

年龄相关性黄斑变性基因治疗的药理与临床研究进展

张 鹏^{1, 2, 3}, 孟 永², 谢金华², 刘楚乔^{2, 3}, 熊亚妮², 常 艳^{4*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226000

3. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133

4. 上海益诺思生物技术有限公司, 上海 201203

摘 要: 年龄相关性黄斑变性(AMD)是由多因素共同诱发的视网膜黄斑区改变, 基因治疗可以显著改善AMD患者临床症状, 减轻长期玻璃体内治疗相关的治疗负担, 提高临床适应性。尽管已取得多项成果, 但基因疗法仍处于起步阶段, 多数药物的临床试验仍处于研究阶段。通过整理近10年以来AMD的相关靶点治疗产品的药理研究与临床研究进展, 并根据不同靶点或新载体进行分类, 结合已取得的临床试验结果, 评估基因治疗AMD的可行性与安全性, 以期对于AMD相关靶点、治疗技术创新与载体开发提供参考。

关键词: 年龄相关性黄斑变性; 基因治疗; 靶点; 载体; 药理研究; 临床试验

中图分类号: R988.1; R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)04-0897-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.027

Advances in pharmacology and clinical research of gene therapy for age-related macular degeneration

ZHANG Peng^{1, 2, 3}, MENG Yong², XIE Jinhua², LIU Chuqiao^{2, 3}, XIONG Yani², CHANG Yan⁴

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. InnoStar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong 226000, China

3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong 226133, China

4. Shanghai InnorStar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: Age-related macular degeneration (AMD), a multifactorial macular alteration of the retina. In AMD gene therapy research, gene therapy has been found to significantly improve patients' clinical symptoms, reduce the treatment burden associated with long-term intravitreal therapy, and improve clinical adaptability. Despite several achievements, current gene therapies are still in their infancy, and clinical trials of most drugs are still in the research stage. This article reviews the pharmacological research progress of AMD-related target therapy products in the past 10 years, classifies them according to different targets or new vectors, and evaluates the feasibility and safety of gene therapy AMD based on the results of clinical trials obtained, so as to provide a reference for AMD-related targets, therapeutic technology innovation and vector development.

Key words: age-related macular degeneration; gene therapy; target; vector; pharmacological research; clinical trials

年龄相关性黄斑变性(AMD)是由多因素诱发的、与年龄密切相关的视网膜黄斑区改变疾病, 是发达国家60岁以上人群失明的主要原因。早期AMD可能与布鲁赫膜(BM)和视网膜色素上皮层(RPE)之间的病理沉积物(玻璃膜疣)有关, 晚期

AMD具有干性、湿性两种形式。湿性AMD只占总发病人群10%~15%^[1], 而脉络膜新生血管(CNV)的产生直接导致了患者视力急性下降乃至丧失^[2]。干性AMD主要表现为RPE细胞、光感受器和脉络膜毛细血管退化, 也称地图状萎缩(GA)。

收稿日期: 2022-10-10

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设(BM2021002)

第一作者: 张 鹏, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。E-mail: kunshanzhangpeng@126.com

*通信作者: 常 艳, 女, 博士生导师, 研究方向为药物毒理学。E-mail: ychang@ncdser.com

玻璃体内注射抗血管内皮生长因子(VEGF)药物已被推荐为湿性AMD的临床一线治疗方法^[3],但部分患者经过了标准化的抗VEGF治疗,仍会出现持续性液体渗出。患有难治性或复发性湿性AMD的患者可能会产生对抗VEGF治疗的耐药机制,这导致抗VEGF药物治疗效果下降^[4]。相比之下,GA的致病机制仍不清楚,目前暂无获批上市的治疗药物^[5]。由于没有可用于修复受损RPE细胞或感光细胞的治疗方法,因此,治疗方法可能会集中在视网膜色素变性(RP)细胞丢失之前的早期干预,以及疾病后期阶段,用干细胞衍生的RPE或感光细胞替代已丢失视网膜细胞^[6],包括人类视网膜移植、人工视觉、视网膜假体、神经保护^[7]等。

随着基因治疗的进步及腺相关病毒(AAV)载体的开发给眼科疾病的治疗带来了希望。由于眼部的“免疫豁免”特点,重组腺相关病毒(rAAV)装载片段基因可以经玻璃体腔注射感染视网膜细胞,在不引起全身免疫反应的情况下,单次注射可持续表达至少2.5年^[8],极大改善了患者的生活质量,同时降低眼部创伤给药的频率与手术风险。治疗眼部疾病的基因疗法仍处于起步阶段,大多数药物临床试验仍处于研究阶段。通过综述近10年以来AMD的相关靶点治疗产品的药理与临床研究进展,包括抗VEGF(anti-VEGF)、重组人补体因子I(rCHI)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管生成素(Ang)-1等,并根据不同基因或载体创新进行分类,以期对AMD相关药物靶点、治疗技术创新与载体开发提供参考。

1 基因治疗的药理研究进展

1.1 AAV载体药物

AAV是目前研究最活跃的基因治疗载体之一,其具有稳定和长期表达等特点。其中,AAV血清型1、2、4和5的载体已经实现了高水平的视网膜基因转移。而治疗AMD的产品中更多的使用AAV2、AAV8,这可能与视网膜内转导效率与启动速度相关^[9]。下文罗列了使用AAV或rAAV载体的部分AMD基因治疗药物,并根据目前的AMD机制研究,按照不同机制或靶点进行划分,详细阐述已取得药理学研究进展。

1.1.1 rAAV-编码阿柏西普 ADVM-022是编码阿柏西普的rAAV2.7m8,针对玻璃体内注射携带抗VEGF cDNA的载体进行了优化,具有高效的视网膜转导效率,从而实现阿柏西普的持续表达。在接受ADVM-022治疗的激光诱导食蟹猴CNV模型

中,7只食蟹猴CNV模型双眼玻璃体腔注射 2×10^{12} 病毒基因组(vg)的ADVM-022,对照组的7只食蟹猴双眼注射等体积溶剂,阿柏西普作为阳性对照。接受ADVM-022治疗动物的视网膜、脉络膜内均能检测到高水平的阿柏西普,且玻璃体内阿柏西普水平在给药后3~9个月不断升高并稳定在一定范围内,给药7个月后房水中的阿柏西普水平与每月或每两个月推注阿柏西普蛋白的人类受试者房水中的阿柏西普水平相似^[3],激光后第2周和第4周,空白组渗出性病变的发生率分别为43%和40%,CNV复合面积分别为 $142\,369\,\mu\text{m}^2$ 和 $82\,923\,\mu\text{m}^2$,与空白组相比,接受ADVM-022治疗的动物在治疗后第2周和第4周渗出性病变发生率明显降低(分别为6%、0),CNV复合体面积显著缩小(分别为 $44\,503.26\,622\,\mu\text{m}^2$),与阳性药物组疗效相似。1项持续2.5年的临床前实验评估了非人灵长类动物中单次双侧玻璃体内注射ADVM-022 2×10^{12} vg后持续表达阿柏西普的长期安全性,实验结果表明,与空载体组相比,经单次给药所产生的阿柏西普持续表达可维持至给药后30个月,治疗期间内动物视网膜结构与视网膜功能均无显著影响,给药后2.5年未观察到组织学异常,具有良好的耐受性与安全性^[8]。

1.1.2 rAAV-可溶性抗VEGF抗体 RGX-314是重组AAV8载体,携带1个可溶性抗VEGF蛋白的编码序列。该载体在转导的视网膜细胞中表达类似于雷珠单抗的可溶性抗VEGF单克隆抗体片段。Shen等^[10]测试了视网膜下注射RGX-314在rho/VEGF小鼠模型中的功效,剂量 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 基因拷贝组(GC)。结果表明,与空载体组相比,小鼠经视网膜下注射 $\geq 1 \times 10^7$ GC的RGX-314,视网膜下新生血管(SNV)平均面积显著降低,注射剂量 $\leq 3 \times 10^7$ GC的SNV平均面积减少了50%,剂量为 3×10^9 、 1×10^{10} GC的眼底SNV几乎完全消除。Liu等^[1]在rho/VEGF小鼠视网膜下腔注射 $1\,\mu\text{L}$ (剂量 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ GC)AAV8-antiVEGF fab抑制视网膜新生血管的实验结果得出相同结论,结果显示视网膜下注射 1×10^{10} GC空AAV8载体的对照组小鼠与视网膜下注射PBS的空白组小鼠眼内可见相当数量的SNV, rho/VEGF小鼠视网膜下注射 1×10^{10} 、 3×10^9 或 1×10^9 GC AAV8-antiVEGF fab,眼底可见非常小的SNV, 3×10^8 、 1×10^8 GC组小鼠可见更多SNV,但仍少于对照组和空白组。除此之外,在饮用水中加入 $2\,\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多西环素后, 1×10^8 、 3×10^8 GC剂量

组中的大多数小鼠与对照组和空白组的全部小鼠均观察到了渗出性视网膜脱离,而 3×10^{10} 、 1×10^{10} GC组中,多数小鼠没有视网膜脱离。1项持续1年的安全性实验^[11]表明非人灵长类动物单次、单侧、视网膜下注射 AAV8-antiVEGF Fab 在低剂量组(1×10^{10} GC)表现出长期安全性,在12个月的随访期间,与未注射的眼睛相比,在载体注射的眼睛中没有观察到显著变化,内核层、外核层厚度无显著变化,而高剂量组(1×10^{13} GC)6只注射眼中,4只注射区域内显示出显著的视网膜外核层变薄,视网膜增厚等改变,未来需要进一步确定RGX-314临床试验剂量上限。

1.1.3 rAAV2-可溶性fms样酪氨酸激酶1 可溶性FMS样酪氨酸激酶1(sFLT-1)是高度有效的内源性VEGF-A抑制剂,可结合并中和VEGF-A,阻止VEGF与其内皮受体的正常结合,仅sFLT-1就足以在啮齿动物和灵长类动物模型中提供抗CNV形成的保护作用^[12]。临床前啮齿动物模型证明了视网膜下给药rAAV.sFLT-1预防CNV形成的机制^[13]。Lai等^[14]验证了注射rAAV.sFLT-1的安全性与耐受性。将8只非人灵长类动物左眼视网膜下注射AAV2.sFIT-1 1.9×10^{10} 转导单位(TU),1只未注射动物作为对照,结果表明视网膜下注射AAV2.sFIT-1 3个月后左眼、右眼、视神经组内均检测到sFIT-1表达,并持续表达至注射后12个月。除注射部位的局部刺激外,无任何不良反应产生,也不会引起细胞免疫反应。

1.1.4 rAAV-补体因子I 补体失调被认为是干性AMD的关键危险因素,其中替代途径的基因与发展该疾病的风险相关。GT005是表达重组人补体因子I(hCFI)的AAV2产品,其作为补体抑制剂已在数个模型被证实有效性,受试动物经视网膜下给药每眼GT005 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ GC,阴性对照动物接受 2×10^8 GC空载体,阳性对照小鼠在激光治疗后玻璃体内接受80 μ g阿柏西普,注射后可在小鼠外层视网膜检测到hCFI mRNA与蛋白质,通过hCFI的高表达减少补体激活导致CNV面积剂量相关地减少^[15],差异在每眼 5×10^7 、 2×10^8 GC剂量下具有统计学显著性^[16]。在非灵长类动物视网膜下注射低剂量(每眼 7×10^{10} vg)和高剂量(每眼 3.5×10^{11} vg)GT005后,从2周至26周在玻璃体液中均可检测到hCFI蛋白,并在第13周达到最大水平(805 ± 249)ng·mL⁻¹,GT005可显著改善GA病变,减小GA区域及提高视网膜功能,但自13周后,hCFI水平降低逐渐下降,治

疗水平下降,可能与hCFI抗体滴度、抗hCFI抗体生成相关^[17]。

1.1.5 rAAV-CD59 CD59是天然存在的膜攻击复合物(MAC)形成的膜结合抑制剂。通过结合C5B678末端补体蛋白复合物和阻止C9分子的掺入而发挥作用^[18]。通过AAV载体将膜结合的人源CD59导入小鼠RPE细胞,可以保护RPE细胞免受补体介导的体外裂解,使激光诱导的CNV减少约60%^[19]。Cashman等^[20]的研究中,建立rAAV2-CD59(HMR59)疗法,使用非膜结合的可溶性重组CD59(sCD59)作为MAC形成的抑制剂,经玻璃体腔注射AAV2-sCD59(8×10^9 vg),增加sCD59的表达,减少激光光凝诱导的CNV面积61.7%($\pm 19.9\%$)。Adhi等^[21]在诱导糖尿病前2周在小鼠玻璃体内注射AAV2/8-sCD59(9×10^8 vg),然后ip链脲佐菌素连续4 d诱导糖尿病性视网膜病变小鼠模型,与未接受注射的对侧眼相比,诱导前2周预注射AAV2/8-sCD59的眼睛减少神经节细胞凋亡,增加视网膜Müller细胞活化,减轻视网膜血管渗漏,抑制MAC沉积能力,减少40%的MAC生成。1项由低、中和高剂量组成的剂量递增研究(NCT03144999)已完成,但尚未公布结果。

1.2 腺病毒、慢病毒载体药物

1.2.1 色素上皮衍生因子 色素上皮衍生因子(PEDF)是相对分子质量 5×10^4 的蛋白质,其晶体结构显示出独特的丝氨酸蛋白酶抑制剂及肝素和胶原蛋白结构域,可在增殖的内皮细胞中诱导细胞凋亡,是一种天然的血管生成抑制剂,其功效已在多种细胞和动物实验中得到证明。1项研究指出,通过眼部注射(玻璃体腔注射 1×10^9 颗粒、视网膜下注射 1×10^8 颗粒)含有编码PEDF基因的腺病毒可抑制rho/VEGF小鼠模型中的视网膜新生血管和CNV形成,治疗14 d后,玻璃体内注射 1×10^9 颗粒小鼠眼底CNV面积较对照组更小,同时小血管开始退化,只留下了大血管,意味着PEDF可能促进构成新生血管的细胞中的程序性细胞凋亡,已经形成的新生血管开始消退^[22],存在治愈AMD的可能性。Yu等^[23]将大鼠暴露于激光进行诱导建立CNV模型,通过玻璃体内注射慢病毒-PEDF-绿色蛋白荧光(浓度 1×10^7 TU·L⁻¹给药5 μ L),对照组给予等剂量空病毒载体。自给药7 d起开始发挥治疗作用,给药4周可在光感受器和RPE中观察到绿色荧光,并且可持续表达28 d,治疗组动物眼底CNV区域的大小自给药后7 d显著减少,第7、14、21、28天OCT图片显示

CNV 厚度显著降低。PCR 和 Western blotting 分析表明第 7、14、21、28 天 PEDF 表达水平明显上调, VEGF 和 Flk-1 表达水平下降。但值得注意的是, 慢病毒有较高并且较稳定的转染能力^[24], 但同时具有潜在的整合与遗传毒性风险^[25], 未来需要对载体进一步改造并评价其安全性。

1.2.2 血管生成素-1 (Ang-1) Ang-1 通过内皮细胞特异性 Tie-2 受体酪氨酸激酶发出信号。Ang-Tie 系统是人血管稳态的重要调节因子, 是血管稳态的关键参与者, 包括血管重塑、成熟和稳定, 通过 Ang-1 激活 Tie-2 受体可维持血管稳定性以限制渗出^[26]。在小鼠湿性 AMD 模型中, 玻璃体腔内注射 rAAV-Ang-1 与 VEGF 抑制剂一样有效地抑制 CNV 的形成^[27]。Lambert 等^[27]在小鼠视网膜下注射 AAV2.COMP-Ang-1 (3×10^{11} vg·mL⁻¹, 1 μ L), 并在视网膜下注射后 1 个月接受激光光凝建立 CNV 模型, Western blotting 结果显示视网膜下注射 2 个月时, COMP-Ang1 蛋白在 RPE/脉络膜中成功表达, 并且 AAV2.COMP-Ang1 组中的 VEGF 浓度 (0.10 ± 0.01) pg· μ g⁻¹ 明显低于对照组 (0.14 ± 0.03) pg· μ g⁻¹, 共聚焦图像分析发现 AAV2.COMP-Ang1 组的 CNV 的面积为 $(6.36 \pm 1.94) \times 10^4 \mu\text{m}^3$, 显著小于对照组的 $(16.12 \pm 3.16) \times 10^4 \mu\text{m}^3$, 面积下降了 30%~39%。

1.3 潜在治疗手段

光遗传学方法是指通过 AAV 载体引入视紫红质亚家族光敏蛋白的 DNA 序列, 使细胞对光有反应。通道视紫红质蛋白在绿藻中充当感觉神经感受器。研究发现, 一旦该蛋白在人眼内表达, 就能赋予神经节细胞 (RGC) 类似光感受器的功能, 从而让患者恢复视力^[28-29]。RGC 中表达光敏视蛋白是恢复视力的有吸引力的方法, Douar 等^[29-30]通过在猕猴眼内单次双侧玻璃体腔内每眼给予 GS030 5×10^{11} vg, 发现 4 只动物在治疗 2 月后, 视力明显改善, 4 个治疗眼中有 3 个显示出对光刺激的高振幅电反应, 无全身或局部不良反应产生, 眼科检查未见异常, 治疗 6 月后动物房水内仍有 AAV 表达。一旦成功, 未来也许可以用于 AMD 中央视网膜萎缩区的视觉恢复。Christian 等^[31]在小鼠眼内进行了安全性评估, 结果证明 AAV2.7m8-ChrimsonR-tdTomato 在 rd1 小鼠中经玻璃体腔每眼注射 7.84×10^9 vg 具有良好的耐受性。但人类视网膜中对微生物视蛋白的潜在免疫反应是个重要问题, 需要进一步研究。

Askou 等^[32]利用 VEGF 短发夹 RNA (shRNA) 与 AAV8 载体结合 (scAAV2/8-hU6-sh9), 经 im 给药 40 μ L

(每毫升 2×10^{10} 颗粒) 治疗的小鼠 mVEGF 表达下调 91%, 证明了内源性 mVEGF 的有效沉默。视网膜下递送 2 μ L (每眼 1×10^9 颗粒) 至激光诱导的 CNV 小鼠模型中, 接受视网膜下给药的 CNV 模型小鼠 CNV 面积显著降低了 48%。

2 靶点药物临床研究进展

2.1 ADVM-022

1 份病例数为 30 例的 I 期临床试验, 旨在评估单次玻璃体内注射 ADVM-022 在 nAMD 患者中的安全性、耐受性和有效性^[33]。结果表明接受单次注射 ADVM-022 治疗的湿性 AMD 患者能够在 22~46 周内保持基准视力并改善中心视力, 减少 CNV 渗出面积, 恢复黄斑区视网膜厚度。试验中 80% 患者经单次玻璃体腔给药后, 在长达 92 周内不需要任何补充性抗 VEGF 注射, 平均年化抗 VEGF 注射频率在 ADVM-022 后降低了 99% (高剂量组每眼 6×10^{11} vg) 和 85% (低剂量组每眼 2×10^{11} vg)。ADVM-022 治疗期间仅出现轻度炎症, 而该症状在 1~3 个月后自行消退^[3]。

2.2 RGX-314

RGX-314 利用腺相关病毒 8 (AAV8) 载体递送抗 VEGF fab 转基因。RGX-314 的 II 期 AAVIAT 研究中展现出了积极结果, 第 1 组 20 例患者脉络膜上腔递送 RGX-314 每眼 2.5×10^{11} GC, 对照组每月玻璃体腔注射雷珠单抗 0.5 mg, 比例为 3:1。第 2 组 20 例患者脉络膜上腔递送每眼 RGX-314 5×10^{11} GC, 注射 2 次, 对照组每月 0.5 mg 雷珠单抗玻璃体内注射, 比例为 3:1。第 3 组与第 2 组剂量相同, 对比 RGX-314 治疗的 20 例中和抗体阳性患者。结果显示, 第 2 组接受 RGX-314 的 15 例患者 6 个月内表现出稳定的最佳矫正视力 (BCVA) 和中央视网膜厚度 (CRT), 从第 1 天起 6 个月内 BCVA 平均变化为 +0.2 字母, CRT 的平均变化为 -33 μ m。第 1 组与第 2 组的雷珠单抗治疗的 10 例患者 6 个月内平均 BCVA 与基线比较变化了 +4.0 个字母, CR 平均变化为 -12 μ m。与 RGX-314 治疗前比较, 平均年化注射率显著降低, 接受 RGX-314 治疗 6 个月内平均注射 1.3 次, 抗 VEGF 符合下降 71.8%^[34]。

2.3 rAAV2-sFLT-1

1 份持续 3 年的 I 期和 IIa 期联合随机对照试验报告^[35]中, 24 例基因治疗患者接受 1×10^{11} vg rAAV.sFLT-1 并每月观察持续 1 年, 并按需进行补充治疗。1~3 年内, 44% 的患者单次治疗维持基准视力, 34% 患者在单次治疗后 3 年内保持显著的视力改善,

55%的患者在数次治疗后视力得到改善,基因治疗耐受性良好,除1例发生短暂性脉络膜炎外,没有发现严重的不良事件。该结果与32例病患的临床随机安全性试验(NCT01494805)^[36]相似,在该试验中,基因治疗组经视网膜下注射 rAAV2-sFLT-1 1×10^{11} vg,雷珠单抗作为阳性对照,在实验开始时与第4周分别给予雷珠单抗治疗,在52周的时间内,rAAV.sFLT-1组中有12例(57%)患者的视力保持或改善,而对照组为4例(36%),52%的基因治疗患者接受 ≤ 2 次治疗即可显著改善症状,并且无显著不良反应;而对照组中,11例患者中有10例(90.9%)接受了超过2次雷珠单抗再治疗。但鉴于样本量较少,需进一步的临床试验来证明 rAAV2-sFLT-1 治疗湿性AMD的可行性。

2.4 GT005

首次I/II期临床研究(NCT03846193)已取得初步结果,研究将11例受试者在视网膜下分别给予 2×10^{10} 、 5×10^{10} 、 2×10^{11} vg 3个剂量,在随访51.8周内,3个剂量水平的GT005均具有良好的耐受性,仅发生轻微不良反应,且不良反应与GT005无关,无严重的眼部不良反应发生^[16]。目前,2项I/II期临床研究(NCT04437368、NCT04566445)正在招募志愿者,以评估2种剂量的GT005单次视网膜下注射对继发于年龄相关性黄斑变性的地图状萎缩受试者的安全性和有效性。1项3年的长期随访试验(NCT05481827)预计于2028年9月完成。

2.5 RetinoStat®

RetinoStat®是表达血管生成抑制剂血管抑素和内皮抑素的重组马传染性贫血慢病毒^[37]。这类基因表达后能潜在地抑制抗VEGF治疗不足的湿性AMD患者的血管生成^[38]。恒河猴和家兔的动物模型表明视网膜下给药是安全的,并且能在眼内长时间表达^[39-40]。1项RetinoStat®的I期剂量递增临床试验中,21例患者被分为3组,分别给予低、中、高3个剂量,除了首次给药时出现血管渗漏,3组患者均表现出良好的耐受性,没有与药物或手术相关的不良事件或严重不良事件,相比治疗前,所有患者视力显著改善,血管渗漏显著减少,并且可实现基因稳定、长期(4年以上)表达^[38]。

Campochiaro等^[41]的研究印证了该药的药效与安全性,21例患有晚期湿性AMD的受试者分为3组,视网膜下分别给予3种剂量(2.4×10^4 、 2.4×10^5 、 8.0×10^5 TU),给药后48周内观察不良反应、视力变化以及视网膜结构改变。结果表明,除1例术中严

重不良反应和2例中度不良反应外,其他受试者没有任何炎症发生或炎症轻微和短暂。中、高剂量组第1周即可测得眼内低水平内皮抑素,低剂量组在4周亦可测得血管抑素和内皮抑素。表达水平在给药24周达到峰值,48周时维持稳定。第48周时,低剂量组2例患出现视力下降,中剂量组所有患者视力保持稳定,高剂量组除1例改善不明显外,其余患者视力均显著改善;低剂量组中的3例受试者中有2例显示BCVA降低,而中剂量组中的受试者几乎没有变化。高剂量组受试者显示BCVA改善了 ≥ 10 个字母。荧光素血管造影渗漏明显减少,长期随访显示在给药2.5年后仍有表达,可在少数患者体内维持4年。

2.6 色素上皮衍生生长因子抑制剂

血小板衍生生长因子(PDGF)抑制剂通过阻断周细胞的募集、存活和成熟,抑制新形成血管的发育和成熟,从而为新生血管性AMD患者提供令人兴奋的新治疗选择。抗VEGF单一疗法已被证明对AMD的治疗有效,然而,在大多数临床试验中,2/3的患者接受抗VEGF治疗未能达到预期效果。2013年的1项研究^[42]首先在动物体内进行,比较了VEGF抑制剂和PDGF抑制剂联合治疗与VEGF抑制剂单独治疗的效果,试验结果显示联合用药的益处,接受ip $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 抗PDGF-BB-设计锚蛋白重复蛋白(DARPin)和 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 抗VEGF-A DARPin的小鼠眼底CNV显著减少,且治疗效果优于单一药物。在Vldlr^{-/-}小鼠模型中,经玻璃体腔注射的给药方式也取得了相似的试验结果,同时研究发现联合治疗的小鼠发生视网膜脱离的频率和严重程度低于单独治疗的小鼠。

I期临床数据也充分证实了联合用药的优越性,其中,12例患者接受4种剂量(0.03、0.3、1.5、3.0 mg)的联合治疗,其余患者接受单一药物治疗^[43]。结果表明联合给药的所有剂量都具有良好的耐受性,第12周59%的患者出现显著的视力增益,BCVA增加15个字母,CNV大小较治疗前平均减少了85%,CNV中心厚度平均减少了38.9%。CRT在基线时为395 μm ,在第4周时为251 μm ,在第8周时为231 μm ,在第12周时为229 μm 。这可能是因为VEGF、PDGF水平在新生血管中均升高,而VEGF被抗VEGF药物所中和,PDGF持续产生作用,导致周围细胞募集,新生血管膜稳定。将VEGF抑制剂与PDGF抑制剂联合治疗的策略,可能更有效治疗新生血管生成。

2.7 Tie-2受体酪氨酸蛋白激酶

Faricimab是第1个专为眼内使用而设计的双特异性抗体,同时且独立地结合、中和血管生成素-2(Ang-2)和VEGF-A,具有高特异性和效力,并且在2项II期临床中分别针对nAMD(NCT02484690)和糖尿病性黄斑水肿患者(NCT02699450)进行了评估,综合2份试验结果发现,每4周或每8周固定给药间隔的法瑞西单抗(faricimab)在nAMD中的安全性和有效性与每月注射雷珠单抗相当,并具有持续疗效的潜力^[44-45]。Arshad等^[44]将72例受试者按1:2:2的比例分别以每4周0.5 mg的玻璃体内注射雷珠单抗或每12或16周6.0 mg的法瑞西单抗,结果发现在24周时,以16周为给药间隔组中61%(19例)的患者无疾病活动,以12周为给药间隔组中71%(17例)的患者无疾病活动,每4周给药1次的雷珠单抗组中,94%(15例)的患者没有疾病活动。第40周时,与雷珠单抗相比,每16周给药1次和每12周给药1次的法瑞西单抗治疗,患者视力有所提高,BACV较基线提升了至少15个字母,光学相干断层扫描结果显示,减少的CNV面积与总病变面积与雷珠单抗治疗相当。

3 结语

眼科基因治疗背后的基本原理是将功能齐全的基因片段通过特定载体注入组织内,对细胞、组织内的脱氧核糖核酸进行基因修饰、基因替代、基因沉默,以达到预期的治疗效果。而与其他器官相比,眼部具有更大的治疗潜力,由于血-视网膜屏障,更易于通过注射手段获得免疫豁免;眼部结构高度分隔有助于接触不同的眼组织,透明的眼内介质允许通过非侵入式技术评估视网膜结构改变,以确认药物的治疗效果^[37]。迄今为止,对于基因治疗在AMD中潜在的应用研究已产生实质性结果,许多体内外研究已充分证实了基因治疗对于AMD的有效性。

但基因治疗效果受多种因素影响。在开发眼部给药疗法中,给药途径也是个重要因素,目前主流给药方式主要为玻璃体腔给药、视网膜下给药。视网膜下腔给药使病毒载体更易透过视网膜物理屏障,靶部位药物浓度较高,然而,该方法需要专业的技巧,可能会产生短暂的医源性视网膜脱落^[46],施术者必须小心控制,以降低手术风险,颞侧血管弓上侧进行给药^[47],可以使药液缓慢向黄斑中心凹扩散,将黄斑中心凹抬起,最大程度减少中心凹延展,减少视网膜脱落风险,尽管手术过程复杂且具

有侵入性,但临床试验数据表明,视网膜下途径通常具有良好的耐受性和有效性^[48]。由于内界膜作为物理屏障的存在,限制了递药系统向视网膜内层的转导,玻璃体腔给药操作难度较小,术后风险较小,但对于治疗视网膜疾病疗效较差,这可能是物理屏障、玻璃体的胶体性质导致药物扩散不完全、载体的潜在稀释所导致的。

AAV载体的视网膜下给药是将治疗基因递送至视网膜的非常有效的方法,病毒载体的应用促进了正常基因在眼组织内的转导,部分产品成功进入临床试验,并取得积极结果。但AAV作为当前最热门的病毒载体也存在一定风险。2021年的1项持续时间10年的长期实验发现,9只接受基因治疗的犬中,2只犬的靶点基因表达逐渐增高,比前4年观察到的水平高4倍^[49]。尽管AAV基因治疗中暂无基因表达增加或载体介导的严重不良事件,但实验结果说明AAV载体可能具有潜在遗传毒性,需要进一步治疗后长期监测以评估该载体的安全性。未来随着更安全和更有效的病毒载体的开发,靶向性的改善使载体更具细胞特异性,通过启动子调控转基因表达的改善,以及外科治疗的进步以减少细胞损失,基因治疗AMD的未来显示出巨大的潜力,有望成为有效的疗法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu Y, Fortmann S D, Shen J, et al. AAV8-antiVEGFab ocular gene transfer for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 542-549.
- [2] Heesterbeek T J, Lechanteur Y T, Lorés-Motta L, et al. Complement activation levels are related to disease stage in AMD [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2020, 61(3): 18-18.
- [3] Grishanin R, Vuilleminot B, Sharma P, et al. Preclinical evaluation of ADVIM-022, a novel gene therapy approach to treating wet age-related macular degeneration [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(1): 118-129.
- [4] Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: A comprehensive review [J]. *Drug Design Develop Ther*, 2016, 10: 1857.
- [5] Hanus J, Anderson C, Wang S. RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD [J]. *Age Res Rev*, 2015, 24: 286-298.
- [6] Rickman C B, Farsiu S, Toth C A, et al. Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets,

- and imaging [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2013, 54 (14): ORSF68-ORSF80.
- [7] Solinís M Á, Del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza P S, et al. Treatment of ocular disorders by gene therapy [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2015, 95: 331-342.
- [8] Kiss S, Bender K O, Grishanin R N, et al. Long-term safety evaluation of continuous intraocular delivery of aflibercept by the intravitreal gene therapy candidate ADVIM-022 in nonhuman primates [J]. Transl Vision Sci Technol, 2021, 10(1): 34-34.
- [9] Auricchio A. Pseudotyped AAV vectors for constitutive and regulated gene expression in the eye [J]. Vision Res, 2003, 43(8): 913-918.
- [10] Shen J-K, Fortmann S D, Yoo S, et al. RGX-314, an AAV8 expressing an anti-VEGF protein, strongly suppresses subretinal neovascularization and vascular leakage in mouse models [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2017, 58(8): 199-199.
- [11] Ammar M J, Zhou E J, Morgan J I W, et al. Safety of the subretinal delivery of RGX-314 AAV8-anti-VEGF Fab gene therapy in NHP: Retinal structure over one year [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2018, 59(9): 1422-1422.
- [12] Rakoczy E P, Lai C M, Magno A L, et al. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 Year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial [J]. Lancet, 2015, 386(10011): 2395-2403.
- [13] Lai C M, Estcourt M J, Wikstrom M, et al. rAAV. sFlt-1 gene therapy achieves lasting reversal of retinal neovascularization in the absence of a strong immune response to the viral vector [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2009, 50(9): 4279-4287.
- [14] Lai C-M, Estcourt M, Himbeck R, et al. Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2. sFlt-1 in non-human primates [J]. Gen Thera, 2012, 19(10): 999-1009.
- [15] Ellis S, Buchberger A, Holder J, et al. GT005, a gene therapy for the treatment of dry age-related macular degeneration (AMD) [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2020, 61(7): 2295-2295.
- [16] Nielsen J, Maclaren R E, Heier J S, et al. Preliminary results from a first-in-human phase I/II gene therapy study (FOCUS) of subretinally delivered GT005, an investigational AAV2 vector, in patients with geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2022, 63(7): 1504-1504.
- [17] Esteve-Rudd J, Francis J, Hughes J, et al. Preclinical pharmacology and safety of GT005, an investigational gene therapy targeting the complement pathway for the treatment of geographic atrophy [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2022, 63(7): 294-F0097.
- [18] Rollins S, Sims P. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9 [J]. J Immunol, 1990, 144(9): 3478-3483.
- [19] 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.
- [20] Cashman S M, Ramo K, Kumar-Singh R. A non membrane-targeted human soluble CD59 attenuates choroidal neovascularization in a model of age related macular degeneration [J]. PloS One, 2011, 6(4): e19078.
- [21] Adhi M, Cashman S M, Kumar-Singh R. Adeno-associated virus mediated delivery of a non-membrane targeted human soluble CD59 attenuates some aspects of diabetic retinopathy in mice [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e79661.
- [22] Mori K, Gehlbach P, Ando A, et al. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2002, 43(7): 2428-2434.
- [23] Yu Y J, Mo B, Liu L, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by lentivirus-mediated PEDF gene transfer in rats [J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(8): 1112.
- [24] Wang L, Zhai W, Yang X, et al. Lentivirus-mediated stable Fas gene silencing in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. J South Med Univ, 2014, 34(10): 1475-1480.
- [25] 陈琛, 万海粟. 慢病毒载体及其研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(12): 870-876.
- Chen C, Wan H S. Research progress on lentivirus vector [J]. Chin J Cancer Res, 2014, 17(12): 870-876.
- [26] Fukuhara S, Sako K, Noda K, et al. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis [J]. Histol Histopathol, 2010, 25(3): 387-396.
- [27] Lambert N G, Zhang X, Rai R R, et al. Subretinal AAV2. COMP-Ang1 suppresses choroidal neovascularization and vascular endothelial growth factor in a murine model of age-related macular degeneration [J]. Exp Eye Res, 2016, 145: 248-257.
- [28] Williams S C, Deisseroth K. Optogenetics [J]. Proc Nat Acad Sci, 2013, 110(41): 16287-16287.
- [29] Moore N A, Bracha P, Hussain R M, et al. Gene therapy for age-related macular degeneration [J]. Exp Opin Biol Ther, 2017, 17(10): 1235-1244.
- [30] Douar A M, Bouquet C, Pruneau D, et al. Optogenetic engineering of retinal ganglion cells with AAV2. 7m8-

- Chrimsonr-tdTomato (GS030-DP) is well tolerated and induces functional responses to light in non-human primates [J]. *Mol Ther*, 2016, 24: S106-S107.
- [31] Christian B J, Sorden S D, Ward M, et al. Ocular safety of AAV2. 7m8-ChrimsonR-tdTomato (GS030-DP) following intravitreal injection and exposure to 595 nm LED light in blind rd1 mice [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2018, 59(9): 5658-5658.
- [32] Askou A L, Pournaras J a C, Pihlmann M, et al. Reduction of choroidal neovascularization in mice by adeno - associated virus - delivered anti - vascular endothelial growth factor short hairpin RNA [J]. *J Gen Med*, 2012, 14(11): 632-641.
- [33] Khanani A M, Kiss S, Turpcu A, et al. Phase 1 study of intravitreal gene therapy ADVIM-022 for neovascular AMD (OPTIC trial) [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2020, 61(7): 1154-1154.
- [34] Heier J, Campochiaro P, Ho A. Key takeaways from the RGX-314 phase I/IIa clinical trial for wet AMD (Cohorts 1—5) [J]. *Am Acad Ophthalmol*, 2019, 10: 21.
- [35] Rakoczy E P, Magno A L, Lai C-M, et al. Three-year follow-up of phase 1 and 2a rAAV. sFLT-1 subretinal gene therapy trials for exudative age-related macular degeneration [J]. *Am J Ophthalmol*, 2019, 204: 113-123.
- [36] Constable I J, Pierce C M, Lai C M, et al. Phase 2a randomized clinical trial: safety and post hoc analysis of subretinal rAAV. sFLT-1 for wet age-related macular degeneration [J]. *EBio Med*, 2016, 14: 168-175.
- [37] De Guimaraes T C, Georgiou M, Bainbridge J W, et al. Gene therapy for neovascular age-related macular degeneration: Rationale, clinical trials and future directions [J]. *Br J Ophthalmol*, 2021, 105(2): 151-157.
- [38] Lauer A K, Campochiaro P A, Sohn E H, et al. Phase I safety and tolerability results for RetinoStat®, a lentiviral vector expressing endostatin and angiostatin, in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2016, 57(12).
- [39] Cavalieri V, Baiamonte E, Lo Iacono M. Non-primate lentiviral vectors and their applications in gene therapy for ocular disorders [J]. *Viruses*, 2018, 10(6): 316.
- [40] Binley K, Widdowson P S, Kelleher M, et al. Safety and biodistribution of an equine infectious anemia virus-based gene therapy, RetinoStat®, for age-related macular degeneration [J]. *Human Gen Ther*, 2012, 23(9): 980-991.
- [41] Campochiaro P A, Lauer A K, Sohn E H, et al. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) study [J]. *Human Gen Ther*, 2017, 28(1): 99-111.
- [42] Dong A, Seidel C, Snell D, et al. Antagonism of PDGF-BB suppresses subretinal neovascularization and enhances the effects of blocking VEGF-A [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(3): 553-562.
- [43] Jaffe G J, Elliott D, Wells J A, et al. A phase 1 study of intravitreal E10030 in combination with ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(1): 78-85.
- [44] Khanani A M, Patel S S, Ferrone P J, et al. Efficacy of every four monthly and quarterly dosing of faricimab vs ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: The STAIRWAY phase 2 randomized clinical trial [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2020, 138(9): 964-972.
- [45] Sahni J, Patel S S, Dugel P U, et al. Simultaneous inhibition of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor-A with faricimab in diabetic macular edema: BOULEVARD phase 2 randomized trial [J]. *Ophthalmology*, 2019, 126(8): 1155-1170.
- [46] Maclaren R E, Groppe M, Barnard A R, 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.
- [47] Weleber R G, Pennesi M E, Wilson D J, et al. Results at 2 years after gene therapy for RPE65-deficient Leber congenital amaurosis and severe early-childhood-onset retinal dystrophy [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(7): 1606-1620.
- [48] Bainbridge J W, Mehat M S, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis [J]. *New Eng J Med*, 2015, 372(20): 1887-1897.
- [49] Nguyen G N, Everett J K, Kafle S, et al. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 47-55.

[责任编辑 李红珠]