

基因治疗的研究进展

张岩松 陈丽娇 张婷 马跃 李善刚*

(昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650000)

摘要 经过科学家们三十年的不懈努力, 基因治疗(gene therapy)这一理念终于得以被运用于临床, 并逐渐成为治疗遗传病、感染性疾病和肿瘤等疾病的重要手段, 它为传统疗法无法解决的疾病提供了更多的选择方案。同时, 基因编辑领域的迅速发展和在递送载体运用上积累的经验, 也极大地推动着基因治疗的进步。至今, 欧洲药品管理局(EMA)和美国食品药品监督管理局(FDA)已经批准了6种基因治疗产品上市, 基因治疗作为新的治疗手段有着较好的前景, 然而继续发展为主流疗法依然面临着诸多挑战。该文回顾了基因治疗的发展过程, 着重讨论了该领域目前的技术发展现状和临床应用情况, 并对基因治疗存在的安全性和伦理等问题做出了总结和展望。

关键词 基因治疗; 递送载体; 基因编辑; 遗传病

Research Progresses of Gene Therapy

ZHANG Yansong, CHEN Lijiao, ZHANG Ting, MA Yue, LI Shangang*

(Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology,
Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650000, China)

Abstract After 30 years of unremitting efforts by scientists, the concept of gene therapy has finally been applied to the clinical medicine, and has gradually become an important means for treating genetic diseases, infectious diseases and tumors, etc. Gene therapy offers more options for the diseases that cannot be treated with traditional therapies. Meanwhile, the rapid development in the gene editing field and the accumulated experience in the use of delivery vectors have also greatly promoted the progress of gene therapy. To date, the EMA (European Medicines Agency) and the U.S. FDA (Food and Drug Administration) have approved the marketing of six gene therapy products. Gene therapy has good prospects as a new treatment method, but it still faces many challenges to continue to develop into mainstream therapies. This paper reviews the development of gene therapy, focuses on the current state of technology development and clinical application in the field, and summarizes and prospects the safety and ethics of gene therapy.

Keywords gene therapy; delivery vehicle; gene editing; hereditary disease

从上个世纪五十年代, 尤其是沃森和克里克发现DNA双螺旋结构以来, 人们更加坚定了基因是基本的遗传单位这一概念。随后科学家们发现, 许多重大的人类疾病是由于某个基因的缺失、染色体变

异等遗传物质的改变导致功能蛋白的遗传编码异常, 从而引起机体病变。如果能对异常的基因进行校正, 那么相应地也会起到治疗的作用。因此, 基因治疗被简单定义为: 利用现代分子生物学的方法

收稿日期: 2020-04-29 接受日期: 2020-06-23

国家自然科学基金(批准号: 31960215)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15000856418, E-mail: lisg@lpbr.cn

Received: April 29, 2020 Accepted: June 23, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31960215)

*Corresponding author. Tel: +86-15000856418, E-mail: lisg@lpbr.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5370>

修复致病基因, 以实现缓解和治愈疾病的一种治疗手段。这种导入外源基因或使致病基因产生人为的定向突变, 实质上是恢复了对机体有利的基因表达。基因治疗发展到现在, 不仅仅是在血友病、囊性纤维病和家族性高胆固醇血症等遗传病中能起作用, 针对一些获得性疾病同样可行, 比如恶性肿瘤、心血管疾病和感染性疾病等^[1-2]。从发展趋势来看, 基因治疗正趋于主流。

基因治疗通常包括以下4种机制: (1)用正常的基因补偿突变的基因, 如治疗血友病可用正常的凝血因子VIII(coagulation factor VIII, *FVIII*)或凝血因子IX(coagulation factor IX, *FIX*)基因分别补偿变异的*FVIII*或*FIX*基因实现基因治疗^[3]。(2)修复体内突变的基因, 对于单碱基突变类型的遗传病如I型酪氨酸血症^[4]、镰状细胞病(sickle cell disease, *SCD*)^[5]、杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, *DMD*)^[6]等都可以通过修复突变碱基来恢复基因功能。(3)使功能异常的致病基因失活/激活, 如对于家族性高胆固醇血症^[7]、遗传性耳聋^[8]等疾病可对致病基因进行敲除以达到治疗的目的。(4)将新的基因或修饰了的基因导入体内进行疾病治疗, 如利用基因修饰后的嵌合抗原受体T细胞疗法(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, *CAR-T*)治疗癌症^[9]。基因治疗的最终目的是使正常的基因在患者体内持久稳定地表达。实现目的基因的转导需借助一定的载体和技术, 大体可分体外和体内2种途径^[1]。在体外途径中, 分离患者体细胞进行体外培养, 将目的基因转导进细胞, 在体外对细胞基因进行修饰, 然后将基因修饰后的细胞重新输回患者体内, 以达到治疗的目的; 而体内途径是直接通过载体导入患者目的体细胞进行基因修饰。体外途径的优势在于体外培养细胞的转染效率高, 对难转染的细胞也能通过筛选来提高效率, 同时外源基因可以直接作用于细胞中的染色体, 能够长期稳定表达, 并随着细胞分裂稳定遗传给子细胞。体内转导途径不需要改变器官组织结构, 但由于机体体积大、细胞量多和体液环境复杂, 所以转染效率低, 且不易控制。

基因治疗主要涉及到目的基因、载体和靶细胞三方面的内容。靶细胞分体细胞和生殖细胞两大类, 但是用精子、卵子和合子等生殖细胞作为靶细胞受到伦理方面的限制, 因而进展缓慢; 而体细胞易获得、来源丰富, 即使一些不易采集的体细胞如神

经细胞、视网膜细胞、肝脏细胞和肌细胞等也都可以进行体内靶向基因治疗, 所以近年来体细胞基因治疗发展较迅速。

1 基因治疗的发展历程

基因治疗的发展经历了“乐观与热情-失望与怀疑-理性与挑战”的认识过程。截至1990年, 世界范围内多个实验室证实了逆转录病毒(retrovirus, *RV*)作为基因校正载体的有效性, 于是美国批准了两项临床试验, 1990年开展的首例基因治疗临床试验便是其中之一。4岁的女孩阿莎提罹患重症联合免疫缺陷病(severe combined immunodeficiency disease, *SCID*), 研究者利用逆转录病毒将正确编码腺苷脱氨酶的*ADA*(adenosine deaminase)基因导入离体培养的患者淋巴细胞, 然后再将细胞输回到女孩体内。随后的检测证明, 该治疗能有效恢复患者体内*ADA*的合成^[10]。此次尝试的成功, 无疑是基因治疗发展史上的重要里程碑。

在此之后, 大量的基因治疗临床试验接踵而至, 整个行业呈现出欣欣向荣的发展态势。但在1999年, 18岁的美国男生在基因治疗过程中接受腺病毒注射几天后, 由于免疫系统对腺病毒过度反应导致器官衰竭而不幸死亡^[11]; 2002年, 接受了逆转录病毒注射的两名*SCID*患者继发白血病。这导致FDA于2003年叫停了所有利用了逆转录病毒的临床试验, 也无疑给基因治疗领域来了一次当头棒喝^[12]。经历了三个月的审核后, FDA通过权衡认为基因治疗利大于弊, 于是决定再次开启逆转录病毒临床试验。此后, 载体的安全性研究成了科学家们努力的方向。

2009年, 宾夕法尼亚大学利用腺相关病毒(adenovirus-associated virus, *AAV*)载体成功治愈了先天性黑蒙症(Leber's congenital amaurosis, *LCA*)患者, 腺相关病毒载体给人们带来了希望, 从此基因治疗又重回大众视野^[13]。2012年, 腺相关病毒衍生的基因治疗药物Glybera首获EMA批准上市, 开启了基因治疗新时代; 2016年, EMA批准了第二款治疗*ADA-SCID*的干细胞基因治疗药物Strimvelis; 2017年, FDA批准了基因治疗药物Luxturna, 其利用携带视网膜色素上皮细胞第65号(retinal pigment epithelium 65, *RPE65*)基因的*AAV2*腺相关病毒载体治疗视网膜病变造成的视力丧失^[14]。越来越多基因治疗产品的获批, 意味着欧洲和美国监管部门对基因治疗安全性

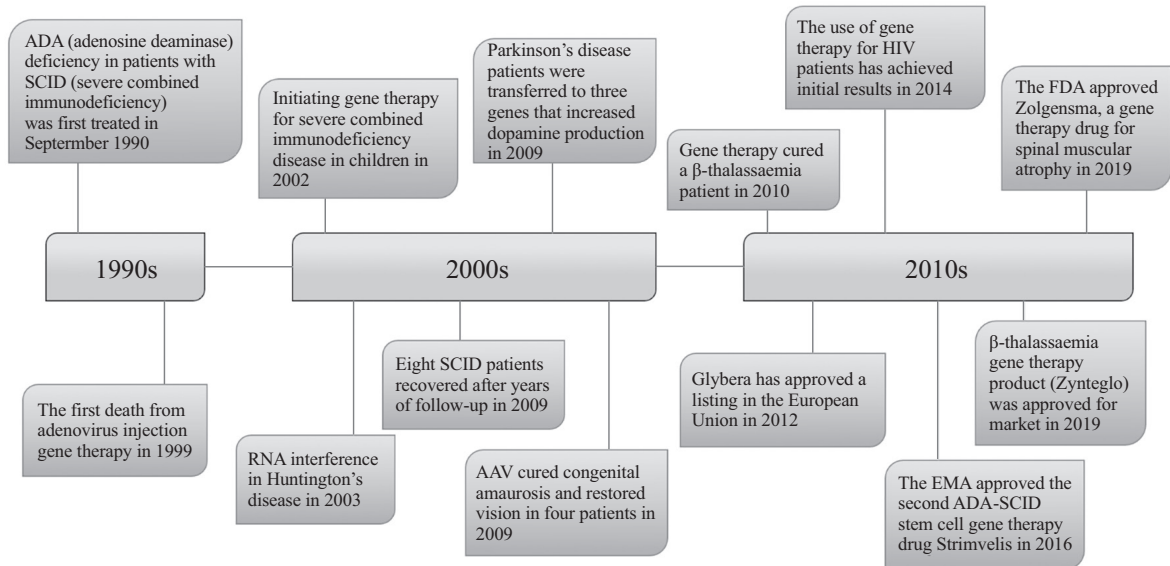


图1 基因治疗发展历程

Fig.1 The development of gene therapy

的认可, 监管部门的大力支持也在很大程度上推动着基因治疗安全性和有效性的进步。在科学家们摸索发展的过程中, 人们也逐渐意识到载体工具对于基因治疗的重要性。基因治疗发展中的里程碑事件如图1所示。

2 用于基因治疗的载体工具

基因治疗成功的关键是如何安全有效地将外源基因导入体外细胞或体内组织, 这同时也是基因治疗所面临的一大瓶颈。所以选择恰当的递送工具, 是安全有效地实现基因治疗所必不可少的。目前主流的载体被分为病毒载体和非病毒载体2种。

2.1 病毒载体

病毒是最小、最简单的无细胞结构的生命寄生体。由于它可以高效地感染人类细胞, 具有传递其基因组进入细胞的分子机制, 因此病毒作为递送载体的利用率远高于非病毒载体, 约70%的基因治疗方案采用病毒作为递送载体。然而, 大多数病毒具有致病性, 必须经过人为改造, 只保留其本身DNA整合的功能元件, 而剔除原有的致病功能元件。目前, 最常见的病毒载体有逆转录病毒、腺相关病毒、腺病毒和慢病毒等^[15]。

2.1.1 逆转录病毒 逆转录病毒是一种正链RNA病毒, 在受染细胞中可逆转录产生DNA互补链, 互补DNA随机整合到宿主细胞基因组中并能长期稳定表达。逆转录病毒是最早被开发的一类病毒载体,

经改造后的逆转录病毒仅具备单次感染性, 从而避免了其在人体细胞间的扩散, 也大大降低了病毒本身的致病性。作为基因治疗的递送工具, 逆转录病毒感染效率高、毒性小, 被感染的细胞不产生病变, 可建立长期表达目的基因的稳转细胞株; 但同时, 逆转录病毒只能感染分裂细胞, 可能会激活致癌基因或插入突变, 具有一定致癌风险, 另外逆转录病毒可包装的外源基因小于8 kb, 因此目前只适用于体外的细胞感染^[1,15]。

2.1.2 腺病毒(adenovirus, AdV) 腺病毒是一种双链无包膜的非整合型DNA病毒, 人类细胞是腺病毒的自然宿主。腺病毒可以感染分裂和不分裂的多种人类细胞, 适用于几乎所有细胞系和原代细胞, 也可以介导多种组织细胞的基因递送, 如肝、肺、脑、血管、神经系统等, 同时这一类病毒载体没有包膜, 不易被其补体所灭活, 也相对安全, 因此在体内基因递送上有很大的优势。而缺点是, 腺病毒在分裂旺盛的细胞中不能长期表达目的基因, 需要多次感染才能达到修复效果, 但是重复处理会导致机体产生的免疫应答增多, 从而影响基因表达和基因治疗的效果^[15]。

2.1.3 腺相关病毒(AAV) 腺相关病毒是目前应用最为广泛的病毒载体之一, 是一种复制缺陷型的单链DNA病毒, 需要辅助腺病毒参与生活周期, 才能将外源基因定点整合至宿主细胞的染色体上, 而现在经过改造的AAV载体已经不需要腺病毒的辅助,

不插入宿主基因组,而是呈卫星状态游离于宿主细胞基因之外长期稳定表达^[16]。腺相关病毒对宿主无致病性,且对多种组织细胞都能长期稳定的表达。用于基因治疗的重组腺相关病毒(rAAV)载体将外源基因导入宿主后,可游离于宿主细胞基因之外稳定表达功能蛋白。生物安全级别高、宿主范围广、表达时间长和免疫原性低等优势使得AAV在基因治疗领域得到了越来越多的关注和应用。但外源基因容量(<4.7 kb)也限制了它的应用^[15,17]。对于包装容量,目前在成簇的规律间隔的短回文序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)领域AAV的应用中有几种可行的解决方案,如将Cas9(CRISPR-associated 9)拆分到2个AAV载体中,转染后在细胞内经过DNA重组、内含子剪接或内裂肽(intein)连接等获得较大的Cas9蛋白^[18-19]。

2.1.4 慢病毒(lentivirus, LV) 慢病毒载体也是逆转录病毒的一种,为二倍体RNA病毒,因其潜伏期长而被称为慢病毒。由HIV改造而来的慢病毒载体,因其转运外源基因稳定且高效而成为基因转导常用的载体工具。这类病毒载体的优势在于感染宿主范围广,对分裂和非分裂细胞都具有感染能力。对于一些较难转染的细胞如原代细胞、干细胞和不分化的细胞也有很高的转染效率,这使得外源基因整合进宿主基因组的几率大大提高。除此之外,相比于腺病毒以及腺相关病毒,慢病毒容量更大,能携带更大、更复杂的基因组,并且具有整合转基因到宿主基因组的能力而使产物稳定长期表达。但同时这种半随机整合的特性也会导致引发突变的潜在安全隐患。由于慢病毒在体内的转染表现较差,所以一般不进行体内应用^[15,20]。

其他类型的病毒载体还有牛痘苗病毒(vaccinia virus, VV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)、噬菌体载体等^[15]。其中,HSV病毒具有滴度高、宿主范围广、外源基因容量大、对神经细胞具有特异性等特点,但它的毒性和免疫原性等因素还需要进一步验证,所以并没有被人们广泛利用。

2.2 非病毒载体

理想的非病毒载体必须满足以下几个条件:(1)可携带DNA穿透细胞膜;(2)保护DNA在进入细胞前不被DNA酶降解,进入细胞后不被溶酶体和酶降

解;(3)可通过生物降解从细胞中清除;(4)无细胞毒性等。不同于病毒载体,非病毒载体纳米级别的粒径有助于实现载体的靶向性和有效性。目前应用较为广泛的非病毒载体有阳离子多聚物载体、脂质体载体和纳米颗粒载体等^[21]。

2.2.1 阳离子多聚物载体 阳离子多聚物与富含阴离子的DNA互相结合,形成的复合物(polyplex)可黏合到细胞膜表面的硫酸黏多糖上,再由细胞膜内吞进入细胞内。聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)是应用较早的阳离子多聚物载体,它可以抑制溶酶体,使在吞噬泡的酸性环境中的正电荷增多,为DNA提供更大的保护作用,有利于DNA从吞噬泡中释放且不被破坏^[22-23]。

2.2.2 脂质体载体 脂质体是由磷脂双分子层构成的,具有亲水和疏水基团。脂质体将外源基因包裹后与细胞膜结合,由于脂质体与细胞膜的相似性而发生融合,使得外源基因进入细胞。脂质体细胞转染的方法目前已经相对成熟,该方法简单、无免疫原性、细胞毒性低,但转染效率不高,多为瞬时表达^[22]。目前,脂质体在基因治疗领域多被用于体外细胞转染,而体内递送应用随着新型脂质体的产生和组合,正在迅速发展。

2.2.3 纳米颗粒载体 纳米颗粒载体所介导的细胞转染具有其他类型非病毒载体所没有的优势。首先,纳米材料在一定颗粒数量范围内,对细胞的生长和活性无明显影响,几乎不具备细胞毒性;同时没有免疫原性,不会使细胞产生免疫反应。其次,纳米材料的外源基因转导效率要高于脂质体,并且它自身体积很小,从而可以随血液到达各个组织中,在体内基因治疗上有很大潜力。目前研究较多的有无机纳米颗粒(如碳酸钙、磁性氧化铁、金纳米颗粒)、天然高分子纳米颗粒、有机硅纳米颗粒等^[22]。2019年,有团队使用装载CRISPR的金纳米颗粒成功编辑了造血干细胞中的基因,而且没有毒副作用^[24]。

其他非病毒载体如生物相容性材料、配体介导的靶向载体等都有一定研究潜力。这些非病毒载体依然存在细胞毒性、转染效率、细胞靶向性等实质性问题亟需解决。

无论是病毒载体还是非病毒载体,其最终目的都是制备一个无毒、高效、低免疫原性、可靶向的外源基因递送解决方案。因而仍需投入更多的研究在寻求更好的载体上,开发新型的载体将会为基因治疗的发展提供更为有力的帮助。

3 基因治疗的应用现状

基因治疗经历了几十年的螺旋式发展,至今在治疗遗传病和获得性疾病上取得了令人兴奋的临床试验进展。截至2018年5月,已有2 600项基因治疗临床试验正在开展或者已经完成^[25]。从欧盟和美国推出的6种基因治疗产品也可以看出,基因治疗正朝着一个光明的方向蓬勃发展。目前,基因治疗主要围绕着发病机制相对明确的单基因遗传病开展,此外基因治疗在多基因遗传病、癌症、感染性疾病等获得性疾病上都做了尝试,各种疾病的基因治疗发展现状如表1所示。

3.1 遗传病的基因治疗

由于某些基因功能的缺失或失活而导致的遗传病,在基因治疗出现之前或许干细胞移植是其唯

一的治疗方法,基因治疗的出现为这类遗传病提供了新的、毒性更小的治疗选择。迄今已有几十种备受关注的遗传疾病正在开展基因治疗相关研究,包括一些免疫缺陷病、神经系统疾病和遗传性血液病等^[25]。

3.1.1 免疫缺陷病 基因治疗最早成功的案例是SCID的治疗。SCID是一种X连锁遗传病,由于多个基因缺失导致患者T细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞缺乏,因而极易受到细菌、病毒和真菌的感染而致病,患者通常在幼年就发生死亡^[26]。ADA-SCID在1990年进行首次基因治疗尝试后,直到2016年才取得重大进展。2002年开展的第一项转基因造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的临床试验(NCT00598481),旨在将功能性ADA基因整合进 γ -

表1 各种疾病的基因治疗发展现状

Table 1 The development of gene therapy for various diseases

| 疾病名称 Name of disease | 缩写 Abbreviation | 基因治疗策略 Gene therapy strategy | 临床试验编号 Clinical trial number |
|--|--------------------|---|---|
| Severe combined immunodeficiency disease | SCID | The functional <i>ADA</i> gene is integrated into the γ -retrovirus to repair HSC and then returned to the patient | NCT00598481 |
| Wiskott-Aldrich syndrome | WAS | Autologous CD34 positive cells are transduced by lentiviral vectors integrating human functional <i>WAS</i> genes | NCT01347242 |
| Chronic granulomatosis | CGD | Lentiviral vectors integrating <i>CYBB</i> genes are used to transfer autologous CD34 positive cells | NCT02234934 |
| β -thalassemia | | Autologous hematopoietic stem cells were repaired by lentiviral vectors encoding human beta-globin genes | NCT02453477 |
| Sickle cell disease | SCD | New lentiviral vector lentiviral BB305 is transducing autologous CD34 positive cells | NCT03282656 |
| Hemophilia | | AAV was used as vector for transduction of IX factor (SPK-9001) | NCT03307980 |
| Spinal muscular atrophy | SMA | Intravenous injection of AAV9 was used to replace the pathogenic gene <i>SMN1</i> | NCT02122952 |
| Leber's congenital amaurosis | LCA | The adenovirus vector (Luxturna) carrying the <i>RPE65</i> functional gene was injected directly into the retinal membrane in one side | NCT00999609 |
| Acquired immune deficiency syndrome | AIDS | ZFN (zinc finger nuclease) technique was used to directly knock out the HIV coreceptor <i>CCR5</i> gene of patient HSPC (hematopoietic stem/progenitor cell) and return it to the patient | NCT02500849 |
| Cancer | | CAR-T | NCT03081910 NCT02663297 NCT02932956 |

逆转录病毒并感染HSC, 之后将修饰后的HSC再输回病人体内进行治疗^[27]。在2002年到2014年的12年间, 该研究共进行了18例临床试验并进行了随访调查, 总的来说这一方法是安全的, 18名病人全部存活且均未继发白血病, 最重要的是, 18人中有15人显示ADA水平上升、淋巴细胞增多, 表明了该方法的有效性^[28]。随后在2016年EMA批准了用于治疗ADA-SCID的基因治疗药物Strimvelis上市^[29]。该项临床试验已于2019年6月结束。但造血干细胞移植患者必须接受化疗或放疗以消除宿主HSC, 该处理伤害比较大, 因此为了实现长期治疗效果, 已有研究团队致力于寻找基于抗体的较安全的替代方案^[30]。

SCID基因治疗取得的成绩为其他遗传性免疫缺陷病的治疗奠定了基础。最近, Wiskott-Aldrich综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)的基因治疗研究也取得了不错的进展。WAS是一种罕见的X连锁隐性遗传病, 多发于男性儿童, WAS基因突变可导致湿疹、血小板减少和免疫缺陷^[31]。WAS的基因治疗研究于2011年启动, 计划于2019年年底完成临床试验(NCT01347242), 该研究使用最先进的自灭活慢病毒载体, 对7位平均年龄7岁的儿童患者进行相关基因治疗并进行了9~42个月的随访, 发现7位患者中的1位死于先前就有的耐药性疱疹病毒感染; 其余6位患者的湿疹缓解且易感性明显降低, 表现出良好的临床获益^[32-33]。该方法最终能否被真正应用于临床, 还需进行更多患者和更长期的随访调查研究。

慢性肉芽肿病(chronic granulomatous disease, CGD)是由细胞色素b-245的 β 链(cytochrome b-245 beta chain, *CYBB*)基因突变引起的致死性遗传免疫缺陷病, 患者中性粒细胞减少, 易受细菌和真菌感染引发炎症性器官化脓^[34]。目前已有大量的CGD基因治疗临床前研究, 1995年到2010年期间的研究都是基于 γ -逆转录病毒载体开展的, 由于逆转录病毒会引入毒性导致结果一直不尽如人意^[35], 2010年以后, 研究从逆转录病毒逐渐向慢病毒转移。2015年开展了基于整合了*CYBB*基因的慢病毒载体的基因治疗临床试验(NCT02234934)^[36], 截至2019年2月公布的进展显示, 7例接受治疗的患者中有6位表现为临床受益, 中性粒细胞数量均高于临床受益所需标准, 且12个月后仍在中性粒细胞中检测到稳定的载体拷贝数, 并且所有患者均能停用预防性抗生素(<https://www.globenewswire.com>)。当然, 该治疗方法的安

全性和有效性仍需进一步验证。

3.1.2 遗传性血液病 基因治疗已经为多种遗传性血液病提供了可行的治疗方案。 β -地中海贫血症是全球最常见的罕见病之一, 每年估计有六万例 β -地中海贫血症婴儿出生。血红蛋白 β 亚基(hemoglobin subunit beta, *HBB*)基因突变导致的 β -球蛋白链异常可使病人严重贫血、生长发育迟缓甚至死亡^[37]。在此之前的治疗手段只有造血干细胞的同种异体移植, 2010年, CAVAZZANA-CALVO及其同事^[38]报道了首次成功地将基因治疗用于具有 β^+ / β^0 突变的 β 地中海贫血患者。最近, 一项I/II期的临床试验(NCT02453477)证实了慢病毒介导的基因治疗的安全性, 并且使成人患者输血需求降低, 3/4儿童患者基因治疗后可中止输血^[39]; 另一项THOMPSON及其同事^[40]开展的I/II期临床试验表明, 22位重症患者输血需求平均降低73%, 至少26个月未发生药物引起的严重不良事故。EMA于2019年5月29日批准了广东蓝鸟生物科技有限公司的基因治疗产品Zynteglo上市。

研究者在SCD上也进行了一些基因治疗的探索。多个针对不同靶向基因及载体的临床试验正如火如荼地进行中。2017年, 广东蓝鸟生物科技有限公司的新型慢病毒载体LentiGlobin BB305被用于SCD临床试验, 成功治愈了一名患者。经过15个月的治疗, 患者体内红细胞有一半以上得到恢复, 且不需要其他药物进行辅助治疗^[41]。

A型(缺少凝血因子VIII)和B型(缺少凝血因子IX)血友病的基因治疗目前也有了突破性进展。上世纪90年代, 复旦大学开展了慢病毒载体介导的B型血友病临床研究, 2016年, SPARK公司推出了治疗B型血友病的基因治疗产品SPK-9001, 并于2017年开展了相关临床试验(NCT03307980), 该产品利用AAV作为载体转导IX因子FIX, 成功治疗了10名患有严重FIX缺乏症的患者。结果表明, 患者对该产品具有良好的耐受性, FIX活性平均提高了33.8%^[42-43]。相比于B型血友病, 由复杂的*FVIII*基因突变导致的A型血友病还处在临床前研究阶段, 2018年开展的AAV介导的临床基因治疗试验(NCT03588299)正在招募病人, 期待未来实验数据的公布。

3.1.3 神经肌肉疾病 神经肌肉疾病是由运动神经元和中枢系统功能紊乱导致肌营养不良、肌束颤动、感觉异常的一类疾病, 包括帕金森病(Parkinson's

disease, PD)、脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)和亨廷顿病等。这些退行性神经系统疾病通常是由多个基因的复杂突变所导致的,在基因治疗的临床应用中极具挑战性。传统治疗手段对于神经肌肉类疾病都收效甚微,所以越来越多的研究人员将目光转向了更有潜力的基因治疗手段上来。

SMA是由于运动神经元蛋白1(survival of motor neuron 1, *SMN1*)基因缺失或突变引起的婴儿运动功能障碍。该病的4种亚型中1型SMA是导致婴儿死亡最常见的遗传性原因之一^[44]。AAV的全身性递送目前已经在SMA治疗上得到有效利用。2017年,15例1~8个月的婴儿患者接受了静脉注射AAV9以对致病基因*SMN1*进行替换,结果在20个月时均存活且临床受益明显^[45];FDA在2019年3月批准了基于该研究的基因治疗药物Zolgensma。

3.1.4 先天性黑蒙症 先天性黑蒙症是由十几种不同的基因突变导致的遗传性视网膜疾病,其中*RPE65*基因编码的酶对视觉色素生成至关重要,不接受治疗的患者大多会发展为严重或进行性失明^[46]。早在2007年美国和英国就开展了先天性黑蒙症基因治疗临床试验(NCT00516477),I期试验对3名患者进行了单侧视网膜膜内直接注射携带*RPE65*功能基因的腺病毒载体AAV2.h*RPE65*v2,结果表明,治疗效果良好,3名患者视力均得到改善,具备治疗耐受性^[13]。验证了基因治疗安全性和有效性后开展的I期剂量递增试验证明,儿童的临床受益最为明显^[47];2012年顺利开展了III期临床试验(NCT00999609),基于AAV2.h*RPE65*v2的基因治疗药物voretigene neparvovec-rzyl(Luxturna)经评估后被证实安全有效^[48]。最终,在2017年Luxturna获批上市,这是FDA首次批准的基因治疗产品。其次,另一款由Editas Medicine公司开发的基于CRISPR/Cas9系统的10型先天性黑蒙症(leber congenital amaurosis type 10, LCA10)基因治疗药物EDIT-101,于2019年9月26日正式开展I/II期临床试验(NCT03872479)^[49]。

3.2 获得性疾病

3.2.1 肿瘤 目前,有66%的基因治疗试验是针对肿瘤开展的^[25],人工改造的T淋巴细胞已经成为治疗癌症的有力工具,它是一种经过基因修饰以表达靶向肿瘤细胞抗原的嵌合抗原受体(CAR-T)的细胞,整合了单克隆抗体的抗原识别能力与T细胞的信号传导和杀伤能力^[9]。迄今为止,应用最广泛的是靶向

CD19的CAR-T细胞,CD19是在大多数B型淋巴瘤和白血病中发现的细胞表面抗原,2015年报道了对急性淋巴白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)儿童和成人患者进行单次自体CD19-CAR-T细胞的灌注实现淋巴去毒化治疗,完全缓解率高达90%^[50],这一突破性进展促使FDA批准了CD19-CAR-T基因治疗药物Kymriah。CAR-T为将来基于T细胞的其他癌症和疾病(例如自身免疫性疾病和艾滋病)的疗法奠定了坚实基础,目前已有大量的针对儿童和成人血液系统恶性肿瘤的CAR-T临床试验(NCT03081910、NCT02663297、NCT02932956等)正在进行。其他基因修饰的免疫细胞如NK和NK-T细胞等也都进入临床试验阶段。

3.2.2 感染性疾病 将基因治疗用于感染性疾病的研究集中于艾滋病和病毒性肝炎等难治病。目前艾滋病的治疗药物只能抑制病毒复制,而不能将其治愈。基因编辑的出现为艾滋病的基因治疗带来希望,基因编辑策略主要分靶向敲除辅助受体和靶向切除HIV前病毒2种。宾夕法尼亚大学医学院于2015年开展的临床试验(NCT02500849)利用锌指核酸酶技术(zinc finger nuclease, ZFN)定向敲除患者造血干细胞或祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)的HIV辅助受体*CCR5*并回输给患者,在体外HSPC的基因编辑效率可达72.9%,回输后的疗效有待进一步验证^[51]。2019年9月,XU等^[52]合作报道了首例利用CRISPR-Cas9在HSPCs中编辑*CCR5*基因并成功将其移植入HIV患者的基因治疗方法,发现携带*CCR5*突变的供体细胞能够在受体体内长期存活达19个月,并初步探索了该方法的可行性和安全性,但突变比例仅有5%,因此需要进一步优化治疗方法。

4 基因编辑在基因治疗中的应用

4.1 基因编辑进展概述

近年来,多种靶向核酸内切酶技术蜂拥而至,从第一代ZFN^[53]到第二代转录激活因子样效应物核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[54],再到现在的第三代CRISPR系统^[55],基因编辑技术得到了飞速发展和广泛应用。此三代基因编辑技术都是在靶基因目标位点引起双链断裂,激活细胞的修复机制(非同源末端连接、同源重组)进而实现特定的基因编辑目的^[56]。2012年,JINEK等^[55]利用CRISPR/Cas9系统对细菌真菌等微

生物实现了基因编辑,证明CRISPR/Cas9系统可以被作为一种可编程的DNA编辑工具。2013年1月,ZHANG实验室^[57]首次将CRISPR/Cas系统应用于哺乳动物和人类细胞,标志着CRISPR/Cas基因编辑系统在真正意义上进入了新时代。2016年,哈佛大学LIU团队^[58-59]首次开发出了不引起双链断裂且无需同源模板就能实现单碱基转换的BE(base editing)技术。2019年10月,LIU团队^[60]又开发出了PE(prime editor)精准基因编辑工具,可实现12种单碱基的任意转换与增删,理论上可修复89%的人类遗传病基因^[5]。工程化缺陷型核酸酶(dCas9)的出现,也使表观基因组编辑和转录调控成为可能。目前开展的研究主要集中于寻找新的基因编辑工具、减少脱靶效应、提高编辑效率和减少免疫原性等方面。如今,世界范围内多家实验室都在致力于开发更小的Cas9系统解决AAV病毒包装的难题。SaCas9是第一个被用于基因治疗研究的小型Cas9^[7],SaCas9以及随后出现的CjCas9^[61]、NmeCas9^[62]等小型Cas9都因为编辑范围和编辑效率的问题而没有被广泛应用。2020年4月,复旦大学王永明课题组和王红艳课题组^[63]联合开发的小型Cas9-SauriCas9,具有比SaCas9更广谱的原间隔序相邻基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)位点以及和SpCas9相当的编辑效率,促进了小型Cas9编辑工具的发展。2020年3月,美国麻省总医院的研究人员^[64]通过基因改造设计出了2种不需要PAM(PAMless)就能实现结合并切割目标位点的Cas9蛋白变体SpG和SpRY,为一些位于“不可编辑”区域的人类疾病相关基因突变的基因编辑治疗创造了可能。

4.2 基因编辑的治疗应用

前文提到的基因治疗重大进展大多是基于逆转录病毒或慢病毒直接导入外源基因的,但病毒始终存在随机整合的致癌风险,因此基因编辑成了人们考虑的又一高效精确整合的方案。目前,基因编辑技术已经在多种单基因遗传病、肿瘤和感染性疾病等的基因治疗上得到有效利用。基因编辑主要的应用方法包括基因敲除、基因敲入、基因敲低和单碱基编辑等。

4.2.1 基因敲除(knock out, KO)

基因敲除是基因编辑工具的一个重要功能,可实现目标基因的失活或激活。基因敲除策略在代谢类疾病的研究中应用较多,多数通过阻断代谢上游通路或者直接将负调

控蛋白进行敲除以达到基因治疗目的。已有研究者利用Cas9对小鼠肝细胞中的4-羟基苯丙酮酸双氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, *Hpd*)基因进行完全敲除,以改变酪氨酸的代谢途径,成功治疗了I型酪氨酸血症小鼠^[65];2015年,ZHANG实验室^[7]研究证明,对于家族性高胆固醇血症,无论是SpCas9还是更小的SaCas9都可用于靶向小鼠肝脏的原蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, *Pcsk9*)基因并对其进行敲除,明显降低了血液中低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的表达水平。DMD是由肌营养不良蛋白基因(*Dmd*)的移码突变导致的,其中44号外显子突变是最常见的原因之一,最近有研究者使用编码Cas9的AAV9和sgRNA成功地在小鼠模型和患者诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)上对44号外显子的突变进行校正,有效提升了Dystrophy蛋白的表达量^[66],这一思路有望被应用于DMD患者的临床治疗试验。2018年,LIU团队^[8]利用阳离子脂质体介导了gRNA-Cas9复合体的核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP),对人类遗传性耳聋的模型小鼠贝多芬小鼠的跨膜通道1(transmembrane channel like 1, *Tmc1*)基因中的腺嘌呤核苷酸A进行敲除使该错义基因失活,减少错义TMC1蛋白的表达,但同时保留了野生型基因,保证正常听力功能实现,大大减少了进行性听力损失。

4.2.2 基因敲入(knock in, KI)

不同于基因敲除,基因敲入适用于因某些关键基因失活而导致的遗传性疾病,可利用同源重组的方式进行点突变或者大片段cDNA敲入。2016年,WILSON实验室^[19]利用双AAV载体静脉注射的形式分别递送SaCas9和修复DNA模板治疗高血氨症的小鼠,实现了10%的新生鼠肝细胞鸟胺酸氨甲酰基转移酶(ornithine carbamoyltransferase, OTC)的功能恢复效率。研究人员还在小鼠中利用不同的形式递送Cas9和供体DNA治疗I型酪氨酸血症,结果也证明该方法可在成年动物中实现基因编辑,且具有纠正人类相关疾病的潜力^[67]。2019年9月,LIU团队^[68]通过慢病毒和AAV病毒载体递送CRISPR/Cas9系统,首次在新生小鼠体内成功实现了铜转运ATP酶(ATPase copper transporting beta, *Atp7b*)基因上8号外显子的替换,为威尔逊病的治疗提供了新的方向,扩展了CRISPR/Cas9在基因治疗中的应用。

4.2.3 基因敲低(knock down, KD) 基因敲低是通过寡核苷酸特异性降解mRNA,减少基因功能表达的一种技术手段。RNA干扰(RNA interference, RNAi)机制是FIRE和MELLO^[69]于1998年首次发现的,这种机制存在于几乎所有真核细胞中,通过短的双链RNA抑制或降解同源mRNA实现基因敲低^[70]。2018年8月,Alnylam制药公司研发的RNAi基因治疗药物Patisiran经FDA与EMA批准上市,它不仅是全球首款获批的RNAi治疗药物,也是美国第一次批准上市的治疗遗传性转甲状腺淀粉样多发性神经病变(hereditary transthyretin amyloidosis, hATTR)的药物。Patisiran的批准为hATTR患者带来了希望,开启了RNAi治疗领域的新篇章^[71]。如今,针对肝脏、肾脏和眼部适应症的多重RNAi候选药物正在进行I、II、III期临床试验(临床试验号分别为NCT03060577、NCT03672188、NCT02631096),并且在未来两年有望实现针对中枢神经系统和其他非肝组织的RNAi治疗^[72]。

4.2.4 单碱基编辑(base editing, BE) BE系统的出现,使单碱基突变类型的遗传病有了新的治疗思路。BE系统在不需双链断裂和外源基因的情况下实现了基因上一种碱基向另一种碱基的化学转换,极大地避免了双链断裂造成的缺失和随机插入突变,使基因编辑的结果更有预测性。2018年10月,有研究利用AAV载体递送CBE系统在子宫中靶向肝脏细胞*Pcsk9*基因和*Hpd*基因治疗I型酪氨酸血症小鼠,成功实现了出生前在子宫中的碱基编辑基因治疗^[4]。同年,韩国首尔大学利用反式剪接的AAV病毒介导ABE系统递送到DMD小鼠的肌肉中纠正20号外显子的一个无义突变,恢复了17%的dystrophin蛋白表达,有效改善了小鼠肌肉功能^[6]。LIU团队^[5]发布的PE碱基编辑器,可以实现包括靶向插入、缺失和所有12种类型的点突变,而无需双链断裂和供体DNA模板。他们在HEK293T细胞系上使用PE系统编辑*HBB*基因和己糖胺酶 α 亚基(hexosaminidase subunit alpha, *HEXA*)基因,有效纠正SCD和泰-萨二氏病。2019年6月,YANG团队^[73]发现,CBE系统和ABE系统均存在大量的RNA脱靶现象,可能导致癌基因和抑癌基因的突变,具有较强的致癌风险。因此解决脱靶问题,寻求高保真的变体,单碱基编辑系统才能更好的被应用于基因治疗。

关于基因编辑被用于基因治疗的临床前研究已经大量开展,也有一些相对成熟的研究进入了

临床试验阶段。2014年开展了第一项证明基因编辑可行性的临床试验,利用ZFN技术敲除*CCR5*基因使艾滋病患者的CD4⁺T细胞得以抵抗HIV病毒。尽管该疗法的效果有限,但也为之后的艾滋病基因编辑策略的临床试验铺平了道路^[51]。此外,使用CRISPR/Cas9治疗 β -地中海贫血的临床试验(NCT03655678、NCT03728322)已于2018年9月被批准在美国开展;同年11月,美国FDA批准了一项由Editas Medicine公司开发的基于CRISPR-Cas9技术的临床实验(NCT03872479),验证EDIT-101疗法用于遗传性视网膜衰退疾病LAC10(Leber先天性黑蒙症中的一种)的治疗效果,且于2019年9月26日正式开展II期临床试验^[49]。

在非遗传性疾病中,如非遗传性眼部疾病、艾滋病、癌症等使用基因编辑进行基因治疗的应用研究也都在有序开展。

除了基因编辑在基因治疗领域取得了不错的进展外,组合基因表达也逐渐被应用于基因治疗。如当今流行的CAR-T细胞治疗,就是通过基因修饰的嵌合抗原受体(CAR-T)表达靶向肿瘤细胞的抗原达到杀死肿瘤细胞的作用进行癌症治疗^[9]。

5 面临的问题

和其他的创新策略一样,基因治疗也面临着诸多问题。除有效性外,安全性、伦理问题等都在无形中阻碍了基因治疗前进的脚步。

5.1 安全性

安全性是治疗任何人类疾病过程中首先应该关注的问题,在安全性得到保障的前提下疗效才更有说服力。如前所述,大多数临床基因治疗策略都使用了病毒载体,而病毒自身的特性不可避免地带来了2个问题,一个是可能随机整合或激活原癌基因导致异常或不受控制的细胞增殖,另一个是病毒载体(尤其是逆转录病毒)自身的免疫原性会引起机体免疫反应。AAV作为新的病毒载体,安全隐患和免疫原性较之前大大降低,而彻底消除病毒载体的毒性或者寻求替代载体降低其免疫原性是未来研究的方向。基因编辑的脱靶效应也不容忽视,一旦脱靶效应发生在重要功能基因上会造成不必要的安全风险,因此深度测序在基因编辑的应用中是必不可少的环节。CAR-T细胞的免疫反应也引起了人们的关注,几乎所有CD19-CAR-T临床试验中都报道

了严重的毒性, 其中细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)是最常见的一种, 重度CRS会导致全身炎症反应^[9]。

5.2 伦理问题

随着基因治疗和基因编辑的发展, 人们对于其中引发的伦理问题提出了疑问。尤其是近年来许多新基因编辑工具出现, 但其用于人体试验的安全性和有效性数据尚不完善, 因而引发社会广泛的讨论。目前对生殖细胞基因编辑的讨论最为激烈, 因为由此产生的遗传变化很可能会传给下一代, 从而使人们的关注点扩大到被治疗者之外^[74]。为了解决日益激烈的伦理问题, 美国国家科学院和美国国家医学会建立国际委员会, 在2017年2月发表了使用可遗传的基因编辑进行临床试验的规范化具体建议^[75]。今后的基因治疗发展, 需要更加严格的监管制度来规范在体细胞和生殖细胞上的基因治疗探索。

6 基因治疗的未来

基因治疗的进步为许多疾病的治疗提供了新的思路, 也让无数患者看到了希望。努力提高基因治疗的安全性和有效性是科研工作者们不可间断的重要工作。尽管一些基因治疗应用已初见成效, 但基因编辑技术的兴起让基因治疗再一次步入了全新的起点, 发展和寻求更高效的基因编辑系统, 是促进基因治疗发展更加有力的助推器。监管部门的辅助工作无疑也会加快基因治疗的进步, 近年来越来越多的基因治疗产品获批上市, 意味着监管部门对基因治疗相关研究的重视和认可, 继续完善监管制度、解决伦理冲突、促进基因治疗产品不断升级也是监管部门义不容辞的责任。不难想象, 基因治疗在不久的未来会以主流治疗手段的姿态登上疾病治疗的历史舞台。

参考文献 (References)

- [1] DUNBAR C E, HIGH K A, JOUNG J K, et al. Gene therapy comes of age [J]. *Science*, 2018, 359(6372): eaan4672.
- [2] STEFFIN D H M, HSIEH E M, ROUCE R H. Gene therapy: current applications and future possibilities [J]. *Adv Pediatr*, 2019, 66: 37-54.
- [3] NATHWANI A C, DAVIDOFF A M, TUDDENHAM E G D. Gene therapy for hemophilia [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2017, 31(5): 853-68.
- [4] ROSSIDIS A C, STRATIGIS J D, CHADWICK A C, et al. In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1513-8.
- [5] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-57.
- [6] RYU S M, KOO T, KIM K, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 536-9.
- [7] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-91.
- [8] GAO X, TAO Y, LAMAS V, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents [J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 217-21.
- [9] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-5.
- [10] 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): 475-80.
- [11] LEHRMAN S. Virus treatment questioned after gene therapy death [J]. *Nature*, 1999, 401(6753): 517-8.
- [12] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 [J]. *Science*, 2003, 302(5644): 415-9.
- [13] MAGUIRE A M, SIMONELLI F, PIERCE E A, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(21): 2240-8.
- [14] WENG C Y. Bilateral subretinal voretigene neparvovec-rzyl (luxturna) gene therapy [J]. *Ophthalmol Retina*, 2019, 3(5): 450.
- [15] LUNDSTROM K. Viral vectors in gene therapy [J]. *Diseases*, 2018, 6(2): 42.
- [16] WANG D, TAI P W L, GAO G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358-78.
- [17] ASOKAN A, SCHAFFER D V, SAMULSKI R J. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(4): 699-708.
- [18] TORNABENE P, TRAPANI I, MINOPOLI R, et al. Intein-mediated protein trans-splicing expands adeno-associated virus transfer capacity in the retina [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(492): eaav4523.
- [19] YANG Y, WANG L, BELL P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 334-8.
- [20] MILONE M C, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. *Leukemia*, 2018, 32(7): 1529-41.
- [21] FOLDVARI M, CHEN D W, NAFISSI N, et al. Non-viral gene therapy: gains and challenges of non-invasive administration methods [J]. *J Control Release*, 2016, 240: 165-90.
- [22] RUI Y, WILSON D R, GREEN J J. Non-viral delivery to enable genome editing [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(3): 281-93.
- [23] RYU N, KIM M A, PARK D, et al. Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2095-102.
- [24] SHAHBAZI R, SGHIA-HUGHES G, REID J L, et al. Targeted homology-directed repair in blood stem and progenitor cells with CRISPR nanoformulations [J]. *Nat Mater*, 2019, 18(10): 1124-32.
- [25] GINN S L, AMAYA A K, ALEXANDER I E, et al. Gene therapy

- clinical trials worldwide to 2017: an update [J]. *J Gene Med*, 2018, 20(5): e3015.
- [26] CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [J]. *Science*, 2000, 288(5466): 669-72.
- [27] 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): 2410-3.
- [28] CICALESE M P, FERRU A F, CASTAGNARO L, et al. Update on the safety and efficacy of retroviral gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency [J]. *Blood*, 2016, 128(1): 45-54.
- [29] AIUTI A, RONCAROLO M G, NALDINI L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an *ex vivo* gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(6): 737-40.
- [30] CHHABRA A, RING A M, WEISKOPF K, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in immunocompetent hosts without radiation or chemotherapy [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(351): 10.
- [31] OCHS H D, THRASHER A J. The Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(4): 725-38.
- [32] HACEIN-BEY ABINA S, GASPAR H B, BLONDEAU J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *JAMA*, 2015, 313(15): 1550-63.
- [33] ELFEKY R A, FURTADO-SILVA J M, CHIESA R, et al. One hundred percent survival after transplantation of 34 patients with Wiskott-Aldrich syndrome over 20 years [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(5): 1654-6.e7.
- [34] HOLLAND S M. Chronic granulomatous disease [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2010, 38(1): 3-10.
- [35] KELLER M D, NOTARANGELO L D, MALECH H L. Future of care for patients with chronic granulomatous disease: gene therapy and targeted molecular medicine [J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2018, 7(suppl_1): S40-4.
- [36] BRENDEL C, ROTHE M, SANTILLI G, et al. Non-clinical efficacy and safety studies on G1XCGD, a lentiviral vector for *ex vivo* gene therapy of X-linked chronic granulomatous disease [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2018, 29(2): 69-79.
- [37] FINOTTI A, BREDA L, LEDERER C W, et al. Recent trends in the gene therapy of beta-thalassemia [J]. *J Blood Med*, 2015, 6: 69-85.
- [38] CAVAZZANA-CALVO M, PAYEN E, NEGRE O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia [J]. *Nature*, 2010, 467(7313): 318-22.
- [39] MARKTEL S, SCARAMUZZA S, CICALESE M P, et al. Intra-bone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent ss-thalassemia [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 234-41.
- [40] THOMPSON A A, WALTERS M C, KWIATKOWSKI J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(16): 1479-93.
- [41] RIBEIL J A, HACEIN-BEY-ABINA S, PAYEN E, et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease [J]. *New Engl J Med*, 2017, 376(9): 848-55.
- [42] HIGH K A, GEORGE L A, EYSTER M E, et al. A phase 1/2 trial of investigational Spk-8011 in hemophilia a demonstrates durable expression and prevention of bleeds [J]. *Blood*, 2018, 132(Supplement 1): 487.
- [43] HARTMANN J, CROTEAU S E. 2017 Clinical trials update: innovations in hemophilia therapy [J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(12): 1252-60.
- [44] KOLB S J, KISSEL J T. Spinal muscular atrophy [J]. *Neurol Clin*, 2015, 33(4): 831-46.
- [45] 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): 1713-22.
- [46] CIDECIYAN A V. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29(5): 398-427.
- [47] MAGUIRE A M, HIGH K A, AURICCHIO A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2009, 374(9701): 1597-605.
- [48] RUSSELL S, BENNETT J, WELLMAN J A, 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 [J]. *Lancet*, 2017, 390(10097): 849-60.
- [49] KIM J, JO D, LEE J, et al. CRISPR/Cas9-mediated therapeutic editing of Rpe65 ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(16): 2985.
- [50] MAUDE S L, TEACHEY D T, PORTER D L, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2015, 125(26): 4017-23.
- [51] DIGIUSTO D L, CANNON P M, HOLMES M C, et al. Pre-clinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 3: 16067.
- [52] XU L, WANG J, LIU Y, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240-7.
- [53] MANI M, KANDAVELOU K, DY F J, et al. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(2): 447-57.
- [54] KAY S, HAHN S, MAROIS E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator [J]. *Science*, 2007, 318(5850): 648-51.
- [55] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [56] MUSUNURU K. The hope and hype of CRISPR-Cas9 genome editing: a review [J]. *JAMA Cardiol*, 2017, 2(8): 914-9.
- [57] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [58] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-4.
- [59] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.

- [60] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-51.
- [61] KIM E, KOO T, PARK S W, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500.
- [62] AMRANI N, GAO X D, LIU P, et al. NmeCas9 is an intrinsically high-fidelity genome-editing platform [J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 214.
- [63] HU Z, WANG S, ZHANG C, et al. A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus auricularis* (SauriCas9) expands the DNA targeting scope [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(3): e3000686.
- [64] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368(6488): 290-6.
- [65] PANKOWICZ F P, BARZI M, LEGRAS X, et al. Reprogramming metabolic pathways *in vivo* with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12642.
- [66] MIN Y L, LI H, RODRIGUEZ-CAYCEDO C, et al. CRISPR-Cas9 corrects duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(3): 12.
- [67] YIN H, XUE W, CHEN S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551-3.
- [68] LIU L, CAO J, CHANG Q, et al. *In vivo* exon replacement in the mouse *Atp7b* gene by the Cas9 system [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(9): 1079-92.
- [69] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-11.
- [70] WITTRUP A, LIEBERMAN J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics [J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(9): 543-52.
- [71] ADAMS D, GONZALEZ-DUARTE A, O'RIORDAN W D, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(1): 11-21.
- [72] SETTEN R L, ROSSI J J, HAN S P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(6): 421-46.
- [73] ZHOU C, SUN Y, YAN R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis [J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-8.
- [74] COLLIER B S. Ethics of human genome editing [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 289-305.
- [75] SCHEUFELE D A, XENOS M A, HOWELL E L, et al. SCIENCE AND SOCIETY U.S. attitudes on human genome editing [J]. *Science*, 2017, 357(6351): 553-4.