

文章编号: 1000-5013(2008)02-0172-05

腺病毒-腺相关病毒嵌合载体的研发趋势

舒静波¹, 刁 勇¹, 肖卫东², 曾棠埭³, 许瑞安¹

(1. 华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021;
2. 滨州大学 医学院, 美国 宾夕法尼亚州; 3. 泉州医学高等专科学校, 福建 泉州 362011)

摘要: 分析腺病毒-腺相关病毒(Ad/ AAV)嵌合载体母体中, 3 代 Ad 载体及 AAV 载体所具有的优势和存在的缺点. 阐述 Ad/ AAV 嵌合载体的制备方法、生产工艺, 以及其在稳定转染造血干细胞、Duchenne 型肌营养不良症(DMD)的基因治疗和人内啡肽基因的表达研究等方面的最新研究进展. 同时指出, Ad/ AAV 嵌合载体是近年发展起来的嵌合病毒载体, 它融合了 Ad 和 AAV 两种常用的病毒载体的优点, 理论上接近理想临床应用的载体, 但还需要通过大量的, 特别是动物体内的应用研究去检验其优越性, 以满足临床治疗需要.
关键词: 载体系统; 腺病毒; 腺相关病毒; 嵌合; 临床治疗
中图分类号: Q 782 文献标识码: A

应用基因治疗技术对 X-连锁重度联合免疫缺陷综合征(SCID XI)^[1-2]和血友病 B 患者的治疗取得初步成功^[3], 用 ADA 基因治疗严重免疫综合缺乏症(SCID-ADA)也取得阳性结果^[4], 增强了人们对基因治疗的信心. 但随后有关受试者发生肿瘤的报告, 再次给基因治疗的前途罩上了阴影^[5]. 特别是一致被认为是最安全的腺相关病毒(AAV)载体, 也有在受试者精子细胞内检出 AAV 基因组. 这都迫使研究者要重新加强基因治疗载体的基础研究, 特别是反复检视载体的安全性问题.

1 背景

在基因治疗的发展之初, 有学者提出了如下 3 个需要解决的基础问题. (1) 安全而有效的基因载体系统. (2) 转基因表达要持久. (3) 宿主免疫反应. 后两个问题对短期基因治疗(如肿瘤和疫苗)并不是限制性因素, 但对于大多数的基因治疗, 需要持久表达目的基因; 而安全有效的基因载体系统, 一直是基因治疗研究人员梦寐以求的目标.

目前的基因治疗方案大部分采用病毒载体, 最常见的病毒载体包括逆转录病毒(Retrovirus, RV)载体、慢病毒(Lentivirus, LV)载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体. 各病毒载体都具有各自的特点, 因而适用于不同的治疗目的, 如表 1 所示.

表 1 4 种常用基因治疗病毒载体的特点
Tab. 1 Four well-known gene therapy of viral vector's characteristics

特点	Ad	AAV	RV	LV
克隆容量/kbp	~ 37	~ 4.7	~ 7.5	~ 7.5
整合	几乎无	少(定点)	随机	随机
靶细胞	分裂期和静止期细胞	分裂期和静止期细胞	分裂细胞	分裂期和静止期细胞
转染效率	好	好	一般	一般
免疫反应	中等	小	小	小

从表 1 各病毒载体的特点可看出, 单一载体总存在这样或那样的缺点, 限制了其广泛的应用. 如果应用现代分子生物学技术将两种或者两种以上的病毒载体结构组合起来, 可得到一种兼容各自优点的

新型病毒载体, 理应比单个病毒载体更有优势。

嵌合病毒的制备对病毒学家来说并不是一个新课题, 他们早就利用嵌合病毒技术作为病毒研究的工具^[6]。基因治疗用嵌合病毒载体, 主要是为了增加宿主范围, 扩大转基因容量和生产滴度、组合基因元件以延长转基因表达时间等。Ad 载体的大容量与 AAV 载体的高安全性和转基因持续表达的特点如能得到有效结合, 从理论上讲应是极佳的组合。Fisher 等^[7]最早报道了 Ad/AAV 嵌合载体的开发和应用, 开辟了病毒载体的崭新研究领域。

2 Ad/AAV 嵌合载体的母体

2.1 Ad 载体^[8]

从结构上区分, Ad 载体可以分为 3 代。第 1 代 Ad 载体仅去除了腺病毒基因组中的 E1 基因。目前已有许多研究报道了第 1 代 Ad 载体在基因治疗方面的应用, 但该载体存在如下 3 点主要的不足。(1) 包装容量较小, 仅能转导 8 kbp 的外源性基因。(2) 残余的病毒基因表达会引起宿主的免疫应答和细胞毒性反应。(3) 转导基因在体内表达短暂。第 2 代 Ad 载体将病毒基因组中的 E2 或 E4 区切除或失活。虽然外源基因表达的效率有所提高, 机体免疫应答也有所降低, 但仍没有实质性解决机体免疫和载体包装能力等问题。

目前, 实验室研究及应用的 Ad 载体主要是采用第 3 代 Ad。它删除了病毒基因中所有开放阅读框, 仅含有必要的顺式元件(即 ITR 和邻近的包装信号序列)。其优点除保留了稳定、滴度高、转导效率高、宿主细胞范围广等外, 并将载体的包装能力增加至 37 kbp, 可同时表达多个基因、大分子蛋白的 cDNA 和一些控制基因表达的调控因子。另外, 由于没有病毒编码序列, 可以有效地减少机体的免疫反应, 延长外源基因的表达效率。然而, 第 3 代 Ad 载体仍存在如下 4 点不可忽视的缺点。(1) 存在少量辅助病毒的污染。(2) 可引起宿主的免疫应答。(3) 治疗基因表达持续时间较短。(4) 缺乏靶向性。

1999 年,《自然》杂志报道美国 18 岁的高中生 Gelsinger 因接受基因治疗致死事故, 所用的载体即采用第 3 代 Ad 载体^[9]。随后的调查表明: Ad 载体即使被灭活仍可刺激机体发生免疫反应, 破坏腺病毒感染的细胞, 使外源基因不能持续表达。同时, 体内所发生的与腺病毒有关的严重炎症反应, 尤其肝脏炎症对病人仍是致命的危险。

2.2 AAV 载体

AAV 是一种单链 DNA 缺陷型病毒, 基因组 DNA 约 4.7 kbp, 具有 2 个开放性阅读框架和 2 个反向末端重复序列。AAV 作为基因治疗载体, 主要体现在如下 6 个方面优势。(1) AAV 是一种人源性的病毒, 对人体无致病性, 免疫反应轻微。(2) 可定点整合至人的第 19 号染色体, 并能较稳定地存在, 从而避免了随机整合可能引起的抑癌基因失活和原癌基因激活的危险。(3) AAV 介导的基因转移系统可使外源基因持续稳定表达。(4) AAV 的宿主范围很广, 包括分裂期和静止期的多种细胞。(5) AAV 载体具有较好的热稳定性和抗酸碱性, 以及抗有机溶剂处理的特点, 便于储存。(6) 改装后的转染系列可具细胞特异靶向性。AAV 载体的缺点是可供插入容量小、病毒滴度低, 对某些细胞转染效率尚不理想等。

3 Ad/AAV 嵌合载体的制备方法

在 20 世纪末期的 Gelsinger 事故发生之前, 人们普遍认为第 3 代 Ad 载体的开发已解决了 Ad 安全性的问题, 下一步的目标就是实现目的基因的持续表达。因而, AAV 的可定点整合特性正好符合这一要求, 两者的结合顺理成章。AAV 的定点整合需要 Rep 蛋白的参与, 但 Rep 蛋白抑制 Ad 的复制, 如何解决 Rep 的反式提供问题成为 Ad/AAV 嵌合载体研究的主攻方向。

Fisher 等^[7]通过聚赖氨酸桥联, 将 Rep 质粒与重组 Ad/AAV 病毒结合在一起, 从而达到了 AAV 基因组的拯救与复制的设计目的。Recchia 等^[10]采用双 HD-Ad 载体法制备了重组 Ad/AAV 病毒。一个 HD-Ad 载体携带整合所需的 Rep 78 基因, 另一个 HD-Ad 载体则携带两端为 AAV-ITR 的转基因框。虽然 Rep 蛋白在起始时会干扰 Ad 的复制, 但逐渐与 Ad 的复制相适应, 并在 293CRE4 细胞连续传代扩增, 每细胞达 50~100 个转染单位^[10]。双载体共感染肝肿瘤细胞后, 在第 19 染色体的 AAVS1 位点

发生定向整合.

反向重复序列(IRs) 插入第 1 代 Ad 载体的基因组, 可以引起基因组精确重排, 产生仅含有两端 Irs, Ad 包装信号和 Ad ITRs, 没有其他病毒基因的 Ad 载体, 可包装成为功能性 Ad 颗粒. 以两端为 AAV-ITR 的转基因框代替 IRs, 构建 E1 缺失的 Ad 载体, 按照第 1 代 Ad 载体的生产工艺制备载体, 得到副产品 Δ d. AAV^[11]. Δ d. AAV 基因组内仅含有两端为 AAV-ITR 的转基因框, Ad 包装信号和 Ad ITRs 所生产 Δ Ad. AAV 载体的滴度为每个细胞 10 ng. 该载体嵌合载体可以转染人固定化细胞, 但转染率低于 rAAV 载体, 与第 1 代 Ad 载体相比, 细胞毒性明显降低. 基因组 Southern 分析证明, 如同预期发生了染色体整合.

采用第 1 代 Ad 载体的生产工艺, 会产生大量的辅助 Ad 病毒, 给纯化带来了困难, 极有可能在临床应用时产生免疫反应. Goncalves 等应用 PER. tTA. Cre/ Ad. floxed Ψ 生产系统, 建立了可以降低辅助 Ad 病毒的污染的生产工艺, 污染率可降低 99. 98%^[12]. 该方法的生产过程如图 1 所示. 在拯救(Rescue) 阶段, 用 pHV, pRep 和 pE2a 共转染 Ad E1 互补生产细胞. pHV 为重组 AAV/Ad 穿梭质粒, 含有 AAV ITRs, Ad 包装信号, 以及其之间的转基因. pRep 为 AAV Rep 表达质粒, pE2a 为 Ad E2a 表达质

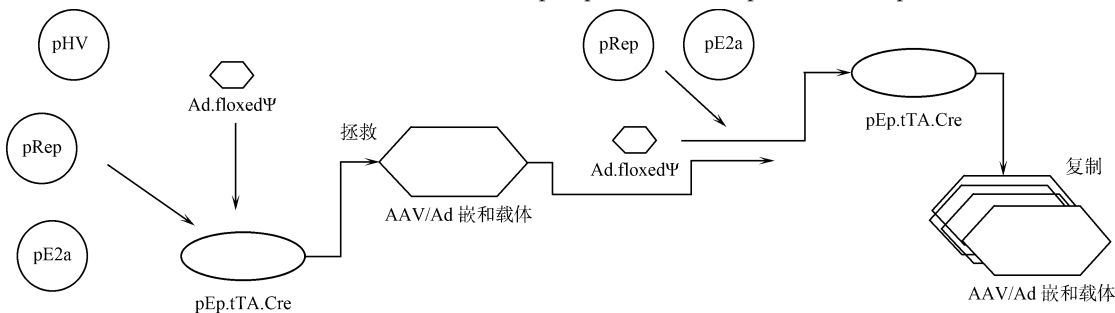


图 1 PER. tTA. Cre/ Ad. floxed 细胞的生产系统流程

Fig. 1 Diagram of the PER. tTA. Cre/ Ad. floxed cell production system

粒. 然后, 用 E1 缺失的 Ad 辅助病毒载体 Ad. floxed Ψ 感染细胞, 以反式提供 Ad 病毒包装所需的 Ad 结构蛋白和 AAV 辅助功能. 通过 AAV DNA 复制机制, 将 AAV/Ad 嵌合载体基因组从穿梭质粒切下并予复制. 最后, 通过顺式提供的 Ad 包装元件, 将 AAV/Ad 嵌合载体基因组组装成 AAV/Ad 嵌合病毒颗粒. 辅助病毒 Ad. floxed Ψ 因 Cre/loxP 介导的对其包装元件的切除而不能包装.

在扩增阶段, 用上一步得到的 AAV/Ad 嵌合病毒感染生产细胞, 并采用 pRep 和 pE2a 共转染. 仍由辅助病毒 Ad. floxed Ψ 反式提供 Ad 病毒包装所需的 Ad 结构蛋白和 AAV 辅助功能, 引入生产细胞核的 AAV/Ad 嵌合基因组, 通过 AAV DNA 复制机制而大量复制. 通过顺式提供的 Ad 包装元件, 生产大量的高滴度的 AAV/Ad 嵌合病毒颗粒.

为了进一步扩增 Ad/AAV 嵌合载体的包装容量, Goncalves 等又建立了双高容量 Ad/AAV 嵌合载体的制备工艺^[13]. 在该工艺中, 将 Ad DNA 复制机制与 AAV ITR 介导的二聚体化过程相结合, 形成的 Ad/AAV 嵌合载体含有尾尾相连的转基因组. 这样一个载体就承载了两个可以有效表达的转基因组, 相当于增加了一倍的疗效, 或者可以减少 Ad 病毒颗粒用量的 50%, 同时提高了其安全性.

4 Ad/AAV 嵌合载体的应用

4.1 稳定转染造血干细胞

遗传性血液疾病的基因治疗, 需要转基因的长期稳定的表达. Ad/AAV 嵌合载体介导的治疗基因在宿主细胞基因组的整合作用, 为长期稳定的表达提供了可能. Ad/AAV 嵌合载体的大容量, 可以同时引进基因表达调控元件, 以满足治疗的特殊要求. Shayakhmetov 等^[14] 采用双 Ad 载体法制备了 Ad/AAV 嵌合载体, 治疗基因为人 β 珠蛋白基因, 以及珠蛋白基因座控制区的 HS₂ 和 HS₃ 调控元件, 整个表达框为 11. 6 kbp. Ad/AAV 嵌合载体转染造血干细胞后, 表现出很好的造血干细胞趋向性. 实验 Southern 分析显示, 载体基因发生了随机整合, 可能与实验无 Rep 参与有关.

4.2 Duchenne 型肌营养不良症的基因治疗

Duchenne 型进行性肌营养不良症(DMD),是一种由于 DMD 突变引起的致死性 X 连锁性遗传病,男婴发病率为 1/3 500. DMD cDNA 基因全长 14 kbp,目前只有 Ad 载体的包装容量适合该基因. 但该病需要长期的治疗,限制了 Ad 载体的应用. 采用上述双高容量 Ad/AAV 嵌合载体的制备工艺^[13],不仅在一个载体内使转基因数量加倍,还加入了促进定点整合的 AAV p5IEE 元件,保障了长期使用的安全性. 在体外转染大鼠心肌细胞后,可见全长 DMD cDNA 基因的有效表达. 在 mdx DMD 小鼠模型,也实现了 DMD 在腓肠肌细胞的合成. 体外转染人宫颈癌细胞后,在 AAV Rep 78 和 Rep 68 蛋白的共同作用下,外源基因靶向整合于 AAVS1 基因座.

4.3 人内啡肽基因的表达研究

国内采用 Ad/AAV 载体进行了人内啡肽的体外表达研究^[15]. 内啡肽是中枢神经系统的一种重要的神经肽,主要由下丘脑和腺垂体神经内分泌细胞分泌. 内啡肽作用于 μ -阿片受体,不仅参与应激反应,也是机体重要的内源性镇痛物质. 插入到 Ad/AAV 载体的内啡肽基因,在转染细胞后能够正确翻译,并被分泌到细胞外.

5 Ad/AAV 嵌合载体的存在问题

与重组 Ad 载体相比,Ad/AAV 嵌合载体在转染的细胞内不表达任何 Ad 基因,所以细胞毒性大为降低. 在实验使用的剂量范围内,未见安全性的报道.

Ad/AAV 嵌合载体转基因组的整合作用,使得转基因的表达时间大为增加,可以实现持续表达的设计目的. 与重组 AAV 载体相比,Ad/AAV 嵌合载体的生产工艺简单,转基因容量成倍增加. 因载体外壳为 Ad 病毒蛋白,其宿主范围也扩大至静息期细胞.

但是,染色体的整合作用是一把双刃剑. 一方面,它能维持治疗基因在细胞中持续表达的能力;另一方面,随机整合也可能引致对宿主有害的突变. 定向整合是实现 AAV 优势的关键所在. 在没有 Rep 参与的情况下,Ad/AAV 嵌合载体转基因组在宿主染色体内发生的是随机整合. 虽然这有利于实现转基因的长期表达,但引起插入失活或突变的可能性,仍然是必须考虑并加以解决的关键问题;否则,将给今后的临床应用带来隐患. 在体内应用过程中,如何合理有效地引入 Rep 的参与,是今后研究的方向. Goncalves 等提出在 Ad/AAV 嵌合载体的非整合区加一个 Rep 条件表达调节单元,或通过第 2 载体提供 Rep 蛋白等,都是可供借鉴的研发思路^[13].

理想的基因治疗载体应当是安全高效、可调控、无免疫性、特异细胞靶向性和表达持久的^[16]. Ad/AAV 嵌合载体是近几年刚发展起来的嵌合病毒载体,它融合了 Ad 和 AAV 两种常用的病毒载体的优点,理论上接近理想临床应用的载体^[17]. 但新型的 Ad/AAV 嵌合载体的研究还处在起步阶段,还需要大量的,特别是动物体内的应用研究,去检验其优越性,去发现和解决潜在的各种问题,更重要的是满足临床治疗的需要. 随着对 Ad/AAV 嵌合载体的结构、制备工艺、功能、表达过程及安全性等方面的全面研究的深化和优化,可以预计,Ad/AAV 嵌合载体会在基因治疗领域得到更广泛的应用,并发挥其特有的功效.

参考文献:

- [1] CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease[J]. Science, 2000, 288: 669-672.
- [2] HACEIN-BEY-ABINA S, LE DEIST F, CARLIER F, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy[J]. N Engl J Med, 2002, 346: 1185-1193.
- [3] KAY M A, MANNO C S, RAGNI M V, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector[J]. Nat Genet, 2000, 24: 257-261.
- [4] AIUTI A, SLAVIN S, AKER M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning[J]. Science, 2002, 296: 2410-2413.
- [5] CHECK E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer[J]. Nature, 2005, 433: 561.
- [6] FRAEFEL C, BREAKFIELD X O. Hybrid vectors: A new generation of virus-based vectors designed to control

the cellular fate of delivered genes[J]. Gen Therapy, 1997(4):1281-1283

- [7] FISHER K J, et al. A novel adenovirus-adeno-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome[J]. Hum Gene Ther, 1996, (7): 2079-2087.
- [8] 刁 勇,王广基,许瑞安. 基因治疗研究进展[J]. 药学进展,2001,25(1):12-16.
- [9] LEHRMAN S. Virus treatment questioned after gene therapy death[J]. Nature, 1999,401: 517-518.
- [10] RECCHIA A, PARKS R J, LAMARTINA S, et al. Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:2615-2620.
- [11] LIEBER A, STEINWAERDER D S, CARLSON C A, et al. Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes[J]. Virol, 1999,73: 9314-9324
- [12] GONCALVES M A, VELDE I, JANSSEN J M. Efficient generation and amplification of high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors[J]. Virol, 2002, 76: 10734-10744
- [13] GONCALVES MAFV, NIEROP G P, TIJSEN M R, et al. Transfer of the full-length dystrophin coding sequence into muscle cells by a dual high-capacity hybrid viral vector with site-specific integration ability[J]. Virol, 2005,79(5): 3146-3162.
- [14] SHAYAKHMETOV D M, CARLSON C A, STECHER H, et al. A high-capacity, capsid-modified hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector for stable transduction of human hematopoietic cells[J]. Virol,2002, 76: 1135-1143.
- [15] 徐学武,俞卫锋,崔贞福,等. 表达人内啡肽的腺病毒 P 腺相关杂合病毒的构建及体外表达分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 856-859.
- [16] 许瑞安,刁 勇,谢海棠. 基因药物在临床上的最新应用和研发[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(10): 1092-1097.
- [17] 曲 光,徐 韬,王晋慧. 基因药物的构建与制备[M] // 许瑞安,肖卫东. 分子基因药理学. 北京: 北京大学出版社, 北京大学医学出版社, 2007: 1-35.

The Development Trend of Chimeric Vector of Adenovirus/ Adeno Associated Viral

SHU Jing-bo¹, DIAO Yong¹, XIAO Weidong²,
ZENG Tang-dai³, XU Rui-an¹

(1. Institute of Molecular Pharmacology, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School of Medicine, Pennsylvania State University, Pennsylvania, America;

3. Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China)

Abstract: Analyze three generations of the Ad and AAV's exhibits advantages and disadvantages in the capsid of adenovirus/adeno-associated virus Hybrid vectors. This article focuses on the latest development of design technique, produce technics, stable transduce Human Hematopoietic cells, duchenne muscular dystrophy's gene therapy, and Express analysis the fusion gene of human β -endorphin and so on, for adenovirus/adeno-associated virus Hybrid vectors, besides adenovirus/adeno-associated virus Hybrid vectors is developed just in latest years, it takes advantage of Ad and AAV vector, achieve clinical application's perfect purpose in theory, but it requires large numbers of experiments to test its advantage, especially experiment with animal, to fulfil the clinical therapy

Keywords: vector system; adenovirus; adeno-associated virus; hybrid vectors; clinical therapy

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)