

腺相关病毒外壳修饰与肿瘤靶向治疗

徐增辉^{①*}, 周秀梅^{①*}, 石文芳^{①②}, 钱其军^{①②†}

① 浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

② 中国人民解放军第二军医大学/东方肝胆外科医院病毒与基因治疗实验室, 上海 200433

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

2008-06-03 收稿, 2008-08-20 接受

国家自然科学基金(批准号: 30772477)和浙江省自然科学基金(批准号: Y206481)资助项目

摘要 靶向性是肿瘤基因治疗取得成功的关键因素。在众多基因治疗病毒载体中, 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 是目前广为关注的基因治疗载体系统。AAV 具有广泛的宿主范围, 这也导致其缺乏组织或细胞特异性, 对靶细胞的基因转染效率不高。因此, 提高 AAV 载体在体内运输的靶向性和感染目的细胞的效率, 是实现 AAV 基因治疗的关键。迄今为止, 科学家已开发出很多策略来改造腺相关病毒的外壳, 期望增强其靶向性或重靶向目的细胞。这些策略不仅包括传统的化学修饰、噬菌体展示、外壳基因组改造和嵌合载体, 也包括新颖的标记营救、衣壳蛋白定向进化、AAV 外壳直接肽段展示和 AAVP (AAV-Phage) 等。本文评述了对 AAV 外壳改造达到靶向肿瘤细胞的研究进展。

关键词
rAAV
靶向治疗
基因治疗

理想的基因治疗载体必须满足 3 个重要标准, 即安全、高效基因转移以及转基因稳定可靠表达。为了满足以上标准, 载体必须能够准确地传递和释放基因。因此如何获得特异性针对肿瘤的靶向治疗载体是基因治疗能否取得成功的关键所在。靶向性可以在基因表达水平上获得, 也可以在基因传递水平上获得。改造载体外壳蛋白是实现基因准确传递的主要策略, 也是实现肿瘤靶向基因治疗的重要途径。Rabinowitz 等人^[1]在 AAV2 外壳结构基因中插入突变, 产生 AAV2 重组病毒颗粒, 首次证明了可以改变外壳蛋白而不影响其感染性。Bowles 等人^[2]用 AAV2 DNA 联合 AAV3 衣壳 DNA 开展“标记营救”, 成功获得了具有新颖靶向特性的镶嵌型载体。Perabo 等人^[3]和 Muller 等人^[4]分别构建了一个新型的、可在 AAV 衣壳随机展示肽段的 AAV 文库, 并利用该文库在不同细胞株上筛选改变了嗜性的变体。Maheshwari 等人^[5]应用定向进化的方法改造 AAV 衣壳, 改变了病毒载体的受体结合特性, 并提高了与受体的特异结合能力。而 Hajitou 等人^[6]创造了一种新的 AAV/Phage 载体系统 (AAVP), AAVP 显示了功能强大的靶向特性、安全性和高效感染特性。本文就近些年

在构建靶向性 AAV 载体上所取得的进展作一评述, 以期能在整体上把握 AAV 外壳改造的方向, 并对将来 AAV 外壳改造工作有所帮助。

1 腺相关病毒研究概况

腺相关病毒是一类非致病性的人类细小病毒, 其复制需要腺病毒或单纯疱疹病毒等作为辅助病毒, 可以感染分裂期和静止期细胞, 还可以定点整合到宿主细胞基因组中 (19q 13-qter), 治疗基因长期稳定表达是腺相关病毒的最大优点。到目前为止, 已从不同的动物中分离出 100 多种 AAV 血清型, 如 AAV1~AAV3 分离自猿腺病毒, AAV8 分离自猕猴^[7], AAV10 和 AAV11 则从食蟹猴中分离得到^[8]。另外, Schmidt 等人^[9]从猿腺病毒库中分离出新的血清型, AAV (VR-195) 和 AAV (VR-355)。许多体内外实验均证明, 这些天然 AAV 血清型具有不同的组织或细胞特异性, 如 AAV1 可高效转导骨骼肌细胞、AAV2 可转导中枢神经系统、AAV3 对巨核细胞的转导具有优势、AAV8 可将基因高效传递至骨骼肌以及心肌和肝细胞。病毒的天然嗜性一方面为靶向运输治疗性基

因奠定了基础,另一方面也使其不能按照人们的意志靶向病变的组织或细胞。为此科学家们发展出了很多方法来改变AAV载体的嗜性,使其按照我们的意愿靶向性的转运治疗基因到目的细胞,从而达到靶向治疗的目的。

2 AAV 外壳修饰

通过修饰外壳可使病毒载体准确释放并专一表达外源基因,从而实现肿瘤的靶向治疗。目前对外壳的修饰研究主要有以下4个方面。

2.1 单纯化学修饰的 AAV 载体

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)是AAV2的主要受体之一,在很多组织和细胞膜上都存在表达^[10]。HSPG分子表达分布广,限制了其作为体内靶向转染的应用。Bartlett等人^[11]将双特异性F(ab')₂抗体特异结合到AAV2衣壳,借此特异结合到靶细胞表面受体 α IIb β ₃,这种修饰后的AAV载体能够感染通常不被感染的巨核细胞系。然而,在体内病毒-双特异性抗体复合物的可逆性和短暂性限制了病毒的高效摄入以及改变了其在细胞内的运输通路^[12]。

Ponnazhagan等人^[13]用双特异的抗生物素蛋白-人表皮生长因子(EGF)融合蛋白(双特异性抗体的取代物),与生物素化的rAAV2一端结合,另一端与表达EGF受体的肿瘤细胞结合。这种方式大大增加了病毒对EGF受体阳性SKOV3.ip1细胞的转染效率。与EGF相似,人纤维原细胞生长因子1(FGF1)通过与抗生物素蛋白融合,在生物素化的rAAV和FGF1受体阳性MO7e细胞系之间形成桥链。最近,Arnold等人^[14]介绍了一种AAV化学生物素化的替代物,即可代谢生物素化的AAV突变体,它将一个BirA生物素酶作用底物肽段的基因插入到AAV2外壳基因中。在AAV2包装生产的同时,转染埃希氏大肠杆菌BirA基因,肽段和BirA共表达,最后产生了生物素化的AAV2载体。

Romanczuk等人^[15]于1999年创建了一种方法,用共价连接一个聚乙二醇聚合体(PEG)来掩盖病毒颗粒表面,对病毒起到了免于血清中和的保护作用。Lee等人^[16]和Le等人^[17]用PEG共轭结合AAV2外壳,研究了其对AAV逃逸中和抗体的作用,结果表明,用适当PEG共轭化的AAV2可以免受血清中和,提示用此方法也可以增强治疗基因转染效率。但是PEG的具体应用还有待进一步的研究。

2.2 外源基因插入修饰的 AAV 载体

插入AAV载体中的外源基因作用方式可以分为两种:(i)单纯结合靶细胞膜分子;(ii)插入的小分子可以结合一类分子,如抗体的Fc段结构域、生物素/亲和素等。由于目前人们对AAV2的外壳蛋白和病毒颗粒结构了解得相对清楚,因此通常在AAV2 *cap* 基因中插入外源基因片段以获得修饰的靶向AAV载体。

在外壳蛋白的基因组内通过突变或插入突变的方式,改变编码衣壳蛋白的基因,最终达到修饰外壳的目的。Girod等人^[18]预测了在AAV2衣壳蛋白的基因组中有6个位点(氨基酸位置261,381,447,534,573,587)可以引入靶向配体。用含14个氨基酸的肽段L14(QAGTFALRGDNPQG,包含RGD结构)作为配体,可结合许多细胞整合素受体,介导病毒高效转染表达适当整合素的细胞。用这种方式获得的rAVV与野生型AAV2有相近的包装效率。而且,在衣壳蛋白587位点插入突变后产生的重组病毒能高效转染表达L14特异整合素受体的肿瘤细胞系。

Grifman等人^[19]比较了AAV2和AAV1,3,4,5的衣壳,结果证明,潜在插入位点与Girod等人^[18]预测的位点一致。第一个尝试使AAV靶向特异细胞的是Yang等人^[20],他们将一个针对人CD34的单链抗体插入到VP1,VP2和VP3的N末端,由突变体和野生型衣壳蛋白混合成的病毒粒对CD34阳性人白血病细胞系KG-1的转染显著增加,而野生型rAAV很难感染此种细胞系。Wu等人^[21]用相同的策略证明,在VP2N末端插入丝氨酸蛋白酶抑制子的配体后,rAAV对IB3的感染效率大大增强,约为野生型的15倍。研究表明,与犬类细小病毒(CPV)相似,AAV的VP2N末端也暴露在病毒颗粒表面^[22,23]。鉴定出衣壳蛋白表面结合硫酸乙酰肝素的氨基酸位点是接下来对AAV载体遗传修饰的基础,为此Rabinowitz等人^[1]和Wu等人^[21]用随机定点突变的方法进行研究,为以后的AAV2结构研究提供了很多宝贵的资料。

Rabinowitz等人^[1]在AAV2外壳结构基因中插入突变,产生AAV2重组病毒颗粒,并分析其AAV2外壳产生、包装、转染、肝磷脂琼脂糖结合和形态学,以确定病毒组装和感染的关键组成部分,首次证明了可以改变外壳蛋白而不影响其感染性的可行性。这些外壳亚单位改变了的AAV病毒颗粒将成为重要的模板,使得我们可以操纵AAV载体以达到体内细胞特异性基因传输。

在此之后,许多科研团队都尝试改造AAV2的外壳,使其具有新的靶向性.其中,Shi等人^[24]在AAV2外壳蛋白基因中鉴定出了5个最优插入位点,修饰的AAV载体展示一个15个氨基酸的肽段,这个肽段结合到人黄体化激素受体(LH-R),实现了LH-R介导卵巢癌细胞(OVCAR-3)的特异转染,证明了AAV介导的转基因可在体内定向释放和表达. Shi等人^[25]将整合素-RGD插入到AAV外壳,以增强基因传输到卵巢癌(ovarian cancer, OvCa)的能力. 基因传输不依赖HSPG而且特异性趋向于靶向受体. 重要的是, RGD修饰的外壳显著增强了AAV-HSVtk在有GCV存在时杀卵巢癌细胞的能力.

尽管我们可以通过插入一个已知肽段来靶向单个受体,但是如果靶向一个新的受体则需要要在衣壳蛋白中引入新的遗传修饰. 因此寻找一种可以靶向多种肿瘤靶分子的AAV载体势在必行. Girod等人^[18]结合两种方法发展了一个多能rAAV载体靶向系统,轻易地重定向rAAV的结合特异性. 将Z34C, *Staphylococcus aureus*蛋白A的一个肽段插入到AAV2衣壳的587位点,形成rAAV2-Z34C载体. 因为Z34C通过识别抗体Fc结构域而结合不同的抗体,抗体的Fab结构域仍然可以作为配体靶向特异的细胞表面受体. rAAV2-Z34C载体连结抗体靶向CD29 (β 1-整合素)、CD117 (c-kit受体)和CXCR4可分别特异性转染人造血细胞系M-07e, Jurkat和Mec1^[26]. 正如前述的生物素化的AAV载体,采用生物素标记生物大分子的技术是十分普及的,因此,针对肿瘤相关膜抗原的抗体分子在用抗生物素蛋白标记以后,便能修饰生物素化的AAV病毒,这样即可增加该类突变AAV载体的肿瘤靶向治疗应用范围. 因此研究那些可以用于多种靶细胞治疗的载体更为实用.

2.3 不同血清型外壳蛋白结构域互换/标记营救产生的镶嵌 AAV 载体

基于各 AAV 血清型之间氨基酸序列的高度同源性以及对 AAV 晶体结构的了解,研究人员有可能获

得由不同血清型衣壳亚单位产生的混合型衣壳载体. 通过交换AAV1 和AAV2 之间的结构域, Hauck等人^[27]鉴定了AAV1 中负责转染骨骼肌的衣壳区域. AAV1 和AAV2 两者有6种不同的衣壳蛋白, AAV1Vp1, Vp2, Vp3 和AAV2Vp1, Vp2, Vp3. 由于整合了不同血清型AAV的趋向性,这些镶嵌病毒有可能展现出更广阔的组织嗜性. 而且因为不同血清型有不同的细胞运输通路,使得启动转基因表达更为有效,他们或许也将具有更高的转基因表达水平.

“标记营救”的方法也已被用来产生荒诞AAV载体. 这个方法的一个优点是基于AAV载体在特定细胞和组织中的功能和选择,产生荒诞AAV载体的过程中相应的负责特异性转染的结构域会被替换. Bowles等人^[2]最近用AAV2 DNA联合AAV3 衣壳DNA开展“标记营救”. AAV2 克隆含野生型末端重复序列,一个完整的rep基因和一个突变的cap基因,此为“标记营救”的模板. 当克隆转染293细胞,并用腺病毒dl309作为辅毒感染时会包装产生非感染性AAV病毒,此AAV病毒不能结合硫酸肝素. 然而,在共转染AAV3 外壳DNA片段后cap基因中的突变可被更正,结果产生了AAV2/AAV3的荒诞病毒. 将在不同“标记营救”实验中获得cap基因进行PCR扩增、克隆、然后测序. 测序结果证实,AAV2 和AAV3 的cap基因都发生了同源重组,更为重要的是,产生了一群AAV荒诞体的混合群,这些荒诞体在每个“标记营救”实验中各自携带了AAV3cap基因中不同区域长为16~2200 bp的基因. 图1显示了“标记营救”方法产生镶嵌外壳的原理.

“标记营救”是一种非常有价值的技术,可以用来确定 AAV 转染过程中起作用的结构域,包括受体结合、细胞内运输通路、在特定细胞中的脱外壳. 最重要的是,在特定细胞中通过“标记营救”产生的一组荒诞病毒会显示出新的趋向性和高的转导效率,有利于提高人类肿瘤基因治疗中载体的靶向性.

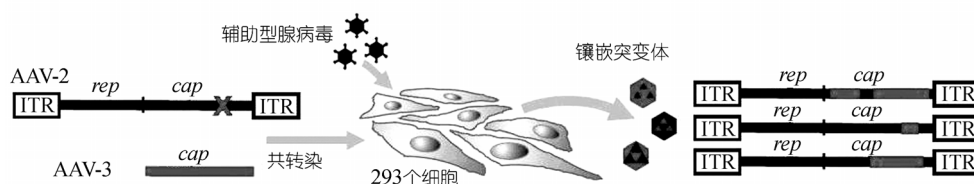


图1 “标记营救”产生镶嵌外壳
修改自文献^[28]

尽管这些镶嵌载体在肿瘤的基因治疗中具有非常好的应用前景,但他们有两个潜在的缺点:(i)在每次包装过程中,两种血清型病毒衣壳间的比例很难重复;(ii)镶嵌AAV衣壳可能被血清中的抗体中和。对这些问题需要做进一步的研究^[29]。

2.4 嵌合型 AAV 载体

把一个 AAV 基因组用另一个 AAV 衣壳包装,产生的病毒将具有衣壳所决定的趋向性。例如,包含 AAV2 基因组和 AAV4 衣壳(AAV2/4)的假型载体有室管膜细胞特异性,而 AAV2 载体(AAV2/2)偏向于中枢神经系统的神经元^[30]。Chao 等人^[31]用 AAV1、AAV3 和 AAV4 衣壳分别包装 AAV2 基因组,产生的病毒介导转基因在骨骼肌中的表达水平分别是 AAV2/2 的 900、30 和 3 倍。而且,AAV2/5 介导基因高效转移至鼠科小脑神经元^[32],AAV2/6 高效感染骨骼肌^[33]。Gao 等人^[34]证明了 AAV2/7 转染骨骼肌的效率与 AAV1 相当,同时它也是最有效的肌肉传输的血清型。他们还发现,AAV2/8 转染鼠科肝脏的转基因表达是其他血清型的 10~100 倍。而且,体内实验显示,AAV2/9 可高效转染小鼠的肝、肺、肌肉和心外组织^[7,35]。AAV10、AAV11 与 AAV2 的衣壳序列分别有 84%和 65%的相似性。AAV2/10 的系统注射能持续转染鼠科肝、心脏、肌肉、肺、肾和子宫,而 AAV2/11 高效转染肌肉、肾、脾、肺、心脏和胃。这些结果不同于 AAV2/2,它只能持续转染肝和脾^[8]。另外,静脉注射 AAV2/10 和 AAV2/11 可介导高效转染猕猴中的淋巴组织^[36]。AAV (VR-195)和 AAV (VR-355)能够转染的人肿瘤细胞系不同于 AAV6,尽管他们同 AAV6 有 96%的序列相同^[9]。

3 靶向分子的寻找

通过单纯化学修饰、外源基因片段插入以及镶嵌等方法获得的 AAV 载体,在改变 AAV 载体趋向性或增强其感染能力上都取得了一定的成功。但是前面所述的方法都基于已知的靶向分子,要获得新的靶向性,就必须寻找新的特异性靶向分子。目前寻找新的靶向分子的研究进展很快,下面我们将讨论 3 种功能强大的方法。

3.1 噬菌体库筛选

M13 噬菌体展示是一个功能强大的平台,可通过插入到噬菌体外壳蛋白表面来展示外源蛋白或肽段

^[37]。肽段文库展示在噬菌体的表面,这已经被广泛用来选择能结合到不同靶标(包括抗体、受体、酶和培养的细胞)的生物活性的肽段^[38]。Pasqualini 等人^[39]已经成功用噬菌体展示肽库筛选出了能够选择性定位于鼠脑和肾血管的肽。许多研究人员也已通过噬菌体展示技术首次分离出特定细胞和组织的靶向性肽段,然后将这个肽段插入 AAV 外壳以改变载体的趋向性^[19,40,41]。Grifman 等人^[19]将一个用噬菌体展示技术获得的肿瘤靶向性肽段整合到 rAAV2,整合后的 rAAV2 成功地改变了趋向性。Work 等人^[42]用噬菌体展示文库进行体内选择,结果分离出了介导噬菌体定位到大鼠脑和肺的肽段。接着把这个肽段插入到 AAV 衣壳蛋白的 V3 区域,产生的 AAV 载体倾向转染大鼠的脑和肺。然而,通过噬菌体展示文库选择出的肽段,转移到 AAV 衣壳蛋白环境后其靶向能力就会减退。Nicklin 等人^[40]从噬菌体展示文库中筛选出一个肽段,能选择性和高效地结合到人静脉内皮细胞。选出来的肽段 SIGYPLP 插入到衣壳蛋白 587 位点时,同野生型 AAV 载体相比,增强了对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的转染。而且,在其他细胞系包括原初人血管平滑肌细胞和人肝实质细胞中未见增强的转染效率,这提示修饰的 AAV 载体有一定程度的组织细胞选择性。

3.2 直接在 AAV 上进行随机肽库展示筛选

为了克服在不同环境下选择靶向肽段所造成的差异,肽段可直接在 AAV 环境下筛选。Perabo 等人^[3]已经采用了一个新型的 AAV 文库,即在 AAV 衣壳随机展示肽段,选择改变了嗜性的变体在 Girod 等人^[18]证实可插入突变的衣壳 587 位点插入 7 个随机序列的氨基酸肽段。这样形成的衣壳突变文库,接下来反复在不被野生型 AAV 感染的巨核细胞和 B 细胞慢性淋巴瘤白血病细胞系中感染和收获。从文库中选择出衣壳突变克隆,转染同样的细胞系,与野生型 AAV 相比转染效率提高了 100 倍^[3]。Muller 等人^[4]用相似的方法构建了 AAV 展示随机肽段文库,然后在人冠状动脉内皮细胞上选择。选择出来的肽段使得病毒滴度可重复性地提高 10~630 倍,而且荧光酶在人冠状动脉内皮细胞的表达增强 4~40 倍。图 2 显示了 AAV 文库直接筛选靶向肽段的原理。

尽管此方法或许不能克服 AAV 在多个细胞外和细胞内转染的障碍(这需要改造病毒表面的多个区域),但它有望增进病毒和细胞靶向蛋白之间的相互作用。

3.3 衣壳蛋白的定向进化

人们已经应用定向进化技术获得了生物活性增强的蛋白药物、亲和性增强的抗体、新的疫苗和改进特性的逆转录病毒载体^[43~47]。Maheshri等人^[5]应用这个功能强大的方法改造AAV衣壳,使其有新颖和增强的靶向特性。衣壳突变文库通过易错PCR、交错延伸、在整个衣壳蛋白主要序列分散随机点突变。经过几个循环的肝磷脂亲和分离和细胞筛选,亲和性比野生型高的和低的AAV2 突变体都被分离出来。图3显示了AAV衣壳蛋白直接进化的原理。

这个方法成功地增强了 AAV 对非转染细胞的感染,如人星形胶质细胞和其他细胞类型,并能进一步拓展解决发展病毒基因运输载体上的挑战。

4 结语

目前国内外对腺相关病毒载体的研究很多,国内许多研究已达到了国际一流水平。伍志坚等人^[48]研发

了一种rAAV的高效快速生产系统,为AAV载体基因治疗的临床应用性生产奠定了基础。曹佐武等人^[49]比较了具有完整ITR和缺陷ITR的AAV的包装和感染能力,发现ITR的不稳定会严重影响病毒产量和感染能力,在AAV病毒质粒复制过程中保证两端ITR的完整性对提高AAV病毒包装效率具有重要意义。无论是对AAV的基础研究还是应用研究,靶向性都显得尤为重要。因为靶向性是肿瘤基因治疗成功与否的关键之一,它是基因治疗中安全性、高效性的保障。

迄今为止研究者在AAV载体改建上已做了大量工作,通过改造AAV外壳以实现靶向目的细胞或组织方面也取得了重要的进展。已应用的靶向性改造策略均是在对AAV载体生物特性的深刻理解基础之上的, Xie等人^[50]于2002年报道阐明了AAV2的原子结构, Nam等人^[51]于2007年报道了AAV8的晶体结构,进一步研究了AAV病毒的生物特性,为确定靶向性肽段插入位点提供了结构基础,可据此合

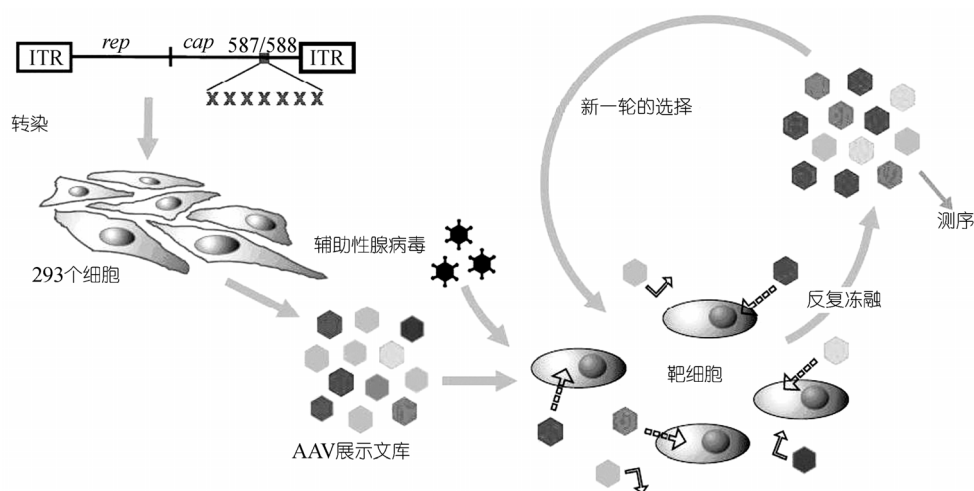


图2 AAV文库直接展示和筛选靶向性肽段

修改自文献^[28]

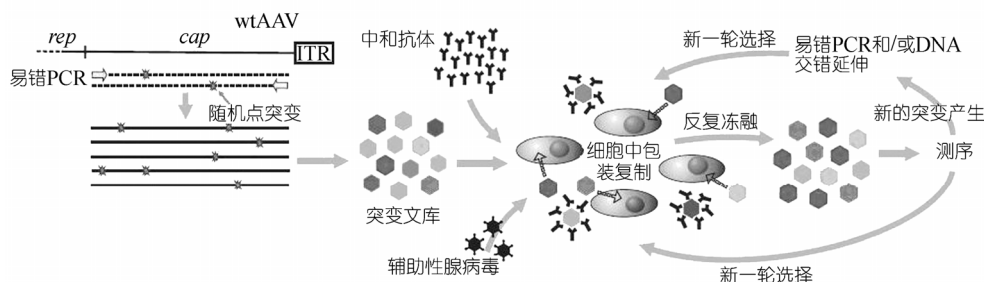


图3 衣壳蛋白通过易错PCR定向进化

修改自文献^[28]

理设计突变位点,从而避免病毒包装失败,避免血清中和等各种原先晶体结构阐明前不可预期的结果。

我们前面介绍的载体改造都是建立在单一血清型AAV或不同血清型AAV相互作用基础之上的,但是尽管极尽所能,我们还是很难克服一些AAV本身固有的一些限制,如无法完全摒除病毒的天然嗜性、不能彻底解决病毒包装滴度低等问题。正如肿瘤治疗需要联合各种手段,我们在改造载体时也可以将各种类型的病毒/非病毒载体的优势结合,实现优势互补。Hajitou等人于^[6]2006年在*Cell*杂志上报道了一种新的AAV/Phage (AAVP)载体系统,给我们带来了很大的启发。噬菌体属原核系统,原本不感染真核哺乳类细胞,在结合了用噬菌体展示技术筛选出来的靶向肽段后具有新的嗜性,可高效转染目的哺乳类细胞。然而,把此种靶向肽筛选出来插入AAV载体外壳后却并不一定会实现AAV的靶向性,因为AAV的空间结构不同于噬菌体,而且AAV本身也具有嗜向性。而直接用噬菌体作为载体,转基因进入目的细胞后表达很不稳定。Hajitou等人用AAV2的全长ITR序列连接一段治疗基因或报告基因,插入到已整合了靶向性肽段的噬菌体基因组中可兼容位点。由此产生的AAVP能高效感染目的细胞,且稳定长效表达目的基因,得到的AAVP可以达到 $10^{10}\sim 10^{11}$ 转染单位

/ μL 。而且,AAVP摒弃了AAV载体的天然嗜性,这是我们改造病毒载体的难点。噬菌体应用于人体的安全性已得到美国FDA的认可和多个临床实验的证实。AAVP系统十分巧妙地联合了真核和原核系统的优势,整合了AAV和噬菌体各自的优点,从而产生出功能更为强大的载体系统。在生产成本、安全性、靶向性上都占据了优势,应用组织特异性启动子,便能靶向转录,实现靶向运输和靶向表达的双靶向。此系统还可用于药物作用临床反应的实时检测系统,以准确检测药物作用过程^[52],这对基础研究和应用研究都能起到极大的促进作用。

目前我们实验室正在进行重组AAV2/8型的外壳改造工作,并用AAV直接展示肽段技术进行建库工作,期望能获新型的靶向分子。综上所述,对AAV载体的进一步研究工作,我们应从以下几方面努力:(i)更深入地了解AAV载体的生物特性;(ii)寻找特异性更强的靶向分子;(iii)联合AAV与噬菌体、AAV和其他病毒载体(如AAV和AD)、AAV和寡聚核苷酸链、AAV和非病毒载体,还有AAV和一些特异性定点整合酶等,以突破AAV的一些局限或更好地发挥/增强AAV载体的功能。可以设想,通过联合多种策略来增强靶向肿瘤基因治疗的效果,将会给人类治愈肿瘤带来更大的希望。

参考文献

- 1 Rabinowitz J E, Xiao W, Samulski R J. Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology*, 1999, 265(2): 274—285^[doi]
- 2 Bowles D E, Rabinowitz J E, Samulski R J. Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: A novel approach for chimeric AAV production. *J Virol*, 2003, 77(1): 423—432
- 3 Perabo L, Buning H, Kofler D M, et al. *In vitro* selection of viral vectors with modified tropism: The adeno-associated virus display. *Mol Ther*, 2003, 8(1): 151—157^[doi]
- 4 Muller O J, Kaul F, Weitzman M D, et al. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(9): 1040—1046^[doi]
- 5 Maheshri N, Koerber J T, Kaspar B K, et al. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(2): 198—204^[doi]
- 6 Hajitou A, Trepel M, Lilley C E, et al. A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging. *Cell*, 2006, 125(2): 385—398^[doi]
- 7 Gao G, Vandenbergh L H, Alvira M R, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*, 2004, 78(12): 6381—6388^[doi]
- 8 Mori S, Wang L, Takeuchi T, et al. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: Pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*, 2004, 330(2): 375—383^[doi]
- 9 Schmidt M, Grot E, Cervenka P, et al. Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol*, 2006, 80(10): 5082—5085^[doi]
- 10 Summerford C, Samulski R J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol*, 1998, 72(2): 1438—1445

- 11 Bartlett J S, Kleinschmidt J, Boucher R C, et al. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab')₂ antibody. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(2): 181—186[[doi](#)]
- 12 Buning H, Ried M U, Perabo L, et al. Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*, 2003, 10(14): 1142—1151[[doi](#)]
- 13 Ponnazhagan S, Mahendra G, Kumar S, et al. Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *J Virol*, 2002, 76(24): 12900—12907[[doi](#)]
- 14 Arnold G S, Sasser A K, Stachler M D, et al. Metabolic biotinylation provides a unique platform for the purification and targeting of multiple AAV vector serotypes. *Mol Ther*, 2006, 14(1): 97—106[[doi](#)]
- 15 Romanczuk H, Galer C E, Zabner J, et al. Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: A novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(16): 2615—2626[[doi](#)]
- 16 Lee G K, Maheshri N, Kaspar B, et al. PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92(1): 24—34[[doi](#)]
- 17 Le H T, Yu Q C, Wilson J M, et al. Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. *J Control Rel*, 2005, 108(1): 161—177[[doi](#)]
- 18 Girod A, Ried M, Wobus C, et al. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med*, 1999, 5(9): 1052—1056
- 19 Grifman M, Trepel M, Speece P, et al. Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol Ther*, 2001, 3(6): 964—975[[doi](#)]
- 20 Yang Q, Mamounas M, Yu G, et al. Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1929—1937[[doi](#)]
- 21 Wu P, Xiao W, Conlon T, et al. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol*, 2000, 74(18): 8635—8647[[doi](#)]
- 22 Weichert W S, Parker J S, Wahid A T, et al. Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology*, 1998, 250(1): 106—117[[doi](#)]
- 23 Chapman M S, Rossmann M G. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology*, 1993, 194(2): 491—508[[doi](#)]
- 24 Shi W, Arnold G S, Bartlett J S. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(14): 1697—1711[[doi](#)]
- 25 Shi W, Hemminki A, Bartlett J S. Capsid modifications overcome low heterogeneous expression of heparan sulfate proteoglycan that limits AAV2-mediated gene transfer and therapeutic efficacy in human ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2006, 103(3): 1054—1062[[doi](#)]
- 26 Ried M U, Girod A, Leike K, et al. Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol*, 2002, 76(9): 4559—4566[[doi](#)]
- 27 Hauck B, Xiao W. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol*, 2003, 77(4): 2768—2774[[doi](#)]
- 28 Perabo L, Huber A, Märsh S, et al. Artificial evolution with adeno-associated viral libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(2): 118—126
- 29 Hauck B, Chen L, Xiao W. Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther*, 2003, 7(3): 419—425[[doi](#)]
- 30 Davidson B L, Stein C S, Heth J A, et al. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3428—3432[[doi](#)]
- 31 Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, et al. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther*, 2000, 2(6): 619—623[[doi](#)]
- 32 Alisky J M, Hughes S M, Sauter S L, et al. Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport*, 2000, 11(12): 2669—2673
- 33 Blankinship M J, Gregorevic P, Allen J M, et al. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther*, 2004, 10(4): 671—678[[doi](#)]
- 34 Gao G P, Alvira M R, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11854—11859
- 35 Pacak C A, Mah C S, Thattaliyath B D, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction *in vivo*. *Circ Res*, 2006, 99(4): e3—9[[doi](#)]
- 36 Mori S, Takeuchi T, Enomoto Y, et al. Biodistribution of a low dose of intravenously administered AAV-2, 10, and 11 vectors to cynomolgus monkeys. *Jpn J Infect Dis*, 2006, 59(5): 285—293
- 37 Smith G P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315—1317[[doi](#)]
- 38 Cortese R, Monaci P, Luzzago A, et al. Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr*

- Opin Biotechnol, 1996, 7(6): 616—621[doi]
- 39 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. Nature, 1996, 380(6572): 364—366[doi]
- 40 Nicklin S A, Buening H, Dishart K L, et al. Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. Mol Ther, 2001, 4(3): 174—181[doi]
- 41 Perabo L, Goldna D, White K, et al. Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus retargeting mutants and consequences for their *in vivo* tropism. J Virol, 2006, 80(14): 7265—7269[doi]
- 42 Work L M, Buning H, Hunt E, et al. Vascular bed-targeted in vivo gene delivery using tropism-modified adeno-associated viruses. Mol Ther, 2006, 13(4): 683—693[doi]
- 43 Rothe A, Hosse R J, Power B E. *In vitro* display technologies reveal novel biopharmaceutics. Faseb J, 2006, 20(10): 1599—1610[doi]
- 44 Hoogenboom H R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat Biotechnol, 2005, 23(9): 1105—1116[doi]
- 45 Yuan L, Kurek I, English J, et al. Laboratory-directed protein evolution. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(3): 373—392[doi]
- 46 Bupp K, Sarangi A, Roth M J. Selection of feline leukemia virus envelope proteins from a library by functional association with a murine leukemia virus envelope. Virology, 2006, 351(2): 340—348[doi]
- 47 Yu J H, Schaffer D V. High-throughput, library-based selection of a murine leukemia virus variant to infect nondividing cells. J Virol, 2006, 80(18): 8981—8988[doi]
- 48 伍志坚, 吴小兵, 曹晖, 等. 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2001, 31(5): 423—430
- 49 曹佐武, 林羿, 程龙球, 等. ITR 缺陷对 AAV 病毒包装与感染力的影响. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(2): 224—230
- 50 Xie Q, Bu W, Bhatia S, et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(16): 10405—10410[doi]
- 51 Nam H J, Lane M D, Padron E, et al. Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. J Virol, 2007, 81(22): 12260—12271[doi]
- 52 Hajitou A, Lev D C, Hannay J A, et al. A preclinical model for predicting drug response in soft-tissue sarcoma with targeted AAVP molecular imaging. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(11): 4471—4476[doi]



您还在为选择一本中意的读本而举棋不定吗？

《科学新闻》双周刊全新改版，由为Science/Nature撰写科学新闻报道的精英团队打造，将于2009年1月7日隆重推出。《科学新闻》全年24期，每期定价12元，全年288元，隔周三出版。即日起，经本刊编辑部直接订阅全年定价7.6折优惠，低至220元/年。学生凭学生证复印件6.5折优惠，更低至188元/年。

银行付款

户 名：科学时报社
开户行：工商银行北京分行海淀支行营业部
账 号：0200049609046215517

邮局汇款

收款人：科学时报社
地址：北京海淀区中关村南一条乙3号
邮政编码：100190
注：请在附言栏中标明“订阅《科学新闻》”

联系人：刘振华

订阅咨询：010-82614585
广告咨询：010-82614585
传真：010-82614585