

重组腺相关病毒载体相关性杂质

刁勇, 王启钊, 肖卫东, 许瑞安

华侨大学分子药理学研究所 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021

摘要: 可以稳定表达治疗基因而无明显不良反应的重组腺相关病毒 (rAAV) 载体被认为是最有发展前景的基因治疗载体。但如何建立可以有效去除 rAAV 载体内具有潜在致病危害的杂质、产品质量符合临床使用要求的纯化工艺是研究人员面临的巨大挑战。其中针对载体相关性杂质的纯化工艺尤为关键, 因为该类杂质的性质与真正的 rAAV 载体极其相似, 一旦存在便难以去除, 且会引起严重不良反应。以下总结了该类杂质形成的过程及有别于 rAAV 载体的特点, 并对可以防止其生成或将其与 rAAV 载体有效分离的技术手段进行了评价。

关键词: 腺相关病毒, 载体相关性杂质, 纯化, 基因治疗

Recombinant adeno-associated virus vector related impurities

Yong Diao, Qizhao Wang, Weidong Xiao, and Rui'an Xu

Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

Abstract: Recombinant adeno-associated virus (rAAV)-based vectors that can stably express therapeutic genes *in vivo* without detectable side-effect have shown great promise for human gene therapy. A major challenge for translation of promising research to clinical development is how to establish clinically compatible purification methods in separating rAAV from potentially pathogenic impurities, especially rAAV vector-related impurities, a class of impurities corresponding to AAV particles that closely resemble bona fide vectors and are difficult to remove. In this review we summarize the assembly process of rAAV vector-related impurities and their characteristics differed with rAAV vectors, and evaluate several current technologies to prevent their formation or separate them from rAAV stocks.

Keywords: adeno-associated virus, vector-related impurity, purification, gene therapy

Received: November 19, 2010; **Accepted:** January 24, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA02Z135), National Science & Technology Major Projects (No. 2009ZX09103-643), National Natural Science Foundation of China (No. 30973591), Program of Science and Technology of Jiangsu Province (No. BC2009029).

Corresponding author: Yong Diao. Tel: +86-595-22692516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA02Z135), 国家重大科技专项 (No. 2009ZX09103-643), 国家自然科学基金 (No. 30973591), 江苏省科技项目 (No. BC2009029) 资助。

长期以来研究人员一致认为重组腺相关病毒 (rAAV) 载体具有无致病性、低免疫原性等优点, 前期涉及啮齿类及灵长类动物的大量临床前研究也从未发现其会引起严重不良反应^[1], 但由美国宾州大学主持进行的治疗血友病的 rAAV 基因药物 I/II 期临床研究却发生了严重的细胞免疫反应^[2], 患者转氨酶水平急剧升高, 肝功能受到严重损害, 临床研究被迫终止。究其原因, 载体衣壳蛋白 (Cap) 是引起该细胞免疫毒性的主要元凶^[3-4], 载体中可以表达 Cap 的类 AAV 病毒以及空病毒颗粒等载体相关性杂质均可能是抗原的供应源^[1]。rAAV 载体相关性杂质是指与其本身性质非常类似的杂质, 主要包括以下 3 类: 包裹有载体基因组之外的核酸序列的类 AAV 病毒颗粒; 空病毒颗粒; rAAV 多聚体。rAAV 载体相关性杂质的产生与载体的生产方法密切相关, 因该类杂质的理化性质与载体本身非常类似, 通过常规纯化方法难以去除 (如空病毒颗粒和多聚体), 甚至几乎不可能去除 (如包裹残留质粒或宿主细胞 DNA 的类 AAV 病毒颗粒)。如果该类杂质大量出现在临床应用的制剂中则可能产生难以预料不良后果: 如类 AAV 病毒颗粒中包装的抗生素抗性序列可能会引起病人对抗生素的耐药性, AAV 复制基因 *rep* 则具有潜在的致突变风险, rAAV 多聚体的形成则会严重降低产品的稳定性, 增加衣壳抗原的免疫原性。如何减少 rAAV 载体相关杂质的污染, 防止 rAAV 载体相关杂质的形成, 是当前建立 rAAV 载体生产工艺最重要的任务之一。

1 类 AAV 病毒颗粒

在生产 rAAV 载体的过程中, 转染用质粒或宿主细胞 DNA 会被误包装而形成类 AAV 病毒颗粒。类 AAV 病毒颗粒又可分为可复制型 (rcAAV) 和复制缺陷型两类。曾有报道在 17 批不同血清型的 rAAV 产品中, 可表达 *cap* 基因的 rcAAV 污染率可达 0.4%~1.0%, 如采用非优化工艺进行生产污染率则可高达 10%^[5]。体内应用 rAAV 载体后可在多种

组织内检出污染的杂质 DNA 序列, 部分 DNA 序列与 AAV 的反向末端重复 (ITR) 相连接存在, 并在一定条件下可以释出并具有复制活性^[6]。近期动物实验表明, *cap* 基因在体内的表达会引起严重的免疫反应^[7-8], 而包装有其他 DNA 杂质的 rcAAV 则具有致癌性或引入抗生素抗性的潜在风险^[6]。

因类 AAV 病毒颗粒与真正的 AAV 病毒几乎完全一样, 一旦形成则难以去除, 必须从包装工艺入手防止或减少其产生。AAV 基因组含有两个开放阅读框架, 分别编码调节基因 (*rep*) 和结构基因 (*cap*), 两端为 145 bp 的 ITR。ITR 是病毒复制和包装必须的顺式作用元件。三质粒共转染法是生产 rAAV 载体最常用的方法, 所用的 3 个质粒分别为 rAAV 载体质粒 (p-vector)、AAV 辅助质粒 (p-AAV) 和 Ad 病毒辅助质粒 (p-Ad)。在 p-vector 内, AAV 基因组的 *rep-cap* 基因被转基因表达框所替代。Rep 和 Cap 蛋白由 p-AAV 反式提供。p-Ad 则替代了最初研究所应用的腺病毒, 负责提供包装 rAAV 所必须的辅助病毒的相应功能。

类 AAV 病毒颗粒的形成主要是由于 rAAV 载体质粒和辅助质粒间的非同源重组而引起, 载体质粒中含有的 ITR 在重组事件中发挥了重要作用^[6]。ITR 是 AAV 复制、包装所必需的最少自身序列, 序列中 CG 含量达 80% 以上, 其前 125 bp (1~125) 序列依次可分为 A、B、B'、C'、C 和 A' 等不同的区段, 其中 A 与 A'、B 与 B'、C 与 C' 反向互补可形成 T 形发夹结构, 作为 AAV 基因组自我复制的起点。ITR 末端 20 bp 大小的 D 序列是唯一的非回文序列, 具有 Rep 蛋白结合位点 (RBS) 和末端解链位点 (TRS), 对 AAV 的复制和包装非常重要, TRS 和包装信号均处于 D 序列中。基因组中含有一个 ITR 及两个 D 序列即可以满足 AAV 基因组的复制和包装需要。在缺失 D 序列时, ITR 形成的发夹结构不足以包装基因组。Wang 等将载体质粒中 ITR 的 D 序列远端的 10 个核苷酸缺失后, 发现可以抑制载体质粒和辅助质粒之间的非同源重组, 产品中 rcAAV 的含

量因此大大降低^[9]。

Nony 等^[10]发现位于 *rep* 基因 5'端的顺式复制元件 (CARE) 具有 Rep 依赖性复制活性, 在无 ITR 序列存在的条件下, 辅助质粒中的 *rep-cap* 基因也可以被包装形成复制缺陷型类 AAV 病毒颗粒。将 CARE 缺失后, 则未检出包装有 *rep-cap* 基因的类 AAV 病毒颗粒。质粒的复制能力对其被包装的可能性也有很大影响^[6]。与含有 ITR 的载体质粒比较, 几乎缺失了 p5 启动子全部序列的辅助质粒 pDG 被包装的几率要小。Allen 等以异源性启动子替代辅助质粒中使用的 p5 和 p40 启动子; 将 *rep* 和 *cap* 基因分为两个独立的转录单元, 且转录方向相反, 有效地降低了 *rep* 和 *cap* 基因被重组包装为 rcAAV 的可能性^[11]。

AAV 对基因组的大小有限制, 如超过 4.7 kb 就很难包装为病毒颗粒。本课题组在辅助质粒的 *rep* 和 *cap* 表达框内插入某些特定的内含子, 使得辅助质粒基因组的大小远远超出了 AAV 的包装容量而不被误包装, rcAAV 的污染可以降低 2~3 个数量级^[12]。Hauck 等使用类似的策略, 也成功地降低了 rAAV2 和 rAAV6 载体中类病毒颗粒的污染^[13]。

基于 ITR 在野生型 AAV 生长过程中发挥的重要作用, 我们将包装缺陷型 ITR 引入辅助质粒, 希望辅助质粒如同野生型 AAV 一样对 *rep* 和 *cap* 基因的表达发挥顺式时空调控作用, 从而提高 rAAV 的生产效率^[14]。在辅助质粒内插入一定的异源性内含子, 使其体积大大超过 AAV 的包装容量而不被包装为类 AAV 病毒颗粒; 另外因所用的 ITR 缺失了 D 序列中的包装调控序列, 有利于减少 rcAAV 的产生。结果该方法既将 rAAV 的包装效率提高了 20 倍, 又有效地降低了 rcAAV 的产生。

2 空病毒颗粒

AAV 空病毒颗粒是不含任何 DNA 的假病毒, 仅由 3 种不同的衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 组成, 构成定量比与真 AAV 一样为 1:1:10。空病毒颗粒的自组装与载体 DNA 的复制和包装无关。在 Rep

蛋白的参与下, 组装好的空病毒颗粒向核质迁移, 载体 DNA 的包装发生在已组装完毕的空病毒颗粒迁移至核质后。野生型 AAV 的包装效率虽然明显高于 rAAV, 但也会产生 50% 以上的空病毒颗粒, 而制备 rAAV 载体时应用的 *rep* 基因序列往往缺失了部分顺式元件 (如 p5 启动子和 CARE 元件), 所以包装效率显著降低, 空壳率更高。由于 rAAV 载体衣壳与 AAV 空病毒颗粒的构成完全一致, 采用实验室常规的亲和层析方法根本不能将二者有效分离。

大量探讨 rAAV 载体引起严重的肝细胞免疫毒性原因的后续研究表明, 该细胞免疫反应由 rAAV 载体衣壳蛋白所引起, 载体衣壳蛋白抗原通过经典或非经典抗原递呈途径被递呈至病人肝细胞表面, 然后激活记忆性 T 细胞引起免疫反应^[3]。rAAV 载体的细胞免疫反应与抗原输入量呈量效关系。空病毒颗粒内不含转基因, 不仅没有任何疗效, 反而会增加抗原输入量^[1,15]。另外, 空病毒颗粒的存在还会降低 rAAV 载体的溶解度, 促进其凝聚, 影响其储存稳定性^[16]。

通过分析比较空病毒颗粒与 rAAV 载体性质的差异, 可以对常用 rAAV 载体生产工艺进行优化, 建立有效减少终产品中空病毒颗粒含量的纯化方法, 从而提高药物比活性, 降低临床用药剂量, 降低病人体内衣壳蛋白抗原负荷, 提高产品稳定性。

基于空病毒颗粒与 rAAV 载体浮力密度的差异, 可以通过密度梯度离心法进行分离。在氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心后, 野生型 AAV 出现在密度 1.41 g/mL 处, rAAV 载体因为转基因表达框大小不同而稍有差异。空病毒颗粒因不含基因组而出现在较低的密度区间 (约 1.32 g/mL), 可以很容易与 rAAV 载体分离, 成为 CsCl 密度梯度离心最突出的优点。但由于 rAAV 载体与核酸及蛋白杂质间存在非特异性结合, 三者的数量比也不均衡, 往往需要 2 次、甚至 3 次 CsCl 梯度离心才得到高纯度 rAAV 载体。但 rAAV 载体长时间与高浓度 CsCl 接触, 会导致滴度降低。Auricchio 首先详细研究了 CsCl

对 rAAV 载体的破坏作用,他们将 rAAV 载体与 CsCl 孵育 24 h 后, rAAV 载体感染滴度降低 2 倍^[17]。在 72 h 后,相当于 2 次 CsCl 梯度离心, rAAV 载体感染滴度仅存 13%。碘克沙醇是一种长期临床应用的 X 线造影剂,可以替代 CsCl 有效去除空病毒颗粒^[18-19]。

密度梯度离心的优点是适用于所有血清型 rAAV 的纯化。缺点主要是仅经密度梯度离心得到的产品,纯度尚达不到临床应用标准,另外处理量小、不易放大生产规模也限制了其应用。最近研究认为,适当增加前处理,可以缩小样品体积,有利于密度梯度离心方法的工业化应用。Ayuso 等^[20]在 CsCl 梯度离心工艺前,增加 PEG 沉淀步骤,产品的纯度明显提高,虽然也需要 2 次 CsCl 梯度离心,但体内外效价无明显降低。Lock 等^[19]则常用切向流过滤 (TFF) 技术,对密度梯度离心前样品进行浓缩。他们用截留分子量为 100 kDa 的 TFF 膜将样品浓缩 130 倍,为之后的密度梯度离心提供了方便。浓缩样品经碘克沙醇密度梯度离心得到的 rAAV8、rAAV9 载体产品中,空白病毒颗粒含量为 0.4%~5%,回收率为 26% 左右^[19]。

空病毒颗粒包装载体基因组后其构型可能发生改变,导致衣壳蛋白 VP1 和 VP2 的 N-端酸性氨基酸残基从病毒颗粒五重对称轴的孔中穿出;载体基因组的包装导致病毒整体阴离子电荷增加,两种因素均导致 rAAV 载体的等电点较空病毒颗粒有所降低^[21]。因此可以通过离子交换色谱法将空病毒颗粒与载体分离^[21-22]。

Urabe 等^[23]采用阴离子交换色谱成功地将空病毒颗粒与 rAAV1 载体分离。以反离液离子 (Antichaotropic ion),如 NH_4^+ 、 $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ 、 PO_4^{3-} 和 SO_4^{2-} 等代替 NaCl 进行盐浓度梯度洗脱,分离效果明显增加,特别是 $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]_2\text{SO}_4$ 和硫酸三甲基胺最佳。上样溶液的 pH 对分离效果也有显著影响,高 pH 值 9 和 8.5 的效果优于 8.0 和 7.5。经过 1 次高分辨柱阴离子交换色谱分离后,大约 90% 的空病毒颗

粒被去除。第 2 次高分辨柱纯化后得到的 rAAV1 载体样品中空病毒颗粒含量少于 5%,回收率均高于 50%。纯化后样品生物滴度显著增加,小鼠肌肉注射 rAAV1 载体后第 56 天,血清转基因表达较未去除空病毒颗粒的样品增加 10 倍左右^[23]。Qu 等^[21]采用阳离子和阴离子交换二步色谱法,得到的终产品中空病毒颗粒含量小于 1%,总体收率为 74%。该工艺不仅适用于血清型 rAAV2 载体,也可以用于 rAAV6 载体的纯化。

膜色谱是将液相色谱与膜分离融合于一起的新型生化分离技术,具有选择性高、分离速度快、能耗低、易放大等特点,是分离纯化生化大分子药物的有力工具。与液相色谱比较,膜色谱扩散路径短、传质快、分离时间短、分离效率显著提高、易于放大、便于实现大规模连续分离和自动操作。与膜技术相比,膜色谱不仅是利用膜孔径的大小,更主要的是利用其特异性和选择性,只要选择合适的膜就可以从复杂体系,尤其是细胞培养液中分离和制取出任何一种生物大分子。近年来该技术被用于 rAAV 载体的纯化,可有效去除空病毒颗粒杂质^[22]。将 rAAV 载体收获液上样至阳离子交换膜后,空病毒颗粒因等电点高呈现较强的正电性,绝大部分 (97%) 被吸附至阳离子交换膜,而 rAAV 载体则直接穿透通过。然后将穿透液上样至阴离子交换膜,经 NaCl 浓度线性洗脱后,空病毒颗粒含量降低至 1% 以下。

3 rAAV 多聚体

在 rAAV 载体的纯化和储存过程中,如实验条件选择不当,往往会促使 rAAV 载体聚集形成多聚体,从而影响纯化收率,降低产品的稳定性。

AAV 在常用缓冲液 (如磷酸盐缓冲液和 Tris 缓冲液) 中的溶解度较低,当浓度达到 2×10^{13} VP/mL 时,就会出现一定程度的聚集现象。浓度为 25% 的甘油溶液可以增加其溶解度至 1.8×10^{15} VP/mL^[24],但甘油含量如低于 5% 则无明显作用。中性表面活性剂辛基-吡喃葡萄糖苷 (0.01%~0.5%) 可缓解

AAV 的聚集, 降低溶液 pH 则有利于提高溶解度。在加入 0.5% 辛基-吡喃葡萄糖苷的条件下, 浓度为 2×10^{13} VP/mL 的样品在 pH 4.5 时完全溶解, 升高至 5.7 则出现聚集^[24]。

一般认为溶液中二价阳离子较一价阳离子能更好地抑制病毒的聚集^[24-25], 但 Wright 等^[26]的研究表明, rAAV 载体溶液的离子强度是影响其聚集的重要因素, 无论采用的离子种类如何, 只要增加离子强度至 200 mmol/L 就可以抑制 rAAV 的聚集。Wright 等^[26]曾推测 rAAV 的聚集可能是由于相邻病毒粒子间带电氨基酸残基的相互作用引起, 所以尝试以游离支链氨基酸阻止聚集的发生。但氨基酸的加入对 rAAV 的聚集并没有特殊的作用, 仍然需要达到 200 mmol/L 的离子强度才有效果。

冻融循环是 rAAV 载体制备工艺中裂解细胞常用的手段, 也是引起病毒聚集的因素之一。在 150 mmol/L 的磷酸钠缓冲液中 rAAV 在 4 °C 保存 5 d 未见聚集, 但一次冻融 (4 °C ~ -20 °C) 就导致明显的聚集^[26]。在 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 保存的 rAAV 经过 4 °C 至 -80 °C 的一次冻融循环, 滴度降低 3 倍以上^[27]。

在 rAAV 载体生产工艺中, 虽然都含有降解核酸的步骤, 但裂解液的盐离子种类和浓度并不是核酶 (一般为 Benzonase) 的最佳反应条件, 所以 rAAV 载体表面仍残留痕量核酸杂质。对纯化后样品再次进行核酶处理后, 即使在低离子强度条件也未见聚集现象, 而未处理的样品则需要高离子强度 (大于 200 mmol/L) 才能抑制聚集现象^[26]。这说明载体表面的核酸杂质可以通过离子键与相邻病毒粒子结合形成多聚体。细胞裂解液中一价阳离子的存在会降低核酶的活性, 造成 DNA 降解不充分, 以二价阳离子 (如 Mg^{2+}) 盐代替钠盐则有利于提高核酶处理的效果, 核酶处理 30 min 后再调节离子强度至 0.15 mol/L, rAAV 的收率提高 4 倍^[25]。Qu 等^[21]在用离子交换色谱去除空病毒颗粒的工艺中, 在阳离子交换色谱柱上进行原位核酶消化处理, 结果既有

效地避免了 rAAV 载体的聚集, 又提高了与空病毒颗粒的分离度。

4 结论

安全、稳定、有效是对所有药品最基本的三大要求, 基因治疗药物更需要把安全性指标放在首位。虽然近年来应用 rAAV 载体在治疗 Leber's 先天性黑内障方面取得重大突破^[28-29], 因此被 Science 杂志评为 2009 年十大科学进展之一^[30], 但 rAAV 载体在临床研究中出现的细胞免疫毒性^[2], 时刻提醒人们必须对其安全性给予高度关注。

rcAAV 是类 AAV 病毒颗粒中危害最大的载体相关性杂质, 一旦转染人体细胞便可以源源不断地产生异源蛋白, 造成意想不到的不良反应。因这类杂质与 rAAV 载体的性质如出一辙, 目前尚无下游纯化技术可以去除, 必须从上游工艺技术着手加以限制, 如对生产用各种质粒的表达元件进行优化, 防止同源或非同源重组, 防止非载体基因组的病毒包装。因痕量 rcAAV 即可造成大危害, 本课题组将特异性 microRNA 结合序列引入 rAAV 辅助质粒 *rep-cap* 基因的 3' UTR 区域, 以便在即使存在 rcAAV 污染的情况下, 也可以控制 rcAAV 在靶细胞内的异源蛋白表达^[31]。

空病毒颗粒是在 rAAV 载体包装前产生, 但可以通过下游技术去除的一类杂质。虽然其与 rAAV 载体外壳一致, 但二者浮力密度的差异足以采用密度梯度离心加以分离。近期开发的离子交换色谱方法更为规模化生产提供了技术手段。然而, 二者理化性质的近似性仍然对分离条件的参数控制提出了严格要求。

rAAV 多聚体是在下游处理及储存过程中出现的一类杂质, 离子强度、pH、温度等实验参数的非优化选择均可能导致 rAAV 载体的聚集, 而这些参数的优化和控制也正是在实际操作中容易被忽视或难以持续被关注的常见问题。

随着 rAAV 载体本身的不断更新和优化^[32]、细

胞包装技术的不断成熟^[33], 下游生产纯化技术的同步发展也一定会极大地促进其在临床上更广泛地应用, 加速其产业化进程。

REFERENCES

- [1] Diao Y, Wang QZ, Xiao WD, et al. Cellular immunotoxicity of rAAV gene medicine and possible solutions. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(9): 1071–1077.
刁勇, 王启钊, 肖卫东, 等. 重组腺相关病毒基因药物的细胞免疫毒性及对策. *药学学报*, 2010, 45(9): 1071–1077.
- [2] Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*, 2006, 12(3): 342–347.
- [3] Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, et al. CD8⁺ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med*, 2007, 13(4): 419–422.
- [4] Madsen D, Cantwell ER, O'Brien T, et al. Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1. *J Gen Virol*, 2009, 90(11): 2622–2633.
- [5] Wright JF. Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(7): 698–706.
- [6] Chadeuf G, Ciron C, Moullier P, et al. Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their *in vivo* persistence after vector delivery. *Mol Ther*, 2005, 12(4): 744–753.
- [7] Li CW, Hirsch M, Asokan A, et al. Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector transduced cells coexpressing the AAV2 capsid *in vivo*. *J Virol*, 2007, 81(14): 7540–7547.
- [8] Wang LL, Figueredo J, Calcedo R, et al. Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T-cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(3): 185–194.
- [9] Wang XS, Khuntirat B, Qing K, et al. Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J Virol*, 1998, 72(7): 5472–5480.
- [10] Nony P, Chadeuf G, Tessier J, et al. Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J Virol*, 2003, 77(1): 776–781.
- [11] Allen JM, Debelak DJ, Reynolds TC, et al. Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol*, 1997, 71(9): 6816–6822.
- [12] Cao L, Liu YH, Daring MJ, et al. High-titer, wild-type free recombinant adeno-associated virus vector production using intron-containing helper plasmids. *J Virol*, 2000, 74(24): 11456–11463.
- [13] Hauck B, Murphy SL, Smith PH, et al. Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for preformed capsid in immune responses. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 144–152.
- [14] Cao L, Daring M, Xiao W. Replication competent helper functions for recombinant AAV vector generation. *Gene Ther*, 2002, 9(18): 1199–1206.
- [15] Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther*, 2007, 7(5): 316–324.
- [16] Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther*, 2008, 15(11): 840–848.
- [17] Auricchio A, Hildinger M, O'Connor E, et al. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(1): 71–76.
- [18] Brument N, Morenweiser R, Blouin V, et al. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Mol Ther*, 2002, 6(5): 678–686.
- [19] Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, et al. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10): 1259–1271.
- [20] Ayuso E, Mingozzi F, Montane J, et al. High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. *Gene Ther*, 2010, 17(4): 503–510.
- [21] Qu G, Bahr-Davidson J, Prado J, et al. Separation of

- adeno-associated virus type 2 empty particles from genome-containing vector by anion-exchange column chromatography. *J Virol Methods*, 2007, 140(1/2): 183–192.
- [22] Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, et al. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(9): 1013–1021.
- [23] Urabe M, Xin KQ, Obara Y, et al. Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Mol Ther*, 2006, 13(4): 823–828.
- [24] Xie Q, Hare J, Turnigan J, et al. Large-scale production, purification and crystallization of wild-type adeno-associated virus-2. *J Virol Methods*, 2004, 122(1): 17–27.
- [25] Chahal PS, Aucoin MG, Kamen A. Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *J Virol Methods*, 2007, 139(1): 61–70.
- [26] Wright JF, Le T, Prado J, et al. Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Mol Ther*, 2005, 12(1): 171–178.
- [27] Croyle MA, Cheng X, Wilson JM. Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Ther*, 2001, 8(17): 1281–1290.
- [28] Bainbridge JWB, Ophth FRC, Smith AJ, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008, 358(21): 2231–2239.
- [29] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008, 358(21): 2240–2248.
- [30] Alberts B. The Breakthroughs of 2009. *Science*, 2009, 326(5960): 1589.
- [31] Xu RA, Xiao WD, Lu H. A HAAVmir gene containing a novel cell specific microRNA binding domain used for gene therapy: CN, 200910136134.5. 2009-09-16.
- [32] Lü Y, Wang Q, Xiao WD, et al. Trends in development of self-complementary adeno-associated virus vector. *Chin J Biotech*, 2009, 25(5): 658–664.
吕颖慧, 王启钊, 肖卫东, 等. 自身互补型腺相关病毒载体发展趋势. *生物工程学报*, 2009, 25(5): 658–664.
- [33] Wang F, Diao Y, Xiao WD, et al. Large-scale production of recombinant adeno-associated virus (rAAV). *Chin J Biotech*, 2009, 25(11): 1608–1613.
王峰, 刁勇, 肖卫东, 等. 重组腺相关病毒规模化生物包装技术. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1608–1613.