

# 使用病毒载体的罕见病基因疗法临床进展

林彦妮<sup>1</sup>, 李秋实<sup>1</sup>, 吴尧<sup>1</sup>, 林俊<sup>2</sup>

1. 苏州克睿基因生物科技有限公司, 苏州 215028
2. 苏州大学附属第一医院, 苏州 215006

**摘要** 很大一部分的罕见病由遗传因素决定, 难以用普通的小分子或大分子药物治愈, 而基因治疗有望从根本上修正人体功能的缺失或异常, 给罕见病患者带来改善生活质量的希望。目前许多基因疗法的临床试验正在开展, 病毒载体是常用的基因递送方法, 本文讨论了用于临床基因递送的多种病毒载体, 包括腺相关病毒、逆转录病毒和慢病毒, 重点列举了这些病毒在罕见病临床试验中的研究、应用和进展, 评价了这些病毒的优缺点, 并简述了基因疗法的研究方向及应用前景。

**关键词** 罕见病; 病毒载体; 基因递送; 基因疗法

罕见病是一类发病率很低的疾病的总称, 又被称为“孤儿病”。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的定义, 患病人数占总人口的0.065%~0.1%的疾病即可被定义为罕见病。不过, 世界各国根据自己国家的具体情况, 对罕见病的认定标准存在一定差异。例如, 美国将罕见病定义为每年患病人数少于20万人(或发病人口比例小于1/1500)的疾病; 日本将罕见病定义为患病人数少于5万(或发病人口比例为1/2500)的疾病; 欧洲将发病率低于1/2000的疾病定义为罕见病<sup>[1]</sup>。中国尚无明确的罕见病定义, 但考虑到中国庞大的人口基数, 即便是参照WHO的最低标准(0.065%), 单一疾病患者的绝对数量也是相当庞大, 罕见病患者总数预估超过1000万。

在全球范围内, 罕见病影响了5%~10%的人口, 其中大约50%的患者是孩子<sup>[2]</sup>。而在美国和欧洲, 至少5500万人正受到罕见病的折磨<sup>[3]</sup>。更不幸的是, 大多数罕见病往往是危重的、慢性的、具有遗传性的, 且常常危及生命。2016年2月, 中国瓷娃娃罕见病关爱中心(China-Dolls Center for Rare Disorders, CCRD)联合腾讯新闻通过网络平台在中国对1771例142种罕见病进行了第一次全国调查。调查结果显示, 罕见病人群所面临的社会和经济困难超乎想象: 超过90%的受访者无法自己谋生, 且患者们的生活质量很低, 甚至低于尘肺

患者。从另一方面来看, 由于疾病的严重性, 除了对患者及其家庭的影响, 这些疾病对社会和医疗保健系统也造成了很大的负担<sup>[4-6]</sup>。

目前, 遗传性罕见病的总数量还难以精确测定。根据对人类孟德尔遗传数据库(<http://www.omim.org/>)以及罕见病综合参考网站(<http://www.hanjianbing.org/>)的研究, 大约6000~7000种罕见病与基因相关<sup>[7]</sup>, 而其中只有5%有治疗药物和方法<sup>[4-6]</sup>。然而, 大量罕见病表型还有待定义, 与基因相关的罕见病数量可能会远远超过7000种: 根据人类基因组突变率和必需基因数估计, 罕见病致病基因总数在7000~15000之间<sup>[8]</sup>。通过连锁图谱和候选基因分析, 历经十数年, 耗资数10万美元, 超过3500种罕见病的分子病因已经确定。

总体而言, 目前针对遗传疾病(包括遗传性罕见病)的治疗手段主要包括饮食治疗、药物治疗、手术治疗、基因治疗和干细胞治疗, 其中药物治疗是现阶段的主要手段。1983年, 美国食品与药品监督管理局(U.S. Food & Drug Administration, FDA)通过了孤儿药(专门治疗罕见病的药物)法案, 随着罕见病关注度的提高, 日本(1993年)、澳大利亚(1998年)、欧盟(2000年)也纷纷出台了与孤儿药相关的法规<sup>[9]</sup>。此类监管和激励措施在美国、欧盟和其他国家促进孤儿药开发方面有了实质性进展。

收稿日期: 2017-06-20; 修回日期: 2017-07-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(81401768); 江苏省自然科学基金项目(BK20140289); 国家重点研发计划项目(2016YFC0901500)

作者简介: 林彦妮, 博士, 研究方向为基因编辑技术与基因治疗方法, 电子信箱: yanni.lin@curegenetics.com

引用格式: 林彦妮, 李秋实, 吴尧, 等. 使用病毒载体的罕见病基因疗法临床进展[J]. 科技导报, 2017, 35(16): 58-63; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.16.008

但值得注意的是,大多数传统药物的治疗效果十分有限,且无法根治这类疾病。伴随精准医疗概念的提出,基因治疗技术也随着基因编辑技术的改进而迅速发展,为罕见病的治疗提供了新途径。简而言之,基因治疗就是通过向人体引入“正确”的基因,以治疗由单基因突变引起的罕见病。史上第一例基因治疗的试验就是针对带有罕见单基因疾病的患者进行的。但由于早期的载体递送系统并不能实现长期的基因表达,早期基因治疗的发展速度一直不容乐观。现在,随着逆转录病毒(retrovirus)、慢病毒(lentivirus)和腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体的出现,动物研究已经实现了引入基因的持久表达。因此,这些技术有望成为许多遗传性罕见病基因治疗方案的基础。在过去的5年中,基因治疗的临床疗效已在一些罕见疾病的试验中被证明,其中包括先天性眼病<sup>[9]</sup>和一些遗传性免疫系统疾病<sup>[10-12]</sup>。此外,对脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)不足的基因治疗方法已成为欧洲第一个被授权的基因治疗产品<sup>[13]</sup>。这些临床试验成功为基因治疗在其他罕见疾病中的应用打下了基础。不过,各类基因的递送效果仍依赖于载体系统和递送系统的进步与发展<sup>[14-15]</sup>。

本文将对基因治疗在罕见病中应用的现状进行介绍,讨论基于非整合型病毒(如AAV)和整合型病毒(如逆转录病毒、慢病毒载体)的基因治疗技术,并展望未来这一领域的研究方向和应用前景。

## 1 腺相关病毒在罕见病中的应用

腺相关病毒(adeno associated virus, AAV)是一种非致病性的、免疫原性低、非整合型的病毒。多数成年人感染过AAV病毒,但尚未发现该病毒引起任何疾病;且用AAV递送进细胞的基因通常不插入宿主基因组,而是游离于宿主基因组之外稳定表达。由于上述的几种特性,普遍认为AAV是一种安全的病毒载体,非常适用于活体内(*in vivo*)的基因递送。由于AAV不整合到基因组中,不会随着细胞分裂而复制,它在活跃分裂增殖的细胞群中会被稀释,无法长期稳定表达,因而AAV比较适用于不会很快更新的组织器官。AAV有许多种不同的血清型,可以高效地在活体内感染多种组织的细胞,如脑、视网膜、肌肉、肝、心血管系统,使转基因在这些组织中静止不分裂的细胞内长期表达<sup>[16]</sup>。虽然AAV有载体容量小的缺点,只能容纳约4.5 kb的片段,但因为上述AAV载体的优越性,在基因治疗的载体中备受青睐,现在能在Clinicaltrials.gov临床试验登记网站上找到的正在招募或将要招募病人的AAV相关临床研究就有35项,总共注册过的AAV临床研究有89项。

### 1.1 AAV靶向肝脏的罕见病治疗

血友病(hemophilia)是AAV基因治疗的常见疾病模型,多数临床试验和研究使用靶向肝脏的AAV载体在病人体内表达凝血因子VIII(血友病A)或凝血因子IX(血友病B),从而改善病人的症状。治疗这种疾病所需的基因表达水平较

低,有时只需正常人水平5%~10%的替代蛋白就可大大改善临床症状,因此该疾病的临床成功可能性较高。由于凝血因子IX的基因较小,容易用AAV装载,血友病B的临床研究进展比血友病A快。2014年发表的针对重症血友病B的一个临床实验中,使用了AAV8血清型递送凝血因子IX,结果表明在中位数为3.2年的追踪期间,10个病人的凝血因子IX水平升高至正常水平的1%~6%,且在高剂量组的6个病人中,平均水平达到了5.1%,使出血事件和注射凝血蛋白的用量均减少了90%,且治疗中未出现长期的毒副反应<sup>[17]</sup>。美国BioMarin公司于2015年开启血友病A的临床1/2期试验(编号NCT02576795),2016年7月公布的结果显示出良好的效果,在7个病人中,有6人血浆中的凝血因子VIII达到正常人水平的50%以上,第7人也有10%以上(该水平被归为轻微病症),在2017年1月发布的数据中,病人的凝血因子水平与半年前的数据持平,表现出了鼓舞人心的长效性。公司计划进一步开展临床Ib期试验,加快临床试验进程。

除了血友病,其他使用AAV靶向肝脏治疗的罕见病还有先天性葡萄糖醛酸转移酶缺乏症(crigler najjar syndrome),威尔森氏症(Wilson disease),鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症(OTC deficiency),同合子家族性高胆固醇血症(homozygous familial hypercholesterolemia, HoFH)等。其中HoFH的AAV疗法已经在RegenXBio公司的推动下进入临床试验(编号NCT02651675),其他疾病还在临床前研究阶段<sup>[18]</sup>。

### 1.2 AAV靶向眼的罕见病治疗

由于眼部注射是一个小范围的局域性递送方法,理论上靶向眼的AAV疗法具有较高的特异性,且对其他器官的影响小,更为安全。雷伯氏先天性黑内障(Leber's congenital amaurosis)是一种罕见的遗传性眼病,患者从出生起视力就会持续恶化,直至失明。现有的AAV临床试验将装载正常RPE63基因的AAV2注射到患者眼部,取得了鼓舞人心的试验结果<sup>[19-20]</sup>。在这个临床试验中,10个患者接受了治疗,一些患者在治疗后可在微弱的光线下视物,其中两人可以在昏暗处跨越障碍。由于临床结果良好,更大规模的三期临床试验将由Spark Therapeutics公司主导进行。另外两个雷伯氏先天性黑内障AAV疗法的临床试验中,虽然患者有短期的视力提高,疗效却会随着时间推移而下降<sup>[21-22]</sup>。

脉络膜缺失症(choroideremia)是由CHM基因突变造成的,患者大多视力恶化,一般在中年时完全失明。2015年报道的一个临床试验中,研究者用AAV将正常的CHM基因递送到患者眼部,在3.5年后,6位患者中2人还保持疗效,视力明显改善,为AAV基因疗法的长效性提供了证据<sup>[23]</sup>。

美国基因治疗公司AGTC也在开发几种罕见眼病的AAV疗法,其中进入临床试验阶段的有X染色体连锁性青年性视网膜分离症(X-linked retinoschisis,临床编号NCT02416622),全色盲(achromatopsia,临床编号NCT02599922)。该公司对X染色体连锁性视网膜色素变性症(X-linked retinitis pigmentosa)的开发还处于临床前研究阶段。

### 1.3 AAV靶向肌肉的罕见病治疗

杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是最常见的,也是症状最严重的肌肉萎缩症,由Dystrophin蛋白的缺失引起。目前全球有2款药物获批,第一个药物于2016年获FDA批准,是Sarepta公司的Exondys 51,适用于可被第51号外显子跳跃(exon 51 skipping)治疗的DMD患者,这部分患者约占13%。Exondys 51是一种反义寡核苷酸,作用机理是在mRNA剪切过程中使第51号外显子被去除,恢复部分患者编码蛋白的读码框。临床结果表明该药物可诱导抗肌萎缩蛋白产生,但平均只增加0.3%,总范围是0~1.3%,临床获益不明确。2017年2月,美国FDA批准了第二个治疗杜氏肌营养不良症的新药Emlflaza。Emlflaza是皮质类固醇药物,临床数据显示治疗组的平均肌力与安慰剂组相比有显著增加。使用AAV基因疗法治疗DMD的一项临床试验一期已经完成(编号NCT00428935),在该研究中,由于Dystrophin基因较大,难以用装载量小的AAV载体递送,研究中使用了迷你版的基因。这次临床研究结果不甚理想,6个病人中只有2个有一些迷你dystrophin蛋白表达,没有长期的蛋白表达,且在4个病人中出现对转基因的免疫反应<sup>[24-25]</sup>。最近3个不同的研究组用AAV递送CRISPR/Cas9基因编辑系统修复Dystrophin基因,在动物实验取得了较好的结果<sup>[26-29]</sup>,未来这种疗法的临床试验有望缓解病人的症状,非常值得期待。

庞贝氏症(Pompe disease),又称为肝糖贮积症II型(glycogen storage disease type II, GSD II),由于基因突变使体内缺乏酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA),无法分解肝糖,导致肌肉衰弱,心脏扩大,患病的新生儿通常2岁前死亡。美国Audentes Therapeutics公司正在开发的疗法使用AAV靶向肌肉递送患者缺乏的GAA酶,还处于临床前研发的阶段。

脂蛋白脂酶缺乏(lipoprotein lipase deficiency, LPLD)的患者血液中无法承受任何脂肪颗粒,极易发生急性胰腺病,严重时甚至导致患者死亡。UniQure公司开发的上市产品Glybera是首个获批的基因治疗药物,该产品利用AAV将一个LPL蛋白的正常基因拷贝通过肌肉注射递送到患者体内,使用Glybera后可以在长达2年内显著减少急性胰腺炎发病率。但是由于该药物的价格昂贵,市场需求有限,且无法完全治愈病人,上市仅3年就退出市场,基因疗法的商业化还存在很多挑战。

### 1.4 AAV靶向神经系统的罕见病治疗

由于AAV安全性较高,且一些AAV血清型能够有效地感染神经元,它成为了治疗神经系统相关疾病的首选载体。最常见的用于中枢神经系统(CNS)的AAV血清型包括1, 2, 5, 8, 9, 和rh10<sup>[30]</sup>。

2001年开展的第一个在脑实质内注射(intracerebral injection)AAV的临床试验针对的罕见病是脑白质海绵状变性综合征(canavan disease),患者由于缺乏转化N-乙酰天冬氨酸(N-acetyl-aspartate, NAA)的酶,脑部会聚集NAA,随着疾病进展严重破坏脑部组织。在这个临床试验中,AAV疗法

的安全性得到证实,并且观察到NAA堆积减少,疾病进展变慢<sup>[31]</sup>。

溶酶体贮积症(lysosomal storage disorders, LSD)是一类遗传性的代谢疾病,包含50多种病种,多数由于溶酶体中的酶缺失引起代谢物的堆积。许多病种会造成中枢神经系统的炎症和神经退化,预后很差<sup>[30]</sup>。基因疗法可以使用AAV递送缺失的酶来治疗该类疾病。粘多糖贮积症(mucopolysaccharidosis, MPS)是溶酶体贮积症的其中一种,基因疗法公司RegenXBio正在开发治疗I型和II型MPS的基因疗法,用AAV装载缺失的酶的正确基因(IDS基因)治疗该疾病,预计2017年启动第一个临床试验。Sangamo Therapeutics公司已注册了I型和II型MPS的临床试验(NCT02702115, NCT03041324),该公司的策略是用AAV递送锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease, ZFN),使用ZFN基因编辑的功能将正确的IDS基因插入到白蛋白的基因位点,在肝细胞中表达该蛋白。

包括UniQure, Spark Therapeutics和Voyager Therapeutics在内的多个基因疗法公司正在研发治疗亨廷顿舞蹈症(Huntington's Disease)的AAV产品,他们的研发都处于临床前阶段。亨廷顿舞蹈症是由CAG重复序列异常扩展引起的,CAG重复次数越多,病情进展越快。UniQure使用的策略是用AAV5装载人工设计的小片段RNA(micro-RNA)使致病基因沉默,抑制突变蛋白的产生。

除了亨廷顿舞蹈症,Voyager Therapeutics公司还在研发的基因疗法适应症包括单基因造成的肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS, 又称渐冻人症),遗传性共济失调(friedreich's ataxia),但均未进入临床试验阶段。

## 2 整合型病毒在罕见病治疗中的应用

非整合型的病毒如AAV不会整合到宿主的基因组内,而是游离在基因组外,细胞进行多次分裂后,这类病毒载体会被持续稀释而失去作用,因此一般只能用于细胞不活跃更新的组织器官。由于血液系统更新快,针对造血干细胞,更适于使用整合型病毒来递送基因,如逆转录病毒和慢病毒。基因整合到造血干细胞基因组内后,会随着造血干细胞的增殖和分化传到后代细胞中,持续起到治疗作用。然而需要注意的是,基因随机整合可能会造成不可预测的副作用,如破坏人体的重要基因,甚至引发癌症等。

### 2.1 逆转录病毒在罕见病治疗中的应用

鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MLV)是最早应用于基因疗法的逆转录病毒递送系统。在针对X染色体相关重度混合免疫缺陷症(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID)的临床试验中,研究人员利用承载 $\gamma$ c基因的MLV在体外感染CD34阳性的造血干细胞,并将这些持续表达 $\gamma$ c基因的造血干细胞移植至患者体内。10个月后,在两位接受治疗的X-SCID患者体内仍能检测出表达 $\gamma$ c基因的T细胞和NK细胞,而T细胞、B细胞和NK细胞的数量和功能都接近于健康对照组<sup>[32]</sup>。

同样的治疗方案也被应用于针对腺苷脱氨酶缺乏造成的重度混合免疫缺陷症(adenosine deaminase deficiency causing severe combined immunodeficiency, ADA-SCID)的临床研究中。在2002年报道的临床试验中,研究人员利用承载ADA基因的MLV在体外感染CD34阳性的造血干细胞,并将这些细胞移植至患者体内。检测结果表明移植入患者体内的造血干细胞能够正常分化。接受治疗的两位ADA-SCID患者的淋巴细胞数量上升,免疫功能提高,并且体内代谢毒物的累积得到了缓解<sup>[33]</sup>,在2009年报道的临床研究中,该疗法的有效性被进一步证实:接受治疗的10位患者中,8人不再需要接受传统的ADA酶替换疗法,9人的T细胞数量和功能均显著提高,而5人对疫苗产生了抗原特异性的免疫应答<sup>[34]</sup>。

## 2.2 慢病毒在罕见病治疗中的应用

以逆转录病毒为基础的基因疗法在临床实践中的成功激发了研究人员探索及应用基因治疗的热情,但MLV的临床安全性也受到了极大的质疑。在2000年报道的针对X-SCID的基因治疗临床研究中,一位受试患者在骨髓移植了MLV感染的造血干细胞后罹患白血病<sup>[32]</sup>。尽管发病原因不明,但MLV等逆转录病毒是以随机插入的方式将外源基因整合至造血干细胞基因组,所以学术界普遍认为MLV介导的外源基因整合干扰了造血干细胞基因组的稳定性,从而诱发了造血干细胞的癌变。因此在基因治疗的临床实践中急需一种生产工艺更稳定、安全性更高的病毒载体,而具备这些优点的慢病毒(lentivirus)逐渐获得了基因治疗研究人员的青睐。

X染色体相关的肾上腺脑白质失养症(X-linked adrenoleukodystrophy, ALD)是由编码脂肪酸转运蛋白的ABCD1基因突变导致的。因缺少脂肪酸转运蛋白,长链脂肪酸会在ALD患者体内过度积累从而破坏髓鞘质,最终引起致死性神经元退行病变。在2010年报道的针对ALD的临床研究中,研究人员利用承载ABCD1基因的慢病毒在体外感染造血干细胞,并将这些造血干细胞移植回患者体内。在接受治疗后14、20个月,两位受试患者的髓鞘分别停止脱落,直到术后30个月都未出现新发的髓鞘损伤<sup>[35]</sup>。

B型地中海贫血症( $\beta$ -thalassemia)是由编码血红蛋白的基因突变导致的血液疾病。血红蛋白基因突变会引起血红蛋白表达量降低,使红细胞携氧能力下降,并诱发贫血等多种症状。在2010年报道的针对 $\beta$ -thalassemia的临床研究中,研究人员利用承载血红蛋白基因的慢病毒感染造血干细胞,并将其移植入患者体内。接受治疗3年后,受试患者体内血红蛋白水平已接近健康成年人的平均水平,并消除了对输血疗法的依赖性<sup>[36]</sup>。

欧德里症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)是由WAS基因突变导致的免疫缺陷疾病,患者的免疫功能下降,凝血功能出现障碍,并伴有湿疹等多种皮肤病变。在2013年报道的针对Wiskott-Aldrich syndrome的1/2期临床试验中,研究人员利用承载WAS基因的慢病毒感染造血干细胞,并将其移植

至3名受试患者体内。这些改造后的造血干细胞以稳定的形态在患者体内存留了相当长的时间,而且受试患者的T细胞功能和免疫系统功能均显著提高。更重要的是,在术后的18个月内并没有在患者体内观察到任何细胞异常扩增,因此该疗法的致癌风险处在可控的安全范围内<sup>[37]</sup>。

由于缺乏硫酸酯酶(arylsulfatase),硫酸脑苷酯沉积于异常性蛋白质营养不良(metachromatic leukodystrophy, MLD)患者的中枢神经系统,阻碍髓鞘的生成,导致脑白质损伤。2013年,研究人员构建出承载ARSA基因(编码Arylsulfatase A蛋白)的慢病毒,用于感染移植用的造血干细胞,并在针对异常性蛋白质营养不良症的1/2期临床研究中发现3位受试患者的骨髓和外周血均含有高水平、稳定的造血干细胞,而3位受试患者的运动能力和认知能力在术后两年内都发育正常<sup>[38]</sup>。

以上临床试验所针对的病症均由关键蛋白的表达缺陷导致的。骨髓移植经慢病毒感染的造血干细胞可以将编码这些蛋白的基因外源导入至人体,从而缓解或治愈这些病症。除了这一类别的基因治疗策略,慢病毒也被广泛应用于日趋火热的以T细胞为载体的免疫基因治疗中。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptors, CAR)是由T细胞共刺激域和T细胞表面识别域组成的融合蛋白,其中胞外的识别域能够通过识别其他细胞表面分子来靶向特定细胞,而胞内的共刺激域能够促进T细胞的增殖与存活。经承载嵌合抗原受体分子序列的慢病毒感染的T细胞,能够稳定表达嵌合抗原受体,在回输体内后通过特异性识别目标细胞的同时产生局部杀伤,从而达到治疗的目的<sup>[39]</sup>。

在体外利用慢病毒向T细胞导入CAR分子(CAR-T)的基因疗法已经初步应用在针对白血病的临床治疗中。靶向CD19阳性细胞的CAR-T在治疗慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和急性淋巴母细胞性白血病(ALL)等难治愈的复发性白血病时效果尤其显著。在2011年报道的临床试验中,共有3位CLL患者接受了CD19靶向的CAR-T治疗<sup>[40]</sup>。其中两人的病情获得完全缓解,第3位患者的病情也得到了部分缓解。尽管CLL细胞仍存留在该患者的骨髓中,但其外周血中的CLL细胞数量显著降低<sup>[40]</sup>。而在2013年报道的临床试验中,5位ALL患者中的4位在接受CAR-T治疗后病情也得到了完全缓解<sup>[41]</sup>。

## 3 结论与展望

本文讨论了用病毒作为基因载体治疗罕见病的临床进展,列举了以腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒为载体,靶向不同组织器官的基因疗法。虽然由于致癌风险、针对病毒的免疫反应、商业化困难,基因疗法遭受了一些挫折,但是部分临床试验展示出长期的治疗效果,给患者带来了新的希望。已有的上市基因治疗产品如Glybera也为同类疗法起到了范例作用,带来了宝贵的经验。

当然,现有的基因疗法也有其局限性,解决转基因的沉

默问题,病毒的免疫原性、安全性,提高病毒感染效率是改良现有技术的热点方向。近年来出现的革命性基因编辑系统CRISPR/Cas9有望能解决其中的某些问题,已发表的多项研究使用AAV递送CRISPR/Cas9,在目标细胞中永久性地切除DNA片段,或特异性地修复突变基因<sup>[26-29,42-44]</sup>,可以恢复原本突变基因的正常功能,或比引入外源转基因疗效更佳。但是这种定点切割的核酸酶也可能在基因组中切割脱靶位点,给临床应用带来风险。未来这种技术在罕见病治疗中的应用还需要长时间的研究和试验验证。

### 参考文献 (References)

- [1] Tiwari J. Navigating through orphan medicinal product regulations in EU and US—Similarities and differences[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 71(1): 63–67.
- [2] Phillips M. I. & Burns A. B. The emergence of gene therapy for rare diseases[J]. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2014, 2(11): 1197–1209.
- [3] Tambuyzer E. Rare diseases, orphan drugs and their regulation: Questions and misconceptions[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(12): 921–929.
- [4] Dye D E, Brameld K J, Maxwell S, et al. The impact of single gene and chromosomal disorders on hospital admissions of children and adolescents: A population-based study[J]. *Public Health Genomics*, 2011, 14(3): 153–161.
- [5] Mccandless S E, Brunger J W, Cassidy S B. The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2004, 74(1): 121–127.
- [6] Yoon P W, Olney R S, Khoury M J, et al. Contribution of birth defects and genetic diseases to pediatric hospitalizations. A population-based study[J]. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 1997, 151(11): 1096–1103.
- [7] Mckusick V A. Mendelian inheritance in man and its online version, OMIM[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2007, 80(4): 588–604.
- [8] Cooper D N, Chen J M, Ball E V, et al. Genes, mutations, and human inherited disease at the dawn of the age of personalized genomics[J]. *Human Mutation*, 2010, 31(6): 631–655.
- [9] Cideciyan A V. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy[J]. *Progress in Retinal & Eye Research*, 2010, 29(5): 398–427.
- [10] Bacchetta R, Aiuti A, Seger R, et al. Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2012, 24(5): 585–591.
- [11] Nathwani A C, Tuddenham E G, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B[J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 365(25): 2357–2365.
- [12] 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]. *Nature Medicine*, 2006, 12(3): 342–347.
- [13] Stroes E S, Nierman M C, Meulenberg J J, et al. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2008, 28(12): 2303–2304.
- [14] Witmer C, Young G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: Rationale and latest evidence[J]. *Therapeutic Advances in Hematology*, 2013, 4(1): 59–72.
- [15] Collins P W, Chalmers E, Hart D P, et al. Diagnosis and treatment of factor VIII and IX inhibitors in congenital haemophilia: (4th edition). UK Haemophilia Centre Doctors Organization[J]. *British Journal of Haematology*, 2013, 160(2): 153–170.
- [16] Büning H, Perabo L, Coutelle O, et al. Recent developments in adeno-associated virus vector technology[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2008, 10(7): 717–733.
- [17] Nathwani A C, Reiss U M, Tuddenham E G D, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B[J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(21): 1994–2004.
- [18] Kattenhorn L M, Tipper C H, Stoica L, et al. Adeno-associated virus gene therapy for liver disease[J]. *Human Gene Therapy*, 2016, 27(12): 947–961.
- [19] Bennett J, Ashtari M, Wellman J, et al. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(120): 120ra15.
- [20] Ashtari M, Zhang H, Cook P A, et al. Plasticity of the human visual system after retinal gene therapy in patients with Leber's congenital amaurosis[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(296): 296ra110.
- [21] Jacobson S G, Cideciyan A V, Roman A J, et al. Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness[J]. *New England Journal of Medicine*, 2015, 372(20): 1920–1926.
- [22] Bainbridge J W B, Mehat M S, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on leber's congenital amaurosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2015, 372(20): 1887–1997.
- [23] Edwards T L, Jolly J K, Grope M, et al. Visual Acuity after Retinal Gene Therapy for Choroideremia[J]. *New England Journal of Medicine*, 2016, 374(20): 1996–1998.
- [24] Rabinowitz J E. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector[J]. *Molecular Therapy the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2012, 20(2): 443–455.
- [25] Fairclough R J, Wood M J, Davies K E. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: Renewed optimism from genetic approaches[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(6): 373–378.
- [26] Long C, Amoasii L, Mireault A A, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 400–403.
- [27] Nelson C E, Hakim C H, Ousterout D G, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 403–407.
- [28] Tabeordbar M, Zhu K, Cheng J K W, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 407–411.
- [29] Long C Z, McAnally J R, Shelton J M, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA [J]. *Science*, 2014, 345(6201): 1184–1188.
- [30] Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, et al. Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS disease[J]. *Human Gene Therapy*, 2016, 27(7): 478–496.
- [31] Leone P, Shera D, Mcphee S W, et al. Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(165): 165ra163.
- [32] Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease[J]. *Science*, 2000, 288(5466): 669–672.

- [33] Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning[J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2410-2413.
- [34] Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(5): 447-458.
- [35] Cartier N, Aubourg P. Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy [J]. *Brain Pathology*, 2009, 20(4): 857-862.
- [36] Cavazzanacalvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia [J]. *Nature*, 2010, 467(7313): 318-322.
- [37] Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233151.
- [38] Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy[J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233158.
- [39] Lim W A, June C H. The principles of engineering immune cells to treat cancer[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 724-740.
- [40] Porter D L, Levine B L, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia[J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 365(8): 725-733.
- [41] Brentjens R J, Davila M L, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(177): 177ra3.
- [42] Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(1): 102-106.
- [43] Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191.
- [44] Platt R, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling[J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440-455.
- [45] 周勇, 周一平, 简丽梅, 等. 郴州市尘肺现患病人的生命质量及其心理状况调查与分析[J]. *医药卫生*, 2015(7): 165-166.  
Zhou Yong, Zhou Yiping, Jian Hongmei, et al. The Quality of life (QOL) and psychological status of pneumoconiosis patients in Chenzhou city[J]. *Medical Science*, 2015(7): 165-166.
- [46] More than 560 medicines in development for rare diseases [EB/OL]. [2017-06-20]. <http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/medicines-in-development-report-rare-diseases.pdf>.
- [47] Boycott K M, Vanstone M R, Bulman D E, et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(10): 681-691.

## Advances in gene therapy for rare diseases using viral vectors

LIN Yanni<sup>1</sup>, LI Qiushi<sup>1</sup>, WU Yao<sup>1</sup>, LIN Jun<sup>2</sup>

1. Cure Genetics Co. Ltd., Suzhou 215028, China
2. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

**Abstract** A large part of rare diseases are caused by genetic factors, making them difficult to be cured using the conventional small or large molecular drugs. Nevertheless, the gene therapy could potentially correct such absence or abnormality of body functions caused by certain genetic disorders, thus bringing better quality of life to those rare-disease patients. Currently, many clinical trials of gene therapies are carried out, and some gene therapies have already been available on the market. The viral vectors are commonly used for the gene delivery. In this paper, a variety of viral vectors for the clinical gene delivery are discussed, including the adeno-associated virus (AAV), the retrovirus, and the lentivirus, focusing on their researches, applications, and developments in clinical trials of rare diseases. Furthermore, the advantages and disadvantages of the viral vectors are evaluated, and the potential applications, as well as the research directions of gene therapies are suggested.

**Keywords** rare diseases; viral vectors; gene delivery; gene therapy

(责任编辑 刘志远)