

BÀI TỔNG QUAN

HỆ THỐNG VECTOR ADENOVIRUS: CÔNG CỤ HỮU HIỆU DẪN TRUYỀN GEN KHÁNG NGUYÊN TẠO VACCINE THỂ HỆ MỚI

Lê Thanh Hòa

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Vaccine virus tái tổ hợp bằng công nghệ gen có khả năng tận dụng 3 loại đáp ứng miễn dịch: miễn dịch dịch thể (humoral immune response), miễn dịch trung gian tế bào (cell-mediated immune response) và miễn dịch niêm mạc (mucosal immune response). Phương thức đưa vaccine vector virus rất tiện lợi, bằng tất cả mọi đường, trong đó lợi thế lớn nhất là tính đơn giản và hiệu quả của việc đưa vaccine vào quần thể qua đường tiêu hóa (ăn/uống) và đường hô hấp (khí dung). Hệ thống adenovirus là một trong những nguồn cung cấp vector virus thông dụng nhất được ứng dụng trong các lĩnh vực, bao gồm dẫn truyền gen vaccine thể hệ mới gây miễn dịch, dẫn truyền và biểu hiện gen cytokine kích ứng miễn dịch, dẫn truyền RNAi phá bỏ gen đối ứng gây bệnh và đặc biệt, được sử dụng rộng rãi trong liệu pháp gen chống ung thư và bệnh hiểm nghèo. Có nhiều loại adenovirus người và động vật đã được thiết kế làm hệ thống vector dẫn truyền gen kháng nguyên. Về nguyên liệu, cần có 3 loại: plasmid DNA vector từ nguồn DNA hệ gen adenovirus; plasmid DNA vector con thoi để nạp gen kháng nguyên và hệ thống tế bào vi khuẩn cũng như tế bào động vật đặc thù để kiến tạo adenovirus tái tổ hợp. Về nguyên tắc, adenovirus tái tổ hợp làm vaccine phải nhân lên tốt cung cấp nguyên liệu sản xuất vaccine và có khả năng gây miễn dịch tốt cho đối tượng. Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu những nét đặc trưng nhất của các loại adenovirus trong họ Adenoviridae, nguyên lý và những phương pháp cơ bản tạo adenovirus tái tổ hợp mang gen kháng nguyên và những ứng dụng thành công hệ thống adenovirus để tạo nên một số vaccine tái tổ hợp thể hệ mới ở người và động vật.

**Từ khóa:** Adenovirus, miễn dịch dịch thể, miễn dịch niêm mạc, miễn dịch trung gian tế bào, tái tổ hợp, vaccine thể hệ mới

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus là phần tử vi sinh vật nhỏ bé và linh hoạt trong mối quan hệ tương tác với tế bào và cơ thể. Có đầy đủ hệ gen, vừa hoạt động độc lập lại vừa hoạt động phụ thuộc, virus được coi là kết quả của quá trình tiến hóa thoái bộ tiên tiến nhất (Vignuzzi *et al.*, 2006; Manrubia, Lazaro, 2006). Do có khả năng chuyển giao gen trong giới sinh vật, nên virus được nghiên cứu triệt để ở mọi khía cạnh trong đó có việc tận dụng chúng để làm vector (Marques, Carthew, 2007; Brun *et al.*, 2008). Vector virus được coi là nguồn công cụ để dẫn truyền gen kháng nguyên linh hoạt nhất, hiệu quả nhất, trước hết vì virus vector là virus sống được nhuộm độc hóa bằng công nghệ gen, nên khả năng sản sinh và giới thiệu kháng nguyên trong cơ thể được coi là hoàn thiện, hơn nữa, chúng là loại nhân lên thiếu năng trong một đời sử dụng nên vaccine trên nền virus vector cũng rất an toàn (Souza *et al.*, 2005; Liniger *et al.*, 2007; Hartman *et al.*, 2008). Chính vì những lợi thế đó, vector virus là nguồn công cụ để dẫn truyền gen kháng nguyên

được coi là đáp ứng đầy đủ các điều kiện nhất cho đến nay (Ferreira *et al.*, 2005; Lê Thanh Hòa, 2006; Brave *et al.*, 2007; Brun *et al.*, 2008).

Trong các hệ thống vector dẫn truyền gen kháng nguyên làm vaccine thể hệ mới, hệ thống vector adenovirus được đặc biệt chú trọng nghiên cứu và sử dụng (Seth, 2000; Tatsis, Ertl, 2004), do adenovirus có đặc tính thích ứng tế bào đa vật chủ thông qua hệ thống thụ thể Toll (Zhu *et al.*, 2007), vô hại với nhiều loài, nhân lên mạnh khi nuôi cấy trên tế bào tổ chức cho hàm lượng virus nhiều để sản xuất vaccine (*in vitro*) (Danthinne, Imperiale, 2000; Seth, 2000), khi vào đối tượng hưởng vaccine (*in vivo*) vẫn có khả năng ổn định nhân lên duy trì kháng nguyên nhưng không gây hại vật chủ (Impler, 1995; Bangari, Mittal, 2006; Arnberg, 2009).

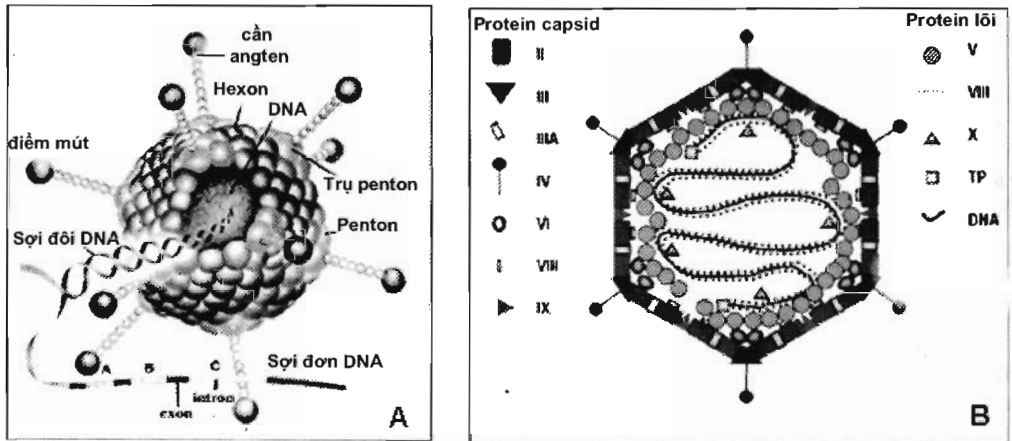
CẤU TRÚC VÀ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA ADENOVIRUS

Adenovirus trong tự nhiên là loại virus có kích

thước bé, hình thái đơn giản, có cấu trúc hình khối đối xứng, đường kính 80 - 110 nm, không có vỏ bọc ngoài cùng, capsid bao gồm 252 capsomer phân chia thành 12 penton, 240 hexon, có 6 sợi protein (fiber) gọi là angten (một số adenovirus loài chim có 12 angten). Capsid có cấu trúc 1 lớp, trọng lượng phân tử khoảng 150 - 180 triệu Da; cả hexon, penton và angten đều là kháng nguyên bề mặt nổi, trong đó penton có điểm nút (knob) làm vị trí tiếp xúc với thụ thể tế bào trong quá trình gây nhiễm (Bunchen-Osmond, 2003; Benko *et al.*, 2005) (Hình 1). Adenovirus có hệ gen không phân đoạn, chứa một phân tử DNA 2 sợi, kích thước 34 - 36 kb đối với động vật, mà tại hai đầu cuối của hệ gen có bố trí hai chuỗi lặp ngược ITR (inverted terminal repetitions), mỗi chuỗi có độ dài 103 bp đối với adenovirus của người, 50 - 200 bp đối với adenovirus động vật khác, có vai trò quan trọng trong quá trình khép vòng hệ gen DNA của virus. Hệ gen bao gồm 2 sợi: 1 sợi DNA hướng trái L (left), 1 sợi DNA hướng phải R (right), chứa các tổ

hợp gen sớm (E, early region) đó là các gen 1A, 1B, 2A-B, 4; và một khung gen chung sao chép muộn (L, late region), mã hóa cho 5 protein hợp nhất (L1-5) (Impler, 1995) (Hình 1).

Tổng số, adenovirus có tất cả 13 loại protein, trong đó có các protein không cấu trúc mang hoạt tính enzyme là DNA - polymerase, replicase và protease. Protein cấu trúc chính của adenovirus bao gồm: II (hexon), III (penton), IIIa, IV (fiber), V (protein lõi), VI, VII (protein lõi), VIII và IX. Hexon (II) là thành phần vỏ virus; penton (III) là protein capsid gốc, với trợ giúp của protein IIIa làm trụ cho cần angten (fiber (IV)) cắm vào; bên trong là các protein đệm bao bọc DNA của hệ gen, gồm protein V (đệm bé) và VII (đệm lớn). Ngoài ra, còn có 3 loại protein chèn màng được liên kết chặt chẽ với hexon là protein VI, VIII và IX; cũng như một số loại protein phụ trợ khác, bao gồm TP (protein kết thúc hệ gen), protein Mu và protein X (Curiel, Douglas, 2002) (Hình 1).



Hình 1. Mô hình cấu tạo adenovirus. A. Cấu trúc không gian của hạt virion adenovirus; B. Cấu tạo hạt virion (cắt phẳng) với DNA hệ gen và các loại protein được biết hiện nay. Tất cả protein của adenovirus được ký hiệu đánh số, trừ protein TP (protein kết thúc hệ gen). Nguồn: Fields *et al.*, Fundamental Virology (1996).

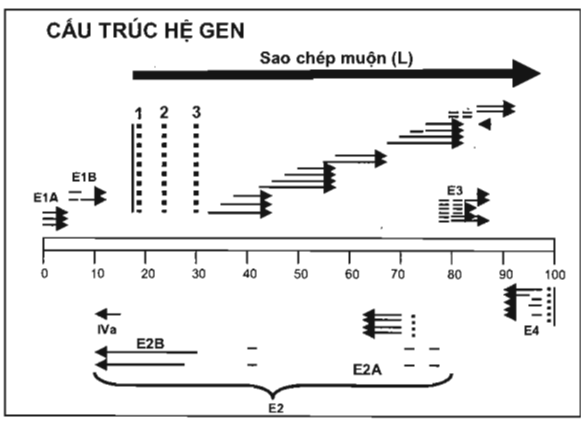
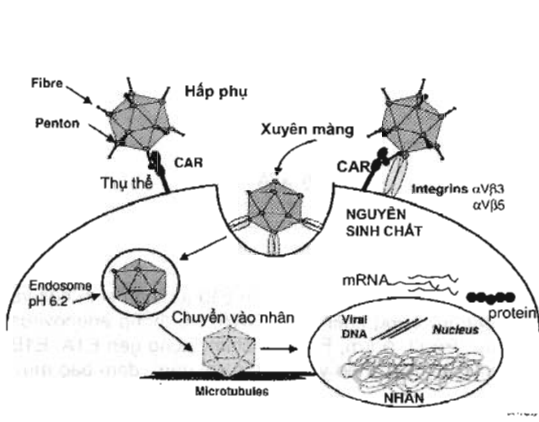
Adenovirus hấp phụ lên tế bào thích ứng bằng cách dùng nút angten (fiber knob) bám dính vào thụ thể tế bào đích (Hình 2). Thụ thể tế bào đích có tên gọi là **CAR** (coxsackie/adenovirus receptor), xuất phát từ bản chất của thụ thể adenovirus giống hoàn toàn thụ thể của virus Coxsackie B, do vậy, thụ thể này được sử dụng chung cho cả hai loại virus (Nemerow, 2002; Zhang, Bergelson, 2005; Rittner *et al.*, 2007). Sau khi bám dính, penton của adenovirus cần có sự tương tác với  $\alpha$ -*integrin* của bề mặt tế bào

để kết dính và xuyên màng thông qua quá trình ẩm bào (endocytosis) (Nemerow, Stewart, 1999). Kết thúc ẩm bào, lúc đó virus đã nằm trong endosome và nhờ penton giúp đỡ, virus thoát khỏi endosome để hướng về màng nhân tế bào. Tại đó, virus giải phóng DNA hệ gen, để DNA xuyên màng vào bên trong nhân thực hiện quá trình sao chép sớm (early transcription). Trong khi DNA nhân lên để có vật liệu hệ gen, virus tiếp tục thực hiện quá trình sao chép muộn (late transcription) để có protein cấu trúc

tạo nên capsid bao gói sản phẩm DNA của hệ gen của các hạt virion mới (Evans, Hearing, 2002). Sao chép, tổng hợp protein, tổng hợp DNA và bao gói virus đều xảy ra trong nhân tế bào nhiễm (Hình 2). Gen E1A được biểu hiện sớm nhất, cho sản phẩm có tác dụng điều khiển các gen khác tổng hợp các sản phẩm cần thiết cho quá trình nhân lên của virus. Do vậy, xóa bỏ gen này để giải gen kháng nguyên ngoại lai vào vị trí đó, là có tính lưỡng dụng, vì như vậy, sẽ tạo ra được virus vector nhân lên thiếu năng. Mặt khác, do được biểu hiện sớm, nên kháng nguyên nhanh chóng kích thích đáp ứng miễn dịch sớm so với các loại virus vector vaccine khác (Santoso et al., 2005; Hartman et al., 2008). Đối với adenovirus tự nhiên, kết thúc quá trình là hàng loạt virion được giải phóng ra. Đối với adenovirus tái tổ hợp thiếu năng mang gen kháng nguyên, virus thông thường chỉ tồn tại một đời, biểu hiện kháng nguyên kích thích miễn dịch; và, do không có các protein cần thiết để bao gói, nên không tạo được thể hệ virion mới (Curiel, Douglas, 2002).

Tất cả adenovirus đều có hệ gen là DNA hai sợi (double-stranded DNA), đều thuộc họ Adenoviridae, tồn tại trong nhiều loài động vật, gia súc, gia cầm, chim cá, ếch nhái, bò sát và người. Cho đến nay, đã có nhiều adenovirus được phân lập

từ rất nhiều loài động vật và chim được sử dụng làm vector (Zhang, Bergelson, 2005). Hầu hết adenovirus đều vô hại, một số chỉ gây nhiễm nhẹ trên các loài thích ứng mà không gây chết. Trên cơ sở phân tích đặc tính hệ gen, đặc tính huyết thanh học và đặc tính nuôi cấy trên môi trường tế bào, adenovirus được phân làm 4 nhóm chính nằm trong họ Adenoviridae (Bunchen-Osmond, 2003), đó là Mastadenovirus, Aviadenovirus, Atadenovirus và Siadenovirus (Benko et al., 2005). Phần lớn adenovirus của động vật có vú đều thuộc về nhóm Mastadenovirus, kể cả những serotype của adenovirus của người (human adenovirus, HAd). Tất cả mọi loại adenovirus phân lập từ chim được phân loại thuộc về nhóm Aviadenovirus. Nhóm Atadenovirus bao gồm những virus đơn nhất phân lập từ cừu, bò, hươu, thú có túi và một vài loài chim, khác biệt với những adenovirus thuộc nhóm Mastadenovirus ở chỗ là chúng không có vùng gen sớm ký hiệu là E1 và hệ gen của chúng chứa một số lượng nucleotide Adenine (A) và Thymine (T) với tỷ lệ rất cao. Nhóm thứ tư mới được phân loại gần đây là Siadenovirus được tạm quy định bao gồm tất cả các adenovirus phân lập từ ếch, cá, một số loài không xương sống và loại virus gây bệnh viêm ruột xuất huyết ở gà tây (Curiel, Douglas, 2002; Benko et al., 2005).



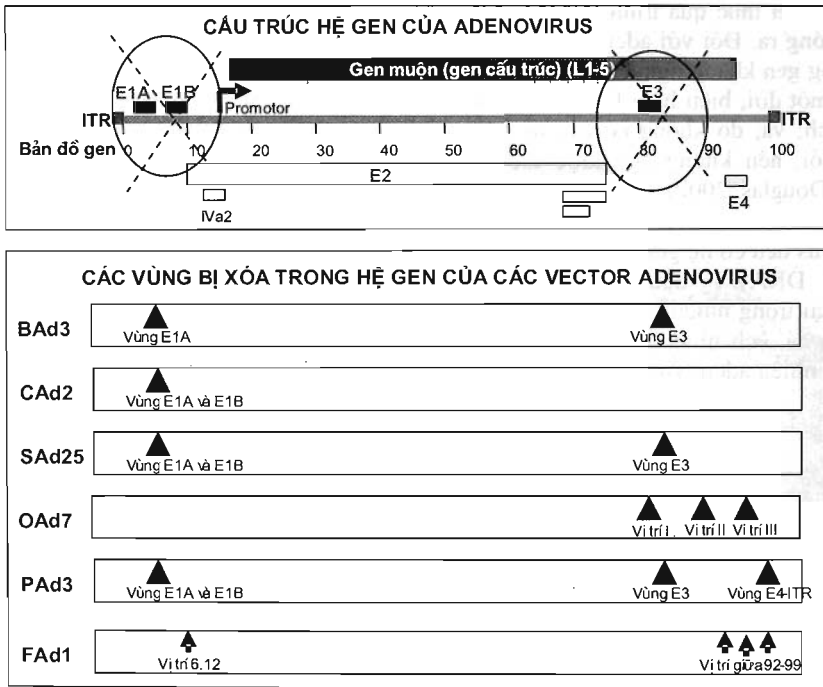
**Hình 2.** Mô tả quá trình hấp phụ, xâm nhập và thực hiện chu trình nhân lên (bên trái); và cấu trúc hệ gen của adenovirus (bên phải). Ghi chú: Adenovirus tự nhiên hay tái tổ hợp đều cần phải tiếp xúc với thụ thể CAR của tế bào niêm mạc, có sự trợ giúp của integrin, để xuyên màng vào endosome, giải phóng virion trần, chuyển DNA vào nhân, sao chép sang mRNA, ra nguyên sinh chất biểu hiện kháng nguyên bề mặt. Đối với adenovirus trong tự nhiên, quá trình nhân lên được thực hiện bình thường tạo nên thể hệ virion mới. Hệ gen chia làm hai nhóm gen: nhóm gen sớm (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, và E4), tổng hợp sản phẩm trong khi virus nhân lên; và nhóm gen muộn (L1 đến L5) mã hóa protein cấu trúc, thường được sản xuất sau khi kết thúc tổng hợp DNA của virus. Nguồn: Baron et al., Medical Microbiology (1996).

**CÁC HỆ THỐNG ADENOVIRUS THIẾT KẾ LÀM KHUNG VECTOR CHO VACCINE**

**Hệ thống vector adenovirus phân lập từ động vật và người**

Adenovirus được chia làm 4 nhóm chính nằm trong họ Adenoviridae đó là *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* và *Siadenovirus* (Bunchen-Osmond, 2003). Hệ gen adenovirus của động vật bậc cao có kích thước 35.800 - 36.200 nucleotide, hệ gen adenovirus của chim khoảng

42.000 - 43.000 nucleotide, cấu trúc bao gồm các gen sớm (E, early region) là E1A, E1B, E2A-B, E3, E4 và một gen chung gồm 5 đoạn gen hợp nhất (L1-5). Theo nguyên tắc thiết kế, nếu làm vector nên, vùng gen E1 hoặc E3 phải được cắt bỏ để đảm bảo an toàn sinh học, như vậy, độ dài hệ gen của adenovirus làm vector giảm 5.000 - 6.000 nucleotide, chỉ còn khoảng 30.000 (động vật), 35.000 - 36.000 nucleotide (chim). Đối với mục đích thiết kế vector, tùy đối tượng cần được sử dụng mà chọn loại adenovirus thích hợp đã cắt bỏ vùng gen thích hợp, để đưa gen kháng nguyên vào vị trí thích hợp (Impler, 1995; Curiel, Douglas, 2002) (Hình 3).



**Hình 3.** Cấu trúc hệ gen của adenovirus và các vùng cần xóa trong hệ gen để thiết kế vector đảm bảo an toàn sinh học và gắn gen kháng nguyên. Ghi chú: ITR: chuỗi lặp ở hai đầu hệ gen, có vai trò trong khép vòng DNA; Hệ thống adenovirus vector đại diện: BAd3: ở bò; CAd2: ở chó; SAd25: ở khỉ; OAd7: ở dê cừu; PAd3: ở lợn; FAd1: ở chim. Vùng gen E1A, E1B và E3, đều được xóa ở tất cả các hệ thống vector theo thiết kế (vòng elip có gạch chéo và mũi tên chỉ dẫn), đảm bảo mức độ nhược độc và an toàn của vector adenovirus.

Có thể kể đến một số adenovirus hiện tại đại diện cho các nhóm virus adenovirus ở người, động vật và chim, đang sử dụng làm vector dẫn truyền gen làm vaccine là:

Hệ thống vector adenovirus từ người (HAd5): Human adenovirus serotype 5.

Hệ thống vector adenovirus từ bò (BAd3): Bovine adenovirus serotype 3.

Hệ thống vector adenovirus từ lợn (PAd3, 5): Porcine adenovirus serotype 3 và 5.

Hệ thống vector adenovirus từ chó (CAd2): Canine adenovirus serotype 2.

Hệ thống vector adenovirus từ khỉ (SAd25): Chimpanzee adenovirus serotype 1.

Hệ thống vector adenovirus từ cừu (OAd7): Ovine adenovirus serotype 7.

Hệ thống vector adenovirus từ chim (FAd1, 8, 9, 10): Fowl adenovirus serotype 1, 8, 9, 10. Chúng tôi trích giới thiệu hệ thống adenovirus người (HAD5) và hệ thống adenovirus loài chim (FAd1, 8, 9, 10) là những hệ thống adenovirus vector đang được sử dụng cho nghiên cứu ứng dụng vaccine tái tổ hợp hiện nay.

Phần lớn những nghiên cứu về vaccine sử dụng adenovirus làm vector chủ yếu tập trung vào loại hình HAd serotype 5 (HAD5) như một hệ thống biểu hiện và dẫn truyền gen kháng nguyên hữu hiệu trong rất nhiều thực nghiệm về gây miễn dịch, về liệu pháp gen chống ung thư và nhiều ứng dụng khác (Danthinne, Imperiale, 2000; Hutchins, 2002). HAD5 vector là một loại vector làm vaccine thế hệ mới với khả năng ứng dụng của chúng rất rộng (Barouch, Nabel, 2005) và linh hoạt thiết kế trong công cuộc phòng chống khủng bố sinh học (Boyer *et al.*, 2005).

### Hệ thống vector adenovirus phân lập từ loài chim (FAd)

Adenovirus phân lập từ chim (FAd, Fowl adenovirus), bao gồm serotype 1, 2 và 3, nằm trong nhóm *Aviadenovirus* (Meulemans *et al.*, 2004). Một số adenovirus khác của gia cầm (ví dụ như virus EDS (egg drop syndrome) chủng 76 lại thuộc về một nhóm mới là *Atadenovirus* dựa trên cơ sở phân tích định tính về gen và cấu trúc hệ gen (Bunchen-Osmond, 2003).

Phân nhóm 1 của *Aviadenovirus* bao gồm các adenovirus gia cầm (FAd) từ serotype 1 đến serotype 12 (FAd1 - 12) và thông thường không gây bệnh hoặc gây nên những triệu chứng bệnh rất nhẹ, một số FAd hoàn toàn vô độc (Ferreira *et al.*, 2005). FAd1 (còn gọi là *virus mô côôi gây chết phôi gà*, CELO (chicken embryo lethal orphan)) được phân lập từ gia cầm nhưng lại không liên quan đến bất kỳ một loại bệnh cụ thể nào ở gà sau nở. FAd1, cũng như các adenovirus ở loài chim, có độ dài hệ gen lớn hơn adenovirus động vật (đến 43.804 bp) và virus có 2 protein fiber (pIV) trên bề mặt, hay nói cách khác có 2 protein angten trên một điểm so với 1 angten đơn độc ở các adenovirus khác (Le Goff *et al.*, 2005). Toàn bộ chuỗi gen của hệ gen FAd1 đã được giải mã và phân tích cho thấy không có những vùng gen có cấu trúc và thành phần tương ứng với những vùng

gen E1a, E1b, E3 hoặc E4 của HAD5 ở người. Như vậy, chức năng vùng E1 của FAd1 không được hoàn toàn trợ giúp bổ sung bằng sản phẩm E1 của HAD5 (Danthinne, Imperiale, 2000).

Vector FAd1 được thiết kế bằng cách sử dụng các phương pháp cổ truyền tái tổ hợp đồng chủng (*đồng nhiễm*) trong vi khuẩn để kiến tạo nên hệ gen adenovirus vector tái tổ hợp. Sau đó, gây nhiễm hệ thống tế bào *Hepatoma* (LMH) của gà trống Leghorn để giải phóng ra adenovirus có khả năng nhân lên toàn năng (Michou *et al.*, 1999). Chiến lược sử dụng cosmid cũng được ứng dụng để tạo nên virus FAd1 tái tổ hợp. Việc xóa bỏ đến 1,3 kb của hệ gen FAd1 ở vùng bản đồ số 91 đến 99 cho phép có thể cài vào đó gen ngoại lai có độ dài đến 4 kb (Hình 4). FAd1 có khả năng biến nạp hoàn toàn tế bào fibroblast biểu bì của người dòng tiên phát (dòng HepG2 và A549) với hiệu suất giống như HAD5 vector và FAd1 có thể gây nhiễm nhưng không có khả năng nhân lên ở nhiều dòng tế bào của người, lợn, ngựa và khỉ (Michou *et al.*, 1999). Do vậy, FAd1 vector có thể được sử dụng như một vector vaccine tiềm năng đối với miễn dịch của các loài gia cầm và không phải gia cầm (Francois *et al.*, 2004; Bangari, Mittal, 2006).

Cùng với vector FAd1, các loại vector FAd8, FAd9 và FAd10 cũng được khám phá và nghiên cứu phát triển để làm vaccine cho gà vài ngày tuổi bằng phương pháp cho uống hoặc nhỏ mắt. Đối với FAd9 vector, việc xóa đi cấu trúc lặp số 2 (TR2) không gây nên ảnh hưởng xấu đối với hệ gen của virus, và do vậy, khi đưa vào đó gen ngoại lai (ví dụ, gen chỉ thị, gen kháng nguyên) thì virus vẫn chấp nhận và nhân lên bình thường. FAd9 là loại adenovirus không độc lắm, hiện nay được nhóm nghiên cứu tại Trường Đại học Guelph (Ontario, Canada) thực hiện chiến lược thiết kế FAd9 tạo thành một loại vector tối ưu (Ojkcic, Nagy, 2001; 2003; Corredor *et al.*, 2006; 2008). FAd9 tái tổ hợp (FAd9vec) sau các thao tác biến đổi hệ gen như thế này, hệ gen đã không bị ảnh hưởng đối với virus về các phương diện phân bố trong tế bào, nhân lên trong tế bào và đáp ứng miễn dịch khi so sánh với virus bố mẹ (Ojkcic, Nagy, 2003; Corredor *et al.*, 2006; 2008).

### GIỚI THIỆU NGUYÊN TẮC THIẾT KẾ VECTOR ADENOVIRUS TÁI TỔ HỢP

#### Nguồn nguyên liệu gen và tế bào

Trong chiến lược tạo ra hệ thống adenovirus tái

tổ hợp nhân tạo mang các gen ngoại lai dị loài (gen kháng nguyên, gen cytokine, RNAi), cần có 3 nguồn nguyên vật liệu:

i) **DNA hệ gen của adenovirus tái thiết kế**, đó là DNA adenovirus chọn lọc đã được cắt bỏ vùng gen chủ định (ví dụ gen E1 hay E3) để tạo nên plasmid mang hệ gen adenovirus nhược độc làm khung (vectoral DNA). Hiện nay, có rất nhiều dòng DNA hệ gen của adenovirus phân lập từ các loài đã được thiết kế và có sẵn do các hãng sinh phẩm sản xuất, ví dụ HAd5 (người), SAd25 (khỉ gấm người) FAd1, 8, 9, 10 (chim), CAD2 (chó), BAD3 (bò), OAd7 (cừu), PAd3 và PAd5 (lợn) (Bangari, Mittal, 2006) (Hình 4).

ii) **Plasmid con thoi** (shuttle plasmid) đã được gài *hộp gen kháng nguyên* và loại plasmid này phải có khả năng đồng nhiễm trong tế bào thích ứng (cell co-transfection) hay còn gọi là tái tổ hợp đồng nhiễm (homologous recombination) với DNA adenovirus chủ, để tạo ra plasmid chứa hệ gen adenovirus vector tái tổ hợp nhược độc mới.

iii) **Hệ thống tế bào trợ giúp thích hợp** là loại tế bào bảo đảm tạo nên adenovirus mới tái tổ hợp từ hệ gen vector mang gen ngoại lai lấy từ plasmid con thoi. Dòng tế bào bao gói được dùng thông dụng nhất là dòng tế bào thận bào thai người **HEK293** (human embryonic kidney cell) (Xu *et al.*, 2006) và dòng tế bào giác mạc trẻ sơ sinh **PER.C6** (Lewis *et al.*, 2006; Nichols *et al.*, 2002). Ngoài ra còn rất nhiều dòng tế bào khác, ví dụ dòng **Hepatoma**, dòng **Caco-2**, tùy thuộc đặc tính của virus vector và gen kháng nguyên tái tổ hợp. Các dòng tế bào này đều có ở Tổ chức tế bào quốc tế ATCC (American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org/>) và dễ dàng đặt mua được để sử dụng (Hutchins, 2002).

### DNA hệ gen của adenovirus vector

Trong chiến lược chọn lọc vùng gen của vector để thiết kế gài gen kháng nguyên có các vùng sau đây (Hình 4):

i) **Vùng gen E1** là vị trí tiếp nhận gen ngoại lai thông dụng nhất ở hệ thống adenovirus vector, do các sản phẩm từ vùng gen E1 là hết sức quan trọng để đảm bảo sự khởi phát nhân lên của virus, đảm bảo cường độ nhân lên của virus. Do vậy, việc xóa bỏ chủ định vùng gen E1 này sẽ dẫn đến tạo ra các hạt virion *nhân lên thiếu năng* tạo lợi thế an toàn khi dùng trên động vật và người (*in vivo*) (Zhang *et al.*, 1995).

ii) **Vùng gen E3** là vùng gen thứ hai trong hệ

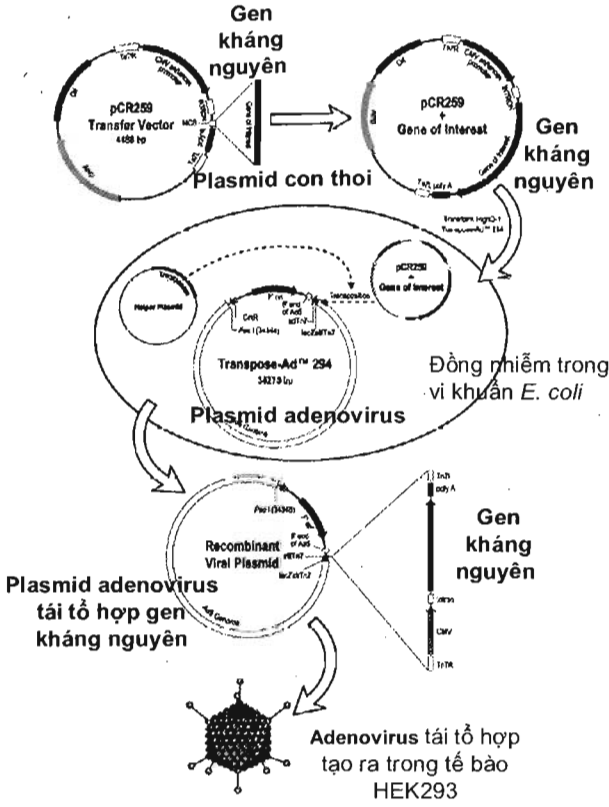
gen của adenovirus thích hợp để chuyển giao gen ngoại lai. E3 thông thường không cho sản phẩm cần thiết cho sự nhân lên của virus, do vậy, khi thay thế vùng gen này, virus vector được tạo ra vẫn là virus *nhân lên toàn năng*.

iii) **Vùng gen E4** là một vùng gen khác cũng thích hợp cho gài lắp các gen ngoại lai, nằm ở vị trí phía phải của hệ gen virus. Khi xóa hết tất cả các vùng gen E1, E2, E3 và E4, chúng ta có thể có 3 vị trí tiếp nhận gen ngoại lai và có thể một lúc cài vào đó *nhiều gen kháng nguyên* khác nhau hoặc nhiều gen cytokine, hoặc hỗn hợp gen kháng nguyên và cytokine. Tuy nhiên, ở hệ thống adenovirus vector, tác động của đa gen gài vào cần phải xem xét cẩn thận, bởi vì, việc kết hợp các gen khác nhau này dễ dẫn đến việc biến đổi đáp ứng miễn dịch và cơ chế miễn dịch. Các phương pháp kiến tạo hệ thống adenovirus vector tái tổ hợp được giới thiệu nhiều và hiện nay các hãng sinh phẩm đã tạo ra các nguồn nguyên liệu kiến tạo vector tái tổ hợp, nên chúng ta có thể dễ dàng thao tác thiết kế các vector mong muốn (Danthinne, Imperiale, 2000).

iv) **Các vùng đặc biệt khác** cũng được khai thác, bao gồm các vùng gen ký hiệu *Vị trí I*, *Vị trí II* và *Vị trí III* trong hệ gen của adenovirus serotype 7 của cừu (OAd7) hoặc các vùng gen tại vị trí ở vùng bản đồ gen số 91 đến 99 có độ dài 1,3 kb của hệ gen adenovirus serotype 1 của chim (FAd1) (Francois *et al.*, 2004) hay vùng cấu trúc lặp số 2 (TR2) của FAd9 (Ojkic, Nagy, 2001; Corredor *et al.*, 2006; 2008).

### Thiết kế hộp gen và plasmid con thoi

Trong chiến lược thiết kế hệ thống adenovirus vector tái tổ hợp, vấn đề tạo nên *hộp gen kháng nguyên* (antigenic cassette) và lắp vào hệ thống *plasmid con thoi* (shuttle plasmid) là những bước quan trọng đầu tiên. *Hộp gen kháng nguyên* là khung DNA thiết kế đặc biệt, được chèn gen kháng nguyên vào, rồi hộp gen này phải được đưa vào trong plasmid con thoi thích hợp với adenovirus. Tiếp theo, *plasmid con thoi tái tổ hợp chứa hộp gen kháng nguyên* này phải được *gây đồng nhiễm* trong tế bào vi khuẩn *E. coli* thuần (dòng BJ5183) với *DNA của hệ thống vector adenovirus* (đã xóa vùng E1, E3 hoặc vùng khác) để chúng tái tổ hợp tạo nên plasmid mang hệ gen adenovirus vector nhược độc. Hộp gen kháng nguyên được *gài vào vị trí vùng gen E1* trong hệ thống tái tổ hợp đồng nhất là được sử dụng nhiều nhất (Anderson *et al.*, 2000; Danthinne, Imperiale, 2000) (Hình 3).



**Hình 4.** Nguyên liệu và nguyên lý các bước kiến tạo vector adenovirus tái tổ hợp làm vaccine (mang gen kháng nguyên), chế phẩm kích ứng miễn dịch (mang gen interleukin/cytokine), hoại tử khối u (mang gen TNF, tumor necrosis factor), sinh trưởng (mang gen sinh trưởng), kháng thể (mang gen đơn chuỗi), hoặc phá bỏ gen đối ứng (mang đoạn oligo RNAi).

**Hệ thống tế bào trợ giúp thích hợp**

Dòng tế bào có vai trò tạo điều kiện bao gói sản phẩm virus tái tổ hợp từ plasmid DNA adenovirus vector, được dùng thông dụng nhất là *dòng tế bào thận bào thai người HEK293* và *dòng tế bào giác mạc trẻ sơ sinh PER.C6* (Lewis *et al.*, 2006).

**HEK293** là loại tế bào xơ thận bào thai người được phát triển thành dòng tế bào thuần cách đây vài chục năm và chính thức được dùng sản xuất vector tái tổ hợp trong 20 năm gần đây, hiện nay được thương mại hóa thông qua Tổ chức tế bào quốc tế (ATCC với mã số thương mại [Cat. No. CRC-1573]) (Xu *et al.*, 2006). Dòng tế bào này có thể tiếp truyền đến 20 đời trong môi trường thích ứng để thực hiện nghiên cứu và sản xuất vaccine (Shaw, 2002, tại <http://www.mbi.ufl.edu/~shaw/293.html>).

**PER.C6** là dòng tế bào giác mạc trẻ sơ sinh

người đã được tạo ra trong những năm gần đây nhằm giải quyết nguồn tế bào dòng thuần an toàn để sản xuất các chế phẩm tái tổ hợp dùng cho người, trong đó có vaccine vector adenovirus. Đây là tế bào dòng thuần đáp ứng sản xuất vaccine, kháng thể đơn dòng, cytokine, protein tái tổ hợp và protein hoạt chất sử dụng trong điều trị liệu pháp gen (gene therapy) (Nichols *et al.*, 2002). Đối với vector adenovirus, do dòng tế bào này thiếu nguồn bổ sung gen và sản phẩm gen E1, nên vector nhân lên trong dòng tế bào này thuộc loại *thiếu năng*, hay nói cách khác rất an toàn cho người và động vật khi sử dụng làm vaccine (Lewis *et al.*, 2006).

**911** hay còn gọi là HER ký hiệu 911, đó là dòng tế bào có nguồn gốc từ nguyên bào giác mạc bào thai người (HER, Human Embryonic Retinoblast) và là dòng tế bào có nhiều đặc tính tương đồng với HEK293, dễ gây nhiễm, tiếp nhận nhanh chóng plasmid adenovirus tái tổ hợp để hình thành virus

(Fallaux *et al.*, 1996). Tuy nhiên, HER (911) có đặc điểm nổi trội hơn HEK293 đó là sự hình thành plaque nhanh (sau 3 - 4 ngày) và rõ để phát hiện, do đó, tiết kiệm thời gian định lượng virus sau khi tạo ra. Sử dụng dòng 911, số lượng adenovirus thiếu năng (nhược độc) được tạo ra gấp 3 lần so với dòng HEK293 (Fallaux *et al.*, 1996).

**GH329** là dòng tế bào người xuất phát từ dòng thuần HeLa (Gao *et al.*, 2000), biểu hiện sản phẩm protein E1 trên cơ sở hoạt động của promoter lấy từ promoter của gen phosphoglycerate kinase (PGK-1). Khả năng tiếp nhận và xúc tiến việc tạo nên adenovirus tái tổ hợp của dòng GH329 tương đương với HEK293 (Gao *et al.*, 2000).

Việc nuôi cấy virus adenovirus vector *thiếu năng* cũng có thể được tiến hành trên tế bào *HEK293* hoặc tương tự. Tuy nhiên, do virus vector và những sản phẩm gen của tế bào có khả năng bổ sung để tạo nên adenovirus *toàn năng* nên *HEK293* có hạn chế sử dụng khi kiến tạo có chủ định virus adenovirus vector làm vaccine sống nhược độc. Để giải quyết vấn đề này, người ta sử dụng dòng tế bào giác mạc người đã được biến nạp gen E1 (dòng *PER.C6*) (Lewis *et al.*, 2006; Nichols *et al.*, 2002). Dòng tế bào này không có các chuỗi gen cấu trúc lặp ngược tương ứng nên không có khả năng tái tạo lại adenovirus hoang dã ban đầu (Fallaux *et al.*, 1998; 2001).

## MÔ TẢ CÔNG NGHỆ VECTOR ADENOVIRUS TÁI TỔ HỢP

Công nghệ vector adenovirus tái tổ hợp được hiểu là lĩnh vực ứng dụng một loạt các kỹ thuật sinh học phân tử và phương pháp tế bào học, để tạo nên một loại adenovirus nhược độc có hệ gen làm nền đã được tái tổ hợp mang gen kháng nguyên có chủ định làm vaccine. Adenovirus tái tổ hợp là loại virus sống nhược độc, có khả năng nhân lên nhưng chỉ ở trong tế bào đặc thù thích ứng, nơi có đầy đủ điều kiện để chúng thực hiện các quá trình nhân lên. Khi nuôi cấy tế bào cung cấp điều kiện thuận lợi cho virus nhân lên, adenovirus nhược độc vaccine có khả năng cho thu hoạch  $10^9-10^{10}$  virus/ml nuôi cấy và mỗi liều vaccine chỉ cần  $10^6$  virus, như vậy, 1 ml có thể cung cấp khoảng 1.000 - 10.000 liều vaccine, rất có ý nghĩa kinh tế (Danthinne, Imperiale, 2000; Amberg, 2009).

Hệ gen adenovirus đã được cắt bỏ các vùng gen không phù hợp (gen E1 và E3) để làm nhược độc

hóa, sử dụng làm vector chuyển giao gen, sau đây gọi là *hệ gen adenovirus nhược độc*, các vị trí cắt bỏ này chính là nơi *nhường chỗ cho vị trí lắp gen kháng nguyên* ngoại lai vào. Đối với HAd5, là hệ thống adenovirus có nguồn gốc từ người, vùng tiếp nhận gen kháng nguyên này có thể gài vào đó đoạn DNA ngoại lai dài đến 7,5 kb. Bằng cách sử dụng PCR nhân gen E1A để kiểm tra an toàn đối với vector tái tổ hợp, nếu không có sản phẩm (âm tính) chứng tỏ không có sự trao đổi chéo hoàn nguyên E1A với adenovirus tạp nhiễm từ môi trường tự nhiên (Zhang *et al.*, 1995).

Để hoàn thiện công nghệ vector HAd5 adenovirus tái tổ hợp, cần có các nguồn nguyên liệu sau: i) DNA plasmid chứa hệ gen adenovirus nhược độ HAd5 (*plasmid*); ii) DNA plasmid chứa hộp gen kháng nguyên (*plasmid*); iii) Các dòng tế bào *E. coli* đơn thuần để chuyển nạp lưu giữ các plasmid này (*dòng tế bào E. coli*); iv) Dòng tế bào *E. coli* đặc thù chủng BJ5183 để gây đồng nhiễm tạo plasmid adenovirus tái tổ hợp (*dòng tế bào E. coli*); v) Các enzyme giới hạn đặc chủng *PmeI* và *PacI* để thao tác (*enzyme giới hạn*); vi) Dòng tế bào động vật chủng *HEK293* hoặc *PER.C6* (cho adenovirus động vật) hay *Hepatoma* (cho adenovirus chim) để tiếp nhận DNA tái tổ hợp adenovirus và kháng nguyên, tạo hạt virus đầy đủ (*dòng tế bào động vật*); vii) Các nguyên vật liệu dung môi phụ trợ khác (*vật liệu môi trường*) (Danthinne, Imperiale, 2000).

*Có thể mô tả vắn tắt như sau (đối với gen VP2 của virus Gumboro):*

**Bước 1.** Gen kháng nguyên VP2 (1356 bp) của virus Gumboro thu nhận bằng cặp môi đặc hiệu (Lê Thanh Hòa, 2003), sau khi cắt bằng enzyme giới hạn được gài vào "*hộp gen mở*" ngay sau chuỗi promoter của CMV; rồi toàn bộ "*hộp gen mở*" được gắn vào DNA của plasmid pShuttle tại vị trí các điểm cắt tương ứng để tạo nên *pShuttle-VP2*. Gen VP2 được định vị tại vùng DNA thuộc "*tay trái*" (left arm) của hệ gen adenovirus. Plasmid pShuttle-VP2 được chuyển nạp vào dòng *E. coli* đơn thuần (DH5 $\alpha$ ) và tách chiết DNA pShuttle-VP2, chuẩn bị cho thao tác tiếp theo.

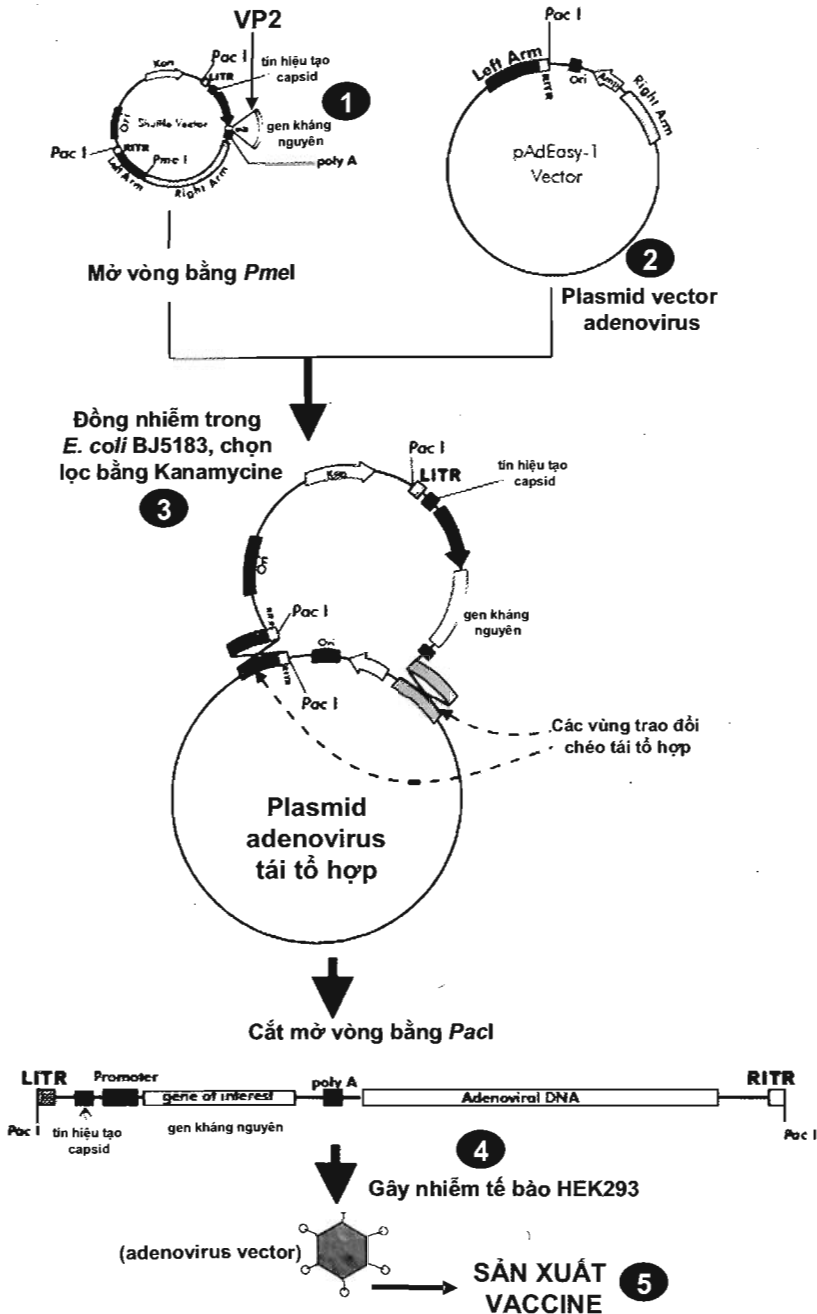
**Bước 2.** Plasmid vector adenovirus (HAd5) gồm 33,5 kb gọi là *pAdEasy-1 vector*, do hãng Stratagene thiết kế và cung cấp. Sau khi mua về, DNA của pAdEasy-1 vector được chuyển nạp vào dòng *E. coli* đơn thuần (DH5 $\alpha$ ) và tách chiết DNA pAdEasy-1 vector, chuẩn bị cho các thao tác tiếp theo.

**Bước 3.** DNA plasmid pShuttle-VP2 được *cắt*



bằng enzyme *PmeI*, loại bỏ phần vector, chỉ lấy đoạn DNA giới hạn trong điểm cắt của *PmeI* có chứa gen VP2 (gọi là *DNA-VP2(PmeI)*). Chuẩn bị tế bào *E. coli* dòng BJ5183. Lấy DNA plasmid pAdEasy-1 và đoạn DNA-VP2 (*PmeI*) cho vào ống tế bào *E. coli*

dòng BJ5183 rồi thực hiện chuyển nạp gây đồng nhiễm (homologous recombination) bằng phương pháp xung điện (electroporation) để tạo ra plasmid adenovirus tái tổ hợp *pAdEasy-VP2*. Tách chiết DNA pAdEasy-VP2 chuẩn bị cho thao tác tiếp theo.



**Hình 5.** Công nghệ tạo vector adenovirus tái tổ hợp chứa gen kháng nguyên VP2 (từ virus Gumboro gây suy giảm miễn dịch gia cầm), sử dụng hệ thống AdEasy™ Adenoviral Vector System (Stratagene).

**Bước 4.** DNA plasmid pAdEasy-VP2 được cắt bằng enzyme *PacI*, loại bỏ phần vector, chỉ lấy đoạn DNA giới hạn trong điểm cắt của *PacI* có chứa gen VP2 và DNA của adenovirus, gọi là DNA-VP2-LITR/RITR(*PacI*) mạch thẳng. Chuẩn bị tế bào động vật dòng HEK293. Lấy DNA-VP2-LITR/RITR(*PacI*) hỗn hợp với tế bào HEK293 trong dung môi thích hợp, sau đó cho môi trường nuôi cấy tế bào và nuôi dưỡng. Cuối cùng nuôi cấy trong 7 - 10 ngày và chọn lọc adenovirus tái tổ hợp bằng phương pháp úp mặt thạch (plaque forming method). Sau khi chuẩn độ, adenovirus nhược độc tái tổ hợp chứa gen VP2, gọi là vector adenovirus-VP2, hoàn toàn là một loại virus sống nhân lên tốt trên môi trường tế bào HEK293 hoặc tương đương.

**Bước 5.** Giống vector adenovirus-VP2 được bảo quản, nuôi cấy để sản xuất virus làm vaccine theo quy trình công nghệ tế bào thường quy (Hình 5).

## MỘT SỐ ỨNG DỤNG ADENOVIRUS TÁI TỔ HỢP LÀM VACCINE

Adenovirus tái tổ hợp làm vaccine có khả năng sản sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể, miễn dịch trung gian tế bào và thích ứng hấp phụ lên tế bào niêm mạc hệ hô hấp và hệ tiêu hóa sản sinh miễn dịch niêm mạc (Arnberg, 2009). Hệ thống dẫn truyền adenovirus đã được làm vector vaccine đối với nhiều bệnh người và gia súc, gia cầm, trước hết phải kể đến dịch hạch *Yersinia pestis*, nhiệt thán *Bacillus anthracis*, vi khuẩn lao, sốt xuất huyết Dengue, sốt xuất huyết Ebola, sốt xuất huyết Dengue đa type, hội chứng suy giảm miễn dịch HIV/AIDS ở người và khi, hội chứng hô hấp virus cấp ở người SARS cũng như nhiều tác nhân gây bệnh khác ở người. Đối với động vật, nhiều loại vaccine trên nền adenovirus đã được nghiên cứu và đưa vào sử dụng như viêm não tủy truyền nhiễm ngựa, cúm A/H5N1 (Gao *et al.*, 2006), viêm phế quản truyền nhiễm IBV, Gumboro virus (Sheppard *et al.*, 1998; Francois *et al.*, 2004), hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (tai xanh) ở lợn và nhiều ứng dụng vaccine khác cho gia súc, gia cầm (Ferreira *et al.*, 2005). Hệ thống dẫn truyền adenovirus cũng được định hướng sử dụng liệu pháp gen phòng chống ung thư (Hartman *et al.*, 2008), điều trị ung thư từ tế bào gốc, điều trị bệnh ty thể, định hướng kích ứng miễn dịch (Rittner *et al.*, 2007), sản xuất kháng thể đơn chuỗi scFv (single chain fragment variable) và biểu hiện kháng thể đơn chuỗi trong tế bào cơ thể (Vellinga *et al.*, 2007) cũng như định hướng phá bỏ gen thông qua cơ chế can thiệp

của RNAi (Grimm, Kay, 2006).

Có thể kể đến một số ứng dụng HAd5 làm vector cho vaccine như sau:

- Vaccine HAd5 vector đối với virus Ebola kích thích sinh miễn dịch bảo hộ tốt khi công cường độc bằng virus Ebola và loài động vật thí nghiệm gần người (primates) (Patel *et al.*, 2007).

- Vaccine HAd5 vector đối với virus HIV-1 chứa gen kháng nguyên *env* có khả năng kích thích miễn dịch bảo hộ chống lại virus HIV khi thử nghiệm trên khỉ *rhesus* và khỉ *baboon* (Gomez-Roman *et al.*, 2006).

- Vaccine HAd5 vector mang gen kháng nguyên của vi khuẩn nhiệt thán (*Bacillus anthracis*) cho khả năng bảo hộ hiệu quả đối với vi khuẩn nhiệt thán cường độc (Kasuya *et al.*, 2005).

- Vaccine HAd5 vector mang gen virus hội chứng hô hấp cấp tính (SARS) thuộc loại Coronavirus cho đáp ứng miễn dịch đặc hiệu tốt khi thử nghiệm trên chuột BALB/c và khỉ *Rhesus macaque* (Ma *et al.*, 2006).

- Vaccine HAd5 vector đối với virus H5N1 mang gen H5 đã cho miễn dịch và bảo hộ tốt trên gà và chuột/chồn ferret khi công cường độc bằng chủng A-VN-1203(04)(H5N1) (Gao *et al.*, 2006).

- Hệ thống HAd5 vector cũng có thể còn được sử dụng như là một công cụ liệu pháp miễn dịch (Rittner *et al.*, 2007), chống ung thư (Hartman *et al.*, 2008; Ribacka, Hemminki, 2008), điều trị bệnh ty thể (Alesci *et al.*, 2007), sản xuất kháng thể đơn chuỗi scFv (single chain fragment variable) và biểu hiện kháng thể đơn chuỗi trong tế bào cơ thể (Vellinga *et al.*, 2007), định hướng phá bỏ gen thông qua cơ chế can thiệp của RNAi (Grimm, Kay, 2006).

Đối với adenovirus loài chim, do có những đặc tính vector thuận lợi, FAd1, FAd8, FAd9 và FAd10 là các hệ thống được sử dụng nhiều nhất làm vaccine ở gia cầm. Cụ thể:

- Vector tái tổ hợp FAd1 mang gen VP2 của virus Gumboro cung cấp được miễn dịch bảo hộ hoàn toàn khi công cường độc với chủng Gumboro cường độc (Francois *et al.*, 2004).

- Vector FAd1 cũng được kiểm nghiệm đối với liệu pháp gen chống ung thư trên mô hình chuột chống lại khối u melanoma dưới da chuột (Shashkova *et al.*, 2005).

- FAd8 tái tổ hợp có hiệu quả nhất hiện nay là vaccine vector chứa gen *S1* của virus viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) (Johnson *et al.*, 2003).

- FAd8 vector chứa gen kích ứng miễn dịch (cytokine), mang gen interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) của gà đã được sử dụng để dẫn truyền cytokine có khả năng tăng cường miễn dịch rất cao chống lại cầu trùng (Johnson *et al.*, 2000).

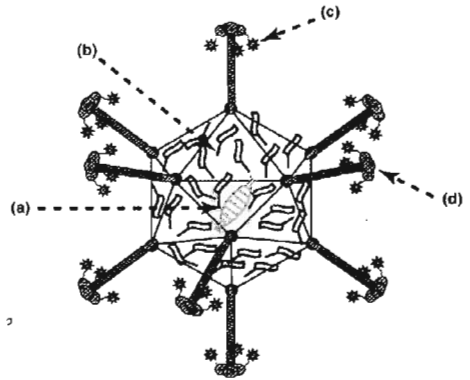
- FAd9 đã được nghiên cứu thiết kế thành công khung vector và đang tiến hành lắp ráp các gen kháng nguyên chủ định (Ojkic, Nagy, 2003; Corredor *et al.*, 2006; 2008). Nhóm nghiên cứu tại Đại học Guelph (Ontario, Canada) đã hoàn thiện hệ thống vector và plasmid con thoi trong nghiên cứu phát triển hệ thống vector adenovirus cho gia cầm. Chúng tôi (Viện Công nghệ sinh học) đã thiết lập mối quan hệ hợp tác với Đại học Guelph (Ontario, Canada) trong định hướng sử dụng FAd9 làm khung cho tái tổ hợp vector làm vaccine với gen kháng nguyên VP2 của virus Gumboro gây suy giảm miễn dịch ở gia cầm và kích ứng miễn dịch với các gen cytokine.

- FAd10 vector tái tổ hợp cũng đã được thiết kế mang gen VP2 của virus Gumboro, bằng cách gài vào hệ gen ở vị trí số 90,8 đến 100 một bộ phận gen biểu hiện VP2 ngay phía trước của cấu trúc lặp, có hiệu lực tốt khi dùng qua đường niêm mạc (Sheppard *et al.*, 1998).

## VÀI NÉT KẾT LUẬN VÀ ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG ADENOVIRUS VECTOR

Cùng với một số hệ thống vector virus khác, vector dựa trên adenovirus đang phát huy những thế mạnh của một loại hình vector linh hoạt trong nhiều lĩnh vực ứng dụng khác nhau (Lê Thanh Hòa, 2006; Arnberg, 2009; Singh, Kostarelos, 2009). Một trong những lợi thế lớn nhất của adenovirus vector là chúng có khả năng xâm nhập và nhân lên (nếu có) trong các loại tế bào niêm mạc đường ruột và hô hấp, không gây nguy hiểm vật chủ và lại có ưu điểm kích thích miễn dịch niêm mạc (Santosuosso *et al.*, 2005; Arnberg, 2009). Cũng do tính đặc thù sử dụng thụ thể *CAR* với sự trợ giúp tín hiệu *integrin*, vaccine có adenovirus làm khung được sử dụng với lợi thế rất lớn qua đường niêm mạc (mắt, mũi, miệng), không cần kim tiêm. Về nguyên tắc, adenovirus tái tổ hợp làm vaccine phải nhân lên tốt để cung cấp nguyên liệu sản xuất vaccine và có khả năng gây miễn dịch tốt cho đối tượng. Một lợi thế khác trong ứng dụng

liệu pháp gen là adenovirus có kích thước bé, hạt virus hoàn chỉnh, nên chúng dễ dàng tiếp cận tế bào ung thư hay tế bào đích khác với nhiệm vụ dẫn dụ kháng thể hay chất độc liệu pháp, hoặc thuốc điều trị để thực hiện kim hãm hoặc tiêu diệt, ngoài ra, adenovirus được ứng dụng như là một loại vector nano sinh học trong y học và chẩn đoán (Evans, Hearing, 2002; Thompson, 2008; Singh, Kostarelos, 2009) (Hình 6).



**Hình 6.** Mô hình adenovirus vector đa dụng trong y - sinh học. Ghi chú: (a) Tái tạo hệ gen bằng cách cài vào gen ngoại lai trình diện sản phẩm là kháng nguyên (antigen) thành phần capsid bề mặt hay cytokine hòa tan; (b) Gắn carbohydrate thành phần nguồn gốc tế bào vi khuẩn sử dụng làm bổ trợ (adjuvant); (c) Cộng hợp peptide kháng nguyên vào đầu mút anghen kích thích miễn dịch; (d) Biến đổi bản chất đầu mút anghen (fiber knob) bằng công nghệ gen, nhằm tăng cường hấp phụ adenovirus và hoạt hóa APC kích thích miễn dịch của vaccine. (Nguồn: Singh, Kostarelos, 2009).

Adenovirus vector là nhân tố tích cực tham gia trong ba lĩnh vực ứng dụng, hơn hẳn nhiều loại vector khác đó là tạo vaccine thể hệ mới, biểu hiện cytokine kích ứng miễn dịch và liệu pháp gen điều trị bệnh hiểm nghèo (Johnson *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2005; Hartman *et al.*, 2008). Ý tưởng biến đổi hạt adenovirus trở thành công cụ như là một phần tử nano sinh học đa dụng (nanoparticle) ngày nay đã trở thành hiện thực (Singh, Kostarelos, 2009). Chiến lược tận dụng adenovirus được thực hiện tạo nên hạt nano sinh học ứng dụng, cả về biến đổi bên trong hệ gen (tái tạo) thông qua công nghệ gen tái tổ hợp và gắn kết protein bề mặt thông qua công nghệ hóa sinh miễn dịch.

Có thể tóm tắt kể đến một số hướng như sau:

i) *Thiết kế hệ gen thiếu năng* trong đó gen kháng

nguyên hoặc cytokine được cài vào vị trí thích hợp để biểu hiện protein kháng nguyên là thành phần capsid bề mặt có tác dụng làm vaccine gây miễn dịch (Hình 6-a) (Singh, Kostarelos, 2009);

ii) *Gắn carbohydrate* có thành phần lysine đính kết lên capsid, đó là các phức hợp đường hoặc polysaccharide dẫn xuất từ thành tế bào vi khuẩn có tác dụng như là chất bổ trợ (adjuvant) để tăng cường trình diện kháng nguyên cho tế bào APC (antigen-presenting cells), mặt khác ngăn cản tương tác bề mặt virus với protein huyết thanh (Hình 6-b) (Singh, Kostarelos, 2009);

iii) *Trình diện peptide kháng nguyên* bằng cách gắn cộng hợp (conjugate) vào đầu mút của protein angten (fiber knob), vị trí quyết định tính kích thích miễn dịch tối đa của virus (Hình 6-c) (Singh, Kostarelos, 2009);

iv) *Biến đổi tái tổ hợp gen đầu mút* angten thay đổi thành phân tạo điều kiện hấp phụ hướng đích tốt đối với APC kích thích miễn dịch hoặc tế bào đích (ung thư) trong liệu pháp gen, mặt khác có tác dụng tăng cường miễn dịch ((Hình 6-d) (Singh, Kostarelos, 2009);

v) *Thiết kế dẫn truyền RNAi* phá bỏ gen đối ứng làm câm lặng hoặc vô hiệu gen gây bệnh hoặc gen “độc” của tác nhân độc hại (Grimm, Kay, 2006)

Cùng với khai thác nhiều mặt của adenovirus trên thế giới, tại Việt Nam, những nghiên cứu ứng dụng adenovirus vector đầu tiên cũng đang được tiếp cận một cách có chọn lọc, nhằm phát huy lợi thế tạo vaccine và kích thích miễn dịch, đặc biệt đối với gia súc gia cầm.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ hỗ trợ kinh phí cho đề tài cấp nhà nước KC04.24/06-10 (2009 - 2010) do PGS. TS. Lê Thanh Hòa chủ nhiệm để hoàn thành công trình này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alesci S, Abu-Asab M, Perera SM, Tsokos M, Morris JC, Pacak K (2007) Mitochondrial localization of human recombinant adenovirus: from evolution to gene therapy. *Neuroimmunomodulat* 14(5): 221-223.

Anderson RD, Haskell RE, Xia H, Roessler BJ, Davidson BL (2000) A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 7(12): 1034-1038.

Arnberg N (2009) Adenovirus receptors: implications for

tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 19(3): 165-178. Review.

Bangari DS, Mittal SK (2006) Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* 24(7): 849-882. Review.

Barouch DH, Nabel GJ (2005) Adenovirus vector-based vaccines for human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther* 16(2): 149-156.

Benko M, Harrach B, Both GW, Russell WC, Adair BM, Adam E, de Jong JC, Hess M, Johnson M, Kajon A, Kidd AH, Lehmkuhl HD, Li QG, Mautner V, Pring-Akerblom P, Wadell G (2005) Family *Adenoviridae*. In: *Virus Taxonomy*. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds). VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, New York: 213-228.

Boyer JL, Kobinger G, Wilson JM, Crystal RG (2005) Adenovirus-based genetic vaccines for biodefense. *Hum Gene Ther* 16(2): 157-168. Review.

Brave A, Ljungberg K, Wahren B, Liu MA (2007) Vaccine delivery methods using viral vectors. *Mol Pharmacol* 4(1): 18-32. Review.

Brun A, Albina E, Barret T, Chapman DA, Czub M, Dixon LK, Keil GM, Klonjowski B, Lepotier MF, Ortego J, Richardson J, Takamatsu HH (2008) Antigen delivery systems for veterinary vaccine development: Viral-vector based delivery systems. *Vaccine* 26: 6508-6528.

Bunchen-Osmond C (Ed.) (2003) 00.001. *Adenoviridae*. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. ICTVdB Management, The Earth Institute and Department of Epidemiology, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, USA.

Corredor JC, Garceac A, Krell PJ, Nagy E (2008) Sequence comparison of the right end of fowl adenovirus genomes. *Virus Genes* 36(2): 331-344.

Corredor JC, Krell PJ, Nagy E (2006) Sequence analysis of the left end of fowl adenovirus genomes. *Virus Genes* 33: 3095-3106.

Curiel DT, Douglas JT (Ed.) (2002) *Adenoviral vectors for gene therapy*. Academic Press.

Danthinne X, Imperiale MJ (2000) Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7: 1707-1714.

Evans JD, Hearing P (2002) Adenovirus replication. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. Eds Curiel DT, Douglas JT. Academic Press: 39-70.

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted

adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9: 1909-1917.

Fallaux FJ, Hoeben RC (2001) Safety of recombinant adenoviruses produced on adenovirus-transformed human cells. *Dev Biol (Basel)* 106: 489-496; discussion 497: 501-511.

Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, van Ormondt H, Hoeben RC, van der Eb AJ (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7(2): 215-222.

Ferreira TB, Alves PM, Aunins JG, Carrondo MJ (2005) Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther* 12 Suppl 1: 73-83. Review.

Francois A, Chevalier C, Delmas B, Etteradossi N, Toquin D, Rivallan G, Langlois P (2004) Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* 22(17-18): 2351-2360.

Gao GP, Engdahl RK, Wilson JM (2000) A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther* 11: 213-219.

Gao W, Soloff AC, Lu X, Montecalvo A, Nguyen DC, Matsuoka Y, Robbins PD, Swayne DE, Donis RO, Katz JM, Barratt-Boyes SM, Gambotto A (2006) Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol* 80(4): 1959-64.

Gomez-Roman VR, Grimes GJ Jr, Potti GK, Peng B, Demberg T, Gravlin L, Treece J, Pal R, Lee EM, Alvord WG, Markham PD, Robert-Guroff M (2006) Oral delivery of replication-competent adenovirus vectors is well tolerated by SIV- and SHIV-infected rhesus macaques. *Vaccine* 24(23): 5064-5072.

Grimm D, Kay MA (2006) Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. *Gene Ther* 13(6): 563-575. Review.

Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A (2008) Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res* 132(1-2): 1-14.

Hutchins B (2002) Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. *Bioprocess J* 1: 25-28.

Impler JL (1995) Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* 13(13): 1143-1151.

Johnson MA, Pooley C, Ignjatovic J, Tyack SG (2003) A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21(21-22): 2730-2736.

Johnson MA, Pooley C, Lowenthal JW (2000) Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors. *Dev Comp*

*Immunol* 24(2-3): 343-354.

Kasuya K, Boyer JL, Tan Y, Alipui DO, Hackett NR, Crystal RG (2005) Passive immunotherapy for anthrax toxin mediated by an adenovirus expressing an anti-protective antigen single-chain antibody. *Mol Ther* 11(2): 237-244.

Le Goff F, Méderlé-Mangeot I, Jestin A, Langlois P (2005) Deletion of open reading frames 9, 10 and 11 from the avian adenovirus CELO genome: effect on biodistribution and humoral responses. *J Gen Virol* 86(7): 2019-2027.

Lê Thanh Hòa (2003) *Sinh học phân tử Gumboro, nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, Việt Nam.

Lê Thanh Hòa (2006) Chiến lược nghiên cứu ứng dụng virus vector tái tổ hợp trong sản xuất vaccine thể mới. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(4): 397-416. Tổng quan.

Lewis JA, Brown EL, Duncan PA (2006) Approaches to the release of a master cell bank of PER.C6 cells; a novel cell substrate for the manufacture of human vaccines. *Dev Biol (Basel)*, 123: 165-176; discussion 183-197.

Liniger M, Zuniga A, Naim HY (2007) Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines* 6(2): 255-266. Review.

Ma C, Yao K, Zhou F, Zhu M (2006) Comparative immunization in BALB/c mice with recombinant replication-defective adenovirus vector and DNA plasmid expressing a SARS-CoV nucleocapsid protein gene. *Cell Mol Immunol* 3(6): 459-465.

Manrubia SC, Lazaro E (2006) Viral evolution. *Phys Life Rev* 3(2): 65-132.

Marques JT, Carthew RW (2007) A call to arms: coevolution of animal viruses and host innate immune responses. *Trends Genet* 23(7): 359-364.

Meulemans G, Couvreur B, Decaesstecker M, Boschmans M, Van Den Berg TP (2004) Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol* 33(2): 164-170.

Michou AI, Lehrmann H, Saltik M, Cotten M (1999) Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for gene delivery vectors. *J Virol* 73(2): 1399-1410.

Nemerow GR (2002) Biology of adenovirus cell entry. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. (Eds) Curiel DT, Douglas JT. Academic Press: 19-38.

Nemerow GR, Stewart PL (1999) Role of alpha-v-integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3): 725-734.

Nichols WW, Lardenoije R, Ledwith BJ, Brouwer K, Manam S, Vogels R, Kaslow D, Zuidgeest D, Bett AJ, Chen L, van der Kaaden M, Galloway SM, Hill RB,

Machotka SV, Anderson CA, Lewis JA, Martinez D, Lebron J, Russo C, Valerio D, Bout A (2002) Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells. In: *Adenoviral vectors for gene therapy*. (Eds) Curiel DT, Douglas JT. Academic Press: 129-166.

Ojkic D, Nagy E (2001) The long repeat region is dispensable for fowl adenovirus replication in vitro. *Virology* 283(2): 197-206.

Ojkic D, Nagy E (2003) Antibody response and virus tissue distribution in chickens inoculated with wild-type and recombinant fowl adenoviruses. *Vaccine* 8(22): 42-48.

Patel A, Zhang Y, Croyle M, Tran K, Gray M, Strong J, Feldmann H, Wilson JM, Kobinger GP (2007) Mucosal delivery of adenovirus-based vaccine protects against Ebola virus infection in mice. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: S413-420.

Ribacka C, Hemminki A (2008) Virotherapy as an approach against cancer stem cells. *Curr Gene Ther* 8(2): 88-96.

Rittner K, Schreiber V, Erbs P, Lusky M (2007) Targeting of adenovirus vectors carrying a tumor cell-specific peptide: *in vitro* and *in vivo* studies. *Cancer Gene Ther* 14 (5): 509-518

Santosuosso M, McCormick S, Xing Z (2005) Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases. *Viral Immunol* 18(2): 283-291. Review.

Seth P (2000) Adenoviral vectors. In: *Cancer Gene Therapy: Past Achievements and Future Challenges*, Habib (Ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.

Shashkova EV, Cherenova LV, Kazansky DB, Doronin K (2005) Avian adenovirus vector CELO-TK displays anticancer activity in human cancer cells and suppresses established murine melanoma tumors. *Cancer Gene Ther* 12: 617-626.

Shaw G (since 2002) A HEK293 Cell Database: <http://www.mbi.ufl.edu/~shaw/293.html>

Sheppard M, Werner W, Tsatas E, McCoy R, Prowse S,

Johnson M (1998) Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Arch Virol* 143(5): 915-930.

Singh R, Kostarelos K (2009) Designer adenoviruses for nanomedicine and nanodiagnostics. *Trends Biotechnol* 27(4): 220-229.

Souza AP, Haut L, Reyes-Sandoval A, Pinto AR (2005) Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Braz J Med Biol Res* 38(4): 509-522.

Tatsis N, Ertl HC (2004) Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 10(4): 616-629.

Thompson DH (2008) Adenovirus in a synthetic membrane wrapper: an example of hybrid vigor? *ACS Nano* 2(5): 821-826.

Vellinga J, de Vrij J, Myhre S, Uil T, Martineau P, Lindholm L, Hoeben RC (2007) Efficient incorporation of a functional hyper-stable single-chain antibody fragment protein-IX fusion in the adenovirus capsid. *Gene Ther* 14(8): 664-670.

Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R (2006) Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439(7074): 344-348.

Xu Q, Arevalo MT, Pichichero ME, Zeng M (2006) A new complementing cell line for replication-incompetent E1-deleted adenovirus propagation. *Cytotechnology* 51: 133-140.

Zhang WW, Kock PE, Roth JA (1995) Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *Biotechniques* 18: 444-447.

Zhang Y, Bergelson JM (2005) Adenovirus Receptors. *J Virol* 79(19): 12125-12131.

Zhu J, Huang X, Yang Y (2007) Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* 81(7): 3170-3180.

## ADENOVIRUS VECTOR SYSTEM: A POTENTIAL TOOL FOR INTRODUCING ANTIGENIC GENE IN PRODUCTION OF NEW GENERATION VACCINES

Le Thanh Hoa\*

*Institute of Biotechnology*

### SUMMARY

Viral vector based vaccines generated by genetic engineering are able to produce three kinds of immune

\* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37567297; E-mail: [imibtvn@gmail.com](mailto:imibtvn@gmail.com)

responses: humoral immune response, cell-mediated immune response and mucosal immune response. Administrative routes for viral vector based vaccines are feasible over other ones, of which the biggest advantage for these kinds of vaccines is easily to introduce antigen to animal population in the simplest way without needle; and is cost-effective by the alimentary (by feeding/drinking) and respiratory (by aerosol) application. The adenoviral vector systems are potential sources to provide common vectors for biomedical usage as gene-transferring vehicles: for new generation vaccines to induce immunity; for expression of cytokines in enhancing immunity; for RNAi (RNA interference) to silence the target genes; and particularly, for genetic therapy as targeting vectors widely used against cancerous and contagious diseases. There are a number of adenovirus based vectors to be constructed as antigenic transferring tools. In terms of materials, three initiative kinds required include source of plasmid DNA originated from genome of a donor adenovirus; source of plasmid DNA vector used as a vehicle to shuttle the target gene(s); and accessory components including bacterial and mammalian cell systems for assembling vaccine-candidate recombinant adenoviruses. In terms of principle, a vaccine-candidate recombinant adenovirus must meet the requirements that they well replicate in permissive cells for provision of high quantity/quality for vaccine production; and is able to induce immunity (immunogenicity) in immunization of the particular vaccines. In this paper, we introduce the most characteristic features of adenoviruses in the family Adenoviridae; the most basic principles and methodologies for generation of a vaccine-candidate recombinant adenovirus harbouring an antigenic gene; and the successfully constructed adenovirus-based vectors for a number of recombinant vaccines for human and animals.

**Keywords:** *Adenovirus, cell-mediated immune response, humoral immune response, mucosal immune response, recombinant, new generation vaccine*