



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119242659 A

(43) 申请公布日 2025.01.03

(21) 申请号 202411393506.3

C12N 15/864 (2006.01)

(22) 申请日 2019.06.12

C12N 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 48/00 (2006.01)

62/683,868 2018.06.12 US

(62) 分案原申请数据

201980053196.1 2019.06.12

(71) 申请人 北卡罗来纳大学教堂山分校

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 肖啸 李娟 肖斌 袁振华

(74) 专利代理机构 南京苏创专利代理事务所

(普通合伙) 32273

专利代理师 王华

(51) Int. Cl.

C12N 15/35 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

权利要求书1页 说明书38页
序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

合成嗜肝性腺相关病毒衣壳及其用途

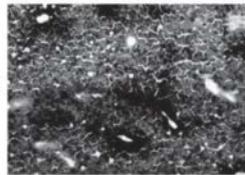
(57) 摘要

本发明涉及靶向肝的合成腺相关病毒衣壳及包含该衣壳的病毒载体。本发明进一步涉及使用所述载体靶向肝并提供肝特异性表达以及转导人原代肝细胞和细胞系的方法。

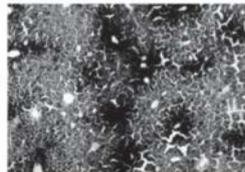
肝



XL12-LACZ



XL32-LACZ



1. 一种编码AAV衣壳的核酸,所述核酸包含与以下序列至少90%相同的AAV衣壳编码序列:
 - (a) SEQ ID NOS:1-3中任一序列的核苷酸序列;或
 - (b) 编码SEQ ID NOS:4-6中任一序列的核苷酸序列。
2. 一种体外细胞,包含稳定整合到基因组中的权利要求1所述的核酸。
3. 一种病毒颗粒,包含权利要求1所述的核酸。
4. 一种AAV衣壳,包含与SEQ ID NOS:4-6中任一序列至少90%相同的氨基酸序列。
5. 一种AAV颗粒,包含:
AAV载体基因组;和
权利要求4所述的AAV衣壳,其中所述AAV衣壳衣壳化所述AAV载体基因组。
6. 一种制备包含AAV衣壳的重组AAV颗粒的方法,所述方法包括:
在体外向细胞提供权利要求1所述的核酸、AAV rep编码序列、包含异源核酸的AAV载体基因组和用于产生生产性AAV感染的辅助功能体;及
组装包含所述AAV衣壳的重组AAV颗粒和衣壳化所述AAV载体基因组。
7. 一种药物制剂,包含在药学上可接受的载体中的权利要求1所述的核酸、权利要求3所述的病毒颗粒、权利要求4所述的AAV衣壳,或权利要求5所述的AAV颗粒。
8. 一种将目标核酸递送至肝细胞的方法,所述方法包括采用权利要求5所述的AAV颗粒接触肝细胞。
9. 一种将目标核酸递送至哺乳动物受试者肝细胞中的方法,所述方法包括:
向哺乳动物受试者施用有效量的权利要求5所述的AAV颗粒或权利要求7所述的药物制剂,从而将目标核酸递送至哺乳动物受试者的肝细胞中。
10. 一种治疗有需要的哺乳动物受试者疾病的方法,其中所述疾病可通过在受试者肝脏中表达产物来治疗,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效剂量的权利要求5所述的AAV颗粒或权利要求7所述的药物制剂,其中表达产物,从而治疗疾病。

合成嗜肝性腺相关病毒衣壳及其用途

优先权声明

[0001] 本申请要求2018年6月12日提交的序列号为62/683,868的美国临时申请的权益,通过引用,该临时申请全文纳入本申请中。

技术领域

[0002] 本发明涉及靶向肝的合成腺相关病毒衣壳及包含该衣壳的病毒载体。本发明进一步涉及使用所述载体靶向肝并提供肝特异性表达以及转导人原代肝细胞和细胞系的方法。

背景技术

[0003] 腺相关病毒(AAV)在各种组织中均具有有效的基因转移和持久的转基因表达,因此是一种很有前景的体内基因治疗载体。AAV载体在基因治疗临床试验中显示出良好的安全性并获得了治疗效果。一些新的AAV血清型的特征是通过全身基因递送大大改善心脏、肌肉和中枢神经系统(CNS)的转导效率。其他一些在小型动物的肝基因转移中有效。这些发现为许多遗传疾病和代谢疾病的基因治疗提供了启示。除了鉴定新的血清型外,基因修饰还可以进一步改善AAV载体的临床应用。利用AAV载体的一个问题是其广泛的组织嗜性通常导致基因在不想要的组织中转移,并可能引发异位基因表达的安全问题。为了改善AAV病毒颗粒的组织特异性和组织靶向能力,增强衣壳多样性和改变衣壳的目标组织嗜性,除进行合理的工程设计外,对衣壳基因开展随机突变是其中最有效的方法之一。定向进化(例如DNA改组)是最新开发出的一种AAV衣壳基因遗传工程方法。

[0004] DNA改组是一种随机片段化方法,然后进行PCR重组,以通过补丁同源重组将新的基因突变引入或交换到基因中。AAV自然会演变成具有不同组织嗜性或免疫原性的不同血清型。这些血清型的AAV cap(衣壳)基因也是通过改组其DNA并选择功能上可行的突变体和变体来生成新型重组体的理想模板。将经修饰的AAV cap基因克隆到合适的质粒载体中,以产生具有高度多样化生物学特性的嵌合病毒文库,并进一步表征其组织嗜性。

[0005] DNA改组后,采用许多基于培养细胞系的体外系统淘选病毒载体。然而,在基因治疗应用中,AAV载体必须面对人体或动物体内更复杂的生理环境,例如大量血清蛋白、潜在的中和抗体及非中和抗体、内皮屏障、对目标细胞的直接嗜性和感染性等。通常,在体外测试时表现出嗜肝性的修饰载体在体内使用时并不能充分靶向肝。

[0006] 因此,本领域需要为体内使用提供益处的嗜肝性改善的AAV载体。

发明内容

[0007] 本发明部分基于以下方案的使用:通过利用DNA改组的体外重组,使不同天然AAV血清型的cap基因显著多样化。首先在小鼠体内对得到的包含广泛的突变体和变体排列的AAV衣壳基因文库直接进行筛选。考虑到鉴定体内载体有效性的障碍,直接在C57BL/6J小鼠体内肝脏中开展AAV文库筛选,以模拟临床前或临床情况下的体内真实环境。随后选择培养细胞上初步富集的衣壳基因,以进一步选择包括嗜肝性衣壳的细胞类型和组织嗜性的新型

AAV衣壳。我们发现一种衣壳基因在小鼠肝脏中高度富集,并且对人肝癌细胞系和原代人肝细胞也具有高度感染性。

[0008] 因此,本发明的一个方面涉及一种编码AAV衣壳的核酸,所述核酸包含与以下序列至少90%相同的AAV衣壳编码序列:(a)SEQ ID NOS:1-3中任一序列的核苷酸序列;或(b)编码SEQ ID NO:4-6中任一序列的核苷酸序列,以及包含所述核酸的细胞和病毒颗粒。

[0009] 本发明的另一方面涉及AAV衣壳,其包含与SEQ ID NOS:4-6中任一序列至少90%相同的氨基酸序列,以及包含AAV载体基因组和本发明AAV衣壳的AAV颗粒。

[0010] 本发明的另一方面涉及产生包含AAV衣壳的重组AAV颗粒的方法,所述方法包括:在体外向细胞提供本发明的核酸、AAV rep编码序列、包括异源核酸的AAV载体基因组,和产生生产性AAV感染的辅助功能体;组装包含所述AAV衣壳的重组AAV颗粒并衣壳化所述AAV载体基因组。

[0011] 本发明的另一方面涉及药物制剂,其包含在药学上可接受的载体中的本发明核酸、病毒颗粒、AAV衣壳或AAV颗粒。

[0012] 本发明的另一方面涉及将目标核酸递送至肝细胞的方法,所述方法包括使细胞与本发明的AAV颗粒接触。

[0013] 本发明的另一方面涉及将目标核酸递送至哺乳动物受试者肝细胞的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用有效量的本发明的AAV颗粒或药物制剂。

[0014] 本发明的另一方面涉及治疗有需要的哺乳动物受试者疾病的方法,其中所述疾病可通过在受试者的肝脏中表达产物来治疗,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的本发明AAV颗粒或药物制剂。

[0015] 本发明的这些方面和其它方面在下面本发明的具体实施方式中进行更详细的说明。

附图说明

[0016] 图1A-1B示出了嗜肝性AAV衣壳XL12和XL32与AAV9的肝基因转移效率的体内对比情况。将LacZ和GFP报告载体包装在AAV9、AAVXL12和AAVXL32中。将这些载体纯化、滴定并经尾静脉注射到成年C57B/6小鼠体内,注射剂量为 5×10^{12} vg(载体基因组)/kg体重。3周后处死小鼠,并用X-gal对肝薄片染色用于检测LacZ表达(图1A);或直接安装并拍摄荧光照片用于检测GFP表达(图1B)。

[0017] 图2示出了嗜肝性AAV衣壳XL12和XL32与AAV9在人肝癌Huh7细胞系上的基因转移效率的体外对比情况。将包装在AAV9、XL12和XL32中的LacZ报告载体以感染复数为 1×10^5 vg/细胞和 1×10^4 vg/细胞(moi)转导Huh7细胞。3天后,开展X-gal染色,检测LacZ表达。

[0018] 图3A-3D显示了嗜肝性AAV衣壳XL12和XL32与其他血清型AAV在人原代肝细胞培养物上的基因转移效率的体外比较。GFP报告载体包装在AAVXL12、AAVXL32和其他多种常用的血清型衣壳中。AAV-GFP载体以感染复数(moi)为 1×10^5 vg/细胞感染人原代肝细胞培养物。在24小时和48小时或每天(长达7天)拍摄绿色荧光照片。(A)在来自三个供体的人原代肝细胞用AAV-GFP载体感染24小时后的GFP表达。(B)感染48小时后的GFP表达。(C)供体患者#4021的肝细胞感染1至7天后的AAVXL12和AAVXL32 GFP基因表达。(D)供体患者#4073的肝细胞感染1至7天后的AAVXL12和AAVXL32 GFP基因表达。观察到GFP基因的表达高效并增加。

[0019] 图4A-4C显示了嗜肝性AAV衣壳XL12和XL32与其他血清型AAV在犬原代肝细胞培养物中的基因转移效率的体外比较。GFP报告载体包装在AAVXL12、AAVXL32和其他多种常用的血清型衣壳中。AAV-GFP载体以感染复数(moi)为 1×10^5 vg/细胞感染犬原代肝细胞培养物。在24小时和48小时拍摄绿色荧光照片。(A) 24和48小时超低温保存的原代肝细胞(Dog DBCP01)的GFP表达。(B) 24小时新分离原代肝细胞(Dog DBF24)的GFP表达。(C) 48小时新分离原代肝细胞(Dog DBF24)的GFP表达。在AAV6、AAVXL12和AAVXL32感染的细胞中观察到GFP基因的表达高效且增加。

[0020] 图5显示了AAVXL32和AAV8经静脉内载体递送在成年猕猴肝脏中转导效率的比较。将AAV载体经静脉注射到血清中和抗体滴度低于1:8的3-5岁的成年雄性恒河猴体内。两只猕猴注射AAVXL32-CB-GFP,另两只猕猴注射AAV-CB-GFP,注射剂量为 1×10^{12} vg/kg体重。AAV载体表达盒采用双链(也称为自我互补)形式,可实现更快、更有效的基因表达。两周后对这些猕猴实施安乐死,并提取肝组织进行冷冻切片和开展绿色荧光照相。某些GFP阳性肝细胞用箭头突出显示。

[0021] 图6示出了AAVXL32和AAVXL32.1衣壳的蛋白质凝胶分析。高纯AAVXL32和AAVXL32.1以每条泳道浓度 1×10^{11} 个颗粒上样,在SDS-PAGE凝胶上进行分析,并通过银染显色。箭头突出显示了典型的AAV衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。箭头突出显示了AAVXL32中额外的衣壳蛋白VPX,这可能是由于CTC到CTG突变产生的较弱的起始密码子所致。将CTG反向突变为CTC消除了AAVXL32.1中的此额外蛋白。

具体实施方式

[0022] 本发明部分基于能够在体内和体外转导肝细胞的合成AAV衣壳序列的开发。此合成衣壳可用于产生AAV载体,用于需要肝脏特异性基因转移而无需将载体广泛生物分布到其他器官的研究或治疗应用中。

[0023] 下面对本发明进行更详细的说明。这些说明并非本发明可以实施的所有不同方式或本发明可以加入的所有特征的详细目录。例如,一个实施例中谈到的特征可以在其它实施例中采纳,特定实施例中阐明的特征也可以从该实施例中省略。此外,对本领域技术人员来说,根据本发明,本文建议的各种实施例的许多变化和添加将是显而易见的,它们并不背离本发明。因此,以下说明旨在阐明本发明的一些特定实施例,而不是穷举地指定其所有排列、组合和变形。

[0024] 除非上下文另外声明,应该特别指出的是,本文描述的本发明的各种特征可以以任何组合形式使用。此外,本发明还设想在本发明的一些实施例中,可以排除或省略本文提出的任何特征或特征组合。例如,如果说明书声明一种复合物包含组分A、B和C,应该特别指出的是,A、B或C组分中的任一种组分,或它们的组合,都可以单独或在任何组合中省略和放弃。

[0025] 除非特别规定,本发明使用的所有术语(包括技术名词和科学术语)的意义与本发明所属领域技术人员通常理解的相同。本发明说明中使用的术语仅仅是为了描述特定实施例,并不是用于限制本发明。

[0026] 除非特别说明,本文核苷酸序列仅以从左至右5'至3'方向的单链显示。本文核苷酸和氨基酸按照IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的方式表示,或(氨基酸)按照37CFR§1.822

和惯用法以单字母代码或三字母代码表示。

[0027] 除非另有说明,否则本领域技术人员熟悉的标准方法可用于制备重组和合成的多肽、抗体或其抗原结合片段,操作核酸序列,产生转化细胞,构建rAAV构建体、修饰的衣壳蛋白、表达AAV rep和/或cap序列的包装载体,以及瞬时和稳定转染的包装细胞。这些技术是本领域技术人员熟悉的。参见,例如,SAMBROOK et al.,MOLECULAR CLONING:ALABORATORY MANUAL 2nd Ed. (Cold Spring Harbor,NY,1989);F.M.AUSUBEL et al.CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(Green Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0028] 本文提到的所有出版物、专利申请、核苷酸序列、氨基酸序列和其它参考文献都通过引用而整体纳入本发明中。

I. 定义

[0029] 在本发明的说明书和所附权利要求书中,AAV衣壳亚基中所有氨基酸位置的指定是相对VP1衣壳亚基编号。

[0030] 在本发明的说明书和所附权利要求书中,除非上下文中清楚表明,否则,单数形式“一”、“这个”也包括复数形式。

[0031] 如本文所使用的,“和/或”指的是和包括一个或多个相关列出项目的任何和所有可能组合,及缺少替代(“或”)中阐明的组合。

[0032] 此外,本发明还设想在本发明的一些实施例中,可以排除或省略本文提出的任何特征或特征组合。

[0033] 此外,提到可测量值,如本发明化合物或试剂的数量、剂量、时间、温度等时使用的词语“大约”指的是包括规定数值 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化范围。

[0034] 本文所述与核酸、蛋白质或衣壳结构有关的词语“基本上由……组成”是指核酸、蛋白质或衣壳结构除所列举的要素以外不包含任何显著改变(例如,大于约1%、5%或10%)目标核酸、蛋白质或衣壳结构功能(例如,蛋白质或衣壳或核酸编码蛋白质或衣壳的嗜性)的要素。

[0035] 正如本文所述,在本发明上下文中,词语“腺相关病毒”(AAV)包括但不限于AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型(包括3A和3B型)、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV 10型、AAV 11型、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、羊AAV及目前已知或以后发现的任何其它AAV。参见,例如BERNARD N.FIELDLS et al.,VIROLOGY(第2卷第69章)(第4版,Lippincott-Raven Publishers(利平科特-雷文出版公司)).已经鉴定了多种其它AAV血清型和分支(参见,例如Gao et al.,(2004)J.Virol.78:6381-6388和表1),这些血清型和分支亦被词语“AAV”包括。

[0036] 各种AAV和自主细小病毒的基因组序列,以及ITR、Rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域熟悉的。这样的序列可以在文献中或公共数据库(如GenBank®数据库)中找到。参见,例如GenBank®登录号NC 002077、NC 001401、NC 001729、NC 001863、NC 001829、NC 001862、NC 000883、NC 001701、NC 001510、AF063497、U89790、AF043303、AF028705、AF028704、J02275、J01901、J02275、X01457、AF288061、AH009962、AY028226、AY028223、NC 001358、NC 001540、AF513851、AF513852、AY530579、AY631965、AY631966;它们的公开内容

整体并入本发明中。亦参见,例如,Srivistava et al.,(1983)J.Virol.45:555;Chiorini et al.,(1998)J.Virol.71:6823;Chiorini et al.,(1999)J.Virol.73:1309;Bantel-Schaal et al.,(1999)J.Virol.73:939;Xiao et al.,(1999)J.Virol.73:3994;Muramatsu et al.,(1996)Virology 221:208;Shade et al.,(1986)J.Virol.58:921;Gao et al.,(2002)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99:11854;国际专利公开WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244;美国专利No.6,156,303;它们的公开内容整体并入本发明中。亦参见表1。AAV1、AAV2和AAV3末端重复序列的早期描述见于Xiao,X.,(1996)“Characterization of Adeno-associated virus(AAV)DNA replication and integration”,宾夕法尼亚州匹兹堡市匹兹堡大学博士论文(整体并入本发明中)。

[0037] “嵌合”AAV核酸衣壳编码序列或AAV衣壳蛋白是结合两个或更多个衣壳序列一部分的一种序列或蛋白。“嵌合”AAV病毒体或颗粒包含嵌合AAV衣壳蛋白。

[0038] 本文所述词语“嗜性”是指病毒优先进入某些类型的细胞或组织和/或与细胞表面优先相互作用,促使进入某些类型的细胞或组织,任选和优选随后表达(例如,转录和(任选地)翻译)细胞中病毒基因组携带的序列,例如,对于重组病毒,异源核苷酸序列的表达)。本领域技术人员将了解的是,在缺乏反式作用因子时,例如,对于诱导型启动子或其它调节核酸序列,可能不会启动从病毒基因组转录异源核酸序列。在rAAV基因组的情况下,病毒基因组的基因表达可以来自稳定整合的原病毒和/或来自非整合附加体,以及病毒核酸可以在细胞内采取的任何其它形式。

表1

	GenBank 登录号		GenBank 登录号		GenBank 登录号
全基因组		Hu T88	AY695375	Hu42	AY530605
腺相关病毒 1	NC_002077,AF063497	Hu T71	AY695374	Hu67	AY530627
腺相关病毒 2	NC_001401	Hu T70	AY695373	Hu40	AY530603
腺相关病毒 3	NC_001729	Hu T40	AY695372	Hu41	AY530604
腺相关病毒 3B	NC_001863	Hu T32	AY695371	Hu37	AY530600
腺相关病毒 4	NC_001829	Hu T17	AY695370	Rh40	AY530559
腺相关病毒 5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377	Rh2	AY243007
腺相关病毒 6	NC_001862	分支 C		Bb1	AY243023
禽 AAV ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu9	AY530629	Bb2	AY243022
禽 AAV 菌株 DA-1	NC_006263, AY629583	Hu10	AY530576	Rh10	AY243015
牛 AAV	NC_005889, AY388617	Hu11	AY530577	Hu17	AY530582
分支 A		Hu53	AY530615	Hu6	AY530621
AAV1	NC_002077,AF063497	Hu55	AY530617	Rh25	AY530557
AAV6	NC_001862	Hu54	AY530616	Pi2	AY530554
Hu.48	AY530611	Hu7	AY530628	Pi1	AY530553
Hu 43	AY530606	Hu18	AY530583	Pi3	AY530555
Hu 44	AY530607	Hu15	AY530580	Rh57	AY530569

Hu 46	AY530609	Hu16	AY530581	Rh50	AY530563
分支 B		Hu25	AY530591	Rh49	AY530562
Hu.19	AY530584	Hu60	AY530622	Hu39	AY530601
Hu.20	AY530586	Ch5	AY243021	Rh58	AY530570
Hu 23	AY530589	Hu3	AY530595	Rh61	AY530572
Hu22	AY530588	Hu1	AY530575	Rh52	AY530565
Hu24	AY530590	Hu4	AY530602	Rh53	AY530566
Hu21	AY530587	Hu2	AY530585	Rh51	AY530564
Hu27	AY530592	Hu61	AY530623	Rh64	AY530574
Hu28	AY530593	分支 D		Rh43	AY530560
Hu 29	AY530594	Rh62	AY530573	AAV8	AF513852
Hu63	AY530624	Rh48	AY530561	Rh8	AY242997
Hu64	AY530625	Rh54	AY530567	Rh1	AY530556
Hu13	AY530578	Rh55	AY530568	分支 F	
Hu56	AY530618	Cy2	AY243020	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu57	AY530619	AAV7	AF513851	Hu31	AY530596
Hu49	AY530612	Rh35	AY243000	Hu32	AY530597
Hu58	AY530620	Rh37	AY242998	克隆分 离株	
Hu34	AY530598	Rh36	AY242999	AAV5	Y18065, AF085716
Hu35	AY530599	Cy6	AY243016	AAV 3	NC_001729
AAV2	NC_001401	Cy4	AY243018	AAV 3B	NC_001863
Hu45	AY530608	Cy3	AY243019	AAV4	NC_001829
Hu47	AY530610	Cy5	AY243017	Rh34	AY243001
Hu51	AY530613	Rh13	AY243013	Rh33	AY243002
Hu52	AY530614	分支 E		Rh32	AY243003
Hu T41	AY695378	Rh38	AY530558		
Hu S17	AY695376	Hu66	AY530626		

[0039] 词语“嗜性模式”是指一种或多种靶细胞、组织和/或器官的转导模式。合成AAV衣壳的代表性例子具有的嗜性模式特征在于具有高效的肝细胞转导，而其他器官的转导较低。

[0040] 本文所述词语“肝细胞特异性”是指病毒载体，当在体内施用，优先转导肝细胞，而肝外细胞的转导非常少。在一些实施例中，至少大约80%的转导细胞是肝细胞，例如，至少大约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的转导细胞是肝细胞。

[0041] 本文所述的词语“可通过在肝脏中表达产物而治疗的疾病”是指其中在肝脏中表达一种产物（例如，蛋白质或多核苷酸）提供有效的治疗或预防的疾病、病症或损伤。

[0042] 如本文所使用的，所述病毒载体（例如，AAV载体）对细胞的“转导”是指通过将核酸

掺入到病毒载体内,随后通过病毒载体转移到细胞中,而使载体进入到细胞内,并将遗传物质转移到细胞中。

[0043] 除非另外说明,否则可以通过参照合适的阳性或阴性对照来确定“有效转导”或“有效嗜性”或类似词语(例如,分别是阳性对照转导或嗜性的至少大约50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或更多,或者分别是阴性对照转导或嗜性的至少大约110%、120%、150%、200%、300%、500%、1000%或更多)。

[0044] 类似地,可以通过参照合适的对照来确定病毒对靶组织是否“没有有效地转导”或“没有有效的嗜性”,或类似的说法。在特定实施例中,病毒载体不能有效地转导(即,对于其没有有效的嗜性)肝外组织,例如,肌肉、肾脏、性腺和/或生殖细胞。在特定实施例中,不期望组织(例如,肝脏)的转导是期望靶组织(例如,肝细胞)的转导水平的20%或更少,10%或更少,5%或更少,1%或更少,0.1%或更少。

[0045] 除非另外说明,如本文所使用的,所述词语“多肽”包括肽和蛋白质。

[0046] “核酸”或“核苷酸序列”是核苷酸碱基序列,可能是RNA、DNA或DNA-RNA杂合序列(包括天然和非天然核苷酸),但是优选是单链或双链DNA序列。

[0047] 如本文所使用的,所述“分离”核酸或核苷酸序列(例如,“分离DNA”或“分离RNA”)指的是与天然生物或病毒的至少一些其它组分分离的核酸或核苷酸或基本上不含天然生物或病毒的至少一些其它组分的核酸或核苷酸,例如,通常发现的与核酸或核苷酸序列有关的细胞或病毒结构组分或其它多肽或核酸。

[0048] 同样,“分离”多肽指的是与天然生物或病毒至少其它一些组分(例如,通常发现与多肽有关的细胞或病毒结构组分或其它多肽或核酸)分离的多肽或基本上不含天然生物或病毒至少其它一些组分的多肽。

[0049] 词语“治疗”(或其语法上相当的词语)指的是受试者疾病严重程度减轻或至少部分改善或变好和/或至少一种临床症状减轻、缓解或减少和/或疾病进程延迟和/或预防或延迟疾病或病症发作。

[0050] 如本文所使用的,词语“预防”(及其语法上相当的词语)是指延迟疾病或病症的发作或减轻疾病或病症发作后的症状。该词语并非指疾病完全消除,并且包括降低疾病发生率或延迟疾病发作和/或发展的任何类型的预防性治疗。

[0051] 本文所述“有效”或“治疗有效”剂量是足够为受试者提供某些改善或好处的剂量。或者,“有效”或“治疗有效”剂量是减轻、缓解或减少受试者至少一种临床症状的剂量。本领域技术人员将了解的是,治疗效果并不需要是全面的或治愈的,只要为受试者提供某些好处即可。

[0052] “异源核苷酸序列”或“异源核酸”是病毒中非天然存在的序列。通常,异源核酸或核苷酸序列包含编码多肽和/或非翻译RNA的开放阅读框。

[0053] “治疗性多肽”是可以缓解或减轻细胞或受试者因蛋白质缺少或缺陷所引发症状的多肽。此外,“治疗性多肽”是给受试者带来好处(例如,抗癌效果或改善移植物存活性)的多肽。

[0054] 如本文所使用的,所述词语“载体”、“病毒载体”、“递送载体”(和类似词语)通常是指充当核酸递送载体并包含包装在病毒体中的病毒核酸(即载体基因组)的病毒颗粒。本发明的病毒载体包含本发明的合成AAV衣壳,并且可以包装AAV或rAAV基因组或任何其他核酸

(包括病毒核酸)。或者,在某些情况下,词语“载体”、“病毒载体”、“递送载体”(和类似词语)可用于指在没有病毒体的情况下的载体基因组(例如vDNA)和/或充当递送束缚在衣壳中或包装在衣壳中的分子的转运蛋白的病毒衣壳。

[0055] “重组AAV载体基因组”或“rAAV基因组”是包含至少一个反向末端重复序列(例如,一个、两个或三个反向末端重复序列)和一个或多个异源核苷酸序列的AAV基因组(即vDNA)。rAAV载体通常保留145个顺式碱基末端重复序列(TR)以产生病毒;但是,包括部分或全部合成序列的修饰AAV TR和非AAV TR也可以达到此目的。所有其它病毒序列是可有可无的,可能以反式提供(Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97)。rAAV载体任选包括两个TR(例如,AAV TR),它们通常将在异源核苷酸序列的5'和3'末端,但是不必与其邻接。这些TR可以彼此相同或不同。载体基因组还可以在其3'或5'末端包括一个ITR。

[0056] 词语“末端重复”或“TR”包括形成发夹结构并作为反向末端重复序列(即介导要求的功能,例如,复制、病毒包装、整合和/或原病毒拯救等)的任何病毒末端重复序列或合成序列。TR可以是AAV TR或非-AAV TR。例如,非-AAV TR序列,如其它细小病毒(例如,犬细小病毒(CPV)、鼠细小病毒(MVM)、人细小病毒B-19)的序列,或作为SV40复制源的SV40发夹可以作为TR使用,可以通过截断、替换、删除、插入和/或加入进一步进行修饰。此外,TR可以部分或全部合成,例如,授权给Samulski等人的美国专利第5,478,745号中描述的“双-D序列”。

[0057] “AAV末端重复”或“AAV TR”可以来自任何AAV,包括但不限于血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或11,或现在熟知的或以后发现的任何其它AAV(参见,例如表1)。AAV末端重复序列不需要拥有天然末端重复序列(例如,天然AAV TR序列可以通过插入、删除、截断和/或错义突变改变),只要所述末端重复序列介导所要求的功能,例如,复制、病毒包装、整合,和/或原病毒拯救等即可。

[0058] 词语“rAAV颗粒”和“rAAV病毒体”在本文中可互换使用。“rAAV颗粒”或“rAAV病毒体”包括包装在AAV衣壳内的rAAV载体基因组。

[0059] AAV衣壳结构在BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, (第2卷第69&70章)(第4版, Lippincott-Raven Publishers(利平科特-雷文出版公司))中进行了更详细的描述。

[0060] “基本上保留”一种性质指的是保留所述性质(例如,活性或其它可测量的特性)的至少大约75%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%。

靶向肝的合成AAV衣壳

[0061] 本发明人已经鉴定出能够在体内和体外转导人和其他哺乳动物肝细胞但对其它器官嗜性非常低的合成AAV衣壳结构。因此,本发明的一个方面涉及能够在受试者(例如野生型受试者)中提供肝基因转移的合成AAV衣壳结构。在一些实施例中,本发明涉及一种编码AAV衣壳的核酸,所述核酸包含、基本上由或由与以下序列至少90%相同的AAV衣壳编码序列组成:(a) SEQ ID NOS:1-3中任一序列的核苷酸序列;或(b) 编码SEQ ID NOS:4-6中任一序列的核苷酸序列;以及包含嵌合AAV衣壳的病毒。在一些实施例中,AAV衣壳编码序列与(a)或(b)的核苷酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%相同。在另一个实施例中,AAV衣壳编码序列包含、基本上由或由(a)或(b)的核苷酸序列组成。

[0062] SEQ ID NOS:4-6示出了VP1衣壳蛋白序列。在本发明的说明书和所附权利要求书

中,所有氨基酸位置的指定是相对VP1编号。本领域技术人员将了解的是,AAV衣壳通常也包含更小的VP2和VP3衣壳蛋白。由于AAV衣壳蛋白的编码序列重叠,根据公开序列所示的VP1序列,VP2和VP3衣壳蛋白的核酸编码序列和氨基酸序列将是显而易见的。特别是,VP2始于SEQ ID NO:1的核苷酸412(acg)和SEQ ID NO:4的苏氨酸138。VP3始于SEQ ID NO:1的核苷酸610(atg)和SEQ ID NO:4的蛋氨酸204。在一些实施例中,考虑了包含来自SEQ ID NOS:4-6的序列的分离VP2和VP3衣壳蛋白及编码VP2或VP3蛋白或这两者的分离核酸。

[0063] 本发明还提供合成AAV衣壳蛋白和合成衣壳,所述衣壳包含、基本上由或由与SEQ ID NOS:4-6中任一序列至少90%相同的氨基酸序列组成。在一些实施例中,所述AAV衣壳序列与SEQ ID NOS:4-6中任一序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%相同。在一些实施例中,衣壳蛋白包含、基本上由或由如SEQ ID NOS:4-6所示氨基酸序列组成,其中SEQ ID NOS:4-6的衣壳蛋白编码序列内的1个、2个或更少,3个或更少,4个或更少,5个或更少,6个或更少,7个或更少,8个或更少,9个或更少,10个或更少,12个或更少,15个或更少,20个或更少,25个或更少,30个或更少,40个或更少或50个或更少的氨基酸被另一个(天然的、修饰的和/或合成的)氨基酸取代(任选是保守氨基酸取代),和/或被删除和/或存在1个、2个或更少,3个或更少,4个或更少,5个或更少,6个或更少,7个或更少,8个或更少,9个或更少,10个或更少,12个或更少,15个或更少,20个或更少,25个或更少,30个或更少,40个或更少,或50个或更少的氨基酸插入(包括N端和C端延伸),或者取代、删除和/或插入的任何组合,其中所述取代、删除和/或插入不会不适当地损害包含变体衣壳蛋白或衣壳的病毒体(例如,AAV病毒体)的结构和/或功能。在一些实施例中,SEQ ID NOS:4-6的衣壳蛋白编码序列内的氨基酸在位置220和/或643处(相对于SEQ ID NO:4编号)被另一个氨基酸取代。例如,在本发明的代表性实施例中,包含合成衣壳蛋白的AAV病毒体基本上保留了包含如SEQ ID NOS:4-6所示合成衣壳蛋白的合成病毒体的至少一种特性。例如,包含合成衣壳蛋白的病毒体可基本上保留包含如SEQ ID NOS:4-6所示合成AAV衣壳蛋白的病毒体的嗜肝性。评价生物学性质例如病毒转导的方法是本领域熟悉的(参见例如实例)。

[0064] 保守氨基酸取代是本领域熟悉的。在特定实施例中,保守氨基酸取代包括以下一组或多组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和/或苯丙氨酸、酪氨酸。

[0065] 对本领域技术人员显而易见的是,SEQ ID NOS:4-6的嵌合AAV衣壳蛋白的氨基酸序列可以进一步修饰,以掺入本领域熟悉的其他修饰,从而赋予所需的性质。作为非限制性的可能性,衣壳蛋白可以经修饰而掺入靶向序列(例如RGD)或方便纯化和/或检测的序列。例如,衣壳蛋白可以与谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白、肝素/硫酸乙酰肝素结合域、聚组氨酸、配体和/或报告蛋白(例如,绿色荧光蛋白、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶等)、免疫球蛋白Fc片段、单链抗体、血凝素、c-myc、FLAG表位等的全部或部分融合,从而形成融合蛋白。将靶向肽插入到AAV衣壳中的方法是本领域熟悉的(参见,例如,国际专利公开W0 00/28004;Nicklin et al., (2001) Mol. Ther. 474-181; White et al., (2004) Circulation 109:513-319; Muller et al., (2003) Nature Biotech. 21:1040-1046)。

[0066] 本发明的病毒可进一步包含双链病毒基因组,如国际专利公开W0 01/92551和美国专利第7,465,583号中所述。

[0067] 本发明还提供了包含本发明合成AAV衣壳蛋白的AAV衣壳和包含所述AAV衣壳的病毒颗粒(即病毒体),其中病毒颗粒包装(即衣壳化)载体基因组,任选AAV载体基因组。在特定实施例中,本发明提供包含AAV衣壳的AAV颗粒,所述AAV衣壳包含本发明的AAV衣壳蛋白,其中所述AAV衣壳包装AAV载体基因组。本发明还提供包含由本发明的合成核酸衣壳编码序列编码的AAV衣壳或AAV衣壳蛋白的AAV颗粒。

[0068] 在特定实施例中,所述病毒体是包括目标异源核酸的重组载体,例如用于递送至细胞。因此,本发明可用于体外、离体和体内将核酸递送至细胞。在代表性实施例中,本发明的重组载体可以有利地用于将核酸递送或转移至动物(例如哺乳动物)细胞。

[0069] 任何异源核苷酸序列都可以采用本发明的病毒载体递送。目标核酸包括编码多肽的核酸,任选治疗性(例如,用于医学或兽医用途)和/或免疫原性(例如,用于疫苗)多肽。

[0070] 治疗性多肽包括但不限于囊性纤维化跨膜调节蛋白(CFTR)、肌营养不良蛋白(包括肌营养不良蛋白小基因或微基因的蛋白质产物,参见,例如,Vincent et al., (1993) Nature Genetics 5:130;美国专利公开No.2003017131;Wang et al., (2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13714-9,[迷你-肌营养不良蛋白];Harper et al., (2002) Nature Med.8:253-61[微肌营养不良蛋白]);迷你聚集蛋白、层粘连蛋白- $\alpha 2$ 、肌聚糖(α 、 β 、 γ 或 δ)、福库汀(Fukutin)相关蛋白、肌生长抑制素前肽、卵泡抑素、显性阴性肌生长抑制素、血管生成因子(例如VEGF,血管生成素-1或2)、抗凋亡因子(例如血红素加氧酶-1、TGF- β 、促凋亡信号的抑制剂(例如caspase)、蛋白酶、激酶、死亡受体[例如CD-095]、细胞色素C释放的调节剂、线粒体孔的开放和肿胀抑制剂);激活素II型可溶性受体、抗炎多肽(例如Ikappa B显性突变体)、肌长蛋白(sarcospan)、utrophin(抗肌萎缩蛋白相关蛋白)、微型-utrophin、抗肌生长抑制素或肌生长抑制素前肽的抗体或抗体片段、细胞周期调节剂、Rho激酶调节剂(如Cethrin,它是一种修饰的细菌C3胞外酶[由加拿大魁北克省圣劳伦市的BioAxone Therapeutics, Inc提供]、BCL-xL、BCL2、XIAP、FLICEc-s、显性阴性caspase-8、显性阴性caspase-9、SPI-6(参见,例如,美国专利申请No.20070026076)、转录因子PGC- $\alpha 1$ 、Pinch基因、ILK基因和胸腺素 $\beta 4$ 基因)、凝血因子(例如,因子VIII、因子IX、因子X等)、促红细胞生成素、血管抑素、内皮抑素、过氧化氢酶、酪氨酸羟化酶、细胞内和/或细胞外超氧化物歧化酶、瘦素、LDL受体、脑啡肽酶、脂蛋白脂肪酶、鸟氨酸转氨甲酰酶、 β -珠蛋白、 α -珠蛋白、血影蛋白、 α_1 -抗胰蛋白酶、甲基胞嘧啶结合蛋白2、腺苷脱氨酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶、 β -葡萄糖脑苷脂酶、鞘磷脂酶、溶酶体氨基己糖苷酶A、支链酮酸脱氢酶、RP65蛋白、细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、干扰素- γ 、白介素-1至-14、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等)、肽生长因子、神经营养性因子和激素(例如,生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子(包括IGF-1和IGF-2)、GLP-1、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、神经营养性因子-3和-4、脑衍生神经营养因子、胶质衍生生长因子、转化生长因子- α 和- β 等)、骨形成蛋白(包括RANKL和VEGF)、溶酶体蛋白、谷氨酸受体、淋巴因子、可溶CD4、Fc受体、T细胞受体、ApoE、ApoC、蛋白磷酸酶抑制剂1的抑制剂1(I-1)、受磷蛋白、serca2a、溶酶体酸性 α -葡萄糖苷酶、 α -半乳糖苷酶A、Barkct、 $\beta 2$ -肾上腺素能受体、 $\beta 2$ -肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3激酶(PI3激酶)、calsarcin、受体(例如,肿瘤坏死生长因子- α 可溶性受体)、抗炎因子(如IRAP、Pim-1、PGC-1 α 、SOD-1、SOD-2、ECF-SOD、激肽释放酶、胸腺素- $\beta 4$)、缺氧诱导转录因子[HIF]、血管生成因子、S100A1、小白蛋白、腺苷酸

环化酶6型、影响G-蛋白偶联2型受体激酶敲低的分子,例如截短的组成性活性bARKct;受磷酸抑制或显性阴性分子,如受磷酸蛋白S16E、单克隆抗体(包括单链单克隆抗体)或自杀基因产物(例如,胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素和肿瘤坏死因子如TNF- α),以及对有需要的受试者具有治疗作用的任何其他多肽。

[0071] 编码多肽的异源核苷酸序列包括编码报告多肽(例如,酶)的那些序列。报告多肽是本领域熟悉的,包括但不限于荧光蛋白(例如,EGFP、GFP、RFP、BFP、YFP或dsRED2),产生可检测产物的酶,例如荧光素酶(例如,Gaussia、Renilla或Photinus供应)、 β -半乳糖苷酶, β -葡萄糖醛酸苷酶、碱性磷酸酶和氯霉素乙酰基转移酶基因,或可以直接检测的蛋白质。实际上,任何蛋白质都可以通过使用例如该蛋白质的特异性抗体来直接检测。适合阳性或阴性真核细胞选择的其他标志物(和相关的抗生素)在Sambrook and Russell(2001), *Molecular Cloning*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.和Ausubel et al.(1992), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, 包括定期更新中进行了公开。

[0072] 或者,异源核酸可编码功能性RNA,例如反义寡核苷酸、核酶(例如,如美国专利第5,877,022号中所述)、影响剪接体介导反式剪接的RNA(参见Puttaraju et al., (1999) *Nature Biotech.* 17:246;美国专利No.6,013,487;美国专利No.6,083,702)、干扰RNA(RNAi),包括介导基因沉默的小干扰RNA(siRNA)(参见Sharp et al., (2000) *Science* 287:2431)、microRNA,或其他非翻译的“功能”RNA,例如“指导”RNA(“guide”RNA)(Gorman et al., (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:4929;U.S. Patent No.5,869,248 to Yuan et al.)等。示例性的未翻译RNA包括针对多重耐药性(MDR)基因产物的RNAi或反义RNA(例如,用于治疗肿瘤和/或向心脏施用以防止化疗造成的损害),针对肌肉生长抑制素(杜氏或贝克尔肌营养不良症)的RNAi或反义RNA,针对VEGF或肿瘤免疫原的RNAi或反义RNA,包括但不限于本文特别描述的那些肿瘤免疫原(用于治疗肿瘤),靶向突变营养不良蛋白(杜氏或贝克尔肌营养不良症)的RNAi或反义寡核苷酸,针对乙型肝炎表面抗原基因(预防和/或治疗乙型肝炎感染)的RNAi或反义RNA,针对HIV tat和/或rev基因(预防和/或治疗HIV)的RNAi或反义RNA和/或针对病原体的任何其它免疫原(以保护受试者免受病原体感染)或有缺陷的基因产物(以预防或治疗疾病)的RNAi或反义RNA。针对上述靶或任何其他靶的RNAi或反义RNA也可以用作研究试剂。

[0073] 正如本领域熟悉的那样,反义核酸(例如,DNA或RNA)和抑制性RNA(例如,microRNA和RNAi,如siRNA或shRNA)序列可以用于在因肌营养不良蛋白基因缺陷而引发肌营养不良症的患者中诱导“外显子跳跃”。因此,异源核酸可以编码诱导适当外显子跳跃的反义核酸或抑制性RNA。本领域技术人员将了解的是,外显子跳跃的具体方法取决于肌营养不良蛋白基因中潜在缺陷的性质,并且许多这样的方案是本领域已知的。示例性反义核酸和抑制性RNA序列靶向一个或多个肌营养不良蛋白外显子(例如外显子19或23)的上游分支点和/或下游供体剪接位点和/或内部剪接增强子序列。例如,在特定实施例中,异源核酸编码针对肌营养不良蛋白基因的外显子19或23的上游分支点和下游剪接供体位点的反义核酸或抑制性RNA。这些序列可以掺入到递送修饰U7 snRNA和反义核酸或抑制性RNA的AAV载体中(参见,例如,Goyenvalle et al., (2004) *Science* 306:1796-1799)。作为另一种策略,可以将修饰的U1 snRNA以及与肌营养不良蛋白外显子(例如外显子19或23)的上游和下游剪接位

点互补的siRNA、microRNA或反义RNA掺入AAV载体中(参见,例如,Denti et al., (2006) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 103:3758-3763)。此外,反义核酸和抑制性RNA可以靶向外显子19、43、45或53内的剪接增强子序列(参见,例如美国专利No.6,653,467;美国专利No.6,727,355;和美国专利No.6,653,466)。

[0074] 核酶是以位点特异性方式切割核酸的RNA-蛋白质复合物。核酶具有拥有核酸内切酶活性的特定催化结构域(Kim et al., (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:8788; Gerlach et al., (1987) Nature 328:802; Forster and Symons, (1987) Cell 49:211)。例如,大量核酶以高度特异性促进磷酸酯转移反应,通常在寡核苷酸底物中仅裂解几种磷酸酯中的一种磷酸酯(Michel and Westhof, (1990) J.Mol.Biol.216:585; Reinhold-Hurek and Shub, (1992) Nature 357:173)。这种特异性归因于以下要求:在化学反应之前,底物通过特定的碱基配对相互作用与核酶的内部引导序列(“IGS”)结合。

[0075] 据观察,核酶催化主要作为涉及核酸的序列特异性剪切/连接反应的一部分(Joyce, (1989) Nature 338:217)。例如,据美国专利No.5,354,855报告,某些核酶可以作为核酸内切酶,其序列特异性大于已知的核糖核酸酶,接近DNA限制酶。因此,序列特异性核酶介导的核酸表达抑制可能特别适合治疗应用(Scanlon et al., (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10591; Sarver et al., (1990) Science 247:1222; Sioud et al., (1992) J.Mol.Biol.223:831)。

[0076] MicroRNA(mir)是天然细胞RNA分子,可以通过控制mRNA的稳定性来调节多个基因的表达。特定microRNA的过表达或减少可用于治疗功能障碍,并已证明在许多疾病和疾病动物模型中均有效(参见,例如Couzin, (2008) Science 319:1782-4)。嵌合AAV可用于将microRNA递送到细胞、组织和受试者中,以治疗遗传性疾病和获得性疾病,或增强功能和促进某些组织的生长。例如,mir-1、mir-133、mir-206和/或mir-208可用于治疗心脏和骨骼肌疾病(参见,例如Chen et al., (2006) Genet.38:228-33; van Rooij et al., (2008) Trends Genet.24:159-66)。MicroRNA也可用于基因递送后调节免疫系统(Brown et al., (2007) Blood 110:4144-52)。

[0077] 本文所述词语“反义寡核苷酸”(包括“反义RNA”)是指与指定的DNA或RNA序列互补并特异性杂交的核酸。反义寡核苷酸和编码反义寡核苷酸的核酸可以按照常规方法制备。参见,例如授权给Tullis的美国专利No.5,023,243;授权给Pederson等的美国专利No.5,149,797。

[0078] 本领域技术人员将了解的是,反义寡核苷酸不必与靶序列完全互补,只要序列相似度足以使反义核苷酸序列与其靶特异性杂交(如上文定义)和减少蛋白质产物的产生(例如减少至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)即可。

[0079] 为了确定杂交的特异性,可以在低严格性、中严格性或甚至高严格性条件下进行这种寡核苷酸与靶序列的杂交。实现低严格性、中严格性和高严格性杂交条件的合适条件如本文所述。

[0080] 换句话说,在特定实施例中,本发明的反义寡核苷酸与靶序列的互补序列具有至少大约60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%或更高的序列一致性,并降低了蛋白质产物的产生量(如上文定义)。在一些实施例中,与靶序列相比,反义序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。

[0081] 确定核酸序列一致性百分数的方法在本申请其他地方更详细地描述。

[0082] 反义寡核苷酸的长度不是很关键,只要它与预期靶特异性杂交并减少蛋白质产物的产生量(如上文定义)即可,并且所述长度可以按照常规程序确定。通常,反义寡核苷酸的长度为至少大约八个、十个或十二个或十五个核苷酸和/或长度小于大约20、30、40、50、60、70、80、100或150个核苷酸。

[0083] RNA干扰(RNAi)是另一种减少蛋白质产物(例如shRNA或siRNA)产生量的有用方法。RNAi是一种转录后基因沉默机制,其中将与目标靶序列相对应的双链RNA(dsRNA)引入到细胞或有机体中,导致相应的mRNA降解。RNAi实现基因沉默的机制在Sharp et al., (2001)Genes Dev 15:485-490;和Hammond et al., (2001)Nature Rev.Gen.2:110-119)中进行了综述。在恢复基因表达之前,RNAi效应会持续多个细胞分裂。因此,RNAi是在RNA水平进行靶向敲除或“敲低”的有力方法。RNAi已证明在人类细胞(包括人类胚胎肾和HeLa细胞)中获得了成功(参见,例如,Elbashir et al.,Nature(2001)411:494-8)。

[0084] 最初,在哺乳动物细胞中使用RNAi进行尝试,得出了响应dsRNA分子的涉及PKR的抗病毒防御机制(参见,例如,Gil et al.,(2000)Apoptosis 5:107)。自那以后,已证明大约21个核苷酸的短合成dsRNA(称为“短干扰RNA”(siRNA))可在哺乳动物细胞中介导沉默而不会触发抗病毒反应(参见,例如,Elbashir et al.,Nature(2001)411:494-8;Caplen et al.,(2001)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 98:9742)。

[0085] RNAi分子(包括siRNA分子)可以是短发夹RNA(shRNA;参见Paddison et al.,(2002),Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99:1443-1448),人们认为,这种短发夹RNA是通过类似Dicer酶一样的RNase III的作用在细胞中被加工成20-25mer siRNA分子的。shRNA通常具有茎环结构,其中两个反向重复序列被环出的短间隔序列隔开。报道了环长度为3至23个核苷酸的shRNA。环序列通常并不重要。示例性的环序列包括以下基序:AUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU、CCACACC和UUCAAGAGA。

[0086] RNAi可进一步包括环状分子,其包括有义和反义区域,在两侧的任一侧具有两个环区,以在有义和反义区域之间形成dsRNA时形成“哑铃”形结构。这种分子可以在体外或体内加工以释放dsRNA部分,例如siRNA。

[0087] 国际专利公开WO 01/77350描述了用于双向转录的载体,以在真核细胞中产生异源序列的有义和反义转录物。这种方法可用于产生本发明使用的RNAi。

[0088] Shinagawa et al.,(2003)Genes Dev.17:1340报道了一种从CMV启动子(pol II启动子)表达长dsRNA的方法,该方法也适用于组织特异性pol II启动子。同样,Xia et al.,(2002)Nature Biotech.20:1006的方法避免了poly(A)拖尾,可与组织特异性启动子结合使用。

[0089] 产生RNAi的方法包括化学合成、体外转录、采用Dicer消化长dsRNA(体外或体内)、从递送载体进行体内表达及从PCR衍生的RNAi表达盒进行体内表达(参见,例如TechNotes10(3)“Five Ways to Produce siRNAs”,德克萨斯州奥斯汀市Ambion公司)。

[0090] 可提供设计siRNA分子的指南(参见,例如,德克萨斯州奥斯汀市Ambion公司的文献)。在特定实施例中,siRNA序列具有约30-50%含量的G/C。此外,如果使用RNA聚合酶III转录RNA,通常避免了长于四个T或A残基的长延伸。可以提供在线siRNA靶查找工具,例如,由Ambion公司、Whitehead Institute of Biomedical Research,或Dharmacon Research,

Inc提供。

[0091] RNAi分子的反义区可以与靶序列完全互补,但并不需要如此,只要它与靶序列特异性杂交(如上文所定义)并减少蛋白质产物的产生量(例如减少至少大约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)即可。在一些实施例中,此类寡核苷酸与靶序列的杂交可以在低严格性、中严格性或甚至高严格性的条件下进行,如上文所定义。

[0092] 在其他实施例中, RNAi的反义区与靶序列的互补序列具有至少约60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%或更高的序列一致性,并减少了蛋白产物的产生量(例如,减少至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)。在一些实施例中,与靶序列相比,反义区包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配。通常,错配位于dsRNA末端比位于中心部分的耐受性更好。

[0093] 在特定实施例中, RNAi通过两个分开的有义和反义分子之间的分子间复合形成。RNAi包含由两条分开的链之间的分子间碱基配对形成的ds区。在其他实施方案中, RNAi包含由单个核酸分子内的分子内碱基配对形成的ds区域,该单个核酸分子包括有义和反义区域,通常作为反向重复序列(例如, shRNA或其他茎环结构,或环状RNAi分子)。RNAi可进一步在有义和反义区域之间包含间隔区。

[0094] 通常, RNAi分子具有高度选择性。如果需要,本领域技术人员可以通过搜索相关数据库以识别与其他已知序列没有实质序列同源性的RNAi序列,轻松消除可能干扰靶以外核酸表达的候选RNAi,例如,使用BLAST(可从www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST获得)。

[0095] 产生RNAi的试剂盒可从例如New England Biolabs公司和Ambion公司获得。

[0096] 重组病毒载体还可包含与宿主染色体上的基因座具有同源性并与其重组的异源核苷酸序列。可以采用这种方法纠正宿主细胞中的遗传缺陷。

[0097] 本发明还提供了表达例如用于疫苗接种的免疫原性多肽的重组病毒载体。异源核酸可以编码本领域熟知的感兴趣的任何免疫原,包括但不限于人类免疫缺陷病毒、流感病毒、gag蛋白、肿瘤抗原、癌抗原、细菌抗原、病毒抗原等的免疫原。或者,免疫原可以存在于病毒衣壳中(例如,掺入其中)或束缚在病毒衣壳中(例如,通过共价修饰)。

[0098] 细小病毒作为疫苗的用途是本领域熟悉的(参见,例如, Miyamura et al., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:8507; 授权给Young等的美国专利No. 5,916,56、Mazzara等的美国专利No. 5,905,040、Samulski等的美国专利No. 5,882,652、No. 5,863,541; 通过引用,这些文献的内容整体纳入本申请中)。抗原可以存在于病毒衣壳中。或者,抗原可以从引入到重组载体基因组中的异源核酸表达。

[0099] 免疫原性多肽或免疫原可以适合于保护受试者免受疾病,包括但不限于微生物、细菌、原生动物、寄生虫、真菌和病毒性疾病侵害的任何多肽。例如,免疫原可以是正粘病毒免疫原(例如,流感病毒免疫原,如流感病毒血凝素(HA)表面蛋白或流感病毒核蛋白基因,或马流感病毒免疫原),或慢病毒免疫原(例如,马传染性贫血病毒免疫原、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)免疫原或人免疫缺陷病毒(HIV)免疫原,例如HIV或SIV包膜GP160蛋白、HIV或SIV基质/衣壳蛋白,以及HIV或SIV gag、pol和env基因产物)。免疫原还可以是沙粒病毒免疫原(例如,拉沙热病毒免疫原,如拉沙热病毒核衣壳蛋白基因和拉沙热包膜糖蛋白基因)、痘病毒免疫原(例如,牛痘,如牛痘L1或L8基因)、黄病毒免疫原(例如,黄热病毒免疫原或日本脑炎病毒免疫原)、丝状病毒免疫原(例如,埃博拉病毒免疫原或马尔堡病毒免疫原,例如NP

和GP基因)、布尼亚病毒免疫原(例如,RVFBV、CCHF和SFS病毒),或冠状病毒免疫原(例如,传染性人类冠状病毒免疫原,例如人冠状病毒包膜糖蛋白基因,或猪传染性胃肠炎病毒免疫原,或禽类传染性支气管炎病毒免疫原,或严重急性呼吸综合征(SARS)免疫原,例如S[S1或S2]、M、E或N蛋白或其免疫原性片段)。免疫原还可以是脊髓灰质炎免疫原、疱疹免疫原(例如,CMV、EBV、HSV免疫原)、腮腺炎免疫原、麻疹免疫原、风疹免疫原、白喉毒素或其他白喉免疫原、百日咳抗原、肝炎(例如,甲型肝炎,乙型肝炎或丙型肝炎)免疫原,或本领域已知的任何其他疫苗免疫原。

[0100] 或者,免疫原可以是任何肿瘤或癌细胞抗原。任选肿瘤或癌细胞抗原在癌细胞表面上表达。示例性癌症和肿瘤细胞抗原在S.A.Rosenberg,(1999) *Immunity* 10:281) 中进行了描述。示例性癌症和肿瘤抗原包括但不限于:BRCA1基因产物、BRCA2基因产物、gp100、酪氨酸酶、GAGE-1/2、BAGE、RAGE、NY-ESO-1、CDK-4、 β -连环蛋白、MUM-1、Caspase-8、KIAA0205、HPVE、SART-1、PRAME、p15、黑色素瘤肿瘤抗原(Kawakami et al., (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:3515;Kawakami et al., (1994) *J.Exp.Med.*,180:347;Kawakami et al., (1994) *Cancer Res.*54:3124),包括MART-1(Coulie et al., (1991) *J.Exp.Med.*180:35),gp100(Wick et al., (1988) *J.Cutan.Pathol.*4:201)和MAGE抗原(MAGE-1,MAGE-2和MAGE-3)(Van der Bruggen et al., (1991) *Science*,254:1643),CEA,TRP-1;TRP-2;P-15和酪氨酸酶(Brichard et al., (1993) *J.Exp.Med.*178:489);HER-2/神经基因产物(美国专利No.4,968,603);CA 125;HE4;LK26;FB5(内皮唾酸蛋白);TAG 72;AFP;CA19-9;NSE;DU-PAN-2;CA50;Span-1;CA72-4;HCG;STN(唾液酸化Tn抗原);c-erbB-2蛋白;PSA;L-CanAg;雌激素受体;牛奶脂肪球蛋白;p53肿瘤抑制蛋白(Levine, (1993) *Ann.Rev.Biochem.*62:623);粘蛋白抗原(国际专利公开WO 90/05142);端粒酶;核基质蛋白;前列腺酸磷酸酶;乳头瘤病毒抗原;以及与以下癌症相关的抗原:黑色素瘤、腺癌、胸腺瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠直肠癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌、肾癌、胃癌、食道癌、头颈癌等(参见,例如,Rosenberg,(1996) *Annu.Rev.Med.*47:481-91)。

[0101] 或者,异源核苷酸序列可以编码期望在体外、离体或体内细胞中产生的任何多肽。例如,可以将病毒载体引入到培养的细胞内,并从中分离表达的蛋白质产物。

[0102] 本领域技术人员将了解的是,目标异源核酸可以与适当的控制序列可操作地连接。例如,异源核酸可以与表达控制元件,例如转录/翻译控制信号、复制起点、聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点(IRES)、启动子、增强子等,可操作地连接。

[0103] 本领域技术人员将进一步了解的是,根据所需的水平和组织特异性表达,可以使用多种启动子/增强子元件。启动子/增强子可以是组成型或诱导型,取决于所需的表达模式。启动子/增强子可以是本身就有的或外来的,可以是天然的或合成的序列。外来的是指在导入转录起始区的野生型宿主中未发现转录起始区。

[0104] 启动子/增强子元件可以是靶细胞或待治疗受试者天然的和/或异源核酸序列天然的元件。通常选择启动子/增强子元件,从而其在目标靶细胞中发挥作用。此外,在代表性实施例中,启动子/增强子元件是哺乳动物启动子/增强子元件。启动子/增强元件可以是基于RNA聚合酶II的启动子或基于RNA聚合酶III的启动子。启动子/增强子元件可以是组成型或诱导型。

[0105] 诱导型表达控制元件通常在期望提供异源核酸序列调节过表达的应用中使用。用于基因递送的诱导型启动子/增强子元件可以是组织-特异性或组织优选的启动子/增强子元件,包括肌肉特异性或优选(包括心肌、骨骼肌和/或平滑肌)、神经组织特异性或优选(包括脑特异性)、眼睛特异性或优选(包括视网膜特异性和角膜特异性)、肝脏特异性或优选、骨髓特异性或优选、胰腺特异性或优选、脾特异性或优选、及肺特异性或优选的启动子/增强子元件。在一个实施例中,使用肝细胞特异性或肝细胞优选的启动子。肝细胞特异性或优选的启动子的实例包括但不限于载脂蛋白AII、白蛋白、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、甲状腺素结合球蛋白、细胞色素P450 CYP3A4或microRNA122或合成的肝特异性调控序列。肝细胞特异性或优选的启动子的使用可通过进一步限制异源核酸向肝脏的表达来增加合成AAV载体所达到的特异性。其它诱导型启动子/增强子元件包括激素-诱导型和金属-诱导型元件。示例性诱导型启动子/增强子元件包括但不限于Tet开/关元件、RU486-诱导型启动子、蜕皮激素-诱导型启动子、雷帕霉素-诱导型启动子及金属硫蛋白启动子。

[0106] 在异源核酸序列在靶细胞中被转录,然后翻译的实施例中,通常采用特异性起始信号来高效翻译插入的蛋白质编码序列。这些外源翻译控制序列,可能包括ATG起始密码子和相邻的序列,可以来自各种天然和合成来源。

[0107] 本发明还提供了包含AAV衣壳和AAV基因组的合成AAV颗粒,其中所述AAV基因组“对应于”(即编码)所述AAV衣壳。还提供了此类嵌合AAV颗粒的集合或文库,其中所述集合或文库包含2个或更多个,10个或更多个,50个或更多个,100个或更多个,1000个或更多个,10⁴个或更多个,10⁵个或更多个,或10⁶个或更多个不同的序列。

[0108] 本发明进一步涵盖包含本发明合成AAV衣壳蛋白、由本发明合成AAV衣壳蛋白组成或基本上由本发明合成AAV衣壳蛋白组成的“空”衣壳颗粒(即没有载体基因组)。如美国专利第5,863,541号中所述,本发明的合成AAV衣壳可用作“衣壳载体”。可以与病毒衣壳共价连接、结合或包装并转移到细胞中的分子包括DNA、RNA、脂质、碳水化合物、多肽、有机小分子或它们的组合。此外,所述分子可以与病毒衣壳的外部缔合(例如,“束缚于”),以将分子转移到宿主靶细胞中。在本发明的一个实施例中,所述分子与衣壳蛋白共价连接(即结合或化学偶联)。共价连接分子的方法是本领域技术人员熟悉的。

[0109] 本发明的病毒衣壳也可用于产生针对新型衣壳结构的抗体。作为另一种选择,可以将外源氨基酸序列插入到病毒衣壳中,以将抗原呈递给细胞,例如,用于向受试者施用,以产生对外源氨基酸序列的免疫响应。

[0110] 本发明还提供了编码本发明合成病毒衣壳和合成衣壳蛋白的核酸(例如,分离核酸)。还提供了包含所述核酸的载体,以及包含本发明核酸和/或载体的(体内或培养)细胞。所述核酸、载体和细胞可以用作,例如用于产生本文所述病毒载体的试剂(例如,辅助构建体或包装细胞)。

[0111] 在示例性实施例中,本发明提供了编码SEQ ID NOS:4-6的AAV衣壳的核酸序列或与SEQ ID NOS:1-3的核苷酸序列至少90%相同的核酸序列。本发明还提供了编码如上所述的AAV衣壳变体、衣壳蛋白变体和融合蛋白的核酸。在特定实施例中,所述核酸在本领域技术人员熟悉的标准条件下与本文具体公开的核酸序列的互补序列杂交,并编码变体衣壳和/或衣壳蛋白。任选所述变体衣壳或衣壳蛋白基本上保留由SEQ ID NOS:1-3的核酸序列编码的衣壳和/或衣壳蛋白的至少一种性质。例如,包含所述变体衣壳或变体衣壳蛋白的病

毒颗粒可基本上保留包含由SEQ ID NO:1-3的核酸编码序列编码的衣壳或衣壳蛋白的病毒颗粒的嗜肝性。

[0112] 例如,所述序列的杂交可以在低严格性、中严格性或甚至高严格性的条件下进行。低严格性杂交、中严格性杂交和高严格性杂交的示例条件如下:(例如,分别是在37°C,35-40%甲酰胺,5x Denhardt溶液,0.5%SDS和1x SSPE的洗涤严格性代表的条件;在42°C,40-45%甲酰胺,5x Denhardt溶液,0.5%SDS和1x SSPE的洗涤严格性代表的条件;以及在42°C,50%甲酰胺,5x Denhardt溶液,0.5%SDS和1x SSPE的洗涤严格性代表的条件)。参见,例如Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual (2d Ed.1989) (Cold Spring Harbor Laboratory)。

[0113] 在其他实施例中,编码本发明的变体衣壳或衣壳蛋白的核酸序列与SEQ ID NO:1-3的核酸序列具有至少约90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%或99.9%或更高的序列一致性,任选编码的变体衣壳或衣壳蛋白基本上保留由SEQ ID NO:1-3的核酸编码的衣壳或衣壳蛋白的至少一种性质。

[0114] 正如本领域熟悉的那样,可以采用多种不同程序来鉴定核酸或多肽与已知序列是否具有序列一致性。本文所述一致性百分数是指当使用BLASTN与另一核酸(或其互补链)最佳比对(具有适当的核苷酸插入或缺失)时,核酸或其片段与另一核酸具有指定的一致性百分数。为了确定两个不同核酸之间的一致性百分数,将使用BLASTN程序“BLAST 2sequences”确定一致性百分数。该程序可通过Internet从国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得(Altschul et al.,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402)。使用的参数是以下各项的任意组合,这些组合会产生最高的计算一致性百分数(如下计算),括号中显示的是默认参数:Program--blastn Matrix--OBLOSUM62 Reward for a match--0or 1(1) Penalty for a mismatch--0,-1,-2or-3(-2) Open gap penalty--0,1,2,3,4or 5(5) Extension gap penalty--0or 1(1)Gap x_dropoff--0or 50(50) Expect--10.

[0115] 当涉及多肽时,一致性或相似性百分数表示所讨论的多肽与另一种蛋白质或其一部分相比,在共同长度上,采用BLASTP测定的特定的一致性或相似性百分数。该程序也可以通过Internet从国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得(Altschul et al.,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402)。通常使用序列分析软件测定多肽的一致性或相似性百分数。参见,例如威斯康星大学生物技术中心(威斯康星州麦迪逊市大学大道910号,邮编53705)遗传学计算机组的序列分析软件包。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其他修饰的同源性度量来匹配相似序列。保守取代通常包括以下各组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。

[0116] 在特定实施例中,核酸可以包含、基本上由或由包括但不限于质粒、噬菌体、病毒载体(例如,AAV载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体或杆状病毒载体)、细菌人工染色体(BAC)或酵母人工染色体(YAC)的载体组成。例如,核酸可以包含、由或基本上由包含5'和/或3'末端重复序列(例如5'和/或3' AAV末端重复序列)的AAV载体组成。

[0117] 在一些实施例中,编码合成AAV衣壳蛋白的核酸进一步包含AAV rep编码序列。例如,核酸可以是用于产生病毒原种的辅助构建体。

[0118] 本发明还提供稳定包含本发明核酸的包装细胞。例如,核酸可以稳定地掺入到细胞的基因组中或可以以附加体形式(例如,“基于EBV的核附加体”)稳定地维持。

[0119] 核酸可以掺入到递送载体,例如病毒递送载体内。举例来说,本发明的核酸可以包装在AAV颗粒、腺病毒颗粒、疱疹病毒颗粒、杆状病毒颗粒或任何其他合适的病毒颗粒中。

[0120] 此外,核酸可以与启动子元件可操作地连接。启动子元件在本发明中更详细地描述。

[0121] 本发明进一步提供产生本发明病毒载体的方法。在一个代表性的实施例中,本发明提供了一种产生重组病毒载体的方法,所述方法包括在体外向细胞提供(a)包含(i)异源核酸和(ii)包装信号序列的模板,所述包装信号序列足够将AAV模板衣壳化为病毒颗粒(例如一个或多个(例如,两个)末端重复序列,例如AAV末端重复序列),以及(b)足以将模板复制和衣壳化为病毒颗粒的AAV序列(例如,编码本发明AAV衣壳的AAV rep和的AAV cap序列)。在一定条件下提供模板和AAV复制序列和衣壳序列,使得在细胞中产生包含包装在衣壳内的模板的重组病毒颗粒。所述方法可以进一步包括从细胞收集病毒颗粒的步骤。病毒颗粒可以从培养基收集和/或通过裂解细胞收集。

[0122] 在另一个示例性实施例中,本发明提供一种产生包含AAV衣壳的rAAV颗粒的方法,所述方法包括:在体外向细胞提供编码本发明合成AAV衣壳的核酸、AAV rep编码序列、包括异源核酸的AAV载体基因组和产生生产性AAV感染的辅助功能体;组装包含AAV衣壳的AAV颗粒及衣壳化AAV载体基因组。

[0123] 所述细胞通常是允许AAV病毒复制的细胞。可以采用本领域熟悉的任何合适细胞,如哺乳动物细胞。此外,合适的细胞有提供复制-缺陷辅助病毒缺失功能的反式-互补包装细胞系,例如,293细胞或其它E1a反式互补细胞。

[0124] AAV复制序列和衣壳序列可以通过本领域熟悉的任何方法提供。目前的方案通常在单个质粒上表达AAV rep/cap基因。AAV复制序列和包装序列不需要一起提供,虽然一起提供的话可能比较方便。AAV rep和/或cap序列可以由任何病毒或非-病毒载体提供。例如,rep/cap序列可以由杂交腺病毒或疱疹病毒载体提供(例如,插入到缺失腺病毒载体的E1a或E3区内)。还可以采用EBV载体来表达AAV cap和rep基因。本方法的一个优点是EBV载体是附加体型的,但将在整个连续细胞分裂期间保持高拷贝数(即作为染色体外元件稳定整合到细胞内,称为“基于EBV的核附加体”)。

[0125] 作为另一种替代,rep/cap序列可以在细胞内稳定地携带(附加的或整合的)。

[0126] 通常,AAV rep/cap序列将不侧接AAV包装序列(例如,AAV ITR),以防止这些序列的拯救和/或包装。

[0127] 所述模板(例如,rAAV载体基因组)可以使用本领域已知的任何方法提供给细胞。例如,模板可以由非病毒(例如质粒)或病毒载体提供。在特定实施例中,模板由疱疹病毒或腺病毒载体提供(例如,插入到缺失腺病毒的E1a或E3区内)。再举例来说,Palombo et al., (1998) J. Virol. 72:5025,描述了携带侧接AAV ITR的报告基因的杆状病毒载体。正如上文谈到rep/cap基因时所述,还可以采用EBV载体递送模板。

[0128] 在另一个代表性实施例中,所述模板通过复制rAAV病毒提供。在其它实施例中,AAV原病毒稳定地整合到细胞的染色体。

[0129] 为了提高病毒滴度,通常向细胞提供生产性AAV感染必不可少的辅助病毒功能(例

如,腺病毒或疱疹病毒)。AAV复制所必需的辅助病毒序列是本领域已知的。通常,这些序列由辅助腺病毒或疱疹病毒载体提供。或者,腺病毒序列或疱疹病毒序列可由另一种非病毒或病毒载体提供,例如,作为非感染性腺病毒微质粒,携带所有有效产生AAV的辅助基因,如Ferrari et al., (1997) Nature Med.3:1295和美国专利第6,040,183号和经6,093,570号所述。

[0130] 此外,辅助病毒功能可由包装细胞提供,所述包装细胞具有整合在染色体内或作为稳定的染色体外元件维持的辅助基因。在代表性实施例中,辅助病毒序列不能包装到AAV病毒体内,例如,不与AAV ITR侧接。

[0131] 熟悉本领域的技术人员将了解的是,在单一辅助构建体上提供AAV复制序列和衣壳序列及辅助病毒序列(例如,腺病毒序列)比较有利。这种辅助构建体可以是非病毒或病毒构建体,但任选是包含AAV rep/cap基因的杂交腺病毒或杂交疱疹病毒。

[0132] 在一个特定实施例中,AAV rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单个腺病毒辅助载体提供。这种载体进一步包含rAAV模板。AAV rep/cap序列和/或rAAV模板可以插入到腺病毒的缺失区(例如,E1a或E3区内)。

[0133] 在另一个实施例中,AAV rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单个腺病毒辅助载体提供。rAAV模板作为质粒模板提供。

[0134] 在另一个示范实施例中,AAV rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体提供,rAAV模板作为原病毒整合到细胞内。或者,rAAV模板由细胞内作为染色体外元件维持的EBV载体提供(例如,作为基于EBV的核附加体),参见Margolski, (1992) Curr.Top.Microbiol.Immun.158:67)。

[0135] 在另一个示范实施例中,AAV rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单个辅助腺病毒提供。rAAV模板可以作为独立的复制病毒载体提供。例如,rAAV模板可以由rAAV颗粒或第二重组腺病毒颗粒提供。

[0136] 根据前面的方法,杂交腺病毒载体通常包括足以进行腺病毒复制和包装的腺病毒5'和3'顺式序列(即腺病毒末端重复序列和PAC序列)。AAV rep/cap序列,及rAAV模板(如果存在的话)嵌在腺病毒骨架内,侧接5'和3'顺式序列,从而这些序列可以包装到腺病毒衣壳内。如上所述,在代表性实施例中,腺病毒辅助序列和AAV rep/cap序列通常并不侧接AAV包装序列(例如,AAV ITR),从而这些序列不包装到AAV病毒体内。

[0137] 疱疹病毒也可以作为AAV包装方法中的辅助病毒。编码AAV rep蛋白的杂交疱疹病毒可有利地促进可扩展AAV载体产生方案。已经有人描述(Conway et al., (1999) Gene Ther.6:986和WO 00/17377,这些公开内容整体纳入本发明中)了表达AAV-2rep和cap基因的杂交I型单纯疱疹病毒(HSV-1)。

[0138] 作为另一个替代方案,正如Urabe et al., (2002) Human Gene Ther.13:1935-43所述,本发明的病毒载体可以采用杆状病毒载体在昆虫细胞中产生,以递送rep/cap基因和rAAV模板。

[0139] 其他产生AAV的方法使用稳定转化的包装细胞(参见,例如美国专利No.5,658,785)。

[0140] 不含污染性辅助病毒的AAV载体原种可以采用本领域已知的任何方法获得。例如,很容易根据大小区分AAV和辅助病毒。AAV还可以根据对肝素底物的亲合性与辅助病毒分离

(Zolotukhin et al., (1999) *Gene Therapy* 6:973)。在代表性实施例中,可以采用缺失复制-缺陷性辅助病毒,从而任何污染性辅助病毒不具有复制能力。作为另一个替代方案,可以采用缺少晚期基因表达的辅助腺病毒,因为介导AAV病毒包装仅需腺病毒早期基因表达。晚期基因表达有缺陷的腺病毒突变体是本领域熟悉的(例如,ts100K和ts149腺病毒突变体)。

[0141] 本发明的包装方法可用于生产高滴度的病毒颗粒原种。在特定实施例中,病毒原种的滴度至少是大约 10^5 个转导单位(tu)/ml,至少大约 10^6 tu/ml,至少大约 10^7 tu/ml,至少大约 10^8 tu/ml,至少大约 10^9 tu/ml,或至少大约 10^{10} tu/ml。

[0142] 这种新型衣壳蛋白和衣壳结构可用于产生抗体,例如用于诊断或治疗用途或用作研究试剂。因此,本发明还提供了针对本发明新型衣壳蛋白和衣壳的抗体。

[0143] 本文使用的词语“抗体”指的是所有类型的免疫球蛋白,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,可以来源于任何物种,包括(例如)小鼠、大鼠、兔子、马、山羊、绵羊或人类,或可以是嵌合抗体。参见,例如,Walker et al., *Mol. Immunol.* 26, 403-11 (1989)。抗体可以是重组单克隆抗体,例如,根据美国专利4,474,893或美国专利4,816,567中公开的方法产生的抗体。抗体也可以例如根据美国专利No. 4,676,980中公开的方法化学构建。

[0144] 包括在本发明范围内的抗体片段包括,例如Fab、F(ab')₂和Fc片段,以及从IgG以外的抗体获得的相应片段。所述片段可以采用人们熟悉的方法制备。例如,F(ab')₂片段可以通过抗体分子胃蛋白酶消化制备,Fab片段可以通过还原F(ab')₂片段的二硫键产生。或者,可以构建Fab表达库,快速且简单地鉴定具有所需特异性的单克隆Fab片段(Huse et al., (1989) *Science* 254, 1275-1281)。

[0145] 多克隆抗体可以通过以下方法产生:按照已知程序,采用与靶向单克隆抗体结合的抗原免疫合适的动物(例如兔、山羊等),从该动物采集免疫血清,并从免疫血清中分离多克隆抗体。

[0146] 单克隆抗体可以按照Kohler and Milstein, (1975) *Nature* 265, 495-97所述的方法在杂交瘤细胞系中产生。例如,可以将包含适当抗原的溶液注射到小鼠中,并在足够的时间后处死小鼠并获得脾细胞。然后,通常在聚乙二醇的存在下,将脾细胞与骨髓瘤细胞或淋巴瘤细胞融合,使它们永生化,从而产生杂交瘤细胞。然后将杂交瘤细胞在合适的培养基中生长,并对上清液进行筛选,得到具有所需特异性的单克隆抗体。单克隆Fab片段可通过本领域技术人员已知的重组技术在大肠杆菌中产生。参见,例如W.Huse, (1989) *Science* 246, 1275-81。

[0147] 对靶多肽具有特异性的抗体还可以通过本领域熟悉的噬菌体展示方法得到。

[0148] 各种免疫测定法可用于筛选以鉴定具有所需特异性的抗体。使用具有确定特异性的多克隆或单克隆抗体进行竞争性结合或免疫放射测定的许多方案是本领域熟悉的。此类免疫测定法通常涉及测定抗原与其特异性抗体之间复合物的形成(例如,抗原/抗体复合物形成)。可以采用利用对两个非干扰表位具有反应性的单克隆抗体的单克隆两点免疫测定法以及竞争性结合测定法。

[0149] 可以根据已知技术将抗体与固体载体(例如,由诸如乳胶或聚苯乙烯材料形成的微球、板、载玻片或孔)结合。同样,根据人们熟悉的方法,抗体可以与可检测基团,如放射性

标记(如³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I)、酶标记(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)与荧光标记(例如,荧光素)直接或间接连接。如本领域熟悉的那样,可以通过检测例如沉淀、凝集、絮凝、放射性、颜色发展或变化、荧光、发光等来测定本发明方法中抗体/抗原复合物的形成。

III. 使用合成AAV衣壳的方法

[0150] 本发明还涉及将异源核苷酸序列递送至肝脏中同时最大限度减少递送至其他器官中的方法。本发明的病毒载体可用于在体外向肝细胞递送目标核苷酸序列,例如在体外产生多肽或核酸或用于离体基因治疗。此外,所述载体在递送核苷酸序列到有需要的受试者体内的方法中使用,例如,用于表达治疗性或免疫原性多肽或核酸。采用这种方式,可以在受试者体内产生多肽或核酸。受试者可能需要所述多肽或核酸,因为该受试者缺乏所述多肽,或者因为受试者体内所述多肽或核酸的产生可以赋予某种治疗效果,作为治疗方法或其他方法,下面将对此进一步解释。

[0151] 在特定实施例中,载体可用于表达通常向受试者提供有益作用的多肽或核酸。在其他实施例中,载体可用于表达对肝中细胞(例如,肝细胞)提供有益作用的多肽或核酸。

[0152] 因此,本发明的另一方面涉及将目标核酸递送至肝细胞的方法,所述方法包括使肝细胞与本发明的AAV颗粒接触。

[0153] 另一方面,本发明涉及一种将目标核酸递送至哺乳动物受试者肝细胞中的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用有效剂量的本发明的AAV颗粒或药物制剂,从而将目标核酸递送至哺乳动物受试者的肝细胞中。

[0154] 本发明的另一方面涉及一种治疗有需要的哺乳动物受试者疾病的方法,其中所述疾病可通过在受试者肝脏中表达产物来治疗,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效剂量的本发明的AAV颗粒,其中表达产物,从而治疗疾病。

[0155] 通常,本发明的病毒载体可以用于递送具有生物学作用的任何外来核酸,以治疗或减轻与基因表达有关的任何疾病症状。此外,本发明可以用于治疗递送治疗性多肽有益的任何疾病。示例性疾病包括但不限于:囊性纤维化(囊性纤维化跨膜调节蛋白)和其他肺部疾病,血友病A(因子VIII),血友病B(因子IX),地中海贫血(β -球蛋白),贫血(促红细胞生成素)和其他血液疾病,阿尔茨海默氏病(GDF;脑啡肽酶),多发性硬化症(β -干扰素),帕金森氏病(胶质细胞源性神经营养因子[GDNF]),亨廷顿舞蹈病(抑制性RNA,包括但不限于RNAi,例如siRNA或shRNA,反义RNA或microRNA以去除重复序列),肌萎缩性侧索硬化,癫痫病(甘丙肽,神经营养因子)和其他神经系统疾病,癌症(内皮抑素,血管抑素,TRAIL,FAS配体,细胞因子包括干扰素;抑制性RNA包括但不限于RNAi(例如siRNA或shRNA),反义RNA和microRNA,包括针对VEGF的抑制性RNA,多重耐药性基因产物或癌症免疫原),糖尿病(胰岛素,PGC- α 1,GLP-1,肌生成抑制素原肽,葡萄糖转运蛋白4),肌肉营养不良症,包括杜氏和贝克尔肌肉营养不良症(例如,肌营养不良蛋白,小肌营养不良蛋白,微肌营养不良蛋白,胰岛素样生长因子I,肌糖蛋白[例如, α , β , γ],抗肌生长抑制素或肌生长抑制素原肽的抑制性RNA[例如,RNAi,反义RNA或microRNA],层粘连蛋白- α 2,福库汀(Fukutin)-相关蛋白,显性负性肌生长抑制素,卵泡抑素,激活素II型可溶性受体,抗炎多肽,例如Ikappa B显性突变体,sarcospan(肌长蛋白),utrophin(抗肌萎缩蛋白相关蛋白),mini-utrophin,抗肌营养不良蛋白基因中的剪接点以诱导外显子跳跃的抑制性RNA[[例如,RNAi,反义RNA或microRNA][参见,例如,WO/2003/095647],抗U7 snRNA以诱导外显子跳跃的抑制性RNA(例

如RNAi,反义RNA或micro RNA [参见,例如,WO/2006/021724],以及抗肌肉生长抑制素或肌肉生长抑制素原肽的抗体或抗体片段),高雪病(葡糖脑苷脂酶),赫尔勒氏症(α -L-艾杜糖苷酸酶),腺苷酸脱氨酶缺乏症(腺苷脱氨酶),糖原贮积病(例如法布里病[α -半乳糖苷酶]和庞贝病[溶酶体酸 α -葡萄糖苷酶])和其他代谢缺陷,包括其他溶酶体贮积病和糖原贮积病,先天性肺气肿(α 1-抗胰蛋白酶),莱施-奈恩综合征(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶),尼曼-匹克病(鞘磷脂酶),枫糖浆尿病(支链酮酸脱氢酶),视网膜退行性疾病(眼睛和和视网膜的其他疾病);例如,PDGF,内皮抑素和/或血管抑制素(黄斑变性),诸如大脑等实体器官疾病(包括帕金森氏病[GDNF],星形细胞瘤[内皮抑素,血管抑制素和/或抗VEGF的RNAi],胶质母细胞瘤[内皮抑素,血管抑制素]和/或抗VEGF的RNAi),肝病(RNAi,例如siRNA或shRNA,microRNA或乙型肝炎和/或丙型肝炎基因的反义RNA),肾病,包括充血性心力衰竭或外周动脉疾病(PAD)在内的心脏病(例如,通过递送蛋白磷酸酶抑制剂I-1],受磷蛋白,肌浆膜内膜Ca²⁺-ATPase[serca2a],调节受磷蛋白基因的锌指蛋白,Pim-1,PGC-1 α ,SOD-1,SOD-2,ECF-SOD,激肽释放酶,胸腺素- β 4,低氧-诱导转录因子[HIF], β arkct, β 2-肾上腺素能受体, β 2-肾上腺素能受体激酶[β ARK],磷酸肌醇-3激酶[PI3激酶],钙蛋白,血管生成因子,S100A1,小白蛋白,腺苷酸环化酶6型,影响G蛋白偶联受体激酶2型敲低的分子,例如截短的组成型活性 β ARKct,抗受磷蛋白的抑制性RNA[例如,RNAi,反义RNA或microRNA];受磷蛋白抑制性或显性负性分子,例如受磷蛋白S16E等),关节炎(胰岛素样生长因子),关节疾病(胰岛素样生长因子),内膜增生(例如,通过递送enos(内皮细胞性一氧化氮合酶),inos(诱导型一氧化氮合酶)),改善心脏移植存活性(超氧化物歧化酶),艾滋病(可溶性CD4),肌肉萎缩症(胰岛素样生长因子I,肌生成抑制素原肽,抗凋亡因子,卵泡抑素),肢体缺血(VEGF,FGF,PGC-1 α ,EC-SOD,HIF),肾虚(促红细胞生成素),贫血(促红细胞生成素),关节炎(抗炎因子,例如IRAP和TNF α 可溶性受体),肝炎(α -干扰素),LDL受体缺乏症(LDL受体),高氨血症(鸟氨酸转氨甲酰酶),包括SCA1,SCA2和SCA3在内的脊髓性脑共济失调,苯酮尿症(苯丙氨酸羟化酶),自身免疫性疾病等。本发明进一步在下述器官移植后使用,用于提高移植成功率和/或减少器官移植或辅助治疗的不良影响(例如,施用免疫抑制剂或抑制性核酸,阻断细胞因子产生)。作为另一个实例,骨形态发生蛋白(包括RANKL和/或VEGF)可以与骨同种异体移植物同时施用,例如,在骨折或癌症患者手术切除后。

[0156] 可以根据本发明治疗的示例性溶酶体贮积病包括但不限于:赫尔勒综合征(MPS IH),施艾氏(Scheie)综合征(MPS IS)和赫尔勒-施艾氏(Hurler-Scheie)综合征(MPS IH/S)(α -L-艾杜糖醛酸酶);亨特氏综合征(MPS II)(硫酸艾杜糖醛酸硫酸酯酶);山菲立普(Sanfilippo)综合征A(MPS IIIA)(乙酰肝素-S-硫酸氨基磺酸酶),山菲立普综合征B(MPS IIIB)(N-乙酰基-D-氨基葡萄糖苷酶),山菲立普综合征C(MPS IIIC)(乙酰辅酶A-葡萄糖苷N-乙酰基转移酶),山菲立普综合征D(MPS IIID)(N-乙酰基-氨基葡萄糖氨基-6硫酸硫酸酯酶);莫基奥A病(MPS IVA)(半乳糖胺-6-硫酸硫酸酯酶),莫基奥B病(MPS IV B)(β -半乳糖苷酶);Maroteaux-lmay病(MPS VI)(芳基硫酸酯酶B);斯赖综合征(MPS VII)(β -葡萄糖醛酸苷酶);透明质酸酶缺乏症(MPS IX)(透明质酸酶);唾液酸贮积症(粘多糖症I),粘多糖症II(I-细胞疾病)(N-乙酰葡萄糖-氨基-1-磷酸转移酶催化亚基);粘多糖症III(假-赫尔勒多营养不良症)(N-乙酰葡萄糖-氨基-1-磷酸转移酶;IIIA型[催化亚基]和IIIC型[底物识别亚基]);GM1神经节苷脂沉积症(神经节苷脂 β -半乳糖苷酶),GM2神经节苷脂沉积症I型

(泰-萨二氏病) (β -己糖苷酶A), GM2神经节苷脂沉积症II型(桑德霍夫病) (β -己糖苷酶B); 尼曼-匹克病(A型和B型)(鞘磷脂酶); 高雪病(葡萄糖脑苷脂酶); 法伯氏病(神经酰胺酶); 法布里病(α -半乳糖苷酶A); 克腊伯氏病(半乳糖神经酰胺 β -半乳糖苷酶); 异染性脑白质营养不良(芳基硫酸酯酶A); 溶酶体酸性脂肪酶缺乏症, 包括沃尔曼病(溶酶体酸性脂肪酶); 贝敦氏症(青少年神经元蜡样脂褐质沉积症)(溶酶体跨膜CLN3蛋白) 唾液酸贮积症(神经氨酸酶1); 半乳糖唾液酸贮积症(戈德堡综合征)(保护蛋白/组织蛋白酶A); α -甘露糖苷过多症(α -D-甘露糖苷酶); β -甘露糖苷过多症(β -D-甘露糖苷过多症); 岩藻糖苷病(α -D-岩藻糖苷酶); 天冬氨酰葡萄糖胺尿症(N-天冬氨酰葡萄糖胺酶); 和涎尿症(Na磷酸协同转运蛋白)。

[0157] 可以根据本发明治疗的示例性糖原贮积病包括但不限于Ia型GSD(冯·基尔克氏病)(葡萄糖-6-磷酸酶), Ib型GSD(葡萄糖-6-磷酸转位酶), Ic型GSD(微粒体磷酸盐或焦磷酸盐转运蛋白), Id型GSD(微粒体葡萄糖转运蛋白), II型GSD, 包括庞贝病或婴儿IIa型GSD(溶酶体酸) α -葡萄糖苷酶)和IIb型(Danon)(溶酶体膜蛋白-2), IIIa型和IIIb型GSD(脱支酶; 淀粉葡萄糖苷酶和寡葡萄糖基转移酶), IV型GSD(安德森氏病)(分支酶), V型GSD(麦卡德尔病)(肌肉磷酸化酶), VI型GSD(赫尔斯病)(肝磷酸化酶), VII型GSD(塔里病)(磷酸果糖激酶), VIII/IXa型GSD(X连锁磷酸化酶激酶), IXb型GSD(肝和肌肉磷酸化酶激酶), IXc型GSD(肝脏磷酸化酶激酶), IXd型GSD(肌肉磷酸化酶激酶), O型GSD(糖原合成酶), Fanconi-Bickel综合征(葡萄糖转运蛋白-2), 磷酸葡萄糖异构酶缺乏症, 肌肉磷酸甘油酸激酶缺乏症, 磷酸甘油酸突变酶缺乏症, 果糖1,6-二磷酸酶缺乏症, 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶缺乏症和乳酸脱氢酶缺乏症。

[0158] 基因转移在了解和提供疾病治疗方面具有巨大的潜在应用。许多遗传病的缺陷基因已经被人们熟知并已进行克隆。通常, 上述疾病可分为两类: 缺陷性疾病, 通常缺酶, 且通常以隐性方式遗传, 及不平衡疾病, 可能涉及调节蛋白或结构蛋白, 通常以显性方式遗传。对于缺陷性疾病, 可采用基因转移将正常基因导入到受影响的组织内开展替换治疗, 以及使用抑制性RNA(例如RNAi(如siRNA或shRNA)、microRNA或反义RNA)建立该疾病的动物模型。对于不平衡疾病, 基因转移可用于在模型系统中建立疾病, 然后, 可用于努力消除这种疾病。因此, 本发明的病毒载体可以治疗遗传疾病。如本文所述, 通过部分或全部拯救引发疾病或使疾病更严重的缺陷或不平衡来治疗疾病。也可以使用核酸序列的位点特异性重组来引发突变或纠正缺陷。

[0159] 还可以采用本发明的病毒载体在体外或体内向细胞提供反义核酸或抑制性RNA(例如, microRNA或RNAi, 如siRNA或shRNA)。靶细胞中抑制性RNA的表达减少了细胞中特定蛋白的表达。因此, 可以施用抑制性RNA来降低有需要的受试者体内特定蛋白的表达。抑制性RNA还可以在体外向细胞施用, 用于调节细胞生理学, 例如, 优化细胞或组织培养系统。

[0160] 另一方面, 本发明的病毒载体可用于在受试者体内产生免疫响应。根据该实施例, 可以将包含编码免疫原的核酸的病毒载体向受试者施用, 并且受试者针对该免疫原发生主动免疫响应(任选保护性免疫响应)。免疫原如上所述。

[0161] 或者, 病毒载体可离体向细胞施用, 然后, 将所述改变的细胞向受试者施用。将异源核酸引入到细胞内, 将所述细胞向受试者施用, 其中编码免疫原的异源核酸任选被表达, 并在受试者体内诱导针对免疫原的免疫响应。在特定实施例中, 所述细胞是抗原-呈递细胞(例如, 树突细胞)。

[0162] “主动免疫响应”或“主动免疫性”的特征是“遇到免疫原后宿主组织和细胞的参与性。它涉及淋巴网状组织中免疫活性细胞的分化和增殖,导致抗体的合成或细胞-介导反应性的发展,或两者兼而有之。”Herbert B.Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, in IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985)。换句话说, 宿主感染或接种疫苗而接触免疫原后会引发主动免疫响应。主动免疫与被动免疫相反, 被动免疫是通过“将预先形成的物质(抗体、转移因子、胸腺移植物、白细胞介素-2)从主动免疫宿主输送到非-免疫宿主”获得的。Id.

[0163] 本文所述“保护性”免疫响应或“保护性”免疫指的是免疫响应因预防或降低疾病发生率而带给受试者某些益处。或者, 保护性免疫响应或保护性免疫可用于治疗疾病, 特别是癌症或肿瘤(例如, 消退癌症或肿瘤和/或预防转移和/或预防转移性结节生长)。保护性效果可以是全面的或部分的, 只要治疗的益处超过其不良影响即可。

[0164] 本发明的病毒载体还可以通过施用表达癌细胞抗原(或免疫学上类似分子)或表达针对癌细胞产生免疫响应的任何其它免疫原的病毒载体来开展癌症免疫治疗。举例来说, 可以通过施用包含编码癌细胞抗原的异源核苷酸序列的病毒载体, 在受试者中产生针对癌细胞抗原的免疫响应, 例如治疗癌症患者。如本发明所述, 病毒载体可以在受试者体内施用或采用离体方法施用。

[0165] 如本发明所述, 词语“癌症”包括肿瘤形成癌症。同样, 词语“癌组织”包括肿瘤。“癌细胞抗原”包括肿瘤抗原。

[0166] 词语“癌症”具有本领域理解的意义, 例如, 组织不受控制地增长, 可能扩散到身体较远部位(即转移)。示例性癌症包括但不限于白血病、淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、脑癌(例如神经胶质瘤和胶质母细胞瘤)、骨癌、肉瘤、黑素瘤、头颈癌、食道癌、甲状腺癌等。在本发明的实施例中, 实施本发明以治疗和/或预防肿瘤形成癌症。

[0167] 在本领域中, 词语“肿瘤”还理解为多细胞生物内未分化细胞的异常包块。肿瘤可以是恶性或良性。在代表性实施例中, 本文公开的方法用于预防和治疗恶性肿瘤。

[0168] 已经在上面描述了癌细胞抗原。词语“治疗癌症”或“癌症的治疗”指的是降低癌症的严重性或预防或至少部分消除癌症。例如, 在特定情况下, 这些词语指的是预防或减少或至少部分消除癌症转移。在其它代表性实施例中, 这些词语指的是预防或减少或至少部分消除转移性结节的生长(例如, 在手术切除原发性肿瘤之后)。词语“癌症预防”或“预防癌症”指的是所述方法至少部分消除或降低癌症的发生或发作。换句话说, 受试者癌症的发作或进展可以减慢、控制, 可能性或概率降低或延迟。

[0169] 在特定实施例中, 可以从癌症受试者取出细胞, 并让所述细胞接触本发明的病毒载体。然后, 将所述修饰细胞向受试者施用, 从而引发抵抗癌细胞抗原的免疫响应。这种方法对免疫功能不全, 体内无法引发足够免疫响应(即无法产生足够数量的增强抗体)的受试者比较有利。

[0170] 本领域熟知的是, 可以通过免疫调节细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、 ω -干扰素、 τ -干扰素、白细胞介素-1 α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-8、白细胞介素-

9、白细胞介素-10、白细胞介素-11、白细胞介素12、白细胞介素-13、白细胞介素-14、白细胞介素-18、B细胞生长因子、CD40配体、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、单核细胞趋化蛋白-1、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和淋巴细胞毒素)增强免疫响应。因此,免疫调节细胞因子(例如,CTL诱导细胞因子)可以与病毒载体一起向受试者施用。

[0171] 细胞因子可以采用本领域熟悉的任何方法施用。可以向受试者施用外源性细胞因子,或者,采用合适的载体将编码细胞因子的核酸序列递送给受试者,并在体内产生细胞因子。

[0172] 病毒载体还可进一步靶向肝细胞用于研究目的,例如用于体外或动物肝功能研究,或用于建立和/或研究疾病的动物模型。例如,在肝损伤(例如纤维化或肝硬化)的动物模型或肝病(例如病毒感染(例如肝炎病毒))的动物模型中,载体可用于将异源核酸递送至肝细胞。

[0173] 此外,本发明的病毒载体进一步用于诊断和筛选方法,从而目标基因在细胞培养系统或转基因动物模型中短暂或稳定表达。还可以实践本发明以递送核酸用于蛋白质生产目的,例如用于实验室、工业或商业目的。

[0174] 本发明的重组病毒载体用于兽医和医学应用。合适的受试者包括禽类和哺乳动物。本文所述词语“禽类”包括但不限于鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡、野鸡、鸚鵡、长尾鸚鵡等。本文所述词语“哺乳动物”包括但不限于人类、灵长类动物、非人类灵长类动物(例如,猴子和狒狒)、牛、绵羊、山羊、猪、马、猫、狗、兔子、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、仓鼠等)。人类受试者包括新生儿、婴儿、少年和成人。任选所述受试者“需要”本发明的方法,例如,因为所述受试者患有或被认为存在患包括本文所述那些疾病的风险,或将从递送包括本文所述的那些核酸中受益。作为另一种选择,受试者可以是实验动物和/或疾病的动物模型。

[0175] 在特定实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在药学上可接受的载体中包含本发明的病毒载体,以及任选其他药物、药物制剂、稳定剂、缓冲液、载体、佐剂、稀释剂等。对于注射施用,载体通常是液体。对于其它施用方法,载体可以是固体或液体。对于吸入施用,载体是可以吸入的,及优选是固体或液体颗粒形式。

[0176] “药学上可接受的”指的是材料无毒或者符合要求,即材料可以向受试者施用而不会造成任何不期望发生的生物效应。

[0177] 本发明的一个方面是一种体外将核苷酸序列转移到细胞的方法。按照适合具体靶细胞的标准转导方法,可以按合适的感染复数将病毒载体引入到细胞内。施用病毒载体或衣壳的滴度可以根据靶细胞类型和数量及具体的病毒载体或衣壳而变化,可以由本领域技术人员无需开展过多实验而确定。在特定实施例中,至少大约 10^3 感染单位,更优选至少大约 10^5 感染单位被引入到细胞内。

[0178] 引入病毒载体的细胞可以是任何类型的细胞,包括但不限于神经细胞(包括外周和中枢神经系统细胞,特别是,脑细胞,如神经元、少突胶质细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞)、肺细胞、眼细胞(包括视网膜细胞、视网膜色素上皮细胞和角膜细胞)、上皮细胞(例如,肠和呼吸系统上皮细胞)、骨骼肌细胞(包括成肌细胞、肌管和肌纤维)、膈肌细胞、树突细胞、胰腺细胞(包括胰岛细胞)、肝细胞、胃肠道细胞(包括平滑肌细胞、上皮细胞),心脏细胞(包括心肌细胞)、骨细胞(例如骨髓干细胞)、造血干细胞、脾细胞、角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞、前列腺细胞、关节细胞(包括例如软骨、半月板、滑膜和骨髓)、生殖细胞等。

或者,所述细胞可以是任何祖细胞。作为另一种替代方案,所述细胞可以是干细胞(例如,神经干细胞、肝脏干细胞)。作为另一种替代方案,所述细胞可以是癌细胞或肿瘤细胞(癌症和肿瘤在上文进行了描述)。此外,所述细胞可以源自上文所述的任何物种。

[0179] 病毒载体可以体外引入到细胞中,用于向受试者施用所述修饰细胞。在特定实施例中,从受试者取出所述细胞,在细胞内引入所述病毒载体,然后,将所述细胞施用回到受试者体内。从受试者取出细胞用于离体治疗,然后将细胞引回到受试者体内的方法是本领域熟悉的(参见,例如美国专利第5,399,346号)。或者,可以将重组病毒载体引入到另一名受试者的细胞内、培养细胞内或其它任何合适来源的细胞内,并将所述细胞向需要的受试者施用。

[0180] 适合离体基因治疗的细胞如上文所述。受试者细胞施用剂量将根据受试者年龄、状况和物种、细胞类型、细胞表达的核酸及施用方式等变化。通常,药学上可接受载体内每次剂量施用的细胞数是至少大约 10^2 至大约 10^8 个细胞或至少大约 10^3 个细胞至大约 10^6 个细胞。在特定实施例中,病毒载体转导的细胞与药学载体一起以有效剂量向受试者施用。

[0181] 在一些实施例中,可以施用已经用病毒载体转导的细胞以引发针对所递送多肽的免疫原性响应(例如,以转基因或衣壳中形式表达)。通常,将数量为表达有效数量多肽的细胞与药学上可接受的载体一起施用。任选所述剂量足够产生保护性免疫响应(如上文定义)。引发的保护程度并不要求是全面的或永久的,只要施用免疫多肽的益处超过任何不良影响即可。

[0182] 本发明的另一个方面是一种向受试者施用本发明病毒载体或衣壳的方法。在特定实施例中,所述方法包括将目标核酸递送至动物受试者的方法,该方法包括:向动物受试者施用有效量的本发明的病毒载体。可以采用本领域已知的任何方式将本发明的病毒载体向需要的人类受试者或动物施用。任选病毒载体以有效剂量在药学上可接受的载体中递送。

[0183] 本发明的病毒载体可以进一步向受试者施用以引发免疫原性响应(例如,作为疫苗)。通常,本发明的疫苗包括有效剂量的病毒与药学上可接受的载体。任选所述剂量足够产生保护性免疫响应(如上文定义)。引发的保护程度并不要求是全面的或永久的,只要施用免疫多肽的益处超过任何不良影响即可。受试者和免疫原如上文所述。

[0184] 受试者病毒载体的施用剂量取决于施用方式、治疗的疾病或病症、受试者的状况、具体的病毒载体,及递送的核酸等,并且可以按照常规方式确定。获得治疗效果的示例性剂量是病毒滴度至少大约 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 、 10^{17} 、 10^{18} 转导单位或更高,优选大约 10^7 或 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 转导单位,更优选大约 10^{12} 至 10^{14} 转导单位。

[0185] 在特定实施例中,要实现要求的基因表达水平,可以在不同的间隔期间,例如,每天、每周、每月、每年等多次施用(例如,施用两次、三次、四次或更多次)。

[0186] 示例性施用方式包括口服、直肠、跨粘膜、局部、鼻内、吸入(例如,通过气溶胶)、颊(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、经皮、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、肌肉[包括骨骼肌、膈肌和/或心肌施用]、皮内、胸膜内、大脑内和关节内)、局部(例如,皮肤和粘膜表面,包括气道表面,及经皮施用)、淋巴内等,以及直接组织或器官注射(例如,注射到肝脏、骨骼肌、心肌、膈肌或大脑)。还可以向肿瘤施用(例如,肿瘤或淋巴节内或附近)。任何情况下,最合适的路径将取决于治疗疾病的性质和严重程度及所用具体载体的性质。

[0187] 在一些实施例中,病毒载体直接施用于肝脏。直接施用会导致肝细胞转导的高特异性,例如其中至少80%、85%、90%、95%或更多的转导细胞是肝细胞。可以使用本领域已知的任何方法将载体直接施用于肝脏。可以通过直接注射到肝脏中或注射到肝脏的动脉或静脉中(例如门内递送)来引入载体。

[0188] 通常,病毒载体将以液体制剂形式通过全身递送或直接注射到肝脏中所需区域或隔室中进行施用。在一些实施例中,载体可以通过贮存器和/或泵递送。在其它实施例中,载体可以经局部施用于期望区域或经鼻内施用气溶胶制剂而提供。眼睛或耳内施用可以是局部施用液滴。作为另一种替代方案,载体可以以固体缓释制剂的形式施用。细小病毒和AAV载体的受控释放在国际专利公开WO 01/91803中进行了描述。

[0189] 也可以通过递送包含病毒载体的储库来递送至这些组织中的任何组织,所述储库可被植入组织中,或者所述组织可以与包含病毒载体的膜或其他基质接触。合适的所述可移植基质或基材在美国专利第7,201,898号中进行了描述。

[0190] 注射液可以以传统形式制备,以液体溶液或悬浮液形式,以适合注射前配制为液体溶液或悬浮液的固体形式,或以乳液形式制备。或者,可以局部而非全身施用本发明的病毒载体,例如,以储库或缓释制剂的形式。此外,可以将病毒载体干燥递送至可手术植入的基质,例如骨移植替代物、缝合线、支架等(例如,如美国专利7,201,898中所述)。

[0191] 适用于口服给药的药物组合物可以以分散的单位存在,例如胶囊、扁囊剂、锭剂或片剂,每一种单位均包含预定量的本发明的组合物;作为粉末或颗粒;作为在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液;或作为水包油或油包水乳液存在。口服可以通过将本发明的病毒载体与能够耐受动物肠道中消化酶降解的载体复合而进行。所述耐受动物肠道中消化酶降解的载体的例子包括本领域已知的塑料胶囊或片剂。此类制剂通过任何合适的药学方法制备,包括将组合物和合适的载体(其可以包含一种或多种如上所述的辅助成分)混合的步骤。通常,本发明实施例的药物组合物通过将组合物与液体或细碎的固体载体或两者均匀紧密地混合,然后,如果需要的话,将所得混合物成形来制备。例如,可以通过将包含所述组合物的粉末或颗粒,任选与一种或多种辅助成分一起压缩或模制来制备片剂。压缩片剂可以通过将自由流动形式,如粉末或颗粒形式的组合物,任选与粘结剂、润滑剂、惰性稀释剂和/或表面活性剂/分散剂一起混合,在合适的设备中进行压制而制备。模塑片剂可采用惰性液体粘结剂润湿粉末化合物,在合适的机器中模塑制备。

[0192] 适用于颊(舌下)给药的药物组合物包括通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶的调味基质中包含本发明组合物的菱形含剂;以及在惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶中包含所述组合物的锭剂。

[0193] 适用于肠胃外给药的药物组合物可以包含本发明组合物的无菌水性和非水性注射溶液,所述制剂任选与预期接受者的血液等渗。这些制剂可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,使组合物与预期接受者的血液等渗。水性和非水性无菌悬浮液、溶液和乳液可包括悬浮剂和增稠剂。非水溶剂的实例有丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油及可注射有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的补充剂)等。也可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0194] 这些组合物可能是用单位剂型或多剂型容器提供,例如,密封安瓿瓶和小瓶,可以储存在冷冻干燥(冻干)条件下,在使用前,仅需加入无菌液体载体,例如,盐水或注射用水即可。

[0195] 可以采用前述无菌粉末、颗粒和片剂配制即时注射液和悬浮液。例如,可以提供密封容器中单位剂型的本发明的可注射的、稳定的无菌组合物。组合物可以以冻干物的形式提供,其可以用合适的药学上可接受的载体重构以形成适合于向受试者注射的液体组合物。单位剂型可以包含大约1 μ g至大约10g本发明的组合物。当组合物基本上不溶于水时,可以包括足够量的生理上可接受的乳化剂以将组合物在水性载体中乳化。一种有用的乳化剂是磷脂酰胆碱。

[0196] 适合直肠给药的药物组合物可以作为单位剂量的栓剂存在。这些可以通过将组合物与一种或多种常规固体载体例如可可脂混合,然后将所得混合物成形来制备。

[0197] 适用于局部施用于皮肤的本发明药物组合物可以采取软膏剂、乳膏剂、洗剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气雾剂或油剂的形式。可以使用的载体包括但不限于凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、醇、透皮增强剂及它们中两种或更多种的组合。在一些实施例中,例如,局部递送可以通过将本发明的药物组合物与能够通过皮肤的亲脂性试剂(例如DMSO)混合来进行。

[0198] 适合透皮给药的药物组合物可以是离散贴剂的形式,所述贴剂适合于与受试者的表皮长时间保持密切接触。适合透皮给药的组合物也可以通过离子电渗疗法递送(参见,例如,Pharm.Res.3:318(1986)),且通常采用本发明组合物的任选缓冲水溶液的形式。合适的制剂可以包含柠檬酸盐或bis\tris缓冲液(pH 6)或乙醇/水,并且可以包含0.1至0.2M活性成分。

[0199] 本文公开的病毒载体可以采用任何合适的方式向受试者的肺施用,例如,施用受试者吸入的由病毒载体组成的可吸入颗粒的气溶胶悬浮液。可吸入颗粒可以是液体或固体。包括所述病毒载体的液体颗粒气溶胶可以采用任何合适的手段制备,例如,采用压力驱动气溶胶雾化器或超声雾化器,正如本领域技术人员熟悉的那样。参见,例如美国专利No.4,501,729。同样,包括所述病毒载体的固体颗粒气溶胶可以采用任何固体颗粒药物气溶胶产生器,采用药物领域熟悉的方法制备。

[0200] 上面已经对本发明进行了描述,将在下述实例中对这些方面进行更详细的说明,这些实例在此仅用于阐述目的,而非用于限制本发明。

实例1

AAV衣壳基因改组文库的构建

[0201] AAV衣壳基因改组文库的构建如前所述(Yang et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106(10):3946(2009);Yang et al.,Meth.Mol.Biol.709:127(2011)),将AAV血清型1、2、3B、4、6、7、8和9的衣壳基因克隆到包含AAV2反向末端重复序列(ITR)和AAV2 Rep基因的相同载体pXX-UF1-AAV中。将这些包含ITR、AAV2 Rep及八个不同Cap基因中的每个基因的质粒依次命名为pXX-UF1-AAVn。这些衣壳基因通过引物CAP-5'5'-CCC-AAGCTTCGATCAACTACGCA GACAGGTACCAA-3'(SEQ ID NO:7)和CAP-3'5'-ATAAGAAT-GCGGCCGC-AGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA-3'(SEQ ID NO:8)扩增,以相同的比例混合用于DNA改组(Stemmer,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747(1994))。简而言之,在15 $^{\circ}$ C下用0.04U DNase I简单处理4 μ g DNA模板,并使用pfu DNA聚合酶从琼脂糖凝胶中纯化300-500和500-

1000bp片段,用于重组衣壳基因。使用CAP5'/CAP3'引物,通过pfu DNA聚合酶将重组的衣壳基因重新扩增,用HindIII/NotI消化,并连接到HindIII/NotI消化的pXX-UF1-AAV载体中,该载体包含侧接AAV2 Rep和Cap基因的AAV2 ITR。HindIII/Not I消化可有效去除AAV2衣壳基因,以替代肝富集Cap基因的PCR扩增片段。PCR程序在94℃下持续5分钟;94℃下持续1分钟,75℃下持续5分钟进行热启动,60℃下持续1分钟,72℃下持续4.5分钟;29个94℃持续1分钟、60℃持续1分钟、72℃持续4.5分钟、72℃持续10分钟循环。将重建的质粒转化到大肠杆菌DH10B细胞中,随机选择多个克隆进行限制性酶分析,以确定重组频率和包装生存力。得到的含有ITR的感染性AAV质粒文库用于产生自包装AAV病毒颗粒文库。

实例2

小鼠肝脏中的体内富集

[0202] 为了体内筛选靶向肝的AAV变体,按 1×10^{11} vg(载体基因组)/小鼠将AAV嵌合文库经尾静脉向成年C57BL/6J小鼠施用。两周后,收集小鼠组织,包括肝脏和其他组织,使用苯酚/氯仿提取进行基因组DNA分离。使用衣壳基因的通用引物进行PCR扩增总肝脏DNA后,将PCR产物重新克隆到含有AAV2 ITR和Rep基因的AAV质粒骨架中。因此,衣壳基因PCR产物和pXX-UF1-AAV载体都用HindIII/NotI消化并连接用于克隆。从第一轮体内富集产生第二轮感染性AAV颗粒,然后再次注射到小鼠体内。将这种体内富集过程在小鼠中重复三遍。

[0203] 将高度富集衣壳基因的最终PCR产物克隆到AAV包装质粒的通用前体中,该质粒包含AAV2 Rep基因,而没有AAV反向末端重复序列(ITR)。将衣壳基因连接在Rep基因的下游和AAV聚腺苷酸化信号序列的上游,以重构Rep和Cap基因表达盒。将连接产物电穿孔到大肠杆菌DH10B菌株中,并在抗Amp的平板上生长。挑选单个菌落并分离微量制备DNA以用于衣壳基因的DNA测序。发现了许多新颖的衣壳基因,其中两个高度富集。将这两个衣壳基因分别命名为AAVXL32和AAVXL12。它们的DNA序列显示在SEQ ID NOS:1和2中,氨基酸序列显示在SEQ ID NOS:4和5中。虽然AAVXL12和AAVXL32 DNA序列相差23个核苷酸(2214个核苷酸中的23个),但它们的氨基酸序列相差仅2个残基(737个氨基酸中的2个)。氨基酸220在XL12中为S,在XL32中为D;氨基酸643在XL12中为N,在XL32中为H。

实例3

含有报告基因的AAV载体的产生

[0204] 通过常规大规模制备方法制备衣壳特异性包装质粒,并通过CsCl密度超速离心两次纯化。这些质粒用于在普遍存在的启动子CMV或CB(CMV增强子加鸡 β -肌动蛋白基础启动子)的转录控制下,包装含有报告基因(例如绿色荧光蛋白GFP和 β -半乳糖苷酶Lac-Z基因)的AAV载体。将AAV载体包装在每个新衣壳中,并通过常规的双CsCl密度超速离心法纯化。采用DNA斑点印迹法,相对相应的报告载体质粒DNA的已知拷贝数,确定报告载体的滴度。所有载体收率均在正常范围内。

实例4

小鼠体内肝富集AAV衣壳的体内考察

[0205] 为了考察体内富集和选择的新型衣壳在转导肝方面是否有效,使用AAVXL12和AAVXL32分别包装两个报告基因,GFP和LacZ。将这些载体纯化、滴定并经尾静脉注射到C57B/6小鼠体内,注射剂量为 5×10^{12} vg/kg体重。使用包装相同GFP和LacZ基因的AAV9载体作为阳性对照,因为AAV9基因在小鼠肝脏中的转移非常稳健。如图1A-1B所示,结果表明,对

于GFP和LacZ报告基因,AAVXL12和AAVXL32均达到了与对照AAV9基本相同的肝脏基因表达水平,从而证实了富集小鼠嗜肝性衣壳基因的体内选择策略。

实例5

肝富集AAV衣壳在人肝癌细胞系中的体外考察

[0206] 为了观察嗜肝性衣壳是否能够转导人源性肝细胞,首先在体外人类肝癌细胞系Huh7上考察了载体。Huh7被广泛用于具有肝特异性启动子的AAV载体基因表达的体外测定。该细胞系保留了人肝细胞的某些特征,并与培养的原代人肝细胞呈正相关。因此,该细胞系可用于人源细胞的AAV衣壳嗜肝性的初步测试。再次,采用AAV9作为阳性对照。如图2所示,AAVXL12和AAVXL32均可在感染复数(moi)为 1×10^5 vg/细胞和 1×10^4 vg/细胞的条件下获得高效的基因表达。另一方面,AAV9在转导Huh7细胞方面效率不高。在较高的moi下,仅检测到少量lacZ阳性细胞。这些结果表明,除小鼠肝细胞外,AAVXL12和AAVXL32还对人肝细胞具有高亲和力。

实例6

肝富集AAV衣壳在人和狗原代肝细胞中的体外考察

[0207] 因为某些AAV血清型可以非常好地转导小鼠肝脏,但不能很好地转导人或非人(猴)肝脏(Hurlbut et al., Mol. Ther. 18:1983 (2010)),而其他血清型的小鼠肝转导能力差,但在人源化肝的小鼠模型中(Lisowski et al., Nature 506(7488):382(2014))和猴子中表现良好(Li et al., Mol. Ther. 12:1867(2015)),因此,这种差异促使人们考察新型嗜肝性AAV衣壳是否还有效地转导人以及犬原代肝细胞培养物。

[0208] 首先在从三个人供体分离的人原代肝细胞上体外考察载体。肝细胞购自TRL (Triangle Research Laboratories,目前是Invitrogen的子公司),并根据供应商提供的协议用供应商提供的培养基进行培养。将在普遍存在的CMV启动子控制下的GFP用作报告基因,并包装在AAVXL12、AAVXL32和AAV2、6、7、8、9等中。这些载体用于感染原代肝细胞培养物,细胞融合率约为80%,载体剂量为感染复数(moi)为 1×10^5 vg/细胞。在不同时间点拍摄细胞荧光照片,了解显示绿色的GFP表达。如图3A-3D所示,结果表明,尽管广泛报道的血清型衣壳(例如AAV8和AAV9)能有效地转导小鼠肝脏,但这些载体对人类原代肝细胞的感染性非常差。相比之下,在本研究中测试的所有其他天然存在的载体中,小鼠肝脏富集的新型嗜肝性AAV衣壳也以最高效率转导了原代人肝细胞。感染24小时后(图3A),AAV的其他血清型几乎没有任何GFP表达,而AAVXL12和AAVXL32已经具有明显的GFP表达。感染48小时后(图3B),AAVXL12和AAVXL32再次显示了最高水平的GFP表达。用上述2种载体感染的肝细胞继续培养7天,并每天拍摄GFP照片。GFP荧光强度随时间增加,并在第7天达到最高水平(图3C和3D)。因此,新型衣壳与其他AAV衣壳(例如AAV3和AAV1K03)(Lisowski et al., Nature 506(7488):382(2014))以及在人源化小鼠肝脏和非人灵长类动物肝脏中转导小鼠肝细胞的能力很差但能强健地转导人肝细胞的猴子形成鲜明的对比(Li et al., Mol. Ther. 12:1867(2015))。据报道,其他AAV血清型(例如AAV2和AAV5)不能很好地转导小鼠和非人灵长类动物肝脏。以上发现强烈表明,AAVXL12和AAVXL32均具有其他已知AAV衣壳中未见到的独特特性。

[0209] 随后,还用狗原代肝细胞考察嗜肝性AAV的感染性,并与许多含有GFP报告基因的常用AAV衣壳进行比较。AAV载体基因组颗粒的使用剂量是感染复数为 1×10^5 vg/细胞。使用

来自两只狗的超低温保存的和新鲜的肝细胞。在感染24小时和48小时后,拍摄AAV GFP载体感染细胞的绿色荧光照片。如图4A-4C所示,AAVXL12和AAVXL32的基因转移效率高于除AAV6以外的其他血清型,后者与AAVXL12和AAVXL32相似或略高。值得注意的是,尽管AAV6在犬肝细胞中显示出高水平的基因转移,但在人原代肝细胞培养物中却未观察到这种情况。这些结果表明AAVXL12和AAVXL32在犬肝细胞上均具有高感染性。

实例7

AAVXL32在非人灵长类动物肝脏中的体内考察

[0210] 接下来,研究了嗜肝性衣壳是否也能够非人灵长类动物肝脏中实现有效的基因转移。选择AAVXL32与AAV8进行比较。先前已报道后者可转导猴肝脏,也已在人类B型血友病临床试验中用于肝定向基因治疗。根据先前发表的论文,对3-5岁的成年雄性恒河猴进行了抗AAVXL32和AAV8的血清中和抗体的筛选。选择中和抗体滴度低于1:8的四只猴子静脉内注射AAV载体。两只猕猴注射AAVXL32-CB-GFP,另两只猕猴注射AAV-CB-GFP,注射剂量为 1×10^{12} vg/kg体重。AAV载体表达盒采用双链(也称为自我互补)形式,可实现更快、更有效的基因表达。两周后对这些猴子实施安乐死,并提取肝组织进行冷冻切片和开展绿色荧光照相。如图5所示,在猴肝中,AAVXL32的GFP表达水平明显高于AAV8。由于更高的荧光强度和更多的阳性细胞(如箭头所示),因此,在AAVXL32处理的猴子中,GFP阳性细胞容易被检测到。另一方面,经AAV8处理的猴子的阳性细胞少得多,且荧光强度更弱。这些结果强烈表明,在非人灵长类动物中,AAVXL32比AAV8明显更具嗜肝性。

实例8

AAVXL32衣壳蛋白的表征和第三个衣壳蛋白的弱起始密码子的去除

[0211] 为了表征衣壳蛋白,对双重CsCl超速离心纯化和DNA点印迹滴定的AAVXL32衣壳进行了分析。将纯化的载体上样到SDS PAGE凝胶上,以确定银染后VP蛋白的分子量。如图6所示,AAVXL32显示了4个条带。除了所有天然AAV的典型VP1、VP2和VP3蛋白外,VP1和VP2之间还有一个额外的条带(在此称为VPX)。这条额外的条带是大蛋白VP1唯一区域内XhoI限制位点处AAV7和AAV8衣壳基因单核苷酸定点突变的结果。进行此突变的最初目的是为了更方便AAV衣壳基因DNA改组文库中的DNA克隆,其中所述文库中包括AAV血清型1、2、3、4、6、7、8和9的衣壳基因(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(10):3946(2009))。从VP1起始密码子开始计数,第219位核苷酸的XhoI位点的单个C到G突变(CTCGAG到CTGGAG)在AAV7和AAV8衣壳基因中产生了氨基酸亮氨酸有义突变。这种突变并没有改变VP1蛋白的氨基酸序列。但是,怀疑这种有义突变产生了较弱的非共识起始密码子CTG(相对于经典的ATG起始密码子)。这可能导致在VP1和VP2之间生成了额外的衣壳蛋白VPX。显然,该额外的条带并未以明显的方式损害载体DNA的包装和感染性。为了确认所述有义突变为额外的衣壳蛋白产生了弱的起始密码子,开展定点突变,将C到G突变逆转回到野生型AAV7和AAV8序列的原始C。这种具有逆向突变的新衣壳基因,称为AAVXL32.1,确实使弱起始密码子失活,并去除了VP1和VP2之间的额外衣壳条带(图6)。包装在XL32或XL32.1中的LacZ报告基因载体在载体收率和感染性方面均未显示明显差异,这表明额外的衣壳条带在AAV衣壳功能中起着无关紧要的或未知的的作用。

实例9

人血清样品中中和抗体的发生率

[0212] 人群中预先存在的抗AAV衣壳的中和抗体 (Nab) 是AAV介导体内基因治疗遇到的重要问题。AAV的某些血清型 (例如AAV2和AAV3) 的Nab发生率很高 (Ling, J. Integr. Med. 5:341 (2015))。初步评估了抗嗜肝性AAVXL32衣壳的Nab的发生率。考察了一组中国患者血清样本中Nab的发生率, 患者身份完全保密。具体而言, 对100个不同人群血清中预先存在的抗AAVXL32衣壳的NAb进行了测定。Nab测定基本上是根据Ling等人及其中的参考文献先前发表的方法进行 (Ling, J. Integr. Med. 5:341 (2015))。通过使用分泌的荧光素酶 (高斯荧光素酶) 作为报告基因和人肝细胞系Huh7作为测试细胞进行修饰。简而言之, 将Huh7细胞按 5×10^4 个细胞/孔在圆底96孔板中接种。第二天, 将单个血清样品按2倍增量连续稀释。Nab阳性对照来自AAVXL32免疫小鼠的血清, 阴性对照来自购自Sigma的幼小鼠血清。将稀释的血清样品和AAV在37°C培养1小时, 并将其添加到一天前接种了Huh7细胞的平板中。在AAVXL32感染48小时后, 从每个孔中取一小份细胞培养基开展荧光素酶活性测定。与萤火虫荧光素酶不同, 高斯荧光素酶是一种分泌的酶, 无需裂解细胞即可进行酶活性测量。结果表明, 超过50%血清样品的Nab滴度低于1:8稀释度, 大约70%低于1:16稀释度。这些数据表明, 中国人群中AAVXL32的Nab发生率远低于先前发表的有关AAV2、AAV3、AAVKL3、AAV5和AAV8的数据。在那些研究中, 发现90%以上的受试者中AAV2、AAV3和AAVK03是中和抗体阳性, 血清稀释度临界值是1:20稀释度, 而在1:20相同稀释临界值时, AAV8的Nab阳性率高于80%, AAV5的阳性率高于70%。

[0213] 上述说明是为了阐明本发明, 不应视为限制本发明。本发明由下述权利要求定义, 与所述权利要求相当的内容也包括在本发明中。

AAV衣壳序列

SEQ ID NO:1AAVXL12衣壳基因DNA序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGA
GTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCGAAGCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACG
GCCGGGGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGG
GAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTGGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCT
GCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTC
TGCAAGAAGATACGTCTTTGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGG
GTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACC
GGTAGAGCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAAC
AGCCCGCCAGAAAAAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTTCCAGACCCT
CAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGACCTAATACA**ATGGCTTCAGG**
CGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCTCCGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAA
ATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACATGG
GCCTTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCAG
CAACGACAACCCTACTTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGATTTCAACAGATTCC
ACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCC
AAGAGACTCAACTTCAAACCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACGAATGATGGCGT
CACGACCATCGTAATAACCTTACCAGCACGGTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAGTACCAGT
TGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTC
ATGATTCCGCAGTACGGCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGGTCATC
CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTACCTTCA
GCTACACCTTTGAGGAAGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGG
CTGATGAATCCTCTCATCGACCAATACCTGTATTACCTGAACAGAACTCAAATCAGTCCGG
AAGTGCCCAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGTGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTTCAGC
CCAAAACTGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCTAAAACAAAAACAGAC
AACAACAACAGCAACTTTACCTGGACTGGTGCTTCAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATC
TATAATCAACCCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGTTCTTTCCCA
TGAGCGGTGTCATGATTTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATTGGACAAT
GTCATGATCACAGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGATTTGG
GACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGTTA
TGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCCTATTTGG
GCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTTATGGGCGGCTTTGGACT
CAAGAACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAG
AGTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTG
GAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATAC
ATCTAACTATGCAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGGACAACAATGGACTTTTATACTG
AGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCC**TAA**

SEQ ID NO:2AAVXL32衣壳基因DNA序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGA
GTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCGAAGCCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACGACG
GCCGGGGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGG
GAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCT**GGAGC**ACGACAAGGCCACGACCAGCAGCT
GCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTC
TGCAAGAAGATACGTCTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGG
GTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACC
GGTAGAGCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAAC
AGCCCGCCAGAAAAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTTCAGACCCT
CAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGACCTAATACA**ATGGCT**TCAGG
CGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGTAATGCCTCAGGAA
ATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACATGG
GCCTTGCCACCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCAG
CAACGACAACCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGATTTCAACAGATTCC
ACTGCCATTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCC
AAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACGAATGATGGCGT
CACGACCATCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAGTACCAGT
TGCCGTACGTCCTCGGCTCTGCGCACCAAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCGGGGCGGACGTGTT
ATGATTCCGCAATACGGCTACCTGACGCTCAACAATGGCAGCCAAGCCGTGGGACGTTTCATC
CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTACCTTCA
GCTACACCTTTGAGGAAGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGG
CTGATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGG
AAGTGCCCAAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGTGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTTCAGC
CCAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCTAAAACAAAACAGAC
AACAAACAGCAACTTACCTGGACTGGTGCTTCAAATATAACCTCAATGGGCGTGAATC
CATCATCAACCCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGTCTTTCCCA
TGAGCGGTGTCATGATTTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATTGGACAAT
GTCATGATCACAGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGATTTGG
GACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGTTA
TGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTATTTGG
GCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACT
TAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAG
AGTTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTG
GAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATAC
ATCTAACTATGCAAAATCTGCCAACGTTGATTTTACTGTGGACAACAATGGACTTTATACTG
AGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCCT**GTAA**

SEQ ID NO:3AAVXL32.1衣壳基因DNA序列

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTCGCGA
GTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCGAAGCCCAAAGCCAACCAGCAAAGCAGGACGACG
GCCGGGGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGG
GAGCCCGTCAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCT
GCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTC
TGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGG
GTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACC

GGTAGAGCCATCACCCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAAC
AGCCCCGCCAGAAAAAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTTCAGACCCT
CAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGACCTAATACA**ATGGCTTCAGG**
CGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAA
ATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACATGG
GCCTTGCCACCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCAG
CAACGACAACCACTACTTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTTGATTCAACAGATTCC
ACTGCCATTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCC
AAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTACGACGAATGATGGCGT
CACGACCATCGTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAGTACCAGT
TGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTT
ATGATTCCGCAATACGGCTACCTGACGCTCAACAATGGCAGCCAAGCCGTGGGACGTTTCATC
CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTACCTTCA
GCTACACCTTTGAGGAAGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGG
CTGATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGG
AAGTGCCCAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGTGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTTCAGC
CCAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCTAAAACAAAACAGAC
AACAACAACAGCAACTTTACCTGGACTGGTGCTTCAAAATATAACCTCAATGGGCGTGAATC
CATCATCAACCCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGTTCTTTCCCA
TGAGCGGTGTCATGATTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATTGGACAAT
GTCATGATCACAGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCAGAAAGATTTGG
GACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCCGAGATGTGCATGTTA
TGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTTATTGG
GCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACT
TAAGCACCCGCCTCCTCAGATCCTCATAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAG
AGTTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTG
GAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATAC
ATCTAACTATGCAAAATCTGCCAACGTTGATTTTACTGTGCACAACATGGACTTTATACTG
AGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCT**GTAA**

SEQ ID NO:4AAVXL12衣壳氨基酸序列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPLGEPFAAPSGVGPNTMASGGGAPMADNNEGASGVGNASGNWHCDSTWLGDRV
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR
 LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSQSEYQLPYVLGSAH
 QGCLPPFPADVMI PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYTFEEV
 PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSVQPKNWL
 PGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESI INPGTAMASHKDDKDKFFPMSG
 VMI FGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTD PATGDVHVM
 GALPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPV PANPP
 AEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNG
 LYTEPRPIGTRYLTRPL

SEQ ID NO:5AAVXL32衣壳氨基酸序列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPLGEPFAAPSGVGPNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRV
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR
 LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSQSEYQLPYVLGSAH
 QGCLPPFPADVMI PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYTFEEV
 PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSVQPKNWL
 PGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESI INPGTAMASHKDDKDKFFPMSG
 VMI FGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTD PATGDVHVM
 GALPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPV PANPP
 AEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNG
 LYTEPRPIGTRYLTRPL

SEQ ID NO:6AAVXL32.1衣壳氨基酸序列

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRS PDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS
ESVPDPQPLGEPAPPSGVPNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRV
ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQR
LINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAH
QGCLPPFPADVMI PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYTFEEV
PFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSVQPKNWL
PGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESI INPGTAMASHKDDKDKFFPMSG
VMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVM
GALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPP
AEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNG
LYTEPRPIGTRYLTRPL

SEQ ID NO:7DNA引物CAP-5'

5' -CCC-AAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAA-3'

SEQ ID NO:8DNA引物CAP-3'

5' -ATAAGAAT-GCGGCCGC-AGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA-3'

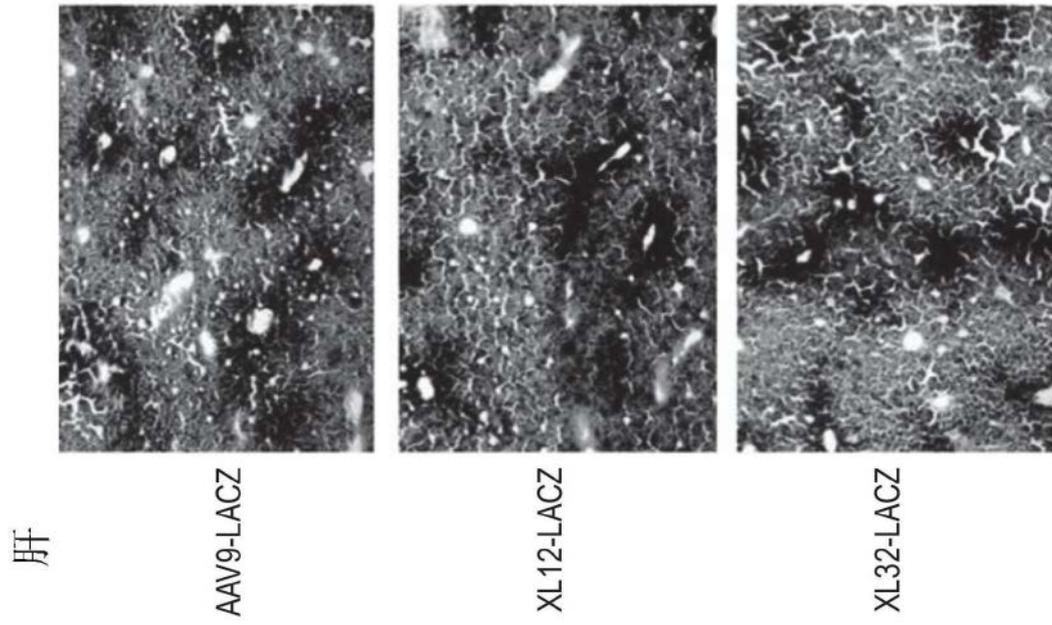


图1A

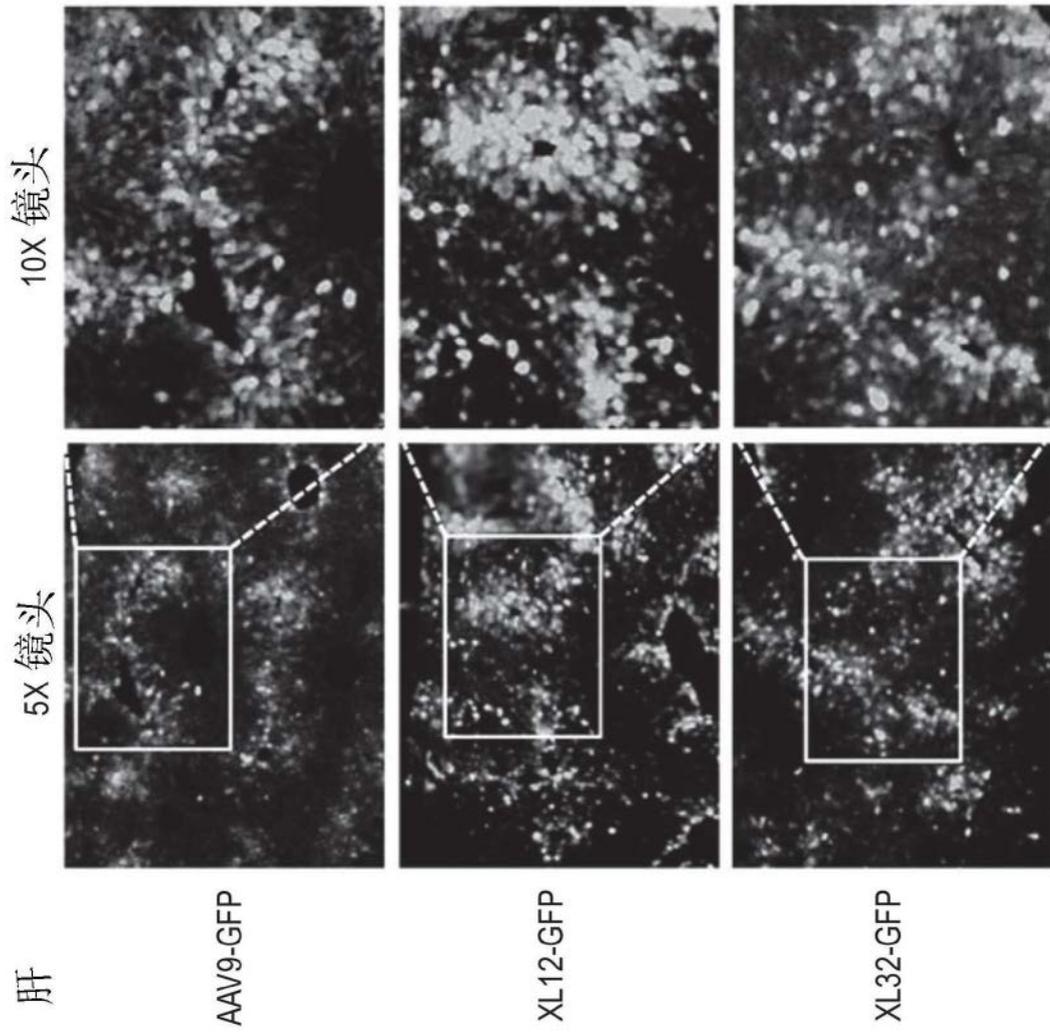


图1B

HUH7肝癌细胞的转导

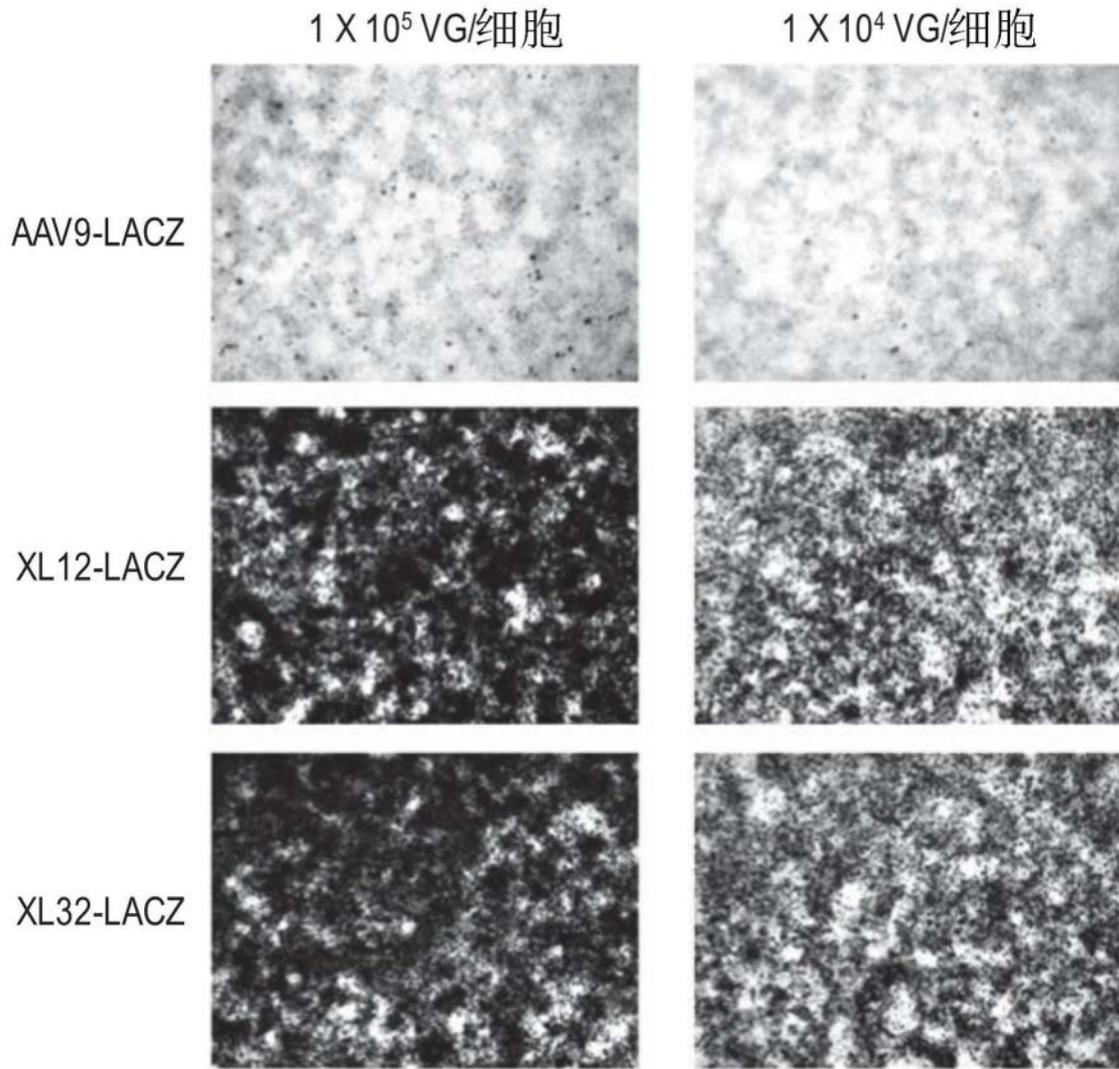
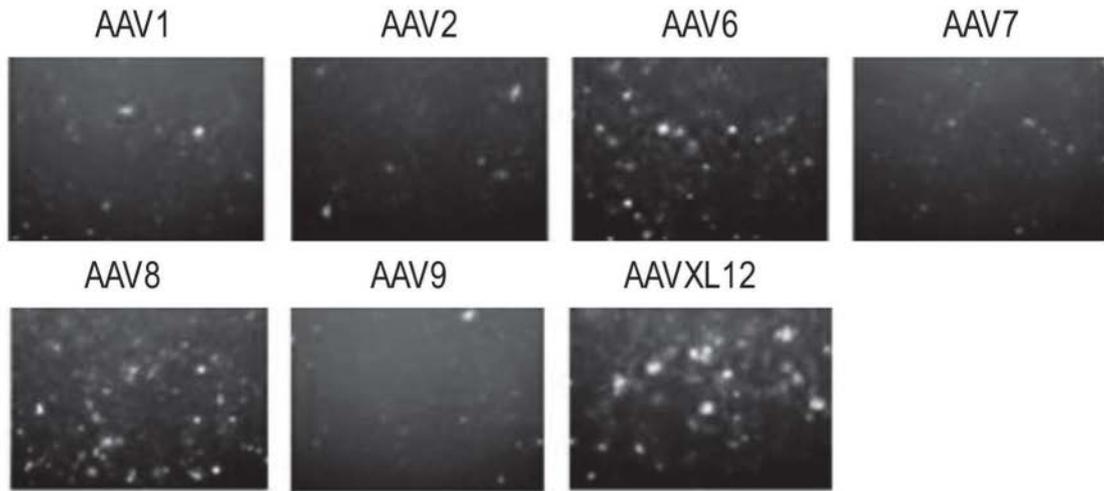
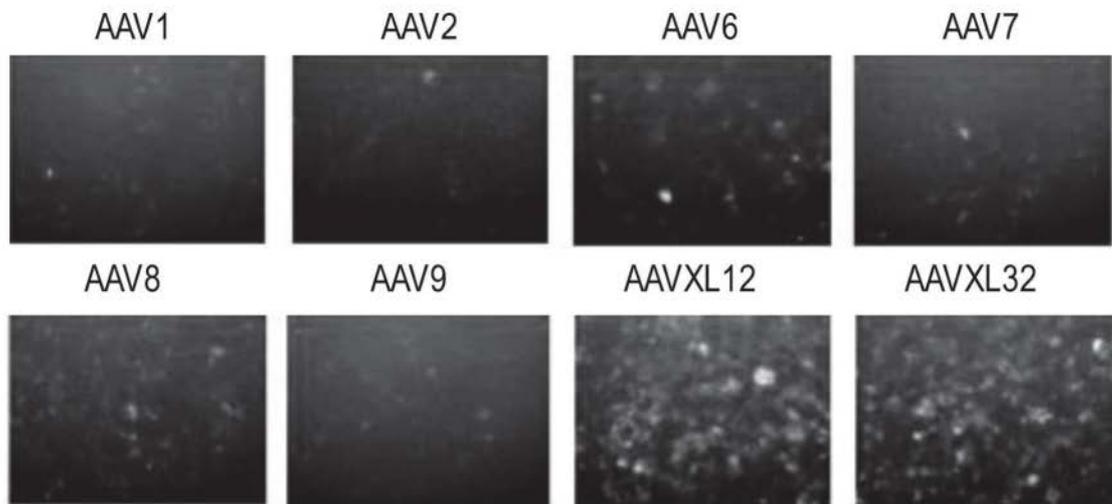


图2

AAV-GFP 24小时表达人源细胞
患者 #4011



患者 #4021



患者 #4037

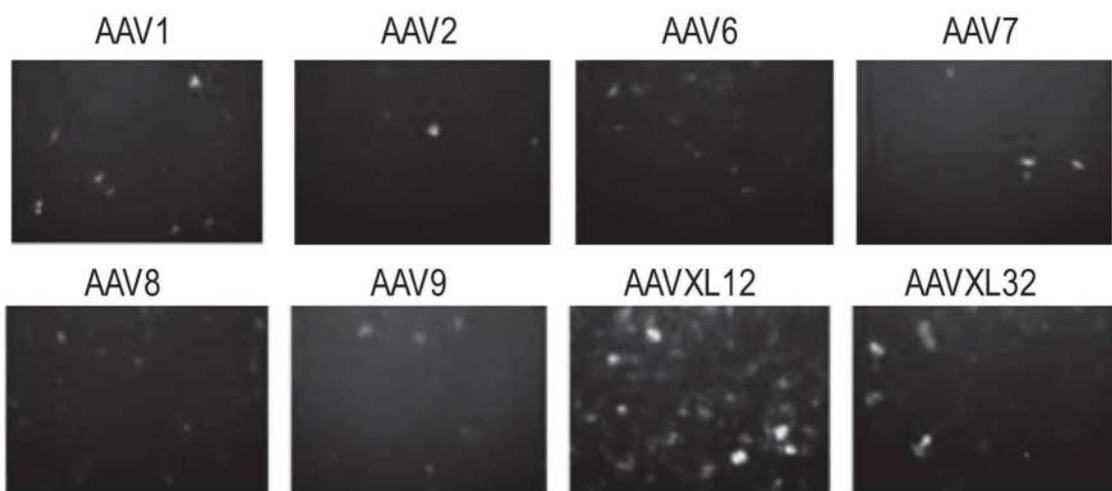
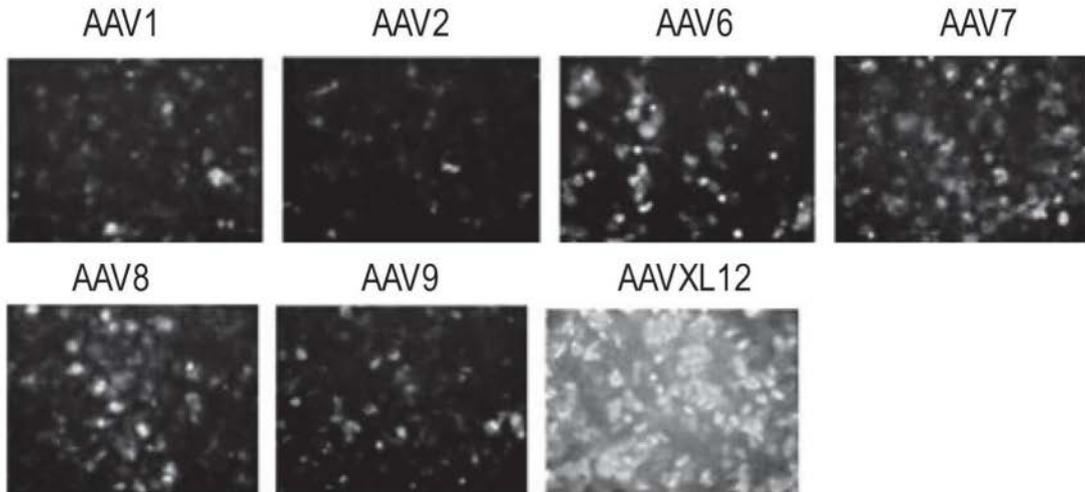
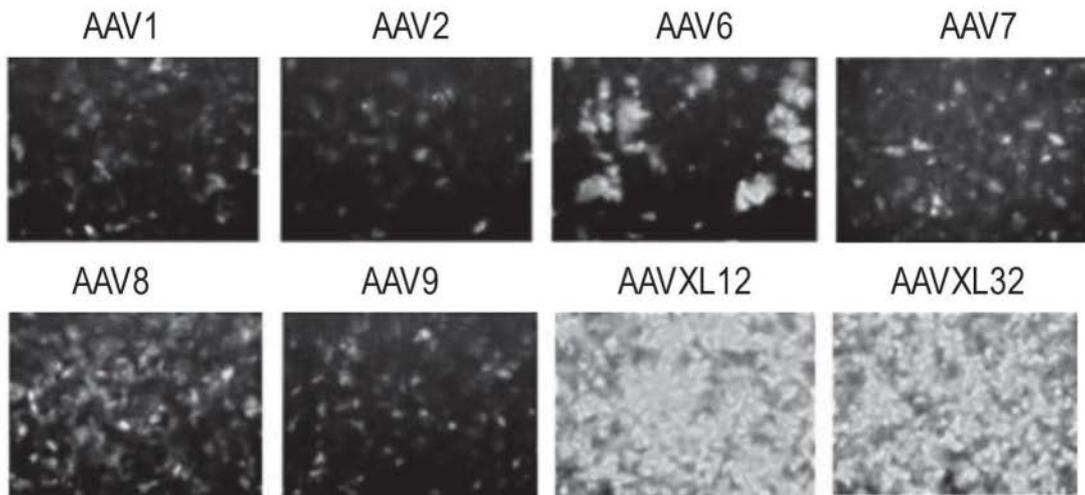


图3A

AAV-GFP 48小时患者基因表达
患者#4011



患者#4021



患者#4037

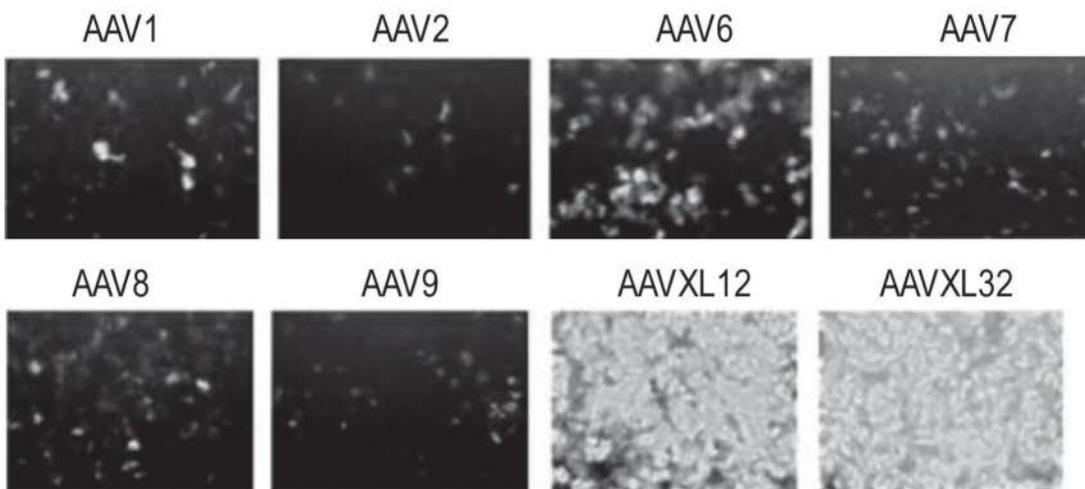
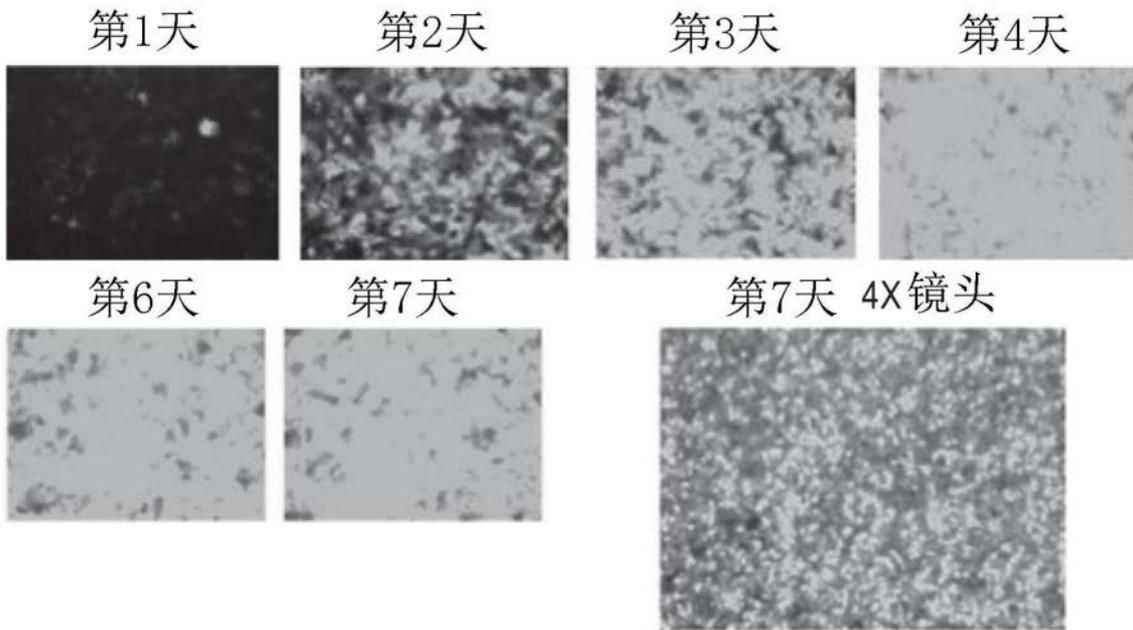


图3B

患者#4021的AAVXL12 GFP基因表达



患者#4021的AAVXL32 GFP基因表达

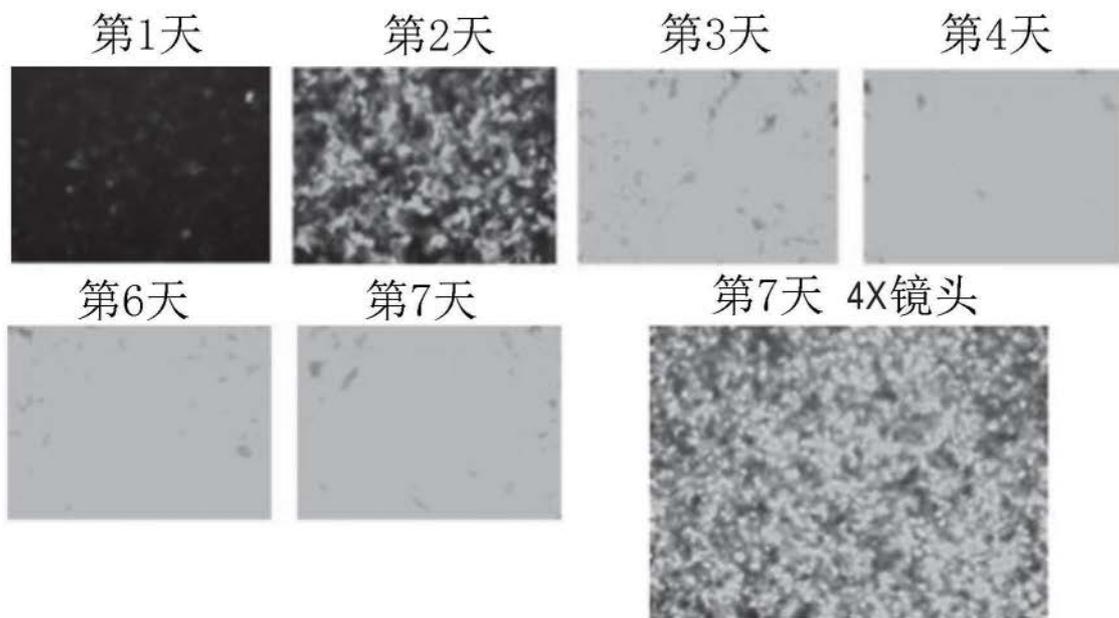
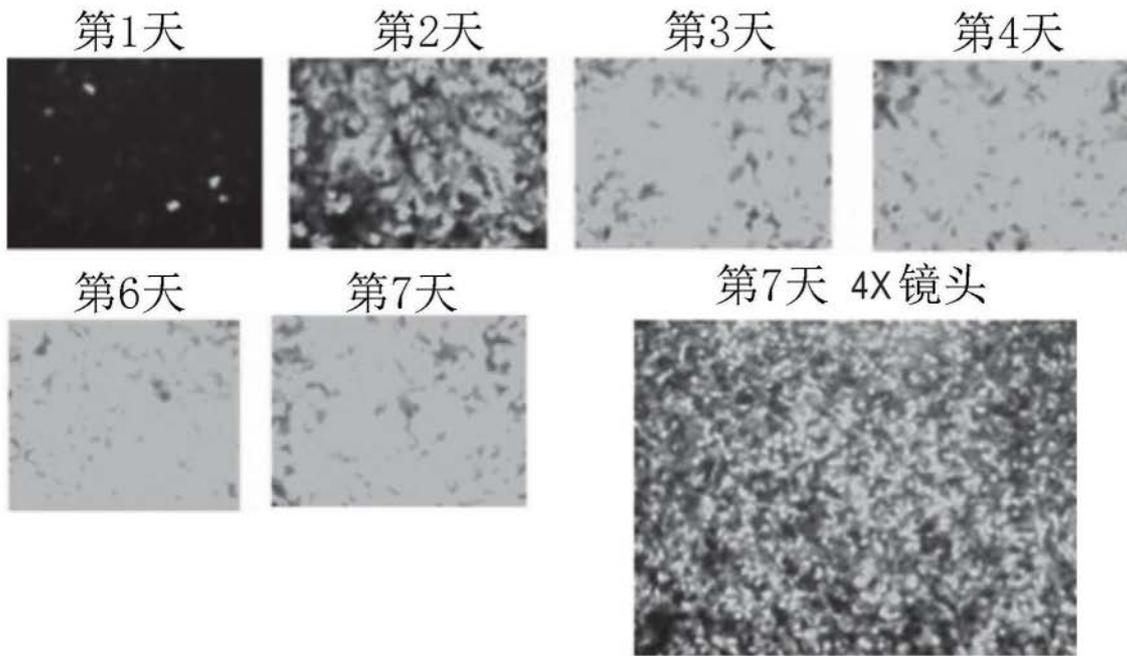


图3C

患者#4037的AAVXL12 GFP基因表达



患者#4037的AAVXL32 GFP基因表达

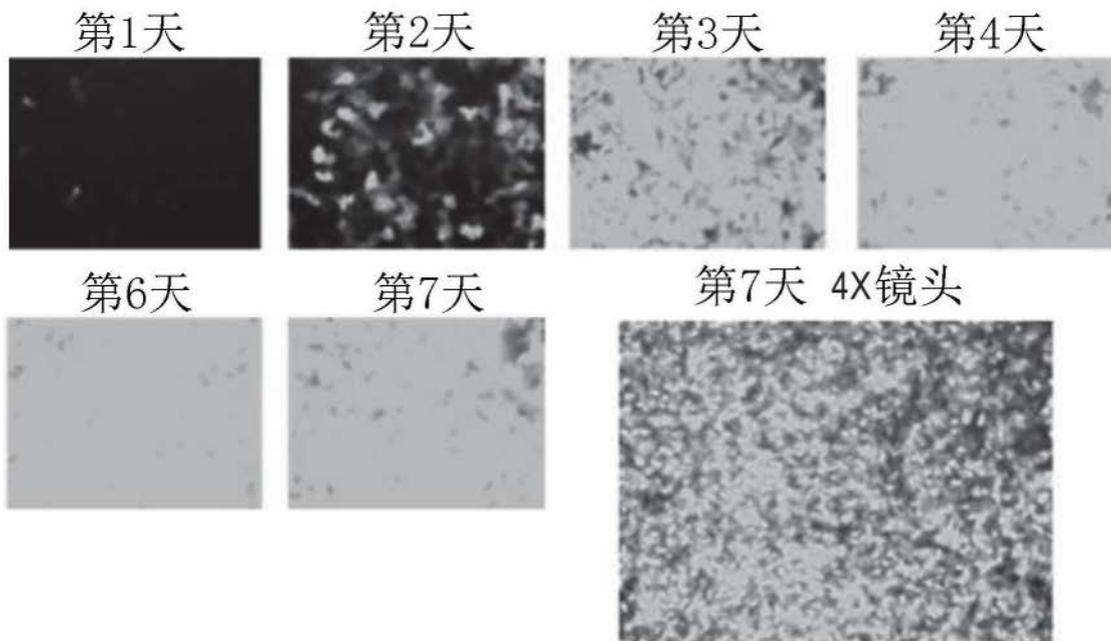


图3D

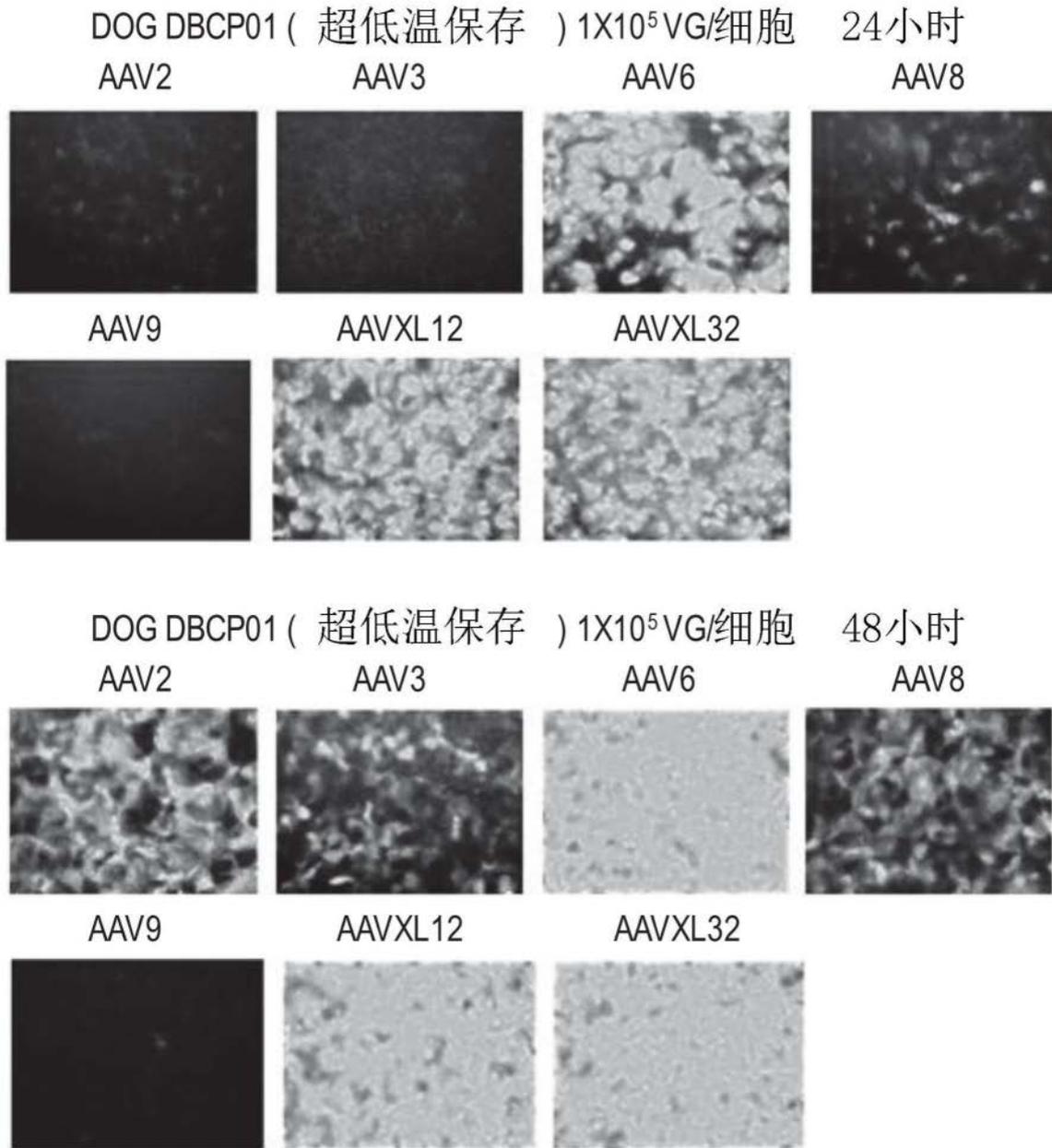


图4A

DOG DBF24 (新鲜) 1×10^5 VG/细胞 24小时

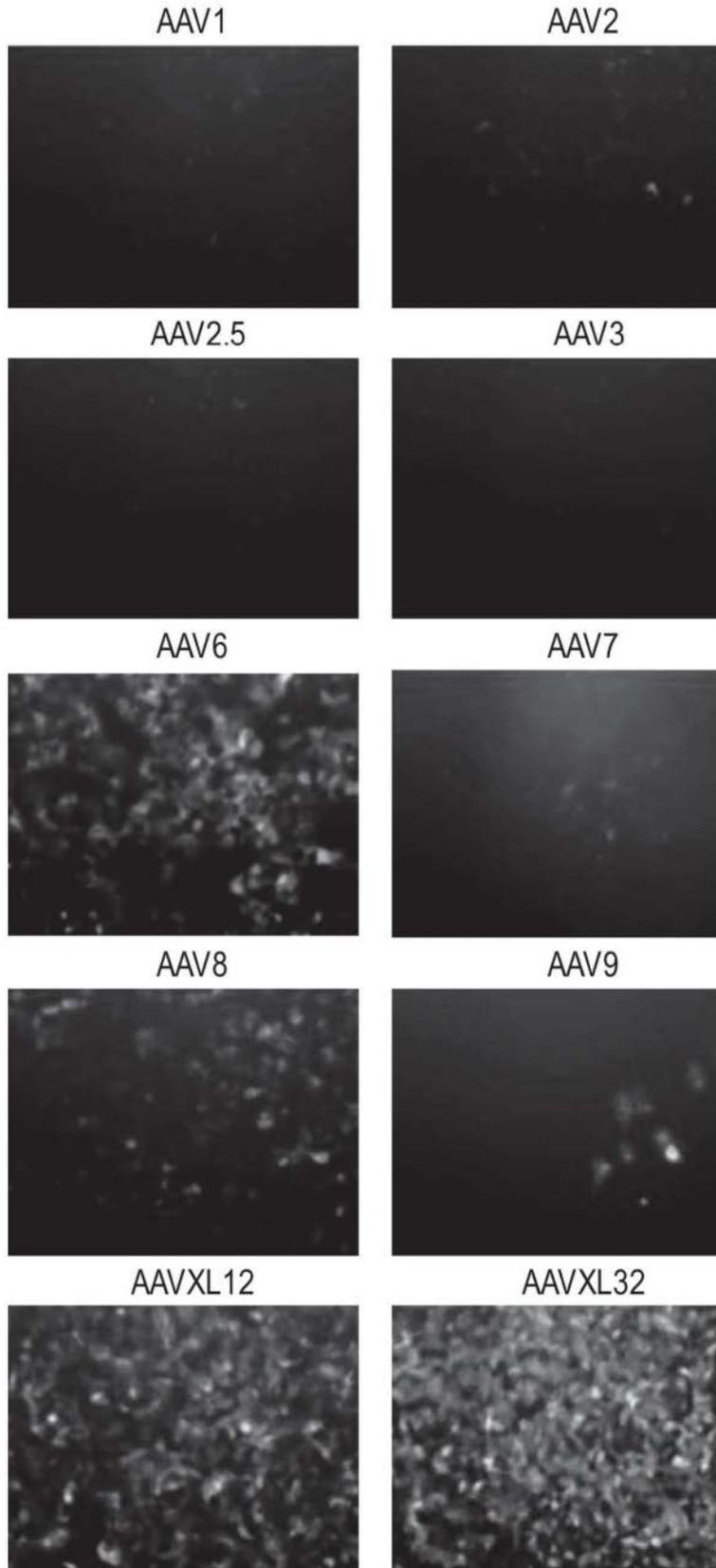


图4B

DOG DBF24 (新鲜) 1×10^5 VG细胞 48小时

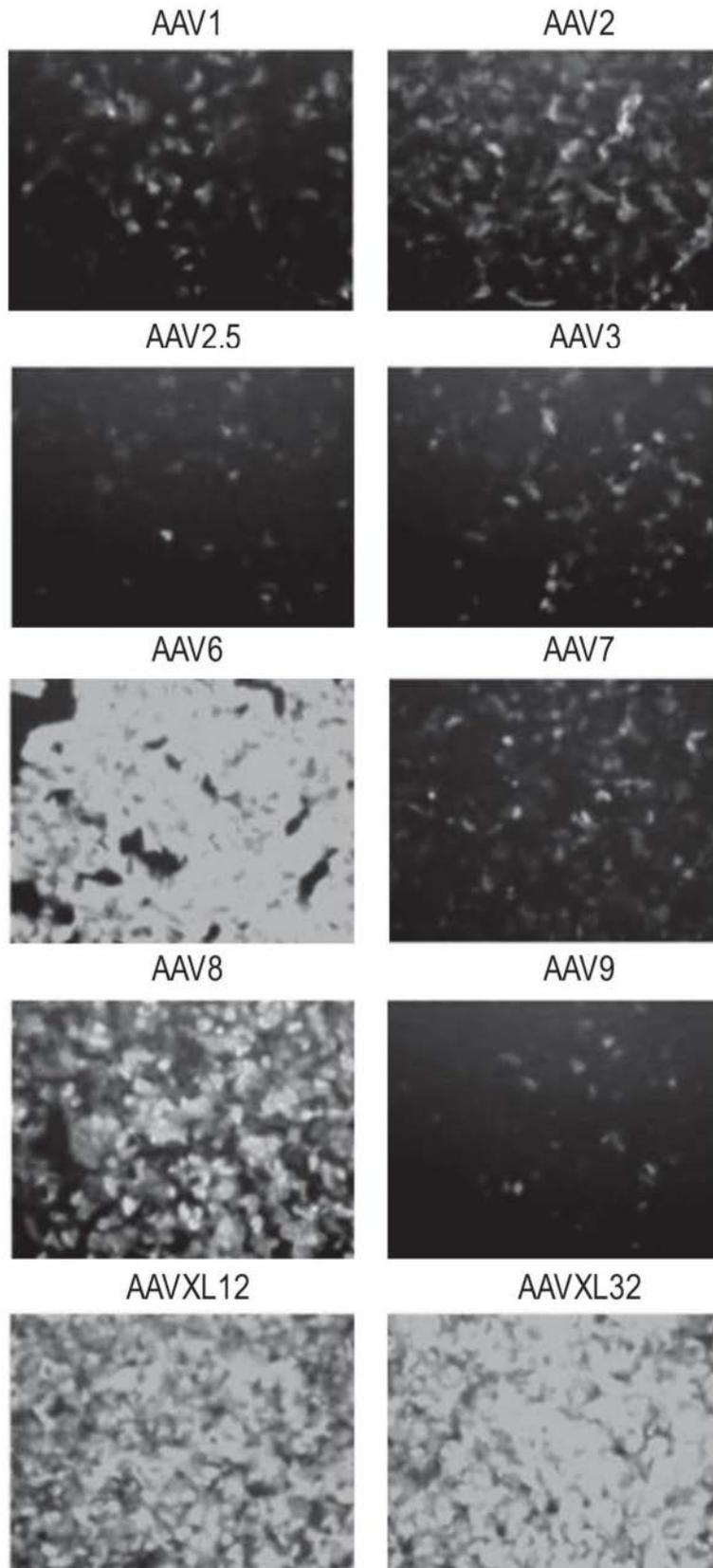
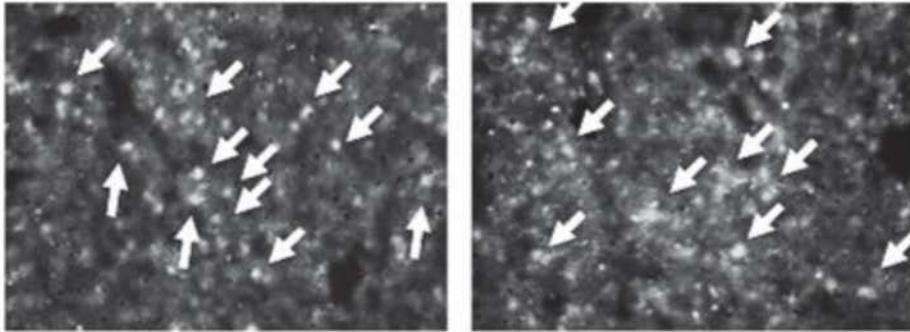


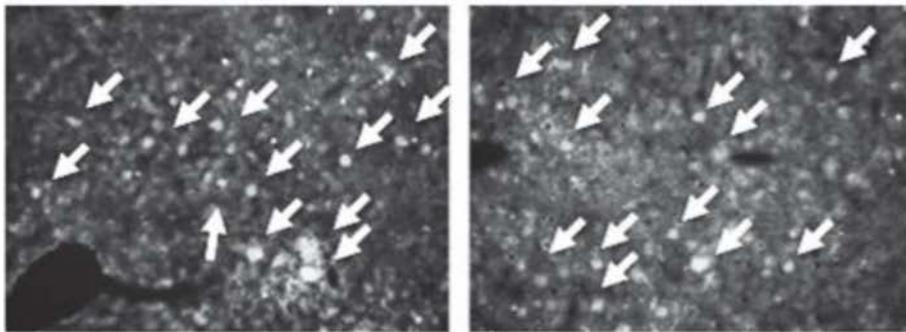
图4C

AAVXL32-CB-GFP

猴子1

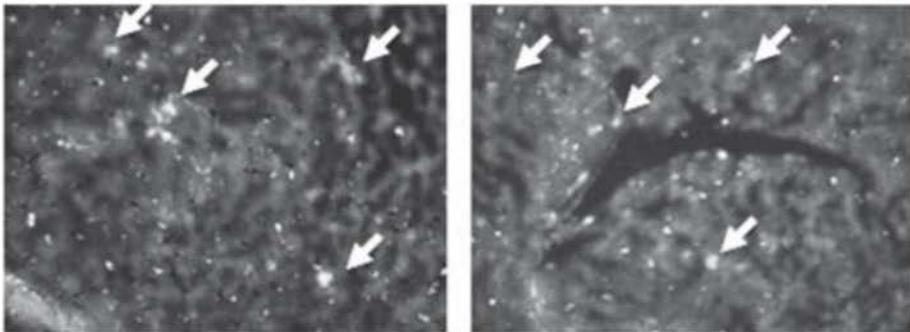


猴子2



AAV8-CB-GFP

猴子3



猴子4

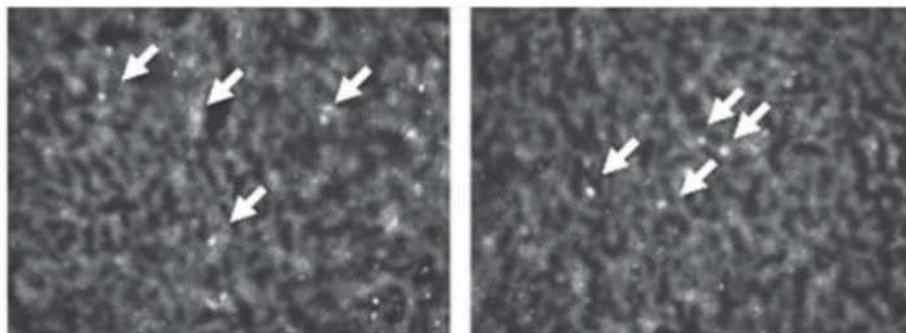


图5

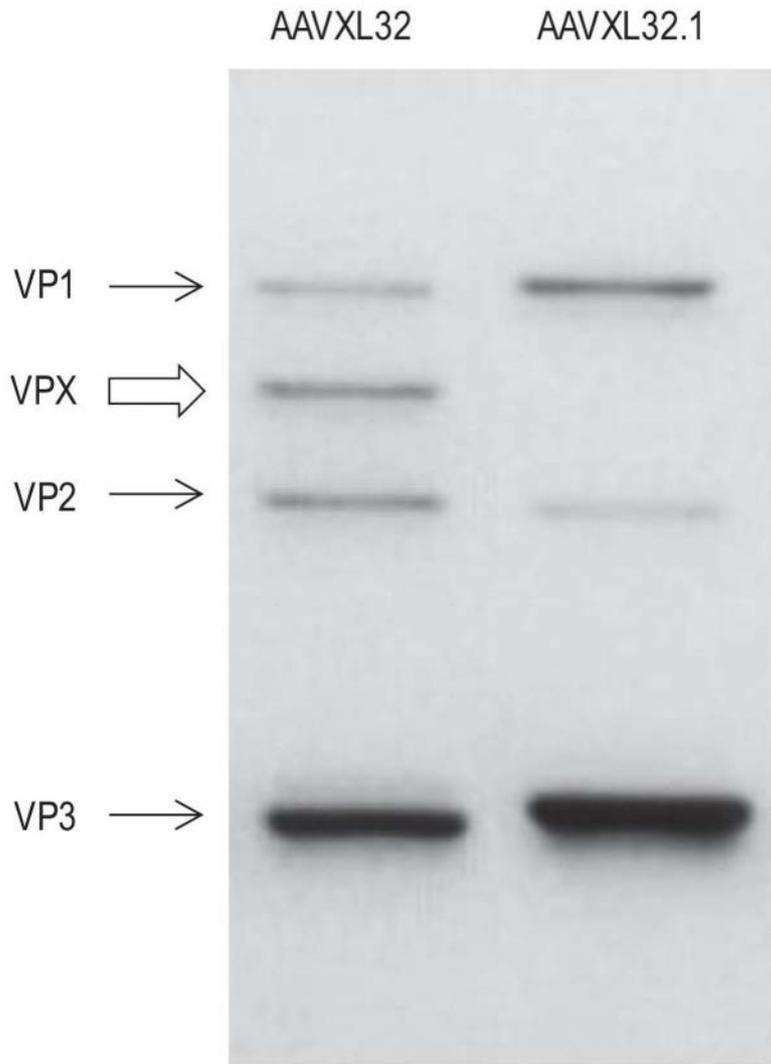


图6