

亨廷顿病

亨廷顿病基因治疗的进展与挑战

裴 中, 吴腾腾

(中山大学附属第一医院神经内科, 广州 510080)



【摘要】亨廷顿病是一种常染色体显性遗传病, 基因治疗是控制病情进展甚至实现根治的有效手段。随着反义核苷酸疗法在亨廷顿病基因治疗中获得初步成功, 针对基因组水平及 mRNA 水平的各项技术也正在积极开发、改良, 在不久的将来相继开展临床试验。本文围绕亨廷顿病基因治疗的现状、发展方向及临床挑战, 开展相关研究状况的综述。

【关键词】亨廷顿病; 基因治疗; 反义寡核苷酸; 基因编辑

【中图分类号】R596.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-01

Progress and challenges in gene therapy for Huntington's disease

Pei Zhong, Wu Tengting

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University)

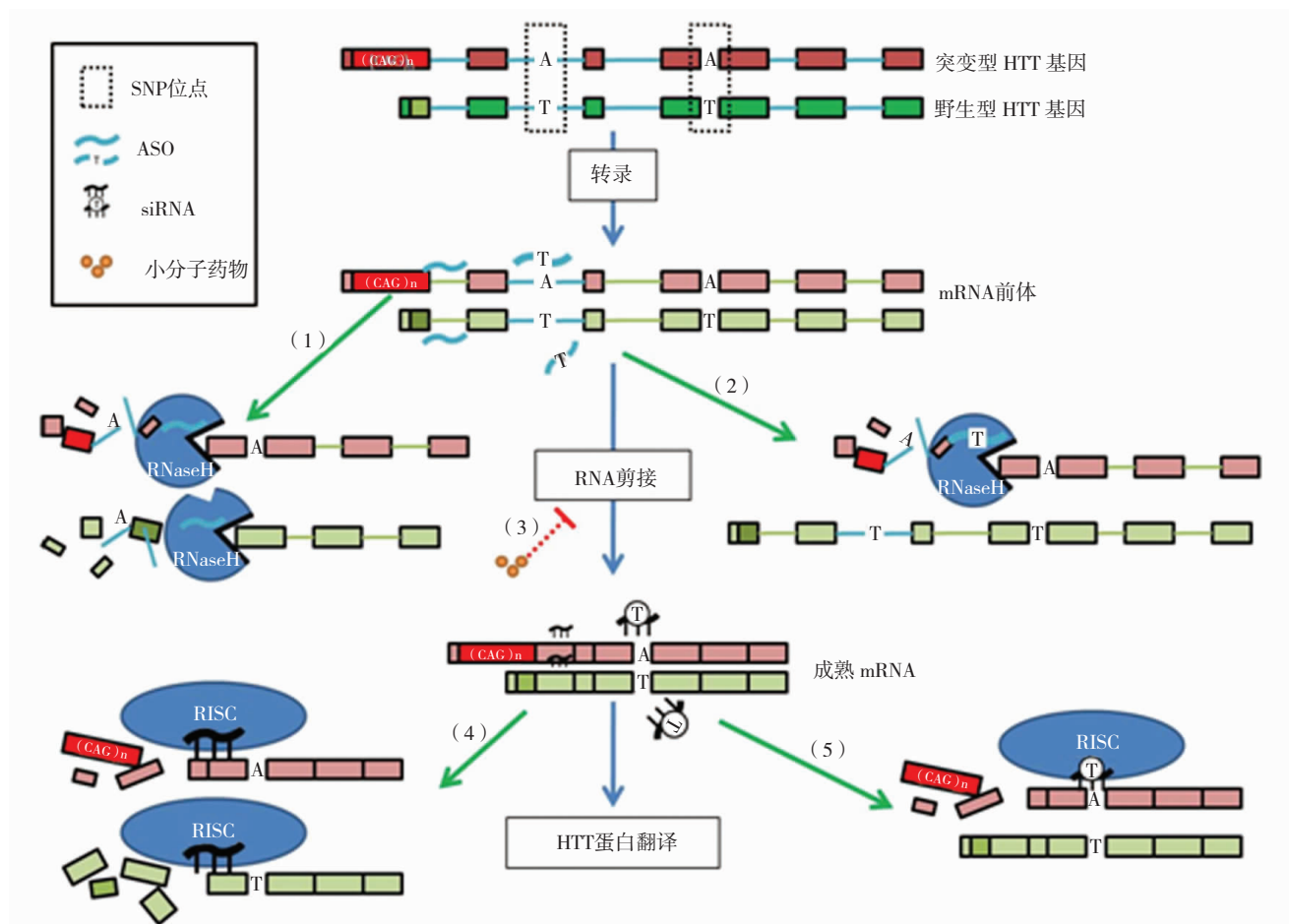
【Abstract】Huntington's disease is an autosomal dominant hereditary disease. Gene therapy is an effective means to control the progression of the disease and even to achieve radical cure. With the initial success of antisense oligonucleotide therapy for Huntington's disease, different strategies targeting genomic DNA or mRNA are being actively developed and improved, and clinical trials will be carried out in the near future. This review focuses on the current situation, further development, and clinical challenges of gene therapy for Huntington's disease.

【Key words】huntington's disease; gene therapy; antisense oligonucleotide; gene editing

作者简介:裴 中, 教授、博士生导师, 中山大学附属第一医院神经内科副主任, 广东省医学会循证医学分会副主委, 中国亨廷顿病协作网共同召集人, 国际运动障碍疾病协会亨廷顿病定义专案组委员会委员。美国“Current Treatment Options in Neurology”, “Journal of Pineal Research”“Basal Ganglia”杂志及中国神经精神疾病杂志编委。1985年毕业于东南大学医学院医疗系, 1997年获中山医科大学神经病学专业硕士学位, 2002年获香港大学医学博士学位。2003年至2004年为NIH访问学者, 2005年曾获得NIH的The Fellows Award for Research Excellence。2004年至2006年在约翰霍普金斯大学医学院从事博士后研究工作。2006年为中山大学百人计划引进人才。先后获国家自然科学基金、国家新药创制项目、广东省科技计划项目、中山大学百人计划资助项目, 参与973项目、国家科技支撑计划项目等各类基金。其研究成果曾发表在PNAS, Nature Neuroscience及stroke等杂志。Email: peizhong@mail.sysu.edu.cn, 研究方向: 神经疾病包括亨廷顿病、帕金森病、脑血管病及老年痴呆的诊断治疗及分子机制研究。

基金项目:国家重点研发计划资助项目(编号:2017YFA0105104); 国家自然科学基金资助项目(编号:81873751、81671102); 广东省重大科技专项资助项目(编号:2016B030230002)。

亨廷顿病(Huntington's disease, HD)又称慢性进行性舞蹈病、大舞蹈病, 患者一般在中年发病, 出现运动、认知和精神方面的症状。患者病情呈进行性恶化, 通常在发病15~20年后死亡。HD是一个常染色体显性遗传病, 子女的发病概率为50%。病因是由于亨廷顿基因(*HTT*)第一号外显子上的CAG三联密码子重复序列异常扩增所致。拥有多于36次CAG重复三联密码子的个体可能患病, 如果重复次数为36~39次, 个体表现不完全外显, 部分携带者可不发病或推迟发病; 当CAG重复次数 ≥ 40 次时, 个体则表现出完全外显, 所有携带个体均可发病^[1]。由于HD是由于基因突变所致, 所以最根本的治疗是基因疗法。目前包括直接在DNA水平纠正亨廷顿基因突变的基因编辑及在mRNA水平抑制变异的HTT蛋白(mHTT)的生成的mHTT蛋白降低(HTT lowering)。针对HD的基因治疗, 科学家尝试了不同的策略, 其中包括反义寡核苷酸、RNA干扰、小分子化合物、锌指蛋白以及CRISPR基因编辑技术^[2]。在2015年, ASO首次进入临床试验, 初步结果发现ASO明显降低HD患者脑脊液毒性蛋白mHTT, 病人对ASO有良好的耐受性, 证实了其良好的安全性。但ASO是否能减缓疾病的进展, 尚有待进一步大规模临床试验。而以



- (1) 以 IONIS-HTT Rx 为代表的 ASO,能够在细胞核内与 mRNA 前体碱基互补配对,诱导 RNaseH 降解目的 mRNA 前体
- (2) 根据 SNP 设计的 ASO 倾向于与突变基因的 mRNA 前体碱基互补配对,选择性降解突变 mRNA 前体
- (3) 小分子化合物直接干扰 mRNA 前体剪接形成成熟 mRNA
- (4) siRNA 在体内组装成 RISC,非选择性的与 HTT 成熟 RNA 结合,诱导其降解
- (5) 等位基因特异性的 siRNA 倾向于与突变 HTT 的成熟 RNA 碱基互补配对,选择性降解突变 HTT 成熟 RNA

图 1 非等位基因特异性及等位基因特异性 mHTT 降低疗法

CRISPR 为代表的新技术还处于实验室研究阶段。本文将就 HD 基因治疗的现状、发展方向及临床挑战作简要综述。

1 HD 基因治疗的现状及进展

1.1 针对毒性蛋白 HTT 的基因治疗

HTT 蛋白(huntingtin, HTT)是亨廷顿基因(HTT)的编码产物。目前 HTT 的正常功能尚不明,但突变亨廷顿基因可产生变异的 HTT 蛋白(mHTT),最终导致蛋白聚集形成包涵体^[3]。mHTT 具有神经毒性,是引起 HD 病理生理改变的主要原因。理论上抑制 mHTT 的生成或促进其降解,都可使 mHTT 蛋白降低,达到治疗目的。但实际上,就 mHTT 蛋白降低效率而言,抑制 mHTT 的生成要远高于促进降解。

如所有基因指导蛋白质合成一样, mHTT 的生成也包括

从 DNA 到 mRNA 的转录及从 mRNA 到蛋白质合成的翻译过程。由于 mRNA 缺乏自我修复机制,因此通过干扰或者阻止 mRNA 的翻译,可以抑制 mHTT 的生成,从而达到降低脑组织中 mHTT 的目的。目前,相关的在研治疗策略主要有以下 3 种:反义寡核苷酸、RNA 干扰以及调控 mRNA 剪接的小分子化合物。

1.1.1 反义寡核苷酸疗法 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)是人工合成的单链 DNA 或 RNA,能够与 mRNA 结合,诱导其被核糖核酸酶 H(RNase H)降解(见图 1)。迄今为止,已经相继研发上市了三代 ASO。通过对其分子结构进行化学修饰,第三代 ASO 的核酸酶抗性以及 mRNA 亲和性,较前两代有了明显提高。在大大增强疗效的同时,减轻了相应的非特异毒副作用(肝脾损害、凝血功能、免疫刺激等)^[4]。目前,用于 HD 临床试验的 ASO,是经过 2'-O-MOE 修饰后

的靶向人源 *HTT* mRNA 的第二代反义寡核苷酸 IONIS-HTTRx。I 期临床试验结果表明,早期 HD 患者经过为期 3~4 个月,每月 1 次的鞘内给药,并未报告严重不良反应,说明早期 HD 患者对于 IONIS-HTTRx 的耐受性良好^[9]。此外,临床结局表明,IONIS-HTTRx 能够降低 HD 患者脑脊液中 mHTT 的含量,且呈浓度相关性。脑脊液 mHTT 降低程度与部分认知、运动相关量表的评分改善相关,可能提示临床获益^[9]。但是,更加完善的设计以及更加充足的样本量是后续临床验证必不可少的环节。相关的三期临床试验将在 2019 年初在全球超过 80 个中心开展,预计入组 660 名症状期 HD 患者,随访超过 25 个月,通过临床量表、生物标志物、智能设备评估等多个维度进一步评价 ASO 治疗对于疾病进程的影响^[9]。

然而 ASO 是否能够改善临床症状仍值得关注,因为鞘内注射 ASO 到达深部脑组织的量可能很有限,而纹状体神经元死亡是导致运动症状的主要原因。在猴模型中发现,鞘内注射 IONIS-HTTRx 能有效地降低皮层的 *HTT* 表达量(约 50%),而在纹状体仅能降低约 20% 的 *HTT* 表达^[9]。可能是由于 ASO 主要通过局部扩散进入脑组织,而扩散深度介于 1~2 mm,所以导致位置浅表的皮层药物疗效较深在的纹状体高^[10]。然而众多研究确实观察到广泛的 ASO 表达,提示可能存在其他药物扩散的途径。这值得进一步研究。

优化 ASO 药物递送方式是解决目前 ASO 脑区间疗效不均一的可能方向。目前通过共价缀合某些多肽或小分子,已能够实现 ASO 靶向 BBB 上相应受体,增强其透过能力,从而使得 ASO 能够随着血流在全脑范围内分布。例如,在脊髓性肌肉萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)小鼠模型中,静脉注射多肽修饰的 ASO,能够减轻 SMA 小鼠的运动障碍,延长其存活时间^[11]。这项技术还有待进一步在 HD 中加以验证。

1.1.2 RNA 干扰 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)通过向细胞中引入特定序列的 RNA,包括 siRNA(short interfering RNA, siRNA)、shRNA(short hairpin RNA, shRNA)以及 miRNA(microRNA, miRNA),在细胞中形成核糖核酸酶沉默复合物 RISC(RNA-induced silencing complex, RISC),进而与特定序列 mRNA 的互补结合,诱导其降解,最终实现基因沉默^[12](见图 1)。由于这类双链结构的 RNA 在脑组织中的扩散范围相对局限,通常需要依靠载体进入脑组织,目前多通过脑内定位注射病毒载体实现 RNA 干扰。通过病毒转染,外源序列能够在目的细胞中长期稳定表达,使细胞自行生产 shRNA/miRNA 等 siRNA 的前体成分,实现基因沉默。

目前 uniQure 公司开发的 AMT-130 即将进入临床试验。AMT-130 是以 AAV5 为载体,通过 miRNA 实现 RNA 干扰的基因疗法。相较于 IONIS-HTTRx, AMT-130 也是靶向人源 *HTT* mRNA,但通过手术定位注射于纹状体,因此对纹状体

mHTT 的抑制效果更佳,能够显著减少纹状体 mHTT 的聚集以及神经元死亡,而且单次给药后疗效维持时间长,可长达 1 年以上^[13-14]。然而缺点是,目前病毒递送需要外科手术辅助,一旦出现由于病毒载体以及外源序列所导致的不良反应,目前缺乏有效的应对措施,存在一定的风险。

受限于病毒安全性问题、有限的治疗范围、外科手术给药等问题, RNAi 在 HD 基因治疗领域中进展较慢。因此,针对该种治疗策略,其优化方向则是研发安全性更强、转染效率更高、转染区域更广的病毒载体。近年来,随着各类新型病毒载体的研发,病毒的扩散性能以及 BBB 穿透能力都有了显著提高,使得多脑区干预以及静脉用药成为可能^[16]。

为了规避病毒载体以及外源序列副作用等问题,利用脂质体、外泌体等针对 BBB 的药物载体^[17],实现短效 RNA 干扰,在未来 HD 基因治疗中也具有可观的潜在应用前景。本课题组与南京大学生科院共同合作,验证装载 siRNA 的外泌体在 HD 的治疗效果。通过静脉注射,装载 siRNA 的外泌体能够穿越血脑屏障,靶向神经元实现 RNA 干扰。该外泌体能够降低小鼠模型 mHTT 的表达以及挽救运动表型^[18]。

1.1.3 等位基因特异性治疗 HD 患者多为杂合突变,即携带有一个具有正常功能的 *HTT* 基因(wtHTT)以及一个突变的 *HTT* 基因(mHTT)。而目前的基因治疗策略大部分靶向 wtHTT 和 mHTT 基因的共有序列,因此在降低 mHTT 的同时,也降低了 wtHTT。虽然 wtHTT 目前的功能不清,但完全缺失 wtHTT 会导致发育障碍,因此同时降低 mHTT 及 wtHTT 存在潜在的危险^[7]。相比之下,只针对 mHTT 的精准治疗可以减少这种风险。因此开发等位基因特异性的基因治疗将是未来发展的趋势。

一对等位基因之间的序列并不是完全一致的,存在着众多单个核苷酸的变异。由这种单个核苷酸变异在基因组层面导致的多态性称为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)。针对仅位于 mHTT 基因上单个 SNP 位点设计药物^[8],能够在降低 mHTT 的同时,维持 wtHTT 的表达(见图 1)。WAVE 公司设计新一代的 ASO,能够分别识别 2 个在 mHTT 存在的高频 SNP 变异,从而选择性降低 mHTT 的表达,预计约 2/3 的 HD 患者适用该类药物^[19]。目前在欧洲、加拿大和美国的 HD 患者中测试这 2 种 ASOs 的安全性^[8]。

与 IONIS-HTTRx 相同, AMT-130 也是靶向 wtHTT 和 mHTT 的共有序列。相较于 ASO 的个体化治疗, RNA 干扰的个体化治疗进展较慢。主要原因是 RNA 干扰靶向的是成熟的 mRNA,成熟的 mRNA 只体现外显子序列,因此只能针对位于外显子区域的 SNP 开发相应的治疗策略,然而位于外显子区域 SNP 远少于位于内含子区域。目前仅报道了针对位于外显子的 SNP 位点 rs362331 设计 miRNA 能够实现等位基

因特异性 RNA 干扰。如果针对该位点开发新疗法,预计能够覆盖 49% 的 HD 患者^[15]。

等位基因特异性治疗需要 HD 人群中杂合度较高的,且能够被靶向的 SNP 位点。随着未来基因检测技术的发展,我们对于 HD 致病基因序列有更加全面的了解,从而获得更多高频的候选位点。而该位点是否能够被靶向,一方面取决于该位点的变异类型及周边序列,另一方面取决于药物对于靶向序列微小差异的识别能力,其中后者是可以通过优化药物组成和结构等方式实现。

1.1.4 调控 mRNA 剪接的小分子化合物 小分子化合物是另一类实现靶向 HTT RNA 治疗的潜在新型药物。该药为口服剂型,体内吸收后能够穿过血脑屏障到达脑内。这类药物主要通过诱导 pre-mRNA 的错误剪接和降解,实现基因沉默(见图 1)。其中,不同构象的药物可以靶向不同的剪接机制,从而干扰特定 pre-mRNA 的剪接。例如,Naryshkin 等^[19]发现了一类小分子能够改变 SMN2 pre-mRNA 的剪接,进而诱导有功能的 SMN 蛋白的表达,其机制与治疗 SMA 的 ASO 类药物 Spinraza 大致相同。目前在 SMA 领域中已有 1 项 I 期试验完成。在 HD 治疗领域,类似的工作也正在进行,现已经筛选出能够降低 HTT mRNA 的先导化合物,经过进一步优化,有望在 2020 年开展临床安全性试验^[31]。

不过,值得注意的是,虽然口服用药可能是实现基因治疗的最佳目标,但是还有很多障碍需要克服。例如,脱靶效应就是这类药物亟待明确的问题。不同于 ASO 以及 RNAi 等治疗药物,这类药物并非基于碱基互补配对的靶向机制,而是直接干扰了一类 RNA 的剪接过程,因此对其脱靶效应需要更加警惕。

1.2 DNA 水平的基因编辑纠正治疗

HD 是一种单基因遗传病,因此,直接纠正基因组 DNA 致病突变或删除突变基因,无疑是治疗疾病的最佳选择。CRISPR/Cas9 基因编辑技术为实现这一治疗提供了可能。例如,李晓江课题组通过病毒载体局部注射的方法,利用 CRISPR/Cas9 编辑系统使小鼠纹状体突变的等位基因失活,从而显著降低了 HD 小鼠纹状体局部的 mHTT 的表达,减轻了相关的病理改变及运动障碍表型,且没有观察到明显的脱靶效应^[20]。但是 HD 基因编辑仍处于实验室阶段,还有几个重要的问题需要解决:时机的选择;等位基因特异编辑;脱靶效应。

由于 HTT 在机体生长发育中十分重要,因此在什么时候对 HTT 进行编辑是目前最关心的问题。研究发现在 2 月龄、4 月龄、8 月龄小鼠完全敲除 HTT 将分别导致 95%、70%、5% 的死亡^[21]。尽管能够存活,完全敲除 HTT 会导致丘脑钙化以及小脑的铁代谢异常^[22]。而选择性敲除神经元 HTT 可引起

18% 的 2 月龄小鼠死亡,而 4 月龄小鼠能够正常存活^[21]。因此不提倡过早在人体使用基因编辑技术,至少待机体发育成熟。而且基因编辑涉及的细胞种类、脑区仍有待进一步论证。

由于基因编辑目前并不可逆,wtHTT 的功能尚未完全阐明,因此要求尽可能保留 wtHTT 的功能,这对等位基因特异性编辑提出更高的要求。CRISPR/Cas9 基因编辑系统切割双链 DNA 的过程依赖 PAM 位点的存在。SNP 的存在使得等位基因间存在不同的 PAM 位点,Jun 等设计了成对 gRNA,借助仅存在于突变基因上的 SNP 形成的 PAM 位点,在人源神经母细胞实现中对 HTT 突变基因的精准删除^[23]。对于这类等位基因特异性策略的开发,依靠大量的 HD 患者遗传信息,且人种之间存在差异,然而目前缺乏关于我国突变 HTT 基因 SNP 的相关数据,这将制约了这一策略在国内人群的应用。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术的脱靶效应也备受学术界关注。研究发现在编辑系统导入后 6 h 内即完成对靶基因的编辑,此后 Cas9 蛋白以及 gRNA 的持续表达是导致脱靶效应的重要原因。因此,Merienne 等^[24]通过导入包含靶向 HTT 基因的 gRNA (sgHTT) 以及靶向 Cas9 基因的 gRNA (sgCas9) 的新型 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,使该系统在切除 HTT 基因的同时,通过 sgCas9 将导入机体的 Cas9 基因切除,实现自我灭活。该技术在抑制 mHTT 表达的同时,能够大幅降低脱靶效应。此外,脱靶效应更低的 Cas9 蛋白以及防止双链 DNA 断裂的切口酶等相关研发工作也正在进行^[25]。

一旦基因被成功编辑,疗效将持续维持,因此并不要求基因编辑相关外源基因的长期表达。利用脂质体等非病毒载体实现基因编辑是未来的发展方向。目前已能实现利用静脉注射的脂质体将外源 mRNA 导入猕猴神经元,指导合成功能蛋白^[26]。未来进一步可实现在脂质体递送的相关 mRNA 指导下,目的细胞短期合成基因编辑所需元件。

2 HD 基因治疗的临床挑战

2.1 前驱期与治疗时机的选择

HD 的临床诊断主要依靠阳性家族史或基因诊断结果,以及典型的舞蹈样动作或锥体外系运动障碍。对于基因诊断阳性,而尚未出现运动症状的个体,称之为 HD 携带者或症状前 HD 患者。而对于出现运动症状,并在 UHDRS 量表置信度评分 4 分或 3 分并伴有认知功能损害的患者,称之为症状期 HD。并根据整体功能量表的评分,将症状期 HD 分为早期、中期及晚期。目前基因治疗临床试验主要招募早期 HD 患者,一方面考虑到这部分患者大脑病理改变较轻,临床获益的可能性较大,另外则是由于这部分患者生物标志物已有明显改变,可用于疗效评估。然而,作为一种功能获得型

(gain of function)基因突变引起的遗传病,致病蛋白从出生即开始表达,主要影响着神经元的存活。至患者出现轻微症状时,已有相当数量的神经元丢失。因此,尽早治疗,延迟甚至防止发病,是最理想的治疗策略。然而,由于目前 ASO 基因治疗的费用高昂,高达 100 万欧元/年。在终身治疗难以实现的情况下,尽早预测或发现潜在发病患者,对于及时开展治疗具有重要意义。

目前提倡从症状前 HD 患者中再进一步细分出前驱期 HD,即 UHDRS 量表置信度评分 3 分或 2 分并伴有轻微认知功能损害的患者^[27]。前驱期患者的脑细胞已经出现受损的征象,但功能尚保持完好,属于可逆性损伤。这个时期治疗可以达到最佳的效价比,是 HTT lowering 治疗的理想人群。然而前驱期 HD 需要接受过相关训练的临床医生在详细的运动量表和认知功能评估后方可确诊,但是国内目前仅有小部分临床医师获得相关资质,而且繁复的评估与日常临床门诊工作实际不符,因此这部分患者在日常临床门诊中的诊断率偏低。随着基因治疗的普及,吸引更多的临床医生关注并参与到 HD 的治疗研究领域,以及开设专门的 HD 或遗传病门诊,可能能够推进前驱期 HD 的及时诊断。

2.2 治疗疗效的评估

基因治疗的目标主要是降低脑内 mHTT 的表达,延缓神经元死亡的进程,从而中止及逆转疾病进展。尽管临床症状是评估治疗效果的重要标准,但是具有滞后性,不能及时反映治疗效果。如何更加灵敏、精确、客观的评估 HD 治疗药物的疗效,对于临床试验以及未来临床决策都具有重要意义。

Ed Wild 等人在 2015 年通过单分子计数技术(Single Molecule Counting),成功在 HD 患者脑脊液中精确测量 mHTT 含量,并发现脑脊液 mHTT 含量与 HD 病程存在正相关关系。尽管目前尚不清楚脑脊液中 mHTT 来源,但是 mHTT 含量与神经丝轻链(neurofilament light chain, NfL)以及 tau 蛋白含量高度相关,提示其可能由神经元释放^[28]。因此,在 IONIS-HTTRx I 期临床试验中,脑脊液 mHTT 含量首次被作为评价疗效的主要指标之一。

神经元损伤后,其细胞骨架成分——神经丝轻链(neurofilament light chain, NfL)将被释放至脑脊液进而入血。通过单分子蛋白阵列检测技术(Single MOlecular Array, SIMOA),能够直接在血浆中测得 NfL,从而能够实现无创评估神经元的损伤情况。Ed Wild 等人发现脑脊液和血液中的 NfL 与 HD 的病情严重程度相关^[29]。

在临床队列样本中,脑脊液 mHTT、脑脊液和血浆 NfL 联合检测,是最早能够反应病情变化的生物标志物^[30]。这些标志物的应用,为 HD 病人了解自身病情、药物开发疗效评估、临床决策提供重要依据。然而即使作为科研样本检测,该类

指标在国内开展例数仍十分有限,未来这些指标用于临床常规评估仍有待进一步普及和推广。

3 结 语

随着对 HTT 基因和蛋白功能基础研究的不断深入,核酸药物研发以及各种基因工程技术取得了突飞猛进的发展,将会有更方便、更安全、更有效的治疗药物在临床试验中取得成功,走向临床。相信在不久的将来,除了优生优育、产前诊断外,临床神经科医生在对抗 HD 上,有更加强而有力的手段实现病情进展控制甚至根治。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组. 亨廷顿病的诊断与治疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2011, 44(9): 638-641.
- [2] Wild EJ, Tabrizi SJ. Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease (vol 16, pg 837, 2017)[J]. LANCET NEUROLOGY, 2017, 16(12): 954.
- [3] Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment[J]. LANCET NEUROLOGY, 2011, 10(1): 83-98.
- [4] Evers MM, Toonen LJA, van Roon-Mom WMC. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015, 87: 90-103.
- [5] van Roon-Mom WMC, Roos RAC, de Bot ST. Dose-dependent lowering of mutant huntingtin using Antisense oligonucleotides in Huntington Disease Patients[J]. Nucleic Acid Therapeutics, 2018, 28(2): 59-62.
- [6] Schobel S, Palermo G, Trundell D, et al. J02 A global development program testing RG6042, an anti-sense oligonucleotide, for the treatment of early manifest huntington's disease (hd)[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2018, 89(s1): A98.
- [7] Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: An alternative approach to Huntington's disease[J]. NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE, 2005, 6(12): 919-930.
- [8] Kay C, Collins JA, Skotte NH, et al. Huntingtin haplotypes provide prioritized target panels for allele-specific silencing in huntington disease patients of european ancestry[J]. Mol Ther, 2015, 23(11): 1759-1771.
- [9] Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, et al. Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of Huntingtin synthesis[J]. Neuron, 2012, 74(6): 1031-1044.
- [10] Grzanna R, Dubin JR, Dent GW, et al. Intrastriatal and intraventricular injections of oligodeoxynucleotides in the rat brain: tissue penetration, intracellular distribution and c-fos antisense effects[J]. Brain Res

- Mol Brain Res, 1998, 63(1): 35–52.
- [11] Hammond SM, Hazell G, Shabanpoor F, et al. Systemic peptide-mediated oligonucleotide therapy improves long-term survival in spinal muscular atrophy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(39): 10962–10967.
- [12] Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing[J]. NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, 2008, 9(1): 22–32.
- [13] Samaranch L, Blits B, San Sebastian W, et al. MR-guided parenchymal delivery of adeno-associated viral vector serotype 5 in non-human primate brain[J]. GENE THERAPY, 2017, 24(4): 253–261.
- [14] Valls A, Brouwers C, Pintauro R, et al. I05 Sustained mutant huntingtin lowering in the brain and cerebrospinal fluid of huntington disease minipigs mediated by AAV5-MIHTT gene therapy[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2018, 89(s1): A89.
- [15] Miniarikova J, Zanella I, Huseinovic A, et al. Design, characterization, and lead selection of therapeutic miRNAs targeting Huntingtin for development of gene therapy for Huntington's disease[J]. MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS, 2016, 5.
- [16] Deverman BE, Pravdo P L, Simpson BP, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain[J]. NATURE BIOTECHNOLOGY, 2016, 34(2): 204.
- [17] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. NATURE BIOTECHNOLOGY, 2011, 29(4): 179–341.
- [18] Wu T, Yu M, Zhang L, et al. I02 Systemic injection of exosomal sirna significantly reduced huntingtin expression in transgenic mice of huntington's disease[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2018, 89(s1): A88.
- [19] Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy[J]. SCIENCE, 2014, 345(6197): 688–693.
- [20] Yang S, Chang R, Yang H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease[J]. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 2017, 127(7): 2719–2724.
- [21] Wang G, Liu X, Gaertig M A, et al. Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(12): 3359–3364.
- [22] Dietrich P, Johnson IM, Alli S, et al. Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis[J]. PLOS Genetics, 2017, 13(7): e1006846.
- [23] Shin JW, Kim K, Chao MJ, et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9[J]. HUMAN MOLECULAR GENETICS, 2016, 25(20): 4566–4576.
- [24] Merienne N, Vachey G, de Longprez L, et al. The Self-inactivating KamiCas9 system for the editing of CNS disease genes[J]. CELL REPORTS, 2017, 20(12): 2980–2991.
- [25] Dabrowska M, Juzwa W, Krzyzosiak WJ, et al. Precise Excision of the CAG Tract from the Huntingtin Gene by Cas9 Nickases[J]. FRONTIERS IN NEUROSCIENCE, 2018, 12(75).
- [26] Rohiwal SS, Klima J, Vaškovičová M, et al. I08 Nanoparticle based CRISPR/CAS gene editing system to treat huntington's disease[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2018, 89(s1): A90.
- [27] Reilmann R, Leavitt BR, Ross CA. Diagnostic Criteria for Huntington's Disease Based on Natural History[J]. MOVEMENT DISORDERS, 2014, 29(11SI): 1335–1341.
- [28] Fodale V, Boggio R, Daldin M, et al. Validation of ultrasensitive mutant Huntingtin detection in human cerebrospinal fluid by single molecule counting immunoassay[J]. JOURNAL OF HUNTINGTONS DISEASE, 2017, 6(4): 349–361.
- [29] Byrne LM, Rodrigues FB, Blennow K, et al. Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis[J]. The Lancet Neurology, 2017, 16(8): 601–609.
- [30] Byrne LM, Rodrigues FB, Johnson EB, et al. Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease[J]. SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, 2018, 10(eaat7108458).
- [31] Schobel S. A global development program testing RG6042, an antisense oligonucleotide, for the treatment of early manifest Huntington's disease[R]. Vienna: EHDN 2018 Plenary Meeting, 2018.
- [32] Panzara M. Precision-HD: an allele specific approach to Huntingtin lowering in HD [R]. Vienna: EHDN 2018 Plenary Meeting, 2018.
- [33] Bhattacharyya A. HTT lowering small molecule program[R]. Vienna: EHDN 2018 Plenary Meeting, 2018.

(责任编辑: 冉明会)