

血友病 B 基因治疗的研究进展

王馨 闫振宇

063000 河北唐山, 华北理工大学(王馨), 华北理工大学附属医院血液内科(闫振宇)

通信作者: 闫振宇, Email: hbyzy2011@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2018.04.007

【摘要】 血友病 B 为临床上常见的出血性疾病, 为 X 染色体连锁隐性遗传性疾病, 以男性患者多见, 女性患者极其罕见。我国血友病 B 患者数量众多, 目前主要治疗方法为输注凝血因子 FⅨ制剂以达到止血目的。但是由于反复输注凝血因子 FⅨ制剂而产生凝血因子 FⅨ抑制物、相关制剂价格高昂等问题, 多数患者未能得到有效治疗, 影响患者的生存质量。血友病 B 为单基因遗传性疾病, 是基因治疗遗传性疾病的理想模型。因此, 基因治疗为有望治愈血友病 B 的方法。近年来, 随着多种病毒载体的成功构建、定点切割的核酸酶的发现, 将基因治疗血友病 B 的各方面研究进一步向前推进。笔者拟就血友病 B 基因治疗的研究进展进行综述。

【关键词】 血友病 B; 基因治疗; 凝血因子 FⅨ; CRISPR-Cas 系统; 基因载体

基金项目: 2016 年河北省政府临床医学优秀人才基础与培养项目(361036)

Research progress in gene therapy of hemophilia B Wang Xin, Yan Zhenyu

North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China (Wang X); Department of Hematology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China (Yan ZY)

Corresponding author: Yan Zhenyu, Email: hbyzy2011@163.com

【Abstract】 Hemophilia B is a common hemorrhagic disease in clinic and a X chromosome-linked recessive genetic disorder. It is common in male patients, and rare in female patients. The number of patients with hemophilia B in China is numerous, the main treatment is infusing coagulation factor FⅨ to achieve hemostasis. But coagulation factor FⅨ inhibitors caused by repeating infusion of coagulation factor FⅨ and costly price of coagulation factor FⅨ products, the majority of patients have not been effectively treated, which influence the life quality of the patients with hemophilia B. Hemophilia B is a monogenetic inherited disease and is an ideal model for genetic treatment. Therefore, gene therapy has become the most promising approach to cure hemophilia B. In recent years, with the successful construction of a variety of viral vectors and the discovery of site-specific nuclease, progress of gene therapy for hemophilia B has been further promoted. In this paper, the progress of gene therapy for hemophilia B is reviewed.

【Key words】 Hemophilia B; Genetic therapy; Factor FⅨ; CRISPR-Cas systems; Genetic vectors

Fund program: 2016 Hebei Provincial Government Clinical Medicine Outstanding Talent Foundation and Training Program (361036)

血友病 B 是由于凝血因子 FⅨ 缺乏或者功能缺陷导致的出血性疾病, 为伴 X 染色体连锁隐性遗传性疾病。血友病 B 的病情严重程度与凝血因子 FⅨ 的缺乏程度相关, 根据血友病 B 患者体内凝血因子 FⅨ 活性的不同, 可以将其分为 3 类: 凝血因子 FⅨ 活性 < 1% 为重型血友病 B, 1% ≤ 凝血因子 FⅨ 活性 < 5% 为中间型, 5% ≤ 凝血因子 FⅨ 活性 ≤ 40% 为轻型^[1]。血友病 B 在我国男性新生儿中的发病率约为 1/25 000, 据估计我国血友病 B 患者总例数约为 20 000 例, 占血友病患者总数的 15%~20%^[2]。目前临床上对血友病 B 的治疗主要采用药物替代疗法, 即通过输注凝血因子 FⅨ 以恢复患者血浆中的凝血

因子 FⅨ 水平达到治疗效果^[3]。替代疗法可以有效地治疗与预防血友病 B 患者的急性出血症状, 但是不能预防关节损伤的发生, 除非在患者儿童期即开始预防性治疗。在发达国家, 临床上一般建议重型血友病 B 患者每周输注 2~3 次凝血因子 FⅨ。在我国, 由于血友病 B 治疗费用高昂, 绝大多数患者迫于经济压力未能接受规范治疗^[4]。

1 血友病 B 的药物替代治疗

目前, 商品化的凝血因子 FⅨ 替代治疗药物主要包括 2 大类, 分为血浆富集来源凝血因子 FⅨ 与重组细胞表达来源凝血

因子 FⅨ。由于血浆富集来源凝血因子 FⅨ来源于血液,存在血源性病毒,如肝炎病毒与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)病毒,以及支原体感染等风险,并且血浆来源十分有限导致其价格昂贵,因此这类制剂应用受限。重组细胞表达来源凝血因子 FⅨ与血浆富集来源凝血因子 FⅨ临床效果没有显著差异,而且避免了血友病 B 患者发生血源性感染的风险,但是半衰期短,需要反复输注,给患者造成不便与经济压力^[5]。

2 血友病 B 基因治疗的途径

由于上述药物替代疗法尚不能满足血友病 B 患者预防与治疗的需求。鉴于此,国内外学者致力于研究基因治疗血友病 B 的方法,以期达到彻底治愈血友病 B 的目的。基因治疗是指将人正常或具有治疗作用的基因通过一定的方式导入人体靶细胞,以校正引发疾病的基因缺陷与异常的治疗方法。简而言之,就是通过载体向人体导入特定的基因,以治疗由基因缺陷与异常引起的疾病。近 20 年,针对血友病 B 的基因治疗的研究蓬勃发展,并取得了一定的进展^[6]。

血友病 B 的基因治疗途径可分为体内(*in vivo*)途径与体外(*ex vivo*)途径。基因治疗的体内途径指直接将携带有目的基因的载体注入患者体内,该方法的优点是操作方便、成本低、治疗周期短、易于推广,代表基因治疗的发展主流方向,然而载体与基因导入后容易引起患者体内强烈的免疫反应,安全性隐患高,并且部分病毒载体易遭到患者体内血清补体灭活而不能达到理想的治疗效果^[7]。体外途径指将患者的体细胞收集后,在体外培养同时导入目的基因,而后将遗传修饰后的体细胞回输给患者。该方法比较经典,安全易控制,基本不会引起患者的免疫排斥且不存在病毒载体在体内被灭活的问题,但是每次基因治疗都需要基因转移、克隆筛选、安全性检测、操作较为繁琐、治疗周期长、技术复杂、费用较高^[7]。上述 2 种基因治疗途径在血友病 B 临床试验研究中均有应用,并且展现出良好的应用前景。

3 血友病 B 的基因治疗临床研究

3.1 基因治疗临床前试验研究

慢病毒载体(lentiviral vector, LV)能够将外源基因转导并整合入非分裂期细胞,使外源基因持续稳定表达,是基因治疗血友病 B 的有效工具之一。Brown 等^[6]首次应用携带人凝血因子 FⅨ基因的 LV 治疗血友病 B 模型小鼠,结果发现小鼠体内产生了抗凝血因子 FⅨ的 T 淋巴细胞免疫反应,凝血因子 FⅨ未能在模型小鼠体内持续表达。随后该研究者对载体进行修饰,加入 1 段特异性造血相关靶序列微小 RNA(microRNA, miRNA),即 miRNA-142-3p,并将修饰后的携带人凝血因子 FⅨ基因的 LV 注射到血友病 B 模型小鼠体内,250 d 后测定小鼠体内凝血因子 FⅨ活性 >10%,并且没有出现凝血因子 FⅨ抗体。究其原因,可能是由于 miRNA-142-3p 介导了 T 淋巴细胞的免疫失活。总之,上述临床前试验结果表明,携带 miRNA-142-3p 的 LV 可以使人凝血因子 FⅨ基因稳定表达,并且能够提高血友病 B 模型小鼠的凝血功能。这为今后血友病 B 基因

治疗提供了良好的实验数据基础。文献报道,有研究者构建了携带人凝血因子 FⅨ基因且整合酶缺陷的 LV,并将其应用于血友病 B 模型小鼠的基因治疗,研究结果表明整合酶缺陷的 LV 能够显著降低由于基因插入导致机体产生特异性抗体的风险,而不影响目的基因的有效表达^[9-10]。该研究报道提示,对载体进行优化设计可以提高基因治疗的安全性,为基因治疗的发展开辟新道路。

常间回文重复序列丛集(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)-CRISPR 关联蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)9 系统是近年来发展起来的重要基因编辑技术之一,其能够精确地对基因组进行靶向改造,适用于单基因遗传性疾病的基因治疗,如血友病 B、杜氏肌营养不良综合征、地中海贫血等疾病^[11-12]。Guan 等^[13]将 CRISPR-Cas9 系统与 F9 基因突变位点修复模板注入血友病 B 模型小鼠体内,治疗后小鼠肝细胞中 F9 基因的突变点经 CRISPR-Cas9 系统改造后校正率为 0.56%,这足够恢复小鼠的凝血功能,而注射腺病毒载体的小鼠达到了更高的校正率,但是由于严重的肝不良反应导致凝血因子 FⅨ并未恢复至发挥凝血功能的水平。但是这足以表明 CRISPR-Cas9 系统介导的原位基因组编辑是一种可以针对血友病 B 的可行治疗策略,但是尚需进一步的临床试验研究予以证实。此外, Wang 等^[14]采用腺病毒相关病毒(adenovirus associated virus, AAV)双载体系统成功地将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa) Cas9, 小导向 RNA(small guide RNA, sgRNA)与 F9 基因 cDNA 导入血友病 B 模型小鼠肝内,使小鼠突变的 F9 基因得到校正并成功表达凝血因子 FⅨ,恢复了血友病 B 模型小鼠凝血功能。Nathwani 等^[15]应用 AAV 载体治疗血友病 B 模型猕猴,并研究其长期的安全性及有效性,研究者将携带编码人凝血因子 FⅨ的 AAV 载体(scAAV2/8-LP1-hFⅨ co)单次静脉注射至血友病 B 模型猕猴体内,结果表明载体滴度与目的基因表达水平呈剂量-反应关系。该研究中高剂量组,注射载体剂量为 2×10^{12} vg/kg,其中 vg 表示载量基因组(vector genomes),注射后人凝血因子 FⅨ基因的表达水平最高为 $(21 \pm 3) \mu\text{g/mL}$ (约为正常水平的 4.2 倍);并且荧光原位杂交结果证实几乎所有肝细胞均表达双链腺病毒相关病毒(self-complementary adenovirus associated virus vector, scAAV)。此外,该研究未发现人凝血因子 FⅨ基因在猕猴体内 10 d 内被清除的现象^[15]。该研究者对注射载体量为 2×10^{12} vg/kg 的高剂量组猕猴进行了长达 5 年的观察发现,在此期间,虽然人凝血因子 FⅨ转基因拷贝数与转染的肝细胞比例逐渐下降,但是人凝血因子 FⅨ表达活性始终维持在 >10% 的正常水平;研究中全部猕猴均产生了血清型特异性抗体,但是未检测到衣壳特异性细胞毒性淋巴细胞。病毒转染肝细胞效率为转染肝外组织细胞的 300 倍。长期的生化指标、超声成像,以及对猕猴的组织学随访均未发现治疗相关不良反应,该研究数据可以对应用 AAV 载体治疗血友病 B 患者的疗效提供临床前试验数据结果^[15]。

3.2 基因治疗的临床研究

早在 20 世纪 90 年代初,我国复旦大学遗传研究所就进行了全球首次血友病 B 基因治疗的 I 期临床试验,研究者构建了

携带人凝血因子 FⅨ 基因逆转录病毒载体 (retroviral vector, RV), 以患者皮肤成纤维细胞为靶细胞, 采用胶原包埋后腹部皮下注射, 先后有 4 例血友病 B 患者接受上述基因治疗, 患者经治疗后出血症状减轻, 取得了安全有效的结果。但是这种体外途径实施的基因治疗存在转入细胞数量大、皮下水肿、细胞难以长期存活等问题^[16-17]。此后, 对血友病 B 基因治疗的临床试验研究竞相开展。

Kay 等^[18]应用携带人凝血因子 FⅨ 基因的 AAV 载体, 转染血友病 B 模型小鼠与犬的骨骼肌细胞, 结果显示凝血因子 FⅨ 的水平足以校正试验动物的血友病 B 表型, 并且该试验未发现 AAV 载体相关的不良反应。随后, 该研究团队设计了采用携带人凝血因子 FⅨ 基因 AAV 载体治疗重型血友病 B 患者的临床试验。该临床试验对纳入研究的重型血友病 B 患者均肌肉注射 2×10^{11} vg/kg 的初始载体剂量, 并对 3 例患者进行基因转染与表达的安全性评价, 结果未发现凝血因子 FⅨ 抑制物的产生; 但是发现患者外周血中凝血因子 FⅨ 活性、需要输注 AAV 的载体剂量, 与临床前期试验结果不一致。这提示, 基于动物试验数据计算出的载体剂量可能低于人类达到治疗水平所需的载体剂量, 但是该基因治疗方法可以将重型血友病 B 转变为轻型血友病 B。

Manno 等^[19]对 8 例血友病 B 患者进行肌肉注射携带人凝血因子 FⅨ 基因的 AAV2 载体, 持续观察的结果显示, 尽管患者注射部位的凝血因子 FⅨ 基因能够持续表达, 但是其中 7 例患者的血浆凝血因子 FⅨ 活性 $< 1\%$ 。随后, 该研究组将携带肝特异性表达基因的 AAV2 载体经肝动脉注入血友病 B 患者体内, 观察 4 周后发现, 1 例接受高剂量载体 (2×10^{12} vg/kg) 治疗的患者血浆凝血因子 FⅨ 活性增加, 但是随后逐渐下降至基线水平。这一现象可能是由于细胞毒性 T 细胞对 AAV2 载体衣壳蛋白的攻击所致^[20]。因此, 降低病毒载体滴度以进一步减低免疫反应发生风险, 并且不影响凝血因子 FⅨ 基因表达水平是目前相关临床试验的研究热点。

George 等^[21]向 10 例血友病 B 患者单次静脉注射剂量为 5×10^{11} vg/kg 携带优化人凝血因子 FⅨ 基因 AAV 载体, 全部接受治疗的患者均能持续表达凝血因子 FⅨ, 平均凝血因子 FⅨ 活性为 $14\% \sim 81\%$, 随访 28~78 周后发现患者年出血率显著降低, 并且未观察到严重不良反应事件。该试验结果提示, 低剂量病毒载体能够使凝血因子 FⅨ 基因稳定表达并达到止血目的, 这与 FⅨ 基因的优化密切相关。

有研究应用新型 AAV8 载体进行临床试验, 将携带优化人凝血因子 FⅨ 基因编码序列的 AAV8 载体经外周静脉注射至 10 例重型血友病 B 患者体内, 结果显示在中位数为 3.2 年的随访期间, 患者血液循环中凝血因子 FⅨ 活性均呈剂量依赖性增加; 在 6 例高剂量组 (载体剂量为 2×10^{12} vg/kg) 患者体内均能够持续检测到升高的凝血因子 FⅨ 活性, 达 $(5.1 \pm 1.7)\%$, 使出血事件与注射凝血因子蛋白的用量均减了 90% 。2 例低剂量组 (载体剂量为 2×10^{10} vg/kg) 与 2 例中剂量组 (载体剂量为 2×10^{11} vg/kg) 患者凝血因子 FⅨ 活性同样有所增高, 但是患者由于严重的血友病导致的关节病尚不能停止预防治疗 (输注凝血因子 FⅨ)。然而, 在接受治疗后的 7~10 周, 高剂量组患

者大部分出现了氨基转移酶水平升高的现象, 应用泼尼松进行短期免疫抑制治疗后氨基转移酶水平恢复至正常参考值范围内。该试验为血友病 B 基因治疗的重要里程碑, 其成功证实应用 AAV 作为载体的基因治疗可以使凝血因子 FⅨ 基因在人体内稳定而维持较长时间的表达, 并且可以使重型血友病 B 患者转变为轻型^[22-23]。此外, 有研究结合上述临床试验的成功经验, 开展了携带优化人凝血因子 FⅨ 基因的 AAV 载体, 即 SPK-9001 治疗血友病 B 的 I/II 期临床试验。该研究对 10 例重型血友病 B 患者静脉注射低剂量 SPK-9001 (5×10^{11} vg/kg) 后, 结果显示全部患者凝血因子 FⅨ 活性均有所升高, 患者出血事件发生率减少 96% , 注射凝血因子 FⅨ 用量减少了 99% , 治疗 12 周后患者体内凝血因子 FⅨ 水平可以稳定维持在 $14\% \sim 81\%$ 的正常参考值范围内 (平均值为 33%)。大部分患者未发生免疫反应, 亦无严重不良反应发生^[24-25]。2018 年 5 月, 美国 Spark Therapeutics 公司公布了上述临床试验的最新数据, 经过对 10 例患者进行 65~121 周的随访, 全部患者凝血因子 FⅨ 水平均能稳定表达^[26]。新入组的 5 例患者接受了增强型携带人凝血因子 FⅨ 基因的 AAV 载体, 治疗 4~53 周后, 患者凝血因子 FⅨ 水平与先入组的 10 例患者相似。全部 15 例患者总体年出血率降低了 98% , 总体年注射凝血因子 FⅨ 用量降低了 99% ^[26]。该研究结果为血友病 B 的彻底治愈带来希望。

Miesbach 等^[27]进行了另一项 I/II 期临床试验, 采用携带肝特异性启动子的 AAV5 载体将凝血因子 FⅨ 基因单次注射到 10 例血友病 B 患者 (凝血因子 FⅨ 水平 $\leq 2\%$) 体内, 根据载体剂量不同分为 2 组, 结果显示低剂量组 (5×10^{12} vg/kg) 患者凝血因子 FⅨ 活性增加 4.6% , 高剂量组 (2×10^{13} vg/kg) 增加到 7.1% , 2 组患者注射凝血因子用量均大幅下降, 患者均未出现 AAV5 载体相关免疫反应, 但是少数患者氨基转移酶水平轻度升高, 经泼尼松龙治疗后好转。该研究结果表明, 单次输注携带肝特异性启动子与凝血因子 FⅨ 基因的 AAV5 载体可以稳定表达凝血因子 FⅨ, 并且具有良好的安全性。该试验为血友病 B 基因治疗改进提供了强有力的证据支持。

3.3 基因治疗的最新研究进展

相关研究者不仅对血友病 B 基因治疗的载体进行不断改造, 而且对编码人凝血因子 FⅨ 基因亦进行修饰, 以期提高其凝血活性^[28]。有研究结果表明, 将人凝血因子 FⅨ 第 338 位精氨酸突变为丙氨酸 (R338L), 即凝血因子 FⅨ-R338L, 该突变型凝血因子 FⅨ 基因表达水平正常, 而凝血活性显著提高, 约为野生型的 8 倍; 在体外, 重组凝血因子 FⅨ-R338L 相当于重组野生型凝血因子 FⅨ 活性的 5~8 倍; R338L 点突变使凝血因子 FⅨ 获得了功能获益性改变, 最终明显增强了凝血因子 FⅨ 的凝血功能, 实现了采用较少载体就达到同样止血效果的目的, 并且可以减低病毒载体引起免疫反应的风险^[29-30]。此外, 近年随着 CRISPR-Cas9 系统的不断发展, 为在 DNA 水平实现对异常基因的修复提供了技术支持。He 等^[31]利用 CRISPR-Cas9 系统精确地校正了血友病 B 患者的诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 点突变, 校正后的细胞仍然保持向肝细胞分化的能力, 这为血友病 B 基因治疗提供了新思路。

4 总结及展望

近 20 年,相关研究者一直对血友病 B 的治疗方法进行孜孜不倦的探索,以期达到彻底治愈血友病 B 的目的,而基因治疗是目前最有希望的治疗方式之一。研究者不断创新,一方面致力于寻找安全、高效的基因载体,如 RV、LV、腺病毒载体、AAV 载体等;另一方面着力研究基因治疗的靶细胞,如肝细胞、成纤维细胞、造血干细胞、血小板、肌肉细胞等。但是目前仍然尚未找到一种无免疫原性、能够高效转染靶细胞,并在靶细胞中长期稳定表达的载体,亦未找到理想的靶细胞。因此,血友病 B 的基因治疗至今仍未获得安全的、稳定的、一次性治疗的效果。这是血友病 B 基因治疗需要继续解决的问题,亦是相关研究者努力的方向。近年来,基因编辑 CRISPR-Cas9 系统的革命性发展为解决基因治疗中的问题提供了新思路,采用 AAV 载体联合 CRISPR-Cas9 系统,在靶细胞中永久性地切除 DNA 片段,或者特异性地修复突变基因,可以恢复原本突变基因的正常功能,这可能比引入外源基因对于血友病 B 的疗效更佳^[32-35]。但是这种定点切割的核酸酶亦可能在基因组中切割脱靶位点,存在致癌风险,给临床应用带来阻碍。综上所述,近年针对血友病 B 基因治疗的各项研究成果展示出了广阔的前景,多种成熟的基因编辑技术为基因治疗注入新的活力,相信在不久的将来,相关研究者将为血友病 B 的治疗,甚至治愈探索出更高效的、更安全的策略。

利益冲突 无

5 参考文献

[1] Liras A, Segovia C, Gabán A. Advanced therapies for the treatment of hemophilia; future perspectives[J]. Orphanet J Rare Dis, 2012, 7(1): 97. DOI: 10.1186/1750-1172-7-97.

[2] World Federation of Hemophilia. Report on the Annual Global Survey 2012[M]. Montreal: WFH, 2013; 10.

[3] 浙江省医师协会血液科医师分会. 浙江省血友病诊疗专家指导意见[J]. 浙江医学, 2017, 39(9): 679-687. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.9.20170901. Hematology Branch of Zhejiang Medical Doctors Association. Advice of experts on diagnosis and treatment of hemophilia in Zhejiang[J]. Zhejiang Med J, 2017, 39(9): 679-687. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.9.20170901.

[4] Berntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care[J]. Lancet, 2012, 379(9824): 1447-1456. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61139-2.

[5] 严红, 曾凡一. 血友病 B 替代治疗药物研究现状及进展[J]. 生物工程学报, 2016, 32(2): 164-171. DOI: 10.13345/j.cjb.150247. Yan H, Zeng FY. Hemophilia B replacement therapy drugs [J]. Chin J Biotech, 2016, 32(2): 164-171. DOI: 10.13345/j.cjb.150247.

[6] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage[J]. Nature, 2015, 526(7573): 351-360. DOI: 10.1038/nature15818.

[7] López SO, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D, et al. Preliminary study on non-viral transfection of F9 (factor IX) gene by nucleofection in human adipose-derived mesenchymal stem cells

[J]. Peer J, 2016, 4: e1907. DOI: 10.7717/peerj.1907. eCollection 2016.

[8] Brown BD, Cantore A, Annoni A, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice [J]. Blood, 2007, 110(13): 4144-4152. DOI: 10.1182/blood-2007-03-078493.

[9] Mátrai J, Cantore A, Bartholomae CC, et al. Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk [J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1696-1707. DOI: 10.1038/mt.2009.319.

[10] Mátrai J, Chuah MK, Vandendriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 477-490. DOI: 10.1002/hep.24230.

[11] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.

[12] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823. DOI:10.1126/science.1231143.

[13] Guan Y, Ma Y, Li Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse[J]. EMBO Mol Med, 2016, 8(5): 477-488. DOI:10.15252/emmm.201506039.

[14] Wang L, Yang Y, White J, et al. Crispr/Cas9-mediated *in vivo* gene targeting corrects haemostasis in newborn and adult F^{IX}-ko mice[J]. Blood, 2016, 128(22): 1174-1174.

[15] Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human F^{IX} pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins[J]. Mol Ther, 2011, 19(5): 876-885. DOI: 10.1038/mt.2010.274.

[16] Mingozi F, Chen Y, Murphy SL, et al. Pharmacological modulation of humoral immunity in a nonhuman primate model of AAV gene transfer for hemophilia B[J]. Mol Ther, 2012, 20(7): 1410-1416. DOI: 10.1038/mt.2012.84.

[17] Mingozi F, Chen Y, Edmonson SC, et al. Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue[J]. Gene Ther, 2013, 20(4): 417-424. DOI:10.1038/gt.2012.55.

[18] Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector[J]. Nat Genet, 2000, 24(3): 257-261. DOI: 10.1038/73464.

[19] Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. [J]. Blood, 2003, 101(8): 2963-2972. DOI:10.1182/blood-2002-10-3296.

[20] High K, Manno C, Sabatino D, et al. Immune responses to AAV and to factor IX in a phase I study of AAV-mediated liver-directed gene transfer for hemophilia B[J]. Mol Ther, 2004, 10(11): S383-S384. DOI: 10.1016/j.ymt.2004.06.940.

- [21] Georǵe LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (23): 2215-2227. DOI: 10.1056/NEJMoa1708538.
- [22] Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (21): 1994-2004. DOI: 10.1056/NEJMoa1407309.
- [23] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365 (25): 2357-2365. DOI: 10.1056/NEJMoa1108046.
- [24] High KA. Gene therapy for hemophilia; the clot thickens[J]. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(11): 915-922. DOI: 10.1089/hum.2014.2541.
- [25] Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EGD. Advances in gene therapy for haemophilia[J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28 (11): 1004-1012. DOI: 10.1089/hum.2017.167.
- [26] Peters R, Harris T. Advances and innovations in haemophilia treatment[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17 (7): 493-508. DOI: 10.1038/nrd.2018.70.
- [27] Miesbach W, Meijer K, Coppens M, et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B[J]. *Blood*, 2018, 131(9): 1022-1031. DOI: 10.1182/blood-2017-09-804419.
- [28] High KA. Gene therapy for haemophilia; a long and winding road[J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (Suppl 1): 2-11. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04369.x.
- [29] Cantore A, Nair N, Della valle P, et al. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice[J]. *Blood*, 2012, 120(23): 4517-4520. DOI: 10.1182/blood-2012-05-432591.
- [30] Simioni P, Tormene D, Tognin G, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua)[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(17): 1671-1675. DOI: 10.1056/NEJMoa0904377.
- [31] He Q, Wan HH, Cheng T, et al. Genetic correction and hepatic differentiation of hemophilia B-specific human induced pluripotent stem cells[J]. *Chin Med Sci J*, 2017, 3(3): 135-144. DOI: 10.24920/J1001-9294.2017.032.
- [32] Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 400-403. DOI: 10.1126/science.aad5725.
- [33] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 403-407. DOI: 10.1126/science.aad5143.
- [34] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells[J]. *Science*, 2016, 351(6271): 407-411. DOI: 10.1126/science.aad5177.
- [35] Long CZ, McAnally JR, Shelton JM, et al. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA [J]. *Science*, 2014, 345 (6201): 1184-1188. DOI: 10.1126/science.1254445.

(收稿日期:2018-06-28 修回日期:2018-07-16)