

DOI: 10.13376/j.cblls/2022139

文章编号: 1004-0374(2022)10-1250-14



黄军就, 中山大学生命科学学院教授, 副院长(主持工作)。中山大学双一流建设“细胞基因编辑研究和应用”方向的团队负责人; 生命科学学院基因编辑动物平台负责人。研究方向为遗传疾病基因编辑治疗研究、细胞衰老与再生的调控机制。在 *Nature*、*Nature Communications*、*Molecular Cell*、*Cell Research*、*Protein Cell*、*Molecular Therapy* 等国际专业杂志上发表论文超 80 篇。世界上首次在人类胚胎中通过 CRISPR/Cas9 技术和单碱基编辑技术修正地中海贫血症的突变基因, 工作入选 2015 年 *Science* 杂志年度十大突破介绍和 2017 年 *Nature* 杂志全球年度科学事件盘点。率先建立系统评估单碱基编辑系统靶向效率的 EndoV-Seq 技术; 建立单 AAV 递送 SaCas9 和 Nme<sub>2</sub>Cas9, 双 AAV 介导单碱基编辑器 (BE) 和前导基因编辑器 (PE) 体内编辑靶细胞基因的递送系统。2014 年, 入选广东特支计划百千万青年拔尖人才; 2015 年, 被 *Nature* 杂志评选为年度全球十大科学人物; 2017 年和 2019 年, 中国遗传学会基因编辑分会第一届和第二届学术委员会委员; 2020 年, 中国医药生物技术协会基因编辑技术分会常委委员; 2020 年, 中国生物工程学会动物生物技术专业委员会委员; 2021 年, 中国妇幼保健协会地中海贫血防治专业委员会委员。获得国家重点研发计划、国家基金委面上项目、广东省重点项目等资助。

## CRISPR/Cas 基因编辑技术治疗人类遗传性疾病的临床研究进展

胡思慧<sup>1,2</sup>, 刘倩宜<sup>1,2</sup>, 谢冬纯<sup>1,2</sup>, 黄军就<sup>1,2\*</sup>

(1 中山大学生命科学学院, 基因功能与调控教育部重点实验室, 广州 510275;

2 中山大学生命科学学院和附属第一医院, 广东省生殖医学重点实验室, 广州 510275)

**摘要:** 随着人类基因组计划完成, 人类遗传信息的解码推动着疾病诊疗迈入基因组学时代。许多医学领域中的“罕见病”和“不治之症”也被逐渐揭开了神秘的面纱, 越来越多的疾病被确证为遗传性疾病。2012 年, CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated enzyme) 基因编辑技术的发现和应用, 是近十年生物医学领域最具革命性的突破之一。该技术具有简便、高效、适用性广泛等特点, 不但被广泛应用于基因功能研究, 而且也在遗传病的基因治疗临床试验上取得重要进展。针对遗传背景明确的单基因遗传病, CRISPR/Cas 可通过对目的 DNA 序列进行精准靶向编辑, 实现对内源基因序列的改变或者基因功能的重新调控, 为治愈部分重大遗传性疾病提供了新的工具和治疗策略。目前, 多个基于 CRISPR/Cas 技术研发的基因药物已经进入临床试验, 并取得了令人鼓舞的阶段性成果。本文就目前已公布临床试验的基因编辑药物研究进展进行回顾与展望。

**关键词:** 遗传性疾病; 基因编辑; CRISPR/Cas9; 临床试验

**中图分类号:** Q78; R596 **文献标志码:** A

收稿日期: 2022-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31971365); 广东省自然科学基金粤深联合重点项目(2020B1515120090); 广东省生殖医学重点实验室项目

\*通信作者: E-mail: hjunjiu@mail.sysu.edu.cn

# Clinical research progress of CRISPR/Cas genome editing in the treatment of human genetic disorders

HU Si-Hui<sup>1,2</sup>, LIU Qian-Yi<sup>1,2</sup>, XIE Dong-Chun<sup>1,2</sup>, HUANG Jun-Jiu<sup>1,2\*</sup>

(1 MOE Key Laboratory of Gene Function and Regulation, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2 Key Laboratory of Reproductive Medicine of Guangdong Province, School of Life Sciences and the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** With the completion of the Human Genome Project, the decoding of human genetic information promotes the diagnosis and treatment of diseases into the era of genomics. Many "rare diseases" and "incurable diseases" have also been gradually unveiled, and more and more diseases have been confirmed as genetic disorders. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated enzyme (CRISPR/Cas) gene editing technology which was discovered and applied in 2012 has been proved to be one of the most breakthroughs in the biomedical field in the past decade. With the characteristics of simplicity, high efficiency and a wide range of applicability, this technique has not only been widely used in the study of gene function, but also made important progress in clinical trials of gene therapies for genetic disorders. For monogenic disorders with clear genetic background, CRISPR/Cas can change the endogenous gene sequence or re-regulate the gene function through editing the target DNA sequence precisely to cure this kind of genetic disorders. Up to now, several drugs based on CRISPR/Cas technology have been studied in clinical trials, and achieved encouraging results. In this paper, we review and prospect the research progress of gene editing drugs in clinical trials.

**Key words:** genetic disorders; gene editing; CRISPR/Cas9; clinical trials

对人类基因组信息认识的进步逐步加深了人们对疾病与基因关系的理解。这些疾病可能源于基因序列的改变,如单基因突变(单基因遗传性疾病)、多基因突变(多基因遗传性疾病)或染色体变异,也可能源于基因的表现遗传修饰变化,比如DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA的作用等<sup>[1]</sup>。基因序列改变引起的遗传性疾病通常具有明显的家系遗传特征。因此,对病患家系的DNA进行测序分析,可明确致病基因突变的详细信息,以及特定遗传变化(基因型)与疾病严重程度之间的相关性<sup>[2]</sup>。其中,单基因遗传病的遗传学背景相对简单,在基因诊断和基因治疗领域具有较高的可操作性。目前已知的单基因疾病超过4 000种(www.omim.org/statistics/geneMap),依据疾病严重程度分为三类:第一类为致死性单基因疾病,如 $\beta$ -地中海贫血( $\beta$ -mediterranean anemia)、镰刀型细胞贫血病(sickle cell disease, SCD)、家族性淀粉样变性(transthyretin amyloidosis, ATTR)、亨廷顿舞蹈症(Huntington chorea, HD)等;第二类为严重但非致命性疾病,代表性的如莱伯氏先天性黑朦症(Leber's congenital amaurosis, LCA)等;第三类为非严重且可控的类型,如红绿色盲(red-green colorblindness)等<sup>[3]</sup>。

临床上,遗传性罕见病面临着难诊断、治疗成

本高昂,且绝大多数遗传性罕见病缺乏有效的临床疗法等问题,是现代医学中难以攻克巨大挑战<sup>[3-4]</sup>。尽管目前少数遗传性罕见病可以通过器官移植治愈或者使用小分子药物进行干预从而缓解疾病症状,但合适移植供体的缺乏限制了患者的治愈机会,而长期服药的经济压力以及药物副作用也为患者的长期治疗带来巨大的负担和痛苦。基因诊断和基因疗法的发展为这类疾病的病理研究和临床治疗带来了新的曙光,尤其是基因编辑工具的出现,为精准医疗提供了重要的“手术刀”。利用基因编辑技术破坏、替换或校正致病性基因突变等策略实现对内源基因功能的重新调控,为治愈这些遗传性疾病提供了新的方案<sup>[5-6]</sup>。本文将就CRISPR/Cas基因编辑技术在人类遗传性疾病治疗方面的研究者发起的临床试验研究的进展进行回顾与展望。

## 1 CRISPR/Cas基因编辑工具的原理、类型及其在疾病研究与治疗中的应用

### 1.1 CRISPR/Cas介导的基因组编辑原理概述

CRISPR/Cas是存在于细菌与古细菌中的一种获得性免疫系统,CRISPR RNA (crRNA)和单个或多个具有核酸酶活性的Cas蛋白形成crRNA-核糖核蛋白(crRNP)效应子复合物,在防止外源DNA

如病毒或质粒入侵与整合的过程中发挥至关重要的作用<sup>[7]</sup>。随着 Cas 蛋白的发现和重组 DNA 技术的应用, 研究者们对 CRISPR/Cas 系统进行了整合改造, 并将其作为基因组编辑的工具使用。目前应用最广泛的是 CRISPR/Cas9 系统, 包括 crRNA、trans-activating crRNA (tracrRNA) 和 Cas9 蛋白<sup>[8-9]</sup>。crRNA 可通过碱基互补配对特异性识别基因组上的靶位点, 与 tracrRNA 协同招募并稳定 Cas9 蛋白。科学家进一步将 crRNA 与 tracrRNA 融合形成单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 从而简化了 CRISPR/Cas 系统的设计流程<sup>[10]</sup>。此外, Cas9 蛋白活性还受到原间隔序列临近基序 (protospacer-adjacent motif, PAM) 的限制。Cas9 蛋白扫描保守的 PAM 序列后, crRNA 特异性结合靶位点, 并激活 Cas9 的切割活性, 造成 DNA 双链断裂 (double-strand breaks, DSBs)。改变 crRNA 中与靶序列互补配对的 20 个核苷酸可使 CRISPR/Cas9 系统靶向全基因组范围内具有 PAM 特征的不同 DNA 序列。

靶标 DNA 序列被切割后, 细胞会招募内源性修复机制相关蛋白在双链断裂位点进行 DNA 序列修复, 包括插入、缺失或碱基替换 (图 1)。该过程所涉及的 DSBs 修复机制主要包括两种, 非同源末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ) 和同源定向重组 (homology directed repair, HDR)。非同源末端连接 (NHEJ), 即将两个断裂的 DNA 片段直接连接在一起, 这种不完美修复过程通常会引起核苷酸的随机插入或缺失 (insertion and deletion, indel), 进而导致原始 DNA 序列发生移码突变或提前终止, 达到直接敲除蛋白编码基因从而沉默基因表达或靶向破坏基因表达调控元件以沉默或激活下游基因表达的效果; 此外, 利用两条 sgRNA 同时引导切割同一染色体臂上的两个不同部位产生 DSB 并引发 NHEJ 修复, 可导致特定基因或调控元件的 DNA 序列被删除或发生反转。基于单个 DSB 或双 DSB 突变引发 NHEJ 修复的基因组编辑方案是临床治疗遗传疾病的主要开发策略<sup>[5]</sup>。同源定向重组 (HDR)

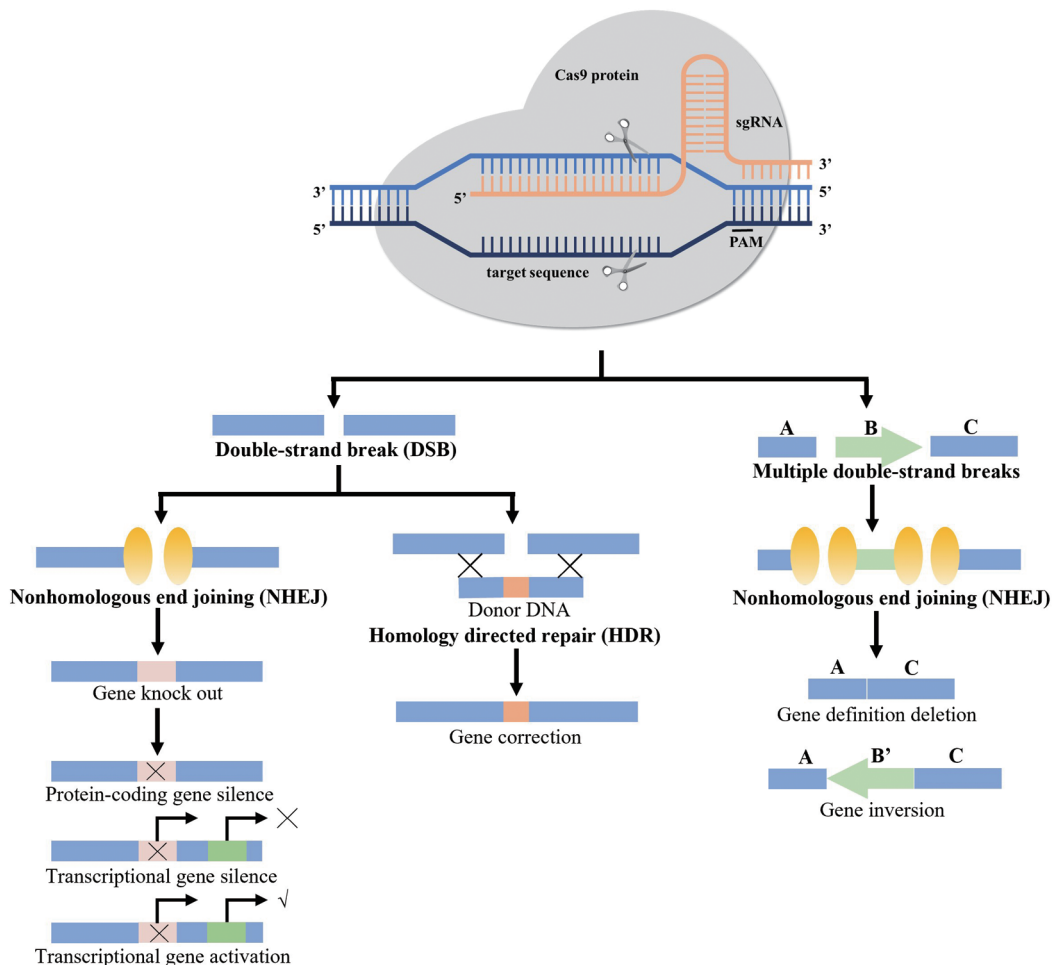


图1 CRISPR/Cas9系统编辑产物类型及应用

修复则可将外源性 DNA 片段插入基因组的特定位置, 从而实现精确的基因替换或插入新的基因。NHEJ 活跃于整个细胞周期中, 并在分裂与不分裂细胞中均被观察到, 可实现靶细胞群中特定 DNA 序列的敲除或定点修饰。相比于 NHEJ, HDR 过程仅活跃于分裂细胞的 S/G<sub>2</sub> 后期阶段, 在动物胚胎和体内组织中发生的概率极低, 基于该策略的插入诱变效率仅为 0.5%~20%, 这也极大地限制了该策略在临床治疗研究中的应用<sup>[6, 11]</sup>。

## 1.2 CRISPR/Cas基因编辑工具的类型

自然界的 CRISPR/Cas 类型丰富多样, 依据其蛋白效应物类型可分为 2 类, 细分为 6 种类型及多种亚型。其中 1 类包含 I、III、IV 型, 其典型特征为具有多蛋白效应复合物, 广泛存在于细菌与古细菌中, 约占已发现的 CRISPR 类型的 90%; 2 类包含 II、V、VI 型, 含有单一蛋白效应物, 占已发现的 CRISPR 类型的 10% 左右<sup>[12]</sup>。II 型 CRISPR 系统源于酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 Cas9 (*S. pyogenes* Cas9, SpCas9) 是目前基因编辑领域应用最为广泛的编辑工具<sup>[13]</sup>。而 SpCas9 的同系物, 如 Cas12a (Cpf1)<sup>[14]</sup>、SaCas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9)<sup>[15]</sup>、CjCas9 (*Campylobacter jejuni* Cas9)<sup>[16]</sup>、NmeCas9 (*Neisseria meningitidis* Cas9) 与 Nme<sub>2</sub>Cas9<sup>[17]</sup> 等, 它们具有独特的 PAM 识别序列或更短的蛋白质编码序列, 进一步拓展了 CRISPR/Cas 系统的靶向范围和应用前景。

基于 CRISPR/Cas9 衍生的一系列基因编辑工具, 则使基因编辑技术的应用不再局限于单纯的 DSBs 及其修复。CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 系统将 Cas9 蛋白改造为无核酸酶活性的 Cas9 (dCas9), 从而在不切割的情况下识别并结合所选的 DNA 序列, 并阻止聚合酶或其他转录因子与靶 DNA 结合, 最终抑制了基因的表达; dCas9 与转录抑制子 (如 Kruppel associated box, KRAB) 融合后特异性结合靶基因的转录起始位点, 也可实现目的基因的表达沉默<sup>[18]</sup>。相反, dCas9 与转录激活子的直接结合, 或一连串短肽结合以招募多个转录激活子的策略, 则可用于实现靶基因转录起始位点附近转录激活子的招募, 从而用于激活目的基因 (CRISPR activation, CRISPRa)<sup>[18-19]</sup>。

将 CRISPR/Cas 系统中 dCas9 或 Cas9 切口酶 (Cas9 nickase, nCas9) 与胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶融合组成胞嘧啶单碱基编辑器 (cytidine base editor, CBE) 或腺嘌呤单碱基编辑器 (adenine base editor, ABE),

可在不引入 DSBs 的情况下对靶位点进行精确的 A/T 与 G/C 间的转换<sup>[20-21]</sup>, 因而有望用于修复各种单基因疾病中的特定单碱基突变。此外, David R. Liu 团队于 2019 年报道了一种具有广泛治疗潜力的新基因编辑器——先导编辑器 (prime editor, PE)。PE 由 nCas9- 逆转录酶融合蛋白与 pegRNA (prime editors guide RNA) 组成, 其中 pegRNA 包含 sgRNA、引物结合位点 (prime binding site, PBS) 和携带靶向位点编辑信息的反转录模板。在 pegRNA 中 sgRNA 的引导下, nCas9 切口酶切断含 PAM 的靶 DNA 链, 断裂的靶 DNA 链与 pegRNA 的 3' 末端 PBS 序列互补并结合, 之后在逆转录酶作用下将反转录模板携带的目的突变引入目标基因序列中; PE 可在不引入 DSBs 的情况下介导靶向插入、缺失以及所有 12 种可能的碱基转换和颠换, 具有更大的靶向灵活性<sup>[22]</sup>。

CRISPR/Cas 系统也可进行 RNA 编辑, 如 Cas13 可在 crRNA 引导下与靶 RNA 结合, 并激活其内在 RNase 活性以实现靶 RNA 切割, 从而抑制基因表达<sup>[23]</sup>; 将 dCas13 与作用于 RNA 的腺苷脱氨酶或胞嘧啶脱氨酶融合表达, 则可实现靶向 RNA 的单碱基编辑<sup>[24]</sup>。

## 1.3 CRISPR/Cas在疾病研究与治疗中的应用概述

目前, CRISPR/Cas 技术已被广泛应用于细菌、植物、动物和人的细胞编辑, 并在人类遗传性疾病模型的快速构建与治疗疾病的策略研究中表现出了巨大的优势。一方面, 通过直接注射 sgRNA 和 Cas9 或 ABE、CBE 的 mRNA 至胚胎中进行基因组编辑, 以生成小鼠<sup>[25-26]</sup>、大鼠<sup>[27]</sup>、猪<sup>[28-30]</sup>及食蟹猴<sup>[31]</sup>等人类疾病模型, 或对人诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 进行基因编辑并诱导其分化, 为特定遗传性疾病构建体外疾病模型<sup>[32-33]</sup>, 提高了体内或体外疾病模型构建的效率, 为鉴定疾病发生机制提供了更加理想的平台。另一方面, 通过电穿孔递送 CRISPR/Cas9 系统至分离的原代细胞如 T 细胞、造血干细胞等进行体外基因编辑<sup>[34-35]</sup>, 及通过病毒载体 (如慢病毒、腺相关病毒)<sup>[36-37]</sup>或非病毒载体 (如脂质纳米颗粒、类病毒)<sup>[38]</sup>递送 CRISPR/Cas9 系统至特定的组织和细胞中以进行体内基因编辑, 展现了基因编辑疗法在人类单基因疾病及多基因疾病或非遗传性疾病治疗干预上的巨大潜力, 为基因编辑的临床转化奠定了基础<sup>[39]</sup>。

随着基因编辑疗法的不断发展与完善, 一些基于 CRISPR/Cas9 的临床试验正在进行中或即将启

动，其中大多数是通过体外编辑的策略制造嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 并用于治疗癌症；少数是针对遗传性疾病，并以针对血液类疾病 (如 SCD 与  $\beta$ -地中海贫血症, NCT03745287N/CT03655678) 的体外基因编辑疗法为主，极少数是针对遗传性眼科疾病 (1 项用于治疗 LCA10, NCT03872479) 和肝靶向的体内基因编辑疗法 (1 项用于治疗 ATTR, NCT04601051) (图 2)。

## 2 基于CRISPR/Cas9基因编辑疗法的研究者发起的临床试验

### 2.1 电穿孔递送CRISPR/SpCas9治疗 $\beta$ -地中海贫血症的临床试验进展

#### 2.1.1 $\beta$ -地中海贫血症概述

$\beta$ -地中海贫血症是由  $\beta$ -珠蛋白 (hemoglobin subunit beta, *HBB*) 基因或其侧翼序列发生点突变、短片段插入或缺失造成的单基因遗传病<sup>[40]</sup>。 $\beta$ -地中海贫血症患者体内表现为  $\beta$ -珠蛋白的合成减少 ( $\beta^+$ ) 或缺失 ( $\beta^0$ )，成人血红蛋白 (adult hemoglobin, HbA) 中  $\alpha$ -珠蛋白链与  $\beta$ -珠蛋白链间的合成失衡，因此造成了  $\alpha$ -链的冗余、聚集及沉积，并最终造成溶血、无效造血及铁过载，并对人体各器官产生严重损伤<sup>[40-41]</sup>。流行病学统计显示， $\beta$ -地中海贫血症高发于地中海区域、中东、中亚及东南亚等地区<sup>[40]</sup>。而我国大陆地区  $\beta$ -地中海贫血症的患病率为 2.21%，部分地区如粤北地区患病率可高达 6.34%<sup>[42]</sup>。

临床上， $\beta$ -地中海贫血的常规治疗手段为输血配合铁螯合治疗。利用小分子药物，如羟基脲 (hydroxyurea)<sup>[43]</sup>、5-氮杂胞苷 (5-azacytidine)<sup>[44]</sup>、组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDAC)<sup>[45]</sup> 和沙利度胺 (Thalidomide)<sup>[46]</sup> 等诱导患者成体保持高胎儿血红蛋白 (fetal hemoglobin, HbF) 表达，可缓解患者体内  $\alpha$ -珠蛋白链冗余情况，减轻  $\beta$ -地中海贫血症的症状，并降低患者治疗成本。尽管如此，造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 仍是  $\beta$ -地中海贫血症唯一的治愈性治疗手段。但事实上，仅 30% 的患者拥有免疫相容的人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 匹配同胞供体以供移植<sup>[47]</sup>，大部分患者仍缺乏有效的治愈性治疗手段。

采用基因修饰后的自体造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 进行 HSCT 可有效规避供体限制及移植物抗宿主病，是一种适用于绝大部分患者的治疗手段。其中，采用基因替代疗法，即利用慢病毒载体递送具有正常功能的  $\beta^A-T87Q$ -珠蛋白至患者来源 HSCs 中，能有效降低患者输血需求<sup>[48-50]</sup>。基于该原理开发的 Zynteglo 于 2019 年 9 月由欧盟委员会批准上市<sup>[51]</sup>，但因慢病毒载体存在随机整合带来的潜在致癌风险，以及对该药的生产制造工艺存在质疑而被多次叫停；此外，该药物在此前的临床试验中的疗效持久性、治疗潜力尚不明确，其应用效益仍有待时间的验证。相比之下，利用基因编辑

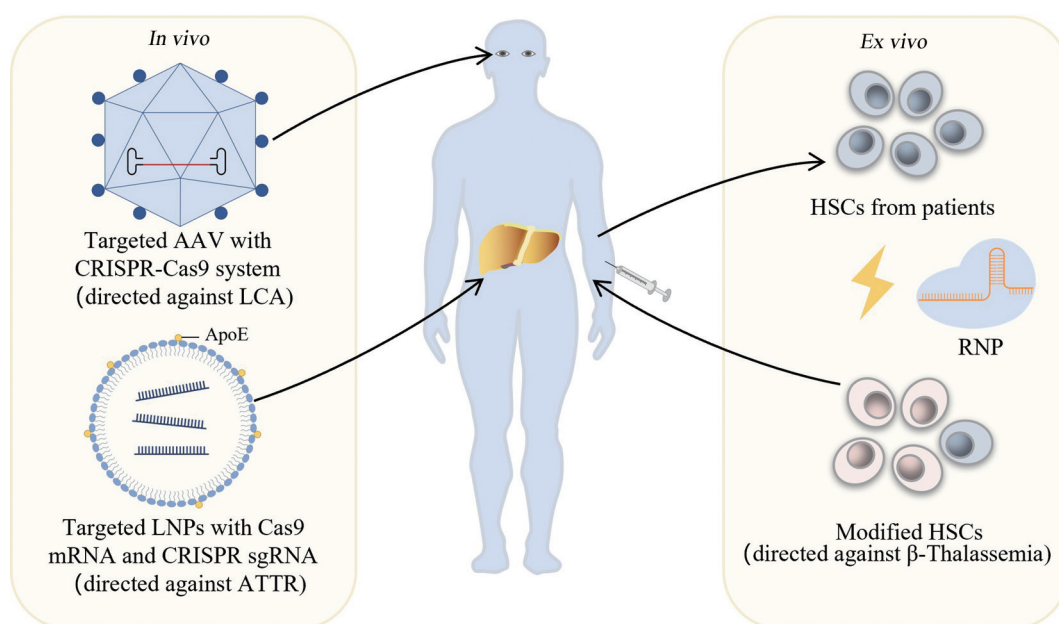


图2 基于CRISPR/Cas9技术的成体基因编辑疗法常用策略

技术可实现永久性的自体 HSCs 位点特异性基因修饰, 在治疗  $\beta$ -地中海贫血领域表现出巨大的潜力。目前,  $\beta$ -地中海贫血症的基因编辑疗法常采用两种策略: 诱导胎儿血红蛋白 HbF 表达和对 *HBB* 基因突变进行精确修复<sup>[52]</sup>。

### 2.1.2 诱导HbF表达的基因编辑疗法治疗 $\beta$ -地中海贫血症

诱导 HbF 表达是临床上常规的  $\beta$ -地中海贫血治疗策略。通常, 人体在出生后 6~24 个月时完成 HbF 向 HbA 的血红蛋白转换, 最终 HbF 表达水平降至约 1%<sup>[53]</sup>。而遗传性胎儿血红蛋白持续存在症 (hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH) 患者出生后 HbF 保持高表达水平<sup>[54]</sup>。当 HPFH 相关突变与 *HBB* 突变共遗传时, 高表达的  $\gamma$ -珠蛋白能中和  $\alpha$ -珠蛋白链的冗余, 减轻  $\beta$ -地中海贫血症的症状<sup>[55]</sup>。利用基因编辑诱导 HbF 表达的治疗策略适用于各种 *HBB* 突变患者的治疗, 目前常用策略包括下调  $\gamma$ -珠蛋白转录抑制因子的表达水平和模拟  $\zeta\gamma$  和  $\Lambda\gamma$ -珠蛋白启动子区突变。

转录抑制因子 *BCL11A* 是  $\gamma$ -珠蛋白表达沉默的重要调节因子<sup>[56]</sup>, 通过基因编辑技术靶向破坏 *BCL11A* 的红系增强子区, 可实现红系细胞特异性 *BCL11A* 敲低, 并减少对淋巴细胞的分化成熟及造血干细胞移植后造血重建过程的影响<sup>[57-59]</sup>。其中, *BCL11A* 内含子 +58 区包含一个重要的红系增强子, 其中存在一个 Half E-box/GATA1 结合基序 (CTGN<sub>7</sub>, WGATAR) 的核心区域, 是靶向下调 *BCL11A* 表达诱导 HbF 高表达的理想靶点<sup>[60-61]</sup>。目前已有多项基于靶向破坏 *BCL11A* 红系增强子位点的治疗方案进入临床研究阶段。其中, CRISPR Therapeutics 与合作伙伴福泰制药 (Vertex) 开发的 CTX001 (NCT03655678)、博雅辑因 ET-01 (NCT04925206) 和上海邦耀 (NCT-04211480) 通过电穿孔方式递送 CRISPR/Cas9 系统至 CD34<sup>+</sup> HSCs 中, 最终可在 *BCL11A* 红系增强子区诱导约 80% 的 indels,  $\gamma$ -珠蛋白表达水平显著升高<sup>[62-63]</sup>。CTX001 的 I/II 期临床试验显示, 第一例患者移植一年后骨髓及外周血细胞中仍保持 60% 以上的编辑效率, 在治疗后第 18 个月仍持续维持脱离输血的状态, 具有临床治疗意义<sup>[62]</sup>。截至 2021 年 3 月, CTX001 产品的 I/II 期临床试验已完成 15 位地贫患者治疗 (年龄 18~32 岁, 平均 23 岁), 患者给药后随访时间为 4.0~26.2 月 (中位 8.7 月), 15 例患者全部达到摆脱输血的状态 (2021 年欧洲血液学年会, EHA 会议)。而健康供体来源 ET-01 在

移植至免疫缺陷 NPG 小鼠后表现出长期增殖及分化能力, 目前相关 I 期临床试验仍在进行<sup>[63]</sup>。2022 年 8 月, 华东师范大学吴宇轩团队联合中南大学湘雅医院及上海邦耀共同发布了 NCT04211480 的 I/II 期临床试验的初期结果, 两名受试患儿移植后 18 个月时的 HbF 含量分别为 159.8 g/L 及 142.7 g/L, 至数据投稿时已脱离输血依赖超过 16 个月<sup>[64]</sup>。此外, 两名患儿的铁过载现象也有所改善, 试验暂未发现明显副作用。Sangamo Therapeutics 的 ST-400 (NCT03432364) 则通过电穿孔递送锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN) 系统以破坏 *BCL11A* 红系增强子区, I/II 期临床初步数据显示移植后患者 HbF 表达水平升高, 移植后 6 个月时外周血单核细胞中 *BCL11A* 红系增强子区 indels 仍处于可检测水平, 但所有患者均未摆脱输血, 当前该临床研究已停止招募入组<sup>[65]</sup>。

另一方面, 模拟  $\zeta\gamma$  和  $\Lambda\gamma$ -珠蛋白启动子区的 HPFH 突变也可作为诱导 HbF 表达的有效策略。HPFH 突变位点主要分布于  $\gamma$ -珠蛋白基因 (hemoglobin subunit gamma, *HBG*) 转录起始位点上游的 -200、-175 及 -115 区。其中 -115 区突变簇包含 *BCL11A* 的结合位点, 利用 CRISPR/Cas 系统在 -115 区模拟天然存在的 13 bp 缺失 (-102 至 -114) 可使 HbF 水平升高超过 30%<sup>[66]</sup>。目前基于该策略的基因治疗产品主要包括 Editas Medicine 的 EDIT-301 (采用 CRISPR/Cas12 技术) 和广州瑞风 (Reforgene Medicine) 的 RM-001 (采用 CRISPR/Cas9 技术)。EDIT-301 用于治疗  $\beta$ -地贫的临床试验申请刚刚获得 FDA 批准, 目前尚无临床数据报道。广州瑞风已经成功开展了 RM-001 的临床研究 (ChiCTR2100052858), 并在 2022 年 EHA 会议上报道初步的临床结果。根据其会议摘要, 两例  $\beta^0/\beta^0$  基因型患者分别在治疗后第 28 天和第 39 天脱离输血, 至 3 个月时其体内 HbF 水平已超过 90 g/L, 总 Hb 超过 110 g/L, 初步显示了这种策略的有效性。此外, 模拟 *HBG* -175 T>C 点突变可为转录激活因子 TAL1/SCL 提供新的结合位点, 而模拟 -200 区突变则可破坏转录抑制因子 LRF 的结合位点, 两者均已被证明是可行的治疗靶点<sup>[67-68]</sup>。利用电穿孔递送 hA3A-BE3/sgRNA 复合物至 CD34<sup>+</sup> 细胞, 可在 *HBG* -115C 或 -114C 位置诱导约 20% 的碱基替代, 使  $\gamma$ -珠蛋白表达水平从 ~13.7% 增加至 ~58.1%, 并规避了 *HBG1* 及 *HBG2* 启动子间大片段缺失带来的 *HBG2* 丢失及 HbF 表达效率降低, 同样具有临床应用潜力<sup>[69]</sup>。

### 2.1.3 $\beta$ -地中海贫血症的体外基因编辑疗法发展前景

总体而言，在输血需求日益增大以及移植供体持续匮乏的背景下， $\beta$ -地中海贫血症的体外基因编辑疗法的开发为疾病治疗提供了一个新的选择。国内外 $\beta$ -地中海贫血症的基因编辑临床试验主要采用诱导 HbF 表达的策略。但与 HbA 相比，HbF 在组织内放氧能力相对较弱，因此 HbF 的高表达可能引起组织缺氧及部分器官发育不良。相比之下，对 *HBB* 基因突变进行精确修复是一种更理想的策略。

近年来，精准修复 *HBB* 基因突变的临床前研究已经取得了较大进展。在中国，最常见的 5 种 *HBB* 基因突变类型包括 CD41/42 (-TTCT) (患病率为 0.93%)、CD17 (A>T) (0.48%)、-28 (A>G) (0.25%)、IVS-II-654 (C>T) (0.25%) 和 CD71/72 (+A) (0.07%)<sup>[70]</sup>。其中，利用 CRISPR/Cas9 系统及单链寡核苷酸提供修复模板，并基于 HDR 的修复方式，已在患者来源的 iPSCs 中实现了 CD41/42 (-TTCT) 校正<sup>[71-72]</sup>。而对于 IVS-II-654 (C>T) 突变，通过电穿孔递送基于 LbCas12a 的 CRISPR/Cas 系统 (TTTV PAM)，可在患者来源 HSPCs 中诱导 76.6% 的 indels，从而破坏由突变造成的错误剪接位点，最终使野生型  $\beta$ -珠蛋白的表达水平从 25.5% 提升至 70.1%。此外，SpRY 变体的开发缩小了治疗靶点的限制，使得基于 NAN PAM 精确修复 IVS-II-654 (C>T) 成为一种新的选择<sup>[73]</sup>。而基于 CBE 系统修复 *HBB* -28 (A>G) 的可行性已在多项研究中得到验证。其中，通过对核移植技术构建的 *HBB* -28 (A>G) 纯合突变核移植人胚胎进行 BE3 mRNA 及 sgRNA 的注射，可使胚胎中 *HBB* -28 (A>G) 突变修复水平达到 7.0%~25.9%<sup>[74]</sup>。通过电穿孔递送 A3A (N57Q)-BE3 变体及 sgRNA 复合的核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 至人动员外周血来源的 CD34<sup>+</sup> HSPCs，可实现 68.2% 的 C>T 修复效率<sup>[75]</sup>。可以预见，随着基因编辑技术的开发与优化，对  $\beta$ -地中海贫血症的更多突变位点有望实现高效精确的校正，并逐步走上临床转化的道路。

而在基因编辑系统的递送策略上，通过电穿孔递送 mRNA 或以 RNP 形式递送编辑系统减少了编辑系统的持续作用时间，降低了脱靶切割风险和编辑工具长期表达的不确定性，且不存在基因组整合风险，是体外递送基因编辑工具的通用策略，契合 HSCs 的递送需求<sup>[76]</sup>。但在临床转化过程中，自体或异体 HSPCs 在回输后的编辑效果的持久性及安

全性仍有待更长期的观察研究。

体外编辑 HSCs 后移植的治疗方案依托于成熟的 HSCT 技术，但 HSCs 的体外培养难度及 HSCT 前患者的清髓预处理仍为患者带来一系列潜在风险。基因编辑系统的体内递送为基因编辑 HSCs 提供了另一种可行的治疗思路，而开发低免疫原性、高 HSCs 靶向性的体内递送工具，如 LNP 等纳米材料，则是这一治疗思路开发的关键步骤。

## 2.2 腺相关病毒递送 CRISPR/SaCas9 治疗先天性黑矇症的临床试验进展

### 2.2.1 莱伯氏先天性黑矇症(LCA)概述

莱伯氏先天性黑矇症是一类导致婴幼儿先天性视力障碍的严重遗传性视网膜疾病，人群患病率约 1/81 000~1/30 000，占遗传性视网膜疾病 (inherited retinal diseases, IRDs) 的 5%；大多数患者在幼年时由于光感受器功能异常即表现出视力显著下降，并由于进行性的视网膜变性在 30~40 岁时完全失明<sup>[77-79]</sup>。该疾病由至少 26 个不同基因的突变引起，并根据基因突变类型进行 LCA 分型，其遗传方式也不尽相同。LCA 主要表现为常染色体隐性遗传，最常见的突变基因有 *CEP290* (15%~20%)、*GUCY2D* (10%~20%)、*RPE65* (3%~16%)、*RDH12* (3.4%~10.5%) 和 *CRB1* (10%)。

目前 LCA 治疗主要是支持性的，包括矫正屈光不正和使用低视力辅助工具，但收效甚微。其他针对 LCA 的疗法仍多停留在临床前研究水平，包括靶向退化视网膜内残留细胞的光遗传学技术、感光细胞移植技术和以基因替代、基因编辑为主的基因疗法<sup>[80-87]</sup>。近年，针对 LCA 的基因疗法发展相对迅速，已有一款基因替代治疗药物 Luxturna 已在欧美多个国家上市，以及 2 款治疗药物处于临床试验阶段。Luxturna 于 2017 年 12 月经 FDA 批准上市，是全球首个针对遗传性视网膜疾病的基因治疗药物，该药物利用重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体递送正常 *RPE65* 基因的 cDNA，用于治疗 *RPE65* 基因突变引起的 Leber 先天性黑矇 2 型 (LCA2)<sup>[88-91]</sup>。2020 年，一位接受 Luxturna 药物治疗的 8 岁儿童患者视力得到了明显改善，但由于随访时间短，该药物的疗效持久性目前尚未明确。相较于基因替代疗法，基因编辑疗法有望通过对基因进行永久性修饰达到治愈疾病的效果，是更为理想的治疗策略。目前一项使用 CRISPR 基因编辑技术治疗 LCA10 的临床试验正在开展中，并于近期公布了初步研究结果。

### 2.2.2 切除CEP290基因IVS26突变治疗LCA

2018年, Allergan 和 Editas Medicine 公司联合开发了名为 EDIT-101 的全球首例体内 CRISPR 基因编辑药物, 用于治疗 LCA10 中最为常见的致病突变——CEP290 基因 IVS26 突变, 即第 26 号内含子突变 (c.2991+1655A>G), 该突变为 CEP290 基因主要突变类型之一 (21%)<sup>[85, 92-93]</sup>。该疗法通过 AAV5 特异性递送 SaCas9 和两条 gRNA 至光感受器细胞, 实现在不影响野生型等位基因功能的情况下, 通过双 gRNA 分别靶向突变内含子区域的上下游, 切割去除 IVS26 突变造成的假外显子错误剪接供体, 并通过 NHEJ 途径修复 DNA 序列, 从而表达出功能正常的 CEP290 蛋白, 以缓解 LCA 表型<sup>[94]</sup>。EDIT-101 是 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在体内治疗的首次临床应用, 目前该药物处于 I/II 期临床试验 (NCT03872479), 总计 18 名成年 LCA10 患者接受了不同剂量的 EDIT-101 治疗, 最初接受治疗的 2 名患者随访时间已经超过 1 年。2021 年, Editas 公布的 I/II 期临床试验初步结果显示, 在安全性方面, EDIT-101 在目前接受治疗的患者中没有出现剂量限制性毒性或严重不良事件, 没有发现任何治疗相关的白内障、水肿或视网膜变薄等不良反应; 在疗效方面, 使用了三种检测方式对患者的视觉功能进行评估, 包括视觉敏锐度 (BCVA)、光敏感性 (FST) 和借助视觉的导航能力, 其中低剂量组的 2 位患者未观察到疗效; 中剂量组中有 1 位患者的三项视觉功能都得到改善, 1 位患者在其他两种检测中尚未表现出改善, 其余 2 位未观察到疗效。总体而言, 目前根据 EDIT-101 的临床试验数据尚无法确认这一疗法能否产生足够强的疗效, 因此, 接下来开展的高剂量组的临床试验将会受到更多关注。

### 2.2.3 LCA等遗传性眼科疾病的体内基因编辑疗法发展前景

利用 CRISPR 基因编辑技术对致病基因进行校正或基因修饰, 有望治疗各种遗传类型的眼科疾病。眼睛由于其独特的生理结构和免疫特性, 已经成为了基因疗法迈入成体治疗阶段的一个重要靶标<sup>[95]</sup>。目前, 40 多款应用于体内治疗眼遗传疾病的基因药物处于临床试验阶段, 并以基因补充 / 替代疗法为主, 通过病毒或非病毒载体递送正常基因表达具有正常功能的蛋白, 从而缓解疾病进展, 恢复视觉功能。目前开展的临床试验主要针对基因突变导致蛋白功能丧失的常染色体隐性 X 染色体连锁遗传性视网膜疾病, 如 RPE65 或 CEP290 突变导致的 LCA,

REPI 或 CHM 基因突变导致的无脉络膜症, PRGR 基因突变导致的 X 染色体连锁视网膜色素变性以及由 RSI 突变引起的 X 染色体连锁视网膜劈裂等<sup>[96-97]</sup>。但对于显性遗传性视网膜疾病或非完全遗传性因素导致的视网膜疾病, 基因替代疗法并不适用。基因编辑疗法可以直接破坏或校正致病性基因突变或重新调控相关基因, 从而缓解甚至治愈疾病, 具有治疗不同类型的遗传性疾病与非遗传性疾病的潜力。目前, 除了针对 CEP290 基因 IVS26 突变导致的 LCA10 的基因编辑疗法率先开展临床试验外, 利用基因编辑技术可以有效修复 LCA 其他分型相关的单基因突变如 GUCY2D、RPE65, 并在相应小鼠跟非人灵长类动物模型中都达到了较好的治疗效果<sup>[98-99]</sup>; 此外, 利用 AAV 载体递送基因编辑器治疗小鼠模型中常染色体显性遗传性视网膜色素变性 (RP) 以及年龄相关性黄斑病变 (AMD)、糖尿病性视网膜病变 (DR) 等研究也取得了较为理想的治疗效果<sup>[100-102]</sup>。

基于 AAV 递送方式的体内基因编辑疗法仍有待进一步优化。不同于体外基因疗法中利用电穿孔直接递送遗传物质至细胞, 体内的基因治疗依赖于组织特异性的病毒或非病毒载体进行靶向递送。腺相关病毒具有免疫原性低、组织特异性高以及基因组整合率较低等特点, 且可在各种类型的视网膜细胞中长期表达, 已成为遗传性视网膜疾病的体内基因疗法临床试验中主要使用的载体<sup>[103-104]</sup>。其存在的主要缺点是装载容量有限, 仅为 4.7 kb, 更大的转基因或基因编辑器如 SpCas9 及 gRNA 的序列及相应调控元件、单碱基编辑器和引导编辑器等难以利用单个 AAV 进行转导。为此, 研究者开发了双 AAV 递送系统, 将大蛋白或基因编辑器中的效应蛋白分为 2 个部分, 并共同转导至同一细胞中, 通过内含肽介导蛋白质的剪接得到完整的蛋白并发挥功能。多个研究团队分别证明了基于该策略递送 CRISPR/SpCas9 及衍生的一系列基因编辑工具体内应用的可行性, 其中中山大学黄军就课题组证明利用双 AAV 递送基于合理设计的断裂 ABE 和 PE 可以有效编辑小鼠成体视网膜细胞, 为该基因编辑工具应用于眼科疾病治疗提供了概念性验证<sup>[105-108]</sup>。此外, 人群体内的 AAV 中和抗体是影响 AAV 有效性的一个重要因素, 目前临床试验中研究和使用的血清型是 AAV2, 但一般人群中 AAV2 中和抗体存在比例较高, 选择存在比例较低的 AAV5、AAV8 或 AAV9 可以降低免疫反应风险<sup>[109]</sup>。



## 2.3 脂质纳米颗粒递送CRISPR/SpCas9治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性的临床试验进展

### 2.3.1 转甲状腺素蛋白淀粉样变性概述

转甲状腺素蛋白淀粉样变性是一种由转甲状腺素蛋白 (transthyretin, TTR) 错误折叠组成的淀粉样纤维在各种器官和组织中沉积引起的进行性罕见病。TTR 蛋白主要在肝中产生, 正常生理条件下以同源四聚体形式存在于外周血中, 发挥转运甲状腺素和视黄醇 (即维生素 A) 的功能<sup>[110]</sup>。TTR 基因突变 (突变型 ATTR, ATTRv) 可导致 TTR 蛋白的天然四聚体解离为单体, 然后错误折叠并聚集成淀粉样原纤维, 导致常染色体显性遗传性淀粉样变性, 包括家族性淀粉样多发性神经病 (familial amyloid polyneuropathy, FAP)、家族性淀粉样心肌病 (familial amyloid cardiomyopathy, FAC) 和家族性细脑膜淀粉样变性 (familial leptomeningeal amyloidosis)<sup>[111]</sup>。由于年龄增长引起的野生型 TTR 类似错误折叠会导致野生型 ATTR 淀粉样变性 (ATTRwt)。据估计, 全世界有 50 000 人患有 ATTRv 淀粉样变性, 20 万至 50 万人患有 ATTRwt 淀粉样变性<sup>[112]</sup>。无预后的 ATTR 患者平均预期寿命为 2~17 年, 其中 FAP 患者寿命更短, 仅 2~6 年<sup>[113-115]</sup>。

目前肝移植为 ATTR 疾病的一线治疗方法<sup>[116]</sup>, 移植可以使异常 TTR 蛋白减少, 提高总体生存率, 但是该疗法受限于供体短缺、手术风险、急性排斥反应, 以及需长期使用免疫抑制剂和患者病情发展等因素。此外, ATTR 的非侵入性疗法也在不断发展, 近 10 年全球有 4 个靶向治疗药物在欧洲、美国上市, 按作用机制可分为 2 类: 一类旨在与 TTR 蛋白的甲状腺素结合位点结合以稳定 TTR 的四聚体结构, 包括 Diflunisal 和 Tafamidis; 另一类通过降解 TTR 的 mRNA 抑制 TTR 蛋白产生, 包括反义寡核苷酸药物 Inotersen 和小干扰 RNA 药物 Patisiran<sup>[116-117]</sup>。但以上疗法均需要长期给药以维持 TTR 敲低水平, 并且不能完全抑制病程; 此外, Patisiran 疗法需辅助使用糖皮质激素, Inotersen 会引起严重的副作用, 包括肾小球肾炎和血小板数量减少。可以看出, 现有 ATTR 的临床治疗方法存在不足, 需要开发更为安全有效的新疗法。

### 2.3.2 敲除 TTR 基因的基因编辑疗法治疗 ATTR

2020 年, Intellia Therapeutics 公司和 Regeneron 公司开展了利用 NTLA-2001 基因编辑药物治疗 ATTR 的 I 期临床试验 (NCT04601051)。此前的临床前研究发现, 通过脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticle,

LNP) 递送编码 SpCas9 的 mRNA 和靶向 TTR 的单个 gRNA 可以特异性敲除小鼠与食蟹猴肝脏细胞的 TTR 基因, 从而沉默 TTR mRNA, 单剂量可使血清 TTR 蛋白持续降低 95% 以上<sup>[118-119]</sup>, 为实现一次性给药治愈 ATTR 提供了依据。在该临床试验中, 通过静脉注射的 NTLA-2001 可被载脂蛋白 E (ApoE) 识别并通过循环系统进入肝脏, 随后转运至内肝窦毛细血管; NTLA-2001 被肝细胞表面表达的低密度脂蛋白 (LDL) 受体摄取, 随后经内吞作用形成内体; 在 LNP 分解和内体膜破坏后, 活性成分 (特异性靶向 TTR 的 sgRNA 和编码 Cas9 的 mRNA) 被释放到细胞质中; Cas9 mRNA 分子通过天然核糖体过程被翻译, 产生 Cas9 蛋白并与特异性靶向 TTR 的 sgRNA 形成 RNP 复合物发挥功能; 通过靶向 ATTR 患者的 TTR 基因突变位点并切割, 减少肝细胞中由于基因突变产生的错误折叠的 TTR 蛋白。NTLA-2001 具有一次给药治愈 ATTR 的潜力, 并且这是首款进入临床试验的通过静脉注射全身性给药的 CRISPR 基因编辑疗法。

2021 年 8 月, 该项研究公布了 I 期临床试验数据<sup>[119]</sup>, 包括了在 I 期临床试验中接受治疗的 6 名 ATTR 患者, 其中 3 名接受剂量为 0.1 mg/kg 的 NTLA-2001 的治疗, 另外 3 名的接受剂量为 0.3 mg/kg。在接受治疗第 28 天的检测显示, NTLA-2001 能够剂量依赖性地降低患者血清中的 TTR 水平。0.1 mg/kg 剂量组 TTR 平均下降 52%, 0.3 mg/kg 剂量组 TTR 平均下降 87%, 其中一名患者 TTR 水平下降 96%。在安全性方面, 截至接受治疗后第 28 天, NTLA-2001 表现出良好的安全性, 没有发现严重不良事件和肝脏问题; 治疗剂量的 NTLA-2001 也并未产生“脱靶效应”。总体来说, CRISPR 体内基因组编辑药物 NTLA-2001 在 I 期临床试验中获得积极结果, 但其长期的安全性还有待深入的研究。

### 2.3.3 ATTR 及靶向肝脏的体内基因编辑疗法发展前景

NTLA-2001 是 CRISPR 体内基因编辑疗法应用中的一个积极尝试, 向研究者发出了推动 ATTR 临床前治疗研究成果转化的积极信号。目前, CRISPR/Cas9 技术的应用受限于 Cas9 蛋白的 PAM 偏好性, 因此, 针对不同类型的 TTR 基因突变, 需要选择合适的 Cas9 蛋白进行靶向。近期, 中山大学黄军就课题组利用具有肝脏特异性的 AAV 递送 PAM 识别序列不同且蛋白大小小于 SpCas9 的 Nme<sub>2</sub>-Cas9, 并证明该策略可以有效降低 TTR 蛋白表达

并缓解携带 TTR 基因突变的人源化小鼠的 ATTR 表型<sup>[120]</sup>, 进一步丰富了 ATTR 的体内基因编辑疗法的内容。此外, 也有通过 AAV 递送进而过表达 TTR 变体稳定其四聚体结构以缓解小鼠 ATTR 表型的研究<sup>[121]</sup>。但肝脏特异性的 AAV 体内递送需要使用高剂量 AAV, 因此存在基因组整合、免疫应答以及致癌的风险。

使用 ApoE 修饰的工程化 LNP 特异性递送 siRNA 或 mRNA 至肝脏的方式则更为安全。非病毒载体 LNP 通常含可阳离子化脂质、PEG 脂质、辅助性磷脂和胆固醇等 4 种组分, 体外封装 siRNA 或 mRNA 后呈中性, 随后通过内吞作用进入细胞, 其可电离阳离子脂质在内体的酸性 pH 下获得正电荷并介导 siRNA 或 mRNA 释放<sup>[122]</sup>。LNP 递送基因编辑器相比病毒载体具有明显优势: 在递送过程中由于没有蛋白质或肽成分暴露在外, 比病毒载体的免疫原性更低; 更容易组装和实现大规模工业化生产; 对装载容量限制较低; 具有瞬时表达核酸酶活性的优势, 并且允许重复给药等。尽管 LNP 是目前最具有应用潜力的非病毒载体, 其仍存在需要进一步优化的空间: (1) LNP 体系中 RNA 从内体中逃逸率低, 目前最高效的 LNP 体系仅为 1%~4%<sup>[123-124]</sup>; (2) 现有的 LNP 大多可特异性靶向肝脏, 肝脏以外其他器官的靶向、特异性递送问题仍待解决<sup>[125]</sup>; (3) LNP 可能引起心肌炎和过敏反应等副作用, 这需要在临床试验中进行更系统的评估<sup>[126]</sup>; (4) LNP 封装工艺和存储方式也需要进一步优化, 因为 RNA 和 LNP 均不稳定且容易降解, 有研究报道 BNT162b2 疫苗的 RNA 完整性估计在生产结束时约为 70%, 预计在分发过程中会进一步降解<sup>[127]</sup>。

基因编辑工具治疗其他疾病的研究也正在开展中。目前, 在靶向肝脏的基因编辑疗法临床前研究中, 研究者通过 LNP 递送腺嘌呤单碱基编辑工具靶向 *Pcsk9* 基因, 可实现小鼠与非人灵长类动物肝脏中该基因的高效精准编辑<sup>[38, 128]</sup>, 而且只需单次注射便可实现血液中 PCSK9 和 LDL 胆固醇的持久降低, 为心血管疾病的治疗与预防提供了新思路。在靶向其他组织器官方面, 工程化 LNP 也在进一步改进和评估。

### 3 展望

CRISPR/Cas 基因编辑技术的出现推动了基因编辑疗法的快速发展。许多临床前研究表明,

CRISPR/Cas9 及其衍生的单碱基编辑器、引导编辑器可以精确地编辑单个基因从而破坏或校正致病性基因突变, 也可以用于致病相关基因的重新调控以达到治疗疾病的目的。数十种临床试验已被批准使用基于 CRISPR/Cas 的基因组编辑治疗各种遗传性疾病以及癌症, 其中多数为针对血液疾病的体外基因编辑疗法, 体内基因编辑疗法较少, 仅应用基因编辑疗法治疗肝脏疾病和遗传性眼科疾病进展较快, 神经系统疾病、传染病以及癌症等的治疗也正在积极探索中。在未来 5~10 年内, 有希望通过基因编辑疗法治愈部分遗传性疾病<sup>[76]</sup>。

然而, 进一步推广 CRISPR/Cas 成体基因编辑疗法之前仍有诸多问题需要解决。(1) 携带特定基因突变的人类遗传性疾病动物模型种类较少, 尤其是大动物模型, 导致基因编辑在转化研究和疗法开发及有效性和安全性评估上受到一定程度的制约<sup>[129]</sup>。因此, 开发简单、快速的动物建模方法可能会加速基因编辑疗法的发展。(2) CRISPR/Cas 基因治疗靶向范围存在局限性。CRISPR/Cas 基因编辑器的治疗靶点的选择高度依赖于 Cas9 蛋白的 PAM 偏好性, 对于特定基因突变靶点, 需要筛选适配的 Cas9 蛋白变体或基因编辑器, 从而获得预期的基因编辑产物。因此, 发现或改造出 PAM 覆盖范围更广的 Cas 蛋白将促进基因编辑疗法的发展<sup>[130]</sup>。(3) 递送问题仍然是成体基因编辑的最大瓶颈。为避免基因编辑系统在体内长期表达引起的潜在遗传毒性和免疫原性, 需要开发出可以满足临床治疗需求、瞬时高效表达且安全的载体<sup>[131]</sup>。通过使用定向进化和合理设计方法对现有的载体系统进行改进有望实现该目标。(4) CRISPR/Cas 基因编辑器的潜在脱靶影响及其成分的安全性仍有待更多临床前研究与临床试验进行评估。目前, 临床前研究中对于基因编辑存在的脱靶效应带来的潜在生物学后果, 以及旁编辑事件所诱发的体内效应研究尚未清晰<sup>[132-133]</sup>。除了脱靶编辑和旁编辑之外, 研究中还发现 Cas9 切割后产生 DSB 会导致 DNA 的大片段缺失和重排, 以及激活 p53 途径产生致癌风险, 通过对引发该现象的具体机制进行探究将为基因编辑疗法效果和安全性评估提供参考依据<sup>[134-135]</sup>。此外, 由于 Cas9 蛋白来源于细菌, 人群中可能存在针对常用 Cas9 同源物的体液免疫和细胞免疫, 再次输入 Cas9 蛋白的安全性与有效性仍有待评估, 而解决 Cas9 蛋白免疫原性问题的潜在途径包括使用免疫正交 Cas9 同源物以及挖掘可能在人类细胞

中免疫原性较低的新 Cas9 同源物<sup>[136]</sup>。总的来说，尽管基于 CRISPR 的基因编辑疗法的临床转化仍然存在诸多挑战，但多个已公布临床试验的基因编辑药物研究的阶段性成果已显示出其在疾病治疗方面的重大潜力。通过对基因编辑技术及递送系统展开更为深入的探究以及改造和创新，有望克服目前面临的挑战，进一步扩大基因编辑技术在治疗人类疾病中的应用范围。

### [参 考 文 献]

- [1] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, 429: 457-63
- [2] Varmus H. Getting ready for gene-based medicine. *New Engl J Med*, 2002, 347: 1526-7
- [3] Pogue RE, Cavalcanti DP, Shanker S, et al. Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources. *Drug Discov Today*, 2018, 23: 187-95
- [4] Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet*, 2008, 371: 2044-7
- [5] Porteus M. Genome editing: a new approach to human therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 163-90
- [6] Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 2015, 21: 121-31
- [7] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [8] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602-7
- [9] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [11] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538-42
- [12] Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15: 169-82
- [13] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168: 328-328.e1
- [14] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759-71
- [15] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186-91
- [16] Kim E, Koo T, Park SW, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500
- [17] Edraki A, Mir A, Ibraheim R, et al. A compact, high-accuracy Cas9 with a dinucleotide PAM for *in vivo* genome editing. *Mol Cell*, 2019, 73: 714-26.e4
- [18] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442-51
- [19] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647-61
- [20] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [21] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-71
- [22] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149-57
- [23] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280-4
- [24] Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017, 358: 1019-27
- [25] Liang P, Sun H, Sun Y, et al. Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell*, 2017, 8: 601-11
- [26] Sun H, Zhi S, Wu G, et al. Cost-effective generation of A-to-G mutant mice by zygote electroporation of adenine base editor ribonucleoproteins. *J Genet Genomics*, 2020, 47: 337-40
- [27] Ma Y, Yu L, Zhang X, et al. Highly efficient and precise base editing by engineered dCas9-guide tRNA adenosine deaminase in rats. *Cell Discov*, 2018, 4: 39
- [28] Perleberg C, Kind A, Schnieke A. Genetically engineered pigs as models for human disease. *Dis Model Mech*, 2018, 11: dmm030783
- [29] Su X, Chen W, Cai Q, et al. Production of non-mosaic genome edited porcine embryos by injection of CRISPR/Cas9 into germinal vesicle oocytes. *J Genet Genomics*, 2019, 46: 335-42
- [30] Su X, Chen W, Cai Q, et al. Effective generation of maternal genome point mutated porcine embryos by injection of cytosine base editor into germinal vesicle oocytes. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 996-1005
- [31] Huang Y, Ding C, Liang P, et al. *HBB*-deficient *Macaca fascicularis* monkey presents with human  $\beta$ -thalassemia. *Protein Cell*, 2019, 10: 538-42
- [32] Li L, Yi H, Liu Z, et al. Genetic correction of concurrent  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia patient-derived pluripotent stem cells by the CRISPR-Cas9 technology. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13: 102
- [33] Morvan MG, Teque F, Ye L, et al. Genetically edited CD34<sup>+</sup> cells derived from human iPS cells *in vivo* but not *in vitro* engraft and differentiate into HIV-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118: e2102404118
- [34] Yu KR, Natanson H, Dunbar CE. Gene editing of human

- hematopoietic stem and progenitor cells: promise and potential hurdles. *Hum Gene Ther*, 2016, 27: 729-40
- [35] Porteus MH. A new class of medicines through DNA editing. *New Engl J Med*, 2019, 380: 947-59
- [36] Li S, Hu Y, Li Y, et al. Generation of nonhuman primate retinitis pigmentosa model by *in situ* knockout of *RHO* in *Rhesus Macaque* retina. *Sci Bull*, 2021, 66: 374-85
- [37] Lin Q, Lv JN, Wu KC, et al. Generation of nonhuman primate model of cone dysfunction through *in situ* AAV-mediated *CNGB3* ablation. *Molr Ther Methods Clin Dev*, 2020, 18: 869-79
- [38] Musunuru K, Chadwick AC, Mizoguchi T, et al. *In vivo* CRISPR base editing of *PCSK9* durably lowers cholesterol in primates. *Nature*, 2021, 593: 429-34
- [39] Memi F, Ntokou A, Papangeli I. CRISPR/Cas9 gene-editing: research technologies, clinical applications and ethical considerations. *Semin Perinatol*, 2018, 42: 487-500
- [40] Cao A, Galanello R.  $\beta$ -thalassemia. *Genet Med*, 2010, 12: 61-76
- [41] Mettananda S, Higgs DR. Molecular basis and genetic modifiers of thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018, 32: 177-91
- [42] Ma Z, Fan S, Liu J, et al. Molecular characterization of hemoglobinopathies and thalassemias in Northern Guangdong Province, China. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100: e27713
- [43] Bradai M, Pissard S, Abad MT, et al. Decreased transfusion needs associated with hydroxyurea therapy in Algerian patients with thalassemia major or intermedia. *Transfusion*, 2007, 47: 1830-6
- [44] Ley TJ, DeSimone J, Anagnou NP, et al. 5-azacytidine selectively increases  $\gamma$ -globin synthesis in a patient with  $\beta^+$  thalassemia. *N Engl J Med*, 1982, 307: 1469-75
- [45] Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, et al. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the  $\beta$ -globin disorders. *N Engl J Med*, 1993, 328: 81-6
- [46] Aguilar-Lopez LB, Delgado-Lamas JL, Rubio-Jurado B, et al. Thalidomide therapy in a patient with thalassemia major. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 41: 136-7
- [47] Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic stem cell transplantation: a historical and scientific overview. *Cancer Res*, 2016, 76: 6445-51
- [48] Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med*, 2018, 378: 1479-93
- [49] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and *HMG2* activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature*, 2010, 467: 318-22
- [50] Marktel S, Scaramuzza S, Cicalese MP, et al. Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *Nat Med*, 2019, 25: 234-41
- [51] Schuessler-Lenz M, Enzmann H, Vamvakas S. Regulators' advice can make a difference: european medicines agency approval of zynteglo for  $\beta$  thalassemia. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 107: 492-4
- [52] Canver MC, Orkin SH. Customizing the genome as therapy for the  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Blood*, 2016, 127: 2536-45
- [53] Cantu I, Philipson S. Flicking the switch: adult hemoglobin expression in erythroid cells derived from cord blood and human induced pluripotent stem cells. *Haematologica*, 2014, 99: 1647-9
- [54] Menzel S, Thein SL. Genetic architecture of hemoglobin F control. *Curr Opin Hematol*, 2009, 16: 179-86
- [55] Bhattacharya G, Banerjee D, Chandra S, et al. Molecular basis of deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin and  $\delta\beta$ -thalassemia in Indian patients. *Clin Chim Acta*, 2008, 392: 69-70
- [56] Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows *BCL11A* associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of  $\beta$ -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 1620-5
- [57] Tsang JC, Yu Y, Burke S, et al. Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in *Bcl11a*-deficient hematopoietic stem cells. *Genome Biol*, 2015, 16: 178
- [58] Smith EC, Luc S, Croney DM, et al. Strict *in vivo* specificity of the *Bcl11a* erythroid enhancer. *Blood*, 2016, 128: 2338-42
- [59] Brendel C, Guda S, Renella R, et al. Lineage-specific *BCL11A* knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *J Clin Invest*, 2016, 126: 3868-78
- [60] Kassouf MT, Hughes JR, Taylor S, et al. Genome-wide identification of *TAL1*'s functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Res*, 2010, 20: 1064-83
- [61] Canver MC, Smith EC, Sher F, et al. *BCL11A* enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis. *Nature*, 2015, 527: 192-7
- [62] Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med*, 2021, 384: 252-60
- [63] Wei D, Li Y, Li C, et al. Manufacturing scale-up and preclinical development of ET-01, autologous CD34<sup>+</sup> cells with the *BCL11A* erythroid enhancer edited by CRISPR/Cas9, for patients with  $\beta$ -thalassemia major. *Blood*, 2019, 134: 965
- [64] Fu B, Liao J, Chen S, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing of the *BCL11A* enhancer for pediatric  $\beta^0/\beta^0$  transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *Nat Med*, 2022, 28: 1573-80
- [65] Smith AR, Schiller GJ, Vercellotti GM, et al. Preliminary results of a phase 1/2 clinical study of zinc finger nucleasemediated editing of *BCL11A* in autologous hematopoietic stem cells for transfusion-dependent  $\beta$  thalassemia. *Blood*, 2019, 134: 3544
- [66] Traxler EA, Yao Y, Wang YD, et al. A genome-editing strategy to treat  $\beta$ -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med*, 2016, 22: 987-90
- [67] Wienert B, Funnell AP, Norton LJ, et al. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun*, 2015, 6: 7085

- [68] Weber L, Frati G, Felix T, et al. Editing a  $\gamma$ -globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype. *Sci Adv*, 2020, 6: eaay9392
- [69] Wang L, Li L, Ma Y, et al. Reactivation of  $\gamma$ -globin expression through Cas9 or base editor to treat  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Cell Res*, 2020, 30: 276-8
- [70] Lai K, Huang G, Su L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland China: evidence from epidemiological surveys. *Sci Rep*, 2017, 7: 920
- [71] Liu Y, Yang Y, Kang X, et al. One-step biallelic and scarless correction of a  $\beta$ -thalassemia mutation in patient-specific iPSCs without drug selection. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 6: 57-67
- [72] Niu X, He W, Song B, et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in  $\beta$ -thalassemia-induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem*, 2016, 291: 16576-85
- [73] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, 2020, 368: 290-6
- [74] Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of  $\beta$ -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 811-22
- [75] Zeng J, Wu Y, Ren C, et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2020, 26: 535-41
- [76] Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*, 2020, 578: 229-36
- [77] Kondkar AA, Abu-Amro KK. Leber congenital amaurosis: current genetic basis, scope for genetic testing and personalized medicine. *Exp Eye Res*, 2019, 189: 107834
- [78] Huang CH, Yang CM, Yang CH, et al. Leber's congenital amaurosis: current concepts of genotype-phenotype correlations. *Genes (Basel)*, 2021, 12: 1261
- [79] Karvelis T, Bigelyte G, Young JK, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 5016-23
- [80] Michalakos S, Gerhardt M, Rudolph G, et al. Gene therapy for inherited retinal disorders: update on clinical trials. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2021, 238: 272-81
- [81] Botto C, Dalkara D, El-Amraoui A. Progress in gene editing tools and their potential for correcting mutations underlying hearing and vision loss. *Front Genome Ed*, 2021, 3: 737632
- [82] Botto C, Rucli M, Tekinsoy MD, et al. Early and late stage gene therapy interventions for inherited retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res*, 2022, 86: 100975
- [83] Cehajic Kapetanovic J, Barnard AR, MacLaren RE. Molecular therapies for choroideremia. *Genes (Basel)*, 2019, 10: 738
- [84] Chuang K, Fields MA, Del Priore LV. Potential of gene editing and induced pluripotent stem cells (ipscs) in treatment of retinal diseases. *Yale J Biol Med*, 2017, 90: 635-42
- [85] Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*, 2019, 25: 229-33
- [86] Napier MP, Selvan K, Hayeems RZ, et al. Gene therapy: perspectives from young adults with Leber's congenital amaurosis. *Eye (Lond)*, 2022, 36: 2088-93
- [87] Ovando-Roche P, Georgiadis A, Smith AJ, et al. Harnessing the potential of human pluripotent stem cells and gene editing for the treatment of retinal degeneration. *Curr Stem Cell Rep*, 2017, 3: 112-23
- [88] Darrow JJ. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug Discov Today*, 2019, 24: 949-54
- [89] Chen N, Sun K, Chemuturi NV, et al. The perspective of DMPK on recombinant adeno-associated virus-based gene therapy: past learning, current support, and future contribution. *AAPS J*, 2022, 24: 31
- [90] Halioua-Haubold CL, Jolly JK, Smith JA, et al. Potential lifetime quality of life benefits of choroideremia gene therapy: projections from a clinically informed decision model. *Eye (Lond)*, 2019, 33: 1215-23
- [91] Sengillo JD, Gregori NZ, Sisk RA, et al. Visual acuity, retinal morphology, and patients' perceptions after voretigene neparvovec-rzyl for *RPE65*-associated retinal disease. *Ophthalmol Retina* 2022, 6: 273-83
- [92] Quinn J, Musa A, Kantor A, et al. Genome-editing strategies for treating human retinal degenerations. *Hum Gene Ther*, 2021, 32: 247-59
- [93] den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, et al. Mutations in the *CEP290 (NPHP6)* gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, 2006, 79: 556-61
- [94] Chen BR, Sleckman BP. A whole genome CRISPR/Cas9 screening approach for identifying genes encoding DNA end-processing proteins. *Methods Mol Biol*, 2022, 2444: 15-27
- [95] Amato A, Arrigo A, Aragona E, et al. Gene therapy in inherited retinal diseases: an update on current state of the art. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 750586
- [96] Chiu W, Lin TY, Chang YC, et al. An update on gene therapy for inherited retinal dystrophy: experience in Leber congenital amaurosis clinical trials. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4534
- [97] Nuzbrokh Y, Ragi SD, Tsang SH. Gene therapy for inherited retinal diseases. *Ann Transl Med*, 2020, 9: 1278
- [98] Jo DH, Song DW, Cho CS, et al. CRISPR-Cas9-mediated therapeutic editing of *Rpe65* ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax1210
- [99] McCullough KT, Boye SL, Fajardo D, et al. Somatic gene editing of *GUCY2D* by AAV-CRISPR/Cas9 alters retinal structure and function in mouse and macaque. *Hum Gene Ther*, 2019, 30: 571-89
- [100] Khanani AM, Thomas MJ, Aziz AA, et al. Review of gene therapies for age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*, 2022, 36: 303-11
- [101] Yang B, Li G, Liu J, et al. Nanotechnology for age-related macular degeneration. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 2035
- [102] Li P, Kleinstiver BP, Leon MY, et al. Allele-specific CRISPR-Cas9 genome editing of the single-base P23H mutation for rhodopsin-associated dominant retinitis

- pigmentosa. *CRISPR J*, 2018, 1: 55-64
- [103] Wang D, Tai PWL, Gao GP. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 358-78
- [104] Schön C, Biel M, Michalakakis S. Retinal gene delivery by adeno-associated virus (AAV) vectors: strategies and applications. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95: 343-52
- [105] Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 139-42
- [106] Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice. *Nat Med*, 2018, 24: 1519-25
- [107] Chen Y, Zhi S, Liu W, et al. Development of highly efficient dual-AAV split adenosine base editor for *in vivo* gene therapy. *Small Methods*, 2020, 4: 2000309
- [108] Zhi S, Chen Y, Wu G, et al. Dual-AAV delivering split prime editor system for *in vivo* genome editing. *Mol Ther*, 2021, 30: 283-94
- [109] 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: 704-12
- [110] Power DM, Elias NP, Richardson SJ, et al. Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 119: 241-55
- [111] Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015, 86: 1036
- [112] Schmidt HH, Waddington-Cruz M, Botteman MF, et al. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve*, 2018, 57: 829-37
- [113] Morie A, Gertz MM. Hereditary ATTR amyloidosis: burden of illness and diagnostic challenges. *Am J Manag Care*, 2017, 23: S107-12
- [114] Patel KS, Hawkins PN. Cardiac amyloidosis: where are we today? *J Intern Med*, 2015, 278: 126-44
- [115] Merlini G, Coelho T, Waddington Cruz M, et al. Evaluation of mortality during long-term treatment with tafamidis for transthyretin amyloidosis with polyneuropathy: clinical trial results up to 8.5 years. *Neurol Ther*, 2020, 9: 105-15
- [116] Hawkins PN, Ando Y, Dispenzeri A, et al. Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann Med*, 2015, 47: 625-38
- [117] Koike H, Katsuno M. Transthyretin amyloidosis: update on the clinical spectrum, pathogenesis, and disease-modifying therapies. *Neurol and Ther*, 2020, 9: 317-33
- [118] Finn JD, Smith AR, Patel MC, et al. A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing. *Cell Rep*, 2018, 22: 2227-35
- [119] Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2021, 385: 493-502
- [120] Wen J, Cao T, Wu J, et al. Single AAV-mediated CRISPR-Nme<sub>2</sub>Cas9 efficiently reduces mutant *hTTR* expression in a transgenic mouse model of transthyretin amyloidosis. *Mol Ther*, 2022, 30: 164-74
- [121] Batista AR, Gianni D, Ventosa M, et al. Gene therapy approach to FAP: *in vivo* influence of T119M in TTR deposition in a transgenic V30M mouse model. *Gene Ther*, 2014, 21: 1041-50
- [122] Kazemian P, Yu SY, Thomson SB, et al. Lipid nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 genome-editing components. *Mol Pharm*, 2022: 1669-86
- [123] Wittrup A, Ai A, Liu X, et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 870-6
- [124] Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 638-46
- [125] Liu S, Cheng Q, Wei T, et al. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Mater*, 2021, 20: 701-10
- [126] Milano G, Gal J, Creisson A, et al. Myocarditis and COVID-19 mRNA vaccines: a mechanistic hypothesis involving dsRNA. *Future Virol*, 2021: 10.2217/fvl-021-0280
- [127] Daniel S, Kis Z, Kontoravdi C, et al. Quality by design for enabling RNA platform production processes. *Trends Biotechnol*, 2022, 40: 1213-28
- [128] Rothgangl T, Dennis MK, Lin PJC, et al. *In vivo* adenine base editing of *PCSK9* in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 949-57
- [129] Zhao J, Lai L, Ji W, et al. Genome editing in large animals: current status and future prospects. *Natl Sci Rev*, 2019, 6: 402-20
- [130] Chatterjee P, Jakimo N, Lee J, et al. An engineered ScCas9 with broad PAM range and high specificity and activity. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1154-8
- [131] van Haasteren J, Li J, Scheideler OJ, et al. The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 845-55
- [132] Behr M, Zhou J, Xu B, et al. *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: progress and challenges. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 2150-71
- [133] Recchia A. AAV-CRISPR persistence in the eye of the beholder. *Mol Ther*, 2019, 27: 12-4
- [134] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med*, 2018, 24: 927-30
- [135] Yeh CD, Richardson CD, Corn JE. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 1468-78
- [136] Wang D, Zhang F, Gao G. CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and *in vivo* delivery by AAV vectors. *Cell*, 2020, 181: 136-50