

综述

重组腺相关病毒规模化生物包装技术

王峰^{1,2}, 刁勇^{1,2}, 肖卫东^{1,2}, 许瑞安^{1,2}

1 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021

2 华侨大学分子药理学研究所, 泉州 362021

摘要: 重组腺相关病毒(Recombinant adeno-associated virus, rAAV)的诸多优点使其成为具有巨大潜力的人类基因治疗载体。人类基因治疗临床前和临床研究以及基因治疗产品的市场化要求 rAAV 载体生产的规模化。自 1989 年野生型的腺相关病毒序列被 Samulski 报道以来, rAAV 的生产工艺已经从传统的质粒共转染发展到应用包装细胞系和生产细胞系, 包装细胞也从“人体细胞”衍化到“昆虫细胞”。目前 rAAV 的生产规模和病毒载体质量都完全可以符合临床应用要求, 有效地促进 rAAV 在基因治疗临床上的广泛运用。以下将着重介绍 rAAV 规模化生物包装技术的发展趋势, 尤其各种规模化生产系统的要点。

关键词: 重组腺相关病毒, 生物技术, 人体, 昆虫, 细胞, 包装, 规模化生产

Large-scale production of recombinant adeno-associated virus (rAAV)

Feng Wang^{1,2}, Yong Diao^{1,2}, Weidong Xiao^{1,2}, and Ruian Xu^{1,2}

1 Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Quanzhou 362021, China

2 Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

Abstract: Recombinant adeno-associated virus has been proven to be a promising gene delivery vector for human gene therapy with many advantages. Successful applications of recombinant adeno-associated virus vectors in preclinical and clinical human gene therapies make it become a demanded product. A well-established and large-scale production system is therefore required. Since wild type of adeno-associated virus was well characterized in 1989, progress has been made. Particularly, package system of recombinant adeno-associated virus has been developed to use insect cell instead of human cell. These advances in adeno-associated virus production will allow it to meet the demands of basic research and clinical applications. This review will focus on trends in packaging systems and development on a large scale of recombinant adeno-associated virus production.

Keywords: recombinant adeno-associated, biotechnology, human, insect, cell, packaging, scale production

重组腺相关病毒载体 (Recombinant adeno-associated virus, rAAV) 是一种可以高效介导转基因在体内长期表达的基因载体, 被广泛应用于各种人

类重大疾病的基因治疗, 如血友病、眼科疾病、肝癌、肺癌、艾滋病等^[1-3]。目前使用 rAAV 的基因治疗已进入到临床阶段, 并取得了很好的疗

Received: April 29, 2009; **Accepted:** July 20, 2009

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

Corresponding author: Ruian 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。

效^[4-5]。大动物临床前研究或临床试验需要至少 10^{15} 个载体颗粒的单批产量^[6], 因而 rAAV 的规模化生产势在必行。经过研究者不断改进, rAAV 的生产工艺已经从“人体细胞工厂”发展到“昆虫细胞工厂”, 并可以采用生物反应器大规模生产病毒, 完全可以达到临床和市场化要求。

1 rAAV 的“人体细胞工厂”

1.1 质粒共转染人体细胞生产系统

野生型的 AAV 生产过程中需要辅助病毒共感染。但是在 rAAV 的制备过程中为了避免辅助病毒的污染, 最新的工艺都尽量避免采用辅助病毒来生产 rAAV 病毒颗粒, 而是把辅助病毒的功能基因重组成新的辅助质粒, 然后由质粒转染就可以起到辅助病毒的作用。研究者通过研究发现了腺病毒作为辅助病毒的基本功能单位为 E1a、E1b、E2a、E4 和 VA RNA^[7], 采用基因重组技术把几种必须的辅助基因重组在一起便可得到具有和腺病毒相似辅助功能的辅助质粒。随着 rAAV 生产工艺的不断改进, 研究者已经完全剔除了腺病毒结构和复制基因, 并得到了最简化的但辅助功能完整的病毒辅助质粒^[8]。目前在质粒转染生产 rAAV 系统中被转染质粒主要功能有 3 种: 目的转基因载体功能; 表达调节 AAV 复制的 *Rep* 基因和包装 AAV 病毒的 *Cap* 基因的功能; 促进 AAV 复制、翻译和包装的辅助病毒功能。在以往的实际生产过程中一般采用三质粒共转染系统或者二质粒共转染系统(将 *Rep*、*Cap* 和 Ad 辅助元件结合)生产 rAAV^[9-10]。在质粒共转染生产 rAAV 系统中被转染细胞一般使用 HEK293 细胞, 因其拥有 2 个必需腺病毒基因: *E1a* 和 *E1b*^[11]。但是研究者通过转染 *E1a* 和 *E1b* 在 HeLa 细胞中表达使 HeLa 细胞也可以通过质粒共转染系统生产 rAAV^[12-13]。目前质粒共转染生产的主要过程包括: 将目的基因插入到 rAAV 载体质粒中; 共转染前 1~3 h 将 293 细胞或 HeLa 细胞培养在不含 FBS 的 IMEM 中, 然后磷酸钙法共转染载体质粒和辅助质粒; 共转染后 4~6 h 将细胞培养基换成含有 FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 72 h 收获细胞; 之后裂解细胞进行一系列纯化直到得到符合要求的 rAAV 病毒载体^[11]。

然而该法使用的成本偏高, 且生产程序较繁, 而且需要瞬时转染贴壁细胞, 不容易稳定生产, 故此法只适用于 rAAV 的一般性研究生产而不适合 rAAV 的大规模生产。

1.2 rAAV 包装细胞系和生产细胞系

rAAV 包装细胞系生产系统有效地避免了多质粒转染效率偏低这个限制病毒生产的步骤。相对于质粒共转染人类细胞生产系统而言, 此法大大降低了大规模生产的成本。该法的发展经历了多个阶段。早在 1994 年, 研究人员就制备了一种可表达 *Rep* 基因的细胞系, 并可协助含有突变 *Rep* 基因的 rAAV 病毒的包装^[14]。改进的包装细胞可同时表达 *Rep* 和 *Cap* 蛋白, 并可协助 rAAV 载体颗粒的包装。但是此法生产 rAAV 病毒载体的效率很低^[15]。虽然之后有研究者采用 HeLa 细胞携带多拷贝的缺少末端重复序列 (ITR) 的 AAV 基因组筛选出包装细胞系, 然后转染 AAV 载体质粒和感染腺病毒籍以提高包装细胞生产 AAV 的能力(病毒滴度达到 10^8 CFU/mL 或 5×10^{10} particles/mL 以上), 可是这种方法仍然需要依赖转染 AAV 载体质粒^[16]。

研究者经过进一步改进, 把 rAAV 生产所需要的 *Rep*、*Cap* 和 rAAV 载体质粒全部转染到 HeLa 细胞或 293 细胞中从而获得包装细胞系, 经过野生型腺病毒感染后便可有效地生产 rAAV^[17-18]。然而这种方法必然会产生 rAAV 包装过程中的传统棘手问题, 即可能导致体内毒性反应的野生型腺病毒污染。而直接使用腺病毒质粒进行替代则致使包装细胞生产病毒效率大幅下降。

解决这一问题有 2 个难点: 一是腺病毒 *E1* 基因泄露表达导致的腺病毒基因和 AAV *Rep* 基因的表达; 二是由于小 *Rep* 蛋白(*Rep52/40*)的启动子在大 *Rep* 蛋白的编码区内导致无法严紧控制 4 种 *Rep* 基因的表达。因而产生细胞毒性导致包装细胞的不稳定或死亡^[14,19]。Qiao 等^[20-21]通过引入 2 种机制有效地解决了这 2 个瓶颈, 制备出高效生产 rAAV 的稳定包装细胞系。首先是引入了 TET-控制的 Ad *E1a* 和 *E1b* 表达细胞系与不含有 *E1a*、*E4* 和 *E3* 基因的复制缺陷型的腺病毒感染相结合的机制。将 AAV *Rep* 和 *Cap* 基因以及包含 *GFP* 表达框的 AAV 载体基因转

染到 TET-控制 *Ela-E1b* 表达细胞系中, 产生可诱导 AAV-GFP 包装细胞系。当在不含有 TET 的细胞培养基中使用复制缺陷型 Ad 感染此细胞系时包装细胞系就会生产出高滴度的 AAV-GFP 病毒载体。其次引入了 Cre-lox P “双剪接开关系统”。该系统同时抑制 Rep78/68 和 Rep52/40 蛋白的表达。在表达 Rep/Cap 蛋白的质粒和含有目的基因的 AAV 载体质粒中都插入两端用 *loxP* 基因包裹的内含子, 从而阻断了基因的表达; 当用可以表达 Cre 重组蛋白酶的 Ad 感染细胞时, *loxP* 基因包裹的内含子被剪切从而引起 Rep/Cap 基因的表达, 进而达到严紧控制 4 种 Rep 蛋白表达的效果。

在包装细胞系的基础上将内源性启动子控制下的 Ad 病毒的 *E2*、*E4* 和 *VA* 基因同时转染入包装细胞系即可以制备出生产细胞系。它能在简单的药物刺激下生产 AAV-GFP 病毒载体, 研究表明此生产细胞系的稳定性和病毒产率不高^[22]。

包装细胞系和生产细胞系使得 rAAV 的生产变得简便、经济且可以规模化, 但是其缺少稳定性和灵活性。包装细胞系或生产细胞系产品单一化, 只能生产一种 rAAV 病毒载体, 且易衰退。此法虽已经市场化, 但是尚需进一步改进与优化。

2 rAAV 的“昆虫细胞工厂”

2.1 杆状病毒/昆虫细胞悬浮生产系统

采用人体细胞生产 rAAV 需要扩增和转染贴壁细胞, 在生产过程中无法完全脱离质粒转染贴壁细胞这一限制性步骤。从苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒得到的一种重组杆状病毒被应用于昆虫细胞生产的 rAAV 生产系统, 彻底解决了上述难关。此方法被证明是一种简单、高效、经济的可以大规模生产的方法, 而且生产出的 rAAV 与使用 293 细胞生产得到的病毒载体在生物功能上没有差异^[6]。通过不断地研究和改进, 此方法日趋完善, 生产规模也从摇瓶规模发展到生物反应器规模, 总产量高达 10^{18} 个病毒颗粒以上^[23]。此方法在 rAAV 的生产工艺上具有很大的改进, 包括: 彻底摆脱了瞬时质粒感染贴壁细胞, 无需辅助病毒或其基因, 具有灵活性(可生产

不同类型的 rAAV), 生产成本低(可以在无血清的培养基中生产), 可以耐受一系列的摩尔渗透压, 可以在悬浮培养基中进行连续的大规模生产, 生产得率和总量完全达到临床和市场化要求, 外源基因高效表达^[6,23-25]。

在杆状病毒/昆虫细胞生产体系中需要 3 种不同的杆状病毒, 分别为 Bac-Rep: 含有 rAAV 的 *Rep52* 和 *Rep78*, 并分别由多角体蛋白启动子(Polyhedrin promoter)和 *IE*(Immediate-early gene)启动子调控; Bav-VP 或 Bac-Cap: 含有 3 种 *Cap* 基因 *VP1*、*VP2* 和 *VP3*, 并由多角体蛋白启动子调控; Bac-Transgene: 含有由 rAAV 末端重复序列包裹的转基因, 并由昆虫 *p10* 和哺乳动物巨细胞病毒(CMV)启动子共同调控, 目前生产研究多使用易检测的绿色荧光蛋白基因(GFP)^[6]。在具体的操作中, 首先将 3 种杆状病毒分别感染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, Sf9)细胞进行扩增。将纯化后的 3 种杆状病毒共感染悬浮培养的 rAAV 昆虫生产细胞。在生产过程中定期检测被感染的细胞量、成活率和 rAAV 产量等参数以优化生产工艺。在最佳时间段收获细胞并提取提纯 rAAV 病毒, 之后检测 rAAV 的产量和质量(图 1)。

2.2 杆状病毒/昆虫细胞悬浮生产系统的优化

目前使用杆状病毒/昆虫细胞生产 rAAV 的规模也从摇瓶发展到生物反应器水平, 最大体积达到 40 L。并且在生产过程使用电介质谱和原型 GFP 生物传感器^[26]等在线监测手段和流式细胞、ELISA 和 Western blotting 等非在线监测手段进行检测, 最优化生产过程中的代谢和物化参数, 最终确定杆状病毒/昆虫细胞大规模生产系统的最佳条件, 包括细胞的类型和感染时的细胞浓度、3 种杆状病毒使用的比例和总的感染复数、溶氧量、pH、温度等。被用于 rAAV 生产的昆虫细胞包括 Sf9 细胞和粉纹夜蛾细胞(*Trichoplusia cell*, H5 cell)。虽然 H5 细胞的单细胞生产量要高于 Sf9 细胞, 但是因为杆状病毒必须在 Sf9 细胞中扩增, 从生产工艺的整体和流水线操作上考虑 Sf9 细胞的优势更大。在不同的杆状病毒/昆虫细胞生物反应器系统中, 当 3 种病毒感染量比列为 1:1:1, 总感染复数(MOI)为 3 或 5, 感染时细胞浓度为 1×10^6 个细胞/mL, 在感染后 72 h 可收获最

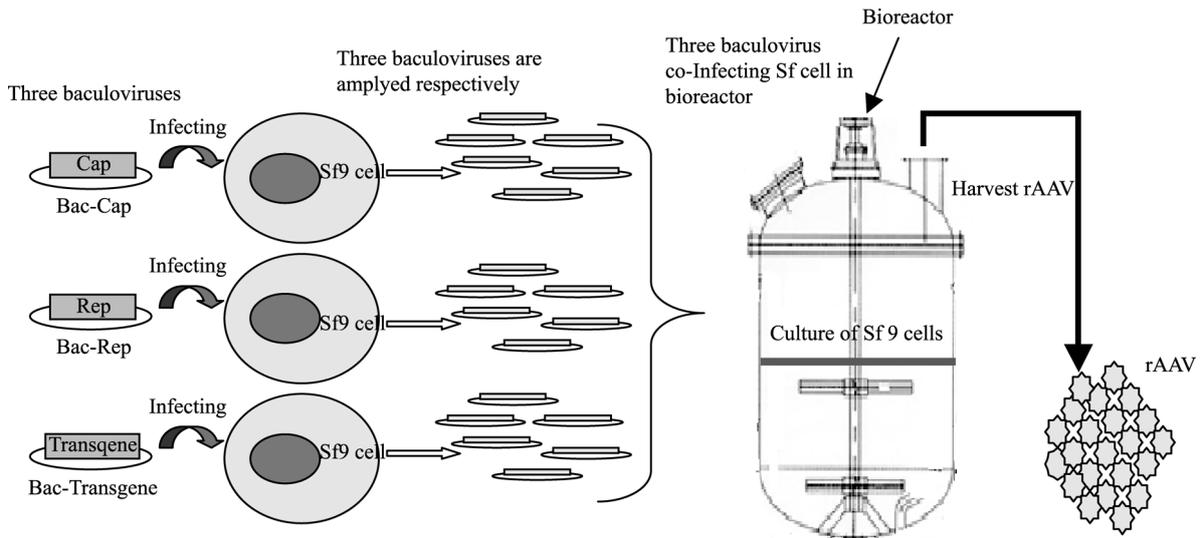


图 1 生物反应器规模的杆状病毒/昆虫细胞悬浮生产 rAAV 系统的生产流程

Fig. 1 Using a baculovirus/insect cell suspension culture system in the scale of bioreactor for rAAV package. First three baculoviruses including Bac-Cap, Bac-Rep and Bac-Transgene are amplified in Sf cell respectively, then the three amplified baculoviruses co-infect Sf cells cultured in the bioreactor. After incubation for 48–72 h, rAAVs are harvested.

大量的感染性 rAAV^[23,25]。但是在更经济的生产系统中, 感染复数可以降低至 0.03, 并且可以在 48 h 得到和 72 h 收获的差异不大的 rAAV 量, 这大大地减少了生产成本和周期^[27-28]。这使得杆状病毒/昆虫细胞生产系统完全适用于作为 rAAV 生产的一种稳定的经济的规模化生产工艺。

3 展望

随着 rAAV 在基因治疗中存在的问题被逐渐解决, 如使用杂合的 rAAV 载体、对 rAAV 的外壳进行修饰等方法降低其免疫原性和提高转导效率^[29-30]; 使用双链 rAAV 基因组提高转导效率^[31]等, rAAV 作为一种高效安全性的转基因载体在人类基因治疗中的优势变得更大。最近的血友病基因治疗临床试验表明, 在通过肝动脉途径给药后, AAV2 外壳启动了 CD8⁺ T 细胞介导的免疫反应, 对转导了载体的肝细胞产生细胞毒作用, 从而使有效的第九因子(FIX)表达只持续了 8 周, 导致治疗失败。研究人员认为, 患者曾经感染过 AAV2, 并在机体存在有针对病毒的记忆性 CD8⁺ T 细胞, 在接受基因治疗后, AAV2 外壳激活了这些记忆性 CD8⁺ T 细胞, 导致了含有 AAV2 载体的肝细胞被免疫系统清除^[1]。

在靶组织内复制竞争性 AAV 颗粒(rcAAV) 所合成的包装蛋白残余污染引发的危险性免疫反应长期存在, 尤其在 FIX 表达对血友病临床治疗中, AAV 颗粒(rcAAV)合成的包装蛋白引发的危险性免疫反应一直被广为关注。为了系统地减少含有潜在污染蛋白的 rcAAV 颗粒的影响, 从源头彻底消除病毒衣壳蛋白复制与合成能力的研究, 迄今为止, 尚未见有国内外的相关报道^[1,37]。

本研究团队最近设计构建了一种新型的、细胞特异性的、内含多个组织特异如肝特异和造血特异序列拷贝的 microRNA 结合序列的基因片段, 通过控制包装蛋白基因片段表达, 进而清除腺相关病毒包装蛋白污染诱发的 AAV 载体介导的免疫反应, 从而保证基因治疗取得成功^[37]。

rAAV 在基因治疗上的诸多优点及其特有的口服给药方式^[1,10,32-33]都表明 rAAV 在临床上的广泛应用将成为基因治疗领域不可阻挡的趋势。而 rAAV 规模化生产工艺在不断成熟, 如使用规模化的杆状病毒/昆虫细胞悬浮生产系统, 使用色谱层析法大规模纯化技术等^[34-36], 也将促进其在临床上更广泛地应用并使其最有可能成为大规模市场化的基因治疗载体^[1]。

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] Xu R, Sun X, Tse LY, *et al.* Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice. *Hepatology*, 2003, **37**(6): 1451–1460.
- [3] Shi J, Zheng D, Liu Y, *et al.* Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res*, 2005, **65**(5): 1687–1692.
- [4] Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, *et al.* Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. hAADC. *Neurology*, 2008, **70**(21): 1980–1983.
- [5] Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, *et al.* Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(10): 979–990.
- [6] Urabe M, Ding C, Kotin RM, *et al.* Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**(16): 1935–1943.
- [7] Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction, vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, **158**: 97–129.
- [8] Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 1998, **72**(3): 2224–2232.
- [9] Xu R, Janson, CG, Mastakov M, *et al.* Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther*, 2001, **8**(17): 1323–1332.
- [10] During MJ, Xu R, Young D, *et al.* Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med*, 1998, **4**(10): 1131–1135.
- [11] Diao Y, Xu RA. Protocols of Cellular and Molecular Biotechnology. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 313–316.
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: 313–316.
- [12] Matsushita T, Okada T, Inaba T, *et al.* The adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based adeno-associated virus vector production. *J Gen Virol*, 2004, **85**(8): 2209–2214.
- [13] Reed SE, Staley EM, Mayginnes JP, *et al.* Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods*, 2006, **138**(1/2): 85–98.
- [14] Yang Q, Chen F, Trempe JP. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol*, 1994, **68**(8): 4847–4856.
- [15] Vincent KA, Moore GE, Haiwood NL. Replication and packaging of HIV envelope genes in a novel adeno-associated virus vector system. Vaccine 90, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990: 353–359.
- [16] Kenji T, Yukihiko H, Takashi S. A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(4): 507–513.
- [17] Clark KR, Voulgaropoulou F, Fraley DM. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, 1995, **6**(10): 1329–1341.
- [18] Chadeuf G, Favre D, Tessier J, *et al.* Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J Gene Med*, 2000, **2**(4): 260–268.
- [19] Michael S, Sandra A, Robert MK. Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol*, 2000, **74**(20): 9441–9450.
- [20] Qiao C, Li J, Skold A, *et al.* Feasibility of generating adeno-associated virus packaging cell lines containing inducible adenovirus helper genes. *J Virol*, 2002, **76**(4): 1904–1913.
- [21] Qiao C, Wang B, Zhu X, *et al.* A novel gene expression control system and its use in stable, high-titer 293 cell-based adeno-associated virus packaging cell lines. *J Virol*, 2002, **76**(24): 13015–13027.
- [22] Cecchini S, Negrete A, Kotin RM. Toward exascale production of recombinant adeno-associated virus for gene transfer applications. *Gene Ther*, 2008, **15**(11): 823–830.
- [23] Alejandro N, Robert MK. Production of recombinant adeno-associated vectors using two bioreactor configurations at different scales. *J Virol Methods*, 2007, **145**(2): 155–161.
- [24] Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, **99**: 119–145.
- [25] Meghrou J, Aucoin MG, Jacob D, *et al.* Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-L bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**(1): 154–160.
- [26] Gilbert, PA, Garnier A, Jacob D, *et al.* Online measurement of green fluorescent protein (GFP) fluorescence for the monitoring of recombinant adenovirus production. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 561–568.

- [27] Negrete A, Yang LC, Mendez AF, *et al.* Economized large-scale production of high yield of rAAV for gene therapy applications exploiting baculovirus expression system. *J Gene Med*, 2007, **9**(11): 938–948.
- [28] Negrete A, Esteban G, Kotin RM. Process optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(4): 761–772.
- [29] Zaiss AK, Muruve DA. Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther*, 2008, **15**(11): 808–816.
- [30] Farris KD, Pintel D. Improved splicing of the AAV capsid protein-supplying pre-mRNAs leads to increased rAAV vector production. *Hum Gene Ther*, 2008, **19**(12): 1421–1427.
- [31] 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.
- [32] During MJ, Symes CW, Lawlor PA, *et al.* An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science*, 2000, **287**(5457): 1453–1460.
- [33] Ma H, Liu Y, Liu S, *et al.* Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular. *Hepatology*, 2005, **42**(6): 1355–1363.
- [34] O’Riordan CR, Lachapelle AL, Vincent KA, *et al.* Scaleable chromatographic purification process for recombinant adeno-associated virus (rAAV). *J Gene Med*, 2000, **2**(6): 444–454.
- [35] Davidoff AM, Ng CY, Sleep S, *et al.* Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *J Virol Methods*, 2004, **121**(2): 209–215.
- [36] Kaludov N, Handelmann B, Chiorini JA. Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**(10): 1235–1243.
- [37] Lu H, Qu G, Xu RA, *et al.* Systemic elimination of de novo capsid protein synthesis from replication competent AAV contamination. *Mol Ther*, 2009 (in press).

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的(Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法(Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论(Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。