



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202005978 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 01 日

(21) 申請案號：108116478

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 05 月 13 日

(51) Int. Cl. : C07K14/005 (2006.01)

C12N15/864 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

(30) 優先權：2018/05/14 美國

62/671,265

(71) 申請人：美商拜奧馬林製藥公司 (美國) BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (US)
美國(72) 發明人：克羅希 彼得 卡麥隆 COLOSI, PETER CAMERON (US)；瑞米爾茲 席薇亞
RAMIREZ, SILVIA (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：11 共 130 頁

(54) 名稱

新穎肝靶向腺相關病毒載體

(57) 摘要

本發明係關於新穎腺相關病毒 (AAV) 衣殼蛋白、包括新穎衣殼蛋白的 AAV 顆粒、編碼這些衣殼蛋白的多核苷酸及表現這些衣殼蛋白的 AAV 載體。本發明亦關於本文所述之表現本發明之新穎衣殼蛋白的 AAV 載體的製造方法及其相關的治療用途。

The invention relates to novel adeno-associated virus (AAV) capsid proteins, AAV particles comprising a novel capsid protein, polynucleotides encoding these capsid proteins and AAV vectors expressing these capsid proteins. The invention also relates to methods of making the herein described AAV vectors expressing the novel capsid proteins of the invention and associated therapeutic uses of thereof.

指定代表圖：

衣殼	腦	眼	肺	心臟	肝臟	胰臟	脾	腎	前肢
Bba 45	1.14E+05	5.62E+04	8.19E+06	2.69E+05	3.60E+07	2.46E+05	2.40E+05	1.54E+05	1.54E+04
	6.38E+04	3.15E+04	7.27E+06	1.25E+05	1.81E+07	1.69E+05	1.43E+05	9.09E+04	1.49E+04
Bba 46	2.01E+05	9.29E+04	8.73E+06	4.18E+05	1.90E+08	8.64E+05	3.94E+05	3.85E+05	4.14E+04
	8.32E+04	8.42E+04	4.90E+06	2.07E+05	2.30E+08	9.18E+05	3.50E+05	3.46E+05	1.16E+04
Bba 47	1.51E+05	7.63E+04	7.06E+06	2.97E+05	6.87E+07	4.79E+05	5.14E+05	2.62E+05	3.11E+04
	5.43E+04	2.72E+04	1.90E+06	1.37E+05	5.62E+07	1.62E+05	8.02E+04	1.07E+05	2.11E+04
Bba 49	2.93E+05	9.94E+04	9.30E+06	3.79E+05	1.73E+08	9.37E+05	3.14E+04	4.76E+05	1.56E+05
	3.09E+05	1.06E+05	3.11E+06	1.61E+05	2.64E+08	1.19E+06	8.33E+05	6.08E+05	1.26E+05
Bba 50	7.14E+04	4.63E+04	1.43E+06	1.15E+05	2.23E+07	1.27E+05	1.04E+05	8.85E+04	2.01E+04
	5.18E+04	4.49E+04	5.57E+05	3.39E+04	8.36E+06	4.32E+04	1.33E+04	5.76E+04	2.42E+04
Bba 51	1.65E+05	7.31E+04	1.33E+07	2.86E+05	4.15E+07	3.97E+05	2.19E+05	2.04E+05	5.97E+04
	5.67E+04	3.54E+04	4.31E+06	1.07E+05	2.03E+07	1.02E+05	9.78E+04	5.68E+04	5.30E+04

衣殼	四頭肌	腓腸肌	脛骨前肌	橫膈膜	舌	皮膚	嚼肌MS	淋巴結	比目魚肌
Bba 45	8.99E+04	2.16E+05	5.43E+04	3.02E+05	8.17E+04	6.34E+04	3.73E+04	5.51E+05	1.91E+04
	5.25E+04	1.53E+05	4.61E+04	1.82E+05	5.69E+04	3.72E+04	2.24E+04	3.63E+05	1.12E+04
Bba 46	2.01E+06	2.06E+06	1.66E+05	5.36E+05	7.97E+04	1.30E+05	4.57E+04	4.80E+05	6.58E+04
	1.59E+06	1.45E+06	1.57E+05	3.39E+05	5.13E+04	9.52E+04	1.73E+04	2.49E+05	6.88E+04
Bba 47	1.49E+06	3.41E+06	1.88E+05	6.09E+05	1.49E+05	1.43E+05	5.88E+04	7.64E+05	8.98E+04
	1.52E+06	3.24E+06	1.80E+05	4.00E+05	1.09E+05	1.14E+05	2.69E+04	2.20E+05	8.91E+04
Bba 49	1.13E+07	6.32E+06	8.79E+05	1.35E+06	1.52E+05	2.43E+05	1.28E+05	1.09E+06	1.58E+05
	6.06E+06	2.70E+06	9.40E+05	7.73E+05	5.83E+04	5.40E+04	4.00E+04	6.45E+05	1.42E+05
Bba 50	1.92E+06	2.44E+06	7.94E+04	1.37E+05	1.88E+05	7.42E+04	2.34E+04	1.18E+05	2.42E+04
	3.00E+06	8.57E+05	5.74E+04	4.95E+04	9.97E+04	1.89E+04	1.69E+04	4.21E+04	1.17E+04
Bba 51	2.72E+06	3.15E+06	1.23E+05	3.85E+05	1.90E+05	1.46E+05	7.69E+04	5.13E+05	5.32E+04
	1.67E+06	3.22E+06	7.77E+04	1.40E+05	5.05E+04	1.00E+05	3.79E+04	2.63E+05	3.70E+04

【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

新穎肝靶向腺相關病毒載體

【英文發明名稱】

NOVEL LIVER TARGETING ADENO-ASSOCIATED VIRAL
VECTORS

【技術領域】

【0001】 本申請案主張2018年5月14日申請之美國臨時申請案第62/671,265號之優先權，其以全文引用的方式併入本文中。

以引用的方式併入以電子方式提交的材料

【0002】 本申請案含有呈電腦可讀形式之序列表作為本揭示案之獨立部分，其以全文引用的方式併入本文中且標識如下：檔案名：53120_Seqlisting.txt；大小：68,361個位元組；創建時間：2019年5月10日。

【0003】 本發明係關於新穎腺相關病毒（AAV）衣殼蛋白、包括新穎衣殼蛋白的AAV顆粒、編碼這些衣殼蛋白的多核苷酸及表現這些衣殼蛋白的AAV載體。本發明亦關於本文所述之表現本發明之新穎衣殼蛋白的AAV載體的製造方法及其相關的治療用途。

【先前技術】

【0004】 AAV為複製缺陷型小病毒，其單股DNA基因組之長度為約4.7 kb，包括145個核苷酸反向末端重複序列（ITR）。AAV血清型2（AAV2）基因組之核苷酸序列呈現於如由Ruffing等人，J. Gen. Virol., 75: 3385-3392 (1994)修正之Srivastava等人，J. Virol., 45: 555-564

(1983)中。指導病毒DNA複製 (rep)、衣殼化/包裝及宿主細胞染色體整合之順式作用序列含於ITR內。三種AAV啟動子p5、p19及p40 (針對其相關定位位置命名) 驅動編碼兩個AAV內部開放閱讀框架之rep及cap基因的表現。兩個rep啟動子 (p5及p19) 結合單個AAV內含子之差異性剪接 (在核苷酸2107及2227處) 將引起從rep基因產生四種rep蛋白 (rep 78、rep 68、rep 52及rep 40)。Rep蛋白具有多種最終負責複製病毒基因組的酶學性質。cap基因從p40啟動子表現, 且其編碼三種衣殼蛋白VP1、VP2及VP3。選擇式剪接及非共同轉譯起始位點負責三種相關衣殼蛋白的產生。單個共同多腺苷酸化位點位於AAV基因組之定位位置95處。AAV之生命週期及遺傳學綜述於Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992)中。

【0005】 當AAV感染人類細胞時, 病毒基因組可以整合到19號染色體中, 導致細胞的潛伏感染。除非細胞被輔助病毒 (例如, 腺病毒或疱疹病毒) 感染, 否則不會產生感染性病毒。在腺病毒的情況下, 基因E1A、E1B、E2A、E4及VA提供輔助功能。在被輔助病毒感染後, 拯救並擴增AAV原病毒, 並產生AAV及腺病毒。

【0006】 AAV具有獨特特徵, 所述獨特特徵使AAV作為用於表現免疫原性肽/多肽之疫苗載體及作為用於將外源DNA遞送至細胞的載體, 例如在基因療法中, 具有吸引力。培養中的細胞的AAV感染為非細胞病變的, 且人類及其他動物之天然感染為沉默及無症狀的。此外, AAV感染多種哺乳動物細胞, 允許在活體內靶向多種不同組織的可能性。AAV原病毒基因組如同質體中之選殖的DNA一樣具有感染性, 這使得重組基因組之構築變得可行。此外, 因為指導AAV複製、基因組衣殼化及整合之信號含

於AAV基因組之ITR內，所以基因組之內部大約4.3 kb（編碼複製及結構性衣殼蛋白，rep-cap）中的一些或全部可經外源DNA替換，所述外源DNA諸如含有啟動子、感興趣的DNA及多腺苷酸化信號的基因卡匣。rep及cap蛋白可以反式提供。AAV之另一種顯著特徵在於其為極其穩定且充滿活力的病毒。其容易承受用以滅活腺病毒的條件（56°C至65°C，數小時），使得AAV-載體之冷藏沒那麼重要。甚至可將AAV凍乾。最後，經AAV感染之細胞對重複感染沒有抗性。

【0007】 AAV載體可用於許多哺乳動物基因治療應用中，且需要可用於基因治療應用的新的及/或經修飾的AAV載體及相關病毒。本發明提供表現本發明之新穎AAV衣殼蛋白的新穎AAV載體，及包括那些載體或衣殼蛋白之新穎的非天然產生的AAV病毒粒子。

【發明內容】

【0008】 本發明提供新穎AAV衣殼蛋白，其可為新穎VP1、VP2或VP3衣殼蛋白；包括這些衣殼蛋白中之任一者的非天然產生的AAV病毒；及此類AAV病毒之用於基因治療應用及用於製備用於基因治療應用之藥物的用途。在一些實施例中，從各種哺乳動物組織分離及鑑定AAV衣殼蛋白。某些新穎的哺乳動物衍生的AAV衣殼VP1蛋白的胺基酸序列如SEQ ID NO:1-7所示，且本文亦描述相應的VP2及VP3序列之相關位置。新穎衣殼蛋白在本文中統稱為「本發明之AAV衣殼蛋白」。

【0009】 在一個實施例中，本發明提供一種腺相關病毒（AAV），其具有衣殼蛋白，所述衣殼蛋白具有與（i）SEQ ID NO:1-7中之任一者、（ii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2區域或（iii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP3區域至少95%相同的胺基酸序列；且進一步具有轉基因，

其中所述轉基因由與調節序列可操作地連接的異源基因構成，所述調節序列控制異源基因在宿主細胞中之表現。在另一實施例中，衣殼蛋白具有 (i) SEQ ID NO:1-7中之任一者、(ii) SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2區域或 (iii) SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP3區域的胺基酸序列。在又一實施例中，AAV具有AAV反向末端重複序列。在其他實施例中，AAV與生理學上相容的載體混合。

【0010】 在另一實施例中，本發明提供一種將轉基因遞送至細胞的方法，所述方法包括使細胞與本文中揭示之任何AAV接觸的步驟。在另一實施例中，本發明提供一種治療患有與內源蛋白之異常活性相關的病症或疾病的個體的方法，所述方法包括向個體投與有效量之本文中揭示之AAV的步驟，其中所述AAV具有編碼所述蛋白質之生物活性複本的轉基因。在又一實施例中，所述方法包括將轉基因遞送至肝細胞。

【0011】 在另一實施例中，本發明提供一種組合物，其包括本發明AAV中之任一者，用於將轉基因遞送至細胞，諸如肝細胞。另外，本發明提供本發明AAV中之任一者之用於製備用於將轉基因遞送至細胞之藥物的用途。

【0012】 在一個實施例中，本發明提供一種經分離腺相關病毒 (AAV) 衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括 (i) 與SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP1胺基酸序列或SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2或VP3區域至少95%、96%、97%、98%或99%相同的胺基酸序列，或 (ii) 包括SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP1胺基酸序列或SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2或VP3區域。在某些實施例中，衣殼蛋白連接至異源胺基酸序列。本發明亦提供具有或包括這些衣殼蛋白中之任一者的非天然產生的

AAV顆粒。在某些實施例中，包括上述VP1、VP2或VP3衣殼蛋白中之任一者的非天然產生的AAV顆粒包括具有AAV反向末端重複序列及轉基因之核酸，所述轉基因包括與調節序列可操作地連接之異源基因，所述調節序列指導異源基因在宿主細胞中之表現。在其他實施例中，包括本文所述之VP1、VP2或VP3衣殼序列中之任一者的非天然產生的AAV顆粒包括與調節序列可操作地連接的異源轉基因，所述調節序列控制宿主細胞中之轉基因表現。如本文所用，術語「異源基因」或「異源調節序列」意謂所提及之基因或調節序列不是天然存在於AAV載體或顆粒中的，而是人工引入其中的。術語「轉基因」係指包括異源基因及與異源基因可操作地連接的調節序列的核酸，所述調節序列控制該基因在宿主細胞中之表現。

【0013】 本發明亦提供一種多核苷酸，其包括編碼腺相關病毒（AAV）衣殼蛋白之核苷酸序列，其中所述衣殼蛋白包括（i）與SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP1胺基酸序列或SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2或VP3區域至少95%、96%、97%、98%或99%相同的胺基酸序列，或（ii）包括SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP1胺基酸序列或SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2或VP3區域，其中所述多核苷酸與異源調節控制序列可操作地連接。因此，應理解，本發明之多核苷酸為非天然產生的。本發明亦提供包括與異源調節序列可操作地連接的這些多核苷酸序列中之任一者的AAV載體及包括這些AAV載體之組合物，包含醫藥組合物。

【0014】 在另一實施例中，本發明提供一種經分離腺相關病毒（AAV）載體，其包括編碼衣殼蛋白之多核苷酸序列及異源轉基因序列，其中所述衣殼蛋白包括（i）與SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP1胺基酸序列或SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2或VP3區域至少95%、96%、

97%、98%或99%相同的胺基酸序列，或(ii)包括SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP1胺基酸序列或SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2或VP3區域。本發明亦提供包括這些AAV載體之組合物，包含醫藥組合物。

【0015】 在另一實施例中，本發明提供一種腺相關病毒(AAV)，其包括衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括SEQ ID NO:1-7中之任一者的功能片段；且進一步包括轉基因，所述轉基因包括與調節序列可操作地連接的異源基因，所述調節序列控制異源基因在宿主細胞中之表現。例如，功能片段包括SEQ ID NO: 1-7中之任一者的胺基酸序列的可變區(VR)、位於可變區之間的恆定區、GBS結構域及GH環中之一或多者。本發明亦提供包括這些AAV載體之組合物，包含醫藥組合物。

【0016】 在另一實施例中，本發明提供一種腺相關病毒，其包括衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括由核苷酸序列編碼之胺基酸序列，所述核苷酸序列與編碼(i) SEQ ID NO: 1-7中之任一者的胺基酸序列、(ii) SEQ ID NO: 1-7中之任一者的胺基酸序列的VP2區域或SEQ ID NO: 1-7中之任一者的胺基酸序列的VP3區域的核苷酸序列雜交；且進一步包括轉基因，所述轉基因包括與調節序列可操作地連接的異源基因，所述調節序列控制異源基因在宿主細胞中之表現。例如，所述核苷酸序列在嚴格條件下與編碼本發明之衣殼蛋白或衣殼蛋白之功能片段的核苷酸序列雜交。本發明亦提供包括這些AAV載體之組合物，包含醫藥組合物。

【0017】 「可變區」係指AAV衣殼蛋白之VP1序列內的九個可變區。可變區(VR)在本文中稱為VR I、VR II、VR III、VR IV、VR V、VR VI、VR VII、VR VIII及VR IX，且本文描述其在各種VP1序列中之相應位置。VR在AAV VP1衣殼序列內表現出最高序列及結構變異，且

亦可在受體附著、轉基因之轉錄活化、組織轉導及抗原性中起作用。

【0018】 「聚糖結合序列 (GBS)」或「 GBS 結構域」或「 GBS 區域」係指位於VR IV與VR V之間的控管病毒衣殼之聚糖結合特異性的胺基酸序列。本文描述各種AAV VP1胺基酸序列中之GBS區域的位置，且其他AAV VP1胺基酸序列之GBS區域的位置為本領域中已知的及/或可以常規鑑定。

【0019】 「GH環」係指在衣殼蛋白之內部 β -桶內側接有 β -鏈G及 β -鏈H的環序列。「GH環」序列包括可變區VR IV至VR VIII，包含所涵蓋的GBS序列及來自供體的所有穿插的保守的骨架序列。本文描述各種AAV VP1胺基酸序列中之GH環區域的位置，且其他AAV VP1胺基酸序列之GH環區域的位置可以常規地鑑定。

【0020】 關於VR、GBS及GH環區域之本文所述的位置，應注意，那些區域之N端及/或C端的位置可以與那些區域之胺基酸位置相差至多1個胺基酸、2個胺基酸、3個胺基酸、4個胺基酸或5個胺基酸，如本文中明確描述的（特別是在表2中）。本發明涵蓋新穎衣殼序列，其包括經取代之VR、GBS及/或GH環區域，其在如本文所定義之N端及/或C端上在至多5個胺基酸之範圍內變化。

【0021】 本發明提供製造重組腺相關病毒 (AAV) 顆粒之方法，所述方法包括以下步驟：培養已經本發明之AAV載體中之任一者轉染的細胞且從經轉染細胞之上清液回收重組AAV顆粒。另外，本發明提供包括本發明之病毒載體或衣殼蛋白中之任一者的病毒顆粒及包括這些病毒載體的細胞。

【0022】 本發明之一個實施例提供一種製造本文所述之重組AAV中

之任一者的方法，所述方法係藉由培養病毒生產細胞，已在所述病毒生產細胞中引入第一核酸載體及第二核酸載體，第一核酸載體具有5'及3' AAV反向末端重複序列，所述序列側接有轉基因，所述轉基因具有與調節序列可操作地連接的異源基因，所述調節序列控制異源基因在宿主細胞中之表現，第二核酸載體具有AAV rep及cap核酸序列，其中所述cap核酸序列編碼與SEQ ID NO:1-7中之任一者至少95%相同的AAV衣殼；及從病毒生產細胞培養物之上清液回收AAV。在另一實施例中，病毒生產細胞為哺乳動物。在一較佳實施例中，昆蟲細胞為HEK293細胞。

【0023】 在另一實施例中，本發明提供治療患有病症或疾病之患者的方法，所述方法包括向患者投與有效量之本發明之AAV載體或病毒中之任一者。

【0024】 在另一實施例中，本發明提供本發明之AAV載體或病毒中之任一者的用於製備用於治療病症或疾病之藥物的用途。本發明亦提供包括本發明之AAV載體或病毒中之任一者以治療疾病或病症的組合物。

【0025】 在又一實施例中，個體中之疾病或病症與內源蛋白之異常活性相關。如本文所用，「內源蛋白」意謂由患有疾病或病症之個體的基因組編碼的蛋白質或基因產物。

【0026】 「AAV病毒粒子」或「AAV病毒顆粒」或「AAV載體顆粒」或「AAV病毒」係指由至少一種AAV衣殼蛋白及衣殼化多核苷酸AAV載體構成的病毒顆粒。若顆粒包括異源多核苷酸（亦即，除野生型AAV基因組以外的多核苷酸，諸如待遞送至哺乳動物細胞之轉基因），則其通常被稱為「AAV載體顆粒」或簡稱為「AAV載體」。因此，AAV載體顆粒之產生必定包含AAV載體之產生，因此載體含於AAV載體顆粒內。

【0027】本發明亦提供包括本發明之AAV載體中之任一者的細胞，及由本發明的這些細胞產生的病毒顆粒。

【0028】如本文所用之術語「反向末端重複序列 (ITR)」係指順式充當DNA複製起點及病毒基因組之包裝信號的在AAV基因組之5'及3'端發現的本領域中公認的區域。AAV ITR連同AAV rep編碼區一起，提供自質體載體的有效切除及拯救，及插入於兩個側接ITR之間的核苷酸序列至宿主細胞基因組中之整合。某些AAV相關的ITR之序列由Yan等人, *J. Virol.* 79(1):364-379 (2005)所揭示，其以全文引用的方式併入本文中。

【0029】如本文所用之短語「用於產生有效 (productive) AAV感染之輔助功能」係指AAV衍生之編碼序列可以經表現以提供AAV基因產物，所述AAV基因產物反過來起反式有效AAV複製的作用。因此，AAV輔助功能包含rep及cap區域。rep表現產物已證明具有許多功能，尤其包含：DNA複製之AAV起點的識別、結合及作缺口 (nicking)；DNA解旋酶活性；及AAV (或其他異源) 啟動子之轉錄調節。cap表現產物提供必需的包裝功能。AAV輔助功能在本文中用以補充AAV載體中缺失的反式AAV功能。用於產生有效AAV感染之輔助功能亦可包含來自桿狀病毒、疱疹病毒、腺病毒或痘瘡病毒的某些輔助功能。

【0030】在一些實施例中，病毒構築體包括編碼AAV rep及cap基因的核苷酸序列。

【0031】如本文所用之術語「AAV rep基因」係指AAV基因組之本領域中公認的編碼病毒複製蛋白的區域，所述病毒複製蛋白為複製病毒基因組及在潛伏感染期間將病毒基因組插入宿主基因組中所需的。關於AAV rep編碼區之進一步描述，參見例如Muzyczka等人, *Current Topics in*

Microbiol. and Immunol.158:97-129 (1992) ; Kotin等人, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994), 其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。如本文所用之rep編碼區可以衍生自任何病毒血清型, 諸如上述AAV血清型。所述區域不需要包含所有的野生型基因, 而是可以改變的, 例如藉由核苷酸之插入、缺失或取代來改變, 只要在適合接受細胞中表現時, rep基因保留所期望的功能特徵即可。

【0032】如本文所用之術語「AAV cap基因」係指AAV基因組之本領域中公認的編碼病毒外殼蛋白的區域, 所述病毒外殼蛋白為包裝病毒基因組所需的。關於cap編碼區之進一步描述, 參見例如Muzyczka等人, Current Topics in Microbiol. and Immunol.158:97-129 (1992) ; Kotin等人, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994), 其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。如本文所用之AAV cap編碼區可以衍生自任何AAV血清型, 如上所述。所述區域不需要包含所有的野生型cap基因, 而是可以改變的, 例如藉由核苷酸之插入、缺失或取代來改變, 只要在連同AAV載體一起存在於宿主細胞中時, 所述基因提供足夠的包裝功能即可。

【0033】術語「轉染」用於指細胞對外源DNA的攝取。當外源性DNA已被引入細胞膜內時, 細胞已被「轉染」。本領域中通常已知多種轉染技術。參見例如Graham等人, Virology 52:456 (1973) ; Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989) ; Davis等人, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986) ; Chu等人, Gene 13:197 (1981), 其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。此類技術可用於將一或多個外源DNA部分, 諸如核苷酸整合載體及其他核酸分子, 引入適合宿主細胞中。該術語

擷取化學、電學及病毒介導之轉染程序。

【0034】在又一態樣中，本文描述一種藉由本文所述之方法產生的AAV顆粒。在一些實施例中，AAV顆粒在其基因組中包括至少一個編碼異源蛋白質之核苷酸。

【0035】術語「異源蛋白質或肽」係指不是由野生型AAV表現的任何蛋白質，包括標籤，諸如六組胺酸、FLAG、myc、多組氨酸，或標記或免疫原、佐劑、選擇標誌物、治療性蛋白質或靶向蛋白質或肽，僅舉幾例。

【0036】本文所述之例示性異源蛋白質包含但不限於β-球蛋白、血紅蛋白、組織纖維蛋白溶酶原活化劑及凝血因子；群落刺激因子（CSF）；介白素，諸如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9等；生長因子，諸如角質細胞生長因子（KGF）、幹細胞因子（SCF）、纖維母細胞生長因子（FGF，諸如鹼性FGF及酸性FGF）、肝細胞生長因子（HGF）、似胰島素生長因子（IGF）、骨成形性蛋白質（BMP）、表皮生長因子（EGF）、生長分化因子-9（GDF-9）、肝細胞瘤衍生生長因子（HDGF）、肌肉抑制素（GDF-8）、神經生長因子（NGF）、神經滋養素、血小板衍生生長因子（PDGF）、血小板生成素（TPO）、轉形生長因子 α （TGF- α ）、轉形生長因子 β （TGF- β ）及類似物；可溶性受體，諸如可溶性TNF- α 受體、可溶性介白素受體（例如，可溶性IL-1受體及可溶性II型IL-1受體）、可溶性 γ/Δ T細胞受體、可溶性受體之配體結合片段及類似物；酶，諸如 α -葡萄糖苷酶、伊米苷酶（imiglucarase）、 β -葡萄糖腦苷酶及阿糖腦苷酶；酶活化劑，諸如組織纖維蛋白溶酶原活化劑；趨化因子，諸如1P-10、由干擾素- γ 誘導之單核因

子 (Mig)、Gro α /IL-8、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、PF-4及類似物；血管生成劑，諸如血管內皮生長因子 (VEGF，例如VEGF121、VEGF165、VEGF-C、VEGF-2)、神經膠質瘤衍生生長因子、血管生成素、血管生成素-2及類似物；抗血管生成劑，諸如可溶性VEGF受體；蛋白質疫苗；神經活性肽，諸如神經生長因子 (NGF)、緩激肽、膽囊收縮素、胃泌素、胰泌素、催產素、促性腺激素釋放激素、 β -腦內啡、腦啡肽、P物質、生長抑素、催乳素、甘丙胺素、生長激素釋放激素、鈴蟾素、強啡肽、華法林 (warfarin)、神經調壓素、腸動素、促甲狀腺素、神經肽Y、黃體成長激素、降血鈣素、胰島素、升糖素、血管加壓素、血管收縮素II、促甲狀腺素釋放激素、血管活性腸肽、睡眠肽及類似物；血栓溶解劑；心房利鈉肽；鬆弛素；膠質原纖維酸性蛋白；激濾泡素 (FSH)；人類 α -1抗胰蛋白酶；白血病抑制因子 (LIF)；組織因子、黃體成長激素；巨噬細胞活化因子；腫瘤壞死因子 (TNF)；嗜中性白血球趨化因子 (NCF)；金屬蛋白酶之組織抑制劑；血管活性腸肽；血管生成素；促血管素；纖維蛋白；水蛭素；IL-1受體拮抗劑；睫狀神經滋養因子 (CNTF)；大腦衍生神經滋養因子 (BDNF)；神經滋養素3及4/5 (NT-3及4/5)；神經膠細胞衍生神經滋養因子 (GDNF)；芳族胺基酸去羧酶 (AADC)；因子VIII、因子IX、因子X；肌肉萎縮蛋白或迷你肌肉萎縮蛋白；溶酶體酸性脂肪酶；苯丙胺酸羥化酶 (PAH)；肝糖貯積病相關酶，諸如葡萄糖-6-磷酸酶、酸性麥芽糖酶、糖原去分支酶、肌糖原磷酸化酶、肝糖原磷酸化酶、肌肉磷酸果糖激酶、磷酸化酶激酶、葡萄糖運輸蛋白、醛縮酶A、 β -烯醇酶、糖原合成酶；及溶酶體酶。

【圖式簡單說明】

【0037】圖1為一組表格，顯示了具有指定的新穎衣殼蛋白之AAV的感染性的相對組織特異性。資料呈現為各組織中之總通量（光子/秒/平方公分/弧度）。對於各組織，頂列表示平均通量且底列表示標準差。

【0038】圖2提供來自新穎衣殼及對照衣殼之IVIG中和分析的資料，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-50及Bba-51，對照衣殼：AAV5、AAV8及AAV9。此分析表明，新穎衣殼展現出IVIG抗性性質。

【0039】圖3提供新穎衣殼及對照衣殼之轉導資料，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-50及Bba-51，對照衣殼：AAV5、AAV8、AAV9及AAV12。此資料在多個實驗中生成且各衣殼之多個資料點代表不同實驗。與AAV5相比，具有新穎衣殼之AAV對肝細胞具有顯著更高程度的特異性。資料顯示為總通量活性，其代表各器官系統之AAV感染性。

【0040】圖4提供新穎衣殼及對照衣殼在多個組織中之轉導資料，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-50及Bba-51，對照衣殼：AAV5、AAV8及AAV9。此資料表明，與AAV5相比，具有新穎衣殼之AAV對肝細胞具有顯著更高程度的特異性。

【0041】圖5提供在注射新穎衣殼及對照衣殼後之血漿bCG蛋白質含量，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49及Bba-50，對照衣殼：AAV8、AAV-rh10及AAV-anc80L65。

【0042】圖6提供在注射新穎衣殼及對照衣殼後在肝臟及血漿中之bCG蛋白質含量，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49及Bba-50，對照衣殼：AAV8、AAV-rh10及AAV-anc80L65。

【0043】圖7A-7C提供在注射新穎衣殼及對照衣殼後在肝臟中之bCG DNA（圖A）、bCG RNA（圖B）及bCG蛋白質（圖C）之含量，新穎衣

殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49及Bba-50，對照衣殼：AAV8、AAV-rh10及AAV-anc80L65。

【0044】圖8A-8B表明，在注射新穎衣殼及對照衣殼後在肝臟中之bCG DNA及bCG RNA含量與肝臟中之bCG蛋白質含量相關，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49及Bba-50，對照衣殼：AAV8、AAV-rh10及AAV-anc80L65。

【0045】圖9提供在注射新穎衣殼及對照衣殼後由AAV轉導之肝細胞的百分比，如藉由免疫組織化學所測定，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49及Bba-50，對照衣殼：AAV8、AAV-rh10及AAV-anc80L65。

【0046】圖10提供顯示在注射新穎衣殼及對照衣殼後肝細胞之免疫組織化學染色的例示性照片，新穎衣殼：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49及Bba-50，對照衣殼：AAV8、AAV-rh10及AAV-anc80L65。

【0047】圖11提供由具有新穎衣殼Bba-49之AAV及來自各種來源之AAV5衣殼轉導的肝細胞的百分比。這些AAV以-AGXT轉基因轉導肝細胞。AAV.Bba-49.AGXT轉導約96%的肝細胞。

【實施方式】

本發明提供新穎AAV衣殼蛋白、編碼那些衣殼蛋白之核酸及包括那些新穎衣殼蛋白之AAV病毒。在一些實施例中，從各種哺乳動物組織分離及鑑定AAV衣殼蛋白。新穎AAV衣殼VP1蛋白之胺基酸序列如SEQ ID NO:1-7所示，且本文中揭示相關的VP2及VP3區域之位置。

AAV載體

【0048】如本文所用，術語「AAV」為腺相關病毒之標準縮寫。腺

相關病毒為僅在某些功能由共感染輔助病毒提供之細胞中生長之單股DNA小病毒。目前已經表徵了至少十三種AAV血清型，如下表1所示。AAV之總體資訊及綜述可見於例如Carter, *Handbook of Parvoviruses*, 第1卷, 第169-228頁 (1989), 及Berns, *Virology*, 第1743-1764頁, Raven Press, (New York, 1990)中。然而, 完全期望這些相同原理將適用於其他AAV血清型, 因為熟知各種血清型在結構上及功能上相當緊密相關, 甚至在遺傳層面上亦如此。(參見例如Blacklowe, *Parvoviruses and Human Disease*之第165-174頁, J. R. Pattison編(1988); 及Rose, *Comprehensive Virology* 3:1-61 (1974))。例如, 所有AAV血清型明顯展現極類似之由同源rep基因介導之複製性質; 且全都帶有三種相關的衣殼蛋白, 諸如在AAV6中表現之衣殼蛋白。相關性程度進一步藉由揭示血清型之間沿基因組長度之廣泛交叉雜交的異雙螺旋分析; 及在末端對應於「反向末端重複序列」(ITR)之類似自黏接區段之存在來表明。類似感染性模式亦表明各血清型中之複製功能受到類似調節控制。

【0049】 如本文所用之「AAV載體」係指包括一或多個感興趣的多核苷酸(或轉基因)之載體, 所述多核苷酸(或轉基因)經由AAV末端重複序列(ITR)側接。可將此類AAV載體複製及包裝至已經編碼及表現rep及cap基因產物之載體轉染的宿主細胞中之感染性病毒顆粒(若存在)中。

【0050】 「AAV病毒粒子」或「AAV病毒顆粒」或「AAV載體顆粒」或「AAV病毒」係指由至少一種AAV衣殼蛋白及衣殼化多核苷酸AAV載體構成的病毒顆粒。若顆粒包括異源多核苷酸(亦即, 除野生型AAV基因組以外的多核苷酸, 諸如待遞送至哺乳動物細胞之轉基因), 則

其通常被稱為「AAV載體顆粒」或簡稱為「AAV載體」。因此，AAV載體顆粒之產生必定包含AAV載體之產生，因此載體含於AAV載體顆粒內。

【0051】 AAV「rep」及「cap」基因分別為編碼複製及衣殼化蛋白之基因。AAV rep及cap基因已發現於迄今為止檢查之所有AAV血清型中，且描述於本文及所引用之參考文獻中。在野生型AAV中，通常發現rep及cap基因在病毒基因組中彼此相鄰（亦即，其作為相鄰或重疊的轉錄單元「偶聯」在一起），且其在AAV血清型中通常係保守的。AAV rep及cap基因亦單獨稱為及統稱為「AAV包裝基因」。根據本發明之AAV cap基因編碼Cap蛋白，其能夠在rep及腺輔助功能存在下包裝AAV載體且能夠結合目標細胞受體。在一些實施例中，AAV cap基因編碼具有衍生自特定AAV血清型，例如表1中所示之血清型的胺基酸序列的衣殼蛋白。

表1.AAV血清型

AAV血清型	Genbank寄存編號
AAV-1	NC_002077.1
AAV-2	NC_001401.2
AAV-3	NC_001729.1
AAV-3B	AF028705.1
AAV-4	NC_001829.1
AAV-5	NC_006152.1
AAV-6	AF028704.1
AAV-7	NC_006260.1
AAV-8	NC_006261.1
AAV-9	AX753250.1
AAV-10	AY631965.1
AAV-11	AY631966.1
AAV-12	DQ813647.1
AAV-13	EU285562.1

【0052】 用於產生AAV之AAV序列可衍生自任何AAV血清型之基因組。通常，AAV血清型具有在胺基酸及核酸層面具有顯著同源性之基因組序列，提供一組相似的遺傳功能，產生在物理上及功能上基本上等效之病

毒粒子，且藉由幾乎相同的機制複製及組裝。對於AAV血清型之基因組序列及基因組相似性之論述，參見例如 GenBank 寄存編號 U89790；GenBank 寄存編號 J01901；GenBank 寄存編號 AF043303；GenBank 寄存編號 AF085716；Chlorini 等人, J. Vir.71:6823-33(1997)；Srivastava 等人, J. Vir.45:555-64 (1983)；Chlorini 等人, J. Vir.73:1309-1319 (1999)；Rutledge 等人, J. Vir.72:309-319 (1998)；及 Wu 等人, J. Vir.74: 8635-47 (2000)。

【0053】 所有已知 AAV 血清型之基因組組織非常相似。AAV 之基因組為長度小於約 5,000 個核苷酸 (nt) 之線性單股 DNA 分子。反向末端重複序列 (ITR) 側接用於非結構複製 (Rep) 蛋白及結構 (VP) 蛋白之獨特編碼核苷酸序列。VP 蛋白形成衣殼。末端 145 nt 為自身互補的且被組織成使得可以形成能量穩定的分子內雙螺旋體，形成 T 形髮夾。這些髮夾結構充當病毒 DNA 複製起點，充當細胞 DNA 聚合酶複合物之引子。Rep 基因編碼 Rep 蛋白 Rep78、Rep68、Rep52 及 Rep40。Rep78 及 Rep68 從 p5 啟動子轉錄，且 Rep 52 及 Rep40 從 p19 啟動子轉錄。cap 基因編碼 VP 蛋白 VP1、VP2 及 VP3。cap 基因從 p40 啟動子轉錄。

【0054】 在一些實施例中，編碼 AAV 衣殼蛋白之核酸序列與針對諸如 Sf9 或 HEK 細胞之特定細胞類型中之表現的調節表現控制序列可操作地連接。可以使用本領域中熟習此項技術者已知用於在昆蟲宿主細胞或哺乳動物宿主細胞中表現外源基因之技術來實施本發明。用於多肽之分子工程改造及在昆蟲細胞中之表現的方法描述於例如 Summers 及 Smith. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. 第 7555 期, College Station,

Tex. (1986); Luckow.1991中。在Prokop等人, Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152 (1986) ; King, L. A.及R. D. Possee, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom (1992) ; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York (1992) ; W.H. Freeman 及 Richardson, C. D., Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, 第39卷 (1995) ; 美國專利第4,745,051號 ; US2003148506 ; 及WO 03/074714中。用於編碼 AAV衣殼蛋白之核苷酸序列之轉錄的尤其適合的啟動子為例如多面體啟動子。然而，本領域中已知在昆蟲細胞中具有活性之其他啟動子，例如 p10、p35或IE-1啟動子，且亦涵蓋以上參考文獻中所述之其他啟動子。

【0055】 使用昆蟲細胞表現異源蛋白質有據可查，將核酸，諸如載體，例如昆蟲-細胞相容載體引入此類細胞中之方法及在培養物中維持此類細胞之方法亦有據可查。參見例如METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Richard 編，Humana Press, NJ (1995) ; O'Reilly 等人，BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS, A LABORATORY MANUAL, Oxford Univ.Press (1994) ; Samulski等人, J. Vir.63:3822-8 (1989) ; Kajigaya等人, Proc. Nat'l.Acad. Sci. USA 88:4646-50 (1991) ; Ruffing 等人, J. Vir.66:6922-30 (1992) ; Kirnbauer 等人, Vir.219:37-44 (1996) ; Zhao 等人, Vir.272:382-93 (2000) ; 及Samulski 等人, 美國專利第 6,204,059號。在一些實施例中，昆蟲細胞中編碼AAV之核酸構築體為昆蟲細胞相容性載體。如本文所用，「昆蟲細胞相容性載體」或「載體」係

指能夠有效轉形或轉染昆蟲或昆蟲細胞之核酸分子。例示性生物載體包含質體、線性核酸分子及重組病毒。可以採用任何載體，只要其為昆蟲細胞相容的即可。載體可以整合至昆蟲細胞之基因組中，但載體在昆蟲細胞中不必永久存在且亦包含短暫游離型載體。載體可以藉由任何已知方法引入，例如藉由化學處理細胞、電穿孔或感染。在一些實施例中，載體為桿狀病毒、病毒載體或質體。在一更佳實施例中，載體為桿狀病毒，亦即，構築體為桿狀病毒載體。桿狀病毒載體及其使用方法描述於上文所引用之關於昆蟲細胞之分子工程改造的參考文獻中。

【0056】 桿狀病毒為節肢動物之包膜DNA病毒，其兩個成員為用於在細胞培養物中產生重組蛋白之熟知表現載體。桿狀病毒具有環狀雙股基因組（80-200 kbp），其可經工程改造以允許將大基因組內含物遞送至特定細胞。用作載體之病毒通常為加州苜蓿夜蛾（*Autographa californica*）多衣殼核多角體病毒（AcMNPV）或家蠶（Bm）NPV（Kato等人, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 85(3):459-470 (2010)）。桿狀病毒常用於感染昆蟲細胞以表現重組蛋白。特定而言，異源基因在昆蟲中之表現可以如以下中所述實現：例如美國專利第4,745,051號；Friesen等人, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*131:31-49.(1986)；EP 127,839；EP 155,476；Miller等人, *Ann.Rev. of Microbiol.*42: 177-199 (1988)；Carbonell等人, *Gene* 73(2):409-18 (1988)；Maeda等人, *Nature* 315(6020):592-4 (1985)；Lebacq-Verheyden等人, *Mol. Cell.Biol.* 8(8):3129-35 (1988)；Smith等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82(24):8404-8 (1985)；Miyajima等人, *Gene* 58(2-3):273-81 (1987)；及Martin等人, *DNA* 7(2):99-106 (1988)。可用於產生蛋白質的多種桿狀病

毒株及變體以及相應允許的昆蟲宿主細胞描述於Luckow等人, Nature Biotechnology 6:47-55 (1988)；及Maeda等人, Nature 315(6020):592-4 (1985)中。

新穎AAV衣殼蛋白

【0057】 在第一態樣中，本發明提供從各種哺乳動物組織分離之新穎AAV衣殼蛋白。新穎AAV VP1衣殼蛋白提供為SEQ ID NO:1-7且本文描述相關的VP2及VP3區域之位置。本發明亦提供包括編碼這些新穎AAV衣殼蛋白之核苷酸序列的多核苷酸。本發明提供新穎AAV衣殼蛋白（本文中統稱為「本發明之AAV衣殼蛋白」）之胺基酸序列，及編碼本發明之AAV衣殼蛋白的核酸序列。亦提供本發明之這些AAV衣殼核酸及胺基酸序列的片段。這些序列各自可以容易地用於多種載體系統及宿主細胞中。衣殼VP1蛋白之所期望的片段包含VP2、VP3及可變區、GBS結構域及GH環、及編碼這些蛋白質之多核苷酸序列。這些片段可以容易地用於多種載體系統及宿主細胞中。此類片段可以單獨使用，與其他AAV序列或片段組合使用，或與來自其他AAV或非AAV病毒序列的元件組合使用。在一個特別期望的實施例中，載體含有本發明之AAV衣殼序列。

【0058】 本發明之AAV衣殼序列及其片段可用於產生rAAV，且亦可用作反義遞送載體、基因治療載體或疫苗載體。本發明進一步提供含有本發明之新穎AAV衣殼序列的核酸分子、基因遞送載體及宿主細胞。

【0059】 可以使用本文提供的資訊確定適合片段。使用各種公開或商業上可獲得的多序列比對程式中之任一者進行比對，諸如「Clustal W」，其可經由網際網路上之網站伺服器存取。或者，亦使用Vector NTI公用程式。本領域亦已知多種可用於量測核苷酸序列一致性的演算法，包

括上述程式中所含的演算法。作為另一實例，可以使用6.1版GCG中之程序FASTA比較多核苷酸序列。FASTA提供查詢序列與搜尋序列之間的最佳重疊區域的比對及序列一致性百分比。例如，核酸序列之間的序列一致性百分比可以使用FASTA以其預設參數（字號為6且NOPAM因子用於計分矩陣）來確定，如6.1版GCG中所提供的，其以引用的方式併入本文中。類似程式可用於胺基酸序列，例如「Clustal X」程式。另外的可以使用的序列比對工具由（蛋白質序列比對；（http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/））及（核酸比對；http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html））提供。通常，這些程式中之任一者在預設設置下使用，但是本領域熟習此項技術者可以根據需要改變這些設置。或者，本領域熟習此項技術者可以利用另一演算法或電腦程式，其至少提供與由所提及之演算法及程式所提供之一致性或比對程度一樣的一致性 or 比對程度。

【0060】 當提及核酸或其片段時，術語「實質性一致性」、「實質性同源性」或「實質性相似性」指示，當以適當的核苷酸插入或缺失與另一核酸（或其互補鏈）最佳比對時，在所比對序列之至少約95%至99%中存在核苷酸序列一致性，諸如95%一致性、96%一致性、97%一致性、98%一致性及99%一致性。較佳地，同源性覆蓋被比較的兩個序列之全長，或其開放閱讀框架，或長度為至少15個核苷酸的另一適合片段。本文描述適合片段之實例。在本發明之核酸序列中亦包含編碼本發明之AAV衣殼之核酸及其互補鏈的天然變體及工程化修飾。此類修飾包含例如此項技術中已知的標記、甲基化、及以簡併核苷酸取代天然產生之核苷酸中之一或更多者。

【0061】當提及胺基酸或其片段時，術語「實質性一致性」、「實質性同源性」或「實質性相似性」指示，當以適當的胺基酸插入或缺失與另一胺基酸（或其互補鏈）最佳比對時，在所比對序列之至少約95%至99%中存在胺基酸序列一致性，諸如95%一致性、96%一致性、97%一致性、98%一致性及99%一致性。較佳地，同源性覆蓋被比較的兩個序列之全長，或其蛋白質，例如cap蛋白、rep蛋白，或長度為至少8個胺基酸或更理想地至少15個胺基酸的其片段。本文描述適合片段之實例。

【0062】術語「高度保守的」意謂至少80%一致性，較佳至少90%一致性，且更佳地，超過97%一致性。一致性容易地由本領域熟習此項技術者藉由本領域熟習此項技術者已知的演算法及電腦程式確定。

【0063】術語「序列一致性百分比」或「相同」在核酸序列或胺基酸序列之情況下係指兩個序列中在出於最大對應性比對時相同的殘基。序列一致性比較長度可以覆蓋被比較的兩個序列之全長，基因編碼序列之全長，或至少約500至5000個核苷酸之片段為所期望的。然而，亦期望較小片段之間的一致性，例如至少約九個核苷酸，通常至少約20至24個核苷酸、至少約28至32個核苷酸、至少約36個或更多個核苷酸的較小片段之間的一致性。類似地，對於胺基酸序列，可以容易地確定蛋白質全長或其片段的「序列一致性百分比」。適當地，片段長度為至少約8個胺基酸，且可多達約700個胺基酸。本文描述適合片段之實例。

【0064】本發明之新穎衣殼可以包括一或多個不影響多肽之生物活性及/或免疫原性活性的額外保守性胺基酸取代。術語「保守性胺基酸取代」係指以非天然殘基，包含天然產生及非天然產生之胺基酸取代天然胺基酸殘基，使得對該位置之胺基酸殘基之極性或電荷幾乎沒有影響或沒有

影響。例如，保守取代由任何其他非極性殘基替換多肽中之非極性殘基引起。此外，根據「丙胺酸掃描誘變」之方法，多肽中之任何天然殘基亦可經丙胺酸取代。天然產生之胺基酸基於其側鏈表徵如下：鹼性：精胺酸、離胺酸、組胺酸；酸性：麩胺酸、天冬胺酸；不帶電極性：麩醯胺酸、天冬醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸；及非極性：苯丙胺酸、色胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、脯胺酸、甲硫胺酸、白胺酸、正白胺酸、異白胺酸。胺基酸取代的一般規則列於下表中。

保守性胺基酸取代

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser、Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asn
Gly	Pro、Ala	Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正白胺酸	Leu
Leu	正白胺酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Leu
Lys	Arg、1,4二胺基丁酸、Gln、Asn	Arg
Met	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Arg
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr、Phe	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、正白胺酸	Leu

【0065】 本發明之新穎衣殼可以由基本上等同於編碼SEQ ID NO: 1-7之胺基酸序列的核酸序列的多核苷酸編碼。根據本發明之多核苷酸與編碼本發明之經修飾多肽胺基酸序列的多核苷酸序列可以具有例如至少

65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%，更通常至少90%、91%、92%、93%或94%且甚至更通常至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

【0066】 在本發明之核酸序列範圍內包含在嚴格條件下與編碼本發明之新穎衣殼的核苷酸序列雜交的核酸序列片段，所述片段大於約5個核苷酸，較佳7個核苷酸，更佳大於9個核苷酸且最佳大於17個核苷酸。涵蓋例如15、17或20個核苷酸或更多核苷酸之具有選擇性（亦即，與本發明多核苷酸中之任一者特異性雜交）的片段。能夠與多核苷酸特異性雜交的探針可以將本發明之多核苷酸序列與同一基因家族中之其他多核苷酸序列區分開來，或者可以將基因與其他細菌基因區分開來，且較佳基於獨特的核苷酸序列。

【0067】 術語「嚴格」用以指本領域中通常理解為嚴格的條件。雜交嚴格度主要由溫度、離子強度及諸如甲醯胺之變性劑的濃度決定。嚴格的雜交及洗滌條件之實例為0.015 M氯化鈉，0.0015 M檸檬酸鈉，在65-68°C下；或0.015 M氯化鈉，0.0015 M檸檬酸鈉及50%甲醯胺，在42°C下。參見Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。亦可使用更嚴格的條件（諸如更高的溫度、更低的離子強度、更高的甲醯胺或其他變性劑），然而，雜交速率將受到影響。在涉及去氧寡核苷酸之雜交的情況下，其他例示性嚴格雜交條件包含在6×SSC 0.05%焦磷酸鈉中在37°C（針對14個鹼基的寡核苷酸）、48°C（針對17個鹼基的寡核苷酸）、55°C（針對20個鹼基的寡核苷酸）及60°C（針對23個鹼基的寡核苷酸）下洗滌。

【0068】出於減少非特異性及/或背景雜交之目的，可以在雜交及洗滌緩衝液中包含其他試劑。實例為0.1%牛血清白蛋白、0.1%聚乙炔基-吡咯啉酮、0.1%焦磷酸鈉、0.1%十二烷基硫酸鈉、NaDodSO₄ (SDS)、菲科爾 (ficoll)、鄧哈特溶液 (Denhardt's solution)、經音波處理之鮭魚精子DNA (或其他非互補DNA) 及硫酸葡聚糖，但亦可使用其他適合試劑。可以在基本上不影響雜交條件嚴格度的情況下改變這些添加劑的濃度及類型。雜交實驗通常在pH 6.8-7.4下進行，然而，在典型離子強度條件下，雜交速率幾乎與pH無關。參見Anderson等人，Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, 第4章, IRL Press Limited (Oxford, England)。雜交條件可以由本領域中熟習此項技術者調整，以便適應這些變數且允許具有不同序列相關性的DNA形成雜交體。

【0069】如本文所述，含有或包括本發明之AAV衣殼蛋白的本發明載體特別適用於中和抗體會降低其他基於AAV血清型之載體以及其他病毒載體之有效性的應用。本發明之rAAV載體在rAAV再投與及重複基因治療中特別有利。

【0070】本發明內亦包含編碼本發明之AAV衣殼蛋白的核酸之片段、其互補鏈、與其互補的cDNA及RNA。適合片段之長度為至少15個核苷酸，且包括功能片段，亦即，生物學上感興趣的片段。此類片段包含編碼衣殼之三種可變蛋白 (VP) 的序列，這三種可變蛋白為替代性剪接變體：VP1、VP2及VP3。編碼本發明之AAV衣殼的核酸之其他適合片段包含含有衣殼蛋白之起始密碼子的片段，及編碼本文所述之VP1衣殼蛋白之可變區的片段。

【0071】本發明不限於從本發明之AAV核酸序列表現的AAV衣殼胺

基酸序列、肽及蛋白質，且包括藉由本領域已知的其他方法產生的胺基酸序列、肽及蛋白質，包含例如藉由化學合成、藉由其他合成技術或藉由其他方法。例如，可以使用多種技術容易地產生本文所述之任何衣殼的序列。

【0072】 適合的製造技術為本領域熟習此項技術者熟知的。參見例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, N.Y.)。或者，肽亦可以藉由熟知固相肽合成方法合成 (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1962) ; Stewart 及 Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* Freeman, (San Francisco, 1969) 第27-62頁)。這些及其他適合的製造方法在本領域熟習此項技術者的知識範圍內，且不是對本發明的限制。

【0073】 AAV衣殼由三種蛋白質VP1、VP2及VP3構成，其為替代性剪接變體。全長衣殼序列被稱為VP1，其包括被稱為VP2及VP3之剪接變體。本發明亦提供本發明之AAV衣殼蛋白的其他功能片段。衣殼蛋白之其他所期望的片段包含可變區 (VR)、位於可變區之間的恆定區、GBS結構域及GH環。衣殼蛋白之其他所期望的片段包含HPV本身。

【0074】 已開發演算法以確定AAV2中之序列發散區域。(Chiorini等人, *J. Virol*, 73:1309-19 (1999) ; Rutledge 等人, *J. Virol.*, 72:309-319 (1998))。使用本文所述之此演算法及/或比對技術，確定新穎AAV衣殼序列之VR。使用本文所提供之使用Clustal X程式在預設設置下或使用其他商業上或公開可用的比對程式在預設設置下進行的比對，熟習此項技術者可以容易地確定本發明之新穎AAV衣殼的相應片段。

【0075】 適當地，AAV衣殼蛋白之片段的長度為至少8個胺基酸，或

長度為至少9個胺基酸，或長度為至少10個胺基酸，或長度為至少20個胺基酸，或長度為30個胺基酸，或長度為至少50個胺基酸，或長度為至少75個胺基酸，或長度為至少100個胺基酸，或長度為200個胺基酸，或長度為250個胺基酸，或長度為300個胺基酸，或長度為350個胺基酸，或長度為400個胺基酸。但是，可以容易地利用其他所期望的長度的片段。所有本發明片段都保留了衣殼AAV蛋白之生物活性。此類片段可以重組產生或藉由其他適合的方法產生，例如化學合成。

【0076】 本發明之序列、蛋白質及片段可以藉由任何適合的方法產生，包括重組產生、化學合成或其他合成方法。此類製造方法在本領域熟習此項技術者的知識範圍內，且不是對本發明的限制。

【0077】 除了包含附圖及序列表中所提供之核酸序列外，本發明亦包含被設計成用於表現本發明之AAV衣殼蛋白的胺基酸序列、蛋白質及肽的核酸分子及序列。因此，本發明包含編碼以下AAV衣殼胺基酸序列之核酸序列及使用這些序列及/或其獨特片段產生的人工AAV衣殼蛋白。

製造具有本發明衣殼蛋白之AAV

【0078】 本發明包括AAV衣殼蛋白序列及編碼這些蛋白質之核酸，其不含自然界中與這些病毒相關的DNA及/或細胞材料。在另一態樣中，本發明提供利用本發明之新穎AAV序列，包含其片段的分子，用於產生可用於將異源基因或其他核酸序列遞送至目標細胞的分子。

【0079】 在另一態樣中，本發明提供利用本發明之AAV衣殼蛋白序列，包含其片段的分子，用於產生可用於將異源基因或其他核酸序列遞送至目標細胞的病毒載體。

【0080】 含有AAV衣殼核酸序列之本發明分子包含任何可被遞送至

宿主細胞的遺傳元件（載體），例如裸DNA、質體、噬菌體、轉位子、黏質體、游離基因體、在非病毒遞送媒劑（例如，基於脂質之載體）中之蛋白質、病毒等，其轉移其上攜帶的序列。所選擇的載體可以藉由任何適合方法遞送，包含轉染、電穿孔、脂質體遞送、膜融合技術、高速DNA包覆顆粒、病毒感染及原生質體融合。用於構築本發明任何實施例之方法為核酸操作領域的技術人員已知的，且包含基因工程、重組工程及合成技術。參見例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.。

【0081】 在一個實施例中，本發明載體至少含有編碼本發明AAV衣殼的序列或其片段。在另一實施例中，本發明載體至少含有編碼AAV rep蛋白之序列或其片段。視情況，此類載體可以含有AAV cap及rep蛋白。在提供AAV rep及cap之載體中，AAV rep及AAV cap序列可以具有相同的AAV血清型來源。或者，本發明提供這樣的載體，其中rep序列所來自的AAV血清型不同於提供cap序列之AAV血清型。在一個實施例中，rep及cap序列由分開的來源（例如，分開的載體或宿主細胞及載體）表現。在另一實施例中，這些rep序列框內融合至不同AAV血清型之cap序列，形成嵌合AAV載體。

【0082】 因此，在一個實施例中，本文所述之載體含有編碼胺基酸序列SEQ ID NO: 1-7中之任一者之完整AAV衣殼蛋白的核酸序列。在另一實施例中，可能期望將VP3蛋白之起始密碼子改為GTG。或者，rAAV可以含有本發明AAV衣殼蛋白中之一或多者的可變區中之一或多者，或其他片段。這些修飾可為增加表現、產量，及/或改善所選表現系統中之純化，或用於另一所期望的目的（例如，改變向性或改變中和抗體抗原決定

基)。

【0083】 本文所述之載體，例如質體，適用於多種目的，但是特別適用於製造含有包括AAV序列或其片段之衣殼的rAAV。這些載體，包含rAAV、其元件、構築及使用，詳述描述於本文中。

新穎衣殼蛋白之VP1

【0084】 從狒狒肝臟分離新穎AAV VP1衣殼蛋白。

【0085】 從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.45）之VP1序列如SEQ ID NO: 1（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 1之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 1之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANRQHQDNARGLVL
PGYKYLGPNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHAD
AEFQQRLATDTSFGGNLGKAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGKKRPLEKTP
NRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRALDFEDSGAGDGPPEGSSSGEMS
HDAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRTW
VLPTYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
NWGLRPKSMRVKIFNIQVREVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVMD
AGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDRNAFYCLEYFPSQMLR
TGNNFEISYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLN
QGTATTTYGKITTGDFAYYRKNWLPGACIKQQKFSKNASQNYKIPASGGDAL
LKYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSS
NNLLFTSEEEIATTNPRD TDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGMVW
QNRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNT

TFSAARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEHSKRWNPEVQFTSNYGTQNSML
WAPDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0086】從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.46）之VP1序列如SEQ ID NO: 2（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 2之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 2之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLV
LPGYKYLGPNGLDKGEVNEADAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHA
DAEFQQRLATDTSFGGNLKGAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGKKRPLEK
TPNRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRTLDFEDSGAGDGPPEGSSSGEM
SHDAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRT
WVLPTYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGCFDFNRFHCHFSPRDWQRLIN
NNWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVM
DAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDNRNAYCYCLEYFPSQML
RTGNNFEISYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLN
QGAATTTYGKITTGDFAYYRKNWLPGACIKQQKFSKNASQNYKIPASGGDAL
LKYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSS
NNLLFTSEEEIATTNPRD TDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGMVW
QNRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNT
TFSAARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEHSKRWNPEVQFTSNYGTQNSML
WAPDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0087】從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.47）之VP1序列如SEQ ID NO: 3（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變

區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 3之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 3之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLV
 LPGYKYLGPNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHA
 DAEFQQRLATDTSFGGNLGKAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGKKRPLEK
 TPNRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRTLDFEDSGAGDGPPEGSSSGEM
 SHDAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRT
 WVLPYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLIN
 NNWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVM
 DAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDRNAFYCLEYFPSQML
 RTGNNFEISYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLN
 QGTATTTYGKITTGDFAYYRKNWLPGACIKQQKFSKNASQNYKIPASGGDAL
 LKYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSS
 NNLLFTSEEEIATTNPRDITDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGMVW
 QNRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNT
 TFSAARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEHSKRWNPEVQFTSNYGTQNSML
 WAPDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0088】從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.48）之VP1序列如SEQ ID NO: 4（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 4之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 4之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLV
 LPGYKYLGPNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHA

DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGKKRPLEKT
 PNRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRTLDFEDSGAGDGPPEGSSSGEMS
 HDAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRTW
 VLPTYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCRFSPRDWQRLINN
 NWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVMD
 AGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDRNAFYCLEYFPSQMLR
 TGNNFEISYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLN
 QGTAITTYGKITTGDFAYYRKNWLPGACIKQKFSKNASQNYKIPASGGDAL
 LKYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSS
 NNLLFTSEEEIATTNPRD TDMFGQIADNNQNAATAPHIANLDAMGIVPGMVW
 QNRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNT
 TFS AARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEH SKRWNPEVQFTS NYGTQNSML
 WAPDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0089】從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.49）之VP1序列如SEQ ID NO: 5（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 5之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 5之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLV
 LPGYKYLGPNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHA
 DAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGKKRPLEKT
 PNRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRTLDFEDSGAGDGPPEGSSSGEMS
 HDAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRTW
 VLPTYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRLINN

NWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVMD
 AGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDRNAFYCLEYFPSQMLR
 TGNNFEISYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLN
 QGTAITTYGKITTGDFAYYRKNWLPGAGIKQQKFSKNASQNYKIPASGGDAL
 LKYDTHHTTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSS
 NNLLFTSEEEIATTNPRD TDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGMVW
 QNRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNT
 TFS AARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEHSKRWNPEVQFTS NYGTQNSML
 WAPDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0090】從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.50）之VP1序列如SEQ ID NO: 6（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 6之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 6之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSESIREWALKPGAPRPKANQQHQDDARGLVL
 PGYKYLPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHAD
 AEFQQRLATDTSFGGNL GKAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGRKRPLEKTP
 NRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRTLDFEDSGAGDGPPEGSSSGEMSH
 DAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRTWV
 LPTYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
 WGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVMDA
 GQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDRNAFYCLEYFPSQMLRT
 GNNFEISYQFEKVPLHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLNQ
 GTATTTYGKITTGDFAYYRKNWLPGACIKQQKFSKNASQNYKIPASGEDALL

KYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSSN
 NLLFTSEEEIATTNPRDMDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGMVWQ
 NRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNTTF
 SAARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEHSKRWNPEVQFTSNYGTQNSMLWA
 PDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0091】從狒狒分離之新穎AAV衣殼（表示為Bba.51）之VP1序列如SEQ ID NO: 7（胺基酸1-742）所示且在下表2中詳細說明相關的可變區及GBS及GH環區域之位置。VP2衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 7之胺基酸138-742且VP3衣殼蛋白跨越SEQ ID NO: 7之胺基酸206-742。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLV
 LPGYKYLGPNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDQQLKSGDNPYLKYNHA
 DAEFQQLATDTSFGGNLGKAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAPGKKRPLEK
 TPNRPTNPDSGKAPAKKKQKDGETADSARRTLDFEDSGAGDGPPEGSSSGEM
 SHDAEMRAAPGGNAVEAGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRT
 WVLPYNNHLYLRIGTTANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLIN
 NNWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSTYELPYVM
 DAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGENQNQTDNRNFAFYCLEYFPSQML
 RTGNNFEISYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLN
 QGTATTTYGKITTGDFAYYRKNWLPGACIKQKFSKNASQNYKIPASGGDAL
 LKYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFSNSQLIFAGPNQSGNTTTSS
 NLLFTSEEEIATTNPRDMDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGMVW
 QNRDIYYQGPIWAKVPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPNT
 TFSARINSFLTQYSTGQVAVQIDWEIQKEHSKRWNPEVQFTSNYGTQNSML

WAPDNAGNYHEPRAIGSRFLTHHL

【0092】 編碼以上所提及之衣殼蛋白的相應核酸序列為 SEQ ID NO:8/Bba.45 ; SEQ ID NO:9/Bba.46 ; SEQ ID NO:10/Bba.47 ; SEQ ID NO:11/Bba.48 ; SEQ ID NO:12/Bba.49 ; SEQ ID NO:13/Bba.50 ; 及 SEQ ID NO:14/Bba.51 。

【0093】 SEQ ID NO:8 (Bba.45)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACAGCCA
AGGCAAATCGACAACATCAAGACAACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTCCAGCAGCGCTTGGCGACCGACACCTCTTTTGGGGGCAACCTCGGCA
AGGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCGGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGGCACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCCCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGATGCTGAGATGCGTGCGGCGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCCTGCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATACT

TTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTTTCCCCACGCGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACACTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAATCT
TCAACATCCAGGTCAGGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGGTC
GCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGAA
CTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCCCC
AACGACGTGTTTATGGTTCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTGGA
GAAAACCAGAACCAAACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTACTT
TCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAATT
TGAAAAAGTTCCTTTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACA
GAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACCA
CTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAACAGCTACCACCACGTACGGGAAA
ATTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTACCTGGAGCC
TGCATTAAACAACAAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAAACTACAAGATT
CCCGCCAGCGGGGGAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATACCACTTTA
AATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCAGGT
GCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACCCAAT
CAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTCAGAA
GAGGAGATTGCCACAACAAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGACAGAT
TGCAGATAATAATCAAATGCCACCACCGCCCCTCACATCGCTAACCTGGA
CGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAACAGAGACATCTACTA
CCAGGGCCCTATTTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTTTCACC
CTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGCAGATTT
TCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCCAATACTACCTTTAGCGCTG

CAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCGGACAAGTCGCCGTTC
AGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATCCCGAA
GTCCAATTTACTTCAAACCTACGGCACTCAAATTTCTATGCTGTGGGCTCCC
GACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGTTTCCT
CACCCACCACTTGTA

【0094】 SEQ ID NO:9 (Bba.46)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACAGCCA
AGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTCCAGCAGCGCTTGGCGACCGACACCTCTTTTGGGGGCAACCTCGGCA
AGGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCCGGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGACACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCCCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGACGCTGAGATGCGTGCGGCGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCCTGCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATGC

TTTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTTTCCCCACGCGACTGGCAGCGA
CTCATCAACAACAACACTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAAT
CTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGG
TCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGA
ACTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCC
CCAACGACGTGTTTATGGTTCCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTG
GAGAAAACCAGAACCAAACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTAC
TTTCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAA
TTTGAAAAAGTTCCTTTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGAC
AGAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACC
ACTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAGCAGCTACCACCACGTACGGGAA
AATTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTGCCTGGAG
CCTGCATTAAACAACAAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAAACTACAAG
ATCCCCGCCAGCGGGGGAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATACTACT
TTAAATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCA
GGTGCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACC
CAATCAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTC
AGAAGAGGAGATTGCCACAACAAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGGA
CAGATTGCAGATAATAATCAAATGCCACCACCGCCCCTCACATCGCTAAC
CTGGACGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAAACAGAGACAT
CTACTACCAGGGCCCTATTTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTT
TCACCCTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGC
AGATTTTCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCCAATACTACCTTTAG

CGCTGCAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCGGACAAGTCGC
CGTTCAGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATC
CCGAAGTCCAATTTACTTCAAACACTACGGCACTCAAATTCTATGCTGTGGG
CTCCCGACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGT
TTCCTCACCCACCACTTGTA

【0095】 SEQ ID NO:10 (Bba.47)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACAGCCA
AGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTCCAGCAGCGCTTGGCGACCGACACCTCTTTTGGGGGCAACCTCGGCA
AGGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCCGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGACACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCTCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGATGCTGAGATGCGTGCGGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCTGCCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATACT

TTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTTTCCCCACGCGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACACTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAATCT
TCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGGTC
GCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGAA
CTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCCCC
AACGACGTGTTTATGGTTCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTGGA
GAAAACCAGAACCACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTACTT
TCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAATT
TGAAAAAGTTCCTTTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACA
GAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACCA
CTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAACAGCTACCACCACGTACGGGAAA
ATTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTGCCTGGAGC
CTGCATTAAACAACAAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAACTACAAGA
TTCCCGCCAGCGGGGGAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATAACCACTT
TAAATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCAG
GTGCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACCC
AATCAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTCA
GAAGAGGAGATTGCCACAACAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGGC
AGATTGCAGATAATAATCAAATGCCACCACCGCCCCTCACATCGCTAACC
TGGACGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAACAGAGACATCT
ACTACCAGGGCCCTATTTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTTT
CACCCTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGCA
GATTTTCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCCAATACTACCTTTAGC

GCTGCAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCGGACAAGTCGCC
G TTCAGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATCC
CGAAGTCCAATTTACTTCAAACCTACGGCACTCAA AATTCTATGCTGTGGGC
TCCCGACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGTT
TCCTCACCCACCACTTGTA A

【0096】 SEQ ID NO:11 (Bba.48)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACAGCCA
AGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTTCAGGAGCGTCTTCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGC
GAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCCGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGACACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCCCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGATGCTGAGATGCGTGCGGCGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCCTGCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATACT

TTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCGCTTTTCCCCGCGCGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACACTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAATCT
TCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGGTC
GCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGAA
CTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCCCC
AACGACGTGTTTATGGTTCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTGGA
GAAAACCAGAACCACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTACTT
TCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAATT
TGAAAAAGTTCCTTTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACA
GAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACCA
CTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAACAGCTATCACCACGTACGGGAAAA
TTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTGCCTGGAGCC
TGCATTAACAACAACAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAAACTACAAGATT
CCCGCCAGCGGGGGAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATACCACTTTA
AATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCAGGT
GCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACCCAAT
CAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTCAGAA
GAGGAGATTGCCACAACAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGACAGAT
TGCAGATAATAATCAAATGCCGCCACCGCCCCTCACATCGCTAACCTGGA
CGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAAACAGAGACATCTACTA
CCAGGGCCCTATTTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTTTCACC
CTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGCAGATTT
TCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCAATACTACCTTTAGCGCTG

CAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCGGACAAGTCGCCGTTC
AGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATCCCGAA
GTCCAATTTACTTCAAACCTACGGCACTCAAATTTCTATGCTGTGGGCTCCC
GACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGTTTCCT
CACCCACCACTTGTA

【0097】 SEQ ID NO:12 (Bba.49)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACAGCCA
AGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTTCAGGAGCGTCTTCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGC
GAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCCGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGACACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCCCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGATGCTGAGATGCGTGCGGCGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCCTGCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATACT

TTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTTTCCCCACGCGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACCTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAATCT
TCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGGTC
GCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGAA
CTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCCCC
AACGACGTGTTTATGGTTCCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTGGA
GAAAACCAGAACCACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTACTT
TCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAATT
TGAAAAAGTTCCTTTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACA
GAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACCA
CTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAACAGCTATCACCACGTACGGGAAAA
TTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTGCCTGGAGCC
GGCATTAAACAACAAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAAACTACAAGAT
TCCCGCCAGCGGGGGAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATACCACTTT
AAATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCAG
GTGCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACCC
AATCAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTCA
GAAGAGGAGATTGCCACAACAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGAC
AGATTGCAGATAATAATCAAATGCCACCACCGCCCCTCACATCGCTAACC
TGGACGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAACAGAGACATCT
ACTACCAGGGCCCTATTTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTTT
CACCCTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGCA
GATTTTCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCAATACTACCTTTAGC

GCTGCAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCGGACAAGTCGCC
G TTCAGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATCC
CGAAGTCCAATTTACTTCAAACCTACGGCACTCAA AATTCTATGCTGTGGGC
TCCCGACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGTT
TCCTCACCCACCACTTGTA A

【0098】 SEQ ID NO:13 (Bba.50)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAAGCATTGCGGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACGGCCCA
AGGCAAATCAACAACATCAAGACGACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTCCAGCAGCGCTTGGCGACCGACACCTCTTTTGGGGGCAACCTCGGCA
AGGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAGGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCCGGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGACACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCCCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGATGCTGAGATGCGTGCGGCGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCCTGCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATACT

TTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTTTCCCCACGCGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACCTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAATCT
TCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGGTC
GCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGAA
CTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCCCC
AACGACGTGTTTATGGTTCCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTGGA
GAAAACCAGAACCACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTACTT
TCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAATT
TGAAAAAGTTCCTCTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACA
GAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACCA
CTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAACAGCTACCACCACGTACGGGAAA
ATTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTGCCTGGAGC
CTGCATTAAACAACAAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAACTACAAGA
TTCCCGCCAGCGGGGAAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATAACCACTT
TAAATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCAG
GTGCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACCC
AATCAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTCA
GAAGAGGAGATTGCCACAACAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGAC
AGATTGCAGATAATAATCAAATGCCACCACCGCCCCTCACATCGCTAACC
TGGACGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAAACAGAGACATCT
ACTACCAGGGCCCTATCTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTTT
CACCCTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGCA
GATTTTCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCAATACTACCTTTAGC

GCTGCAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCGGACAAGTCGCC
G TTCAGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATCC
CGAAGTCCAATTTACTTCAAACCTACGGCACTCAA AATTCTATGCTGTGGGC
TCCCGACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGTT
TCCTCACCCACCACTTGTA A

【0099】 SEQ ID NO:14 (Bba.51)

ATGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCT
GAAGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCACAGCCA
AGGCAAATCAACAACATCAAGACAACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGT
TACAAATACTTGGGACCCGGTAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAA
CGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAG
CTCAAGTCGGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGGACGCCGA
GTTCCAGCAGCGCTTGGCGACCGACACCTCTTTTGGGGGCAACCTCGGCA
AGGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATTCTCGAGCCTCTGGGTCTGGTT
GAAGAGGGCGTTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAACGCCATTAGAAAAGA
CTCCAAATCGGCCGACCAACCCGGACTCTGGGAAGGCCCCCGGCCAAGAA
AAAGCAAAAAGACGGCGAGACAGCCGACTCTGCTAGAAGGACACTCGAC
TTTGAAGACTCTGGAGCAGGAGACGGACCCCCTGAGGGATCATCTTCCGG
AGAAATGTCTCATGATGCTGAGATGCGTGCGGCGCCAGGCGGAAATGCTG
TCGAGGCGGGACAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCCGGTGATTGG
CATTGCGATTCCACCTGGTCAGAGGGCCGAGTCACCACCACCAGCACCCG
AACCTGGGTCCTGCCACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGAATCGGAA
CAACGGCCAACAGCAACACCTACAATGGATTCTCCACCCCCTGGGGATACT

TTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTTTCCCCACGCGACTGGCAGCGAC
TCATCAACAACAACACTGGGGACTCAGGCCGAAATCGATGCGTGTTAAAATCT
TCAACATCCAGGTCAAGGAGGTCACTACGTCAAACGGCGAGACTACGGTC
GCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGATTCAACGTATGAA
CTCCCATACGTGATGGACGCCGGTCAGGAGGGGAGCCTTCCTCCGTTCCCC
AACGACGTGTTTATGGTTCCCAATACGGGTACTGCGGAGTCGTCACTGGA
GAAAACCAGAACCACAGACAGAAATGCCTTTTACTGTCTGGAGTACTT
TCCATCCCAAATGCTAAGAACTGGCAACAACCTTTGAAATCAGTTACCAATT
TGAAAAAGTTCCTTTCCATTCAATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACA
GAATGATGAATCCTTTGCTGGATCAGTACCTGTGGCATCTGCAATCGACCA
CTACCGGAAATTCCCTTAATCAAGGAACAGCTACCACCACGTACGGGAAA
ATTACCACTGGGGACTTTGCCTACTACAGGAAAAACTGGTTGCCTGGAGC
CTGCATTAACAACA AAAAATTTTCAAAGAATGCCAGTCAAACTACAAGA
TTCCCGCCAGCGGGGGAGACGCCCTTTTAAAGTATGACACGCATAACCACTT
TAAATGGGCGATGGAGTAACATGGCTCCTGGTCCTCCAATGGCCACCGCAG
GTGCCGGGGACTCGGATTTTAGCAACAGCCAGCTGATCTTTGCCGGACCC
AATCAGAGCGGTAACACGACCACGTCTTCAAACAATTTGTTGTTTACCTCA
GAAGAGGAGATTGCCACAACAACCCACGAGACACGGACATGTTTGGAC
AGATTGCAGATAATAATCAAATGCCACCACCGCCCCTCACATCGCTAACC
TGGACGCTATGGGAATTGTTCCCGGAATGGTCTGGCAAACAGAGACATCT
ACTACCAGGGCCCTATTTGGGCCAAGGTCCCTCACACGGACGGACACTTT
CACCCTTCGCCGCTGATGGGAGGATTTGGACTGAAACACCCGCCTCCGCA
GATTTTCATCAAAAACACCCCCGTACCCGCCAATCCAATACTACCTTTAGC

GCTGCAAGGATCAATTCTTTTTTGACGCAGTACAGCACCCGGACAAGTCGCC
 GTTCAGATCGACTGGGAAATTCAGAAGGAGCACTCCAAACGCTGGAATCC
 CGAAGTCCAATTTACTTCAAACACTACGGCACTCAAATTTCTATGCTGTGGGC
 TCCCGACAACGCCGGCAACTACCACGAACCCCGGGCTATTGGGTCCCGTT
 TCCTCACCCACCACTTGTA

【0100】在緊接在下面的表2中，「VR」係指可變區且數字係指各可變區或GBS及GH環區域在胺基酸序列中所跨越的胺基酸殘基。

表2

AAV	VRI	VRII	VRIII	VRIV	GBS	VRV	VRVI	VRVII
AAVBba.45	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564
AAVBba.46	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564
AAVBba.47	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564
AAVBba.48	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564
AAVBba.49	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564
AAVBba.50	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564
AAVBba.51	265-269	325-330	381-386	452-462	468-478	490-512	534-544	550-564

轉基因

【0101】轉基因係側接有所述轉基因之載體序列的異源核酸序列，其編碼感興趣的多肽、蛋白質或其他產物。核酸編碼序列與調節組分以允許轉基因在宿主細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式可操作地連接。

【0102】轉基因序列之組成將視所得載體之用途而定。例如，一種類型的轉基因序列包含報導序列，其在表現時產生可偵測信號。此類報導序列包含但不限於編碼以下之DNA序列：β-內醯胺酶、β-半乳糖苷酶（LacZ）、鹼性磷酸酶、胸苷激酶、綠色螢光蛋白（GFP）、氯黴素乙醯轉移酶（CAT）、螢光素酶、膜結合蛋白，包含例如CD2、CD4、CD8、流感血球凝集素蛋白及本領域中熟知之其他存在或可以藉由習知方法產生針對其之高親和力抗體的物質，及融合蛋白，包括與尤其來自血球凝集素或Myc之抗原標籤結構域適當融合的膜結合蛋白。

【0103】 這些編碼序列在與驅動其表現之調節元件相關時，提供可藉由習知方法偵測之信號，習知方法包含酶性、放射照相、比色、螢光或其他光譜分析、螢光活化細胞分選分析及免疫分析，包含酶聯免疫吸附分析（ELISA）、放射免疫分析（RIA）及免疫組織化學。例如，在標記序列為LacZ基因的情況下，藉由針對 β -半乳糖苷酶活性之分析來偵測攜帶信號之載體的存在。在轉基因為綠色螢光蛋白或螢光素酶的情況下，攜帶信號之載體可以藉由顏色或光產生而在光度計中目測量測。

【0104】 然而，理想地，轉基因為編碼可用於生物學及醫學中之產物的非標記序列，諸如蛋白質、肽、RNA、酶、顯性負突變體或催化性RNA。所期望的RNA分子包含tRNA、dsRNA、核糖體RNA、催化性RNA、siRNA、小髮夾RNA、反式剪接RNA及反義RNA。有用的RNA序列之一個實例為抑制或消除靶向核酸序列在經處理動物中之表現的序列。通常，適合的目標序列包含致癌性目標及病毒性疾病。對於此類目標之實例，參見下文在與免疫原相關之部分中鑑定的致癌性目標及病毒。

【0105】 轉基因可用於校正或改善基因缺陷，基因缺陷可以包含正常基因之表現量低於正常表現量的缺陷或功能基因產物未表現的缺陷。較佳類型之轉基因序列編碼在宿主細胞中表現之治療性蛋白質或多肽。本發明進一步包含使用多個轉基因，例如以校正或改善由多次單元蛋白質引起的基因缺陷。在某些情況下，可以使用不同的轉基因編碼蛋白質之各次單元，或編碼不同的肽或蛋白質。當編碼蛋白質次單元之DNA的大小很大時，例如對於免疫球蛋白、血小板衍生生長因子或肌肉萎縮蛋白，這是所期望的。為了使細胞產生多次單元蛋白質，用含有不同次單元中之每一者的重組病毒感染細胞。或者，可以由同一個轉基因編碼蛋白質之不同次單

元。在此情況下，單個轉基因包含編碼次單元中之每一者的DNA，各次單元之DNA由內部核糖核酸酶進入位點（IRES）隔開。當編碼所述次單元中之每一者的DNA的大小很小時，例如，編碼次單元之DNA及IRES的總的大小小於五千鹼基，這是所期望的。作為IRES之替代方案，DNA可以由編碼2A肽之序列隔開，所述肽在轉譯後事件中自切割。參見例如 Donnelly 等人, *J. Gen. Virol.*, 78(Pt 1):13-21 (1997年1月)；Furler 等人, *Gene Ther.*, 8(11):864-873 (2001年6月)；Klump 等人, *Gene Ther.*, 8(10):811-817 (2001年5月)。此2A肽顯著地小於IRES，這使其非常適合在空間為限制因素時使用。更常見的是，當轉基因很大，由多個次單元組成，或兩個轉基因共同遞送時，攜帶所期望的轉基因或次單元之rAAV共同投與以允許其在活體內多連體化（concatamerize），形成單個載體基因組。在此類實施例中，第一AAV可以攜帶表現單個轉基因之表現卡匣且第二AAV可以攜帶表現不同轉基因以在宿主細胞中共表現之表現卡匣。然而，所選擇的轉基因可以編碼任何生物活性產物或其他產物，例如研究所需的產物。

【0106】 適合的轉基因可以由本領域熟習此項技術者容易地選擇。不認為轉基因之選擇是對本發明之限制。

【0107】 在一些實施例中，轉基因為異源蛋白質，且此異源蛋白質為治療性蛋白質。例示性治療性蛋白質包含但不限於血液因子，諸如β-球蛋白、血紅蛋白、組織纖維蛋白溶酶原活化劑及凝血因子；群落刺激因子（CSF）；介白素，諸如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9等；生長因子，諸如角質細胞生長因子（KGF）、幹細胞因子（SCF）、纖維母細胞生長因子（FGF，諸如鹼性FGF及酸性FGF）、肝細

胞生長因子 (HGF)、似胰島素生長因子 (IGF)、骨成形性蛋白質 (BMP)、表皮生長因子 (EGF)、生長分化因子-9 (GDF-9)、肝細胞瘤衍生生長因子 (HDGF)、肌肉抑制素 (GDF-8)、神經生長因子 (NGF)、神經滋養素、血小板衍生生長因子 (PDGF)、血小板生成素 (TPO)、轉形生長因子 α (TGF- α .)、轉形生長因子 β (TGF- β .) 及類似物；可溶性受體，諸如可溶性TNF- α .受體、可溶性VEGF受體、可溶性介白素受體 (例如，可溶性IL-1受體及可溶性II型IL-1受體)、可溶性 γ/δ T細胞受體、可溶性受體之配體結合片段及類似物；酶，諸如 α -葡萄糖苷酶、伊米苷酶、 β -葡萄糖腦苷酶及阿糖腦苷酶；酶活化劑，諸如組織纖維蛋白溶酶原活化劑；趨化因子，諸如IP-10、由干擾素- γ 誘導之單核因子 (Mig)、Gro α /IL-8、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β .、MCP-1、PF-4及類似物；血管生成劑，諸如血管內皮生長因子 (VEGF，例如VEGF121、VEGF165、VEGF-C、VEGF-2)、神經膠質瘤衍生生長因子、血管生成素、血管生成素-2及類似物；抗血管生成劑，諸如可溶性VEGF受體；蛋白質疫苗；神經活性肽，諸如神經生長因子 (NGF)、緩激肽、膽囊收縮素、胃泌素、胰泌素、催產素、促性腺激素釋放激素、 β -腦內啡、腦啡肽、P物質、生長抑素、催乳素、甘丙胺素、生長激素釋放激素、鈴蟾素、強啡肽、華法林、神經調壓素、腸動素、促甲狀腺素、神經肽Y、黃體成長激素、降血鈣素、胰島素、升糖素、血管加壓素、血管收縮素II、促甲狀腺素釋放激素、血管活性腸肽、睡眠肽及類似物；血栓溶解劑；心房利鈉肽；鬆弛素；膠質原纖維酸性蛋白；激濾泡素 (FSH)；人類 α -1抗胰蛋白酶；白血病抑制因子 (LIF)；組織因子、黃體成長激素；巨噬細胞活化因子；腫瘤壞死因子 (TNF)；嗜中性白血球趨化因子 (NCF)；金屬

蛋白酶之組織抑制劑；血管活性腸肽；血管生成素；促血管素；纖維蛋白；水蛭素；IL-1受體拮抗劑；及類似物。感興趣的蛋白質之一些其他非限制性實例包含睫狀神經滋養因子（CNTF）；大腦衍生神經滋養因子（BDNF）；神經滋養素3及4/5（NT-3及4/5）；神經膠細胞衍生神經滋養因子（GDNF）；芳族胺基酸去羧酶（AADC）；血友病相關的凝血蛋白，諸如因子VIII、因子IX、因子X；肌肉萎縮蛋白、迷你肌肉萎縮蛋白或微小肌肉萎縮蛋白；溶酶體酸性脂肪酶；苯丙胺酸羥化酶（PAH）；肝糖貯積病相關酶，諸如葡萄糖-6-磷酸酶、酸性麥芽糖酶、糖原去分支酶、肌糖原磷酸化酶、肝糖原磷酸化酶、肌肉磷酸果糖激酶、磷酸化酶激酶（例如，PHKA2）、葡萄糖運輸蛋白（例如，GLUT2）、醛縮酶A、 β -烯醇酶及糖原合成酶；溶酶體酶（例如， β -N-乙醯基己糖胺酶A）；及其任何變體。

調節控制元件

【0108】 AAV載體亦包含習知控制元件或序列，其以允許其在用質體載體轉染或用由本發明產生之病毒感染的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與轉基因可操作地連接。如本文所用，「可操作地連接」之序列包含與感興趣的基因相鄰之表現控制序列及以反式起作用或在一定距離起作用以控制感興趣的基因的表現控制序列。

【0109】 表現控制序列包含適當的轉錄起始、終止、啟動子及強化子序列；有效RNA加工信號，諸如剪接及多腺苷酸化（polyA）信號；使細胞質mRNA穩定之序列；增強轉譯效率之序列（亦即，Kozak共同序列）；增強蛋白質穩定性之序列；及必要時，增強經編碼產物之分泌的序列。本領域中已知且可採用大量表現控制序列，包含天然的、組成型、誘

導型及/或組織特異性的啟動子。

【0110】組成型啟動子之實例包含但不限於逆轉錄病毒勞斯肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus, RSV) LTR啟動子 (視情況含有RSV強化子)、巨細胞病毒 (CMV) 啟動子 (視情況含有CMV強化子) (參見例如 Boshart等人, Cell, 41:521-530 (1985))、SV40啟動子、二氫葉酸還原酶啟動子、 β -肌動蛋白啟動子、磷酸甘油激酶 (PGK) 啟動子及EF1啟動子 [Invitrogen]。誘導型啟動子允許基因表現之調節且可以藉由以下調節：外源提供之化合物；環境因素，諸如溫度；或特定生理狀態之存在，例如急性期，特定細胞分化狀態之存在，或僅存在於複製細胞中。誘導型啟動子及誘導型系統可從多種商業來源得到，包含但不限於Invitrogen、Clontech及Ariad。已描述多個其他系統且其可以由本領域熟習此項技術者容易地選擇。由外源提供之化合物調節的誘導型啟動子之實例包含鋅誘導型綿羊金屬硫蛋白 (MT) 啟動子、地塞米松 (dexamethasone, Dex) 誘導型小鼠乳腺腫瘤病毒 (MMTV) 啟動子、T7聚合酶啟動子系統[WO 98/10088]；蛻皮激素昆蟲啟動子[No等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)]、四環素可抑系統[Gossen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)]、四環素誘導型系統[Gossen等人, Science, 268:1766-1769 (1995)，亦參見Harvey等人, Curr.Opin.Chem. Biol., 2:512-518 (1998)]、RU486誘導型系統[Wang等人, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)及Wang等人, Gene Ther., 4:432-441 (1997)]及雷帕黴素 (rapamycin) 誘導型系統[Magari等人, J. Clin.Invest., 100:2865-2872 (1997)]。可用於此背景下的其他類型的誘導型啟動子為受特定生理狀態調節的啟動子，例如溫度、急性期、特定細胞分化狀態或僅在複製細胞

中。

【0111】 在另一實施例中，將使用轉基因之天然啟動子。當期望轉基因之表現應該模擬天然表現時，天然啟動子係較佳的。當轉基因之表現必須在時間上或發育上，或以組織特異性方式，或響應於特定轉錄刺激調節時，可以使用天然啟動子。在另一實施例中，其他天然表現控制元件，諸如強化子元件、多腺苷酸化位點或Kozak共同序列，亦可用於模擬天然表現。

【0112】 轉基因之另一實施例包含與組織特異性啟動子可操作地連接的基因。例如，若骨骼肌中之表現為所期望的，則應使用在肌肉中有活性的啟動子。這些啟動子包含來自編碼骨骼 β -肌動蛋白、肌凝蛋白輕鏈2A、肌肉萎縮蛋白、肌肉肌酸激酶之基因的啟動子，以及活性高於天然產生之啟動子的合成肌肉啟動子（參見Li等人, *Nat. Biotech.*, 17:241-245 (1999)）。已知針對以下組織的組織特異性啟動子之實例：肝臟（白蛋白，Miyatake等人, *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997)；B型肝炎病毒核心啟動子，Sandig等人, *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996)； α -胎蛋白（AFP），Arbuthnot等人, *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)）、骨質鈣化素（Stein等人, *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)）；骨唾液蛋白（Chen等人, *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)）、淋巴細胞（CD2，Hansal等人, *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998)；免疫球蛋白重鏈；T細胞受體鏈）、神經元，諸如神經元特異性烯醇酶（NSE）啟動子（Andersen等人, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)）、神經絲輕鏈基因（Piccioli等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)）及神經元特異性vgf基因（Piccioli等人, *Neuron*, 15:373-84 (1995)）以及其他。

【0113】視情況，攜帶治療上有用的轉基因的質體亦可以包含可選擇的標記或報導基因尤其可以包含編碼遺傳黴素（geneticin）、潮黴素（hygromycin）或嘌呤黴素（purimycin）抗性的序列。此類可選擇的報導或標記基因（較佳位於待藉由本發明方法拯救之病毒基因組的外部）可用於用信號表示在細菌細胞中存在質體，諸如胺苄青黴素（ampicillin）抗性。質體之其他組分可以包含複製起點。這些及其他啟動子及載體元件的選擇為習知的且可獲得多個此類序列[參見例如Sambrook等人及其中所引用之參考文獻]。

重組AAV之製造方法

【0114】本揭示案提供在昆蟲或哺乳動物細胞中產生重組AAV之材料及方法。在一些實施例中，病毒構築體進一步包括啟動子及啟動子下游之限制位點以允許插入編碼一或多種感興趣的蛋白質之多核苷酸，其中啟動子及限制位點位於5' AAV ITR下游及3' AAV ITR上游。在一些實施例中，病毒構築體進一步包括在限制位點下游及3' AAV ITR上游之轉錄後調節元件。在一些實施例中，病毒構築體進一步包括插入於限制位點處且與啟動子可操作地連接之多核苷酸，其中多核苷酸包括感興趣的蛋白質之編碼區。如本領域熟習此項技術者將瞭解，本申請案中所揭示之AAV載體中之任一者可作為病毒構築體用於所述方法中以產生重組AAV。

【0115】在一些實施例中，輔助功能由包括腺病毒或桿狀病毒輔助基因之一或多個輔助質體或輔助病毒提供。腺病毒或桿狀病毒輔助基因之非限制性實例包含但不限於E1A、E1B、E2A、E4及VA，其可為AAV包裝提供輔助功能。

【0116】AAV之輔助病毒為本領域中已知的且包含例如來自腺病毒

科及疱疹病毒科之病毒。AAV之輔助病毒之實例包含但不限於美國公開案第20110201088號（其揭示內容以引用的方式併入本文中）中所述之SAdV-13輔助病毒及類SAdV-13輔助病毒、輔助載體pHELP（Applied Viromics）。本領域熟習此項技術者將瞭解，本文中可使用任何可為AAV提供足夠輔助功能的AAV之輔助病毒或輔助質體。

【0117】 在一些實施例中，AAV cap基因存在於質體中。質體可以進一步包括AAV rep基因。本文中可使用來自任何AAV血清型（包含但不限於AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13及其任何變體）之cap基因及/或rep基因以產生重組AAV。在一些實施例中，AAV cap基因編碼來自血清型1、血清型2、血清型4、血清型5、血清型6、血清型7、血清型8、血清型9、血清型10、血清型11、血清型12、血清型13或其變體之衣殼。

【0118】 在一些實施例中，昆蟲或哺乳動物細胞可以用輔助質體或輔助病毒、病毒構築體及編碼AAV cap基因之質體轉染；且重組AAV病毒可以在共轉染之後的各個時間點收集。例如，重組AAV病毒可以在共轉染之後約12小時、約24小時、約36小時、約48小時、約72小時、約96小時、約120小時或其中任何兩個時間點之間的時間收集。

【0119】 重組AAV亦可以使用本領域中已知適合產生感染性重組AAV之任何習知方法產生。在一些情況下，重組AAV可以使用穩定表現用於AAV顆粒產生之必需組分中之一些的昆蟲或哺乳動物細胞產生。例如，包括AAV rep及cap基因之質體（或多個質體），及可選標記，諸如新黴素（neomycin）抗性基因，可以整合至細胞之基因組中。昆蟲或哺乳動物細胞隨後可以用輔助病毒（例如，提供輔助功能之腺病毒或桿狀病

毒)及包括5'及3' AAV ITR (以及必要時, 編碼異源蛋白質之核苷酸序列)之病毒載體共感染。此方法之優點為細胞為可選的且適合於大規模產生重組AAV。作為另一非限制性實例, 可以使用腺病毒或桿狀病毒而非質體, 將rep及cap基因引入包裝細胞中。作為又一非限制性實例, 含有5'及3' AAV LTR之病毒載體及rep-cap基因均可以穩定整合於生產細胞之DNA中, 且輔助功能可以由野生型腺病毒提供以產生重組AAV。

AAV生產中所用之細胞類型

【0120】 包括本發明之AAV載體之病毒顆粒可以使用任何允許產生AAV或生物產物且可維持於培養物中之無脊椎動物細胞類型產生。例如, 所用之昆蟲細胞株可以來自草地黏蟲 (*Spodoptera frugiperda*), 諸如Sf9、SF21、SF900+; 果蠅細胞株; 蚊子細胞株, 例如白蚊伊蚊 (*Aedes albopictus*) 衍生之細胞株; 家蠶細胞株, 例如家蠶 (*Bombyxmori*) 細胞株; 粉紋夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 細胞株, 諸如High Five細胞; 或鱗翅目細胞株, 諸如黑巫婆飛蛾 (*Ascalapha odorata*) 細胞株。較佳的昆蟲細胞為來自易受桿狀病毒感染之昆蟲物種的細胞, 包含High Five、Sf9、Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、BM-N、Ha2302、Hz2E5及Ao38。

【0121】 桿狀病毒為節肢動物之包膜DNA病毒, 其兩個成員為用於在細胞培養物中產生重組蛋白之熟知表現載體。桿狀病毒具有環狀雙股基因組 (80-200 kbp), 其可經工程改造以允許將大基因組內含物遞送至特定細胞。用作載體之病毒通常為加州苜蓿夜蛾多衣殼核多角體病毒 (AcMNPV) 或家蠶 (Bm-NPV) (Kato等人, 2010)。

【0122】 桿狀病毒常用於感染昆蟲細胞以表現重組蛋白。特定而

言，異源基因於昆蟲中之表現可如以下各者中所述實現：例如美國專利第4,745,051號；Friesen等人 (1986)；EP 127,839；EP 155,476；Vlak等人 (1988)；Miller等人 (1988)；Carbonell等人 (1988)；Maeda等人 (1985)；Lebacq-Verheyden等人 (1988)；Smith等人 (1985)；Miyajima等人 (1987)；及Martin等人 (1988)。可用於產生蛋白質的多種桿狀病毒株及變體以及相應允許的昆蟲宿主細胞描述於Luckow等人 (1988)；Miller米勒 (1986)；Maeda等人 (1985)；及McKenna (1989)中。

【0123】 在本發明之另一態樣中，亦藉由允許複製AAV或產生生物產物且可維持於培養物中之任何哺乳動物細胞類型進行本發明之方法。所用的較佳哺乳動物細胞可以為HEK293、HeLa、CHO、NS0、SP2/0、PER.C6、Vero、RD、BHK、HT 1080、A549、Cos-7、ARPE-19及MRC-5細胞。

在活體外產生異源蛋白質

【0124】 作為非限制性實例，本文中所揭示之重組AAV可用於在活體外，例如在細胞培養物中產生感興趣的蛋白質。作為一個非限制性實例，在一些實施例中，一種用於在活體外產生感興趣的蛋白質的方法，其中所述方法包含：提供重組AAV，其包括編碼異源蛋白質之核苷酸序列；及使重組AAV與細胞培養物中之細胞接觸，藉此，重組AAV在細胞中表現感興趣的蛋白質。編碼感興趣的蛋白質之核苷酸序列的大小可以變化。例如，核苷酸序列可為至少約1.4 kb、至少約1.5 kb、至少約1.6 kb、至少約1.7 kb、至少約1.8 kb、至少約2.0 kb、至少約2.2 kb、至少約2.4 kb、至少約2.6 kb、至少約2.8 kb、至少約3.0 kb、至少約3.2 kb、至少約3.4 kb、長度至少約3.5 kb、長度至少約4.0 kb、長度至少約5.0 kb、長度

至少約6.0 kb、長度至少約7.0 kb、長度至少約8.0 kb、長度至少約9.0 kb或長度至少約10.0 kb。在一些實施例中，核苷酸長度為至少約1.4 kb。

在活體內產生異源蛋白質

【0125】 本文中所揭示之重組AAV可用於在活體內，例如在諸如哺乳動物之動物中產生感興趣的蛋白質。一些實施例提供一種用於在活體內產生感興趣的蛋白質的方法，其中所述方法包含：提供重組AAV，其包括編碼感興趣的蛋白質之核苷酸序列；及向個體投與重組AAV，藉此，重組AAV在個體中表現感興趣的蛋白質。在一些實施例中，個體可為非人類哺乳動物，例如猴、狗、貓、小鼠或牛。編碼感興趣的蛋白質之核苷酸序列的大小可以變化。例如，核苷酸序列可為至少約1.4 kb、至少約1.5 kb、至少約1.6 kb、至少約1.7 kb、至少約1.8 kb、至少約2.0 kb、至少約2.2 kb、至少約2.4 kb、至少約2.6 kb、至少約2.8 kb、至少約3.0 kb、至少約3.2 kb、至少約3.4 kb、長度至少約3.5 kb、長度至少約4.0 kb、長度至少約5.0 kb、長度至少約6.0 kb、長度至少約7.0 kb、長度至少約8.0 kb、長度至少約9.0 kb或長度至少約10.0 kb。在一些實施例中，核苷酸長度為至少約1.4 kb。

治療用途

【0126】 藉由所述方法產生之重組AAV可用於表現一或多種治療性蛋白質以治療各種疾病或病症。疾病之非限制性實例包含癌症，諸如癌瘤、肉瘤、白血病、淋巴瘤；及自體免疫疾病，諸如多發性硬化症。癌瘤之非限制性實例包含食道癌；肝細胞癌；基底細胞癌；鱗狀細胞癌（各種組織）；膀胱癌，包含移行細胞癌；支氣管癌；結腸癌；結腸直腸癌；胃癌；肺癌，包含小細胞肺癌及非小細胞肺癌；腎上腺皮質癌；甲狀腺癌；

胰臟癌；乳癌；卵巢癌；前列腺癌；腺癌；汗腺癌；皮脂腺癌；乳頭狀癌；乳頭狀腺癌；囊腺癌；髓質癌；腎細胞癌；乳腺管原位癌或膽管癌；絨膜癌；精細胞癌；胚胎性癌；威爾姆斯瘤（Wilm's tumor）；子宮頸癌；子宮癌；睪丸癌；骨原性癌；上皮癌；及鼻咽癌。肉瘤之非限制性實例包含纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、脊索瘤、骨原性肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏肉瘤（Ewing's sarcoma）、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤及其他軟組織肉瘤。實體腫瘤之非限制性實例包含神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤。白血病之非限制性實例包含慢性骨髓增生性症候群；急性骨髓性白血病；慢性淋巴球性白血病，包含B細胞CLL、T細胞CLL、前淋巴球性白血病及毛細胞白血病；及急性淋巴母細胞性白血病。淋巴瘤之實例包含但不限於B細胞淋巴瘤，諸如伯基特氏淋巴瘤（Burkitt's lymphoma）；霍奇金氏淋巴瘤（Hodgkin's lymphoma）；及類似淋巴瘤。可以使用本文中所揭示之AAV載體、重組病毒及方法治療之疾病的其他非限制性實例包含遺傳病症，包含鎌狀細胞貧血、囊腫性纖維化、溶酶體酸性脂肪酶（LAL）缺乏症I、泰-薩克斯病（Tay-Sachs disease）、苯丙酮尿症、黏多醣貯積症、肝糖貯積症（GSD，例如GSD類型I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII及XIV）、半乳糖血症、肌肉萎縮症（例如，杜興氏肌肉萎縮症（Duchenne muscular dystrophy））及血友病，諸如A型血友病（經典血友病）及B型血友病（克里斯多氏症（Christmas Disease））、威爾森氏病（Wilson's

disease)、法布瑞氏症 (Fabry Disease)、高雪氏症 (Gaucher Disease)、遺傳性血管性水腫 (HAE) 及 α 1抗胰蛋白酶缺乏症。另外，本文中所揭示之AAV載體、重組病毒及方法可用於其他病症，其可以藉由轉基因在肝臟中之局部表現或藉由從肝臟或肝細胞表現分泌蛋白質來治療。

【0127】 在個體 (例如，個體之血清) 中表現之異源蛋白質之量可以變化。例如，在一些實施例中，蛋白質可以按以下量在個體之血清中表現：至少約9 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約10 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約50 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約100 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約200 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約300 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約400 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約500 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約600 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約700 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約800 $\mu\text{g/ml}$ 、至少約900 $\mu\text{g/ml}$ 或至少約1000 $\mu\text{g/ml}$ 。在一些實施例中，感興趣的蛋白質在個體之血清中按以下量表現：約9 $\mu\text{g/ml}$ 、約10 $\mu\text{g/ml}$ 、約50 $\mu\text{g/ml}$ 、約100 $\mu\text{g/ml}$ 、約200 $\mu\text{g/ml}$ 、約300 $\mu\text{g/ml}$ 、約400 $\mu\text{g/ml}$ 、約500 $\mu\text{g/ml}$ 、約600 $\mu\text{g/ml}$ 、約700 $\mu\text{g/ml}$ 、約800 $\mu\text{g/ml}$ 、約900 $\mu\text{g/ml}$ 、約1000 $\mu\text{g/ml}$ 、約1500 $\mu\text{g/ml}$ 、約2000 $\mu\text{g/ml}$ 、約2500 $\mu\text{g/ml}$ 或介於這些值中任何兩個之間的範圍。熟習此項技術者將理解，要使所述方法有效所需的感興趣的蛋白質的表現量可以視非限制性因素而變化，諸如特定的感興趣的蛋白質及接受治療之個體，且蛋白質之有效量可以容易地由熟習此項技術者使用本領域中已知的習知方法確定而無需過多的實驗。

實例

實例1

分離新穎的天然產生之衣殼蛋白

【0128】 從狒狒肝臟分離新穎的天然產生之衣殼蛋白。從Texas Biomedical或New England Primate Research Center獲得冷凍的肝臟組

織。使用DNeasy血液與組織套組（Qiagen目錄號69504），由肝臟組織製備基因組DNA。

【0129】使用以下引子：引子 rep-1397-F（5'-GTGCCCTTTTACGGCTGCGTGA ACTGGACCAATGAAA ACTTTCC-3' SEQ ID NO:21）及引子 cap-2872-R（5'-CCGACGGAGTGGGCAATGCCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCC-3' SEQ ID NO:22），在以下條件下：初始培育：97°C，120秒；變性步驟：97°C，15秒；黏接步驟：58°C、60°C或62°C，15秒；延伸步驟：72°C，240秒，對基因組DNA進行聚合酶鏈反應（PCR）。變性、黏接及延伸步驟進行35個循環。隨後將反應在72°C下培育7分鐘且在4°C下儲存直至分析。PCR產物藉由在1%瓊脂糖凝膠上電泳分離，根據製造商之說明書，使用凝膠提取套組（Qiagen目錄號28704）分離，且選殖至pCR4-TOPO-TA（Invitrogen目錄號450030）中。在大腸桿菌（E. coli）NEB5 α 細胞之轉形後，由胺苄青黴素抗性群落製備DNA且從兩端對其定序以判定插入物是否編碼AAV相關序列。

【0130】若pCR4-TOPO TA中之插入物與AAV序列相關，則針對序列之rep部分設計序列特異性引子以進行「圍繞游離基因體PCR」（下文「ATE PCR」），獲得完整的衣殼基因。ATE PCR係基於以下觀點：持久的AAV基因組在動物組織中形成環狀游離基因體。因此，可以使用與rep基因中之序列對應的一組「發散」引子來進行聚合酶鏈反應以分離可能存在於所述游離基因體中的任何AAV序列中之大部分或所有，但特別是，可以分離完整的連續衣殼基因。游離基因體之多聚體可以例如藉由同源重組形成，且在此情況下，有可能從單個ATE PCR反應分離出超過一個衣殼

基因（其通常不相同）。

【0131】 在標準聚合酶鏈反應儀器中使用2步驟方案如下進行ATE PCR：初始培育：95°C，240秒；變性步驟：95°C，30秒黏接/延伸步驟：72°C，300秒。變性及組合黏接/延伸步驟進行40個循環。隨後將反應在72°C下培育7分鐘且在4°C下儲存直至分析。將PCR產物在1%瓊脂糖凝膠上電泳。從凝膠切下AAV基因組之多聚體長度（約4.5千鹼基）的PCR產物，其根據製造商之說明書，使用QIAquick凝膠提取套組（Qiagen目錄號28704）純化且選殖至pCR4-TOPO-TA（Invitrogen目錄號450030）中。在大腸桿菌NEB5 α 細胞之轉形後，由胺苄青黴素抗性群落製備DNA且確定插入物之完整序列。

【0132】 若上述2步驟方案不產生正確大小的PCR產物，則使用以下3步驟方案：初始培育：95°C，240秒；變性步驟：95°C，30秒；黏接步驟：62°C、64°C、66°C或68°C，30秒；延伸步驟：72°C，300秒。變性、黏接及延伸步驟進行40個循環。隨後將反應在72°C下培育7分鐘且在4°C下儲存，直至如上述進行分析。

【0133】 一旦確定pCR4-TOPO TA中之完整插入序列，使用BLAST演算法（可在NCBI網站獲得）將其鑑定為AAV衣殼基因。其與已知AAV之關係使用各種核苷酸或胺基酸序列比對程式，諸如Clustal Omega（可在EBI網站獲得）或Vector NTI（Invitrogen公司）確定。

【0134】 為了產生AAV，將獨特的AAV衣殼基因次選殖至表現質體（pAAV-RC；Agilent公司）中，隨後將其與載體（pAAV螢光素酶）及腺病毒輔助質體（pHELPER；Agilent公司）一起轉染至293細胞中。允許AAV產生3天，且隨後藉由將細胞凍融三次來製備粗溶解物。將碎片沈

澱且將上清液（粗AAV）藉由Q-PCR滴定以確定基因組效價（其證實衣殼能夠進行組裝及DNA包裝），且隨後用於評估AAV在各種細胞上之轉導。

【0135】 所鑑定之新穎哺乳動物組織衍生的AAV衣殼蛋白之VP1胺基酸序列在本文中描述為SEQ ID NO:1-7。本文中亦描述相關的VP2及VP3區域之位置。本發明係關於（i）經分離AAV衣殼蛋白，其與SEQ ID NO:1-7之VP1衣殼序列中之任一者或SEQ ID NO:1-7之衣殼序列中之任一者的VP2或VP3區域具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；或（ii）經分離AAV衣殼蛋白，其包括以下或由以下組成：SEQ ID NO:1-7之VP1衣殼序列中之任一者或SEQ ID NO:1-7之衣殼序列中之任一者的VP2或VP3區域。本發明亦關於一種包括以上所述AAV衣殼蛋白中之任一者的AAV顆粒，其中AAV顆粒進一步包括（i）具有AAV反向末端重複序列及轉基因之核酸，所述轉基因包括與調節序列可操作地連接之異源基因，所述調節序列指導異源基因在宿主細胞中之表現；或（ii）包括與調節序列可操作地連接之異源基因的核酸，所述調節序列控制異源基因在宿主細胞中之表現。

【0136】 亦研究人類血清中之抗體對本發明之新穎AAV顆粒的中和。將HEK293T細胞以 5×10^4 個細胞/孔的密度接種且培育隔夜。將經純化之rAAV稀釋至 2×10^6 vg/ μ L之最終效價且與IVIG之連續稀釋液（0-10 mg/mL）混合1小時。使用1000之MOI將重組AAV添加至HEK293T細胞上且在37°C下培育。感染後七十二小時，基於相對螢光素酶單位（RLU）讀數分析IVIG中和。在此研究中不使用依託泊昔（etoposide）。結果提供於表3中。如所預期的，添加人類IVIG（未示出）消除了AAV2

轉導（陽性對照）。相反，所測試的某些新穎AAV表現出IVIG抗性性質。

表3：IVIG中和資料：

IVIG (mg/ml)	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.0781	0.039
Bba.45	268.0035	2460.32	25398.7	62037.8	120120.5	128270	163621.5	156841	174272
Bba.46	143.001	1030.049	6323.76	36465.35	92936.55	102423.15	179724	124453	156407.5
Bba.47	471.01665	1366.085	9060.61	42023.6	90104.35	123976.5	169643.5	152828.5	186058.5
Bba.49	271.004	1100.063	15301.9	65175.15	148917	159579.5	222658.5	337455.5	309530.5
Bba.50	188.0021	660.027	1574.105	6904.1	14449.3	19913.45	21366.1	26117.05	28455.65
Bba.51	1223.0695	1508.1235	10817.1	55625	103595.5	151814	153542	178776	255409

【0137】另外，重複IVIG中和分析以比較具有表3中所列之衣殼（表示為「新穎衣殼」）的重組AAV顆粒之中和與具有對照衣殼AAV5、AAV8及AAV9之重組AAV顆粒之中和。如圖2中所示，具有本文中所揭示之衣殼的AAV表現出IVIG抗性性質。

【0138】為了確定本文中所揭示之AAV衣殼之組織特異性感染性，產生包括所述衣殼中之每一者且表現螢光素酶轉基因的AAV（AAV-RSV-egfp-T2A-Fluc2）。從 Charles River Breeding Laboratories 購得雄性 Balb/C 小鼠。將劑量為 2×10^{13} vg/kg 之 AAV-RSV-egfp-T2A-Fluc2 載體注入 8 週齡小鼠之尾靜脈中。在注射後 3 週及 5 週，使用活體內成像裝置（IVIS Lumina LT，從 PerkinElmer 公司, Waltham, MA 獲得）進行活體內生物發光成像。簡言之，用 2% 異氟烷及氧氣麻醉小鼠。腹膜內注射 150 μ l 之 30 mg/ml RediJect D-螢光素生物發光受質。在受質注射後十分鐘，用活體內成像裝置，使用其冷卻的電荷耦合裝置（CCD）攝影機使動物成像。獲取動物背部位置之影像。在整個成像期內，藉由在不透光成像室中遞送異氟烷-氧氣來維持麻醉。

【0139】在 AAV 注射後 5 週，在成像期後處死小鼠。收穫各個器官且使用成像裝置使其成像。量測條件與用於活體內成像之量測條件相同。對

於成像，擷取動物之灰度照片，隨後擷取生物發光影像。使用4.5.2版即時影像軟體（PerkinsElmer Waltham, MA）處理並分析影像資料。圍繞各動物以及個別器官追蹤感興趣的區域（ROI）以定量由螢光素酶活性所釋放的總通量（TF）（光子/秒）。總通量活性代表各器官系統之AAV感染性且針對各AAV衣殼顯示於圖1中。資料表明，新穎衣殼產生對肝細胞具有高度特異性的重組AAV。

【0140】 如上所述，使用具有本文中所揭示之以下衣殼（Bba.45、Bba.46、Bba.47、Bba.49、Bba.50及Bba.51）之AAV進行另外的實驗，且將所述轉導與具有以下對照衣殼：AAV5、AAV8及AAV9之AAV的轉導進行比較。如圖3中所示，與AAV5相比，具有新穎衣殼之AAV表現出10-40%的轉導效率倍數增加。此外，圖4表明，與AAV5相比，具有新穎衣殼之AAV對肝細胞具有顯著更高程度的特異性。另外，具有新穎衣殼之AAV所表現出來的肝細胞轉導與具有AAV8或AAV9衣殼之AAV所觀察到的肝細胞轉導類似。

實例2

評估新穎的天然產生之衣殼蛋白之生物分佈及活性評估

【0141】 為了評估本文中所揭示之AAV衣殼之生物分佈及活性，在ApoE-hAAT啟動子下產生包括所述衣殼、絨毛膜促性腺激素次單元β（cyno-CG-β）轉基因之AAV（AAV-ApoE-hAAT-Cyno-CG-β）。從Jackson Laboratories購得雄性C57BL/6J小鼠。將劑量為 2×10^{13} vg/kg之AAV-ApoE-hAAT-Cyno-CG-β注入8週齡小鼠之尾靜脈中。此研究採用具有以下衣殼蛋白之AAV進行：Bba-45、Bba-46、Bba-47、Bba-49、Bba-50（統稱為「新穎衣殼」）及AAV5、AAV8、AAV-Rh10及AAV-

anc80L65（統稱為「對照衣殼」）。投與無AAV載體的媒劑對照。

【0142】在注射後5週，藉由使用質譜法量測bCG蛋白之血漿含量來評估cyno-CG轉基因之表現。如圖5中所示，具有新穎衣殼之AAV的轉基因表現量與具有AAV5衣殼之AAV中之表現類似。然而，bCG蛋白在肝臟中之表現在注射有具有新穎衣殼之AAV的小鼠中相比於注射有具有AAV5衣殼之AAV的小鼠中增加（圖6）。注射有具有新穎衣殼之AAV的小鼠之肝臟中之cyno-CG轉基因之DNA及RNA複本的數目與注射有具有AAV5衣殼之AAV的小鼠沒有顯著差異（圖7A-7C）。DNA及RNA資料與bCG蛋白資料很好地相關（參見圖8A-8B）。

【0143】與對照衣殼（AAV5、AAV8、AAV-Rh10及AAV-anc80L65）相比，新穎衣殼Bba-45至Bba-50沒有導致顯著更高的轉導或轉錄物量。然而，當比較所有新穎衣殼時，Bba-49達成最高的轉錄物及轉導量。Bba-49衣殼達成比AAV5衣殼高約2倍的轉錄物量（RNA），但此差異並不顯著（圖7B）。Bba-49與AAV5之比率列於表4中：

表4

Bba49與AAV5之間的比率	
蛋白質	2.23
RNA	1.98
DNA	0.90

【0144】使用免疫組織化學評估轉基因bCG在肝細胞中之表現。所有新穎衣殼均產生比AAV5衣殼高的表現bCG之肝細胞的百分比。另外，具有新穎衣殼之AAV對肝細胞之轉導與對照衣殼AAV8、AAV-Rh10及AAV-anc80L65類似（圖9及10）。

【0145】產生包括Bba-49衣殼、ApoE-hAAT啟動子、丙胺酸乙醛酸酯胺基轉移酶（AGXT）轉基因的AAV。將劑量為 $1E14$ vg/kg之AAV-

AGXT注入3至4週齡 $AGXT^{-/-}$ C57BL/6J雄性小鼠之尾靜脈中。將肝細胞之轉導與來自各種來源的具有AAV5衣殼之AAV進行比較。使用免疫組織化學評估轉基因AGXT在肝細胞中之表現。如圖11中所示，Bba-49衣殼產生比所測試之AAV5衣殼高的表現AGXT之肝細胞的百分比。AAV.Bba-49.AGXT轉導約96%的肝細胞。

【序列表】

<110> 美商拜奧馬林製藥公司 (BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.)

<120> 新穎肝靶向腺相關病毒載體

<130> 30610/53120

<150> US 62/671,265

<151> 2018-05-14

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 742

<212> PRT

<213> 狒狒

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Bba.45

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(742)

<223> VP1衣殼蛋白

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(742)

<223> VP2衣殼蛋白

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (206)..(742)

<223> VP3衣殼蛋白

<400> 1

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 Arg 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ser 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 Lys 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 Thr Ala Asp Ser Ala
 165 170 175

Arg Arg Ala 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

Asp Arg Met Met Asn Pro Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Trp His Leu Gln
435 440 445

Ser Thr Thr Thr Gly Asn Ser Leu Asn Gln Gly Thr Ala Thr Thr Thr
450 455 460

Tyr Gly Lys Ile Thr Thr Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Arg Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Ala Cys Ile Lys Gln Gln Lys Phe Ser Lys Asn Ala Ser
485 490 495

Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Ser Gly Gly Asp Ala Leu Leu Lys Tyr
500 505 510

Asp Thr His Thr Thr Leu Asn Gly Arg Trp Ser Asn Met Ala Pro Gly
515 520 525

Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Ala Gly Asp Ser Asp Phe Ser Asn Ser
530 535 540

Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Thr Thr Ser
545 550 555 560

Ser Asn Asn Leu Leu Phe Thr Ser Glu Glu Glu Ile Ala Thr Thr Asn
565 570 575

Pro Arg Asp Thr Asp Met Phe Gly Gln Ile Ala Asp Asn Asn Gln Asn
580 585 590

Ala Thr Thr Ala Pro His Ile Ala Asn Leu Asp Ala Met Gly Ile Val
595 600 605

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile
610 615 620

Trp Ala Lys Val Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (206)..(742)

<223> VP3衣殼蛋白

<400> 2

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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ser 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 Lys 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 Thr 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 Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn
 245 250 255

Asn His Leu Tyr Leu Arg Ile Gly Thr Thr Ala Asn Ser Asn Thr Tyr
 260 265 270

Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Cys 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 Leu Arg Pro Lys Ser Met Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp Ser Thr Tyr Glu Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp
 355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Val Val Thr Gly Glu
370 375 380

Asn Gln Asn Gln Thr Asp Arg Asn Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Ile Ser Tyr Gln
405 410 415

Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Met Met Asn Pro Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Trp His Leu Gln
435 440 445

Ser Thr Thr Thr Gly Asn Ser Leu Asn Gln Gly Ala Ala Thr Thr Thr
450 455 460

Tyr Gly Lys Ile Thr Thr Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Arg Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Ala Cys Ile Lys Gln Gln Lys Phe Ser Lys Asn Ala Ser
485 490 495

Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Ser Gly Gly Asp Ala Leu Leu Lys Tyr
500 505 510

Asp Thr His Thr Thr Leu Asn Gly Arg Trp Ser Asn Met Ala Pro Gly
515 520 525

Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Ala Gly Asp Ser Asp Phe Ser Asn Ser
530 535 540

Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Thr Thr Ser
545 550 555 560

Ser Asn Asn Leu Leu Phe Thr Ser Glu Glu Glu Ile Ala Thr Thr Asn
565 570 575

Pro Arg Asp Thr Asp Met Phe Gly Gln Ile Ala Asp Asn Asn Gln Asn
580 585 590

Ala Thr Thr Ala Pro His Ile Ala Asn Leu Asp Ala Met Gly Ile Val
595 600 605

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile
610 615 620

Trp Ala Lys Val Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
625 630 635 640

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys
645 650 655

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Asn Thr Thr Phe Ser Ala Ala Arg
660 665 670

Ile Asn Ser Phe Leu Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ala Val Gln
675 680 685

Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu His Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
690 695 700

Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Thr Gln Asn Ser Met Leu Trp Ala
705 710 715 720

Pro Asp Asn Ala Gly Asn Tyr His Glu Pro Arg Ala Ile Gly Ser Arg
725 730 735

Phe Leu Thr His His Leu
740

<210> 3
<211> 742
<212> PRT
<213> 狒狒

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Bba.47

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(742)

<223> VP1衣殼蛋白

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(742)

<223> VP2衣殼蛋白

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (206)..(742)

<223> VP3衣殼蛋白

<400> 3

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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ser 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 Lys 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 Thr 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 Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn
 245 250 255

Asn His Leu Tyr Leu Arg Ile Gly Thr Thr Ala Asn Ser Asn Thr Tyr
 260 265 270

Asn Gly Phe 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 Leu Arg Pro Lys Ser Met Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val

Asp Thr His Thr Thr Leu Asn Gly Arg Trp Ser Asn Met Ala Pro Gly
515 520 525

Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Ala Gly Asp Ser Asp Phe Ser Asn Ser
530 535 540

Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Thr Thr Ser
545 550 555 560

Ser Asn Asn Leu Leu Phe Thr Ser Glu Glu Glu Ile Ala Thr Thr Asn
565 570 575

Pro Arg Asp Thr Asp Met Phe Gly Gln Ile Ala Asp Asn Asn Gln Asn
580 585 590

Ala Thr Thr Ala Pro His Ile Ala Asn Leu Asp Ala Met Gly Ile Val
595 600 605

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile
610 615 620

Trp Ala Lys Val Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
625 630 635 640

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys
645 650 655

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Asn Thr Thr Phe Ser Ala Ala Arg
660 665 670

Ile Asn Ser Phe Leu Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ala Val Gln
675 680 685

Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu His Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
690 695 700

Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Thr Gln Asn Ser Met Leu Trp Ala

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 Ser 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 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 Thr 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 Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn
 245 250 255

Asn His Leu Tyr Leu Arg Ile Gly Thr Thr Ala Asn Ser Asn Thr Tyr
 260 265 270

Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285

Cys Arg Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300

Gly Leu Arg Pro Lys Ser Met Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp Ser Thr Tyr Glu Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp
 355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Val Val Thr Gly Glu
 370 375 380

Asn Gln Asn Gln Thr Asp Arg Asn Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Ile Ser Tyr Gln
 405 410 415

Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

Asp Arg Met Met Asn Pro Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Trp His Leu Gln
 435 440 445

Ser Thr Thr Thr Gly Asn Ser Leu Asn Gln Gly Thr Ala Ile Thr Thr
450 455 460

Tyr Gly Lys Ile Thr Thr Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Arg Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Ala Cys Ile Lys Gln Gln Lys Phe Ser Lys Asn Ala Ser
485 490 495

Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Ser Gly Gly Asp Ala Leu Leu Lys Tyr
500 505 510

Asp Thr His Thr Thr Leu Asn Gly Arg Trp Ser Asn Met Ala Pro Gly
515 520 525

Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Ala Gly Asp Ser Asp Phe Ser Asn Ser
530 535 540

Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Thr Thr Ser
545 550 555 560

Ser Asn Asn Leu Leu Phe Thr Ser Glu Glu Glu Ile Ala Thr Thr Asn
565 570 575

Pro Arg Asp Thr Asp Met Phe Gly Gln Ile Ala Asp Asn Asn Gln Asn
580 585 590

Ala Ala Thr Ala Pro His Ile Ala Asn Leu Asp Ala Met Gly Ile Val
595 600 605

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile
610 615 620

Trp Ala Lys Val Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
625 630 635 640

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys
645 650 655

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Asn Thr Thr Phe Ser Ala Ala Arg
 660 665 670

Ile Asn Ser Phe Leu Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ala Val Gln
 675 680 685

Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu His Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
 690 695 700

Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Thr Gln Asn Ser Met Leu Trp Ala
 705 710 715 720

Pro Asp Asn Ala Gly Asn Tyr His Glu Pro Arg Ala Ile Gly Ser Arg
 725 730 735

Phe Leu Thr His His Leu
 740

<210> 5
 <211> 742
 <212> PRT
 <213> 狒狒

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Bba.49

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(742)
 <223> VP1衣殼蛋白

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (138)..(742)
 <223> VP2衣殼蛋白

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (206)..(742)
 <223> VP3衣殼蛋白

<400> 5

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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ser 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 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 Thr 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 Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn
 245 250 255

Asn His Leu Tyr Leu Arg Ile Gly Thr Thr Ala Asn Ser Asn Thr Tyr
 260 265 270

Asn Gly Phe 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 Leu Arg Pro Lys Ser Met Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp Ser Thr Tyr Glu Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp
 355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Val Val Thr Gly Glu
 370 375 380

Asn Gln Asn Gln Thr Asp Arg Asn Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Ile Ser Tyr Gln
405 410 415

Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Met Met Asn Pro Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Trp His Leu Gln
435 440 445

Ser Thr Thr Thr Gly Asn Ser Leu Asn Gln Gly Thr Ala Ile Thr Thr
450 455 460

Tyr Gly Lys Ile Thr Thr Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Arg Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Ala Gly Ile Lys Gln Gln Lys Phe Ser Lys Asn Ala Ser
485 490 495

Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Ser Gly Gly Asp Ala Leu Leu Lys Tyr
500 505 510

Asp Thr His Thr Thr Leu Asn Gly Arg Trp Ser Asn Met Ala Pro Gly
515 520 525

Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Ala Gly Asp Ser Asp Phe Ser Asn Ser
530 535 540

Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Thr Thr Ser
545 550 555 560

Ser Asn Asn Leu Leu Phe Thr Ser Glu Glu Glu Ile Ala Thr Thr Asn
565 570 575

Pro Arg Asp Thr Asp Met Phe Gly Gln Ile Ala Asp Asn Asn Gln Asn
580 585 590

Ala Thr Thr Ala Pro His Ile Ala Asn Leu Asp Ala Met Gly Ile Val
595 600 605

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile
610 615 620

Trp Ala Lys Val Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
625 630 635 640

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys
645 650 655

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Asn Thr Thr Phe Ser Ala Ala Arg
660 665 670

Ile Asn Ser Phe Leu Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ala Val Gln
675 680 685

Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu His Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
690 695 700

Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Thr Gln Asn Ser Met Leu Trp Ala
705 710 715 720

Pro Asp Asn Ala Gly Asn Tyr His Glu Pro Arg Ala Ile Gly Ser Arg
725 730 735

Phe Leu Thr His His Leu
740

<210> 6
<211> 742
<212> PRT
<213> 狒狒

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Bba.50

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(742)

<223> VP1衣殼蛋白

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(742)

<223> VP2衣殼蛋白

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (206)..(742)

<223> VP3衣殼蛋白

<400> 6

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

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

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asp 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ser 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 Lys 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 Arg 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 Thr 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 Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn
 245 250 255

Asn His Leu Tyr Leu Arg Ile Gly Thr Thr Ala Asn Ser Asn Thr Tyr
 260 265 270

Asn Gly Phe 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 Leu Arg Pro Lys Ser Met Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp Ser Thr Tyr Glu Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp
 355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Val Val Thr Gly Glu
 370 375 380

Asn Gln Asn Gln Thr Asp Arg Asn Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Ile Ser Tyr Gln
 405 410 415

Phe Glu Lys Val Pro Leu His Ser Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

Asp Arg Met Met Asn Pro Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Trp His Leu Gln
 435 440 445

Ser Thr Thr Thr Gly Asn Ser Leu Asn Gln Gly Thr Ala Thr Thr Thr
 450 455 460

Tyr Gly Lys Ile Thr Thr Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Arg Lys Asn Trp
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Ala Cys Ile Lys Gln Gln Lys Phe Ser Lys Asn Ala Ser
 485 490 495

Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Ser Gly Glu Asp Ala Leu Leu Lys Tyr
 500 505 510

Asp Thr His Thr Thr Leu Asn Gly Arg Trp Ser Asn Met Ala Pro Gly
 515 520 525

Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Ala Gly Asp Ser Asp Phe Ser Asn Ser
530 535 540

Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Thr Thr Ser
545 550 555 560

Ser Asn Asn Leu Leu Phe Thr Ser Glu Glu Glu Ile Ala Thr Thr Asn
565 570 575

Pro Arg Asp Thr Asp Met Phe Gly Gln Ile Ala Asp Asn Asn Gln Asn
580 585 590

Ala Thr Thr Ala Pro His Ile Ala Asn Leu Asp Ala Met Gly Ile Val
595 600 605

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile
610 615 620

Trp Ala Lys Val Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
625 630 635 640

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys
645 650 655

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Asn Thr Thr Phe Ser Ala Ala Arg
660 665 670

Ile Asn Ser Phe Leu Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ala Val Gln
675 680 685

Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu His Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
690 695 700

Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Thr Gln Asn Ser Met Leu Trp Ala
705 710 715 720

Pro Asp Asn Ala Gly Asn Tyr His Glu Pro Arg Ala Ile Gly Ser Arg
725 730 735

Phe Leu Thr His His Leu
740

<210> 7
<211> 742
<212> PRT
<213> 狒狒

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Bba.51

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(742)
<223> VP1衣殼蛋白

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (138)..(742)
<223> VP2衣殼蛋白

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (206)..(742)
<223> VP3衣殼蛋白

<400> 7

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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

Asn Gly Phe 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 Leu Arg Pro Lys Ser Met Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp Ser Thr Tyr Glu Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp
 355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Cys Gly Val Val Thr Gly Glu
 370 375 380

Asn Gln Asn Gln Thr Asp Arg Asn Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Ile Ser Tyr Gln
 405 410 415

Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

Asp Arg Met Met Asn Pro Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Trp His Leu Gln
 435 440 445

Ser Thr Thr Thr Gly Asn Ser Leu Asn Gln Gly Thr Ala Thr Thr Thr
 450 455 460

Tyr Gly Lys Ile Thr Thr Gly Asp Phe Ala Tyr Tyr Arg Lys Asn Trp

Ile Asn Ser Phe Leu Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ala Val Gln
675 680 685

Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu His Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
690 695 700

Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly Thr Gln Asn Ser Met Leu Trp Ala
705 710 715 720

Pro Asp Asn Ala Gly Asn Tyr His Glu Pro Arg Ala Ile Gly Ser Arg
725 730 735

Phe Leu Thr His His Leu
740

<210> 8
<211> 2229
<212> DNA
<213> 狒狒

<220>
<221> misc_feature
<223> Bba.45

<400> 8
atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aggcattcgc 60
gagtgggtggg cgctgaaacc tggagcccca cagcccaagg caaatcgaca acatcaagac 120
aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacttgg gacccggttaa cggactcgac 180
aaggagagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
cagcagctca agtcgggaga caacccttac ctcaagtaca accacgcgga cgccgagttc 300
cagcagcgtt tggcgaccga cacctctttt gggggcaacc tcggcaaggc agtcttccag 360
gccaaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgtaa aacggctcct 420
ggaaagaaac gccattaga aaagactcca aatcgcccga ccaaccgga ctctgggaag 480
gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aagggcactc 540

gactttgaag actctggagc aggagacgga cccctgagg gatcatcttc cggagaaatg 600
tctcatgatg ctgagatgcg tgcggcgcca ggcggaaatg ctgtcaggc gggacaaggt 660
gccgatggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgcy attccacctg gtcagagggc 720
cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtccctgcca cctacaaca ccacctgtac 780
ctgcgaatcg gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac cccctgggga 840
tactttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttttccccac gcgactggca gcgactcadc 900
aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgcytgta aaatcttcaa catccaggtc 960
agggagggtca ctacgtcaaa cggcgagact acggtcgcata ataaccttac cagcacggtt 1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatacgtga tggacgccgg tcaggagggg 1080
agccttcttc cgttccccaa cgacgtgttt atggttcccc aatacgggta ctgcggagtc 1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt 1200
ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagt 1260
cctttccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg 1320
gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaagggaaca 1380
gtlaccacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg 1440
ttacctggag cctgcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag 1500
attcccgccca gcgggggaga cggcctttta aagtatgaca cgcataccac tttaaatggg 1560
cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg caggtgccgg ggactcggat 1620
tttagcaaca gccagctgat ctttgccgga cccaatcaga gcggtaacac gaccacgtct 1680
tcaacaatt tgttgtttac ctcaagagag gagattgcca caacaaccc acgagacacg 1740
gacatgtttg gacagattgc agataataat caaaatgccca ccaccgccc tcacatcgt 1800
aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac 1860
cagggcccta tttgggcca ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgccgctg 1920
atgggaggat ttggactgaa acaccgctt ccgcagattt tcatcaaaa caccgccgta 1980
cccgccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attcttttt gacgcagtac 2040

agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaattc agaaggagca ctccaaacgc 2100
 tggaatcccg aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct 2160
 cccgacaacg ccggcaacta ccacgaacct cgggctattg ggtcccgttt cctcaccac 2220
 cacttgtaa 2229

<210> 9
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> 狒狒

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Bba.46

<400> 9
 atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aggcattcgc 60
 gagtgggtgg cgctgaaacc tggagcccca cagcccaagg caaatcaaca acatcaagac 120
 aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacttgg gaccgcgtaa cggactcgac 180
 aaggagagagc cggtaaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
 cagcagctca agtcgggaga caacccttac ctcaagtaca accacgcgga cggcagttc 300
 cagcagcgtt tggcgaccga cacctctttt gggggcaacc tcggcaaggc agtcttcag 360
 gccaaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgtaa aacggctcct 420
 ggaaagaaac gccattaga aaagactcca aatcggccga ccaaccgga ctctgggaag 480
 gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aaggacactc 540
 gactttgaag actctggagc aggagacgga ccccctgagg gatcatcttc cggagaaatg 600
 tctcatgacg ctgagatgcy tgcggcgcca ggcggaaatg ctgtcgaggc gggacaaggt 660
 gccgatggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgcy attccacctg gtcagagggc 720
 cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtctgcccc cctacaacaa ccacctgtac 780
 ctgcgaatcg gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac cccctgggga 840
 tgctttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttttccccac gcgactggca gcgactcacc 900

aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgctgttta aaatcttcaa catccaggtc 960
aaggagggtca ctacgtcaaa cggcgagact acggtcgcta ataaccttac cagcacggtt 1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatacgtga tggacgccgg tcaggagggg 1080
agccttctc cgttcccaaa cgacgtgttt atggttcccc aatacgggta ctgcggagtc 1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt 1200
ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagt 1260
cctttccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg 1320
gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaaggagca 1380
gctaccacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg 1440
ttgcctggag cctgcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag 1500
atccccgcca gcgggggaga cggcctttta agtatgaca cgcataccac tttaaatggg 1560
cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg caggtagccg ggactcggat 1620
tttagcaaca gccagctgat ctttgccgga cccaatcaga gcggtaacac gaccacgtct 1680
tcaacaatt tgttgtttac ctcaagaag gagattgcca caacaaacc acgagacacg 1740
gacatgtttg gacagattgc agataataat caaaatgcca ccaccgccc tcacatcgt 1800
aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac 1860
cagggcccta tttgggcaa ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgccgctg 1920
atgggaggat ttggactgaa acaccgcct ccgagattt tcatcaaaa caccgccgta 1980
cccgccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attcttttt gacgcagtac 2040
agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaattc agaaggagca ctccaaacgc 2100
tggaatcccg aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct 2160
cccgacaacg ccggaacta ccacgaacc cgggctattg ggtcccgttt cctcaccac 2220
cacttgtaa 2229

<210> 10
<211> 2229
<212> DNA

<213> 狒狒

<220>

<221> misc_feature

<223> Bba.47

<400> 10

atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aggcattcgc 60
gagtgggtggg cgctgaaacc tggagcccca cagcccaagg caaatcaaca acatcaagac 120
aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacttgg gaccocgtaa cggactcgcac 180
aaggagagagc cggatcaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
cagcagctca agtcgggaga caacccttac ctcaagtaca accacgcgga cggcaggttc 300
cagcagcgtc tggcgaccga cacctctttt gggggcaacc tcggcaaggc agtcttcag 360
gccaaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgttaa aacggctcct 420
ggaaagaaac gccattaga aaagactcca aatcgccga ccaaccgga ctctgggaag 480
gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aaggacactc 540
gactttgaag actctggagc aggagacgga cctcctgagg gatcatcttc cggagaaatg 600
tctcatgatg ctgagatgcg tgcggcgcca ggcggaaatg ctgtcagggc gggacaagggt 660
gccgatggag tggglaatgc ctccggtgat tggcattgcy attccacctg gtcagagggc 720
cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtcttgccta cctacaaca ccacctgtac 780
ctgcgaatcg gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac cccctgggga 840
tactttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttttccccac gcgactggca gcgactcacc 900
aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgcgtgta aaatcttcaa catccaggtc 960
aaggaggtca ctacgtcaaa cggcgagact acggctcgtc ataaccttac cagcacggtt 1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatacgtga tggacgccgg tcaggagggg 1080
agccttcctc cgttcccaaa cgacgtgttt atggttcccc aatacgggta ctgcggagtc 1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt 1200
ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagtt 1260

cctttccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg 1320
 gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaaggaaca 1380
 gctaccacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg 1440
 ttgcctggag cctgcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag 1500
 attcccgccca gcgggggaga cggcctttta aagtatgaca cgcataccac tttaaatggg 1560
 cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg caggtagccg ggactcggat 1620
 tttagcaaca gccagctgat ctttgccgga cccaatcaga gcggtaacac gaccacgtct 1680
 tcaacaatt tgttgittac ctcagaagag gagattgccca caacaaacc acgagacacg 1740
 gacatgtttg ggcagattgc agataataat caaaatgccca ccaccgccc tcacatcgt 1800
 aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac 1860
 cagggcccta tttgggcca ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgcccgtg 1920
 atgggaggat ttggactgaa acaccgcct ccgcagattt tcatcaaaa cacccccgt 1980
 cccccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attcttttt gacgcagtac 2040
 agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaatc agaaggagca ctccaacgc 2100
 tggaatccc aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct 2160
 cccgacaacg ccggaacta ccacgaacc cgggctattg ggtcccgtt cctcaccac 2220
 cacttgtaa 2229

<210> 11
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> 狒狒

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Bba.48

<400> 11
 atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aggcattcgc 60
 gagtgggtgg cgctgaaacc tggagcccca cagcccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcggg gtccttgct tccgggttac aaatacttgg gacccggtaa cggactcgac	180
aaggagagac cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgaaa ggcctacgac	240
cagcagctca agtcgggaga caacccttac ctcaagtaca accacgcgga cggcagttt	300
caggagcgtc ttcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag	360
gccccaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgttaa aacggctcct	420
ggaaaagaac gccattaga aaagactcca aatcgccga ccaaccgga ctctgggaag	480
gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aaggacactc	540
gactttgaag actctggagc agggagcggg cccctgagg gatcatctc cggagaaatg	600
tctcatgatg ctgagatgcg tgcggcgcga ggcggaaatg ctgtcaggc gggacaaggt	660
gccgatggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgag attccacctg gtcagagggc	720
cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtctgcccc cctacaaca ccacctgtac	780
ctgcgaatcg gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac cccctgggga	840
tactttgact ttaaccgctt ccaactgccg ttttccccg gcgactggca gcgactcacc	900
aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgcgtgta aaatcttcaa catccaggtc	960
aaggaggtca ctacgtcaaa cggcgagact acggctgcta ataaccttac cagcacggtt	1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatactgta tggacgccgg tcaggagggg	1080
agccttcctc cgttcccaaa cgactgtttt atggttcccc aatagggta ctgcggagtc	1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt	1200
ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagtt	1260
cctttccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg	1320
gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaaggaaca	1380
gctatcacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg	1440
ttgcctggag cctgcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag	1500
attcccacca gcgggggaga cggcctttta aagtatgaca cgcataccac tttaatggg	1560
cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg cagggtgccg ggactcggat	1620

tttagcaaca gccagctgat ctttgccgga cccaatcaga gcggtaacac gaccacgtct 1680
 tcaaacatt tgttgtttac ctcagaagag gagattgcca caacaaacc acgagacacg 1740
 gacatgtttg gacagattgc agataataat caaaatgccg ccaccgccc tcacatcgt 1800
 aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac 1860
 cagggcccta tttgggcca ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgcccgtg 1920
 atgggaggat ttggactgaa acaccgcct ccgcagattt tcatcaaaaa cacccccgt 1980
 cccgccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attctttttt gacgcagtac 2040
 agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaatc agaaggagca ctccaaacgc 2100
 tggaatcccg aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct 2160
 cccgacaacg ccggaacta ccacgaacc cgggctattg ggtcccgtt cctcaccac 2220
 cacttgtaa 2229

<210> 12
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> 狒狒

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Bba. 49

<400> 12
 atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aggcattcgc 60
 gagtggtggg cgctgaaacc tggagcccca cagcccaagg caaatcaaca acatcaagac 120
 aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacttgg gacccggtta cggactcgac 180
 aaggagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgaca ggcctacgac 240
 cagcagctca agtcgggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgcgga cgccgagttt 300
 caggagcgtc ttcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag 360
 gccaaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgttaa aacggctcct 420
 ggaaagaaac gccattaga aaagactcca aatcgccga ccaaccgga ctctgggaag 480

gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aaggacactc 540
gactttgaag actctggagc aggagacgga cccctgagg gatcatcttc cggagaaatg 600
tctcatgatg ctgagatgcg tgcggcgcca ggcggaaatg ctgtcaggc gggacaaggt 660
gccgatggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgcy attccacctg gtcagagggc 720
cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtcttgccea cctacaaca ccacctgtac 780
ctgcgaatcg gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac cccctgggga 840
tactttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttttccccac gcgactggca gcgactcacc 900
aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgcgtgta aaatcttcaa catccaggtc 960
aaggaggta ctacgtcaaa cggcgagact acggtcgcta ataaccttac cagcacggtt 1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatacgtga tggacgccgg tcaggagggg 1080
agccttcctc cgttcccaaa cgacgtgttt atggttcccc aatacgggta ctgcggagtc 1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt 1200
ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagtt 1260
cctttccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg 1320
gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaaggaaca 1380
gctatcacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg 1440
ttgcctggag ccggcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag 1500
attcccgcca gcgggggaga cgcctttta aagtatgaca cgcataccac tttaaatggg 1560
cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg caggtgccgg ggactcggat 1620
tttagcaaca gccagctgat ctttgccgga cccaatcaga gcgtaaacac gaccacgtct 1680
tcaaacaatt tgtttttac ctcaagaagag gagattgcca caacaaacc acgagacacg 1740
gacatgtttg gacagattgc agataataat caaaatgccca ccaccgccc tcacatcgt 1800
aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac 1860
cagggcccta tttgggcaa ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgccgctg 1920
atgggaggat ttggactgaa acaccgcct ccgcagattt tcatcaaaa caccgccgta 1980

cccgccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attctttttt gacgcagtac 2040
 agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaattc agaaggagca ctccaaacgc 2100
 tggaatcccg aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct 2160
 cccgacaacg ccggcaacta ccacgaacct cgggctattg ggtcccgttt cctcaccac 2220
 cacttgtaa 2229

<210> 13
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> 狒狒

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Bba.50

<400> 13
 atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aagcattcgc 60
 gagtgggtggg cgctgaaacc tggagcccca cggcccaagg caaatcaaca acatcaagac 120
 gacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacttgg gacccggtta cggactcgac 180
 aaggagagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgaca ggcctacgac 240
 cagcagctca agtcgggaga caacccttac ctcaagtaca accacgcgga cggcagttc 300
 cagcagcgtt tggcgaccga cacctctttt gggggcaacc tcggcaaggc agtcttcag 360
 gccaaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgtaa aacggctcct 420
 ggaaggaaac gccattaga aaagactcca aatcggccga ccaaccgga ctctgggaag 480
 gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aaggacactc 540
 gactttgaag actctggagc aggagacgga cccctgagg gatcatcttc cggagaaatg 600
 tctcatgatg ctgagatgcy tgcggcgcga ggcggaaatg ctgtcgaggc gggacaaggt 660
 gccgatggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgcy attccacctg gtcagagggc 720
 cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtctgcccc cctacaacaa ccacctgtac 780
 ctgcgaatcg gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac ccctggggga 840

tactttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttttccccac gcgactggca gcgactcacc	900
aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgctgttta aaatcttcaa catccaggtc	960
aaggagggtca ctacgtcaaa cggcgagact acggtcgcta ataaccttac cagcacggtt	1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatacgtga tggacgccgg tcaggagggg	1080
agccttctc cgttccccaa cgacgtgttt atggttcccc aatacgggta ctgcggagtc	1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt	1200
ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagtt	1260
cctctccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg	1320
gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaaggaaca	1380
gctaccacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg	1440
ttgcctggag cctgcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag	1500
attcccgcc gcygggaaga cggcctttta aagtatgaca cgcataccac tttaatggg	1560
cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg caggtgccgg ggactcggat	1620
tttagcaaca gccagctgat ctttgccgga cccaatcaga gcggtaacac gaccacgtct	1680
tcaaacaatt tgtttgttac ctcaagaagag gagattgcca caacaaacc acgagacacg	1740
gacatgtttg gacagattgc agataataat caaaatgcc aaccgcccc tcacatcgt	1800
aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac	1860
cagggcccta tctgggcaaa ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgccgctg	1920
atgggaggat ttggactgaa acaccgcct ccgcagattt tcatcaaaa caccgccgta	1980
cccccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attcttttt gacgcagtac	2040
agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaatc agaaggagca ctccaaacgc	2100
tggaatccc aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct	2160
cccgacaacg ccggaacta ccacgaacc cgggctattg ggtcccgttt cctcaccac	2220
cacttgtaa	2229

<210> 14

<211> 2229

<212> DNA

<213> 狒狒

<220>

<221> misc_feature

<223> Bba.51

<400> 14

atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga aggcattcgc 60
gagtgggtggg cgctgaaacc tggagcccca cagcccaagg caaatcaaca acatcaagac 120
aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacttgg gacccggtaa cggactcgac 180
aaggagagagc cggtaaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
cagcagctca agtcgggaga caacccttac ctcaagtaca accacgcgga cggcagttc 300
cagcagcgtt tggcgaccga cacctctttt gggggcaacc tcggcaaggc agtcttcag 360
gccaaaaaga ggattctcga gcctctgggt ctggttgaag agggcgtaa aacggctcct 420
ggaaagaaac gccattaga aaagactcca aatcgccga ccaaccgga ctctgggaag 480
gccccggcca agaaaaagca aaaagacggc gagacagccg actctgctag aaggacactc 540
gactttgaag actctggagc aggagacgga cccctgagg gatcatcttc cggagaaatg 600
tctcatgatg ctgagatgcy tgcggccca ggcggaaatg ctgtcgaggc gggacaaggt 660
gccgatggag tgggtaatgc ctccggtgat tggcattgcy attccacctg gtcagagggc 720
cgagtcacca ccaccagcac ccgaacctgg gtctgcccc cctacaaca ccacctgtac 780
ctgcgaatcy gaacaacggc caacagcaac acctacaatg gattctccac cccctgggga 840
tactttgact ttaaccgctt ccaactgccac ttttccccac gcgactggca gcgactcacc 900
aacaacaact ggggactcag gccgaaatcg atgcgtgta aaatcttcaa catccaggtc 960
aaggaggtca ctacgtcaaa cggcgagact acggtcgtca ataaccttac cagcacggtt 1020
cagatctttg cggattcaac gtatgaactc ccatactgta tggacgccgg tcaggagggg 1080
agccttctc cgttcccaa cgacgtgttt atggttcccc aatacgggta ctgcggagtc 1140
gtcactggag aaaaccagaa ccaaacagac agaaatgcct tttactgtct ggagtacttt 1200

ccatcccaaa tgctaagaac tggcaacaac tttgaaatca gttaccaatt tgaaaaagtt 1260
cctttccatt caatgtacgc gcacagccag agcctggaca gaatgatgaa tcctttgctg 1320
gatcagtacc tgtggcatct gcaatcgacc actaccggaa attcccttaa tcaaggaaca 1380
gctaccacca cgtacgggaa aattaccact ggggactttg cctactacag gaaaaactgg 1440
ttgcctggag cctgcattaa acaacaaaaa ttttcaaaga atgccagtca aaactacaag 1500
attcccgcc a gcgggggaga cgcctttta aagtatgaca cgcataccac tttaaatggg 1560
cgatggagta acatggctcc tggctctcca atggccaccg caggtgccgg ggactcggat 1620
tttagcaaca gccagctgat ctttgcggga cccaatcaga gcgtaaacac gaccacgtct 1680
tcaacaatt tgttgittac ctcagaagag gagattgcca caacaaacc acgagacacg 1740
gacatgtttg gacagattgc agataataat caaaatgcc a ccaccgccc tcacatcgt 1800
aacctggacg ctatgggaat tgttcccgga atggtctggc aaaacagaga catctactac 1860
cagggcccta tttgggcaa ggtccctcac acggacggac actttcacc ttcgccgctg 1920
atgggaggat ttggactgaa acaccgcct ccgcagattt tcatcaaaa cacccccgt 1980
cccccaatc ccaatactac ctttagcgt gcaaggatca attcttttt gacgcagtac 2040
agcaccggac aagtcgccgt tcagatcgac tgggaaatc agaaggagca ctccaaacgc 2100
tggaatccc aagtccaatt tacttcaaac tacggcactc aaaattctat gctgtgggct 2160
ccgacaacg ccggaacta ccacgaacc cgggctattg ggtcccgttt cctcaccac 2220
cacttgtaa 2229



202005978

【發明摘要】

【中文發明名稱】

新穎肝靶向腺相關病毒載體

【英文發明名稱】

NOVEL LIVER TARGETING ADENO-ASSOCIATED VIRAL
VECTORS

【中文】

本發明係關於新穎腺相關病毒（AAV）衣殼蛋白、包括新穎衣殼蛋白的AAV顆粒、編碼這些衣殼蛋白的多核苷酸及表現這些衣殼蛋白的AAV載體。本發明亦關於本文所述之表現本發明之新穎衣殼蛋白的AAV載體的製造方法及其相關的治療用途。

【英文】

The invention relates to novel adeno-associated virus (AAV) capsid proteins, AAV particles comprising a novel capsid protein, polynucleotides encoding these capsid proteins and AAV vectors expressing these capsid proteins. The invention also relates to methods of making the herein described AAV vectors expressing the novel capsid proteins of the invention and associated therapeutic uses of thereof.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種腺相關病毒（AAV），其包括一衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括與（i）SEQ ID NO:1-7中之任一者、（ii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2區域或（iii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP3區域至少95%相同的一胺基酸序列；且進一步包括一轉基因，所述轉基因包括與一調節序列可操作地連接的一異源基因，所述調節序列控制所述異源基因在一宿主細胞中之表現。

【第2項】

如請求項1的AAV，其中所述衣殼蛋白包括（i）SEQ ID NO:1-7中之任一者、（ii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的所述VP2區域或（iii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的所述VP3區域的所述胺基酸序列。

【第3項】

一種腺相關病毒（AAV），其包括一衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括SEQ ID NO:1-7中之任一者的一功能片段；且進一步包括一轉基因，所述轉基因包括與一調節序列可操作地連接的一異源基因，所述調節序列控制所述異源基因在一宿主細胞中之表現。

【第4項】

如請求項3的AAV，其中所述衣殼包括以下中之一或多者：SEQ ID NO: 1-7中之任一者的所述胺基酸序列的可變區（VR）、位於所述可變區之間的恆定區、GBS結構域及GH環。

【第5項】

一種腺相關病毒，其包括一衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括由一

核苷酸序列編碼之一胺基酸序列，所述核苷酸序列與 (i) SEQ ID NO: 8-14中之任一者的一核苷酸序列、(ii) 編碼SEQ ID NO: 1-7中之任一者的所述胺基酸序列之所述VP2區域的一核苷酸序列或 (iii) 編碼SEQ ID NO: 1-7中之任一者的所述胺基酸序列之所述VP3區域的一核苷酸序列雜交；且進一步包括一轉基因，所述轉基因包括與一調節序列可操作地連接的一異源基因，所述調節序列控制所述異源基因在一宿主細胞中之表現。

【第6項】

如請求項1至5中任一項的AAV，其進一步包括AAV反向末端重複序列。

【第7項】

一種組合物，其包括如請求項1至6中任一項的AAV及一生理學上相容的載體。

【第8項】

一種將一轉基因遞送至一細胞的方法，其包括使所述細胞與如請求項1至6中任一項的AAV接觸。

【第9項】

一種組合物，其包括如請求項1至6中任一項的AAV以用於將一轉基因遞送至一細胞。

【第10項】

一種如請求項1至6中任一項的AAV的用途，其用於製備用於將一轉基因遞送至一細胞的一藥物。

【第11項】

如請求項8至10中任一項的方法、組合物或用途，其中所述細胞為一

肝細胞。

【第12項】

一種治療患有與一內源蛋白之異常活性相關的一病症或疾病的一個體的方法，其包括向所述個體投與一有效量之一AAV，所述AAV包括一衣殼蛋白，其中所述衣殼蛋白包括與（i）SEQ ID NO:1-7中之任一者、（ii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的所述VP2區域或（iii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的所述VP3區域至少95%相同的一胺基酸序列，且其中所述AAV包括編碼所述蛋白質之一生物活性複本的一轉基因。

【第13項】

一種治療患有與一內源蛋白之異常活性相關的一病症或疾病的一個體的方法，其包括向所述個體投與一有效量之如請求項1至8中任一項的一AAV。

【第14項】

如請求項12或13的方法，其中所述病症或疾病與一肝細胞中表現的一內源基因之異常活性相關。

【第15項】

如請求項12至14中任一項的方法，其中所述病症或疾病選自由以下組成之群組：A型血友病、B型血友病、威爾森氏病（Wilson's disease）、遺傳性血管性水腫（HAE）、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症及半乳糖血症。

【第16項】

一種載體，其包括編碼一腺相關病毒（AAV）衣殼蛋白的一核酸序列，所述腺相關病毒（AAV）衣殼蛋白具有與（i）SEQ ID NO:1-7中之任一者、（ii）SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2區域或（iii）SEQ ID

NO:1-7中之任一者的VP3區域至少95%相同的一胺基酸序列。

【第17項】

一種載體，其包括編碼一腺相關病毒（AAV）衣殼蛋白的一核酸序列，其中所述核苷酸序列與（i）SEQ ID NO:8-14中之任一者的一核酸序列、（ii）編碼SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP2區域的一核苷酸序列或（iii）編碼SEQ ID NO:1-7中之任一者的VP3區域的一核苷酸序列雜交。

【第18項】

一種載體，其包括編碼一衣殼蛋白的一核酸序列，其中所述衣殼蛋白包括SEQ ID NO:1-7中之任一者的一功能片段。

【第19項】

如請求項18的載體，其中所述衣殼包括以下中之一或多者：SEQ ID NO: 1-7中之任一者的所述胺基酸序列的可變區（VR）、位於所述可變區之間的恆定區、GBS結構域及GH環。

【第20項】

如請求項16至19中任一項的載體，其中所述核酸序列與一異源調節元件可操作地連接，所述異源調節元件控制所述衣殼蛋白在一宿主細胞中之表現。

【第21項】

一種細胞，其包括如請求項16至20中任一項的載體。

【第22項】

一種如請求項1至8中任一項的AAV的用途，其用於製備用於治療一病症或疾病的一藥物。

【第23項】

如請求項22的用途，其中所述病症或疾病與一內源蛋白之異常活性相關且另外其中所述AAV包括編碼所述蛋白質的一生物活性複本的一轉基因。

【第24項】

如請求項22或23的用途，其中所述病症或疾病選自由以下組成之群組：A型血友病、B型血友病、威爾森氏病、遺傳性血管性水腫（HAE）、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症及半乳糖血症。

【第25項】

一種組合物，其包括如請求項1至8中任一項的AAV以治療一疾病或病症。

【第26項】

如請求項25的組合物，其中所述病症或疾病與一內源蛋白之異常活性相關且另外其中所述AAV包括編碼所述蛋白質的一生物活性複本的一轉基因。

【第27項】

如請求項26的組合物，其中所述病症或疾病選自由以下組成之群組：A型血友病、B型血友病、威爾森氏病、遺傳性血管性水腫（HAE）、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症及半乳糖血症。

【第28項】

一種製造如請求項1至8中任一項的一腺相關病毒（AAV）的方法，其包括：

（a）培養一病毒生產細胞，已在所述病毒生產細胞中引入一第一核酸載體及一第二核酸載體，所述第一核酸載體包括5'及3' AAV反

向末端重複序列，其側接有一轉基因，所述轉基因包括與調節序列可操作地連接的一異源基因，所述調節序列控制所述異源基因在一宿主細胞中之表現，所述第二核酸載體包括AAV rep及cap核酸序列，其中所述cap核酸序列編碼與SEQ ID NO:1-7中之任一者至少95%相同的一AAV衣殼；及

(b) 從所述病毒生產細胞培養物之上清液回收所述AAV。

【第29項】

如請求項28的方法，其中所述病毒生產細胞為一哺乳動物細胞。

【第30項】

如請求項29的方法，其中所述哺乳動物細胞選自由以下組成之群組：HEK293、HeLa、CHO、NS0、SP2/0、PER.C6、Vero、RD、BHK、HT 1080、A549、Cos-7、ARPE-19及MRC-5細胞。

【第31項】

如請求項30的方法，其中所述哺乳動物細胞為一HEK293細胞。

【第32項】

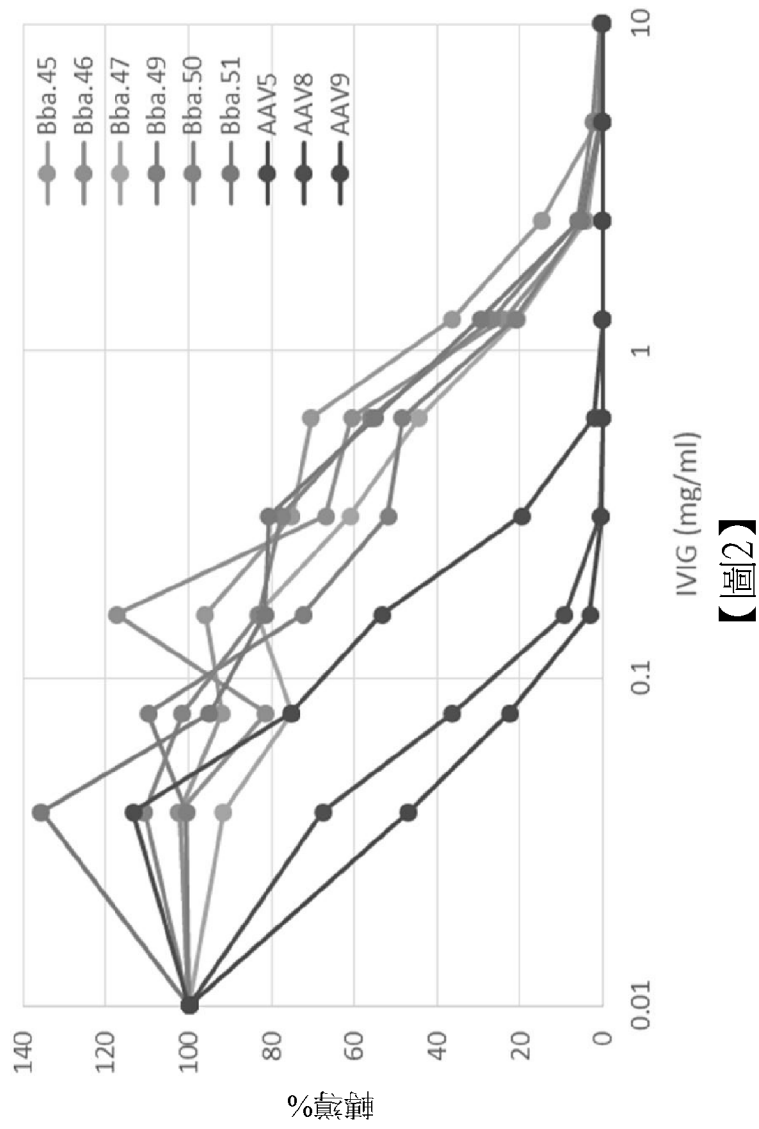
一種腺相關病毒（AAV），其藉由如請求項28至31中任一項的方法產生。

【發明圖式】

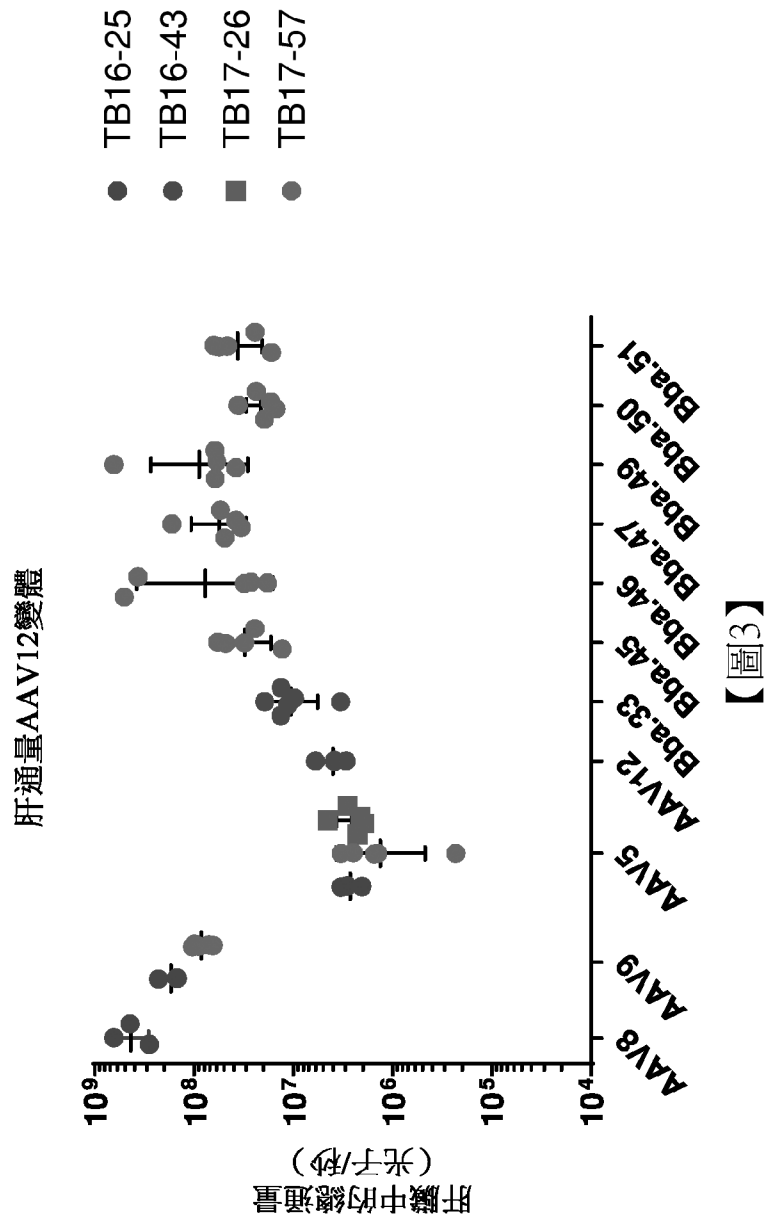
衣殼	腦	眼	肺	心臟	肝臟	胰臟	脾	腎	前肢
Bba.45	1.14E+05	5.62E+04	8.18E+06	2.69E+05	3.50E+07	2.46E+05	2.40E+05	1.54E+05	1.64E+04
	6.38E+04	3.15E+04	7.27E+06	1.25E+05	1.81E+07	1.69E+05	1.43E+05	9.09E+04	1.49E+04
Bba.46	2.01E+05	9.29E+04	8.73E+06	4.18E+05	1.90E+08	8.64E+05	3.94E+05	3.85E+05	4.14E+04
	8.32E+04	8.42E+04	4.90E+06	2.07E+05	2.30E+08	9.18E+05	3.50E+05	3.46E+05	1.16E+04
Bba.47	1.51E+05	7.63E+04	7.06E+06	2.97E+05	6.87E+07	4.79E+05	5.14E+05	2.62E+05	3.11E+04
	5.43E+04	2.72E+04	1.90E+06	1.37E+05	5.62E+07	1.62E+05	8.02E+04	1.07E+05	2.11E+04
Bba.49	2.93E+05	9.94E+04	9.30E+06	3.79E+05	1.73E+08	9.37E+05	3.14E+04	4.76E+05	1.65E+05
	3.09E+05	1.06E+05	3.11E+06	1.61E+05	2.64E+08	1.19E+06	8.33E+05	6.08E+05	1.26E+05
Bba.50	7.14E+04	4.63E+04	1.43E+06	1.15E+05	2.23E+07	1.27E+05	1.04E+05	8.85E+04	2.01E+04
	5.18E+04	4.49E+04	5.57E+05	3.39E+04	8.36E+06	4.32E+04	1.33E+04	5.76E+04	2.42E+04
Bba.51	1.65E+05	7.31E+04	1.33E+07	2.86E+05	4.15E+07	3.97E+05	2.19E+05	2.04E+05	5.97E+04
	5.67E+04	3.54E+04	4.31E+06	1.07E+05	2.03E+07	1.02E+05	9.78E+04	5.68E+04	5.30E+04

衣殼	凹頭肌	腓腸肌	脛骨前肌	橫膈膜	舌	皮膚	嚼肌MS	淋巴結	比目魚肌
Bba.45	8.99E+04	2.16E+05	5.43E+04	3.02E+05	8.17E+04	6.34E+04	3.73E+04	5.51E+05	1.91E+04
	5.25E+04	1.53E+05	4.61E+04	1.82E+05	5.69E+04	3.72E+04	2.24E+04	3.63E+05	1.12E+04
Bba.46	2.01E+06	2.06E+06	1.66E+05	5.36E+05	7.97E+04	1.30E+05	4.57E+04	4.80E+05	6.68E+04
	1.59E+06	1.45E+06	1.57E+05	3.35E+05	5.13E+04	9.52E+04	1.73E+04	2.49E+05	6.88E+04
Bba.47	1.49E+06	3.41E+06	1.88E+05	6.09E+05	1.49E+05	1.43E+05	5.88E+04	7.64E+05	8.98E+04
	1.52E+06	3.24E+06	1.80E+05	4.00E+05	1.09E+05	1.14E+05	2.69E+04	2.20E+05	8.91E+04
Bba.49	1.13E+07	6.32E+06	8.79E+05	1.35E+06	1.52E+05	2.43E+05	1.28E+05	1.09E+06	1.68E+05
	6.06E+06	2.70E+06	9.40E+05	7.73E+05	5.83E+04	5.40E+04	4.00E+04	6.45E+05	1.42E+05
Bba.50	1.92E+06	2.44E+06	7.94E+04	1.37E+05	1.88E+05	7.42E+04	2.34E+04	1.18E+05	2.42E+04
	3.00E+06	8.57E+05	5.74E+04	4.95E+04	9.97E+04	1.88E+04	1.69E+04	4.21E+04	1.17E+04
Bba.51	2.72E+06	3.15E+06	1.23E+05	3.85E+05	1.30E+05	1.46E+05	7.69E+04	5.13E+05	5.32E+04
	1.67E+06	3.22E+06	7.77E+04	1.40E+05	5.05E+04	1.00E+05	3.79E+04	2.63E+05	3.70E+04

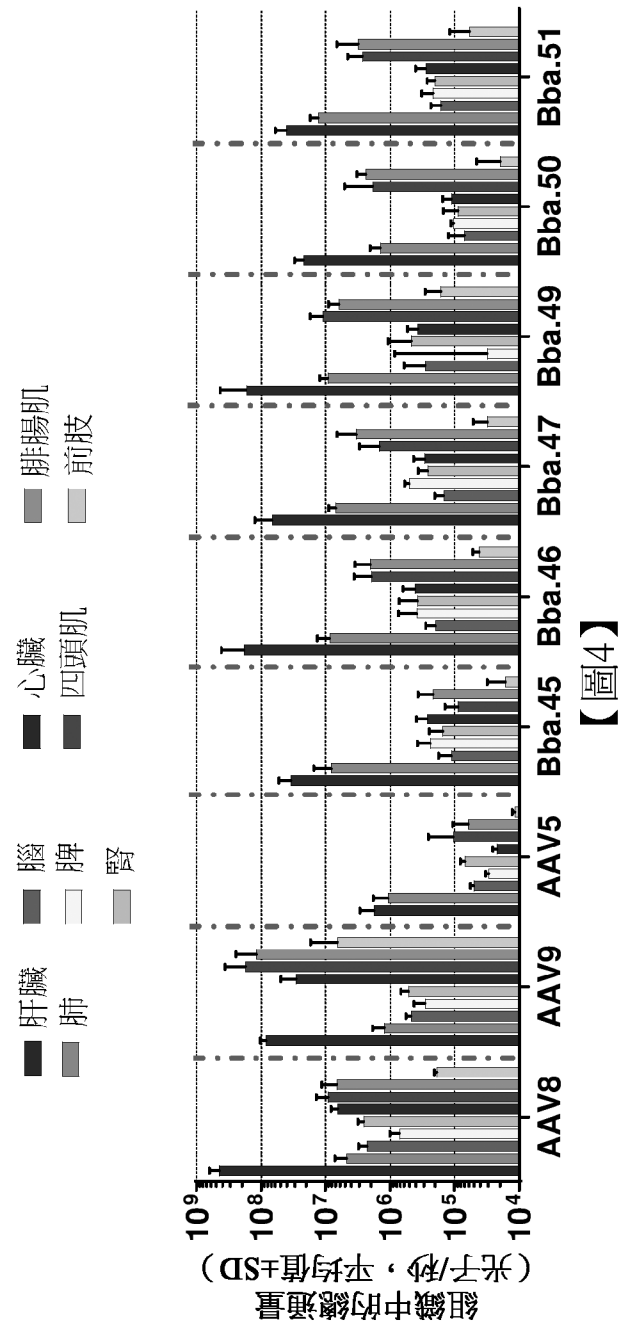
【圖1】



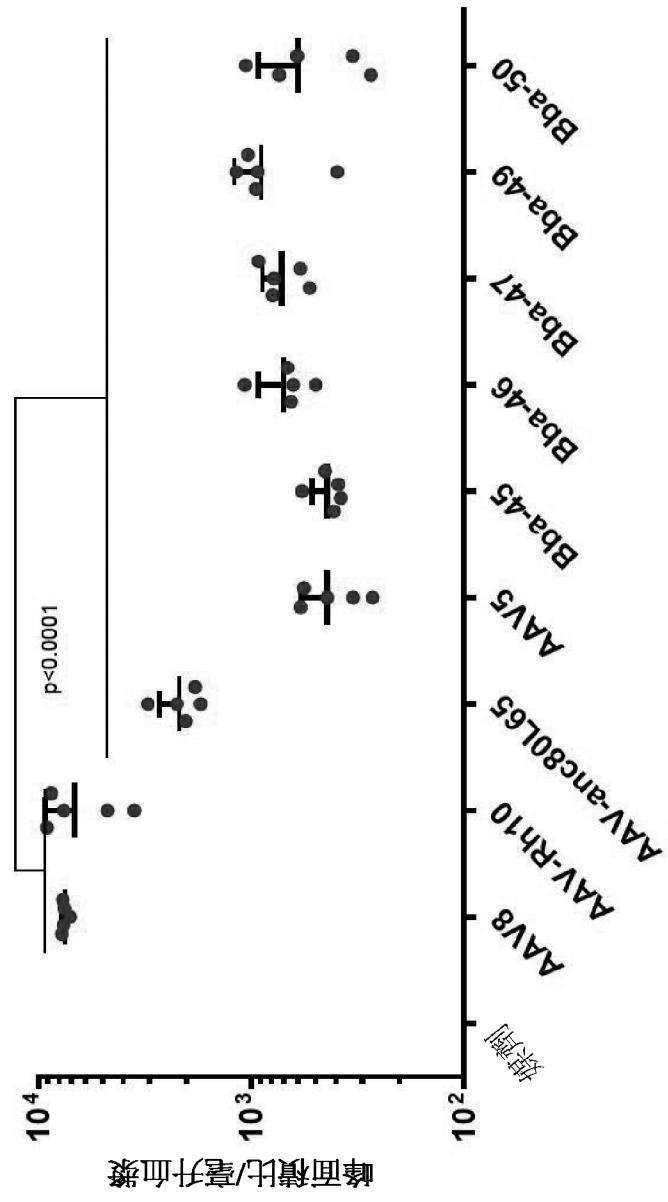
【圖2】



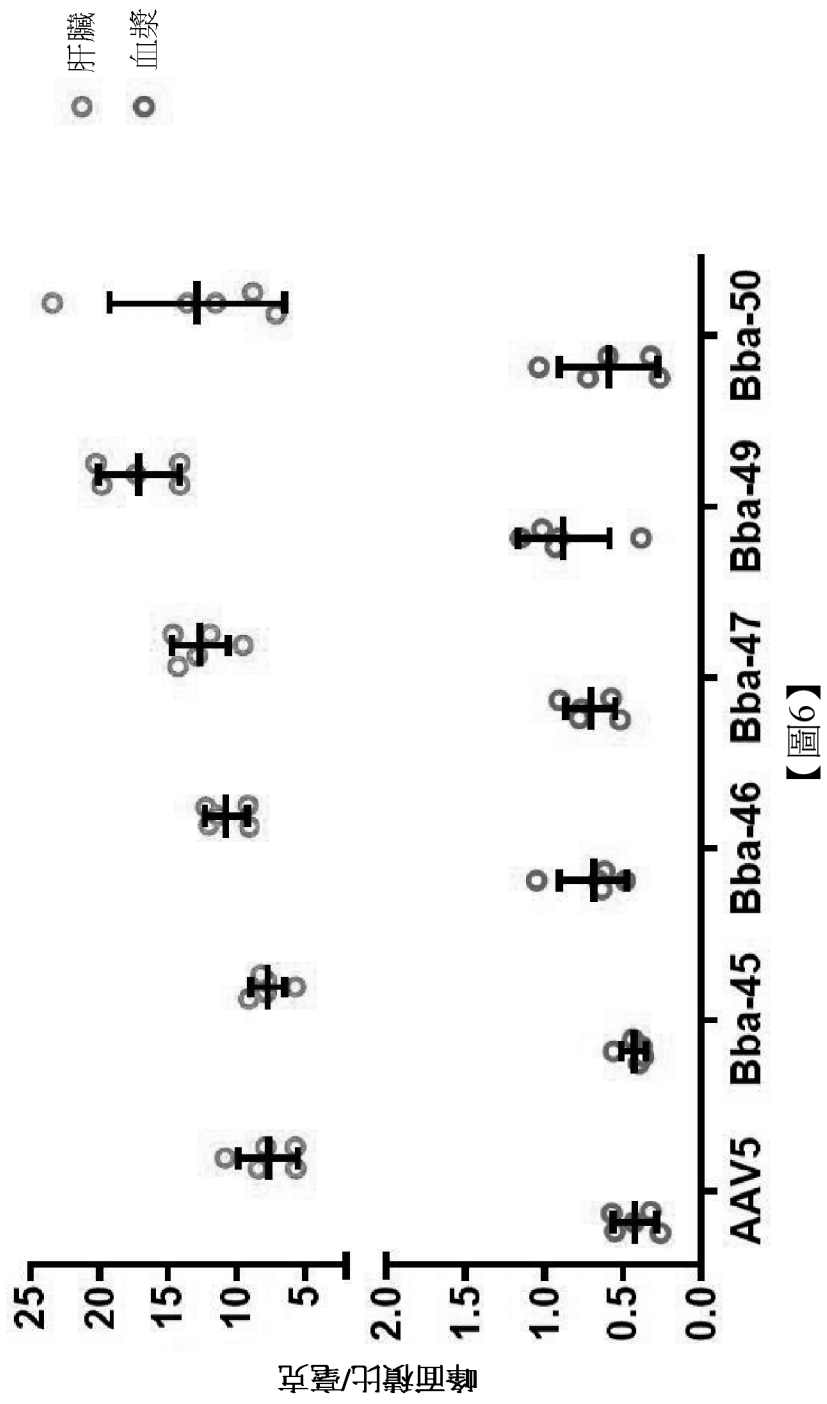
【圖3】



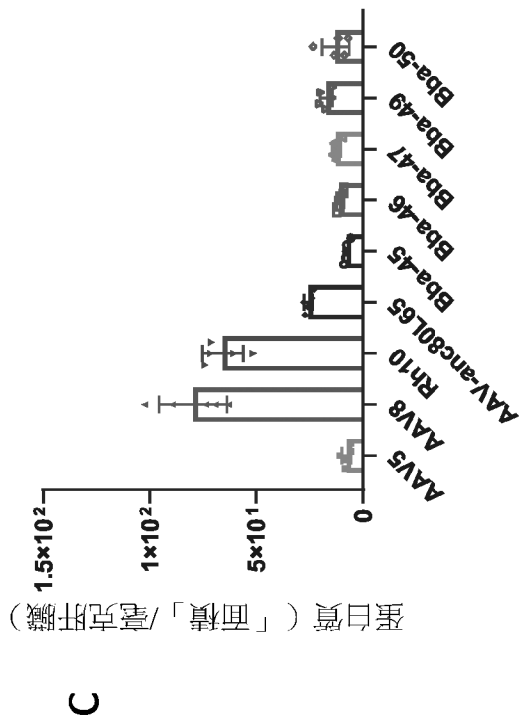
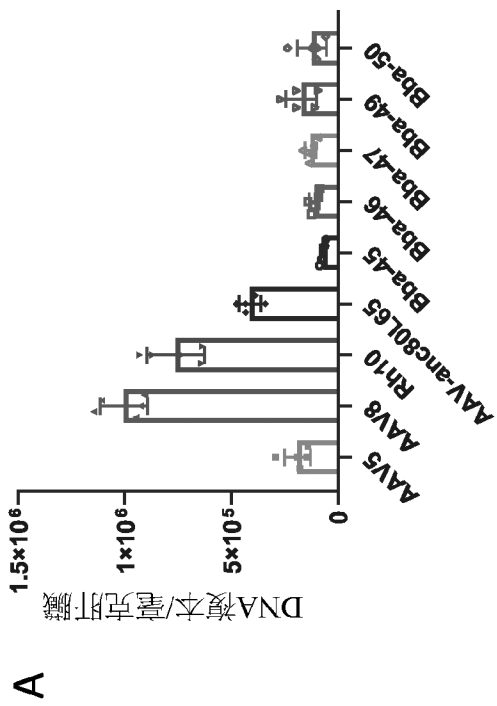
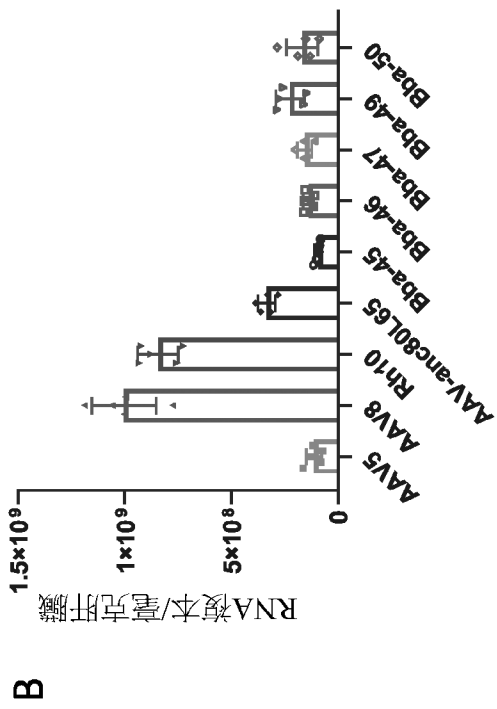
【圖4】



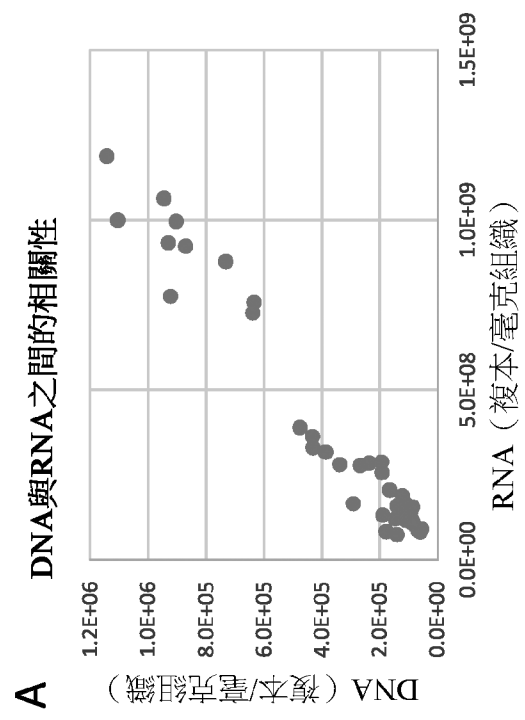
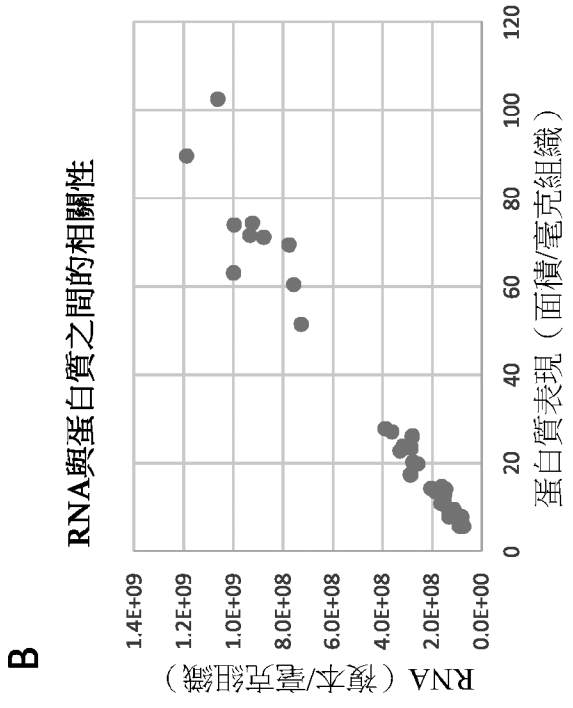
【圖5】



【圖6】

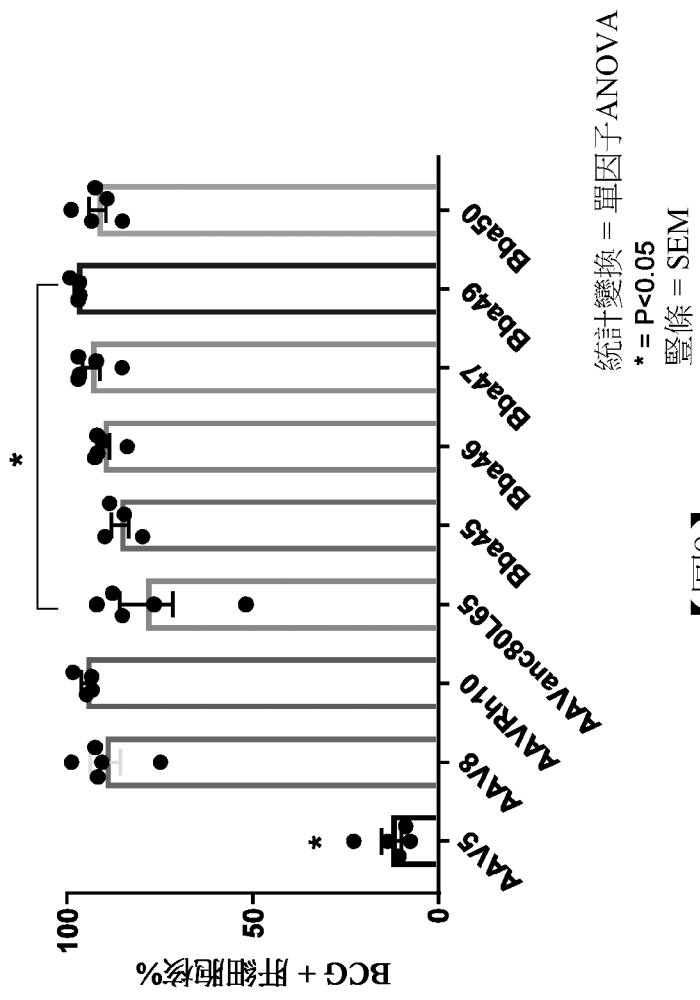


【圖7】

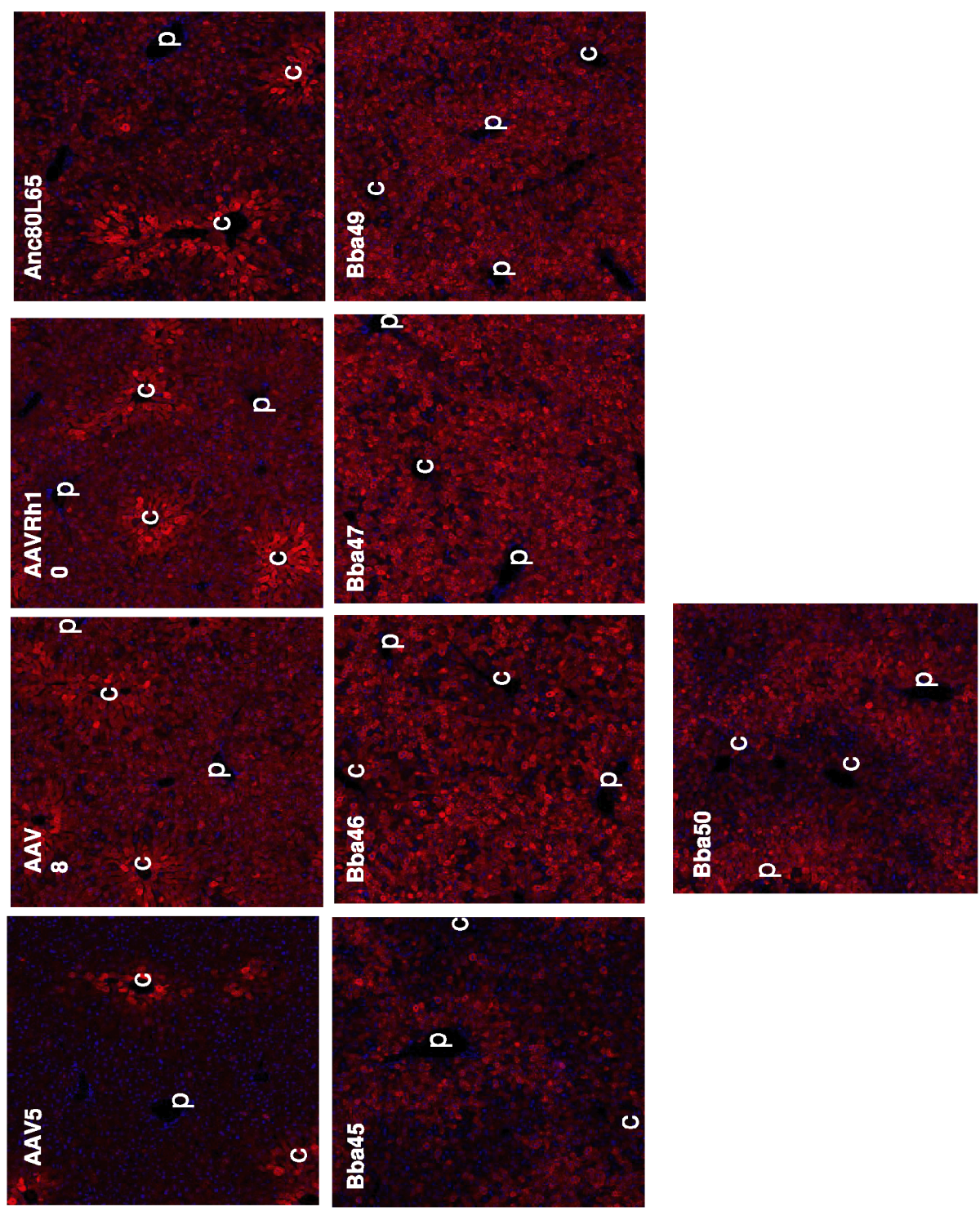


【圖8】

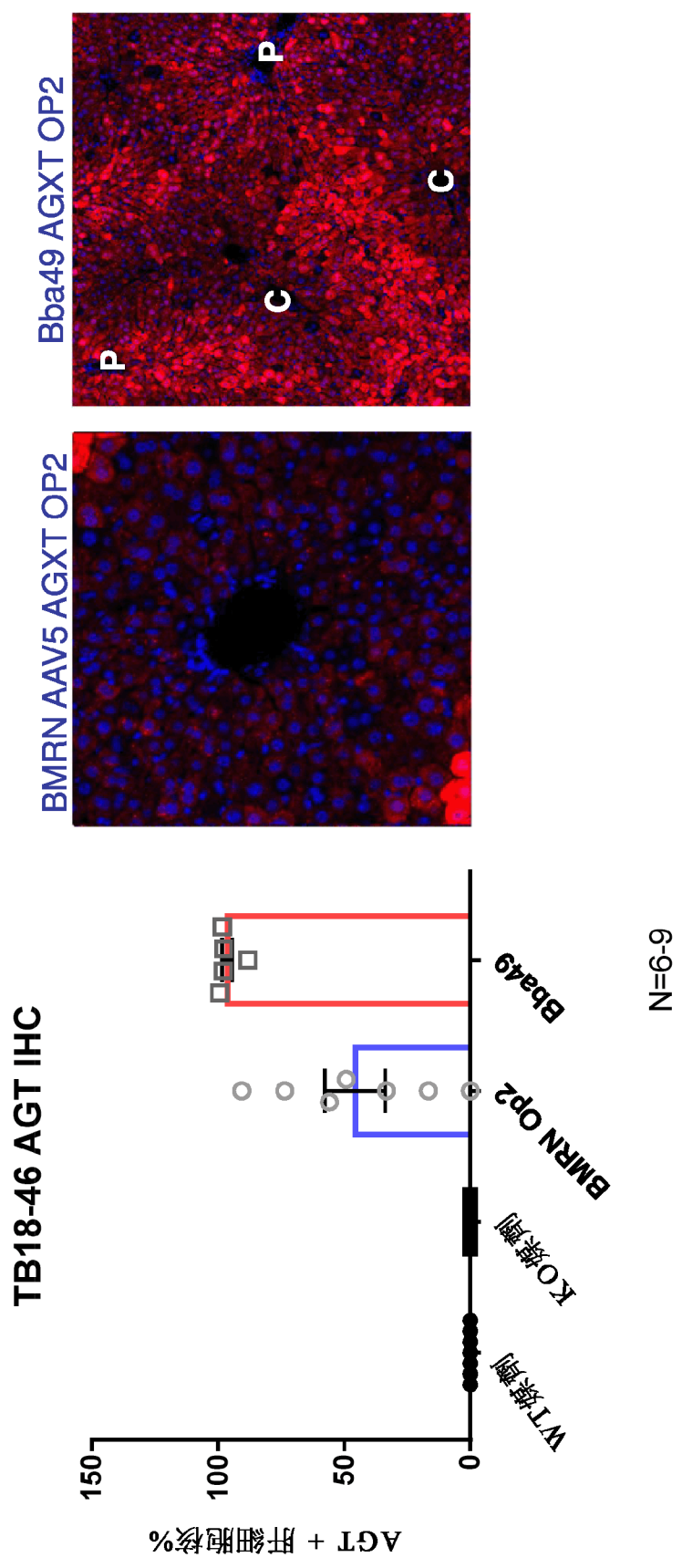
TB18-50 bCG IHC



【圖9】



【圖10】



【圖11】