综述

基因治疗产品及其载体的研究进展和挑战

王丹阳[1,2]，徐婷婷[2]，陈建军[2]，邱云良[2*]
（1. 上海工程技术大学化学化工学院，上海 201620；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：基因治疗是一种通过改变个体的基因表达来治疗疾病的方法，为肿瘤、罕见病及其他难治性疾病提供了全新的治疗策略。基因治疗通过基因编辑技术实现对个体致病基因的改造，同时也依赖基因递送载体改善其在体内的稳定性和靶向性。本综述简述了基因治疗的方式，结合目前的基因治疗产品，介绍了病毒、非病毒基因递送载体和基因编辑技术在基因治疗中的发展概况，并总结归纳了临床实践中基因治疗的安全性问题。

关键词：基因治疗；载体；基因传递；基因编辑；安全性
中图分类号：Q812　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)04-0481-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.002

Research Progress and Challenges of Gene Therapy Products and Vectors

WANG Danyang[1,2], XU Tingting[2], CHEN Jianjun[2], QIU Yunliang[2*]
(*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620; 2. Shanghai Yinuosi Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Gene therapy is a new approach to treating diseases by altering gene expression *in vivo*, provides a new treatment strategy for tumors, rare diseases, and other refractory diseases. Gene therapy modifies the pathogenic genes of an individual through gene editing technology and relies on gene delivery vectors to improve the stability and targeting *in vivo* of genes. This review briefly describes gene therapy methods, introduces the development of viral and non-viral vectors for gene delivery and gene editing technologies in gene therapy combined with the current gene therapy products, and summarizes the safety issues of gene therapy in clinical practice.

Key Words: gene therapy; vector; gene delivery; gene editing; safety

基因治疗是一种旨在改变个体基因表达或纠正异常基因以治疗疾病的治疗方法。早在1972年，FRIEDMANN等[1]就已提出使用“好的”DNA替代缺陷的DNA来治疗遗传性疾病，明确了基因治疗的概念。1990年，ROSENBERG等[2]将编码新霉素抗性的基因导入晚期黑色素瘤患者的肿瘤浸润淋巴细胞中进行基因修饰。1998年，美国FDA批准上市了第一个反义寡核苷酸福米韦生（fomivirsen），用于治疗艾滋病患者并发的巨细胞病毒性视网膜炎[3]。2021年，我国首个嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）治疗产品阿基仑赛注射液获批上市，该产品可对T淋巴细胞进行修饰，以改善其肿瘤细胞消除能力[4]。

基因治疗正处于快速发展阶段，为恶性肿瘤、罕见病及其他难治性疾病提供了全新的治疗策略。本研究总结了基于不同载体的基因治疗产品及其在疾病中的应用，并讨论了其在临床试验中容易出现的安全性问题；重点介绍了病毒载体、非病毒载体，

收稿日期：2023-02-10
基金项目：上海市科委研发平台项目(21DZ2291000)
作者简介：王丹阳(1993—)，女，硕士研究生，专业方向：基因治疗和生物药的免疫原性检测。
通信作者：邱云良(1978—)，男，研究员，从事药物毒理学、生物标志物及非临床依赖性研究。
E-mail：ylqiu@innostar.cn

以及基因编辑技术的临床应用及局限性。

1　基因治疗的方式

基因治疗通常分为体外基因治疗和体内基因治疗。体外基因治疗是将细胞从患者体内取出，通过培养和体外转导使其与治疗基因结合后重新导入患者体内。骨髓中的干细胞和 T 淋巴细胞常作为体外基因治疗的靶细胞。Strimvelis 是首个获批的体外基因疗法[5]，用于治疗缺乏腺苷脱氨酶导致的严重联合免疫缺陷。体内基因治疗是使用载体将遗传物质递送至患者体内的靶细胞或组织。肝细胞和视网膜感受器常作为体内基因治疗的靶细胞[5]。目前，体内基因治疗已成功用于神经肌肉疾病（脊髓性肌萎缩、进行性假肥大性肌营养不良、X 连锁肌管性肌病）、中枢神经系统疾病（阿尔茨海默病、帕金森病），以及眼部疾病（Leber 先天性黑矇、色盲、色素性视网膜炎）等疾病[6—7]。

2　基因传递的载体

用于递送遗传物质的载体可分为病毒载体和非病毒载体，其中 70%以上的基因治疗产品使用非致病性和复制缺陷的病毒载体[8]。目前常用的病毒载体包括腺相关病毒（adeno associated virus，AAV）、逆转录病毒（retrovirus，RV）、慢病毒（lentivirus，LV）、腺病毒（adenovirus，AdV）和单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）等[9]；非病毒载体则包括阳离子聚合物、裸 DNA 和脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles，LNP）等，安全性优于病毒载体，但基因转染效率相对较低[10]。

2.1　病毒载体

2.1.1　AAV

AAV 是一种细小、无致病性的无包膜病毒，是体内基因治疗中使用较广泛的病毒载体。其基因组大小约 4 700 bp，需在 AdV、HSV 等辅助病毒或调节蛋白存在下，感染宿主的分裂和非分裂期细胞。AAV 基因组主要由反向重复序列（inverted terminal repeats，ITR）和 2 个 ITR 之间的 2 个开放阅读框组成。通过保留 2 个 ITR，将病毒序列（如 rep 和 cap 基因）替换成其他病毒基因组可产生重组 AAV（rAAV）。rAAV 的转导类似于其亲本野生型（wt）AAV 感染细胞，但由于缺乏重复基因，整合频率较低[11]。

目前发现灵长类动物体内有 13 种不同血清型的 AAV，不同的 AAV 血清型具有不同的结合受体和组织特异性，可用于不同类型疾病患者的治疗[12]。AAV 载体于 1995 年首次用于治疗囊性纤维化疾病[13]。2012 年，首个 AAV 基因治疗产品 Glybera 上市，可用来治疗家族性脂蛋白脂酶缺乏症。2017 年上市的 Luxturna 和 Zolgensma，分别将目的基因转移到人视网膜和中枢神经系统中治疗双等位基因 *RPE65* 突变造成的遗传性视网膜营养不良[14] 和脊髓性肌萎缩[15]。目前，已有 6 款基因治疗产品上市，如表 1 所示。越来越多的基于 AAV 基因治疗产品已进入临床试验，用于治疗血友病[16] 和进行性假肥大性肌营养不良[17]。

虽然 AAV 载体在基因治疗方面取得了重大进展，但由于衣壳蛋白和所递送的核酸序列可能触发免疫系统而引起宿主免疫反应，目前仍有 50%的患者不能接受基于 AAV 载体的治疗[18—19]。文献[20] 报道可通过改造 AAV 衣壳来逃避免疫系统清除、增强靶向性，还可使用内肽酶（imlifidase，IdeS）清除抗 AAV 抗体[21]、与西罗莫司纳米颗粒联合用药来抑制体液免疫应答[22]，或者开发中和抗体生成量较少的新型 AAV 载体[23] 等。

2.1.2　RV 和 LV

RV 是一种 RNA 病毒，可将其单链 RNA 基因组反转录为双链 DNA，稳定地整合到分裂细胞中，实现长期表达，感染效率高；可感染胚胎干细胞、造血干细胞和神经干细胞等多种体细胞。RV 装载容量较大，可容纳 9 000 ～ 12 000 bp 的目的基因。1995 年，通过向体内回输 RV 纠正自体白细胞来治疗重症联合免疫缺陷病的临床试验[24]，被认为是基因治疗发展史上一个重要的里程碑。张野等[25] 通过改造 RV 载体来构建 SynNotc 门控系统，为 CAR-T 细胞疗法提供了一种新的选择。

RV 载体能优先靶向某些区域，顺式激活原癌基因，或抑制抑癌基因，以及反激活内源性基因与病毒蛋白相互作用，从而产生载体复制和插入诱

变[26]。然而，一些基于γ-RV载体的基因治疗产品在治疗X连锁重症联合免疫缺陷、Wiskott-Aldrich综合征及X连锁慢性肉芽肿病的早期试验中表现出诱发白血病和克隆细胞增殖的风险[27—28]。

LV也是一种RV，可感染有丝分裂后的细胞，包装容量约6 500 bp。研究[28]表明，LV的基因毒性小于γ-RV，易在转录单位中随机整合，而不是像γ-RV一样在转录起点的上游整合。使用LV载体可以在中枢神经系统（CNS）中建立长期、稳定的转基因表达，是治疗单基因疾病和需要基因递送的过继性免疫细胞治疗试验的主要载体[29]。ZHAO等[30]采用基于LV的基因治疗体系在2种乳腺癌细胞（MDA-MB-231细胞和MCF-7细胞）中降低了跨膜蛋白［密封蛋白（claudin 1）］的表达，抑制了乳腺癌细胞系中上皮细胞到间充质细胞转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT），进而抑制肿瘤细胞的生长，在乳腺癌的基因治疗中显示出巨大潜力。于榛等[31]也通过优化第三代LV载体的HS4区，诱导$CD34^+$细胞稳定表达β-球蛋白，为地中海贫血及其他β-球蛋白异常疾病提供了基因治疗的可行性依据。近年来，基于γ-RV和LV载体的已上市基因治疗产品如表2所示。

2.1.3 其他病毒载体

此外，AdV、HSV和麻疹病毒等其他病毒载体也被应用于基因治疗研究中[32]。AdV是一种线性双链DNA的无包膜病毒，基因组有稳定的遗传性，可作为游离体DNA保留在细胞核中，不会整合到宿主基因组中。通过对AdV载体的修饰可控制病毒复制，达到较大的转基因容量（可达到约37 000 bp）和较高的体内转导效率[33]。基于AdV的重组人p53腺病毒注射液（Gendicine）于2003年在中国获批上市，主要用于治疗头颈部鳞状细胞癌，是首个抗肿瘤基因治疗产品。

HSV是一种双链DNA的大型包膜病毒，对分裂和非分裂细胞均有较强的感染能力，载荷能力强（约30 000 bp），能装载多个或相对分子质量较大的转基因。HSV是非整合型载体，在递送目的基因时，能以封闭的环状分子结构保持游离型，避免插

表1 已上市的基于AVV载体的基因治疗产品（截至2023年3月）

Tab.1 Marketed Gene Therapy Products Based on AAV Vectors (up to March 2023)

产品名称	载体	获批年份	研发公司	适应证
Glybera	AVV	2012（已退市）	uniQure	家族性脂蛋白脂酶缺乏症
Luxturna	AVV	2017	Spark Therapeutics	遗传性视网膜疾病
Zolgensma	AVV	2017	Novartis Gene Therapies	脊髓性肌萎缩
Upstaza	AAV	2022	PTC Therapeutics	芳香族L-氨基酸脱羧酶缺乏症
Roctavian	AAV	2022	BioMarin	血友病A
Hemgenix	AAV	2022	uniQure	血友病B

表2 已上市的基于RV和LV载体的基因治疗产品（截至2023年3月）

Tab.2 Marketed Gene Therapy Products Based on RV and LV Vectors (up to March 2023)

产品名称	载体	获批年份	研发公司	适应证
Rexin-G	γ-RV	2007	Epeius	胰脏癌
Strimvelis	γ-RV	2016	GSK	腺苷脱氨酶重症联合免疫缺陷
Zalmoxis	γ-RV	2016	MolMed	血液系统恶性肿瘤
Yescarta	γ-RV	2017	Kite Pharma	复发性或难治性大B细胞淋巴瘤
Tecartus	γ-RV	2020	Kite Pharma	复发性或难治性套细胞淋巴瘤
奕凯达	γ-RV	2021	复星凯特	复发性或难治性大B细胞淋巴瘤
Kymriah	LV	2017	诺华	复发性B细胞急性淋巴细胞白血病
Zynteglo	LV	2019	Bluebird	β-地中海贫血
Breyanzi	LV	2021	BMS	复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤
Abecma	LV	2021	BMS、Celgene Corporation	多发性骨髓瘤
倍诺达	LV	2021	药明巨诺	复发性或难治性B细胞淋巴瘤
Carvykti	LV	2022	传奇生物	复发性或难治性多发性骨髓瘤

入诱变的风险[34]。

目前，病毒载体在临床研究中应用广泛，可用于β-地中海贫血、血友病、Leber先天性黑矇和Wiskott-Aldrich综合征等疾病的治疗[35—37]。基因治疗可将人体内的每个细胞作为基因操作的潜在目标，因此根据基因传递的细胞类型选择病毒载体，可治疗多种疾病，应用前景良好。

2.2 非病毒载体

非病毒载体也是目前发展较快的一种新型载体系统，由于具低细胞毒性和低免疫原性而备受关注。如今，已开发和应用的有阳离子聚合物、LNP、裸质粒DNA（pDNA）和功能型载体等[10]，并且已有多项基于非病毒载体的基因治疗产品处于不同的临床试验阶段，如表3所示。

阳离子聚合物能与DNA形成聚离子复合物，在保护核酸的同时增强复合基因的流体动力学特征。阳离子聚合物是水溶性的，因而可有效地将DNA浓缩成较小的复合物[38]，利于细胞内化和基因表达。聚乙烯亚胺（PEI）、聚L-赖氨酸（PLL）和壳聚糖等都是常用的阳离子聚合物载体。使用阳离子聚合物时，如何降低细胞毒性和提高转染率是应用中的难点。研究[39]显示，用氨基酸偶联低分子PEI，以及用惰性复合物葡聚糖、聚乙二醇（PEG）改造PEI等方法，可提高PEI转染效率并降低其细胞毒性[40—41]。WANG等[42]利用2种共聚物聚（ε-己内酯）-*co*-乙交酯（CG）、PEG-CG的自组装或共组装来降低与PEI相关的细胞毒性，同时增强PEI与DNA或siRNA复合物的血清稳定性。

LNP由脂质体发展而来，是一种具有均匀脂质核心的脂质囊泡，可用于核酸药物的递送。首个LNP核酸疗法Onpattro®于2018年获批用于治疗甲状腺素转运蛋白诱导的成人淀粉样变性疾病[43]。研究[44]显示，LNP递送的编码新型冠状病毒（SARS-COV-2）刺突蛋白的mRNA能对肺部感染进行有效保护，已应用于新型冠状病毒病疫苗中，如辉瑞的BNT162b2和Moderna的mRNA-1273。

此外，设计和开发具有新型功能的非病毒载体也至关重要。LIU等[45]合成的聚氨酯具有可生物降解的骨架和羟基，可在人胚肾细胞（HEK-293细胞）中提供较高的转染效率和较低的细胞毒性。由于非病毒载体在临床上的转化成功率较低，在医学临床实践应用中需要考虑到效率、生物相容性、长效作用、给药途径、实验条件设计以及商业化过程等问题。

3 基因编辑技术

在基因治疗中，除了关注基因的传递方式外，合适的基因编辑技术也至关重要。基因编辑可通过基因添加、基因敲除、基因纠正等操作，精确修复

表3 处于临床试验阶段的基于非病毒载体的基因疗法汇总

Tab.3 Summary of Non-viral Vector-based Gene Therapies in Clinical Trials

公司	载体	适应证	临床阶段	临床试验编号
Precigen Inc.	pDNA	输卵管癌/卵巢癌	Ⅰ/Ⅰb期	NCT03907527
Inovio Pharmaceuticals	pDNA	禽流感	Ⅰ期完成	NCT01142362
美国国家过敏和传染病研究所(NIAID)	pDNA	艾滋病	Ⅰ/Ⅰb完成	NCT00955006
美国国家癌症研究所(NCI)	pDNA	人乳头瘤	Ⅱ期	NCT03439085
Mirna Therapeutics Inc.	LNP	实体瘤	Ⅰ期完成	NCT01829971
Lupin Ltd.	LNP	难治性实体瘤	Ⅰ期完成	NCT05187858
Novartis	LNP	肾小球病	Ⅱ期	NCT03955445
Bristol-Myers Squibb	LNP	肝病	Ⅱ期	NCT04267393
BioNTech SE	LNP	头颈癌	Ⅱ期	NCT04534205
Silence Therapeutics GmbH	阳离子脂质复合物	胰腺癌	Ⅰ/Ⅱ期完成	NCT01808638
BioNTech SE	阳离子脂质复合物	前列腺癌	Ⅰ/Ⅱ期	NCT04382898
BioNTech SE	LNP	新型冠状病毒病	Ⅱ/Ⅲ期	NCT04816643
MD Anderson Cancer Center	外泌体	胰腺癌	Ⅰ期	NCT03608631
CureVac AG	树突状细胞	黑色素瘤	Ⅱ期	NCT03291002
Sirnaomics	组氨酸-赖氨酸共聚物(PNP)	瘢痕疙瘩	Ⅱ期	NCT04844840

突变基因，使基因治疗更加精准和高效[46]。现有的编辑技术主要有锌指核酸酶（zinc-finger nuclease，ZFN）、转录激活因子样效应核酸酶（transcription activator-like effector nuclease，TALEN）、成簇规则间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）及其相关核酸酶（Cas9）（即 CRISPR/Cas9）、单碱基编辑和先导编辑技术[47—48]。

2010 年，基因疗法作为一种预防 T 细胞感染 HIV 的方法首次进入临床试验[49]。2020 年，LEDFORD[50] 报道了首个进入临床试验（Ⅰ/Ⅱ期）阶段的基于 CRISPR 的体内基因疗法产品 AGN-151587，可用于治疗 Leber 先天性黑矇 10 型。NTLA-2001 也是一种基于 CRISPR/Cas9 的体内基因疗法产品。Ⅰ期临床试验数据显示，在体内输注一次 NTLA-2001 后，致病蛋白会大幅减少[51]。随后，国内首个 CRISPR/Cas9 基因疗法产品 ET-01 的临床试验在 2020 年获得批准，为 β- 地中海贫血患者带来了新的治疗选择。与此同时，基因编辑修饰的 T 细胞和造血干细胞也在临床试验中进行了安全性和可行性评价[52—53]，为正在进行和即将进行的基因组编辑临床试验奠定了基础。目前，基因组编辑的临床前研究主要集中在治疗病毒感染、心血管疾病、代谢紊乱、免疫系统缺陷、血友病、肌营养不良、眼部疾病，以及基于 T 细胞的抗肿瘤免疫疗法的开发等方面[52—56]。

目前，基因编辑技术的安全性和有效性仍具有争议与挑战。CRISPR/Cas9 等基因编辑技术产生的脱靶效应是影响该技术发展的一个重要因素[57]。ZUO 等[58] 采用基于双细胞胚胎注射的全基因组脱靶分析法检测到单碱基编辑系统有严重的脱靶突变。为了减少脱靶效应，可设计合理的指导 RNA（gRNA）以及使用单点突变的 Cas9 变体（R691A）[59]。此外，JIN 等[60] 也开发了高精确和高特异性的胞嘧啶碱基编辑器来减少脱靶效应，为基因治疗提供了合适的工具。

此外，在 CRISPR-Cas9 基因编辑技术中，非同源末端连接（non-homologous end joining，NHEJ）是一种比同源定向修复（homologous directed repair，HDR）更快、更有效的修复 DNA 双链断裂的途径。SHAHRYARI 等[61] 通过瞬时下调 NHEJ 通路并提高 HDR 来改变基因的靶向效率，并通过操纵 Cas9 的表达载体来提高向诱导多能干细胞中插入基因的编辑效率。ZHANG 等[62] 也通过使用双切的 HDR 供体来提高 HDR 的效率。但在实现高效编辑效率的同时也需注意安全性问题，即脱靶突变以及 CRISPR 蛋白过度表达产生的毒性[63]。

4 总结与展望

基因治疗发展迅猛，使用不同的载体提高输送核酸的效率以及基因编辑技术为保障人类健康提供了新方法。本研究对基因治疗方式、基因传递载体、基因编辑技术及基因治疗遇到的障碍，尤其是安全性问题做出了相关阐述，为基因疗法的安全性、有效性和长远发展提供了参考。虽然基因治疗已取得了长足进步，为肿瘤、代谢紊乱、神经元和传染性等疾病的治疗提供了新的手段，但仍面临诸多挑战。

病毒载体可能产生免疫反应、脱靶效应、炎症和插入突变等问题。免疫反应会降低抗病毒治疗的效率[64]。炎症被认为是使用高剂量 AdV 载体导致死亡案例的主要原因[65]。插入诱变则是基因治疗领域必须克服的主要障碍。对于整合型载体，如 RV，存在将基因插入肿瘤抑制基因或激活肿瘤基因的风险。因此，病毒载体的选择以及开发新型载体来递送治疗基因到特定的靶细胞至关重要。

由于开发时间长、潜在接受者数量有限，基因治疗的成本高，因此价格通常较昂贵。例如，Glybera 是 2012 年被 EMA 批准用于家族性脂蛋白脂酶缺乏症的基因治疗产品，定价为 110 万欧元[66]，然而 5 年内接受 Glybera 治疗的患者仅有 1 例，高昂的治疗费用导致 uniQure 公司于 2017 年宣布停止销售此产品[67]。在 Glybera 之后，基因疗法几乎均以天价面世。例如，40 万～50 万美元的 CAR-T 疗法、200 万美元的脊髓性肌萎缩基因治疗，以及 85 万美元的 Luxturna。因此，在发展基因疗法时优化方法、缩短开发时间，以及对治疗产品进行合理定价，探索适用于一次性基因疗法的新报销模式，才能使更

多患者受益，提高基因治疗的可持续性。

基因治疗引起的变化在体内长期存在，可能增加不可预测的风险。《基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则（试行）》[68]提出，需关注不同类型基因治疗产品的潜在风险，细化相应的长期随访要求，以评估患者的长期安全性风险。

随着科学技术的发展，若能解决基因治疗中插入突变、免疫反应、传递效率等问题，发现更多靶向性强、毒性小的新型载体，基因治疗将迎来新一轮发展契机、获得更加广阔的应用空间。

参考文献：

[1] FRIEDMANN T, ROBLIN R. Gene Therapy for human genetic disease? Proposals for genetic manipulation in humans raise difficult scientific and ethical problems [J]. *Science*, 1972, **175**(4025): 949-955.

[2] ROSENBERG S A, AEBERSOLD P, CORNETTA K, *et al*. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction [J]. *N Engl J Med*, 1990, **323**(9): 570-578.

[3] Vitravene Study Group. A randomized controlled clinical trial of intravitreous fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS [J]. *Am J Ophthalmol*, 2002, **133**(4): 467-474.

[4] ELLIS G I, SHEPPARD N C, RILEY J L. Genetic engineering of T cells for immunotherapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2021, **22**(7): 427-447.

[5] NALDINI L. Gene therapy returns to centre stage [J]. *Nature*, 2015, **526**(7573): 351-360.

[6] MENDELL J R, AL-ZAIDY S A, RODINO-KLAPAC L R, *et al*. Current clinical applications of *in vivo* gene therapy with AAVs [J]. *Mol Ther*, 2021, **29**(2): 464-488.

[7] HAMPSON G, TOWSE A, PEARSON S D, *et al*. Gene therapy: evidence, value and affordability in the US health care system [J]. *J Comp Eff Res*, 2018, **7**(1): 15-28.

[8] YIN H, KANASTY R L, ELTOUKHY A A, *et al*. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, **15**(8): 541-555.

[9] ALNASSER S M. Review on mechanistic strategy of gene therapy in the treatment of disease [J]. *Gene*, 2021, **769**: 145246.

[10] YAN Y, LIU X Y, LU A, *et al*. Non-viral vectors for RNA delivery [J]. *J Control Release*, 2022, **342**: 241-279.

[11] COLELLA P, RONZITTI G, MINGOZZI F. Emerging issues in AAV-mediated *in vivo* gene therapy [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, **8**: 87-104.

[12] LI C W, SAMULSKI R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, **21**(4): 255-272.

[13] FLOTTE T, CARTER B, CONRAD C, *et al*. A phase Ⅰ study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult cf patients with mild lung disease. Johns Hopkins Children's Center, Baltimore, Maryland [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**(9): 1145-1159.

[14] MAGUIRE A M, BENNETT J, ALEMAN E M, *et al*. Clinical perspective: treating RPE65-associated retinal dystrophy [J]. *Mol Ther*, 2021, **29**(2): 442-463.

[15] CROSSRATES M. AveXis receives FDA approval for Zolgensma®, the first and only gene therapy for pediatric patients with spinal muscular atrophy (SMA) [EB/OL]. [2022-08-12]. https://www. novartis. com/news/media-releases/avexis-receives-fda-approval-zolgensma-first-and-only-gene-therapy-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-sma.

[16] PASI K J, RANGARAJAN S, MITCHELL N, *et al*. Multiyear follow-up of AAV5-hFⅧ-SQ gene therapy for hemophilia A [J]. *N Engl J Med*, 2020, **382**(1): 29-40.

[17] MENDELL J R, SAHENK Z, LEHMAN K, *et al*. Assessment of systemic delivery of rAAVrh74. MHCK7. micro-dystrophin in children with duchenne muscular dystrophy: a nonrandomized controlled trial [J]. *JAMA Neurol*, 2020, **77**(9): 1122-1131.

[18] RONZITTI G, GROSS D A, MINGOZZI F. Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors [J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 670.

[19] MINGOZZI F, HIGH K A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy [J]. *Blood*, 2013, **122**(1): 23-36.

[20] TSE L V, KLINC K A , MADIGAN V J, *et al*. Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(24): E4812-E4821.

[21] LEBORGNE C, BARBON E, ALEXANDER J M, *et al*. IgG-cleaving endopeptidase enables *in vivo* gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies [J]. *Nat Med*, 2020, **26**(7): 1096-1101.

[22] MELIANI A, BOISGERAULT F, HARDET R, *et al*. Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 4098.

[23] 宁秦洁, 陈 颖, 闫梦迪, 等. 人体肝脏靶向性新型AAV血清型载体的研发[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2020, **46**(3): 404-410.

[24] BLAESE R M, CULVER K W, MILLER A D, *et al*. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years [J]. *Science*, 1995, **270**(5235): 475-480.

[25] 张 野, 陈 静, 王佩佩, 等. 逆转录病毒载体介导的SynNotch门控系统构建[J]. 山东医药, 2022, **62**(15): 6-11.

[26] FDA. Testing of retroviral vector-based human gene therapy products for replication competent retrovirus during product manufacture and patient follow-up [EB/OL]. [2022-08-12]. https://www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/testing-retroviral-vector-based-human-gene-therapy-products-replication-competent-retrovirus-during.

[27] BRAUN C J, WITZEL M, PARUZYNSKI A, *et al*. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome—long-term reconstitution and clinical benefits, but increased risk for leukemogenesis [J]. *Rare diseases*, 2014, **2**(1): e947749.

[28] BUSHMAN F D. Retroviral insertional mutagenesis in humans: evidence for four genetic mechanisms promoting expansion of cell clones [J]. *Mol Ther*, 2020, **28**(2): 352-356.

[29] MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. *Leukemia*, 2018, **32**(7): 1529-1541.

[30] ZHAO X Q, ZOU Y N, GU Q Q, *et al*. Lentiviral vector mediated claudin1 silencing inhibits epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells [J]. *Viruses*, 2015, **7**(6): 2965-2979.

[31] 于 榛, 仝 帅, 白 玥, 等. 优化第三代慢病毒载体稳定表达β-珠蛋白治疗β-地中海贫血的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2022, **30**(3): 844-850.

[32] KOTTERMAN M A, CHALBERG T W, SCHAFFER D V. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2015, **17**: 63-89.

[33] RICOBARAZA A, GONZALEZ-APARICIO M, MORA-JIMENEZ L, *et al*. High-capacity adenoviral vectors: expanding the scope of gene therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(10): 3643.

[34] ARTUSI S, MIYAGAWA Y, GOINS W F, *et al*. Herpes simplex virus vectors for gene transfer to the central nervous system [J]. *Diseases*, 2018, **6**(3): 74.

[35] ALHAKAMY N A, CURIEL D T, BERKLAND C J. The era of gene therapy: from preclinical development to clinical application [J]. *Drug Discov Today*, 2021, **26**(7): 1602-1619.

[36] MAGNANI A, SEMERARO M, ADAM F, *et al*. Long-term safety and efficacy of lentiviral hematopoietic stem/progenitor cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *Nat Med*, 2022, **28**(1): 71-80.

[37] CAPPELL K M, SHERRY R M, YANG J C, *et al*. Long-term follow-up of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2020, **38**(32): 3805-3815.

[38] RUPONEN M, YLÄ-HERTTUALA S, URTTI A. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1415**(2): 331-341.

[39] WU X R, ZHANG J, ZHANG J H, *et al*. Amino acid-linked low molecular weight polyethylenimine for improved gene delivery and biocompatibility [J]. *Molecules*, 2020, **25**(4): 975.

[40] JIANG D H, SALEM A K. Optimized dextran-polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments [J]. *Int J Pharm*, 2012, **427**(1): 71-79.

[41] SAQAFI B, RAHBARIZADEH F. Polyethyleneimine-polyethylene glycol copolymer targeted by anti-HER2 nanobody for specific delivery of transcriptionally targeted tBid containing construct [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, **47**(1): 501-511.

[42] WANG W W, BALK M, DENG Z J, *et al*. Engineering biodegradable micelles of polyethylenimine-based amphiphilic block copolymers for efficient DNA and siRNA delivery [J]. *J Control Release*, 2016, **242**: 71-79.

[43] SUHR O B, COELHO T, BUADES J, *et al*. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase Ⅱ multi-dose study [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2015, **10**(1): 109.

[44] MARTÍNEZ-BAZ I, TROBAJO-SANMARTÍN C, MIQUELEIZ A, *et al*. Product-specific COVID-19 vaccine effectiveness against secondary infection in close contacts, Navarre, Spain, April to August 2021 [J]. *Euro Surveill*, 2021, **26**(39): 2100894.

[45] LIU Q, SU R C, YI W J, *et al*. Biodegradable poly(amino ester) with aromatic backbone as efficient nonviral gene delivery vectors [J]. *Molecules*, 2017, **22**(4): 566.

[46] MAEDER M L, GERSBACH C A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy [J]. *Mol Ther*, 2016, **24**(3): 430-446.

[47] COX D B T, PLATT R J, ZHANG F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges [J]. *Nat Med*, 2015, **21**(2): 121-131.

[48] 邱志超, 李卓霏, 石　宏. 基因编辑技术及其在疾病治疗中的研究进展和应用前景[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2021, **46**(5): 100-109.

[49] TEBAS P, STEIN D, TANG W W, *et al*. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV [J]. *N Engl J Med*, 2014, **370**(10): 901-910.

[50] LEDFORD H. CRISPR gene therapy shows promise against blood diseases [J]. *Nature*, 2020, **588**(7838): 383.

[51] GILLMORE J D, GANE E, TAUBEL J, *et al*. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis [J]. *N Engl J Med*, 2021, **385**(6): 493-502.

[52] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, *et al*. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer [J]. *Science*, 2020, **367**(6481): eaba7365.

[53] XU L, WANG J, LIU Y F, *et al*. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2019, **381**(13): 1240-1247.

[54] LI H Y, YANG Y, HONG W Q, *et al*. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**(1): 1.

[55] 马丹宝, 钟玮晔, 于　晨. CRISPR基因编辑技术及其在眼科疾病中的应用进展[J]. 眼科学报, 2021, **36**(7): 537-542.

[56] BULAKLAK K, GERSBACH C A. The once and future gene therapy [J]. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5820.

[57] SCHAEFER K A, WU W H, COLGAN D F, *et al*. Unexpected mutationsafter CRISPR Cas9 editing *in vivo* [J]. *Nat Methods*, 2017, **14**(6): 547-548.

[58] ZUO E W, SUN Y D, WEI W, *et al*. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos [J]. *Science*, 2019, **364**(6437): 289-292.

[59] VAKULSKAS C A, DEVER D P, RETTIG G R, *et al*. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2018, **24**(8): 1216-1224.

[60] JIN S, FEI H Y, ZHU Z X, *et al*. Rationally designed APOBEC3B cytosine base editors with improved specificity [J]. *Mol Cell*, 2020, **79**(5): 728-740.

[61] SHAHRYARI A, MOYA N, SIEHLER J, *et al*. Increasing gene editing efficiency for CRISPR-Cas9 by small RNAs in pluripotent stem cells [J]. *CRISPR J*, 2021, **4**(4): 491-501.

[62] ZHANG J P, LI X L, LI G H, *et al*. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage [J]. *Genome Biol*, 2017, **18**(1): 35.

[63] IHRY R J, WORRINGER K A, SALICK M R, *et al*. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells [J]. *Nat Med*, 2018, **24**(7): 939-946.

[64] RAPTI K, GRIMM D. Adeno-associated viruses (AAV) and host immunity—a race between the hare and the hedgehog [J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 753467.

[65] STOLBERG S G. The biotech death of Jesse Gelsinger [J]. *NY Times Mag*, 1999, **28**: 136-140.

[66] YLÄ-HERTTUALA S. Glybera's second act: the curtain rises on the high cost of therapy [J]. *Mol Ther*, 2015, **23**(2): 217-218.

[67] SENIOR M. After Glybera's withdrawal, what's next for gene therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(6): 491-493.

[68] 国家药品监督管理局药品评审中心. 国家药监局药审中心关于发布《基因治疗产品长期随访临床研究技术指导原则(试行)》的通告(2021年第50号)[EB/OL]. [2022-08-12]. http://cjpi.org.cn/zryyxxw/cfdazsjg/ypspzx/webinfo/2021/12/1640589635428234.htm.