



(21) 申請案號：111138258

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 15 日

(51) Int. Cl. :

*C07K14/075 (2006.01)**C07K14/005 (2006.01)**A61K35/761 (2015.01)**G01N33/569 (2006.01)**C12N7/00 (2006.01)**C12N15/861 (2006.01)**G01N33/68 (2006.01)*

(30) 優先權：2016/08/15

美國

62/375,314

(71) 申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72) 發明人：金 曉英 JIN, XIAOYING (US)；奧瑞爾登 凱瑟琳 O'RIORDAN, CATHERINE

(US)；劉 琳 LIU, LIN (US)；張 曉葵 ZHANG, KATE (US)

(74) 代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：19 共 163 頁

(54) 名稱

偵測 AAV 之方法

(57) 摘要

本文中提供了用於測定病毒顆粒的血清型和/或測定病毒顆粒(例如 AAV 顆粒)的異質性的方法。在其它實施方案中，本發明提供了測定 AAV 顆粒的異質性的方法。在一些態樣，本發明藉由增加殼體蛋白的乙酰化和/或脫醯胺化來提供具有改善的穩定性和/或改善的轉導效率的病毒顆粒(例如，rAAV 顆粒)。

Provided herein are methods for determining the serotype of a virus particle and/or or determining the heterogeneity of a virus particle (e.g., an AAV particle). In other embodiments, the invention provides methods to determine the heterogeneity of AAV particles. In some aspects, the invention provides viral particles (e.g., rAAV particles) with improved stability and/or improved transduction efficiency by increasing the acetylation and/or deamidation of capsid proteins.

指定代表圖：

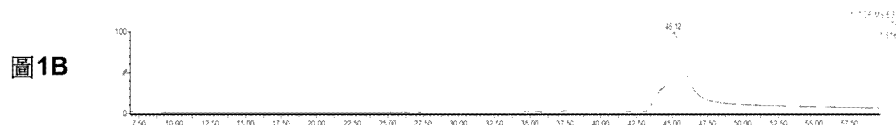
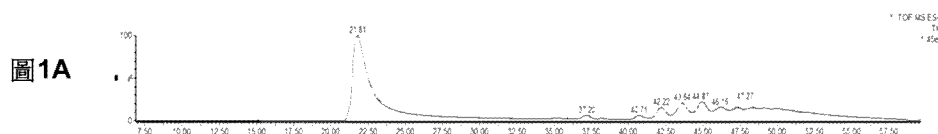


圖1C

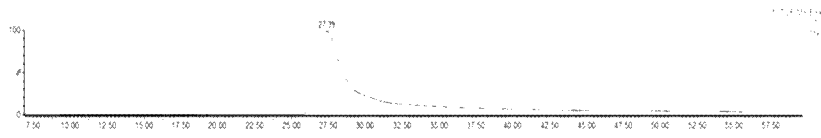
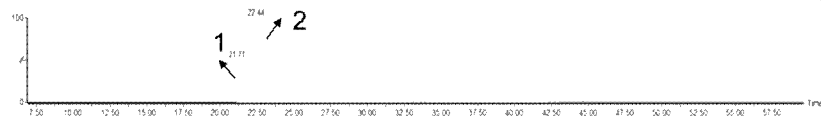


圖1D



## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 偵測AAV之方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR DETECTING AAV

### 【中文】

本文中提供了用於測定病毒顆粒的血清型和/或測定病毒顆粒(例如AAV顆粒)的異質性的方法。在其它實施方案中，本發明提供了測定AAV顆粒的異質性的方法。在一些態樣，本發明藉由增加殼體蛋白的乙醯化和/或脫醯胺化來提供具有改善的穩定性和/或改善的轉導效率的病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)。

### 【英文】

Provided herein are methods for determining the serotype of a virus particle and/or or determining the heterogeneity of a virus particle (e.g., an AAV particle). In other embodiments, the invention provides methods to determine the heterogeneity of AAV particles. In some aspects, the invention provides viral particles (e.g., rAAV particles) with improved stability and/or improved transduction efficiency by increasing the acetylation and/or deamidation of capsid proteins.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】偵測AAV之方法

【英文發明名稱】METHODS FOR DETECTING AAV

【技術領域】

【0001】對相關申請的交叉引用

【0002】本申請要求於2016年8月15日提交的美國臨時申請序列號62/375,314的優先權權益，其在此藉由引用整體併入。

【0003】ASCII文字檔上的以下提交的內容藉由引用整體併入本文：序列表的計算機可讀形式(CRF) (檔案名：xx.txt，記錄日期：xx，大小：xx KB)。

【0004】本發明涉及使用質量測定(例如藉由採用液相層析/質譜法法(LC/MS)或液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS))對病毒顆粒(例如腺相關病毒(AAV)顆粒)測定血清型和/或測定異質性的方法。在一些態樣，本發明涉及改善AAV顆粒穩定性的方法。

【先前技術】

【0005】病毒載體(例如，AAV載體)的病毒殼體蛋白(包括其序列和翻譯後修飾)的完整表徵在基因療法研究和開發中是期望的，因為病毒殼體蛋白(VP)對病毒感染性至關重要。

【0006】通常使用靶向核酸轉基因的分子工具鑒定病毒載體產物，如重組腺相關病毒(rAAV)產物。這些方法可以包括靶向轉基因特異性序列的聚合酶鏈式反應(PCR)和限制性片段長度多態性(RFLP)技術。隨著rAAV技術演化，許多

機構開始研究編碼其治療性轉基因的多種AAV殼體血清型，以改善靶向組織向性。

**【0007】** 傳統的分子鑒定方法鑒定含有獨特轉基因的產物，但不能辨別那些具有不同AAV殼體血清型的產物。目前，大多數AAV血清型鑒定測試基於SDS-PAGE顯帶模式、基於抗體的ELISA、或Western印跡測定法。然而，顯帶模式和抗體對於區分不同AAV血清型不是足夠特異的。已經報告了Gel-LC/MS/MS為殼體血清型鑒定方法。然而，此方法牽涉多個步驟，包括SDS-PAGE、凝膠內消化和LC/MS/MS，並且因此需要多天進行分析，同時提供有限的序列覆蓋。用於鑒定載體，如rAAV載體的方法對於基因療法載體是感興趣的(參見例如美國PG公開文本No. US20110275529)。因此，具有改善的表徵病毒顆粒的方法將是有用的。

**【0008】** 藉由引用將本文中引用的所有參考文獻，包括專利申請和出版物整體併入本文。

#### **【發明內容】**

**【0009】** 使用rAAV作為例子，本文中描述了使用LC/MS作為特異性鑒定不同病毒殼體血清型(例如rAAV殼體血清型)的分析工具。作為病毒表徵的部分，可以使用LC/MS提升分子鑒定方法。此分析組合可以藉由辨別產物的治療轉基因的身份和殼體血清型的身份來滿足管理要求。可以使用此方法，例如作為AAV血清型鑒定試驗，或用於監測重組AAV基因療法開發中的病毒殼體蛋白異質性。它也可用於確認殼體工程化研究中的VP序列。此外，可以使用此技術

研究後翻譯修飾(如病毒殼體蛋白的N端乙醯化)對轉染效力和胞內蛋白質運輸的影響。

**【0010】** 還可以使用本文中所述的方法設計AAV顆粒以獲得更大的穩定性和/或改善的轉導效率；例如藉由改變AAV殼體的VP1和/或VP3的第2位處的胺基酸殘基，使得與野生型AAV殼體相比，以更高的程度使第2位處的胺基酸乙醯化。在一些實施方案中，可以使用方法設計具有降低的轉導效率的AAV顆粒；例如藉由改變AAV殼體的VP1和/或VP3的第2位處的胺基酸殘基，使得與野生型AAV殼體相比以更高或更低的程度使第2位處的胺基酸脫乙醯化。

**【0011】** 在一些態樣，本發明提供了測定病毒顆粒的血清型的方法，所述方法包括：a) 使病毒顆粒變性，b) 使變性的病毒進行液相層析/質譜法(LC/MS)，並且c) 測定病毒顆粒的一種或多種殼體蛋白的質量；其中一種或多種殼體蛋白的質量的特定組合表示病毒血清型。在一些實施方案中，將一種或多種殼體蛋白的計算質量與一種或多種病毒血清型的一種或多種殼體蛋白的理論質量比較。

**【0012】** 在一些態樣，本發明提供了測定病毒顆粒的異質性的方法，所述方法包括a) 使病毒顆粒變性，b) 使變性的病毒顆粒進行液相層析/質譜法/質譜法(LC/MS/MS)，c) 測定所述病毒顆粒的一種或多種殼體蛋白的質量，並且d) 將步驟c)的質量與病毒血清型的一種或多種殼體蛋白的理論質量比較；其中一種或多種殼體蛋白的一種或多種質量的偏差表示病毒殼體異質性。在一些實施方案中，異質性包含下列一種或多種：混合血清型、變體殼體、殼體胺基酸取代、截短的殼體或經修飾的殼體。

【0013】 在上述態樣的一些實施方案中，液相層析是逆相液相層析、尺寸排阻層析、親水相互作用液相層析、或陽離子交換層析。 在一些實施方案中，病毒顆粒包含編碼異源轉基因的病毒載體。

【0014】 在一些態樣，方法提供了測定病毒顆粒的血清型的方法，所述方法包括a) 使病毒顆粒變性，b) 使變性的病毒顆粒進行還原和/或烷基化，c) 對變性的病毒顆粒進行消化以產生所述病毒顆粒的一種或多種殼體蛋白片段，d) 使所述一種或多種殼體蛋白的片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)，並且e) 測定所述病毒顆粒的一種或多種殼體蛋白片段的質量；其中一種或多種殼體蛋白的片段的質量的特定組合表示病毒血清型。在一些實施方案中，將一種或多種殼體蛋白片段的計算質量與一種或多種病毒血清型的一種或多種殼體蛋白的片段的理論質量比較。

【0015】 在一些態樣，本發明提供了測定病毒顆粒的血清型的異質性的方法，所述方法包括a) 使病毒顆粒變性，b) 使變性的病毒顆粒進行還原和/或烷基化，c) 對變性的病毒顆粒進行消化以產生病毒顆粒的一種或多種殼體蛋白片段，d) 使一種或多種殼體蛋白的片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)，e) 測定所述病毒顆粒的一種或多種殼體蛋白片段的質量，並且f) 將步驟e)的質量與所述病毒血清型的一種或多種殼體蛋白的片段的理論質量比較；其中一種或多種殼體蛋白的一種或多種質量的偏差表示病毒殼體異質性。在一些實施方案中，異質性包括下列一種或多種：混合血清型、變體殼體、殼體胺基酸取代、截短的殼體或經修飾的殼體。在一些實施方案中，液相層析是逆相液相層析、尺寸排阻層析、親水相互作用液相層析或陽離子交換層析。

【0016】如本文中顯示，可以在缺乏凝膠分離步驟(例如十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE))的情況下進行方法。

【0017】在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，病毒顆粒包含編碼異源轉基因的病毒載體。在一些實施方案中，病毒顆粒屬選自下組的病毒科：腺病毒科、細小病毒科、逆轉錄病毒科、桿狀病毒科和疱疹病毒科。在一些實施方案中，病毒顆粒屬選自下組的病毒屬：腺胸腺病毒屬(*Atadenovirus*)、禽腺病毒屬(*Aviadenovirus*)、*Ichtadenovirus*、哺乳動物腺病毒屬(*Mastadenovirus*)、唾液腺病毒屬(*Siadenovirus*)、*Ambidensovirus*、短頸濃核病毒屬(*Brevidensovirus*)、蝦肝胰腺濃核病毒屬(*Hepandensovirus*)、重複濃核病毒屬(*Iterandensovirus*)、*Penstlydensovirus*、*Amdoparvovirus*、*Aveparvovirus*、博卡病毒屬(*Bocaparvovirus*)、*Copiparvovirus*、*Dependoparvovirus*、*Erythroparvovirus*、*Protoparvovirus*、*Tetraparvovirus*、 $\alpha$ 反轉錄病毒屬、 $\beta$ 反轉錄病毒屬、 $\delta$ 逆轉錄病毒屬、 $\epsilon$ 反轉錄病毒屬、 $\gamma$ 逆轉錄病毒屬、慢病毒屬、泡沫病毒屬、 $\alpha$ 桿狀病毒屬(*Alphabaculovirus*)、 $\beta$ 桿狀病毒屬(*Betabaculovirus*)、 $\delta$ 桿狀病毒屬(*Deltabaculovirus*)、 $\gamma$ 桿狀病毒屬(*Gammabaculovirus*)、傳喉炎病毒屬(*Iltovirus*)、馬立克病毒屬(*Mardivirus*)、單純疱疹病毒屬(*Simplexvirus*)、水痘病毒屬、巨細胞病毒屬、鼠巨細胞病毒屬(*Muromegalovirus*)、長鼻動物病毒屬(*Proboscivirus*)、薔薇疹病毒屬、淋巴細胞隱病毒屬(*Lymphocryptovirus*)、瑪卡病毒屬(*Macavirus*)、馬疱疹病毒屬(*Percavirus*)和棒狀病毒屬(*Rhadinovirus*)。

【0018】在一些態樣，本發明提供了測定腺相關病毒(AAV)顆粒的血清型的方法，所述方法包括：a) 使AAV顆粒變性，b) 使變性的AAV顆粒進行液相層析/質譜法(LC/MS)，並且c) 測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的質量；其中VP1、

VP2和VP3的質量的特定組合表示AAV血清型。在一些實施方案中，將VP1、VP2和VP3的計算質量與一種或多種AAV血清型的VP1、VP2和VP3的理論質量比較。

**【0019】** 在一些態樣，本發明提供了測定AAV顆粒的異質性的方法，所述方法包括a) 使AAV顆粒變性，b) 使變性的AAV顆粒進行液相層析/質譜法/質譜法(LC/MS/MS)，c) 測定所述AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的質量，並且d) 將步驟c)的質量與AAV血清型的VP1、VP2和VP3的理論質量比較；其中VP1、VP2或VP3的一種或多種質量的偏差表示AAV殼體異質性。在一些實施方案中，異質性包含下列一種或多種：混合血清型、變體殼體、殼體胺基酸取代、截短的殼體或經修飾的殼體。

**【0020】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，用乙酸、鹽酸胍和/或有機溶劑使所述AAV顆粒變性。在一些實施方案中，液相層析是逆相液相層析、尺寸排阻層析、親水相互作用液相層析、或陽離子交換層析。在一些實施方案中，液相層析是逆相液相層析。在一些實施方案中，逆相層析是C4或C8逆相層析。在一些實施方案中，層析使用含甲酸之水的移動相A。在一些實施方案中，移動相A包含約0.1%的甲酸。在一些實施方案中，層析包含含甲酸之乙腈的移動相B。在一些實施方案中，移動相B包含約0.1%的甲酸。在一些實施方案中，層析中移動相B的比例隨時間增加。在一些實施方案中，層析中移動相B的比例以逐步的方式增加。在一些實施方案中，移動相B從約10%至約20%、從約20%至約30%、和從約30%至約38%增加。在一些實施方案中，移動相B在約6分鐘內從約10%增加到約20%，在約10分鐘內從約20%增加到約30%，以及在約40分鐘內從約30%增加到約38%。在一些實施方案中，液相層析是超高效液相層析(UPLC)。

【0021】 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中質譜法包括約3.5kV的毛細管電壓。在一些實施方案中，質譜法包括約45V的採樣錐電壓。在一些實施方案中，質譜法包括輔助校準。在一些實施方案中，碘化鈉用作校準物。

【0022】 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，將VP1和/或VP3的N端乙醯化。在一些實施方案中，AAV顆粒是重組AAV (rAAV)顆粒。在一些實施方案中，AAV顆粒包含AAV1殼體、AAV2殼體、AAV3殼體、AAV4殼體、AAV5殼體、AAV6殼體、AAV7殼體、AAV8殼體、AAVrh8殼體、AAV9殼體、AAV10殼體、AAVrh10殼體、AAV11殼體、AAV12殼體、AAV LK03殼體、AAV2R471A殼體、AAV2/2-7m8殼體、AAV DJ殼體、AAV DJ8殼體、AAV2 N587A殼體、AAV2 E548A殼體、AAV2 N708A殼體、AAV V708K殼體、山羊AAV殼體、AAV1/AAV2嵌合殼體、牛AAV殼體、或小鼠AAV殼體rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV/人博卡病毒1)。在一些實施方案中，AAV殼體包含酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施方案中，將VP1、VP2、和VP3的質量與下列一項或多項的理論質量比較：AAV1殼體、AAV2殼體、AAV3殼體、AAV4殼體、AAV5殼體、AAV6殼體、AAV7殼體、AAV8殼體、AAVrh8殼體、AAV9殼體、AAV10殼體、AAVrh10殼體、AAV11殼體、AAV12殼體、AAV LK03殼體、AAV2R471A殼體、AAV2/2-7m8殼體、AAV DJ殼體、AAV DJ8殼體、AAV2 N587A殼體、AAV2 E548A殼體、AAV2 N708A殼體、AAV V708K 殼體、山羊AAV殼體、AAV1/AAV2嵌合殼體、牛AAV殼體或小鼠AAV殼體rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV/人博卡病毒1)、AAV2HBKO殼體、AAVPHP.B 殼體或AAVPHP.eB 殼體。

【0023】 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，病毒顆粒包含AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、

AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR、或AAV12 ITR。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼異源轉基因的AAV載體。

**【0024】** 在一些態樣，本發明提供了測定腺相關病毒(AAV)顆粒的血清型的方法，所述方法包括a)使AAV顆粒變性，b)使變性的AAV顆粒進行還原和/或烷基化，c)對變性的AAV顆粒進行消化以產生所述AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3片段，d)使所述VP1、VP2和/或VP3的片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)，並且e)測定所述AAV顆粒的VP1、VP2和VP3片段的質量；其中VP1、VP2和VP3的片段的質量的特定組合表示AAV血清型。在一些實施方案中，將VP1、VP2和/或VP3片段的計算質量與一種或多種AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3的片段的理論質量比較。

**【0025】** 在一些態樣，本發明提供了測定AAV顆粒的血清型的異質性的方法，所述方法包括a)使AAV顆粒變性，b)使變性的AAV顆粒進行還原和/或烷基化，c)對變性的AAV顆粒進行消化以產生AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3片段，d)使VP1、VP2和/或VP3的片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)，e)測定所述AAV顆粒的VP1、VP2和VP3片段的質量，並且f)將步驟e)的質量與所述AAV血清型的VP1、VP2和VP3的片段的理論質量比較；其中VP1、VP2或VP3的一種或多種質量的偏差表示AAV殼體異質性。在一些實施方案中，異質性包括下列一種或多種：混合血清型、變體殼體、殼體胺基酸取代、截短的殼體或經修飾的殼體。在一些實施方案中，還原藉由使所述AAV顆粒經受二硫蘇糖醇、 $\beta$ -巰基乙醇或三(2-羧乙基)膦(TCEP)進行。在一些實施方案中，烷基化藉由使所述AAV顆粒經受碘乙酸、碘乙醯胺或4-乙炔基吡啶進行。在一些實施方案中，消化是酶消化或化學消化。在一些實施方案中，酶消化是內肽酶消化。在一些

實施方案中，酶消化是胰蛋白酶消化、LysC消化，Asp-N消化或Glu-C消化。在一些實施方案中，化學消化是溴化氰消化或酸消化。在一些實施方案中，用乙酸/鹽酸胍和/或有機溶劑使所述AAV顆粒變性。

**【0026】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，液相層析是逆相液相層析、尺寸排阻層析、親水相互作用液相層析或陽離子交換層析。在一些實施方案中，液相層析是逆相液相層析。在一些實施方案中，逆相層析是C18逆相層析。在一些實施方案中，層析使用含甲酸之水的移動相A。在一些實施方案中，移動相A包含約0.1%的甲酸。在一些實施方案中，層析包含含甲酸之乙腈的移動相B。在一些實施方案中，移動相B包含約0.1%的甲酸。在一些實施方案中，層析中移動相B的比例隨時間增加。在一些實施方案中，移動相B從約2%增加到約60%。在一些實施方案中，移動相B在約121分鐘內從約2%增加到約60%。在一些實施方案中，液相層析是高效液相層析(HPLC)。

**【0027】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，質譜法包括約3.5kV的毛細管電壓。在一些實施方案中，質譜法包括約45V的採樣錐電壓。在一些實施方案中，質譜法包括輔助校準。在一些實施方案中，碘化鈉用作校準物。

**【0028】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，將VP1和/或VP3的N端乙醯化。在一些實施方案中，AAV顆粒是重組AAV (rAAV)顆粒。在一些實施方案中，AAV顆粒包含AAV1殼體、AAV2殼體、AAV3殼體、AAV4殼體、AAV5殼體、AAV6殼體、AAV7殼體、AAV8殼體、AAVrh8殼體、AAV9殼體、AAV10殼體、AAVrh10殼體、AAV11殼體、AAV12殼體、AAV LK03殼體、AAV2R471A殼體、AAV2/2-7m8殼體、AAV DJ殼體、AAV DJ8殼體、AAV2 N587A殼體、AAV2 E548A殼體、AAV2 N708A殼體、AAV V708K 殼體、山羊AAV殼體、AAV1/AAV2

嵌合殼體、牛AAV殼體、或小鼠AAV殼體rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV/人博卡病毒1)。在一些實施方案中，AAV殼體包含酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施方案中，將VP1、VP2、和VP3的質量與下列一項或多項的理論質量比較：AAV1殼體、AAV2殼體、AAV3殼體、AAV4殼體、AAV5殼體、AAV6殼體、AAV7殼體、AAV8殼體、AAVrh8殼體、AAV9殼體、AAV10殼體、AAVrh10殼體、AAV11殼體、AAV12殼體、AAV LK03殼體、AAV2R471A殼體AAV2/2-7m8殼體、AAV DJ殼體、AAV DJ8殼體、AAV2 N587A殼體、AAV2 E548A殼體、AAV2 N708A殼體、AAV V708K 殼體、山羊AAV殼體、AAV1/AAV2嵌合殼體、牛AAV殼體、或小鼠AAV殼體rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV/人博卡病毒1)。

**【0029】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，病毒顆粒包含AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR、或AAV12 ITR。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼異源轉基因的AAV載體。

**【0030】** 在一些實施方案中，本發明提供了重組AAV (rAAV)顆粒，其包含VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代；其中與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，取代導致較高頻率的N端乙醯化或較低頻率的N端乙醯化。在一些實施方案中，rAAV顆粒包含VP1的胺基酸殘基2處的胺基酸取代；其中與所述親本AAV顆粒的VP1的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP1的胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，rAAV顆粒包含VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代；其中與所述親本AAV顆粒的VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸

取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro或Tyr取代所述胺基酸殘基2。在一些實施方案中，用Ser、Asp或Glu取代胺基酸殘基2。

**【0031】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，AAV顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8 殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、小鼠AAV、rAAV2/HBoV1血清型殼體、AAV2 HBKO、AAVPHP.B或AAVPHB.eB血清型殼體。在一些實施方案中，AAV殼體還包含酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施方案中，rAAV顆粒包含rAAV載體。在一些實施方案中，rAAV載體包含一種或多種AAV ITR。在一些實施方案中，rAAV載體包含AAV1 ITR，AAV2 ITR，AAV3 ITR，AAV4 ITR，AAV5 ITR，AAV6 ITR，AAV7 ITR，AAV8 ITR，AAVrh8 ITR，AAV9 ITR，AAV10 ITR，AAVrh10 ITR，AAV11 ITR或AAV12 ITR。在一些實施方案中，AAV殼體和AAV ITR源自相同的血清型。在一些實施方案中，AAV殼體和所述AAV ITR源自不同的血清型。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼側翼有一種或多種AAV ITR的異源轉基因的AAV載體。

**【0032】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，rAAV載體是自身互補載體。在一些實施方案中，所述rAAV載體包含編碼轉基因的第一核酸序列和編碼所述轉基因的互補物的第二核酸序列，其中所述第一核酸序列能沿著其大部分或整個長度與所述第二核酸形成鏈內鹼基對。在一些實施方案中，第一核

酸序列和所述第二核酸序列藉由突變的AAV ITR連接，其中所述突變的AAV ITR包含D區的缺失並且包括末端解析序列的突變。

【0033】 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，所述rAAV顆粒藉由用編碼所述rAAV載體的核酸和編碼AAV rep和cap功能的核酸轉染宿主細胞並提供編碼AAV輔助功能的核酸來產生。在一些實施方案中，藉由用編碼所述AAV輔助功能的核酸轉染所述宿主細胞提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，藉由用提供所述AAV輔助功能的AAV輔助病毒感染所述宿主細胞提供AAV輔助功能。在一些實施方案中，所述AAV輔助病毒是腺病毒、單純疱疹病毒或桿狀病毒。在一些實施方案中，所述rAAV顆粒藉由包含編碼rAAV載體的核酸和編碼AAV rep和cap功能的核酸的AAV生產細胞，並提供編碼AAV輔助功能的核酸來產生。在一些實施方案中，所述AAV生產細胞包含編碼AAV輔助功能的核酸。在一些實施方案中，藉由用提供所述AAV輔助功能的AAV輔助病毒感染AAV生產細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，AAV輔助病毒是腺病毒、單純疱疹病毒或桿狀病毒。在一些實施方案中，AAV cap功能提供VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代，其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的所述胺基酸取代改變N端乙醯化。

【0034】 在一些態樣，本發明提供了醫藥組合物，其包含如本文中所述的rAAV顆粒。在一些態樣，本發明提供了套組，其包含如本文中所述的rAAV顆粒或醫藥組合物。在一些態樣，本發明提供了製品，其包含如本文中所述的rAAV顆粒或醫藥組合物。

【0035】 在一些態樣，本發明提供了AAV殼體蛋白，其包含親本AAV殼體蛋白的胺基酸殘基2處的胺基酸取代；其中與所述親本AAV殼體蛋白的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，胺基酸殘基2處的所述胺基酸取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，所述取代導致較高頻率的N端乙醯化或較低頻率的N端乙醯化。在一些實施方案中，AAV殼體蛋白是VP1或VP3。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro或Tyr取代AAV殼體蛋白的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，用Ser、Asp或Glu取代AAV殼體蛋白的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，胺基酸取代導致AAV殼體的較少的脫醯胺化。

【0036】 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，AAV顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、小鼠AAV、rAAV2/HBoV1、AAV2HBKO、AAVPHP.B或AAVPHP.eB血清型殼體。在一些實施方案中，所述AAV殼體蛋白還包含酪胺酸突變或肝素結合突變。

【0037】 在一些態樣，本發明提供了改善rAAV顆粒的穩定性的方法，其包括取代親本VP1和/或VP3的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2；其中與所述親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2相比，取代胺基酸殘基2改變VP1和/或VP3的N端乙醯化。在一些態樣，本發明提供了改善細胞中rAAV顆粒的裝配的方法，其包括取代VP1和/或VP3或親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2；其中與所述親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2相比，取代第2位處的胺基酸改變VP1和/或VP3的N端乙醯

化。在一些態樣，本發明提供了改善細胞中rAAV顆粒轉導的方法，包括取代VP1和/或VP3或親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2；其中與所述親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2相比，取代所述胺基酸殘基2改變VP1和/或VP3的N端乙醯化。在一些實施方案中，取代的胺基酸導致較高頻率的N端乙醯化或較低頻率的N端乙醯化。在一些實施方案中，取代VP1的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，取代VP3的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro或Tyr取代胺基酸殘基2。在一些實施方案中，用Ser、Asp或Glu取代胺基酸殘基2。在一些態樣，本發明提供了降低細胞中rAAV顆粒的轉導的方法，其包括取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2；其中與所述親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2相比，第2位處取代的胺基酸改變VP1和/或VP3的N端乙醯化。

**【0038】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，AAV顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8 殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、小鼠AAV、rAAV2/HBoV1、AAV2HBKO、AAVPHP.B、或AAVPHP.eB血清型殼體。在一些實施方案中，AAV殼體還包含酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施方案中，rAAV顆粒包含rAAV載體。在一些實施方案中，rAAV載體包含一種或多種AAV ITR。在一些實施方案中，rAAV載體包括AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR或AAV12

ITR。在一些實施方案中，AAV殼體和所述AAV ITR源自相同的血清型。在一些實施方案中，AAV殼體和所述AAV ITR源自不同的血清型。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼側翼有一種或多種AAV ITR的異源轉基因的AAV載體。

**【0039】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，rAAV載體是自身互補載體。在一些實施方案中，rAAV載體包含編碼所述轉基因的第一核酸序列和編碼所述轉基因的互補物的第二核酸序列，其中所述第一核酸序列能沿著其大部分或整個鏈與所述第二核酸序列形成鏈內鹼基對。在一些實施方案中，所述第一核酸序列和所述第二核酸序列藉由突變的AAV ITR連接，其中所述突變的AAV ITR包含D區的缺失並且包含末端解析序列的突變。

**【0040】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，藉由用編碼所述rAAV載體的核酸和編碼AAV rep和cap功能的核酸轉染宿主細胞，並提供編碼AAV輔助功能的核酸來產生所述rAAV顆粒。在一些實施方案中，藉由用編碼所述AAV輔助功能的核酸轉染所述宿主細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，藉由用提供所述AAV輔助功能的AAV輔助病毒感染所述宿主細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，AAV輔助病毒是腺病毒、單純疱疹病毒或桿狀病毒。在一些實施方案中，藉由包含編碼所述rAAV載體的核酸和編碼AAV rep和cap功能的核酸的AAV生產細胞，並提供編碼AAV輔助功能的核酸來產生所述rAAV顆粒。在一些實施方案中，AAV生產細胞包含編碼AAV輔助功能的核酸。在一些實施方案中，藉由用提供所述AAV輔助功能的AAV輔助病毒感染所述AAV生產細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，AAV輔助病毒是腺病毒、單純疱疹病毒或桿狀病毒。在一些實施方案中，所述AAV cap功能提供VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代，其中與所述親本AAV顆

粒的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的N端醯胺化相比，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處胺基酸取代改變N端醯胺化。

【0041】 在一些態樣，本發明提供了重組AAV (rAAV)顆粒，其在親本AAV顆粒的VP1或VP3的胺基酸殘基A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716處包含一個或多個胺基酸取代，殘基編號基於AAV2的VP1；其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，一個或多個胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代在VP1的胺基酸殘基A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716處，並且與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比改變脫醯胺化。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代包含VP1的N57、VP3的N382、VP3的N511、或VP3的N715處的Asp取代，並且與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比導致較高頻率的脫醯胺化。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代包含N57K或N57Q取代，並且與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比導致較低頻率的脫醯胺化。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代包含VP1的A35處的Asn取代，並且與所述親本AAV顆粒的VP1的脫醯胺化相比導致較高頻率的脫醯胺化。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代在VP1的G58、VP3的G383、VP3的G512、或VP3的G716處，並且與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比導致較低頻率的脫醯胺化。在一些實施方案中，用Asp取代VP1的G58。在一些實施方案中，所述rAAV顆粒是AAV1顆粒或AAV2顆粒。

【0042】 在一些態樣，本發明提供了包含AAV顆粒的醫藥組合物，所述AAV顆粒在VP1或VP3的胺基酸殘基A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、

N715或G716處包含一個或多個胺基酸取代，殘基編號基於AAV2的VP1；其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些態樣，本發明提供了包含AAV顆粒或組合物的套組，所述AAV顆粒或組合物在VP1或VP3的胺基酸殘基A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716處包含一個或多個胺基酸取代，殘基編號基於AAV2的VP1；其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些態樣，本發明提供了包含AAV顆粒或包含AAV顆粒的組合物的製品，所述AAV顆粒或包含AAV顆粒的組合物在VP1或VP3的胺基酸殘基A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716處包含一個或多個胺基酸取代，殘基編號基於AAV2的VP1；其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些態樣，本發明提供了AAV殼體蛋白，其包含親本AAV殼體蛋白的胺基酸取代；其中與所述親本AAV殼體蛋白相比，所述胺基酸取代改變所述殼體的脫醯胺化。

**【0043】** 在一些態樣，本發明提供了改善rAAV顆粒的穩定性的方法，其包括取代一個或多個胺基酸殘基，其中所述一個或多個胺基酸殘基是A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716，殘基基於AAV2的VP1編號；其中與所述親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些態樣，本發明提供了改善細胞中rAAV顆粒的裝配的方法，包括取代一個或多個胺基酸殘基，其中所述一個或多個胺基酸殘基是A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716，殘基基於AAV2的VP1編號；其中與所述親本VP1和/或VP3的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些態樣，本發明提供了改善細胞中rAAV顆粒的轉導的方

法，其包括取代一個或多個胺基酸殘基，其中所述一個或多個胺基酸殘基是A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716，殘基基於AAV2的VP1編號；其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代在VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716；其中與所述親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化。在一些實施方案中，用Asn取代VP1的第35位處的親本Ala殘基。在一些實施方案中，用Asp取代VP1的第58位處的親本Gly殘基。在一些實施方案中，rAAV顆粒是AAV1顆粒或AAV2顆粒。

**【0044】** 在一些實施方案中，本發明提供了改善rAAV顆粒的穩定性、裝配和/或轉導效率的方法，其包括取代一個或多個胺基酸殘基，其中所述一個或多個胺基酸殘基是A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715或G716，殘基基於AAV2的VP1編號；其中與如上文描述的親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化，其中AAV顆粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8 殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、小鼠AAV、或rAAV2/HBoV1血清型殼體。在一些實施方案中，AAV 殼體還包含酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施方案中，rAAV顆粒包含rAAV載體。在一些實施方案中，rAAV載體包含一種或多種AAV ITR。在一些實施方案中，rAAV載體包括AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、

AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR、或AAV12 ITR。在一些實施方案中，AAV殼體和所述AAV ITR源自相同的血清型。在一些實施方案中，AAV殼體和所述AAV ITR源自不同的血清型。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼側翼有一種或多種AAV ITR的異源轉基因的AAV載體。

**【0045】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，rAAV載體是自身互補載體。在一些實施方案中，rAAV載體包含編碼所述轉基因的第一核酸序列和編碼所述轉基因的互補物的第二核酸序列，其中所述第一核酸序列能沿著其大部分或整個鏈與所述第二核酸序列形成鏈內鹼基對。在一些實施方案中，第一核酸序列和所述第二核酸序列藉由突變的AAV ITR連接，其中所述突變的AAV ITR包含D區的缺失並且包含末端解析序列的突變。

**【0046】** 在上述態樣和實施方案的一些實施方案中，藉由用編碼所述rAAV載體的核酸和編碼AAV rep和cap功能的核酸轉染宿主細胞，並提供編碼AAV輔助功能的核酸來產生所述rAAV顆粒。在一些實施方案中，藉由用編碼所述AAV輔助功能的核酸轉染所述宿主細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，藉由用提供所述AAV輔助功能的AAV輔助病毒感染所述宿主細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，AAV輔助病毒是腺病毒、單純疱疹病毒或桿狀病毒。在一些實施方案中，藉由包含編碼所述rAAV載體的核酸和編碼AAV rep和cap功能的核酸的AAV生產細胞，並提供編碼AAV輔助功能的核酸來產生所述rAAV顆粒。在一些實施方案中，AAV生產細胞包含編碼AAV輔助功能的核酸。在一些實施方案中，藉由用提供所述AAV輔助功能的AAV輔助病毒感染所述AAV生產細胞來提供所述AAV輔助功能。在一些實施方案中，AAV

輔助病毒是腺病毒、單純疱疹病毒或桿狀病毒。在一些實施方案中，AAV cap 功能提供VP1和/或VP3的胺基酸取代，其中與所述親本AAV顆粒相比胺基酸取代調節殼體的脫醯胺化。

### 【圖式簡單說明】

【0047】 圖1A-D提供了AAV2 VP的LC/MS的總離子層析圖。圖1A：用1.7%/min梯度的10cm長BEH C4柱，圖1B：用0.5%/min梯度的10cm長的BEH C4柱；圖1C：用0.5%/min梯度的15cm長的BEH C4柱，圖1D：用0.5%/min梯度的15cm長BEH C8柱。

【0048】 圖2A和B提供了圖1D峰1(圖2A)和圖1D峰2(圖2B)的去卷積質譜。

【0049】 圖3提供了AAV2 VP1：綠色，胰蛋白酶肽，藍色，Lys-C肽，粉紅色，Asp-N肽的序列覆蓋。

【0050】 圖4A-4C提供了AAV2 VP N端肽的MS/MS譜。圖4A：VP1 N端胰蛋白酶肽A(Ac)ADGYLPDWLEDTLSEGIR，圖4B VP2 N端Asp-N肽APGKKRPVEHSPVEP。圖4C：VP-3 N端Asp-N衍生肽A(Ac)TGSGAPM。

【0051】 圖5提供了13個AAV血清型黑色字母/白色背景的序列比對：不相似；藍色字母/藍色背景：保守；黑色/綠色背景：相似區塊；紅色字母/黃色背景：相同；綠色字母/白色背景：弱相似。

【0052】 圖6A和6B顯示了LC/MS/MS分析的結果，其比較了藉由TTx和PCL方法產生的AAV1和AAV2顆粒中脫醯胺化的百分比。使用T9肽YLGPFNGLDK (SEQ ID NO: 9)來監測AAV1和AAV2兩者中的潛在脫醯胺化位點N57。

【0053】 圖7A和7B顯示了LC/MS/MS分析的結果，其比較了藉由TTx和PCL方法產生的AAV1和AAV2顆粒中脫醯胺化的百分比。分別使用T49肽YNLNGR (SEQ ID NO: 11)和YHLNGR (SEQ ID NO: 12)監測AAV1和AAV2中的潛在脫醯胺化位點N511。

【0054】 圖8A和8B顯示了LC/MS/MS分析的結果，其比較了藉由TTx和PCL方法產生的AAV1和AAV2顆粒中脫醯胺化的百分比。分別使用T67肽SANVDFTVDNNGLYTEPR (SEQ ID NO: 13)和SVNVDFTVDTNGVYSEPR (SEQ ID NO: 14)來監測AAV1和AAV2中的潛在脫醯胺化位點N715。

【0055】 圖9顯示了AAV5脫乙醯化突變體變體的產生和VP1:VP2:VP3比率的SYPRO蛋白質凝膠分析的結果。

【0056】 圖10顯示了用於測試AAV5脫乙醯化變體的轉導效率的體外轉導測定。

【0057】 圖11顯示了如藉由載體基因組拷貝/ $\mu$ g蛋白質測量，由指定的AAV5脫乙醯化變體或親本未修飾AAV5的細胞進入的效率。使用三種細胞株：293、HeLa和HuH7。

【0058】 圖12顯示了與用親本未修飾的AAV5轉導相比，由用指定的AAV5脫乙醯化變體轉導的細胞的eGFP表達(如藉由ELISA測量)。使用三種細胞株：293、HeLa和HuH7。

【0059】 圖13提供13種AAV血清型的序列比對，突出顯示了AAV2中的保守N57G58脫醯胺化位點和A35殘基。

【0060】 圖14顯示了藉由PCL或TTx方法產生的AAV1或AAV2顆粒的VP1、VP2和VP3殼體蛋白的蛋白質凝膠。\*突出顯示了截短的VP1(tVP1)蛋白。

【0061】 圖15顯示了與對照AAV2殼體相比，指定的AAV2突變體的脫醯胺化的LC/MS分析結果。

【0062】 圖16顯示了AAV2脫醯胺化突變體變體的產生和VP1:VP2:VP3比率的SYPRO蛋白質凝膠分析的結果。

【0063】 圖17顯示了用於測試AAV2脫醯胺化變體的轉導效率的體外轉導測定。

【0064】 圖18顯示了如藉由載體基因組拷貝/ $\mu\text{g}$ 蛋白質測量，由指定的AAV2脫醯胺化變體或親本未修飾的AAV2的細胞進入的效率。使用三種細胞株：293、HeLa和HuH7。

【0065】 圖19顯示了與用親本未修飾的AAV2轉導相比，由用指定的AAV2脫醯胺化變體轉導的細胞的eGFP表達(如藉由ELISA測量)。使用三種細胞株：293、HeLa和HuH7。

#### 【實施方式】

【0066】 在一些態樣，本發明提供了測定腺相關病毒(AAV)顆粒的血清型的方法，其包括：a)使AAV顆粒變性，b)將變性的AAV顆粒注射到液相層析/質譜法(LC/MS)，並且c)測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的質量；其中VP1、VP2和VP3的質量的特定組合表示AAV血清型。

【0067】 在其它態樣，本發明提供了測定AAV顆粒的異質性的方法，其包括：a)使AAV顆粒變性，b)將變性的AAV顆粒注射到液相層析/質譜法(LC/MS)中，並且c)測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3質量，並將步驟c)的質量與AAV血

清型的VP1、VP2和VP3的理論質量比較；其中VP1、VP2或VP3的一種或多種質量的偏差表示AAV殼體異質性。

**【0068】** 在其它態樣，本發明提供了測定腺相關病毒(AAV)顆粒的血清型的方法，其包括a)使AAV顆粒變性，b)使變性的AAV顆粒進行還原和/或烷基化，c)將變性AAV顆粒消化以產生AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3片段，d)使VP1、VP2和/或VP3的片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)，並且e)測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3片段的質量；其中VP1、VP2和VP3的片段質量的特定組合表示AAV血清型。

**【0069】** 在其它態樣，本發明提供了測定血清型的AAV顆粒的異質性的方法，其包括：a)使AAV顆粒變性，b)使變性的AAV顆粒進行還原和/或烷基化，c)將變性的AAV顆粒消化以產生AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3片段，d)使VP1、VP2和/或VP3的片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)，e)測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的片段質量，並且f)比較步驟e)的質量與AAV血清型的VP1、VP2和VP3片段的理論質量；其中VP1、VP2或VP3的一種或多種質量的偏差表示AAV殼體異質性。

**【0070】** 在一些態樣，本發明提供了包含在VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代的重組AAV (rAAV)顆粒；其中與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。

**【0071】** 在一些態樣，本發明提供了改善細胞中rAAV顆粒的裝配的方法，其包括取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2；其中第2位處取代的胺基酸比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2以更高的頻率進行N-乙醯化。在一些態樣，本發明

提供了改善細胞中rAAV顆粒轉導的方法，包括取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2；其中第2位處的取代的胺基酸比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2以更高的頻率進行N-乙醯化。

**【0072】** I. 通用技術

**【0073】** 使用本領域普通技術的常規方法，諸如例如記載於下列各項的廣泛利用方法，一般完全瞭解並且通常採用本文中描述或提及的技術和方案：

*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook等, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel 等編, 2003)；系列*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)；*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames和G.R. Taylor 編, 1995)；*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow和Lane編, 1988)；*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 第6版, J. Wiley and Sons, 2010)；*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait編, 1984)；*Methods in Molecular Biology*, Humana Press；*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis編, Academic Press, 1998)；*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather和P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)；*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths和D.G. Newell編, J. Wiley and Sons, 1993-8)；*Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir和C.C. Blackwell編, 1996)；*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller和M.P. Calos編, 1987)；*PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等編, 1994)；*Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan等編, 1991)；*Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等編, J. Wiley and Sons, 2002)；*Immunobiology* (C.A. Janeway等, 2004)；

*Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty編, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd和C. Dean編, Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow和D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti和J. D. Capra編, Harwood Academic Publishers, 1995); 和*Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita等編, J.B. Lippincott Company, 2011)。

**【0074】** II. 定義

**【0075】** 如本文所用，「載體」是指包含要在體外或體內遞送入宿主細胞中的核酸的重組質粒或病毒。

**【0076】** 如本文所用，術語「多核苷酸」或「核酸」是指任何長度的核苷酸的聚合形式，核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸。因此，該術語包括但不限於單鏈、雙鏈或多鏈DNA或RNA、基因組DNA、cDNA、DNA-RNA雜合物或包含嘌呤和嘧啶鹼基或其它天然、經化學或生物化學修飾的，非天然的或衍生化的核苷酸鹼基的聚合物。核酸的主鏈可以包含糖和磷酸基團(其通常可以在RNA或DNA中找到)或經修飾或取代的糖或磷酸基團。或者，核酸的主鏈可以包含合成亞基的聚合物，如胺基磷酸酯，因此可以是寡脫氧核苷酸胺基磷酸酯(P-NH<sub>2</sub>)或混合的胺基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。此外，可以藉由合成互補鏈並且在合適的條件下退火鏈，或藉由用合適的引物使用DNA聚合酶從頭合成互補鏈，從化學合成的單鏈多核苷酸產物獲得雙鏈核酸。

**【0077】** 術語「多肽」和「蛋白質」可互換使用，指胺基酸殘基的聚合物，並且不限於最小長度。胺基酸殘基的此類聚合物可以含有天然或非天然胺基酸殘基，並且包括但不限於胺基酸殘基的肽、寡肽、二聚體、三聚體和多聚體。

全長蛋白質及其片段兩者由所述定義涵蓋。術語還包括多肽的翻譯後修飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化，磷酸化等。此外，為了本發明的目的，「多肽」是指包括對天然序列的修飾，如缺失、添加和取代(通常本質上保守)的蛋白質，只要蛋白質保持期望活性即可。這些修飾可以有意的，如藉由定點誘變，或可能是偶然的，如藉由產生蛋白質的宿主的突變或由於PCR擴增引起的錯誤。

**【0078】** 「重組病毒載體」是指包含一個或多個異源序列(即不是病毒起源的核酸序列)的重組多核苷酸載體。在重組AAV載體的情況下，重組核酸側翼有至少一個，例如兩個反向末端重複序列(ITR)。

**【0079】** 「重組AAV載體(rAAV載體)」是指包含一個或多個異源序列(即不是AAV起源的核酸序列)的多核苷酸載體，所述異源序列側翼有至少一個，例如兩個AAV反向末端重複序列(ITR)。當存在於已經用合適的輔助病毒感染(或表達合適的輔助功能)並且表達AAV rep和cap基因產物(即AAV Rep和Cap蛋白)的宿主細胞中時，可以將此類rAAV載體複製並包裝到感染性病毒顆粒中。當將rAAV載體摻入較大的多核苷酸中(例如染色體中或另一載體，如用於克隆或轉染的質粒中)時，則rAAV載體可以稱為「原載體(pro-vector)」，其可以藉由在AAV包裝功能和合適的輔助功能的存在下的複製和殼體化來「拯救」。rAAV載體可以是許多形式的任一種，包括但不限於質粒、綫性人工染色體，其與脂質複合，在脂質體內包囊，並且在實施方案中，在病毒顆粒，特別是AAV顆粒中殼體化。可以將rAAV載體包裝到AAV病毒殼體中以產生「重組腺相關病毒顆粒(rAAV顆粒)」。

**【0080】** 「rAAV病毒」或「rAAV病毒顆粒」是指由至少一種AAV殼體蛋白和殼體化的rAAV載體基因組組成的病毒顆粒。

**【0081】** 如本文中比較N-乙醯化和/或脫醯胺化的上下文中使用，「親本AAV顆粒」和「親本AAV殼體蛋白」是指引入胺基酸修飾以調節N-乙醯化和/或脫醯胺化的AAV顆粒或殼體蛋白(例如，與本發明的AAV顆粒/殼體相同或相似，但不包含如本文中描述的調節/改變N-乙醯化和/或脫醯胺化的突變的AAV顆粒/殼體蛋白)。在一些實施方案中，親本AAV顆粒是包含重組AAV基因組的重組AAV顆粒。在一些實施方案中，親本AAV殼體顆粒或親本AAV殼體蛋白包含影響AAV顆粒的其它態樣的胺基酸取代。例如，親本AAV顆粒可以包含影響AAV與其受體的結合，如影響AAV2與硫酸肝素蛋白聚糖(例如AAV2 HBKO顆粒)的結合的胺基酸取代。可以突變AAV2 HBKO顆粒以引入調節N-乙醯化和/或脫醯胺化的胺基酸取代。然後，可以將此類突變的AAV顆粒與本發明的態樣中的親本AAV2 HBKO顆粒比較，如本文中描述。親本AAV殼體蛋白可以包括親本VP1殼體蛋白、親本VP2殼體蛋白或VP3殼體蛋白。

**【0082】** 如本文所用，術語「調節」或「改變」就親本分子而言是指改變親本分子的特徵。例如，與親本AAV顆粒相比，具有改變的N-乙醯化作用的AAV顆粒可以顯示增加或減少的N-乙醯化，並且與親本AAV顆粒相比，具有改變的脫醯胺化的AAV顆粒可以顯示增加或減少的脫醯胺化。

**【0083】** 「異源」是指源自與同其比較或者接受其引入或摻入的實體的剩餘部分在基因型上獨特的實體。例如，藉由基因工程技術引入不同細胞類型的核酸是異源核酸(並且在表達時可以編碼異源多肽)。類似地，摻入病毒載體中的細胞序列(例如，其基因或部分)相對於載體是異源核苷酸序列。

**【0084】** 術語「轉基因」是指導入細胞中並且能夠轉錄成RNA並任選地在適當條件下翻譯和/或表達的核酸。在各態樣，它對接受其導入的細胞賦予期望

的性質，或以其它方式導致期望的治療或診斷結果。在另一態樣，它可以轉錄成介導RNA干擾的分子，如siRNA。

【0085】 如就病毒滴度而言使用，術語「基因組顆粒(gp)」、「基因組當量」或「基因組拷貝」是指含有重組AAV DNA基因組的病毒體數，而不管感染性或功能性。可以藉由方案，如本文實施例中，或者例如在Clark等, (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039；Veldwijk等, (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278中描述的方案測量特定載體製劑中的基因組顆粒的數目。

【0086】 如就病毒滴度而言使用，術語「感染單位(iu)」、「感染性顆粒」或「複製單位」指感染性且有複製能力的重組AAV載體顆粒的數目，如藉由感染中心測定法，也稱為複製中心測定法測量，例如在McLaughlin等 (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973中描述。

【0087】 如就病毒滴度而言使用，術語「轉導單位(tu)」是指導致產生功能性轉基因產物的感染性重組AAV載體顆粒的數目，如功能測定法中測量，如記載於本文實施例中，或者例如Xiao等 (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124；或Fisher et al. (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU測定法)。

【0088】 「反向末端重複」或「ITR」序列是本領域中公知的術語，並且是指在相反取向的病毒基因組末端處發現的相對較短的序列。

【0089】 「AAV反向末端重複(ITR)」序列(本領域中公知的術語)是存在於天然單鏈AAV基因組兩端的約145個核苷酸的序列。ITR的最外125個核苷酸可以存在於兩個備選方向之任一，導致不同AAV基因組之間和單個AAV基因組兩端之間的異質性。最外的125個核苷酸還含有幾個較短的自身互補性區域(稱為A、A'、B、B'、C、C'和D區)，允許在ITR的此部分內發生鏈內鹼基配對。

【0090】 「末端解析序列」或「trs」是在病毒DNA複製期間由AAV rep蛋白切割的AAV ITR的D區中的序列。突變體末端解析序列對於AAV rep蛋白的切割是難處理的。「AAV輔助功能」是指允許由宿主細胞複製和包裝AAV的功能。AAV輔助功能可以以多種形式之任一種提供，包括但不限於幫助AAV複製和包裝的輔助病毒或輔助病毒基因。其它AAV輔助功能在本領域中是已知的，如遺傳毒性劑。

【0091】 「AAV輔助功能」是指允許宿主細胞複製和包裝AAV的功能。AAV輔助功能可以以多種形式之任一種提供，包括但不限於幫助AAV複製和包裝的輔助病毒或輔助病毒基因。其它AAV輔助功能在本領域中是已知的，例如遺傳毒性劑。

【0092】 AAV的「輔助病毒」是指允許宿主細胞複製和包裝AAV (其是有缺陷的細小病毒)的病毒。已經鑒定出許多此類輔助病毒，包括腺病毒、疱疹病毒、痘病毒如痘苗和桿狀病毒。腺病毒包含許多不同的亞組，儘管亞組C的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人、非人哺乳動物和禽來源的許多腺病毒是已知的，並且可購自保藏所，如ATCC。也可購自保藏所(諸如ATCC)的疱疹科病毒包括例如單純疱疹病毒(HSV)、埃巴病毒(EBV)、巨細胞病毒(CMV)和偽狂犬病病毒(PRV)。可購自保藏所的桿狀病毒包括苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)。

【0093】 「百分比(%)序列同一性」就參照多肽或核酸序列而言定義為候選序列中，在比對序列並且在必要時引入缺口以實現最大百分比序列同一性後，並且不考慮任何保守取代作為序列同一性的部分，與參照多肽或核酸序列中的胺基酸殘基或核苷酸相同的胺基酸殘基或核苷酸的百分比序列。為了測定

百分比胺基酸或核酸序列同一性的比對可以以本領域技術範圍內的各種方式來實現，例如使用公開可獲得的計算機軟體程式，例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等編, 1987), 增刊30, 第7.7.18節, 表7.7.1中描述的程式，並且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。潛在的比對程式是ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania)。本領域技術人員可以確定用於測量比對的適當參數，包括在待比較的序列的全長上實現最大比對需要的任何演算法。為了本文的目的，給定胺基酸序列A對、與、或相對於給定胺基酸序列B的%胺基酸序列同一性(或者，其可以表述為對、與或相對於給定胺基酸序列B具有或包含某個%胺基酸序列同一性的給定胺基酸序列A)計算如下：分數X/Y的100倍，其中X是藉由所述程式的序列比對程式對A和B的比對評分為相同匹配的胺基酸殘基的數目，並且其中Y是B中胺基酸殘基的總數。應當理解，在胺基酸序列A的長度不等於胺基酸序列B的長度的情況下，A與B的%胺基酸序列同一性不等於B與A的%胺基酸序列同一性。對於本文的目的，給定核酸序列C對、與、或相對於給定核酸序列D的%胺基酸序列同一性(或者，其可以表述為對、與或相對於給定核酸序列D具有或包含某個%胺基酸序列同一性的給定核酸序列C)計算如下：分數W/Z的100倍，其中W是藉由所述程式的序列比對程式對C和D的比對評分為相同匹配的核苷酸殘基的數目，並且其中Z是D中核苷酸的總數。應當理解，在核酸序列C的長度不等於核酸序列D的長度的情況下，C與D的%核酸序列同一性將不等於D與C的%核酸序列同一性。

**【0094】** 「分離的」分子(例如，核酸或蛋白質)或細胞意味著它已經得到鑒定並且從其天然環境的組分中分離和/或回收。

【0095】 「質譜法」是指藉由測量氣相離子的質荷比和豐度來鑒定化合物(例如多肽)的量和/或類型的分析化學技術。術語「質譜法」可以在本文中互換使用。

【0096】 當提及AAV殼體使用時，「異質性」是指藉由觀察到偏離VP1、VP2和/或VP3多肽或其片段的參照質量的一種或多種殼體多肽表徵的AAV殼體。參照質量可以包括但不限於VP1、VP2和/或VP3多肽(例如已知AAV血清型)的理論、預測或預期質量。例如，若AAV殼體表明下列一種或多種性質(但不限於)：混合血清型、變體殼體、殼體胺基酸取代、截短的殼體或修飾的殼體，則AAV殼體可以說成表現出異質性。

【0097】 本文中提及「約」數值或參數包括(並且描述)針對該數值或參數本身的實施方案。例如，涉及「約X」的描述包括「X」的描述。

【0098】 如本文所用，除非另有表示，冠詞「一個/種」和「所述/該」的單數形式包括多個提及物。

【0099】 應當理解，本文中描述的本發明的態樣和實施方案包括「包含」態樣和實施方案、由態樣和實施方案「組成」和/或「基本上由態樣和實施方案組成」。

### 【0100】 III. 方法

【0101】 本公開的某些態樣涉及測定病毒顆粒的血清型的方法。本公開的其它態樣涉及測定病毒顆粒的異質性的方法。如下文所述，每種AAV血清型的VP1、VP2和VP3的精確質量是獨特的，並且可以用於鑒定或區別AAV殼體血清型。這些方法部分基於本文所述的發現，即可以使用變性後不同類型的AAV的直接LC/MS用完整蛋白質水準的精確質量測量來監測蛋白質序列和翻譯後修

飾。此外，也可以在不同的AAV血清型中鑒定和/或監測VP1和VP3的N端的乙醯化。基於這些AAV結果和本文中提供的指導，涵蓋此類方法可以容易地應用於描繪多種病毒，例如本公開的病毒科、亞科和屬的概貌。本公開的方法可以例如在描繪VP的概貌中得到應用，以監測VP表達、翻譯後修飾和截短並且確保VLP產生期間的產物一致性，以確認殼體蛋白工程應用的定點誘變或結構表徵，和/或監測或檢測病毒顆粒或製劑的異質性。

**【0102】** 在一些實施方案中，所述方法包括使病毒顆粒變性。在一些實施方案中，可以使用去汙劑、熱、高鹽或用低或高pH的緩衝來使病毒顆粒如AAV顆粒變性。在某些實施方案中，可以使用乙酸或鹽酸胍使AAV顆粒變性。熟練技術人員將認識到，可用於促進和/或監測蛋白質變性的多種方法在本領域是可用的，並且可以適當地選擇與液相層析/質譜法相容的變性方法。例如，若使用熱變性，則可以注意避免蛋白質沉澱和反相柱堵塞。類似地，可以在LC/MS或LC/MS/MS前將高鹽變性與脫鹽步驟偶聯。在其它實施方案中，使用高pH變性、低pH變性或使用有機溶劑的變性。

**【0103】** 在一些實施方案中，所述方法包括使本公開的變性病毒顆粒經受液相層析/質譜法(LC/MS)。如本領域中已知的，LC/MS利用用於離子的物理分離的液相層析和用於從離子產生質譜數據的質譜法。此類質譜數據可用於測定例如分子量或結構、按質量、數目、純度等鑒定顆粒。這些數據可以表示檢測到的離子的性質，例如隨時間(例如保留時間)的信號強度(例如豐度)或者隨質荷比的相對豐度。

**【0104】** 在一些實施方案中，液相層析(例如在如本文中所述的LC/MS中使用)是超高效液相層析(UPLC；術語「超高效液相層析」或UHPLC可以在本文中

互換使用)。UPLC在本領域中稱為LC技術，其依賴於具有降低的細微性(例如，小於 $2\mu\text{m}$ )的柱和增加的流速以改善層析解析度、效率、峰容量和靈敏度(參見例如Plumb, R.等 (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18:2331-2337)。在一些實施方案中，UPLC是指在液相層析中使用具有粒徑小於 $2\mu\text{m}$ 的柱。在一些實施方案中，UPLC是指在液相層析中使用高綫性溶劑速度(例如如在6000psi以上操作時觀察到)。示例性的UPLC儀是商品化的(例如，來自Waters; Milford, MA的ACQUITY UPLC®)。

**【0105】** 在一些實施方案中，質譜(例如在如本文中所述的LC/MS中使用)可以指電噴霧離子化質譜法(ESI-MS)。ESI-MS在本領域中稱為使用質譜法使用電能來分析源自溶液的離子的技術(參見例如Yamashita, M.和Fenn, J.B. (1984) *J. Phys. Chem.* 88:4451-4459)。藉由在帶電液滴的氣溶膠中分散將離子種類(或在溶液中或氣相中離子化的中性種類)從溶液轉移到氣相，隨後進行溶劑蒸發，其在用相對於地面(例如，周圍室的壁)的電壓使溶液藉由小毛細管時減少帶電液滴的尺寸和從帶電液滴中的樣品離子噴射。在一些實施方案中，毛細管電壓為約2kV至約10kV，或約2.5kV至約6.0kV。在某些實施方案中，液相層析(例如在如本文所述的LC/MS中使用)使用約3.5kV的毛細管電壓。在一些實施方案中，毛細管電壓範圍為約1kV至約10kV。在其它實施方案中，質譜法(例如在如本文所述的LC/MS中使用)可以指基質輔助鐳射解吸/電離(MALDI)。

**【0106】** 在一些實施方案中，質譜法(例如，如本文所述的LC/MS中使用)使用離子可以在進入分析儀前藉由的取樣錐體和/或分液器。在一些實施方案中，例如，當如上文所述對毛細管施加電壓時，將樣品錐體保持於低於毛細管電壓的電壓。在某些實施方案中，液相層析(例如在如本文所述的LC/MS中使用)

使用約45V的取樣錐電壓。在一些實施方案中，取樣錐電壓範圍為約0V至約200V。

**【0107】** 在一些實施方案中，質譜法(例如在如本文所述的LC/MS中使用)使用輔助校準。當提及質譜法使用時，校準可以包括引入一種或多種具有已知質量的化合物(例如標準品)，以便就質量檢測(例如， $m/z$ 測量)而言校準儀器。在一些實施方案中，輔助校準可以指使用軟體將已知標準品(例如，校準物)的峰和/或位置與特定質荷( $m/z$ )比相關聯。一旦校準，用戶可以對具有一種或多種未知化合物或以未知濃度存在的化合物的樣品在一定的精確或誤差程度內和/或期望的再現性水準進行質譜法，例如與先前的或已知的實驗條件相比。各種校準物是本領域已知的，包括但不限於碘化鈉、碘化銫鈉、聚乙二醇、和全氟三丁胺。在某些實施方案中，使用碘化鈉作為校準物。在一些實施方案中，校準物是Glu-1-血纖肽B和亮胺酸腦啡肽以在LC/MS操作期間鎖定質量。

**【0108】** 在一些實施方案中，所述方法包括使本公開的變性病毒顆粒，或本公開的變性病毒顆粒的消化片段進行液相層析/質譜法-質譜法(LC/MS/MS)。如本領域已知的，LC/MS/MS(術語「液相層析-串聯質譜法」可以在本文中可互換使用)利用用於離子的物理分離的液相層析和用於從離子產生質譜數據的質譜法，其中質譜法使用質量(例如， $m/z$ )分離的多個階段，其通常以碎裂步驟分開。例如，可以在第一輪MS中將 $m/z$ 範圍內的感興趣的離子分離出來，碎裂，然後在第二輪MS中基於各個 $m/z$ 進一步分離。離子碎裂可以包括但不限於諸如碰撞誘導解離(CID)、較高的能量碰撞解離(HCD)、電子捕獲解離(ECD)或電子轉移解離(ETD)等技術。

**【0109】** 在一些實施方案中，所述方法包括使本公開的變性病毒顆粒進行還原和/或烷基化。降低病毒顆粒的手段包括但不限於用二硫蘇糖醇、 $\beta$ -巰基乙醇或三(2-羧乙基)膦(TCEP)處理。使病毒顆粒烷基化的手段包括但不限於用碘乙酸、碘乙醯胺或4-乙炔基吡啶處理AAV顆粒。

**【0110】** 在一些實施方案中，所述方法包括使本公開的變性病毒顆粒進行消化，例如產生AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3片段。例如，變性的AAV顆粒可以進行消化以產生肽片段，所述肽片段可以例如使用用於分離的LC和用於分析的MS/MS分析(關於更多描述，參見下文)。在一些實施方案中，消化是酶促消化。在一些實施方案中，消化使用化學消化如CNBr處理儀器碎裂(例如自上而下)。在一些實施方案中，消化使用化學消化如酸消化。

**【0111】** 在一些實施方案中，酶促消化是內肽酶消化。內肽酶可以包括催化多肽的非末端胺基酸的肽鍵的蛋白水解的任何肽酶。已知的內肽酶可以包括但不限於胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、AspN、Glu-C、LysC、胃蛋白酶、嗜熱菌蛋白、穀胺醯內肽酶、彈性蛋白酶和腎胰島素殘基溶酶(neprilysin)。在某些實施方案中，酶促消化是胰蛋白酶消化或LysC消化。

**【0112】** 在一些實施方案中，液相層析(例如，在如本文所述的LC/MS或LC/MS/MS中使用)是逆相液相層析(術語「相逆相液相層析」或RPLC可以在本文中與逆相液相層析可互換使用)。如本領域已知的，逆相液相層析可以指使用疏水性固定相(例如支援物或基底如柱)在極性移動相中吸附疏水性分子的層析分離。藉由降低移動相的極性(例如，藉由添加有機溶劑)，可以藉由疏水性實現分子的梯度分離，因為由於較強的與柱的疏水性相互作用，較多的疏水性分子將在較高的有機溶劑濃度中在柱上保留。在一些實施方案中，分離是藉由毛細管

電泳(CE)、尺寸排阻層析(SEC)、離子交換層析(IEC)，如陽離子交換層析、疏水相互作用層析(HIC)、親水相互作用液相層析(HILIC)，但不限於到在綫LC/MS，如MS前的離綫分離；例如尖端、柱、板或筒。

**【0113】** 通常，可以將適用於逆相液相層析的固定相(例如疏水部分)偶聯至支援物，包括但不限於填充有顆粒或珠(例如多孔二氧化矽顆粒或聚苯乙烯)的柱或樹脂。多種疏水性固定相是本領域已知的，包括但不限於疏水烷基鏈、辛基或十八烷基甲矽烷基部分、氰基部分和胺基部分。在一些實施方案中，固定相可以包括特定長度的疏水性烷基鏈，如C4、C8或C18。在某些實施方案中，逆相層析是C4或C8逆相層析(例如，使用C4或C8固定相的逆相層析)。本領域技術人員可以根據感興趣的分子(例如，變性AAV顆粒或其片段)適當地選擇固定相。

**【0114】** 適用於逆相液相層析的多種移動相是本領域已知的。如上文所述，逆相液相層析移動相可以包括有機(例如疏水)和水性(例如極性)溶劑的混合物。增加有機溶劑的比例會增加其從固定相中洗脫疏水化合物的能力。可以改變化合物保留和/或選擇性，例如藉由改變固定相的類型或暴露，添加極性試劑如封端試劑，改變溫度和/或改變移動相特性，如有機溶劑的比例、pH、緩衝液和所用有機溶劑的類型。在一些實施方案中，移動相的極性組分可以包括但不限於水或水性緩衝液。在一些實施方案中，移動相的極性組分可以包括但不限於乙腈、甲醇、乙醇、異丙醇、四氫呋喃(THF)和甲酸。

**【0115】** 在一些實施方案中，可以以感興趣的梯度或比例使用兩種或更多種移動相(例如，移動相A、移動相B等)。在某些實施方案中，層析使用包含水中的甲酸的移動相A。在某些實施方案中，移動相A包含約0.1%的甲酸。在某些

實施方案中，移動相A包含約0.1%至約5%的甲酸。在某些實施方案中，層析使用包含乙腈中的甲酸的移動相B。在某些實施方案中，移動相B含有約0.1%的甲酸。

**【0116】** 在一些實施方案中，層析中移動相B的比例隨時間增加。例如，可以以逐步方式增加層析中移動相B的比例。在某些實施方案中，移動相B從約10%增加至約20%，約20%至約30%，和約30%至約38%增加。在其它實施方案中，移動相B從約2%增加至約60%。在其它實施方案中，移動相B在約1分鐘至約200分鐘中從約2%增加至約100%。在一些實施方案中，移動相的剩餘部分是本公開的第二移動相，例如移動相A。在某些實施方案中，移動相B在約6分鐘內從約10%增加至約20%，在約10分鐘內從約20%增加至約30%，和在約40分鐘內從約30%增加至約38%。在其它實施方案中，移動相B在約121分鐘內從約2%增加至約60%。本領域技術人員可以基於期望的層析分離和/或感興趣的分析物適當調整感興趣的移動相和使用的梯度時機。

**【0117】** 在一些實施方案中，液相層析是高效液相層析(HPLC)。HPLC在本領域中稱為液相層析形式，其中含有樣品的液體溶劑當其藉由含有固相的柱時加壓。雖然傳統或低壓LC可以使用重力將移動相藉由固相，但是HPLC使用泵向移動相施加壓力，並且通常使用具有較小顆粒的固相以提高解析度。在一些實施方案中，HPLC使用約50巴和約350巴之間的壓力。在一些實施方案中，反相HPLC可用於使蛋白質(例如AAV殼體蛋白質)濃縮和/或脫鹽以進行MS分析。

**【0118】** 在一些實施方案中，基於本文所述的發現，可以調節一項或多項參數，包括但不限於源電壓、毛細管溫度、ESI電壓(若使用ESI-MS)、CID能量和MS/MS事件數目，例如在如本文中使用的LC/MS/MS中。在一些實施方案中，

質譜法(例如，如本文所述的LC/MS/MS中使用)使用約2.5kV的源電壓(例如，毛細管電壓)。在一些實施方案中，質譜法(例如在如本文所述的LC/MS/MS中使用)使用約275°C的毛細管溫度。在一些實施方案中，毛細管溫度範圍為約20°C至約400°C。

**【0119】** 適用於LC/MS和/或LC/MS/MS的多種質量分析器是本領域已知的，包括但不限於飛行時間(TOF)分析儀、四極質量濾器、四極TOF(QTOF)、和離子阱(例如，基於傅裏葉變換的質譜儀或Orbitrap)。在Orbitrap中，使用地電位的桶狀外電極和心軸狀中心電極將離子捕獲在軌跡中，圍繞中心電極以橢圓旋轉，沿著受到離心力和靜電力的平衡限制的中心軸振動。使用此類儀器採用傅裏葉變換操作以將時域信號(例如頻率)從圖像電流的檢測轉換為高解析度質量測量(例如nano LC/MS/MS)。進一步的描述和細節可參見例如Scheltema, R.A.等 (2014) *Mol. Cell Proteomics* 13:3698-3708; Perry, R.H.等 (2008) *Mass. Spectrom. Rev.* 27:661-699；和Scigelova, M.等 (2011) *Mol. Cell Proteomics* 10:M111.009431。

**【0120】** 如上文所述，在一些實施方案中，MS包括nano LC/MS/MS，例如使用Orbitrap質量分析儀。在一些實施方案中，離子源可以包括堆疊環離子引導件或S透鏡。如本領域已知的，可以採用S透鏡來使用射頻(RF)聚焦離子束，從而增加離子透射入儀器中。這可以改善靈敏度(例如，對於低強度離子)和/或改善掃描速率。在某些實施方案中，質譜法的S透鏡RF水準為約55%。在某些實施方案中，質譜法的S透鏡RF水準為約20%至約100%。

**【0121】** 在一些實施方案中，可以例如基於LC/MS和/或LC/MS/MS數據來測定病毒殼體蛋白的質量。在一些實施方案中，可以例如基於LC/MS和/或LC/MS/MS數據來測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的質量，或AAV顆粒的VP1、

VP2和VP3的片段的質量。從MS數據測定蛋白質質量和/或身份的一種方法是本領域已知的。例如，可以使用肽質量指紋法來基於MS數據測定蛋白質序列，或者可以基於與一種或多種構成肽相關的MS/MS數據來鑒定蛋白質。當使用串聯MS時，產物離子掃描可用於分析與感興趣的蛋白質的一種或多種肽相關的m/z數據。然後，可以使用本領域已知的軟體，例如將鑒定的峰與參照或已知峰匹配，將峰分組成同位素異位體包絡(isotopomer envelope)等。肽質量值可以與已知肽序列的數據庫進行比較。例如，Mascot可以用於將觀察到的肽與理論數據庫肽匹配，例如源自將特定的消化模式應用於計算機蛋白質數據庫。其它合適的軟體可以包括但不限於Proteome Discoverer、ProteinProspector、X!Tandem、Pepfinder、Bonics、或MassLynx™ (Waters)。適用於MS數據分析的各種步驟的其它軟體可以參見例如[www.ms-utils.org/wiki/pmwiki.php/Main/SoftwareList](http://www.ms-utils.org/wiki/pmwiki.php/Main/SoftwareList)。

【0122】 在一些實施方案中，本公開的確定或計算質量(例如，AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3的確定或計算質量)可以與參照，例如一種或多種AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3的理論質量比較。本公開的參照可以包括本文所述的任何一種或多種AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3的理論質量。例如，在一些實施方案中，將VP1、VP2和/或VP3的質量與下列一種或多種的理論質量比較：  
AAV1殼體、AAV2殼體、AAV3殼體、AAV4殼體、AAV5殼體、AAV6殼體、AAV7殼體、AAV8殼體、AAVrh8殼體、AAV9殼體、AAV10殼體、AAVrh10殼體、AAV11殼體、AAV12殼體、AAV LK03殼體(參見美國專利No. 9,169,299)、AAV2R471A殼體、AAV2/2-7m8殼體、AAV DJ殼體(參見美國專利7,588,772)、AAV DJ8殼體、AAV2 N587A殼體、AAV2 E548A殼體、AAV2 N708A殼體、AAV V708K殼體、山羊AAV殼體、AAV1/AAV2嵌合殼體、牛AAV殼體、或小鼠AAV

殼體、rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV / 人博卡病毒1)、AAV2HBKO殼體、AAVPHP.B殼體、或AAVPHP.eB殼體。在一些實施方案中，本公開的確定或計算質量(例如，AAV顆粒的VP1、VP2和/或VP3的確定或計算質量)可以與相應的AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3的理論質量比較。

**【0123】** 在一些實施方案中，本公開的方法可以包括測定AAV顆粒的異質性。在一些實施方案中，VP1、VP2和/或VP3的一種或多種質量(例如，與參照質量，如理論、預測或預期質量)的偏差表示AAV殼體異質性。在一些實施方案中，異質性可以包括以下的一種或多種，不限於：混合血清型、變體殼體、殼體胺基酸取代、截短的殼體或經修飾的殼體。

**【0124】** 在一些實施方案中，可以組合如本文中所述的LC/MS和LC/MS/MS的使用。在一些實施方案中，測定AAV顆粒的血清型的方法可以包括使變性的AAV顆粒經受LC/MS(例如，如本文所述)，並測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的質量；以及將VP1、VP2和/或VP3的片段進行LC/MS/MS，並測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的片段質量(VP1、VP2和VP3的片段質量的特定組合表示AAV血清型)。在一些實施方案中，測定AAV顆粒的異質性的方法可以包括使變性的AAV顆粒經受LC/MS(例如，如本文所述)，測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的質量，並且將這些質量與AAV血清型的VP1、VP2和VP3的理論質量比較；以及將VP1、VP2和/或VP3的片段進行LC/MS/MS，測定AAV顆粒的VP1、VP2和VP3的片段質量，並將這些質量與AAV血清型的VP1、VP2和VP3的理論質量比較(VP1、VP2或VP3的一種或多種質量的偏差表示AAV殼體異質性)。

【0125】 在一些實施方案中，可以使本公開的AAV顆粒乙醯化。例如，在一些實施方案中，使VP1和/或VP3的N端乙醯化。如下文更詳細描述，可以突變AAV殼體蛋白的起始甲硫胺酸(iMet X)第2位處的胺基酸以測定其對N端(Nt-)乙醯化的影響，以及影響Nt-乙醯化對AAV顆粒運輸、轉導和/或翻譯後修飾(例如糖基化，泛素化等)的功能後果。在一些實施方案中，AAV殼體蛋白(例如，VP1或VP3)的N末端可以指起始甲硫胺酸後的第一個胺基酸，所述起始甲硫胺酸在一些情況下可以藉由例如Met-胺肽酶除去。

【0126】 在一些實施方案中，本公開的AAV顆粒(例如，重組AAV或rAAV顆粒)包含VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代。在一些實施方案中，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代導致與參照(例如，胺基酸取代前的親本AAV顆粒，或具有VP1和/或VP3的不同胺基酸殘基2的AAV顆粒)相比具有N端乙醯化的不同頻率或比例的VP1和/或VP3。在一些實施方案中，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比改變N端乙醯化。例如，在某些實施方案中，與親本AAV顆粒的VP1的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP1的胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。在某些實施方案中，與親本AAV顆粒的VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，「改變」N端乙醯化的胺基酸取代(例如，VP1或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代)導致較高頻率的N端乙醯化或較低頻率的N端乙醯化，例如，與沒有取代的VP1或VP3，如親代VP1或VP3相比。VP1和/或VP3可以屬本文所述的任何示例性AAV血清型，包括其變體或雜合體(例如攜帶酪胺酸突變或肝素結合突變)。用於N端乙醯化的示例性測定法包括但不限於質譜法、同位素

標記(例如，用同位素標記的乙醯基基團或其前體)、用乙醯化特異性抗體的Western印跡法等。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro或Tyr取代AAV殼體蛋白(例如VP1或VP3)的胺基酸殘基<sup>2</sup>。在一些實施方案中，胺基酸取代導致AAV殼體的較少的脫醯胺化。

**【0127】** 在一些實施方案中，可以使本公開的AAV顆粒脫醯胺化。例如，在一些實施方案中，使VP1的N57和/或N382、N511和/或N715 VP3脫醯胺化。如下文更詳細描述，可以突變選自AAV殼體蛋白(例如，VP1或VP3)的VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716的胺基酸以測定其對脫醯胺化的作用，以及影響脫醯胺化對AAV顆粒運輸、轉導和/或翻譯後修飾(例如糖基化，泛素化等)的功能後果。

**【0128】** 在一些實施方案中，本公開的AAV顆粒(例如，重組AAV或rAAV顆粒)包含選自下組的一個或多個胺基酸殘基處的胺基酸取代：VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715、和VP3的G716。在一些實施方案中，VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715和/或VP3的G716處的胺基酸取代導致與參照(例如胺基酸取代前的親本AAV顆粒，或具有不同相應胺基酸殘基<sup>2</sup>的AAV顆粒)相比具有不同的脫醯胺化頻率或比例的VP1和/或VP3。在一些實施方案中，「改變」脫醯胺化的胺基酸取代(例如，VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716處的胺基酸取代)導致更高的脫醯胺化頻率或

更低的脫醯胺化頻率，例如，與沒有取代的VP1或VP3(如親本VP1或VP3)相比。VP1和/或VP3可以屬本文所述的任何示例性AAV血清型，包括其變體或雜合體(例如攜帶酪胺酸突變或肝素結合突變)。用於脫醯胺化的示例性測定法包括但不限於質譜法、HPLC(參見例如來自Promega的ISOQUANT®異天冬胺酸檢測套組)等等。在一些實施方案中，用Asp取代VP1的N57、VP3的N382、VP3的N511和/或VP3的N715，並且與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代導致更高的脫醯胺化頻率。在其它實施方案中，胺基酸取代為N57K或N57Q，並且與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代導致更低的脫醯胺化頻率。在其它實施方案中，用不為Gly的胺基酸(例如，Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、或Val)取代VP1的G58、VP3的G382、VP3的G512和/或VP3的G716，並且與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代導致更低的脫醯胺化頻率。在其它實施方案中，用Asn取代VP1的A35，並且與親本顆粒的VP1的脫醯胺化相比導致更高的脫醯胺化頻率。

**【0129】** 如本文所用，「N-乙醯化」是指將乙醯基共價添加到蛋白質的N端胺基酸的胺基基團的過程。通常，N端乙醯轉移酶(NAT)將乙醯基基團從乙醯輔酶A (Ac-CoA)轉移到蛋白質的第一個胺基酸殘基的 $\alpha$ -胺基基團。

**【0130】** 如本文所用，「脫醯胺化」是指將天冬醯胺或穀胺醯胺的側鏈中的醯胺官能團除去或轉化成另一種官能團的化學反應。例如，可以將天冬醯胺轉化成天冬胺酸或異天冬胺酸。在其它實例中，將穀胺醯胺轉化為谷胺酸或焦谷胺酸(5-氧代脯胺酸)。

**【0131】** 在一些實施方案中，與親本AAV殼體蛋白相比，在更高的程度上使AAV顆粒N-乙醯化。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含多超過約下列任一項的N-乙醯基基團：5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含多約下列任一項的N-乙醯基基團：5%-10%、10%-15%、15%-20%、20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-55%、45%-50%、50%-55%、55%-60%、60%-65%、65%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-100%、5-25%、25-50%、50-75%、75%-100%、5-50%或50%-100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含多超過約下列任一項的N-乙醯基基團：2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、或1000倍。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含多約下列任一項的N-乙醯基基團：2倍至3倍、3倍至4倍、4倍至5倍、5倍至10倍、10倍至25倍、25倍至50倍、50倍至100倍、100倍至500倍、500倍至1000倍、2倍至10倍、10倍至100倍、或100倍至1000倍。

**【0132】** 在一些實施方案中，與親本AAV殼體蛋白相比在更低程度上使AAV顆粒N-乙醯化。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含少超過約下列任一項的N-乙醯基基團：5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含少約下列任一項的N-乙醯基基團：5%-10%、10%-15%、15%-20%、20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-55%、45%-50%、50%-55%、55%-60%、60%-65%、

65%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-100%、5-25%、25-50%、50-75%、75%-100%、5-50%或50%-100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含少超過約下列任一項的N-乙醯基基團：2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、或1000倍。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒包含少約下列任一項的N-乙醯基基團：2倍至3倍、3倍至4倍、4倍至5倍、5倍至10倍、10倍至25倍、25倍至50倍、50倍至100倍、100倍至500倍、500倍至1000倍、2倍至10倍、10倍至100倍、或100倍至1000倍。

**【0133】** 在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比在更高程度上使AAV顆粒脫醯胺化。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化多超過約下列任一項：5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化多約下列任一項：5%-10%、10%-15%、15%-20%、20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-55%、45%-50%、50%-55%、55%-60%、60%-65%、65%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-100%、5-25%、25-50%、50-75%、75%-100%、5-50%或50%-100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化多超過約下列任一項：2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、或1000倍。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化多約下列任一項：2倍至3倍、3倍至4倍、4倍至5倍、5倍至10倍、10倍至25倍、25倍至50倍、50倍至100倍、100倍至500倍、500倍至1000倍、2倍至10倍、10倍至100倍、或100倍至1000倍。

【0134】 在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比在更低程度上使AAV顆粒脫醯胺化。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化少超過約下列任一項：5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化少約下列任一項：5%-10%、10%-15%、15%-20%、20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、40%-55%、45%-50%、50%-55%、55%-60%、60%-65%、65%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-100%、5-25%、25-50%、50-75%、75%-100%、5-50%或50%-100%。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化少超過約下列任一項：2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、500倍、或1000倍。在一些實施方案中，與親本AAV顆粒相比，AAV顆粒的脫醯胺化少約下列任一項：2倍至3倍、3倍至4倍、4倍至5倍、5倍至10倍、10倍至25倍、25倍至50倍、50倍至100倍、100倍至500倍、500倍至1000倍、2倍至10倍、10倍至100倍、或100倍至1000倍。

【0135】 本發明提供了N-乙醯化和脫醯胺化的任何組合。例如，AAV殼體蛋白可以比親本AAV殼體蛋白在更高程度上進行N-乙醯化並且比親本AAV殼體蛋白在更高程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以比親本AAV殼體蛋白在更高程度上進行N-乙醯化並且與親本AAV殼體蛋白在相同程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以比親本AAV殼體蛋白在更高程度上進行N-乙醯化並且比親本AAV殼體蛋白在更低程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以與親本AAV殼體蛋白在相同程度上進行N-醯胺化並且比親本AAV殼體蛋白在更高程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以與親本AAV殼體蛋白在相同程度上進行N-醯胺化並

且與親本AAV殼體蛋白在相同程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以與親本AAV殼體蛋白在相同程度上進行N-醯胺化並且比親本AAV殼體蛋白在更低程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以比親本AAV殼體蛋白在更低程度上進行N-醯胺化並且比親本AAV殼體蛋白在更高程度上進行脫醯胺化，AAV殼體蛋白可以比親本AAV殼體蛋白在更低程度上進行N-醯胺化並且與親本AAV殼體蛋白在相同程度上進行脫醯胺化，或者AAV殼體蛋白可以比親本AAV殼體蛋白在更低程度上進行N-醯胺化並且比親本AAV殼體蛋白在更低程度上進行脫醯胺化。

#### 【0136】 IV. 載體

【0137】 在某些態樣，本發明涉及適用於本文所述的任何方法的病毒顆粒，其可以包含AAV載體(例如rAAV載體)或源自另一種病毒的載體。在一些實施方案中，病毒顆粒包含編碼異源核酸，例如異源轉基因的載體。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼異源核酸，例如異源轉基因的AAV載體基因組。

【0138】 本發明涵蓋使用重組病毒基因組引入編碼治療性多肽的一種或多種核酸序列和/或用於包裝入rAAV病毒顆粒中的核酸。重組病毒基因組可以包括建立治療性多肽和/或核酸表達的任何元件，例如啓動子、本公開的ITR、核糖體結合元件、終止子、增強子、選擇標誌物、內含子、多聚A信號和/或複製起點。

【0139】 在一些實施方案中，異源核酸編碼治療性多肽。治療性多肽可以例如提供在細胞或生物體中缺乏或以降低的水準存在的多肽和/或酶活性。或者，治療性多肽可以提供間接抵抗細胞或生物體中的不平衡的多肽和/或酶活性。例如，用於與由代謝酶或活性缺陷引起的代謝物累積相關的病症的治療性多肽可以提供缺少的代謝酶或活性，或者它可以提供導致代謝物降低的替代代

謝酶或活性。還可以使用治療性多肽藉由例如以顯性負性多肽起作用來降低多肽(例如，下述蛋白質，所述蛋白質是過表達的，藉由功能獲得突變啟動，或者其活性以其它方式錯誤調節)的活性。

**【0140】** 本發明的核酸可編碼多肽，所述多肽是胞內蛋白質，錨定在細胞膜中，在細胞內保留，或由用本發明的載體轉導的細胞分泌。對於由接受載體的細胞分泌的多肽；多肽可為可溶的(即不附著於細胞)。例如，可溶性多肽缺乏跨膜區，並且從細胞分泌。鑒定和除去編碼跨膜域的核酸序列的技術是本領域已知的。

**【0141】** 本發明的核酸(例如AAV載體基因組)可以包含核酸作為轉基因，所述核酸編碼調節或治療CNS相關病症的蛋白質或功能性RNA。以下是一批非限制性的與CNS相關疾病有關的基因：神經元離亡抑制蛋白(NAIP)、神經生長因數(NGF)、膠質細胞衍生的生長因數(GDNF)、腦源性生長因數(BDNF)、睫狀神經營養因數(CNTF)、酪胺酸羥化酶(TM、GTP-環水解酶(GTPCH)、天冬醯胺醯酶(ASPA)、超氧化物歧化酶(SOD1)、抗氧化劑、抗血管生成多肽、抗炎多肽和胺基酸脫羧酶(AADC)，例如，帕金森氏病治療中有用的轉基因編碼TH，其是多巴胺合成中的限速酶，編碼GTPCII (其產生TH輔因數四氫生物蝶呤)的轉基因也可用於治療帕金森氏病。編碼GDNF或BDNF或AADC (其促進L-多巴轉化為DA)的轉基因也可用於治療帕金森氏病。對於ALS的治療，有用的轉基因可以編碼：GDNF、BDNF或CNTF。也為了治療ALS，有用的轉基因可以編碼抑制SOD1表達的功能性RNA，例如shRNA，miRNA。為了治療缺血，有用的轉基因可以編碼NAIP或NGF。編碼β-葡糖醛酸糖苷酶(GUS)的轉基因可用於治療某些溶酶體貯積病(例如，VII型粘多糖貯積症(MPS VII))。編碼前藥活化基因的轉基因，例

如將更昔洛韋轉化為破壞DNA合成並導致細胞死亡的毒性核苷酸的HSV-胸苷激酶，可用於治療某些癌症，例如當與前藥組合投予時。編碼內源性阿片樣物質，如 $\beta$ -內啡肽的轉基因可用於治療疼痛。抗氧化劑的實例包括但不限於SOD1；SOD2；過氧化氫酶；Sirtuins 1、3、4或5；NRF2；PGC1a；GCL(催化亞單元)；GCL(改性劑亞基)；脂聯素；谷胱甘肽過氧化物酶1和神經珠蛋白。抗血管生成多肽的實例包括但不限於血管他丁、內皮他丁、PEDF、可溶性VEGF受體和可溶性PDGF受體。抗炎多肽的實例包括但不限於IL-10、可溶性IL17R、可溶性TNF-R、TNF-R-Ig、IL-1抑制劑和IL18抑制劑。可在本發明的rAAV載體中使用的轉基因的其他實例對熟練技術人員是顯而易見的(參見例如Costantini L C等, *Gene Therapy* (2000) 7, 93-109)。

【0142】 在一些實施方案中，異源核酸編碼治療性核酸。在一些實施方案中，治療性核酸可以包括但不限於siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反義RNA、核酶或DNA酶。因此，治療性核酸可以編碼當從載體的核酸轉錄時可以藉由干擾與本發明的病症相關的異常或過量蛋白的翻譯或轉錄來治療病症的RNA。例如，本發明的核酸可以編碼藉由高度特異性消除或減少編碼異常和/或過量蛋白質的mRNA來治療病症的RNA。治療性RNA序列包括可藉由高度特異性消除或減少編碼異常和/或過量蛋白質的mRNA來治療病症的RNAi、小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和/或核酶(例如錘頭和髮夾核酶)。

【0143】 在一些實施方案中，使用治療性多肽或治療性核酸治療CNS的病症。不希望受限於理論，認為可以使用治療性多肽或治療性核酸來降低或消除多肽的功能獲得與病症有關的多肽的表達和/或活性，或者增強多肽的表達和/或活性以補充與病症相關的缺陷(例如，基因表達顯示相似或相關活性的基因中的

突變)。可由本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的本發明的病症的非限制性實例(對於每種病症，在括號中提供了可靶向或供應的示例性基因)包括中風(例如，胱天蛋白酶-3、*Beclin1*、*Ask1*、*PAR1*、*HIF1 $\alpha$* 、*PUMA*和/或*Fukuda*、和/或*Fukuda*, A.M.和*Badaut*, J. (2013) *Genes (Basel)* 4:435-456中描述的任何基因)、亨廷頓氏病(突變體*HTT*)、癲癇(例如*SCN1A*、*NMDAR*、*ADK*、和/或*Boison*, D. (2010) *Epilepsia* 51:1659-1668中描述的任何基因)、帕金森氏病( $\alpha$ -突觸核蛋白)、*Lou Gehrig*氏病(也稱為肌萎縮側索硬化；*SOD1*)、阿爾茨海默氏病(*tau*，澱粉樣蛋白前體蛋白)、皮質基底變性或*CBD(tau)*、皮質基底神經節變性或*CBGD (tau)*、額顳葉癡呆或*FTD(tau)*、進行性核上性麻痺或*PSP(tau)*、多系統萎縮或*MSA( $\alpha$ -突觸核蛋白)*、腦癌(例如，腦癌中牽涉的突變體或過表達癌基因)和溶酶體貯積病(*LSD*)。本發明的病症可包括那些涉及皮層的大面積(例如皮層的超過一個功能區、皮質的超過一個腦葉和/或整個皮層)的那些病症。可藉由本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的本發明病症的其它非限制性實例包括創傷性腦損傷、酶功能障礙病症、精神病學障礙(包括創傷後應激綜合征)、神經變性性疾病和認知病症(包括癡呆、孤獨症和抑鬱)。酶功能障礙病症包括但不限於腦白質營養不良症(包括卡納萬病)和下文描述的任何溶酶體貯積病。

**【0144】** 在一些實施方案中，使用治療性多肽或治療性核酸治療溶酶體貯積病。如本領域公知的，溶酶體貯積病是罕見的，以溶酶體功能缺陷為特徵的遺傳性代謝病症。此類病症通常由適當的粘多糖、糖蛋白和/或脂質代謝需要的酶的缺陷引起，導致溶酶體貯存的細胞材料的病理性積累。可以由本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的本發明的溶酶體貯積病的非限制性實例(對於每種病症，在括號中提供了可以靶向或供應的示例性基因)包括戈謝病2型或3型(酸性

$\beta$ -葡糖苷酶，*GBA*)、GM1神經節苷脂貯積病( $\beta$ -半乳糖苷酶-1，*GLB1*)、亨特病(Hunter disease)(艾杜糖2-硫酸酯酶，*IDS*)、克拉伯病(半乳糖神經醯胺酶，*GALC*)、甘露糖苷貯積症疾病(甘露糖苷酶，如 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶，*MAN2B1*)、 $\beta$ 甘露糖苷病( $\beta$ -甘露糖苷酶，*MANBA*)、異染性腦白質營養不良疾病(假芳基硫酸酯酶A，*ARSA*)、粘脂貯積症II/III病(N-乙醯葡糖胺-1-磷酸轉移酶，*GNPTAB*)、尼曼皮克A疾病(酸性鞘磷脂酶，*ASM*)、尼曼皮克C病(尼曼皮克C蛋白，*NPC1*)、龐皮病(Pompe disease)(酸性 $\alpha$ -1,4-葡糖苷酶，*GAA*)、桑德霍夫(Sandhoff)病(己糖胺酶 $\beta$ 亞基，*HEXB*)、桑菲列浦(Sanfilippo) A疾病(N-磺基葡糖胺磺基水解酶(N-sulfoglucosamine sulfohydrolase)，*MPS3A*)、桑菲列浦B病(N- $\alpha$ -乙醯胺基葡糖苷酶，*NAGLU*)、桑菲列浦C病(肝素乙醯CoA: $\alpha$ -葡糖胺酶N-乙醯轉移酶，*MPS3C*)、桑菲列浦D病(N-乙醯葡糖胺-6-硫酸酯酶，*GNS*)、欣德勒病(Schindler disease)( $\alpha$ -N-乙醯半乳糖胺酶，*NAGA*)、Sly病( $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶，*GUSB*)、泰薩克斯病(Tay-Sachs disease)(己糖胺酶 $\alpha$ 亞基，*HEXA*)和沃爾曼病(Wolman disease)(溶酶體酸性脂肪酶，*LIPA*)。

【0145】 另外的溶酶體貯積症以及與每種疾病相關的缺陷酶列於下表1中。在一些實施方案中，下表中列出的疾病由補充或以其它方式補償相應的酶缺陷的本發明的治療性多肽或治療性核酸治療。

【0146】 表1. 溶酶體貯積病症和相關的缺陷酶。

溶酶體貯積病	缺陷酶
天冬胺醯基葡萄糖胺尿(Aspartylglucosaminuria)	天冬胺醯胺基葡糖苷酶
法布裏病	$\alpha$ -半乳糖苷酶 A
嬰兒巴藤(Batten)病(CNL1)	棕櫚醯蛋白硫酸酯酶

典型晚期巴藤病(CNL2)	三肽基肽酶
幼年巴藤病(CNL3)	溶酶體跨膜蛋白
巴藤，其它形式(CNL4-CNL8)	多種基因產物
胱胺酸病	半胱胺酸轉運蛋白
法伯病	酸性神經醯胺酶
岩藻糖苷沉積症	酸性 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶
Galactosidialidosis	保護蛋白/組織蛋白酶 A
戈謝病 1、2 和 3 型	酸性 $\beta$ -葡糖苷酶
GM1 神經節苷脂貯積病	酸性 $\beta$ -半乳糖苷酶
亨特病	艾杜糖醛酸 -2- 硫酸酯酶 (Iduronate-2-sulfatase)
Hurler-Scheie	$\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶
克拉伯(Krabbe)病	半乳糖腦苷脂酶
$\alpha$ -甘露糖苷貯積症	酸性 $\alpha$ -甘露糖苷酶
$\beta$ -甘露糖苷貯積症	酸性 $\beta$ -甘露糖苷酶
馬-拉病	芳基硫酸酯酶 B
異染性腦白質營養不良	芳基硫酸酯酶 A
莫爾基奧病 A (Morquio A)	N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸
莫爾基奧病 B	酸性 $\beta$ -半乳糖苷酶
粘脂質累積 II/III	N-乙醯葡糖胺-1-磷酸轉移酶
尼曼-皮克 A, B	酸性鞘磷脂酶
尼曼-皮克 C	NPC-1
Pompe 酸	$\alpha$ -葡糖苷酶
桑德霍夫病	$\beta$ -己糖胺酶 B
桑菲列浦病 A	乙醯肝素 N-硫酸酯酶
桑菲列浦病 B	$\alpha$ -N-乙醯胺基葡糖苷酶
桑菲列浦病 C	乙醯基-CoA: $\alpha$ -胺基葡糖苷 N-乙醯轉 移酶
桑菲列浦病 D	N-乙醯基葡糖胺-6-硫酸
欣德勒病	$\alpha$ -N-乙醯基半乳糖胺酶

Schindler-Kanzaki	$\alpha$ -N-乙醯基半乳糖胺酶
唾液酸沉積症	$\alpha$ -神經醯胺酶
斯萊病(Sly)	$\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶
泰-薩克斯病	$\beta$ -己糖胺酶 A
沃爾曼氏病	酸性脂肪酶

【0147】 在一些實施方案中，異源核酸與啓動子可操作連接。示例性啓動子包括但不限於巨細胞病毒(CMV)立即早期啓動子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)啓動子、猿病毒40(SV40)啓動子和CK6啓動子、轉甲狀腺素蛋白啓動子(TTR)、TK啓動子、四環素應答啓動子(TRE)、HBV啓動子、hAAT啓動子、LSP啓動子、嵌合肝特異性啓動子(LSP)、E2F啓動子、端粒酶(hTERT)啓動子；巨細胞病毒增強子/雞 $\beta$ -肌動蛋白/兔 $\beta$ -珠蛋白啓動子(CAG啓動子；Niwa等, *Gene*, 1991, 108(2):193-9)和延伸因數1- $\alpha$ 啓動子(EF1- $\alpha$ )啓動子(Kim等, *Gene*, 1990, 91(2):217-23和Guo等, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10)。在一些實施方案中，啓動子包含人 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶啓動子或與雞 $\beta$ -肌動蛋白(CBA)啓動子連接的巨細胞病毒增強子。啓動子可以是組成性、誘導型或抑制性啓動子。在一些實施方案中，本發明提供了重組載體，其包含與CBA啓動子可操作連接的編碼本公開的異源轉基因的核酸。示例性的啓動子和描述可以參見例如美國PG公開文本20140335054。

【0148】 組成性啓動子的實例包括但不限於逆轉錄病毒勞斯肉瘤病毒(RSV) LTR啓動子(任選地與RSV增強子一起)、巨細胞病毒(CMV)啓動子(任選地與CMV增強子一起)[參見例如Boshart等, *Cell*, 41:521-530 (1985)]、SV40啓動子、

二氫葉酸還原酶啓動子、13-肌動蛋白啓動子、磷酸甘油激酶(PGK)啓動子和EF1a啓動子[Invitrogen]。

【0149】 誘導型啓動子允許調節基因表達並且可以藉由外源供應的化合物、環境因素如溫度、或特定生理狀態的存在，例如急性期、細胞的特定分化狀態或僅在複製細胞中調節。誘導型啓動子和誘導型系統可購自多種商業來源，包括但不限於Invitrogen、Clontech和Ariad。已經描述了許多其它系統，並且可以由本領域技術人員容易地選擇。由外源供應的啓動子調節的誘導型啓動子的實例包括鋅誘導型綿羊金屬硫蛋白(MT)啓動子、地塞米松(Dex)誘導型小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)啓動子、T7聚合酶啓動子系統(WO 98/10088)；蛻皮激素昆蟲啓動子(No等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996))、四環素抑制系統(Gossen等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992))、四環素誘導系統(Gossen等, *Science*, 268:1766-1769 (1995))，還可見Harvey等, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998))、RU486誘導系統(Wang等, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997))和Wang等, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997))和雷帕黴素誘導型系統(Magari等, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997))。可以在此背景中有用的其它類型的誘導型啓動子是由特定生理狀態(例如溫度、急性期、細胞的特定分化狀態或僅在複製細胞中)調節的啓動子。

【0150】 在另一個實施方案中，使用轉基因的天然啓動子或其片段。當期望轉基因的表達應當模擬天然表達時，可以使用天然啓動子。當轉基因的表達必須在時間上或發育上，或以組織特異性方式，或者響應特定的轉錄刺激物時，可以使用天然啓動子。在另一個實施方案中，也可以使用其它天然表達控制元件，如增強子元件、多聚腺苷酸化位點或Kozak共有序列來模擬天然表達。

【0151】 在一些實施方案中，調節序列賦予組織特異性基因表達能力。在一些情況下，組織特異性調節序列結合以組織特異性方式誘導轉錄的組織特異性轉錄因數。此類組織特異性調節序列(例如啟動子，增強子等)是本領域公知的。

【0152】 在一些實施方案中，載體包含內含子。例如，在一些實施方案中，內含子是源自雞 $\beta$ -肌動蛋白和兔 $\beta$ -珠蛋白的嵌合內含子。在一些實施方案中，內含子是小鼠細小病毒(MVM)內含子。

【0153】 在一些實施方案中，載體包含多聚腺苷酸化(polyA)序列。多聚腺苷酸化序列的許多實例是本領域已知的，例如牛生長激素(BGH)多聚(A)序列(參見例如登錄號EF592533)、SV40多聚腺苷酸化序列和HSV TK pA多聚腺苷酸化序列。

【0154】 V. 病毒顆粒和生成病毒顆粒的方法

【0155】 本公開的某些態樣涉及重組病毒顆粒(例如rAAV顆粒)。

【0156】 基於本文中提供的指導，本領域技術人員可以適當地改編本公開的技術以與多種不同病毒一起使用。

【0157】 在一些實施方案中，病毒是腺病毒科，其包括通常稱為腺病毒的非包膜病毒。在一些實施方案中，病毒屬腺胸腺病毒屬(*Atadenovirus*)、禽腺病毒屬(*Aviadenovirus*)、*Ichtadenovirus*、哺乳動物腺病毒屬(*Mastadenovirus*)、或唾液腺病毒屬(*Siadenovirus*)。

【0158】 在一些實施方案中，病毒是細小病毒科，其包括非包膜病毒如AAV和博卡病毒屬(*Bocaparvovirus*)。在一些實施方案中，病毒是濃核病毒亞科(*Densovirinae*)。在一些實施方案中，病毒是*Ambidensovirus*、短頸濃核病毒屬(*Brevidensovirus*)、蝦肝胰腺濃核病毒屬(*Hepandensovirus*)、重複濃核病毒屬

(*Iteradensovirus*)、或*Penstyldensovirus*。在一些實施方案中，病毒是亞科細小病毒亞科(*Parvovirinae*)。在一些實施方案中，病毒屬*Amdoparvovirus*、*Aveparvovirus*、博卡病毒屬(*Bocaparvovirus*)、*Copiparvovirus*、*Dependoparvovirus*、*Erythroparvovirus*、*Protoparvovirus*、或*Tetraparvovirus*。

【0159】 在一些實施方案中，病毒是逆轉錄病毒科，其包括包含包膜病毒，包括慢病毒。在一些實施方案中，病毒是正反轉錄病毒亞科(*Orthoretrovirinae*)。在一些實施方案中，所述病毒屬 $\alpha$ 反轉錄病毒屬、 $\beta$ 反轉錄病毒屬、 $\delta$ 逆轉錄病毒屬、 $\epsilon$ 反轉錄病毒屬、 $\gamma$ 逆轉錄病毒屬、或慢病毒屬。在一些實施方案中，病毒是泡沫病毒亞科(*Spumaretrovirinae*)。在一些實施方案中，病毒屬泡沫病毒屬。

【0160】 在一些實施方案中，病毒屬桿狀病毒科，其包括包膜病毒，包括 $\alpha$ 桿狀病毒屬。在一些實施方案中，病毒屬 $\alpha$ 桿狀病毒屬、 $\beta$ 桿狀病毒屬、 $\delta$ 桿狀病毒屬、或 $\gamma$ 桿狀病毒屬。

【0161】 在一些實施方案中，病毒屬皰疹病毒科，其包括包膜病毒，如單純皰疹病毒HSV-1和HSV-2。在一些實施方案中，病毒屬 $\alpha$ 皰疹病毒亞科(*Alphaherpesvirinae*)。在一些實施方案中，病毒屬傳喉炎病毒屬(*Iltovirus*)、馬立克病毒屬(*Mardivirus*)、單純皰疹病毒屬(*Simplexvirus*)、或水痘病毒屬。在一些實施方案中，所述病毒屬 $\beta$ 皰疹病毒亞科。在一些實施方案中，病毒屬巨細胞病毒屬、鼠巨細胞病毒屬(*Muromegalovirus*)、長鼻動物病毒屬(*Proboscivirus*)、或薔薇疹病毒屬。在一些實施方案中，病毒是 $\gamma$ 皰疹病毒亞科。在一些實施方案中，病毒屬淋巴細胞隱病毒屬(*Lymphocryptovirus*)、瑪卡病毒屬(*Macavirus*)、馬皰疹病毒屬(*Percavirus*)或棒狀病毒屬(*Rhadinovirus*)。

【0162】 在一些實施方案中，病毒是AAV病毒。在AAV顆粒中，在AAV顆粒中使核酸殼體化。AAV顆粒還包含殼體蛋白。在一些實施方案中，核酸包含在轉錄方向上可操作連接的異源核酸和/或一種或多種以下組分：控制序列，包括轉錄起始和終止序列，從而形成表達盒。

【0163】 在一些實施方案中，病毒顆粒包含AAV ITR序列。例如，表達盒在5'和3'端側翼可具有至少一個功能性AAV ITR序列。藉由「功能性AAV ITR序列」意指ITR序列如意圖用於AAV病毒體的救援、複製和包裝那樣發揮功能。參見Davidson等, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32; Passini等, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; 以及Pechan等, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16，它們全部藉由引用完整併入本文。爲了實施本發明的一些態樣，重組載體至少包含所有對於殼體化必需的AAV序列和用於由rAAV感染的物理結構。用於本發明載體的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列(例如，如Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801中描述)，並且可以藉由插入、缺失或取代核苷酸改變，或者AAV ITR可以源自幾種AAV血清型中的任一種。目前已知AAV的超過40種血清型，並且繼續鑒定現有血清型的新血清型和變體。參見Gao等, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao等, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; 以及Bossis等, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810。認爲使用任何AAV血清型在本發明的範圍內。在一些實施方案中，rAAV載體是源自AAV血清型的載體，包括但不限於AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV DJ、AAV DJ8、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV ITR等。在一些實施方案中，AAV(例如，rAAV載體)中的核酸包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、

AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV DJ、AAV DJ8、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV ITR等的ITR。在一些實施方案中，AAV顆粒包含編碼側翼有一個或多個AAV ITR的異源轉基因的AAV載體。

**【0164】** 在一些實施方案中，rAAV顆粒包含選自以下的殼體化蛋白：

AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6 (例如野生型AAV6殼體、或變體AAV6殼體如ShH10，如記載於美國PG公開文本2012/0164106)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9 (例如野生型AAV9殼體、或經修飾的AAV9殼體，如記載於美國PG公開文本2013/0323226)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、酪胺酸殼體突變體、肝素結合殼體突變體、AAV2R471A殼體、AAVAAV2/2-7m8殼體、AAV LK03殼體、AAV DJ殼體(例如AAV-DJ/8殼體、AAV-DJ/9殼體、或美國PG公開文本2012/0066783中描述的任何其它殼體)、AAV2 N587A殼體、AAV2 E548A殼體、AAV2 N708A殼體、AAV V708K殼體、山羊AAV殼體、AAV1/AAV2嵌合殼體、牛AAV殼體、小鼠AAV殼體、rAAV2/HBoV1殼體、AAV2HBKO殼體、AAVPHP.B殼體或AAVPHP.eB殼體或美國專利No. 8,283,151或國際公開文本No. WO/2003/042397中描述的AAV殼體。在另外的實施方案中，rAAV顆粒包含來自進化枝(Clade) A-F的AAV血清型的殼體蛋白。

**【0165】** 本公開的某些態樣涉及在胺基酸殘基2處包含胺基酸取代的AAV (例如，rAAV)殼體蛋白。在一些實施方案中，與親本AAV殼體蛋白的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。如本文所述，可以檢查AAV殼體蛋白的起始甲硫胺酸(iMet X)第2位處的胺基酸對N端乙

醯化、運輸、轉導和/或其它翻譯後修飾(例如，糖基化，泛素化等)的影響。可以使用用於檢查乙醯化或其與AAV顆粒相關的功能結果的本文所述的任何測定法來評估N端乙醯化。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro或Tyr取代AAV殼體蛋白(例如VP1或VP3)的胺基酸殘基<sup>2</sup>。在一些實施方案中，胺基酸取代導致AAV殼體的較少脫醯胺化。

**【0166】** 本公開的其它態樣涉及包含改變脫醯胺化的胺基酸取代的AAV(例如，rAAV)殼體蛋白。在一些實施方案中，「改變」脫醯胺化的胺基酸取代(例如，VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716處的胺基酸取代)導致更高的脫醯胺化頻率或更低的脫醯胺化頻率，例如與沒有取代的VP1或VP3(如親本VP1或VP3)相比。如本文中所述，可以檢查AAV殼體蛋白(例如，VP1或VP3)的潛在脫醯胺化位點對脫醯胺化、運輸、轉導和/或其它翻譯後修飾(例如，糖基化，泛素化，等等)的影響。可以使用用於檢查脫醯胺化或其與AAV顆粒相關的功能性結果的本文所述的任何測定法來評估脫醯胺化。

**【0167】** 本文中描述了幾種潛在的脫醯胺化位點。在一些實施方案中，改變脫醯胺化的胺基酸取代選自VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716。例如，在一些實施方案中，用Asp取代VP1的N57、VP3的N382、VP3的N511和/或VP3的N715，並且與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代導致更高的脫醯胺化頻率。在其它實施方案中，胺基酸取代為N57K或N57Q，並且與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代導致更低的脫醯胺

化頻率。在其它實施方案中，用不為Gly的胺基酸(例如，Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、或Val)取代VP1的G58、VP3的G382、VP3的G512和/或VP3的G716，並且與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的脫醯胺化相比，胺基酸取代導致更低的脫醯胺化頻率。

**【0168】** 在一些實施方案中，AAV殼體蛋白是VP1、VP2或VP3。AAV顆粒可以包含本文所述的任何示例性AAV殼體血清型，如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12,AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8,AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、小鼠AAV、或rAAV2/HBoV1。AAV殼體蛋白可以進一步包含本文所述的任何殼體蛋白突變，如酪胺酸和/或肝素結合突變。

**【0169】** 本公開的其它態樣涉及改善rAAV顆粒的穩定性的方法。在一些實施方案中，所述方法包括取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2，例如如本文所述。例如，在一些實施方案中，取代VP1的胺基酸殘基2。在其它實施方案中，取代VP3的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，第2位處取代的胺基酸以比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2更高的頻率進行N-乙醯化，例如如本文所述。在一些實施方案中，取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2可以使rAAV顆粒的穩定性改善至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在一些實施方案中，可以將第2位處具有取代胺基

酸的rAAV顆粒的穩定性與野生型或親本AAV殼體(例如相同血清型的)比較。例如，在一些實施方案中，取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2可以將rAAV顆粒的穩定性改善約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%之任一項，例如，與包含野生型殼體的rAAV顆粒的穩定性相比。可以使用本領域已知的各種測定法來測量AAV顆粒的穩定性，包括但不限於差示掃描螢光(DSF)、差示掃描量熱法(DSC)、其它熱變性測定法、對蛋白水解的易感性、成像或結構分析以觀察變性(例如，使用電子顯微術)、轉導效率或對特定溫度(例如室溫或4°C，用於熱穩定性)保持指定時間間隔或在特定pH(例如pH穩定性)處理的AAV顆粒組合物的另一功能測定法，等等。

**【0170】** 本公開的其它態樣涉及改善rAAV顆粒的裝配的方法。在一些實施方案中，所述方法包括取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2，例如如本文所述。例如，在一些實施方案中，取代VP1的胺基酸殘基2。在其它實施方案中，取代VP3的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，第2位處的取代的胺基酸以比親本VP1

和/或VP3的胺基酸殘基2更高的頻率進行N-乙醯化，例如如本文所述。在一些實施方案中，取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2可以使rAAV顆粒的裝配改善至少至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在一些實施方案中，可以將第2位處具有取代胺基酸的rAAV顆粒的裝配與野生型或親本AAV殼體(例如相同血清型的)進行比較。例如，在一些實施方案中，取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2可以將rAAV顆粒的裝配改善約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%之任一項，例如與包含野生型殼體的rAAV顆粒的裝配相比。可以使用本領域已知的各種測定法來測量AAV顆粒裝配，包括但不限於測量顆粒產生量和/或速率，量化殼體產生(例如，使用本文所述的任何方法純化後)、測定完整載體對空殼體的產生、測量轉導效率、成像或結構分析以觀察顆粒形

成(例如，使用電子顯微術)、產生AAV殼體蛋白(例如，藉由Western印跡測定)等。

**【0171】** 本公開的其它態樣涉及改善rAAV顆粒的轉導的方法。在一些實施方案中，所述方法包括取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2，例如如本文所述。例如，在一些實施方案中，取代VP1的胺基酸殘基2。在其它實施方案中，取代VP3的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，第2位處取代的胺基酸以比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基2更高的頻率進行N-乙醯化，例如如本文所述。在一些實施方案中，取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2將rAAV顆粒的轉導改善至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在一些實施方案中，可以將第2位處具有取代胺基酸的rAAV顆粒的轉導與野生型或親代AAV殼體(例如相同血清型的)進行比較。例如，在一些實施方案中，取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2可以將rAAV顆粒轉導改善約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約

50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%之任一項，例如與包含野生型殼體的rAAV顆粒的轉導相比。可以使用本領域已知的各種測定來測量AAV顆粒轉導，包括但不限於本文所述的轉導效率測定法。在一些實施方案中，本發明提供了減少rAAV顆粒的轉導的方法；例如，藉由取代VP1和/或VP3的胺基酸殘基2。

**【0172】** 本公開的其它態樣涉及改善rAAV顆粒的穩定性的方法。在一些實施方案中，所述方法包括取代改變脫醯胺化的VP1和/或VP3的胺基酸，例如如本文所述。例如，在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716。在一些實施方案中，取代的胺基酸以比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基更高的頻率脫醯胺化，例如如本文所述。在一些實施方式中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715和/或VP3的G716將rAAV顆粒的穩定性改善至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80% 85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在一些實施方案中，具有取代的VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716的rAAV顆粒的穩定性可以與野生型或親本AAV殼體(例如相同血清型的)進行比較。例如，在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715和/或VP3的G716將rAAV顆粒的穩定性改

善約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%之任一項，例如，與包含野生型殼體的rAAV顆粒的穩定性相比。可以使用本領域已知的各種測定法來測量AAV顆粒的穩定性，包括但不限於差示掃描螢光(DSF)、差示掃描量熱法(DSC)、其它熱變性測定法、對蛋白水解的易感性、成像或結構分析以觀察變性(例如，使用電子顯微術)、轉導效率或對特定溫度(例如室溫或4°C，用於熱穩定性)保持指定時間間隔或在特定pH(例如pH穩定性)處理的AAV顆粒組合物的另外的功能測定法，等等。

**【0173】** 本公開的其它態樣涉及改善rAAV顆粒的裝配的方法。在一些實施方案中，所述方法包括取代改變脫醯胺化的VP1和/或VP3的胺基酸，例如如本文所述。例如，在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716。在其它實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716。在一些實施方

案中，取代的胺基酸以比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基更高的頻率進行脫醯胺化，例如如本文所述。在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716可以使rAAV顆粒的裝配改善至少至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在一些實施方案中，可以將具有取代的VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716的rAAV顆粒的穩定性與野生型或親本AAV殼體(例如相同血清型的)進行比較。例如，在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716可以將rAAV顆粒的裝配改善約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至

約30%、或約10%至約20%之任一項，例如與包含野生型殼體的rAAV顆粒的裝配相比。可以使用本領域已知的各種測定法來測量AAV顆粒裝配，包括但不限於測量顆粒產生量和/或速率，量化殼體產生(例如，使用本文所述的任何方法純化後)、測定完整載體對空殼體的產生、測量轉導效率、成像或結構分析以觀察顆粒形成(例如，使用電子顯微術)、產生AAV殼體蛋白(例如，藉由Western印跡測定)等。

**【0174】** 本公開的其它態樣涉及改善rAAV顆粒的轉導的方法。在一些實施方案中，所述方法包括取代改變脫醯胺化的VP1和/或VP3的胺基酸，例如如本文所述。例如，在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716。在一些實施方案中，取代的胺基酸以比親本VP1和/或VP3的胺基酸殘基更高的頻率進行脫醯胺化，例如如本文所述。在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716將rAAV顆粒的轉導改善至少約5%、至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約100%。在一些實施方案中，可以將具有取代的VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716的rAAV顆粒的穩定性與野生型或親代AAV殼體(例如相同血清型的)進行比較。例如，在一些實施方案中，取代VP1的A35、VP1的N57、VP1的G58、VP3的N382、VP3的G383、VP3的N511、VP3的G512、VP3的N715或VP3的G716可以將rAAV顆粒轉導改善

約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%之任一項，例如與包含野生型殼體的rAAV顆粒的轉導相比。可以使用本領域已知的各種測定來測量AAV顆粒轉導，包括但不限於本文所述的轉導效率測定法。

**【0175】** 在一些態樣，本發明提供包含重組自身互補基因組(例如自身互補或自身補充的rAAV載體)的病毒顆粒。美國專利No. 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 和8,361,457; 以及Wang Z., 等, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111 (每篇藉由引用整體併入本文)描述了具有自身互補載體基因組的AAV病毒顆粒和使用自身互補AAV基因組的方法。包含自身互補基因組的rAAV由於其部分互補序列(例如，異源核酸的互補編碼和非編碼鏈)將快速形成雙鏈DNA分子。在一些實施方案中，載體包含編碼異源核酸的第一核酸序列和編碼核酸互補物的第二核酸序列，其中第一核酸序列可以沿著其大部分或整個長度與第二核酸序列形成鏈內鹼基對。

【0176】 在一些實施方案中，第一異源核酸序列和第二異源核酸序列藉由突變的ITR (例如，右側ITR)連接。在一些實施方案中，ITR包含多核苷酸序列 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA GGTCGCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG - 3' (SEQ ID NO: 8)。突變ITR 包括包含末端解析序列的D區域的缺失。因此，在複製AAV病毒基因組上，rep 蛋白不會在突變的ITR處切割病毒基因組，因此，在病毒殼體中包裝以5'至3'順序包含以下各項的重組病毒基因組：AAV ITR、第一異源多核苷酸序列，包括調節序列、突變AAV ITR、與第一異源多核苷酸為反向取向的第二異源多核苷酸和第三AAV ITR。

【0177】 使用不同的AAV血清型來優化特定靶細胞的轉導或靶向特定靶組織(例如患病組織)內的特定細胞類型。rAAV顆粒可以包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。例如，rAAV顆粒可以含有一種或多種源自相同AAV血清型的ITR和殼體，或者rAAV顆粒可以含有源自與rAAV顆粒的殼體不同的AAV血清型的一種或多種ITR。

【0178】 在一些實施方案中，AAV殼體包含突變，例如殼體包含突變殼體蛋白。在一些實施方案中，突變是酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施方案中，突變體殼體蛋白維持形成AAV殼體的能力。在一些實施方案中，rAAV顆粒包含AAV2或AAV5酪胺酸突變體殼體(參見例如Zhong L.等, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (22):7827-7832)，例如在Y444或Y730 (根據AAV2編號)中的突變。在另外的實施方案中，rAAV顆粒包含來自進化枝A-F的AAV血清型的殼體蛋白(Gao,等, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381)。

【0179】 在一些實施方案中，殼體蛋白包含在與硫酸肝素蛋白聚糖相互作用的一個或多個位置處或在對應於胺基酸484、478、527、535、585或588 (基於AAV2的VP1編號來編號)的一個或多個位置處的一個或多個胺基酸取代。本領域已知硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)作用為AAV2顆粒的細胞受體(Summerford, C.和Samulski, R.J. (1998) *J. Virol.* 72 (2):1438-45)。AAV2顆粒與細胞膜上的HSPG之間的結合用來將顆粒附著到細胞。其它細胞表面蛋白如成纖維細胞生長因數受體和 $\alpha v\beta 5$ 整聯蛋白也可以促進細胞感染。結合後，AAV2顆粒可以藉由機制進入細胞，所述機制包括經由網格蛋白包被的凹陷進行的受體介導的胞吞作用。在內體酸化時，AAV2顆粒可從胞吞囊泡中釋放。這允許AAV2顆粒行進到核周的區域以及然後細胞核。還已知AAV3顆粒結合肝素(Rabinowitz, J.E.,等 (2002) *J. Virol.* 76(2):791-801)。

【0180】 已知AAV2殼體蛋白和HSPG之間的結合藉由鹼性AAV2殼體蛋白殘基和帶負電荷的糖胺聚糖殘基之間的靜電相互作用發生(Opie, SR等, (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A等, (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081)。參與這些相互作用的特定殼體殘基包括R484、R487、K527、K532、R585和R588。已經顯示這些殘基中的突變減少AAV2與Hela細胞和肝素本身的結合(Opie, SR等, (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A等, (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081; WO 2004/027019 A2, 美國專利No. 7,629,322)。此外，不希望受限於理論，認為對應於胺基酸484、478、527、532、585或588 (基於AAV2的VP1編號來編號)的一個或多個殘基處的胺基酸取代可以調節不結合HSPG的AAV殼體類型的轉導特性，或者可以不依賴於其結合HSPG的能力調節AAV殼體類型的轉導特性。在一些實施方案中，一個

或多個胺基酸取代包括基於AAV2的VP1編號的VP1、VP2和/或VP3的R484、R487、K527、K532、R585和/或R588位處的取代。

**【0181】** 在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代將rAAV顆粒與硫酸肝素蛋白聚糖的結合降低約至少10%、約至少25%、約至少50%、約至少75%、或約至少100%。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代將rAAV顆粒與硫酸肝素蛋白聚糖的結合降低約至少10%、約至少15%、約至少20%、約至少25%、約至少30%、約至少35%、約至少40%、約至少45%、約至少50%、約至少55%、約至少60%、約至少65%、約至少70%、約至少75%、約至少80%、約至少85%、約至少90%、約至少95%、或約至少100% (與包含野生型殼體的rAAV顆粒的結合相比)。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代將rAAV顆粒與硫酸肝素蛋白聚糖的結合降低約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%之任一項(與包含野生型殼體的rAAV顆粒的結合相比)。在一些實施方案中，與野生型rAAV顆粒的結合相比，一個或多個胺基酸取

代導致rAAV顆粒與硫酸肝素蛋白聚糖的檢測不到的結合。測量AAV顆粒與HSPG的結合的手段是本領域中已知的；例如結合硫酸肝素層析介質或結合已知在細胞表面上表達HSPG的細胞。例如參見Opie, SR等, (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006和Kern, A等, (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代將rAAV顆粒對細胞(例如眼或CNS中的細胞)的轉導效率改善約至少10%、約至少15%、約至少20%、約至少25%、約至少30%、約至少35%、約至少40%、約至少45%、約至少50%、約至少55%、約至少60%、約至少65%、約至少70%、約至少75%、約至少80%、約至少85%、約至少90%、約至少95%、或約至少100% (與包含野生型殼體的rAAV殼體的轉導效率相比)。在一些實施方案中，一個或多個胺基酸取代將rAAV顆粒對細胞(例如眼或CNS中的細胞)的轉導效率改善約10%至約100%、約20%至約100%、約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約10%至約90%、約20%至約90%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%、約10%至約80%、約20%至約80%、約30%至約80%、約40%至約80%、約50%至約80%、約60%至約80%、約70%至約80%、約10%至約70%、約20%至約70%、約30%至約70%、約40%至約70%、約50%至約70%、約60%至約70%、約10%至約60%、約20%至約60%、約30%至約60%、約40%至約60%、約50%至約60%、約10%至約50%、約20%至約50%、約30%至約50%、約40%至約50%、約10%至約40%、約20%至約40%、約30%至約40%、約10%至約30%、約20%至約30%、或約10%至約20%中任一項(與包含野生型殼體的rAAV殼體的轉導效率相比)。測量AAV顆粒對細胞(例如培養物或組織部分中的細胞)的轉導效

率的手段是本領域中已知的。例如，可以用一定濃度的含有載體的rAAV顆粒感染細胞群體(例如在培養物或組織部分中)，所述載體在細胞中表達時產生可測定報告物(例如GFP螢光、sFLT產生、等等)。

**【0182】 AAV殼體蛋白**

**【0183】** 在一些態樣，本發明提供了包含胺基酸殘基2處的胺基酸取代的AAV殼體蛋白；其中與親本AAV殼體蛋白的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，在胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，AAV殼體蛋白是VP1或VP3。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro或Tyr取代AAV殼體蛋白(例如VP1或VP3)的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，胺基酸取代導致AAV殼體蛋白的較少脫醯胺化。本發明的AAV殼體蛋白質的非限制性實例包括以下任一AAV血清型的VP1和/或VP3：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8,AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、AAV1/AAV2嵌合、牛AAV、小鼠AAV、或rAAV2/HBoV1血清型殼體。在一些實施方案中，AAV殼體還包含酪胺酸突變或肝素結合突變。

**【0184】 AAV顆粒的產生**

**【0185】** 本領域中已知用於產生rAAV載體的許多方法，包括轉染、穩定的細胞株產生和感染性雜合病毒產生系統，其包括腺病毒-AAV雜合體、疱疹病毒-AAV雜合體(Conway, JE等, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789)和桿狀病毒-AAV雜合體(Urabe, M.等, (2002) *Human Gene Therapy* 13(16):1935-1943; Kotin,

R. (2011) *Hum Mol Genet.* 20(R1): R2–R6)。用於產生rAAV病毒顆粒的rAAV生產培養物都需要；1)合適的宿主細胞，2)合適的輔助病毒功能，3)AAV rep和cap基因和基因產物；4)側翼有至少一個AAV ITR序列(例如，編碼GNPTAB的AAV基因組)的核酸(如治療性核酸)；以及5)用於支持rAAV產生的合適的培養基和培養基成分。在一些實施方案中，合適的宿主細胞是靈長類宿主細胞。在一些實施方案中，合適的宿主細胞是人衍生的細胞株，如HeLa、A549、293或Perc.6細胞。在一些實施方案中，合適的輔助病毒功能由野生型或突變型腺病毒(如溫度敏感性腺病毒)、疱疹病毒(HSV)、桿狀病毒或提供輔助功能的質粒構建體提供。在一些實施方案中，AAV rep和cap基因產物可以來自任何AAV血清型。一般但不強制，AAV rep基因產物與rAAV載體基因組的ITR是相同血清型的，只要rep基因產物可以發揮功能以複製和包裝rAAV基因組。本領域已知的合適的培養基可用於生產rAAV載體。這些培養基包括但不限於由Hyclone Laboratories和JRH生產的培養基，包括改良的Eagle培養基(MEM)、Dulbecco改良Eagle培養基(DMEM)、定制配製劑，如美國專利No. 6,566,118中描述，和Sf-900II SFM培養基，如美國專利No. 6,723,551中描述，其各自藉由引用整體併入本文，特別是關於用於生產重組AAV載體的定制培養基配方。在一些實施方案中，AAV輔助功能由腺病毒或HSV提供。在一些實施方案中，AAV輔助功能由桿狀病毒提供，並且宿主細胞是昆蟲細胞(例如草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (Sf9)細胞)。在一些實施方案中，AAV cap功能在VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處提供胺基酸取代，其中與親本AAV顆粒的VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的N端乙醯化相比，VP1和/或VP3的胺基酸殘基2處的胺基酸取代改變N端乙醯化。在一些實施方案中，用Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、

Met、Pro或Tyr取代AAV殼體蛋白(例如VP1或VP3)的胺基酸殘基2。在一些實施方案中，胺基酸取代導致AAV殼體的較少脫醯胺化。

【0186】一種生產rAAV顆粒的方法是三重轉染方法。簡言之，可以將含有rep基因和殼體基因的質粒連同輔助腺病毒質粒一起轉染(例如，使用磷酸鈣法)到細胞株(例如，HEK-293細胞)中，並且可以將病毒收集並且任選地純化。因此，在一些實施方案中，藉由將編碼rAAV載體的核酸、編碼AAV rep和cap的核酸和編碼AAV輔助病毒功能的核酸三重轉染到宿主細胞中來產生rAAV顆粒，其中將核酸轉染入宿主細胞中產生能夠產生rAAV顆粒的宿主細胞。

【0187】在一些實施方案中，可藉由生產細胞株方法產生rAAV顆粒(參見Martin等, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269; 美國PG公開文本No. US2004/0224411; 以及Liu, X.L.等 (1999) *Gene Ther.* 6:293-299)。簡言之，可以用含有rep基因、殼體基因和載體基因組的質粒穩定轉染細胞株(例如HeLa、293、A549或Perc.6細胞株)，所述載體基因組包含啓動子-異源核酸序列(例如，GNPTAB)。可以篩選細胞株以選擇用於rAAV產生的引導克隆，其然後可以擴增到生產生物反應器並用輔助病毒(例如，腺病毒或HSV)感染以啓動rAAV生產。隨後，可以收穫病毒，可以將腺病毒滅活(例如藉由加熱)和/或除去，並且可以純化rAAV顆粒。因此，在一些實施方案中，rAAV顆粒由生產細胞株產生，所述生產細胞株包含編碼rAAV載體的核酸、編碼AAV rep和cap的核酸和編碼AAV輔助病毒功能的核酸中的一種或多種。如本文所述，與三重轉染方法相比，生產細胞株方法可以有利於生產具有過大基因組的rAAV顆粒。

【0188】在一些實施方案中，將編碼AAV rep和cap基因和/或rAAV基因組的核酸穩定地維持於生產細胞株中。在一些實施方案中，將編碼AAV rep和cap

基因和/或rAAV基因組的核酸在一種或多種質粒上導入細胞株中以產生生產細胞株。在一些實施方案中，將AAV rep、AAV cap和rAAV基因組在相同質粒上導入細胞中。在其它實施方案中，將AAV rep、AAV cap和rAAV基因組在不同質粒上導入細胞中。在一些實施方案中，用質粒穩定轉染的細胞株維持質粒，持續細胞株的多次傳代(例如，細胞的5、10、20、30、40、50或超過50次傳代)。例如，質粒可以隨細胞複製而複製，或者質粒可以整合入細胞基因組中。已經鑒定出使質粒在細胞(例如人細胞)中能夠自主複製的多種序列(參見例如Krysan, P.J.等 (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:1026-1033)。在一些實施方案中，質粒可以含有允許選擇維持質粒的細胞的選擇標誌物(例如抗生素抗性標誌物)。通常用於哺乳動物細胞中的選擇標誌物包括但不限於殺稻瘟素、G418、潮黴素B、zeocin，嘌呤黴素及其衍生物。用於將核酸導入細胞中的方法是本領域已知的，包括但不限於病毒轉導、陽離子轉染(例如，使用陽離子聚合物如DEAE-葡聚糖或陽離子脂質如lipofectamine)、磷酸鈣轉染、顯微注射、顆粒轟擊、電穿孔和納米顆粒轉染(關於更多細節，參見例如Kim, T.K.和Eberwine, J.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397:3173-3178)。

**【0189】** 在一些實施方案中，將編碼AAV rep和cap基因和/或rAAV基因組的核酸穩定整合入生產細胞株的基因組中。在一些實施方案中，將編碼AAV rep和cap基因和/或rAAV基因組的核酸在一種或多種質粒上導入細胞株中以產生生產細胞株。在一些實施方案中，將AAV rep、AAV cap和rAAV基因組在相同質粒上導入細胞中。在其它實施方案中，將AAV rep、AAV cap和rAAV基因組在不同質粒上導入細胞中。在一些實施方案中，質粒可以含有允許選擇維持質粒的細胞的選擇標誌物(例如抗生素抗性標記)。用於將核酸穩定整合到多種宿主細

胞株中的方法是本領域已知的。例如，可以使用重複選擇(例如，藉由使用選擇標誌物)來選擇已經整合含有選擇標誌物(和AAV cap和rep基因和/或rAAV基因組)的核酸的細胞。在其它實施方案中，核酸可以以位元點特異性方式整合到細胞株中以產生生產細胞株。幾種位點特異性重組系統是本領域已知的，例如FLP/FRT (參見例如O'Gorman, S.等 (1991) *Science* 251:1351-1355)、Cre/loxP (參見例如Sauer, B.和Henderson, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5166-5170)和phi C31-att (參見例如Groth, A.C.等 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5995-6000)。

**【0190】** 在一些實施方案中，生產細胞株源自靈長類細胞株(例如，非人靈長類細胞株，如Vero或FRhL-2細胞株)。在一些實施方案中，細胞株源自人細胞株。在一些實施方案中，生產細胞株源自HeLa、293、A549或PERC.6® (Crucell)細胞。例如，在將編碼AAV rep和cap基因的核酸和/或超大的rAAV基因組導入和/或穩定維持/整合到細胞株中以產生生產細胞株前，細胞株是HeLa、293、A549、或PERC.6® (Crucell)細胞株或其衍生物。

**【0191】** 在一些實施方案中，改編生產細胞株以在懸浮液中生長。如本領域已知的，依賴貼壁細胞通常不能在沒有基底如微載體珠的懸浮液中生長。改編細胞株以在懸浮液中生長可包括例如用攪拌槳在旋轉培養物中培養細胞株，使用缺乏鈣和鎂離子以避免凝集(和任選地消泡劑)的培養基，使用矽化合物包被的培養容器，並且在每次傳代時選擇培養物中(而非在大塊中或容器的側面上)的細胞。關於進一步描述，參見例如ATCC常見問題檔(在萬維網 [atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20uspension-40.aspx](http://atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20uspension-40.aspx)可獲得)及其中引用的參考文獻。

**【0192】** 本發明的合適的AAV生產培養基可以以0.5%-20% (v/v或w/v)的水準補充有血清或血清衍生的重組蛋白。或者，如本領域已知的，AAV載體可以在無血清條件中產生，所述無血清條件也可以稱為不含動物衍生產物的培養基。本領域普通技術人員可以理解，設計用於支持AAV載體生產的商業或定制培養基也可補充有本領域已知的一種或多種細胞培養組分，包括但不限於葡萄糖、維生素、胺基酸和/或生長因素，以提高生產培養物中AAV的滴度。

**【0193】** 可以在適合於所使用的特定宿主細胞的多種條件下(在寬的溫度範圍內，持續不同長度的時間等)培養AAV生產培養物。如本領域已知的，AAV生產培養物包括可以在合適的附著依賴性容器，例如滾瓶、中空纖維濾器、微載體和填充床或流化床生物反應器中培養的附著依賴性培養物。AAV載體生產培養物還可以包括懸浮適應的宿主細胞，如HeLa、293和SF-9細胞，其可以以多種方式培養，包括例如旋轉燒瓶、攪拌罐生物反應器和一次性系統，如Wave袋系統。

**【0194】** 可以從AAV生產培養物中藉由裂解生產培養物的宿主細胞或從生產培養物中收穫用過的培養基(條件是在本領域已知的條件下培養細胞以引起從完整的細胞釋放AAV顆粒到培養基中，如美國專利No. 6,566,118中更全面地描述)來收穫本發明的AAV載體顆粒。裂解細胞的合適方法在本領域中也是已知的，並且包括例如多次冷凍/融化循環、超聲處理、微流化和用化學品如去汙劑和/或蛋白酶處理。

**【0195】** 在另一個實施方案中，純化AAV顆粒。如本文所用，術語「純化」包括製備缺乏至少一些其它組分的AAV顆粒，所述其它組分也可以存在於AAV顆粒天然存在或最初製備AAV顆粒的地方。因此，例如，可以使用純化技術來

製備分離的AAV顆粒，以從來源混合物如培養裂解物或生產培養物上清液中富集它。富集可以以多種方式測量，例如藉由存在於溶液中的DNA酶抗性顆粒(DRP)或基因組拷貝(gc)的比例或藉由感染性測量，或者它可以相對於存在於來源混合物中的第二種潛在的干擾物質，如污染物，包括生產培養污染物或過程中的污染物，包括輔助病毒、培養基組分等測量。

**【0196】** 在一些實施方案中，澄清AAV生產培養物收穫物以除去宿主細胞碎片。在一些實施方案中，藉由一系列深度濾器進行過濾來澄清生產培養物收穫物，所述深度濾器包括例如DOHC Millipore Millistak + HC Pad級濾器、A1HC Millipore Millistak + HC Pad級濾器和0.2 $\mu$ m濾器Opticap XL10 Millipore Express SHC親水膜濾器。也可以藉由本領域已知的多種其它標準技術來實現澄清，例如藉由本領域已知的0.2 $\mu$ m或更大孔徑的任何乙酸纖維素濾器進行離心或過濾。

**【0197】** 在一些實施方案中，用Benzonase<sup>®</sup>進一步處理AAV生產培養物收穫物以消化生產培養物中存在的任何高分子量DNA。在一些實施方案中，在本領域已知的標準條件下進行Benzonase<sup>®</sup>消化，所述標準條件包括例如終濃度1-2.5單位/ml Benzonase<sup>®</sup>於範圍為環境溫度至37°C的溫度持續30分鐘到幾個小時的時段。

**【0198】** 可以使用一個或多個以下純化步驟分離或純化AAV顆粒：平衡離心；流過陰離子交換過濾；用於濃縮AAV顆粒的切向流過濾(TFF)；藉由磷灰石層析的AAV捕獲；輔助病毒的熱滅活；藉由疏水相互作用層析的AAV捕獲；藉由尺寸排阻層析(SEC)的緩衝液交換；納濾；藉由陰離子交換層析、陽離子交換層析或親和層析的AAV捕獲。可以單獨使用、以各種組合或不同的順序使用這些步驟。在一些實施方案中，該方法包括如下所述的順序的所有步驟。例如，

純化AAV顆粒的方法參見例如Xiao等, (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232; 美國專利號6,989,264和8,137,948; 以及WO 2010/148143。

**【0199】 醫藥組合物**

**【0200】** 在一些實施方案中，本公開的AAV顆粒(例如，rAAV顆粒)在醫藥組合物中。醫藥組合物可以適合於本文所述或本領域已知的任何投予方式。在一些實施方案中，醫藥組合物包含修飾為改善rAAV顆粒的穩定性和/或改善轉導效率的rAAV顆粒；例如，用於取代VP1和/或VP3的第2位處的胺基酸殘基以改善rAAV殼體蛋白的乙醯化。在一些實施方案中，醫藥組合物包含修飾為調節rAAV顆粒的穩定性和/或轉導效率的rAAV顆粒(例如，增加穩定性和/或轉導效率或降低穩定性和/或轉導效率)；例如，用於取代調節脫醯胺化(例如增加脫醯胺化或減少脫醯胺化)的胺基酸殘基。

**【0201】** 在一些實施方案中，rAAV顆粒在包含藥學可接受賦形劑的醫藥組合物中。如本領域公知的，藥學可接受賦形劑是相對惰性的物質，其促進藥理學有效物質的投予，並且可以以液體溶液或懸浮液、以乳劑，或以在使用前適合於液體中溶解或懸浮的固體形式提供。例如，賦形劑可以給出形式或稠度，或起稀釋劑的作用。合適的賦形劑包括但不限於穩定劑、潤濕和乳化劑、用於改變滲量的鹽、包膠劑、pH緩衝物質、和緩沖劑。此類賦形劑包括適合於直接遞送到眼的任何藥劑，其可以在無過度毒性的情況下投予。藥學可接受賦形劑包括但不限於山梨糖醇、各種TWEEN化合物之任一種、和液體如水、鹽水、甘油和乙醇。其中可以包含藥學可接受鹽，例如無機酸鹽，如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、磷酸鹽、硫酸鹽等；以及有機酸鹽，如乙酸鹽、丙酸鹽、丙二酸鹽，苯甲酸鹽等。關於藥學可接受賦形劑的詳細討論可以在REMINGTON'S

PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)中獲得。在一些實施方案中，包含本文所述的rAAV顆粒和藥學可接受載體的醫藥組合物適合於投予於人。此類載體是本領域公知的(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences，第15版，第1035-1038頁和第1570-1580頁)。

**【0202】** 此類藥學可接受載體可以是無菌液體，如水和油，包括石油、動物、植物或合成起源的那些，如花生油、大豆油、礦物油等。鹽水溶液和水性右旋糖、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液也可用作液體載體，特別是可注射溶液。醫藥組合物還可以包含另外的成分，例如防腐劑、緩衝劑、張力劑、抗氧化劑和穩定劑、非離子潤濕劑或澄清劑、增粘劑等。本文所述的醫藥組合物可以以單一單位劑量或多劑量形式包裝。組合物通常配製成無菌和基本上等張的溶液。

**【0203】** *套組和製品*

**【0204】** 本發明還提供包含本公開的任何rAAV顆粒和/或醫藥組合物的套組或製品。套組或製品可以包含本發明的任何rAAV顆粒或rAAV顆粒組合物。在一些實施方案中，使用套組來改善rAAV顆粒的穩定性和/或改善轉導效率；例如，用於取代VP1和/或VP3的第2位處的胺基酸殘基以改善rAAV殼體蛋白質的乙醯化。在一些實施方案中，使用套組來調節rAAV顆粒的穩定性和/或轉導效率(例如，增加穩定性和/或轉導效率或降低穩定性和/或轉導效率)；例如，用於取代調節脫醯胺化(例如，增加脫醯胺化基或減少脫醯胺化)的胺基酸殘基。

**【0205】** 在一些實施方案中，套組或製品還包括用於投予rAAV顆粒組合物的說明書。本文所述的套組或製品可以進一步包括從商業和用戶的觀點看期望的其它材料，包括其它緩衝液、稀釋劑、濾器、針、注射器和包裝插頁，其具有用於進行本文所述的任何方法的說明書。也可以包括合適的包裝材料，並

且可以是本領域已知的任何包裝材料，包括例如小瓶(如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、柔軟包裝(例如，密封的Mylar或塑膠袋)，等等。可以進一步滅菌和/或密封這些製品。

**【0206】** 在一些實施方案中，套組或製品還含有本文所述的一種或多種緩衝液和/或藥學可接受賦形劑(例如，如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991中所述)。在一些實施方案中，套組或製品包含本文所述的一種或多種藥學可接受賦形劑、載體、溶液和/或另外的成分。本文所述的套組或製品可以單一單位劑量或多劑量形式包裝。套組或製品的內容物通常配製成無菌的，並且可以凍乾或以基本上等張的溶液提供。

#### 實施例

**【0207】** 藉由參考以下實施例將更全面地理解本發明。然而，它們不應解釋為限制本發明的範圍。應當理解，本文描述的實施例和實施方案僅用於說明目的，並且根據其的各種修改或改變對於本領域技術人員將是提示性的，並且應當包含在本申請的精神和範圍和所附權利要求書的範圍內。

**【0208】** 實施例1：用於完全表徵重組AAV病毒殼體蛋白的直接LC/MS和LC/MS/MS

**【0209】** 重組腺相關病毒(rAAV)由於其非病原性性質、感染分裂細胞和非分裂細胞兩者的能力和長期基因表達而成為受歡迎的基因療法載體。目前，基於AAV的基因療法用於許多疾病靶標，例如肌營養不良、血友病、帕金森病、萊伯(Leber)氏先天性黑矇和黃斑變性的臨床試驗。

**【0210】** AAV是一種具有二十面體殼中殼體化的單鏈DNA基因組的小的且非包膜的細小病毒。每個殼體包含以約1:1:10比率的三種病毒殼體蛋白質

VP1(87kDa)、VP2 (73kDa)和VP3(62kDa)的60個拷貝。三種病毒殼體蛋白藉由使用可變剪接和非典型起始密碼子從相同可讀框中表達，因此具有重疊序列。與VP3相比，VP1具有約137個額外的N端胺基酸殘基，而與VP3相比，VP2具有約65個額外的N端胺基酸殘基。已經從人和非人靈長類組織中分離出至少13種AAV血清型和約150種基因序列；AAV血清型在病毒殼體蛋白的胺基酸序列及其用於靶向的相應細胞受體和共受體上不同。

**【0211】** 除保護基因組內部之外，AAV殼體在介導受體結合、病毒從內體的逃逸以及在病毒感染週期中病毒DNA轉運到核中起重要作用，從而直接影響病毒感染性。已經顯示VP1 N端含有磷脂酶PLA2域(a.a. 52-97)，其在病毒的內體逃逸中是至關重要的[1-3]。VP1和VP2的N端還含有三個鹼性胺基酸簇作為核定位信號。這些序列在不同的AAV血清型中是高度保守的。已經顯示這些胺基酸的突變完全減少或消除感染性[4]。此外，每種AAV血清型具有相應的序列特異性受體和共受體。例如，將硫酸肝素蛋白聚糖鑒定為AAV2的主要受體，並且已經鑒定出幾種其它共受體，包括 $\alpha$ V $\beta$ 5整聯蛋白、成纖維細胞生長因數受體1、和肝細胞生長受體[5-8]。AAV2殼體蛋白的突變分析鑒定出一組鹼性胺基酸(精胺酸484、487、585和賴胺酸532)作為肝素結合基序，其有助於肝素和HeLa細胞結合[9]。將AAV2中的NGR結構域鑒定為整聯蛋白 $\alpha$ 5 $\beta$ 1結合域，其對於病毒細胞進入是必需的[10]。總之，病毒殼體蛋白序列在病毒感染週期中的細胞靶向和運輸中是重要的。由於不同生成條件可以引起病毒殼體蛋白的不同表達水準、翻譯後修飾和截短，需要對病毒殼體蛋白進行表徵和監測，以確保基因療法開發項目中的產品一致性。

【0212】 傳統上，已經使用SDS-PAGE來表徵AAV病毒殼體蛋白，提供粗略的分子量資訊，如87kDa、73kDa和62kDa。沒有從Edman測序中獲得序列資訊，可能是由於除了VP2外病毒殼體蛋白的封閉N端。雖然已經解析了多種AAV的X射綫結構，但在晶體結構中僅觀察到VP3區序列。在X射綫結構中仍然缺少VP3的15個N端胺基酸殘基，可能是由於其內在無序[11-13]。可能的是，原子結構中缺乏VP1和VP2 N端區域的資訊可能是由於殼體中VP1和VP2的低化學計量學。此外，VP1和VP2的N端是在殼體內部包埋的，並且在天然狀態中不能接近抗體，如一些文獻中報告[3, 14, 15]。通常，在表徵VP中使用Gel-LC/MS方法(SDS-PAGE，凝膠中胰蛋白酶消化和LC/MS/MS) [16-18]。然而，尚未使用此方法確認VP1、VP2和VP3的N端，這是因為此方法由於從凝膠的有限的肽回收而未能獲得VP的100%序列覆蓋。

【0213】 對幾種病毒殼體蛋白報告了使用MALDI-TOF MS的直接分析，包括用有機酸解離後的煙草花葉病毒U2 [19]。已經使用醯胺氫交換和質譜法之的直接肽定位來研究雀麥花葉病毒(BMV)的殼體中pH誘導的結構變化[20]。由於AAV是僅含有殼體蛋白和基因組的非包膜病毒，可以藉由蛋白質的RP-LC/MS和肽定位的LC/MS/MS直接分析AAV殼體，以在沒有SDS-PAGE分離的情況下解離殼體後達到100%的序列覆蓋。DNA片段可以在外水體積中洗脫，因此對藉由LC/MS的蛋白質/肽檢測沒有干擾。為了研究這些方法，使用變性後不同類型AAV的直接LC/MS監測AAV殼體蛋白的蛋白質序列和翻譯後修飾。如本文所述，已經藉由質譜法確認AAV的VP1、VP2和VP3的N端。也在AAV的不同血清型中鑒定出VP1和VP3的N端的乙醯化。還開發出AAV的直接LC/MS/MS肽定位以提供VP1、VP2和VP3的序列覆蓋，並確認VP1和VP3的N端乙醯化。

**【0214】** 方法**【0215】** 材料和試劑

**【0216】** 二硫蘇糖醇(DTT)、4-乙基吡啶、超純甲酸、乙酸、鹽酸胍、Tris-HCl和Tris鹼購自Sigma Chemicals (St. Louis, MO)。Amicon ultra-4濾器購自Millipore (Billerica, MA)。豬測序級胰蛋白酶購自Promega (Milwaukee, WI)。內切蛋白酶Lys-C和Asp-N購自Roche (Germany)。具有10,000MWCO的Slide-A-Lyzer盒購自Pierce (Rockford, IL)。

**【0217】** 載體生成和純化

**【0218】** 如前所述(Xiao, 1998 #123)，使用瞬時三重轉染方法產生 AAV 載體。簡言之，使用聚乙烯亞胺、PEI 和 1:1:1 比率的三種質粒(ITR 載體、AAV rep/cap 和 Ad 輔助質粒)轉染 HEK293 細胞。載體質粒含有來自 AAV2 的載體基因組 CBA-EGFP 和 ITR 序列。EGFP 表達由如(Miyazaki, 1989 #124) (Niwa, 1991 #125) 所述的 CMV 增強子雞  $\beta$  肌動蛋白雜合啟動子(CBA)驅動。AAV rep/cap 輔助含有來自 AAV2 的 rep 序列和血清型特異性殼體序列，具有名稱 rep2/cap2、rep2/cap5、rep2/cap7 等。所用的 pAd 輔助是 pHelper (Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。如 Qu *et al.* (2007, *J. Virol. Methods* 140:183-192 )描述的那樣進行 AAV 的純化。

**【0219】** LC/MS完整蛋白質分析

**【0220】** 用Amicon ultra-4 filter (10kDa MWCO)濃縮AAV病毒體，並用10%乙酸變性，然後在Acquity UPLC –Xevo® QTOF MS儀(Waters, Milford, MA)中直接分析。使用UPLC BEH C4或C8柱(1.7 $\mu$ m, 2.1mm i.d.)以0.25ml/min流速進行分離。移動相A是水中的0.1%甲酸，而移動相B是乙腈中的0.1%甲酸。最終梯度如下：10% B至20% B持續6分鐘，在10分鐘中20% B至30% B，然後30%至38% B

持續40分鐘。對於MS，毛細管電壓和採樣錐電壓分別設定為3.5 kV和45 V。在m/z範圍為500-4000的靈敏度模式下獲取質譜。對於質量校準，進行用碘化鈉作為校準物的輔助校準。Masslynx軟體中的MaxEnt1用於蛋白質去卷積。

**【0221】 AAV2 VP的酶促消化**

**【0222】** 用6M鹽酸胍，0.1M Tris (pH 8.5)變性濃縮的AAV2病毒顆粒。在55°C用30mM DTT在黑暗中將蛋白質還原1小時，並用0.07% 4-乙炔基吡啶在室溫烷基化2小時。藉由添加1M DTT來淬滅反應。用Slide-A-Lyzer盒(10,000MCOCO)針對25mM Tris緩衝液(pH8.5)將樣品透析約18小時。透析後，將樣品分成三個等分試樣。於37°C分別用1:25的胰蛋白酶或1:50的Lys-C或1:100酶:蛋白質比率(wt/wt)的Asp-N將每個等分試樣消化18小時。

**【0223】 LC/MS/MS肽定位**

**【0224】** 與Orbitrap Velos質譜儀(Thermo-Fisher Scientific，Waltham，MA)結合使用NanoAcquity HPLC系統(Waters，Milford，MA)，使用家庭包裝的nanoLC柱(75µm×10mm)及具有包裝材料(5µm，Bruker，Billerica，MA)的Magic C18以300nl/min流速進行Nano LC/MS/MS。移動相A和B分別是水中和乙腈中的0.1%甲酸。梯度在121分鐘內是2% B至60% B。

**【0225】** velos的源參數如下：源電壓：2.5 kv，毛細管溫度275°C；S透鏡RF水準：55%。使用前十數據依賴性方法以精確性ms在離子阱中以60,000解析度和10 MS/MS獲得數據。使用Mascot針對AAV2病毒殼體蛋白序列進行數據庫搜索。對於數據庫搜索，使用10 ppm的MS容差和0.8 Da的ms/ms容差。

**【0226】 UPLC/MS/MS肽定位**

【0227】也藉由Acquity UPLC-Xevo qTOF MS中的UPLC/MS/MS分析蛋白質消化物。使用BEH300 C18柱(2.1x150mm)在移動相中用水/乙腈梯度中的0.1%甲酸以流速0.25ml/min分離。在質量範圍200-2000中以陽性MSe模式獲得質譜。

【0228】結果

【0229】AAV變性方法

【0230】可以藉由使用去汙劑、熱、高鹽或具有低或高pH的緩衝液的多種方法使AAV變性。熱變性可導致蛋白質沉澱，並且因此容易堵塞並且過度加壓反相柱。用高鹽變性需要在LC/MS分析前額外的脫鹽步驟。用10%乙酸變性用於LC/MS完整蛋白質分析，因為它允許乾淨的質譜。對於肽定位，可以使用0.1% RapiGest或6M鹽酸胍作為變性試劑。

【0231】完整的蛋白質分析方法開發

【0232】使用UPLC BEH C4柱以快速梯度進行AAV2的初始完整蛋白質分析。在此條件下，僅觀察到總離子層析圖中的一個單峰，具有對應於VP3的質量(圖1A)。不希望受限於理論，認為VP1和VP2的缺乏可能是由於VP3和VP2的低化學計量學或VP3對VP1和VP2信號的抑制(若所有VP共洗脫的話)。為了檢測VP1和VP2，已經嘗試使用較淺的梯度和使用備選柱來增加注射或柱長度。在0.5% B/min具有較淺梯度的較高負載(1.7 $\mu$ g)導致左側肩峰(圖1B)。柱長度從10cm到15cm的增加未增加肩峰的分離(圖1C)。然而，使用BEH C8柱將肩峰進一步與主峰分離，觀察到改善的信號強度(圖1D)。

【0233】結果，在圖2A中顯示的信號強度在此肩峰中獲得VP1和VP2質量。VP1和VP3的質量分別對應於a.a. 2-735 (乙醯化)和a.a. 204-735 (乙醯化)(圖2A和2B)。在VP2 (a.a.139-735)中未觀察到乙醯化。此外，觀察到質量小於VP3的次

要峰，質量對應於具有一個乙醯化的胺基酸序列212-735 (圖2B)。這些數據與DNA序列一致，因為VP3在AAV2中含有兩個ATG起始密碼子：

ATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGAC(SEQ ID NO: 1)，得到兩種可能的N端(下劃綫)：MATGSGAPMAD (SEQ ID NO: 2)。如藉由完整蛋白質分析測量，VP1和VP3兩者中不存在N端甲硫胺酸殘基。VP1和VP3的乙醯化不是方法誘導的偽像(藉由10%乙酸使AAV變性)，因為在使用不含乙酸的備選變性方法的AAV製劑中也觀察到VP1和VP3的乙醯化。完整的蛋白質數據還證實，即使存在幾個N連接的共有序列，病毒殼體蛋白中也不存在糖基化[16]。

#### 【0234】 LC/MS/MS肽定位

【0235】 爲了進一步證實在完整蛋白質分析中觀察到的N端和乙醯化，使用多種酶進行肽定位，並使用多種儀器進行分析。已經評估了各種樣品製備方法，包括變性方法和脫鹽步驟。最終消化方法，包括用6M鹽酸胍變性、還原和用4-乙烯基吡啶的烷基化，然後使用載玻片 A-lyzer 透析，然後進行酶消化，在消化過程期間創建具有低人工修飾的清晰的肽定位。測試低至5µg起始材料，使用 nano LC/MS/MS 和 UPLC/MS/MS 產生完整序列覆蓋。

【0236】 如圖3中顯示，僅來自 nano LC/MS/MS 的胰蛋白酶消化物的 Mascot 搜索得到78%序列覆蓋及離子得分13截留。在具有 BEH C18 柱的 Xevo TOF MS 中的 LC/MS 中找到來自 nano LC/MS/MS 的兩種大的缺少的胰蛋白酶肽 T27 和 T38 (框示) (圖3)。此外，藉由 Asp-N 消化物的 nano LC/MS/MS 進一步證實大部分 T27 和 T38 肽序列，如圖3中以斜體顯示。Lys-C 消化物覆蓋完整的 N 端和 C 端肽，如圖3中下劃綫顯示。因此，藉由多次酶消化和兩種 LC/MS/MS 方法實現了 VP1 的 100% 序列覆蓋。

【0237】 LC/MS/MS證實在完整蛋白質分析中觀察到的VP1、VP2和VP3的N和C端以及VP1和VP3的N端乙醯化。圖4A-4C顯示了VP1 N端胰蛋白酶A(Ac)ADGYLPDWLEDTLSEGIR (SEQ ID NO:4) (圖4A)、VP2 N端Asp-N衍生肽(APGKKRPVEHSPVEP) (圖4B)、和VP3 N端Asp-N肽A(Ac)TGSGAPM (SEQ ID NO:5) (圖4C)的MS/MS譜。MS/MS已證實VP1和VP3肽兩者中的N端丙胺酸殘基處的乙醯化位置。未修飾的y18和y17離子的存在，以及圖4A中所有檢測到的具有42Da質量漂移的b離子表示42 da修飾位於VP1的N端。類似地，圖4C中未修飾的y3至y8離子的存在證實了N端丙胺酸殘基處的乙醯化位置。

【0238】 AAV VP N端的比較

【0239】 除AAV2以外，還已經藉由完整的蛋白質分析了AAV1、AAV5、AAV7、AAV9和AAV Rh10。表2中顯示了AAV中VP的理論和預測質量。

【0240】 表2：AAV VP的理論質量對實驗質量

血清型	同種型	預測的胺基酸序列	實際胺基酸序列	理論質量 (Da)	實驗質量(Da)
AAV1	VP1	1-736	2 (ac)-736	81286	81291
	VP2	138-736	139-736	66093	66098
	VP3	203-736	204(ac)-736	59517	59520
AAV2	VP1	1-735	2 (ac)-735	81856	81856
	VP2	138-735	139-735	66488	66488
	VP3	203-735	204(ac)-735	59974	59974
AAV5	VP1	1-724	2 (ac)-724	80336	80336
	VP2	137-724	138-724	65283	65284
	VP3	193-724	194(ac)-724	59463	59463
AAV7	VP1	1-737	2 (ac)-737	81564	81567
	VP2	138-737	139-737	66372	66374
	VP3	204-737	213(ac)-737	59101	59103

AAV9	VP1	1-736	2 (ac)-736	81291	81288
	VP2	138-736	139-736	66210	66209
	VP3	203-736	204(ac)-736	59733	59733
AAVRh10	VP1	1-738	2 (ac)-738	81455	81455
	VP2	138-738	139-738	66253	66252
	VP3	204-738	205 (ac)-738	59634	59634

【0241】 N端及其翻譯後修飾在分析的AAV血清型中是高度保守的，即使報告了AAV5是最多樣的AAV血清型序列，如圖5中的序列比對中所示。在13種AAV血清型中的11種中，VP1的N端共用相同的13個胺基酸殘基序列(MAADGYLPDWLED) (SEQ ID NO:6)，而所有13種AAV血清型在VP2中具有相同的TAP ... N端序列(圖5)。AAV2的LC/MS表示T在蛋白質水準上在VP2中是缺少的。VP3的N端是三種病毒殼體蛋白中最多樣的，13種AAV血清型中8種共用MA ... N端序列。與AAV2類似，AAV1和AAV Rh10也具有兩個ATG起始密碼子，基於LC/MS完整蛋白質分析，第一個為主要的N端。令人感興趣的是，雖然AAV7具有兩個潛在的起始密碼子

(GTGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAAC...) (SEQ ID NO: 7)，但是基於完整的蛋白質分析，第二個起始密碼子(ATG)是有利的：具有213(ac)-737的VP3'是主要峰，而具有203(ac)-737的VP3為次要峰。

#### 【0242】 結論

【0243】 在基因療法研究和開發中應用AAV VP的LC/MS完整蛋白質分析和LC/MS/MS肽定位

**【0244】** 這些結果表明，證明變性後不同類型的AAV的直接LC/MS是一種簡單且有效的方法，用於藉由在完整蛋白質水準的精確質量測量監測蛋白質序列和翻譯後修飾。藉由質譜法確認AAV的VP1、VP2和VP3的N端。在AAV的不同血清型中也鑒定出VP1和VP3的N端的乙醯化。開發了AAV的直接LC/MS/MS肽定位，提供了VP1、VP2和VP3的100%序列覆蓋，並且證實了VP的N端乙醯化。表3中顯示了基於幾種AAV血清型的序列比對和完整蛋白質分析的13種AAV血清型的預測序列的理論質量。

**【0245】** 表3：預測序列和質量

	預測的 VP1 序列	質量(Da)	預測的 VP2 序列	質量(Da)	預測的 VP3 序列	質量(Da)
AAV1	2 (ac)-736	81286	139-736	66093	204(ac)-736	59517
AAV2	2 (ac)-735	81856	139-735	66488	204(ac)-735	59974
AAV3	2 (ac)-736	81571	139-736	66319	204(ac)-736	59849
AAV4	2 (ac)-734	80550	138-734	65626	198(ac)-734	59529
AAV5	2 (ac)-724	80336	138-724	65283	194(ac)-724	59463
AAV6	2 (ac)-736	81322	139-736	66096	204(ac)-736	59519
AAV7	2 (ac)-737	81564	139-737	66372	213(ac)-737	59101
AAV8	2 (ac)-738	81667	139-738	66519	205 (ac)-738	59805
AAV9	2 (ac)-736	81291	139-736	66210	204(ac)-736	59733
AAV10	2 (ac)-738	81477	139-738	66271	205 (ac)-738	59638
AAV11	2 (ac)-733	80987	139-733	65794	198(ac)-733	59696
AAV12	2 (ac)-742	82106	139-742	66905	207(ac)-742	59846
AAVRh10	2 (ac)-738	81455	139-738	66253	205 (ac)-738	59634

**【0246】** 每種血清型的VP1、VP2和VP3的精確質量是獨特的，因此完整的蛋白質分析可以用作區分AAV殼體血清型的身份測試。表4-6顯示了13種常見的

AAV血清型中VP的質量差異。正常字體顯示了大於10的delta質量，小於10的delta質量為粗體。

【0247】 表4：13種AAV同種型中VP1的質量差異

	AAV1											
AAV2	570	AAV2										
AAV3	285	285	AAV3									
AAV4	736	1306	1021	AAV4								
AAV5	950	1520	1235	215	AAV5							
AAV6	36	534	249	772	987	AAV6						
AAV7	277	292	8	1013	1228	241	AAV7					
AAV8	381	189	96	1117	1332	345	104	AAV8				
AAV9	5	585	280	741	955	31	272	376	AAV9			
AAV10	191	379	94	927	1142	155	86	190	186	AAV1		
										0		
AAV11	299	869	584	436	651	335	577	681	304	490	AAV1	
											1	
AAV12	820	250	535	1555	1770	784	542	439	815	629	1119	AAV1
												2
AAVRh10	169	401	116	905	1119	133	109	212	164	22	468	651

【0248】 表5：13種AAV同種型中VP2的質量差異

	AAV1											
AAV2	395	AAV2										
AAV3	226	169	AAV3									
AAV4	467	862	693	AAV4								
AAV5	810	1205	1036	343	AAV5							
AAV6	2	392	224	470	812	AAV6						
AAV7	278	116	52	746	1088	276	AAV7					

AAV8	425	31	199	893	1235	423	147	AAV8				
AAV9	117	278	109	584	927	115	161	308	AAV9			
AAV10	177	217	49	645	987	175	101	248	60	AAV1 0		
AAV11	299	694	525	168	511	301	578	725	416	476	AAV1 1	
AAV12	812	417	586	1279	1622	810	533	386	695	635	1111	AAV1 2
AAVRh10160	235	66	627	970	157	119	266	43	18	459	652	

【0249】表6：13種AAV同種型中VP3的質量差異

	AAV1											
AAV2	457	AAV2										
AAV3	332	125	AAV3									
AAV4	12	445	320	AAV4								
AAV5	54	511	386	66	AAV5							
AAV6	2	455	330	10	56	AAV6						
AAV7	416	673	748	428	362	418	AAV7					
AAV8	288	169	44	276	342	286	704	AAV8				
AAV9	216	241	116	204	270	214	632	72	AAV9			
AAV10	121	336	211	109	175	119	537	167	95	AAV1 0		
AAV11	179	278	153	167	233	177	595	109	37	58	AAV1 1	
AAV12	329	128	3	317	383	327	745	41	113	208	150	AAV1 2
AAVRh10117	340	215	105	171	115	533	171	99	4	62	212	

【0250】 沒有觀察到兩個同種型之間的所有三種VP的10 Da內的質量。即使VP2和VP3兩者在AAV1和AAV6之間僅具有2 Da差異，AAV1和AAV6之間的VP1質量差異是36，顯著得足以藉由精確的質量測量來區分。因此，VP1、VP2和VP3的完整蛋白質測量作為身份測試是高度特異的。

【0251】 這些結果表明，完整的蛋白質分析和LC/MS/MS可用於對VP分析概貌以監測VP表達、翻譯後修飾和截短，並且確保VLP生產期間的產品一致性。這兩種分析也可用於確認定點誘變或結構表徵，用於殼體蛋白質工程化應用。

【0252】 實施例2：AAV殼體蛋白的N端乙醯化的作用

【0253】 細胞蛋白質的化學修飾是控制其功能的常用手段(Arnesen, T. (2006)*Virology* 353(2): 283–293)。涉及將乙醯基基團從乙醯輔酶A轉移到蛋白質的第一個胺基酸殘基的 $\alpha$ -胺基基團的N端乙醯化(Nt-乙醯化) Brown, J.L.和 Roberts, W.K. (1976) *J Biol Chem* 251: 1009–1014; Arnesen, T.等 (2009)*Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8157–8162)是蛋白質修飾的最豐富者之一。與大多數其它蛋白質修飾不同，Nt-乙醯化是不可逆的；它主要發生在蛋白質的合成過程中，由與核糖體結合的N端乙醯轉移酶(NAT)催化(Gautschi, M.等 (2003) *Mol Cell Biol* 23: 7403–7414; Pestana, A.和 Pitot, H.C. (1975) *Biochemistry* 14: 1404–1412; Polevoda, B.等 (2003) *J Biol Chem* 278: 30686–97)。在真核生物中有幾種獨特的NAT：NatA-NatF，每種由一個或多個亞基組成，並且每種根據前幾個胺基酸的胺基酸序列而使特定亞組的N端乙醯化(Jornvall, H. (1975) *J Theor Biol* 55: 1–12; Persson, B.等 (1985) *Eur J Biochem* 152: 523–527)。

【0254】 實驗數據表示，具有乙醯化N端的蛋白質在體內比非乙醯化蛋白質更穩定，即Nt-乙醯化保護蛋白質免於降解(Hershko, A.等 (1984) *Proc Natl Acad*

*Sci U S A* 81: 7021–7025)。對此的一種解釋可能是2004年的發現，即另一種N端修飾泛素化(其涉及將小蛋白泛素直接附著到N端胺基酸殘基)促進隨後的蛋白質降解(Ben Saadon, R.等 (2004) *J Biol Chem* 279: 41414–41421)。相反，Nt-乙醯化信號也可以是降解未折疊或錯誤折疊的蛋白質並調節體內蛋白質化學計量學的質量控制機制的部分(Hwang, C.S.等 (2010) *Science* 327: 973–977)。

**【0255】** 胞質蛋白對註定分選到分泌途徑的蛋白質的預測N端加工的示意性分析揭示了，胞質蛋白有利於加工而深刻偏向，但是存在有相等且相反的針對分泌蛋白的此類修飾的偏倚(Forte, G.M.A.等 (2011) *PLoS Biology*, 2011年5月4日第9卷)。導致其乙醯化的分泌信號序列中的突變導致以依賴於N端加工機械的方式錯誤分選到胞質溶膠。因此，N端乙醯化代表新生多肽的細胞分選中的早期確定步驟，所述新生多肽代表額外的嚴格性層，以確保註定留在胞質溶膠中的蛋白質實際上駐留在胞質溶膠中。真核細胞包括進行特定功能所需要的幾個獨特的區室，稱為細胞器。這些區室中的蛋白質在細胞質中合成，因此需要複雜的分選機制以確保其遞送至合適的細胞器。蛋白質在其合成的非常早期階段藉由其胺基端的乙醯化進行修飾。對胞質蛋白的此類修飾和對那些註定用於主要細胞器之一(內質網(ER))的蛋白質的修飾的可能性之間有深刻的差異：而胞質蛋白通常是乙醯化的，那些對於ER結合的蛋白質在很大程度上是未修飾的。此外，當將特定ER蛋白工程化改造為誘導其乙醯化時，它們對ER的靶向受到抑制(Forte, G.M.A.等 (2011) *PLoS Biology*, 2011年5月4日第9卷)。

**【0256】** 已經顯示了收縮蛋白肌動蛋白和原肌球蛋白需要NatB介導的Nt-乙醯化來實現適當功能，特別涉及肌動蛋白-原肌球蛋白結合和肌動球蛋白調節(Coulton, A.T.等 (2010) *J Cell Sci* 123: 3235–3243; Polevoda, B.等 (2003) *J Biol*

*Chem* 278: 30686–97)。因此，AAV殼體蛋白的Nt乙醯化可以在rAAV載體的轉導潛力中具有意義。如果AAV載體不能進入核，則它們因此不能轉導細胞。肌動蛋白絲和FKBP52 (FK506結合蛋白p52)在AAV殼體從內體移位到核中的作用是明確的(Zhao,W.等 (2006) *Virology* 353(2): 283–293)。重要的是，Nt-乙醯化對於藉由調節蛋白質-蛋白質相互作用的肌動蛋白絲的功能發揮是至關重要的(Coulton, A.T.等 (2010) *J Cell Sci* 123: 3235–3243; Plevoda, B.等 (2003) *J Biol Chem* 278: 30686–97)。

【0257】 雖然蛋白質的N端乙醯化是一個廣泛已知的現象，但尚未完全瞭解N-乙醯化對AAV殼體蛋白的生物學意義。基於DNA測序的VP1和VP3的預測N端都是甲硫胺酸，然後是丙胺酸。已經報告了藉由Met-胺肽酶除去N端甲硫胺酸常常導致所得的N端丙胺酸、纈胺酸、絲胺酸、蘇胺酸和半胱胺酸殘基的Nt-乙醯化，並且N端的乙醯化作用為潛在的降解信號[21]。提出了病毒殼體蛋白的泛素化為病毒體解裝配時殼體加工的潛在信號[22]。進一步研究了VP1和VP3的N-乙醯化與核進入前病毒殼體降解和脫包覆之間的聯繫。

【0258】 爲了就AAV殼體蛋白而言瞭解N端乙醯化的功能含意，使用VP3 N端起始密碼子的定點誘變產生AAV突變體。

【0259】 方法

【0260】 產生在起始甲硫胺酸(iMet X)的第2位處具有不同胺基酸的AAV殼體蛋白，以確定是否抑制或降低Nt-乙醯化，然後測量功能後果。評估殼體蛋白質在細胞內運輸和/或獲得翻譯後修飾如糖基化的能力，隨後確定該能力是否影響裝配的AAV顆粒的感染性。此外，測定乙醯化對泛素化/降解和靶向到溶酶體、ER、高爾基體或內核膜的影響。

【0261】 例如，爲了測定運輸或靶向，將具有突變的第2位(例如，iMet X)的殼體蛋白的AAV顆粒螢光標記並用於感染細胞(例如HeLa細胞)。與用於感染相同細胞株的螢光標記的野生型AAV顆粒相比，對這些AAV顆粒測定下列一種或多種：病毒顆粒攝取的時間、AAV顆粒與特定區室標誌物(例如，高爾基體、ER或溶酶體蛋白質或其它標誌物)的共定位、核積累(例如，如藉由與核標誌物或染料的共定位測定)、和/或運輸對早期內體逃逸的特異性抑制劑(例如巴弗洛黴素A (bafilomycin A)或氯化銨)的敏感性(關於此類測定法的描述，參見例如 Bartlett, J.S.等 (2000) *J. Virol.* 74:2777-2785)。

【0262】 爲了測定感染性，使用含有具有突變的第2位(例如，iMet X)的殼體蛋白的AAV顆粒感染細胞(例如HeLa細胞)，並且將它們的轉導效率與野生型AAV顆粒(例如，具有相同的AAV血清型並感染相同類型的細胞)比較。

【0263】 爲了測定糖基化，使用含有具有突變的第2位(例如，iMet X)的殼體蛋白的AAV顆粒感染細胞(例如HeLa細胞)。與用於感染相同細胞株的野生型AAV顆粒相比，對來自感染細胞的AAV顆粒進行一種或多種測定法，包括但不限於糖基化的化學檢測(例如，在變性且電泳分離的殼體蛋白上應用商品化的洋地黃毒苷(DIG)聚糖檢測和/或螢光糖蛋白檢測套組)和質譜法(例如，FT-ICR MS)(關於此類測定法的描述，參見例如Murray, S.等 (2006) *J. Virol.* 80:6171-6176)。

【0264】 爲了測定泛素化，使用含有具有突變的第2位的殼體蛋白的AAV顆粒感染細胞(例如HeLa細胞)。用抗殼體抗體將AAV顆粒從感染的細胞免疫沉澱，然後用抗泛素抗體進行Western印跡法，並與用於以相同方式感染細胞的野生型AAV顆粒進行比較。與野生型AAV顆粒相比，突變體AAV顆粒也可以用於體外泛素化測定法(參見例如Yan, Z.等 (2002) *J. Virol.* 76:2043-2053)。

【0265】 實施例3：AAV2殼體蛋白的脫醯胺化的作用

【0266】 AAV2殼體蛋白的序列分析揭示了潛在的脫醯胺化位點，如以下胺基酸序列中下劃綫所示：

【0267】 MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDD  
SRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYN  
*H**A**D**A**E**F**Q**E**R**L**K**E**D**T**S**F**G**G**N**L**G**R**A**V**F**Q**A**K**K**R**V**L**E**P**L**G**L**V**E**E**P**V**K**T**A**P**G**K**K**R**P**V*  
EHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGL  
GTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTW  
ALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR  
LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLP  
YVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQM  
LRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTT  
TQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGAT  
KYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKV  
MITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQD  
RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS  
AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTV  
DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO: 3)。

【0268】 特別地，在磷脂酶A2結構域(Ca<sup>++</sup>結合位點)中的N57/G58處發現潛在的脫醯胺化位點，如上述序列中的粗體和斜體所示。以下實驗旨在探索N57處的脫醯胺化是否可以導致AAV2的降低的效力和/或截短，以及不同的AAV生產方法是否可以對脫醯胺化有不同的影響。例如，生產細胞株方法(參見Martin等, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269; U.S. PG Pub. No.

US2004/0224411; 以及Liu, X.L.等 (1999) *Gene Ther.* 6:293-299)與三重轉染方法相比可以在N57處誘導更高水準的脫醯胺化。根據AAV2的晶體結構，未顯示N57；然而，N382和N511是部分暴露的，並且N715是完全暴露的。

**【0269】 方法**

**【0270】 AAV1和AAV2 VP的酶促消化**

**【0271】** 使用Amicon濾器(10kDa MWCO)濃縮10 $\mu$ g每種AAV1-EGFP或AAV2-EGFP材料(由三重轉染以及生產細胞株方法產生)，用6M鹽酸胍，50mM Tris，pH8.5變性。在60 $^{\circ}$ C在黑暗中用5mM DTT將蛋白質還原30分鐘，在室溫用15mM碘乙醯胺烷基化30分鐘，然後使用Bio-Spin<sup>®</sup> 6 Tris微柱將緩衝液更換成25mM Tris pH 7.1，用於消化。緩衝液更換後，將樣品分成兩個等分試樣。分別用1:25的胰蛋白酶或1:50酶:蛋白質比率(wt/wt)的Asp-N在37 $^{\circ}$ C將每個等分試樣消化2小時。

**【0272】 UPLC/MS/MS肽定位**

**【0273】** 也藉由在Acquity UPLC-Xevo qTOF MS中的UPLC/MS/MS分析蛋白質消化物。使用BEH300 C18柱(2.1x150mm)在移動相中用水/乙腈梯度中的0.1%甲酸以0.25ml/min分離。在質量範圍50-2000中以陽性MSe解析模式中獲得質譜。

**【0274】 測定AAV VP中的脫醯胺化水準**

**【0275】** 使用含有 NG 位點(AA1 和 AAV2 VP 中的 T9、T49 和 T67)的肽及其相應的脫醯胺化種類的提取離子層析圖(XIC)計算脫醯胺化水準。

**【0276】** 爲了比較藉由三重轉染(TTx)和生產細胞株(PCL)方法產生的AAV載體，使用TTx或PCL方法產生用EGFP加標籤的AAV1或AAV2。發現截短

的VP1(tVP1)存在於藉由PCL產生的AAV2-EGFP中，但不存在於藉由TTx產生的AAV2-EGFP中。無論生產方法如何，未發現AAV1-EGFP具有tVP1。還發現與藉由TTx產生的AAV2相比藉由PCL方法產生的AAV2的體外效力降低。還發現突變體N57K和N57Q AAV2顆粒具有降低的效力和破壞的Ca<sup>++</sup>結合。

【0277】 下表提供了經分析以檢查每個潛在的脫醯胺化位點以及相應的殘基的胰蛋白酶肽。

【0278】 表7：含有NG位點的胰蛋白酶肽

肽(NG 序列加下劃綫)	殘基
YLGPF <u>N</u> GLDK (SEQ ID NO: 9)	N57
EVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFM VPQYGYLTLN <u>N</u> GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR (SEQ ID NO: 10)	N382
YNL <u>N</u> GR (AAV1) (SEQ ID NO: 11)	N511
YHL <u>N</u> GR (AAV2) (SEQ ID NO: 12)	N511
SANVDFTVDN <u>N</u> GLYTEPR (AAV1) (SEQ ID NO: 13)	N715
SVNVDFTVD <u>T</u> NGVYSEPR (AAV2) (SEQ ID NO: 14)	N715

【0279】 如表7所示，使用T9肽YLGPFNGLDK (SEQ ID NO: 9)監測N57，使用T38肽

EVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP  
QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR (SEQ ID NO: 10)監測N382，使用T49肽YNLNGR (SEQ ID NO: 11)和YHLNGR (SEQ ID NO: 12) (分別)監測AAV1或AAV2中的N511，並使用T67肽SANVDFTVDNNGLYTEPR (SEQ ID NO: 13)和SVNVDFTVDTNGVYSEPR (SEQ ID NO: 14) (分別)監測N715 AAV1或AAV2。

【0280】 使用LC/MS/MS分析來比較藉由TTx和PCL方法產生的AAV1和AAV2顆粒中脫醯胺化的百分比。圖6A和6B中顯示了來自T9肽的結果。圖7A和7B中顯示來自T49肽的結果。圖8A和8B中顯示了來自T67肽的結果。在表8中匯總了這些結果。T38肽由於其大小而檢測不到。

【0281】 表8：LC/MS/MS結果的匯總

		%脫醯胺化		
		N57	N511	N715
AAV1	TTx	7.9	30.9	18.1
	PCL	11.3	27.4	18.7
AAV2	TTx	6.7	39.6	27.4
	PCL	18.4	42.3	28.0

【0282】 特別地，與藉由TTx產生的AAV2相比，藉由PCL產生的AAV2顯示脫醯胺化度的幾乎3倍增加。這些結果表明，由於藉由PCL產生的AAV2的體外效力降低，脫醯胺化降低AAV效力。

【0283】 結論

【0284】 總而言之，實施例1-3證明瞭使用LC/MS分析病毒顆粒的完整蛋白質(例如AAV殼體蛋白)的方法。精確測量分子量，並且這些技術也可以用於評估病毒殼體蛋白的N端和/或修飾。此外，這些方法可適用為基因療法中有用的殼體血清型身份測定法，例如分析平臺。這些結果進一步建立殼體蛋白質結構(例如截短、脫醯胺化等)和效力之間的相關性，提示關鍵位點處的點突變可以用於設計更有效的載體。

【0285】 實施例4：闡明AAV殼體蛋白的N端乙醯化的作用

【0286】 如上文討論，AAV殼體蛋白的N端在血清型中是高度保守的(圖5)。實施例1中描述的技术允許詢問VP表達和翻譯後修飾。接著，檢查AAV殼體蛋白的N端乙醯化的作用和生物學意義。

【0287】 結果

【0288】 爲了闡明AAV殼體蛋白的脫乙醯化的潛在作用，測試了AAV5脫乙醯化變體。將在CBA啓動子下表達eGFP的AAV5顆粒(AAV5-CBA-Egfp)與AAV5變體比較，所述AAV5變體具有對VP1和VP3突變的起始甲硫胺酸(iMET)相鄰的胺基酸(deAC-AAV5-CBA-eGFP)。選擇預測爲具有藉由NatA、NatC或NatD進行乙醯化的低可能性的三種胺基酸來產生變體：Gly、Leu和Pro，如下表9中顯示。

【0289】 表9：N端乙醯化頻率

N端 aa	轉移酶	NT-AC 頻率
通常存在於VP1和VP3中的MET-ALA	NatA	高
通常存在於VP1和VP3中的MET-SER，用於AAV5	NatA	高
AAV 變體		
MET-GLY	NatA	低
MET-LEU	NatC	低
MET-PRO	NatD/其它	低

【0290】 產生以下AAV5脫乙醯化(deAC)突變體：

S2GVPI –AAV5VP1中第2位Ser改變爲Gly

S2LVPI –AAV5VP1中第2位Ser改變爲Leu

S2PVP1 –AAV5VP1中第2位Ser改變為Pro

S2GVP3 –AAV5VP3中第2位Ser改變為Gly

S2LVP3 –AAV5VP3中第2位Ser改變為Leu

S2PVP3 –AAV5VP3中第2位Ser改變為Pro

S2PVP1/VP3 –AAV5 VP1和VP3兩者中第2位Ser改變為Pro

S2GVPI/VP3 –AAV5 VP1和VP3兩者中第2位Ser改變為Gly

S2LVPI/VP3 –AAV5 VP1和VP3兩者中第2位Ser改變為Leu

【0291】如上所述使用TTX方法產生這些變體。所有AAV5變體顯示出良好的生產率，產量大於 $10^{13}$ 個總VG。藉由SYPRO蛋白質凝膠分析，所有AAV5變體也顯示預期的VP1:VP2:VP3蛋白比率(圖9)。接著，使用LC/MS證實所有AAV5變體具有減少的乙醯化，如表10中所示。

【0292】表10： AAV5變體乙醯化的LC/MS分析

突變體	VP1	VP1	$\Delta$ mass	VP2	VP2	$\Delta$ mass	VP3	VP3	$\Delta$ mass	注釋
	Theo.	Exp.	(VP1)	Theo.	Exp.	(VP2)	Theo.	Exp.	(VP3)	
1 <i>deAC-AAV5</i> (S2GVPI)/CBA-eGFP	80234	nd		65283	65293	10	59463	59472	9	檢測不到 VP1
2 <i>deAC-AAV5</i> (S2LVPI)/CBA-eGFP	80346	80501	181	65283	65292	9	59463	59471	8	不正確的 VP1
3 <i>deAC-AAV5</i> (S2GVP3)/CBA-eGFP	80234	nd		65253	65261	8	59391	59398	7	確認
4 <i>deAC-AAV5</i> (S2LVP3)/CBA-eGFP	80336	80363	27	65309	65309	0	59447	59620	173	不正確 VP3
5 <i>deAC-AAV5</i> (S2PVP1VP3)/CBA-eGFP	80314	80324	10	65293	65300	7	59431	59438	7	確認
6 <i>deAC-AAV5</i>	80234	80243	9	65253	65261	8	59391	59398	7	確認

	(S2GVP1VP3)/CBA-eGFP										
	deAC-AAV5										
7	(S2PVP3)/CBA-eGFP	80336	80346	10	65293	65292	1	59431	59430	1	確認
	deAC-AAV5										
8	(S2PVP1)/CBA-eGFP	80314	80313	1	65283	65291	8	59463	59470	7	確認
	deAC-AAV5 (S2L										
9	VP1VP3)/CBA-eGFP	80346	nd		65309	65318	9	59447	59629	182	不正確 VP3

nd=未測定

【0293】 這些LC/MS分析證實AAV5變體是脫乙醯化的。變體S2LVPI、S2LVP3、和S2LVPI/VP3都顯示VP1和VP3蛋白中增加的質量(從173增加到182)，這表明在VP1或VP3中將第二個N端胺基酸改變為亮胺酸改變蛋白質，導致質量增加。

【0294】 接著，使用eGFP作為報告基因在體外轉導測定法中測定AAV5變體(圖10)。設計該測定法以評估 $10^6$ 感染複數(MOI)下的AAV5脫乙醯化突變體變體的轉導，將每種變體與親本未修飾的AAV5顆粒進行比較。使用三種細胞株：293、HuH7和HeLa細胞。感染後，測定細胞以確定載體基因組拷貝數(vg/ $\mu$ g細胞蛋白)和eGFP表達(藉由ELISA)。載體基因組拷貝數(vg/ $\mu$ g蛋白)表示AAV5變體進入細胞的效率，並且eGFP代錶殼體細胞內運輸的效率，因為轉基因表達需要殼體/載體DNA有效運輸到核(圖10)。藉由TaqMan分析量化載體基因組。

【0295】 圖11顯示，基於載體基因組分析，與親本未修飾的AAV5顆粒相比，AAV5脫乙醯化突變體載體以相似但降低的水準感染所有三種測試細胞株。圖12顯示，與用親本未修飾AAV5的轉導相比，AAV5脫乙醯化突變體載體在所有三種細胞株中都導致減少的eGFP表達。

【0296】 結論

【0297】 如預測，當藉由LC/MS檢測時，在N端Ser至Pro/Leu/Gly突變體變體中未觀察到乙醯化。AAV5 deAC變體顯示強力的載體產生，並且AAV5 deAC變體以與親本AAV5相當的水準感染細胞。然而，與親本AAV5相比時，用deAC變體感染的細胞中的功能性蛋白水準大大降低。這些數據表明，向性在最小程度上受到VP1/VP3中的N端脫乙醯化的缺乏影響，但下游加工(例如運輸和/或降解)受到顯著影響。由於測試的變體顯示降低的體外活性，本領域技術人員可以理解，特別是當期望降低的轉導水準時，可以採用藉由降低或消除的乙醯化表徵的變體。

【0298】 實施例5：AAV殼體蛋白的脫醯胺化的評估

【0299】 實施例1和3表明允許詢問AAV殼體蛋白的翻譯後修飾並探索AAV2殼體的脫醯胺化的作用的技術。以下實施例測試脫醯胺化是否降低效力和/或誘導殼體蛋白的截短，以及不同的製造過程是否可以誘導不同的脫醯胺化水準。

【0300】 方法

【0301】 產生AAV顆粒，並如實施例3所述測定脫醯胺化狀態。

【0302】 結果

【0303】 如實施例3所述，在AAV2殼體的VP1中的磷脂酶A2結構域(Ca<sup>++</sup>結合位點)的N57/G58處發現潛在的脫醯胺化位點。N57/G58基序在AAV血清型上是保守的(圖13)。實施例3顯示，與藉由TTx產生的AAV2相比，藉由PCL產生的AAV2表現出脫醯胺化的幾乎3倍增加(參見圖6A和6B和表8)。

【0304】 在藉由蛋白質凝膠檢測VP1、VP2和VP3產生時，僅藉由PCL方法產生的AAV2殼體蛋白中檢測到截短的VP1蛋白(tVP1) (圖14)。

【0305】接著，產生一系列AAV2脫醯胺化突變體。這些突變體靶向規範NG序列中的Gly殘基。也產生了靶向A35殘基(參見圖13)，即tVP1的N端胺基酸的突變，如表11中所示。攜帶多個突變的pAF277和pAF279突變體未包裝。

【0306】表11：脫醯胺化突變體

名稱	突變	平均 drp/細胞
pAF274	G58K	4.54E+03
pAF275	G58D	5.00E+03
pAF276	G58Q	5.41E+03
pAF277	G58,383,512,716K	1.2
pAF278	A35N	6.89E+03
pAF279	A35N, G58,383,512,765K	2.2
293	-	0.9
PIM45	對照	6.28E+03

K = 正電荷(鹼性)

D = 負電荷(酸性)

Q = 極性

【0307】接著，藉由LC/MS分析變體的脫胺基化，如實施例3所述。與親本AAV2相比，AAV2A35N和AAV2G58D變體具有改變的脫醯胺化(圖15)。特別地，與親本AAV2 (5.7%)相比，AAV2A35N突變體具有增加的脫醯胺化(17.8%)。與親本AAV2相比，AAV2G58D變體具有減少的脫醯胺化(1.1%)。SYPRO蛋白質凝膠分析表明AAV2脫醯胺化突變體表現出正確的VP1:VP2:VP2比率(圖16)。

【0308】接著，使用eGFP作為報告基因在體外轉導測定法中測定AAV2脫醯胺化變體(圖17)。該測定法設計用於評估 $10^6$ 感染複數(MOI)下的AAV2脫醯胺化突變體變體的轉導，將每種變體與親本未修飾的AAV2顆粒進行比較。使用三

種細胞株：293、HuH7和HeLa細胞。感染後，測定細胞以確定載體基因組拷貝數(vg / $\mu$ g細胞蛋白)和eGFP表達(藉由ELISA)。載體基因組拷貝數(vg / $\mu$ g蛋白)表示AAV2變體進入細胞的效率，並且eGFP代錶殼體細胞內運輸的效率，因為轉基因表達需要殼體/載體DNA有效運輸到核(圖17)。藉由TaqMan分析量化載體基因組。

【0309】 載體基因組分析表示AAV2脫醯胺化突變體變體以與親本AAV2載體相當的水準感染測試的所有細胞株(圖18)。重要的是，發現AAV2A35N變體比用於轉導所有三種細胞株的親代AAV2載體更有力(圖19)。發現AAV2G58D變體在HuH7細胞中比親本AAV2載體更有力(圖19)。

#### 【0310】 結論

【0311】 總之，AAV2脫醯胺化突變體載體以與親本AAV2顆粒相當的水準(例如相當的vg / $\mu$ g細胞蛋白)感染細胞。然而，基於轉導細胞中eGFP水準的分析，AAV2A35N變體在測試的所有細胞株中比親本AAV2具有更高的效力，並且AAV2G58D變體在HuH7細胞(肝衍生的細胞株)中比親本AAV2具有更高的效力。這些結果表明，A35N突變可以有效增加用於轉導許多細胞類型的載體效力，並且G58D突變也可有效增加某些細胞類型例如肝細胞中的效力。

#### 參考文獻

1. Girod, A.等, *The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity*. J Gen Virol, 2002. 83(Pt 5): p. 973-8.

2. Stahnke, S.等, *Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles*. *Virology*, 2011. 409(1): p. 77-83.
3. Bleker, S., F. Sonntag 和 J.A. Kleinschmidt, *Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity*. *J Virol*, 2005. 79(4): p. 2528-40.
4. Popa-Wagner, R.等, *Impact of VP1-specific protein sequence motifs on adeno-associated virus type 2 intracellular trafficking and nuclear entry*. *J Virol*, 2012. 86(17): p. 9163-74.
5. Kashiwakura, Y.等, *Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection*. *J Virol*, 2005. 79(1): p. 609-14.
6. Qing, K.等, *Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2*. *Nat Med*, 1999. 5 (1): p. 71-7.
7. Sanlioglu, S.等, *Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation*. *J Virol*, 2000. 74(19): p. 9184-96.
8. Summerford, C., J.S. Bartlett 和 R.J. Samulski, *AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection*. *Nat Med*, 1999. 5 (1): p. 78-82.
9. Kern, A.等, *Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids*. *J Virol*, 2003. 77(20): p. 11072-11081.
10. Asokan, A.等, *Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry*. *J Virol*, 2006. 80(18): p. 8961-9.

11. Xie, Q.等, *The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(16): p. 10405-10.
12. DiMattia, M.A.等, *Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9*. J Virol, 2012. 86(12): p. 6947-58.
13. Nam, H.J.等, *Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector*. J Virol, 2007. 81(22): p. 12260-71.
14. Kronenberg, S.等, *A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini*. J Virol, 2005. 79(9): p. 5296-303.
15. Sonntag, F.等, *Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus*. J Virol, 2006. 80(22): p. 11040-54.
16. Murray, S.等, *Characterization of the capsid protein glycosylation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry*. J Virol, 2006. 80(12): p. 6171-6.
17. Salganik, M.等, *Evidence for pH-dependent protease activity in the adeno-associated virus capsid*. J Virol, 2012. 86(21): p. 11877-85.
18. Van Vliet, K.等, *Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application*. J Virol Methods, 2009. 159(2): p. 167-77.
19. Thomas, J.J.等, *Viral characterization by direct analysis of capsid proteins*. Anal Chem, 1998. 70(18): p. 3863-7.

20. Wang, L., L.C. Lane 和 D.L. Smith, *Detecting structural changes in viral capsids by hydrogen exchange and mass spectrometry*. *Protein Sci*, 2001. 10(6): p. 1234-43.
21. Hwang, C.S., A. Shemorry 和 A. Varshavsky, *N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals*. *Science*, 2010. 327(5968): p. 973-7.
22. Yan, Z.等, *Ubiquitination of both Adeno-Associated Virus Type 2 and 5 Capsid Proteins Affects the Transduction Efficiency of Recombinant Vectors*. *J Virol*, 2002. 76(5): p. 2043-2053.

序列

除非另有說明，以 N 端至 C 端呈現所有多肽序列。

除非另有說明，以 5' 至 3' 呈現所有核酸序列。

潛在 AAV2 VP3 起始密碼子的核苷酸序列(ATG 密碼子加下劃綫)

ATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGAC (SEQ ID NO:1)

對應於潛在 AAV2 VP3 起始密碼子的多肽序列(甲硫胺酸加下劃綫)

MATGSGAPMAD (SEQ ID NO:2)

AAV2 VP1 多肽序列

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP  
 GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNH  
 ADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKK  
 RPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLGQPP  
 AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD

RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNR  
 FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANN  
 LTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG  
 SQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDR  
 LMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGP  
 CYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKD  
 DEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEEIRTTNPVATEQYGS  
 VSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTD  
 GHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTG  
 QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPR  
 PIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:3)

VP1 N 端胰蛋白酶肽(N 端丙胺酸是乙醯化的)

AADGYLPDWLEDTLSEGIR (SEQ ID NO:4)

VP3 N 端 Asp-N 肽(N 端丙胺酸是乙醯化的)

ATGSGAPM (SEQ ID NO:5)

常見的 VP1 N 端序列

MAADGYLPDWLED (SEQ ID NO:6)

潛在 AAV7 VP3 啓示密碼子的核苷酸序列(起始密碼子加下劃綫)

GTGGCTGCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAAC (SEQ ID  
 NO:7)

突變 ITR 的核苷酸序列

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA  
AGGTCGCCCACGCCC GGGCTTTGCCCGGGCG (SEQ ID NO:8)

111354-seq

## 序列表

<110> 美商健臻公司  
GENZYME CORPORATION

<120> 偵測AAV之方法  
METHODS FOR DETECTING AAV

<130> 159792014140

<140> 106127648

<141> 2017-8-15

<150> 62/375,314

<151> 2016-08-15

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構建體

<400> 1

Ala Thr Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Gly Cys Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala  
20 25 30

Cys

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構建體

<400> 2

Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp  
1 5 10

<210> 3

<211> 735

<212> PRT

111354-seq

&lt;213&gt; 腺相關病毒 2

&lt;400&gt; 3

```

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1          5          10          15
Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro
 20          25          30
Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35          40          45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50          55          60
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65          70          75          80
Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85          90          95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100         105         110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115         120         125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130         135         140
Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145         150         155         160
Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165         170         175
Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180         185         190
Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195         200         205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210         215         220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225         230         235         240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245         250         255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260         265         270
Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275         280         285
Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290         295         300
Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305         310         315         320
Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325         330         335
Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340         345         350
Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355         360         365
Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370         375         380
Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 385         390         395         400
Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 405         410         415

```

第 2 頁

## 111354-seq

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr  
 435 440 445  
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495  
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
 515 520 525  
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540  
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560  
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575  
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590  
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605  
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
 610 615 620  
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
 625 630 635 640  
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
 645 650 655  
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670  
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys  
 675 680 685  
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr  
 690 695 700  
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr  
 705 710 715 720  
 Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730 735

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構建體

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 乙酰化

&lt;222&gt; 1

&lt;400&gt; 4

## 111354-seq

Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Arg

<210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<220>  
 <221> 乙醯化  
 <222> 1

<400> 5  
 Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met  
 1 5

<210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 6  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 7  
 Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Gly Ala  
 20 25 30  
 Cys Ala Ala Thr Ala Ala Cys  
 35

<210> 8  
 <211> 78

111354-seq

<212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 8  
 Cys Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr Gly Cys Gly Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Cys Thr Cys Gly Cys Thr Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly  
 20 25 30  
 Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Gly Cys Gly Ala Cys Cys Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Gly Gly Thr Cys Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Cys Cys Cys Gly Gly  
 50 55 60  
 Gly Cys Thr Thr Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Cys Gly  
 65 70 75

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 9  
 Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 83  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

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

111354-seq

<210> 11  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構建體

<400> 11  
Tyr Asn Leu Asn Gly Arg  
1 5

<210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構建體

<400> 12  
Tyr His Leu Asn Gly Arg  
1 5

<210> 13  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構建體

<400> 13  
Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu Tyr Thr Glu  
1 5 10 15  
Pro Arg

<210> 14  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構建體

<400> 14  
Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu  
1 5 10 15  
Pro Arg

## 111354-seq

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

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 15  
 Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> 腺相關病毒 2

<400> 16  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His

## 111354-seq

		275					280				285					
Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp	
	290					295					300					
Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu	
				325					330					335		
Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	
			340					345					350			
Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Asp	
		355					360					365				
Val	Phe	Met	Val	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	
	370					375					380					
Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	
385					390					395					400	
Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	
				405					410					415		
Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	
			420					425					430			
Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Arg	Thr	
		435					440					445				
Asn	Thr	Pro	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Arg	Leu	Gln	Phe	Ser	Gln	
	450					455					460					
Ala	Gly	Ala	Ser	Asp	Ile	Arg	Asp	Gln	Ser	Arg	Asn	Trp	Leu	Pro	Gly	
465				470						475					480	
Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	
				485					490					495		
Asn	Ser	Glu	Tyr	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	Gly	
			500				505						510			
Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	Asp	
		515					520					525				
Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Phe	Pro	Gln	Ser	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Gly	Lys	
	530					535					540					
Gln	Gly	Ser	Glu	Lys	Thr	Asn	Val	Asp	Ile	Glu	Lys	Val	Met	Ile	Thr	
545					550					555					560	
Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Arg	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Gln	Tyr	
				565				570						575		
Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Arg	Gly	Asn	Arg	Gln	Ala	Ala	Thr	
			580					585					590			
Ala	Asp	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asp	
		595				600						605				
Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	Thr	
	610					615					620					
Asp	Gly	His	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Leu	Lys	
625					630					635					640	
His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	Asn	
				645					650					655		
Pro	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Ala	Ala	Lys	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Thr	Gln	
			660					665					670			
Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln	Lys	
		675					680					685				
Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn	Tyr	
	690					695					700					
Asn	Lys	Ser	Val	Asn	Val	Asp	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Asn	Gly	Val	Tyr	
705					710					715					720	

## 111354-seq

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730 735

<210> 17  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

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

<210> 18  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 18  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

## 111354-seq

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

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構建體

&lt;400&gt; 19

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

## 111354-seq

115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
 165 170 175  
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro  
 180 185 190  
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly  
 195 200 205  
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser  
 210 215 220  
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg  
 225 230 235

<210> 20  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

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

111354-seq  
235

225

230

<210> 21  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

&lt;400&gt; 21

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

<210> 22  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

&lt;400&gt; 22

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15

## 111354-seq

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
                   20                                  25                                  30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                                  40                                  45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
                   50                                  55                                  60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
                                   85                                  90                                  95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
                   100                                  105                                  110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
                   115                                  120                                  125  
 Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                   130                                  135                                  140  
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
                                   165                                  170                                  175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
                   180                                  185                                  190  
 Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
                   195                                  200                                  205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala  
                   210                                  215                                  220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg  
 225                                  230                                  235

<210> 23  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 23  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1                                  5                                  10                                  15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
                   20                                  25                                  30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                                  40                                  45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
                   50                                  55                                  60  
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
                                   85                                  90                                  95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
                   100                                  105                                  110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
                   115                                  120                                  125

## 111354-seq

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg  
 225 230 235

<210> 24  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 24  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Gly  
 130 135 140  
 Ala Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg  
 225 230 235

111354-seq

<210> 25  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

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

<210> 26  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 26  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

## 111354-seq

20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Lys Gln Leu Glu Gln Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Gln Arg Leu Ala Thr Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Leu Glu Lys Thr Pro Asn Arg Pro Thr Asn Pro Asp Ser Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Ala Lys Lys Lys Gln Lys Asp Gly Glu Pro Ala Asp Ser Ala  
 165 170 175  
 Arg Arg Thr Leu Asp Phe Glu Asp Ser Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro  
 180 185 190  
 Glu Gly Ser Ser Ser Gly Glu Met Ser His Asp Ala Glu Met Arg Ala  
 195 200 205  
 Ala Pro Gly Gly Asn Ala Val Glu Ala Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val  
 210 215 220  
 Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly  
 225 230 235 240  
 Arg

<210> 27  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 27  
 Met Thr Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys  
 20 25 30  
 Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
 35 40 45  
 Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro Val  
 50 55 60  
 Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp Gln  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp  
 85 90 95  
 Ala Glu Phe Gln Gln Arg Leu Gln Gly Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn  
 100 105 110  
 Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Leu

## 111354-seq

115 120 125  
 Gly Leu Val Glu Gln Ala Gly Glu Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro  
 130 135 140  
 Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr  
 165 170 175  
 Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser  
 180 185 190  
 Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly  
 195 200 205  
 Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys  
 210 215 220  
 Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly His  
 225 230

<210> 28  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 28  
 Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys  
 20 25 30  
 Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
 35 40 45  
 Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val  
 50 55 60  
 Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp  
 85 90 95  
 Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn  
 100 105 110  
 Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe  
 115 120 125  
 Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile  
 130 135 140  
 Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln  
 165 170 175  
 Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr  
 180 185 190  
 Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala  
 195 200 205  
 Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp  
 210 215 220  
 Met Gly Asp Arg

111354-seq

225

<210> 29  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 29  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg  
 225 230 235

<210> 30  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<220>  
 <221> 變體  
 <222> 24, 148, 151, 152, 154, 155, 168, 169, 170, 171, 172, 208,

## 111354-seq

209

&lt;223&gt; Xaa = 任何胺基酸

&lt;400&gt; 30

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

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成構建體

&lt;400&gt; 31

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys  
 50 55 60

111354-seq

<210> 32  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 32  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys  
 50 55 60

<210> 33  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 33  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys  
 50 55 60

<210> 34  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 34  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45

## 111354-seq

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys  
 50 55 60

<210> 35  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

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

<210> 36  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 36  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro  
 20 25 30  
 Lys Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu  
 35 40 45  
 Pro Gly Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys  
 50 55 60

<210> 37  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 37  
 Met Thr Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys  
 20 25 30

## 111354-seq

Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
           35                          40                          45  
 Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys  
       50                          55                          60

<210> 38  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 38  
 Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu  
   1                  5                  10                  15  
 Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys  
                   20                  25                  30  
 Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
           35                          40                          45  
 Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg  
       50                          55                          60

<210> 39  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<400> 39  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
   1                  5                  10                  15  
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro  
                   20                  25                  30  
 Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro  
           35                          40                          45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys  
       50                          55                          60

<210> 40  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成構建體

<220>  
 <221> 變體  
 <222> 24

111354-seq

<223> Xaa = 任何胺基酸

<400> 40

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1				5					10					15	
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Xaa	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35					40					45			
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys			
	50					55					60				

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種重組 AAV (rAAV)顆粒，其包含 VP1 和/或 VP3 或親本多肽的胺基酸殘基 2 處的胺基酸取代；其中與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的胺基酸殘基 2 處的 N 端乙醯化相比，VP1 和/或 VP3 的胺基酸殘基 2 處的所述胺基酸取代改變 N 端乙醯化，任選地其中：

- a) 於胺基酸殘基 2 處之取代導致較高頻率的 N 端乙醯化或較低頻率的 N 端乙醯化；
- b) 所述 rAAV 顆粒包含 VP1 的胺基酸殘基 2 處的胺基酸取代；並且其中與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 的胺基酸殘基 2 處的 N 端乙醯化相比，VP1 的胺基酸殘基 2 處的胺基酸取代改變 N 端乙醯化；
- c) 所述 rAAV 顆粒包含 VP3 的胺基酸殘基 2 處的胺基酸取代；並且其中與所述親本 AAV 顆粒的 VP3 的胺基酸殘基 2 處的 N 端乙醯化相比，VP3 的胺基酸殘基 2 處的胺基酸取代改變 N 端乙醯化；
- d) 用 Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro 或 Tyr 取代所述胺基酸殘基 2，可選地用 Ser、Asp 或 Glu 取代。

【請求項2】 如請求項 1 的 rAAV 顆粒，其中所述 AAV 顆粒包含

- (i) AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8 殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊 AAV、AAV1/AAV2 嵌合、牛 AAV、小鼠 AAV、rAAV2/HBoV1 血清型殼體、AAV2 HBKO、AAVPHP.B 或 AAVPHB.eB 血清型殼體，和/或所述 AAV 顆粒包含酪胺酸突變或肝素結合突變；和/或
- (ii) rAAV 載體，可選地自身互補載體，及可選地其中所述 AAV 載體包含

- (1) 一或多 AAV ITR ；
- (2) AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR、或 AAV12 ITR ；
- (3) 編碼側翼有一種或多種 AAV ITR 的異源轉基因的 AAV 載體；和/或
- (4) 編碼轉基因的第一核酸序列和編碼所述轉基因的互補物的第二核酸序列，其中所述第一核酸序列能沿著其大部分或整個長度與所述第二核酸形成鏈內鹼基對，任選地其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列藉由突變的 AAV ITR 連接，以及所述突變的 AAV ITR 包含 D 區的缺失且包括末端解析序列的突變。

**【請求項3】** 一種重組 AAV (rAAV) 顆粒，任選地一種 AAV1 顆粒或一種 AAV2 顆粒，包含親本 AAV 顆粒的 VP1 或 VP3 在胺基酸殘基 A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715 或 G716 的一或多胺基酸取代，其中殘基編號基於 AAV2 的 VP1，且與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的脫醯胺化相比，所述一或多胺基酸取代改變脫醯胺化，以及可選地其中：

- a) 一個或多個胺基酸取代在 VP1 的胺基酸殘基 A35、VP1 的 N57、VP1 的 G58、VP3 的 N382、VP3 的 G383、VP3 的 N511、VP3 的 G512、VP3 的 N715 或 VP3 的 G716 處，並且與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的脫醯胺化相比改變脫醯胺化；
- b) 所述一個或多個胺基酸取代包含 VP1 的 N57、VP3 的 N382、VP3 的 N511、或 VP3 的 N715 處的 Asp 取代，並且與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的脫醯胺化相比導致較高頻率的脫醯胺化；
- c) 所述一個或多個胺基酸取代包含 N57K 或 N57Q 取代，並且與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的脫醯胺化相比導致較低頻率的脫醯胺化；

- d) 所述一個或多個胺基酸取代包含 VP1 的 A35 處的 Asn 取代，並且與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 的脫醯胺化相比導致較高頻率的脫醯胺化；或
- e) 所述一個或多個胺基酸取代在 VP1 的 G58、VP3 的 G383、VP3 的 G512、或 VP3 的 G716 處，並且與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的脫醯胺化相比導致較低頻率的脫醯胺化，可選地其中所述 VP1 的 G58 以 Asp 取代。

【請求項4】 一種醫藥組合物，其包含請求項 1-3 中任一項的 rAAV 顆粒。

【請求項5】 一種套組，其包含請求項 1-3 中任一項的 rAAV 顆粒或請求項 4 的醫藥組合物。

【請求項6】 一種製品，其包含請求項 1-3 中任一項的 rAAV 顆粒或請求項 4 的醫藥組合物。

【請求項7】 一種 AAV 殼體蛋白，其包含親本 AAV 殼體蛋白的胺基酸殘基 2 處的胺基酸取代；其中與所述親本 AAV 殼體蛋白的胺基酸殘基 2 處的 N 端乙醯化相比，胺基酸殘基 2 處的所述胺基酸取代改變 N 端乙醯化，以及任選地其中：

- a) 所述取代導致較高頻率的 N 端乙醯化或較低頻率的 N 端乙醯化；
- b) 所述 AAV 殼體蛋白是 VP1 或 VP3；
- c) 胺基酸殘基 2 以 Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro 或 Tyr 取代，可選地以 Ser、Asp 或 Glu 取代；和/或
- d) 所述胺基酸取代導致 AAV 殼體的較少的脫醯胺化。

【請求項8】 如請求項 7 的 AAV 殼體蛋白，其中所述 AAV 殼體蛋白係 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8 殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2

N708A、AAV V708K、山羊 AAV、AAV1/AAV2 嵌合、牛 AAV、小鼠 AAV、rAAV2/HBoV1、AAV2HBKO、AAVPHP.B 或 AAVPHP.eB 血清型；和/或所述 AAV 殼體蛋白進一步包含酪胺酸突變或肝素結合突變。

**【請求項9】** 一種改善 rAAV 顆粒的穩定性、改善細胞中 rAAV 顆粒的裝配、或改善細胞中 rAAV 顆粒轉導的方法，其包括取代親本 VP1 和/或 VP3 的 VP1 和/或 VP3 的胺基酸殘基 2；其中與所述親本 VP1 和/或 VP3 的胺基酸殘基 2 相比，取代第 2 位處的胺基酸改變 VP1 和/或 VP3 的 N 端乙醯化，可選地其中取代所述胺基酸殘基 2 導致較高頻率的 N 端乙醯化或較低頻率的 N 端乙醯化和/或其中胺基酸殘基 2 以 Cys、Ser、Thr、Val、Gly、Asn、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Gln、Lys、Met、Pro 或 Tyr 取代，可選地胺基酸殘基 2 以 Ser、Asp 或 Glu 取代。

**【請求項10】** 一種改善 rAAV 顆粒的穩定性、改善細胞中 rAAV 顆粒的裝配、或改善細胞中 rAAV 顆粒轉導的方法，包含取代親本 VP1 和/或 VP3 的 VP1 和/或 VP3 的一或多胺基酸殘基，其中所述一或多胺基酸殘基係 A35、N57、G58、N382、G383、N511、G512、N715、或 G716，殘基編號基於 AAV2 的 VP1；其中與所述親本 VP1 和/或 VP3 的胺基酸殘基 2 相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化，可選地其中所述一或多胺基酸取代係 VP1 的 A35、VP1 的 N57、VP1 的 G58、VP3 的 N382、VP3 的 G383、VP3 的 N511、VP3 的 G512、VP3 的 N715 或 VP3 的 G716 處；其中與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的脫醯胺化相比，所述胺基酸取代改變脫醯胺化，進一步可選地其中位於 VP1 的 35 處的所述親本 Ala 殘基以 Asn 取代，和/或位於 VP1 的 58 處的所述親本 Gly 殘基以 Asp 取代。

**【請求項11】** 如請求項 9 或 10 之方法，其中所述 rAAV 顆粒藉由以下產生：

- a) 用編碼所述 rAAV 載體的核酸和編碼 AAV rep 和 cap 功能的核酸轉染宿主細胞，以及提供編碼 AAV 輔助功能的核酸；或
- b) 包含編碼所述 rAAV 載體的核酸和編碼 AAV rep 和 cap 功能的核酸的 AAV 生產細胞，以及提供編碼 AAV 輔助功能的核酸，

可選地其中所述 AAV cap 功能提供 VP1 和/或 VP3 的胺基酸取代，其中與所述親本 AAV 顆粒的 VP1 和/或 VP3 的乙醯化相比，VP1 和/或 VP3 的胺基酸取代改變乙醯化。

**【請求項12】** 如請求項 9-11 中任一項的方法，其中所述 AAV 顆粒包含：

- (i) AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV DJ8 殼體、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊 AAV、AAV1/AAV2 嵌合、牛 AAV、小鼠 AAV、rAAV2/HBoV1、AAV2HBKO、AAVPHP.B、或 AAVPHP.eB 血清型殼體，可選地其中所述 AAV 顆粒的殼體進一步包含酪胺酸突變或肝素結合突變；和/或
- (ii) rAAV 載體，可選地自身互補載體。

**【請求項13】** 一種 AAV 殼體蛋白，其包含親本 AAV 殼體蛋白的胺基酸取代；其中與所述親本 AAV 殼體蛋白相比，所述胺基酸取代改變所述殼體的脫醯胺化。

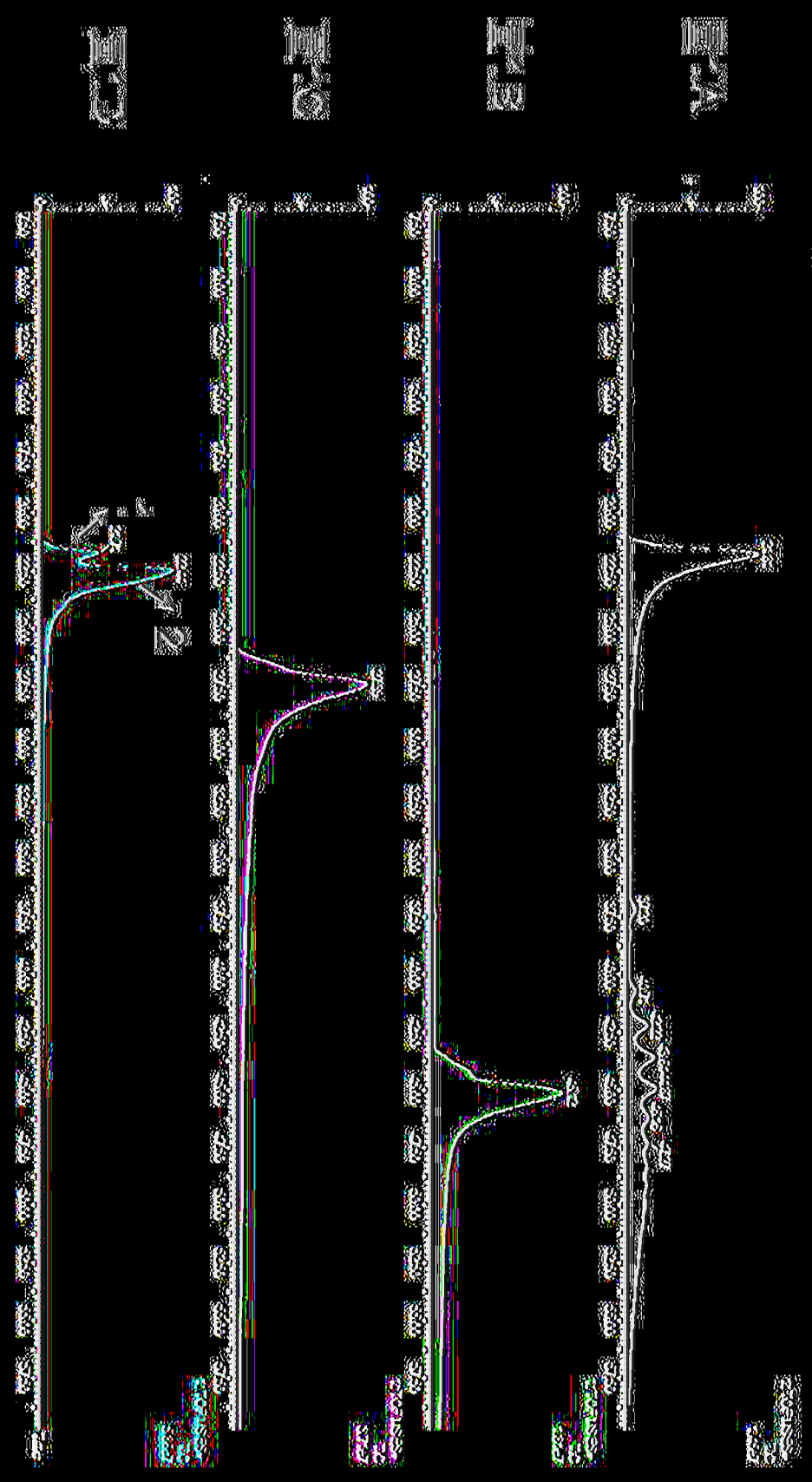
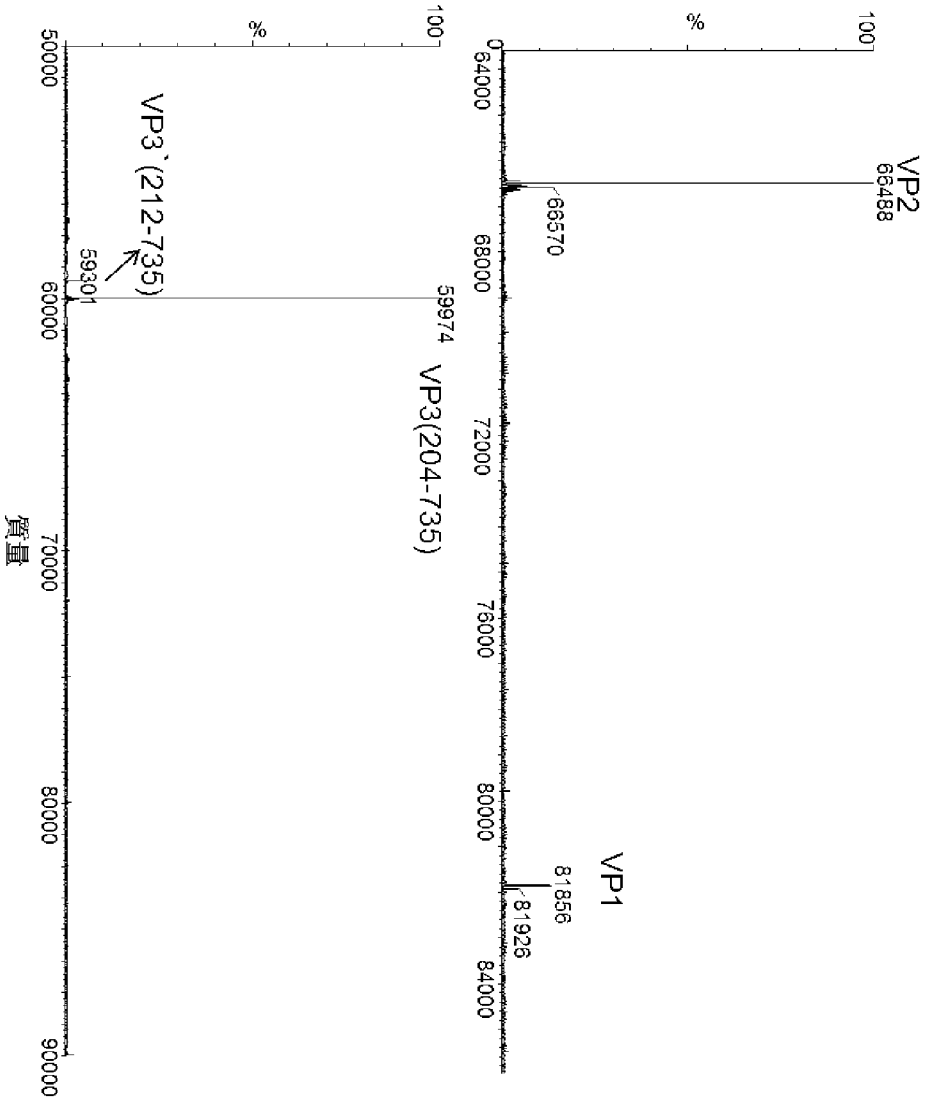


圖 2A

圖 2B



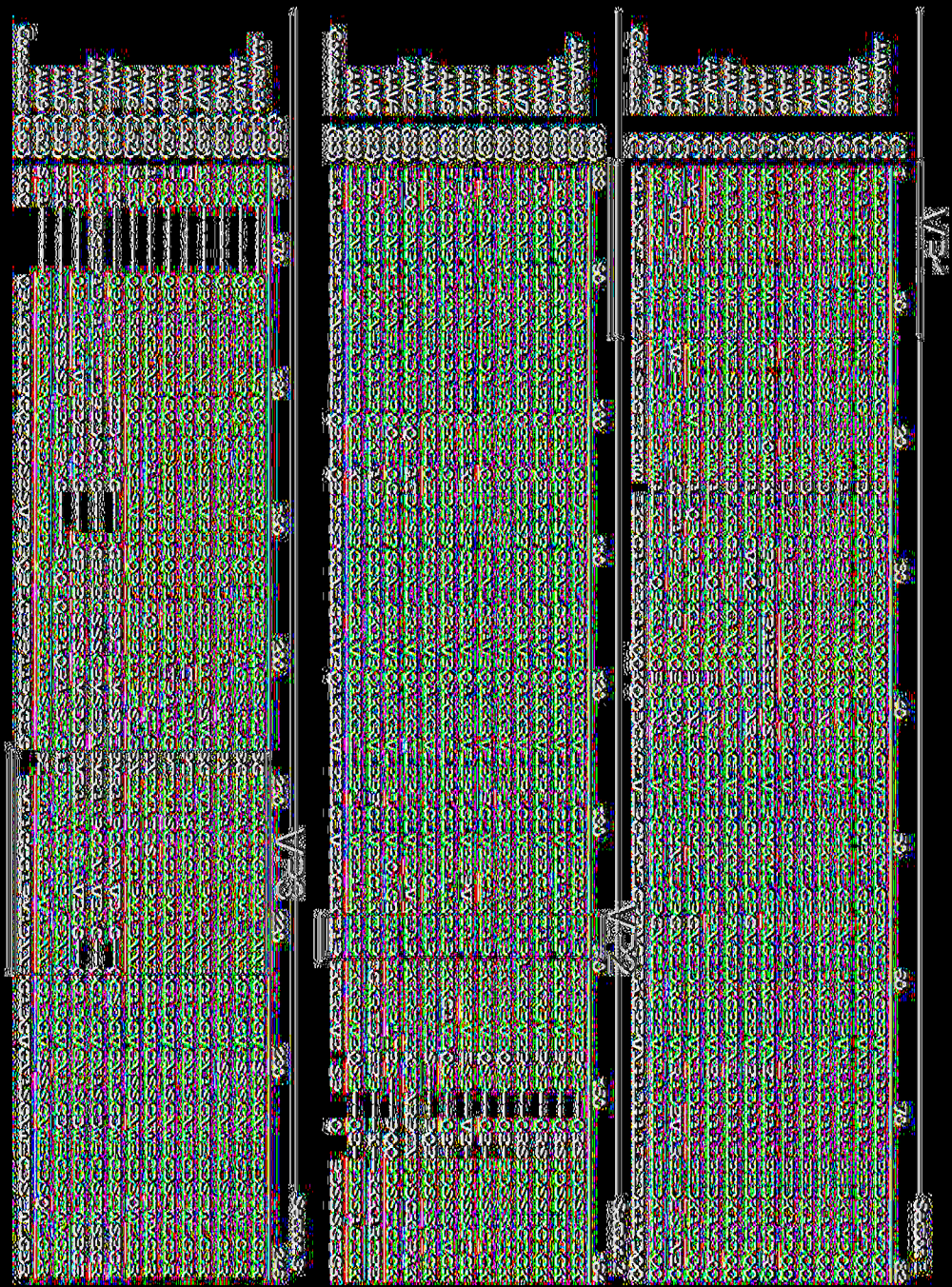


1. HAVICQYAVIVLVEFVLEBOIFKOUVKIKIOTIIRIACRHEIIFKIOIVLITOV 40  
 51. KYLOITPHOIDRQETVREZUAAAIEHIDRAYIKOIFSOINUYIYNNIATLAF 100  
 101. QERKVEIYVSTFOONLQIAYEQAKRRIEELQIAYEIVYVYATONKRIYVENST 150  
 151. VEIIESSKOTQIACOOIAYKRIIDTQOYQIAYEYVLIQILOQIYALIKOIQI 200  
 201. NTHATOSQATIAIUNTCATOVONS&ONVHCLESTUHOITVYIYVETRTUAI 250  
 251. YVNNIAYKQISEQSOZSNINNYTOYESTFOYEDFRHICONTSEIKDUQIK 300  
 301. RHHUCYKRIKRIIDTFRYONREVIQHIQIYIYIYNNIAYEIVYVYATONKRIY 350  
 351. IYVLOSANHOOCLEIIFLAIYTHYTOYQYIYIYNNIAYEIVYVYATONKRIY 400  
 401. QHITQONNITFSYTFEIVITHEKYANISOBLIYNNIAYEIVYVYATONKRIY 450  
 451. I&SOIYQKRIQV&QAOZSIYKIQSQUVITQIOTRQOKVET&ADHNN&EY 500  
 501. &VIQATYVNIHOCISLVNIFQIAYEIVYVYATONKRIY 550  
 551. RYI&EYVNI&EIVYVYATONKRIY 600  
 601. IYONVQKRIYIYQOIT&Y&EIVYVYATONKRIY 650  
 651. IYVY&EIVYVYATONKRIY 700  
 701. T&EYVNI&EIVYVYATONKRIY 750

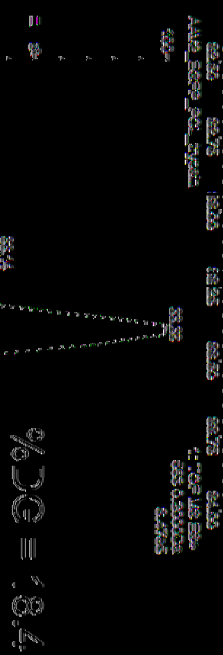
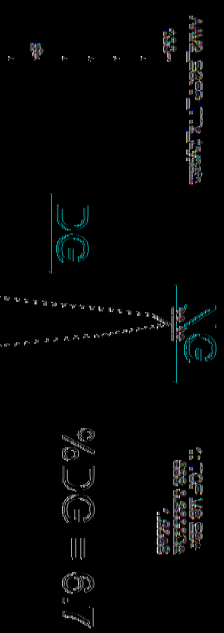
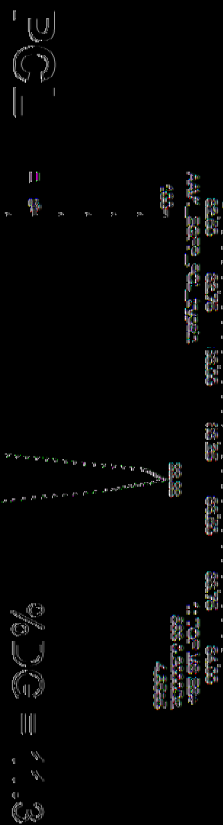
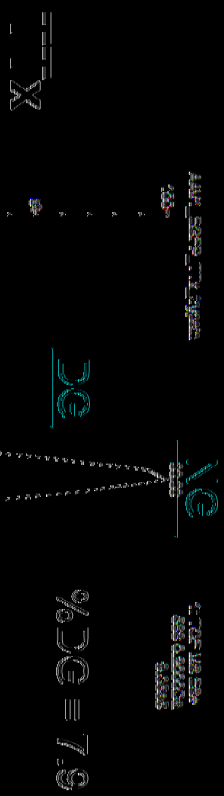




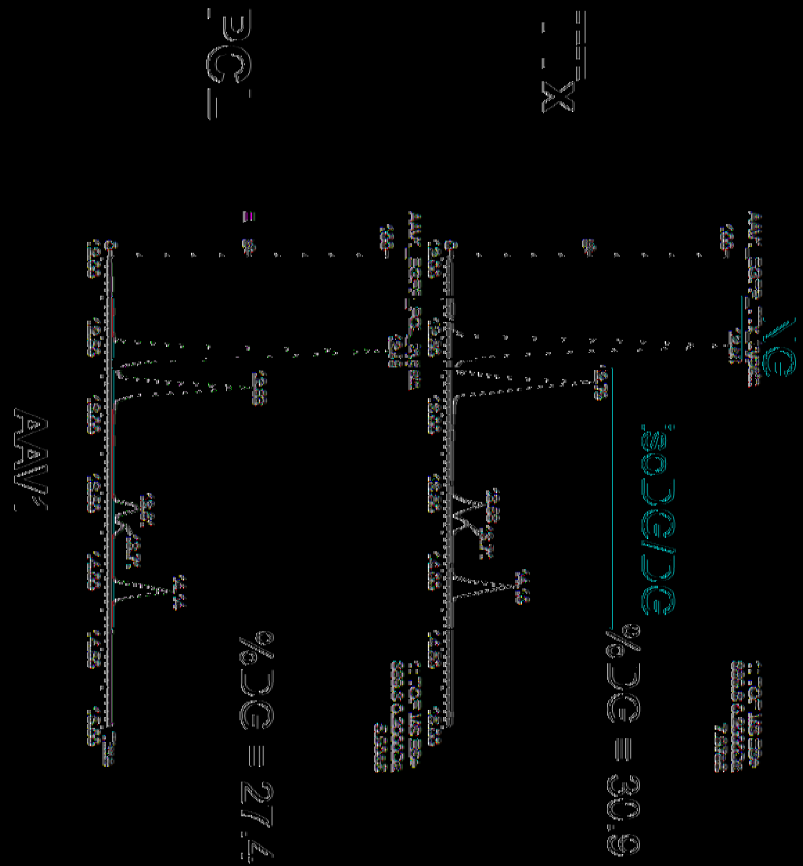




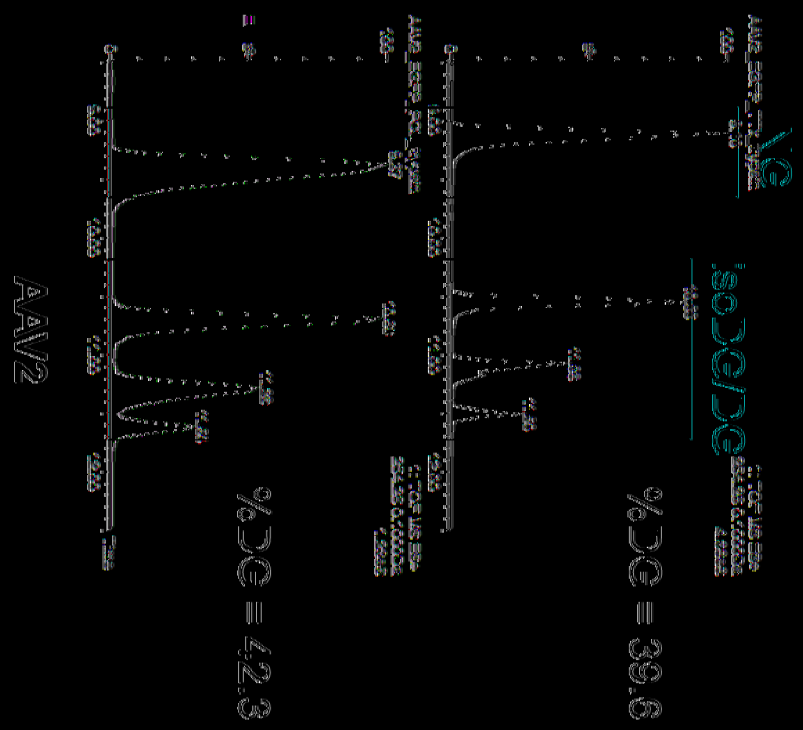
$$\tau_9: V_{G2} = \sqrt{57G_{2X}} \quad (SEQ. NO. 9)$$



AAV1\_749: V=1\5'GR



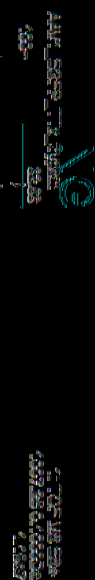
AAV2\_749: V=1\5'GR



AAV<sub>1</sub>:T67:  
SAVVD:VDL\7.5G.VFEEPR

AAV2:T67:  
SAVVD:VDL\7.5G.VFVSEPR

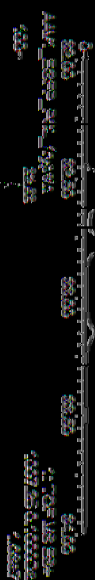
---



!SODG/DG

%DG = 18.1

---



%DG = 18.7

AAV<sub>1</sub>

Σ8A



!SODG/DG

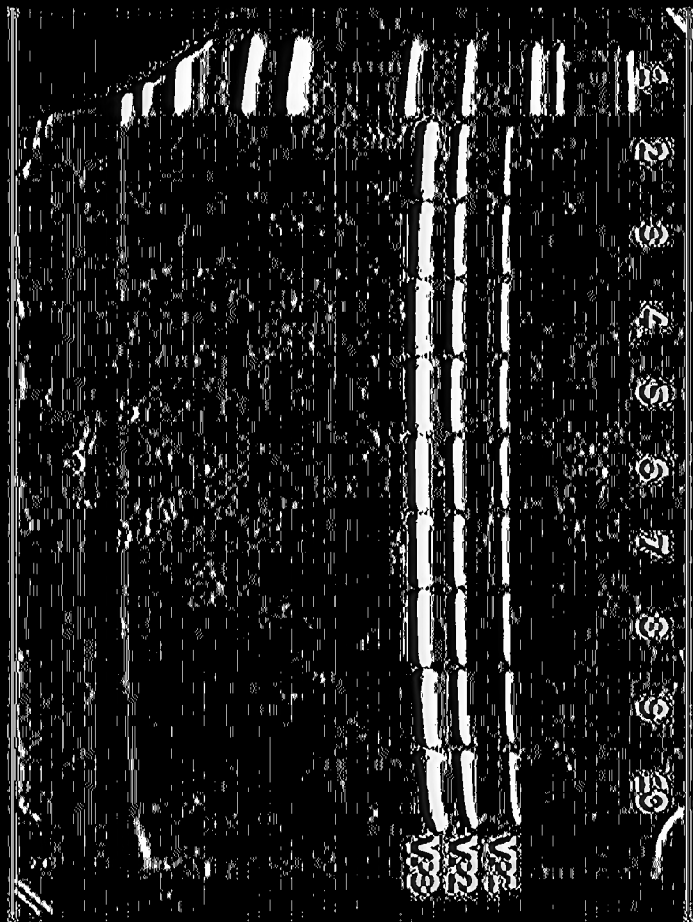
%DG = 27.4



%DG = 28.0

AAV<sub>2</sub>

Σ8B



VP2  
VP2  
VP3

Z2V1AVN

(P310VCS)

- 1 VP2
- 2 VP2
- 3 VP2
- 4 VP2
- 5 VP2
- 6 VP2
- 7 VP2
- 8 VP2
- 9 VP2
- 10 VP2





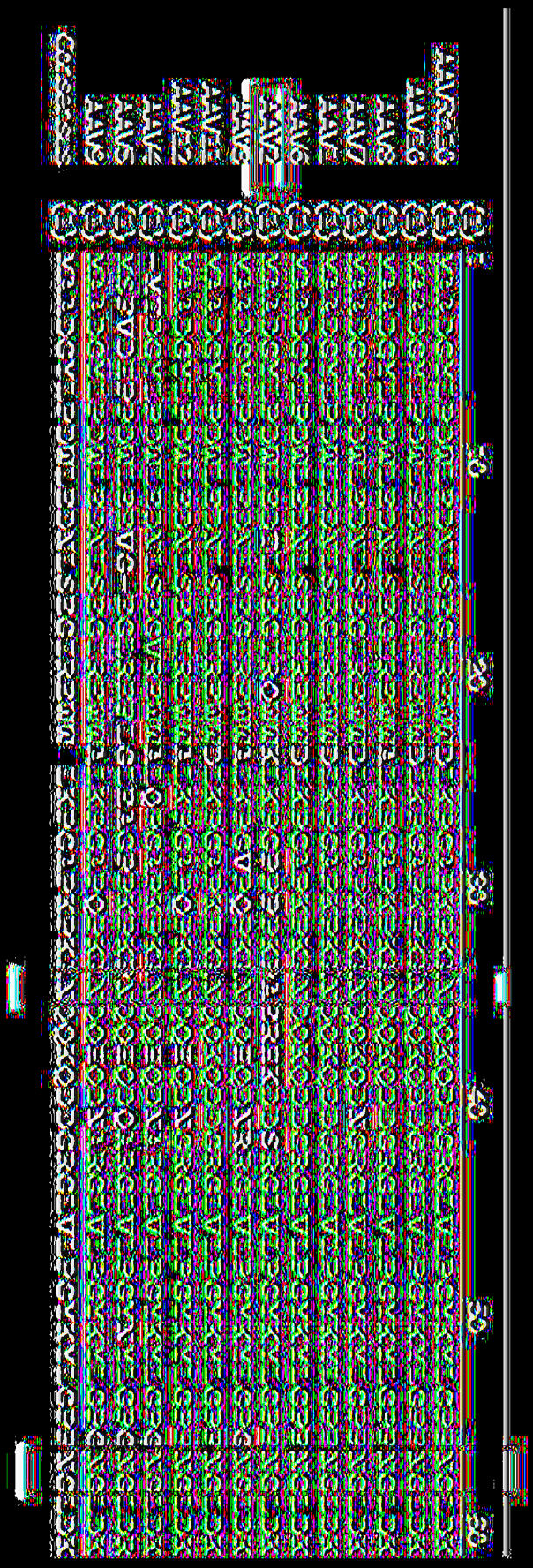
裝置與/或材料

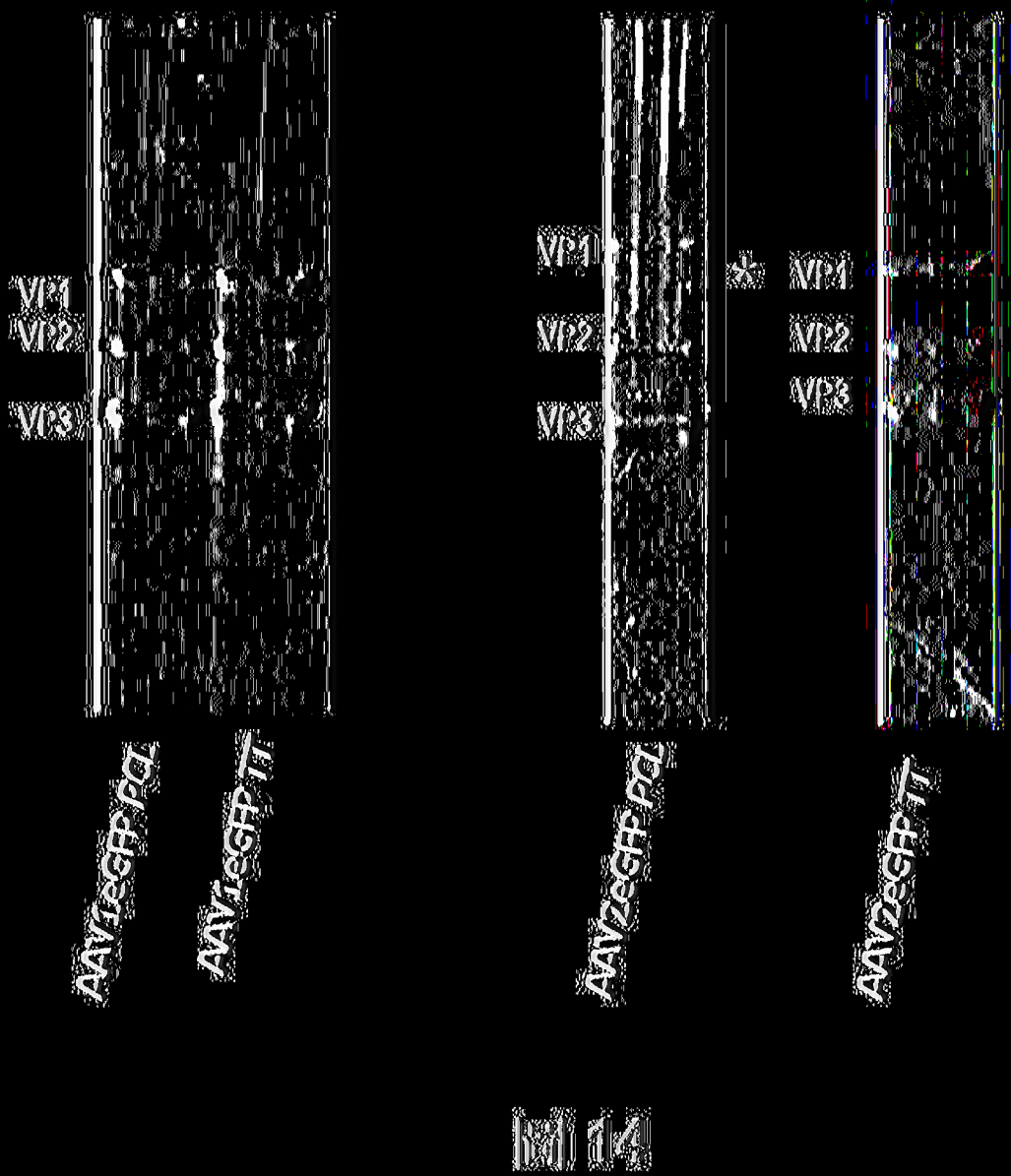


圖式	說明	圖式	說明	圖式	說明	圖式	說明
100	VP1 S2G	100	VP1 S2G	100	VP1 S2G	100	VP1 S2G
	VP1 S2I		VP1 S2I		VP1 S2I		VP1 S2I
	VP1 S2P		VP1 S2P		VP1 S2P		VP1 S2P
	VP3 S2G		VP3 S2G		VP3 S2G		VP3 S2G
	VP3 S2I		VP3 S2I		VP3 S2I		VP3 S2I
	VP3 S2P		VP3 S2P		VP3 S2P		VP3 S2P
	VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G
	VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I
	VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P
	AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP
200	VP1 S2G	200	VP1 S2G	200	VP1 S2G	200	VP1 S2G
	VP1 S2I		VP1 S2I		VP1 S2I		VP1 S2I
	VP1 S2P		VP1 S2P		VP1 S2P		VP1 S2P
	VP3 S2G		VP3 S2G		VP3 S2G		VP3 S2G
	VP3 S2I		VP3 S2I		VP3 S2I		VP3 S2I
	VP3 S2P		VP3 S2P		VP3 S2P		VP3 S2P
	VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G
	VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I
	VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P
	AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP
300	VP1 S2G	300	VP1 S2G	300	VP1 S2G	300	VP1 S2G
	VP1 S2I		VP1 S2I		VP1 S2I		VP1 S2I
	VP1 S2P		VP1 S2P		VP1 S2P		VP1 S2P
	VP3 S2G		VP3 S2G		VP3 S2G		VP3 S2G
	VP3 S2I		VP3 S2I		VP3 S2I		VP3 S2I
	VP3 S2P		VP3 S2P		VP3 S2P		VP3 S2P
	VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G		VP1 S2G; VP3 S2G
	VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I		VP1 S2I; VP3 S2I
	VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P		VP1 S2P; VP3 S2P
	AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP		AAVS C1A cGI IP

圖 12

c)	aCl 1° (ppg)		aCl 1° (μg)		bμm	cμm	dμm
	500	1000	500	1000			
500	WF1 S2G						
	WF1 S2I						
	WF1 S2P						
	WF3 S2G						
	WF3 S2I						
	WF3 S2P						
	WF1 S2G; WF3 S2G						
	WF1 S2I ; WF3 S2I						
	WF1 S2I;WF3 S2P						
	AAWG ClA. aCl 1°						
1000	WF1 S2G						
	WF1 S2I						
	WF1 S2P						
	WF3 S2G						
	WF3 S2I						
	WF3 S2P						
	WF1 S2G; WF3 S2G						
	WF1 S2I ; WF3 S2I						
	WF1 S2I;WF3 S2P						
	AAWG ClA. aCl 1°						
10000	WF1 S2G						
	WF1 S2I						
	WF1 S2P						
	WF3 S2G						
	WF3 S2I						
	WF3 S2P						
	WF1 S2G; WF3 S2G						
	WF1 S2I ; WF3 S2I						
	WF1 S2I;WF3 S2P						
	AAWG ClA. aCl 1°						



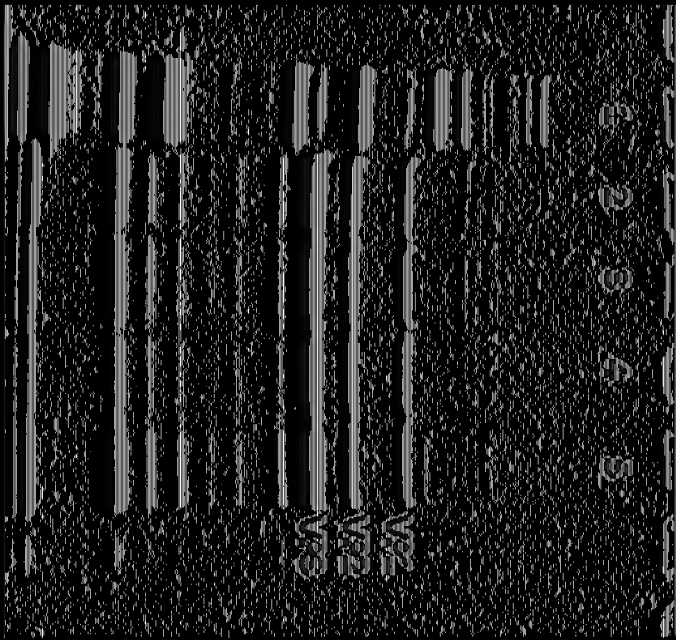


## N57(G)的脫離股件:

	N57(G)的脫離 股件 %	重複
AAV2(A35N)	37.8	1
AAV2(G58D)	3.3	1
AAV2 control	6.7	2

[ 將 AAV2(A35N) 在 4°C 儲存 14 個月 ]

圖 15



環乙烷/AAV12反應精製法

---

裝置 樣品

- 1 V4422 標準物
- 2 844WD-AAV2 (N579)Q2A-689? YE7079B
- 3 844WD-AAV2 (N570)Q2A-689? YE7079C
- 4 844WD-AAV2 (N570)Q2A-689? YE7079D
- 5 844WD-AAV2 (A85N)Q2A-689? YE7079E

PS20V6A / 2000

五 / 6

