

基因治疗在眼底血管性疾病中的应用和展望

张朝阳^{1*}, 张敬香^{2*}, 张敬法¹

引用: 张朝阳, 张敬香, 张敬法. 基因治疗在眼底血管性疾病中的应用和展望. 国际眼科杂志 2023;23(3):400-406

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82171062)

作者单位:¹(200080) 中国上海市第一人民医院眼科 国家眼部疾病临床医学研究中心 上海市眼底病重点实验室 上海眼视觉与光医学工程技术研究中心 上海市眼科疾病精准诊疗工程技术研究中心;²(266400) 中国山东省青岛市黄岛区人民医院护理部

*: 张朝阳和张敬香对本文贡献一致。

作者简介: 张朝阳, 博士, 助理研究员, 研究方向: 眼底病; 张敬香, 本科, 副主任护师, 研究方向: 基因治疗及眼表疾病诊治。

通讯作者: 张敬法, 博士, 研究员, 副主任医师, 研究方向: 眼底病. 13917311571@139.com

收稿日期: 2022-04-27 修回日期: 2023-02-03

摘要

眼底血管性疾病, 如新生血管性年龄相关性黄斑变性 (nAMD) 和糖尿病视网膜病变 (DR) 是全球范围内患者视力损害的主要病因。随着全球人口老龄化进程和糖尿病发病率的不断提高, 这两种眼底疾病的患病率也将持续攀升。当前对眼底血管性疾病的治疗以眼内注射抗血管内皮生长因子 (anti-VEGF) 药物为主, 但存在频繁注射、费用高昂、患者依从性差等问题, 因此需要探寻更加持久且有效的治疗策略。基因治疗在遗传性视网膜疾病 (IRDs) 中的成功应用为眼底血管性疾病的治疗提供了新思路。随着多项临床试验的开展, 眼底血管性疾病的基因治疗有望实现临床转化, 但仍存在一些问题, 包括最佳治疗靶点选择、给药途径和潜在的安全性等。本文重点阐述基因补充和基因编辑技术介导的 anti-VEGF 治疗在 nAMD 和 DR 中的应用和展望。

关键词: 基因治疗; 眼底血管性疾病; 新生血管性年龄相关性黄斑变性; 糖尿病视网膜病变; 糖尿病黄斑水肿; 抗血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.10

Application and prospect of gene therapy for fundus vascular diseases

Chao-Yang Zhang^{1*}, Jing-Xiang Zhang^{2*}, Jing-Fa Zhang¹

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.82171062)

¹Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital; National Clinical Research Center for Eye Diseases; Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Diseases; Shanghai Engineering Center for Visual Science and Photomedicine; Shanghai Engineering Center for Precise Diagnosis and Treatment of Eye Diseases, Shanghai 200080, China; ²Department of Nursing, the People's Hospital of Huangdao District, Qingdao 266400, Shandong Province, China

Co-first authors: Chao-Yang Zhang and Jing-Xiang Zhang

Correspondence to: Jing-Fa Zhang. Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital; National Clinical Research Center for Eye Diseases; Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Diseases; Shanghai Engineering Center for Visual Science and Photomedicine; Shanghai Engineering Center for Precise Diagnosis and Treatment of Eye Diseases, Shanghai 200080, China. 13917311571@139.com

Received: 2022-04-27 Accepted: 2023-02-03

Abstract

• Fundus vascular diseases, including neovascular age-related macular degeneration (nAMD) and diabetic retinopathy (DR), are the leading causes of visual impairment worldwide. With the accelerated aging and increased incidence of diabetes, the prevalence of these two fundus diseases will continue to rise. Currently, intraocular injection of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) remains the first-line treatment for fundus vascular diseases, but disadvantages exist, such as frequent intraocular injections, high cost and poor compliance, thus more durable and effective therapeutic strategies need to be explored. The successful application of gene therapy in inherited retinal diseases (IRDs) provides a new idea for the treatment of fundus vascular diseases. With the ongoing of several clinical trials, gene therapy for fundus vascular diseases is expected to be employed in the clinical setting. But there still remain some concerns, including the optimal therapeutic targets selection, administration route and safety issues. This review focuses on the application and prospect of gene augmentation and gene editing-mediated anti-VEGF therapy for the treatment of nAMD and DR.

• KEYWORDS: gene therapy; fundus vascular diseases; neovascular age-related macular degeneration; diabetic retinopathy; diabetic macular edema; anti-vascular endothelial growth factor

Citation: Zhang CY, Zhang JX, Zhang JF. Application and prospect of gene therapy for fundus vascular diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(3):400-406

0 引言

随着遗传学基础研究取得重大进展,基因治疗已经成为很多难以治愈疾病的潜在治疗选择。基因治疗在眼部的应用取得了巨大成功,具体原因如下:(1)眼睛具有解剖尺寸小、多细分隔间、便于手术进入等特点,因此每个基因载体经眼内注射后可以形成局部高浓度,即大约每 $100\mu\text{L}$ 达到 1.0×10^{10} 至 2.0×10^{10} 拷贝数,大大减少了治疗所需的载体总量。(2)由于血-视网膜屏障和独特的眼内微环境,使眼睛成为相对封闭和相对免疫豁免的区域,这些特性可以限制载体的全身扩散、并减少免疫反应。(3)眼睛是成对存在的,因此基因治疗可以在动物模型和临床试验受试者中进行自身比较。鉴于以上独特优势,眼睛一直处于基因治疗转化研究的前沿领地^[1]。2017-12,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了首个用于眼遗传性疾病的基因治疗产品Luxturna,用于治疗2型莱伯氏先天性黑矇(Leber's congenital amaurosis 2, LCA2)^[2]。Luxturna基于腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体,采用基因补充策略将正常的人源RPE65基因导入患者视网膜。Luxturna的问世为遗传性和获得性视网膜疾病基因治疗的临床转化研究奠定了基础。目前,数十项视网膜基因治疗临床试验正在开展,所涉及的疾病包括全色盲、1型莱伯氏先天性黑矇、Stargardt病、X连锁视网膜色素变性、Usher综合征、无脉络膜症、视网膜色素变性、X染色体连锁视网膜劈裂、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)等^[3-4]。

基因治疗在单基因遗传性视网膜疾病(inherited retinal diseases, IRDs)中取得了巨大成功,但该类疾病比例较低(约为1/3000),且具有基因和表型多样性(>300个致病基因),因此对于罕见突变的特异性治疗的可行性和成本效益都提出了巨大挑战^[5]。相比之下,获得性视网膜疾病,如以AMD和DR为代表的眼底血管性疾病的受众群体十分庞大,且该类疾病具有相似的发病机制和干预靶点,因此在基因治疗的应用方面具有巨大潜力。根据世界卫生组织的数据,AMD和DR分列全球性致盲眼病的第3和第5位。AMD是全球性老年人视力损害的主要原因,目前约有超过1.9亿患者,预计到2040年上升至2.88亿^[6];DR是全球性工作人群的主要致盲眼病之一,根据国际糖尿病联盟第10版的数据(IDF Diabetes Atlas),2021年全球约5.37亿成年人患有糖尿病,预计到2030年将上升至6.43亿,其中1/3的糖尿病患者会发生不同程度的视网膜病变^[7]。此外,眼底血管性疾病还包括视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusions, RVOs)、病理性近视继发脉络膜新生血管等。这些疾病具有相似的发病机制,其中一个关键靶点是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[8],且anti-VEGF治疗已成为该类疾病的金标准和一线疗法,因此基于VEGF及其相关信号通路的基因治疗研究和临床试验是当前该领域的研究热点^[9-10]。本综述首先介绍基因治疗的基本概念和要素,随后重点讨论基因补充和基因编辑在nAMD和DR中的探索、应用、挑战以及未来的发展方向。

1 基因治疗概述

在医学领域,基因治疗特指将具体的、有针对性的核酸聚合物(特别是外源正常基因)导入患者的靶细胞,并在患者体内产生相应基因的直接产物,以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病,以达到治疗目的。按这样的理解,曾被视为基因治疗先驱的减毒活疫苗治疗并不属于现代基因治疗的范畴,因为这些疫苗并不改变接种者的基因。另一方面,进行输血、骨髓移植和器官移植等治疗时,虽然把异体DNA带给了受体患者,但由于其导入的不是特定的基因,也不是依靠特定的基因发挥治疗作用,因此也不属于基因治疗。但利用新技术在DNA水平进行修饰(如基因编辑技术)以治疗疾病的策略应该属于基因治疗的范畴。

1.1 基因治疗的策略 基因治疗的策略主要包括基因补充和基因编辑(图1)。基因补充主要是将外源性遗传物质导入遗传缺陷的细胞;而基因编辑主要是对内源性基因组进行精确修饰,以纠正突变的等位基因。基因补充对常染色体隐性遗传的突变很有效;然而,功能获得性(gain-of-function)显性突变则需要通过敲除或抑制突变等位基因来纠正疾病表型^[1]。

1.2 眼底基因治疗给药途径 科学的给药途径是保证基因特异且有效导入眼底的重要决定因素。最常见的给药途径是玻璃体腔注射和视网膜下腔注射,另有一些研究采用脉络膜上腔给药。如图2所示,玻璃体腔注射可在玻璃体中释放治疗药物,有限转染内层视网膜;而视网膜下腔注射是将载体注射至视网膜下腔,即视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和光感受器细胞(photoreceptor, PRs)之间,主要靶向RPE和PRs。尽管玻璃体腔注射更容易操作且载体分布更广泛,但对于RPE和PRs的转染弱于视网膜下腔注射,其原因可能是由于玻璃体和视网膜内存在物理屏障而使载体无法有效到达靶细胞^[11]。然而,视网膜下腔注射会导致视网膜短暂脱离,使得原本脆弱的病变视网膜雪上加霜。脉络膜上腔给药为nAMD和其他脉络膜疾病的药物递送提供了额外选择。

1.3 基因治疗的载体

1.3.1 病毒载体 基因治疗最常用的载体是病毒载体,包括腺病毒(adenovirus, Ad)、慢病毒(lentivirus, LV)和腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)三种。每一种病毒载体都具有各自的优缺点,见表1。

1.3.2 非病毒载体 非病毒载体常用电穿孔法、显微注射法和脂质体等导入目的基因。与病毒载体相比,非病毒基因载体在降低免疫反应风险和转入更大基因的潜力方面具有优势。最近,一些研究将非病毒载体用于视网膜基因导入,并发现至少在短期内对某些IRDs动物模型的治疗是有效的^[12]。然而,考虑到非病毒载体治疗持续时间较短及转染效率偏低(特别是在大型动物模型中),因此限制了其在视网膜基因治疗中的广泛应用。在非病毒基因治疗领域,反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, AON)可以用来靶向突变等位基因,导致异常剪接。最近的一项临床试验通过反复玻璃体内注射AONs,以此靶向LCA10的致病基因(CEP290 IVS26等位基因),结果表明该治

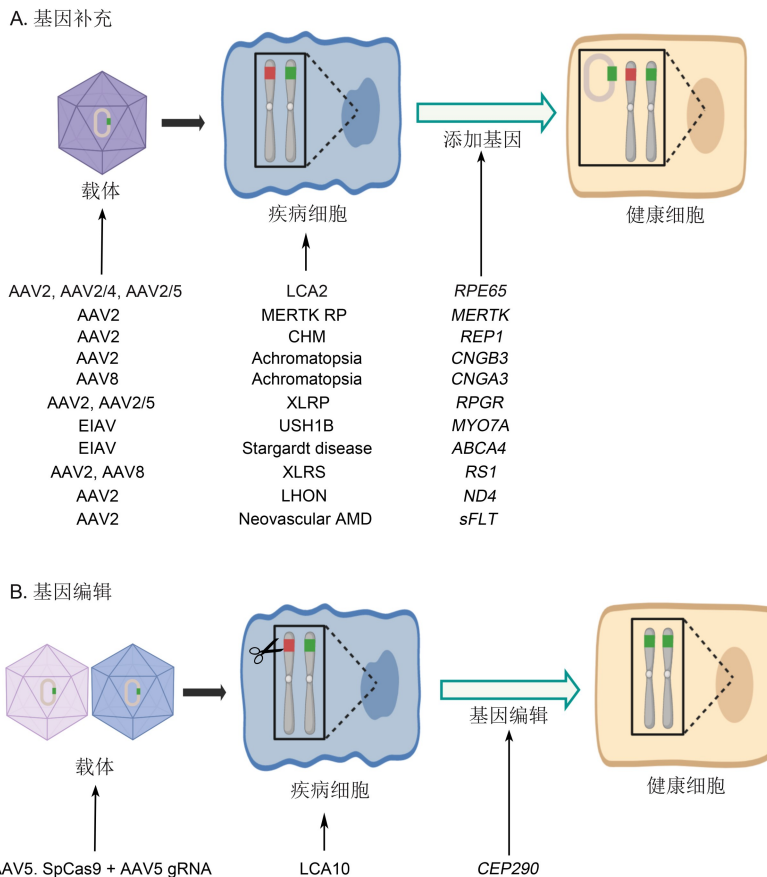


图1 基因补充和基因编辑在眼科中的应用实例 A:目前通过“基因补充”治疗视网膜疾病的临床试验及相关载体信息;B:“基因编辑”技术用于矫正突变基因,如 CRISPR/Cas9 位点特异性核酸酶矫正 CEP290 基因。

表1 腺病毒和慢病毒及腺相关病毒的特点比较

病毒载体	家族	基因组	颗粒直径 (nm)	载体容量 (kb)	趋向性	整合	表达时效	免疫原性
腺病毒	腺病毒科	双链 DNA	70~90	≤7.5	分裂/非分裂细胞	否	短暂	高
慢病毒	逆转录病毒科	单链 RNA	80~130	≤8	分裂(为主)/非分裂细胞	是	长期	低
腺相关病毒	细小病毒科	单链 DNA	18~26	≤4.7	分裂/非分裂细胞	否	长期	极低

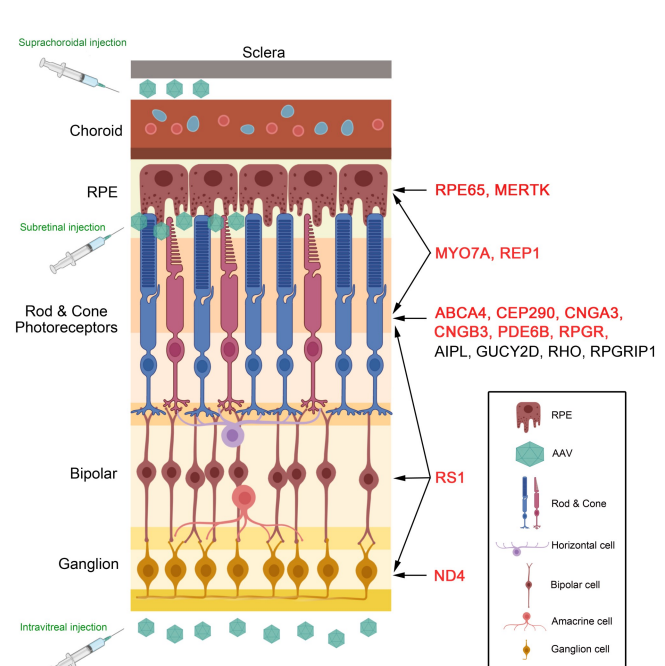


图2 视网膜基因治疗的给药途径 红色字体表示处在临床试验阶段的基因治疗。

疗没有出现严重的不良事件,且患者在3mo时视力提高^[13]。基于此,相关临床试验(NCT03913143、NCT03780257)正在进行,这将为AONs是否适用于视网膜基因治疗提供重要证据,但该方法需要多次给药。

2 眼底血管性疾病

2.1 新生血管性年龄相关性黄斑变性 AMD的晚期病理表现包括:地图样萎缩(geographic atrophy, GA)和新生血管性AMD(nAMD),但目前临床上只有针对nAMD的治疗方法。Anti-VEGF药物已成为治疗nAMD的一线药物,该治疗能显著抑制脉络膜新生血管、减少视网膜渗漏,并提高患者视力^[14-16]。然而,高频的玻璃体腔注射造成患者精神上和经济上的双重负担,导致患者依从性较差,所以真实世界中anti-VEGF的治疗效果并没有达到关键随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)中的水平^[6, 17-18]。

2.2 DR 糖尿病患者中约30%~40%会出现不同程度的DR,其中5%~10%会表现出威胁视力的DR(vision threatening DR, VTDR),包括严重的非增殖性DR(non-proliferative DR, NPDR)、增殖性DR(proliferative DR, PDR)和糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema,

DME)^[19]。需要注意的是, PDR 和 DME 是造成 DR 患者视力降低的主要原因, 其中 DME 可能出现在 DR 病程的任何阶段^[20]。由于 VEGF 是导致 DR 发病的重要因子, 所以目前 anti-VEGF 也是 PDR 和 DME 的一线治疗方法^[21]。同样, anti-VEGF 治疗 PDR 和 DME 也存在着频繁注射、费用昂贵以及患者依从性差等劣势, 导致真实世界中的治疗效果不及临床试验^[22-23]。

2.3 其他眼底血管性疾病 由于 VEGF/VEGFR 相关信号通路在眼底血管性疾病的发生发展中发挥了非常重要的作用, 所以 VEGF 抑制剂也常用于治疗 RVOs 继发的黄斑水肿 (RVOs - ME)、脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 和早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 等。RVOs 是仅次于 DR 的最常见视网膜血管类疾病, 目前世界范围内患者约为 2800 万人^[24], RVOs-ME 的 anti-VEGF 治疗同样面临着与 nAMD、DME、PDR 类似的困扰。ROP 是一种危及视力的儿童视网膜血管疾病, 在新生血管增殖期可接受 VEGF 抑制剂治疗。由于患儿处于发育阶段, 抗 VEGF 治疗需要合理把握治疗窗口、治疗剂量和治疗频次^[25]。

3 基因治疗在眼底血管性疾病中的应用

与单基因 IRDs 相比, 眼底血管性疾病的基因治疗更多地依赖于相关信号通路/治疗靶点 (如 VEGF), 对细胞类型或位点的特异性要求相对较低^[26]。但在监管批准和临床应用方面, 眼底血管性疾病基因治疗的门槛较高, 即需要与现有标准疗法进行严格评估和对比, 且表现出明显优势的前提下才能被采用。如前文所述, 常规的 anti-VEGF 治疗存在诸多问题导致患者依从性较差、治疗效果欠佳。而基因治疗介导的 anti-VEGF 策略可以有效克服这些短板^[27], 其最大的优势是可以实现长期有效的 VEGF 阻断, 避免了频繁的眼内注射^[26]。

针对眼底血管性疾病, 研究者尝试了各种基因治疗策略 (图 3), 主要包括基因补充、基因编辑, 以及 RNA 干扰等技术^[26]。其中, 通过基因补充“内源性 anti-VEGF”的基因治疗研究最多, 且最接近临床转化^[28-30]。表 2 汇总了目前正在进行的眼底血管性疾病的基因治疗临床试验, 其中 nAMD 相关临床试验最多, 此外还涉及干性 AMD、DME 以及 DR (非 DME)。

3.1 基因补充 如前所述, 基因补充可以使治疗性蛋白长期内源性生成, 相当于创建了一个“眼内生物工厂”。由于 anti-VEGF 已成为眼底血管性疾病的一线治疗药物, 所以基于基因治疗持续表达 anti-VEGF 蛋白是最容易实现临床转化的。正如表 2 所示, 当前大部分眼底血管性疾病基因治疗临床试验都采用了 AAV 介导的基因补充 anti-VEGF 相关分子的策略, 例如表达合成的重组 anti-VEGF 蛋白 (aflibercept) 或内源性 VEGF 抑制剂 (soluble fms-like tyrosine kinase 1, SFlt-1)。本节我们将重点介绍 3 种基于 anti-VEGF 的基因治疗产品。

3.1.1 ADVM-022 ADVM-022 (Adverum Biotechnologies, Inc.) 通过玻璃体腔内注射 AAV2.7m8 载体诱导眼内产生 aflibercept, 目前用来治疗 nAMD 和 DME。一项 I 期 OPTIC 研究的 2a 结果显示: nAMD 患者玻璃体腔内注射 ADVM-022 耐受性良好; 眼内 aflibercept 可持续产生 2a,

减少了患者频繁注射的治疗负担; 期间患者视力稳定, 视网膜厚度降低 (ADVM-022 Intravitreal Gene Therapy for Neovascular AMD - Phase 1 OPTIC Study; NCT03748784)。ADVM-022 针对 nAMD 患者的 III 期临床试验正在计划中。此外, ADVM-022 针对 DME 患者的一项 II 期临床试验正在进行中 (NCT04418427)。

3.1.2 SFlt-1 SFlt-1 是一种机体天然的内源性 VEGF 抑制剂, 通过 AAV 介导的基因补充 SFlt-1 可以实现其内源性表达, 目前用来治疗 nAMD^[28-30]。一项 I 期临床试验 (NCT01024998) 结果显示: 玻璃体腔内注射 AAV2-sFlt-1 是安全的, 且耐受性良好; 但 sFlt-1 的表达水平和疗效并不稳定, 研究者认为可能是受到本底 anti-AAV2 血清抗体的影响^[29]。在另一项 I/II a 期临床试验 (NCT01494805) 中, 视网膜下腔注射 rAAV-sFlt-1 是安全的且耐受性良好; 但该治疗并没有显著改善患者视力或视网膜厚度^[28, 31]。

3.1.3 RGX-314 RGX-314 (REGENXBIO Inc.) 通过 AAV 介导的基因补充 anti-VEGF 抗原结合片段 (antigen-binding fragment, Fab), 目前用以治疗 nAMD 和 DR (非 DME)。一项 I/II a 期临床试验 (NCT03066258) 已经证明该治疗对于 nAMD 患者具有良好的耐受性和安全性; RGX-314 可稳定患者视力、降低视网膜厚度^[3]。同时, 针对 nAMD 的 II 期 (NCT03999801) 和 II b/III 期 (NCT04514653、NCT04704921、NCT04832724) 临床试验正在进行中。此外, 针对 DR (非 DME) 患者的一项 II 期临床试验 (NCT04567550) 正在进行中。

3.1.4 其他靶点的基因补充 眼底血管性疾病的基因治疗临床试验除了聚焦经典靶点 VEGF 外, 还涉及一些其他分子。两项 I 期临床试验通过基因补充生成内源性抗血管生成因子用来治疗 nAMD, 分别靶向色素上皮衍生因子 (NCT00109499)、内皮抑素和血管抑制素 (NCT01301443)^[32-33]。另有一些临床试验靶向补体途径的抑制因子, 例如靶向 CD59 治疗 nAMD (NCT03585556) 和干性 AMD (NCT03144999); 靶向补体因子 I (NCT03846193、NCT04437368、NCT04566445) 用以治疗干性 AMD。

3.2 基因编辑 基于基因组中成簇有规律间隔短回文重复序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR) 的基因编辑技术在 IRDs 的治疗中取得了巨大进展^[34], 也为眼底血管性疾病的基因治疗提供了新思路, 即借助基因编辑技术对血管生成通路中的信号分子进行敲除/敲低来实现治疗目的^[35]。目前, 基于基因编辑技术治疗眼底血管性疾病仅限于临床前研究, 主要集中在小鼠 CNV 模型中^[35-41]。这些研究大多采用视网膜下腔或玻璃体腔注射病毒载体, 如 AAV 和慢病毒来导入核酸酶; 另有一些研究尝试采用非病毒载体, 如直接使用预组装的 Cas9 核糖核蛋白, 以尽量减少免疫和抗体反应^[38]。CRISPR 基因编辑系统靶向的基因一般为血管生成通路相关信号分子, 包括 VEGF-A、VEGF 受体 2 (VEGFR2)、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 等^[35-41]。基因编辑技术可以实现长期抗新生血管的作用, 但也要考虑其脱靶效应带来的风险, 这些问题将在未来的临床前和临床试验中予以考虑和优化。

表2 AMD和DR基因治疗临床试验汇总(截至2022-04)

疾病	靶蛋白	载体	注射	申办方	分期	试验编号
nAMD	Aflibercept	AAV2.7m8	IVT	Adverum Biotechnologies, Inc.	I	NCT03748784 NCT04645212
	sFlt-1	AAV	SR	Adverum Biotechnologies, Inc.	I / II a	NCT01494805
	sFlt-1	AAV2	IVT	Sanofi Genzyme	I	NCT01024998
	Soluble CD59	AAV2	IVT	Hemera Biosciences	I	NCT03585556
	Endostatin/angiostatin	EIAV	SR	Oxford BioMedica	I	NCT01301443
	Monoclonal anti-VEGF fab	AAV8	SR/SC	REGENXBIO Inc.	I / II a II II b/III	NCT03066258 NCT03999801 NCT04514653 NCT04704921 NCT04832724
Dry AMD with GA	PEDF	Adenovirus	IVT	GenVec	I	NCT00109499
	Complement factor I	AAV2	SR	Gyroscope Therapeutics	I / II II	NCT03846193 NCT04437368 NCT04566445
DME	CD59	AAV2	IVT	Hemera Biosciences	I	NCT03144999
	Aflibercept	AAV2.7m8	IVT	Adverum Biotechnologies, Inc	II	NCT04418427
DR without DME	Monoclonal anti-VEGF fab	AAV8	SR	REGENXBIO Inc.	Preclinical	Corporate website
DR without DME	Monoclonal anti-VEGF fab	AAV8	SC	REGENXBIO Inc.	II	NCT04567550

注:阿柏西普:Aflibercept; AAV2: adeno-associated virus serotype 2; AAV2.7m8: adeno-associated virus serotype 2 with 7m8 capsid protein; AAV8: adeno-associated virus serotype 8; 马传染性贫血病毒: equine infectious anemia virus (EIAV); 玻璃体腔内: intravitreal (IVT); 色素上皮衍生因子: pigment epithelium-derived factor (PEDF); 脉络膜上腔: suprachoroidal (SC); 视网膜下: subretinal (SR) (以上信息获取自 *clinicaltrials.gov*)。

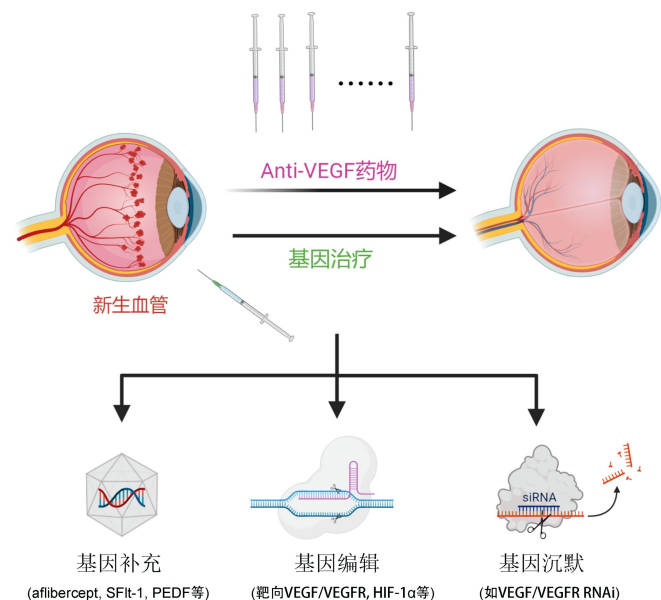


图3 眼底血管性疾病的常规 anti-VEGF 治疗和基因治疗
 常规治疗采用定期、多次注射 anti-VEGF 药物;基因治疗策略主要包括基因补充、基因编辑以及基因沉默。

3.3 基因沉默 基因沉默在基因治疗中的应用也十分广泛。基因沉默是把反义核酸(如 siRNA、shRNA、反义 RNA、反义 DNA 等)和核酶等导入细胞内,在转录和翻译水平阻断特定基因的异常表达,或者破坏某个基因结构使其不表达,从而实现治疗的目的^[42]。其中,RNA 干扰技术(RNAinterfere, RNAi)已在眼底血管性疾病治疗中进行了相关探索。一项 III 期临床试验(NCT00557791)结果显示:

一种靶向 VEGF 的 siRNA 药物 Bevasiranib 治疗 nAMD 的效果没有达到预期,因此试验终止^[43]。另一种靶向 VEGF 受体 1(VEGFR1)的 RNAi 药物 Sirna-027(AGN211745)进行了 II 期临床试验(NCT00395057)评估,同样也因治疗效果不佳而选择终止^[42]。需要注意的是,单纯的 RNAi 药物并不能提供持久的抑制效果,所以仍需要进行频繁眼内注射;而病毒(如 AAV)介导的内源性 shRNA/miRNA 可以实现长期有效抑制 VEGF 的目的^[44]。

4 讨论与展望

基因治疗在 IRDs 中的研究和应用已趋向成熟,这也为眼底血管性疾病的基因治疗提供了理论和技术基础。基因治疗通过提供有效和持续的抗血管生成药物释放,克服了传统疗法的缺陷,进而减轻了患者的经济和精神负担。虽然眼底血管性疾病的基因治疗具有巨大的应用潜力,但目前仍面临一些挑战。与常规 anti-VEGF 治疗相比,基因治疗最大优势在于治疗效果的持久性,但持续抑制 VEGF 可能是一把双刃剑。临床研究表明频繁给予 anti-VEGF 治疗会引起视网膜萎缩或地图样萎缩^[45-46],其原因可能是 VEGF 本身的生理功能也受到了长期慢性的阻断,因此探索可调控的基因治疗可有效解决此类问题^[47-49]。此外,眼底血管性疾病基因治疗受制于所选靶点的有效性,因此对该类疾病发病机制的探索尤为重要,以便为基因治疗提供更加关键的治疗靶点。在基础研究中,建立更加具有代表性的 AMD/DR/DME 动物模型有助于该类疾病基因治疗的转化医学研究。

综上所述,大量基础和临床研究已证实基于基因补充、基因编辑和基因沉默靶向血管生成通路相关信号分子

(如 VEGF/VEGFR) 治疗眼底血管性疾病是安全且有效的;同时,多项正在进行的临床试验也将推进眼底血管性疾病基因治疗的临床转化。基因治疗的发展将会为众多眼底血管性疾病患者带来福音。

参考文献

- 1 DiCarlo JE, Mahajan VB, Tsang SH. Gene therapy and genome surgery in the retina. *J Clin Invest* 2018;128(6):2177–2188
- 2 Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390(10097):849–860
- 3 Tan TE, Fenner BJ, Barathi VA, et al. Gene-based therapeutics for acquired retinal disease: opportunities and progress. *Front Genet* 2021;12:795010
- 4 Takahashi VKL, Takiuti JT, Jauregui R, et al. Gene therapy in inherited retinal degenerative diseases, a review. *Ophthalmic Genet* 2018;39(5):560–568
- 5 Tan TE, Chan HW, Singh M, et al. Artificial intelligence for diagnosis of inherited retinal disease: an exciting opportunity and one step forward. *Br J Ophthalmol* 2021;105(9):1187–1189
- 6 Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017;5(12):e1221–e1234
- 7 Zhao JL, Xu X, Ellwein LB, et al. Causes of visual impairment and blindness in the 2006 and 2014 nine-Province surveys in rural China. *Am J Ophthalmol* 2019;197:80–87
- 8 Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994;145(3):574–584
- 9 Chung SH, Sin TN, Ngo T, et al. CRISPR technology for ocular angiogenesis. *Front Genome Ed* 2020;2:594984
- 10 Chung SH, Frick SL, Yiu G. Targeting vascular endothelial growth factor using retinal gene therapy. *Ann Transl Med* 2021;9(15):1277
- 11 Planul A, Dalkara D. Vectors and gene delivery to the retina. *Annu Rev Vis Sci* 2017;3:121–140
- 12 Cahoon JM, Rai RR, Carroll LS, et al. Intravitreal AAV2. COMP-Ang1 prevents neurovascular degeneration in a murine model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2015;64(12):4247–4259
- 13 Cideciyan AV, Jacobson SG, Drack AV, et al. Effect of an intravitreal antisense oligonucleotide on vision in Leber congenital amaurosis due to a photoreceptor cilium defect. *Nat Med* 2019;25(2):225–228
- 14 Wu J, Zhang CY, Yang Q, et al. Imaging hyperreflective foci as an inflammatory biomarker after anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration patients with optical coherence tomography angiography. *Biomed Res Int* 2021;2021:6648191
- 15 Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355(14):1419–1431
- 16 Brown DM, Michels M, Kaiser PK, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 2009;116(1):57–65. e5
- 17 Pearce E, Chong V, Sivaprasad S. Aflibercept reduces retinal hemorrhages and intravitreal microvascular abnormalities but not venous beading: secondary analysis of the CLARITY study. *Ophthalmol Retina* 2020;4(7):689–694

- 18 Lad EM, Hammill BG, Qualls LG, et al. Anti-VEGF treatment patterns for neovascular age-related macular degeneration among medicare beneficiaries. *Am J Ophthalmol* 2014;158(3):537–543. e2
- 19 Wong TY, Sabanayagam C. The war on diabetic retinopathy: where are we now? *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2019;8(6):448–456
- 20 Tan GS, Cheung N, Simó R, et al. Diabetic macular oedema. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;5(2):143–155
- 21 Writing Committee for the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Gross JG, Glassman AR, et al. Panretinal photocoagulation vs intravitreal ranibizumab for proliferative diabetic retinopathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2015;314(20):2137–2146
- 22 van Aken E, Favreau M, Ramboer E, et al. Real-world outcomes in patients with diabetic macular edema treated long term with ranibizumab (VISION study). *Clin Ophthalmol* 2020;14:4173–4185
- 23 Mitchell P, Sheidow TG, Farah ME, et al. Effectiveness and safety of ranibizumab 0.5 Mg in treatment-naïve patients with diabetic macular edema: results from the real-world global LUMINOUS study. *PLoS One* 2020;15(6):e0233595
- 24 Song PG, Xu YH, Zha MM, et al. Global epidemiology of retinal vein occlusion: a systematic review and meta-analysis of prevalence, incidence, and risk factors. *J Glob Health* 2019;9(1):010427
- 25 Stahl A, Lepore D, Fielder A, et al. Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial. *Lancet* 2019;394(10208):1551–1559
- 26 Xu D, Khan MA, Ho AC. Creating an ocular biofactory: surgical approaches in gene therapy for acquired retinal diseases. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2021;10(1):5–11
- 27 Moore NA, Bracha P, Hussain RM, et al. Gene therapy for age-related macular degeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17(10):1235–1244
- 28 Rakoczy EP, Magno AL, Lai CM, et al. Three-year follow-up of phase 1 and 2a rAAV. sFLT-1 subretinal gene therapy trials for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2019;204:113–123
- 29 Heier JS, Kherani S, Desai S, et al. Intravitreal injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial. *Lancet* 2017;390(10089):50–61
- 30 Constable IJ, Lai CM, Magno AL, et al. Gene therapy in neovascular age-related macular degeneration: three-year follow-up of a phase 1 randomized dose escalation trial. *Am J Ophthalmol* 2017;177:150–158
- 31 Constable IJ, Pierce CM, Lai CM, et al. Phase 2a randomized clinical trial: safety and post hoc analysis of subretinal rAAV. sFLT-1 for wet age-related macular degeneration. *EBioMedicine* 2016;14:168–175
- 32 Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, et al. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006;17(2):167–176
- 33 Campochiaro PA, Lauer AK, Sohn EH, et al. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) study. *Hum Gene Ther* 2017;28(1):99–111
- 34 Trapani I, Auricchio A. Seeing the light after 25 years of retinal gene therapy. *Trends Mol Med* 2018;24(8):669–681
- 35 Lin FL, Wang PY, Chuang YF, et al. Gene therapy intervention in neovascular eye disease: a recent update. *Mol Ther* 2020;28(10):2120–2138

- 36 Ling SK, Yang SQ, Hu XD, *et al.* Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice. *Nat Biomed Eng* 2021;5(2):144-156
- 37 Koo T, Park SW, Jo DH, *et al.* CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. *Nat Commun* 2018;9(1):1855
- 38 Kim K, Park SW, Kim JH, *et al.* Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. *Genome Res* 2017;27(3):419-426
- 39 Kim E, Koo T, Park SW, *et al.* *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun* 2017;8:14500
- 40 Huang XG, Zhou GH, Wu WY, *et al.* Genome editing abrogates angiogenesis *in vivo*. *Nat Commun* 2017;8(1):112
- 41 Holmgaard A, Askou AL, Benckendorff JNE, *et al.* *In vivo* knockout of the vegfa gene by lentiviral delivery of CRISPR/Cas9 in mouse retinal pigment epithelium cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;9:89-99
- 42 Weng YH, Xiao HH, Zhang JC, *et al.* RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol Adv* 2019; 37 (5): 801-825
- 43 Garba AO, Mousa SA. Bevasiranib for the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Ophthalmol Eye Dis* 2010;2:75-83
- 44 Askou AL, Alsing S, Benckendorff JNE, *et al.* Suppression of choroidal neovascularization by AAV-based dual-acting antiangiogenic gene therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;16:38-50
- 45 Sada SR, Guymer R, Monés JM, *et al.* Anti-vascular endothelial growth factor use and atrophy in neovascular age-related macular degeneration: systematic literature review and expert opinion. *Ophthalmology* 2020;127(5):648-659
- 46 Chong Teo KY, Nguyen V, Cheung CMG, *et al.* The impact of disease activity on 5-year outcomes in patients undergoing treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2022; 42 (1): 95-106
- 47 Stieger K, Le Meur G, Lasne F, *et al.* Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman Primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 2006;13(5):967-975
- 48 Sochor MA, Vasireddy V, Drivas TG, *et al.* An autogenously regulated expression system for gene therapeutic ocular applications. *Sci Rep* 2015;5:17105
- 49 Le Guiner C, Stieger K, Toromanoff A, *et al.* Transgene regulation using the tetracycline-inducible TetR-KRAB system after AAV-mediated gene transfer in rodents and nonhuman Primates. *PLoS One* 2014;9(9):e102538