

神经肌肉疾病基因治疗的研究进展

周 鹏, 颜景斌*

(上海市儿童医院, 上海医学遗传研究所, 上海交通大学附属儿童医院, 国家卫生健康委员会胚胎分子生物学重点实验室, 上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040)

摘要: 神经肌肉疾病(neuromuscular diseases, NMD)是一类以运动单位受损、运动耐力下降、肌力减退为主要表现的中枢及周围神经疾病。长期以来, 神经肌肉疾病的治疗手段主要是对症治疗, 但仅能缓解症状, 无法根治。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体是经过基因工程改造过的转基因载体, 由于其安全性好、免疫原性低、表达时间长, 可以感染分裂细胞和非分裂细胞等特点, 在基因治疗和疫苗研究中得到广泛应用。CRISPR/Cas9基因编辑系统由Ⅱ型CRISPR细菌免疫系统改进而来, 具有靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低等特点, 是目前应用最为广泛的基因编辑工具。本综述总结了几种常见神经肌肉疾病的最新基因治疗进展, 着重讨论了基于AAV载体和CRISPR/Cas9系统的基因治疗在NMD治疗中的潜在价值以及相应的风险。

关键词: 神经肌肉疾病; 基因治疗; AAV载体; CRISPR/Cas9

Advances in gene therapy of neuromuscular diseases

ZHOU Peng, YAN Jingbin*

(NHC Key Laboratory of Medical Embryogenesis and Developmental Molecular Biology, Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Neuromuscular diseases (NMD) are a kind of central or nervous system diseases, mainly manifested by impaired motor units, reduced exercise endurance, and hypotonia. In the past several years, symptomatic treatment is the major therapy for NMD, which is able to relieve the symptoms. Adeno-associated virus vectors (AAV) are the most common tools, which are widely used in gene therapy and vaccine due to their safety, low immunogenicity and long expression time. More importantly, dividing and non-dividing cells can be effectively infected with AAV. CRISPR/Cas9 (CRISPR-associated protein 9), derived from type II CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) bacterial immune systems, is emerging as a powerful tool for gene editing. It has the characteristics of precise targeting, low off-target rate, and low cytotoxicity. In this review, recent progress in gene therapy of several common NMD are summarized. The potential value and corresponding risks of gene therapy based on AAV vector and CRISPR/Cas9 system in the treatment of NMD are mainly discussed.

Key Words: neuromuscular diseases; gene therapy; AAV; CRISPR/Cas9

神经肌肉疾病(neuromuscular diseases, NMD) 是一类以运动单位受损、运动耐力下降、肌力减

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 上海市临床重点专科项目(shslczdk05705)

第一作者: E-mail: zhoupengabc@sjtu.edu.cn

*通信作者: E-mail: m18917128323@163.com

退为主要表现的中枢及周围神经疾病。NMD主要表现为肌无力、肌萎缩、肌肉肥大和肌肉疼痛等症状, 严重时还可能表现为继发关节挛缩、骨骼畸形、感觉知觉障碍和呼吸衰竭等, 最终可能导致严重残疾甚至死亡。目前, NMD的主要治疗手段为康复训练、家庭护理及少数非特异性药物。尽管这些治疗方法在一定程度上可以延长患者生存时间, 但不能达到彻底治愈的目的。

基因治疗可以直接替代或修复突变基因, 已成为治疗神经肌肉疾病的新途径。目前, 基因治疗主要采用基因替代和基因编辑两种方式。基因替代治疗中, 外源正常功能基因一般利用病毒载体包括腺病毒(adenoviruses, AD)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、逆转录病毒(retroviruses, RV)和慢病毒(lentivirus, LV)转导到病人体内, 从而表达正常的蛋白质, 起到代偿的作用。而基因编辑治疗中, 主要采用基因编辑技术将体内的突变基因原位修复, 从而恢复细胞的正常功能。

1 几种重要的神经肌肉疾病

1.1 脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)

SMA是一种常染色体隐性遗传性神经肌肉疾病, 其特征是脊髓和脑干中的 α 运动神经元变性, 导致进行性近端肌无力、感觉减退和麻痹。活产婴儿发病率为10/100 000~15/100 000, SMA的致病基因为SMN(survival motor neuron), 位于5q11.2-q13.3, 有两个高度同源的拷贝SMN1和SMN2^[1]。SMN2基因与SMN1基因的区别在于第7号外显子起始处核苷酸C变成T, 导致7号外显子的跳跃, 产生90%的不稳定蛋白质, 容易被降解, 无法发挥功能。SMN2基因拷贝数的多少与SMA表型轻重相关, 拷贝数越多, 产生的正常SMN蛋白越多, 病情越轻。SMA分为I~IV型, 大部分I型患者SMN2拷贝数为2, II型患者拷贝数为3, III型和IV型有3~4个拷贝。

1.2 Duchenne型肌营养不良症(duchennemuscular dystrophy, DMD)

DMD是X连锁隐性遗传性肌病, 由位于Xp21.2的DMD基因突变所致, 根据发病年龄分为

Duchenne型肌营养不良(duchenne muscular dystrophy, DMD)和Becker型肌营养不良(becker muscular dystrophy, BMD)。在活产男婴中, DMD的发病率为1/3 500~1/5 000^[2]。DMD基因是人类基因组中最大的基因, 具有79个外显子和78个内含子, 编码14 kb成熟的mRNA^[3]。最常见的DMD基因突变包括基因片段的缺失、点突变和基因重复^[4]。DMD基因编码dystrophin蛋白, 当dystrophin蛋白缺失时, 肌膜因结构稳定性下降而断裂, 细胞外液及钙离子流入细胞内, 激活蛋白酶途径, 增加蛋白质降解, 引起肌细胞坏死, 从而导致疾病。

1.3 庞贝病(Pompe disease, PD)

PD又称为糖原累积病II型, 是一种罕见的常染色体隐性代谢性肌病, 由 α -葡萄糖苷酶基因(acid alpha-glucosidase, GAA)突变导致酸性 α -葡萄糖苷酶活性降低引起, 而酸性 α -葡萄糖苷酶在溶酶体糖原降解中具有关键作用。糖原在细胞内的异常积累导致了自噬的发生和细胞肌纤维功能变性的障碍, 从而导致疾病^[5]。

1.4 其他神经肌肉疾病

I型强直性肌营养不良症(Myotonic dystrophy type 1, DM1)是强直性肌营养不良症(DM)的一种, DM1是由强直性肌营养不良蛋白激酶基因(myotonic dystrophy protein kinase, DMPK)变异导致的。患者DMPK基因3'UTR中发现了CTG三核苷酸重复序列的扩增, 导致DMPK基因剪接失调, 无法产生正常的蛋白质^[6]。

X连锁型肌管肌病(X-linked myotubular myopathy, XLMTM)是由肌管蛋白基因1(myotubular myopathy 1, MTM1)突变引起的。XLMTM的确切发病机理还不确定, 可能与兴奋收缩偶联的改变、肌肉纤维大小的降低、神经肌肉接头的异常以及自噬作用有关。

Ullrich先天性肌营养不良(Ullrich congenital muscular dystrophy, UCMD)是与胶原蛋白VI相关的肌营养不良(collagen VI-related dystrophies, COL6-RDs), 由COL6A1基因突变所致, 是细胞外基质疾病, 影响骨骼肌和结缔组织。

2 基因替代治疗

基因替代治疗即将正常的基因导入患者体

内, 替代突变的基因, 从而获得表达完整功能的蛋白质。AAV载体因不含病毒编码序列、引起较弱的炎症反应和免疫反应、主要以游离形式存在、与宿主基因组整合概率低的特点在基因治疗方面得到广泛应用^[7]。美国食品和药品管理局(FDA)批准的首个AAV基因治疗Luxturna, 用于治疗由等位基因*RPE65*突变引起的儿童早期视网膜营养不良^[8]。此外, AAV载体已被证明可用于神经肌肉疾病的治疗^[9]。James Wilson开发的以AAV9作为载体的Zolgensma, 获得美国FDA批准上市, 成为全球首个SMA的基因治疗方法^[10]。

AAV载体也有自身的局限性。AAV载体一般分为单链AAV载体(ssAAV)和自我互补AAV载体(scAAV)。scAAV载体携带的转基因容量仅为2.2 kb, 约为ssAAV载体容量(4.7 kb)的一半。因此, AAV载体不适合较大基因的转导。另一个缺点是转基因在分裂细胞中的逐渐稀释, 如果目标组织处于活跃的再生或增殖状态, 则可能在以后的生活中需要重新给药。虽然在人体中未观察到AAV载体整合到基因组中, 但是在狗和小鼠模型的临床前研究中发现有宿主基因的整合及其他不良事件^[11-13]。2021年12月, 4名肌管性疾病患者和1名DMD患者在AAV载体给药后死亡, 详细原因仍在调查中^[14]。因此, AAV载体应用的相关潜在风险需要格外注意。

2.1 SMA基因替代治疗

针对SMA基因替代治疗, 目前唯一进入临床项目的是AveXis公司开发的AVXS-101(即Zolgensma)。该新药的治疗策略以血清型9的腺相关病毒(scAAV9)为载体, 其中包含稳定的功能齐全的*SMN1*基因。导入的基因为一个自我互补的双链分子, 因此不需要经过宿主细胞调控合成双链这一限速步骤, 可直接编码SMN蛋白, 起效迅速。AAV9可以通过血脑屏障, 因此, Zolgensma既可以鞘内注射, 也可以静脉给药。AveXis公司报道, 在5岁以下儿童中, 单次静脉输注Zolgensma后, 在中枢神经系统(CNS)中显示出良好的效果, 并且在体内检测到相关抗体的滴度较低^[15]。2017年9月, 开始了SMA的Ⅲ期临床试验STRIVE, 结果显示, 22名患者中有20名在14个月时恢复自主呼吸, 13名患者在18个月时实现了独坐30秒或更

长时间^[16]。基于临床研究的积极结果, SMA基因治疗药物AVXS-101已被FDA批准用于治疗*SMN1*基因突变的2岁以下儿童^[10]。在最近的一项临床研究中, Weiß等^[17]报道了76名患者中有56名出现肝酶升高, 59名出现了血小板减少症以及少数的心脏不良事件。

2.2 DMD基因替代治疗

DMD的基因替代治疗与SMA基因替代治疗相似, 利用AAV载体导入外源性DMD基因。但是由于DMD的基因全长cDNA大小就达到了14 kb, 而AAV载体的运载容量大约为4.7 kb, 导致DMD基因难以全部转入载体。一种策略是采用三载体转导: 在2014年, 有学者将DMD基因分成三个部分, 通过共注射三种病毒载体(Tri-AAV)来递送^[18]。尽管在小鼠模型中重组效率低, 但Tri-AAV载体成功表达了全长的dystrophin蛋白, 三载体策略为治疗DMD及其他单基因神经肌肉遗传病提供了新思路。另一种解决策略是导入截短的micro-dystrophin基因。Potter等^[19]在mdx小鼠模型中发现, 转入micro-dystrophin后, 小鼠的膈肌和胫骨前肌肌肉增加, 临床和特定器官的实验室评估或病理学检测未发现载体的相关毒性。2020年的一项研究表明, 4名儿童DMD患者在接受micro-dystrophin基因输入治疗后, micro-dystrophin蛋白获得正确定位和稳定表达, 肌酸激酶水平改善和NSAA评分提高, 并且不良事件极少^[20]。但是需要注意的是, 截短后的micro-dystrophin缺少了神经元型一氧化氮合酶(Nnos)。Nnos对于维持细胞内Ca²⁺浓度的稳态、维持正常的心功能具有重要作用^[21]。

2.3 PD基因替代治疗

在庞贝病的基因替代治疗中, Keeler等^[22]通过AAVB1载体和AAV9载体给药, 发现小鼠的体重增长, 且AAVB1载体处理过的小鼠有更高的GAA酶活性和更高的舌尖糖原清除率, 改善后的呼吸功能也与野生型相当。在Ⅰ/Ⅱ期临床试验中, Byrne等^[23]和Corti等^[24]研究了膈肌输送(AAV1-CMV-GAA), 在5岁以下儿童患者中显示了安全性良好, 潮气量略有增加, 无助呼吸延长。最近的一项研究中, Eggers等^[25]采用AAV8血清型载体, 在肌酸激酶启动子下表达人GAA蛋白, 在小鼠和食

蟹猴中发现糖原清除和酶活性水平的显著改善。由于是异种抗原, 食蟹猴在高剂量下发生了载体相关的免疫炎症反应, 导致心脏异常, 最后被安乐死。另外一种策略是使用肝脏特异性启动子, Puzzo等^[26]通过AAV8载体将*GAA*基因导入基因敲除的小鼠模型中, 缓解小鼠肌肉和中枢神经系统中的糖原累积, 并改善了小鼠的呼吸功能障碍。但这种策略仍会受组织摄取的限制和中和抗体的影响。最后, 据报道来自Abeona Therapeutics的下一代AIMTM AAV载体平台的新型AAV改善了其在心脏、肌肉和中枢神经系统中的分布, 目前正处于庞贝病的临床前开发阶段^[27]。

2.4 XLMTM基因替代治疗

研究人员已在*MTM1*突变的狗中证明了使用AAV8载体进行*MTM1*基因治疗的功效^[28]。Audentes公司开发了第一种XLMTM的基因治疗方法, 该治疗方法通过AAV8载体转导人*MTM1*基因。I/II期研究的中期结果显示, 肢体和躯干的力量增强, 运动的速度和准确性提高, 交流和吞咽的能力增强^[29]。

3 基因编辑治疗

近年来, 基因编辑技术发展迅速, 相继出现了锌指核酸酶(ZFN)、类转录激活样效应因子核酸酶(TALEN)和规律成簇间隔短回文重复序列(CRISPR/Cas)三种基因编辑技术。尤其是CRISPR/Cas9技术, 使对DNA序列的操作变得简单易行^[30,31]。

CRISPR/Cas9因具有靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低、价格低廉等特点受到重点关注。CRISPR/Cas9基因编辑系统由原核生物II型CRISPR/Cas系统改进而来, 在人工设计的sgRNA引导下, Cas9蛋白可以切割靶DNA的磷酸酯键, 最终形成双链断裂损伤(DSBs), DSBs会激发细胞本身的两种DNA损伤修复机制——同源重组修复(HDR)机制和非同源重组末端直接连接(NHEJ)修复机制^[32]。通过CRISPR/Cas9可在DNA水平去除一个外显子, 达到外显子跳跃的效果; 也可以通过非同源末端连接(NHEJ)途径插入和删除无义突变, 甚至添加外显子。目前还需要通过AAV作为载体, 将CRISPR/Cas9系统运送进体内。正常人和

DMD患者的外显子及几种常见的靶向策略有以下几种(图1)。

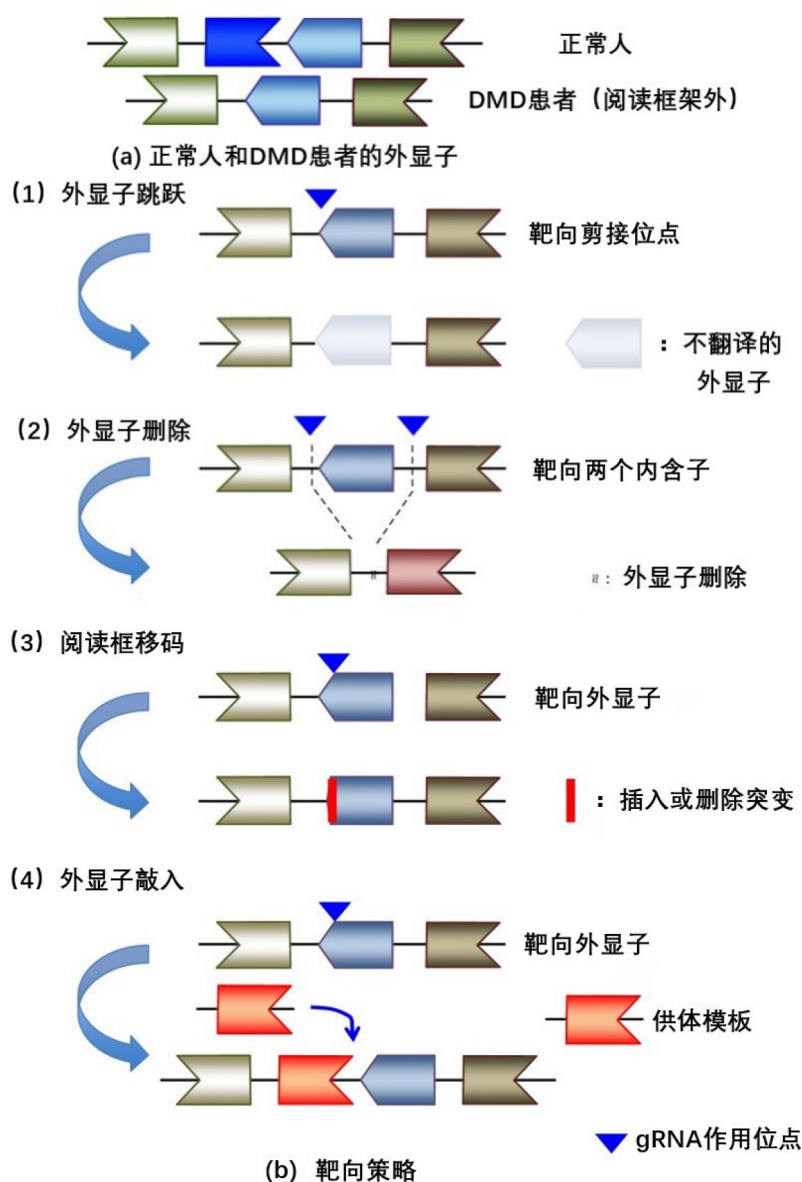
3.1 基因校正

基因校正即利用同源重组修复(HDR)机制和非同源重组末端直接连接(NHEJ)修复机制将突变基因进行校正, 可以恢复整个蛋白质。针对Ullrich先天性肌营养不良, Bolduc等^[33]利用CRISPR/Cas9技术, 采用双重gRNA系统切除假外显子序列, 恢复了*COL6A1*基因的正常剪接, 表达了功能性胶原蛋白VI。Corti等^[34]使用SMA患者来源的iPSC, 采用针对性的单链寡核苷酸基因组编辑校正方法, 将*SMN2*外显子7中的T改变成C, 将*SMN2*基因转变成*SMN1*基因。结果显示, 移植iPSC衍生的运动神经元后, SMA I型小鼠的表型得到改善, 存活时间也得到延长。Matre等^[35]通过CRISPR/Cas9靶向mdx小鼠肌肉祖细胞中突变基因的第23个外显子, 获得了dystrophin蛋白的恢复。Xu等^[36]在成年mdx小鼠中使用单碱基编辑技术后, 在骨骼肌和心肌中观察到广泛的dystrophin蛋白, 超过95%的心肌细胞得到纠正。

目前, 基因编辑技术的优势在于精准地在DNA水平永久修复基因, 不需要长期用药; 缺点在于对不同突变类型的患者需进行不同类型的基因编辑, 工作量繁重, 成本较高, 而且CRISPR/Cas9基因编辑技术仍可能存在脱靶和Cas9蛋白引起体液和细胞免疫反应等问题, 需要我们谨慎对待^[37]。除此之外, 治疗需要大量的AAV以导入CRISPR/Cas9, AAV的量产仍存在问题, 而且有些患者体内存在AAV抗体, 治疗效果还有待验证。

3.2 外显子跳跃

CRISPR/Cas9系统可以改变剪接位点, 实现外显子跳跃, 恢复阅读框。与使用反义寡核苷酸的(antisense oligonucleotide, ASO)的外显子跳跃不同, CRISPR/Cas9的使用可以改变剪接位点, 以防止外显子掺入RNA。这种方法已经被广泛使用, 尤其被用来评估它在DMD治疗中的相关性和有效性^[38]。Amoasii等^[39-41]使用CRISPR/Cas9工具在外显子50缺失的小鼠和狗中进行DMD基因外显子51的跳跃, 恢复阅读框并产生了较短但具功能性的蛋白质。研究结果显示, 在骨骼肌、心肌和膈肌中, dystrophin蛋白都有显著的恢复。在2018年,



a: 正常人和DMD患者的外显子; b: DMD患者中使用CRISPR/Cas9介导的基因编辑的几种靶向策略

图1 正常人和DMD患者的外显子及几种常见的靶向策略

Ifuku等^[42]使用DMD患者来源的诱导多能干细胞(iPSC)进行研究,通过在iPSC中使用CRISPR/Cas9系统来破坏外显子45中的剪接位点,恢复了dystrophin蛋白的表达。Min等^[43]使用单切割策略的CRISPR/Cas9,在缺失了外显子43、45和52的3种小鼠模型和人iPS细胞中有效恢复了dystrophin蛋白的表达。

3.3 外显子删除

CRISPR/Cas9也可用于删除一个或多个外显子,以恢复基因的阅读框或删除一个或多个含有突变的外显子^[44]。与外显子跳跃不同,这种治疗

方法不涉及剪接机制。Provenzano等^[45]使用CRISPR/Cas9基因编辑技术在DM1患者来源的成纤维细胞中删除了CTG重复序列,防止核病灶的形成和剪接改变,和其他方法相比可以使受影响的细胞永久恢复到正常表型。Dastidar等^[46]在DM1患者iPS来源的肌肉细胞中使用CRISPR/Cas9删除CTG重复序列,结果显示,修复了DMPK基因剪接,恢复了蛋白质的表达。

2016年以来发表了一系列应用CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗DMD模式动物的研究^[38]。Duchêne等^[47]设计了一对靶向外显子47和58的sgRNA,使4

名不同外显子缺失的DMD患者的肌细胞恢复了正常的阅读框和dystrophin蛋白的表达。同样, Moretti等^[48]通过CRISPR/Cas9在52外显子缺失的猪模型和患者来源的诱导多能干细胞模型中得到验证, 提高了dystrophin蛋白的表达, 延长了生存期, 并降低了心率失常的易感性。

4 增强补偿基因的表达

尽管基因替代和基因编辑技术的临床试验取得了令人鼓舞的结果, 但是某些目标基因大小或其他原因限制了基因治疗的应用。增强补偿基因表达的方法主要指不直接针对突变的基因而间接增强其他相关通路基因表达, 从而弥补突变导致的功能丧失。例如, Duchenne型肌营养不良症是由于DMD基因过大而无法完全通过转基因转至细胞内。因此, 一些学者寻求替代基因策略。例如, *Utrophin*基因编码Utrophin蛋白, 与DMD基因编码的dystrophin蛋白具有80%的同源性, 结构相近, 功能相似。*Utrophin*基因位于6q24, cDNA全长约为13 kb, 包含73个外显子, 是继DMD基因之后发现的第二个人类大基因。因此, 可以通过上调Utrophin蛋白代偿dystrophin蛋白来治疗DMD。Wojtal等^[49]通过CRISPR/Cas9基因编辑技术上调*Utrophin*基因表达, 使DMD患者细胞中Utrophin-A提高了1.7~6.9倍。Sengupta等^[50]通过CRISPR/Cas9介导的基因编辑删除抑制*Utrophin*基因表达的五个miRNA结合位点, 发现DMD患者来源的iPS细胞中Utrophin蛋白表达水平高出两倍。由于Utrophin蛋白是自身蛋白, 不会引起免疫反应, 而且适用于任何类型的DMD患者, 但是结构上的差异, 使Utrophin蛋白并不能完全代替dystrophin蛋白, 且过度上调的安全性还有待验证。

*GALGT2*基因可以上调其他对肌肉功能至关重要的蛋白质表达量, 从而逐步修复肌肉功能。*GALGT2*基因治疗借助人工改造的rAAVrh74载体将*GALGT2*基因导入体内, 并在骨骼肌和心肌细胞中表达*GALGT2*基因。Xu等^[51]发现, 过表达*GALGT2*基因改变了mdx小鼠心肌细胞膜的糖基化, 可以防止小鼠心脏功能的丧失。该治疗不仅能纠正由DMD基因突变引起的肌功能异常, 还能纠正其他肌营养不良症。

另一种增强补偿基因表达方法是卵泡抑素(Follistatin-like protein, fsl)的过表达。卵泡抑素可以通过结合并抑制负责调节和限制肌肉生长的肌肉生长抑制素, 使肌肉显著增长, 一般作为健美运动员使用的一种补剂。在BMD患者中, 基于AAV转导的肌内卵泡抑素基因治疗显示, 6 min步行测试可增加肌肉力量^[52,53]; Milo Biotechnology公司开发的卵泡抑素-334以rAAV1为载体, 将改良版卵泡抑素-334基因递送到肌肉细胞中, 目前已完成临床试验。

5 展望

近年来, 新技术的出现推动了基因治疗在单基因神经肌肉疾病中的应用, 临床试验的数量达到了历史新高^[54]。目前基因治疗存在两个方面的挑战: 一个是基因脱靶和基因组整合; 另一个是病毒载体或基因编辑剂的免疫原性风险。未来研究应聚焦于开发新型载体, 减少载体剂量, 提高药物递送效率, 减少剂量相关的副作用, 提高载体的安全性等。Tabebordbar等^[55]开发出改进的AAV载体, 该载体以较低的剂量靶向肌肉细胞, 同时减少了肝脏摄取, 并且没有发现明显的毒性和免疫相关的副作用。对于基因编辑方法的创新, 要提高基因编辑的效率, 减少脱靶, 降低Cas9蛋白的免疫原性等。Banskota等^[56]开发了一种工程化无DNA病毒样颗粒(eVLPs)搭配碱基编辑器(BE), 作为一种有前途的体内基因编辑新工具, 在动物实验中未检测到脱靶和基因组的整合。此外, 对于基因治疗的结果, 应采用合适的监测评估手段, 开发出新的生物标志物等。相信随着上述研究取得突破性的成果, 神经肌肉疾病基因治疗的大规模临床应用将在不久的将来得以实现。

参考文献

- [1] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995, 80(1): 155-165
- [2] Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis*, 2020, 15(1): 141
- [3] Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is

- cotranscriptionally spliced. *Nat Genet*, 1995, 9(2): 184-190
- [4] Neri M, Rossi R, TrabANELLI C, et al. The genetic landscape of dystrophin mutations in Italy: a nationwide study. *Front Genet*, 2020, 11: 131
- [5] van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*, 2008, 372(9646): 1342-1353
- [6] Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 1992, 68(4): 799-808
- [7] Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, et al. Immune responses to viral gene therapy vectors. *Mol Ther*, 2020, 28(3): 709-722
- [8] Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, et al. Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med*, 2015, 372(20): 1920-1926
- [9] Aguti S, Malerba A, Zhou H. The progress of AAV-mediated gene therapy in neuromuscular disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18(6): 681-693
- [10] Hoy SM. Onasemnogene abeparvovec: first global approval. *Drugs*, 2019, 79(11): 1255-1262
- [11] Nguyen GN, Everett JK, Kafle S, et al. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 47-55
- [12] Dalwadi DA, Torrens L, Abril-Fornaguera J, et al. Liver injury increases the incidence of HCC following AAV gene therapy in mice. *Mol Ther*, 2021, 29(2): 680-690
- [13] Li Y, Miller CA, Shea LK, et al. Enhanced efficacy and increased long-term toxicity of CNS-directed, AAV-based combination therapy for krabbe disease. *Mol Ther*, 2021, 29(2): 691-701
- [14] Chamberlain JS. A boost for muscle with gene therapy. *N Engl J Med*, 2022, 386(12): 1184-1186
- [15] Saffari A, Weiler M, Hoffmann GF, et al. Gentherapien für neuromuskuläre Erkrankungen. *Nervenarzt*, 2019, 90(8): 809-816
- [16] Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, 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(4): 284-293
- [17] Weiß C, Ziegler A, Becker LL, et al. Gene replacement therapy with onasemnogene abeparvovec in children with spinal muscular atrophy aged 24 months or younger and bodyweight up to 15 kg: an observational cohort study. *Lancet Child Adolesc Health*, 2022, 6(1): 17-27
- [18] Lostal W, Kodippili K, Yue Y, et al. Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(6): 552-562
- [19] Potter RA, Griffin DA, Heller KN, et al. Dose-escalation study of systemically delivered rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in the *mdx* mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, 2021, 32(7-8): 375-389
- [20] Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, et al. Assessment of systemic delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in children with duchenne muscular dystrophy. *JAMA Neurol*, 2020, 77(9): 1122-1131
- [21] Dombrowsky NW, Ölmestig JNE, Witting N, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in Duchenne and Becker muscular dystrophies-still a possible treatment modality? *Neuromuscular Disord*, 2018, 28(11): 914-926
- [22] Keeler AM, Zieger M, Todeasa SH, et al. Systemic delivery of AAVB1-GAA clears glycogen and prolongs survival in a mouse model of pompe disease. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(1): 57-68
- [23] Byrne PI, Collins S, Mah CC, et al. Phase I/II trial of diaphragm delivery of recombinant adeno-associated virus acid alpha-glucosidase (rAAV1-CMV-GAA) gene vector in patients with Pompe disease. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2014, 25(3): 134-163
- [24] Corti M, Liberati C, Smith BK, et al. Safety of intradiaphragmatic delivery of adeno-associated virus-mediated alpha-glucosidase (rAAV1-CMV- *hGAA*) gene therapy in children affected by pompe disease. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2017, 28(4): 208-218
- [25] Eggers M, Vannoy CH, Huang J, et al. Muscle-directed gene therapy corrects Pompe disease and uncovers species-specific GAA immunogenicity. *EMBO Mol Med*, 2022, 14(1): e13968
- [26] Puzzo F, Colella P, Biferi MG, et al. Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secreted acid α -glucosidase. *Sci Transl Med*, 2017, 9(418): eaam6375
- [27] Unnisa Z, Yoon JK, Schindler JW, et al. Gene therapy developments for pompe disease. *Biomedicines*, 2022, 10(2): 302
- [28] Elverman M, Goddard MA, Mack D, et al. Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. *Muscle Nerve*, 2017, 56(5): 943-953
- [29] Dowling J, Shieh P, Kuntz N, et al. O39ASPIRO phase 1/2 gene therapy trial in X-linked motubular myopathy (XLMTM): update on preliminary safety and efficacy findings. *Neuromuscular Disord*, 2019, 29: S207
- [30] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826

- [31] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [32] Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(12): 8096-8106
- [33] Bolduc V, Foley AR, Solomon-Degefa H, et al. A recurrent COL6A1 pseudoexon insertion causes muscular dystrophy and is effectively targeted by splice-correction therapies. *JCI Insight*, 2019, 4(6): e124403
- [34] Corti S, Nizzardo M, Simone C, et al. Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med*, 2012, 4(165): 165ra162
- [35] Matre PR, Mu X, Wu J, et al. CRISPR/Cas9-based dystrophin restoration reveals a novel role for dystrophin in bioenergetics and stress resistance of muscle progenitors. *Stem Cells*, 2019, 37(12): 1615-1628
- [36] Xu L, Zhang C, Li H, et al. Efficient precise *in vivo* base editing in adult dystrophic mice. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3719
- [37] Lagor WR. Anti-Cas9 immunity: a formidable challenge for muscle genome editing. *Mol Ther*, 2022, 30(1): 10-12
- [38] Erkut E, Yokota T. CRISPR therapeutics for Duchenne muscular dystrophy. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1832
- [39] Amoasii L, Long C, Li H, et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Sci Transl Med*, 2017, 9(418): ean8081
- [40] Amoasii L, Li H, Zhang Y, et al. *In vivo* non-invasive monitoring of dystrophin correction in a new Duchenne muscular dystrophy reporter mouse. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4537
- [41] Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2018, 362(6410): 86-91
- [42] Ifuku M, Iwabuchi KA, Tanaka M, et al. Restoration of dystrophin protein expression by exon skipping utilizing CRISPR-Cas9 in myoblasts derived from DMD patient iPS cells. *Methods Mol Biol*, 2018, 1828: 191-217
- [43] Min YL, Chemello F, Li H, et al. Correction of three prominent mutations in mouse and human models of duchenne muscular dystrophy by single-cut genome editing. *Mol Ther*, 2020, 28(9): 2044-2055
- [44] Gee P, Xu H, Hotta A. Cellular reprogramming, genome editing, and alternative CRISPR Cas9 technologies for precise gene therapy of duchenne muscular dystrophy. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 8765154
- [45] Provenzano C, Cappella M, Valaperta R, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of CTG expansions recovers normal phenotype in myogenic cells derived from myotonic dystrophy 1 patients. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9: 337-348
- [46] Dastidar S, Ardui S, Singh K, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated editing of trinucleotide repeat expansion in myotonic dystrophy patient-derived iPS and myogenic cells. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(16): 8275-8298
- [47] Duchêne BL, Cherif K, Iyombe-Engembe JP, et al. CRISPR-induced deletion with SaCas9 restores dystrophin expression in dystrophic models *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther*, 2018, 26(11): 2604-2616
- [48] Moretti A, Fonteyne L, Giesert F, et al. Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*, 2020, 26(2): 207-214
- [49] Wojtal D, Kemaladewi DU, Malam Z, et al. Spell checking nature: versatility of CRISPR/Cas9 for developing treatments for inherited disorders. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(1): 90-101
- [50] Sengupta K, Mishra MK, Loro E, et al. Genome editing-mediated utrophin upregulation in duchenne muscular dystrophy stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 500-509
- [51] Xu R, Jia Y, Zygmunt DA, et al. rAAVrh74.MCK. GALGT2 protects against loss of hemodynamic function in the aging mdx mouse heart. *Mol Ther*, 2019, 27(3): 636-649
- [52] Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther*, 2015, 23(1): 192-201
- [53] Mendell JR, Sahenk Z, Al-Zaidy S, et al. Follistatin gene therapy for sporadic inclusion body myositis improves functional outcomes. *Mol Ther*, 2017, 25(4): 870-879
- [54] Flotte TR, Gessler DJ. Gene therapy for rare neurological disorders. *Clin Pharma Ther*, 2022, 111(4): 743-757
- [55] Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell*, 2021, 184(19): 4919-4938
- [56] Banskota S, Raguram A, Suh S, et al. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins. *Cell*, 2022, 185(2): 250-265