

文章编号: 1004-0374(2010)05-0459-07

## 重组腺相关病毒载体的整合性研究进展

卢超, 王启钊, 许瑞安\*

( 华侨大学分子药理学研究所, 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021)

**摘要:** 重组腺相关病毒(rAAV)载体是一种具有高靶向性和良好安全性的病毒载体, 在基因治疗中得到了较为广泛的应用。目前全球范围内已有70余项以rAAV为基因药物的临床研究已经完成或正在进行中。与野生型AAV(wtAAV)定点整合不同, 不表达Rep蛋白的rAAV载体与宿主染色体发生的是随机整合, 而这给临床应用带来了可能的潜在的安全隐患。该文在综述wtAAV和rAAV整合机理的基础上对rAAV的因随机整合而可能导致的致癌性及其他后果进行探讨, 并总结了相应应对策略, 特别是目前利用Rep蛋白所开展的定点整合研究。

**关键词:** 腺相关病毒; 定点整合; 随机整合; Rep蛋白; 安全性

**中图分类号:** R374.18; Q789 **文献标识码:** A

### Research progress on recombinant adeno-associated virus vector integration

LU Chao, WANG Qi-zhao, XU Rui-an\*

( Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education & Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** Recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV) have been extensively applied in gene therapy for its high safety and specific targeting activity. More than 70 clinical trials have demonstrated the efficacy of rAAV based gene drugs. Unlike wild type AAV (wtAAV), which is able to integrate into a specific locus of human chromosome 19, rAAV randomly integrates in chromosomes for lack of rep expression. The random integration of rAAV may induce a potential danger in clinical. This review presents the progress of the mechanisms for wtAAV and rAAV, and discuss the potential consequences (including carcinogenicity) that caused by the random integration of rAAV. Moreover, the strategies, especially using Rep protein to improve the site-specific integration is also reviewed.

**Key words:** adeno-associated virus; site-specific integration; random integration; Rep protein; safety

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)属于细小病毒家族中的一种缺损病毒, 其复制依赖于辅助病毒(helper virus), 如腺病毒或疱疹病毒。野生型AAV (wtAAV)基因组为线性单链DNA, 大小约4.7 kb。两末端各含一个倒置末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR), 中间含有*rep*和*cap*基因。目前已发现12种血清型及120多种突变型。由于rAAV载体具有高稳定性、高靶向性、低致病性、低免疫原性, 宿主范围广, 能感染分裂与非分裂细胞, 可长期表达等优点, 使得rAAV基因药物研发工作

日益受到业界重视<sup>[1]</sup>。全球已有71项以rAAV作为载体的临床研究在进行之中(<http://www.abedia.com/wiley/>)。虽然wtAAV在体内与宿主19号染色体AAVS1区发生的是不影响正常基因表达的定点整合, 但rAAV却很容易与宿主染色体发生同源性的

收稿日期: 2009-12-08; 修回日期: 2010-01-20

基金项目: 国家“863”项目(2008AA02Z135); 福建省发改委项目, 2008年第三批[26]

\*通讯作者 E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn

随机整合<sup>[2]</sup>, 这与之前长期以来认为的非同源性重组不同。最近研究发现, rAAV 载体在小鼠体内存在低水平的致癌性<sup>[3]</sup>。本文对 wtAAV 和 rAAV 的整合机理分别进行详述和比较, 并在此基础上对 rAAV 因随机整合而可能导致的潜在致癌性及其他后果进行探讨, 以期采取相应的有效策略来消除 rAAV 基因药物随机整合的负面影响, 从而促进其在临床上得以广泛地应用。

## 1 wtAAV 的定点整合机理

wtAAV 定点整合的概况见图 1<sup>[4-6]</sup>。在辅助病毒(b)提供 wtAAV(a) 所必需的复制元件的帮助下, wtAAV 在体内完成复制, 形成单链 DNA(ssDNA, c) 和 Rep 蛋白(d)。ssDNA 在复制的过程中部分会形成双链 DNA(dsDNA, g), 在缺少辅助病毒的情况下, 部分 dsDNA 在体内以首尾相连(head-to-tail) 的形式形成前病毒(provirus)。在 Rep 蛋白作用下, 人 19 号染色体长臂 1 区 3 带 4 亚带 2 次亚带(19q13.42) 的 AAVS1 区域(e) 产生切口并开始复制(i)。复制到一定阶段时 Rep 蛋白介导前病毒与染色体发生整合, 形成稳定的染色体-AAV(ch19-AAV, i) 的整合形式。该位点与临近的肌球蛋白亚基 85(*Mbs85*) 基因高度保守<sup>[7]</sup>, 而且其定点整合必须依赖于 *Mbs85* 基因的部分复制<sup>[8]</sup>。研究者在此基础上对先前提出的 wtAAV 整合模型进行了完善, 改变了人们长期以来在 wtAAV 整合过程的认识上存在的误区<sup>[5,6,8]</sup>。现结合各个实验小组的研究成果我们将 wtAAV 整合过程阐述如下(图 2)。

a Rep 蛋白同时结合在染色体 AAVS1 和 wtAAV ITR 上的 Rep 蛋白结合位点(RBE), 将 AAV 基因组

牵引至染色体 AAVS1 区域, 确保整合位点的精确性<sup>[9]</sup>。两区域的 RBE 位点均含有 (GAGC)<sub>3</sub> 重复序列, 有助于 Rep 蛋白在两区域结合<sup>[10]</sup>。

b 结合在 AAVS1 上 RBE 处的 Rep 蛋白在末端解链位点(trs) 处的双胸腺嘧啶(TT) 间进行切割产生 3' - OH, 并以此为引物, 按不对称复制的机制不断合成新链, 从而使得染色体发生位移<sup>[11]</sup>。5' 端与 Rep 蛋白形成共价连接复合物, 有助于与 wtAAV 的 ITR 相关联<sup>[12, 13]</sup>。与此同时 wtAAV 上 Rep 蛋白的 ATP 依赖性解旋酶作用将 ITR 解旋并拉伸形成发卡结构, 在 ITR 上的 trs 处的 TT 间产生切口, 形成新的 5' 端和 3' 端。由 CTTTG 构成的 Rep 蛋白结合位点(RBE), 亦即图中的 RBE', 是 ITR 解旋必需元件<sup>[14, 15]</sup>。

c Rep 蛋白结合在染色体上作为复制泡随着双链的复制不断前移解开双链。合成的新链延伸到完成 *Mbs85* 基因的复制时, 新链以 AAV 的 DNA 为模板开始新的复制延伸<sup>[8, 16, 17]</sup>。

d AAV 基因组复制完成后, 新合成链以自身为模板, 产生一段短的反向重复序列, 称之为未知序列(unknown sequences, US)<sup>[8]</sup>。

e 新合成链通过新合成的反向重复序列与置换链 5' 端在 Rep 蛋白作用下共价连接, 完成 *Mbs85* 基因的重叠<sup>[8]</sup>。

f 染色体的亲本链产生一个切口, 由 DNA 修复机制对不互补的区域进行修复, 从而形成稳定的整合形式<sup>[8, 18]</sup>。

在细胞水平上 wtAAV 的整合效率与感染复数(MOI) 相关。当 MOI=10 时, 整合率 < 5%。当 MOI ≥ 100 时, 整合率为 35%~40%, 约为转染效率的

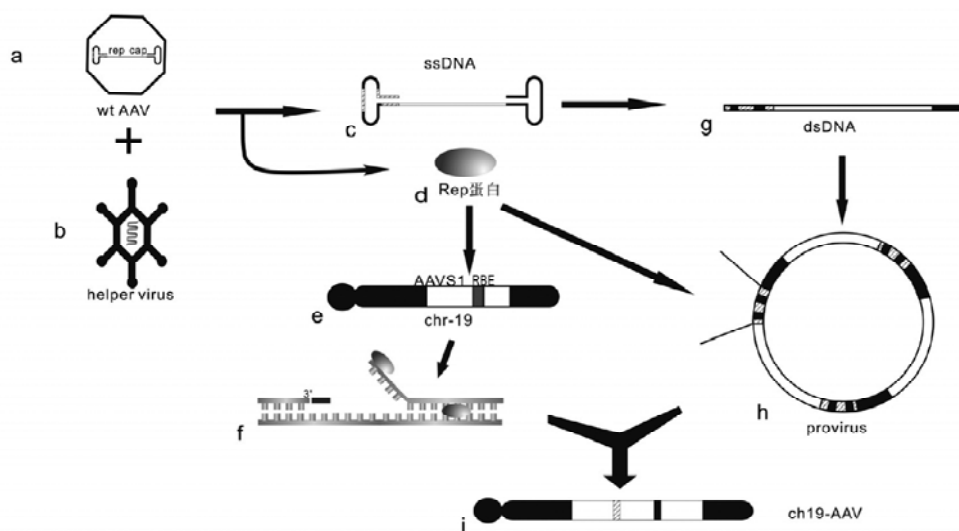


图1 wt AAV 与人 19 号染色体发生整合过程示意图

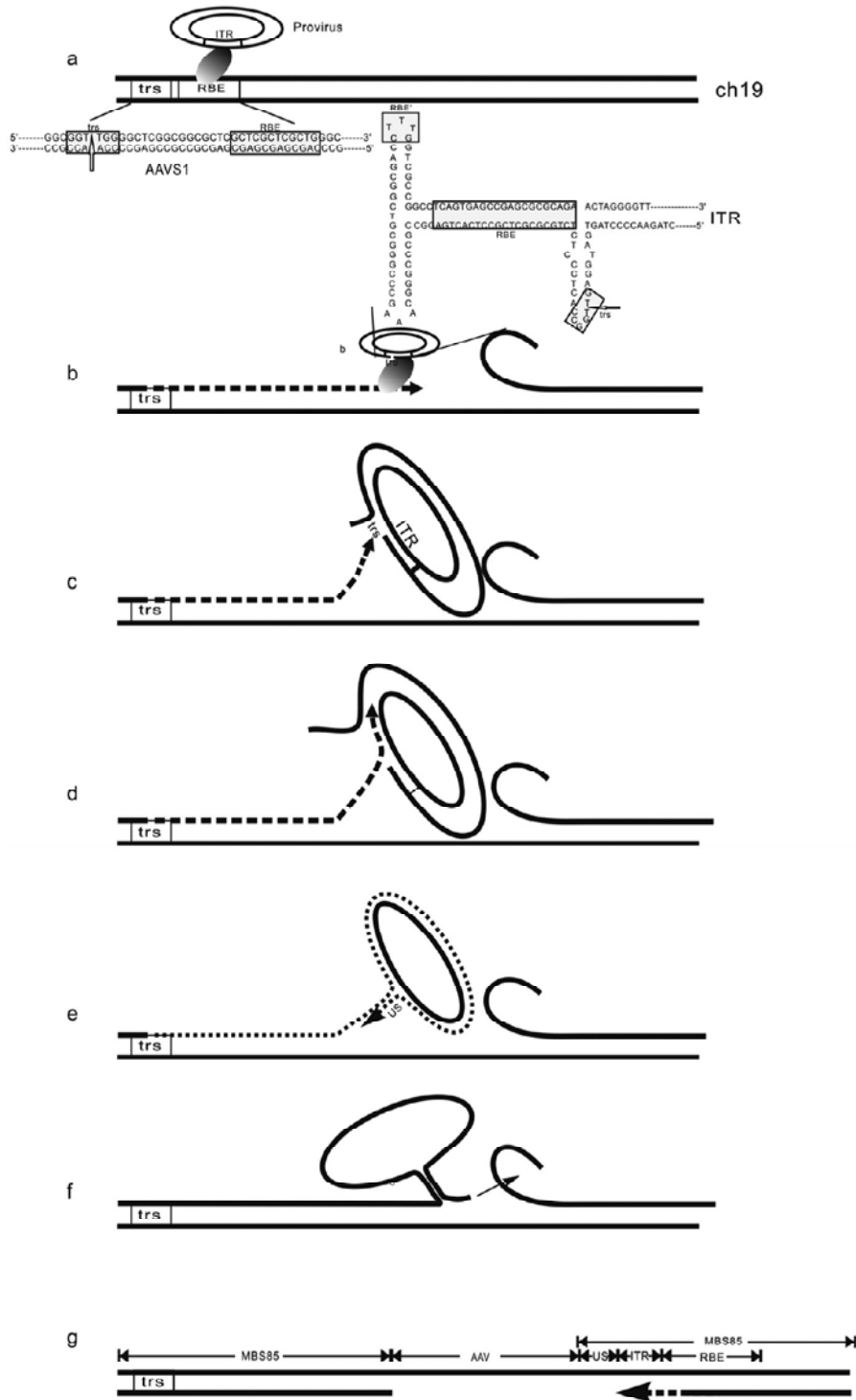


图2 wtAAV与19号染色体AAVS1区域发生定点整合的详细过程

一半<sup>[19]</sup>。在动物水平的研究发现, wtAAV 整合效率范围为 0.1%~0.5%<sup>[5]</sup>。

### 2 rAAV 的随机整合与致癌性

在小鼠体内注射 rAAV2 表达的人凝血因子 9 (hF. IX) 12 个月后进行部分肝切除实验,在肝切除实验 6 周后发现小鼠体内 hF. IX 表达水平下降了 84%,

平均每细胞含有的载体基因组数量下降 92%<sup>[20]</sup>。类似的数据在其他的肝切除实验中也均有体现<sup>[21, 22]</sup>。考虑到整合的 rAAV 载体会随着肝细胞的分裂而在新生的肝细胞中持续表达目的基因,因此这些实验证明了在肝脏中注射的 rAAV 载体主要是以附加体的形式而非染色体整合形式存在。rAAV 的整合效率因载体血清型、宿主种群与组织细胞甚至实验方法的

区别而有所差异。在Hela细胞中，rAAV整合率可达到0.1%~1%<sup>[23]</sup>。rAAV2在小鼠肝细胞中的转导率达到10%<sup>[20]</sup>，而在小鼠肌肉组织中整合率低于0.5%<sup>[24]</sup>。

与wtAAV的定点整合不同，缺少Rep蛋白定点整合辅助作用的rAAV载体与宿主染色体的整合是一种随机整合。虽然人们对wtAAV的定点整合机制已经有一定的了解，但对rAAV的随机整合机制还不够清楚。最新的研究表明，rAAV整合机制是一种依赖于RAD51/RAD56途径的同源重组<sup>[2, 25]</sup>。S期的细胞因其DNA修复机制活性更高而使得rAAV整合效率与停滞期细胞相比提高200倍<sup>[26]</sup>，通过酶切或放射等DNA损伤因素刺激也能使rAAV整合效率明显提高<sup>[27]</sup>。这些都说明rAAV的整合机制与DNA修复机制密切相关。研究还发现，rAAV与宿主染色体整合的发生至少需要以下两方面因素来共同完成：一方面rAAV的全基因组必须发生部分降解<sup>[23]</sup>；另一方面宿主染色体在整合前必须存在缺口<sup>[27]</sup>。

对rAAV的随机整合位点进行深入大规模研究发现，rAAV与宿主染色体的随机整合具有一定规律，主要体现在以下四个方面<sup>[28]</sup>：(1) 高达70%的整合会发生小于1 kb的宿主染色体的丢失，约35%的整合会发生小于100 bp的染色体插入或二倍体的产生，1%~2%的整合会发生染色体重组；(2) rAAV上的整合多发生在ITR上整合易发位点(见wtAAV的hot-spots)；(3) 与其他血清型相比较，rAAV2更易于整合在活性基因处；(4) 染色体上的整合中约27%发生在转录起始位点±1 kb区域内，37%发生在CpG岛，30%发生在包括肝脏、肌肉、心脏组织在内的大于40 bp的回文区域。

不过，与wtAAV在19号染色体上定点整合不同的是，rAAV可以整合到人类23条染色体中的任何一条。其中与7号染色体和19号染色体整合几率较大，而与5号染色体发生整合的几率最小。整合特别容易发生在7号染色体上的两个整合易发位点和19号染色体上的三个整合易发位点<sup>[29]</sup>。

wtAAV的定点整合发生在19号染色体的AAVS1区，该区DNA不仅与临近的*Mbs85*基因高度保守，还与人骨骼肌肌原蛋白*TNNT1*基因紧密连接。已有实验证明wtAAV的定点整合依赖于*Mbs85*基因的部分复制，但不影响*Mbs85*基因的表达<sup>[8]</sup>。另外，wtAAV还会与*TNNT1*基因发生整合<sup>[30]</sup>。虽然到目前为止尚未发现任何致病性的存在，但这种两个等位

基因全部因整合而导致其原功能性破坏的潜在威胁却也不得不引起我们在进一步研究中的关注。因为缺乏Rep蛋白介导的定点整合能力，这一可能性在rAAV的随机整合中体现得更为明显。

rAAV的随机整合会引起宿主染色体的缺失、插入等一系列核酸水平的改变。实验中也发现rAAV在非人灵长类动物细胞和小鼠肝脏中的整合分别有53%和38%发生在活性基因上<sup>[29, 31]</sup>。另一个实验通过rAAV对小鼠肝细胞的整合研究更是发现了高达72%的整合发生在活性基因上<sup>[32]</sup>。发生在基因编码区的整合会产生癌基因激活或者抑癌基因失活的潜在威胁，增加了癌症发生的可能性。Nakai等<sup>[31]</sup>的实验发现，rAAV的整合中有部分会发生在9个癌相关基因上或其临近区域。这一系列的研究以及逆转录病毒因为其整合性在临床上已经引起致癌性的事实加深了人们对rAAV载体临床应用上安全性的担忧<sup>[33]</sup>。

虽然在临床上尚未发现任何因rAAV基因药物的随机整合而引起基因失活或者癌症发生，但有研究报道rAAV基因药物在动物水平上会引起致癌性，其致癌机理也得以初步探讨<sup>[3]</sup>。该实验通过静脉注射rAAV基因药物后，小鼠的肝癌发生率高达33%~56%，这相当于正常小鼠肝癌发生率的4~7倍<sup>[3]</sup>。考虑到目前大多数实验证明rAAV基因药物在鼠类、大型动物以及灵长类动物体内都能得以长期表达且无致癌性，因此我们认为物种、品系或实验条件的差异可能会在一定程度上造成该实验中小鼠的高肝癌发生率<sup>[34]</sup>。

尽管rAAV载体的随机整合所带来的活性基因的失活还没有在动物水平实验中表现出来，而且在动物水平的致癌性文献报道也有限<sup>[3, 35, 36]</sup>，但我们应对这种可能性予以足够的重视。利用高通量分析及改良方法来获得随机整合的位点和几率等相关的信息给我们对随机整合的研究提供了新的思路<sup>[29, 31, 37]</sup>。相信随着对wtAAV以及rAAV载体整合机理研究的深入，生物信息学的发展以及对人和动物基因组学、蛋白质组学的进一步研究，人们必将从rAAV载体的这种看似随机的整合现象中发现突破性的规律，发现安全整合位点并提高在这些位点整合的几率，避免与染色体的不利整合，从而有助于rAAV载体在临床前和临床研究中得以更广泛的应用。另外，利用Rep蛋白介导rAAV载体在AAVS1区域定点整合是解决因随机整合导致潜在威胁的另一个有

效途径。

### 3 AAV 定点整合能力的应用

wtAAV 定点整合能力是 rAAV 载体得以深入研究和广泛发展的主要动力<sup>[6]</sup>。为了避免 Rep 蛋白的杀细胞毒性以及对细胞生长的抑制<sup>[38, 39]</sup>, 人们在构建 rAAV 载体时一般都采取除去 *rep* 基因的方法, 这也导致了 rAAV 载体在整合上的随机性。

随着对 wtAAV 整合机制研究的深入, 很多研究者有针对性地利用 Rep 蛋白以及 ITR 介导的定点整合能力来构建不同的病毒载体或非病毒载体, 均能达到有效定点整合目的, 从而避免了因随机整合而存在的安全隐患。Balague 等<sup>[40]</sup>构建的含有两个不同的质粒来分别表达 ITR 与 Rep 蛋白的系统表现出高达 23% 的 AAVS1 位点整合率。Palombo 等<sup>[41]</sup>证明杆状病毒-腺相关病毒的杂交系统也能有效地在 AAVS1 处发生定点整合。Recchia 等<sup>[42]</sup>构建的腺病毒-腺相关病毒杂交系统也得到了类似良好的整合结果。

考虑到 *rep* 基因长期表达的 Rep 蛋白的负面作用会影响染色体和转录基因的稳定性, 近年来有较多的研究从不同角度来提出各种不同的改进方法, 这些方法主要包括: (1) 直接瞬时加入 Rep 蛋白。Lamartina 等<sup>[43]</sup>向由含有 AAV ITR 的腺病毒转染的细胞中通过脂质体转染的方法分别加入 Rep78 和 Rep68 蛋白, 实验结果表明, 单独加入 Rep68 蛋白便可在 AAVS1 发生定点整合; (2) 通过外界条件调节 *rep* 基因实现 Rep 蛋白的可调控性表达。Satoh 等<sup>[44]</sup>通过构建一个 Cre-loxP 的重组酶系统使构建的 AAV 质粒中 *rep78* 基因的表达条件性失活, 这种暂时性表达的 Rep78 蛋白能有效地达到明显的整合效果。Rinaudo 等<sup>[45]</sup>借鉴经典的米非司酮 (RU486) 诱导系统, 并在此基础上构建了高度依赖于 RU486 的诱导系统, 从而条件性激活 *rep* 基因的表达; (3) 利用 mRNA 半衰期短的特点瞬时表达 Rep 蛋白。Howden 等<sup>[46]</sup>在体外构建成熟的含 *rep78/rep68* 基因的 mRNA, 并通过电转的方式导入 K562 细胞, 在电转 24 h 后发现大于 85% 的细胞成功地转染了 mRNA, 实验表明在 AAVS1 处的定点整合效率高达 17%。

### 4 rAAV 载体的前瞻

rAAV 基因药物的免疫性以及其理论上存在的因随机整合而带来基因失活或者致癌性的潜在威胁给人们 rAAV 载体的广泛应用过程中带来一些顾虑。2007 年, 美国一位关节炎患者在接受 rAAV 载体的

二次给药后出现了严重不良反应, 4 d 后该名患者死亡<sup>[47]</sup>。这一起医疗事故让人们对于理论上最安全的病毒载体——rAAV 载体也开始产生怀疑, 一度使基因治疗蒙上绝境的阴影。事后的调查结果否定该基因治疗事故是因为 rAAV 载体的使用, 打消了人们对其安全性的顾虑<sup>[48]</sup>。最近一年来的在临床试验上 rAAV 基因药物使用的良好治疗效果及其安全性再次使人们对 rAAV 基因药物的研究和开发充满了信心<sup>[48-50]</sup>。以后的 rAAV 载体研发工作将重点集中在降低 rAAV 基因药物的免疫性, 提高靶向性和定点整合能力这三方面, 相信随着这三方面的突破, rAAV 载体将会在基因治疗中得到更广泛的应用。

### [参 考 文 献]

- [1] 许瑞安, 陈凌, 肖卫东著. 分子基因药理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 2-40
- [2] Vasileva A, Linden RM, Jessberger R. Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(11): 3345-60
- [3] Donsante A, Miller DG, Li Y, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*, 2007, 317(5837): 477
- [4] Kotin RM, Linden RM, Berns KI. Characterization of a preferred site on human chromosome-19Q for integration of adeno-associated virus-DNA by nonhomologous recombination. *EMBO J*, 1992, 11(13): 5071-8
- [5] McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet*, 2004, 38: 819-45
- [6] Smith RH. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther*, 2008, 15(11): 817-22
- [7] Dutheil N, Yoon-Robarts M, Ward P, et al. Characterization of the mouse adeno-associated virus AAVS1 ortholog. *J Virol*, 2004, 78: 8917-21
- [8] Henckaerts E, Dutheil N, Zeltner N, et al. Site-specific integration of adeno-associated virus involves partial duplication of the target locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(18): 7571-6
- [9] Weitzman M, Kyostio S, Kotin R, et al. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(13): 5808-12
- [10] McCarty DM, Pereira DJ, Zolotukhin I, et al. Identification of linear DNA-sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol*, 1994, 68(8): 4988-97
- [11] Urcelay E, Ward P, Wiener S, et al. Asymmetric replication *in vitro* from a human sequence element is dependent on adeno-associated virus Rep protein. *J Virol*, 1995, 69(4): 2038-46
- [12] Im DS, Muzyczka N. The AAV origin binding-protein Rep68 is a TP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell*, 1990, 61(3): 447-57
- [13] Young S, Samulski R. Adeno-associated virus (AAV) site-

- specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3): 13525-30
- [14] Brister J, Muzyczka N. Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J Virol*, 1999, 73(11): 9325-36
- [15] Brister J, Muzyczka N. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol*, 2000, 74(17): 7762-71
- [16] Linden RM, Ward P, Giraud C, et al. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11288-94
- [17] Kearns WG, Afione SA, Fulmer SB, et al. Recombinant adeno-associated virus (AAV-CFTR) vectors do not integrate in a site-specific fashion in an immortalized epithelial cell line. *Gene Ther*, 1996, 3(9): 748-55
- [18] Linden RM, Winocour E, Berns KI. The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(15): 7966-72
- [19] Hamilton H, Gomos J, Berns K, et al. Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *J Virol*, 2004, 78(15): 7874-82
- [20] Nakai H, Yant S, Storm T, et al. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol*, 2001, 75(15): 6969-76
- [21] Grimm D, Pandey K, Nakai H, et al. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol*, 2006, 80(1): 426-39
- [22] 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): 13104-9
- [23] Rutledge E, Russell D. Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol*, 1997, 71(11): 8429-36
- [24] Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, et al. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol*, 2003, 77(6): 3495-504
- [25] Vasileva A, Jessberger R. Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(11): 837-47
- [26] Russell D, Miller A, Alexander I. Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8915-9
- [27] Miller DG, Petek LM, Russell DW. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 767-73
- [28] Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1189-99
- [29] Miller DG, Trobridge GD, Petek LM, et al. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J Virol*, 2005, 79(17): 11434-42
- [30] Dutheil N, Shi F, Dupressoir T, et al. Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4862-6
- [31] Nakai H, Wu XL, Fuess S, et al. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol*, 2005, 79(6): 3606-14
- [32] Nakai H, Montini E, Fuess S, et al. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet*, 2003, 34(3): 297-302
- [33] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302(5644): 415-9
- [34] Russell DW. AAV vectors, insertional mutagenesis, and cancer. *Mol Ther*, 2007, 15(10): 1740-3
- [35] Embury J, Charron C, Poirier A, et al. Long term portal vein administration of AAV-WPRE vector results in increased incidence of neoplastic disease and hepatic pathology. *Mol Ther*, 2006, 13: S83
- [36] Bell P, Moscioni A, McCarter R, et al. Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver. *Mol Ther*, 2006, 14(1): 34-44
- [37] Inagaki K, Lewis SM, Wu XL, et al. DNA palindromes with a modest arm length of greater than or similar to 20 base pairs are a significant target for recombinant adeno-associated virus vector integration in the liver, muscles, and heart in mice. *J Virol*, 2007, 81(20): 11290-303
- [38] Yang Q, Chen F, Trempe J. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol*, 1994, 68(8): 4847-56
- [39] Hermanns J, Schulze A, Jansen-Doblerr P, et al. Infection of primary cells by adeno-associated virus type 2 results in a modulation of cell cycle-regulating proteins. *J Virol*, 1997, 71(8): 6020-7
- [40] Balague C, Kalla M, Zhang W. Adeno-associated virus Rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J Virol*, 1997, 71(4): 3299-306
- [41] Palombo F, Monciotti A, Recchia A, et al. Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adeno-associated virus vector. *J Virol*, 1998, 72(6): 5025-34
- [42] Recchia A, Parks R, Lamartina S, et al. Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(6): 2615-20
- [43] Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo D, et al. Lipofection of purified adeno-associated virus Rep68 protein: toward a chromosome-targeting nonviral particle. *J Virol*, 1998, 72(9): 7653-8
- [44] Satoh W, Hirai Y, Tamayose K, et al. Site-specific integration of an adeno-associated virus vector plasmid mediated by regulated expression of rep based on Cre-loxP recombination. *J Virol*, 2000, 74(22): 10631-8
- [45] Rinaudo D, Lamartina S, Roscilli G, et al. Conditional site-specific integration into human chromosome 19 by using a ligand-dependent chimeric adeno-associated virus/Rep protein. *J Virol*, 2000, 74(1): 281-94
- [46] Howden SE, Voullaire L, Warden H, et al. Site-specific, Rep-mediated integration of the intact  $\beta$ -globin locus in the human erythroleukaemic cell line K562. *Gene Ther*, 2008, 15(20): 1372-83
- [47] Kaiser J. Clinical research: death prompts a review of gene

- therapy vector. *Science*, 2007, 317(5838): 580
- [48] Mueller C, Flotte TR. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*, 2008, 15(11): 858-63
- [49] 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): 2240-8
- [50] Binbridge JWB, 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): 2231-9