

## 腺病毒载体在基因治疗和疫苗研究中的应用

卢曾军, 曹跃梅, 刘在新<sup>\*\*</sup>, 谢庆雷

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃兰州, 730046)

### Advance of Adenoviral Vector in Gene Therapy and Vaccine Research

LU Zeng-jun, CAO Yi-mei, LIU Zai-xin, XIE Qing-ge

(Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agriculture Science, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou, Gansu 730046, China)

**Key words:** Adenoviral vector, Gene Therapy, Vaccine

**关键词:** 腺病毒载体, 基因治疗, 疫苗

**中图分类号:** Q789

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125(2006)06-0622-05

自从二十世纪五十年代开始认识腺病毒(Adenovirus)以来,对腺病毒的生物学和免疫学特征已经有比较多的认识。腺病毒科包括禽腺病毒属(Aviadenovirus)和哺乳动物腺病毒(Mastadenovirus)两个属。除人腺病毒以外,一些哺乳动物的腺病毒和禽腺病毒也成为基因治疗和载体疫苗研究的热点,如猪腺病毒 3 型(PAV-3)<sup>[1-5]</sup>、牛腺病毒 3 型(BAV-3)<sup>[6,7]</sup>、绵羊腺病毒(Ovine adenovirus, OAV)<sup>[8]</sup>、禽腺病毒(Aviadenovirus)<sup>[9,10]</sup>、犬腺病毒(Canine adenovirus, CAV)和黑猩猩腺病毒(Chimpanzee adenovirus)。不同种属的腺病毒虽然基因组序列完全不同,但其结构和功能却非常相似,而且各型腺病毒之间很少有交叉免疫反应,这就为利用这些腺病毒研制基因治疗载体和活载体疫苗提供了丰富的材料。近年来的研究也发现,如果利用一种腺病毒载体来进行重复免疫,宿主针对腺病毒载体蛋白的免疫反应比较强大,造成转基因表达时间缩短,重复免疫的效果较差,换用不同的病毒载体,则可以回避这种免疫反应,提高转基因的表达时间和保护性免疫反应<sup>[11,12]</sup>。腺病毒可以感染很多分裂期或静止期细胞,即使在一些高度分化的组织细胞中也可增殖,如可有效的感染肌肉组织、心、肺和脑组织,并能高效的复制、表达其基因产物,因此腺病毒成为基因治疗和活病毒载体疫苗研究的首选工具。

### 1 腺病毒载体的类型和构建策略

腺病毒是一种双股 DNA 病毒,基因组全长约

为 34-43kb,包括基因组两端长约 40-200bp 反向重复序列,早期和晚期基因编码区。两端的反向重复序列与启动和增强早期基因的转录有关<sup>[5]</sup>。腺病毒的转录可分为早期和晚期两个阶段,早期基因转录之后,产生 4 个早期基因的表达盒,分别为 E1、E2、E3 和 E4。E1 基因编码区是病毒复制的必需区,有 E1A 和 E1B 两种产物,E1A 主要参与调节细胞代谢、促进病毒在细胞内的复制、使细胞更易感染病毒,E1B 则启动晚期基因的转录并引起炎症反应。E2 区基因产物分 E2A (DBP) 和 E2B (pTP 和 Pol),提供病毒 DNA 的复制机器,并引起晚期基因的转录。E3 区是病毒复制的非必需区,在所有血清型之间都比较保守,该区基因编码产物与调整宿主免疫反应有关:最有特征的是 gp19 蛋白,可以与 MHC-I 重链分子结合,从而阻断了 MHC-I 复合物向细胞表面的转移;14.7kD 蛋白与控制宿主免疫反应有关,可以阻断肿瘤坏死因子(TNF)介导的溶细胞作用。E3 区基因的缺失不会影响病毒的复制,但 E3 区的删除会增加腺病毒感染的致病性,主要是增强了感染组织中淋巴细胞浸润<sup>[13]</sup>。E4 区是另一个与腺病毒生活周期重要相关的区域,总共有 6-7 个基因表达盒(orf1-6/7),该区基因产物与早期和晚期基因表达的转换,关闭宿主细胞基因的表达,病毒的复制和病毒粒子的组装有关。然而,在该区编码蛋白中同时突变 orf3 和 orf6 编码蛋白时病毒不可复制,而在重组病毒中只含有 orf6 就可以满足病毒复制的需要。已经有表达 E4 的互补细胞系,可用于

收稿日期:2006-05-17,修回日期:2006-07-20

作者简介:卢曾军(1971-),男,助理研究员,博士,主要从事病毒分子生物学与免疫学研究。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者:刘在新(1964-),男,研究员,博士,博士生导师,主要从事动物病毒学研究。

Corresponding author: Tel: 0931-8342587; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

包装 E4 缺失的重组腺病毒<sup>[2]</sup>。

在感染 HeLa 细胞后 6-8 h 腺病毒 DNA 的复制开始, 晚期基因的表达开始, 该区基因的表达由主要晚期启动子(MLP) 控制, 所产生的大转录本被剪辑为 5 组晚期 mRNAs (L1-L5), 编码大部分的结构蛋白; 这些 mRNAs 均有共同的 3 个外显子, 编码 3 个前导肽, 增强结构蛋白的翻译<sup>[13]</sup>。

通过缺失腺病毒某些片段可以产生复制缺陷型和可复制型的重组腺病毒。可插入的外源基因的长度不可超过母本病毒基因组长度的 105%, 约为 1.8kbp 的外源片段, 外源基因插入的主要区域为 E1、E3 和 E4 区。缺失 E3 非必需区(2.7kbp), 可以容许插入 3.5kb 的外源片段, 由此可以构建可复制的重组腺病毒; 同时缺失 E1/E3(4.7kbp)区基因, 可以容许 6.5kb 的片段插入, 由此构建产生复制缺陷型的重组腺病毒, 这类病毒载体通常称作第一代腺病毒载体。缺失部分或全部的 E4 区基因(4kbp), 以及 E2 区基因, 可以提高外源基因插入的长度, 这类载体需要在相应的互补细胞系中增殖, 这类载体称为第二代载体; E4 区缺失可以产生更加致弱的重组病毒, 降低宿主的免疫反应<sup>[13]</sup>。第三代腺病毒载体缺失了除两端包装信号序列以外的所有病毒基因<sup>[11]</sup>, 需要有辅助病毒和互补细胞系才能够包装产生病毒粒子, 又称为辅助病毒依赖性载体, 必须用填充序列和外源转基因序列补充所需的 DNA 长度, 才能包装出稳定的病毒粒子, 但是要纯化出表达外源基因的重组腺病毒, 而不受辅助病毒的污染, 需要较高的技术条件, 因而在实际的临床应用中难度较大。在肿瘤基因治疗研究中, 设计了一种肿瘤组织特异性的选择性复制的重组腺病毒, 可在肿瘤组织特异性的表达抗肿瘤基因和调节性细胞因子, 以提高机体的抗肿瘤免疫反应, 达到抑制和消除肿瘤生长的治疗目的<sup>[14,15]</sup>。腺病毒载体的构建策略见图 1<sup>[16]</sup>。

腺病毒载体的构建策略有三种: 一种是在细胞内同源重组产生重组腺病毒, 首先要纯化出全长的腺病毒 DNA, 外源基因插入到带有腺病毒基因片段的穿梭质粒中, 将腺病毒 DNA 和重组质粒共转染表达 E1 基因产物的 HEK293 细胞中, 通过噬斑筛选出重组病毒<sup>[16]</sup>。二是将腺病毒全长 DNA 序列克隆入 Cosmid 质粒中, 转化大肠杆菌感受菌, 在细菌中复制腺病毒 DNA 序列, 然后将外源基因片段插入带适当抗性基因的真核表达质粒, 将重组真核质粒线性化后, 转化带 Cosmid 质粒的大肠杆菌, 在高表达 Cre 重组酶的大肠杆菌发生同源重组, 将外源基因表达

盒插入腺病毒 DNA 中, 用这种方法也可以缺失任何区段的腺病毒 DNA<sup>[3]</sup>。第三种方法是将稀有的限制性内切酶位点引入穿梭质粒和腺病毒骨架载体中, 将外源基因克隆入穿梭质粒中, 再通过酶切连接的方法将外源基因克隆入腺病毒骨架载体, 转化大肠杆菌复制重组质粒, 转染相应的包装细胞系后, 即可产生复制缺陷型的重组腺病毒<sup>[17]</sup>。选择性复制的重组腺病毒载体的构建, 主要是将腺病毒复制必需的 E1A 或者 E1B 基因置于组织特异性的启动子控制之下, 这样重组腺病毒只可以在特定的组织中表达<sup>[14,15]</sup>, 这类载体在目前基因治疗中研究比较多。

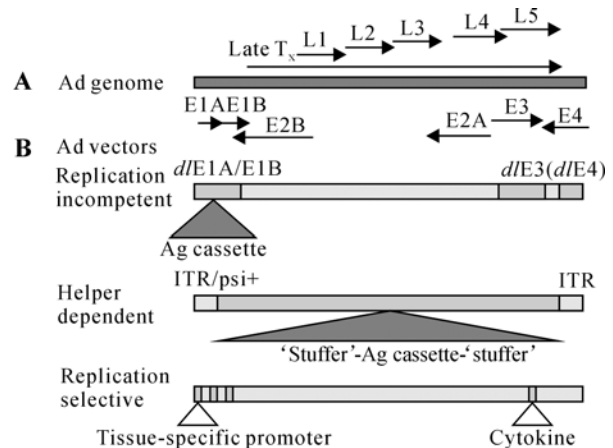


图 1 腺病毒载体的构建示意图<sup>[16]</sup>

Fig.1 Construction schema of adenoviral vector

A: Partial genes of adenovirus. B: Three adenoviral vectors.

## 2 腺病毒载体在基因治疗中的应用

在人类癌症的基因治疗中表达转基因的重组腺病毒载体显示出比较好的治疗效果。利用表达粒性巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的重组腺病毒治疗黑色素瘤的临床试验, 显示了强大的抗癌效果<sup>[18]</sup>。病毒性肿瘤、黑色素瘤和致癌基因过表达引起的肿瘤能够表达诱导 T-细胞免疫反应的肿瘤抗原。但是, 许多肿瘤却可以规避有效的抗肿瘤 T-细胞免疫反应, 许多肿瘤病人存在这种肿瘤免疫耐受性。通过优化设计肿瘤免疫程序可以激发产生高效的抗肿瘤 T-细胞免疫反应, 至少在某些癌症可以得到有效的治疗。这些免疫方法包括用全肿瘤细胞疫苗、完整的肿瘤抗原或肿瘤抗原中的 T-细胞表位来进行免疫, 用腺病毒连续表达多个肿瘤抗原的 CTL-表位, 具有很好的抗肿瘤活性<sup>[16]</sup>。肿瘤组织选择性复制的腺病毒载体被用来表达抗肿瘤细胞因子激活物具有明显的抗癌和抑瘤效果<sup>[14,15]</sup>。

树突状细胞(DCs)是很重要的抗原递呈细胞, 能够活化 T-细胞依赖抗肿瘤免疫反应, 增强 DCs 的

功能是新型治疗性疫苗研究的一个中心目标。一般的方法包括用诱导DC分裂和活化的信号分子进行免疫治疗；另外一个很重要的增强免疫反应的方案是将抗原更有效的靶向DCs<sup>[19]</sup>。利用基因工程病毒载体在DCs和其他抗原递呈细胞中表达抗原基因，可以将抗原表位递呈于细胞表面，递呈给效应性T-细胞，这种免疫方案将是激发机体免疫反应的最有效疫苗<sup>[20]</sup>。利用可在DCs细胞中持续表达抗原基因的载体，转化DCs细胞，用转化的DCs细胞注射到人体内，就可以长期的刺激机体产生特异性的免疫反应<sup>[21]</sup>。最新的研究发现，嵌合表达35血清型腺病毒纤突蛋白的HAd5可以更有效的转染DCs细胞<sup>[22]</sup>，表达CD21结合基序的腺病毒载体对B细胞有更好的感染作用<sup>[23]</sup>，这种对抗原递呈细胞的靶向作用，可以明显提高转基因的表达，有望开发出高效的免疫治疗和疫苗载体。

### 3 腺病毒载体在人载体疫苗研究中的应用

重组腺病毒载体疫苗作为一种新型疫苗，在各种人和动物病毒病、细菌病和寄生虫病的免疫预防中进行了大量的研究。目前在人病毒病的重组腺病毒载体疫苗研究中，已进行研究的病原主要有人/猿免疫缺陷病毒（Human/Simian immunodeficiency virus, HIV/SIV）、狂犬病病毒(Rabies virus, RV)、丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）、乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）、SARS冠状病毒（SARS-coronavirus）、麻疹病毒（Measles virus）<sup>[24]</sup>、登革病毒（Dengue virus）、巨细胞瘤病毒（Cytomegalovirus, CMV）<sup>[25]</sup>、EB病毒（Epstein-Barr virus, EBV）、埃博拉病毒（Ebola virus）等，重组腺病毒均可有效的表达上述病毒的抗原基因，在试验动物和非人灵长类动物体进行的免疫试验表明，可以刺激产生特异性的细胞免疫和体液免疫反应，其中 HIV 重组腺病毒载体疫苗已在人体进行了免疫试验<sup>[26]</sup>。在利用重组腺病毒表达人疟原虫（malaria）CS 抗原蛋白进行免疫研究中证明，其免疫效果甚至比放射孢子体的免疫效果还要好<sup>[27]</sup>。

尽管人源重组腺病毒在试验动物体内取得较好的免疫效果，但是在多数人不同程度的存在人腺病毒的中和抗体，这些中和抗体会阻碍重组腺病毒载体在体内有效的表达外源基因。甚至是中度水平的中和抗体也会降低重组腺病毒进入细胞的量，包括一些抗原递呈细胞。高剂量免疫尽管可以提高免疫效果，但是存在载体的毒性问题。怎样来避免腺

病毒特异性的中和抗体是目前腺病毒载体疫苗研究中的一个主要的问题<sup>[28]</sup>。

将重组腺病毒载体用PEG包裹或者制成藻酸盐胶囊可以避开腺病毒的中和抗体，提高对细胞的感染效率<sup>[29,30]</sup>。利用不同血清型的腺病毒构建重组载体疫苗也可以避开中和抗体，提高转基因的表达效率，目前最常用的载体为HAd5型腺病毒，随着上述问题的发现，对其他血清型腺病毒以及非人类腺病毒载体的研究逐渐增多，如HAd2、HAd4、HAd7<sup>[31]</sup>、HAd12型腺病毒载体，来自动物的腺病毒载体有PAV-3、BAV-3、OAV，动物的腺病毒对人类细胞的转染效率不高，通过改造腺病毒的纤突蛋白可以改变腺病毒对某些细胞的嗜性<sup>[32]</sup>，从而提高重组腺病毒对不同细胞（包括DCs、肌肉细胞、上皮细胞等）的转染效率，提高转基因的表达水平，同时避开了腺病毒中和抗体对细胞转染的阻碍作用。采用不同的基因疫苗来进行免疫可以提高抗HIV的免疫反应，如采用DNA初免，然后用腺病毒载体疫苗加强免疫可以明显的提高保护性免疫效果<sup>[33]</sup>。

### 4 腺病毒载体在动物载体疫苗研究中的应用

在动物疫病的腺病毒活载体疫苗的研究中HAd5 型复制缺陷型的腺病毒载体是最常应用的。用表达伪狂犬病毒 gD 糖蛋白的重组痘病毒和重组腺病毒载体疫苗进行对比试验，证明腺病毒在刺激特异性抗体应答和免疫保护方面要好于痘病毒（Gonin *et al*, 1996），并且可以多途径进行免疫，说明人腺病毒 HAd5 具有较广泛的细胞嗜性。重组腺病毒的免疫不受母源抗体的干扰，给有母源抗体的仔猪免疫伪狂犬病毒的重组腺病毒，可以产生高水平的抗体，并具有保护作用。给新生羔羊肠道免疫表达牛疱疹病毒 gD 糖蛋白的重组腺病毒，可以刺激肠道的局部粘膜免疫和全身免疫应答，说明空肠 Peyer's 结等局部淋巴组织能够起到免疫防御作用；以壳聚糖和乙二醇壳聚糖作为鼻腔免疫的佐剂也可以提高表达 gD 糖蛋白的重组腺病毒在牛体的免疫效果<sup>[34]</sup>。利用缺失 E3 的 BAV-3 表达牛疱疹病毒 1 型的全长 gD 糖蛋白基因，鼻内注射棉鼠可产生很强的 gD 和 BAV-3 特异性的 IgA 和 IgG，说明可复制的牛腺病毒 3 型有希望用于研制重组载体疫苗用于粘膜免疫(Zakhartchouk,1998)。利用壳聚糖包装重组腺病毒，制备缓释胶囊，可以将腺病毒递呈到小肠粘膜表面，使转基因在粘膜系统表达，刺激产生更好的粘膜免疫反应。

利用缺失 E1/E3 区基因的重组腺病毒表达了黄病毒科病毒的抗原基因, 如日本乙型脑炎病毒 (JEV), 黄热病毒 (YFV), 蜱传性脑炎病毒 (TBEV), 登革热病毒 (DFV) 和 HCV 病毒的抗原基因, 通过口服免疫重组腺病毒均可刺激产生保护性的体液和细胞免疫反应; 而且腺病毒的嗜肝性, 适用于 HCV 持续感染者的基因治疗。

利用 PAV3 构建了表达猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) E2 基因的可复制重组腺病毒, E2 基因置于 PAV3 主要晚期启动子 (MLP) 的控制之下。用这种重组腺病毒免疫猪, 可以完全保护致死剂量的 CSFV 的攻击, 免疫猪没有出现临床和剖解病理变化。外源基因插入后基因组长度达到了 PAV3 基因组长度的 106.8%, 超过预期的长度; 通过皮下和口服免疫试验证明, 皮下免疫的效果最好, 可达到完全的保护<sup>[35,36]</sup>。利用 HAd5 型腺病毒载体表达 BVDV E2 蛋白在小鼠体内也产生了较好的免疫应答<sup>[37]</sup>。

利用禽腺病毒构建了表达禽传染性支气管炎病毒 (IBV) 包膜突起蛋白 S1 亚单位的重组腺病毒 (血清型 8), 免疫仔鸡可以产生抗 FAV 抗体和 IBV S1 抗体, 用同源或异源 IBV 攻击, 保护率可达 90%~100%。本研究显示了 IBV 腺病毒载体苗的巨大潜力<sup>[9]</sup>。

用禽腺病毒 CELO 载体表达 IBDV 病毒宿主保护性抗原 VP2 基因, 将 VP2 置于 CMV 启动子控制之下, 通过不同途径和不同剂量免疫家禽, 证明重组病毒对禽类无致病性。通过口鼻免疫鸡, 仅有很弱的保护作用。而通过皮下或皮内接种感染 CELOa-VP2 重组腺病毒, 用 IBDV 强毒攻击后没有表现出临床症状和死亡; 但是, 与商业化的 IBDV 疫苗一样不能够完全保护法氏囊不产生病变。采用不同的二次免疫方案, 只有用该重组腺病毒二次免疫可以提高保护水平, 而用纯化 VP2 抗原、质粒 DNA 或表达 cMGF (鸡骨髓生长因子) 二免均未提高免疫保护水平。这一结果显示 CELO 腺病毒载体疫苗可以诱导鸡产生坚强的保护性免疫反应<sup>[10]</sup>。

## 5 小结

腺病毒给人和动物带来了许多病症, 但是同时它也为我们提供了用于基因治疗和载体疫苗研究的丰富资源。如此众多的腺病毒种类, 使我们可以根据不同的需要来研究开发不同的腺病毒载体, 可以根据需要来改变腺病毒的宿主嗜性, 制造出嵌合腺病毒, 可以将腺病毒靶向到特定的组织器官中复制来治疗和预防人和动物的各种疫病。随着病毒分

子生物学技术和疫苗技术的不断发展, 腺病毒载体疫苗和治疗药物必将会从研究走向临床应用, 为人和动物的卫生健康服务。

## References

- [1] Zakhartchouk A, Yan Z, Tikoo S K. A recombinant E1-deleted porcine adenovirus-3 as an expression vector [J]. *Virology*, 2003, 313, 377-386.
- [2] Li X, Babiuk LA, Tikoo S K. Analysis of early region 4 of porcine adenovirus type 3 [J]. *Virus Res*, 2004, 104: 181-190.
- [3] Li X, Tikoo S K. Characterization of cis-Acting packaging motifs of porcine adenovirus type3 [J]. *Virus Res*, 2004, 104: 207-214.
- [4] Li X, Tikoo S K. Porcine adenovirus type 3 E1 transcriptional control region contains a bifunctional regulatory element [J]. *Virology*, 2004, 318: 37-44.
- [5] Li X, Tikoo S K. Promoter activity of left inverted terminal repeat and downstream sequences of porcine adenovirus type 3 [J]. *Virus Res*, 2005, 109:51-58.
- [6] Zakhartchouk A, Connors W, van Kessel A, *et al.* Bovine adenovirus type 3 containing heterologous protein in the C-terminus of minor capsid protein IX [J]. *Virology*, 2004, 320: 291-300.
- [7] Wu Q H, Tikoo S K. Altered tropism of recombinant bovine adenovirus type-3 expressing chimeric fiber [J]. *Virus Res*, 2004, 99: 9-15.
- [8] Wuest T, Both G W, Prince A M, *et al.* Recombinant ovine adenovirus induces a strong and sustained T cell response against the hepatitis C virus NS3 antigen in mice [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 2717-2721.
- [9] Johnson M A, Pooley C, Ignjatovic J, *et al.* A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 2730-2736.
- [10] Francois A, Chevalier C, Delmas B, *et al.* Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 2351-2360.
- [11] Morral N, O'Neal W, Rice K, *et al.* Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons [J]. *Proc Nat Acad Sci, USA*. 1999, 96, 12816-12821.
- [12] Bangari D S, Shukla S, Mittal S K. Comparative transduction efficiencies of human and nonhuman adenoviral vectors in human, murine, and porcine cells in culture [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327: 960-966.
- [13] Tatsis N, Ertl H C J. Adenoviruses as vaccine vectors [J]. *Mol Ther*, 2004, 10 (4): 616-629.
- [14] Reik A, Gregory P D, Case C C. An oncolytic adenovirus armed with a

- GM-CSF activating designed Zinc-finger protein transcription factor: a potential cancer vaccine approach [J]. *Mol Ther*, 2004, 9 (S1): S238.
- [15] Takayama K, Ikegami A, Inoue H, *et al.* VEGF promoter-based conditionally replicative adenoviruses are useful for the treatment of malignant pleural mesothelioma [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(S1): S238.
- [16] Polo J M, Dubensky T W. Virus-based vectors for human vaccine applications [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7: 719-727.
- [17] Moraes M P, Mayr G A, Grubman M J. pAd5-Blue: direct ligation system for engineering recombinant adenovirus constructs [J]. *Biotechniques*, 2001, 31: 1056.
- [18] Ahmad K. Adenovirus vaccine works best [J]. *The Lancet Oncol*, 2003, 4: 558.
- [19] Ophorst OJAE, Kostense S, Goudsmit J, *et al.* An adenoviral type 5 type vector carrying a type 35 fiber as a vaccine vehicle: DC targeting, cross neutralization and immunogenicity [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 3035-3044.
- [20] Nouredini S C, Krendelshchikov A, Simonenko V, *et al.* Generation and selection of targeted adenoviruses embodying optimized vector properties [J]. *Virus Res*, 2006, 116:185-195.
- [21] Hsu C, Boysen M, Gritton L D, *et al.* In vitro dendritic cell infection by pseudotyped adenoviral vectors does not correlate with their in vivo immunogenicity [J]. *Virology*, 2005, 332: 1-7.
- [22] Dipaolo N, Ni S, Gaggari A, *et al.* Evaluation of adenovirus vectors containing serotype35 fibers for vaccination [J]. *Mol Ther*, 2006, 13 (4): 758-765.
- [23] Mailly L, Renaut L, Rogee S, *et al.* Improved gene delivery to B lymphocytes using a modified adenovirus vector targeting CD21 [J]. *Mol Ther*, 2006, 14 (2): 293-304
- [24] Putz M M, Bouche F B, de Swart R L, *et al.* Experimental vaccines against measles in a world of changing epidemiology [J]. *Inter J Parasitol*, 2003, 33: 525-545.
- [25] Shanley J D, Wu C A. Intranasal immunization with a replication-deficient adenovirus vector expressing glycoprotein H of murine cytomegalovirus induces mucosal and systemic immunity [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 996-1003.
- [26] Robinson H L. New hope for an aids vaccine [J]. *Nature Rev Immunol*, 2002, 2: 239-250.
- [27] Bruna-Romero O, Rocha C D, Tsuji M, *et al.* Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of Plasmodium lacking the GPI-anchoring motif [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 3575-3584.
- [28] Moffatt S, Hays J, HogenEsch H, *et al.* Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenovirus: implication in gene therapy [J]. *Virology*, 2000, 272:159-167.
- [29] Sailaja G, HogenEsch H, North A, *et al.* Encapsulation of recombinant adenovirus into alginate microspheres circumvents vector-specific immune response [J]. *Gene Ther*, 2002, 9: 1722- 1729.
- [30] Mittal S K, Aggarwal N, Sailaja G, *et al.* Immunization with DNA, adenovirus or both in biodegradable alginate microspheres: effect of route of inoculation on immune response [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 253- 263.
- [31] Purkayastha A, Su J, Carlisle S, *et al.* Genomic and bioinformatics analysis of HAdV-7, a human adenovirus of species B1 that causes acute respiratory disease: implications for vector development in human gene therapy [J]. *Virology*, 2005, 332: 114-129.
- [32] Roy S, Zhi Y, Clawson D, *et al.* Novel chimeric adenovirus vaccine vector [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(s1): s389.
- [33] Takakura M, Okuda K, Matsuda T, *et al.* Combination of DNA vaccine and adenovirus vector by cutaneous administration induced strong HIV-specific cellular immune responses in mice [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 847-848.
- [34] Gogev S, de Fays K, Versali M F, *et al.* Glycol chitosan improves the efficacy of intranasally administrated replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1 [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 1946-1953.
- [35] Hammond J M, McCoy R J, Jansen E S, *et al.* Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55(E2) gene protect pigs against classical swine fever [J]. *Vaccine*, 2000, 18: 1040-1050.
- [36] Hammond J M, Jansen E S, Morrissy C J, *et al.* Protection of pigs against 'in contact' challenge with classical swine fever following oral or subcutaneous vaccination with a recombinant porcine adenovirus [J]. *Virus Res*, 2003, 97: 151-157.
- [37] Elahi S M, Shen S H, Talbot B G, *et al.* Recombinant adenovirus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus induce humoral and cellular immune responses [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 177: 159-166.