



腺相关病毒在脂代谢研究和降脂 基因治疗中的应用*

严子阳¹⁾ 王倩茹^{1,2)} 黄晓飞²⁾ 曹春雨^{1,2)**}

(¹⁾ 三峡大学基础医学院, 宜昌 443002; (²⁾ 三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 宜昌 443002)

摘要 动脉粥样硬化性心脑血管疾病是当前全球死亡率最高的疾病, 而脂代谢紊乱是动脉粥样硬化性心脑血管疾病的主要病因, 其既可以导致心肌梗死、脑卒中、急性胰腺炎等急性病, 也可以导致慢性肾脏疾病。近年来基因治疗技术的快速发展, 为脂代谢机制研究提供了有效的手段, 特别是使先天性脂代谢异常患者的治愈成为可能。腺相关病毒 (adeno associated virus, AAV) 宿主范围广、安全性高、免疫原性低、表达长期稳定, 是当前单基因遗传病基因治疗首选的递送工具。以 AAV 为载体的多种降脂基因治疗药物目前已经得到临床应用或正在进行临床试验。本文综述了 AAV 载体在脂质代谢机制研究的新进展及其在降脂基因治疗中的应用和前景。

关键词 腺相关病毒, 脂代谢, 降脂基因治疗

中图分类号 Q812, R319

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0464

环境因素和遗传因素导致的脂代谢异常是动脉粥样硬化性心脑血管疾病的主要病因, 如何使患者体内异常的脂代谢得到长期稳定的恢复, 仍然是当前医学研究的重点课题^[1]。基因治疗是通过对靶细胞进行外源基因导入或基因编辑, 以补偿或纠正缺陷基因引起的疾病达到治疗目的。近年来随着基因治疗技术的发展, 临床上逐渐采用基因治疗技术调节和控制动脉粥样硬化性心血管病患者的血脂水平。这一新的治疗策略不仅突破了他汀类药物降脂的垄断格局, 降低了长期反复给药带来的潜在风险, 也拓宽了调脂治疗的脂质和脂蛋白谱。腺相关病毒 (adeno associated virus, AAV) 由于其宿主范围广、安全性高、免疫原性低、可长期持续稳定表达等优点, 已成为当前较为理想的基因递送载体, 被广泛地应用于基因治疗基础研究和药物开发的临床试验中^[2]。特别是在脂质代谢机制研究和降脂药物研发领域中, 以 AAV 为载体的研究和临床试验获得了多个典型的成功案例, 值得关注和借鉴。

1 腺相关病毒载体

AAV 属细小病毒科, 是单链无包膜的 DNA 病

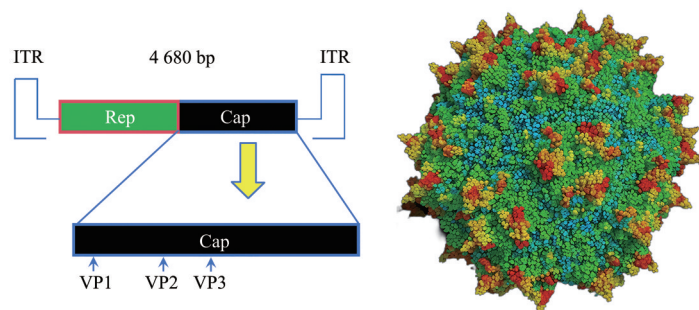
毒。AAV 基因组 DNA 全长 4 680 bp, 基因组两端为 145 个核苷酸的反向末端重复序列 (inverted terminal repeats, ITRs) (图 1)。ITR 序列折叠成发卡结构, 其自身互补区可作为“引物”用于基因组 DNA 复制, 是 DNA 复制起始和重组 AAV 基因组包装为感染性病毒颗粒所需的顺式作用元件。基因组两端的 ITR 序列之间为病毒编码区, 分别编码 Rep、Cap 蛋白及组装激活蛋白 (assembly activating protein, AAP)。Rep 蛋白参与病毒基因的复制、组装和整合, 包括 Rep40、Rep52、Rep68、Rep78 四种蛋白; Cap 蛋白为病毒衣壳蛋白, 包括 VP1、VP2 和 VP3, 相应地以 10:1:1 的比例组装形成衣壳, 同时包裹 AAV 基因组, 形成 20 nm 直径大小的二十面体病毒结构^[3]。

* 湖北省自然科学基金 (2022CFB320) 和国家自然科学基金 (81772833) 资助项目。

** 通讯联系人。

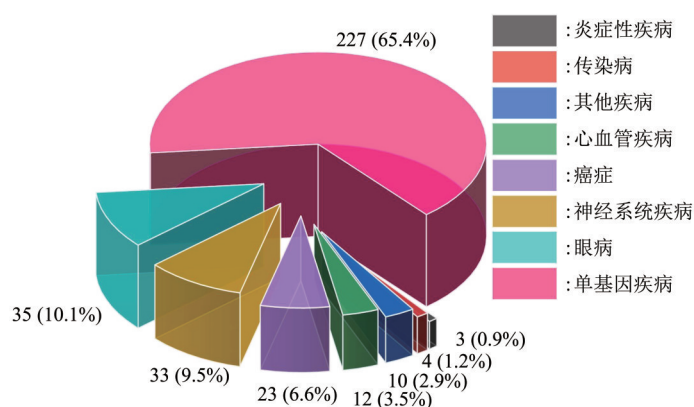
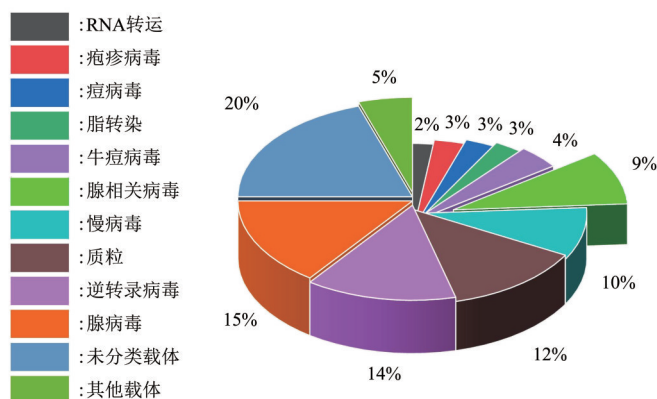
Tel: 18986816882, E-mail: caocy@ctgu.edu.cn

投稿日期: 2023-11-23, 接受日期: 2024-03-28

**Fig. 1** Diagram of adeno-associated virus capsid**图1** 腺相关病毒衣壳示意图

AAV病毒是复制缺陷病毒，需借助共感染的腺病毒或疱疹病毒所提供的DNA复制酶进行复制。出于安全性考虑，人为将其衣壳蛋白编码序列和基因组的其他部分拆分，并分别构建成为Cap质粒和核心质粒。它们和携带辅助病毒DNA复制酶编码序列的Helper质粒，共同组成能够在HEK 293T细胞中复制并组装的重组AAV。由于重组AAV无致病性、不整合基因组、免疫原性低，能够将大约

4.8 kb的DNA递送到多种哺乳动物组织细胞中实现长期稳定表达，使其成为首选的体内基因治疗载体^[4]。目前，在基因治疗相关基础研究和临床试验中，AAV基因治疗载体的使用最为广泛，已有接近350项使用AAV作为转基因载体的临床试验正在进行中（Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, Wiley; <https://www.abedia.com/wiley>）（图2，3）。

**Fig. 2** Diseases classification of gene therapies using adeno-associated viruses in clinical trials**图2** 开展腺相关病毒介导的基因治疗临床实验的疾病分类**Fig. 3** Composition of gene therapy vectors for clinical trials**图3** 用于临床实验的基因治疗递送载体的构成

目前已在人及灵长类动物体内发现多种衣壳蛋白一级序列不同的AAV血清型(命名为1~13型)。不同血清型的AAV有着截然不同的生物学特性,特别是其感染组织器官的偏好性具有显著差异^[5]。研究发现,AAV病毒衣壳蛋白的氨基酸组成能够显著影响其对不同组织细胞的转导能力,使其介导外源DNA转导的效率发生显著变化。据此,通过人工定向进化、化学修饰及合理设计等方案对AAV病毒衣壳蛋白的一级结构进行改造,能够显著改变AAV载体的组织与器官偏好性,由此实现AAV载体的组织和器官靶向性基因转导^[6];同时,也可以通过添加增强子元件、组织特异性启动子及使用互补双链AAV(scAAV或dsAAV)等方式增加AAV载体对外源基因的特异性递送和转导效率^[7-8]。其中,AAV8对肝脏细胞具有相对特异性的基因转导能力,是脂质研究和降脂基因治疗的首要AAV载体工具。

2 脂代谢和降脂治疗靶点

人类血脂的代谢分为外源性和内源性的脂质循环。外源性的脂质循环起源于小肠对食物中脂质的吸收,小肠吸收入血的脂质成分与载脂蛋白(apolipoprotein, Apo)ApoB48结合形成乳糜微粒,然后接收来自高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的ApoCII和ApoE;进一步地,乳糜微粒中的脂肪酸被脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)以ApoCII为辅因子水解,水解后的乳糜微粒残粒被肝细胞上的ApoE受体结合清除。内源性的脂质循环则起源于肝脏合成的极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL),VLDL与ApoB100、CII和E结合形成完整的VLDL颗粒。LPL水解VLDL中的甘油三酯(TG),将脂肪酸释放入血,同时VLDL逐渐转变为低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。LDL摄取组织中的胆固醇然后通过ApoB和ApoE结合肝细胞的LDL受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)而被肝细胞内吞。

LPL、LDL、LDLR、ApoB、ApoE等在脂质转运和细胞摄取等脂代谢过程中发挥关键作用,其表达水平异常直接导致脂代谢失衡。因此,调节这些脂代谢关键蛋白质表达的调控因子是降脂治疗的药物靶点。例如,目前临床应用的他汀类降脂药物是体内胆固醇合成的关键酶3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methyl glutaryl

coenzyme A reductase, HMG-CoA reductase)的竞争性抑制剂,直接抑制低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的合成^[9]。而Kexin样前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶家族成员9(proprotein convertase subtilisin kexin 9, PCSK9)可阻止LDLR的循环再生、导致LDLR加速降解^[10]。临床应用PCSK9抑制剂,可上调肝细胞LDLR表达,抑制患者血浆LDL-C水平^[11]。

新近研究还发现,进行性肥胖和代谢综合征的致病基因SLC35D3在肥胖小鼠白色脂肪细胞中表达显著下降。SLC35D3蛋白能够在白色脂肪细胞内质网中与Notch1的细胞外结构域相互作用,使其在内质网滞留而不能发挥功能,从而抑制Notch1信号通路、导致白色脂肪组织褐变、小鼠能量消耗增加和胰岛素敏感性恢复。而利用AAV8介导敲低小鼠白色脂肪组织中的Notch1表达,能够显著改善肥胖和糖脂代谢^[12]。

3 腺相关病毒在脂代谢研究和降脂基因治疗中的应用

AAV作为基因递送载体,主要以介导基因过表达/敲低或对脂代谢调节基因进行基因编辑的方式,用于体内脂代谢机制研究和降脂基因治疗。

3.1 重组腺相关病毒介导的脂代谢调节基因过表达

目前,AAV已被用做基因递送载体于体内过表达载脂蛋白、脂酶、脂转运蛋白、脂蛋白受体、脂代谢信号通路蛋白和多种脂质合成酶^[13]。LPL缺乏导致一种罕见的遗传性疾病家族性LPL缺乏症,主要表现为血浆中乳糜微粒的堆积、严重的甘油三酯血症和威胁生命的胰腺炎^[14]。2012年,全球首个临床应用的基因治疗药物阿利泼金(Alipogene tiparvovec, 又名Glybera),利用重组AAV1载体直接向肌肉细胞递送高活性LPL蛋白S447X突变体,可以显著降低LPL功能缺失患者胰腺炎的发生率^[15]。由于阿利泼金局部肌肉注射对恢复LPL活性的能力有限,目前已经停止临床应用,但是该基因药物首次证明了AAV载体用于临床基因治疗的安全性和可行性。

PCSK9由肝脏细胞分泌,其通过与LDLR结合形成复合物并转运至溶酶体降解,从而加速降解LDLR、导致血浆LDL-C堆积。鉴于AAV8对肝脏细胞具有组织嗜性和高转导效率,采用重组AAV8为载体在肝脏过表达PCSK9的高活性突变体,可

显著降低小鼠肝脏细胞 LDLR 表达、增加其血浆 LDL-C 水平, 导致小鼠发生动脉粥样硬化^[13]。由此省去 *Ldlr* 或者 *Apoe* 基因敲除小鼠杂交的复杂流程, 极大地简化了动脉粥样硬化模型小鼠的构建过程。

家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是一种常染色体遗传性疾病, 分为杂合性 (heterozygous familial hypercholesterolemia, HeFH) 和纯合性 (homozygous familial hypercholesterolemia, HoFH) 两种。HeFH 更为常见, 患者多由于 *Ldlr* 基因突变导致 LDLR 功能丧失, 使患者血浆中含有 ApoB 的脂蛋白清除率下降, 血浆胆固醇水平异常增高。HoFH 则为罕见病, 发病率约为三十万分之一, 多由于 *Ldlr/Pcsk9* 或 *Apob100* 基因突变所致^[16]。相比 HeFH, HoFH 发病更早、症状更重, 目前的他汀类药物或血浆置换等治疗方案无法将 HoFH 患者 LDL-C 降至正常水平, 且通常伴有显著的毒副作用。早期 FH 纯合子患者的基因治疗方案是以携带野生型 LDLR 编码基因的逆转录病毒感染提取出来的患者肝细胞, 然后移植回患者体内^[17]。但是, 该方案受可移植的肝细胞数量限制而不能显著改善患者的血脂水平。重组 AAV8.TBG.hLDLR 利用 AAV8 的肝脏细胞嗜性、高转导效率和长期稳定表达能力, 同时采用肝脏特异性的甲状腺素结合球蛋白 (thyroxine-binding globulin, TBG) 启动子控制人 LDLR 编码序列在肝细胞的转录, 由此实现肝脏细胞特异性的 LDLR 高表达。研究表明, AAV8.TBG.hLDLR 一次静脉给药能够长期、有效地维持 FH 模型小鼠血浆 LDL-C 的低水平, 从而阻止动脉粥样硬化的发生^[18-19]。然而在动物和临床实验中长期观察发现, AAV8.TBG.hLDLR 给药后大约 120 d, hLDLR 的表达水平较其给药 14 d 的表达峰值下降了约 75%。为进一步提高 AAV 介导 hLDLR 在体内的长期、稳定表达水平, 2021 年, Wang 等^[20] 将 hLDLR 的高稳定性三突变体 hLDLR-L318D/K809R/C818 进行密码子优化并在其编码序列前加入 Kozak 序列, 同时, 在该编码序列 5' 端放入人 β 珠蛋白基因 *I/S2* (intervening sequence 2) 序列、3' 端放入土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件 (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE), 获得一种新的第二代治疗 HoFH 的重组 AAV8 载体。该载体显著提高了 hLDLR 在 *Ldlr* 和 *Apobec1* 基因双敲除的高胆固醇血

症模型小鼠体内的长期表达水平, 同时给药 1 d 后就将高胆固醇血症模型小鼠体内的 LDL-C 水平降低了 77%; 此后, 从给药后第 3 天直至第 120 天, 模型小鼠体内的 LDL-C 水平低至检测水平以下。

近期研究还发现, 在 *Ldlr*^{-/-} 小鼠的肝脏中特异性地敲除去乙酰化酶 6 (Sirtuin 6, *Sirt6*) 基因可诱发脂肪肝和动脉粥样硬化; 而采用重组 AAV8 递送白蛋白启动子控制的 *Sirt6* 基因在该小鼠肝脏细胞特异性过表达 *Sirt6* 蛋白可显著降低 LDL-C 水平、逆转其动脉粥样硬化表型^[21]。以往研究报道, *Sirt6* 可以抑制 PCSK9 介导的 LDLR 降解, 从而降低 LDL-C 的水平^[22]。但从在 *Ldlr*^{-/-} 小鼠肝脏过表达 *Sirt6* 致 LDL-C 水平降低的结果来看, *Sirt6* 不仅是通过 PCSK9-LDLR 途径降脂, *Sirt6* 还可能独立于 LDLR 通路抑制小肠对胆固醇和脂质的吸收、抑制肝脏 VLDL 的分泌, 从而产生抗动脉粥样硬化的效应^[21-22]。

ApoA-V 是由肝脏分泌的载脂蛋白, 能够促进 LPL 介导的 TG 水解, 具有降低 TG 水平和抗动脉粥样硬化作用^[23]。Sharma 等^[24] 报道, 以重组 AAV2/8 为载体在 *Apoa5*^{-/-} 小鼠肝脏递送野生型 *apoA-V* 基因, 可使 *Apoa5*^{-/-} 小鼠血浆中 apoA-V 表达水平显著增加并持续 8 周以上, 同时使其血浆 TG 水平显著下调达 50%, 证明了 AAV 载体介导基因治疗降低 TG 的有效性。

神经轴突生长抑制因子受体 (Nogo-B receptor, NgBR) 在人体神经系统、肝、肺、肾及血管和炎症细胞中广泛表达, 参与动脉粥样硬化发生发展^[25]。2023 年, Gong 等^[26] 用重组 AAV2/9-NgBR 注射 *ApoE*^{-/-} 小鼠, 同时以高脂饮食喂养 12 周。实验结果表明, AAV2/9 均可有效介导外源性 NgBR 蛋白在 *ApoE*^{-/-} 小鼠肝脏组织中过表达, 同时显著降低高脂饮食诱导的小鼠肝脏和血清胆固醇、甘油三酯和乳糜微粒的水平, 并上调 B1 型清道夫受体和胆汁酸合成基因的表达; 同时, AAV2/9-NgBR 介导的 NgBR 过表达显著抑制了小鼠的血清炎症因子水平, 激活了 AMP 介导的蛋白激酶通路, 由此抑制脂肪合成, 发挥抗动脉粥样硬化的作用。

3.2 AAV-CRISPR/Cas9 介导的脂代谢调节基因编辑

最初, 研究者们采用腺病毒载体递送化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*, Sp) 的 Cas9 蛋白编码序列和一段靶向 *Pcsk9* 基因的引导 RNA (guide RNA, gRNA) 序列, 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除

小鼠肝脏细胞的 *Pcsk9* 基因, 由此显著降低了小鼠血浆中 PCSK9 蛋白和胆固醇的水平、上调了小鼠肝脏细胞 LDLR 表达^[27]。随后, Ran 等^[28] 采用 AAV 递送金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, Sa) 的 Cas9 蛋白编码序列和靶向 *Pcsk9* 基因编码序列的 gRNA, 进行小鼠肝脏 *Pcsk9* 基因敲除, 同样可显著降低小鼠血浆 PCSK9 胆固醇水平并长期维持。Jarret 等^[29] 则采用 AAV8 重组的 SaCas9 系统敲除了雌、雄小鼠肝脏的 *Ldlr* 基因, 并在雄性小鼠体内产生了严重程度与全身 *Ldlr* 基因敲除小鼠相当的高胆固醇血症, 同时在雌性小鼠体内产生的高胆固醇血症则与 AAV 介导的 PCSK9 过表达相当。然而, 研究者同时发现, 小鼠对 SpCas9 和对 SaCas9 均呈现出免疫反应, 提示机体存在针对 Cas9 的免疫反应。为提高基因编辑的效率和安全性, 研究者进一步设计了能够自我降解的 AAV-CRISPR-Cas9 系统, 以阻止 Cas9 的持续表达和降低肝脏细胞中 AAV 的拷贝数, 由此降低机体对 Cas9 的免疫反应^[30-31]。

Jarret 等^[32] 采用 AAV 递送目标基因的 gRNA 到 Cas9 转基因小鼠体内能够有效地敲除其肝脏 *Ldlr* 和 *Apob* 基因。其实验结果发现, 敲除小鼠肝脏的 *Ldlr* 基因可导致严重的高胆固醇血症和动脉粥样硬化, 同时敲除 *Apob* 则可纠正 *Ldlr* 基因敲除所致的高胆固醇血症。他们的研究同时发现, AAV-CRISPR 介导的 *Apob* 基因敲除导致肝脏细胞产生微泡性脂肪变性, 这一结果提示, 抑制肝脏细胞的 VLDL 分泌具有诱导肝细胞毒性的风险。

Cas9 介导的单碱基基因编辑是通过在 Cas9 上增加一个胞嘧啶的脱氨基功能域和尿嘧啶糖基化酶抑制子, 同时对 Cas9 进行 D10A 和 H840A 碱基突变使其丧失内切核酸酶活性同时保留其在 gRNA 的引导下与特定的 DNA 序列结合的能力。这一“失活的”Cas9 (dCas9) 能够结合 gRNA 并在其引导下靶向目标基因序列、水解脱氨基的胞嘧啶生成尿嘧啶, 从而修正特定突变或者产生提前的终止密码, 实现基因编辑或基因敲除^[33-34]。

肝细胞特异性血管生成素相关蛋白 3 (angiopoietin-related protein 3, Angptl3) 是 LPL 的内源性抑制剂, 是脂代谢重要的调节蛋白。2023 年, Zuo 等^[35] 采用双 AAV 病毒感染小鼠, 实现了 *Angptl3* 基因的靶向敲除, 获得了较低的血浆 Angptl3 水平和血脂水平。该研究采用 AAV-9 介导的 AncBE4max 系统, 通过基于单碱基基因组编辑

系统引入提前终止密码子的方式, 实现 Angptl3 在肝细胞中的敲除, 平均敲除效率高达 63.3%。在给药后 2~4 周, 外周血中已经完全检测不到 Angptl3 蛋白, 血清 TG 和总胆固醇分别下降 58% 和 61%。

Clifford 等^[36] 新近运用重组 AAV 介导小鼠肝脏过表达 RNF130, 采用 AAV-CRISPR 系统敲除小鼠肝脏 *Rnf130* 基因。结果发现, RNF130 能够泛素化 LDLR, 导致 LDLR 泛素化降解和在细胞膜上的重新分布, 过表达 RNF130 可显著降低肝脏细胞表面的 LDLR 表达、增加血浆 LDLC 的水平, 而敲除 *Rnf130* 基因则会造成相反的结果。这一 AAV 介导的 RNF130 功能研究表明, RNF130 是 LDLR 翻译后调节蛋白, 在血清 LDLC 的调控中起重要作用。

4 重组 AAV 载体用于降脂基因治疗的展望

AAV 载体相比其他基因载体拥有较高的安全性, 介导基因表达或基因敲除的效率 high 且长期稳定, 因此成为降脂基因治疗的首选载体。然而, AAV 在人群中具有广泛的感染, 人群中广泛存在 AAV 抗体, 从而有可能引起免疫反应并降低 AAV 的转导效率^[37-38]。此外, AAV 载体外源性基因插入的容量约为 4.8 kb, 对于较大的基因序列需要分次转导 (交叉包装)。更重要的是, 重组 AAV 载体的组织或细胞靶向性亟待提高。因此, 当前 AAV 载体研究的热点是利用基因工程改造 AAV 载体以降低其免疫原性, 提高其生物安全性、组织特异性基因转导效率^[38-39]。目前, 筛选组织靶向性 AAV 的主要策略是定向进化, 即针对编码衣壳蛋白的 DNA 片段, 通过易错 PCR 等技术随机引入大量碱基变异、建立衣壳蛋白库, 通过利用其制备 AAV 病毒库后注射入小鼠或灵长类动物体内, 然后进行各组织 AAV 病毒 DNA 的提取, 经过几轮重复后, 鉴定特定组织富集的 AAV 病毒衣壳蛋白序列, 以此寻找特定组织靶向性的重组 AAV 载体。同时, 也可以通过生物信息学辅助推断和设计衣壳蛋白序列。如美国哈佛大学 Pardis C. Sabeti 等通过 AAV 衣壳变体家族的定向进化, 实现跨物种的强效肌肉定向基因传递。其制订了一个命名为 DELIVER (Directed Vivo Expression of Transgene Evolution of AAV capsids Leveraging in RNA) 的策略, 用于进化和严格选择能够有效地靶向递送 DNA 到特定组织的 AAV 衣壳蛋白变体。使用这种方法, 研究人员确定了一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 基序的衣壳

蛋白, 在小鼠和非人类灵长类动物静脉注射后能以卓越的高效率和选择性转导肌肉细胞^[38]。此外, 使用组织特异性启动子可以增加组织特异性基因转导和 AAV 基因组的包装能力, 并极大地弱化细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 对重组 AAV 病毒的免疫反应、降低机体对重组 AAV 的免疫应答。2023 年, Zuo 等^[35]发现, 使用突变 AAV 载体上的 ITR 来防止 Rep 蛋白编码基因的剪切, 可增强载体转导靶基因的能力, 而 ITR 序列的突变则可能降低 AAV 的先天免疫反应。该研究还发现, 在 AAV 递送基因中使用人工合成的 poly (A) 替代野生型 poly (A) 序列可以增加 mRNA 的出核、翻译和稳定性 (通过增强聚腺苷酸化), 而使用反向的 poly (A) 可避免 ITR 的转录, 这两种方法都可增强 AAV 转导能力。最后, 使用双 AAV 载体 (或交叉包装 AAV 基因组) 可以使 AAV 实现对大片段基因的有效转导。

值得注意的是, 2020 年在对 A 型血友病模型犬进行基因治疗时, 研究人员发现, 重组 AAV 能够介导其携带的外源基因整合到犬的肝细胞基因组上, 且高达 44% 的外源基因整合处于控制细胞生长的基因所在染色体区域附近。另外, 该实验的 9 只犬中有两只的血清凝血因子 VIII 水平达到了正常值的 4 倍。这表明 AAV 治疗具有潜在的致癌、致病风险^[40]。

AAV 载体目前已越来越广泛地运用于脂代谢机制研究和降脂的基因治疗。随着生物技术的进步和基因工程技术的发展, AAV 载体有望在提高组织、细胞靶向性和转导效率上, 以及在降低免疫原性等安全性方面获得新的进展, AAV 载体有可能成为未来治疗心血管疾病的重要手段。

参 考 文 献

- [1] Fu J, Deng Y, Ma Y, *et al.* National and provincial-level prevalence and risk factors of carotid atherosclerosis in Chinese adults. *JAMA Netw Open*, 2024, **7**(1):e2351225
- [2] Abdul-Rahman T, Bukhari S M A, Herrera E C, *et al.* Lipid lowering therapy: an era beyond statins. *Curr Probl Cardiol*, 2022, **47**(12): 101342
- [3] Hudry E, Vandenberghe L H. Therapeutic AAV gene transfer to the nervous system: a clinical reality. *Neuron*, 2019, **101**(5): 839-862
- [4] Earley J, Piletska E, Ronzitti G, *et al.* Evading and overcoming AAV neutralization in gene therapy. *Trends Biotechnol*, 2023, **41**(6): 836-845
- [5] Issa S S, Shaimardanova A A, Solovyeva V V, *et al.* Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: an overview. *Cells*, 2023, **12**(5): 785
- [6] Mulcrone P L, Lam A K, Frabutt D, *et al.* Chemical modification of AAV9 capsid with N-ethyl maleimide alters vector tissue tropism. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 8436
- [7] Srivastava A. Rationale and strategies for the development of safe and effective optimized AAV vectors for human gene therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2023, **32**: 949-959
- [8] Cabanes-Creus M, Navarro R G, Liao S H Y, *et al.* Single amino acid insert ion allows functional transduction of murine hepatocytes with human liver tropic AAV capsids. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, **21**: 607-620
- [9] Samizo S, Kaneko H. Predictive modeling of HMG-CoA reductase inhibitory activity and design of new HMG-CoA reductase inhibitors. *ACS Omega*, 2023, **8**(30): 27247-27255
- [10] Seidah N G, Awan Z, Chretien M, *et al.* PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res*, 2014, **114**(6): 1022-1036
- [11] Laufs U, Blüher M, Isermann B. Third generation PCSK9-inhibitors. *Eur Heart J*, 2023, **44**(40): 4281-4283
- [12] Wang H, Yu L, Wang J, *et al.* SLC35D3 promotes white adipose tissue browning to ameliorate obesity by NOTCH signaling. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 7643
- [13] Keeter W C, Carter N M, Nadler J L, *et al.* The AAV-PCSK9 murine model of atherosclerosis and metabolic dysfunction. *Eur Heart J Open*, 2022, **2**(3): oeac028
- [14] Gaudet D, Stroes E S, Méthot J, *et al.* Long-term retrospective analysis of gene therapy with Alipogene Tiparvovec and its effect on lipoprotein lipase deficiency-induced pancreatitis. *Hum Gene Ther*, 2016, **27**(11): 916-925
- [15] Gaudet D, Méthot J, Déry S, *et al.* Efficacy and long-term safety of alipogenic tiparvovector (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther*, 2013, **20**(4): 361-369
- [16] Abifadel M, Boileau C. Genetic and molecular architecture of familial hypercholesterolemia. *J Intern Med*, 2023, **293**(2): 144-165
- [17] Grossman M, Rader D J, Muller D W, *et al.* A pilot study of *ex vivo* gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nat Med*, 1995, **1**(11): 1148-1154
- [18] Chen R, Lin S, Chen X. The promising novel therapies for familial hypercholesterolemia. *J Clin Lab Anal*, 2022, **36**(7): e24552
- [19] Greig J A, Limberis M P, Bell P, *et al.* Nonclinical pharmacology/toxicology study of AAV8.TBG.mLDLR and AAV8.TBG.hLDLR in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2017, **28**(1): 28-38
- [20] Wang L, Muthuramu I, Somanathan S, *et al.* Developing a second-generation clinical candidate AAV vector for gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, **22**: 1-10
- [21] Zhu Y, Hu S, Pan X, *et al.* Hepatocyte Sirtuin 6 protects against atherosclerosis and steatohepatitis by regulating lipid homeostasis. *Cells*, 2023, **12**(15): 2009
- [22] Tao R, Xiong X, DePinho R A, *et al.* FoxO3 transcription factor

- and Sirt6 deacetylase regulate low density lipoprotein (LDL) - cholesterol homeostasis *via* control of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Pcsk9) gene expression. *J Biol Chem*, 2013, **288**(41): 29252-29259
- [23] Sharma V, Forte T M, Ryan R O. Influence of apolipoprotein A-V on the metabolic fate of triacylglycerol. *Curr Opin Lipidol*, 2013, **24**(2): 153-159
- [24] Sharma V, Beckstead J A, Simonsen J B, *et al.* Gene transfer of apolipoprotein A-V improves the hypertriglyceridemic phenotype of apoA-V (-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, **33**(3): 474-480
- [25] 朱莹, 张利群, 李建东. Nogo-B 受体的生物学功能. *生理学报*, 2022, **74**(2): 301-308
- Zhu Y, Zhang LQ, Li J D. *Acta Physiologica Sinica*, 2022, **74**(2): 301-308
- [26] Gong K, Wang M, Wang D, *et al.* Overexpression of NgBR inhibits high-fat diet-induced atherosclerosis in apoE-deficiency mice. *Hepatol Commun*, 2023, **7**(4): e0048
- [27] Ding Q, Strong A, Patel K M, *et al.* Permanent alteration of PCSK9 with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*, 2014, **115**(5): 488-492
- [28] Ran F A, Cong L, Yan W X, *et al.* *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, **520**(7546): 186-191
- [29] Jarrett K E, Lee C, De Giorgi M, *et al.* Somatic Editing of Ldlr with adeno associated viral-CRISPR is an efficient tool for atherosclerosis research. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, **38**(9): 1997-2006
- [30] Li A, Tanner M R, Lee C M, *et al.* AAV-CRISPR gene editing is negated by pre-existing immunity to Cas9. *Mol Ther*, 2020, **28**(6): 1432-1441
- [31] Li Q, Su J, Liu Y, *et al.* *In vivo* PCSK9 gene editing using an all-in-one self-cleavage AAV-CRISPR system. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, **20**: 652-659
- [32] Jarrett K E, Lee C M, Yeh Y H, *et al.* Somatic genome editing with CRISPR/Cas9 generates and corrects a metabolic disease. *Sci Rep*, 2017, **7**: 44624
- [33] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, **533**(7603): 420-424
- [34] Su M, Li F, Wang Y, *et al.* Molecular basis and engineering of miniature Cas12f with C-rich PAM specificity. *Nat Chem Biol*, 2024, **20**(2): 180-189
- [35] Zuo Y, Zhang C, Zhou Y, *et al.* Liver-specific *in vivo* base editing of Angptl3 *via* AAV delivery efficiently lowers blood lipid levels in mice. *Cell Biosci*, 2023, **13**(1): 109
- [36] Clifford B L, Jarrett K E, Cheng J, *et al.* RNF130 regulates LDLR availability and plasma LDL cholesterol levels. *Circ Res*, 2023, **132**(7): 849-863
- [37] Wagner D L, Amini L, Wendering D J, *et al.* High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat Med*, 2019, **25**(2): 242-248
- [38] Weber T. Anti-AAV antibodies in AAV gene therapy: current challenges and possible solutions. *Front Immunol*, 2021, **12**: 658399
- [39] Tabebordbar M, Lagerborg K A, Stanton A, *et al.* Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*, 2021, **184**(19): 4919-4938.e22
- [40] Nguyen G N, Everett J K, Kafle S, *et al.* A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(1): 47-55

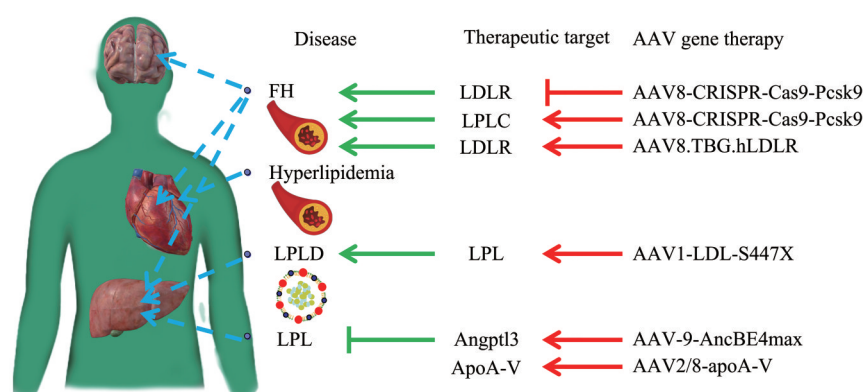
The Application of Adeno-associated Virus in Lipid Metabolism Research and Lipid-lowering Gene Therapy*

YAN Zi-Yang¹⁾, WANG Qian-Ru^{1,2)}, HUANG Xiao-Fei²⁾, CAO Chun-Yu^{1,2)**}

⁽¹⁾College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;

⁽²⁾Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Graphical abstract



Abstract Cardiovascular and cerebrovascular diseases, usually result from atherosclerosis, has the highest mortality rate globally. Lipid metabolism disorder is the main cause of atherosclerotic cardiovascular and cerebrovascular diseases, which not only lead to acute diseases such as myocardial infarction, stroke, acute pancreatitis, but also chronic kidney disease. In recent years, the advancement of gene therapy technologies has provided novel means for lipid metabolism study, and has also made it possible to cure patients with congenital lipid metabolism abnormalities. Adeno-associated virus has a wide host range, high safety, low immunogenicity, and especially the ability of long-term stable expression *in vivo*, making it the preferred delivery tool for gene therapy of monogenic genetic diseases. Alipogene triprivec, also known as Glybera, was approved by the European Medicines Agency in 2012. It is the first gene therapy drug that uses recombinant AAV1 vector to directly deliver a highly active LPL protein S447X mutant to muscle cells for the treatment of patients with hereditary LPL deficiency. To enhance the targeted transduction efficiency of AAV carriers, recombinant AAV8.TBG.hLDLR utilizes the tissue tropism of AAV8 to liver, meanwhile utilizes a liver specific thyroxine binding globulin promoter to control gene transcription, thereby achieving liver cell specific high expression of human low-density lipoprotein receptors (LDLR). In patients with familial hypercholesterolemia, AAV8.TBG.hLDLR treatment effectively lower the level of plasma LDL for a long time, thus preventing the

* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Hubei Province (2022CFB320) and The National Natural Science Foundation of China (81772833).

** Corresponding author.

Tel: 86-18986816882, E-mail: caocy@ctgu.edu.cn

Received: November 23, 2023 Accepted: March 28, 2024

occurrence of atherosclerosis. Proprotein convert subunit kexin 9 (PCSK9) is secreted by liver cells. PCSK9 binds and transports LDLR to lysosomes for degradation, preventing the circulation and regeneration of LDLR, leading to accelerated degradation of LDLR and finally resulting in the accumulation of low-density lipoprotein cholesterol in plasma. Using AAV to deliver Cas9 of *Staphylococcus aureus* and gRNA targeting the *Pcsk9* gene can knock out *Pcsk9* in mouse liver, leading to a long-term significant decrease in plasma cholesterol levels in mice. Hepatocyte specific angiopoietin related protein 3 (Angptl3) is an endogenous inhibitor of LPL. Using the AAV9 mediated AncBE4max system and the dCas9 mediated single base gene editing system to introduce early termination codons, the knockout of Angptl3 in liver cells was achieved with an average knockout efficiency of 63.3%. After 2–4 weeks of administration in mice, the Angptl3 protein was completely undetectable in the peripheral blood, and serum triglycerides and total cholesterol decreased by 58% and 61%, respectively. Ring finger containing protein 130 (RNF130) is an E3 ubiquitin ligase. Research has shown that overexpression of RNF130 using AAV2/8 leads to ubiquitination degradation and redistribution of LDLR on the cell membrane, significantly reducing LDLR expression on liver cells and increasing plasma LDLC levels, while knocking out *Rnf130* gene using the AAV-CRISPR system results in the opposite effect. This AAV mediated RNF130 function study proves that RNF130 is a posttranslational regulatory protein of LDLR and plays an important role in the regulation of serum LDLC. As mentioned above, recently, various lipid-lowering gene therapy drugs carried by different serotypes of adeno-associated virus have been applied in clinic or are undergoing clinical trials, and adeno-associated virus has emerging to be an important tool for lipid metabolism research. This article reviews the new progress of adeno-associated virus vectors in lipid metabolism study and lipid-lowering gene therapy.

Key words adeno associated virus, lipid metabolism, lipid-lowering gene therapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0464