



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105518145 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201480039270. 1

C12Q 1/68(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 11

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/09(2006. 01)

61/845, 841 2013. 07. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/046428 2014. 07. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/006743 EN 2015. 01. 15

(71) 申请人 费城儿童医院

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 凯瑟琳·A·海 费德里科·麦格兹

陈一峰

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 樊英如 李献忠

(51) Int. Cl.

C12N 15/861(2006. 01)

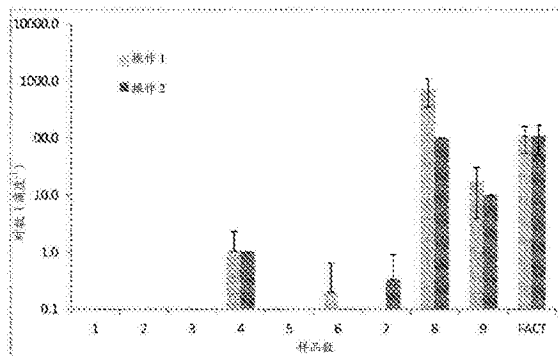
权利要求书4页 说明书22页 附图3页

(54) 发明名称

AAV 载体和用于抗 AAV (腺相关病毒) 中和抗体的检测

(57) 摘要

本发明提供了病毒载体、病毒颗粒以及筛选、检测、分析和测定样品的病毒抗体的量或中和抗体活性的方法和用途。这样的病毒载体、病毒颗粒以及方法和用途适用于广泛的病毒类型, 例如慢病毒、腺病毒和腺相关病毒 (AAV) 血清型。方法和用途包括病毒抗体筛选, 例如筛选、检测、分析抗病毒免疫球蛋白以及所测定的量。



1. 一种重组AAV载体序列,其中所述载体序列包括报告转基因,其中所述报告转基因包括(a)单链或自身互补的基因组,(b)能操作地连接在一个或多个表达调控元件上,以及(c)侧翼为一个或多个侧翼元件。

2. 一种重组AAV载体,其中所述载体包括报告转基因,其中所述报告转基因包括(a)单链或自身互补的基因组,(b)能操作地连接在一个或多个表达调控元件上,以及(c)侧翼为一个或多个侧翼元件,其中所述重组AAV载体包括感染性重组AAV颗粒。

3. 一种用于分析或检测或测量结合AAV的抗体的方法,其包括:

(a)提供使重组载体衣壳化的感染性重组AAV颗粒,其中

(i)所述载体包括报告转基因,

(ii)所述报告转基因包括单链或自身互补的基因组,和

(iii)所述报告转基因能操作地连接在一个或多个表达调控元件上并且侧翼为一个或多个侧翼元件;

(b)提供来自受试者的生物样品以用于分析或检测结合AAV的抗体;

(c)提供能感染所述感染性重组AAV颗粒的细胞;

(d)使(a)的所述感染性重组AAV颗粒与(b)的所述生物样品接触或孵育,从而产生所得的混合物(M);

(e)在其中(a)的所述感染性重组AAV颗粒能在所述细胞中感染并表达所述报告转基因的条件下使(c)的所述细胞和所得的混合物(M)接触;

(f)测量所述报告转基因的表达;以及

(g)将(f)的所述报告转基因表达与对照的报告转基因表达进行比较,所述对照或者阴性(-)对照(i)缺乏结合AAV的抗体,或(ii)含有预定量的结合AAV的抗体,从而分析或检测或测量结合AAV的抗体。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞包括哺乳动物细胞。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞提供编码用于AAV复制和/或基因组整合的辅助功能的核酸序列。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞能感染AAV颗粒,所述AAV颗粒包括与AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体的VP1、VP2或VP3序列具有90%或更高同一性的VP1、VP2或VP3序列。

7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞能感染AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

8. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞包括哺乳动物细胞。

9. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞包括HEK-293、CHO、BHK、MDCK、10T1/2、WEHI细胞、COS、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、WI38、MRC5、A549、HT1080、293、B-50、3T3、NIH3T3、HepG2、Saos-2、Huh7、HER、HEK、HEL或HeLa细胞。

10. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞表达AAV E4基因。

11. 根据权利要求3所述的方法,其中所述细胞包括2V6.11细胞。

12. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述报告转基因

编码提供酶、比色、荧光、发光、化学发光或电化学信号的蛋白质。

13. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述报告转基因包括荧光素酶基因。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述荧光素酶基因包括海肾荧光素酶或萤火虫荧光素酶基因。

15. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述报告转基因包括 $\beta$ -半乳糖苷酶基因、 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因或氯霉素转移酶基因。

16. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述报告转基因编码绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)或碱性磷酸酶。

17. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述重组载体包括AAV载体。

18. 根据权利要求17所述的AAV载体或方法,其中所述AAV载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10载体,或任何前述AAV载体的杂合体或嵌合体。

19. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述表达调控元件包括哺乳动物细胞中能操作的启动子和/或增强子核酸序列。

20. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述表达调控元件包括巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子/增强子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子/增强子、SV40启动子、二氢叶酸还原酶(DHFR)启动子、鸡 $\beta$ -肌动蛋白(CBA)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子或延伸因子1 $\alpha$ (EF1- $\alpha$ )启动子。

21. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述报告转基因是单链基因组。

22. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述报告转基因是自身互补的基因组。

23. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述一个或更多个侧翼元件包括一个或更多个AAV反向末端重复序列(ITR)。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述报告转基因定位在一个或更多个5'和/或3' AAV ITR之间。

25. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述自身互补的报告转基因基因组包括双链反向重复序列结构。

26. 根据权利要求1所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述一个或更多个侧翼元件包括未经AAV Rep蛋白处理的突变的或变体的AAV ITR。

27. 根据权利要求1所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述一个或更多个侧翼元件包括突变的或变体的AAV ITR,所述突变的或变体的AAV ITR允许或促进自身互补的报告转基因基因组在所述感染性重组AAV颗粒中形成双链反向重复序列结构。

28. 根据权利要求27或28所述的AAV载体或方法,其中所述突变的、修饰的或变体的AAV ITR具有删除的D序列和/或突变的、修饰的或变体的末端解离位点(TRS)序列。

29. 根据权利要求28所述的AAV载体或方法,其中所述突变的、修饰的或变体的末端解离位点(TRS)序列包括:CGGTTG。

30. 根据权利要求27或28所述的AAV载体或方法,其中所述突变的或变体的AAV ITR定位在所述报告转基因的自身互补序列之间。

31. 根据权利要求27或28所述的AAV载体或方法,其中所述突变的或变体的AAV ITR包括具有对应于删除的AAV2基因组序列的核苷酸122-144的核苷酸的AAV2ITR。

32. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述重组载体包括AAV的第一反向末端重复(ITR);哺乳动物细胞中能操作的启动子;所述报告转基因;多腺苷酸化信号和任选的第二AAV ITR。

33. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述重组载体包括限制位点,以允许在哺乳动物细胞中能操作的启动子下游插入所述报告转基因和在所述限制位点下游插入转录后调控元件,其中所述启动子、所述限制位点和所述转录后调控元件均位于5'AAV ITR的下游和任选的3'AAV ITR的上游。

34. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述感染性重组AAV颗粒包括感染灵长类动物的AAV血清型。

35. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述感染性重组AAV颗粒包括感染人类或猕猴的AAV血清型。

36. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述感染性重组AAV颗粒包括与AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体的VP1、VP2或VP3序列具有90%或更高同一性的VP1、VP2或VP3序列。

37. 根据权利要求1或2所述的AAV载体或权利要求2所述的方法,其中所述感染性重组AAV颗粒包括AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

38. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品包括灵长类动物样品。

39. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品包括血清。

40. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品包括血浆。

41. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品包括人血清或人血浆。

42. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

43. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者是人类。

44. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者患有由于蛋白质表达或活性不足引起的病症。

45. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者患有由于不正常的、异常的或不希望有的蛋白质的表达或活性引起的病症。

46. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者患有遗传性疾病。

47. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者是基因替代或补充疗法的候选者。

48. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者是基因剔除或敲除疗法的候选者。

49. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述受试者患有肺疾病(例如,囊性纤维化)、出血性疾病(例如,血友病A或血友病B,具有或不具有抑制剂)、地中海贫血、血液紊乱(例如,贫血)、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、癫痫症、溶酶体贮积病、铜或铁累积病(例如,威尔森氏或门克斯病)、溶酶体酸性脂肪酶缺乏症、神经或神

经变性疾病、癌症、1型或2型糖尿病、高雪氏病、胡尔勒氏病、腺苷脱氨酶缺乏症、代谢缺陷(例如,糖原贮积病)、视网膜变性疾病(例如RPE65缺乏症、无脉络膜和眼睛的其他疾病)、实体器官(例如,脑、肝、肾、心脏)的疾病或感染性病毒(例如,乙型肝炎和丙型肝炎、HIV等)、细菌或真菌病。

50. 根据权利要求2或3所述的方法,其进一步包括与(-)对照相比较而言基于(f)的所述报告转基因表达计算所述生物样品中结合AAV的抗体的量。

51. 根据权利要求2或3所述的方法,其进一步包括将所述生物样品中结合AAV的抗体的量输入或包括到与所述受试者相关的报告中。

52. 根据权利要求2或2所述的方法,进一步包括将所述生物样品中结合AAV的抗体的量输入数据库,从而产生数据库输入,所述数据库输入与所述受试者相关。

53. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所分析或检测的抗体结合AAV衣壳蛋白。

54. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所分析或检测的抗体结合AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

55. 根据权利要求2或3所述的方法,其中预定量的抗体结合AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

56. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品在与(a)的感染性重组AAV颗粒接触或孵育之前被稀释。

57. 根据权利要求2或3所述的方法,其中分析了多个稀释的所述生物样品。

58. 根据权利要求2或3所述的方法,其中分析了多个不同稀释比率的所述生物样品。

59. 根据权利要求2或3所述的方法,其中将所述生物样品在与(a)的所述感染性重组AAV颗粒接触或孵育之前稀释到介于1:1至1:500之间。

60. 根据权利要求2或3所述的方法,其中将所述生物样品在与(a)的所述感染性重组AAV颗粒接触或孵育之前稀释到介于1:500至1:5000之间。

61. 根据权利要求2或3所述的方法,其中分析了至少2、3、4、5或6个不同稀释比的所述生物样品。

62. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述细胞与所得的混合物(d)接触6-48小时。

63. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述细胞与所得的混合物(d)接触12-36小时。

64. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述细胞与所得的混合物(d)接触20-30小时。

65. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述细胞与所得的混合物(d)接触约24小时。

66. 根据权利要求2或3所述的方法,其中在测量所述报告转基因的表达之前裂解所述细胞。

67. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品已被热灭活。

68. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品已在约50-70°C热灭活约15分钟至多达1小时。

69. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述生物样品已在约56°C热灭活约30分钟。

70. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述方法在体外进行。

## AAV载体和用于抗AAV(腺相关病毒)中和抗体的检测

### 相关申请信息

[0001] 本申请要求2013年7月12日提交的美国临时申请序列No.61/845841的名称为“AAV VECTOR AND ASSAY FOR ANTI-AAV(ADENO-ASSOCIATED VIRUS)NEUTRALIZING ANTIBODIES”的优先权,该申请的全部内容在此通过引用明确地并入本文。

### 背景技术

[0002] 抗腺相关病毒(AAV)载体的体液免疫是血管内基因转移的重要屏障,导致在载体进入靶细胞之前将其清除。针对AAV衣壳的抗体在人体(该病毒的天然宿主)中是非常普遍存在的,并且由于衣壳蛋白质序列的同源性程度而与许多血清型交叉反应。结果,当载体被导入血流中时甚至相对低滴度的中和抗体(NAb)可阻断AAV转导。相反地,AAV载体向眼、脑的基因转移或直接肌内递送似乎对NAb中和比较不敏感。

[0003] 抗AAV的NAb存在于滑液(SF)中并且具有以血清型依赖性的方式抑制载体介导的转导的潜力。然而,SF中抗不同血清型的NAb水平和血清中的抗AAV NAb滴度与SF之间的关系是鲜为人知的。最后,因为NAb可有效地阻断体内AAV介导的转导,所以克服抗病毒衣壳的体液免疫的策略对于实现成功的基因转移而言是非常重要的。

### 发明内容

[0004] 本文公开的是病毒载体、病毒颗粒以及筛选、分析和测定病毒抗体的量或中和样品的抗体活性的方法和用途。这样的病毒载体、病毒颗粒以及方法和用途可用于许多病毒类型,例如慢病毒、腺病毒和腺相关病毒(AAV)血清型。使用不同的病毒载体、病毒颗粒和抗体筛选方法和用途,可筛选、检测、分析和测定抗病毒免疫球蛋白(g),例如IgG、IgA、IgM、IgE、IgD以及量。

[0005] 该筛选、检测、分析或测定量的结果可用于使用慢病毒、腺病毒和腺相关病毒(AAV)血清型测定受试者的适宜性,或用于基因治疗的载体类型或剂量(以取代或补充缺陷或缺失基因或者剔除或敲除缺陷或不希望有的基因的表达)。例如,如果受试者表达很少的或不表达抗特定病毒血清型例如AAV血清型2(AAV2)的抗体,那么受试者将是AAV2介导的基因疗法的合适的候选者。如果受试者表达抗特定病毒血清型例如AAV2的中等量或大量抗体时,那么对于AAV2介导的基因疗法而言,受试者可能需要更大剂量或更多个剂量的AAV2载体,或与药理学调节的B细胞应答的药剂或方法相组合。受试者的基因转移因此可实现,否则对于病毒载体基因转移疗法而言其不是理想的候选者。替代地,如果是可用的,则非AAV2载体(例如另一个AAV血清型)可用于这样的受试者的基因治疗。因此,基于所存在的病毒抗体(如果有的话)的存在或不存在、类型和/或量(例如滴度),以及基于受试者中病毒抗体的存在、类型和量针对给定的受试者所选的载体,病毒载体施用可以个体化。

[0006] 根据本发明,提供了重组AAV载体序列,所述载体序列包括报告转基因。在一个实施方式中,重组AAV载体序列包括报告转基因,其中报告转基因包括(a)单链或自身互补的基因组,(b)可操作地连接在一个或多个表达调控元件上,以及(c)侧翼为一个或多个

侧翼元件。

[0007] 根据本发明,还提供了重组AAV载体,其中所述载体包括报告转基因。在一个实施方式中,重组AAV载体包括报告转基因,其中报告转基因包括(a)单链或自身互补的基因组,(b)可操作地连接在一个或多个表达调控元件上,以及(c)侧翼为一个或多个侧翼元件。在具体的实施方式中,所述重组AAV载体包括感染性重组AAV颗粒。

[0008] 根据本发明,进一步提供了用于分析或检测或测量结合AAV的抗体的方法和用途。在一个实施方式中,方法或用途包括:A)提供使重组载体衣壳化的感染性重组AAV颗粒,其中(i)所述载体包括报告转基因,(ii)所述报告转基因包括单链或自身互补的基因组,和(iii)所述报告转基因可操作地连接在一个或多个表达调控元件上并且侧翼为一个或多个侧翼元件;B)提供来自受试者的生物样品以用于分析或检测结合AAV的抗体;C)提供可以感染所述感染性重组AAV颗粒的细胞;D)使(A)的感染性重组AAV颗粒与(B)的生物样品接触或孵育,从而产生所得的混合物(M);在其中(A)的感染性重组AAV颗粒可在所述细胞中感染并表达报告转基因的条件下使(C)的细胞和所得的混合物(M)接触;测量报告转基因的表达;以及将(f)的所述报告转基因表达与对照的报告转基因表达进行比较,所述对照或者阴性(-)对照(i)缺乏结合AAV的抗体,或(ii)含有预定量的结合AAV的抗体。比所述(-)对照的报告转基因表达多的(f)的报告转基因表达分析或检测或测量生物样品中结合AAV的抗体的存在。相比于预定量的结合AAV的抗体的报告转基因表达而言,(f)的报告转基因表达分析或检测或测量比对照的更大或更小的生物样品中的抗体。

[0009] 在本发明的具体方面,所述重组载体包括AAV载体。在更具体的方面,所述AAV载体包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10载体,或任何前述AAV载体的杂合体或嵌合体。

[0010] 在本发明的具体方面,所述方法或用途在体外进行。例如,细胞可以与感染性重组AAV颗粒体外接触或孵育。

[0011] 在本发明的多个实施方式中,所分析、检测或测量的抗体结合病毒包膜或衣壳蛋白质,例如AAV衣壳蛋白质。在本发明的具体方面,所分析、检测或测量的抗体结合AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

[0012] 在本发明的多个实施方式中,预定量的结合AAV的抗体可以是任何AAV血清型。在本发明的具体方面,预定量的抗体结合AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

[0013] 在本发明的进一步的具体方面,细胞包括哺乳动物细胞,例如灵长类动物(例如,人)细胞。在本发明的更具体的方面,细胞包括HEK-293(例如,2V6.11)细胞、CHO、BHK、MDCK、10T1/2、WEHI细胞、COS、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、WI38、MRC5、A549、HT1080、293、B-50、3T3、NIH3T3、HepG2、Saos-2、Huh7、HER、HEK、HEL或HeLa细胞。

[0014] 在其他方面,细胞提供编码用于AAV复制和/或基因组整合的辅助功能的核酸序列。在本发明的更具体的方面,细胞表达AAV E4基因和或AAV rep或cap。

[0015] 在进一步的方面,所述细胞可以感染包括与AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体的VP1、VP2或VP3序列具有90%或更高同一性的VP1、VP2或VP3序列的AAV颗

粒,或者所述细胞可以感染AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

[0016] 在更进一步的方面,所述细胞与所得混合物(M)接触6-48小时的时间,12-36小时的时间,20-30小时的时间,或约24小时的时间。在更进一步的方面,所述细胞在测量所述报告转基因的表达之前裂解。

[0017] 在本发明的多个实施方式中,报告转基因编码提供酶、比色、荧光、发光、化学发光或电化学信号的蛋白质。在具体的方面,报告转基因包括萤光素酶基因,例如海肾萤光素酶或萤火虫萤光素酶基因。在进一步的具体方面,报告转基因包括 $\beta$ -半乳糖苷酶基因、 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因、氯霉素转移酶基因。在进一步的具体方面,报告转基因编码绿色荧光蛋白质(GFP)、红色荧光蛋白质(RFP)或碱性磷酸酶。

[0018] 在本发明的进一步的多个实施方式中,报告转基因是单链基因组,或报告转基因是自身互补的基因组。在本发明的其他方面,自身互补的报告转基因基因组包括双链(或双链体)反向重复序列结构。在本发明的进一步的方面,自身互补的报告转基因基因组包括发夹环结构。

[0019] 在本发明的进一步的实施方式中,载体或载体序列包括一个(或更多个)表达调控元件,例如启动子和/或增强子核酸序列,其可在哺乳动物细胞中操作。在本发明的还有的进一步的实施方式中,载体或载体序列包括一个或更多个侧翼元件,例如一个或更多个AAV反向末端重复序列(ITR)。在本发明的进一步的方面,报告转基因定位在一个或更多个侧翼元件之间,例如一个或更多个5'和/或3' AAV ITR。

[0020] 在本发明的更具体的实施方式中,载体或载体序列包括AAV的第一反向末端重复(ITR);可在哺乳动物细胞中操作的启动子;报告转基因;多腺苷酸化信号和任选的AAV的第二ITR。在本发明的具体方面,重组载体或载体序列包括限制位点,以允许在可在哺乳动物细胞中操作的启动子下游插入报告转基因,以及在限制位点下游插入转录后调控元件。在本发明的进一步的具体方面,重组载体或载体序列包括限制位点,以允许在可在哺乳动物细胞中操作的启动子下游插入报告转基因,以及在限制位点下游插入转录后调控元件。在具体的方面,所述启动子、所述限制位点和所述转录后调控元件均位于5' AAV ITR的下游和任选的3' AAV ITR的上游。

[0021] 在本发明的更具体的方面,一个或更多个侧翼元件是未经AAV Rep蛋白质处理的突变的或变异的AAV ITR。在本发明的其他的更具体的方面,一个或更多个侧翼元件是突变的或变异的AAV ITR,其允许或促进在感染性重组AAV颗粒中自身互补的报告转基因基因组形成双链反向重复序列结构。在本发明的进一步的更具体的方面,一个或更多个侧翼元件是突变的或变异的AAV ITR,其具有删除的D序列和/或删除的末端解离位点(TRS)序列(例如,突变的或变异的AAV ITR被定位在报告转基因的自身互补序列之间)。在本发明的还有的进一步的更具体的方面,突变的或变异的AAV ITR包括AAV2ITR,该AAV2ITR具有对应于所突变的、修饰的、改变的或删除的AAV2基因组序列的核苷酸122-144的一个或更多个核苷酸。

[0022] 在本发明的进一步的具体实施方式中,感染性重组AAV颗粒包括感染灵长类动物的AAV血清型。在具体的方面,感染性重组AAV颗粒包括感染人类或猕猴的AAV血清型。在多个具体的方面,感染性重组AAV颗粒包括与AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、

AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体的VP1、VP2或VP3序列具有90%或更高同一性的VP1、VP2或VP3序列。在进一步的多个具体方面,感染性重组AAV颗粒包括AAV血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、Rh74或Rh10,或任何前述AAV血清型的杂合体或嵌合体。

[0023] 在本发明的多个实施方式中,生物样品包括灵长类动物的样品。这样的样品包括但不限于血清、血浆或血液,例如人血清、人血浆或人血。

[0024] 在本发明进一步的实施方式中,生物样品是或已经热灭活的。在具体的方面,生物样品是或已经在约50-70摄氏度热灭活约15分钟至多达1小时,或者是或已经在约56摄氏度热灭活约30分钟。

[0025] 在本发明的还有的进一步的实施方式中,生物样品在与感染性重组AAV颗粒接触或孵育之前被稀释。在具体的方面,分析、测量或检测多个生物样品的稀释液。在进一步具体的方面,分析、测量或检测多个不同稀释比的生物样品。在更具体的方面,将生物样品在与感染性重组AAV颗粒接触或孵育之前稀释为1:1至1:500;或将生物样品在与感染性重组AAV颗粒接触或孵育之前稀释为1:500至1:5000。在另外的具体方面,分析、测量或检测至少2、3、4、5或6个不同稀释比的生物样品。

[0026] 在本发明的多个实施方式中,受试者(例如,用于病毒载体例如AAV载体介导的基因治疗的候选者)受试者是哺乳动物(例如,灵长类动物)。在具体方面,受试者是人。

[0027] 在本发明的多个实施方式中,受试者患有由于蛋白质的表达或活性不足引起的病症,或患有由于不正常、异常或不期望有的蛋白质的表达或活性引起的病症。

[0028] 在本发明的进一步的多个实施方式中,受试者患有遗传性疾病。在本发明的另外的多个实施方式中,受试者是基因替代或补充疗法例如基因剔除或敲除疗法的候选者。在本发明的更具体的实施方式中,受试者患有肺疾病(例如,囊性纤维化)、出血性疾病(例如,血友病A或血友病B,其具有或无抑制剂)、地中海贫血、血液紊乱(例如,贫血)、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、癫痫症、溶酶体贮积病、铜或铁累积病(例如,威尔森氏或门克斯病)、溶酶体酸性脂肪酶缺乏症、神经或神经变性疾病、癌症、1型或2型糖尿病、高雪氏病、胡尔勒氏病、腺苷脱氨酶缺乏症、代谢缺陷(例如,糖原贮积病)、视网膜变性疾病(例如RPE65缺乏症、无脉络膜和眼睛的其他疾病)、实体器官(例如,脑、肝、肾、心脏)的疾病或感染性病毒(例如,乙型肝炎和丙型肝炎、HIV等)、细菌或真菌病。

[0029] 在本发明的多个进一步的实施方式中,测定/计算生物样品中结合AAV的抗体的量。在一个实施方式中,基于(f)的报告转基因表达对比阴性(-)对照计算抗体。在另一个实施方式中,基于(f)的报告转基因表达对比AAV抗体对照的预定量计算抗体。

[0030] 在本发明的还有的进一步的实施方式中,将抗体的量输入到与受试者(生物样品从其获得)相关的数据库或报告中。输入从而产生与受试者相关的数据库输入或报告。

## 附图说明

[0031] 图1A示出了作为细胞传代数的函数的萤光素酶报告基因最大信号。利用5.0b版本的GraphPad Prism进行统计学分析。线性回归:R<sup>2</sup>曲线0.1509,P<0.0001,曲线的斜率显著非零。通过对比传代1-12次与传代13-25次的细胞得到的最大信号(RLU)平均值进行其他的统计学分析。为此目的,使用双尾非配对t检验。平均值±平均值的标准误差:传代1-12次,

17921+/-1181, n=53; 传代13-25次, 11427+/-903, n=45, P<0.0001。

[0032] 图1B示出了作为细胞传代数的函数的萤光素酶报告基因的背景信号。利用5.0b版本的GraphPad Prism进行统计学分析。线性回归: R<sup>2</sup>曲线0.04720, p=0.0308, 曲线的斜率显著非零。通过对比传代1-12次与传代13-25的细胞得到的背景信号(RLU)平均值进行其他的统计学分析。为此目的, 使用双尾非配对t检验。平均值+/-平均值的标准误差: 传代1-12次, 320+/-24, n=54; 传代13-25次, 252+/-27, n=45, p=0.0651。

[0033] 图2示出了操作1和2的人血清样品的平均NA<sub>b</sub>滴度。误差线显示±标准偏差。

[0034] 图3示出了具有突变TRS序列的AAV2 ITR的结构: 指示为“CGGTTG”。RBS: Rep结合序列; Flop/Flip: ITR(类似于+/-株)。

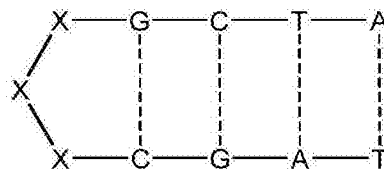
[0035] 图4示出了含有萤光素酶报告转基因的通用质粒构建体结构。CBA: 鸡β-肌动蛋白质启动子; pA: 多腺苷酸化。

### 具体实施方式

[0036] 本发明至少部分基于用于筛选用于检测、分析和测定病毒抗体或中和抗体的量的灵敏分析。因此, 本发明提供了载体、病毒载体和颗粒以及筛选用于检测、分析和测定例如样品中的病毒抗体或中和抗体的量的方法和用途。

[0037] 如本文所述, 载体序列、载体(例如, 病毒载体)和颗粒提供了筛选用于检测、分析和测定病毒抗体或中和抗体的量的方法。本发明的载体序列、载体(例如, 病毒载体)和颗粒以及筛选用于检测、分析和测定病毒抗体的量的方法和用途使用报告转基因(转基因提供可检测的信号), 该转基因包括单链或自身互补的基因组。自身互补的转基因基因组当包装到病毒颗粒(病毒载体)内时或在病毒载体细胞转导和在转导细胞内进行病毒脱壳时变为双链的或是双链二聚体。

[0038] 当参照多核苷酸或核酸分子例如转基因使用时, 术语“互补的”或“补充的”是指使得通过碱基配对使一个单链序列确实或能够“特异性杂交”或结合(退火)到另一个单链序列以形成双链或双链体分子的多个化学碱基。两个单链序列彼此特异性杂交或结合(退火)并形成双链(或双链体)分子的能力是借助于一条链(例如, 有义)上的碱基的官能团, 这将使氢与相反的核酸链(例如, 反义)上的另一个碱基键合。能彼此结合的互补碱基通常在DNA中为A与T以及C与G, 并且在RNA中为C与G以及U与A。因此, 自身互补的序列的示例可以是ATCGXXXCGAT, X代表非互补碱基, 并且具有未杂交的X碱基的这样的双链或双链体分子的结构将表现为:



[0039] 当参照多核苷酸或核酸分子例如转基因使用时, 术语“互补的”和“补充的”因此旨在描述其中双链或双链体多核苷酸或核酸分子形式的物理状态, 或简单地描述两个多核苷酸或核酸分子之间的使得每个单链分子可彼此形成双链的序列关系。“互补的”和“补充的”因此是指每条多核苷酸或核酸分子链的碱基的关系, 而不是两条链必须在双链中彼此作为双链(或双链体)构型或物理状态存在。

[0040] 通常,对于包装单链核酸的病毒载体例如AAV而言,反向末端重复(ITR)序列参与复制并形成发夹环,这有助于使自身引发允许起始并合成第二DNA链。合成第二DNA链之后,AAV ITR具有所谓的末端解离位点(TRS),使得发夹环裂解成两条单链,各自具有用于病毒包装的5'和3'末端重复。

[0041] 在至少一个ITR中使用删除的、突变的、修饰的或无功能的TRS导致形成在TRS处未切割的双链的双链体。在自身互补的报告转基因双链的双链体结构的实施方式中,通常具有位于两条互补链之间的删除的、突变的或变异的TRS的ITR。非裂解的或不溶解的TRS允许形成自身互补的报告转基因的双链的双链体结构,因为双链形式不裂解。具有删除的、突变的或变异的TRS的不溶解的ITR或可溶解的ITR可适用于病毒包装。可溶解的AAV ITR不必是野生型ITR序列,只要ITR介导所需的功能(例如病毒包装或整合)即可。

[0042] 可以删除的、突变的、修饰的或改变的多种AAV血清型的ITR和TRS序列包括本文阐述的或本领域技术人员将已知的任何AAV血清型。例如,多种AAV血清型的ITR和TRS序列包括例如AAV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-rh74、-rh10或AAV-2i8。对于AAV2而言,代表性的突变TRS序列是:“CGGTTG”。

[0043] 对于具有视为转基因外的自身互补报告转基因序列的载体或载体序列而言,例如一个或多个ITR、表达或调控序列、下游序列等,报告转基因外的载体序列的这样的序列可以但不必是自身互补的。因此,自身互补可用在特定的情形中,例如,参照转基因,例如报告转基因,使得仅转基因例如报告转基因是自身互补的,而其他的非转基因序列可以是或可以不是自身互补的。

[0044] 对于自身互补的转基因而言,不是单链中所有碱基必须与相对的互补链的每个碱基互补。仅需要足够数量的互补核苷酸或核苷碱基能使两个多核苷酸或核酸分子能够彼此特异性杂交或结合(退火)。因此,自身互补的多核苷酸或核酸分子之间可能是短序列片段或非互补的碱基区域。例如,1-5、5-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-75、75-100或100-150或更多个连续或不连续的非互补碱基可以存在但是可以有两个序列长度上的足够的互补碱基,使得两个多核苷酸或核酸分子能够彼此特异性杂交或结合(退火)并形成双链(或双链体)序列。因此,两个单链区域的序列的彼此互补性可以小于100%,但仍能够形成双链的双链体分子。在具体的实施方式中,两个单链序列彼此具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或更高的互补性。

[0045] 自身互补的多核苷酸或核酸分子之间的非互补的碱基的这样的片段或区域可以是内部的序列,使得当两个单链分子的互补部分形成双链或双链体时,非互补碱基形成环或凸起构型,并且整体结构类似于发夹。自身互补的多核苷酸或核酸分子之间的非互补碱基的这样的片段或区域也可以是互补区域的侧翼,在这种情形下,5'或3'侧翼区域中任一个或两个不可形成双链的双链体。

[0046] 形成双链或双链体序列的自身互补的转基因的表达通常比单链转基因对应物的更快(开始更迅速)。因此,这样的表达可以通过测量随时间推移例如在指定的时间点(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、12-16、16-20、20-24小时,例如)的表达来检测。此外,双链自身互补转基因的表达量通常比单链报告转基因对应物的大。因此,这样的表达可以通过在表达将被认为接近或是最大时的某个时间点测量来检测。因此,双链自身互补转基因构型提高检测灵敏度并且可以提高病毒抗体定量测定的准确度,尤其是对于感染特定细胞

类型的效率较低的病毒,即,具有相对低的细胞感染率或向性率的病毒。

[0047] 如本文所用的“载体”可以指病毒颗粒,例如细小病毒(例如,AAV),其可用于将核酸(例如,报告转基因)递送到细胞内,并且其中载体包括包装到病毒体内或通过病毒蛋白质(包膜蛋白质或衣壳蛋白质,例如AAV衣壳)衣壳化的核酸(例如,报告转基因)。或者,术语“载体”可用于在更有限的上下文中,是指载体序列或核酸。因此,如本文所用的载体可用于指包括核酸(例如,报告转基因)的病毒颗粒,或仅指核酸或序列,其序列可被称为“载体序列”等等。

[0048] 病毒载体衍生自或基于包括病毒基因组的一个或更多个核酸元件。特别的病毒载体包括细小病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。

[0049] 在具体的实施方式中,重组载体(例如,AAV)是细小病毒载体。细小病毒是具有单链DNA基因组的小病毒。“腺相关病毒”(AAV)是细小病毒家族。

[0050] 如本文所用的术语“重组”,作为载体例如病毒载体的修饰剂,以及序列例如重组多核苷酸和多肽的修饰剂,意指组合物(例如,AAV或序列)已经被以自然界中通常不存在的方式操纵(即,改造)。重组载体序列的具体示例(例如AAV载体)将是其中通常不存在于野生型病毒(例如,AAV)基因组中的多核苷酸被插入到病毒基因组内。例如,重组载体的示例将是其中异源多核苷酸(例如,转基因)被克隆到载体序列内,具有或没有5'、3'和/或所述基因通常与载体例如病毒(例如,AAV)载体基因组相关的内含子区。虽然术语“重组”在本文中不总是参照病毒载体例如AAV载体和载体序列以及多核苷酸和多肽使用,但是明确地包括病毒载体例如AAV、载体序列以及多核苷酸和多肽的重组形式,尽管有任何这些的省略。

[0051] 重组“载体”或“AAV载体”可以通过使用分子方法从病毒(例如AAV)序列去除野生型基因组,并用非天然核酸例如报告转基因替换而衍生自野生型病毒(例如AAV)基因组。通常,对于AAV而言,野生型AAV基因组的一个或两个反向末端重复(ITR)序列保留在AAV载体中。重组病毒载体(例如,AAV)与病毒(例如,AAV)基因组不同,因为相对于病毒(例如,AAV)核酸例如报告转基因而言,所有或一部分病毒基因组序列已被非天然序列替换。非天然序列例如报告转基因的导入因此将病毒载体(例如,AAV)定义为“重组”载体,在AAV的情形下,其可以称为“rAAV载体”。

[0052] 重组载体“基因组”(例如,病毒或AAV载体基因组)可以被衣壳化或包装到病毒(本文中也称为“颗粒”或“病毒体”)内用于随后离体、体外或体内感染(转导或转化)细胞。当重组AAV载体基因组被衣壳化或包装到AAV颗粒内时,该颗粒可以被称为“rAAV”。这样的颗粒或病毒体将通常包括衣壳化或包装载体基因组的蛋白质。具体的示例包括病毒衣壳和包膜蛋白质,以及在AAV的情形下,包括AAV衣壳蛋白质。

[0053] 对于重组质粒而言,载体“基因组”是指最终包装或衣壳化以形成病毒颗粒的重组质粒序列的一部分。在重组质粒被用于构建或制造重组载体的情形下,载体基因组不包括不对应于重组质粒的载体基因组序列的“质粒”的一部分。重组质粒的该非载体基因组部分被称为“质粒骨架”,其对于质粒的克隆和扩增、传代和重组病毒产生所需的过程是重要的,但本身不包装或衣壳化进入病毒(例如,AAV)颗粒。

[0054] 因此,载体“基因组”是指由病毒(例如,AAV)包装或衣壳化的载体质粒的一部分,并且其含有异源(转基因)多核苷酸序列。重组质粒的非载体基因组部分包括对于质粒的克隆和扩增是重要的骨架,但是骨架本身不被病毒(例如,AAV)包装或衣壳化。

[0055] 通过插入或导入多核苷酸操纵重组载体序列。如本文所公开的,载体序列或质粒通常包括用于细胞传代的至少复制起点和一个或更多个表达调控元件。

[0056] 重组载体(例如AAV)、载体序列或质粒以及其方法和用途包括任何病毒株或血清型。作为非限制性示例,重组载体(例如,AAV)质粒可基于任何AAV基因组,例如AAV-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-rh74、-rh10或AAV-2i8,例如。这样的载体可基于相同的菌株或血清型(或亚组或变体),或者彼此不同。作为非限制性示例,基于一种血清型基因组的重组载体(例如,AAV)质粒可以与包装载体的一种或更多种衣壳蛋白质相同。此外,重组载体(例如,AAV)质粒可以基于与包装载体的一种或更多种衣壳蛋白质不同的AAV(例如AAV2)血清型基因组。因此,仅通过举例说明的方式而言,rAAV-2载体质粒可具有来自AAV-2或任何其他AAV衣壳(例如AAV-1、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-rh74、-rh10或AAV-2i8衣壳,例如)的三种衣壳蛋白质中的至少一种(或更多种)。

[0057] 如本文所公开的,载体被用于利用报告转基因转导靶细胞,该转基因随后转录并任意地翻译,从而提供可检测的信号,以检测或测量转基因表达。信号的量与细胞转导和随后的表达效率成比例。结合包装或衣壳化报告转基因的载体蛋白质的抗体将抑制转基因转导和随后的表达。因此,可确认检测、测量和分析结合载体蛋白质例如病毒(例如,AAV)载体蛋白质的抗体的存在。

[0058] 在本文所述的测定法中,抗体的检测、测量和分析将通过包装或衣壳化报告转基因的包膜或衣壳蛋白质的标识来测定。因此,如果希望检测AAV-2抗体,那么报告转基因应被一种或更多种AAV-2衣壳蛋白质衣壳化。如果希望检测AAV-7抗体,那么报告转基因应被一种或更多种AAV-7衣壳蛋白质衣壳化。如果希望检测AAV-8抗体,那么报告转基因应被一种或更多种AAV-8衣壳蛋白质衣壳化。如果存在抗体,那么抗体结合使报告转基因衣壳化的包膜或衣壳蛋白质,从而降低细胞转导和随后的报告转基因表达。结合包膜或衣壳蛋白质的抗体的量越大,细胞的载体转导和随后的报告转基因表达越少。

[0059] 根据传统的定义,血清型意指已测试感兴趣的病毒对用于中和活性的所有现有和特征化的血清型的血清特异性并且已发现无抗体中和感兴趣的病毒。随着越来越多的天然存在的病毒分离物的发现和/或衣壳突变体的产生,可能与任何目前现有的血清型有或无血清学差异。因此,在新病毒(例如,AAV)无血清学差异的情形下,这种新病毒(例如,AAV)将是相应的血清型的亚组或变体。在许多情形下,测试中和活性的血清学也不得不在具有衣壳序列修饰的突变病毒上进行以根据血清型的传统定义确定它们是否是另一种血清型。因此,为方便起见并为了避免重复,术语“血清型”广泛地是指血清学差异的病毒(例如,AAV)以及血清学无差异的可以是给定血清型的亚组或变体内的病毒(例如,AAV)。

[0060] 包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、Rh10、Rh74或AAV-2i8的重组载体(例如,AAV)和载体序列可以使用技术人员已知的重组技术构建,以包括侧翼为一个或更多个功能性AAV ITR序列的一个或更多个异源多核苷酸序列(转基因)。这样的载体可具有一个或更多个全部或部分删除的野生型AAV基因,例如,rep和/或cap基因,但保留至少一个功能性侧翼ITR序列(例如AAV2或任何其他AAV血清型ITR),这是将重组载体拯救、复制和包装到AAV载体颗粒中所必需的。因此,AAV载体基因组将包括顺式复制和包装所需的序列(例如功能性ITR序列)。

[0061] 术语“转基因”、“序列”、“多核苷酸”和“核酸”在本文可互换使用,是指所有形式的

核酸、寡核苷酸,包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。转基因包括基因组DNA、cDNA和反义DNA,剪接的或未剪接的。转基因包括天然存在的、合成的和有意改变或修饰的多核苷酸以及类似物和衍生物。转基因通常是单链或双链的、线性或环状的,并且可以是任何长度。在讨论转基因时,特定的多核苷酸的序列或结构可根据提供的5'至3'方向的序列的惯例在本文中进行描述。

[0062] “异源”转基因、序列或多核苷酸是指为了将多核苷酸经载体介导转移/递送到细胞中的目的而插入到载体(例如,AAV)中的多核苷酸。异源转基因、序列或多核苷酸通常与载体(例如,AAV)核酸不同,即相对于病毒(例如,AAV)核酸序列而言是非天然的。一旦被转移/递送到细胞中,那么包含在病毒体内的异源转基因、序列或多核苷酸可以表达(例如,转录,并且翻译,如果合适的话)。或者,包含在病毒体中的在细胞中的转移/递送的异源转基因、序列或多核苷酸不需要表达。虽然术语“异源”在本文中并不总是参照转基因、序列或者多核苷酸使用,但参照转基因、序列或者多核苷酸甚至在没有修饰词“异源”的情形下也旨在包括异源转基因、序列和多核苷酸,尽管已省略。

[0063] 术语“转基因”在本文中用于方便地指已被导入细胞或生物体中的异源多核苷酸。转基因包括任何多核苷酸,例如转录成多核苷酸的基因,或者通常通过中间转录物的方式编码多肽或蛋白质的基因。

[0064] 如本文所用的,“报告”转基因是提供可检测信号的基因。该信号可以通过转基因本身、转基因的转录物或由转基因编码的蛋白质来提供。报告转基因的具体的非限制性示例包括编码萤光素酶蛋白质的萤光素酶基因等等。

[0065] 通过“转基因”或“多核苷酸序列”编码的“多肽”、“蛋白质”和“肽”包括全长天然序列和天然存在的蛋白质以及功能性子序列、修饰形式或序列变体,只要子序列、修饰形式或变体保留天然全长蛋白质的一定程度的功能性即可。在本发明的方法和用途中,由转基因或多核苷酸序列编码的这样的多肽、蛋白质和肽可以但不需要与野生型蛋白质相同。

[0066] 包括本文公开的非限制性报告转基因和编码蛋白质的所有哺乳动物和非哺乳动物形式的转基因、序列和多核苷酸均明确被包括,无论是已知的或未知的。因此,本发明包括来自非哺乳动物、除人类以外的哺乳动物和人类的报告转基因和蛋白质,其中报告转基因和蛋白质可在转导或转移之后在细胞中检测,如本文所述。

[0067] 在具有转基因的细胞中,所述转基因已通过载体例如病毒载体(例如,AAV)导入/转移。这一过程被称为细胞的“转导”或“转化”或“转染”。术语“转导”、“转化”和“转染”是指将分子例如转基因导入细胞。

[0068] 其中已经导入转基因的细胞被称为“转化的细胞”或“转化体”。因此,“转导的”、“转化的”或“转染的”细胞(例如,在哺乳动物中,例如细胞或者组织或器官的细胞),意指在将外源分子例如多核苷酸或蛋白质(例如,转基因)导入细胞中之后细胞的遗传改变。因此,“转导的”、“转染的”或“转化的”细胞是其中或其后代中已经导入外源分子的细胞,例如。可以传代一种或更多种细胞并且所导入的转基因被转录和/或蛋白质被表达。

[0069] 所导入的转基因可以或不整合到受体细胞的核酸中。如果所导入的转基因被整合到受体细胞或生物体的核酸(基因组DNA)中,则其可以稳定地保持在该细胞或生物体中,并且进一步传递到或遗传给受体细胞或生物体的后代细胞或生物体。最后,所导入的转基因可以仅短暂地存在于受体细胞或宿主生物体中。

[0070] 可以是用于利用含转基因的载体(例如,病毒载体)转导的靶标的细胞可以是易感染载体的任何细胞。这样的细胞可具有低、中或高比率的易感性。因此,靶细胞包括任何组织或器官类型的、任何来源(例如,中胚层、外胚层或内胚层)的细胞。细胞的具体非限制性示例包括肝(例如,肝细胞、肝窦内皮细胞),胰腺(例如, $\beta$ 胰岛细胞),肺,中枢或外周神经系统,例如脑(例如,神经、神经胶质或室管膜细胞)或脊柱,肾(HEK-293细胞),眼睛(例如,视网膜、细胞成分),脾,皮肤,胸腺,睾丸,肺,隔膜,心脏(心肌),肌肉或腰肌,或内脏(例如,内分泌),脂肪组织(白色、褐色或米色),肌肉(例如,成纤维细胞),滑膜细胞,软骨细胞,破骨细胞,上皮细胞,内皮细胞,唾液腺细胞,内耳神经细胞或造血(例如,血液或淋巴)细胞。其他的示例包括干细胞,例如亚全能或多能祖细胞,其发育或分化到肝脏(例如,肝细胞、肝窦内皮细胞),胰腺(例如, $\beta$ 胰岛细胞),肺,中枢或外周神经系统,例如脑(例如,神经、神经胶质或室管膜细胞)或脊柱,肾,眼睛(视网膜、细胞成分),脾,皮肤,胸腺,睾丸,肺,膈肌,心脏(心肌),肌肉或腰肌,或内脏(例如内分泌),脂肪组织(白色、褐色或米色),肌肉(例如,成纤维细胞),滑膜细胞,软骨细胞,破骨细胞,上皮细胞,内皮细胞,唾液腺细胞,内耳神经细胞或造血(例如,血液或淋巴)细胞。

[0071] 病毒载体例如AAV载体和载体序列可包括一个或多个“表达调控元件”或“调控元件”。通常,表达调控或调控元件是影响可操作地连接的多核苷酸的表达的一个或多个核酸序列。存在于载体内的包括如本文所述的表达调控和调控元件(例如启动子和增强子)的调控元件被包括以促进适当的异源多核苷酸(转基因)转录以及(如果适当的话)翻译(例如,启动子、增强子、内含子的剪接信号,维持基因的正确阅读框,以允许框内翻译mRNA以及,终止密码子等)。这些元件通常以顺式起作用,但也可用作反式。

[0072] 表达调控可以在转录、翻译、剪接、信息稳定性等的水平下实施。通常,调节转录的表达调控元件邻近转录的多核苷酸的5'端(即“上游”)。表达调控元件也可位于转录序列的3'端(即“下游”)或转录物内(例如,在内含子内)。表达调控元件可位于远离转录序列的一定距离上(例如,来自多核苷酸的100至500、500至1000、2000至5000、5000至10000或多个核苷酸),甚至在相当大的距离。然而,由于多核苷酸长度的限制,对于AAV载体而言,这样的表达调控元件将通常为多核苷酸的1至1000个核苷酸。

[0073] 功能上,可操作地连接的异源多核苷酸(转基因)的表达至少部分地由元件(例如,启动子)调控,使得所述元件调节多核苷酸的转录并且在适当时调节翻译转录物。表达调控元件的一个具体示例是启动子,其通常位于转录序列的5'处。表达调控元件的另一个示例是增强子,其可以位于转录序列的5'、3'处,或在转录序列内。

[0074] 如本文所用的“启动子”可以指邻近转基因定位的DNA序列。启动子通常可操作地连接在相邻序列例如异源多核苷酸(转基因)上。与不存在启动子时表达的量相比较而言,启动子通常增加异源多核苷酸(转基因)的表达量。

[0075] 如本文所用的“增强子”可以指邻近异源多核苷酸(转基因)定位的序列。增强子元件通常位于启动子元件的上游,但也起作用,并且可以位于DNA序列(例如,转基因)的下游或其内。因此,增强子元件可以位于异源多核苷酸(转基因)的上游或下游的100个碱基对、200个碱基对或300个或更多个碱基对。增强子元件通常增加异源多核苷酸(转基因)的表达,大于启动子元件提供的表达增加。

[0076] 表达调控元件(例如,启动子)包括在特定组织或细胞类型中具有活性的那些,在

本文中称为“组织特异性表达调控元件/启动子”。组织特异性表达调控元件通常在特定的细胞或组织(例如,肝、脑、中枢神经系统、脊髓、眼睛、视网膜、骨骼、肌肉、肺、胰、心脏、肾脏细胞等)中具有活性。表达调控元件通常在这些细胞、组织或器官中具有活性,因为它们由转录激活蛋白或特定细胞、组织或器官类型所特有的其他转录调节剂识别。

[0077] 表达调控元件还包括普遍存在的或混杂的启动子/增强子,其能够驱动多核苷酸在许多不同的细胞类型中的表达。这样的元件包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子/增强子序列、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子/增强子序列和在多种哺乳动物细胞类型中具有活性的其他病毒启动子/增强子或自然界中不存在的合成元件(参见例如Boshart等人, *Cell*, 41:521-530(1985))、SV40启动子,二氢叶酸还原酶(DHFR)启动子、鸡 $\beta$ 肌动蛋白(CBA)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子和延伸因子1 $\alpha$ (EF1- $\alpha$ )启动子。

[0078] 表达调控元件还可以赋予可调节的方式的表达,即,信号或刺激增加或减少可操作地连接的异源多核苷酸(转基因)的表达。响应于信号或刺激而增加可操作地连接的多核苷酸的表达的调控元件也称为“诱导型元件”(即,被信号诱导)。具体的示例包括但不限于激素(例如,类固醇)诱导型启动子。响应于信号或刺激而降低可操作地连接的多核苷酸的表达的可调节元件被称为“阻遏元件”(即,信号降低表达,使得当信号被去除或不存在时表达增加)。通常,由这样的元件赋予的增加或减少的量与存在的信号或刺激的量成比例;信号或刺激的量越大,表达的增加或减少越大。具体的非限制性示例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子;类固醇激素诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子;T7聚合酶启动子系统(W098/10088);四环素阻遏系统(Gossen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551(1992));四环素诱导系统(Gossen, et al., *Science*. 268:1766-1769(1995));还参见Harvey, et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:512-518(1998));RU486诱导系统(Wang, et al., *Nat. Biotech.* 15:239-243(1997)以及Wang, et al., *Gene Ther.* 4:432-441(1997));以及雷帕霉素诱导系统(Magari, et al., *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872(1997);Rivera, et al., *Nat. Medicine.* 2:1028-1032(1996))。在此情形下可以是有用的其他可调节的调控元件是由特定的生理状态例如温度、急性期调节的那些。

[0079] 表达调控元件还包括用于异源多核苷酸(转基因)的一个或更多个天然元件。当希望异源多核苷酸的表达应模拟天然表达时可以使用天然调控元件(例如,启动子)。当异源多核苷酸的表达是暂时或发展式调节的,或以组织特异性的方式,或响应于特定转录刺激时可以使用天然元件。其他天然的表达调控元件,例如内含子、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列,也可以使用。

[0080] 如本文所用的,术语“可操作的连接”或“可操作地连接”是指部件被如此描述以允许它们以所希望的方式发挥功能的物理上或功能上的并置。在可操作地连接转基因的表达调控元件的示例中,该关系使得调控元件调节转基因的表达。更具体地,例如,两个DNA序列可操作地连接意指以使至少一个DNA序列能在另一个序列上发挥生理作用的这样的关系布置(顺式或反式)两个DNA。

[0081] 如本文所公开的,包括病毒载体例如AAV和载体序列的载体还可包括另外的核酸元件。这些元件包括但不限于一个或更多个拷贝的AAV ITR序列、启动子/增强子元件、转录终止信号、5'或3'非翻译区(例如,多腺苷酸化序列),其侧翼为转基因或者全部或部分内含子I。这样的元件还任选地包括转录终止信号。转录终止信号的具体非限制性示例是SV40转

录终止信号。

[0082] 如本文所用的术语“侧翼”，参照载体或载体序列例如转基因的元件，意指所参照的元件位于5'或3'。因此，在表达调控元件为转基因的侧翼时，所述调控元件位于转基因的5'或3'。术语“侧翼”不排除它们之间的中间序列。例如，可以有转基因和调控元件之间的插入序列，例如，限制位点。该限制位点可以是转基因和调控元件之间的插入序列。因此，作为元件的“侧翼”的序列表示一个元件位于序列的5'或3'但可以是插入序列，使得所述侧翼序列不紧邻其从侧翼包围的序列。

[0083] 如本文所公开的，AAV载体通常接受具有定义的大小范围的DNA插入物，通常为约4kb至约5.2kb，或略多。因此，当报告转基因是单链基因组或是自身互补的时，该转基因的大小将为小于约4kb至约5.2kb。

[0084] 对于较短的载体序列而言，将堵塞物或填充物导入插入片段以调节长度至接近或为用于将AAV载体包装到病毒颗粒内可接受的病毒基因组序列的正常大小。在多个实施方式中，填充物/堵塞物核酸序列是核酸的非翻译(非蛋白质编码)片段。在AAV载体的具体实施方式中，异源多核苷酸序列的长度小于4.7Kb并且填充物或堵塞物多核苷酸序列具有当合并转基因序列时(例如，插入载体中)有介于约3.0-5.5Kb，或约4.0-5.0Kb，或约4.3-4.8Kb的总长度的长度。

[0085] 包括修饰形式的多核苷酸和多肽可以使用多种标准克隆、重组DNA技术，通过细胞表达或体外翻译和化学合成技术制得。多核苷酸的纯度可通过测序、凝胶电泳等来测定。例如，核酸可以通过使用杂交或基于计算机的数据库筛选技术进行分离。这样的技术包括但不限于：(1)使基因组DNA或cDNA文库与探针杂交以检测同源核苷酸序列；(2)抗体筛选以检测具有共享的结构特征的多肽，例如，使用表达文库进行；(3)使用能对感兴趣的核酸序列退火的引物对基因组DNA或cDNA进行聚合酶链式反应(PCR)；(4)对相关序列进行序列数据库的计算机检索；和(5)差别筛选消减核酸文库。

[0086] 包括修饰形式的多核苷酸和多肽也可以由技术人员通过化学合成方法使用例如自动合成装置来制备(参见例如，Applied Biosystems, Foster City, CA)。使用化学方法可以整体或部分地合成肽(参见例如，Caruthers(1980). *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215; Horn(1980); 以及Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems(1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA)。可以使用各种固相技术进行肽合成(参见例如Roberge *Science* 269:202(1995); Merrifield, *Methods Enzymol.* 289:3(1997))并且可以实现自动合成，例如，按照制造商的说明使用ABI 431A肽合成仪(Perkin Elmer)实现。

[0087] 当用作组分(例如，载体)的修饰剂时，术语“分离的”意指该组分是通过人工制得或者从它们的天然存在的体内环境完全或至少部分地分离出的。通常，分离的组分基本上不含在自然界中通常与它们相关的一种或更多种物质，例如，一种或更多种蛋白质、核酸、脂质、碳水化合物、细胞膜。术语“分离的”不排除通过人工产生的组合，例如，包装或衣壳化载体基因组的重组病毒载体(例如，AAV)、载体序列或病毒颗粒(例如，AAV)和药物制剂。术语“分离的”也不排除可替代的物理形式的组分，例如杂合体/嵌合体、多聚体/低聚物、修饰(例如，磷酸化、糖基化、脂化)或衍生化形式，或者通过人工产生的在宿主细胞中表达的形式。

[0088] 含有重组载体、载体序列、颗粒等的报告转基因允许用于分析或检测(测量/量化)结合病毒抗原的抗体,例如包膜或衣壳蛋白,包括AAV衣壳。根据本发明,提供了用于分析或检测(测量/量化)结合病毒抗原的抗体的方法。在一个实施方式中,方法包括提供使重组载体衣壳化的感染性重组病毒颗粒,其中(i)所述载体包括报告转基因,(ii)所述报告转基因是单链或自身互补的基因组,以及(iii)所述报告转基因可操作地连接在一个或多个表达调控元件上并且侧翼为一个或多个侧翼元件;提供来自受试者的生物样品,用于分析或检测结合病毒的抗体;提供可感染所述感染性病毒颗粒的细胞;使感染性重组病毒颗粒与生物样品接触或孵育从而产生所得混合物;在其中感染性重组病毒颗粒可感染并表达细胞中的报告转基因的条件下,使可感染的细胞与所得混合物接触;并测量报告转基因的表达。将混合物的报告转基因的表达与阴性(-)对照的报告转基因的进行比较,其中所述(-)对照或者(i)缺乏结合感染性病毒的抗体,或(ii)具有预定量的结合感染性病毒的抗体。如果所述混合物的报告转基因表达大于所述(-)对照的,那么这测定或检测到生物样品中结合病毒的抗体的存在。

[0089] 在具体的方面,所分析或检测的抗体结合AAV颗粒,和/或感染性重组病毒颗粒包括一种或更多种AAV衣壳蛋白和/或重组载体包括病毒载体,例如AAV载体,任选地与一种或更多种AAV ITR。

[0090] 术语“受试者”是指动物,通常是哺乳动物,例如人类、非人类灵长类(猿、长臂猿、大猩猩、黑猩猩、猩猩、猕猴)、驯养动物(狗和猫)、农场动物(家禽,例如鸡、鸭、马、牛、山羊、绵羊、猪)和实验动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠)。人类受试者包括胎儿、新生儿、婴儿、青少年和成年受试者。

[0091] 本发明提供了包含包装材料和其中的一种或更多种组分的试剂盒。试剂盒通常包括标签或包装插页,其包括组分的描述或和其中的组分的体外、体内或离体使用的说明。试剂盒可包含这样的组分例如载体(例如AAV)、载体序列、基因组或病毒颗粒或组合物的集合。

[0092] 试剂盒是指容纳试剂盒的一种或更多种组分的物理结构。包装材料可保持组分无菌,并且可以由通常用于这样的目的的材料(例如,纸、波纹纤维、玻璃、塑料、箔、安瓿、小瓶、管等)制成。

[0093] 标签或插页可包括识别其中一种或更多种组分,剂量,活性成分的临床药理学的信息,其包括作用机制、药动学和药效学。标签或插页可包括识别生产厂家、批号、生产地点和日期、有效期的信息。标签或插页可包括标识生产厂家的信息、批号、生产地点和日期的信息。标签或插页可包括临床医生或受试者使用方法或用途中的一种或更多种试剂盒组分的说明。说明书可包括用于实施本文所述的任何方法和用途的说明。

[0094] 标签或插页包括“印刷品”,例如纸或纸板,或单独的或固定在组分、试剂盒或包装材料(例如,箱)上或连接到含试剂盒组分的安瓿、管或小瓶。标签或插页可另外包括计算机可读介质,例如条形码打印的标签,磁盘,光盘例如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD,MP3,磁带或电存储介质,例如RAM和ROM或这些的杂合体,例如磁/光存储介质,FLASH介质或记忆型卡。

[0095] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语与本发明所属本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管类似于或等同于本文所述的方法和材料可用于实施或测试本发明,但是合适的方法和材料如本文所述。

[0096] 本文所引用的所有申请、出版物、专利和其他参考文献、GenBank引文和ATCC引文均通过引用整体并入本文。在冲突的情形下,将以本说明书包括定义为准。

[0097] 本文所公开的所有特征均可以以任何组合进行组合。说明书中公开的每个特征可以由起到相同、相等或类似目的的作用的可替代特征所代替。因此,除非另有明确声明,否则所公开的特征(例如,重组载体(例如,AAV)、载体序列、质粒、基因组或转基因,或重组病毒颗粒(例如,AAV)是一类相等或相似特征的示例。

[0098] 如本文所用的单数形式“一个(种)”、“和”以及“所述”包括复数对象,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一种多核苷酸”包括多种这样的多核苷酸,提及“一种载体”包括多种这样的载体,“一个载体序列、质粒或基因组”包括多个这样的载体,并且提及“病毒”或“颗粒”包括多种这样的病毒体/颗粒。

[0099] 如本文所用的,所有数值或数值范围包括这样的范围内的整数和或范围内的值或整数的分数,除非上下文另有明确说明。因此,为了说明,提及至少80%的互补性或同一性包括81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%等等以及81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%等等,82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%等等,并以此类推。

[0100] 提及大于(多于)或小于整数包括分别大于或小于参比数的任何数。因此,例如,提及大于1,包括2、3、4、5、6等等及以上。

[0101] 如本文所用的,所有数值或范围包括这样的范围内的值和整数的分数以及这样的范围内的整数的分数,除非上下文另有明确说明。因此,举例而言,提及数值范围,例如百分比范围,例如1-10包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等等,并依此类推。提及1-50的范围因此包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等等及以上并包括50以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等等,2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等等并依此类推。

[0102] 提及一系列范围包括组合系列内的不同范围的边界值范围。因此,举例而言,提及一系列11-10、10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-75、75-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-400、400-500、500-750、750-1,000、1000-1500、1500-2000、2000-2500、2500-3000、3000-3500、3500-4000、4000-4500、4500-5000、5500-6000、6000-7000、7000-8000或8000-9000的范围包括10-50、50-100、100-1000、1000-3000、2000-4000等范围。

[0103] 本文通常使用肯定的语言来描述许多实施方式和方面来公开本发明。本发明还具体地包括其中特定的主题例如物质或材料、方法步骤和条件、协议或程序被全部或部分省略的实施方式。例如,在本发明的某些实施方式或方面,材料和/或方法步骤被省略。因此,尽管本发明通常不在本文中表达有关本发明不包含的内容,但是本发明未明确省略的方面仍然在本文中公开。

[0104] 已描述了本发明的许多实施方式。尽管如此,本领域技术人员,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种改变和修改,以使其适用于各个用途和条件。因此,以下示例旨在举例说明但不是限制要求保护的本发明的范围。

示例

示例1

[0105] 该示例概述了评价抗AAV中和抗体(NAb)测定的性能的多个研究。这样的测定可用

于在招募用于AAV载体介导的基因转移研究之前筛选受试者,以及监测在AAV载体介导的基因转移疗法过程中和AAV载体介导的基因转移治疗之后抗AAV中和抗体的存在或量。

[0106] 相当一部分的成年人已暴露于野生型AAV,通常在童年时期通过呼吸道感染(Calcedo, 2011)暴露。许多人因此携带与载体交叉反应的抗AAV的NAb。较早的临床研究(Manno et al. 2006)证明当载体经循环递送时甚至适度的NAb滴度似乎阻断转导。在非人类灵长类的其他研究表明,当载体经循环递送时低至1:5的NAb滴度完全阻断肝转导(Jiang et al., Blood 2006; Scallan, Blood 2006)。该测定的目的是测定纳入该研究中存在的受试者的NAb滴度;预先存在>1:5的滴度的那些不是参与该研究的候选者。

[0107] 该研究使用表达报告基因的AAV载体进行基于细胞的测定。将测试血清与载体混合并将荧光素酶的表达水平与未暴露于血清的对照样品的水平进行比较。中和滴度被定义为导致与具有细胞和载体但不含血清的孔相比较而言报告基因(例如,荧光素酶)的表达抑制50%或更多的血清最高稀释度,但在该文献中报告为一个范围;例如,如果1:3.1的稀释样品观察到50%或更多的抑制,则滴度报告为范围为1:3.1至1:10。

[0108] 3个变量可能影响测定精度和准确度。它们是细胞传代数对测定结果、操作可变性和测试血清和FACT的冻融循环的结果稳定性的影响。用于测试的血清样品通常接收自冷冻干冰,保存在-80°C,并且在第一解冻上测试。另一个冻融循环之后可以进行重复测定。

### 示例2

[0109] 该示例包括本文所述的研究中使用的某些材料和设备的描述。

[0110] 材料:测试样品,受试者来源是血清或血浆(血浆必须不含作为抗凝剂的肝素);PBS(磷酸盐缓冲液),无菌,不含Ca<sup>++</sup>和Mg<sup>++</sup>,Invitrogen 14190-136或等同物;DMEM(Dulbecco改良的Eagle培养基),Invitrogen 11965-084或等同物;FBS(胎牛血清),Hyclone SH30070.03IR或等同物;青霉素/链霉素,Invitrogen 15140-122或等同物;L-谷氨酰胺,200mM,Invitrogen 25030-156或等同物;cDMEM:完全DMEM(10%FBS,1×青霉素/链霉素,1×L-谷氨酰胺);人胚肾细胞稳定表达的Ad-E4(2V6.11细胞,ATCC编号:CRL-2784,下文26#代);胰蛋白酶-EDTA(0.25%胰蛋白酶与EDTA 4Na)1X,Invitrogen 25200-056或等同物;密度梯度纯化的AAV-荧光素酶,其与载体基因组(vg)衣壳的比例为1,使用荧光素酶质粒作为标准通过斑点杂交滴定;对照FACT血浆,George King Biomedical Cat#0020-1,批号D9d1,以50μl等份试样冷冻存储;松甾酮A,Invitrogen H101-01,在100%乙醇中重构为1μg/mL的浓度;500mL的过滤系统,0.22μm,Millipore SCGPU05RE;96孔平底组织培养板康宁3595;血清移液管,5、10、25mL;50mL离心/锥形管,康宁430290;试剂库,Costar4870;12通道多通道移液器1-10μl;12通道多通道移液器20-200μl;P-20、P-200和P-1000Rainin Pipetman;枪头;Eppendorf管;12通道储库,Costar4877;移液器辅助器,Drummond 4-000-100或等同物;旋涡混合器;用于活菌计数的台盼蓝(Sigma T8154或等同物);Renilla荧光素酶测定试剂盒,Promega,目录#E2820;微软Excel软件。

[0111] 设备:培养箱,37°C和5%CO<sub>2</sub>;生物安全柜;血细胞计数板,Reichert Bright-Line, Fisher#02-671-5或等同物;倒置显微镜;冷冻机,-80°C;冰箱,2-8°C;恒温箱,37°C;分析天平;Veritas微孔板发光检测仪,特纳生物系统和振荡器。

### 示例3

[0112] 该示例包括检测和/或定量抗AAV抗体的示例性方法的描述。

[0113] 使用单独的AAV-荧光素酶载体或载体与一系列稀释血清的混合物转导2V6.11细胞(HEK-293细胞,遗传修饰以表达腺病毒的E4基因)。24小时后,使用发光检测仪检测荧光素酶的表达。以与用于这些研究和用于常规分析相同的方式处理细胞。

[0114] 以一式三份运行结果,与单独的载体(对照)的读数进行比较,以测定荧光素酶表达等于或小于单独载体表达的50%的血清稀释度。该检测使用荧光素酶报告基因,而不是以lacZ作为报告基因,因为它在低水平抑制时更敏感。

[0115] 评估运行成功的标准包括:

1.对照血浆(汇集人血浆,FACT)对AAV8载体产生1:100至1:316的读数,并且对AAV2载体产生1:1000至1:3160的读数。

2.含有细胞但不含载体并不含血清的孔给出可接受的低读数。

3.含有细胞和载体但不含血清的孔给出可接受的读数。

[0116] 对于其中通过循环递送载体的协议而言,低(<1:5)或检测不到的滴度通常优选纳入研究。由于这个原因,该范围内的所有结果均重复运行进行确认。

[0117] 在从抗-AAV8NAbs滴度范围从低至阴性到高的居住在美国的患有严重血友病的成年人获得的一组9人血清样品评估该测定的测定间变异。阳性对照FACT血浆(批号D9d1#)被纳入在这些研究中。FACT是可商购的来自至少30人供体的正常人血浆样品池。汇集群体内将有具有高滴度AAV抗体的个体,这将在该测定中显示为阳性。使用血浆作为阳性对照是可接受的,因为血清和血浆具有相似水平的抗体。一个单独批次的FACT血浆被用于该研究。

[0118] 更详细地,制备试剂和样品:AAV-CBS-海肾载体的浓度为 $\geq 2 \times 10^{11}$ vg/mL,并以等份试样储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。对于对照血浆FACT而言,样品在 $56^{\circ}\text{C}$ 热灭活30分钟,并以等份试样储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。对于测试样品而言,样品(血清或血浆)在 $56^{\circ}\text{C}$ 热灭活30分钟,并以等份试样储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。对于荧光素酶裂解和测定缓冲液而言,制备海肾荧光素酶系统中的试剂并根据制造商使用。对于稀释血清而言,胎牛血清在 $56^{\circ}\text{C}$ 热灭活30分钟,并冷却至室温,并通过0.22 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤。将等份试样储存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0119] 更详细地,对于该程序,将通过ATCC(目录号CRL-2784)获得的低传代(2#)2V6.11细胞在 $37^{\circ}\text{C}$ 的水浴中解冻约两分钟,然后使用含有10%FBS、1%青霉素/链霉素和1%谷氨酰胺的DMEM清洗两次。然后将细胞铺板在T-75细胞培养瓶中,培养2天,用胰蛋白酶处理,然后在T-75烧瓶中再铺板两代以上。然后用胰蛋白酶处理细胞、清洗并计数,在cDMEM中稀释至 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL,并且加入松甾酮至最终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ,并以20000/孔的密度接种在96孔板上。将细胞在 $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$ 培养箱中孵育过夜,并且汇合度应为约70-80%。

[0120] 在稀释板(96孔U型底组织培养板)中制备一系列稀释的测试样品和对照血浆样品。使用FBS作为稀释剂制备3.1倍(半对数)系列稀释的FACT对照血浆。稀释范围取决于FACT血浆。推荐至少六个连续稀释,通常为1:10至1:3160。

[0121] 使用FBS作为稀释剂制备3.1倍系列稀释的测试样品。稀释的范围取决于样品,推荐稀释度为,对于基础(施用前)样品为1:1至1:316,对于施用AAV样品后为1:10及以上。

[0122] 将 $18\mu\text{L}$ 来自稀释板的上述稀释液转移到第二96孔预测板中。通过将AAV荧光素酶载体在不使用cDMEM和含牛血清的任何稀释剂的DMEM中稀释至 $8 \times 10^7$ - $2 \times 10^9$ vg/mL来制备工作浓度的AAV荧光素酶载体。 $0.5\text{mL}$ 体积的稀释载体足够用于一个完整的测定板。

[0123] 制备载体与稀释的测试和对照样品的混合物以制得“中和的”样品。将稀释载体转

移到12通道储库中。将18 $\mu$ L稀释载体从储库转移到预测板中18 $\mu$ L的每份测试和对照样品的稀释液中。混合18 $\mu$ L稀释载体和18 $\mu$ L仅用于载体对照的FBS(“V+FBS”)。向预测板中的一个孔中加入18 $\mu$ L FBS作为“空白”。将预测板在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0124] 孵育后,将7.5 $\mu$ L“中和的”测试样品稀释液、“中和的”对照血浆稀释液、V+FBS对照和空白FBS转移到测定板中,一式三份。在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜孵育测定板。

[0125] 对于细胞裂解和荧光素酶活性的测定,在15或50mL锥形管中制备足够的裂解缓冲液(5mL足够用于一个板)并在15或50mL锥形管中制备足够的测定缓冲液(7mL足够用于一个板),如所述。在转导后20至24小时,使用PBS清洗细胞1次。使用多通道移液器吸出细胞培养上清液。向细胞中加入200 $\mu$ L PBS,注意不要扰乱细胞单层。吸出清洗液并每孔加入40 $\mu$ L裂解缓冲液,在室温下将板孵育15分钟。

[0126] 打开发光检测计并将测定缓冲液加载到指定区域,准备好注射器并加载细胞板(Promega萤光素酶协议)。测量荧光素酶的活性并在Excel中保存所有读数。发光检测仪的参数:积分时间,2秒,最后操作和此注射之间的延迟:0秒,注射量:50 $\mu$ L,注射速度:333 $\mu$ L/秒,注射和测量之间的延迟:1秒。

[0127] 对于抗AAV中和抗体滴度的计算,在Excel表中计算一式三份孔的平均原始荧光素酶-空白值,并测定荧光素酶表达%:

荧光素酶表达% = [(测试样品的荧光素酶读数-空白)/(V-FBS萤光素酶读数-空白)]  
 $\times 100$ 。

荧光素酶抑制% = 100-荧光素酶表达%

[0128] 当最高稀释导致荧光素酶表达抑制50%或更多时测定样品的中和滴度。将NAb滴度报告为稀释范围。例如,如果在样品1:10稀释时观察到抑制50%或更多,那么滴度报告为1:10至1:31的范围。

[0129] 操作变化:基于在不同的天数由操作1和2对相同组的人血清样品进行的多AAV NAb测定结果评估操作变化。操作知晓样品数。

[0130] 操作1在不同的天数对9份血清样品进行6次NAb测定。在不同的6天测试FACT血浆共18次。

[0131] 操作2在不同的天数对9份血清样品进行5次NAb测定。在不同的5天测试FACT血浆共15次。

[0132] 记录细胞传代数并用于结果分析。最后,在多次冻融循环之后测定FACT血浆的抗AAV8NAb滴度以评估与样品处理相关的抗AAV NAb的变化。

表1:测定板布局:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FACT (1:10)			样品 X (1:1)			样品 Y (1:1)			样品 Z (1:1)		
B	FACT (1:31.6)			样品 X (1:3.16)			样品 Y (1:3.16)			样品 Z (1:3.16)		
C	FACT (1:100)			样品 X (1:10)			样品 Y (1:10)			样品 Z (1:10)		
D	最大信号			样品 X (1:31.6)			样品 Y (1:31.6)			样品 Z (1:31.6)		
E	背景			样品 X (1:100)			样品 Y (1:100)			样品 Z (1:100)		
F	FACT (1:316)			样品 X (1:316)			样品 Y (1:316)			样品 Z (1:316)		
G	FACT (1:1000)			样品 X (1:1000)			样品 Y (1:1000)			样品 Z (1:1000)		
H	FACT (1:3160)			样品 X (1:3160)			样品 Y (1:3160)			样品 Z (1:3160)		

[0133] 括号之间表示样品稀释倍数。最大信号的孔仅含有用样品稀释液孵育的病毒。背景孔仅含稀释液。在96孔板中测试三份未知样品的最大值。这里所示布局的测定板与测试性能过程中所使用的相同。

#### 示例4

[0134] 该示例包括用于检测和/或定量抗AAV抗体的测定结果的描述。

[0135] 信号强度为细胞传代数的函数：在该研究中接种共33个板并用于AAV NAb测试。测量最大和最小报告信号强度，作为细胞传代数的函数。

[0136] 增加细胞传代数观察到最大报告基因信号(最大信号)降低(图1A)，这似乎不影响测定结果，即NAb滴度与所测定的尽管细胞传代数多达25代的样品的相同，并且所有测定均满足成功测定的要求。需要注意的是，当前测定中所用的细胞传代决不超过25代。为了NAb测定的目的，细胞应少于或等于25代。

[0137] 背景信号也随细胞传代数降低(图1B)。然而，细胞传代1-12代对比13-25代的平均信号无统计学差异。

[0138] 操作变化：对于AAV8载体而言，在实验室例行评估的数月过程中用于这些分析的具体批次的FACT血浆的AAV NAb滴度是1:100-1:316。从平均值弃去 $\geq$ 或 $\leq 1/2$ 对数的NAb滴度。研究所弃去的运行的标准方法用于确认任何试剂均未过期，并且包括发光检测仪的关键设备的维护是最新的。经验表明，具体原因是很少存在超出范围的测定；最可能地，其反映了基于细胞的测定的固有差异性。

[0139] 操作1：在由操作1(表2A)进行测定的组中，在6个独立的研究中测定FACT对照血浆的抗AAV8NAb滴度18次。

16/18次，FACT血浆给出的滴度为1:100-1:316；

1/18次(板2，第4天)测定滴度低1/2对数，为1:31.6-1:100，导致弃去测定运行；

1/18次(板3，第6天)，测定滴度高1/2对数，为1:316-1:1000，导致弃去测定运行。

表2A:FACT血浆样品中的抗AAV滴度(操作1)

	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
板1	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316
板2	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:31.6-1:100	1:100-1:316	1:100-1:316

板3	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:316-1:1000
----	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------

[0140] 在不同的6天测试共9份人血清样品的抗AAV8NAb。结果总结在表2B中。灰色阴影区域代表已经从分析排除的测试运行,因为FACT血浆对照NAb滴度与历史范围不同。

[0141] 观察到样品1、2、3、5和7的滴度之间无变化,其在所有测试天数的得分均为阴性(<1:1)。对于样品4和9,在测试的5天中观察到约1个对数的变化,滴度范围分别为<1:1至1:3.1-1:10和1:3.1-1:10至1:31.6-1:100。对于样品6,观察到半个对数的变化;该样品在所有测试天数的得分均为阴性,但在第5天,其得分为1:1-3.1。对样品8也观察到滴度的半个对数的变化,滴度范围为1:316-1:1000至1:1000-1:3160。

[0142] 每个样品得分一致,高于或低于研究合格的阈值,除了样品9之外,其第1-4天的得分高于阈值(不合格)并且第5天低于阈值(合格)。

表2B:人血清样品中的抗AAV滴度(操作1)

	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
样品1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品2	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品3	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品4	<1:1	<1:1	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	1:3.1-1:10	1:1-1:3.1
样品5	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品6	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	1:1-1:3.1	<1:1
样品7	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品8	1:1000- 1:3160	1:1000- 1:3160	1:316- 1:1000	1:1000- 1:3160	1:316- 1:1000	1:316- 1:1000
样品9	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6

样品1-3在板1上;样品4-6在板2上;样品7-9在板3上。

[0143] 操作2:在由操作2进行的一部分研究中(表3A),在5个独立的实验中测定FACT对照血浆的抗AAV8NAb滴度15次。

13/15次,FACT血浆给出的滴度为1:100-1:316;

1/15次(板3,第3天)测定滴度高1/2对数,为1:316-1:1000,导致弃去测定运行。

1/15次(板3,第5天)测定滴度低1/2对数,为1:31.6-1:100,导致弃去测定运行。

表3A:FACT血浆样品中的抗AAV滴度(操作2)

	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
板1	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316
板2	1:100-1:316	1:100-1:316	1:100-1:316	1:31.6-1:100	1:100-1:316
板3	1:100-1:316	1:100-1:316	1:316-1:1000	1:100-1:316	1:31.6-1:100

[0144] 在不同的5天测试共9份人血清样品的抗AAV8NAb。结果总结在表3B中。阴影面积代表已经从分析排除的测试运行,因为FACT血浆对照NAb滴度与历史范围的不同。

[0145] 样品1、2、3、5、6的抗AAV8NAb滴度(<1:1)为阴性,并且样品4的滴度为1:1-1:3.1,一致地与所有测试5天给出的滴度相同。滴度更高的样品,样品8和9,也在测试天数一致;样品8得分为1:100-1:316,并且样品9的得分为1:10-1:31.6。样品7在除了第2天的所有试验天数得分为阴性(<1:1),其中第2天得分为1:1-1:3.1,半个对数的变化。

[0146] 每个样品得分一致,高于或低于研究合格的阈值。

表3B:人血清样品中的抗AAV滴度(操作2)

	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
样品1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品2	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品3	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品4	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1
样品5	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品6	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
样品7	<1:1	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
样品8	1:100-1:316	1:100-1:316	1:316- 1:1000	1:100-1:316	1:316- 1:1000
样品9	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6	1:100-1:316	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10

样品1-3在板1上;样品4-6在板2上;样品7-9在板3上。

[0147] 操作间的变化:由操作1和2测量的每个样品的平均AAV NAb滴度呈现在表4和图2中。平均值是使用所报告的滴度范围的较低值的倒数计算的。例如,如果给定运行中样品的滴度报告为1:3.1-1:10,那么3.1值被用于计算平均值。对于报告为<1:1的滴度而言,使用0值。

[0148] 观察到样品1、2、3、4或5无操作间的变化。观察到样品6、7、8和9具有一些操作间的变化,尽管对于任何样品而言操作平均值之间的差异不大于1个对数。平均FACT滴度实际上在操作之间是相同的,仅有0.01个对数的差异(计算所包括的平均FACT滴度弃去FACT滴度不同于其历史范围的运行)。

表4:操作1和2的平均滴度和标准偏差

	操作 1		操作 2	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
样品 1	0	0	0	0
样品 2	0	0	0	0
样品 3	0	0	0	0
样品 4	1.0	1.3	1.0	0
样品 5	0	0	0	0
样品 6	0.2	0.5	0	0
样品 7	0	0	0.3	0.6
样品 8	726.4	374.6	100.0	0
样品 9	17.3	13.4	10.0	0
FACT	108.2	109.8	109.8	59.7

[0149] 冻融循环的影响:评估了反复冻融循环对FACT血浆阳性对照的AAV NAb滴度的影响。将样品进行多达6个冻融循环(在37°C解冻并在乙醇/干冰浴中冷冻,在-80°C临时储存)并测量抗AAV8NAb滴度。重复该试验两次。需要注意的是测试样品也储存在-80°C,但在冰(0°C)上解冻。冻融循环测试的结果总结在表5中。在多达6个冻融循环之后测量AAV NAb滴度无变化。

表5:冻融对FACT对照血浆的抗AAV8NAb滴度的影响

冻融循环	第一次运行的 NAb 滴度 (第3代细胞)	第二次运行的 NAb 滴度 (第4代细胞)
0	1:100-1:316	1:100-1:316
1	1:100-1:316	1:100-1:316
2	1:316-1:1000	1:100-1:316
3	1:100-1:316	1:100-1:316
4	1:100-1:316	1:100-1:316
5	1:100-1:316	1:100-1:316
6	1:100-1:316	1:100-1:316

#### 示例5

[0150] 该示例包括基于AAV抗体测定的结论的描述。

[0151] 将从最初解冻的细胞的25代内用于NAb测定,观察到萤光素酶信号的最大信号显

著降低。然而,该降低似乎不影响测试结果,即AAV NAb滴度与所测定的尽管细胞传代多达25代的样品的相同,并且所有测定均符合成功测定的要求。

[0152] 6个冻融循环不影响测定中所测量的对照血浆样品的NAb滴度。将该测定中所用的对照血浆分成等份试样并在接收时冷冻,并且解冻的等份试样不再冷冻。

[0153] 观察到相同组样品的几次测定的NAb滴度的变化有限(测定间差异)。测量中至高NAb滴度的样品的差异较大,而观察到低滴度的NAb样品的差异较小。

[0154] 相似地,观察到中至高NAb滴度的样品的操作间的NAb滴度的差异较大(操作间差异),而观察到低滴度的NAb样品的差异较小。

[0155] 鉴于纳入当前的AAV介导的基因转移试验的NAb滴度阈值 $<1:5$ ,所以仅观察到样品9具有不明确的结果,7/8的测试运行的得分 $>1:5$ (对于研究中的招募而言不合格)而1/8的运行的得分 $<1:5$ (对于研究中的招募而言是合格)。如果这已是真实的受试者样品,那么 $<1:5$ 的滴度将促使重复测试。

[0156] 这些结果表明,NAb测定是测量人血清(或血浆)样品中抗AAV NAb滴度的可靠试验。这样的测定可用于在AAV基因转移试验招募之前识别具有低的抗AAV滴度的受试者和/或在AAV介导的基因转移过程中或之后监测AAV滴度。

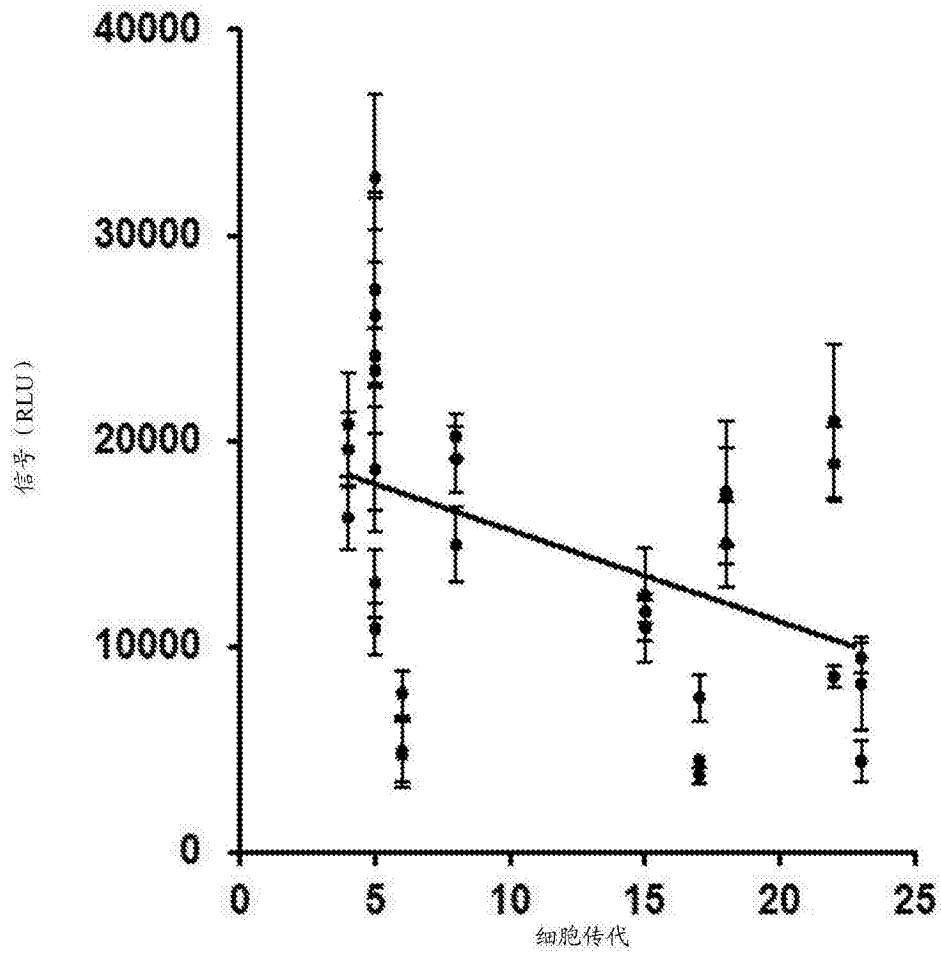


图1A

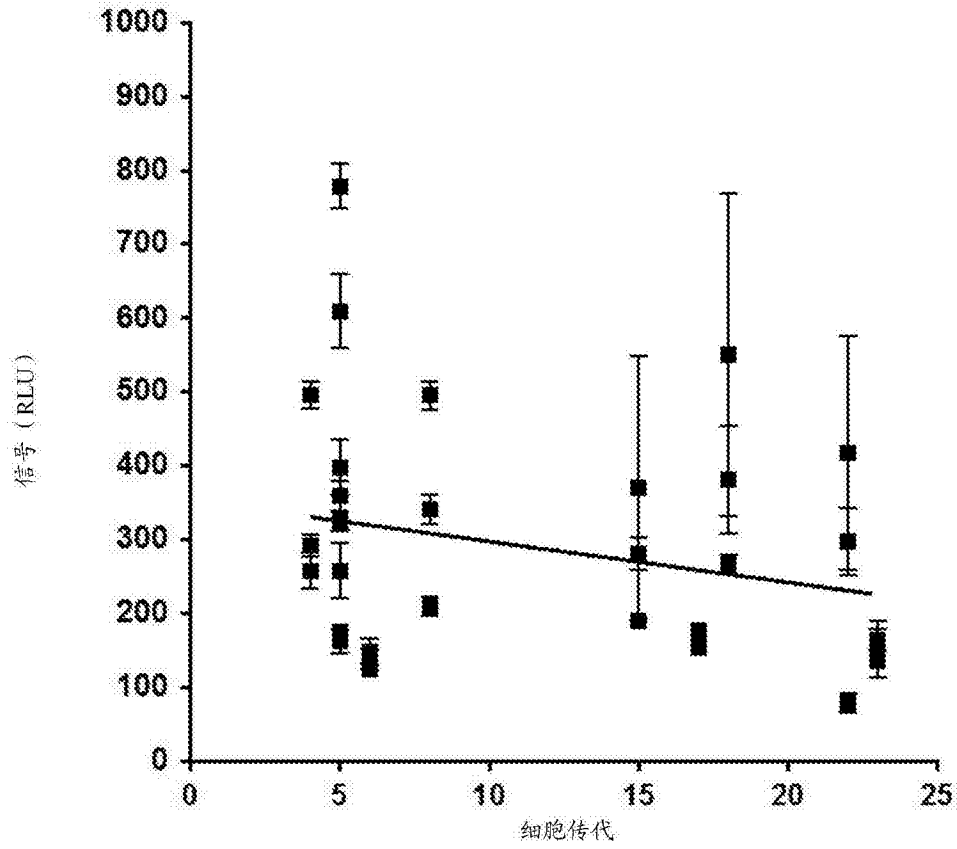


图1B

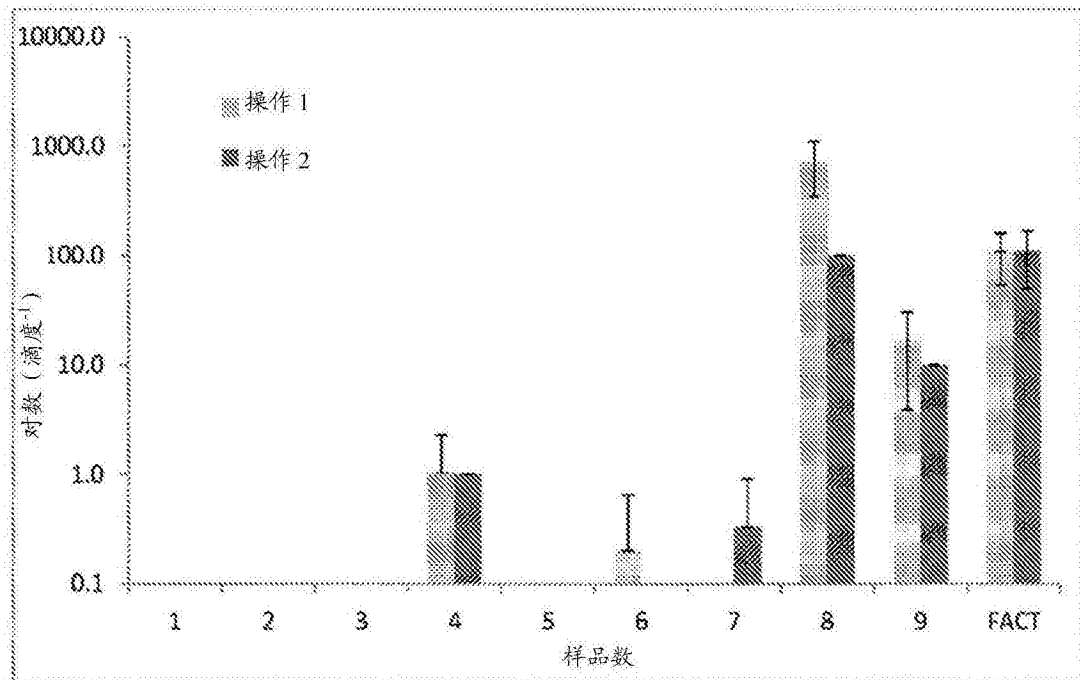


图2

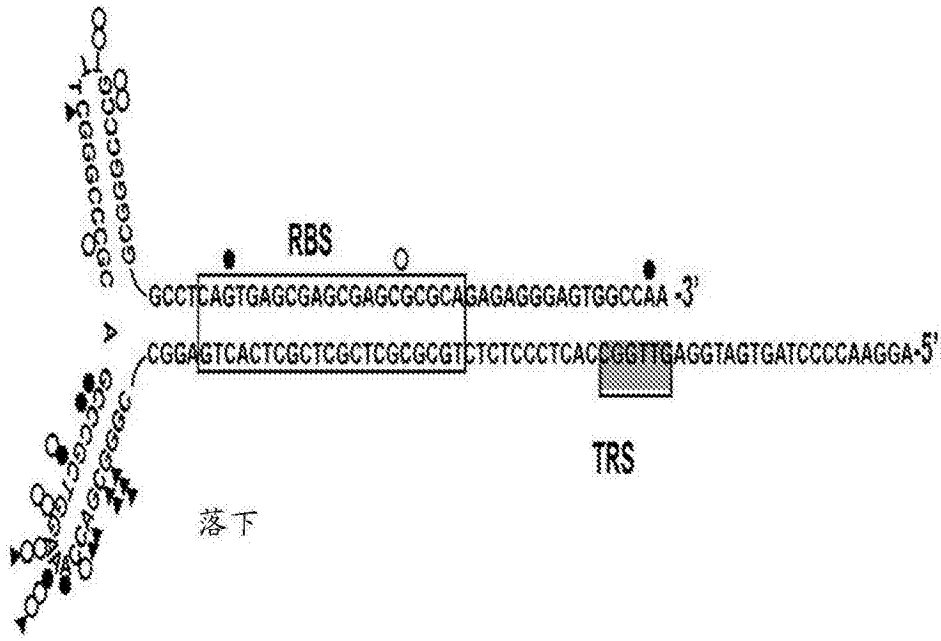


图3

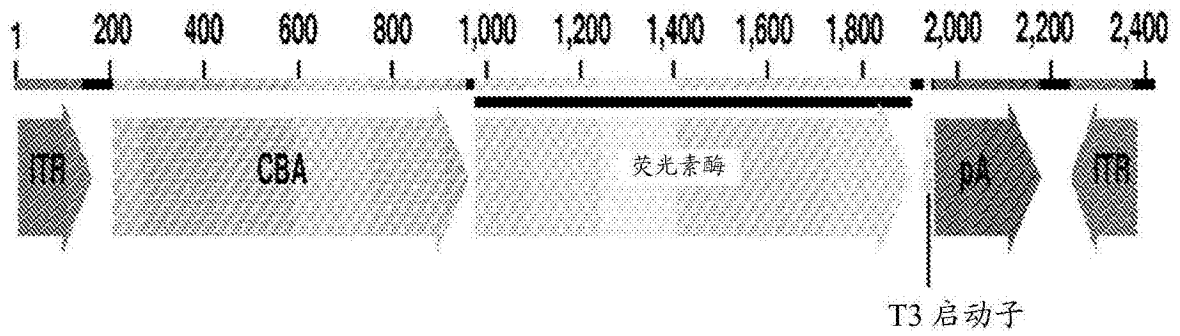


图4

专利名称(译)	AAV载体和用于抗AAV (腺相关病毒) 中和抗体的检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN105518145A</a>	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201480039270.1	申请日	2014-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	费城儿童医院		
申请(专利权)人(译)	费城儿童医院		
当前申请(专利权)人(译)	费城儿童医院		
[标]发明人	凯瑟琳A海 费德里科麦格兹 陈一峰		
发明人	凯瑟琳·A·海 费德里科·麦格兹 陈一峰		
IPC分类号	C12N15/861 C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12N15/86 C12N2750/14131 C12N2750/14143 C12Q1/6897 C12Q1/701 G01N2469/20 A61K48/00 C12N7/00 G01N33/6854 G01N2333/075 G01N2333/90241		
代理人(译)	李献忠		
优先权	61/845841 2013-07-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了病毒载体、病毒颗粒以及筛选、检测、分析和测定样品的病毒抗体的量或中和抗体活性的方法和用途。这样的病毒载体、病毒颗粒以及方法和用途适用于广泛的病毒类型，例如慢病毒、腺病毒和腺相关病毒(AAV)血清型。方法和用途包括病毒抗体筛选，例如筛选、检测、分析抗病毒免疫球蛋白以及所测定的量。

