

## 第三代腺病毒载体的改良与应用

陈琳,薛绪潮\*

(第二军医大学长海医院普通外科,上海 200433)

**[摘要]** 腺病毒载体是一种非常有效的转基因载体,具有高效率、低致病性、高滴度及不整合入宿主细胞染色体等优点,广泛应用于基因治疗。第一、二代腺病毒载体仍有许多不足之处,在其基础上发展了第三代腺病毒载体。第三代腺病毒载体与前者相比,具有低免疫原性及高容量等优点,在基因治疗中表现出独特优势。然而,由于辅助病毒污染的存在及病毒产量有待提高,第三代腺病毒载体的临床应用仍面临一定困难。

**[关键词]** 第三代腺病毒;遗传载体;辅助病毒

**[中图分类号]** Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0722-04

### Modification and application of the third-generation adenovirus vectors

CHEN Lin, XUE Xu-chao\* (Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** Adenovirus as gene transfer vector is characterized by high transfection efficiency, high titer, good stability in target cells and low pathogenicity, and has been widely used in gene therapy. Compared to first- and second-generation adenovirus vectors, the third-generation adenovirus vectors have unique advantages for gene therapy because of their low immunogenicity and high capacity. However, the clinical application of the third-generation adenovirus vectors is hampered by the existence of helper contamination and difficulties in their large-scale production.

**[KEY WORDS]** third-generation adenovirus; genetic vectors; helper viruses

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7): 722-725]

腺病毒载体是一种非常有效的转基因载体,具有高效率、高滴度、低致病性及不整合入宿主细胞染色体等优点。然而,第一、二代腺病毒载体仍有许多不足之处,如包装容量小、细胞毒性大、免疫原性强及表达时相短等。因此,在第一、二代腺病毒载体的基础上发展了第三代腺病毒载体,又称辅助病毒依赖型腺病毒(helper-dependent adenovirus)或空壳载体(gutless vector),既保留了传统腺病毒载体的优点,又具有安全、长效、高容量等特点,表现出在人类基因治疗中的特殊优势及良好前景。

### 1 第三代腺病毒载体简介

**1.1 传统腺病毒载体** 腺病毒载体共分为三代,其中第一、二代腺病毒载体又称为传统腺病毒载体。第一代腺病毒载体是去除了 E1/E3 基因表达盒的腺病毒,可以携带大小为 6.5~8 kb 的目的基因,外源性基因表达盒(包括外源启动子、目的基因与终止子)一般被插入到 E1 区对应处。第一代腺病毒通过腺病毒包装细胞系(如 293 细胞)反式提供 E1 区的功能,增殖并产生成熟的腺病毒颗粒。第一代腺病毒载体的优点是转基因能力很强,能够获得高滴度的病毒,适合大多数的基因治疗方案;其缺点在于载体的包装容量偏小,免疫原性强,容易被机体免疫系统清除而无法长效表达目的基因。

第二代腺病毒载体是在第一代的基础上,将病毒基因组的 E3/E4 区部分或全部进行了缺失突变,缺失的功能仍由辅助细胞株补充<sup>[1]</sup>。载体中还加入了可调控基因表达的温

敏因子,消除了复制 DNA 和产生可复制型腺病毒(RCA)的可能。第二代腺病毒载体的优点是免疫原性明显低于第一代,包装容量也扩增至 14 kb;其缺点是成熟腺病毒颗粒的产量较低,病毒滴度下降,仍未充分解决免疫反应和包装能力等问题。对于传统腺病毒载体而言,宿主的免疫反应似乎是一道难以逾越的障碍,严重影响了载体对外源基因的长效表达和重复应用。

**1.2 第三代腺病毒载体** 第三代腺病毒载体又称空壳载体<sup>[2]</sup>,顾名思义,它去除了腺病毒全部的编码反式作用蛋白的基因,仅保留了两端的反向末端重复序列(ITR)以及包装信号( $\Psi$ )等少量的腺病毒复制及包装所必需的顺式结构,其去除的腺病毒蛋白编码序列的功能由辅助病毒提供。第三代腺病毒载体系统主要由空壳载体、辅助病毒以及包装细胞株三部分组成。空壳载体为携带目的基因的载体;包装细胞株是腺病毒包装的场所;辅助病毒是 E1/E3 区缺失的复制缺陷型腺病毒,能为空壳载体的复制提供全部所需的反式作用蛋白,并大量生产衣壳以供空壳载体包装成有感染能力的病毒颗粒。5 型腺病毒(Ad5)及三代腺病毒载体的结构如图 1 所示<sup>[3]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30571830). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571830).

**[作者简介]** 陈琳,博士生, E-mail: linchen79@163.com

\* Corresponding author. E-mail: xuexch@163.com

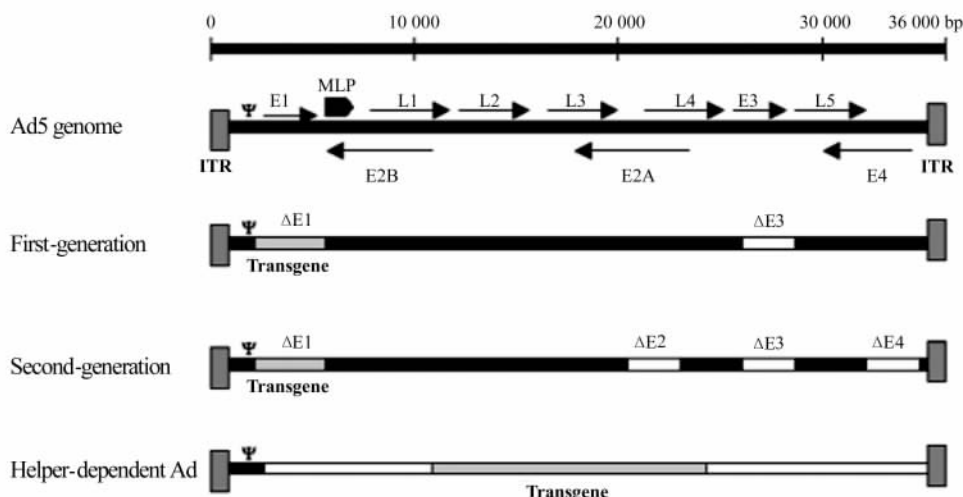


图1 5型腺病毒及三代腺病毒载体的基因结构图

Fig 1 Adenovirus serotype 5 genome and different generations of adenoviral vectors

Early transcripts are represented by E1-E4 regions and late transcripts are represented by L1-L5 regions. MLP: Major late promoter; Ψ: Packaging signal

第三代腺病毒载体不仅继承了传统腺病毒载体的优点,还有其独特优势<sup>[3]</sup>:(1)由于其不表达腺病毒自身蛋白,显著降低了细胞毒性与免疫原性,安全性更好,表达目的基因的时间更长;(2)转载容量大大提高,达到36 kb,可同时表达多个基因及一些能控制基因表达的调控因子;(3)由辅助病毒决定载体的血清型,采用不同的辅助病毒就可包装出不同血清型的空壳载体。理论上,第三代腺病毒载体能够克服传统腺病毒载体的基因泄漏表达及包装容量有限等缺点,可反复应用于临床治疗。

## 2 第三代腺病毒载体面临的问题

尽管第三代腺病毒载体能够利用病毒编码序列的缺失逃避机体免疫系统的侦察,有其独特优势,但要将其应用于临床,仍存在以下困难:

(1)辅助病毒污染问题:第三代腺病毒载体的扩增必须在辅助病毒的协同下,经过数轮感染生长才能实现。尽管在完成扩增后可通过氯化铯纯化法去除辅助病毒,但难以完全消除污染,第三代腺病毒的临床应用亦因此受到阻碍<sup>[4]</sup>。

(2)缺乏高效的生产系统:空壳载体本身增殖能力低,生产成本高,氯化铯纯化法的应用亦限制了其大量生产。不仅如此,辅助病毒的结构及其提供反式互补功能的效率,重组酶的结构及表达重组酶的细胞系的效率等,都可能影响空壳载体的生产。

(3)免疫应答问题:基因治疗往往需要反复应用病毒载体,而反复应用第三代腺病毒载体仍有引起机体免疫炎症反应的可能<sup>[4-5]</sup>。Roth等<sup>[6]</sup>证明,由于病毒衣壳具有免疫原性,空壳载体仍能引起机体的免疫反应。尽管空壳载体具有较高的转基因效率,但如果没有良好的降低免疫反应的方法,针对之前感染或应用的腺病毒产生的中和抗体将明显减低甚至清除治疗用病毒载体。

## 3 第三代腺病毒载体在基因治疗中的应用

3.1 应用领域的拓展 由于第三代腺病毒载体的独特优势,其面临的应用领域非常宽广,但主要集中在基因相关疾病的治疗上。通过携带不同的具有针对性的治疗基因,国内外已有多项利用第三代腺病毒载体治疗动物模型的研究。治疗方向主要包括:利用转基因表达产物抑癌的肿瘤治疗;将转基因传递到组织细胞内弥补缺陷基因的基因治疗;利用转基因表达产物进行辅助补充治疗等。

多项研究结果显示,空壳载体可用于血管及血液疾病治疗并产生良好疗效。Wen等<sup>[7]</sup>构建携带尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂的第一代腺病毒载体及空壳载体,分别注入兔颈动脉内,发现空壳载体可在动物体内持续高水平表达超过8周。实验证明空壳载体不仅表达目的基因的时效长,引起的免疫炎症反应也远远低于第一代腺病毒,在治疗血管疾病方面具有独特优势。Oka等<sup>[8]</sup>利用空壳载体在鼠低脂蛋白血症模型中表达人载脂蛋白A~I,结果显示目的基因可以持续稳定的表达,且没有引起免疫反应,对低脂蛋白血症疗效明显。Kim等<sup>[9]</sup>发现在小鼠模型中,利用空壳载体进行基因治疗的高脂血症鼠的生存时间有明显改善。在此项研究中,能够检测到外源基因表达的时间长达2.5年,充分体现了第三代腺病毒载体的长效性。Reddy等<sup>[10]</sup>利用空壳载体在鼠血友病模型中表达Ⅷ因子,结果显示其改善血友病的时间超过9个月,亦是第三代腺病毒载体在血液循环中持续高效地表达治疗基因的有利证明。

空壳载体还有应用于治疗遗传性疾病的可能。Bilbao等<sup>[11]</sup>建立孕鼠模型,将空壳载体及第一代腺病毒载体分别转入鼠胚胎体内,治疗胎儿肌营养不良症,结果发现空壳载体可以介导转基因在胎儿体内长效表达,对肌营养不良具有良好的疗效。由此可见,空壳载体应用于妊娠期的胎儿治疗

遗传疾病具有很大的发展潜力。不仅如此,空壳载体还可用于治疗其他多种疾病。Mian等<sup>[12]</sup>利用空壳载体转导人鸟氨酸氨甲酰基转移酶入鼠体内,结果发现目的基因能够持续高效表达,使鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症(尿素循环紊乱)的症状完全缓解,没有明显毒副作用,疗效可持续6~12个月以上。实验结果提示,细胞内酶的缺陷可以通过高效的基因转导与表达进行弥补,而空壳载体介导的基因替代疗法在此领域独具优势。

**3.2 应用方法的改进** 在拓展第三代腺病毒载体的应用范围的同时,如何改进病毒载体的应用方式以使其效率更高、毒性更低,也是学者们研究的热点。其中,靶向双基因-病毒治疗策略的研究就取得了良好进展,即在靶向载体中插入两个有协同效应的基因以增加其抗癌功能。有实验室尝试将该策略与第三代腺病毒载体结合,以期产生更好的生物治疗效果<sup>[13]</sup>。

此外,Brunetti-Pierri等<sup>[14]</sup>认为全身性的注射病毒载体是引起机体强烈炎症反应的主要原因,通过高压注射的方法将第三代腺病毒载体注入鼠体内,观察肝脏、脾脏等脏器及血液中IL-6等炎症因子的变化,结果发现第三代腺病毒载体具有很高的肝脏特异性,并未引起机体强烈的全身炎症反应,为第三代腺病毒载体进行安全高效的、肝脏靶向的基因治疗提供了新的思路和证明。不仅如此,Brunetti-Pierri等<sup>[15]</sup>还在非人灵长类动物体内实验,将肝脏的出入血路暂时闭合,由门静脉向肝脏内注射空壳载体,以延长载体与肝细胞的接触时间,从而使载体的全身性血运播散降低,取得高效的肝脏转导效果。结果表明,虽然此方法伴随外科手术的创伤,但是其能够介导稳定的、高水平的转基因表达,且没有任何长期毒性,尤其是对于那些目前还没有有效治疗手段或只能进行肝脏移植的重症患者而言,更是值得继续探索的方案。

## 4 第三代腺病毒载体系统的改良

**4.1 重组系统的发展** 1996年,Graham等采用位点特异性的Cre-LoxP重组系统去除辅助腺病毒的包装信号,失去了包装信号的辅助病毒仍能提供空壳载体所需的各种腺病毒蛋白,但不能包装成成熟的腺病毒颗粒,从而减少混杂的辅助病毒。Ng P等开发了FLP/frt系统(酵母内发现的位点特异性重组系统),用酵母的FLP重组酶和frt序列取代Cre重组酶和LoxP序列。与Cre-LoxP相比,FLP/frt系统对辅助病毒包装信号的剪切效率更高<sup>[16]</sup>。

为进一步控制辅助病毒污染,Cheschenko等<sup>[17]</sup>利用昆虫细胞产生杆状病毒,此病毒内包含着除包装信号外的大部分腺病毒基因。用该病毒感染293细胞后,腺病毒基因组被释放,生产出空壳腺病毒。此法虽然避免了辅助病毒污染,但容易产生可复制腺病毒(replication competent adenovirus, RCA),难以得到高产量的腺病毒。Sargent等<sup>[18]</sup>采用限制腺病毒包装容量的方法来降低辅助病毒的污染。他们设计出序列长度大于35 kb并缺失蛋白IX(protein IX)的辅助病毒,此病毒可以在提供pIX的293细胞中复制,产生腺病毒复制包装所需的蛋白,但自身由于序列过长而无法包装。Soudais

等<sup>[19]</sup>通过突变辅毒的包装信号,改变辅助病毒基因片段的大小(基因组大于或小于最佳长度都会影响包装效率),降低辅助病毒基因组的包装效率,减少辅助病毒污染。

**4.2 选择合适的特异性启动子** 肿瘤特异性启动子虽然具有治疗靶向性,但其转基因表达效率往往较低,需要予以解决。Takikawa等<sup>[20]</sup>构建含有AFP启动子和转录激活因子的载体及含有AFP启动子和Cre序列的载体,用于治疗肝细胞癌。这种使腺病毒载体既具有高肿瘤靶向性,又能在肿瘤组织中高效表达外源基因的方法,取得了一定效果。钱程及Guan等<sup>[5,21]</sup>构建了在AFP启动子调控下的第三代腺病毒与塞姆利基森林病毒(SFV)的杂交病毒载体,该载体可以在肝癌动物模型内高效率高靶向性地表达IL-12,疗效良好。

组织特异性启动子能使载体更稳定高效地表达目的基因。Dudley等<sup>[22]</sup>在治疗进行性假肥大性肌营养不良症时,用腺病毒载体转导肌营养不良抗肌萎缩蛋白的全长cDNA,同时使用细胞巨化病毒的增强子和 $\beta$ 肌动蛋白的启动子,目的基因表达时间可达1年以上。钱程及Wang等<sup>[5,23]</sup>生产了包含有RU486诱导系统的肝脏特异性表达IL-12的第三代腺病毒载体,并进行体内实验和体外实验,结果证明空壳载体可以安全长效地、可调控地表达外源基因,且肝脏特异性良好。研究者在载体构建中加入肝特异性的TTR启动子和RU486调控系统,结果发现肝细胞出现IL-12的高效表达,其峰值依赖于载体和RU486诱导剂的剂量;通过间断性持续给予RU486,可维持IL-12的持续高水平至少48周,对肿瘤动物模型有明显疗效。

**4.3 腺病毒的纯化与测定** 第三代腺病毒生产过程中,存在辅助病毒和RCA的污染,必须通过氯化铯密度梯度离心法进行纯化,也因此限制了空壳载体的大量生产。Puntel等<sup>[4]</sup>在氯化铯纯化的基础上,将载体DNA从感染的细胞及组织中分离出来,采用快速可靠且敏感的实时定量PCR法,精确测定空壳载体、辅助病毒及RCA的量,以期进一步提高空壳载体用于基因治疗的安全性。同时,他们还证明在动物实验及临床试验中,定量PCR可以精确定量组织样品中的腺病毒基因,为空壳载体临床应用的安全性做进一步的保障。有学者将第三代腺病毒载体进行聚乙二醇(PEG)化修饰,结果发现修饰后的载体在动物体内引起的免疫炎症反应较低,可逃避巨噬细胞及枯否细胞的吞噬。实验结果提示对空壳载体进行PEG化修饰既能减轻载体引起的免疫反应,又不影响其转基因的高效表达<sup>[24-25]</sup>。

## 5 展望

空壳载体不仅保留了传统腺病毒载体基因转染效率高的优点,还进一步提高了安全性,扩大了基因的转染容量,并且大幅延长了目的基因的表达时间,具有其他转基因载体所无法比拟的优越性。尽管临床应用第三代腺病毒载体面临严重挑战,但如果基因治疗载体系统没有更好的替代者,它仍具有蓬勃的生命力。相信随着研究的进展,生产出安全高效,靶向性强,表达时间长并可调控的第三代腺病毒载体,并将其应用于临床为患者带来疗效的前景并不遥远。

## [参考文献]

- [1] Moorhead J W, Clayton G H, Smith R L, et al. A replication-incompetent adenovirus vector with the preterminal protein gene deleted efficiently transduces mouse ears [J]. *J Virol*, 1999, 73:1046-1053.
- [2] Xu Z L, Mizuguchi H, Sakurai F, et al. Approaches to improving the kinetics of adenovirus-delivered genes and gene products [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 781-802.
- [3] Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2005, (12 Suppl 1): S18-S27.
- [4] Puntel M, Curtin J F, Zirger J M, et al. Quantification of high-capacity helper-dependent adenoviral vector genomes *in vitro* and *in vivo*, using quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17: 531-544.
- [5] Qian C, Liu X Y, Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach [J]. *Cell Res*, 2006, 16: 182-188.
- [6] Roth M D, Cheng Q, Harui A, et al. Helper-dependent adenoviral vectors efficiently express transgenes in human dendritic cells but still stimulate antiviral immune responses [J]. *J Immunol*, 2002, 169:4651-4656.
- [7] Wen S, Graf S, Massey P G. Improved vascular gene transfer with a helper-dependent adenoviral vector [J]. *Circulation*, 2004, 110: 1484-1491.
- [8] Oka K, Belalcazar L M, Dieker C, et al. Sustained phenotypic correction in a mouse model of hypoalphalipoproteinemia with a helper-dependent adenovirus vector [J]. *Gene Ther*, 2007, 14: 191-202.
- [9] Kim I H, Jozkowicz A, Piedra P A, et al. Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:13282-13287.
- [10] Reddy P S, Sakhuja K, Ganesh S, et al. Sustained human factor VIII expression in hemophilia A mice following systemic delivery of a gutless adenoviral vector [J]. *Mol Ther*, 2002, 5: 63-73.
- [11] Bilbao R, Reay D P, Wu E, et al. Comparison of high-capacity and first-generation adenoviral vector gene delivery to murine muscle *in utero* [J]. *Gene Ther*, 2005, 12: 39-47.
- [12] Mian A, McCormack W M Jr, Mane V, et al. Long-term correction of ornithine transcarbamylase deficiency by WPRE-mediated overexpression using a helper-dependent adenovirus [J]. *Mol Ther*, 2004, 10: 492-499.
- [13] Liu X Y, Qiu S B, Zou W G, et al. Effective gene-viro therapy for complete eradication of tumor mediated by combination of hTRATL(TNF SF10) and plasminogen k5 [J]. *Mol Ther*, 2005, 11: 531-541.
- [14] Brunetti-Pierri N, Palmer D J, Mane V, et al. Increase hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors [J]. *Mol Ther*, 2005, 12: 99-106.
- [15] Brunetti-Pierri N, Ng T, Iannitti D A, et al. Improved hepatic transduction, reduced systemic vector dissemination, and long-term transgene expression by delivering helper-dependent adenoviral vectors into the surgically isolated liver of nonhuman primates [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17: 391-404.
- [16] Umama P, Gerdes C A, Stone D, et al. Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 582-585.
- [17] Cheshenko N, Krougkiak N, Eisensmith R C, et al. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus [J]. *Gene Ther*, 2001, 8: 846-854.
- [18] Sargent K L, Ng P, Eveleigh C, et al. Development of a size-restricted pX-deleted helper virus for amplification of helper-dependent adenovirus vectors [J]. *Gene Ther*, 2004, 11: 504-511.
- [19] Soudais C, Skander N, Kremer E J. Long-term *in vivo* transduction of neurons throughout the rat CNS using novel helper-dependent CAV-2 vectors [J]. *FASEB J*, 2004, 18: 391-393.
- [20] Takikawa H, Mafune K, Hamada H, et al. An advanced strategy of enhanced specific gene expression of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22: 1051-1056.
- [21] Guan M, Rodriguez-Madraz J R, Alzuguren P, et al. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus- alphavirus hybrid vector [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 1620-1629.
- [22] Dudley R W, Lu Y, Gilbert R, et al. Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15: 145-156.
- [23] Wang L, Hernandez-Alcoceba R, Shankar V, et al. Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: a potential therapy for liver cancer [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126: 278-289.
- [24] Croyle M A, Le H T, Linse K D, et al. PEGylated helper-dependent adenoviral vectors; highly efficient vectors with an enhanced safety profile [J]. *Gene Ther*, 2005, 12: 579-587.
- [25] Mok H, Plmer D J, Ng P, et al. Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses [J]. *Mol Ther*, 2005, 11: 66-79.

[收稿日期] 2007-01-23

[修回日期] 2007-03-29

[本文编辑] 尹茶