



Najważniejsze cechy wektorów adenowirusowych

Magdalena Stopa, Józef Dulak, Alicja Józkowicz

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

The most important features of adenoviral vectors

Summary

One of the major hurdles to successful gene therapy is the ability to efficiently introduce a foreign nucleic acid into the tissue of interest. As adenoviruses possess ability to enter rapidly a mammalian host cell and achieve propagation, they are widely used as a tool for delivery transgenes. Recombinant adenoviral vectors of first generation (AdV) contain an expression cassette with exogenous genes and are made replication deficient by the deletion of the E1/E3 region. They offer many advantages for gene delivery: ability to transduce a wide variety of cell types in a cell-cycle independent manner, easy and cheap propagation process to high titers and low pathogenicity for humans. However, AdV also have some disadvantages, namely cytotoxicity, immunogenicity, transient expression of transgene, which are mostly important in case of clinical trials. Despite those limitations and development of more sophisticated adenoviral systems (helper-dependent adenoviral vectors), AdV of first generation are still widely used for transducing different cell types *in vitro*, especially those that are refractory to other gene transfer methods, as well as in gene therapy clinical trials.

Key words:

gene therapy, adenoviruses, adenoviral vectors.

Adres do korespondencji

Alicja Józkowicz,
Zakład Biotechnologii
Medycznej,
Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Gronostajowa 7,
31-271 Kraków;
e-mail:
alicia@mol.uj.edu.pl

1. Wstęp

Najpoważniejszym problemem terapii genowej, ograniczającym możliwości jej stosowania, jest uzyskanie odpowiednich nośników (wektorów) pozwalających na wydajne, a jednocześnie bezpieczne wprowadzenie materiału genetycznego do komórek pacjenta. Nośniki takie powinny skutecznie wnikać do komórek

docelowych, pozwalając na uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji transgenów, a jednocześnie nie mogą być cytotoksyczne i immunogenne (1). Wektory niewirusowe, zwłaszcza plazmidy wprowadzane jako nagi DNA lub za pomocą kationowych lipidów, nie indukują odpowiedzi odpornościowej i są bezpieczne dla organizmu. Niestety, zwykle są też mało wydajne, gdyż nawet po dostaniu się do komórki w większości są trawione w endosomach i tylko niewiele z nich wnika do jądra (2,3).

Dostarczanie egzogenego materiału genetycznego do komórek eukariotycznych jest jednak doskonale znane w przyrodzie – mechanizmy te zostały doprowadzone do perfekcji w toku ewolucji wirusów. Nic dziwnego, że najskuteczniejsze jak dotąd wektory zostały stworzone poprzez modyfikację genomów wirusowych. Dzięki temu uzyskano nośniki pozwalające na efektywną transdukcję komórek oraz wydajną ekspresję transgenów.

Spośród stosowanych wektorów wirusowych najbardziej efektywnymi nośnikami są wektory adenowirusowe (AdV). Transdukują one zarówno komórki dzielące się jak i nie dzielące się, pozwalając na silną ekspresję transgenów, a wprowadzony przez nie DNA nie wbudowuje się do chromosomów gospodarza, lecz pozostaje w jądrze w formie episomalnej. Nie niosą zatem ani zagrożenia mutagenizacją insercyjną ani ryzyka transmisji transgenów do linii zarodkowej (4,5). Nośniki te są też stosunkowo pojemne – można do nich wbudować DNA o długości 7-9 kb (w przypadku wektorów typu *gutless* nawet do 37 kb), co umożliwia wprowadzenie transgenów z pełną kasetą ekspresyjną, a także dołączenie dodatkowych elementów regulatorowych (3,5,6). W przeciwieństwie do infekcji adenowirusem dzikiego typu transdukcja wektorem adenowirusowym nie prowadzi do śmierci komórki (7,8). Co bardzo ważne, AdV mogą być dość łatwo namnażane do wysokich mian, a ich produkcja jest stosunkowo niedroga (8,9). Niestety, nośniki te mają też poważne wady – są silnie immunogenne, w wysokich dawkach również cytotoksyczne (3,10,11).

Indukcja odpowiedzi układu odpornościowego przez białka kapsydu wektora jest głównym czynnikiem ograniczającym wykorzystywanie AdV do dostarczania genów *in vivo*, zwłaszcza w próbach klinicznych (3,4,11), wymagających zachowania szczególnie dużej ostrożności (5,12). Ponadto, aktywowane limfocyty T cytotoksyczne rozpoznające białka wirusowe mogą wybiórczo niszczyć stransdukowane komórki, a co za tym idzie przyczyniać się do krótkotrwałej ekspresji transgenów i osłabienia efektu terapeutycznego (12). Należy jednak pamiętać, że w wielu przypadkach aktywacja układu immunologicznego może być tolerowana lub jest wręcz pożądana, a często do osiągnięcia trwałego efektu terapeutycznego wystarczy krótkotrwała ekspresja leczniczego transgenów. Tak jest np. w próbach leczenia nowotworów za pomocą terapii samobójczej, przy podawaniu szczepionek DNA, pobudzaniu procesów związanych z gojeniem się ran, czy indukcji angiogenezy (13-15). W efekcie AdV po kilku latach pozostawiania na drugim miejscu, za wektorami retrowirusowymi, są obecnie najczęściej stosowanymi nośnikami w klinicznych próbach terapii genowej (patrz: www.wiley.co.uk/genmed/clinical/, dane z roku 2006).

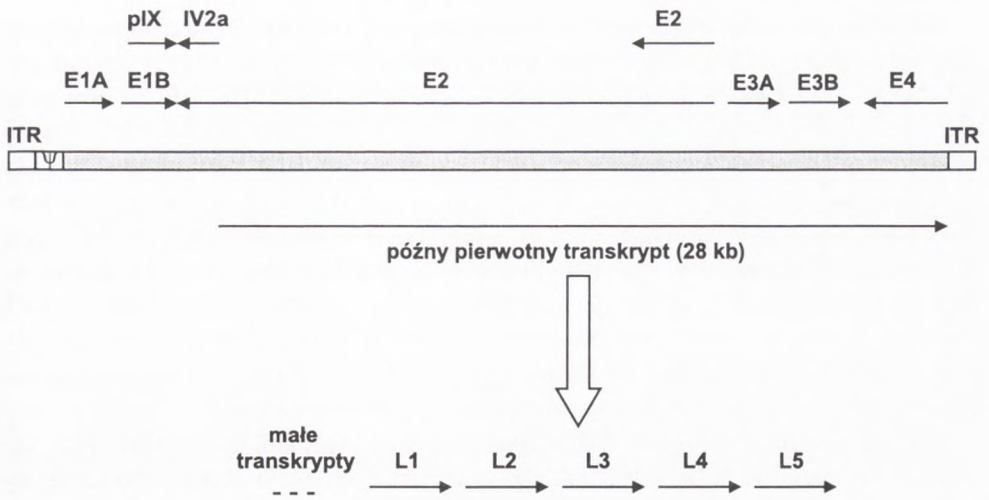
Immunogenność nie ma żadnego znaczenia przy transformacji hodowli komórkowych, toteż wektory adenowirusowe są doskonałymi nośnikami do wprowadzania transgenów do komórek inkubowanych *in vitro* – także tych, które są trudne do transfekcji lub transdukcji innymi metodami. Transfer genów za pomocą AdV wykorzystuje się powszechnie w badaniach fizjologii i patofizjologii komórek, a także do produkcji białek rekombinowanych (4,16,17). O skuteczności wektorów świadczy fakt, że nawet 20-40% białka produkowanego przez stransdukowaną komórkę, to białko kodowane przez transgen (4).

2. Proces infekcji

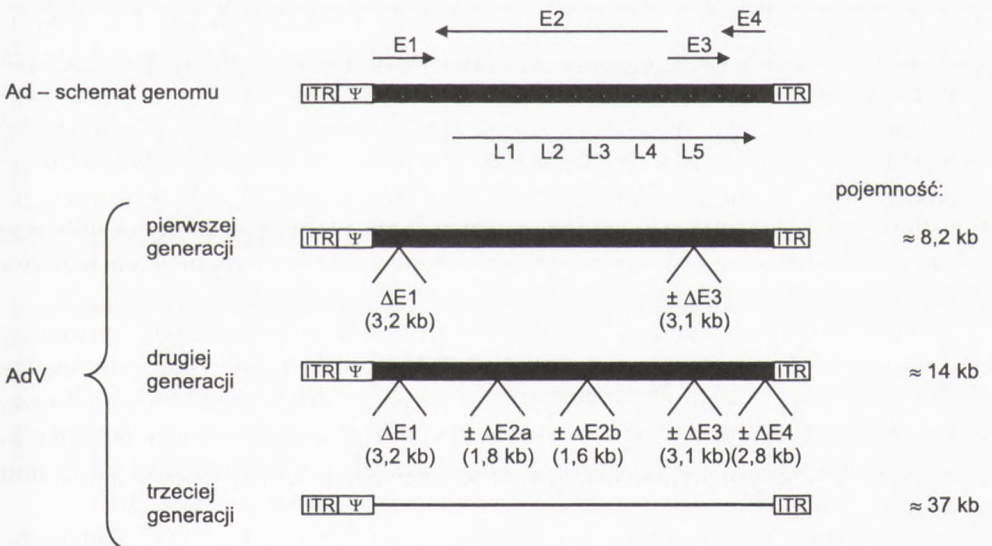
Adenowirusy (Ad) są cytolitycznymi, niegroźnymi dla człowieka wirusami, wywołującymi najczęściej łagodne infekcje układu oddechowego, zapalenie spojówek lub zatrucia pokarmowe (4,5,8). W niektórych przypadkach, jak się wydaje, mogą przyczyniać się do rozwoju kardiomiopatii idiopatycznej czy infekcji wątroby (4,15,18). Około 50% populacji ludzkiej ma przeciwciała przeciwko adenowirusom, co świadczy o powszechności zakażeń (19). Obecnie znanych jest 51 serotypów Ad, podzielonych na 6 podgrup (klasy A-F) (7,20). Najlepiej scharakteryzowano serotypy 2 (Ad2) i 5 (Ad5), należące do klasy C i to głównie one używane są do produkcji AdV (6,21).

Adenowirusy to wirusy bezotoczkowe, posiadające ikozedralny kapsyd o średnicy ok. 70-100 nm. Kapsyd zbudowany jest z trzech głównych typów białek – heksoнового, pentonowego i włókna zakończonego galką oraz licznych, dodatkowych białek (rys. 1) (5,7). Genom adenowirusów to linearny, dwuniciowy DNA o długości około 36 kb. Na jego końcach znajdują się sekwencje ITR (ang. *internal terminal repeats*) służące jako miejsce startu replikacji, a blisko jednego z nich leży sygnał pakowania DNA do kapsydu – sekwencja Ψ . DNA połączony jest z białkiem terminalnym, odpowiedzialnym za transport wirusowego DNA do odpowiedniego miejsca w jądrze komórki, gdzie zajdzie jego transkrypcja. Inne białka wchodzące w skład kapsydu to proteaza umożliwiająca uwolnienie DNA z kapsydu podczas infekcji oraz białka upakowujące DNA i łączące je z kapsydem (7,8,21).

Genom adenowirusa (rys. 2) ma kilka otwartych ramek odczytu i koduje 50-70 białek (4,21). Można w nim wyróżnić geny wczesne (ang. *early*, geny E1A i E1B, E2, E3, E4) i późne (ang. *late*, geny L1-L5), w zależności od tego czy ulegają transkrypcji przed czy po replikacji wirusowego DNA (7,8). Pierwsza, wczesna faza infekcji, obejmująca wniknięcie wirusa do komórki, wejście wirusowego DNA do jądra oraz transkrypcję i translację genów wczesnych, trwa w komórkach permissywnych 6-8 h. Późna faza infekcji, obejmująca replikację, a następnie ekspresję genów późnych oraz dojrzewanie wirionów zajmuje dalsze 4-6 h (7).



Rys. 1. Schemat organizacji genomu Ad5. Strzałki prezentują kierunki transkrypcji genów wczesnych (E) i późnych (L), jak również tzw. genów przejściowych pIX, IV2a, które choć znajdują się pod kontrolą MLP są transkrybowane na wczesnym etapie infekcji. Wszystkie transkrypty, z wyjątkiem pIX podlegają alternatywnemu składaniu. Do rozpoczęcia replikacji konieczne są ITR (ang. *inverted terminal repeats*), a Ψ jest sygnałem pakowania DNA do kapsydu (na podstawie (8) zmodyfikowane).



Rys. 2. Schemat genomu adenowirusa (Ad), oraz genomów wektorów pierwszej, drugiej i trzeciej generacji (na podstawie (6) zmodyfikowane).

Infekcja adenowirusowa rozpoczyna się od interakcji białka gałki z błoną komórkową, a konkretnie ze znajdującym się na jej powierzchni receptorem o dużym powinowactwie – CAR (ang. *coxsackie-adenovirus receptor*) (7,22) Jest to receptor konserwatywny, występujący również na komórkach innych gatunków, dzięki czemu można infekować, np. komórki mysie ludzkimi serotypami adenowirusów (23). Prawdopodobnie istnieją również inne receptory, do których mogą wiązać się kapsydy adenowirusowe. W ostatnich badaniach wykazano na przykład, że Ad37 jest rozpoznawany przez receptor sialoglikanowy, co może tłumaczyć jego ułatwione wnikanie do spojówki (24,25). Warto wspomnieć, że podobieństwa w budowie CAR i MHC-I (główny kompleks zgodności tkankowej I) skłaniają niektórych badaczy do przypuszczeń, że białka MHC-I mogą odgrywać rolę w procesie infekcji adenowirusowej (26).

Nie odkryto, jak dotąd, żadnych szlaków przekazu sygnału, które byłyby aktywowane przez receptor CAR, toteż, jak się wydaje, nie jest on konieczny do samej internalizacji kapsydu (25). Niezbędna do wniknięcia adenowirusa do komórki jest natomiast interakcja między motywem RGD białka pentonowego kapsydu, a integrynami $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$ lub $\alpha_V\beta_1$ (24,25). Indukuje ona szlaki przekazu sygnału działające poprzez kinazę PI-3K, które z kolei wywołują zmiany w cytoszkieletcie (7,24). Nie wiadomo czy oddziaływanie CAR i integryn ze swoimi ligandami następuje jednocześnie czy sekwencyjnie, choć ta druga możliwość jest, jak się wydaje, bardziej prawdopodobna (25). Obecność receptorów w błonie komórkowej to czynnik bezpośrednio determinujący wydajność z jaką wektory adenowirusowe infekują daną tkankę i linię komórkową (27).

Interakcja białek kapsydu z receptorami powierzchniowymi pociąga za sobą endocytozę poprzez pęcherzyki opłaszczone klatryną, choć przy wysokich wielokrotnościach infekcji (MOI, ang. *multiplicity of infection*) możliwa jest również endocytoza poprzez pęcherzyki nieopłaszczone lub makropinocytoza (7,24). W endosomie kapsyd jest częściowo degradowany przy udziale wirusowej proteazy. Nie dochodzi jednak do jego całkowitego zniszczenia przez proteazy lizosomalne, gdyż wirus wydostaje się do cytoplazmy. Warunkiem koniecznym do ucieczki adenowirusa z endosomu jest niskie pH, a dodatkowym czynnikiem ułatwiającym permeabilizację błony endosomalnej jest integryna $\alpha_V\beta_5$ połączona z pentonowym białkiem kapsydu (24).

Po ucieczce z endosomu, częściowo zdeintegrowany wirion zostaje skierowany ku porom jądrowym, z wykorzystaniem komórkowego systemu transportu między mitochondrium a jądrem (7,24) Białka heksonowe pozostają przed błoną jądrową, a DNA wchodzi do środka przez pory otoczki jądrowej, wykorzystując lamininę B, importyny i białka hsp70 (7,24). Proces wejścia wirusa do komórki trwa od 15 min do 1h (4,7), a zaraz po nim zachodzi transkrypcja wirusowego DNA (4).

W przypadku adenowirusów typu dzikiego, jako pierwszy transkrypcji ulega region E1 – już po 45 minutach od kontaktu z komórką pojawiają się jego mRNA (4). Białka kodowane przez ten region wprowadzają komórkę gospodarza w fazę S, od-

powiednią do efektywnego namnażania się wirusa i umożliwiają ekspresję kolejnych genów wirusowych (8,21). Ponadto, geny regionu E1B przeciwdziałają wejściu komórki na drogę apoptozy poprzez blokowanie proapoptotycznych czynników transkrypcyjnych, między innymi p53 (4,7). Geny regionu E1A mogą jednak wywierać także przeciwny wpływ na białko p53, zwiększając jego syntezę i stabilność (7).

Transaktywacja regionu E2 jest możliwa dzięki produktom regionu E1, a białka kodowane przez region E2 są z kolei konieczne do replikacji genomu adenowirusa (3,4). Są to m.in. polimeraza, białko wiążące ssDNA (DBP, ang. *DNA binding protein*) i białko preterminalne (pTP, ang. *pre-terminal protein*). Replikacja zachodzi około 5-6 h po zakażeniu (7,8).

Region E3 koduje m.in. adenowirusowe białko śmierci (ADP, ang. *adenoviral death protein*), ułatwiające lizę komórki i uwolnienie wirionów potomnych (7,8). Koduje także białko gp19K, które zmniejsza cytotoksyczną i humoralną odpowiedź komórki na infekcję (18,28). Hamuje ono działanie białek MHC I, zapobiegając ich transportowi na powierzchnię komórki i opóźnia aktywację czynnika NFκB, zmniejszając syntezę mediatorów prozapalnych (7,18). W rezultacie białka regionu E3 osłabiają obronną odpowiedź komórki, która mogłaby ograniczyć rozprzestrzenianie się wirusa (18).

Produkty regionu E4 biorą udział w metabolizmie wirusowego mRNA i promują replikację wirusowego DNA przy jednoczesnym zablokowaniu syntezy białek komórkowych. Wraz z białkami E1B inaktywują białko p53, przeciwdziałając apoptozie (7).

Geny późne kodują białka kapsydu i rdzenia. Znajdują się one pod wspólną kontrolą promotora MLP (ang. *major late promotor*) i powstają dzięki alternatywnemu składaniu jednego transkryptu (7,8). MLP jest wyciszony podczas transkrypcji genów E, a ekspresja genów późnych może przebiegać, gdy genom wirusa ulegnie już replikacji (czyli około 12-36 h po zakażeniu), dzięki aktywacji promotora przez produkty genów wczesnych (3,7). Zreplikowany DNA wnika do niedojrzałego kapsydu, po czym dzięki procesom proteolitycznym formowana jest dojrzała cząstka wirusowa (4,7). Proces pakowania genomu adenowirusowego do kapsydu odbywa się w jądrze i zależy od znajdującej się w DNA wirusa sekwencji Ψ (7,21). Następnie dochodzi do zniszczenia otoczki jądrowej, przedostania się wirionów do cytoplazmy, dezintegracji plazmalemy i uwolnienia wirusów z komórki (7). Liza komórki ma miejsce 24-36 h po zakażeniu i prowadzi do uwolnienia 10^3 - 10^5 wirionów (4,5).

3. Odpowiedź immunologiczna wywołana podaniem AdV

Najważniejsze czynniki ograniczające stosowanie AdV w terapii genowej to reakcja zapalna, będąca głównym powodem zaniku ekspresji transgeny, oraz produkcja przeciwciał uniemożliwiających powtórne podanie wektora (3,11,12,29). Indukcja odpowiedzi immunologicznej związana z użyciem AdV jest procesem skomplikowa-

nym, wielostopniowym, angażującym zarówno mechanizmy odporności wrodzonej jak i nabytej.

Wrodzona reakcja odpornościowa, będąca pierwszą linią obrony, rozwija się gwałtownie w ciągu 24 h po zakażeniu i trwa około czterech dni, znacząco wpływając na czas ekspresji transgenu (12,30). Uważa się, że jest ona odpowiedzialna za utratę 70-90% stransdukowanych komórek (31). W przeciwieństwie do odporności nabytej, odporność wrodzona zależy od dawki wektora, jest indukowana niezależnie od ekspresji transgenu i produkcji białek wirusowych, a skierowana jest przeciwko białkom kapsydu (30,32). Opiera się głównie na działaniu neutrofilów, makrofagów i komórek NK oraz mastocytów i bazofili (33-35). Komórki te ograniczają transdukcję zarówno bezpośrednio, poprzez zabijanie stransformowanych komórek, jak i poprzez produkcję cytokin i chemokin, będących chemoatraktantami i aktywatorami dla komórek prezentujących antygen, odpowiedzialnych za powstanie nabytej reakcji odpornościowej (12,30). Do syntetyzowanych lokalnie czynników prozapalnych, będących podstawowym składnikiem wczesnej odpowiedzi na AdV, należą: TNF, IL-6 i IL-8, a ponadto IL-12, IP-10, RANTES, MIP-1 α , MIP-2 i MCP-1 (30,34,36). Cytokiny uwalniane są także przez inne tkanki, np. komórki nabłonka i śródbłonek, co zwiększa naciek neutrofilów i nasila reakcję zapalną (3,7).

Aktywacja produkcji cytokin nie zależy od ekspresji genów wektora, lecz jest najprawdopodobniej efektem samej infekcji AdV (30,31). Wciąż nie wiadomo jednak, co jest bezpośrednim powodem indukcji – związanie przez komórkę kapsydów, ich internalizacja, przejście AdV przez cytoplazmę czy ucieczka z endosomu (30). Nie są również dokładnie zbadane szlaki przekazu sygnału wpływające na reakcję zapalną oraz odpowiedź antywirusową (30). Najważniejsza jest, jak się wydaje, aktywacja NF κ B, indukowana w obecności kapsydu wirusowego już w kilkanaście minut lub kilka godzin po zakażeniu (7,30,36). Dodatkowo aktywowany może być również układ dopełniacza (33).

Odpowiedź zapalna polegająca na uwolnieniu dużych ilości IL-6, IL-12 oraz TNF pojawia się około 6 h po zakażeniu i zależy przede wszystkim od aktywacji makrofagów i komórek dendrytycznych (12,35). Objawia się silnym naciekiem leukocytów, głównie w wątrobie, co może wywoływać jej nekrozę (11,33,34). W jednej z prób klinicznych terapii genowej z wykorzystaniem AdV, nagły wzrost ilości IL-6 po podaniu wektora oraz gwałtownie rozwijające się zapalenie prowadzące do zaburzenia funkcji wielu organów spowodowały śmierć pacjenta (5,12).

Odporność nabyta rozwija się w ciągu 5-7 dni po zakażeniu, choć w przypadku powtórnego podania AdV pojawia się znacznie szybciej (3,37). Obejmuje ona naciek limfocytów, produkcję przeciwciał anti-Ad rozpoznających białka wirusowe i prowadzi do śmierci stransdukowanych komórek (12,38). Jest ona przynajmniej częściowo skorelowana z syntezą białek wirusowych, które są następnie prezentowane przez białka MHC klasy I, powodując powstanie cytotoksycznych limfocytów T (CTL, ang. *cytotoxic lymphocytes*), specyficznych względem białka wirusowego lub transgenicznego (12,32). CTL uwalniają perforyny i prowadzą do lizy stransdukowanych ko-

mórek (7). Na podstawie niektórych badań sugeruje się, że synteza białek wirusowych nie jest konieczna do aktywacji CTL, gdyż może ona również zachodzić na skutek działania pustych kapsydów (36,32). Produkcja białek AdV jest jednak najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za aktywację limfocytów Th1, które poprzez uwalnianie IL-2 i IFN γ dodatkowo stymulują rozwój specyficznych CTL (12,30).

Kolejną przeszkodą w osiągnięciu trwałej ekspresji transgenu jest odpowiedź humoralna układu immunologicznego (9,7). Antygeny wirusowe są prezentowane przez białka MHC-II, a następnie rozpoznawane przez limfocyty Th2, które poprzez uwolnienie cytokin takich jak IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 powodują różnicowanie limfocytów B w komórki plazmatyczne, produkujące przeciwciała skierowane przeciwko białkom kapsydu (7,12). Choć przeciwciała nie są odpowiedzialne za eliminację transdukowanych komórek, to opłaszczają one cząstki wirusowe i nasilają ich fagocytozę przez makrofagi, osłabiając tym samym efektywność transdukcji, szczególnie przy powtórnym podaniu wektora tego samego serotypu (3,9,12,38). Należy ponadto pamiętać, że większość ludzi posiada już przeciwciała anty-Ad jako efekt infekcji adenowirusami, co sprawia, że ten etap odpowiedzi immunologicznej pojawia się już przy pierwszym podaniu AdV (7,12). Co więcej, rozwija się również, często ignorowana, odpowiedź immunologiczna przeciwko samemu transgenowi, która znacząco wpływa na neutralizację białka transgenicznego (12,38). Na podstawie niektórych badań wskazuje się, że to właśnie immunogenność transgenu, a nie białek wirusowych, jest głównym czynnikiem ograniczającym czas ekspresji, a sam transgen może być wręcz konieczny do aktywacji odpowiedzi limfocytów CTL czy Th (12).

4. Klasyfikacja wektorów adenowirusowych

Obecnie stosowane i udoskonalane są trzy główne klasy AdV – wektory I generacji, wektory II generacji i wektory III generacji (ang. *gutless*, *guttled*, *helper-dependent*) (rys. 2) (3,6,9).

Modyfikacja genomu adenowirusa mająca na celu otrzymanie AdV pierwszej generacji polega na wklonowaniu kasety ekspresyjnej zawierającej transgen, promotor, intron i sygnał poliadenylacji w miejsce usuniętego regionu E1 (6,7,8). Stworzony wektor, na skutek braku genów E1 nie może się namnażać w transdukowanych komórkach i ma znacznie upośledzoną ekspresję pozostałych genów wirusowych (3,7). Do produkcji (czyli namnażania) AdV służą zatem specjalne linie komórkowe (komórki pakujące – HEK293, 911, PER.C6), stabilnie transfekowane regionem E1 i dostarczające niezbędnych aktywatorów *in trans* (5,6,17).

Genom AdV o długości przekraczającej 105% genomu dzikiego Ad jest niestabilny i podlega rearanzacji już przy trzecim lub czwartym pasażu. Dlatego wielkość transgenu, który może zostać umieszczony w wektorze pierwszej generacji Δ E1, to ok. 5,1 kb (3,2 kb zajmowane przez region E1 i dodatkowe 2 kb, o które maksymal-

nie może zostać powiększony genom wektora bez ryzyka zmniejszenia miana oraz szybkości namnażania AdV). Dodatkowo możliwa jest delecja regionu E3, co zwiększa dopuszczalną wielkość transgenu o kolejne 3,1 kb (3,4,18). Czasami jednak pozostawienie tego regionu może być pożądane, gdyż hamując wywołaną infekcją odpowiedź immunologiczną wydłuża on czas ekspresji transgenu (10,28,33).

Silna aktywacja układu odpornościowego związana ze stosowaniem wektorów adenowirusowych pierwszej generacji sprawiła, że dalszy rozwój AdV poszedł w kierunku usuwania z genomu wirusa kolejnych fragmentów (4,5,6) (tab.). W ten sposób powstały wektory II generacji, które charakteryzują się dodatkowymi delecjami w regionach E2 i E4, całkowicie hamującymi replikację i zwiększającymi pojemność AdV do około 14 kb (3,39). Wektory te wywołują mniejszy odczyn zapalny i w niektórych przypadkach pozwalają na przedłużoną ekspresję transgenu. Mniejsze jest również ryzyko rekombinacji prowadzącej do powstania wirusów zdolnych do replikacji (7,39). Do produkcji tych wektorów konieczne są linie pakujące dostarczające *in trans* produkty genów E2 i E4 (3,6).

Tabela

Zalety i wady różnych klas wektorów adenowirusowych (na podstawie (3) zmodyfikowane)

Struktura genomu/delecje	Maksymalna pojemność	Główne wady	Główne zalety
ΔE1 ΔE1, ΔE3	4 kb 8 kb	krótki czas ekspresji transgenu, silna odpowiedź zapalna	łatwość produkcji
ΔE1, ΔE2A, ΔE3	9 kb	trudne do namnażania	obniżony odczyn zapalny
ΔE1, ΔE2B, ΔE3	12 kb	wzbudzają odczyn zapalny	zredukowana ostra toksyczność, wydłużona ekspresja transgenu, łatwe do przeskalowania produkcji
E1-, E3-, E4- delecja proteazy	10 kb 4-8 kb	bardzo krótka ekspresja transgenu ekspresja wszystkich białek wirusowych	zredukowany odczyn zapalny możliwość replikacji – podwyższenie poziomu ekspresji transgenu
100 K	4-9 kb	ekspresja wielu białek wirusowych	replikacja podwyższa poziom ekspresji transgenu, obniżona ekspresja genów późnych, obniżona toksyczność
delecja wszystkich sekwencji kodujących	37 kb	trudność w produkcji dużych mian, zanieczyszczenie wektorem pomocniczym	duża pojemność, zredukowana ostra i chroniczna toksyczność, zwiększony poziom i czas ekspresji transgenu

Inny typ wektorów adenowirusowych to AdV pozbawione proteazy lub genu 100 K. Nie są one defektywne replikacyjnie, ale nie mogą produkować funkcjonalnych kapsydów. Toteż mimo replikacji zrekombinowanego wirusowego DNA zawierającego transgen (a co za tym idzie – zwiększenia poziomu ekspresji transgenu) nie dochodzi do uwalniania wirionów i lizy komórki (3).

Wektory III generacji zostały pozbawione wszystkich genów wirusowych. Genom AdV typu gutless składa się zatem z sekwencji ITR, sekwencji pakującej Ψ , wprowadzonego transgenu oraz ewentualnie wypełniacza, czyli odcinka DNA niezawierającego sekwencji kodujących, ale zapewniającego odpowiednią długość genomu (3,6,7). Pojemność wektorów zwiększa się w ten sposób do 37 kb (3,5). Ich wadą jest skomplikowany proces produkcji i konstrukcji, wymagający m.in. użycia wektora pomocniczego (3,6). Całkowite zablokowanie syntezy *de novo* białek wirusowych sprawia, że nośniki te wywołują bardzo niewielki w porównaniu z wektorami pierwszej generacji odczyn zapalny i naciek limfocytarny (4,5). Reakcja immunologiczna indukowana przez kapsydy AdV nie zostaje jednak przewyżczona (12). Mimo to możliwe jest znaczne wydłużenie czasu ekspresji transgenu w porównaniu z AdV poprzednich generacji (3,40).

5. Podsumowanie

Wektory AdV są zaledwie jedną z wielu metod wprowadzania transgenu do komórek. Jednakże zalety tego typu nośników sprawiają, że w wielu przypadkach są one metodą z wyboru stosowaną w badaniach nad terapią genową. Do licznych zalet można również dodać stosunkowo prosty proces produkcji, którego zarys, jak również sposoby optymalizacji, zostały przedstawione w artykule *Produkcja wektorów adenowirusowych pierwszej generacji – optymalizacja metody* (41).

Praca finansowana z projektów PBZ-KBN 105 P05 2004 i 2 P04 016 26 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Magdalena Stopa otrzymuje stypendium Sapere Auso z Małopolskiej Fundacji Stypendialnej. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

Literatura:

1. Szala S., (red.), (2003), *Terapia genowa*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
2. Niidome T., Huang L., (2002), *Gene Ther.*, 9, 1647-1652.
3. Amalfitano A., Parks R. J., (2002), *Curr Gene Ther*, 2, 111-133.
4. Amalfitano A., (2004), *Methods*, 33, 173-178.
5. Volpers C., Kochanek S., (2004), *J. Gene Med.*, 6, S164-S171.
6. Danthinne X., Imepriale M. J., (2000), *Gene Ther.*, 7, 1707-1714.
7. Russell W. C., (2000), *J. Gen. Virol.*, 81, 2573-2604.
8. Yeh P., Perricaudet M., (1997), *FASEB J.*, 11, 615-623.
9. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M., (1999), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10, 440-447.
10. Chuah M. K. L., Collen D., VandenDriessche T., (2003), *Current Gene Ther.*, 3, 527-543.
11. Yang Y., Nunes F. A., Berencsi K., Furth E. E., Gonczol E., Wilson J. M., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4407-4411.
12. Schagen F. H. E., Ossevoort M., Toe R. E. M., Hoeben R. C., (2004), *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 50, 51-70.

13. Bonnekoh B., Greenhalgh D. A., Bundman D. S., Kosai K., Chen S. H., Finegold M. J., Krieg T., Woo S. L. C., Roop D. R., (1996), *J. Invest. Dermatol.*, 106, 1163-1168.
14. Bramson J. I., Graham F. L., Gauldie J., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6, 590-595.
15. Crombleholme T. M., (2000), *Wound Repair Regen.*, 8, 460-472.
16. Massie B., Mosser D. D., Koutroumanis M., Vitte-Mony I., Lamoureux L., Couture F., Paquet L., Guilbault C., Dionne J., Chahla D., Jolicoeur P., Langelier Y., (1998), *Cytotechnology*, 28, 53-64.
17. Wang Y., Huang S., (2000), *Drug Discov. Today*, 5, 10-16.
18. Horowitz M. S., (2004), *J. Gene Med.*, 6, S172-S183.
19. Nadeau I., Kamen A., (2003), *Biotechnol. Adv.*, 20, 475-489.
20. Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T., (2003), *Mol. Ther.*, 8, 813-821.
21. Mizuguchi H., Kay M. A., Hayakawa T., (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 165-176.
22. Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., (1997), *Science*, 275, 1321-1323.
23. Bergelson J. M., Krithivas A., Celi L., Drouguett G., Horwitz M. S., Wickham T., Crowell R. L., Finberg R. W., (1998), *J. Virol.*, 72, 415-419.
24. Meier O., Greber U. F., (2004), *J. Gene Med.*, 6, S152-S163.
25. Nemerow G. R., (2000), *Virology*, 274, 1-4.
26. Nalbantoglu J., Pari G., Karpati G., Holland P. C., (1999), *Hum. Gene Ther.*, 10, 1009-1019.
27. Stopa M., Dulak J., Józkowicz A., (2007), *Biotechnologia*, 3, 123-140.
28. Bruder J. T., Jie T., McVey D. L., Kovsesi I., (1997), *J. Virol.*, 71, 7623-7628.
29. Yang Y., Li Q., Ertl H. C., Wilson J. M., (1995), *J. Virol.*, 69, 2004-2015.
30. Liu Q., Muruje D. A., (2003), *Gene Ther.*, 10, 935-940.
31. McCarter S. D., Scott J. R., Lee P. J., Zhang X., Choi A. M. K., McLean C. A., Badhwar A., Dungey A. A., Bihari A., Harris K. A., Potter R. F., (2003), *Gene Ther.*, 10, 1629-1635.
32. Molinier-Frenkel V., Gahery-Segard H., Mehtali M., Le Boulaire C., Ribault S., Boulanger P., Tursz T., Guillet J.-G., Farace F., (2000), *J. Virol.*, 74, 7678-7682.
33. Lieber A., He C.-Y., Meuse L., Schowalter D., Kirillova I., Winther B., Kay M. A., (1997), *J. Virol.*, 71, 8798-8807.
34. Muruve D. A., Barnes M. J., Stillmann I. E., Libermann T. A., (1997), *Hum. Gene Ther.*, 10, 965-976.
35. Zhang Y., Chirmule N., Gao G.-P., Qian R., Croyle M., Joshi B., Tazelaar J., Wilson J. M., (2001), *Mol. Ther.*, 3, 697-707.
36. Borgland S. L., Bowen G. P., Wong N. C. W., Libermann T. A., Muruve D. A., (2000), *J. Virol.*, 3941-3947.
37. Harvey B. G., McKinney R. L., Rosengart T., Lesser M. L., Crystal R. G., (2002), *Mol. Ther.*, 6, 287-297.
38. Yang Y., Su Q., Wilson J. M., (1996), *J. Virol.*, 70, 7209-7212.
39. Lusky M., Christ M., Rittner K., Dieterle A., Dreyer D., Mourot B., Sxhultz H., Stoeckel F., Pavirani A., Mehtali M., (1998), *J. Virol.*, 72, 2022-2032.
40. Kim I. H., Józkowicz A., Piedra P. A., Oka K., Chan L., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23, 13282-13287.
41. Stopa M., Jaźwa A., Mleczko K., Dulak J., Józkowicz A., (2007), *Biotechnologia*, 3, 98-122.