

科技进步奖推荐号：009-401

项目名称	肌萎缩侧索硬化的基因治疗
提名单位（专家）	李春岩 院士
项目简介	<p>肌萎缩侧索硬化（ALS）至今尚无有效的治疗方法。治疗 ALS 的药物包括力如太和依达拉奉仅能延缓病程数月。基因突变是 ALS 鉴定明确的病因，超氧化物歧化酶 1（SOD1）突变占家族性 ALS 的 20%，通过修复突变基因为控制疾病进展，保护残存的运动神经元带来希望。由腺相关病毒 9（AAV9）系统递送的成簇规律间隔短回文重复序列相关的核酸酶 9（CRISPR-Cas9）是一种中枢神经系统基因组编辑的工具。通过筛选靶向人 SOD1 的单链向导 RNA（sgRNA），将验证有效的 sgRNA 克隆到金葡菌来源的 CRISPR-Cas9（Sa-CRISPR-Cas9）系统，利用 AAV9 载体携带 CRISPR-Cas9-sgRNA 系统感染 SOD1-G93A 模型小鼠运动神经元，观察基因编辑的效果，测定脱靶率和突变位点修复率。实验结果显示：AAV9-SaCas9-sgRNA5 通过编辑 SOD1 基因清除了运动神经元中的突变 SOD1 蛋白，小鼠中位生存期延长了 71 天。病理上，胶质细胞增生明显减少，终末期 AAV9-SaCas9-sgRNA5 治疗小鼠运动神经元平均保留个数达到 13 个，而对照组平均只保留 1.5 个。该项目通过高通量测序证实 AAV9-SaCas9-sgRNA5 治疗小鼠没有出现脱靶现象，非同源末端连接修复率（INDEL 率）增加了 4.65 倍。因此，针对突变 SOD1 相关的 ALS，AAV9-SaCas9-sgRNA5 实现了从根本上治疗 ALS。</p> <p>ALS 病人以散发性为主，病因不清，营养因子缺乏是运动神经元变性的机制之一。以 AAV9 病毒为载体筛选与运动神经元变性有关的营养因子和保护性蛋白，包括胰岛素样生长因子 1（IGF-1）、血管内皮生长因子（VEGF）、TANK 结合激酶 1（TBK1）和 D-氨基酸氧化酶（DAO）进而证实他们对运动神经元的保护作用。本项目建立 scAAV9-hIGF1、scAAV9-VEGF165、AAV9-TBK1 和 scAAV9-DAO 等以病毒为载体的基因治疗药物，进一步证实这些生长因子和神经保护性蛋白对运动神经元的影响。研究结果显示：在发病前期（2 月龄 ALS 模型小鼠）一次性鞘内注射 scAAV9-hIGF1，小鼠的中位生存期延长了 44 天，肌肉注射和静脉注射中位生存期分别延长 29 天和 10 天；发病期（3 月龄 ALS 模型小鼠）一次性鞘内注射 scAAV9-hIGF1，小鼠的中位生存期延长了 38 天，肌肉注射延长 15 天；发病期小鼠一次性鞘内注射 scAAV9-VEGF165 中位生存期延长 13 天；发病期小鼠一次性鞘内注射 scAAV9-DAO 中位生存期仅延长 6 天；新生小鼠一次性脑室注射 AAV9-TBK1 中位生存期仅延长 10 天。因此，scAAV9-hIGF1 鞘内注射治疗效果最好。</p> <p>本项目通过对家族性 ALS 致病基因 SOD1 的基因编辑和散发性 ALS 基因治疗的探索，为患者提供新的治疗靶点，并实现了突变 SOD1 相关 ALS 的精准治疗。</p> <p>创新点内容：</p> <ol style="list-style-type: none">1、该项目建立的 AAV9-SaCas9-sgRNA5 实现了对突变 SOD1 基因的编辑，清除了运动神经元中的突变 SOD1 蛋白，显著延长了模型小鼠的寿命，是一种治疗 SOD1 突变导致 ALS 的新方法。2、该项目建立的 scAAV9-hIGF1 显著减少了运动神经元凋亡，从 NF-κB 炎症通路、线粒体自噬通路和谷氨酸介导的兴奋性毒通路等方面保护了运动神经元，与 scAAV9-VEGF165、AAV9-TBK1 和 scAAV9-DAO 比较是保护运动神经元最有效的适用于散发性 ALS 治疗的一种新方法。

主要完成单位及创新推广贡献		<p>主要完成单位：河北医科大学第二医院，是本项目的主研人单位，负责课题的整体设计，研究质量的把控，负责收集、整理数据及撰写论文，并积极参与该项目的推广。河北医科大学第二医院神经病学实验室仪器设备完善，参研人员具有较高的科研及实验技能，保障项目顺利开展，圆满完成了研究内容。石家庄平安医院作为该项目的完成单位，利用已经建立的基因编辑载体修饰 ALS 模型小鼠巨噬细胞 中的突变 SOD1，获得了显著的疗效。</p>			
推广应用及经济社会效益情况		<p>该项目建立了 AAV9-SaCas9-sgRNA5 基因编辑载体，这一载体是一个治疗 SOD1 突变导致 ALS 的新方法；该项目建立了 scAAV9-hIGF1、scAAV9-VEGF165、AAV9-TBK1 和 scAAV9-DAO 等基因治疗药物，采用鞘内注射、肌肉注射、静脉注射等方式分别在 ALS 模型小鼠发病前期或发病期给予相应治疗，在体证实了这些生长因子和神经保护性蛋白对运动神经元的影响及保护机制，发现 scAAV9-hIGF1 的运动神经元保护作用最好，为临床治疗散发性 ALS 提供了新方法。</p> <p>最终发表了与研究内容密切相关的 15 篇 SCI 论文，培养博士研究生 8 名、硕士研究生 1 名，获国家发明专利一项。研究结果在国内学术会议进行交流，得到专家学者的广泛认可及关注，具有很好的实用价值和推广价值。本项目为 ALS 基础研究提供了新的干预手段，为 ALS 临床治疗提供了新的途径。</p>			
主要论文					
序号	题目	杂志名称	年	卷	期
1	Myeloid TBK1 Deficiency Induces Motor Deficits and Axon Degeneration Through Inflammatory Cell Infiltration	Mol Neurobiol	2021	58	5
2	The deletion of mutant SOD1 via CRISPR/Cas9/sgRNA prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model	Gene Ther	2020	27	3-4
3	Deletion of Tbk1 disrupts autophagy and reproduces behavioral and locomotor symptoms of FTD-ALS in mice	Aging (Albany NY)	2019	11	8
4	The role of insulin-like growth factor 1 in ALS cell and mouse models: a mitochondrial protector	Brain Res Bull	2019	114	
5	Systemic administration of scAAV9-IGF1 extends survival in SOD1G93A ALS mice via inhibiting p38 MAPK and the JNK-mediated apoptosis pathway.	Brain Res Bull	2018	139	
6	IGF1 affects macrophage invasion and activation and TNF- α production in the sciatic nerves of female SOD1G93A mice	Neurosci Lett	2018	668	

7	Intrathecal Injection of scAAV9-hIGF1 Prolongs the Survival of ALS Model Mice by Inhibiting the NF-kB Pathway	Neuroscience	2018	381	
8	AAV9-IGF1 protects TDP-25 cells from apoptosis and oxidative stress partly via up-regulating the expression of VEGF in vitro	Neurosci Lett	2017	640	
9	Intramuscular Delivery of scAAV9-hIGF1 Prolongs Survival in the hSOD1 G93A ALS Mouse Model via Upregulation of D-Amino Acid Oxidase	Mol Neurobiol	2018	55	1

主要知识产权和标准规范等目录

序号	知识产权（标准）类别	知识产权（标准）具体名称	国家（地区）	授权号（标准编号）	授权（标准发布）日期	证书编号（标准批准发布部门）	权利人（标准起草单位）	发明人（标准起草人）	发明专利（标准）有效状态	是否包含河北省完成单位/完成人
1	发明专利	一种基因载体介导的基于CRISPR/Cas9基因编辑系统的sgRNA及其用途	中国	ZL 2017 1 0167563.3	2021.3.26	国家知识产权局	河北医科大学第二医院；北京五加和分子医学研究有限公司	段伟松；吴小兵；李春岩	有效专利	是

主要完成人情况表

排名	姓名	技术职称	工作单位	完成单位	对本项目技术创造性贡献	曾获奖情况
1	段伟松	副研究员	河北医科大学第二医院	河北医科大学第二医院	为该项目负责人，制定项目的总体实验设计，与课题组主要成员共同对实验计划、实施方案等进行了充分的论证和缜密的分析。整个实验过程中对实验数据、资料的整理及论文的撰写、发表等进行严格的把关。为本成果中论文合著中 1,2,3 第一作者，论文 4,5,6,7,8,9 的参与者。对创新点 1、2 均有突出贡献。	河北省科技进步二等奖 1 项
2	李媛媛	助理研究员	河北医科大学第二医院	河北医科大学第二医院	是该项目的主要参与者，参与实验方案设计及实施，数据整理及统计分析，参与论文撰写及发表。为本成果论文 1,3,6 的参与者。对创新点 1,2 有突出贡献。	无

3	刘亚坤	助理研究员	河北医科大学第二医院	河北医科大学第二医院	是该项目的主要参与人，参与实验方案设计及实施，数据整理及统计分析，参与论文撰写及发表。为本成果论文 8 的通讯作者，论文1,2,3,4,5,6,7,9 的参与作者。对创新点1,2 有突出贡献。	无
4	郭默然	助理研究员	河北医科大学第二医院	河北医科大学第二医院	是项目的主要参与人，参与实验方案设计及实施，数据整理及统计分析，参与论文撰写及发表。为本成果论文 1,2,3 的参与作者，对创新点1,2 有突出贡献。	无
5	黄怀鹏	研究员	石家庄平安医院	石家庄平安医院	是项目的主要参与人，参与实验方案设计及实施，数据整理及统计分析，参与论文撰写及发表。为本成果论文 1 的参与作者，对创新点 2 有突出贡献。	天津市科技进步奖二等奖 1 项、三等奖 1 项；江苏省科技进步二等奖 1 项

完成人合作关系说明

- 2016 年 1 月-2017 年 12 月：完成人段伟松（1）、刘亚坤（3）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.8）。
- 2016 年 1 月-2018 年 12 月：完成人段伟松（1）、刘亚坤（3）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.9），完成人段伟松（1）、李媛媛（2）、刘亚坤（3）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.6），完成人段伟松（1）、刘亚坤（3）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.5）。
- 2017 年 1 月-2019 年 12 月：完成人段伟松（1）、李媛媛（2）、刘亚坤（3）、郭默然（4）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.3），完成人段伟松（1）、刘亚坤（3）合著 SCI 论文 2 篇（附件 2.6.7，附件 2.6.4），完成人段伟松（1）、刘亚坤（3）、郭默然（4）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.2）。
- 2017 年 1 月-2021 年 12 月：完成人刘亚坤（3）、郭默然（4）合作完成研究“肌萎缩侧索硬化的基因治疗及临床转化探索”，完成人段伟松（1）、李媛媛（2）、刘亚坤（3）、郭默然（4）、黄怀鹏（5）合著 SCI 论文 1 篇（附件 2.6.1）。

完成人合作关系情况汇总表

序号	合作方式	合作者/项目排名	合作时间	合作成果	备注
1	论文合著	段伟松/1 刘亚坤/3	2016-2017	AAV9-IGF1 protects TDP-25 cells from apoptosis and oxidative stress partly via up-regulating the expression of VEGF in vitro	
2	论文合著	段伟松/1	2016-2018	Intramuscular Delivery of scAAV9-hIGF1 Prolongs Survival in the hSOD1 G93A ALS Mouse Model via	

		刘亚坤/3		Upregulation of D-Amino Acid Oxidase	
3	论文合著	段伟松/1 李媛媛/2 刘亚坤/3	2016-2018	IGF1 affects macrophage invasion and activation and TNF- α production in the sciatic nerves of female SOD1G93A mice	
4	论文合著	段伟松/1 刘亚坤/3	2016-2018	Systemic administration of scAAV9-IGF1 extends survival in SOD1G93A ALS mice via inhibiting p38 MAPK and the JNK-mediated apoptosis pathway	
5	论文合著	段伟松/1 李媛媛/2 刘亚坤/3 郭默然/4	2017-2019	Deletion of Tbk1 disrupts autophagy and reproduces behavioral and locomotor symptoms of FTD-ALS in mice	
6	论文合著	段伟松/1 刘亚坤/3	2017-2019	(1)Intrathecal Injection of scAAV9-hIGF1 Prolongs the Survival of ALS Model Mice by Inhibiting the NF-kB Pathway (2)The role of insulin-like growth factor 1 in ALS cell and mouse models: a mitochondrial protector	
7	论文合著	段伟松/1 刘亚坤/3 郭默然/4	2017-2019	The deletion of mutant SOD1 via CRISPR/Cas9/sgRNA prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model	
8	论文合著	段伟松/1 李媛媛/2 刘亚坤/3	2018-2021	Myeloid TBK1 Deficiency Induces Motor Deficits and Axon Degeneration Through Inflammatory Cell Infiltration	

		郭默然/4 黄怀鹏/5			
9	共同立项	刘亚坤/3 郭默然/4	2017-2021	肌萎缩侧索硬化的基因治疗及临床转化探索	

知情同意报奖证明

知情同意证明

本人李春岩，同意以下文章用于“肌萎缩侧索硬化的基因治疗”项目进行河北省科学技术奖励的评审。

- 1、Myeloid TBK1 Deficiency Induces Motor Deficits and Axon Degeneration Through Inflammatory Cell Infiltration. Duan W, Yi L, Tian Y, Huang HP, Li Z, Bi Y, Guo M, Li Y, Liu Y, Ma Y, Song X, Liu Y, Li C. Mol Neurobiol. 2021 May;58(5):2435-2446.
- 2、The deletion of mutant SOD1 via CRISPR/Cas9/sgRNA prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. Duan W, Guo M, Yi L, Liu Y, Li Z, Ma Y, Zhang G, Liu Y, Bu H, Song X, Li C. Gene Ther. 2020 Apr;27(3-4):157-169.
- 3、Deletion of Tbk1 disrupts autophagy and reproduces behavioral and locomotor symptoms of FTD-ALS in mice. Duan W, Guo M, Yi L, Zhang J, Bi Y, Liu Y, Li Y, Li Z, Ma Y, Zhang G, Liu Y, Song X, Li C. Aging (Albany NY). 2019 Apr 30;11(8):2457-2476.
- 4、The role of insulin-like growth factor 1 in ALS cell and mouse models: a mitochondrial protector. Di Wen, Can Cui, Weisong Duan, Wan Wang, Ying Wang, Yakun Liu, Zhongyao Li, Chunyan Li. Brain Res Bull.2019 Jan;144:1-13.
- 5、Systemic administration of scAAV9-IGF1 extends survival in SOD1G93A ALS mice via inhibiting p38 MAPK and the JNK-mediated apoptosis pathway. Wan Wang, Di Wen, Weisong Duan, Juntao Yin, Can Cui, Ying Wang, Zhongyao Li, Yakun Liu, Chunyan Li. Brain Res Bull. 2018 May;139:203-210.
- 6、IGF1 affects macrophage invasion and activation and TNF- α production in the sciatic nerves of female SOD1G93A mice. Yingxiao Ji, Weisong Duan, Yaling Liu, Yakun Liu, Chang Liu, Yuanyuan Li, Di Wen, Zhongyao Li, Chunyan Li. Neurosci Lett. 2018 Mar 6;668:1-6.
- 7、Intrathecal Injection of scAAV9-hIGF1 Prolongs the Survival of ALS Model Mice by Inhibiting the NF- κ B Pathway. Haojie Hu, HuiQian Lin, WeiSong Duan, Can Cui, ZhongYao Li, YaKun Liu, Wan Wang, Di Wen, Ying Wang, ChunYan Li. Neuroscience. 2018 Jun 15;381:1-10.
- 8、AAV9-IGF1 protects TDP-25 cells from apoptosis and oxidative stress partly via up-regulating the expression of VEGF in vitro. Zhongyao Li, Weisong Duan, Can Cui, Yaling Liu, Chunyan Li, Yakun Liu. Neurosci Lett. 2017 Feb 15;640:123-129.
- 9、Intramuscular Delivery of scAAV9-hIGF1 Prolongs Survival in the hSOD1 G93A ALS Mouse Model via Upregulation of D-Amino Acid Oxidase. HuiQian Lin, Haojie Hu, WeiSong Duan, YaLing Liu, GuoJun Tan, ZhongYao Li, YaKun Liu, BinBin Deng, XueQin Song, Wan Wang, Di Wen, Ying Wang, ChunYan Li. Mol Neurobiol. 2018 Jan;55(1):682-695.

签名: 李春岩

日期: 2022.6.28

注：所填报内容必须与推荐书中提交的完全一致，否则责任自负，可自行调整行间距。