

综 述

## 自身互补型腺相关病毒载体发展趋势

吕颖慧<sup>1,2</sup>, 王启钊<sup>1,2</sup>, 肖卫东<sup>1,3</sup>, 刁勇<sup>1,2</sup>, 许瑞安<sup>1,2</sup>

1 华侨大学分子药理学研究所, 福建 362021

2 分子药物教育部工程研究中心, 福建 362021

3 宾州大学医学院, 宾夕法尼亚 19104, 美国

**摘 要:** 重组腺相关病毒(Recombinant adeno-associated virus, rAAV)可以作为基因运载工具将目的基因运送入靶器官并对多种疾病发挥治疗作用。以 rAAV 为载体进行基因治疗的关键是病毒基因组由单链变为双链, 否则不能适时、有效表达目的基因。自身互补型 rAAV(scrAAV)载体基因组本身以双链形式存在, 与常规的单链 rAAV(ssrAAV)载体相比, 无论在表达时间还是表达强度上都有十分明显改善, 可显著降低在疾病治疗过程中由于载体本身所诱发的免疫反应。目前, scrAAV 已经在肝脏疾病、中枢神经系统疾病、眼部疾病、干细胞修饰以及 RNA 干扰、核酶技术等领域得到应用。以下在介绍 scrAAV 载体构建、表达、定位的基础上, 以血友病 B 为主要对象, 阐述 scrAAV 的应用潜力及发展趋势。

**关键词:** 基因治疗, 自身互补, 重组腺相关病毒, 血友病 B, RNA 干扰

## Trends in development of self-complementary adeno-associated virus vector

Yinghui Lü<sup>1,2</sup>, Qizhao Wang<sup>1,2</sup>, Weidong Xiao<sup>1,3</sup>, Yong Diao<sup>1,2</sup>, and Rui'an Xu<sup>1,2</sup>

1 Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Fujian 362021, China

2 Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fujian 362021, China

3 Department of Pediatrics, University of Pennsylvania, Philadelphia 19104, USA

**Abstract:** Numerous studies and clinical trials have demonstrated the efficacy of recombinant adeno-associated virus gene delivery vectors. However, prior to expression, it is necessary to convert the single-stranded DNA genome into double-stranded DNA, which hinders the efficiency of these vectors. We can entirely circumvent this step through the use of self-complementary recombinant adeno-associated virus vector (scrAAV). ScrAAV packages an inverted repeat genome that can fold into double-stranded DNA without the requirement for DNA synthesis or base-pairing between multiple vector genomes. By using scrAAV, we could increase expression efficiency and reduce immune response caused by vectors themselves. Therefore, it is a promising vector for gene therapy. So far, it has been used in the treatment of hepatic diseases, central nervous system diseases, and eye diseases. It has also been used in the modifications of stem cells and as vectors for siRNA/miRNA and ribozymes. In this review, we focused on the preparation, expression and location of scrAAV both *in vitro* and *in vivo*. We mainly introduced the recent progress of scrAAV based therapy of Hemophilia B, in order to elucidate the potential and prospects of scrAAV in gene therapy.

**Keywords:** gene therapy, self-complementary, recombinant adeno-associated virus, hemophilia B, RNAi

**Received:** December 4, 2008; **Accepted:** March 20, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2005AA216050, 2008AA02Z135).

**Corresponding author:** Rui'an Xu. Tel: +86-595-22690952; Fax: +86-595-22690952; E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(Nos. 2005AA216050, 2008AA02Z135)资助。

重组腺相关病毒(Recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体被认为是最有希望的临床基因治疗载体<sup>[1]</sup>, 已有 60 余项以 rAAV 为载体的基因治疗进入临床试验。本实验室近 20 年的研究已显示其在众多疑难杂症中具有良好的应用前景<sup>[2-4]</sup>。rAAV 载体进一步在临床上应用的关键是在不影响目的基因表达的同时如何最大限度地克服免疫反应。因此, 提高 rAAV 载体在靶细胞的转染效率, 降低载体的使用剂量是目前研究的目标。本实验室前期研究发现, 由单链(ssDNA)变成双链(dsDNA)之后, rAAV dsDNA 不稳定是影响转染效率和持久性的最主要因素<sup>[5]</sup>。因此, 开发带有双链基因组的自身互补型 rAAV 病毒载体(Self-complementary rAAV, scrAAV)是解决目前困扰 AAV 临床研究的有效方法之一。

## 1 scrAAV 载体的构建原理

无论是野生型 AAV(wt-AAV)病毒, 还是 rAAV 载体, 其病毒颗粒中都可包裹二倍体, 甚至四倍体的 AAV 基因组<sup>[6,7]</sup>, 这是构建 scrAAV 载体的理论基础。而 wt-AAV ITR 序列的特殊性是构建 scrAAV 载体的结构基础。目前的载体大多以 AAV2 为骨架, 其 DNA 两端 ITR 由 145 个核苷酸组成(图 1)。其中, RBE 由一连串重复 5'-GNGC-3'序列组成, 是 Rep(Rep78 和 Rep68)结合位点。AAV 复制时, 以自身 3'端序列

作为引物, 产生 2 个等长的具有一个共价连接末端的分子(子/母链)。之后, Rep78 和 Rep68 发挥核酸内切酶的作用, 在母链末端断裂位点处(TRS)产生一个缺口。在 T 型结构顶端, 存在另外一个 RBE(RBE'), 能维持这一结构的稳定性。新产生的-3'OH 作为 DNA 聚合酶底物, 合成新的 ITR。最后, ITR 退火形成发夹结构, 并将-3'OH 重新置于单链取代合成的起始位点。经过新一轮复制, 可形成一个新的 AAV 病毒及一个子/母链共存二聚体。如果其中一个 ITR 中的缺口产生失败, 那么产生的 AAV 病毒将可以二聚体形式稳定存在。因此, 将 TRS 缺失或者突变, 甚至将 D 序列也同时缺失, 即可得到 scrAAV 载体<sup>[9-11]</sup>。

## 2 scrAAV 载体的包装容量和包装效率

scrAAV 病毒颗粒中包装的是二聚体基因组, 那么其包装容量能否满足基因治疗需要呢? 本实验室前期已报道单链 rAAV(Single-stranded rAAV, ssrAAV)载体最大包装容量为 5.7 kb<sup>[12]</sup>, 虽也有报道包装容量可达 6.0 kb, 但其包装效率却明显下降<sup>[13]</sup>。McCarty 等最初制备的 scrAAV 基因组总大小为 4474 bp, 而当单链基因组达 3.4 kb 时即不能有效包装成病毒颗粒<sup>[9]</sup>。Wu 等证实, 能有效形成 scrAAV 病毒颗粒的最大单链基因组为 3.3 kb, 且在 2.3~3.3 kb 之间包装效率基本相同, 超过 3.4 kb 虽也能形成

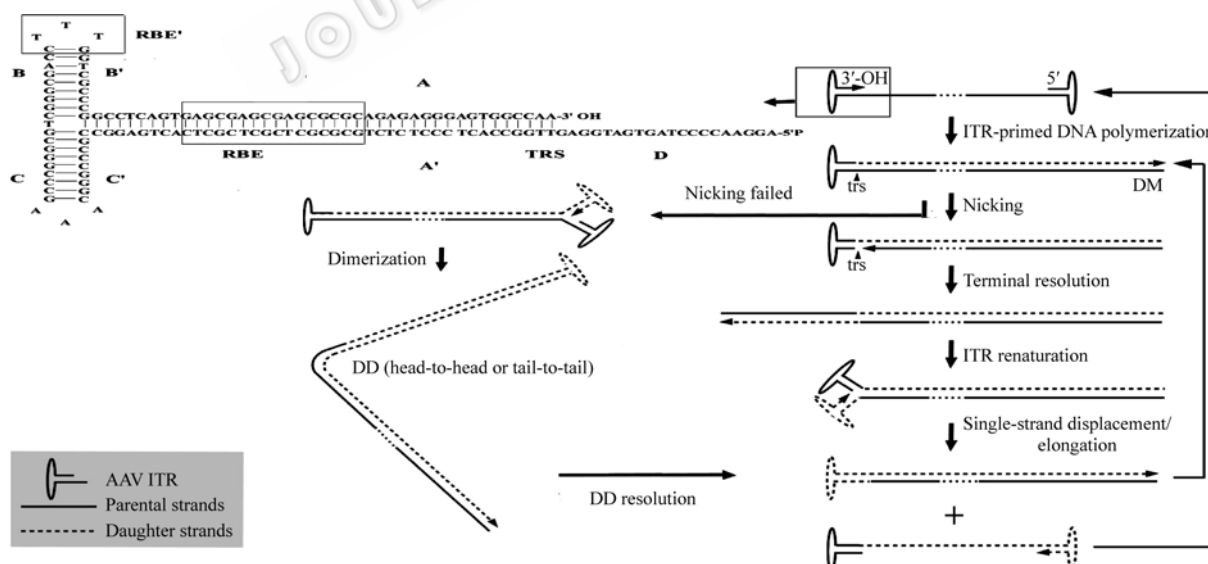


图 1 AAV 病毒复制过程以及 scrAAV 的产生机理(该图由 Gonçalves MA 发表于 2005 年 *Virol J* 的文章修改而成<sup>[8]</sup>)

Fig. 1 Schematic representation of the AAV DNA replication model and mechanism of scrAAV generation. The AAV2 ITR is composed of two arm palindromes (B-B' and C-C') embedded in a larger stem palindrome (A-A'). The D sequence is present only once at each end of the genome thus remaining single-stranded. RBE: Rep-binding element; TRS: terminal resolution site; DM: duplex monomers; DD: duplex dimers (Modified from the article of Gonçalves MA<sup>[8]</sup>).

病毒颗粒,均以 ssrAAV 形式存在<sup>[11]</sup>。何以 3.3 kb 的长度还能有效包装?要知道其最终形成的 scrAAV 病毒颗粒中包含有约 6.5 kb DNA。笔者认为这可能是 scrAAV 中基因组二级结构产生变化所致。目前已有报道显示,制备得到的 scrAAV 纯度从 45%至 90%不等<sup>[11,14,15]</sup>,皆有不同比例的 ssrAAV 存在。这些 ssrAAV 从何而来?scrAAV 的纯度又何以差别如此之大?研究表明突变的 TRS 修复并不是造成大量 ssrAAV 病毒颗粒产生的原因,而有可能是 Rep78 和 Rep68 核酸内切酶活性的作用结果<sup>[11]</sup>。高含量 Rep78 和 Rep68 可使 AAV ITR 重新产生缺口,致使 AAV 复制正常化,出现 ssrAAV。如果将 Rep78/68 的起始密码子 ATG 换成 ACG,便能使 scrAAV 的纯度从 45%提高到 90%左右<sup>[11]</sup>。

### 3 scrAAV 载体的转染效率和基因表达速度

转染效率高是 scrAAV 优于 ssrAAV 的一个主要特点。在 HeLa 细胞中,scrAAV 的转染效率是相应 ssrAAV 的 5~140 倍。对于一些 ssrAAV 很难转染的细胞,如 B16、3LL Lewis 以及 NIH3T3 细胞,scrAAV 都能有效转染<sup>[16]</sup>,且转染效率受腺病毒影响小,也不受羟基脲的影响,显示其转染效率与 DNA 合成无关。与 ssrAAV 相比较,scrAAV 的表达不仅高效,而且快速。在 293、HeLa 和 COS-7 细胞中,转染 scrAAV 载体(500 vector genome(vg)/细胞),1 d 之后就有 10%~20%的细胞表达 GFP,3 d 时几乎所有的细胞都可见 GFP;而转染 ssrAAV 的细胞在 1 d 及 3 d 表达 GFP 的阳性细胞仅占 1%和 10%,且荧光暗淡<sup>[16]</sup>。

不同类型 scrAAV 对于特定细胞的感染能力也不尽相同。scrAAV2 几乎能 100%感染多数肿瘤细胞,scrAAV5 则不及 scrAAV2,但若将 scrAAV2 与 scrAAV5 共转染即具有协同增效作用<sup>[17]</sup>。scrAAV2 及 scrAAV5 还能有效感染间叶干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC),并被认为是—种长效、安全的修饰 MSC 的载体<sup>[18]</sup>。在皮肤纤维原细胞中,scrAAV2 和 scrAAV6 的感染效率是其他类型载体的 3~5 倍<sup>[19]</sup>。未成熟树突状细胞(DC)中,以 scrAAV2、5、6 为高。scrAAV8、scrAAV-rh10 与 scrAAV7 相比,转染肝细胞的效率要高 4 倍,且转染效率还受性别影响,男性是女性的 2 倍<sup>[20]</sup>。而在造血干细胞(HSC)中,以 scrAAV1 和 scrAAV7 较高<sup>[21]</sup>。

在肝脏、肌肉、脑部和眼部组织中,scrAAV 启动基因表达的速度都比 ssrAAV 快,而且表达效率更高。小鼠门静脉注射  $2 \times 10^{10}$  (颗粒/鼠) scrAAV,7 d 后就有明显基因表达,而 ssrAAV 直到 21 d 才表现出明显区别<sup>[9]</sup>。进一步研究表明,静脉注射 scrAAV( $2 \times 10^{11}$  vg/鼠)后,3 d 时即可检测到 2%~5%的肝细胞表达 GFP,1 周后达到 10%,2 个月后达到 90%且有 1/3 的细胞具有极强的荧光信号,而 ssrAAV 直到 2 周后方能检测到荧光信号,荧光信号在 6 个月内缓慢增强,但只有 2%肝细胞可见荧光,且不及 scrAAV 在 3 d 时的荧光强度。肌肉内注射同样证明 scrAAV 无论是在表达速度还是效率上都优于 ssrAAV<sup>[16]</sup>。从整个试验过程分析,scrAAV 表达的总 GFP 是相应 ssrAAV 的 15~20 倍<sup>[16,22]</sup>。脑内直接注射 scrAAV 载体能在广泛的区域内监测到基因表达,从嗅觉区到脑干,再到脊髓,超过 50%的小脑 Purkinje 细胞可表达目的基因。无论是脑内注射还是静脉注射,甘露醇预处理都能显著增强 scrAAV 载体在中枢神经系统的分布<sup>[15]</sup>。在眼部组织中,对于 ssrAAV 几乎不能感染的人小梁网(TM)细胞,scrAAV 都能有效感染,且在 18 h 即开始表达目的蛋白<sup>[23]</sup>。在大鼠体内,scrAAV ( $6-8 \times 10^9$  颗粒/眼)除了能感染 TM 细胞外,还能有效感染虹膜和角膜内皮,几乎所有的动物在 6 周后都能检测到 GFP 阳性细胞,且不会引起眼内压(IOP)明显变化,也不会引起强烈免疫反应<sup>[24]</sup>。但是,不同 scrAAV 对于眼部各组织的感染效率也不尽相同。scrAAV5 对 TM 的感染能力最强,但是对虹膜和角膜内皮最低<sup>[24]</sup>。因此 scrAAV5 最适合 TM 相关疾病的治疗。另外,将衣壳蛋白中特定位点酪氨酸残基突变为苯丙氨酸,能促进目的基因在视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells, RGCs)的表达,表明对于特定细胞可以通过修饰衣壳蛋白进一步促进 scrAAV 的转染效率<sup>[25]</sup>。

### 4 scrAAV 体内的存在形式

Nathwani 等报道尾静脉注射 scrAAV8 后 24 h,绝大多数以线性方式存在,但已有 5%转变成超螺旋形式<sup>[26]</sup>。Wang 等报道在 scrAAV 载体注射后 3 d 的小鼠肝内,主要也还是以线性形式存在,但是 2 周时即有半数 scrAAV 转变成超螺旋形式,2 月后全部转变成超螺旋<sup>[12]</sup>。从基因组数量上看,注射 scrAAV

后 3 d 到 6 个月, DNA 拷贝数维持在 4~5 拷贝/细胞。而 ssrAAV 在注射后 3 d 到 2 周, 拷贝数急剧降低, 2 个月后再进一步降低, 平均只有 0.2 拷贝/细胞, 而且在 2 周内基本上都是以单链形式存在, 2~6 月期间才慢慢由单链变成双链<sup>[12]</sup>。scrAAV 与 ssrAAV 相比, 基因组在肝内更加稳定。转染后 1 年, scrAAV 组能检测到病毒基因组, 而 ssrAAV 即使转染剂量提高 10 倍也未能检测到病毒基因组<sup>[22]</sup>。在肝内, 表达目的基因的载体主要是游离形式的载体, 而非发生整合的载体<sup>[26]</sup>; 然而在 HSC 中, scrAAV 基因组可整合到寄主细胞的染色体上<sup>[21]</sup>。

## 5 scrAAV 载体在 B 型血友病基因治疗中的应用

B 型血友病是 X 染色体隐性遗传, 是第 IX 凝血因子(FIX)突变的结果。根据血液中 FIX 水平可分为轻度(5%~25%)、中度(1%~5%)、重度(<1%)患者, 但只要维持正常水平 1%的 FIX 水平就能显著降低自发性溶血的发生机率。目前主要治疗手段是静脉内注射 FIX 蛋白, 而重组蛋白存在半衰期短、重复给药等诸多不便<sup>[27]</sup>。

早在 1997 年, Snyder 等就首次成功利用 ssrAAV-FIX 治疗血友病 B(小鼠)<sup>[28]</sup>, 遗憾的是在大动物乃至临床开展的试验结果却不甚理想。犬肌肉内注射 ssrAAV 载体能使 FIX 稳定表达(70 ng/mL, 1%)超过 1 年, 但高剂量会产生明显免疫反应<sup>[29]</sup>。I/II 期临床试验表明, 肌肉内多点注射高达  $1.8 \times 10^{12}$  vg/kg 剂量的 ssrAAV 是安全的, 但却不足以产生 1%的 FIX<sup>[30]</sup>。随后利用肝脏靶向性 ssrAAV 载体, 在  $8 \times 10^{11}$ ~ $3.4 \times 10^{12}$  vg/kg 的范围内, 能够持续表达 FIX(220~590 ng/mL)超过 6 个月, 可惜的是也会发生抑制剂形成现象<sup>[31]</sup>。在另一项临床试验中通过肝动脉注射  $2 \times 10^{12}$  vg/kg 的 ssrAAV 载体, 在 2 周时 FIX 可达 11%, 但是 10 周后就回落到本底水平, 并且在 4 周后发现谷丙转氨酶活性升高(由 AAV 衣壳蛋白引起的)<sup>[32]</sup>。本实验室的研究也表明, 肌肉内注射 rAAV1 能明显提高 FIX 的表达水平, 但是同样存在抑制剂形成现象<sup>[33]</sup>。上述临床前及临床实验意味着降低机体的免疫反应是实现 rAAV 基因治疗血友病 B 的关键, 即如何安全地注入高剂量的 rAAV 载体而不引起抑制剂形成或者降低载体的使用量。

为此, 将 rAAV2 VP1 蛋白第 350~430 之间的氨基酸序列换成 rAAV1 VP1 的相应序列, 肌肉内注射  $1 \times 10^{11}$  颗粒/只(小鼠)杂合病毒载体(ssrAAV-221-IV), 产生的 hFIX 水平可达 450 ng/mL, 是相应 ssrAAV2 载体的 4~10 倍<sup>[34]</sup>。最近研究表明, ssrAAV8 在肝脏中的转染效率明显比 ssrAAV2 高<sup>[35]</sup>。尽管如此, 要达到 100%转染肝细胞(小鼠), 仍然需要  $1 \times 10^{13}$  的载体剂量。由于 scrAAV 不但转染高效, 而且快速, 因此是 B 型血友病基因治疗的理想选择。

为了将 hFIX 包装入 scrAAV 载体, 必须尽量缩短 hFIX 表达元件的长度。Nathwani 等构建了一个 mini-hFIX 表达框(scrAAV-LP1-hFIXco), 长度从原来的 4123 bp 缩短为 2.1 kb<sup>[26,36]</sup>。小鼠尾静脉注射 scrAAV8-LP1-hFIXco( $1 \times 10^{11}$  vg/只)产生的 hFIX 水平是相应 ssrAAV8 的 20 倍, 血浆 hFIX 水平可达 150 µg/mL。最终的结果证实, scrAAV8-LP1-hFIXco 比临床试验中所采用的最好的 ssrAAV 治疗效果还要好。在灵长类动物上展开的研究进一步表明, 肠系膜静脉注射后, 血清转氨酶水平和 IL-6 水平 6 周内都无明显升高。scrAAV5 比相应 ssrAAV5 表达强度高 2 个数量级, 但其强度却只有 scrAAV8 的 1/20 左右, 且速度相对较慢(可能是因为 rAAV5 衣壳蛋白的释放速度较慢)。在预先有较低抗 AAV8 抗体的恒河猴内, 注射 scrAAV8 载体并不能有效转染肝细胞, 采用 scrAAV5 却能实现有效转染。因此可以通过变换 rAAV 病毒的衣壳蛋白重复感染以加强治疗效果, 且交叉注射不会引起 IL-6 和转氨酶活性产生明显变化(6 周)。scrAAV5 与 scrAAV8 引起的免疫反应类似, 但似乎不受注射途径的影响。7 d 之后 anti-AAV IgM 抗体达到峰值, 并在 6 周时回复至本底水平。anti-AAV IgG 抗体 9 周时达到最大值并可稳定维持 200 d 以上。Anti-AAV IgG1 水平变化与 anti-AAV IgG 类似, 而 IgG2 和 IgG3 基本不变化。但是 Anti-AAV5 IgG 抗体的滴度是相应注射 scrAAV8 动物的 25 倍<sup>[36]</sup>。这些研究表明, 外周静脉注射 scrAAV5 和 scrAAV8 载体能有效、安全地转染非人灵长类, 为基因治疗 B 型血友病带来了新的希望。据此 Wu 等通过进一步优化 GC 含量、cis 调控元件以及密码子, 可使 hFIX 的表达再提高 4~20 倍, 可以进一步降低基因治疗中载体的使用量, 改善炎症、免疫等毒副反应<sup>[37]</sup>。

## 6 scrAAV 载体在其他领域的应用

基于 scrAAV 所具有的众多优点,其在各个领域的应用已经逐渐展开。scrAAV 治疗眼部疾病(如青光眼)的研究尚还处于临床前研究阶段,主要热点集中于注射途径、载体类型对 scrAAV 在体内的分布和毒副作用的考察<sup>[23-25]</sup>。研究表明,scrAAV 在眼部疾病治疗中的应用前景巨大。其中 scrAAV5 比较适合 TM 相关疾病的治疗。青光眼基因治疗的靶组织包括眼表的结膜组织、眼前节的小梁网和睫状体、眼后节的视网膜神经节细胞等。如果能在这些靶点增加目的基因的表达将有助于青光眼的治疗。通过将治疗基因,如 Rho-GTP 酶、钙调结合蛋白、睫状神经营养因子等装入载体 scrAAV,结合特异性表达调控元件,便有可能用于治疗青光眼等慢性眼部疾病。另外, siRNA、microRNA 和核酶皆为潜力巨大的基因治疗手段<sup>[38,39]</sup>,其目的基因都很小,特别适合用 scrAAV 作为表达载体。多项研究已经表明,scrAAV 载体能有效传递这些治疗性 RNA 进入靶细胞。Xu 等研究表明,scrAAV 载体能有效携带 siRNA 进入多药耐药肿瘤细胞系(乳腺癌和口腔癌),抑制目的基因 MDR1 的表达,并能快速、持续、有效地降低 P-糖蛋白的表达,逆转肿瘤耐药性<sup>[40]</sup>。scrAAVsi-PDHA1 则能有效感染大鼠肺纤维原细胞,转染 3 d 后 PDHA1 mRNA 水平降低 53%~80%,10 d 后降低 54%~70%<sup>[41]</sup>。利用 scrAAV 运载靶向 TGF- $\beta$ 1 的核酶进入角膜细胞能减少 77% TGF- $\beta$ 1 蛋白分泌<sup>[42]</sup>。B19p6 启动子与 scrAAV 载体结合在治疗乙型地中海贫血以及镰刀形红细胞相关疾病中非常有前景<sup>[43]</sup>。此外,scrAAV 在 HSC 修饰、克服血脑屏障等方面都有相关报道。scrAAV 转染之后基因组可以整合到宿主 HSC 的不同染色体上,但都不会危害宿主安全(1 年)<sup>[44]</sup>。结合上文关于 scrAAV 在中枢神经系统中的高效转染的论述,可知 scrAAV 在治疗中枢神经系统疾病中也可能有极大的应用前景<sup>[15]</sup>。

## 7 未来展望

以 ssrAAV 为载体的基因治疗研究正在有序地进行<sup>[1]</sup>,用于临床研究的载体类型已由单一的 rAAV2 扩展到 rAAV1、5、6,并出现了一批令人欣喜的、有显著治疗效果的 rAAV 基因药物。特别

是最近在眼部疾病——先天性黑内障治疗临床研究中取得的研究成果,再次激发了 rAAV 基因药物的研发与临床应用的热潮<sup>[45,46]</sup>。这 2 项最新的临床研究不但证明了 rAAV 基因药物的有效性,而且再次确认了其安全性。

大量动物以及临床研究的深入同时也给从事 rAAV 载体研究的科学家提出了更多挑战。rAAV 存在的潜在免疫反应,特别是衣壳蛋白特异性 T 细胞的问题<sup>[32]</sup>,是目前困扰整个 rAAV 基因治疗领域的难题。scrAAV 载体较之于 ssrAAV 载体,具有表达效率更高的优点,从而可以在达到具有治疗效果基因表达水平时尽量降低载体的使用量,进而克服机体存在的免疫反应以及对肝细胞的损伤问题。另外,scrAAV 表达快速,为某些需要及时表达目的基因的疾疾病如糖尿病等提供了更为合适的治疗载体<sup>[47]</sup>。其表达持久的特性不但可以降低在治疗过程中重复注射的次数,而且特别适合肝纤维化等慢性疾病的长期治疗<sup>[4]</sup>。因此,笔者认为 scrAAV 载体的出现将可极大促进 rAAV 载体在基因治疗中的应用,加速 rAAV 基因药物的产业化进程。

鉴于 scrAAV 载体包装容量的限制,可能无法直接将其应用于某些较大目的基因的包装和表达,因而,重新设计目的基因表达框、尽量缩短目的基因长度,使之能在 scrAAV 中有效包装、表达是今后 scrAAV 载体研究工作的重点之一。

## REFERENCES

- [1] Xu RA, Chen L, Xiao WD. Molecular Gene Medicine. Beijing: Peking University Press and Peking University Medical Press, 2008: 2-40, 68-90.  
许瑞安,陈凌,肖卫东.分子基因药理学.北京:北京大学出版社&北京大学医学出版社,2008: 2-40, 68-90.
- [2] During MJ, Xu RA, Young D, *et al.* Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med*, 1998, 4: 1131-1136.
- [3] Xu RA, Sun X, Tse LY, *et al.* Long-term expression of angiostatin and suppression of liver metastatic cancer. *Hepatology*, 2003, 37(6): 1451-1461.
- [4] Xu RA, Harrison PM, Chen M, *et al.* Cytochrome protects against damage-induced liver fibrosis. *Mol Ther*, 2006, 13(6): 1093-1100.
- [5] Wang J, Xie J, Lu H, *et al.* Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(32): 13104-13109.

- [6] de la Maza LM, Carter BJ. Molecular structure of adeno-associated virus variant DNA. *J Biol Chem*, 1980, **255**(7): 3194–3203.
- [7] Hirata RK, Russell DW. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol*, 2000, **74**: 4612–4620.
- [8] Gonçalves MA. Adeno-associated virus: From detective virus to effective vector. *Virol J*, 2005, **2**: 43.
- [9] McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther*, 2001, **8**(16): 1248–1254.
- [10] McCarty DM, Fu H, Monahan PE, *et al.* Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*. *Gene Ther*, 2003, **10**(26): 2112–2118.
- [11] Wu J, Zhao W, Zhong L, *et al.* Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: Packaging capacity and the role of Rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther*, 2007, **18**: 171–182.
- [12] Xu RA, Janson CG, Mastakov M, *et al.* Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther*, 2001, **8**: 1323–1332.
- [13] Grieger JC, Samulski RJ. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: Impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol*, 2005, **79**(1): 9933–9944.
- [14] Ding W, Yan Z, Zak R, *et al.* Second-strand genome conversion of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and AAV-5 is not rate limiting following apical infection of polarized human airway epithelia. *J Virol*, 2003, **77**(13): 7361–7366.
- [15] Fu H, Muenzer J, Samulski RJ, *et al.* Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: Global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol Ther*, 2003, **8**(6): 911–917.
- [16] Wang Z, Ma HI, Li J, *et al.* Rapid and highly efficient transduction by doublestranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*, 2003, **10**: 2105–2111.
- [17] Lee HS, Shin OK, Kim SJ, *et al.* Efficient gene expression by self-complementary adeno-associated virus serotype 2 and 5 in various human cancer cells. *Oncol Rep*, 2007, **18**(3): 611–616.
- [18] Kim SJ, Lee WI, Heo H, *et al.* Stable gene expression by self-complementary adeno-associated viruses in human MSCs. *Biochem Bioph Res Commun*, 2007, **360**(3): 573–579.
- [19] Han Z, Berendzen K, Zhong L, *et al.* A combined therapeutic approach for pyruvate dehydrogenase deficiency using self-complementary adeno-associated virus serotype-specific vectors and dichloroacetate. *Mol Genet Metab*, 2008, **93**(4): 381–387.
- [20] Nathwani AC, Cochrane M, McIntosh J, *et al.* Enhancing transduction of the liver by adeno-associated viral vectors. *Gene Ther*, 2009, **16**(1): 60–69.
- [21] Maina N, Han Z, Li X, *et al.* Recombinant self-complementary adeno-associated virus serotype vector-mediated hematopoietic stem cell transduction and lineage-restricted, long-term transgene expression in a murine serial bone marrow transplantation model. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(4): 376–383.
- [22] Thomas CE, Storm TA, Huang Z, *et al.* Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 2004, **78**: 3110–3112.
- [23] Li G, Choi V, Bryant PA, *et al.* A new, non-immunogenic gene therapy vector for the human trabecular meshwork: scAAV (self-complementary adeno-associated virus). *Invest Ophthalm Vis Sci*, 2005, **46**: 1358.
- [24] Buie LK, Borrás T. New self-complementary adeno-associated virus (scAAV) serotypes result in specific gene delivery to the trabecular meshwork in living rats. *Invest Ophthalm Vis Sci*, 2008, **49**: 1610.
- [25] Petrs-Silva H, Min SH, Zhong L, *et al.* Improving retinal ganglion cell transduction by using scAAV type 8 or type 9 vectors containing capsid mutations. *Invest Ophthalm Vis Sci*, 2008, **49**: 5350.
- [26] Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, *et al.* Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood*, 2006, **107**(7): 2653–2661.
- [27] Hasbrouck NC, High KA. AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: Problems and prospects. *Gene Ther*, 2008, **15**: 870–875.
- [28] Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, *et al.* Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet*, 1997, **16**(3): 270–276.
- [29] Herzog R, Yang E, Couto L, *et al.* Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med*, 1999, **5**: 56–63.
- [30] Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, *et al.* AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*, 2003, **101**: 2963–2972.
- [31] Mount JD, Herzog RW, Tillson DM, *et al.* Sustained phenotype correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver directed gene therapy. *Blood*, 2002, **99**(8): 2670–2676.
- [32] Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAVFactor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*, 2006, **12**: 342–347.

- [33] Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, *et al.* Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood*, 2004, **101**(1): 85–92.
- [34] Hauck B, Xu R, Xie J, *et al.* Efficient AAV1-AAV2 hybrid vector for gene therapy of hemophilia. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**(1): 46–54.
- [35] Gao GP, Lu Y, Sun X, *et al.* High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *J Virol*, 2006, **80**(12): 6192–6194.
- [36] Nathwani AC, Gray JT, McIntosh J, *et al.* Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood*, 2007, **109**(4): 1414–1421.
- [37] Wu Z, Sun J, Zhang T, *et al.* Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther*, 2008, **16**(2): 280–289.
- [38] Wang QZ, Lü YH, Diao Y, *et al.* The design of vectors for RNAi delivery system. *Curr Pharm Design*, 2008, **14**, 1327–1340.
- [39] Diao Y, Xu RA. *Protocols of Cellular and Molecular Biotechnology*. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 221–261.  
刁勇, 许瑞安. *细胞生物技术实验指南*. 北京: 化学工业出版社, 2008: 221–261.
- [40] Xu D, McCarty DM, Fernandes A, *et al.* Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Ther*, 2005, **11**(4): 523–530.
- [41] Han ZC, Gorbatyuk M, Jr TJ, *et al.* Down-regulation of expression of rat pyruvate dehydrogenase E1alpha gene by self-complementary adeno-associated virus-mediated small interfering RNA delivery. *Mitochondrion*, 2007, **7**(4): 253–259.
- [42] Kuznia PM, Glickman L, Yuan R, *et al.* Ribozyme mediated knockdown of TGF- $\beta$ 1 in cell culture using an scAAV vector. *Invest Ophth Vis Sci*, 2008, **49**: E-Abstract 3385.
- [43] Maina N, Zhong L, Li X, *et al.* Optimization of recombinant adeno-associated viral vectors for human beta-globin gene transfer and transgene expression. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(4): 365–375.
- [44] Han Z, Zhong L, Maina N, *et al.* Stable integration of recombinant adeno-associated virus vector genomes after transduction of murine hematopoietic stem cells. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(3): 267–278.
- [45] 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.
- [46] Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, *et al.* Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, 2008, **358**(21): 2231–2239.
- [47] Li H, Li XY, Xu RA. Adeno-associated virus-mediated pancreatic and duodenal homeobox gene 1 delivery induced insulin-producing cells in livers of diabetic rats. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2007, **12**(6): 614–619.