

## · 综 述 ·

## 非病毒载体在遗传性视网膜变性基因治疗中的应用

卫星 综述 睢瑞芳 审校

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院眼科, 北京 100730

通信作者: 睢瑞芳, Email: hrfsui@163.com

**【摘要】** 遗传性视网膜变性(IRD)发病机制复杂多样,常常导致不可逆盲,目前尚缺乏有效的治疗方法。近年来,针对 IRD 的基因治疗显示出广阔的应用前景,而如何将基因药物递送至靶细胞并安全、高效地表达成为目前研究发展的关键点。病毒载体系统转染效率较高,但具有潜在的免疫反应和生物安全等问题,其临床应用的局限性使非病毒载体系统的开发应运而生。DNA 纳米复合体是新型非病毒载体的研究热点之一,这种聚合物/DNA 复合物纳米粒子由多肽、脂质、多糖等物质压缩和包裹 DNA 而成,在 IRD 的应用上取得了较大的进展。此外,非病毒载体在成本、制备难易度、包装容量及安全性上均显示出其优势,为视网膜色素变性、Stargardt 病、先天性视网膜劈裂、Leber 先天性黑矇等 IRD 的基因治疗提供了新的研究思路。本文对近年来非病毒载体系统在转染效率、靶向性和安全性等方面的进展及其在 IRD 基因治疗中的应用进行综述。

**【关键词】** 遗传性视网膜变性; 非病毒载体; 基因疗法

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81873687); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目(2016-I2M-1-002)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200627-00457

### Non-viral vector for gene therapy in inherited retinal degeneration

Wei Xing, Sui Ruifang

Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Sui Ruifang, Email: hrfsui@163.com

**【Abstract】** Inherited retinal degeneration (IRD), a group of diseases often causing irreversible blindness, with multiple pathogenesis, still lacks effective treatments currently. Development of effective therapeutics is a primary research goal. Despite rapid advances in gene therapy during the past decades, the most challenging aspect of gene therapy in clinical applications for IRD is to deliver the curative molecules to achieve optimal expression levels in target cells safely. Apart from high gene transfection efficiency, there are still many limitations, such as immunogenicity, biosafety issue, etc. in the application of viral vectors, which drive the development of gene therapy based on non-viral vectors. As one of the hot research topics in non-viral vectors, encouraging progress has been made in DNA nanoparticles for IRD treatment. The polymer/DNA complex nanoparticle is compacted and encapsulated DNA via peptides, lipids, or polysaccharides. Besides, the non-viral delivery system shows cost, preparation, packaging capacity, and safety advantages, providing a promising non-viral platform for safe and effective treatment of IRD, such as retinitis pigmentosa, Stargardt disease, X-linked juvenile retinoschisis, Leber congenital amaurosis, and so on. In this article, advances in transfection efficiency, targeting ability and safety of non-viral gene therapy and its application in IRD were reviewed.

**【Key words】** Inherited retinal degeneration; Non-viral vector; Gene therapy

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81873687); Medical and Health Science and Technology Innovation Funding Project of Chinese Academy (2016-I2M-1-002)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200627-00457

遗传性视网膜变性(inherited retinal degeneration, IRD)是一大类致盲眼病,发病机制复杂多样。IRD 通常会导致严重的视功能损害,具有高度的遗传异质性,目前尚缺少明确有效的治疗方法。随着基因治疗药物和技术的不断发展,IRD 的基因

治疗显示出广阔的应用前景。基因治疗药物,如野生型基因或 DNA 片段等通过基因增强策略应用于功能丧失性突变,小干扰 RNA 和微小 RNA 等通过基因沉默策略应用于功能获得性突变<sup>[1-3]</sup>。近年来,基因编辑技术成簇规律间隔短回文重复序列

(CRISPR) 相关核酸酶系统技术的出现为精准修复致病基因提供了可能<sup>[4-5]</sup>。然而,一方面,基因药物多呈电负性,自身相对分子质量较大,并且易被核酸酶降解,导致基因药物体内稳定性差,难以递送至靶细胞;另一方面,眼部具有多重保护性屏障,基因药物难以通过传统的局部点眼或全身给药的方式突破屏障实现高效转染,因此要实现 IRD 的有效治疗需要借助适宜的载体递送。目前,IRD 基因治疗的载体递送系统可分为病毒载体递送系统和非病毒载体递送系统。病毒载体因其转染效率较高,在动物模型和临床试验中广泛应用,但在眼科临床应用上仍具有免疫原性强、细胞毒性大等潜在风险<sup>[6]</sup>。此外,病毒载体包装容量较小、成本高、制备难等问题也亟待解决。非病毒载体在成本、制备难易度、包装容量及安全性上均显示出其优势,越来越多地被应用于 IRD 基因治疗研究中。本文就非病毒载体系统在转染效率、靶向性和安全性等方面的进展及其在 IRD 基因治疗中的应用进行综述。

## 1 IRD 基因治疗的非病毒载体

非病毒载体的种类颇多,主要包括阳离子脂质体、阳离子聚合物、树枝状大分子、壳聚糖纳米粒子等。对于 IRD 基因治疗,理想的非病毒载体递送系统应具有以下重要的性质:(1)携带性能 可携带目的基因,具有较大的载体容量;(2)安全性 对机体无致病性或免疫原性,具有良好的生物降解性;(3)稳定性 载体系统本身应稳定并且能够保护携带的基因免受核酸酶等的破坏;(4)靶向性 可准确地将目的基因递送至靶细胞;(5)转染效率 可协助基因药物实现高效转染。非病毒载体易于化学修饰及合成的特点为其不断优化提供了良好的条件。近年来,研究发现可利用多肽、脂质、多糖等物质将体积较大的 DNA 压缩和包裹成体积较小的聚合/DNA 复合物纳米粒子,这种纳米复合体在 IRD 的应用上取得了较大的进展,成为新型非病毒载体的研究热点之一。

### 1.1 多肽复合物载体

多肽在 DNA 压缩、细胞靶向、细胞膜穿透、内涵体逃逸以及核定位等方面的优异性质使其在非病毒载体递送体系中具有很大的开发潜力。其中,聚赖氨酸是一种天然的阳离子多肽,具有良好的生物可降解性及生物相容性。早期实验显示,聚赖氨酸与 DNA 形成的纳米复合物可实现有效转染<sup>[7]</sup>,而聚赖氨酸经过化学修饰、特定氨基酸成分改变等优化后在安全性和转染效率上有所提升,具体如下:(1)聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 化学修饰,CK30PEG 纳米粒子是 PEG 取代赖氨酸 30 聚体肽和目标 pDNA 压缩后形成的 DNA 复合物,可有效转染感光细胞和视网膜色素上皮细胞<sup>[8-11]</sup>。此外,其安全性在基

因治疗上也显示出巨大的价值。Ding 等<sup>[12]</sup>研究表明,CK30PEG 纳米粒子单次视网膜下注射后不会诱导炎症浸润或细胞因子水平的显著升高,而考虑到纳米粒子所介导的基因表达难以长时间维持,重复注射对于维持疗效在所难免。Han 等<sup>[13]</sup>对重复注射的安全性进行了深入探讨,在 BALB/c 鼠视网膜下首次注射 CK30PEG 纳米粒子 1 个月后进行第 2 次注射,结果显示 2 次注射均仅在注射后 6 h 产生短暂的眼内炎症反应,而后未检测到包括炎症在内的不良反应。(2)通过调整聚赖氨酸中赖氨酸的反离子即可对聚赖氨酸复合物进行优化。例如,将醋酸盐替换成三氟醋酸盐可将纳米粒子塑形为棒状、球状,提高在眼部的转染效率<sup>[9]</sup>。同样,体外实验中显示,在聚赖氨酸中加入组氨酸可将转染效率提高 20 倍。这是由于组氨酸中的氨基氮能够捕获质子,导致内小体渗透压升高后破裂,从而将内吞的药物/载体释放到细胞质,此时组氨酸就像一个可以捕获质子的海绵一样,因此这一现象也被称为质子海绵效应,能够有效地阻碍基因药物在细胞内的降解<sup>[14-16]</sup>(图 1)。(3)聚赖氨酸可在与 DNA 复合前被构建为分支状树状大分子,增加其缓冲能力,从而提高基因递送效率<sup>[17]</sup>。同时,该粒子可被完全地生物降解,因此相比其他树状大分子毒性骤降。

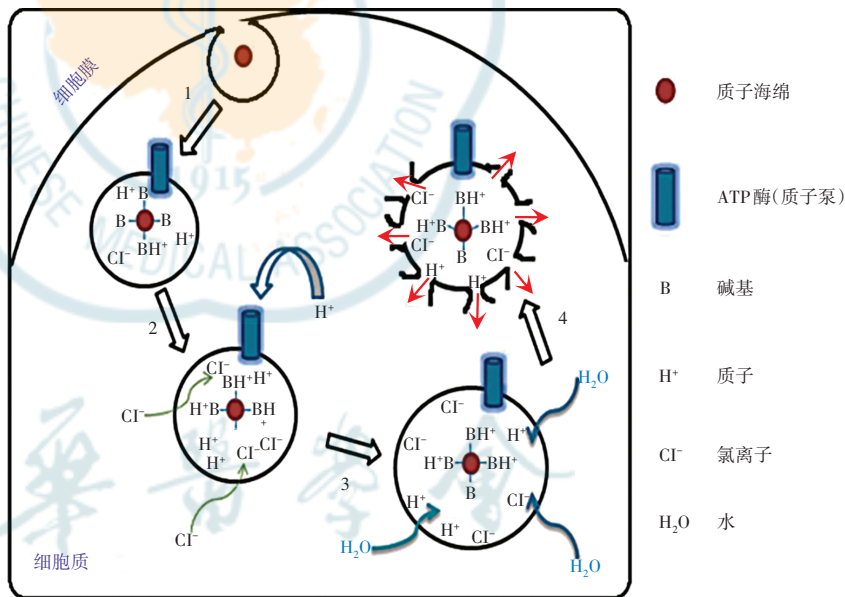


图 1 质子海绵效应示意图<sup>[16]</sup> 1:“质子海绵”经细胞内吞形成内小体 2:质子通过 ATP 酶内流,同时  $\text{Cl}^-$  进入内小体 3:内小体离子浓度升高,吸水膨胀 4:内小体破裂,释放内容物

### 1.2 脂质复合物载体

脂质复合物载体是聚合物与脂质成分共同制备的纳米复合物,可将核酸药物包载其中<sup>[18]</sup>。脂质复合物因其稳定性及较高的细胞摄取率成为非病毒载体应用于 IRD 动物模型中的实例。该聚合作用由脂质带正电荷的阳离子基团和 DNA 带负电荷的碱基对相互作用所介导,从而形成直径约 50 nm、带少量正电荷的纳米复合物<sup>[19]</sup>。磷脂中,例如 1,2-二油酰甘油-3-磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、(2,3-二油酰基-丙基)-三甲胺 (DOTAP)、1,2-二硬脂酰甘油磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 被广泛应用于脂质复合物中,表现出无毒、转染效率高等优势<sup>[20]</sup>。目前,

相关脂质复合物已在 X 连锁遗传青年型视网膜劈裂症 (X-linked juvenile retinoschisis, XLRS) 和 Leber 先天性黑矇 (Leber congenital amaurosis, LCA) 的动物模型中显示出有效性<sup>[21-23]</sup>。视网膜结构由不同的细胞组成,不适当的传递可能会有异位表达的潜在风险,而脂质纳米复合物的缺点即在于缺乏精准的靶向性。在之后的研究中,Wang 等<sup>[24]</sup>解决了脂质纳米复合物的这一不足,利用细胞特异性启动子使其靶向于视网膜不同类型的细胞,如视网膜色素上皮细胞、视锥细胞、视杆细胞和神经节细胞。

### 1.3 多糖复合物

多糖复合物因其无免疫原性、可生物降解、生产成本低、易于化学修饰的特性在非病毒递送体系中具有重要的研究价值。作为载体,透明质酸和壳聚糖的混合物应用较多。透明质酸整体带负电荷,对 DNA 的压缩造成影响,而壳聚糖作为阳离子多糖与透明质酸的复合物可以形成直径 100~200 nm 的小颗粒,保护 DNA 不被降解并实现有效转染。载体制备过程中,通过改变壳聚糖与透明质酸的比例可以很容易地控制颗粒的大小和表面电荷,对转染效率和持久性进行优化。此外,壳聚糖也可以单独作为载体压缩包裹 DNA,并携带质粒 DNA,通过视网膜下注射转染至视网膜色素上皮细胞和感光细胞<sup>[25-26]</sup>。Puras 等<sup>[25]</sup>研究表明,基于 NOVA FECTO25 寡壳聚糖多聚体可转染至大鼠视网膜的不同细胞。采用视网膜下注射转染的主要是视网膜色素上皮细胞和感光细胞,玻璃体内注射可转染至视网膜内层。

## 2 非病毒载体在 IRD 中的应用

近年来,非病毒载体系统在转染效率、靶向性和安全性等方面不断进展。尽管其在 IRD 上的应用尚未进入临床试验阶段,但其有效性已在动物模型上得到验证。对于视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP)、Stargardt 病 (Stargardt disease, STGD)、XLRS、LCA 等 IRD 疾病的基因治疗,非病毒载体提供了较为安全、有效的研究思路,例如,多肽复合物 CK30PEG 已应用于 RP、STGD 的治疗研究中,多功能 pH 敏感型氨基脂质 ECO 已应用于 STGD、LCA 的研究中<sup>[10,21-22,27-32]</sup>(表 1)。目前,研究通过改变粒子表面结构和组成、优化载体设计等方式完善非病毒载体,以期突破转染效率低这一临床应用的技术瓶颈。

表 1 非病毒载体在基因治疗动物模型中的应用

| 研究团队                       | 载体            | 疾病   | 小鼠模型                             |
|----------------------------|---------------|------|----------------------------------|
| Cai 等 <sup>[10]</sup>      | CK30PEG       | RP   | <i>rd</i> <sup>+/−</sup>         |
| Rajala 等 <sup>[21]</sup>   | TAT-NLS-LPD   | LCA  | <i>Rpe65</i> <sup>−/−</sup>      |
| Apaolaza 等 <sup>[22]</sup> | HA-P-SLN      | RS   | <i>Rs1h</i> -KO <sup>a</sup>     |
| Han 等 <sup>[27]</sup>      | CK30PEG       | STGD | <i>Abca4</i> <sup>−/−</sup>      |
| Sun 等 <sup>[29]</sup>      | ECO           | STGD | <i>Abca4</i> <sup>−/−</sup>      |
| Sun 等 <sup>[30]</sup>      | ECO           | LCA  | <i>Rpe65</i> <sup>−/−</sup>      |
| Mitra 等 <sup>[31]</sup>    | CK30PEG10-TAT | RP   | <i>Rho</i> <sup>P23H/P23H</sup>  |
| Pensado 等 <sup>[32]</sup>  | SP-PA         | RP   | <i>Prpf31</i> <sup>A216P/+</sup> |

注:RP:视网膜色素变性;LCA:Leber 先天性黑矇;RS:视网膜劈裂症;STGD:Stargardt 病;Rs1h-KO<sup>a</sup>:Rs1h 基因缺陷

### 2.1 非病毒载体在 RP 中的应用

RP 是常见的遗传性致盲眼病,以进行性视网膜光感受器细胞凋亡和色素上皮变性为主要特征,患病率为 1/7 000~1/3 000<sup>[33]</sup>。RP 的致病基因多种、遗传方式多样,目前已发现 130 种与 RP 相关的致病基因,遗传方式主要包括常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及 X 染色体连锁遗传等<sup>[34]</sup>。早期研究表明,CK30PEG 在眼内注射的载体容量可达 14 kb,在 BALB/c 野生鼠视网膜下注射后仅产生短暂炎症反应<sup>[13]</sup>,较大的载体容量和安全性提示了其广阔的应用空间。Cai 等<sup>[10]</sup>将包含了视蛋白启动子和 *Rds* 基因的 CK30PEG 纳米粒子注射至 *rd*<sup>+/−</sup> 小鼠模型视网膜下,在注射后 2~7 d 检测到 *Rds* mRNA 的表达量达峰值,并可持续维持至注射后 120 d,表明 CK30PEG 纳米粒子可以安全、有效地在感光细胞中表达并延缓疾病进展。其中,在改善功能和结构方面,研究显示注射后视杆细胞功能部分改善,而视锥细胞功能甚至恢复到了野生型水平。同时,电子显微镜下观察结果显示,视网膜光感受器外节和外核层增厚。在安全性方面,CK30PEG 纳米粒子注射后并未诱发免疫反应和炎症反应。之后,Mitra 等<sup>[31]</sup>利用细胞穿透肽 TAT、CK30PEG10 二嵌段共聚体压缩 DNA 构建了 CK30PEG10-TAT 纳米复合物并将其注射至纯合 *Rho*<sup>P23H/P23H</sup> 基因敲入模型鼠的视网膜下,该研究在纳米复合物构建时采用密码子优化的 *Rho* 以实现基因替换,同时结合 RNA 干扰技术实现基因沉默抑制突变基因的表达,结果表明 *Rho* 蛋白在外核层表达显著,并可部分改善视功能。此外,脂质纳米复合物在 RP 基因治疗的应用上也有所进展。Pensado 等<sup>[32]</sup>采用多聚左旋精氨酸山梨糖醇酯和 *PRPF31* 构建了 SP-PA-PRPF31 纳米粒子,该纳米粒子在 *Prpf31*<sup>A216P/+</sup> 模型鼠视网膜下注射后可实现基因的有效转染,模型鼠的视网膜厚度和视力均得到显著改善。

### 2.2 非病毒载体在 STGD 中的应用

STGD 是青少年常见的黄斑营养不良,患病率为 1/10 000~1/8 000,大多数患者的致病基因为 *ABCA4* 基因,呈常染色体隐性遗传<sup>[35]</sup>。*ABCA4* 基因编码 ABCA4 蛋白,为 ATP 结合盒式转运蛋白家族中的一员。该蛋白在感光细胞外节表达,具有清除视循环中间代谢废物的功能。*ABCA4* 基因变异将导致视网膜毒性产物聚集,从而发生视网膜色素上皮细胞和感光细胞凋亡,进而影响视网膜功能<sup>[36]</sup>。对于 STGD,基于病毒载体基因治疗的前期探索收效甚微。*ABCA4* 长达 6.8 kb,而 AAV 载体的荷载量低于 5 kb。McClements 等<sup>[37]</sup>将 *ABCA4* 分为 2 个片段并采用双重 AAV 载体递送以期突破单一 AAV 的有限荷载量,结果表明尽管双重 AAV 载体策略可以介导 *Abca4*<sup>+/−</sup> 小鼠中全长 ABCA4 蛋白在感光细胞外节的表达,但载体转染效率不佳且会产生截短蛋白表达。而病毒载体中的慢病毒虽具有可递送 *ABCA4* 的有效荷载量,但仍存在不可控的基因组整合、潜在致癌风险等安全性问题<sup>[38-39]</sup>。因此,荷载量大且相对安全的非病毒载体或将成为 STGD 基因治疗的突破口。考虑到非病毒载体 CK30PEG 具有较大的载体容量,Han 等<sup>[27]</sup>将其应用于 STGD *Abca4*<sup>−/−</sup> 小鼠模型。该研究团队构建了携带 *ABCA4* cDNA 的 CK30PEG 纳米载体,发现 *ABCA4* 可在视网膜

下注射后持续表达 8 个月,该治疗策略可改善暗适应及减少脂褐素颗粒。但就目前的阳性结果来看,CK30PEG 纳米载体注射后 *Abca4*<sup>-/-</sup> 模型小鼠的蛋白表达水平仍无法与野生型持平,并会随着时间逐渐下降,在注射后 2 个月为野生型的 25%,注射后 8 个月降至 11%。2020 年, Sun 等<sup>[29]</sup> 提出多功能 pH 敏感型氨基脂质 1-氨基-2-[N-(油酰半胱氨酰-1-氨基)-丙酰基]-亚胺((1-aminoethyl)iminobis[N-(oleoylcysteinyl-1-aminoethyl)propionamide], ECO) 可作为安全、有效的载体,研究利用 ECO 和 *ABCA4* 质粒构建了自组装粒子 ECO/p*RHO-ABCA4*。在 *Abca4*<sup>-/-</sup> 模型鼠视网膜下注射后,该纳米粒子成功介导了基因转染,并通过在质粒中克隆视紫红质特异性启动子实现了 *ABCA4* 在感光细胞外节的特异性表达,这种特异且高水平的表达可维持至少 8 个月,平均减少 35% 视网膜毒性产物维生素 A 二聚体 A2E 的积累,并延缓 STGD 的进展。同时, ECO 纳米粒子在视网膜下注射后显示出良好的安全性,为 STGD 及其他 IRD 的基因治疗提供了新的思路。

### 2.3 非病毒载体在 XLRs 中的应用

XLRs 是由 *RS1* 基因变异引起的遗传性退行性眼病,在男性中的患病率为 1/25 000~1/5 000<sup>[40]</sup>。*RS1* 编码 RS1 蛋白,该蛋白主要介导细胞间相互作用与细胞间的黏附,*RS1* 基因变异将导致视网膜内层劈裂<sup>[41]</sup>。大部分患者 10 岁以内发病,视力受损明显,且多数患者成年后出现视网膜萎缩,导致视功能进一步恶化<sup>[42-43]</sup>。近年来,应用于 XLRs 基因治疗的纳米复合物在不断研发优化中, Delgado 等<sup>[23]</sup> 开发了一种由右旋糖苷-硫酸鱼精蛋白-pDNA (pCMS-EGFP 或 pCEP4-RS1) 组成并将其吸附在固体脂质纳米粒上的纳米复合物。该研究在大鼠模型中采用了视网膜下注射、玻璃体腔内注射和局部点眼 3 种不同的纳米粒子递送方式,结果表明纳米材料玻璃体腔内注射后基因仅在神经节细胞层表达,局部点眼后仅在角膜表达,而视网膜下注射后可转染至视网膜色素上皮细胞和感光细胞。随后, Apaolaza 等<sup>[22]</sup> 将上述研究纳米复合物中的右旋糖苷替换为透明质酸构建出新的载体,即透明质酸-硫酸鱼精蛋白-pDNA-脂质纳米粒子 HA-P-SLN,并与上述纳米复合物载体分别注射至 *Rs1h* 缺陷模型小鼠中,结果显示 2 种载体均能转染至视网膜。研究采用了视网膜下注射和玻璃体腔内注射 2 种载体递送方式,结果发现当采用视网膜下注射时感光细胞中检测到的 *RS1* 表达水平较高,并可在神经节细胞层和内核层维持表达至注射后 2 个月。此外,2 种载体均能部分改善视网膜结构和功能,包括减少感光细胞的丢失及改善视网膜的组织结构。

### 2.4 非病毒载体在 LCA 中的应用

LCA 是一种严重的遗传性致盲视网膜疾病,多数患者呈常染色体隐性遗传,患病率为 1/80 000<sup>[44]</sup>。LCA 发病年龄早,大部分患儿于出生后 1 年内即出现眼球震颤及视力下降。尽管以 AAV 为载体的基因药物 Luxturna<sup>®</sup> 已经上市并为 LCA 的基因治疗带来了实质性的突破,但其治疗费用高达 85 万美元<sup>[45]</sup>。因此,成本较低且更为安全的非病毒载体也在不断研究中。 Rajala 等<sup>[21]</sup> 采用脂质体-鱼精蛋白-质粒复合物结合核定位信号 NLS、细胞穿透肽 TAT 构建了脂质体纳米粒子 TAT-

NLS-LPD,并将其应用于 *RPE65* 相关致盲小鼠模型中,结果表明单次视网膜下注射后基因表达可至少维持 3 个月,并且未检测到注射后免疫反应及炎症反应,该治疗策略可改善视功能并延缓疾病致盲进展。此外,多功能 pH 敏感型氨基脂质 ECO 除在上述 STGD 有应用外,在 LCA 2 型的基因治疗上也颇具潜能。 Sun 等<sup>[30]</sup> 将 ECO 与质粒 DNA 缩合构建了 ECO 纳米粒子,在 *Rpe65*<sup>-/-</sup> 小鼠视网膜下注射后观察到视锥细胞的显著改善,该治疗作用可维持至少 120 d。同时,在野生 BALB/c 小鼠上的安全性研究显示,该纳米粒子经视网膜下注射后未产生不可逆性损伤,为 LCA 2 型的治疗提供了安全、有效的策略。

## 3 基因治疗递送途径

目前 IRD 基因治疗递送途径主要为眼内注射,根据注射的位置分为视网膜下注射和玻璃体腔内注射等。视网膜下注射是将药物注射到感光细胞层和色素上皮层间,注射后会产生 150 μm 的间隙。由于视网膜下注射可以将基因药物直接递送至靶组织,所以视网膜下注射成为目前 IRD 基因治疗的主要递送途径。尽管视网膜下注射突破了眼复杂的解剖屏障和生理屏障,但其潜在的并发症仍不容忽视。相比之下,玻璃体腔内注射更为简单、安全,但劣势也较为明显,即转染效率相对较低。

### 3.1 视网膜下注射

视网膜下注射因其转染效率高这一巨大优势成为目前将基因药物递送至视网膜感光细胞和视网膜色素上皮层最有效的方法。事实上,无论采用病毒载体还是非病毒载体,视网膜下注射均成为 IRD 基因治疗研究中递送途径的重要选择。但其在临床转化应用中仍存在一定的不足:(1) 视网膜下注射可出现不同程度的并发症,如注射后视网膜脱离。由于治疗性注射液可使感光细胞层与色素上皮层分离<sup>[46-47]</sup>,而感光细胞需要色素上皮层的营养供给和结构支持,同时维持结构的完整性对于视紫红质光化学循环中感光色素的再生也至关重要,所以注射后的视网膜脱离可导致感光细胞和视功能受损<sup>[48]</sup>。此外,视网膜下注射还可造成眼内炎、玻璃体积血,并增加白内障的患病风险<sup>[49-51]</sup>。(2) 视网膜下注射对注射技术及注射设备具有较高要求,费用高,并且患者注射后恢复期长。(3) 转染范围局限在注射后视网膜下液泡出现的区域,限制了其在全视网膜疾病治疗上的有效应用。尽管存在上述不足,采用视网膜下注射的 IRD 临床试验表明,在大多数患者中注射所带来的视功能改善的利远大于其不良反应的弊<sup>[52-53]</sup>,视网膜下注射仍然是 IRD 基因治疗中应用最广泛的递送途径。

### 3.2 玻璃体腔内注射

玻璃体是透明的凝胶体,主要由胶原结构和透明质酸组成,其中胶原纤维和带负电荷的双螺旋透明质酸分子相互作用形成 3D 网状结构<sup>[54-55]</sup>。基于玻璃体的 3D 网状结构及负电荷组分,可对非病毒材料进行一定的化学修饰,或采用纳米材料避免粒径过大以及正负电荷相互作用对非病毒载体的扩散造成影响。玻璃体腔内注射的优势在于:(1) 不会造成视网膜下液泡和视网膜脱离,患者在治疗室即可接受注射。(2) 可将转染范围扩大至整个视网膜,使治疗效果得到显著改善。(3) 增

加治疗的安全性和患者的舒适性,并在降低成本上具有优势。因此,安全、有效的玻璃体腔内注射可为许多致盲视网膜疾病的基因治疗带来革命性的改变<sup>[1,56-57]</sup>。

非病毒载体递送系统具有易于制备、载体容量大、免疫反应低、有效荷载大以及化学修饰灵活等优势,在 IRD 的基因治疗上具有广阔的应用前景。近年来,非病毒载体在转染效率、靶向性和安全性等方面不断改进,并在动物实验中取得了显著的效果。视网膜下注射是将基因药物递送至视网膜感光细胞和色素上皮层最有效的方法,而玻璃体腔内注射的优势在于损伤较小,并可达成更加广泛、均匀的转染。然而这些方法均需要反复进行眼内注射并有不同程度的并发症,所以对于载体的设计优化、递送方式的探索仍需不断进行,开发更为安全、有效并且持续表达的方法。尽管 IRD 的基因治疗仍存在很多难以解决的问题和挑战,如治疗时机的选择、基因载体的安全性和转染效率等问题还需要研究者不懈的努力和探索,但值得肯定的是,随着基因载体研究的不断深入,无论是病毒载体还是非病毒载体都向着理想载体的目标不断改进。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Takahashi V, Takiuti JT, Jauregui R, et al. Gene therapy in inherited retinal degenerative diseases, a review [J]. *Ophthalmic Genet*, 2018, 39(5): 560-568. DOI: 10.1080/13816810.2018.1495745.
- [2] Vázquez-Domínguez I, Garanto A, Collin R. Molecular therapies for inherited retinal diseases-current standing, opportunities and challenges [J/OL]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(9): 654 [2021-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31466352/>. DOI: 10.3390/genes10090654.
- [3] Bacchi N, Casarosa S, Denti MA. Splicing-correcting therapeutic approaches for retinal dystrophies: where endogenous gene regulation and specificity matter [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(5): 3285-3294. DOI: 10.1167/iovs.14-14544.
- [4] Benati D, Patrizi C, Recchia A. Gene editing prospects for treating inherited retinal diseases [J]. *J Med Genet*, 2020, 57(7): 437-444. DOI: 10.1136/jmedgenet-2019-106473.
- [5] Knott CJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering [J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869. DOI: 10.1126/science.aat5011.
- [6] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, et al. Non-viral vectors for gene-based therapy [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(8): 541-555. DOI: 10.1038/nrg3763.
- [7] Vitiello L, Chonn A, Wasserman JD, et al. Condensation of plasmid DNA with polylysine improves liposome-mediated gene transfer into established and primary muscle cells [J]. *Gene Ther*, 1996, 3(5): 396-404.
- [8] Cai X, Nash Z, Conley SM, et al. A partial structural and functional rescue of a retinitis pigmentosa model with compacted DNA nanoparticles [J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5290 [2021-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19390689/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0005290.
- [9] Farjo R, Skaggs J, Quiambao AB, et al. Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles [J/OL]. *PLoS One*, 2006, 1(1): e38 [2021-01-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17183666/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0000038.
- [10] Cai X, Conley SM, Nash Z, et al. Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa [J]. *FASEB J*, 2010, 24(4): 1178-1191. DOI: 10.1096/fj.09-139147.
- [11] Koirala A, Makkia RS, Cooper MJ, et al. Nanoparticle-mediated gene transfer specific to retinal pigment epithelial cells [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(35): 9483-9493. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.062.
- [12] Ding XQ, Quiambao AB, Fitzgerald JB, et al. Ocular delivery of compacted DNA-nanoparticles does not elicit toxicity in the mouse retina [J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7410 [2021-01-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19823583/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0007410.
- [13] Han Z, Koirala A, Makkia R, et al. Direct gene transfer with compacted DNA nanoparticles in retinal pigment epithelial cells; expression, repeat delivery and lack of toxicity [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2012, 7(4): 521-539. DOI: 10.2217/nmm.11.158.
- [14] Boylan NJ, Kim AJ, Suk JS, et al. Enhancement of airway gene transfer by DNA nanoparticles using a pH-responsive block copolymer of polyethylene glycol and poly-L-lysine [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2361-2371. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.080.
- [15] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(16): 7297-7301. DOI: 10.1073/pnas.92.16.7297.
- [16] Shete HK, Prabhu RH, Patravale VB. Endosomal escape: a bottleneck in intracellular delivery [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14(1): 460-474. DOI: 10.1166/jnn.2014.9082.
- [17] Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, et al. Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87(3): 472-479. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.04.013.
- [18] Fraley R, Subramani S, Berg P, et al. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255(21): 10431-10435.
- [19] Pitard B, Aguerre O, Airiau M, et al. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(26): 14412-14417 [2021-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9405626/>. DOI: 10.1073/pnas.94.26.14412.
- [20] San H, Yang ZY, Pompili VJ, et al. Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 1993, 4(6): 781-788. DOI: 10.1089/hum.1993.4.6-781.
- [21] Rajala A, Wang Y, Zhu Y, et al. Nanoparticle-assisted targeted delivery of eye-specific genes to eyes significantly improves the vision of blind mice *in vivo* [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(9): 5257-5263. DOI: 10.1021/nl502275s.
- [22] Apaolaza PS, Del Pozo-Rodríguez A, Torrecilla J, et al. Solid lipid nanoparticle-based vectors intended for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis by gene therapy: *in vivo* approaches in Rs1h-deficient mouse model [J]. *J Control Release*, 2015, 217: 273-283. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.033.
- [23] Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, et al. Dextran and protamine-based solid lipid nanoparticles as potential vectors for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(4): 345-355. DOI: 10.1089/hum.2011.115.
- [24] Wang Y, Rajala A, Cao B, et al. Cell-specific promoters enable lipid-based nanoparticles to deliver genes to specific cells of the retina *in vivo* [J]. *Theranostics*, 2016, 6(10): 1514-1527. DOI: 10.7150/thno.15230.
- [25] Puras G, Zarate J, Díaz-Tahoces A, et al. Oligochitosan polyplexes as carriers for retinal gene delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48(1-2): 323-331. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.11.009.
- [26] Raemdonck K, Naeye B, Høgset A, et al. Biodegradable dextran nanogels as functional carriers for the intracellular delivery of small interfering RNA [J/OL]. *J Control Release*, 2010, 148(1): e95-96 [2021-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21529657/>. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.07.070.
- [27] Han Z, Conley SM, Makkia RS, et al. DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice [J]. *J Clin Invest*,



- 2012, 122 (9) : 3221–3226. DOI: 10. 1172/JCI64833.
- [28] Miraldi Utz V, Coussa RG, Antaki F, et al. Gene therapy for RPE65-related retinal disease[J]. Ophthalmic Genet, 2018, 39 (6) : 671–677. DOI: 10. 1080/13816810. 2018. 1533027.
- [29] Sun D, Schur RM, Sears AE, et al. Non-viral gene therapy for Stargardt disease with ECO/pRHO-ABCA4 self-assembled nanoparticles[J]. Mol Ther, 2020, 28 (1) : 293–303. DOI: 10. 1016/j. ymthe. 2019. 09. 010.
- [30] Sun D, Sahu B, Gao S, et al. Targeted multifunctional lipid ECO plasmid DNA nanoparticles as efficient non-viral gene therapy for Leber's congenital amaurosis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 7 : 42–52. DOI: 10. 1016/j. omt. 2017. 02. 005.
- [31] Mitra RN, Zheng M, Weiss ER, et al. Genomic form of rhodopsin DNA nanoparticles rescued autosomal dominant retinitis pigmentosa in the P23H knock-in mouse model [J]. Biomaterials, 2018, 157 : 26–39. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2017. 12. 004.
- [32] Pensado A, Diaz-Corrales FJ, De la Cerda B, et al. Span poly-L-arginine nanoparticles are efficient non-viral vectors for PRPF31 gene delivery: an approach of gene therapy to treat retinitis pigmentosa [J]. Nanomedicine, 2016, 12 (8) : 2251–2260. DOI: 10. 1016/j. nano. 2016. 06. 007.
- [33] Tsang SH, Sharma T. Retinitis pigmentosa (non-syndromic) [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1085 : 125–130. DOI: 10. 1007/978-3-319-95046-4\_25.
- [34] Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa [J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125 (2) : 151–158. DOI: 10. 1001/archophth. 125. 2. 151.
- [35] Tsang SH, Sharma T. Stargardt disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1085 : 139–151. DOI: 10. 1007/978-3-319-95046-4\_27.
- [36] Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, et al. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options [J]. Br J Ophthalmol, 2017, 101 (1) : 25–30. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2016-308823.
- [37] McClements ME, Barnard AR, Singh MS, et al. An AAV dual vector strategy ameliorates the Stargardt phenotype in adult Abca4<sup>-/-</sup> mice [J]. Hum Gene Ther, 2019, 30 (5) : 590–600. DOI: 10. 1089/hum. 2018. 156.
- [38] Kong J, Kim SR, Binley K, et al. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy [J]. Gene Ther, 2008, 15 (19) : 1311–1320. DOI: 10. 1038/gt. 2008. 78.
- [39] Binley K, Widdowson P, Loader J, et al. Transduction of photoreceptors with equine infectious anemia virus lentiviral vectors: safety and biodistribution of StarGen for Stargardt disease [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 (6) : 4061–4071. DOI: 10. 1167/iovs. 13-11871.
- [40] Tsang SH, Sharma T. X-linked juvenile retinoschisis [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1085 : 43–48. DOI: 10. 1007/978-3-319-95046-4\_10.
- [41] Sikkink SK, Biswas S, Parry NR, et al. X-linked retinoschisis: an update [J]. J Med Genet, 2007, 44 (4) : 225–232. DOI: 10. 1136/jmg. 2006. 047340.
- [42] Molday RS, Kellner U, Weber BH. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms [J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31 (3) : 195–212. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2011. 12. 002.
- [43] Fahim AT, Ali N, Blachley T, et al. Peripheral fundus findings in X-linked retinoschisis [J]. Br J Ophthalmol, 2017, 101 (11) : 1555–1559. DOI: 10. 1136/bjophthalmol-2016-310110.
- [44] Tsang SH, Sharma T. Leber congenital amaurosis [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1085 : 131–137. DOI: 10. 1007/978-3-319-95046-4\_26.
- [45] Darrow JJ. Luxturna; FDA documents reveal the value of a costly gene therapy [J]. Drug Discov Today, 2019, 24 (4) : 949–954. DOI: 10. 1016/j. drudis. 2019. 01. 019.
- [46] Bruewer AR, Mowat FM, Bartoe JT, et al. Evaluation of lateral spread of transgene expression following subretinal AAV-mediated gene delivery in dogs [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (4) : e60218 [2021-01-23]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23560080/. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0060218.
- [47] Nour M, Quiambao AB, Peterson WM, et al. P2Y (2) receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (10) : 4505–4514. DOI: 10. 1167/iovs. 03-0453.
- [48] Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, et al. Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment *in vivo* [J]. Am J Pathol, 2001, 158 (4) : 1271–1278. DOI: 10. 1016/S0002-9440(10)64078-3.
- [49] de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, et al. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62 (1) : 100–117. DOI: 10. 1016/j. addr. 2009. 11. 026.
- [50] Conley SM, Cai X, Naash MI. Nonviral ocular gene therapy: assessment and future directions [J]. Curr Opin Mol Ther, 2008, 10 (5) : 456–463.
- [51] Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for ocular drug delivery [J]. Macromol Biosci, 2012, 12 (5) : 608–620. DOI: 10. 1002/mabi. 201100419.
- [52] MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial [J]. Lancet, 2014, 383 (9923) : 1129–1137. DOI: 10. 1016/S0140-6736(13)62117-0.
- [53] Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years [J]. Arch Ophthalmol, 2012, 130 (1) : 9–24. DOI: 10. 1001/archophth. 2011. 298.
- [54] Bishop P. The biochemical structure of mammalian vitreous [J]. Eye (Lond), 1996, 10 (Pt 6) : 664–670. DOI: 10. 1038/eye. 1996. 159.
- [55] Scott JE. The chemical morphology of the vitreous [J]. Eye (Lond), 1992, 6 (Pt 6) : 553–555. DOI: 10. 1038/eye. 1992. 120.
- [56] Dalkara D, Goureau O, Marazova K, et al. Let there be light: gene and cell therapy for blindness [J]. Hum Gene Ther, 2016, 27 (2) : 134–147. DOI: 10. 1089/hum. 2015. 147.
- [57] Garafalo AV, Cideciyan AV, Héon E, et al. Progress in treating inherited retinal diseases: early subretinal gene therapy clinical trials and candidates for future initiatives [J/OL]. Prog Retin Eye Res, 2020, 77 : 100827 [2021-01-25]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31899291/. DOI: 10. 1016/j. pretyeres. 2019. 100827.

(收稿日期: 2021-02-08 修回日期: 2021-06-28)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对稿件组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片, 为了反映组织标本大小的最精确尺度, 请在电子版图片的左下方附注标尺。



中华医学会杂志社  
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究

(本刊编辑部)