

CÔNG NGHỆ ADENOVIRUS VECTOR VÀ ỨNG DỤNG TRONG KÍCH ỨNG MIỄN DỊCH GIA CẦM

Phạm Việt Cường^{*}, Nguyễn Thị Kim Cúc

Viện Hóa sinh Biển, Viện KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

^{*}Email: *cuongwg@yahoo.com*

Đến Tòa soạn: 17/12/2012; Chấp nhận đăng: 24/12/2012

TÓM TẮT

Adenoviruses tái tổ hợp là những công cụ đa năng để vận chuyển và biểu hiện gen. Ad vector đã được thử nghiệm như hệ chuyển vaccine trong một số nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng cho các bệnh truyền nhiễm như sởi, viêm gan B, bệnh dại, bệnh than, Ebola, SARS, HIV-1, sốt rét, lao và cúm. Cùng với sự phát triển của kỹ thuật di truyền, các vectors adenovirus thế hệ 1, 2, 3 lần lượt ra đời, đáp ứng những đòi hỏi khắt khe của một vector biểu hiện gen. Adenovirus vector có thể được sử dụng (i) trong lĩnh vực liệu pháp gen chữa ung thư như chuyển các gen ức chế khối u p53, và p16, antisense DNA, các kháng thể đơn chuỗi, herpes simplex virus thymidine kinase và cytosine deaminase; (ii) liệu pháp gen cho các bệnh di truyền như chữa bệnh xơ nang, các bệnh về phổi; (iii) liệu pháp hỗ trợ; và (iv) các ứng dụng khác như sản xuất proteins cho những phân tích phân tử sâu hơn. Adenovirus vectors được biết hoạt hóa cả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng. Sự hoạt hóa hệ thống miễn dịch bẩm sinh được kích thích bởi các hạt virus và vì vậy, không phụ thuộc vào sự sao chép DNA virus. Adenovirus tác động lên cả các tế bào trong hệ thống miễn dịch và các tế bào không thuộc hệ thống miễn dịch như tế bào biểu mô và tế bào màng trong, thúc đẩy một loạt các tín hiệu xảy ra trong các tế bào và bằng cách đó hệ thống miễn dịch của vật chủ được tăng cường. Adenovirus vector dựa trên loại adenovirus type 5 của người đã được nghiên cứu sử dụng làm vaccine cho gia cầm. Các nghiên cứu đã chứng minh liệu tiêm chủng đơn *in ovo* hoặc trong cơ (i.m) loại vaccine cúm gia cầm dựa trên Ad vector type 5 của người mang gen kháng nguyên đặc hiệu cúm gia cầm tạo miễn dịch bảo vệ cho gà kháng lại virus cúm gia cầm.

Từ khóa: adenovirus, liệu pháp gen, miễn dịch, vaccine, vector.

1. MỞ ĐẦU

Adenovirus thuộc họ virus DNA với genome hai sợi thẳng. Protein vỏ của virus được cấu tạo trong một icosohedral, capsid không vỏ. Genome virus 36 kb và các gen của adenovirus về mặt thực nghiệm được chia thành nhóm sớm và muộn, dựa trên việc liệu chúng được biểu hiện trước hoặc sau sao chép DNA. Trong các bản sao (transcript) RNA sớm, E1a và E1b mã hóa proteins cho việc hoạt hóa-trans các gen khác của virus hoặc điều chỉnh chu trình tế bào của vật chủ, E2 cho sao chép DNA của virus, E3 cho điều chỉnh đáp ứng miễn dịch của vật chủ và E4 ức

chế tế bào vật chủ tự chết (apoptosis). Gen muộn mã hóa các thành phần cấu trúc cho capsid và protein tham gia vào điều khiển gen [1].

Adenoviruses tái tổ hợp là những công cụ đa năng để vận chuyển và biểu hiện gen. Việc sử dụng vector virus để chuyển gen là một ý tưởng đơn giản; gắn vật liệu di truyền mong muốn vào genome virus, bằng cách đó sử dụng lợi thế vốn có của virus chuyển cho (transduce) các tế bào tác dụng chữa bệnh mong muốn. Trong những năm gần đây, chiến lược này được sử dụng cho một trong những hệ vector virus được nghiên cứu mạnh nhất và ứng dụng rộng rãi nhất, dựa trên adenoviruses của người (Ads) [2, 3, 4]. Các đặc tính sinh học của Adenoviruses cho thấy, chúng có khả năng nhiễm nhiều loại tế bào, nhưng genome của chúng không gắn vào với genes của vật chủ, vì vậy chúng được đánh giá là vector chuyển gen an toàn cho người và động vật. Adenovirus vector là một trong những loại vectors được sử dụng nhiều nhất trong liệu pháp gen. Ad vector đã được thử nghiệm như hệ chuyển vaccine trong một số nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng cho các bệnh truyền nhiễm bao gồm bệnh sởi, viêm gan B, bệnh dại, bệnh than, Ebola, SARS, HIV-1, sốt rét, lao và cúm [5].

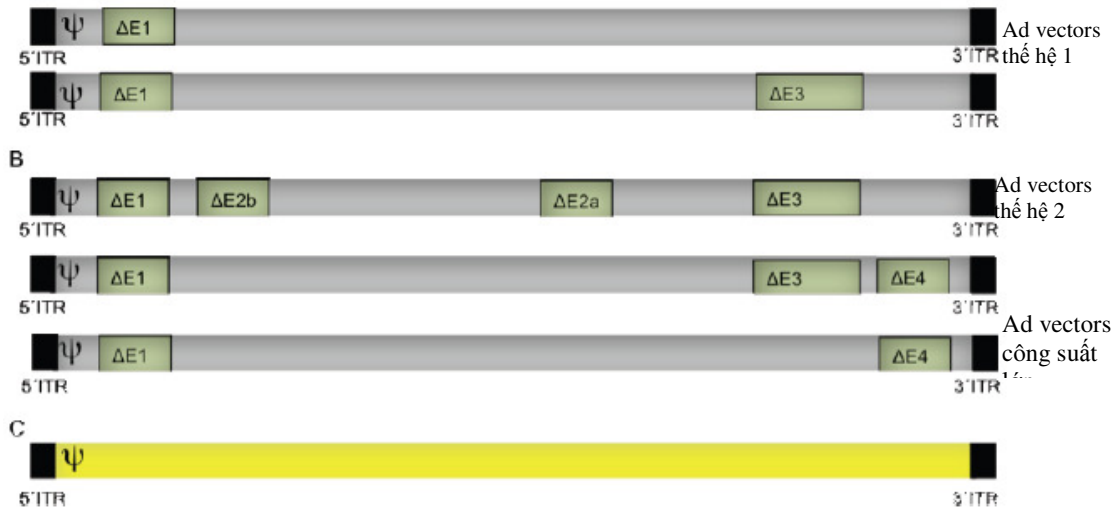
2. CÁC LOẠI ADENOVIRUS VECTORS

Adenovirus vectors là những ứng viên thích hợp cho vận chuyển gen do: (i) tính an toàn và sản xuất vector khá dễ; (ii) khả năng nhiễm các tế bào động vật đang phân chia hoặc không phân chia và cảm ứng mạnh sự biểu hiện gen ngoại lai; (iii) nguy cơ gắn với genome vật chủ tối thiểu; (iv) khả năng tạo titers lớn trong nuôi cấy mô; (v) có sẵn những dòng tế bào được phép sử dụng để nhân virus và kỹ thuật để tinh sạch qui mô lớn; (vi) đặc tính vốn có của virus như một chất bổ trợ bằng cách hoạt hóa miễn dịch bẩm sinh; (vii) tạo đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào cao để phản ứng lại vector được đưa vào qua đường màng nhầy hoặc toàn thân [6].

Vectors thế hệ 1: Đầu những năm 90s, Ad vector được sử dụng chủ yếu do hiệu quả truyền nhiễm cao. Trong các loại Ad vector thế hệ 1, chỉ có vùng gen E1 bị loại bỏ, các gen trong vùng E1 cần cho sự hoạt hóa promoters của virus và sự biểu hiện các gen sớm và muộn. Loại bỏ vùng E1 tạo ra virus không có khả năng tái tạo. Ngoài ra, vùng E1 mã hóa cho chức năng gây ung thư của virus. Vì vậy, chiến lược đầu tiên là thay vùng E1 bằng gen ngoại lai (transgene) để thiết kế adenovirus vector. Có thể loại vùng E1 bởi có những dòng tế bào cung cấp chức năng này *in trans*, điển hình là dòng tế bào 293 (dòng tế bào thận phôi thai của người) được biến nạp vùng E1 adenovirus. Loại bỏ vùng E1 có thể gắn gen ngoại lai khoảng 5,1 kb vào vector. Các gen E3 không cần thiết cho sinh trưởng của virus *in vitro*, vì vậy rất nhiều vectors thế hệ 1 cũng bị loại vùng E3, và khi loại bỏ vùng này cùng vùng E1, cho phép gắn gen ngoại lai tới 8,2 kb (hình 1A) [7, 8].

Ad vectors thế hệ 2: được thiết kế bằng cách bỏ các trình tự mã hóa E1 và E2 hoặc E3 và/hoặc E4 và như vậy có thể gắn được gen có trình tự lớn hơn vào vector. Nhược điểm lớn nhất của vector này là cần có dòng tế bào có thể biểu hiện những chức năng đã bị loại bỏ *in trans*. Mặc dù tốn thời gian, nhưng vector loại này sinh sôi trong dòng tế bào không tạo ra virus có khả năng tự sao chép. Trong trường hợp gen E2, các dòng tế bào biểu hiện protein được gắn DNA sợi đơn, preterminal protein, DNA polymerase virus hoặc tổ hợp của cả 3. Vector bị loại bỏ các gen này không có khả năng sao chép genome, và trong trường hợp vector khuyết polymerase, sự sao chép không xảy ra ngay cả khi có nhiều E1A. Với việc loại bỏ vùng E4 kết quả không rõ ràng. Sử dụng động vật gặm nhấm làm mô hình cho thấy, loại bỏ một phần hoặc toàn bộ proteins E4 ảnh hưởng đến mức độ và thời gian biểu hiện của gen ngoại lai, nhưng sự điều khiển này phụ thuộc vào mô và promotor đặc hiệu. Ad vector có thể được sử dụng trong liệu pháp gen, biểu

hiện protein tái tổ hợp với mục đích chủng ngừa, hoặc đơn giản là truyền tính trạng (transducing) cho các dòng tế bào không truyền nhiễm được bằng các phương pháp khác (hình 1B).



Hình 1. Sơ lược các Ad vectors tái tổ hợp. A) genome của Ad vectors thể hệ 1. Vector này không có vùng mã hóa E1 hoặc loại bỏ cả E1 và E3. B) genome của Ad vectors thể hệ 2. Vectors này bị loại bỏ một số vùng mã hóa, thí dụ, E1, E3 và cả E2 (thanh trên cùng) hoặc E4 (thanh giữa) hoặc chỉ E1 và E4 (thanh dưới). C) Genome Ad vector công suất lớn. Tất cả các trình tự mã hóa của virus bị loại bỏ, chỉ còn lại các trình tự đầu cuối đảo lặp lại (ITRs) và tín hiệu gói (ψ) được giữ lại [8]

Ad vector phụ thuộc (helper-dependent Ad vector hoặc high capacity Ad vector): trong Ad vector này, tất cả các trình tự mã hóa cho protein virus được loại bỏ, chỉ để lại các trình tự đảo nhắc lại đầu cuối (viral inverted terminal repeats) và tín hiệu gói (packaging signal ψ), tổng khoảng 500 bp (hình 1C). Loại bỏ các gen của virus giảm mạnh đáp ứng độc tế bào của vật chủ, kéo dài sự biểu hiện transgen (đến 2,5 năm ở chuột và hơn 1 năm ở khi đầu chó). Trong quá trình sản xuất HD-Ad có 2 hạn chế chính ngăn cản sự tiến bộ của quá trình là: (1) khó sản xuất vector, đặc biệt với lượng lớn; (2) sự nhiễm virus helper. Rất khó để tách HD-Ad khỏi helper virus có cùng kích thước.

Oncolytic vectors: các chiến lược sửa chữa gen đòi hỏi vector chuyển gen phải đến được mô đích và các tế bào chuyển đổi (transduce) tồn tại. Ad vector có mục đích giết các mô đích chọn lọc gọi là oncolytic hoặc adenovirus sao chép có điều kiện (conditionally replicating adenoviruses-CRAds) đã được sản xuất để điều trị ung thư. Các tế bào ác tính thường có những đột biến trong các gen ức chế khối u, những gen cần thiết để điều chỉnh tiến triển của chu trình tế bào như gen *p53* và *Rb1*. Sự sao chép chọn lọc của oncolytic Ad nằm ở chỗ chúng có khả năng sao chép chỉ ở trong các tế bào có các điểm kiểm soát chu trình tế bào bị phá vỡ. Vector này đã được thử nghiệm trên mô hình động vật và lâm sàng và cho thấy triển vọng tiêu diệt các mô ác tính của chúng [1, 9, 10].

3. CHIẾN LƯỢC THIẾT KẾ ADENOVIRUS VECTOR

Một số chiến lược đã được khai thác để thiết kế Ad vector mang đoạn được gắn gen ngoại lai. Theo truyền thống, Ad vectors được thiết kế sử dụng hai phương pháp chuẩn. Phương pháp thứ nhất là gắn *in vitro*, gồm việc gắn đoạn DNA nhận được bằng cách cắt giới hạn plasmid mang gen ngoại lai vào trình tự Ad là phần còn lại của Ad genome. Phương pháp thứ hai là sự kết hợp tương đồng trong các dòng tế bào cho phép giữa hai plasmids – plasmid con thoi mang gen ngoại lai và genomic plasmid mang hầu như toàn bộ genome adenovirus. Các phương pháp này có hiệu suất không cao và đôi khi có thể bị nhiễm bởi virus bố mẹ.

Các phương pháp thay thế được triển khai nhằm vượt qua những hạn chế của các phương pháp truyền thống. Một trong những chiến lược mới dựa trên hiệu suất kết hợp tương đồng cao của bộ máy *E. coli* (BJ5183) để tạo Ad vector. Sự kết hợp tương đồng giữa plasmid đã được mở vòng hoặc nguyên vẹn chứa hầu như toàn bộ genome của adenovirus và plasmid con thoi mang cassette biểu hiện gen ngoại lai tạo clone thay đổi hoặc có đoạn gắn tại vùng mong muốn (hình 2). Chiến lược tương tự sử dụng sự kết hợp tương đồng trong nấm men đã được báo cáo [11]. Chiến lược này bao gồm kết hợp tương đồng giữa DNA adenovirus và chromosome nhân tạo của nấm men (YAC) mang các trình tự đầu cuối phía phải và phía trái của Ad genome, kết quả tạo ra một YAC mang một copy của Ad genome truyền nhiễm. Phương pháp kết hợp tương đồng trình tự trong tế bào động vật có hiệu suất thấp, vì vậy, để vượt qua vấn đề này phương pháp dựa trên hệ tái tổ hợp P1 Cre/LoxP của bacteriophage đã được đưa ra. Ad vector được tạo thành là kết quả tái tổ hợp đặc hiệu thông qua điểm Cre giữa hai plasmids sau khi chúng được đồng thời nhiễm vào dòng tế bào thích ứng biểu hiện Cre recombinase. Hiệu suất tạo vector sử dụng hệ dựa trên Cre/LoxP cao hơn 30 đến 100 lần so với các phương pháp truyền thống [6].

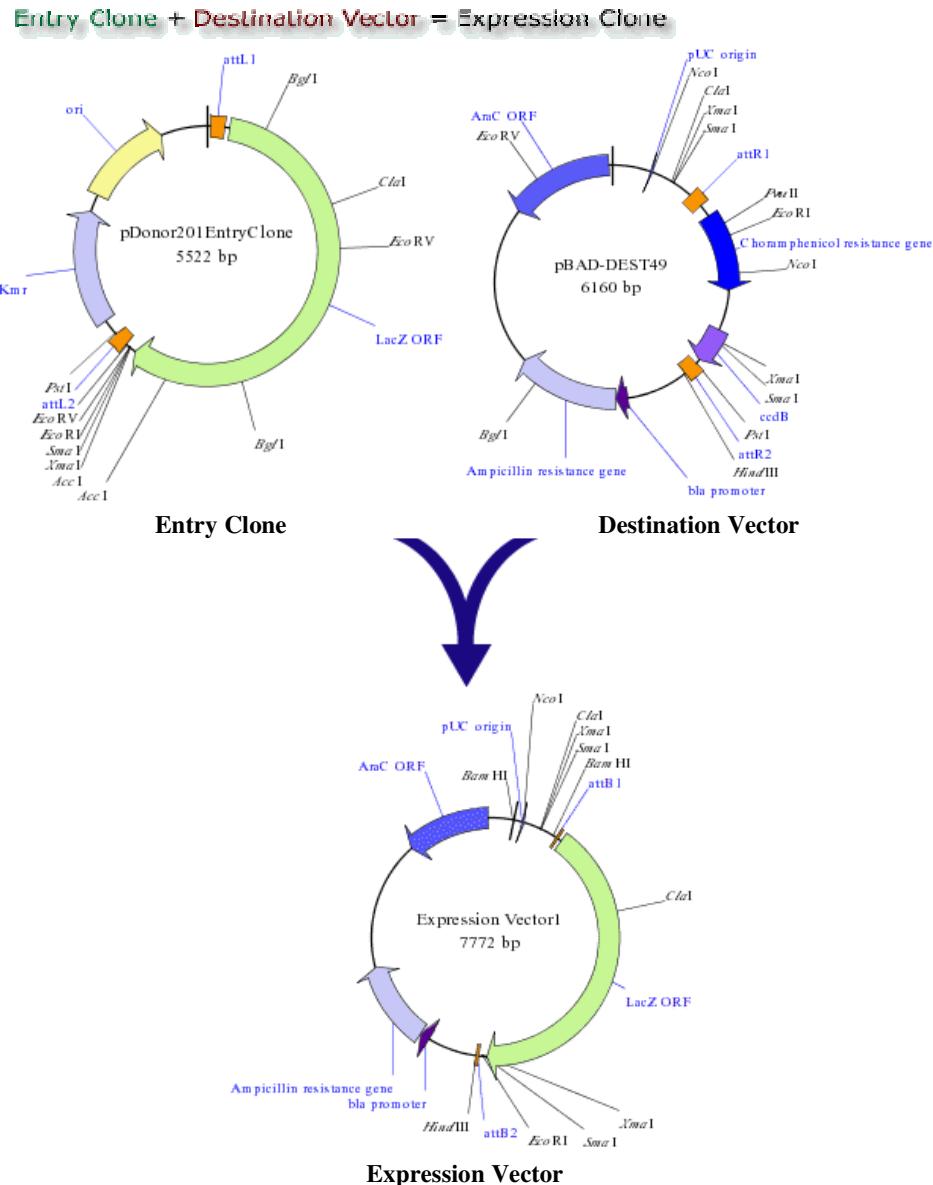
Một phương pháp đơn giản để tạo Ad5 vector cho phép tách dòng trực tiếp gen ngoại lai vào vùng E3 của Ad genome đã chứa CMV promotor upstream của 3 điểm cắt giới hạn. Bước đầu tiên thiết kế pAd5CMV/TCS, một plasmid mang Ad5 genome đã bị loại bỏ vùng E1 và mang CMV promotor ngược hướng (upstream) với điểm bộ ba tách dòng (TCS) gồm 3 điểm cắt giới hạn thay cho vùng E3. Để nhận được pAd5CMV/TCS, hai đoạn DNA bao quanh vùng E3 được PCR, sử dụng pTG3622 làm khuôn và các môi đặc hiệu, sau đó tạo dòng vào một đầu của CMVp trong pcDNA3 để nhận được pLeft/Right plasmid. Tiếp theo, các oligonucleotides mang TCS được gắn vào pLeft/Right đã được mở vòng để có pLeft/Right/TCS. CMVp và TCS của plasmid này được dùng để thay thế cho vùng E3 trong pTG3622, sử dụng tái tổ hợp tương đồng trong *E. coli* để nhận được pAd5CMV/TCS [12].

4. MỘT SỐ ỨNG DỤNG CỦA ADENOVIRUS VECTORS

Có rất nhiều ví dụ về việc sử dụng thành công Ad vector chuyển gen vào các mô hình động vật để chữa một số bệnh cho người như viêm, ung thư và các bệnh tự miễn. Ad vector cũng được sử dụng nhiều trong các pha khác nhau của các thử nghiệm lâm sàng [1].

Liệu pháp gen chữa ung thư: Trong lĩnh vực liệu pháp gen chữa ung thư, Ad vector được sử dụng rộng rãi trong thay thế đột biến và các phương pháp hóa trị liệu phân tử mà mục đích là tiết trừ tế bào bị chuyển đổi (transduced). Ad vector chuyển các gen khác nhau để chữa ung thư như gen ức chế khối u p53, và p16, antisense DNA, rybozyme và các kháng thể đơn chuỗi, gen tự chết herpes simplex virus thymidine kinase và cytosine deaminase. Sản phẩm liệu pháp gen thương mại đầu tiên dựa trên adenovirus serotype 5 của người được thiết kế để biểu hiện gen p53. Sản phẩm này của Gendicine (Trung Quốc) được phê chuẩn bởi State Food and Drug

Administration of China để chữa bệnh ung thư tế bào vảy cổ và đầu (head and neck squamous cell carcinoma) và đang được thử nghiệm lâm sàng giai đoạn cuối cho các loại u ác tính khác. Ở Châu Âu và Mỹ, Ad5 vector mang gen p53 trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng III cho ung thư buồng trứng và màng bụng, ung thư tế bào vảy cổ và đầu, ung thư phổi non-small cell không phẫu thuật được (unresectable), bằng cách chỉ dùng liệu pháp gen hoặc kết hợp với chiếu xạ. Nhưng kết quả của liệu pháp gen sử dụng Ad vector nhìn chung vẫn chưa được tốt. Người ta cũng quan tâm đến việc sử dụng Ad vector để sản xuất vaccines cho các bệnh truyền nhiễm và mắc phải như AIDS, virus Ebola, lao phổi và ung thư [7].



Hình 2. Minh họa bằng hình vẽ phản ứng LR trong Gateway® Cloning

Có nhiều phương pháp được sử dụng để ức chế hoặc loại bỏ khối u, phần lớn phụ thuộc vào loại và vị trí khối u. Các liệu pháp này có thể chia thành 3 nhóm: ức chế khối u; oncolytic và sensitizing drug therapy (thuốc làm cho khối u nhạy cảm và dung giải); và vaccines.

(i) **Ức chế khối u:** Có thể làm đột biến gen, ví dụ: đưa vector mang gen cần đột biến, có thể kết hợp với gen điều biến miễn dịch (interleukins) hoặc thuốc. Phương pháp này đã được sử dụng hiệu quả cho ung thư tuyến giáp (anaplastic thyroid cancer) [13], u thần kinh đệm ác tính ở người (human malignant gliomas) [14,15] và ung thư vú [16]. Chuyển trực tiếp các gen cytokines vào vật chủ mang khối u được chứng minh có hiệu quả để ức chế sự phát triển của khối u. Wang và đồng tác giả (2002) đã báo cáo việc chuyển đồng thời 2 gen cytokines, hoặc 1 gen cytokine với một tác nhân nhất định nào đó, như IL-2 hoặc thuốc hóa học, có thể cảm ứng miễn dịch kháng khối u của vật chủ [17].

(ii) **Oncolytic and sensitizing drug therapy:** Sử dụng trực tiếp adenovirus dạng đại để chữa khối u đã được thử sau khi virus được phát hiện vào những năm 50s, nhưng chỉ chứng minh được hiệu quả tại chỗ. Sau đó phát hiện ra rằng, adenovirus có đột biến có thể hoạt động như virus diệt khối u. Gần đây, nghiên cứu của Motoi và đồng tác giả (2000), sử dụng adenovirus biểu hiện IL-2 song song với việc loại bỏ gen E1B, cho thấy đã diệt hoàn toàn u tuyến tụy khuyết p53 trên mô hình chuột [18].

(iii) **Vaccines:** Chiến lược để có miễn dịch tế bào kháng khối u là sử dụng vector mang các gen điều biến miễn dịch và/ hoặc kháng nguyên đặc hiệu. Phương pháp này đã thu được nhiều kết quả khả quan. Ad vector đầu tiên được sử dụng trong nghiên cứu vaccine cho HIV, có tiềm năng tạo đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh nhanh chóng được chú ý. Khi nghiên cứu trên người, những thử nghiệm lâm sàng đầu tiên chứng minh Ad vaccine HIV tái tổ hợp không tái tạo (non-replicating), sử dụng đơn lẻ hoặc cùng với DNA, an toàn và tạo miễn dịch (immunogenic) [19]. Phần lớn vaccines sử dụng Ad vectors đều dùng HAd serotype 5 (HAd5) vì hệ biểu hiện này thường được sử dụng như tác nhân phân phối trong các thử nghiệm liệu pháp gen dựa trên vector virus. Một số thử nghiệm lâm sàng và tiền lâm sàng sử dụng hAd5 hiện đang được tiến hành. Một số thử nghiệm nổi bật gồm: (i) hAd5 vector vaccine chống virus Ebola (EV) cho động vật linh trưởng; (ii) một hAd5 vector vaccine biểu hiện gen HIV-1env của người cảm ứng miễn dịch bảo vệ chống HIV ở khỉ (rhesus monkeys) cũng như khỉ đầu chó (baboons), và trung hòa kháng thể ở khỉ; (iii) hAd5 vector biểu hiện kháng nguyên bảo vệ chống bệnh than (anthrax) và thể hiện hiệu quả bảo vệ kháng khi phơi nhiễm anthrax; và (iv) hAd5 vector biểu hiện protein virus corona SARS tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở rhesus macaques [20].

Liệu pháp gen cho các bệnh di truyền: Đã sử dụng adenovirus được thiết kế đặc biệt (sử dụng cationic lipids và calcium phosphate co-precipitates, chimeric adenovirus vector, giữ gen E4 trong vector) để chữa các bệnh như xơ nang (cystic fibrosis), các bệnh về phổi. Ngoài ra, adenovirus cũng được sử dụng trong loạn dưỡng cơ. Jooss và đồng tác giả (1998c) cho rằng adeno-associated virus (AAV) vectors có thể là phương tiện vận chuyển gen tốt hơn với các tế bào cơ, vì đáp ứng miễn dịch trong các tế bào này trung gian qua các tế bào dendric [21].

Liệu pháp hỗ trợ: Adenoviruses, với khả năng nhiễm tế bào sau phân bào có tơ (postmitotic) đồng thời với hiệu quả truyền tính trạng cao và khả năng gây bệnh thấp tại điểm tiêm chủng của hệ thần kinh trung ương, sẽ là những vector hiệu quả cho liệu pháp gen thần kinh. Có 2 chiến lược chính đã được kiểm tra để chuyển gen: tiêm vector trực tiếp vào não hoặc sử dụng liệu pháp gen *ex vivo*, nơi tế bào có thể thay đổi bằng cách nhiễm vector *in vitro* và sau đó được cấy vào vùng tương ứng của não. Đối với các bệnh của tuổi già như Parkinson's, Huntington's, đây sẽ là một phương pháp chữa bệnh hiệu quả. Adenovirus vectors rất hiệu quả trong việc làm sáng tỏ vai trò của cytokines và các bước của chúng trong quá trình tiến triển của

bệnh khớp. Trên mô hình chuột, đã sử dụng adenovirus vectors mang thụ thể TNF α và cytokine IL-1, cho thấy tác dụng hiệp trợ trực tiếp và gián tiếp để chữa bệnh khớp [22].

Các ứng dụng khác. Adenoviruses là những vectors hữu ích để sản xuất proteins cho những phân tích phân tử. Adenovirus vaccines đã được thử nghiệm kỹ càng về tính an toàn.

5. ADENOVIRUS VECTOR VÀ HỆ MIỄN DỊCH

Ad vectors được biết hoạt hóa cả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng. Đưa Ad vector vào, cơ thể tạo đáp ứng tiền viêm phụ thuộc liều bằng cách tiết ra các cytokines tiền viêm và chemokines, đó là TNF- α ; IL-1 β ; IL-6; IL-12; IFN- γ ; protein-10 cảm ứng bởi IFN- γ (IP-10); regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES); protein-2 tế bào đơn nhân hướng hóa (chemoattractant monocytes - MCP-2) và protein viêm macrophage alpha (MIP- α); MIP-1 β và MIP-2. Đáp ứng miễn dịch bẩm sinh do Ad vectors được trung gian qua con đường phụ thuộc TLR và không phụ thuộc TLR [6, 9].

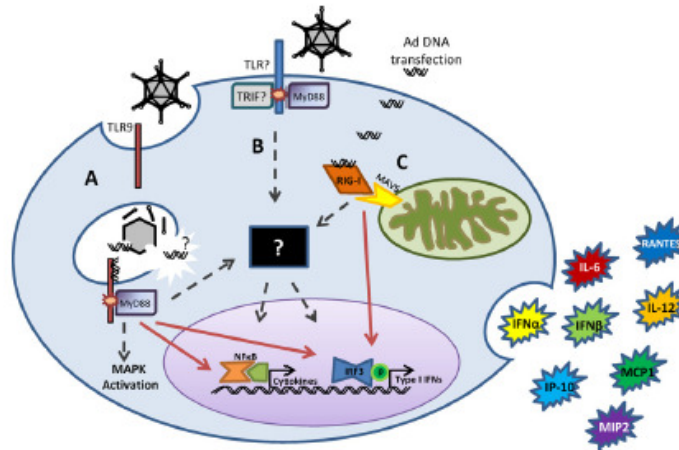
Cảm ứng đáp ứng miễn dịch bẩm sinh: Hệ miễn dịch bẩm sinh bảo thủ và có ở trong hầu hết các cơ thể đa bào. Nó là bước bảo vệ đầu tiên chống lại sự tấn công của nguồn bệnh thông qua việc nhận biết các cấu trúc bảo thủ của vi sinh vật như PAMPs bởi một loạt các thụ thể gọi là các thụ thể nhận biết mẫu.

Sự hoạt hóa hệ thống miễn dịch bẩm sinh được kích thích bởi các hạt virus và vì vậy, không phụ thuộc vào sự sao chép DNA virus. Miễn dịch bẩm sinh được hoạt hóa sau khi nhận biết các patterns phân tử trên Ad capsid bằng các thụ thể nhận biết pattern trên macrophages (mφ) và tế bào dendric (DC), dẫn đến hoạt hóa các con đường đa tín hiệu như mitogen-activated protein kinase (MAPK) và nuclear factor (NF)- κ B, làm tăng biểu hiện của một vài cytokines và chemokines [20]. Một số tác giả đã chỉ ra rằng, adenovirus gây đáp ứng miễn dịch bẩm sinh thông qua cảm ứng mức độ cao Interferons type I (IFNs) bởi cả hai loại tế bào plasmacytoid dendritic cells (pDCs) và non-pDCs như các tế bào DCs thông thường và macrophages. Ở miễn dịch bẩm sinh, các tế bào pDCs nhận biết adenovirus thông qua trung gian thụ thể Toll-like 9 (TLR9) và phụ thuộc vào MyD88, trong khi đó non-pDCs nhận biết được adenovirus không phụ thuộc vào TLR. Ngoài ra, IFNs type I có vai trò chủ chốt trong các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng đối với DNA adenovirus *in vivo*, và khi IFNs type I bị bao vây thì sự biểu hiện gen ngoại lai bền hơn và làm giảm viêm. Những nghiên cứu trước kia về đáp ứng miễn dịch bẩm sinh đến adenovirus chủ yếu tập trung vào sự tiết các cytokines tiền viêm và chemokines. Nghiên cứu này cho thấy, ngoài các cytokines tiền viêm và chemokines, adenovirus cũng cảm ứng mạnh Interferons type I [23].

Đáp ứng của các tế bào không miễn dịch(Non-Immune) đến sự nhiễm Adenovirus in vitro: Adenovirus nhiễm các tế bào “không miễn dịch” (tế bào biểu mô, và tế bào màng trong) thúc đẩy rất nhanh những thay đổi trong tế bào, với sự phosphoryl hóa p42/MAPK và ERK signaling, 10-20 phút sau khi nhiễm Adenovirus ở cả tế bào Hela và A549. Tương tự đối với tế bào REC (tế bào biểu mô thận chuột), p38 và ERK hoạt hóa 10 phút sau khi bị nhiễm. Những tín hiệu sớm này có quan hệ trực tiếp với sự biểu hiện chemokines tiếp đó, như các chất ức chế được lý của p38 và ERK, ức chế trực tiếp sự biểu hiện IP-10 do Ad kích ứng. Các gen khác được cảm ứng bởi nhiễm Ad gồm các phân tử bám bạch cầu (leukocyte adhesion) như ICAM-1 và VCAM-1. Ngoài ra, các loại tế bào không miễn dịch khác nhau đáp ứng lại sự nhiễm Ad bằng cách sản sinh ra các loại cytokines khác nhau, mặc dù sự tăng các nguồn cytokines thay đổi giữa các loại tế bào [2, 6].

Các tế bào miễn dịch đáp ứng nhiễm Ad in vitro: Ad hoạt hóa DCs của cả người và chuột, điều chỉnh lên (upregulate) IL-6 và IFNs type I. Hoạt hóa macrophages, cảm ứng tạo các cytokine như TNF- α , IL-6, MIP-2 và MIP-1 α .

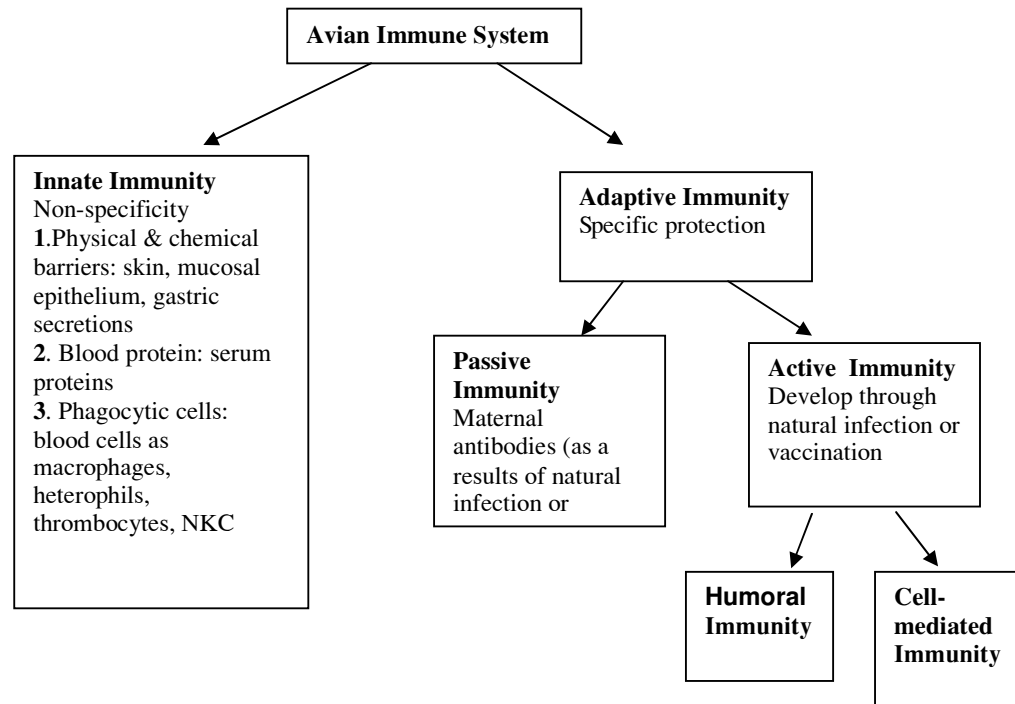
Tương tác của Adenovirus với thụ thể nhận biết protein (PRR) in vitro: Họ TLR là những thụ thể có vai trò chủ chốt trong việc nhận biết nguồn bệnh. Tiếp theo sự hoạt hóa TLR, một hệ thống phản ứng phức tạp được kích thích, tạo đáp ứng bảo vệ vật chủ bằng cách tăng lượng cytokines và chemokines, với dòng tế bào miễn dịch chuyên nghiệp để cố gắng loại bỏ nguồn bệnh.



Hình 3. Các cảm biến (sensors) gắn màng và trong tế bào của TLRs adenovirus là các thụ thể nhận biết mẫu (pattern) gắn màng (PRRs), chúng nhận biết các cấu trúc phân tử bảo thủ như pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) tìm thấy trên nguồn bệnh. (A) dựa trên loại tế bào, Ad gây các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh qua các con đường phụ thuộc TLR9 và MyD88. Ad cảm ứng kích thích các con đường đó tạo ra sự hoạt hóa nhanh chóng của hơn 30 nhân tố sao chép gồm NF- κ B và IRF3, cũng như giải phóng nhiều cytokines và chemokines. (B) Loại bỏ MyD88 hoặc TLR9 không ức chế hoàn toàn các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh này, các TLR proteins khác, hoặc adaptors như TRIF, tồn tại và nó kích thích miễn dịch bẩm sinh không phụ thuộc MyD88 và/hoặc TLR9. (C) sensors trong tế bào của dsDNA như RIG-I cũng giống như PRRs liên quan đến tín hiệu bẩm sinh cảm ứng bởi Ad trong các loại tế bào khác nhau [24]

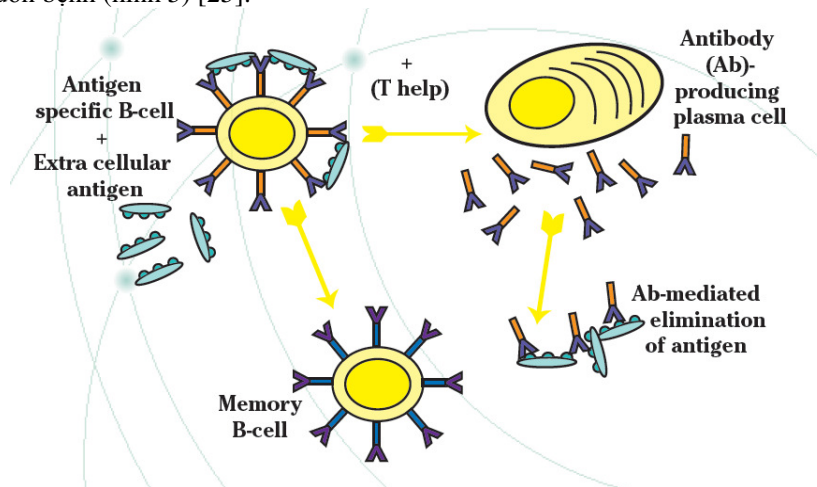
6. HỆ MIỄN DỊCH CỦA GIA CẦM

Để hiểu được quá trình phát sinh bệnh và chủng ngừa, cần phải hiểu những vấn đề cơ bản của hệ MD gia cầm. Hệ MD gia cầm có một vài cách bảo vệ để ngăn cản nguồn bệnh đi vào và nhiễm bệnh (hình 4).



Hình 4. Giản đồ hệ miễn dịch của gia cầm

MD dịch thể: kháng thể là đơn vị chức năng của MD dịch thể. Chúng được các tế bào plasma, một loại B lymphocyte. Khi chúng ở trên bề mặt tế bào B, những phân tử này là immunoglobulins, sau khi tiết ra chúng được gọi là kháng thể. Chúng phản ứng với protein trên bề mặt vi khuẩn, ký sinh hay virus, gắn với những phân tử đặc trưng của nguồn bệnh. Ba loại immunoglobulins được tìm thấy trong hệ MD của gia cầm IgM, IgY (IgG) và IgA. Khi một kháng thể tương tác với kháng nguyên, chúng hoạt hóa hoặc tăng cơ chế phản ứng kích thích để loại bỏ nguồn bệnh (hình 5) [25].



Hình 5. Đáp ứng MD dịch thể đến một kháng nguyên ngoại bào

MD trung gian tế bào: phá hủy các tế bào bị nhiễm hoặc đi vào trong tế bào để loại bỏ kháng nguyên (cho các kháng nguyên hoặc nguồn bệnh nội bào). Ví dụ tác động bởi đáp ứng trung gian tế bào gồm hoạt hóa macrophages, tiêu bào bởi T lymphocytes cytotoxic và NKC (natural killer cells), tất cả được trung gian qua cytokines do các tế bào T helper hoặc các tế bào khác giải phóng ra. Cytokines là các sứ giả (messenger) hóa học phối hợp sự tương tác giữa các tế bào MD như một trong những chức năng rộng của chúng. Cytokines là những chất kích thích quyết định sự bắt đầu và duy trì đáp ứng MD và tự chúng giữ vai trò như một phân tử phản ứng kích thích tác động đến duration và cường độ đáp ứng. B lymphocytes có nguồn gốc trong các nang lymphoid của bursa. Trong các nang bursa, các tiền tế bào trải qua quá trình chuyển đổi gen, tạo ra rất nhiều tế bào con và mỗi tế bào có khả năng nhận biết kháng nguyên riêng biệt. Tế bào sau đó chín, tăng sinh và biệt hóa tạo thành hoặc tế bào huyết tương (plasma) hoặc tế bào nhớ. Hai loại tế bào này sẽ sản xuất kháng thể để dính kết hoặc trung hòa kháng nguyên và là cơ sở bảo vệ từ mẹ [26].

6. VACCINES CÚM GIA CẦM DỰA TRÊN ADENOVIRUS VECTOR

Một vaccine cúm gia cầm phải đáp ứng không chỉ những đòi hỏi thông thường của các sản phẩm vaccine (cầm ứng miễn dịch bảo vệ, giá thành thấp, an toàn trong chuỗi thức ăn và có thể phân phối rộng khắp...), mà còn phải tuân theo chiến lược DIVA (phân biệt giữa động vật bị nhiễm bệnh và động vật được tiêm chủng) và quy tắc an toàn sinh học tăng cường cả tại các trung tâm sản xuất vaccine cũng như ngoài thực địa. Trong chăn nuôi gia cầm hiện có rất nhiều vaccines có khả năng cầm ứng miễn dịch bảo vệ trong gà. Vaccine cúm gia cầm sống sử dụng các chủng virus không độc hoặc nhược độc nhưng có nguy cơ tạo các viruses cúm tái sắp xếp (reassortant) khi gia cầm đồng thời bị nhiễm bởi chủng virus vaccine và một loại virus cúm khác. Vaccine tái tổ hợp được sản xuất gần đây có lợi thế can thiệp miễn dịch đặc hiệu cao dựa trên các kháng nguyên xác định. Nhưng hiện tượng bảo vệ chéo trong các subtypes giữa các loại virus cúm gia cầm với các kháng nguyên khác nhau có thể xảy ra ở gia cầm. Ngoài ra, vaccine tái tổ hợp sống có nguy cơ trở lại trạng thái ban đầu và phân tán chủng được thay đổi di truyền cả trong các loài được sử dụng vaccine và không sử dụng vaccine trong môi trường [27].

Việc sử dụng adenovirus tái tổ hợp như vaccine thú y có rất nhiều lợi thế: chúng có thể nhiễm nhiều loại tế bào; sự nhiễm adenovirus thường gấp và thường không có những triệu chứng lâm sàng nặng; có thể sử dụng qua đường miệng; genome của adenovirus đã được nghiên cứu tỉ mỉ; có thể gắn tới 36 kb vật liệu di truyền ngoại lai vào; genome của chúng ít khi gắn vào chromosome của vật chủ; các kỹ thuật thiết kế adenovirus vector tái tổ hợp đã được thiết lập rất tốt; và chúng có khả năng tái tạo với chuẩn độ cao (titre) trong các dòng tế bào bỏ thể [28]. Ngoài đặc tính nhiễm nhiều loại tế bào, DNA virus duy trì chủ yếu như một episome vài tuần hoặc vài tháng trong tế bào và gen ngoại lai được biểu hiện trong thời gian đó và như vậy có thể có được đáp ứng miễn dịch lâu dài. Ngoài ra, mặc dù Ad5 có nguồn gốc từ người, virus này có thể đưa gen ngoại lai đến đích trong nhiều loài động vật khác [29].

Vaccines cúm dựa trên Ad vector có một số lợi thế so với vaccines cúm sản xuất trong trứng. Vaccines dựa trên Ad vector không đắt, sản xuất lượng lớn trong các dòng tế bào xác định dễ hơn, và không đòi hỏi những thiết bị an toàn sinh học cao cấp.

Vector tái tổ hợp dựa trên adenovirus serotype 5 của người đã được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau như chuyển gen *in vitro*, tiêm chủng *in vivo* và liệu pháp gen. Gao và đồng tác giả (2006) báo cáo gà có thể được bảo vệ khi phơi nhiễm cúm gia cầm H5N1 sau khi được tiêm dưới da hAd5 vector mã hóa H5 HA gia cầm [30]. Thí nghiệm của một số tác giả chứng minh

hAd vector truyền tính trạng hiệu quả cho các tế bào gia cầm *in vivo*, và gen biến nạp hemagglutinin (HA) virus cúm gia cầm biểu hiện thành công, và đáp ứng kháng thể kháng HA được thể hiện trong gà [27].

Những vaccines cúm gia cầm hiện được cấp phép cần tiêm bụng là các vaccine chết hoặc dưới da hoặc rạch da là vaccine tái tổ hợp fowlpox. Nhưng tất cả những kỹ thuật tiêm chủng này cần nhiều nhân lực và khó thực hiện trong thời gian dịch bệnh xảy ra. Vaccine cúm gia cầm sử dụng Ad vector không sao chép có thể được sản xuất qui mô lớn trong dòng tế bào PER.C6 trong các bioreactors. Vaccine này tuân thủ chiến lược phân biệt giữa gia cầm nhiễm bệnh và gia cầm tiêm chủng bởi vector chỉ mã hóa HA virus. Ngoài ra, vaccine này không tái sắp xếp với các viruses đại đang lưu hành; không sinh sản, ngay cả trong tế bào người, khi không có sự biểu hiện của gen Ad E1 [31, 32].

Nghiên cứu của Singh và đồng tác giả (2010) đã xác định được đáp ứng của tế bào lympho CD8+ T của chim đến virus cúm gia cầm (AIV) sau khi ủ vector Ad5 không sao chép biểu hiện AIV HA hoặc NP virus cúm. Kết quả chứng minh rằng các tế bào lympho T cảm ứng bởi vector biểu hiện hoặc HA hoặc NP đặc hiệu cho cả AIV H5N9 và chủng H7N2. Nghiên cứu này cho thấy hAd vector vaccine biểu hiện HA có khả năng cảm ứng cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch trung gian tế bào chống lại AIV HA cho gà. Đáp ứng tế bào lympho CD8+ cảm ứng bởi Ad5 vector có khả năng phản ứng chéo hiệu quả với các chủng AIV khác loại. Ngoài ra, chủng ngừa nhắc lại cho gà với Ad vector biểu hiện HA kích thích đáp ứng tế bào lympho CD8+ ở gà [33].

Một số tác giả chỉ ra rằng Ad5 có thể truyền nhiễm thành công các tế bào phôi gà và gà 6 tuần tuổi có đáp ứng kháng thể cao với protein lạ sau khi được tiêm cơ một lần. Kháng thể ở gà 1 ngày tuổi được tiêm tồn tại ít nhất 56 ngày [29].

Ảnh hưởng của đáp ứng miễn dịch từ gà mẹ truyền sang con với vaccine adenovirus cũng đã được nghiên cứu. Gà được tiêm vaccine dựa trên Ad vector biểu hiện AIV H5 HA gen từ chủng virus A/turkey/WI/68 (AdTW68.H5ck). Nhóm gà nhận vaccine liều cao ($\geq 10^8$ ifu (infectious units)/con, có gần 90% gà được bảo vệ. Ngay cả những con gà mà mức độ kháng thể không phát hiện được cũng được bảo vệ hiệu quả khi phơi nhiễm AIV độc lực cao. Kết quả này khẳng định Ad vector gây ra đáp ứng tế bào lympho T. Đánh giá sự tồn tại của kháng thể cho thấy lượng kháng thể ở những gà được tiêm chủng *in ovo* tiếp tục tăng đến 12 tuần và bắt đầu giảm sau 18 tuần tuổi. Tiêm cơ nhắc lại với cùng loại vaccine cho gà ở 16 tuần tuổi làm tăng đáng kể đáp ứng kháng thể trong gà mái đẻ, và những đáp ứng này giữ ở mức cao trong suốt quá trình thí nghiệm (34 tuần tuổi). Gà mái đẻ được tiêm chủng với AdTW68.H5ck chuyển hiệu quả kháng thể đơn dòng cho các gà con. Lượng kháng thể đơn dòng trong gà con phù hợp với lượng được phát hiện trong gà mẹ. Kháng thể của gà mẹ giảm với thời gian trong gà con và đạt mức thấp nhất ở 34 ngày tuổi. Gà có mức kháng thể mẹ cao được tiêm vaccine *in ovo* hoặc qua đường mắt không có sự thay đổi huyết thanh. Ngược lại, gà không có kháng thể đơn dòng sinh lượng kháng thể đặc hiệu cao sau khi được tiêm chủng *in ovo* hoặc qua niêm mạc. Kết quả này chỉ ra rằng lượng kháng thể đơn dòng cao gây trở ngại cho tiêm chủng Ad vector [34, 35].

Thí nghiệm ở chuột của Steffensen và đồng tác giả (2012) cũng cho thấy hiệu ứng ức chế đáp ứng tế bào CD8 T đến gen ngoại lai khi chuột đã có miễn dịch đối với Ad5 vector. Phần lớn các công bố đều chỉ ra rằng, kháng thể là trung gian quan trọng của quá trình ức chế ở chuột có miễn dịch từ trước và các tế bào T cũng có liên quan. Nhưng kháng thể có trước không giải thích được tất cả. Ở chuột bị khuyết tế bào B, sau 2 hoặc 3 lần tiêm chủng bằng Ad5, lượng tế bào CD8 T đặc hiệu Ad5 tăng đáng kể, hiện tượng không thấy ở chuột dạng dại (wt). Ngoài ra, chuột có lượng tế bào CD8 T đặc hiệu Ad5 tăng sau 3 lần tiêm chủng bằng Ad5 có lượng tế bào CD8 T đặc hiệu GP33 thấp hơn hẳn so với chuột chỉ được tiêm chủng 1 lần. Vì kháng thể có thể được

loại bỏ là nguyên nhân ức chế miễn dịch ở những con chuột này, kết quả ủng hộ ý kiến cho là các tế bào T cũng đóng góp vào tác dụng ức chế của các con chuột đã phơi nhiễm Ad, ít nhất trong bối cảnh khi kháng thể không đủ để trung hòa virus [36].

8. KẾT LUẬN

Adenovirus vector là một phương tiện thay thế triển vọng trong liệu pháp gen do chúng có khả năng nhiễm nhiều loại tế bào đang phân chia và tế bào không phân chia. Các thể hệ adenovirus vectors cũ gây ra các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng và các thể hệ vectors mới ngoài ra còn thể hiện sự an toàn cao hơn và khả năng biểu hiện gen ngoại lai lâu hơn. Mặc dù Ad5 vector có nguồn gốc từ động vật, nhưng nó có khả năng chuyển gen ngoại lai vào các tế bào gia cầm và có thể được sử dụng như một virus vector cho gia cầm để phát triển vaccine thể hệ mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Huibi, David R. Koehler, Jim Hu - Adenoviral Vectors for Gene Replacement Therapy, *Viral Immun.* **17** (3) (2004) 327-333.
2. Hartman Zachary C., Daniel M. - Appledorn, Andrea Amalfitano. Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications, *Virus Research* **132** (2008) 1-14.
3. Holst Peter Johannes, Cathrine Ørskov, Allan Randrup Thomsen, Jan Pravsgaard Christensen -Quality of the transgen-specific CD8⁺ T cell Response Induced by Adenoviral Vector Immunization Is Critically Influenced by Virus Dose and Route of Vaccination, *J Immunol*; Prepublished online; (2010) doi:10.4049/jimmunol.0900537
<http://www.jimmunol.org/content/early/2010/03/08/jimmunol>.
4. Howarth Joanna L., Youn Bok Lee, James B. Uney - Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells), *Cell Biol Toxicol* **26** (2010) 1-20.
5. Russell W. C. - Update on adenovirus and its vectors, *J. general virol.* **81** (2000) 2573-2604.
6. Vemula Sai V. & Suresh K. Mittal - Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines, *Expert Opin. Biol. Ther.* **10** (10) (2010) 1469-1487.
7. Douglas Joanne T. - Adenoviral vectors for gene therapy, *Mol Biotechnol.* **36** (2007) 71-80.
8. Rauschhuber Christina Theresa - Analysis of Adenovirus-Host Interactions to Improve Recombinant Adenoviral Vectors for Gene Therapy, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München (2011).
9. McConnell M.J., Imperiale M.J. -Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy, *Human gene therapy* **15** (2004) 1022-1033.
10. Lei N., Shen F. B., Chang J. H., Wang L., Li H., Yang C., Li J., Yu D. C. - An oncolytic adenovirus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor shows

- improved specificity and efficacy for treating human solid tumors, *Cancer Gene Therapy*, (2008) 1-11.
11. Ketner G., Spencer F., Tugendreich S., et al. - Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone, *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (1994) 6186-6190.
 12. Mailly Laurent, Charlotte Boulade-Ladame, Georges Orfanoudakis, François Deryckere - A novel adenovirus vector for easy cloning in the E3 region downstream of the CMV promoter, *Virology Journal* **5** (2008) 73.
 13. Blagosklonny M. V., Giannakakou P., Wojtowicz M., Romanova L. Y., Ain K. B., Bates S.E. & Fojo T. - Effects of p53-expressing adenovirus on the chemosensitivity and differentiation of anaplastic thyroid cancer cells, *Journal of Endocrine Metabolism* **83** (1998) 2516-2522.
 14. Cirielli C., Inyaku K., Capogrossi M. C., Yuan X., and Williams J. A. - Adenovirus-mediated wild-type p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of experimental intracranial human malignant glioma, *Journal of Neurooncology* **43** (1999) 99-108.
 15. Li H., Alonso-Vanegas M., Colicos M. A., Jung S. S., Lochmuller H., Sadikot A. F., Snipes G. J., Seth P., Karpati G., and Nalbantoglu J. - Intracerebral adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for experimental human glioma, *Clinical Cancer Research* **5** (1999a) 637-642.
 16. Putzer B. M., Bramson J. L., Addison C.L., Hitt M., Siegel P. M., Muller W. J., and Graham F. L. - Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer, *Human Gene Therapy* **9** (1998) 707-718.
 17. Wang L., Xiaosheng Qi, Yinghao Sun, Li Liang, and Dianwen Ju. - Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity, *Cancer Gene Therapy* **9** (2002) 819-824.
 18. Motoi F., Sunamura M., Ding L., Duda D.G., Yoshida Y., Zhang W., Matsuno S., and Hamada H. - Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus, *Human Gene Therapy* **11** (2000) 223-235.
 19. Takahashi Marie-Noelle, Judith A. Rolling, Katherine E. - Owen Characterization of transgene expression in adenoviral vector-based HIV-1 vaccine candidates, *Virology J.* **7** (2010) 39 <http://www.virologyj.com/content/7/1/39>.
 20. Bangari Dinesh S., Suresh K. Mittal - Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors, *Vaccine* **24** (7) (2006) 849-862.
 21. Jooss K., Chirmule N. - Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy, *Gene Therapy* **10** (2003) 955-963.
 22. Ghivizzani S. C., Lechman E. R., Kang R., Tio C., Kolls J., Evans C. H., and Robbins P. D. - Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritic effects, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95** (1998) 4613-4618.

23. Zhu Jiangao, Xiaopei Huang, Yiping Yang - Innate Immune Response to Adenoviral Vectors Is Mediated by both Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways, *J. Virology* **81** (7) (2007) 3170–3180.
24. Zachary C. Hartman, Daniel M. Appledorn, Andrea Amalfitano - Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications, *Virus Research* **132** (2008) 1-14.
25. Scott T. R. - Our Current Understanding of Humoral Immunity of Poultry, *Poultry Sci.* **83** (2004) 574–579.
26. Kaiser P. - The avian immune genome- a galss half-full or half-empty?, *Cytogenet Genome Res.* **117** (2007) 221-230.
27. Toro H., Tang D. C. - Protection of chickens against avian influenza with nonreplicating adenovirus-vectored vaccine, *Poultry Science* **88** (2009) 867–871.
28. Ferreira T. B., Alve P. M., Aunins J.G., Carrondo M. J. T. - Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines, *Gene Therapy* **12** (2005)S73–S83.
29. Adam Micheline, Wahiba Oualikene, Hervé Le Cocq, Michèle Guittet, Marc Eloit Replication-defective adenovirus type 5 as an *in vitro* and *in vivo* gene transfer vector in chickens, *Journal of General Virology* **76** (1995) 3153-315.
30. Gao W., Adam C. Soloff, Xiuhua Lu, Angela Montecalvo, Doan C. Nguyen, Yumi Matsuoka, Paul D. Robbins, David E. Swayne, Ruben O. Donis, Jacqueline M. Katz, Simon M. Barratt-Boyes, Andrea Gambotto - Protection of Mice and Poultry from Lethal H5N1 Avian Influenza Virus through Adenovirus-Based Immunization, *J. Virology* **80** (4) (2006)1959-1964.
31. Toro Haroldo, Frederik W. van Ginkel, De-chu C. Tang, Bettina Schemera, Soren Rodning, Joseph Newton - Avian Influenza Vaccination in Chickens and Pigs with Replication-Competent Adenovirus–Free Human Recombinant Adenovirus 5, *Avian Dis* **54** (2010) (1 Suppl): 224–231.
32. Toro H., David L. Suarez, De-chu C. Tang, Frederik W. van Ginkel, Cassandra Breedlove - Avian Influenza Mucosal Vaccination in Chickens with Replication-Defective Recombinant Adenovirus Vaccine, *Avian Diseases* **55** (1) (2011) 43-47.
33. Singh Shailbala, Haroldo Toro, De-Chu Tang, Worthie E. Briles, Linda M. Yates, Renee T. Kopulos, Ellen W. Collisson - Non-replicating adenovirus vectors expressing avian influenza virus hemagglutinin and nucleocapsid proteins induce chicken specific effector, memory and effector memory CD8+ T lymphocytes, *Virology* **405** (1) (2010) 62–69. doi:10.1016/j.virol.2010.05.002.
34. Mesonero Alexander, David L. Suarez, Edzard van Santen,De-chu C. Tang, Haroldo Toro - Avian Influenza In Ovo Vaccination with Replication Defective Recombinant Adenovirus in Chickens: Vaccine Potency, Antibody Persistence, and Maternal Antibody Transfer, *Avian diseases* **55** (2011) 285-292.
35. Pandey Aseem, Neetu Singh, Sai V. Vemula, Laurent Coue" til, Jacqueline M. Katz, Ruben Donis, Suryaprakash Sambhara, Suresh K. Mittal - Impact of Preexisting Adenovirus Vector Immunity on Immunogenicity and Protection Conferred with an Adenovirus-Based H5N1 Influenza Vaccine, *PLoS ONE* **7(3)** (2012)e33428.
36. Steffensen Maria Abildgaard, Benjamin Anderschou Holbech Jensen, Peter Johannes Holst, Maria Rosaria Bassi, Jan Pravsgaard Christensen, Allan Randrup Thomsen - Pre-

Existing Vector Immunity Does Not Prevent Replication Deficient Adenovirus from Inducing Efficient CD8 T-Cell Memory and Recall Responses, PLoS ONE 7 (4) (2012) e34884. doi:10.1371/journal.pone.0034884.

ABSTRACT

ADENOVIRUS VECTOR TECHNOLOGY AND POTENTIAL APPLICATION IN TRIGGER OF POULTRY'S IMMUNITY

Pham Viet Cuong*, Nguyen Thi Kim Cuc

Institute of Marine Biochemistry, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

*Email: cuongwg@yahoo.com

Recombinant adenoviruses are versatile tools for gene delivery and expression. Adenovirus vectors were tested as vaccine vehicles in some pre-clinical and clinical studies for infectious diseases such as measles, hepatitis B, rabies, anthrax, Ebola, SARS, HIV-1, malaria, tuberculosis and influenza. With development of genetic engineering techniques, first-, second- and third-adenovirus vector generations have been developed, meeting strict demands of an expression vector. There are numerous examples of successful using adenovirus vectors in human and animal gene therapy. Adenovirus vectors can be used in (i) gene therapy in cancer treatment as such delivery of tumour inhibition gene p53 and p56, antisense DNA, rybozyme and single chain antibody, apoptosis gene, herpes simplex virus thymidine kinase and cytosine deaminase; (ii) gene therapy for genetic diseases. In this case, adenovirus vectors specially constructed for treatment of cystic fibrosis, lung diseases; (iii) Supplementary therapy; and (iv) other applications as for the production of a number of proteins for more-detailed molecular analysis. Adenovirus vector has been known to induce both innate and adaptive immune responses. The activation of innate immune system was stimulated by virus particles so is independent of virus DNA reproduction. Adenovirus affect immune and non-immune cells including epithelium and endothelial cells, promoting series of cell signals and thus reinforcing host immune system. Vector - based on human Adenovirus type 5 have been investigated for poultry vaccine production. The scientific reports document protective immunity against avian influenza (AI) virus has been elicited in chickens by single dose *in ovo* or i.m. vaccination with a replication-competent adenovirus (Ad)-free human Ad vector vaccine containing specific antigens of AI.

Keywords: adenovirus, gene therapy, immune, influenza vaccine, vector.