(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105163764 B
(45)授权公告日 2019.11.12

(21)申请号 201480025514.0
(22)申请日 2014.03.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105163764 A
(43)申请公布日 2015.12.16
(30)优先权数据
61/802111 2013.03.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/028545 2014.03.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/144229 EN 2014.09.18

(73)专利权人 北卡罗来纳－查佩尔山大学
地址 美国北卡罗来纳州
(72)发明人 A.阿索肯 R.萨穆尔斯基
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李唐 黄希贵

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C07K 14/075(2006.01)

审查员 胡百灵

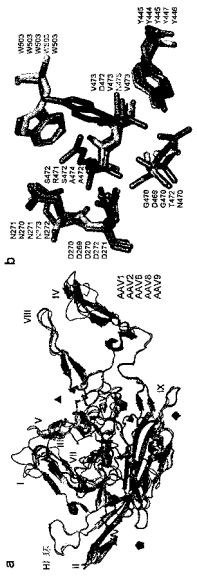
权利要求书1页 说明书35页 附图10页

(54)发明名称

双重聚糖结合AAV载体的方法和组合物

(57)摘要

本发明提供了包含腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白的方法和组合物，所述AAV衣壳蛋白包含一个或多个氨基酸取代，其中所述取代将新的聚糖结合位点引入AAV衣壳蛋白内。



CN 105163764 B

1.一种腺伴随病毒1(AAV1)衣壳蛋白,其包含引入了每个以下氨基酸取代的AAV1衣壳氨基酸序列:A267S、SRGSPAGMSVQPK464-476SVAGPSNMAVQGR和NFTW500-503EFAW(AAV1 VP1编号)。

2.一种腺伴随病毒6(AAV6)衣壳蛋白,其包含引入了每个以下氨基酸取代的AAV6衣壳氨基酸序列:A267S、SRGSPAGMSVQPK464-476SVAGPSNMAVQGR和NFTW500-503EFAW(AAV6 VP1编号)。

3.一种腺伴随病毒2(AAV2)衣壳蛋白,其包含引入了每个以下取代的AAV2衣壳氨基酸序列:A266S、Q464V、A467P、D469N、I470M、R471A、D472V、S474G、Y500F和S501A (AAV2 VP1编号)。

4.一种腺伴随病毒2(AAV2)衣壳蛋白,其包含引入了每个以下取代的AAV2衣壳氨基酸序列:A266S、Q464V、A467P、D469N、I470M、R471A、D472V、S474G、Y500F和S501A ,并且其中氨基酸585-590被QQNTAP取代(AAV2 VP1编号)。

5.一种腺伴随病毒8(AAV8)衣壳蛋白,其包含引入了每个以下取代的AAV8衣壳氨基酸序列:A269S、Q467V、G468A、N471S、T472N、N473M、N475V、A477G、K478R、N502E (AAV8 VP1编号)。

6.一种AAV衣壳,其包含权利要求1-5中任一项的AAV衣壳蛋白。

7.一种病毒载体,其包含:

(a)权利要求6的AAV衣壳;和

(b)包含至少一个末端重复序列的核酸,

其中所述核酸由AAV衣壳壳体化。

8.一种组合物,其包含在药学上可接受的载体中的权利要求1-5中任一项的AAV衣壳蛋白、权利要求6的AAV衣壳或权利要求7的病毒载体。

9.权利要求7的病毒载体在制备用于治疗主体的药物中的用途。

10.权利要求9的用途,其中所述主体是人主体。

双重聚糖结合AAV载体的方法和组合物

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请根据35 U.S.C. § 119(e)要求于2013年3月15日提交的美国临时申请序列号61/802,111的权益,所述美国临时申请的完整内容通过引用并入本文。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明根据由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号R01HL089221、P01HL112761和R01AI072176在政府支持下进行。美国政府在本发明中拥有一定权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及来自腺伴随病毒(AAV)的经修饰的衣壳蛋白、包含其的病毒衣壳和病毒载体及其使用方法。

[0006] 发明背景

[0007] 病毒-聚糖相互作用是宿主细胞侵入的关键决定因素。细胞表面碳水化合物例如唾液酸、神经节苷脂或硫酸类肝素由大量病毒采用,所述病毒例如流感、疱疹病毒、SV40、多瘤病毒、乳头状瘤病毒及其他病原体[1,2]。在大多数情况下,单个类别的聚糖主要充当病毒的细胞表面附着因子,导致其他受体/辅受体的序贯或平行衔接用于细胞进入。腺伴随病毒(AAV)是辅助依赖性细小病毒,其采用硫酸类肝素(HS)、半乳糖(Gal)或唾液酸(Sia)作为细胞表面结合的主要受体[3,4]。例如,AAV血清型2和3b利用HS;AAV1、4和5以不同连接特异性结合Sia,而AAV9采用Gal用于宿主细胞附着。不同的AAV毒株还需要与辅受体的后续相互作用用于细胞摄取,所述辅受体例如整联蛋白αVβ5或α5β1、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、血小板来源的生长因子受体(PDGFR)、表皮生长因子受体(EGFR)、肝细胞生长因子受体(HGFR)或层粘连蛋白受体[3,4]。

[0008] 特定AAV毒株和单个类别的碳水化合物之间的单配关系的显著例外是AAV血清型6,其识别Sia和HS[5]。然而,仅Sia已显示是病毒转导必需的。结构研究目前已确定在AAV6衣壳的VP3亚基中与R488、K528和K533结合的K531残基构成HS葡萄氨基葡聚糖的静电识别的连续基本片(patch)[6-8]。类似地,通过AAV2和AAV3b的HS识别的结构基础是众所周知的,并且归于位于三重对称轴处的碱性氨基酸残基的相似簇[9-12]。AAV1、AAV4、AAV5和AAV6的Sia结合足迹(binding footprint)仍有待确定。最近以来,涉及通过AAV9衣壳的Gal识别的关键氨基酸残基通过使用分子对接和定点诱变的组合进行鉴定[13]。需要的是具有多重聚糖结合能力的病毒载体,以采用替代途径用于细胞进入和转导。

[0009] 本发明通过提供具有多重聚糖结合位点的经修饰的衣壳蛋白、包含这些衣壳蛋白的AAV载体和其用作治疗载体的方法,克服了本领域中的前述缺点。

[0010] 发明概述

[0011] 在一个方面,本发明提供了包含一个或多个氨基酸取代的腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白,其中所述取代将新的聚糖结合位点引入AAV衣壳蛋白内。在一些实施方案中,氨基酸取代在AAV2中的氨基酸266、氨基酸463-475和氨基酸499-502中,或者AAV1、AAV3、AAV4、

AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV10中的相应氨基酸位置中。

[0012] 在一些实施方案中，新的聚糖结合位点可以是己糖结合位点，其中所述己糖是半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)或岩藻糖(fuc)。

[0013] 在一些实施方案中，新的聚糖结合位点可以是唾液酸(Sia)结合位点，其中所述Sia残基是N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)或N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)。

[0014] 在一些实施方案中，新的聚糖结合位点可以是二糖结合位点，其中所述二糖是以形式Sia(α2,3)Gal或Sia(α2,6)Gal与半乳糖连接的唾液酸。

[0015] 在一些实施方案中，取代将来自第一AAV血清型的新的聚糖结合位点引入第二AAV血清型的衣壳蛋白内，所述第二AAV血清型不同于所述第一AAV血清型。

[0016] 本发明还提供了包含本发明的AAV衣壳蛋白的AAV衣壳。

[0017] 本文进一步提供的是包含本发明的AAV衣壳的病毒载体，以及包含在药学上可接受的载体中的本发明的AAV衣壳蛋白、AAV衣壳和/或病毒载体的组合物。

[0018] 本发明另外提供了将核酸引入细胞内的方法，其包括使细胞与本发明的病毒载体接触。细胞可以在主体中，并且在一些实施方案中，主体可以是人主体。

[0019] 本发明的这些及其他方面在下文阐述的本发明的说明书中更详细地描述。

[0020] 附图简述

[0021] 图1. AAV1、AAV2、AAV6、AAV8和AAV9 VP3单体的结构比对。(a)AAV1(紫蓝色)、AAV2(深蓝色)、AAV6(浅品红色)、AAV8(绿色)和AAV9(褐色)的VP3单体的重叠，其中标记了环I-IX，并且指出了对称轴。(b)在AAV9上的半乳糖结合位点以及在AAV1、AAV2、AAV6和AAV8上的等价残基的覆盖的特写视图。氨基酸残基通过(a)中的色码进行标记。坐标得自VP单体(PDB登录#: AAV1-3NG9、AAV2-1LP3、AAV6-3OAH、AAV8-2QA0、AAV9-3UX1)的X射线晶体学结构。结果比对使用PyMOL执行且显现。

[0022] 图2. G-突变体利用Gal作为新型受体以在体外转导细胞。(a)AAV1、1G9和AAV9对中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系的转导效率。在4℃下以1000 vg/细胞的MOI的AAV-CBA-萤光素酶感染60分钟之前，使Pro5和Lec2细胞预冷至4℃共30分钟。在通过用冰冷的PBS的三次洗涤去除未结合的病毒粒子之后，将受感染细胞在37℃温箱中培养24小时。执行发光分析，以定量来自细胞裂解产物的萤光素酶转基因表达效率。(b)AAV2i8、2i8G9和AAV9对Pro5和Lec2细胞的转导效率。(c)AAV6、6G9和AAV9对Pro5和Lec2细胞的转导效率。(d)AAV8、8G9和AAV9对Pro5和Lec2细胞的转导效率。结果呈现为平均值± s.e.m.(n=4)。统计学显著性使用单尾斯氏t检验进行评价(n.s.,不显著;* $p < 0.05$;** $p < 0.01$)。

[0023] 图3. 双重聚糖结合AAV2G9嵌合体及其亲本株AAV2和AAV9的三维模型。(A)具有分别以紫色和橙色着色的现有HS和“移植”Gal结合位点的完整AAV2G9衣壳的三维结构模型。(B-D)在AAV2(B)、AAV9(C)和AAV2G9(D)衣壳的三重对称轴处的VP3三聚体的三维表面模型的图示。涉及HS结合(AAV2 VP1编号:R487、K527、K532、R585、R588)和Gal结合(AAV9 VP1编号: D271、N272、Y446、N470、A472、V473、W503)的残基如(A)中突出显示。黑色三角形指示三重对称轴。

[0024] 图4. 双重聚糖结合AAV2G9嵌合体的体外表征。(*A-C*)用FITC-ECL和可溶性肝素抑制AAV2(*A*)、AAV9(*B*)和AAV2G9(*C*)对CHO Lec2细胞的转导。在用AAV2、AAV9或AAV2G9包装CBA-萤光素酶报道转基因盒感染之前，使CHO Lec2细胞在4℃下预冷，且与FITC-ECL、可溶

性肝素或两者一起温育。转导效率在感染后24小时作为以相对光单位(RLU)表示的萤光素酶活性进行测量。转基因表达的百分比通过使转导效率针对来自对照的RLU标准化进行计算。结果呈现为平均值± s.e.m.(n=4)。(*D-F*)用FITC-ECL和可溶性肝素竞争抑制AAV2(*D*)、AAV9(*E*)和AAV2G9(*F*)在CHO Lec2细胞上的细胞表面结合。不同AAV颗粒与在4℃下预冷的细胞结合,并且通过用冰冷的PBS洗涤去除未结合的病毒粒子。在病毒基因组提取后,使用qPCR定量结合的病毒粒子。通过使结合病毒粒子的数目针对相应对照的那种标准化,来测定结合的病毒粒子的百分比。结果呈现为平均值± s.e.m.(n=5)。统计学显著性使用单尾斯氏*t*检验进行分析(* p < 0.05;**p < 0.01)。

[0025] 图5. 在感染后0小时(hpi),在Lec2细胞表面上的结合病毒粒子的免疫荧光。CHO Lec2细胞在12 mm盖玻片上以5x10^{4}细胞/盖玻片的密度铺平板过夜。在4℃下预冷30分钟后,Lec2细胞用AAV2、AAV 2G9和AAV9以1000 vg/细胞的MOI在4℃下感染30分钟。在去除未结合的病毒粒子之后,将细胞用在1xPBS中的2%多聚甲醛固定。使用单克隆抗体(A20用于AAV2/AAV2G9和ADK9用于AAV9)检测完整病毒粒子,作为来自在免疫荧光洗涤缓冲液(IFWB)中1:10稀释的相应杂交瘤培养物的培养基上清液获得。Alexa Fluor 594®山羊抗小鼠IgG以在IFWB中1:1000的稀释度用作免疫荧光检测的二抗。盖玻片随后固定到在具有DAPI的Prolong® Gold抗褪色试剂中的玻璃载玻片上。使用配备63x油浸物镜和专门检测系统的Zeiss® 710共聚焦激光扫描显微镜获取荧光显微照片。图像处理使用LSM®观察器和Image J®软件来进行。白色比例尺指示10 μm。

[0026] 图6. 通过AAV2衣壳或AAV9衣壳竞争抑制AAV2G9对Lec2细胞的转导。在用AAV2G9-CBA-Luc颗粒(MOI 1000 vg/细胞)感染之前,使Lec2细胞与(*A*)AAV2或(*B*)AAV9-CBA-tdTomato以范围为500 - 100,000 vg/细胞的感染复数(MOI)一起预温育2小时。通过使萤光素酶转基因表达水平针对未经处理的对照的那种标准化,来计算AAV2G9转导的抑制百分比。结果呈现为平均值± s.e.m.(n=4)。统计学显著性使用单尾斯氏*t*检验进行分析(* p < 0.05;**p < 0.01)。

[0027] 图7. 在感染后的所示时间点,与亲本AAV2和AAV9相比较,AAV2G9对Lec2细胞的转导效率概况的动力学。如所述的,用AAV2、AAV2G9或AAV9-CBA-萤光素酶载体以1000 vg/细胞的MOI感染预冷的Lec2细胞。在感染后的所示时间点(18、24、28、42和54小时),细胞在发光分析之前进行裂解。萤光素酶转基因表达通过以相对光单位(RLU)表示的细胞裂解产物的萤光素酶活性进行测量(n=5)。统计学显著性使用单尾斯氏*t*检验进行评价(* p < 0.05;**p < 0.01)。

[0028] 图8. AAV2G9在体内介导快速发作和增强的转基因表达。(*A*)包装CBA-萤光素酶转基因盒的AAV2、AAV 2G9和AAV9载体的体内转基因表达动力学。BALB/c小鼠(n=4)通过尾静脉以1x10^{11} vg/动物的剂量施用AAV载体,并且使用Xenogen® Lumina成像系统,在注射后3、7和18天时收集生物发光图像。用在彩虹色标上的生物发光显示了代表性活动物图像(1x10^5-1x10^{6}光子/秒/cm^2/球面度)。AAV2G9维持AAV2的肝向性,但证实比两种亲本AAV毒株更快速和强大的萤光素酶信号。(*B*和*C*)通过标记以不同时间间隔获得的(*B*)肝区和(*C*)整个动物的目的区(ROIs)周围图像,执行光信号输出(表示为光子/秒/cm^2/球面度)的动力学定量(n=4)。统计学显著性使用单尾斯氏*t*检验进行评价(n.s.,不显著;* p < 0.05;** p < 0.01)。

[0029] 图9. AAV2G9在小鼠中的转基因表达定量和生物分布概况。(*A*)在第3和18天时，来自AAV2(黑色)、AAV2G9(灰色)或AAV9(白色)处理动物的心脏和肝组织裂解产物的萤光素酶转基因表达的定量(n=4)。(*B*)在第3和18天时，得自施用AAV2(黑色)、AAV2G9(灰色)或AAV9(白色)的BALB/c小鼠的肝和心脏裂解产物中的载体基因组的生物分布。在所示时间点，宿主基因组DNA和病毒基因组从组织裂解产物中分离，并且使用qPCR与对于小鼠核纤层蛋白基因和萤光素酶转基因特异性的引物组进行定量。结果呈现为平均值± s.e.m.(n=4)。统计学显著性使用单尾斯氏*t*检验进行评价(n.s.，不显著；* p < 0.05；** p < 0.01)。

[0030] 图10. 包装CBA-萤光素酶转基因盒的AAV2i8、2i8G9和AAV9载体的体内转基因表达动力学。BALB/c小鼠(n=4)通过尾静脉以$1x10^{11}$ vg/动物的剂量施用AAV载体，并且使用Xenogen® Lumina成像系统，在注射后3、7和18天时收集生物发光图像。用在彩虹色标上表示的生物发光显示了代表性活动物图像(10^5-10^6光子/秒/cm^2/球面度)。

[0031] 图11. 在新生小鼠中的代表性AAV “G9”毒株的CNS向性概况。使用含有由杂合鸡β肌动蛋白(CBh)启动子驱动的GFP转基因的3.5x10e9 AAV载体基因组，将出生后0(P0)幼崽(n=3)单侧注射到左侧脑室内。在注射后2周时，GFP免疫组织化学揭示在鼠脑内，关于每种AAV “G9”毒株的差异传播、区域和细胞向性。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明现在参考附图进行描述，其中显示了本发明的代表性实施方案。然而，本发明可以以不同形式体现，并且不应解释为限制于本文阐述的实施方案。相反，提供这些实施方案，以便本公开内容将是彻底和完整的，并且将本发明的范围完全传达给本领域技术人员。

[0034] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。在本文中本发明的说明书中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的，并且不预期限制本发明。本文提及的所有出版物、专利申请、专利及其他参考文献通过引用全文并入本文。

[0035] 本发明基于AAV衣壳蛋白上的“袋(pocket)”的发现，所述袋限定聚糖识别足迹。限定该袋的特异性氨基酸已得到鉴定且在本文中得到描述，例如关于AAV9的半乳糖结合位点。在本发明中，将该AAV9半乳糖结合足迹移植到AAV2衣壳蛋白模板内，导致在植入的AAV2衣壳蛋白模板中引入新的聚糖结合位点。通过取代例如显示于本文表3中的相应氨基酸，可以将该AAV半乳糖结合足迹引入任何其他AAV血清型内。

[0036] 因此，本发明涉及聚糖识别足迹从一种AAV毒株分子移植到另一种AAV毒株上，其通过结构建模研究进行指导，并且通过定点诱变来实现。包装报道盒的重组载体(来源于这些新毒株)在细胞培养和动物模型中展示快速发作和增强的转基因表达。使用天然存在的血清型/分离物作为模板，可以应用该通用策略，以生成合成双重聚糖结合AAV毒株的实验对象组，其可以解决例如在人基因疗法临床试验中观察到的剂量依赖性免疫毒性的挑战。

[0037] 因此，在一个方面，本发明提供了包含一个或多个氨基酸取代的腺伴随病毒(AAV)衣壳蛋白，其中所述取代将新的聚糖结合位点引入AAV衣壳蛋白内。在一些实施方案中，氨基酸取代在AAV2中的氨基酸266、氨基酸463-475和氨基酸499-502中，或者AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV10或如表3中鉴定的任何其他AAV血清型中的相应氨基酸位置中。

[0038] 在一些实施方案中，新的聚糖结合位点可以是己糖结合位点，其中所述己糖为半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)或岩藻糖(fuc)。

[0039] 在一些实施方案中，新的聚糖结合位点可以是唾液酸(Sia)结合位点，其中所述Sia残基是N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)或N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)。

[0040] 在一些实施方案中，新的聚糖结合位点可以是二糖结合位点，其中所述二糖是以形式Sia(α2,3)Gal或Sia(α2,6)Gal，与半乳糖连接的唾液酸。

[0041] 在一些实施方案中，取代将来自第一AAV血清型(“供体”)的衣壳蛋白的新的聚糖结合位点引入第二AAV血清型(“模板”)的衣壳蛋白内，所述第二AAV血清型不同于所述第一AAV血清型。

[0042] 本发明还提供了包含本发明的AAV衣壳蛋白的AAV衣壳。

[0043] 本文进一步提供的是包含本发明的AAV衣壳的病毒载体，以及包含在药学上可接受的载体中的本发明的AAV衣壳蛋白、AAV衣壳和/或病毒载体的组合物。

[0044] 本发明另外提供了将核酸引入细胞内的方法，其包括使细胞与本发明的病毒载体接触。细胞可以在主体中，并且在一些实施方案中，主体可以是人主体。

[0045] 在一些示例性实施方案中，AAV衣壳蛋白供体可以是AAV血清型9，并且AAV衣壳蛋白模板可以是AAV血清型1(AAV1)、AAV血清型2(AAV2)、AAV血清型3a(AAV3a)、AAV血清型3b(AAV3b)、AAV血清型4(AAV4)、AAV血清型5(AAV5)、AAV血清型6(AAV6)、AAV血清型7(AAV7)、AAV血清型8(AAV8)、或AAV血清型10(AAV10)。

[0046] 在一些示例性实施方案中，AAV衣壳蛋白模板可以来自AAV2，并且a)在氨基酸266处的取代是A266S；b)在氨基酸463-475处的取代是SQAGASDIRDQSR463-475SX$_1$AGX$_2$SX$_3$X$_4$X$_5$X$_6$QX$_7$R，其中X$_{1-7}$可以是任何氨基酸；和c)在氨基酸499-502处的取代是EYSW499-502EX$_8$X$_9$W，其中X$_{8-9}$可以是任何氨基酸。在一些实施方案中，X$_1$可以是V；X$_2$可以是P；X$_{3-6}$可以是NMAV；并且X$_7$可以是G，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在一些实施方案中，X$_8$可以是F，并且X$_9$可以是W，导致序列EFAW。

[0047] 提供上文实例以证实可能将来自AAV9供体的半乳糖结合位点引入AAV2模板内的取代。表3列出了对于其鉴定这些相应的氨基酸的几种AAV血清型，以及可以在这些血清型各自中制备的示例性取代，以引入AAV9的半乳糖结合位点。表3中显示和本文详细描述的是特异性氨基酸位置是保守的，并且其他氨基酸位置是取代。当显示取代时，表3中阐述的取代是可以在这些残基位置处制备的各种取代的示例。考虑本发明的实施方案涵盖除AAV9之外的其他供体AAV血清型，以及除半乳糖结合位点之外的其他聚糖结合位点。

[0048] 表2列出了可以由本发明涵盖的AAV的非限制性示例性血清型以及基因组登录号和衣壳序列。供体和模板的AAV血清型并不限于人AAV，还可以包括非人AAV，例如禽类或牛AAV，以及非人灵长类动物AAV，其实例显示于表1中。

[0049] 上文实例显示了在AAV2模板中可能的氨基酸取代，用于引入来自AAV9供体的半乳糖结合位点。在另一个实例中，模板可以是AAV1或AAV6，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是SX$_1$X$_2$X$_3$PX$_4$X$_5$MX$_6$VQX$_7$X$_8$，其中X$_{1-8}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X$_{1-3}$是VAG；X$_4$是S；X$_5$是N；X$_6$是A；X$_7$是G，并且X$_8$是R，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是X$_9$FX$_{10}$W，其中X$_9$和X$_{10}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X$_9$是E并且X$_{10}$是W，导致序

列EFAW。

[0050] 在另一个实例中，模板可以是AAV3a或AAV3b，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是$SX_1AGPX_2X_3MX_4X_5QX_6R$，其中$X_{1-6}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，$X_1$是V；$X_2$是S；$X_3$是N；$X_4$是A；$X_5$是N；并且$X_6$是G，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是X_7FX_8W，其中X_7和X_8可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X_7是E并且X_8是W，导致序列EFAW。

[0051] 在另一个实例中，模板可以是AAV4，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是$X_1X_2X_3X_4PX_5NX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$，其中$X_{1-11}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，$X_1$是S；$X_2$是V；$X_3$是A；$X_4$是G；$X_5$是S；$X_6$是M；$X_7$是A；$X_8$是V；$X_9$是Q；$X_{10}$是G；并且$X_{11}$是R，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是$X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$，其中X_{12-15}可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X_{12}是E；X_{13}是F；X_{14}是A；并且X_{15}是W，导致序列EFAW。

[0052] 在另一个实例中，模板可以是AAV5，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8AX_9X_{10}X_{11}X_{12}$，其中$X_{1-12}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，$X_1$是S；$X_2$是V；$X_3$是A；$X_4$是G；$X_5$是P；$X_6$是S；$X_7$是N；$X_8$是M；$X_9$是V；$X_{10}$是Q；$X_{12}$是G；并且$X_{12}$是R，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是$X_{13}X_{14}AX_{15}$，其中X_{13-15}可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X_{13}是E；X_{14}是F；X_{15}是A；并且X_{16}是W，导致序列EFAW。

[0053] 在另一个实例中，模板可以是AAV7，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是$X_1X_2X_3GPSX_4MAX_5QX_6X_7$，其中$X_{1-7}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，$X_1$是S；$X_2$是V；$X_3$是A；$X_4$是N；$X_5$是V；$X_6$是G；并且$X_7$是R，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是X_8FAW，其中X_8可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，其中X_8是E，导致序列EFAW。

[0054] 在另一个实例中，模板可以是AAV8，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是$SX_1X_2GPX_3X_4MAX_5QX_6X_7$，其中$X_{1-7}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，$X_1$是V；$X_2$是A；$X_3$是S；$X_4$是N；$X_5$是V；$X_6$是G；并且$X_7$是R，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是X_8FAW，其中X_8可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X_8可以是E，导致序列EFAW。

[0055] 在另一个实例中，模板可以是AAV10，并且在对应于AAV2的位置463-475的氨基酸位置处的取代可以是$X_1X_2AGPX_3NMX_4X_5QX_6X_7$，其中$X_{1-7}$可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，$X_1$是S；$X_2$是V；$X_3$是S；$X_4$是A；$X_5$是V；$X_6$是G；并且$X_7$是R，导致序列SVAGPSNMAVQGR。在进一步的实施方案中，在对应于AAV2中的位置499-502的氨基酸位置处的取代可以是X_8FAW，其中X_8可以是任何氨基酸。在一个特定实施方案中，X_8可以是E，导致序列EFAW。

[0056] 上文实例描述了将来自AAV9的半乳糖结合位点引入衣壳蛋白模板内，所述衣壳蛋白模板可以是AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8或AAV10。这些实例不预期是限制性的，证实通过修饰限定本文描述的“袋”的残基，可以将来自供体AAV血清型的聚糖结合位点引入不同AAV血清型的衣壳蛋白模板内的该通用原则(例如表3中列出的)。包含新的聚糖结合位点的此类经修饰的或嵌合衣壳蛋白可以装配成衣壳，其构成可以用作病毒载体的病毒颗粒，所述病毒载体具有增加细胞表面结合的有利表型，以及在体内更快速和增强的转

基因表达。

[0057] 如本文使用的，术语“腺伴随病毒”(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、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、进化枝F AAV以及目前已知或以后发现的任何其他AAV。参见例如BERNARD N. FIELDS等人，VIROLOGY，第2卷，第69章(第4版，Lippincott-Raven Publishers)。许多相对新的AAV血清型和进化枝已得到鉴定(参见例如Gao等人(2004)*J. Virology* 78:6381-6388和表1)。

[0058] 各种AAV血清型的基因组序列，以及天然末端重复(TR)、Rep蛋白质和衣壳亚基的序列是本领域已知的。此类序列的示例性但非限制性实例可以在参考文献或公共数据库例如GenBank®数据库中找到。参见例如GenBank®数据库登录号NC_002077.1、NC_001401.2、NC_001729.1、NC_001863.1、NC_001829.1、NC_006152.1、NC_001862.1、AF513851.1、AF513852.1，其公开内容通过引用并入本文，用于教导细小病毒和AAV核酸和氨基酸序列。还参见例如Srivistava等人(1983)*J. Virology* 45:555;Chiorini等人(1998)*J. Virology* 71:6823;Chiorini等人(1999)*J. Virology* 73:1309;Bantel-Schaal等人(1999)*J. Virology* 73:939;Xiao等人(1999)*J. Virology* 73:3994;Muramatsu等人(1996)*Virology* 221:208;Shade等人(1986)*J. Virol.* 58:921;Gao等人(2002)*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:11854;国际专利公开WO 00/28061，WO 99/6160和WO 98/11244;和美国专利号6,156,303;其公开内容通过引用并入本文，用于教导细小病毒和AAV核酸和氨基酸序列。

[0059] 自主性细小病毒和AAV的衣壳结构在BERNARD N. FIELDS等人，Virology，第2卷，第69 & 70章(第4版，Lippincott-Raven Publishers)中更详细地描述。还参见AAV2(Xie等人(2002)*Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:10405-10)、AAV4(Padron等人(2005)*J. Virol.* 79:5047-58)、AAV5(Walters等人(2004)*J. Virol.* 78: 3361-71)和CPV(Xie等人(1996)*J. Mol. Biol.* 6:497-520和Tsao等人(1991)*Science* 251: 1456-64)的晶体结构的描述。

[0060] 定义

[0061] 单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”预期还包括复数形式，除非上下文另有明确说明。

[0062] 此外，如本文使用的，当提及可测量值例如多核苷酸或多肽序列长度、剂量、时间、温度等的量时，术语“约”意欲涵盖指定量± 20%、± 10%、± 5%、± 1%、± 0.5%或甚至± 0.1%的变动。

[0063] 还如本文使用的，“和/或”指且涵盖相关列出项中的一种或多种的任何和所有可能组合，以及当以替代(“或”)解释时的组合缺乏。

[0064] 除非上下文另有说明，特别预期本文描述的本发明的各种特点可以以任何组合使用。

[0065] 此外，本发明还考虑了在本发明的一些实施方案中，可以排除或省略本文阐述的任何特点或特点组合。

[0066] 为了进一步举例说明，如果例如说明书指示特定氨基酸可以选自A、G、I、L和/或V，则该措辞还指示氨基酸可以选自这些氨基酸的任何子集，例如A、G、I或L;A、G、I或V;A或G;仅L;等，如同每种此类子组合在本文中明确阐述一样。此外，此类措辞还指示指定氨基酸中

的一个或多个可以被放弃。例如，在特定实施方案中，氨基酸不是A、G或I；不是A；不是G或V；等，如同每种此类可能弃权者在本文中明确阐述一样。

[0067] 如本文使用的，术语“降低(reduce)”、“降低(reduces)”、“降低(reduction)”和相似术语意指至少约5%、10%、15%、20%、25%、35%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、100%或更多的减少。

[0068] 如本文使用的，术语“增强(enhance)”、“增强(enhances)”、“增强(enhancement)”和相似术语指示至少约10%、20%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的增加。

[0069] 如本文使用的，术语“多肽”涵盖肽和蛋白质两者，除非另有说明。

[0070] “多核苷酸”是核苷酸碱基的序列，并且可以是RNA、DNA或DNA-RNA杂合序列(包括天然存在和非天然存在的核苷酸两者)，但在代表性实施方案中，是单链或双链DNA序列。

[0071] 如本文使用的，“经分离的”多核苷酸(例如“经分离的DNA”或“经分离的RNA”)意指至少部分与天然存在的生物或病毒的至少一些其他组分，例如通常发现与多核苷酸结合的细胞或病毒结构组分或者其他多肽或核酸分开的多核苷酸。在代表性实施方案中，与原材料相比较，“经分离的”核苷酸富集至少约10倍、100倍、1000倍、10,000倍或更多倍。

[0072] 同样地，“经分离的”多肽意指至少部分与天然存在的生物或病毒的至少一些其他组分，例如通常发现与多肽结合的细胞或病毒结构组分或者其他多肽或核酸分开的多肽。在代表性实施方案中，与原材料相比较，“经分离的”多肽富集至少约10倍、100倍、1000倍、10,000倍或更多倍。

[0073] 如本文使用的，“分离”或“纯化”(或语法等价物)病毒载体意指病毒载体至少部分与原材料中的至少一些其他组分分开。在代表性实施方案中，与原材料相比较，“经分离的”或“纯化的”病毒载体富集至少约10倍、100倍、1000倍、10,000倍或更多倍。

[0074] “治疗多肽”是可以减轻、降低、预防、延迟和/或稳定症状的多肽，所述症状产生于蛋白质在细胞或主体中的不存在或缺陷，和/或是以其他方式对主体赋予利益，例如抗癌效应或移植存活性中的改善的多肽。

[0075] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“……的治疗”(及其语法变化)意指主体状况的严重性降低，至少部分改善或稳定，和/或实现至少一种临床症状中的一定减轻、缓和、减少或稳定，和/或在疾病或病症的进展中存在延迟。

[0076] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”(及其语法变化)指相对于在不存在本发明的方法的情况下出现的那种，主体中的疾病、病症和/或临床症状的发作预防和/或延迟，和/或疾病、病症和/或临床症状的发作严重性中的降低。预防可以是完全的，例如疾病、病症和/或临床症状的完全不存在。预防还可以是部分的，使得主体中的疾病、病症和/或临床症状的出现和/或发作的严重性小于在不存在本发明的情况下出现的那种。

[0077] 如本文使用的，“治疗有效”或“有效”量是足以对主体提供一定改善或利益的量。或者说，“治疗有效”或“有效”量是提供主体中的至少一种临床症状中的一定减轻、缓和、减少或稳定的量。本领域技术人员应当理解疗效无需是完全或治愈的，只要对主体提供一定利益。

[0078] 如本文使用的，“预防有效”量是相对于在不存在本发明的方法的情况下出现的那

种，足以预防和/或延迟主体中的疾病、病症和/或临床症状的发作，和/或降低和/或延迟疾病、病症和/或临床症状的发作严重性的量。本领域技术人员应当理解预防水平无需是完全的，只要对主体提供一定利益。

[0079] 术语“异源核苷酸序列”和“异源核酸”在本文中可互换使用，并且指在病毒中并非天然存在的序列。一般地，异源核酸包含编码目的多肽或非翻译RNA(例如用于递送至细胞或主体)的开放读码框。

[0080] 如本文使用的，术语“病毒载体”、“载体”或“基因递送载体”指病毒(例如AAV)颗粒，其充当核酸递送媒介物，并且包含在病毒粒子内包装的载体基因组(例如病毒DNA[vDNA])。可替代地，在一些背景下，术语“载体”可以用于指单独的载体基因组/vDNA。

[0081] 本发明的病毒载体可以进一步是“靶向”病毒载体(例如具有指定向性)和/或“杂合”细小病毒(即，其中病毒TR和病毒衣壳来自不同细小病毒)，如国际专利公开WO 00/28004和Chao等人(2000)*Molecular Therapy* 2:619中描述的。

[0082] 本发明的病毒载体可以进一步是双链体细小病毒颗粒，如国际专利公开WO 01/92551(其公开内容通过引用全文并入本文)中所述。因此，在一些实施方案中，双链(双链体)基因组可以包装到本发明的病毒衣壳内。

[0083] 生产病毒载体的方法

[0084] 本发明还涵盖了包含本发明的经修饰的衣壳蛋白和衣壳的病毒载体。在特定实施方案中，病毒载体是细小病毒载体(例如包含细小病毒衣壳和/或载体基因组)，例如AAV载体(例如包含AAV衣壳和/或载体基因组)。在代表性实施方案中，病毒载体包含包含本发明的经修饰的衣壳亚基经修饰的AAV衣壳和载体基因组。

[0085] 例如，在代表性实施方案中，病毒载体包含：(a)包含本发明的经修饰的衣壳蛋白的经修饰的病毒衣壳(例如经修饰的AAV衣壳)；(b)包含末端重复序列(例如AAV TR)的核酸，其中包含末端重复序列的所述核酸由经修饰的病毒衣壳壳体化。核酸可以任选包含两个末端重复(例如两个AAV TR)。

[0086] 在代表性实施方案中，病毒载体是包含编码目的多肽或功能RNA的异源核酸的重组病毒载体。重组病毒载体在下文更详细地描述。

[0087] 在特定实施方案中，与通过不含经修饰的衣壳蛋白的病毒载体的转导水平相比较，本发明的病毒载体具有降低的肝转导。在特定实施方案中，病毒载体具有朝向肌肉的全身转导，例如载体转导遍及全身的多重骨骼肌群，并且任选转导心肌和/或膈肌。

[0088] 本领域技术人员应当理解本发明的经修饰的衣壳蛋白、病毒衣壳和病毒载体排除在其天然状态下在指定位置处具有指示氨基酸的那些衣壳蛋白、衣壳和病毒载体(即，不是突变体)。

[0089] 本发明进一步提供了产生本发明的病毒载体的方法。在一个代表性实施方案中，本发明提供了生产病毒载体的方法，该方法包括对细胞提供：(a)包含至少一个TR序列(例如AAV TR序列)的核酸模板，和(b)对于核酸模板复制和包入AAV衣壳内足够的AAV序列(例如编码本发明的AAV衣壳的AAV *rep*序列和AAV *cap*序列)。任选地，核酸模板进一步包含至少一种异源核酸序列。在特定实施方案中，核酸模板包含两个AAV ITR序列，其位于异源核酸序列(例如果存在的话)的5’和3’，尽管它们无需与之直接邻接。

[0090] 核酸模板以及AAV *rep*和*cap*序列在这样的条件下提供，使得在细胞中产生包含在

AAV衣壳内包装的核酸模板的病毒载体。该方法可以进一步包括从细胞中收集病毒载体的步骤。病毒载体可以从培养基中和/或通过使细胞裂解进行收集。

[0091] 细胞可以是对于AAV病毒复制许可的细胞。可以采用本领域已知的任何合适的细胞。在特定实施方案中，细胞是哺乳动物细胞。作为另一个选项，细胞可以是反式补充包装细胞系(trans-complementing packaging cell line)，其提供从复制缺陷辅助病毒中缺失的功能，例如293细胞或其他E1a反式补充细胞。

[0092] AAV复制和衣壳序列可以通过本领域已知的任何方法提供。目前方案通常在单一质粒上表达AAV *rep/cap*基因。AAV复制和包装序列无需一起提供，尽管这样做可以是方便的。AAV *rep*和/或*cap*序列可以通过任何病毒或非病毒载体提供。例如，*rep/cap*序列可以通过杂合腺病毒或疱疹病毒载体提供(例如插入缺失的腺病毒载体的E1a或E3区内)。EBV载体还可以用于表达AAV *cap*和*rep*基因。该方法的一个优点是EBV载体是附加型，在相继细胞分裂自始至终仍维持高拷贝数(即作为染色体外元件稳定整合到细胞内，指定为“基于EBV的核附加体”，参见Margolski(1992)*Curr. Top. Microbiol. Immun.* 158:67)。

[0093] 作为进一步的替代方案，可以将*rep/cap*序列稳定掺入细胞内。

[0094] 通常，AAV *rep/cap*序列不由TR侧接，以预防这些序列的援救和/或包装。

[0095] 核酸模板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)或病毒载体供应。在特定实施方案中，核酸模板由疱疹病毒或腺病毒载体供应(例如插入缺失腺病毒的E1a或E3区内)。作为另一个举例说明，Palombo等人(1998)*J. Virology* 72:5025，描述了携带由AAV TR侧接的报道基因的杆状病毒载体。EBV载体还可以用于如上所述就*rep/cap*基因而言递送模板。

[0096] 在另一个代表性实施方案中，核酸模板通过复制rAAV病毒提供。在另外其他实施方案中，包含核酸模板的AAV原病毒稳定整合到细胞的染色体内。

[0097] 为了增强病毒滴度，促进生产性AAV感染的辅助病毒功能(例如腺病毒或疱疹病毒)可以提供给细胞。AAV复制所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。可替代地，腺病毒或疱疹病毒序列可以通过另一种非病毒或病毒载体例如作为非感染性腺病毒小质粒提供，所述非感染性腺病毒小质粒携带促进有效AAV生产的所有辅助基因，如由Ferrari等人(1997)*Nature Med.* 3:1295;以及美国专利号6,040,183和6,093,570描述的。

[0098] 进一步地，辅助病毒功能可以通过包装细胞提供，所述包装细胞具有在染色体中包埋或作为稳定的染色体外元件维持的辅助序列。一般地，辅助病毒序列不能包装到AAV病毒粒子内，例如不由TR侧接。

[0099] 本领域技术人员应当理解，在单一辅助构建体上提供AAV复制和衣壳序列以及辅助病毒序列(例如腺病毒序列)可以是有利的。该辅助构建体可以是非病毒或病毒构建体。作为一个非限制性举例说明，辅助构建体可以是包含AAV *rep/cap*基因的杂合腺病毒或杂合疱疹病毒。

[0100] 在一个特定实施方案中，AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体供应。该载体可以进一步包含核酸模板。AAV *rep/cap*序列和/或rAAV模板可以插入腺病毒的缺失区(例如E1a或E3区)内。

[0101] 在一个进一步的实施方案中，AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒

辅助载体供应。根据该实施方案，rAAV模板可以作为质粒模板提供。

[0102] 在另一个举例说明性实施方案中，AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体(adenovirus helper)供应，并且rAAV模板作为原病毒整合到细胞内。可替代地，rAAV模板由EBV载体提供，所述EBV载体作为染色体外元件(例如作为基于EBV的核附加体)维持在细胞内。

[0103] 在一个进一步的示例性实施方案中，AAV *rep/cap*序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体供应。rAAV模板可以作为分开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。

[0104] 根据前述方法，杂合腺病毒载体通常包含对于腺病毒复制和包装足够的腺病毒5'和3'顺式序列(即，腺病毒末端重复和PAC序列)。AAV *rep/cap*序列和rAAV模板(例如果存在的话)包埋在腺病毒骨架中，并且由5'和3'顺式序列侧接，使得这些序列可以包装到腺病毒衣壳内。如上所述，腺病毒辅助序列和AAV *rep/cap*序列一般不由TR侧接，使得这些序列不包装到AAV病毒粒子内。

[0105] Zhang等人((2001)*Gene Ther.* 18:704-12)描述了包含腺病毒以及AAV *rep*和*cap*基因两者的嵌合辅助者。

[0106] 疱疹病毒还可以用作AAV包装方法中的辅助病毒。编码AAV Rep蛋白质的杂合疱疹病毒可以有利地促进可扩大的AAV载体生产方案。表达AAV-2 *rep*和*cap*基因的杂合单纯疱疹病毒I型(HSV-1)载体已得到描述(Conway等人(1999)*Gene Therapy* 6:986和PCT公开号WO 00/17377。

[0107] 作为进一步的替代方案，本发明的病毒载体可以使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，如例如Urabe等人(2002)*Human Gene Therapy* 13:1935-43中所述。

[0108] 不含污染性辅助病毒的AAV载体原种可以通过本领域已知的任何方法获得。例如，AAV和辅助病毒可以基于大小容易地区分。AAV还可以基于对于肝素底物的亲和力与辅助病毒分离开(Zolotukhin等人(1999)*Gene Therapy* 6:973)。可以使用缺失的复制缺陷辅助病毒，使得任何污染性辅助病毒不是有复制能力的。作为进一步的替代方案，可以采用缺乏晚期基因表达的腺病毒辅助者，因为仅需要腺病毒早期基因表达以介导AAV病毒的包装。对于晚期基因表达缺陷的腺病毒突变体是本领域已知的(例如ts100K和ts149腺病毒突变体)。

[0109] 重组病毒载体

[0110] 本发明的病毒载体可用于在体外、先体外后体内和在体内将核酸递送至细胞。特别地，病毒载体可以有利地用于将核酸递送或转移至动物细胞，包括例如哺乳动物细胞。

[0111] 任何目的异源核酸序列均可在本发明的病毒载体中递送。目的核酸包括编码多肽的核酸，包括治疗(例如用于医学或兽医学用途)或免疫原性(例如用于疫苗)多肽。

[0112] 治疗多肽包括但不限于囊性纤维化跨膜调节蛋白(CFTR)、抗肌萎缩蛋白(包括小和微小抗肌萎缩蛋白，参见例如Vincent等人(1993)*Nature Genetics* 5:130;美国专利公开号2003017131;PCT公开号WO/2008/088895，Wang等人*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13714*-13719(2000);和Gregorevic等人*Mol. Ther.* 16:657-64(2008))、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、IGF-1、抗炎多肽例如IκB显性突变体、sarcospan、肌营养相关蛋白(utrophin)(Tinsley等人(1996)*Nature* 384:349)、小肌营养相关蛋白、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、超氧化物歧化酶、瘦素、LDL受体、脂蛋白脂肪酶、鸟氨酸氨甲酰基转移酶、β-珠蛋白、α-珠蛋白、血影蛋白、α_1-抗胰蛋白酶、腺苷脱氨酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶、β-葡糖脑苷脂酶、鞘磷脂酶、溶酶体氨基己糖苷酶A、支链酮酸脱氢酶、RP65蛋白质、细胞因子(例如α-干扰素、β-干扰素、干扰素-γ、白细胞介素-2、白细胞介素-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等)、肽生长因子、神经营养因子和激素(例如生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1和2、血小板来源的生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、神经营养因子-3和-4、脑来源的神经营养因子、骨形态发生蛋白[包括RANKL和VEGF]、神经胶质来源的生长因子、转化生长因子-α和-β等)、溶酶体酸性α-葡糖苷酶、α-半乳糖苷酶A、受体(例如肿瘤坏死生长因子α可溶性受体)、S100A1、小白蛋白、腺苷酸环化酶6型、调节钙处理的分子(例如PP1的$SERCA_{2A}$抑制剂1及其片段[例如PCT公开号WO 2006/029319和WO 2007/100465])、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bARKct、抗炎因子例如IRAP、抗肌肉生长抑制素蛋白、天冬氨酸酰酶、单克隆抗体(包括单链单克隆抗体;示例性Mab是Herceptin® Mab)、神经肽及其片段(例如甘丙肽、神经肽Y(参见美国专利号7,071,172)、血管生成抑制剂例如Vasohibins及其他VEGF抑制剂(例如Vasohibin 2 [参见PCT公开WO JP2006/073052])。其他举例说明性异源核酸序列编码自杀基因产物(例如胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素和肿瘤坏死因子)，赋予对在癌症疗法中使用的药物抗性的蛋白质、肿瘤抑制基因产物(例如p53、Rb、Wt-1)、TRAIL、FAS-配体、以及在有此需要的主体中具有疗效的任何其他多肽。AAV主体还可以用于递送单克隆抗体和抗体片段，例如针对肌肉生长抑制素的抗体或抗体片段(参见例如Fang等人*Nature Biotechnology* 23:584-590(2005))。

[0113] 编码多肽的异源核酸序列包括编码报道多肽(例如酶)的那些。报道多肽是本领域已知的，并且包括但不限于绿色荧光蛋白、β-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、萤光素酶和氯霉素乙酰转移酶基因。

[0114] 任选地，异源核酸编码分泌多肽(例如作为以其天然状态的分泌多肽，或例如通过与如本领域已知的分泌信号序列可操作地结合已改造为被分泌的多肽)。

[0115] 可替代地，在本发明的特定实施方案中，异源核酸可以编码反义核酸，核酶(例如如美国专利号5,877,022中所述)，实现剪接体介导的反式剪接的RNA(参见Puttaraju等人(1999)*Nature Biotech.* 17:246;美国专利号6,013,487;美国专利号6,083,702)，干扰RNA(RNAi)包括介导基因沉默的siRNA、shRNA或miRNA(参见Sharp等人(2000)*Science* 287:2431)，以及其他非翻译RNA，例如“引导”RNA(Gorman等人(1998)*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:4929;给予Yuan等人的美国专利号5,869,248)等。示例性非翻译RNA包括针对多药抗性(MDR)基因产物的RNAi(例如以治疗和/或预防肿瘤和/或用于施用于心脏以预防通过化学疗法的损害)、针对肌肉生长抑制素的RNAi(例如用于杜兴肌营养不良)、针对VEGF的RNAi(例如以治疗和/或预防肿瘤)、针对受磷蛋白的RNAi(例如以治疗心血管疾病，参见例如Andino等人*J. Gene Med.* 10:132-142(2008)和Li等人*Acta Pharmacol Sin.* 26:51-55(2005));受磷蛋白抑制或显性失活分子例如受磷蛋白S16E(例如以治疗心血管疾病，参见例如Hoshijima等人*Nat. Med.* 8:864-871(2002))，针对腺苷激酶的RNAi(例如用于癫痫症)，以及针对致病性生物和病毒(例如乙型和/或丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、CMV、单

纯疱疹病毒、人乳头状瘤病毒等)的RNAi。

[0116] 进一步地,可以递送指导可变剪接的核酸序列。为了举例说明,与抗肌萎缩蛋白外显子51的5'和/或3'剪接位点互补的反义序列(或其他抑制序列)可以与U1或U7小核(sn)RNA启动子结合递送,以诱导该外显子的跳跃。例如,包含位于反义/抑制序列5'的U1或U7 snRNA启动子的DNA序列可以在本发明的经修饰的衣壳内包装且递送。

[0117] 病毒载体还可以包含异源核酸,其与宿主染色体上的基因座共享同源性且与之重组。该方法可以例如用于校正宿主细胞中的遗传缺陷。

[0118] 本发明还提供了表达免疫原性多肽的病毒载体,例如用于疫苗接种。核酸可以编码本领域已知的任何目的免疫原,包括但不限于来自人免疫缺陷病毒(HIV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、流感病毒的免疫原,HIV或SIV gag蛋白质,肿瘤抗原,癌抗原,细菌抗原,病毒抗原等。

[0119] 细小病毒作为疫苗载体的用途是本领域已知的(参见例如Miyamura等人,(1994)*Proc. Nat. Acad. Sci USA* 91:8507;给予Young等人的美国专利号5,916,563、给予Mazzara等人的美国专利号5,905,040、美国专利号5,882,652、给予Samulski等人的美国专利号5,863,541)。抗原可以存在于细小病毒衣壳内。可替代地,抗原可以由引入重组载体基因组内的异源核酸表达。如本文描述的和/或如本领域已知的任何目的免疫原可以由本发明的病毒载体提供。

[0120] 免疫原性多肽可以是适合于引发免疫应答和/或保护主体不受感染和/或疾病的任何多肽,所述感染和/或疾病包括但不限于微生物、细菌、原生动物、寄生虫、真菌和/或病毒感染和疾病。例如,免疫原性多肽可以是正粘病毒免疫原(例如流感病毒免疫原,例如流感病毒血凝素(HA)表面蛋白质或流感病毒核蛋白、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、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蛋白质,HIV或SIV基质/衣壳蛋白,和HIV或SIV *gag*、*pol*和*env*基因产物)。免疫原性多肽还可以是沙粒病毒免疫原(例如拉沙热病毒免疫原,例如拉沙热病毒核衣壳蛋白和/或拉沙热包膜糖蛋白)、痘病毒免疫原(例如牛痘病毒免疫原,例如牛痘L1或L8基因产物)、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基因产物)、布尼亚病毒免疫原(例如RVFV、CCHF和/或SFS病毒免疫原)、或冠状病毒免疫原(例如传染性人冠状病毒免疫原例如人冠状病毒包膜糖蛋白、或猪传播性胃肠炎病毒免疫原、或禽传染性支气管炎病毒免疫原)。免疫原性多肽可以进一步是脊髓灰质炎免疫原、疱疹病毒免疫原(例如CMV、EBV、HSV免疫原)、腮腺炎病毒免疫、麻疹病毒免疫、风疹病毒免疫原、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、丙型肝炎等)免疫原、和/或本领域目前已知或以后鉴定为免疫原的任何其他疫苗免疫原。

[0121] 可替代地,免疫原性多肽可以是任何肿瘤或癌细胞抗原。任选地,肿瘤或癌抗原在癌细胞的表面上表达。示例性癌症和肿瘤细胞抗原在S.A. Rosenberg(*Immunity* 10:281(1991))中描述。其他举例说明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、LAGE、NY-ESO-1、CDK-4、β-连环蛋白、MUM-1、半胱天冬酶-8、KIAA0205、HPVE、SART-1、PRAME、p15、黑素瘤肿瘤抗原(Kawakami等人(1994)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3515;Kawakami等人(1994)*J. Exp. Med.*,180:347;

Kawakami等人(1994)*Cancer Res*. 54:3124)、MART-1、gp100 MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、TRP-1、TRP-2、P-15、酪氨酸酶(Brichard等人(1993)*J. Exp. Med*. 178:489);HER-2/neu基因产物(美国专利号4,968,603)、CA125、LK26、FB5(内皮唾液酸蛋白)、TAG 72、AFP、CA19-9、NSE、DU-PAN-2、CA50、SPan-1、CA72-4、HCG、STN(唾液酸Tn抗原)、c-erbB-2蛋白质、PSA、L-CanAg、雌激素受体、乳脂球蛋白、p53肿瘤抑制蛋白质(Levine,(1993)*Ann. Rev. Biochem*. 62:623);粘蛋白抗原(PCT公开号WO 90/05142);端粒酶;核基质蛋白;前列腺酸性磷酸酶;乳头状瘤病毒抗原;和/或目前已知或以后发现与下述癌症相关的抗原:黑素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、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、脑癌和目前已知或以后鉴定的任何其他癌症或恶性状况(参见例如Rosenberg,(1996)*Ann. Rev. Med*. 47:481-91)。

[0122] 作为进一步的替代方案,异源核酸可以编码在体外、先体外后体内或在体内在细胞中期望地产生的任何多肽。例如,病毒载体可以引入培养的细胞内,并且由其分离所表达的基因产物。

[0123] 本领域技术人员应当理解,目的异源核酸可以与适当的控制序列可操作地结合。例如,异源核酸可以与表达控制元件可操作地结合,所述表达控制元件例如转录/翻译控制信号、复制起点、多聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点(IRES)、启动子和/或增强子等。

[0124] 进一步地,例如通过选择性阻断在特异性位点处的剪接活性的寡核苷酸、小分子和/或其他化合物(例如如PCT公开号WO 2006/119137中所述)的存在或不存在,通过调节不同内含子的选择性剪接,可以在转录后水平下实现目的异源核酸的调节表达。

[0125] 本领域技术人员应当理解,取决于所需水平和组织特异性表达,可以使用各种启动子/增强子元件。取决于所需表达模式,启动子/增强子可以是组成型或诱导型的。启动子/增强子可以是天然或外源的,并且可以是天然或合成序列。外源预期转录起始区在转录起始区引入其内的野生型宿主中未发现。

[0126] 在特定实施方案中,启动子/增强子元件对于待处理的靶细胞或主体可以是天然的。在代表性实施方案中,启动子/增强子元件对于异源核酸序列可以是天然的。启动子/增强子元件一般这样加以选择,使得它在目的靶细胞中起作用。进一步地,在特定实施方案中,启动子/增强子元件是哺乳动物启动子/增强子元件。启动子/增强子元件可以是组成型或诱导型的。

[0127] 诱导型表达控制元件通常在其中期望提供异源核酸序列的过表达调节的那些应用中是有利的。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优选的启动子/增强子元件,并且包括肌肉特异性或优选的(包括心肌、骨骼肌和/或平滑肌特异性或优选的)、神经组织特异性或优选的(包括脑特异性或优选的)、眼特异性或优选的(包括视网膜特异性和角膜特异性的)、肝特异性或优选的、骨髓特异性或优选的、胰腺特异性或优选的、脾特异性或优选的、和/或肺特异性或优选的启动子/增强子元件。其他诱导型启动子/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和金属硫蛋白启动子。

[0128] 在其中异源核酸序列在靶细胞中转录且随后翻译的实施方案中,一般包括特异性

起始信号用于所插入的蛋白质编码序列的有效翻译。这些外源翻译控制序列可以包括ATG起始密码子和邻近序列，可以具有各种起源，天然和合成的两者。

[0129] 根据本发明的病毒载体提供了用于将异源核酸递送到广泛范围的细胞包括分裂和不分裂细胞内的手段。病毒载体可以用于将目的核酸在体外递送至细胞，例如在体外产生多肽或用于先体外后体内基因疗法。病毒载体另外可用于将核酸递送至有此需要的主体的方法中，例如以表达免疫原性或治疗多肽或功能RNA。以这种方式，多肽或功能RNA可以在主体中在体内产生。因为主体具有多肽的缺乏，所以主体可以需要该多肽。进一步地，因为多肽或功能RNA在主体中的产生可以赋予一些有利效应，所以可以实践该方法。

[0130] 病毒载体还可以用于在培养的细胞或主体中产生目的多肽或功能RNA(例如使用主体作为生物反应器来产生多肽，或例如与筛选方法结合观察功能RNA对主体的作用)。

[0131] 一般而言，本发明的病毒载体可以用于递送编码多肽或功能RNA的异源核酸，以治疗和/或预防对其而言递送治疗多肽或功能RNA是有利的任何疾病状态。举例说明性疾病状态包括但不限于：囊性纤维化(囊性纤维化跨膜调节蛋白)和肺的其他疾病、血友病A(因子VIII)、血友病B(因子IX)、地中海贫血(β-珠蛋白)、贫血(促红细胞生成素)及其他血液病症、阿尔茨海默氏病(GDF ；脑啡肽酶)、多发性硬化(β-干扰素)、帕金森氏病(神经胶质细胞系来源的神经营养因子[GDNF])、亨廷顿氏病(RNAi以去除重复)、肌萎缩侧索硬化、癫痫症(甘丙肽、神经营养因子)、及其他神经病症、癌症(内皮抑素、血管抑素、TRAIL、FAS-配体、细胞因子包括干扰素；RNAi包括针对VEGF或多药抗性基因产物的RNAi、mir-26a[例如用于肝细胞癌])、糖尿病(胰岛素)、肌营养不良包括杜兴(抗肌萎缩蛋白、小抗肌萎缩蛋白、胰岛素样生长因子I、肌聚糖[例如α、β、γ]、针对肌肉生长抑制素的RNAi、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、抗炎多肽例如IκB显性突变体、sarcospan、肌营养相关蛋白、小肌营养相关蛋白、针对抗肌萎缩蛋白基因中的剪接点的反义或RNAi以诱导外显子跳跃[参见例如PCT公开号WO/2003/095647]、针对U7 snRNA的反义以诱导外显子跳跃[参见例如PCT公开号WO/2006/021724]、或针对肌肉生长抑制素或肌肉生长抑制素前肽的抗体或抗体片段)和贝克尔、戈谢病(葡糖脑苷脂酶)、胡尔勒病(α-L-艾杜糖醛酸酶)、腺苷脱氨酶缺乏症(腺苷脱氨酶)、糖原贮积病(例如法布里病[-α半乳糖苷酶]和庞贝氏症[溶酶体酸性α葡糖苷酶])及其他代谢病症、先天性肺气肿(α1-抗胰蛋白酶)、莱-尼二氏(Lesch-Nyhan)综合征(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶)、尼曼-皮克病(鞘磷脂酶)、泰萨克斯病(Tays Sachs disease)(溶酶体氨基己糖苷酶A)、枫糖尿症(支链酮酸脱氢酶)、视网膜变性疾病(以及眼和视网膜的其他疾病；例如PDGF用于黄斑变性和/或vasohibin或其他VEGF抑制剂或其他血管生成抑制剂，以治疗/预防视网膜病症，例如在I型糖尿病中)、实体器官例如脑(包括帕金森氏病[GDNF]、星形细胞瘤[内皮抑素、血管抑素和/或针对VEGF的RNAi]、成胶质细胞瘤[内皮抑素、血管抑素和/或针对VEGF的RNAi])、肝、肾、心脏的疾病包括充血性心力衰竭或外周动脉疾病(PAD)(例如通过递送蛋白磷酸酶抑制剂I(I-1)及其片段(例如I1C)、serca2a、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、Barkct、β2-肾上腺素受体、 β2-肾上腺素受体激酶(BARK)、磷脂酰肌醇-3激酶(PI3激酶)、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bARKct；calsarcin、针对受磷蛋白的RNAi；受磷蛋白抑制或显性失活分子例如受磷蛋白S16E等)、关节炎(胰岛素样生长因子)、关节病症(胰岛素样生长因子1和/或2)、内膜增生(例如通过递送enos、inos)、改善心脏移

植的存活(超氧化物歧化酶)、AIDS(可溶性CD4)、肌萎缩(胰岛素样生长因子I)、肾虚(促红细胞生成素)、贫血(促红细胞生成素)、关节炎(抗炎因子如IRAP和TNFα可溶性受体)、肝炎(α-干扰素)、LDL受体缺乏(LDL受体)、高氨血症(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、克拉伯病(半乳糖脑苷脂酶)、巴滕病、脊髓小脑性共济失调包括SCA1、SCA2和SCA3、苯丙酮尿症(苯丙氨酸羟化酶)、自身免疫疾病等。本发明可以进一步在器官移植后使用,以增加移植的成功和/或降低器官移植或辅助疗法的不良副作用(例如通过施用免疫抑制剂或抑制核酸以阻断细胞因子生产)。作为另一个实例,例如在骨折后或在癌症患者中的手术摘除后,骨形态发生蛋白(包括BNP 2、7等,RANKL和/或VEGF)可以与骨异体移植物一起施用。

[0132] 本发明还可以用于生产诱导的多能干细胞(iPS)。例如,本发明的病毒载体可以用于将干细胞相关核酸递送到非多能细胞内,例如成年成纤维细胞、皮肤细胞、肝细胞、肾细胞、脂肪细胞、心肌细胞、神经细胞、上皮细胞、内皮细胞等。编码与干细胞相关的因子的核酸是本领域已知的。与干细胞和多能性相关的此类因子的非限制性实例包括Oct-3/4、SOX家族(例如SOX1、SOX2、SOX3和/或SOX15)、Klf家族(例如Klf1、Klf2、Klf4和/或Klf5)、Myc家族(例如C-myc、L-myc和/或N-myc)、NANOG和/或LIN28。

[0133] 本发明还可以进行实践,以治疗和/或预防代谢病症例如糖尿病(例如胰岛素)、血友病(例如因子IX或因子VIII)、溶酶体贮积症例如粘多糖贮积症(例如斯莱综合征[β-葡糖醛酸苷酶]、胡尔勒综合征[α-L-艾杜糖醛酸酶]、沙伊综合征[α-L-艾杜糖醛酸酶]、胡-射二氏(Hurler-Scheie)综合征[α-L-艾杜糖醛酸酶]、亨特氏综合征[艾杜糖醛酸硫酸酯酶]、圣菲利波综合征A[肝素磺酰胺酶]、B [N-乙酰氨基葡糖苷酶]、C [乙酰-CoA:α-氨基葡糖苷乙酰基转移酶]、D [N-乙酰氨基葡糖-6-硫酸酯酶]、莫尔基奥氏综合征A[半乳糖-6-硫酸盐硫酸酯酶]、B [β-半乳糖苷酶]、马-兰二氏(Maroteaux-Lamy)综合征[N-乙酰氨基半乳糖-4-硫酸酯酶]等)、法布里病(α-半乳糖苷酶)、戈谢病(葡糖脑苷脂酶)、或糖原贮积症(例如庞贝氏症;溶酶体酸性α-葡糖苷酶)。

[0134] 基因转移具有用于理解且提供疾病状态疗法的基本潜在用途。存在其中缺陷基因是已知的且已得到克隆的许多遗传性疾病。一般而言,上述疾病状态落入两个类别内:通常为酶的缺乏状态,其一般以隐性遗传方式遗传,和不平衡状态,其可以涉及调节或结构蛋白质,并且通常以显性方式遗传。对于缺乏状态疾病,基因转移可以用于将正常基因带入受累组织内用于替代疗法,以及使用反义突变产生疾病的动物模型。对于不平衡疾病状态,基因转移可以用于产生在模型系统中的疾病状态,其随后可以用于对抗疾病状态的努力中。因此,根据本发明的病毒载体允许遗传疾病的治疗和/或预防。

[0135] 根据本发明的病毒载体还可以用于在体外或在体内将功能RNA提供给细胞。功能RNA在细胞中的表达例如可以缩小特定靶蛋白通过细胞的表达。相应地,可以施用功能RNA,以减少特定蛋白质在有此需要的主体中的表达。功能RNA还可以在体外施用于细胞,以调节基因表达和/或细胞生理学,例如以优化细胞或组织培养系统或筛选方法。

[0136] 另外,根据本发明的病毒载体在诊断和筛选方法中有用,由此目的核酸在细胞培养系统中或可替代的转基因动物模型中瞬时或稳定表达。

[0137] 本发明的病毒载体还可以用于各种非治疗目的,包括但不限于在评价基因靶向、清除、转录、翻译等的方案中使用,如对于本领域技术人员显而易见的。病毒载体还可以用于评估安全(传播、毒性、免疫原性等)的目的。此类数据例如由美国食品和药物管理局

(United States Food and Drug Administration)视为在临床功效评估前的监管审批过程的部分。

[0138] 作为进一步方面,本发明的病毒载体可以用于在主体中产生免疫应答。根据该实施方案,包含编码免疫原性多肽的异源核酸序列的病毒载体可以施用于主体,或活性免疫应答通过主体针对免疫原性多肽产生。免疫原性多肽如上文描述。在一些实施方案中,引发保护性免疫应答。

[0139] 可替代地,病毒载体可以先体外后体内施用于细胞,并且将改变的细胞施用于主体。将包含异源核酸的病毒载体引入细胞内,并且将细胞施用于主体,编码免疫原的异源核酸可以在其中表达且在主体中诱导针对免疫原的免疫应答。在特定实施方案中,细胞是抗原呈递细胞(例如树突细胞)。

[0140] "主动免疫应答"或"主动免疫"的特征在于"在遇到免疫原后宿主组织和细胞的参与。它涉及免疫活性细胞在淋巴网状组织中的分化和增殖,其导致抗体合成或细胞介导反应性的发展,或两者"。Herbert B. Herscowitz,*Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation,in* IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117(Joseph A. Bellanti编辑1985)。或者说,在通过感染或疫苗接种暴露于免疫原后,通过宿主产生主动免疫应答。主动免疫可以与被动免疫相比较,所述被动免疫通过"预先形成的物质(抗体、转移因子、胸腺移植物、白细胞介素-2)从主动免疫的宿主转移到非免疫宿主"获得。同上。

[0141] 如本文使用的,"保护性"免疫应答或"保护性"免疫指示免疫应答对主体赋予一定利益,因为它预防或降低疾病的发生率。可替代地,保护性免疫应答或保护性免疫可以用于治疗和/或预防疾病,特别是癌症或肿瘤(例如通过预防癌症或肿瘤形成,通过引起癌症或肿瘤消退,和/或通过预防转移和/或通过预防转移结节的生长)。保护效应可以是完全或部分的,只要治疗的利益超过其任何缺点。

[0142] 在特定实施方案中,包含异源核酸的病毒载体或细胞可以以免疫原性有效量施用,如本文描述的。

[0143] 通过施用表达一种或多种癌细胞抗原(或免疫相似分子),或产生针对癌细胞的免疫应答的任何其他免疫原的病毒载体,还可以施用本发明的病毒载体用于癌症免疫疗法。为了举例说明,通过施用包含编码癌细胞抗原的异源核酸的病毒载体,可以在主体中产生针对癌细胞抗原的免疫应答,例如以治疗患有癌症的患者和/或预防癌症在主体中的发展。病毒载体可以在体内或通过使用先体外后体内方法施用于主体,如本文描述的。可替代地,癌抗原可以作为病毒衣壳的部分表达,或以其他方式与病毒衣壳结合(例如如上所述)。

[0144] 作为另一个替代方案,可以施用本领域已知的任何其他治疗核酸(例如RNAi)或多肽(例如细胞因子),以治疗和/或预防癌症。

[0145] 如本文使用的,术语"癌症"涵盖肿瘤形成癌症。同样地,术语"癌组织"涵盖肿瘤。"癌细胞抗原"涵盖肿瘤抗原。

[0146] 术语"癌症"具有其在本领域中理解的含义,例如不受控制的组织生长,其具有传播到机体的遥远部位(即转移)的潜力。示例性癌症包括但不限于黑素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、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、脑癌和目前已知或以后鉴定

的任何其他癌症或恶性状况。在代表性实施方案中，本发明提供了治疗和/或预防肿瘤形成癌症的方法。

[0147] 术语“肿瘤”还在本领域中例如理解为在多细胞生物内的未分化细胞的异常团块。肿瘤可以是恶性的或良性的。在代表性实施方案中，本文公开的方法用于预防和治疗恶性肿瘤。

[0148] 术语“治疗癌症”、“癌症的治疗”和等价术语预期癌症的严重性得到降低或至少部分消除，和/或疾病的进展减慢和/或得到控制和/或疾病得到稳定。在特定实施方案中，这些术语指示癌症的转移得到预防或降低或至少部分消除，和/或转移结节的生长得到预防或降低或至少部分消除。

[0149] 术语“癌症的预防”或“预防癌症”和等价术语预期该方法至少部分消除或降低和/或延迟癌症的发生率和/或癌症发作的严重性。或者说，主体中的癌症发作可以在可能性或概率中得到降低和/或延迟。

[0150] 在特定实施方案中，细胞可以从患有癌症的主体中取出，并且与根据本发明的表达癌细胞抗原的病毒载体接触。随后将经修饰的细胞施用于主体，由此引发针对癌细胞抗原的免疫应答。该方法可以有利地对免疫妥协的主体使用，所述免疫妥协的主体不能在体内产生足够的免疫应答(即，不能产生足够数量的增强抗体)。

[0151] 本领域已知免疫应答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-1α、白细胞介素-1β、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毒素)得到增强。相应地，免疫调节细胞因子(优选地CTL诱导细胞因子)可以与病毒载体结合施用于主体。

[0152] 细胞因子可以通过本领域已知的任何方法进行施用。外源细胞因子可以施用于主体，或可替代地，编码细胞因子的核酸可以使用合适载体递送至主体，并且在体内产生细胞因子。

[0153] 主体、药物制剂和施用方法

[0154] 根据本发明的病毒载体和衣壳在兽医学和医学应用两者中有用。合适的主体包括禽类和哺乳动物两者。如本文使用的，术语“禽类”包括但不限于鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡、雉鸡、鹦鹉、长尾鹦鹉等。如本文使用的，术语“哺乳动物”包括但不限于人、非人灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、猫、犬、兔类动物等。人主体包括新生儿、婴幼儿、青少年、成人和老年主体。

[0155] 在代表性实施方案中，主体“需要”本发明的方法，并且因此在一些实施方案中，可以是“有此需要的主体”。

[0156] 在特定实施方案中，本发明提供了药物组合物，其包含在药学上可接受的载体中的本发明的病毒载体和/或衣壳，以及任选的其他医学试剂、药物试剂、稳定剂、缓冲剂、载体、佐剂、稀释剂等。对于注射，载体通常为液体。对于其他施用方法，载体可以是固体或液体。对于吸入施用，载体将是呼吸性的，并且任选可以采取固体或液体微粒形式。

[0157] “药学上可接受的”意指无毒或在其他方面不期望的材料，即材料可以施用于主

体，而不引起任何不期望的生物效应。

[0158] 本发明的一个方面是在体外将核酸转移至细胞的方法。根据适合于特定靶细胞的标准转导方法，病毒载体可以以适当的感染复数引入细胞内。取决于靶细胞类型和数目，以及特定的病毒载体，待施用的病毒载体滴度可以改变，并且可以由本领域技术人员无需过度实验而决定。在代表性实施方案中，将至少约10^3感染单位、任选至少约10^5感染单位引入细胞。

[0159] 病毒载体引入其内的细胞可以具有任何类型，包括但不限于神经细胞（包括外周和中枢神经系统的细胞，特别是脑细胞例如神经元和少突胶质细胞）、肺细胞、眼细胞（包括视网膜细胞、视网膜色素上皮和角膜细胞）、上皮细胞（例如肠道和呼吸道上皮细胞）、肌细胞（例如骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和/或膈肌细胞）、树突细胞、胰腺细胞（包括胰岛细胞）、肝细胞、心肌细胞、骨细胞（例如骨髓干细胞）、造血干细胞、脾细胞、角化细胞、成纤维细胞、内皮细胞、前列腺细胞、生殖细胞等。在代表性实施方案中，细胞可以是任何祖细胞。作为进一步实施方案，细胞可以是干细胞（例如神经干细胞、肝干细胞）。作为再进一步的实施方案，细胞可以是癌症或肿瘤细胞。此外，细胞可以来自任何起源的物种，如上所述。

[0160] 病毒载体可以在体外引入细胞内，用于将经修饰的细胞施用于主体的目的。在特定实施方案中，细胞已从主体中取出，并且将病毒载体引入其内，并且随后将细胞施用回主体。从主体中取出细胞用于先体外后体内操作，随后引入回主体内的方法是本领域已知的（参见例如美国专利号5,399,346）。可替代地，重组病毒载体可以引入来自供体主体的细胞、培养的细胞或来自其他合适来源的细胞内，并且将细胞施用于有此需要的主体（即，“接受者”主体）。

[0161] 用于先体外后体内核酸递送的合适细胞如上所述。待施用于主体的细胞剂量根据主体的年龄、状况和物种，细胞类型，由细胞表达的核酸，施用模式等而改变。通常，施用在药学上可接受的载体中的至少约10^2至约10^8细胞或至少约10^3至约10^6细胞/剂量。在特定实施方案中，用病毒载体转导的细胞以治疗有效或预防有效量与药学载体组合施用于主体。

[0162] 在一些实施方案中，将病毒载体引入细胞内，并且将细胞施用于主体，以引发针对所递送多肽（例如作为转基因表达或在衣壳中）的免疫应答。通常，施用表达与药学上可接受的载体组合的免疫原性有效量的多肽的细胞数量。“免疫有效量”是所表达多肽的量，其足以在药物制剂施用于其的主体中诱发针对多肽的主动免疫应答。在特定实施方案中，剂量足以产生保护性免疫应答（例如上文定义的）。赋予的保护程度无需是完全或永久的，只要施用免疫原性多肽的利益超过其任何缺点。

[0163] 本发明的进一步方面是将病毒载体和/或病毒衣壳施用于主体的方法。根据本发明的病毒载体和/或衣壳施用于有此需要的人主体或动物可以通过本领域已知的任何手段。任选地，病毒载体和/或衣壳以在药学上可接受的载体中的治疗有效或预防有效剂量递送。

[0164] 可以进一步施用本发明的病毒载体和/或衣壳，以引发免疫应答（例如作为疫苗）。通常，本发明的免疫原性组合物包含与药学上可接受的载体组合的免疫原性有效量的病毒载体和/或衣壳。任选地，剂量足以产生保护性免疫应答（例如上文定义的）。

[0165] 待施用于主体的病毒载体和/或衣壳的剂量取决于施用模式、待治疗和/或预防的疾病或状况、各个主体的状况、特定病毒载体或衣壳、待递送的核酸等，并且可以以常规方

式测定。用于实现疗效的示例性剂量是至少约10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^3、10^{14}、10^{15}转导单位，任选约10^8 - 10^{13}转导单位的滴度。

[0166] 在特定实施方案中，多于一次施用(例如两次、三次、四次或更多次施用)可以用于实现在各种间隔的时期上的所需基因表达水平，例如每天一次、每周一次、每月一次、每年一次等。

[0167] 示例性施用模式包括口服、直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如经由气溶胶)、经颊(例如舌下)、阴道、鞘内、眼内、经皮、在子宫内(或在卵内)、肠胃外(例如静脉内、皮下、皮内、肌内[包括施用于骨骼肌、膈肌和/或心肌]、皮内、胸膜内、脑内和关节内)、局部(例如对皮肤和粘膜表面两者，包括气道表面和经皮施用)、淋巴管内等，以及直接的组织或器官注射(例如对肝、骨骼肌、心肌、膈肌或脑)。施用还可以针对肿瘤(例如在肿瘤或淋巴结中或者接近肿瘤或淋巴结)。在任何给定情况下的最合适途径取决于待治疗和/或预防状况的性质和严重性，以及使用的特定载体的性质。

[0168] 根据本发明对骨骼肌的施用包括但不限于对肢体(例如上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背部、颈部、头部(例如舌)、胸部、腹部、骨盆/会阴、和/或手指中的骨骼肌的施用。合适的骨骼肌包括但不限于小指展肌(在手中)、小趾展肌(在足中)、拇展肌、外展小趾肌、拇短展肌、拇长展肌、短收肌、拇收肌、长收肌、大收肌、拇内收肌、肘肌、前斜角肌、膝关节肌、肱二头肌、股二头肌、肱肌、肱桡肌、颊肌、喙肱肌、皱眉肌、三角肌、降口角肌、降下唇肌、二腹肌、背侧骨间肌(在手中)、背侧骨间肌(在足中)、桡侧腕短伸肌、桡侧腕长伸肌、尺侧腕伸肌、小指伸肌、指伸肌、趾短伸肌、趾长伸肌、短伸肌、长伸肌、食指伸肌、拇短伸肌、拇长伸肌、桡侧腕屈肌、尺侧腕屈肌、小指短屈肌(在手中)、小趾短屈肌(在足中)、趾短屈肌、趾长屈肌、指深屈肌、指浅屈肌、短屈肌、长屈肌、拇短屈肌、拇长屈肌、额肌、腓肠肌、颏舌骨肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、股薄肌、颈髂肋肌、腰髂肋肌、胸髂肋肌、髂肌、下孖肌、下斜肌、下直肌、冈下肌、棘突间肌、横突间肌、翼外肌、外直肌、背阔肌、提口角肌、提上唇肌、提上唇鼻翼肌、提上睑肌、肩胛提肌、长回旋肌、头最长肌、颈最长肌、胸最长肌、头长肌、颈长肌、蚓状肌(在手中)、蚓状肌(在足中)、咬肌、翼内肌、内直肌、中斜角肌、多裂肌、下颌舌骨肌、头下斜肌、头上斜肌、闭孔外肌、闭孔内肌、枕肌、肩胛舌骨肌、小指对掌肌、拇对掌肌、眼轮匝肌、口轮匝肌、骨间掌侧肌、掌短肌、掌长肌、耻骨肌、胸大肌、胸小肌、腓骨短肌、腓骨长肌、第三腓骨肌、梨状肌、骨间足底肌、跖肌、颈阔肌、腘肌、后斜角肌、旋前方肌、旋前圆肌、腰大肌、股方肌、跖方肌、头前直肌、头外侧直肌、头后大直肌、头后小直肌、股直肌、大菱形肌、小菱形肌、笑肌、缝匠肌、小斜角肌、半膜肌、头半棘肌、颈半棘肌、胸半棘肌、半腱肌、前锯肌、短回旋肌、比目鱼肌、头棘肌、颈棘肌、胸棘肌、头夹肌、颈夹肌、胸锁乳突肌、胸骨舌骨肌、胸骨甲状肌、茎突舌骨肌、锁骨下肌、肩胛下肌、上孖肌、上斜肌、上直肌、旋后肌、冈上肌、颞肌、阔筋膜张肌、大圆肌、小圆肌、胸肌(thoracis)、甲状舌骨肌、胫骨前肌、胫骨后肌、斜方肌、肱三头肌、股中间肌、股外侧肌、股内侧肌、颧大肌和颧小肌，以及如本领域已知的任何其他合适的骨骼肌。

[0169] 病毒载体和/或衣壳可以通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌注(任选地，腿和/或臂的隔离肢体灌注；参见例如Arruda等人(2005)*Blood* 105:3458-3464)、和/或直接肌内注射而递送至骨骼肌。在特定实施方案中，病毒载体和/或衣壳通过肢体灌注，任选隔离肢体灌注(例如通过静脉内或动脉内施用)施用于主体(例如患有肌营养不良例如

DMD的主体)的肢体(臂和/或腿)。在本发明的实施方案中,本发明的病毒载体和/或衣壳可以无需采用“水动力”技术而有利地施用。载体的组织递送(例如对肌肉)通常通过水动力技术(例如以大体积的静脉内/静脉内施用)得到增强,所述水动力技术增加脉管系统中的压力,并且促进载体跨越内皮细胞屏障的能力。在特定实施方案中,本发明的病毒载体和/或衣壳可以在不存在水动力技术的情况下施用,例如高体积输注和/或升高的血管内压(例如大于正常收缩压,例如在血管内压中相对于正常收缩压的小于或等于5%、10%、15%、20%、25%增加)。此类方法可以降低或避免与水动力技术相关的副作用,例如水肿、神经损害和/或筋膜室综合征。

[0170] 对心肌的施用包括对左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜的施用。病毒载体和/或衣壳可以通过静脉内施用、动脉内施用例如主动脉内施用、直接心脏注射(例如进入左心房、右心房、左心室、右心室内)、和/或冠状动脉灌注而递送至心肌。

[0171] 对膈肌的施用可以通过任何合适的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。

[0172] 对靶组织的递送还可以通过递送包含病毒载体和/或衣壳的储库来实现。在代表性实施方案中,将包含病毒载体和/或衣壳的储库植入骨骼肌、心肌和/或膈肌组织内,或组织可以与包含病毒载体和/或衣壳的薄膜或其他基质接触。此类可植入基质或基底例如在美国专利号7,201,898中描述。

[0173] 在特定实施方案中,根据本发明的病毒载体和/或病毒衣壳施用于骨骼肌、膈肌和/或心肌(例如以治疗和/或预防肌营养不良、心脏病[例如PAD或充血性心力衰竭])。

[0174] 在代表性实施方案中,本发明用于治疗和/或预防骨骼肌、心肌和/或膈肌的病症。

[0175] 在代表性实施方案中,本发明提供了治疗和/或预防有此需要的主体中的肌营养不良的方法,该方法包括:给哺乳动物主体施用治疗或预防有效量的本发明的病毒载体,其中所述病毒载体包含编码下述的异源核酸:抗肌萎缩蛋白、小抗肌萎缩蛋白、微小抗肌萎缩蛋白、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、激活素II型可溶性受体、IGF-1、抗炎多肽如IκB显性突变体、sarcospan、肌营养相关蛋白、微小肌营养不良蛋白、层粘连蛋白α2、α-肌聚糖、β-肌聚糖、γ-肌聚糖、δ-肌聚糖、IGF-1、针对肌肉生长抑制素或肌肉生长抑制素前肽的抗体或抗体片段、和/或针对肌抑制素的RNAi。在特定实施方案中,病毒载体可以施用于骨骼肌、膈肌和/或心肌,如本文其他地方描述的。

[0176] 可替代地,本发明可以进行实践,以将核酸递送至骨骼肌、心肌或膈肌,其用作多肽(例如酶)或功能RNA(例如RNAi、微小RNA、反义RNA)的生产平台,所述多肽或功能RNA通常在血液中循环或用于全身递送至其他组织,以治疗和/或预防病症(例如代谢病症,例如糖尿病[例如胰岛素]、血友病[例如因子IX或因子VIII]、粘多糖症[例如斯莱综合征,胡尔勒综合征,沙伊综合征,胡-射二氏综合征,亨特氏综合征,圣菲利波综合征A、B、C、D,莫尔基奥氏综合征,马-兰二氏综合征等]或溶酶体贮积症,例如戈谢病[葡糖脑苷脂酶]或法布里病[α-半乳糖苷酶A]或糖原贮积症,例如庞贝氏症[溶酶体酸性α葡糖苷酶])。用于治疗和/或预防代谢病症的其他合适蛋白质在本文中描述。肌肉用作表达目的核酸的平台的用途在美国专利公开号20020192189中描述。

[0177] 因此,作为一个方面,本发明进一步涵盖治疗和/或预防有此需要的主体中的代谢病症的方法,该方法包括:给主体的骨骼肌施用治疗或预防有效量的本发明的病毒载体,其

中所述病毒载体包含编码多肽的异源核酸，其中所述代谢病症是多肽中的缺乏和/或缺陷的结果。举例说明性代谢病症和编码多肽的异源核酸在本文中描述。任选地，多肽是分泌的(例如作为以其天然状态的分泌多肽，或例如通过与如本领域已知的分泌信号序列可操作地结合已改造为被分泌的多肽)。不受本发明的任何具体理论束缚，根据该实施方案，对骨骼肌的施用可以导致多肽分泌到大循环内，并且递送至靶组织。将病毒载体递送至骨骼肌的方法在本文中更详细地描述。

[0178] 本发明还可以进行实践，以产生反义RNA、RNAi或其他功能RNA(例如核酶)用于全身递送。

[0179] 本发明还提供了治疗和/或预防有此需要的主体中的先天性心力衰竭或PAD的方法，该方法包括给哺乳动物主体施用治疗或预防有效量的本发明的病毒载体，其中所述病毒载体包含编码例如下述的异源核酸：肌浆内质网(sarcoplasmic endoreticulum)Ca^{2+}-ATP酶(SERCA2a)、血管生成因子、磷酸酶抑制剂I(I-1)及其片段(例如I1C)、针对受磷蛋白的RNAi；受磷蛋白抑制或显性失活分子例如受磷蛋白S16E、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、β2-肾上腺素受体、β2-肾上腺素受体激酶(BARK)、PI3激酶、calsarcan、β-肾上腺素受体激酶抑制剂(βARKct)、蛋白磷酸酶1的抑制剂1及其片段(例如I1C)、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bARKct、Pim-1、PGC-1α、SOD-1、SOD-2、EC-SOD、激肽释放酶、HIF、胸腺肽-β4、mir-1、mir-133、mir-206、mir-208和/或miR-26a。

[0180] 注射剂可以以常规形式制备为液体溶液或悬浮液，适合于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式，或制备为乳状液。可替代地，可以以局部方式而不是全身方式，例如在储库或持续释放制剂中，施用本发明的病毒载体和/或病毒衣壳。进一步地，病毒载体和/或病毒衣壳可以附着至可手术植入的基质进行递送(例如如美国专利公开号20040013645中描述的)。

[0181] 本文公开的病毒载体和/或病毒衣壳可以通过任何合适手段施用于主体的肺，任选通过施用主体吸入的呼吸性颗粒的气溶胶悬浮液，所述呼吸性颗粒包含病毒载体和/或病毒衣壳。呼吸性颗粒可以是液体或固体。包含病毒载体和/或病毒衣壳的液体颗粒的气溶胶可以通过任何合适手段产生，例如使用压力驱动的气溶胶雾化器或超声波雾化器，如本领域技术人员已知的。参见例如美国专利号4,501,729。同样地可以通过药学领域已知的技术，用任何固体微粒药剂气溶胶发生器，来产生包含病毒载体和/或衣壳的固体颗粒的气溶胶。

[0182] 病毒载体和病毒衣壳可以施用于中枢神经系统(CNS)的组织(例如脑、眼)，并且可以有利地导致比在不存在本发明的情况下观察到的更广泛的病毒载体或衣壳分布。

[0183] 在特定实施方案中，本发明的递送载体可以施用以治疗CNS的疾病，包括遗传病症、神经变性病症、精神障碍和肿瘤。举例说明性CNS疾病包括但不限于阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、卡纳万病、利氏病、雷弗素姆病、图雷特综合征、原发性侧索硬化、肌萎缩侧索硬化、进行性肌萎缩、皮克氏病、肌营养不良、多发性硬化、重症肌无力、宾斯万格病、由于脊髓或头部损伤的外伤、泰萨克斯病、莱-尼二氏病、癫痫症、脑梗塞、精神障碍包括情绪障碍(例如抑郁症、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情感障碍)、精神分裂症、药物依赖(例如酗酒及其他物质依赖)、神经症(例如焦虑、强迫症、躯体形式障碍、分离性障

碍、悲伤、产后抑郁症)、精神病(例如幻觉和妄想)、痴呆、偏执狂、注意力缺陷障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食障碍或体重病症(例如肥胖、恶病质、神经性厌食症、和诱吐症(bulemia))以及癌症和CNS肿瘤(例如垂体瘤)。

[0184] CNS病症包括涉及视网膜、后束和视神经的眼病症(例如色素性视网膜炎、糖尿病视网膜病变及其他视网膜变性疾病、葡萄膜炎、年龄相关性黄斑变性、青光眼)。

[0185] 大多数(如果并非全部)眼疾病和病症与三类适应症中的一类或多类相关:(1)血管生成、(2)炎症和(3)变性。本发明的递送载体可以用于递送抗血管生成因子;抗炎因子;延缓细胞变性,促进细胞保留,或促进细胞生长和上述的组合的因子。

[0186] 例如,糖尿病视网膜病变的特征在于血管生成。糖尿病视网膜病变可以通过眼内(例如在玻璃体中)或眼周(例如在筋膜下区中)递送一种或多种抗血管生成因子进行治疗。一种或多种神经营养因子还可以眼内(例如玻璃体内)或眼周共递送。

[0187] 葡萄膜炎涉及炎症。一种或多种抗炎因子可以通过眼内(例如玻璃体或眼前房)施用本发明的递送载体进行施用。

[0188] 相比之下,色素性视网膜炎的特征在于视网膜变性。在代表性实施方案中,色素性视网膜炎可以通过编码一种或多种神经营养因子的递送载体的眼内施用(例如玻璃体施用)进行治疗。

[0189] 年龄相关性黄斑变性涉及血管生成和视网膜变性两者。该病症可以通过眼内(例如玻璃体)施用编码一种或多种神经营养因子的本发明的递送载体,和/或眼内或眼周(例如在筋膜下区中)施用编码一种或多种抗血管生成因子的本发明的递送载体进行治疗。

[0190] 青光眼的特征在于增加的眼内压和视网膜神经节细胞的丧失。青光眼的治疗包括使用本发明的递送载体施用一种或多种神经保护剂,其保护细胞免于兴奋性毒素损害。此类试剂包括眼内任选玻璃体内递送的N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂、细胞因子和神经营养因子。

[0191] 在其他实施方案中,本发明可以用于治疗癫痫发作,例如以降低癫痫发作的发病、发病率和/或严重性。癫痫发作的治疗性处理的功效可以通过行为(例如摇晃、眼睛或口轻拍(ticks))和/或电子照相手段(大多数癫痫发作具有特色脑电图异常)进行评价。因此,本发明还可以用于治疗癫痫症,其通过随着时间过去的多重癫痫发作进行标记。

[0192] 在一个代表性实施方案中,生长抑素(或其活性片段)使用本发明的递送载体施用于脑,以治疗垂体瘤。根据该实施方案,编码生长抑素(或其活性片段)的递送载体通过显微输注施用到垂体内。同样地,此类治疗可以用于治疗肢端肥大症(来自垂体的异常生长激素分泌)。生长抑素的核酸序列(例如GenBank登录号J00306)和氨基酸序列(例如GenBank登录号P01166;含有经加工的活性肽生长抑素-28和生长抑素-14)是本领域已知的。

[0193] 在特定实施方案中,载体可以包含如例如美国专利号7,071,172中所述的分泌信号。

[0194] 在本发明的代表性实施方案中,将病毒载体和/或病毒衣壳施用于CNS(例如脑或眼)。病毒载体和/或衣壳可以引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、脑垂体、黑质、松果体)、小脑、端脑(纹状体,大脑包括枕叶、颞叶、顶叶和额叶,皮层,基底神经节,海马和杏仁核(portaamygdala))、边缘系统、新皮层、纹状体、大脑和/或下丘。病毒载体和/或衣壳还可以施用于不同眼区,例如视网膜、角膜和/或视神经。

[0195] 病毒载体和/或衣壳可以递送到脑脊髓液内(例如通过腰椎穿刺术)用于递送载体的更分散施用。在其中血脑屏障已被扰乱(例如脑瘤或脑梗塞)的情况下,病毒载体和/或衣壳可以进一步血管内施用于CNS。

[0196] 病毒载体和/或衣壳可以通过本领域已知的任何途径施用于所需CNS区,包括但不限于鞘内、脑内、心室内、静脉内(例如在糖如甘露醇的存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如玻璃体内、视网膜下、眼前房)和眼周(例如筋膜下区(sub-Tenon's region))递送以及肌内递送与逆行递送至运动神经元。

[0197] 在特定实施方案中,病毒载体和/或衣壳通过直接注射(例如立体定向注射)在液体制剂中施用于所需CNS区或区室。在其他实施方案中,病毒载体和/或衣壳可以通过局部应用提供给所需区,或通过气溶胶制剂的鼻内施用提供。对眼的施用可以通过液体小滴的局部应用。作为进一步的替代方案,病毒载体和/或衣壳可以作为固体、缓慢释放制剂进行施用(参见例如美国专利号7,201,898)。

[0198] 在再另外的实施方案中,病毒载体可以用于逆向转运,以治疗和/或预防涉及运动神经元的疾病和病症(例如肌萎缩侧索硬化(ALS);脊髓性肌萎缩(SMA)等)。例如,病毒载体可以递送至肌肉组织,它可以从其中迁移到神经元内。

[0199] 本发明已得到描述,同样在下述实施例中更详细地加以说明,所述实施例包括在本文中仅用于举例说明性目的,并且不预期是本发明的限制。

[0200] 实施例:双重聚糖结合AAV的改造

[0201] 结构建模。AAV2和AAV9衣壳蛋白(VP)晶体结构的坐标得自RCSB蛋白质数据库(Protein Databank)(分别为PDB登录# 1LP3和3UX1)[30,31]。使用SWISS-MODEL蛋白质结构建模服务器(http://swissmodel.expasy.org/)[32],用AAV2 VP3的晶体结构作为模板生成2G9 VP3单体的同源性模型。使用VIPERdb-Virus Particle ExploreR2[33]中的Oligomer Generator实用程序产生完整的2G9衣壳的三维二十面体模型。类似地,使用Oligomer Generator实用程序产生AAV2 VP3三聚体、2G9三聚体和AAV9三聚体的举例说明。所有结构模型均使用PyMOL显现,其中形成半乳糖结合位点(AAV9 VP1编号: D271、N272、Y446、N470、A472、V473、W503)[13]和硫酸类肝素结合位点(AAV2 VP1编号: R487、K527、K532、R585、R588)的残基[10-12,34]分别以橙色和紫色突出显示。不同单体以淡绿色、浅蓝色和浅粉色着色。

[0202] 双重聚糖结合AAV毒株的生成。辅助质粒pXR1、2、6、8和9得自UNC载体核心。通过将AAV9衣壳蛋白亚基上直接涉及或侧接Gal识别位点的氨基酸残基取代到AAV2的衣壳亚基上的相应残基(AAV2 VP1编号: A266S、Q464V、A467P、D469N、I470M、R471A、D472V、S474G、Y500F、S501A)上,生成原型pXR2G9嵌合质粒构建体。使用下述引物(IDT),使用QuikChange® Lightning定点诱变试剂盒(Agilent)生成取代:5'- GGAACCACCA CGCAGTCAAG GCTTCAGTTT TCTGTGGCCG GACCCAGTAA CATGGCTGTC CAGGGAAGGA ACTGGCTTCCT GGACCCTGTT ACCGC-3'和5'- GACATCTGCG GATAACAACA ACAGTGAATTT GCTTGGACTG GAGCTACCAA GTACCACCT-3'。包装CBA-Luc转基因盒的重组AAV载体如先前描述的生成[14]。病毒滴度通过定量PCR获得。

[0203] 体外结合、转导和竞争抑制测定。CHO Lec2细胞在αMEM(Thermo Scientific)中进行培养,所述αMEM补充有10%胎牛血清(FBS)、100 U/ml青霉素(Cellgro)、100 μg/ml链霉素(Cellgro)和2.5 μg/ml两性霉素B(Sigma)。细胞以1x10^{5}细胞/孔的密度种植到24孔板中。

对于竞争抑制测定，细胞在4℃下预冷30分钟，并且与100 μg/ml FITC-标记的鸡冠刺桐(*Erythrina Cristagalli*)凝集素(FITC-ECL，Vector Labs)一起在αMEM中在4℃下温育1小时。可替代地，不同的病毒衣壳与100μg/ml可溶性肝素(Sigma)或1xPBS(对照)一起在室温下温育1小时。随后用HS结合或模拟处理的AAV2、AAV2G9或AAV9衣壳(其包装CBA-Luc转基因盒)，以1000个载体基因组(vg)拷贝/细胞的MOI，感染模拟处理或FITC-ECL处理的细胞。在冷室中温育1小时后，通过用冰冷的1xPBS的三次洗涤去除未结合的病毒粒子。对于细胞表面结合测定，通过使用定量PCR定量每个孔中的载体基因组拷贝数/细胞，来测量结合的病毒粒子数目。对于转导测定，将受感染的Lec2细胞移动至37℃，并且在定量来自细胞裂解产物的萤光素酶转基因表达之前温育24小时。

[0204] 对于用亲本AAV2或AAV9衣壳的竞争抑制，利用包装CBA启动子驱动的tdTomato转基因盒的载体。简言之，将Lec2细胞以$1x10^5$细胞/孔的密度种植到24孔板中过夜。在4℃下预冷30分钟后，使Lec2细胞与AAV2-tdTomato或AAV9-tdTomato载体在4℃下预温育另外30分钟，其感染复数(MOI)范围为500 - 100,000 vg/细胞。细胞随后用AAV2G9-CBA-Luc以1000 vg/细胞的MOI在4℃下重叠感染45分钟，随后使用冰冷的PBS去除未结合的病毒粒子。随后在萤光素酶表达分析之前，使受感染的细胞在37℃下温育24小时。对照包括AAV2-CBA-Luc或AAV9-CBA-Luc载体。

[0205] 在体内的转基因表达的动力学。雌性BALB/c小鼠(6-8周龄)购自Jackson Laboratories，并且在UNC Chapel Hill使用IACUC批准的方案，依照NIH指导进行处理。将包装CBA-Luc盒的不同AAV载体以$1x10^{11}$ vg/小鼠的剂量静脉内注射到尾静脉内。在施用后的所示时间间隔时(3、7和18天)，小鼠用萤光素(120mg/kg;Nanolight)进行腹膜内注射，并且使用Xenogen IVIS® Lumina系统(Caliper Lifesciences)获得生物发光图像。使用WAVEMETRICS®软件，进行来自肝和整个动物图像的光输出的定量。在不同的两组小鼠中进行在不同组织中的萤光素酶转基因表达和载体基因组生物分布的进一步定量，所述不同的两组小鼠在载体施用后第3和18天时处死。如较早描述的，在不同组织裂解产物中监控萤光素酶转基因表达。通过使用DNeasy® Kit(Qiagen)，首先从组织裂解产物中提取基因组DNA，来测定载体基因组生物分布。使用qPCR测定萤光素酶转基因拷贝数，并且针对小鼠核纤层蛋白基因的拷贝数标准化，以测定每种组织中的vg/细胞。特异性引物组分别为5'-AGGGCACCTC CATCTCGGAA AC-3' / 5'-GGACCCAAGG ACTACCTCAA GGG-3'(用于小鼠核纤层蛋白)和5'-AAAAGCACTC TGATTGACAA ATAC-3'/ 5'-CCTTCGCTTC AAAAAATGGA AC-3'(用于CBA-Luc)。

[0206] 统计分析。所有数据均表示为平均值±平均值标准误，并且每次实验的重复数目在相应的图例中提供。使用不成对单向斯氏*t*检验测定统计学显著性，并且对于不同实验，小于0.05的p值视为统计学显著的，除非另有说明。

[0207] 结果

[0208] 为了探究AAV9的Gal足迹"移植"到几种AAV毒株内的可行性，我们首先在与AAV9的那种的比对中，比较AAV血清型1、2、6和8的VP3亚基三聚体的三维结构(图1)。通过多轮定点诱变修饰在模板衣壳上的氨基酸残基，其与直接涉及结合或紧侧接Gal受体足迹的相应AAV9 VP3残基重叠。使用先前确定的方案[14]，生成的所有嵌合AAV毒株均制备为重组载体，其包装鸡β-肌动蛋白启动子驱动的萤火虫萤光素酶(CBA-Luc)报道转基因盒。涉及Gal识别的

氨基酸残基和来自AAV9的其他侧接残基在不同AAV血清型衣壳上是显著良好耐受的，因为这些AAV嵌合体的包装效率可与亲本株相比较。获得基于AAV血清型1、2、6、8和先前改造的AAV2i8突变体[15]的多重AAV嵌合体(滴度范围为5×10^{11}至5×10^{12}病毒基因组拷贝/mL)，并且进行观察以采用Gal作为在体外转导CHO Lec2细胞中的新型主要受体(图2)。我们随后进行原型双重聚糖结合AAV嵌合体的详细表征，所述双重聚糖结合AAV嵌合体称之为AAV2G9(其中G代表Gal足迹，并且编号分别鉴定接受者和供体衣壳血清型)。

[0209] 使用Swiss Model®，通过同源性建模生成合成改造的AAV2G9的三维模型(图3A中的完全衣壳和图3D中的VP3三聚体)，其中突出显示假定的双重聚糖受体结合位点(HS和Gal)。AAV2G9完全衣壳的分子模型证实位于二十面体衣壳上的三重对称轴周围的HS和Gal结合位点的几何分布和正交性。来自三重轴的HS和Gal受体足迹的特写视图进一步支持下述观察：将正交Gal结合位点移植到AAV2衣壳的骨架上就衣壳装配而言可以是耐受的。还显示了AAV2 VP3亚基三聚体的三维结构，其具有涉及HS识别的带正电残基的侧链(图3A)，以及包含在AAV9 VP3亚基三聚体上的Gal识别位点的氨基酸残基的侧链(图3C)。

[0210] AAV2G9在体外可互换地利用HS和Gal受体。支持双重聚糖受体由AAV2G9使用的第一线证据得自在细胞表面上的病毒结合的竞争抑制测定，其涉及可溶性肝素和鸡冠刺桐凝集素(ECL)，所述ECL选择性结合末端半乳糖基化的聚糖。如图4A-B中可见的，HS而不是ECL显著抑制CHO Lec2细胞中的AAV2转导(深灰色条)，而ECL将AAV9转导选择性阻断将近两个对数单位(白色条)。这些结果与对于AAV2和AAV9预期的转导概况一致[16-18]。相比之下，AAV2G9仅能够通过用ECL和HS两者的组合的预处理得到有效中和(浅灰色条，图4C)。对于ECL观察到小但显著的抑制效应。

[0211] 使用ECL或HS通过抑制每种毒株的细胞表面结合，进一步确证AAV2和AAV9的转导概况(图4D-E)。通过经由ECL和HS的组合专一地，而不是单独的任一试剂竞争抑制AAV2G9的细胞表面附着，进一步支持嵌合AAV毒株的独特细胞表面附着(图4F)。另外，使用针对不同AAV衣壳的单克隆抗体获得的共聚集免疫荧光显微照片(图5)，提示AAV2G9比AAV2或AAV9更强地与CHO Lec2细胞的表面结合。基于AAV2G9可互换地结合两种不同聚糖的明显能力，可以预期此类情况。

[0212] 为了进一步查询通过AAV2G9的替代转导途径的利用，我们用亲本血清型AAV2和AAV9进行竞争测定。如图6A-B中所示，分别如通过萤光素酶转基因表达测量的，以范围为500 - 100,000 vg/细胞的MOI与AAV2-CBA-tdTom或AAV9-CBA-tdTom竞争载体的预温育有效阻断通过AAV2-CBA-Luc或AAV9-CBA-Luc的转导。然而，在10倍过量的感染复数(MOI)时，AAV2和AAV9两者均不能有效阻断AAV2G9转导。在更高的MOI(100倍过量)时，AAV2看起来在中和AAV2G9转导方面比AAV9竞争效力更低。总之，这些结果支持下述观念：AAV2G9事实上是新型、双重聚糖结合毒株，具有利用HS和Gal两者作为转导的主要受体的独特能力。

[0213] AAV2G9介导转基因表达的快速发作。我们随后调查双重聚糖结合是否对在体外和体内的病毒转导赋予特异性优点。监控CHO Lec2细胞中的萤光素酶报道分子表达的时间过程揭示：AAV2G9介导在体外的快速发作和改善的基因转移(图7)。随后进行活动物成像研究，以监控在BALB/c小鼠中全身施用不同AAV毒株后的萤光素酶转基因表达(图8A)。在注射后第3、7和18天时获得的生物发光图像以及在肝和整个动物内的光输出的定量评价与体外数据关联，并且支持AAV2G9可以介导快速发作和增强的基因表达的观念(图8B-C)。有趣的

是，由AAV2G9展示的动力学概况反映AAV9而不是AAV2的那种。相比之下，AAV2G9的转导概况/组织向性看起来主要是亲肝的，类似于AAV2，并且不像如先前确定的由AAV9展示的全身向性[4,19-21]。因此，双重聚糖受体衔接看起来改善AAV毒株的转导效率，但不改变组织向性。

[0214] AAV2G9载体在体内的转导和生物分布概况。为了进一步评估AAV2G9的体内转导和生物分布概况，在施用后第3和18天时，进行来自BALB/c小鼠的组织裂解产物的定量分析。具体地，在施用后3天时，与AAV2（将近两个对数单位）和AAV9（~1个对数单位）相比较，AAV2G9展示在肝中显著更高的萤光素酶转基因表达（图9A）。虽然AAV9展示在心脏中比AAV2G9高多于10倍的转导效率，但还观察到与AAV2相比较，通过AAV2G9在心脏转导中的适度增加。在第18天时，从用AAV2G9处理的小鼠中收获的心脏和肝组织继续证实更高的转基因表达，尽管AAV9作为该阶段时的最有效毒株出现。具体地，通过AAV2、AAV2G9和AAV9在心脏组织中的转导效率维持与施用后3天观察到的相似的趋势。在肝中，在进展至注射后18天后，通过AAV2、AAV2G9和AAV9在萤光素酶转基因表达之间的差异缩小。具体地，当分别与AAV2G9和AAV2相比较时，AAV9证实高5至10倍的转基因表达。

[0215] 在施用后3天时通过AAV2G9和亲本AAV毒株在肝和心脏中的载体基因组拷贝数的定量分析（图9B）与对于图5A中所示的转导效率观察到的趋势一致。具体地，AAV2G9在心脏组织中累积至与AAV2相比较更高的程度，但仍比AAV9低~2对数单位。在肝中，AAV2G9拷贝数可与AAV9的那种相比较，但比AAV2高超过一个对数单位。在第18天时，所有血清型的拷贝数均减少，可能是由于继续的细胞更新和单链AAV基因组的降解，如先前报道的[22,23]。

[0216] 图10显示了包装CBA-萤光素酶转基因盒的AAV2i8、2i8G9和AAV9载体的体内转基因表达动力学。BALB/c小鼠（n=4）通过尾静脉以$1x10^{11}$ vg/动物的剂量施用AAV载体，并且使用Xenogen® Lumina成像系统，在注射后3、7和18天时收集生物发光图像。用在彩虹色标上表示的生物发光显示了代表性活动物图像（10^5-10^6光子/秒/cm^2/球面度）。

[0217] 图11显示了在新生小鼠中的代表性AAV G9毒株的中枢神经系统（CNS）向性概况。使用含有由杂合鸡β肌动蛋白（CBh）启动子驱动的GFP转基因的3.5x10e9 AAV载体基因组，将出生后0（P0）幼崽（n=3）单侧注射到左侧脑室内。在注射后2周时，GFP免疫组织化学揭示在鼠脑内，关于每种AAV “G9”毒株的差异传播、区域和细胞向性。

[0218] 前述是本发明的举例说明，并且不应解释为其限制。

[0219] 表1. AAV基因组

[0220]

表1 完整基因组	GenBank® 登录号		GenBank® 登录号			GenBank® 登录号
		Hu T88	AY695375		进化枝E	
AAV1	NC_002077,AF063497	**Hu T71**	AY695374		Rh38	AY530558
AAV2	NC_001401	**Hu T70**	AY695373		Hu66	AY530626
AAV 3	NC_001729	**Hu T40**	AY695372		Hu42	AY530605
AAV3B	NC_001863	**Hu T32**	AY695371		Hu67	AY530627
AAV4	NC_001829	Hu T17	AY695370		Hu40	AY530603
AAV5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377		Hu41	AY530604
AAV6	NC_001862				Hu37	AY530600
AAV	AY186198, AY629583, NC_004828	进化枝C			Rh40	AY530559
禽类AAV毒株DA-1	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629		Rh2	AY243007
Bo[illegible]**AAV**	NC_005889, AY388617	Hu10	AY530576		Bb1	AY243023
		Hu11	AY530577		Bb2	AY243022
进化枝A		Hu53	AY530615		Rh10	AY243015
AAV1	NC_002077,AF063497	Hu55	AY530617		Hu17	AY530582
AAV6	NC_001862	Hu54	AY530616		Hu6	AY530621
Hu.48	AY530611	Hu7	AY530628		Rh25	AY530557
Hu 43	AY530606	Hu18	AY530583		Pi2	AY530554
Hu 44	AY530607	Hu15	AY530580		Pi1	AY530553
Hu 46	AY530609	Hu16	AY530581		Pi3	AY530555
		Hu25	AY530591		Rh57	AY530569
进化枝B		Hu60	AY530622		Rh50	AY530563
Hu. 19	AY530584	Ch5	AY243021		Rh49	AY530562
Hu. 20	AY530586	Hu3	AY530595		Hu39	AY530601
Hu 23	AY530589	Hu1	AY530575		Rh58	AY530570
Hu22	AY530588	Hu4	AY530602		Rh61	AY530572
Hu24	AY530590	Hu2	AY530585		Rh52	AY530565
Hu21	AY530587	Hu61	AY530623		Rh53	AY530566
Hu27	AY530592				Rh51	AY530564
Hu28	AY530593	进化枝D			Rh64	AY530574
Hu 29	AY530594	Rh62	AY530573		Rh43	AY530560
Hu63	AY530624	Rh48	AY530561		**AAV8**	AF513852
Hu64	AY530625	Rh54	AY530567		Rh8	AY242997
Hu13	AY530578	Rh55	AY530568		Rh1	AY530556
Hu56	AY530618	Cy2	AY243020			
Hu57	AY530619	**AAV7**	AF513851		进化枝F	
Hu49	AY530612	Rh35	AY243000		Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu58	AY530620	Rh37	AY242998		Hu31	AY530596
Hu34	AY530598	Rh36	AY242999		Hu32	AY530597
Hu35	AY530599	Cy6	AY243016			
AAV2	NC_001401	Cy4	AY243018		克隆分离物	
Hu45	AY530608	Cy3	AY243019		**AAV5**	Y18065, AF085716
Hu47	AY530610	Cy5	AY243017		**AAV 3**	NC_001729
Hu51	AY530613	Rh13	AY243013		**AAV 3B**	NC_001863
Hu52	AY530614				**AAV4**	NC_001829
Hu T41	AY695378				Rh34	AY243001
Hu S17	AY695376				Rh33	AY243002
					Rh32	AY243003

[0221] 表2．示例性AAV基因组和衣壳登录号。

[0222]

病毒和血清型	基因组登录号	衣壳/VP1登录号
AAV1	NC_002077.1	NP_049542.1
AAV2	NC_001401.2	YP_680426.1
AAV3A	NC_001729.1	NP_043941.1
AAV3B	NC_001863.1	NP_045760.1
AAV4	NC_001829.1	NP_044927.1
AAV5	NC_006152.1	YP_068409.1
AAV6	NC_001862.1	NP_045758.1
AAV7	AF513851.1	AAN03855.1
AAV8	AF513852.1	AAN03857.1
AAV9	AY530579.1	AAS99264.1
AAV10	AY631965.1*	AAT46337.1
AAV11	AY631966.1*	AAT46339.1
AAV13	EU285562.1	ABZ10812.1

[0223] * 不完全序列。

[0224] 表3．将AAV9的Ga1结合足迹移植到不同AAV毒株内的氨基酸位置突变

[0225]

AAV毒株	登录号	移植半乳糖结合足迹的突变
AAV1	NP_049542.1	A267S, SRGSPAGMSVQPK464-476SVAGPSNMAVQGR, NFTW500-503EFAW
AAV2	YP_680426.1	A266S, SQAGASDIRDQSR463-475SVAGPSNMAVQGR, EYSW499-502EFAW
AAV3a	NP_043941.1	A266S, SQAGPQSMSLQAR464-476SVAGPSNMAVQGR, NFPW500-503EFAW
AAV3b	NP_045760.1	A266S, SQAGPQSMSLQAR464-476SVAGPSNMAVQGR, NFPW500-503EFAW
AAV4	NP_044927.1	在N261前插入SSND，TKLRPTNFSNFKK458-470SVAGPSNMAVQGR, DSLI499-502EFAW
AAV5	YP_068409.1	G257S, NKNLAGRYANTYK450-463SVAGPSNMAVQGR, VSAF486-489EFAW
AAV6	NP_045758.1	A267S, SRGSPAGMSVQPK464-476SVAGPSNMAVQGR, NFTW500-503EFAW
AAV7	AAN03855.1	VQGGPSTMAEQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, NFAW502-505EFAW
AAV8	AAN0857.1	A269S,SQGGPNTNANQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, NFAW502-505EFAW
AAV9	**AAS99264.1**	供体毒株
AAV10	AAT46337.1	T270S, SQAGPANMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
禽类AAV	NP_852781.1	D273S，N275D,在D273前插入ANS，SRATKTNMAAQYR467-479SVAGPSNMAVQGR, FSVW505-508EFAW
BB1	AAO88209.1	T270S, SQAGPNNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
BB2	AAO88208.1	T270S, SQAGPNNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
CH5	AAO88207.1	AT266-267SS, SQAGPSSMAQQAK463-475SVAGPSNMAVQGR
CY2	AAO88206.1	T269S, YQGGPSTMAEQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
CY3	AAO88205.1	AT262-263SS, HQAGPNTMAEQSK457-469SVAGPSNMAVQGR, N493E
CY4	AAO88204.1	AT262-263SS, HQAGPNTVAEQSK457-469SVAGPSNMAVQGR, N493E
CY5	AAO88203.1	AT262-263SS, HQAGPNTMAEQSK457-469SVAGPSNMAVQGR, N493E
CY6	AAO88202.1	AT262-263SS, HQAGPNTMAEQSK457-469SVAGPSNMAVQGR, N493E
Hu LG15	AAU05371.1	A266S, QAGASDIRDQWR464-475VAGPSNMAVGQR, DYS499-501EFA
Hu S17	AAU05370.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu T17	AAU05358.1	A266S, QAGASDIRDQWR464-475VAGPSNMAVGQR, DYS499-501EFA
Hu T41	AAU05372.1	A266S, QAGASDIRDQWR464-475VAGPSNMAVGQR, DYS499-501EFA
Hu T70	AAU05364.1	A266S, QAGASDIRDQWR464-475VAGPSNMAVGQR, EYS499-501EFA
Hu T71	AAU05366.1	A266S, QAGASDIRDQWR464-475VAGPSNMAVGQR, DYS499-501EFA
Hu T88	AAU05368.1	A266S, QAGASDIRDQWR464-475VAGPSNMAVGQR, DYS499-501EFA
Hu1	AAS99260.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu2	AAS99270.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu3	AAS99280.1	AC267-268SS, QAGPTNMSLQAK465-476VAGPSNMAVQGR, NFP500-502EFA
Hu4	AAS99287.1	A266S, QAGPTNMSLQAK464-475VAGPSNMAVQGR, NFP499-501EFA
Hu6	AAS99306.1	T270S, SQAGPNNMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Hu7	AAS99313.1	A266S, SQAGPTSMSLQAK463-475SVAGPSNMAVQGR, NFP499-501EFA
Hu9	AAS99314.1	A266S, SQAGPTSMSLQAK463-475SVAGPSNMAVQGR, NFP499-501EFA
Hu10	AAS99261.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu11	AAS99262.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu13	AAS99263.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, EYS499-501EFA
Hu15	AAS99265.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu16	AAS99266.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu17	AAS99267.1	T270S, QAGPNNMSAQAK467-478VAGPSNMAVGQR, NFA502-504EFA
Hu18	AAS99268.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu19	AAS99269.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, DYS499-501EFA

[0226]

AAV毒株	登录号	移植半乳糖结合足迹的突变
Hu20	AAS99271.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, DYS499-501EFA
Hu21	AAS99272.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, DYS499-501EFA
Hu22	AAS99273.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, DYS499-501EFA
Hu23	AAS99274.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, DYS499-501EFA
Hu24	AAS99275.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, DYS499-501EFA
Hu25	AAS99276.1	A266S, QAGPTSMSLQAK464-475VAGPSNMAVGQR, NFP499-501EFA
Hu27	AAS99277.1	A266S, QAGASDVRDQSR464-475VAGPSNMAVGQR, DYS499-501EFA
Hu28	AAS99278.1	A266S, QAGASDIQDQSR464-475VAGPSNMAVGQR, EYS499-501EFA
Hu29	AAS99279.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVGQRN, EYS499-501EFA
Hu34	AAS99283.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu35	AAS99284.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu37	AAS99285.1	T270S, QAGPANMSAQAK467-478VAGPSNMAVQGR, N502E
Hu39	AAS99286.1	T270S, RAGPSNMSAQAR467-478VAGPSNMAVQGR, N502E
Hu40	AAS99288.1	T270S, QAGPANMSAQAK467-478VAGPSNMAVQGR, N502E
Hu41	AAS99289.1	T270S, QAGPANMSAQAK467-478VAGPSNMAVQGR, N502E
Hu42	AAS99290.1	T270S, QAGPANMSAQAK467-478VAGPSNMAVQGR, N502E
Hu43	AAS99291.1	A268S, RGSPAGMSVQPK466-477VAGPSNMAVQGR, NFT502-503EFA
Hu44	AAS99292.1	A267S, RGSPAGMSVQPK465-476VAGPSNMAVQGR, NFT500-502EFA
Hu45	AAS99293.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu46	AAS99294.1	A267S, RGSPAGMSVQPK465-476VAGPSNMAVQGR, NFT500-502EFA
Hu47	AAS99295.1	A266S, S270N, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu48	AAS99296.1	A267S, RGSPAGMSVQPK465-476VAGPSNMAVQGR,NFT500-502EFA
Hu49	AAS99297.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu51	AAS99298.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu52	AAS99299.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu54	AAS99301.1	A266S, QAGPTNMSLQAK463-474VAGPSNMAVQGR, NFP498-500EFA
Hu55	AAS99302.1	A266S, QAGPTNMSLQAK463-474VAGPSNMAVQGR, NFP498-500EFA
Hu56	AAS99303.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu57	AAS99304.1	A265S, QAGASDIRDQSR463-474VAGPSNMAVQGR, YS499-500FA
Hu58	AAS99305.1	A266S, QAGASDIRDQSR464-475VAGPSNMAVQGR, YS500-502FA
Hu60	AAS99307.1	A266S, SQAGPTMNSLQAK463-475SVAGPSNMAVQGR, NFP499-501EFA
Hu61	AAS99308.1	A266S, SQAGPTMNSLQAK463-475SVAGPSNMAVQGR, NFP499-501EFA
Hu63	AAS99309.1	A266S, SQAGASDIRDQSR463-475SVAGPSNMAVQGR, YS500-501FA
Hu64	AAS99310.1	A266S, SQAGASDIRDQSR463-475SVAGPSNMAVQGR, YS500-501FA
Hu66	AAS99311.1	T270S, SQAGPANMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Hu67	AAS99312.1	T270S, SQAGPANMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh1	AAS99241.1	T270S, SQAGPSSMANQAR465-477SVAGPSNMAVQGR, N501E
Rh2	AAO88193.1	T270S, SQAGPANMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh8	AAO88183.1	T270S, SQAGPSSMANQAR464-476SVAGPSNMAVQGR, N500E
Rh10	AAO88201.1	T270S, SQAGPNNMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh12	AAO88200.1	T265S, SQAGPNNMSAQAK461-473SVAGPSNMAVQGR, N497E
Rh13	AAO88199.1	AT262-263SS, HQAGPNTMAEQSK457-469SVAGPSNMAVQGR, N493E
Rh14	AAO88198.1	T265S, SQAGPNNMSAQAK461-473SVAGPSNMAVQGR, N497E
Rh16	AAO88197.1	AT262-263SS, SQAGPNNMSAQAK459-471SVAGPSNMAVQGR, N495E
Rh17	AAO88196.1	AT262-263SS, SQAGPNNMSAQAK459-471SVAGPSNMAVQGR, N495E

[0227]

AAV毒株	登录号	移植半乳糖结合足迹的突变
Rh18	AAO88195.1	T270S, SQAGPNNMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh19	AAO88194.1	T270S, HQAGPNTMAEQSK464-476SVAGPSNMAVQGR, N500E
Rh22	AAO88192.1	AT262-263SS, HQAGPNTMAEQSK457-469SVAGPSNMAVQGR, N493E
Rh23	AAO88191.1	T270S, HQAGPNTMAEQSK464-476SVAGPSNMAVQGR, N500E
Rh24	AAO88190.1	T265S, SQAGPNNMSAQAK461-473SVAGPSNMAVQGR, N497E
Rh25	AAS99242.1	T270S, SQAGPNNMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh26	AAO89501.1	T188S, YQGGPTTMAEQAK385-397SVAGPSNMAVQGR, N421E
Rh27	AAO89502.1	T188S, YQGGPTTMAEQAK385-397SVAGPSNMAVQGR, N421E
Rh31	AAO89500.1	T188S, YQGGPTTMAEQAK385-397SVAGPSNMAVQGR, N421E
Rh32	AAO88189.1	在N259前插入SGGSS， GKIRSGDFAFYRK457-469SVAGPSNMAVQGR, NALL498-501EFAW
Rh33	AAO88188.1	在N259前插入SGGSS， GKIRSGDFAFYRK457-469SVAGPSNMAVQGR, NALL498-501EFAW
Rh34	AAO88187.1	在N259前插入SGGSS， GKIRSGDFAFYRK457-469SVAGPSNMAVQGR, NALL498-501EFAW
Rh35	AAO88186.1	AT263-264SS, HQAGPNTMAEQSK458-470SVAGPSNMAVQGR, N494E
Rh36	AAO88185.1	AT263-264SS, HQAGPNTMAEQSK458-470SVAGPSNMAVQGR, N494E
Rh37	AAO88184.1	AT263-264SS, HQAGPNTMAEQSK458-470SVAGPSNMAVQGR, N494E
Rh38	AAS99243.1	T270S, SQAGPANMSAQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh40	AAS99244.1	T270S. SQAGPANMSARAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh43	AAS99245.1	AT268-269SS, SQGGPNTMANQAK456-477SVAGPSNMAVQGR, N501E
Rh48	AAS99246.1	T269S, YQGGPTTMAEQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh49	AAS99247.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh50	AAS99248.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh51	AAS99249.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh52	AAS99250.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh53	AAS99251.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh54	AAS99252.1	T269S, YQGGPTTMAEQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh55	AAS99253.1	T269S, YQGGPTTMAEQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh57	AAS99254.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh58	AAS99255.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh60	AAS99256.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh61	AAS99257.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh62	AAS99258.1	T269S, YQGGPTTMAEQAK466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E
Rh64	AAS99259.1	T270S, SQAGPSNMSAQAR466-478SVAGPSNMAVQGR, N502E

[0228] 参考文献

1. Olofsson, S, Bergstrom, T (2005). Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann Med* **37:** 154-172.

2. Neu, U, Bauer, J, Stehle, T (2011). Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Curr Opin Struct Biol* **21:** 610-618.

3. Agbandje-McKenna, M, Kleinschmidt, J (2011). AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol Biol* **807:** 47-92.

4. Asokan, A, Schaffer, DV, Jude Samulski, R (2012). The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Mol Ther* **20:** 699-708.

5. Halbert, CL, Allen, JM, Miller, AD (2001). Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol* **75:** 6615-6624.

6. Wu, Z, Asokan, A, Grieger, JC, Govindasamy, L, Agbandje-McKenna, M, Samulski, RJ (2006). Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J Virol* **80:** 11393-11397.

[0229] 7. Ng, R, Govindasamy, L, Gurda, BL, McKenna, R, Kozyreva, OG, Samulski, RJ, Parent, KN, Baker, TS, Agbandje-McKenna, M (2010). Structural characterization of the dual glycan binding adeno-associated virus serotype 6. *J Virol* **84:** 12945-12957.

8. Xie, Q, Lerch, TF, Meyer, NL, Chapman, MS (2011). Structure-function analysis of receptor-binding in adeno-associated virus serotype 6 (AAV-6). *Virology* **420:** 10-19.

9. Lerch, TF, Chapman, MS (2012). Identification of the heparin binding site on adeno-associated virus serotype 3B (AAV-3B). *Virology* **423:** 6-13.

10. Opie, SR, Warrington, KH,Jr, Agbandje-McKenna, M, Zolotukhin, S, Muzyczka, N (2003). Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* **77:** 6995-7006.

11. Levy, HC, Bowman, VD, Govindasamy, L, McKenna, R, Nash, K, Warrington, K, Chen, W, Muzyczka, N, Yan, X, Baker, TS, Agbandje-McKenna, M (2009). Heparin binding induces conformational changes in Adeno-associated virus serotype 2. *J Struct Biol* **165:** 146-156.

12. O'Donnell, J, Taylor, KA, Chapman, MS (2009). Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor--Cryo-EM structure of a heparin complex. *Virology* **385:** 434-443.

13. Bell, CL, Gurda, BL, Van Vliet, K, Agbandje-McKenna, M, Wilson, JM (2012). Identification of the galactose binding domain of the AAV9 capsid. *J Virol*

14. Grieger, JC, Choi, VW, Samulski, RJ (2006). Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* **1:** 1412-1428.

15. Asokan, A, Conway, JC, Phillips, JL, Li, C, Hegge, J, Sinnott, R, Yadav, S, DiPrimio, N, Nam, HJ, Agbandje-McKenna, M, McPhee, S, Wolff, J, Samulski, RJ (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* **28:** 79-82.

16. Summerford, C, Samulski, RJ (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72:** 1438-1445.

17. Bell, CL, Vandenberghe, LH, Bell, P, Limberis, MP, Gao, GP, Van Vliet, K, Agbandje-McKenna, M, Wilson, JM (2011). The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *J Clin Invest* **121:** 2427-2435.

18. Shen, S, Bryant, KD, Brown, SM, Randell, SH, Asokan, A (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J Biol Chem* **286:** 13532-13540.

[0230] 19. Gao, GP, Alvira, MR, Wang, L, Calcedo, R, Johnston, J, Wilson, JM (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 11854-11859.

20. Inagaki, K, Fuess, S, Storm, TA, Gibson, GA, Mctiernan, CF, Kay, MA, Nakai, H (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* **14:** 45-53.

21. Zincarelli, C, Soltys, S, Rengo, G, Rabinowitz, JE (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* **16:** 1073-1080.

22. Wang, J, Xie, J, Lu, H, Chen, L, Hauck, B, Samulski, RJ, Xiao, W (2007). Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 13104-13109.

23. Wang, L, Bell, P, Lin, J, Calcedo, R, Tarantal, AF, Wilson, JM (2011). AAV8-mediated hepatic gene transfer in infant rhesus monkeys (Macaca mulatta). *Mol Ther* **19:** 2012-2020.

24. Imai, M, Watanabe, T, Hatta, M, Das, SC, Ozawa, M, Shinya, K, Zhong, G, Hanson, A, Katsura, H, Watanabe, S, Li, C, Kawakami, E, Yamada, S, Kiso, M, Suzuki, Y, Maher, EA, Neumann, G, Kawaoka, Y (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers

respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* **486:** 420-428.

25. Herfst, S, Schrauwen, EJ, Linster, M, Chutinimitkul, S, de Wit, E, Munster, VJ, Sorrell, EM, Bestebroer, TM, Burke, DF, Smith, DJ, Rimmelzwaan, GF, Osterhaus, AD, Fouchier, RA (2012). Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* **336:** 1534-1541.

26. High, KA (2012). The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Blood*

27. Mingozzi, F, High, KA (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12:** 341-355.

28. McCarty, DM (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* **16:** 1648-1656.

29. Zhong, L, Li, B, Mah, CS, Govindasamy, L, Agbandje-McKenna, M, Cooper, M, Herzog, RW, Zolotukhin, I, Warrington, KH,Jr, Weigel-Van Aken, KA, Hobbs, JA, Zolotukhin, S, Muzyczka, N, Srivastava, A (2008). Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl*

[0231] *Acad Sci U S A* **105:** 7827-7832.

30. Xie, Q, Bu, W, Bhatia, S, Hare, J, Somasundaram, T, Azzi, A, Chapman, MS (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 10405-10410.

31. DiMattia, MA, Nam, HJ, Van Vliet, K, Mitchell, M, Bennett, A, Gurda, BL, McKenna, R, Olson, NH, Sinkovits, RS, Potter, M, Byrne, BJ, Aslanidi, G, Zolotukhin, S, Muzyczka, N, Baker, TS, Agbandje-McKenna, M (2012). Structural insight into the unique properties of adeno-associated virus serotype 9. *J Virol* **86:** 6947-6958.

32. Arnold, K, Bordoli, L, Kopp, J, Schwede, T (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22:** 195-201.

33. Carrillo-Tripp, M, Shepherd, CM, Borelli, IA, Venkataraman, S, Lander, G, Natarajan, P, Johnson, JE, Brooks, CL,3rd, Reddy, VS (2009). VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res* **37:** D436-42.

34. Kern, A, Schmidt, K, Leder, C, Muller, OJ, Wobus, CE, Bettinger, K, Von der Lieth, CW, King, JA, Kleinschmidt, JA (2003). Identification of a heparin-binding motif on adeno-

[0232] associated virus type 2 capsids. *J Virol* **77:** 11072-11081。

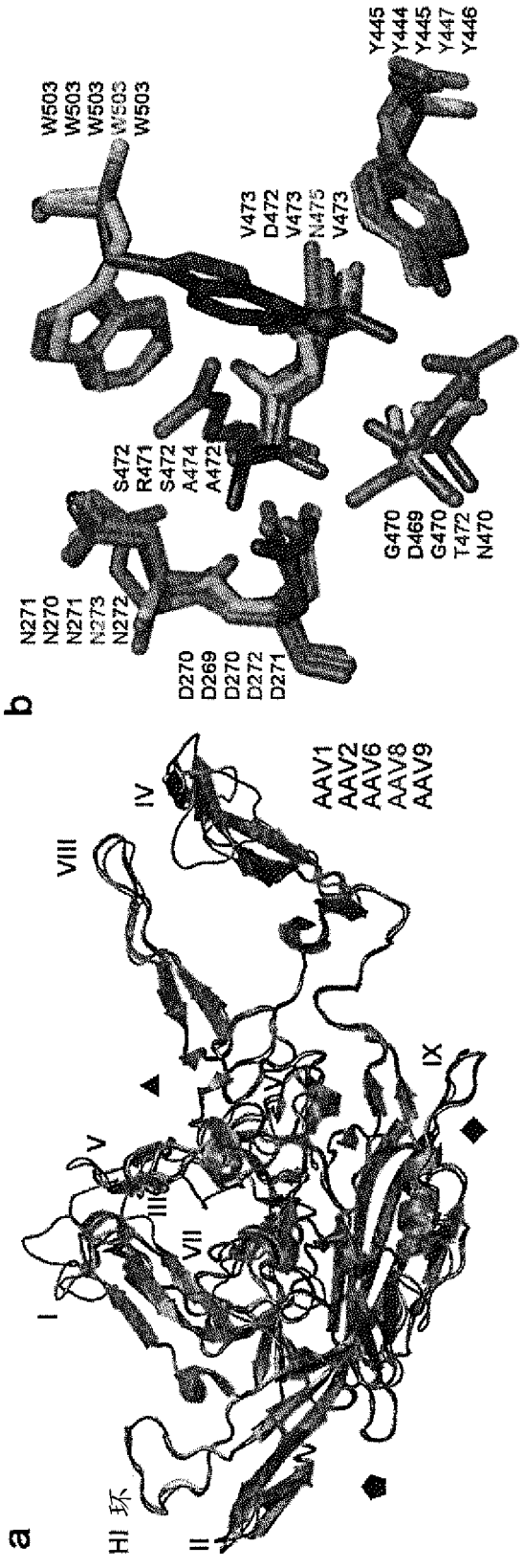

a
HI 环
II
I
III
V
VII
VIII
IV
IX
AAV1
AAV2
AAV6
AAV8
AAV9
b
N271
N270
N271
N273
N272
D270
D269
D270
D272
D271
S472
R471
S472
A474
A472
G470
D469
G470
T472
N470
V473
D472
V473
N475
V473
W503
W503
W503
W503
W503
Y445
Y444
Y445
Y447
Y446

图 1

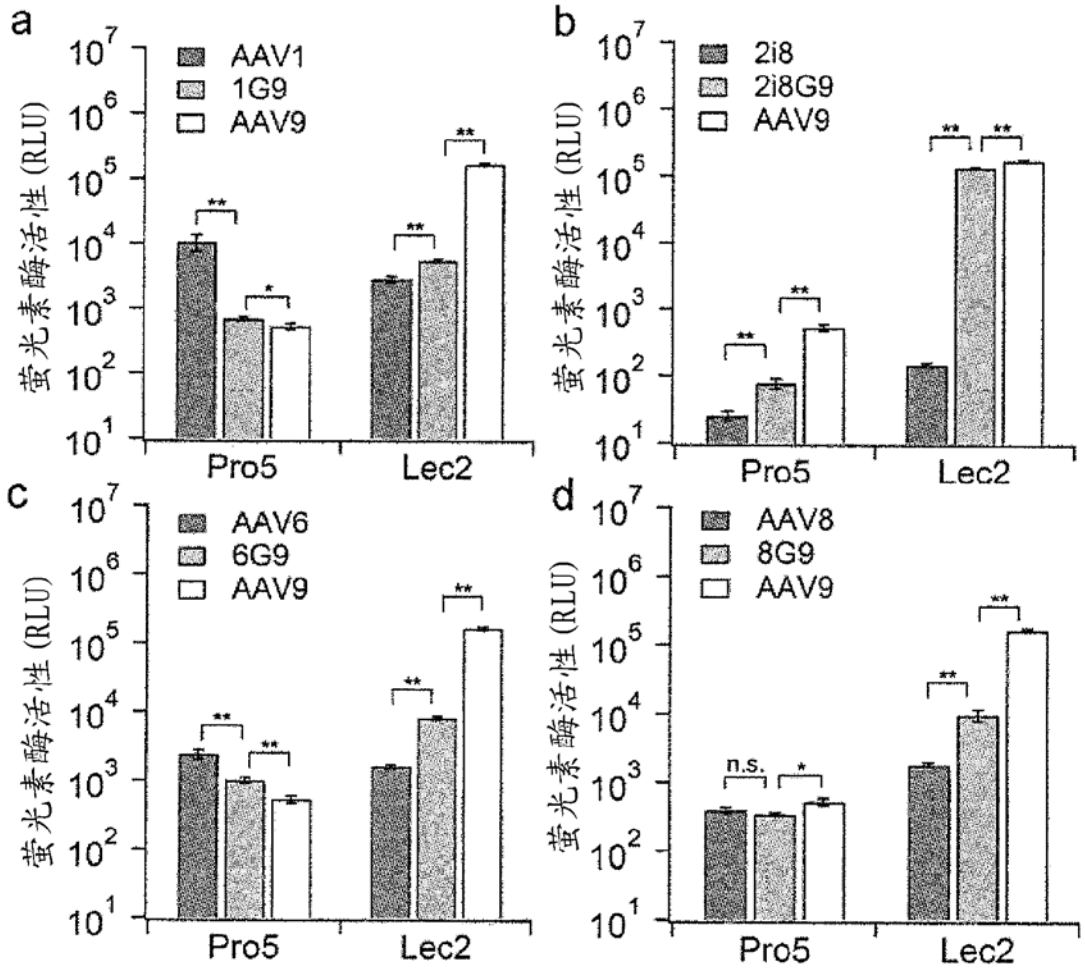

a
b
c
d
AAV1
1G9
AAV9
2i8
2i8G9
AAV9
AAV6
6G9
AAV9
AAV8
8G9
AAV9
萤光素酶活性 (RLU)
Pro5
Lec2
n.s.

图 2

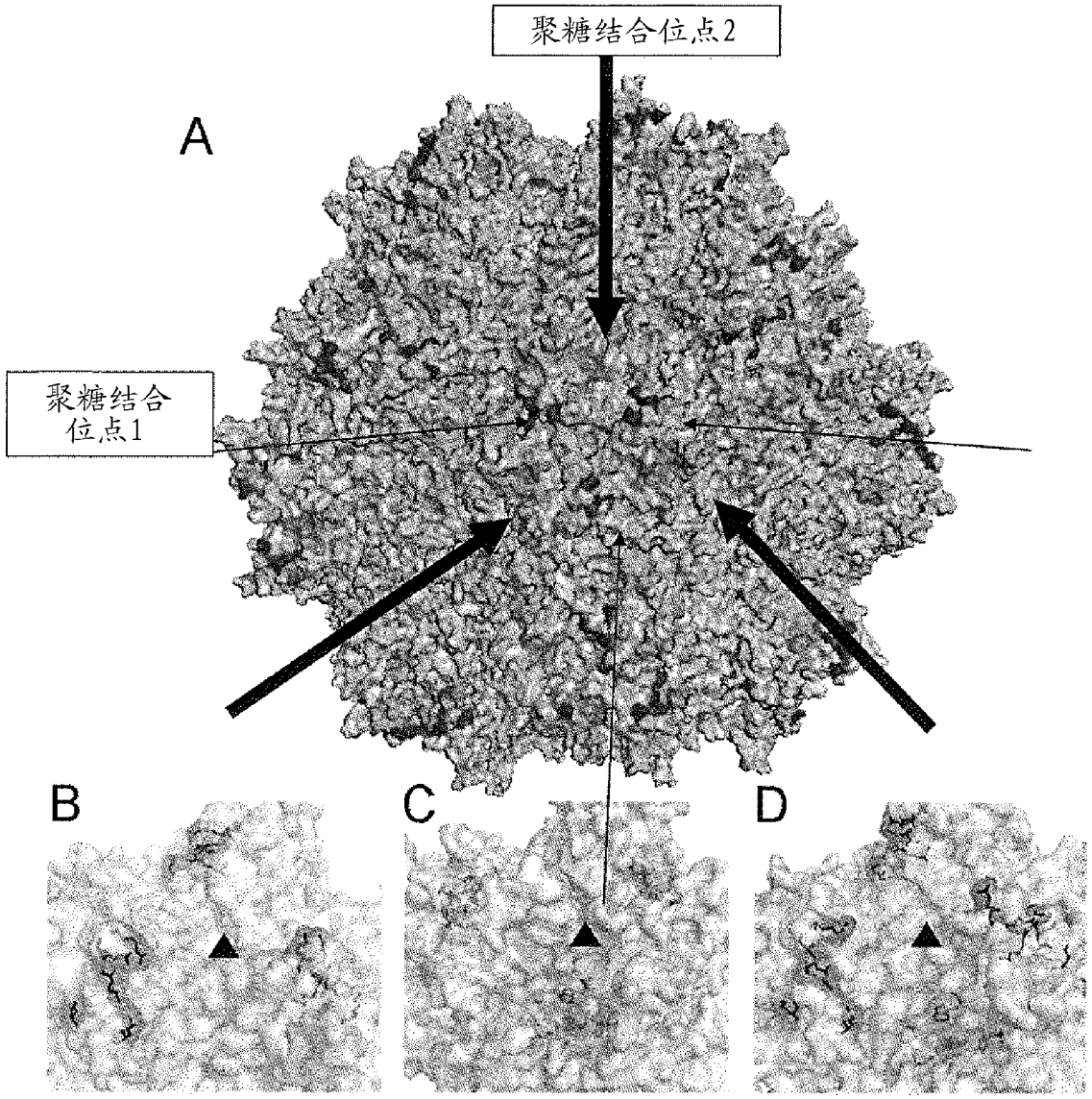


图 3

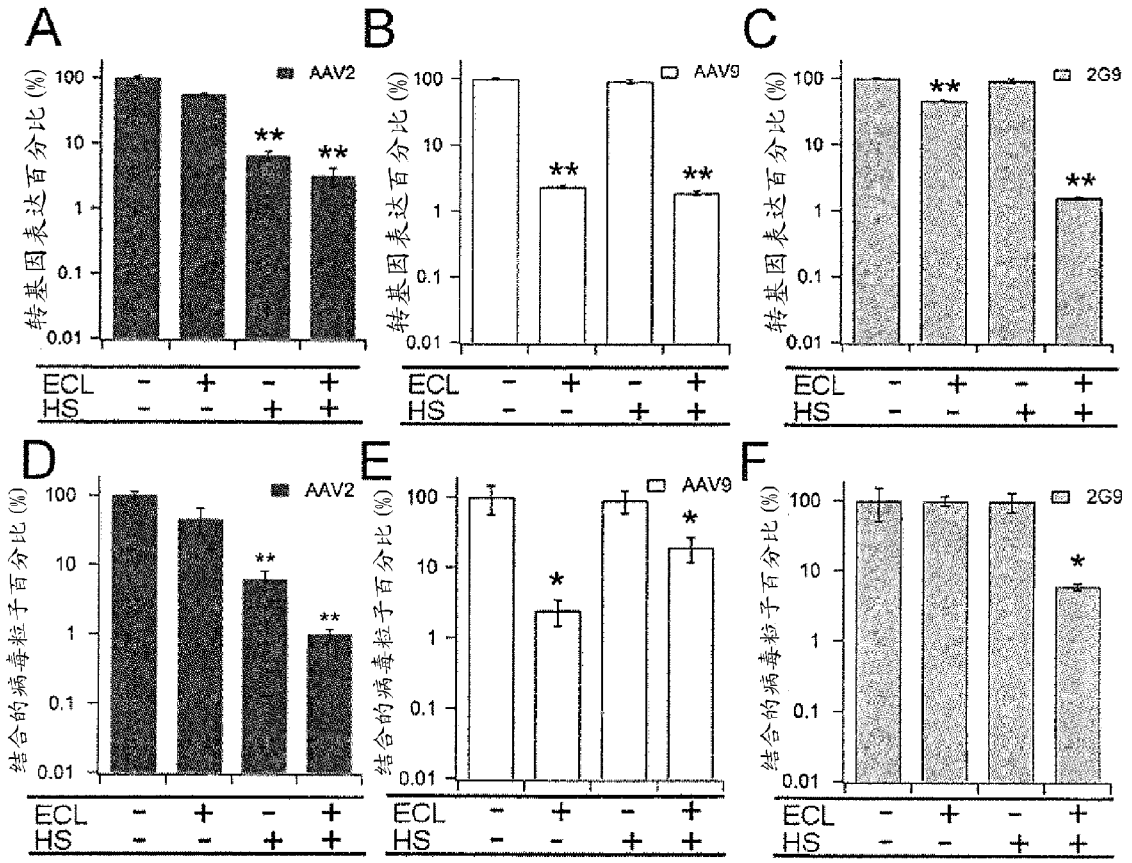

A
B
C
D
E
F
AAV2
AAV9
2G9
转基因表达百分比 (%)
结合的病毒粒子百分比 (%)
100
10
1
0.1
0.01
**
*
ECL - + - +
HS - - + +

图 4

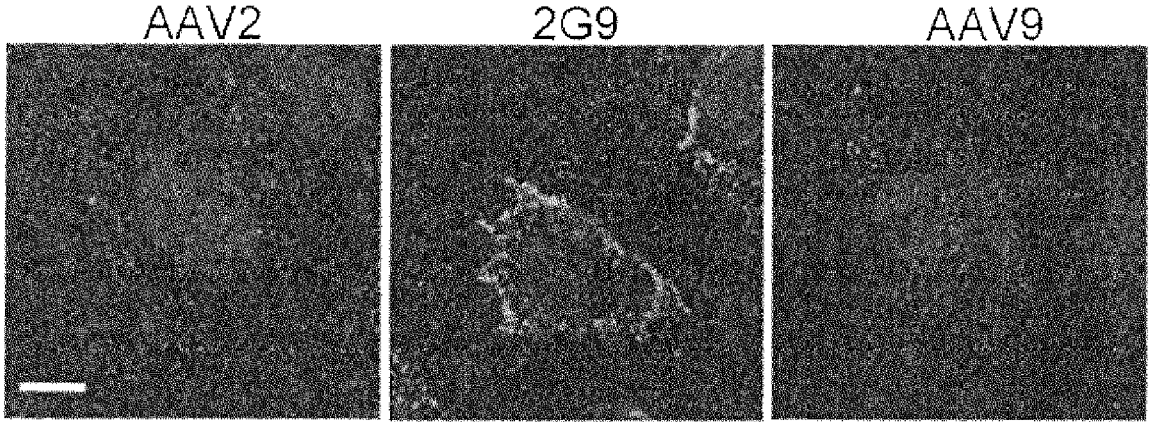

AAV2
2G9
AAV9

图 5

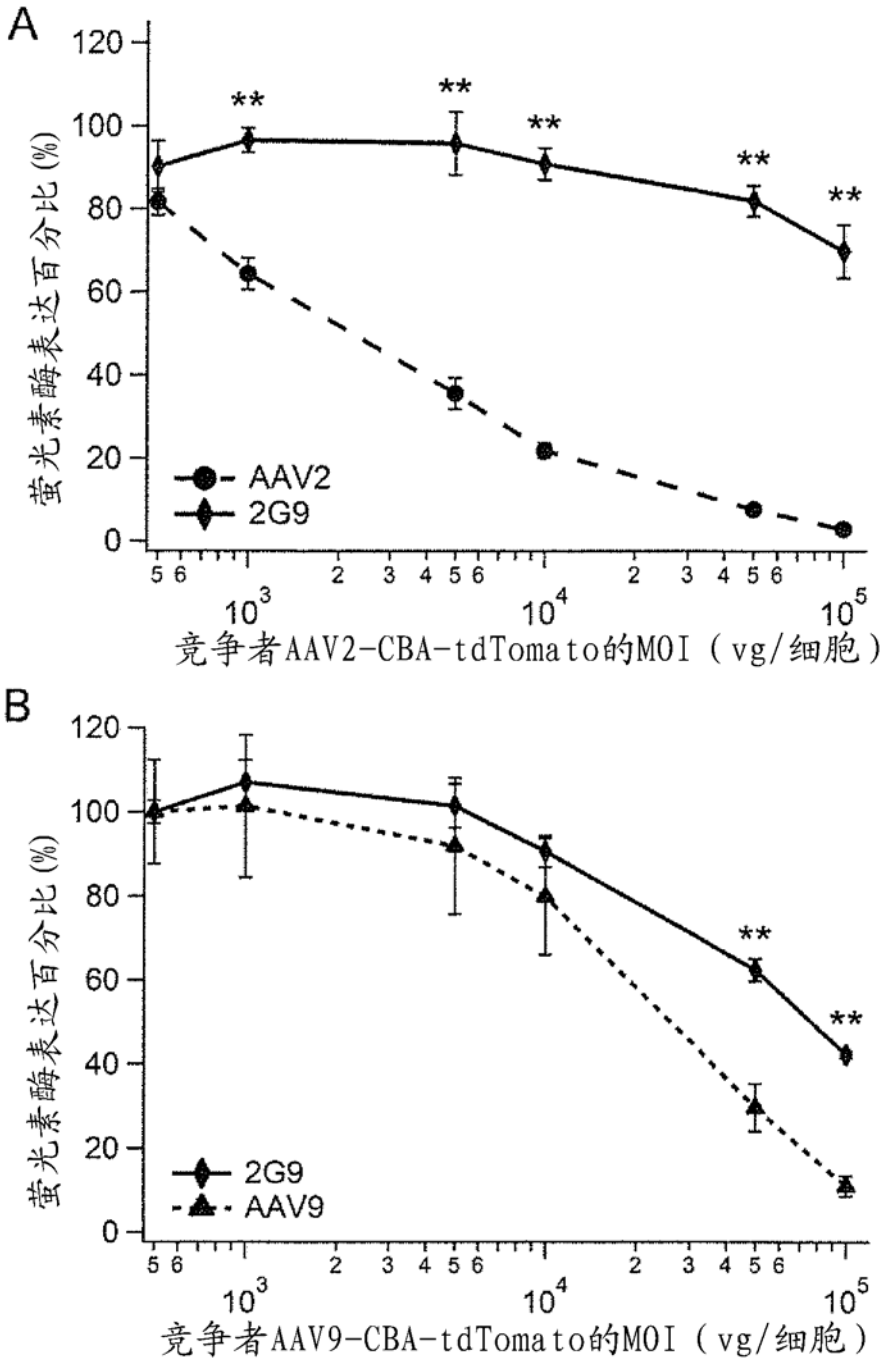

A
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
**
AAV2
2G9
萤光素酶表达百分比(%)
5 6 2 3 4 5 6 2 3 4 5 6
10^3
10^4
10^5
竞争者AAV2-CBA-tdTomato的MOI（vg/细胞）
B
120
100
80
60
40
20
0
**
**
2G9
AAV9
萤光素酶表达百分比(%)
5 6 2 3 4 5 6 2 3 4 5 6
10^3
10^4
10^5
竞争者AAV9-CBA-tdTomato的MOI（vg/细胞）

图 6

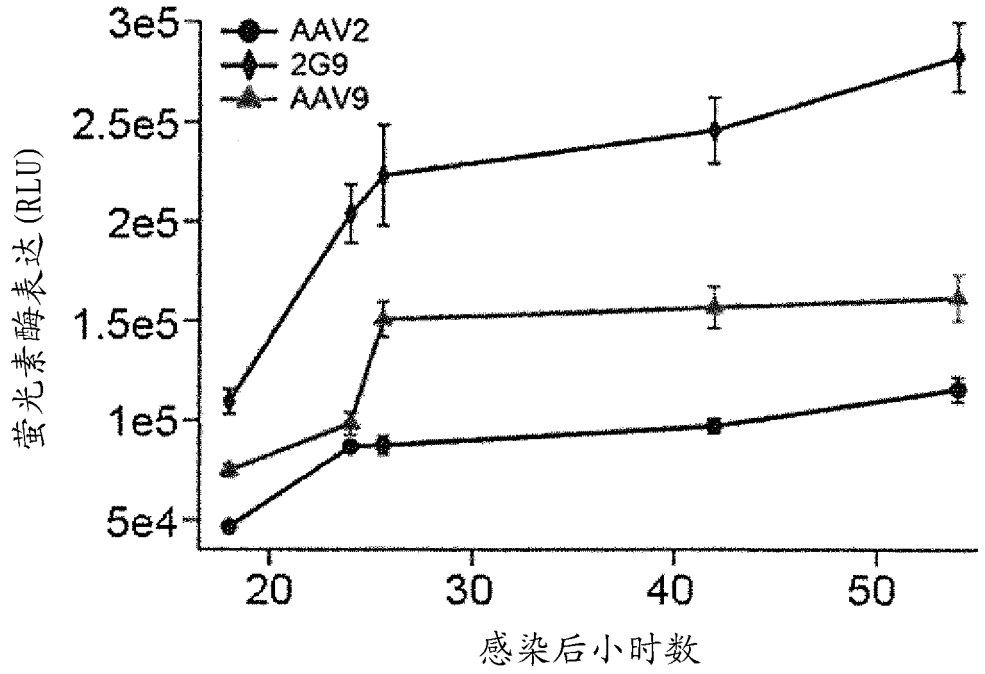

3e5
2.5e5
2e5
1.5e5
1e5
5e4
AAV2
2G9
AAV9
萤光素酶表达(RLU)
20
30
40
50
感染后小时数

图 7

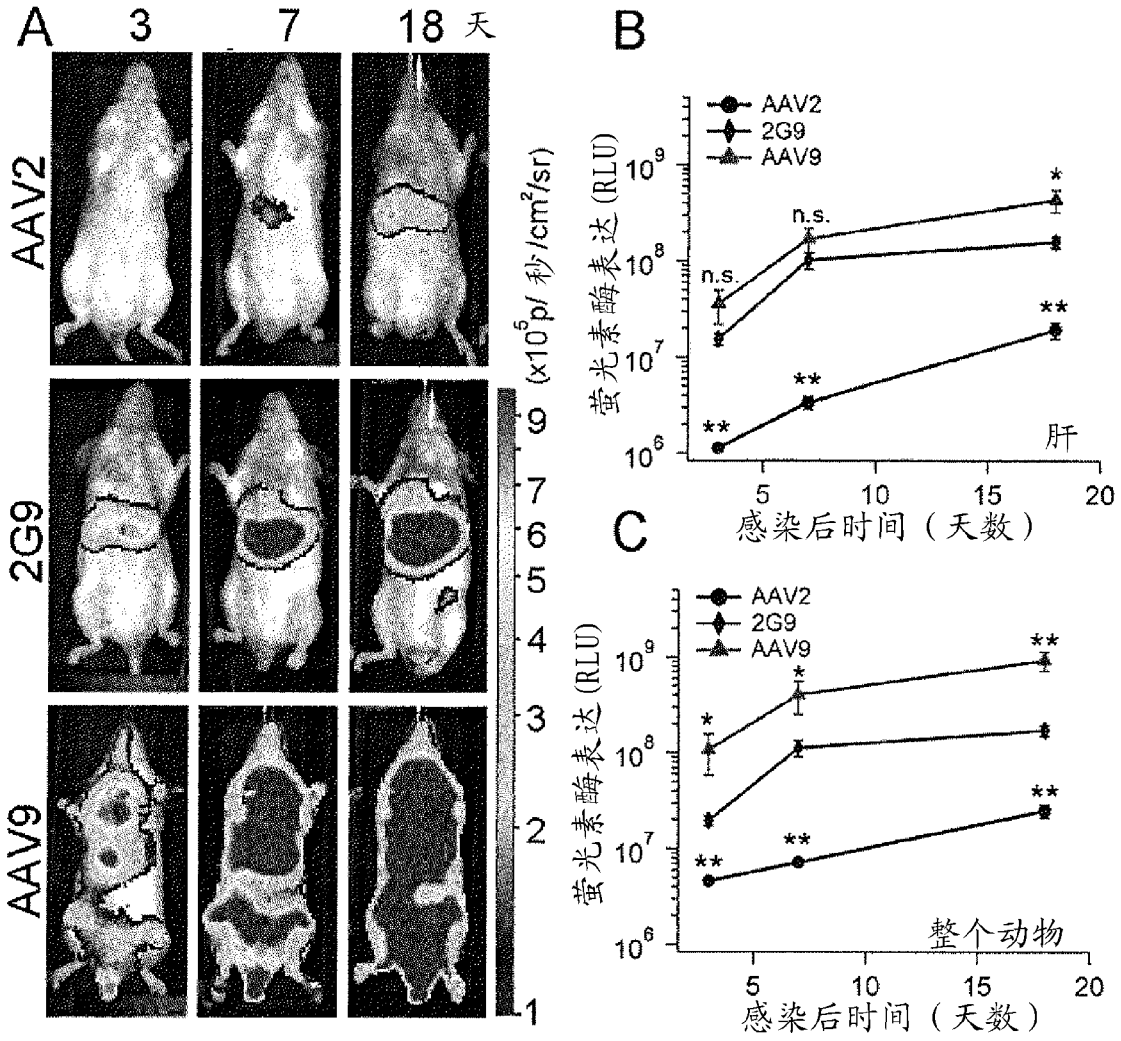

A
3
7
18 天
AAV2
2G9
AAV9
(x10^5 p/ 秒/cm^2/sr)
9
7
6
5
4
3
2
1
B
AAV2
2G9
AAV9
萤光素酶表达 (RLU)
n.s.
n.s.
*
**
**
**
肝
感染后时间（天数）
C
AAV2
2G9
AAV9
萤光素酶表达 (RLU)
*
*
**
**
**
整个动物
感染后时间（天数）

图 8

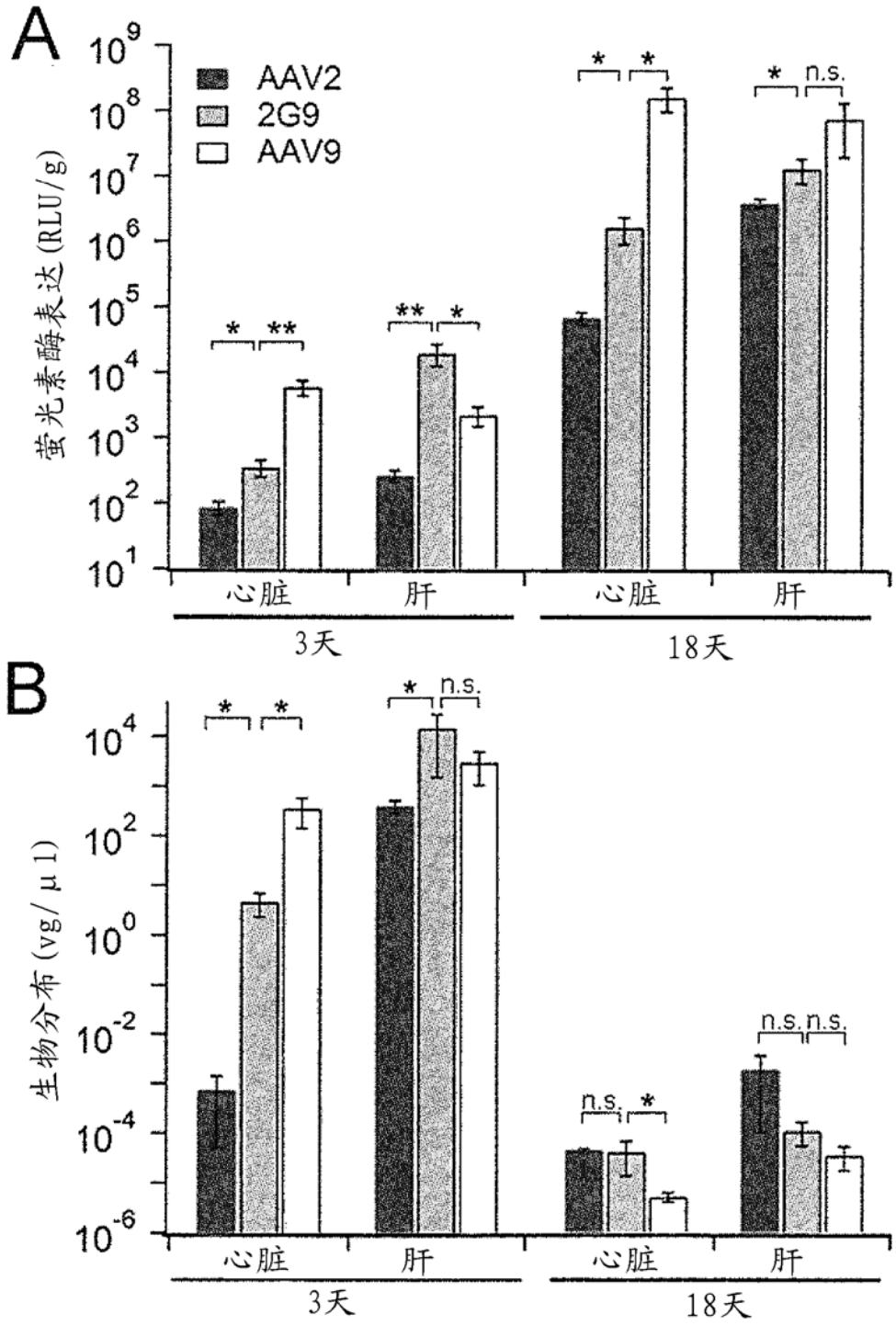

A
AAV2
2G9
AAV9
萤光素酶表达(RLU/g)
心脏
肝
心脏
肝
3天
18天
B
生物分布(vg/μl)
n.s.
心脏
肝
心脏
肝
3天
18天

图 9

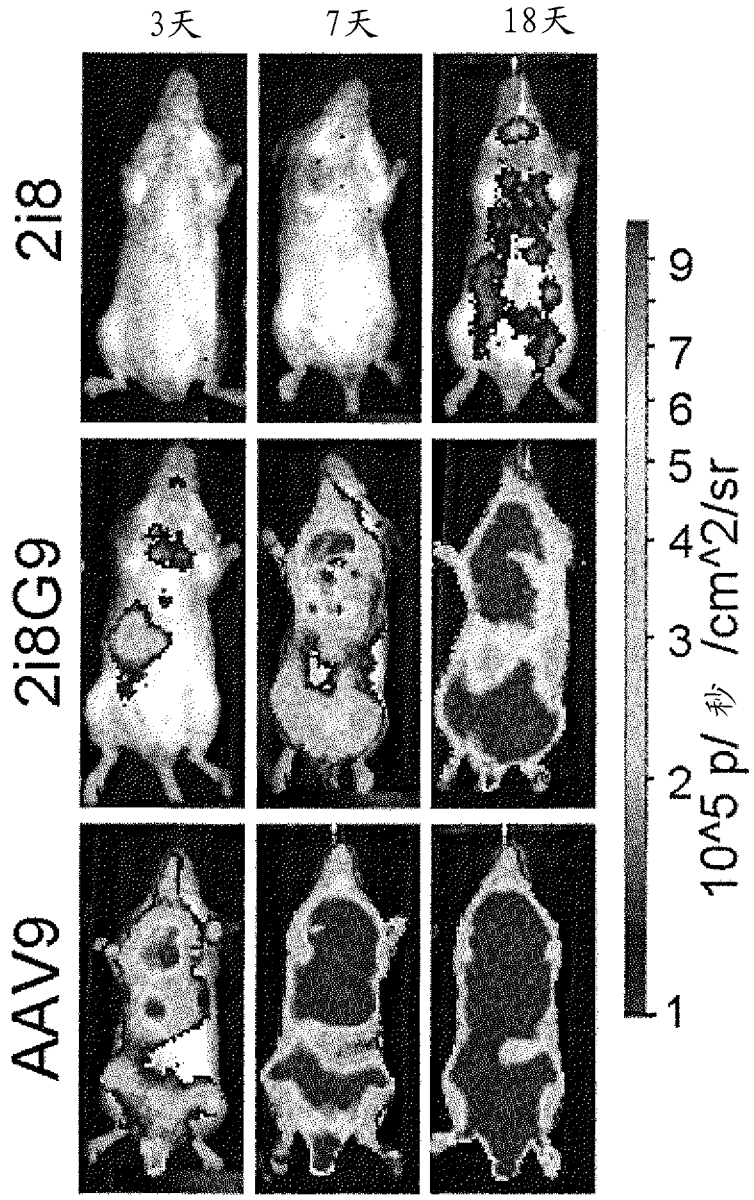


图 10

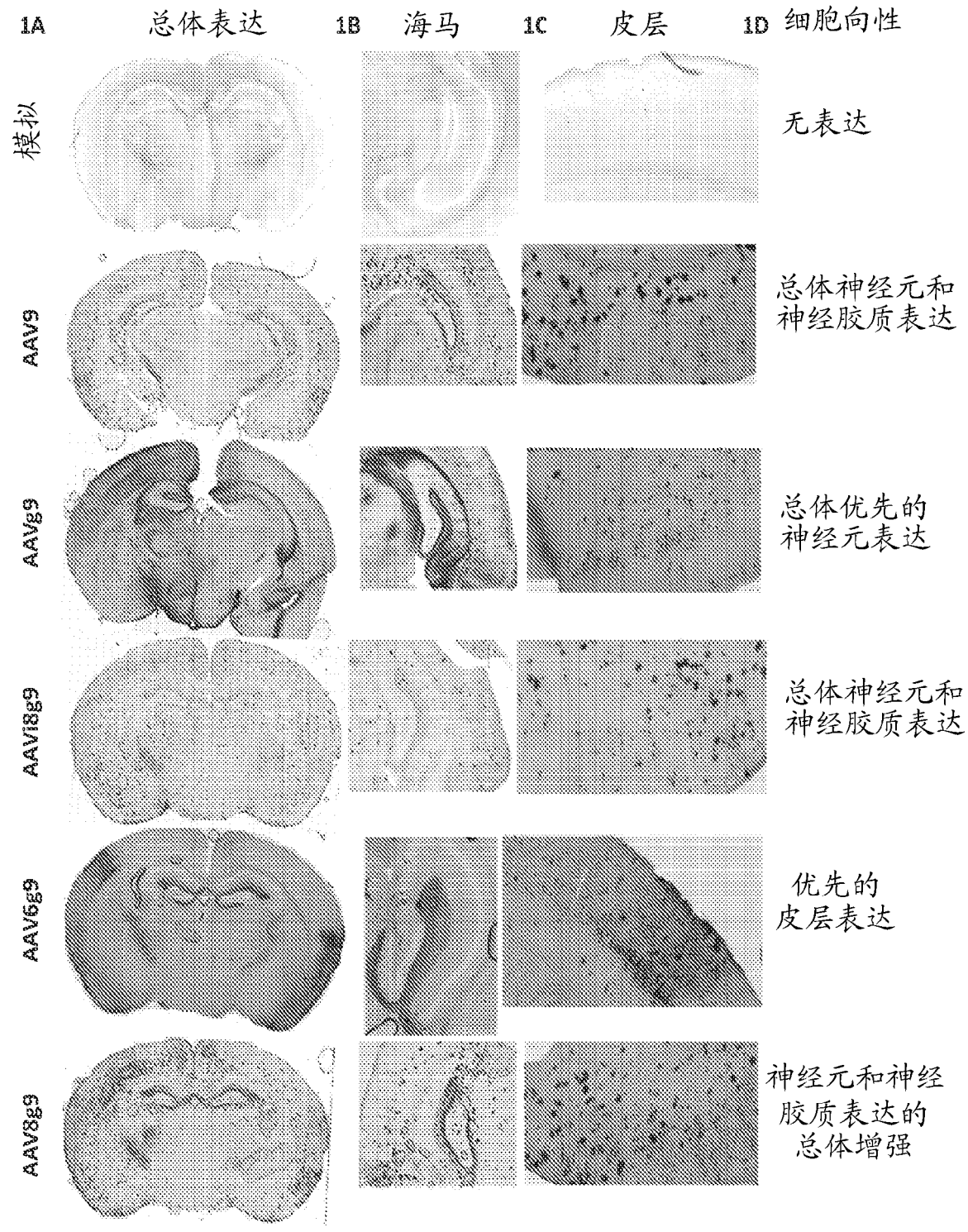

1A
总体表达
1B
海马
1C
皮层
1D
细胞向性
模拟
无表达
AAV9
总体神经元和
神经胶质表达
AAVg9
总体优先的
神经元表达
AAVi8g9
总体神经元和
神经胶质表达
AAV6g9
优先的
皮层表达
AAV8g9
神经元和神经
胶质表达的
总体增强

图 11