

辅助病毒依赖型腺病毒载体研究进展

付远辉^{1,2}, 何金生^{2*}, 石长信³, 洪涛^{1,2}

(¹中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052)

(²北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

(³ Division of Hematology Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale AZ 85259, USA)

摘要 辅助病毒依赖型腺病毒载体(helper-dependent adenoviral vector, HDAd)缺乏所有腺病毒的编码序列,与非复制型的第一代腺病毒载体(first-generation adenoviral vector, FGAd)相比,具有载体免疫原性低、安全、转移容量大和持续表达等特点,现广泛用于遗传性疾病、神经退行性疾病和肿瘤等的基因治疗和特异性靶向治疗研究。本文综述了 HDAd 构建和应用等方面的研究进展及未来的发展方向。

关键词: 辅助病毒依赖型腺病毒载体, 基因治疗

中图分类号: Q93-3 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)02-0147-06

非复制型的第一代腺病毒载体(first-generation adenoviral vector, FGAd),可有效转导不同物种、不同种类和不同复制周期的细胞,且转基因的表达量高,被广泛用作基因治疗载体。但由于 FGAd 仍保留了大部分腺病毒(Adenovirus, Ad)基因组,在转导细胞内,低水平表达腺病毒基因,既可对转导细胞产生直接毒性作用,也可诱导机体产生针对病毒载体及转导细胞的细胞免疫应答,导致病毒载体重复应用时效果下降,转基因表达短暂,同时产生长期的毒性作用^[1]。这些不足限制了 FGAd 在治疗需长期表达转基因的疾病上的应用。因此,科学家们在 FGAd 的基础上,研制了一种全缺失的腺病毒载体^[2],缺乏所有腺病毒的编码序列,只含有约 500 bp 的腺病毒 DNA 复制和包装的顺式作用元件,需要辅助病毒为其反式提供腺病毒载体包装需要的所有蛋白,因此,又被称为辅助病毒依赖型腺病毒载体(helper-dependent adenoviral vector, HDAd)。与 FGAd 相比,

HDAd 具有转基因表达时间长、转基因容量大、安全性好和副作用小等优点。

1 HDAd 构建及制备

HDAd 的生产及制备涉及 3 种不同成分的共同作用,分别是 HdAd、辅助病毒及包装细胞株。

1.1 HDAd

缺失腺病毒基因组的所有编码基因,仅含有腺病毒基因组末端的非编码基因倒置重复序列[inverted terminal repeat, ITR]及包装信号,为保证载体的正常包装,缺失的基因组由“stuffer DNA”进行填充,同时克隆有相关的转基因。

目前有数个 HDAd 的制备系统,原理和成分基本相同。在这些系统中比较成功的是由加拿大麦克马斯特大学 Graham 教授设计的 HDAd 系统,该系统成功降低了辅助病毒污染,并大大提高了载体产量^[3]。下面我们该系统为例,介绍其构建及制备

基金项目: 国家自然科学基金(30671965),教育部留学回国人员科研启动基金(20071108),北京交通大学科技基金(2007RC006)

* 通信作者。Tel: +86-10-51684080; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

作者简介: 付远辉(1974-)男,河南人,博士研究生,研究方向分子病毒学。E-mail: fyh01669@tom.com

收稿日期: 2008-09-25; 修回日期: 2008-11-19

的主要原则(图1)^[4]。通过改造 FGAd 腺病毒载体获得辅助病毒,即将 FGAd 的包装信号镶嵌于 loxP 位点之间。将克隆有外源基因的 HDAd 重组质粒线性化,转染能表达 Cre 重组酶的 293Cre 细胞系,并用辅助病毒进行感染。通过 Cre 重组酶介导的位点特异性重组去除辅助病毒的包装信号,大大降低辅助病毒的包装效率,但仍能进行正常复制,为扩增 HDAd 载体提供所有必需的反式激活因子。重组

HDAd 的滴度通过随后 HDAd 和辅助病毒连续共感染 293Cre 细胞得到不断提高,并完成 HDAd 的大量制备,最后利用 CsCl 超速离心方法,通过不连续密度梯度及等密度梯度 2 次离心对重组 HDAd 进行纯化。在 HDAd 系统基础上,Ng 开发了 FLP/FRT 技术系统,他利用酵母的 FLP 重组酶和 FRT 序列分别替换 Cre 重组酶和 loxP 序列^[5],该系统与 Cre/loxP 系统具有类似的辅助病毒包装信号切割效率。

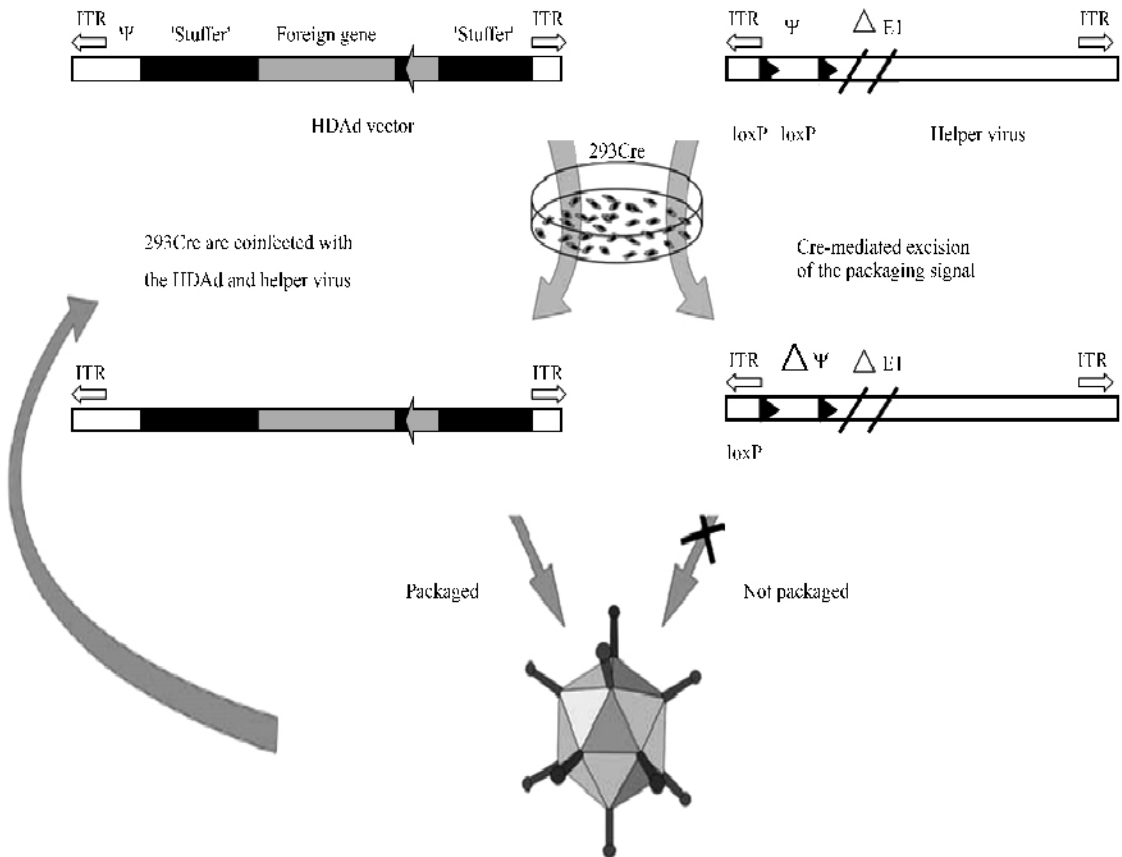


图1 重组 HDAd 载体 Cre/loxP 制备系统示意图

Fig.1 Cre/loxP system for generating HDAd vectors. ITR: inverted terminal repeat, Ψ : packaging signal, stuffer: non-Ad DNA sequences, Foreign gene: transgene, $\Delta E1$: E1 deleted, $\Delta\Psi$: packaging signal deleted.

1.2 辅助病毒

辅助病毒可反式提供腺病毒载体包装和复制所必需的结构和功能蛋白,常是通过在第一代腺病毒载体包装信号两侧插入一种重组酶的酶切位点构建而成,同时会在 E3 区插入一段“stuffer DNA”,以阻止潜在的 E1+ 辅助病毒重组体正常包装^[6]。根据包装细胞株中不同的重组酶类型,插入辅助病毒包装信号两侧的酶切位点也不同,例如:Cre-loxP、FLP-FRT 和 $\varphi C31$ -attB/attP 重组系统是分别在包装信号两侧各插入一个 loxP 位点、或 FRT 位点、或各插入一个 attB 和一个 attP 位点。

目前已知的腺病毒共有 50 多种血清型,它们对细胞的嗜性主要由纤维蛋白决定。不同血清型的腺病毒由于其纤维蛋白 knob 结构域的氨基酸组成和长度存在差异,细胞嗜性也不同。常用的 Ad5 型辅助腺病毒可感染带有 CAR 受体的细胞,但对上皮细胞、肌肉细胞、造血细胞、树突状细胞和肿瘤细胞等的嗜性较低,或难以有效感染,为了提高腺病毒载体对细胞的转导效率或通过靶向新的替代受体以拓宽腺病毒细胞型特异性转导能力,常利用基因工程的方法修饰 Ad5 型腺病毒的纤维蛋白,或者构建含 Ad5/35 嵌合型纤维蛋白的腺病毒,从而可获得转导

效率提高的辅助病毒或者具有新型靶向能力的辅助病毒^[7-8]。另外,除 E1 和 E3 区外,也有研究报道多区联合缺失的辅助病毒,以期进一步降低 E1 + 的复制型辅助腺病毒(replication competent adenovirus, RCA)出现的可能性,提高 HDAd 的安全性。

1.3 包装细胞株

常见的包装细胞株包括 PERC6-Cre、116、293Cre4、293Cre415、293FRT、293CreFRT、CreE、C7-cre、293-FLPe6 等,均是通过在细胞染色体上整合位置特异的重组酶(site-specific recombinase)基因序列构建而成,这些重组酶基因序列包括:Cre 序列、FRT 序列等。这些包装细胞株可高效表达重组酶,当辅助病毒及其 HDAd 共同感染或转染这些细胞株时,细胞内表达的重组酶就能切割相应的辅助病毒包装信号处的酶切位点,从而阻止辅助病毒包装、促进 HDAd 载体的包装。

包装细胞株的研究主要集中在两个方向,一是设法获得可高效表达重组酶或能同时表达两种重组酶的细胞株,提高重组酶对辅助病毒中嵌于重组酶切割位点之中的腺病毒包装信号的切割效率,达到降低辅助病毒对 HDAd 污染的目的,从而可采用简便、易行可进行规模化制备的基于亲和层析的 HDAd 纯化方法,以替代复杂、难以满足产业化大规模制备的 CsCl 超速离心纯化方法;二是设法提高单个细胞 HDAd 的产量,以期能满足大动物实验及临床应用的要求^[6]。

2 HDAd 与免疫反应

HDAd 缺乏所有腺病毒的编码序列,因而早期的研究认为 HDAd 诱导的针对载体的细胞免疫非常微弱,且炎症反应也很微弱^[9]。随后大量研究表明 HDAd 象 FGAd 一样能够诱导载体特异性的免疫应答^[10-12],但其免疫应答特点不同于 FGAd。

针对 Ad 的天然免疫是由 Ad 外壳蛋白或病毒颗粒诱导的,因而,尽管 HDAd 不含 Ad 的编码基因,也能够诱导与 FGAd 相似的天然免疫应答,但不同于 FGAd 的是随着时间推移,其诱导的天然免疫应答迅速消失^[13]。由于 HDAd 不含 Ad 的编码基因,因而其诱导的细胞免疫应答比较微弱^[14]。尽管 HDAd 也能诱导针对 Ad 的抗体,但抗-Ad 不能够清除已转染的细胞,因而不影响转基因表达时间,即使存在有针对 Ad 的抗体,HDAd 也能够进行高效的转

基因表达^[15]。还有研究表明 HDAd 诱导的针对载体的免疫应答存在剂量效应关系^[16],选择合适的载体用量对有效降低免疫应答十分重要。

3 HDAd 的应用

3.1 HDAd 在基因治疗中的应用

HDAd 因具有:安全性、长期、持续表达转基因,可转移的转基因容量高达 37 kb,可感染分裂期细胞和非分裂期细胞,且副作用小等优点,可广泛用于各种实验研究。

经静脉注射的载体易于进入肝脏组织,且肝细胞能够将治疗蛋白分泌入循环系统转运到全身,许多遗传病都会累及肝脏,因而肝脏成为基因治疗的理想靶点。腺病毒对肝脏具有天然亲嗜性,HDAd 被广泛用于肝脏疾病的基因治疗,并获得较好的实验效果^[17-18]。

神经系统为传统意义的免疫豁免区,是理想的基因治疗候选区域,但限于大多数成熟神经元缺乏分裂增殖能力和血脑屏障等原因,致使神经系统疾病基因治疗十分困难。HDAd 因具有感染非分裂细胞、转染多种组织的能力,以及安全等优点已被广泛用于神经系统疾病的基因治疗,亦获得较好的实验效果^[19-20]。

DMD 是由于肌营养不良蛋白基因突变引起的,由于肌营养不良蛋白基因(dystrophin)的全长 cDNA 约 14 kb,因而绝大多数载体不适合表达该基因。将 HDAd 用于 DMD 的基因治疗,也获得了另人满意的效果^[21-22]。

HDAd 还被用于其他多种遗传性疾病的治疗,如:肥胖症^[9]、囊性纤维病^[23]、糖尿病^[24]和血友病^[25]等疾病的治疗。另外,在神经退行性疾病^[26]、肿瘤^[27]和心血管疾病^[28]均获得较好的实验效果。

3.2 HDAd 在疫苗中的应用

除了基因治疗研究外,由于腺病毒载体可诱导机体针对转基因产生高效、持久的体液及细胞免疫,成为一种广泛应用的疫苗载体^[29],然而 FGAd 因能够诱导抗腺病毒的免疫而导致应用受限。Harui^[30]用 HDAd 免疫 C57BL/6 小鼠获得了比等量的 FGAd 更好的转基因特异性 CTL 和抗体反应,并认为转基因的高效表达引起机体产生了针对转基因的增强的免疫应答。目前以 HDAd 作为疫苗载体的文献并不多见,其在疫苗中的价值还需要进一步探索。

我们课题组目前已成功构建了可表达人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)融合蛋白(fusion glycoprotein, F)的 HDAd/F, 并成功进行了体外表达^[31], 该重组病毒体内应用时, 是否具有更低的载体反应、更好的免疫保护作用正在研究之中。

我们认为可充分利用 HDAd 具有包装容量大的特点, 同时表达 RSV 的多种保护性抗原及可增强免疫应答的细胞因子, 以期取得更好的免疫保护作用。

3.3 HDAd 在 RNA 干扰的应用

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发展起来的一门新兴的抑制基因表达技术。HDAd 因具有感染细胞种类多、感染效率高、转基因表达时间长、转基因容量大、安全性和副作用小等优点亦被用于 RNA 干扰。到目前为止, 对 shRNA 体内诱导的效应的了解很少, 为确定用 HDAd 在肝脏表达 shRNA 的可行性, Witting^[32]设计了鼠 fabp5 的 shRNA 结构。静脉注射后导致 75% 的 fabp5 不表达(沉默)。

4 HDAd 展望

HDAd 因具有转基因表达时间长、转基因容量大、安全性好和副作用小等优点, 在基因治疗及通过改造腺病毒外壳蛋白进行特异性靶向治疗上取得了一定的进展。可能由于 HDAd 的构建有一定的实验条件及技术要求, 目前开展这方面研究的实验室还较少, 同时用于多基因转移的报道也较少。相信随着基因治疗、干细胞和反向遗传学等研究的进一步深入, 以 HDAd 实现多基因转移的报道会大大增多。辅助腺病毒污染、载体诱导的针对载体自身的免疫反应以及不能大规模制备等限制了其在临床上的应用, 因而降低甚至消除辅助病毒污染、限制载体诱导的针对载体自身的免疫反应和探寻大规模制备方法等应该是今后研究的重点。

参考文献

- [1] Dai Y, Schwarz EM, Gu D, et al. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1995, 92(5):1401-1405.
- [2] Mitani K, Graham FL, Caskey CT, et al. Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1995, 92(9):3854-3858.
- [3] Parks RJ, Chen L, Anton M, et al. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1996, 93(24):13565-13570.
- [4] Ng P, Parks RJ, Graham FL. Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Molecular Medicine*, 2002, 69:371-388.
- [5] Ng P, Beauchamp C, Eveleigh C, et al. Development of a FLP/rt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Molecular Therapy*, 2001, 13(5 Pt 1):809-815.
- [6] Palmer D, Ng P. Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Molecular Therapy*, 2003, 18(5):846-852.
- [7] Balamotis MA, Huang K, Mitani K. Efficient delivery and stable gene expression in a hematopoietic cell line using a chimeric serotype 35 fiber pseudotyped helper-dependent adenoviral vector. *Virology*, 2004, 324(1):229-237.
- [8] Bramson JL, Grinshtein N, Meulenbroek RA, et al. Helper-dependent adenoviral vectors containing modified fiber for improved transduction of developing and mature muscle cells. *Human Gene Therapy*, 2004, 15(2):179-188.
- [9] Morsy MA, Gu M, Motzel S, et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1998, 95(14):7866-7871.
- [10] Koehler DR, Martin B, Corey M, et al. Readministration of helper-dependent adenovirus to mouse lung. *Gene Therapy*, 2006, 13(9):773-780.
- [11] Kushwah R, Cao H, Hu J. Characterization of pulmonary T cell response to helper-dependent adenoviral vectors following intranasal delivery. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(6):4098-4108.
- [12] McCaffrey AP, Fawcett P, Nakai H, et al. The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. *Molecular Therapy*, 2008, 16(5):931-941.
- [13] Muruve DA, Cotter MJ, Zaiss AK, et al. Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *The Journal of virology*, 2004, 78(11):5966-5972.
- [14] Morral N, Parks RJ, Zhou H, et al. High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha1-antitrypsin with negligible toxicity. *Human Gene Therapy*, 2004, 15(18):2709-2716.

- [15] Maione D , Della Rocca C , Giannetti P , et al. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* , 2001 , 98(11) :5986 – 5991.
- [16] Brunetti-Pierri N , Palmer DJ , Beaudet AL , et al. Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Human Gene Therapy* , 2004 , 15(1) :35 – 46.
- [17] Brunetti-Pierri N , Ng T , Iannitti DA , 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. *Human Gene Therapy* , 2006 , 17(4) :391 – 404.
- [18] Crettaz J , Berraondo P , Mauleon I , et al. Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. *Hepatology* , 2006 , 44(3) :623 – 632.
- [19] Barcia C , Jimenez-Dalmaroni M , Kroeger KM , et al. One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity : clinical implications. *Molecular Therapy* , 2007 , 15(12) :2154 – 2163.
- [20] Xiong W , Goverdhan S , Sciascia SA , et al. Regulatable gutless adenovirus vectors sustain inducible transgene expression in the brain in the presence of an immune response against adenoviruses. *The Journal of Virology* , 2006 , 80(1) :27 – 37.
- [21] Deol JR , Danialou G , Laroche N , et al. Successful compensation for dystrophin deficiency by a helper-dependent adenovirus expressing full-length utrophin. *Molecular Therapy* , 2007 , 15(10) :1767 – 1774.
- [22] Gilbert R , Dudley RW , Liu AB , et al. Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (gutted) adenovirus-encoding murine dystrophin. *Human Molecular Genetics* , 2003 , 12(11) :1287 – 1299.
- [23] Koehler DR , Sajjan U , Chow YH , et al. Protection of Cfr knockout mice from acute lung infection by a helper-dependent adenoviral vector expressing Cfr in airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* , 2003 , 100(26) :15364 – 15369.
- [24] Kojima H , Fujimiya M , Matsumura K , et al. NeuroD-beta cell gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nature Medicine* , 2003 , 9(5) :596 – 603.
- [25] Cerullo V , Seiler MP , Mane V , et al. Correction of murine hemophilia A and immunological differences of factor VIII variants delivered by helper-dependent adenoviral vectors. *Molecular Therapy* , 2007 , 15(12) :2080 – 2087.
- [26] Huang B , Schiefer J , Sass C , et al. High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo. *Human Gene Therapy* , 2007 , 18(4) :303 – 311.
- [27] King GD , Muhammad AK , Xiong W , et al. High-capacity adenovirus vector-mediated anti-glioma gene therapy in the presence of systemic antiadenovirus immunity. *The Journal of Virology* , 2008 , 82(9) :4680 – 4684.
- [28] Nomura S , Merched A , Nour E , et al. Low-density lipoprotein receptor gene therapy using helper-dependent adenovirus produces long-term protection against atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *Gene Therapy* , 2004 , 11(20) :1540 – 1548.
- [29] Sharpe S , Fooks A , Lee J , et al. Single oral immunization with replication deficient recombinant adenovirus elicits long-lived transgene-specific cellular and humoral immune responses. *Virology* , 2002 , 293(2) :210 – 216.
- [30] Harui A , Roth MD , Kiertscher SM , et al. Vaccination with helper-dependent adenovirus enhances the generation of transgene-specific CTL. *Gene Therapy* , 2004 , 11(22) :1617 – 1626.
- [31] Yang B , He JS , Shi CX , et al. Construction and preparation of helper-dependent adenoviral vector expressing human respiratory syncytial virus F gene. *Wei Sheng Wu Xue Bao* , 2007 , 47(4) :682 – 685.
- [32] Witting SR , Brown M , Saxena R , et al. Helper-dependent adenovirus-mediated short hairpin RNA expression in the liver activates the interferon response. *Journal of Biological Chemistry* , 2008 , 283(4) :2120 – 2128.

Advances in helper-dependent adenoviral vector – A review

Yuanhui Fu^{1,2}, Jinsheng He^{2*}, Changxin Shi³, Tao Hong^{1,2}

(¹Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

(²College of Life Sciences & Bioengineering, School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing, 100044, China)

(³Division of Hematology Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale AZ 85259, USA)

Abstract: Helper-dependent adenoviral vector (HDAd) lacking all viral coding sequences with the advantages of minimal immunogenicity, negligible chronic-toxicity, and durable transgene expression over first-generation adenoviral vector (FGAd). HDAd vehicles have demonstrated tremendous potential for gene therapy in animal models for inherited diseases, neurodegenerative diseases and cancer etc. Additionally, the large cloning capacity of HdAd, up to 37 kb, permits the delivery of whole genomic loci, multiple transgenes. In this review we characterize the basic features of HdAd and summarize some of their experimental and potential clinical applications both at present and in future.

Keywords: helper-dependent adenoviral vector; gene therapy

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671965), the Grant of Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (20071108) and the Grant of Research Foundation of Beijing Jiaotong University (2007RC006)

* Corresponding author. Tel: +86-10-51684080; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

Received: 25 September 2008/Revised: 19 November 2008

1953年创刊以来所有文章全文上网

2008年1月中旬,《微生物学报》自1953年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文!

建立全文数据库的工作是从2007年初开始的,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化,变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

2009年2月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 ~ 1956	半年刊	1 ~ 4	1 ~ 2
1957 ~ 1958	季刊	5 ~ 6	1 ~ 4
1959	季刊	7	1 ~ 2
1959 ~ 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 ~ 4
1963 ~ 1965	季刊	9 ~ 11	1 ~ 4
1966	季刊	12	1 ~ 2
1966 ~ 1972	停刊6年半		
1973 ~ 1988	季刊	13 ~ 28	1 ~ 4
1989 ~ 2007	双月刊	29 ~ 47	1 ~ 6
2008	月刊	48	1 ~ 12
2009	月刊	49	1 ~ 2