

## • 综述 •

## 以腺病毒为载体的基因治疗药物毒性及其机制的研究进展

曾宪成, 周国民, 李 华, 南雅萍, 史民华, 陈啸天, 马 璟  
国家上海新药安全评价研究中心, 上海 201203

**摘要:** 基因治疗药物已成为当今生物技术药物研发的重点, 而腺病毒是目前临床基因治疗较常选用的载体系统。它们在发挥治疗作用的同时, 亦会引起机体出现毒性反应。从腺病毒载体及相应药物引发的毒性反应, 固有免疫及获得性免疫系统活化等方面对它们的毒性及其机制进行总结。

**关键词:** 腺病毒; 基因治疗; 毒性; 固有免疫; 获得性免疫

**中图分类号:** R965.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-6376(2012)01-0027-04

## Advances in studies on toxicity of gene therapy drugs mediated by adenovirus vectors and their mechanism

ZENG Xian-cheng, ZHOU Guo-ming, LI Hua, NAN Ya-ping, SHI Min-hua, CHEN Xiao-tian, MA Jing  
National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China

**Abstract:** Gene therapy drugs have become a key of exploitation for biotechnology-derived pharmaceuticals, and adenovirus vectors are common used to mediate gene therapy in clinic. They could induce toxicity reaction accompanied with their therapeutic effect simultaneously. This review will focus on the toxicity reaction and activation of innate and acquired immune system induced by adenovirus vectors and the related drugs to elucidate their toxicity and the related mechanism.

**Key words:** adenovirus; gene therapy; toxicity; innate immune; acquired immune

基因治疗 (gene therapy) 是指将外源正常基因通过基因转移技术导入靶细胞, 纠正或补偿因基因缺陷或异常引起的疾病, 以达到治疗目的, 在人体遗传性及获得性疾病治疗过程中具有广阔的应用前景。基因治疗药物亦成为当今生物技术药物研发的重点。建立安全有效的外源基因导入体系是决定基因治疗成功与否的关键因素, 而载体的选择和构建则是建立导入体系的核心技术环节。用于基因治疗的载体可分为病毒性和非病毒性<sup>[1]</sup>。选用病毒载体是基因治疗中最常见的外源基因导入策略, 大约有70%的临床基因治疗选用病毒载体, 而在这些病毒载体中大约25%是腺病毒载体 (adenoviral vectors, AdVs)<sup>[2]</sup>。

然而限制 AdVs 临床运用的障碍主要在于: 一方面它可引起以补体系统活化及炎性因子释放为特征的宿主固有免疫反应 (innate immune response),

造成机体血管及组织损伤甚至死亡<sup>[3]</sup>; 另一方面它可引起机体出现毒性反应甚至死亡<sup>[4-5]</sup>。本文将从本课题组进行以腺病毒为载体的基因治疗药物安全性评价研究的实践出发, 结合国外相关研究, 对 AdVs 及相应药物的毒性及其机制进行总结。

### 1 AdVs 及相应药物对不同种属实验动物的毒性研究

AdVs 常被作为基因治疗的载体主要是由于它具有以下优点: 高转导效率, 体外实验通常接近100%; 广泛的组织分布性, 可转导人不同类型的组织细胞, 且不受靶细胞是否为分裂细胞所限; 容易制得高滴度病毒载体<sup>[6-7]</sup>。在本课题组进行的试验中, SD 大鼠经静脉重复给予以腺病毒为载体的拟治疗糖尿病的基因治疗药物 14 d 后, 白细胞计数 (WBC)、球蛋白及谷丙转氨酶 (ALT) 升高, 红细胞计数 (RBC)、血红蛋白 (HB)、红细胞压积 (HCT)、

收稿日期: 2011-10-26

基金项目: 上海市科委 2010 年度实验动物项目 (10140901000)

作者简介: 曾宪成 (1981—), 男, 博士, 主要从事新药毒理及实验动物研究。E-mail: xczen@ncdser.com yczxc99@163.com

血小板 (PLT) 及白蛋白 (ALB) 下降, 脾脏肿大。Morrissey 等<sup>[4]</sup>在大鼠 14 d 和 28 d 经腹腔重复给予 SCH 58500 (以腺病毒为载体并表达 p53) 的毒性试验中亦得到相似的结果。犬经静脉给予表达 VIII 因子的腺病毒载体后, ALT、谷草转氨酶 (AST) 及碱性磷酸酶 (ALP) 升高, PLT 下降<sup>[5]</sup>。恒河猴 *Macaca mulatta* 经静脉给予表达 IX 因子的第一代腺病毒载体 AVC3FIX5 后, 表征肝脏、肺及肌肉损伤的酶升高, PLT 降低, 并伴随白细胞介素 6 (IL-6) 的升高<sup>[8]</sup>。食蟹猴 *Macaca fascicularis* 经肌肉给予 (3 次/周) 表达 IFN- $\gamma$  的腺病毒载体 8 周后, 体质量、尿液检查、血液学、血清生化、电解质及组织病理学检查并未见明显异常<sup>[9]</sup>。上述研究结果表明, AdVs 引起的不良反应多表现为肝脏功能受损。另外, AdVs 可以引起机体固有免疫反应。固有免疫系统在机体长期进化中形成, 出生起就具有, 并非由特定抗原诱导的抵抗病原体侵袭、清除体内异物的防御能力, 是机体抵御病原体感染的第一道防线。固有免疫系统清除病原体主要通过一类表达于固有免疫细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptors) 识别病原体进而介导病原体的清除。固有免疫系统的效应细胞主要由一群执行非特异性免疫作用的细胞组成, 主要包括单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞 (DC)、NK 细胞、非特异性免疫 T 细胞、非特异性免疫 B 细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞和肥大细胞。恒河猴经门静脉给予表达 LacZ 的第一代腺病毒载体后, 血液中 IL-6 水平升高, 脾脏巨噬细胞和 DC 活化, 然后大量细胞发生凋亡<sup>[10]</sup>。小鼠经静脉给予 AdVs 将导致肝脏巨噬细胞 (枯否氏细胞, KCs) 迅速死亡<sup>[11]</sup>。体外培养的人成纤维细胞经 AdVs 转导后, 将发生 NK 细胞介导的细胞裂解<sup>[12]</sup>。由于 AdVs 可以引起抗原递呈细胞, 比如 DC 的活化, 所以它必然会引起机体获得性免疫, 机体将产生抗 AdVs 的中和抗体<sup>[13]</sup>。

## 2 固有免疫反应与 AdVs 引发的不良反应

### 2.1 AdVs 引发固有免疫反应的分子基础

尽管目前对腺病毒载体已进行了多方面的结构改造以减少其固有<sup>[6]</sup>及获得性免疫反应<sup>[7]</sup>, 但这些研究仍处于实验室阶段, 尚未进入临床实践。虽然通过结构改造可以减弱 AdVs 固有及获得性免疫反应, 但由 AdVs 衣壳 (capsid) 蛋白激发的固有免疫反应至今仍无法避免。而固有免疫反应可能是 Ads 引发急性毒性反应的主要原因<sup>[8-9]</sup>。另外, 病毒核酸

也是一种能被细胞广泛和有效识别的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 可通过多种受体对胞浆 RNA 及 DNA 作出应答, 如核糖核酸解旋酶 (RNA helicases) 能在维甲酸诱导基因-I (retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I) 及黑色素瘤分化相关基因-5 (melanoma differentiation associated gene 5, mda5) 的参与下对胞浆 RNA 及 DNA 作出应答, 而 Toll 样受体 (TLRs) 中的 TLR-3 可识别核内体双链 RNA, TLR-7/-8 可识别单链 RNA, TLR-9 可识别低甲基化的 DNA, 从而引发固有免疫反应<sup>[10]</sup>。进一步研究表明, 胞浆 DNA 可通过 PI3K、p38MAPK、JNK、NF- $\kappa$ B、JAK/STAT 及 ERK1/2 依赖的信号转导途径诱导固有免疫反应<sup>[10]</sup>。

### 2.2 肝脏枯否氏细胞与 AdVs 清除

当 AdVs 通过静脉注射给予时, 由于肝脏枯否氏细胞 (Kupffer cells, KCs) 对它们的快速清除作用, 其转导治疗的效率明显降低。KCs 是位于肝窦内的一种巨噬细胞, 是肝脏清除通过门脉循环进入的病毒的第一道防线。肝脏对 iv 给予 AdVs 的免疫反应可以划分为两个时期: 第一个时期出现在注射后 1~4 d, 部分特征表现为门管区多形核白细胞浸润, 肝酶升高, 在有些情况下高剂量组会出现死亡; 第二个时期出现在给药后 5~7 d, 表现为病毒自身及转导基因表达产物作为抗原激发的免疫反应<sup>[11]</sup>。KCs 对 AdVs 的清除是诱发炎症反应及肝脏毒性反应的原因<sup>[12]</sup>。参与腺病毒进入培养细胞的受体已经被研究清楚: 首先腺病毒的纤突与柯萨奇-腺病毒受体 (CAR) 结合, 接下来五邻体与整合素结合从而介导其内化。当局部注射 AdVs 时, 上述受体在腺病毒体内转导过程中发挥着重要作用; 但是上述受体在 KCs 清除静脉给予的 AdVs 时并不是必需的, 清道夫受体 (scavenger receptors, SRs)、天然抗体 IgM 及补体参与了该过程, 且 SRs 介导的清除是主要的清除机制。另外, 维生素 K 依赖的凝血因子及血小板并没有参与上述过程<sup>[13]</sup>。SRs 可以识别带负电荷的物质, 且不需要血浆蛋白的调理作用。SRs 受体参与 KCs 清除 AdVs 的作用提示可以通过改变 AdVs 表面负电荷来干预 KC 对 AdVs 的清除。但是删除腺病毒六邻体高度可变区 (hypervariable region 1, HVR1) 的部分酸性支链并没有影响 AdVs 的清除, 上述原因可能在于负电荷删除的程度有限<sup>[14]</sup>。因此, 当更高程度地删除负电荷后, AdVs 的清除将

如何变化, 需要进一步研究。

### 3 获得性免疫与 AdVs 毒性

在注射 AdVs 数日或数周后将出现细胞介导的针对载体本身或所转基因产物的免疫反应(获得性免疫反应), 且与 AdVs 类型及转基因产物有关。Rag<sup>-/-</sup>小鼠(获得性免疫缺陷小鼠)与野生型 C57BL/6 小鼠一样, 在注射携带精氨酸合成酶(argininosuccinate synthetase, ASS)的第一代腺病毒(FGV) 4 周后, ASS 及 AdVs 均显著减少, 两者减少与 AdVs 引发的获得性免疫有关<sup>[15]</sup>。β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)具有较强的免疫原性, 可以引起机体的获得性免疫反应。在野生型 C57BL/6 小鼠, FGV 及辅助子依赖的腺病毒载体(helper-dependent adenoviral vector, HDV)携带的转基因 β-半乳糖苷酶表达均下降; 但在 Rag<sup>-/-</sup>小鼠体内 HDV 本身及其携带的转基因 β-半乳糖苷酶基因表达仍可维持<sup>[15]</sup>。上述结果表明, 腺病毒基因表达是引发获得性免疫的主要决定因素; 在腺病毒基因不表达时, 强免疫原性的转基因表达产物亦可引起获得性免疫反应, 从而促进被转导的肝细胞的清除<sup>[15]</sup>。

### 4 结语

如何突破因宿主免疫清除腺病毒载体及转基因表达产物而影响转基因表达效率及基因治疗疗效的限制, 必将关系到以腺病毒为载体的基因治疗的应用前景。为解决上述问题, 当今的研究主要集中于外源性药物促进转基因表达, 比如非转导环节依赖的促进转基因表达的 FK228<sup>[16]</sup>; 及对腺病毒载体进行结构改造<sup>[17]</sup>。另外, 在考察 AdVs 及其携带转基因的毒性时, 应该注意机体是否已经存在针对该血清型 AdVs 的特异性免疫反应, 因为已经存在的免疫反应将改变机体对静脉给予 AdVs 的免疫反应<sup>[18]</sup>。

### 参考文献

[1] Zhang C, Wang Q T, Liu H, *et al.* Advancement and prospects of tumor therapy [J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(3): 182-188.

[2] Hidde J H, Anna R B. Pharmacological interventions for improving adenovirus usage in gene therapy [J]. *Mol Pharm*, 2010, 8(5): 50-55.

[3] Matkovic U, Pacenti M, Trevisan M, *et al.* Investigation on human adrenocortical cell response to adenovirus and adenoviral vector infection [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 220(1): 45-57.

[4] Morrissey R E, Horvath C, Snyder E A, *et al.* Rodent

nonclinical safety evaluation studies of SCH 58500, an adenoviral vector for the p53 gene [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 65(2): 266-275.

- [5] Gallo-Penn A M, Shirley P S, Andrews J L, *et al.* Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs [J]. *Blood*, 2001, 97(1): 107-113.
- [6] Johnson M, Huyn S, Burton J, *et al.* Differential biodistribution of adenoviral vector in vivo as monitored by bioluminescence imaging and quantitative polymerase chain reaction [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(12): 1262-1269.
- [7] Katayama K, Furuki R, Yokoyama H, *et al.* Enhanced *in vivo* gene transfer into the placenta using RGD fiber-mutant adenovirus vector [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(17): 4185-4193.
- [8] Lozier J N, Csako G, Mondoro T H, *et al.* Toxicity of a first-generation adenoviral vector in rhesus macaques [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(1): 113-124.
- [9] Li Y, Shao J Y, Liu R Y, *et al.* Evaluation of long-term toxicity of Ad/hIFN-, an Adenoviral vector encoding the human interferon-gamma gene, in nonhuman primates [J]. *Hum Gene Ther*, 2008, 19(8): 827-839.
- [10] Steinstraesser L, Sorkin M, Jacobsen F, *et al.* Evaluation of signal transduction pathways after transient cutaneous adenoviral gene delivery [J]. *BMC Immuno*, 2011, 12: 8.
- [11] Liber A, He C Y, Meuse L, *et al.* The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors [J]. *J Virol*, 1997, 71(11): 8798-8807.
- [12] Haisma H J, Boesjes M, Beerens A M, *et al.* Scavenger receptor A: A new route for adenovirus 5 [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(2): 366-374.
- [13] Xu Z, Tian J, Smith J S, *et al.* Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement [J]. *J Virol*, 2008, 82(23): 11705-11713.
- [14] Alemany R, Suzuki K, Curiel D T. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 11): 2605-2609.
- [15] Mian A, Guenther M, Finegold M, *et al.* Toxicity and adaptive immune response to intracellular transgenes delivered by helper-dependent vs first generation adenoviral vectors [J]. *Mol Genet Metab*, 2005, 84(3): 278-288.
- [16] Danielsson A, Dzojic H, Rashkova V, *et al.* The HDAC

- inhibitor FK228 enhances adenoviral transgene expression by a transduction-independent mechanism but does not increase adenovirus replication [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e14700.
- [17] Schaack J, Qiao L P, Walkiewicz M P, *et al.* Insertion of CTCF-binding sites into a first-generation adenovirus vector reduces the innate inflammatory response and prolongs transgene expression [J]. *Virology*, 2011, 412: 136-145.
- [18] Varnavski A N, Calcedo R, Bove M, *et al.* Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naïve and pre-immunized mice [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(5): 427-436.

• 信 息 •

## FDA 公告含氯氟烃的非处方哮喘吸入剂于 2011 年 12 月 31 日停产或停售

2011 年 9 月 22 日，美国食品药品监督管理局（FDA）宣布含氯氟烃（CFCs）的肾上腺素吸入剂于 2011 年 12 月 31 日停产或停售，患者应计划寻求替代产品治疗。

Armstrong 制药公司 Primatene Mist 肾上腺素吸入剂是唯一获 FDA 批准的暂时缓解轻度哮喘偶然发作的吸入剂，属于患者无需处方即可在零售药店购买的非处方药品（OTC）。该产品利用 CFCs 推进药物喷出，以使消费者能够将药物吸入肺内。

为履行《蒙特利尔协定公约》的义务，2011 年 12 月 31 日后含 CFC 的肾上腺素吸入剂将不再生产或销售，Primatene Mist 将在 2011 年底不再供应。《蒙特利尔协定》是美国签署的一项国际协议，签署国允诺按期逐步淘汰包括 CFCs 在内的消耗臭氧层物质。

2006 年 1 月，FDA 开始公开讨论肾上腺素吸入剂中 CFCs 的使用。FDA 最终敲定了使用 CFCs 的吸入剂逐步淘汰日期，并在 2008 年 11 月告知公众。许多制造商将吸入剂中 CFCs 替换成环保的助推剂氢氟烷（HFA）。目前尚无 HFA 型的肾上腺素吸入剂上市。

但是，有许多其他安全有效的吸入剂治疗哮喘，所有这些吸入剂都需要持证专业医护人员（医师、医师助理或执业护士）的处方。目前尚未开具新处方的肾上腺素吸入剂的使用者，可以询问家庭成员或朋友所用的和医师推荐的新处方，或者到联邦政府授权的卫生中心、地方诊所、社区卫生服务中心、临时就诊处（有时设在药房里）寻问专业医护人员，并获取处方。

Primatene Mist 产品标签上显著标明逐步淘汰日期。FDA 鼓励 Armstrong 制药公司随着截止日期的临近，加强对消费者的教育，以确保无事故过渡。FDA 当局也将继续与零售商和药房协作，共同推动 CFCs 产品顺利地逐步淘汰，并且准备好替代产品申请的审评工作。

（本刊讯）