维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0183-03

腺病毒载体的 PEG 修饰及其特性研究

邱 峰[1],陈世知[2],陈 虹[1],周远大[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院临床药理学研究室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院核医学科,重庆 400010)

【摘 要】目的:本研究通过对腺病毒载体(Adv)进行聚乙二醇(PEG)修饰,以达到改善 Adv 在体内免疫原性较强、血液半衰期短的不足。方法:使用活化的甲氧基 PEG 对 Adv 衣壳蛋白质进行修饰得到 PEG 化 Adv(PEG-Adv),用 A549 细胞评价了 PEG-Adv 的抗体抵抗能力、基因转导能力,并以体内试验考察其半衰期。结果:用本实验方法可通过调整反应中的 PEG 量控制 Adv 的 PEG 修饰率,PEG-Adv 的血液半衰期及抗体抵抗能力显著优于普通 Adv。结论:Adv 经 PEG 修饰后,可显著改善 Adv 血液半衰期短、易被抗体中和等缺点,对开发高效的、有理想药动学特征的 Adv 具有重要意义。

【关键词】腺病毒载体;聚乙二醇

【中国图书分类法分类号】Q 78 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-23

PEGylation of adenovirus vectors and its features

QIU Feng, et al

(*Department of Clinical Pharmacology Lab, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstact】*Objective:* To enhanced the physical stability of adenovirus vectors (Adv) and ablated humoral immune responses by PEGylation of adenovirus with polyethylene glycols. *Methods:* PEGylated Adv (PEG-Adv) was constructed by PEGylated adenoviral capsid proteins with activated methoxypolyethylene glycols, and gene expression was evaluated using A549 cells. Furthermore, the plasma half life and the antibody evasion ability were also evaluated. *Results:* PEG-adv could be protected from antibody neutralization in the high antibody titers to adenovirus, suggesting that PEGylation improve of the ability to administer Adv on a repeated basis. *Conclusion:* PEGylated Adv can maintain strong protective activity against antibodies. The approach described here could form the basis for further development of adenoviral gene therapy vectors with improved pharmacokinetics and increased efficiency of therapeutic gene transfer in disease.

【Key word】Adenovirus vector; Polyethylene glycol

由于腺病毒载体(Adenovirus vector, Adv)具有较强免疫原性,可能引起严重的免疫反应及炎症反应,且在体内清除速度快、半衰期短,Adv 的这些缺点不但降低了利用 Adv 进行基因治疗的效果,也增加了发生不良反应的可能性[1,2]。

聚乙二醇(PEG)是一种水溶性高分子化合物,其免疫原性和毒性较低,是一种理想的合成聚合物。将活化的 PEG 偶联到蛋白质、多肽和脂质体上可对其进行 PEG 修饰,经 PEG 修饰后,可提高蛋白质、多肽等的体内稳定性、延长半衰期、减小免疫原性及抗原性,并使其对肿瘤具有一定的被动靶向性[3-5]。

本实验中,通过对 Adv 衣壳蛋白质进行 PEG 修饰,得到 PEG 化 Adv(PEG-Adv),以实现降低 Adv 免疫原性、延长血液半衰期的目的。

作者介绍:邱 峰(1969-),男,讲师,博士,
主要研究方向:肿瘤基因免疫治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293 细胞、A549 细胞、含荧光素酶(Luc)基因的普通腺病毒载体 WT-Ad-Luc 由大阪大学药学研究科提供;BALB/c 小鼠、ICR 小鼠,均为雌性,6 周龄,购自 CLEA Japan, Inc.。

活化的甲氧基聚乙二醇 mPEG-SPA (MW 5 000) 购自 Shearwater Co. (USA),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自 Quality Biological, Inc. (USA),PAGE 购自 Daiichi Pure Chemicals Co. (Japan),考马斯亮兰 R250 购自 Fluka Chemie (Germany),Luc 基因对照载体 pGL3-Control Vector 购自 Promega Japan, 限制性内切酶 Xba 购自 Roche Diagnostics (Germany)、*Hind* Ⅲ购自 Boehringer Mannheim (Germany),DNA 回收试剂盒 QIAquick® Gel Extraction Kit、QIAamp® DNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

Blood Mini Kit 购自 QIAGEN (USA), Coomassie® Plus Protein Assay Reagent Kit 购自 Pierce Biotechnology (USA), Lipofectamine 2000®转染试剂购自 Invitrogen Co.(USA), OptiMEM I Reduced Serum Medium 购自 GIBCO BRL; Luc 检测试剂盒 Luciferase Assay System 购自 Promega Japan(Japan), 过滤灭菌装置 MILLEX®-GV 0.22 mL Filter unit(MILLIPORE)。

Beckman LE-80K 低温超速离心机, Beckman DU 650 分光光度计 (Beckman Coult, USA), 激光粒度分析仪 ZETASIZER 3000HS(Malvern instruments Co., UK)。

1.2 Adv 的 PEG 修饰

配制浓度为 1×10^{12} particles/mL 的 WT-Ad-Luc 溶液, 按每个病毒颗粒衣壳蛋白质含 7 500 个 Lys 残基[9]计算 mPEG-SPA 用量, 反应中 mPEG-SPA 与 Lys 的摩尔比分别为 25∶1、100∶1、400∶1、1 600∶1 和 6 400∶1, 加入相应量的 mPEG-SPA, 于 37℃, 搅拌, 反应 45 min(300 r/min), 制备得到不同修饰率的 PEG-Adv。

1.3 PEG-Adv 的纯制

在离心管中加入 CsCl 密度梯度离心液(比重 1.34), 将 PEG-Adv 缓慢加至密度梯度离心液表面, 于 18℃, 40.8 kr/min 离心 18 h; 吸取 PEG-Adv 离心层, 用切割分子量(WMCO)10 000 的超滤膜于 4℃, PBS(-)液中透析 1h, 更换为 10% 甘油 -PBS(-)透析 2 h, 分装 PEG-Adv 液, 于 -20℃保存。

1.4 PEG-Adv 的修饰率及粒子直径检测

采用 SDS-PEGE 法测定 PEG-Adv 的 PEG 修饰率。将 Adv 混悬液与等量 2×SDS-PEGE 蛋白上样缓冲液混合, 于 95℃反应 5 min 后, 进行 SDS-PAGE 电泳; 以考马斯亮兰进行蛋白质染色, 以 0.1 mol/L 碘溶液进行 PEG 染色; 用 NIH ImageJ 图像软件分析 PAGE 凝胶, 计算 PEG-Adv 衣壳蛋白质修饰率, 粒子直径用激光粒度分析仪检测。

1.5 PEG-Adv 基因转导实验

A549 细胞接种于 48 孔板(1×10^5 cells/mL)培养 24 h; 用 10% FBS-DMEM 配制适当浓度的 PEG-Ad-Luc 溶液, 分别按 300、1 000、3 000、10 000 particles/cell 加入 48 孔板, 培养 24 h, 用 Luciferase Assay System 测定 Luc 活性。

1.6 转染试剂介导的 PEG-Adv 基因转导

将 A549 细胞接种于 48 孔板(1×10^5 cells/mL)培养 24 h; 用 OptiMEM I Reduced Serum Medium 配制 Adv 和不同修饰率的 PEG-Adv 溶液, 分别加入 48 孔板 (1000 particles/cell), 并加入 Lipofectamine 2000®转染试剂(20 mg/mL)培养 4 h, 培养基更换为 10% FBS-DMEM 培养基培养 24 h 后, 用 Luciferase Assay System 测定 Luc 活性。

1.7 Luc 基因探针制备

将 pGL3- 对照载体用限制性内切酶 Xba、Hind Ⅲ酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 切取 1689 bp 电泳带, 用 QIAquick® Gel Extraction Kit 提取得到 Luc 基因探针。

1.8 PEG-Ad 血浆半衰期检测

取 PEG 修饰率分别为 0%、9.7%、34%、61.1%、89.3%、100%的 PEG-Adv, 用 PBS (-) 配制 1.5×10^{11} particles/ml 的 PEG-Adv 混悬液, 由 BALB/c 小鼠尾静脉注射上述各 PEG-Adv 100 μL, 分别于注射后 0、2、5、10、15、30 min 采静脉血分离血浆, 用 QIAamp® DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取 DNA; 用 Slot Blot 法检测血液中的 Adv, 分析计算血浆中 PEG-Adv 量。

1.9 小鼠抗 Adv 抗血清的制备

对 ICR 小鼠皮下注射 WT-Adv(4×10^8PFU)与弗氏完全佐剂(FCA), 并分别于初次注射后 2w、4w, 进行第 2、3 次免疫, 于第 5w 采集小鼠全血, 分离血清, MILLEX®-GV 过滤灭菌, 于 -20℃保存备用; 用 Coomassie® Plus Protein Reagent Kit 检测血清蛋白质浓度, 以 μg/ml 表示。血清 Adv 特异性抗体效价用 ELISA 法检测。

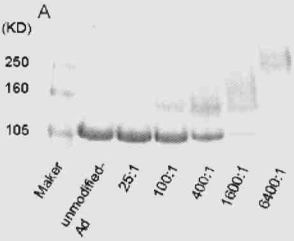
1.10 抗体存在下 PEG-Adv 的基因表达效率

A549 细胞接种于 48 孔板(1×10^5 cells/mL)培养 24h; 分别加入含抗 Adv 抗体的 ICR 小鼠血清(滴度分别为:6、8、9.5; 蛋白质量分别为:42、125、415 ng)和空白 ICR 小鼠血清, 加入不同 PEG 修饰率的 PEG-Adv(40 PFU/cell)培养 24 h, 测定 Luc 活性。

2 结 果

2.1 Adv 的 PEG 修饰

用 PEG 以不同比例对 Adv 颗粒衣壳蛋白进行 PEG 修饰, 通过 SDS-PAGE 电泳分析其修饰效率。蛋白质考马斯亮兰染色及 PEG 碘染色表明, 随着所加入 PEG 量的增加, 未 PEG 化 Adv 蛋白质电泳带逐渐消失(图 1A), 在高分子量区逐渐出现 PEG 电泳带 (图 1B), 当 PEG 量增加至 6 400 倍摩尔量时, 蛋白质电泳带完全消失, 而出现清晰的 PEG 带, 即该条件下所有衣壳蛋白质都被 PEG 修饰 (图 1A); 用 NIH ImageJ 图像分析程序计算得到 PEG 修饰率(表 1), 可见 Adv 的 PEG 修饰率随 PEG 量的增加而逐渐提高, 且 PEG-Adv 的粒子径相应增



维普资讯 http://www.cqvip.com

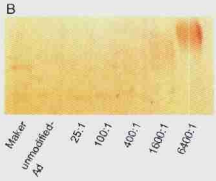


图 1 PEG-Adv 的 SDS-PAGE 实验结果

表 1 PEG 修饰率与病毒载体粒子径的关系

Rotio(Ad:PEG)	PEGylated-Capsid(%)	Vector size(nm)
1:0(unmodified)	0	113.3±0.76
1:25	9.7±0.82	120.6±0.64
1:100	34.0±3.16	123.8±0.98
1:400	61.1±4.94	128.5±1.25
1:1600	89.3±7.38	137.6±0.91
1:6400	100.0±8.87	148.2±1.48

大，所以，通过改变反应中 PEG 量，可调节 Adv 的 PEG 修饰率。

2.2 PEG-Adv 的基因转导效率

PEG-Adv 的基因转导率随 PEG 修饰率的增加而降低（图 2A），但在使用 Lipofectamine2000 转染试剂的情况下，PEG-Adv 仍具有 Adv 载体特有的高效基因转导能力（图 2B），所以，Adv 表面的 PEG 可能影响 Adv 基因转导效率，但并未改变 Adv 高效基因转导的特性。

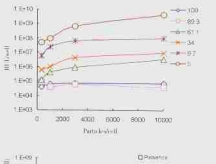


图 2 PEG-Adv 的基因转导效率

2.3 PEG-Adv 的血液半衰期

由小鼠尾静脉注射 Adv 和 PEG-Adv 后，其在血液中的经时变化过程如表 2 所示，随 PEG 修饰率的增加，PEG-Adv 的血浆半衰期逐渐延长，修饰率为 100%时 PEG-Adv 的血液半衰期为 Adv 的 50 倍。

表 2 PEG-Adv 的血液半衰期

PEGylated-Hexon	$t_{1/2}$ (min) (n=6)
0%（unmodified-Ad）	1.55
9.7%	1.84
34.0%	1.83
61.1%	5.03
89.3%	11.97
100.0%	78.56

2.4 PEG-Adv 载体的抗体抵抗能力

分别于小鼠抗 Adv 抗体阳性和阴性的条件下，检测不同修饰率 PEG-Adv 的基因转导情况。结果表明，随抗血清量的增加，Adv 的基因转导率迅速下降，而随着 PEG 修饰率的增加，PEG-Adv 基因转导率逐渐上升，即使在高浓度抗血清存在时，修饰率为 61.1%的 PEG-Adv 仍可保持较高的基因表达效率，其抗体抵抗能力约为未 PEG 化 Adv 的 30 倍（图 3）。

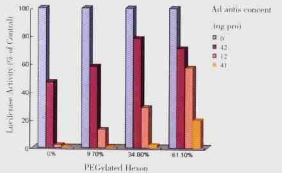


图 3 抗 Adv 血清阳性时 PEG-Adv 的转导效率

3 讨 论

Adv 虽然具有理想的基因转导效率，但却存在血液半衰期短、抗体中和致其作用减弱等缺点。本实验通过对 Adv 表面衣壳蛋白质进行 PEG 修饰，从而达到了延长其血液半衰期、抵抗抗体中和的目的。但是，对 Adv 进行 PEG 修饰后，PEG-Adv 表面 PEG 形成的立体位阻以及 Adv 纤毛与 （下转第 222 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

Ling RS 等[9]则认为孔隙率与骨水泥抗压强度间并无明显相关性,骨水泥的最大抗压强度不仅由孔隙率决定,粉剂的成分和分子量对其影响更大[10]。本研究中 Endurance 骨水泥粉剂预存温度及时间的改变对骨水泥干固后的最大抗压强度并未产生影响。这可以由以下两点来解释:(1)预冷粉剂并未改变干固后骨水泥的孔隙率。(2)温度降低对粉剂的成分及分子量无影响。

本试验对 Endurance 骨水泥粉剂预冷后骨水泥的孔隙率、密度及最大抗压强度等指标的研究表明:温度的降低并未损害骨水泥的生物力学性能。我们认为,可以在术前对骨水泥粉剂进行预冷,在不降低骨水泥生物力学性能的前提下增加使用骨水泥时的可操作性。这将有利于提高关节置换的质量。

参 考 文 献

[1] Iesaka K, Jaffe WL, Kummer FJ. Effects of the initial temperature of acrylic bone cement liquid monomer on the properties of the stem-cement interface and cement polymerization [J]. J Biomed Mater Res, 2004; 68B(2): 186-190.

[2] Buckley PJ, Orr JF, Revie IC, et al. Fracture characteristics of acrylic bone cement-bone composites [J]. Proc Inst Mech Eng [H], 2003; 217(6): 419-427.

[3] Mann KA, Mocarski R, Damron LA, et al. Mixed-mode failure response of the cement-bone interface[J]. J Orthop Res, 2001; 19(6):1153-1161.

[4] Toborek J, Gajda Z, Balin A. The effect of organism environment on bacteriostatic and mechanical properties of Palacos R cement mixed with antibiotic [J]. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, 2002; 67(6):605-611.

[5] Schelling K, Heisel C, Schnurer Sm, et al. New PMMA bone cements for vacuum mixing systems[J].Orthopade, 2002; 31(6): 556-562.

[6] Lewis G. Effect of mixing method and storage temperature of cement constituents on the fatigue and porosity of acrylic bone cement[J]. J Biomed Mater Res, 1999; 48(2): 148-149.

[7] Parks ML, Walsh HA, Salvati EA, et al. Effect of increasing temperature on the properties of four bone cements [J]. Clin Orthop,1998; 355: 238-248.

[8] Jasty M, Davies JP, O'Connor D, et al. Porosity of various preparations of acrylic bone cements[J]. Clin Orthop, 1990; 259: 122-129.

[9] Ling RS, Lee AJ. Porosity reduction in acrylic cement is clinically irrelevant[R]. Clin Orthop, 1998; 355: 249-253.

[10] Graham J, Pruitt L, Ries M, et al. Fracture and fatigue properties of acrylic bone cement: the effects of mixing method, sterilization treatment,and molecular weight [J]. J Arthroplasty, 2000; 15(8): 1028-1035.

(上接第 185 页) CAR的结合中心被修饰,使 PEG-Adv 经 CAR 介导的转染受阻,降低基因转导效率。

Adv 经 PEG 修饰使血浆半衰期延长的确切机制尚不清楚,可能是由于:(1)PEG 链的空间构型阻碍了 PEG-Adv 与 CAR 的结合;(2)PEG 覆盖于 Adv 颗粒表面,使表面近似于非离子(non-ionic)状态,抑制了免疫细胞对病毒颗粒的吞食作用,延长了在血液中的半衰期[7-9];(3)由于 PEG 链的立体位阻,可能使 PEG-Adv 具备抵抗中和抗体的能力。

综上所述,用高分子化合物 PEG 修饰 Adv,可改善 Adv 血液半衰期短、易被中和抗体中和等缺点;但 PEG 修饰对 CAR 介导的转染有一定的抑制作用,在今后的研究中,将在保持 PEG-Adv 优点的基础上,进一步改善其转染能力。

参 考 文 献

[1] Cao H, Koehler DR, Hu J. Adenoviral vectors for gene replacement therapy [J]. Viral Immunol, 2004;17(3):327-333.

[2] St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors [J]. Gene Ther, 2003;10(14):1135-1141.

[3] Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003;55(10):1261-1277.

[4] Molineux G. Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy [J]. Cancer Treat Rev, 2002;28 Suppl A:13-16.

[5] Baker DE. Pegylated interferons [J]. Rev Gastroenterol Disord, 2001;1(2):87-99.

[6] Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus Structure [J]. Human Gene Therapy, 2004;15(12): 1167-1176.

[7] Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly (ethylene glycol)-protein conjugates [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003;55(10): 1261-1277.

[8] Hinds KD, Kim SW. Chemistry for peptide and protein PEGylation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002;54(4):459-476.

[9] Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions [J]. Biomaterials, 2001;22(5):405-417.