

Research Biomedical Engineering—Article

延长腺相关病毒递送药物的半衰期提高治疗效果

吴会芳^a, 胡丹^a, 李泉晓^a, 王春雨^a, 朱晓艺^a, 李威^b, 陈宾凡^a, 季萍^a, 黄可可^a, 黄爱玲^a, 黄竞荷^a,
Dimitar S. Dimitrov^b, 吴艳玲^{a,c,*}, 应天雷^{a,c,*}^a MOE/NHC Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Shanghai Institute of Infectious Disease and Biosecurity & School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China^b Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA^c Shanghai Engineering Research Center for Synthetic Immunology, Shanghai 200032, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2021

Revised 6 February 2022

Accepted 20 February 2022

Available online 22 March 2022

关键词

基因疗法

腺相关病毒

半衰期

成纤维细胞生长因子 21

2 型糖尿病

摘要

延长基于蛋白质治疗药物的半衰期可以提高药物疗效。然而,基因治疗本质上是提供了长期表达所需的治疗性蛋白,药物半衰期对基因治疗疗效的影响尚不清楚。在这项腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)基因治疗研究中,通过与免疫球蛋白 G1 (immunoglobulin G 1, IgG1)可溶性单体 Fc 区(soluble monomeric IgG1 fragment crystallizable, sFc)或 Fc 区融合,设计了几种能够延长半衰期的蛋白质。研究表明,延长 AAV 递送的小分子双功能蛋白和成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21)的半衰期显著增加了它们在血液循环中的浓度。此外,AAV 递送 FGF21 延长其半衰期使 2 型糖尿病动物模型中肝损伤和血糖显著降低,并改善了葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。这些结果证明了延长药物半衰期的基因治疗在应对人类疾病中的治疗潜力。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

目前,蛋白质疗法在全世界获批的药物和正在临床开发的数千种生物制药产品中占据主导地位[1]。一些小分子重组蛋白,如细胞因子和激素,在临床上用于治疗各种疾病。由于它们的分子量小(小于 50 kDa)和终末半衰期短(通常在几分钟到几小时的范围内),它们可以通过肾脏过滤迅速从体内清除[2]。保持有效治疗浓度的一种方法是以高剂量和高频率给药,然而,这可能导致初始峰值较高,伴随着浓度波动,引起剂量和波动相关的并发

症,影响患者依从性以及增加治疗成本[3]。延长药物的半衰期是维持治疗浓度的有效方法。近年来,已经开发了多种技术,包括聚乙二醇化、脂肪酸偶联、白蛋白融合以及与免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)可结晶片段(fragment crystallizable, Fc)区域的融合[4]。这些技术已被广泛应用于蛋白质药物治疗,并且证明延长药物在体内循环的半衰期能够提高其治疗效果。值得注意的是,即使药物半衰期延长,对慢性疾病的长期治疗也需要多次药物注射,这表明需要一种疗法能够将药物输送到治疗部位后作用更长时间。

* Corresponding authors.

E-mail addresses: yanlingwu@fudan.edu.cn (Y. Wu), tlying@fudan.edu.cn (T. Ying).

基因治疗将治疗性蛋白的基因输送到靶细胞和组织,从而长期表达药物,是目前解决基于蛋白质的治疗中存在挑战的可行方案[5-6]。第一个基于腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)递送基因的治疗产品被批准用于治疗脂蛋白脂酶缺乏症[7]。此后,AAV因其安全性较好以及整合到宿主基因组的概率较低等优点成为临床试验中最广泛使用的基因治疗载体[8-9]。然而,目前仍需解决的问题是需要提高基因表达的效率以降低成本和给药剂量。目前已有研究证明延长基于蛋白质疗法的药物半衰期能够提高其疗效,然而,延长药物半衰期对基因疗法疗效的影响却很少受到关注[10-15]。

为了评估在基因治疗中延长药物半衰期的效果,我们选择了两种半衰期短的蛋白质药物(一种小分子的双功能蛋白质和细胞因子)作为概念证明,并设计了几个具有不同半衰期的生物分子。结果表明,当AAV载体在体内编码时,双特异性抗体(bispecific antibodies, BsAbs)-sFc(n18-sFc-mD1.22)和Fc-成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21, FGF21)具有相当高的浓度。增加的药物浓度显著改善了治疗效果,AAV递送延长半衰期后FGF21显著降低了两种不同的2型糖尿病(T2DM)模型的肝损伤和血糖,并改善了葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。这些结果证明了延长药物半衰期的基因治疗在促进人类疾病治疗方面的潜力。

2. 材料与方法

2.1. 动物

所有动物程序均获得复旦大学动物护理和使用委员会的批准,动物的饲养温度为22 °C, 12 h的明暗循环。雄性野生型(wild type, WT) BALB/c小鼠(年龄为6-8周),购自上海灵畅生物科技有限公司。6周龄雄性糖尿病小鼠 db/db (C57BLKS/J- $Lepr^{db}/Lepr^{db}$)和非糖尿病小鼠 db/m (C57BKS/J- $Lepr^{db}/+$)购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。 db/db 和 db/m 小鼠是通过杂合育种获得的同窝小鼠。重组腺相关病毒血清型8(recombinant adenovirus serotype 8, rAAV8)通过尾静脉注射(i.v.)给药。根据小鼠体重随机分组。

2.2. 蛋白质、质粒和细胞

重组Fc γ 受体IIIa [Fc γ RIIIa; 分化簇16a(cluster of differentiation 16a, CD16a)]、n118、人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)包膜(envelope, Env)糖蛋白(glycoprotein 140, gp140)、工程

化单域抗体CD4(mD1.22)和sFc由我们的团队制备,如前所述[16]。简言之,结合CD16a的单域抗体n118和工程化单域抗体mD1.22在大肠杆菌菌株HB2151中表达,并使用Ni-NTA树脂(QIAGEN, 德国)纯化。将CD16a和gp140基因克隆到pSecTag 2B载体中,在Expi293细胞(Invitrogen, USA)中瞬时表达,并用Ni-NTA树脂纯化。将sFc基因克隆到pComb3x载体中,在HB2151中表达,并使用蛋白G树脂(Roche Applied Science, 德国)纯化。中国仓鼠卵巢ZA(CHO-ZA)细胞购自Invitrogen。CHO ZA单链gp160(gp160sc)细胞系是我们实验室开发的表达HIV-1 gp160的稳定细胞系,并在含有31.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 来霉素和2 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 谷氨酰胺的CD OptiCHO培养基(Invitrogen)中培养。表达CD16a的Jurkat T细胞购自Promega(美国)。

2.3. 融合蛋白的表达与纯化

*BsAb-sFc*基因是通过重叠延伸聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)融合n118、sFc和mD1.22基因获得的。将SfiI酶切的*BsAb sFc*基因克隆到含有His标签(HHHHHH)和FLAG标签(DYKDDDDK)的pComb3x载体中。测序验证后的质粒转化到感受态HB2151中。挑取单克隆菌落到5 mL含有100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素和0.2% (w/v)葡萄糖的2YT(yeast extract-tryptone)培养基中,在37 °C下以250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速在摇床中培养3-4 h,然后转移到含有100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的500 mL SB(super broth)培养基培养,直到600 nm处的光密度值(optical density, OD)达到0.6。接着,加入1 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 异丙基-1-硫代- β -D-半乳糖基吡喃糖苷(isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside, IPTG)诱导蛋白质表达,并将培养物在30 °C和250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下进一步孵育过夜。通过离心收集细菌,并使用蛋白质G柱纯化蛋白质。*n118-mD1.22*基因是通过重叠延伸PCR融合n118和mD1.22基因而产生的。n118-mD1.22(BsAb)蛋白使用与BsAb-sFc相同的方案表达,并使用Ni-NTA树脂纯化。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)验证蛋白质纯度,并用分光光度法测量蛋白质浓度(NanoVue; GE Healthcare, USA)。

2.4. 生物层干涉法检测蛋白结合动力学

使用Octet Red 96(Pall ForteBio, USA)通过生物层干涉法(bio-layer interferometry, BLI)检测蛋白质(BsAb-sFc、BsAb)与gp140或CD16a的结合动力学。将CD16a

或gp140蛋白用乙酸钠缓冲液稀释为 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 并固定在活化的AR2G (amine reactive 2nd generation) 探针上, 将 $500\ \text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白质稀释三倍至 $0.69\ \text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 将固化gp140或CD16a后的探针与蛋白稀释液在含有0.02%吐温-20的磷酸盐缓冲 (phosphate-buffered saline, PBS) 中孵育。实验步骤如下 (37 °C): ①平衡步骤 (10 min); ②通过1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) /N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 激活AR2G (5 min); ③加载步骤 (5 min); ④用乙醇胺封闭 (5 min); ⑤基线步骤 (5 min); ⑥蛋白质结合 (5 min); ⑦蛋白质解离 (5 min)。使用ForteBio数据分析软件 (Pall ForteBio) 拟合曲线。

2.5. 抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用

ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, 抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用) 报告基因生物活性检测 (Promega) 用于评估融合蛋白的ADCC活性。将编码荧光素酶报告基因的Jurkat T-CD16a细胞用作效应细胞。使用稳定表达HIV-1 Env gp160的CHO的细胞系 (CHO-ZA-gp160sc细胞) 作为靶细胞。靶细胞以每孔 2.5×10^4 个细胞的密度在25 μL RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 培养基 (Gibco, USA) 中接种在96孔板上。融合蛋白从初始浓度 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始连续稀释加到细胞孔中。接下来, 在25 μL RPMI1640培养基中以每孔 2.5×10^5 个细胞的密度加入效应细胞。在37 °C孵育过夜后, 使用Bio-Glo荧光素酶测定系统 (Promega) 和发光计数器 (Infinite M200 Pro) 进行测定。没有靶细胞或gp160阴性CHO-ZA细胞与Jurkat T CD16a细胞共孵育作为阴性对照。

2.6. HIV-1中和实验

通过用pNL4-3.Luc.R-E-backbone和Env克隆共转染293 T细胞产生假病毒, 48 h后收集上清液, 在376离心力 (reactive centrifugal force, RCF) 下离心5 min, 并在-80 °C下储存。构建了19个假病毒, 标准接种剂量为每个假病毒半数组织感染量 (median tissue culture infective dose TCID₅₀) 的200倍, 用于测试两种中和蛋白的广谱度和中和能力。使用荧光素酶的测定评估假病毒中和。使用五倍连续稀释法对每种蛋白质进行重复测试。计算每种蛋白质的50%抑制浓度 (inhibitory concentration, IC₅₀) 以确定抗HIV-1效力。

2.7. 药代动力学

BALB/c小鼠饲养在复旦大学动物房。在第0天静脉

注射0.5 mg蛋白质样品。在注射后6 h、8 h、10 h和12 h以及1 d、2 d、3 d、4 d和5 d通过眼眶出血收集血浆样本。使用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定血浆蛋白浓度, 使用样品蛋白和CD16a生成标准曲线。

2.8. 构建

CD16a、BsAb、gp140和BsAb sFc由我们团队表达[17], 使用n118正向引物: 5'-CCGGAATTCGAGGTG-CAGCTGGTGGAGTCT-3'和mD1.22反向引物: 5'-GAAGATCTTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCATGGTGATGGTGATGATGGCCCACCACACCAGCTGCAC-3'进行扩增。FGF21基因序列可在参考文献[18]中找到。FGF21和Fc-FGF21基因均由金斯瑞合成, 并使用基因特异性引物进行扩增。引物包括FGF21正向引物: 5'-AGAATTG-GATCGGCTAGCGGTACC-3'和FGF21反向引物: 5'-GAGGTGATTGTGCAAGATC-3'。PCR反应在以下优化条件下进行: 95 °C初始变性3 min, 再95 °C变性30 s, 56 °C退火60 s (或90 s), 72 °C延伸30 s。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳并回收。接下来, 基于基因同源重组的原理, 在CAG启动子的控制下, 使用一步PCR克隆试剂盒 (Novo-protein, 中国) 将BsAb、BsAb-sFc、FGF21和Fc-FGF21插入AAV8载体中。

2.9. 病毒制备

通过三质粒共转293T细胞, 用碘克沙醇密度梯度纯化rAAV8。简言之, 用PEIpro转染试剂 (Polyplus, 法国) 与DNA以1:1的比例转染293 T细胞。pHelper、RC8和AAV8质粒以1:1:1的摩尔比转染。转染后72 h收集上清液和细胞, 并使用先前描述的方法进行处理[19]。粗纯化的rAAV8用 $50\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 核酸酶于37 °C处理30 min, 然后加入到含有碘克沙醇 (15%、25%、40%和60%) 的离心管 (Beckman Coulter, USA) 中, 在112 700 RCF下离心4 h。收集40%的组分, 浓缩, 在超滤管 (UFC 910096; 100kDa; Millipore, USA) 中用PBS进行缓冲液置换, 并用含有pluronic-F68 (BBI生命科学) 的水 (0.1%、0.001%和0.0001%) 洗涤三次。使用前rAAV8储存于-80 °C。

2.10. rAAV8的定量和ELISA

AAV8纯化后使用QIAamp病毒RNA迷你试剂盒 (QIAGEN) 提取病毒DNA, 使用实时逆转录聚合酶链式反应 (realtime reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 定量, 使用CFX 96 RT系统 (BioRad, USA) 与TB Green (Takara Bio-DNA, 日本) 进行检测。

对 mD1.22 或 FGF21 设计引物 (FGF21 正向引物: 5'-CAGC TGAAGGCCCTGAAGCCT-3'; FGF21 反向引物: 5'-CCT AAAAAGAACAGGCCTCGGGG-3'; mD1.22 正向引物: 5'-ACCTGCACCGCCAGCCAGAAG-3'; mD1.22 反向引物: 5'-GCTCCTCTCTGTGTCCACCCT-3')。使用 ELISA 试剂盒 (R&D Systems Inc., 美国) 检测血浆 FGF21 和 Fc-FGF21 浓度。

2.11. 胰岛素耐受实验和葡萄糖耐量实验

禁食 6 h 后, 腹腔注射胰岛素 (Novolin R) 或葡萄糖。db/db 小鼠使用 2 IU·kg⁻¹ (IU: 国际单位) 的胰岛素或 1 g·kg⁻¹ 的葡萄糖, 饮食诱导肥胖 (DIO) 小鼠使用 0.4 IU·kg⁻¹ 的胰岛素或 1.5 g·kg⁻¹ 的葡萄糖。在注射后 0、15 min、30 min、45 min、60 min、90 min 和 120 min 使用血糖仪 (Yuwell, 中国) 测量血糖。

2.12. 血清学分析

通过眼眶采血收集血液, 离心分离血清 (2041 RCF, 4 °C, 10 min)。使用自动生化分析仪 (ADVIA XPT; Siemens Healthcare Diagnostic, Inc., 德国) 测定所有血清指标。

2.13. 肝脏生化分析

将小鼠肝脏用均质仪 (上海必横生物科技有限公司) 均质后, 使用检测试剂盒 (Promega) 检测总胆固醇 (total cholesterol, CHOL; TC) 和游离胆固醇 (TG) 水平。

2.14. 全身定量微型计算机断层扫描

为了可视化全身脂肪组织的积聚和分布, 包括皮下脂肪、内脏脂肪和棕色脂肪, 对小鼠进行了全身微型计算机断层扫描 (micro-computed tomography, μ CT)。使用高分辨率 X 射线 μ CT 扫描 (Quantum FX; PerkinElmer, 美国) 捕获小鼠内部的详细三维图像。用 1.5%~2.5% 异氟烷麻醉小鼠, 并将其置于扫描平台上。将 X 射线源设置为 72 μ A 的电流和 90 kVp 的电压。扫描从计算机终端开始, 每只小鼠持续 4 min。使用体积编辑工具进行图像分割, 并使用软件包 (AnalyzerDirect, 美国) 中的目的区域模块对体积进行量化。使用 Analyze 12.0 软件计算脂肪含量和分布。

2.15. 骨分析

使用 μ CT 评估骨体积和结构。将小鼠胫骨保存在 PBS 中, 并使用 eXtlore Locus CT 扫描仪 (美国通用电气公司) 以 36 μ m 分辨率进行扫描。将 X 射线源设置为 88 μ A 的电流和 90 kVp 的电压。分析胫骨近端骨髓 1 mm³

的小梁。使用 MicroView 3D 图像查看器和分析工具 (AnalyzerDirect) 计算骨骼参数。

2.16. 统计分析

所有数据均表示为平均值 \pm 标准差 (SEM)。使用 SPSS17.0 软件进行统计分析。正态分布检验后, 使用方差分析 (ANOVA) 进行组间比较和两个差异之间的多重比较 (最小显著性差异)。差异在 $p < 0.05$ 时被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 设计抗 HIV-1 的小分子双功能蛋白

治疗 HIV/获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 仍然是一项医学挑战, 因为在联合抗逆转录病毒疗法 (combination antiretroviral therapy, cART) 停止后, 病毒会迅速反弹。目前为开发 HIV-1 的治疗方法已经做出了大量努力, 包括 Xencor 的抗体半衰期延长技术 (XtendTM), 该技术使用 Fc 突变体 (M428L/N434S) [20–21] 延长抗体的半衰期, 以及构建双特异性免疫球蛋白样免疫黏附素结构 [22]。然而, 当与 cART 联合治疗时, 这些方法仅仅在短期治疗中显示出相对延迟的病毒反弹。单次注射 AAV 递送基因表达蛋白可长期抑制病毒反弹, 从而产生优异的治疗效果 [23–24]。这一结果促使我们设计了一种新型长效蛋白质, 通过 AAV 向体内递送改善治疗效果。

首先, 我们开发了一种抗 HIV-1 的双功能蛋白 [图 1 (a)]。简言之, mD1.22 是能够高亲和力结合 HIV-1 gp140 的工程化单域 CD4 抗体 [25], n118 是源自我们噬菌体展示库 (数据未显示) 的全人单域抗体, 可以高亲和力结合自然杀伤细胞上的 CD16a。使用柔性的 3 \times GGGGS 接头融合 mD1.22 和 n118, 得到一种双功能蛋白, 命名为 BsAb。为了延长该蛋白 (28 kDa) 的半衰期, 同时保留对 HIV-1 上空间限制表位的结合 [26], 我们使用先前工程化的 sFc 来生成双功能蛋白 BsAb-sFc。BsAb-sFc 与 BsAb 相似 [图 1 (b) 和图 S1 (a)], 能够以高亲和力结合 CD16a 和 gp140。值得注意的是, 药代动力学结果表明, 与从小鼠体内快速清除的 BsAb 不同, sFc 融合的双功能蛋白 BsAb-sFc 的半衰期长达 21 h, 表明其具有在体内提供更好保护的潜力 [图 1 (c)]。

此外, 使用动态光散射评估蛋白质聚集趋势。结果表明, BsAb-sFc 显示出比 BsAb 更高的溶解度和热稳定性 [图 S1 (b) 和 (c)]。SDS-PAGE 显示, BsAb-sFc 和

BsAb 在 4 °C 下保存 7 d 后依然稳定[图 S1 (d)]。此外, BsAb-sFc 能够有效地介导 ADCC 作用[图 1 (d)]。BsAb-sFc 和 BsAb 对 19 种不同分支和地理起源的 HIV-1 假病毒表现出广泛而有效的中和活性[图 1 (e) 和图 S1 (e)]。总之, 我们的研究结果表明 BsAb-sFc 能够作为一种潜在的抗 HIV-1 的治疗剂。

3.2. 通过 AAV8 递送的基因治疗提高双功能蛋白的表达水平延长其半衰期

接下来, 我们探讨了 BsAb-sFc 和 BsAb 在基因治疗中的潜力。AAV8 分别编码红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP; 对照)、BsAb-sFc 和 BsAb 的序列, 其表达受 CAG 启动子的控制[图 1 (f)] [27]。检测 AAV8-RFP 在

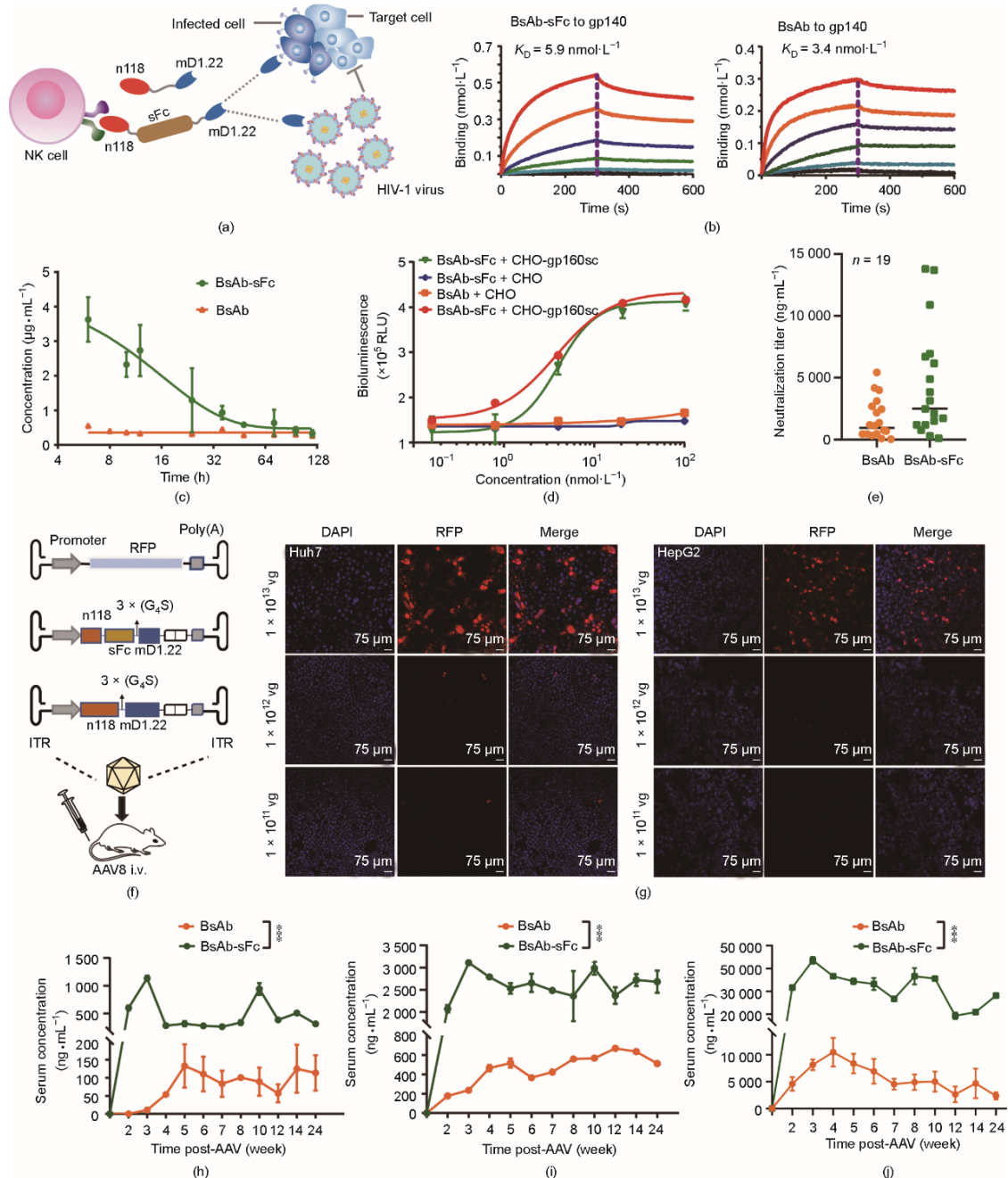


图 1. AAV8 递送抗 HIV-1 双功能蛋白。(a) 两种抗 HIV-1 双功能蛋白[BsAb (n118-mD1.22) 和 BsAb-sFc (n118-sFc-mD1.22)]的设计。(b) 通过 Octet-Red 96 设备测量了 BsAb 和 BsAb-sFc 与 gp140 的结合亲和力。(c) BsAb 和 BsAb-sFc 的药代动力学性质。(d) 使用 BsAb-sFc 和 BsAb 孵育 Jurkat T-CD16a 细胞后, 通过监测荧光素酶活性来测定其 ADCC 活性。(e) BsAb 和 BsAb-sFc 对 19 种 HIV-1 假病毒亚型的中和滴度。(f) 在动物实验中使用的 AAV8 载体和实验设计。(g) AAV8-RFP 感染的 HepG2 和 Huh7 细胞的典型图像。还进行了 DAPI 染色 (蓝色)。展示了双重染色的合并图像。(h) ~ (j) 在注射 1×10^{11} 个、 1×10^{12} 个和 1×10^{13} 个载体基因组 (vg) / 小鼠的动物中, AAV8-BsAb 和 AAV8-BsAb-sFc 的表达。对照小鼠也接受相同的 AAV8-RFP。所有数值均表示为均值 \pm 标准误差。NK: 自然杀伤细胞; RLU: 相对光单位; RFP: 红色荧光蛋白; DAPI: 4',6-二氨基-2-苯基吡啶; ITR: 倒置末端重复序列; K_D : 解离常数; Poly(A): 腺苷酸聚合物; G_4S : 甘氨酸-丝氨酸 (GGGGS) 连接体。*** $P < 0.001$ 。

HepG2和Huh7肝癌细胞系中的表达,结果表明,AAV8-RFP能够成功感染细胞并表达RFP蛋白。此外,细胞的阳性率随着病毒剂量的增加而增加[图1(g),图S1(f)、(g)和图S2(a)]。因此,我们向BALB/c小鼠静脉注射不同剂量的AAV8-BsAb和AAV8-BsAb-sFc。结果表明,体内BsAb-sFc和BsAb的浓度与AAV8的剂量呈正相关[图1(h)~(j)]。此外,BsAb-sFc浓度显著高于BsAb[图1(h)~(j)]。这表明延长AAV8表达蛋白的半衰期可以增加其在血液中的浓度。注射AAV8-BsAb-sFc后,在不同时间检测小鼠血清中的抗BsAb-sFc抗体,结果表明,抗BsAb-sFc抗体浓度不会随着BsAb-sFc蛋白浓度的增加($OD_{405} < 0.5$)或时间的增加而增加[图S2(b)]。此外,为了检测AAV8-BsAb-sFc和AAV8-BsAb在体内的长期表达是否会导致器官损伤,我们使用苏木精和伊红(H&E)染色分析了最高剂量组小鼠的内脏。结果表明,在高剂量组的器官中未检测到病理特征,证明了AAV8在体内长期表达蛋白的安全性(图S3)。

3.3. 通过AAV8递送的基因治疗提高FGF21的表达水平延长其半衰期

为了进一步验证我们的观察结果,开发了另一种基于AAV8的基因治疗。FGF21是葡萄糖和脂质代谢的关键调节剂[28],已成为T2DM治疗的一种有前途的药物。由于天然FGF21的半衰期较短(小鼠为30 min,猴子为2 h),因此已有大量研究来改善其药代动力学。例如,Hecht等开发了长效FGF21(RG)类似物[18]。FGF21(RG)蛋白包含两个点突变,第98位的亮氨酸突变为精氨酸(L98R),第171位的脯氨酸突变为甘氨酸(P171G)。然而,目前临床开发中的FGF21类似物仍需要定期给药以维持药效,这可能引发患者的依从性问题并引发免疫系统紊乱。

在此,我们的结果表明,Fc融合显著延长了FGF21(RG)(以下简称FGF21)在小鼠体内的半衰期[图S4(a)]。接下来,我们使用AAV8载体分别以每只小鼠 1×10^{10} 个、 1×10^{11} 个和 1×10^{12} 个载体基因组(vg)通过尾静脉向BALB/c小鼠递送RFP(对照)、FGF21和Fc-FGF21基因[图2(a)]。在12周的监测期内,AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠体重显著低于AAV8-FGF21处理的高剂量组小鼠[图2(b)~(d)和图S4(b)~(d)]。为了确定AAV8是否延长FGF21的半衰期,我们对FGF21和Fc-FGF21的血清浓度进行检测。结果表明,三个剂量组中Fc-FGF21的血清浓度显著高于FGF21[图2(e)~(g)]。小鼠体内循环中Fc-FGF21和FGF21的增加主要是由于肝脏

中的基因表达[图2(h)~(j)]。重要的是,在高剂量组和低剂量组中,Fc-FGF21的mRNA水平低于FGF21。这些结果进一步证明,延长AAV8表达的FGF21的半衰期增加了Fc-FGF21浓度,并抑制了小鼠体重增加。此外,高剂量时,AAV8-Fc-FGF21小鼠的肝脏重量低于AAV8-FGF21小鼠[图2(k)~(m)和图S4(b)~(d)]。总之,AAV8-Fc-FGF21治疗在增加血清浓度及减轻体重和肝脏重量方面比AAV8-FGF21更有利。

3.4. 比较不同剂量的AAV8递送FGF21对骨骼和脂肪的影响

基于以上AAV8-Fc-FGF21组小鼠体重显著下降的结果。使用小鼠的 μ CT图像分析脂肪,在低剂量组[图S5(a)和(b)]和中剂量组[图S5(c)和(d)]中未观察到脂肪组织体积显著减少。相反,在高剂量组中,AAV8-Fc-FGF21组的内脏脂肪体积低于AAV8-FGF21组[图S5(e)和(f)]。总之,AAV8-Fc-FGF21组内脏脂肪体积显著低于AAV8-FGF21组,这进一步验证了延长FGF21的半衰期可以增加其体内浓度并减少脂肪组织的体积。

为了检查FGF21或Fc-FGF21持续性表达对骨骼的影响,对胫骨进行了 μ CT扫描。我们的结果表明,低剂量组对胫骨几乎没有任何影响(图S6),而AAV8-FGF21和AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠在中剂量组的一些骨参数[如骨体积(bone volume, BV)和BV/组织体积(tissue volume, TV)]均降低,而小鼠也表现出发生骨质疏松的风险,如骨小梁数(trabecular number, Tb.N)降低以及骨小梁分离(trabecular separation, Tb.Sp)增加(图S7)。此外,与AAV8-FGF21处理的小鼠相比,AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠在高剂量组中显示出更严重的骨丢失,如骨表面(bone surface, BS)和TV降低(图S8)。总之,FGF21或Fc-FGF21的持续性表达会导致骨量损失,尤其是骨小梁。当Fc-FGF21浓度持续高达 $1300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,骨丢失比FGF21更严重[图2(g)和图S8]。

3.5. Fc-FGF21过量表达可改善db/db小鼠的血糖水平,并逆转胰岛素抵抗和葡萄糖耐量

为了评估治疗肥胖的效果,对瘦素受体缺陷db/db小鼠单次注射Fc-FGF21或FGF21(每只小鼠注射 1×10^{11} vg)[29],这是一种T2DM的非胰岛素依赖型糖尿病模型,显示为高血糖、胰岛素抵抗和肥胖的特征[30]。结果表明,Fc-FGF21组(KO-Fc-FGF21)的小鼠与初始体重相比体重增加了1.8%,低于FGF21组[KO-FGF21;图3(a)和图S9]的13.8%。值得注意的是,瘦素受体似乎是FGF21

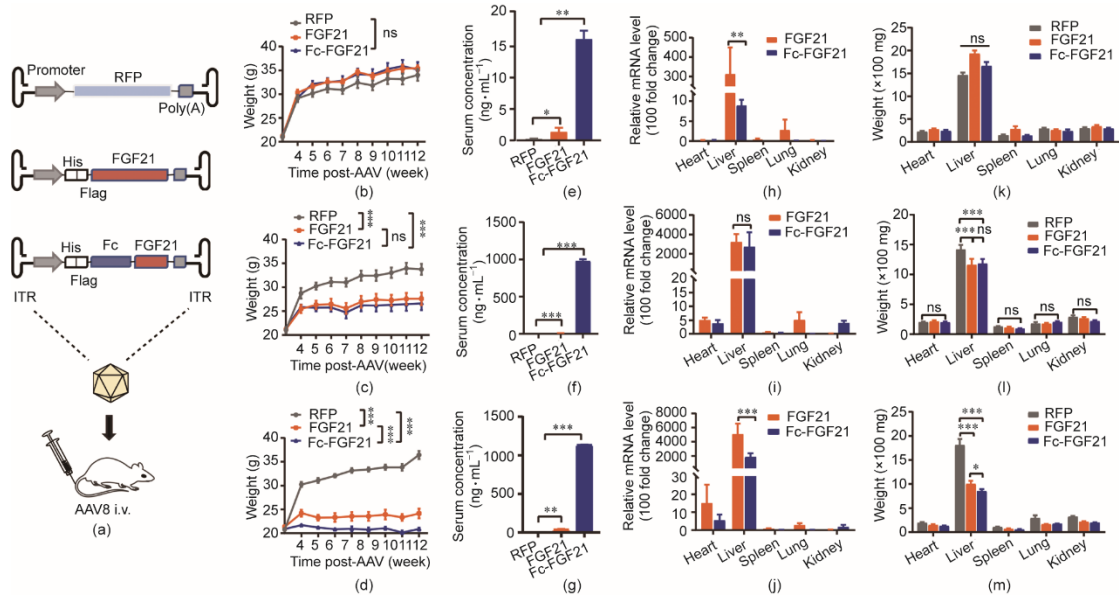


图2. AAV8-FGF21和AAV8-Fc-FGF21的体内表达。(a) AAV8载体和实验设计。(b)~(d)在注射AAV8-FGF21或AAV8-Fc-FGF21后,动物体重的变化。(e)~(g)注射病毒后不同时间点血清中FGF21和Fc-FGF21的水平。(h)~(j)使用RT-qPCR检测处理不同剂量AAV8-FGF21或AAV8-Fc-FGF21后各器官中的信使RNA(mRNA)水平(相对mRNA水平)。(k)~(m)经AAV8-FGF21或AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏的重量。BALB/c小鼠每只注射(AAV8-FGF21或AAV8-Fc-FGF21的基因组) 1×10^{10} 个(b, e, h, k)、 1×10^{11} 个(c, f, i, l)和 1×10^{12} 个(d, g, j, m)vg。对照小鼠也接受相同的AAV8-RFP。所有数值均表示为均值 \pm 标准误差。ns:无显著性差异。** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$ 。

对体重的影响所必需的,因为所有治疗组的 db/db 小鼠的体重几乎没有减轻[31]。KO-Fc-FGF21组的血糖水平在治疗6周后恢复正常,优于KO-FGF21组[图3(b)]。同样,胰岛素耐受实验(insulin tolerance test, ITT)和葡萄糖耐量实验(glucose tolerance test, GTT)结果显示, KO-Fc-FGF21组的胰岛素敏感性和葡萄糖耐量得到了更有效的改善[图3(c)和(d)]。总之,这些结果表明Fc-FGF21在 db/db 小鼠模型中具有更好的治疗效果。此外,通过比较小鼠血清中FGF21和Fc-FGF21的浓度,我们发现Fc-FGF21的浓度显著高于FGF21[图3(e)]。然而,两组之间的mRNA水平没有明显差异[图3(f)]。因此,有理由推测Fc-FGF21浓度增加是半衰期延长的结果。这些结果表明, Fc-FGF21改善了 db/db 小鼠的葡萄糖调节和胰岛素敏感性。

3.6. Fc-FGF21减轻 db/db 小鼠的血脂异常和肝脏损伤

肥胖是脂质异常的重要原因,因此,我们测量了KO-Fc-FGF21和KO-FGF21组的脂质水平。大多数脂质指标没有明显改善,然而, Fc-FGF21通过降低甘油三酯(triglyceride, TRIG)和低密度脂蛋白CHOL(LDL;图S10)的浓度显著减轻了血脂异常。此外,使用血清标记物评估肝功能,结果表明除天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)外, KO-Fc-FGF21组的血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平较低,表明KO-Fc-FGF21可

以改善肝功能[图3(g)]。KO-Fc-FGF21组的肝脏TC和TG水平没有显著降低[图3(h)],但其肝脏重量低于KO-FGF21的肝脏重量[图S11(a)和(b)]。H&E染色的组织学分析也表明KO-Fc-FGF21在减少肝脏脂质积聚方面具有更好的治疗效果[图S11(c)]。总之,在减轻血脂异常、降低血清LDL和TRIG浓度、增加高密度脂蛋白CHOL(HDL)和减少肝脏脂质积聚方面, Fc-FGF21的治疗效果优于FGF21。

3.7. Fc-FGF21治疗增强 db/db 小鼠的能量消耗

FGF21增加能量消耗并降低体重[32]。在 db/db 小鼠喂食期间, KO-Fc-FGF21组的多饮和多尿症状有所改善。虽然KO-Fc-FGF21组体重没有减少,但体重增加受到抑制。我们假设小鼠的体重增加量减少是由于Fc-FGF21抑制脂肪合成和增强碳水化合物代谢。因此,使用代谢笼实验检查各组的代谢指数。结果表明,在KO-FGF21和KO-Fc-FGF21处理的小鼠中观察到 O_2 消耗和 CO_2 产生显著减少,并接近正常小鼠的水平[图S12(a)和(b)]。值得注意的是,在KO-Fc-FGF21组中,呼吸交换比(respiratory exchange ratio, RER)也从肥胖引起的失调向正常水平转变,并且KO-Fc-FGF21处理的小鼠没有表现出产热和运动距离的增加,观察到的体重增加的抑制是由于代谢改变造成的[图S12(c)~(e)]。这些结果表明, Fc-FGF21对 db/db 小鼠能量代谢的改善主要通过增加碳水化合物代谢和抑制持续脂肪合成,这比FGF21更有效。

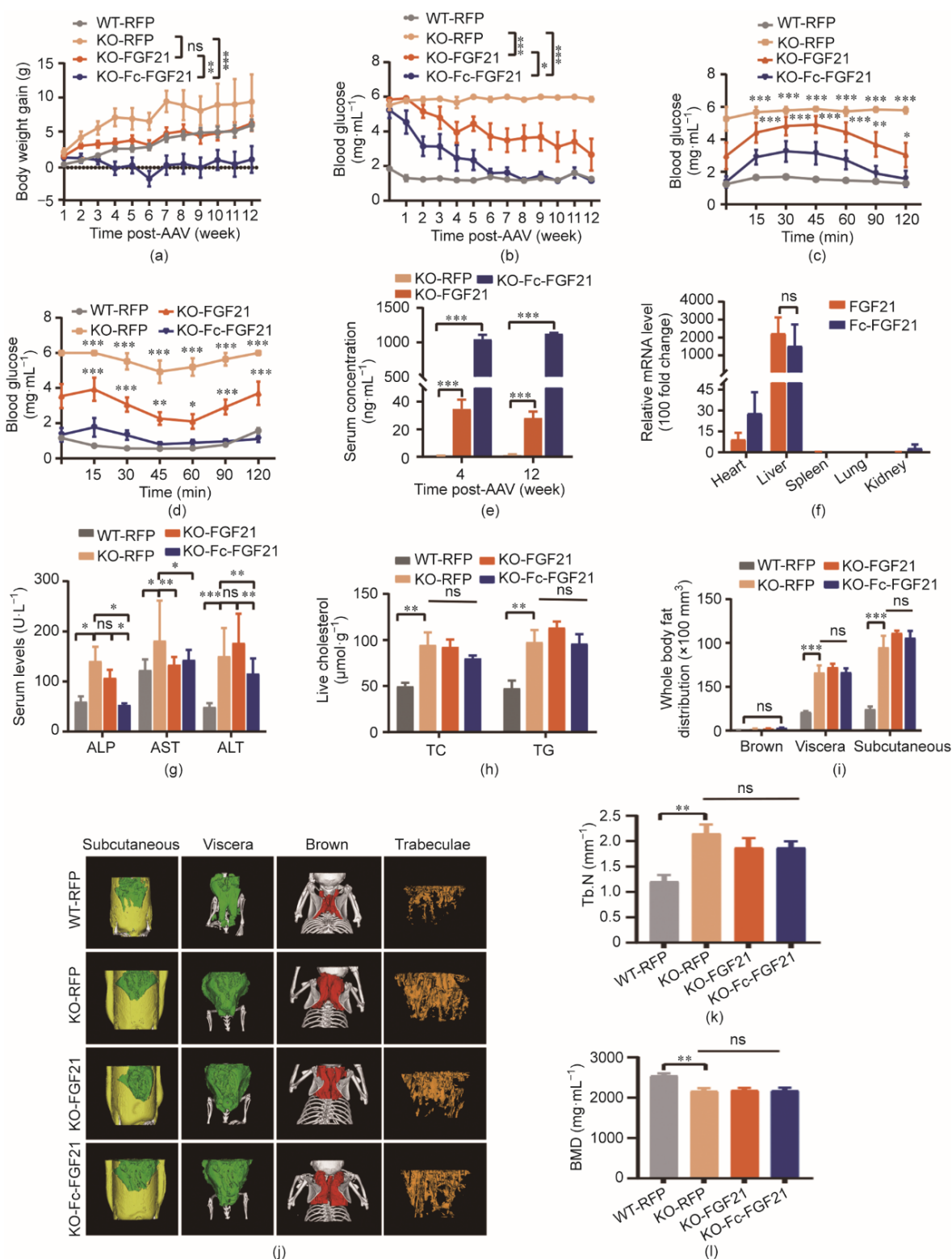


图3. AAV8基因治疗在 db/db 小鼠模型中的治疗效果。(a)在不同时间点,测量了不同组小鼠的体重。(b)测量了不同组小鼠的血糖水平。对照组包括野生型小鼠($n=6$)和注射AAV8-RFP的 db/db 小鼠($n=6$),实验组中的其他 db/db 小鼠分别注射了AAV8-FGF21($n=6$)或AAV8-Fc-FGF21($n=6$)。所有小鼠均以每只 1×10^{11} 个载体基因组(vg)的剂量进行治疗。(c)在腹腔注射葡萄糖($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)后进行了葡萄糖耐量试验(GTT)。(d)在腹腔注射胰岛素($2 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)后进行了胰岛素耐受试验(ITT)。(e)在AAV8载体注射后不同时间点测定了FGF21的血清水平。(f)使用RT-qPCR测定了经AAV8-FGF21或AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠各器官中的mRNA水平(相对mRNA水平)。(g)血清碱性磷酸酶(ALP)、天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)的水平。(h)肝脏总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)水平。(i)~(k)不同脂肪组织和骨密度(BMD)、小梁数目(Tb.N)的定量分析。(l)皮下(黄色)、内脏(绿色)和棕色脂肪(红色)的ICT 3D图像以及胫骨的小梁骨。所有数值均表示为均值±标准误差。
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

3.8. Fc-FGF21 治疗不会减少 *db/db* 小鼠的脂肪体积,也不会导致骨丢失,但会减轻白色脂肪组织中的炎症

根据结果,高浓度的 Fc-FGF21 和 FGF21 促进了 WT 小鼠的体重减轻和脂肪降解。然而, *db/db* 小鼠的体重降低得最少。因此,我们使用 μ CT 扫描检查脂肪体积。脂肪定量显示, FGF21 和 Fc-FGF21 均未有效减少皮下脂肪(黄色)、内脏脂肪(绿色)和棕色脂肪(brown adipose tissue, BAT; 图 3 (i) 和 (j)) 的体积。此外, H&E 染色显示白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT) 体积没有减少,棕色脂肪组织的脂质降解也没有改善[图 S13 (a) 和 (b)]。由于肥胖会导致 WAT 的炎症,巨噬细胞被标记为 F4/80,并通过免疫染色分析巨噬细胞浸润。结果表明, KO-Fc-FGF21 组的 WAT 中浸润巨噬细胞的数量少于 KO-FGF21 组,这表明 KO-Fc-FGF21 组中 WAT 中的炎症被显著抑制[图 S13 (c) 和 (d)]。

结果表明,高浓度的 Fc-FGF21 和 FGF21 导致 WT 小鼠的骨丢失,我们使用 μ CT 扫描分析了小鼠胫骨。与 WT 对照组小鼠相比,所有 *db/db* 小鼠的 Tb.N 显著较高[图 3 (k)], Tb.Sp 较低,小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th) 呈增加趋势[图 S14 (a) 和 (b)]。对骨量的参数进行评估,骨密度(bone mineral density, BMD)、BS/BV 降低,BS、BV、BS/TV 和 BV/TV 显著增加[图 3 (l) 和图 S14 (c) ~ (h)]。此外,与 KO-RFP 对照组小鼠相比, KO-FGF21 和 KO-Fc-FGF21 治疗组小鼠的骨参数没有明显变化。我们推测, *db/db* 小鼠的体型越大,骨体积也可能增加,从而导致骨参数增加。上述结果表明,在 *db/db* 小鼠模型中, Fc-FGF21 和 FGF21 均未减少小鼠的脂肪体积,也未引起副作用,如骨小梁和骨量减少。

3.9. 在 DIO 小鼠模型中, Fc-FGF21 降低体重并改善胰岛素敏感性和葡萄糖耐量

上述结果表明,尽管 Fc-FGF21 的浓度已经足够高了,但在 *db/db* 小鼠模型中治疗效果仍有不足。众所周知,长期喂食高脂肪饮食(high-fat diet, HFD) 的小鼠会造成体重增加, WAT 和胰岛素抵抗增加从而发展成 T2DM [33]。因此,我们用 DIO 小鼠模型探索 AAV8 递送的 FGF21 或 Fc-FGF21 的治疗效果。使用与 *db/db* 小鼠相同的给药方法,用 Fc-FGF21 处理的动物(命名为 HFD-Fc-FGF-21) 体重减少 45.9%,高于 FGF21 处理组[命名为 HFD-FGF21; 图 4 (a)、图 S15] 的 27.1%。此外, HFD-Fc-FGF21 组的胰岛素敏感性和葡萄糖分解代谢能力也优于 HFD-FGF21 [图 4 (b) ~ (d)]。总之, FGF21 半衰期的延长增加了 Fc-FGF21 的血清浓度,这有助于 DIO 小鼠模型中体重降

低、胰岛素抵抗的改善和葡萄糖代谢的增强。

3.10. Fc-FGF21 改善 DIO 小鼠模型中的肝功能和脂质分布

因为慢性 HFD 可能导致脂肪肝,因此我们对小鼠的肝功能进行研究,肝脏血清标志物结果显示,实验组的 ALT 和 AST 水平正常[图 4 (e)]。HFD-Fc-FGF21 组的肝脏重量低于 HFD-FGF21 [图 4 (f) 和图 S16 (a)]。因此,我们对肝脏 CHOL 进行了测量,结果表明 AAV8-Fc-FGF21 在降低 HFD 诱导的肥胖小鼠模型中的 TC 和 TG 水平方面表现更好[图 4 (g)]。Fc-FGF21 在 DIO 小鼠模型中显示出比 *db/db* 小鼠更好的降血脂效果,血清 CHOL 和 LDL 的浓度也呈下降趋势,尽管没有显著差异[图 4 (h)]。此外,与 WT 对照小鼠相比,实验小鼠的血清胆碱酯酶(serum cholinesterase, CHE) 降至正常,其他参数包括血清脂联素、白蛋白(albumin protein, ALBP)、总蛋白(total protein, TP)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDLP)、肌酸激酶(creatine kinase, CK) 和尿酸(uric acid, UA) 无显著差异,但尿素氮(urea nitrogen, UN) 显著增加[图 S16 (b) ~ (i)]。UN 水平较高可能是由于实验小鼠体内脂质的快速降解。此外, H&E 染色分析表明, HFD-RFP 对照小鼠的肝组织中存在较大的脂肪泡,而 HFD-Fc-FGF21 组中脂肪泡消失,切片与正常组织相比没有差异[图 4 (i)]。油红染色还表明, HFD-Fc-FGF21 组的肝组织与正常小鼠的肝组织相同[图 4 (j)]。总之,在 DIO 小鼠模型中, Fc-FGF21 治疗有效地减少了肝脏脂肪积聚并促进了肝损伤的恢复。

3.11. 在 DIO 小鼠模型中, Fc-FGF21 减少脂肪体积并逆转 HFD 诱导的 WAT 细胞肥大

我们的结果表明, Fc-FGF21 治疗使 DIO 小鼠的体重降低了 45.9%。因此,我们进一步研究了治疗后小鼠的脂肪体积。 μ CT 显示 AAV8-Fc-FGF21 处理的小鼠的皮下(黄色)和内脏脂肪(绿色)减少[图 4 (k) 和 (l)]。HFD-Fc-FGF21 组的 WAT 重量低于 HFD-FGF21 [图 4 (m) 和图 S17 (a)]。此外, H&E 染色显示 HFD-Fc-FGF21 组的白色脂肪细胞体积较低, BAT 中脂质积累小于 HFD-FGF21 [图 S17 (b) 和 (c)]。这表明, Fc-FGF21 增强脂肪降解,减轻体重并改善小鼠的肝功能,逆转 HFD 诱导的 WAT 细胞肥大,这优于 FGF21 的基因治疗。

正如我们的结果所示,高浓度的 Fc-FGF21 和 FGF21 在 WT 小鼠中会导致骨丢失,但在 *db/db* 小鼠中没有,因此,我们进一步探讨了 DIO 小鼠模型中是否发生骨丢失。结果显示, HFD-FGF21 和 HFD-Fc-FGF21 组的 Tb.N 显著

降低, 对Tb.Th和Tb.Sp没有影响[图4 (n) 和图S18 (a)、(b)]。此外, 骨量参数BMD、BV、TV和BS/BV没有显著变化, 但其他参数(包括BS、BV/TV和BS/TV)显著下降, 表明HFD-FGF21和HFD-Fc-FGF21治疗导致致DIO小鼠模型骨丢失[图4 (o) 和图S18 (c) ~ (h)]。尽管Fc-FGF21的浓度显著高于FGF21, 但骨丢失并不比FGF21严重。

4. 讨论与总结

在本研究中, 以双功能(BsAb-sFc)和治疗蛋白(Fc-FGF21)为例, 我们证明AAV8表达的半衰期延长后小分子蛋白对提高其体内浓度和疗效及安全性具有有益作用。我们首先构建了双功能抗体, 表明BsAb和BsAb-sFc都能有效中和HIV-1, BsAb-sFc在体内的半衰期更长。接

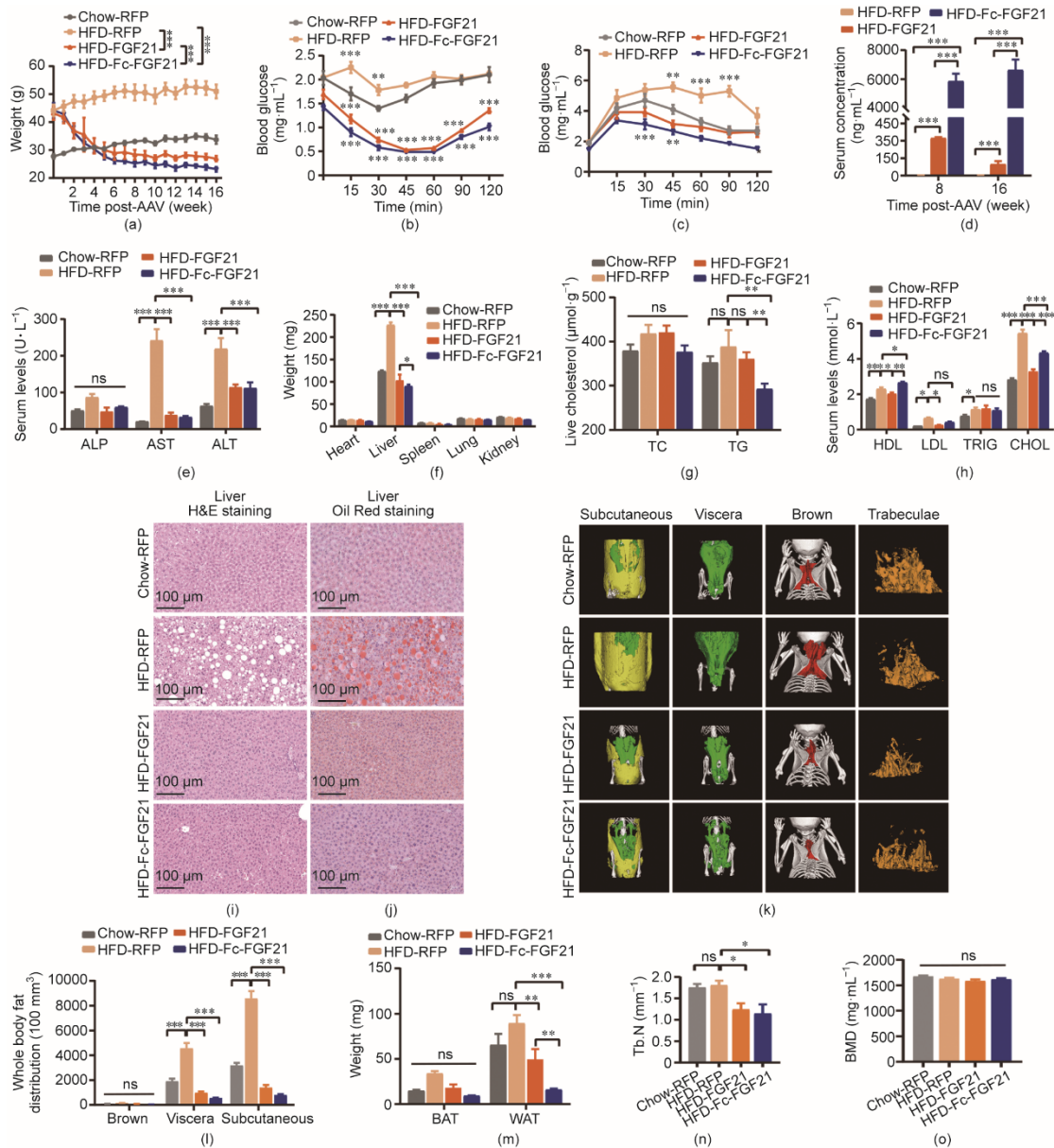


图4. AAV8基因治疗在DIO小鼠模型中的疗效。(a)在不同时间点, 测量了不同组小鼠的体重。对照组包括野生型小鼠 ($n=6$) 和注射AAV8-RFP的DIO小鼠 ($n=6$), 实验组中的其他DIO小鼠分别注射了AAV8-FGF21 ($n=6$) 或AAV8-Fc-FGF21 ($n=6$)。所有小鼠均以每只 1×10^{11} 个载体基因组(vg)的剂量进行治疗。(b)在腹腔注射胰岛素($0.4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)后, 所有实验组进行了胰岛素耐受试验(ITT)。(c)在腹腔注射葡萄糖($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重)后, 各组进行了葡萄糖耐量试验(GTT)。(d)注射病毒后不同时间点血清中FGF21和Fc-FGF21的水平。(e)血清碱性磷酸酶(ALP)、天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)的水平。(f)来自接受AAV8-RFP、AAV8-FGF21和AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏的重量。(g)肝脏总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)水平。(h)血清脂质水平的高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、甘油三酯(TRIG)和总胆固醇(CHOL)的变化。(i)、(j)肝脏的H&E染色和Oil Red染色。(k)皮下(黄色)、内脏(绿色)和棕色脂肪(红色)的 μ CT 3D图像以及胫骨的小梁骨图像。(l)不同脂肪组织的定量分析。(m)接受AAV8-RFP、AAV8-FGF21和AAV8-Fc-FGF21处理的小鼠WAT沉积物的重量。(n)、(o)骨密度(BMD)和小梁数目(Tb.N)的定量分析。所有数值均表示为均值 \pm 标准误差。ns: 无显著性差异。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

下来, 通过 AAV8 递送 BsAb 和 BsAb-sFc, 并在体内比较它们在不同剂量下的浓度。这些结果表明, 在相同剂量下延长治疗蛋白的半衰期显著增加了蛋白浓度。

为了进一步验证这一发现, 我们选择同样具有短半衰期的 FGF21 来比较 AAV8 在体内不同剂量下递送的 FGF21 和 Fc-FGF21 之间的差异。结果与 AAV8 表达双功能蛋白的结果一致, 在相同剂量的 AAV8 下, Fc-FGF21 显著降低小鼠的体重、脂肪体积和肝脏重量。我们进一步评估了瘦素受体缺陷 *db/db* 小鼠模型的疗效。结果表明, AAV8-Fc-FGF21 处理的小鼠体重增加得到控制, 血糖降至正常水平。此外, 胰岛素敏感性和葡萄糖耐量也有所改善。小鼠的脂肪量没有降低, 但肝功能和代谢水平得到改善, 没有副作用, 如 BMD 或骨小梁减少。在 HFD 喂养的小鼠模型中, Fc-FGF21 基因治疗也比 FGF21 更有效, 包括减轻体重、肝脏重量、脂肪重量、脂肪体积和脂肪细胞大小。

FGF21 在肥胖模型中的治疗作用先前已有报道[32, 34–35]。然而, FGF21 类似物的临床研究并未有效地改善血糖, 这可能是因为基于蛋白质的治疗方法的半衰期相对较短[31,36]。通过基因治疗持续表达 FGF21 是否可能成为一种潜在的新治疗方法仍有待确定。值得注意的是, 根据我们的实验结果, AAV8 递送的 FGF21 或 Fc-FGF21 减少了 HFD 喂养小鼠模型中骨小梁的数量。在这方面, AAV8 递送的 Fc-FGF21 的浓度在降低 AAV8 的剂量以实现治疗效果后保持有效, 却能够显著减少副作用。

多种小分子蛋白和肽已被临床用于治疗各种疾病。然而, 半衰期较短成为治疗剂开发的瓶颈。截至 2020 年, 13 种 Fc 融合蛋白药物已在主要市场获得监管部门批准[37]。然而, 即使对 Fc 进行修饰以延长药物的半衰期, 它仍需要频繁给药, 这无法从根本上解决问题。因此, 需要开发具有持久药理学和疗效的“一对一”治疗方法, 这正是 AAV 基因治疗的关键特征。尽管目前使用 AAV 载体的临床试验呈指数级增长, 说明 AAV 已成为改善人类健康的有前途的载体, 但必须认识到该基因递送平台的局限性和挑战, 包括 AAV 制造成本高和递送的免疫障碍[38–39]。此外, 由于低剂量的载体可能被自身抗体中和, 并会损害治疗效果, 因此通常认为有效治疗需要足够高的载体剂量[40]。然而, 矛盾的是, AAV 载体诱导的全身毒性也是剂量依赖性的。据观察, 在两项非人类灵长类动物研究中, 静脉注射高剂量 AAV 导致严重不良事件, 影响了疗效[41–42]。因此, 基因治疗领域迫切需要开发降低制造成本和给药剂量的新策略。基于我们的发现, 我们假设增加基因治疗药物的半衰期可能是减少 AAV 所需剂量的一种方法, 从而解决高剂量毒性并降低 AAV 基因治疗的高成

本。我们的研究为优化当前的基因疗法提供了新的见解, 并有助于将其应用于常见疾病。

致谢

本研究得到了国家重点研发计划(2019YFA0904400)和国家自然科学基金(81822027、81630090 和 81902108)的支持。作者感谢复旦大学上海医学院-PerkinElmer 公司联合活体小动物成像实验室的郭晓女士在使用高分辨率 X 射线 μ CT 扫描方面提供的技术支持。

作者贡献

吴艳玲和应天雷设计了实验。吴会芳、胡丹、李泉晓、王春雨、朱晓艺、陈宾凡、黄可可和黄爱玲进行了体外和体内实验。李威和 Dimiter S. Dimitrov 进行了 ADCC 分析。季萍和黄竞荷进行了 HIV-1 中和试验。吴会芳和应天雷撰写了手稿。所有作者都对手稿作出了贡献, 并认可了提交的版本。

Compliance with ethics guidelines

Huifang Wu, Dan Hu, Quanxiao Li, Chunyu Wang, Xiaoyi Zhu, Wei Li, Binfan Chen, Ping Ji, Keke Huang, Ailing Huang, Jinghe Huang, Dimiter S. Dimitrov, Yanling Wu, and Tianlei Ying declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.02.009>.

References

- [1] Deshaies RJ. Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation. *Nature* 2020;580(7803):329–38.
- [2] Briukhovetska D, Dorr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 2021;21(8):481–99.
- [3] Conner KP, Devanaboyina SC, Thomas VA, Rock DA. The biodistribution of therapeutic proteins: mechanism, implications for pharmacokinetics, and methods of evaluation. *Pharmacol Ther* 2020;212:107574.
- [4] Liu LM. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell* 2018;9(1):15–32.
- [5] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discovery* 2019;18(5):358–78.
- [6] Chowdhury EA, Meno-Tatang G, Chang HY, Wu S, Huang HW, Jamier T, et al.

- Current progress and limitations of AAV mediated delivery of protein therapeutic genes and the importance of developing quantitative pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) models. *Adv Drug Delivery Rev* 2021;170:214–37.
- [7] Wagner HJ, Weber W, Fussenegger M. Synthetic biology: emerging concepts to design and advance adeno-associated viral vectors for gene therapy. *Adv Sci* 2021;8(9):2004018.
- [8] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015;526(7573):351–60.
- [9] Bulaklak K, Gersbach CA. The once and future gene therapy. *Nat Commun* 2020;11(1):5820.
- [10] Powell JS, Pasi KJ, Ragni MV, Ozelo MC, Valentino LA, Mahlangu JN, et al. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. *N Engl J Med* 2013;369(24):2313–23.
- [11] Gardner MR, Kattenhorn LM, Kondur HR, von Schaewen M, Dorfman T, Chiang JJ, et al. AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature* 2015;519(7541):87–91.
- [12] Le Quellec S, Dane A, Enjolras N, McIntosh J, Rosales C, Negrier C, et al. Potential limits of AAV-based gene therapy with the use of new transgenes expressing factor IX fusion proteins. *Haemophilia* 2019;25(1):e11–8.
- [13] Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, Marsters SA, Gregory T, Mitsuya H, et al. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 1989;337(6207):525–31.
- [14] Shapiro AD, Ragni MV, Valentino LA, Key NS, Josephson NC, Powell JS, et al. Recombinant factor IX-Fc fusion protein (rFIXFc) demonstrates safety and prolonged activity in a phase 1/2a study in hemophilia B patients. *Blood* 2012;119(3):666–72.
- [15] Le Quellec S, Dane AP, Barbon E, Bordet JC, Mingozzi F, Dargaud Y, et al. Recombinant adeno-associated viral vectors expressing human coagulation FIX-E456H variant in hemophilia B mice. *Thromb Haemost* 2019;119(12):1956–67.
- [16] Wang C, Wu Y, Wang L, Hong B, Jin Y, Hu D, et al. Engineered soluble monomeric IgG1 Fc with significantly decreased non-specific binding. *Front Immunol* 2017;8:1545.
- [17] Li W, Wu Y, Kong D, Yang H, Wang Y, Shao J, et al. One-domain CD4 fused to human anti-CD16 antibody domain mediates effective killing of HIV-1 infected cells. *Sci Rep* 2017;7(1).
- [18] Hecht R, Li YS, Sun J, Belouski E, Hall M, Hager T, et al. Rationale-based engineering of a potent long-acting FGF21 analog for the treatment of type 2 diabetes. *PLoS One* 2012;7(11):e49345.
- [19] Challis RC, Ravindra Kumar S, Chan KY, Challis C, Beadle K, Jang MJ, et al. Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents. *Nat Protoc* 2019;14(2):379–414.
- [20] McKeage K. Ravulizumab: first global approval. *Drugs* 2019;79(3):347–52.
- [21] Liu R, Oldham RJ, Teal E, Beers SA, Cragg MS. Fc-engineering for modulated effector functions—improving antibodies for cancer treatment. *Antibodies* 2020;9(4):64.
- [22] Pincus SH, Craig RB, Weachter L, LaBranche CC, Nabi R, Watt C, et al. Bispecific anti-HIV immunoadhesins that bind Gp120 and Gp41 have broad and potent HIV-neutralizing activity. *Vaccines* 2021;9(7):774.
- [23] Wu X, Guo J, Niu M, An M, Liu L, Wang H, et al. Tandem bispecific neutralizing antibody eliminates HIV-1 infection in humanized mice. *J Clin Invest* 2018;128(6):2239–51.
- [24] Li S, Qiao Y, Jiang S, Wang B, Kong W, Shan Y. Broad and potent bispecific neutralizing antibody gene delivery using adeno-associated viral vectors for passive immunization against HIV-1. *J Controlled Release* 2021;338:633–43.
- [25] Chen W, Feng Y, Prabakaran P, Ying T, Wang Y, Sun J, et al. Exceptionally potent and broadly cross-reactive, bispecific multivalent HIV-1 inhibitors based on single human CD4 and antibody domains. *J Virol* 2014;88(2):1125–39.
- [26] Ying T, Wang Y, Feng Y, Prabakaran P, Gong R, Wang L, et al. Engineered antibody domains with significantly increased transcytosis and half-life in macaques mediated by FcRn. *mAbs* 2015;7(5):922–30.
- [27] Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2020;21(4):255–72.
- [28] Targher G, Corey KE, Byrne CD, Roden M. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus—mechanisms and treatments. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18(9):599–612.
- [29] Ogrodnik M, Zhu Yi, Langhi LGP, Tchkonja T, Krüger P, Fielder E, et al. Obesity-induced cellular senescence drives anxiety and impairs neurogenesis. *Cell Metab* 2019;29(5):1061–77.e8.
- [30] Campbell MD, Sathish T, Zimmet PZ, Thankappan KR, Oldenburg B, Owens DR, et al. Benefit of lifestyle-based T2DM prevention is influenced by prediabetes phenotype. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16(7):395–400.
- [31] Talukdar S, Zhou Y, Li D, Rossulek M, Dong J, Somayaji V, et al. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab* 2016;23(3):427–40.
- [32] Davidsohn N, Pezone M, Vernet A, Graveline A, Oliver D, Slomovic S, et al. A single combination gene therapy treats multiple age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(47):23505–11.
- [33] Noh MR, Kong MJ, Han SJ, Kim JI, Park KM. Isocitrate dehydrogenase 2 deficiency aggravates prolonged high-fat diet intake-induced hypertension. *Redox Biol* 2020;34:101548.
- [34] Jimenez V, Jambrija C, Casana E, Sacristan V, Muñoz S, Darriba S, et al. FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. *EMBO Mol Med* 2018;10(8):emmm.201708791.
- [35] Sponton CH, Kajimura S. AAV-mediated gene therapy as a strategy to fight obesity and metabolic diseases. *EMBO Mol Med* 2018;10(8):e9431.
- [36] Gaich G, Chien J, Fu H, Glass L, Deeg M, Holland W, et al. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* 2013;18(3):333–40.
- [37] Strohl WR. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell* 2018;9(1):86–120.
- [38] Nidetz NF, McGee MC, Tse LV, Li C, Cong L, Li Y, et al. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: understanding barriers to gene delivery. *Pharmacol Ther* 2020;207:107453.
- [39] Salzman R, Cook F, Hunt T, Malech HL, Reilly P, Foss-Campbell B, et al. Addressing the value of gene therapy and enhancing patient access to transformative treatments. *Mol Ther* 2018;26(12):2717–26.
- [40] Muhuri M, Maeda Y, Ma H, Ram S, Fitzgerald KA, Tai PW, et al. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *J Clin Invest* 2021;131(1):e143780.
- [41] Flotte TR. Revisiting the “new” inflammatory toxicities of adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 2020;31(7–8):398–9.
- [42] Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122(1):23–36.