



基于AAV的遗传性耳聋基因治疗的基础和临床研究进展

周吟毅³, 杨雪寒¹, 陆宜成¹, 王晓涵¹, 陈相琰¹, 范瑾怡¹, 张心茹¹, 伍贤敏¹, 张李燕¹, 谈方志^{1*}, 齐洁玉^{1,2,3*}, 柴人杰^{1,2,3,4,5*}

1. 东南大学数字医学工程全国重点实验室, 附属中大医院耳鼻咽喉头颈外科, 生命科学与技术学院, 生命健康高等研究院, 江苏省生物医学高新技术研究重点实验室, 南京 210096
2. 南通大学神经再生联合创新中心, 南通 226001
3. 北京理工大学生命科学学院航天中心医院神经内科, 听力与平衡科学国家重点实验室, 北京 100081
4. 四川省医学科学院, 四川省人民医院/电子科技大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 成都 610072
5. 东南大学深圳研究院, 深圳 518063

* 联系人, E-mail: tanfangzhi@163.com; jieyu_qi@163.com; Renjiec@seu.edu.cn

收稿日期: 2024-07-07; 接受日期: 2024-10-24; 网络版发表日期: 2024-12-04

国家重点研发计划(批准号: 2021YFA1101300, 2021YFA1101800, 2020YFA0113600, 2020YFA0112503)、国家自然科学基金(批准号: 82330033, 82030029, 92149304, 82000984, 82371162, 82371161)、江苏省自然科学基金基础研究计划(批准号: BK20232007)、四川省科技计划重点研发项目(批准号: 2021YFS0371)、深圳市科技计划(批准号: JCYJ20190814093401920, JCYJ20210324125608022)和广东省医学科学院2022年度开放课题(批准号: YKY-KF202201)资助

摘要 听力障碍作为发病率极高的社会健康问题受到广泛关注. 约60%的感音神经性耳聋由遗传物质突变引起. 遗传性聋的临床治疗主要依赖人工耳蜗和助听器, 更为有效全面的生物学治疗手段的开发迫在眉睫. 修复受损的基因, 是从根本上治疗遗传性耳聋的有效手段. 多个研究已表明, 替代或修复遗传性聋小鼠模型中的突变基因, 可有效恢复小鼠受损的听力. 目前, 基因治疗已成功恢复携带*OTOF*突变的遗传性耳聋患者听力. 包括*OTOF*在内的耳聋基因有200多种, 作为一种精准疗法, 基因治疗在遗传性耳聋中的应用尚有诸多问题需要解决. 本文首先概述了遗传性耳聋的发生发展, 随后深入探讨了目前基因治疗应用于遗传性耳聋临床治疗的研究进展, 并提出了耳聋基因治疗现阶段面临的困境与挑战.

关键词 听力损失, 基因治疗, 遗传性耳聋, 耳蜗

听力损失在个人层面会影响语言发展和生活质量, 在社会层面会造成社会和经济问题. 据世界卫生组织(WHO)统计, 到2050年至少7亿人需要耳聋的康复治疗^[1]. 60%听力问题都是由遗传因素引起的. 遗传性耳

聋往往发生时间早, 且尚无特效治疗药物, 目前通常采用人工耳蜗的方法进行治疗. 而人工耳蜗植入技术的效果受到听神经完整性和毛细胞状态的影响, 并且毛细胞状态对人工耳蜗植入技术的效果影响较低, 听神

引用格式: 周吟毅, 杨雪寒, 陆宜成, 等. 基于AAV的遗传性耳聋基因治疗的基础和临床研究进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 697–710
Zhou ZHOU, Yang YANG, Lu L U, et al. Basic and clinical research progress of AAV-based gene therapy for hereditary deafness (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 697–710, doi: [10.1360/SSV-2024-0031](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0031)

经完整性是影响人工耳蜗植入技术效果的主要因素。

2003年4月, 两个患有先天性腺苷脱氨酶缺乏症的患者, 在用逆转录病毒(retrovirus)递送了正常的腺苷脱氨酶基因后缓解了症状, 这是世界范围内人体基因治疗的首次临床试验^[2]。之后, 研究者使用重组腺相关病毒(recombined adeno-associated virus, rAAV)向*Vglut3*突变小鼠的毛细胞中递送了*Vglut3*基因, *Vglut3*模型小鼠的听力恢复是人类通过基因治疗策略来治疗耳聋的第一次成功尝试^[3]。在此之后, 基因治疗策略在遗传性耳聋的治疗中快速发展。

因此, 未来有可能通过rAAV递送的方式, 实现内耳精准给药, 恢复基因表达, 弥补功能缺陷, 进而恢复听力水平。本文旨在系统总结基因治疗在遗传性耳聋治疗方面的临床研究进展与现实挑战, 为基因治疗在遗传性耳聋的临床应用提供思路。

1 耳蜗的结构

人耳根据位置可以分为外耳、中耳和内耳。环境中的声波通过外耳传递到中耳的鼓室, 引起鼓膜与听骨链的震动, 将声音信号转化为机械振动。中耳的听骨链与内耳前庭相连。内耳可以分为骨迷路和膜迷路两部分, 其中最重要的方位感受器是膜迷路中的半规管, 听觉感受器则是骨迷路中的耳蜗。内耳是一个充满淋巴液的中空结构, 听骨链的震动会引起耳蜗内淋巴液震动, 从而将机械信号转化为淋巴液震动。耳蜗形似蜗牛壳, 由骨螺旋板延伸至基底膜连接到螺旋韧带和骨性壁完整地将骨蜗管分为上、下两个腔, 上腔又被前庭膜分为两腔, 依次为前庭阶、中阶和鼓阶。在基底膜的上方, 存在声音传导过程中的最重要的声音感受器-Corti器(图1)^[4]。它可以将液波震动转化为神经电信号, 通过传入神经元产生听觉神经冲动。

Corti器由支持细胞、盖膜、毛细胞和螺旋节神经元等组成。支持细胞根据位置可以分为: 边缘细胞, 内、外指细胞, 内、外柱细胞, Hensen细胞, Deiter细胞和Claudius细胞^[5], 主要起支持作用和参与淋巴液的离子平衡调节; 盖膜由螺旋缘前庭唇伸出的纤维和胶状基质构成, 与Corti器直接接触, 通过振动与毛细胞之间产生剪切运动, 造成静纤毛弯曲, 使液波振动转化为机械振动, 将声音信号传递给毛细胞; 毛细胞是一种终末分化细胞, 是听觉产生的关键感受细胞, 主要参

与将机械信号转化为神经电信号的过程。毛细胞位于弓状带上方, 根据位置可分为内毛细胞和外毛细胞。所有毛细胞的胞体顶部表面存在高度特化的纤毛结构, 纤毛结构根据不同的构成可以分为动纤毛与静纤毛。外毛细胞的静纤毛插入盖膜中, 当声音传入内耳时会引起剪切运动, 静纤毛从盖膜处接收声音信号, 通过机械电转导机制, 打开或关闭部分机械应力激活的离子通道, K^+ 和 Ca^{2+} 进入毛细胞, 产生转导电流, 从而激活压力敏感的离子通道, 最终导致神经递质释放^[6], 将声音信号传递至神经细胞^[7]; 最后是螺旋神经节, 根据螺旋神经节的形态与结构可以分为I型神经节和II型神经节, 其中I型较为常见。I型神经节为双极神经元细胞; II型神经节为假单级神经元, 一个II型神经节可以与10个左右的外毛细胞间形成突触连接^[8], 神经节主要负责接收毛细胞传递的电化学信号并将其转化为神经冲动, 传递给中枢神经。

2 遗传性耳聋

感音神经性耳聋主要是由于内耳或听觉神经异常导致的, 脑的听觉通路病变引起的听力下降和损失也是感音神经性耳聋的成因, 例如毛细胞损伤、听觉神经元损伤、支持细胞损伤等。遗传物质突变是耳聋的主要病因。遗传性聋是指由亲代遗传的耳聋基因或突变产生了新的耳聋基因导致耳部发育或代谢异常, 引起的听觉功能障碍。遗传性耳聋根据是否会引起其他的遗传疾病又可以分为: 非综合征耳聋(nonsyndromic hearing impairment, NSHI)和综合征耳聋(syndromic hearing impairment, SHI), 其中综合征耳聋是指患者除了遗传性聋以外还伴着眼睛^[9]、皮肤、神经系统等其他器官的遗传疾病, 最常见的是Pendred综合征和Usher综合征^[10], 并占有所有病例的30%; 非综合征耳聋是指患者除了遗传性耳聋以外, 无其他遗传疾病的发生, 占有所有病例的70%^[11], 如广泛表达于支持细胞和血管纹的*GJB2*和*GJB6*等, 在毛细胞中表达的*MYO7A*、*MYO15A*、*TMCI*、*OTOF*等的突变都会造成非综合征耳聋。根据耳聋基因所在染色体的位置与遗传特点可以将非综合征遗传耳聋进一步分为: 常染色体显性遗传聋(autosomal dominant inheritance, DFNA)、常染色体隐性遗传聋(autosomal recessive inheritance, DFNB)、性连锁遗传(sex chromosome linked inheritance, DFN)

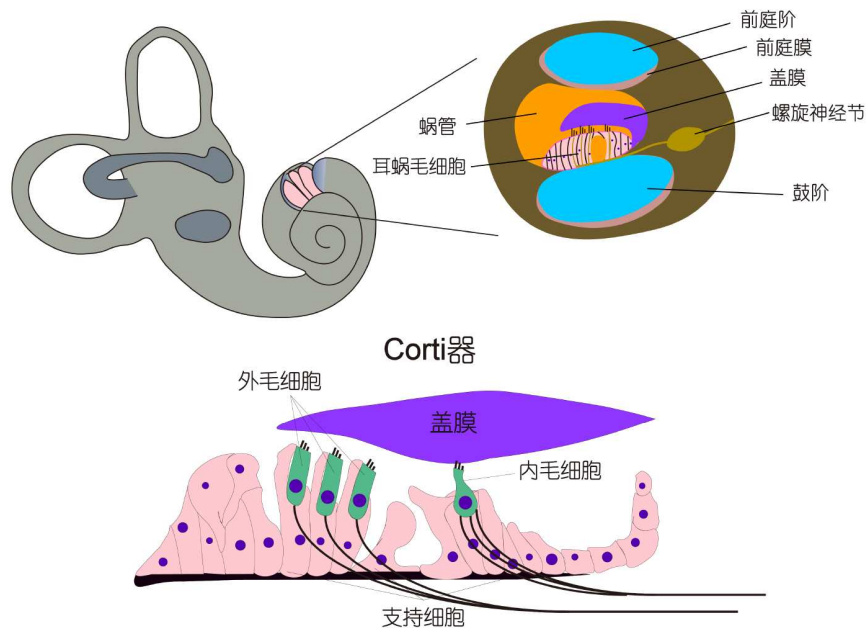


图1 耳蜗中Corti器的结构

Figure 1 Structure of the organ of Corti in the cochlea

和线粒体遗传耳聋(mitochondrial inheritance). 其中最常见遗传模式是常染色体隐性遗传^[11], 其次是常染色体显性遗传. 性连锁和线粒体遗传则较为罕见. 线粒体DNA(mtDNA)和听力损失有关的变异主要有16S rRNA突变, 其突变会改变氨基糖苷类抗生素的结合位点, 特定位点结合特性的改变导致耳蜗毛细胞的损伤和死亡, 引起听力损失^[12,13]. 在耳聋患者中致病性mtDNA突变的比例约为5%^[14]. 目前已鉴定的与遗传性非综合征相关的耳聋基因超过120个(<https://hereditary-hearingloss.org/>). 现阶段遗传性耳聋的主要治疗方式有助听器和人工耳蜗. 助听器可以为轻度或中度听力损失人群放大声音, 而人工耳蜗适用于听力损失更严重的患者^[15]. 但不管是人工耳蜗还是助听器, 都没有从病理学角度对患者的内耳状况进行改善. 近年来有许多研究工作集中于恢复遗传导致的内耳听力功能损失, 例如通过病毒载体基因递送的研究等^[16,17], 为遗传性耳聋治愈带来了新的希望.

3 遗传性耳聋的基因治疗现状概述

基因治疗指将外源遗传物质(DNA或RNA)递送至靶细胞中, 通过表达外源基因的产物对靶细胞的致病

基因进行删除、替换、修复等调控, 或直接表达正常的蛋白来替代致病基因错误表达的蛋白, 降低或恢复由基因缺陷引起的功能障碍, 从而达到相应疾病的治疗目的. 近年来随着生物技术的更新换代, 基因治疗策略在其他疾病模型得到广泛应用与推广, 前期国内外在耳聋动物模型上也进行了多年的探索, 最近有2项关于AAV介导的基因治疗策略成功恢复*OTOF*突变患者的听力功能的报道, 这为其他遗传性耳聋的治疗提供了基础. 目前主流的基因治疗的策略主要包括基因替代和基因编辑.

3.1 基因替代

基因替代疗法主要通过外源提供具有正常功能的目的基因序列, 弥补功能缺失的突变基因, 适用于隐性突变疾病和单倍剂量不足的显性遗传病治疗, 也是目前临床治疗遗传性耳聋最常用的策略. 最早的耳聋基因治疗研究开始于2012年, 通过AAV1介导的基因治疗策略部分恢复了*Vglut3*缺陷小鼠的听力功能^[3]. 自此之后, AAV介导的遗传性耳聋的基因治疗研究开始不断发展. 已有多个治疗遗传性耳聋的靶点基因的实验验证了该策略的可行性, 包括*OTOF*^{-/-}、*TMCI*^{Y182C/Y182C}、*STRC*^{d/d}、*KCNQ4*^{W276S/+}等^[18~21]. *OTOF*基因突变引起

的常染色体隐性遗传性耳聋9型(DFNB9), 也称为耳畸蛋白缺陷, 约占我国婴幼儿先天性听神经病总数的40%, 患者体量巨大, 且目前有较为明确的致病机制, 是遗传性耳聋基因治疗领域炙手可热的治疗靶点。由于AAV的包装容量有限, 研究人员将*OTOF*通过双AAV载体的方式进行重组表达恢复*Otof*缺陷小鼠的听力, 包括SD-SA介导的DNA重组和intein介导的蛋白重组^[18]。Chai研究团队^[22]和Shu研究团队^[23]开展了临床试验, 证明了AAV-hOTOF能恢复重度DFNB9耳聋患者的听力至正常水平, 患者听觉脑干反应(ABR)、纯音听力学(PTA)和言语识别能力均有明显改善。基因替代疗法可以对多个突变位点以及多种突变形式进行治疗, 不需要针对具体的突变位点针对性地设计治疗体系, 这个特点使基因替代疗法充满优势, 广泛被研究人员应用。综上, 基因替代疗法易操作, 效率高, 具有明显优势, 且临床安全性和有效性已得到验证, 是目前应用最为广泛的治疗策略。

3.2 基因编辑

基因编辑疗法包括基因敲除、基因修复两种手段, 通过利用不同的基因编辑工具实现靶位点的基因序列插入、删除或替换, 从而破坏、修复或激活目的基因的表达, 以达到疾病治疗效果。

3.2.1 基因敲除

基因敲除(gene disruption)是一种由CRISPR/Cas9等核酸酶介导的非同源末端连接(NHEJ)方式来完成基因修复的治疗手段, 基因敲除的方法可应用于治疗突变的等位基因具有致病性或干扰正常等位基因功能导致的显性遗传性疾病。2014年David Liu团队利用SpCas9-gRNA核糖核蛋白复合体(ribonucleoprotein, RNP)成功实现首例CRISPR/Cas9对内耳细胞的体内基因编辑^[24]。随后在2018年, Gao等人^[25]将SpCas9-gRNA技术应用于*Tmc1^{Bth}*耳聋小鼠模型, 将RNP复合物通过阳离子脂质体递送到P1小鼠体内, 敲除*Tmc1*突变等位基因, 但是由于脂质体对Cas9-gRNA的递送效率较低, 且*Tmc1^{Bth}*耳聋小鼠的突变等位基因较WT仅相差一个碱基, 该Cas9-gRNA无法高特异性地识别该突变位点, 识别效率较低, 该方法对小鼠听觉功能的改善大约为15 dB, 仍有较大改善空间。

2019年起Jeffrey R. Holt实验室设计了由

Anc80L65介导的金黄色葡萄球菌Cas9的突变体-Sa-Cas9-KKH以及由双AAV9-PHP.B介导的SpCas9靶向*Tmc1*突变体*Bth*等位基因的治疗系统^[17,26], 验证表明这两种递送方式可以促进*Tmc1*点突变和敲除小鼠的毛细胞存活, 其中AAV-SaCas9-KKH-gRNA-4.2处理的*Tmc1^{Bth/WT}*小鼠在4周时ABR阈值恢复最佳, 为20~35 dB, 与WT水平接近, 且在24周时仍稳定维持; 在DFNB7/11的*Tmc1^{Δ/Δ}*模型中使用PHP.B-*Tmc1*也实现小鼠在4周时ABR阈值恢复至接近WT, 在24周时依然维持中低频的ABR阈值在60 dB左右, DPOAE阈值恢复更加显著, 说明该治疗系统显著实现了小鼠听觉功能的恢复。

2022年, 熊巍实验室首次利用非同源末端连接的基因编辑手段实现非综合性耳聋DFNB23小鼠的听力挽救^[27], 该实验利用的*PCDH15av-3j*小鼠模型携带单碱基插入造成的移码突变, 是常染色体隐性遗传性耳聋模型。以AAV2/9为递送载体, 将SpCas9引导的*m-3j*-gRNA1注射到耳蜗组织, 实现了*av-3j*突变的靶向修复, 发现耳蜗毛细胞的PCDH15蛋白表达、机械转导电流和小鼠的ABR、Startle以及前庭功能均得到了改善, 其中表现最好的小鼠ABR阈值恢复到75 dB左右。

2022年, Xue等人^[28]以AAV-PHP.eB为递送载体, 开发出SaCas9-KKH-gRNA复合物用于靶向治疗*MYO6* p.C442Y突变引起的DFNA22遗传性耳聋, 特异性地敲除了突变等位基因, 恢复了立纤毛基部MYO6的表达, 从而改善了注射小鼠的听力功能, 在第10周, AAV-SaCas9-KKH-Myo6-gRNA处理的小鼠ABR阈值仍有显著降低, 在14 kHz时降低至40 dB, 并且在第10个月仍然维持较为明显的治疗效果。

3.2.2 基因修复

基因修复包括碱基编辑器、先导编辑器和Cas9核酸酶等介导的同源重组修复(HDR), 依赖HDR的修复通路是以野生型的DNA作为模板, 将靶基因修复为野生型, 可以精确纠正突变位点, 其中碱基编辑器和先导编辑器能够在不断裂DNA双链的前提下实现基因修复, 目前主要的碱基编辑器有: 催化C→T(或G→A)转换的胞嘧啶碱基编辑器(CBEs)和介导A→G(或T→C)转换的腺嘌呤碱基编辑器(ABEs)。

2016年, Mianné等人^[29]利用CRISPR/Cas9介导的HDR在小鼠受精卵中纠正了*Cdh23ahl*突变等位基因,

利用带有配对RNA向导和单链寡核苷酸供体模板的偏移缺口Cas9 (D10A)缺口酶,实现了等位基因修复,挽救了其相关的年龄相关听力损失。2020年,David Liu课题组将CBE应用于隐性*Tmc1*突变的Baringo小鼠模型^[19],使内耳中C•G点突变逆转为野生型T•A,从而改善小鼠的听力功能,但由于编辑效率低等原因,听力恢复效果只维持了大约4周。通过提高载体的递送效率和碱基编辑器的表达效率可以进一步完善这一策略。2022年,Davis等人^[30]通过最小化ABE和AAV的组分,成功设计了一种单AAV-ABE系统,当在小鼠眼眶后递送时,该系统在肝脏、心脏和肌肉等器官中表现出较高的碱基编辑效率,为内耳中的点突变基因编辑策略提供了新的探索启示。2021年,Ingham等人^[31]采用了HDR的优化版—同源介导的末端连接(HMEJ)在体修复了*Klhl18*纯合隐性突变小鼠模型的听觉功能,听力恢复效果维持了至少6个月。

在遗传性耳聋的治疗领域中, RNA编辑技术正逐渐崭露头角,与DNA编辑技术并驾齐驱,共同为这一难题提供新的解决方案。2023年,Xue等人^[32]采用单个AAV为载体携带的CRISPR/Cas13 RNA单碱基编辑工具(emxABE)在人源化*OTOF* Q829X点突变小鼠中实现了mRNA中突变位点的精准修复,emxABE是由蛋白尺寸小且综合性能最佳的mini-dCas13X.1与RNA编辑酶腺苷脱氨酶(adenosine deaminase action RNA, ADAR)联合组成的,可以实现A到I高效碱基编辑功能,经证实,该编辑方法安全、有效,为*OTOF*点突变提供了一种优选的临床治疗策略,是目前唯一使用RNA单碱基编辑策略来治疗遗传性听力损失的策略。目前该项研究已经在Clinicaltrials.gov上登记了关于治疗*OTOF*突变引起的听神经病DFNB9的临床试验(NCT06025032),暂未招募患者。

总的来看,基因编辑疗法已经在部分遗传性耳聋的小鼠模型中展示出明显的疗效,提供了对缺陷基因操作更为精准的治疗方案,但是目前仍然缺乏临床试验验证此类疗法的安全性、有效性和可拓展性,有待进一步研究的推进。

4 内耳基因治疗递送载体

近年来,病毒载体和非病毒载体的基因递送技术均已开展应用研究。非病毒载体主要是基于脂质纳米

颗粒(LNPs)、阳离子聚合物、电穿孔和磁转染等技术的递送系统^[33-35],这些载体系统不仅可以提供可持续的基因表达,而且在提供强大基因负载能力的同时不会引发有害的炎症和免疫反应^[36],但转移效率有限^[37]。然而,基于其优势,已有相关产品被批准上市。2023年11月16日,英国药品和保健产品监管机构(MHRA)批准全球首款CRISPR/Cas9基因编辑药物Casgevy(通用名exagamglogene autotemcel, exa-cel)上市。与非病毒载体相比,病毒载体因具有天然的趋向性,作为可以靶向递送的载体,病毒载体可以更高效且特异地递送外源物质^[38]。针对不同的遗传物质,均已有相应的病毒载体经设计和改造后应用于基因治疗。

4.1 病毒载体

作为基因治疗中最常用的载体类型之一,不同病毒载体,表达特性和优势不同。常见的病毒载体有:腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、逆转录病毒、甲病毒、单纯疱疹病毒等。以下就其中几种进行介绍。腺病毒为二十面体,是一种无包膜的双链DNA病毒,具有50多种血清型。作为第一个在体内进行基因转移的有效载体,于20世纪50年代首次在人类的腺样体组织中被检测到^[39]。据不完全统计,截至2023年12月,已有200多项以腺病毒为载体的已完成或正在进行的临床试验,说明其在临床中的广泛应用。然而,在耳聋的基因治疗中,腺病毒的高免疫原性和潜在的毒性仍是其使用的限制条件^[40]。Luebke等人^[41]报道了在病毒滴度提高的情况下,腺病毒转染的耳蜗与腺相关病毒转染的相比功能受到严重损害,且外毛细胞失去了完整结构。这提醒我们在选择基因治疗载体时,需要考虑其对目标器官的潜在毒性风险。与腺病毒和腺相关病毒不同,慢病毒很少存在中和抗体^[42]。其主要优势在于稳定的基因表达能力。慢病毒可以感染分裂期或非分裂期的细胞,而逆转录病毒(鼠白血病病毒MLV)缺乏入核能力,只能感染分裂期细胞^[43]。

相比之下,腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)具有更低的免疫原性和衣壳毒性。作为微小病毒科(Parvoviridae)的一种单链无包膜DNA病毒,腺相关病毒于1965年在猿猴的腺病毒(Ad)制剂中被首次发现并分离^[44]。由于其在没有腺病毒或其他疱疹类病毒作为辅助病毒时很难发挥作用,因此得名腺病毒相关病毒,并被归入依赖病毒属。AAV携带了4.7 kb的ssDNA,

基因组由*rep*基因和*cap*基因组成, 其两端是倒置末端重复序列(ITR), 外部是由3种衣壳蛋白(VP1、VP2、VP3)组成的大小为20~25 nm的二十面体衣壳。虽然在健康人群中的血清阳性率最高的AAV2阳性率在70%左右^[45,46], 但目前没有在人类中定位到相关疾病与之相关。迄今为止, 现有的野生型AAV血清型至少有12种, 并已有100多种变体, 研究者们不断优化AAV突变体以更好地应用于基因递送^[47]。由于不同血清型的载体对细胞表面糖蛋白受体、次级受体或可能的共同受体AAVR的亲合力不同, 每一种血清型都表现出不同的组织趋向性^[48,49]。总的来说, AAV出色的安全性, 广泛的组织细胞趋向性和较高的感染效率已使其越来越多地成为基因治疗方案的首选载体^[50]。

2017年, FDA批准了首个以AAV为载体的基因治疗疗法LuxturnTM上市, 用以治疗视网膜营养不良。在上市前的III期临床实验中, 实验人员通过将含有人RPE65 cDNA的AAV2载体递送至视网膜细胞达到治疗并恢复视力的目的^[51]。2019年, 用于治疗脊髓性肌萎缩症(Zolgensma)并在III期临床实验中展现了安全性和有效性^[52,53]。据不完全统计, 截至2023年12月, 已有175项以AAV为载体的临床实验正在开展或已经完成(筛选字段: adenovirus vector. 筛选条件: (1) Looking for participants-Not yet recruiting & Recruiting; (2) No longer looking for participants-Active, not recruiting & Completed; (3) Study Type-Interventional; 其余条件均为默认)(<https://clinicaltrials.gov/>)。在中国, 截至2023年12月, 正在开展的临床试验中(<https://www.chictr.org.cn>)有17项是以AAV为载体开展, 53项是以腺病毒为载体开展。据不完全统计, 在中国药物临床试验登记平台(<http://www.chinadrugtrials.org.cn>)可供查询的已完成或正在进行的以腺病毒为载体进行递送的药物共有15种, 而以腺相关病毒为递送载体开展的仅有4项是已完成或正在进行的。

基因治疗作为一种重要的治疗方法逐步被认可, 尤其是以AAV为载体的治疗方法已经在临床实践中取得重要进展。展望未来, 我们应进一步提高基因治疗的安全性和有效性, 积极推进相关的临床试验, 为治疗更多疾病提供新的可能。

4.2 内耳基因治疗的AAV血清型

传统的AAV血清型可以以较高的效率感染新生小

鼠的内耳毛细胞, 但对于成年小鼠的外毛细胞和支持细胞的感染效率常常较低^[54-56]。AAV载体的转导率和表达效率随实验小鼠的年龄和目标部位发生变化^[57]。与人耳出生时已发育成熟的情况不同, 小鼠的耳部发育到出生后第16天左右才停止^[58]。同时, 现有在耳蜗中开展的基因治疗主要围绕毛细胞(HC)和支持细胞(SC)展开, 并且HC的损伤在哺乳动物中被认为是永久性的, 但近期有研究显示了SC细胞被诱导成HC祖细胞的可能性^[59]。因此, SC作为目前基因治疗的重要靶向位点, 不仅可以用于改善遗传性听力缺陷, 未来还可能用于诱导HC再生。所以筛选在成年小鼠中对SC或HC趋向性高的AAV载体显得尤为重要。为了使内耳基因治疗具有更高的治疗效率, 已有许多研究团队构建出感染效率更高、组织特异性更好的AAV载体。

Dalkara等人^[60]通过一种体内定向进化的方法在AAV2的基础上设计了变体AAV2.7m8, 用以在玻璃体内注射时递送视网膜外基因。而Isgrig等人^[61]验证了它能够同时高效感染新生小鼠和成年小鼠耳蜗中的IHC和OHC, 同时SC中的内柱细胞和内指骨细胞也可以得到高效的感染。暗示我们AAV2.7m8是一种可以对各年龄段小鼠耳蜗毛细胞和支持细胞为靶点的高效基因治疗载体。

2015年, Zinn等人^[62]通过计算机重建技术, 从人类和灵长类动物进化谱系的75种衣壳蛋白中构建得到Anc80以及一种特定变体Anc80L65。从进化关系上来看, AAV1、2、8、9均起源于此。Suzuki等人^[63]证实了在成年小鼠中, Anc80L65可以在前庭感觉上皮细胞(近乎100%的IHC和部分OHC)以及近一半的前庭神经节细胞中进行高效转导。Landegger等人^[64]的研究则表明, 在幼年小鼠中, 对于OHC, Anc80L65也可以做到接近90%的转导率。进一步地, Hu等人^[65]验证了Anc80L65可以对胚胎小鼠中内外毛细胞中的高效转导, 效率可达90%。同时也在SC的Deiters细胞和位于Deiters细胞外的Hensen细胞中也检测到了转导。

AAV-PHP.B是通过基于Cre重组的AAV定向进化方法筛选出的AAV9突变体, 对中枢神经细胞有高度嗜性^[66]。Wu等人^[17]的研究表明AAV-PHP.B可以在以较高的效率对幼年小鼠IHCs进行转导的同时对OHCs也高效转导, 同时在新生时期进行治疗的*Tmc1*突变小鼠的听力得到持续地恢复。György等人^[67]则展示了AAV9-PHP.B能转导新生的小鼠和大鼠中的IHC, 在非人灵长

类动物中也发现了有效转导. 同时在Usher综合征3A型耳聋(基因*CLRN1*)的幼年小鼠模型中, 达到挽救部分听力的作用.

而针对SC, Tan等人^[16]通过改造AAV衣壳蛋白, 获得了对SC具有高感染效率的变体AAV-ie, 在成年小鼠和幼年小鼠中, 其对耳蜗SC的感染率显著高于4种天然AAV(AAV1、6、8、9)和两种变体(AAV2.7m8和Anc80L65). 同时, 利用AAV-ie将*Atoh1*基因导入到幼年小鼠的耳蜗中, 首次实现利用SCs再生HC样细胞. 而且AAV-ie能够高效转导培养的成人椭圆囊组织支持细胞. 但AAV-ie也有不足, 高剂量的AAV-ie才能几乎完全转导SC; 此外AAV-ie对成年小鼠耳蜗的SCs的转导效率也仍有提高的空间.

4.3 小鼠内耳药物递送技术

由于血液-迷宫屏障限制了药物进入内耳, 大部分内耳疾病无法通过全身用药得到有效治疗. 耳蜗的密闭结构结合局部给药途径给了基因治疗策略更好的发挥空间. 耳蜗的密闭结构使外源基因的表达更稳定高效, 同时基因治疗策略的持续治疗效果使患者不必多次接受局部给药手术, 这也意味着更低的手术风险. 常用给药方式有耳蜗造口术(cochleostomy)、圆窗膜(the round window membrane, RWM)注射、半规管注射(或称耳道造口术, canalostomy)等多种.

耳蜗造口术可以通过颅骨的颞骨直接将病毒药物送达中阶, 并且具有较高的感染效率^[68]. 但是耳蜗造口术带来的注射创伤有可能引起内淋巴液的渗漏, 这可能会对耳蜗的内部结构造成不利影响而损伤患者的听力. Chien等人^[68]也表明, 尽管耳蜗造口术和RWM途径给药带来的病毒感染效果相当, 但耳蜗造口术形成的手术创伤更大. 这些研究共同说明了耳蜗造口术的潜在手术损伤风险. 本身耳蜗造口术是一种侵入性的手术方式, 不可避免地会对内耳的平衡环境造成不利影响. 基因治疗策略的递送方式既要求尽可能小的损伤率, 也要求更高的转导效率. 圆窗膜注射相比于耳蜗造口术更满足这些需求. 圆窗膜注射将药物递送至耳蜗管的鼓室中, 整个过程几乎不会造成毛细胞的损伤并且极小地影响内耳的稳态. 耳廓后圆窗膜注射手术作为一种微创手术, 对患者听力影响极小, 并且术后恢复较快, 已被广泛应用于幼年小鼠和非人灵长类动物的耳聋基因治疗中. Akil等人^[70]发现, 通过RWM的

递送在效率和药物分布均匀性方面都优于耳蜗造口术, 能广泛转染多种细胞类型, 同时不影响ABR阈值, 显示出其作为临床小分子转染替代方案的潜力. 但是, RWM传递的转导率主要依赖药物的渗透性及其在圆窗膜的停留时间^[71]. 因此, 实验设计中需考虑药物或试剂的通透性. 尽管RWM注射手术对新生小鼠几乎无创, 但在成年小鼠中, RWM注射手术引起了轻度的听力损失^[68,70]. Zhu等人^[72]的实验证明, 圆窗手术后小鼠出现的中耳积液(middle ear effusion, MEE)与听力损失高度相关. 此外, 后半规管注射法被证明相比上述两种方法可以更高效地转导耳蜗和前庭中的毛细胞^[63]. Zhu等人^[73]发现, 周围淋巴渗漏的时间及注射速率显著影响术后听力水平, 并基于此改良了传统的后半规管注射手术技术, 达到了剂量依赖性地高效转导成年小鼠的内毛细胞与外毛细胞的目的. 此外, 后半规管解剖位置明确, 啮齿动物的半规管位于鼓室外, 手术中易于发现, 降低了手术对内耳损伤的风险^[74]. 临床上, 可以通过乳突皮质切除术安全地进入后半规管, 这为后半规管注射手术的临床开发提供了可能性.

除了上述的方法外, 耳蜗导水管作为颅内脑脊液与耳蜗外淋巴的直接液体通道, 具有作为递送媒介的潜力. 但是这种方法需要进入颅内空间并且需要更大的药物递送量. 2023年1月, Ranum等人^[75]报道, 通过脑脊液递送三种血清型(AAV1、AAV2和AAV9)的AAV, 可稳定转导非人灵长类动物的内耳毛细胞和整个螺旋韧带和螺旋缘的各种细胞. 同年6月, Mathiesen等人^[76]报道称, 耳蜗导水管作为连接脑脊液和内耳液的骨通道, 具有类似淋巴管的特性, 可以通过向小脑延髓池注射AAV-*Slc17A8*, 经过耳蜗导水管成功传输至内耳, 并可以恢复听力损失的*Slc17A8*^{-/-}模型小鼠的听力. 但该研究仅在治疗两周后评估了效果, 长期作用仍需进一步验证. 同时, 在非人灵长类动物模型中的进一步验证将是该方法的未来研究内容之一. 这也暗示了通过脑脊液输送的基因疗法, 可能会为治疗听力损失开辟新的道路.

5 AAV载体优化

AAV递送系统由自然界中存在的AAV病毒改造而来, 其由两部分构成: 一是一个由蛋白构成的20面体衣壳(capsid); 二是被衣壳所包裹的单链DNA, 包括了

ITR序列、启动子序列、目的基因序列以及其他调控元件。基于AAV的基因递送是一个复杂的过程,涉及rAAV各个组分的精密配合。AAV病毒颗粒通过衣壳蛋白与细胞上的受体相结合,被内吞进入细胞核,释放的DNA利用细胞内源蛋白启动所携带的基因的表达,从而实现基因治疗。针对AAV衣壳和基因组进行改造筛选,可以使rAAV拥有更高特异性的组织和细胞感染效率。

5.1 AAV衣壳改造

定向进化是AAV衣壳筛选的常用策略。已有研究表明,AAV进入细胞依赖于其衣壳蛋白与细胞表面受体相互作用。利用重组技术,针对AAV衣壳蛋白的编码序列,采用受体靶向多肽插入、随机文库构建以及点突变等常用手段改造策略,对病毒的衣壳蛋白进行改造,可以改变AAV细胞靶向性(图2)。通常,定向进化需要进行2~3轮的压力筛选。靶向内耳毛细胞的AAV9的变体PHP.B是采用其中一种称作CREATE (Cre recombination-based AAV targeted evolution)的定向进化方法筛选得到的。CREATE是一种依赖Cre-Loxp系统的AAV筛选方法,能够筛选靶向表达Cre酶的特定细胞群。研究人员使用CREATE生成AAV变体,其中AAV9-PHP.B对中枢神经系统的转导效率是AAV9的40倍^[66]。随后,研究人员确定了AAV9-PHP.B可以几乎完全转导小鼠和非人灵长类动物的内外毛细胞^[67]。

除了这些方法,还有一些合理设计和寻找祖先序列的方法,虽然属于小众方法,但也值得尝试。Vandenberghe团队使用祖先序列重建推断病毒衣壳的进化中间体,产生了9个候选祖先AAV。其中Anc80L65被认为是AAV1、2、8、9四种血清型的祖先,能够有效转导肝脏、肌肉、视网膜和内耳毛细胞^[62]。Anc80L65也存在不足,其对非人灵长类的外毛细胞转导率很低^[77],限制了其在治疗因毛细胞缺陷引起耳聋的临床应用。结合毛细胞特异启动子可以提高Anc80L65对小鼠和非人灵长类OHC的转导率^[78],提示AAV载体的靶向性和转导效率同时受衣壳和启动子的影响。因此,筛选靶向内耳各类型细胞的特异性启动子至关重要。

5.2 启动子筛选

目的基因在AAV在进入细胞后,由AAV载体携带的启动子驱动表达。常用的II型启动子包括组成型启

动子、组织特异性启动子。已有很多研究使用组成型启动子,如CMV(cytomegalovirus)、EF1a(elongation factor 1 alpha)等,驱动基因表达,从而治疗听觉损伤^[20,79,80]。启动子驱动基因表达的能力过强则可能会表现出强烈的耳毒性^[81]。Qi等人^[69]发现外源TPRN的表达以剂量依赖的方式影响正常听力,在CAG驱动的TPRN基因表达中,随着注射剂量的增加,听力阈值也随之增加。除了强启动子引起的基因过量表达产生的耳毒性,启动子本身可能也具有细胞毒性。研究表明,广谱启动子CAG在成年鼠耳蜗注射后会导致细胞缺失。一项眼科的AAV体内实验表明,CMV启动子序列本身会导致视网膜细胞死亡,而细胞特异性启动子对细胞没有毒性^[82]。Myo15是一种毛细胞特异性启动子,安全性已经在小鼠和非人灵长动物中被验证,最新的临床试验中被应用于启动人源耳畸蛋白的表达,最终成功恢复了患者的听力^[23]。这些研究工作提示CMV、CAG等广谱启动子可能不适合进行内耳基因治疗,内耳转基因表达需要由特异性启动子驱动。组成型启动子有较强的驱动目标基因表达能力,因此基因治疗时可以降低AAV剂量,但是其表达位置缺乏特异性,基因的异位表达可能带来副作用。我们也需要组织特异启动子的弱表达活性。表达足够剂量的目的基因需要更高的病毒量,可能也会带来免疫系统的过度反应。

6 耳聋基因治疗的临床研究

耳聋基因治疗已经开始进入临床试验阶段。Novartis Pharmaceuticals开展了第一个耳聋基因治疗临床试验,试验产品为CGF166,一种重组腺病毒5 (Ad5)载体,含有编码人失调性转录因子(Hath1)的cDNA,该药物于2016年进入临床阶段(1/2期),尚无进一步消息。

目前,正在进行的耳聋基因治疗临床试验有6项,集中于OTOF点突变引起的遗传性DFNB9。其中3个团队公布了基因治疗的结果。(1)柴人杰团队利用AAV-hOTOF双载体驱动人OTOF在IHC中再表达。充分的临床前实验表明,AAV-hOTOF能够持续恢复小鼠听力至4个月以上,同时不引起小鼠和非人灵长类全身明显不良反应。2024年1月,研究人员报道了2名患者的临床试验数据。入组患者从术后2周听力得到持续有效改善,仅通过注射病毒耳朵即可听到声音,且未发现任何与

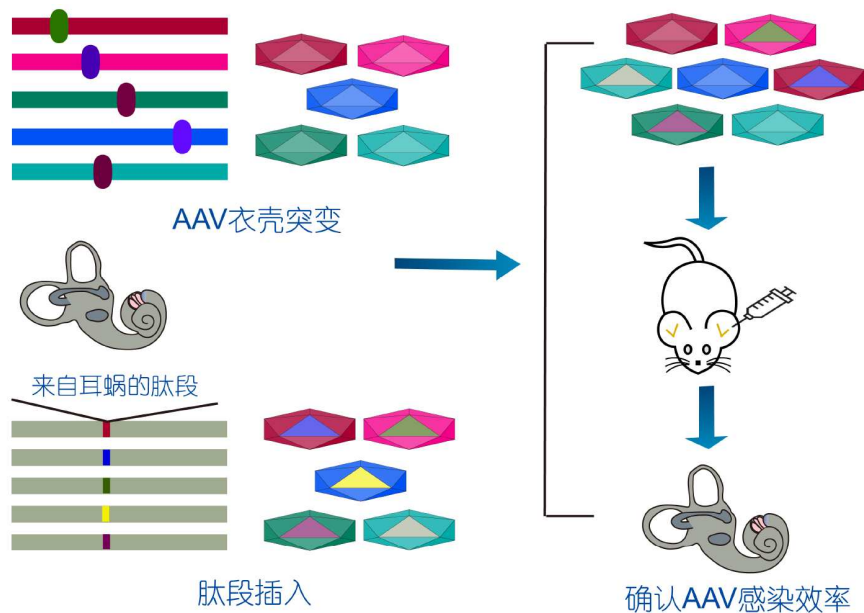


图2 AAV衣壳改造策略示意图

Figure 2 Schematic representation of the AAV capsid modification strategy

AAV-hOTOF相关的不良反应^[22]。(2) 舒易来团队利用AAV1-hOTOF和毛细胞特异性启动子*Myo15*在内耳中再表达人OTOF,并在*Otof*小鼠模型中得到了一个长达6个月的听力持续恢复效果^[83]。在临床前研究中充分验证了AAV1-hOTOF在小鼠和非人灵长类动物中的安全性后,舒易来团队利用AAV1构建递送人源OTOF进入6名OTOF突变耳聋患儿单侧内耳中,其中5名患儿的听力得到明显恢复^[23]。在单侧治疗效果得到验证的基础上,舒易来团队进行了双耳给药的研究,5名OTOF突变患儿在给药后,双耳听力均得到显著恢复,并且一定程度上恢复了语音感知和声源定位能力^[84],该研究目前仍在进行阶段。这项双耳AAV基因治疗研究初步验证了双耳AAV基因治疗遗传性耳聋的安全性和有效性。(3) Akouos公司的AK-OTOF基因治疗药物于在给药12周后,患者的听力从术前>100 dB恢复至50 dB,患者可以听到日常对话声音。这些研究表明基因治疗有望治愈遗传性耳聋。

值得注意的是,在这6项DFNB9基因治疗临床试验中,其中5项采用的策略是递送全长OTOF。由吴皓团队发起的儿童OTOF Q829X突变先天性耳聋患者单次窗内耳给药的安全性及耐受性的临床研究,则采用了基因编辑疗法,并在动物试验中验证了该疗法的安全性和有效性。研究人员针对OTOF Q829X突变的

耳聋患者,利用单个AAV携带自主开发的CRISPR/Cas13 RNA单碱基编辑工具(emxABE)进行治疗。临床前研究表明,人源化OTOF Q829X点突变的遗传性聋小鼠模型中注射治疗病毒后,OTOF mRNA中突变位点得到高效精准修复,小鼠听力恢复至接近野生型水平^[34]。目前该研究暂未招募患者。

DFNB9耳聋基因治疗的发展令人瞩目,已经实现从零到一的突破。但DFNB9属于罕见病,该疗法不能惠及更多的耳聋患者。*GJB2*是最常见的非综合征型耳聋突变基因之一。临床研究表明,*GJB2*基因突变导致的耳聋在两侧对称性、发病年龄、耳聋程度及稳定性等临床表型方面具有多样性,这给*GJB2*基因治疗带来了诸多挑战^[85]。国内外多个研究团队正进行*GJB2*基因治疗的临床前研究。Otonomy公司的数据表明单次施用AAV-GJB2可挽救两种*GJB2*缺陷小鼠模型的听力损失。Decibel Therapeutics针对*GJB2*突变的AAV.103药物可恢复*GJB2*缺陷小鼠受损听力至野生型小鼠的水平。Sensorion和Akouos公司也在研发*GJB2*基因治疗药物,目前还在探索阶段。*GJB2*的基因治疗需要关注至少2点:(1) *GJB2*分布广泛,需要开发能够覆盖其表达细胞的新型AAV载体,(2) *GJB2*异位表达引起毛细胞损伤^[85],需要筛选能够覆盖其表达细胞的特异启动子,一方面提高药效,另一方面降低耳毒性。

7 总结

基于AAV的基因治疗是遗传性耳聋的新兴治疗方式。本文系统叙述了遗传性耳聋基因治疗的现状,着重介绍了常见遗传性耳聋的发病机制,常用基因治疗的原理, AAV载体的构建与进化, 基因治疗临床研究进展与局限性。基因治疗方案建立在明确的疾病发生机制的基础之上。DFNB9是目前临床上唯一利用基因治疗药物成功恢复患者听力的遗传性耳聋。

人群最常见的*GJB2*、*SLC26A4*等突变引起的遗传性耳聋基因, 发病机制复杂, 基因治疗药物成药难度大: 一方面缺少可及的模拟人发病的动物模型, 另一方面需要精准的AAV载体开发与设计, 包括衣壳和基因组, 最终实现精准的基因治疗。临床上, 则需要建立更加完善的规范指南, 完善病人筛选机制和评估指标, 提供标准的术后维护手段, 持续对患者进行长期随访, 以指导遗传性耳聋基因治疗的临床实践活动。

参考文献

- 1 Chadha S, Kamenov K, Cieza A. The world report on hearing, 2021. *Bull World Health Organ*, 2021, 99: 242–242A
- 2 Otsu M, Yamada M, Nakajima S, et al. Outcomes in two Japanese adenosine deaminase-deficiency patients treated by stem cell gene therapy with no cytoreductive conditioning. *J Clin Immunol*, 2015, 35: 384–398
- 3 Akil O, Seal R P, Burke K, et al. Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron*, 2012, 75: 283–293
- 4 Driver E C, Kelley M W. Development of the cochlea. *Development*, 2020, 147: dev162263
- 5 Flock A, Duvall 3rd A J. The ultrastructure of the kinocilium of the sensory cells in the inner ear and lateral line organs. *J Cell Biol*, 1965, 25: 1–8
- 6 Raphael Y, Altschuler R A. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*, 2003, 60: 397–422
- 7 Santos-Sacchi J, Dallos P. Intercellular communication in the supporting cells of the organ of Corti. *Hear Res*, 1983, 9: 317–326
- 8 Meyer A C, Moser T. Structure and function of cochlear afferent innervation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 18: 441–446
- 9 Dorbeau C, Bijou W, Bakhos D. Syndromic hearing loss. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2021, 138: 118–119
- 10 Koffler T, Ushakov K, Avraham K B. Genetics of hearing loss. *Otolaryngol Clin N Am*, 2015, 48: 1041–1061
- 11 Sheffield A M, Smith R J H. The epidemiology of deafness. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9: a033258
- 12 Guan M X. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*, 2011, 11: 237–245
- 13 Qian Y, Guan M X. Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 4612–4618
- 14 Jacobs H T, Hutchin T P, Käppi T, et al. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13: 26–33
- 15 Michels T C, Duffy M T, Rogers D J. Hearing loss in adults: differential diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*, 2019, 100: 98–108
- 16 Tan F, Chu C, Qi J, et al. AAV-ie enables safe and efficient gene transfer to inner ear cells. *Nat Commun*, 2019, 10: 3733
- 17 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. *Mol Ther*, 2021, 29: 973–988
- 18 Akil O, Dyka F, Calvet C, et al. Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 4496–4501
- 19 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. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaay9101
- 20 Shubina-Oleinik O, Nist-Lund C, French C, et al. Dual-vector gene therapy restores cochlear amplification and auditory sensitivity in a mouse model of DFNB16 hearing loss. *Sci Adv*, 2021, 7: eabi7629
- 21 Noh B, Rim J H, Gopalappa R, et al. *In vivo* outer hair cell gene editing ameliorates progressive hearing loss in dominant-negative *Kcnq4* murine model. *Theranostics*, 2022, 12: 2465–2482
- 22 Qi J, Tan F, Zhang L, et al. AAV-mediated gene therapy restores hearing in patients with DFNB9 deafness. *Adv Sci*, 2024, 11: 2306788
- 23 Lv J, Wang H, Cheng X, et al. AAV1-hOTOF gene therapy for autosomal recessive deafness 9: a single-arm trial. *Lancet*, 2024, 403: 2317–2325

- 24 Zuris J A, Thompson D B, Shu Y. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. [Nat Biotechnol](#), 2015, 33: 73–80
- 25 Gao X, Tao Y, Lamas V, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. [Nature](#), 2018, 553: 217–221
- 26 György B, Nist-Lund C, Pan B, et al. Allele-specific gene editing prevents deafness in a model of dominant progressive hearing loss. [Nat Med](#), 2019, 25: 1123–1130
- 27 Liu L, Zou L, Li K, et al. Template-independent genome editing in the Pcdh15 mouse, a model of human DFNB23 nonsyndromic deafness. [Cell Rep](#), 2022, 40: 111061
- 28 Xue Y, Hu X, Wang D, et al. Gene editing in a Myo6 semi-dominant mouse model rescues auditory function. [Mol Ther](#), 2022, 30: 105–118
- 29 Mianné J, Chessum L, Kumar S, et al. Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair. [Genome Med](#), 2016, 8: 16
- 30 Davis J R, Wang X, Witte I P, et al. Efficient *in vivo* base editing via single adeno-associated viruses with size-optimized genomes encoding compact adenine base editors. [Nat Biomed Eng](#), 2022, 6: 1272–1283
- 31 Ingham N J, Banafshe N, Panganiban C, et al. Inner hair cell dysfunction in Khlh18 mutant mice leads to low frequency progressive hearing loss. [PLoS One](#), 2021, 16: e0258158
- 32 Xue Y, Tao Y, Wang X, et al. RNA base editing therapy cures hearing loss induced by *OTOF* gene mutation. [Mol Ther](#), 2023, 31: 3520–3530
- 33 Mellott A J, Forrest M L, Detamore M S. Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. [Ann Biomed Eng](#), 2013, 41: 446–468
- 34 Patil S, Gao Y G, Lin X, et al. The development of functional non-viral vectors for gene delivery. [Int J Mol Sci](#), 2019, 20: 5491
- 35 Sum C H, Shortall S M, Wong S, et al. Non-viral gene delivery. *Exp Suppl*, 2018, 110: 3–68
- 36 Wang C, Pan C, Yong H, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. [J Nanobiotechnol](#), 2023, 21: 272
- 37 Zu H, Gao D. Non-viral vectors in gene therapy: recent development, challenges, and prospects. [AAPS J](#), 2021, 23: 78
- 38 Lee C S, Bishop E S, Zhang R, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. [Genes Dis](#), 2017, 4: 43–63
- 39 Benihoud K. Adenovirus vectors for gene delivery. [Curr Opin Biotechnol](#), 1999, 10: 440–447
- 40 Butt M, Zaman M, Ahmad A, et al. Appraisal for the potential of viral and nonviral vectors in gene therapy: a review. [Genes](#), 2022, 13: 1370
- 41 Luebke A E, Foster P K, Muller C D, et al. Cochlear function and transgene expression in the guinea pig cochlea, using adenovirus- and adeno-associated virus-directed gene transfer. [Hum Gene Ther](#), 2001, 12: 773–781
- 42 Kalidasan V, Ng W H, Ishola O A, et al. A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. [Sci Rep](#), 2021, 11: 19265
- 43 Jayappa K D, Ao Z, Yao X. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012, 3: 70–85
- 44 Atchison R W, Casto B C, McD. Hammon W. Adenovirus-associated defective virus particles. [Science](#), 1965, 149: 754–756
- 45 Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. [Hum Gene Ther](#), 2010, 21: 704–712
- 46 Erles K, Sebkov P, Schlehofer J R. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). [J Med Virol](#), 1999, 59: 406–411
- 47 Li C, Samulski R J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. [Nat Rev Genet](#), 2020, 21: 255–272
- 48 Meyer N L, Chapman M S. Adeno-associated virus (AAV) cell entry: structural insights. [Trends Microbiol](#), 2022, 30: 432–451
- 49 Summerford C, Samulski R J. AAVR: a multi-serotype receptor for AAV. [Mol Ther](#), 2016, 24: 663–666
- 50 Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging issues in AAV-mediated *in vivo* gene therapy. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2018, 8: 87–104
- 51 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. [Lancet](#), 2017, 390: 849–860
- 52 Day J W, Finkel R S, Chiriboga C A, et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. [Lancet Neurol](#), 2021, 20: 284–293
- 53 Strauss K A, Farrar M A, Muntoni F, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the Phase III SPRINT trial. [Nat Med](#), 2022, 28: 1390–1397

- 54 Shu Y, Tao Y, Wang Z, et al. Identification of adeno-associated viral vectors that target neonatal and adult mammalian inner ear cell subtypes. [Hum Gene Ther](#), 2016, 27: 687–699
- 55 Tao Y, Huang M, Shu Y, et al. Delivery of adeno-associated virus vectors in adult mammalian inner-ear cell subtypes without auditory dysfunction. [Hum Gene Ther](#), 2018, 29: 492–506
- 56 Askew C, Rochat C, Pan B, et al. *Tmc* gene therapy restores auditory function in deaf mice. [Sci Transl Med](#), 2015, 7
- 57 Walters B J, Zuo J. Postnatal development, maturation and aging in the mouse cochlea and their effects on hair cell regeneration. [Hear Res](#), 2013, 297: 68–83
- 58 Zhao Y, Zhang L, Wang D, et al. Approaches and vectors for efficient cochlear gene transfer in adult mouse models. [Biomolecules](#), 2023, 13: 38
- 59 Lustig L R, Akil O. Cochlear gene therapy. [Curr Opin Neurol](#), 2012, 25: 57–60
- 60 Dalkara D, Byrne L C, Klimczak R R, et al. *In vivo*-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. [Sci Transl Med](#), 2013, 5: 189ra76
- 61 Isgrig K, McDougald D S, Zhu J, et al. AAV2.7m8 is a powerful viral vector for inner ear gene therapy. [Nat Commun](#), 2019, 10: 427
- 62 Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, et al. *In silico* reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. [Cell Rep](#), 2015, 12: 1056–1068
- 63 Suzuki J, Hashimoto K, Xiao R, et al. Correction: corrigendum: cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. [Sci Rep](#), 2017, 7: 46827
- 64 Landegger L D, Pan B, Askew C, et al. A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 280–284
- 65 Hu C J, Lu Y C, Tsai Y H, et al. Efficient in utero gene transfer to the mammalian inner ears by the synthetic adeno-associated viral vector Anc80L65. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2020, 18: 493–500
- 66 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. [Nat Biotechnol](#), 2016, 34: 204–209
- 67 György 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. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2019, 13: 1–13
- 68 Chien W W, McDougald D S, Roy S, et al. Cochlear gene transfer mediated by adeno - associated virus: comparison of two surgical approaches. [Laryngoscope](#), 2015, 125: 2557–2564
- 69 Qi J, Tan F, Zhang L, et al. Critical role of TPRN rings in the stereocilia for hearing. [Mol Ther](#), 2024, 32: 204–217
- 70 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 Vis Exp](#), 2015 doi: [10.3791/52187](#)
- 71 Guo J Y, He L, Qu T F, et al. Canalostomy as a surgical approach to local Drug Delivry into the inner ears of adult and neonatal mice. [J Vis Exp](#), 2018 doi: [10.3791/57351](#)
- 72 Zhu B Z, Saleh J, Isgrig K T, et al. Hearing loss after round window surgery in mice is due to middle ear effusion. [Audiol Neurotol](#), 2016, 21: 356–364
- 73 Zhu J, Choi J W, Ishibashi Y, et al. Refining surgical techniques for efficient posterior semicircular canal gene delivery in the adult mammalian inner ear with minimal hearing loss. [Sci Rep](#), 2021, 11: 18856
- 74 Isgrig K, Chien W W. Posterior semicircular canal approach for inner ear gene delivery in neonatal mouse. [J Vis Exp](#), 2018, 133: 56648
- 75 Ranum P T, Tecedor L, Keiser M S, et al. Cochlear transduction via cerebrospinal fluid delivery of AAV in non-human primates. [Mol Ther](#), 2023, 31: 609–612
- 76 Mathiesen B K, Miyakoshi L M, Cederroth C R, et al. Delivery of gene therapy through a cerebrospinal fluid conduit to rescue hearing in adult mice. [Sci Transl Med](#), 2023, 15: eabq3916
- 77 Andres-Mateos E, Landegger L D, Unzu C, et al. Choice of vector and surgical approach enables efficient cochlear gene transfer in nonhuman primate. [Nat Commun](#), 2022, 13: 1359
- 78 Qi J, Zhang L, Tan F, et al. Preclinical efficacy and safety evaluation of AAV-OTOF in DFNB9 mouse model and nonhuman primate. [Adv Sci](#), 2024, 11: 2306201
- 79 Riaz S, Sethna S, Duncan T, et al. Dual AAV-based PCDH15 gene therapy achieves sustained rescue of visual function in a mouse model of Usher syndrome 1F. [Mol Ther](#), 2023, 31: 3490–3501

- 80 Aaron K A, Pekrun K, Atkinson P J, et al. Selection of viral capsids and promoters affects the efficacy of rescue of Tmprss3-deficient cochlea. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2023, 30: 413–428
- 81 Zhao X, Jin C, Dong T, et al. Characterization of promoters for adeno-associated virus mediated efficient Cas9 activation in adult Cas9 knock-in murine cochleae. [Hear Res](#), 2020, 394: 107999
- 82 Calcedo R, Vandenberghe L H, Gao G, et al. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. [J Infect Dis](#), 2009, 199: 381–390
- 83 Zhang L, Wang H, Xun M, et al. Preclinical evaluation of the efficacy and safety of AAV1-hOTOF in mice and nonhuman primates. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2023, 31: 101154
- 84 Wang H, Chen Y, Lv J, et al. Bilateral gene therapy in children with autosomal recessive deafness 9: single-arm trial results. [Nat Med](#), 2024, 30: 1898–1904
- 85 Guo J, Ma X, Skidmore J M, et al. GJB2 gene therapy and conditional deletion reveal developmental stage-dependent effects on inner ear structure and function. [Mol Ther-Methods Clin Dev](#), 2021, 23: 319–333

Basic and clinical research progress of AAV-based gene therapy for hereditary deafness

ZHOU Yinyi³, YANG Xuehan¹, LU Yicheng¹, WANG Xiaohan¹, CHEN Xiangyan¹, FAN Jinyi¹,
ZHANG Xinru¹, WU Xianmin¹, ZHANG Liyan¹, TAN Fangzhi^{1*}, QI Jieyu^{1,2,3*} &
CHAI Renjie^{1,2,3,4,5*}

¹ State Key Laboratory of Digital Medical Engineering, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Zhongda Hospital, School of Life Sciences and Technology, School of Medicine, Advanced Institute for Life and Health, Jiangsu Province High-Tech Key Laboratory for Bio-Medical Research, Southeast University, Nanjing 210096, China

² Co-Innovation Center of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China

³ State Key Laboratory of Hearing and Balance Science, Department of Neurology, Aerospace Center Hospital, School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

⁴ Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, 610072, China

⁵ Southeast University Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518063, China

* Corresponding authors, E-mail: tanfangzhi@163.com, jieyu_qi@163.com, Renjie@seu.edu.cn

Hearing impairment has been widely concerned as a social health problem with high incidence. About 60% of cases of sensorineural hearing loss are caused by mutations in genetic material. The clinical treatment of hereditary deafness mainly relies on cochlear implants and hearing AIDS, and the development of more effective and comprehensive biological treatment methods is imminent. Repairing the damaged genes is an effective way to fundamentally treat hereditary deafness. Several studies have shown that the replacement or repair of mutant genes in inherited deafness mouse models can effectively restore the impaired hearing in mice. At present, gene therapy has successfully restored hearing in patients with hereditary deafness carrying *OTOF* mutations. There are more than 200 deafness genes including *OTOF*. As a precision therapy, there are still many problems need to be solved in the application of gene therapy in hereditary deafness. In this paper, the occurrence and development of hereditary deafness are summarized, and then the current research progress of gene therapy applied to the clinical treatment of hereditary deafness is deeply discussed, and the dilemma and challenge of gene therapy for deafness at this stage are put forward.

hearing loss, gene therapy, hereditary deafness, cochlea

doi: [10.1360/SSV-2024-0031](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0031)