

腺相关病毒载体的靶向策略探讨

王毅刚 黄芳 蔡荣 钱程* 刘新垣*

(浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; 中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031. * 联系人, E-mail: xyliu@sibs.ac.cn; cqian3184@yahoo.com.cn)

摘要 与其他病毒载体相比, 腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)由于具有宿主范围广、病原性低和携带的治疗基因表达期长等优势而成为目前最有前景的基因转移载体之一。然而, 在临床基因治疗过程中, AAV 具有广泛的宿主范围同时也导致缺乏组织或细胞特异性, 对靶细胞的基因转染效率不高, 同时也缺乏安全性。因此, 提高重组 AAV (rAAV)的靶向能力对于基因治疗成功与否非常关键。目前, 各种不同血清型 AAVs 的分离、鉴定、应用以及 rAAV 制备技术的发展使得 rAAV 载体可用于更多的临床基因治疗实验。而且, 当前针对 rAAV 载体各种靶向策略的研究也显示了很好的基因治疗应用前景。这些靶向策略主要包括转录靶向、受体靶向、共价偶联靶向、各种不同血清型 AAV 的应用以及基因重组靶向策略等。本文就近年来基于 rAAV 载体的各种靶向策略的进展作一评述。

关键词 腺相关病毒 基因治疗 靶向

基因疗法为人类许多疾病提供了一种可能的治疗手段。通过基因转移载体在体内或体外可有效地将编码治疗性多肽、蛋白或 RNA (包括 miRNA^[1])的基因转移进宿主细胞或组织, 以达到治疗疾病的目的。目前, 所用载体包括非病毒载体和病毒载体。病毒载体主要包括腺病毒(adenovirus, Ad)、逆转录病毒(retrovirus)、慢病毒(lentivirus)、腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)、艾巴氏(Epstein-Barr)病毒、嵌合病毒(来自不同病毒的衣壳经融合或衣壳通过遗传修饰而得到的病毒)和杂合病毒(指不同病毒的杂合体)等。与非病毒载体相比, 重组病毒载体具有更高的基因转移效率。

自重组 AAV (rAAV)载体首次被用于将新霉素(neo)抗性基因转导哺乳细胞以来, 其应用得到了飞速的发展^[2]。到目前为止, 在 PubMed 中用“AAV and gene therapy”关键词可检索到的文献有 986 篇, 而在 2002 年前仅有 364 篇。由于 rAAV 载体在人体中至今没有检测到其所导致的病原性, 因此被广泛应用于多种疾病的临床前研究^[3]。而且, rAAV 载体介导的外源基因能长期稳定表达, 没有或极低的免疫反应和广泛的宿主范围或细胞嗜向性, 表现出作为人类基因治疗最有前景的载体之一。值得关注的是, 目前基于 15 个不同的 rAAV2 载体, 至少有针对上百个病

人的 20 个临床实验已经完成或正在进行^[4]。然而, 尽管 AAV 载体具有很好的安全性和效率, 但由于其广泛的宿主范围导致了组织或细胞特异性缺乏以及基因表达水平不高等缺点, 使得其在临床前和临床基因治疗中存在局限。因此, 为达到最好的治疗效率和最小的细胞毒性, 发展靶向 AAV 载体对基因治疗的成功非常关键。

近年来, 研究者们通过各种方法致力于提高 AAV 载体的转染效率、靶向能力和安全性。这些方法包括修饰 AAV 的衣壳蛋白、插入各种适当的受体到衣壳基因组、组织特异性转录调控靶向、位点特异性插入突变及多肽展示文库的应用、化学共价偶联和基因重组靶向特异性缺失等。另一重要的研究进展是对人类或非人灵长类组织中许多不同血清型 AAV 以及对混杂于腺病毒液中的超过上百种 AAV 突变体的分离和鉴定^[5]。由于这些不同血清型 AAV 具有潜在的细胞嗜向性和较高的转导效率, 因此, AAV 载体携带外源基因在特异组织或细胞中具有更高的表达水平。

1 AAV 载体的生物学特征和应用概况

1.1 AAV 的生物学特征

AAV 属于细小病毒(parvovirus)家族的一员, 具有大小约 4.7 kb 的单链 DNA 病毒基因组, 由二十面

体衣壳蛋白包裹。AAV 基因组包括 3 个启动子(P5, P19 和 P40)和 2 个可读框(ORFs), 与 Rep 和 Cap 蛋白(末端与长为 145 bp 的 ITR 相接)的转录和翻译有关。5'端 *rep* ORF 编码 4 个重叠的具有多种功能的蛋白(Rep78, Rep68, Rep52 和 Rep40), 主要负责病毒的位点特异性整合、复制和转录调控等。3'端 *cap* ORF 编码 3 个衣壳蛋白, 即 VP1 (90 kD), VP2 (72 kD)和 VP3 (60 kD), 主要负责病毒颗粒的装配(图 1)。

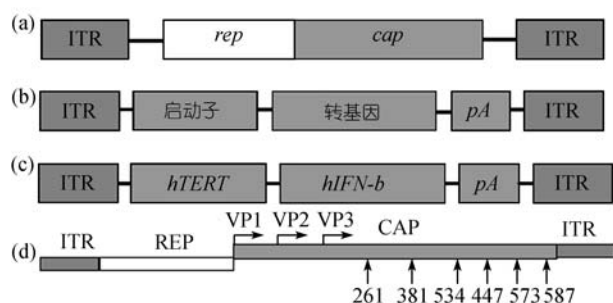


图 1 腺相关病毒(AAV)基因组结构示意图

(a) 野生型 AAV 结构图。基因组由两个回文 ITR 包裹, *rep* ORF 编码病毒复制相关蛋白, *cap* ORF 编码病毒包装所需衣壳蛋白。(b) AAV 载体结构图。病毒基因组由外源基因表达框替代, 表达框由启动子、外源基因和 poly(A)尾(pA)组成。(c) AAV-hTERT-hIFN- β 载体结构图。(d) *rep* 和 *cap* ORF 示意图。*cap* 编码 3 个衣壳蛋白 VP1, VP2 和 VP3。箭头所指为可插入特异性配体的位置(数字表示插入的 N 末端氨基酸位点)

AAV 感染宿主细胞是一个多步有序的过程。首先, AAV 与细胞表面的初级或黏附受体硫酸肝素糖蛋白(HSPG)结合。随后, AAV 与共受体 α V β 5 整合素、成纤维细胞生长因子 1(FGFR1)、发动蛋白(dynamin)、Rac1 和磷脂酰肌醇激酶(PI3K)等作用, 经由网格蛋白包被凹陷介导快速内化, 并形成内含体。入胞后, 经细胞内运输, AAV 从内含体释放入胞浆, 并定位于核周。最后, AAV 缓慢地经由核孔复合体进入核内并且整合进宿主染色体以介导外源基因的长期表达^[6]。

1.2 AAV 载体的应用概况

rAAV 载体的细胞内运输动力学和可整合进宿主染色体对于实现外源基因在靶向组织或细胞中的长久稳定表达非常关键。然而, rAAV 载体在临床试验上的应用仍依赖于其大规模制备技术的发展。近年来, 许多有关 rAAV 载体的新型制备技术取得了迅速发展^[7,8]。这些新方法不仅使得 rAAV 滴度提高了至少 100 倍, 而且还消除了辅助病毒的污染。

目前, rAAV 载体被广泛用于人类疾病的治疗研

究。在人血友病 B 的狗动物模型治疗中, rAAV 载体注射体内后, 其介导的因子 (F) 可持续表达一年以上, 并且没有观察到明显的毒性^[9]。另一研究也显示, AAV2-F 体内注射后, 无论在肌肉活组织切片还是循环系统中, F 的表达至少持续 4 年以上^[10]。在肿瘤治疗方面, AAV2 载体携带的 p53, 金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP1)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、干扰素(IFN)、内皮抑素(endostatin)和血管抑素(angiostatin)等基因, 在结肠癌、肺癌和肝癌等动物实验中显示了很好的抑制肿瘤发生、肿瘤血管形成和肿瘤生长作用, 提高了动物的抗肿瘤免疫功能及其生存率。此外, AAV 载体转染各种不同的治疗基因进入特异性组织或细胞也被广泛应用于治疗人类其他的遗传性疾病、帕金森病、 α 1 抗胰蛋白酶缺陷病、纤维性囊肿、杜氏肌营养不良、中枢神经系统和视网膜疾病、肥胖症、自身免疫性疾病、糖尿病和关节炎等^[11]。特别值得一提的是, rAAV8 载体介导的小鼠血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 抗体 DC101 基因在小鼠体内实现了高水平长期表达, 显示了其重要的抗癌作用前景^[12]。

2 AAV 载体的靶向策略

理想地说, 用于治疗疾病的 AAV 载体应该即安全又有效, 并可靶向特定组织或细胞。因而, 发展具特异靶向能力的 AAV 载体非常重要。下面就近年来有关靶向 AAV 载体发展的不同策略作一总结。

2.1 转录靶向策略

由于位于靶细胞表面的受体不是唯一的, 这使得 rAAV 载体携带治疗基因特异性转染靶组织或细胞的能力存在一定限制。因此, 治疗基因的可调控性特异表达深受关注。一般来说, 基因表达框由 3 个部分组成: 增强子-启动子, 基因编码系列和 poly(A)尾。治疗基因编码系列的表达受上游增强子-启动子调控。因此, 利用合适的组织特异性转录调控系列可用来提高 rAAV 载体的靶向转导能力。这些调控系列包括靶向脑细胞的神经元特异性烯醇酶基因(NSE)启动子^[13]、肝细胞特异的甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子^[14]、肌肉细胞特异的肌氨酸激酶(CK)启动子^[15], 以及肿瘤特异性转录调控系列如腺癌细胞特异激活的癌胚抗原(CEA)启动子^[16]、肝癌细胞特异的甲胎蛋白(AFP)启动子^[17]和 85%~90% 的肿瘤细胞中具有活性的人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子^[18]等(表 1)。

表 1 可用于 AAV 载体的组织或肿瘤特异性启动子

增强子/启动子	靶位	携带基因	参考文献
hSYN	脑细胞	报道基因	[19]
NSE	脑细胞	报道基因	[13]
CBA	肝脏, 视网膜, 脉络膜	报道基因, <i>Flk-1</i> , <i>PEDF</i>	[13,20~22]
hTERT	端粒酶阳性肿瘤细胞	<i>GFP</i> , <i>hIFN-β</i>	[18,23]
MLC2v	心肌细胞	<i>GFP</i> , <i>AS-AT₁R</i>	[24]
骨髓肌动蛋白/CMV 杂合增强子	鼠 c2c12 细胞肌小管	<i>hFIX</i>	[25]
TBG	鼠血液, 肝脏	<i>Camine F VIII</i> , <i>IDS</i>	[14,26]
RSV	灵长类动物	<i>Epo</i>	[27]
hRPE65	啮齿动物视网膜色素 上皮细胞	报道基因, <i>RPE</i>	[28]
人视蓝蛋白启动子	啮齿动物视网膜	<i>GFP</i>	[29]
CCT α	肺上皮细胞	<i>Epo</i> , <i>CCT</i>	[30]
hPDGF β 链启动子/CMV 增强子	神经元	荧光素酶基因	[31]
Pro 炎症诱导启动子	视神经	<i>SOD2</i>	[32]
RSV, Ad E1A 启动子	神经系统	<i>Lac Z</i>	[33]
hcGMP-PDE β 亚基	人视网膜母细胞瘤	<i>Lac Z</i>	[34]
hGABRA4 启动子	神经突触	报道基因	[35]
HSP70	视网膜	<i>GFP</i>	[36]
CK	肌肉	微小抗肌萎缩蛋白基因, γ -肌聚糖	[15,37]
GRE	心脏	<i>mTPO</i>	[38]
hEF1 α	肝脏, CD4 ⁺ T 细胞	<i>IFN-α</i> , <i>Ova</i> , <i>GFP</i>	[39,40]
hAAT	肝脏	<i>hFIX</i>	[41]
鼠视紫质启动子	视网膜	外周蛋白基因	[42,43]
OBHRE	血液	<i>mEPO</i>	[44]
降血钙素启动子	髓质性甲状腺癌	<i>hNIS</i>	[45]
鼠白蛋白	肝脏	<i>HGAA</i> , <i>tTA</i> , <i>EGFP</i>	[46]
白蛋白+ α 胎蛋白	肝癌	<i>HSV-TK</i>	[17,47]
鼠胰岛素	鼠胰腺	<i>GFP</i>	[48]
鼠视杆蛋白	眼	<i>hRS1</i> , <i>Lac Z</i>	[49]
人 α -球蛋白, HSV-TK	血液	人 α -球蛋白	[50]
IL-2	T 细胞	荧光素酶, <i>Neo</i>	[51]
CC10	肺	<i>Epo</i>	[52]
MHC	心肌细胞	<i>Lac Z</i> , <i>hGH</i>	[53]
人 β -葡萄糖苷酸酶	脑细胞	人 β -葡萄糖苷酸酶基因	[54]
鼠眼白化病基因 1 启动子	眼	荧光素酶, <i>GFP</i>	[55]

近来, 我们实验室构建了一种新型的利用 hTERT 启动子控制 rAAV 载体介导 hIFN- β 基因表达系统(AAV-hTERT-hIFN- β) (图 1(c)), 该载体显示了肿瘤特异性的 hIFN- β 表达和肿瘤细胞杀伤性。因此, 这种新型的 rAAV 载体具有很好的抗癌效应 [23]。在我们构建的 rAAV-hTERT-gene 载体平台的基础上, 联合应用 AAV-hTERT-hIFN- β 和 AAV-hTERT-TRAIL 治疗 A549 肺癌细胞荷瘤裸鼠肿瘤的实验中取得了更好的抗癌效果, 甚至部分小鼠的肿瘤能够完全消除(结果将另文发表)。这些研究证明了 AAVs 联合 hTERT 启动子介导治疗基因为其他类型肿瘤的特异性靶向治疗打开了新的思路和可能性。

除采用组织特异性增强子/启动子外, 几个可诱

导性基因表达系统如 tet, RU486 和 Cre-loxP 也被应用于 rAAV 载体的靶向性治疗研究。在强力霉素(Dox)的诱导下, rAAV 介导的 tet 系统调控 GFP 基因在大鼠视网膜细胞得到了高效的可控性表达 [56]。Chtarto 等人 [57] 也采用 rAAV 载体介导 tet 系统使得外源基因在肿瘤细胞和大鼠 Schwann 细胞中的有效调控性表达分别提高 50 和 100 倍以上。另一研究也显示, 通过视网膜下注射 rAAV 载体, 在 Dox 诱导下, 可观察到非人灵长类视网膜细胞长期的外源基因表达 [58]。Cre-loxP 系统也被用于 rAAV 载体介导的基因表达调控, 位点特异性整合以及 rAAV 的高效生产。例如, 应用 Cre-loxP 系统在杂合病毒 Ad/AAV 载体介导的外源基因位点特异性整合中, 能有效调控 AAV 的 Rep 蛋白表达 [59]。另

有研究表明,用突变或野生型的loxP系列分别控制Rep和Cap蛋白的表达使得rAAV载体的生产效率大大提高^[60]。最近,在帕金森病的大鼠模型治疗中,Cre-loxP系统应用于rAAV介导的多巴胺调控生产能够潜在地提高治疗的安全性^[61]。另外,通过米非司酮(RU486)诱导剂的加入,RU486系统已被用于腺病毒和HSV载体有效地调控外源基因的表达^[62]。因此,RU486诱导系统应用于rAAV载体也有很好的前景。

2.2 受体靶向策略

AAVs进入细胞依赖于其衣壳与特异细胞表面受体的相互作用。随后,共受体与衣壳作用介导AAVs的内化和细胞内运输过程^[6]。AAVs的转导效率与其感染宿主细胞的过程紧密相关,而该过程受AAVs的衣壳结构影响。因而,构建能够选择性地与特异细胞表面受体相结合且衣壳经修饰的AAV载体是目前研究的热点。

Girod等人^[63]首先鉴定了暴露于AAV2衣壳表面可用于遗传修饰的6个氨基酸位点,其分别位于261, 381, 447, 534, 573和587。这些位点允许插入特异性配体而不会干扰AAV的生活周期等必需功能。进一步通过插入14氨基酸靶向多肽L14进入6个不同的位点,产生相应的AAV2衣壳突变体。该L14多肽包含RGD模体,可以靶向结合整合素细胞受体,因而,整合素也被称为病毒受体。修饰后的AAV2载体能够感染表达整合素受体的B16F10和RN22细胞株,而在正常情况下,它们不能被野生型AAV2感染。这些位点的鉴定使得插入与靶细胞结合的各种不同选择性多肽配体非常方便。另一研究组^[64]用可靶向转导脐静脉和隐静脉表皮细胞的七肽序列SIGYPLP修饰AAV2载体衣壳,结果改造后的载体可靶向转染该两种细胞,而其对早期人血管平滑肌细胞和肝细胞则不能转染。此外,也有研究将含核心EYH模体的多肽插入AAV2的衣壳,使得修饰后的rAAV载体可特异性地转染平滑肌细胞^[65]。

最近,White等人^[66]采用噬菌体展示技术(phage display)筛选出靶向人静脉内皮细胞多肽MTP,并将该多肽插入AAV2衣壳的587氨基酸位点。修饰后的rAAV2载体经静脉内注射后能特异转染静脉内皮细胞而很少进入肝、脾和肺,并且腔静脉内检测到有增加的病毒粒子摄入和选择性的外源基因表达。另有研究证明^[67],RGD模体整合入AAV2的VP3导致病毒不依赖HSPG受体而进入细胞,并且提高了经整合素

受体转染细胞的效率。这提示携带RGD多肽的rAAV载体为治疗缺失表达HSPG受体的肿瘤提供了新的应用前景。

除靶向性配体进行衣壳的修饰外,随机文库(random library)方法也被用于修饰AAV载体的衣壳。研究证实,经修饰的AAV载体不仅能结合最适合的细胞表面受体而且在靶细胞内可有效装配,胞内运输和去衣壳。例如,Perabo等人^[68]采用该方法建立了两侧带有丙氨酸的7个随机衣壳多肽的AAV库。研究结果显示,该AAV库可持续转染对rAAV2非允许转染的MO7e和Mec1细胞。Muller等人^[69]采用相似的策略构建的AAV载体可提高对冠状动脉内皮细胞的转染而对照非内皮细胞则不能被转染。此外,这种方法产生的AAV突变体极少被人体抗体所中和并且可用于治疗对AAVs具有免疫原性的患者^[70]。

2.3 共价偶联靶向策略

受体靶向策略通过插入受体靶向多肽进入rAAV衣壳大大提高了rAAV载体的转导效率。另一种应用于rAAVs的靶向策略是间接共价偶联靶向,其特点是通过使用共价偶联分子(如双特异性抗体和交联剂分子)使得病毒表面特异分子和靶细胞表面特定分子相互作用达到靶向目的,并且不改变病毒衣壳基因的序列。Bartlett等人^[71]采用能介导AAV载体和人巨核细胞表面特异受体相互作用的双特异性抗体来提高AAV2载体的靶向性,并首次证实了这种靶向策略的可行性,显示了经偶联的rAAV载体能高效转染原先不允许AAVs进入的人巨核细胞。

此外,rAAV载体经共价偶联选择性多肽分子,并没有影响病毒随后的从内含体释放、去衣壳及入核等成功转导靶细胞所必需的过程。Ponnazhagan等人^[72]使用高亲和力的生物素-亲和素系统作为分子桥交叉连接靶向配体到核心链状亲和素。然后,rAAV2载体与双特异性靶向配体蛋白的共价偶联通过生物素交联纯化的rAAV而形成,而且这种偶联并没有影响病毒的衣壳结构,其内化和随后的外源基因表达。经由EGFR或FGFR1 α 靶向修饰的rAAV载体转染EGFR阳性细胞SKOV3.ip1和FGFR1 α 阳性细胞M07e的效率大增。尽管上述策略的应用使得共价偶联载体在体外能成功靶向整合素、EGFR和EGFR1 α 等受体,但是这种修饰rAAV载体在体内的稳定性仍值得关注。最近,Ried等人^[73]采用一种简单的方法来改变AAV的衣壳蛋白,使其共价偶联到靶向多肽。他们通过插

入一段包含可结合IgG结构域的 34 个残基蛋白A片段 (Z34C)进入AAV2 衣壳的 587 氨基酸位点, 产生的 AAV2-Z34C突变体可被包装, 纯化至高滴度且能结合IgG分子. 进一步研究表明, rAAV2- Z34C载体可偶联抗CD29 (β 1-整合素), CD117 (c-kit受体)和趋化因子受体 4 (CXCR4)受体并且能特异性地转导人造血干细胞. 此外, 也有研究显示, 使用该AAV2 嵌合载体可改变其组织或细胞嗜向性并能够选择性地高效转染MO7e和Jurkat细胞 [74].

因此, 通过特异性多肽片段插入到 AAV2 衣壳或通过偶联各种不同双特异性抗体而构建的 AAV2 嵌合体, 可以特异性地分别转导广泛的细胞种类. 进一步地优化该靶向策略, 应着重在于提高 AAV2 载体用于 *ex vivo* 和 *in vivo* 基因治疗的潜能, 并为发展针对其他血清型 AAV 的靶向策略建立研究平台.

2.4 不同血清型 AAV 的应用

自 1982 年感染性AAV2 载体首次被成功构建以来, 其作为体内基因转移载体的应用得到了快速的发展 [75]. 目前, 至少有 13 种AAV血清型和超过 100 种AAV突变体从灵长类、鸟类、家畜、羊、犬和马等动物中被分离和鉴定 [76]. 各种不同血清型AAV的主要差别在于其衣壳结构, 这使得其具有不同的组织嗜向性. 大量研究表明, AAV2 载体具有广泛的宿主范围, 如可转染肌肉、中枢神经系统、肝脏、肺和眼等, 但这也限制了其进一步的应用. 近年来, 许多研究采用灵长类来源的不同血清型AAV1-9 作为载体, 结果显示即提高了转染效率又具有特异的嗜向性. 不同血清型AAVs显示了不同的组织嗜向性(表 2).

在不同血清型AAV载体的应用中, Xiao等人 [77] 做了许多开拓性的工作. 他们用AAV1 作为载体介导外源基因转染肌肉的效率比AAV2 高 10~100 倍. 另有研究证实, AAV4 和AAV5 能有效介导外源基因转

染中枢神经系统 [78]. 在骨骼肌转染中, AAV7 载体携带的外源基因表达效率与AAV1 相当. 与其他血清型 AAV载体相比, AAV8 载体转导肝脏的效率提高了 10~100 倍, 并使得肝细胞获得了高水平的外源基因表达 [79]. AAV9 具有与AAV1 相近的肌肉转导能力. 此外, 从AAV1 病毒液中分离得到的AAV6, 与AAV1 相比仅有 6 个氨基酸残基不同, 其也显示了很好的转导骨骼肌和肝脏的应用潜能 [80]. 此外, 与AAV2 的比较结果表明, AAV1 和AAV5 对中枢神经系统的每个区域均显示出了更高的转染效率 [81]. AAV2 具有广泛地转染整个中脑的能力, 而AAV4 则只能特异性转染侧脑室的星形胶质细胞和室管膜细胞, 另AAV5 转染神经元和星形胶质细胞也具特异性 [78]. 另一研究表明, AAV4 也能转染视网膜色素上皮细胞, 但与AAV5 相比其效率较低 [82].

当前, 新型血清型 AAVs 作为基因转移载体已被广泛用于许多治疗实验方案中, 并且取得了令人满意的结果. 然而, 由于机体存在血-脑和血-胸等屏障, 因此这使得全身注射 AAV 载体很难进入中枢神经系统和某些实体组织. 近年研究表明, AAV8 能跨越存在于内皮细胞和血管之间的这种屏障而转染该种组织和细胞, 因而 AAV8 成为人们备感兴趣的载体. 因此, 对于人类临床治疗实验, 更好地理解 and 利用这些不同血清型 AAVs 的组织嗜向性非常关键. 这些新型血清型 AAVs 可望成为靶向基因治疗领域未来最有效的基因转移载体之一.

2.5 rAAVs 基因重组靶向策略

病毒载体如逆转录病毒和 AAV 携带基因转移的过程中会导致外源基因片段随机整合或半随机整合进宿主细胞基因组. 尽管这种整合能高效稳定地介导外源基因在靶细胞中表达, 但依然存在一些不稳定的因素或缺点, 主要包括外源基因整合进宿主基因组的可变位点和不同拷贝数所引起机体的严重后

表 2 各种血清型 AAVs 的不同组织嗜向性

AAV 血清型	靶向器官或组织							
	肝脏	肌肉	肺	中枢神经系统	心脏	肾脏	视网膜色素上皮	其他组织
AAV2/1		+						
AAV2/2	+	+	+	+	+	+	+	+
AAV2/4				+			+	
AAV2/5				+			+	
AAV2/6	+	+						
AAV2/7		+						
AAV2/8	+	+			+			
AAV2/9	+	+	+					

果以及基因随机整合所导致的不可预见性^[83]。例如,应用逆转录病毒载体介导的对X染色体连锁的严重联合免疫缺陷性疾病(X-SCID)患者进行临床基因治疗实验后,由于癌基因的意外激活而导致白血病的产生这一严重后果^[84]。

然而,AAV载体由于宿主范围广,衣壳经修饰可重靶向特异的细胞类型和其他一些特性,使rAAVs介导的基因重组靶向策略通过在培养的人原代细胞中产生基因敲除可实现高效、稳定和非突变性的基因修正或基因干扰^[85]。其主要机理包括外源基因与宿主基因组内的同源基因位点之间的重组过程。因此通过基因重组及靶向修复可保持特异染色体片段的稳定并且确保转录的正常进行,而随机整合的序列被逐渐丢失。Russell等人^[86]证实,rAAV载体介导的哺乳动物细胞特定基因修复的同源重组率可高达约1%,提示rAAV是一种很有前景的靶向基因治疗载体。尽管rAAV介导的基因靶向重组率达到了1%,但还伴随大约10%的随机整合所带来的危险性。成体干细胞的使用则可排除这种随机整合事件并消除致死或致癌性等严重副反应,因为其在自体移植前通过*ex vivo*基因操作后,具有潜在的治疗疾病的功能。近年来,COL1A1^[87],PRNP^[88],EGFP^[89]等基因的应用进一步证实了rAAV载体介导的这种策略的可行性和有效性。

COL1A1基因(胶原纤维的一种成分)是一种可导致脆骨病即骨形成不全(osteogenesis imperfecta, OI)的靶向显性负性等位基因。在正常人成纤维原细胞中,利用rAAV载体介导可使该基因破坏^[87]。此后,另一靶向治疗研究采用rAAV载体转导间充质干细胞也成功实现了COL1A1基因的干扰。进一步的研究显示,COL1A1基因靶向转染间充质干细胞后在小鼠模型中能够促进骨结构的形成以及提高胶原纤维的稳定性^[90]。同样,通过rAAV载体靶向转染胎牛成纤维原细胞,与牛神经退行性疾病相关的编码朊病毒蛋白(prion protein, Prp)的正常PRNP基因也被破坏^[88]。而且,研究还显示牛获得了对朊病毒疾病的抵抗能力^[91]。更近研究表明,通过RNA干扰机制,AAV载体介导EGFP和RFP基因的重组靶向机制被阐明^[89]。这将在很大程度上促进AAV载体重组靶向策略用于治疗疾病的安全性发展,显示其具有很好的应用前景。

3 前景与展望

目前,基于rAAV载体的各种靶向策略被广泛采用,并且当前还有一些策略也在积极发展当中。AAVs已成为最具潜力的安全性最好的人类基因治疗的病毒载体之一。例如,在AAV2载体治疗血友病B的期临床实验中,治疗基因高效表达的同时没有检测到任何明显的毒性。

然而,要实现对其他多种疾病的治疗进入临床实验,还有很长的一段路要探索。当前,许多研究都致力于构建新型靶向AAV载体,以达到更高效治疗疾病的同时具有最小的毒副作用。因此,针对AAVs的进一步研究,我们应该从以下几方面努力:()更深入地了解AAV载体的分子生物学特征和感染途径的分子机制;()寻找并修饰针对特异性组织或细胞的最优化和最稳定的配体或靶向受体,用于靶向rAAV载体的构建;()筛选并应用更多具有不同嗜向性的血清型AAVs或突变体;()尽量减少或避免AAVs的副反应和细胞毒性,并建立AAVs的安全性监测范围。可以设想,联合应用共价偶联靶向、转录靶向和新型血清型AAVs,以及转录靶向AAV载体携带治疗基因甚至联合放化疗,将会为人类疾病的临床治疗提供广阔而美好的前景。

参 考 文 献

- 1 潘秋卫,蔡荣,刘新垣,等. 肿瘤基因治疗新策略——RNA干扰. 科学通报, 2006, 51(9): 993—997
- 2 Hermonat P L, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of Neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(20): 6466—6470[DOI]
- 3 Wu Z, Asokan A, Samulski R J. Adeno-associated virus serotypes: Vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther, 2006, 14(3): 316—327[DOI]
- 4 Carter B J. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. Hum Gene Ther, 2005, 16: 541—550[DOI]
- 5 Schmidt M, Grot E, Cervenka P, et al. Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. J Virol, 2006, 80(10): 5082—5085
- 6 Bartlett J S, Wilcher R, Samulski R J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. J Virol, 2000, 74(6): 2777—2785[DOI]
- 7 Merten O W, Geny-Fiamma C, Douar A M. Current issues in adeno-associated viral vector production. Gene Ther, 2005, 12 (Suppl 1): S51—61[DOI]
- 8 陈立,陈浩明,李戈,等. 一种新型的低辅毒污染的重组AAV生产系统. 科学通报, 2003, 48(1): 52—54
- 9 Wang L, Calcedo R, Nichols T C, et al. Sustained correction of

- disease in naïve and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood*, 2005, 105(8): 3079—3086[DOI]
- 10 Jiang H, Pierce G F, Ozelo M C, et al. Evidence of multiyear Factor expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther*, 2006, 14(3): 452—455[DOI]
- 11 Warrington K H, Herzog R W. Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet*, 2006, 119(6): 571—603[DOI]
- 12 Fang J, Qian J J, Yi S, et al. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 584—590[DOI]
- 13 Shevtsova Z, Malik J M I, Michel U, et al. Promoters and serotypes: Targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system *in vitro* and *in vivo*. *Exp Physiol*, 2005, 90(1): 53—59[DOI]
- 14 Wang L, Takabe K, Bidlingmaier S M, et al. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7): 3906—3910[DOI]
- 15 Yue Y, Li Z, Harper S, et al. Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the Mdx mouse heart. *Circulation*, 2003, 108: 1626—1632[DOI]
- 16 Nyati M K, Sreekumar A, Li S, et al. High and selective expression of yeast cytosine deaminase under a carcinoembryonic antigen promoter-enhancer. *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2337—2342
- 17 Guan M, Rodriguez-Madoz J R, Alzuguren P, et al. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 620—629
- 18 Zou W, Luo C, Zhang Z, et al. A novel oncolytic adenovirus targeting to telomerase activity in tumor cells with potent. *Oncogene*, 2004, 23(2): 457—464[DOI]
- 19 Kugler S, Lingor P, Scholl U, et al. Differential transgene expression in brain cells *in vivo* and *in vitro* from AAV-2 vectors with small transcriptional control units. *Virology*, 2003, 311(1): 89—95[DOI]
- 20 Boye S L, Peterson J, Petrs-Silva H, et al. Transduction and tropism of an abbreviated form of CMV-chicken β -actin promoter (CBA) with AAV in mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47: 852
- 21 Davidoff A M, Nathwani A C, Spurbeck W, et al. rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice. *Cancer Res*, 2002, 62(11): 3077—3083
- 22 Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(6): 1994—2000
- 23 Wang Y G, Wang J H, Zhang Y H, et al. Antitumor effect of a novel adeno-associated virus vector targeting to telomerase activity in tumor cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36(7): 492—500
- 24 Phillips M I, Tang Y, Schmidt-Ott K, et al. Vigilant vector: Heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension*, 2002, 39(2 Pt 2): 651—655[DOI]
- 25 Hagstrom J N, Couto L B, Scallan C, et al. Improved muscle-derived expression of human coagulation factor from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood*, 2000, 95(8): 2536—2542
- 26 Cardone M, Polito V A, Pepe S, et al. Correction of Hunter syndrome in the MPS mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(7): 1225—1236[DOI]
- 27 Rivera V M, Gao G P, Grant R L, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*, 2005, 105(4): 1424—1430[DOI]
- 28 Li Q, Glushakova L, Doyle T J, et al. Only a specific region of the human RPE65 promoter supports AAV-vectored reporter gene expression in rodent RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 3640—3645
- 29 Glushakova L G, Timmers A M, Doyle T D, et al. AAV transfers human Blue Cone Opsin promoter targeted reporter gene expression to rat S-cone photoreceptors with high efficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 440—448
- 30 Zhou J M, You Y, Zabner J, et al. The CCT promoter directs high-level transgene expression in distal lung epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30(1): 61—68[DOI]
- 31 Li Y, Yang Y, Wang S. Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter. *Exp Physiol*, 2005, 90(1): 39—44[DOI]
- 32 Sun L, Qi X, Hauswirth W W, et al. AAV-mediated Sod2 gene expression driven by a pro-inflammatory inducible promoter: A novel method for gene therapy of multiple sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 628
- 33 Smith R L, Traul D L, Schaack J, et al. Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system. *J Virol*, 2000, 74(23): 11254—11261[DOI]
- 34 Ogueta S B, Polo A D, Flannery J G, et al. The human cGMP-PDE β -subunit promoter region directs expression of the gene to mouse photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 4059—4063
- 35 Roberts D S, Raol Y H, Bandyopadhyay S, et al. Egr3 stimulation of GABRA4 promoter activity as a mechanism for seizure-induced up-regulation of GABAA receptor $\alpha 4$ subunit expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11894—11899[DOI]
- 36 Sund N J, Yang X, Kuroki A, et al. Heat-inducible AAV-mediated gene delivery in RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 454
- 37 Cordier L, Gao G P, Hack A A, et al. Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(2): 205—215[DOI]
- 38 Lee L Y, Zhou X, Polce D R, et al. Exogenous control of cardiac

- gene therapy: Evidence of regulated myocardial transgene expression after adenovirus and adeno-associated virus transfer of expression cassettes containing corticosteroid response element promoters. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999, 118(1): 26—35[DOI]
- 39 Berraondo P, Ochoa L, Cretaz J, et al. IFN- α gene therapy for woodchuck hepatitis with adeno-associated virus: Differences in duration of gene expression and antiviral activity using intraportal or intramuscular routes. *Mol Ther*, 2005, 12(1): 68—76[DOI]
- 40 Dobrzynski E, Mingozzi F, Liu Y L, et al. Induction of antigen-specific CD4⁺ T-cell anergy and deletion by *in vivo* viral gene transfer. *Blood*, 2004, 104(4): 969—977[DOI]
- 41 Gray J T, Davidoff A M, Nathwani A C. A novel human factor expression cassette packaged as self-complementary DNA dimers in adeno-associated virus vectors results in dramatically improved liver transduction, significantly improving prospects for hemophilia B gene therapy. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2004, 104: 3181
- 42 Sarra G M, Stephens C, de Alwis M, et al. Gene replacement therapy in the retinal degeneration slow (rds) mouse: The effect on retinal degeneration following partial transduction of the retina. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(21): 2353—2361[DOI]
- 43 Buch P, Balaggan K S, Durán, Y, et al. AAV-Mediated GDNF Expression in combination with gene replacement therapy to treat rodent models of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 5226
- 44 Binley K, Askham Z, Iqbal S, et al. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood*, 2002, 100(7): 2406—2413[DOI]
- 45 Cengic N, Baker C H, Schutz M, et al. A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(8): 4457—4464[DOI]
- 46 Raben N, Lu N, Nagaraju K, et al. Conditional tissue-specific expression of the acid α -glucosidase (GAA) gene in the GAA knockout mice: Implications for therapy. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(19): 2039—2047[DOI]
- 47 Su H, Chang J C, Xu S M, et al. Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(4): 463—470
- 48 Wang Z, Zhu T, Rehman K K, et al. Widespread and stable pancreatic gene transfer by adeno-associated virus vectors via different routes. *Diabetes*, 2006, 55(4): 875—884[DOI]
- 49 Min S H, Molday L L, Seeliger M W, et al. Recovery of retinal structure and function after gene therapy in a Rslh-deficient mouse model of human X-linked juvenile retinoschisis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 5228
- 50 Ponnazhagan S, Nallari M L, Srivastava A. Suppression of human alpha-globin gene expression mediated by the recombinant adeno-associated virus 2-based antisense vectors. *J Exp Med*, 1994, 179(2): 733—738[DOI]
- 51 Zhang P X, Fuleihan R L. Transfer of activation-dependent gene expression into T cell lines by recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther*, 1999, 6(2): 182—189[DOI]
- 52 Auricchio A, O'Connor E, Weiner D, et al. Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest*, 2002, 110(4): 499—504[DOI]
- 53 Aikawa R, Huggins G S, Snyder R O, et al. Cardiomyocyte-specific gene expression following recombinant adeno-associated viral vector transduction. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 18979—18985[DOI]
- 54 Passini M A, Wolfe J H. Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector. *J Virol*, 2001, 75(24): 12382—12392[DOI]
- 55 Vetrini F, Auricchio A, Du J, et al. The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene: Link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(15): 6550—6559[DOI]
- 56 McGee Sanftner L H, Rendahl K G, Quiroz D, et al. Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther*, 2001, 3(5pt1): 688—696[DOI]
- 57 Chtarto A, Bender H U, Hanemann C O, et al. Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Ther*, 2003, 10(1): 84—94[DOI]
- 58 Stieger K, Le Meur G, Lasne F, et al. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther*, 2006, 13(5): 967—975[DOI]
- 59 Ueno T, Matsumura H, Tanaka K, et al. Site-specific integration of a transgene mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector using the Cre/loxP-expression-switching system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2): 473—478[DOI]
- 60 Mizukami H, Okada T, Ogasawara Y, et al. Separate control of Rep and Cap expression using mutant and wild-type loxP sequences and improved packaging system for adeno-associated virus vector production. *Mol Biotechnol*, 2004, 27(1): 7—14[DOI]
- 61 Li X G, Okada T, Kodera M, et al. Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*, 2006, 13(1): 160—166[DOI]
- 62 Mohammadi S, Lotze M. Regulatable systems: Applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest*, 2000, 105(9): 1177—1183
- 63 Girod A, Ried M, Wobus C, et al. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med*, 1999, 5(9): 1052—1056
- 64 Nicklin S A, Buening H, Dishart K L, et al. Efficient and selective AAV2 mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther*, 2001, 4(3): 174—181[DOI]
- 65 Work L M, Nicklin S A, brain N J, et al. Development of efficient viral vectors selective for vascular smooth muscle cells. *Mol Ther*, 2004, 9(2): 198—208[DOI]

- 66 White S J, Nicklin S A, Buning H, et al. Targeted gene delivery to vascular tissue *in vivo* by tropism-modified adeno-associated virus vectors. *Circulation*, 2004, 109(4): 513—519[DOI]
- 67 Shi W, Bartlett J. RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism. *Mol Ther*, 2003, 7: 515—525[DOI]
- 68 Perabo L, Buning H, Kofler D M, et al. *In vitro* selection of viral vectors with modified tropism: The adeno-associated virus display. *Mol Ther*, 2003, 8(1): 151—157[DOI]
- 69 Muller O J, Kaul F, Weitzman M D, et al. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(9): 1040—1046[DOI]
- 70 Perabo L, Endell J, King S, et al. Combinatorial engineering of a gene therapy vector: Directed evolution of adeno-associated virus. *J Gene Med*, 2006, 8(2): 155—162[DOI]
- 71 Bartlett J S, Kleinschmidt J, Boucher R C, et al. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F (ab')₂ antibody. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(2): 181—186[DOI]
- 72 Ponnazhagan S, Mahendra G, Kumar S, et al. Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin linked ligands. *J Virol*, 2002, 76(24): 12900—12907 [DOI]
- 73 Ried M U, Girod A, Leike K, et al. Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol*, 2002, 76(9): 4559—4566[DOI]
- 74 Gigout L, Rebollo P, Clement N, et al. Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol Ther*, 2005, 11(6): 856—865[DOI]
- 75 Samulski R J, Berns K I, Tan M, et al. Cloning of infectious adeno-associated virus into pBR322: Rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(6): 2077—2081[DOI]
- 76 Gao G P, Vandenberghe L H, Wilson J M. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther*, 2005, 5(3): 1—13
- 77 Xiao W, Chirmule N, Berta S C, et al. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol*, 1999, 73(5): 3994—4003
- 78 Davidson B L, Stein C S, Heth J A, et al. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3428—3432[DOI]
- 79 Gao G P, Alvira M R, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11854—11859[DOI]
- 80 Blankinship M J, Gregorevic P, Allen J M et al. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther*, 2004, 10(4): 671—678[DOI]
- 81 Burger C, Gorbatyuk O S, Velardo M J, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*, 2004, 10(2): 302—317[DOI]
- 82 Weber M, Rabinowitz J, Provost N, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther*, 2003, 7(6): 774—781[DOI]
- 83 Baum C, Dullmann J, Li Z, et al. Site effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*, 2003, 101(6): 2099—2114[DOI]
- 84 Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2003, 348(3): 255—256 [DOI]
- 85 Kohli M, Rago C, Lengauer C, et al. Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adeno-associated viruses. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(1): e3[DOI]
- 86 Russell D W, Hirata R K. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet*, 1998, 18: 325—330[DOI]
- 87 Hirata R, Chamberlain J, Dong R, et al. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(7): 735—738[DOI]
- 88 Hirata R K, Xu C, Dong R, et al. Efficient PRNP gene targeting in bovine fibroblasts by adeno-associated virus vectors. *Clon Stem Cells*, 2004, 6(1): 31—36[DOI]
- 89 Vasileva A, Linden R M, Jessberger R. Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(11): 3345—3360[DOI]
- 90 Chamberlain J R, Schwarze U, Wang P R, et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, 2004, 303(5661): 1198—1201[DOI]
- 91 Mallucci G, Collinge J. Rational targeting for prion therapeutics. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(1): 23—34[DOI]