

口服重组腺相关病毒基因药物

刁 勇*, 许瑞安

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

摘要: 重组腺相关病毒 (rAAV) 载体介导的口服基因药物引起业界广泛的重视。尽管经口服给药后转基因的有效表达面临许多障碍, 但该技术的有效性已得到大量实验证实。本文总结了口服 rAAV 基因药物的临床前研究结果, 重点阐述了该类型药物的传递、吸收、分布和基因转导等药动学特点。已证实 rAAV 基因药物对人体的安全性高, 但口服 rAAV 基因药物的临床应用仍需对其作用机制和生物药剂学特征进行深入和广泛的研究。

关键词: 口服给药; 基因药物; 腺相关病毒

中图分类号: R91

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0703-07

Oral recombinant adeno-associated virus gene medicine

DIAO Yong*, XU Rui-an

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

Abstract: The efficacy of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-mediated gene delivery to the gastrointestinal tract has been paid a considerable attention over the last 10 years, since our first report on the oral gene pill strategy in Nature Medicine, even though there are still several potential obstacles for this route to overcome in order to obtain efficient gene delivery. The preclinical results of oral rAAV gene medicine are summarized in this review, and special attention is paid on its pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects with an emphasis on drug delivery, absorption, distribution and transduction. The rAAV based vectors have been shown promising results in human clinical trials with fewer safety concerns over other gene medicines. However, the underlying mechanisms and biopharmaceutical features of oral rAAV gene medicine remain to be explored extensively and intensively to develop this novel technology as a treatment for a wider range of diseases.

Key words: oral delivery; gene medicine; adeno-associated virus

虽然基因药物研究遭遇的困难超过预期, 但近期临床研究取得的进展预示了其发展前景^[1, 2]。基因药物在临床研究中大多采用注射给药, 病人痛苦、费用昂贵、安全性低。而口服给药方便安全、费用低廉、病人依从性高, 所以基因药物口服给药一直是本领域研究人员孜孜以求的目标。临床和临床前研究结果显示, 口服基因药物可用于胃肠道疾病和系统性疾病的治疗^[1]。口服基因药物载体的选择取决于治疗的

目的和载体的性质。人们曾采用壳聚糖^[3]、脂质体^[4]、反转录病毒^[5]、慢病毒^[6]、疱疹病毒^[7]和腺病毒^[8]等载体进行了大量尝试, 发现不同载体各有特点。腺病毒载体转基因表达时间短, 适用于炎症等急性疾病的治疗^[9]。而对于糖尿病或肿瘤等慢性病的治疗, 则需要转基因的长期表达。反转录病毒可以介导转基因的长期表达, 并仅转导 M 期细胞, 理论上特别适合转导处于增殖状态的胃肠道上皮细胞。但在动物体内转基因表达不尽人意, 其原因可能是载体中前病毒序列的选择性甲基化所致^[10]。重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体因具有无致病性、低免疫原性、能介导外源基因长期表达

收稿日期: 2008-12-16.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2008AA02Z135).

*通讯作者 Tel: 86-595-22692516, Fax: 86-595-22690952,
E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

和宿主范围广泛等特点,被认为是最有发展前景的基因治疗载体。目前在世界范围内有 60 项 rAAV 基因药物进入临床研究阶段,部分已取得了阶段性结果^[2]。

本课题组首次进行了口服 rAAV 载体的可行性研究,乳糖不耐受大鼠口服基因药物后,转基因可在肠道深层细胞长期表达,并显著提高了大鼠消化和吸收乳糖的能力^[11]。之后有关口服 rAAV 基因药物药效学的实验研究陆续得到报道,涉及的疾病包括癫痫和中风^[12]、结肠炎^[13]、肿瘤^[14–16]、贫血^[17]、糖尿病^[18–20]、阿尔茨海默病^[21]和艾滋病^[22]等。大部分实验取得了可喜的结果,同时也暴露了存在的问题,即前期研究仅重视 rAAV 载体和基因表达框的筛选和优化,而忽视了 rAAV 基因药物的生物药剂学特征的研究,造成不同实验室的实验结果不尽一致, rAAV 基因药物的口服给药技术和条件还存在许多潜在的问题需要深入探讨。基因药物口服吸收和表达的生物药剂学特征,是影响其体内疗效的重要因素,也是制约其剂型设计和临床应用的关键问题。 rAAV 基因药物如何突破胃肠道屏障,其细胞摄取、转运和表达的时空过程及影响因素,以及能否通过制剂学手段提高其生物利用度等一系列基础问题,引起基因药物研究人员的重点关注,并作为今后努力的方向。

本文总结了口服 rAAV 基因药物临床前研究结果,介绍了经胃肠道转运、摄取和吸收的通道和机制、组织和细胞分布、以及胞内转导等药动学特征,认为今后应当加强 rAAV 基因药物的生物药剂学研究,以便为临床研究的开展奠定扎实的基础。

1 口服 rAAV 基因药物的药效学

1.1 消化道局部疾病治疗

1995 年首次提出口服基因药物的设想,世界上第 1 个口服基因药物专利在美国注册^[23],并在 1998 年报道了 rAAV 基因药物口服后可以矫正乳糖不耐受症^[11]。可表达抑癌基因 FHIT 的 rAAV 基因药物口服后,可以预防致癌物 NMBA 诱导的食道癌和胃癌的发生,肿瘤的发生与发展明显受到抑制^[14]。更有意义的是,口服 rAAV-FHIT 还可有效抑制食道肿瘤的生长,部分肿瘤甚至发生消退^[15]。Polyak 等^[13]进行了结肠炎基因治疗的动物实验,发现不同血清型 rAAV 载体对结肠上皮细胞的亲嗜性和转导效率存在明显差异,其原因可能是不同血清型 rAAV 的细胞受体有所不同。经口服和灌肠途径给药后均未在小鼠结肠细胞中检出基因表达,与本课题组前期的实验结果一致^[11]。

1.2 系统性疾病的治疗

口服 rAAV 基因药物不仅在消化道局部性疾病动物模型取得了成功,在糖尿病^[18–20]、肝癌^[16]和贫血^[17]等全身性疾病的基因治疗研究同样取得了显著的疗效。STZ 糖尿病模型大鼠在口服 rAAV-insulin 后,血糖水平在 12 h 即从 30 mmol·L⁻¹ 下降至 2~6 mmol·L⁻¹ 的低血糖状态,必须在饮水中补充葡萄糖以维持动物的正常活动^[18]。之后 2~3 d,由于阳性肠上皮细胞的自然脱落,胰岛素表达水平降低,表现为血糖重新升高。在服药 4 周后,血糖水平又从 30 mmol·L⁻¹ 下降至 12 mmol·L⁻¹,此时肝细胞成为转基因胰岛素表达的主要器官。Hsu 等^[20]的研究表明,口服 rAAV 基因药物可转导小肠内分泌细胞 K-细胞,并长期分泌胰岛素至血液系统中,STZ 诱导糖尿病小鼠的死亡率明显下降。小鼠口服基因药物 rAAV-sTRAIL 后,抑制了肝癌皮下移植瘤小鼠的肿瘤生长^[16]。

1.3 基因疫苗

rAAV 还可以作为口服疫苗的载体。 β 淀粉样前体蛋白转基因小鼠在口服阿尔茨海默病 rAAV 疫苗后,肠上皮细胞可分泌 A β 1-43 或 A β 1-21 多肽,并在 6 个月内维持抗体的高水平产生,小鼠脑内 β 淀粉样负荷明显降低^[21]。BALB/c 小鼠口服编码 HIV 病毒 env 基因的 rAAV-HIV 疫苗后,在小肠和引流淋巴结中均检出 HIV mRNA 的表达^[22]。在免疫 2 个月后,血清中检出高滴度的 IgG,粪便中检出高滴度的 IgA。口服 rAAV-HIV 疫苗不仅可以诱导体液免疫,还可以诱导细胞和黏膜免疫。这三重免疫反应对 AIDS 等严重感染性疾病的预防具有重要意义。小鼠在口服 rAAV-HIV 后,经直肠给与的 HIV 病毒负荷可以显著降低^[22],提示该疫苗完全有可能成为有效防治 AIDS 的口服疫苗。

把 NMDA 受体的 NR1 亚单元基因克隆至 rAAV 载体,大鼠口服后可持续表达 NR1 亚单元蛋白达 5 个月,并诱导相应自身抗体的产生^[12]。在 9 只由海人藻酸诱导的颞叶癫痫模型大鼠中,7 只未发生癫痫反应,2 只脑电图表现为癫痫发作,仅 1 只发生了海马区细胞损伤和凋亡。而对照组大部分大鼠出现了癫痫发作,癫痫发作鼠均出现了海马区细胞损伤和凋亡。在由内皮素-1 诱导的中脑动脉阻塞模型,口服 rAAV 基因疫苗也表现出极好的防御中风和神经损伤的作用^[12]。

2 口服 rAAV 基因药物的药动学

2.1 胃肠道内传递

胃肠道内环境因素,如食物、pH、黏液、消化酶、胆酸、菌群、细胞代谢与更新、细胞间连接和免疫细

胞等均可能对口服 rAAV 基因药物的体内稳定性和表达效率产生重大影响。

在长期的进化过程中, 野生型 AAV 获得了在胃肠道生存和增殖的能力, 在一定程度上抵御 pH 和酶的破坏。如在 pH 降低时, 原本包裹在病毒衣壳内部的衣壳蛋白 VP1 和 VP2 的 N 端碱性氨基酸序列将外露出来, 提高了病毒在酸性环境的稳定性。而 rAAV 基因组 DNA 体积如过大或过小, 相应序列发生突变等会阻碍衣壳构象的转变, 稳定性也大大降低^[24]。

早期 rAAV 细胞内跟踪研究表明, rAAV 基因药物入膜的时间为 5 min, 入核最快时间为 30~45 min。在空腹状态下, 药物从胃部进入肠道的时间远小于 4 h, 在口服给药后不同时间点经大鼠肝门静脉取血, PCR 检测发现给药后 1 h 就有 rAAV 存在, 3 h 达到高峰, 并维持到 6 h, 直至 8 h 才开始回落^[18]。上述实验表明 rAAV 在口服后可迅速地进入肠道, 被细胞摄取并传递至门静脉, 从而有效地避开胃肠道内环境的破坏。

2.2 口服吸收通道

胃肠道拥有近 300 m² 的黏膜表面, 肠上皮中含有多种不同性质和功能的细胞, 如吸收性肠细胞、杯状细胞、内分泌细胞和 Peyer 氏结 (PPs) 中的 M 细胞等。大量的肠上皮细胞是转基因潜在的加工厂。肠管的淋巴组织, 如上皮内淋巴细胞、固有层淋巴滤泡和 PPs, 是基因黏膜免疫的良好入口。因而经口传输是基因治疗和基因免疫颇具潜力的方法。基因药物经胃肠道给药后可以通过以下途径实现转基因的体内表达 (图 1)^[25]: 直接转导肠上皮细胞; M 细胞转运; 跨上皮细胞转运; 细胞旁路转运; 淋巴细胞主动摄取等。

2.2.1 直接转导肠上皮细胞 野生型 AAV 经受体介导的胞吞作用感染细胞, rAAV 基因药物的细胞转导同样需要受体的参与。血清型 AAV-2 的主要受体为硫酸肝素蛋白多糖 (HSPG), I 型成纤维细胞生长因子受体 (FGFR1) 和 $\alpha V\beta 5$ 整合素是辅助受体。主要受体和辅助受体的共同作用导致 AAV-2 的有效感染。HSPG 广泛存在于小肠上皮细胞及细胞基质, 为 rAAV-2 的有效转导提供了可能^[26]。肠上皮细胞可以被 rAAV-2 载体转导, 在服药后 3 d 大量表达转基因, 之后随着自然脱落, 阳性上皮细胞数量迅速减少^[11, 12]。血清型 AAV-5 的主要细胞受体为唾液酸^[27], 血小板衍生生长因子受体 (PDGFRs) 则是其辅助受体载体^[28]。Caco-2 细胞因缺乏 PDGFRs 而不能被 rAAV-5 有效转导, 但在稳定表达 PDGFRs 后, rAAV-5

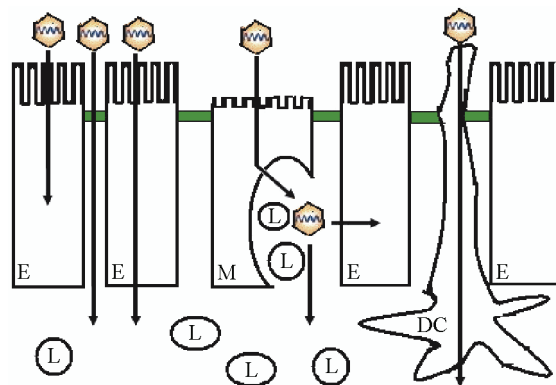


Figure 1 Schematic depiction of the pathways available for oral rAAV gene medicine absorption. 1: Direct transduction of the epithelial cells; 2: Paracellular pathway (in between adjacent cells). In order to open this pathway, it is necessary to alter or disrupt the tight junctions that exist between cells; 3: Transcellular pathway (through the epithelial cells); 4: M cell mediated transport; 5: Direct uptake by dendritic cells. E: Epithelial cells; M: M cells; DC: Dendritic cells; L: Lymphocytes

转导 Caco-2 细胞的效率得以明显提高^[28]。

2.2.2 M 细胞转运 M 细胞是存在于 PPs 中肠黏膜淋巴滤泡相关上皮 (FAE) 内的一种特殊细胞。大量证据表明细菌、病毒和朊蛋白等多种病原体可经 M 细胞被肠相关淋巴组织所摄取^[29]。M 细胞的结构特点非常有利于其摄取功能的发挥。其表面糖被层较其他肠上皮细胞薄, 肠腔内物质容易接近。M 细胞顶面无刷状缘, 只有形态数量不等的微绒毛, 在微绒毛之间有较大的内吞区域。M 细胞包含免疫细胞的“袋型囊腔”结构 (图 1) 缩短了物质的转运距离。在 M 细胞内部呈广泛分布的肌动蛋白, 有助于迅速吞噬黏附其上的微生物。M 细胞内缺乏水解酶, 降低了被吞噬物质的水解。

rAAV 基因药物的直径为 20~22 nm, 与 M 细胞表面糖被层厚度基本一致, 有利于与 M 细胞表面的受体相结合而被主动摄取, 然后转运至肠组织深层, 转导固有层细胞, 甚至从侧底层转导肠上皮细胞 (图 1)。但 rAAV 载体是否主要经 M 细胞转运, 尚缺乏系统性的实验证明。Caco-2 细胞与 B 淋巴细胞共培养, 可以定向分化为 M 细胞的发现^[30], 为 rAAV 载体经 M 细胞转运机制的研究提供了可能。

2.2.3 跨上皮细胞转运 跨细胞转运是一种特殊的内吞作用, 内吞物从极化细胞的一端入胞后, 被快速和选择性地转运到相反的方向, 然后通过胞吐作用出胞。所以病毒的跨细胞转运并不造成肠上皮细胞的感染, 黏膜深层细胞才是其靶细胞^[31]。近期研究认为 M 细胞吞噬并不是微粒和病原体唯一的摄取途径,

肠上皮细胞的跨胞转运也可能发挥一定的作用。因与肠上皮细胞相比, M 细胞数量几乎微乎其微。Pasquale 等^[28]研究了 rAAV 载体对各种上皮和内皮细胞屏障的跨胞转运, 认为和细胞转导一样, 跨胞转运也经受体介导, 并具有载体血清型和细胞特异性, 但受体种类不同。在跨胞转运后, 载体仍然保持完整的病毒颗粒状态和细胞转导能力, 肠道深层固有层细胞的转染也许和该途径有关。

2.2.4 树突状细胞 (DC) 直接摄取 DC 的树突部分可以从上皮细胞间隙伸入肠腔, 直接摄取病原体^[32]。有证据表明羊痒病病毒即通过该途径被肠淋巴系统摄入^[33], 但 rAAV 是否从上皮细胞间隙被 DC 直接摄取尚待证实。

2.2.5 细胞旁路转运 胃肠道上皮细胞间虽连接紧密, 但该紧密连接却呈现动态行为, 肌动蛋白和肌球蛋白环的收缩、细胞外 Ca^{2+} 的螯合作用、磷酸酶 C 介导的调节作用都可以暂时松弛紧密连接, 微粒和病原体因而乘虚而入^[34]。口服制剂中辅料的选用, 如吸收促进剂和金属离子螯合剂等使用, 有可能改变上皮细胞的连接紧密状态, 从而影响 rAAV 基因药物口服后的吸收途径和效率。

2.3 组织或细胞分布

rAAV 基因药物口服后仅分布在胃、十二指肠和空肠上部, 尚未见结肠分布的报道。胃肠道上皮细胞仅短暂表达转基因, 固有层中髓源性细胞、树突状细胞和弥散神经内分泌系统 (DNES) 细胞是长期表达转基因的肠道细胞^[12, 18, 20, 22]。rAAV 载体在口服后可以经门静脉分布于肝脏^[18]。大鼠口服药物后 1 h, 在门静脉中检测出载体基因组, 在 3 h 其浓度达到峰值, 而在尾静脉血中非常微量。说明载体基因组经高度血管化的肠道摄入后, 可以迅速经门静脉传输至肝脏并有效地表达。

2.4 基因转导

对野生型 AAV 感染细胞的过程已了解地较为清楚^[35] (图 2), 即 AAV 首先结合于细胞膜表面受体, 然后被细胞内吞进入细胞内部, 在胞质内经内体转运抵达细胞核, 入核前 (或后) 脱壳, 正负链 DNA 聚合形成二聚体, 或以自身 DNA 为模板复制形成二聚体, 然后定点整合至第 19 号染色体中, 并表达病毒基因。rAAV 载体缺失了 *Cap* 基因和对染色体整合发挥关键作用的 *Rep* 基因, 其胞内过程可能与野生型 AAV 具有一定区别, 其胞内基因转导过程尚未达成共识。

基因药物临床实验结果不理想的主要问题在于不能靶向高效地转导靶细胞^[36], 同样口服 rAAV 基因

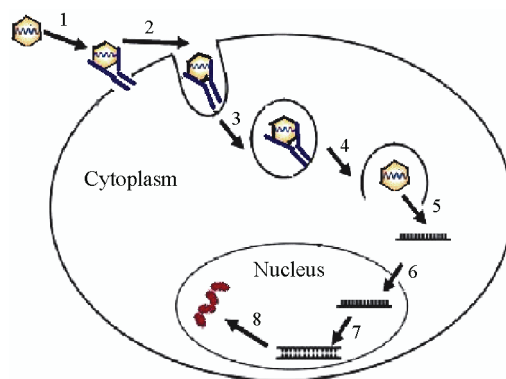


Figure 2 Schematic depiction of the eight steps of wild AAV transduction of host cells^[35]. 1: Binding to membrane receptors; 2: Endocytosis by the cell; 3: Intracellular trafficking through the endosomal compartment; 4: Escape from the endosome; 5: Virion uncoating; 6: Entry into the nucleus; 7: Viral genome conversion from a single-stranded to a double-stranded genome; and 8: Integrating into the host genome and expression the encoded genes

药物能否转导靶细胞并表达治疗水平的转基因产物, 是制约其疗效的关键。

口服 rAAV 基因药物的靶向转导, 可通过受体靶向、偶联靶向和转录靶向等多种手段而实现^[37]。单个氨基酸的不同即可以改变 AAV 的细胞亲嗜性和受体结合^[38]。目前已发现 12 种不同的 AAV 血清型及 100 多种亚型, 每种 AAV 的细胞亲嗜性和转染特性均有所不同。对 rAAV 载体的蛋白衣壳定点偶联靶向配基技术的改进, 为细胞水平的靶向传递提供了技术平台^[39]。Tang 等^[40]将 rAAV/insulin 转导人小肠内分泌细胞后, 转基因胰岛素的表达动态行为与内源性胰高血糖素样多肽-1 一致, 且分布符合内分泌特征, 但内分泌细胞仅占肠上皮细胞的 1%, 如何实现转基因的靶向传递成为研究的关键。Nian 等^[41]则报道采用高血糖素原启动子, 可实现转基因在肠分泌细胞的专属表达, 为解决肠分泌细胞的靶向转录提供了思路。

疾病治疗需要及时调整转基因的表达水平, 是长期基因治疗的要求, 基因表达框的优化有利于实现表达调控。如采用构成性延长因子 1 α 启动子 (EF1 α) 控制 AAV 载体表达胰岛素基因时, 在体外的表达效率是胰岛素 I 启动子 (RIP) 的 3~5 倍, 但动物口服后会迅速出现低血糖状态^[19]。而采用 RIP 启动子所表达的胰岛素原颗粒可以加工为成熟的胰岛素, 在细胞内储存后根据血糖水平及时释放, 更有利于实现血糖水平的即时调整^[19]。

3 口服 rAAV 基因药物的生物药剂学

虽然已在动物水平证明了口服 rAAV 基因药

物的可行性, 但仍有部分研究未能实现预计的结果^[13, 42]。研究人员往往把精力集中在基因表达载体本身的优化上, 而忽视了基因药物的药剂学研究。本课题组在研究中发现, 口服基因药物所采用的剂型、使用的辅料和给药途径等药剂学因素会对药物的疗效产生重要的影响。因此进一步研究口服 rAAV 基因药物的生物药剂学特点, 并规范口服技术, 应当引起研究人员的高度重视。

3.1 胃肠道降解作用

rAAV 基因药物在肠道 pH 条件下非常稳定, 但胃中较低的 pH 会降低其稳定性^[42]。在 pH 2 的条件下, 30 min 内药物活性即下降 50%, 但在 pH 3 时 30 min 内活性没有变化, 在 pH 4~7.4 内非常稳定, 4 h 内保持感染活力。胃酸中和剂的使用可保护 rAAV 基因药物免受胃中低 pH 的破坏作用, 蛋白酶抑制剂则可以抵御肠道胰凝乳蛋白酶和胰酶的降解。在处方中加入 NaHCO₃ 和蛋白酶抑制剂 (aprotinin), rAAV 基因药物的口服转导效率可以提高数倍。

3.2 食物因素

动物服药时胃内食物残留量的多寡, 会显著影响 rAAV 基因药物的药效。大鼠禁食 12 h, 尚有半数动物的胃内食物未充分排空, 此时口服 rAAV-furin 的有效率仅 50%^[18], 延长排空时间 (如禁食 24 h 后给药) 可以明显提高有效率。建议将空腹口服作为今后标准的临床给药方法。

3.3 药物凝聚作用

颗粒大小是经肠细胞吸收的关键因素。尽管直径大于 10 μm 的颗粒也可以被 M 细胞所吞噬, 但纳米级的小粒子吸收效率更高。rAAV 基因药物凝聚后, 微粒直径增大, 转导效率降低。在处方中加入 β 环糊精、糖类和表面活性剂, 可降低其凝聚趋向, 提高药物的稳定性。

3.4 细胞吸附

肠道表面的黏液层是药物吸收的天然屏障, 采用黏液溶解剂减少小肠黏液层的厚度和黏度, 有利于 rAAV 基因药物吸附于肠上皮细胞。小肠以黏液溶解剂十二烷基麦芽糖苷预处理, 口服转导效率可提高 7 倍^[20]。rAAV 基因药物表面带有大量的负电荷, 细胞表面糖链的负电荷对其发生排斥作用, 以阳离子聚合物处理后, 有助于药物吸附于肠细胞表面并吸收。

3.5 细胞转运作用

金属离子络合剂通过钙离子排空作用, 可以破坏细胞间紧密连接, 促进细胞间转运。表面活性剂既可以提高 rAAV 的稳定性, 又可以促进细胞间转运。但处方设计时必须关注细胞间转运的非选择性。非肠道菌冲击可提高肠道 M 细胞数量和转运能力的现象^[43], 启示 rAAV 的选择性转运也有可能通过制剂学手段被增强。

3.6 胞内酶系统对转导的影响

泛素-蛋白酶体系统具有胰凝乳蛋白酶、胰酶、半胱氨酸天冬氨酸酶类活性, 对 rAAV 基因药物在细胞内的降解发挥主要作用。蛋白酶体抑制剂 MG101 和阿霉素可以抑制泛素-蛋白酶体系统活性, 从而提高 rAAV 基因药物的转导效率。单独应用 MG101 或阿霉素后, rAAV 基因药物转导肠上皮细胞的效率可提高数倍, 如二者合并使用, 转导效率可提高数千倍^[44]。

总之, 制剂处方的优化、各种药物的配伍应用及给药方法的标准化等, 为排除传递屏障、增强药物稳定性、促进药物吸收、提高 rAAV 基因药物的生物利用度发挥关键作用 (表 1)。但各种辅料对细胞膜的完整性、细胞间连接、细胞功能及消化模式的改变, 也可能会产生不利的影响, 甚至会引起毒性反应, 在制

Table 1 Excipients of rAAV gene medicine formulation and their mechanisms

Category	Example	Mechanism
Cyclodextrin	β-Cyclodextrin	Form inclusion complex and inhibit aggregation
pH Buffer	NaHCO ₃	Neutralize gastric acid
Sugar	Sucrose, trehalose, chitosan	Inhibit aggregation and increase paracellular transport
Surfactant	Pluronic F68, bile salt, fatty acid	Inhibit aggregation, permeabilize cell membrane, open tight junction
Mucolytic agent	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltoside ^[20] , dithiothreitol ^[45]	Dissolve thick mucus, lower the viscosity of mucin, facilitate improve the access of intestinal epithelial cells to vectors
Cationic polymer	Polylysine, protamine ^[46]	Compact rAAV into positively charged particle, facilitate rAAV to interact with anionic proteoglycans at the cell surface
Protease inhibitor	Aprotinin ^[42]	Inhibit the activity of trypsin and chymotrypsin within the intestinal lumen
	MG-101 (<i>N</i> -acetyl-L-leucyl-L-leucyl-norleucine) ^[44]	Inhibit the activity of intracellular chymotrypsin-like proteasome
Calcium chelators	EDTA	Ca ²⁺ depletion, disrupt actin filaments, open tight junction

剂处方设计时必需严格考察, 综合权衡。

4 展望

毫无疑问, 与小分子药物比较, 基因药物的组成和作用机制更复杂, 新药审批更苛刻, 对其口服给药的有效性和安全性的技术要求更严格。口服可表达白介素 10 的乳酸菌治疗克罗恩氏病的人体试验已取得初步成功, 表明基因药物的口服给药并不是难以跨越的鸿沟^[1, 47]。随着 rAAV 基因药物制备技术的优化更新, 与口服给药途径相关的生物药剂学等基础研究的深入和系统化, 口服 rAAV 基因药物一定会在不远的将来造福于人类。

References

- [1] Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6: 349–362.
- [2] 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.
- [3] Chen J, Yang WL, Li G, et al. Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium *in vivo* mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 112–116.
- [4] Niu Y, Epperly MW, Shen H, et al. Intraesophageal MnSOD-plasmid liposome enhances engraftment and self-renewal of bone marrow derived progenitors of esophageal squamous epithelium [J]. Gene Ther, 2008, 15: 347–356.
- [5] Li M, Lional H, Citarella R, et al. Tumor inhibitory activity of anti-ras ribozymes delivered by retroviral gene transfer [J]. Cancer Gene Ther, 1996, 3: 221–229.
- [6] Seppen J, Barry SC, Klinkspoor JH, et al. Apical gene transfer into quiescent human and canine polarized intestinal epithelial cells by lentivirus vectors [J]. J Virol, 2000, 74: 7642–7645.
- [7] Varghese S, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy [J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9: 967–978.
- [8] Ko SY, Cheng C, Kong WP, et al. Enhanced induction of intestinal cellular immunity by oral priming with enteric adenovirus 41 vectors [J]. J Virol, 2009, 83: 748–756.
- [9] Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure [J]. Gut, 1999, 44: 800–807.
- [10] Wu Y, Wang X, Csencsits KL, et al. M cell-targeted DNA vaccination [J]. PNAS, 2001, 98: 9318–9323.
- [11] During MJ, Xu R, Young D, et al. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector [J]. Nat Med, 1998, 4: 1131–1135.
- [12] During MJ, Symes CW, Lawlor PA, et al. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy [J]. Science, 2000, 287: 1453–1460.
- [13] Polyak S, Mah C, Porvasnik S, et al. Gene delivery to intestinal epithelial cells *in vitro* and *in vivo* with recombinant adeno-associated virus types 1, 2 and 5 [J]. Dig Dis Sci, 2008, 53: 1261–1270.
- [14] Dumon DR, Ishii H, Fong LYY, et al. FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 3346–3351.
- [15] Ishii H, Zanesi N, Vecchione A, et al. Regression of upper gastric cancer in mice by FHIT gene delivery [J]. FASEB J, 2003, 17: 1768–1770.
- [16] Ma H, Liu Y, Liu S, et al. Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice [J]. Hepatology, 2005, 42: 1355–1363.
- [17] Diao Y, Xu RA, Wang GJ, et al. Adeno-associated virus mediated expression of human erythropoietin *in vitro* [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23: 55–58.
- [18] Xu RA, Chen L, Xiao WD. Molecular Gene Medicine (分子基因药理学) [M]. Beijing: Beijing University Press, 2008: 68–90.
- [19] Xu RA, Ma X. Orally taken carrier to transduce liver and intestine cell: China, 200310102910.2 [P]. 2005-04-27.
- [20] Hsu EC, Pownall S, Timothy J, et al. Gene transfer to gut K cells for physiologic insulin replacement in diabetes [J]. Mol Ther, 2006, 13: s186.
- [21] Hara H, Monsonogo A, Yuasa K, et al. Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2004, 6: 483–488.
- [22] Xin KQ, Ooki T, Mizukami H, et al. Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses [J]. Hum Gene Ther, 2002, 13: 1571–1581.
- [23] During MJ. Oral delivery of adeno-associated viral vectors: US, 19950472755 [P]. 1996-12-19.
- [24] Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, et al. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus [J]. J Virol, 2006, 80: 11040–11054.
- [25] Li FQ, Fei YB, Su H, et al. Oral vaccination and vaccine-entrapped microparticle delivery system [J]. Acta Pharm Sin

- (药学报), 2007, 42: 245-251.
- [26] Takano-Maruyama M, Hase K, Fukamachi H, et al. Foxl1-deficient mice exhibit aberrant epithelial cell positioning resulting from dysregulated EphB/EphrinB expression in the small intestine [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291: G163-G170.
- [27] Seiler MP, Miller AD, Zabner J, et al. Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17: 10-19.
- [28] Pasquale GD, Chiorini JA. AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium [J]. *Mol Ther*, 2006, 13: 506-516.
- [29] Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6110-6115.
- [30] Kerneis S, Caliot E, Stubbe H, et al. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update [J]. *Microbes Infect*, 2000, 2: 1119-1124.
- [31] Bomsel M, Alfsen A. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 57-68.
- [32] Maria R, Matteo U, Barbara V, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2: 361-367.
- [33] Mabbott NA, MacPherson GG. Prions and their lethal journey to the brain [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 201-211.
- [34] Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2006, 22: 85-89.
- [35] Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration [J]. *Mol Ther*, 2008, 16: 1189-1199.
- [36] Mueller C, Flotte TR. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors [J]. *Gene Ther*, 2008, 15: 858-863.
- [37] Wang YG, Huang F, Cai R, et al. Targeting strategies for adeno-associated viral vector [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2007, 52: 1590-1599.
- [38] Wu Z, Asokan A, Grieger JC, et al. Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes [J]. *J Virol*, 2006, 80: 11393-11397.
- [39] Stachler MD, Chen I, Ting AY, et al. Site-specific modification of AAV vector particles with biophysical probes and targeting ligands using biotin ligase [J]. *Mol Ther*, 2008, 16: 1467-1473.
- [40] Tang SC, Sambanis A. Development of genetically engineered human intestinal cells for regulated insulin secretion using rAAV-mediated gene transfer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303: 645-652.
- [41] Nian M, Gu J, Irwin DM, et al. Human glucagon gene promoter sequences regulating tissue-specific versus nutrient-regulated gene expression [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 282: R173-R183.
- [42] Shao G, Greathouse K, Huang Q, et al. Gene transfer to the gastrointestinal tract after peroral administration of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006, 43: 168-179.
- [43] Man AL, Lodi F, Bertelli E, et al. Macrophage migration inhibitory factor plays a role in the regulation of microfold (M) cell-mediated transport in the gut [J]. *J Immunol*, 2008, 181: 5673-5680.
- [44] Tang SC, Sambanis A, Sibley E. Proteasome modulating agents induce rAAV2-mediated transgene expression in human intestinal epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331: 1392-1400.
- [45] Sandberg JW, Lau C, Jacomino M, et al. Improving access to intestinal stem cells as a step toward intestinal gene transfer [J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5: 323-329.
- [46] Kwon YM, Li YT, Liang JF, et al. PTD-modified ATTEMPTS system for enhanced asparaginase therapy: a proof-of-concept investigation [J]. *J Control Release*, 2008, 130: 252-258.
- [47] Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin 10 in Crohn's disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4: 754-759.