DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20210203

基于AAV的基因治疗在遗传性耳聋中的研究进展

齐洁玉[1#]，王洪阳[2#]，张李燕[1]，王秋菊[2]*，柴人杰[1]*

（1.东南大学生命科学与技术学院，生物电子重点实验室，神经再生协同创新中心，江苏 南京 210096；
2.中国人民解放军总医院，耳鼻咽喉头颈外科医学部耳鼻咽喉内科，国家耳鼻咽喉疾病临床医学研究中心，全军耳鼻咽喉研究所，北京 100853）

【摘要】近20年来，遗传性疾病的基因治疗研究日益深入。作为临床试验中相对较为安全的基因治疗载体，重组腺相关病毒AAV在遗传性疾病的基础和临床研究中被广泛使用。遗传性耳聋（包括非综合征和综合征耳聋）的主要致病原因是遗传物质，即基因发生异常突变。自1997年发现首个耳聋基因以来，目前已鉴定123个非综合征耳聋基因，超过40个综合征耳聋基因。遗传性耳聋的临床发病率高，但缺乏有效的治疗方法。随着分子生物学和基因治疗临床研究的发展，重组AAV介导的基因治疗开始广泛应用于耳聋治疗的基础研究之中。本文对重组AAV及其介导的遗传性疾病，尤其是遗传性耳聋相关的基因治疗的概念、策略及其应用作一综述。

【关键词】腺相关病毒（AAV）；基因治疗；遗传性耳聋

中图分类号：R764.43　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2021）02-0015-09

Progress of gene therapy based on AAV in hereditary deafness

Qi Jieyu[1#], Wang Hongyang[2#], Zhang Liyan[1], Wang Qiuju[2]*, Chai Renjie[1]*

(1. State Key Laboratory of Bioelectronics, Co-innovation Center of Neuroregeneration, School of Life Sciences and Technology, Southeast University, Nanjing 210096, Jiangsu, China;
2. Department of Audiology and Vestibular Medicine, College of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Chinese People's Liberation Army (PLA) General Hospital, National Clinical Research Center for Otolaryngologic Diseases, Beijing 100853, China)

【**Abstract**】In the past 20 years, the research about gene therapy on hereditary diseases has been deepening. As a safe vector, recombinant adeno-associated virus (rAAV) viruses are widely used in basic and clinical studies of genetic diseases. Hereditary hearing loss, including nonsyndromic and syndromic hearing loss, is mainly caused by genetic or chromosomal abnormalities. Since the first deafness gene was discovered in 1997, 123 nonsyndromic deafness genes and more than 40 syndromic deafness genes have been identified in the past twenty-four years. Hereditary deafness is characterized by a high clinical incidence in the population and lack of effectively treatments. Fortunately, with the development of molecular biology technology and the progress of gene therapy, recombinant AAV-mediated gene therapy has been widely used in the basic research of deafness treatment. This review will address the concepts, strategies and applications of recombinant AAV-mediated gene therapies for hereditary diseases, especially for hereditary deafness.

【**Keywords**】Adeno-associated virus (AAV); Gene therapy; Hereditary deafness

---

基金项目：国家博士后创新计划（BX20200082）；国家自然科学基金重点项目（82030029）；科技部国家重点研发计划（2017YFA0103903；SQ2020YFA010013）

通讯作者：柴人杰（1982-），男，江苏南京人，博士生导师，主要从事感音神经性聋研究。E-mail：renjiec@seu.edu.cn
王秋菊（1965-），女，北京人，博士生导师，主要从事耳内科临床及聋病遗传学研究与临床转化应用。E-mail：wqcr301@vip.sina.com
#为共同第一作者

前言

2020年3月，世界卫生组织发布的听力报告指出，目前全球超过4.3亿人患有听力损失，到2025年，听障人士可能增加至7亿。遗传物质突变是导致先天性耳聋的主要病因之一，超过120个基因的突变与人类非综合征性耳聋的发生发展有关。目前，临床上治疗耳聋的方法主要局限于助听器和人工耳蜗，还没有针对人类听力损失的生物治疗方法。因此，针对遗传性耳聋的基因疗法正在大力研发中。过去20年，基因治疗方法，尤其是腺相关病毒（Adeno-Associated Virus，AAV）基因治疗，在遗传性疾病临床治疗领域取得了重大的突破。AAV介导的基因疗法即通过重组AAV病毒将治疗性基因或其它治疗性分子输送到特定的组织和器官中，以达到有效治疗遗传病的目的。作为近年来飞速发展的一种全新治疗方式，基因治疗在探索遗传性耳聋治疗的方法上前景光明。

1 AAV概述

AAV属于微小病毒科依赖病毒属，无自主复制能力，需要在辅助病毒如腺病毒或疱疹病毒的帮助下进行复制，是一种单链DNA缺陷型病毒[1]。AAV直径在18~26 nm之间，其整个基因组长度约为4.7 kb[2]，由两个反向重复序列（Inverted Terminal Repeats，ITRs）和两个基因，即*rep*基因和*cap*基因组成。ITRs是位于AAV基因组中的唯一顺式作用元件，是AAV病毒包装所必须的自身结构，主要起指导基因复制和引导毒粒组装的作用[3]。ITR的碱基突变或缺失会影响病毒颗粒的包装和感染。*rep*和*cap*这两个基因是AAV基因组仅存的开放阅读框（Open Reading Frame，ORF），编码AAV病毒所有的组成蛋白。*rep*基因编码四个蛋白：Rep78、Rep68、Rep52和Rep40，参与病毒复制和组装；cap基因编码三个蛋白，即VP（Virion Protein，VP）1、VP2和VP3，三者以1∶1∶10的比例共同组成AAV病毒的衣壳蛋白[3]。每个VP亚基在衣壳蛋白表面包含9个可变区域，决定了AAV的细胞偏好性、AAV的胞内运输力和生物体内中和抗体对AAV的识别能力[4, 5]。因此，AAV衣壳蛋白的基因工程改造和修饰能够改变病毒的感染效率和中和抗体的清除能力[6]。

重组AAV病毒（recombined AAV，rAAV）是将天然存在的AAV经过基因工程改造，由治疗性外源转基因代替*rep*和*cap*基因，仅保留两端的ITR序列，所产生的一种可供人工转基因应用的载体。因此，重组AAV病毒在帮助质粒提供辅助病毒功能的作用下，依赖保留的ITR序列可以在体外包装形成新的含有转基因的重组AAV[7]，因此rAAV携带与野生型AAV相同的衣壳蛋白，保留了AAV衣壳蛋白原有的特性。也正因如此，rAAV中外源基因组的长度极限在4.7 kb左右。完全删除病毒基因组序列不仅能够使rAAV携带转基因的容量达到最大，同时还能够减小rAAV体内转导过程所产生的免疫反应和细胞毒性。因此，通过基因改造后的rAAV具有致病性低，安全性高，免疫原性弱，物理性质稳定，并且在宿主内能稳定表达等特点，在基因治疗研发中有很大的应用前景[8, 9]。

2 AAV转导途径

AAV进入靶细胞是通过胞吞作用实现的。AAV病毒颗粒通过衣壳蛋白的氨基酸残基与细胞表面受体结合，然后通过网格蛋白介导的细胞内吞进入胞质。在胞质中，AAV衣壳蛋白的组分VP1和VP2构象发生改变，暴露蛋白氮端，引导病毒颗粒从内吞泡中释放。释放的AAV病毒颗粒一部分逐渐向细胞核周围聚集并入核启动病毒复制，一部分病毒的衣壳蛋白发生泛素化，进入泛素介导的蛋白酶体降解途径。聚集在细胞核附近的AAV病毒，在进入细胞核内之前，首先在细胞核膜孔进行脱壳，释放单链基因组进入细胞核。病毒单链DNA在宿主细胞DNA聚合酶的转化作用下合成反义链并退火成双链DNA，并进行转录[10]。因此，在基因治疗系统中，携带外源基因的单链rAAV基因组在细胞核中经转录生成的mRNA转运至胞质内质网后，便可在细胞中实现特定外源重组蛋白的表达。

3 AAV在基因治疗中的应用

临床上使用的进行基因治疗的载体通常有rAAV、逆转录病毒、慢病毒等。Clinicaltrials.gov上显示的正在进行的临床试验中，最常用的体内基因治疗载体是rAAV。AAV因其低遗传毒性成为人类遗传性疾病进行基因治疗最为理想的载体。目前，欧盟委员会或美国食品药品监督管理局FDA已批准3款可以在患者身上使用的治疗性rAAV产品，分别是Glybera（uniQure公司，AAV1-LPL），

Luxturna（Spark Therapeutics公司，AAV2-RPE65）和Zolgensma（Novartis公司，AAV9-SMN1）。Glybera作为欧盟委员会批准的首款基因治疗产品，用于治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症（Lipoprotein Lipase Deficiency, LPLD）。单侧病毒注射即可长期显著降低血液中甘油三酯的水平，从而降低急性胰腺炎的发病率[11-14]。尽管因极其低的LPLD发病率，Glybera自获批以来仅进行过一次治疗，但其在基因治疗研究中具有里程碑意义。此后，越来越多的基于AAV的药品开始进入临床试验。2017年末，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准的Luxturna[15, 16]，成为第一款AAV基因治理药物，用于治疗因双等位基因*Rpe65*突变引起的遗传性视神经萎缩[17]。2019年，FDA批准了第二款AAV基因治疗药物Zolgensma，用于治疗因*Smn 1*基因突变造成的脊髓性肌萎缩症[18-20]。同时，FDA在2019年的年度报告指出，目前有10~20个新的细胞或基因治疗药物正在进行临床试验，预计会在2025年受批。

在基因治疗时，rAAV作为载体，可携带不同的转基因分别进行基因替代（携带目的基因cDNA）、基因沉默（携带shRNA）、基因添加（携带治疗性基因cDNA）或基因编辑（携带Cas基因及其配套元件）。（1）基因替代（Gene Replacement)旨在通过补充正常基因的产物，以补偿因基因突变造成的蛋白缺失或功能丧失，适用于治疗隐性单基因疾病。目前已获得临床成功并上市的这三种药物Glybera、Luxturna和Zolgensma均采用此种治疗方式。根据对Clinicaltrials.gov上进行的临床试验查阅发现，目前大多数临床试验项目采取的方式均为基因替代。基因替代可在单基因突变引发疾病的分子机制尚未清晰的情况下，进行基因治疗研究，适应性非常广泛。（2）基因沉默（Gene Silencing）主要利用反义寡核苷酸降解发生突变的基因转录的mRNA，达到治疗因毒性功能蛋白聚集引起的显性单基因病，其外源基因的作用效应与基因替代效应相反。（3）基因添加（Gene Addition）主要用来辅助治疗病因复杂或影响广泛的遗传性疾病等，如目前Clinicaltrials.gov上进行的临床试验中，AAV2-GDNF介导的神经生长因子导入正用于多系统萎缩的研究。（4）基因编辑（Gene Editing）结合了rAAV与日益发展的Crispr-Cas9，可以直接修复已知的致病性点突变，属于精准基因治疗的范畴。基因编辑适应性最广的疾病是由单碱基造成的点突变引发的疾病，如单碱基突变引发的非综合征型遗传性耳聋。工程核酸酶Cas9介导的单碱基替代能够实现精细化的基因治疗，是目前遗传性疾病基础研究中的重要方向。

我们也应当注意，AAV在临床上的应用存在失效的可能性。临床试验表明，在利用rAAV-FIX治疗血友病B的时候，相同治疗浓度下，人体中外源FIX的表达量明显低于小鼠[21, 22]。研究人员猜测，AAV衣壳特异细胞毒性的T淋巴细胞应答降低了靶向肝细胞的rAAV转导，从而降低转基因表达，最终导致治疗的失败。rAAV作为外源物质，其进入靶标细胞后，需要进行多步反应才能表达转基因产物，因此rAAV在细胞中进行转导的每个阶段都有可能产生细胞免疫反应，弱化基因传递和长期表达效应[10]。截至2021年1月25日，在ClinicalTrials.gov上，除去暂缓、停止或撤回的项目，有219项干预性临床试验中使用重组AAV载体。因此，需要综合深入理解病毒学、免疫学、细胞生物学等各学科知识，攻克rAAV在治疗性应用研究中的难题，助力新药研发。

4 遗传性耳聋治疗的现状

据世界卫生组织称，全球约有20%的人听力受损。在婴幼儿或青年人群中，超过半数的感音神经性耳聋源于遗传物质的改变，进而导致耳蜗毛细胞的受损和缺失。成年哺乳类毛细胞属终末分化细胞，其受损缺失后不能通过其周围毛细胞的分裂增生得到补充[23]，因此毛细胞损伤是遗传性耳聋的原因之一。目前耳聋的临床治疗常用的助听器和人工耳蜗虽然可以帮助大部分耳聋患者获得一定的听力，但二者对耳聋的恢复程度有限[24, 25]。虽然遗传性非综合征感音神经性耳聋目前尚无有效的药物疗法，但基因治疗极有可能成为治疗因遗传物质改变引起的遗传性聋。已经有研究表明，基因治疗手段能够挽救某些基因突变或缺失造成的遗传性耳聋[26-31]。因此，作为一种安全的、有潜力的临床应用载体，rAAV在治疗因基因改变诱发的遗传性听力损失中，有很好的应用前景。

5 不同AAV血清型在遗传性耳聋治疗中的应用研究

最初的遗传性耳聋的基因治疗载体多为天然存

在AAV血清型或其改良血清型，如AAV1，AAV2/1，AAV2/9。天然的AAV病毒有多种血清型，其中人源的天然AAV共有12种，不同器官、组织对不同血清型的AAV亲和力有所不同。内耳系统包含三种主要功能细胞类型：毛细胞（Hair Cells, HCs）、支持细胞（Sertoli Cells, SCs）和螺旋结节神经元（Spiral Ganglion Neurons, SGNs）。许多传统或人工改造的AAV血清型可以高效率地转导IHCs，如AAV2等，但大多对OHCs的转导效率非常低，甚至不感染[32-35]。2015年，Luk H. Vandenberghe团队根据天然存在于灵长类中的75种AAV衣壳蛋白氨基酸序列，利用亲缘分析和序列重建推断并验证了祖先序列Anc80中的Anc80L65对肝脏、肌肉和视网膜组织的高度感染力[36]；2017年，Jeffrey R. Holt团队联合Vandenberghe团队共同发现，相同滴度下的Anc80L65同时能够以非常高的效率转导小鼠耳蜗的OHCs和IHCs，甚至能达到近100%的感染效率，优于目前大多数传统的AAV血清型[37]。Holt实验室进一步发现PHP.B（一种基于AAV-9的变体，在AAV9 Cap基因编码蛋白第588位和589位氨基酸之间插入穿膜肽TLAVPFK[38]，能够跨越血脑屏障，实现对CNS系统的感染[39]）对OHCs和IHCs的感染率不亚于Anc80L65，且能有效感染SGNs[40]。因此，早期针对遗传性耳聋的基因治疗多基于rAAV1和rAAV2及其变体[41-43]。随着新的血清型在耳蜗中的应用，基于Anc80L65和PHP.B的rAAV在遗传性耳聋的基因治疗研究中开始逐渐广泛应用[27, 30, 44, 45]。

除了上述方法以外，还可以通过内耳干细胞再生有功能的毛细胞来治疗感音神经性聋。Chai等人首先鉴定了内耳听觉上皮中*Lgr5*阳性支持细胞是内耳干细胞。*Lgr5*是Wnt信号通路的下游靶基因，表达于小鼠耳蜗部分支持细胞中，包括第三排Deiters′ cell，内柱细胞（Inner Pillar Cells），内指细胞（the Medial Inner Phalangeal Cells）以及大上皮脊边缘的细胞（the Lateral GER）[46, 47]；在受到损伤的内耳组织中，这些*Lgr5*阳性内耳干细胞可以再生毛细胞[47-51]。但到目前为止，通过AAV介导的基因治疗调控内耳干细胞的研究几乎没有报道，主要是由于目前已知的商业化AAVs对内耳干细胞的转染效率都很低。因此，优化改造AAV，提高其对内耳干细胞的转染效率至关重要。由于内耳中Lgr5阳性SCs细胞是内耳干细胞，因此研究人员以耳蜗中的SCs为目标，筛选了现有的AAVs[32, 34, 35]，发现即便在比较高的滴度下（1×10^{12}GC/mL, Genomic Particles, GC），最多也只能达到约20%的感染效率[34]。Anc80L65虽然对毛细胞有极高的感染效率，但对支持细胞的感染效率并不高，只能达到30%左右[34]。2019年初，Isgrig等人发现人工合成的AAV2.7m8能够高效感染Lgr5阳性内柱细胞（约80%~90%）和内指细胞（约50%~70%），但对Deiters′ cell的感染效率很低[52]。Deiters′ cell对外毛细胞的再生至关重要[48]，因此进一步优化改造AAV，提高其对所有类型内耳干细胞的转染效率就成为了一个关键的技术瓶颈。在2019年8月，我们与合作者在AAV-DJ的基础上，优化出了更为高效且安全的新型AAV-ie，对外毛细胞和内毛细胞的感染率高达90%以上；同时在相同滴度下，更高效感染多种类型支持细胞（总体效率超80%），包括Hense′ s细胞（约95%），Deiters′细胞（约80%），外柱细胞（约95%）、内柱细胞（约80%）和内指细胞（约90%）等[53]。因此，AAV-ie是目前已知对内耳干细胞感染效率最高的人工合成AAV载体，能够在体内实现内耳干细胞向毛细胞的转化，具有临床应用价值。

6 AAV在遗传性耳聋治疗中的研究进展

近年来，虽然已经确定了140个与耳聋相关的等位基因，但很少有治疗方法可以减缓或逆转遗传性耳聋。基因疗法已成为遗传性耳聋最有希望的治疗方法[54]。内耳是基因治疗的理想靶点，许多病毒和非病毒载体已经被用于在耳蜗中传播遗传物质[55]。作为基因治疗的靶标，耳蜗有天然的优势：同眼球一样，耳蜗是免疫豁免器官；耳蜗体积小，所需病毒少；由于蜗壳的存在，空间上耳蜗处于相对隔绝位置；淋巴液的存在便于病毒在蜗管内传播[56]。在某些特定形式，如基因缺失（例：*Tmc1*、*Otoferlin*等基因缺失），基因突变（例：*Ush1c c.216G > A*）造成的动物听力损失模型中，AAV介导的外源基因重新表达疗法能够部分恢复损失的听力[26-29, 57, 58]。

最早在小鼠中进行遗传性耳聋的基因治疗始于2012年，研究人员利用AAV1将外源*Vglut3*通过耳蜗造口术和圆窗膜注射的方法导入出生后1-3 d的*Vglut3*敲除幼鼠耳蜗中，能够显著降低成年敲除小鼠的听力阈值，并且该治疗效果可持续至少3个月以上[41]。自此，开启了基于AAV的遗传性耳聋生物治疗的研究[26-29, 31, 42-44, 57-63]。目前，耳聋基因*Tmc1*

的基因治疗研究最广泛，最深入。*Tmc1*为遗传性耳聋患者中最常见的致病基因之一。*Tmc1*的突变可造成常染色体隐性（DFNB7/11）或显性（DFNA36）遗传性耳聋[64]。TMC1蛋白表达于毛细胞表面凸起的静纤毛的顶部，与TMC2共同构成毛细胞的机-电转换通道。因此*Tmc1*的突变直接影响了毛细胞的机-电转换功能，引发听力障碍。

常用的*Tmc1*耳聋小鼠模型有*Tmc1*敲除小鼠[65]，Tmc1 Baringo小鼠（携带隐性点突变c.A545G，p.Y182C）[66]和Tmc1 Beethoven小鼠（携带显性点突变c.T1253A，p.M412K）[67-70]。基因替代治疗能够使因*Tmc1*缺失或突变引发的隐性遗传性耳聋小鼠毛细胞恢复听觉功能[31, 45, 57, 71]。科学家们利用AAV将外源正确的*Tmc1*基因导入发生隐性突变的毛细胞中，转录翻译的外源TMC1蛋白发挥正常的生理功能，达到治疗耳聋的目的[31, 45]。需要注意的是，这种方法可能会导致基因过度表达引起细胞毒性。得益于飞速发展的CRISPR/Cas9基因编辑系统，发生点突变的基因可以利用Cas9实现精准有效的切割和替换。因此，在新的研究中，研究人员在小鼠体内将SpCas9和靶向gRNA同时递送到发生Tmc1 c.A545G点突变的毛细胞中，最终实现突变小鼠听力的部分恢复[71]。这是人类首次通过基因编辑技术解决隐性遗传突变导致的遗传疾病。

同理，CRISPR/Cas9的基因编辑效果也能实现针对获得性Tmc1 Beethoven耳聋小鼠的精准基因治疗。在显性遗传的Tmc1 Beethoven小鼠中，一条染色体上的*Tmc1*基因发生碱基A>T即可造成耳聋[70]，那么需要在健康的Tmc1基因拷贝功能不变的情况下，沉默突变的Tmc1以达到保护听力的目的。经典的CRISPR/Cas9基因编辑系统是通过gRNA识别和Cas9切割达到编辑靶基因的目的[72-74]，但因gRNA和Cas9存在一定的脱靶效应，最终可能会导致错误的DNA切割[75]。2019年，David P. Corey联合Jeffrey R. Holt发现源自金黄色葡萄球菌的一种经过修饰的SaCas9-KKH，结合通过筛选的高特异性gRNA，能够精确定位并选择性切割Beethoven小鼠中的特定突变，同时不影响正常健康拷贝的功能，精准度可达99%，从而达到治疗耳聋的目的[63]。因此，结合rAAV安全性，CRISPR/Cas的高度特异性和靶向性，精准的基因治疗在携带单点突变形式的人类遗传性疾病中有很好的应用潜力。此外，在早些时候，刘如谦团队还使用脂质复合物（Lipid Complexes）将Cas9蛋白和gRNA一起送入Beethoven幼鼠内耳中，使突变的Tmc1失活，同时保留正常的野生型Tmc1基因，达到挽救听力的治疗效果[26]。与常规的病毒递送方式不同，这款疗法的好处在于能够避免过度的Cas9蛋白产生，规避不可控的脱靶效应。这些研究提示携带单点突变的常染色体显性遗传耳聋非常适宜使用CRISPR/Cas9基因编辑系统进行精准基因治疗。

7 Dual-AAV系统在遗传性耳聋治疗中的研究进展

由于AAV基因组约5 kb[2]，其中两侧ITR序列约0.3 kb，所以rAAV的包装容量仅约4.7 kb，无法携带长度超过这个极限的基因。尽管采用长度较小的基因调控元件（约0.5 kb）如短启动子和多聚A信号等可以一定程度上提高可容纳的外源基因片段大小，但适用范围依然有限。然而，双重AAV策略可以克服这一限制[76, 77]。双AAV系统，实质上是将目的基因cDNA的5′-末端和3′-末端分别构建进入两个AAV载体中。若在同一细胞中同时感染两种AAVs，即可达到编码目的基因的效果。通常来讲，多AAVs重建完整目的基因表达产物的方式可在基因，转录或蛋白水平上实现，即DNA重组，mRNA杂交/反式剪接和蛋白质Split intern/反式剪接系统。DNA重组即利用两个AAV载体基因组通过重叠序列、反向末端重复序列或重组基因序列介导重组，将目的基因cDNA的5′-末端和3′-末端形成重组载体DNA，然后编码全长蛋白[78-82]。转录水平上的重组发生在mRNA上。目的基因cDNA的5′-末端和3′-末端分别编码的mRAN通过各自携带的杂交区域（通常是剪切供体和受体）进行反式剪接，形成成熟的编码全长蛋白的嵌合mRNA，实现目的基因的表达[83, 84]。在蛋白水平上进行的重建通过Split inteins系统实现[85-88]。Split inteins是一对天然存在的多肽，若将其分别连于两段肽段末端，可介导蛋白质的反式剪接[89]。因此，将目的基因分为两段，使用两个rAAV载体表达的两个半蛋白可以通过Split inteins介导的蛋白质反式剪接形成全长蛋白。

耳聋基因治疗中，目前仅有2例以基因重组的方式，在小鼠体内实现了*Otoferlin*这一常染色体隐性遗传性耳聋基因的基因替代，成功恢复了小鼠听力。耳畸蛋白OTOFERLIN的基因突变引起的听力障碍多为重度先天性遗传耳聋[90]。*Otoferlin*编码区

的长度是6 kb。研究人员将*Otoferlin*基因的5′-端和3′-端分别构建进两个不同的rAAV载体，利用重组最终实现毛细胞中OTOFERLIN蛋白的表达，从而恢复小鼠听力[28, 29]。研究表明，不管是在新生还是在耳蜗发育完成后的*Otoferlin*缺失小鼠中进行AAV-*Otoferlin*的基因治疗后，均可使突变小鼠获得明显的听力恢复并保持6个月以上，这意味着基因替代治疗能够在预防或治疗因*Otoferlin*突变造成的遗传性耳聋中发挥作用，表示*Otoferlin*突变引发的耳聋治疗窗口可能更长。目前，针对*Otoferlin*突变造成的遗传性耳聋，Akouos公司主导的基于AAV的基因疗法AK-OTOF项目目前已进入临床开发阶段。

8 展望

听力损失是一种常见的神经系统疾病。在中国，每1 000名儿童中约有2名出生时出现严重的听力损失，中国每年约有6万名婴儿患有听力损失，其中一半源自遗传物质的改变。目前临床上，听力损失的治疗主要依赖人工耳蜗和助听器，但治疗效果有限。因此，听损的治疗仍迫切需要有效的方法。目前，美国有20多项听力损失疗法的临床试验，其中一个临床试验涉及听觉疾病的基因治疗[91]。然而，并没有基于AAV的临床药物试验。一些与AAV相关的基因治疗药物已经获得美国FDA的批准，充分证明了AAV的临床应用潜力。此外，AAV介导的基因治疗在动物模型上已被证实能够在一定程度恢复耳聋小鼠的听力。因此，基于rAAV的基因治疗，将可能成为治疗遗传性耳聋的新方法。

参 考 文 献

[1] BALAKRISHNAN B, JAYANDHARAN G R. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy[J]. Current Gene Therapy, 2014, 14(2): 86-100.

[2] DONG J Y, FAN P D, FRIZZELL R A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(17): 2101-2112.

[3] WU Z, ASOKAN A, SAMULSKI R J. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy[J]. Mol Ther, 2006, 14(3): 316-327.

[4] XIE Q, BU W, BHATIA S, et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(16): 10405-10410.

[5] GOVINDASAMY L, PADRON E, MCKENNA R, et al. Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4[J]. J Virol, 2006, 80(23): 11556-11570.

[6] BUNING H, HUBER A, ZHANG L, et al. Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions[J]. Curr Opin Pharmacol, 2015, 24: 94-104.

[7] KOTTERMAN M A, SCHAFFER D V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(7): 445-451.

[8] VERDERA H C, KURANDA K, MINGOZZI F. AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer[J]. Mol Ther, 2020, 28(3): 723-746.

[9] KANG W, ZHAO X, SUN Z, et al. Adeno-associated virus vector enables safe and efficient Cas9 activation in neonatal and adult Cas9 knockin murine cochleae[J]. Gene Ther, 2020, 27(7-8): 392-405.

[10] LI C, SAMULSKI R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy[J]. Nat Rev Genet, 2020, 21 (4): 255-272.

[11] CARPENTIER A C, FRISCH F, LABBE S M, et al. Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012, 97(5): 1635-1644.

[12] GAUDET D, METHOT J, DERY S, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial[J]. Gene Therapy, 2013, 20 (4): 361-369.

[13] FERREIRA V, TWISK J, KWIKKERS K, et al. Immune responses to intramuscular administration of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) in a phase II clinical trial of lipoprotein lipase deficiency gene therapy[J]. Human Gene Therapy, 2014, 25(3): 180-188.

[14] GAUDET D, STROESE S, METHOT J, et al. Long-term retrospective analysis of gene therapy with alipogene tiparvovec and its effect on lipoprotein lipase deficiency-induced pancreatitis[J]. Human Gene Therapy, 2016, 27 (11): 916-925.

[15] 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): 849-860.

[16] BENNETT J, WELLMAN J, MARSHALL K A, et al.

Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial[J]. Lancet, 2016, 388(10045): 661-672.

[17] WOLF G. Function of the protein RPE65 in the visual cycle[J]. Nutr Rev, 2005, 63(3): 97-100.

[18] AL-ZAIDY S, PICKARD A S, KOTHA K, et al. Health outcomes in spinal muscular atrophy type 1 following AVXS-101 gene replacement therapy[J]. Pediatr Pulmonol, 2019, 54(2): 179-185.

[19] 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): 1713-1722.

[20] URQUHART L. FDA new drug approvals in Q2 2019[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(8): 575.

[21] NATHWANI A C, TUDDENHAM E G, RANGARAJAN S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B[J]. N Engl J Med, 2011, 365 (25): 2357-2365.

[22] NATHWANI A C, GRAY J T, NG C Y, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver[J]. Blood, 2006, 107(7): 2653-2661.

[23] CHEN Y, ZHANG S, CHAI R, et al. Hair cell regeneration[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1130: 1-16.

[24] NAKAGAWA T. Strategies for developing novel therapeutics for sensorineural hearing loss[J]. Frontiers in Pharmacology, 2014, 5: 206.

[25] LESICA N A. Why do hearing aids fail to restore normal auditory perception? [J]. Trends Neurosci, 2018, 41(4): 174-185.

[26] 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): 217-221.

[27] PAN B, ASKEW C, GALVIN A, et al. Gene therapy restores auditory and vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1c[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(3): 264-272.

[28] AKIL O, DYKA F, CALVET C, et al. Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(10): 4496-4501.

[29] AL-MOYED H, CEPEDA A P, JUNG S, et al. A dual-AAV approach restores fast exocytosis and partially rescues auditory function in deaf otoferlin knock-out mice[J]. EMBO Mol Med, 2019, 11(1): e9396.

[30] TAIBER S, COHEN R, YIZHAR-BARNEA O, et al. Neonatal AAV gene therapy rescues hearing in a mouse model of SYNE4 deafness[J]. EMBO Mol Med, 2020, 13 (2): e13259.

[31] NIST-LUND C A, PAN B, PATTERSON A, et al. Improved TMC1 gene therapy restores hearing and balance in mice with genetic inner ear disorders[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 236.

[32] SHU Y, TAO Y, WANG Z, et al. Identification of adeno-associated viral vectors that target neonatal and adult mammalian inner ear cell subtypes[J]. Hum Gene Ther, 2016, 27(9): 687-699.

[33] TAO Y, HUANG M Q, SHU Y L, et al. Delivery of adeno-associated virus vectors in adult mammalian inner-ear cell subtypes without auditory dysfunction[J]. Human Gene Therapy, 2018, 29(4): 492-506.

[34] GU X, CHAI R, GUOL, et al. Transduction of adeno-associated virus vectors targeting hair cells and supporting cells in the neonatal mouse cochlea[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 8.

[35] HU X D, WANG J H, YAO X, et al. Screened AAV variants permit efficient transduction access to supporting cells and hair cells[J]. Cell Discov, 2019, 5: 49.

[36] ZINN E, PACOURET S, KHAYCHUK V, et al. In silico reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector[J]. Cell Rep, 2015,12(6): 1056-1068.

[37] LANDEGGER L D, PAN B, ASKEW C, et al. A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(3): 280-284.

[38] DEVERMAN B E, PRAVDO P L, SIMPSON B P, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain[J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(2): 204-209.

[39] CHAN K Y, JANG M J, YOO B B, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems[J]. Nature Neuroscience, 2017, 20(8): 1172-1179.

[40] LEE J, NIST-LUND C, SOLANES P, et al. Efficient viral transduction in mouse inner ear hair cells with utricle injection and AAV9-PHP. B[J]. Hear Res, 2020, 394: 107882.

[41] AKIL O, SEAL R P, BURKE K, et al. Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy[J]. Neuron, 2012, 75(2): 283-293.

[42] ISGRIG K, SHTEAMER J W, BELYANTSEVA I A, et al. Gene therapy restores balance and auditory functions in a mouse model of usher syndrome[J]. Mol Ther, 2017, 25(3): 780-791.

[43] DULON D, PAPAL S, PATNI P, et al. Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome[J]. J Clin Invest, 2018, 128(8): 3382-3401.

[44] GYORGY B, MEIJER E J, IVANCHENKO M V, et al. Gene transfer with AAV9-PHP. B rescues hearing in a mouse model of usher syndrome 3A and transduces hair cells in a non-human primate[J]. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2019, 13: 1-13.

[45] WU J, SOLANES P, NIST-LUND C, et al. Single and dual vector gene therapy with AAV9-PHP. B rescues hearing in Tmc1 mutant mice[J]. Mol Ther, 2020, 29(3): 973-988.

[46] CHAI R, XIA A, WANG T, et al. Dynamic expression of Lgr5, a Wnt target gene, in the developing and mature mouse cochlea[J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2011, 12(4): 455-469.

[47] CHAI R, KUO B, WANG T, et al. Wnt signaling induces proliferation of sensory precursors in the postnatal mouse cochlea[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(21): 8167-8172.

[48] COX B C, CHAI R, LENOIR A, et al. Spontaneous hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea in vivo[J]. Development, 2014, 141(4): 816-829.

[49] CHAI R, XIA A, WANG T, et al. Dynamic expression of Lgr5, a wnt target gene, in the developing and mature mouse cochlea[J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2011, 12(4): 455-469.

[50] JAN T A, CHAI R, SAYYID Z N, et al. Tympanic border cells are Wnt-responsive and can act as progenitors for postnatal mouse cochlear cells[J]. Development, 2013, 140(6): 1196-1206.

[51] WANG T, CHAI R, KIM G S, et al. Lgr5+ cells regenerate hair cells via proliferation and direct transdifferentiation in damaged neonatal mouse utricle[J]. Nat Commun, 2015, 6(1): 7613.

[52] ISGRIG K, MCDOUGALD D S, ZHU J, et al. AAV2.7m8 is a powerful viral vector for inner ear gene therapy[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 427.

[53] TAN F, CHU C, QI J, et al. AAV-ie enables safe and efficient gene transfer to inner ear cells[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3733.

[54] GELEOC G S, HOLT J R. Sound strategies for hearing restoration[J]. Science, 2014, 344(6184): 1241062.

[55] SACHELI R, DELACROIX L, VANDENACKERVEKEN P, et al. Gene transfer in inner ear cells: a challenging race[J]. Gene Ther, 2013, 20(3): 237-247.

[56] AKIL O, ROUSE S L, CHAN D K, et al. Surgical method for virally mediated gene delivery to the mouse inner ear through the round window membrane[J]. J Vis Exp, 2015(97): 52187.

[57] ASKEW C, ROCHAT C, PAN B, et al. Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(295): 295ra108.

[58] CHANG Q, WANG J, LI Q, et al. Virally mediated Kcnq1 gene replacement therapy in the immature scala media restores hearing in a mouse model of human Jervell and Lange-Nielsen deafness syndrome[J]. EMBO Mol Med, 2015, 7(8): 1077-1086.

[59] IIZUKA T, KAMIYA K, GOTOH S, et al. Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(13): 3651-3661.

[60] KIM M A, CHO H J, BAE S H, et al. Methionine sulfoxide reductase B3-Targeted in utero gene therapy rescues hearing function in a mouse model of congenital sensorineural hearing loss[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2016, 24(11): 590-602.

[61] SHIBATA S B, RANUM P T, MOTEKI H, et al. RNA interference prevents autosomal-dominant hearing loss[J]. Am J Hum Genet, 2016, 98(6): 1101-1113.

[62] GENG R, OMAR A, GOPAL S R, et al. Modeling and preventing progressive hearing loss in usher syndrome III[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13480.

[63] GYORGY B, NIST-LUND C, PAN B F, et al. Allele-specific gene editing prevents deafness in a model of dominant progressive hearing loss[J]. Nature Medicine, 2019, 25(7): 1123-1130.

[64] KURIMA K, PETERS L M, YANG Y, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function[J]. Nat Genet, 2002, 30(3): 277-284.

[65] KAWASHIMA Y, GELEOC G S, KURIMA K, et al. Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes[J]. J Clin Invest, 2011, 121(12): 4796-4809.

[66] MANJI S S, MILLER K A, WILLIAMS L H, et al. Identification of three novel hearing loss mouse strains with mutations in the Tmc1 gene[J]. Am J Pathol, 2012, 180(4): 1560-1569.

[67] KITAJIRI S, MAKISHIMA T, FRIEDMAN T B, et al. A

novel mutation at the DFNA36 hearing loss locus reveals a critical function and potential genotype-phenotype correlation for amino acid-572 of TMC1[J]. Clin Genet, 2007, 71(2): 148-152.

[68] YANG T, KAHRIZI K, BAZAZZADEGHAN N, et al. A novel mutation adjacent to the Bth mouse mutation in the TMC1 gene makes this mouse an excellent model of human deafness at the DFNA36 locus[J]. Clin Genet, 2010, 77(4): 395-398.

[69] ZHAO Y, WANG D, ZONG L, et al. A novel DFNA36 mutation in TMC1 orthologous to the Beethoven (Bth) mouse associated with autosomal dominant hearing loss in a Chinese family[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97064.

[70] VREUGDE S, ERVEN A, KROS C J, et al. Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36[J]. Nat Genet, 2002, 30(3): 257-258.

[71] YEH W H, SHUBINA-OLEINIK O, LEVY J M, et al. In vivo base editing restores sensory transduction and transiently improves auditory function in a mouse model of recessive deafness[J]. Sci Transl Med, 2020, 12(546)：eaay9101.

[72] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

[73] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.

[74] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in arabidopsis and nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 688-691.

[75] PATTANAYAK V, LIN S, GUILINGER J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 839-843.

[76] PATEL A, ZHAO J, DUAN D, et al. Design of AAV vectors for delivery of large or multiple transgenes[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1950: 19-33.

[77] TORNABENE P, TRAPANI I. Can adeno-associated viral vectors deliver effectively large genes? [J]. Human Gene Therapy, 2020, 31(1-2): 47-56.

[78] DUAN D S, YUE Y P, YAN Z Y, et al. A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation[J]. Nature Medicine, 2000, 6(5): 595-598.

[79] GHOSH A, YUE Y P, LAI Y, et al. A hybrid vector system expands adeno-associated viral vector packaging capacity in a transgene-independent manner[J]. Molecular Therapy, 2008, 16(1): 124-130.

[80] LAI Y, YUE Y P, LIU M J, et al. Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors [J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(11): 1435-1439.

[81] NAKAI H, STORM T A, KAY M A. Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(5): 527-532.

[82] SUN L W, LI J, XIAO X. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization[J]. Nature Medicine, 2000, 6(5): 599-602.

[83] PERGOLIZZI R, ROPPER A, DRAGOS R, et al. In vivo trans-splicing of 5' and 3' segments of pre-mRNA directed by corresponding DNA sequences delivered by gene transfer[J]. Molecular Therapy, 2003, 8(6): 999-1008.

[84] SONG Y, LOU H H, BOYER J L, et al. Functional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in cystic fibrosis airway epithelial cells by AAV6.2-mediated segmental trans-splicing[J]. Human Gene Therapy, 2009, 20(3): 267-281.

[85] CHEW W L, TABEBORDBAR M, CHENG J K W, et al. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response[J]. Nature Methods, 2016, 13(10): 868-874.

[86] LI J, SUN W C, WANG B, et al. Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated in vivo gene therapy[J]. Human Gene Therapy, 2008, 19(9): 958-964.

[87] TRUONG D J J, KUHNER K, KUHN R, et al. Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(13): 6450-6458.

[88] VILLIGER L, GRISCH-CHAN H M, LINDSAY H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice[J]. Molecular Therapy, 2019, 27 (4): 367-367.

[89] ARANKO A S, WLODAWER A, IWAI H. Nature's recipe for splitting inteins[J]. Protein Engineering Design & Selection, 2014, 27(8): 263-271.

[90] YASUNAGA S, GRATI M, COHEN-SALMON M, et al. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness[J]. Nat Genet, 1999, 21(4): 363-369.

[91] REN Y, LANDEGGER L D, STANKOVIC K M. Gene therapy for human sensorineural hearing loss[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 323.

［收稿日期］2021−03−01