



张磊, 医学博士, 主任医师、博士生导师。中国医学科学院血液病医院血液学研究所副所长、国家血液系统疾病临床研究中心副主任、实验血液学国家重点实验室副主任、中国医学科学院基因治疗重点实验室主任、天津市血液病基因治疗重点实验室主任、天津市血液与再生医学理事长、*Global Medical Genetics* 主编、中华血液学杂志编委。获“协和学者”特聘教授、“津门医学英才”。从事出凝血疾病和血小板疾病的诊断与治疗。承担国家及省部级科研项目课题15项, 国际合作基金2项。在*Cell Stem Cell*、*Blood*以及*Leukemia*等国内外知名专业期刊上发表SCI论文百余篇, 申请专利4项。获国家级奖1项, 获省部级奖4项。
<http://www.chinablood.com.cn/zyb/science/team/401.html>

血友病AAV载体基因治疗研究进展

代新岳 张磊*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 血友病基因治疗经过30年的持续发展, 已取得长足的进步。血友病患者FVIII或FIX水平达到正常甚至治愈已成为可能。虽然在多个国家血友病基因治疗已取得显著成果, 但仍然有很大的改进空间。目前临床试验中AAV是血友病基因治疗的主要载体, 未来的研究将集中在完善病毒衣壳、转基因和启动子的设计上, 以追求更高的转导效率、更低的免疫反应和可预测性的治疗结果。目前的研究表明, 与在动物模式中近乎100%的高转导效率相比, 在人类肝细胞中实现高转导效率及凝血因子的高表达仍有不足之处, 需要避免蛋白质过载引起的细胞应激风险。虽然血友病基因治疗面临一定的挑战, 但是随着技术的不断发展成熟, 相信未来会开发出真正治愈血友病的个体化治疗方案。

关键词 血友病; 基因治疗; 腺相关病毒载体

Research Progress of AAV-Mediated Gene Therapy for Hemophilia

DAI Xinyue, ZHANG Lei*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Gene therapy has great potential to produce normal levels of FVIII or FIX in patients with hemophilia. After nearly 30 years of continuous development in this field, considerable progress has been made, but there is still much room for improvement. AAV is the primary carrier of gene therapy for hemophilia. Researches

收稿日期: 2021-11-05

接受日期: 2021-12-06

国家重点研发计划(批准号: 2019YFA0110802)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2020-PT310-011)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13502118379, E-mail: zhanglei1@ihcams.ac.cn

Received: November 5, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2019YFA0110802) and the Non-Profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2020-PT310-011)

*Corresponding author. Tel: +86-13502118379, E-mail: zhanglei1@ihcams.ac.cn

will focus on improving the design of viral capsids, transgenes and promoters in order to pursue higher transduction efficiency, lower immune response and predictable treatment results. Compared with the almost 100% transduction efficiency of animal models, there are still shortcomings in achieving high transduction efficiency and high expression of coagulation factors in human hepatocytes. At the same time, attention should be paid to avoid the risk of cell stress caused by protein overload. Although gene therapy for hemophilia still faces specific challenges, safer, more effective and even personalized treatment plans will be developed in the future to truly improve the quality of life of hemophilia patients and even cure them.

Keywords hemophilia; gene therapy; adeno-associated virus carrier

血友病是一种X连锁先天性出血性疾病,由F8或F9单基因突变导致凝血因子VIII(FVIII; 血友病A)或凝血因子IX(FIX; 血友病B)分泌不足所致,中国医学科学院血液病医院发起的血友病登记注册显示全中国血友病患者数量达34 000余例^[1]。血友病以关节、肌肉反复出血为主要表现,常幼年起病、累及终身。重型血友病患者(血浆中FVIII活性<1%)需每周多次静脉注射凝血因子,如未规范进行替代治疗,患者常出现不同程度的肢体功能障碍甚至残疾^[2]。血友病管理的主要目标是通过替代性输注FVIII或FIX使患者的谷浓度维持在1%甚至3%~5%以上来预防自发性出血。但长期静脉输注因子患者的依从性差,且25%~30%的重型血友病患者会产生FVIII中和性抗体^[3-4],因此需要开发更有效的血友病治疗方法。

血友病作为一种单基因遗传病,体内FVIII或FIX活性上升至5%可使患者出血症状显著减轻,通过检测血浆中凝血因子水平即可以评估基因表达情况,因此基因治疗在治疗该疾病方面具有巨大优势,而且通过单次基因治疗使凝血因子长期稳定表达将给患者带来巨大的临床益处。目前,部分血友病基因治疗的研究已处于临床试验后期阶段,预计未来1~2年内将有一款血友病基因治疗产品获批。

1 血友病基因治疗的发展现状

我国研究者1996年在世界上首次报道了血友病B基因治疗临床试验^[5],利用逆转录病毒载体将人F9基因转染至患者的离体皮肤成纤维细胞,筛选出表达FIX的细胞,经一系列安全性检测后用胶原包埋,注射到患者腹部或背部皮下组织。2例患者体内血浆FIX水平升高超过2倍,持续超过1年,且没有出现明显的治疗相关不良反应。早期的血友病基因治疗使用病毒(如腺病毒载体)和非病毒载体,安全性尚可但并未实现在治疗水平上持续的转基因表达^[6-7]。

CRISPR-Cas9基因编辑技术目前已经在镰状细胞病和 β -地中海贫血等疾病中展示出良好疗效^[8]。在血友病中,已有研究者通过基因编辑方法修复F8或F9突变或将F8或F9 cDNA靶向特定基因组位点。然而,近50% F8基因突变和大多数F9突变是倒位突变^[9],不易纠正。研究者已尝试将F8或F9 cDNA靶向向内皮细胞、肝窦内皮细胞、肝细胞、滋养细胞、造血干细胞和间充质干细胞,部分研究能够恢复血友病A和B小鼠中FVIII或FIX的表达和功能^[10-12]。

基于重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)的血友病基因治疗开始于20年前,研究者向血友病B患者肌肉注射rAAV-FIX,该过程安全,肌肉活检显示FIX表达持续3年以上,然而多数患者血浆中的FIX仅为1%^[13-15]。同时期临床前研究表明,特定剂量的AAV载体向肝脏递送相较于肌肉注射FIX表达水平更高,可能由于肝脏是FIX合成的天然场所^[16]。因此,研究者2006年在重型血友病B患者中首次进行AAV2载体肝脏基因治疗临床研究,通过肝动脉输注载体,FIX表达持续2个月^[17]。在该研究中,FIX表达下降和肝转氨酶表达量瞬时增加同时发生,随后几周内恢复到基线值,可能是由于AAV2衣壳肽在MHC I类分子呈递下可引起针对转导肝细胞的细胞毒性T细胞反应。长期随访显示,即使在12~15年后仍无不良事件包括肝癌的发生^[18]。2011年,研究者对血友病B患者首次通过静脉输注具有肝脏靶向性的AAV8载体,高剂量组患者FIX表达水平在正常值的5%左右,患者出血事件显著减少且无需预防性使用FIX^[19]。3年后最高剂量组6名患者中位FIX水平为5.1%,部分患者随访现已超过8年,他们的F9基因长期稳定表达^[20-21]。2017年12月,GEORGE等^[22]发表了一项关于SPK9001的I/II期临床试验结果,是目前为止单次静脉注射基因治疗获得最稳定因子活性水平和最佳临床预后的报道。SPK-9001是携带肝

脏特异性启动子和经密码子优化的高活性FIX-Padua的单链腺相关病毒载体。FIX-Padua是一种在FIX催化区发生错义突变(R338L)的FIX变体,可以使FIX活性提高8倍^[23]。当10例患有血友病B的成年男性受试者单次注射SPK-9001 12周后,测得所有患者的稳态下FIX活性为正常值的14%~81%。

迄今为止,大多数基于AAV基因治疗的研究都是在血友病B患者中进行的。AAV有限的包装能力(4 680个核苷酸)和FVIII的低表达谱限制了该载体在血友病A基因治疗的应用。研究者通过去除与辅因子活性无关的B结构域,减小了F8基因表达盒的大小。相较于野生型F8基因,其mRNA表达水平提高了17倍,FVIII分泌提高了30%^[24]。利用该方法BioMarin公司开始使用密码子优化的AAV5-hFVIII-SQ载体(BMN 270)在重型血友病A患者中进行I/II期临床试验,高剂量(6×10^{13} $\mu\text{g}/\text{kg}$)组共7名患者,其中6名患者1年内FVIII水平 $>50\%$ ^[25]。这些早期的研究结果为多个研究小组和公司进一步开发血友病基因治疗产品奠定了基础。

近年来,血友病基因治疗行业蓬勃发展,临床试验受试者数目正迅速攀升。目前,已有42项关于血友病基因治疗的临床试验已经或正在进行中(clinicaltrials.gov,截至2021年10月)。不同研究间的主要差异在于AAV衣壳的选择、载体基因组的配置、表达盒的设计和载体制造方法(哺乳动物系统和昆虫细胞-杆状病毒方法)。

我国基因治疗的研究紧追其上,中国医学科学院血液病医院于2019年开展了中国首个AAV血友病B基因治疗临床试验(NCT04135300)。该研究已完成全部10例受试者入组,均接受BBM-H901治疗(5×10^{12} $\mu\text{g}/\text{kg}$,单次静脉滴注)。检测受试者FIX活性情况表明,BBM-H901在输注1天后起效。目前的研究数据表明,BBM-H901是安全的,对肝肾功能影响不大,不影响生育能力,输注2个月后在精液中检测不到AAV载体(尚未报道)。另外,该团队已全面开展血友病A基因治疗临床试验(NCT04728841)的招募工作,目前已经有3例患者入组,FVIII水平显著提高。

2 AAV载体介导的血友病基因治疗

目前全球血友病基因治疗的研究集中在病毒载体,特别是rAAV载体。AAV是一类结构简单的单链DNA缺陷型病毒,需要辅助病毒(通常是腺病毒或

疱疹病毒)参与复制,目前研究认为AAV不会导致任何人类疾病的发生^[26]。它具有多种血清型,能够感染几乎所有类型的组织,包括非分裂细胞。与腺病毒不同,AAV极少引起强烈的免疫反应^[27]。rAAV源于野生型AAV,具有安全性高、宿主应用范围广和在体内表达时间长等特点,成为当前最有前景的血友病体内基因治疗载体。

2.1 作用机制

肝脏是血友病基因治疗首选靶器官,其独特的生理功能有利于载体高效转导和蛋白全分泌。FIX在肝细胞合成,这可能为血友病B患者提供更多的益处^[28]。在成熟的成人肝脏中,少于2%的肝细胞处于活跃分裂状态,由于细胞更新率低,AAV转导后有望获得持久的治疗效果^[29]。

携带F8或F9基因的rAAV载体经静脉给药后,通过内吞作用进入肝细胞,以游离形式存在于肝细胞核中并产生mRNA,后者被翻译成功能性FVIII或FIX蛋白。蛋白质在内质网和高尔基体中加工最终被释放到循环中。AAV F8和F9基因转移似乎是安全有效的,受试者出血事件和凝血因子使用率降幅超过90%^[18,25]。

2.2 治疗后潜在的风险

AAV载体基因转移存在一定的潜在风险,包括免疫原性、肝毒性、基因毒性、插入突变、转基因变异性和有限的持久性等。表1列出了AAV载体设计时需考虑的内容。

除了临床常见的肝毒性,血栓性微血管病等新的风险也逐渐显现,其发生可能是由先天免疫系统补体途径过度激活驱动的,再次强调了AAV载体免疫反应的风险^[30]。2021年9月,Astellas公司在X连锁肌管性肌病的AT132试验中报告了第4例死亡病例(<https://www.astellas.com/en/news/17161>)。由于基因治疗可能诱发癌症,美国FDA停止了Biomarin公司BMN307治疗苯丙酮尿症的I/II期临床试验(<https://investors.biomarin.com/2021-09-06-U-S-FDA-Placed-a-Clinical-Hold-on-BMN-307-Phearless-Phase-1-2-Gene-Therapy-Study-in-Adults-with-PKU-Based-on-Interim-Pre-clinical-Study-Findings>)。虽然迄今为止大多数基因治疗临床试验的结果令人欣慰,但这些风险不容忽视。

肝毒性是AAV基因治疗临床上观察到的最常见的不良反应。AAV基因治疗早期首要问题之一是

表1 AAV载体设计需要考虑的内容
Table 1 Considerations for AAV vector design

目标 Goal	理想属性 Ideal properties
Target tissues for optimal therapeutic benefit	A vector that shows a high predilection for target tissue, or tissue tropism, and also limits off-target specificity ^[31] Tissue-specific promoters may be incorporated into the expression cassette to increase tissue specificity Posttranscriptional regulation can decrease off-target tissue expression ^[32]
Achieve optimal therapeutic transgene expression levels	Adequate levels of transgene expression for optimized health and well-being Durable transgene expression
Limit or control host immune response to the vector	Preexisting host Nabs are either not present or, if present, are low enough to avoid blocking transduction or causing a life-threatening immunologic response Host cellular-immune response to vector is minimized, and if a cellular-immune response does occur, it is adequately controlled by immune suppression, with the goal of preserving expression of the therapeutic protein ^[33]
Minimize the risk of vector-associated genotoxicity	Vector does not cause insertional mutagenesis, caused by the disruption of host genes at the integration site, which could lead to cancer Vector-encoded regulatory elements, such as promoters, do not activate expression of oncogenes following genomic integration
Achieve therapeutic safety	Vectors are designed to minimize innate immunogenicity Capsid and expression cassette efficiency for each application are maximized to minimize the vector dose required
Optimize CMC	Rigorous QC of components to ensure consistency and safety of the gene therapy product Optimized manufacturing processes to ensure high purity and high yields of clinical vectors

CMC: 化学、生产和控制; QC: 质量控制。

CMC: chemistry, manufacturing, and controls; QC: quality control.

宿主针对转导病毒肝细胞的免疫反应^[17]。既往研究发现肝酶[天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)]的表达水平升高常伴有血液循环中AAV衣壳特异性T细胞数量的增加, 推测两者可能具有一定相关性^[34]。如果基因转移后8周内出现肝酶水平升高, 可使用糖皮质激素或免疫抑制剂能够减弱这种反应。在某些情况下, 使用短期泼尼松龙可以控制转氨酶水平升高, 目前并没有后期复发或持续性肝细胞损伤的证据, 肝酶表达水平降低的过程似乎是一种自限性现象。由于无法在动物模型中重现这种毒性, 转氨酶水平升高的确切病理生理学机制目前仍不清楚^[23,35]。既往研究表明, AAV基因治疗后转氨酶表达量的增加取决于载体剂量和CpG基序的数量^[36-37], 与AAV衣壳类型、基因组配置、转基因启动子和载体生产方法无关。

AAV载体肝脏基因治疗的潜在风险还包括插入突变引起的基因毒性。AAV载体输注剂量很高, 即使在基因组中整合比例很低仍要引起人们重视。在一项以狗为模型的AAV基因治疗试验中已证实

肝细胞克隆性扩增与其有关^[38]。尽管AAV被认为是非整合型载体, 有研究在新生小鼠中观察到了AAV相关的肝细胞癌, 测序发现AAV整合在肝癌细胞的特定基因组区域^[39]。然而, AAV治疗后的成年小鼠每个细胞AAV拷贝数很低且未发现肝癌, 推测新生小鼠活跃的细胞分裂可能是肝癌发生的诱因, 而不是由于插入突变。1名慢性乙肝和丙肝感染的成年血友病B患者在静脉注射AAV5-hFIX Padua治疗后, 随访过程中发现该患者患上肝癌, 但在肿瘤细胞中并未检测到AAV载体整合^[40]。有报道发现, 野生型AAV2基因组片段整合在少部分人肝癌样本原癌基因附近^[41]。因此, 对血友病患者肝组织进行AAV整合位点分析将有助于评估AAV肝脏基因治疗在高危人群中的整合概率和发生肝癌的风险。另外, 针对AAV基因疗法的潜在致癌风险需要进行更仔细的长期监测。

2.3 目前研究的主要障碍

即使宿主不存在针对载体的免疫反应, 凝血因子的表达水平仍可能很低, 特别是血友病A基因治

疗。此原因可能是FVIII通常在肝窦内皮细胞中产生^[42], 而不是在肝细胞中。提高FVIII表达水平的方法包括: 载体中引入肝脏特异性启动子和增强子、优化密码子以及减少转基因的CpG含量等。部分载体优化方法可能由于肝细胞内质网应激导致肝酶水平升高。已有研究者在血友病A小鼠细胞系中观察到FVIII错误折叠, FVIII在内质网中呈淀粉样球形聚集^[43], 但目前并无这一现象的体内证据。既往已有以高于临床试验使用剂量的AAV输注导致受试者死亡的病例, 其原因是否与AAV整合、表达蛋白的分子状态或AAV复制中间体有关, 目前仍不清楚。

20%~70%的血友病患者预先存在针对特定AAV血清型的中和性抗体(neutralizing anti-AAV antibody, NAb), 且血清阳性率随着年龄和血浆制品暴露时间的增加而增加^[44]。临床前研究证明了体液免疫能够阻止AAV成功转导到肝细胞^[45-46], 这将阻碍AAV有效的基因转移。目前预先存在抗体的患者已被排除在基因治疗试验之外, 但NAb的存在是基因治疗对血友病患者普遍适用的主要限制。在动物模型中改变AAV血清型能够有效避免NAb的产生^[47], 然而由于NAb的交叉反应性, 这种方法并不适用于人类。通过免疫抑制剂、血浆置换、增加载体剂量或增加空衣壳等方法可能会减少NAb的阻碍^[48]。

基因表达的异质性和持久性与载体剂量、载体血清型、启动子的组织特异性、转基因的效力和宿主差异有关。F9-Padua变体可以使用相对较低剂量的载体^[49], 但目前没有相应的F8变体, 因此, F8基因表达的异质性和随载体剂量增加的潜在毒性仍然是需要考虑的问题。接受了AAV-F8基因治疗的血友病A受试者5年后FVIII水平下降超过50%^[25], 表明AAV血友病基因治疗基因表达的持久性仍是一项挑战。

3 结论与展望

如何获得血友病基因治疗的最佳疗效以及其安全性是目前科学家们关注的重点, 未来的研究方向将集中在AAV基因载体设计上, 以最大限度地减少免疫原性、减少宿主免疫反应并避免靶器官毒性和基因毒性。随着研究的不断发展, 血友病基因治疗有望实现安全、高效和持久的FVIII和FIX因子表达, 并成为血友病患者未来的标准治疗方法。

参考文献 (References)

- [1] 余自强, 吴德沛. 推动血友病规范化治疗需落实五方面工作 [J]. 中华医学信息导报(YU Z Q, WU D P. Five aspects need to be implemented to promote standardized treatment of hemophilia [J]. Chinese Medical Information Herald), 2021, 36(8): 22.
- [2] COLLINS P W, BLANCHETTE V S, FISCHER K, et al. Break-through bleeding in relation to predicted factor VIII levels in patients receiving prophylactic treatment for severe hemophilia A [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(3): 413-20.
- [3] GOUW S C, VAN DEN BERG H M, FISCHER K, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study [J]. Blood, 2013, 121(20): 4046-55.
- [4] WIGHT J, PAISLEY S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review [J]. Haemophilia, 2003, 9(4): 418-35.
- [5] QIU X, LU D, ZHOU J, et al. Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients [J]. Chin Med J, 1996, 109(11): 832-9.
- [6] ROTH D A, TAWA N E, Jr, O'BRIEN J M, et al. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A [J]. N Engl J Med, 2001, 344(23): 1735-42.
- [7] MANNUCCI P M. Hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002, doi: 10.1182/asheducation-2002.1.1.
- [8] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia [J]. N Engl J Med, 2021, 384(3): 252-60.
- [9] GOUW S C, VAN DEN BERG H M, OLDENBURG J, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis [J]. Blood, 2012, 119(12): 2922-34.
- [10] WANG L, YANG Y, BRETON C A, et al. CRISPR/Cas9-mediated *in vivo* gene targeting corrects hemostasis in newborn and adult factor IX-knockout mice [J]. Blood, 2019, 133(26): 2745-52.
- [11] CHEN H, SHI M, GILAM A, et al. Hemophilia A ameliorated in mice by CRISPR-based *in vivo* genome editing of human factor VIII [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 16838.
- [12] ZHANG J P, CHENG X X, ZHAO M, et al. Curing hemophilia A by NHEJ-mediated ectopic F8 insertion in the mouse [J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 276.
- [13] KAY M A, MANNO C S, RAGNI M V, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector [J]. Nat Genet, 2000, 24(3): 257-61.
- [14] 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): 2963-72.
- [15] JIANG H, PIERCE G F, OZELO M C, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B [J]. Mol Ther, 2006, 14(3): 452-5.
- [16] NATHWANI A C, DAVIDOFF A, HANAWA H, et al. Factors influencing *in vivo* transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA [J]. Blood, 2001, 97(5): 1258-65.

- [17] MANNO C S, PIERCE G F, ARRUDA V R, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response [J]. *Nat Med*, 2006, 12(3): 342-7.
- [18] GEORGE L A, RAGNI M V, RASKO J E J, et al. Long-term follow-up of the first in human intravascular delivery of AAV for gene transfer: AAV2-hFIX16 for severe Hemophilia B [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(9): 2073-82.
- [19] NATHWANI A C, TUDDENHAM E G, RANGARAJAN S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(25): 2357-65.
- [20] NATHWANI A C, REISS U M, TUDDENHAM E G, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(21): 1994-2004.
- [21] NATHWANI A C. Gene therapy for hemophilia [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2019, 2019(1): 1-8.
- [22] GEORGE L A, SULLIVAN S K, GIERMASZ A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(23): 2215-27.
- [23] SIMIONI P, TORMENE D, TOGNIN G, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX padua) [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(17): 1671-5.
- [24] MIAO H Z, SIRACHAINAN N, PALMER L, et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion [J]. *Blood*, 2004, 103(9): 3412-9.
- [25] 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): 2519-30.
- [26] SHIRLEY J L, DE JONG Y P, TERHORST C, et al. Immune responses to viral gene therapy vectors [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 709-22.
- [27] NIDETZ N F, MCGEE M C, TSE L V, et al. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: understanding barriers to gene delivery [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 207: 107453.
- [28] SABATINO D E, LANGE A M, ALTYNOVA E S, et al. Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(3): 442-9.
- [29] KATTENHORN L M, TIPPER C H, STOICA L, et al. Adeno-associated virus gene therapy for liver disease [J]. *Hum Gene Ther*, 2016, 27(12): 947-61.
- [30] KOTULSKA K, FATTAL-VALEVSKI A, HABERLOVA J. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 gene therapy in spinal muscular atrophy [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 726468.
- [31] PIPE S, LEEBEEK F W G, FERREIRA V, et al. Clinical considerations for capsid choice in the development of liver-targeted AAV-based gene transfer [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 15: 170-8.
- [32] BROWN B D, VENNERI M A, ZINGALE A, et al. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer [J]. *Nat Med*, 2006, 12(5): 585-91.
- [33] VERDERA H C, KURANDA K, MINGOZZI F. AAV Vector Immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 723-46.
- [34] RONZITTI G, GROSS D A, MINGOZZI F. Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 670.
- [35] FINN J D, NICHOLS T C, SVORONOS N, et al. The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy [J]. *Blood*, 2012, 120(23): 4521-3.
- [36] XIANG Z, KURUPATI R K, LI Y, et al. The effect of CpG sequences on capsid-specific CD8⁺ T cell responses to AAV vector gene transfer [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 771-83.
- [37] MARTINO A T, MARKUSIC D M. Immune response mechanisms against AAV vectors in animal models [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 17: 198-208.
- [38] NGUYEN G N, EVERETT J K, KAFLE S, et al. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 47-55.
- [39] DONSANTE A, MILLER D G, LI Y, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma [J]. *Science*, 2007, 317(5837): 477.
- [40] SPRONCK E A, LIU Y P, LUBELSKI J, et al. Enhanced factor IX activity following administration of AAV5-R338L "Padua" factor IX versus AAV5 WT human factor IX in NHPs [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 15: 221-31.
- [41] NAULT J C, DATTA S, IMBEAUD S, et al. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(10): 1187-93.
- [42] EVERETT L A, CLEUREN A C, KHORIATY R N, et al. Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells [J]. *Blood*, 2014, 123(24): 3697-705.
- [43] POOTHONG J, POTTEKAT A, SIIRIN M, et al. Factor VIII exhibits chaperone-dependent and glucose-regulated reversible amyloid formation in the endoplasmic reticulum [J]. *Blood*, 2020, 135(21): 1899-911.
- [44] STANFORD S, PINK R, CREAGH D, et al. Adenovirus-associated antibodies in UK cohort of hemophilia patients: a seroprevalence study of the presence of adenovirus-associated virus vector-serotypes AAV5 and AAV8 neutralizing activity and antibodies in patients with hemophilia A [J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2019, 3(2): 261-7.
- [45] HURLBUT G D, ZIEGLER R J, NIETUPSKI J B, et al. Preexisting immunity and low expression in primates highlight translational challenges for liver-directed AAV8-mediated gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(11): 1983-94.
- [46] WANG L, CALCEDO R, BELL P, et al. Impact of pre-existing immunity on gene transfer to nonhuman primate liver with adeno-associated virus 8 vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(11): 1389-401.
- [47] NATHWANI A C, GRAY J T, 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 [J]. *Blood*, 2007, 109(4): 1414-21.
- [48] MINGOZZI F, ANGUELA X M, PAVANI G, et al. Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(194): 194ra92.
- [49] VANDENDRIESSCHE T, CHUAH M K. Hyperactive factor IX padua: a game-changer for hemophilia gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 14-6.