



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103502458 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 201280008862.8
 (22)申请日 2012.02.17
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 103502458 A
 (43)申请公布日 2014.01.08
 (30)优先权数据
 61/443,879 2011.02.17 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2013.08.14
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2012/025550 2012.02.17
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02012/112832 EN 2012.08.23
 (73)专利权人 宾夕法尼亚大学托管会
 地址 美国宾夕法尼亚州
 (72)发明人 J·M·威尔森 C·L·贝尔
 L·H·范登伯格
 (74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
 司 31100
 代理人 韦东

(51)Int.Cl.
 C12N 15/861(2006.01)
 A61K 48/00(2006.01)
 (56)对比文件
 WO 2010127097 A1,2010.11.04,
 Zhijian Wu et al.α2,3 and α2,6 N-
 linked sialic acids facilitate efficient
 binding and transduction by adeno-
 associated virus type1 and 6.《J.Viro1.》
 .2006,第80卷(第18期),9093-9103.
 Guangping Gao et al.Clades of adeno-
 associated viruses are widely
 disseminated in human tissues..
 《J.Viro1.》.2004,第78卷(第12期),6381-88.

审查员 孙薇

权利要求书1页 说明书31页
 序列表4页 附图6页

(54)发明名称
 用于改变组织特异性和改善AAV9-介导的基
 因转移的组合物和方法

(57)摘要
 在此说明了一种改变腺联病毒(AAV)的病毒
 载体的靶向和/或细胞摄取效率的方法,这种病
 毒载体具有一种包含AAV9细胞表面结合结构域
 的衣壳。该方法涉及修饰一个进化枝F细胞表面
 受体,该受体包含一种聚糖,这种聚糖具有一个
 末端唾液酸残基和一个倒数第二β-半乳糖残基。
 这种修饰可以涉及通过暂时地功能性地去除
 AAV9在一个细胞亚群中的结合作用使该载体重
 新靶向,由此将该载体重新指向另一个细胞亚
 群。可替代地,这种修饰可以涉及通过用一种神
 经氨酸酶来处理这些细胞以暴露出细胞表面β-

半乳糖来增加细胞摄取效率。在此还提供了含有
 AAV9载体和神经氨酸酶的多组合物。在此还提
 供了一种使用连接到固相支持物上的β-半乳糖
 来纯化AAV9的方法。在此还提供了多种突变载
 体,这些突变载体已经被修饰以改变它们的靶向
 特异性,它们包括:突变体AAV9,其中半乳糖结合
 结构域发生突变;以及AAV,其中一个AAV9半乳糖
 结合结构域被工程化。

1. 腺联病毒AAV载体和神经氨酸酶的组合在制备用于改变所述AAV载体的靶向和/或细胞摄取效率的药物中的用途,该病毒载体具有来自一个进化枝F AAV的一个衣壳,所述衣壳具有 β -半乳糖受体结合结构域,其特征在于,当所述AAV载体和神经氨酸酶联合递送给一位受试者时,所述组合调节了细胞结合一个进化枝F AAV的能力,所述细胞带有一种细胞表面聚糖,这种细胞表面聚糖具有末端唾液酸和一种倒数第二 β -半乳糖,由此使得该神经氨酸酶将该末端唾液酸切除并且将该倒数第二 β -半乳糖转变成一个末端 β -半乳糖,所述AAV载体还包含一种微基因,这种微基因具有多个AAV反向末端重复序列,以及一个异源基因,该异源基因可工作地连接到指导其在一个宿主细胞中表达的多个调节序列上。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述受试者用该神经氨酸酶进行预处理。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述受试者同时地用所述AAV病毒载体以及该神经氨酸酶处理。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述药物包括该AAV病毒载体、一种运载体、和该神经氨酸酶。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中该神经氨酸酶是选自下组,该组是由细菌神经氨酸酶或人神经氨酸酶组成。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中,这种近末端 β -半乳糖残基在受试者内具有AAV细胞表面受体的一个第一细胞亚群中功能性地被去除,由此减少或消除由该细胞亚群进行的AAV摄取并使该AAV重新靶向至该受试者体内具有AAV进化枝F受体的一个第二细胞亚群。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中,该 β -半乳糖是通过将半乳糖苷酶与这些AAV载体相结合递送至该第一细胞亚群而以酶促方式移除的。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中,将一种结合末端 β -半乳糖残基的凝集素与这些AAV载体相结合递送至受试者体内天然地具有AAV进化枝F受体的一个第一细胞亚群,这样使得在所述第一细胞亚群中这些受体结合这些AAV载体的能力功能性地被去除,并且使这些AAV载体被靶向该受试者体内天然地具有AAV进化枝F受体的一个第二细胞亚群。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中,该凝集素是选自下组,该组由以下各项组成:钙依赖性凝集素、鸡冠刺桐凝集素、巨噬细胞半乳糖凝集素、人清道夫受体C型凝集素和人巨噬细胞钙依赖性C型凝集素。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中,所述巨噬细胞半乳糖凝集素是选自人或大鼠巨噬细胞半乳糖凝集素。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中,该组合物被配置用于滴入肺中。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述来自AAV进化枝F的衣壳选自AAV hu.14/AAV9, hu.31或hu.32。

13. 根据权利要求1所述的用途,其中该AAV载体具有一个AAV9衣壳,其中该AAV9衣壳与具有氨基酸203至736的AAV9vp3是至少95%相同的。

用于改变组织特异性和改善AAV9-介导的基因转移的组合物 和方法

[0001] 关于联邦赞助研究和开发的声明

[0002] 本发明受美国政府支持在国家健康研究所资助的NHLBIP01#P01-HL-059407下做出。美国政府享有本发明中的某些权利。

[0003] 发明背景

[0004] 为基因治疗所评价的首个腺联病毒(AAV)载体基于血清型2(AAV2)并且示出在体内递送后转导多种体细胞[Z.Wu(吴)等人,(2006)Mol Ther(分子治疗),14:316-327]。第一批临床基因治疗成功案例之一使用AAV2载体,以便在患有遗传性形式失明的患者中视网膜下注射后恢复某些方面的视力[A.Kern(克恩)等人,(2003)J Virol(病毒学杂志),77:11072-11081;AM Maguire(马奎尔)等人,(2008)N Engl J Med(新英格兰医学杂志),358:2240-2248]。然而应用AAV2载体用于治疗其他疾病不那么成功,这归因于低劣转导效率和不同免疫问题,例如针对衣壳的预存中和抗体和T细胞活化[Wu(吴)等人,上文援引]。已知AAV2利用硫酸类肝素(HS)蛋白聚糖作为主要受体用于细胞的识别[Kern(克恩)等人,上文援引]。基于来自其他现有血清型(例如AAV1)和其近亲AAV6的AAV衣壳开发额外的载体,此二者均示出增强由唾液酸化糖蛋白介导的肌肉转导和细胞结合作用[Z.Wu(吴)等人,(2006)J Virol(病毒学杂志),80:9093-9103;W.Xiao(肖)等人,(1999)J Virol(病毒学杂志),73:3994-4003]。基于AAV5的载体也需要结合N联唾液酸(SA),同时示出在脑中直接注射后增强CNS(中枢神经系统)中的转导[RW Walters(沃尔特斯)等人,(2001)J Biol Chem(生物化学杂志),276:20610-20616;BL Davidson(戴维森)等人,(2000)Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院院刊),97:3428-3432]。通过从人类和非人灵长类组织中的潜在基因组发现庞大且多样的新颖衣壳家族,AAV载体用于人类基因治疗的潜力扩大。这种扩大的AAV家族数目超过120种基因组,覆盖6种抗原性进化枝[G.Gao(高)等人,(2003)Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院院刊),100:6081-6086;G.Gao(高)等人,(2004)J Virol(生物化学杂志),78:6381-6388;G Gao(高)等人,(2002)Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院院刊),99:11854-11859]。已经确定许多AAV衣壳的高分辨率X射线晶体结构和低分辨率冷冻电子显微术重构图像,显示出高度保守的核心区,其具有总计9个表面暴露的高变区[HJ Nam(纳姆)等人,(2007)J Virol(病毒学杂志),81:12260-12271]。对基于这些新颖内源衣壳的载体的评价已经就实现大幅度更高转导效率,同时减少免疫后遗症方面而言显得相当有前景[G.Gao(高)等人,(2002)Proc Natl Acad Sci(美国国家科学院院刊),上文援引]。

[0005] 基于腺联病毒(AAV)血清型9的载体已经出现,作为体内向许多器官递送基因的先导性候选物。AAV9已经在靶向心脏用于治疗心肌病[LT Bish(比什)等人,(2008)Hum Gene Ther(人类基因治疗)19:1359-1368]和靶向神经元用于治疗多种疾病,例如脊髓性肌萎缩[S.Duque(杜奇)等人,(2009)Mol Ther(分子治疗),17:1187-1196;KD Foust(福斯特)等人,(2009)Nat Biotechnol(自然生物技术),27:59-65]方面,示出明显的前景。AAV9也在不激发体液反应情况下非常有效地转导肺部肺泡上皮细胞,允许载体的有效反复给予[MP

Limberis和JM Wilson,(2006)Proc Natl.Acad Sci.USA,103:12993-12998]。然而,介导这些嗜性的一种或多种受体仍待限定。

[0006] 需要的是用于宿主内转基因的靶向AAV介导递送的安全、有效方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了用于调节希望的靶细胞上AAV9受体的可用性及用于改变载体功效的药理学方法。这种方法因本发明的诸位发明人发现末端 β -半乳糖是AAV9的主要受体而是可行的。另外,该方法预期适用于包含AAV9 β -半乳糖结合结构域的其他AAV。

[0009] 在一个方面,本发明提供了一种改变腺联病毒(AAV)病毒载体的靶向和/或细胞摄取效率的方法,所述腺联病毒载体具有来自AAV9的衣壳。该方法包括向受试者递送改变 β -半乳糖细胞表面受体结合载体的可用性的组合物。

[0010] 在一个方面,宿主中靶细胞的细胞表面包含具有末端唾液酸残基和倒数第二 β -半乳糖残基的聚糖,所述聚糖受本发明修饰以暴露 β -半乳糖残基。在一个实施例中,该方法包括向受试者递送与一种神经氨酸酶组合的AAV病毒载体,由此所述神经氨酸酶切除聚糖上的末端唾液酸并且通过增加 β -半乳糖的可用性而增加AAV由细胞摄取的效率。受试者可以用这种神经氨酸酶预处理。在一个实施例中,这种神经氨酸酶是外切神经氨酸酶(即与内部唾液酸相反,它靶向末端唾液酸用于切除)。

[0011] 在另一个实施例中,通过功能性消除具有AAV9受体的第一细胞亚群上暴露的细胞表面末端 β -半乳糖残基(例如,具有末端 β -半乳糖残基的细胞表面聚糖),将AAV9载体再指引偏离具有末端 β -半乳糖的第一细胞亚群,并且由此使所述AAV重新靶向至受试者中具有末端 β -半乳糖的第二细胞亚群和/或增加接触第二细胞亚群的AAV的数目,由此增加被这些细胞摄取。在一个实施例中,将功能性消除第一细胞亚群的部分局部递送至第一细胞亚群。在一个实施例中,在具有AAV9细胞表面受体的第一细胞亚群中,酶促移除 β -半乳糖,由此减少或消除AAV由所述细胞亚群摄取,并使所述AAV重新靶向至所述受试者中具有AAV9受体(末端 β -半乳糖)的第二细胞亚群。在一个实施例中,通过递送与AAV9载体组合的半乳糖苷酶至第一细胞亚群,酶促地移除 β -半乳糖。在另一个实施例中,将结合末端 β -半乳糖残基的凝集素递送至受试者,这通过结合这些残基而封闭 β -半乳糖。

[0012] 仍在另一个方面,本发明提供了一种通过向受试者递送包括神经氨酸酶和AAV9载体的组合,增加AAV9载体在具有表面聚糖的细胞中基因递送的方法,该表面聚糖具有末端唾液酸和倒数第二 β -半乳糖残基,所述载体进一步包括具有AAV反向末端重复序列的微型基因和与指导其在宿主细胞中表达的调节序列可工作地连接的异源基因。

[0013] 在一个方面,该组合物进一步提供了突变AAV9载体,其中基本上减少或消除野生型(wt)AAV9转导传导气道的天然能力,但是保留与wtAAV9相似的肝脏和心脏转导作用。在一个实施例中,突变AAV具有其中替换在位置470(Asn)处天然氨基酸的AAV9衣壳。在一个实例中,这种替换物是丙氨酸。在另一个实施例中,突变AAV具有其中替换在位置446(Tyr)处天然氨基酸的AAV9衣壳。在一个实例中,这种替换物是丙氨酸。仍在另一个实施例中,突变AAV具有其中替换在位置271(Asp)处天然氨基酸的AAV9衣壳。在一个实例中,该氨基酸替换为丙氨酸。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了一种通过以下方式使AAV9载体不靶向气道上皮、同时保留其转导肝脏和心脏的能力的方法:将一个或多个在位置271、446、和470处的氨基酸

改变成丙氨酸或另一种氨基酸,即,优选地具有小的、不带电荷的侧链氨基酸。在另一个实施例中,该氨基酸具有不影响结合位点构象的带甲基的小侧链。

[0015] 在又一个方面,本发明提供具有经工程化以包含AAV9半乳糖结合结构域的AAV衣壳的AAV载体。在一个实施例中,工程化的AAV衣壳包含在亲本AAV9的相应氨基酸位置内插入的AAV9的Y446、N470、A472和V472和AAV9的D271、N272和W503。

[0016] 仍在另一个实施例中,本发明提供了一种用于分离具有AAV9衣壳的腺联病毒(AAV)病毒载体的方法。这种方法涉及(a)使包括具有来自AAV9衣壳的AAV病毒载体的样品暴露,以接触包括已经连接固相支持物的 β -半乳糖的分子,由此具有 β -半乳糖结合位点的纯化靶由该分子选择性结合及;(b)洗涤固相支持物以从样品中移除非特异性结合固相支持物的物质;和(c)从固相支持物中分离病毒载体。

[0017] 仍在另一个实施例中,本发明提供包括以下组合的组合物:(a)神经氨酸酶、(b)具有AAV9衣壳的腺联病毒(AAV)载体和(c)药学上可接受的运载体。所述载体进一步包括具有AAV反向末端重复序列的微型基因和与指导其在宿主细胞中表达的调节序列可工作地连接的异源基因。

[0018] 仍在另外实施例中,本发明提供了包括以下组合的组合物:(a)凝集素、(b)具有AAV9衣壳的腺联病毒(AAV)载体和(c)药学上可接受的运载体。

[0019] 本发明的这些和其他方面将会因本发明的以下详细描述而轻易明晰。

[0020] 发明简要说明

[0021] 图1A-1C提供了研究AAV结合缺少唾液酸(SA)的聚糖的结果。图1A是对每种细胞类型或酶处理,N联和O联聚糖的示意图。图1B示出通过用神经氨酸酶(NA)处理,从Pro-5细胞表面移除SA并且施加载体至NA处理和未处理的细胞并评价结合作用时的结果。基于平均相对荧光单元(以RFU呈现),筛选空AAV9衣壳用于结合465种不同聚糖,并且鉴定到结合AAV9的最优5种聚糖(未示出)。图1C示出最优5种聚糖的结构及它们的代表性示图。%CV:表示为百分比的变异系数(数据的标准偏差与平均数的比率)。

[0022] 图2A-2F示出对结合并转导CHO细胞,AAV9依赖半乳糖的研究结果。将表达ffLuc的AAVs2、6或9添加至Pro-5、Lec-2亦或Lec-8细胞并且在4°C孵育1hr,并且分离总DNA以通过qPCR(图2A)确定结合的基因组副本,或将细胞在37°C孵育48小时并分析ffLuc表达(图2B)。在不同凝集素存在下,将AAV2和AAV9施加至NA处理的Pro-5细胞,以竞争AAV结合(图2C)或转导(图2D)。因RCA对细胞有毒,故它不用于转导研究中。将AAV2和AAV9添加至用NA或NA和 β -半乳糖苷酶(NA及 β -gal)处理过的Pro-5细胞,以评估AAV(图2E)结合和(图2F)转导。ffLuc,萤火虫萤光素酶;RLU,相对发光单位。

[0023] 图3A和图3B示出半乳糖结合作用所需的AAV9衣壳氨基酸的研究结果。图3A.将AAV9独有的包含带电荷或极性侧链的特定氨基酸突变成丙氨酸(A),以鉴定负责半乳糖结合的那些氨基酸。构建14种突变载体,并且根据天然氨基酸和其随后是新氨基酸-丙氨酸,A的特定位置命名,。与AAV9相比,测试这些突变体与Pro-5、Lec-2和Lec-8细胞的结合。将载体添加(5×10^9 个GC)至每个细胞系并在4°C孵育1小时。在洗涤后,分离总DNA以通过定量PCR确定结合的载体GC。确定N470是AAV9半乳糖结合作用必需的。图3B.随后,将紧邻N470定位的19个氨基酸突变成丙氨酸,以检验对AAV9半乳糖结合作用的影响。此外,产生4种其他突变体,它们包含非极性氨基酸A472或V473至丝氨酸亦或天冬氨酸的突变。然后如上文所

述评估这些突变载体的结合。发现D271、N272、Y446和W503连同A472和V473对AAV9半乳糖结合是重要的。数据显示为平均数+SD。

[0024] 图4A和图4B提供了突变载体的体外转导效率。将丧失半乳糖结合能力的5种突变体(N470A、D271A、N272A、Y446A和W503A),连同保留半乳糖结合作用的2种突变体(S469A和E500A)和AAV9对照载体(它们均表达ffLuc)以109GC/孔(MOI=104)添加至(图4A)Lec-2或(图4B)Pro-5细胞,并且48小时后,测量ffLuc表达。数据显示为平均数+SD。RLU,相对发光单位。

[0025] 图5是曲线图,示出在rAAV2/9滴注后,用神经氨酸酶预处理对鼻中转基因表达的影响的体内研究结果。将结果示出为萤光素酶的总辐射通量(光子每秒(p/s)),如在第1、3、7、14、21和28天(感染后天数(时间))通过萤光素鼻内成像。

[0026] 发明详细说明

[0027] 描述了用于改变靶细胞上AAV9受体的可用性及用于改变载体功效的药理学方法。这种方法因本发明的诸位发明人发现末端 β -半乳糖是AAV9的主要受体而是可行的。为在整篇本说明书中便利,参考AAV9。然而,应理解,对于细胞表面末端 β -半乳糖,可以替换另一种包含AAV9衣壳结合结构域的AAV或对于细胞表面末端 β -半乳糖,可以替换包含另一种AAV衣壳结合结构域的AAV,例如,来自进化枝F的另一种AAV。额外地,在此所述的方法和组合物对于是病毒颗粒(即,具有包装于其中的基因组序列的AAV衣壳,该基因组序列在摄取病毒载体后递送至宿主细胞)的载体连同对空AAV9衣壳(无序列包装于其中的完整AAV衣壳)是有用的。另外,预计本发明可用于野生型衣壳和工程化衣壳二者。

[0028] 在一个实施例中,提供了具有经工程化以包含AAV9半乳糖结合结构域的AAV衣壳的AAV载体,该AAV载体在面朝AAV衣壳的2重轴和5重轴的凸出物的外表面处包含小袋,该凸出物由可变区I形成。在一个实施例中,工程化的AAV衣壳包含在亲本AAV9的相应氨基酸位置内插入的AAV9的Y446(紧邻可变区(VR)IV之前的保守结构域)、N470(VR IV)、A472(VR IV)和V473(VR IV)和AAV9的D271(VR I)、N272(VR I)及W503(VR V)。尽管亲本AAV可以天然具有这些氨基酸中的一个或多个,但是它并不天然结合半乳糖或天然地包含全部这些氨基酸。例如,Y446、D271和N272在许多血清型之间保守;而N470则不是。因此,修饰的AAV衣壳可以仅需要工程化N470(基于AAV9的位置编号)。然而,这种AAV衣壳可能需要工程化以上氨基酸中的一个或多个,以便提供AAV9结合结构域。在一个实施例中,工程化的AAV9源自AAV,其中在其野生型时,所述AAV具有唾液酸结合作用,但是因半乳糖结构域中工程化,现在因空间位阻而缺少唾液酸结合作用。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了一种通过以下方式使AAV9载体不靶向气道上皮、同时保留其转导肝脏和心脏的能力的方法:将一个或多个在位置271、446、和470(可变区IV)处的氨基酸改变成丙氨酸或另一种氨基酸。在一个实施例中,替代野生型氨基酸的氨基酸是具有的小的、不带电荷的、侧链氨基酸。在另一个实施例中,该氨基酸具有带甲基的小侧链,例如Val、Ile和Leu。仍在另一个实施例中,选择不以消除半乳糖结合功能的方式影响结合位点构象的另一种合适氨基酸,例如Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ser、Thr、Asp、Gln、Cys、Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp。在一个实施例中,该氨基酸选自除Pro之外的组。

[0030] 还提供的是具有不同于wt AAV9的靶向效率的突变AAV9载体,该wt AAV9靶向传导气道细胞、心脏和肝脏。在一个实例中,这种突变AAV9载体通过以下方式不靶向气道上皮,

同时保留其转导肝脏和心脏的能力:将一个或多个在位置271、446、和470处的氨基酸改变成丙氨酸或另一种氨基酸。在一个实施例中,替代野生型氨基酸的氨基酸是具有小的、不带电荷的、侧链的氨基酸。在另一个实施例中,该氨基酸具有带甲基的小侧链,例如Val、Ile和Leu。仍在另一个实施例中,选择不以消除半乳糖结合功能的方式影响结合位点构象的另一种合适氨基酸,例如Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ser、Thr、Asp、Gln、Cys、Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp。在一个实施例中,该氨基酸选自除Pro之外的组。

[0031] 在一个实施例中,本发明提供了突变AAV9载体,其中基本上减少或消除野生型(wt)AAV9转导传导气道的天然能力,但是保留与wtAAV9相似的肝脏和心脏转导作用。在一个实施例中,突变AAV具有其中替换在位置470(Asn)处天然氨基酸的AAV9衣壳。在一个实例中,这种替换物是丙氨酸。在另一个实施例中,突变AAV具有其中替换在位置446(Tyr)处天然氨基酸的AAV9衣壳。在一个实例中,这种替换物是丙氨酸。仍在另一个实施例中,突变AAV具有其中替换在位置271(Asp)处天然氨基酸的AAV9衣壳。在一个实例中,该氨基酸替换为丙氨酸。

[0032] I. 定义

[0033] 进化枝F是在系统进化上涉及AAV9、hu.14/AAV9[GenBank登录号AY530579],hu.31[AY530596]和hu.32[GenBank登录号AY530597]的一组AAV,如基于AAV vp1氨基酸序列的比对,使用邻接算法,由(至少1000个副本的)至少75%自助值和不多于0.05的泊松校正距离量值所确定。邻接法算法已经在文献中广泛描述。见,例如,M.Nei(内)和S.Kumar(库马尔),Molecular Evolution and Phylogenetics(分子进化与系统发育)(Oxford University Press(牛津大学出版社),纽约(2000)。可以用来执行这种算法的计算机程序是可获得的。例如,MEGA v2.1程序执行改良的Nei-Gojobori方法。使用这些技术和计算机程序以及AAV vp1衣壳蛋白的序列,本领域普通技术人员可以轻易地确定选择的AAV是否含于在此鉴定的进化枝之一、含于另一个进化枝中、或位于这些进化枝外部。

[0034] 进化枝F AAV可以是天然存在的AAV vp1衣壳。然而,AAV不局限于天然存在的AAV。进化枝可以涵盖非天然存在的AAV,包括而不局限于重组的、修饰的或改变的、工程化的、嵌合的、杂合的、合成的、人工的等AAV,所述AAV是系统进化相关的,如基于AAV vp1氨基酸序列的比对,使用邻接算法,由(至少1000个副本的)至少75%自助值和不多于0.05的泊松校正距离量值所确定。

[0035] 在另一个实施例中,重组AAV可以来自除进化枝F AAV之外的进化枝,该进化枝具有已经被工程化以包含与细胞表面末端 β -半乳糖结合的AAV9结合结构域的衣壳。

[0036] 在另一个实施例中,本发明中使用的AAV是一种AAV载体,其包括与AAV9 vp3蛋白(SEQ ID NO:1的氨基酸203至736)至少95%相同、与AAV9 vp2(SEQ ID NO:1的约氨基酸138至736)至少95%相同和/或与全长AAV9 vp1衣壳(SEQ ID NO:1的氨基酸1至736或2至736)至少95%相同的衣壳。在另一个实施例中,AAV与野生型AAV9(SEQ ID NO:1)的vp1、vp2和/或vp3约96%、约97%、约98%或约99%相同,并且包含AAV9细胞表面 β -半乳糖结合结构域。本领域普通技术人员将理解,由于vp3结构域包含大部分可变区,所以对于AAV而言可能是与AAV9具有在AAV9的vp1范围内95%同一性,而与AAV9的vp3具有更高同一性。在一个实施例中,用于制备AAV载体的AAV具有100%与AAV9 vp1、vp2和/或vp3相同的衣壳。仍在另一个实施例中,用来制备AAV载体的AAV具有AAV9衣壳,例外在于它包含如在此定义的一个或多个突变。

[0037] 在指氨基酸或其片段时,术语“基本上同源性”或“基本上相似性”表示在适当的氨基酸插入或缺失与另一种氨基酸(或其互补链)最佳比对时,存在至少约95%至99%的比对序列的氨基酸序列同一性。优选地,同源性是在全长序列或其蛋白(例如cap蛋白、rep蛋白)或其长至少8个氨基酸或更希望地至少15个氨基酸的片段范围内。在此描述合适片段的实例。

[0038] 术语“高度保守”意指至少80%同一性,优选地至少90%同一性,和更优选地超过97%同一性。通过求助本领域普通技术人员已知的算法和计算机程序,同一性由本领域普通技术人员轻易地确定。

[0039] 总体上,在指两种不同腺联病毒之间“同一性”,“同源性”,或“相似性”时,参考“比对的”序列确定“同一性”,“同源性”或“相似性”。“比对的”序列或“比对结果”指与参考序列相比,经常包含丢失或额外碱基或氨基酸修正的多个核酸序列或蛋白(氨基酸)序列。在核酸序列的背景下,术语“序列同一性”“序列同一性百分比”或“百分比相同”指两个序列中为最大对应性进行比对时相同的残基。序列同一性比较的长度可以是在全长基因组、全长基因编码序列范围内,或希望至少约500至5000个核苷酸的片段。然而,也可以需要更小片段之间的同一性,例如至少约9个核苷酸,通常至少约20至24核苷酸,至少约28至32核苷酸,至少约36或更多个核苷酸的片段。类似地,可以对氨基酸序列、全长蛋白范围或其片段轻易地确定“序列同一性百分比”。合适地,片段是至少约8氨基酸长度,并且可以至多到约700个氨基酸。在此描述合适片段的实例。

[0040] 使用多种公开或可商业获得的多重序列比对程序的任一种进行比对。这类程序的实例包括“ClustalW”、“CAP Sequence Assembly”、“MAP”和“MEME”,它们是通过互联网上网络服务器可访问的。这类程序的其他来源是本领域普通技术人员已知的。可替代地,也使用Vector NTI应用。也存在本领域已知的可以用来测量核苷酸序列同一性的多种算法,包括上述程序中所含的那些。作为另一个实例,可以使用Fasta™(GCG版本6.1中的程序)比较多核苷酸序列。Fasta™提供查询对象和检索序列之间最佳重叠区域的比对结果和序列同一性百分比。例如,核酸序列之间的序列同一性百分比可以使用如通过引用方式结合在此的6.1版GCG中提供的Fasta™,采用其默认参数(字大小6和用于评分矩阵的NOPAM因子)来确定。用于氨基酸序列的多重序列比对程序也可获得,例如,“ClustalX”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“LOCKMAKER”、“MEME”和“Match-Box”程序。总体上,这些程序的任一种何以默认设置使用,虽然本领域普通技术人员可以按需要改变这些设置。可替代地,本领域普通技术人员可以利用另一种算法或计算机程序,该另一种算法或计算机程序提供至少与参比的算法和程序提供的相同水平的同一性或比对结果。见,例如JD Thomson(汤姆森)等人,(1999) Nucl. Acids. Res.(核酸研究),“A comprehensive comparison of multiple sequence alignments(多重序列比对的综合比较)”,27(13):2682-2690。

[0041] 术语“血清型”是相对于具有血液学上与其他AAV血清型不同的衣壳的AAV的区别。与其他AAV相比,基于针对AAV的抗体之间缺少交叉反应性确定血清学区分性。交叉反应性典型地在中和抗体测定法中测量。对于这种测定法,在兔或其他合适的动物模型中使用腺联病毒生成针对特定AAV的多克隆血清。在这个测定法中,针对特定AAV生成的血清然后就其中和相同(同源)亦或异源AAV的能力进行测试。将实现50%中和的稀释度视为中和抗体滴度。如果对于两种AAV,异源滴度除以同源滴度的商以交互方式低于16,则将这两个载体视为相同的血清型。相反,如果异源滴度对同源滴度的比率以交互方式是16或更大,则将两个

AAV视为不同的血清型。

[0042] 如在此使用,“末端 β -半乳糖”是具有暴露的野生型结合位点的AAV9的细胞表面受体,使得它在空间上可用于或否则结合AAV9半乳糖结合结构域。

[0043] 除非另外说明,在用来修饰数字时,术语“约”意指 $\pm 10\%$ 变异。

[0044] 如本说明书和权利要求书通篇使用,术语“包括(comprising)”和“包括(including)”是包括其他组分、元件、整数、步骤等。相反,术语“由……组成”及其变体排除其他组分、元件、整数、步骤等。

[0045] II. 治疗方案

[0046] 在一个方面,本发明提供了一种改变具有AAV9衣壳的腺联病毒(AAV)病毒载体的靶向和/或细胞摄取效率的方法。该方法包括向受试者递送改变 β -半乳糖细胞表面受体结合基于AAV9的递送载具的可用性的组合物。在一个实施例中,希望的靶细胞表面包含具有末端唾液酸残基和倒数第二 β -半乳糖残基的聚糖,该聚糖受本发明修饰以暴露 β -半乳糖残基。

[0047] 在一个实施例中,该方法包括向受试者递送与一种神经氨酸酶(NA)组合的AAV病毒载体,由此该神经氨酸酶切除细胞表面上的末端唾液酸并且增加AAV由细胞摄取的效率。受试者可以用该神经氨酸酶预处理。

[0048] 预处理意指将治疗(例如,神经氨酸酶)在AAV9介导的疗法之前递送至受试者。典型地,这涉给予AAV9-介导的疗法之前给予预处理。然而,在某些实施例中,由AAV9载体编码的转基因可以处在预处理后激活的调节型启动子控制下。在此类实施例中,AAV9载体可以在实施预处理之前或基本上与之同时给予,但是在预处理之后给予组成型启动子的活化剂。

[0049] 神经氨酸酶,也称作唾液酸酶,特异性靶向唾液酸用于切除,并且可以商业购买或从多种来源获得。在一个实施例中,神经氨酸酶是外切神经氨酸酶,即与内部唾液酸相反,它特异性靶向末端唾液酸用于切除。在一个实施例中,在水解末端唾液酸残基的 α -(2 \rightarrow 3)-, α -(2 \rightarrow 6)-, α -(2 \rightarrow 8)-糖苷键中,外切神经氨酸酶发挥功能。在本发明中有用的神经氨酸酶的实例包括例如细菌神经氨酸酶、病毒和哺乳动物神经氨酸酶。神经氨酸酶(酰基-神经氨酰水解酶:EC3.2.1.18)可以来自任何来源,包括但不限于产脉节杆菌(*Arthrobacter ureafaciens*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*),或来自哺乳动物来源。在一个实施例中,神经氨酸酶是细菌神经氨酸酶,例如来自霍乱弧菌的III型神经氨酸酶(Sigma)。然而,可以选择其他神经氨酸酶类型。在另一个实施例中,可以选择病毒神经氨酸酶,例如,流感神经氨酸酶。仍在另一个实施例中,哺乳动物神经氨酸酶可以选自例如人类、啮齿类、类人猿或另一哺乳动物来源。

[0050] 可以将神经氨酸酶配制为液体,或它可以作为固体,例如,其中神经氨酸酶与常规的药物赋形剂混合,包括,例如,包埋或混合于生物可降解或生物可侵蚀基质中。该基质可以是延时释放基质。这些基质是本领域普通技术人员熟知的。神经氨酸酶可以通过注射或通过舌下途径施用。在一个实施例中,溶媒是容纳于惰性容器内部的水溶液(例如,盐水,包括缓冲盐水,或其他合适的液体运载体)。在另一个变例中,这种组合物为栓剂形式。液体形式的组合物可以借助标准方法给予,所述标准方法包括静脉内、肌肉和皮下途径、舌下或鼻内途径。在一个实施例中,运载体是0.9%氯化钠(USP)中的0.1%至0.4%苯酚。

[0051] 神经氨酸酶可以按例如约300U至约5000U神经氨酸酶的剂量(即,等同于每剂量约

15mg至250mg神经氨酸酶)给予。可替代地,可以使更低剂量,例如处于约0.0001mg至0.01mg范围内。可替代地,可以使用这两个范围之间的量,例如,从0.01mg至约250mg。

[0052] 在一个实施例中,本发明提供了AAV介导的基因递送,其中向受试者基本上同时递送AAV9病毒载体(或具有AAV9细胞(半乳糖)结合结构域的进化枝F或载体)和神经氨酸酶。神经氨酸酶可以从AAV载体单独配制和/或经不同的途径递送,但是以基本上同时递送。可替代地,将AAV病毒载体在进一步包括神经氨酸酶的运载体中递送至受试者。

[0053] 虽然预计身体将天然地清除酶,例如神经氨酸酶,使得其作用仅是短暂的,但是在一个实施例中,可以递送神经氨酸酶抑制剂以中和任何延续的神经氨酸酶作用。合适的神经氨酸酶抑制剂是本领域已知的,并且可以包括可商购的抗病毒药物,例如,奥司他韦(Tamiflu)、扎那米韦(Relenza)、Laninavir(Inavir)和帕拉米韦。全身用神经氨酸酶抑制剂,例如奥司他韦的典型剂量方案是口服约75mg,一天两次,持续5天或如处方更长时间。然而,对于本发明中的使用,可能希望更短给药方案,例如,1-2天,和/或更低或更高每天剂量。可替代地,对于肺相关应用,可能希望吸入型神经氨酸酶抑制剂,例如扎那米韦。典型地,这种药物的剂量是通过吸入10mg,每天二次,持续5天或如处方更长时间。然而,对于本发明中的使用,可能需要更短给药方案,例如,1-2天,和/或更低或更高每天剂量。可替代地,可以选择另一种类型的神经氨酸酶抑制剂。

[0054] 在另一个方面,通过功能性消除具有AAV9受体的第一细胞亚群上暴露的细胞表面 β -半乳糖残基(例如,具有末端 β -半乳糖残基的细胞表面聚糖),将AAV载体再指引偏离具有进化枝F受体的第一细胞亚群,并且由此使AAV重新靶向至受试者中具有进化枝F受体的第二细胞亚群和/或增加接触第二细胞亚群的AAV的数目,由此增加被这些细胞摄取。在一个实施例中,酶促移除具有AAV细胞表面受体的第一细胞亚群中的 β -半乳糖,由此减少或消除AAV由所述细胞亚群摄取,并使AAV重新靶向至所述受试者中具有AAV9受体的第二细胞亚群。

[0055] 在一个实施例中,将功能性封闭第一细胞亚群的表面上结合结构域的部分局部递送至第一细胞亚群。典型地,这种封闭作用仍保持相对局限于靠近递送部位定位的细胞。例如,局部递送可以例如通过吸入、鼻内滴注、直接注射至关节或直接递送至眼部中,连同通过本领域已知的多种其他方法来实现。

[0056] 可以递送化合物以消除半乳糖苷酶、凝集素或其他封闭部分的作用。例如,可以将抗 β -半乳糖苷酶递送至受试者。例如,可以利用化合物,例如GT-2558[US 4,497,797]或苯基乙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷[PETG]。可替代地,可以递送另一种部分以加速 β -半乳糖苷酶或凝集素的清除。然而,预计这种部分(例如,半乳糖苷酶)将由试者的身体轻易地清除。

[0057] 在一个实施例中,通过递送与AAV载体组合的半乳糖苷酶至第一细胞亚群,酶促地移除 β -半乳糖。可以使用多种 β -半乳糖苷酶。在一个实施例中,可以使用同工型1[GLB1, RefSeq:NM_000404;UniProtP16278。合适的 β -半乳糖苷酶也是商业可获得,例如来自New England Biolabs公司、Roche Applied Scienc公司和Sigma Aldrich公司(来自大肠杆菌(E. Coli)来源)。可以如上文对神经氨酸酶所述配制并递送这种酶。可以利用范围从每次给药从约0.0001mg至约250mg或每次给药约0.001mg至约100mg的 β -半乳糖苷酶的剂量。这些剂量可以按需要或希望进行调节。通过切去半乳糖并显著减少或基本上消除其中切除了半

乳糖的那些细胞摄取AAV9, β -半乳糖苷酶发挥作用。以此方式, 使AAV9载体重新靶向至保留细胞表面半乳糖的其他细胞。

[0058] 在另一个实施例中, 将结合结合 β -半乳糖残基和特别是末端 β -半乳糖残基的凝集素与如在此所述的AAV载体组合递送至受试者。在有用的凝集素当中, 有钙依赖性(C型)凝集素, 例如人清道夫受体C型凝集素(SRCL)和人巨噬细胞钙依赖性(C型)凝集素。其他有用的凝集素包括鸡冠刺桐(*Erythrina Cristagalli*)凝集素(ECL)和巨噬细胞半乳糖凝集素(MGL)。另外, 其他凝集素可以包括凝集素、花生凝集素或麦胚凝集素。多种的这些凝集素已经在文献中描述和/或可以通过商业来源(例如, Vectorlabs公司)获得。如在此所述, 可以将凝集素配制在合适的液体运载体中, 并且可以包括按以下范围的凝集素: 从200至10,000 $\mu\text{g/ml}$, 如从200至5000 $\mu\text{g/ml}$, 例如从200至3000 $\mu\text{g/ml}$, 如从200至2000 $\mu\text{g/ml}$, 例如从200至1500 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0059] 仍在另一个实施例中, 可以将抗末端半乳糖抗体递送至受试者。

[0060] 制备如在此所述的基于AAV9的载体和其他AAV载体的方法是已知的。见, 例如US公布的专利申请号2007/0036760(2007年2月15日)将其通过引用结合在此。本发明不局限于使用AAV9或其他进化枝F AAV氨基酸序列, 但是涵盖通过本领域已知的其他方法(例如, 通过化学合成、通过其他合成技术或通过其他方法)产生的包含末端 β -半乳糖结合的肽和/或蛋白。可以使用多种技术轻易地产生在此提供的任何AAV衣壳的序列。合适的产生技术是本领域普通技术人员熟知的。见, 例如Sambrook(萨姆布鲁克)等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(分子克隆实验指南), Cold Spring Harbor Press(冷泉港出版社)(Cold Spring Harbor(冷泉港), NY)。可替代地, 肽也可以通过熟知的固相肽合成方法合成(Merrifield(梅里菲尔德), (1962) *J. Am. Chem. Soc.* (美国化学会志), 85: 2149; Stewart(斯图尔特)和Young(扬), *Solid Phase Peptide Synthesis*(固相肽合成)(Freeman公司, San Francisco(圣弗朗斯科), 1969)第27-62页)。这些和其他合适的产生方法处于本领域普通技术人员的知识范围内, 并且不是本发明的限制。

[0061] 产生如在此所述的重组腺联病毒(AAV)(例如, 具有 β -半乳糖细胞结合结构域的AAV)的方法是已知的。此类方法涉及培养宿主细胞, 该宿主细胞包含编码AAV衣壳的核酸序列; 功能性rep基因; 最少由AAV反向末端重复序列(ITR)和转基因组成的微型基因; 和允许将所述微型基因包装成AAV衣壳蛋白的足够辅助子功能。

[0062] 可以向宿主细胞反式提供要在宿主细胞中培养所需要的组分, 以使AAV微型基因包装于AAV衣壳内。可替代地, 所需要的组分(例如, 微型基因、rep序列、cap序列和/或辅助子功能)的任一种或多种可以由稳定的宿主细胞提供, 其中使用本领域普通技术人员已知的方法, 已经工程化所述宿主细胞以便包含一种或多种所需要的组分。最合适地, 这种稳定的宿主细胞将包含在诱导型启动子控制下的所需要的一种或多种组分。然而, 所需要的一种或多种组分可处在组成型启动子的控制下。在讨论适合随转基因一起使用的调节元件时, 在此提供了合适的诱导型启动子和组成型启动子的实例。仍在另一个替代方案中, 选择的稳定宿主细胞可以包含在组成型启动子控制下的一种或多种选定组分和在一个或多个诱导型启动子控制下的其他一种或多种选定组分。例如, 可以产生一种稳定宿主细胞, 该宿主细胞源自293细胞(其包含在组成型启动子控制下的E1辅助子功能), 但是包含在诱导型启动子控制下的rep和/或cap蛋白。可以由本领域普通技术人员产生其他稳定的宿主细胞。

[0063] 可以将用于产生本发明的rAAV所需要的微型基因、rep序列、cap序列和辅助子功能以转移其上所携带序列的任何遗传元件的形式递送至包装宿主细胞。可以通过任何适合的方法(包括在此所述的那些方法)递送选定的遗传元件。用来构建体本发明任何实施例的方法是核酸操作领域的普通技术人员已知的,并且包括基因工程、重组工程和合成技术。参见,例如Sambrook(萨姆布鲁克)等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆实验指南),Cold Spring Harbor Press(冷泉港出版社),Cold Spring Harbor(冷泉港),NY。类似地,产生rAAV病毒粒的方法是熟知的并且对合适方法的选择不限制本发明。参见,例如K.Fisher(费舍尔)等人,(1993)J.Virol.(病毒学杂志),70:520-532和美国专利号5,478,745。

[0064] 除非另外说明,在此所述的AAV ITR和其他选择的AAV组分可以轻易地选自任何AAV之间。这些ITR或其他AAV组分可以使用本领域普通技术人员可获得的技术从AAV序列轻易分离。这种AAV可以分离或从学术、商业或公共来源(例如,the American Type Culture Collection(美国典型培养物保藏中心),Manassas(马纳萨斯),弗吉尼亚州)获得。可替代地,可以通过参考已公开的序列,例如在文献或数据库(例如,GenBank®、PubMed®等)中可获得的序列,通过合成手段或其他合适手段获得AAV序列。

[0065] A. 微型基因

[0066] 微型基因最少由转基因及其调节序列和5'及3' AAV反向末端重复序列(ITR)组成。在一个实施例中,使用AAV血清型2的ITR。然而,可以选择来自其他合适来源的ITR。正是将这种微型基因包装在衣壳蛋白中并递送至选择的宿主细胞。

[0067] 1. 转基因

[0068] 转基因是与所述转基因侧翼的载体序列异源的核酸序列,编码感兴趣的多肽、蛋白或其他产物。核酸编码序列以允许转基因在宿主细胞中转录、翻译和/或表达的方式与调节组分有效连接。

[0069] 转基因序列的组成将取决于所得载体将投入的用途。例如,一种类型的转基因序列包括在表达时产生可检测信号的报告序列。这些编码序列,与驱动它们表达的调节元件连接时,提供通过常规手段可检测的信号,所述常规手段包括酶测定法、射线照相测定法、比色测定法、荧光测定法或其他摄谱测定法、荧光活化细胞分选测定法和免疫学测定法(包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学)。然而,希望地,转基因是一种非标记序列,其编码在生物学和医学中有用的产物,例如蛋白、肽、RNA、酶、显性负性突变体或催化性RNA。希望的RNA分子包括tRNA、dsRNA、核糖体的RNA、催化性RNA、siRNA、小发夹RNA、反式剪接RNA和反义RNA。有用RNA序列的一个实例是抑制或取消靶定核酸序列在治疗的受试者中表达的序列。典型地,合适的靶序列包括肿瘤学靶和病毒疾病。对这类靶的举例,参见下文在涉及免疫原的部分中所鉴定的肿瘤学靶和病毒。

[0070] 转基因可以用来纠正或改善基因缺陷,可以包括其中正常基因以低于正常水平表达的缺陷或其中不表达功能性基因产物的缺陷。可替代地,转基因可以向细胞提供在细胞类型中或在宿主中不天然表达的产物。优选类型的转基因序列编码在宿主细胞中表达的治疗性蛋白或多肽。本发明进一步包括使用多个转基因。在某些情况下,一个不同的转基因可以用来编码蛋白的每种亚基,或用来编码不同的肽或蛋白。在编码蛋白亚基(例如,免疫球蛋白、血小板衍生生长因子或肌养蛋白)的DNA的尺寸大时,这是合乎需要的。为了细胞产生

多亚基蛋白,将细胞用包含每一个不同亚基的重组病毒感染。可替代地,蛋白的不同亚基可以由相同的转基因编码。在这种情况下,单一转基因包括编码每一个亚基的DNA,其中每个亚基的DNA由内部核酶进入位点(IRES)隔开。在编码每个亚基的DNA的尺寸小,(例如,编码这些亚基和IRES的DNA的总尺寸小于5千碱基)时,这是合乎需要的。作为IRES的替代,DNA可以由编码2A肽的序列分隔,所述2A肽在翻译后事件中自我切割。见,例如ML Donnelly(唐纳利)等人,(1997年1月)J.Gen.Virol.(普通病毒学杂志),78(Pt1):13-21;S.Furler(富勒),S等人,(2001年6月)Gene Ther.(基因治疗),8(11):864-873;H.Klump(克伦普)等人,(2001年5月)Gene Ther.(基因治疗),8(10):811-817。这种2A肽明显小于IRES,使得它在空间成为限制性因素时特别适用。更经常地,在转基因庞大、由多个亚基组成或两个转基因共递送时,将携带希望的一个或多个转基因或亚基的rAAV共给予,以允许它们在体内连环体化,形成单一载体基因组。在此类实施例中,第一AAV可以携带表达单一转基因的表达盒,并且第二AAV可以携带表达不同转基因的表达盒,用于在宿主细胞中共表达。然而,选择的转基因可以编码任何生物活性产物或其他产物,例如,研究所需要的产物。

[0071] 合适的转基因可以由本领域普通技术人员轻易地选择。对转基因的选择不视为限制本发明。

[0072] 2. 调节元件

[0073] 除上文对微型基因所鉴定的主要元件之外,载体还包括与转基因以允许其在细胞中转录、翻译和/或表达的方式可工作地连接的常规控制元件,其中该细胞用质粒载体转染或用本发明产生的病毒感染。如在此使用,“可工作地连接的”序列包括与感兴趣的基因连续的表达控制序列和以反式方式发挥作用或在远距离控制目的基因的表达控制序列。

[0074] 表达控制序列包括适当的转录起始序列、终止序列、启动子和增强子序列;有效RNA加工信号如剪接和多聚腺苷化(polyA)信号;稳定胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白稳定性的序列;和在需要时,增强编码产物分泌的序列。许多表达控制序列,包括天然、组成型、诱导型和/或组织特异性启动子,是本领域已知的并且可以利用。

[0075] 组成型启动子的实例包括而不局限于,逆转录病毒罗氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地连同RSV增强子)、细胞巨化病毒(CMV)启动子(任选地连同CMV增强子)[见,例如,Boshart(波沙特)等人,(1985)Cell(细胞),41:521-530],SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1启动子[Invitrogen公司]。诱导型启动子允许调节基因表达并且可以受外来供应的化合物、环境因素(例如温度)、或存在特定生理状态(例如,急性期)、细胞具体分化状态调节或仅在复制型细胞中受调节。诱导型启动子和诱导型系统从多种商业来源可获得的,包括而不局限于Invitrogen公司、Clontech公司和Ariad公司。已经描述了许多其他系统并且可以由本领域普通技术人员轻易地选择。受外源供应的化合物调节的诱导型启动子的实例包括锌诱导型羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动、T7聚合酶启动子系统[国际专利公开号W098/10088];蜕皮素昆虫启动子[No(诺)等人,(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院院刊),93:3346-3351]、四环素阻遏型系统[Gossen(戈森)等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院院刊),89:5547-5551]、四环素诱导型系统[Gossen(戈森)等人,(1995)Science(科学),268:1766-1769,还

见Harvey(哈维)等人,(1998)Curr.Opin.Chem.Biol.(化学生物学新见),2:512-518]、RU486诱导型系统[Wang(王)等人,(1997)Nat.Biotech.(自然生物技术),15:239-243和Wang(王)等人,(1997)Gene Ther.(基因治疗),4:432-441]和雷帕霉素诱导型系统[Magari(马加里)等人,(1997)J.Clin.Invest.(临床研究杂志),100:2865-2872]。可以在这种背景下有用的其他类型的诱导型启动子是受特定生理状态例如,急性期、温度、细胞特定分化状态调节或仅在复制型细胞中受调节的那些。

[0076] 在另一个实施例中,将使用转基因的天然启动子。当希望转基因的表达应当模拟天然表达时,天然启动子可以是优选的。当转基因的表达必须按时间方式或发育方式或以组织特异性方式或响应于特定转录刺激而调节时,可以使用天然启动子。在另外实施例中,也可以使用其他天然表达控制元件,例如增强子元件、多聚腺苷化位点或Kozak共有序列来模拟天然表达。

[0077] 转基因的另一个实施例包括与组织特异性启动子可工作地连接的基因。例如,如果希望骨骼肌中表达,则应当使用在肌肉中有活性的启动子。这些包括来自编码骨骼肌 β -肌动蛋白、肌球蛋白轻链2A、肌养蛋白、肌肉肌酸激酶的基因的启动子,以及活性高于天然存在启动子的合成性肌肉启动子(见Li(李)等人,(1999)Nat.Biotech.(自然生物技术),17:241-245)。具有组织特异性的启动子的实例对肝脏而言是已知的(白蛋白,Miyatake(宫武)等人,(1997)J.Virol.(病毒学杂志),71:5124-32;乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig(桑蒂格)等人,(1996)Gene Ther.(基因治疗),3:1002-9; α -胎蛋白(AFP),Arbuthnot(阿巴思诺特)等人,(1996)Hum.Gene Ther.(人类基因治疗),7:1503-14)、骨钙素(Stein(斯坦因)等人,(1997)Mol.Biol.Rep.(分子生物学报告),24:185-96);骨涎蛋白(Chen(陈)等人,(1996)J.Bone Miner.Res.(骨与矿质研究杂志),11:654-64)、淋巴细胞(CD2,Hansal(韩赛尔)等人,(1998)J.Immunol.(免疫学杂志),161:1063-8;免疫球蛋白重链;T细胞受体链),神经元启动子如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen(安徒生)等人,(1993)Cell.Mol.Neurobiol.(细胞与分子神经生物学),13:503-15)、神经微丝轻链基因(Piccioli(皮奇奥利)等人,(1991)Proc.Natl.Acad.Sci(美国国家科学院院刊).USA,88:5611-5),和神经元特异性vgf基因(Piccioli(皮奇奥利)等人,(1995)Neuron(神经元),15:373-84),连同其他。

[0078] 为在此简化称谓,将转基因、启动子/增强子和5'和3' AAV ITR的组合称作“微型基因”。提供了本发明教授内容的情况下,可以通过求助于常规技术做出这种微型基因的设计。

[0079] 3. 递送微型基因至包装宿主细胞

[0080] 可以在递送至宿主细胞的任何适合的载体(例如,质粒)上的携带微型基因。可以将用于本发明中的质粒工程化,使得它们适于在原核细胞、哺乳动物细胞或这两者中复制并且任选地整合。这些质粒(或携带5' AAV ITR异源分子-3' AAV ITR的其他载体)包含允许微型基因在真核生物和/或原核生物中复制的序列和用于这些系统的选择标记。选择标记或报告基因可以包括编码遗传霉素、潮霉素或嘌呤霉素(连同其他)抗性的序列。质粒也可以包含某些可选择报告基因或标记基因,它们可以用来发出载体在细菌细胞中存在的信号,例如氨苄青霉素抗性。质粒的其他组分可以包括复制起点和扩增子,例如使用爱泼斯坦-巴尔病毒核抗原的扩增子系统。这种扩增子系统或其他类似的扩增子组分允许细胞中

的高拷贝数附加体复制。优选地,将携带微型基因的分子转染至细胞中,在那里它可以暂时存在。可替代地,微型基因(携带5' AAV ITR-异源分子-3' ITR)可以按染色体方式亦或作为附加体,稳定整合入宿主细胞的基因组中。在某些实施例中,微型基因可以按多拷贝形式存在,任选地按头对头、头对尾或尾对尾连环体形式存在。合适的转染技术是已知的,并且可以轻易地用于递送微型基因至宿主细胞。

[0081] 通常,在通过转染递送包括微型基因的载体时,载体按相对于约 1×10^4 细胞至约 1×10^{13} 细胞、或约 1×10^5 细胞从约5 μ g至约100 μ g DNA、约10 μ g至约50 μ g DNA的量递送。然而,考虑这类因素如选择的载体、递送方法和选择的宿主细胞,可以调节载体DNA对宿主细胞的相对量。

[0082] B. 包装宿主细胞

[0083] 除微型基因外,宿主细胞还包含驱动本发明的新颖AAV衣壳蛋白(或包括其片段的衣壳蛋白)在宿主细胞中表达的序列,以及来源与微型基因中发现的AAVITR的来源或交叉互补来源相同的rep序列。包装宿主细胞也需要辅助子功能,以便包装本发明的rAAV。这类辅助子功能是本领域熟知的并且将不在此复制。类似地,用于产生具有AAV衣壳的合适载体的方法是已知的[见,例如美国公开专利申请号US 2007/0036760]。

[0084] 因此,本发明进一步提供了使用本发明的新AAV的核酸序列和氨基酸序列产生的载体。这类载体可用于多种目的,包括用于递送治疗性分子和用于疫苗方案中。为递送治疗性分子,特别希望包含本发明新AAV的衣壳的重组AAV。包含本发明新颖AAV序列的这些载体或其他载体构建体可以用于疫苗方案中,例如,用于共递送细胞因子或用于递送免疫原本身。

[0085] 因此,本领域普通技术人员已知的技术可以产生具有rAAV进化枝F衣壳、AAV9衣壳的AAV和/或具有包括AAV9 β -半乳糖结合结构域的AAV衣壳的载体。在一个实施例中,可以使用来自单一AAV的全长衣壳,例如,hu.14/AAV9[SEQ ID NO:1]。在另一个实施例中,可以产生包含AAV9衣壳的一个或多个片段(例如,包含AAV9 β -半乳糖结合结构域的片段)的全长衣壳,其中这些片段与来自另一个选择的AAV或来自相同AAV的异源(即,不连续)部分的序列符合可读框地融合。仍在另一个实施例中,使用相似技术,装配出具有突变AAV9衣壳的载体或经工程化以包含AAV9半乳糖结合结构域的AAV。

[0086] 可以根据公布的方法,将上述重组载体递送至宿主细胞。可以向人类或非人哺乳动物患者给予rAAV,其优选地悬浮在生理相容性运载体中。鉴于转移病毒导致的适应症,合适的运载体可以由本领域普通技术人员轻易地选择。例如,一种合适的运载体包括盐水,其可以用多种缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)配制。其他示例性运载体包括无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、葡聚糖、琼脂、果胶、花生油、芝麻油、和水。对运载体的选择不限制本发明。

[0087] 任选地,除rAAV和一种或多种运载体之外,本发明的组合物可以包含其他的常规药用成分,例如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包括氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、尼泊金酯、乙基香草醛、丙三醇、苯酚和对氯酚。合适的化学稳定剂包括明胶和白蛋白。

[0088] 将载体以足够的量给予,以便转染细胞并且提供足够水平的基因转移和表达,以便提供治疗益处,而没有过多副作用,或具有医学可接受的生理作用,这可以由医学领域普

通技术人员确定。常规和可药用的施用途径包括但不限于、直接递送至希望的器官(例如,肺、心或脑)、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼球内、静脉内、肌内、皮下、皮内和其他肠胃外给予途径。如果希望,可以组合给予途径。

[0089] 病毒载体的剂量将主要取决于多种因素,例如正在治疗的病状、患者的年龄、重量和健康,并且可以因此在患者间变化。例如,病毒载体的治疗有效的人用剂量总体上处于从约0.1mL至约100mL溶液的范围,其中所述溶液包含从约 1×10^9 至 1×10^{16} 个基因组浓度的病毒载体。用于递送至大器官(例如,肺、骨骼肌、心脏或肺)或中枢神经系统(例如,脑)的优选人用剂量可以是以约1至100mL体积每1kg约 5×10^{10} 至 5×10^{13} 个AAV基因组。用于递送至眼部(例如,视网膜)的优选剂量是以约0.1mL至1mL体积约 5×10^9 至 5×10^{12} 个基因组副本。将调节剂量以平衡治疗益处与任何副作用,并且这类剂量可以取决于采用重组载体的治疗应用而变化。可以监测转基因表达的水平以确定剂量的频率,从而产生病毒载体、优选地包含微型基因的AAV载体。

[0090] 如基于AAV9的载体的实例中所示,在酶促地移除末端SA时,细胞的转导增加,提示相对于SA最常观察的倒数第二单糖-半乳糖-介导AAV9转导。这与多个其他AAV血清型相反,其中其他AAV血清型借助具有末端唾液酸(SA)的聚糖摄取,这是常见进入模式。在缺乏参与糖蛋白生物生成的酶的细胞和凝集素干扰研究中验证了借助末端SA摄取基于AAV9的载体。在聚糖结合分析中展示AAV9与具有末端半乳糖的聚糖结合。通过以下方式展示这种途径对于肺定向基因转移的相关性:将AAV9载体与神经氨酸酶一起共滴注至小鼠肺中,这导致末端半乳糖在传导气道上皮细胞的顶端表面上暴露和载体介导的这些细胞的转导大幅度增加,所述细胞是用于囊性纤维化的基因治疗的相关靶。

[0091] 下文提供用于由包含AAV的本发明载体递送的治疗性产物和免疫原性产物的实例。这些载体可以用于多种方案,如在此所述。额外地,这些载体可以在希望的方案中与一种或多种其他载体或活性成分组合递送。

[0092] 例如,合适的转基因可以包括偏好靶向肺(包括传导气道上皮细胞)的那些。这类转基因可以包括可用于治疗囊性纤维化的那些基因,例如包括囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)基因,包括,例如,一个或多个微型CFTR基因[L. Zhang(张)等人,(1998年8月18日)Proc.Natl.Acad Sci USA(美国国家科学院院刊),95(17):10158-63]。类似地,可以使用治疗其他肺部病状的基因,包括例如,抗炎细胞因子或对于治疗COPD和其他肺部病症有用的其他分子。

[0093] 在另一个实例中,可用于治疗视网膜和/或眼部病症的转基因可以更一般地包括例如视网膜色素上皮特异性65kDa蛋白(RPE65)(用于治疗Leibers先天性黑矇(LCA)、bPDE和AIPL1色素上皮驱动因子(PEDF)(例如,用于治疗黄斑变性和糖尿病性肾病)、抗血管生成性因子(包括例如抗血管内皮生长因子(VEGF)(例如,用于治疗湿式年龄相关性黄斑变性(AMD))以及与视网膜色素变性和LCA及视锥-视杆营养不良相关的其他基因。

[0094] 在仍另一个实例中,可以选择可用于治疗关节病症(例如,类风湿性关节炎)的转基因。这类转基因可以例如是肿瘤坏死因子(TNF) α 或白介素1(IL-1)阻滞剂例如像,抗TNF α 单克隆抗体,可溶性TNF α 受体、IL-1的II型可溶性受体、IL-1受体拮抗药(IL-1Ra)、抗炎细胞因子(例如,IL-4、IL-10、IL1)。这类拮抗药可以例如是抗体或Fab,或其功能性片段或另一个部分。

[0095] 仍其他基因可以包括对于治疗与中枢神经系统相关的各种病状(例如包括帕金森病、阿尔茨海默病和贮积病)有用的那些基因;与先病天性心脏相关的治疗性基因(例如, SERCA2a、血管生成素-1(Ang1)和Ang2)、与全身性溶酶体贮积病和肌肉消耗病症(例如, 肌营养不良蛋白、微型肌养蛋白)相关的基因等。

[0096] 可以选择由转基因编码的其他有用的治疗性产物用于希望的适应症。这类转基因包括激素和生长和分化因素包括而不局限于、胰岛素、胰高血糖素、生长激素(GH)、甲状旁腺激素(PTH)、生长激素释放因子(GRF)、促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素、血管抑制素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、红细胞生成素(EPO)、结缔组织生长因子(CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、胰岛素生长因子I和II(IGF-I和IGF-II)、转化生长因子或 α 超家族中的任一种,包括TGF α 、活化素、抑制素或骨形态发生蛋白(BMP)BMP1-15中的任一种、调蛋白/神经调节蛋白/ARIA/neu分化因子(NDF)生长因子家族中的任一种、神经生长因子(NGF)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养因子NT-3和NT-4/5、睫状神经营养因子(CNTF)、神经胶质细胞系衍生神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、聚集蛋白、脑信号蛋白/脑衰蛋白家族中的任一种、神经轴突导向因子-1(Netrin-1)和神经轴突导向因子-2(Netrin-2)、肝细胞生长因子(HGF)、ephrin、noggin、音猬因子和酪氨酸羟化酶。

[0097] 其他有用的转基因产物包括调节免疫系统的蛋白,包括而不局限于细胞因子和淋巴因子如促血小板生成素(TPO)、白介素(IL)IL-1至IL-25(例如包括IL-2、IL-4、IL-12和IL-18)、单核细胞趋化蛋白、白血病抑制性因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、Fas配体、肿瘤坏死因子 α 和 β 、干扰素 α 、 β 和 γ 、干细胞因子、f1k-2/f1t3配体。由免疫系统产生的基因产物也用于本发明中。这些包括而不局限于免疫球蛋白IgG、IgM、IgA、IgD和IgE、嵌合免疫球蛋白、人源化抗体、单链抗体、T细胞受体、嵌合T细胞受体、单链T细胞受体、I类和II类MHC分子,以及工程化的免疫球蛋白和MHC分子。有用的基因产物也包括补体调节蛋白如补体调节蛋白、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CR1、CF2和CD59。

[0098] 仍其他有用的基因产物包括激素、生长因子、细胞因子、淋巴因子、调节蛋白和免疫系统蛋白的多种受体的任一种。本发明包括用于胆固醇调节和/或脂质调节的受体、包括低密度脂蛋白(LDL)受体、高密度脂蛋白(HDL)受体、极低密度脂蛋白(VLDL)受体和清道夫受体。本发明也涵盖基因产物,例如类固醇激素受体超家族的成员,包括糖皮质激素受体和雌激素受体、维生素D受体和其他核受体。此外、有用的基因产物包括转录因子如jun、fos、max、mad、血清应答因子(SRF)、AP-1、AP2、myb、MyoD和肌形成蛋白、包含ETS框的蛋白、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、SP1、CCAAT框结合蛋白、干扰素调节因子(IRF-1)、Wilm肿瘤蛋白、ETS结合蛋白、STAT、GATA框结合蛋白,例如GATA-3和叉头翼状螺旋蛋白家族。

[0099] 其他有用的基因产物包括氨基甲酰基合成酶I、鸟氨酸氨甲酰基转移酶、精氨酸琥珀酸盐合成酶、精氨酸琥珀酸裂解酶、精氨酸酶、延胡索酰乙酰乙酸水解酶、苯丙氨酸羟化酶、 α -1抗胰蛋白酶、葡萄糖-6-磷酸酶、胆色素原脱氨酶、胱硫醚 β -合酶、支链酮酸脱羧酶、白蛋白、异戊酰基-CoA脱氢酶、丙酰基CoA羧化酶、甲基丙二酸单酰CoA变位酶、戊二酰CoA脱氢酶、胰岛素、 β -葡糖苷酶、丙酮酸羧酸酯、肝的磷酸化酶、磷酸化酶激酶、甘氨酸脱羧酶、H-蛋

白、T-蛋白、囊性纤维化跨膜调节蛋白(CFTR)序列和肌营养不良蛋白基因产物[例如,微型或小型肌养蛋白]。仍其他有用的基因产物包括酶,如可以在酶替代疗法中有用的酶,该酶替代疗法在因缺乏酶活性所致的多种病状中是有用的。例如,包含甘露糖-6-磷酸的酶可以用于溶酶体贮积疾病疗法中(例如,合适的基因包括编码 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUSB)的基因)。

[0100] 仍其他有用的基因产物包括用于治疗血友病那些基因产物,包括血友病B(包括因子IX)和血友病A(包括因子VIII及其变体,例如异二聚体的轻链和重链和B缺失的结构域;美国专利号6,200,560和美国专利号6,221,349)。因子VIII基因编码2351个氨基酸,并且这种蛋白具有6个结构域,从氨基至末端羧基端命名为A1-A2-B-A3-C1-C2[Wood(伍德)等人,(1984)Nature(自然),312:330;Vehar(费哈尔)等人,(1984)Nature(自然)312:337;和Toole(图尔)等人,(1984)Nature(自然),342:337]。人因子VIII在细胞内部被加工,以产生异二聚体,其主要包括:包含A1、A2和B结构域的重链和包含A3、C1和C2结构域的轻链。这种单链多肽和异二聚体均在血浆中环化成无活性前体,直至由凝血酶在A2和B结构域之间的切割激活,这释放B结构域并且产生由A1和A2结构域组成的重链。B结构域在蛋白的激活的促凝血形式中缺失。额外地,在天然蛋白中,在B结构域侧翼的两条多肽链(“a”和“b”)与二价钙阳离子结合。

[0101] 在一些实施例中,微型基因包括因子VIII重链的编码10氨基酸信号序列的前57对碱基连同人生长激素(hGH)多聚腺苷化序列。在替代实施例中,微型基因进一步包含A1和A2结构域,连同来自B结构域N末端的5个氨基酸,和/或B结构域C末端的85个氨基酸,以及A3、C1和C2结构域。仍在其他实施例中,在单个微型基因中提供编码因子VIII重链和轻链的核酸,该微型基因由编码B结构域14个氨基酸的42个核苷酸分隔[美国专利号6,200,560]。

[0102] 如在此使用,治疗有效量是AAV载体的量,该量产生足够量的因子VIII以缩减受试者血液凝血花费的时间。通常,与非血友病患者的约10分钟相比,具有小于1%正常水平的因子VIII的严重血友病患者具有大于60分钟的全血凝固时间。

[0103] 本发明不局限于任何特定的因子VIII序列。已经分离和产生许多天然和重组形式的因子VIII。天然存在的和重组形式的因子VIII的实例可以在专利和科学文献中找到,所述专利和科学文献包括美国专利号5,563,045、美国专利号5,451,521、美国专利号5,422,260、美国专利号5,004,803、美国专利号4,757,006、美国专利号5,661,008、美国专利号5,789,203、美国专利号5,681,746、美国专利号5,595,886、美国专利号5,045,455、美国专利号5,668,108、美国专利号5,633,150、美国专利号5,693,499、美国专利号5,587,310、美国专利号5,171,844、美国专利号5,149,637、美国专利号5,112,950、美国专利号4,886,876;国际专利公开号W094/11503、W087/07144、W092/16557、W091/09122、W097/03195、W096/21035,和W091/07490;欧洲专利申请号EP 0 672 138、EP 0 270 618、EP 0 182 448、EP 0 162 067、EP 0 786 474、EP 0 533 862、EP 0 506 757、EP 0 874 057、EP 0 795 021、EP 0 670 332、EP 0 500 734、EP 0 232 112和EP 0 160 457;Sanberg(圣伯格)等人,(1992)XXth Int.Congress of the World Fed.Of Hemophilia(世界血友病联合会第二十届国际大会)和Lind(林德)等人,(1995)Eur.J.Biochem.(欧洲生物化学杂志),232:19。

[0104] 可以使用重组方法或通过从已知包括因子VIII的载体衍生序列,获得编码上述因子VIII的核酸序列。此外,希望的序列可以使用标准技术,例如苯酚提取法和cDNA或基因组

DNA的PCR,从包含因子VIII的细胞和组织直接分离[见,例如Sambrook(萨姆布鲁克)等人]。也可以合成地产生而非克隆核苷酸序列。完整序列可以从重叠寡核苷酸装配出来,所述重叠寡核苷酸由标准方法制备并且装配成完整编码序列[见,例如Edge(艾奇),(1981)Nature(自然)292:757;Nambari(南巴里)等人,(1984)Science(科学),223:1299和Jay(杰)等人,(1984))J.Biol.Chem(生物化学杂志).259:6311。

[0105] 另外,本发明不局限于人因子VIII。实际上,本发明意在包括来自除人之外的动物的因子VIII,所述动物包括但不局限于伴侣动物(例如犬、猫和马)、家畜(例如牛、山羊和羊)、实验室动物、海洋哺乳动物、大型猫科动物(large cat)等。

[0106] AAV载体可以包含编码因子VIII片段的核酸,所述因子VIII片段本身无生物活性,然而在给予至受试者时改善或恢复凝血时间。例如,如上文讨论,因子VIII蛋白包括两条多肽链:由加工期间被切去的B-结构域分隔的重链和轻链。如本发明所展示,用因子VIII重链和轻链共转导受体细胞导致生物活性因子VIII的表达。因为大部分血友病患者仅在一条链(例如,重链或轻链)包含突变或缺失,故而可能仅给予患者中缺陷的链以补足另一条链。

[0107] 其他有用的基因产物包括非天然存在的多肽,例如具有非天然存在的氨基酸序列的嵌合或杂合多肽,所述非天然存在的氨基酸序列包含插入、缺失或氨基酸置换。例如,单链工程化的免疫球蛋白可能在某些免疫受损的患者中 useful。其他类型非天然存在的基因序列包括可以用来减少靶的过表达的反义分子和催化性核酸,例如核酶。

[0108] 为治疗以细胞过度增生为特征的过度增生性病状,如癌症和银屑病,特别希望减少和/或调节基因的表达。靶多肽包括与正常细胞相比,仅在过度增生性细胞中产生或以更高水平产生的那些多肽。靶抗原包括由癌基因,例如myb、myc、fyn和易位基因bcr/abl、ras、src、P53、neu、trk和EGFR编码的多肽。除癌基因产物作为靶抗原之外,用于抗癌治疗和保护性方案的靶多肽包括由B细胞淋巴瘤产生的抗体可变区和T细胞淋巴瘤的T细胞受体可变区,在一些实施例中,也使用所述可变区作为自身免疫性疾病的靶抗原。可以使用其他肿瘤相关多肽作为靶多肽,例如在肿瘤细胞中以更高水平发现的多肽,包括由单克隆抗体17-1A识别的多肽和叶酸结合多肽。

[0109] 其他合适的治疗性多肽和蛋白包括可以对于治疗患有自身免疫疾病和病症的个体有用的那些多肽和蛋白,所述自身免疫疾病和病症因针对与自身免疫性相关的靶赋予宽泛基础性保护免疫反应所致,所述靶包括细胞受体和产生“自我”指向抗体的细胞。T细胞介导的自身免疫疾病包括类风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、Sjögren综合征、肉瘤样病、胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、自身免疫性甲状腺炎、反应性关节炎、强直性脊柱炎、硬皮病、多发性肌炎、皮炎、银屑病、血管炎、韦格纳肉芽肿、Crohn病和溃疡性结肠炎。这些疾病的每一种均特征在于:结合内源抗原并且启动与自身免疫疾病相关的炎症级联的T细胞受体(TCR)。

[0110] 用于递送靶细胞的仍其他产物是本领域普通技术人员已知的。

[0111] III. 分离和纯化的方法

[0112] 本发明提供了一种用于通过使用与固相支持物附接的 β -半乳糖,分离和检测AAV9的方法。本发明也可以轻易地适用于纯化具有 β -半乳糖结合位点的另一种进化枝F AAV或适用于包含 β -半乳糖结合位点的所谓“空AAV9衣壳”(其中无包装的基因组序列的完整衣壳蛋白)。例如,应理解,可以根据本发明检测、分出和分离包含嵌合AAV衣壳的AAV载体,例如,

包含AAV9的部分或具有 β -半乳糖结合位点的其他进化枝F衣壳蛋白的那些AAV载体。为了本说明书中自始至终方便,将这些病毒载体和具有如在此所述的 β -半乳糖特异性结合位点的其他蛋白称作“纯化靶”。如之前所述,应理解,在这个部分中对AAV9的称谓用于速记目的并且不排除具有 β -半乳糖结合位点的其他AAV衣壳。

[0113] 使用在此所述的方法,通过用高盐溶液洗脱或孵育移除特异性结合的病毒(或“空衣壳蛋白”),有效回收纯度比CsCl₂沉降法所达到纯度更合乎需要的AAV9。此外,这种技术快速,不需要专用设备并且可以容易地放大。本发明进一步提供了使用在此所述的方法(所述方法利用单步骤亲和柱用于纯化并检测病毒载体)和任选地可视检测标记系-----AAV9衣壳(无论是包装的病毒颗粒或“空”衣壳)有用的试剂盒。

[0114] 在一个实施例中,该方法提供了一种用于分离纯化靶的方法。这种方法涉及:暴露包括纯化靶的一种样品,接触包括已经与固相支持物连接的 β -半乳糖的分子,由此具有 β -半乳糖结合位点的纯化靶由该分子选择性结合。此后,洗涤固相支持物以从样品中移除与固相支持物非特异性结合的物质。纯化靶然后可以从固相支持物分离。任选地,为进一步使用,浓缩从固相支持物分离的纯化靶。在一个实施例中,将固相支持物装填在亲和层析柱中。

[0115] 本发明充分适合分隔和分离具有下述衣壳的病毒载体,所述衣壳来自进化枝F AAV或具有AAV9细胞结合结构域的AAV。这些AAV可以因其衣壳特异性结合 β -半乳糖的能力,从产生这些病毒的培养物中发现的材料分离。本发明的方法在从辅助子依赖性生产培养物中用于分隔和分离进化枝F AAV或具有AAV9细胞结合结构域的AAV的方法中,因为腺病毒、AAV1和在这类培养物中发现的其他病毒或细胞物质并不特异性结合 β -半乳糖。

[0116] 为了用于本发明,一个或多个 β -半乳糖分子可以直接或间接地(例如,经由合适接头)与固相支持物结合,如在此定义。可替代地, β -半乳糖可以发现于多种分子中,包括蛋白、糖和化学部分,它们可以(直接或间接)与固相支持物结合。为了有效结合包含AAV9细胞结合结构域的AAV9、其他进化枝F或嵌合AAV,这类分子包含末端(外部)半乳糖。包含 β -半乳糖的分子的实例是具有末端 β -半乳糖的聚糖。这类分子可以从商业来源获得或根据多种天然、合成、重组或其他合适方法制备。

[0117] β -半乳糖的化学合成是本领域已知的,例如 α -氨基的TBOC或FMOC保护法。(参见,Coligan(克里冈)等人,Current Protocols in Immunology(免疫学实验指南),Wiley Interscience公司,1991,单元9)。可替代地,肽也可以通过熟知的固相肽合成方法合成(Merrifield(梅里菲尔德),J. Am. Chem. Soc. (美国化学会志),85:2149(1962);Stewart(斯图尔特)和Young(扬),Solid Phase Peptide Synthesis(固相肽合成)(Freeman公司, San Francisco(圣弗朗斯科),1969)第27-62页)。可替代地,可以利用包含一个或多个 β -半乳糖部分的化学分子,使得化学分子与固相支持物附接。仍在另一个替代方案中,用于纯化的固相支持物可以化学地或以其他方式改性以包含一个和优选地多于一个 β -半乳糖部分。这类 β -半乳糖部分可以与固相支持物直接连接,例如,通过经受住 β -半乳糖与纯化靶结合并移除非特异性结合物质的共价键或其他合适键连接。可替代地, β -半乳糖部分可以与固相支持物间接连接,例如,通过促进 β -半乳糖与支持物结合的部分连接。这种部分可以是蛋白、化学部分或另一种合适连接物。用于连接 β -半乳糖或包含末端 β -半乳糖的部分的合适方法是本领域已知的,并且也从固相支持物制造商可获得。

[0118] 如在此使用,术语“固相支持物”指任何物质,包括凝胶、树脂、珠、粉末和其他固体,其中 β -半乳糖或包含末端 β -半乳糖的分子可以与任何物质结合,使得与固相支持物结合的 β -半乳糖分子经受住 β -半乳糖与纯化靶结合和非特异性结合物质的移除。合适的固相支持物的实例包括由琼脂糖凝胶、琼脂糖、交联琼脂糖、混合型琼脂糖或聚丙烯酰胺组成的树脂;珠(包括微珠);硅;玻璃;微量比色池;微胶囊;微量滴定平板;和生物芯片。有用的支持物包括在1999年6月3日公布的国际专利公布W0 99/27351;1999年6月3日公布的国际专利公布W0 99/27140;美国专利号6,096,273;2000年3月16日公布的国际专利公布W0 00/14197,连同其他专利中描述的那些。

[0119] 已知多种微珠,包括在美国专利号6,074,884;5,945,293和5,658,741中描述的氨基葡聚糖珠。也可以采用磁性铁氧体的氨基葡聚糖涂覆的单分散胶态分散体[美国专利号5,240,640];金属[美国专利号5,248,772];聚苯乙烯[美国专利号5,466,609;美国专利号5,707,877;美国专利号5,639,620;美国专利号5,776,706],和聚苯乙烯-金属[美国专利号5,552,086;美国专利号5,527,713]粒子作为根据本发明的固相支持物。另一种类型的固相支持物可以包含上述涂覆的基质,连同一层胶体大小的覆盖氨基葡聚糖涂层的金属固体。已经描述了金/银胶态涂覆的聚苯乙烯-氨基葡聚糖珠、它们的制备、表征和在分析全血中白细胞亚群中的用途。见,例如美国专利号5,248,772;美国专利号5,552,086;美国专利号5,945,293;O.Siiman和A.Burshteyn, *J. Phys. Chem.*, 104:9795-9810(2000);和O.Siiman(西曼)等人, *Cytometry*(细胞计数), 41:298-307(2000)。这种涂覆基质的替代品采用羧基官能化聚苯乙烯粒子作为核芯基质,所述聚苯乙烯粒子通过EDAC偶联用氨基葡聚糖涂覆,如美国专利号5,639,620中所述。这些和其他固相支持物是本领域普通技术人员已知的并且从多个商业来源可获得,包括而不局限于Amersham Pharmacia公司(Uppsala(乌普萨拉),瑞典);Pierce公司;Biorad公司(Richmond(里士满),弗吉尼亚州)和Beckman Coulter公司,连同其他。

[0120] 在一个实施例中,固相支持物由活化的琼脂糖凝胶组成。CnBr活化的琼脂糖凝胶可以从Amersham Pharmacia公司购买。然而,琼脂糖凝胶和活化的琼脂糖凝胶的其他来源是已知的,如活化方法和活化化合物。合适的活化琼脂糖凝胶的实例包括CnBr活化的、羰基二咪唑活化的、戊二醛活化的、羟基琥珀酰亚胺活化的和甲苯磺酰氯的琼脂糖凝胶。

[0121] 使 β -半乳糖或包含 β -半乳糖的分子与固相支持物结合的方法可以选自己知的方法。这类方法也由固相支持物制造商提供。在一个实施例中, β -半乳糖连接的固相支持物装填在靶分隔、分离和/或纯化的亲和层析柱中。在这个实施例中,允许包含纯化靶(例如,来自AAV生产培养的裂解物)的样品流经该柱,使得纯化靶与 β -半乳糖连接的固相支持物特异性结合。此后,洗涤该柱以移除非特异性结合的物质,同时保留特异性结合的纯化靶。希望地,洗涤试剂是盐水,或另一种缓冲至生理pH(例如,磷酸盐缓冲盐水)的合适试剂。然后该柱移除纯化靶的条件下经历进一步的洗涤步骤。适合地,洗脱试剂是包含高浓度盐的溶液。一个合适实例是以至少约0.1M浓度包含NaCl的磷酸盐缓冲盐水溶液。另一个合适的溶液包含磷酸盐缓冲盐水和至少约0.4M NaCl。鉴于这种信息,本领域普通技术人员可以轻易地选择将实现相似效果的替代性盐溶液。可替代地,洗脱试剂可以是任何适合的酸性试剂或其盐(例如,具有范围约1至约5的低pH的试剂)。这类试剂的实例包括乙酸(例如,1mM)及其盐例如乙酸钠,和0.1M甘氨酸(pH3),连同本领域普通技术人员轻易明白的其他试剂。在洗脱

纯化靶(例如,具有AAV9细胞结合结构域)后,AAV可以借助常规技术经历浓缩。

[0122] 在另一个实施例中, β -半乳糖连接的固相支持物可以与包含纯化靶的样品一起孵育。在这种实施例中,样品可以是包含裂解物的溶液,该裂解物来自其中产生待分离蛋白的细胞培养物。可替代地,样品可以是来自受试者的生物样品,或受试者的与合适稀释剂混合的生物样品。本发明的“来自受试者的生物样品”可以包括任何样品,连同其他流体,其包括全血、血浆或血清,其中所形成的主体是细胞、特别是血细胞。这类样品可以通过用于处置这种类型其他样品的常规方法纯化,例如通过离心等分离。这些“来自受试者的生物样品”可以与标记化合物混合和/或任选地与缓冲剂液或稀释剂混合,以调节样品浓度,或否则制备样品用于分析。仍在另一个替代方案中,生物样品可以是组织样品,并且 β -半乳糖连接的固相支持物可以与合适的缓冲液或其他稀释剂混合,用于与组织样品一起孵育。

[0123] 在另一个实施例中,本发明提供了用于分离纯化靶的试剂盒。这种试剂盒特别适用于产生病毒载体(例如,在其衣壳中包含AAV9-细胞结合结构域的进化枝F或AAV载体)。

[0124] 典型地,这种试剂盒包含固相支持物,该固相支持物具有 β -半乳糖或包含与之连接的分子的 β -半乳糖。这类固相支持物可以选自上文描述的那些。在一个想要的实施例中,固相支持物是用于与样品一起孵育的珠或凝胶。在另一个想要的实施例中,固相支持物装填在亲和柱(例如液相色谱柱)中,并且使样品通过该柱。

[0125] 此外,本发明的试剂盒也可以包含希望的试剂,包括洗涤试剂、洗脱试剂和浓缩试剂。这类试剂可以轻易地选自在此所述的试剂,并选自常规浓缩试剂。在一个想要的实施例中,洗涤试剂是已经缓冲至生理pH的等渗盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS);洗脱试剂是包含0.4M NaCl和浓缩试剂的PBS,及装置。例如,本领域普通技术人员将认识到,试剂(例如聚乙二醇(PEG)或 NH_4SO_4)或这类装置(例如滤器装置)可以是有益的。例如,具有100K膜的滤器装置将浓缩rAAV。

[0126] 这些试剂盒可以额外地包含维持或保护样品所必需的试剂。更重要地,该试剂盒包含用于进行竞争性测定和制备对照的说明书。还可以在试剂盒中提供针对样品的合适稀释剂和缓冲液、用于比较信号的指示图、一次性手套、净化说明书、敷药棒或容器、和样品制备杯。如需要,试剂盒优选地也包含必需的缓冲物质或培养基。本领域普通技术人员可以用就任何特定受体和靶细胞而言对患者进行所述方法必需的信息和组分装配任何数目的试剂盒,并且将结果与这种结合位点的标准进行比较。

[0127] 仍在另一个实施例中,本发明提供了对于检测纯化靶(例如,AAV9)在样品中存在有用的试剂盒。除包含上文描述的组分之外,这种试剂盒还可以包含允许目视检测纯化靶与所述分子结合的标记试剂。这种试剂盒特别适用于检测来自受试者的生物样品(例如,血液)中的纯化靶。除包含上文描述的 β -半乳糖连接的支持物和试剂之外,这种类型的试剂盒还可以另外包括目视可检测的标记。

[0128] 术语“标记”总体上指分子,优选地蛋白分子,还指小化学分子,优选地目视可检测的那些。在一个实例中,通过被激光激发时发射具体波长的可检测信号,这些标记使能够检测。藻胆蛋白、串联染料、某些荧光蛋白,小化学分子,和由其他手段可检测的某些分子均可以视为用于这些分析的标记。见,例如Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(荧光探针和研究化学品手册),第6版,R.P.Haugland(格兰德),Molecular Probes, Inc.公司,Eugene(尤金),俄勒冈州(1996)中列出的标记。

[0129] 在本发明中有用的藻胆蛋白的实例是藻青蛋白、别藻蓝蛋白(APC)、别藻蓝蛋白B、藻红蛋白(PE)并且优选地是R-藻红蛋白。PE属于目前可用的最明亮荧光染料。与抗体缀合, PE已经用来在荧光平板测定法中和在(MC Custer(卡斯特)和MT Lotze(洛策), (1990) J. Immunol. Meth. (免疫法杂志), 128, 109-117)中检测白介素-4, 并且被发现是产生足够信号的唯一测试过的荧光团。串联染料是可以由藻胆蛋白和另一种染料形成的非天然存在分子。参见例如, 美国专利号4, 542, 104和美国专利号5, 272, 257。在本发明中有用的串联染料的实例是藻红花青甙或PC5(PE-Cy5、藻红蛋白-花青苷5.1; 激发, 486-580nm, 发射, 660-680nm)[A. S. Waggoner(瓦格纳)等人, (1993) Ann. N. Y. Acad. Sci. (纽约科学院年报), 677: 185-193和美国专利号5, 171, 846]和ECD(藻红蛋白-得克萨斯红; 激发, 486-575nm, 发射, 610-635nm)[美国专利号4, 542, 104和美国专利号5, 272, 257]。其他已知的串联染料是PE-Cy7、APC-Cy5和APC-Cy7[M. Roederer(罗德雷)等人, (1996) Cytometry(细胞计数), 24: 191-197]。已经通过涉及染料的亚氨基硫烷活化的若干种方法, 使串联染料PC5和ECD成功地与单克隆抗体直接缀合。可以与配体直接缀合并且在本发明中与藻胆蛋白或串联染料一起用来向所述方法增加额外数目的标记(标记的配体)的仍其他标记包括激发时发射小于500nm的波长的小分子。这类分子不与藻胆蛋白的发射重叠。这种标记的一个实例是异硫氰酸荧光素(FITC)。其他标记在上文援引的手册中列出。可以在这种方法中用来提供额外颜色的仍其他标记是称作绿色荧光蛋白和蓝色荧光蛋白的蛋白; 也有用的可以是受紫外光激发时发射的标记。胆蛋白和串联染料是从不同来源可商业获得的, 这些来源包括Coulter International Corporation公司, Miami公司, FL公司、Molecular Probes, Inc. 公司, Eugene(尤金), 俄勒冈州和Prozyme, Inc. 公司, San Leandro(圣莱安德罗), 加利福尼亚州。上文讨论的其他标记或标记物可以从已知来源商业地获得。

[0130] 利用这些标记的方法将是本领域普通技术人员轻易明白的, 并且可以涉及在接触 β -半乳糖连接的固相支持物之前, 在标记存在的情况下孵育样品。可替代地, 标记可以与固相支持物结合。仍在另一个替代方案中, 标记可以在洗涤步骤在包含纯化靶的洗脱物中孵育, 这从固相支持物移除特异性结合的纯化靶。对标记和检测系统的选择不限制本发明。由本发明提供的试剂盒对于进行在此所述的方法是有用的。

[0131] 以下实例仅是说明性的并且不意在限制本发明的范围。

[0132] IV. 实例

[0133] 实例1-细胞结合和转导测定法

[0134] A. 结合测定法

[0135] 对于结合测定法, 将细胞从150cm²烧瓶刮下并以 5×10^5 个细胞/孔在100 μ l冷无血清(SF)培养基中接种到96孔板上。如先前所描述, AAV载体由Penn载体(http://www.med.upenn.edu/gtp/-vector_core.shtml)产生并且以 5×10^9 个基因组副本(GC)/孔在100 μ l冷SF培养基中添加并且在4 $^{\circ}$ C孵育1hr。将细胞用SF培养基洗涤3次并重悬于200 μ l PBS中。使用QIAamp DNA Mini试剂盒(QIAGEN公司), 提取总DNA。通过实时PCR定量细胞GC。所用引物和探针与载体基因组的SV40多聚腺苷化序列互补。F引物: AGCAATAGCATCACAAATTTTACAA[SEQ ID NO:2]; R引物: CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT[SEQ ID NO:3]; TaqMan探针: 6FAM-AGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTGTC[SEQ ID NO:4]-TAMRA。对于细胞转导测定法, 将细胞以 10^5 个细胞/孔在黑色壁、透明底96孔板中接种过

夜。然后将平板置于4℃持续15min,并且将 10^9 GC的表达ffLuc的AAV载体在100 μ l冷SF培养基中添加,并且在4℃孵育1hr。然后将细胞用SF培养基洗涤3次。补充含血清温热培养基,并且将细胞在37℃孵育48hr。通过添加每孔150 μ g/ml D-萤光素底物,并使用光度计测量相对发光单位/秒(RLU/s),监测ffLuc表达。

[0136] B. 细胞转导测定法

[0137] 对于细胞转导测定法,将细胞从150cm²烧瓶刮下并且以 5×10^5 个细胞/孔在黑色壁、透明底96孔板中接种过夜。然后将平板置于4℃持续15min,并且将 10^9 GC的表达ffLuc的AAV载体在100 μ l冷SF培养基中添加,并且在4℃孵育1hr。然后将细胞用SF培养基洗涤3次。补充含血清温热培养基,并且将细胞在37℃孵育48hr。通过添加每孔150 μ g/ml D-萤光素底物,并使用光度计测量相对发光单位/秒(RLU/s),监测ffLuc表达。

[0138] C. 体内实验

[0139] 50 μ l PBS中具有或不具有100mU NA的AAV。在载体滴注之前1hr亦或同时给予NA。给予后21天,通过先前描述的方法检验肺中nLacZ基因表达[Bell(贝尔)等人, *Histochem Cell Biol*(组织化学和细胞生物学),124(6):2427-35(2005)]。以100x和200x放大率检验肺切片。通过计数每个200x放大率视野的阳性细胞,定量传导气道中的LacZ阳性细胞。小鼠用氯胺酮/赛拉嗪麻醉并给予鼻内滴注30 μ l PBS中的100mU NA或作为对照的单独PBS。通过先前描述的方法(Bell(贝尔),2005,上文援引),1hr后收获肺,并且将切片在冷(-20℃)丙酮中固定5min。然后将肺切片用无Carbo TM封闭液(Vector laboratories公司)封闭,并且在室温与15 μ g/ml罗丹明标记的蓖麻(*Ricinus Communis*)凝集素I(RCAI)和7.5 μ g/ml荧光素标记的西泽接骨木(*Sambucus Nigra*)凝集素(SNA)一起孵育30min。然后将载玻片在PBS中洗涤2次并且用DAPI(Vector laboratories)封装在Vectashield中。通过广域(200x)及共聚焦显微术(Zeiss LSM510共聚焦显微镜)拍摄图像。对于肌肉,心、肝和脑的RCA染色,从未处理的小鼠取出器官并且切片如上述染色。对于脑的CD31染色,将载玻片48与大鼠抗CD31第一抗体(BD Pharmingen公司)孵育,随后与荧光素标记的抗大鼠第二抗体(Vector laboratories公司)和罗丹明标记的RCA孵育。对于肺的 α -微管蛋白染色,如上述处理载玻片,不同之处在于,将切片在4%多聚甲醛中固定,并且用小鼠抗 α -微管蛋白第一抗体(Sigma)染色,随后荧光素标记的马抗小鼠第二抗体(Vector laboratories公司)和罗丹明标记的RCA染色。图像以400x放大率拍摄。使用双尾t检验确定统计显著性。小于0.001的P值视为显著。数据表述为平均数 \pm SD。

[0140] 实例2-糖苷酶处理和凝集素竞争。

[0141] 将Pro-5细胞在37℃,用100 μ l SF培养基中的、50mU/ml的、来自霍乱弧菌的NA型III(Sigma公司)处理2hr,或将对照细胞在37℃用培养基单独处理2hr。然后将一些细胞额外地在37℃,用50 μ l反应缓冲液(Sigma)中的60mU/ml β -(1,4)-半乳糖苷酶处理3hr,或将对照细胞在37℃用培养基单独处理3hr。然后在结合研究和转导研究之前,将细胞如上文所述洗涤三次。对于凝集素竞争研究,首先将Pro-5细胞用NA处理以除去唾液酸。将细胞用冷SF培养基洗涤,并且将凝集素以50 μ g/ml添加在100 μ l SF培养基中,或作为对照的单独培养基中,并在4℃孵育15min。然后移除凝集素溶液,并且添加AAV载体(对于结合测定法, 5×10^9 GC,和对于结合测定法, 10^9 GC)和50 μ g/ml凝集素或作为对照的单独载体的混合物,并且在4℃孵育1hr。然后洗涤细胞并且如上文所述分析AAV结合或转导。本研究中所用的凝集

素包括结合半乳糖基(β -1,4)N-乙酰葡糖胺的鸡冠刺桐凝集素(ECL)、结合末端半乳糖残基的蓖麻凝集素I(RCAI)、结合N-乙酰葡糖胺并且还通过唾液酸相互作用的麦胚凝集素(WGA)、结合(α -1,3)和(α -1,6)甘露糖的杂交朱顶红(*Hippeastrum Hybrid*)凝集素(HHL)、结合 α -半乳糖的加纳谷物(*Griffonia Simplicifolia*)凝集素I同工凝集素B4(GSLB4)和结合 α 连接的岩藻糖(Vector laboratories)的翅荚百脉根(*Lotus Tetragonolobus*)凝集素(LTL)。

[0142] 实例3-筛选AAV9的聚糖结合特异性

[0143] 对于聚糖微阵列(GMA)结合研究,如先前所述,使用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统/Sf9表达系统制备AAV9的病毒样颗粒(VLP)[Mitchell(米切尔)等人,2004,PLoS Bio (PLoS生物學)12(8):E234]并且在功能性糖组功能糖组学联盟的核芯D和H开发的高通量聚糖微阵列中进行筛选(CFG;NIH National Institute of General Medicine Science Initiative(NIH国家全科医学科学研究所倡议))。印刷阵列(哺乳动物印刷阵列[PA]V4.1, <http://www.functional-glycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh14.shtml>)由465种不同的天然和合成哺乳动物聚糖组成,所述聚糖包括具有不同键和修饰的唾液酸化糖,其中使用胺偶联法以使胺聚糖或聚糖缀合物与胺反应性N-羧琥珀酰亚胺活化的玻璃载片共价连接,生成所述唾液酸化糖。将包含每种聚糖或糖缀合物6个重复的印刷载玻片与AAV9 VLP以200 μ g/ml孵育,然后将ADK9(一种衣壳单克隆抗体(Jurgen Kleinschmidt(尤尔根克莱舒密特)提供,German Cancer Research Centre(德国癌症研究中心),海德堡,德国))覆盖在结合的衣壳上,随后覆盖FITC-标记的第二抗体(5 μ g/ml),用于检测。使用ScanArray5000共聚焦扫描仪(Perkin Elmer Inc.)检测荧光强度。使用IMAGENE图像分析软件(BioDiscovery公司,El Segundo(埃尔塞贡多),加利福尼亚州)分析图像。每种聚糖的相对结合作用表述为6个重复中4个重复的平均相对荧光单位(RFU),在不使用最高值和最低值的情况下计算。使用两种选择标准分析结合数据:(I)处于具有最高RFU值的聚糖的平均数的3个标准偏差内的和(II)具有用来计算平均RFU值的4个重复的RFU之间<20%的变异系数(%CV)的聚糖(其中%CV=变异系数,定义为数据的标准偏差相对于平均数的比率,表示为百分比)。在开放获取网址上的以下URL/访问位置处可获得关于生成聚糖阵列数据的信息:http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen_3528。这种数据集中包括原始数据、归一化数据、样品注释、实验设计、聚糖阵列注释和实验方案(登录号id primscreen_3528)。

[0144] 结果

[0145] 如在此所述,在用或不用外切 β -唾液酸酶(神经氨酸酶,NA)处理的情况下,筛选了若干先前描述的AAV(血清型1、2、5和6)和新型AAV血清型7、8、9和rh32.33与用来研究糖基化的遗传学和生物化学的CHO细胞系Pro-5的结合作用。用第一代AAV时的结果如预期那样,其中NA预处理(图1A)不影响AAV2的结合,并且对AAV1、AAV5和AAV6的结合削弱至少两个对数(图1B)。用新AAV的研究未能示出NA处理影响对AAV7、8和rh32.33的结合,而AAV9示出结合作用出乎意料地增加2.5个对数(图1B)。

[0146] 本发明的诸位发明人推测,末端SA在低聚糖上的存在抑制与AAV9结合亦或SA的移除暴露了增强结合作用的分子。认为最可能的候选物将是 β -1,3或 β -1,4半乳糖,它们是大多数富含SA的聚糖上的倒数第二单糖(图1A)。最初,使用亲本CHO细胞系Pro-5的体细胞突

变体,探索这些假设,这些体细胞突变体由于凝集素抗性而缺乏参与糖基化的不同酶[SK Patnaik(帕特奈克)和P. Stanley(斯坦利)(2006) *Methods Enzymol*(酶学方法)416:159-182]。Lec-2在CMP-SA高尔基转运体中缺乏并且应当具有失去末端SA的N-聚糖和O-聚糖的完全互补物(图1A)。Lec-8在UDP-Gal高尔基转运体中缺乏,所述UDP-Gal高尔基转运体应当产生同时失去SA和半乳糖类的N-和O-聚糖(图1A)。将基于表达萤火虫萤光素酶(ffLuc)的AAV2、6和9的载体与Pro-5、Lec-2和Lec-8细胞孵育,并且分析其结合作用和转导(图2A、B)。AAV2的结合作用和转导在全部3个细胞系中相同,并且在用AAV6时在Lec-2和Lec-8细胞中相对于Pro-5细胞下降,这基于先前研究而预计到,所述先前研究展示SA在促进AAV6进入方面的重要性。对于AAV9,结合作用和转导在Lec-2中大幅度增加,但是在Lec-8细胞中下降至基线水平,这与以下假设更一致:与末端 β -半乳糖结合促进摄取,而非SA抑制摄取。结合与转导的同时出现提示,与末端半乳糖结合是AAV9转导中的限速步骤。消除唾液酸对结合的影响大于对转导的影响,提示进入后步骤也可能限制转导。

[0147] 在Pro-5细胞中进一步研究末端半乳糖在AAV9结合中的作用,Pro-5细胞用NA预处理并且然后与具有不同特异性的凝集素共培养(图2C,结合作用;图2D,转导)。阻断结合AAV9的仅有凝集素是识别 β -半乳糖的鸡冠刺桐凝集素(ECL)和识别若干类型 β -半乳糖键同时对 β -1,4半乳糖示出最高亲和力的蓖麻凝集素I(RCA I);二者均不影响对AAV2的结合。识别 α -半乳糖[加纳谷物凝集素I同工凝集素B₄(GSLB₄)]、 α -1,3和 α -1,6甘露糖[杂交朱顶红凝集素(HHL)]和 α -岩藻糖[翅荚百脉根凝集素(LTL)]的凝集素不干扰对AAV2或AAV9的结合。麦胚凝集素(WGA)轻微影响AAV9结合作用,这可能归因于其与通常结合于半乳糖的N-乙酰葡萄糖胺相互作用。凝集素抑制AAV2和AAV9转导验证了结合结果,例外是RCA,因为它毒害细胞,故不提供信息。

[0148] 在Pro-5细胞中最终证实AAV9摄取的聚糖特异性,其中Pro-5细胞用切去末端SA或NA的NA和将同时移除NA和 β -半乳糖类的 β -半乳糖苷酶(β -gal)预处理(图1A)。用AAV2的结合和转导不受酶预处理影响,同时如前述,NA增强AAV9的转导,一种由后续 β -gal处理逆转的效果(图2E、F)。

[0149] 使用由465种不同的天然及合成哺乳动物聚糖组成的聚糖微阵列,进一步探查AAV9的聚糖-衣壳相互作用,所述聚糖微阵列包含每种聚糖6个重复。一项相似的策略用来验证AAV1与唾液酸化聚糖的结合,如通过生物化学和分子方法所确定(Wu(吴)等人,2006, *J Virol*(病毒学杂志),80:9093-9103)。在我们的分析中,评价每种聚糖的结合作用,如根据阵列内部4个重复的平均数 \pm 1SD(消除6个重复的最高和最低结合作用),通过相对荧光的单位(RFU)测量。将4个重复内部的变异性评估为%CV,如果它小于20,则认为低。选择具有AAV9衣壳特异性结合亲和力的聚糖以两项独立标准为基础:如RFU所测量的高整体总结合作用和由%CV评估的4个重复之间的低变异性。将最高结合性聚糖主观地定义为平均RFU值落在最高结合性聚糖415的3个S.D.内部的那些。满足高结合亲和力标准的4种4聚糖当中,3种显示高特异性,如通过%CV小于20所测量。这三种聚糖415、297和399展示出被视为AAV9结合作用潜在受体的足够亲和力和特异性。基于总结合作用和结合作用特异性,因与AAV9特异性结合而选择的三种聚糖均示出具有含 β -1,4键(415和399)或 β -1,3键(297)的末端半乳糖(Gal)。每种聚糖在它们的结构中相对于GalNAc包含Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc连接的 β 1-3或 β 1-6,提示缺乏唾液酸的聚糖用于与AAV9结合的结构性背景。使结合数据与基于细胞的

结合/转导实验一致,证实末端 β -半乳糖键在AAV9嗜性中的作用。

[0150] 如在此所述,在小鼠中进行研究,以确定是否可以通过用包含NA的制剂预处理小鼠气道增强AAV9转导传导气道。与给予AAV6的小鼠相比,AAV6在先前研究中示出使传导气道有效体内转导[MP Limberis(里博瑞斯)等人,(2009)Mol Ther(分子治疗)17:294-301],其中基于用细胞系的体外研究,这可能依赖于与SA结合[Z.Wu(吴)等人,(2006)J Virol(病毒学杂志)80:9093-9103]。在NA不存在的情况下肺递送AAV9展示出预期的肺泡受限转导样式;在给予AAV9之前1小时或与之同时给予NA至肺中,产生了非常不同的样式,其中在肺泡细胞和传导气道上皮细胞中均存在高水平转导。当动物用NA处理时,完全消除用AAV6获得的传导气道高水平转导,证实体内转导对结合SA的依赖性。通过用荧光标记的结合末端半乳糖残基(RCA)或末端SA残基(SNA)的凝集素染色肺切片,直接研究气道递送NA对聚糖结构的丰度和分布的影响。在NA处理之前,RCA染色限于肺泡细胞和传导气道的基底外侧区域。用SNA观察到相似的样式,虽然传导气道的顶端表面也染色。用NA处理具有对传导气道上皮细胞染色的最突出结果,这相对于RCA大幅度增加并且相对于SNA适度减少。

[0151] 进行更高分辨率显微研究以确定RCA结合作用是否定位至质膜或覆盖性粘液层。对来自NA预处理的动物的肺切片评价RCA染色与 α -微管蛋白免疫定位的共定位,这勾勒出来自气道上皮细胞顶端表面的纤毛。这些研究展示,RCA与NA预处理的肺的传导气道中上皮细胞的细胞表面结合。

[0152] 血管内(IV)给予AAV载体后转导的主要障碍是微循环的连续内皮和基底层的物理屏障。一个例外是包含穿孔内皮的肝脏,穿孔内皮允许血液中的载体直接抵达肝细胞。AAV9的独特性在于它部分地克服这种屏障,允许靶向骨骼肌和心肌,和更低程度地靶向中枢神经系统的细胞(Inagaki(稻垣),K.,S.等人,(2006),Mol Ther(分子治疗)14(1):45-53.; Duque(杜奇)等人,(2009)Mol Ther(分子治疗)17:1187-1196;K.D.Foust(福斯特)等人,(2009),Nat Biotechnol(自然生物技术)27:59-65)。在AAV9载体以 10^{11} 和 10^{12} 个基因组副本(GC)/小鼠的剂量IV给予后,分析lacZ转导。通过用RCA染色,这与末端 β -半乳糖的存在相关。如已经描述,以十分低剂量的载体有效地转导肝脏[Vandendriessche(范登德里舍)等人,2007,J Thromb Haemost(血栓形成与止血法杂志)5(1):16-24)];可能按更高载体剂量有效转导心肌和骨骼肌[Inagaki(稻垣),2006,上文援引]。来自骨骼组织和心脏组织的肌纤维表面展示高水平的末端 β -半乳糖,如通过RCA结合所佐证。肝细胞展示更低水平的RCA结合,虽然肝血管的内皮表面染色鲜明。

[0153] 脑组织的凝集素结合研究因RCA与内皮细胞大量结合而SNA不与内皮细胞大量结合而值得注意。这是令人好奇的,因为AAV9具有静脉内注射后靶向CNS细胞的独特性能,虽然在直接注射入脑时,用AAV9和AAV5均实现有效转导[B.L.Davidson(戴维森)等人,(2000)Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院院刊)97:3428-3432;S.]。全身性给予后向CNS递送治疗剂的主要障碍是从唯一紧密的内皮细胞网络形成的血脑屏障。已经利用受体和吸收介导的跨内皮转胞吞途径来克服这种屏障。脑部微循环中存在的高水平AAV9受体可以在其通过转胞吞途径靶向CNS的能力中发挥作用。

[0154] 聚糖在介导AAV9转导中的潜在作用是本研究的焦点,因为它们经常充当病毒感染的受体,相对于组分单糖通常具有极端特异性。已经对许多病毒(包括若干其他AAV血清型)描述了与包含末端唾液酸的聚糖的特异性相互作用。我们发现:AAV9的结合和转导经由末

端 β -半乳糖键发生,还没有对任何其他病毒(包括已知的AAV)描述过,虽然诺如病毒与具有 α -半乳糖键的聚糖结合(Zakhour(扎克霍尔),M.,(2009)。(组织血型抗原家族的 α Gal表位是牛诺如病毒Newbury2的预期阻止跨物种传播的配体),PLoS Pathog(PLoS病原学)5(7): e1000504.)。

[0155] 聚糖阵列研究展示AAV9至3种聚糖的特异性结合,所述3种聚糖均包含末端 β -半乳糖键,证实这种糖在转导中的重要性,如使用三种独立方法(即,糖苷酶预处理、凝集素竞争和体细胞突变体在多个细胞系中描述)。这些聚糖均在它们的结构中相对于GalNAc包含Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc连接的 β 1-3或 β 1-6,并且经由苏氨酸通过GalNAc连接,表明包含O联半乳糖的聚糖能够与AAV9结合,虽然不能排除与其他类型键连接的聚糖的功能性相互作用(Marth(马尔斯),J.D.1999.O-Glycans(O-聚糖).Essentials of Glycobiology(糖生物学要点).A.Varki(瓦尔基),R.Cummings(卡姆斯),J.Esko(埃斯克)等人.Cold Spring Harbor(冷泉港),NY,Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社):第101-113页)。关于结合数据的重要提醒是,就介导转导的糖基化受体而言,结合亲和力并不必然地与功能意义相关。重要基因治疗载体的受体已经在体外充分表征,但是几乎没有验证过这些受体对体内转导的意义。体外和体内转导之间不一致性的一个实例是人腺病毒5(Ad5)。基于体外研究和尝试,以利用消除CAR结合作用的Ad5进行体内基因转移后证实CAR重要性,将柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)作为Ad5的受体分离。在静脉内给予后,消除CAR结合作用的Ad5的转导水平和肝选择谱与Ad5相似,提示体内潜在冗余性摄取途径。对体内Ad5转导机制的研究确定,凝血因子的存在可能通过CAR非依赖性途径介导转导。相比之下,与NA组合进行肺基因转移后,我们采用AAV9载体的研究直接证实 β -半乳糖键在借助AAV9转导传导气道上皮细胞中的重要性。

[0156] 评价 β -半乳糖键在体内基因转移后转导除肺之外组织的细胞中的作用是更复杂的,原因在于递送屏障,该递送屏障在将载体递送入气道内,允许直接抵达上皮细胞时不存在。IV给予AAV9后的转导(其是在许多基因治疗临床应用中正在考虑的给予途径)显示这一点。IV输注基于大多数AAV血清型的载体导致主要限于肝细胞的转导,因为肝血窦小孔消除血管屏障。在我们的研究中,AAV9有效转导肝细胞,尽管 β -半乳糖水平有限。更高剂量的AAV9可以克服血管屏障并有效地转导的确包含高水平细胞表面 β -半乳糖聚糖的心肌纤维和骨骼肌纤维。如若干组所示,AAV9独特穿越甚至更强化的血脑屏障以允许有限的神经元转导。推测带有 β -半乳糖键的聚糖在一些血管结构的内皮细胞表面上的存在,如我们在脑中示出,可能参与可能通过转胞吞过程促进这种外出。经展示的AAV9与结构多样的O联聚糖的结合提示,例如在血液中或在粘膜表面中与无细胞介导的糖蛋白的相互作用可以调节载体的生物分布和转导谱。

[0157] 鉴定AAV9的主要受体也在开发用于增强其转导肺部传导气道的的药理学方法中是有用的。预期将对AAV9的其他靶实现这种效果,特别是当NA配制的载体可以直接给予至组织(例如视网膜)中或施用至封闭空间(例如关节)时。

[0158] 实例5-鉴定AAV9衣壳的半乳糖结合结构域

[0159] 在这项研究中,我们旨在鉴定AAV9衣壳中结合半乳糖所必需的特定氨基酸。通过位点定向诱变和细胞结合测定法,加上配体对接计算研究,我们发现结合半乳糖所需要的5个氨基酸,所述氨基酸在二十面体3重对称轴周围在凸出物基部形成口袋。这些氨基酸的重

要性也通过小鼠肺中的体内研究进行验证。鉴定AAV9与半乳糖结合所必需的相互作用可以导致推进载体工程化。

[0160] 在这项研究中,我们力图鉴定AAV9衣壳上的半乳糖结合基序。我们产生一系列丙氨酸突变体以确定特定氨基酸对于体外和体内半乳糖结合的必要性。这导致发现在围绕AAV9衣壳的3重对称轴的凸出物的基部处的半乳糖结合袋,这个发现也由分子对接研究验证。

[0161] A. 材料与amp;方法

[0162] 1. 细胞系。

[0163] 全部细胞系均从American Type Culture Collection(美国典型培养物保藏中心)(ATCC)获得。在结合实验和转导实验中使用三种不同的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系,包括亲本细胞系Pro-5、唾液酸缺陷细胞系Lec-2和半乳糖缺陷细胞系Lec-8。将这些细胞培养在补充有核糖核苷和脱氧核糖核苷(Invitrogen公司)连同10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素的 α -最少基本培养基(α -MEM)中。

[0164] 2. 动物。

[0165] 雄性C57BL/6小鼠(6-8周龄)从Charles River实验室购买并且在宾夕法尼亚大学转化研究实验室的动物设施中饲养。全部动物程序由宾夕法尼亚大学的研究机构动物护理和使用委员会批准。

[0166] 3. AAV9诱变和小规模载体制备。

[0167] 选择AAV9衣壳序列的特定带电荷或极性氨基酸以便突变成非极性丙氨酸,如图3A-3B中指示。使用来自Agilent Technologiess公司的QuikChange Lightning位点定向诱变试剂盒进行诱变。为后续小规模生产用于中体外结合测定法和转导测定法的突变载体,使用表达AAV2rep基因和突变AAV9 cap基因的质粒,以及表达ffLuc转基因的质粒和腺病毒辅助子质粒(pAd Δ F6)在6孔板(9.6cm²)进行HEK293细胞的三重转染,其中所述ffLuc转基因从侧翼分布有AAV2反向末端重复序列的细胞巨化病毒(CMV)启动子表达。在72小时后,将细胞和上清液以总计2ml培养基收获并且经历三次冻/融循环并且然后在3500xg离心30min以除去细胞碎片。通过定量PCR测定载体的滴度(GC/ml)。

[0168] 4. 用于体内研究的载体生产和纯化。

[0169] 产生体内使用的AAV载体并由Penn Vector纯化,如以下网址所述:http://www.med.upenn.edu/gtp/vector_core/production.shtml。通过用编码AAV2 rep基因和AAV9或突变cap基因的质粒,和腺病毒辅助子质粒(pAd Δ F6)三重转染HEK293细胞,包装来自鸡 β -肌动蛋白启动子并且侧翼分布有AAV2反向末端重复序列的nLacZ的质粒。通过碘克沙醇梯度离心纯化载体并且通过定量PCR测定滴度。

[0170] 5. 细胞结合测定法和转导测定法。

[0171] 对于结合测定法,将Pro-5、Lec-2和Lec-8细胞从150cm²烧瓶刮下并以 5×10^5 个细胞/孔在100 μ l冷无血清 α -MEM中接种于96孔板内。将载体以 5×10^9 GC/孔添加在100 μ l冷 α -MEM中并且在4 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后,将细胞用200 μ l α -MEM洗涤3次并重悬于200 μ l PBS中。使用QIAamp DNA Mini试剂盒(QIAGEN公司)提取总DNA,并且通过定量PCR测定细胞结合的载体GC。对于转导测定法,在黑色壁、透明底96孔板中接种 10^5 个细胞/孔过夜。在移去培养基后,将表达ffLuc(10^9 GC)的AAV载体添加至100 μ l完全培养基中的细胞并且在37 $^{\circ}$ C孵育48小

时。随后通过添加100 μ L α -MEM中的每孔150 μ g/ml D-荧光素底物并使用光度计测量相对发光单位/秒(RLU/s)确定ffLuc表达。图4A和图4B中示出突变载体的体外转导效率。

[0172] 6. 小鼠肺的转导。

[0173] 如实例3中所述,小鼠用氯胺酮/赛拉嗪麻醉并给予鼻内滴注30 μ l PBS中的100mU NA。1小时后,将10¹¹个表达nLacZ的AAV9或突变载体的GC在50 μ l PBS中鼻内递送。给予21天后,通过先前描述的方法检验肺中的 β -gal表达(Bell(贝尔),2005,上文援引)。以100x放大率检查肺切片。

[0174] 7. 通过分子对接研究预测AAV9衣壳上的半乳糖结合位点。

[0175] 使用分子对接网路服务器PatchDock(<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/index.html>)(Schneidman(施耐德曼)-Duhovny(杜楚尼)等人,Nucleic Acids Res(核酸研究)33(Web Server issue):W363-72005),进行分子对接以预测AAV9衣壳上的半乳糖结合位点。利用人半乳糖凝集素-3结合的半乳糖的X射线晶体结构(PDB登录号1A3K)以提供半乳糖的坐标(Seetharaman(西萨拉曼)等人,J Biol Chem(生物化学杂志),273(21):13047-52(1998)。将AAV9X射线晶体结构的坐标(未公开数据)用来使用VIPERdb Oligomer发生器(http://viperd.b.scripps.edu/oligomer_multi.php)(Carrillo-Tripp, Nucleic Acids Res,37(数据库专刊):D436-42(2009)建立三聚体。将AAV9三聚体的输出PDB文件截短以包括具有表面可及性并维持病毒衣壳表面环的结构完整性的氨基酸。在截短AAV9三聚体PDB文件中作为分子对接的输入文件所包括的氨基酸是N262-Y277、L435-G475和F501-M559。分子对接以非定向方式进行,以评价在AAV9衣壳上可能与半乳糖相互作用的位点。还使用截短的AAV9三聚体和唾液酸进行对接。利用与其唾液酸受体复合物中的马鼻A病毒的X射线晶体结构(PDB登录号2XB0),以提供唾液酸的坐标(Fry(弗莱)等人,J Gen Virol(普通病毒学杂志),91(Pt8):1971-7(2010)。

[0176] B. 结果

[0177] 1. N470是AAV9半乳糖结合作用必需的。

[0178] 为鉴定AAV9衣壳的可以参与半乳糖结合的潜在氨基酸,将AAV9的衣壳氨基酸序列与不结合半乳糖的其他血清型(例如AAV1、2、6、7和8)的衣壳氨基酸序列比对,以确定AAV9独有的氨基酸。基于这种比对结果,选择具有极性侧链的14个氨基酸以便突变成非极性丙氨酸,以检验对AAV9结合的影响(图3A)。这些突变衣壳构建体用来通过小规模制备方法制造载体,并且它们产生与野生型AAV9相比相似的滴度。

[0179] 然后将突变载体添加至三种不同的CHO细胞系以评估它们的结合能力。这些实验中使用亲本CHO细胞系Pro-5连同这个细胞系的体细胞糖基化突变体Lec-2和Lec-8。Lec-2细胞在胞苷单磷酸-唾液酸高尔基转运体方面缺陷,并且因此在它们的表面聚糖上缺少唾液酸残基,这造成最常见的倒数第二糖-半乳糖暴露。Lec-8细胞在尿苷二磷酸-半乳糖高尔基转运体方面缺陷,并且因此在它们的表面聚糖结构上缺少半乳糖类。当检验载体与这些CHO细胞系结合时,观察到对AAV9预期的结果。在Pro-5细胞上观察到低水平结合作用,但是示出结合作用在具有自由用于AAV9结合的末端半乳糖残基的Lec-2细胞上增加100倍。与Lec-8细胞的结合降低返回至基线水平,由于它们缺少细胞表面半乳糖。十四个突变载体中有十三个展示出这种在Lec-2细胞上结合作用增加的趋势,提示它们保留结合半乳糖的能力。然而,位置470处的天冬酰胺残基至丙氨酸的突变(N470A)将Lec-2细胞结合作用降低至

Pro-5和Lec-8细胞上所观察到的水平。这表明,AAV9与半乳糖结合需要N470。

[0180] 2. AAV9半乳糖结合作用需要紧邻N470定位的额外氨基酸

[0181] 产生额外的AAV9突变体以确定结构上围绕N470的任何氨基酸是否也有助于半乳糖结合。第二组突变体靶向遍及衣壳的多个已确定可变区(VR)(包括VRI、IV、V和VII)各处的氨基酸,这些可变区在病毒粒的装配的二十面体结构中彼此密切接触。选择N470附近的十九个氨基酸用于突变成丙氨酸(图3B),并且载体由小规模方法产生。如前文,全部突变体均产生与AAV9对照相似的高滴度载体,提示这些突变均没有负面影响衣壳装配。随后对这些突变载体测试其结合Pro-5、Lec-2和Lec-8细胞的能力(图3B)。再次,与Pro-5和Lec-8细胞相比,AAV9示出与Lec-2细胞结合增加100倍的预期结果。尽管大部分测试的突变体也显示这种表型,但是四种突变体展示不能与Lec-2细胞结合。对D271、N272、Y446或W503的突变均取消AAV9结合半乳糖的能力。

[0182] 连同这十九个丙氨酸突变体,进行其他4个AAV9位点定向突变。非极性氨基酸A472和V473正好相邻N470定位并且可以潜在地在半乳糖结合中发挥作用。为测试这种设想,将A472和V473均突变成极性氨基酸-丝氨酸或带电荷氨基酸-天冬氨酸。通过小规模方法构建这些载体是成功的,并且实现与野生型AAV9相似的滴度。当检验这些载体与CHO细胞的结合时,观察到全部这四种突变体(A472S、A472D、V473S和V473D)均丧失结合Lec-2细胞的能力。这提示这些非极性残基是形成半乳糖结合区必需的,因为向这个区域添加极性或电荷破坏与半乳糖的相互作用。

[0183] 3. AAV9突变体的半乳糖结合指示体外转导效率

[0184] 为体外评估AAV9突变体的转导作用,将表达萤火虫萤光素酶(ffLuc)的载体添加至Pro-5和Lec-2细胞。将丧失半乳糖结合作用的五种突变体(N470A、D271A、N272A、Y446A和W503A),连同保留半乳糖结合作用的两种突变体(S469A和E500A)和AAV9对照载体添加至细胞(MOI=104),并且48小时后,评价ffLuc表达。如预期,与AAV9、S469A和E500A相比,缺少半乳糖结合能力的突变体在转导Lec-2细胞方面展示3倍或更大的下降。W503A和N272A示出最低转导水平,仅高于背景。在Pro-5细胞上,总体转导作用是2倍至5倍更低,因为这些细胞缺少用于结合的丰富末端半乳糖残基。然而,如对Lec-2细胞所确定,仍然观察到转导作用的相似趋势。在半乳糖结合方面缺陷的突变体示出最低转导,并且保留半乳糖结合作用的两种突变体(S469A和E500A),连同AAV9对照载体,展示更高水平的转导。然而,E500A在Pro-5细胞上示出比AAV9高约2倍的表达,提示这种载体可能具备有利的胞内相互作用。

[0185] 4. 在半乳糖结合方面缺陷的突变载体不转导传导气道上皮

[0186] 在鼻内给予AAV9载体之前鼻内递送神经氨酸酶(NA)至小鼠允许AAV9有效转导肺的传导气道上皮。这因以下而发生:NA从气道细胞的表面聚糖切去末端唾液酸残基,这暴露位于下面的半乳糖残基并且允许AAV9结合和转导。研究了半乳糖结合作用缺陷的突变载体是否可以在体内转导传导气道上皮。将表达靶向核的LacZ(nLacZ)的载体(10^{11} 个GC)在滴注100mU NA后1小时鼻内递送至小鼠,并且二十一天后移除肺并对 β -gal表达染色。AAV9对照载体展示出有效的传导气道转导,如基于我们先前的结果所预期。丧失半乳糖结合能力的五种突变体(N470A、D271A、N272A、Y446A和W503A)不能转导传导气道上皮,这进一步证明它们不能在体内结合半乳糖。保留半乳糖结合作用的S469A和E500A突变体显示与AAV9相似的有效传导气道转导。

[0187] 5.结合作用必需的氨基酸AAV9衣壳上形成支持与半乳糖相互作用的口袋

[0188] 使用AAV9结构的知识,确定衣壳表面上对半乳糖结合重要的氨基酸的位置。利用分子对接方法来鉴定AAV9VP三聚体上的半乳糖结合位点。评价前100个对接结果并且抛弃将半乳糖安置在衣壳内表面上的对接方案。剩余的13个方案均将使半乳糖与N470密切接触对接,13个方案中有12个使半乳糖在N470和W503之间对接。N470、D271、N272、Y446和W503在围绕3重对称轴的凸出物的基部处形成口袋。这个口袋由面朝2重轴及5重轴的凸出物的外表面和在2重轴及5重轴之间由VR I形成的小表面凸出物形成。AAV9包含其中进一步说明半乳糖残基怎样装进这个区域内的结合袋。发现对于半乳糖结合作用重要的非极性A472和V473氨基酸位于结合袋基部,并且因此可能允许半乳糖的成功插入。半乳糖结合位点的一个有趣特征是,已经示出对结合作用重要的氨基酸来自两个不同单体,其中Y446、N470、A472和V473构成结合袋的底部,并且构成结合袋顶部的氨基酸D271、N272和W503来自另一个起作用的单体。这可以提供一种机构以确保仅正确装配的衣壳可以与受体结合。有意义地,在鉴定半乳糖结合袋后,将唾液酸分子对接至相同衣壳区域的尝试示出这种聚糖因空间位阻不能容纳于这个口袋内。这种观察结果与AAV9缺少唾液酸结合作用一致。

[0189] C. 讨论

[0190] 研究AAV9的细胞表面聚糖相互作用的先前实验展示,这种载体使用半乳糖作为细胞受体。分析AAV9对多个细胞系(包括Pro-5、HEK293和Huh-7细胞)的结合和转导,揭示了使用NA从细胞表面聚糖酶促移除末端唾液酸残基导致AAV9结合作用的显著增加。这种增加归因于下方半乳糖的暴露,这促进AAV9结合和转导。使用CHO糖基化突变体细胞系Lec-2和Lec-8连同凝集素竞争测定法的另外研究验证了半乳糖的这种作用。额外地,鼻内递送至小鼠的NA导致气道细胞表面上末端半乳糖残基的增加,并且因此导致AAV9转导的增加。

[0191] 这项研究的目的是鉴定半乳糖结合作用所需的AAV9衣壳氨基酸,我们确定这些氨基酸包括N470、D271、N272、Y446和W503。将AAV9的乳糖结合位点与其他半乳糖结合蛋白的乳糖结合位点比较,发现氨基酸组成方面的相似性。糖与芳族残基相互作用是糖结合蛋白的结合位点中常见的,并且已经对半乳糖特异性蛋白观察到(Elgavish(艾尔盖维什)等人,1997,Trends Biochem Sci(生物化学趋势)22(12):462-7.;Sujatha(素加塔)等人,2005,Biochemistry(生物化学)44(23):8554-62)。这些残基与糖形成疏水相互作用并且也参与区分半乳糖与其他糖,例如葡萄糖(Elgavish(艾尔盖维什),1997;Sujatha(素加塔),2005)。这与我们对AAV9定位的结合位点一致,这些结合位点包含两个芳族残基Y446和W503。额外地,许多半乳糖结合蛋白包含极性和带电荷氨基酸,包括天冬酰胺、天冬氨酸和谷氨酰胺,这些氨基酸已经示出通过与糖的羟基形成氢键而有助于半乳糖结合(Montfort(蒙特福特)等人,1987,J Biol Chem(生物化学杂志)262(11):5398-403;Elgavish(艾尔盖维什),1997)。可能的是AAV9衣壳的N470、D271和N272与半乳糖形成相似的相互作用。也已经确定其他AAV血清型的受体结合结构域的位置。AAV2的HS结合位点定位至五个氨基酸:R484、R487、R585、R588和K532(Kern(克恩),2003J Virol(病毒学杂志)77(20):11072-81.;Opie(奥佩),2003,J Virol(病毒学杂志)77(12):6995-7006)。这些氨基酸在每个3重对称性相关衣壳凸出物的内侧面上形成基础小片。也已经示出与HS结合的AAV6在类似位置中包含如AAV2观察到的相似基部氨基酸片段,这些氨基酸包括R485、R488、K528和K533(Ng等人,2010,J Virol(病毒学杂志)84(24):12945-57)。此外,通过诱变研究,K493、K459、R576

和K531均已经示出是AAV6 HS结合作用必需的并且位于相邻位置内。AAV9的半乳糖结合结构域,位于围绕3重轴的凸出物的基部处,与位于面朝3重轴的内表面上的AAV2 HS结合区相比处在这个结构的对侧面上。AAV6 HS结合残基也位于该凸出物外侧壁的上,但是与AAV9半乳糖结合残基相比位于更靠近VR III和二十面体2重轴的对侧壁上。这些观察结果进一步说明,装配成围绕3重轴的凸出物的氨基酸和结构以及毗邻于这个区域的残基在受体识别不同AAV血清型中的重要性。它还支持一项提议:AAV衣壳,特别是表面暴露的凸出物的常见结构变异性已经演化成使能够利用不同表面分子成功感染,这是它们相应转导表型的重要决定因素。

[0192] AAV9示出了可以通过受体相互作用而可以解释的独特特征。例如,在静脉内注射后,AAV9可以穿越血脑屏障并转导成年和新生小鼠和猫的脊髓中的运动神经元,连同新生小鼠脑中的神经元和成年小鼠脑中的星形细胞。而且,在非人灵长类中测试时,AAV9转导脊髓中的运动神经元并主要转导脑中的神经胶质细胞。通过荧光凝集素染色,我们先前已经在小鼠脑中血管的表面上观察到丰富的半乳糖表达。AAV9会可能使用半乳糖来促进跨血管系统的转胞吞作用,允许进入中枢神经系统。将半乳糖结合结构域工程化到其他AAV血清型的衣壳上,可以允许转移AAV9的有吸引力的表型及开发用于基因治疗的新颖载体。

[0193] 实例-NA预处理改善小鼠鼻气道中AAV介导的ffLuc表达

[0194] C57BL6小鼠(6-8周龄,20-25g体重,雄性)用氯胺酮/赛拉嗪的混合物麻醉。随后在每个鼻孔中向小鼠给予5 μ l的来自霍乱弧菌的神经氨酸酶(NA)(Sigma公司,N7885)(总计80-100mU NA)。在NA预处理10分钟内,将AAV9载体(总剂量 10^{11} GC)作为PBS中稀释的两份15 μ l等分试样(每鼻孔15 μ l)滴入,其中所述AAV9载体在鸡 β -肌动蛋白启动子转录性控制下表达萤火虫萤光素酶(ffLuc)。允许小鼠恢复,并且载体接种后早至24小时监测转基因表达(ffLuc)。

[0195] 在发光成像时,将小鼠麻醉并给予萤光素[两个鼻孔中每个鼻孔15 μ l 15mg/ml D-萤光素溶液(Caliper Life Sciences公司,Hopkinton(霍普金顿),马萨诸塞州)],并在施加萤光素5分钟内对表达进行成像。为了后续在第3、7、14、21和28天的成像过程,允许小鼠恢复。

[0196] 这些结果在图5的条形图说明。这些数据示出,在用神经氨酸酶预处理后,鼻气道中萤火虫萤光素酶基因表达改善约2倍。在两种独立情况下观察到这种差异。另外,添加神经氨酸酶导致基因表达快速开始,其中在AAV9载体滴注24小时内观察到最高基因表达,其在1周内减弱至稳态水平。

[0197] 在本说明书中援引的全部出版物、专利文献和GenBank序列通过引用方式结合在此。尽管已参照特别优选的实施例描述了本发明,但是将理解,可以做出修改而不偏离本发明的精神。

序列表

- <110> 宾夕法尼亚大学托管会 (The Trustees of the University of Pennsylvania)
 J·M·威尔森 (Wilson, James M.)
 C·L·贝尔 (Bell, Christie L.)
 L·H·范登伯格 (Vandenberghe, Luc H.)
- <120> 用于改变组织特异性和改善 AAV9-介导的基因转移的组合物和方法
- <130> LPN-X5836PCT
- <150> US 61/443,879
 <151> 2011-02-17
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> 未知
- [0001] <220>
 <223> hu.14/AAV9 的衣壳
- <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 Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
- Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
- Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
- Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
- Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 [0002] Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 370 | | | | | 375 | | | | | | | | | | 380 |
| | Gly | Ser | Gln | Ala | Val | Gly | Arg | Ser | Ser | Phe | Tyr | Cys | Leu | Glu | Tyr | Phe |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| | Pro | Ser | Gln | Met | Leu | Arg | Thr | Gly | Asn | Asn | Phe | Gln | Phe | Ser | Tyr | Glu |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| | Phe | Glu | Asn | Val | Pro | Phe | His | Ser | Ser | Tyr | Ala | His | Ser | Gln | Ser | Leu |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| | Asp | Arg | Leu | Met | Asn | Pro | Leu | Ile | Asp | Gln | Tyr | Leu | Tyr | Tyr | Leu | Ser |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | | 445 | | |
| | Lys | Thr | Ile | Asn | Gly | Ser | Gly | Gln | Asn | Gln | Gln | Thr | Leu | Lys | Phe | Ser |
| | 450 | | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| | Val | Ala | Gly | Pro | Ser | Asn | Met | Ala | Val | Gln | Gly | Arg | Asn | Tyr | Ile | Pro |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| | Gly | Pro | Ser | Tyr | Arg | Gln | Gln | Arg | Val | Ser | Thr | Thr | Val | Thr | Gln | Asn |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| | Asn | Asn | Ser | Glu | Phe | Ala | Trp | Pro | Gly | Ala | Ser | Ser | Trp | Ala | Leu | Asn |
| [0003] | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | |
| | Gly | Arg | Asn | Ser | Leu | Met | Asn | Pro | Gly | Pro | Ala | Met | Ala | Ser | His | Lys |
| | | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | |
| | Glu | Gly | Glu | Asp | Arg | Phe | Phe | Pro | Leu | Ser | Gly | Ser | Leu | Ile | Phe | Gly |
| | | | 530 | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| | Lys | Gln | Gly | Thr | Gly | Arg | Asp | Asn | Val | Asp | Ala | Asp | Lys | Val | Met | Ile |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| | Thr | Asn | Glu | Glu | Glu | Ile | Lys | Thr | Thr | Asn | Pro | Val | Ala | Thr | Glu | Ser |
| | | | | 565 | | | | | | 570 | | | | | 575 | |
| | Tyr | Gly | Gln | Val | Ala | Thr | Asn | His | Gln | Ser | Ala | Gln | Ala | Gln | Ala | Gln |
| | | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| | Thr | Gly | Trp | Val | Gln | Asn | Gln | Gly | Ile | Leu | Pro | Gly | Met | Val | Trp | Gln |
| | | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| | Asp | Arg | Asp | Val | Tyr | Leu | Gln | Gly | Pro | Ile | Trp | Ala | Lys | Ile | Pro | His |
| | | 610 | | | | | 615 | | | | | | 620 | | | |
| | Thr | Asp | Gly | Asn | Phe | His | Pro | Ser | Pro | Leu | Met | Gly | Gly | Phe | Gly | Met |
| | 625 | | | | | 630 | | | | | | 635 | | | | 640 |

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

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

[0004]

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人 (homo sapiens) 的 F 引物

<400> 2

agcaatagca tcacaaattt cacaa

25

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人 (homo sapiens) 的 R 引物

<400> 3

ccagacaatga taagatacat tgatgagtt

29

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于智人 (homo sapiens) 的 TaqMan 探针

[0005]

<400> 4

agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtc

36

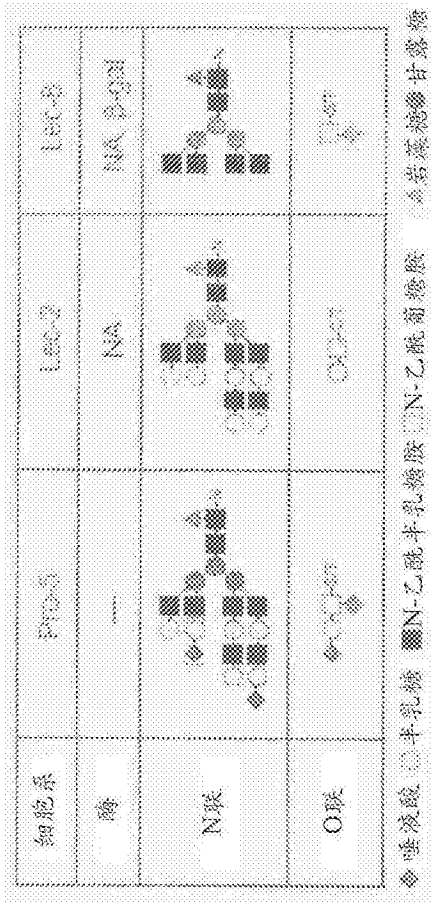


图1A

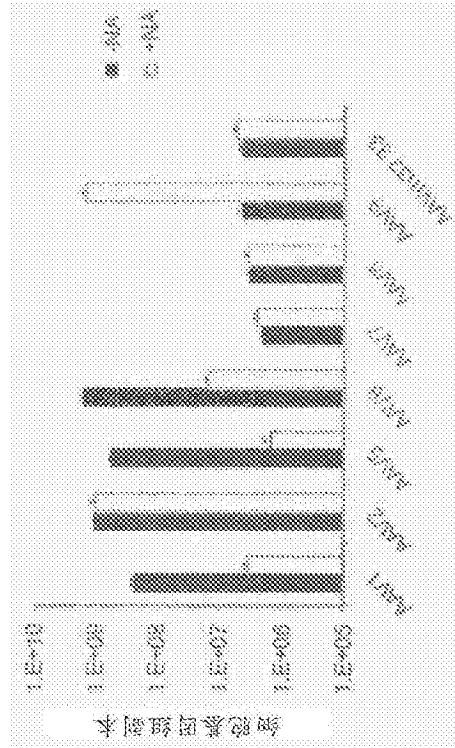


图1B

| 编号 | 聚糖结构 | 平均 RFU | 来自4个点的SDEV | %CV | 聚糖示意图 |
|-----|---|--------|------------|-----|-------|
| 416 | Fucose1-GlcNAc2-Galactose3-Asparagine4 | 283 | 72 | 12 | |
| 287 | GlcNAc1-GlcNAc2-Galactose3-GlcNAc4-Asparagine5 | 630 | 110 | 18 | |
| 402 | GlcNAc1-GlcNAc2-GlcNAc3-GlcNAc4-Asparagine5 | 619 | 180 | 30 | |
| 399 | GlcNAc1-GlcNAc2-GlcNAc3-GlcNAc4-Asparagine5-Sialic acid6 | 482 | 84 | 17 | |
| 417 | GlcNAc1-GlcNAc2-GlcNAc3-GlcNAc4-Asparagine5-Sialic acid6-Sialic acid7 | 287 | 72 | 6 | |

图1C

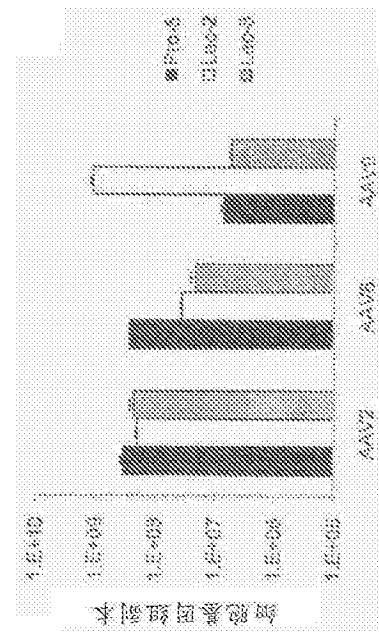


图2A

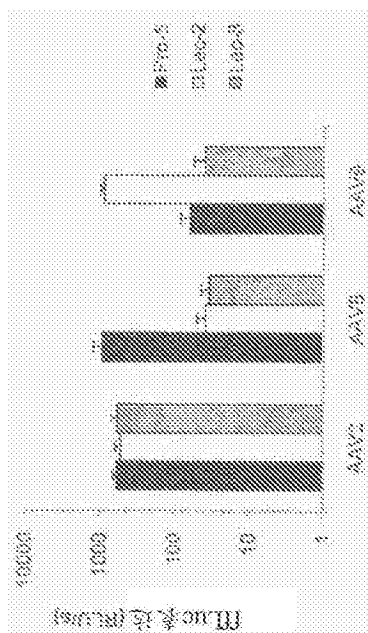


图2B

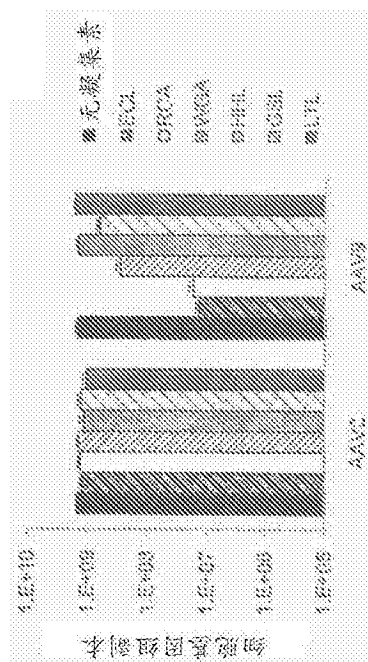


图2C

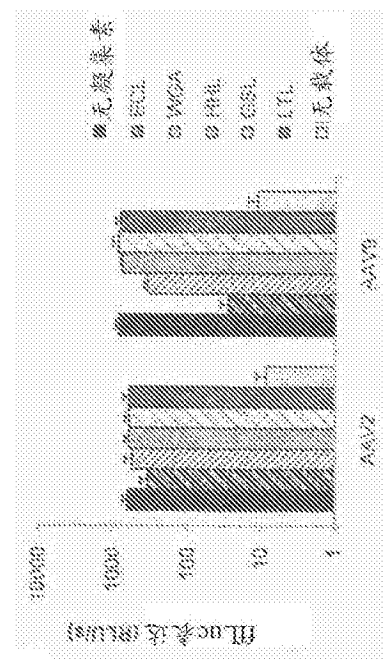


图2D

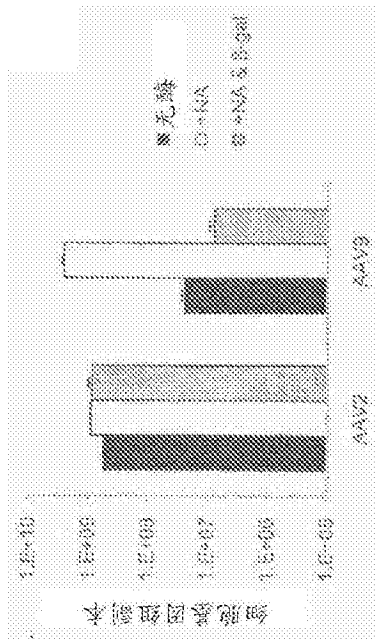


图2E

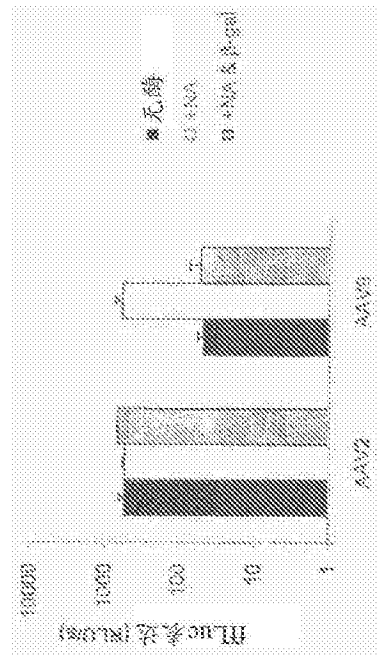


图2F

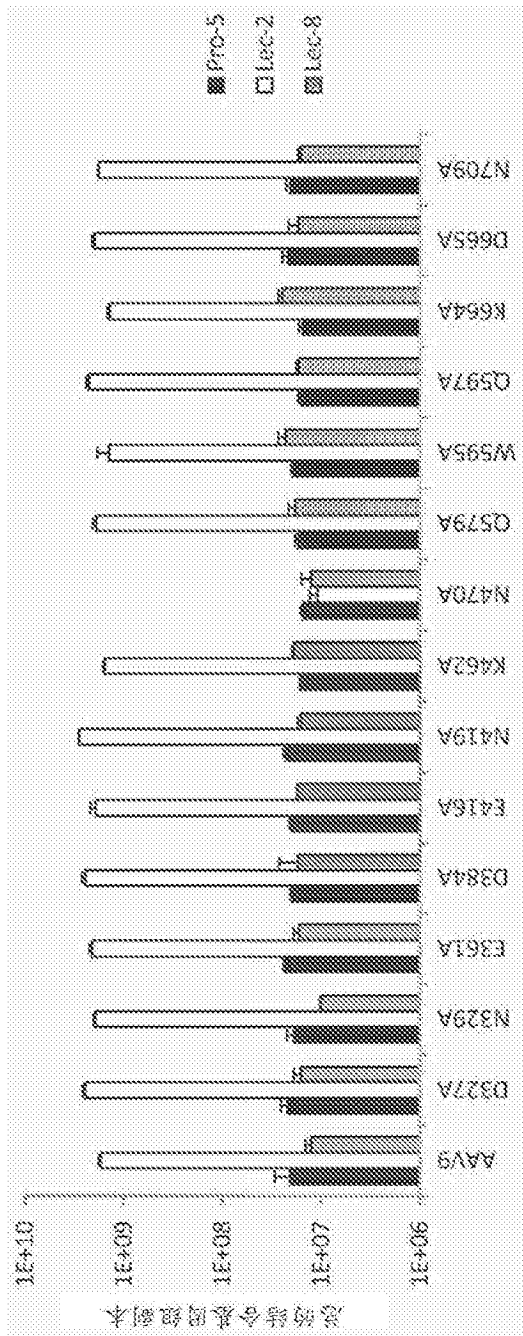


图3A

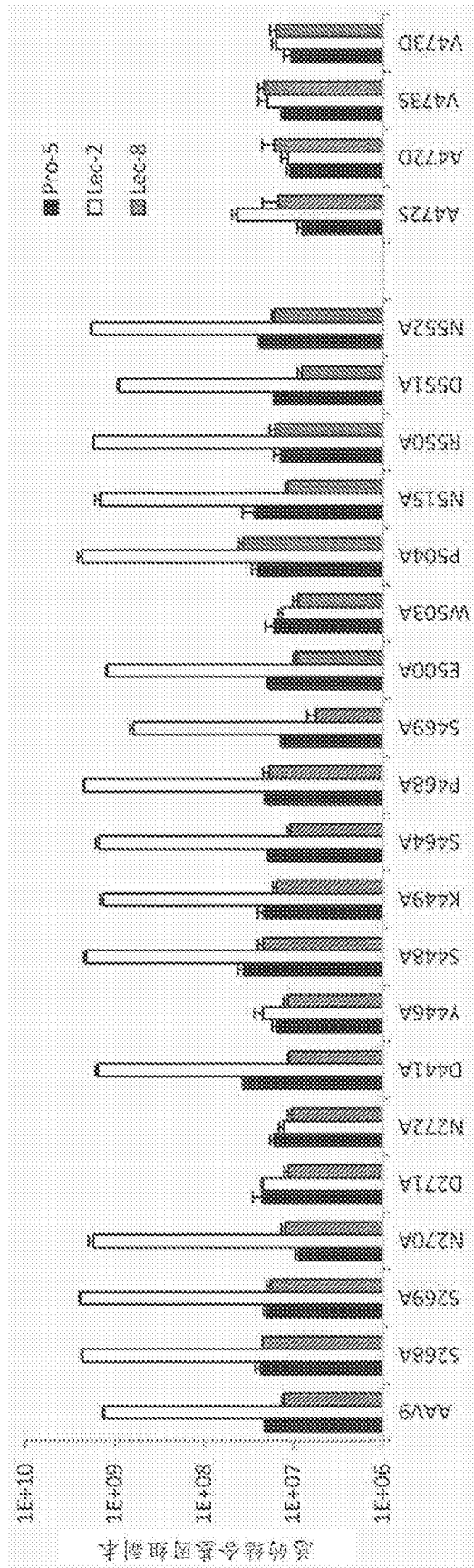


图3B

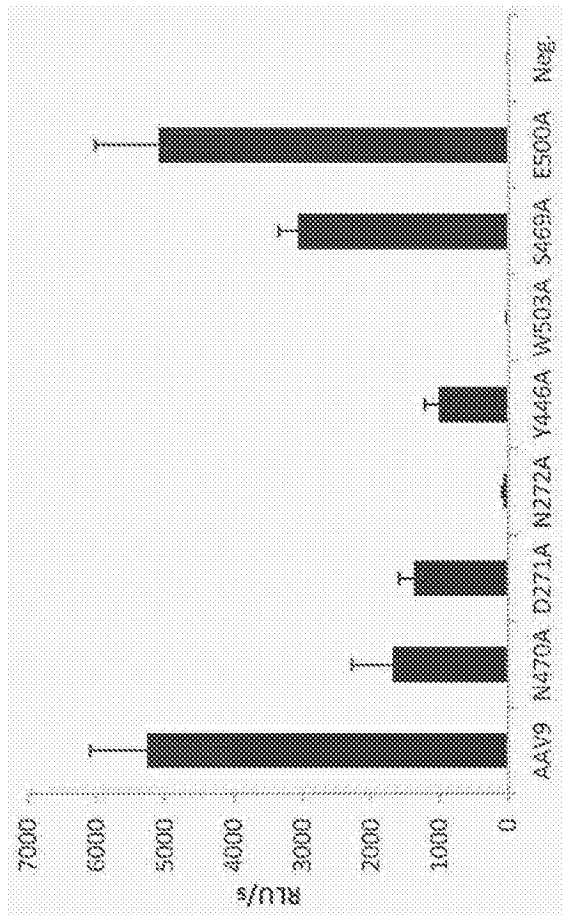


图4A

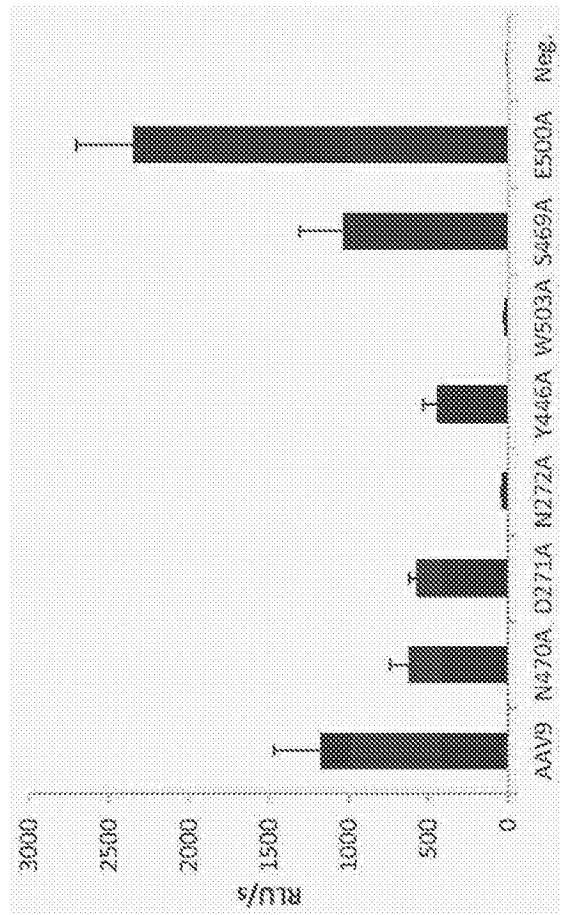


图4B

