

重组腺相关病毒：很有潜力的基因治疗载体

唐彬秩¹⁾ 秦豪杰^{1,2)} 傅强¹⁾ 屈艺^{3)*}

(¹⁾四川大学华西基础与法医学院, 成都 610041; ²⁾河南科技大学法医学系, 洛阳 471003;

³⁾四川大学华西第二医院中心实验室, 成都 610041)

摘要 腺相关病毒(AAV)是细小病毒家族的一员, 为无包膜的线性单链 DNA 病毒. 由于 AAV 具有长期潜伏于人体而不具有任何明显致病性等优点, 人们对 AAV 作为一种理想的基因治疗载体给予了很大期望. 但是, 近来发现, 这类载体在应用上有许多明显的缺陷, 包括某些细胞膜上病毒受体数量极少, 重组 AAV 载体位点特异性整合不足, AAV 衣壳成分和转基因产物引起宿主的免疫反应等等. 这些缺陷促使人们加大对 AAV 生物学特性和转染过程的研究, 从而更好地对 AAV 载体进行改进, 使新一代重组 AAV 载体具备基因治疗所必需的安全性、高效性和靶向性, 以期更广泛地应用于临床.

关键词 腺相关病毒, 重组载体, 基因治疗

学科分类号 Q78

安全高效地将目的基因导入人体靶细胞是成功进行基因治疗的关键之一. 经典的基因导入方式(显微注射、电穿孔、磷酸钙转染等)虽然曾在科研中起了一定的作用, 但由于不能很好地解决转染率、靶向性、安全性等问题而限制了它们的应用. 随着病毒学等相关学科的发展, 目前基因打靶已广泛使用各种病毒作载体, AAV 载体就是最近几十年发展起来的一类新型载体. 作为病毒载体的一员, AAV 不具有明显的细胞毒性效应并且不会像其他病毒载体那样引起细胞强烈的免疫反应等特性^[1], 因而其在基因治疗中的应用潜力引起了人们越来越多的兴趣和关注. 随着对 AAV 的结构、功能以及病毒颗粒转染过程的进一步了解, 我们有理由相信在不远的将来人们能够成功构建高效的 AAV 打靶载体.

1 腺相关病毒

腺相关病毒(AAV)属于细小病毒科的依赖性病毒属, 是最小和最简单的动物病毒, 是一种具有极端寄生性的卫星病毒. AAV 通常需要腺病毒、疱疹病毒等辅助病毒的帮助, 才能在其生活周期的繁殖相进行自我复制. 在没有辅助病毒的情况下, AAV 可在哺乳动物细胞中长期潜伏. 当先前有 AAV 潜伏感染的细胞被辅助病毒感染时, AAV 就能被“拯救”并重新进入其生活周期的复制相. 通

过对人类和其他灵长类组织中出现的可被“拯救”的 AAV 基因组进行筛选, 许多新的 AAV 血清型已被鉴别出来, 超过 40 个不同的基因种类已被报道^[2]. 从这些报道来看, 似乎存在一些相关种类的主要进化支, 在这些进化支中, 许多变异似乎是由不同亲代血清型衣壳编码序列间发生重组所致. 国际病毒分类委员会根据衣壳的差异已鉴别出多个 AAV 种类成员, 包括 AAV-1~AAV-8, avian AAV, bovine AAV 和 canine AAV 等. 不同 AAV 血清型具有不同的衣壳构象, 因而其识别与结合的细胞表面受体或共受体也相应有差异^[3]. 形态结构的差异和细胞趋向性 (cell tropisms) 的不同导致不同血清型转染的细胞类型和感染效率也各不相同. AAV-1 和 AAV-7 在骨骼肌中的转导效率较高^[4,5], AAV-3 在巨核细胞的转导具有优势^[6], AAV-5 和 AAV-6 感染气道顶侧细胞更加高效^[7,8], AAV-2, AAV-4 和 AAV-5 均可转导中枢神经系统的细胞, 但在感染途径和靶细胞类型上存在差异^[9]. 特别值得一提的是, 美国 Pittsburgh 大学医学院的几位华裔科学家^[10]通过比较不同 AAV 将绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因传递至鼠不同

* 通讯联系人. Tel: 13808183352, E-mail: quyi712002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-21, 接受日期: 2006-04-30

组织的转染效率,发现 AAV-8 可将基因高效地靶向传递至骨骼肌和心肌,该成果发表于 2005 年 3 月的《Nature》杂志上.可以预见,在 AAV 血清型上所进行的深入研究将鉴定出所有在受体结合和病毒摄入中起作用的结构域,从而大大推进新型 AAV 载体的构建.

2 AAV 的基因组结构

AAV 的基因组结构短小 (4.7 kb) 而且简单,但这已足以让 AAV 具有完成其生活周期所必需的全部功能. AAV 基因组编码两大开放阅读框架 (open reading frames, ORF) *rep* 和 *cap*, 它们位于两侧的末端倒转重复序列 (inverted terminal repeats, ITRs) 之间 (图 1).

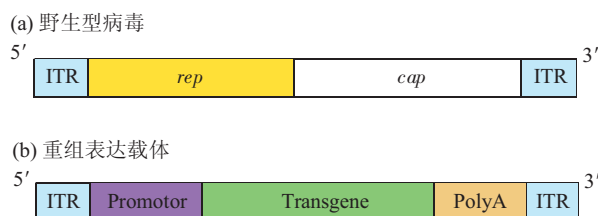


Fig. 1 Sketch map of wild-type AAV and recombinant AAV genome

图 1 野生型 AAV (a) 和重组 AAV (b) 基因组简图

重组 AAV(rAAV)是通过切除 AAV 的 *rep* 和 *cap* 基因部分,并用相应的目的基因表达盒进行置换而构建的,表达盒包括启动子、转基因和 polyA 尾巴 3 部分.由图可知,只有 ITRs 是复制和包装所必需的顺式元件,但 *rep* 过短或缺失将严重降低 AAV 的整合效率和特异性.

ITRs 包含载体基因组进行包装、复制、整合及病毒基因组环化所需的顺式作用元件^[1],并具有增强子和 / 或较弱的转录启动子功能^[2]. AAV 的复制蛋白 Rep 和衣壳蛋白 Cap 通常由携带它们基因的包装质粒反式提供. *rep* 基因编码 4 种非结构性蛋白 (Rep78, Rep68, Rep52 和 Rep40), 由 2 个不同的启动子控制. 大 Rep 蛋白 (Rep78 和 Rep68) 由 p5 启动子控制,为病毒 DNA 复制、转录调控和位点特异性整合所必需. 大 Rep 蛋白是双重功能转录调节因子,可在繁殖感染期激活 AAV 基因表达而在潜伏期抑制基因表达. Rep52 和 Rep40 是由 p19 启动子控制的小 Rep 蛋白,是单链 AAV 包裹进衣壳所必需的,同时也影响着大 Rep 的转录调节活性. *Cap* 基因编码 AAV 的衣壳蛋白,经典的 AAV 衣壳由 60 个亚单位组成, VP1 : VP2 : VP3 的比例

大致为 3 : 3 : 54, 呈无包膜的二十面体结构. 不同 AAV 血清型其衣壳蛋白的成分种类与构成比例差异较大. 以常见的 AAV-2 为例,其 *cap* 提供 3 种衣壳蛋白 VP1 (90 ku)、VP2 (72 ku) 和 VP3 (60 ku),这 3 种衣壳蛋白均由 p40 启动子操控,共享同一终止子,但由于不同的起始密码和不同的剪接方式而产生了从 VP1 至 VP3 依次缩短的产物,全部 3 种衣壳蛋白都是产生感染性病毒颗粒所必需的. Opie 等^[3]通过在衣壳蛋白各位置导入突变的方法确定出 AAV-2 结合到硫酸肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPG) 受体的两个结构决定簇. 根据关键性肝素结合残基在肝素结合型 AAV 和非肝素结合型 AAV 上的不同,人们推测各种血清型对不同受体的亲和力不同,就是由于这些结构决定簇有差别所致.

3 AAV 的感染途径和胞内过程

大多数 AAV 载体建立在 AAV-2 血清型的基础之上,因为它是第一个从感染克隆中得到的血清型,也是人们目前了解得最多的一类 AAV 血清型. 本文以 AAV-2 为代表简要介绍 AAV 的细胞感染途径和细胞内转运过程. 成功的病毒感染是一个完整的多步过程,它以病毒结合到细胞表面作为起始,紧接着是病毒被摄入和胞质内的转运,最后是核内脱壳、整合、复制过程 (图 2).

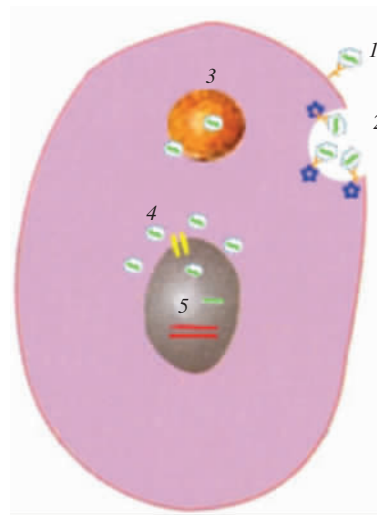


Fig. 2 Overview of cellular infection of AAV

图 2 AAV 感染细胞模式图

1: AAV 在与细胞表面的 HSPG (金黄色) 特异性识别并结合; 2: 通过网格蛋白 (蓝色) 包被的凹陷被内化; 3: 然后被转运至内体,在酸化后 AAV 从内体释放到胞浆; 4: AAV 在核周聚集并通过核孔复合体 (NPC) 缓慢进入胞核; 5: 病毒颗粒在核内脱壳并整合至靶 DNA (红色).

在图 2 所示的 AAV-2 感染模型中, AAV-2 首先结合到靶细胞表面的 HSPG. 关于 AAV-2 的广泛趋向性, 一个简单的解释是所有的粘附细胞在其表面均表达粘多糖. 但人们发现, 在诸如被覆纤毛的呼吸道上皮细胞等一些 AAV-2 无法高效转导的细胞中, 其顶侧胞膜上的 HSPG 数量极少, 因此推测该受体的充足表达是 AAV-2 高效转导的一个关键因素^[7]. 除主要受体 HSPG 外, $\alpha_v\beta_5$ 整合素和成纤维细胞生长因子 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 这 2 种与 AAV-2 感染密切相关的共受体已被鉴别出来. FGFR1 被认为可增强粘附过程^[4], 而 $\alpha_v\beta_5$ 整合素则在由网格蛋白 (clathrin) 所介导的 AAV-2 的内吞过程中扮演重要角色. 目前认为, 腺病毒 α_v 整合素聚集有助于病毒颗粒着位到凹陷处, 接着在发动蛋白 (dynamin) 的协助下启动内吞, 发动蛋白是一种分子质量为 100 ku 的胞浆 GTP 酶. 虽然人们对发动蛋白在囊泡形成中的具体功能尚有争议, 但可以肯定的是该蛋白质在新生囊泡从胞浆膜上分离中发挥着重要作用^[15]. 此外, Sanlioglu 等^[16]认为衣壳与整合素的结合还有活化 Rac1 的作用. 他们提出 Rac1 的活化可激活磷酸肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K), 从而促进微丝与微管的重新排列, 而这些重排是内吞后启动 AAV-2 的胞内转运进程所必需的. 最近的研究显示: AAV-2 在不同感染复数 (multiplicities of infection, m.o.i.) 下其内体进程也存在差异^[17]. AAV-2 从内体的释放需要一个低 pH 环境, 因为酸性环境能引起内体释放或进入胞核所必需的病毒关键蛋白的构象改变. 有趣的是 VP1 的某区域包含有潜在的磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 结构域, 该结构域可能在此酸化过程中起作用. PLA2 失活的点突变不会影响 AAV-2 衣壳装配、包裹、细胞结合或进入, 但会延迟早期基因表达的出现以及降低表达的量. 有的研究发现, AAV-2 从内体释放后在缓慢进入胞核前病毒颗粒在核周聚集, 并推测病毒是通过核孔复合体进入核内然后进行下一步的脱壳和基因整合. AAV 载体基因组在与靶细胞基因组进行基因整合之前通常先形成染色体外游离 DNA, 这些 DNA 以与组蛋白结合的串联子 (concatemer) 形式存在, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂可增强组蛋白 H3 的乙酰化程度, 从而增强 AAV 介导的转基因的表达^[18].

如上所述, 某些细胞膜上 AAV 结合受体的不足是导致 AAV 无法与靶细胞识别结合的一个重要

因素, 而影响细胞接合的另一个重要胞外障碍是胞外抗衣壳成分的中和抗体的出现. 最近 Chen 等^[19]所进行的一项采用 AAV-2 和 AAV-8 基因治疗 B 型血友病的研究显示, 针对载体衣壳和转基因产物的抗体及细胞毒性 T 细胞反应的出现, 是该基因治疗的首要限制性因素, 这与先前 Zhang 等^[20]的研究结论是一致的. AAV 载体颗粒克服上述两大胞外障碍进入细胞后还需经过一系列复杂的胞内转运过程才能顺利到达胞核^[3]. 在这诸多的胞内障碍中, 一种重要的障碍是蛋白酶体介导的载体降解^[21], 通过使用小分子蛋白酶体抑制物抑制蛋白酶体的活性可相应地增强载体进入胞核的效率.

4 AAV 介导的基因位点特异性整合 (基因打靶)

近年来用 AAV 进行基因转移的技术获得了飞速发展. 人们已成功地将 AAV 用于多种生物组织细胞的基因打靶. AAV 载体可介导包括插入、缺失、替换突变在内的多种遗传修饰, 充分展示了这项技术的多能性. 1998 年, Russell 等^[22]报道了用 AAV 作载体进行基因打靶的一系列实验. 包括 AAV 被用于修复人宫颈癌 HeLa 细胞中 *neo* 基因的复合突变, 以及在 HT-1080 人骨肉瘤细胞和正常人成纤维细胞中介导单拷贝 X 连锁 *HPRT* 基因的突变, 并获得了较高的打靶频率, 在最适条件下整个成纤维细胞组大约 1% 在 *HPRT* 基因位点发生了打靶. 相比之下, 采用转染或电穿孔方式获得的基因打靶频率范围在 10^{-6} 到 10^{-8} 之间. 且在许多打靶中 AAV 介导的基因表达可以维持终身^[23], 充分说明了该载体的持续性. AAV 载体打靶的高效率和持续稳定的目的基因表达对基因打靶技术的发展起了很大的推动, 它对科研甚至临床应用都有一定价值.

AAV 介导的基因打靶还具有高度的保真性. 在大多数情况下, 打靶克隆被扩增后通过 DNA 印迹 (Southern blot) 分析发现其包含期望的基因改变, 且没有其他的异常^[24]. 人们还通过 DNA 测序在核酸水平研究打靶位点. 一种策略是在打靶位点导入含有细菌耐药性基因和复制起点, 使其“复原”为细菌质粒并进行测序. 通过这种策略, Inoue 等^[25]研究一些修正的 *neo* 基因, 包括同源臂两侧在内的区域都没有发现二级突变 (secondary mutations). Liu 等^[26]通过扩增荧光标记的细胞克隆和 PCR 测序证实了 *GFP* 基因修正的保真度. Russell 等^[27]对载体介导的插入、替换、缺失在超过 50 个打靶位点进行了测

序, 从未发现二级突变, 充分说明该方法的高保真度.

AAV基因打靶载体也能进行随机整合, 随机整合也是临床应用中需要考虑的一个重要因素, 因为随机插入性突变能导致非预期的效应. AAV基因打靶通过同源重组(homologous recombination, HR)的方式进行, 而随机整合则主要通过所谓的“非同源性末端连接”(non-homologous end joining, NHEJ)方式进行, 两者分别包含了各自独立的分子机制^[28]. 通常情况下随机整合的发生频率是同源重组的上千倍, 即便是在最适 m.o.i. 下, 0.1%~1%的细胞经历着打靶而 1%~10%的细胞包含随机整合产物, 即随机整合与打靶之间的比例大约是 10:1^[29], 可见重组 AAV 载体位点特异性整合的效率尚有待提高.

AAV 载体入胞后其基因打靶的步骤包括: a. 载体 DNA 传递至核, b. 载体 DNA 与染色体靶位点的配对, c. 基因序列改变被导入染色体 DNA. 单链载体 DNA 从病毒颗粒被释放之后, 它必须与同源染色体靶序列配对以启动基因打靶. 那么单链载体 DNA 是直接和染色体配对还是先通过复制或互补链间的配对形成双链中间体, 然后再经过类似于转染性质粒介导的重组途径? 三条证据证明导入的单链 DNA 直接与同源染色体序列配对. 首先, 在感染后的几天内(打靶常常发生在这期间)大部分胞内载体基因组是单链形式存在的^[30]. 第二, 形成双链分子的自身互补载体基因组在脱壳以后并没有参与基因打靶反应^[31]. 第三, 用自主性细小病毒鼠微小病毒(minute virus of mice, MVM)作载体进行的实验表明, 在打靶中有对链进行优先选择, 这在打靶 DNA 是双链的情况下是不可能发生的^[32].

目前存在两种关于载体基因组与同源染色体序列配对后引入目的基因的可能机制. 在第一种机制中, 载体基因组的一部分通过重组替代染色体靶位点的某条链. 在一个 *neo* 基因矫正检测中观察到, 当交互突变间距离减小时打靶频率也降低^[25], 这个结果支持该模型. 如果重组交叉必须发生在染色体突变与载体突变之间, 就会出现上述结果. 也有证据支持第二种机制, 在该机制中使用载体基因组作模板进行 DNA 修复合成从而将突变导入到某一染色体链. 不同的微细突变在不同的速度下被导入^[33], 这与错配修复蛋白能在不同的效率下修复特异类型错配碱基的假说一致. 特异性错配碱基可被识别并引起载体的降解. 在载体编码的突变导入到一条染

色体链后, 另一条链可通过额外的重组或修复合成步骤来进行修饰. 或者若第二条链维持不变, DNA 合成与细胞分裂则可产生一个携带突变的子细胞和一个不携带突变的子细胞.

由于 AAV 载体可包装任一 DNA 链, 因此不能断定在基因打靶中是否有链的优先选择. 但在 MVM(这种 MVM 根据不同的末端回文之间的序列方向而对某一极性线性 DNA 进行包装)载体打靶 *HPRT* 位点的实验中, 一条链明显比另一条作用更大^[32]. 在打靶期间这种链的偏向性是由于优先暴露某条染色体链并与特异性载体 DNA 链进行配对而导致的, 转录和复制都可能会发生某条染色体链的暴露. 在转录期间, 模板链被 RNA 聚合酶和相关蛋白占据, 使得编码链更容易配对. 在 DNA 复制期间, 随从链合成中所产生的缺口处暴露的染色体链更容易配对. 打靶中链优先选择机制的确定可从根本上改进载体的设计并优化反应条件使打靶频率增加.

5 AAV 载体的设计

AAV 载体在末端重复序列之间最多可携带长 4.5 kb 的外源基因. 这种相对较小的包装容量限制了 AAV 可供插入同源序列的长度, 导致 AAV 对许多由大片段基因变异所引起的疾病无能为力, 而且较小的包装容量对提高 AAV 打靶的效率和特异性均无好处, 因为人们发现基因打靶频率随同源长度的增加而增加, 带有 3.0 kb 同源序列的载体与带有 1.7 kb 同源序列的载体相比, 前者的打靶效率比后者高出 2~5 倍^[34]. 将需要导入的突变置于远离载体中心的位置会减少打靶, 当同源短臂 <50 bp 时减少得更加明显^[34]. 因此, 最适的打靶载体应当尽可能与打靶位点具有同源性, 且修饰应当在载体中间位置导入. 此外, 最近已开发出一种拼接型载体以打破 AAV 的包装容量限制: 将某个基因和它的调节元件剪接后分别导入两个不同的 rAAV 载体, 然后将两个载体共导入靶细胞, 经过片段间拼接重组以形成头-尾相接的异源性二聚体. 通过该策略可使包装容量得到有效提高^[35], 但此拼接型载体的一个致命缺陷是靶细胞内异源片段间拼接重组效率较低所导致的转基因表达量降低. 为了提高转基因表达量, McCarty 等^[36]开发出一种新型的双链自身互补 AAV 载体(self-complementary vector, scAAV). 虽然 scAAV 并不直接参与基因打靶^[31], 但通过以 scAAV 为载体, McCarty 等^[37]成功将 SiRNA 导入

多重耐药的人乳腺癌和口腔癌细胞, 以下调 P 型糖蛋白的表达, 获得了比使用传统 AAV 更高的转导效率。

导入的突变类型也是一个需要考虑的重要因素。虽然在某些情况下打靶频率因突变类型的不同而不同 (比如插入的导入往往比缺失具有更高的效率), 但小于 20 个核苷酸的插入、缺失、置换等微细突变都已被成功转导。用 AAV 载体已能介导更大的缺失 (长达 1.2 kb), 同时连接上插入的选择性标记, 且大型插入 (长达 2.7 kb) 似乎比小型插入 (至少与同源臂相同长度) 具有更高的效率。这是该项技术一个很有用的特点, 因为它能让我们插入一个用作靶细胞筛选和富集的功能性转基因盒。通过插入选择性标记, 这项技术已被用于一些基因的敲除, 例如在某些情况下需要在富集之后除去选择性标记, 这可以通过在选择性标记外侧置入 *LoxP* 位点并在克隆筛选以后使用 *Cre* 重组酶来除去插入序列。

Kohli 等^[38]最近公布了一种包括两同源臂和一个能简化载体质粒制备的敲除盒三效融合 PCR (three-way fusion PCR) 的创新策略, 用一个或多个辅助质粒共转染载体质粒可建立 AAV 载体库, 并获得大量的载体病毒颗粒, 它们能被提纯到高滴度并冰冻储存, 或者作为转染细胞的原始溶菌产物用于感染靶细胞。Recchia 等^[39]最近报道, 通过构建 Adeno/AAV 杂化载体成功将功能性转基因特定地整合至人体基因组, 这种新型杂化载体以高容量的辅助病毒依赖性腺病毒载体为基本结构框架, 携带一个两侧与 AAV ITRs 相接的整合盒和一个药物诱导性 Rep 表达盒, 该载体具有打靶效率高、高度位点特异性等优点。

提高 AAV 基因打靶的特异性、降低 AAV 免疫原性的一个重要突破口是对衣壳组分的修饰。总的来说, 至少有两种获得 AAV 受体打靶的策略是可行的: a. 间接打靶。病毒载体与靶细胞间的相互作用通过相关中间分子的介导 (例如葡萄糖苷分子或双特异性抗体) 来进行, 这种分子能结合到病毒表面并与特定的细胞表面分子相互作用。b. 直接打靶。载体的细胞特异性打靶由直接插入到病毒衣壳的配体所介导。就间接打靶而言, 病毒与中间介质相互作用的稳定性以及病毒 - 中间介质复合体生成的效率是限速关键。此外, 中间介质还必须结合到细胞特异性受体, 从而启动病毒的摄入和正确的细胞内进程。通过直接衣壳修饰以成功制备打靶载体

必须考虑两个重要的因素。第一是选择一个良好的插入位点以维持衣壳高效率的包装。第二是目标肽段的选择。插入到 AAV 衣壳的配体应具有独立结构并且不能太大以避免整个衣壳的不稳定, 此外, 配体 - 受体复合物应当以某种适当的可使病毒进行高效转运并使病毒 DNA 释放到细胞核的模式被内化。

Bartlett 等^[40]首先论证了将介导病毒与靶细胞相互作用的双特异性抗体用于 AAV-2 基因打靶的可行性。所使用的抗体由抗 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 整合素单克隆抗体 (AP-2 antibody) 和抗完整 AAV-2 衣壳单克隆抗体 (A20 antibody) 的 Fab 臂进行化学交联而获得。该打靶载体能转导对野生型 AAV-2 不易感的 MO7e 和 DAMI 细胞。Ponnazhagan 等^[41]利用生物素 - 亲和素相互作用的高亲和力作为连接打靶配体的分子桥梁, 使基因转导的特异性和效率明显增加。虽然打靶效率提高了, 但使用间接打靶策略所面临的一个关键问题是病毒 - 双特异性抗体复合体在体内的稳定性。

Yang 等^[42]报道了第一例直接改变 AAV-2 趋向性的实验。他们在 VP1、VP2 和 VP3 的 5' 端插入抗人 CD34 的单链抗体。将突变型和野生型 AAV-2 衣壳蛋白融合后得到能感染 HeLa 细胞的完整病毒颗粒并能增强 CD34 阳性 KG-1 细胞的转导活性。虽然该过程第一次表明通过对衣壳的直接修饰来进行 AAV-2 的打靶是可行的, 但获得的病毒滴度相当低。Wu 等^[43]插入 HA 抗原决定基 YPVDVPDYA 到 VP1、VP2 和 VP3 的 N 端区域和 ORF 的 C 端。他们观察到, 在 VP1 的 N 端、VP3 的 N 端和 cap 开放阅读区的 C 端插入 HA 和其他抗原决定基不会产生可检测到的颗粒。这个结果与 Yang 等的观点一致, 只有在 VP2 的 N 端 (氨基酸位 138) 的插入可产生效应。

Girod 等^[44]报道了第一例将基因水平上的衣壳修饰 (直接打靶) 成功用于 AAV-2 基因打靶的实验。通过将 AAV-2 与晶体结构已知的 CPV 进行序列分析比较, 他们鉴定出 6 个位点 (氨基酸位 261, 381, 447, 534, 573, 587) 暴露于病毒衣壳表面并允许不明显破坏病毒生活周期的配体的插入。此后, Grifman 等^[45]报道, 使用通过扩大比较范围到几乎所有细小病毒的序列分析来鉴定 AAV-2 衣壳的潜在打靶位点。他们鉴别出与 Girod 等一致的区域并最终使用位点 448 和 587 来进行他们的研究。Shi 等^[46]也试着通过插入诱变 (insertional

mutagenesis) 筛选出 AAV-2 衣壳中可供异源性肽段配体插入的位置, 所谓插入诱变即将外源 DNA 随机插入到衣壳基因组, 当外源 DNA “击中” 某一基因时, 该特定基因就被关闭。

由于细胞表面 AAV 受体在体外和体内可表现出不同的分子结构、理化特性和生物学活性, 导致在体外实验中具有某种细胞趋向性的衣壳肽段在体内实验时丧失该细胞趋向性。为了克服上述缺陷, Work 等^[47] 采用在体生物筛选技术 (*in vivo* biopanning) 从经鼠股静脉注射入体的 PhD C7Cmer 噬菌体展示库 (phage display library) 中筛选出 QPEHSST, VNTANST, HGPMQKS 和 PHKPPLA 4 个对象肽段, 将它们各自融合到 AAV-2 衣壳蛋白的 VP3 区域 (位点 587 附近) 并使之表达于病毒表面, 然后分别对它们进行了 HSPG 亲和力测定和组织趋向性观察等系列研究, 这是迄今为止第一例将在体生物筛选技术用于 AAV 衣壳改造实验研究的报道。除了单独使用间接打靶或直接打靶对 AAV 衣壳进行修饰外, 近来已有关于将间接打靶与直接打靶结合起来以改变 AAV-2 趋向性的报道^[48]。

除了单独对某一 AAV 衣壳进行修饰, 人们还根据不同 AAV 血清型衣壳蛋白在进化中可通过互相重组而生成新的衣壳型和他们之间的高度同源性, 将不同 AAV 进行衣壳融合或所谓的“标志补救(marker rescue)”以改变其细胞趋向性^[23]。衣壳融合由于融合了不同血清型来源的衣壳蛋白, 因而具有更加广泛的细胞趋向性, 其转基因的表达也因为更多可启动基因表达的胞内途径的出现而得到加强。“标志补救”是通过不同血清型衣壳的编码 DNA 之间的重组使单个血清型衣壳 DNA 上的“缺陷”得以弥补, 从而获得细胞感染性更强的衣壳产物。通过上述策略可以在一定程度上解决某些细胞膜上 AAV 病毒受体不能表达或表达不充分的问题。

迄今为止, 人们为将 AAV 更好地用于基因治疗, 进行了增加打靶同源序列的长度、在适当的位置引入合适的功能盒(如启动子、增强子)、在蛋白质水平或基因水平对衣壳进行修饰等诸多尝试。所有这些富有创造性的载体设计思维将为制备更加安全高效的新型 AAV 打靶载体奠定坚实基础。

6 AAV 基因治疗前景

为了获得高效的 AAV 载体, 需要对 AAV 感染的生物学特性有更好的理解。这包括病毒-细胞表面的相互作用, 摄入的机制, 胞内进程和释放,

核内转运和引导基因表达的机制等。AAV 作为基因治疗的载体确实存在一些非常突出的优点, 比如能感染分裂和非分裂细胞、不具有明显的致病性、整合至宿主特定染色体长期表达目的蛋白等。但又同时存在可供插入容量小、病毒滴度低、转染效率尚不理想等缺点。而其广泛的宿主范围则是一把双刃剑, 一方面可扩大 AAV 载体的应用范围, 另一方面又导致基因导入的特异性降低。目前人们已经掌握了一些与 AAV 载体在基因治疗中更好地发挥作用密切相关的因素, 例如高滴度、高纯度的病毒颗粒的制备、增强 AAV 衣壳组分与靶细胞表面分子的特异性识别黏附和相互作用、尽量避免针对病毒颗粒中和抗体的出现和蛋白酶体介导的载体降解、增大载体容量和增加转录活性等等, 几乎包括了高效持续的基因转移和表达发生之前的所有步骤。怎样克服这些重重阻力以早日实现将 AAV 用于临床基因治疗是各国科学家所面临的一大挑战。从 AAV 被发现之日起, 人们就在努力研究其生物学活性并不遗余力地从各方面对其加以改进, 所有这些努力的最终目的是制备使基因准确传递到目的细胞或组织的重组 AAV 载体, 从而开启 AAV 载体临床治疗的窗口。

参 考 文 献

- 1 Carter P J, Samulski R J. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med*, 2000, **6** (1): 17~27
- 2 Gao G, Alvira M R, Somanathan S, *et al.* Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (10): 6081~6086
- 3 Ding W, Zhang L, Yan Z, *et al.* Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy*, 2005, **12** (11): 873~880
- 4 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
- 5 Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, *et al.* Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther*, 2000, **2** (6): 619~623
- 6 Handa A, Muramatsu S, Qiu J, *et al.* Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J Gen Virol*, 2000, **81** (8): 2077~2084
- 7 Zabner J, Seiler M, Walters R, *et al.* Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol*, 2000, **74** (8): 3852~3858
- 8 Halbert C L, Allen J M, Miller A D. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J Virol*,

- 2001, **75** (14): 6615~6624
- 9 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
- 10 Wang Z, Zhu T, Qiao C, *et al.* Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (3): 321~328
- 11 Yan Z, Zak R, Zhang Y, *et al.* Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J Virol*, 2005, **79** (1): 364~379
- 12 Haberman R P, McCown T J, Samulski R J. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol*, 2000, **74** (18): 8732~8739
- 13 Opie S R, Warrington K H, McKenna M A *et al.* Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol*, 2003, **77** (12): 6995~7006
- 14 Qing K, Mah C, Hansen J, *et al.* Human fibroblast growth factor receptor 1 is a coreceptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med*, 1999, **5** (1): 71~77
- 15 Marks B, Stowell M, Vallis Y, *et al.* GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*, 2001, **410** (6825): 231~235
- 16 Sanlioglu S, Benson P K, Yang J, *et al.* Endocytosis and nuclear trafficking of adenoassociated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, 2000, **74** (19): 9184~9196
- 17 Ding W, Zhang L N, Yeaman C, *et al.* rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol Ther*, 2006, **13** (4): 671~682
- 18 Okada T, Uchibori R, Okada M I, *et al.* A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther*, 2006, **13** (4): 738~746
- 19 Chen J, Wu Q, Yang P, *et al.* Determination of specific CD4 and CD8 T cell epitopes after AAV2- and AAV8-hF.IX gene therapy. *Mol Ther*, 2006, **13** (2): 260~269
- 20 Zhang H G, High K A, Wu Q, *et al.* Genetic analysis of the antibody response to AAV2 and Factor IX. *Mol Ther*, 2005, **11** (6): 866~874
- 21 Denby L, Nicklin S A, Baker A H. Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther*, 2005, **12** (20): 1534~1538
- 22 Russell D W, Hirata R K. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet*, 1998, **18** (4): 325~330
- 23 Li C, Bowles D E, Dyke T, *et al.* Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 2005, **12** (12): 913~925
- 24 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
- 25 Inoue N, Hirata R K, Russell D W. High-fidelity correction of mutations at multiple chromosomal positions by adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 1999, **73** (9): 7376~7380
- 26 Liu X, Yang Z, Luo M, *et al.* Targeted correction of single-base-pair mutations with adenoassociated virus vectors under nonselective conditions. *J Virol*, 2004, **78** (8): 4165~4175
- 27 Hendrie P C, Russell D W. Gene targeting with viral vectors. *Mol Ther*, 2005, **12** (1): 9~17
- 28 Vasileva A, Jessberger R. Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiology*, 2005, **3** (11): 837~847
- 29 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
- 30 Russell D W, Miller A D, Alexander I E. Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (19): 8915~8919
- 31 Hirata R K, Russell D W. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol*, 2000, **74** (10): 4612~4620
- 32 Hendrie P C, Hirata R K, Russell D W. Chromosomal integration and homologous gene targeting by replication-incompetent vectors based on the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol*, 2003, **77** (24): 13136~13145
- 33 Inoue N, Dong R, Hirata R K, *et al.* Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors. *Mol Ther*, 2001, **3** (4): 526~530
- 34 Cummins J M, Rago C, Kohli M, *et al.* Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53. *Nature*, 2004, **428** (6982): 486
- 35 Lai Y, Yue Y, Liu M, *et al.* Efficient *in vivo* gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (11): 1435~1439
- 36 McCarty D M, Fu H, Monahan P E, *et al.* Adenoassociated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*. *Gene Therapy*, 2003, **10** (26): 2112~2118
- 37 Xu D, McCarty D M, Fernandes A, *et al.* Delivery of small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vector. *Mol Ther*, 2005, **11** (4): 523~530
- 38 Kohli M, Rago C, Lengauer C, *et al.* Facile methods for generating human somatic cell gene knockouts using recombinant adenoassociated viruses. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (1): e3
- 39 Recchia A, Perani L, Sartori D, *et al.* Site-specific integration of functional transgenes into the human genome by adeno/AAV hybrid vectors. *Mol Ther*, 2004, **10** (4): 660~670
- 40 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'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol*, 1999, **17** (2): 181~186
- 41 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
- 42 Yang Q, Mamounas M, Yu G, *et al.* Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1998, **9** (13): 1929~1937

- 43 Wu P, Xiao W, Conlon T, *et al.* Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol*, 2000, **74** (18): 8635~8647
- 44 Girod A, Ried M, Wobus C, *et al.* Genetic capsid modifications allow efficient retargeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med*, 1999, **5** (9): 1052~1056
- 45 Grifman M, Trepel M, Speece P, *et al.* Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol Ther*, 2001, **3** (6): 964~975
- 46 Shi W, Arnold G S, Bartlett J S. Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum Gene Ther*, 2001, **12** (14): 1697~1711
- 47 Work L M, Buning H, Hunt E, *et al.* Vascular bed-targeted *in vivo* gene delivery using tropism-modified adeno-associated viruses. *Mol Ther*, 2006, **13** (4): 683~693
- 48 Korokhov N, Mikheeva G, Krendelshchikov A, *et al.* Targeting of adenovirus *via* genetic modification of the viral capsid combined with a protein bridge. *J Virol*, 2003, **77** (24): 12931~12940

rAAV: a Promising Vehicle for Gene Therapy

TANG Bin-Zhi¹⁾, QIN Hao-Jie^{1,2)}, FU Qiang¹⁾, QU Yi^{3)*}

¹⁾West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

²⁾Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

³⁾Central Laboratory of West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Adeno-associated virus (AAV) is a member of the parvovirus family, single-stranded DNA-containing nonenveloped icosahedral viruses. AAVs have been regarded as promising vectors for human gene therapy as they have the capacity to establish long-term latency within human cells without any apparent pathogenicity. However, a lot of obvious defects in their applications have been revealed recently, including the paucity of cell surface receptors on some cells, the lack of site-specific integration by recombinant AAV vectors, and the host immune responses to AAV capsid components and transgene products and so forth. Driven by these defects, increasing efforts are being made to study biological properties and infectious pathway of AAVs. It is consequently optimized by the modification of the AAV vectors to produce new generation of recombinant AAV vectors with more security, efficiency and site-specific targeting, allowing AAVs to move forward into broader clinical application.

Key words adeno-associated virus, recombinant vectors, gene therapy

*Corresponding author. Tel: 86- 13808183352, E-mail: quyi712002@yahoo.com.cn

Received: March 21, 2006 Accepted: April 30, 2006