

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )04-0388-05

## 不同血清型腺相关病毒载体组织表达差异的研究进展

### Expression of different serotypes of adeno-associated virus vectors: an update

高 凯 综述; 王军志\* 审阅( 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 )

[ 摘 要 ] 重组腺相关病毒( adeno-associated virus, AAV )具有弱免疫源性、可介导治疗基因长期稳定表达等优势, 使其被公认为基因治疗的理想载体之一。目前临床研究广泛采用的 AAV-2 血清型载体对部分靶器官和组织的转导效率不十分理想, 同时 AAV-2 中和抗体会干扰此型载体介导的基因转移效率。为了克服上述不足, 众多学者将开展了针对其他 7 种天然血清型 AAV( AAV-1, AAV-3 至 AAV-8 )的研究。研究表明这些新型载体的组织亲嗜性和针对同一靶器官的转导效率与 AAV-2 不同, 并且规避了 AAV-2 免疫应答对载体介导基因转移效率的影响。在视网膜中 AAV-1、AAV-5 的表达检出较早, 表达水平高于 AAV-2; AAV-5 在胰腺的表达水平也明显高于 AAV-2; AAV-4, AAV-5 在中枢神经系统的转导效率和表达水平均显著高于 AAV-2, 并且表达不仅局限于注射部位; AAV-1, 3, 4, 5, 7 型载体在肌肉的表达水平均超过 AAV-2, 其中又以 AAV-1 最为显著; 肺组织中 AAV-1, 5, 6 型的表达较高, 其中 AAV-5 表达量又高于 AAV-1 和 AAV-6; 而肝脏表达水平由高到低的先后顺序为 AAV-1 > AAV-5 > AAV-3 > AAV-2。这些研究均提示了新型 AAV 载体在基因治疗研究和应用领域的巨大潜力。

[ 关键词 ] 腺相关病毒; 血清型; 基因治疗; 病毒载体

[ 中图分类号 ] R734 [ 文献标志码 ] A

病毒介导的基因转移利用病毒对细胞天然的感染能力, 将外源基因导入细胞中, 效率明显高于非病毒载体系统, 因此在肿瘤基因治疗中, 以病毒为载体的治疗方案最有效, 并占据主导地位。截至 2007 年 7 月, 在已开展的 1 309 项基因治疗方案中, 采用病毒作为载体的有 903 项, 约占总数的 69%。腺相关病毒可感染分裂和非分裂细胞, 并在体内长期稳定地表达所携带的治疗基因<sup>[1]</sup>, 因此在基因治疗领域受到广泛关注。

#### 1 腺相关病毒的结构与性能

重组腺相关病毒( adeno-associated virus, AAV )属细小病毒科( parvoviridae ), 是一种无被膜的具有 20 面体结构的病毒, 颗粒直径在 20 ~ 26 nm 之间, 含有 47 000 bp 的线状单链 DNA 基因组。以人 2 型腺相关病毒为例, 基因组为 4 681 个核苷酸的单链 DNA, 基因组的两末端为 145 bp 的倒转末端重复序列( inverted terminal repeat, ITR ), 是 AAV 整合、复制、拯救和包装所必须的顺式作用元件, 并具有转录启动子的活性。ITR 序列之间为病毒编码区, 含有两个开放阅读框架, 分别表达 Rep 和 Cap 蛋白。AAV 载体为复制缺陷型病毒, 只有在辅助病毒( 腺病毒或疱疹病毒 )共同感染条件下才能复制包装发生毒性感染<sup>[1]</sup>。迄今从未发现 AAV 与任何人类疾病相关, 因此 AAV 作为基因转移载体是安全的。AAV 的免疫原性弱、宿主范围广, 既能感染分裂细胞, 又能感染非分裂细胞; 其理化性质稳定, 可耐受冻溶、65 °C 高温及多种有机溶剂, 其结构在 pH 3 ~ 9 的范围内保持稳定。改造后的 AAV 载体可通过将外源基因转变成稳定的染色体外附加体形式

介导外源基因的长期表达。

截至 2007 年 7 月, 全球共有 47 项以 AAV 作为基因治疗载体的方案处于不同临床研究阶段, 并已经证明了该载体的安全与有效性。目前已进入临床试验的适应证包括血友病 B、囊性纤维化、Canavan 病、杜氏肌营养不良、类风湿性关节炎、帕金森病、阿尔茨海默病、小儿肝脏移植、溶酶体疾病等; 临床前研究的包括高血压、恶性胶质瘤、脊髓损伤、视网膜色素变、糖尿病、中风、癫痫、血友病 A、戈谢病、心血管疾病、肌萎缩侧索硬化等。

#### 2 不同血清型 AAV 载体的转导效率和组织亲嗜性

在已批准的以腺相关病毒作为载体的临床方案中, 采用的均是 AAV-2。这是由于 AAV-2 作为基因治疗载体研究已超过 30 年, 研究得最清楚。然而其也具有一定局限性, 如 AAV-2 对部分组织转导效率不理想; 同时资料<sup>[2-3]</sup>显示, 80% 人群存在对野生型 AAV-2 的抗体, 其中有 27% 为中和抗体, 因此 AAV-2 载体介导的治疗基因表达可被中和抗体所阻断。鉴于此原因, 对不同血清型 AAV 载体进行基因治疗的研究十分活跃。根据壳蛋白的不同, 目前已发现约 35 种不同血清型的 AAV<sup>[4]</sup>, 并且至少有 8 种被改造成重组病毒载体。通

[ 基金项目 ] 国家高技术研究发展( 863 )计划资助项目( No. 2003AA2Z3480 )。Supported by National High Technology Research and Development Program of China ( No. 2003AA2Z3480 )

[ 作者简介 ] 高 凯( 1975- ), 男, 北京市人, 助理研究员, 主要从事生物技术药物质量控制方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: Wangjz@ nicpbp. org. cn

常不同血清型重组腺相关病毒载体的改造具有两种模式:(1)纯合载体,即重组病毒载体外壳蛋白与 ITR 均来自同一血清型病毒;(2)杂合载体(pseudotyped AAV vector),即将来源于 AAV-2 的 ITR 与治疗基因包装入其他血清型外壳蛋白内。目前 AAV 血清型载体的应

用研究多采用后者,本文所介绍的不同血清型腺相关病毒载体研究均是基于杂合构建的。目前从灵长类动物中已经分离到 8 种血清型的 AAV(表 1)。下面从组织分类角度对各血清型载体表达加以介绍。

表 1 腺相关病毒载体血清型 1~8 的部分特性比较

血清型	天然宿主	基因组长度(bp)	ITR长度(bp)	与 AAV-2 的同源性	受体	细胞黏附阻断物		
						胰酶	黏蛋白	肝素
1	猴	4 718	143	80%	未报道	未报道	未报道	未报道
2	人	4 681	145	100%	已知	是	未报道	是
3	人	4 722	145	82%	未报道	未报道	未报道	是
4	猴	4 767	144	75%	已知	否	是	否
5	人	4 642	167	55%	已知	未报道	是	否
6	人	4 683	145/143 <sup>b</sup>	82%	未报道	未报道	未报道	否
7	猴	4 721 <sup>a</sup>	未报道	84%	未报道	未报道	未报道	未报道
8	猴	4 393 <sup>a</sup>	未报道	84%	未报道	未报道	未报道	未报道

a: 目前 AAV-7、AAV-8 只有 rep、cap 序列得到克隆,ITR 序列克隆后基因组总长度将增加;

b: AAV-6 左侧 ITR 序列与 AAV-2 相同;右侧 ITR 序列与 AAV-1 相同

## 2.1 不同血清型 AAV 载体在视网膜的表达

黑矇症是视网膜色素变性导致的一种严重疾病,由于视网膜色素上皮细胞的基因突变造成的失明占儿童失明 10% 左右。由于眼组织由许多隔离的小腔构成,可以精确地定点注射载体,因此眼睛是对基因治疗具吸引力的靶组织之一<sup>[5]</sup>。Acland 等<sup>[6]</sup>研究证明,无论在大鼠视网膜基底或玻璃体内注射,AAV-1、AAV-2、AAV-5 载体均可有效感染光受体细胞和视网膜色素上皮细胞,并表达所携带的 GFP 基因。但 AAV-2、AAV-5 表达部位位于感染光受体细胞和视网膜色素上皮细胞,而 AAV-1 则特异集中于视网膜色素上皮细胞层,AAV-2 还可感染内层视网膜色素细胞,而 AAV-1、AAV-5 在该部位表达则较 AAV-2 差。AAV-1 载体表达从病毒注射后 4 d 即可检出,而 AAV-2、AAV-5 则分别要到 4 周、2 周后检出;一旦表达检出后,表达可平稳持续 4 个月以上。Yang 等<sup>[7]</sup>还发现,AAV-5 在视网膜的表达早于 AAV-2,并且感染效率和表达水平要高于 AAV-2 约 30 倍左右。Auricchio<sup>[8]</sup>发现 AAV-3、AAV-6 在视网膜的表达与 AAV-5 类似。

## 2.2 不同血清型 AAV 载体在胰腺的表达

I 型糖尿病是由于机体免疫系统紊乱后,免疫细胞浸润胰岛引起炎症,最终破坏产生胰岛素的  $\beta$  细胞。同种异体移植胰岛  $\beta$  细胞虽然可以缓解症状,但会引起排斥反应,因此向胰岛  $\beta$  细胞中导入免疫调控、细胞保护、抗凋亡等基因即可达到基因治疗 I 型糖尿病的目的。

Eisold 等<sup>[9]</sup>报道 AAV-2 载体可在不干扰其分泌胰岛素的情况下转导猪、大鼠等不同种属来源的胰岛  $\beta$  细胞,但表达量距临床应用还有较大差距。而 Flotte<sup>[10]</sup>研究表明,AAV-5 也可在小鼠胰岛  $\beta$  细胞表达 LacZ 等外源基因,且表达量明显高于 AAV-2。

## 2.3 不同血清型 AAV 载体在中枢神经系统的表达

研究表明,AAV-2 载体可有效介导外源基因于中枢神经系统长期表达,而载体本身无毒性作用,且可优先感染神经元细胞<sup>[11]</sup>。但 AAV-2 载体的表达仅限于注射部位附近,且除神经元细胞外,AAV-2 载体对如星形胶质细胞等其他靶细胞感染效率较低。McCown 等<sup>[12-13]</sup>报道携带 LacZ 报告基因的 AAV-2、AAV-4、AAV-5 载体注射小鼠纹状体后,AAV-4、AAV-5 载体在脑室内的细胞转导效率高于 AAV-2 载体 10 倍以上,且均集中在室管膜细胞。AAV-4 的表达最早,可在 3 周检出,表达量高于 AAV-5 载体 10 倍、高于 AAV-2 载体 100 倍以上。且不同血清型载体感染靶细胞的部位也不同,AAV-2 载体感染部位集中于纹状体,AAV-4 载体感染部位集中于室管膜细胞。而 AAV-5 载体感染部位位于纹状体 and 大脑皮质,靶细胞包括神经元细胞和星形胶质细胞等。Liu<sup>[14]</sup>也证实 AAV-5 载体于脑室内的感染部位不仅仅局限在注射部位。AAV-2、AAV-5 载体在感染部位的差异是由不同血清型载体的受体造成的,目前已知 AAV-2 载体的受体与 AAV-5 不同。AAV-2 的受体为肝素硫酸盐多糖(heparan sulfate pro-

teoglycans, HSPG),因此在肝素存在条件下,会阻碍 AAV-2 与其受体肝素硫酸盐多糖的作用,并会导致 AAV-2 载体进一步扩散。Mastakov 等<sup>[15]</sup>证实,将肝素分别与 AAV-2、AAV-5 载体混合后于大鼠大脑皮层系统注射,AAV-2 载体与肝素混合组的感染部位分布和感染细胞数量上与对照比较有显著提高,而 AAV-5 载体与肝素混合组的感染部位分布和感染细胞数量上与对照比较则无显著差异。Thorsen 等<sup>[16]</sup>报道,AAV-2、AAV-4 和 AAV-5 均可有效转导神经祖细胞,这些不同血清型载体为神经系统疾病基因治疗提供了新方式。

#### 2.4 不同血清型 AAV 载体在肌肉组织中的表达

AAV 载体在肌肉中的表达研究报道较多。首先许多肌肉组织相关的遗传疾病,诸如肌营养不良症等致病机制已明确,使基因治疗该类疾病成为可能。其次肌肉组织是表达机体所缺乏功能蛋白的有效平台,如凝血因子等。最后,位于体表的肌肉组织提供了更好的基因治疗给药途径。Riviere 等<sup>[17]</sup>和 Louboutin 等<sup>[18]</sup>的研究表明不同血清型的 AAV 载体在肌肉组织的表达存在较大差异。Chao 等<sup>[19]</sup>将携带犬凝血因子 IX (canine factor IX, cFIX) 的 AAV-1 到 AAV-5 载体于小鼠骨骼肌注射 12 周后,表达水平顺序为 AAV-1 > AAV-5 > AAV-3 > AAV-4 > AAV-2。在凝血因子 IX 缺陷小鼠模型也得到类似结果,在小鼠腓肠肌注射同样剂量的 AAV-1 和 AAV-2, AAV-1 cFIX 的表达水平高于 AAV-2 约 300 倍左右。该结果得到了 Ghosh 等<sup>[20]</sup>的支持,但他们又发现不同血清型载体的肌肉表达差异还与所携带表达盒的 DNA 序列或动物品系有关。虽然早期研究支持 AAV-1、AAV-5 在肌肉表达效果优于 AAV-2 的结果,但还有报道发现 AAV-5 的表达还可通过将来源于 AAV-2 的 ITR 更换为 AAV-5 的 ITR 进一步提高。Duan 等<sup>[21]</sup>发现携带荧光素酶基因 (Luciferase) 的 AAV-5 和 AAV-2 载体于正常小鼠表达时,结果与上述研究吻合,即 AAV-5 > AAV-2; 而携带 GFP 的 AAV-5 和 AAV-2 载体于肌营养不良小鼠模型 (Mdx) 表达时,AAV-5 与 AAV-2 的表达则无显著差异;结果再次提示了表达盒 DNA 序列对不同血清型载体表达水平的影响。Louboutin 等<sup>[18]</sup>的研究发现 AAV-7 肌肉表达总体水平与 AAV-1 相当,虽然有报道 AAV-7 在肌肉介导治疗基因的表达水平高于 AAV-1,但两者表达量均显著高于 AAV-2。

#### 2.5 不同血清型 AAV 载体在肺组织中的表达

囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 的病因是基因突变导致氯离子通道异常引起肺纤维化,发病率在高加索人种/白种人中达到 1/3000。携带囊性纤维化跨膜气传导率调节剂 (cystic fibrosis transmembrane conduct-

ance regulator, CFTR) 基因的 AAV-2 载体可在小鼠、兔、恒河猴中有效表达,并已在临床研究中取得了良好效果<sup>[22]</sup>,但研究也表明 AAV-2 载体在肺组织的感染效率不理想,虽然其表达可通过手术介入给药或与腺病毒共感染提高,但不适合未来的实际应用。而且肺上皮细胞的更新速度较快,需要反复给药。Halbert 等<sup>[2]</sup>的研究表明,以鼻腔吸入的给药途径,AAV-6 感染气管上皮的效率和表达量高于 AAV-2,可达 80% 左右,而 AAV-3 的表达量则要低于 AAV-2。Virella 等<sup>[23]</sup>的研究报道 AAV-5 在啮齿类动物肺组织中的表达高于 AAV-2 近 50 倍,多为肺泡细胞感染,AAV-1 在肺组织中的表达与 AAV-6 接近。相关研究认为肺组织与肌肉类似,可用做表达机体缺乏功能蛋白的有效平台,且肺部毛细血管丰富,便于血溶解物交换。研究证明携带 FIX 基因或 EPO 基因的 AAV-5 载体在小鼠肺组织表达量高于 AAV-1、AAV-2。AAV-4 虽然与细胞结合黏附的能力远高于 AAV-2,但表达水平却与 AAV-2 相差无几;受体分析表明,AAV-4 虽然与 AAV-5 载体的受体类似均为 2,3-唾液酸,但 AAV-4 结合 O 型 2,3-唾液酸,而 AAV-5 结合 N 型 2,3-唾液酸,由于气管上皮细胞的受体分布差异造成 AAV-4 表达低于 AAV-5。同样由于 AAV-2 的受体位于气管上皮细胞的基底部分,因此结合效率不高导致在肺组织低表达,而 AAV-2 和 AAV-5 在对基底气管上皮细胞的感染效率、表达量均没有明显差异<sup>[24-25]</sup>。而将携带 LacZ 报告基因的 AAV-1 至 AAV-6 载体从尾静脉注射后,只有 AAV-4 绝大多数在肺脏检出,而脾脏和肝脏是其他血清型的主要靶标。

#### 2.6 不同血清型 AAV 载体在肝脏组织中的表达

许多疾病是肝脏细胞的遗传基因改变所造成,诸如血友病 A、B 是由于凝血因子 VIII 或 IX 基因突变所造成的。虽然不同血清型 AAV 载体在肌肉中可以表达治疗基因,但在非天然分泌、合成器官的表达会造成表达产物翻译后修饰的差异,从而影响治疗效果。虽然肝脏给药途径需要手术,但已有研究表明可通过系统给药实现 AAV 载体介导的肝脏表达。Wiwaniikit 等<sup>[25]</sup>大量研究表明,AAV-2 可以有效转导肝脏细胞,并表达足量治疗需要的凝血因子。但即使给予很大剂量的 AAV-2 载体,并且几乎全部肝脏细胞可检测到载体存在,也只有约 5% 的肝脏细胞可表达治疗基因,这说明细胞内的一些机制比细胞对载体摄取、结合更能影响 AAV 载体的肝脏表达。

Grimm 等<sup>[27]</sup>通过肝脏门静脉导入等剂量的 AAV-1、AAV-2 载体,并发现 AAV-2 载体在肝脏的表达高于 AAV-1 10 ~ 50 倍。但 Wang 等<sup>[28]</sup>后续研究却发现通过小鼠门静脉或静脉内的导入 AAV-1 至 AAV-5 载体,各

血清型载体的表达量为 AAV-1 > AAV-5 > AAV-3 > AAV-2 > AAV-4。但该研究与 Xiao 的研究<sup>[29]</sup>一样,载体中调控治疗基因表达均为 CMV 启动子,而通常由 CMV 启动子表达肝脏来源的治疗用蛋白(如凝血因子 VIII 或 IX 等)则会很快被肝脏细胞所抑制。

Mingozi 等<sup>[30]</sup>发现,将携带凝血因子 IX 基因的 AAV-2 和 AAV-5 注射于小鼠脾被膜或尾静脉后,AAV-2 组小鼠血清 IX 因子的表达在 4 周后达到平台,而 AAV-5 组可继续高表达,与前述报道一致,两者在肝脏的表达均高于血清表达 5 倍以上。但 AAV-5 在转导肝脏细胞的效率方面优于 AAV-2,可达 15%,因此可以治疗包括家族性血脂胆固醇过高等疾病,此类肝脏疾病的治疗需要尽量提高转染阳性、表达治疗基因细胞在靶组织中的比例,而非每个转染的肝脏细胞均获得治疗基因的高表达。同时还发现 AAV-2 载体转导 IX

因子表达的肝脏细胞集中位于给药血管附近,而 AAV-5 介导表达的细胞则位于肝脏实质,类似于该两种血清型载体在中枢神经系统的表达。AAV-2 和 AAV-5 的细胞转导效率具有协同作用,将携带不同报告基因的 AAV-2 和 AAV-5 载体共同在肝脏表达,同时表达两种基因的肝脏细胞则超过了 90%。但 Gao 等<sup>[31-32]</sup>的研究发现,由肝脏特异启动子介导治疗基因表达的 AAV-1,2,5,7,8,载体表达量差异为 AAV-8 > AAV-5 > AAV-7 > AAV-2 > AAV-1,且 AAV-8 的肝脏细胞转导效率最高,但该结果可能是由于采用了不同启动子、不同血清型载体纯化方式不同(肝素亲和层析或氯化铯密度梯度离心)造成的载体差异,AAV-7,AAV-8 与 AAV-2 在肝脏表达的差异还需要进一步研究,表 2 总结了不同血清 AAV 载体在各靶组织器官表达的差异。

表 2 不同血清型 AAV 载体在各靶组织、器官的表达水平差异

组织	AAV-2	AAV-1	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-7	AAV-8
胰腺	+	-	-	-	+*	-	-	-
肌肉	+	+*	+*	+*	+*	-	+*	+*
肺	+	+*	+	+	+*	+*	-	-
眼睛	+	+*	+	+*	+*	+*	-	-
肝脏	+	+*	+	+	+*	+*	+*	+*
中枢神经系统	+	-	-	+*	+*	-	-	-

+ : 有可表达的报道; - : 未见有表达的报道; \* : 表达速度和表达量较 AAV-2 更快、更高

### 3 展望

目前来自不同研究者针对各血清型 AAV 载体在组织亲嗜性、靶器官转导效率等方面的研究报道还具有一定差异。主要由以下几个因素造成的:首先,由于众多研究者选用的表达基因有人凝血因子等功能基因,也有的选用 GFP、荧光素酶或 LacZ 等报告基因,因此各研究采用的 AAV 血清型载体结构不同。其次,各血清型载体的受体研究还不十分清楚,而且研究结果大多来自啮齿类动物,缺少在大动物模型上的验证研究。还有,各种 AAV 血清型研究在载体包装、纯化工艺、给药剂量、给药方式等环节上的差异,也是造成 AAV 不同血清型载体表达趋势研究结果并不十分吻合的因素之一,这些方面均有待进一步更具针对性的比对研究。不同血清型 AAV 载体的各种研究开创了 AAV 载体学(vectorology)研究的新领域,更重要的是 AAV 载体血清型研究的日趋成熟,将使介导治疗基因表达的策略发生革新。AAV 安全性好,并可在宿主体

内长期稳定表达所携带的治疗基因,因此其优势主要在于治疗遗传性疾病和目前难以治愈的慢性疾病。针对不同血清型载体的特性,可通过采用各种血清型载体的特定组合,使包括基因治疗载体多次重复给药或联合给药的设想成为可能,并进一步拓展可感染组织、靶细胞的种类,越来越多的疾病列入采用 AAV 载体基因治疗的候选对象。随着不同血清型 AAV 的不断发现、重组载体包装系统和大规模制备工艺的进步,以及未来 AAV 载体靶向技术和壳蛋白三维结构确认技术的成熟,不同血清型的 AAV 载体将为基因治疗的研究提供更加多样化的选择。

### [参考文献]

- [1] Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors [J]. Nat Protoc, 2006, 1 (3): 1412-1428.
- [2] Halbert CL, Miller AD, McNamara S, et al. Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: implications for

- gene therapy using AAV vectors [ J ]. *Hum Gene Ther.* 2006, 17 ( 4 ): 440-447.
- [ 3 ] Sanftner LM, Suzuki BM, Doroudchi MM, *et al.* Striatal delivery of rAAV-hAADC to rats with preexisting immunity to AAV [ J ]. *Mol Ther.* 2004, 9( 3 ): 403-409.
- [ 4 ] Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors [ J ]. *Curr Gene Ther.* 2005, 5( 3 ): 285-297.
- [ 5 ] Jacobson SG, Boye SL, Aleman TS, *et al.* Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in leber congenital amaurosis [ J ]. *Hum Gene Ther.* 2006, 17( 8 ): 845-858.
- [ 6 ] Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, *et al.* Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness [ J ]. *Mol Ther.* 2005, 12( 6 ): 1072-1082.
- [ 7 ] Yang GS, Schmidt M, Yan Z, *et al.* Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size [ J ]. *J Virol.* 2002, 76( 15 ): 7651-7660.
- [ 8 ] Auricchio A, Rolling F. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases [ J ]. *Curr Gene Ther.* 2005, 5( 3 ): 339-348.
- [ 9 ] Eisold S, Schmidt J, Ryschich E, *et al.* Induction of an antitumoral immune response by wild-type adeno-associated virus type 2 in an *in vivo* model of pancreatic carcinoma [ J ]. *Pancreas.* 2007, 35( 1 ): 63-72.
- [ 10 ] Flotte T, Agarwal A, Wang J, *et al.* Efficient *ex vivo* transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors [ J ]. *Diabetes.* 2001, 50( 3 ): 515-520.
- [ 11 ] Griffey MA, Wozniak D, Wong M, *et al.* CNS-directed AAV2-mediated gene therapy ameliorates functional deficits in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis [ J ]. *Mol Ther.* 2006, 13( 3 ): 538-547.
- [ 12 ] McCown TJ. Adeno-associated virus ( AAV ) vectors in the CNS [ J ]. *Curr Gene Ther.* 2005, 5( 3 ): 333-338.
- [ 13 ] Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, *et al.* Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain [ J ]. *Hum Gene Ther.* 2007, 18( 3 ): 195-206.
- [ 14 ] Liu G, Chen YH, He X, *et al.* Adeno-associated virus type 5 reduces learning deficits and restores glutamate receptor subunit levels in MPS VII mice CNS [ J ]. *Mol Ther.* 2007, 15( 2 ): 242-247.
- [ 15 ] Mastakov MY, Baer K, Kotin RM, *et al.* Recombinant adeno-associated virus serotype 2 and 5 mediated gene transfer in the mammalian brain: quantitative analysis of heparin co-infusion [ J ]. *Mol Ther.* 2002, 5( 4 ): 380-381.
- [ 16 ] Thorsen F, Afione S, Huszthy PC, *et al.* Adeno-associated virus ( AAV ) serotypes 2, 4 and 5 display similar transduction profiles and penetrate solid tumor tissue in models of human glioma [ J ]. *J Gene Med.* 2006, 8( 9 ): 1131-1140.
- [ 17 ] Riviere C, Danos O, Douar AM. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice [ J ]. *Gene Ther.* 2006, 13( 17 ): 1300-1138.
- [ 18 ] Louboutin JP, Wang L, Wilson JM. Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes [ J ]. *J Gene Med.* 2005, 7( 4 ): 442-451.
- [ 19 ] Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, *et al.* Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors [ J ]. *Mol Ther.* 2000, 2( 6 ): 619-623.
- [ 20 ] Ghosh A, Yue Y, Duan D. Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral ( AAV ) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle [ J ]. *J Gene Med.* 2006, 8( 3 ): 298-305.
- [ 21 ] Duan D, Yan Z, Yue Y, *et al.* Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation [ J ]. *J Virol.* 2001, 75( 16 ): 7662-7671.
- [ 22 ] Moss RB, Rodman D, Spencer LT, *et al.* Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial [ J ]. *Chest.* 2004, 125( 2 ): 509-521.
- [ 23 ] Virella-Lowell I, Zusman B, Foust K, *et al.* Enhancing rAAV vector expression in the lung [ J ]. *J Gene Med.* 2005, 7( 7 ): 842-850.
- [ 24 ] Seiler MP, Miller AD, Zabner J, *et al.* Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry [ J ]. *Hum Gene Ther.* 2006, 17( 1 ): 10-19.
- [ 25 ] Wu Z, Miller E, Agbandje-McKenna M, *et al.* Alpha 2,3 and alpha 2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6 [ J ]. *J Virol.* 2006, 80( 18 ): 9093-9103.
- [ 26 ] Wiwanitkit V. Functions of AAV-CMV-F. IX And AAV-EF1alpha-F. IX in gene therapy for hemophilia B [ J ]. *Hum Gene Ther.* 2007, 18( 2 ): 89-92.
- [ 27 ] Grimm D, Pandey K, Nakai H, *et al.* Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype [ J ]. *J Virol.* 2006, 80( 1 ): 426-439.
- [ 28 ] Wang L, Herzog RW. AAV-mediated gene transfer for treatment of hemophilia [ J ]. *Curr Gene Ther.* 2005, 5( 3 ): 349-360.
- [ 29 ] Xiao W, Chirmule N, Berta SC, *et al.* Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type [ J ]. *J Virol.* 1999, 73( 5 ): 3994-4003.
- [ 30 ] Mingozzi F, Schuttrumpf J, Arruda VR, *et al.* Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector [ J ]. *J Virol.* 2002, 76( 20 ): 10497-10502.
- [ 31 ] Gao G, Lu Y, Calcedo R, *et al.* Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates [ J ]. *Mol Ther.* 2006, 13( 1 ): 77-87.
- [ 32 ] Gao GP, Lu Y, Sun X, *et al.* High-level gene transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes [ J ]. *J Virol.* 2006, 80( 12 ): 6192-6194.