

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202010006



重组腺相关病毒基因药物 三种滴度的比较与分析

王晓¹, 黄晓平², 黎玲¹, 刁勇¹

(1. 华侨大学 医学院, 福建 泉州 362021;

2. 泉州师范学院 化工与材料学院, 福建 泉州 362000)

摘要: 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)、实时荧光定量聚合酶链反应(Q-PCR)和转导方法对重组腺相关病毒(rAAV)的衣壳滴度、基因组滴度、转导滴度进行定量,并比较衣壳滴度/基因组滴度(P/GC)和基因组滴度/转导滴度(GC/TU).实验结果表明:3批 rAAV 的平均衣壳滴度为 $3.65 \times 10^{13} \text{ P} \cdot \text{mL}^{-1}$,平均基因组滴度为 $8.67 \times 10^{11} \text{ GC} \cdot \text{mL}^{-1}$,平均转导滴度为 $9.85 \times 10^9 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$,P/GC 平均值为 41.70,GC/TU 平均值为 88.20,P/GC 和 GC/TU 平均值接近于 AAV2 标准品,说明文中方法的制备工艺成熟、稳定,制备的 rAAV 感染活性较高.

关键词: 重组腺相关病毒; 衣壳滴度; 基因组滴度; 转导滴度; 基因治疗

中图分类号: R 446.6; R 394.6

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2021)04-0507-05

Comparison and Analysis of Three Titers of Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Drugs

WANG Xiao¹, HUANG Xiaoping², LI Ling¹, DIAO Yong¹

(1. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

Abstract: The particle titer, genome titer and transduction titer of recombinant adeno-associated virus (rAAV) were quantified by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR) and transduction method, and then the particle titer/genome titer (P/GC) and genome titer/transduction titer (GC/TU) were compared. The experiment results showed that the average particle titer of rAAV in three batches was $3.65 \times 10^{13} \text{ P} \cdot \text{mL}^{-1}$, the average genome titer was $8.67 \times 10^{11} \text{ GC} \cdot \text{mL}^{-1}$, the average transduction titer was $9.85 \times 10^9 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$, the average value of P/GC was 41.70 and the average value of GC/TU was 88.20. The average values of P/GC and GC/TU were close to the AAV2 standard, indicating that the preparation process of the method in this paper is mature and stable, and the prepared rAAV has high infectious activity.

Keywords: recombinant adeno-associated virus; particle titer; genome titer; transduction titer; gene therapy

重组腺相关病毒(rAAV)是一种无包膜的单链 DNA 病毒,因自身复制缺陷、基因组结构简单、免疫原性小等优点,被认为是目前最安全的基因治疗载体之一^[1-2].近年来,rAAV 载体作为基因治疗载体已

收稿日期: 2020-10-08

通信作者: 刁勇(1967-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事基因药物的研究. E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81371669);福建省自然科学基金资助项目(2017J01548);福建省泉州市科技计划项目(2020C061,2016N070);华侨大学科研基金资助项目(17BS501)

在遗传性疾病、癌症、干细胞和神经退行性疾病等研究中取得了显著的治疗效果^[3-6]. 目前,世界范围内有 100 余项以 rAAV 为载体的基因药物已完成或正在进行临床研究^[7]. 2017 年 12 月,治疗遗传性视网膜病变的基因药物 Luxturna 上市^[8],这给基因治疗带来了美好前景. 然而,规模化制备和质量控制等因素制约了 rAAV 在临床上的应用,尤其是缺少准确、可靠的 rAAV 滴度定量标准方法,这使不同实验室的 rAAV 剂量由于缺少参比标准而无法进行归一化处理.

rAAV 滴度分为衣壳滴度、基因组滴度、转导滴度和感染滴度等. 目前,临床剂量通常基于 rAAV 载体的基因组滴度,准确地定量载体是药物获得最大疗效和最小毒性的前提条件^[9],也是不同工艺和不同厂家产品横向比较的依据^[10-11]. 实时荧光定量聚合酶链反应(Q-PCR)是常用的 rAAV 基因组滴度测定法,但传统的 Q-PCR 具有适用范围窄、易产生系统性误差和易受杂质干扰等缺点^[11-12];采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定衣壳滴度的价格昂贵,且无法区分空心病毒;转导滴度受转基因和细胞的限制,不具有普适性;感染滴度测定需要腺病毒辅助,再提取细胞 DNA,通过 Q-PCR 测定病毒基因组拷贝数,测定过程繁琐,尚未广泛得到应用. 腺相关病毒参比标准事务委员会推荐 ELISA, Q-PCR, 半数组织培养感染剂量(TCID₅₀)等方法一起使用,作为 rAAV 检定的测量方法^[13]. 由于 TCID₅₀ 的测量过程繁琐、费时费力,故采用转导方法代替 TCID₅₀. 基于此,本文采用 ELISA, Q-PCR 和转导方法对实验室制备的 rAAV 进行定量.

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞株

质粒 pCMV-ITR-GFP, pH22, pdf6 为实验室保存;细胞株 293T 购自美国模式菌种收藏中心(ATCC).

1.2 主要试剂

Real-time PCR 试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司); AAV2 Titration ELISA 试剂盒(德国 PRO-GEN Biotechnik 公司); RNase(北京市庄盟生物科技公司);氯化铯(德国 Sigma 公司);Benzonase(德国 Merck 公司);聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI, 美国 Polysciences 公司);DMEM, 1640 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司).

1.3 rAAV 的制备

参照实验室建立的制备 rAAV 方法,当 293T 细胞密度为 85% 时,进行三质粒共转染,质粒与 PEI 按照质量比为 1:3 进行混合,静置后加入 293T 细胞中;72 h 后收获病毒,进行氯化铯梯度离心分离、透析和浓缩,制备 rAAV,共制备 3 批 rAAV,后续实验每批重复 3 次.

1.4 ELISA 测定 rAAV 衣壳滴度

采用 AAV2 Titration ELISA 试剂盒对 rAAV 进行定量. 首先,将试剂盒中的标准品稀释至 $10^7 \sim 10^9$ P · mL⁻¹ 范围内,以标准样品浓度的对数值($\lg C_s$)为横坐标,以其光密度的对数值($\lg D$)为纵坐标,绘制 rAAV 标准曲线(图 1). 然后,将 rAAV2 原液进行稀释,按照说明书进行操作,酶标仪读取光密度 D_{450} ,通过标准曲线计算 rAAV2 衣壳滴度.

1.5 Q-PCR 测定 rAAV 基因组滴度

以 GFP5'-GAGCGCACCATCTTCTTCAA-3'; GF-PR5'-TCCTTGAAGTCGATGCCCTT-3'为引物,以 SYB-R Green 为染料,反应体系为 25 μ L,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 40 s, 40 个反应循环.

1.6 转导滴度的测定

制备 293T 细胞悬液密度为 1×10^5 个 · mL⁻¹,按照 100 μ L · 孔⁻¹接种至 96 孔板,待细胞贴壁后加入 rAAV;取 10 μ L 病毒原液,按 10 倍进行梯度稀释,取 10 μ L 稀释后的 rAAV 加入 96 孔板中;4 h 后,

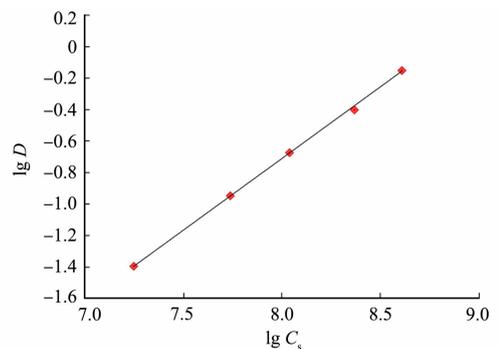


图 1 rAAV 标准曲线

Fig. 1 Standard curves of rAAV

更换为新鲜培养液并添加丁酸钠;24 h 后,观察荧光表达情况,在最高稀释梯度的孔中计算绿色荧光细胞数目,可得 rAAV 的转导滴度。

2 结果与分析

2.1 rAAV 衣壳滴度

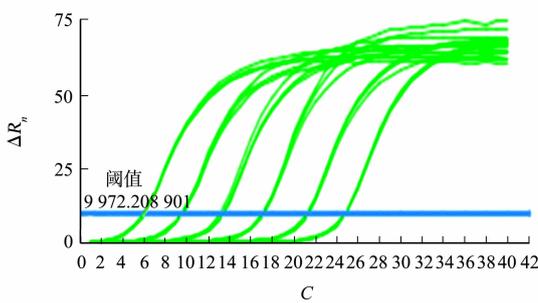
rAAV 标准曲线的回归方程为 $y=0.915x-8.032$, 相关系数 $R^2=0.998$, 根据标准曲线计算 3 批包装、纯化的 rAAV 的衣壳滴度, 结果如表 1 所示。表 1 中:SD 为标准差。由表 1 计算可知:3 批 rAAV 平均衣壳滴度为 $3.65 \times 10^{13} \text{ P} \cdot \text{mL}^{-1}$; 不同批次制备得到的 rAAV 产量相差 2 倍左右, 这是因为 rAAV 在制备过程中受到细胞状态、数目、转染条件和纯化工艺等的影响。

表 1 不同批次的 rAAV 衣壳滴度
Tab.1 Particle titers of rAAV in different batches

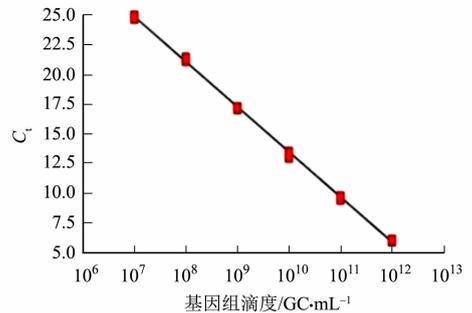
批次	衣壳滴度			衣壳滴度平均值	SD
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
1	3.51×10^{13}	3.72×10^{13}	3.43×10^{13}	3.55×10^{13}	1.50×10^{12}
2	1.64×10^{13}	1.75×10^{13}	1.89×10^{13}	1.69×10^{13}	1.40×10^{12}
3	5.81×10^{13}	5.23×10^{13}	6.09×10^{13}	5.71×10^{13}	4.30×10^{12}

2.2 rAAV 基因组滴度

以质粒 pAMG-EGFP 为标准品, 绘制 Q-PCR 扩增曲线和标准曲线, 如图 2 所示。图 2 中: ΔR_n 为产物的荧光值; C 为循环次数; C_t 为扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时, 荧光值对应的 PCR 循环次数; $R^2=0.998$ 。依据标准曲线计算 3 批 rAAV 基因组滴度, 结果如表 2 所示。由表 2 计算可知:3 批 rAAV 平均基因组滴度为 $8.67 \times 10^{11} \text{ GC} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。ELISA 方法测得的 rAAV 不仅包括实心病毒、空心病毒, 还包括不完整病毒。因此, ELISA 测定的衣壳滴度一般比基因组滴度大, 衣壳滴度与基因组的比值 P/GC 能体现 rAAV 在包装和纯化过程中的工艺优劣。腺相关病毒参比标准事务委员会推出 AAV2 标准品的 P/GC 为 28, 而实验室制备的 3 批 rAAV 的 P/GC 分别为 42.16, 40.33, 42.61 (平均值为 41.70), 与 AAV2 标准品的 P/GC 较为接近。



(a) Q-PCR 扩增曲线



(b) Q-PCR 标准曲线

图 2 Q-PCR 扩增曲线与标准曲线

Fig. 2 Q-PCR amplification curves and standard curves

表 2 不同批次的 rAAV 基因组滴度

Tab.2 Genome titers of rAAV in different batches

批次	基因组滴度			基因组滴度平均值	SD
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
1	8.32×10^{11}	8.82×10^{11}	8.19×10^{11}	8.42×10^{11}	3.57×10^{10}
2	3.91×10^{11}	4.16×10^{11}	4.49×10^{11}	4.19×10^{11}	2.90×10^{10}
3	1.37×10^{12}	1.24×10^{12}	1.42×10^{12}	1.34×10^{12}	9.57×10^{10}

2.3 rAAV 转导滴度

以感染复数(MOI)为 250 : 1,500 : 1,1 000 : 1 分别转导 HeLa 细胞, 其荧光表达情况, 如图 3 所示。由图 3 可知: 随着 MOI 增大, 表达绿色荧光的细胞数目增多。rAAV 经过稀释后转导 293T 细胞, 观

察表达 GFP 细胞数目,统计分析得到 rAAV 转导滴度,如表 3 所示.由表 3 计算可知:3 批 rAAV 平均转导滴度为 $9.85 \times 10^9 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$.基因组滴度与转导滴度的比值 GC/TU 可反映 rAAV 的转染、亲嗜和表达能力的优劣,GC/TU 越小,则能力越强.腺相关病毒参比标准事务委员会推出 AAV2 标准品的 GC/TU 为 64.4,实验室制备的 3 批 rAAV 的 GC/TU 分别为 88.45,88.58,87.58(平均值为 88.20),与 AAV2 标准品的 GC/TU 较为接近.

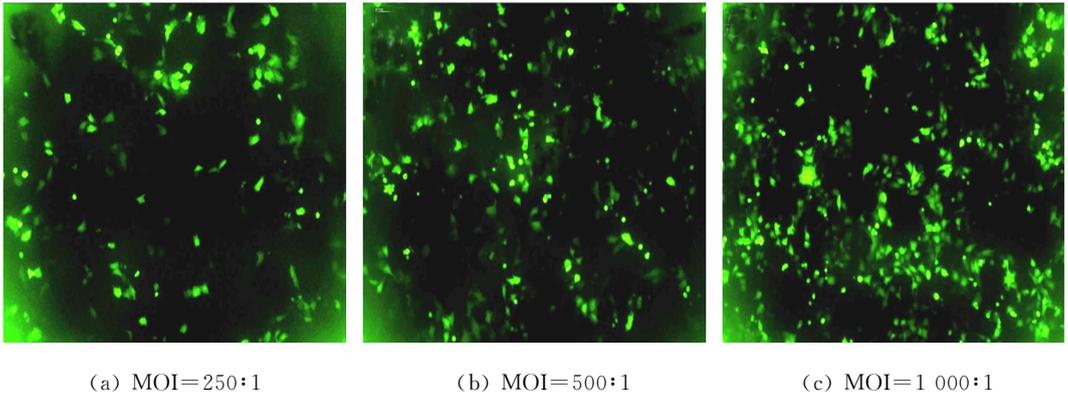


图 3 rAAV-GFP 转导荧光表达情况

Fig. 3 Transduction fluorescence expression situation of rAAV-GFP

表 3 不同批次的 rAAV 转导滴度

Tab. 3 Transduction titers of rAAV in different batches

$\text{TU} \cdot \text{mL}^{-1}$

批次	转导滴度			转导滴度平均值	SD
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
1	9.41×10^9	9.97×10^9	9.18×10^9	9.52×10^9	4.04×10^8
2	4.42×10^9	4.70×10^9	5.07×10^9	4.73×10^9	3.36×10^8
3	1.55×10^{10}	1.41×10^{10}	1.62×10^{10}	1.53×10^{10}	1.07×10^9

3 讨论

目前,多数实验室对 rAAV 滴度定量采用 Q-PCR 方法,但 Q-PCR 只能测定 rAAV 包裹的基因组,无法测定空壳 rAAV,而空壳 rAAV 不仅不会表达转基因,反而会引起免疫反应^[14-20].文中利用 ELISA、Q-PCR 和转导方法,分别测定 rAAV 的衣壳滴度、基因组滴度和转导滴度,并计算其 P/GC 平均值为 41.70,GC/TU 平均值为 88.20,这与 AAV2 标准品的 P/GC,GC/TU 较为接近^[21],表明制备的 rAAV 质量与标准品相当.

rAAV 基因药物的临床研究已充分证实它具有有效性和安全性,但临床试验仍发现 rAAV 衣壳蛋白会引起严重的细胞免疫毒性.建立完整的 rAAV 基因药物的质量控制体系,降低免疫反应,需要保证 rAAV 转基因药效的同时尽量减少剂量^[16],这要求 rAAV 的纯度高、空壳少、亲嗜性高.单一的基因组滴度或转导滴度无法反映 rAAV 的质量标准,因此,在 rAAV 质量标准建立时,需要测定 rAAV 的衣壳滴度、基因组滴度和转导滴度,文中研究为 rAAV 质量标准的建立提供了一种新的思路.

参考文献:

- [1] DHAMA K, GOWTHAMAN V, KARTHIK K, *et al.* Haemorrhagic enteritis of turkeys-current knowledge[J]. The Veterinary Quarterly, 2017, 37(1): 31-42. DOI:10.1080/01652176.2016.1277281.
- [2] NATHWANI A C, TUDDENHAM E G, RANGARAJAN S, *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B[J]. New England Journal of Medicine, 2011, 365(25): 2357-2365. DOI:10.1056/NEJ-Moal108046.
- [3] DECREASESAC M, MATTSSON B, LUNDBLAD M, *et al.* Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons[J]. Neurobiology of Disease, 2012, 45(3): 939-953. DOI:10.1016/j.nbd.2011.12.013.

- [4] MORSCHEID S, REY-RICO A, SCHMITT G, *et al.* Therapeutic effects of rAAV-mediated concomitant gene transfer and overexpression of TGF- β and IGF-I on the chondrogenesis of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10): 2591. DOI:10.3390/ijms20102591.
- [5] PIERCE E A, BENNETT J. The status of RPE65 gene therapy trials: Safety and efficacy[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5(9): a017285. DOI:10.1101/cshperspect.a017285.
- [6] SUN Erlin, HAN Ruifa, LU Bingxin. Gene therapy of renal cancer using recombinant adeno-associated virus encoding human endostatin[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(3): 2789-2796. DOI:10.3892/ol.2018.9036.
- [7] WANG Dan, TAI P W L, GAO Guangping. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18(5): 358-378. DOI:10.1038/s41573-019-0012-9.
- [8] DARROW J J. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy[J]. *Drug Discovery Today*, 2019, 24(4): 949-954. DOI:10.1016/j.drudis.2019.01.019.
- [9] WAGNER A, RÖHRS V, KEDZIERSKI R, *et al.* A novel method for the quantification of adeno-associated virus vectors for RNA interference applications using quantitative polymerase chain reaction and purified genomic adeno-associated virus DNA as a standard[J]. *Human Gene Therapy Methods*, 2013, 24(6): 355-363. DOI:10.1089/hgtb.2013.095.
- [10] 刁勇,王启钊,吕颖慧.重组腺相关病毒基因药物的病毒滴度定量测定[J].*中国新药与临床杂志*, 2010, 29(10): 728-732.
- [11] 肖桂清,杨会勇,刁勇.重组腺相关病毒质量控制的 qPCR 技术研究进展[J].*华侨大学学报(自然科学版)*, 2014, 35(2): 191-195. DOI:10.11830/issn.1000-5013.2014.02.0191.
- [12] WERLING N J, SATKUNANATHAN S, THORPE R, *et al.* Systematic comparison and validation of quantitative real-time PCR methods for the quantitation of adeno-associated viral products[J]. *Human Gene Therapy Methods*, 2015, 26(3): 82-92. DOI:10.1089/hgtb.2015.013.
- [13] SNYDER R O, FLOTTE T R. Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors[J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2002, 13(5): 418-423. DOI:10.1016/S0958-1669(02)00369-5.
- [14] 刁勇,王启钊,肖卫东.重组腺相关病毒基因药物的细胞免疫毒性及对策[J].*药科学报*, 2010, 45(9): 1071-1077.
- [15] 刁勇,许瑞安.重组腺相关病毒载体诱导的天然免疫反应及机制[J].*微生物学报*, 2012, 52(5): 550-557.
- [16] 张国海,曾淑兰,许瑞安.在降低 rAAV 基因药物免疫反应中减少载体剂量并保持高效表达和药效的实施策略 [J].*药科学报*, 2013, 48(3): 305-314.
- [17] KHASA H, KILBY G, CHEN Xiaoyu, *et al.* Analytical band centrifugation for the separation and quantification of empty and full AAV particles[J]. *Molecular Therapy: Methods and Clinical Development*, 2021, 21: 585-591. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.04.008.
- [18] WANG Qizhao, DONG Biao, KATIE A, *et al.* Syngeneic AAV pseudo-particles potentiate gene transduction of AAV vectors[J]. *Molecular Therapy: Methods and Clinical Development*, 2017, 4: 149-158. DOI:10.1016/j.omtm.2016.12.004.
- [19] BENSKEY M J, SANDOVAL L M, MANFREDSSON F, *et al.* Continuous collection of adeno-associated virus from producer cell medium significantly increases total viral yield[J]. *Human Gene Therapy Methods*, 2016, 27(1): 32-45. DOI:10.1089/hgtb.2015.117.
- [20] QU Guang, BAHR-DAVIDSON J, PRADO J, *et al.* Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 140(1/2): 183-192. DOI:10.1016/j.jviromet.2006.11.019.
- [21] 蒙青林,张彬彬,张春.测定重组腺相关病毒基因组滴度的 qPCR 新方法[J].*生物工程学报*, 2013, 29(2): 235-242.

(责任编辑:钱筠 英文审校:刘源岗)