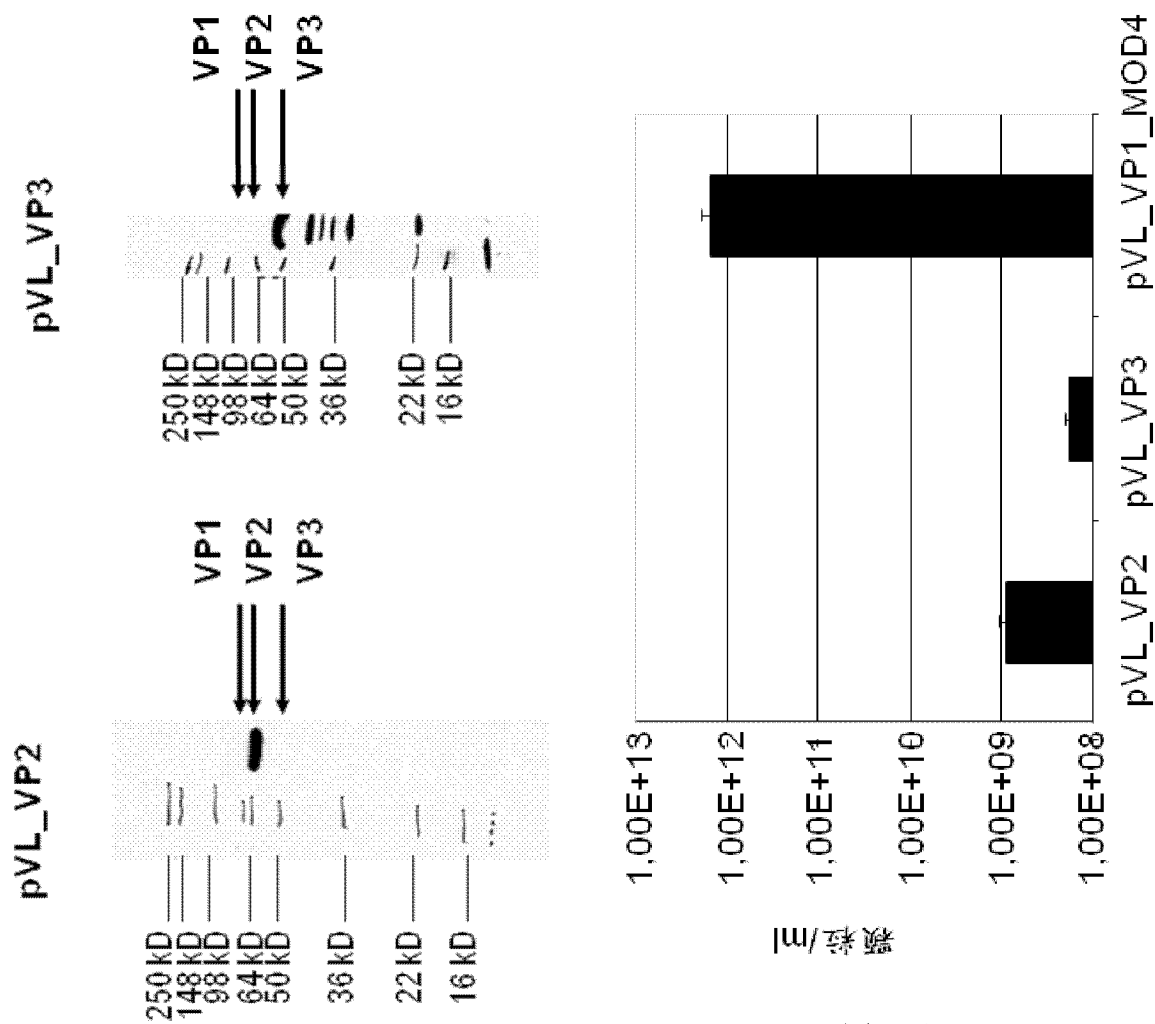


图12C)

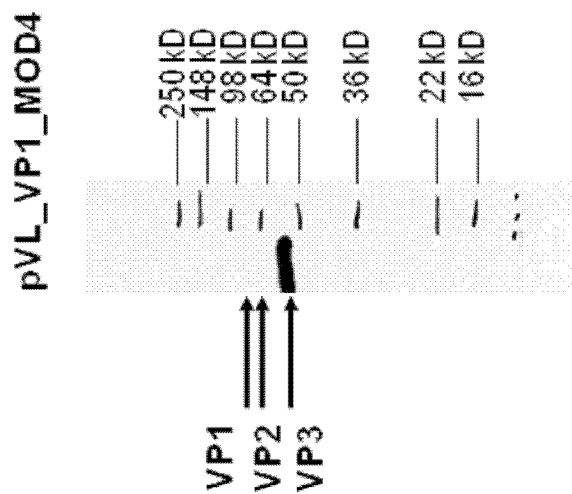


图12B)

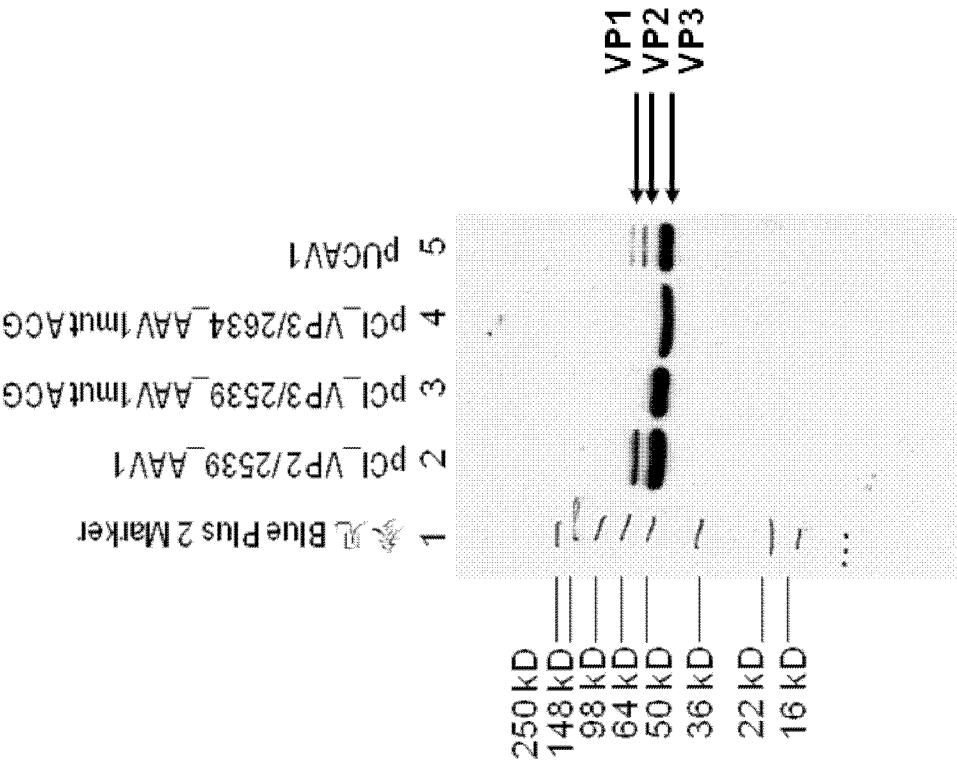


图13

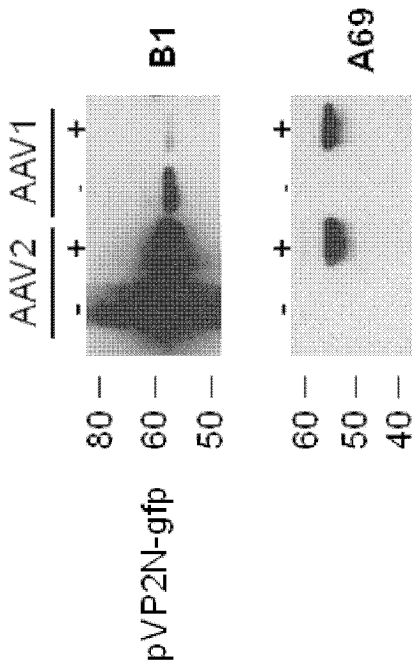


图14

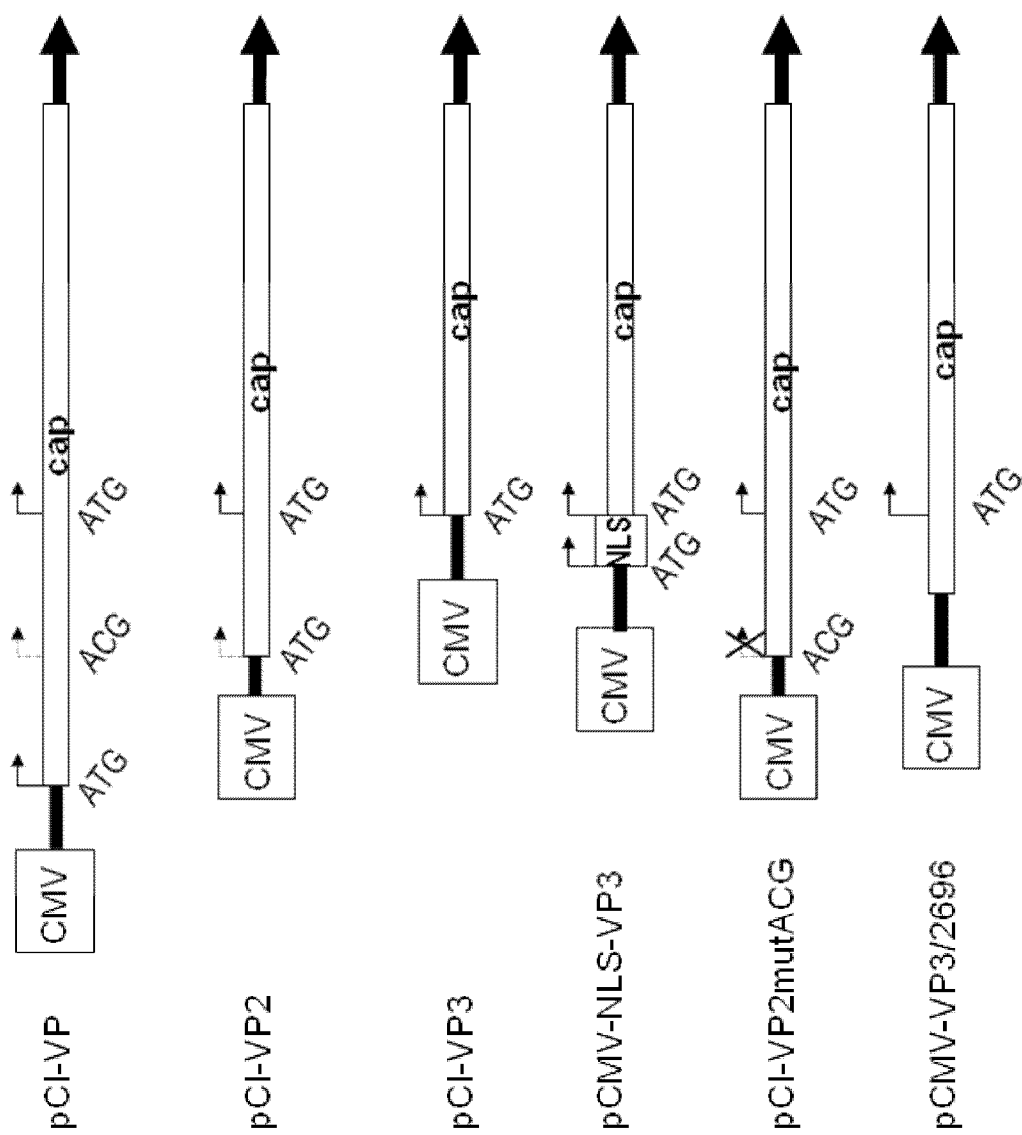


图15A)

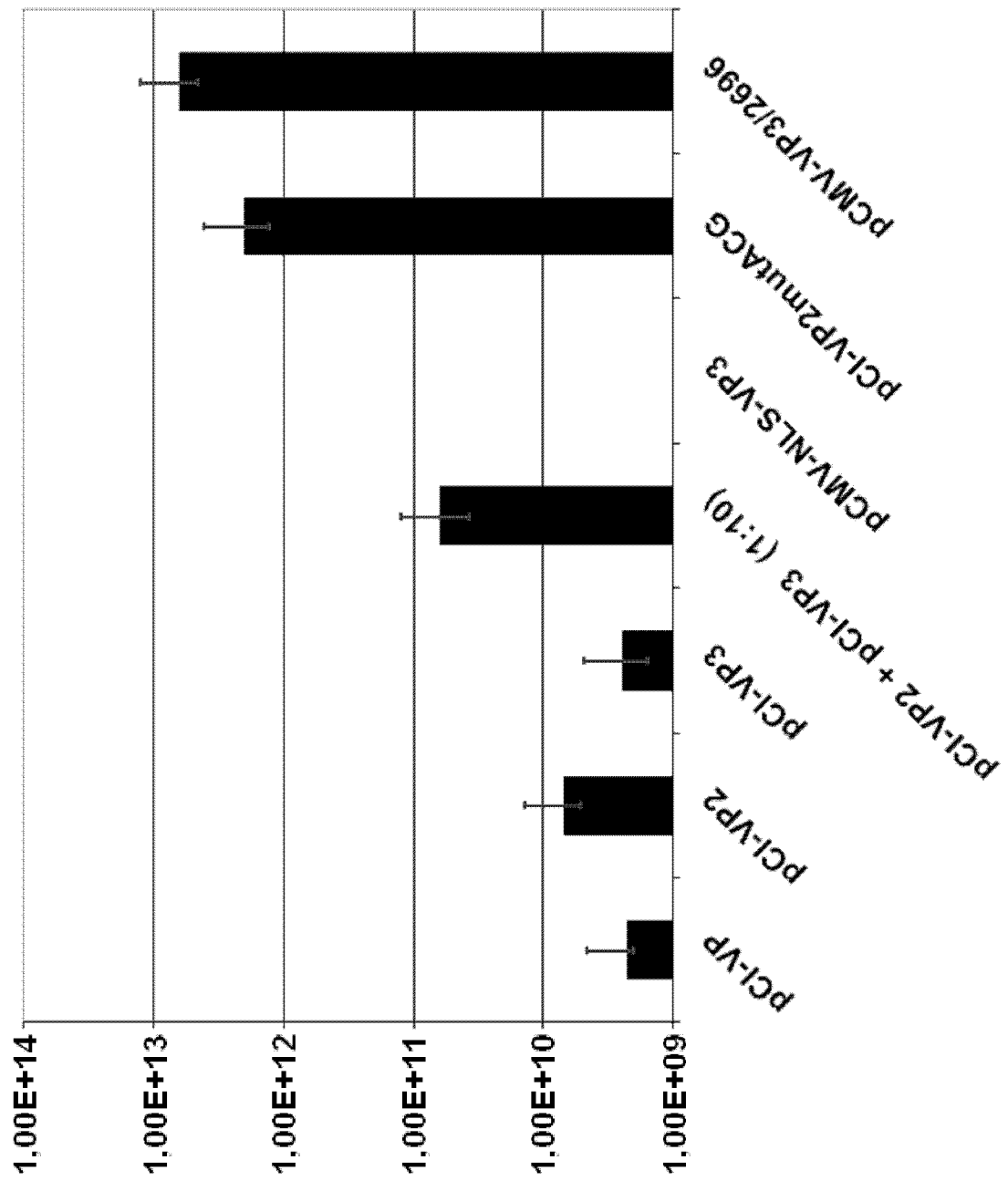


图15B)

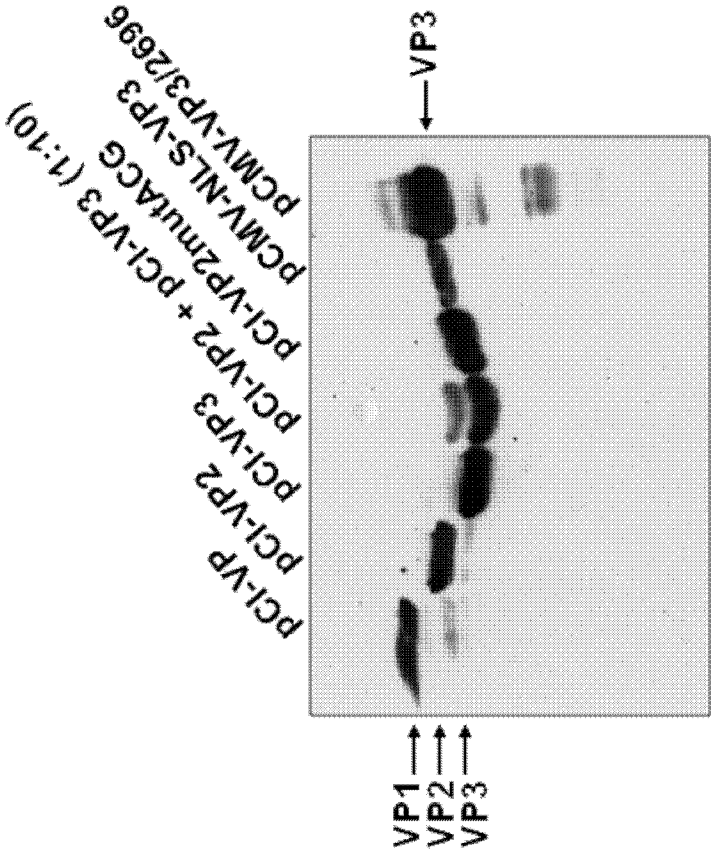


图15C)

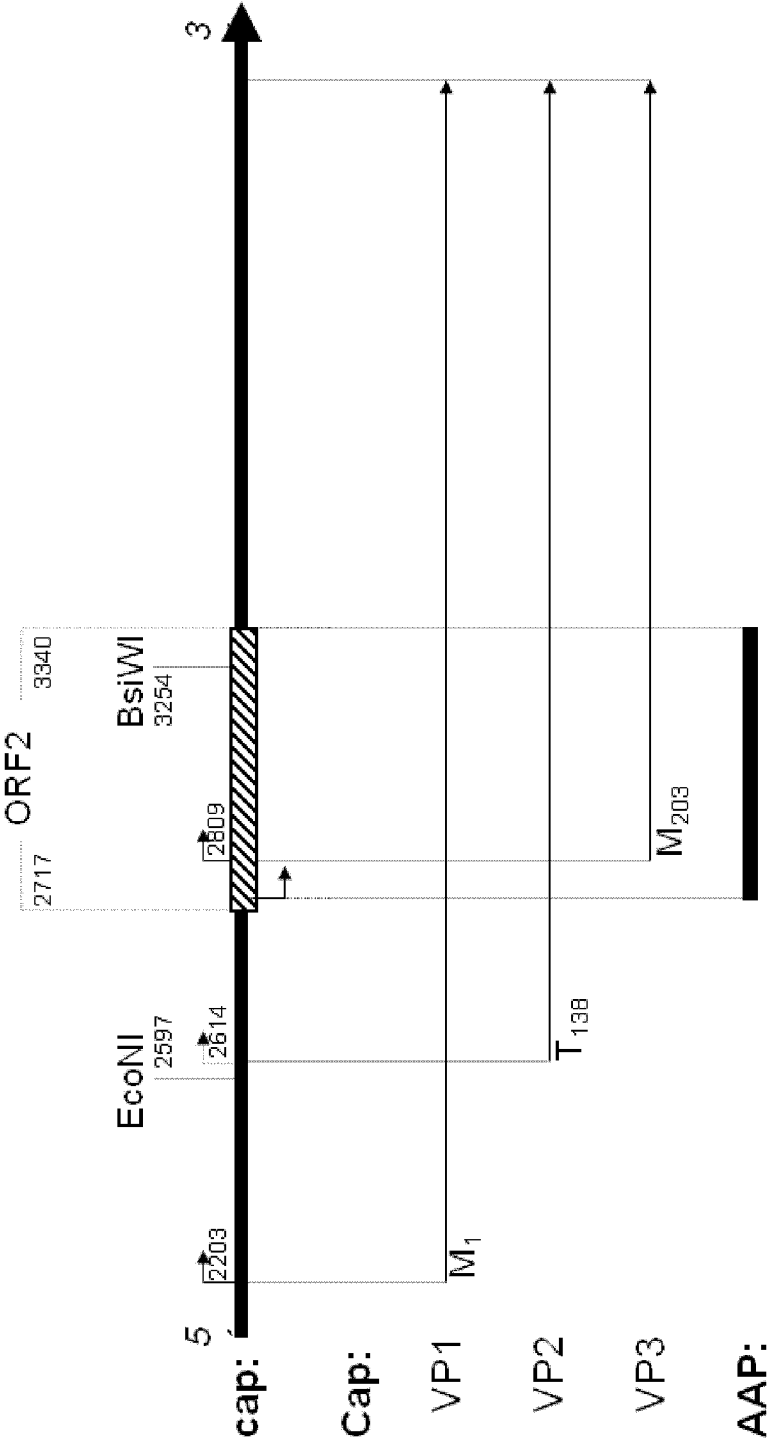


图16

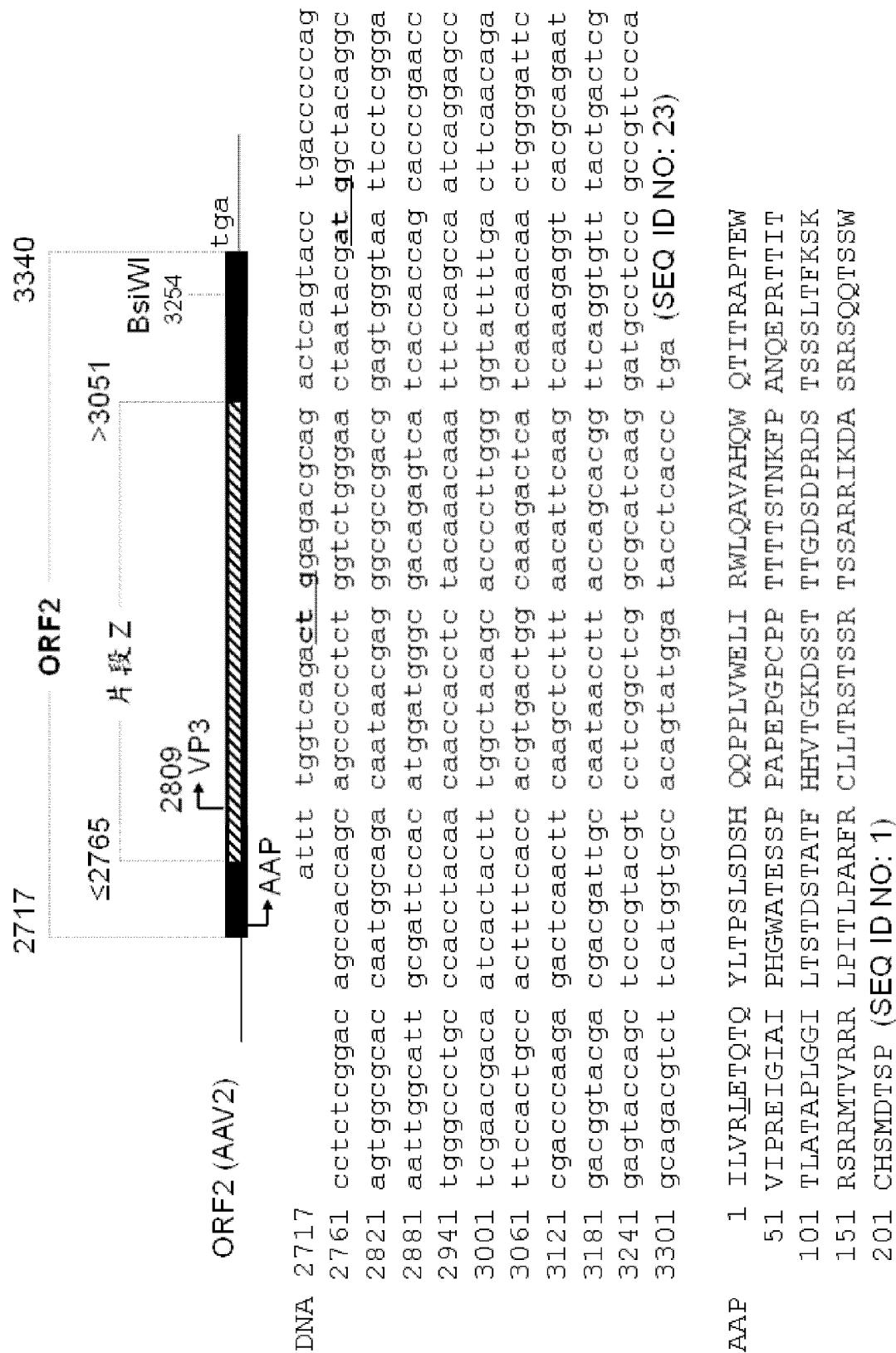


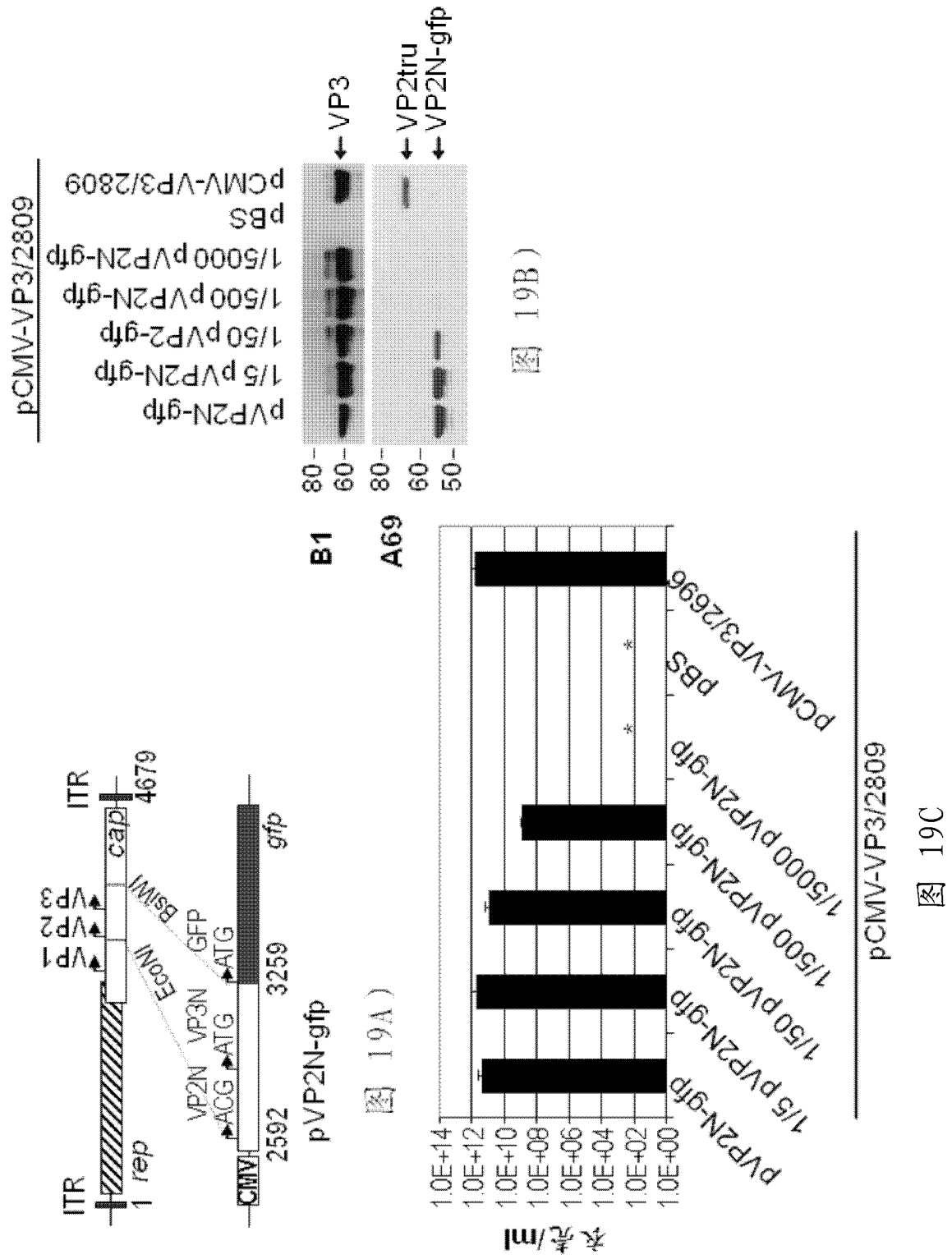
图17

ORF1cm 1 TTGAGGAACC TGTTAAGACG GCCCCCTGGCA AGAAACGGCC CGTGGAGCAC
51 AGCCCCGTGG AGCCCGACAG CAGCAGCGGC ACCGGCAAGG CCGGACAGCA
101 GCCCGCCAGA AAGCGGCTGA↓ACTTCGGCCA GACCGGCGAC GCTGATAGCG
151 TGCCCCGACCC TCAGCCCCCTG GGCCAGCCTC CTGCTGCTCC TAGCGGCCCTC
201 GGCACCAACA CCAATGGCCAC CGCAGCGGA GCCCCCATGG CCGATAACAA
251 TGAAGGGGCA GACGGCGTGG GCAACAGCTC CGGCAACTGG CACTGCGACA
301 GCACCTGGAT GGGAGATCGG GTGATCACAA CCTCCACCCG GACATGGGCT
351 CTCCCTACTT ATAATAATCA CCTGTACAAG CAGATCAGCA GCCAGAGCGG
401 CGCCAGCAAT GATAACCACT ACTTCGGTA CTCTACACC TGGGGCTACT
451 TCGATTTCAA TCGGTTTCAC TGTCACTTCA GCCCCAGAGA CTGGCAGCGG
501 CTGATTAAATA ATAATTGGG CTTCCGGCCC AAGCGGCTGA ATTTCAAGCT
551 GTTCAATATC CAGGTGAAGG AAGTGACCCA GAACGATGGC ACCACCACAA
601 TCGCCAACAA CCTGACCTCA ACCGTGCAGG TGTTCACCGA CAGCGAGTAC
651 CAGCTGCCGT AC (SEQ ID NO: 57)

图18A)

ORF2cm 1 TTGAGGAACC TGTTAAGACG GCTCCGGGAA AAAAGAGGCC GGTAGAGCAC
51 TCTCCTGTGG AGCCAGACTC CTCCTCGGGA ACCGGAAAGG CGGGCCAGCA
101 GCCTGCAAGA AAAAGATTGA↓ATTTGGTCA GACTGGAGAC GCAGACTCAG
151 TACCTGACCC CCAGCCTCTC GGACAGCCAC CAGCAGCCCC CTCGTGCTG
201 GGAACATAA CGATGGCTGC AGGCCGTGGC CCACCAGTGG CAGACCATCA
251 CCAGAGCCCC CACCGAGTGG GTGATCCCTC GGGAGATCGG CATTGCCATC
301 CCTCACGGCT GGGCCACAGA GTCTAGCCCT CCAGCCCCCTG AGCCTGGCCC
351 TTGTCCCCCT ACCACCACCA CCTCCACCAA CAAGTTCCCC GCCAACCAAG
401 AACCCCGGAC CACCATCACC ACACTGGCCA CAGCCCCTCT GGGCGGCATC
451 CTGACCAGCA CCGACAGCAC CGCCACCTTT CACCACGTGA CCGGCAAGGA
501 CAGCAGCAC ACCACCGGCG ACAGCGACCC CAGAGACAGC ACCAGCTCCA
551 GCCTGACCTT CAAGAGCAAG CGGAGCAGAC GGATGACCGT GCGGCGGAGA
601 CTGCCATATCA CCTGCCCCG CAGATTCCGG TGCCTGCTGA CCAGAAGCAC
651 CAGCAGCCGT AC (SEQ ID NO: 58)

图18B)



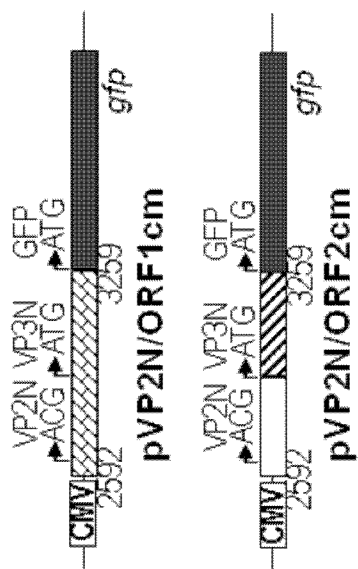


图20A)

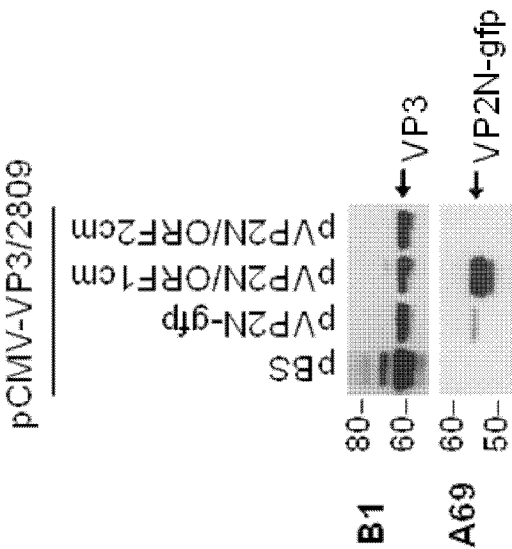


图20B)

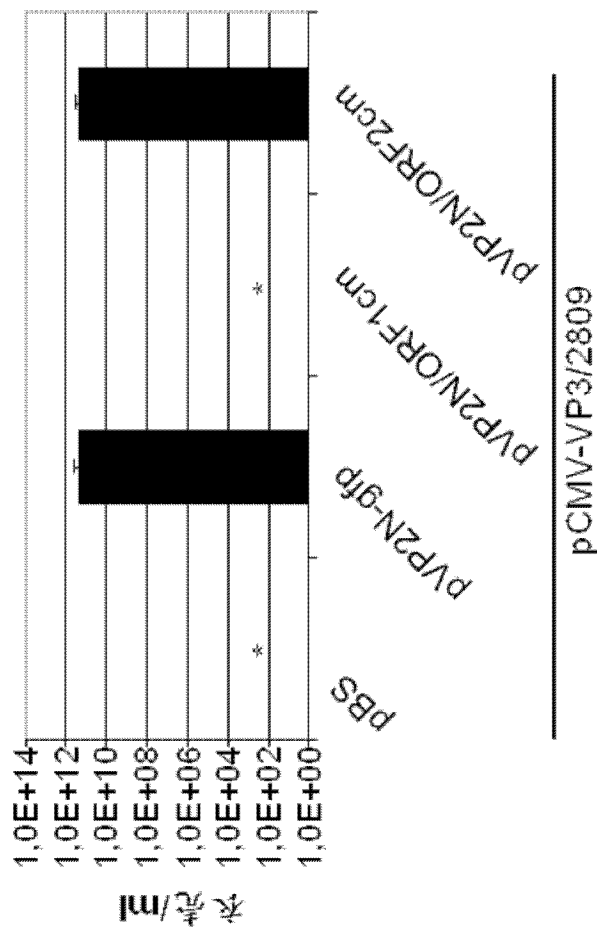
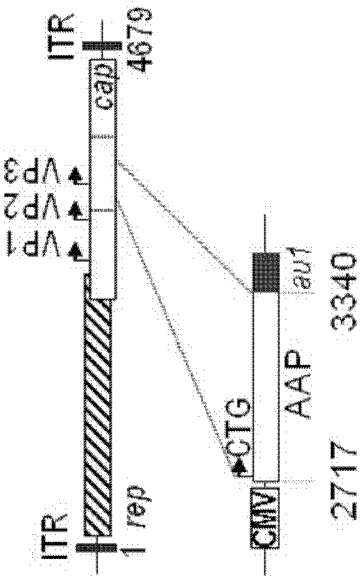


图20C)



pORF2/CTG-AU1: ctg
pORF2/ATG-AU1: atg (c2729a)
pORF2/TTG-AU1: ttg (c2729t)

图 21A)

pCMV-VP3/2809

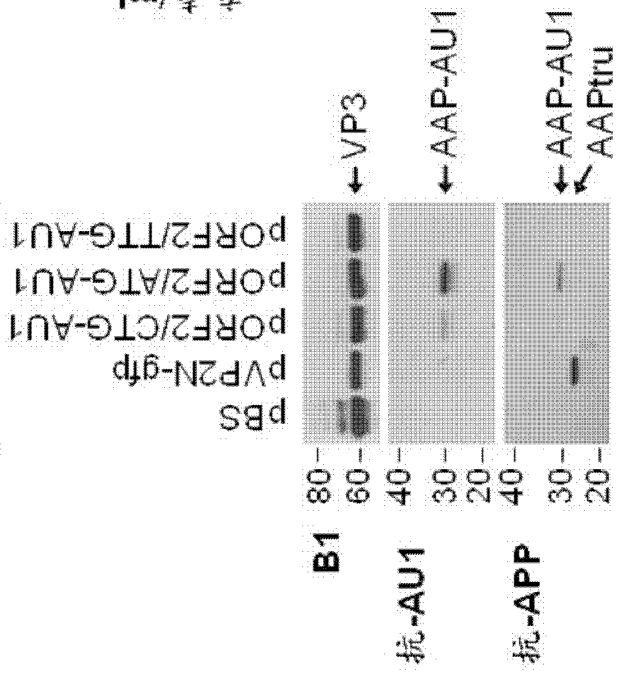
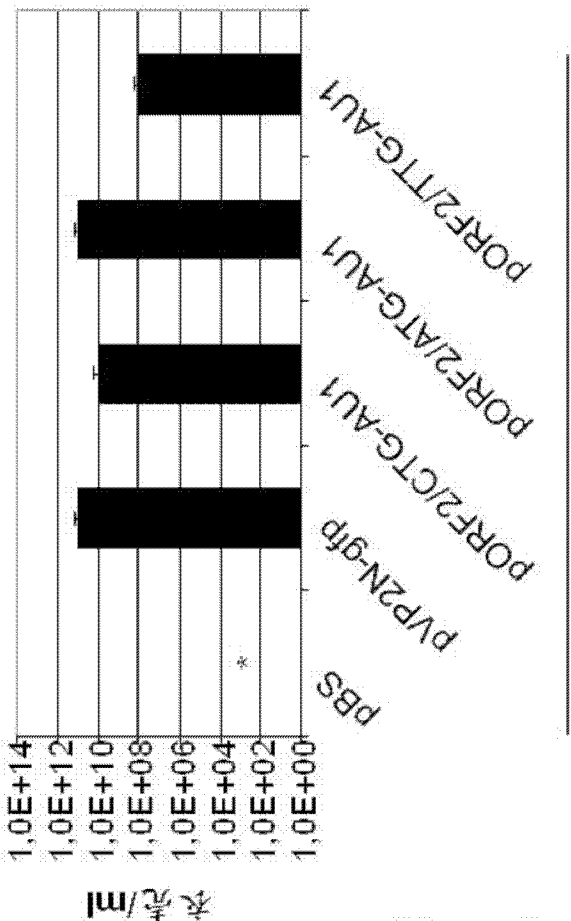


图 21B)



pCMV-VP3/2809

图 21C)

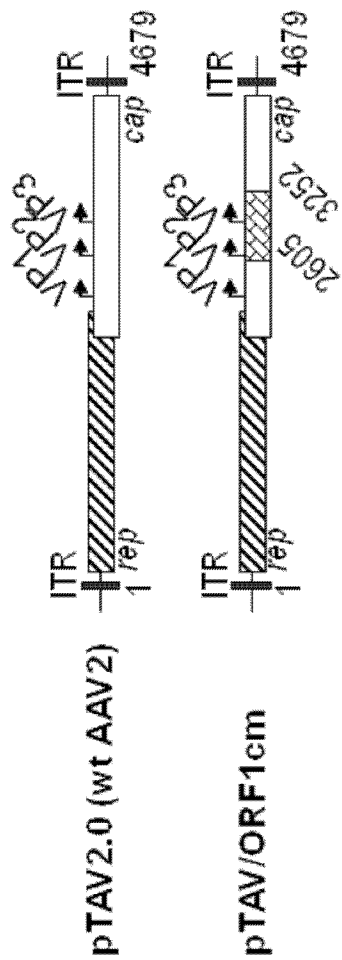


图 23A)

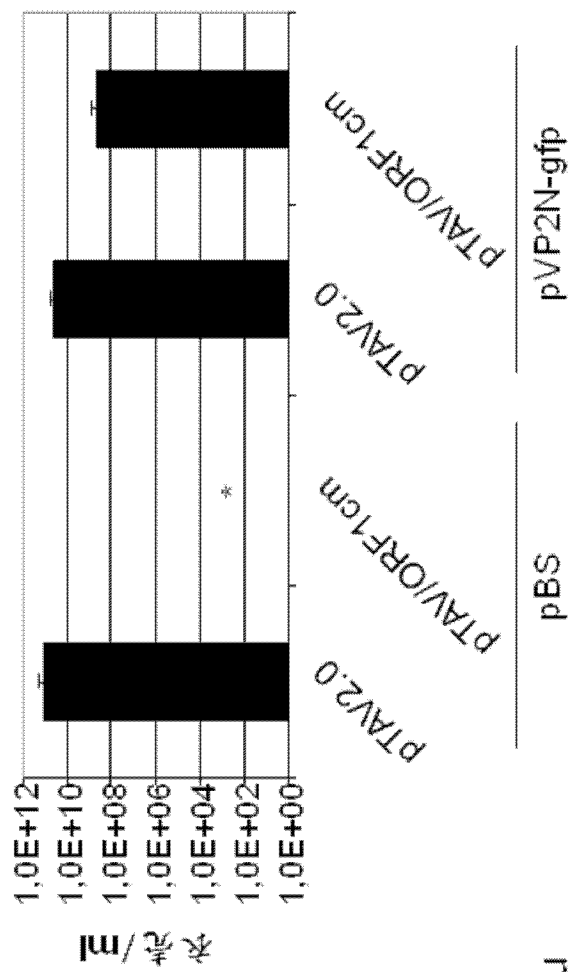


图 23C)

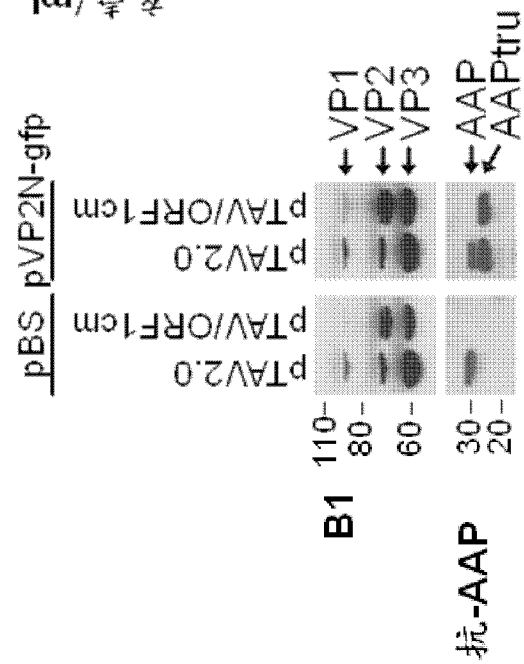


图 23B)

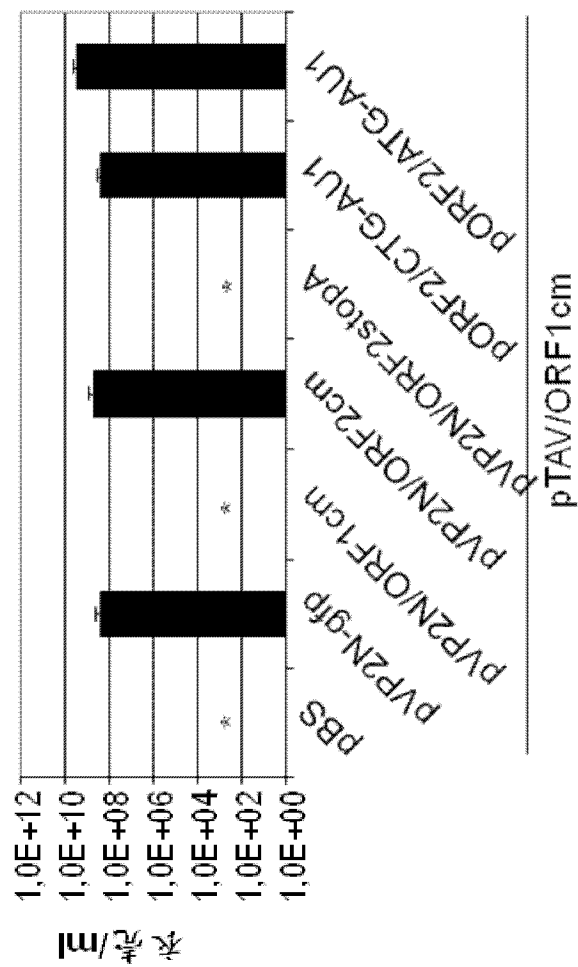


图23D)

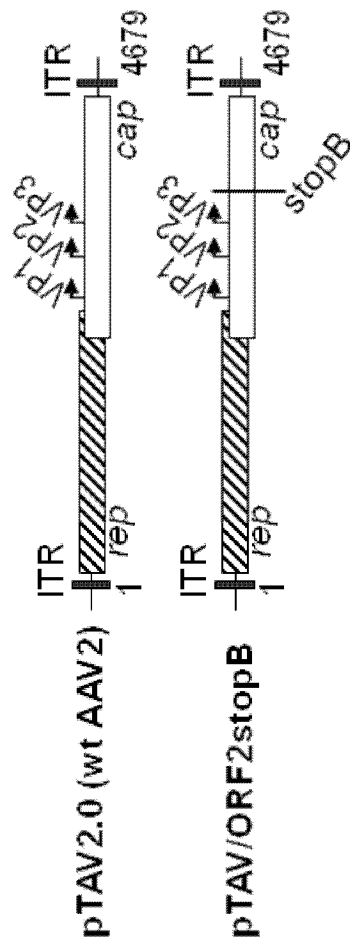


图24A)

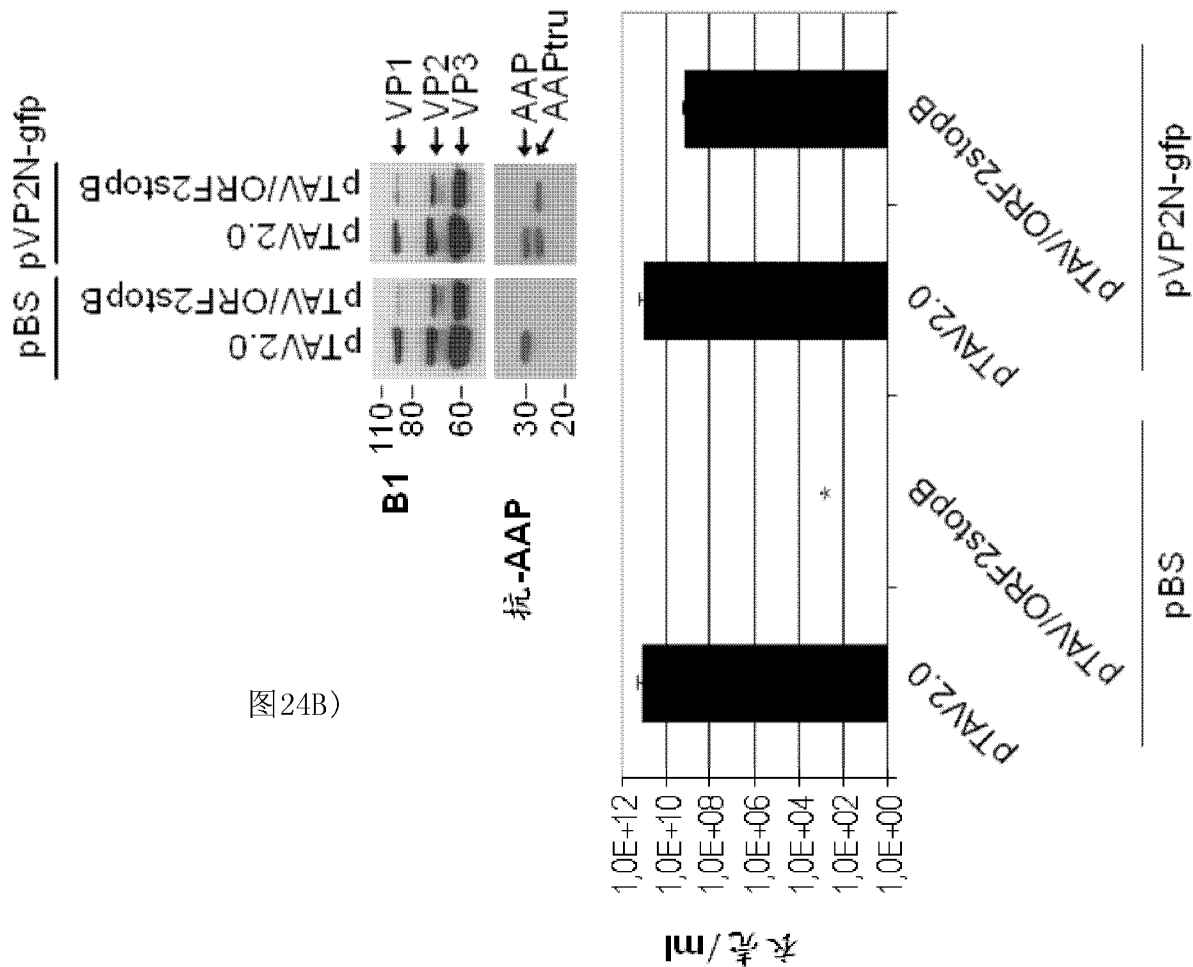


图24B)

图24C)

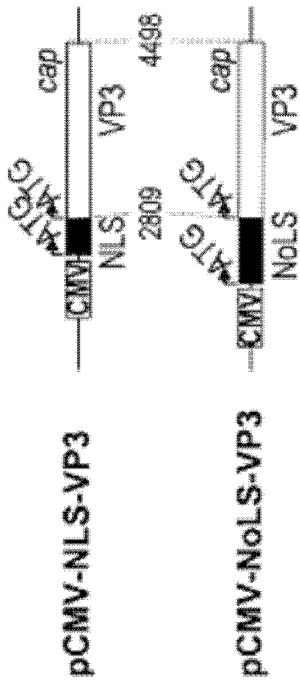


图25A)

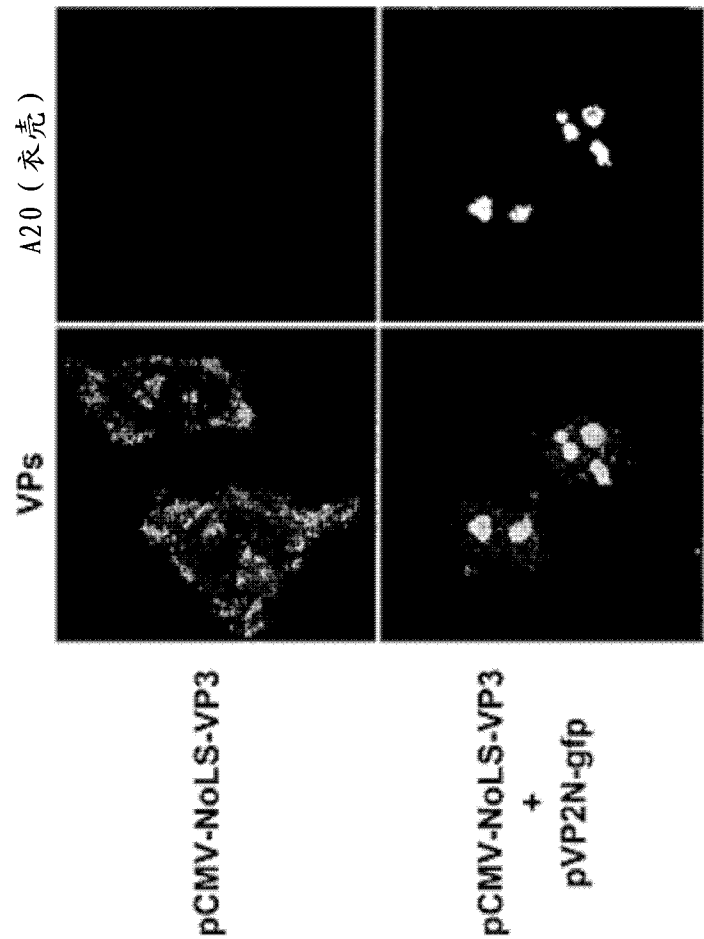


图25B

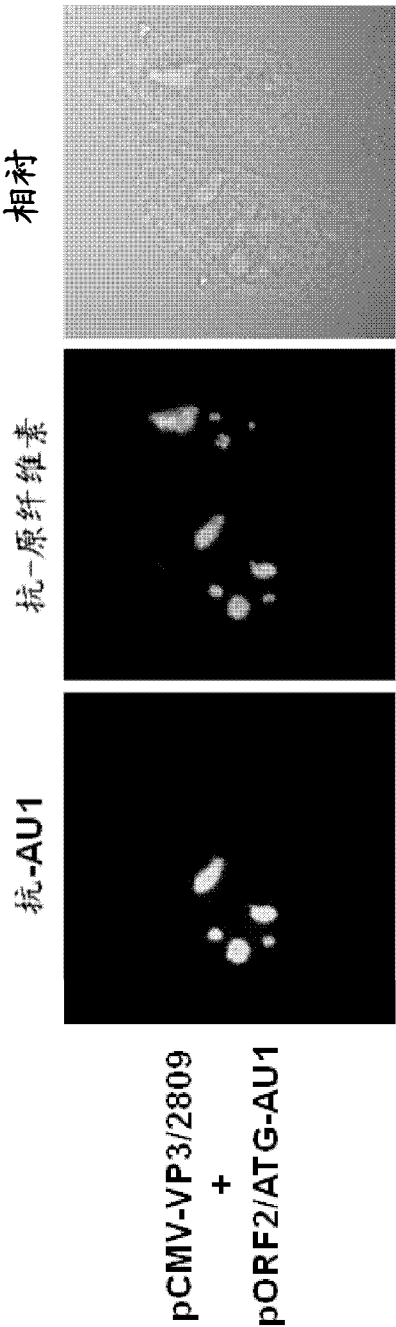


图25C)

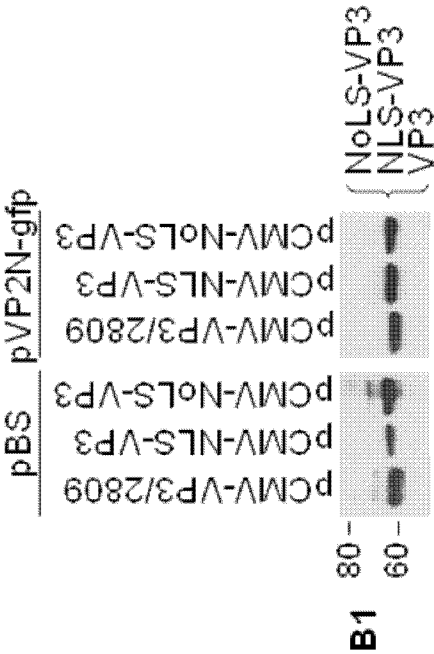


图26A)

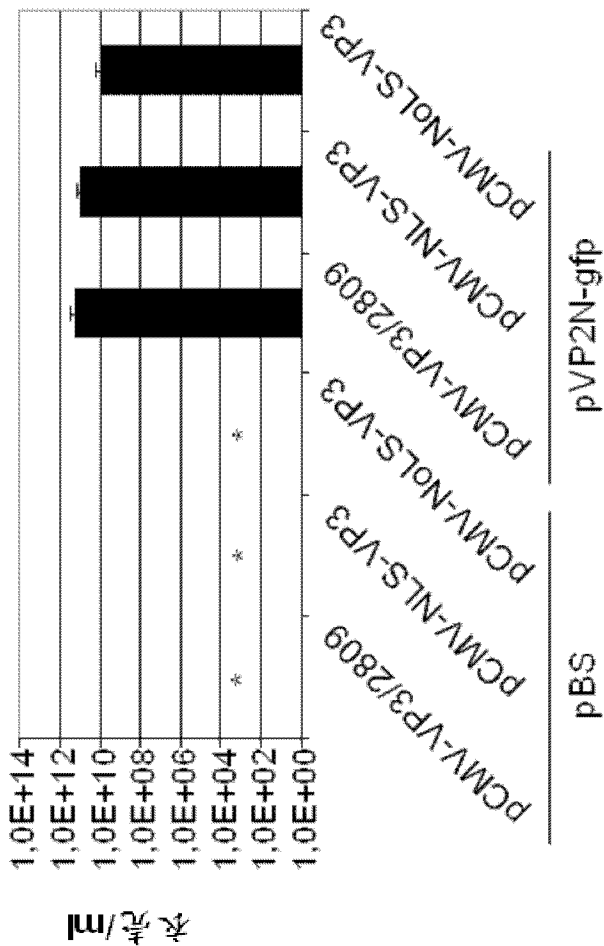


图26B)

AAV2	PRLETOQVLTISLSDSHQPP--LV-----WELIRNL-----
AAV10	TIGHLASQSPITNQSENHQAP--LV-----WDIVQNL-----
小鼠_AAV1	TRRTVSSLEPQSRPKLEALPPP--AI-----WDIVQNL-----
鼠_AAV	LNMPTRPGPGRSVENASTTESRRRRRPRPKAKPLIKRANTKEKEPIITLDQAPLV-----WDHL SWL-----
山羊_AA	TTTTQKERLGPKNRPSLPKRCIFKLPADPSSCKSQHNQPOVWELIQCL-----
大鼠_AAV1	ASBSRWLLQSSVHTPRPKQRIREVSRRDIFGRPRHSGSSPSLDIQQVYLPHNSPSLEQGFVWFLVRLL-----
猪_FV	KTEE--PERRAPNL-----WHLKWK-----
猪_FV	KSNLYLKKITLHFVIVEEKVQ--LPPKAPNL-----WHLTWQ-----
b-AAV	SRVKSQTERAELARKANSLPERDSLTITNLEPETGLPQKDHPELCLRLKCV
蛇_FV1	INTILKIKRPNKACRYQIHAEKKLHRHLGCAQVPIAAHL-----SWL
保守的	
AAV2	QAVAHQWQITIRAPTEWVIREIGIAIPHGNAITESPPABEPGPCPTTITTSNKKFPANQ--EPRITITITLATAPLGILLISTDSTAI
AAV10	QAVALQWQITIKAPTEWVIREIGIAIPHGNAITESPPABEPGPCPTTITTSKSPGCHREHAPITITTSATAPPGLISTDSTAI
小鼠_AAV1	EAVARQSITAEWVEMENAMPREIGIAIPHGNIIVSSPEPQEGIGLOFTITTSN---DSTERPETKATSDSAPPDTLISTASIVIS
鼠_AAV	KEVAVQMANQAKVETEWALIREIGIAIPENGWTTESLPELEPGSCPAITITICI--SGSKDRREPTPTINSLDSAPPGGILLITIDSTAI
山羊_AA	REVAAHWATITKVENWAMEREIGIAIPRGWTESSSPAPGCGCPATITTSERSKAAPSTIAPTP--TLDIAPPGGITLITASTATG
大鼠_AAV1	QEEALQWMLNKVPTENAMEREIGIAIPGNWATEFSPDPGPGCCBATITCISQSPACIASPGADILATAPPGGISIASIAIS
猪_FV	REERELNATLQGVFMEWVNPQREIGIAIPNGWETIQSSQRPFPFGSCQATITTSIKQLPVE--ELMMQSSNQDITVPEGGTISTASTS
猪_FV	REERELNATLQGVFMEWVNPQREIGIAIPNGWETIQSLRLQEPGSCQATITTSIKPQAE--QIQIQINMLDITAPPGGTISTASTS
b-AAV	QQLAEMVANKDKVREWVWMPVIGIAIPLGQRATSPPPAPAGSCHPTITTTCTGSG---ARATPATPSTDSPPPGDTLITASTS
蛇_FV1	QEEAVRQITIRAPREWVIPQVIGIAPISGHEITSLQSQPELGSPLIGIISTIGLITLAPQVRLMQPMQDITRLFGGILLISTASTS
保守的	
AAV2	HHVTGKDSITITGSDPRDSTISSLIFRKKSRBMIVRRRLPITLPAFRFROLITRSTISGRTISSAPRIKDAERRSQOTSSWCHNDISP
AAV10	HHVTGSDSITITGSDGCKDSAGSSSTSRSRSRBMVAFRRSPITLPAFRFYRTIRNTISGRTISSAPRITRAACLRSRMSE
小鼠_AAV1	PLETGKDSITITGSDQRAYGSKSLTFELKSRKTKQRRSPITLPAFRFYRTIRNTISGRT
鼠_AAV	PETGNDSITITGSDPKRCALDSLIRLKKSLKIPTEPSPITSPARKSLRIRITTSORISSDRLQRAFRRSRGRTISRGSMVTAR
山羊_AA	APETGKDSITITGSDPLGSEKSSSTSEKSRSGCRTPPPSPPTTSPPSKCLRITITTSRTISSATGPRDACRPSERRSLRCSTAIR
大鼠_AAV1	RPETGSASITITGASDFRDCESMSSTSRSRSLLRPRSPITSRARSSQITTSICRTSAATPFRDACRSPRISRCRCSTAIRA
猪_FV	PLETGRDLSTITIGSDPNLINSRSMSSKWSQRIKQRIQTIQSPQFKSLMMSINSRMSWAPLRKAPCRSRSRMSMPCRTGTATQC
猪_FV	LOETGRDSTITIGLDRKHNSRYSMCHLKKSRKTRQRIQLITITLPLQSRYSRIMNTSCPMTHARRPRRRRCHRSRSPQMCMPSTATAQC
b-AAV	RQETGKGSITITGDCAFKACKASASTSKLRRRLITGRPPPTTSPARSRSLTARISSRT
蛇_FV1	PETGKDSITITQSGRDKSKSLISKSNKLQCKIQKQLPTTSPAPYRLRIRITTYHMY
保守的	

图27-1

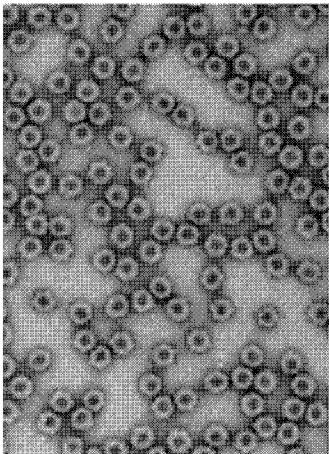
AAV2
AAV10
小鼠 AAV1
禽 AAV
山羊 AA
大鼠 AAV1
鸡 PV
鸭 PV
b-AAV
蛇 PV1
保守的

TPTRMEHGSMIVVHSIA
TPTRVEIDSMTEVPSIA

(SEQ ID NO: 1)
(SEQ ID NO: 10)
(SEQ ID NO: 16)
(SEQ ID NO: 143)
(SEQ ID NO: 18)
(SEQ ID NO: 19)
(SEQ ID NO: 20)
(SEQ ID NO: 21)
(SEQ ID NO: 13)
(SEQ ID NO: 22)

图27-2

VP3 VLP



VP1,2,3 VLP

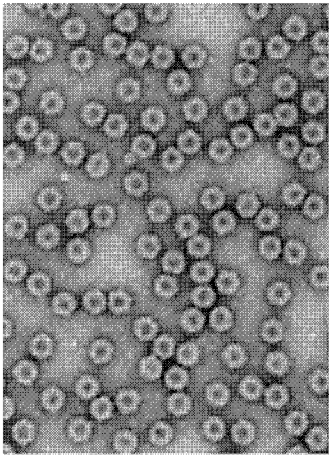


图28

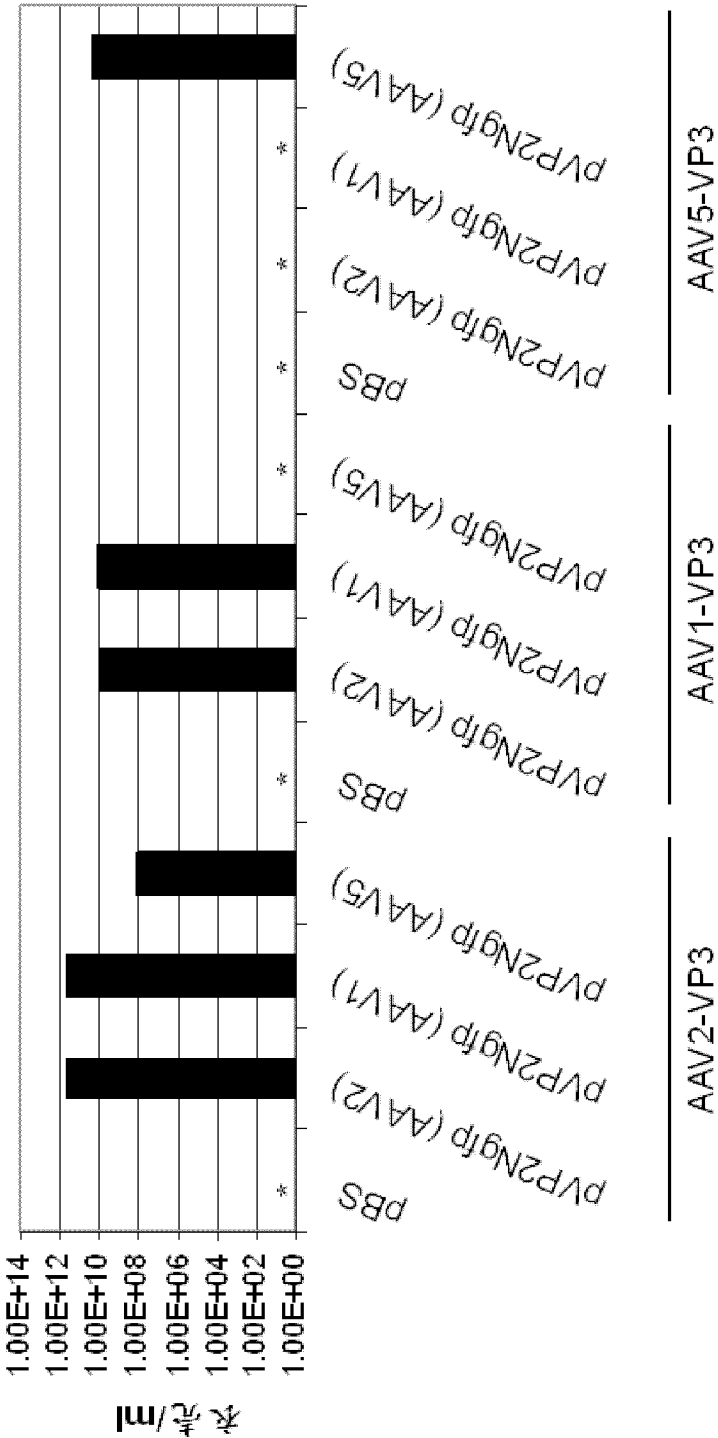


图29