

腺相关病毒包装条件优化及重组 AAV8/hFVIII 基因治疗血友病 A 小鼠的实验研究

毛建华¹ 沈艳^{2,3} 王婧¹ 王韵¹ 阮铮¹ 奚晓东¹

¹医学基因组学国家重点实验室,上海血液学研究所,上海交通大学医学院附属瑞金医院 200025;²上海交通大学医学院附属瑞金医院实验医学研究中心 200025;³南京农业大学动物医学院 210095

通信作者:奚晓东,Email:xixiaodong@shsmu.edu.cn

【摘要】 目的 评价携带人凝血因子FVIII(hFVIII)的重组腺相关病毒(AAV)血清型8(AAV8/hFVIII)病毒治疗血友病A(HA)小鼠效果。方法 应用pAAV-CB-EGFP, pH22(AAV2血清型)和pfΔ6(腺病毒辅助质粒)摸索在HEK-293细胞中AAV的包装条件,pH22、pfΔ6及pAAV-CB-EGFP质粒按照1:1:1的比例进行转染,免疫荧光显微镜观察四个条件(包括10 cm培养皿转10 μg质粒,20 cm培养皿分别转20、30和40 μg质粒)的病毒包装效果。应用最佳包装条件在HEK-293细胞中包装AAV2-EGFP,通过冻融法获得AAV2粗提液,感染HEK-293细胞和16095细胞,应用荧光显微镜观察包装效果。应用最佳转染条件将pAAV-TTR-hFVIII、pH28、pfΔ6按1:1:1的比例转染HEK-293细胞获得AAV8/hFVIII,两轮的氯化铯梯度离心法纯化病毒,以 8×10^{12} vg/kg剂量经尾静脉注射HA小鼠进行基因治疗,活化部分凝血活酶时间(APTT)测定分析FVIII的活性。结果 20 cm培养皿转染20 μg质粒的条件能够在24、48和72 h都达到最佳的转染效果,且该条件包装的AAV2粗提液在16095细胞中具有较高的感染率。HA小鼠体内AAV8/hFVIII能够在注射后12周仍有维持在治疗水平的FVIII活性。结论 利用优化包装条件制备的AAV8/hFVIII能够在HA小鼠体内有效维持治疗水平的FVIII活性达12周。

【关键词】 腺相关病毒; 人凝血因子FVIII; 血友病A; 基因治疗

基金项目: 国家自然科学基金(81970112、81670127、81101721);上海市浦江人才计划(16PJ1406100);上海市卫生健康委员会面上项目(201940342);中国诺和诺德血友病基金

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.01.007

Optimized AAV package and experimental application of recombinant AAV8/hFVIII for gene therapy on hemophilia A mice

Mao Jianhua¹, Shen Yan^{2,3}, Wang Qiang¹, Wang Yun¹, Ruan Zheng¹, Xi Xiaodong¹

¹ State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ² Center of experimental medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ³ Department of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Corresponding author: Xi Xiaodong, Email: xixiaodong@shsmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of adeno-associated virus (AAV) carrying hFVIII by serotype 8 (AAV8/hFVIII) on hemophilia A (HA) mice by gene therapy strategy. **Methods** pAAV-CB-EGFP, pH22 (serotype 2) and pfΔ6 (adenovirus helper) were used to package AAV into HEK-293 cells in different conditions (ratios of cells to plasmids). The efficiency of transfection and infection were evaluated using immunofluorescence microscope to seek an optimized package condition. pAAV-TTR-hFVIII, pH 28 (serotype 8) and pfΔ6 were applied to package AAV8/hFVIII in HEK-293 cells using the optimized package condition. The purified AAV8/hFVIII were intravenously injected into HA mice and the effects of gene therapy were estimated. **Results** The efficiency of package was evaluated according to the amount and intensity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) under immunofluorescence microscope. Four package conditions including 10 cm-dish to transfect 10 μg plasmids, 20 cm-dish to 20 μg, 30 μg and 40 μg plasmids were employed, and the condition of 20 cm-dish to transfect 20 μg plasmids reached the highest transfection efficiency at 24 h, 48 h and 72 h after transfection. The small scale AAV-EGFP was packaged

using the optimized condition and an AAV crude extract was harvested by a freeze-thaw method. HEK-293 and 16095 cells were infected by the AAV crude extract, and the preferential infection efficiency was recognized in 16095 cells under immunofluorescence microscope. Then, AAV8/hF VIII was packaged and purified based on the optimized transfection condition, and the high purity of AAV8/hF VIII was detected by Western blot. Fractions of AAV8/hF VIII at the dose of 8×10^{12} vg/kg were injected into HA mice through tail vein, an eye-bleeding was performed at every two weeks, and the activity of F VIII was measured by aPTT assay. Results showed that the activity of F VIII maintained at the therapeutic level and lasted up to 12 weeks after injection. **Conclusion** The purified AAV8/hF VIII based on the optimized package condition could play a role in HA mice gene therapy, and the long-term therapeutic effects of AAV8/hF VIII were observed in vivo.

【Key words】 Adeno-associated virus; Factor VIII; Hemophilia A; Gene therapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81970112, 81670127, 81101721); the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (16PJ1406100); Shanghai Health Commission in China(201940342); Novo Nordisk Hemophilia Research Fund in China

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.01.007

血友病 A(HA)是一种由凝血因子 VIII(F VIII)基因缺陷导致的出血性疾病,为 X 染色体连锁的隐性遗传性疾病^[1-2]。临床上 HA 的治疗以反复输注浓缩 F VIII 或重组 F VIII 替代治疗为主,而替代治疗需要长期反复输注,不仅给患者的治疗带来不便,而且还有感染血源性传染病(肝炎、获得性免疫缺陷综合征等)的风险^[3-5]。基因治疗能够实现 1 次注射维持较长时间的基因表达^[6],减少注射次数和感染风险。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体安全性较好,可感染非分裂细胞,根据血清型的不同,AAV 可以感染不同靶器官^[7]。近年来,国外基因治疗血友病 B(HB)^[8-9]和 HA^[10]的实验研究主要以 AAV 介导的 F IX 和 F VIII 为主,其安全性和有效性得到了证实。AAV8 主要感染肝细胞,而 F VIII 主要在肝脏的内皮细胞表达和分泌^[11],因此,本研究我们采用 AAV8 血清型携带重组人 F VIII(hF VIII)进行实验。

为了提高 AAV8/hF VIII 的包装效率,我们首先应用 pAAV-CB-EGFP 优化了 AAV 的包装条件,选择最佳条件包装、纯化获得 AAV8/hF VIII,通过尾静脉注射 HA 小鼠,检测小鼠血浆 hF VIII 活性,为临床应用 AAV 载体治疗 HA 提供实验研究数据。

材料与amp;方法

1. 实验材料、动物及仪器:质粒 pAAV-CB-EGFP, pH22(AAV 血清型 2)、pfΔ6(腺病毒辅助质粒)、pAAV-TTR-hF VIII, pH28(AAV 血清型 8)由美国天普大学肖卫东教授赠予。人胚肾细胞 HEK-293 细胞和人成纤维细胞 16095 细胞购自美国 ATCC 细胞库。DMEM 培养基、PBS、胰酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自澳大利亚 Moregate 公司;乏 F VIII 血浆、活化部分凝血活酶时间(APTT)

检测试剂、检测杯、钢珠购自法国 Stago 公司;DNA 抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自美国 Epizyme 公司;抗-AAV(VP1/VP2/VP3)小鼠单克隆抗体购自美国 Research Products 公司。

小鼠 F VIII 基因第 16~19 号外显子靶向剔除小鼠(HA 小鼠)^[12]从上海南方模式动物中心引进,遗传背景为 S129,在上海交通大学医学院附属瑞金医院实验动物中心(SPF 级饲养环境)饲养和繁殖。取 7 只 6~8 周龄小鼠(雌鼠 3 只,雄鼠 4 只)进行实验研究。小鼠的使用经上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会批准,严格按照相关实验动物管理条例进行。

荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,半自动 APTT 检测仪购自法国 Stago 公司,Western blot 显影仪 ImageQuant LAS-4000 购自日本富士胶片株式会社,Western blot 基础电泳仪、电泳槽、转膜槽等购自美国 Bio-Rad 公司,水平摇床购自杭州奥盛仪器有限公司,细胞培养箱购自德国 Thermo 公司,生物安全柜购自新加坡 ESCO 公司。

2. AAV2-EGFP 病毒包装条件摸索:质粒抽提按照 Qiagen 质粒抽提试剂盒提供的说明书进行。HEK-293 细胞接种于 10 cm 和 20 cm 培养皿中培养过夜,待细胞处于对数生长期,融合度达到 70% 左右时开始进行细胞转染。采用标准的三质粒转染系统进行病毒包装,pH22、pfΔ6 及 pAAV-CB-EGFP 按照 1:1:1 的比例进行转染。对于 10 cm 培养皿的细胞应用质粒总量 10 μg,对于 20 cm 培养皿的细胞,质粒量分别为 20、30 和 40 μg。应用磷酸钙法进行转染,具体操作如下:以 10 cm 培养皿转 10 μg 质粒用 3 ml 转染体系为例,首先配置 CaCl₂ 和质粒的

混合液,无菌离心管中依次加入三蒸水 1 314 μl 、质粒 DNA 10 μg 、2 mol/L CaCl_2 186 μl ,混匀后,用移液器小心吸取 1.5 ml 2 \times HBS (50 mmol/L HEPES 缓冲液、10 mmol/L KCl、12 mmol/L 右旋葡萄糖、280 mmol/L NaCl、1.5 mmol/L Na_2HPO_4 , pH = 7.05),逐滴加入到上述离心管中,小心吹泡 20 s,然后逐滴均匀加入 10 cm 培养皿的细胞中。对于 20 cm 培养皿的细胞转染,相应的扩大转染体系为 6、9 和 12 ml,质粒量分别为 20、30 和 40 μg 。转染后的细胞置于 37 $^\circ\text{C}$ 孵箱继续培养 8~10 h 后,更换新鲜完全培养基继续培养。转染后 24、48、72 h 于荧光显微镜下观察并拍照。

3. AAV2-EGFP 感染 HEK-293 细胞和 16095 细胞:收集应用最佳转染条件包装 AAV2-EGFP 的 HEK-293 细胞,将细胞用 PBS 重悬后于干冰/乙醇混合液中放置 10 min,然后于 37 $^\circ\text{C}$ 放置 10 min,反复冻融 3 次裂解细胞,18 877 \times g 离心 15 min 获得病毒粗提液。将 HEK-293 细胞和 16095 细胞接种于 6 孔板中,待细胞处于对数生长期时,每孔加入粗提液 50 μl 进行感染。于 AAV2 感染后的 24、48、72 h 于荧光显微镜下观察并拍照。

4. AAV8/hFVIII 的包装与纯化:应用最佳转染条件将 pAAV-TTR-hFVIII、pH28、p Δ 6 按 1:1:1 的比例转染 HEK-293 细胞,转染 72 h 后收集细胞,用 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 重悬细胞,超声裂解细胞后,应用两轮的氯化铯梯度离心法离心后收集 AAV8/hFVIII^[13],经 PBS 透析后,定量、分装,-80 $^\circ\text{C}$ 冻存。应用 qPCR 对病毒滴度进行测定^[14]。以 SYBR Green 为荧光染料,针对 TTR 序列设计引物,正向引物:5'-TCCGATACTCTAATCTCCC-3',反向引物:5'-CTGACTCCAAACCTGCT-3',产物长度 103 bp。qPCR 在 10 μl 反应体系中进行,反应条件为:50 $^\circ\text{C}$ 2 min,95 $^\circ\text{C}$ 10 min,进行 40 个循环的 95 $^\circ\text{C}$ 30 s 和 60 $^\circ\text{C}$ 30 s。

5. Western blot 检测 AAV8/hFVIII 的纯度:取纯化前、后的 AAV8/hFVIII 样品进行 Western blot 电泳,转膜,封闭后加入抗 AAV (VP1/VP2/VP3) 小鼠单克隆抗体 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,1 \times TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入抗小鼠辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,1 \times TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,进行显影。

6. AAV8/hFVIII 尾静脉注射 HA 小鼠:注射 AAV 前 1 周对小鼠进行眼眶采血,获得注射之前的小鼠血浆,注射病毒前对小鼠进行称重,随机分为对照组 (3 只,2 雄 1 雌) 和 AAV8/hFVIII 组 (4 只,2 雄

2 雌)。将纯化的 AAV8/hFVIII 应用生理盐水进行稀释,通过尾静脉将 8×10^{12} vg/kg AAV8/hFVIII 注射至 HA 小鼠体内,对照组小鼠注射相同体积的生理盐水。每 2 周进行眼眶采血,0.38% 枸橼酸钠抗凝,收集血浆,-80 $^\circ\text{C}$ 冻存。

7. APTT 试验检测 FVIII 活性:应用 1 \times assay 缓冲液 (10 mmol/L HEPES、75 mmol/L NaCl、1% BSA, pH = 7.4) 10 倍稀释小鼠血浆。测量杯中依次加入钢珠、50 μl reagent 检测试剂、50 μl 乏 FVIII 血浆和稀释的 50 μl 小鼠血浆待测标本,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 170 s,加入 50 μl CaCl_2 (25 mmol/L),开始计时,读取并记录钢珠停止振动的时间。应用正常人预混血浆 (normal human plasma, NHP) 作为标准品,一般 NHP 为 20 个正常人预混血浆,起始活性设定为 100%。将 NHP 进行 2 倍稀释,设置浓度梯度建立标准曲线,根据标准曲线计算待测小鼠血浆的 FVIII 活性。测定 3 只正常小鼠血浆 FVIII 活性,取平均值,正常小鼠 FVIII 活性的平均值定义为 100%,计算待测小鼠血浆 FVIII 活性与正常小鼠 FVIII 活性的比值,获得待测小鼠血浆 FVIII 相对于正常小鼠的相对活性。

8. 统计学处理:EGFP 表达的荧光强度 (包括平均荧光强度和总荧光强度) 应用 BioFlux200 软件 (美国 Fluxion Biosciences 公司产品) 获得量化数值,统计数据由 3 次独立的重复实验获得,采用 GraphPad Prism 7.0 绘制统计图并进行组间比较,不同转染条件的组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AAV2-EGFP 包装条件的优化:pH22、p Δ 6 及 pAAV-CB-EGFP 质粒按照 1:1:1 的比例进行转染,应用 4 个转染条件 (10 cm 培养皿转 10 μg 质粒,20 cm 培养皿转 20、30、40 μg 质粒) 在相同起始密度的 HEK-293 细胞中转染 EGFP,荧光显微镜观察转染 24、48 和 72 h 的荧光表达细胞数量和荧光强度 (转染效率) 的差异,结果如图 1 所示,20 cm 培养皿转 20 μg 质粒的荧光表达细胞数量最多,荧光强度最强 (图 1B); 其次是 10 cm 培养皿转 10 μg 质粒 (图 1A),考虑到包装 AAV2 需要较多的细胞才能获得足够的病毒量,因此,20 cm 培养皿转 20 μg 质粒条件优于 10 cm 培养皿转 10 μg 质粒。20 cm 培养皿转 30 μg 质粒 (图 1C) 和 20 cm 培养皿转 40 μg 质粒 (图 1D) 可能由于随着质粒量的增加,增加了细胞毒性,活细胞数量减少,其转染效率明显低于 20 cm 培

养皿转 20 μg 质粒。为了更确切地评价各组的转染效率,我们对 EGFP 表达的平均荧光强度和总荧光强度进行了量化处理,结果如图 1E 和 1F 所示,20 cm 培养皿转 20 μg 质粒的平均荧光强度略高于其他 3 组,而总体荧光强度显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$),提示 20 cm 培养皿转 20 μg 质粒的转染效率最高。综上,20 cm 培养皿转 20 μg 质粒是最佳包装条件。

2. 应用最佳条件包装 AAV2-EGFP 并感染 HEK-293 细胞和 16095 细胞:应用 20 cm 培养皿转 20 μg 质粒在 HEK-293 细胞中包装 AAV2-EGFP,共转染 4 个 20 cm 培养皿。HEK-293 细胞在转染 24、48 和 72 h 的荧光表达情况如图 2 所示。收集转染 72 h 细胞,冻融法裂解细胞获得 AAV2 粗提液。将对数生长期 HEK-293 和 16095 细胞接种于 6 孔板中,每孔加入 AAV2 粗提液 50 μl 进行感染。感染 24、48 和 72 h 时分别于荧光显微镜下观察并拍照。结果如图 3 所示,无论是 HEK-293 细胞(图 3A)还是 16095 细胞(图 3B)在 AAV2-EGFP 感染 48 h 的荧光信号最强,分布最广,提示在 AAV2 感染后的 48 h EGFP 表达最高,16095 细胞的感染效率强于 HEK-293 细胞。

3. AAV8/hFVIII 病毒纯度检测及 qPCR 定量: pAAV-TTR-hFVIII、pH28、pfΔ6 按 1:1:1 转染 HEK-293 细胞 72 h 后收集细胞,利用氯化铯梯度离心法纯化获得 AAV8/hFVIII。Western blot 检测纯化前后

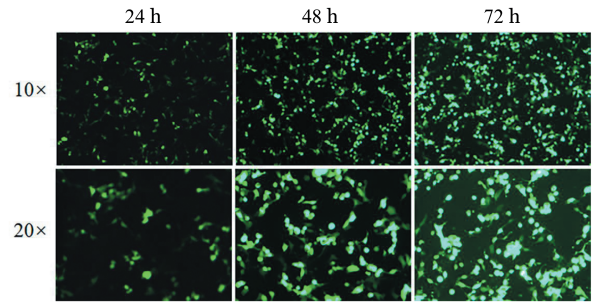
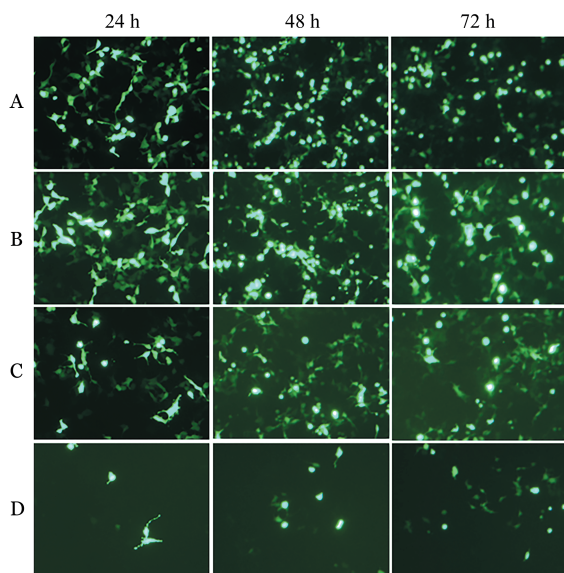


图 2 免疫荧光显微镜观察 20 cm 培养皿在 6 ml 体系内转染 20 μg 质粒(pH22、pfΔ6 及 pAAV-CB-EGFP 按 1:1:1 比例构建)在 HEK-293 细胞包装腺相关病毒(AAV)病毒效率

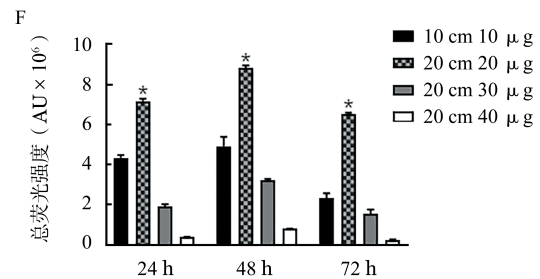
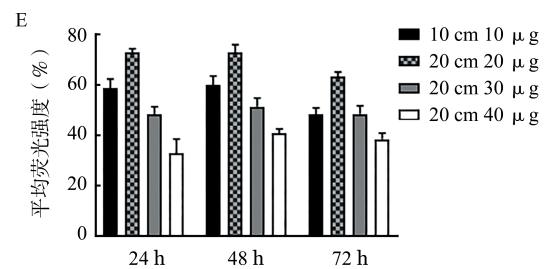
AAV8/hFVIII 衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 表达(其组成比例大约为 1:1:10)。结果见图 4,纯化前 AAV8/hFVIII 除了含有 VP1、VP2 和 VP3 以外,还有较多杂带能够被检测到;而纯化后的 AAV8/hFVIII 杂带较少,VP1、VP2 和 VP3 的比例接近 1:1:10。证明纯化获得的 AAV8 纯度较好。接着,我们应用 qPCR 对纯化的 AAV8/hFVIII 进行定量。以 pAAV-TTR-hFVIII 质粒(浓度 1.0 μg/μl)稀释(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})作为标准曲线,AAV8/hFVIII 病毒 10 倍稀释检测。qPCR 反应的扩增曲线如图 5 所示,根据标准曲线计算获得 AAV8/hFVIII 的滴度为 1.86×10^{12} vg/ml。

4. AAV8/hFVIII 在 HA 小鼠体内的活性维持:6~8 周龄 HA 小鼠随机分为对照组和 AAV8/hFVIII 组,AAV8/hFVIII 注射剂量为 8×10^{12} vg/kg,通过尾静脉注射,对照组注射生理盐水。每 2 周进行眼眶采血,构



质粒为 pH22、pfΔ6 及 pAAV-CB-EGFP 按 1:1:1 比例构建。A: 10 cm 培养皿培养细胞,转染 10 μg 质粒,转染体系 3 ml;B~D: 20 cm 培养皿培养细胞,分别转染 20、30、40 μg 质粒,转染体系分别为 6、9、12 ml;E: 平均荧光强度柱状图;F: 总荧光强度柱状图(AU 示任意单位)

图 1 免疫荧光显微镜观察 HEK-293 细胞 AAV2-EGFP 病毒包装效率($\times 200$)(实验重复 3 次;与其他各组比较, $*P < 0.05$)



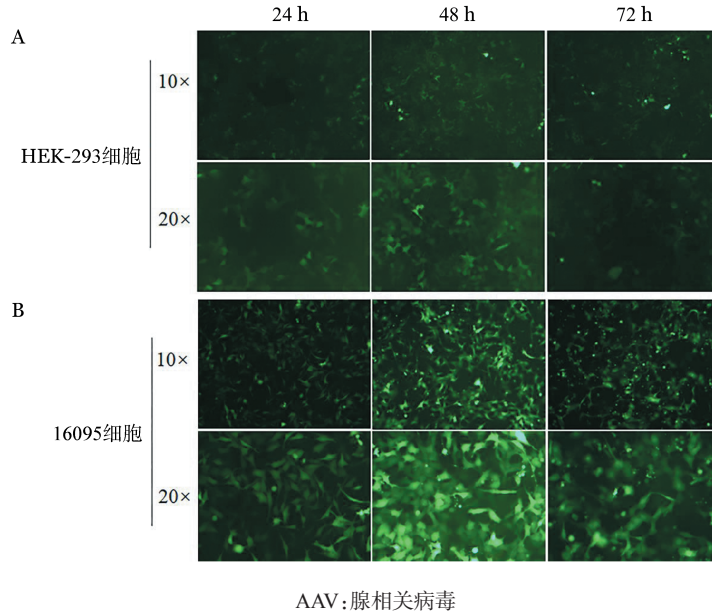
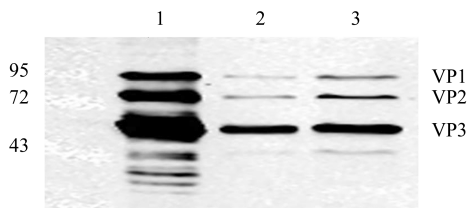


图3 免疫荧光显微镜观察应用50 μl AAV2-EGFP粗提液感染HEK-293细胞(A)和16095细胞(B)24、48、72 h的感染效率



AAV8/hFVIII:携带人凝血因子VIII的重组腺相关病毒血清型8; 1: 5 μl未纯化 AAV8/hFVIII; 2: 5 μl 纯化 AAV8/hFVIII; 3: 10 μl 纯化 AAV8/hFVIII

图4 Western blot 检测 AAV8/hFVIII病毒纯化前后纯度(衣壳蛋白VP1:VP2:VP3的比例约为1:1:10,未纯化组可见较多杂带,纯化后病毒较纯)

橡酸钠抗凝,收集血浆,APTT 试验检测 FVIII 在 HA 小鼠体内的活性。结果如图6所示,注射 AAV8/hFVIII 的小鼠可以在长达12周的时间内FVIII活性维持10%以上,提示通过基因治疗的方法应用 AAV8/hFVIII 注射 HA 小鼠,实现了1次注射维持长期FVIII表达的目的。

与对照组小鼠相比,在整个观察期内,注射 AAV8/hFVIII 小鼠 FVIII 的活性均显著高于对照组小鼠。

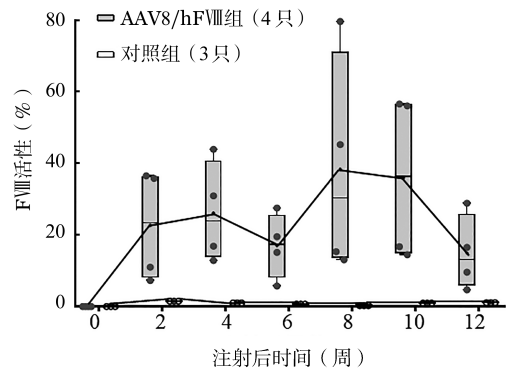
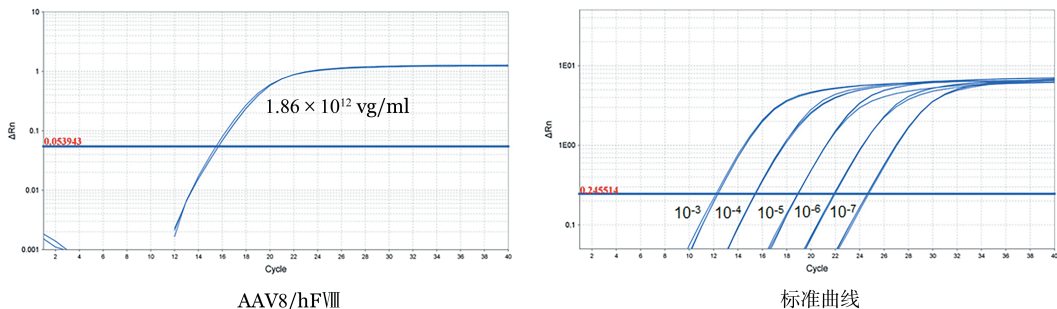


图6 AAV8/hFVIII-BDD在血友病A小鼠体内的活性测定

讨论

基因治疗有望使HB和HA的治疗得到改善,而病毒载体的制备是基因治疗成功的关键。本研究



AAV8/hFVIII:携带人凝血因子VIII的重组腺相关病毒血清型8; A: AAV8/hFVIII的扩增曲线; B: 标准曲线的扩增曲线

图5 qPCR检测 AAV8/hFVIII病毒定量

中,我们应用易于观察结果的EGFP转染,摸索了AAV包装的几个条件,从中找到最佳转染条件为20 cm培养皿转染20 μg质粒(图1),该条件代表了能够与hFⅧ的包装效率和AAV总量相对应的最佳转染条件。应用该条件,小量包装了AAV2-EGFP(图2),获得AAV2粗提液感染HEK-293细胞和16095细胞,免疫荧光显微镜下观察到在AAV2-EGFP感染后的24、48和72 h细胞内有绿色荧光蛋白表达(图3)。证明了应用该条件包装的AAV2-EGFP能够有效感染细胞。在此基础上我们应用该最佳转染条件包装了AAV8/hFⅧ,通过经典的氯化铯梯度离心法获得纯化的病毒,经Western blot检测到病毒纯度较好(图4)。以 8×10^{12} vg/kg的剂量注射HA小鼠,获得了在HA小鼠体内1次注射维持12周有效FⅧ活性的较好效果(图5~6)。

关于AAV病毒的纯化,目前较常用的方法包括氯化铯梯度离心法^[13]、碘克沙醇梯度离心法^[15]、基于液相色谱的柱纯化法^[16]以及梯度离心和柱纯化结合在一起的方法^[17]。无论何种方法,能够有效提高实体病毒的产率和纯度,减少空壳病毒的污染是AAV病毒纯化中的共同挑战。本研究中使用的氯化铯梯度离心法获得病毒纯度和级别用于动物实验是安全的。但是若要应用于HA患者,必须使用符合生产质量管理规范(GMP)要求的纯度和安全性更高的AAV载体。

本研究我们通过摸索AAV的包装条件,获得优化的转染条件,以此方法包装AAV8/hFⅧ,纯化后用于HA小鼠的体内基因治疗研究,发现能够在小鼠体内维持较长时间的FⅧ活性。为AAV包装、纯化及基因治疗HA提供了实验研究数据。

参考文献

- [1] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Guidelines for the management of hemophilia[J]. Haemophilia, 2013, 19(1):e1-47. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x.
- [2] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组,中国血友病协作组. 血友病诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(5):364-370. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.05.002.
- [3] Lai J, Hough C, Tarrant J, et al. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity[J]. Blood, 2017, 129(24): 3147-3154. DOI: 10.1182/blood-2016-11-750885.
- [4] Di Minno G, Santagostino E, Morfini M, et al. Patient satisfaction and acceptability of an on-demand and on-prophylaxis de-
- vice for factor VIII delivery in patients with hemophilia A[J]. Patient Prefer Adherence, 2019, 13:233-240. DOI: 10.2147/PPA.S175254.
- [5] Morfini M, Rapisarda C. Safety of recombinant coagulation factors in treating hemophilia[J]. Expert Opin Drug Saf, 2019, 18(2):75-85. DOI: 10.1080/14740338.2019.1574743.
- [6] Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, et al. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors[J]. J Virol, 2002, 76(9):4580-4590. DOI: 10.1128/jvi.76.9.4580-4590.2002.
- [7] Lee EJ, Guenther CM, Suh J. Adeno-associated virus (AAV) vectors: rational design strategies for capsid engineering[J]. Curr Opin Biomed Eng, 2018, 7: 58-63. DOI:10.1016/j.cobme.2018.09.004.
- [8] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B[J]. N Engl J Med, 2011, 365(25):2357-2365. DOI: 10.1056/NEJMoa1108046.
- [9] George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant[J]. N Engl J Med, 2017, 377(23):2215-2227. DOI: 10.1056/NEJMoa1708538.
- [10] Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A[J]. N Engl J Med, 2017, 377(26):2519-2530. DOI: 10.1056/NEJMoa1708483.
- [11] Mazurkiewicz-Pisarek A, Plucienniczak G, Ciach T, et al. The factor VIII protein and its function[J]. Acta Biochim Pol, 2016, 63(1):11-16. DOI: 10.18388/abp.2015_1056.
- [12] 匡颖, 王津津, 卢希彬, 等. 应用四倍体补偿技术建立血友病A小鼠模型[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(1):1-6. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2010.01.001.
- [13] Mueller C, Ratner D, Zhong L, et al. Production and discovery of novel recombinant adeno-associated viral vectors[J]. Curr Protoc Microbiol, 2012, Chapter 14:Unit14D.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc14d01s26.
- [14] Wang F, Cui X, Wang M, et al. A reliable and feasible qPCR strategy for titrating AAV vectors[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2013, 19:187-193. DOI: 10.12659/MSMBR.883968.
- [15] Fripont S, Marneffe C, Marino M, et al. Production, purification, and quality control for adeno-associated virus-based vectors[J]. J Vis Exp, 2019, 143. DOI: 10.3791/58960.
- [16] Gao G, Qu G, Burnham MS, et al. Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(15): 2079-2091. DOI: 10.1089/104303400750001390.
- [17] Sandoval IM, Kuhn NM, Manfredsson FP. Multimodal production of adeno-associated virus[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1937: 101-124. DOI: 10.1007/978-1-4939-9065-8_6.

(收稿日期:2019-07-02)

(本文编辑:刘爽)