

用于基因治疗的非病毒附着体载体研究进展

张伟莉¹ 杜秋杰¹ 朱嘉懿¹ 王浩民¹ 乔可欣¹ 王天云^{1,2} 赵春澎^{1*} 张玺^{2,3} 王小引^{1,2*}

(¹新乡医学院基础医学院, 新乡 453003; ²河南省重组药物蛋白表达系统国际联合实验室, 新乡 453003;

³新乡医学院药学院, 新乡 453003)

摘要 基因转移载体在基因治疗中起着关键的作用。非病毒附着体载体可以附着而非整合到宿主细胞染色体上, 克服了病毒载体及整合载体带来的副作用, 是目前安全、理想的可用于基因治疗的表达载体。然而, 其低克隆形成率、低表达量和低拷贝数限制了其在基因治疗中的应用。自第一代非病毒附着体载体构建以来, 采用截短核基质附着区(matrix attachment region, *MAR*)元件、减少*CpG*岛的数量、选择合适的启动子、使用调控元件等一系列措施调控其表达水平和稳定性, 不仅提高了非病毒附着体载体的转染效率, 而且使其表现出了高表达水平和高稳定性。目前, 该载体已经广泛应用于各个系统疾病的基因治疗研究。该文综述了非病毒附着体载体的各种优化策略的研究进展, 并对其在基因治疗中的潜在应用价值进行了讨论。

关键词 附着体载体; 非病毒载体; 载体优化; 基因治疗

Advances of Non-Viral Episomal Vectors for Gene Therapy

ZHANG Weili¹, DU Qiuji¹, ZHU Jiayi¹, WANG Haomin¹, QIAO Kexin¹, WANG Tianyun^{1,2},

ZHAO Chunpeng^{1*}, ZHANG Xi^{2,3}, WANG Xiaoyin^{1,2*}

(¹School of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

²Henan International Joint Laboratory of Recombinant Therapeutic Protein Expression System, Xinxiang 453003, China;

³School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract Gene transfer vector plays a key role in gene therapy. Non-viral episomal vectors can be episomal replication within the host cell rather than be integrated to the host to overcome the adverse effects of viral vector and integrated vector, so it is a safe and ideal expression vector for gene therapy. However, its application in gene therapy is limited because of its low clone formation rate, low expression and low copy number. Since the construction of the first generation of non-viral episomal vectors, a series of measures, such as truncating *MAR* elements, reducing the number of *CpG* motifs, selecting suitable promoters, using regulatory elements have been used to regulate their expression levels and stability, resulting in improving transfection efficiency, and make it exhibit higher expression level and stability. And these vectors have been widely used in gene therapy research for various systemic diseases. This paper reviewed the research progress of various strategies for optimization of non-viral episomal vectors and discussed their applications in gene therapy.

Keywords episomal vector; non-viral vector; vector optimization; gene therapy

收稿日期: 2021-05-13 接受日期: 2021-09-29

国家自然科学基金(批准号: U1804168)、河南省高等学校重点科研项目(批准号: 22A310009)和大学生创新创业训练计划(批准号: S202110472014)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3029127, E-mail: 1090069176@qq.com; wxyin@xxmu.edu.cn

Received: May 13, 2021 Accepted: September 29, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.U1804168), the Key Scientific Research Projects in Universities of Henan Province (Grant No.22A310009) and the Henan College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (Grant No.S202110472014)

*Corresponding authors. Tel: +86-373-3029127, E-mail: 1090069176@qq.com; wxyin@xxmu.edu.cn

基因治疗是将人类正常基因或治疗基因以某种方式转移到人类靶细胞或生物组织中,用于纠正导致疾病发展的缺陷基因以达到治疗目的的一种技术。1990年世界上第一例基因治疗临床试验在美国被批准实施,研究人员利用逆转录病毒载体将人腺苷酸脱氨酶(adenosine deaminase, *ADA*)基因体外导入淋巴细胞后再将其回输至体内,成功治愈了一名患有ADA缺乏症的重度联合免疫缺陷病的4岁女孩。这是人类历史上首例成功的基因治疗临床试验,该试验的成功标志着基因治疗时代的来临^[1]。基因治疗的主要途径之一是将外源基因装配到适宜的载体传递系统,再直接输入至人体。基因治疗载体根据DNA/RNA序列的种类和来源可分为病毒载体和质粒载体^[2]。在病毒载体中,逆转录病毒载体是最常用的载体,由于病毒自身含有病毒蛋白及癌基因,宿主细胞有感染病毒和致癌的可能性。与病毒载体相比,质粒载体毒性低、免疫反应也比较低,但其表达一般是短暂的,且效率较低。表达载体按照进入宿主细胞后的存在状态可分为整合载体和附着体载体。由于整合载体的位置效应可引起插入突变或者导致疾病的发生,与整合载体相比,附着体载体可以消除与宿主基因组的非特异性整合,从而消除转化的风险。

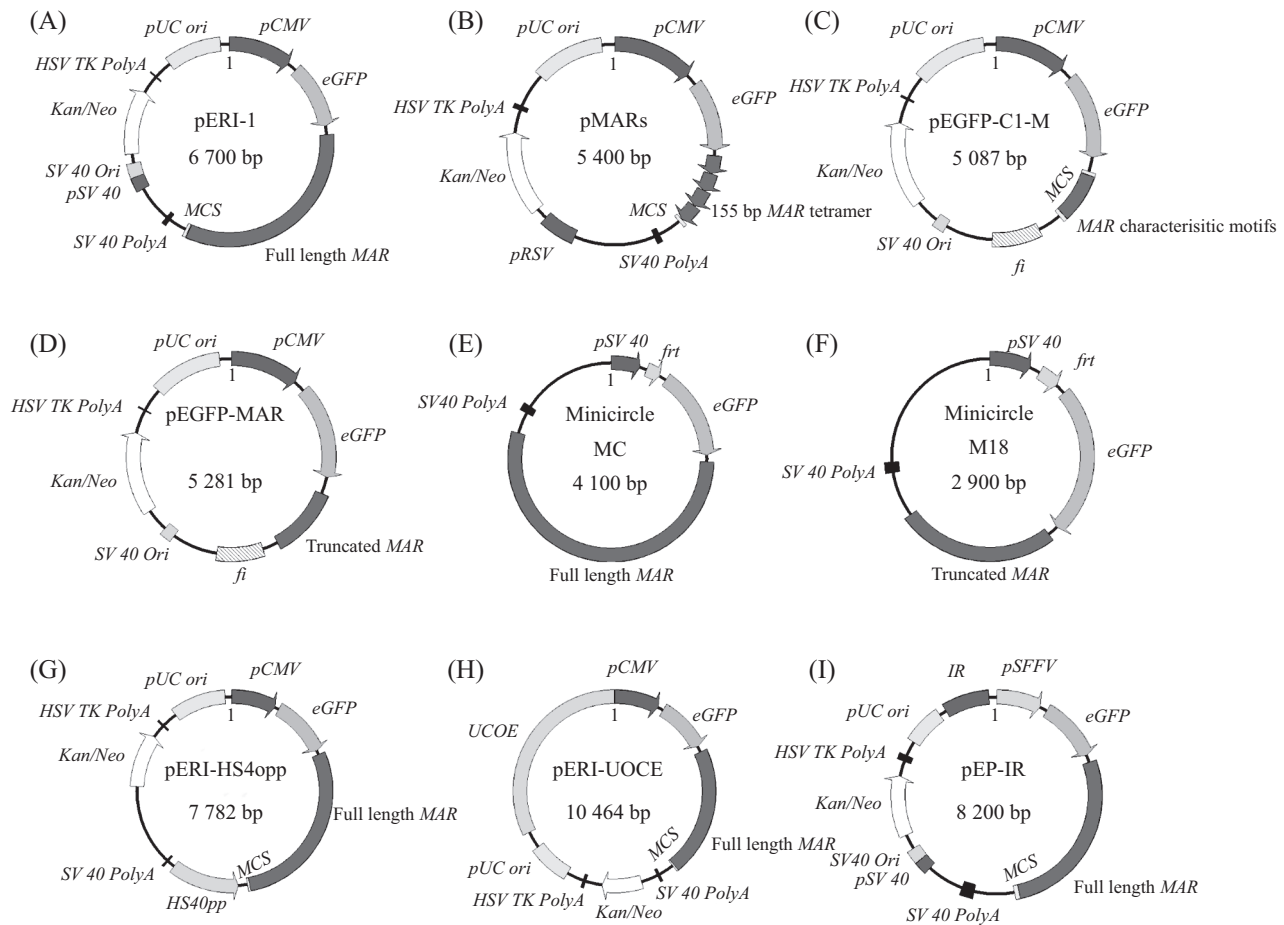
1 非病毒附着体载体

附着体载体转染宿主细胞后不整合到基因组上,以附着染色体外的形式存在,其包括病毒附着体载体和非病毒附着体载体。病毒附着体载体是由腺病毒(Adenovirus)、腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)、单纯疱疹病毒(Herpes Simplex virus, HSV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus, EBV)等病毒介导的,在真核细胞中通过复制起始点和顺式作用元件共同作用进行复制,由于会产生病毒蛋白并且转移到其宿主细胞中,从而造成宿主细胞病理损害甚至形成肿瘤^[3-4]。非病毒附着体载体是以附着在染色体外的形式存在的一类不含编码病毒蛋白序列的载体。1999年,PIECHACZEK等^[5]研究者将由猿猴病毒40(simian virus 40, *SV 40*)编码的大T抗原介导的病毒附着体载体中的*SV 40*替换为人 β -干扰素,成功构建基于*MAR*的pEPI质粒载体(图1A),该表达载体不含编码病毒的蛋白序列,这是第一个完全采用哺乳动物序列的非病毒附着体载体。pEPI-1

载体在CHO细胞、K562人造血祖细胞、HeLa细胞、人肝癌Huh7、HaCat细胞和其他细胞系中以拷贝数5~10个/细胞进行复制,在缺乏选择压力的情况下,每个细胞周期都会复制一次,其有丝分裂可稳定达几百代^[6-7]。pEPI-1载体不仅在培养细胞中保持附着状态,而且由精子介导其移植到胚胎中后,在猪胎儿的各种组织中持续存在,说明了基于*MAR*的附着体载体的稳定性^[8]。非病毒附着体载体具有有丝分裂稳定性,允许非整合建立,并且其还在安全性方面有优势,比如插入突变的风险较低,以及先天免疫反应的可能性较小等。这些特性使其成为一种很有前途的可用于基因治疗的表达载体^[9]。表1比较了整合载体和附着体载体,以及病毒和非病毒附着体载体的区别。

2 非病毒附着体载体的附着机制

非病毒附着体载体的发现,让越来越多的科学家开始对其感兴趣。一方面,STEHLER团队^[17]为了研究载体的附着机制,在pEPI-1载体的基础上分别设计了几种元件缺失的载体如缺失绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, *eGFP*)基因的载体(pEPI-1/ Δ eGFP)、缺失*CMV*启动子的载体(pEPI-eGFP/ Δ pCMV)和缺失*MAR*下游*SV 40*多聚腺苷酸化位点(*SV 40 PolyA*)的载体(pEPI-eGFP/ Δ PolyA),结果发现只有pEPI-eGFP/ Δ PolyA不影响载体附着复制能力,其他载体均整合到宿主基因组中,其中载体pEPI-eGFP/ Δ pCMV不再复制。将*SV 40 PolyA*插入到*eGFP*基因和*MAR*之间时,该载体亦不能自主复制并整合到基因组中。以上的研究表明为了维持载体附着状态,转录必须进入与表达盒相连的*MAR*且这种转录不允许在*MAR*之前终止^[17]。GIANNAKOPOULOS等^[18]也证明了此观点,他们制备了pFAR4衍生型实验载体,这些载体由复合HCRHPi肝脏特异性启动子驱动,在*eGFP*表达盒中缺乏*MAR*元件(pFAR4-noMAR)或者*MAR*元件存在*eGFP*表达盒的*PolyA*上游(pFAR4-MAR-IN)或下游(pFAR4-MAR-OUT),发现只有含有载体pFAR4-MAR-IN的细胞才能获得稳定的转染性,在培养3个月时,*eGFP*仍持续表达,并且荧光原位杂交分析和质粒还原实验表明载体处于附着状态。RUPPRECHT等^[19]再次实验证明,进入*MAR*的转录是载体附着复制和长期维持所必需的(图2)。另外,在JENKE等^[10]的研究中,载体



A~I: pERI-1、pMARs、pEGFP-C1-M、pEGFP-MAR、Minicircle MC、Minicircle M18、pERI-HS4opp、pERI-UOCE、pEP-IR。pCMV: 巨细胞病毒启动子; pUC ori: 质粒UC的复制区序列; HSV TK PolyA: 单纯疱疹病毒胸苷激酶PolyA; SV40 ori: 猿猴病毒40复制区序列; pSV40: 猿猴病毒40启动子; SV40 PolyA: 猿猴病毒40 PolyA; MCS: 多克隆位点; UCOE: 普遍存在的染色质开放元件; HS4opp: HS4绝缘子元件; eGFP: 增强型绿色荧光蛋白; IR: β-珠蛋白位点的复制起始区; pRSV: 劳斯肉瘤病毒启动子; pSFFV: 脾脏成瘤病毒启动子。

A-I: pERI-1、pMARs、pEGFP-C1-M、pEGFP-MAR、Minicircle MC、Minicircle M18、pERI-HS4opp、pERI-UOCE、pEP-IR。pCMV: cytomegalovirus promoter; pUC ori: replication origin of plasmid UC; HSV TK PolyA: herpes simplex virus thymidine kinase PolyA; SV40 ori: replication origin of simian virus 40; pSV40: simian virus 40 promoter; SV40 PolyA: simian virus 40 PolyA; MCS: multiple cloning site; UCOE: ubiquitous chromatin opening element; HS4opp: HS4 insulator element; eGFP: enhanced green fluorescent protein; IR: β-globin replicator; pRSV: rous sarcoma virus promoter; pSFFV: spleen focus-forming virus promoter。

图1 部分非病毒附着体载体图(根据参考文献[5,10-16]修改)

Fig.1 Map of some non-viral episomal vectors (modified from the references [5,10-16])

表1 整合载体和附着体载体的比较

Table 1 Comparison of integrated vectors and episomal vectors

项目 Item	整合载体 Integrated vectors		附着体载体 Episomal vectors	
	质粒载体 Plasmid vector	病毒载体 Viral vector	质粒载体 Plasmid vector	病毒载体 Viral vector
Concepts and features	Exogenous gene integration into host cell chromosome, easy to cause insertion		Non-integration into the chromosome, in the form of episomal vectors, with a lower risk of insertion mutation and higher safety	
Mediated forms	Plasmid DNA	Virus	The MAR element 1	Virus
Produce/not produce viral proteins	Not produce	Produce	Not produce	Produce
Transfection efficiency	Low	High	Low	High

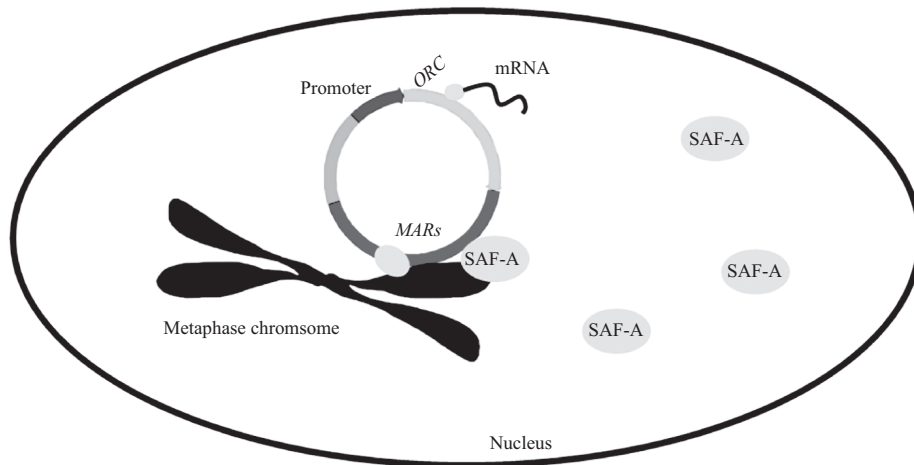


图2 非病毒附着体载体核保留和有丝分裂稳定性的机制(根据参考文献[20]修改)

Fig.2 Mechanisms of nuclear retention and mitotic stability of non-viral episomal vectors (modified from reference [20])

的SV 40的复制起点被删除后, 构建一个pEPI衍生载体pEPI-RSV, 结果发现其复制和转录行为与pEPI-1没有显著差异, 表明pEPI-1的SV 40复制起点对于哺乳动物的附着复制不是必需的。

另一方面, pEPI载体附着机制与核基质蛋白, 如核基质结合因子A(scaffold attachment factor A, SAF-A)有关(图2)。SAF-A是核基质的主要成分, 对核结构至关重要^[21]。MAR序列能介导早期复制点与SAF-A结合而稳定附着存在, MAR序列和SAF-A结合能够改变复制起始点的构象从而促进mRNA的转录^[22-23]。JENKE等^[10]用1个155 bp的寡聚体MAR模块取代pEPI-1的2 201 bp MAR时, 发现包含二聚体的载体整合到基因组中, 而包含该序列四聚体的载体仍然是附着体。通过体外和体内实验发现, SAF-A只能识别四聚体, 而不能识别二聚体MAR结构。在有丝分裂中, MAR元件介导载体附着在核基质及其衍生物上, 通过在核分裂期间将载体搭载在染色体上来保持有丝分裂的稳定性^[10]。这一观点与MESNER等^[24]的报道相一致, 该研究表明MAR可能参与了染色质的凝聚和分离, 这被称为“piggyback”机制。他们同时也解释了为什么附着体载体在细胞周期的S期只复制一次^[25]。此外, 他们还认为, MAR必须进入或穿过转录表达盒很可能是因为它产生了供复制酶所需的染色质结构^[26]。

3 非病毒附着体载体的优化

非病毒附着体载体的低稳定克隆形成率、转基因沉默和低表达量限制了其临床应用。对非病毒附着体载体进行优化是目前研究的热点之一, 关于附

着体载体的优化策略详见表2。

3.1 载体骨架优化

载体骨架的大小及结构与转染效率、转基因表达水平及载体的生物安全性有关。pEPI载体中使用的人β-干扰素MAR序列全长为2 200 bp, 优化介导载体附着的MAR序列、减少载体中的易甲基化的CpG岛的数量、除去载体中的细菌骨架均能提高转染效率和表达水平。

如上文所述, JENKE等^[10]发现似乎不需要全长的MAR来阻止载体整合。他们在天然MAR中发现的155 bp模块的四聚体可以在功能上取代2 201 bp的MAR元件, 通过对载体pEPI-1进行修饰, 设计了一个功能完全依赖于活性转录单位和最小MAR元件之间相互作用的附着体载体pMARS(图1B), 该载体不仅可以附着复制, 且与pEPI-1一样可以稳定表达。因此, 他们定义了MAR在体内发挥作用的最小序列要求^[10]。国内研究者林艳等^[11]建立了由387 bp MAR特征性元件(如AT序列等)介导的附着体载体pEGFP-C1-M(图1C)。该载体结合了pEPI载体的复制能力和有丝分裂稳定性特征, 使载体的转基因表观遗传沉默的趋势有所减弱, 并且至少维持4个月的高转基因表达水平。2019年, 研究者王天云等^[12]将2 201 bp的MAR分为5个MAR亚片段(核苷酸1-480、361-900、781-1320、1201-1740和1621-2201), 发现含截短的581 bp MAR(1621-2201)的载体不仅转染效率、瞬时和稳定转基因表达量高, 且可以保持附着状态并维持转基因表达高达50代(图1D)。这些结果表明, 截短的MAR足以维持染色体的复制和附着。

表2 非病毒附着体载体的优化
Table 2 The optimization of non-viral episomal vectors

类别 Type	载体 Vector	启动子 Promoter	MAR大小/bp MAR size /bp	载体大小/bp Vector size /bp	调控元件 Regulatory element	瞬时转染 效率 Transient transfection efficiency	建立率 Establishment rate	瞬时表达 /倍数 Transient expression /fold	稳定表达 时间 Stable expression time	稳定表达 /倍数 Stable expression /fold	拷贝数 Copy number	参考文献 References
Vector backbone optimiza- tion	pEPI-1	CMV	2 201	6 700			1.00%-5.00%	-	60 d	-	5.00-10.00	[5]
	pMARS	CMV	620	5 400				-	56 d	-	4.00-11.00	[10]
	pEGFP-MAR	CMV	581	5 281		87.15%	26.70%±3.50%	3.80	50 G	7.00	16.55±0.79	[12]
	pEGFP-C1-M	CMV	387	5 087		65.32%		5.87	120 d	1.95	4.00-11.00	[11,28]
	pEPito-hCMV/ EF-1α	EF-1α	2 201	6 909	Enhancer	75.00%		3.00	32 d	6.00	0.50-6.00	[20]
Promoter optimiza- tion	minicircle MC	CMV	2 201	4 137		40.00% - 45.00%	70.00%	-	50 PDs		6.70±3.50	[13]
	minicircle M18	CMV	733	2 900		53.10%	86.00%	2.40	150 d	5.00	4.00-8.00	[14]
	mini-AAT-MAR	AAT	2 200	5 359				5.00	90 d	20.00	3.00-4.00	[31]
	pEM- EF-1α	EF-1α	387	5 833		76.00%		3.00	20 G	4.00		[29]
	pEP-IR	SFFV	2 201	8 200	IR	53.00%	15.00%	3.00	150 d	2.60	1.78	[16]
Use regu- latory element	pEPito-hCMV/ AFP	AFP	2 201	7 251	Enhancer			18.00				[30]
	pEPI-HS4opp	CMV	2 201	7 782	cHS4		25.30%±13.98%		60 d		4.54±0.07	[15]
	pEPI-UCOE	CMV	2 201	10 464	A2UCOE		11.20%±9.04%		60 d	3.60	12.30±2.60	[15]
	pEGFP-C1-M- WPRE	CMV	387	5 685	WPRE	78.23%		2.88	120 d	4.12	5.00-10.00	[31]

G: 代; d: 天; PDs: 细胞群体倍增数。
G: generations; d: days; PDs: population doublings.

核苷酸序列中的一个胞嘧啶(C)和一个鸟嘌呤(G)被称为CpG二核苷酸(或CpG岛)。CpG岛的甲基化状态影响转基因表达^[27]。HAASE团队^[20]降低了pEPI-1载体骨架的CpG含量,构建了pEPito附着体载体。pEPI-1载体包含305个CpG岛和2个哺乳动物转录单位,pEPito减少了60% CpG岛的数量,且只含有1个转录单位。pEPito不仅体积减小,在体外的建立率比pEPI-1也高6倍,且在体内转基因表达稳定且水平高,通过流体动力将其注射到小鼠体内后可维持长达32天。pEPito被认为是一种用于体外生物技术和体内非病毒基因传递的改良载体。

载体中的细菌骨架元件包括抗生素耐药性基因、原核DNA复制起始点等,这些序列可能引起生物安全问题。将载体中原核DNA骨架序列去除后产生的微环载体,由于缺乏原核DNA骨架序列,可提高转基因水平,避免宿主机体的免疫反应^[32],这为非病毒附着体载体的优化提供了新的方向。第一个基于MAR的微环载体(图1E)是由NEHLSSEN等^[13]利用Flp重组酶除去骨架结构中的细菌序列产生的,亲代质粒pEPI-1被分成两个环状结构:1个包含原核载体元件的小质粒和1个包含启动子转移基因-MAR盒的微环。BROLL等^[14]在此基础上,通过减少MAR序列,形成了新的MAR微环载体M18(图1F),其中MAR序列截短为约700 bp。M18载体、第一代微环载体和pEPI-1载体同时转染CHO-K1细胞20天后,转基因的表达量分别是58%、53%和38%,说明减少MAR序列的含量和除去细菌序列都可以进一步提高转基因表达水平。

ARGYROS等^[33]通过Cre/Lox重组酶分别产生含MAR微环载体mini-UBC-MAR和mini-AAT-MAR。mini-UBC-MAR和mini-AAT-MAR在体外和体内均没有抗生素选择的情况下,维持了3个月的水平高和时间持久的转基因表达,且首次证明了基于MAR的微环载体在体内对基因表达的能力增强和对附着体载体介导的转基因表达的维持作用。在体内,分别对四组动物进行载体注射,载体mini-AAT-MAR介导的表达量在第1周增加了约10倍,在整个实验过程中也表现出显著高于含细菌骨架载体pAAT-MAR,并且无论是在第32天还是在注射后92天实验结束时,由载体mini-AAT-MAR介导的表达水平仍然明显高于所有其他载体介导的表达水平^[33]。

另外,WAGNER和MCCRACKEN等^[34]使用Flp重

组酶产生了一个含小鼠乳清酸蛋白(whey acid protein, WAP)启动子驱动的人髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达盒的微环附着体载体,在无选择压力情况下的原代牛成纤维细胞中稳定表达2个多月,通过对来源于体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)的胚胎中生长出的细胞分析,发现微环附着体载体能够在克隆胚胎的早期胚胎发育过程中维持,这为利用带有微环的细胞系来产生转基因动物提供了可能。

为了使载体分子最小化并提高其转染效率和表达水平,在JEREMY团队等^[35]开发的不含抗生素的微环载体基础上,研究者研发出了更小分子的载体pFAR4^[36]和Nano-MAR^[37]。转染pFAR4后通过异染色质形成的减少促进了小鼠肝脏中转基因的持续表达^[38]。QUIVIGER等^[18]在载体pFAR4基础上加入MAR元件,构建了pFAR4-MAR-IN载体。该载体可介导有效的附着体复制,并用于肝脏靶向基因治疗。与含有细菌骨架的对照载体相比,Nano-MAR载体在分裂细胞中可产生更高的转基因表达水平和建立率^[37]。最近,该团队在Nano-MAR的基础上又开发了两种新载体SP-Nano MAR-A和SP-Nano MAR-B,这两种载体显示出比原载体更高的转染效率和表达水平^[39],利用这项技术可以快速生产临床规模的嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T),使其在体外和体内的抗肿瘤活性都有所增强。

3.2 启动子的优化

筛选非病毒附着体载体的适配性启动子,降低启动子的甲基化水平,使用组织特异性启动子均可以提高转基因的表达水平和稳定性。启动子作为RNA聚合酶识别、结合和开始转录的一段DNA序列,它含有RNA聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列,多数位于结构基因转录起始点的上游。启动子本身不转录,但直接影响转基因的表达水平。

不同启动子驱动的非病毒附着体载体在转基因表达等方面有明显的差异。比较hCMV、RSV、人类泛素C(human ubiquitin C, UBC)、SV 40、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)和 β -珠蛋白启动子对稳定转染的由MAR特征性基序介导的附着体载体pEGFP-C1-M的转基因表达和稳定性分析,发现hCMV启动子在转基因高表达水平和稳定性方面表现最好^[28]。另有研究也证实了启动子选择对基因表达的影响,微环附着体载体SV 40-cGFP-

MAR转染牛受精卵后, 71.4%囊胚表达*eGFP*基因, 用*hCMV*替代*SV 40*启动子后, 仅发现23%囊胚有荧光表达^[40]。另外, 与*CMV*或*SV 40*启动子相比, *EF-1 α* 启动子在CHO细胞中更为活跃, 转染效率提高1.86倍, 转基因瞬时表达提高1.71倍, 在长期培养中更趋于稳定^[41]。HAASE团队^[20]将pEPito载体转染小鼠32天后, 发现含*hCMV-EF-1 α* 启动子的pEPito载体荧光素酶基因的表达是含*CMV*启动子的6倍。而且含*EF-1 α* 启动子驱动的附着体载体可以维持转基因在HEK293、Chang liver及原代细胞中高水平稳定表达^[29]。CHOW等^[42]研究者将由*CMV*启动子驱动的pEPI载体转染CD34⁺造血细胞, 发现*eGFP*表达非常低, 只能通过RT-PCR检测到, 而*CMV*启动子由杂交启动子延伸因子1 α /人T细胞白血病病毒(extension factor 1 α /human T cell leukemia virus, *EF-1 α /HTLV*)和*SFFV*启动子长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)的U3区取代后, 发现这种替换对CD34⁺细胞中的*eGFP*表达有积极影响^[16]。

有研究表明, 转基因效率低下主要是由转录沉默引起的^[43], 这与DNA甲基化有关^[44], DNA甲基化是由DNA甲基转移酶催化的。降低DNA甲基转移酶水平可以提高附着体载体在CHO细胞中的转基因表达水平和稳定性^[45]。基于pEPI的转基因表达水平的降低是由*CMV*启动子的胞嘧啶甲基化引起的^[46], 这种现象在其他载体中也能观察到^[47]。将*CMV*启动子容易甲基化的碱基进行点突变, 发现*CMV*启动子的突变体提高了附着体载体在HEK293和Chang liver细胞的转基因表达水平^[29]。*CAG*启动子是由*CMV*增强子元件、鸡 β -肌动蛋白启动子序列和兔 β -珠蛋白3'-非翻译区域(untranslated area, UTR)序列组成的杂合启动子, *CAG*启动子不易被胞嘧啶甲基化, 并且在体内大多数组织中稳定活跃^[48]。*CAG*启动子代替了pEPI载体中的*CMV*启动子产生pEPIX, 与pEPI-1相比, pEPIX显示出较高的表皮生长因子蛋白表达水平, 并且稳定培养超过40代^[49]。

利用组织特异性启动子可以特异性地提高组织细胞中的转基因表达水平。ARGYROS等^[47]研究发现, 相同条件下向鼠肝内转染含不同启动子的MAR元件介导的附着体质粒, 肝特异性*AAT*启动子介导的pAAT-MAR载体能够持续高效表达转基因, 而*CMV*启动子介导的pCMV-MAR载体的表达水平却没有提高。同时他们还在MAR微环载体上进行了相

关研究, 将*UBC*和*AAT*启动子分别介导的mini-UBC-MAR载体和mini-AAT-MAR载体注射到鼠肝内92天后, 发现mini-AAT-MAR载体中的转基因表达水平是注射后24 h的5倍, 而mini-UBC-MAR载体仅为其3倍^[33]。用肿瘤特异性*AFP*启动子和肌肉特异性平滑肌22(smooth muscle 22, *SM22*)启动子替换pEPI衍生生物pEPito中的*CMV*启动子, 分别促进*AFP*阳性的人肝癌Huh7细胞和*SM22*阳性细胞系中的转基因表达, 且*SM22*启动子驱动的pEPito载体可以在体外进行组织特异性复制, *AFP*启动子驱动的pEPito载体可以实现肝癌细胞的体内特异性表达。在载体中加入*hCMV*增强子元件后发现, 其可以进一步提高上述2个启动子的表达水平。组织特异性pEPito载体系统具有较高的组织特异性和较少的不良反应, 适合于基因治疗中转基因在体内的长期表达^[30]。

3.3 使用调控元件

顺式作用元件如*UCOE*、稳定和抗阻遏元件(stabilizing and anti-repressor element, *STAR*)、*WPRE*、基因座控制区(locus control region, *LCR*)、具有绝缘体性能的*cHS4*等^[31,50-53], 不编码任何蛋白质, 是具有调控基因表达的DNA序列。HAGEDORN等^[15]在pEPI-eGFP载体的*CMV*启动子上游插入一种来自HNRPA2B1-CBX3位点的*A2UCOE*元件(图1G), 在*CMV*启动子下游插入1.2 Kb *cHS4*元件(图1H), 结果表明*A2UCOE*可以使附着体转基因表达提高2倍, 而*cHS4*可以提高建立效率, 使其高达25.30% $\pm$ 13.98%。此外, 加入*WPRE*元件的pEGFP-C1-MAR附着体载体瞬时转基因表达量提高了2.88倍, 稳定转基因表达提高了4.12倍^[31]。除此之外研究者还发现了一种哺乳动物复制起始区^[54], 它能够使附着体载体的附着功能额外增强, 为非病毒附着体载体的发展提供了新的视角。

β -珠蛋白复制子是一种真正的哺乳动物复制子, 来源于人 β -珠蛋白位点, 能够在非天然位点启动DNA复制^[54]。STAVROU等^[16]将*IR*插入pEPI-SFFV载体中产生载体pEP-IR(图1I)。载体pEP-IR可以在K562细胞和健康供者外周血CD34⁺细胞中进行稳定转染, 其中在CD34⁺细胞转染效率可达30%。在CD34⁺/eGFP⁺细胞中可达100%的*eGFP*阳性克隆, 并且pEP-IR的建立率高达15%。与pEPI-SFFV和pEPI-EF-1/HTLV载体相比, 每个细胞的质粒拷贝数增加了50%, *eGFP*的表达量增加了3倍^[16], 且载体pEP-IR

可以在来源于地中海贫血小鼠模型的造血祖细胞中实现传递。STAVROU等^[55]根据激活剂ZIF-VP64可以在特定位置特异性激活 γ -珠蛋白转录,设计了人工 γ -珠蛋白基因激活剂的附着体载体:启动子为CMV的ZIF-VP64-EP1载体和启动子为SFFV并加入IR元件的ZIF-VP64-EP2载体,它们都能够介导造血细胞(如K562细胞和CD34⁺祖细胞)以及 γ -珠蛋白基因不活跃的细胞(如小鼠 β -YAC骨髓细胞)中 γ -珠蛋白的高效激活。在CD34⁺细胞中含IR元件的载体ZIF-VP64-EP2 CD34⁺/eGFP⁺细胞达到了100%的阳性克隆, γ -珠蛋白mRNA增加了 2.11 ± 0.13 倍^[55]。

4 非病毒附着体载体在基因治疗中的应用

非病毒附着体表达载体附着而非整合到宿主细胞染色体上,克服病毒载体及整合载体带来的副作用。在各个系统疾病的基因治疗中,其应用和研究越来越广泛。

MICHELE团队^[56]将iBAC-MAR-LDLR附着体载体应用于LDLR缺陷细胞CHO-ldlr-1-a7中,该载体iBAC-MAR-LDLR附着体载体在LDLR缺陷细胞CHO-ldlr-1-a7中高效地传递和维持1个135 Kb的携带人低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)基因位点的基因组DNA插入片段,使LDLR的表达水平能够达到生理水平;SGOUROU等^[57]将红系 β -珠蛋白位点控制区- β -珠蛋白基因(β -globin locus control region- β -globin locus box, β -LCR-HBB)与MAR相结合,形成的 β -LCR-HBB-MAR附着体载体能够在生理水平稳定表达 β -珠蛋白。

CIM等^[58]发现基于CpG缺失且以AAT启动子驱动的附着体载体,可以驱动胰岛十二指肠同源盒-1(pancreatic and duodenal homomorphous box-1, PDX1)的高水平和持续的表达。将载体注射到大鼠体内后,发现3只大鼠中有2只在第14天胰岛素的表达与第1天相比,增加了30~70倍。这些技术很可能在未来的糖尿病基因治疗策略中有重大参考价值。

WONG团队^[59]通过利用超声介导的转染技术和基于质粒的基因表达系统,证明了荧光素酶在小鼠后腿肌肉的功能基因表达时间较长。同时他们还通过超声波将质粒pEPI-Luc导入辐射诱导纤维肉瘤-1肿瘤中,用来监测小鼠背部肿瘤的生长^[59],这对于肿瘤治疗具有重大临床意义。2011年,WONG等^[60]证明含有pDNA的MAR复合物(其中荧光素酶的表达

由人的UBC启动子驱动)在1.5日龄小鼠体内肝、肺、心、脾、脑和肾中实现了有效转染。这份报告成功地证明了非病毒载体可以在新生小鼠体内有效传递,利用这项技术很可能将非病毒附着体载体运用到基因治疗中。

JENKE等^[61]将shRNA表达盒克隆到pEPI中,可以抑制HepG2-2.15细胞中的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制。DE ROCCO等^[62]开发了一个具有较大基因携带量的pBQ-MAR载体,该载体表达的囊性纤维化跨膜电导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR),可用于治疗由CFTR功能障碍引起的囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)肺病。

CALADO等^[63]分别在D407人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中进行体外实验和在出生后5天(P5) C57BL6小鼠中进行体内实验,发现pEPIto-hCMV载体可以维持长期较高的转基因表达且保持附着体状态。同样,ADARSHA团队^[64]发现,含MAR的载体在RPE细胞中的持久性更好,可以保持长达1年。这证实了包含MAR的载体能够促进RPE中在视网膜下的附着体载体表达的维持,并且可能还有利于非病毒性眼部基因的转移,这与PORTER等^[65]的研究一致。尽管非病毒附着体载体在基因治疗方面取得了许多进展,但大多数临床试验仍然使用病毒载体。非病毒附着体载体在基因传递中的有效性仍比病毒载体低,而且在有丝分裂中容易丢失等局限性仍然存在。除了继续对附着体载体进行优化改造外,随着基因组编辑技术的进步,还可以整合细胞生物学、工程学和计算机科学原理,进一步提高非病毒附着体载体的治疗作用。

5 总结

非病毒表达载体的开发是基因治疗的一个重要进展,通过在骨架结构中除去细菌序列和减少CpG岛的数量、筛选最优启动子、选用组织特异性启动子以及突变启动子中的甲基化位点,使用DNA调控元件(如UCOE、*chs4*、IR、STARs)等一系列优化条件对非病毒附着体载体进行改造,提高它们的表达水平和稳定性以及临床应用的适宜性,为临床基因治疗提供了一种安全有效的非病毒表达载体。其中,除去载体中的细菌元件产生的微环载体支持短期转基因表达,在生物安全性、低副作用和最小

副作用方面占优势。缩短介导载体附着的MAR元件的长度、使用适配性启动子、降低启动子甲基化水平等措施可以维持附着体载体长期稳定的转基因表达水平。未来可以从载体附着位点的染色质结构及与载体附着密切相关的核基质蛋白的数量及其表观遗传修饰上对新型附着体载体进行研究, 优化表达体系使目的基因安全长期稳定表达并易于调控, 为临床基因治疗提供一种稳定高效的通用性表达载体。

参考文献 (References)

- [1] BLAESE R M, CULVER K W, MILLER A D, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years [J]. *Sci*, 1995, 270(5235): 475-80.
- [2] MUELLER C, FLOTTE T R. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(11): 858-63.
- [3] COLE A. Child in gene therapy programme develops leukaemia [J]. *BMJ*, 2008, 336(7634): 13.
- [4] KAMIMURA K, SUDA T, ZHANG G, et al. Advances in gene delivery systems [J]. *Pha Med*, 2011, 25(5): 293-306.
- [5] PIECHACZEK C, FETZER C, BAIKER A, et al. A vector based on the SV 40 origin of replication and chromosomal MARs replicates episomally in CHO cells [J]. *Nuc Aci Res*, 1999, 27(2): 426-8.
- [6] PAPAPETROU E P, ZIROS P G, MICHEVA I D, et al. Gene transfer into human hematopoietic progenitor cells with an episomal vector carrying an MAR element [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(1): 40-51.
- [7] JENKE A C W, EISENBERGER T, BAIKER A, et al. The non-viral episomal replicating vector pEPI-1 allows long-term inhibition of BCR-ABL expression by shRNA [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(4): 533.
- [8] MANZINI S, VARGIOLU A, STEHLE I M, et al. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 17672-7.
- [9] WADE-MARTINS R. Developing extrachromosomal gene expression vector technologies: an overview [J]. *Met Mol Bio*, 2011, 738: 1-17.
- [10] JENKE A C, STEHLE I M, HERRMANN F, et al. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(31): 11322-7.
- [11] LIN Y, LI Z X, WANG T Y, et al. MAR characteristic motifs mediate episomal vector in CHO cells [J]. *Gene*, 2015, 559(2): 137-43.
- [12] WANG X Y, ZHANG X, WANG T Y, et al. Shortened nuclear matrix attachment regions are sufficient for replication and maintenance of episomes in mammalian cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(22): 2761-70.
- [13] NEHLSSEN K, BROLL S, BODE J. Replicating minicircles: generation of nonviral episomes for the efficient modification of dividing cells [J]. *Gene Ther Mol Bio*, 2006, 10(2): 233-43.
- [14] BROLL S, OUMARD A, HAHN K, et al. Minicircle performance depending on MAR-nuclear matrix interactions [J]. *J Mol Biol*, 2010, 395(5): 950-65.
- [15] HAGEDORN C, ANTONIOU M N, LIPPS H J. Genomic cis-acting sequences improve expression and establishment of a non-viral vector [J]. *Mol Ther Nucl Aci*, 2013, 2(8): e118.
- [16] STAVROU E F, LAZARIS V M, GIANNAKOPOULOS A, et al. The β -globin replicator greatly enhances the potential of mar based episomal vectors for gene transfer into human haematopoietic progenitor cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40673.
- [17] STEHLE I M, SCINTEIE M F, BAIKER A, et al. Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication [J]. *Chro Res*, 2003, 11(5): 413-21.
- [18] GIANNAKOPOULOS A, QUIVIGER M, STAVROU E, et al. Efficient episomal gene transfer to human hepatic cells using the pFAR4-MAR vector [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(3): 3203-11.
- [19] RUPPRECHT S, HAGEDORN C, SERUGGIA D, et al. Controlled removal of a nonviral episomal vector from transfected cells [J]. *Gene*, 2010, 466(1/2): 36-42.
- [20] HAASE R, ARGYROS O, WONG S P, et al. pEPito: a significantly improved non-viral episomal expression vector for mammalian cells [J]. *Bmc Bio*, 2010, 10: 20.
- [21] KIPP M, GOHRING F, OSTENDORP T, et al. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(20): 7480-9.
- [22] BAIKER A, MAERCKER C, PIECHACZEK C, et al. Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix [J]. *Nat Cell Bio*, 2000, 2(3): 182.
- [23] JENKE B H C, FETZER C P, STEHLE I M, et al. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A *in vivo* [J]. *EMBO Rep*, 2002, 3(4): 349-54.
- [24] MESNER L D, HAMLIN J L, DIJKWEL P A. The matrix attachment region in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication may be required for local chromatid separation [J]. *Proc Nat Aca Sci USA*, 2003, 100(6): 3281-6.
- [25] SCHAARSCHMIDT D, BALTIN J, STEHLE I M, et al. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex [J]. *EMBO J*, 2004, 23(1): 191-201.
- [26] ANDREAS C W J, ISA M S, FRANK H, et al. Nuclear scaffold-matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome [J]. *Proc Nat Aca Sci USA*, 2004, 101(31): 11322-7.
- [27] BROOKS A R, HARKINS R N, WANG P, et al. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle [J]. *Jou Gene Med*, 2004, 6(4): 395-404.
- [28] WANG X Y, ZHANG J H, ZHANG X, et al. Impact of different promoters on episomal vectors harbouring characteristic motifs of matrix attachment regions [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26446.
- [29] XU Z J, JIA Y L, WANG M, et al. Effect of promoter, promoter mutation and enhancer on transgene expression mediated by episomal vectors in transfected HEK293, Chang liver and priMAY cells [J]. *Bioengineered*, 2019, 10(1): 548-60.
- [30] HAASE R, MAGNUSSON T, SU B, et al. Generation of a tumor- and tissue-specific episomal non-viral vector system [J].

- BMC Bio, 2013, 13(1): 49.
- [31] WANG X Y, ZHANG W L, JIA Y L, et al. Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element improves transgene expression and stability mediated by episomal vectors in CHO-K1 cells [J]. Act Bio Et Bio Sin, 2020, 52(11): 1285-8.
 - [32] DARQUET A M, RANGARA R, KREISS P, et al. Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer [J]. Gene Ther, 1999, 6(2): 209-18.
 - [33] ARGYROS O, WONG S P, FEDONIDIS C, et al. Development of MAR minicircles for enhanced and persistent transgene expression in the mouse liver [J]. J Mol Med, 2011, 89(5): 515-29.
 - [34] WAGNER S, MCCracken J, BRUSZIES S, et al. Episomal minicircles persist in periods of transcriptional inactivity and can be transmitted through somatic cell nuclear transfer into bovine embryos [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(2): 1737-46.
 - [35] LUKE J, CARNES A E, HODGSON C P, et al. Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system [J]. Vaccine, 2009, 27(46): 6454-9.
 - [36] MARIE C, VANDERMEULEN G, QUIVIGER M, et al. pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells [J]. Gene Med, 2010, 12(4): 323-32.
 - [37] BOZZA M, GREEN E W, ESPINET E, et al. Novel non-integrating DNA Nano-MAR vectors restore gene function in isogenic patient-derived pancreatic tumor models [J]. Mol Ther Met Clin Dev, 2020, 17: 957-68.
 - [38] PASTOR M, QUIVIGER M, PAILLOUX J, et al. Reduced heterochromatin formation on the pFAR4 miniplasmid allows sustained transgene expression in the mouse liver [J]. Mol Ther Nuc Aci, 2020, 21: 28-36.
 - [39] BOZZA M, DE ROIA A, CORREIA M P, et al. A nonviral, nonintegrating DNA nanovector platform for the safe, rapid, and persistent manufacture of recombinant T cells [J]. Sci Adv, 2021, 7(16): eabf1333.
 - [40] IQBAL K, BARG-KUES B, BROLL S, et al. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos [J]. Bio Tech, 2009, 47(5): 959-68.
 - [41] WANG X Y, XU Z J, TIAN Z W, et al. The EF-1 alpha promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11): 3044-54.
 - [42] CHOW C M, ATHANASSIADOU A, RAGUZ S, et al. LCR-mediated, long-term tissue-specific gene expression within replicating episomal plasmid and cosmid vectors [J]. Gene Ther, 2002, 9(5): 327-36.
 - [43] WANG T Y, WANG Y F, GUO X, et al. A vector based on the chicken hypersensitive site 4 insulator element replicates episomally in mammalian cell [J]. Cur Gene Ther, 2017, 16(6): 410-8.
 - [44] ANDREA O, SILKE S, ULRICH G. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant chinese hamster ovary cell lines [J]. Bio Tech Bio, 2011, 108(11): 2670-81.
 - [45] WANG X Y, YI D D, WANG T Y, et al. Enhancing expression level and stability of transgene mediated by episomal vector via buffering DNA methyltransferase in transfected CHO cells [J]. J Cell Bio, 2019, 120(9): 15661-70.
 - [46] NUO M T, YUAN J L, YANG W L, et al. Promoter methylation and histone modifications affect the expression of the exogenous DsRed gene in transgenic goats [J]. Gene Mol Res, 2016, doi: 10.4238/gmr.15038560.
 - [47] ARGYROS O, WONG S P, NICETA M, et al. Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector [J]. Gene Ther, 2008, 15(24): 1593-605.
 - [48] SAWICKI J A, MORRIS R J, MONKS B, et al. A composite CMV-IE enhancer/beta-actin promoter is ubiquitously expressed in mouse cutaneous epithelium [J]. Exp Cell Res, 1998, 244(1): 367-9.
 - [49] MANZINI S, VARGIOLU A, SERUGGIA D, et al. MAR trek: a new generation of non-viral episomal vectors to be used in gene transfer experiments [J]. Tra Res, 2010, 19(2): 340-1.
 - [50] BENTON T, CHEN T, MCENTEE M, et al. The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein [J]. Cytotechnology, 2002, 38(1/2/3): 43-6.
 - [51] SAUTTER K, ENENKEL B. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity [J]. Biotech Bioengi, 2005, 89(5): 530-8.
 - [52] DEAN A. In the loop: long range chromatin interactions and gene regulation [J]. Bri Fun Gene, 2011, 10(1): 3-10.
 - [53] LU X B, GUO Y H, HUANG W. Characterization of the cHS4 insulator in mouse embryonic stem cells [J]. FEBS Open Bio, 2020, 10: 4.
 - [54] WANG L X, LIN C M, LOPREIATO J O, et al. Cooperative sequence modules determine replication initiation sites at the human beta-globin locus [J]. Hum Mol Gene, 2006, 15(17): 2613-22.
 - [55] STAVROU E F, SIMANTIRAKIS E, VERRAS M, et al. Episomal vectors based on MAR and the beta-globin Replicator, encoding a synthetic transcriptional activator, mediate efficient gamma-globin activation in haematopoietic cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 19765.
 - [56] LUFINO M M, MANSERVIGI R, WADE-MARTINS R. An MAR-based infectious episomal genomic DNA expression vector provides long-term regulated functional complementation of LDLR deficiency [J]. Nuc Aci Res, 2007, 35(15): e98.
 - [57] SGOUROU A, ROUTLEDGE S, SPATHAS D, et al. Physiological levels of HBB transgene expression from MAR element-based replicating episomal vectors [J]. Bioengineered, 2009, 143(2): 85-94.
 - [58] CIM A, SAWYER G, ZHANG X, et al. *In vivo* studies on non-viral transdifferentiation of liver cells towards pancreatic β cells [J]. J End, 2012, 214(3): 277-88.
 - [59] LI Y S, DAVIDSON E, REID C N, et al. Optimising ultrasound-mediated gene transfer(sonoporation) *in vitro* and prolonged expression of a transgene *in vivo*: potential applications for gene therapy of cancer [J]. Cancer Let, 2009, 273(1): 62-9.
 - [60] WONG S P, ARGYROS O, HOWE S J, et al. Systemic gene transfer of polyethylenimine(PEI)-plasmid DNA complexes to neonatal mice [J]. Jou Con Rel, 2011, 150(3): 298-306.
 - [61] JENKE A C W, WILHELM A D, ORTH V, et al. Long-term suppression of hepatitis B virus replication by short hairpin rna expression using the scaffold/matrix attachment region-based

- replicating vector system pEPI-1 [J]. *Ant Age Che*, 2008, 52(7): 2355-9.
- [62] DAVIDE D R, BARBARA P, STEFANO C, et al. Assembly and functional analysis of an MAR based episome with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1220.
- [63] CALADO S M, OLIVEIRA A V, MACHADO S, et al. Sustained gene expression in the retina by improved episomal vectors [J]. *Tis Eng Part A*, 2014, 20(19/20): 2692-8.
- [64] KOIRALA A, CONLEY S M, NAASH M I. Episomal maintenance of MAR-containing non-viral vectors for RPE-based diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 801: 703-9.
- [65] PORTER S D, HU J, GILKS C B. Distal upstream tyrosinase MAR-containing sequence has regulatory properties specific to subsets of melanocytes [J]. *Gene*, 2015, 25(1): 40-8.