



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116478254 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202310515810.X

(22) 申请日 2016.12.14

(30) 优先权数据

62/266,941 2015.12.14 US

(62) 分案原申请数据

201680081759.4 2016.12.14

(71) 申请人 北卡罗来纳大学教堂山分校

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 R·J·萨穆尔斯基

J·瓦里斯查尔克

(74) 专利代理机构 南京苏创专利代理事务所

(普通合伙) 32273

专利代理师 王华

(51) Int.Cl.

C07K 14/015 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书53页

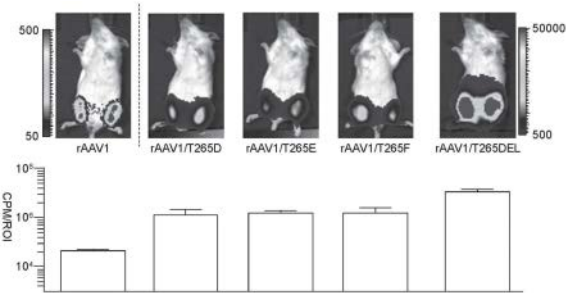
序列表(电子公布) 附图47页

(54) 发明名称

增强细小病毒载体递送的修饰衣壳蛋白

(57) 摘要

本发明涉及转导效率提高的修饰细小病毒衣壳蛋白、包括所述衣壳蛋白的病毒载体及利用所述衣壳蛋白递送核酸至细胞或受试者的方法。



1. 一种细小病毒衣壳蛋白, 包括来自腺相关病毒 (AAV) 血清型或T=1二十面体衣壳结构的任何其它细小病毒的衣壳蛋白氨基酸序列, 其中可变区1 (VR1) 的环包括AAV1衣壳蛋白氨基酸残基258至272或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基, 所述可变区1的环通过删除与/或替换一个或多个氨基酸残基进行修饰, 由于所述残基编排的氢键模式被靶向破坏, 导致环内区域失稳, 其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比, 所述修饰衣壳蛋白使包括所述衣壳蛋白的病毒载体的转导效率与/或修饰组织特异性得到提高。

2. 根据权利要求1所述的衣壳蛋白, 其中AAV1衣壳蛋白氨基酸残基258至272中的一个或多个氨基酸残基或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基被删除。

3. 根据权利要求1所述的衣壳蛋白, 其中AAV1衣壳蛋白氨基酸残基261至269中的一个或多个氨基酸残基或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基被删除。

4. 根据权利要求1所述的衣壳蛋白, 其中AAV1衣壳蛋白的氨基酸残基265或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基被删除。

5. 根据权利要求1所述的衣壳蛋白, 其中所述衣壳蛋白包括与硫酸肝素结合的AAV血清型或其它细小病毒的氨基酸序列, 其中调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除, 其中所述衣壳蛋白与硫酸肝素的结合大幅减少。

6. 根据权利要求5所述的衣壳蛋白, 其中所述衣壳蛋白包括来自AAV3a、AAV3b、AAV6或AAV8血清型的氨基酸序列。

7. 根据权利要求5所述的衣壳蛋白, 其中所述衣壳蛋白包括来自AAV6血清型的氨基酸序列, 其中所述氨基酸残基531被替换, 从而大幅减少与硫酸肝素的结合。

8. 根据权利要求7所述的衣壳蛋白, 其中所述氨基酸残基531被谷氨酸替换。

9. 一种腺相关病毒 (AAV) 衣壳蛋白, 包括来自AAV3a、AAV3b、AAV6或AAV8血清型的氨基酸序列, 其中调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除, 其中所述衣壳蛋白与硫酸肝素的结合大幅减少。

10. 根据权利要求9所述的衣壳蛋白, 其中所述衣壳蛋白包括来自AAV6血清型的氨基酸序列, 其中所述氨基酸残基531被替换, 从而大幅减少与硫酸肝素的结合。

11. 根据权利要求10所述的衣壳蛋白, 其中所述氨基酸残基531被谷氨酸替换。

12. 根据权利要求1-11任一项所述的衣壳蛋白, 其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比, 所述衣壳蛋白的肌肉转导提高了至少大约10%。

13. 根据权利要求1-12任一项所述的衣壳蛋白, 其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比, 所述衣壳蛋白的肝脏转导提高了至少大约10%。

14. 根据权利要求1-13任一项所述的衣壳蛋白, 其中至少一个酪氨酸残基被替换, 从而改善了心肌转导效率。

15. 根据权利要求14所述的衣壳蛋白, 其中所述衣壳蛋白包括来自AAV1或AAV6血清型的氨基酸序列, 酪氨酸替换是Y445F。

16. 编码权利要求1-15任一项所述衣壳蛋白的多核苷酸。

17. 包含权利要求1-15任一项所述衣壳蛋白的细小病毒衣壳。

18. 一种病毒载体, 包括:

(a) 权利要求17所述的细小病毒衣壳; 及

(b) 包含重组病毒模板的核酸,

其中所述核酸被所述细小病毒衣壳包裹。

19. 根据权利要求18所述的病毒载体,其是一种AAV载体。

20. 根据权利要求18或19所述的病毒载体,其中所述病毒载体对骨骼肌、心肌与/或膈肌表现出系统嗜性。

21. 根据权利要求20所述的病毒载体,其中所述病毒载体对骨骼肌表现出系统嗜性。

22. 根据权利要求18-21任一项所述的病毒载体,其中与包含野生型衣壳蛋白的病毒载体相比,所述病毒载体的肝脏嗜性降低。

23. 根据权利要求18-21任一项所述的病毒载体,其中与包含野生型衣壳蛋白的病毒载体相比,所述病毒载体的肝脏嗜性提高。

24. 一种在药学上可接受载体中包含权利要求18-23任一项所述病毒载体的药物组合物。

25. 一种将核酸递送至细胞的方法,所述方法包括在足以使核酸进入到细胞内的条件下将所述细胞与权利要求18-23任一项所述病毒载体或权利要求24所述药物组合物接触。

26. 一种将核酸递送至受试者的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求18-23任一项所述的病毒载体或权利要求24所述的药物组合物。

27. 一种将核酸递送至受试者的方法,所述方法包括向受试者施用已经在足以使核酸进入到细胞内的条件下与权利要求18-23任一项所述病毒载体或权利要求24所述药物组合物接触的细胞。

28. 根据权利要求26或27所述的方法,其中所述受试者是人类受试者。

29. 根据权利要求26-28任一项所述的方法,其中所述受试者患有下述疾病或存在患下述疾病的风险:肌肉萎缩症、杜氏肌肉萎缩症、贝克型肌肉萎缩症、血友病A、血友病B、多发性硬化、糖尿病、高雪氏症、法布瑞氏症、庞贝氏症、癌症、关节炎、肌肉萎缩、心脏病、先天性心脏衰竭、外周动脉疾病、内膜增生、神经疾病、癫痫、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森氏病、阿尔茨海默病、自身免疫性疾病、囊性纤维化、地中海贫血、贺勒氏症、斯赖综合征、贺勒氏症、贺勒氏-施艾氏症、亨特氏综合征、沙费利波综合征A、B、C、D、莫基奥综合征、马尔多-拉米综合征等、克腊伯氏病、苯丙酮酸尿症、巴滕病、脊髓大脑共济失调、LDL受体缺陷、高氨血症、贫血、关节炎、视网膜变性疾病、黄斑变性和腺苷脱氨酶缺乏症。

30. 根据权利要求26-29任一项所述的方法,其中所述病毒载体或药物组合物施用于骨骼肌、心肌与/或膈肌。

31. 根据权利要求26-29任一项所述的方法,其中所述病毒载体或药物组合物施用于眼睛。

32. 根据权利要求26-29任一项所述的方法,其中所述病毒载体或药物组合物施用于大脑。

33. 根据权利要求26-29任一项所述的方法,其中所述病毒载体或药物组合物经静脉内施用。

34. 根据权利要求26-29任一项所述的方法,其中所述受试者患有肌肉萎缩症或存在患肌肉萎缩症的风险。

35. 根据权利要求26-29任一项所述的方法,其中所述受试者患有心脏病或存在患心脏病的风险。

36. 根据权利要求26-29任一项所述的方法, 其中所述受试者患有充血性心力衰竭或外周动脉疾病或存在患这些病的风险。

37. 根据权利要求26-29任一项所述的方法, 其中所述受试者患有代谢病或存在患代谢病的风险。

38. 一种产生重组细小病毒粒子的方法, 包括向允许细小病毒复制的细胞提供:

(a) 重组细小病毒模板, 包括(i) 异源核酸, 及(ii) 至少一种反向末端重复序列; 及

(b) 多核苷酸, 包括复制蛋白编码序列和编码权利要求1-15任一项所述衣壳蛋白的序列;

在足够复制和包装重组细小病毒模板的条件下;

从而在细胞中产生重组细小病毒粒子。

增强细小病毒载体递送的修饰衣壳蛋白

优先权声明

[0001] 本申请要求2015年12月14日提交的序列号为62/266,941的美国临时申请的权益,通过引用,该临时申请全文纳入本申请中。

联邦支持声明

[0002] 本发明得到美国政府支持,是美国国立卫生研究院拨款项目AI080726、DK084033、HL112761、AI072176、AR064369和GM007050完成的发明。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本发明涉及转导效率提高的修饰细小病毒衣壳蛋白、包括所述衣壳蛋白的病毒载体及利用所述衣壳蛋白递送核酸至细胞或受试者的方法。

背景技术

[0004] 目前,重组腺相关病毒(rAAV)的各种血清型被用于各种临床试验中(例如,rAAV1用于脂蛋白脂酶缺乏症、rAAV2用于莱伯先天性黑朦症,rAAV8用于血友病)。在这些血清型中,rAAV1被认为最适合肌肉(i.m.)递送,不管是直接治疗肌肉疾病(例如,肌肉萎缩症)或从治疗性蛋白质分泌到血液中受益的病症(例如, α -1抗胰蛋白酶(AAT)缺乏症)。这种方法的主要局限是即使施用高剂量的rAAV,转基因表达也一直低于治疗剂量。例如,虽然rAAV-AAT临床试验结果表明,肌肉注射后,血清中AAT浓度呈现剂量依赖性增加,但是,在高剂量队列中,仅实现~3%靶向AAT表达。由于该队列要求每次注射1.35mL,共肌肉注射100次,因此,将剂量提高到疾病治疗必需水平可能并不可行。最近批准的rAAV1-类药物格利贝拉(Glybera)也报告了类似现象。要使rAAV基因增强治疗成为以上疾病的实用选择,必须改善其在肌肉组织内的转导效率。

[0005] 提高转基因表达的工作分为内源法与/或外源法,在内源法中,rAAV衣壳和转基因本身被修饰从而增强转导,在外源法中,在施用rAAV的同时开展补充治疗。虽然外源法,如免疫抑制法改善了转导,但是,将rAAV生物学新发现整合到临床试验设计中的方法一直是最成功的策略。随着众多天然AAV血清型,及其偏好的组织转导模式的研究,这一点得到了很好地证明。这样可以使AAV血清型与靶器官正确配对(例如,肌肉递送rAAV的临床试验表明,采用rAAV1显然比以前采用的rAAV2更成功)。此外,血清型比较生物学和结构分析促进了rAAV的定向演变和合理工程操作,开发了新一代翻译载体。

[0006] 人们已经辨别了最常见rAAV血清型的衣壳结构。每个衣壳结构包括60个重复单体,所述单体由保守 β -桶状核心组成,周围散布构成衣壳表面拓扑的大环。通过将rAAV2与同源性最低血清型rAAV4的结构进行对比,定义了共9个可变区(VR;VRI至VRIX)。VR的氨基酸含量导致每个血清型不同表型,例如,受体结合、抗原反应性及转导效率。将rAAV2的VR(原型rAAV)与更有效的肌肉转导子(如rAAV1)比较,使首个工程rAAV衣壳进入临床试验。rAAV2.5由rAAV1五个氨基酸接枝的rAAV2衣壳组成,隔离它们在肌肉内对rAAV1效率的作用。随访研究表明,要明显增强rAAV2在肌肉内的效率,只需改变单个氨基酸;即在264位置

后插入不同的氨基酸,从而创建新位置265。持续的临床前研究表明,rAAV2的翻译性受到血清型,如rAAV1和rAAV6的高效率,及群内rAAV2中和抗体高主导性限制。通过调节衣壳骨架上的表面氨基酸,这些“新一代”血清型的传导效率进一步得到提高。

[0007] 随着rAAV1已经成为肌肉骨骼应用的首选,rAAV1在67%肌肉内临床试验中使用,过去5年中在86%肌肉内临床试验中使用,因此,改善rAAV1效率对临床转化来说正当其时。本发明提供具有改善特点的修饰衣壳蛋白,适合用于制备具有广泛用途,包括基因治疗的载体。

发明内容

[0008] 本研究分析了rAAV衣壳结构,以制定设计用于改善肌肉转导的工程策略。与rAAV2265插入突变相反,从rAAV1衣壳删除位置265最大程度地提高了肌肉组织内的转基因递送和表达。此外,通过同源建模和突变分析,鉴定了衣壳共同作用别构性控制rAAV6和rAAV2转导效率的两个区。该结果提供了因破坏氢键结合模式而使VR1环区域失稳的机理。该发现允许对这些血清型合理突变,从而使转导效率提高至少一个数量级。此外,嵌合体rAAV血清型内的临床AAT转基因表达比亲代rAAV1提高达12.5倍,支持这些构建体在临床试验中应用。该研究证明了采用rAAV衣壳结构建模和分子剖析的合理设计方法,用于改善更适合翻译研究的递送制剂。

[0009] 本发明的一个方面涉及一种细小病毒衣壳蛋白,包含来自AAV血清型或T=1二十面体衣壳结构的任何其它细小病毒的衣壳蛋白氨基酸序列,其中可变区1 (VR1) 的环包括AAV1衣壳蛋白氨基酸残基258至272或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基,所述可变区1的环通过删除与/或替换一个或多个氨基酸残基进行修饰,由于所述残基编排的氢键模式被靶向破坏,导致环内区域失稳,其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,所述修饰衣壳蛋白使包括所述衣壳蛋白的病毒载体的转导效率得到提高。

[0010] 本发明的另一个方面涉及本发明所述衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白包括与硫酸肝素结合的AAV血清型或其它细小病毒的氨基酸序列,其中调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除,其中所述衣壳蛋白与硫酸肝素的结合大幅减少。

[0011] 本发明的另一个方面涉及一种AAV衣壳蛋白,包括来自AAV3a、AAV3b、AAV6或AAV8血清型的氨基酸序列,其中调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除,其中所述衣壳蛋白与硫酸肝素的结合大幅减少。

[0012] 本发明的另一个方面涉及一种AAV衣壳蛋白,包括来自AAV2、AAV3a或AAV3b血清型的氨基酸序列,其中所述衣壳蛋白在紧接AAV2衣壳蛋白残基264后面或在紧接AAV3a或AAV3b衣壳蛋白相应残基后面插入一个或多个氨基酸残基,且调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除,其中所述衣壳蛋白与硫酸肝素的结合大幅减少;其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,所述修饰衣壳蛋白使包括所述衣壳蛋白的病毒载体的转导效率得到提高。

[0013] 本发明的另一个方面涉及一种编码本发明所述衣壳蛋白的多核苷酸、包括本发明所述衣壳蛋白的细小病毒衣壳、包括本发明所述衣壳蛋白的病毒载体及包括本发明所述病毒载体的药物组合物。

[0014] 本发明的另一个方面涉及一种将核酸递送给细胞的方法,所述方法包括在足以使核酸进入到细胞内的条件下将所述细胞与本发明病毒载体或药物组合物接触。

[0015] 本发明的另一个方面涉及一种将核酸递送到受试者体内的方法,所述方法包括向受试者施用本发明所述的病毒载体或药物组合物。

[0016] 本发明的另一个方面涉及一种将核酸递送给受试者的方法,所述方法包括向受试者施用已经在足以使核酸进入到细胞内的条件下与本发明所述病毒载体或药物组合物接触的细胞。

[0017] 本发明的另一个方面涉及一种产生重组细小病毒粒子的方法,包括向允许细小病毒复制的细胞提供:(a)重组细小病毒模板,包括(i)异源核酸,及(ii)至少一种反向末端重复序列;及(b)多核苷酸,包括复制蛋白编码序列和编码本发明所述衣壳蛋白的序列;在足够复制和包装重组细小病毒模板的条件下;从而在细胞中产生重组细小病毒粒子。

[0018] 本发明的这些方面和其它方面将在下面进行更详细的说明。

附图说明

[0019] 图1A-1D示出了肌肉注射后rAAV1位置265突变体的体内表征情况。(A)小鼠腓肠肌(GC)内施用 1×10^{10} vg。利用7dpi(注射7天后)时的活动物生物荧光成像,将荧光素酶转基因表达直观显示且进行定量。单位以感兴趣区每分钟计数(CPM/ROI)表示。为了直观显示,rAAV1以与265突变体不同的比例尺显示。这不会影响图像定量。为了对转导表型(B)进行体外定量,收获注射的肌肉并将其裂解,并对组织裂解液开展荧光素酶分析。测量结果以归一化为mg总蛋白的相对光单位(RLU/mg蛋白质)表示。(C)采用qPCR测定每个细胞的病毒转基因拷贝数(vg/cg)。(D)在注射 1×10^{10} vg后,开展rAAV1和rAAV1/T265del表达动力学时间过程分析。所有数据表示每组n=4;在(A)组中,每组示出一个代表性图像。

[0020] 图2A-2C示出了rAAV6 265删除突变体的表型。(A) 1×10^{10} vg rAAV6或rAAV6/T265del(删除)在注射7天后(7dpi)的荧光素酶转基因表达。(B) rAAV1(浅灰)和rAAV6(深灰)的VR1衣壳区比对。残基265在rAAV1上以深蓝色突出显示,在rAAV6上以黄色突出显示。采用这些衣壳的结晶坐标在PyMol中生成图像。(C)向小鼠GC中注射rAAV1→rAAV6点突变体后的转基因表达。数据以相对rAAV6测定表达值的倍数差表示。所有数据表示每组n=4。

[0001] 图3A-3D直观示出了rAAV6衣壳的氨基酸位置265和531。rAAV6衣壳结晶坐标的Pymol描述(A),并对每个二十面体对称轴进行标记。(B)3-倍对称轴特写,残基265和531为紫色和橙色,并以箭头表示。(C)5-倍对称轴特写,残基265和531为紫色和橙色,并以箭头表示。(D)2-倍对称轴特写,残基265和531为紫色和橙色,并以箭头表示。

[0021] 图4A-4C示出了衣壳:肝素相互作用对265突变转导表型的影响。(A) rAAV2衣壳突变体注射到GC内7天后的转基因表达。(B) rAAV6衣壳的Pymol描述,在3-倍对称轴中,残基T265(紫色)、K531(橙色)和R585(蓝色)。虚线圆表示肝素结合足迹的一般轮廓。(C) rAAV2和rAAV1在盐水或硫酸肝素溶液中预培养后注射到GC内的转基因表达。所有数据表示每组n=4。

[0022] 图5A-5D示出了本研究中使用的rAAV2和rAAV6构建体的肝素亲和层析洗脱图。本研究中使用的rAAV2(A、B)和rAAV6(C、D)构建体采用肝素-结合琼脂糖小球培养,然后采用日趋严格的NaCl从小球中洗脱。采用RT-qPCR,对每个洗脱组分中存在的病毒基因组的数量进行定量,采集洗脱图。实验重复三次;每组示出一个代表性层析谱。

[0023] 图6示出了rAAV1衣壳VR1删除扫描突变体的转基因表达。在rAAV1衣壳的VR1环中

产生单删除突变,并按 1×10^{10} vg剂量将构建体注射到小鼠GC内。转基因表达以相对注射rAAV1后的测定值的倍数差表示。上图以浅灰色表示本研究中突变的残基,位置265以深灰色表示。亦示出了围绕VR1的N-端和C-端 β -折叠的位置。数据表示每组 $n=4$ 。

[0024] 图7示出了肌肉注射rAAV1和rAAV6构建体后hAAT的血清浓度。包装hAAT转基因的rAAV1和rAAV6衣壳按剂量 1×10^{10} vg注射到GC内。注射5周后,采集血清,并采用ELISA对血液中的hAAT蛋白质进行定量。数据表示每组 $n=4$ 。

[0025] 图8示出了rAAV1和rAAV6衣壳VR1区的氢键。采用MolProbity全原子接触分析和采用KiNG图形程序直观显示,对rAAV1和rAAV6结晶坐标,计算参与氢键形成的原子对。标明包含VR1环的残基。残基265产生的氢键采用绿点直观显示,并以箭头表示。VR1侧链以橙色显示,蛋白质骨架以黄色显示。

[0026] 图9示出了眼内注射rAAV1和rAAV6构建体后的转基因表达。

[0027] 图10示出了眼内注射rAAV1和rAAV6构建体后的转基因表达。

[0028] 图11A-11I示出了KiNG显示软件直观显示的VR1氢键网络(A)。蛋白质主链以橙色显示,侧链以浅绿色显示。氢键以深绿色云表示,箭头指示VR1中存在的氢键。标明VR1残基。在(B)组中,突出显示rAAV1的下述键:HG1 T265-O S262;O A263-HG1 T265;OG S264-H T265。在(C)组中,突出显示rAAV2的下述键:OG S264-H G265;H A266-O Q263。在(D)组中,突出显示rAAV3b的下述键:O Q263-H A266;O Q263-H G265。在(E)组中,突出显示rAAV4的下述键:O L258-H N261。在(F)组中,突出显示rAAV5的下述键:H S258-O V255;O S258-H N261。在(G)组中,突出显示rAAV6的下述键:O S264 A-HG S264 A;HG1 T265-O S262;OG S262-HD1 H272。在(H)组中,突出显示rAAV8的下述键:HG1 T265-O T265。在(I)组中,突出显示rAAV9的下述键:HG S265-O S265;H G267-O S263。

[0029] 图12A-12H示出了各种rAAV血清型的VR1氢键网络。Pymol图像的重点是衣壳环VR1。虚线表示rAAV1(PDB ID、3NG9)、rAAV2(PDB ID、1LP3)、rAAV3b(PDB ID、3KIC)、rAAV4(PDB ID、2G8G)、rAAV5(PDB ID、3NTT)、rAAV6(PDB ID、3OAH)、rAAV8(PDB ID、2QA0)和rAAV9(PDB ID、3UX1)中存在的晶体结构。参与氢键网络的VR1氨基酸以棒状和绿色显示。经突变用于此研究的氨基酸以青绿色表示。在rAAV1(A)中,所示键在残基T265和S262、T265和A263、T265和S264及S264和G266之间。在rAAV2(B)中,所示键在残基S264和G265及Q263和A266之间。在rAAV3b(C)中,所示键在残基Q263和A266及Q263和G265之间。在rAAV4(D)中,所示键在残基L258和N261之间。在rAAV5(E)中,所示键在残基S258和V255及S258和N261之间。在rAAV6(F)中,所示键在残基T265和S262及S262和H272之间。在rAAV8(G)中,所示键在残基T265和T265之间(残基氢键与残基本身)。在rAAV9(H)中,所示键在残基S263和G267,及S265和S265之间(残基氢键与残基本身)。

[0030] 图13A-13F示出了包含VR1删除突变的rAAV1和rAAV6衣壳的生物分布。rAAV1(A)和rAAV6(D)衣壳每个构建体经尾静脉注射 1×10^{11} 载体基因组9天后的活动物生物荧光图像。在注射10天后,收获所示器官、并进行裂解和均化,对裂解液的荧光素酶表达和总蛋白质含量进行定量(B、E)。数值以每毫克总蛋白质相对光单位(RLU/mg)表示。采用qPCR(C、F),对所示器官进一步处理,从而测定每个细胞基因组的载体基因组数量(vg/cg)。每个数据点表示 $n=3$;图像是每组一个代表性小鼠的图像。误差棒反映标准偏差。

[0031] 图14A-14I示出了包含VR1删除突变的rAAV7、rAAV8和rAAV9的生物分布。rAAV7

(A)、rAAV8(D)和rAAV9(G)衣壳每个构建体经尾静脉注射1e11载体基因组9天后的活动物生物荧光图像。在注射10天后,收获所示器官、并进行裂解和均化,对裂解液的荧光素酶表达和总蛋白质含量进行定量(B、E、H)。数值以每毫克总蛋白质相对光单位(RLU/mg)表示。采用qPCR(C、F、I),对所示器官进一步处理,从而测定每个细胞基因组的载体基因组数量(vg/cg)。每个数据点表示n=3;图像是每组一个代表性小鼠的图像。误差棒反映标准偏差。

[0032] 图15A-15D示出了血清型rAAV2和rAAV3b的VR1删除突变衣壳的定性生物分布。在(A)组和(B)组中,经尾静脉施用1e11vg所示构建体。在注射10天后对小鼠成像。在(C)组和(D)组中,经尾静脉施用5e11vg所示构建体。在注射10天后对小鼠成像。在所有情况下,对N=3进行评价;每组示出一个代表性小鼠。

[0033] 图16A-16C示出了VR1删除突变rAAV1和rAAV6衣壳的定量生物分布。组(A)和(B)描述了经尾静脉注射1e11vg所示构建体后内脏器官以平均RLU/mg蛋白质表示的荧光素酶表达。组(C)对心脏、肝脏和GC中rAAV6/T262del和rAAV6/T265del以平均RLU/mg蛋白质表示的荧光素酶表达进行了对比。N=3;误差棒代表标准偏差。

[0034] 图17A-17D示出了VR1删除突变rAAV7、rAAV8和rAAV9衣壳的定量和定性生物分布。组(A)、(B)和(C)描述了经尾静脉注射1e11vg所示构建体后内脏器官以平均RLU/mg蛋白质表示的荧光素酶表达。在组(D)中,小鼠经尾静脉注射1e11vg/所示构建体,并在注射10天后成像。所有实验N=3;误差棒代表标准偏差。在组(D)中,示出每组的一个代表性小鼠。

[0035] 图18A-18L示出了包含VR1插入/替换突变的rAAV1、rAAV2、rAAV3b和rAAV6衣壳的生物分布。rAAV2(A)、rAAV3b(D)、rAAV1(G)和rAAV6(J)衣壳每个构建体经尾静脉注射1e11载体基因组9天后的活动物生物荧光图像。在注射10天后,收获所示器官、并进行裂解和均化,对裂解液的荧光素酶表达和总蛋白质含量进行定量(B、E、H、K)。数值以每毫克总蛋白质相对光单位(RLU/mg)表示。采用qPCR(C、F、I、L),对所示器官进一步处理,从而测定每个细胞基因组的载体基因组数量(vg/cg)。每个数据点表示n=3;图像是每组一个代表性小鼠的图像。误差棒反映标准偏差。

[0036] 图19A-19D示出了VR1 265D突变rAAV1、rAAV2、rAAV3b和rAAV6衣壳的定量生物分布。组(A)、(B)、(C)和(D)描述了经尾静脉注射1e11vg所示构建体后内脏器官以平均RLU/mg蛋白质表示的荧光素酶表达。N=3;误差棒代表标准偏差。

[0037] 图20A-20B示出了265D突变rAAV8和rAAV9衣壳的定性生物分布。在(A)组和(B)组中,经尾静脉注射1e11vg所示构建体。在注射10天后对小鼠成像。在所有情况下,对N=3进行评价;每组示出一个代表性小鼠。

[0038] 图21A-21D示出了衣壳肝素结合能力对含VR1插入/替换突变衣壳的转导效率的影响。注射1e11vg以下各衣壳子组10天后采集的小鼠肝脏样本的体外荧光素酶分析结果:(A) rAAV2衣壳子组,包括265D,零-肝素,及265D零-肝素组合突变体;(B) rAAV3b衣壳子组,包括265D,零-肝素,及265D零-肝素组合突变体;及(C) rAAV6衣壳子组,包括265D,零-肝素,及265D零-肝素组合突变体。注射1e11vg子组(D) rAAV6衣壳10天后采集的小鼠心脏、肝脏和GC样本的体外荧光素酶分析结果:子组(D) rAAV6衣壳包括T265del,零-肝素,及T265del零-肝素组合突变体。数据表示归一化相对光单位每毫克分析蛋白质(RLU/mg)。每个数据点表示n=3;误差棒反映标准偏差。

[0039] 图22A-22D示出了VR1突变体与野生型衣壳在心脏组织和肝脏组织中的转导效率

对比。注射1e11vg VR1删除突变衣壳10天后心脏(A)和肝脏(B)组织样本的体外荧光素酶分析结果。测定每毫克分析蛋白质的相对光单位之后,数据以相对rAAV9测定值的倍数变化表示。A和B中分析器官的心脏和肝脏转导之比(C)。注射1e11vg 265D突变衣壳10天后肝组织样本的体外荧光素酶分析结果。测定每毫克分析蛋白质的相对光单位之后,数据以相对rAAV8测定值的倍数变化表示。每个数据点表示n=3;误差棒反映标准偏差。

[0040] 图23A-23B示出了包含VR1突变及酪氨酸-至-苯丙氨酸突变的rAAV1和rAAV6衣壳的转导效率。仅包含VR1删除突变及还包含Y445F突变的rAAV1衣壳(A),及具有相当突变的rAAV6衣壳(B)的心脏、肝脏和GC组织的体外荧光素酶分析结果。数据表示归一化相对光单位每毫克分析蛋白质(RLU/mg)。组织样本在每个构建体注射1e11vg 10天后采集。每个数据点表示n=3;误差棒反映标准偏差。

[0041] 图24示出了rAAV8和rAAV8/S266del衣壳的定性生物分布。每个所示构建体经尾静脉注射1e11vg。在注射10天后对小鼠成像。在所有情况下,对N=3进行评价;每组示出一个代表性小鼠。

具体实施方式

[0042] 现在,将参考示出本发明优选实施例的附图对本发明进行说明。但是,本发明可以采用各种不同形式实施,并且不应认为本发明限于此处提出的实施例。相反,提供这些实施例是为了充分完整地公开本发明,本领域技术人员将全面了解本发明的范围。

[0043] 除非特别规定,本发明使用的所有术语(包括技术名词和科学术语)的意义与本发明所属领域技术人员通常理解的相同。本发明说明中使用的术语仅仅是为了描述特定实施例,并不是用于限制本发明。此处提到的所有出版物、专利申请、专利和其它公开文献都通过引用而纳入本申请中。

[0044] 除非特别说明,此处核苷酸序列仅以单链、5'至3'方向、从左至右显示。此处核苷酸和氨基酸按照IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的方式表示,或(氨基酸)按照37CFR§1.822和惯用法以单字母代码或三字母代码表示。参见,例如PatentIn User Manual,99-102(1990年11月)(美国专利商标局)。

[0045] 除非另外指出,可以采用本领域技术人员熟悉的标准方法构建重组细小病毒和AAV(rAAV)构建体,包装表达细小病毒Rep与/或Cap序列的载体,及瞬时稳定地转染包装细胞。所述方法是本领域技术人员熟悉的,参见,例如,SAMBROOK et al.,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL 2nd Ed.(Cold Spring Harbor,NY,1989);AUSUBEL et al.,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(Green Publishing Associates, Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0046] 此外,本发明还设想在本发明的一些实施例中,可以排除或省略此处提出的任何特征或特征组合。

[0047] 为了进一步说明,例如,如果说明书表明某一氨基酸可以选自A、G、I、L与/或V,则该陈述亦表明该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,就好像每个所述子组合在此处明确提出一样。此外,所述陈述还表明,可以放弃一个或多个规定氨基酸。例如,在特定实施例中,氨基酸不是A、G或I;不是A;不是G或V等,就好像此处明确提出了这些可能的否认声明一样。

定义

[0048] 此处发明内容和所附权利要求书中使用下述术语。

[0049] 除非上下文中清楚表明,否则,单数形式“一”也包括复数形式。

[0050] 此外,提到可测量值,如多核苷酸或多肽序列的长度、剂量、时间、温度等时使用的词语“大约”指的是包括规定数值20%、10%、5%、1%、0.5%或甚至0.1%的变化范围。

[0051] 此外,此处所述“与/或”指的是和包括一个或多个相关列出项目的任何和所有可能组合,及缺少替代(“或”)中阐明的组合。

[0052] 连接词“基本上由……组成”解释为包括列出的材料或步骤“及那些并不显著影响本发明基本新特点”的材料或步骤(例如,rAAV复制)。参见,In re Herz,537 F.2d 549, 551-52,190 U.S.P.Q.461,463(CCPA 1976)(原文强调);亦参见MPEP§2111.03。因此,此处词语“基本上由……组成”不应解释为相当于“包括”。

[0053] 正如应用于本发明多核苷酸或多肽序列时,词语“基本上由……组成”(及其语法变化形式)指的是多核苷酸或多肽由所提出序列(例如SEQ ID NO)及所提出序列5'与/或3'或N-端与/或C-端上共10个或更少数量(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的其它核苷酸或氨基酸组成,从而多核苷酸或多肽的功能并未显著改变。共10个或更少数量的其它核苷酸或氨基酸包括两端加和的其它核苷酸或氨基酸的总数量。正如应用于本发明多核苷酸时那样,词语“显著改变”指的是与所提出序列组成的多核苷酸的表达水平相比,表达编码多肽的能力提高或降低至少大约50%或更高。正如应用于本发明多肽时那样,词语“显著改变”指的是与所提出序列组成的多肽的活性相比,转导活性提高或降低至少大约50%或更高。

[0054] 此处所述词语“细小病毒”包括细小病毒科,包括自主复制细小病毒和依赖病毒。自主复制细小病毒包括细小病毒属、红病毒属、浓核病毒属、重复病毒属(Iteravirus)和康特拉病毒属(Contravirus)的成员。示例性自主复制细小病毒包括但不限于小鼠微小病毒、牛细小病毒、犬细小病毒、鸡细小病毒、猫泛白细胞减少症病毒、猫细小病毒、鹅细小病毒、H1细小病毒、番鸭细小病毒、蛇细小病毒和B19病毒。其它自主复制细小病毒是本领域技术人员熟悉的。参见例如,FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69章(4版,利平科特-雷文出版公司(Lippincott-Raven Publishers))。

[0055] 依赖病毒属包括腺相关病毒(AAV),包括但不限于AAV 1、AAV 2、AAV 3(包括3A和3B型)、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAV 13、鸟AAV、牛AAV、犬AAV、山羊AAV、蛇AAV、马AAV和绵羊AAV。参见,例如FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69章(4版,利平科特-雷文出版公司)和表1。

[0056] 正如此处所述,词语“腺相关病毒”(AAV)包括但不限于AAV 1、AAV 2、AAV 3(包括3A和3B型)、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAV 13、蛇AAV、鸟AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、山羊AAV、虾AAV及目前了解或以后发现的任何其它AAV。参见,例如FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69章(4版,利平科特-雷文出版公司)。已经鉴定了多种相对较新的AAV血清型和分支(参见,例如Gao et al.,(2004)J.Virol.78: 6381;Moris et al.,(2004)Virol.33-:375;和表1)。

[0057] 本发明的细小病毒粒子和基因组可以来源于AAV,但不限于来源于AAV。AAV各种血清型及自主复制细小病毒的基因组序列,以及天然ITR、Rep蛋白质和衣壳亚单位的序列是本领域熟悉的。这些序列可以在文献或公开数据库,如基因库(GenBank)中找到。参见,例如

基因库保藏号NC_002077、NC_001401、NC_001729、NC_001863、NC_001829、NC_001862、NC_000883、NC_001701、NC_001510、NC_006152、NC_006261、AF063497、U89790、AF043303、AF028705、AF028704、J02275、J01901、J02275、X01457、AF288061、AH009962、AY028226、AY028223、AY631966、AX753250、EU285562、NC_001358、NC_001540、AF513851、AF513852和AY530579;通过引用,有关细小病毒和AAV核酸和氨基酸序列的公开内容并入本申请中。亦参见,例如,Bantel-Schaal et al., (1999) J.Virol.73:939;Chiorini et al., (1997) J.Virol.71:6823;Chiorini et al., (1999) J.Virol.73:1309;Gao et al., (2002) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 99:11854;Moris et al., (2004) Virol.33-:375-383;Mori et al., (2004) Virol.330:375;Muramatsu et al., (1996) Virol.221:208;Ruffing et al., (1994) J.Gen.Virol.

75:3385;Rutledge et al., (1998) J.Virol.72:309;Schmidt et al., (2008) J.Virol.82:8911;Shade et al., (1986) J.Virol.58:921;Srivastava et al., (1983) J.Virol.45:555;Xiao et al., (1999) J.Virol.73:3994;国际专利公开W0 00/28061、W0 99/61601、W0 98/11244;及美国专利第6,156,303号;通过引用,有关细小病毒和AAV核酸和氨基酸序列的公开内容并入本申请中。亦参见表1。最初有关AAV1、AAV2和AAV3 ITR序列的描述由Xiao,X., (1996) 在宾夕法尼亚州匹兹堡大学博士论文“Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and

integration”中提供(该论文全文并入本申请中)。

表1

	基因库保藏号		基因库保藏号		基因库保藏号
全基因组		Hu T88	AY695375	分支 E	
腺相关病毒 1	NC_002077, AF063497	Hu T71	AY695374	Rh38	AY530558
腺相关病毒 2	NC_001401	Hu T70	AY695373	Hu66	AY530626
腺相关病毒 3	NC_001729	Hu T40	AY695372	Hu42	AY530605
腺相关病毒 3B	NC_001863	Hu T32	AY695371	Hu67	AY530627
腺相关病毒 4	NC_001829	Hu T17	AY695370	Hu40	AY530603
腺相关病毒 5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377	Hu41	AY530604
腺相关病毒 6	NC_001862			Hu37	AY530600
鸟 AAV ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	分支 C		Rh40	AY530559
鸟 AAV 菌株 DA-1	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629	Rh2	AY243007
牛 AAV	NC_005889, AY388617	Hu10	AY530576	Bb1	AY243023
		Hu11	AY530577	Bb2	AY243022
分支 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
分支 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	分支 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	分支 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	克隆分离体	
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

[0058] 此处所述词语“嗜性”指的是病毒进入细胞,任选和优选地随后表达(例如转录和任选翻译)细胞中病毒基因组携带的序列,例如,对重组病毒来说,表达异源核苷酸序列。本领域技术人员将了解的是,病毒基因组异源核酸序列的转录可以在缺乏反式作用因子时启动,例如,用于诱导型启动子或其它调节核酸序列。在AAV时,病毒基因组的基因表达可以来自稳定整合的细小病毒、非整合附加体,以及病毒可能进入细胞内的任何其它形式。

[0059] 正如此处所述,细小病毒或AAV的细胞“转导”指的是细小病毒/AAV-介导将遗传物质传输到细胞内。参见,例如FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69章(3版,利平科特-雷文出版公司)。

[0060] 词语“5' 部分”和“3' 部分”是定义两个或多个元件之间空间关系的相对词语。因此,例如,多核苷酸的“3' 部分”指的是多核苷酸另一段下游的一段。词语“3' 部分”并不表示所述段是多核苷酸3' 端必需的,或甚至一半多核苷酸3' 端必需的,虽然情况可能是这样。同样,例如,多核苷酸的“5' 部分”指的是多核苷酸另一段上游的一段。”词语“5' 部分”并不表示所述段是多核苷酸5' 端必需的,或甚至一半多核苷酸5' 端必需的,虽然情况可能是这样。

[0061] 正如此处所述,除非另外说明,词语“多肽”包括肽和蛋白质。

[0062] “多核苷酸”是核苷酸碱基序列,可能是RNA、DNA或DNA-RNA混合序列(包括天然和非天然核苷酸),可以是单链或双链DNA序列。

[0063] 词语“序列一致性”是本领域的标准意义。正如本领域熟悉的那样,可以利用许多不同的程序鉴定多核苷酸或多肽与已知序列是否具有序列一致性或类似性。序列一致性或类似性可以采用本领域熟悉的标准方法测定,包括但不限于Smith&Waterman局部序列一致性算法(Adv. Appl. Math. 2:482 (1981))、Needleman&Wunsch序列一致性比对算法(J. Mol. Biol. 48:443 (1970))、Pearson&Lipman相似性检索方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988))、这些算法的计算机实施(威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,该软件包由威斯康星州麦迪逊市科学大道575号的Genetics Computer Group提供),及Devereux et al., Nucl. 描述的最佳拟合序列程序。

[0064] 有用算法的一个实例是PILEUP。PILEUP利用渐进、双序列比对,根据一组相关序列

建立了多序列比对法。它还绘制了表明聚类关系的树图,用于建立比对。PILEUP采用Feng&Doolittle (J.Mol.Evol.35:351 (1987)) 渐进比对的简化方法;这种方法与Higgins&Sharp,CABIOS 5:151(1989)描述的方法类似。

[0065] 另一个有用算法的实例是Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403 (1990) 和 Karlin et al.,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873(1993)描述的BLAST算法。特别有用的BLAST程序是Altschul et al.,Meth.Enzymol.,266:460(1996);blast.wustl/edu/blast/README.html的WU-BLAST-2程序。WU-BLAST-2采用几个搜索参数,这些参数优选设定为默认值。这些参数是动态值,是由程序本身建立的,取决于具体序列的组成和搜索感兴趣序列的具体数据库的组成;但是,可以调节这些值以提高灵敏性。

[0066] 另一种有用的算法是Altschul et al.,Nucleic Acids Res.25:3389(1997)报告的空位BLAST法。

[0067] 氨基酸序列一致性百分数通过匹配相同残基的数量除以比对区“长”序列残基的总数量确定。“长”序列是比对区中实际残基数最多的序列(为了最大程度地提高比对分数而通过WU-Blast-2引入的空位被忽略)。

[0068] 按照类似方式,核酸序列一致性百分数定义为候选序列中与此处特别公开的多核苷酸中核苷酸相同的核苷酸残基百分数。

[0069] 比对可能包括在比对序列中引入空位。此外,对于核苷酸比此处特别公开多核苷酸多或少的序列来说,应该了解的是,在一个实施例中,序列一致性百分数将根据相同核苷酸的数量相对核苷酸总数量确定。因此,例如,在一个实施例中,比此处特别公开序列短的序列的序列一致性将采用短序列中的核苷酸数确定。在一致性百分数计算中,相对权重并未分配给各种不同的序列变化表示,如插入、删除、替换等。

[0070] 在一个实施例中,仅一致性评为正分(+1),所有序列变化形式,包括空位都分配一个数值“0”,序列相似性计算不需要下述加权尺度或参数。序列一致性百分数可以,例如,将匹配相同残基数除以比对区“短”序列残基总数,然后乘以100计算得出。“长”序列是比对区实际残基数最多的序列。

[0071] “分离”多核苷酸(例如,“分离DNA”或“分离RNA”)指的是与天然生物或病毒至少其它一些组分(例如,通常发现与多核苷酸有关的细胞或病毒结构组分或其它多肽或核酸)分离的多核苷酸或基本上不含天然生物或病毒至少其它一些组分的多核苷酸。

[0072] 同样,“分离”多肽指的是与天然生物或病毒至少其它一些组分(例如,通常发现与多肽有关的细胞或病毒结构组分或其它多肽或核酸)分离的多肽或基本上不含天然生物或病毒至少其它一些组分的多肽。

[0073] “治疗多肽”是可以缓解或减轻细胞或受试者因蛋白质缺少或缺陷所引发症状的多肽。或者,“治疗多肽”是给受试者带来好处(例如,抗癌效果或改善移植物存活性)的多肽。

[0074] 正如应用于多核苷酸或多肽序列时,词语“修饰”,指的是由于一个或多个删除、加入、替换或它们的任何组合,得到的与野生型序列不同的序列。

[0075] “分离”或“提纯”(或语法相当形式)病毒载体,指的是将病毒载体与初始材料中的至少其它一些组分至少部分分离。

[0076] 词语“治疗”(及其语法变化形式)指的是受试者疾病严重程度减轻、至少部分改善或稳定与/或至少一种临床症状减轻、缓解、减少或稳定与/或疾病或病症进程延迟。

[0077] 词语“预防”(及其语法变化形式)指的是与不采用本发明方法相比,阻止与/或延迟受试者疾病、病症与/或临床症状的发生与/或减轻疾病、病症与/或临床症状发生的严重程度。预防可以是全面的,例如,完全不出现疾病、病症与/或临床症状。预防还可以是部分的,从而受试者疾病、病症与/或临床症状的发生与/或疾病、病症与/或临床症状发生的严重程度低于不采用本发明方法时的情况。

[0078] “治疗有效”剂量是足够为受试者提供某些改善或好处的剂量。或者,“治疗有效”剂量是将减轻、缓解、减少或稳定受试者至少一种临床症状的剂量。本领域技术人员将了解的是,治疗效果并不需要全面或治愈,只要为受试者提供某些好处即可。

[0079] “预防有效”剂量是与不采用本发明方法相比,足够阻止与/或延迟受试者疾病、病症与/或临床症状的发生与/或减轻疾病、病症与/或临床症状发生的严重程度的剂量。本领域技术人员将了解的是,预防水平并不需要全面,只要为受试者提供某些好处即可。

[0080] 词语“异源核苷酸序列”和“异源核酸”在此处互换使用,指的是病毒中的非天然序列。在一些实施例中,异源核酸包括编码感兴趣多肽或非翻译RNA的开放阅读框(例如,用于输送至细胞或受试者)。

[0081] 词语“病毒载体”、“载体”或“基因递送载体”指的是作为核酸递送媒介的病毒(例如,AAV)粒子,包括包装在病毒粒子内的载体基因组(例如,病毒DNA[vDNA])。或者,在一些背景中,词语“载体”可用于仅指载体基因组/vDNA或指质粒。

[0082] 本发明的病毒载体可以进一步是国际专利公开WO 01/92551所述的双链细小病毒粒子(通过引用,该专利公开全文纳入本申请中)。因此,在一些实施例中,可以包装双链(双)基因组。

[0083] “rAAV载体基因组”或“rAAV基因组”是包括一个或多个异源核酸序列的AAV基因组(即vDNA)。rAAV载体通常仅需顺式145碱基ITR来产生病毒。所有其它病毒序列是可有可无的,可能以反式提供(Muzyczka (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97)。通常, rAAV载体基因组将仅保留一个或多个ITR序列,从而最大限度增大载体有效包装转基因的尺寸。结构和非结构蛋白质编码序列可以以反式提供(例如,来自载体,如质粒,或将序列稳定整合到包装细胞内)。在本发明的实施例中, rAAV载体基因组包括至少一个ITR序列(例如,AAV ITR序列),任选两个ITR序列(例如,两个AAV ITR序列),所述序列通常将位于载体基因组的5'端和3'端,侧接异源核酸,但并不需要与其连接。ITR可以彼此相同或不同。

[0084] 词语“末端重复”或“TR”包括形成发夹结构并作为反向末端重复序列(即调节要求的功能,例如,复制、病毒包装、整合与/或前病毒补救等)的任何病毒末端重复序列或合成序列。ITR可以是AAV ITR或非-AAV ITR。例如,非-AAV ITR序列,如其它细小病毒(例如,犬细小病毒、牛细小病毒、鼠细小病毒、猪细小病毒、人细小病毒B-19)的序列,或作为SV40复制源的SV40发夹可以作为ITR使用,ITR可以通过截断、替换、删除、插入与/或加入进一步进行修饰。此外,ITR可以部分或全部合成,例如, Samulski et al 美国专利第5,478,745号所述的“双-D序列”。图24提供了本发明设想的合成ITR实例。

[0085] 细小病毒基因组在其5'端和3'端都有回文序列。序列的回文性质导致形成发夹结构,发夹结构通过在互补碱基对之间形成氢键稳定。人们认为,这种发夹结构采用“Y”形或

“T”形。参见，例如FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69&70章(4版，利平科特-雷文出版公司)。

[0086] “AAV反向末端重复序列”或“AAV ITR”可以来自任何AAV，包括但不限于血清型1、2、3a、3b、4、5、6、7、8、9、10、11或13、蛇AAV、鸟AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、山羊AAV、虾AAV或现在熟知或以后发现的任何其它AAV(参见，例如表1)。AAV ITR不需要拥有天然末端重复序列(例如，天然AAV ITR序列可以通过插入、删除、截断与/或错义突变改变)，只要所述末端重复序列调节所要求的功能，例如，复制、病毒包装、持久性，与/或前病毒拯救等即可。

[0087] 本发明的病毒载体可以进一步是如国际专利公开W0 00/28004和Chao et al., (2000)Mol. Therapy 2:619所述的“靶向”病毒载体(例如，拥有定向嗜性)与/或“混合”细小病毒(即其中病毒ITR和病毒衣壳来自不同的细小病毒)。

[0088] 此外，病毒衣壳或基因组元件可以包含其它修饰，包括插入、删除与/或替换。

[0089] 正如此处所述，词语“氨基酸”包括任何天然氨基酸、其修饰形式及合成氨基酸。

[0090] 天然左旋(L-)氨基酸如表2所示。

表2

氨基酸残基	缩写	
	三字母代码	单字母代码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸(天冬氨酸盐)	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸(谷氨酸盐)	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
蛋氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0091] 或者，氨基酸可以是修饰氨基酸残基(非限制性实例在表3中示出)或可以是后-翻译修饰(例如，乙酰化、酰胺化、甲酰化、羟基化、甲基化、磷酸化或硫酸化)氨基酸。

表3:氨基酸残基衍生物

修饰氨基酸残基	缩写
2-氨基己二酸	Aad
3-氨基己二酸	bAad
β -丙氨酸、 β -氨基丙酸	bAla
2-氨基丁酸	Abu
4-氨基丁酸、哌啶酸	4Abu
6-氨基己酸	Acp
2-氨基庚酸	Ahe
2-氨基异丁酸	Aib
3-氨基异丁酸	bAib

2-氨基庚二酸	Apm
叔丁基丙氨酸	t-BuA
瓜氨酸	Cit
环己基丙氨酸	Cha
2,4-二氨基丁酸	Dbu
锁链素	Des
2,2'-二氨基庚二酸	Dpm
2,3-二氨基丙酸	Dpr
N-乙基甘氨酸	EtGly
N-乙基天冬酰胺	EtAsn
高精氨酸	hArg
高半胱氨酸	hCys
高丝氨酸	hSer
羟赖氨酸	Hyl
别-羟赖氨酸	aHyl
3-羟基脯氨酸	3Hyp
4-羟基脯氨酸	4Hyp
异锁链素	Ide
别-异亮氨酸	alle
蛋氨酸亚砷	MSO
N-甲基甘氨酸、肌氨酸	MeGly
N-甲基异亮氨酸	Melle
6-N-甲基赖氨酸	MeLys
N-甲基缬氨酸	MeVal
2-萘基丙氨酸	2-Nal
正缬氨酸	Nva
正亮氨酸	Nle
鸟氨酸	Orn
4-氯苯基丙氨酸	Phe(4-Cl)
2-氟苯基丙氨酸	Phe(2-F)
3-氟苯基丙氨酸	Phe(3-F)
4-氟苯基丙氨酸	Phe(4-F)
苯基甘氨酸	Phg
β -2-噻吩丙氨酸	Thi

[0092] 此外,非天然氨基酸可以是Wang et al., (2006) Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.35:225-49描述的“非天然”氨基酸。这些非天然氨基酸可以有利地用于将感兴趣的分子与AAV衣壳蛋白化学连接。

[0093] 词语“模板”或“底物”指的是可复制产生细小病毒DNA的多核苷酸序列。为了产生载体,模板通常将嵌在更大的核苷酸序列或构建体内,包括但不限于质粒、裸DNA载体、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或病毒载体(例如,腺病毒、疱疹病毒、Epstein-Barr病毒、AAV、杆状病毒、逆转录病毒载体等)。或者,所述模板稳定地包含在包装细胞的染色体。

[0094] 细小病毒或AAV“Rep编码序列”指的是编码细小病毒或编码调节病毒复制和新病毒粒子产生的AAV非结构蛋白的核酸序列。细小病毒和AAV复制基因和蛋白质在例如，FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69&70章(4版，利平科特-雷文出版公司)中进行了描述。

[0095] “Rep编码序列”并不需要编码所有细小病毒或AAV复制蛋白质。例如，谈到AAV时，Rep编码序列并不需要编码所有四个AAV Rep蛋白质(Rep78、Rep 68、Rep52和Rep40)，实际上，我们认为，AAV5仅表达剪接Rep68和Rep40蛋白质。在代表性实施例中，Rep编码序列至少对病毒基因组复制和包装到新病毒粒子内必须的复制蛋白质进行编码。Rep编码序列通常将对至少一种大型Rep蛋白质(即Rep78/68)和一种小型Rep蛋白质(即Rep52/40)编码。在具体实施例中，Rep编码序列编码AAV Rep78蛋白质和AAV Rep52与/或Rep40蛋白质。在其它实施例中，Rep编码序列编码Rep68蛋白质和Rep52蛋白质与/或Rep40蛋白质。在另一个实施例中，Rep编码序列编码Rep68和Rep52蛋白质、Rep68和Rep40蛋白质、Rep78和Rep52蛋白质、Rep78和Rep40蛋白质。

[0096] 词语“大型Rep蛋白质”指的是Rep68与/或Rep78。发明所述大型Rep蛋白质可以是野生型或合成型。野生型大型Rep蛋白质可以来自任何细小病毒或AAV，包括但不限于血清型1、2、3a、3b、4、5、6、7、8、9、10、11或13，或现在熟知或以后发现的任何其它AAV(例如见表1)。合成大型Rep蛋白质可以通过插入、删除、截断与/或错义突变改变。

[0097] 本领域技术人员将进一步了解的是，复制蛋白质并不一定由同一多核苷酸编码。例如，对MVM来说，NS-1和NS-2蛋白质(剪接变体)可以由另一种多核苷酸独立表达。同样，对AAV来说，p19启动子可以失活，大型Rep蛋白质由一种多核苷酸表达，而小型Rep蛋白质由另一种不同的多核苷酸表达。但是，复制蛋白质由单一构建体表达通常更方便。在一些系统中，病毒启动子(例如，AAV p19启动子)可能无法被细胞识别，因此，必须由不同的表达盒表达大型和小型Rep蛋白质。在其它情况下，可能要求分别表达大型Rep和小型Rep蛋白质，即在独立转录与/或翻译控制元件控制下。例如，可能要求控制大型Rep蛋白质的表达，从而降低大型Rep蛋白质和小型Rep蛋白质之比。在昆虫细胞的情况下，下调大型Rep蛋白质(例如Rep78/68)的表达，避免对细胞的毒性比较有利(参见，例如Urabe et al., (2002) Human Gene Therapy 13:1935)。

[0098] 细小病毒或AAV“帽子(cap)编码序列”编码构成功能细小病毒或AAV衣壳(即可以包装DNA和感染靶细胞)的结构蛋白质。通常，帽子编码序列将编码所有细小病毒或AAV衣壳亚单位，但可以并非对全部衣壳亚单位进行编码，只要产生功能衣壳即可。通常，帽子编码序列将位于单个核酸分子上，但并非必须如此。

[0099] 自主细小病毒和AAV的衣壳结构在FIELDS等所著《病毒学》第2卷第69&70章(4版，利平科特-雷文出版公司)中进行了更详细的描述。

修饰细小病毒衣壳蛋白

[0100] 本发明提供修饰细小病毒衣壳蛋白，所述修饰细小病毒衣壳蛋白增强组织转导能力与/或修饰组织特异性，可用于制备高效递送核酸到细胞内的细小病毒载体。发明人已经发现，通过破坏氨基酸残基之间的氢键结合，衣壳蛋白可变区1(VR1)的环失去稳定，提高了细胞转导与/或修饰组织特异性。

[0101] 本发明的一个方面涉及一种细小病毒衣壳蛋白，包含来自AAV血清型或T=1二十面体衣壳结构的任何其它细小病毒的衣壳蛋白氨基酸序列，其中可变区1(VR1)的环包括

AAV1衣壳蛋白氨基酸残基258至272或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基,所述可变区1的环通过删除与/或替换一个或多个氨基酸残基进行修饰,由于所述残基编排的氢键模式被靶向破坏,导致环内区域失稳,其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,所述修饰衣壳蛋白使包括所述衣壳蛋白的病毒载体的转导效率与/或修饰组织特异性得到提高。

[0102] AAV血清型是本领域熟悉的,并在上面表1中进行了描述。AAV血清型具有T=1的二十面体衣壳结构。

[0103] 在能够感染脊椎动物的细小病毒亚科下面有8个属,它们的特征是都拥有T=1的二十面体对称衣壳。细小病毒包括但不限于下述病毒。

- 1.) 阿留申细小病毒属(包括以下种:水貂阿留申病毒、灰狐阿留申病毒)
- 2.) Aveparvovirus属(包括以下种:Aveparvovirus)
- 3.) 牛犬细小病毒属(包括以下种:食肉动物牛犬细小病毒1-3;鳍足类牛犬细小病毒1和2;灵长类牛犬细小病毒1和2;蹄类牛犬细小病毒1-5)
- 4.) Copiparvovirus属(包括以下种:Copiparvovirus)
- 5.) 依赖性细小病毒属(包括以下种:腺相关依赖性细小病毒A;腺相关依赖性细小病毒B;雁形目依赖性细小病毒1;鸟依赖性细小病毒1;翼手目依赖性细小病毒1;鳍足类依赖性细小病毒1;有鳞类依赖性细小病毒1)
- 6.) 红视症细小病毒属(包括以下种:灵长类红视症细小病毒1-4;啮齿类红视症细小病毒1;蹄类红视症细小病毒1)
- 7.) Protoparvovirus属(包括以下种:食肉类protoparvovirus 1;啮齿类protoparvovirus 1和2;蹄类细小病毒1)
- 8.) 四体细小病毒属(包括以下种:翼手目四体细小病毒1;灵长类四体细小病毒1;蹄类四体细小病毒1-4)

[0104] 衣壳蛋白序列是本领域熟悉的,可以在序列数据库,如GenBank中获取。此处谈到来自AAV1、AAV2、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8和AAV9的衣壳蛋白时提到的氨基酸残基编号指的是表1列出的GenBank保藏号公开的序列。

[0105] VR1区是本领域识别的AAV血清型和T=1二十面体衣壳结构细小病毒的衣壳蛋白序列部分。构成VR1区的环基本上由AAV1的氨基酸残基258至272或另一种AAV或细小病毒的相应氨基酸残基组成。由于VR1环是充分识别的结构,因此,本领域技术人员很容易鉴定相应的氨基酸残基。例如,表4清单包括示例VR1氨基酸残基名单。虽然列出了特定残基,但是,本领域技术人员应该了解的是,VR1区的界限是近似的,可能变化一个或两个残基。

表4

细小病毒	VR1氨基酸残基
AAV1	²⁶¹ SSASTGASNDNHY ₂₇₃ (SEQ ID NO:1)
rAAV2	²⁶¹ SSQSGAS ₂₆₇ (SEQ ID NO:2)
rAAV3b	²⁶¹ SSQSGASNDNHY ₂₇₂ (SEQ ID NO:3)
rAAV4	²⁵⁶ ESLQSNTY ₂₆₃ (SEQ ID NO:4)
rAAV5	²⁵² SGSVDGS ₂₅₈ (SEQ ID NO:5)
rAAV6	²⁶¹ SSASTGASNDNHY ₂₇₃ (SEQ ID NO:6)
rAAV8	²⁶³ NGTSGGAT ₂₇₀ (SEQ ID NO:7)
rAAV9	²⁶¹ SNSTSGGSS ₂₆₉ (SEQ ID NO:8)

[0106] 细小病毒和AAV的VR1区的特征在于稳定该区的众多氢键。例如, AAV1衣壳的VR1区包括四个氢键, AAV6衣壳的VR1区包括二个氢键(参见图8)。VR1环的稳定性可通过消除该区的一个或多个氢键降低, 例如, 通过删除参与氢键结合的氨基酸残基或以不构成氢键的残基替换所述氨基酸残基。在一些实施例中, VR1环中至少1、2、3或4或更多个氢键被破坏。

[0107] VR1环内氨基酸残基形成的氢键可以采用本领域熟悉的方法鉴定, 包括衣壳蛋白晶体结构计算分析、衣壳蛋白核磁共振结构分析、序列同源性对比等。直接参与VR1环内氢键结合的氨基酸残基实例在表5中列出。

表5

病毒	氢键
AAV1	HG1 T265 至 O S262 O A263 至 HG1 T265 OG S264 至 H T265
AAV2	OG S264 至 H G265 H A266 至 O Q263
AAV3b	O Q263 至 H A266 O Q263 至 H G265
AAV4	O L258 至 H N261
AAV5	H S258 至 O V255 O S258 至 H N261
AAV6	O S264 A 至 HG S264 A HG1 T265 至 O S262 OG S262 至 HD1 H272
AAV8	HG1 T265 至 O T265
AAV9	HG S265 至 O S265 H G267 至 O S263

[0108] 例如，晶体结构可以从公开数据库下载，例如，RCSB蛋白质数据库 (www.rcsb.org)，该数据库是美国国立卫生研究院赞助建立的公开可访问的所有结构数据库。单个pdb文件可通过结构验证程序，如公开可获取的MolProbity4结构验证程序 (www.molprobidity.biochem.duke.edu) 运行，该程序分析晶体结构内单个分子的几何关系及它们的电子云位置，从而提供有关给定结构中氢键位置的直观信息/pdb文件。MolProbity的输出是Kinemage-这是一种包括氢键的晶体结构的图形表示，采用公开可获取的软件程序KiNG (www.kinemage.biochem.duke.edu) 可以使其直观显示。

[0109] 在一些实施例中，与包括未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比，包括修饰衣壳蛋白的病毒载体的转导效率提高了至少大约10%，例如，提高了至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%或更高。未修饰衣壳蛋白可以是野生型衣壳蛋白或可以是合成型衣壳蛋白，只要其不包含本发明所述修饰即可。转导效率可以采用本领域熟悉的方法及此处所述方法测定。

[0110] 在一些实施例中，含修饰衣壳蛋白的病毒载体的组织特异性被改变。在一些实施例中，与包括未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比，肌肉，例如，骨骼肌与/或心肌转导提高了至少大约10%，例如，提高了至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%或更高。在一些实施例中，与包括未修饰衣壳蛋白的病毒载体相

比,肝脏转导提高了至少大约10%,例如,提高了至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%或更高。在一些实施例中,与包括未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,肌肉转导提高,肝脏转导下降。在一些实施例中,与包括未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,肝脏转导提高了至少大约10%,例如,提高了至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%或更高。

[0111] 在一些实施例中,衣壳通过删除或替换AAV1衣壳蛋白氨基酸残基258至272中的一个或多个氨基酸残基或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基进行修饰,例如,删除或替换1、2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多个残基。删除或替换的残基可以是VR 1中导致氢键网络参与残基的旋转异构体发生变化的任何残基。在另一个实施例中,衣壳通过删除或替换AAV 1衣壳蛋白氨基酸残基261至269中的一个或多个氨基酸残基或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基进行修饰。在另一个实施例中,衣壳通过删除或替换AAV 1衣壳蛋白氨基酸残基265或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基进行修饰。

[0112] 在某些实施例中,所述修饰是针对AAV1或AAV6衣壳进行修饰,导致肌肉转导增加和肝脏转导降低。在一些实施例中,修饰针对AAV7、AAV8或AAV9衣壳进行修饰,导致肝脏转导降低,同时保持肌肉转导。在一些实施例中,修饰是表6所示的一种或多种修饰。在一些实施例中,修饰衣壳并非来自AAV2、AAV3b、AAV4或AAV5。

表6可变区1删除突变。

血清型	突变
rAAV1	T265del
rAAV2	Q263del、S264del
rAAV3b	Q263del
rAAV4	N261del
rAAV5	S258del
rAAV6	S262del、T265del
rAAV7	T265del
rAAV8	T265del
rAAV9	S263del、S265del、 S263del_S265del

[0113] 在一些实施例中,衣壳通过在AAV2衣壳蛋白氨基酸残基264后或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白相应氨基酸残基后插入一个或多个氨基酸残基(例如,天冬氨酸)进行修饰。在另一个实施例中,衣壳通过替换(例如,用天冬氨酸替换)AAV1衣壳蛋白氨基酸残基265的氨基酸残基或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白相应氨基酸残基进行修饰。

[0114] 在一些实施例中,修饰针对AAV1、AAV2或AAV3b衣壳进行修饰,导致肝脏转导增加。在某些实施例中,所述修饰是针对AAV6衣壳进行修饰,导致肝脏转导和肌肉转导都增加。在一些实施例中,与包括未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,肝脏的转导提高了至少大约10%,例如,提高了至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、500%或更高。在其它实施例中,修饰是表7所示的一种或多种修饰。

表7可变区1天冬氨酸插入和替换突变。

血清型	突变
rAAV1	T265D
rAAV2	265D
rAAV3b	266D
rAAV6	T265D
rAAV8	T265D
rAAV9	S265D

[0115] 本发明的另一方面涉及降低衣壳蛋白硫酸肝素结合能力对转导效率的影响。此处的实例表明,大幅降低衣壳蛋白与硫酸肝素的结合提高了转导效率。在一些情况下进一步表明,大幅降低硫酸肝素的结合能力与VR1环失稳发生别构相互作用,与仅采用修饰相比,大幅提高了转导效率。

[0116] 在本发明的一个方面,包括VR1环修饰的衣壳蛋白来自AAV血清型或与硫酸肝素结合的其它细小病毒,其中调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除,其中衣壳蛋白与硫酸肝素的结合被大幅降低。词语“大幅降低”指的是硫酸肝素的结合能力降低至少大约80%,例如,至少大约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高。衣壳蛋白与硫酸肝素的结合可以采用本领域熟悉的方法及此处所述的方法测定。

[0117] 在一些实施例中,与硫酸肝素结合的衣壳蛋白来自AAV2、AAV3a、AAV3b、AAV6或AAV8血清型。在一些实施例中,与硫酸肝素结合的衣壳蛋白来自AAV3a、AAV3b、AAV6或AAV8血清型。这些血清型中参与硫酸肝素结合的氨基酸残基是本领域熟悉的。实例包括但不限于AAV2中的R484、R487、K532、R585和R588,AAV6中的K531,及AAV3b中的R594。在一些实施例中,与硫酸肝素结合的衣壳蛋白包括经修饰提供硫酸肝素结合能力的任何合成AAV或细小病毒衣壳蛋白。

[0118] 在一个实施例中,衣壳蛋白包括来自AAV6血清型的氨基酸序列,其中氨基酸残基531被替换,例如,被谷氨酸替换,从而大幅降低与硫酸肝素的结合。在另一个实施例中,衣壳蛋白包括来自AAV2血清型的氨基酸序列,其中氨基酸残基585被替换,例如,被谷氨酸替换,从而大幅降低与硫酸肝素的结合。在另一个实施例中,衣壳蛋白包括来自AAV3b血清型的氨基酸序列,其中氨基酸残基594被替换,例如,被丙氨酸替换,从而大幅降低与硫酸肝素的结合。

[0119] 本发明的另一个方面涉及其中调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除的衣壳蛋白,其中衣壳蛋白与硫酸肝素的结合大幅降低。在一些实施例中,这些衣壳蛋白的VR1环中并没有修饰。在一些实施例中,衣壳蛋白包括来自AAV3a、AAV3b、AAV6或AAV8血清型的氨基酸序列。在一个实施例中,衣壳蛋白包括来自AAV6血清型的氨基酸序列,其中氨基酸残基531被替换,例如,被谷氨酸替换,从而大幅降低与硫酸肝素

的结合。

[0120] 本发明的另一个方面涉及一种AAV衣壳蛋白,包括来自AAV2、AAV3a或AAV3b血清型的氨基酸序列,其中所述衣壳蛋白在紧接AAV2衣壳蛋白残基264后面或在紧接AAV3a或AAV3b衣壳蛋白相应残基后面插入一个或多个氨基酸残基,且调节衣壳蛋白与硫酸肝素结合的一个或多个氨基酸残基被替换与/或删除,其中所述衣壳蛋白与硫酸肝素的结合被大幅降低;其中与包含未修饰衣壳蛋白的病毒载体相比,所述修饰衣壳蛋白使包括所述衣壳蛋白的病毒载体的转导效率得到提高。

[0121] 已经证明,在紧接AAV2衣壳蛋白残基264之后插入一个或多个氨基酸残基,提高了转导效率(参见,例如美国专利第7,892,809号,通过引用,该专利全文纳入本申请中)。在一个实施例中,在紧接AAV2衣壳蛋白残基264之后或AAV3a或AAV3b衣壳蛋白相应残基之后插入的氨基酸残基是天冬氨酸、谷氨酸或苯基丙氨酸残基。在一个实施例中,衣壳蛋白包括来自AAV2血清型的氨基酸序列,其中氨基酸残基585被替换,例如,被谷氨酸替换,从而大幅降低与硫酸肝素的结合。

[0122] 本发明的另一个方面涉及一种AAV衣壳蛋白,包括删除和/或替换AAV1衣壳蛋白氨基酸残基258至272中的一个或多个氨基酸残基或另一个AAV或细小病毒衣壳蛋白的相应氨基酸残基,且进一步包括替换酪氨酸残基,例如,从而改善心脏转导效率。已经证明,rAAV衣壳表面选定酪氨酸残基发生突变,通过避免细胞内衣壳在到达细胞核之前发生磷酸化和最终蛋白酶体降解,从而提高了rAAV转导效率(Zhong et al., Virology 381(2):194(2008))。在一个实施例中,酪氨酸替换是AAV1或AAV6中的Y445F。

[0123] 本发明的一个方面涉及一种编码本发明所述衣壳蛋白的多核苷酸。在一个实施例中,所述多核苷酸包括编码本发明衣壳蛋白的核苷酸序列,例如,此处公开的其中一个序列,或所述多核苷酸基本上由或由所述核苷酸序列组成。在其它实施例中,所述多核苷酸包括与此处公开的其中一个衣壳蛋白序列至少80%相同,例如,至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的衣壳蛋白编码核苷酸序列,或基本上由或由这些序列组成。

[0124] 本发明的另一个方面涉及一种包括本发明衣壳蛋白的细小病毒衣壳。在一些实施例中,衣壳中的所有衣壳蛋白都是本发明的衣壳蛋白。在其它实施例中,衣壳中的一些但并非所有衣壳蛋白是本发明的衣壳蛋白。

[0125] 本发明还提供一种包括本发明细小病毒衣壳的病毒载体。病毒载体可以是细小病毒载体,例如,AAV载体。病毒载体可以进一步包括包含重组病毒模板的核酸,其中所述核酸被细小病毒衣壳包裹。本发明进一步提供包含本发明所述衣壳蛋白的重组细小病毒粒子(例如,重组AAV粒子)。下面进一步讨论病毒载体和病毒粒子。

[0126] 在一些实施例中,由于本发明衣壳蛋白的存在,病毒载体显示出修饰嗜性。在一个实施例中,细小病毒载体对骨骼肌、心肌与/或膈肌,例如,骨骼肌具有系统嗜性。在其它实施例中,与含野生型衣壳蛋白的病毒载体相比,所述细小病毒载体对肝脏的嗜性降低。

产生病毒载体的方法

[0127] 本发明进一步提供产生病毒载体的方法。在一个具体实施例中,本发明提供一种产生重组细小病毒粒子的方法,包括向允许细小病毒复制的细胞提供:(a)重组细小病毒模板,包括(i)异源核苷酸序列,和(ii)细小病毒ITR;(b)多核苷酸,包括Rep编码序列和本发明的Cap编码序列;在足够复制和包装重组细小病毒模板的条件下;从而在细胞中产生重组

细小病毒粒子。足够复制和包装重组细小病毒模板的条件可以是,例如,存在足够复制细小病毒模板和包裹到细小病毒衣壳内的AAV序列(例如,细小病毒rep序列和细小病毒cap序列)及来自腺病毒与/或疱疹病毒的辅助序列。在具体实施例中,细小病毒模板包括两个细小病毒ITR序列,这两个序列位于异源核酸序列的5'和3'端,虽然它们并不需要与它们直接连接。

[0128] 在一些实施例中,重组细小病毒模板包括非Rep分辨的ITR,从而形成国际专利公开WO 01/92551所述的双链AAV载体。

[0129] 细小病毒模板和细小病毒rep和cap序列在某种条件下提供,从而在细胞内产生病毒载体,所述病毒载体包括细小病毒衣壳包装的细小病毒模板。所述方法可以进一步包括从细胞采集病毒载体的步骤。病毒载体可以从培养基采集与/或通过裂解细胞采集。

[0130] 细胞可以是允许细小病毒复制的细胞。可以采用本领域熟悉的任何合适细胞。在具体实施例中,细胞是哺乳动物细胞(例如,灵长类动物或人类细胞)。作为另一种选择,所述细胞可以是反式-互补包装细胞系,提供复制-缺陷辅助病毒删除的功能,例如,293细胞或其它E1a反式互补细胞。

[0131] 可以采用本发明熟悉的任何方法提供细小病毒复制和衣壳序列。目前的方案通常表达单质粒上的细小病毒rep/cap基因。细小病毒复制和包装序列不需要一起提供,虽然一起提供的话可能比较方便。细小病毒rep与/或cap序列可以由任何病毒或非-病毒载体提供。例如,rep/cap序列可以由混合腺病毒或疱疹病毒载体提供(例如,插入到删除腺病毒载体的E1a或E3区内)。还可以采用EBV载体来表达细小病毒cap和rep基因。本方法的一个优点是EBV载体是附加体,但将在整个连续细胞分化期间保持高拷贝数(即作为额外-染色体元件稳定整合到细胞内,称为“EBV基核附加体”,参见Margolski, (1992) Curr.Top.Microbiol.Immun.158:67)。

[0132] 作为另一个替代,rep/cap序列可以稳定整合到细胞内。

[0133] 通常,细小病毒rep/cap序列将不侧接TR,以防止这些序列的补救与/或包装。

[0134] 可以采用本领域熟悉的任何方法向细胞提供细小病毒模板。例如,模板可由非病毒(例如质粒)或病毒载体提供。在具体实施例中,细小病毒模板由疱疹病毒或腺病毒载体提供(例如,插入到删除腺病毒的E1a或E3区内)。作为另一种阐述,Palombo et al., (1998) J.Virology72:5025描述了携带侧接AAV TR报告基因的杆状病毒载体。正如上文谈到rep/cap基因时所述,还可以采用EBV载体递送模板。

[0135] 在另一个代表实施例中,细小病毒模板通过复制rAAV病毒提供。在另一个其它实施例中,包括细小病毒模板的AAV前病毒稳定地整合到细胞的染色体。

[0136] 为了提高病毒滴度,可以向细胞提供促进增殖性细小病毒感染的辅助病毒功能(例如,腺病毒或疱疹病毒)。细小病毒复制必须的辅助病毒序列是本领域熟悉的。通常,这些序列将由辅助腺病毒或疱疹病毒载体提供。或者,腺病毒或疱疹病毒序列可由另一种非病毒或病毒载体提供,例如,作为非感染性腺病毒微质粒,携带促进细小病毒高效产生的所有辅助基因,如Ferrari et al., (1997) Nature Med.3:1295和美国专利第6,040,183号和第6,093,570号所述。

[0137] 此外,辅助病毒功能可由包装细胞提供,其中辅助序列嵌在染色体或作为稳定的染色体外元件维持。通常,辅助病毒序列不能包装到AAV病毒粒子内,例如,不侧接ITR。

[0138] 熟悉本领域的技术人员将了解的是,在单一辅助构建体上提供细小病毒复制和衣壳序列及辅助病毒序列(例如,腺病毒序列)比较有利。这种辅助构建体可以是非病毒或病毒构建体。作为非限制性说明,辅助构建体可以是包括AAV rep/cap基因的混合腺病毒或混合疱疹病毒。

[0139] 在一个具体实施例中,细小病毒rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单个腺病毒辅助载体提供。这种载体可以进一步包括细小病毒模板。细小病毒rep/cap序列与/或细小病毒模板可以插入到腺病毒的删除区(例如,E1a或E3区内)。

[0140] 在另一个实施例中,细小病毒rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单个腺病毒辅助载体提供。根据该实施例,细小病毒模板可以作为质粒模板提供。

[0141] 在另一个示范实施例中,细小病毒rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单一腺病毒辅助载体提供,细小病毒模板作为前病毒整合到细胞内。或者,细小病毒模板由细胞内作为染色体外元件维持的EBV载体提供(例如,作为EBV基核附加体)。

[0142] 在另一个示范实施例中,细小病毒rep/cap序列和腺病毒辅助序列由单个辅助腺病毒提供。细小病毒模板可以作为独立的复制病毒载体提供。例如,细小病毒模板可以由细小病毒粒子或第二重组腺病毒粒子提供。

[0143] 根据前面的方法,混合腺病毒载体通常包括足够腺病毒复制和包装的腺病毒5'和3'顺式序列(即腺病毒末端重复序列和PAC序列)。细小病毒rep/cap序列,及AAV模板(如果存在的话)嵌在腺病毒骨架内,侧接5'和3'顺式序列,从而这些序列可以包装到腺病毒衣壳内。如上所述,腺病毒辅助序列和腺病毒rep/cap序列通常并不侧接ITR,从而这些序列不包装到细小病毒粒子内。

[0144] Zhang et al., ((2001)Gene Ther.18:704-12)描述了一种包括腺病毒及AAV rep和cap基因的嵌合辅助序列。

[0145] 疱疹病毒也可以作为细小病毒包装方法中的辅助病毒。编码细小病毒Rep蛋白的混合疱疹病毒可有利地促进可扩展细小病毒载体产生方案。已经有人描述(Conway et al., (1999)Gene Ther.6:986和WO 00/17377)了表达AAV-2rep和cap基因的混合I型单纯疱疹病毒(HSV-1)。

[0146] 作为另一个替代方案,正如,例如Urabe et al., (2002)Human Gene Ther.13:1935-43所述,本发明的病毒载体可以采用杆状病毒在昆虫细胞中产生,以递送rep/cap基因和细小病毒模板。

[0147] 不含污染辅助病毒的细小病毒载体库可采用本领域熟悉的任何方法获取。例如,细小病毒和辅助病毒很容易根据尺寸区分。细小病毒还可以根据对硫酸肝素的亲合性与辅助病毒区分(Zolotukhin et al., (1999)Gene Therapy 6:973)。可以采用删除复制-缺陷辅助病毒,从而任何污染辅助病毒不会复制。作为另一个替代方案,可以采用缺少晚期基因表达的辅助腺病毒,因为细小病毒包装调节仅需腺病毒早期基因表达。晚期基因表达缺陷腺病毒突变体是本领域熟悉的(例如,ts100K和ts149腺病毒突变体)。

重组病毒载体

[0148] 本发明的病毒载体用于将核酸递送给试管内、活体外、活体内细胞。特别是,可以有利地采用病毒载体,递送或输送核酸至动物(包括哺乳动物)细胞。

[0149] 可以在本发明的病毒载体中递送任何感兴趣的异源核酸序列。感兴趣的核酸包括

编码多肽的核酸,包括治疗(例如,医药或兽医用途)、免疫(例如,疫苗)或诊断多肽。

[0150] 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(包括迷你-和微-抗肌萎缩蛋白(参见例如Vincent et al., (1993)Nature Genetics 5:130;美国专利公开第2003/017131号;国际公开W0/2008/088895;Wang et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13714-13719(2000);和Gregorevic et al., Mol.Ther.16:657-64(2008))、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素、II型激活素可溶受体、IGF-1、抗炎多肽,如Ikappa B显性突变体、肌长、肌营养相关蛋白(utrophin)(Tinsley et al., (1996)Nature 384:349)、迷你-肌营养相关蛋白、凝血因子(例如,因子VIII、因子IX、因子X等)、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、鸟氨酸转氨甲酰酶、 β -球蛋白、 α -球蛋白、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转移酶、 β -葡糖脑苷脂酶、鞘磷脂酶、溶酶体己糖胺酶A、支链酮酸脱氢酶、RP65蛋白、细胞因子(例如 α -干扰素、 β -干扰素、干扰素- γ 、白细胞介素-2、白细胞介素-4、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、淋巴细胞毒素等)、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、血小板衍生生长因子、上皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、神经营养因子-3和-4、脑衍生神经营养因子、骨形态发生蛋白[包括RANKL和VEGF]、神经胶质衍生生长因子、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 可溶受体)、S100A1、小清蛋白、6型腺苷酸环化酶、影响2型G-蛋白偶联受体激酶敲低的分子,如结构性截断活性bARKct、抗炎因子如IRAP、抗-肌肉生长抑制素蛋白、天冬氨酸酰酶和单克隆抗体(包括单链单克隆抗体;Mab实例有Herceptin[®]Mab)。其它示范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)、耐癌症治疗药物的蛋白质、肿瘤抑制基因产物(例如,p53、Rb、Wt-1)、TRAIL、FAS-配体及对受试者有治疗效果的任何其它多肽。细小病毒载体还可以用于递送单克隆抗体和抗体片段,例如,抗肌肉生长抑制素的抗体或抗体片段(参见,例如Fang et al., Nature Biotechnol.23:584-590(2005))。

[0151] 编码多肽的异源核酸序列包括编码报告多肽的核酸序列(例如,酶)。报告多肽是本领域熟悉的,包括但不限于绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、荧光素酶和氯霉素乙酰转移酶基因。

[0152] 或者,在本发明的具体实施例中,异源核酸可以编码反义核酸、核酶(例如,美国专利第5,877,022号所述)、影响剪接体-介导反式剪接的RNA(参见,Puttaraju et al., (1999)Nature Biotech.17:246;美国专利第6,013,487号;美国专利第6,083,702号所述)、干扰RNA(RNAi),包括调节基因沉默的siRNA、shRNA或miRNA(参见,Sharp et al., (2000)Science 287:2431),和其它非-翻译RNA,例如,“向导RNA(Gorman et al., (1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:4929;Yuan et al.美国专利第5,869,248号)等。示例性非翻译RNA包括抗多药耐药(MDR)RNAi基因产物(例如,治疗与/或预防肿瘤与/或施用于心脏防止化疗损伤)、抗肌肉生长抑制素RNAi(例如,用于杜氏肌肉萎缩症)、抗VEGF的RNAi(例如,用于治疗与/或预防肿瘤)、抗受磷蛋白的RNAi(例如,用于治疗心血管疾病,参见,例如Andino et al., J.Gene Med.10:132-142(2008)和Li et al., Acta Pharmacol Sin.26:51-55(2005));受磷蛋白抑制分子或显性-负性分子,如受磷蛋白S16E(例如,用于治疗心血管疾病,参见,例如Hoshijima et al., Nat.Med.8:864-871(2002))、抗腺苷激酶RNAi(例

如,用于癫痫)、抗肌聚糖RNAi(例如 α 、 β 、 γ]、抗肌肉生长抑制素RNAi、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素或II型激活素可溶受体、抗消炎多肽的RNAi(如Ikappa B显性突变体)和抗病原性有机体和病毒的RNAi(例如,乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、CMV、单纯疱疹病毒、人乳头状瘤病毒等)。

[0153] 或者,在本发明的具体实施例中,异源核酸可以编码蛋白磷酸酶抑制剂I(I-1)、serca2a、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、Barkct、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3激酶(PI3激酶)、影响2型G-蛋白偶联受体激酶敲低的分子,如结构性截断活性bARKct;钙调神经酶相关肌小节蛋白(calsarcin)、抗受磷蛋白RNAi;受磷蛋白抑制分子或显性-负性分子,如受磷蛋白S16E、内皮型一氧化氮合酶(enos)、诱导型一氧化氮合酶(inos)或骨形态发生蛋白(包括BNP 2,7等,RANKL与/或VEGF)。

[0154] 病毒载体还可以包括与宿主染色体上位点同源及重组的异源核酸。可以采用这种方法,例如,纠正宿主细胞中的遗传缺陷。

[0155] 本发明还提供表达免疫原性多肽的病毒载体,例如,用于接种疫苗。核酸可以编码本领域熟悉的任何感兴趣的免疫原,包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、流感病毒、HIV或SIV gag蛋白、肿瘤抗原、癌抗原、细菌抗原、病毒抗原等的免疫原。

[0156] 细小病毒作为疫苗载体的用途是本领域熟悉的(参见,例如,Miyamura et al., (1994)Proc.Nat.Acad.Sci USA 91:8507;Young et al.美国专利第5,916,563号;Mazzara et al.美国专利第5,905,040号;Samulski et al.美国专利第5,882,652号、第5,863,541号)。抗原可以存在于细小病毒衣壳内。或者,抗原可以由引入到重组载体基因组内的异源核酸表达。此处描述的与/或本领域熟悉的感兴趣的任何免疫原可以由本发明的病毒载体提供。

[0157] 免疫原多肽可以是适合诱导免疫响应与/或防止受试者感染与/或罹患疾病的任何多肽,包括但不限于微生物、细菌、原虫、寄生虫、真菌与/或病毒感染和疾病。例如,免疫原多肽可以是正粘病毒免疫原(例如,流感病毒免疫原,如流感病毒血凝素(HA)表面蛋白或流感病毒核蛋白,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,如HIV或SIV包膜GP160蛋白、HIV或SIV基质/衣壳蛋白,及HIV或SIV gag、pol和env基因产物)。免疫原多肽还可以是沙粒病毒免疫原(例如,拉沙热病毒免疫原,如拉沙热病毒核衣壳蛋白和拉沙热包膜糖蛋白)、痘病毒免疫原(例如,牛痘病毒免疫原,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乙型脑炎病毒免疫原)、线状病毒免疫原(例如,埃博拉病毒免疫原,或马尔堡病毒免疫原,如NP和GP基因产物)、布尼亚病毒免疫原(例如,RVSV、CCHF与/或SFS病毒免疫原),或冠状病毒免疫原(例如,人传染性冠状病毒免疫原,如人冠状病毒包膜糖蛋白,或猪传染性胃肠炎病毒免疫原,或鸟传染性支气管炎病毒免疫原)。免疫原多肽可以进一步是脊髓灰质炎免疫原、疱疹免疫原(例如,CMV、EBV、HSV免疫原)、腮腺炎免疫原、麻疹免疫原、风疹免疫原、白喉毒素或其它白喉免疫原、百日咳抗原、肝炎(例如,甲肝、乙肝、丙肝等)免疫原,与/或本领域目前熟悉的或以后鉴定为免疫原的任何其它疫苗免疫原。

[0158] 或者,免疫原多肽可以是任何肿瘤或癌细胞抗原。肿瘤或癌抗原任选在癌细胞表面表达。示例性癌细胞和肿瘤细胞抗原在S.A.Rosenberg(Immunity 10:281(1991))中进行

了描述。其它示例性癌抗原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、黑色素瘤抗原(Kawakami et al., (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:3515;Kawakami et al., (1994) J.Exp.Med., 180:347;

Kawakami et al., (1994) Cancer Res.54:3124)、MART-1、gp100 MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、TRP-1、TRP-2、P-15、酪氨酸酶(Brichard et al., (1993) J.Exp.Med.178:489);HER-2/neu基因产物(美国专利第4,968,603号)、CA 125、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、PSA、L-CanAg、雌激素受体、乳脂球蛋白、p53肿瘤抑制蛋白(Levine, (1993) Ann.Rev.Biochem.62:623);粘蛋白抗原(国际专利公开WO 90/05142);端粒末端转移酶;核基质蛋白;前列腺酸性磷酸酶;乳头状瘤病毒抗原;与/或目前熟知的或以后发现的与下述癌症有关的抗原:黑色素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如,非-霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、白血病、子宫癌、乳癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌和目前熟知的或以后鉴定的任何其它癌症或恶性疾病(参见,例如 Rosenberg, (1996) Ann.Rev.Med.47:481-91)。

[0159] 作为另一个替代方案,异源核酸可以编码试管中、活体外或活体内期望产生的任何多肽。例如,病毒载体可以引入到培养细胞内,表达基因产物与其分离。

[0160] 本领域技术人员将了解的是,感兴趣的异源核酸可以与合适的控制序列操作连接。例如,异源核酸可以与表达控制元件操作连接,例如,转录/翻译控制信号、复制源、多腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点(IRES)、启动子,与/或增强子等。

[0161] 本领域技术人员将了解的是,根据期望的水平和组织-特异性表达,可以采用各种启动子/增强子元件。根据期望的表达模式,启动子/增强子可以是构成的或诱导的。启动子/增强子可以是本身就有的或外来的,可以是天然的或合成的序列。若为外来的,表示野生型宿主中未发现转录起始区,在其中引入转录起始区。

[0162] 在具体实施例中,启动子/增强子元件可以是靶细胞或治疗受试者本身就有的。在代表性实施例中,启动子/增强子元件可以是异源核酸序列本身就有的。通常选择启动子/增强子元件,从而其在感兴趣的靶细胞中发挥作用。此外,在具体实施例中,启动子/增强子元件是哺乳动物启动子/增强子元件。启动子/增强子元件可以是构成的或诱导的。

[0163] 可诱导表达控制元件通常在期望提供异源核酸序列调节过表达的应用中比较有利。基因递送可诱导启动子/增强子元件可以是组织-特异性或优选启动子/增强子元件,包括肌肉特异性或优选(包括心肌、骨骼肌与/或平滑肌特异性或优选)、神经组织特异性或优选(包括脑特异性或优选)、眼睛特异性或优选(包括视网膜特异性和角膜特异性)、肝脏特异性或优选、骨髓特异性或优选、胰腺特异性或优选、脾特异性或优选、肺特异性或优选启动子/增强子元件。其它可诱导启动子/增强子元件包括激素-可诱导和金属-可诱导元件。示例性可诱导启动子/增强子元件包括但不限于Tet开/关元件、RU486-可诱导启动子、蜕皮激素-可诱导启动子、雷帕霉素-可诱导启动子及金属硫蛋白启动子。

[0164] 在异源核酸序列在靶细胞中转录,然后翻译的实施例中,通常包括特异性起始信号用于高效翻译插入的蛋白编码序列。这些外源翻译控制序列,可能包括ATG起始密码子和相邻的序列,可以来自各种天然和合成来源。

[0165] 本发明的病毒载体提供一种递送异源核酸到范围广泛的各种细胞(包括分化和未分化细胞)内的手段。可以采用所述病毒载体将感兴趣核酸递送到体外细胞内,例如,从而试管内或活体外产生用于基因治疗的多肽。此外,所述病毒载体在递送核酸到受试者体内的方法中使用,例如,用于表达免疫原性或治疗性多肽或功能RNA。采用这种方式,可以在受试者体内产生多肽或功能RNA。受试者需要这种多肽,因为受试者缺乏这种多肽。此外,所述方法可以实施,因为受试者体内多肽或功能RNA的产生可能赋予某些有益效果。

[0166] 病毒载体还可用于在培养细胞中或受试者体内产生感兴趣的多肽或功能RNA(例如,采用受试者作为生物反应器,产生多肽,或观察功能RNA对受试者的影响,例如,与筛选方法一起使用)。

[0167] 通常,可以采用本发明的病毒载体递送编码多肽和功能RNA的异源核酸,治疗与/或预防受益于治疗多肽或功能RNA递送的任何疾病。示例性疾病包括但不限于:囊性纤维化(囊性纤维化跨膜调节蛋白)和其它肺病、血友病A(因子VIII)、血友病B(因子IX)、地中海贫血(β -珠蛋白)、贫血症(红细胞生成素)和其它血液病、阿尔茨海默病(GDF;脑啡肽酶)、多发性硬化(β -干扰素)、帕金森氏病(胶质细胞源性神经营养因子[GDNF])、亨廷顿氏舞蹈病(删除重复单元RNAi)、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、癫痫(甘丙肽、神经营养因子)和其它神经疾病、癌症(内皮抑素、血管抑素、TRAIL、FAS-配体、细胞因子(包括干扰素);RNAi(包括抗VEGF的RNAi或多药耐药基因产物)、糖尿病(胰岛素)、肌肉萎缩症(包括杜氏肌肉萎缩症(抗肌萎缩蛋白、迷你-抗肌萎缩蛋白、胰岛素样生长因子I、肌聚糖[如 α , β , γ]、抗肌肉生长抑制素RNAi、肌肉生长抑制素前肽、卵泡抑素或II型激活素可溶受体、抗炎多肽(如Ikappa B显性突变体)、肌长、肌营养相关蛋白(utrophin)、迷你-肌营养相关蛋白、抗肌营养蛋白基因剪接点从而诱导外显子跳跃的RNAi[参见,例如WO/2003/095647]、抗U7 snRNA的反义,诱导外显子跳跃[参见,例如WO/2006/021724],及抗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)及贝克病,戈谢病(葡糖脑苷脂酶)、赫尔勒氏症(α -L-艾杜糖醛酸酶)、腺苷脱氨酶缺乏症(腺苷脱氨酶)、糖原累积病(例如,法布瑞氏症[α -半乳糖苷酶]和庞贝氏症[溶酶体酸性 α -葡萄糖苷酶])和其它代谢缺陷、先天性肺气肿(α 1-抗胰蛋白酶)、莱施-尼汉综合征(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)、尼曼匹克病(鞘磷脂酶)、泰-萨克斯病(溶酶体己糖胺酶A)、槭糖尿病(支链酮酸脱氢酶)、视网膜变性疾病(和其它眼睛和视网膜疾病;例如用于黄斑变性的PDGF)、实质器官(如大脑)疾病(包括帕金森氏病[GDNF]、星形细胞瘤[内皮抑素、血管抑素与/或抗VEGF的RNAi]、胶质母细胞瘤[内皮抑素、血管抑素与/或抗VEGF的RNAi])、肝、肾、心脏,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)、serca2a、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、Barkct、 β 2-肾上腺素能受体、 β 2-肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3激酶(PI3激酶)、S100A1、小清蛋白、6型腺苷酸环化酶、影响2型G-蛋白偶联受体激酶敲低的分子(如结构性截断活性bARKct)、calsarcin(钙调神经酶相关肌小节蛋白)、抗受磷蛋白RNAi;受磷蛋白抑制分子或显性-负性分子,如受磷蛋白S16E等)、关节炎(胰岛素样生长因子)、关节疾病(胰岛素样生长因子1与/或2)、内膜增生(例如,通过递送内皮型一氧化氮合酶(enos)、诱导型一氧化氮合酶)、改善心脏移植物的生存率(超氧化物歧化酶)、爱滋病(可溶CD4)、肌肉萎缩(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TNF α 可溶受体)、肝炎(α -干扰素)、LDL受体缺陷(LDL受体)、高氨血症(鸟氨酸转氨甲酰酶)、克腊伯氏

病(半乳糖脑苷脂酶)、巴滕病(Batten's disease)、脊髓大脑共济失调(包括SCA1、SCA2和SCA3)、苯丙酮酸尿症(苯丙氨酸羟化酶)、自身免疫性疾病等。本发明进一步在下述器官移植后使用,用于提高移植成功率与/或减少器官移植或辅助治疗的不良影响(例如,施用免疫抑制剂或抑制性核酸,阻断细胞因子产生)。作为另一个实例,骨形态发生蛋白(包括BNP 2、7等,RANKL与/或VEGF)可以与骨同种异体移植同时使用,例如,在骨折或癌症患者手术切除后。

[0168] 基因转移在了解和提供疾病治疗方面具有巨大的潜在应用。许多遗传病的缺陷基因已经被人们熟知并已进行克隆。通常,上述疾病分为两类:缺陷性疾病,通常缺酶,且通常以隐性方式遗传,及不平衡疾病,可能涉及调节或结构蛋白,通常以显性方式遗传。对于缺陷性疾病,基因转移可用于将正常基因导入到受影响组织内,开展替换治疗,以及采用反义突变,建立疾病动物模型。对于不平衡疾病,基因转移可用于在模型系统中建立疾病,然后,可用于努力消除这种疾病。因此,本发明的病毒载体可以治疗与/或预防遗传疾病。

[0169] 本发明的病毒载体还可以用于向体外或体内细胞提供功能RNA。细胞中功能RNA的表达,例如,可以减弱细胞具体靶向蛋白质的表达。因此,可以施用功能RNA,降低受试者体内具体蛋白质的表达。功能RNA还可以向体外细胞施用,用于调节基因表达与/或细胞生理学,例如,优化细胞或组织培养系统或在筛选方法中使用。

[0170] 本发明的病毒载体可用于诊断和筛选方法,从而感兴趣的核酸在细胞培养系统或转基因动物模型中短暂或稳定表达。

[0171] 本发明的病毒载体还可以用于各种非治疗用途,包括但不限于评价基因打靶、清除、转录、翻译等方案中的用途,这些用途是本领域技术人员显而易见的。病毒载体还可以用于评价安全性(扩散、毒性、免疫原性等)。这些数据,例如,被美国食品药品监督管理局视为评价临床效果前监管批准过程的一部分。

[0172] 另一方面,本发明病毒载体可用于在受试者体内产生免疫响应。根据该实施例,可以向受试者施用病毒载体,所述病毒载体包含编码免疫原性多肽的异源核酸序列,受试者抵抗所述免疫原性多肽而引发主动免疫响应。免疫原性多肽如上文所述。在一些实施例中,引发保护性免疫响应。

[0173] 或者,可向体外细胞施用病毒载体,然后,将所述改变的细胞向受试者施用。将包含异源核酸的病毒载体引入到细胞内,将所述细胞向受试者施用,其中编码免疫原的异源核酸可以被表达,并在受试者体内诱导针对免疫原的免疫响应。在具体实施例中,所述细胞是抗原-呈递细胞(例如,树突细胞)。

[0174] “主动免疫响应”或“主动免疫性”的特征是“遇到免疫原后宿主组织和细胞的参与性”。它涉及淋巴网状组织中免疫活性细胞的分化和增殖,导致合成抗体或发展细胞-介导反应性,或两者。Herbert B.Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, in IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985)。另外,宿主感染或接种疫苗后接触免疫原引发主动免疫响应。主动免疫与被动免疫相反,通过“从主动免疫宿主将预形成物质(抗体、转移因子、胸腺移植、白细胞介素-2)输送到非-免疫宿主”获得主动免疫。Id。

[0175] “保护性”免疫响应或“保护性”免疫指的是免疫响应带给受试者某些益处,预防或降低疾病发生率。或者,保护性免疫响应或保护性免疫可用于治疗与/或预防疾病,特别是

癌症或肿瘤(例如,预防癌症或肿瘤形成,消退癌症或肿瘤与/或阻止转移与/或阻止转移结节生长)。保护性效果可以是全面的或部分的,只要治疗的益处超过其不良影响即可。

[0176] 如下文所述,在具体实施例中,包含异源核酸的病毒载体或细胞可以以免疫原性有效剂量施用。

[0177] 本发明的病毒载体还可以通过施用表达一种或多种癌细胞抗原(或免疫原性类似分子)或任何其它免疫原的病毒载体,产生抵抗癌细胞的免疫响应,用于癌症免疫治疗。为此,可以通过施用包含编码癌细胞抗原的异源核酸的病毒载体,在受试者体内产生抵抗癌细胞的免疫响应,例如,用于治疗癌症患者与/或预防受试者发展癌症。如本发明所述,病毒载体可以在受试者体内施用或采用体外方法施用。或者,癌症抗原可作为病毒衣壳的一部分表达或与上文所述病毒衣壳连接。

[0178] 作为另一种替代方案,可以施用本领域熟悉的任何其它治疗核酸(例如, RNAi)或多肽(例如,细胞因子)治疗与/或预防癌症。

[0179] 如本发明所述,词语“癌症”包括肿瘤形成癌症。同样,词语“癌组织”包括肿瘤。“癌细胞抗原”包括肿瘤抗原。

[0180] 词语“癌症”具有本领域理解的意义,例如,组织不受控制地增长,可能扩散到身体较远部位(即转移)。示例性癌症包括但不限于黑色素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如,非-霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、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、脑癌和目前熟知的或以后鉴定的任何其它癌症或恶性疾病。在代表性实施例中,本发明提供一种治疗与/或预防肿瘤形成癌症的方法。

[0181] 在本领域中,词语“肿瘤”还理解为多细胞生物内未分化细胞的异常包块。肿瘤可以是恶性或良性。在代表性实施例中,此处公开的方法用于预防和治疗恶性肿瘤。

[0182] “治疗癌症”、“癌症治疗”及相当词语指的是降低癌症的严重性,或至少部分消除与/或减慢与/或控制疾病的进程与/或稳定疾病。在具体的实施例中,这些词语表示癌症转移被阻止或减少或至少部分消除与/或转移节点增长被阻止或减少或至少部分被消除。

[0183] 词语“癌症预防”或“预防癌症”或相当词语指的是所述方法至少部分消除或降低与/或延迟癌症发生的发生率与/或严重性。或者,受试者发生癌症的可能性或概率可能被降低或延迟。

[0184] 在具体实施例中,可以从癌症受试者采集细胞,并让所述细胞接触本发明的病毒载体。然后,将所述修饰细胞向受试者施用,从而引发抵抗癌细胞抗原的免疫响应。这种方法对免疫功能不全,体内无法引发足够免疫响应(即无法产生足够数量的增强抗体)的受试者比较有利。

[0185] 本领域熟知的是,可以通过免疫调节细胞因子(例如, α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、 ω -干扰素、 τ -干扰素、白细胞介素-1 α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素5、白细胞介素-6、白细胞介素-7、白细胞介素-8、白细胞介素-9、白细胞介素-10、白细胞介素-11、白细胞介素12、白细胞介素-13、白细胞介素-14、白细胞介素-18、B细胞生长因子、CD40配体、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、单核细胞趋化蛋白-1、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和淋巴细胞毒素)增强免疫响应。因此,免疫调节细胞因子(优选CTL诱导细胞因子)可以与病毒载体一起向受试者施用。

[0186] 细胞因子可以采用本领域熟悉的任何方法施用。可以向受试者施用外源性细胞因

子,或者,采用合适的载体将编码细胞因子的核酸递送给受试者,及体内产生细胞因子。

受试者、药物制剂及施用方式

[0187] 本发明的病毒载体和衣壳用于兽医和医学应用。合适的受试者包括鸟类和哺乳动物。词语“鸟类”包括但不限于鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡、野鸡、鸚鵡、长尾鸚鵡等。词语“哺乳动物”包括但不限于人类、非人类灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、猫、犬、兔等。人类受试者包括婴儿、胎儿、少年和成人。

[0188] 在具体实施例中,本发明提供一种药物组合物,包括在药学上可接受载体中的本发明病毒载体与/或衣壳及,任选其它药剂、药物、稳定剂、缓冲液、载体、佐剂、稀释剂等。注射用时,载体通常是液体。对于其它施用方法,载体可以是固体或液体。对于吸入施用,载体是可以吸入的,及任选可以是固体或液体颗粒形式。

[0189] “药学上可接受的”指的是材料无毒或者是符合要求的,即材料可以向受试者施用而不会造成任何不期望发生的生物效应。

[0190] 本发明的一个方面是一种将核酸递送到体外细胞的方法。按照适合具体靶细胞的标准转导方法,可以按合适的感染复数将病毒载体引入到细胞内。施用病毒载体的滴度可以根据靶细胞类型和数量及具体的病毒载体而变化,可以由本领域技术人员确定,无需开展过多实验。在代表性实施例中,至少大约 10^3 感染单位,更优选至少大约 10^5 感染单位被引入到细胞内。

[0191] 引入病毒载体的细胞可以是任何类型的细胞,包括但不限于神经细胞(包括外周和中枢神经系统细胞,特别是,脑细胞,如神经元和少突胶质细胞)、肺细胞、眼细胞(包括视网膜细胞、视网膜色素上皮细胞和角膜细胞)、血管细胞(例如,内皮细胞、内膜细胞)、上皮细胞(例如,肠和呼吸系统上皮细胞)、肌细胞(例如,骨骼肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞与/或膈肌细胞)、树突细胞、胰腺细胞(包括胰岛细胞)、肝细胞、肾细胞、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。在代表性实施例中,所述细胞可以是任何祖细胞。作为另一种可能性,所述细胞可以是干细胞(例如,神经干细胞、肝脏干细胞)。作为另一个替代方案,所述细胞可以是癌细胞或肿瘤细胞。此外,所述细胞可以源自上文所述任何物种。

[0192] 病毒载体可以引入到体外细胞中,用于向受试者施用所述修饰细胞。在具体实施例中,从受试者采集所述细胞,在细胞内引入所述病毒载体,然后,将所述细胞施用回到受试者体内。体外操作从受试者采集细胞,然后将细胞引回到受试者体内的方法是本领域熟悉的(参见,例如美国专利第5,399,346号)。或者,可以将重组病毒载体引入到供体受试者的细胞内、培养细胞内或其它任何合适来源的细胞内,并将所述细胞向需要的受试者施用(即“受体”受试者)。

[0193] 体外基因递送的合适细胞如上文所述。受试者细胞施用剂量将根据受试者年龄、状况和物种、细胞类型、细胞表达的核酸及施用方式等变化。通常,药学上可接受载体内每次剂量施用的细胞数是至少大约 10^2 至大约 10^8 个细胞或至少大约 10^3 个细胞至大约 10^6 个细胞。在具体实施例中,病毒载体转导的细胞以治疗有效或预防有效剂量与药学载体一起向受试者施用。

[0194] 在一些实施例中,病毒载体被引入到细胞内,然后,将细胞向受试者施用,引发抵抗递送多肽的免疫响应(例如,作为转基因或在衣壳中表达)。通常,将数量为表达免疫有效

数量多肽的细胞与药学上可接受的载体一起施用。“免疫原有效数量”是足够在药物制剂施用受试者体内产生抗多肽主动免疫响应的表达多肽的数量。在具体实施例 1 中,所述剂量足够产生保护性免疫响应(如上文定义)。引发的保护程度并不要求是全面的或永久的,只要施用免疫多肽的益处超过不良影响即可。

[0195] 本发明的另一个方面是一种向受试者施用病毒载体的方法。可以采用本领域熟悉的任何方法向需要的人类受试者或动物施用本发明病毒载体与/或衣壳。任选病毒载体与/或衣壳在药学上可接受载体内按治疗有效或预防有效剂量递送。

[0196] 本发明的病毒载体与/或衣壳可以进一步施用,以引发免疫响应(例如,作为疫苗)。通常,本发明的免疫组合物包括免疫有效剂量的病毒载体与/或衣壳及药学上可接受的载体。任选所述剂量足够产生保护性免疫响应(如上文定义)。引发的保护程度并不要求是全面的或永久的,只要施用免疫多肽的益处超过任何不良影响即可。受试者和免疫原如上文所述。

[0197] 受试者病毒载体与/或衣壳的施用剂量取决于施用方式、治疗与/或预防的疾病或病症、受试者的状况、具体的病毒载体或衣壳,及递送的核酸等,并且可以按照常规方式确定。实现治疗效果的示例剂量是至少大约 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 转导单位滴度,任选大约 10^8 - 10^{13} 转导单位滴度。

[0198] 在具体实施例 1 中,要实现要求的基因表达水平,可以在不同的间隔期间,例如,每天、每周、每月、每年等多次施用(例如,施用两次、三次、四次或更多次)。

[0199] 示例性施用方式包括口服、直肠、跨粘膜、鼻内、吸入(例如,通过气溶胶)、颊(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、经皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、颅内、肌内[包括骨骼肌、膈肌与/或心肌施用]、胸膜内、大脑内和关节内)、局部(例如,皮肤和粘膜表面,包括气道表面,及经皮施用)、淋巴内等,以及直接组织或器官注射(例如,注射到肝脏、眼睛内[包括玻璃体内和视网膜下]、骨骼肌、心肌、膈肌或大脑)。

[0200] 施用部位可以是受试者的任何部位,包括但不限于选自大脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、膈、气道上皮、肝脏、肾脏、脾、胰腺、皮肤和眼睛的部位。

[0201] 还可以向肿瘤施用(例如,肿瘤或淋巴结内或附近)。任何情况下,最合适的路径将取决于治疗与/或预防疾病的性质和严重程度及所用具体载体的性质。

[0202] 向本发明所述骨骼肌施用包括但不限于向四肢(例如上臂、下臂、大腿与/或小腿)、背部、颈部、头部(例如,舌头)、胸部、腹部、骨盆/会阴,与/或足趾的骨骼肌施用。合适的骨骼肌包括但不限于小指展肌(手部)、小趾展肌(脚部)、拇展肌、第五指(趾)展肌(abductor ossis metatarsi quinti)、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、掌背骨间肌(手部)、背侧骨间肌(脚背)、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、伸足母短肌、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(手部)、小趾短屈肌(脚部)、趾短屈肌、趾长屈肌、指深屈肌、指浅屈肌、屈拇短肌、拇长屈肌、拇短屈肌、屈拇长肌、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、上睑提肌、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(手部)、蚓状肌(脚部)、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、膈肌、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、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、颧小肌及本领域熟悉的其它合适的任何骨骼肌。

[0203] 病毒载体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,腿与/或臂隔离肢体灌注;参见例如,Arruda et al., (2005) Blood 105:3458-3464)与/或直接肌肉内注射递送给骨骼肌。在具体实施例中,通过四肢灌注,任选隔离肢体灌注(例如,通过静脉内或动脉内施用)向受试者(例如,肌肉萎缩症受试者,如DMD)四肢(手臂与/或腿)施用病毒载体与/或衣壳。在本发明的实施例中,本发明的病毒载体与/或衣壳可以有利地施用,无需采用“流体动力学”技术。在先有技术中,载体的组织递送(例如,递送到肌肉)通常采用流体动力学技术增强(例如,静脉内/动脉内大量施用),增加了血管系统的压力,促进载体通过内皮细胞屏障。在具体实施例中,本发明的病毒载体与/或衣壳可以不采用流体动力学技术,如高容量输注与/或高血管内压力(例如,大于正常收缩压,例如,血管内压力比正常收缩压高5%或以下、10%或以下、15%或以下、20%或以下、25%或以下)施用。此类方法可以减少或避免流体动力学技术相关副作用,如浮肿、神经损伤与/或间室综合征。

[0204] 心肌施用包括向左心房、右心房、左心室、右心室与/或隔膜施用。病毒载体与/或衣壳可以通过静脉内施用、动脉内施用(如主动脉内施用)、直接心脏注射(例如,注射到左心房、右心房、左心室、右心室)与/或冠状动脉灌注递送到心肌内。

[0205] 膈肌施用可以采用任何合适的方法,包括静脉内施用、动脉内施用与/或腹膜内施用。

[0206] 平滑肌施用可以采用任何合适的方法,包括静脉内施用、动脉内施用与/或腹膜内施用。在一个实施例中,可以向平滑肌内部、附近与/或上面的内皮细胞施用。

[0207] 向靶组织递送还可以通过递送包含病毒载体与/或衣壳的储库实现。在代表性实施例中,将包含病毒载体与/或衣壳的储库移植到骨骼肌、平滑肌、心肌与/或膈肌组织内或组织可以与包含所述病毒载体与/或衣壳的薄膜或其它基质接触。合适的可移植基质或基材在美国专利第7,201,898号中进行了描述。

[0208] 在具体实施例中,本发明的病毒载体向骨骼肌、膈肌与/或心肌施用(例如,用于治疗与/或预防肌肉萎缩症或心脏病[例如,PAD或充血性心力衰竭])。

[0209] 在代表性实施例中,本发明用于治疗与/或预防骨骼肌、心肌与/或膈肌疾病。

[0210] 在代表性实施例中,本发明提供一种治疗与/或预防受试者肌肉萎缩症的方法,所述方法包括:向哺乳动物受试者施用治疗或预防有效剂量的本发明病毒载体,其中所述病毒载体包括编码抗肌萎缩蛋白、迷你-抗肌萎缩蛋白、微-抗肌萎缩蛋白、肌肉生长抑制素前

肽、卵泡抑素、II型激活素可溶受体、IGF-1、抗炎多肽,如Ikappa B显性突变体、肌长、肌营养相关蛋白、微-肌营养相关蛋白、层粘连蛋白- $\alpha 2$ 、 α -肌聚糖、 β -肌聚糖、 γ -肌聚糖、 δ -肌聚糖、IGF-1、抗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,与/或抗肌肉生长抑制素的RNAi。在具体实施例中,正如本发明别的地方所述,病毒载体可以向骨骼肌、膈肌与/或心肌施用。

[0211] 或者,可以实践本发明,将核酸递送到骨骼肌、心肌或膈肌,作为产生通常在血液中循环,或全身输送到其它组织的多肽(例如酶)或功能RNA(例如,RNAi、microRNA、反义RNA)的平台,用于治疗与/或预防疾病(例如,代谢紊乱,如糖尿病(例如,胰岛素)、血友病(例如,因子IX或因子VIII)、粘多糖病(例如,斯赖综合征、贺勒氏症、施艾氏症、贺勒氏-施艾氏症、亨特氏综合征、沙费利波综合征A、B、C、D、莫基奥综合征、马尔多-拉米(Maroteaux-Lamy)综合征等)或溶酶体贮积症(如高雪氏病[葡糖脑苷脂酶]、庞贝氏症[溶酶体酸性 α -葡萄糖苷酶]或法布瑞氏症[α -半乳糖苷酶A]或糖原累积病(例如庞贝氏症[溶酶体酸性 α -葡萄糖苷酶])).治疗与/或预防代谢病的其它合适蛋白质如上文所述。采用肌肉作为表达感兴趣核酸的平台在美国专利公开第2002/0192189号中进行了描述。

[0212] 因此,一方面本发明进一步包括一种治疗与/或预防受试者代谢病的方法,所述方法包括:向受试者施用治疗或预防有效剂量的本发明病毒载体(例如,向受试者骨骼肌施用),其中所述病毒载体包括编码多肽的异源核酸,其中所述代谢病是由于多肽缺乏与/或缺陷引起的。示例性代谢病和编码多肽的异源核酸在此处进行描述。任选,多肽是分泌的(例如,正如本领域熟悉的那样,多肽是天然状态分泌的多肽或经工程方法分泌的多肽,例如,通过与分泌信号序列操作连接)。并不受限于本发明任何具体的理论,根据本实施例,向骨骼肌施用会导致多肽分泌进入全身循环,并递送到靶组织。向骨骼肌递送病毒载体的方法将在此处进行更详细的说明。

[0213] 本发明还用于产生反义RNA、RNAi或其它功能RNA(例如,核糖酶)用于全身输送。

[0214] 本发明还提供一种治疗与/或预防受试者先天性心脏衰竭或PAD的方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用治疗或预防有效剂量的本发明病毒载体,其中所述病毒载体包括编码,例如,肌浆网 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a)、血管生成因子、磷酸酶抑制剂I (I-1)、抗受磷蛋白RNAi、受磷蛋白抑制分子或显性-负性分子,如受磷蛋白S16E、调节受磷蛋白基因的锌指蛋白、 $\beta 2$ -肾上腺素能受体、 $\beta 2$ -肾上腺素能受体激酶(BARK)、磷酸肌醇-3激酶(PI3激酶)、钙调神经酶相关肌小节蛋白、 $\beta 2$ -肾上腺素能受体激酶抑制剂(BARKct)、蛋白磷酸酶1抑制剂1、S100A1、小清蛋白、6型腺苷酸环化酶、影响2型G-蛋白偶联受体激酶敲低的分子,如结构性截断活性bARKct;Pim-1、PGC-1 α 、SOD-1、SOD-2、EC-SOD、激肽释放酶、HIF、胸腺素- $\beta 4$ 、mir-1、mir-133、mir-206与/或mir-208的异源核酸。

[0215] 注射液可以以传统形式制备,以液体溶液或悬浮液形式,以适合注射前配制为液体溶液或悬浮液的固体形式,或以乳液形式制备。或者,可以局部而非全身施用本发明的病毒载体与/或病毒衣壳,例如,以储库或缓释制剂的形式。此外,病毒载体与/或病毒衣壳可以粘附在外科可移植基质上递送(例如,如美国专利公开第2004-0013645号所述)。

[0216] 此处公开的病毒载体可以采用任何合适的方式向受试者的肺施用,任选施用受试者可吸入的由病毒载体与/或病毒衣壳组成的可吸入颗粒气溶胶悬浮液。可吸入颗粒可以是液体或固体。包含病毒载体与/或病毒衣壳的液体颗粒气溶胶可以采用任何合适的方法

制备,例如,采用压力驱动气溶胶雾化器或超声雾化器,正如本领域熟悉的那样。参见,例如,美国专利第4,501,729号。同样,包含病毒载体与/或病毒衣壳的固体颗粒气溶胶可以采用制药领域熟悉的任何固体颗粒药物气溶胶发生器制备。

[0217] 病毒载体可以向CNS(例如,大脑、眼睛)组织施用,与不使用本发明相比,使病毒载体或衣壳分布更广泛。

[0218] 在具体的实施例中,本发明的递送载体可以用于治疗CNS疾病,包括遗传病、神经退行性疾病、精神疾病和肿瘤。CNS示例性疾病包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏舞蹈病、海绵状脑白质营养不良症、雷氏病、雷夫叙姆病、妥瑞症、原发性脊髓侧索硬化、肌萎缩性侧索硬化、进行性肌萎缩、皮克氏病、肌肉萎缩症、多发性硬化、重症肌无力、皮质下动脉硬化性脑病、脊髓或头部损伤引起的创伤、泰-萨克斯病、莱施-尼汉病、癫痫、脑梗死、精神疾病(包括情感障碍(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、赖药症(例如,酒精和其它物质依赖症)、神经症(例如,焦虑、强迫症、躯体形式障碍、分离性障碍、悲伤、产后忧郁症)、精神病(例如,幻觉和妄想)、痴呆、偏执狂、注意力缺失症、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、饮食或体重失调(例如,肥胖症、恶病质、神经性厌食症和易饿症)及CNS癌症和肿瘤(例如,垂体瘤)。

[0219] CNS疾病包括涉及视网膜、后视束和视神经的眼病(例如,色素性视网膜炎、糖尿病视网膜病和其它视网膜退行性疾病、葡萄膜炎、年龄-相关黄斑变性、青光眼)。

[0220] 大多数(如果并非全部)眼睛疾病和障碍都与以下三种指征的一种或多种有关:(1)血管形成,(2)发炎及(3)变性。可以采用本发明的递送载体递送抗-血管形成因子;抗炎因子;减慢细胞退化、促进细胞保留、或促进细胞生长的因子及前述组合。

[0221] 糖尿病患者视网膜病,例如,其特征在于血管形成。糖尿病患者视网膜病可以通过眼内(例如,玻璃体内)或眼周(例如,筋膜下区域内)递送一种或多种抗-血管形成因子治疗。还可以通过眼内(例如,玻璃体内或视网膜下)或眼周共同递送一种或多种神经营养因子。

[0222] 葡萄膜炎涉及发炎。一种或多种抗炎因子可以通过眼内(例如,玻璃体或前房)施用本发明递送载体施用。

[0223] 相比之下,色素性视网膜炎的特征在于视网膜变性。在代表性实施例中,色素性视网膜炎可以通过眼内施用(例如,玻璃体施用)编码一种或多种神经营养因子的递送载体治疗。

[0224] 年龄相关黄斑变性涉及血管形成和视网膜变性。这种疾病可以通过眼内(例如,玻璃体)施用本发明编码一种或多种神经营养因子的递送载体与/或眼内或眼周施用(例如,筋膜下区域)一种或多种抗-血管形成因子进行治疗。

[0225] 青光眼的特征在于眼压升高和视网膜神经节细胞损失。青光眼的治疗包括利用本发明递送载体,施用一种或多种神经保护剂,阻止细胞受到兴奋毒性损害。所述制剂包括N-甲基-D-天冬氨酸酯(NMDA)拮抗剂、细胞因子和神经营养因子,它们通过眼内,任选玻璃体内递送。

[0226] 在其它实施例中,本发明可用于治疗癫痫发作,例如,减少癫痫发作的开始、发生或严重性。癫痫治疗效果可以通过行为(例如,眼睛或嘴巴颤动、转动)与/或电图(大多数癫痫显示信号电图异常)评价。因此,本发明还可用于治疗多次发作的癫痫。

[0227] 在一个代表性实施例中,采用本发明的递送载体,向大脑施用生长抑素(或其活性片段),用于治疗垂体瘤。根据该实施例,编码生长抑素(或其活性片段)的递送载体通过微输液施用到垂体内。同样,此类治疗可用于治疗肢端肥大症(垂体生长激素分泌异常)。生长抑素的核酸(例如,GenBank保藏号J00306)和氨基酸(例如,GenBank保藏号P01166;包含加工活性肽生长抑素-28和生长抑素-14)序列是本领域熟悉的。

[0228] 在具体实施例中,载体包括美国专利第7,071,172号描述的分泌信号。

[0229] 在本发明的代表性实施例中,病毒载体与/或病毒衣壳施用于CNS(例如,大脑或眼睛)。病毒载体与/或衣壳可以引入到脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(丘脑下部、背侧丘脑、丘脑上部、垂体、黑质、松果体)、小脑、终脑(纹状体、大脑(包括枕骨、颞、顶骨和额叶)、皮层、基底节、海马和杏仁核(portaamygdala)、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。病毒载体与/或衣壳还可以施用于眼睛的不同区域,例如,视网膜、角膜与/或视神经。

[0230] 病毒载体与/或衣壳可以递送到脑脊髓液(例如,通过腰椎穿刺)中,使递送载体更分散。在血-脑屏障已经被扰乱(例如,脑瘤或脑梗死)的情况下,病毒载体与/或衣壳可以进一步血管内施用于CNS。

[0231] 病毒载体与/或衣壳可以经本领域熟悉的任何路径施用于CNS的期望区域,包括但不限于鞘内、眼内、大脑内、心室内、静脉内(例如,在糖,如甘露醇存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如,玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如,筋膜下区域)递送及肌肉递送,逆行递送到运动神经元。

[0232] 在具体实施例中,病毒载体与/或衣壳在液体制剂中直接注射(例如,立体定位注射)到CNS的期望区域或室内。在其它实施例中,病毒载体与/或衣壳可以经局部施用于期望区域或经鼻内施用气溶胶制剂。眼睛施用可以局部施用液滴。作为另一个替代方案,病毒载体与/或衣壳可以以固体、缓释制剂施用(参见,例如美国专利第7,201,898号)。

[0233] 在另一个实施例中,病毒载体可用于逆运输,治疗与/或预防神经运动元疾病和症状(例如,肌萎缩性侧索硬化(ALS);脊髓性肌萎缩(SMA)等)。例如,病毒载体可以递送到肌肉组织,从肌肉组织迁移到神经元内。

[0234] 上面已经对本发明进行了描述,将在下述实例中对这些方面进行更详细的说明,这些实例在此仅用于阐述目的,而非用于限制本发明。

实例1

材料和方法

[0235] 质粒和病毒。所有质粒都来自北卡罗来纳大学基因治疗中心载体核心设施。病毒通过HEK293细胞三次转染,并经氯化铯密度超速离心提纯产生。利用下述设计用于识别荧光素酶转基因的引物集:(正向)5'-AAA AGC ACT CTG ATT GAC AAA TAC-3'(SEQ ID NO:9)和(反向)5'-CCT TCG CTT CAA AAA ATG GAA C-3'(SEQ ID NO:10);或下述设计用于识别人 α 1抗-胰蛋白基因的引物集:(正向)5'-GAA GTC AAG GAC ACC GAG GA-3'(SEQ ID NO:11)和(反向)5'-CCC AGC TGG ACA GTC TCT TA-3'(SEQ ID NO:12),采用实时定量PCR(qPCR)分析,得到病毒滴度。对所有实验小组来说,相关病毒构建体在使用前先用同一qPCR板滴定。采用定点突变(Stratagene QuikChange)进行核苷酸删除或替换。表8列出了本研究中考察的所有VR1突变体的引物序列。rAAV1->rAAV6点突变(例如,rAAV6.1等)已经是普通实验室储备的一部分。对本工作中使用的每个质粒开展DNA测序,以在制备病毒之前验证

序列一致性。

表8 VR1突变体定向突变采用的引物。

名称	序列（列出 5'至 3'）
rAAV1/T265D	gca atc tcc agt gct tca gac ggg gcc agc aac g (SEQ ID NO:13)
rAAV1/T265E	gca atc tcc agtngct tca gag ggg gcc agc aac g (SEQ ID NO:14)
rAAV1/T265F	gca atc tcc agt gct tca ttc ggg gcc agc aac gac (SEQ ID NO:15)
rAAV1/S261del	caa gca aat cag tgc ttc aac ggg gg (SEQ ID NO:16)
rAAV1/S262del	gca aat ctc cgc ttc aac ggg gg (SEQ ID NO:17)
rAAV1/A263del	gca aat ctc cag ttc aac ggg ggc (SEQ ID NO:18)
rAAV1/S264del	caa atc tcc agt gct acg ggg gcc aga aac (SEQ ID NO:19)
rAAV1/T265del*	ctc cag tgc ttc agg ggc cag caa cg (SEQ ID NO:20)
rAAV1/G266del	cca gtg ctt caa cgg cc gca agc (SEQ ID NO:21)
rAAV1/A267del	gct tca acg ggg agc aac gac aac c (SEQ ID NO:22)
rAAV1/S268del	cgg ggg cca acg aca acc ac (SEQ ID NO:23)
rAAV1/N269del	cgg ggg cca gcg aca acc act tc (SEQ ID NO:24)

*准确的rAAV1/T265del引物用于建立rAAV6/T265del突变体。

[0236] 活动物研究。所有动物均按照美国国立卫生研究院指南，遵照北卡罗来纳大学教堂山分校IACUC批准的协议维持和处理。将包装CBA- 荧光素酶或CBA-hAAT转基因的rAAV变体按指示剂量注射到6-8周大雌性BALB/c小鼠 (Jackson Laboratories) 体内。每次注射总体积50μL。在注射之前，小鼠采用异氟烷气体麻醉。按120mg/kg体重腹膜内注射D- 荧光素底物(Nanolight) 后,采用Xenogen IVIS Lumina成像系统(Perkin Elmer/Caliper Life Sciences) 监测指示时间点的荧光素酶转基因表达。采用Living Image软件(Perkin Elmer/Caliper Life Sciences)开展生物荧光图像分析,荧光素酶表达以CPM/ROI(感兴趣选择区域每分钟计数)报告。

[0237] 转基因表达和拷贝数的体外定量。对体外荧光素酶分析来说,在注射1e10vg剂量7天后处死小鼠,并收获注射肌肉组织。将大约50mg的每个组织在冰上切碎。然后,采用组织匀浆机(Cole-Parmer)将每个组织试样在150μL 2X被动裂解缓冲液(Promega)中均化。将35 μL裂解液和100μL D- 荧光素底物(Promega) 转移到96-孔板,采用Victor2发光计(Perkin Elmer)开展发光分析。组织裂解液的总蛋白浓度采用Bradford分析(Bio-Rad) 测定。在注射1e10vg剂量3天后,收获注射的GC/按照上述说明均化和裂解,采用DNeasy试剂盒(Qiagen) 处理~25mg组织试样,提取宿主和载体基因组DNA。细胞数量利用专为小鼠核纤层蛋白(管家基因)设计的下述引物,采用qPCR测定:(正向)5'-GGA CCC AAG GAC TAC CTC AAG GG-3' (SEQ ID NO:25) 和(反向)5'-AGG GCA CCT CCA TCT CGG AAA C-3' (SEQ ID NO:26)。如上文所述,每个细胞病毒基因组的数量利用专为荧光素酶转基因设计的引物,采用qPCR测定。

[0238] 肝素竞争。将所示构建体在溶于林格氏盐溶液(RSS)的250 μ g/mL猪硫酸肝素钠盐(Sigma-Aldrich)溶液中于4 $^{\circ}$ C转动条件下培养1个晚上或仅在林格氏盐溶液中于4 $^{\circ}$ C转动条件下培养1个晚上。每组每GC注射1e10vg,每次注射总体积50 μ L。在注射7天后,开展活动物生物荧光成像。

[0239] 分子建模。rAAV1、rAAV2或rAAV6的三维结构采用PyMol之前公开的坐标(www.pymol.org),以整个衣壳形式展示(来自Mavis Agbandje-McKenna博士的礼物)。PyMol对齐指令用于对齐各种结构。涉及氢键结合的原子对采用MolProbity在晶体结构坐标上计算,并采用KiNG图形软件直观显示(kinemage.biochem.duke.edu)。

[0240] 肝素亲和层析。将所示构建体采用与琼脂糖小球(Sigma-Aldrich)结合的硫酸肝素在4 $^{\circ}$ C转动条件下培养1个晚上。将淤浆转移到微色谱柱(Bio-Rad),并用RSS洗脱3次,然后采用日趋严格的NaCl洗脱。在调节溶液中已经存在的NaCl含量以后,将合适数量的NaCl溶于RSS中,配制溶液。收集所有洗脱组分。如上文所述,采用专门设计用于荧光素酶转基因的引物,对每次洗脱中包含的病毒粒子开展qPCR定量测定,从而测定每种洗脱组分中病毒的百分含量。

[0241] 人AAT ELISA检测。采用肝素化毛细管(Sigma-Aldrich)经后眼窝出血采集小鼠血液。采集后,立即将样品做成颗粒状,收集血清,并在-80 $^{\circ}$ C贮存供以后使用。在出血之前,小鼠采用异氟烷气体麻醉。将96-孔板涂覆10mg/mL兔子抗-人AAT抗体(Sigma-Aldrich)在4 $^{\circ}$ C放1个晚上。然后,在室温采用血清稀释溶液(含2.5%牛血清白蛋白和0.05%吐温的PBS)洗涤和封闭1小时。将所示血清稀释溶液(每个样品共100 μ L)加入到板中,并在室温培养2小时。采用PBS洗涤4次后,在板中加入100 μ L HRP-结合山羊抗-人AAT抗体(10ug/mL;Abcam)室温培养1小时。进一步洗涤后,加入TMB底物(Pierce)显色,并加入10% H_2SO_4 终止。采用iMark酶标仪(Bio-Rad)读取光密度。采用这种方法无法检测鼠AAT。

实例2

rAAV1衣壳位置265突变提高骨骼肌转导

[0242] 在rAAV2衣壳位置264之后插入天冬氨酸、谷氨酸或苯丙氨酸(建立新位置265),将骨骼肌转导提高了一个数量级,我们假设rAAV1中位置265用D、E或F替换天然存在的苏氨酸将提高这种血清型的骨骼肌转导(在此衣壳环中,rAAV1是比rAAV2长的一种氨基酸)。作为对照,从rAAV1删除T265,从而类似未修饰rAAV2。将包装鸡 β -肌动蛋白启动子驱动萤火虫荧光素酶(CBA-luc)转基因的rAAV1、rAAV1/T265D、rAAV1/T265E、rAAV1/T265F和rAAV1/T265del注射到鼠腓肠肌(GC)内,剂量是1e10病毒基因组(vg)。在注射7天后(dpi)开展活动物生物荧光成像,从而通过测定发射的光对转基因表达进行定量(图1A)。与rAAV1相比,rAAV1/T265D、rAAV1/T265E和rAAV1/T265F的转基因表达分别提高了28-倍、34-倍和36-倍,支持我们之前对rAAV2衣壳骨架的分析。令人吃惊的是,与rAAV1相比,rAAV1/T265del将转导提高了大约200-倍。为了更好地了解这种现象,在本研究其它大多数分析中采用265删除突变体。

[0243] 为了证明用于产生上述数据的图像定量方法准确地表示了注射肌肉组织内的转基因表达水平,切除注射腓肠肌(GC),进行均化/裂解,并对组织裂解液开展体外荧光素酶分析。在此分析中,当归一化到每毫克分析组织相对发射光单位时,与rAAV1相比,rAAV1/T265del的转导效率提高了137-倍(图1B)。rAAV1/T265del报告基因表达增加与肌肉转基因

递送提高有关:采用定量实时PCR(qPCR)分析(图1C),检测出与rAAV1相比,每个肌肉细胞的病毒基因组拷贝数多14.5倍。所有结果都采用几种方法(例如,密度超速离心、亲和层析法)提纯的载体独立制剂,在多个实验中得到了证实,从而确保测定的效果并非仅对某一批次或提纯方法有效。

[0244] 为了确保考察合适的时间点,利用注射7天后、14天后、21天后和42天后采集的测定数值,开展rAAV1和rAAV1/T265del转基因表达的时间过程分析。表达动力学表现相同,其中在注射7天后观察到稳健表达,在rAAV1注射7天后和42天后这段期间提高7.5-倍,在注射rAAV1/T265del后的同一时期提高12-倍。在所有时间点,rAAV1/T265del都比rAAV1超出大约两个数量级(第7天时100-倍,第14天时176-倍,第21天时81-倍,第42天时159-倍)。总之,这些数据表明,删除rAAV1衣壳骨架中的氨基酸265是提高骨骼肌组织内转基因递送和表达的非常有效的策略。更重要的是,正如qPCR分析记录的那样,这种提高在可持续的一段时间内得到维持,支持我们关于载体基因组拷贝数增加的观察。

实例3

远端残基与265共同作用调节转导效率

[0245] rAAV6被视为肌肉与骨骼基因治疗应用的另一种优先候选者,是与rAAV1衣壳序列同源性最高的血清型(99.2%)。为了确定rAAV1衣壳删除位置265实现的转导表型增强是否将在rAAV6中得到保持,产生了包装CBA-luc的rAAV6和rAAV6/T265del衣壳。将它们按 1×10^{10} vg剂量注射到鼠GC内7天后,对转基因表达进行定量。有趣的是,注射rAAV6/T265del后,转基因表达仅仅是rAAV6测定值的82% (图2A)。考虑到rAAV1删除位置265对转导的巨大影响,及rAAV1和rAAV6仅有6个氨基酸不同,这6个氨基酸中没有一个氨基酸空间上位于与位置265足够近的地方,从而形成直接相互作用,这样的结果让人非常吃惊。此外,rAAV1与rAAV6两者之间不同的任何残基都位于距位置265至少22Å的地方。为了形成直接相互作用,例如,氢键结合,残基彼此之间的距离必须在 ~ 3 Å以内。尽管如此,位置265附近rAAV1和rAAV6的结构存在构象区别(图2B),正如它们的晶体数据比对直观显示所示。

[0246] 为了辨别rAAV6衣壳内哪个残基可能抑制删除位置265对增强转导效率的有效性,采用标记获救实验,其中将rAAV6衣壳中与rAAV1不同的每个残基突变为rAAV1中存在的氨基酸,同时删除位置265。这些突变体分别命名为rAAV6.1(rAAV6中第一个非保守残基(F129L)突变为rAAV1中的相当氨基酸)、rAAV6.2(D418E)、rAAV6.3(K531E)、rAAV6.4(L584F)、rAAV6.5(V598A)和rAAV6.6(H642N)。rAAV6衣壳的大多数变化对转导产生非常小的变化(图2C)。构建体rAAV6.1、rAAV6.1/T265del、rAAV6.2、rAAV6.2/T265del和rAAV6.3的转基因表达分别降低 ≤ 2 -倍。rAAV6.4和rAAV6.4/T265del的转基因表达增加大约2-倍。与其它突变相比,位置598和642(rAAV6.5和rAAV6.6)的突变使转基因表达相对rAAV6大幅降低,分别降低3.4-倍和13.1-倍。删除位置265及rAAV6.5和rAAV6.6对这些构建体的表现几乎未产生什么变化,rAAV6.4/T265del和rAAV6.5/T265del转基因表达分别降低4.8-倍和8.7-倍。令人吃惊的是,要补救rAAV1时观察到的265表型,仅要求改变位置531(rAAV6.3)的一个氨基酸,与rAAV6相比,rAAV6.3/T265del转导效率提高23-倍(图2C)。

[0247] 考察rAAV6晶体结构中残基531和265之间的空间关系(图3A-3D)。氨基酸265和531离得不够近,无法在二十面体对称轴中形成直接相互作用。在2-倍轴中,位置265和531相距 ~ 26.7 Å,而在5-倍轴中,它们相距 ~ 42.6 Å。但是,在3-倍对称轴中,虽然相距 ~ 22.8 Å,但是,两

个残基在同一平面中表面暴露(图3B)。残基531位于每个3-倍“刺突”的底部,265位于这些刺突之间的轻微突起处。总之,在这些时间点,上述数据表明,位置265和531调节转导效率最可能的情况是通过形成3-倍对称轴的突起。

实例4

衣壳肝素结合能力影响265表型,反之亦然

[0248] rAAV1和rAAV6都连接N-连接唾液酸作为主要受体;但是,rAAV6还与硫酸肝素单元结合。以前,我们的结果表明,K531是rAAV6与硫酸肝素相互作用所需的唯一残基。K531也是补救rAAV1中观察到的265删除表型所需的唯一残基。为了进一步探索衣壳肝素结合及位置265突变提高转导之间的功能关系,我们考察了rAAV2-据知这是一种利用硫酸肝素蛋白聚糖作为主要感染受体的原型血清型。将rAAV2在位置585突变(据知这种突变降低rAAV2肝素结合),同时插入天冬氨酸,建立前面描述的新位置265。按剂量 1×10^{10} vg将rAAV2、rAAV2/265D、rAAV2/K585E和rAAV2/265D、K585E注射到鼠GC内。与前面的报告一致,消除肝素结合提高了骨骼肌的rAAV2转导。但是,位置265突变和肝素结合能力消除共同作用,使转导效率提高最多(图4A),与rAAV2相比,转导提高96-倍,与rAAV2/265D相比,转导提高7-倍,与上文rAAV6观察到的结果一致(图2C)。值得指出的是,残基531突变消除了rAAV6的肝素结合,残基585突变消除了rAAV2的肝素结合。虽然线性序列中残基531和585彼此相距并不近,但是,它们都位于衣壳表面肝素结合足迹的重叠碱性片区(图4B)。

[0249] 为了辨别直接抑制肝素结合是否提高265突变的转导,在向小鼠注射265突变构建体之前先开展肝素竞争。与rAAV6相比,rAAV2与肝素结合的亲和力更大,过去数据已经表明,rAAV2是在硫酸肝素溶液中培养后转导有效减少的唯一一种血清型,因此,采用rAAV2考察这个问题。将rAAV2和rAAV2/265D衣壳在盐溶液或 $250 \mu\text{g/mL}$ 硫酸肝素溶液中培养1个晚上。采用rAAV1作为对照。将病毒按剂量 1×10^{10} vg注射到鼠GC内,注射7天后对小鼠成像。在rAAV2和rAAV2/265D中,硫酸肝素培养使转导效率降低了大约3-倍,而rAAV1几乎没有影响,转导仅降低了0.3-倍(图4C)。这些结果表明,为了使位置265突变有效提高转导,需要减少硫酸肝素结合,其原因是本身衣壳内的结构变化及肝素结合未抑制。

[0250] 肝素亲和层析证明,所有rAAV2和rAAV6衣壳突变都按照预期降低了肝素结合(图5A-5D)。将相关构建体采用肝素-结合琼脂糖培养,并用不断增加的NaCl梯度洗脱。有趣的是,与亲代衣壳相比,位置265突变衣壳的肝素结合减少。例如,在柱子载入病毒后,在第一次洗涤步骤期间洗脱的rAAV2/265D比rAAV2高20%。同样,300mM NaCl组分中洗脱的rAAV2/265D比rAAV2少20%。同样,在洗柱期间,洗脱的rAAV6/T265del比rAAV6多37%,而200mM NaCl时洗脱的rAAV6/T265del比rAAV6低25%,这些数据支持这两种蛋白质基序之间相互作用的假设(rAAV6在比rAAV2更不严格的洗脱组分中的洗脱与前面的工作一致)。虽然rAAV2/K585E减少rAAV2肝素结合,但rAAV2/265D-K585E进一步强化了这种影响。在初次洗涤步骤期间,75% rAAV2/K585E和96.5% rAAV2/265D-K585E被洗脱。在200mM NaCl时,洗脱的rAAV2/265D-K585E比rAAV2/K585E少10%。改变包含位置265的衣壳区影响肝素结合位点包含区的形态结构,反之亦然,结合图3和图4提供的数据,这些结果为这种说法提供了新的证据。

实例5

VR1结构多重破坏提高骨骼肌转导

[0251] 目前提出的数据表明,VR1形态结构变化是位置265突变提高转导的唯一驱动因素。因此,我们试图确定VR1结构的其它破坏是否会产生类似的转导提高表型。因此,使rAAV1突变,产生S261del、S262del、A263del、S264del、G266del、A267del、S268del和N269del,如图6所示。这些构建体按 1×10^{10} vg剂量注射到鼠GC内,此外,还将rAAV1和rAAV1/T265del按此剂量注射到鼠GC内。在注射7天后对转基因表达进行定量(图6)。与rAAV1相比,每个突变体都不同程度地提高了转导效率。S261、S262和N269构建体的转导提高 ≤ 3 -倍。与rAAV1相比,G266和S268删除构建体的转导提高了 ~ 5 -倍,A263del和A267del提高了 ~ 10 -倍。与rAAV1相比,S264和T265删除构建体的转导提高最多,转基因表达分别提高了25-倍和100-倍。这些数据表明,通过删除氨基酸而对VR1环所做的任何破坏将提高rAAV1转导,此种提高在删除位置265时达到峰值,随着突变远离位置265而逐步降低(图6)。

实例6

265删除突变改善治疗转基因的表达

[0252] 为了对265-删除组的相对效果进行比较,将六个衣壳采用目前临床试验的hAAT表达盒包装。按 1×10^{10} vg剂量将rAAV1、rAAV1/T265del、rAAV6、rAAV6/T265del、rAAV6.3和rAAV6.3/T265del注射到鼠GC内。在注射5周后,采用ELISA测定hAAT的血清浓度(图7)。与上面一致的是,删除位置265提高了转基因表达;但是,提高程度未达到荧光素酶分析测定的水平(例如,采用ELISA分析时,与rAAV1相比,rAAV1/T265del表达提高9-倍,而采用荧光素酶分析时,测定平均值提高 >100 -倍)。不管怎样,所有265突变体都超过亲代血清型,其中rAAV6.3/T265del时hAAT的血清浓度最大。

实例7

提高眼睛内的转导效率

[0253] 将AAV构建体经视网膜下(SRI)或玻璃体内(IV)注射到采用氯胺酮/甲苯噻嗪组合麻醉的小鼠中。在鸡B肌动蛋白启动子(CBh)条件下,所有AAV衣壳均包装报告基因荧光素酶。考察的构建体包括AAV1(1-CBh)、AAV1/T265del(1.1-CBh)、AAV6/T265del(6.1-CBh)、AAV6/K531E(6.3-CBh)、AAV6/T265del_K531E(6.3.1-CBh),及我们实验室以前表征的AAV2变体、AAV2.5(2.5-CBh)(Bowles et al., Mol. Ther. 20(2):443(2012))。采用IVIS lumina活动物成像系统,在注射后的所示时间点测定以荧光素酶活性衡量的转基因表达。按120mg/kg体重腹腔内注射D-荧光素底物(Nanolight)后,对小鼠成像,按照IVIS生产商的说明,测定给定兴趣区域内的光子,对图像进行定量。结果如图9和图10所示。

[0254] rAAV基因治疗的成功转化的挑战是体内转导效率低。本研究采用rAAV衣壳的结构分析来建立合理的工程策略,明确产生在骨骼肌内转导表型提高的新型衣壳变体。我们实验室的早期报告披露,VR1是rAAV2转导效率的关键决定因素,根据这一点,可以建立总方法。正如我们以前在rAAV2方面发现的那样,rAAV1中位置265处采用各种氨基酸替换,观察到转导得到提高。但是,引人注目的是,通过删除临床上更相关rAAV1的单个氨基酸破坏VR1,所得新型载体的转导提高了几个数量级(图1)。仅这种现象对目前使用rAAV1的患者剂量方案具有非常重大的意义,可能向前推进载体生产的简单性。值得指出的是,rAAV6得到了类似的结果,但是仅在二次突变破坏前面表明赋予硫酸肝素结合活性的碱性氨基酸片区以后,才得到这种结果。通过分析衣壳序列同源性,可以采用标记补救方法,定义一起作用调节转导效率和主要受体辨别的两个衣壳表面远区,表明了衣壳拓扑在病毒生命周期期间

的复杂作用。

[0255] 位置265和主要受体结合的对抗关系表明,265删除表型来源于衣壳和结合伙伴之间蛋白质:蛋白质相互作用的修饰。这种情况是在与细胞表面初步粘附时发生或在进入事件后发生还有待确认。与转基因表达有关的唯一可测量的关系是每个细胞载体基因组数量的增加,而不是表达动力学或寿命的增加,这一点强烈地表明265表型是细胞进入现象改变的结果。已经表明,VR1与rAAV2中的受体结合有关,以及与定向进化产生的嵌合载体有关,但是,这些相互作用性质的明确结构细节尚未定义。位置265相对包含三-倍对称轴的突起(衣壳负责受体连接的主要区域)的空间关系为这种想法进一步提供了证据。值得注意的是,野生型和突变构建体在以下方面并未发现任何差别:1) 测试衣壳稳定性的热变性分析,2) 考察衣壳蛋白比例和尺寸的蛋白质印迹,或3) 探索衣壳拓扑或空病毒全衣壳总体分布明显差别的电子显微镜。此外,剂量数据表明,265转导提高可以用于各种临床应用(例如,AAT vs 脂蛋白脂肪酶缺乏症)。

[0256] 众所周知的是,苏氨酸残基磷酸化影响细胞内蛋白质动力学。实际上,rAAV衣壳表面上的选择丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基磷酸化最终导致衣壳蛋白酶体在转基因递送之前被清除,将这些残基突变为无法磷酸化的残基,可以阻止衣壳清除,从而提高转导效率。位置265处几种不同类型的氨基酸(苏氨酸删除、仿磷酸化或大体积疏水基替换)都提高了转导,表明磷酸化不可能负责265突变调节的转导提高。此外,VR1的结构可以在整个环中被破坏,得到转导改善的表型。可能这些破坏将衣壳从与抑制蛋白的相互作用中释放出来,虽然这一点仍有待确认。但是,有证据表明rAAV2存在类似效应,其中衣壳肝素结合能力降低大幅改善了肌肉组织的转导^(空)。实际上,本工作重现了这些数据。人们认为,rAAV2与硫酸肝素蛋白聚糖结合的能力通过病毒组织适应培养逐步发展,与所述受体结合对这种血清型的体内转导效应存在不利影响。同样,在腺病毒时,即使衣壳突变而不与其主要连接(tethering)受体CAR结合,也维持稳健的肝转导,因为衣壳的替代区能够通过促进与替代受体的生产性相互作用而补偿。

[0257] 特别是,转导效率在删除位置265后达到峰值。在分析rAAV1内VR1的氢键网络时(图8),值得指出的是,VR1通过主要由位置265编排的氢键网络稳定。实际上,次好的转导子是删除位置264和263得到的,这两者也通过这种网络参与VR1的结构稳定。当然,真正考察这些突变对VR1稳定性影响的唯一方法是分辨这些构建体的晶体结构。但是,非常重要的是,rAAV6在位置265附近的稳定性本身较差(图8),实际中,rAAV6需要其它突变来复制位置265表型。许多研究试图阐明密切相关的rAAV1和rAAV6之间的表型差异(例如,受体偏好和组织嗜性之间的差异)。几乎所有以前的研究都考察了这两种病毒不同的六种衣壳氨基酸,了解这些位置的精确定位能够分析直接影响病毒生命周期的衣壳区。虽然事实如此,但是,我们首次在此证明了这两种血清型结构水平不同的另外一个更精细的衣壳架构层调节病毒生物学以及合理设计探索这些属性的方法。

[0258] 直接考察注射组织内转基因表达(即体外荧光素酶分析,产生137-倍提高)vs分泌蛋白质转基因表达(即ELISA测定hAAT的浓度,产生9-倍提到)时,发现rAAV1和rAAV1/T265del之间的转导提高测量值之间存在差异,这是另一个引人注目的发现。值得指出的是,在以前比较肌肉注射rAAV2、rAAV2.5和AAV2/265D分泌hAAT测量的实验中,ELISA方法并未发现任何明显差别,但是,当采用工程衣壳时,与rAAV2相比,荧光素酶表达数量级增加。

同样,虽然已经发现,采用荧光素酶分析时,蛋白酶体抑制剂硼替佐米可以将rAAV2在肝脏组织中的转导提高大约10-倍,但是,当测定分泌因子IX表达的血清型时,提高不到2-倍。由于,例如,细胞内环境vs血清内蛋白质半衰期的差异,以及蛋白质分泌相对蛋白质表达的总效率,因此,从收获组织直接测量转基因表达可能比先采集、然后测定分泌因子更灵敏。当设计rAAV载体,意味着递送编码分泌蛋白质的转基因时,这些发现突出了实现转化应用所需的转导急剧增加。

[0259] 这些努力的目标是持续改善rAAV载体技术,从而基因治疗成为更实际有效的临床选择,例如,降低实现治疗有益转基因水平所需的载体剂量。这种努力可能减少人们对有关剂量-依赖性毒性的临床关注及减轻临床-级载体的生产工作。在这里,我们提出了一个简单有效的策略,改善目前直接注射靶向骨骼肌的临床试验中采用的rAAV血清型的性能。由于这种策略利用对其它rAAV载体发展重大进步来说非常独特的衣壳区(例如,Tyr-to-Phe衣壳突变体),确定其是否能够与这些技术进步协同整合,进一步优化rAAV载体用于基因治疗,是非常有趣的。由于我们继续对我们的265突变体组全身施用后靶向和提高在心脏组织及全身骨骼肌中表达的潜力进行评估,此处的工作为下一代可翻译rAAV载体的开发提供了初步基础。此外,我们已经产生了一批rAAV衣壳试剂供进一步详细(例如,结晶)分析,最终将更全面了解单个氨基酸在rAAV载体生物学中独特且重要的作用。

实例8

材料和方法

[0260] 质粒和病毒:所有质粒都来自北卡罗来纳大学基因治疗中心载体核心设施。如前文所述,病毒通过HEK293细胞三次转染,并通过氯化铯密度超速离心法提纯产生(Grieger et al., Nat. Protoc. 1 (3):1412 (2006))。采用下述设计用于识别荧光素酶转基因的引物集,采用实时定量PCR (qPCR) 分析,测定病毒滴度:(正向) 5'-AAA AGC ACT CTG ATT GAC AAA TAC-3' (SEQ ID NO:10) 和(反向) 5'-CCT TCG CTT CAA AAA ATG GAA C-3' (SEQ ID NO:11)。对每个实验小组来说,相关病毒构建体在使用前采用同一qPCR板滴定。采用定点突变(Stratagene QuikChange) 进行核苷酸删除或替换。表9列出了创建本研究中所有VR1突变体采用的引物序列。在制备病毒之前,先开展DNA测序,确认本研究中使用的每个质粒的序列一致性都是正确的。

表9本研究中使用的定点突变引物。

构建体	引物序列(5' ->3')
pXR1/T265del*	ctc cag tgc ttc agg ggc cag caa cg (SEQ ID NO:27)
pXR1/T265D*	gca atc tcc agt gct tca gac ggg gcc agc aac g (SEQ ID NO:13)
pXR1/Y445F*	cat cga cca gta cct gta ttt cct gaa cag aac tca (SEQ ID NO:28)
pXR2/Q263del	caa aca aat ttc cag ctc agg agc ctc g (SEQ ID NO:29)
pXR2/S264del	caa att tcc agc caa gga gcc tcg aac g (SEQ ID NO:3026)
pXR3b/Q263del	caa gca aat ctc cag ctc agg agc ttc (SEQ ID NO:31)
pXR3b/266D	ctc cag cca atc aga cgg agc ttc aaa cg (SEQ ID NO:32)
pXR3b/R594A	cag ctc cca cga ctg caa ctg tca atg atc (SEQ ID NO:33)
pXR4/N261del	gag cct gca gtc cac cta caa cgg (SEQ ID NO:34)
pXR5/258del	ccg tcg acg gaa acg cca acg cc (SEQ ID NO:35)
pXR6/S262del	gca aat ctc cgc ttc aac ggg gg (SEQ ID NO:36)
pXR7/T265del	caa atc tcc agt gaa gca ggt agt acc (SEQ ID NO:37)

pXR8/T265del	ctc caa cgg gtc ggg agg agc (SEQ ID NO:38)
pXR8/T265D	caa atc tcc aac ggg gac tcg gga gga gcc acc (SEQ ID NO:39)
pXR8/S266del	tct cca acg gga cag gag gag cca acc (SEQ ID NO:40)
pXR9/S263del	caa gca aat ctc cag cac atc tgg agg (SEQ ID NO:41)
pXR9/S265del	ctc caa cag cac agg agg atc ttc aaa tg (SEQ ID NO:42)
pXR9/T265D	caa gca aat ctc caa cag cga ctc tgg agg atc ttc aaa tg (SEQ ID NO:43)
pXR9/S263A_S266del	gca aat ctc caa cgc cac agg agg atc ttc aaa tga c (SEQ ID NO:44)

*表明pXR1和pXR6构建体采用相同的引物序列。

[0261] 结构分析和分子建模：所示pdb文件通过MolProbity结构验证软件(molprobity.biochem.duke.edu)处理,必要时,通过包含Asn/Gln/His翻转开展H-键优化,根据电子云x-H键长度,添加氢键。然后,针对文件分析所有原子接触和几何形状,并在KiNG中直观显示(kinimage.biochem.duke.edu),确定参与氢键的VR1原子。然后,在PyMol(pymol.org)中打开PDB,以氢直观显示的棒图表示,而且KiNG中鉴定的氢键采用该测量转化为短划线。

[0262] 活动物研究：所有动物均按照美国国立卫生研究院指南,遵照北卡罗来纳大学教堂山分校IACUC批准的协议维持和处理。将包装CBA-荧光素酶转基因的rAAV变体按指示剂量注射到6-8周大雌性BALB/c小鼠(Jackson Laboratories)的尾静脉内。每次注射总体积200μL(采用1XPBS使体积达到200μL)。在按120mg/kg体重注射D-荧光素底物(Nanolight)后,采用Xenogen IVIS Lumina成像系统(Perkin Elmer/Caliper Life Sciences)直观显示荧光素酶转基因表达。采用Living Image软件(Perkin Elmer/Caliper Life Sciences)开展生物荧光图像分析。

[0263] 转基因表达和拷贝数体外定量：为了获取用于体外荧光分析的组织样本,在注射10天后处死小鼠,并收获指示器官和进行急速冷冻。采用刀片将组织在冰上均化,然后将大约50mg组织匀浆悬浮在250μL 2X被动裂解缓冲液(Promega)中,采用组织匀浆机(Cole-Parmer)机械裂解。然后,将35μL组织裂解液转移到96-孔板中,并与100μL D-荧光素底物(Promega)混合,然后,马上采用Victor2发光计(Perkin Elmer)开展发光分析。组织裂解液的总蛋白浓度采用Bradford分析(Bio-Rad)测定。此外,采用DNeasy试剂盒(Qiagen)处理~25mg上文产生的组织匀浆,提取宿主和载体基因组DNA。细胞数量利用专为小鼠核纤层蛋白(管家基因)设计的下述引物,采用qPCR测定：(正向)5'-GGA CCC AAG GAC TAC CTC AAG GG-3' (SEQ ID NO:45)和(反向)5'-AGG GCA CCT CCA TCT CGG AAA C-3' (SEQ ID NO:46)。如上文所述,每个细胞病毒基因组的数量利用专为荧光素酶转基因设计的引物,采用qPCR测定。

实例9

rAAV衣壳结构分析,用于鉴定VR1中的氢键网络

[0264] 我们前面已经证明,删除rAAV1衣壳VR1内的选择氨基酸导致小鼠肌肉注射后转导效率呈对数级增加(Warischalk et al., Mol. Ther. 2015)。rAAV1晶体结构分析表明,大多数有效VR1删除突变与参与环内氢键网络的氨基酸对应,表明VR1结构元件失稳导致转导表型提高。本研究的目的是确定：1)肌肉注射后,rAAV1 VR1突变体衣壳是否可有效地靶向肌肉组织(vs仅转导提高表型),及2)VR1结构元件的靶向失稳是否是改善其它rAAV血清型转导的保守方法。为了解决这些问题,采用开放源结构验证软件MolProbity(Davis et al.,

Nucleic Acids Res.35(Web Server issue):W375(2007)) 和KiNG中直观显示的VR1氢键图(Chen et al.,Protein Sci.18(11):2403(2009)),分析了包括rAAV1、rAAV2、rAAV3、rAAV4、rAAV5、rAAV6、rAAV7、rAAV8和rAAV9的一组rAAV衣壳(图11A-11H)。根据衣壳晶体结构数据(Govindasamy et al.,J.Virol.80(23):11556(2006);Miller et al.,Acta Crystallogr.Sect.F Struct.Biol.Cryst.Comm.62(Pt 12):1271(2006);Xie et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99(16):10405(2002);Lerch et al.,Virology 403(1):26(2010);Govindasamy et al.,J.Virol.87(20):11187(2013);Xie et al.,Acta Crystallogr.Sect.F Struct.Biol.Cryst.Comm.64(Pt 11):1074(2008);Nam et al.,J.Virol.81(22):12260(2007);Mitchell et al.,Acta Crystallogr.Sect.F Struct.Biol.Cryst.Comm.65(Pt 7):715(2009)) 和预先存在的它们体内转导表型资料(Zincarelli et al.,Mol.Ther.

16(6):1073(2008)) 的获得性,选择这些血清型进行分析。rAAV7没有公开可以获得的资料;但是,为了完整起见,在分析中纳入了这种血清型。为了直观化简单起见,然后,将鉴定的氢键模式转化为PyMol图像(图12A-12H)。

[0265] 根据这些分析,选择每种血清型中被发现参与环内VR1氢键网络的氨基酸用于删除。表10列出了血清型rAAV1-rAAV9的VR1氨基酸序列及本研究中选择用于突变的氨基酸,以及每个突变假设破坏了多少个氢键。在rAAV7的情况下,根据以前得到的rAAV1的结果(Warischalk et al.,Mol.Ther.2015),选择了位置265处的苏氨酸突变。在rAAV9的情况下,VR1的结构似乎通过两个位置的氢键稳定,第一个氢键主要由源自残基S263附近的键编排,第二个氢键通过残基S265附近的键编排。因此,除双突变体rAAV9/S263del_S265del之外,创建了包含rAAV9/S263del和rAAV9/S265del的突变体衣壳。但是,双删除突变体无法产生完整的病毒粒子,替代策略是将突变位置S263突变为丙氨酸,同时删除位置S265,创建rAAV9/S263A_S265del。关于此研究所有血清型氢键关系的详细原子说明,参考图11图例。

表10rAAV1-rAAV9可变区1的氨基酸序列和删除突变。

血清型	可变区 1	突变
rAAV1	²⁶¹ SSASTGASNDNH ^Y ₂₇₃ (SEQ ID NO:1)	T265del+++
rAAV2	²⁶¹ SSQSGAS ₂₆₇ (SEQ ID NO:2)	Q263del+, S264del+
rAAV3b	²⁶¹ SSQSGASNDNH ^Y ₂₇₂ (SEQ ID NO:3)	Q263del++
rAAV4	²⁵⁶ ESLQSNT ^Y ₂₆₃ (SEQ ID NO:4)	N261del+
rAAV5	²⁵² SGSVDGS ₂₅₈ (SEQ ID NO:5)	S258del++
rAAV6	²⁶¹ SSASTGASNDNH ^Y ₂₇₃ (SEQ ID NO:6)	S262del++, T265del+
rAAV7	n/a	<i>T265del</i>
rAAV8	²⁶³ NGTSGGAT ₂₇₀ (SEQ ID NO:7)	T265del+
rAAV9	²⁶¹ SNSTSGGSS ₂₆₉ (SEQ ID NO:8)	S263del++, S265del+, S263del_S265del+++

+表示突变后假设破坏的氢键数量。

实例10

突变后VR1中氢键网络失稳的rAAV衣壳的生物分布

[0266] 为了直观显示上文详细描述野生型衣壳和VR1突变体衣壳的组织分布和转导效率,以上组合中的每个成员都采用鸡β-肌动蛋白启动子驱动萤火虫荧光素酶(CBA-luc)报告转基因包装,并经尾静脉注射到小鼠体内,每次注射的剂量是1e11病毒基因组(vg)。在注射9天后,开展活动物生物荧光成像。注射10天后,处死小鼠,切除选择器官,并进行均化和裂解。然后,对组织裂解液开展体外荧光素酶分析,对载体生物分布进行定量,从而测定转基因表达,并开展qPCR分析,对每个细胞的病毒基因组拷贝数量进行定量。VR1氨基酸的删除导致四种表型:1)选择性和稳健地靶向心肌与/或骨骼肌,如rAAV1和rAAV6观察到的那样(图13);2)维持先天性心肌与/或骨骼肌转导效率,大幅降低肝脏转导,如rAAV7、rAAV8和rAAV9中看到的那样(图14);3)广泛缺乏转导,如rAAV2和rAAV3所示(图15A-15B);及4)无法产生完整的病毒粒子,如rAAV4和rAAV5所示。

[0267] rAAV1和rAAV6衣壳的VR1突变导致心肌和骨骼肌组织转导效率大幅增加(图13)。与rAAV1相比,采用rAAV1/T265del处理的小鼠心脏组织样本测定的转基因表达高21-倍,腓肠肌(GC)组织样本高26-倍。其它几种组织(包括膈(26-倍)、脾(3.5倍)、肾(5-倍)、胰腺(6-倍)及肺(8-倍))中rAAV1/T265del的转导效率也得到提高(图16A)。令人吃惊的是,与rAAV1相比,肝脏转导降低3.5倍(图13B)。类似地,心肌和GC中转导的rAAV6/T265del比野生型rAAV6高14-倍和3-倍,而肝脏中的转导低28-倍(图13E)。在测试的任何其它组织中,rAAV6和rAAV6/T265del衣壳测定的转基因表达并未表现出明显的差别(图16B)。rAAV6/S262del产生的表型与rAAV6/T265de类似,与rAAV6/T265del相比,其在心肌和GC中的转导水平分别

低3.5-倍和高6-倍,在肝脏中的表达是rAAV6/T265del的1-倍以内(图16C)。这些结果表明,当向小鼠全身施用, rAAV1和rAAV6 VR1突变构建体优先转导肌肉组织。

[0268] 采用qPCR,对一组器官,包括心脏、GC和肝脏的每个宿主细胞中存在的载体基因组数量进行定量(图13C、13F)。在以rAAV1/T265del和rAAV6/T265del衣壳处理的小鼠组织样本中,qPCR测定的宿主细胞转基因数量的变化趋势与荧光素酶分析测定观察到的转基因表达类似(即载体基因组增加与转基因表达增加相关,反之亦然)。但是,转基因数量测定值之间的差异比转导效率更敏感。例如,在采用rAAV6/T265del处理的小鼠中,每个心脏细胞病毒载体基因组的数量比rAAV6处理的小鼠高4-倍,而突变体衣壳情况下心脏转导增加14-倍(图13F)。同样,每个肝脏细胞rAAV6/T265del基因组少4-倍,相比之下,转导降低28-倍。有趣的是,在rAAV1和rAAV1/T265del的情况下,每个心脏细胞载体基因组数量大幅低于每个肝脏细胞测定的数量,但在这两种构建体的情况下,心脏的转导远高于肝脏。总之,这些数据表明,rAAV1和rAAV6 VR1突变衣壳减少肝脏转导的能力与这些衣壳无法向肝细胞递送持续转基因相对应。另外,VR1突变衣壳向肌肉组织递送的转基因比其野生型递送的转基因似乎更有效地得到表达。最后,似乎肝脏微环境的某些方面对rAAV1衣壳进入细胞核的能力设置了障碍或一到那里就脱壳。

[0269] 从rAAV7、rAAV8和rAAV9衣壳删除VR1氨基酸得到具有非常类似表型的生物分布曲线(图14A、14B、14G)。它们观察到的主要特征是肝转导急剧下降(与野生型衣壳相比,rAAV7下降427-倍、rAAV8下降23-倍、rAAV9下降107-倍),而天然心肌和骨骼肌转导水平得到维持。肌肉组织中rAAV7和rAAV7/T265del的转导效率并未表现显著变化;但是,与rAAV8相比,GC组织中rAAV8/T265del转导效率增加大约8-倍(图14E)。rAAV9/S263del_S265del在肌肉组织中产生可变影响,与rAAV9相比,心脏组织转导低3-倍,GC组织高2-倍(图14H)。在任何其它组织类型样本中,该组中VR1突变体和野生型衣壳之间的转导并没有表现出明显差异(图17A-17C)。值得指出的是,在rAAV9时,要产生肌肉靶向生物分布曲线,要求位置S263和S265同时突变,这些位置的任一位置单独删除都大幅降低总转导效率(图14D)。

[0270] 对心脏、GC和肝组织样本中每个宿主细胞中存在的载体基因组拷贝数进行定量。在该组所有VR1突变衣壳中,肝脏转基因表达减少与肝细胞内转基因数量减少相对应(对rAAV7/T265del来说,每个肝细胞的载体基因组减少85-倍,对rAAV8/T265del来说,减少27-倍,对rAAV9/S263del_S265del来说,减少7-倍;图14C、14F、14I)。肌肉组织样本中转基因数量和转导效率之间的关系没有这么明显。例如,当rAAV7/T265del与rAAV7比较时,每个心肌细胞的转基因拷贝数减少22-倍,而衣壳之间的转导效率几乎相同。这些数据表明,该组VR1突变衣壳缺乏将数量稳定的转基因递送至肝细胞的能力,而这些衣壳向肌肉组织递送的转基因比其野生型递送的转基因得到更有效的表达。

[0271] 删除VR1氨基酸在rAAV2、rAAV3b、rAAV4和rAAV5衣壳中产生不良影响。在rAAV4和rAAV5中,VR1氨基酸删除导致无法产生完好的病毒粒子。采用这两种构建体尝试几次产生载体,以验证该结果的重复性。在rAAV2和rAAV3b中,VR1氨基酸删除对载体产生不存在任何可测量的影响;但是,在这两种血清型中,VR1删除突变导致小鼠静脉内注射后未出现可测量的转导(图15A-15B)。再一次,为了验证这些结果的重复性,采用新鲜载体储备,在第二队列小鼠中,采用剂量高5-倍(5e11vg/注射)的rAAV2和rAAV2/S264del重复这些实验(图15C)。总之,这些血清型响应VR1删除突变观察到的显著影响表明,维持规定VR1结构对这些

衣壳完成生产性病毒生命周期非常重要。

实例11

实现高效肝转导的衣壳基序的鉴定

[0272] 以前的研究已经表明,在衣壳蛋白位置264后包含氨基酸插入突变(建立新的位置265)的rAAV2衣壳在肌肉注射后,在骨骼肌中表现明显提高的转导效率(Bowles et al., Mol.Ther.20(2):443(2012);Li et al.,J.Virol.2012.86(15):7752(2012))。特别是,已经发现,插入天冬氨酸(rAAV2/265D)将转导提高了几个数量级(Li et al., J.Virol.2012.86(15):7752(2012))。由于删除VR1氨基酸使rAAV2衣壳无法转导,我们接下来考察替代方案-在VR1中插入氨基酸-是否能够提高rAAV2的生物分布表型。将包装CBA-luc的rAAV2和rAAV2/265D衣壳注射到小鼠尾静脉中,在注射9天后开展活动物生物荧光成像(图18A)。如上文所述,在注射10天后收获器官,并对转基因表达进行定量。有趣的是,虽然其它血清型中VR1氨基酸删除导致肝转导急剧减少,但是,在VR1中插入其它氨基酸导致相反的表型。与rAAV2相比,rAAV2/265D的肝转导增加10-倍(图14B),而在研究的其它所有组织中,这两种衣壳的转导相差≤2-倍。心脏和GC组织中这两种衣壳每个宿主细胞载体基因组拷贝数的差异小于1-倍;但是,施用rAAV2/265D与施用rAAV2相比,小鼠中每个肝细胞的载体基因组拷贝数增加10倍(图18C)。因此,与rAAV2衣壳相比,rAAV2/265D衣壳更能够靶向和进入肝细胞,或这些突变衣壳递送的基因组能够在这些细胞中更好的维持(或两者)。

[0273] 为了确定VR1中的天冬氨酸是否能够提高其它血清型的肝转导,在rAAV1(rAAV1/T265D)和rAAV6(rAAV6/T265D)中开展替换突变(表11),并在rAAV3b(rAAV3b/265D)中开展插入突变。在所有情况下都观察到偏向肝脏的强大转导。肝脏转导方面,rAAV1/T265D是rAAV1的大约212.5-倍,rAAV6/T265D是rAAV6的28-倍(图18K),rAAV3b/265D是rAAV3b的9-倍。在rAAV1和rAAV1/T265D的情况下,在考察的其它所有组织中,这两种构建体之间的转导差异为2.5-倍或更低(图18H和图19C)。与rAAV6相比,rAAV6/T265D将心肌和GC转导分别提高32-倍和4.5-倍(图18K)。在其它所有组织中,这两种构建体的转导效率几乎相同(图19D)。最后,当比较rAAV3b和rAAV3b/265D的生物分布时,这种突变构建体将心脏和膈组织中的转导提高大约3-倍,而在其它任何组织中,未观察到这两种构建体的明显转导差异(图18E和图19B)。总之,数据表明,在VR1中插入或替换天冬氨酸,优先提高了静脉内注射rAAV后的肝脏转导。

表11选择rAAV衣壳中的可变区1氨基酸序列及天冬氨酸插入和替换突变。

血清型	可变区 1	突变
rAAV1	* 261SSASDGASNDNHY273 (SEQ ID NO:1)	T265D
rAAV2	* 261SSQSDGAS268 (SEQ ID NO:2)	265D

rAAV3b	²⁶¹ SSQSDGASNDNHY ₂₇₃ (SEQ ID NO:3)	265D
rAAV6	²⁶¹ SSASDGASNDNHY ₂₇₃ (SEQ ID NO:6)	T265D
rAAV8	²⁶³ NGDSGGAT ₂₇₀ (SEQ ID NO:7)	T265D
rAAV9	²⁶¹ SNSDSGGSS ₂₆₉ (SEQ ID NO:8)	T264D

加粗文本表示保守的一级氨基酸序列；星号表示天冬氨酸突变。

[0274] 为了确定转导效率是否与每个组织内基因组拷贝数相关,对心脏、肝和GC组织样本每个宿主细胞的载体基因组拷贝数进行定量。与野生型相比,采用rAAV1/T265D和rAAV3b/265D处理的小鼠,其载体基因组数量增加(分别增加4.5-倍和182-倍,图18F、18I)。在rAAV6的情况下,野生型和突变衣壳每个肝细胞的载体基因组拷贝数几乎相同(图18I)。VR1天冬氨酸突变还大幅提高了rAAV1/T265D或rAAV3b/T265D处理小鼠中每个GC细胞的载体基因组拷贝数(分别比野生型提高60-倍和51-倍;图18F、18I、18L),虽然这类组织中突变体和野生型构建体的转导效率相同(在任一种情况下,测定值都在野生型衣壳的2-倍以内)。载体基因组拷贝数和转导效率之间缺乏始终如一的关系强烈表明,病毒衣壳的后进入处理至少部分负责推动提高这些突变衣壳的肝转导效率。

[0275] 虽然在265D突变后,rAAV1、rAAV2、rAAV3b和rAAV6衣壳都包含相同的SSXSDGAS (SEQ ID NO:47)VR1氨基酸序列,但是,rAAV8和rAAV9在衣壳的这些区具有差异较大的氨基酸序列(表11)。因此,为了阐明包含265D突变的衣壳产生的肝脏转导优先提高是否是由于一级氨基酸序列vs天冬氨酸本身赋予的某些静电或结构影响,在rAAV8和rAAV9衣壳中开展265D突变。产生包装CBA-luc的rAAV8/T265D和rAAV9/T265D衣壳,同时rAAV8和rAAV9开展同样的操作,并将它们都静脉内注射到小鼠内。在注射10天后开展生物荧光成像。在rAAV8和rAAV9衣壳中,与野生型衣壳相比,T265D突变大幅降低了总转导效率(图20)。这些结果表明,提高相关rAAV衣壳肝转导效率的推动因素是SSXSDGAS (SEQ ID NO:48)VR1氨基酸序列,而非天冬氨酸本身赋予的结构特征。

实例12

衣壳肝素结合能力对VR1突变衣壳转导效率的影响

[0276] 我们以前已经证明,给定衣壳与硫酸肝素结合的能力阻碍肌内注射施用VR1突变衣壳提高转导表型(Warischalk et al.,Mol.Ther.2015)。以前已经表明,通过每个衣壳中的单点突变,可以破坏rAAV2、rAAV3b和rAAV6中的肝素结合(Kern et al.,J.Virol.77(20):11072(2003);Opie et al.,J.Virol.77(12):6995(2003);Lerch et al.,Virology, 423(1):6(2012);Wu et al.,J.Virol.80(22):11393(2006))。因此,为了确定VR1突变衣壳转导效率是否可以进一步提高,在rAAV2、rAAV3b和rAAV6中纳入这些突变,创建rAAV2/R585E、rAAV3b/R594A和rAAV6/K531E。采用肝素亲和层析法,证明了这些突变衣壳无法与肝素相互作用。上述衣壳采用CBA-luc包装,并静脉内施用于小鼠,同时对rAAV2/265D_R585E、rAAV3b/265D_594A和rAAV6/T265D_K531E及其单突变和野生型衣壳开展同样的操作。在注射10天后,处死小鼠,切除肝脏,用于转基因表达定量分析。正如以前研究所示(Asokan et

al., Nat. Biotechnol. 28(1):79(2010); Kern et al., J. Virol. 77(20):11072(2003)), 肝素与rAAV2衣壳结合减少, 使小鼠肝脏转导降低了大约6.5-倍(图21A)。但是, 当将这种零-肝素rAAV2衣壳与VR1突变265D结合时, 得到的rAAV2/265D_R585E的肝脏转导超过了rAAV2和rAAV2/265D, 分别超过132-倍和11-倍(图21A)。与各自亲代衣壳相比, 降低rAAV3b和rAAV6的衣壳肝素结合能力与VR1 265D突变相组合也提高了转导。rAAV3b/265D_R594A的肝脏转导是rAAV3b的53-倍, 是rAAV3b.265D的2.5-倍, 而rAAV6/T265D_K531E与rAAV6和rAAV6/T265D相较分别是其46-倍和4-倍(图21B、21C)。最后, 由于VR1删除突变应用于rAAV6衣壳提高了肌肉组织的转导效率(与rAAV2和rAAV3b中VR1氨基酸删除后转导缺乏的类似突变不同), 我们还试图确定rAAV6无肝素结合是否进一步提高了这种情况下的转导。向小鼠施用1e11vg rAAV6、rAAV6/T265del、rAAV6/K531E或rAAV6/T265del_K531E。注射10天后, 处死小鼠, 切除心脏和GC样本, 测定体外荧光素酶表达。与上面rAAV6/T265D一致, 消除rAAV6衣壳肝素结合能力进一步提高了rAAV6/T265del的转导效率。rAAV6/T265del_K531E在心脏组织中的转导分别比rAAV6和rAAV6/T265del有效170-倍和13-倍, 在GC组织中的转导比它们分别有效9027-倍和2795-倍(图21D)。总之, 这些研究表明, 为了优化VR1突变衣壳的转导效率, 必须确保消除适用血清型的衣壳肝素结合能力。

实例13

相对最有效野生型血清型的VR1突变衣壳转导

[0277] 当静脉内递送到小鼠体内时, rAAV8和rAAV9通常被认为分别是转导肝脏和心脏组织最有效的血清型(Bish et al., Hum. Gene Ther. 19(12):1359(2008); Davidoff et al., Mol. Ther. 11(6):875(2005))。因此, 为了充分评价我们的VR1突变衣壳在现有试剂情况下的体内性能, 将分别对含VR1删除突变的衣壳与含VR1插入突变的衣壳与rAAV9和rAAV8一起进行评价。同时制备包装CBA-luc的rAAV1/T265del、rAAV6/T265del、rAAV6/T265del_K531E、rAAV7/T265del、AAV8/T265del、rAAV9/S264del_S266del和rAAV9衣壳, 并采用同一反应板通过qPCR测定滴度。每个构建体向小鼠注射1e11vg, 注射10天后处死小鼠, 采集心脏和肝脏组织样本进行定量分析。除心脏外, 还采集肝脏组织, 作为载体特异性的量度。rAAV1/T265del、rAAV6/T265del、rAAV6/T265del_K531E和rAAV7/T265del转导心脏的水平与rAAV9相同, 而rAAV8/T265del的转导效率是rAAV9的5-倍, rAAV9/S263A_S265del的转导效率是rAAV9的大约1/3(图22A)。我们接下来想要确定, 与其它器官, 如肝脏相比, 我们的突变体是否优先转导心脏组织。所有VR1突变衣壳比rAAV9表现出更大的心脏趋性(图22B、22C), 但rAAV8/T265del例外, 该突变衣壳转导肝脏的水平与rAAV9相当。rAAV6/T265del产生最有前景的心脏趋性, 心脏转导效率是肝脏的大约582倍(图22C), 相比之下, rAAV9心脏转导效率仅为肝脏的2-倍。总之, 这些数据表明, 这6种新试剂比rAAV9具有更有利的心脏趋性。

[0278] 为了评价与rAAV8相比我们265D突变衣壳组肝脏转导的能力, 制备了包装CBA-luc的rAAV1/T265D、rAAV2/265D_R585E、rAAV3b/265D_R594A和rAAV6/T265D_K531E载体, 同时rAAV8也开展同样的操作。所有构建体都采用同一qPCR板上测定滴度, 并按1e11vg剂量注射到小鼠体内。注射10天后处死小鼠, 并切除肝脏样本用于分析。没有265D突变衣壳达到rAAV8的转导效率, 虽然rAAV2/265D_R585E转导效率是<3-倍(图22D)。rAAV1/T265D和rAAV6/T265D_K531E肝脏转导效率是rAAV8的1/8, 而rAAV3b/265D_R594A是1/17(图22D)。总

之,这些结果表明,虽然在VR1中插入或替换天冬氨酸残基可以大幅提高众多血清型的肝脏转导效率,但是,在这种小鼠模型中,rAAV8在肝脏中的转导仍然是最优秀的。

实例14

纳入Y->F突变,提高VR1突变衣壳的心脏趋性

[0279] 已经证明,rAAV衣壳表面的选择酪氨酸残基突变通过避免细胞内衣壳到达细胞核之前发生磷酸化和最终发生蛋白酶体降解,从而提高了rAAV转导效率(Zhong et al., Virology 381 (2):194 (2008))。我们想要确定这些突变是否与VR1突变衣壳协同作用,提高转导效率,同时维持VR1突变赋予的生物分布表型。由于rAAV1是将心脏和骨骼肌疾病治疗人类研究进行转化时使用最多的血清型(Flotte et al., Hum. Gene Ther. 22 (10):1239 (2011); Greenberg et al., JACC Heart Fail. 2 (1):84 (2014)),因此,创建包含Y445F和T265del突变的rAAV1衣壳。虽然以前并未在rAAV1背景下对酪氨酸-至-苯丙氨酸突变进行评价,但是,已经证明,肌内注射Y445F后提高rAAV6的转导效率(Qiao et al., Hum. Gene Ther. 21 (10):1343 (2010))。rAAV1和rAAV6的衣壳蛋白序列的同源性>99% (Wu et al., J. Virol. 80 (22):11393 (2006)),因此,预期这种突变的作用与rAAV1类似是合理的。虽然如此,还是将rAAV6纳入本分析中。制备包装CBA-1u的野生型rAAV1和rAAV6衣壳,同时制备T265del和Y445F单突变和双突变衣壳。经尾静脉向小鼠注射1e11vg这些衣壳,注射10天后,切除心脏、肝脏和GC组织样本进行分析。在这两种血清型中,T265del_Y445F双突变衣壳进一步改善了心脏转导效率。rAAV1/T265del_Y445F的心脏转导分别是rAAV1和rAAV1/T265del的66-倍和9-倍(图23A),而rAAV6/T265del_Y445F的心脏转导是rAAV6和rAAV6/T265del分别的30-倍和3-倍。T265del_Y445F双突变导致GC组织的影响发生变化,其中与rAAV6/T265del相比,rAAV6/T265del_Y445F提高3.5-倍(图23B),而rAAV1各突变体之间几乎相同。在这两种血清型中,VR1突变衣壳导致的肝脏脱靶在Y445F突变中完全得到保持。奇怪的是,静脉内递送后,仅Y445F突变无法提高rAAV1或rAAV6的转导效率,虽然细胞培养实验中,与野生型衣壳相比,该突变体显著提高了转导效率。据我们了解,以前并未对这些突变体静脉注射到小鼠体内后进行评价,因此,很难推测它们在这种递送途径时无法超过其亲代的原因。也许,要成功越过血管屏障,需要位置445的酪氨酸残基。总之,这些数据表明,在VR1突变衣壳中纳入Y445F可以进一步增强心脏转导,同时维持肝脏脱靶生物分布特点。

[0280] 我们在此提供一种新的衣壳工程方法,可用于改善全身递送rAAV的打靶和转导。以前的观察表明,通过删除选择氨基酸,破坏rAAV1衣壳环VR1的稳定性,在肌内注射后明显改善了骨骼肌转导(Warischalk, J.K.a.S., Mol. Ther. 2015)。提高转导最有效的突变与破坏VR1环内氢键网络最多的突变有关。这些观察引导我们探索rAAV1中VR1靶向失稳是否诱导静脉内施用后优先靶向肌肉组织,及这种方法是否可用于工程制备产生类似结果的其它rAAV血清型。在研究的9种血清型中,我们的策略在提高生物分布性质方面对五种血清型有效。在rAAV1和rAAV6衣壳中,观察到它们在心脏与/或骨骼肌组织转导方面的作用稳健提高,而在rAAV7、rAAV8和rAAV9衣壳中,它们在肌肉组织中维持天然转导水平,而在肝脏中的转导效率显著下降。我们注意到其它血清型VR1突变后的明显不良影响,包括rAAV4和rAAV5无法产生完好的病毒粒子及rAAV2和rAAV3b严重缺乏转导。因此,我们的方法提供了对衣壳拓扑的功能洞察,当设计新载体时,可以系统采用或避免采用。

[0281] 在几乎每类蛋白质(包括许多病毒)中,蛋白质氢键网络都调节功能和结构动力学

(例如,参见Worth et al.,BMC Evol.Biol.10:161(2010))。但是,除获得经验结构数据外,目前仅相关证据支持氢键失稳是改善本研究中VR1突变衣壳表型的推动因素。但是,这些证据确实为这种假设提供了合理的支持。首先,这种策略在试验的大多数血清型中有效。其次,rAAV6残基S262和T265构成一起作用的氢键对,从而稳定其它VR1(图11F),删除这些残基中的任一个残基都导致相当的生物分布表型(图16C)。第三,VR1稳定性似乎取决于rAAV9中氢键伙伴的两个不同组(图11H),仅在它们两者都突变后,才得到期望的肌肉-趋性生物分布表型(图14G);任一个残基单独突变都是无效的(图17D)。最后,在rAAV8中,VR1中仅存在一个氢键:位置T265氨基酸侧链氢与本身结合的氢键(图11G)。虽然删除T265导致肝脏大幅脱靶(图14E),但删除附近的S266并未出现这种现象(图24)。综合VR1失稳对rAAV2、rAAV3b、rAAV4和rAAV5的破坏性影响,证据表明,这种衣壳环精确定义的结构在其生命周期内高度影响rAAV的生产进步。

[0282] 虽然破坏VR1结构明显导致载体系统性质提高,但仍然不清楚影响这些新表型的机理的其它细节。已经发现,氢键对控制各种病毒的衣壳稳定性和感染效率(Tipper et al.,J.Virol.88(18):10289(2014);Tso et al.,J.Mol.Biol.426(10):2112(2014);Rue et al.,J.Virol.77(14):8009(2003);Speir et al.,J.Virol.80(7):3582(2006)),并另外假设调节rAAV组装(Grieger et al.,J.Virol.80(11):5199(2006))。但是,设计用于测定rAAV衣壳稳定性的热分解方案(Horowitz et al.,J.Virol.87(6):2994(2013))表明,野生型和VR1突变衣壳之间并没有区别。此外,仅衣壳可分离性增加似乎不可能导致载体生物分布广泛变化。rAAV的VR1环位于暴露衣壳表面各单体亚单位之间交界处,因此,可能与其它蛋白质相互作用。众所周知,衣壳内氢键网络调节衣壳与结合伙伴的相互作用,例如,在流感神经氨酸酶聚糖催化(von Grafenstein et al.,J.Biomol.Struct.Dyn.33(1):104(2015))、人多瘤病毒受体结合(Khan et al.,J.Virol.88(11):6100(2014)),及HIV-2引起的抗病毒因子TRIM5 α 侵入(Miyamoto et al.,PLoS One 6(7):e22779(2011))期间。因此,VR1突变可以改变衣壳稳定性,从而防止衣壳与优选细胞表面受体相互作用,实现替代进入细胞核。正如突变衣壳递送到心肌细胞的载体基因组的表达远比野生型衣壳递送的载体基因组更高效这一发现所示,小鼠施用VR1删除突变衣壳后肝脏载体基因组数量一致减少,支持了这种说法。此外,这种概念并非没有先例,因为当衣壳突变,消除肝素结合时,rAAV2表现出肌肉靶向改善和肝脏转导降低(Asokan et al.,Nat.Biotechnol.28(1):79(2010);Kern et al.,J.Virol.77(20):11072(2003))。当突变减少半乳糖结合时,rAAV9还显示出肝脏脱靶,系统地提高了表型(Shen et al.,J.Virol.86(19):10408(2012))。值得指出的是,已经表明,VR1突变减少了rAAV2和rAAV6衣壳与硫酸肝素结合的能力(Warischalk et al.,Mol.Ther.2015)。此外,VR1的N-末端区位于衣壳上,距离rAAV9半乳糖-结合点足够近($<3\text{\AA}$),两个区之间的直接相互作用是可行的(Bell et al.,J.Virol.86(13):7326(2012))。这些观察带来了有趣的问题:鉴定用于体外不同rAAV血清型的受体是否有潜力的细胞培养传代人工产物,如果这些人工产物突变消融的话,rAAV是否具有比以前认为强大很多的体内转导潜力。

[0283] 从结构方面来看,VR1删除突变使rAAV4和rAAV5无法产生完好的病毒粒子的现象是直接的。在这两种血清型中,VR1构成相对较短的环,主要是与下面 β -折叠连接的氢。因此,破坏衣壳此区域的稳定性可能导致总体结构变化,阻止衣壳单体彼此相互作用。VR1删

除突变导致rAAV2和rAAV3b转导缺乏的原因还不清楚。尽管无法转导小鼠组织,但是,rAAV2/S264del和rAAV3b/S262del能够转导培养细胞。因此,小鼠组织任何转导缺乏来源于体内环境的某个方面。将来的实验将进一步剖析这些现象。但是,VR1氨基酸删除无法改善rAAV2并非一无是处,因为它导致一个偶然发现,即在VR1中插入天冬氨酸,产生与删除突变相反的表型:在全身施用载体后,稳健提高肝脏转导。目前尚不了解控制VR1插入突变行为的机械细节。天冬氨酸是人们熟悉的仿磷酸,因此,可能在细胞内重新定向衣壳输送。实际上,人们已经建议对丝氨酸和苏氨酸磷酸化用于标记rAAV衣壳,用于蛋白酶体降解(Gabriel et al.,Hum.Gene Ther.Meth.24(2):80(2013))。但是,开放源磷酸化-位点预测软件(NetPhos2.0)并未表明VR1(修饰或未修饰)作为磷酸化位点,利用蛋白酶体抑制剂的细胞培养实验的数据并不支持265D突变衣壳的表型是蛋白酶体清除减少的结果。另一种可能性是VR1中插入天冬氨酸产生与氨基酸删除相反的效果:稳定VR1结构,而非破坏其结构。人们熟悉天冬氨酸残基通过参与蛋白质内相互作用,如羰基叠加(Deane et al.,Protein Eng.12(12):1025(1999))、盐桥(Speare et al.,J.Biol.Chem.278(14):12522(2003))和氢键网络(Worth et al.,BMC Evol.Biol.10:161(2010))稳定蛋白质结构的影响。如果确实如此的话,可以想象,虽然VR1删除突变使衣壳此区域失稳,从而阻止给定受体的相互作用,相反的是,VR1插入天冬氨酸增强了衣壳结构稳定性和由此得到的蛋白质:蛋白质相互作用。大多数265D突变衣壳提高肝脏和GC内载体基因组数量,表明265D突变提高了细胞进入。但是,在肝脏转导时这似乎比较有利,在265D突变情况下,GC转导效率并未得到提高,表明衣壳的吸附后处理也受到突变的影响。

[0284] 总之,我们的研究对rAAV衣壳的VR1区对转导效率和体内组织打靶的影响提供了新结构观点。这些观点允许开发两种合理的保守工程策略,在全身施用载体后改善组织打靶。首先,VR1删除突变衣壳组合似乎与临床更相关,因为开发了6种新载体,其打靶心脏的水平等于或超过rAAV9。虽然这是rAAV载体学方面真正有价值的进步,但是,不应忽视265D突变衣壳组合的临床价值。虽然rAAV8一直被认为是小鼠模型最好的肝脏转导子(Davidoff et al.,Mol.Ther.11(6):875(2005)),虽然在我们的研究中,265D衣壳组合无法超过rAAV8,但值得指出的是,rAAV8可能并非转化人类基因治疗应用最理想的载体。实际上,人们已经发现,rAAV2和rAAV3b变体感染人类肝细胞的效率超过rAAV8(Lisowski et al.,Nature,506(7488):382(2014))。因此,我们的VR1突变衣壳组合能够扩展肌肉-或肝脏-定向基因治疗应用的试剂组合。我们希望这种扩展能够使基因治疗个性化更好地向前推进,也许使患者现有的中和抗体谱(Louis et al.,Hum.Gene Ther.Meth.24(2):59(2013))帮助选择最适合的血清型,满足各自的需求,必要时提高重新施用载体的能力。

[0285] 上述说明是为了阐明本发明,不应视为限制本发明。本发明由下述权利要求定义,与所述权利要求相当的内容也包括在本发明中。

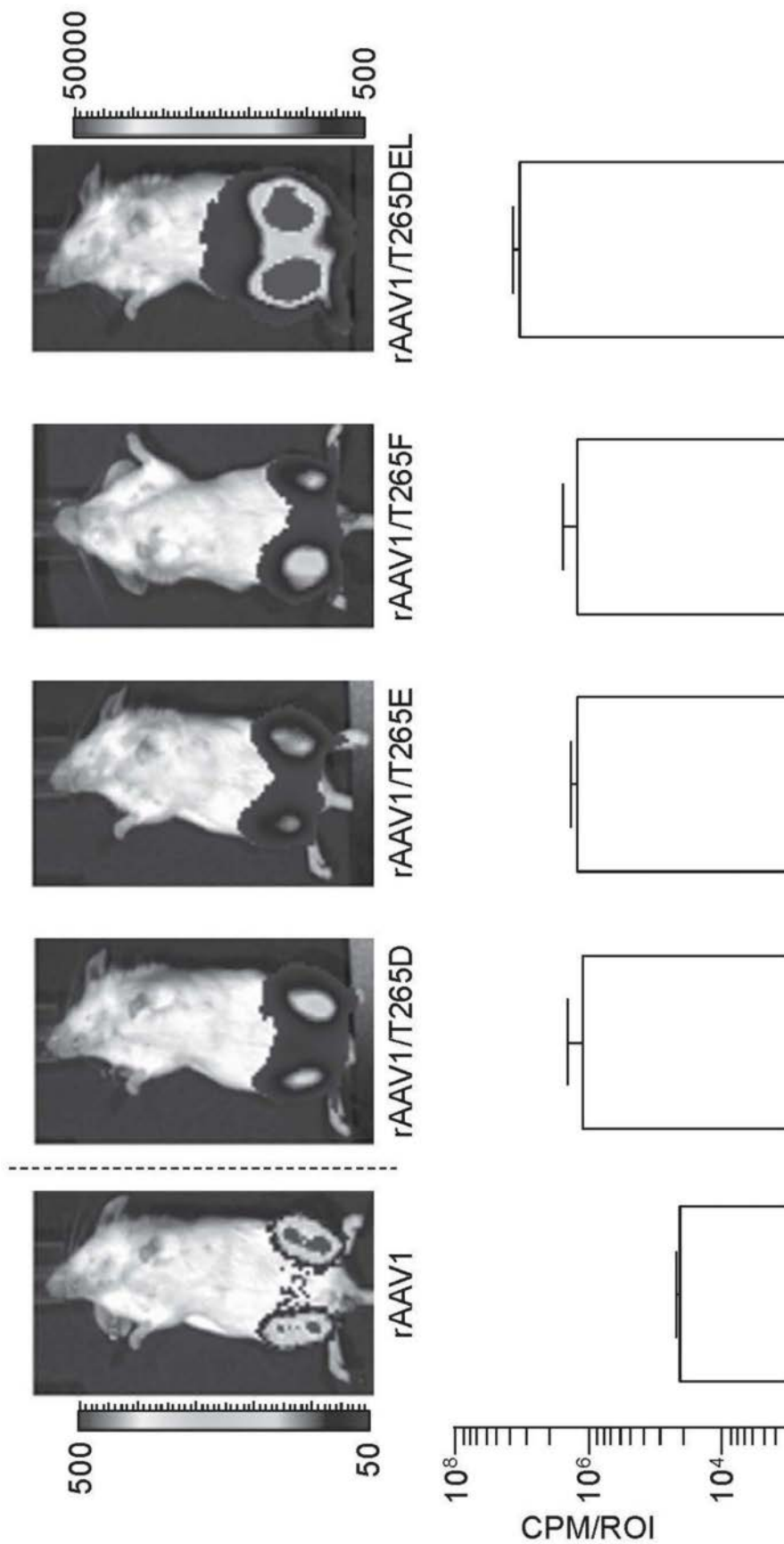


图1A

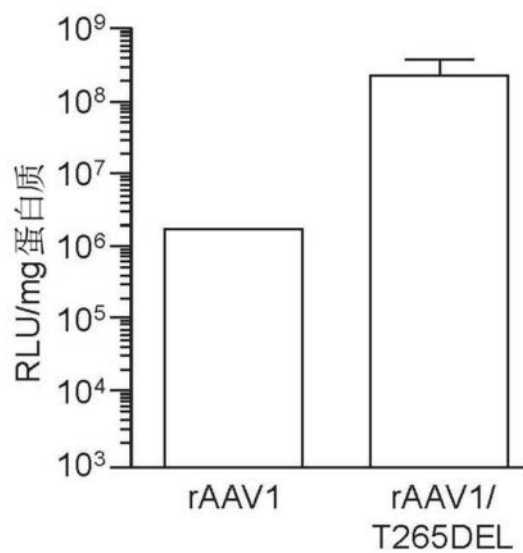


图1B

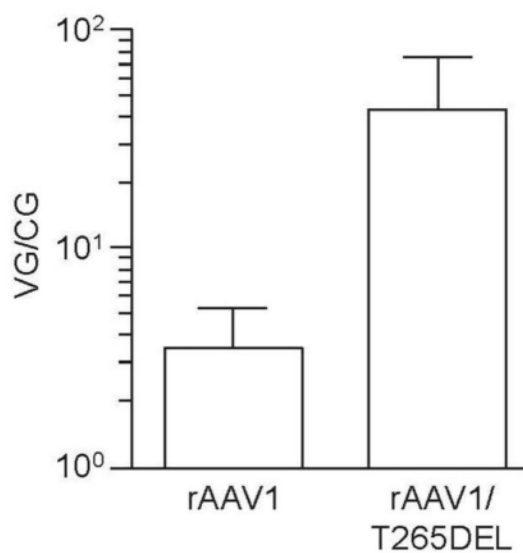


图1C

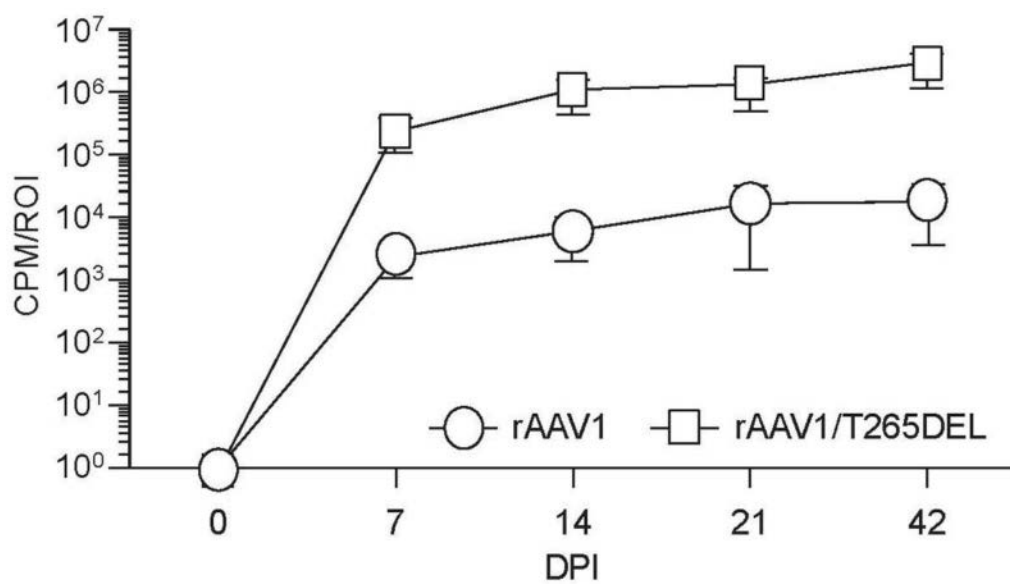


图1D

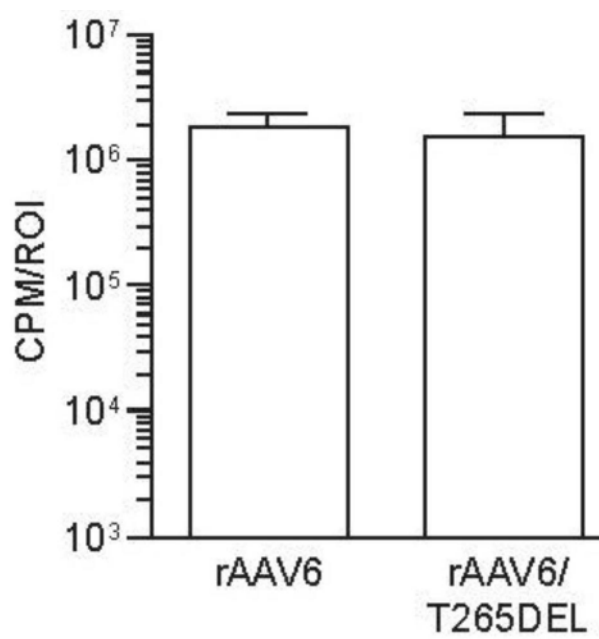


图2A

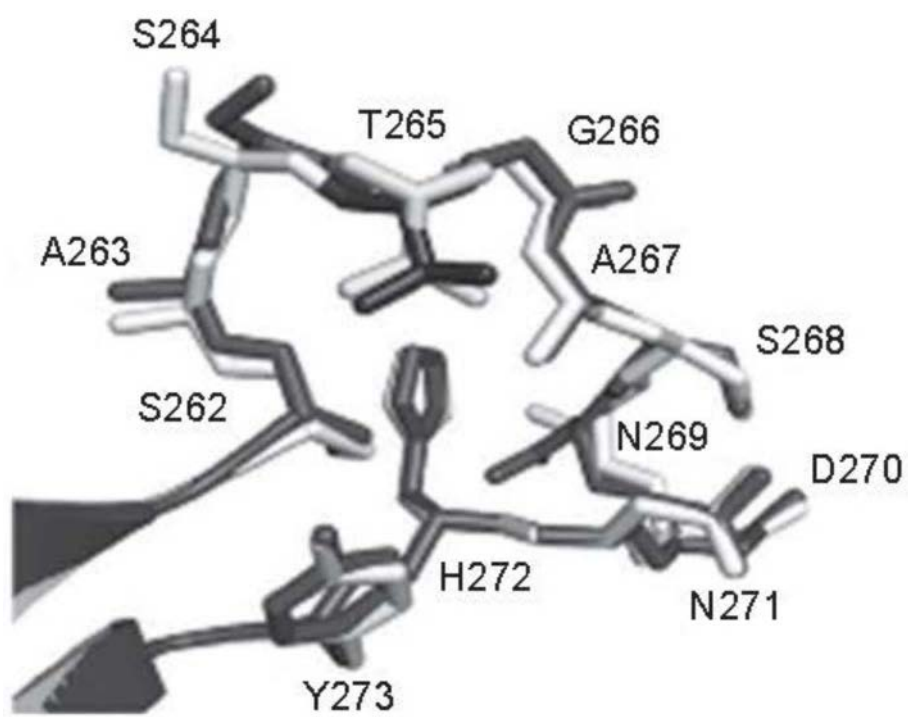


图2B

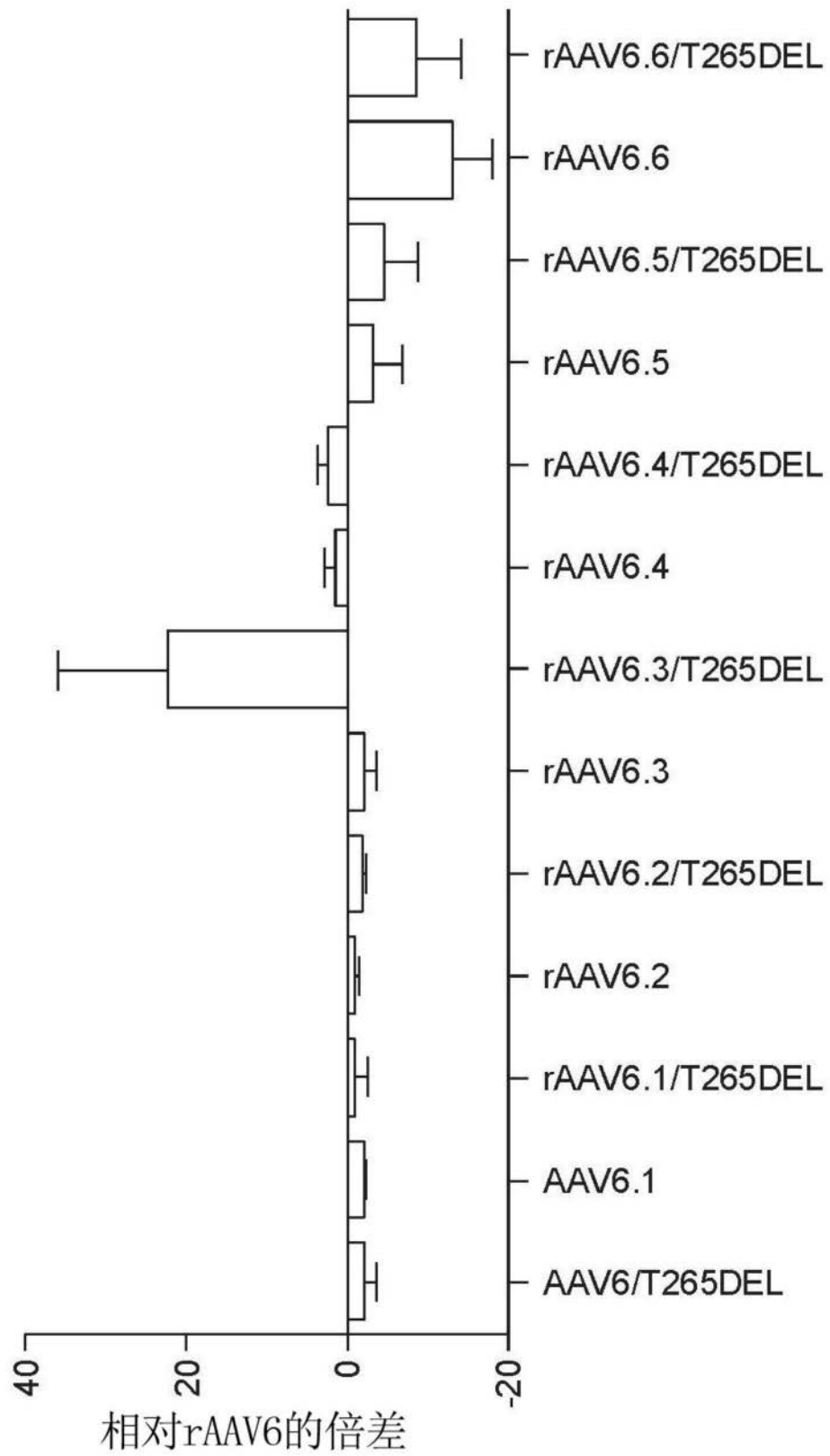


图2C

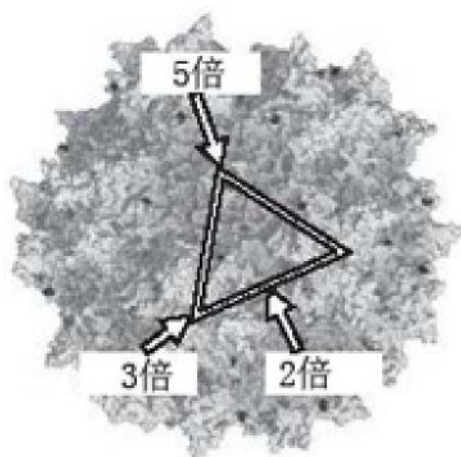


图3A

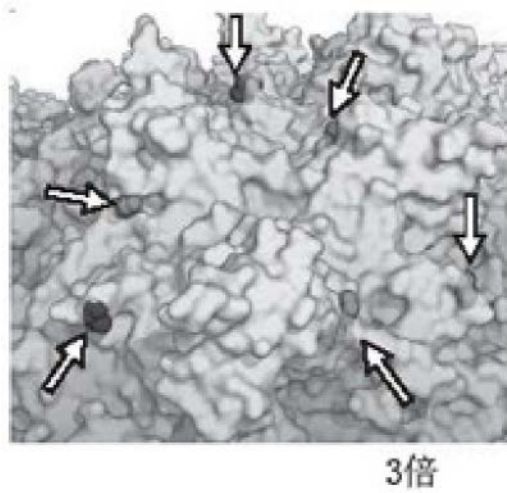


图3B

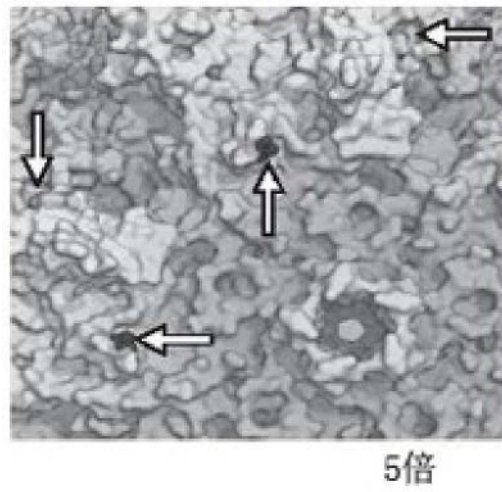


图3C

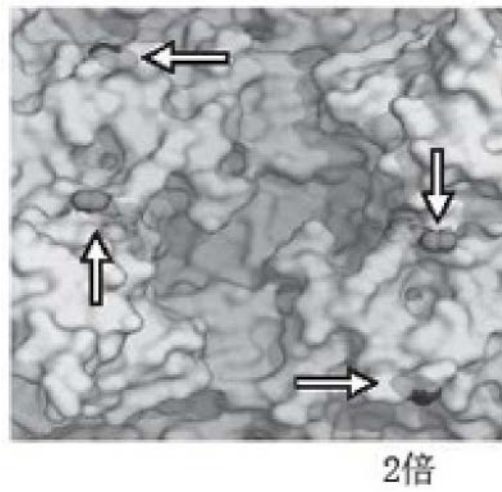


图3D

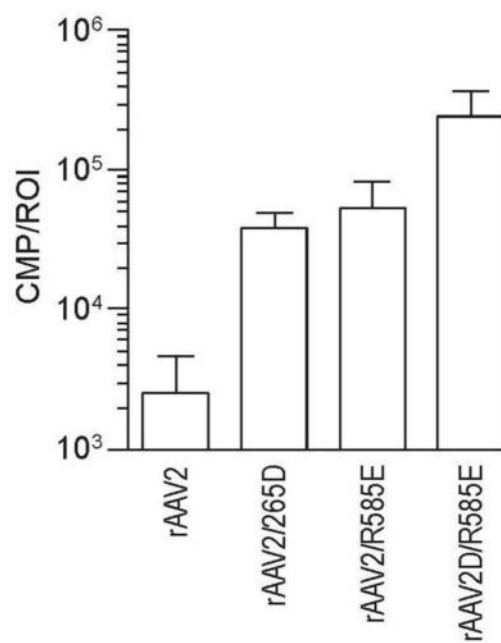


图4A

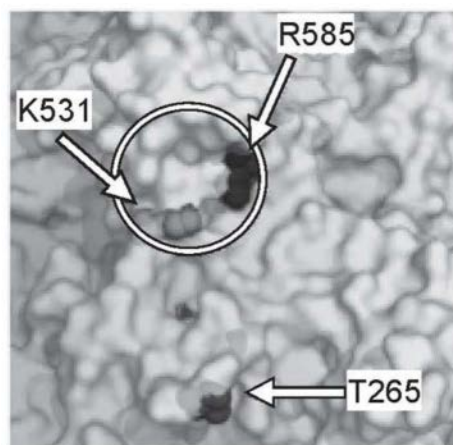


图4B

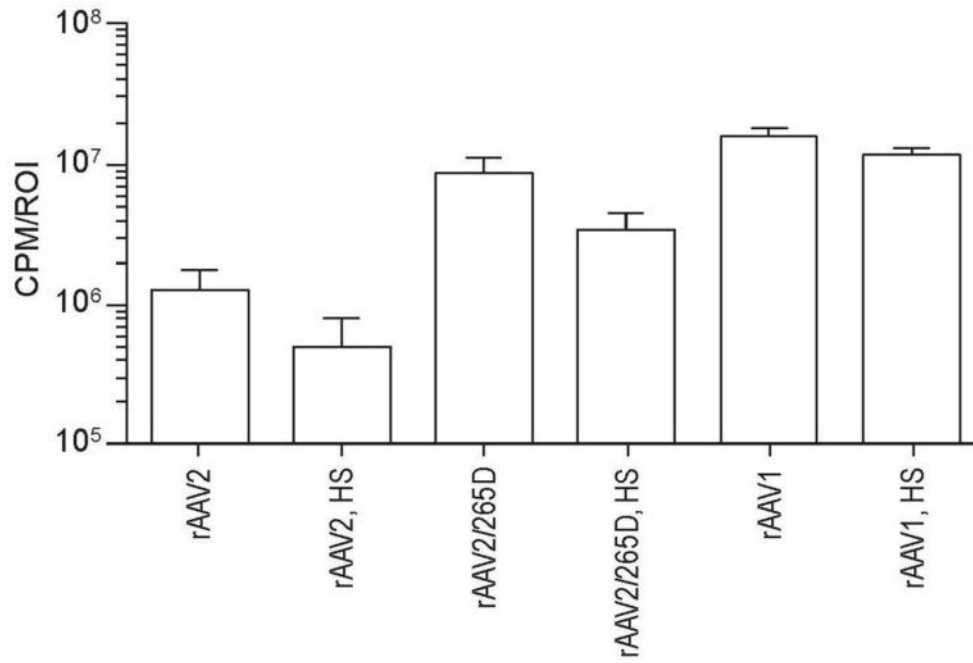


图4C

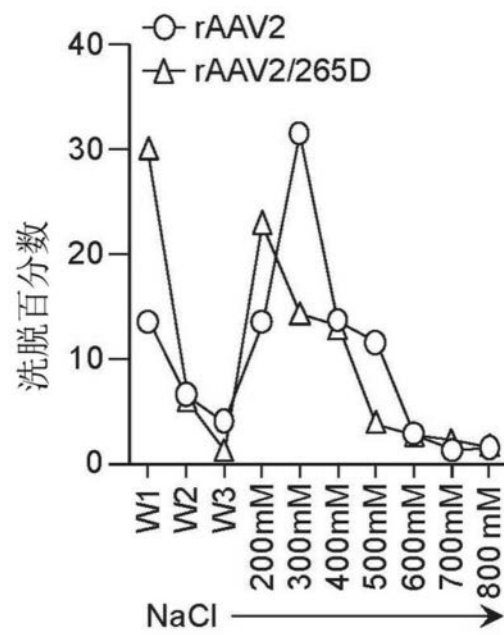


图5A

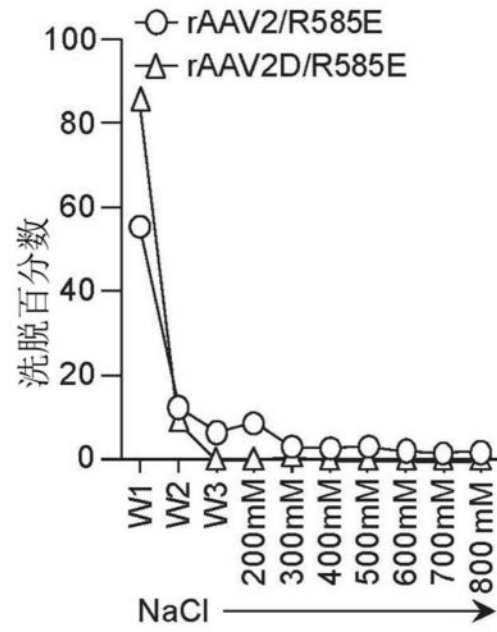


图5B

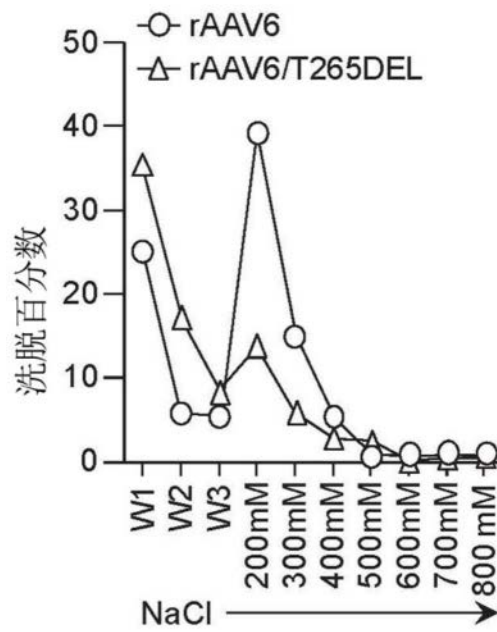


图5C

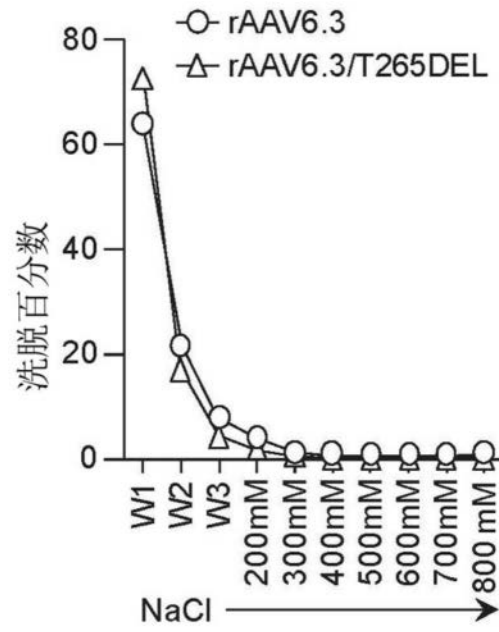


图5D

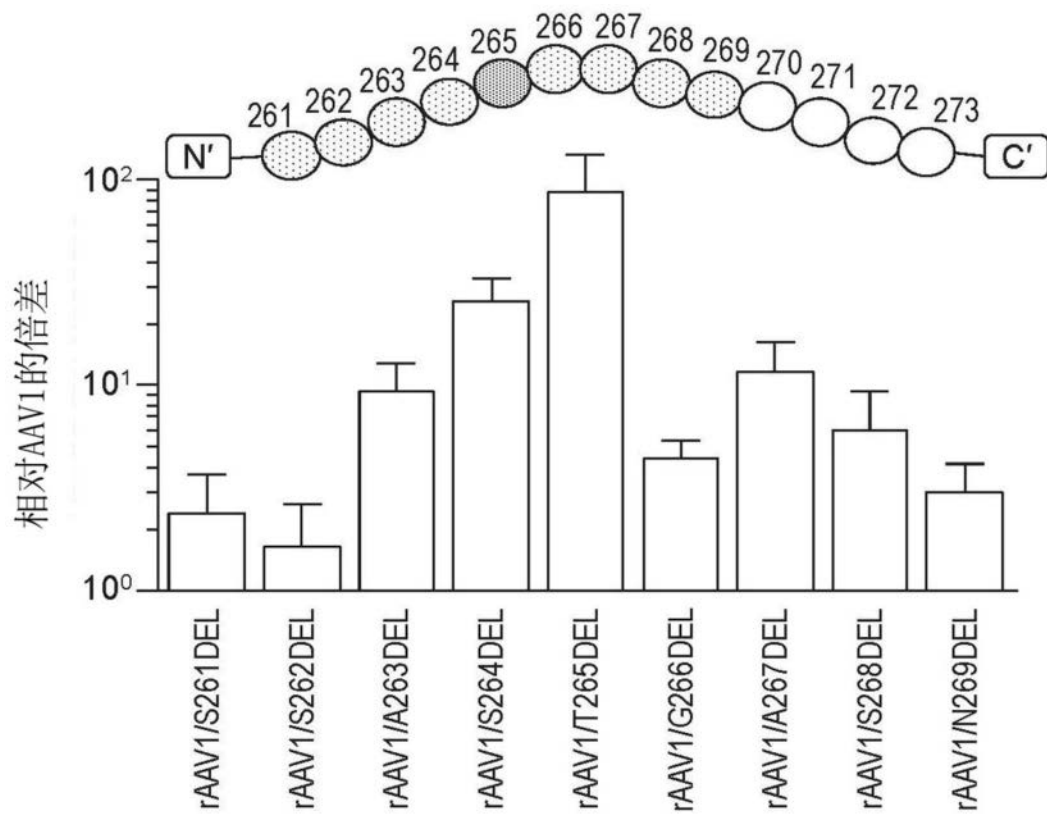


图6

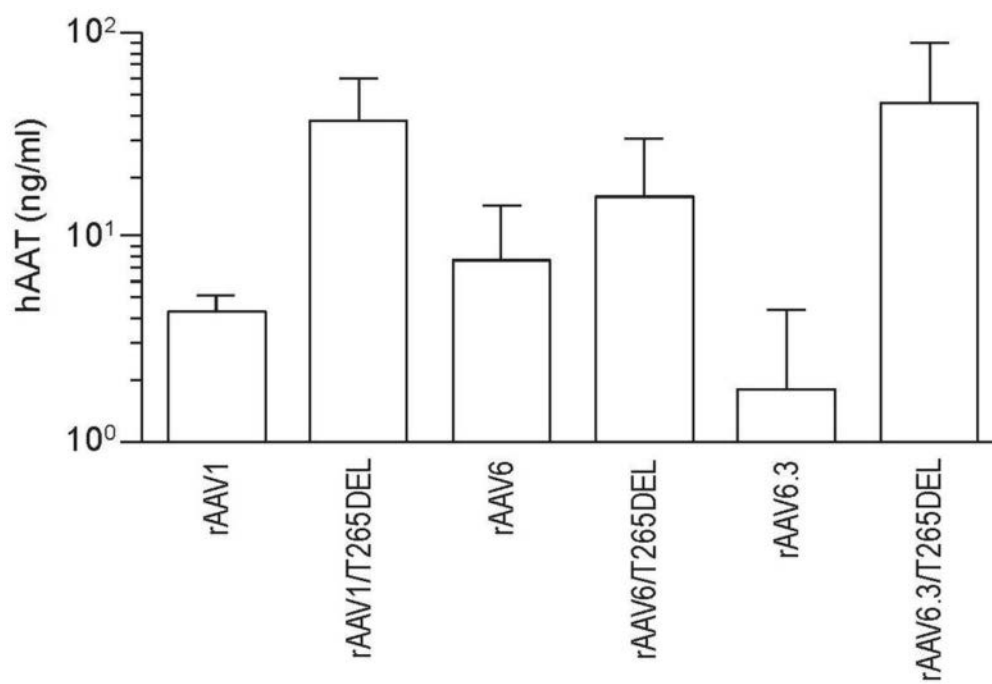
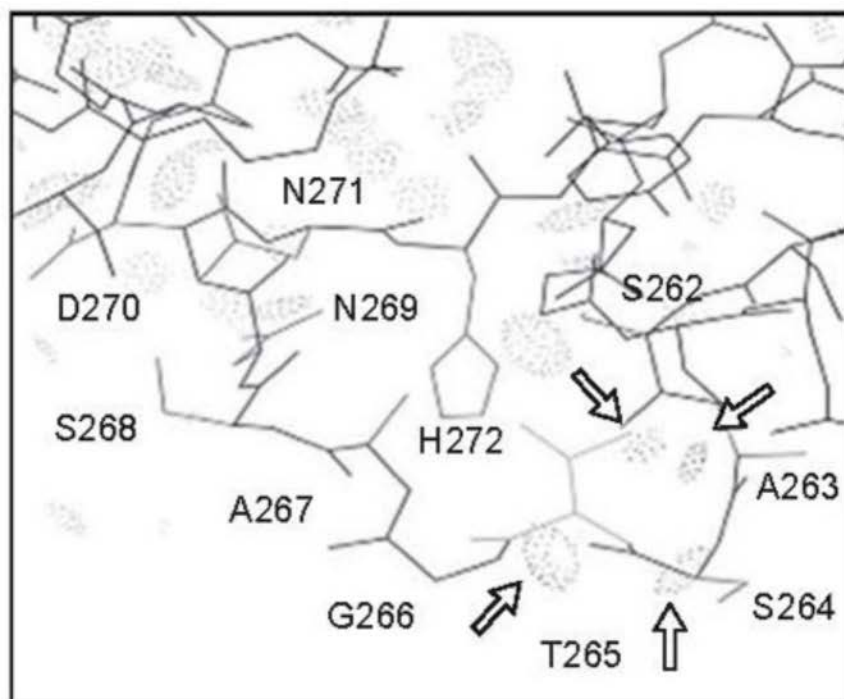
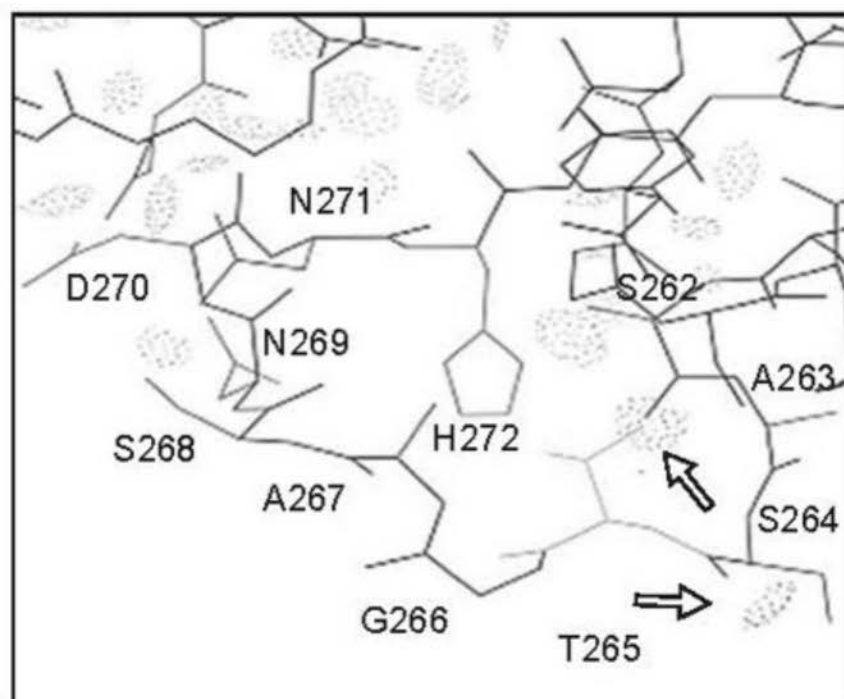


图7



rAAV1



rAAV6

图8

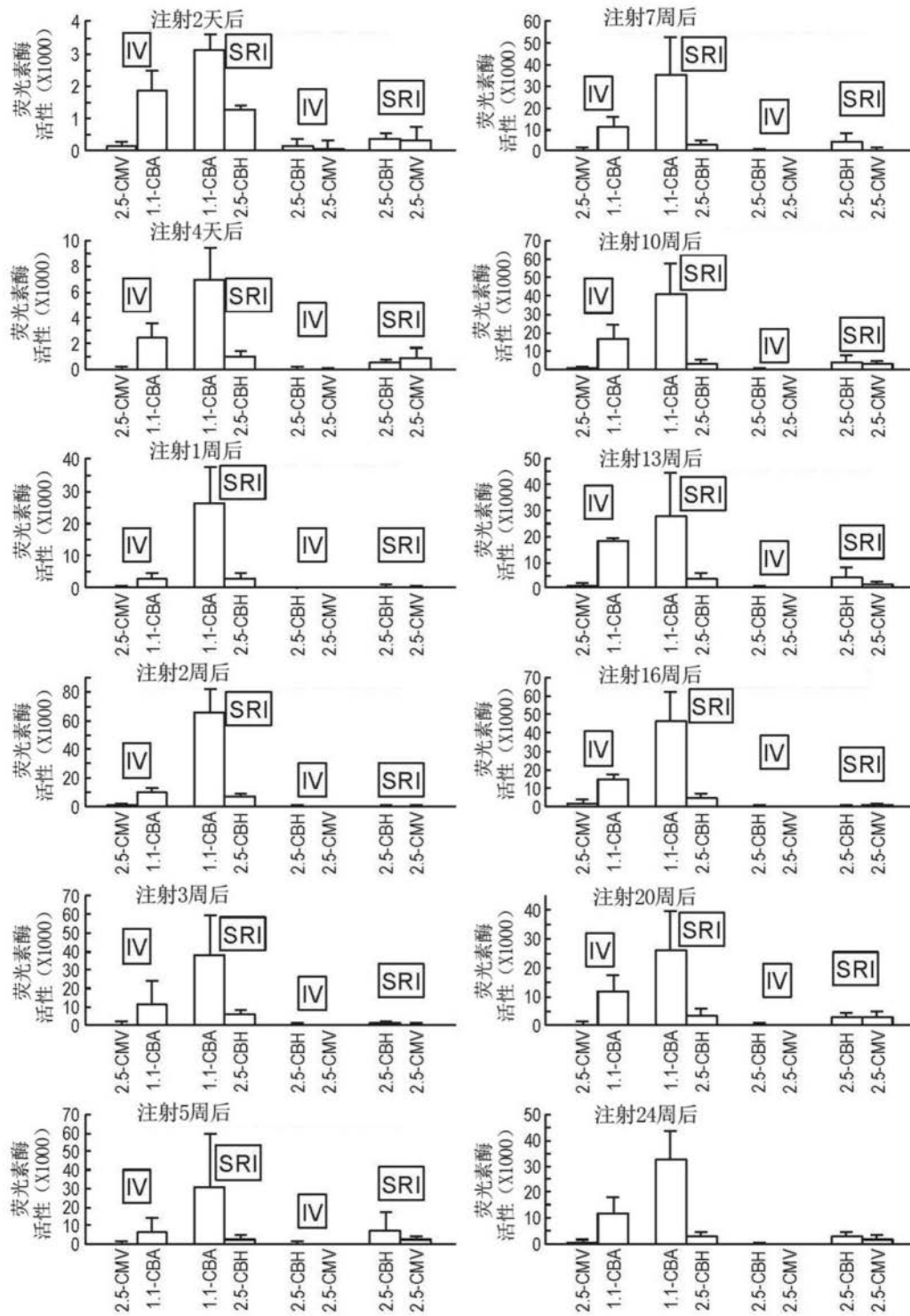


图9

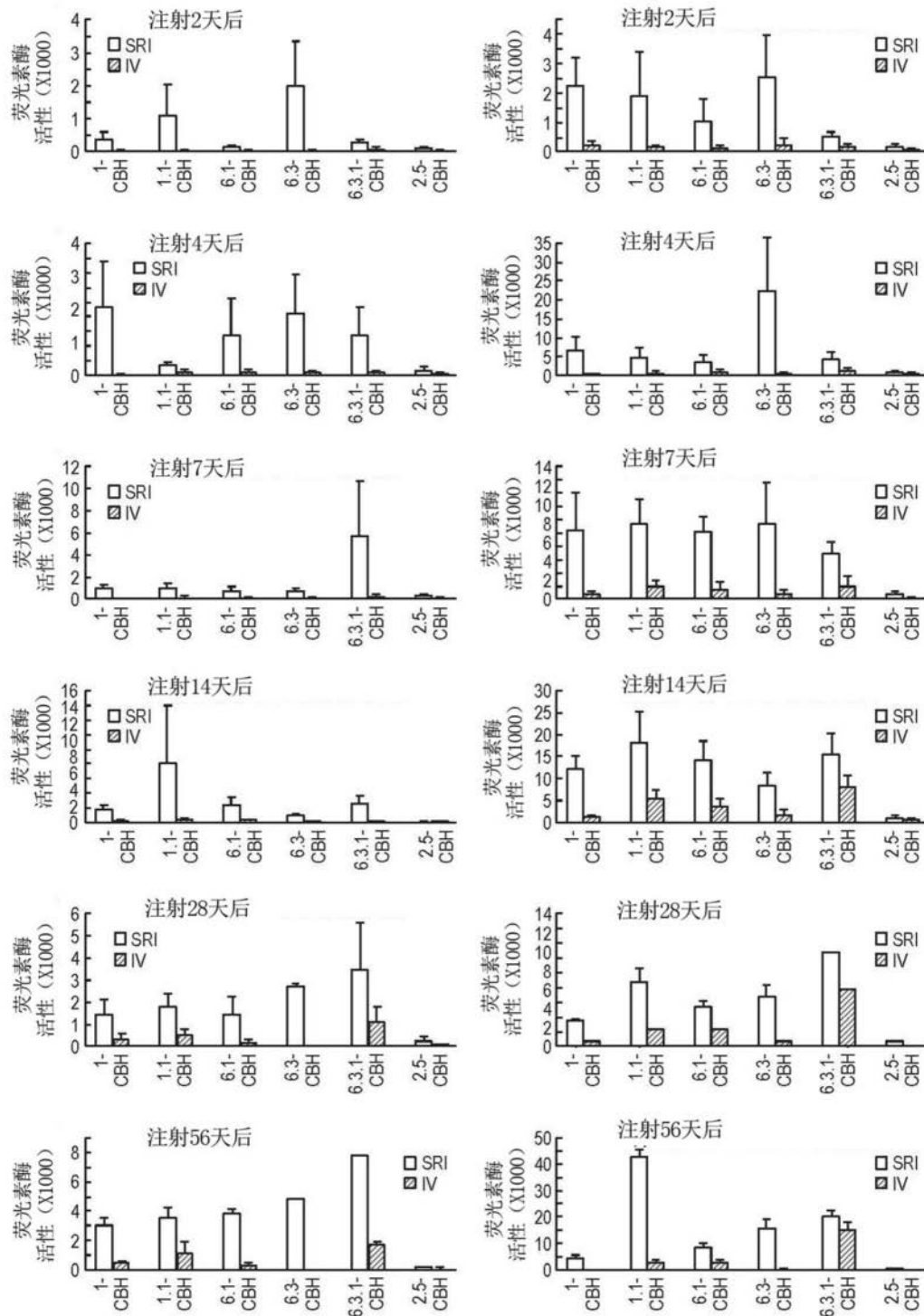


图10

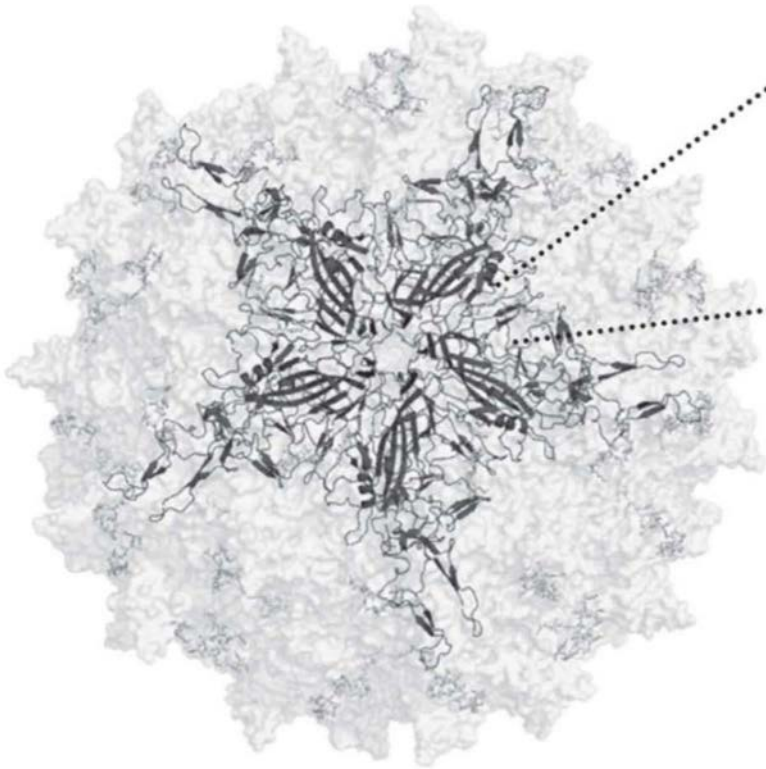


图 11A

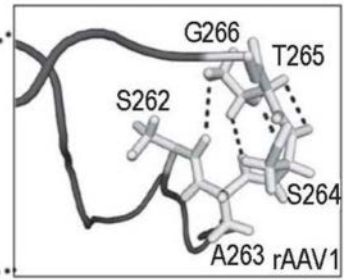


图 11B

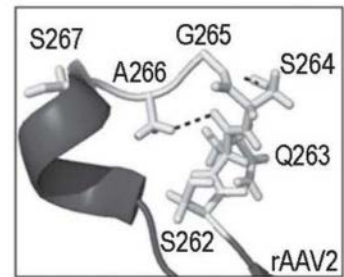


图 11C

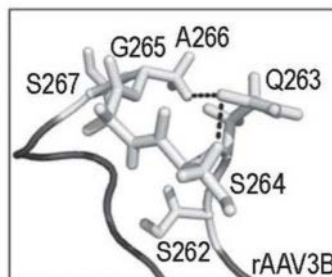


图11D

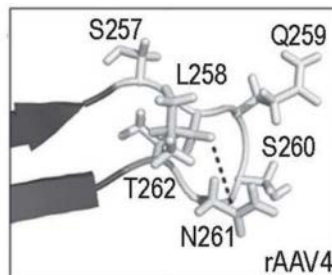


图11E

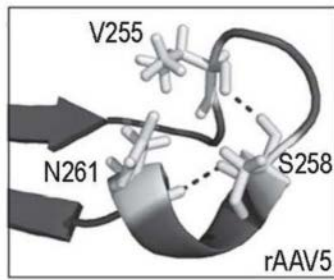


图11F

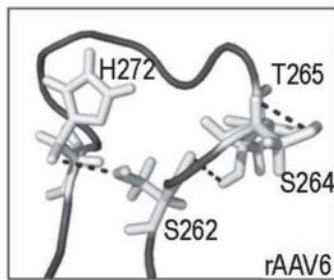


图11G

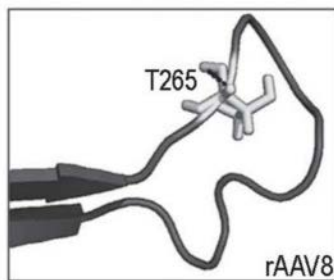


图11H

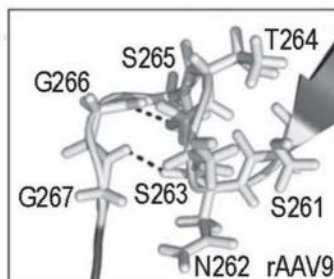


图11I

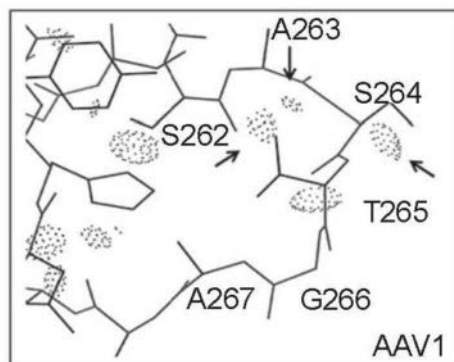


图12A

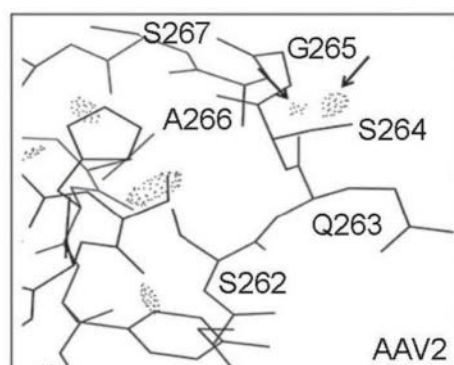


图12B

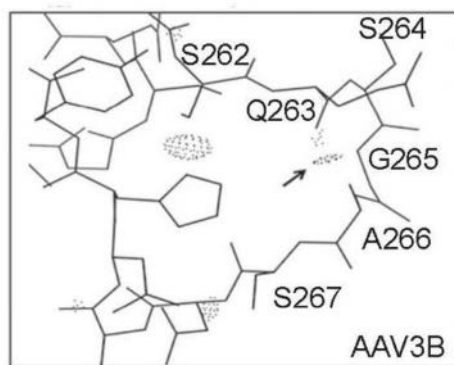


图12C

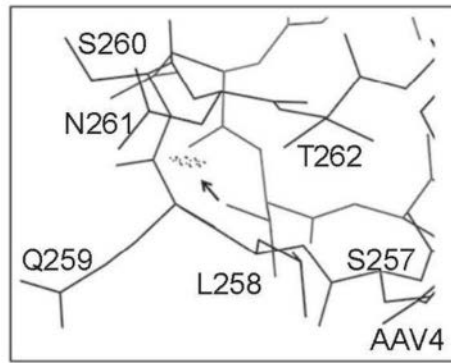


图12D

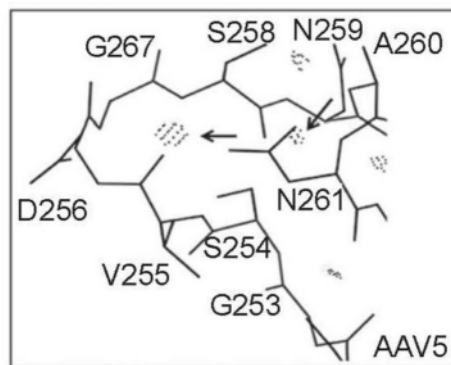


图12E

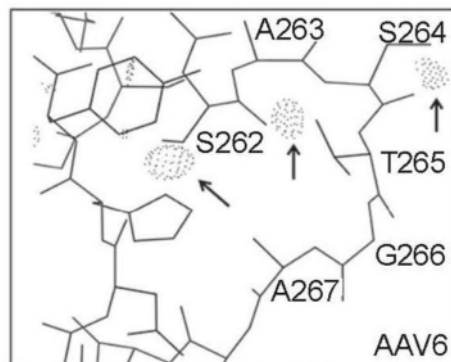


图12F

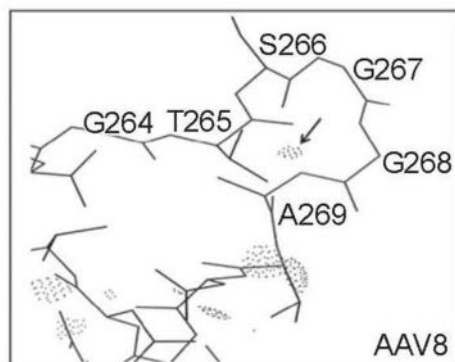


图12G

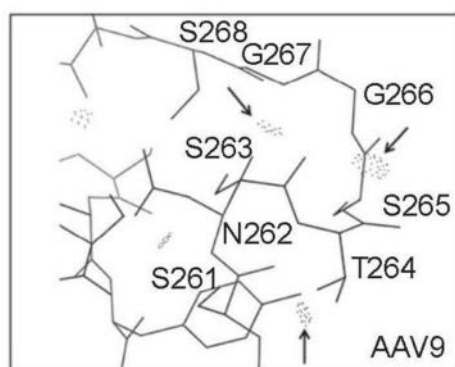


图12H

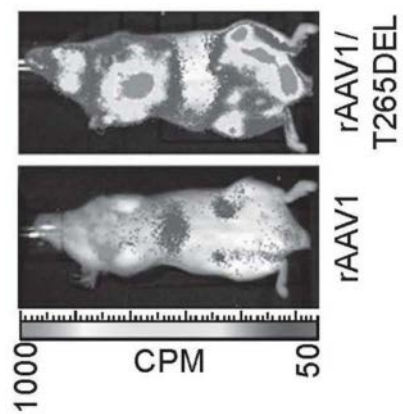


图13A

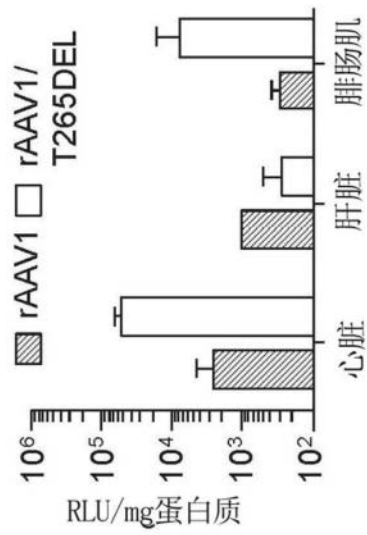


图13B

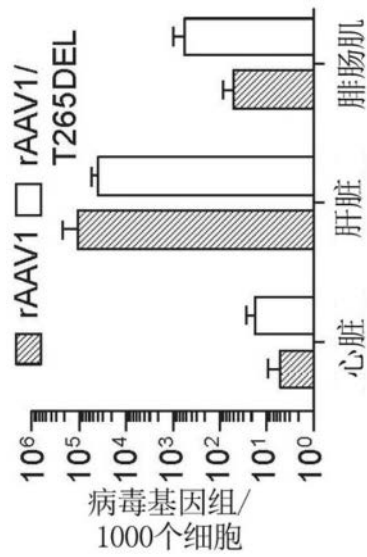


图13C

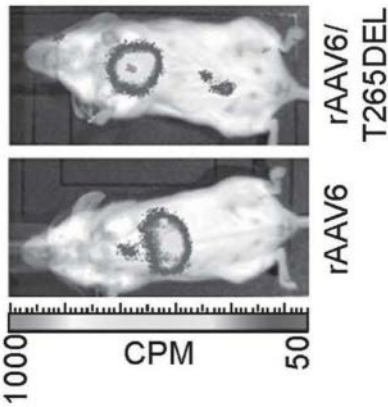


图13D

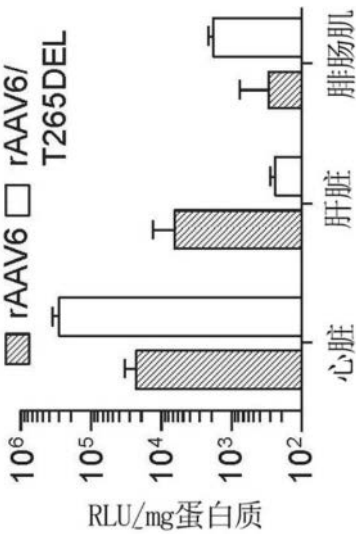


图13E

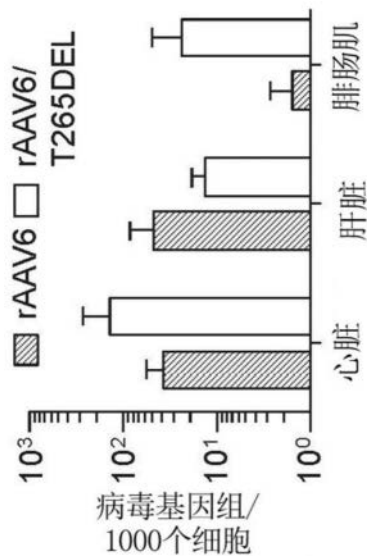


图13F

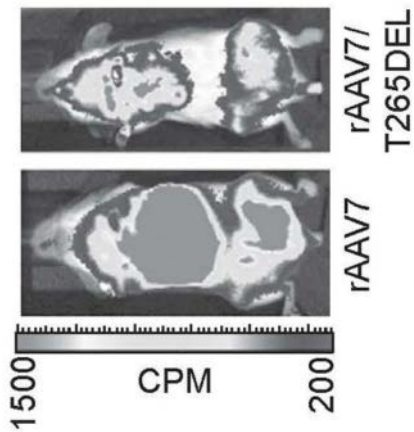


图14A

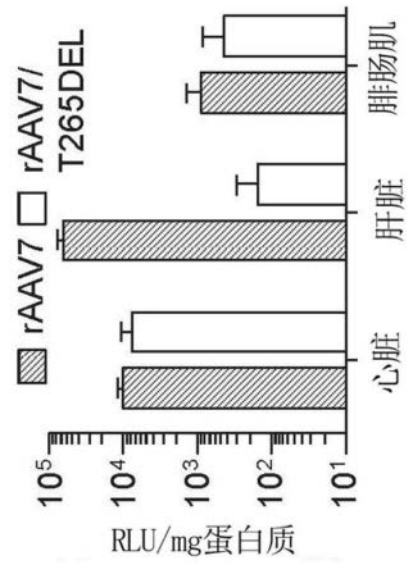


图14B

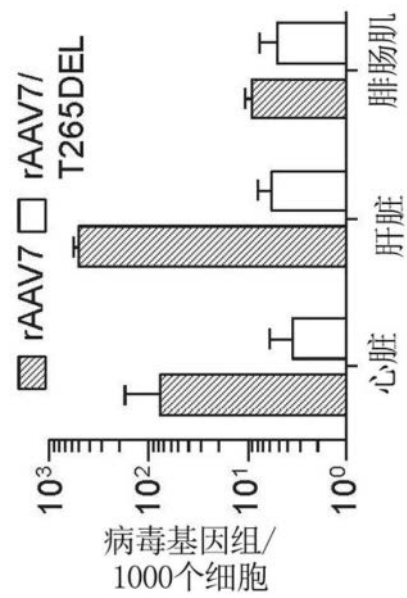


图14C

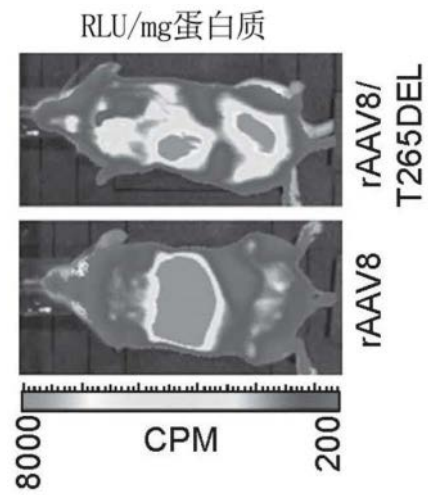


图14D

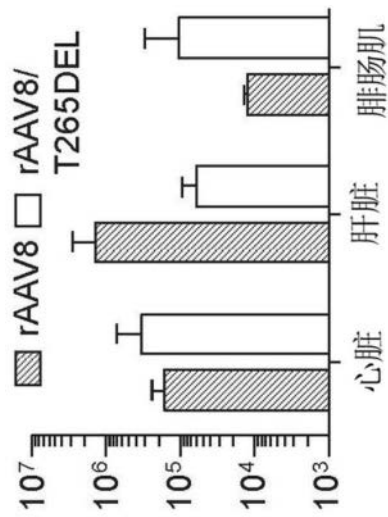


图14E

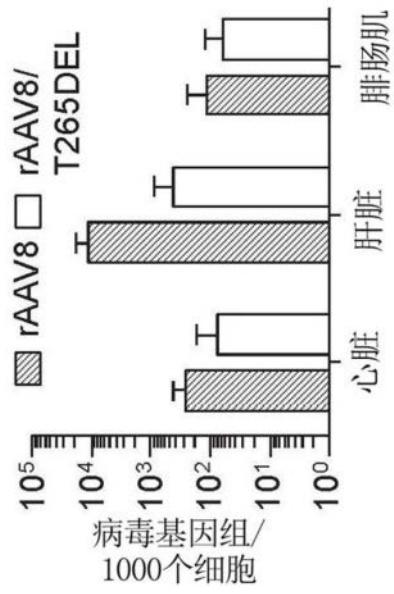


图14F

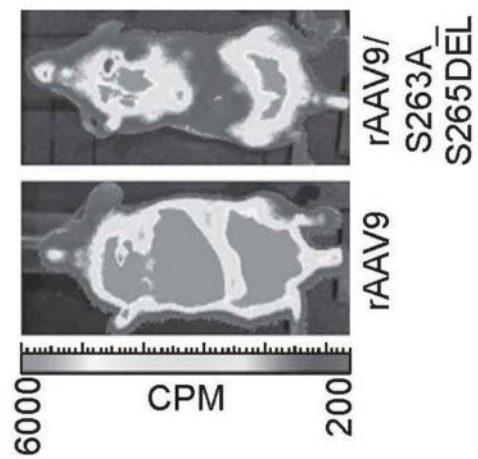


图14G

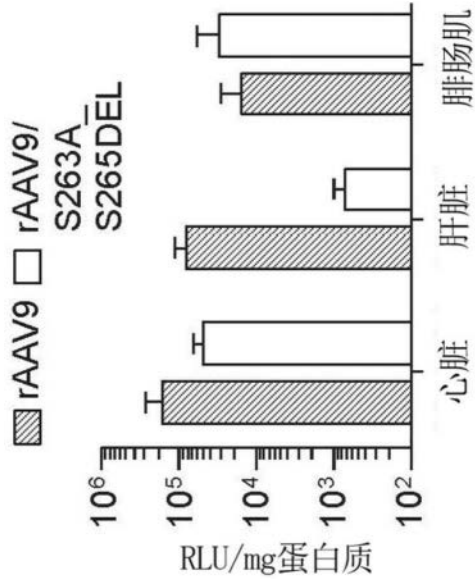


图14H

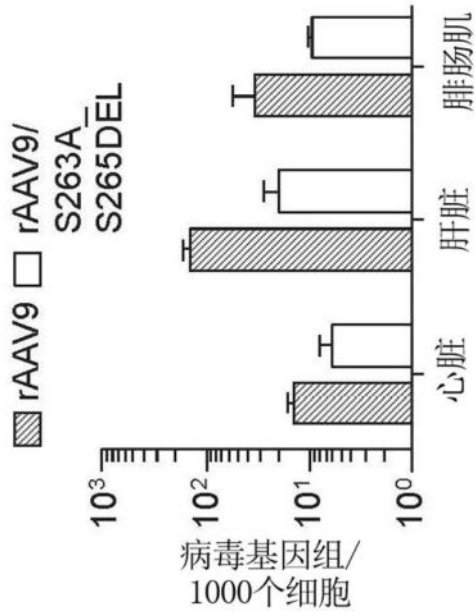


图14I

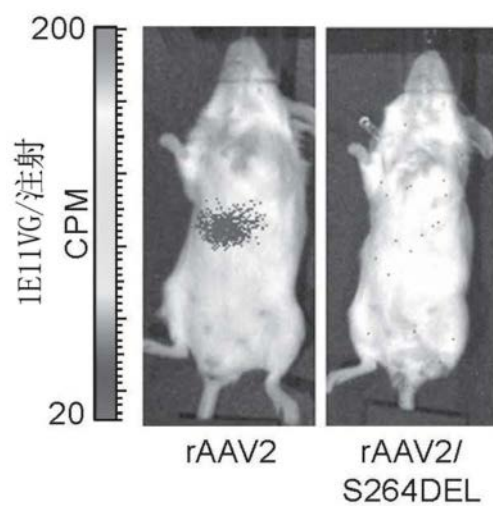


图15A

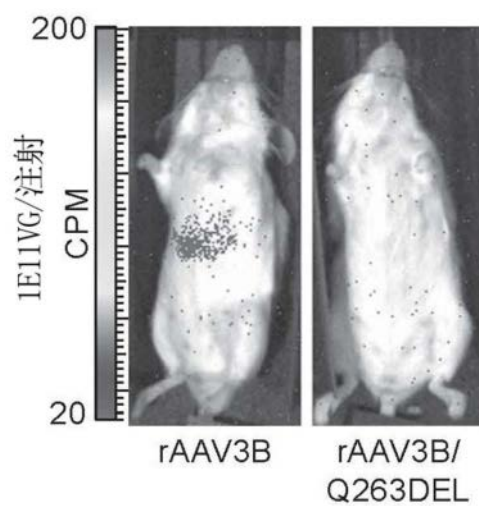


图15B

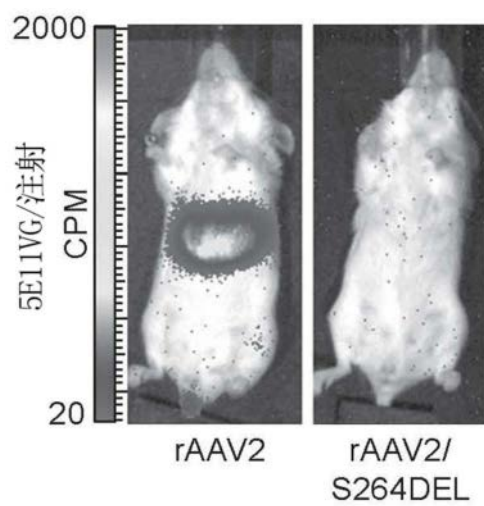


图15C

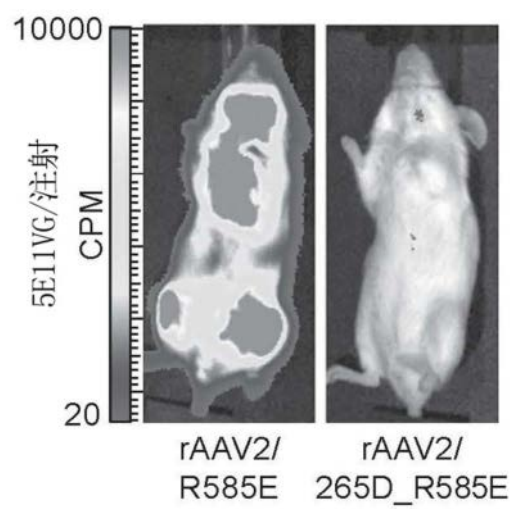


图15D

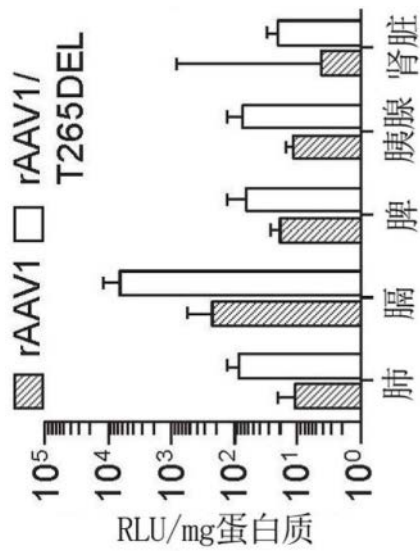


图16A

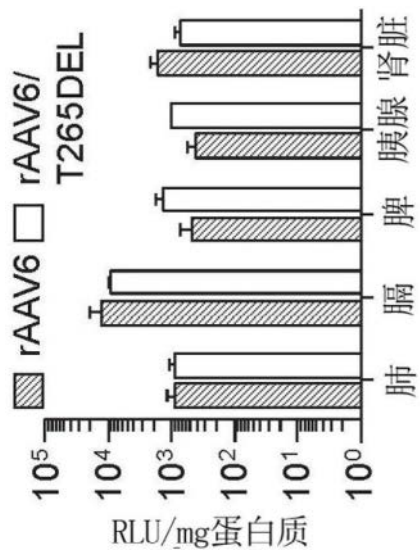


图16B

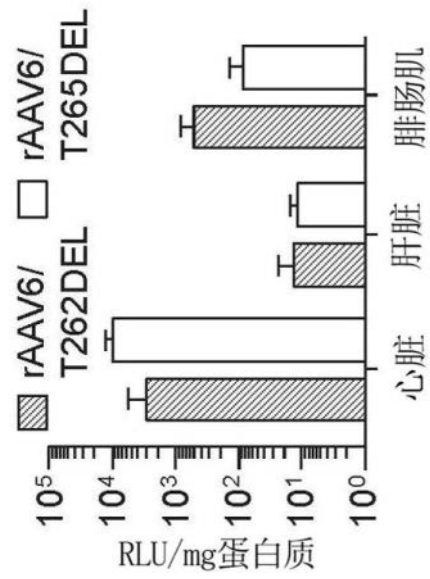


图16C

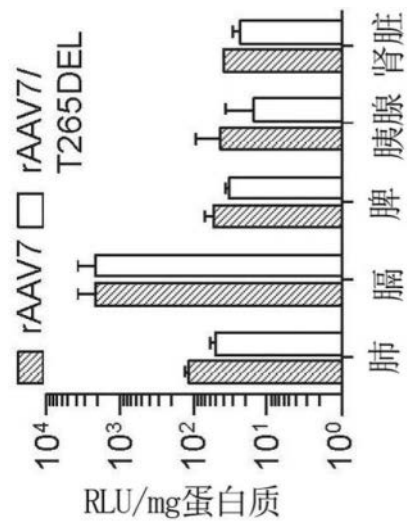


图17A

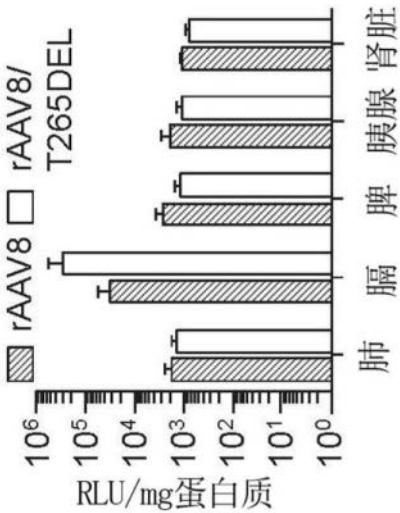


图17B

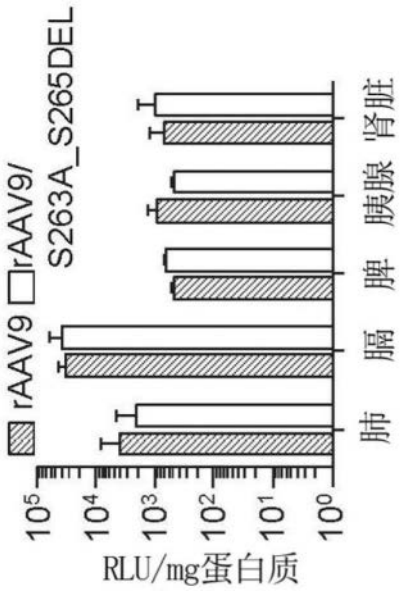


图17C

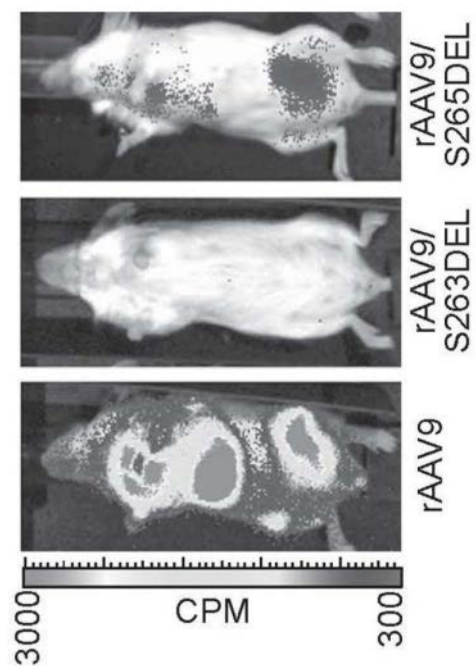


图17D

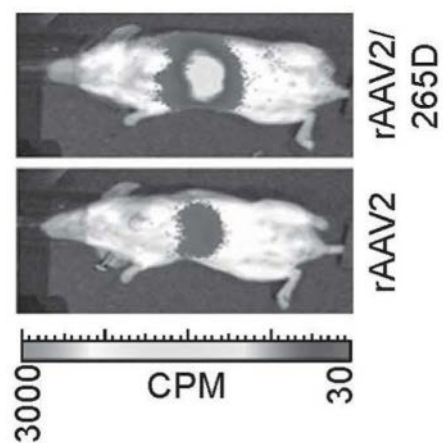


图18A

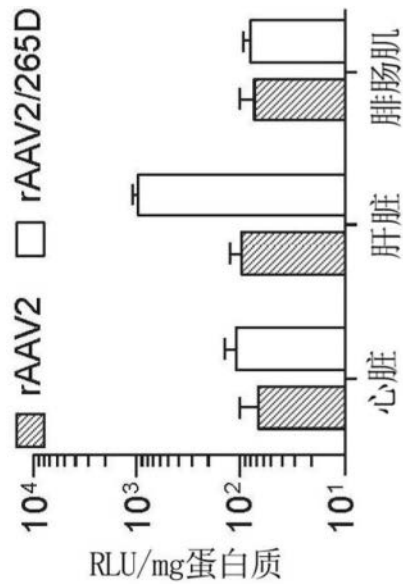


图18B

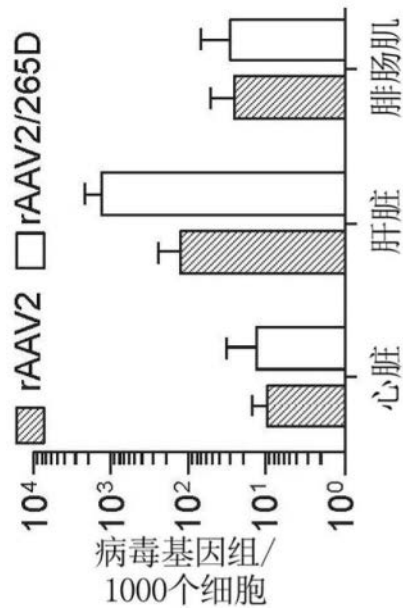


图18C

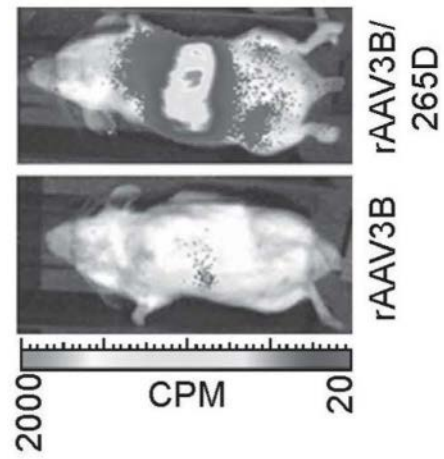


图18D

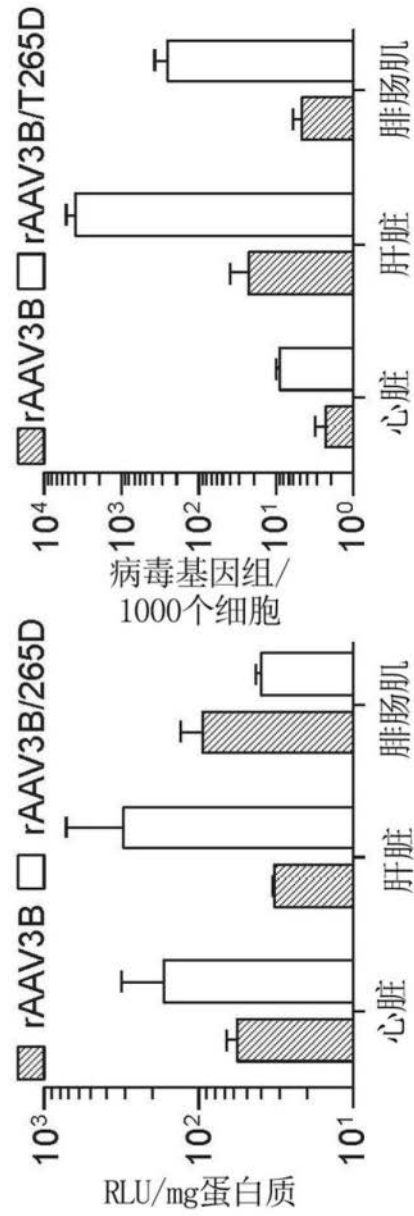


图 18E

图 18F

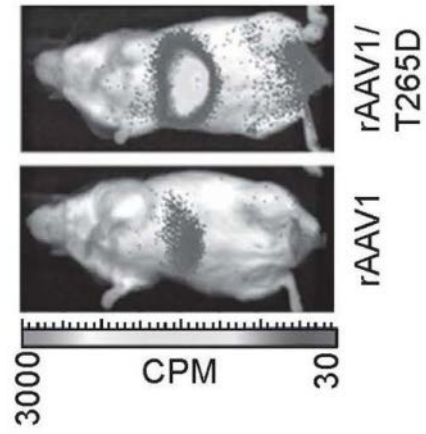


图18G

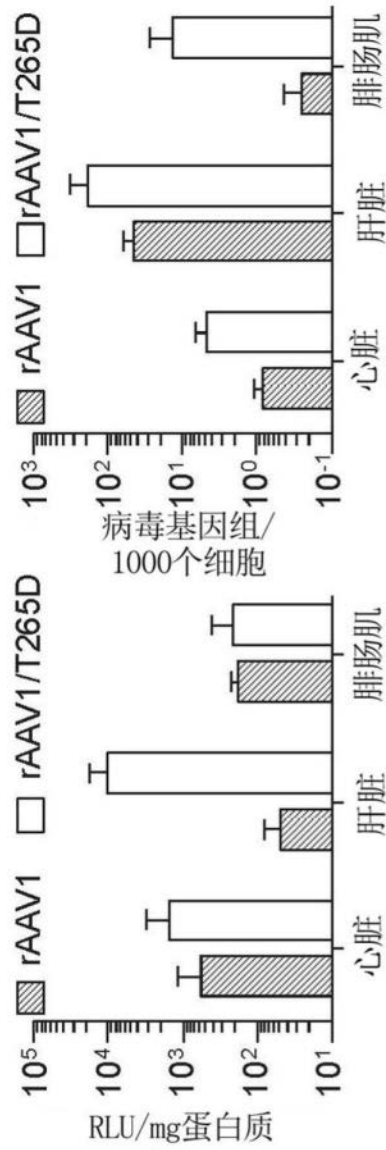


图 18I

图 18H

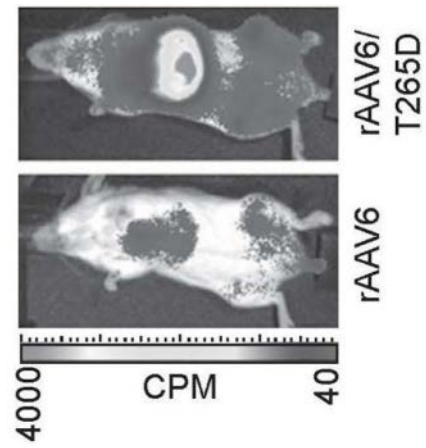


图18J

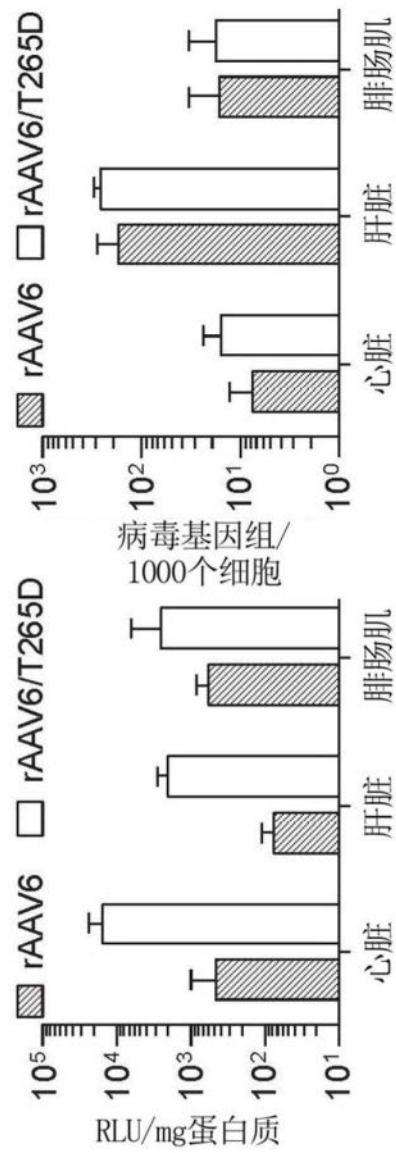


图 18L

图 18K

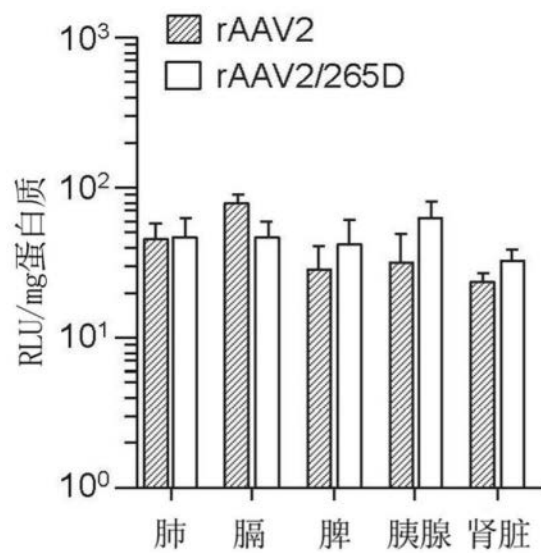


图19A

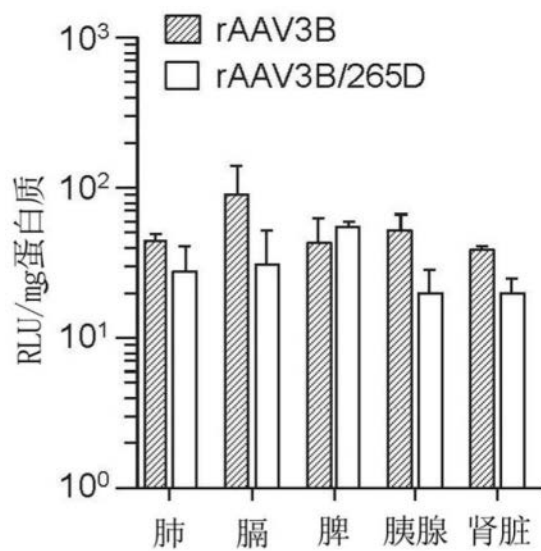


图19B

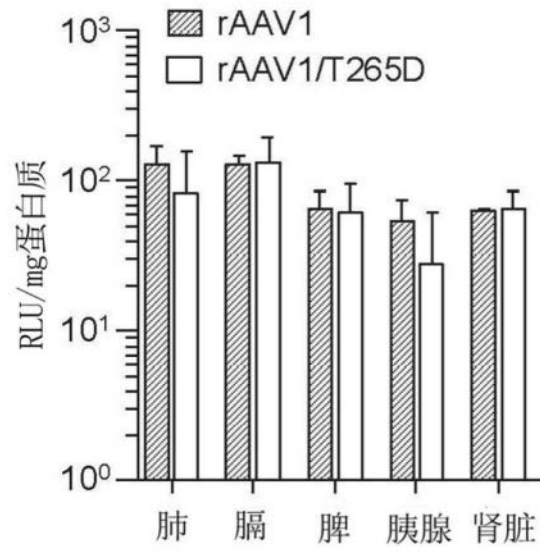


图19C

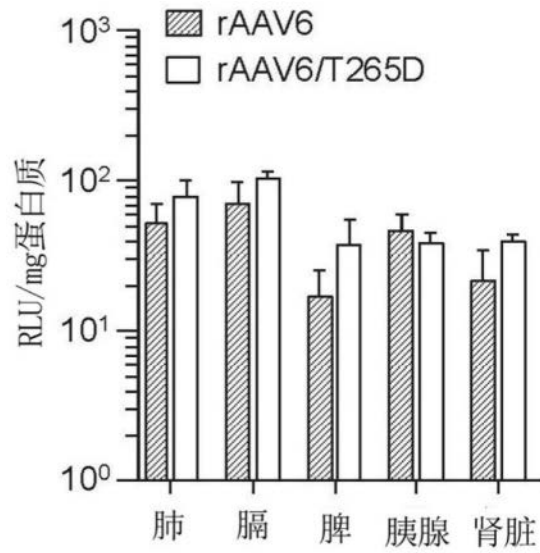


图19D

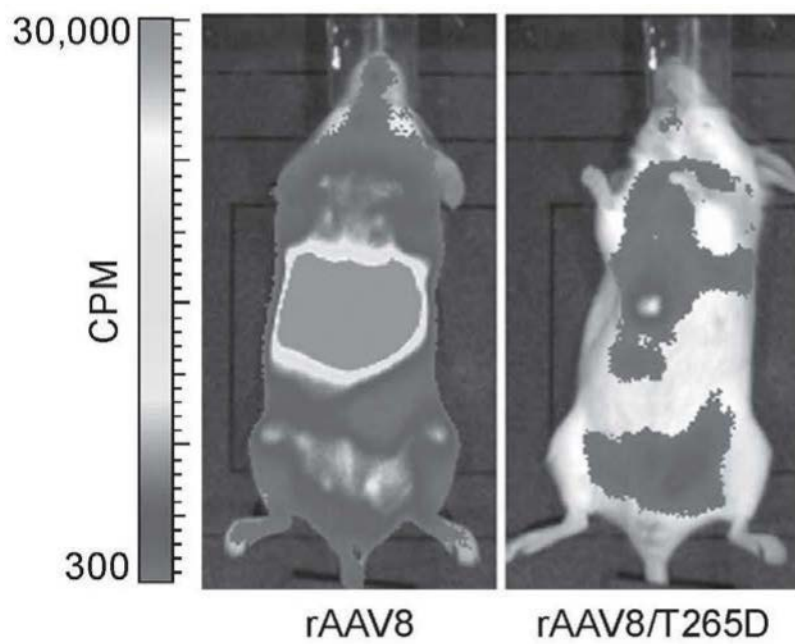


图20A

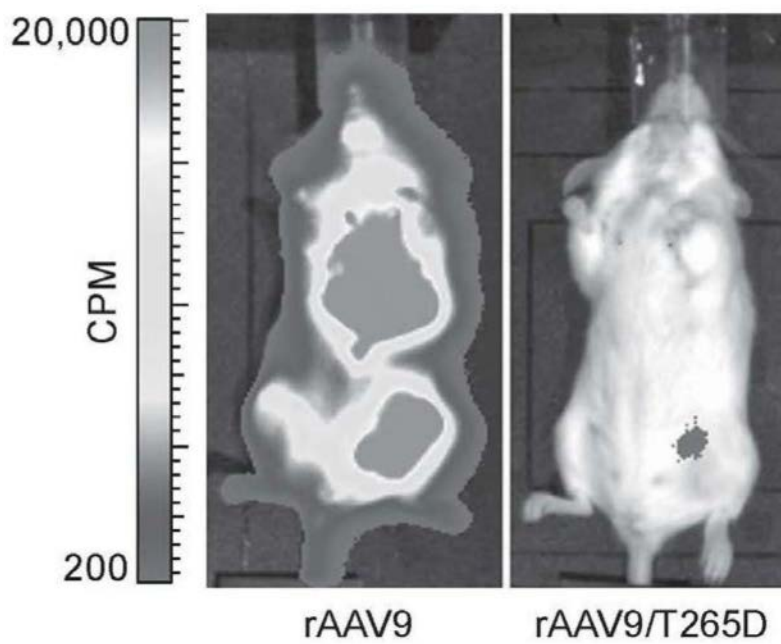


图20B

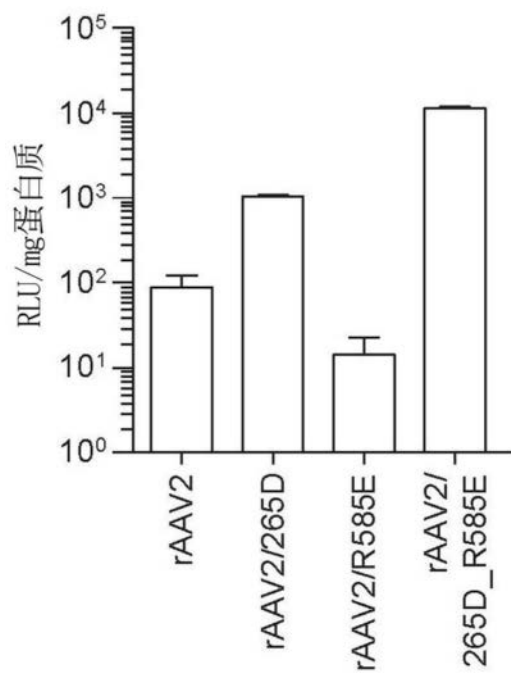


图21A

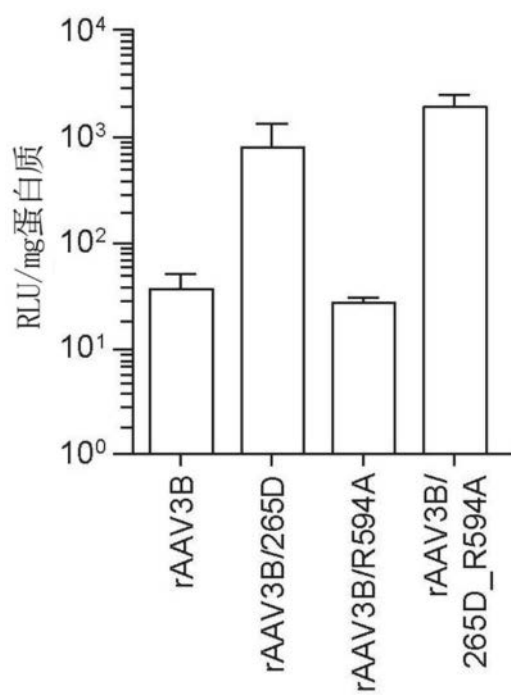


图21B

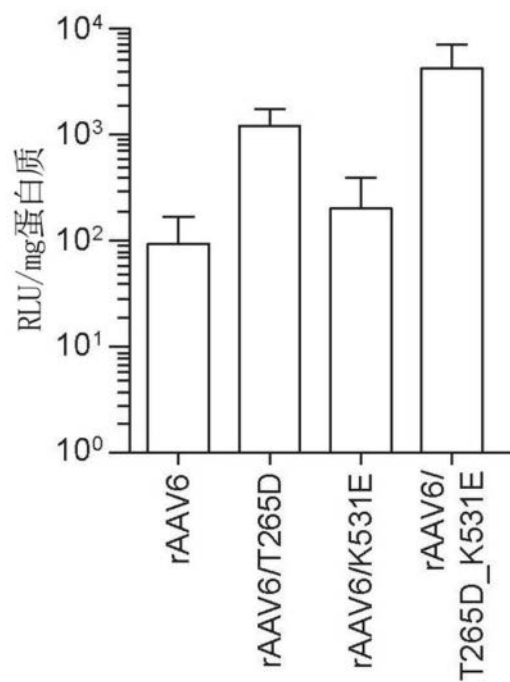


图21C

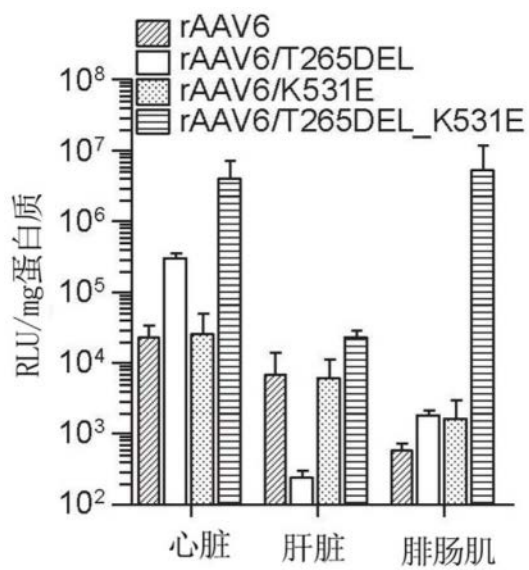


图21D

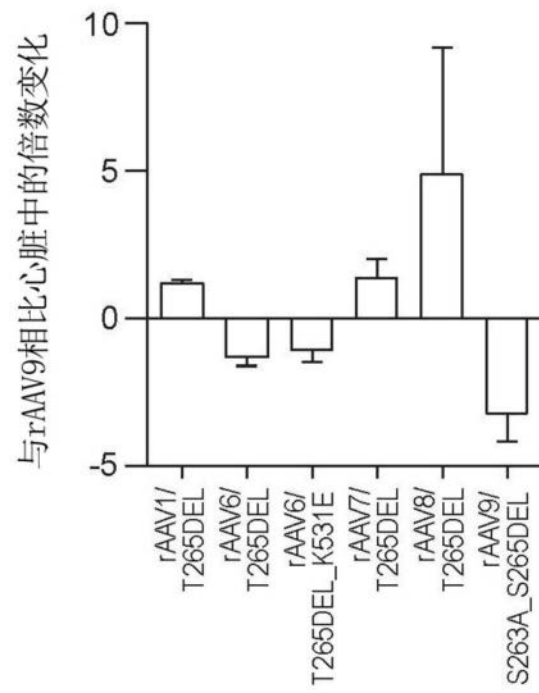


图22A

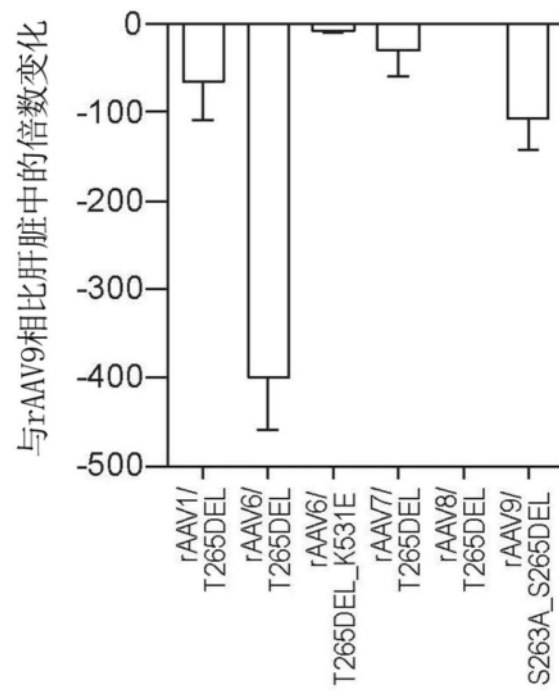


图22B

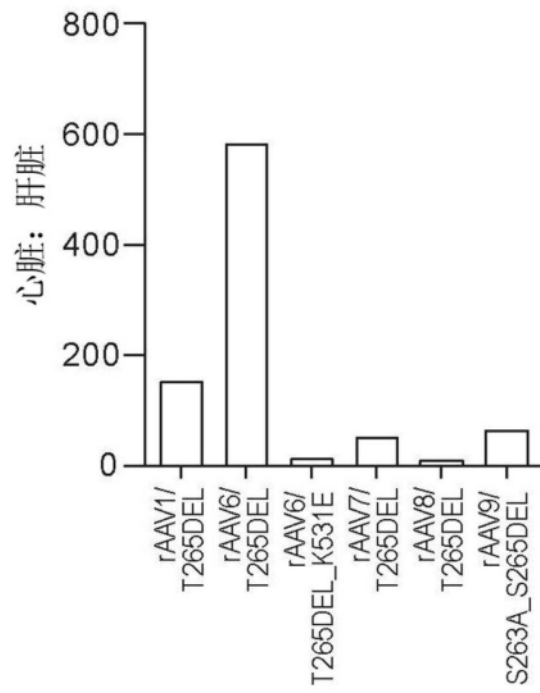


图22C

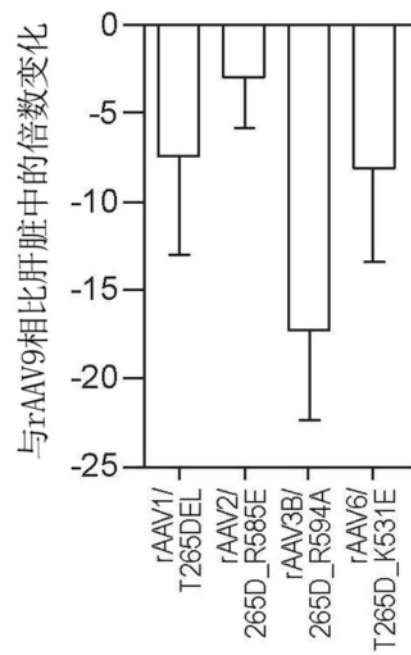


图22D

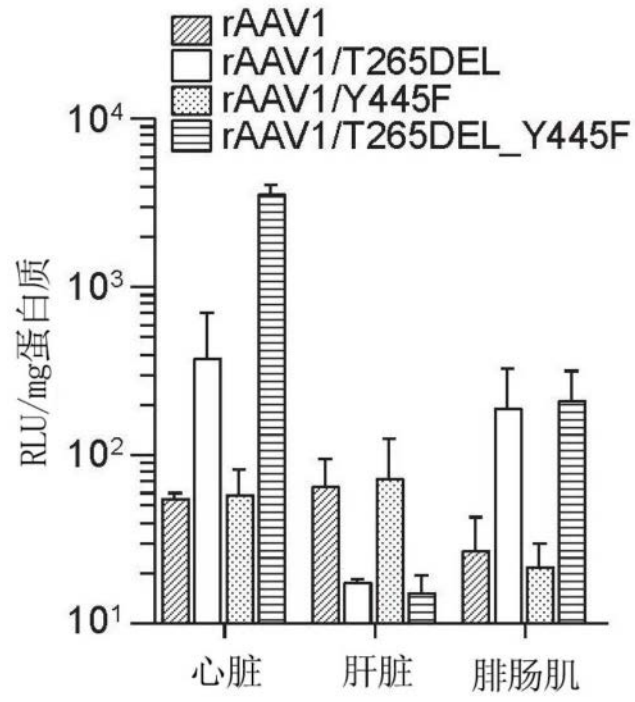


图23A

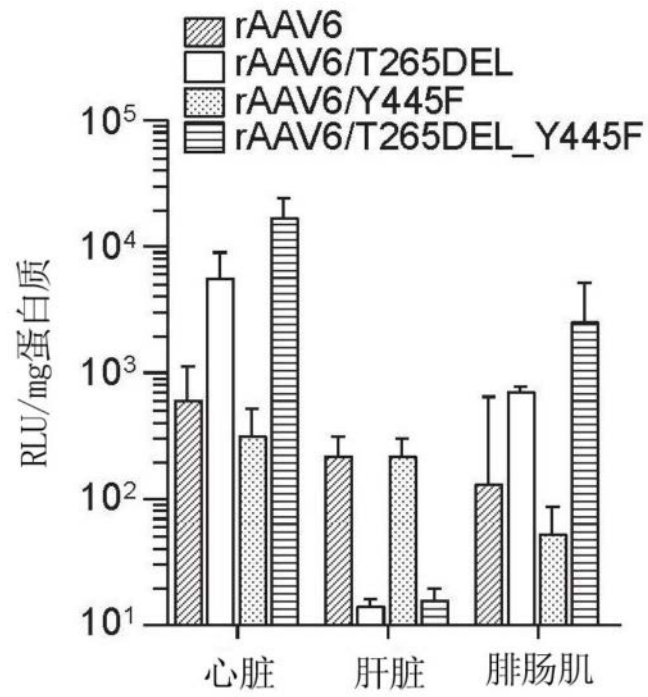


图23B

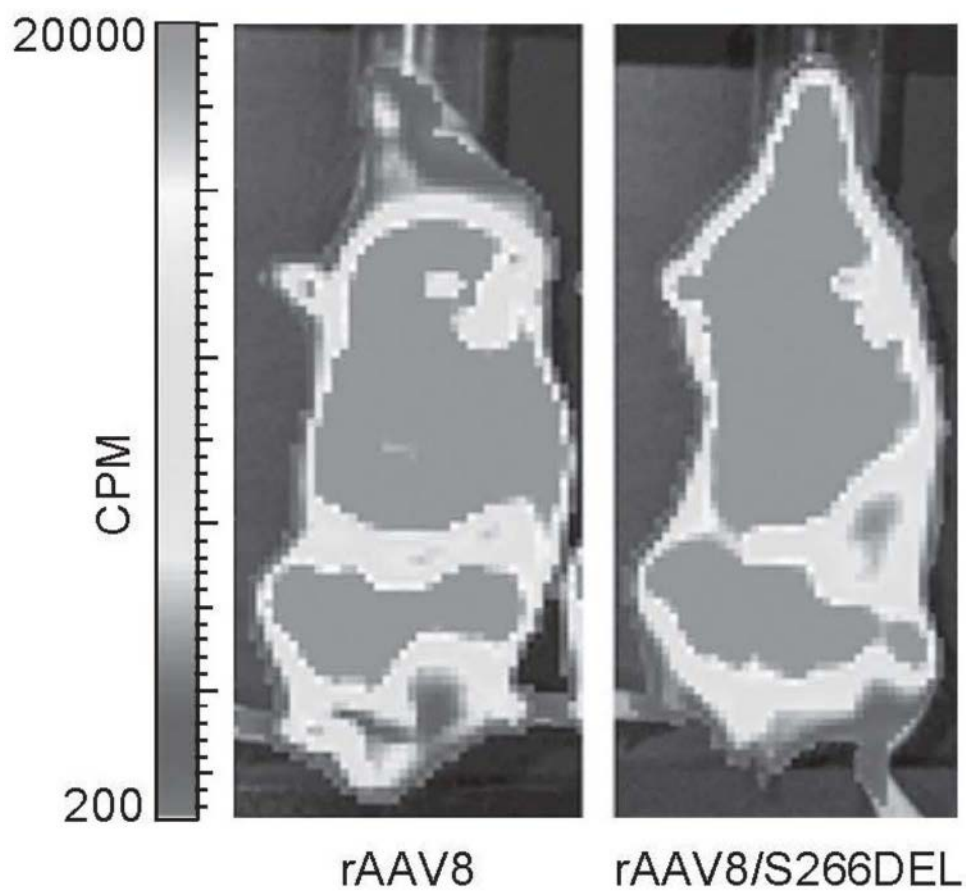


图24