基因药物的开发与生产质量控制专栏

重组腺相关病毒载体生产用质粒的设计与合规考量

陈一飞[1]，马琳莎[2]，刘　芬[1*]

（1. 上海药品审评核查中心，上海 201203；2. 华南农业大学，广东广州 510642）

摘要：重组腺相关病毒是当前体内基因治疗产品中最常用的载体。在其生产中，质粒是重要的起始原材料。质粒的设计与管理直接决定了产品的生物学作用机制、药学性质、有效性与安全性。因此，对质粒及其基因元件性质的理解是该类产品“质量源于设计”的管理基础。文章以商业化生产中常用的三质粒系统为例，概述了不同质粒的作用，介绍了主要基因元件，分析了质粒的设计要点，综述了合规要求，讨论了质粒的设计与合规考量，以期为以重组腺相关病毒为代表的基因治疗产品的开发和管理提供参考。

关键词：基因治疗产品；重组腺相关病毒载体；质粒；设计；合规

中图分类号：R95　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)08-1136-07

引用：陈一飞 , 马琳莎 , 刘　芬. 重组腺相关病毒载体生产用质粒的设计与合规考量 [J]. 中国医药工业杂志 , 2024, 55(8): 1136-1142. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.015

Considerations for the Plasmid Designing and Compliance of Recombinant Adeno-associated Virus Vector Production

CHEN Yifei[1], MA Linsha[2], LIU Fen[1*]

(*1. Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Shanghai 201203; 2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642*)

ABSTRACT: At present, recombinant adeno-associated virus is the most commonly used vectors for *in vivo* gene therapy products. For producing virus vectors, plasmids are believed to be the important starting raw material. The designing and managing of plasmids directly contribute to the biological mechanisms, pharmaceutical properties, efficacy, and safety of products. Therefore, understanding the properties of plasmids and their gene elements is the basis for the “quality by design” of such products. The functions of different plasmids are introduced in this paper, the construction of main genetic elements are summarized, the considerations for designing of plasmids are discussed, the compliance for developing and manufacturing of plasmids are reviewed, in order to provide some references for the development and management of gene therapy products, especially for the recombinant adeno-associated virus products.

Key Words: gene therapy product; recombinant adeno-associated virus vector; plasmid; design; compliance

重组腺相关病毒（recombinant adeno-associated virus，rAAV）是当前基因治疗产品中常用的病毒载体，来源于经基因组改造的野生型腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）[1—3]。rAAV 载体基因组中保留了衣壳蛋白（Cap）和末端反向重复（inverted terminal repeats，ITRs）序列，在携带外源目的基因的同时尽可能减少病毒元件，提高产品安全性。rAAV 载体的商业化生产中，较成熟的生产平台包括人胚胎肾细胞（HEK 293 细胞）瞬时转染、杆状病毒（baculovirus，Bac）/ 草地贪夜蛾细胞（Sf9 细胞）昆虫细胞系统 2 种 [4]。由于在 HEK 293 细胞转染系统中不引入辅助病毒，rAAV 的生产主要依赖质粒转染，对于质粒性质和管理的分析更

收稿日期：2024-05-07

作者简介：陈一飞（1983—），女，副研究员，从事药物非临床安全性评价与药品监管科学研究。

通信作者：刘　芬（1986—），女，高级工程师，从事药品监管科学研究。

E-mail：ysliufen@smda.sh.cn

有代表性，因此本文选择以 HEK 293 细胞瞬时转染系统为例，阐述对质粒的设计考虑与管理要求。

目前普遍采取的病毒制备策略是将病毒包装及扩增的必要元件拆分，使各结构基因和靶标基因分别搭载至不同质粒的转录单元中[3]，再通过共转染 HEK 293 细胞实现 rAAV 载体的包装与扩增。质粒是 rAAV 载体生产的起始原材料，其设计是 rAAV 产品生物学作用机制的起始，制备是 rAAV 产品药学性质的基础。质粒的来源和序列，结构、基因、元件设计，生产过程和制备工艺，以及全过程质量控制等与终产品的质量、有效性、安全性密切相关。根据“质量源于设计”理念，对质粒及其基因元件的分析是理解 rAAV 产品性质的基础，是对病毒载体类产品进行变更管理、质量管理、生产管理的源头。

瞬时转染包括三质粒和双质粒系统，其中三质粒系统较常用。本文以三质粒瞬时转染 HEK 293 细胞系统为例，基于风险分析了 rAAV 载体生产用质粒的设计考量和合规关注点，以期为病毒类载体药物的设计与生产质量管理提供参考。

1 rAAV 载体生产用三质粒系统

三质粒系统中转基因质粒编码外源目的基因（gene of interest，GOI）；包装质粒包括复制（*rep*）基因和 *cap* 基因；辅助质粒提供从腺病毒中分离的辅助基因，促进 rAAV 载体复制[5]。

转基因质粒是三质粒系统的核心组分，包括 ITRs 序列、启动子、GOI、终止子、多腺苷酸化信号（polyadenylation signal，pA）、另一侧的 ITRs 序列[6—8]。ITRs 序列是转基因质粒中唯一保留的病毒元件，也是病毒基因组包装需要的顺式作用元件，来源于 AAV2 的 ITRs 序列应用较多[1]。ITRs 序列使得转基因质粒携带的 GOI 可包装至 rAAV 载体颗粒中，是目的基因有效转导的关键[1,6]。

包装质粒携带 *rep* 基因和 *cap* 基因，在 rAAV 组装中发挥重要作用。衣壳蛋白决定 rAAV 载体的血清型，是组织 / 细胞嗜性和免疫原性的主要来源。产品开发中会根据预期适应证来选择合适的血清型[6]。常见的 AAV 血清型主要来源于灵长类动物，约 13 种。其中，AAV2 致病性低、宿主范围广、能建立长期的转基因表达，是首个被构建为病毒载体的血清型，且已用于上市的体内基因治疗产品[9]。

辅助质粒通常搭载腺病毒辅助基因，如 E2A 和 E4[6]。E2A 可编码单链 DNA 结合蛋白，具有激活 rAAV 载体启动子、参与剪接 Rep 蛋白、促进 mRNA 加工和衣壳组装等功能；E4 含多个开放阅读框（open reading frame，ORF），其中 E4orf6 可增强第二链合成，促进 rAAV 载体转导和复制的抑制蛋白降解，协助 rAAV 载体 mRNA 从细胞核转出等[10]。

将三质粒共转染至 HEK 293 细胞，并在胞内实现病毒的重组与包装，通过细胞裂解、密度梯度离心、浓缩和无菌过滤等纯化和富集等工序，最终获得高纯度的 rAAV 病毒颗粒。

2 rAAV 载体生产用质粒的设计考量

转基因质粒和包装质粒分别是 GOI 有效表达和病毒载体有效转导的基础，是决定产品安全性的重要因素，是质粒设计的重点。相对来说，辅助质粒在不同产品中的通用程度最高，也有通过 FDA 药物主文件（drug master files，DMF）备案的案例报道[11—12]。因此本文主要论述转基因质粒和包装质粒的设计。设计这 2 种质粒时，需从基因组整合特性、免疫原性、靶向特性和脱靶风险等多角度考虑。

2.1 转基因质粒设计

GOI 表达调控元件以及 ITRs 序列在 GOI 表达和可能的基因组整合中发挥重要作用，将决定终产品的有效性和安全性。

在表达调控元件中，启动子是转录起始的必需元件，决定基因表达水平，通常还具有细胞选择性。一般优先选择能持续激活的强启动子，以确保外源基因的有效表达[3]。常用启动子类型有巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）启动子、鸡 β- 肌动蛋白、猿猴病毒 40、延伸因子 1α、鸡 β- 肌动蛋白衍生物等，并且还可通过添加增强子提高表达水平[13]。有研究[14—15]显示，增强子 / 启动子类型和宿主体内酶缺乏与 rAAV 遗传毒性具有一定相关性。转录通读、增强子效应、肿瘤抑制因子破坏可能是导致 rAAV 遗传毒性的潜在机制[16]，且受载体剂量、给药时间等影响[17]。启动子大小会影响病毒的包装难度[18]，

并且部分启动子在特定组织中可能会因超甲基化而被沉默[19]。因此，应审慎选择增强子 / 启动子，需着重考察启动子与靶细胞的相互作用，结合拟构建的载体大小选择启动子。

除了启动子，还可设计或优化其他表达调控元件来控制 GOI 的表达。例如，在 3'- 非翻译区（3'-untranslated region，3'-UTR）编码序列中插入微小 RNA（microRNA，miRNA）靶序列，使其表达受肝脏 miRNA-122 抑制，下调肝脏中 GOI 的表达，以减轻肝脏负担[20]。另外，还可通过四环素、西罗莫司介导转录调控，蛋白降解系统介导翻译后调控来实现转基因质粒的设计和优化[21]。

如前述，目前常用的 ITRs 序列源于 AAV2，但由于 AAV2 的 ITRs 序列具有部分启动子活性，可能干扰 GOI 启动子的功能[22]，因此仍需关注 ITRs 序列对 GOI 表达有效性的影响。ITRs 序列中的 CpG 位点可诱导炎症反应，CpG 位点的去除和 GC 含量的改变可能影响 rAAV 滴度[21]。此外，ITRs 序列还可能介导 AAV 与宿主基因组整合[23]。尽管目前尚未见 rAAV 载体类体内基因治疗产品的遗传毒性相关不良事件报道，且多项动物和人体中的长期（4 ～ 15 年）随访结果也未明确显示发生 rAAV 载体相关肿瘤[24—27]，但仍不能忽视基因组整合带来的潜在风险。早期细胞和动物试验表明，rAAV 保留了与宿主基因组整合的能力，但并不一定整合至 19 号染色体上的特定位点[28—30]。随机整合可见于新生小鼠 *Rian* 基因、白蛋白（albumin，ALB）基因、甲胎蛋白（alpha fetoprotein，AFP）基因等[27,31—33]。随机整合的位点通常为转录起始位点、转录活跃区域和 CpG 岛[34]。值得注意的是，非人灵长类动物中有关整合位点偏好性的研究仍存在争议[31—35]。在已知的随机整合位点中，新生小鼠 *Rian* 基因位点上的整合与肿瘤发生有较强的相关性。*Rian* 基因突变会使小鼠发生肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）[36]。由于人长链非编码 RNA（long noncoding RNA，lncRNA）MEG8 是新生小鼠 *Rian* 基因的同源类似物，而 MEG8 的表达上调与 HCC 患者预后不良相关[37]。因此，rAAV 应用于人类时也具有类似的致病风险。在设计 ITRs 序列时，需基于基因组整合特性考虑潜在的致病风险，尽量减小 ITRs 序列与 *rep* 基因、*cap* 基因的序列相似性，将结构基因分散于不同质粒，避免产生复制型病毒，降低重组风险[38]。此外，基因组整合特性导致疾病的风险还与动物种属、年龄、辅助治疗等有关[39]。例如，放射疗法可能会导致双链 DNA 断裂，增加 rAAV 载体的整合概率，提高潜在的致病风险[40]。因此，应综合考虑终产品适用人群的遗传背景、年龄范围、辅助治疗等，选择或设计合适的 GOI 表达调控元件和 ITRs 序列。

2.2　包装质粒设计

rAAV 衣壳蛋白可识别宿主细胞表面受体，既具有一定免疫原性，又决定了不同血清型的组织嗜性[1]。由于 AAV 在人群中的感染率较高（30%～ 60%），不同血清型间存在交叉反应[41]。因此设计包装质粒时，应基于预期临床应用选择不同的血清型 *cap* 基因，并关注免疫毒性和脱靶毒性风险，优先选择人群中基础感染率和抗体滴度水平偏低的 AAV 血清型（如 AAV5、AAV8）的衣壳蛋白编码序列。

目前具备临床应用潜力的衣壳蛋白序列主要来源于天然血清型，如从动物组织、腺病毒等中分离的中枢神经系统嗜性 AAV9、淋巴系统嗜性 AAV10 和 AAV11 等[9]。另一方面，也可通过基因工程技术设计或改造衣壳蛋白，降低 rAAV 载体的免疫原性和脱靶风险，包括理性设计（rational design）、定向进化（directed evolution）、生物信息学方法等[42]，如通过氢 / 氘交换质谱探测 rAAV 衣壳的高阶结构，进而设计和改造衣壳蛋白[43]。

设计和改造衣壳蛋白时，需考虑拟用 AAV 血清型的确切生物学特性，并结合技术难度和成本选择合适的方法。如对于人群基础感染率或抗体滴度水平较高的 rAAV 载体，可在给药前进行血浆置换，降低患者体内的预存抗体水平，减小机体的免疫反应[44]；在衣壳蛋白的特定结构中插入蜂毒肽，从而提高 rAAV 在肝癌细胞中的转导效率等[45]。

相较于 *cap* 基因，*rep* 基因较为确定，可选择性与设计灵活度相对较低[46]。AAV 衣壳蛋白感染宿主

细胞的机制尚未完全阐明，现有认知主要集中在宿主细胞特定受体和 AAV 的亲和力特性方面。经人工设计或改造后，衣壳蛋白的生物物理性质和生物学特性的不确定性和复杂性增加，因此设计包装质粒时，还需预先考虑下游生产方案，通过最小修改来最大程度降低成本。

3 rAAV 载体生产用质粒的合规性考量

在采用三质粒系统生产的rAAV载体类产品中，质粒作为最终药物生产的起始原材料，其质量对终产品的质量、安全和有效性密切相关。应鼓励基于“质量源于设计”的药物开发理念，探索质粒与产品质量的相关性，进一步指导和规范质粒的管控。应按照《药品生产质量管理规范》将质粒纳入质量管理体系进行管理，包括质量风险评估、清晰且可溯的来源、稳健的工艺、有效的质量控制等，以保障产品质量，降低质粒相关风险。

质粒的结构、基因和元件设计应符合前述的风险控制原则及预期用途。质粒序列，特别是作为终产品活性组分的转基因质粒，应不含具有潜在致瘤风险的基因或元件，且应在必要时对此类基因 / 元件进行替换或改造 [47]。质粒筛选时，应考虑抗菌药抗性基因的风险，避免使用 β- 内酰胺类抗菌药抗性基因（如氨苄西林抗性）作为质粒的筛选基因。

由于基因治疗产品固有的复杂性和变异性，可溯的质粒来源是保证终产品安全、有效、质量可控的基本前提。质粒生产使用的菌种来源和历史应明确，制备过程应清晰、完整，应尽量避免使用人源或动物源性原材料，应确认种子批的单克隆性，并在申报资料中提供来源、基因型等信息和证明文件 [47]。菌种需建库管理，建立至少 2 级细菌种子批系统。种子批系统应在限定代次内具有遗传稳定性，贮存稳定性应能满足生产要求，并在申报资料中详述细菌种子和种子批的建立过程、提供相应的鉴定报告等。

质粒 DNA 的生产应基于经批准的种子批系统，采用经验证的发酵和纯化工艺制备，质粒的生产规模及批量应与后续 rAAV 载体的生产规模相适应。可在发酵罐水平，以单位产量及质粒 DNA 的同质性等为指标，优化补料策略、发酵溶氧、收获时间等工艺参数及控制范围；可在裂解和纯化阶段，以 DNA 同质性比例、大肠埃希菌宿主 DNA 残留、收率等为指标，优化裂解的体系和时长、裂解液收获方法、色谱上样载量和洗脱条件等工艺参数 [48] 及控制范围。综合评估工艺研发数据、非临床和临床批次生产工艺，确定关键工艺参数，建议应完成至少 3 批、连续成功的质粒工艺验证。

每批质粒通过放行检测方能用于产品生产，建议生产过程中也进行适当的质量控制，确保产品生产一致性和安全性 [48—49]。质粒的质量标准一般包括质粒鉴别、含量、纯度、完整质粒或重要基因序列的确认、超螺旋比率、无菌、细菌内毒素、抗菌药残留（如适用）、一般理化性质（如 pH 值）、工艺相关杂质（如宿主菌 DNA/RNA/ 蛋白质等大分子杂质低于 1%）等 [47,49]。若生产的质粒为冻干形式，应当控制残留水分 [49]，并在稳定性考察中予以关注。在三质粒系统中，由于 3 种质粒携带基因不同，应分别考虑 PCR 鉴别的目的片段种类和大小，以及限制性酶切图谱鉴别中所用的限制性内切酶和酶切图谱，测序鉴别的结果应符合各质粒的预期序列 [48]。ITRs 序列易在质粒的生产过程中丢失，对 rAAV 载体的包装效率影响较大，且其高级结构并不适用 PCR，因此可用限制性内切酶酶切后，通过电泳法检测 ITRs 序列的丢失情况 [48]。在质粒形态上，超螺旋结构质粒的包装效率最佳，3 种质粒均应保证较高的超螺旋比率（>80%）。超螺旋比率的质量评价方法包括琼脂糖凝胶电泳、毛细管凝胶电泳或高效液相色谱等 [48—49]。应关注质粒生产批量和包材的选择，并确保留出检验 / 检测和稳定性试验的样品量，质粒的贮存稳定性应能支持后续生产步骤的生产 [47—48]。

最后，建议全面审核 rAAV 载体生产用质粒相关的风险因素以及生产商对相应风险的控制，根据风险评估结果建立合理的内控标准。生产过程中使用的耗材和容器应具有稳定的物理和化学特性，耗材与直接接触的溶液、中间产物等应有良好的相容性，可根据耗材材质、使用阶段、供应商等因素对耗材、容器的相容性进行评估或研究 [47]。

4 讨论

质粒是 rAAV 载体生产过程中重要的起始原材料，对终产品的安全性和有效性有重要影响。由于与 GOI 表达和病毒载体转导相关，转基因质粒和包装质粒设计的考量因素更为繁杂。在 GOI 及其表达调控元件的设计方面，应符合终产品的预期用途，充分考察拟用元件的生物学特性，保证终产品有效性；还需充分考虑重组风险，尽量减少转基因质粒与包装质粒的序列同源性，避免产生复制型病毒等，提高终产品安全性。在衣壳蛋白编码序列的设计中，不仅可通过选择合适的 AAV 血清型减少不必要的免疫毒性，还可通过基因工程技术赋予其预期的生物学特性，增强终产品靶向性，提高转导效率。同时，衣壳蛋白编码序列的设计还需适用预期制备工艺，最大化利用已有资源、降低生产或潜在的变更成本。当需要选用 AAV 新型组件时，应充分考虑其靶向性、免疫原性等，如特定 AAV 血清型在人群中的预存抗体分布情况、不同 AAV 血清型间的抗体交叉活性、工程化衣壳蛋白和蛋白修饰的靶向性及安全性等。

总而言之，质粒的设计与生产应遵循“质量源于设计”的基本理念和“基于风险”的基本原则，以临床安全性和有效性为出发点，审慎考量质粒对病毒载体免疫原性、重组风险等的影响，合理利用有效的优化和改造技术，实现基因治疗产品的高质量研发与生产。

参考文献：

[1] MEZZINA M, MERTEN O W. Adeno-associated viruses [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, **737**: 211-234.

[2] CHUNG T W. Scale up of Sf9/BEVS-based AAV production process for GMP-manufacturing of cardiovascular gene therapies [EB/OL]. (2023-04-23) [2023-09-19]. https://dc.engconfintl. org/ccexviii/34/.

[3] NASO M F, TOMKOWICZ B, PERRY W L 3rd, *et al*. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [J]. *BioDrugs*, 2017, **31**(4): 317-334.

[4] YOUNG P. Treatment to cure: advancing AAV gene therapy manufacture [J]. *Drug Discov Today*, 2023, **28**(7): 103610.

[5] SCHULTZ B R, CHAMBERLAIN J S. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(7): 1189-1199.

[6] ROBERT M A, CHAHAL P S, AUDY A, *et al*. Manufacturing of recombinant adeno-associated viruses using mammalian expression platforms [J]. *Biotechnol J*, 2017, **12**(3): 1600193.

[7] SAMULSKI R J, MUZYCZKA N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes [J]. *Annu Rev Virol*, 2014, **1**(1): 427-451.

[8] GRIEGER J C, CHOI V W, SAMULSKI R J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors [J]. *Nat Protoc*, 2006, **1**(3): 1412-1428.

[9] ISSA S S, SHAIMARDANOVA A A, SOLOVYEVA V V, *et al*. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: an overview [J]. *Cells*, 2023, **12**(5): 785.

[10] MEIER A F, FRAEFEL C, SEYFFERT M. The interplay between adeno-associated virus and its helper viruses [J]. *Viruses*, 2020, **12**(6): 662.

[11] 派真生物. 国际罕见病日丨派真生物 GMP 质粒获 DMF 备案，助力药物申报，为罕见生命点亮色彩！[EB/OL]. (2023-03-02) [2023-10-11]. https://www. packgene. cn/news-cn/dmf/.

[12] FDA. List of drug master files (DMFs) [EB/OL]. (2023-10-10) [2023-10-11]. https://www. fda. gov/drugs/drug-master-files-dmfs/list-drug-master-files-dmfs.

[13] POWELL S K, RIVERA-SOTO R, GRAY S J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy [J]. *Discov Med*, 2015, **19**(102): 49-57.

[14] BELL P, MOSCIONI A D, MCCARTER R J, *et al*. Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver [J]. *Mol Ther*, 2006, **14**(1): 34-44.

[15] DONSANTE A, VOGLER C, MUZYCZKA N, *et al*. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors [J]. *Gene Ther*, 2001, **8**(17): 1343-1346.

[16] ROSAS L E, GRIEVES J L, ZARASPE K, *et al*. Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity [J]. *Mol Ther*, 2012, **20**(11): 2098-2110.

[17] CHANDLER R J, LAFAVE M C, VARSHNEY G K, *et al*. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy [J]. *J Clin Invest*, 2015, **125**(2): 870-880.

[18] GRAY S J, FOTI S B, SCHWARTZ J W, *et al*. Optimizing

promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, **22**(9): 1143-1153.

[19] TENENBAUM L, CHTARTO A, LEHTONEN E, *et al*. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system [J]. *J Gene Med*, 2004, **6**(Suppl 1): S212-S222.

[20] GEISLER A, FECHNER H. MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy [J]. *World J Exp Med*, 2016, **6**(2): 37-54.

[21] WANG J H, GESSLER D J, ZHAN W, *et al*. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, **9**(1): 78.

[22] PAN X F, YUE Y P, BOFTSI M, *et al*. Rational engineering of a functional CpG-free ITR for AAV gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2022, **29**(6): 333-345.

[23] BALAKRISHNAN B, JAYANDHARAN G R. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2014, **14**(2): 86-100.

[24] 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): 2073-2082.

[25] SRIVASTAVA A, CARTER B J. AAV infection: protection from cancer [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, **28**(4): 323-327.

[26] NATHWANI A C, REISS U, TUDDENHAM E, *et al*. Adeno-associated mediated gene transfer for hemophilia B: 8 year follow up and impact of removing "empty viral particles" on safety and efficacy of gene transfer [J]. *Blood*, 2018, **132**(S1): 491.

[27] 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.

[28] NAKAI H, IWAKI Y, KAY M A, *et al*. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver [J]. *J Virol*, 1999, **73**(7): 5438-5447.

[29] RUTLEDGE E A, RUSSELL D W. Adeno-associated virus vector integration junctions [J]. *J Virol*, 1997, **71**(11): 8429-8436.

[30] YANG C C, XIAO X, ZHU X, *et al*. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Virol*, 1997, **71**(12): 9231-9247.

[31] CHANDLER R J, SANDS M S, VENDITTI C P. Recombinant adeno-associated viral integration and genotoxicity: insights from animal models [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, **28**(4): 314-322.

[32] DALWADI D A, TORRENS L, ABRIL-FORNAGUERA J, *et al*. Liver injury increases the incidence of HCC following AAV gene therapy in mice [J]. *Mol Ther*, 2021, **29**(2): 680-690.

[33] GIL-FARINA I, FRONZA R, KAEPPEL C, *et al*. Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients [J]. *Mol Ther*, 2016, **24**(6): 1100-1105.

[34] MILLER D G, TROBRIDGE G D, PETEK L M, *et al*. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells [J]. *J Virol*, 2005, **79**(17): 11434-11442.

[35] SULLIVAN L, ZAHN M, FARINA I G, *et al*. Rare genomic integrations of AAV5-hFVIII-SQ occur without evidence of clonal activation or gene-specific targeting [J]. *Mol Ther*, 2021, **29**(4): 425.

[36] WANG P R, XU M, TOFFANIN S, *et al*. Induction of hepatocellular carcinoma by *in vivo* gene targeting [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(28): 11264-11269.

[37] LOU J, YAN W, LI Q Y, *et al*. LncRNA MEG8 plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma progression through miR-367-3p/14-3-3ζ/TGFβR1 axis [J]. *Neoplasma*, 2021, **68**(2): 273-282.

[38] 国家药品监督管理局药品审评中心. 重组腺相关病毒载体类体内基因治疗产品临床试验申请药学研究与评价技术指导原则 [EB/OL]. (2024-01-19) [2024-06-04]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=50e5084c5744f082a85dd7e4eb068703.

[39] SABATINO D E, BUSHMAN F D, CHANDLER R J, *et al*. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: an integrated perspective [J]. *Mol Ther*, 2022, **30**(8): 2646-2663.

[40] MILLER D G, PETEK L M, RUSSELL D W. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites [J]. *Nat Genet*, 2004, **36**(7): 767-773.

[41] WEBER T. Anti-AAV antibodies in AAV gene therapy: current challenges and possible solutions [J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 658399.

［42］ WANG D, TAI P W L, GAO G P. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery［J］. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(5): 358-378.

［43］ IKEDA T, YAMAGUCHI Y, OYAMA H, *et al*. Higher-order structure of adeno-associated virus serotype 8 by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry［J］. *Viruses*, 2024, **16**(4): 585.

［44］ MENDELL J R, AL-ZAIDY S, SHELL R, *et al*. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy［J］. *N Engl J Med*, 2017, **377**(18): 1713-1722.

［45］ MENG J S, HE Y, YANG H B, *et al*. Melittin analog p5RHH enhances recombinant adeno-associated virus transduction efficiency［J］. *J Integr Med*, 2024, **22**(1): 72-82.

［46］ EL ANDARI J, GRIMM D. Production, processing, and characterization of synthetic AAV gene therapy vectors［J］. *Biotechnol J*, 2021, **16**(1): e2000025.

［47］ 国家药品监督管理局药品审评中心. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2022-05-31)[2023-10-02]. https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=c78a179af7edac00e6d8893dcdfef01f.

［48］ 基因治疗制品质量控制概述［J］. 中国药事, 2023, **37**(6): 611-644.

［49］ FDA. Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications［EB/OL］. [2023-10-12]. https://www.fda.gov/media/73667/download.

