

基因疗法治疗 nAMD 的相关临床试验及前景展望

张玮 综述 颜华 审校

天津医科大学总医院眼科 300052

通信作者:颜华,Email:zyyanhua@tmu.edu.cn

【摘要】 新生血管性年龄相关性黄斑变性(nAMD)是老年人群主要的致盲眼病之一,早发现、早治疗尤为重要。目前,nAMD 的治疗主要为抗血管内皮生长因子(VEGF)和激光治疗等对症疗法,这并不能解决 nAMD 持续性活动的问题,反复治疗增加患者的经济负担,也增加了眼压升高、炎症反应等并发症的发生。近年来,基因疗法的广泛应用为 nAMD 的治疗带来了更多可能。它以病毒为载体,将目的基因 cDNA 与载体组合,利用病毒感染宿主细胞的特点,实现了目的基因在宿主细胞内的表达。在动物实验成功的基础上,国内外学者相继开展 I 期、II 期临床试验,其靶点有色素上皮衍生因子、RNA 干扰、可溶性 VEGF 受体-1、内皮抑素和血管抑素、抗人 VEGF 抗体片段、可溶性 CD59、阿柏西普、补体因子 I 等,取得了一定的成效,但也暴露出一些问题。本文就基因疗法治疗 nAMD 的机制、临床试验研究进展及存在的问题进行综述,并提出未来基因疗法的前景展望。

【关键词】 新生血管性黄斑变性; 基因疗法; 临床试验

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81830026); 天津市重大疾病防治科技重大专项(18ZXDBSY00030)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210113-00033

Related clinical trials and prospects of gene therapy for neovascular age-related macular degeneration

Zhang Wei, Yan Hua

Department of Ophthalmology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Yan Hua, Email: zyyanhua@tmu.edu.cn

[Abstract] Neovascular macular degeneration (nAMD) is one of the main eye diseases causing blindness in the elderly population. Early detection and early treatment are particularly important. At present, the treatment of nAMD is mainly symptomatic, including anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and laser treatment etc., which can not solve the problem of persistent disease activity of nAMD. Repeated treatment increases the economic burden of patients, and also the incidence of complications, such as increased intraocular pressure and inflammatory reaction. In recent years, the extensive application of gene therapy has brought more possibilities for the treatment of nAMD. It takes virus as the vector, combines the cDNA of target genes with the vector, and realizes the expression of target genes in the host cell by making use of the virus infecting host cells. Based on the successful animal experiments, phase I and phase II clinical trials with pigment epithelium derived factor, RNA interference, soluble VEGF receptor 1, endostatin and angiostatin, anti-VEGF Fab, soluble CD59, aflibercept, complement factor I, etc. as targets have been conducted at home and abroad. Certain achievements have been made, but some problems are also exposed. In this paper, the mechanism, research progress of clinical trials and existing problems of gene therapy for nAMD were reviewed, and the prospect of gene therapy in the future was proposed.

[Key words] Neovascular macular degeneration; Gene therapy; Clinical trial

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81830026); Major Special Science and Technology Project of Major Disease Prevention and Control in Tianjin (18ZXDBSY00030)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210113-00033

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)患者多为 50 岁以上人群,双眼先后或同时发病,视力进行性损害,是发达国家老年人群的主要致盲眼病之一。据估

计,2040 年 AMD 人数将达到 2.88 亿^[1]。伴随着人口老龄化的发展,AMD 的发病率、患病率将逐年升高。新生血管性年龄相关性黄斑变性(neovascular age-related macular degeneration,

nAMD) 又称湿性 AMD, 主要特点为脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成^[2]。虽然 nAMD 患病人群的比例明显低于干性 AMD, 但却是 90% 以上 AMD 患者视力下降, 甚至视力丧失的主要原因^[3], 因而对 nAMD 患者进行早期干预和及时治疗尤为重要。

1 nAMD 的治疗方法

目前, nAMD 的治疗方法主要是抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和激光治疗。抗 VEGF 药物包括哌加他尼钠、贝伐单抗、雷珠单抗、阿柏西普和 Brolocizumab 等, 患者往往需要重复注射, 不仅增加经济负担, 也增加了玻璃体腔内注射带来的严重并发症^[4]。许多 nAMD 患者抗 VEGF 药物治疗后效果欠佳, 主要原因为: (1) CNV 病灶反复活动, 导致视网膜水肿、渗出及出血, 影响视力; (2) 出现局部组织纤维化或萎缩, 损害视功能^[5]。激光治疗包括传统的激光光凝、光动力疗法和经瞳孔温热疗法, 其只对已形成的 CNV 有效, 不能阻止早期 AMD 的发展, 仅限于晚期 AMD 的治疗^[6-7]。

虽然抗 VEGF 疗法为目前 nAMD 的主流治疗方法, 但其只靶向新生血管生成, 并不能抑制 nAMD 其他致病通路的激活, 如氧化应激、炎症反应等^[8]。此外, 抗 VEGF 治疗后复发率较高, 不能解决 nAMD 持续性活动的问题, 因而亟需寻找一个长效、持续、缓释的临床治疗方法^[9-10]。近年来, 基因疗法的广泛应用为 nAMD 的治疗带来了更多可能。通过延长治疗间隔, 其可进一步提高疗效并降低治疗成本^[11], 还可靶向 nAMD 多个发病机制的位点。基因疗法在动物实验中显示出的良好效果, 促使其治疗 nAMD 临床试验的进一步开展, 探寻其安全性和有效性。

2 基因疗法治疗 nAMD 的机制

基因疗法通常以腺病毒 (adenovirus, Ad)、腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 或慢病毒作为载体^[12], 将目的基因 cDNA 与载体组合, 利用病毒感染宿主细胞的特点, 实现目的基因在宿主细胞内的表达。不同的是, Ad、AAV 不能整合, 而慢病毒可将外源基因整合到宿主细胞基因组中, 具有更稳定的转基因能力^[13]。基因疗法通常使用玻璃体腔内或视网膜下注射的方法将药物导入病变组织, 实现内源性蛋白在眼中的持续表达, 达到抑制 CNV 形成和发展的目的^[14]。

3 不同基因治疗 nAMD 的临床试验

关于 nAMD 的基因疗法, 早期靶点为色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF)、可溶性 VEGF 受体-1 (soluble VEGF receptor 1, sFlt-1)、内皮抑素和血管抑素、ADVM-022、可溶性 CD59 (soluble CD59, sCD59) 等, 均进入临床试验阶段, 结果显示安全性较好^[14]。随着基础研究的深入, 动物实验的成功施行行为基因疗法治疗 nAMD 的临床试验带来了更多可选择的靶点, 如缺氧诱导因子、血小板衍生生长因子^[15-16] 等。下面就 PEDF、RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)、sFlt-1、内皮抑素和血管抑素、抗人 VEGF 抗体片段、sCD59、阿柏西普、GT005 基因治疗 nAMD 的临床试验逐一介绍。

3.1 PEDF

PEDF 是眼中的强血管生成抑制剂, 最初在人类胎儿视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞中检测到, 在血管生成、神经保护、纤维生成和炎症反应等各种生理和病理机制中发挥至关重要的作用^[17]。

早在 2001 年, Rasmussen 等^[18] 分别在鼠激光诱导的 CNV 模型、VEGF 转基因模型及早产儿视网膜病变模型中, 证明了 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 颗粒单位 (pu) 的 Ad (GV) PEDF 可显著抑制新生血管形成, 抑制率高达 85%, 该研究促使了首个基因疗法治疗 nAMD 临床试验的进行。2006 年, Campochiaro 等^[19] 发布了 28 例晚期 nAMD 患者的 I 期临床试验 (NCT00109499) 结果, 患者接受单次玻璃体腔内注射表达人 PEDF 的 E1、E3、E4 部分缺失的 Ad 载体 (AdPEDF. 11), 剂量范围为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ pu, 结果显示未见严重的剂量限制性毒副作用或与药物相关的不良事件, 25% 的患者出现轻度、短暂的眼内炎症, 6 例患者的眼压升高, 可通过局部用药控制, 所有 Ad 培养均为阴性。剂量高达 $1 \times 10^{9.5}$ pu 的 AdPEDF. 11 安全且耐受良好, I 期临床试验着重于药物安全性的评价, 由于缺少随机对照, 无法得出 AdPEDF. 11 的疗效性结论, 但其结果潜在表明接受高剂量载体 ($> 1 \times 10^8$ pu) 治疗的患者中, CNV 病变更易保持稳定或面积有所减小, 可能发生剂量递增反应, 从而为 II 期临床试验疗效性的评价提供了基础。

然而, Ad 载体的安全性令人担忧, 严重死亡事件的发生限制了以 Ad 为载体临床试验的进行^[20], 这也是 AdPEDF. 11 临床试验没有继续下去的可能原因之一。后来学者们以 AAV 为载体表达 PEDF, 在小鼠模型中尚未发现病毒毒性, 且显著抑制 CNV 的渗漏^[21-22], 提示了基因疗法未来临床试验的方向。

3.2 RNAi

小干扰 RNA (small interferon RNA, siRNA) 是调节基因表达的双链 RNA, 通过 RNAi 导致基因选择性沉默^[23]。Bevasiranib 是首个用于治疗 nAMD 的小分子 RNAi 药物, 是一种 VEGF 的细胞内转录抑制剂^[24]。分别在 2004 年和 2007 年进行的 I 期和 II 期临床试验 (NCT00722384/NCT00259753) 的早期结果显示出 Bevasiranib 治疗 nAMD 的潜力^[25], 然而, 至今尚无资料详细介绍其结果。由于不太可能达到主要终点, 因而终止了 III 期临床试验 (NCT00499590)。

siRNA-027 也称为 AGN 211745, 可靶向人、食蟹猴、小鼠和大鼠 VEGFR-1 mRNA 分子的保守区域, 诱导 VEGFR-1 基因沉默。2007 年, Kaiser 等^[26] 招募了 26 例中位年龄 82 岁的 nAMD 患者, 接受单剂量的 siRNA-027 (100、200、400、800、1 200 或 1 600 $\mu\text{g}/\text{眼}$), 结果显示未发现剂量限制性毒性, 不良事件的严重程度为轻度到中度, 视力和中央凹厚度稳定或改善。siRNA-027 的 I 期临床试验 (NCT00363714) 已表明其安全性, 但由于无法达到所需的视敏度目标, 以及 siRNA 直接激活 Toll 样受体 3 相关的脱靶效应, 进而可能对血管和免疫系统产生不良影响, 因而终止了 II 期临床试验 (NCT00395057)^[27]。

PF-04523655 是一种通过 RNAi 抑制缺氧诱导基因 *RTP801* 表达的 siRNA, 2007 年的 I 期临床试验 (NCT00725686) 已在 27 例 nAMD 患者中表明单次玻璃体腔内注射 PF-0523655 \leq

3 000 μg 安全且耐受性良好^[28]。II 期临床试验 (NCT00713518) 招募了 151 例 nAMD 患者, 结果显示 PF-04523655 与雷珠单抗联合治疗的效果优于单药治疗^[29]。

siRNA 靶向性差, 容易发生脱靶效应; 稳定性不高, 容易被酶降解, 难以实现其目标活动; 且在某些情况下可能触发不可预测的免疫反应, 导致临床试验效果不佳, 这些特点限制了其在临床治疗中的应用^[23]。

3.3 sFlt-1

sFlt-1 是 VEGF 的内源性抑制剂, 过量的 sFlt-1 可以与 VEGF 高亲和力结合, 从而中和 VEGF^[30]。sFlt01 是一种新型融合蛋白, 它由人 VEGFR-1/Flt-1 的 VEGF 结合域组成, 该结合域通过聚甘氨酸接头与人 IgG1 的 Fc 部分融合, 可与人 VEGF 结合^[31]。

2010 年, The Lions Eye Institute 和 Adverum Biotechnologies 合作, 在美国 4 家诊所进行了 I 期临床试验 (NCT01024998), 研究 AAV2-sFlt01 玻璃体腔内注射的安全性和有效性, 在注射 AAV2-sFlt01 后的多个时间点, 测定 19 例患者房水中 sFlt01 的表达水平, 结果显示在注射 2×10^8 、 2×10^9 或 6×10^9 载体基因 (vector genomes, vg) 后的任何时间点, 房水中均未检测到 sFlt01, 但在接受 2×10^{10} vg 注射的 10 例患者中, 有 5 例患者检测出 sFlt01 的峰值, 提示可能存在剂量效应, 仅 1 例出现眼内炎症, 局部类固醇治疗后缓解, 并且在停止治疗后未复发。这 5 例患者中, 有 4 例患者抗 AAV2 血清抗体 (AAV2 的中和抗体) 呈阴性, 另 1 例患者的滴度非常低, 为 1:100; 另外 5 例给予 2×10^{10} vg 而无 sFlt01 表达的患者中, 4 例患者抗 AAV2 血清抗体滴度非常高, 1 例无中和抗体, 认为抗 AAV2 滴度高的患者可能不是 AAV2 基因治疗的良好候选者, 但抗体滴度和载体剂量并非影响转基因表达的唯一因素, 需要进一步研究结论的正确性以及 AAV2-sFlt01 的安全性及疗效^[32]。

随后在 2011 年, nAMD 患者视网膜下注射 rAAV. sFlt-1 的 I 期、II a 期临床试验 (NCT01494805) 在澳大利亚顺利进行。I 期临床试验中, 招募的 9 例患者均都在第 0 天及第 4 周接受玻璃体腔内注射雷珠单抗的治疗。在第 7 天, 8 例患者被随机分配, 3 例接受 1×10^{10} vg 治疗 (低剂量组), 3 例接受 1×10^{11} vg 治疗 (高剂量组), 2 例不接受基因治疗 (对照组), 从第 8 周开始, 每 4 周进行 1 次随访, 直至第 52 周, 共 12 次随访。随访中观察患者的最佳矫正视力 (best corrected visual acuity, BCVA)、光相干断层扫描和荧光素眼底血管造影 (fluorescein fundus angiography, FFA) 结果, 必要时对患者进行雷珠单抗抢救治疗。治疗组中 6 例患者有 4 例不需要抢救治疗, 占 67%, 2 例患者需要 1 次抢救治疗, 占 33%。在 52 周内进行多次评估, 均未出现明显眼内炎、眼压升高及视网膜脱离等不良反应。第 52 周的随访结果显示, 每例患者的 BCVA 和视网膜厚度均得到改善或保持稳定。在此基础上, 研究者对其中 6 例患者进行了为期 36 个月的安全性评估, 结果显示 rAAV. sFlt-1 视网膜下注射的耐受性和安全性良好, 未见眼部及全身严重不良反应发生, 绝大多数受试者的 BCVA 在 18 个月时保持稳定^[33-34]。

I 期临床试验已证明视网膜下注射 rAAV. sFlt-1 的安全性和耐受性, 由于样本量小, 不能进行统计学分析, 促使了 2012

年 II a 期临床试验的进行, 招募的 32 例患者在第 0 天和第 4 周接受雷珠单抗玻璃体腔内注射, 基因治疗组 21 例患者在第 7 天接受 rAAV. sFlt-1 (1×10^{11} vg) 视网膜下注射, 对照组 11 例不做处理, 结果表明未见与基因治疗相关的严重不良反应, 基因治疗组和对照组从第 0 天到第 52 周, BCVA 的中位数变化分别为 1.0 (-3.0, 9.0) ETDRS 字母和 -5.0 (-17.5, 1.0) ETDRS 字母。然而对照组的结果很可能是由于其中 3 例患者的并发症导致视力下降 (>20 个 ETDRS 字母), 当去除这 3 个受试者的数据后, 基因治疗组和对照组之间的 BCVA 变化量比较差异无统计学意义^[35]。视网膜下注射 rAAV. sFlt-1 是安全的, 但是仍需扩大样本量进行进一步的临床试验以证明视网膜下注射 rAAV. sFlt-1 的可行性。

3.4 内皮抑素和血管抑素

内皮抑素可抑制血管内皮细胞的增生、迁移, 也可与 VEGFR-2 结合, 从而竞争性阻断 VEGF^[36], 血管抑素可抑制血管内皮细胞增生, 二者均是内源性血管生成抑制剂^[37]。

Campochiaro 等^[38] 在美国 3 个临床中心进行了开放标签、剂量递增的 I 期临床试验 (NCT01301443), 该试验首次以慢病毒马传染性贫血病毒 (lentiviral equine infectious anemia virus, EIAV) 作为载体, 表达了内皮抑素和血管抑素 (RetinoStat[®]), 旨在测试其安全性及表达谱。招募的 21 例晚期 nAMD 患者中, 3.3 和 15 例患者分别接受视网膜下注射 2.4×10^4 、 2.4×10^5 和 8.0×10^5 转导单位 (TU) 的 RetinoStat[®], 结果显示每种剂量均具有良好的耐受性, 没有剂量限制的毒性, 仅 1 例患者出现因视网膜下注射导致的黄斑裂孔; 房水中内皮抑素和血管抑素的水平与载体剂量相关, 眼内持续表达高水平的内皮抑素和血管抑素可能会减少 FFA 中 CNV 的渗漏, 但不能消除晚期 nAMD 患者的视网膜下和/或视网膜内积液, 未提供有力的证据表明 RetinoStat[®] 的治疗益处, 但其证明了视网膜下注射 EIAV-RetinoStat[®] 安全且耐受性良好, 并可提供持续的转基因表达, 其疗效仍有待进一步临床试验验证。在此基础上, Campochiaro 等^[38] 又进行新的临床试验 (NCT01678872), 进行 RetinoStat[®] 治疗 nAMD 患者的后续研究, 旨在检验其长期安全性, 该试验仍在持续进行中。

3.5 抗人 VEGF 抗体片段

在临床前试验中, Liu 等^[39] 用 AAV8 表达了抗人 VEGF 抗体片段 (anti-VEGF Fab), 在 VEGF 转基因小鼠 (rho/VEGF 小鼠) 模型中, 视网膜下注射 AAV8-anti-VEGF Fab $\geq 1 \times 10^7$ 基因拷贝 (GC) 的眼平均 CNV 面积明显小于对照组, 数据有力地支持了 anti-VEGF Fab 在 nAMD 患者中的疗效。

RGX-314 是重组 AAV 基因治疗载体, 带有与雷珠单抗相关的抗 VEGF 抗体片段的编码序列。2017 年 3 月, Regenxbio 开展了 I/II a 期、开放标签的、剂量递增临床试验, 将 RGX-314 向视网膜下和脉络膜上递送, 分别评估其安全性和耐受性 (NCT03066258)。在视网膜下递送的试验中, 招募了 42 例重度 nAMD 患者, 分为 5 个组, 6、6、6、12、12 例患者分别接受 3×10^9 、 1×10^{10} 、 6×10^{10} 、 1.6×10^{11} 和 2.5×10^{11} gc RGX-314 治疗, 截止到 2020 年 7 月 13 日, I/II a 期试验的患者对所有剂量的

RGX-314 耐受性良好,有 18 例严重不良事件,其中 17 例与 RGX-314 不相关。接受 1.6×10^{11} gc 和 2.5×10^{11} gc RGX-314 治疗的患者观察到持久的治疗效果,1 年的随访期内,在眼中观察到剂量依赖性 RGX-314 蛋白表达,并稳定改善了视力和视网膜厚度^[40]。在此基础上,Regenxbio 公司计划启动一项 AAVIATE 试验,预计该试验将招募约 40 例重度 nAMD 患者,以评估 2 种剂量水平,即 2.5×10^{11} gc 和 5×10^{11} gc RGX-314 在脉络膜上递送的疗效、安全性和耐受性;主要评价指标为第 40 周时通过 BCVA 衡量患者平均视力的变化,其他评价指标包括视网膜中央厚度 (central retinal thickness, CRT) 的平均变化及抗 VEGF 注射的次数^[41]。

3.6 sCD59

CD59 可阻止 C9 募集到 C5b-8 复合物中,从而抑制膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC) 在细胞上的形成^[42],其含有糖基磷脂酰肌醇细胞膜锚定点,如果将其删除则会变成 sCD59 的形式^[43]。Cashman 等^[44]研究表明,表达人类 CD59 可溶性非膜结合形式的 Ad 载体 (AdCAGsCD59) 在视网膜下递送可以减少小鼠 MAC 的形成及 CNV 病变面积,首次在动物体内证明了 sCD59 的生物效应。

2017 年和 2018 年, Hemera Biosciences 分别启动了关于 AAVCAGsCD59 的 I 期临床试验。其中一项临床试验 (NCT03144999) 招募了干性 AMD 患者,分别玻璃体腔内注射低、中和高剂量 AAV2-sCD59 (HMR59),以评估最大耐受剂量,并在 18 个月时进行安全性评估^[45]。另一项临床试验 (NCT03585556) 中,湿性 AMD 患者接受玻璃体腔内抗 VEGF 治疗,并在注射后第 7 天玻璃体腔内注射 HMR59。该研究计划将对患者随访 12 个月,必要时接受抗 VEGF 抢救治疗。主要评估指标为抗 VEGF 抢救注射的次数,次要评估指标为 BCVA 改善 ≥ 15 个字母的患者例数及患有炎症、眼压 > 30 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)、视网膜脱离、白内障和全身不良反应的患者例数^[46]。该研究将于 2022 年完成。

3.7 阿柏西普

ADVM-022 是一种编码阿柏西普的 AAV 载体,在非人灵长类动物的 CNV 模型中,关于 ADVM-022 治疗的临床前评估结果显示,玻璃体腔内注射 ADVM-022 耐受性良好,并可导致持续的阿柏西普表达,可能为 nAMD 患者提供安全、有效的长期治疗^[47]。

2018 年 11 月, Adverum Biotechnologies 启动了一项 ADVM-022 治疗 nAMD 患者的 I 期临床试验 (NCT03748784)^[48]。至 2020 年 11 月 14 日,高剂量组和低剂量组各 15 例患者分别接受 6×10^{11} vg 和 2×10^{11} vg ADVM-022 治疗,结果显示受试者平均 BCVA 及 CRT 水平均得以保持或改善;ADVM-022 治疗后,抗 VEGF 注射的频率大幅降低,高剂量组和低剂量组分别减少 99% 和 85%;在高剂量组中,6 例受试者单次玻璃体腔内注射实现了长达 92 周的零抗 VEGF 挽救性注射治疗;ADVM-022 在高、低剂量下均具有良好的耐受性和安全性,所有与 ADVM-022 相关的眼部不良事件均为轻度或中度,分别占 78% 和 22%,眼部炎症对类固醇滴眼液有较好的反应^[49]。此外, Adverum

Biotechnologies 公司目前也积极开展 ADVM-022 长期安全性的临床试验 (NCT04645212),目前正在试验中^[50]。

3.8 GT005

2018 年和 2020 年, Gyroscope Therapeutics 公司分别启动了 I 期 (NCT03846193) 和 II 期 (NCT04437368、NCT04566445) 临床试验,其招募了补体因子 I (complement factor I, CFI) 基因突变的患者,以 AAV 为载体视网膜下递送 GT005,通过增加 CFI 蛋白的产生来恢复补体系统的平衡,以减轻干性 AMD 患者的地图状萎缩 (geographic atrophy, GA),该试验已获得美国 FDA 授予快速通道资格^[51-53]。

4 基因疗法治疗 nAMD 可能出现的问题

4.1 疗效问题

疗效问题是基因治疗十分重要且具有挑战性的问题,其与基因治疗的效果密切相关^[54]。提高疗效的关键在于研制出转导效率及组织亲和力更高的递送系统。值得注意的是,体内针对病毒载体的中和抗体是影响疗效的关键因素,若其滴度较高,则不能实现目的基因的有效表达^[55]。

4.2 安全问题

病毒的免疫原性及基因整合相关的安全问题应当引起重视。Ad 的免疫原性较高^[56-57],该特点限制了 Ad 作为基因疗法载体的应用。此外,基因整合到宿主细胞基因组后,可能引起未知的基因突变,若发生原癌/抑癌基因突变,则有引起肿瘤的风险^[54,58]。解决上述问题可能的方法之一是使用非整合型载体。

4.3 长期抑制 VEGF 的并发症

随着基因治疗技术的发展,长期抑制 VEGF 成为可能。但是,这种正常生理方式的抑制可能会对血管的发育、RPE 及神经视网膜等多个方面产生不利影响。研究表明,RPE 细胞产生的 VEGF 缺乏可引起脉络膜毛细血管密度减少^[59],长期抑制 VEGF 可能不利于 nAMD 的预后。一项体外实验中, Ford 等^[60]将永生化的 RPE 细胞系 ARPE-19 作为研究对象,分别用贝伐单抗 (中和 VEGF) 和 IgG (对照) 处理,结果显示贝伐单抗处理后 RPE 细胞凋亡增加。临床试验数据也表明,长期抗 VEGF 治疗可导致 RPE 的萎缩,进而引发 GA^[61]。此外,越来越多的研究表明,VEGF 对神经元和神经胶质细胞有营养和保护作用^[62]。在动物模型中已证明 VEGF 对视网膜神经节细胞的保护作用,VEGF 水平的降低会导致视网膜神经节细胞的存活率降低^[63]。

基因疗法治疗 nAMD 具有巨大的应用前景,动物实验及临床试验数据表明,基因治疗载体安全性和耐受性较好,其对 CNV 的治疗及视力改善有一定效果,但其剂量梯度的设计及疗效性的检验仍需进一步扩大样本量,以便于统计学分析,得出可靠性结论。同时,基因疗法抑制 VEGF 的长期安全性仍需进一步研究,为探索更安全、有效的 nAMD 治疗方法奠定基础。在前期研究的基础上,未来基因治疗的方向为多基因、多靶点、多方位联合治疗,从而达到更好的治疗效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Jonas JB, Cheung C, Panda-Jonas S. Updates on the epidemiology of

- age-related macular degeneration [J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2017, 6(6): 493-497. DOI: 10. 22608/APO. 2017251.
- [2] Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration; a review [J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 12: 1313-1330. DOI: 10. 2147/CIA. S143508.
- [3] 刘舒, 徐晓芳. 抗血管内皮细胞生长因子药物治疗湿性年龄相关性黄斑变性研究现状 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(12): 962-966. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095. 0160. 2018. 12. 014.
- Liu S, Xu XF. Research progress of anti-VEGF for the therapy in wet age-related macular degeneration [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(12): 962-966. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095. 0160. 2018. 12. 014.
- [4] Solomon SD, Lindsley K, Vedula SS, et al. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration [J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 3: CD005139 [2021-01-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270425/>. DOI: 10. 1002/14651858. CD005139. pub4.
- [5] Mettu PS, Allingham MJ, Cousins SW. Incomplete response to anti-VEGF therapy in neovascular AMD; exploring disease mechanisms and therapeutic opportunities [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2020: 100906 [2021-01-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33022379/>. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2020. 100906.
- [6] Rosenfeld PJ, Feuer WJ. Warning; do not treat intermediate AMD with laser therapy [J]. *Ophthalmology*, 2019, 126(6): 839-840. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2018. 12. 016.
- [7] Marshall J, Cusumano A. Re; Rosenfeld et al.; warning; do not treat intermediate AMD with laser therapy (Ophthalmology. 2019; 126: 839-840) [J/OL]. *Ophthalmology*, 2020, 127(4): e25-26 [2021-01-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32200850/>. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2019. 11. 022.
- [8] 杨仕琪, 孙晓东. 抗 VEGF-A 治疗湿性年龄相关性黄斑变性的长期疗效及其影响视力预后的原因分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(3): 236-240. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 03. 016.
- Yang SQ, Sun XD. Analysis of long-term outcomes and causes influencing visual prognosis in eyes receiving anti-VEGF-A for wet age-related macular degeneration [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(3): 236-240. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 03. 016.
- [9] 白玉婧, 黎晓新. 新生血管性老年性黄斑变性药物治疗面临的挑战与未来的发展趋势 [J]. *中华眼底病杂志*, 2016, 32(1): 3-7. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2016. 01. 002.
- Bai YJ, Li XX. Progression and challenge of therapeutic strategies in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2016, 32(1): 3-7. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2016. 01. 002.
- [10] 程子芳, 王雨生, 王海燕, 等. 抗血管内皮生长因子治疗湿性年龄相关性黄斑变性的效果及复发因素分析 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(1): 20-26. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20201104-00743.
- Cheng ZF, Wang YS, Wang HY, et al. Effect of anti-vascular endothelial growth factor therapy on wet age-related macular degeneration and its recurrence factors [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(1): 20-26. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20201104-00743.
- [11] Pugazhendhi A, Hubbell M, Jairam P, et al. Neovascular macular degeneration; a review of etiology, risk factors, and recent advances in research and therapy [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1170 [2021-01-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7866170/>. DOI: 10. 3390/ijms22031170.
- [12] Chen S, Luo M, Kou H, et al. A review of gene therapy delivery systems for intervertebral disc degeneration [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(3): 194-205. DOI: 10. 2174/1389201020666191024171618.
- [13] Kaufmann KB, Büning H, Galy A, et al. Gene therapy on the move [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(11): 1642-1661. DOI: 10. 1002/emmm. 201202287.
- [14] Moore NA, Bracha P, Hussain RM, et al. Gene therapy for age-related macular degeneration [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2017, 17(10): 1235-1244. DOI: 10. 1080/14712598. 2017. 1356817.
- [15] Mammadzadeh P, Corredora PM, André H. The role of hypoxia-inducible factors in neovascular age-related macular degeneration; a gene therapy perspective [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(5): 819-833. DOI: 10. 1007/s00018-019-03422-9.
- [16] Sadiq MA, Hanout M, Sarwar S, et al. Platelet-derived growth factor inhibitors; a potential therapeutic approach for ocular neovascularization [J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, 55: 310-316. DOI: 10. 1159/000438953.
- [17] Farnoodian M, Wang S, Dietz J, et al. Negative regulators of angiogenesis; important targets for treatment of exudative AMD [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(15): 1763-1780. DOI: 10. 1042/CS20170066.
- [18] Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, et al. Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF. 11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD) [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(16): 2029-2032.
- [19] 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 [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(2): 167-176. DOI: 10. 1089/hum. 2006. 17. 167.
- [20] Greber UF, Flatt JW. Adenovirus entry: from infection to immunity [J]. *Annu Rev Virol*, 2019, 6(1): 177-197. DOI: 10. 1146/annurev-virology-092818-015550.
- [21] Askou AL, Alsing S, Benckendorff J, et al. Suppression of choroidal neovascularization by AAV-based dual-acting antiangiogenic gene therapy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 38-50. DOI: 10. 1016/j. omt. 2019. 01. 012.
- [22] Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(6): 1994-2000.
- [23] Gemayel MC, Bhatwadekar AD, Ciulla T. RNA therapeutics for retinal diseases [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2021, 21(5): 603-613. DOI: 10. 1080/14712598. 2021. 1856365.
- [24] Dejneka NS, Wan S, Bond OS, et al. Ocular biodistribution of bevasiranib following a single intravitreal injection to rabbit eyes [J]. *Mol Vis*, 2008, 14: 997-1005.
- [25] Jiang J, Zhang X, Tang Y, et al. Progress on ocular siRNA gene-silencing therapy and drug delivery systems [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2021, 35(1): 4-24. DOI: 10. 1111/fcp. 12561.
- [26] Kaiser PK, Symons RC, Shah SM, et al. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027 [J]. *Am J Ophthalmol*, 2010, 150(1): 33-39. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2010. 02. 006.
- [27] Gupta A, Kafetzis KN, Tagalakis AD, et al. RNA therapeutics in ophthalmology-translation to clinical trials [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2021, 205: 108482 [2021-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33548256/>. DOI: 10. 1016/j. exer. 2021. 108482.
- [28] Nguyen QD, Schachar RA, Nduaka CI, et al. Phase 1 dose-escalation study of a siRNA targeting the RTP801 gene in age-related macular degeneration patients [J]. *Eye (Lond)*, 2012, 26(8): 1099-1105. DOI: 10. 1038/eye. 2012. 106.
- [29] Nguyen QD, Schachar RA, Nduaka CI, et al. Evaluation of the siRNA PF-04523655 versus ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration (MONET Study) [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(9): 1867-1873. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2012. 03. 043.
- [30] Tang Y, Ye W, Liu X, et al. VEGF and sFLT-1 in serum of PIH patients and effects on the foetus [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 2123-2128. DOI: 10. 3892/etm. 2019. 7184.
- [31] Bagley RG, Kurtzberg L, Weber W, et al. sFLT01; a novel fusion protein with antiangiogenic activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(3): 404-415. DOI: 10. 1158/1535-7163. MCT-10-0813.
- [32] 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 [J]. *Lancet*, 2017, 390(10089): 50-61. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30979-0.
- [33] Rakoczy EP, Lai CM, Magno AL, et al. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase I randomized clinical trial [J]. *Lancet*, 2015, 386(10011): 2395-2403. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00345-1.
- [34] Constable IJ, Lai CM, Magno AL, et al. Gene therapy in neovascular age-related macular degeneration: three-year follow-up of a phase I randomized dose escalation trial [J]. *Am J Ophthalmol*, 2017, 177: 150-158. DOI: 10.1016/j.ajo.2017.02.018.
- [35] 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 [J]. *EBioMedicine*, 2016, 14: 168-175. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.11.016.
- [36] Poluzzi C, Iozzo RV, Schaefer L. Endostatin and endorepellin: a common route of action for similar angiostatic cancer avengers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 156-173. DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.012.
- [37] Helgeland E, Pedersen TO, Rashad A, et al. Angiostatin-functionalized collagen scaffolds suppress angiogenesis but do not induce chondrogenesis by mesenchymal stromal cells *in vivo* [J]. *J Oral Sci*, 2020, 62(4): 371-376. DOI: 10.2334/josnusd.19-0327.
- [38] Campochiaro PA, Lauer AK, Sohn EH, et al. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) Study [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(1): 99-111. DOI: 10.1089/hum.2016.117.
- [39] Liu Y, Fortmann SD, Shen J, et al. AAV8-antiVEGF β ocular gene transfer for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 542-549. DOI: 10.1016/j.ythet.2017.12.002.
- [40] Regenxbio. REGENXBIO reports second quarter 2020 financial results and operational highlights [R/OL]. CISION, 2020. (2020-08-06) [2021-01-10]. <https://www.prnewswire.com/news-releases/regenxbio-reports-second-quarter-2020-financial-results-and-operational-highlights-301107904.html>.
- [41] Regenxbio. REGENXBIO announces dosing of first patient in phase II AAVIATETM trial of RGX-314 for the treatment of wet AMD using suprachoroidal delivery [R/OL]. CISION, 2020. (2020-09-09) [2021-01-10]. <https://www.prnewswire.com/news-releases/regenxbio-announces-dosing-of-first-patient-in-phase-ii-aaviate-trial-of-rgx-314-for-the-treatment-of-wet-amd-using-suprachoroidal-delivery-301126029.html>.
- [42] Kumar-Singh R. The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD from hypothesis to clinical trials [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 184: 266-277. DOI: 10.1016/j.exer.2019.05.006.
- [43] Sugita Y, Ito K, Shiozuka K, et al. Recombinant soluble CD59 inhibits reactive haemolysis with complement [J]. *Immunology*, 1994, 82(1): 34-41.
- [44] Cashman SM, Ramo K, Kumar-Singh R. A non membrane-targeted human soluble CD59 attenuates choroidal neovascularization in a model of age related macular degeneration [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19078 [2021-01-10]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0019078>. DOI: 10.1371/journal.pone.0019078.
- [45] Hemera Biosciences. Treatment of advanced dry age related macular degeneration with AAVCAgsCD59 [DB/OL]. Boston; Ophthalmic Consultants of Boston, 2017. (2018-12-11) [2021-01-11]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03144999>.
- [46] Bordet T, Behar-Cohen F. Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(8): 1685-1693. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.038.
- [47] Grishanin R, Vuilleminot B, Sharma P, et al. Preclinical evaluation of advm-022, a novel gene therapy approach to treating wet age-related macular degeneration [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(1): 118-129. DOI: 10.1016/j.ythet.2018.11.003.
- [48] Adverum Biotechnologies. ADVM-022 intravitreal gene therapy for wet AMD [DB/OL]. California; Adverum Clinical Site, Bakersfield, 2021. (2018-11-14) [2021-01-11]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04645212?cond=ADVM-022&draw=2&rank=3>.
- [49] Adverum Biotechnologies. Adverum biotechnologies announces positive interim data from cohorts 1-4 from OPTIC phase 1 trial of ADVM-022 intravitreal gene therapy for wet AMD [EB/OL]. California; Adverum Clinical Site, Bakersfield, 2021. (2021-11-14) [2021-01-11]. <https://investors.adverum.com/news-releases/news-release-details/adverum-biotechnologies-announces-positive-interim-data-0>.
- [50] Adverum Biotechnologies. Long-term study of ADVM-022 in neovascular (wet) AMD [OPTIC-EXT] [DB/OL]. California; Adverum Clinical Site, Bakersfield, 2021. (2020-12-14) [2021-01-11]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04645212>.
- [51] Gyroscope Therapeutics. Focus: first in human study to evaluate the safety and efficacy of GT005 administered in subjects with dry AMD [DB/OL]. Boston; Ophthalmic Consultants of Boston (OCB), 2018. (2020-11-04) [2021-01-11]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03846193>.
- [52] Gyroscope Therapeutics. Explore: a phase II study to evaluate the safety and efficacy of two doses of GT005 [DB/OL]. Florida; Retina Vitreous Associates of Florida, 2020. (2021-02-21) [2021-03-21]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04437368>.
- [53] Gyroscope Therapeutics. Horizon: a phase II study to evaluate the safety and efficacy of two doses of GT005 [DB/OL]. California; Retina Consultants San Diego, 2020. (2021-01-25) [2021-03-21]. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04566445>.
- [54] Carvalho M, Martins AP, Sepodes B. Hurdles in gene therapy regulatory approval: a retrospective analysis of European Marketing Authorization Applications [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(3): 823-828. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.12.007.
- [55] Del Pozo-Rodríguez A, Rodríguez-Gascón A, Rodríguez-Castejón J, et al. Gene therapy [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2020, 171: 321-368. DOI: 10.1007/10_2019_109.
- [56] Atasheva S, Yao J, Shayakhmetov DM. Innate immunity to adenovirus: lessons from mice [J]. *FEBS Lett*, 2019, 593(24): 3461-3483. DOI: 10.1002/1873-3468.13696.
- [57] Crystal RG. Adenovirus: the first effective *in vivo* gene delivery vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(1): 3-11. DOI: 10.1089/hum.2013.2527.
- [58] High KA, Roncarolo MG. Gene therapy [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(5): 455-464. DOI: 10.1056/NEJMr1706910.
- [59] Le YZ, Bai Y, Zhu M, et al. Temporal requirement of RPE-derived VEGF in the development of choroidal vasculature [J]. *J Neurochem*, 2010, 112(6): 1584-1592. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06573.x.
- [60] Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, et al. Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(13): 9478-9487. DOI: 10.1167/iovs.11-8353.
- [61] Grunwald JE, Daniel E, Huang J, et al. Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(1): 150-161. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.08.015.
- [62] Theis V, Theiss C. VEGF-A stimulus for neuronal development and regeneration in the CNS and PNS [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(6): 589-597. DOI: 10.2174/1389203719666180104113937.
- [63] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2018, 392(10153): 1147-1159. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.

(收稿日期: 2021-01-13 修回日期: 2021-06-29)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

