

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202412014



# C5-12 启动子降低 rAAV1 介导的基因递送后转基因的免疫反应

王晓<sup>1</sup>, 黄晓平<sup>2</sup>, 黎玲<sup>1</sup>, 张红<sup>1</sup>, 刁勇<sup>1</sup>

(1. 华侨大学 医学院, 福建 泉州 362021;

2. 泉州师范学院 化工与材料学院, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 通过转基因表达测定、体外抗原递呈、转导阳性细胞清除等实验,探索 C5-12 启动子在减少或消除针对卵清蛋白(OVA)的免疫反应的作用。实验结果表明:在小鼠成肌细胞 C2C12 中,C5-12 启动子不影响 OVA 的表达,而在小鼠骨髓树突状细胞 JAWS II 中,C5-12 启动子显著抑制 OVA 表达和 OVA 抗原肽的递呈;肌肉给药后,C5-12 启动子能维持 OVA 在肌肉组织中持续高表达,体液免疫维持较低水平,肌肉组织中免疫反应较轻且转导阳性细胞清除明显减少。

**关键词:** C5-12 启动子;重组腺相关病毒(rAAV);免疫反应;转基因;卵清蛋白(OVA)

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2025)04-0435-07

## C5-12 Promoter Reduces Transgene Immune Response Following rAAV1-Mediated Gene Delivery

WANG Xiao<sup>1</sup>, HUANG Xiaoping<sup>2</sup>, LI Ling<sup>1</sup>,  
ZHANG Hong<sup>1</sup>, DIAO Yong<sup>1</sup>

(1. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. College of Chemical Engineering and Materials Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** The efficacy of the C5-12 promoter in reducing or abolishing the immune response against ovalbumin (OVA) was explored through experiments such as determination of transgene expression, *in vitro* antigen presentation, and the clearance of transduced positive cells. The experimental results showed that in mouse myoblasts C2C12, the C5-12 promoter had no impact on the expression of OVA, while in mouse bone marrow dendritic cells JAWS II, the C5-12 promoter significantly inhibited both the expression of OVA and the presentation of OVA antigenic peptides. After muscle administration, the C5-12 promoter could maintain the continuous high expression of OVA in muscle tissues, the humoral immunity remained at a relatively low level, the immune response in muscle tissues was relatively mild, and the clearance of transduced positive cells was significantly reduced.

**Keywords:** C5-12 promoter; recombinant adeno-associated virus (rAAV); immune response; transgene; ovalbumin (OVA)

收稿日期: 2024-12-20

通信作者: 刁勇(1967—),男,教授,博士,博士生导师,主要从事基因药物的研究。E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81502687, 81371669);福建省自然科学基金资助项目(2021J01439);福建省泉州市科技计划项目(2020C061);福建省高等教育协会 2022 年高等教育科学研究实验室研究专项(22FJSYYB006)

在传染性疾病的防治领域,骨骼肌已成为外源性生产、分泌相关治疗药物极具吸引力的靶向组织之一<sup>[1]</sup>。重组腺相关病毒(rAAV)具备无致病性、低免疫原性、介导外源基因长期表达等多重优势特性,且宿主范围广泛。因此,rAAV 成为当下基因治疗领域最具发展潜力与前景的载体<sup>[2-7]</sup>。大量研究表明,rAAV 具备在多种组织(肌肉组织尤为典型)中进行转基因传递和表达的能力<sup>[8]</sup>。最近,rAAV 的应用范畴得到进一步拓展,rAAV 被用于表达外源广谱中和抗体,或者修饰 CD4-Ig<sub>s</sub>,旨在预防艾滋病<sup>[9-11]</sup>、丙型肝炎<sup>[12]</sup>、疟疾<sup>[13]</sup>和流感<sup>[14]</sup>等感染性疾病。然而,这些方法存在的主要局限是 rAAV 介导的基因递送可导致转基因特异性免疫反应<sup>[15]</sup>,甚至进一步引发针对内源性蛋白的自身免疫现象<sup>[16-17]</sup>。

抗原呈递细胞(APC)的不良转导是转基因诱导的免疫反应的一个众所周知的原因,它会触发宿主对 rAAV 表达的转基因产物的免疫<sup>[18-19]</sup>。在专职 APC(如树突状细胞(DC)、巨噬细胞和 B 淋巴细胞)中,DC 是宿主中最重要的细胞类型,有着最广泛的抗原呈递范围。因此,rAAV 转导 DC 可促使转基因肽表位展示于 MHC I 类分子上,进而激活细胞毒性 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞(CTL)来清除表达外源蛋白的细胞。C5-12 启动子最初是在筛选 C2C12 肌管中的转基因表达时发现的,它能启动基因在肌肉细胞中实现高表达,并在质粒载体转导肌肉组织的实验中得到证实<sup>[20-21]</sup>。此外,C5-12 启动子已被证明在转基因动物中具有肌细胞特异性,使用它不仅可以达到与传统巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的表达系统相当的 F. IX 表达水平<sup>[22]</sup>,还能限定转基因在肌肉组织中表达,消除转基因诱导的免疫反应。基于此,本文构建新型重组 rAAV 载体 rAAV-C5-12-OVA,并对其在小鼠体内的作用效果进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、1640 培养基、小鼠成肌细胞 C2C12、胎牛血清(武汉市普诺赛生命科技有限公司);小鼠骨髓树突状细胞 JAWS II (深圳市赛奥斯科技有限公司);聚乙烯亚胺(PEI,美国 Polysciences 公司);卵清蛋白(OVA)、人抗卵清蛋白 IgG 酶联免疫吸附测定试剂盒(上海市瑞番科技有限公司)。

1.2 rAAV 载体的构建与制备

依据实验室建立的三质粒包装系统进行 rAAV 的包装。首先,将 293T 接种于 15 cm 培养皿中,进行为期 3 d 的培养,待细胞密度达 85%,将转基因质粒、衣壳质粒和辅助质粒按照 1 : 1 : 3 的摩尔比与 PEI 充分混合,静置 10 min 后,添加至培养皿中,转染持续 6 h 后,更换为完全 DMEM 培养基,继续培养至 72 h 后,收获细胞。然后,超声破碎细胞、全能核酸酶(Benzonase)消化,采用氯化铯梯度离心法对 rAAV 进行分离,通过透析密度梯度离心进一步纯化 rAAV,从而获得符合实验要求的 rAAV 载体。最后,对 rAAV 进行实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)分析。

1.3 OVA 和抗 OVA 抗体质量浓度的测定

采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法对细胞培养上清、血清中 OVA 和血清中 OVA 抗体进行检测,具体操作严格遵守说明书的流程。首先,酶标板中加入 100  $\mu$ L 的 OVA 抗体或 OVA,室温孵育 10 h 后,吸出液体,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次。然后,将 100  $\mu$ L 细胞培养上清或血清,与标准品分别加入酶标板中,室温孵育 1 h,吸出液体,含 Tween 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)漂洗 3 次。接着,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的 OVA 抗体或抗 OVA 抗体的抗体,室温孵育 1 h,吸出液体,PBS 漂洗 3 次。最后,加入 100  $\mu$ L 的 3,3',5,5'-四甲基联苯二胺(TMB)于室温显色 30 min,待显色反应充分后,加入 50  $\mu$ L 1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,随即使用酶标仪读取吸光值(D(450))。依据预先绘制的标准曲线,精确计算得出 OVA 及其抗体的质量浓度。

1.4 体外转染

C2C12 在含有胎牛血清(FBS,体积分数为 10%)和青霉素/链霉素(体积分数为 1%)的 DMEM 培养基中进行培养。后续使用 PolyJet 转染试剂将质粒 pAAV-CMV-OVA、pAAV-C5-12-OVA 转染至 C2C12;JAWS II 培养在含有 FBS(体积分数为 10%)、鼠 GM-CSF(5 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)、谷氨酰胺(4 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)的  $\alpha$ -MEM 中,培养至合适阶段后,收获 2.0 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞,在室温下重悬于 100  $\mu$ L 电转缓冲液里,再加入 pAAV-CMV-OVA、pAAV-C5-12-OVA,将混合样品加入电击转化杯中,并选择相应的程序进行电转,电转操作完成后继续培养 3 d。最后,收集细胞培养上清液,测定 OVA 质量浓度。

### 1.5 DC 体外对 OVA 抗原递呈分析

首先,用 pAAV-CMV-OVA 和 pAAV-C5-12-OVA 质粒分别电转 JAWS II ,将电转质粒 12 h 后的 JAWS II 和 B3Z 杂交瘤细胞按 1 : 1 个数比进行混合。然后,每孔接种  $1\times 10^5$  个细胞到 12 孔板中,在 37 ℃ ,CO<sub>2</sub> 体积分数为 5 % 的条件下继续培养 24 h。接着,收集细胞,弃培养上清,PBS 漂洗 2 次,加入 0.5 mL 氯酚红-β-d-吡喃半乳糖苷(CPRG)底物缓冲液,待溶液变黄后,酶标仪读取吸光值( $D(570)$ ),或在细胞中加入 X-Gal 染色液进行染色,待细胞形成蓝色产物,进行拍照,并统计阳性细胞数目。

### 1.6 动物实验

雄性 C57BL/6 小鼠(8~10 周龄)购自中国科学院上海实验动物中心,为了保障实验动物的健康状况,将其饲养于独立通风笼具(IVC)系统之中。设置对照组与实验组,每组包含了 3 只小鼠。其中,对照组的小鼠在胫骨前肌部位注射 rAAV1-CMV-OVA,注射剂量为每只小鼠  $1\times 10^{11}$  病毒基因组;实验组的小鼠在胫骨前肌部位注射 rAAV1-C5-12-OVA,注射剂量为每只小鼠  $1\times 10^{11}$  病毒基因组。

在完成注射操作 1 周后,通过眼球静脉丛进行采血,采集的血液收集至 BD 微量血清分离管内,之后每隔 1 周进行一次采血操作,如此持续至完成注射后的第 12 周。收集的血液样本将用于后续分析 OVA 质量浓度。

### 1.7 数据统计

数据用平均值±标准偏差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示;结果采用 SPSS 统计学分析,\* 表示差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ );\* \* 表示差异具有高度统计学意义 ( $P<0.01$ );ns 表示差异不具有统计学意义 ( $P>0.05$ )。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 C5-12 启动子对转基因在不同细胞中表达的影响

为了验证构建的载体在细胞中表达情况,将质粒 pAAV-C5-12-OVA、pAAV-CMV-OVA 分别转染至 C2C12 和 JAWS II 细胞,并用 ELISA 法测定 OVA 表达量(OVA 质量浓度, $\rho(\text{OVA})$ ),结果如图 1 所示。由图 1 可知:经 pAAV-CMV-OVA 转染,JAWS II 、C2C12 中 OVA 质量浓度分别为 213.3、453.5 ng · mL<sup>-1</sup>;经 pAAV-C5-12-OVA 转染,JAWS II 中 OVA 质量浓度仅为 18.6 ng · mL<sup>-1</sup>,而在 C2C12 中 OVA 质量浓度为 405.2 ng · mL<sup>-1</sup>。

因此,C5-12 启动子不影响 OVA 在 C2C12 细胞中的表达,却使转基因在 JAWS II 细胞的表达效率大幅降低,凸显了 C5-12 启动子的组织特异性。

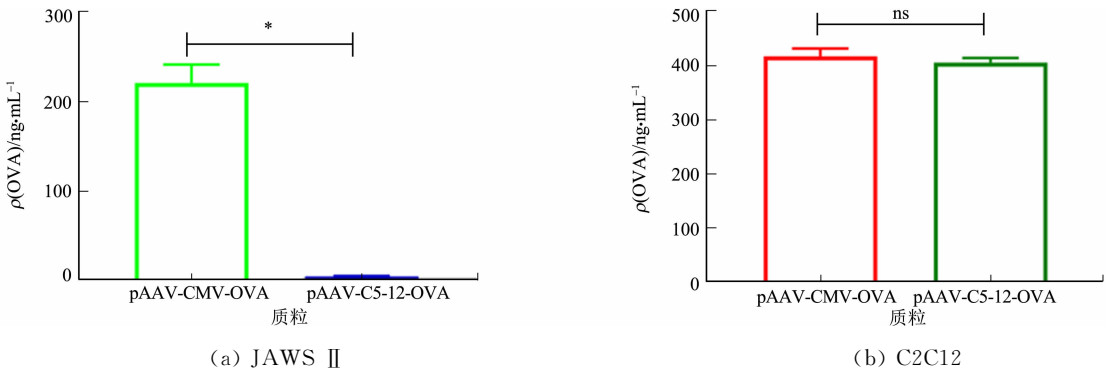


图 1 JAWS II 和 C2C12 细胞中的 OVA 质量浓度

Fig. 1 OVA mass concentration in JAWS II and C2C12 cells

### 2.2 C5-12 启动子对 OVA 抗原递呈的抑制

B3Z 细胞作为一种 CD8+T 细胞的杂合瘤细胞,具备特异性识别小鼠 Kb MHC- I 类分子上递呈的 OVA 抗原肽残基 257-264(SIINFEKL)的能力。与此同时,B3Z 细胞含有受 IL2 增强子的活化 T 细胞核因子(NFAT)元件转录控制驱动的 LacZ 报告基因,一旦 APC 细胞递呈的抗原被 B3Z 细胞识别,便会触发 LacZ 基因的表达,因此,B3Z 细胞成为检测 APC 细胞通过 MHC- I 类途径递呈 OVA 抗原的关键细胞。用 pAAV-C5-12-OVA、pAAV-CMV-OVA 转染 JAWS II 细胞后,将其与 B3Z 细胞共培养。

活化的 B3Z 细胞原位染色,如图 2 所示。对活化的 B3Z 细胞进行 β 半乳糖苷酶定量分析,结果如

图 3 所示。由图 2、3 可知:经 LacZ 原位染色后,转染 pAAV-CMV-OVA 组中表达  $\beta$ -半乳糖苷酶的 B3Z 细胞明显增多,转染 pAAV-C5-12-OVA 组中活化的 B3Z 细胞则明显减少;CPRG 底物显色结果与原位染色结果基本一致,转染 pAAV-C5-12-OVA 组的吸光度明显小于转染 pAAV-CMV-OVA 组。

因此,pAAV-C5-12-OVA 在 JAWS II 细胞中的 OVA 表达量大幅降低,进而使递呈到细胞膜表面的 SIINFEKL 抗原肽显著减少,进一步说明了 C5-12 启动子的特异性。

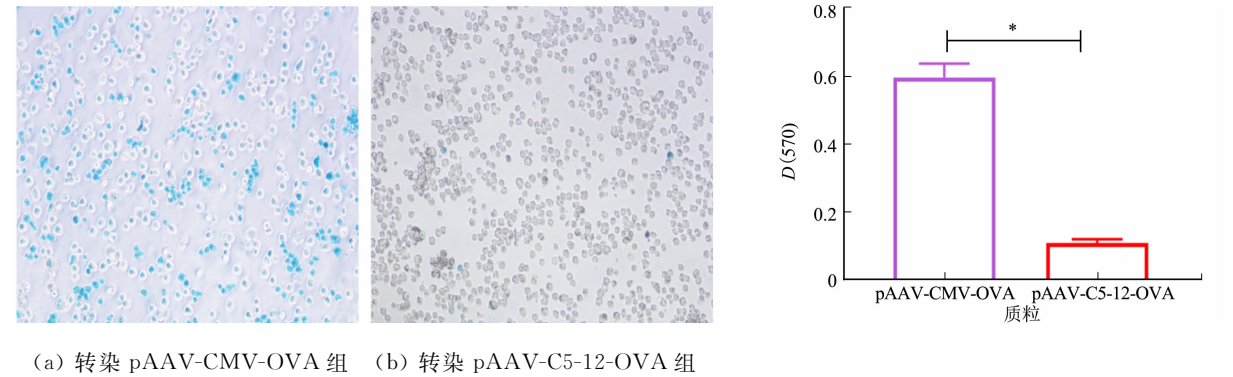


Fig. 2 Activated B3Z cells stained *in situ*

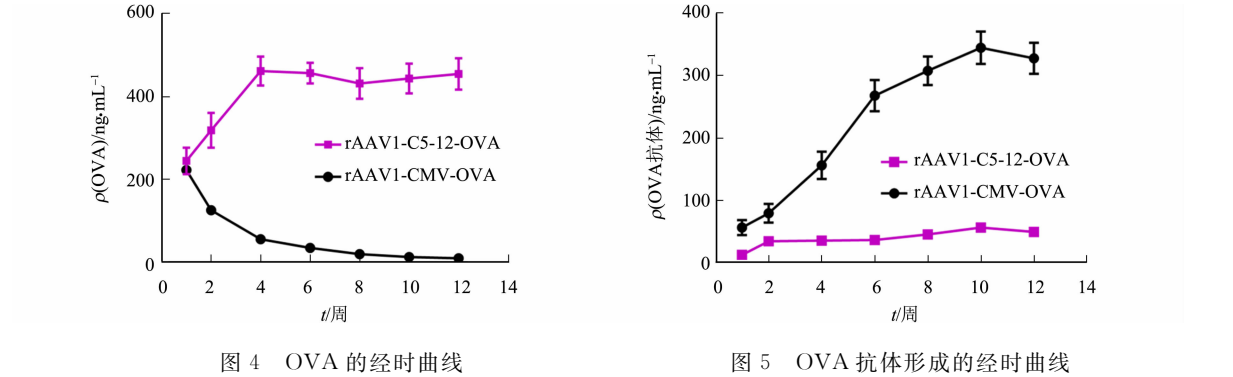
Fig. 3 Quantitative analysis of  $\beta$ -galactosidase

2.3 C5-12 启动子对 OVA 表达和抗体形成的影响

小鼠血清中的 OVA 和 OVA 抗体形成的经时曲线,如图 4、5 所示。图 4、5 中: $t$  为时间; $\rho$ (OVA 抗体)为 OVA 抗体的质量浓度。

由图 4、5 可知:注射 rAAV1-C5-12-OVA 的小鼠,其循环系统中产生高水平且持续稳定的 OVA 表达,与此同时,OVA 抗体(IgG)水平非常低;注射 rAAV1-CMV-OVA 的小鼠在治疗后 2 周,循环系统中 OVA 质量浓度出现急剧下降的态势,并且随着时间的推移,这一现象还伴随着 OVA 抗体水平的持续攀升。

因此,通用的 CMV 启动子使 OVA 转基因引发机体免疫反应,而将 C5-12 启动子整合到 OVA 表达盒中,能够有效规避这种因转基因诱发的免疫。



2.4 C5-12 启动子减少转导细胞清除

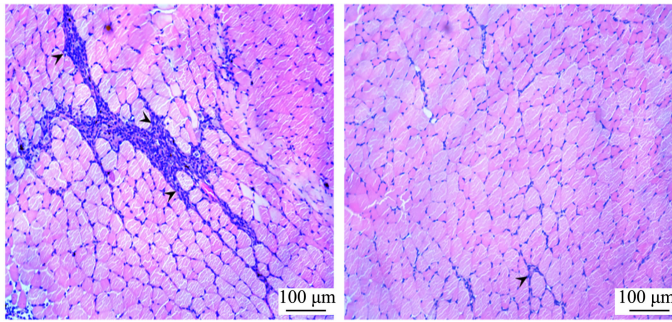
为进一步对肌肉注射 rAAV 后转导阳性细胞的状况予以验证,对小鼠胫骨前肌经过固定、H&E 染色,分析肌肉组织中 rAAV 基因组的情况。

rAAV1-OVA 肌肉注射后组织 H&E 分析,如图 6 所示。由图 6 可知:注射 rAAV1-CMV-OVA 的小鼠肌肉中出现了大量炎症细胞浸润的现象,直接导致 rAAV 转导细胞被清除。

经过 qPCR 分析,可得肌肉组织每微克 DNA 中 OVA 基因拷贝数( $n$ ),结果如图 7 所示。由图 7 可知:rAAV1-CMV-OVA 组每微克 DNA 中 OVA 基因拷贝数为  $58 \pm 2$ ,而 rAAV1-C5-12-OVA 组每微克 DNA 中 OVA 基因拷贝数为  $1\,358 \pm 25$ 。这一基因拷贝数的分析结果与 H&E 染色结果一致,即炎症细胞的浸润及体内循环的 OVA 抗体共同作用促使转导阳性细胞被清除,而 C5-12 启动子则展现出独特优势,它能够有效减弱免疫反应,抑制转导阳性细胞的清除和 OVA 抗体的产生。由此证明特异性启



动子是降低转基因诱导的免疫反应的一种有效方式。



(a) rAAV1-CMV-OVA 组      (b) rAAV1-C5-12-OVA 组

图 6 rAAV1-OVA 肌肉注射后组织 H&E 分析  
Fig. 6 H&E analysis of tissue after intramuscular injection of rAAV1-OVA

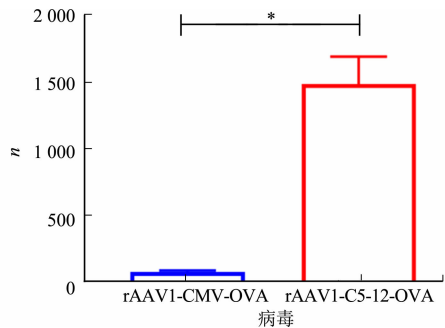


图 7 肌肉组织每微克 DNA 中 OVA 基因拷贝数  
Fig. 7 Copy number of OVA gene per microgram of DNA in muscle tissue

### 3 讨论

rAAV 是一种非常具有前途的载体，能将治疗性基因递送至多种组织，为单基因疾病治疗开辟新路<sup>[23-25]</sup>，其安全性和有效性均已在临床前和临床研究中得到证实<sup>[26-29]</sup>。肌肉是 rAAV 载体介导的基因治疗非常有吸引力的靶组织，是神经肌肉疾病、代谢紊乱和血友病基因治疗的靶组织<sup>[27,30-32]</sup>，因为它易于接近且富含血管血液供应，为分泌的蛋白质提供了有效的运输系统。然而，rAAV 肌肉递送后，常引发机体针对转基因产物的免疫反应，致使转导细胞被清除，基因表达的丧失<sup>[33]</sup>，因此，开发防止转基因产物诱导免疫反应策略成为研究热点。目前，临床多靠免疫抑制药物规避，可这些药物副作用多、易引发并发症<sup>[31-34]</sup>，难以保证预期效果，如杜氏肌营养不良症临床试验尽管使用了免疫抑制，但在 rAAV 载体肌肉递送后仍有一定程度的免疫反应发生<sup>[35-36]</sup>。探究根源，转基因诱导的免疫毒性主要由于抗原呈递细胞的不良转导，随后触发宿主对 rAAV 表达的转基因产物的免疫反应<sup>[37-39]</sup>，故避免 APC 中表达转基因产物已成为研究者的共识。

C5-12 启动子在削减针对 rAAV 肌肉内递送所产生的转基因产物免疫反应层面潜藏的巨大潜力，C5-12 启动子展现出高度的肌肉特异性，在肌肉细胞中可大量表达转基因，而在 APC 中表达量大幅降低。因此，肌肉中转基因表达得以维持，保障治疗效果。同时，OVA 抗体水平明显下降，免疫反应得到有效遏制，肌肉组织中细胞浸润明显减少。综上所述，文中的基因治疗方法像“安全锁”一样适配肌肉 rAAV 载体基因传递，可防控免疫风险，为开发更安全、有效的 rAAV 基因药物提供了新思路。

### 参考文献：

[1] WANG Dan,ZHONG Li,ABU N M,*et al.* The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue[J]. Expert Opinion on Drug Delivery,2014,11(3):345-364. DOI:10.1517/17425247.2014.871258.

[2] HUANG Xiaoping,WANG Xiao,LI Ling,*et al.* MiR133b-mediated inhibition of EGFR-PTK pathway promotes rAAV2 transduction by facilitating intracellular trafficking and augmenting second-strand synthesis[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine,2023,27(18):2714-2729. DOI:10.1111/jcmm.17858.

[3] HUANG Xiaoping,WANG Xiao,REN Yanxuan,*et al.* Reactive oxygen species enhance rAAV transduction by promoting its escape from late endosomes[J]. Virology Journal,2023,20(1):2. DOI:10.1186/s12985-023-01964-w.

[4] SHEN Weiran,LIU Shengjiang,OU Li. rAAV immunogenicity, toxicity, and durability in 255 clinical trials: A meta-analysis[J]. Frontiers in Immunology,2022,13:1001263. DOI:10.3389/fimmu.2022.1001263.

[5] 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[J]. 药学报,2010,45(9):1071-1077. DOI:10.16438/j.0513-4870.2010.09.009.

[6] 刁勇,许瑞安. 重组腺相关病毒载体诱导的天然免疫反应及机制[J]. 微生物学报,2012,52(5):550-557. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2012.05.002.

[7] 王晓,黄晓平,黎玲,等. 氧化应激促进重组腺相关病毒 2 型体外转导分析[J]. 华侨大学学报(自然科学版),2022,

- 43(4):489-497. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.202201036.
- [8] SAMULSKI R J, MUZYCZKA N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes[J]. Annual Review of Virology, 2014, 1(1):427-451. DOI:10.1146/annurev-virology-031413-085355.
- [9] BALAZS A B, CHEN J, HONG C M, *et al.* Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis[J]. Nature, 2011, 481(7379):81-84. DOI:10.1038/nature10660.
- [10] FUCHS S P, MARTINEZ-NAVIO J M, PIATAK M, *et al.* AAV-delivered antibody mediates significant protective effects against SIVmac239 challenge in the absence of neutralizing activity[J]. Plos Pathogens, 2015, 11(8):e1005090. DOI:10.1371/journal.ppat.1005090.
- [11] JOHNSON P R, SCHNEPP B C, ZHANG Jianchao, *et al.* Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys[J]. Nature Medicine, 2009, 15(8):901-906. DOI:10.1038/nm.1967.
- [12] DE JONG Y P, DORNE M, MOMMERSTEEG M C, *et al.* Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection[J]. Science Translational Medicine, 2014, 6(254):254ra129. DOI:10.1126/scitranslmed.3009512.
- [13] DEAL C, BALAZS A B, ESPINOSA D A, *et al.* Vectored antibody gene delivery protects against Plasmodium falciparum sporozoite challenge in mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(34):12528-12532. DOI:10.1073/pnas.1407362111.
- [14] LIMBERIS M P, ADAM V S, WONG G, *et al.* Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza[J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(187):187ra172. DOI:10.1126/scitranslmed.3006299.
- [15] BOENNEMANN C G, BELLUSCIO B A, BRAUN S, *et al.* Dystrophin immunity after gene therapy for duchenne's muscular dystrophy[J]. New England Journal of Medicine, 2023, 388(24):2294-2296. DOI:10.1056/NEJMc2212912.
- [16] CHENUAUD P, LARCHER T, RABINOWITZ J E, *et al.* Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy[J]. Blood, 2004, 103(9):3303-3304. DOI:10.1182/blood-2003-11-3845.
- [17] GAO Guangping, LEBHERZ C, WEINER D J, *et al.* Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques[J]. Blood, 2004, 103(9):3300-3302. DOI:10.1182/blood-2003-11-3852.
- [18] JOOSS K, YANG Y, FISHER K J, *et al.* Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers[J]. Journal of Virology, 1998, 72(5):4212-4223. DOI:10.1128/JVI.72.5.4212-4223.1998.
- [19] MAYS L E, WILSON J M. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products[J]. Molecular Therapy, 2011, 19(1):16-27. DOI:10.1038/mt.2010.250.
- [20] DRAGHIA-AKLI R, FIOROTTO M L, HILL L A, *et al.* Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(12):1179-1183. DOI:10.1038/70718.
- [21] LI Xuyang, EASTMAN E M, SCHWARTZ R J, *et al.* Synthetic muscle promoters: Activities exceeding naturally occurring regulatory sequences[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(3):241-245. DOI:10.1038/6981.
- [22] LIU Yilin, MINGOZZI F, RODRIGUEZ-COLON S M, *et al.* Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector[J]. Human Gene Therapy, 2004, 15(8):783-792. DOI:10.1089/1043034041648453.
- [23] PUPO A, FERNANDEZ A, LOW S H, *et al.* AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy[J]. Molecular Therapy, 2022, 30(12):3515-3541. DOI:10.1016/j.ymthe.2022.09.015.
- [24] SCHULZ M, LEVY D I, PETROPOULOS C J, *et al.* Binding and neutralizing anti-AAV antibodies: Detection and implications for rAAV-mediated gene therapy[J]. Molecular Therapy, 2023, 31(3):616-630. DOI:10.1016/j.ymthe.2023.01.010.
- [25] WANG Jianghui, GESSLER D J, ZHAN Wei, *et al.* Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1):78. DOI:10.1038/s41392-024-01780-w.
- [26] GAUDET D, DE WAL J, TREMBLAY K, *et al.* Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene

- therapy for lipoprotein lipase deficiency[J]. *Atherosclerosis Supplements*, 2010, 11(1): 55-60. DOI: 10. 1016/j. atherosclerosis. 2010. 03. 004.
- [27] GAUDET D, METHOT J, KASTELEIN J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency[J]. *Current Opinion In Lipidology*, 2012, 23(4): 310-320. DOI: 10. 1097/MOL. 0b013e3283555a7e.
- [28] MAGUIRE A M, HIGH K A, AURICCHIO A, *et al.* Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: A phase 1 dose-escalation trial[J]. *Lancet*, 2009, 374 (9701): 1597-1605. DOI: 10. 1016/ s0140-6736(09)61836-5.
- [29] NATHWANI A C, ROSALES C, MCLNTOSH J, *et al.* Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins[J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(5): 876-885. DOI: 10. 1038/mt. 2010. 274.
- [30] HANLEY J P, JARVIS L M, ANDREWS J, *et al.* Investigation of chronic hepatitis C infection in individuals with haemophilia: Assessment of invasive and non-invasive methods[J]. *British Journal of Haematology*, 1996, 94(1): 159-165. DOI: 10. 1046/j. 1365-2141. 1996. 6192064. x.
- [31] MANNO C S, CHEW A J, HUTCHISON S, *et al.* AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2963-2972. DOI: 10. 1182/blood-2002-10-3296.
- [32] MENDELL J R, RODINO-KLAPAC L, SAHENK Z, *et al.* Gene therapy for muscular dystrophy: Lessons learned and path forward[J]. *Neuroscience Letters*, 2012, 527(2): 90-99. DOI: 10. 1016/j. neulet. 2012. 04. 078.
- [33] YUASA K, SAKAMOTO M, MIYAGOE-SUZUKI Y, *et al.* Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product[J]. *Gene Therapy*, 2002, 9(23): 1576-1588. DOI: 10. 1038/sj. gt. 3301829.
- [34] KESSLER P D, PODSAKOFF G M, CHEN Xiaojuan, *et al.* Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(24): 14082-14087. DOI: 10. 1073/pnas. 93. 24. 14082.
- [35] ARRUDA V R, FAVARO P, FINN J D. Strategies to modulate immune responses: A new frontier for gene therapy[J]. *Molecular Therapy*, 2009, 17(9): 1492-1503. DOI: 10. 1038/mt. 2009. 150.
- [36] BOENNEMANN C G, BELLUSCIO B A, BRAUN S, *et al.* Dystrophin immunity after gene therapy for duchenne's muscular dystrophy[J]. *New England Journal of Medicine*, 2023, 388 (24): 2294-2296. DOI: 10. 1056/NEJMc 2212912.
- [37] HOFFMAN B E, DOBRZYNSKI E, WANG Lixin, *et al.* Muscle as a target for supplementary factor IX gene transfer[J]. *Human Gene Therapy*, 2007, 18(7): 603-613. DOI: 10. 1089/hum. 2007. 042.
- [38] MUHURI M, ZHAN Wei, MAEDA Y, *et al.* Novel combinatorial microRNA-binding sites in AAV vectors synergistically diminish antigen presentation and transgene immunity for efficient and stable transduction[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 674242. DOI: 10. 3389/fimmu. 2021. 674242.
- [39] XIAO Yuanyuan, MUHURI M, LI Shaoyong, *et al.* Circumventing cellular immunity by miR142-mediated regulation sufficiently supports rAAV-delivered OVA expression without activating humoral immunity[J]. *JCI Insight*, 2019, 5(13): 1-14. DOI: 10. 1172/jci. insight. 99052.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)