

AAV 载体靶向修饰策略在基因治疗中的研究进展

邓怡晨, 刘云波

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是微小病毒科的一种,它能以其广泛的宿主范围及低的免疫原性对人及灵长类进行感染,而且经过改造后的 AAV 能够更有效的转导特异组织及细胞。腺相关病毒作为一种基因治疗载体其生物学特性已被深入了解,通过改造腺相关病毒的血清型和蛋白衣壳结构能够扩宽其应用范围。本文对 AAV 病毒载体的衣壳蛋白基因工程修饰、转录水平调控修饰、基因改造和衣壳蛋白共价偶联修饰的靶向机理以及相关的一些研究成果进行介绍。

【关键词】 腺相关病毒 靶向 基因治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 02-0081-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 02. 015

Progress in targeting modification strategy of AAV vector in gene therapy

DENG Yi-chen, LIU Yun-bo

(Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences. Beijing 100021)

【Abstract】 Adeno-associated virus (AAV) belongs to the family of Parvoviridae. It is a small virus which can infect humans and some other primate species with extensive host cell and low-immunogenicity. Besides, modified AAV can target the specific tissues and cells effectively. As a kind of gene therapy vector, Adeno-associated virus have been widely known of its biological characteristics. By modification of the adeno-associated virus serotype and structure of capsid protein, we can extend the application range of AAV vectors. This article introduces the targeting mechanism and results of some related researches, the genetic engineering modification of AAV capsid proteins, the transcription regulation modification of target gene expression, and gene modification and the covalent coupling of AAV capsid proteins.

【Key words】 Adeno-associated virus (AAV); Targeting; Gene therapy

随着对腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)研究的深入,研究人员发现 AAV 作为转基因的载体有一定的局限性,如 AAV 宿主范围广泛、组织或细胞特性缺乏等,使得其作为基因的载体被用于临床治疗实验中存在安全性、靶向性和转染效率低的缺陷^[1]。因此,AAV 的靶向性对于基因治疗的成功与否非常关键。具有靶向性的病毒载体是目前基因治疗临床试验研究的主要载体,应用 AAV

载体来转导治疗基因有宿主范围广泛及低免疫原性等优点。而且经过 AAV 改造后的重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体更能有效的转导治疗基因和靶向特定的组织或细胞^[2, 3]。在 AAV 成功用于基因治疗的研究中,需要尽可能提高基因治疗的效率和努力使其造成的细胞毒性降到最低,探究 AAV 载体介导基因治疗的最佳靶向策略。目前优化 AAV 的感染靶向性有四种

【基金项目】 国家科技支撑计划(No. 2014BAI03B01)。

【作者简介】 邓怡晨(1991 -),女,硕士研究生,动物学,Email:yichendeng007@126.com。

【通讯作者】 刘云波(1962 -),男,研究员,Email:yunbolu@126.com。

策略:一是衣壳蛋白基因工程修饰;二是在转录水平上进行靶向调控;三是通过基因改造;四是对衣壳蛋白通过共价偶联进行修饰。

1 衣壳蛋白基因工程修饰

AAV 对细胞的靶向性依赖于其衣壳和特异细胞表面受体的相互作用,是由受体和衣壳的相互作用介导的 AAV 内化和细胞运输等过程。目前对构成衣壳的 cap 蛋白(capsid protein)进行改造成为主要研究方向^[4-6]。

在早期对 AAV 靶向性研究中一般是直接将目标配体插入到 cap 基因中。如 Yang 等首次构建了一种以人类造血干细胞为靶点的 AAV 载体,方法是在 AAV2 的 VP2 蛋白 N 端插入了抗人 CD34 的单链抗体基因,结果显著地增强了 AAV 对 CD34 细胞的感染率^[7]。随后的研究中,Buning 等发现在 AAV2 衣壳蛋白的表面有 6 位点暴露出来,位点分别是 261、381、447、534、573、587,且在各位点插入一些氨基酸序列不会影响病毒的衣壳包装等正常生活周期并且能改变其转染趋向性。如 White 等构建了靶向人内皮细胞的 AAV 载体,即在 AAV2 衣壳的 587 位点插入靶向人内皮细胞的多肽序列,结果是大大增强了 AAV2 载体转染人内皮细胞的靶向性。而且该突变体感染途径不依赖硫酸乙酰肝素(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)而增强了其特异靶向性。因为野生型 AAV2 广泛趋向性是在其感染各种细胞过程中先与 HSPG 结合,而大多细胞表面都表达葡萄糖胺聚糖^[8]。

随后,很多研究团队也分别通过直接插入的方式在 AAV 衣壳上插入选择配体从而构建了具有不同靶向性的 AAV 载体。Grifman 等用受体靶向性修饰 AAV 衣壳,将肿瘤靶向多肽序列 NGRAHA 插入至 AAV 衣壳的特定位点,使插入该靶向多肽的 rAAV 载体感染 Kaposi 肉瘤细胞和胚胎横纹肌肉瘤细胞的能力远高于用野生型 AAV2 的感染效果^[9]。Nicklin 等通过用多肽 SIGYPLP 修饰 AAV 衣壳,使构建的 AAV 能人为靶向的感染多种肿瘤细胞株,包括恶性黑色素瘤细胞系(C8161)、前列腺癌细胞系(PC-3 和 LnCAP)、胃癌细胞系(MKN-45)、和肺腺癌细胞(A549),而且不受 AAV 本身对细胞亲噬性的影响^[10]。这些研究有力的说明了野生型 AAV 经过对衣壳蛋白进行插入和突变修饰能提高其对特异细胞的靶向性,从而提高 AAV 转导目的基因的转

染率。

2 在转录水平上进行靶向调控

在转录水平对 AAV 靶向调控方式包括:一、组织特异性启动子调控 AAV 载体转导基因的靶向性;二、转录后水平的 microRNA 靶向元件调控 AAV 的靶向性。

2.1 组织特异性启动子对 AAV 的靶向性探究

在机体内,几乎所有的细胞都具有完整基因组,但在不同组织细胞中会呈现出不同的表型特征,这是因为由 DNA 中的启动子、增强子元件及转录因子相互作用在基因组表达过程中调控基因的转录。病毒启动子如 CMV 具有广泛的组织表达特性,也就是在多种细胞中均有活性,在传统的基因治疗研究中,经常会选择这类病毒启动子来调控基因治疗的表达,这就不可避免的对靶外细胞和组织产生毒副作用,并引起机体免疫反应^[11, 12]。而组织特异性启动子则由于启动子对细胞的特异性而限制基因只在靶细胞中才能得以表达,更加适合用于基因治疗的靶向调控^[13]。

目前,各类型的组织特异性启动子已经被报道并用于 AAV 载体靶向调控的研究中。但有些特异性启动子的活性要低于病毒启动子,如在肝脏细胞中, α -抗胰酶(hAA)、白蛋白(Alb)都是肝特异性蛋白基因,这两种启动子比 CMV 启动子的活性低。Okuyama 等在 hAAT 启动子上插入了肝特异性增强子 ApoE,较之前单一特异性启动子表达水平提高 15 倍^[14]。在用 AAV 介导的肝靶向性血友病基因治疗中,Jenny McIntosh 等用 rAAV 载体携带重组人类凝血因子 VIII 靶向转导肝细胞实验中,选择用一种肝脏细胞特异性的嵌合启动子 HLP,同时还优化了 B 结构域缺失的人凝血因子 VIII 基因中 226 个氨基酸区域,用新型 17-aa 肽替换,用所构建的新型 rAAV 载体(rAAV-HLP-codop-hFVIII-V3)通过外周静脉注射靶向感染肝细胞,得到超生理水平表达目的基因的结果,且在小鼠和猕猴的体内都得到有效的验证^[15]。

对于神经系统疾病而言,由于血-脑屏障的存在,用基因治疗的方法很难将外源的基因表达产物转运到脑部进而达到治疗效果。AAV 是一类微小的,且在正常细胞中不发生毒性感染的病毒,研究表明 AAV9 型载体不仅可以在脑中扩散,还能够使目的基因进入脑部的中枢神经系统,所以 AAV 能

够用于研究各种神经系统疾病的治疗^[16, 17]。特定神经元的进行性变性死亡引起各种的神经退行性疾病,如阿尔茨海默病(AD)患者表现为皮质神经元的丢失,帕金森病(PD)患者表现为黑质多巴胺能神经元的丢失。因此优化 AAV 在神经系统中的靶向性尤为重要。

Akiya Watakabe 等在猕猴大脑皮层注射携带 GFP 的 AAV 病毒载体,得知在 CMV 启动子调控下,血清型 1,5,8,9 的 AAV 的 GFP 都在胶质细胞中大量表达,且表达效率没有明显的差异^[18]。而 AAV2 表达范围较其他 4 中血清型 AAV 明显较小^[19]。此外,猕猴脑池内注射 AAV9 在整个中枢神经系统中的扩散较好,而小脑薄壁组织注射,其扩散程度相比脑池内注射有局限性,其主要扩散至小脑皮层和小脑传出神经元。这两种注射方式都会将目的基因转导至运动神经元、神经节、背根神经节、背索内侧丘、脊髓小脑束。根据不同神经系统疾病的病变部位分析,前一种注射方式适用 AD、溶酶体贮积症(LSD)等疾病研究,后一种注射方式适合小脑的损伤、脑中相关的神经核团损伤而造成的神经系统失调,如脊髓小脑病变症。在前脑谷氨酸能神经元特异性启动子(CAMK II)调控下,所有血清型 AAV 载体都能高效的在大脑皮层神经元(cortical neurons)细胞中表达^[16]。hSyn 是人 SYN1 基因的启动子,SYN1 基因表达产生的 Synapsin I 蛋白,是在神经元内特异表达的蛋白。研究发现 rSynI 在猕猴浦肯野细胞中的表达极弱,但在啮齿类动物浦肯野细胞中启动子活性较好,说明在不同物种之间,组织特异性启动子介导基因的途径也会有差异。

2.2 microRNA 靶向元件调控 AAV 的靶向性

miRNA 是由其前体 pri-RNA 被 RNaseIII 核酸内切酶 Drosha 和 Dicer 酶酶切和催化而形成的双链 miRNA,其一条链被降解,另一条链即具有内源性的非编码单链小分子 RNA。miRNA 先与基因沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,然后在 RISC 的指导下,miRNA 在与 mRNA 互补的位置结合,通过使 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译来实现对目的基因表达的调控^[20]。用 AAV 作为载体携带 miRNA 转染特异性细胞较用其他病毒载体如慢病毒、逆转录病毒等明显降低了外源基因在某些非靶向组织和细胞中表达而产生的免疫反应和毒副反应^[21, 22]。

3 基因改造

AAV 载体在靶细胞的转导过程中双链 DNA(dsDNA)不稳定严重影响了其转导效率和持久性,研究者发现 AAV 的 DNA 中一个末端反向重复序列(inverted terminal repeats, ITR)中的串联重复序列(tandem repeat sequences, TRS)缺失或突变产生的 AAV 病毒将以二聚体形式稳定存在,即自身互补型腺相关病毒(scAAV)。与常规的重组腺相关病毒相比较,其主要特点是表达效率高且快速,所以在使用时能相对降低 scAAV 的使用量,进而降低机体可能会出现免疫反应^[23, 24]。scAAV 载体的出现促进了 AAV 载体在临床试验上的应用。

4 衣壳蛋白共价偶联修饰

近年来,用化学生物学方法修饰生物大分子得到了广泛的应用^[25],有关研究表明,用活化的高分子共价结合 AAV 衣壳蛋白氨基酸残基能对病毒进行修饰,能改变其组织特异性,提高病毒载体靶向性。

分子的 PEG 化,即活化的聚乙二醇与 AAV 衣壳蛋白的 α -以及 ε -氨基偶联使衣壳蛋白活性发生改变进而降低 AAV 抵抗蛋白酶水解的能力,减低免疫原性和毒副作用,延长体内半衰期,降低血浆清除率等^[26, 27]。一种水溶性高分子聚合物 pHPMA 对 AAV 进行修饰,使高分子直接与靶细胞受体反应或通过高分子链将载体上的受体包裹,从而让 AAV 丧失原本具有的趋向性,实现被动靶向^[28]。

综上所述,用化学方法修饰病毒能较大幅度地优化病毒载体在基因治疗中的靶向性和转染效率,为当前解决 AAV 载体的靶向性等问题提供了新的思路和方法。

5 结语和展望

基因治疗中,应用较早、较广泛的两类载体是腺病毒载体和逆转录载体,但至今未取得令人满意的临床研究结果。AAV 作为基因转导的载体较腺病毒和逆转录病毒有很多优点,如广泛的宿主细胞范围、低免疫源性、长时间在体内表达外源基因等。为了能将 AAV 作为基因载体用于临床的基因治疗,研究者不断改善 AAV 对宿主或靶向细胞的转导效率及感染的选择性。目前有四种调控 AAV 靶向的基本方式:一是衣壳蛋白基因工程修饰;二是通过

转录水平进行调控;三是通过基因改造;四是衣壳蛋白共价偶联修饰。为了将 AAV 载体作为基因治疗的工具,需要研究更多的 AAV 亚型、在基因水平上将 AAV 感染靶向性和转录靶向性相结合,更加深入的了解 AAV 在机体内的各种分子机制。

除了从以上这些基因分子水平上调控 AAV 的靶向性的策略,注射途径的选择及添加辅助药物、不同物种的差异和病毒的多重感染都会影响到 AAV 对组织和细胞转导的靶向性、感染率。为了解决这些问题,当前有许多研究正致力发展其他策略,如构建新型靶向 AAV 载体以降低免疫反应和提高治疗效果、在不同实验动物疾病模型探究 AAV 转导机制的异同等。相信随着对靶向修饰 AAV 的技术越来越成熟,会有力的促进人类疾病基因治疗的发展。

参考文献:

- [1] 赵丽琴, 席斌, 彭华松. 腺相关病毒(AAV)载体研究进展[J]. 生物技术进展, 2012, 02(2): 110-115.
- [2] 王毅刚, 黄芳, 蔡荣, 等. 腺相关病毒载体的靶向策略探讨[J]. 科学通报, 2007, 52(10): 1107-1115.
- [3] 何茂锐, 黄爱龙. 感染靶向性重组腺相关病毒载体在基因治疗中的研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2005, 12(5): 136-140.
- [4] Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, et al. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex [J]. *Neurosci Res*, 2015, 93: 144-157.
- [5] 王启钊, 吕颖慧, 李招发, 等. 腺相关病毒的衣壳装配和 DNA 衣壳化机制 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(4): 531-538.
- [6] Van Vliet KM, Blouin V, Brument N, et al. The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 437: 51-91.
- [7] Okuyama T, Huber RM, Bowling W, et al. Liver-directed gene therapy: a retroviral vector with a complete LTR and the ApoE enhancer- α 1-antitrypsin promoter dramatically increases expression of human α 1 -antitrypsin in vivo [J]. *Human Gene Ther*, 1996, 7(5): 637-645.
- [8] Strobel B, Klauser B, Hartig JS, et al. Riboswitch-mediated attenuation of transgene cytotoxicity increases adeno-associated virus vector yields in HEK-293 Cells [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(10): 1582-1591.
- [9] Rosas LE, Grieves JL, Zarspe K, et al. Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(11): 2098-2110.
- [10] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. *Nature Biotechnol*, 2004, 22(3):

326-330.

- [11] Rashnnejad A, Chermahini GA, Li S, et al. Large-scale production of adeno-associated viral vector serotype-9 carrying the human survival motor neuron gene [J]. *Mol Biotechnol*, 2015, 58(1): 1-7.
- [12] Yang Q, Mamounas M, Yu G, et al. Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1929-1937.
- [13] Meng X, Feng Y, Ouyang T, et al. Specific gene expression in mouse cortical astrocytes is mediated by a 1740bp-GFAP promoter-driven combined adeno-associated virus 2/5/7/8/9 [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 593: 45-50.
- [14] Mclean JR, Smith GA, Rocha EM, et al. Widespread neuron-specific transgene expression in brain and spinal cord following synapsin promoter-driven AAV9 neonatal intracerebroventricular injection [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 576: 73-78.
- [15] Matsuzaki Y, Konno A, Mukai R, et al. Transduction profile of the marmoset central nervous system using adeno-associated virus serotype 9 vectors [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, Feb 16. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s12035-016-9777-6
- [16] Liu Q, Perez CF, Wang Y. Efficient site-specific integration of large transgenes by an enhanced herpes simplex virus/adeno-associated virus hybrid amplicon vector [J]. *J Virol*, 2006, 80(4): 1672-1679.
- [17] Lee GK, Maheshri N, Kaspar B, et al. PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92(1): 24-34.
- [18] Kohli M, Rago C, Lengauer C, et al. Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): e3.
- [19] Kelly EJ, Russell SJ. MicroRNAs and the regulation of vector tropism [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(3): 409-416.
- [20] Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, et al. A precise chemical strategy to alter the receptor specificity of the adeno-associated virus [J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 55(36): 10645-10649.
- [21] McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, et al. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant [J]. *Blood*, 2013, 121(17): 3335-3344.
- [22] Hutson TH, Verhaagen J, Moon LDF. Corticospinal tract transduction: a comparison of seven adeno-associated viral vector serotypes and a non-integrating lentiviral vector: Transduction of the CST using viral vectors [J]. *Gene Ther*, 2012, 19(1): 49-60.
- [23] Guo P, Xiao X, Elgohary Y, et al. A simplified purification method for AAV variant by polyethylene glycol aqueous two-phase partitioning [J]. *Bioengineered*, 2012, 4(2): 103-106.
- [24] Carlisle RC, Reuben B, Briggs SS, et al. Coating of adeno-associated virus with reactive polymers can ablate virus tropism,

enable retargeting and provide resistance to neutralising antisera [J]. J Gene Med, 2008, 10(10): 400–411.

[25] Büning H, Ried MU, Perabo L, et al. Receptor targeting of adeno-associated virus vectors [J]. Gene Ther, 2003, 10(14): 1142–1151.

[26] Buie LKK, Rasmussen CA, Porterfield EC, et al. Self-complementary AAV virus (scAAV) safe and long-term gene transfer in the trabecular meshwork of living rats and monkeys [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2010, 51(1): 236–248.

[27] Buening H. Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells [J]. Mol Ther, 2001, 4(3): 174–181.

[28] Aydemir F, Salganik M, Resztak J, et al. Mutants at the 2-fold interface of adeno-associated virus type 2 (aav2) structural proteins suggest a role in viral transcription for AAV capsids [J]. J Virol, 2016, 90(16): 7196–7204.

[修回日期]2016–11–15

(上接第 69 页)

[2] 岳秉飞. 北京实验动物质量监督检测概况 [R]. 广州:中国食品药品检定研究院,2015.

[3] 魏晓锋. 上海地区实验动物质量检测现状 [R]. 广州:上海市实验动物质量监督检验站,2015.

[4] 隋丽华, 范薇, 杨敬, 等. 实验动物微生物、寄生虫抽样调查及分析 [J]. 实验动物与比较医学,2008,28(4): 259–262.

[5] 佟巍,张丽芳,向志光. 北京地区 2011~2012 年度实验小鼠 POLY 病毒感染情况调查与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(112): 40–43.

[6] Chichlowski M, Hale LP. Effects of Helicobacter infection on research: the case for eradication of Helicobacter from rodent research colonies [J]. Comp Med. 2009, 59(1): 10–17.

[7] Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice [J]. Clin Diagn Lab Immunol. 2005, 12(10): 1145–1151.

[8] 丁聪,冯洁,谢建云,等. 应用 PCR 方法调查实验大小鼠螺杆菌感染情况 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2012, 33(2): 6–9.

[9] 高正琴, 张强, 贺争鸣, 等. 肝螺杆菌多重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 891–895.

[10] 袁文, 张钰, 刘忠华, 等. 广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查 [J]. 中国比较医学杂志,2010, 20(2): 78–82.

[11] 刘芹,魏晓锋,田立立, 等. 上海地区小鼠诺瓦克病毒的检测分析及病毒分离 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 80–85.

[12] 田胜男. 小鼠诺如病毒检测方法的研究 [D]. 北京:北京协和医学院,2014.

[13] KR Pritchett-Corning, J Cosentino, CB Clifford. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. Lab Animals, 2009, 43: 165–173.

[修回日期]2016–07–20