

文章编号: 1006-3080(2020)03-0107-07

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20190312002

人体肝脏靶向性新型 AAV 血清型载体的研发

宁秦洁, 陈颖, 闫梦迪, 胡泽岚, 吴侠, 杜增民, 郑静, 肖啸
(华东理工大学药学院神经分子药理学实验室, 上海 200237)

摘要:通过 DNA shuffling 技术选择 8 种 AAV(AAV1~AAV4, AAV6~AAV9) *cap* 基因序列进行 *cap* 基因的 DNA 改组, 获得 AAV 衣壳蛋白(Capsid)突变体库。将突变体基因库插入到含有 AAV2 *Rep* 基因和 ITR 序列的质粒中, 最终获得的质粒(pIRC)具有全套 AAV 基因组序列(>10⁷ 独立克隆, 即细菌菌落)。经过共转染 HEK293 细胞, 72 h 后收集纯化病毒, 获得 AAV 突变库。利用野生型 5 型腺病毒(Wild Type Ad5, wt Ad5)辅助感染人肝癌 Hep G2 细胞, 进行筛选后, 最终在肝细胞中富集获得 1 种衣壳蛋白 Cap 突变体 AAVXL12。通过将携带 *GFP* 基因的不同血清型重组 AAV 病毒感染 Hep G2 细胞, 观察到不同程度的绿色荧光的表达, 最终显示筛选到的血清型载体 AAVXL12 介导的 *GFP* 基因表达效果最好, 荧光强度最强。

关键词:腺相关病毒(AAV); 基因治疗; 新型 AAV 血清型; DNA shuffling; 靶向; 肝脏细胞
中图分类号: **文献标志码:**A

基因治疗(Gene Therapy)是通过基因水平改变来治疗疾病的方法, 即通过基因载体(通常为改造过的病毒)导入一段有独立功能的基因进入体细胞, 代替或纠正已经发生突变的基因进行独立表达, 发挥其原本应该有的功能。经过近三十年的发展, 基因治疗已经由最初用于单基因遗传病的治疗扩大到恶性肿瘤、感染性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病、代谢性疾病等多种重大疾病的治疗。

腺相关病毒(Adeno-associated Virus, AAV)是目前基因治疗领域中最常用的病毒载体之一, 是细小病毒家族的成员, 具有约 4.7 kb 的单链 DNA 基因组^[1-2]。AAV 基因治疗的安全性、有效性和持续性表达已经在绝大多数基因治疗的临床试验中得到了证实^[3-11]。然而 30%~40% 的人群存在 AAV 中和抗体(Neutralizing Antibody, Nab), 这些预先存在的 AAV 中和抗体, 即使在适度的滴度下, 也能够给予 AAV 后阻止其成功转导。因此会导致功能基因表达量的降低, 甚至产生免疫毒性, 这类患者都不适用目前的治疗方案^[10]。所有临床研究中的一致观察结果

是针对 AAV 转导的肝细胞的免疫应答的风险取决于载体剂量^[12-14]。这一观察结果突出了一个基本的治疗原则, 即需要使用最低剂量, 从而产生临床效益, 同时尽量减少不良事件的风险。

由于天然 wt AAV(Wild type AAV)感染, 在大部分人群中发现 Nab, 而新型 AAV 血清型在人体内的中和抗体量较少, 因此研发新型的 AAV 血清型在一定程度上可以克服中和抗体对基因治疗的影响。设计用于靶向递送基因的 AAV 衣壳的筛选(其通常依赖于序列分析和合理的肽插入)已经取得了一些成功, 但是由于 AAV 载体介导的免疫反应的发生以及载体包装的报告基因的活性较低等因素的影响, 这些新型 AAV 载体可能不是最理想的基因治疗载体^[15-17]。

目前针对 AAV 衣壳的设计优化的主要方法为合理设计、计算机生物信息学、自然发现和定向进化方法。合理设计即利用衣壳生物学和宿主细胞靶标的预先存在的知识来设计组织特异性或细胞特异性细胞外标记物或免疫逃避的衣壳。虽然可以改善衣壳靶向性, 但它也可能对衣壳的其他特征产生负面影

收稿日期: 2019-03-12

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助

作者简介: 宁秦洁(1993—), 女, 山东烟台人, 硕士生, 主要研究方向为基因治疗。E-mail: ecust19930306@163.com

通信联系人: 肖啸, E-mail: 979261307@qq.com

引用本文: 宁秦洁, 陈颖, 闫梦迪, 等. 人体肝脏靶向性新型 AAV 血清型载体的研发 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 107-113.

Citation: NING Qinjie, CHNE Ying, YAN Mengdi, et al. Development of a Novel AAV Serotype Vector for Human Targeted Liver[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2020, 46(3): 107-113.

响,例如其稳定性;计算机设计是一种新的衣壳发现方法,利用计算方法来预测自然界中未见的新衣壳设计,能够从现代衣壳重建祖先 AAVs 是计算机设计的一种形式;自然发现即从自然界中发现新型 AAV 衣壳,但由于 40%~80% 的 AAV 都有其相应的抗体,因此人源衣壳可能不是理想的基因治疗载体;包含 DNA shuffling、error prone-PCR 在内的定向进化技术能够产生具有特定生物学特性和有利特征的 AAV 遗传变体(例如,组织特异性靶向、免疫逃避和转基因表达),再加上 DNA shuffling 技术是对 cap 基因改造能力最为有效的一种技术,它的主要优点是能够将所有的 AAV 血清型组合在一起产生许多独特的衣壳组合,其可以具有不同且有利的载体特性,避免单纯研究一种血清型而发生偏差,不会在搜索序列空间方面受到限制^[18]。

本研究通过 DNA shuffling 技术对 8 种 AAV (AAV1~AAV4, AAV6~AAV9)cap 基因序列进行 DNA 改组,利用 wt Ad5 对 Hep G2 细胞进行超感染,在 Hep G2 细胞内复制 AAV 颗粒,通过 Hep G2 细胞筛选新型 AAV 突变体,将新型 AAV 突变体与不同 AAV 血清型分别包装报告基因 GFP,观察不同 AAV 血清型介导的绿色荧光的表达,同时对所筛选的新型突变体同其他血清型一起分别在小鼠中进行中和抗体的检测。因此,本文首次通过人肝癌 Hep G2 细胞筛选新型 AAV 突变体改变衣壳向性的同时增强基因的传递,逃避 AAV 中和抗体。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

AAV1~AAV4, AAV6~AAV9 共 8 种血清型腺相关病毒、含有 ITR 序列和氨苄抗性的 pAAV-mcs、大肠杆菌 TOP10、pAAV-GFP、pHelper、wt Ad5 均为本实验室所有;HEK293 细胞、Hep G2 细胞均购自 ATCC 公司,Taq 聚合酶、T4 连接酶、DNase I 酶、Benzonase 酶均购自 Takara 公司;胶回收试剂盒、Plasmid Max Kit(25)均购自 Omega 公司;Dneasy Blood&Tissue Kit(250)购自 QIAGEN 公司;聚乙二醇(PEG 8000)、碘克沙醇、蛋白酶 K 均购自 Sigma-Aldrich 公司;Zeta-Probe GT 印迹膜购自 Bio Rad 公司;各种限制性核酸酶、Silver SNAP 染色试剂盒 II 购自 Thermo Fisher Scientific 公司;胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS)、DMEM 培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)、双抗(Penicillin-

Streptomycin, Liquid)及胰蛋白酶(0.25%)均购自 BI 公司。

1.2 实验仪器

高速离心机(CR21N 型),购于日本日立公司;蛋白纯化仪(NGC QUEST10 型)、蛋白纯化收集器(Bio Frad 型),均购于美国 Bio Rad(伯乐)公司;脱色摇床(翘板)(SK-R1807-E 型),购于大龙兴创实验仪器(北京)有限公司;超净工作台(SW-CJ-2FD 型),购于苏净安泰空气技术有限公司;全温落地摇床(ZWY-211C 型),购于上海智城分析仪器制造有限公司;生化培养箱(SHP-250 型),购于上海精宏实验设备有限公司;PCR 仪(Veriti DX 型),购于美国应用生物系统(ABI)公司;紫外透照台(TL-TM FL-26 型),购于上海默威生物科技有限公司;台式离心机(FRESCO21 型),购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;高压灭菌锅(80E 型),购于山东新华医疗器械股份有限公司;实时荧光定量 PCR 仪(qTOWER3G touch 型),购于德国耶拿分析仪器公司。

1.3 实验原理和方法

1.3.1 DNA shuffling DNA shuffling 是一种通过随机片段化和聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)重组对所选突变基因库进行体外同源重组的方法。用 DNase I 处理来自基因或指向同源基因的序列变体以产生随机 DNA 片段。用同源 DNA 作为模板和引物进行 PCR 扩增,将这些片段重新组装成与原始大小相同的基因,但具有可变功能^[19]。

1.3.2 细胞培养、转染、病毒生产和纯化 将 HEK293 细胞维持在含有 10%FBS 的 DMEM 培养基中。使用聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)通过三质粒转染 HEK293 细胞产生重组 AAV^[20-21]。在转染后 72 h 从培养基中收获病毒颗粒。将细胞沉淀重悬于含有 2 mmol/mL MgCl₂、10 mmol/mL Tris(pH=8)中,冻融 3 次,并用 100 U/mL Benzonase 酶在 37 °C 处理至少 1 h。通过用含有 500 mmol/mL 氯化钠、8% PEG 8000 试剂浓缩病毒培养基,并将离心后的沉淀重悬于 Tris-MgCl₂中,将其与裂解液合并^[22]。然后将合并的裂解液的盐离子浓度调节至 500 mmol/mL NaCl,在 37 °C 下孵育 30 min,并在 2 000 g 下离心得到澄清的裂解液。然后将澄清的裂解液分别用碘克沙醇密度梯度(15%, 25%, 40% 和 60%)离心,将病毒浓缩并储存在磷酸盐缓冲盐水(0.001%(w/v)Pluronic F-68 + 0.2 mol/L NaCl)中^[23]。

1.3.3 斑点印迹(Dot Blot) 首先将 2 μL 样品与 300 U 的 DNase I 在 25 mL 限制酶缓冲液中于 37 °C 温育 1 h,然后补充 1 mL、0.5 mol/L 乙二胺四乙酸,调节

pH为8.0,在100℃温育10 min。随后,加入1 mL蛋白酶K混合物(4 mL、10%十二烷基硫酸钠,4 mL或5 U蛋白酶K,6 mL H₂O)并将样品在50℃温育1 h。然后将蛋白酶K反应物用H₂O稀释至100 mL,并用H₂O将5 mL稀释的样品进一步稀释至300 mL,然后按照试剂盒说明的方法用30 ku截留分子量的Ultra-0.5 mL离心装置处理。将回收的样品和线性化的标准品的系列稀释液在0.4 mol/L NaOH中进行1:20稀释,然后转移至Zeta-Probe GT印迹膜。交联后,用来自Hybrisol I中的载体质粒的EcoRI-PstI片段探测膜,并根据标准方法洗涤。在暴露于存储荧光屏之后,使用图像分析软件对图像进行定量。在本研究中,斑点杂交技术用于AAV基因治疗载体滴度测定^[24]。

1.3.4 银染(Silver staining) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。在5~12%凝胶上分离指示体积的样品,用Silver SNAP染色试剂盒II进行银染色,以检测病毒包装过程中空壳与实心的比例。

1.3.5 AAV中和抗体检测技术 中和抗体检测参考基于细胞体外转导抑制的测定方法^[25-27]。Nabs效价被定义为血清的最高稀释度。将表达荧光素酶的AAV载体直接注射到6~8周龄的C57BL/6小鼠的肝脏中。两周后镜下观察转基因的表达^[25],利用酶联免疫吸附测定技术(Enzyme Linked Immune Sorbent Assay, ELISA)测定抗AAV抗体的总量^[28]。用TBS-C(筛选测定)将对照和测试样品按照1:20稀释,或

在含有 1.08×10^{12} capsid/mL AAV(特异性/确证测定)并一式两份添加至平板^[29]。

2 结果与讨论

2.1 新型AAV血清型的研发

2.1.1 突变体库的产生 通过DNA shuffling技术构建了AAV衣壳蛋白突变体库如图1所示。本研究选择8种(AAV1~AAV4, AAV6~AAV9)用于cap基因的DNA改组,因为已显示AAV5 cap基因与其他AAV血清型相比具有最大的序列变异并可能降低体外重组的效率。从质粒文库中挑选随机克隆用于检查重组AAV cap基因的序列变异和生存力。每个病毒颗粒的cap基因型和表型都是一对一的对应关系,有利于连续筛选AAV文库。

为构建随机嵌合AAV衣壳基因文库,使用AAV血清型1、2、3、4、6、7、8和9作为PCR模板。通过引物1(5'-CCC-AAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAA-3')和引物2(5'-ATAAGAATGCGGCCGC-AGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA-3')扩增衣壳基因。扩增后,使用DNase I处理获得cap基因混合物,处理后样品将得到许多DNA小片段,并以相等比例混合用于DNA改组^[30]。将4 μg DNA模板用0.04 U的DNase I酶在15℃下短暂处理。通过琼脂糖凝胶电泳纯化大小为300~1 000 bp的DNA片段,变性,再退火并通过DNA聚合酶修复

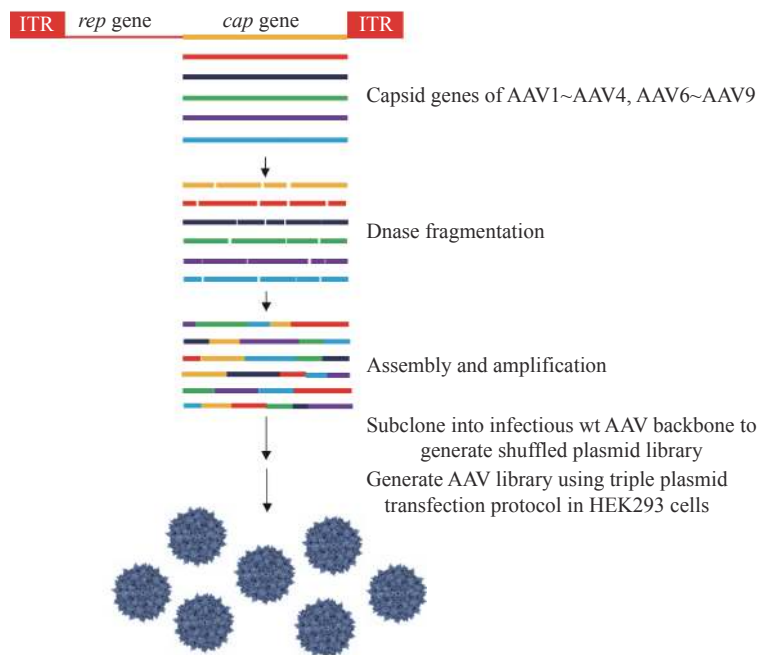


图1 通过DNA shuffling技术构建AAV衣壳蛋白突变体库
Fig. 1 Construction of AAV capsid mutant library by DNA shuffling

以重新组装随机衣壳基因。通过使用 DNA 聚合酶和引物 1 成引物 2 进行扩增。PCR 程序是 95 °C, 10 min; 30 个循环的 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 72 °C, 3 min。然后用 *Hind* III 和 *Not* I 消化 PCR 产物, 并连接到含有 AAV2 *Rep* 基因和反向末端重复序列的并且经过 *Hind* III 和 *Not* I 消化的质粒骨架中。通过将上述连接的 DNA 转化到 DH10B 大肠杆菌细胞中获得随机感染质粒文库。挑选随机克隆用于限制酶分析和 293 细胞中的复制和包装。最后将构建的新型病毒包装质粒同 pHelper 质粒共同转染 HEK293 细胞生产改组的感染性 AAV 文库。

2.1.2 从突变体库里筛选靶向肝脏的突变体 图 2 示出了筛选获得的 AAVXL12 capsid 突变体。如图 2(a), 我们用腺病毒 wt Ad5 对 Hep G2 细胞进行超感染, 允许扩增内化的 AAV 文库克隆。回收扩增的 AAV 并进行两轮选择以富集 AAV 文库, 同时与 Hep G2 细胞结合、内化, 在 Hep G2 细胞内复制 AAV 颗粒。从病毒中提取基因组 DNA, 并以此为模板, 通过 PCR 扩增含有从选择的最后阶段回收的 AAV capsid 的 DNA 区域。扩增得到的 *cap* 基因再次插入到携带有 AAV2 *rep* 基因和 ITR 序列的质粒中, 获得的质粒进行测序鉴定。如图 2(b), 将用于 wt Ad5 辅助细胞 (pAd-Helper), AAV *Rep* 和 *cap* (pAAV-

rep/cap, 即新型突变体) 和表达目基因的 AAV 载体 (pAAV-GFP) 三质粒共同转染 HEK293 细胞。在转染后的第 3 d, 收获重组 AAV 并进行纯化以获得纯化的病毒。通过几轮筛选后, 最终富集获得一种衣壳蛋白 *cap* 突变体 AAVXL12。将携带 *GFP* 基因的不同血清型重组 AAV 病毒同所筛选到的新型 AAVXL12 分别以同一滴度感染 Hep G2 细胞, 在感染之后的 48 h, 通过荧光成像检测不同血清型介导 *GFP* 基因表达。图 2(c) 示出了 7 种不同血清型重组 AAV 的荧光强度。从图 2(c) 能够明显看出 AAVXL12 的荧光强度最强, 其次是 AAV8、AAV9, 而 AAV1、AAV2、AAV6 和 AAV7 的荧光强度显示最弱, 基本无荧光。

2.2 AAVXL12 cap 序列的组成

AAVXL12 衣壳的序列组成如图 3 所示, 用 Align X 将 AAVXL12 的测序结果与 AAV1~AAV4、AAV6~AAV9 *cap* 序列进行对比, 发现 AAVXL12 *cap* 序列由 AAV1、AAV2、AAV6、AAV7、AAV8 5 种 AAV 的 *cap* 序列组成, 全长 2 103 bp。

2.3 AAV 中和抗体检测

将筛选出来的 AAVXL12 与 AAV8 用同一病毒量分别感染健康小鼠的肝脏来进行中和抗体的检测, 结果如图 4 所示。从图 4 中看出, 所筛选到的新

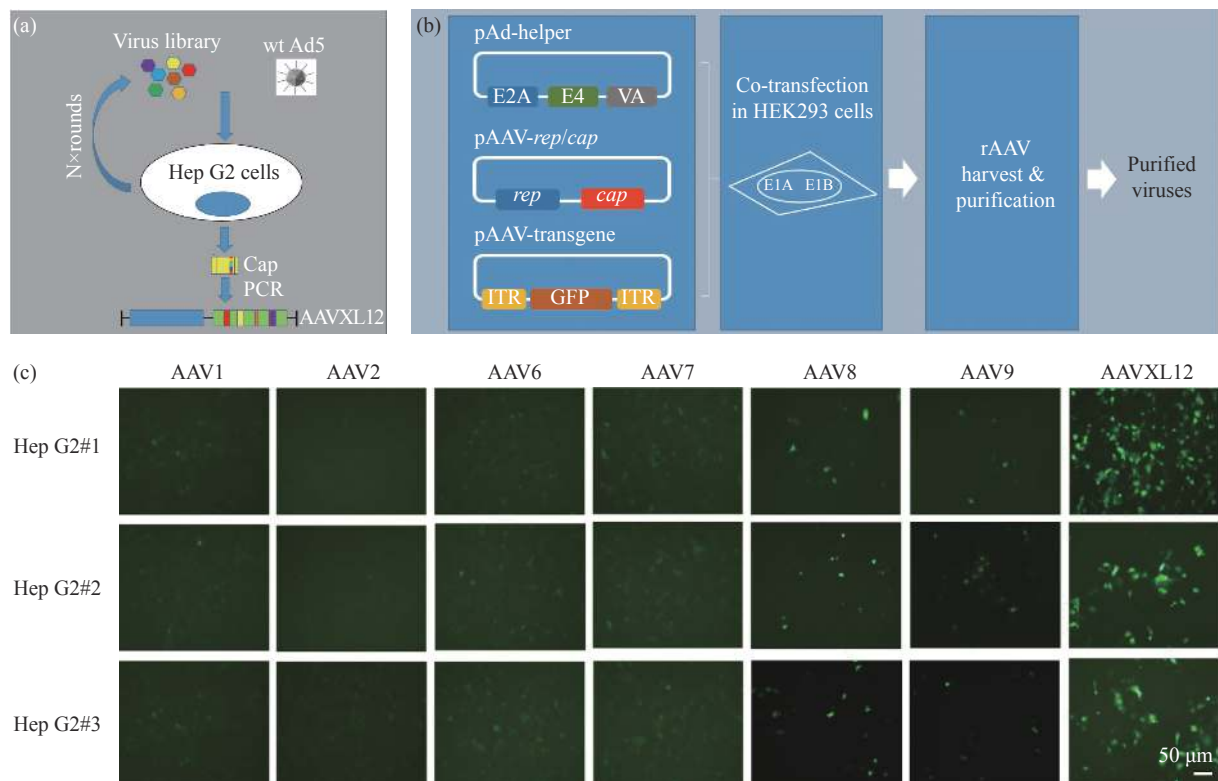


图 2 筛选获得 AAVXL12 capsid 突变体

Fig. 2 Screening of AAVXL12 capsid mutant

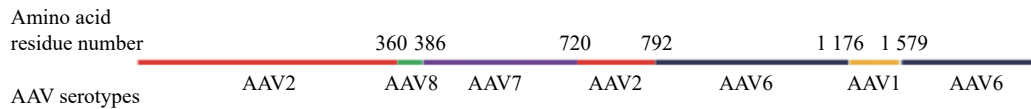


图3 AAVXL12 衣壳的序列组成

Fig. 3 Composition of the AAVXL12 capsid sequence

型 AAVXL12 载体的 Nab 阳性率在 30% 左右 (小于 1:8 稀释)。而 AAV8 阳性率在 90% 左右。因此, AAVXL12 较低的中和抗体阳性率使得它更加适用于基因治疗的研究。

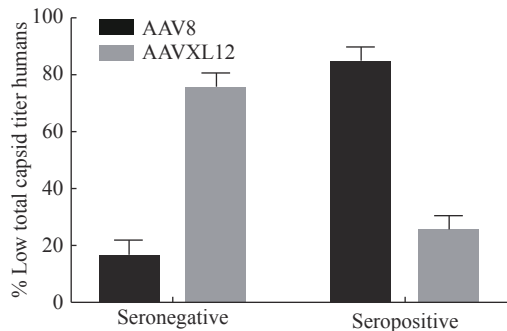


图4 不同 AAV 血清型在鼠中的中和抗体滴度检测

Fig. 4 Detection of neutralizing antibody titers in different AAV serotypes in mice

3 讨论

迄今为止,已从各种物种中分离出超过 100 种 AAV 基因型,包括山羊、牛、非人灵长类动物和人类^[31-32]。目前适用于基因治疗的 AAV 血清型为 1-9 型,并且各种血清型对不同的组织器官具有不同的感染能力^[32]。虽然有个别 AAV 血清型对小鼠肝脏组织感染能力较强(如 AAV8),但普遍特异性较差,同时也会对其他组织器官存在较强的感染能力。在应用于基因治疗研究中时,往往会造成副作用。为了设计具有组合特性的载体,本文通过 DNA 改组产生 AAV 衣壳基因文库并进行筛选。本文研究的主要优点是避免血清型偏差的限制。研究结果表明:通过人肝癌 Hep G2 细胞筛选到了肝脏高亲和力的新型突变体 AAVXL12,增强了对肝细胞的趋向性的同时减少了中和抗体的产生。新型血清型 AAVXL12 最大的优势是对肝脏的高亲和力,从而大大增强肝细胞基因转导效率,将其用于基因治疗时,只需要很少的用量就能达到理想的治疗效果。因此将基因载体的用量及可能的细胞免疫应答最小化。这一创新载体大大增加了基因治疗用药人群,降低了毒副作用。但是新型血清型 AAVXL12 对其他组织器官的感染力还需要进一步研究,之后我们将通过携带荧

光蛋白的 AAVXL12 载体静脉注射到小鼠中,并通过测定肝脏和几个对照器官中的荧光素酶活性的方法来检测 AAVXL12 对其他组织器官的感染效果。

参考文献:

- [1] SAMULSKI R J, MUZYCZKA N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes[J]. *Annual Review of Virology*, 2014, 1(1): 427-451.
- [2] HERMONAT P L, MUZYCZKA N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(20): 6466-6470.
- [3] DOLGIN E. Early clinical data raise the bar for hemophilia gene therapies[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(10): 999-1001.
- [4] HARTMANN J, CROTEAU S E. 2017 Clinical trials update: Innovations in hemophilia therapy[J]. *American Journal of Hematology*, 2016, 91(12): 1252-1260.
- [5] HERZOG R W. A cure for hemophilia: The promise becomes a reality[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(9): 1503-1504.
- [6] KUMAR S R, MARKUSIC D M, BISWAS M, *et al.* Clinical development of gene therapy: Results and lessons from recent successes[J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2016, 3: 16034.
- [7] GEORGE L A, SULLIVAN S K, GIEMASZ A, *et al.* Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(23): 2215-2227.
- [8] MIESBACH W, MELJER K, COPPENS M, *et al.* Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B[J]. *Blood*, 2018, 131(9): 1022-1031.
- [9] RANGARAJAN S, WALSH L, LESTER W, *et al.* AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(26): 2519-2530.
- [10] HM V D B. A cure for hemophilia within reach[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(26): 2592-2593.
- [11] MANNO C S, CHEW A J, HUTCHISON S, *et al.* AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in

- patients with severe hemophilia B[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2963-2972.
- [12] NATHWANI A C, GRAY J T, NG C Y, *et al.* Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver[J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2653-2661.
- [13] NATHWANI A C, GRAY J T, MCINTOSH J, *et al.* Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates[J]. *Blood*, 2007, 109(4): 1414-1421.
- [14] GIROD A, RIED M, WOBUS C, *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2[J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(9): 1052-1056.
- [15] 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[J]. *Human Gene Therapy*, 2001, 12(14): 1697-1711.
- [16] GRIFMAN M, TREPEL M, SPEECE P, *et al.* Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids[J]. *Molecular Therapy*, 2001, 3(6): 964-975.
- [17] ARKIN A, YOUVAN D C. An algorithm for protein engineering: Simulations of recursive ensemble mutagenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(16): 7811-7815.
- [18] DELAGRAVE S, YOUVAN D C. Searching sequence space to engineer proteins: Exponential ensemble mutagenesis[J]. *Journal of Biotechnology (NY)*, 1993, 11(13): 1548-1552.
- [19] PALZKILL T, BOTSTEIN D. Identification of amino acid substitutions that alter the substrate specificity of TEM-1 beta-lactamase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(16): 5237-52343.
- [20] OLIPHANT A R, NUSSBAUM A L, STRUHL K. Cloning of random-sequence oligodeoxynucleotides[J]. *Journal of Gene*, 1986, 44(2-3): 177-183.
- [21] HERMES J D, BLACKLOW S C, KNOWLES J R. Searching sequence space by definably random mutagenesis: Improving the catalytic potency of an enzyme[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(2): 696-700.
- [22] LEUNG D W, CHEN E, CACHIANES G, *et al.* Nucleotide sequence of the partition function of *Escherichia coli* plasmid ColE1[J]. *DNA Research*, 1985, 4(5): 351-355.
- [23] CADWELL R C, JOYCE G F. Randomization of genes by PCR mutagenesis[J]. *PCR Methods and Applications*, 1992, 2(1): 28-33.
- [24] SUN J, HUA B, CHEN X, *et al.* Gene delivery of activated factor VIII using alternative adeno-associated virus serotype improves hemostasis in hemophilic mice with FVIII inhibitors and adeno-associated virus neutralizing antibodies[J]. *Human Gene Therapy*, 2017, 28(8): 654-666.
- [25] WANG M, ASHLEY C, ERIC H, *et al.* Prediction of adeno-associated virus neutralizing antibody activity for clinical application[J]. *Gene Therapy*, 2015, 22(12): 984-992.
- [26] CALCEDO R, VANDENBERGHE L H, GAO G, *et al.* Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199(3): 381-390.
- [27] MAHESHRI N, KOERBER J T, KASPAR B K, *et al.* Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(2): 198-204.
- [28] FU H, MEADOWS A S, PINEDA R J, *et al.* Differential prevalence of antibodies against adeno-associated virus in healthy children and patients with mucopolysaccharidosis III: Perspective for AAV-mediated gene therapy[J]. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2017, 28(4): 187-196.
- [29] SOONG N W, NOMURA L, PEKRUN K, *et al.* Molecular breeding of viruses[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(4): 436-439.
- [30] GAO G, ALVIRA M R, SOMANATHAN S, *et al.* Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(10): 6081-6086.
- [31] CHIORINI J A, KIM F, YANG L, *et al.* Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(2): 1309-1319.
- [32] SHARMA A, GHOSH A, HANSEN E T, *et al.* Transduction efficiency of AAV 2/6, 2/8 and 2/9 vectors for delivering genes in human corneal fibroblasts[J]. *Brain Research Bulletin*, 2010, 81(2-3): 273-278.

Development of a Novel AAV Serotype Vector for Human Targeted Liver

NING Qinjie, CHNE Ying, YAN Mengdi, HU Zelan, WU Xia, DU Zengmin, ZHENG Jing, XIAO Xiao
(Laboratory of Molecular Neuropharmacology, School of Pharmacy, East China University
of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In recent years, the number of clinical trials of adeno-associated virus (AAV) vectors for gene transfer *in vivo* has steadily increased. Excellent safety and efficient transduction of a wide range of target tissues make AAV vectors to be the platform of choice for gene therapy *in vivo*. However, due to the poor selectivity of AAV vector serotypes and target cells, the presence of AAV neutralizing antibodies, and the continuous occurrence of immune responses, the effect of gene therapy are seriously affected. For enhancing the liver targeting of AAV and making AAV silent against the body's immune response. Recently, DNA shuffling was employed to produce an AAV cap gene library based on eight different AAV (AAV1-4, AAV6-9) capsid genes. DNA sequences in the mutant gene library were inserted into the plasmid containing the AAV2 Rep gene and the ITR sequence, and the resulting plasmid (pIRC) have a full set of AAV genomic sequences ($>10^7$ independent clones, ie, bacterial colonies). HEK293 cells were co-transfected, and the purified virus was collected after transfection for 72 h hours to obtain an AAV mutant library. Human liver cancer Hep G2 cells were assisted by wild type 5 adenovirus (wt Ad5). After screening, we finally obtained a capsid protein mutant AAVXL12 in hepatocytes. By infecting Hep G2 cells with different serotypes of recombinant AAV virus carrying the GFP gene, we observed different degrees of green fluorescence expression, which finally showed that the serotype vector AAVXL12 mediated GFP gene expression was the best. Therefore, the new AAV vector, which is highly infectious to human liver cells, has enhanced the efficiency of gene transduction and is expected to provide a novel therapeutic vector for AAV for gene therapy.

Key words: adeno-associated virus (AAV); gene therapy; novel AAV serotype; DNA shuffling; targeting; liver cells