

腺相关病毒衣壳蛋白修饰的研究进展

陈倩影, 马萃娇, 吕亚丰, 曹春雨

三峡大学医学院 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443002

摘要: 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 介导的基因治疗在单基因遗传性疾病的临床治疗中取得了突破性进展。通过衣壳蛋白修饰来优化 AAV 载体, 获得具有细胞靶向性、高转导能力和低或无免疫原性的 AAV 载体成为当前基因治疗研究的重点之一。目前, 研究者主要通过合理设计、定向进化和化学修饰方法对 AAV 衣壳进行修饰、改造。本文综述了 AAV 的生物学特性和有关 AAV 衣壳修饰的新近研究进展, 并讨论了该领域所面临的挑战。

关键词: 基因治疗; 基因递送; 腺相关病毒工程; 腺相关病毒衣壳修饰; 细胞靶向性

中图分类号: Q42-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2022)01-0101-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2022.01.019

网络出版时间: 2021-11-26 09:11 **网络出版地址:** https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20211125.1107.002.html

引用本文: 陈倩影, 马萃娇, 吕亚丰, 等. 腺相关病毒衣壳蛋白修饰的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2022, 43 (1): 101-105.

Research advances in capsid protein modification of adeno-associated virus

CHEN Qianying, MA Cuijiao, LYU Yafeng, CAO Chunyu

Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University Medical College, Yichang 443002, Hubei Province, China

Corresponding authors: CAO Chunyu. Email: caocy@ctgu.edu.cn; LYU Yafeng. Email: lvyafeng@ctgu.edu.cn

Abstract: Adeno-associated virus (AAV)-mediated gene therapy has led to a breakthrough in the clinical treatment of single-gene disorder. Optimizing AAV vector through capsid modification to obtain AAV vector with cell targeting, high transduction efficiency and low or no immunogenicity has become one of the focuses of gene therapy research. At present, AAV capsid is mainly modified and reconstructed by rational design, directed evolution and chemical modification. Here, we review the biological characteristics of AAV and the recent research advances in the modification of AAV capsid, and discuss the challenges in this field.

Keywords: gene therapy; gene delivery; AAV engineering; AAV capsid modification; cell targeting

Cited as: Chen QY, Ma CJ, Lyu YF, et al. Research advances in capsid protein modification of adeno-associated virus [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2022, 43 (1): 101-105.

基因治疗是以治疗或治愈某种疾病为目的, 引入、去除或改变遗传密码内容, 基于递送编码治疗性蛋白质或 RNA 作为基因编辑策略, 在基因水平上治疗疾病的方法^[1]。选择高效、安全的递送载体是实现基因治疗的首要问题。目前, 基因治疗主要采用的递送载体系统有病毒载体 [腺病毒载体、慢病毒载体^[2]、腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体]、纳米颗粒和脂质体等。其中 AAV 载体具有基因容量较大、基因组不整合、无致病性等显著优势, 近年来已成为基因治疗研究

的主要递送载体^[3-4]。2012 年以来, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准基于多种 AAV 载体开发的基因治疗药物, 如 Glybera、Luxturna® 和 Zolgensma® 分别用于遗传性脂蛋白脂肪酶缺乏症、Leber 先天性黑蒙病和脊髓性肌萎缩症的临床治疗^[5]。鉴于衣壳蛋白靶向性修饰在 AAV 载体研究中的核心作用, 本文就 AAV 及其衣壳蛋白靶向性修饰的新近研究进展做一综述, 并讨论 AAV 衣壳改造在基因治疗中的前景及应用。

1 AAV 生物学特性

1.1 AAV 结构 AAV 属于细小病毒科, 是单链 DNA 病毒, 基因组包含两端的反向末端重复序列 (inverted terminal repeats, ITRs)、转录调控区启动子 (P5、P19、P40) 和两个分别编码 Rep 和 Cap 蛋白的开放阅读框, 全长 4.7 kb (图 1)。ITRs 是 AAV 基因组中必需的顺式作用元件, 其由 180 个碱基

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81772833)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81772833)

作者简介: 陈倩影, 女, 硕士。Email: 1577564930@qq.com

通信作者: 曹春雨, 男, 教授。Email: caocy@ctgu.edu.cn; 吕亚丰, 男, 博士, 讲师。Email: lvyafeng@ctgu.edu.cn

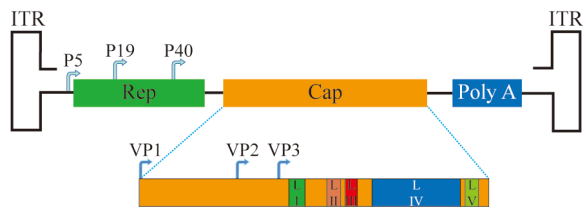


图 1 AAV 的基因组结构示意图

Fig.1 Schematic of AAV genome structure

组成,是 DNA 复制、包装和整合位点的起始位点并在单链 DNA 复制过程中起“引物”的作用^[6]。Rep 基因编码病毒 DNA 复制和组装需四种蛋白质——Rep40、Rep52、Rep68 和 Rep78。Cap 基因编码来自两个交替剪接 mRNA 的三个病毒衣壳蛋白——VP1、VP2 和 VP3,同时编码组装激活蛋白^[7]。AAV 衣壳 VP1、VP2 和 VP3 蛋白分子组装成直径约 25 nm 的二十面体粒子,其 VP1、VP2 和 VP3 蛋白分子的比例为 1 : 1 : 10。

1.2 AAV 血清型及其细胞受体 AAV 病毒基因组中,ITR 和 Rep 基因序列相对保守,而 Cap 基因序列则差异性较大,由此产生具有不同衣壳蛋白的 AAV 病毒。由于 AAV 病毒衣壳蛋白的氨基酸组成直接决定其组织嗜性和感染细胞的能力,研究者以此为标准把近年来鉴定的来自人类或非人灵长类的 AAV 病毒分为 13 个血清型,即 AAV1 ~ AAV13^[8]。具有代表性的是 AAV1 ~ AAV9,比对 AAV1 ~ AAV9 的衣壳蛋白序列发现,这 9 个 AAV 血清型的衣壳蛋白氨基酸序列一致性为 58% ~ 99%,其中 AAV1 与 AAV9 衣壳蛋白氨基酸序列一致性达 99%、与 AAV2/3/6/7/8 衣壳蛋白氨基酸序列一致性达 82% 以上^[9]。这表明 AAV 衣壳氨基酸组成及结构是决定其组织嗜性的关键,而现有研究已证明细胞表面多糖与 AAV 衣壳蛋白的结合是影响 AAV 感染细胞能力的重要因素。AAV 成员转导细胞的能力已被证明是由于其衣壳与不同细胞表面聚糖结合。细胞膜表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 是第一个被鉴定的 AAV 病毒细胞受体,其通过识别结合 AAV2/3/6 血清型衣壳突出部蛋白碱性区域 (包含第 585 位和第 588 位精氨酸),使病毒附着于细胞表面,由此启动 AAV 进入细胞的过程 (图 2)^[10]。此后,唾液酸和 N 末端半乳糖基化多糖也被证明是 AAV 病毒进入细胞的表面多糖受体^[11-12]。目前,AAV 病毒的细胞表面受体主要是三大类多糖,即 HSPG 受体 (AAV2、AAV3 和 AAV6)、唾液酸受体 (AAV1、AAV4、

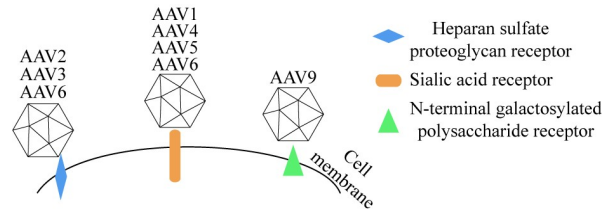


图 2 AAV 血清型受体分类

Fig.2 Classification of AAV serotype receptors

AAV5 和 AAV6) 和半乳糖基化受体 (AAV9)^[13]。除多糖受体以外,2016 年 Pillay 等^[14]报道了一种介导 AAV 细胞转导的蛋白质受体 AAVR (又称为 KIAA0319L)。AAVR 是 I 型跨膜蛋白,通过胞外 Ig 样结构域 (多囊肾病结构域) 直接与邻近二十面体三重轴的 AAV2 衣壳刺突蛋白相互作用,由此介导 AAV2 的入胞作用。

1.3 AAV 的组织嗜性和细胞转导效率 不同 AAV 血清型对人体组织的嗜性和转导效率显著不同,尽管多数 AAV 都能在肝中富集,但 AAV8 具有脂肪组织嗜性^[15]、AAV9 具有心脏、肝、骨骼肌组织嗜性并能够穿越血-脑脊液屏障富集于脑组织^[16]。一方面,AAV 的组织嗜性和细胞转导效率主要依赖于衣壳蛋白结构,尤其是 VP3 与宿主细胞表面受体的相互作用;另一方面,当 AAV 进入宿主细胞后,AAV 递送基因在细胞内的稳定表达依赖于 AAV 从细胞内体中释放并进入细胞核,而这一过程与宿主细胞内相关信号分子和衣壳蛋白 VP1 的相互作用有关^[17]。

2 AAV 衣壳靶向性修饰

如何通过改造 AAV 衣壳蛋白获得具有组织或细胞靶向性的高效基因递送载体是基因治疗研究领域的核心问题。近年来,基于合理设计、定向进化和化学方法修饰等基因工程策略的 AAV 衣壳修饰已广泛用于 AAV 基因靶向递送研究。

2.1 合理设计 合理设计,即通过基因工程技术改造衣壳蛋白编码序列,从而赋予 AAV 靶向性或提高其基因转导效率。已有大量研究证实,将组织和细胞靶向性短肽或蛋白质编码序列插入衣壳蛋白编码序列,经基因转录、翻译后形成新的重组 AAV 衣壳蛋白,可获得具有特定组织或细胞靶向性的重组 AAV 载体^[18-19]。AAV 衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 由同一个启动子 P40 驱动转录,然后分别在各自起始密码子引导下翻译,并最终以 1 : 1 : 10 的比例组装形成病毒衣壳,短肽或蛋白质的插入可直接改变衣壳蛋白结构,有可能影响病毒衣壳组装。因此,插入位点通常在

VP2 起始密码子后或 VP3 编码区的非保守区域(可变区 IV/V/VIII 在衣壳蛋白表面形成 Loop 结构并能够容纳外源性多肽的插入),从而使得修饰肽段或蛋白暴露在衣壳蛋白表面并位于蛋白亲水区,有利于修饰肽或蛋白介导 rAAV 的靶向细胞转导^[20]。如肌肉细胞表面高表达胰岛素受体, Jackson 等^[21]将胰岛素受体结合肽 S519 编码序列插入 AAV9 衣壳蛋白 G543(可变区 IV)和 A589(可变区 VIII)位点,产生表面携带 S519 的 rAAV9,成功实现了 rAAV9 的小鼠肌肉组织靶向基因递送。

AAV 衣壳蛋白具有泛素化、糖基化、乙酰化、磷酸化、SUMO 化等多种翻译后修饰功能,这些单个或多个氨基酸的翻译后修饰在 AAV 的细胞转导、细胞内脱衣壳和细胞核转运过程中发挥重要作用^[22]。AAV1/2/5/7/9 和 rh10 的 VP1、VP3 蛋白 N 端具有乙酰化修饰,并影响 AAV 进入细胞核前的降解和脱壳过程^[23]。Frederick 等^[24]对 AAV5 衣壳蛋白分别进行 S2G、S2P、S194P、S194G、S2G+S194G 和 S2P+S194P 点突变。由于将乙酰化位点丝氨酸突变为甘氨酸和脯氨酸,使得 AAV5 的 VP1、VP3 蛋白 N 端不发生乙酰化(S-P)或乙酰化水平显著下降(S-G),由此可观察 N 端乙酰化对 AAV5 衣壳蛋白组装和转导能力的影响。结果表明,VP1、VP3 蛋白 N 端乙酰化不影响衣壳蛋白组装,但 S194G 突变使得 AAV5 对小鼠视网膜外核层细胞和脉络膜细胞转导效率显著增加。2021 年, Crosson 等^[25]对 AAV2 衣壳蛋白进行 V387R、W502H、E530K、L583R 点突变使衣壳蛋白疏水性增加,结果发现 AAV2 的视网膜细胞转导效率显著下降。但如果同时进行 AAV2 衣壳蛋白 R585A、R588A 点突变(AAV2 的 HSPG 受体结合位点),则显著提高了 AAV2 对小鼠和非人灵长类动物恒河猴视网膜细胞的转导效率。因此,突变 AAV 衣壳蛋白的特定翻译后修饰位点能够通过改变其表面电荷性质、亲/疏水结构等途径显著影响 AAV 的转导效率、靶向性和递送基因表达水平。

2.2 定向进化 定向进化,即通过诱导蛋白质编码基因突变,产生具有定制特性的蛋白质。经典的 AAV 定向进化策略包括 DNA shuffling、随机多肽序列插入和噬菌体展示,由此制备 AAV 衣壳蛋白编码序列的随机重排序列文库,包装 AAV,然后通过多轮体内或体外的细胞和组织感染、富集、筛选步骤,获得具有定制特性的 AAV 衣壳^[26]。Liu 等^[27]以 AAV1/2/3B/4/6/7/8/9 衣壳编码序列为基础构建 DNA shuffling 文库,以 AAV2 衣壳编码

序列为基础构建多肽展示文库,然后等比例混合两种文库,感染 Tie2-GFP 转基因小鼠(由于该小鼠的内皮细胞特异性表达 GFP,可直接进行流式细胞术分选),通过提取小鼠心脏内皮细胞进行 PCR 扩增筛选衣壳蛋白编码序列、建立 AAV 文库、感染小鼠内皮细胞,并将这一过程多轮重复,最后获得能够靶向转导小鼠心脏内皮细胞的 AAV 突变体。2020 年, De Alencastro 等^[28]以“Barcode”标记 AAV 文库、通过高通量测序跟踪定向 AAV 衣壳的进化和转导,结果发现这一策略的缺点主要在于:1)随机效应;2)具有不同衣壳蛋白组成的 AAV 在转导同一细胞时具有竞争效应;3)AAV 文库制备中采用的辅助病毒在此过程中将选择性促进文库中易复制 AAV 的生成。由于该策略是筛选 AAV 基因组 DNA 而非 mRNA,这种多轮筛选策略反而对 AAV 转导能力形成负性选择。为优化定向进化策略,2021 年 Tabebordbar 等^[29]报道了一种名为 DELIVER(directed evolution of AAV capsids leveraging in vivo expression of transgene RNA)的 AAV 载体衣壳定向进化方法,该方法基于合理性设计来制备多样性衣壳蛋白文库,以该 AAV 文库感染小鼠、递送编码其自身衣壳蛋白基因并以该衣壳蛋白的 mRNA 为筛选对象,由此筛选具有组织特异性和高效转导能力的 rAAV 衣壳蛋白序列。该研究具体步骤:在 AAV9 衣壳蛋白 VIII 疏水区第 588 位和 589 位氨基酸位点中插入随机组成的七肽(以使插入的肽段暴露于衣壳蛋白表面),构建多样性衣壳蛋白文库。将上述插入随机组成七肽的衣壳蛋白构建于通用启动子(CMV)驱动的质粒载体,构成多样性衣壳蛋白编码基因递送文库。将二者结合,经 293T 细胞系包装、建立递送编码其自身衣壳蛋白基因的多样性衣壳蛋白文库后,使用 C57BL/6J 小鼠进行体内基因递送,提取肌肉组织,通过检测衣壳蛋白 DNA 和 mRNA 筛选出靶向并有效转导肌肉组织的 AAV。进一步,将筛选获得的 AAV 衣壳蛋白编码序列构建于两种小鼠肌肉组织特异性启动子(CK8、MHCK7)驱动的带有 ITR 序列的质粒载体作为递送基因,将其与前述多样性衣壳蛋白编码基因递送文库结合制备 rAAV,对 C57BL/6J 小鼠进行体内基因递送。再次通过相同的衣壳蛋白 DNA 和 mRNA 筛选步骤,与前述结果比对,该研究成功获得靶向并有效转导肌肉组织的 AAV 衣壳蛋白编码序列(插入该衣壳蛋白的七肽中,前三个氨基酸为 RGD)。该研究同时发现,多样性衣壳蛋白编码基

因 rAAV 文库感染小鼠的组织中,同一种衣壳蛋白编码的 DNA 和 mRNA 水平并不一致,而转导基因的 mRNA 水平是鉴定有效的特异性组织或细胞基因转导的主要指标。这一结果表明,基于 AAV 衣壳蛋白 DNA 而非 mRNA 筛选获得的 AAV 很可能不具备有效的特异性组织或细胞转导能力。

2.3 化学修饰 外源性多肽或蛋白质插入通常受到 AAV 衣壳蛋白插入位点和容量的限制,也常导致 AAV 衣壳蛋白无法正确组装,因此限制了合理设计策略在 AAV 衣壳靶向性修饰中的应用。为解决上述问题,研究者新近开发了基于化学修饰的 AAV 衣壳靶向性修饰策略,该策略同样基于合理设计,但可通过对 AAV 衣壳蛋白进行化学修饰,使其能结合靶细胞特异性受体的配体分子或抗体,从而使 AAV 具备细胞靶向性,由此实现配-受体或抗体介导的 AAV 靶向转导。

亮氨酸拉链结构域之间可特异性、高亲和力和地相互作用形成卷曲螺旋对, Thadani 等^[30]利用这一特性,将 C 端融合肠激酶切割基序的亮氨酸拉链卷曲螺旋结合基序插入 AAV9 衣壳蛋白 G453 位点之后,制备亮氨酸拉链卷曲螺旋结合基序修饰衣壳的 AAV9 病毒。具备该衣壳蛋白的 AAV9 经肠激酶处理后,表面展示线性化的亮氨酸拉链卷曲螺旋结合基序,该 AAV9 可与互补亮氨酸拉链卷曲螺旋结合基序融合的靶细胞配体分子特异性结合,实现配-受体介导的靶向细胞转导。

DNA-蛋白质相互作用也可用于 AAV 靶向性修饰。如蛋白标签 HUH 能与特定序列单链 DNA (5'-CCA GTT TCT CGA AGA GAA ACC GGT AAG TGC ACC CTC CCT GAT GA - AmMO-3') 形成共价键结合。Zdechlik 等^[31]将分子量 21 kU 的 HUH-tag 引入 AAV-DJ 衣壳的可变区 IV,制备衣壳表面携带 HUH 的 AAV-DJ。由于此 AAV-DJ 可通过其 HUH 标签与单链 DNA 共价修饰的任何抗体结合,从而成为了一种“通用型”靶向 AAV。

上述两种方案尽管提供了制备“通用型”靶向修饰 AAV 的方法,但仍需要对衣壳蛋白进行基因重组,有可能导致 AAV 组装问题。去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGP-R) 在肝细胞表面高表达,可特异性识别、结合 N-乙酰半乳糖胺。Mével 等^[32]直接对 AAV2 衣壳蛋白赖氨酸残基的氨基基团进行 N-乙酰半乳糖胺修饰,使 AAV2 获得 ASGP-R 介导的靶向肝细胞转导能力。

3 结语和展望

目前多个临床试验证明 AAV 作为治疗性基因

递送载体具有显著的优势和良好的应用前景^[33]。但 AAV 载体的临床应用仍然存在以下问题亟待解决: 1) AAV 衣壳的固有免疫原性可激活宿主免疫反应,影响基因治疗的安全性,导致无法重复给药,从而影响基因治疗的有效性^[34-35]; 2) AAV 载体缺乏靶向性,阻碍体内基因治疗递送和细胞转导效率; 3) AAV 载体具有潜在的宿主基因组整合能力^[36]。同时,对于 AAV 转导宿主细胞的生物学全过程尚未完全阐明,特别是需要进一步鉴定介导 AAV 黏附、进入不同宿主细胞的受体分子,研究 AAV 衣壳蛋白激发宿主免疫反应的过程。“机器学习”无需物理建模可直接基于实验数据进行训练、获得工程蛋白质的全部潜在多样性序列组成。2021 年, Bryant 等^[37]通过机器学习模拟单个氨基酸随机突变,设计了多达 5 万多个的有功能的野生型 AAV2 衣壳蛋白变体。同年, Hie 等^[38]运用新的“机器学习”算法处理宿主体内流感病毒血凝素、HIV-1 包膜糖蛋白和新型冠状病毒的高通量测序数据,鉴定了能够保护病毒逃逸免疫系统识别,同时保留其感染性的突变。这些新近研究提示,利用已发现的天然 AAV 衣壳蛋白编码序列、衣壳蛋白翻译后修饰和衣壳蛋白免疫原性位点的信息,通过“机器学习”有望预测 AAV 衣壳蛋白的免疫逃逸突变,以此有效优化衣壳序列以改善 AAV 转导效率并降低其免疫原性。同样的,将病毒组装前后的 AAV 衣壳文库编码序列数据用于“机器学习”算法有望预测病毒衣壳组装,从而对衣壳蛋白文库设计进行改进^[39]。

综上所述, AAV 衣壳是激发宿主免疫反应的主要免疫原,同时决定 AAV 组织嗜性和细胞转导的靶向性,因此衣壳蛋白修饰是当前 AAV 载体研究的重点。多种 AAV 衣壳蛋白修饰的研究策略结合“机器学习”,有望筛选出能够重复给药并具备靶向性和高转导能力的 AAV 载体,进一步促进基因治疗的临床应用。

参考文献

- 1 Bulaklak K, Gersbach CA. The once and future gene therapy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 5820.
- 2 梁文涛, 丁毅, 王嵘, 等. 慢病毒载体用于羊骨髓间充质干细胞基因表达实验 [J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37 (12): 1284-1288.
- 3 Lukashchuk AN, Zamyatnin AA Jr. Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81 (7): 700-708.
- 4 邹振玉, 杜晓辉, 李荣. 腺相关病毒抗肿瘤研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37 (7): 804-806.
- 5 Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21 (4): 255-272.

- 6 Wilmott P, Lisowski L, Alexander IE, et al. A user's guide to the inverted terminal repeats of adeno-associated virus [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2019, 30 (6): 206-213.
- 7 Grosse S, Penaud-Budloo M, Herrmann AK, et al. Relevance of assembly-activating protein for adeno-associated virus vector production and capsid protein stability in mammalian and insect cells [J]. *J Virol*, 2017, 91 (20): e01198-e01117.
- 8 Chen MY, Chen WT, Tong J, et al. N-terminal serine/threonine motif has diverse and important effects on behavior of multiple AAV serotypes [J]. *Virology*, 2021, 563: 107-115.
- 9 Mietzsch M, Jose A, Chipman P, et al. Completion of the AAV structural atlas: serotype capsid structures reveals clade-specific features [J]. *Viruses*, 2021, 13 (1): 101.
- 10 Cabanes-Creus M, Hallwirth CV, Westhaus A, et al. Restoring the natural tropism of AAV2 vectors for human liver [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12 (560): eaba3312.
- 11 Ambrosi CM, Sadananda G, Han JL, et al. Adeno-associated virus mediated gene delivery: implications for scalable in vitro and in vivo cardiac optogenetic models [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 168.
- 12 Huang LY, Patel A, Ng R, et al. Characterization of the adeno-associated virus 1 and 6 sialic acid binding site [J]. *J Virol*, 2016, 90 (11): 5219-5230.
- 13 Zengel J, Carette JE. Structural and cellular biology of adeno-associated virus attachment and entry [J]. *Adv Virus Res*, 2020, 106: 39-84.
- 14 Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection [J]. *Nature*, 2016, 530 (7588): 108-112.
- 15 Bates R, Huang W, Cao L. Adipose tissue: an emerging target for adeno-associated viral vectors [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 19: 236-249.
- 16 Bertolin J, Sánchez V, Ribera A, et al. Treatment of skeletal and non-skeletal alterations of Mucopolysaccharidosis type IVA by AAV-mediated gene therapy [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 5343.
- 17 Robinson TM, Ho ML, Wahlig B, et al. An essential N-terminal serine-rich motif in the AAV VP1 and VP2 subunits that may play a role in viral transcription [J]. *Virology*, 2020, 546: 127-132.
- 18 Cabanes-Creus M, Navarro RG, Liao SHY, et al. Single amino acid insertion allows functional transduction of murine hepatocytes with human liver tropic AAV capsids [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 607-620.
- 19 Alméciga-Díaz CJ, Montaña AM, Barrera LA, et al. Tailoring the AAV2 capsid vector for bone-targeting [J]. *Pediatr Res*, 2018, 84 (4): 545-551.
- 20 Büning H, Srivastava A. Capsid modifications for targeting and improving the efficacy of AAV vectors [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 12: 248-265.
- 21 Jackson CB, Richard AS, Ojha A, et al. AAV vectors engineered to target insulin receptor greatly enhance intramuscular gene delivery [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 19: 496-506.
- 22 Mary B, Maurya S, Arumugam S, et al. Post-translational modifications in capsid proteins of recombinant adeno-associated virus (AAV) 1-Rh10 serotypes [J]. *FEBS J*, 2019, 286 (24): 4964-4981.
- 23 Jin XY, Liu L, Nass S, et al. Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017, 28 (5): 255-267.
- 24 Frederick A, Sullivan J, Liu L, et al. Engineered capsids for efficient gene delivery to the Retina and cornea [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31 (13/14): 756-774.
- 25 Crosson SM, Bennett A, Fajardo D, et al. Effects of Altering HSPG Binding and Capsid Hydrophilicity on Retinal Transduction by AAV [J/OL]. <https://doi.org/10.1128/jvi.02440-20>.
- 26 Westhaus A, Cabanes-Creus M, Rybicki A, et al. High-throughput in vitro, Ex vivo, and in vivo screen of adeno-associated virus vectors based on physical and functional transduction [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31 (9/10): 575-589.
- 27 Liu YB, Xu BC, Chen YT, et al. Directed evolution of AAV accounting for long-term and enhanced transduction of cardiovascular endothelial cells in vivo [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 22: 148-161.
- 28 De Alencastro G, Pekrun K, Valdmanis P, et al. Tracking adeno-associated virus capsid evolution by high-throughput sequencing [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31 (9/10): 553-564.
- 29 Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species [J]. *Cell*, 2021, 184 (19): 4919-4938.
- 30 Thadani NN, Yang J, Moyo B, et al. Site-specific post-translational surface modification of adeno-associated virus vectors using leucine zippers [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9 (3): 461-467.
- 31 Zdechlik AC, He YG, Aird EJ, et al. Programmable assembly of adeno-associated virus-antibody composites for receptor-mediated gene delivery [J]. *Bioconjug Chem*, 2020, 31 (4): 1093-1106.
- 32 Mével M, Bouzelha M, Leray A, et al. Chemical modification of the adeno-associated virus capsid to improve gene delivery [J]. *Chem Sci*, 2019, 11 (4): 1122-1131.
- 33 Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, et al. Current clinical applications of in vivo gene therapy with AAVs [J]. *Mol Ther*, 2021, 29 (2): 464-488.
- 34 Ronzitti G, Gross DA, Mingozzi F. Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 670.
- 35 Shirley JL, Keeler GD, Sherman A, et al. Type I IFN sensing by cDCs and CD4+ T cell help are both requisite for cross-priming of AAV capsid-specific CD8+ T cells [J]. *Mol Ther*, 2020, 28 (3): 758-770.
- 36 Nguyen GN, Everett JK, Kaffle S, et al. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39 (1): 47-55.
- 37 Bryant DH, Bashir A, Sinai S, et al. Deep diversification of an AAV capsid protein by machine learning [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39 (6): 691-696.
- 38 Hie B, Zhong ED, Berger B, et al. Learning the language of viral evolution and escape [J]. *Science*, 2021, 371 (6526): 284-288.
- 39 Marques AD, Kummer M, Kondratov O, et al. Applying machine learning to predict viral assembly for adeno-associated virus capsid libraries [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 20: 276-286.