基因治疗用病毒载体的化学修饰策略

张传领*, 周德敏*

北京大学药学院, 分子与细胞药理学, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: zhangchuanling@bjmu.edu.cn; demin Zhou@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-02; 接受日期: 2018-06-05; 网络版发表日期: 2018-09-04

国家自然科学基金(编号: 81673342, 81530090, 91753202, 81690264)和国家重点研发计划(编号: 2016YFA0501500)资助项目

摘要 病毒是目前基因治疗中最常用的载体, 但依然不能将治疗基因高效和选择性地输送到特定的靶细胞. 因此构建转导效率高、选择性强和免疫原性低的病毒载体是当今基因治疗研究关注的焦点. 目前国际上主流的策略是利用不同的技术手段, 在病毒载体上偶联各种修饰分子, 从而克服病毒载体自身缺陷或赋予其新功能, 综合提升病毒载体临床适用性. 近十几年来, 许多化学手段被报道. 本文以基因治疗用病毒载体为切入点, 对病毒可利用的化学修饰方法进行了综述, 并对基因治疗用病毒载体的未来发展趋势进行了展望.

关键词 基因治疗, 病毒载体, 化学修饰

1 引言

基因治疗是将外源基因, 通常是人的正常基因或有干预甚至修复功能的基因, 通过基因转移技术输送到适当的靶细胞中, 然后利用这些外源遗传物质治疗因基因缺失、突变或异常表达引起的相关疾病, 如恶性肿瘤、心血管疾病和艾滋病等. 基因治疗的一个关键步骤是借助某些介质将具有治疗作用的外源基因输送到细胞内, 这些外源基因或置入靶细胞的基因组中替代或原位修复缺陷基因, 或通过其产物干预缺陷基因的功能, 从而在源头上根除疾病发生的原因^[1,2]. 早在1966年Tatum^[3]就已经证明病毒用于体细胞遗传和基因治疗研究的有效性. 直到1990年美国国家癌症研究院开展了人类第一例基因治疗临床试验, 将含有正常人腺苷脱氨酶(ADA)基因通过逆转录病毒载体, 输送到一个患有严重复合免疫缺陷综合征(SCID)的4岁

女孩的白细胞中. 经10天左右白细胞介素II刺激其增殖, 再经静脉输入患儿体内, 每过1~2月治疗一次, 8个月患儿体内ADA水平达到正常值的25%^[4], 之后全世界掀起了基因治疗的研究热潮. 截至1995年全世界共批准了一百多个基因治疗方案, 然而经美国国家卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)评估后发现真正有效的仅几例, 特别是1999年宾夕法尼亚大学基于腺病毒载体的基因治疗导致受试者死亡, 2000年法国内克尔医院基于逆转录病毒载体对17名SCID幼儿实施基因治疗导致2名患者白血病并有一名儿童死亡, 给基因治疗投来了巨大的阴影^[5]. 自此基因治疗由狂热转入理性, 加强基因治疗中的基础科学问题研究成为共识. 近年来, 大量的基础研究和临床试验表明, 1999年由腺病毒载体引发的机体免疫副反应和2000年由逆转录病毒导致的非选择性基因整合是患者死亡的根本原因^[6].

引用格式: Zhang C, Zhou D. Chemical modification strategies of viral vectors for gene therapy. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1365–1375, doi: 10.1360/N032018-00075

尽管存在着许多不确定性, 但基因治疗并未止步。经过之后十多年的努力, 基因治疗研究取得了巨大的进展, 重新燃起了研究人员的希望。2012年欧盟委员会批准首个基因治疗药物Glybera——一种携带脂蛋白酶基因的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV), 用于治疗脂蛋白脂酶缺乏遗传病(LPLD), 其药价为125万欧元, 创造了现代医药的新纪录, 成为基因治疗的巨大推力^[7]。2013年, 意大利San Raffaele基因治疗技术研究所(San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, HSR-TIGET)^[8,9]在*Science*上发表了他们利用慢病毒载体治疗6名具有严重性遗传病儿童的研究成果。*Science*和*Nature*分别发表文章, 评论这项研究对于重启基因治疗具有里程碑的意义^[10,11]。2017年12月, 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)评审委员会以16:0全票通过治疗先天遗传性失明的药物——Luxturna, 这是美国第一款利用AAV作为载体, “体内”直接用药, 用作治疗“基因缺失遗传病”的基因治疗药物^[12]。2017年获批的突破性CAR-T疗法Kymriah, 用于治疗B细胞前体急性淋巴性白血病。作为一款需要基因改造的自体T细胞免疫疗法, Kymriah的治疗需要先从个体患者的体内提取出T细胞, 并在生产中心利用病毒载体进行遗传改造^[13]。另外, 近年CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)系统可以对细胞基因组的任意位点进行编辑, 纠正致病突变; 或通过增加、删除基因片段调节基因表达, 为基因治疗提供了新的高效的手段^[14,15]。其在艾滋病^[16,17]、肿瘤^[18,19]、遗传病^[20,21]等各种疾病的治疗中展现良好的效果, 预示着这些顽疾有望被根治, 颠覆了这些疾病是不治之症的观念。CRISPR基因编辑技术的发展, 为基因治疗提供了更为丰富的想象空间和临床应用前景, 真正将基因治疗带到了黄金时代。

基因治疗主要包含两个基本要素: 治疗性的核酸和运送核酸的载体。RNA干扰以及CRISPR基因编辑等技术的开发标志着在人类在治疗性核酸方面取得了重大进展, 也因此迫切需要开发有效的运送载体。目前病毒载体是将治疗基因输入靶细胞的最有效和最常用的工具, 包括反转录病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒以及来源于其他病毒的载体。但是, 病毒载体自身及其转基因产物的非特异性表达常引起免疫副反应; 同时由于病毒受体在人体细胞内表达的非特异性,

导致部分病毒载体对于目标细胞和组织缺乏特异的感染能力。因此安全性和靶向性问题是目前限制病毒载体临床应用且急需解决的重要障碍^[22]。近年来, 随着基因治疗研究如火如荼地开展, 一直被认为最安全的腺相关病毒载体也发现有T细胞免疫毒性^[23]。2018年初, 宾夕法尼亚大学Wilson教授研究团队^[24]研究发现, AAV9在高剂量静脉注射情况下, 产生严重的肝脏和神经元毒性, 并不同于其他AAV病毒载体的免疫相关性。这些不断层出的新问题都为基因治疗提出新的挑战。

基因治疗经历了“乐观与热情-失望与怀疑-理性与挑战”的3个发展阶段。目前困扰基因治疗的一个重要因素是不能将治疗基因高效和选择性地输送到特定的靶细胞。例如, 在以腺病毒为载体的抑癌p53基因导入并治疗恶性肿瘤方案中, 腺病毒载体只能直接注射到肿瘤部位; 若静脉注射, 选择性到达肿瘤组织的病毒载体非常少, 难以达到治疗效果^[25]; 而大剂量的注射由于病毒感染的非选择性和免疫原性增加了副作用。人类第一例借助逆转录病毒载体介导ADA基因治疗SCID的病例, 由于导入效率低, 前后经历了11次体外转导和回输。因此, 构建转导效率高、选择性强和免疫原性低的外源基因输送方法是当今基因治疗研究关注的焦点。生物学家通过不同生物技术手段深入研究这个科学问题^[26,27]。安德森癌症中心的研究者利用遗传工程的方法, 将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD) 3个氨基酸融合到溶瘤腺病毒衣壳表面, 获得了能够特异性识别脑胶质瘤的靶向型腺病毒“DNX-2401”。最近, I期临床试验研究结果显示, 溶瘤腺病毒能够显著延长胶质母细胞瘤复发患者的生存期, 其中20%的患者生存期达到3年^[28], 这是目前很有希望走向临床的靶向型溶瘤病毒。但是由于传统生物技术手段的限制, 一些技术难题得到解决, 更多的瓶颈问题一直无解。近十几年来, 许多化学家将化学方法引入生物体系中^[29-31], 利用化学手段解决了困扰生物学家多年的难题, 催生化学生物学这一新兴学科, 推动生命科学的蓬勃发展。本文以基因治疗用病毒载体为切入点, 对病毒可利用的化学修饰方法进行了综述, 评述了化学和生物学交叉技术手段在解决基因治疗瓶颈问题, 推动基因治疗向更安全、更高效方向发展的研究进展。

化学修饰病毒载体的研究策略主要是共价和非共价修饰。共价修饰利用病毒蛋白的天然氨基酸或后修

饰的非天然氨基酸残基,对病毒载体直接共价偶联,是一种最为直接、稳定和有效的修饰方式.非共价修饰利用静电吸附、配体-受体和抗原-抗体等分子间作用力,对病毒进行多聚包裹或靶向配体的修饰.

2 共价化学修饰

病毒一般是由蛋白包裹核酸组成,病毒蛋白的天然氨基酸或后引入的非天然氨基酸残基,为病毒的共价化学修饰提供了“把手”,通过偶联的修饰分子赋予病毒新颖的物理和化学功能.

2.1 天然氨基酸

多肽化学经过几十年的发展,目前已经能够在20种天然氨基酸中的赖氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和酪氨酸的侧链基团上进一步形成生物兼容性的共价连接.在天然氨基酸残基上直接偶联,已经在多种病毒载体的化学修饰中取得良好的效果,但是这些可修饰天然氨基酸在蛋白中的位置和密度并不能够完全满足化学修饰的需要.在一定程度上,这种潜在的弱点可以通过在特定位点利用遗传工程的方法插入或删除天然氨基酸残基来克服.不过这种遗传突变往往也受限于残基的位置,不能因突变而导致蛋白活性的大幅降低.尽管存在该缺陷,利用天然氨基酸残基的化学修饰依然被广泛采用.

2.1.1 赖氨酸和N-端修饰

赖氨酸和蛋白质的N端都能够提供活泼的伯氨基($-\text{NH}_2$),伯氨基可以和N-羟基琥珀酰亚胺-酯(NHS-酯)或NHS-酯的硫酸衍生物形成共价连接.利用这种方式,紫杉醇(图1)^[32]、荧光基团^[33]、聚N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(ploy-hydroxypropyl, pHPMA)^[34,35]、聚乙二醇(PEG)^[36-39]、生物素^[40]等都能够成功地连接到各种病毒表面.赖氨酸是一种普通的氨基酸,在常见蛋白质中的约占氨基酸组成的6.3%^[41].它是一种亲水的氨基酸常暴露在蛋白质表面,这些特征使得赖氨酸是一个极佳的修饰靶,但是过多的修饰也可危害病毒的结构.

蛋白质的N端提供了位置更加特异的一个氨基,但是它依然同赖氨酸的氨基存在竞争关系,而且N端并不总是暴露在外.可以通过重新设计使得被包埋的

图1 腺相关病毒与紫杉醇的共价连接^[32] (网络版彩图)

Figure 1 Adeno-associated virus covalently linked to paclitaxel ^[32] (color online).

N端暴露,进而可以将一些配体偶联在病毒蛋白的N端,Dedeo等^[42]利用这个策略在烟草花叶病毒上进行了配体修饰,这为基因治疗用病毒载体的修饰提供了借鉴.

NHS-酯由于具有简单可靠、易获取的优点,被广泛应用为靶向伯氨基的功能基团.这个强亲电子基团的一个缺陷是发生水解副反应,其水中半衰期小于5 h,当 $\text{pH}>7$ 时,水解过程还会更快.由于水解反应的竞争,目标反应的效率就会降低.近年来也出现了一些新的氨连接反应,如硫代亚氨酸酯和氨的反应^[43]、转氨基策略^[44].但是,目前还是NHS-酯更加常用,且已有很多结构多样的NHS-酯商品.

2.1.2 半胱氨酸

病毒蛋白的半胱氨酸的巯基可与马来酰亚胺反应形成共价化学连接,利用这个反应可将修饰分子偶联至病毒载体.半胱氨酸在蛋白的氨基酸组成中只占1.1%,既不过度亲水也不过度疏水,因此是理想的修饰靶点^[41].另外,马来酰亚胺也容易通过化学合成或购买得到.因此,马来酰亚胺-巯基反应也被广泛应用于蛋白质药物的化学修饰^[45].Kreppel等^[46]首先利用遗传工程的方法,在腺病毒衣壳表面暴露的位置引入半胱氨酸,进而利用其巯基形成的二硫键将转铁蛋白偶联在病毒衣壳之上,引导病毒靶向转铁蛋白受体高表达的细胞(图2).

除了马来酰亚胺,半胱氨酸巯基也可以与另外一个巯基在氧化条件下形成二硫键^[47].一些病毒中本身就含有二硫键以利于病毒组装和结构稳定^[48,49].如果经过突变人为引入半胱氨酸,可能导致二硫键的错配,打乱病毒蛋白的正确折叠和自组装^[50].为了避免使用半胱氨酸-马来酰亚胺反应时形成二硫键,可将衣壳蛋白表面袋或内部暴露的氨基酸突变为半胱氨酸,这些

图2 利用遗传和化学结合的方法修饰腺病毒^[46]

Figure 2 Genetic and chemical modification of adenovirus [46].

半胱氨酸只能与通过小孔扩散进来的马来酰亚胺配体反应, 该技术降低了反应过程对病毒自身二硫键的影响^[51,52].

2.1.3 精氨酸

二羧基系列化合物能与蛋白质反应生成末端糖基化产物^[53]. Horowitz等^[54]用丙二醛经美拉德反应(Mailard reaction)与暴露在AAV2衣壳表面的精氨酸残基选择性反应, 得到精氨酸末端糖基化的AAV2 (图3). AAV2的糖基化使得病毒对肝脏的亲合能力降低, 转而增强了对骨骼肌及心肌的感染能力.

2.1.4 其他

目前大多病毒载体的化学修饰选用赖氨酸为修饰靶点. 一些植物病毒或噬菌体^[52,55~57]的修饰中选用天冬氨酸、谷氨酸酪氨酸或酪氨酸为靶点. 这也为基因

图3 甲基乙二醛修饰AAV载体的示意图^[54]

Figure 3 Schematic of methylglyoxal modified AAV vector [54].

治疗用病毒载体的化学修饰提供了很好的借鉴.

上述总结了目前病毒载体修饰能够采用的天然氨基酸, 我们期待将来研发出更多针对天然氨基酸基团的共价反应.

2.2 非天然氨基酸

天然氨基酸的特殊化学基团为病毒载体的化学修饰提供了多种选择, 但针对天然氨基酸的化学反应, 如高温、有毒催化剂或极端pH, 会对病毒衣壳的结构及活性造成不同程度的影响; 赖氨酸、精氨酸等可修饰的天然氨基酸往往是蛋白的活性中心, 这些特殊位点的化学修饰会造成病毒活性的大幅降低, 以天然氨基酸为靶的化学修饰, 很难做到任意定点的修饰. 近几年, 化学家们尝试在病毒特定的氨基酸位点引入一些功能性化学基团, 如叠氮基、炔基等, 将天然氨基酸改造成可人工合成的非天然氨基酸, 为病毒载体的进一步化学修饰提供了特异的“把手”, 再利用“把手”基团与修饰分子之间的正交化学反应, 使得病毒载体的修饰位点特异、反应条件温和可控. 目前在基因治疗用病毒载体表面引入非天然氨基酸的方法主要有以下3种.

2.2.1 代谢掺入

一些含有特殊化学基团的糖, 由于与天然糖结构上的类似性, 可以在细胞正常代谢时被掺入天然糖基侧链中, 如叠氮甘露糖在细胞代谢过程中能被识别和吸收, 转作蛋白糖基化酶的底物, 进而将叠氮基团引入到细胞表面. 再利用叠氮-炔基的点击化学反应, 将修饰分子定点偶联至细胞表面, 这种方法已经被广泛应用在蛋白功能分析和糖蛋白成像方面^[58,59]. 目前基因治疗用病毒载体大都是由哺乳动物细胞包装合成, 因此, 在病毒包装过程中利用非天然糖作为病毒糖蛋

白的糖基化底物, 同样可以赋予病毒非天然的化学基团. 腺病毒是一种常用的基因治疗用病毒载体, Banerjee等^[60,61]和Oum等^[62]首先在其刺突蛋白的糖基侧链上成功地引入了叠氮糖(图4). 经过叠氮和炔基的点击化学反应, 或叠氮化合物和膦硫酯的无痕施陶丁格反应(Staudinger reaction), 肿瘤靶向配体被偶联在腺病毒表面, 提高了病毒靶向肿瘤细胞的能力. 同时, 这种策略也成功地应用在牛痘病毒^[63]、麻疹病毒^[64]、慢病毒^[65]、HIV假病毒^[66]、流感病毒(H5N1)^[67], 实现病毒特殊化学基团的定点标记. 不过, 这种利用蛋白质翻译后修饰过程中引入非天然化学基团的方法也有一定的局限性. 一方面, 修饰位点只能是糖基化位点, 不能任意选取; 另一方面, 这种方法只能用于表面具有天然糖基化修饰的病毒, 没有糖基化的修饰病毒, 如腺相关病毒不能采用这种方法.

为了克服上述方法的缺陷, Banerjee等^[68,69]进一步发明了另外一种将非天然化学基团引入病毒的方法. 这种方法可在腺病毒包装过程中, 通过代谢掺入蛋氨酸结构类似物, 叠氮丙氨酸(azidohomoalanine, Aha)或炔丙基甘氨酸(homopropargylglycine, HPG), 替换衣壳蛋白所含的天然蛋氨酸, 实现病毒的选择性标记, 为进一步化学选择性标记提供了“把手”(图5). 随后, Su等^[70]利用生物正交的HPG和点击化学反应, 从时空角度解析单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)感染期全蛋白的合成代谢情况. 这项工作提供了对HSV感染后早期新陈代谢过程的新见解, 并展示了这些技术在研究病毒感染和病毒-宿主相互作用方面的巨大潜力.

2.2.2 酶促反应引入

上述方法利用某种氨基酸结构类似物替换某种天然氨基酸残基的策略, 虽然能在温和条件下实现病毒蛋白的高效化学标记, 但依然缺乏单位点的特异性. 一些研究表明, 可以利用蛋白酶将天然氨基酸转变成非天然氨基酸^[71]. Liu等^[72]首先利用遗传工程的方法, 在AAV2的N587位点引入13个氨基酸的多肽(LCTPSRAALLTGR), 甲酰生成酶(formylglycine generating enzyme)可以特异识别上述肽段, 并将半胱氨酸转化成含有醛基的甲酰甘氨酸, 为AAV2提供一个位点特异的醛基. 利用这个醛基, 氨基-或酰肼化的多肽、荧光、抗体等功能分子可成功地以共价键形式偶

图4 叠氮糖代谢法标记腺病毒并叶酸修饰的示意图^[60]. (a) 利用叠氮化合物和膦硫酯的无痕施陶丁格反应连接; (b) 利用点击化学反应进行连接(网络版彩图)

Figure 4 Schematic of azido and folic acid modification of adenovirus via glucose metabolism labeling [60]. (a) The ligation of the non-marking Staudinger reaction between azide and phosphonothioate. (b) The ligation of click chemistry reaction [60] (color online).

图5 叠氮丙氨酸标记腺病毒的示意图^[68]. (a) 腺病毒上的叠氮基可与炔基进行铜催化的化学反应; (b) 也可利用叠氮化合物和膦硫酯反应偶联探针

Figure 5 A cartoon representation of adenovirus labeled by azidohomoalanine [68]. (a) The azido group on adenovirus can connect with alkyne via Cu-catalyzed click chemistry, (b) connect with a phosphine probe via Staudinger ligation.

联到病毒表面(图6).

20世纪末, 人们从金黄色葡萄球菌中分离得到转肽酶(sortase A, SrtA), 它能够选择性地识别特异性多肽序列LPXTG, 并在特定位点切断氨基酸的肽键进而将其与一个新的肽链连接. 该特性使SrtA成为一种位点特异、共价、正交的蛋白质修饰的工具^[73]. 近年有研究者将这种方法应用到流感病毒^[74]、豇豆褪绿斑

图6 腺相关病毒的定点醛基化标记及修饰示意图^[72] (网络版彩图)

Figure 6 Schematic of the site-specific modification of AAV2 by genetically encoded aldehyde tag^[72] (color online).

点病毒^[75]、番木瓜花叶病毒^[76]的修饰, 为基因治疗用病毒载体的修饰提供了借鉴。

2.2.3 基因密码子扩展

美国的Schultz课题组^[77]基于对古细菌原核生物核糖体的翻译机制的理解, 研究并开发了基因密码子扩展技术。这项技术利用原本不编码氨基酸的UAG密码子进行编码自然界中不存在、但能人工合成的具有特殊物理和化学特性的非天然氨基酸, 定点插入到活细胞在体蛋白的特定位置点(图7(a)), 赋予了这些蛋白质新颖的物理、化学和生理性质。借助该非天然氨基酸的活性基团实现了在体蛋白质多样化的定点修饰, 如光交联、正交连接(图7(b))。

经过大量筛选, 目前已经有将近100种非天然氨基酸被筛选出来, 以满足各种生物研究的需求^[78,79]。这些非天然氨基酸具有多样性的功能基团, 如叠氮、炔基、酮基、醛基、烯基、酰胺基、硝基、磷酸根、磺酸根等, 可作为把手进一步地连接不同的基团, 是蛋白质定点修饰的有力工具^[80]。近年来, 本课题组^[81~86]基于基因密码子扩展技术, 在国际上率先建立了病毒定点标记和修饰的新方法, 如图8所示。首先, 通过叠氮非天然氨基酸在病毒膜/衣壳蛋白定点插入, 使慢病毒^[82]、腺相关病毒^[81,83~85]载体能够在其任何指定位置点实现定点叠氮化标记, 然后利用无铜催化的八元环辛炔-叠氮的环加成反应^[87]。

温和、快速、高效、定量和特异地引入具有特殊物理和化学性质的多肽、聚乙二醇、荧光基团等其他功能分子, 从而赋予病毒靶向、低免疫原性、可视等性能。这种无铜催化的点击化学反应可在无任何催化剂的磷酸盐缓冲液中温和高效地进行, 不会对生物大

图7 基于基因密码子扩展的非天然氨基酸定点标记蛋白质的新方法。(a) 终止密码子UAG编码非天然氨基酸示意图; (b) 光交联氨基酸和把手氨基酸定点标记在体蛋白质及其应用(网络版彩图)

Figure 7 A new method for site-specifically labeling proteins with unnatural amino acid based on genetic code expansion. (a) Schematic of stop codon UAG encoding unnatural amino acid; (b) photo-crosslinking amino acid and handle amino acid site-specifically labeled on *in vivo* proteins and applications thereof (color online).

图8 基于基因密码子扩展的腺相关病毒非天然氨基酸标记及化学偶联修饰^[81]。(a) 基于基因密码子扩展对腺相关病毒实行叠氮非天然氨基酸的定点标记; (b) 利用叠氮和环辛炔的点击化学反应连接修饰分子(网络版彩图)

Figure 8 Chemical labeling of an adeno-associated virus (AAV) based on genetic code expansion^[81]. (a) AAV2 nanoparticles are site-specifically modified by a genetically encoded azide-bearing amino acid. (b) Modified molecules are then labeled through a click chemistry reaction between azide and cyclooctyne (color online).

分子或细胞产生明显的毒性, 因而在生物医药领域有了极为广泛的应用。此后, 其他研究人员利用上述策

略在腺相关病毒上^[88~90]成功地进行了类似的化学修饰, 证明这种新技术的可靠性和可重复性. 这种基于基因密码子扩展的病毒非天然氨基酸的定点标记及修饰技术, 能够对病毒载体实施任意单位点的叠氮标记和进一步的无催化化学修饰, 避免了以往研究中由于对病毒衣壳大幅度或非特异修饰而造成的病毒包装效率低、活性差的后果, 以及由于催化剂或剧烈化学反应对生物大分子造成的损伤. 同时, 新偶联的靶向基团以较高的自由度游离于病毒衣壳之外, 可屏蔽病毒天然嗜性, 展现新的靶向作用. 总之, 该方法为病毒的标记及修饰提供了一种崭新的途径, 将会极大地推动基于病毒载体的基因治疗向更加安全、高效的方向迈出坚实一步.

同时, 本课题组^[86]将非天然氨基酸引至流感病毒复制酶, 并作为病毒复制的开关, 获得复制缺陷型流感病毒活疫苗及治疗性药物(图9). 这一直接将病毒转化成活疫苗及治疗药物的技术颠覆了传统疫苗制备的思路, 研究成果发表在*Science*, 并入选2017年“中国科学十大进展”. 其他研究人员将这一研究思路成功地在HIV病毒上得到验证^[91,92], 进一步证明了这种新的疫苗研制思路.

3 非共价化学修饰

非共价化学修饰主要利用静电吸附、金属螯合和生物亲和, 具有操作简便、对蛋白结构影响较小等优点, 广泛应用于蛋白和病毒的修饰.

3.1 静电吸附

静电吸附主要利用病毒和修饰分子表面正负电荷的引力作用完成病毒修饰. Müller等^[93]利用AAV6、AAV9在中性条件所带的正电荷, 通过静电吸附作用与阴离子型脂质体结合, 获得AAV-脂质体复合物, 在超声波作用下, 提高了病毒对心肌的转导效率. Kim等^[94]利用静电吸附将阳离子聚合物聚醚酰亚胺(PEI)与衣壳表面带有负电荷的AAVr3.45包裹在一起, 实现病毒在特定空间位置的靶向转导(图10). 由于大部分病毒蛋白在生理条件下带有负电荷, 所以带有正电荷的阳离子高分子都可通过静电吸附实现对病毒载体的包裹^[95,96], 这为解决病毒载体的自身缺陷提供了新的思路和方法.

图9 基于基因密码子拓展技术的复制缺陷的活流感病毒疫苗^[86] (网络版彩图)

Figure 9 Replication-defective live flu virus vaccine based on genetic code expansion ^[86] (color online).

图10 AAV/PEI-C杂合载体的形成与鉴定^[94]. (a) 聚醚酰亚胺-邻苯二酚(PEI-C)固定黏性病毒的示意图; (b) 杂合载体的电势; (c) 杂合载体的流体动力学尺寸(网络版彩图)

Figure 10 Formation and identification of AAV/PEI-C hybrid vectors ^[94]. (a) A schematic of polyetherimide-catechol (PEI-C) fixing cohesive virus; (b) the potential of the hybrid vector; (c) hydrodynamic size of hybrid carrier (color online).

3.2 金属螯合

金属螯合修饰是利用金属多价离子与合适的配位体结合, 实现金属离子与病毒颗粒的结合. Kim等^[97]利用镍离子将六聚组氨酸标记的AAV聚合修饰在含有链霉亲和素图层的超顺磁氧化铁纳米粒子上. 在磁场力引导下, 实现AAV在短时间内对非嗜好型细胞的感染(图11). 另外, 常用于蛋白质螯合修饰的金属离子还有铜离子、锌离子和铁离子等, 这些螯合剂为病毒的化学修饰提供了更多的选择.

3.3 生物亲和

生物亲和修饰多为利用配体-受体和抗原-抗体之间的相互识别和选择性的结合, 实现病毒与修饰分子的非共价结合. Hwang等^[98]利用硫酸乙酰肝素与AAV2的亲合力, 将超顺磁纳米粒子与AAV2偶联在一起, 实现AAV2在磁场作用下对肾上腺嗜铬细胞瘤细胞的靶向感染; 同时, 也有不少研究利用生物素和亲和素之间的特异结合力对病毒载体进行非共价修饰^[99,100]; Bartlett等^[101]利用遗传工程的方法将蛋白A的免疫球蛋白结合区域的肽段融合进AAV衣壳表面, 然后利用蛋白A与抗体Fc段的结合力, 将抗体偶联至病毒表面, 使得病毒能选择性地感染MO7e和Jurkat细胞.

4 基因治疗用病毒载体的展望

目前基因治疗仍存在诸多不确定性, 人们对于病毒载体的毒性、机体免疫反应、组织靶向性, 特别是病毒基因在宿主细胞的整合是否引发肿瘤有众多顾

图 11 磁性引导的6xHis AAV/NiStNP复合物的示意图^[97]. (a) 链霉亲和素(streptavidin)包被的超顺磁性氧化铁纳米颗粒; (b) Ni-NTA-生物素缀合到链霉亲和素包被的超顺磁性氧化铁纳米颗粒; (c) 6xHis AAV结合的NiStNP

Figure 11 A schematic of magnetically guided 6xHis AAV/NiStNP complexes ^[97]. (a) Streptavidin-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles; (b) Ni-NTA-biotin conjugated to streptavidin-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles; (c) 6xHis AAV-bound NiStNP.

虑. 通过对病毒基因整合几十年的深入研究, 科学家已经发现了慢病毒和腺相关病毒位点整合的机制, 减缓了人们对病毒载体随机整合的恐惧. 增加病毒载体的靶向性、提高基因治疗效果是当前亟待解决的问题. 理论上, 通过提高病毒载体的靶向性可以减少病毒用量, 从而降低病毒载体的毒性和减缓机体免疫反应. 不过靶向病毒载体大都还处于实验室阶段的研究, 少部分载体已经进入临床阶段. 目前还尚未有基于靶向病毒载体的基因治疗药物上市. 我们相信, 作为对人类健康影响深远的药物治疗方式, 基因治疗正朝着治愈更大范围的疾病迈进, 特别是21世纪前后涌现的一系列生物技术, 如基因干扰、基因敲除/入、基因编辑等, 更加激发了人类对基因治疗技术的探索. 通过病毒载体将这些生物技术用于基因治疗研究和应用, 将对肿瘤、遗传性疾病的治疗产生深远的影响, 为人类最终战胜这些疾病带来希望.

参考文献

- Collins M, Thrasher A. *Proc R Soc B*, 2015, 282: 20143003
- Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. *Gene*, 2013, 525: 162–169
- Tatum EL. *Perspect Biol Med*, 1966, 10: 19–32
- Blaese RM, Culver KW, Dusty Miller A, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, French Anderson W. *Science*, 1995, 270: 475–480
- SG Stolberg. *N Y Times Mag*, 1999, 136-140: 149–150
- Frank KM, Hogarth DK, Miller JL, Mandal S, Mease PJ, Samulski RJ, Weisgerber GA, Hart J. *N Engl J Med*, 2009, 361: 161–169
- Ylä-Herttuala S. *Mol Ther*, 2012, 20: 1831–1832
- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, Dionisio F, Calabria A, Giannelli S, Castiello MC, Bosticardo M, Evangelio C, Assanelli A, Casiraghi M, Di Nunzio S, Callegaro L, Benati C, Rizzardi P, Pellin D, Di Serio C, Schmidt M, Von Kalle C, Gardner J, Mehta N, Neduva V, Dow DJ, Galy A, Miniero R, Finocchi A, Metin A, Banerjee PP, Orange JS, Galimberti S, Valsecchi MG, Biffi A,

- Montini E, Villa A, Ciceri F, Roncarolo MG, Naldini L. *Science*, 2013, 341: 1233151
- 9 Biffi A, Montini E, Liorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, Benedicenti F, Vallanti G, Biasco L, Leo S, Kabbara N, Zanetti G, Rizzo WB, Mehta NAL, Cicalese MP, Casiraghi M, Boelens JJ, Del Carro U, Dow DJ, Schmidt M, Assanelli A, Neduva V, Di Serio C, Stupka E, Gardner J, von Kalle C, Bordignon C, Ciceri F, Rovelli A, Roncarolo MG, Aiuti A, Sessa M, Naldini L. *Science*, 2013, 341: 1233158
 - 10 Leboulch P. *Nature*, 2013, 500: 280–282
 - 11 IM Verma. *Science*, 2013, 3416148: 853–855
 - 12 Dias MF, Joo K, Kemp JA, Fialho SL, da Silva Cunha A Jr., Woo SJ, Kwon YJ. *Prog Retinal Eye Res*, 2018, 63: 107–131
 - 13 Prasad V. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 15: 11–12
 - 14 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *Science*, 2012, 337: 816–821
 - 15 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. *Science*, 2013, 339: 819–823
 - 16 Liao HK, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, Suzuki K, Xu R, Hishida T, Chang CJ, Esteban CR, Young J, Izpisua Belmonte JC. *Nat Commun*, 2015, 6: 6413
 - 17 Saayman S, Ali SA, Morris KV, Weinberg MS. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15: 819–830
 - 18 Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. *Nat Med*, 2015, 21: 256–262
 - 19 Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 387–393
 - 20 Ma Y, Zhang L, Huang X. *FEBS J*, 2014, 281: 5186–5193
 - 21 Lander N, Chiurillo MA, Docampo R. *J Eukaryot Microbiol*, 2016, 63: 679–690
 - 22 Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV. *Annu Rev Biomed Eng*, 2015, 17: 63–89
 - 23 Mingozzi F, High KA. *Blood*, 2013, 122: 23–36
 - 24 Hinderer C, Katz N, Buza EL, Dyer C, Goode T, Bell P, Richman LK, Wilson JM. *Human Gene Ther*, 2018, 29: 285–298
 - 25 Li Y, Li B, Li CJ, Li LJ. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15: 437–454
 - 26 Schaffer DV, Koerber JT, Lim K. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10: 169–194
 - 27 Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. *Nat Rev Genet*, 2007, 8: 573–587
 - 28 Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Yung WKA, Sawaya R, Weinberg JS, Prabhu SS, Rao G, Fuller GN, Aldape KD, Gumin J, Vence LM, Wistuba I, Rodriguez-Canales J, Villalobos PA, Dirven CMF, Tejada S, Valle RD, Alonso MM, Ewald B, Peterkin JJ, Tufaro F, Fueyo J. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 1419–1427
 - 29 Parsons G. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 576–580
 - 30 Schenone M, Dančik V, Wagner BK, Clemons PA. *Nat Chem Biol*, 2013, 9: 232–240
 - 31 Chuh KN, Pratt MR. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 24: 27–37
 - 32 Wei F, McConnell KI, Yu TK, Suh J. *Eur J Pharmaceut Sci*, 2012, 46: 167–172
 - 33 Xiao PJ, Samulski RJ. *J Virol*, 2012, 86: 10462–10473
 - 34 Droblenkov AV, Karelina NR. *Neurosci Behav Phys*, 2010, 40: 761–766
 - 35 Carlisle RC, Benjamin R, Briggs SS, Sumner-Jones S, McIntosh J, Gill D, Hyde S, Nathwani A, Subr V, Ulbrich K, Seymour LW, Fisher KD. *J Gene Med*, 2008, 10: 400–411
 - 36 Leggiero E, Astone D, Cerullo V, Lombardo B, Mazzaccara C, Labruna G, Sacchetti L, Salvatore F, Croyle M, Pastore L. *Gene Ther*, 2013, 20: 1124–1130
 - 37 Lee GK, Maheshri N, Kaspar B, Schaffer DV. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92: 24–34
 - 38 Le HT, Yu QC, Wilson JM, Croyle MA. *J Control Release*, 2005, 108: 161–177
 - 39 Croyle MA, Yu QC, Wilson JM. *Human Gene Ther*, 2000, 11: 1713–1722
 - 40 Ponnazhagan S, Mahendra G, Kumar S, Thompson JA, Castillas M. *J Virol*, 2002, 76: 12900–12907
 - 41 Gilis D, Massar S, Cerf NJ, Roonan M. *Genome Biol*, 2001, 2: research0049.1
 - 42 Dedeo MT, Duderstadt KE, Berger JM, Francis MB. *Nano Lett*, 2010, 10: 181–186
 - 43 Running WE, Ni P, Kao CC, Reilly JP. *J Mol Biol*, 2012, 423: 79–95
 - 44 Carrico ZM, Farkas ME, Zhou Y, Hsiao SC, Marks JD, Chokhawala H, Clark DS, Francis MB. *ACS Nano*, 2012, 6: 6675–6680
 - 45 Holtz KM, Robinson PS, Matthews EE, Hashimoto Y, McPherson CE, Khramtsov N, Reifler MJ, Meghrouh J, Rhodes DG, Cox MM,

- Srivastava IK. *BMC Biotechnol*, 2014, 14: 111
- 46 Kreppel F, Gackowski J, Schmidt E, Kochanek S. *Mol Ther*, 2005, 12: 107–117
- 47 Saaranen MJ, Ruddock LW. *Antioxidants Redox Signal*, 2013, 19: 46–53
- 48 Nguyen HNP, Steede NK, Robinson JE, Landry SJ. *Vaccine*, 2015, 33: 2887–2896
- 49 Nath MD, Peterson DL. *Archives Biochem Biophys*, 2001, 392: 287–294
- 50 Szczepaniak R, Nellissery J, Jadwin JA, Makhov AM, Kosinski A, Conway JF, Weller SK. *J Virol*, 2011, 85: 8625–8634
- 51 Stephanopoulos N, Tong GJ, Hsiao SC, Francis MB. *ACS Nano*, 2010, 4: 6014–6020
- 52 Stephanopoulos N, Liu M, Tong GJ, Li Z, Liu Y, Yan H, Francis MB. *Nano Lett*, 2010, 10: 2714–2720
- 53 Rabbani N, Thornalley PJ. *Ann New York Acad Sci*, 2008, 1126: 124–127
- 54 Horowitz ED, Weinberg MS, Asokan A. *Bioconj Chem*, 2011, 22: 529–532
- 55 Aljabali AAA, Shah SN, Evans-Gowing R, Lomonosoff GP, Evans DJ. *Integr Biol*, 2011, 3: 119–125
- 56 Chung WJ, Lee DY, Yoo SY. *Int J Nanomed*, 2014, 9: 5825
- 57 Lockney DM, Guenther RN, Loo L, Overton W, Antonelli R, Clark J, Hu M, Luft C, Lommel SA, Franzen S. *Bioconj Chem*, 2011, 22: 67–73
- 58 Chang PV, Prescher JA, Hangauer MJ, Bertozzi CR. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 8400–8401
- 59 Agard NJ, Bertozzi CR. *Acc Chem Res*, 2009, 42: 788–797
- 60 Banerjee PS, Ostapchuk P, Hearing P, Carrico I. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 13615–13617
- 61 Banerjee PS, Carrico IS. *Methods Mol Biol*, 2011, 751: 55–66
- 62 Oum YH, Carrico IS. *Bioconj Chem*, 2012, 23: 1370–1376
- 63 Huang LL, Lu GH, Hao J, Wang H, Yin DL, Xie HY. *Anal Chem*, 2013, 85: 5263–5270
- 64 Zhao X, Cai L, Adogla EA, Guan H, Lin Y, Wang Q. *Bioconj Chem*, 2015, 26: 1868–1872
- 65 Chu Y, Oum YH, Carrico IS. *Virology*, 2016, 487: 95–103
- 66 Oum YH, Desai TM, Marin M, Melikyan GB. *J Virol Methods*, 2016, 233: 62–71
- 67 Pan H, Li WJ, Yao XJ, Wu YY, Liu LL, He HM, Zhang RL, Ma YF, Cai LT. *Small*, 2017, 13: 1604036
- 68 Banerjee PS, Ostapchuk P, Hearing P, Carrico IS. *J Virol*, 2011, 85: 7546–7554
- 69 Banerjee PS, Zuniga ES, Ojima I, Carrico IS. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 4985–4988
- 70 Su Hui Teo C, Serwa RA, O'Hare P. *PLoS Pathog*, 2016, 12: e1005927
- 71 Appel MJ, Bertozzi CR. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 72–84
- 72 Liu Y, Fang Y, Zhou Y, Zandi E, Lee CL, Joo KI, Wang P. *Small*, 2013, 9: 421–429
- 73 Antos JM, Truttmann MC, Ploegh HL. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, 38: 111–118
- 74 Popp MWL, Karssemeijer RA, Ploegh HL. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002604
- 75 Schoonen L, Pille J, Borrmann A, Nolte RJM, van Hest JCM. *Bioconj Chem*, 2015, 26: 2429–2434
- 76 Thérien A, Bédard M, Carignan D, Rioux G, Gauthier-Landry L, Laliberté-Gagné MÈ, Bolduc M, Savard P, Leclerc D. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15: 54
- 77 Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG. *Science*, 2001, 292: 498–500
- 78 Dumas A, Lercher L, Spicer CD, Davis BG. *Chem Sci*, 2015, 6: 50–69
- 79 Liu CC, Schultz PG. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 413–444
- 80 Kim CH, Axup JY, Schultz PG. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 412–419
- 81 Zhang C, Zhou X, Yao T, Tian Z, Zhou D. *Biotechnol J*, 2018, 13: 1700374
- 82 Zheng Y, Yu F, Wu Y, Si L, Xu H, Zhang C, Xia Q, Xiao S, Wang Q, He Q, Chen P, Wang J, Taira K, Zhang L, Zhou D. *Nucl Acids Res*, 2015, 43: e73
- 83 Zhang C, Yao T, Zheng Y, Li Z, Zhang L, Zhou D. *Data Brief*, 2016, 7: 77–80
- 84 Zhang C, Yao T, Zheng Y, Li Z, Zhang Q, Zhang L, Zhou D. *Biomaterials*, 2016, 80: 134–145
- 85 Yao T, Zhou X, Zhang C, Yu X, Tian Z, Zhang L, Zhou D. *Molecules*, 2017, 22: 1155
- 86 Si L, Xu H, Zhou X, Zhang Z, Tian Z, Wang Y, Wu Y, Zhang B, Niu Z, Zhang C, Fu G, Xiao S, Xia Q, Zhang L, Zhou D. *Science*, 2016, 354: 1170–1173
- 87 Jewett JC, Bertozzi CR. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 1272

- 88 Katrekar D, Moreno AM, Chen G, Worlikar A, Mali P. *Sci Rep*, 2018, 8: 3589
- 89 Kelemen RE, Mukherjee R, Cao X, Erickson SB, Zheng Y, Chatterjee A. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 10645–10649
- 90 RE Kelemen, SB Erickson, A Chatterjee. *Methods Mol Biol*, 2018, 1728: 313–326
- 91 Yuan Z, Wang N, Kang G, Niu W, Li Q, Guo J. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 721–731
- 92 Wang N, Li Y, Niu W, Sun M, Cerny R, Li Q, Guo J. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 4867–4871
- 93 Müller OJ, Schinkel S, Kleinschmidt JA, Katus HA, Bekeredjian R. *Gene Ther*, 2008, 15: 1558–1565
- 94 Kim E, Song IT, Lee S, Kim JS, Lee H, Jang JH. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 5598–5601
- 95 Mendez N, Herrera V, Zhang L, Hedjran F, Feuer R, Blair SL, Trogler WC, Reid TR, Kummel AC. *Biomaterials*, 2014, 35: 9554–9561
- 96 Shikano T, Kasuya H, T. Sahin T, Nomura N, Kanzaki A, Misawa M, Nishikawa Y, Shiota T, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Kanazumi N, Nomoto S, Takeda S, Nakao A. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11: 111–122
- 97 Kim E, Oh JS, Ahn IS, Park KI, Jang JH. *Biomaterials*, 2011, 32: 8654–8662
- 98 Hwang JH, Lee S, Kim E, Kim JS, Lee CH, Ahn IS, Jang JH. *Int J Pharm*, 2011, 421: 397–404
- 99 Meunier S, Strable E, Finn MG. *Chem Biol*, 2004, 11: 319–326
- 100 Stachler MD, Chen I, Ting AY, Bartlett JS. *Mol Ther*, 2008, 16: 1467–1473
- 101 Bartlett JS, Kleinschmidt J, Boucher RC, Samulski RJ. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 181–186

Chemical modification strategies of viral vectors for gene therapy

Chuanling Zhang^{*}, Demin Zhou^{*}

Department of Molecular and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

^{*}Corresponding authors (email: zhangchuanling@bjmu.edu.cn; deminzhou@bjmu.edu.cn)

Abstract: Viruses are the most commonly used vectors in gene therapy, but the therapeutic gene still cannot be efficiently and selectively delivered to the specific target cells. How to construct viral vectors with high transduction efficiency, strong selectivity and low immunogenicity is the focus of current gene therapy research. Present international mainstream strategy is to couple a variety of modified molecules on viral vectors through different technical means, thereby overcoming the defects of viral vectors or giving them new functions, and comprehensively improving the clinical applicability of viral vectors. In the past decade or so, many chemical methods have been introduced into biological systems, solving many problems that have plagued biologists for many years. In this article, the viral vectors used for gene therapy are taken as the starting point, and the available chemical modification methods of viruses are reviewed. The future development trend of viral vectors for gene therapy is also prospected.

Keywords: gene therapy, viral vector, chemical modification

doi: [10.1360/N032018-00075](https://doi.org/10.1360/N032018-00075)