

·综述·

重组腺相关病毒基因药物的细胞免疫毒性及对策

刁 勇*, 王启钊, 肖卫东, 许瑞安

(教育部分子药物工程研究中心, 华侨大学分子药物学研究所, 福建 泉州 362021)

摘要: 重组腺相关病毒 (rAAV) 因具有在体内可以长期稳定表达转基因、安全性高等优点, 迅速成为基因治疗的首选载体之一。最近采用 rAAV 基因药物进行的血友病临床实验所暴露的细胞免疫毒性引起人们高度关注, 此问题能否顺利解决直接关系该类药物的发展前景。之后的研究发现针对 AAV 衣壳蛋白的 T 细胞免疫反应是毒性反应的原因。本文针对 rAAV 细胞免疫毒性的各种假说进行了分析, 总结了 AAV 衣壳蛋白抗原肽如何在靶细胞递呈并激活细胞毒性 T 淋巴细胞的研究结果, 并针对该免疫毒性的各关键环节提出了可能的解决方案, 包括免疫抑制、载体优化、提高纯度等, 期望有助于提高 rAAV 基因药物的临床安全性和有效性。

关键词: 细胞免疫毒性; 基因药物; 腺相关病毒

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 09-1071-07

Cellular immunotoxicity of rAAV gene medicine and possible solutions

DIAO Yong*, WANG Qi-zhao, XIAO Wei-dong, XU Rui-an

(Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Gene medicine based on recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector has rapidly become the prior-choose reagent for gene therapy, since it had been shown that the rAAV was able to stably express many genes *in vivo* without detectable side-effect. However, recent findings of CTL immune responses to AAV capsid in a clinical trial highlighted a new issue regarding safety that previously was not identified in animal studies. Obviously it is so important to understand the interaction of rAAV with the immune system in details for the safety and success of rAAV gene medicine. In this review we evaluate several current hypotheses aiming to explain the cellular immunotoxicity, also analysis the current findings including the presentation kinetics of the capsid antigen and the activation of CTL. Focusing on the key steps of the immune response several solutions are proposed, including immunosuppression, optimization of vector and improvement of purity, in order to insure clinical safety and efficacy of rAAV.

Key words: cellular immunotoxicity; gene medicine; adeno-associated virus

几种重大疾病基因治疗临床试验的成功, 标志屡遭挫折的基因治疗取得了重大突破, 因而被 *Science* 杂志评为 2009 年十大科学进展之一^[1]。应用重组腺相关病毒 (rAAV) 基因药物成功治愈 Leber's

先天性黑内障, 2 名部分失明患者的感光能力有了明显改善, 4 个病童重见光明^[2, 3], 极大鼓舞了本领域研究人员的信心。长期以来研究人员一致认为 rAAV 基因药物 具有无致病性、低免疫原性、能介导外源基因长期表达和宿主范围广泛等优点, 是最有发展前景的基因治疗载体^[4]。但由美国宾州大学主持进行的治疗血友病的 rAAV 基因药物 I/II 期临床研究却发生了严重的细胞免疫反应^[5], 患者转氨酶水平急剧升高, 肝功能受到严重损害, 临床研究被迫终止。如果

收稿日期: 2010-03-23.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2008AA02Z135); 国家科技重大专项资助项目 (2009ZX09103-643); 国家自然科学基金资助项目 (30973591).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-595-22692516, E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

不能解决 rAAV 基因药物在人体内可能诱发细胞免疫毒性的问题, 其今后的临床应用很有可能就此终结。所以探究其细胞免疫毒性发生的原因和机制, 并提出解决问题的策略, 对今后的临床研究意义重大。

1 rAAV 基因药物细胞免疫毒性的发现

在小鼠、大鼠、犬和非人灵长类动物体内进行的大量 rAAV 基因药物的临床前研究, 从未发现由淋巴细胞介导的免疫反应^[6-8], 血友病的 I/II 期临床研究发生的严重细胞免疫毒性大大出乎人们意料^[2]。在该临床研究中, 血友病患者经肝动脉输注可表达人凝血第九因子 (FIX) 的 rAAV2 基因药物, 治疗剂量为 $8 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{12}$ vp·kg⁻¹。低和中剂量组各 2 名受试者虽未有任何疗效, 但也未出现明显的毒副反应。高剂量组的 2 位患者中, 一人血液内 FIX 水平在 2 周内上升至正常水平的 3%, 但在第 4 周降至基线水平; 另外一人 FIX 水平迅速上升至正常水平的 10%~12%, 足以明显改善血友病病情, 但在给药 4 周后, 肝脏出现转氨酶升高症状。之后将第 7 位患者的给药剂量降为中剂量, 也同样发生了转氨酶升高现象, 该临床研究随之终止。经详细排查, 未发现与基因转移无关的其他任何毒性或感染性原因, 也未检出针对转基因产物 FIX 的抗体。对第 7 位患者的外周单核细胞 (PBMC) 的 T 细胞效应分析显示, 该毒性反应是针对 AAV2 衣壳蛋白的细胞免疫反应, IFN- γ 的产生与 AAV2 衣壳蛋白抗原肽直接相关。

在治疗脂蛋白脂酶的临床试验中, 半数患者 (共 8 名) 经肌肉注射 rAAV1 基因药物后发生了针对 AAV1 衣壳蛋白的 T 细胞反应, 反应程度呈剂量相关性, 但无一例患者出现针对转基因产物的免疫反应^[9], 与上述血友病临床结果非常相似。该不良反应的报道揭示细胞免疫毒性的发生可能并不局限于某一种血清型 rAAV 载体。

2 对 rAAV 基因药物细胞免疫毒性的认识

针对 rAAV 基因药物的细胞免疫毒性进行的大量基础研究, 纠正了人们之前对其免疫毒性认识的偏差。特别是对由 AAV 衣壳蛋白激活的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的起源及免疫反应的发生过程有了明确的认识。

2.1 细胞免疫毒性的原因

人是 AAV2 病毒的唯一宿主, 其他种属动物不可能感染 AAV2。Manno 等推测发生细胞免疫毒性的患者曾经感染过非致病性 AAV2 病毒, 当时又恰好被辅助病毒所感染, 在体内形成了被 AAV2 病毒和辅助病毒同时致敏的记忆 CD8⁺ T 细胞。当患者应用

rAAV2 基因药物后, 记忆 CD8⁺ T 细胞被激活, 并大量扩增为 CTL, 与肝细胞表面抗原肽-MHC 复合物 (pMHC) 结合, 继而裂解肝细胞^[5]。随后在健康人群进行的研究表明, 半数以上的人体内存在针对 AAV2 衣壳蛋白的记忆 CD8⁺ T 细胞^[10, 11], 在用药后有可能激活细胞免疫反应。以前之所以普遍认为人体发生细胞免疫的可能性很小, 是因为临床常规测定记忆 CD8⁺ T 细胞的方法灵敏度太低而不能被检出。将检测方法适当改进, 如对 PBMC 进行反复增殖刺激^[10], 或 rAAV 的激活浓度增加 100 倍^[11], 阳性检出率显著提高。

2.2 衣壳蛋白抗原肽的递呈

抗原在细胞内的加工递呈一般按照经典途径进行: 内源性蛋白被加工为抗原肽后荷肽于 MHC-I 类分子, 以 pMHC-I 的形式转运并递呈至细胞表面, 即 MHC-I 类途径; 外源性输入蛋白的抗原肽则荷肽于 MHC-II 类分子, 即 MHC-II 类途径。非经典途径也称为交叉递呈途径, 即外源性抗原通过 MHC-I 类分子递呈, 而内源性抗原通过 MHC-II 分子递呈, 一般认为该途径的应用较为罕见, 且主要发生在树突细胞 (DC)。

在构建 rAAV 基因药物时, 已经剔除了与其衣壳蛋白编码和加工有关的所有病毒基因 (图 1), rAAV 在靶细胞内仅表达转基因, 不应当再表达衣壳蛋白, 所以按照经典途径难以解释 AAV 衣壳蛋白抗原的递呈。Mingozzi 等^[10]认为在人体内, 任何有核细胞均可通过非经典递呈途径处理外源性蛋白并递呈至细胞表面, 然后激活记忆性 T 细胞。Pien 等^[12]采用可溶性 T 细胞受体 (TCR) 多聚体技术, 首次观察到在肝细胞表面递呈的 rAAV 衣壳蛋白 pMHC-I, 为外源性输入 rAAV 抗原的交叉递呈提供了直接的证据。但在小鼠体内进行的实验表明, 经转基因手段内源性表达 AAV 衣壳蛋白的肝细胞可以激活 CTL 并被裂解, 而外源性输入的 rAAV 衣壳蛋白虽可能以交叉递呈途径激活 CTL, 但不足以引起细胞的裂解^[13-15], 说明即使存在非经典途径递呈抗原, 其加工和递呈抗原肽的效率也明显低于经典途径。

2.3 外源性 rAAV 衣壳蛋白假说

不含任何基因组, 因而不能表达任何转基因的空壳 rAAV 在转导肝细胞后, 可以形成 pMHC 并被递呈至细胞表面, 激活 CTL 并裂解肝细胞, 有力地支持了引起肝细胞免疫毒性的抗原来自输入性 rAAV 衣壳蛋白的假说。遗憾的是上述实验仅在细胞水平进行, 迄今为止无一动物实验能够模拟血友病临床

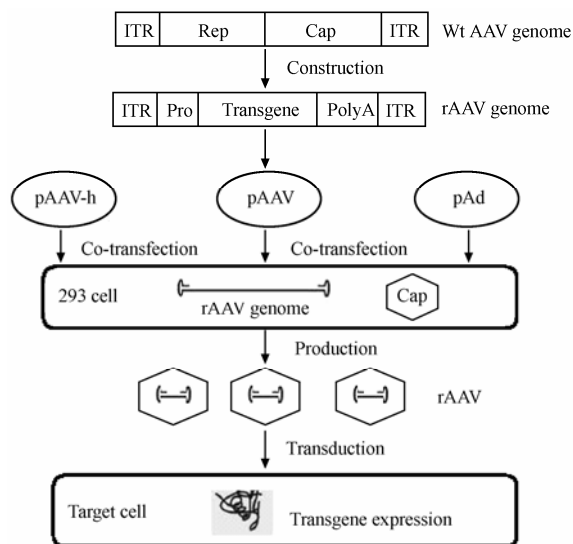


Figure 1 Diagram of the construction, production and transduction of rAAV. The wild type AAV is a single stranded DNA virus whose genome is flanked by two inverted terminal repeats (ITRs). The genome contains two ORFs, that encoding the nonstructural (Rep) and structural (Cap) viral proteins. Recombinant AAV (rAAV) vectors are derived from the wild type virus by replacing the *rep* and *cap* genes with the transgene associated with its transcriptional control elements, such as promoter (Pro) and PolyA tails. The rAAV vectors are usually produced by the triple plasmid co-transfection system that contains rAAV vector plasmid (pAAV), AAV-helper plasmid (pAAV-h), Ad-helper plasmid (pAd) and HEK293 cells. The pAAV-h encodes the Rep and Cap proteins required to make infectious virions, and the pAd encodes the adenovirus genes required for producing AAV in 293 cells. The 293 cell contributes adenovirus E1A and E1B proteins, which are stably expressed and essential for packaging virions. From this triple plasmid transfection system, replication-deficient rAAV virions are produced. The transduction of target cells by rAAV has been used to deliver potentially therapeutic genes. Efficient and long-term expression of transgene in patients has been achieved in several clinic trials

研究表现出的细胞免疫毒性^[13-15]。Li 等^[16]推测人和动物对 rAAV 的免疫反应程度有所不同, rAAV2 衣壳蛋白本身在小鼠体内的免疫源性太弱, 因此将具有强免疫源性的白蛋白抗原肽重组进 rAAV2 衣壳蛋白内, 致敏小鼠经注射给药后, 转基因表达水平明显降低, 而转氨酶活性明显升高, 基本再现了临床毒性的表现。但该重构衣壳蛋白是否能够真正模拟原 rAAV2 衣壳蛋白的体内行为尚不得而知。

因非经典途径的抗原递呈效率很低, 输入性 rAAV 衣壳蛋白是否真正是细胞免疫毒性的原因成为人们争论的焦点。从临床上发生细胞免疫毒性的时间考虑, 衣壳蛋白含量的巅峰期应是用药的初期, 而不是发生细胞免疫反应的用药后 4~6 周。从肝细胞

表面 pMHC 复合物的数量分析, 临床用量的 rAAV 基因药物也不足以引起细胞免疫反应。Vandenberghe 等基于现有数据进行了估算, 得出血友病患者每个肝细胞表面可能出现的 pMHC 复合物最多为 8~32 个^[17], 尚未达到致敏 T 细胞所需的 40~400 个 pMHC 复合物/细胞的最低要求。而 Pien 等进行的证明发生交叉递呈的细胞试验, 使用 rAAV 的剂量高出临床用量近 1 000 倍^[12]。

2.4 内源性 AAV 衣壳蛋白假说

引发 T 细胞免疫反应的抗原肽来自内源性产生的 AAV 衣壳蛋白, 是人们提出的另一种假设。即在生产 rAAV 载体的过程中, 可表达衣壳蛋白的辅助质粒被误包装或重组成为可复制性 AAV (rcAAV), rcAAV 转导肝细胞后源源不断地表达衣壳蛋白, 抗原肽通过经典的 MHC-I 类途径加工、荷肽和递呈。内源性蛋白的大量表达需要一段时间的启动, 所以可以解释为什么细胞免疫反应发生在用药后 4~6 周。抗原的连续表达也解决了 pMHC 复合物的最低量要求。动物实验显示的只有内源性表达衣壳蛋白的肝细胞才被 CTL 所裂解的结果^[13-15], 则很容易通过该假设得到解释。Allen 等^[18]早在 1997 年就发现了 rcAAV 的污染问题, 平均污染率在 1%左右, 其原因被推测为包装过程中的非同源重组。之后其他课题组也报道了类似的现象, 动物体内用药后可在多种组织中检出 rcAAV 序列^[19, 20], 间接支持了该假说。

Hauck 等则认为该假说并不成立, 因为痕量的衣壳蛋白 DNA 不能被有效转录, 对 pMHC 复合物的形成贡献甚微^[21], 他们采用血友病临床研究的同批药品转导肝细胞, 以临床剂量 26 倍的用量给小鼠注射, 未检出衣壳蛋白的表达^[22]。

3 应对 rAAV 细胞免疫毒性的可能策略

rAAV 的细胞免疫毒性问题的解决, 可以从免疫调节、载体优化和提高药物纯度从而降低与抗原有关的杂质等方面进行尝试。

3.1 免疫调节策略

3.1.1 应用免疫抑制剂 他克莫司已被证实可以抑制 T 淋巴细胞活化, 霉酚酸吗啉乙酯 (MMF) 则通过抑制核酸合成阻止活化 T 细胞的增殖, 两者合用是临床常见的 T 细胞免疫抑制方案。Jiang 等^[23]试图利用非人灵长类动物恒河猴模拟血友病临床的毒性反应, 并采用该 T 细胞免疫抑制方案验证免疫抑制的有效性。因恒河猴是 AAV8 的天然宿主, 他们推断恒河猴体内可能存在针对 AAV8 的记忆 T 细胞, 所

以采用的药物以 rAAV8 为载体。很遗憾该试验未能出现细胞免疫毒性, 但 T 细胞免疫抑制方案的安全性得到了确认, 转基因的表达也未受任何影响。

环孢素通过抑制 T 细胞激活和增殖必需的信号通路发挥免疫抑制作用, 与 MMF 在免疫抑制方面具有很好的协同作用。正常犬短期应用环孢素和 MMF 可以抑制肌肉注射 rAAV6 基因药物后引起的针对衣壳蛋白的细胞免疫反应, 但在杜氏肌营养不良症 (DMD) 模型犬则未获得成功^[24], 其原因可能是患病肌肉内与 T 细胞激活有关的 MHC 分子、各种趋化因子和 T 细胞共刺激因子等的表达均显著上调, 形成了高致敏环境。在首先应用具有 T 淋巴细胞选择性排空功能的抗胸腺细胞球蛋白后, 再短期应用环孢素和 MMF, DMD 模型犬针对 rAAV6 衣壳蛋白的细胞免疫反应得到抑制, 转基因可以长期持续表达^[24]。但合并应用 MMF、西罗莫司和抗 CD-25 单克隆抗体赛呢派的免疫抑制方案却导致针对转基因产物抗体的产生, 同时调节性 T 细胞数量也急剧减少^[25]。所以免疫抑制策略的应用必须仔细设计, 并根据患者免疫反应状态及时调整。

3.1.2 应用 TCR 多聚体 CTL 通过 TCR 特异性地辨识在靶细胞表面递呈的 pMHC, 并专属性地与靶细胞结合。因 TCR 与 pMHC 的结合具有高专属性和灵敏度, 起初 TCR 多聚体被用做定量检测 APC 表面抗原的递呈^[26], 之后又发现其可以抑制 CD8⁺ T 细胞的活化^[27], 为细胞免疫的调节提供了新思路。Pien 等首次报道可溶性 TCR 多聚体还可以阻断 CTL 对靶细胞的裂解^[12], 阻断效果呈现剂量依赖性, 说明有可能将其开发成为新型特异性细胞免疫抑制剂。

3.1.3 应用蛋白酶体抑制剂 蛋白酶体抑制剂通过抑制衣壳蛋白在细胞内的降解, 可以减少 pMHC 的递呈, 因而避免 CTL 对靶细胞的辨识和裂解。Pinn 等^[28]应用蛋白酶体抑制剂硼替佐米处理 rAAV 转导的肝细胞, 可以剂量依赖性地减少 pMHC 的递呈。对于用抗原肽致敏的肝细胞, 硼替佐米减少其抗原递呈的作用不明显, 说明其确实是影响了衣壳蛋白在细胞内的降解, 而不是抗原肽的荷肽和递呈。值得一提的是, 硼替佐米抑制衣壳蛋白在细胞内降解的有效浓度为 30~100 nmol·L⁻¹, 远远小于其抑制肿瘤细胞生长的浓度 300 nmol·L⁻¹, 有利于降低不良反应的产生。另外, 蛋白酶体抑制剂还可以诱导活化和增殖 T 细胞的凋亡, 抑制人 CD4⁺ T 细胞的免疫功能^[29-31], 这些性质都有利于其用以减少 rAAV 有关的免疫反应的发生。

3.2 载体优化策略

3.2.1 选用不同的载体 Vandenberghe 等认为 DC 摄取是决定载体能否激活 CTL 的关键因素。DC 细胞是体内功能最强、唯一既能活化静息 T 细胞、又能活化记忆 T 细胞的专职抗原提呈细胞, 是启动、调控和维持免疫应答的中心环节。载体结构中是否含有能与 DC 细胞表面受体硫酸肝素糖蛋白 (HSPG) 特异结合的结构域, 决定了其引起细胞免疫反应的强弱。AAV2 衣壳蛋白 VP3 的第 585~588 位氨基酸残基 RXXR, 是 HSPG 结合位点。基于 AAV2 以及含有 RXXR 结构的 AAV 分支 B 的血清型 AAV-hu.51 得到的 rAAV 载体, 经肌肉注射可引起细胞免疫反应, 而不含 RXXR 结构的 rAAV7 和 rAAV8 的细胞免疫源性则小很多^[32]。将 AAV2 中 RXXR 更换为 SGNT 后, 其细胞免疫反应明显降低。当把 AAV8 的 QQNT 序列更换为 RXXR 后, 其细胞免疫源性大大增强。所以他们建议采用 rAAV8 等载体进行经肝脏给药的基因治疗。Lu 等也证明 rAAV8 载体的免疫源性明显低于 rAAV1^[33]。美国 2007 年底批准的血友病基因治疗临床方案, 采用的载体即改用 rAAV8^[34]。但 Mingoizzi 等^[10]则认为 T 细胞抗原决定表位是相对保守的, 难以通过载体转换避免细胞免疫的发生。他们用不同的 AAV 衣壳蛋白刺激健康人 PBMC, 发现人细胞加工和递呈的抗原决定表位是相同的, AAV2 衣壳蛋白激活的 CD8⁺ T 细胞对 AAV1 和 AAV8 同样有功能。另外, 他们认为 DC 的抗原递呈对激活记忆 CD8⁺ T 细胞并不必需。临床试验表明 rAAV1 载体确实也可以引起同样的细胞免疫毒性^[9]。

rAAV 进入细胞后, 其衣壳蛋白上的酪氨酸残基在内体 (endosome) 酸性环境下外露, 由 EGFR-PTK 信号通路介导磷酸化后继续被泛素化, 在之后的胞内转运过程中被蛋白酶体所辨识并降解。将酪氨酸残基定点突变, 可以使 rAAV 逃避泛素化, 因此减少蛋白酶体介导的胞内降解, 降低 pMHC 的递呈, 减轻 CTL 细胞的裂解作用^[35]。酪氨酸定点突变后的 rAAV2 体内外比活性可以提高 10 倍, 也有助于降低抗原的负荷。

3.2.2 应用自身互补型 rAAV 载体 rAAV 基因药物在转导细胞后, 其基因组从单链转变为双链的过程是基因表达效率的关键^[36]。自身互补型 rAAV (scrAAV) 载体基因组本身以双链形式存在, 无论在起效时间还是表达强度上都较单链 rAAV 有明显改善, 可以提高表达效率 10 倍以上, 为大幅度减少用

药剂量提供了可能,可显著降低因输入过多抗原所诱发的免疫反应。Buie 等^[37]的研究表明,对于普通 rAAV2 载体难以转导的小梁细胞,scrAAV 载体也可以顺利转导,起效时间仅需 4 天,在大鼠和猴体内分别长达 3.5 个月和 2.35 年的实验期内,未见任何体液和细胞免疫反应。前述新批准的血友病基因治疗临床方案,除载体采用 rAAV8 外,基因组也改用了自身互补的双链基因组^[34]。

3.2.3 应用 microRNA 技术 为进一步降低肝毒性,本课题组将肝特异性 microRNA 结合序列引入 rAAV 辅助质粒 *cap* 基因的 3' UTR 区域,籍以控制 rcAAV 在肝细胞内表达衣壳蛋白^[38]。在哺乳动物细胞中,microRNA 最初由 RNA 聚合酶 II 转录产生,形成长的原初转录物,然后在核内由 RNase III (Drosha) 降解成具有发夹样结构的 pre-microRNA。pre-microRNA 通过核转运受体 Exportin 5 从细胞核转移到细胞质。在细胞质内,pre-microRNA 通过 DCR 酶剪切成具有双链的 RNA,其中一条最后成为成熟的 microRNA 并最终进入 RISC 复合物,RISC 复合物结合到靶基因的 mRNA 的 3' UTR 从而发挥基因沉默作用^[39]。肝特异性 microRNA 结合序列的引入对 rAAV 的包装和细胞转导均无明显影响,但肝细胞内由 rcAAV 导致的衣壳蛋白的表达几乎完全得到抑制^[38]。

3.3 纯度提高策略

3.3.1 降低空壳 rAAV 含量 按照常规色谱纯化工艺所得到的 rAAV 产品中,空壳 rAAV 的含量可高达 50%~90%以上^[40]。按照抗原来源的第一种假说,相当于输入体内抗原的负荷增加了 1~9 倍。在小规模制备时,一般利用空壳与实心 rAAV 密度的不同,通过超速梯度离心进行分离,但规模化制备则很难采用离心工艺。Qu 等基于空壳 rAAV 与实心 rAAV 表面电荷的细微差异,在纯化过程中利用阴离子交换层析技术,可以将空壳 rAAV 含量减小 86 倍^[41],为提高 rAAV 纯度提供了可行工艺。

3.3.2 减少 rcAAV 的产生 按照抗原来源的第二种假说,rAAV 基因药物中污染的 rcAAV 是导致细胞免疫毒性的关键。在 rAAV 基因药物中检出 rcAAV 的污染^[18],动物体内用药后在多种组织中检出 rcAAV 序列^[19, 20]的报道提示该假说也颇具合理性。AAV 对基因组的大小有严格限制,如超过 4.7 kb 就很难包装为病毒颗粒,本课题组在辅助质粒的 AAV 基因 *rep* 和 *cap* 表达框内插入一定的内含子,使得辅助质粒基

因组的大小远远超出了 AAV 的包装容量而不被误包装,rcAAV 的污染可以降低 2~3 个数量级^[42]。

4 结论

最近 rAAV 基因药物在先天性黑内障临床研究中取得的巨大成功,再次激发了 rAAV 基因药物的研发与临床应用的热情^[2, 3]。但 rAAV 基因药物的临床研究仍处于初级阶段,特别是近期临床研究所暴露的细胞免疫毒性^[5, 9],给我们再次敲响了安全的警钟。rAAV 基因药物细胞免疫毒性来源于衣壳蛋白已不存争议,但作为抗原的衣壳蛋白的源头尚无定论。衣壳蛋白抗原以 pMHC I 的形式递呈虽得到实验证实,但抗原在细胞内的加工、转运、荷肽等过程尚不清楚。缺乏合适的动物模型进行该毒性的验证的现状,既强调了实验动物与人的差异^[43-45],又强调了临床前研究向临床的过渡必须慎而又慎。本文针对细胞免疫毒性提出的多种方案的效果,虽然分别在人体、动物或细胞水平得到了初步检验,但是否真正能行之有效地克服 rAAV 基因药物潜在的细胞免疫毒性,还必须在今后临床研究中进行验证。

References

- [1] Alberts B. The breakthroughs of 2009 [J]. Science, 2009, 326: 1589.
- [2] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis [J]. N Engl J Med, 2008, 358: 2240-2248.
- [3] Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis [J]. N Engl J Med, 2008, 358: 2231-2239.
- [4] Diao Y, Xu RA. Oral recombinant adeno-associated virus gene medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 703-709.
- [5] Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response [J]. Nat Med, 2006, 12: 342-347.
- [6] Wang L, Calcedo R, Nichols TC, et al. Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy [J]. Blood, 2005, 105: 3079-3086.
- [7] Nathwani AC, Davidoff AM, Hanawa H, et al. Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus

- encoding the hFIX gene in rhesus macaques [J]. *Blood*, 2002, 100: 1662–1669.
- [8] Arruda VR, Stedman HH, Nichols TC, et al. Regional intravascular delivery of AAV-2-FIX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model [J]. *Blood*, 2005, 105: 3458–3464.
- [9] Mingozzi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells [J]. *Blood*, 2009, 114: 2077–2086.
- [10] Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 419–422.
- [11] Madsen D, Cantwell ER, O'Brien T, et al. Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1 [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90: 2622–2633.
- [12] Pien GC, Basner-Tschakarjan E, Hui DJ, et al. Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119: 1688–1695.
- [13] Wang L, Figueredo J, Calcedo R, et al. Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18: 185–194.
- [14] Li C, Hirsch M, Asokan A, et al. Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector-transduced cells coexpressing the AAV2 capsid *in vivo* [J]. *J Virol*, 2007, 81: 7540–7547.
- [15] Li H, Murphy SL, Giles-Davis W, et al. Pre-existing AAV capsid-specific CD8+ t cells are unable to eliminate AAV-transduced hepatocytes [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 792–800.
- [16] Li CW, Hirsch M, DiPrimio N, et al. Cytotoxic-T-lymphocyte mediated elimination of target cells transduced with engineering adeno-associated virus type 2 vector *in vivo* [J]. *J Virol*, 2009, 83: 6817–6824.
- [17] Vandenberghe LH, Wilson JM. AAV as an immunogen [J]. *Curr Gene Ther*, 2007, 7: 325–333.
- [18] Allen JM, Debelak DJ, Reynolds TC, et al. Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by non homologous recombination during AAV vector production [J]. *J Virol*, 1997, 71: 6816–6822.
- [19] Nony P, Chadeuf G, Tessier J, et al. Evidence for packaging rep-cap sequences into AAV-2 capsids in the absence of the inverted terminal repeat: a model for the generation of rep+ AAV particles [J]. *J Virol*, 2003, 77: 776–781.
- [20] Chadeuf G, Ciron C, Moullier P, et al. Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adenoassociated virus production and their *in vivo* persistence after vector delivery [J]. *Mol Ther*, 2005, 12: 744–753.
- [21] Hauck B, Murphy S, Liu X, et al. Trace capsid DNA impurities in AAV2 vectors are not transcribed and are unlikely to contribute to capsid peptide-MHC class I complexes [J]. *Blood*, 2007, 110: 090A.
- [22] Hauck B, Murphy S, Smith PH, et al. Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for preformed capsid in immune responses [J]. *Mol Ther*, 2009, 17: 144–152.
- [23] Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, et al. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy [J]. *Blood*, 2006, 108: 3321–3328.
- [24] Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 1160–1166.
- [25] Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, et al. Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver [J]. *Blood*, 2007, 110: 2334–2341.
- [26] Subbramanian RA, Moriya C, Martin KL, et al. Engineered T-cell receptor tetramers bind MHC-peptide complexes with high affinity [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1429–1434.
- [27] Laugel B., Boulter JM, Lissin N, et al. Design of soluble recombinant T cell receptors for antigen targeting and T cell inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 1882–1892.
- [28] Pinn JD, Hui DJ, Downey HD, et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid-derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction [J]. *Mol Ther*, 2010, 18: 135–142.
- [29] Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, et al. The proteasome and its inhibitors in immune regulation and immune disorders [J]. *Crit Rev Immunol*, 2006, 26: 487–498.
- [30] Berges C, Habersack H, Fuchs D, et al. Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4+ T cells [J]. *Immunology*, 2008, 124: 234–246.
- [31] Nencioni A, Garuti A, Schwarzenberg K, et al. Proteasome

- inhibitor-induced apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36: 681–689.
- [32] Vandenberghe LH, Wang L, Somanathan S, et al. Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid [J]. *Nat Med*, 2006, 12: 967–971.
- [33] Lu Y, Song S. Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17158–17162.
- [34] Wang QZ, Lü YH, Xiao WD, et al. The clinical researches of recombinant adeno-associated vector [J]. *J Chin Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2010, 30: 73–79.
- [35] Zhong L, Li BZ, Mah CS, et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 7827–7832.
- [36] Lv YH, Wang QZ, Xiao WD, et al. Trends in development of self-complementary adeno-associated virus vector [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2009, 25: 658–664.
- [37] Buie LK, 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 Vis Sci*, 2010, 51: 236–248.
- [38] Xu RA, Xiao WD, Lu H. A HAAVmir gene containing a novel cell specific microRNA binding domain used for gene therapy: China, 200910136134.5 [P]. 2009-09-16.
- [39] Wang QZ, Xu W, Habib N, et al. Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9: 572–594.
- [40] Sommer JM, Smith PH, Parthasarathy S, et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement [J]. *Mol Ther*, 2003, 7: 122–128.
- [41] Qu G, Bahr-Davidson J, Prado J, et al. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome-containing vector by anion-exchange column chromatography [J]. *J Virol Methods*, 2007, 140: 183–192.
- [42] Cao L, Liu Y, During MJ, et al. High-titer, wild-type free recombinant adeno-associated virus vector production using intron-containing helper plasmids [J]. *J Virol*, 2000, 74: 11456–11463.
- [43] Kapliot MG, Feigin A, Tang C, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial [J]. *Lancet*, 2007, 369: 2097–2105.
- [44] Lang KS, Georgiev P, Recher M, et al. Immunoprivileged status of the liver is controlled by toll-like receptor 3 signaling [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116: 2456–2463.
- [45] Nguyen DH, Hurtado-Ziola N, Gagneux P, et al. Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7765–7770.