

# 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗 $\beta$ -地中海贫血的最新进展

解倩<sup>1†</sup>, 雷双银<sup>2†</sup>, 曲超<sup>3†</sup>, 吴昊<sup>3</sup>, 刘影茹<sup>4</sup>, 黄萍<sup>1\*</sup>, 滕曙智<sup>1\*</sup>

1. 吉林大学白求恩医学部, 病理生物学教育部重点实验室, 长春 130021;

2. 吉林大学白求恩第二临床医学院, 长春 130021;

3. 吉林大学白求恩第一临床医学院, 长春 130021;

4. 吉林大学白求恩第三临床医学院, 长春 130021

† 同等贡献

\* 联系人, E-mail: [huangping@jlu.edu.cn](mailto:huangping@jlu.edu.cn); [steng@jlu.edu.cn](mailto:steng@jlu.edu.cn)

2022-01-21 收稿, 2022-03-29 修回, 2022-03-30 接受, 2022-03-31 网络版发表

吉林大学学术带头人基金(干细胞生物学)、国家自然科学基金(31771624)和吉林省国家级大学生创新创业训练计划(202010183004)资助

**摘要**  $\beta$ -地中海贫血是 $\beta$ -珠蛋白基因(*HBB*)点突变或缺失引起的单基因遗传病, 患者产生溶血性贫血, 其生存主要依赖于反复输血及去铁治疗, 最终导致多器官受损、衰竭, 给个人、家庭和国家带来严重的经济负担。随着基因编辑技术的蓬勃发展, 可能治愈基因突变性疾病的基因治疗应运而生, 其中CRISPR/Cas9基因编辑技术凭借其靶向特异性、经济性等优势备受关注, 并已广泛应用于分子生物学以及生命科学领域的研究。如今CRISPR/Cas9基因编辑技术修复人多能干细胞*HBB*基因、诱导胎儿血红蛋白(HbF)合成或抑制 $\alpha$ -珠蛋白基因(*HBA*基因)表达是治愈 $\beta$ -地中海贫血的三大可行性策略, 相关临床试验已相继开展。本文就CRISPR/Cas9系统的研究进展、作用机制以及在治疗 $\beta$ -地中海贫血的最新研究与应用进行综述, 涉及细胞实验、动物模型、临床试验等内容, 并介绍了CRISPR/Cas9系统衍生的新型基因编辑工具碱基编辑器在该领域的研究应用, 为促进 $\beta$ -地中海贫血从基础研究转向临床治疗提供新的思路 and 方向。

**关键词** CRISPR/Cas9,  $\beta$ -地中海贫血, *HBB*, 基因治疗, 基因编辑

血红蛋白是红细胞内一种负责运输氧气的特殊蛋白质, 由血红素和珠蛋白构成, 珠蛋白是一种四聚体, 由两对不同的珠蛋白链( $\alpha$ 链和 $\beta$ 链)组成<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -地中海贫血( $\beta$ -thalassemia, 以下简称 $\beta$ -地贫)是人 $\beta$ -珠蛋白基因点突变或缺失引起的常染色体隐性遗传病, 因 $\beta$ -珠蛋白完全不能合成(即 $\beta^0$ )或仅能部分合成(即 $\beta^+$ )引起 $\alpha$ 、 $\beta$ 链合成比例失衡, 导致不稳定的游离型 $\alpha$ -珠蛋白堆积、变性及降解, 从而产生细胞毒性活性氧化物, 损害红细胞的成熟和活力, 破坏红细胞膜, 最终导致溶血性

贫血<sup>[2]</sup>。据报道, 全球有8000万~9000万人(约占全球总人口的1.5%)为 $\beta$ -地贫携带者<sup>[3]</sup>。 $\beta$ -地贫好发于地中海地区, 其次为中东、印度、巴基斯坦, 是我国南方常见的遗传性血液病之一, 患病率达2.21%<sup>[4]</sup>, 其中广西、广东、海南、贵州等地区是地贫高发区, 携带率分别约为4.8%、2.54%、2.27%、3.23%<sup>[5-8]</sup>。

$\beta$ -地贫发病的分子机制复杂多样, 其致病基因*HBB*位于第11号染色体, 到目前为止已经确认了200多个致病突变类型, 其中大多数是单核苷酸替换、缺失或寡

**引用格式:** 解倩, 雷双银, 曲超, 等. 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗 $\beta$ -地中海贫血的最新进展. 科学通报, 2022, 67: 2492-2508

Xie Q, Lei S Y, Qu C, et al. Recent advances of CRISPR/Cas9 gene editing in the treatment of  $\beta$ -thalassemia (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 2492-2508, doi: [10.1360/TB-2022-0109](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0109)

核苷酸插入导致移码<sup>[9]</sup>。在中国4种常见突变类型为CD41/42(-CTTT)碱基缺失, CD17(AAG>TAG)、IVS2-654(C>T)和TATAbox28(A>G)点突变, 约占全部病例的90%, 尤以CD41/42(-CTTT)基因型最多<sup>[10]</sup>。根据临床症状的严重程度,  $\beta$ -地贫可分为轻型、中间型、重型三类, *HBB*基因的突变类型决定了 $\beta$ -珠蛋白合成抑制的程度, 从而决定了临床症状的严重程度。重型 $\beta$ -地贫可为 $\beta^0$ 或 $\beta^+$ 纯合子( $\beta^0/\beta^0$ ,  $\beta^+/\beta^+$ ), 或 $\beta^0$ 与 $\beta^+$ 杂合子( $\beta^0/\beta^+$ ); 中间型 $\beta$ -地贫基因型多为 $\beta^0/\beta^+$ 杂合子或 $\beta^+$ 纯合子; 轻型 $\beta$ -地贫多为 $\beta^0$ 或 $\beta^+$ 与正常基因型的杂合子( $\beta^0/\beta$ ,  $\beta^+/\beta$ )<sup>[11]</sup>。重型 $\beta$ -地贫患儿出生后3~12个月开始发病, 呈慢性进行性贫血, 患者可伴有肺动脉高压、血栓形成、腿部溃疡、骨质疏松症、自身免疫性溶血性贫血等严重并发症<sup>[12]</sup>。中间型和重型 $\beta$ -地贫传统的治疗方案主要为输血, 患者因长期输血产生一系列铁代谢障碍性疾病, 需进行铁螯合治疗, 后续因脾功能亢进合并脾肿大常需将脾脏切除<sup>[13]</sup>。这种传统治疗方法费用高昂, 无法根治且长期治疗后会引起器官受损、免疫力低下、过敏反应等不良作用。

近年来, 基因疗法, 如通过慢病毒载体承载目的基因片段介导细胞内靶基因的编辑修饰, 在 $\beta$ -地贫的治疗中得到广泛应用, 但其具有激活原癌基因、增加患肿瘤风险、导入后基因表达不稳定等缺陷<sup>[14]</sup>。随着基因编辑核酸酶如锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录因子样效应物核酸酶(transcriptional activator-like effector nuclease, TALEN)及CRISPR相关核酸酶Cas9(CRISPR/Cas9系统)等不断发展改善, 基于此类切割酶的基因编辑技术得以在基因组水平上实现精确持久的校对与修复, 基因治疗也由此逐渐风靡全球。利

用基因编辑技术不仅可以像应用载体系统一样进行基因添加, 同时还能精确地进行基因的校正、敲除和替换<sup>[15]</sup>。ZFNs、TALEN和CRISPR/Cas9技术都依赖DNA结合蛋白, 而不同的是, 前两者是通过蛋白来识别靶序列, CRISPR/Cas9是通过单向导RNA(single-guide RNA, sgRNA)来识别靶序列, 特异性更强。此外, CRISPR/Cas9技术引起的细胞毒性比TALEN和ZFN更低, 摆脱了TALEN质粒构建时的繁琐操作, 其sgRNA的设计和合成都较为简单快速、成本低廉, 可以实现多个基因同时编辑<sup>[16]</sup>。

总之, CRISPR/Cas9基因编辑技术因其高效、适用、精确等优点广泛运用于细胞、组织、器官水平等基础性研究, 并在药物研发、核酸检测、动物育种等开发性研究中发挥重要作用, 是现代生命科学研究和基因治疗的一项重大技术革新, 成为治疗 $\beta$ -地贫最具前景的治疗方案<sup>[17]</sup>。

## 1 CRISPR/Cas9系统发展历程

CRISPR/Cas9系统的研究可以追溯到1987年(图1), Ishino等人<sup>[18]</sup>在大肠杆菌中发现具有“重复-间隔-重复”这一排列特征的异常重复序列。2002年, 这一独特的重复串联序列家族被正式命名为成簇规律性间隔短回文重复(CRISPR)<sup>[19]</sup>。2005年, 多个研究通过基因测序表明, 虽然CRISPR序列多存在于原核生物中, 但其间隔序列却来源于噬菌体或质粒, 且含有间隔序列的原核生物不会被与该间隔序列同源噬菌体或质粒感染, 由此研究人员提出假设: CRISPR/Cas9可能是一种原核生物免疫系统<sup>[20]</sup>。2007年, 这一假设被Barrangou等人<sup>[21]</sup>证实, CRISPR/Cas9确实是一种细菌获得性免疫

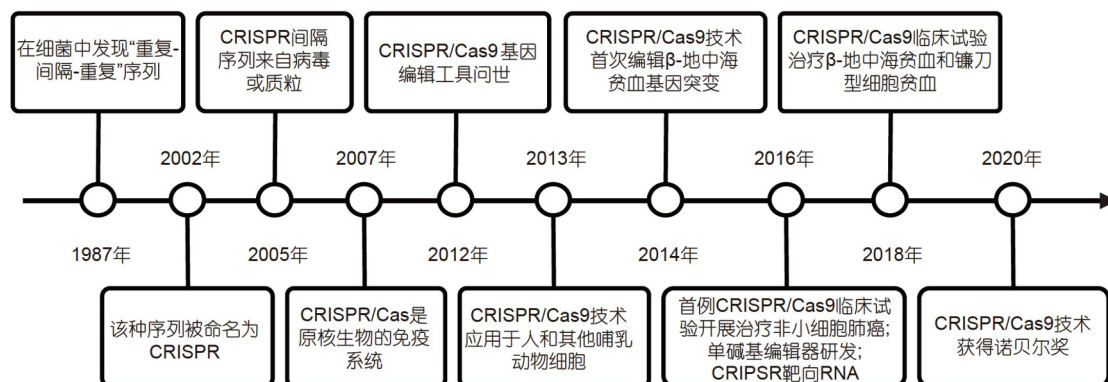


图1 利用CRISPR/Cas9系统治疗 $\beta$ -地中海贫血的发展历程

Figure 1 Development of the CRISPR/Cas9 system for the treatment of  $\beta$ -thalassaemia

系统, Cas酶通过剪切外源DNA发挥其防御功能, CRISPR间隔序列可决定剪切的特异性. 2012年, Jinek等人<sup>[22]</sup>将crRNA(CRISPR RNA)和tracrRNA(trans-activating crRNA)连接成了一种嵌合型RNA, 这种单向导RNA(sgRNA)可以介导从化脓性链球菌中分离的Cas9蛋白在靶点进行DNA精确切割. 此项工作构造了最初的CRISPR/Cas9基因编辑工具并首次报道了crRNA、tracrRNA和Cas9体系可实现DNA编辑, 也因此荣获了诺贝尔奖. 2013年, Cong等人<sup>[23]</sup>使用CRISPR/Cas9技术首次实现了对人和小鼠哺乳动物细胞内源性基因组位点的精确切割、定向修复以及新基因的引入, 证明了CRISPR/Cas9技术对基因编辑的可行性和广泛适用性. 2014年, 两个独立的小组进行了第一次全基因组Cas9筛查<sup>[24,25]</sup>. 同年, Nishimasu等人<sup>[26]</sup>揭示了Cas9与向导RNA和靶DNA复合物的晶体结构. 2020年, Emmanuelle Charpentier博士和Jennifer Doudna博士荣获诺贝尔化学奖, 以表彰她们对CRISPR/Cas9基因编辑技术作出的巨大贡献<sup>[22]</sup>. 随着CRISPR/Cas9系统强大的基因编辑功能及其技术的不断完善, 该技术与疾病的临床治疗也愈发紧密地联系在一起.

## 2 CRISPR/Cas系统组成与作用机制

### 2.1 CRISPR/Cas系统的组成与分类

CRISPR/Cas系统是由成簇规律间隔短回文重复序

列(CRISPR)以及CRISPR相关基因(CRISPR-associated gene, Cas gene)组成, 是细菌和古生菌在长期演化过程中形成的抵御外来遗传物质的一种获得性免疫防御机制<sup>[27]</sup>. CRISPR序列由一系列重复(repeat)序列和间隔区(spacer)相互间隔构成, 其上游含有Cas家族基因. 在同一细菌中, 重复序列其碱基组成和长度高度保守, 基本保持不变; 与其相反的是, 间隔序列因锚定不同的外源基因, 碱基组成具有很大的差异性, 该序列通过给宿主提供一个“记忆性”平台, 以确保修饰后的crRNA能与被锚定的基因精确结合. 前导序列位于CRISPR位点第一个重复序列的上游, 大约200~500 bp, 其序列中富含AT, 并包含重复序列和间隔序列转录的启动子<sup>[28]</sup>. 在靠近CRISPR基因座的位点附近有一组高度保守基因群, 即Cas基因, 其编码的Cas蛋白具有核酸内切酶、解旋酶活性以及与核糖核酸结合的结构域, 可在gRNA引领下锚定靶点进行双链DNA切割(图2)<sup>[29]</sup>.

病毒与CRISPR/Cas系统进行持续不断的入侵与抵御, 导致了Cas基因的快速进化<sup>[30]</sup>. 根据Cas基因排列顺序及效应子复合物的不同, CRISPR/Cas系统可以分为“1类”和“2类”<sup>[31]</sup>, 并进一步细分为6种类型(Type I~VI). “1类”包括Type I、Type III和Type IV, 具有多重亚基效应子复合物如CRISPR相关抗病毒防御复合物(Cascade)复合物、Csm复合物或Cmr复合物. “2类”包括Type II、Type V和Type VI, 只含单个效应蛋白如Cas9、Cpf1、C2c2蛋白等. 其中, Type II仅分布于细

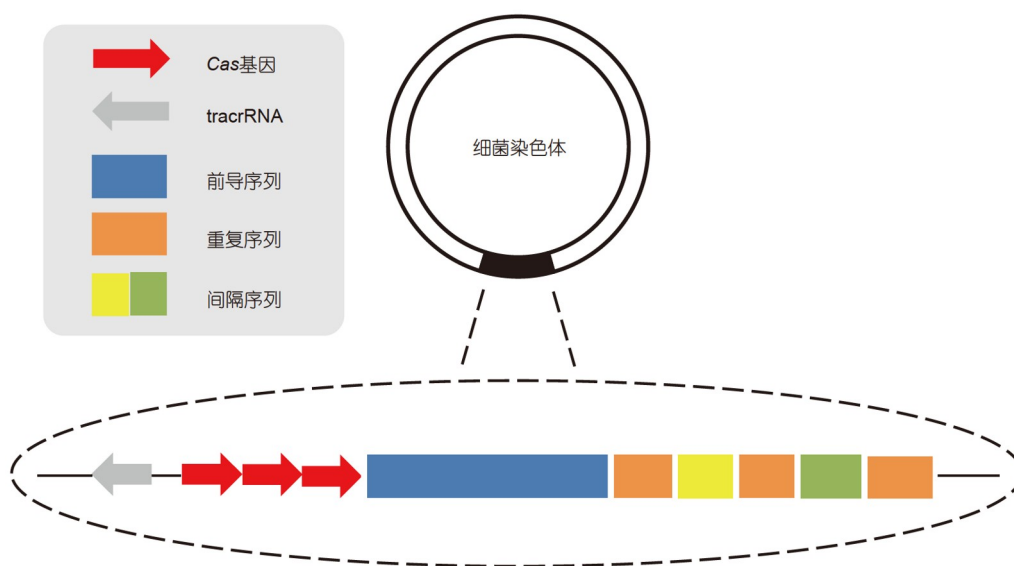


图2 细菌染色体中CRISPR/Cas系统的组成  
Figure 2 Composition of CRISPR/Cas system in bacterial chromosomes

菌, 结构最为简单, 其最关键的标志性蛋白Cas9在crRNA的引导下能锚定靶序列并对DNA双链进行切割<sup>[32]</sup>. 该类型因可操作性与实用性, 被改造成风靡当下的基因编辑工具, 即CRISPR/Cas9基因编辑技术.

## 2.2 CRISPR/Cas系统作用机制

尽管CRISPR/Cas系统类型存在多样性, 但其作用都主要分为3个阶段: 外源DNA捕获、crRNA生物合成和靶向干扰<sup>[33]</sup>. CRISPR基因编辑工具主要由Type II型改造而来, 故以Type II型为例介绍其作用机制.

第一步: 外源DNA的捕获. 入侵的外源DNA被细菌Cas核酸酶切割成短的DNA片段(原间隔序列), 并按照入侵的时间顺序被依次整合到宿主菌染色体CRISPR位点的前导序列后, 由重复序列分隔, 形成对入侵者的“记忆平台”. 外源DNA原间隔序列3'端有一个2~5 bp的原间隔序列邻近序列(protospacer adjacent motif, PAM)<sup>[34]</sup>, 但这段序列没有被整合到宿主菌中. Cas蛋白对间隔序列的识别基于PAM, 且PAM能够作为标志区分自身与外来序列, 因此PAM在原间隔序列的识别整合以及靶向干扰中都起着至关重要的作用<sup>[35,36]</sup>.

第二步: crRNA的生物合成. II型系统中成熟crRNA的加工除需Cas9蛋白的协同外, 还需要一种编码在CRISPR-Cas基因座之外的细菌核酸酶RNase III以及与重复序列有互补序列的tracrRNA参与<sup>[37]</sup>. 首先细菌基因组CRISPR位点的间隔序列与重复序列被共同转录成长链的pre-crRNA, tracrRNA单独转录并与pre-crRNA的重复序列互补结合形成异二聚体; 其次该异二聚体RNA被RNase III剪切形成成熟crRNA, 每个crRNA都包含一个完整的间隔序列和部分重复序列, Cas9在此过程起到稳定pre-crRNA-tracrRNA复合物的作用.

第三步: 靶向干扰. 当外源基因再次入侵时, 成熟的crRNA和tracrRNA结合形成gRNA, 并与Cas9蛋白结合, 形成具有切割活性的核酸蛋白复合物(ribonucleoprotein, RNP). RNP通过crRNA和外源基因匹配, 引导Cas9蛋白识别外源基因的PAM序列并在其上游的3个碱基处进行定点双链切割, 使外源DNA序列受到破坏而无法在宿主体内进行自我复制, 从而消灭外源基因<sup>[22]</sup>.

在Type II型中, pre-crRNA可与同时被转录的tracrRNA互补结合形成双链RNA二聚体, 后续被改造为单链sgRNA<sup>[38]</sup>, 引导Cas9核酸酶对目标DNA进行双

链切割, CRISPR/Cas9基因编辑技术正是基于这一特性实现基因编辑. 断裂DNA的修复主要包括两种途径(图3): 一是非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ), 此修复机制发生在细胞周期G1和M期, 是细胞内主要的DNA断裂损伤修复机制, 但保真性低, 导致修复后发生碱基的缺失或插入(Indel), 从而造成移码突变, 可提前出现终止密码子, 达到基因敲除的目的; 二是同源重组介导的修复(homology-directed repair, HDR), 通常发生在细胞周期S和G2期, 保真性高, 但是发生概率低, 通过提供外源修复模板可以大大提高同源重组发生的概率<sup>[39,40]</sup>.

## 3 CRISPR/Cas9基因编辑技术在 $\beta$ -地中海贫血中的应用

目前异体造血干细胞移植是根治 $\beta$ -地贫的唯一手段, 但与患者组织相容性抗原匹配的供体难寻. 骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是血液系统中的成体干细胞, 可分化产生各系造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs), 进而分化为各系血细胞, 为造血系统提供新的细胞来源, 同时造血干细胞不断自我增殖以维持自身数量的相对稳定. 研究表明, CD34是造血干/祖细胞(HSPCs)的特异性分子标志, 并在HSPCs归巢过程中发挥重要作用<sup>[41]</sup>. 诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是通过体细胞重编程技术从成体细胞获得的类似于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的多能性干细胞, 鼠和人iPSCs分别在2006、2007年问世<sup>[42,43]</sup>. iPSCs来源于病人本身的体细胞, 易于获取, 不会发生免疫排斥反应, 不具有伦理问题, 并且具有类似ESC的自我更新和多向分化潜能<sup>[44]</sup>. 因此, 在CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗 $\beta$ -地贫的相关研究中常使用CD34<sup>+</sup> HSPCs和iPSCs作为疾病模型建立、基因治疗和细胞治疗的重要靶细胞.

### 3.1 建立 $\beta$ -地中海贫血体内外模型

动物模型的建立对生物医学研究和探寻疾病发生发展进程具有不可或缺的作用. 小鼠具有基因序列与人类相近、成本低、繁殖快的特点, 是目前用量最大、用途最广、品种最多的实验动物, 而且小鼠 $\beta$ -珠蛋白基因的缺失会导致与人类 $\beta$ -地贫相似的表型, 证明了 $\beta$ -珠蛋白在小鼠和人类之间结构与功能的保守性<sup>[45]</sup>, 故早在20多年前就已有利用传统的同源重组技术敲除 $\beta$ -地贫相关基因的敲除鼠<sup>[46]</sup>. 新兴的CRISPR/

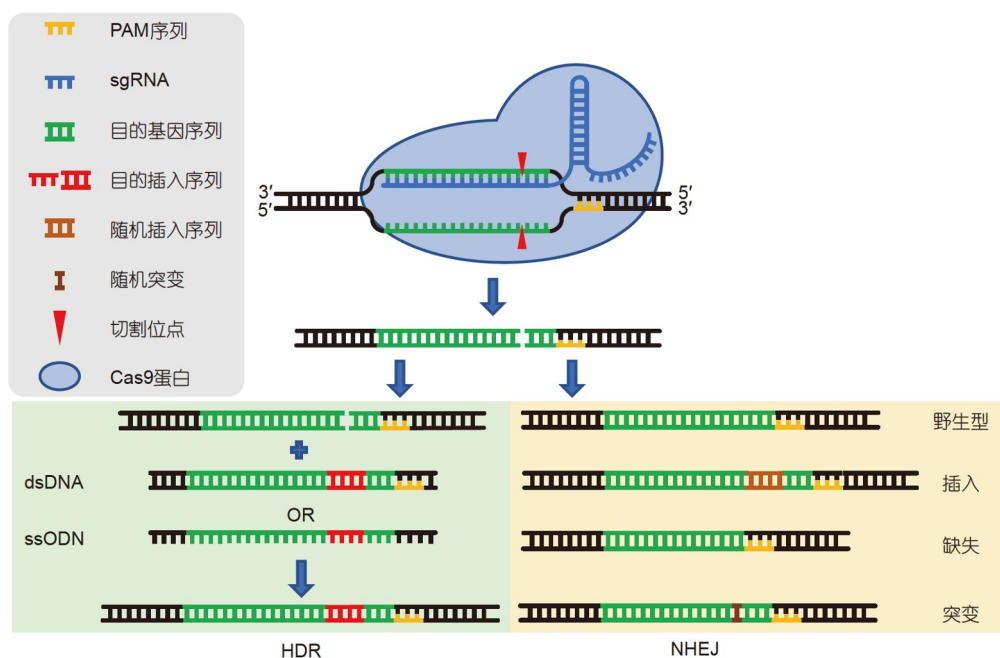


图3 CRISPR/Cas9技术的两种基因编辑策略。Cas9蛋白在PAM序列上游3个碱基处靶向切割DNA双链，同源重组修复(HDR)指细胞可以dsDNA或ssODN作为模板进行精确修复，而非同源末端连接(NHEJ)介导的随机修复可造成插入、缺失或突变。ssODN: 单链寡核苷酸; dsDNA: 双链DNA

Figure 3 Two CRISPR/Cas9 gene editing strategies. Cas9 creates DNA double strand break at three bases upstream of the PAM sequence. Homologous recombination repair (HDR) mediates precise repair using dsDNA or ssODN as a template, while non-homologous end joining (NHEJ)-mediated repair can cause insertion, deletion or mutation. ssODN: Single-strand oligodeoxynucleotide; dsDNA: Double strand DNA

Cas9技术使得构建各种β-地贫体内外模型更快捷方便。2018年，Ghassemi等人<sup>[47]</sup>通过显微注射的方式将编码Cas9蛋白的质粒DNA和两条靶向*Hbb*基因的sgRNAs导入受精卵，靶向删除外显子2和3，最终敲除靶位点的效率约为10%，插入/缺失的突变效率约为20%，提供了一种建立β-地贫小鼠模型的精确方案。Ajami等人<sup>[48]</sup>利用电穿孔将靶向*Hbb-b1*(β血红蛋白，成年型主链)外显子的Cas9-sgRNA表达载体导入小鼠胚胎干细胞，经过筛选得到小鼠*Hbb*基因敲除的单克隆ES细胞，将该ES细胞红系分化后建立了研究地中海贫血的细胞模型。Li等人<sup>[49]</sup>研究利用CRISPR/Cas9系统与不对称单链寡脱氧核苷酸(ssODN)，在K562细胞中构建了*HBB*-28(A>G)点突变的人β-地贫细胞模型，通过高通量测序首次揭示了多种信号途径发生改变，包括对红细胞分化非常重要的PI3K-AKT和JAK-STAT信号水平下调，氧相关途径如细胞对缺氧的响应通路以及缺氧相关基因如GATA家族转录因子上调等，提示它们可能参与*HBB*-28(A>G)突变引起的地中海贫血，可见体内疾病模型的建立对探究β-地贫发生的分子机制和治疗方

案至关重要。

小鼠仅在α-珠蛋白和β-珠蛋白基因簇与人珠蛋白基因在结构及功能上高度同源，而人类胎儿期还表达γ-珠蛋白基因(*HBG1*、*HBG2*)等基因簇，这些差距限制了从临床前研究到临床的转化<sup>[50]</sup>，人们也因此尝试构建其他种属的β-地贫动物模型。2017年，Midic等人<sup>[51]</sup>首次使用Cas9 RNA/蛋白和单个/多个sgRNAs四种不同的组合，通过CRISPR/Cas9技术编辑恒河猴胚胎血红蛋白*HBB*基因，在41个胚胎中检测到18个插入/缺失突变，而且在选定的脱靶位点上没有检测到脱靶效应，其中Cas9蛋白和两种sgRNAs的组合编辑效率最高。虽然被比较的样本数量很少，但Cas9蛋白的使用和sgRNAs浓度的选择对编辑效率的影响不容忽视。该研究首次详细量化了CRISPR/Cas9基因编辑方法对胚胎植入前阶段整个细胞群体的影响，为基因编辑的时机、效率和特异性以及遗传嵌合的整体水平提供了全面的评估，为灵长类动物β-地贫疾病模型的进一步建立打下坚实基础。但是在发生了基因编辑的胚胎中无一例是同源重组修复，说明利用CRISPR/Cas9技术精准修复*HBB*基

因突变具有挑战性。此外,我国学者基于CRISPR/Cas9技术设计了3种靶向*HBB*基因的sgRNA编辑97个食蟹猴胚胎<sup>[52]</sup>,通过T7E1酶切检测结合Sanger测序显示,Cas9核酸酶切割率达到80%,其中5/8达到完全敲除,且未发现脱靶效应。后续,他们在一只已出生纯合子猴中研究发现其不仅在血象上与人类 $\beta$ -地贫患者一致,还存在典型的红细胞生成缺陷、脾肿大、体重偏低等临床表现,是 $\beta$ -地贫灵长类动物模型建立的又一重要突破。

与灵长类动物相比,兔子具有研究成本低、生命周期短等优势;而与小鼠相比,兔子的生理、解剖和遗传学与人类有更多的相似之处。更关键的是,比较基因组学研究显示,兔 $\beta$ -珠蛋白基因簇与人类相近,含有3个功能性珠蛋白基因:胚胎 $\epsilon$ -珠蛋白基因(*HBE*)、胎儿 $\gamma$ -珠蛋白基因(*HBG*)和成年 $\beta$ -珠蛋白基因(*HBB-2*),表明兔是研究人类 $\beta$ -地贫的较好模型。2021年,Yang等人<sup>[53]</sup>构建了首例靶向*HBB-2*基因的 $\beta$ -地贫动物兔模型,利用NHEJ修复Cas9/gRNA诱导的双链断裂,成功获得了*HBB-2*基因插入/缺失突变的基因编辑兔(F0和F1代),并且未在选中的48个潜在脱靶位点检测到脱靶。该模型兔的血液学特征变化和红细胞形态与人类 $\beta$ -地贫患者的相对参数和病理特征相似,准确再现了地贫患者的典型基因型和表型特征。

### 3.2 通过HDR校正病人*HBB*基因原位突变

当Cas9蛋白产生双链断裂后,HDR是进行基因编辑的途径之一,现已广泛运用于*HBB*基因各种常见突变类型的修复治疗(表1)。HDR是一个依赖于模板的过程<sup>[63]</sup>,研究发现相比dsDNA,ssODN作为供体模板具有更高的基因敲入效率。其中Xiong等人<sup>[56]</sup>运用CRISPR/Cas9系统和ssODN供体模板,创新性地用两种策略来纠正 $\beta$ -地贫患者iPSCs中的*HBB* IVS2-654(C>T)突变。其中一步修复法(不引入新的突变直接进行修复)修复效率较低约为4%;为了减少Cas9在靶位点二次切割的发生,该研究建立了两步修复法:第一步修正*HBB* IVS2-654(C>T)突变并在该突变位点上游sgRNA处引入新突变,第二步通过HDR修复新引入的突变,结果显示减少了二次切割的发生,修复效率约为一步修复法的5倍。

为提高靶向整合效率和基因表达效率,Lamsfus-Calle等人<sup>[64]</sup>通过腺相关病毒AAV6传递DNA修复模板结合CRISPR/Cas9和HDR编辑*HBB*基因,构建了一种通

用的修复方法。该研究首先在健康供体HSPCs中通过AAV6转导*HBB*基因修复模板来评估最佳病毒滴度和HDR修复效率。随后,在 $\beta^0/\beta^+$ 、 $\beta^0/\beta^0$ 、 $\beta^+/ \beta^+$ 患者中运用同一方法成功纠正了不同类型的*HBB*突变基因,且HSPCs分化后细胞血红蛋白表达水平显著提高,证明了该方法对 $\beta$ -地贫具有普遍的治疗潜力。血红蛋白E病是由于*HBB* CD26(G>A)突变引起的一种常染色体不完全显性遗传疾病,因产生的异常血红蛋白E(HbE)易解离为单体而被氧化变性沉淀,形成包涵体(即海因小体),从而导致血管内外溶血<sup>[65]</sup>。HbE/ $\beta$ -地贫是血红蛋白E病和 $\beta$ -地贫的双重杂合性疾病,是东南亚成人最常见的地中海贫血综合征,研究表明,在一个等位基因中校正HbE突变比纠正 $\beta$ -珠蛋白基因突变更容易<sup>[66]</sup>。基于上述特点,Wattanapanitch等人<sup>[60]</sup>使用CRISPR/Cas9系统和ssODN供体模板仅对一个等位基因中的HbE突变进行遗传校正,通过校正后的iPSCs能分化为造血干细胞,可用于患者的自体移植,但分化而来的红系细胞数目有限且*HBB*基因表达效率无明显提升,他们分析后者的原因可能是培养体系中血红蛋白产生所需的转录因子浓度过低。

为分析不同基因编辑技术对*HBB*基因修复的可行性和编辑效应,早在2015年,Xu等人<sup>[55]</sup>将TALENs和CRISPR/Cas9分别与piggyBac转座子供体结合应用校正*HBB* IVS2-654(C>T)突变时,发现TALENs比CRISPR/Cas9介导了更高的同源基因靶向效率,CRISPR/Cas9则显示出更高的DSB效率。不同基因编辑技术有其独特的作用机制和编辑优势,Antony等人<sup>[62]</sup>同时比较了3种基因编辑工具对*HBB*基因IVS1-110(G>A)的靶向效率,发现CRISPR/Cas9的编辑效率高于TALENs和ZFNs。该研究还表明,相比传统Cas9长期表达体系,使用瞬时表达的Cas9 mRNA体系和ssODN在HSCs中引入新的DNA序列在没有病毒载体的情况下是可行的。但遗憾的是,该研究没有评估编辑后细胞的分化情况和 $\beta$ -珠蛋白表达水平。这提示,为全面探讨各基因编辑技术对*HBB*基因的修复效率和在未来临床应用中的疗效与优势,编辑后细胞*HBB*基因能否长期进行正常的转录和翻译过程,回输入体内细胞的可移植性、增殖性、功能性如何,以及是否会产生严重的不良影响等问题有待进一步系统剖析。

### 3.3 调控 $\gamma$ -珠蛋白基因表达

$\gamma$ -珠蛋白基因(*HBG*)是一种在胎儿时期大量表达

表1 利用CRISPR/Cas9技术介导的HDR在治疗β-地中海贫血的研究

Table 1 CRISPR/Cas9 mediated HDR in the treatment of human β-thalassemia

HBB基因突变类型	编辑细胞	转染方式	编辑/修复效率	编辑后体内/体外效应	发表年份	参考文献
CD17(A>T)	β-地贫iPSCs	电穿孔	16.67%	校正后iPSCs分化为造血干细胞、红系巨核细胞祖细胞和红系前体细胞的百分比大大提高,造血相关转录因子表达上调	2015	[54]
IVS2-654(C>T)	β-地贫iPSCs	电穿孔	12.3%	编辑后iPSCs在体外形成了典型的胚胎体,在SCID <sup>a)</sup> 小鼠体内形成畸胎瘤	2015	[55]
	β-地贫iPSCs	电穿孔	21%	校正后iPSCs成功向红系前体细胞EPCs分化,并出现β-珠蛋白表达(对照组几乎无表达)	2019	[56]
CD41/42(-TCTT)	β-地贫iPSCs	未说明	未说明	校正后的iPSCs移植入NSI <sup>b)</sup> 小鼠体内造血分化后产生β-珠蛋白,且没有观察到肿瘤形成	2016	[57]
	β-地贫iPSCs	磷酸钙法	4.5%	纯化的克隆保留了完全多能性并显示出正常的核型,分化后恢复了HBB蛋白的表达	2016	[58]
	β-地贫iPSCs	电穿孔	54%	由校正后iPSCs在体外分化的红细胞HBB基因的表达恢复	2017	[59]
	β-地贫iPSCs	电穿孔	2.9%	校正后iPSCs经小鼠骨髓基质细胞系OP9共培养系统以及红系培养液培养后恢复造血分化时的HBB蛋白表达	2018	[60]
-28(A>G)和CD41/42(-TCTT)	β-地贫iPSCs	电穿孔	23.5%	校正后的iPSCs的HBB基因转录表达比亲代iPSCs增加了约16倍	2014	[61]
-28(A>G)	K562细胞	电穿孔	未说明	未说明	2020	[49]
IVS1-110(G>A)	正常供体CD34 <sup>+</sup> HSCs	电穿孔	8%	未说明	2018	[62]

a) SCID小鼠: 严重联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency, SCID)小鼠; b) NSI小鼠: NOD-SCID-IL2rg小鼠, 是通过TALEN基因敲除技术, 在NOD/SCID背景小鼠中敲除*IL2rg*基因获得的第三代免疫缺陷小鼠新品系

的血红蛋白基因, 编码生成血红蛋白γ链(γ-globin). 两条γ链与两条α链形成四聚体(α<sub>2</sub>γ<sub>2</sub>), 即胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF)<sup>[67]</sup>. 在胎儿出生后, HbF蛋白逐渐被血红蛋白A(HbA, α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>)取代<sup>[68]</sup>. 通过恢复*HBG*基因表达, 可使γ链合成增加, 调整α链与非α链比例, 使HbF蛋白生成增多, 以缓解由HbA蛋白减少引起的β-地贫的临床症状<sup>[69]</sup>. 早期研究表明, β-地贫合并遗传性胎儿血红蛋白增高症(HPFH)患者会表现出较轻的临床症状或不表现临床症状, 这提示可以通过恢复HbF蛋白表达对β-地贫进行治疗. 下面介绍通过不同调控γ-珠蛋白基因表达方法提高HbF蛋白水平的研究(表2).

### 3.3.1 靶向*BCL11A*基因红系增强子

*HBG*基因受到多种转录因子的调节, 人类全基因组关联分析发现了*BCL11A*、*Xmn1-HBG2*、*HMIP-2*三个与HbF蛋白表达相关的基因位点<sup>[81,82]</sup>, 其中有关*BCL11A*基因的研究与应用取得了长足的进展. 研究发现, *BCL11A*基因表达的BCL11A蛋白, 对HbF蛋白的表达起负性调控作用. 在*BCL11A*基因的第二内含子区域, 存在一个特异性红系增强子, 其具有3个DNaseI敏感位点(+55、+58、+62 kb), 其中+58位点可与转录因子

GATA1结合, 增强*BCL11A*基因表达<sup>[83]</sup>. BCL11A蛋白在淋巴细胞生长发育过程中起到重要作用, 因此对特异性红系增强子进行编辑可以恢复HbF表达, 而不影响淋巴细胞成熟. Khosravi等人<sup>[84]</sup>在K562细胞中使用两个序列不同sgRNA切除包含*BCL11A*基因的红系增强子GATA1结合域的200 bp的片段, 在66.6%的克隆中检测到了精确的基因编辑, 在18.75%的克隆中出现了HbF蛋白水平的显著升高. 无独有偶, Wu等人<sup>[77]</sup>通过电穿孔技术结合sgRNAs核糖核蛋白(RNP)复合物靶向β-地贫患者来源的造血干细胞特异性红系增强子GATA1结合域, 利用NHEJ造成剪切位点处的微小插入或缺失, 从而阻断GATA1与*BCL11A*红系增强子结合, 降低*BCL11A*基因表达水平, 重新启动HbF蛋白表达. 结果表明, 在造血干细胞分化后, 红细胞中γ/α-珠蛋白比例达到正常(63.6%), 红细胞形态恢复正常, 且未发现脱靶效应. 基于靶向破坏*BCL11A*红系增强子恢复HbF蛋白表达方案表现出卓越的安全性及有效性、不影响淋巴细胞成熟且由于NHEJ较HDR编辑效率更高, 目前使用CRISPR/Cas9治疗β-地中海贫血的临床试验大多围绕该位点开展.

表 2 通过调控*HBG*相关基因表达治疗 $\beta$ -地中海贫血的研究

Table 2 Study of regulating gene expressions in the treatment of beta thalassemia

年份	编辑细胞	转染方式	编辑位点	编辑/修复效率	编辑后体内/体外效应	参考文献
2016	K562细胞	脂质体	<i>KLF1</i> 基因上第2和第3外显子中的3个位点	最高26%	$\gamma$ -珠蛋白mRNA水平: 3个编辑组分别为对照组的8.1、7.7和1.8倍 HbF蛋白水平: 3个编辑组分别上升至5.2%、4.8%和1.2%, 对照组为0.5%	[70]
2016	HUDEP-2细胞	慢病毒	<i>HBG1/2</i> 基因启动子	最高77%	HbF蛋白水平: 两个编辑组分别上升到约17%和3%, 对照组中无表达	[71]
2018	K562细胞	慢病毒	<i>HBG</i> 基因启动子上3个SOX6转录因子的结合位点	最高30%	$\gamma$ -珠蛋白mRNA水平: 3个编辑组比对照组分别增加了1.3、2.1和1.1倍	[72]
2018	HUDEP-2细胞	未说明	血红素调节抑制剂HRI	最高98%	65%~80% $\gamma$ -珠蛋白的表达抑制得到恢复 mRNA水平: $\gamma/(\gamma+\beta)$ 比值由10%上升至60%	[73]
2018	HUDEP-2细胞	核转染	BCL11A和ZBTB7A结合位点	未说明	蛋白水平: HbF/(HbF+HbA)比值由0%上升至40%	[74,75]
2019	CD34 <sup>+</sup> HSPCs	电穿孔	<i>HBG1/2</i> 基因启动子序列	最高80%	HbF蛋白水平试验组为42.9%±1.5%, 对照组为1.3%±0.5%	[76]
2019	CD34 <sup>+</sup> HSPCs	电穿孔	<i>BCL11A</i> 红系特异增强子	最高90.7%	$\gamma$ -珠蛋白水平(相对于 $\alpha$ -珠蛋白)平均上升至63.6% HbF蛋白水平: 编辑组为37.6%, 对照组为9.1%	[77]
2019	HUDEP-2细胞	核感染	<i>HBG</i> 基因启动子	未说明	$\gamma$ -珠蛋白mRNA和HbF蛋白水平显著增加	[78]
2020	CD34 <sup>+</sup> HSPCs	电穿孔	<i>KLF1</i> 、 <i>BCL11A</i> 和 <i>HBG1/2</i> 基因区	最高91%	$\gamma$ -珠蛋白mRNA水平: 3个编辑组分别为对照组的5倍以上、4倍以上、6.5倍以上 HbF蛋白水平: 3个编辑组分别高达25%、39.5%、41.9%, 对照组小于10%	[79]
2020	$\beta$ -地贫HSPCs	电穿孔	<i>HBG1/2</i> 基因启动子	平均85%	$\gamma$ -珠蛋白mRNA水平: 编辑组的范围为23%~64%, 而未编辑对照组为7%~34%	[80]

### 3.3.2 靶向*HBG*基因启动子BCL11A结合位点

BCL11A结合位点位于*HBG*基因近端启动子中转录起始位点上游115 bp区域, 该位点发挥转录抑制作用, 并由多个HPFH的自然突变覆盖<sup>[71,85,86]</sup>, 其具体位点与作用机制直到2018年才由ChIP-seq和CUT&RUN分析技术阐明<sup>[74,87]</sup>. Traxler等人<sup>[71]</sup>使用CRISPR/Cas9基因编辑技术结合慢病毒载体与sgRNAs靶向HUDEP-2(人脐血来源红细胞祖细胞系-2)细胞系中*HBG1*基因启动子, 利用NHEJ建立突变, 模拟自然存在的导致HPFH 13 nt(-102~114)的缺失. 体外实验表明, HbF蛋白水平上升至17%(对照组无HbF蛋白的表达), HbF/(HbF+HbA)%比值上升, 在CD34<sup>+</sup> HSPCs中HbF蛋白水平上升至20%(对照组5%). 在此基础上, Métais等人<sup>[76]</sup>通过CRISPR/Cas9切断镰刀型细胞贫血(SCD)患者CD34<sup>+</sup> HSPCs的-115位点, 并将其输入免疫缺陷小鼠进行临床前研究. 实验结果表明, 编辑效率达到70%, HbF水平平均达到30%~40%, 具有临床治疗意义. 对*HBG1*和

*HBG2*基因同时切割可切除一个5 kb的片段, 但这一缺失被证明对造血分化无害, 该研究也未检测到脱靶效应. 在后续对比分析研究中发现, 针对*HBG*基因启动子的基因编辑效率上略高于编辑*BCL11A*基因, 而RNA-seq分析显示其安全性稍差, 此外研究通过GUIDE-seq在编辑*HBG*基因启动子的sgRNA中检测到一个低频脱靶, 其影响尚不能确定<sup>[79]</sup>. 事实上, Humbert等人<sup>[88]</sup>使用CRISPR/Cas9技术编辑恒河猴的HSPCs中*HBG*基因启动子上BCL11A结合位点, 并将编辑细胞自体回输后, 经过超过一年的观察发现, 编辑细胞可以持续增殖并稳定地产生HbF蛋白, 未显示出远期的毒性效应. 这一研究支持了编辑*HBG*基因启动子治疗 $\beta$ -地贫的可行性和远期安全性, 推动了该策略向临床转化的进程. 在碱基编辑器问世后, 这一位点也得到了持续的关注与研究. 近来, Edilas Medicine公司开发的EDIT-301疗法, 使用CRISPR/Cas12a靶向*HBG*基因启动子BCL11A结合位点以治疗SCD和 $\beta$ -地贫, 前者临床试验(NCT04853576)



已进入临床I/II期,后者已获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准将于近期开展.相信经过更加系统的评估,该策略可以成为另一种可选择的 $\beta$ -地中海贫血临床治疗方法.

### 3.3.3 靶向其他*HBG*基因转录因子和表观遗传因子

其他的转录因子如GATA1、SOX6、KLF1等也参与调控*HBG*基因表达. Martyn等人<sup>[78]</sup>研究在HUDEP-2细胞系中引入*HBG*基因近端启动子-113 A>G突变(一种自然HPFH突变),该突变不会改变转录因子BCL11A与该位点的结合,而为转录激活因子GATA1提供了一个新的结合位点,从而驱动了HbF蛋白的生成.转录因子KLF1可以直接激活*BCL11A*基因从而抑制HbF蛋白表达<sup>[89]</sup>,在*KLF1*基因第2外显子末端第288密码子处存在一个可导致HPFH的无义突变,早在2016年,Shariati等人<sup>[70]</sup>就通过破坏该区域上下游的3个位点分别导致了8.1、7.7和1.8倍的 $\gamma$ -珠蛋白mRNA水平增加,而后续的对比分析表明针对*KLF1*基因的编辑可能导致细胞的功能失调,不适用于临床,相较而言*BCL11A*红系增强子位点是安全且有效的编辑位点<sup>[79]</sup>.SOX6可以结合在*HBG*基因启动子上,并与BCL11A共同作用,抑制 $\gamma$ -珠蛋白基因的转录<sup>[90,91]</sup>,因此Shariati团队<sup>[72]</sup>后续又通过破坏*HBG*基因启动子上3个SOX6转录因子的结合位点,阻止SOX6与*HBG*基因结合,最高可导致2.1倍的 $\gamma$ -珠蛋白mRNA水平增加.这些转录因子在细胞增殖、分化、成熟过程中功能众多,对其进行编辑可能产生潜在的不良影响,因此尽管对这些基因及结合位点的编辑能够提升HbF蛋白水平,但迄今为止没有大型动物模型和临床试验.使用CRISPR文库能够发现新的HbF蛋白调控因子,进一步阐明HbF蛋白调控的分子机制. Blobel研究组<sup>[92]</sup>在HUDEP-2细胞中通过CRISPR/Cas9靶向482个蛋白激酶结构域进行了功能缺失型基因筛选,发现了 $\gamma$ -珠蛋白新的调控因子HRI激酶和它下游的转录因子AFT4,提出了HRI>eIF2a-p>AFT4>BCL11A的信号调控通路.除此之外,表观遗传因子也在HbF的表达中起重要作用. Gong等人<sup>[93]</sup>在1142名 $\beta$ -地贫患者中研究甲基转移酶I(DNMT-I)变异与地贫表型的关系, DNMT-I可以使DNA甲基化,从而抑制*HBG*基因表达.研究发现, S878F错义突变可使DNMT-I结构不稳定、功能丧失,使其与*HBG*基因相关转录因子结合减少, *HBG*基因启动子招募减少,从而去除DNMT-I对*HBG*基因的抑制.研究表明,利用CRISPR/Cas9在HUDEP-2细胞中引入该突变可使 $\gamma$ -珠蛋白的

mRNA与蛋白表达量增加,也为恢复HbF蛋白表达提供了一个新的调控位点.

相较于修复突变的*HBB*基因,恢复HbF蛋白表达的治疗策略表现出一些优势.首先,这一策略展示出良好的泛用性,理论上对各种类型的地贫突变都能够产生治疗效果;其次,恢复HbF蛋白表达可以通过破坏或沉默其调控基因,即NHEJ的方法实现. NHEJ活跃于细胞周期的G1和M期,具有较高的发生率,不需要额外的供体模版,在技术上更简单,而精准修复*HBB*突变基因通常基于HDR,发生率低且有可能导入错误突变<sup>[76]</sup>.更重要的是,从该领域现有的临床试验来看,该方法取得了重大突破.目前唯一一例详细公布结果的临床试验(NCT03655678)旨在通过向患者体内输注经CRISPR/Cas9技术破坏BCL11A红系增强子的自体CD34<sup>+</sup>HSPC,以达到治疗目的.2020年,该临床试验初步结果报告了一位 $\beta^0/\beta^+$ 19岁女性患者,经治疗后第4个月时,患者体内的血红蛋白水平就已经恢复正常(12.1 g/dl),并在截稿为止的18个月内维持正常水平<sup>[94]</sup>,显示出临床应用该基因编辑疗法的巨大潜力.

### 3.4 抑制*HBA*基因表达

$\alpha$ -地中海贫血( $\alpha$ -地贫)与 $\beta$ -地贫发病机制相似,有临床数据表明,当 $\alpha$ -地贫与 $\beta$ -地贫共遗传时,*HBA*和*HBB*基因的表达都减少,因而游离 $\alpha$ -珠蛋白链数量减少,珠蛋白链比例失衡程度减轻,在红系细胞中形成毒性沉淀物减少,当 $\alpha$ -珠蛋白表达量降到正常值的75%~25%之间都可显著改善 $\beta$ -地贫患者的临床症状<sup>[95]</sup>.这提示,通过抑制 $\alpha$ -珠蛋白基因表达是治疗 $\beta$ -地贫的又一新策略.

*HBA*基因的表达由位于基因上游10~50 kb的4个增强子(MCS-R1至R4)控制<sup>[96,97]</sup>,其中MCS-R2(又称HS-40),是调控*HBA*基因表达的最强增强子<sup>[98]</sup>. Mettananda等人<sup>[99]</sup>研究了一例自然突变导致MCS-R2片段缺失的病例,发现该突变导致且仅导致 $\alpha$ -地贫的产生.他们更进一步用CRISPR/Cas9技术删除HbE/ $\beta$ -地贫病人CD34<sup>+</sup>细胞基因组中的MCS-R2片段,发现由编辑后CD34<sup>+</sup>细胞诱导分化的红细胞中 $\alpha$ -珠蛋白表达减少且病理性珠蛋白链失衡得到纠正.此外,小鼠异体移植试验表明,一部分编辑后的CD34<sup>+</sup>细胞是长期再生的造血干细胞(LT-HSC),证明了该方法治疗 $\beta$ -地贫的潜力,但是这种方法只适用于 $\beta$ -珠蛋白有部分表达的病人,即 $\beta^+$ 病人.近来, Pavani等人<sup>[100]</sup>联合了两种治疗手段对 $\beta$ -

地贫细胞模型(敲除*HBB*基因的HUDEP-2细胞, HU-DEP2- $\beta^0$ )进行基因编辑, 利用同一个gRNA, 首先通过Cas9 RNP靶向 $\alpha$ -珠蛋白基因亚型*HBA2*基因的5'端非翻译区, 敲除了*HBA2*基因, 降低了 $\alpha$ -珠蛋白的表达水平; 之后使用腺相关病毒AVV6载体在同一Cas9切割位点通过HDR敲入修饰过的*HBB*基因, 使其受*HBA2*基因的启动子调控, 启动异位*HBB*基因表达, 使珠蛋白水平恢复到约正常值的40%。在 $\beta^+$ 和 $\beta^0$ 患者来源的HSPCs中应用该方法, 细胞既保留了分化潜能又使 $\alpha/\beta$ -珠蛋白失衡得到改善, 仅表现出少许和双链切割相关的细胞毒性。在K562细胞中的后续研究表明, 可使用nCas9(Cas9的一种突变形式, 导致在目标位点产生单链切割而不是双链断裂)进行*HBA2*基因敲除和*HBB*基因敲入, 尽管nCas9编辑效率不如Cas9, 但是nCas9不会导致插入或缺失突变, 可减轻细胞毒性, 在临床应用上仍大有可为。为减少珠蛋白比例失衡程度, 除了对*HBA*基因直接编辑外, Cosenza等人<sup>[101]</sup>运用CRISPR/Cas9技术成功修正 $\beta^0$ 39(*HBB*第39个密码子CAG密码子突变为UAG终止密码子)纯合子突变患者的红系前体细胞*HBB*基因后, 发现修正的细胞能够表达大量的HbA蛋白, 相当于血红蛋白总量的94.08%。更重要的是, 在编辑过的红系前体细胞中, 过量的游离 $\alpha$ -珠蛋白链大量减少, 并且与HbA蛋白的增加显示了高相关性。该研究可能为CRISPR/Cas9技术编辑*HBB*基因联合其他方法(如使用化学诱导剂诱导HbA蛋白生成)治疗 $\beta^0$ 39患者提供了一种有效方案。

目前, 有关抑制 $\alpha$ -珠蛋白基因表达的基础性研究和临床试验少, 显然, 要将这一策略运用于 $\beta$ -地贫的临床治疗, 需要重点攻克的问题包括两方面内容: 一是选择性地调控 $\alpha$ -珠蛋白表达量, 若 $\alpha$ -珠蛋白表达量小于25%会由于血红蛋白生成量急剧减少导致原本贫血状态加以恶化, 而表达量过多则无法起到减轻 $\alpha/\beta$ -珠蛋白链比例失衡的作用; 二是高靶向性地调控 $\alpha$ -珠蛋白表达, 合理设计基因编辑系统, 评估不良反应, 避免 $\beta$ -珠蛋白的产生受到影响<sup>[102]</sup>。

## 4 其他基因编辑技术在治疗 $\beta$ -地贫的研究

### 4.1 CRISPR/Cas9衍生技术单碱基编辑器

单碱基编辑器(base editors, BEs)是在CRISPR/Cas9技术的基础上发展而来的一种能实现单个碱基编辑的新型基因编辑工具, 由David Liu实验室<sup>[103]</sup>在2016年首

次报道, 其将dCas9与脱氨酶相结合, dCas9单链切割目标DNA, 脱氨酶使缺口末端的碱基脱氨, 并在复制过程中替换为其他碱基, 根据脱氨酶的不同分为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)。BEs能够介导精确的基因编辑而不需要供体模板和双链DNA断裂, 在经过多次的更新迭代后, 已经可以编辑所有4种转换碱基突变, 也展示出更高的编辑效率(ABE7.10在人类细胞中约50%)与较好的安全性<sup>[104]</sup>。

Liang等人<sup>[105]</sup>应用优化的第三代单碱基编辑器(BE3)首次在 $\beta$ -地贫患者来源的皮肤成纤维细胞和构建的含*HBB*-28(A>G)突变的人胚胎中修复了该突变, 在皮肤成纤维细胞中修复效率约为20%, 在克隆胚胎细胞中为22.9%。尽管大多数修复的细胞为杂合子、胚胎为嵌合体, 但是部分表达的*HBB*基因足以改善地贫症状。该研究在293T细胞和胚胎细胞中发现了*HBB*-28位点的意外G>C碱基颠换, 可能为碱基切除修复效应(BER)<sup>[103]</sup>所致, 表明需要开发新的方法抑制BER。另外, 研究还在293T细胞和皮肤成纤维细胞中发现了-25 G>A突变, 虽然未在胚胎细胞中发现, 但仍提示其具有潜在的安全风险, 故使用YEE-BE3(一种改良BE3, 窗口更小)进行优化以防止该突变发生, 在使用YEE-BE3的重组人胚胎细胞中, 两种突变均未出现, 但脱靶效应须由全基因组分析进一步确定。除了原位修复外, BEs也可以调控 $\gamma$ -珠蛋白基因表达达到治疗目的。比如Zeng等人<sup>[106]</sup>利用优化的BE3实现了对地贫患者( $\beta^0\beta^+$ 和 $\beta^0\beta^E$ 基因型)CD34<sup>+</sup> HSPCs中针对红系特异增强子*BCL11A*基因+58位点的高效基因编辑(90%以上), 结果发现编辑后的CD34<sup>+</sup>细胞体外红系分化后, *BCL11A*基因的表达水平显著降低, 同时HbF含量得到极大提升。此外, 该研究还尝试通过BE3同时纠正 $\beta$ -地贫患者的*HBB*-28(A>G)点突变并靶向*BCL11A* +58位点, 结果发现多点编辑和单点编辑相比, 效率相近, 但是 $\beta$ -和 $\gamma$ -珠蛋白表达水平都提高, 分化后的红细胞更加成熟、体积和形态都恢复至接近于健康细胞水平。另外, Wang等人<sup>[80]</sup>利用hA3A-BE3靶向*HBG*基因启动子区*BCL11A*的结合位点以解除其对*HBG*基因的表达抑制, 发现在 $\beta$ -地贫患者来源的HSPCs中编辑效率达到85%,  $\gamma/\alpha$ -珠蛋白蛋白mRNA比值达到126%, 且插入缺失频率低(2%), 未发现脱靶效应, 证明这是一种潜在可行的 $\beta$ -地贫治疗策略, 而*BCL11A*结合位点是单碱基编辑器的理想靶点。

相比CRISPR/Cas9技术, 碱基编辑技术不需要

DNA双链断裂或提供供体模板,对DNA损伤更小,编辑效率明显提高.此外,由于无需依赖细胞周期,BEs在各种动植物中得以广泛运用,被*Science*评为2017年度十大科学技术之一,开启了精准编辑基因组的又一新篇章.早期的单碱基编辑器具有明显的DNA和RNA脱靶效应以及意外的核苷酸转换,经过改良其安全性已有显著的提升.张学礼和毕昌昊团队<sup>[107]</sup>及Joung团队<sup>[108]</sup>同时创建出新型糖基化酶碱基编辑器(glycosylase base editor, GBE),用胞嘧啶脱氨酶-nCas9-尿嘧啶糖基转移酶(Ung)蛋白复合物,将胞嘧啶脱氨酶形成的尿嘧啶,然后脱去尿嘧啶建立无嘌呤/无嘧啶(AP)位点,利用自身DNA损伤修复系统首次在哺乳动物细胞中实现C-G碱基特异性颠换,有望实现任意碱基编辑. BEs在 $\beta$ -地贫的基因治疗相关研究中具有很大潜力,目前国内外暂无利用BEs治疗 $\beta$ -地贫的详细临床试验报道.

## 4.2 先导编辑器

BEs虽然基因编辑功能强大,但是目前仅可以编辑4种基因转换和C-G颠换,没有做到任意碱基置换.在此基础上,David Liu课题组<sup>[109]</sup>研发了先导编辑器(prime editor, PE),他们将nCas9蛋白与逆转录酶(RT)结合,构造出融合蛋白,并在sgRNA的末端添加一段新RNA(pegRNA),pegRNA由PBS(primer binding site)序列、包含待编辑碱基的RT模板和引导序列组成.靶DNA链3'端作为引物与PBS序列互补,对RT模板进行逆转录,新生成的DNA片段将原序列替换,从而实现基因编辑. PE在不依赖DSB和供体DNA的条件下便可有效编辑所有12种点突变,此外还能有效实现多碱基的精准插入(最多可插入44 bp)和删除(最多删除80 bp),这使得PE在理论上能够修正绝大部分的致病等位基因.使用PE3可在HEK293T细胞中导入和修复导致SCD的*HBB*基因E6V突变,修复的编辑效率可达58%,插入缺失频率约为1.4%<sup>[109]</sup>.  $\beta$ -地中海贫血与镰状细胞病同为 $\beta$ -血红蛋白病,这提示PE也具有编辑 $\beta$ -地中海贫血致病基因的潜力.

PE在CRISPR/Cas9技术和BEs的基础上能够实现更精准更灵活的基因编辑,但也面临着诸多挑战,比如需进一步提升在多种细胞中的编辑效率、准确评估其脱靶效应扩大编辑窗口以及优化大分子量融合蛋白的胞内递送等. PE自诞生以来快速更新迭代不断完善,将有可能成为未来 $\beta$ -地贫基因治疗的新热点和方向.

## 5 结语与讨论

20世纪80年代诞生的基因编辑技术,为基因突发性疾病的治愈带来希望,其中CRISPR/Cas9基因编辑技术能够以最小的副作用恢复正常的 $\beta$ -珠蛋白功能<sup>[110]</sup>,在 $\beta$ -地贫的治疗中具有里程碑式的意义.另外,CRISPR/Cas9基因技术衍生的新的基因编辑工具也为 $\beta$ -地贫的治疗带来了新的曙光.目前,基于CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗 $\beta$ -地贫主要有3种可行方案,包括通过HDR对突变*HBB*基因DNA位点进行精确修复、通过NHEJ编辑*HBB*相关基因重新激活 $\gamma$ -珠蛋白基因表达或编辑*HBA*基因抑制 $\alpha$ -珠蛋白表达平衡 $\alpha/\beta$ -珠蛋白链比例.前文中已对上述提及的基因疗法部分优势或(和)局限性进行了讨论,此外还需考虑以下问题.

(1) 开发更加安全高效的递送方式. CRISPR/Cas9系统的主要递送方式包括质粒、RNP和病毒载体.质粒是HDR的主要供体类型,其往往会引起强烈的免疫反应和严重的细胞毒性<sup>[111]</sup>. RNP(Cas9-gRNA复合物)结合电穿孔的递送方式亦是当下主流,但电穿孔会对细胞膜上磷脂双层造成损害,更适用于体外实验.相比之下,AAV能将CRISPR/Cas9系统整合到哺乳动物细胞的腺相关病毒定点整合的AAVS1位点,具有广泛的亲和性,是目前最安全的病毒传递方法,适合在体内应用.但AAV通常只能包裹约4.7 kb大小的基因,*Cas9*基因的大小为约4.3 kb,所以*Cas9*基因和sgRNA需要通过两个单独的AAV载体分别传递<sup>[112]</sup>.基于多学科交叉不断发展的非病毒载体(如脂质体、纳米材料等)具有高效、多功能的优势,有望解决上述提及的细胞毒性、生物安全和包裹量等问题<sup>[113]</sup>.

(2) 提高体外HDR编辑效率.传统的CRISPR/Cas9技术同源重组效率低,目前没有关于HDR基因编辑效率>50%的报道,这种低编辑效率与寡核苷酸供体诱导靶细胞激活IFN- $\gamma$ 介导的炎症免疫反应、HSPCs(尤其是原始HSCs)对HDR编辑的低敏感性等因素有关<sup>[114]</sup>.有越来越多的研究表明,通过添加抑制NHEJ修复途径的小分子化合物、优化sgRNA的设计、运用Cas9类似物与突变体、调整Cas9/sgRNA浓度等方法可以改善CRISPR/Cas9技术非同源末端连接修复的问题<sup>[115]</sup>.

(3) 发展干细胞培养技术与移植技术.经编辑后的iPSCs培养和维持困难,在体外分化的红系细胞数量有限<sup>[60]</sup>或优先表达HbF蛋白<sup>[61]</sup>,难以达到正常成人红系细胞功能,且分化出的HSPCs也很难在免疫缺血小鼠

表3 CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗β-地中海贫血的相关临床试验

Table 3 Clinical trials of CRISPR/Cas9 gene editing in the treatment of β-thalassemia

NCT编号 <sup>a)</sup>	试验名称	预计起止时间	编辑细胞	编辑方式	国家	试验阶段	状态	招募人数	项目别称
NCT03655678	A safety and efficacy study evaluating CTX001 in subjects with transfusion-dependent β-thalassemia	2018年9月~2024年8月	自体CD34 <sup>+</sup> HSPCs	破坏 <i>BCL11A</i> 红系特异增强子	美国、加拿大、德国、意大利和英国	临床Ⅱ/Ⅲ期	招募中	45	CTX001-111
NCT03728322	iHSCs with the gene correction of HBB intervent subjects with β-thalassemia mutations	2019年1月~2021年1月	自体HSCs	<i>HBB</i> 基因突变的原位修复	未知	早期临床Ⅰ期	未知	12	HBB HSC-01
NCT04211480	Safety and efficacy evaluation of γ-globin reactivated autologous hematopoietic stem cells	2020年4月~2023年6月	自体HSCs	激活γ-珠蛋白基因表达	中国	无	招募中	12	2019-BRL-00CH1
NCT04390971	Safety and efficacy evaluation of ET-01 transplantation in subjects with transfusion dependent β-thalassaemia	2020年8月~2023年10月	自体HSCs	修饰 <i>BCL11A</i> 增强子	中国	无	未招募	1	EDI-001
NCT04925206	A safety and efficacy study evaluating ET-01 in subjects with transfusion dependent β-thalassaemia	2021年8月~2024年6月	自体CD34 <sup>+</sup> HSPCs	未知	中国	临床Ⅰ期	招募中	8	EDG-001
NCT04205435	β-globin restored autologous HSC in β-thalassemia major patients	2021年11月~2023年12月	自体HSCs	修复 <i>HBB</i> IVS2-654 (C>T)突变	中国	临床Ⅰ/Ⅱ期	未招募	12	2019-BRL-00CH2

a) 在 <https://clinicaltrials.gov> 上搜索相应NCT编号可见各研究的详情

体内长期植入并保持基因编辑状态<sup>[116]</sup>。在临床应用中,干细胞移植过程复杂、难度大、不可控因素多,尽管消除了移植物抗宿主病和长期免疫抑制的风险,但接受基因编辑的患者在自体HSCs移植前仍需要进行清髓性预处理,这些疗法对技术要求很高。

CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗β-地中海贫血的人体临床试验已开展。截至目前,本文检索仅有6例,其中5例尚未公布详细结果(表3)。尽管有试验(NCT03655678)表明在治疗过程中出现不良事件,如伴有中性粒细胞减少的肺炎和静脉闭塞性肝病伴窦性梗阻综合征

(VOD-SOS)等待解决<sup>[94]</sup>,但该患者经治疗4个月后体内的血红蛋白水平就已恢复正常,显示出CRISPR/Cas9技术在治疗β-地贫中具有良好前景。同时需要注意的是,目前这些临床试验的长期疗效以及安全性仍不确定,在进行大量临床试验之前,还需要进行更多基础研究来完善基因编辑过程和编辑效率,尽量减少潜在的有害的靶外突变以及脱靶效应。随着分子生物学和基因编辑技术的不断发展,有待进一步探究新的靶点和新的编辑方式以不断优化基因编辑策略,达到最优治疗效果。

## 参考文献

- Ahmed M H, Ghatge M S, Safo M K. Hemoglobin: Structure, function and allostery. *Subcell Biochem*, 2020, 94: 345–382
- Khandros E, Thom C S, D'Souza J, et al. Integrated protein quality-control pathways regulate free α-globin in murine β-thalassemia. *Blood*, 2012, 119: 5265–5275
- Origa R. β-thalassemia. *Genet Med*, 2017, 19: 609–619

- 4 Lai K, Huang G, Su L, et al. The prevalence of thalassemia in mainland of China: Evidence from epidemiological surveys. *Sci Rep*, 2017, 7: 920
- 5 Pan H F, Long G F, Li Q, et al. Current status of thalassemia in minority populations in Guangxi, China. *Clin Genet*, 2007, 71: 419–426
- 6 Xu X M, Zhou Y Q, Luo G X, et al. The prevalence and spectrum of  $\alpha$  and  $\beta$  thalassaemia in Guangdong Province: Implications for the future health burden and population screening. *J Clin Pathol*, 2004, 57: 517–522
- 7 Jie Q L, Li Q, Sun W Y, et al. The prevalence and genetic analysis of thalassaemia in 20450 cases in Hainan (in Chinese). *J Practic Med*, 2020, 36: 1092–1095 [揭秋玲, 李崎, 孙文页, 等. 海南地区地中海贫血筛查者的基因结果分析. *实用医学杂志*, 2020, 36: 1092–1095]
- 8 Long Y Y, Yang Y H, Chen Y, et al. Molecular epidemiological characteristics of thalassemia in Guizhou Province (in Chinese). In: *Data Collection of the 23rd National Conference of Pediatric Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019. 122 [龙圆圆, 杨宇航, 陈艳, 等. 贵州省地中海贫血分子流行病学特征分析. 见: 第二十三次全国儿科中西医结合学术会议资料汇编. 北京: 人民卫生出版社, 2019. 122]
- 9 Taher A T, Musallam K M, Cappellini M D.  $\beta$ -thalassemias. *N Engl J Med*, 2021, 384: 727–743
- 10 Xu L H, Fang J P. The current status of  $\beta$ -thalassemia major in mainland of China. *Hemoglobin*, 2013, 37: 307–314
- 11 Zhu L, Luo R G, Zhou T H, et al. Genotypes of  $\beta$ -thalassemia in Guangxi (in Chinese). *Milit Med J South China*, 2009, 23: 41–43 [朱凌, 罗瑞贵, 周天红, 等. 广西地区 $\beta$ 地中海贫血基因突变类型分析. *华南国防医学杂志*, 2009, 23: 41–43]
- 12 Borgna-Pignatti C, Marsella M, Zanforlin N. The natural history of thalassemia intermedia. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1202: 214–220
- 13 Taher A T, Weatherall D J, Cappellini M D. Thalassaemia. *Lancet*, 2018, 391: 155–167
- 14 Payen E, Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Hematol-Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012: 276–283
- 15 Zhou L J, Wang J C, Gao H B, et al. Gene therapy for monogenetic diseases (in Chinese). *Sci Technol Rev*, 2020, 38: 89–100 [周丽娟, 王京春, 高宏斌, 等. 单基因遗传疾病的基因疗法. *科技导报*, 2020, 38: 89–100]
- 16 Lino C A, Harper J C, Carney J P, et al. Delivering CRISPR: A review of the challenges and approaches. *Drug Deliver*, 2018, 25: 1234–1257
- 17 Gibran A, Akram T M, Kamran S, et al. Advances in genome editing: The technology of choice for precise and efficient  $\beta$ -thalassemia treatment. *Gene Ther*, 2020, 28: 6–15
- 18 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429–5433
- 19 Jansen R, Embden J D A, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43: 1565–1575
- 20 Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174–182
- 21 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709–1712
- 22 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 23 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 24 Wang T, Wei J J, Sabatini D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343: 80–84
- 25 Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84–87
- 26 Nishimasu H, Ran F A, Hsu P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935–949
- 27 Garneau J E, Dupuis M È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468: 67–71
- 28 Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1: e60
- 29 Makarova K S, Aravind L, Grishin N V, et al. A DNA repair system specific for thermophilic archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 482–496
- 30 Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67–78
- 31 Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722–736
- 32 Chira S, Gulei D, Hajitou A, et al. CRISPR/Cas9: Transcending the reality of genome editing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 211–222
- 33 Carter J, Wiedenheft B. SnapShot: CRISPR-RNA-guided adaptive immune systems. *Cell*, 2015, 163: 260–260.e1
- 34 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151: 2551–2561
- 35 Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467–477
- 36 Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence

- system. *Microbiology*, 2009, 155: 733–740
- 37 Charpentier E, Richter H, van der Oost J, et al. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39: 428–441
- 38 Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602–607
- 39 Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, et al. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering. *Arch Immunol Ther Exp*, 2017, 65: 233–240
- 40 Rahman S, Datta M, Kim J, et al. CRISPR/Cas: An intriguing genomic editing tool with prospects in treating neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 96: 22–31
- 41 Knapp W, Strobl H, Scheinecker C, et al. Molecular characterization of CD34<sup>+</sup> human hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*, 1995, 70: 281–296
- 42 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 43 Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917–1920
- 44 Zhang W C. Somatic cell reprogramming and generation of induced multipotent endodermal stem cells (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: Academy of Military Sciences, 2012 [张文成. 细胞重编程与诱导内胚层多能干细胞的获取与鉴定. 博士学位论文. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012]
- 45 McColl B, Vadolas J. Animal models of  $\beta$ -hemoglobinopathies: Utility and limitations. *J Blood Med*, 2016, 7: 263–274
- 46 Ciavatta D J, Ryan T M, Farmer S C, et al. Mouse model of human beta zero thalassemia: Targeted deletion of the mouse beta maj- and beta min-globin genes in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9259–9263
- 47 Ghassemi B, Shamsara M, Soleimani M, et al. Pipeline for the generation of gene knockout mice using dual sgRNA CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Anal Biochem*, 2019, 568: 31–40
- 48 Ajami M, Atashi A, Kaviani S, et al. Generation of an *in vitro* model of  $\beta$ -thalassemia using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *J Cell Biochem*, 2020, 121: 1420–1430
- 49 Li J, Zhou Z, Sun H X, et al. Transcriptome analyses of  $\beta$ -thalassemia –28(A>G) mutation using isogenic cell models generated by CRISPR/Cas9 and asymmetric single-stranded oligodeoxynucleotides (assODNs). *Front Genet*, 2020, 11: 577053
- 50 Trimborn T, Gribnau J, Grosveld F, et al. Mechanisms of developmental control of transcription in the murine  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin loci. *Genes Dev*, 1999, 13: 112–124
- 51 Midic U, Hung P H, Vincent K A, et al. Quantitative assessment of timing, efficiency, specificity and genetic mosaicism of CRISPR/Cas9-mediated gene editing of hemoglobin beta gene in rhesus monkey embryos. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 2678–2689
- 52 Huang Y, Ding C, Liang P, et al. *HBB*-deficient *Macaca fascicularis* monkey presents with human  $\beta$ -thalassemia. *Protein Cell*, 2019, 10: 538–542
- 53 Yang Y, Kang X, Hu S, et al. CRISPR/Cas9-mediated  $\beta$ -globin gene knockout in rabbits recapitulates human  $\beta$ -thalassemia. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100464–100473
- 54 Song B, Fan Y, He W, et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1053–1065
- 55 Xu P, Tong Y, Liu X Z, et al. Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the *HBB* IVS2-654 (C>T) mutation in  $\beta$ -thalassemia-derived iPSCs. *Sci Rep*, 2015, 5: 12065
- 56 Xiong Z, Xie Y, Yang Y, et al. Efficient gene correction of an aberrant splice site in  $\beta$ -thalassaemia iPSCs by CRISPR/Cas9 and single-strand oligodeoxynucleotides. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 8046–8057
- 57 Ou Z, Niu X, He W, et al. The combination of CRISPR/Cas9 and iPSC technologies in the gene therapy of human  $\beta$ -thalassemia in mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 32463
- 58 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: 16576–16585
- 59 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
- 60 Wattanapanitch M, Damkham N, Potirat P, et al. One-step genetic correction of hemoglobin E/beta-thalassemia patient-derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 system. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9: 46
- 61 Xie F, Ye L, Chang J C, et al. Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and *piggyBac*. *Genome Res*, 2014, 24: 1526–1533
- 62 Antony J S, Latifi N, Haque A K M A, et al. Gene correction of *HBB* mutations in CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells using Cas9 mRNA and ssODN donors. *Mol Cell Pediatr*, 2018, 5: 1–7

- 63 Jensen N M, Dalsgaard T, Jakobsen M, et al. An update on targeted gene repair in mammalian cells: Methods and mechanisms. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 10
- 64 Lamsfus-Calle A, Daniel-Moreno A, Ureña-Bailén G, et al. Universal gene correction approaches for  $\beta$ -hemoglobinopathies using CRISPR-Cas9 and adeno-associated virus serotype 6 donor templates. *CRISPR J*, 2021, 4: 207–222
- 65 Wang M Y, Lai Y R. Hemoglobin E/ $\beta$ -thalassemia (in Chinese). *Med Recap*, 2009, 15: 860–864 [王明月, 赖永榕. 血红蛋白E复合 $\beta$ 地中海贫血. 医学综述, 2009, 15: 860–864]
- 66 Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*, 2010, 12: 61–76
- 67 Albitar M, Care A, Peschle C, et al. Developmental switching of messenger RNA expression from the human alpha-globin cluster: Fetal/adult pattern of theta-globin gene expression. *Blood*, 1992, 80: 1586–1591
- 68 Donze D, Jeancake P H, Townes T M. Activation of delta-globin gene expression by erythroid kruppel-like factor: A potential approach for gene therapy of sickle cell disease. *Blood*, 1996, 88: 4051–4057
- 69 d'Arqom A. Nucleic acid therapy for  $\beta$ -thalassemia. *Biol-Targets Ther*, 2020, 14: 95–105
- 70 Shariati L, Khanahmad H, Salehi M, et al. Genetic disruption of the *KLF1* gene to overexpress the  $\gamma$ -globin gene using the CRISPR/Cas9 system. *J Gene Med*, 2016, 18: 294–301
- 71 Traxler E A, Yao Y, Wang Y D, et al. A genome-editing strategy to treat  $\beta$ -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med*, 2016, 22: 987–990
- 72 Shariati L, Rohani F, Heidari Hafshejani N, et al. Disruption of *SOX6* gene using CRISPR/Cas9 technology for gamma-globin reactivation: An approach towards gene therapy of  $\beta$ -thalassemia. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 9357–9363
- 73 Grevet J D, Lan X, Hamagami N, et al. Domain-focused CRISPR screen identifies HRI as a fetal hemoglobin regulator in human erythroid cells. *Science*, 2018, 361: 285–290
- 74 Martyn G E, Wienert B, Yang L, et al. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of *BCL11A* or *ZBTB7A* binding. *Nat Genet*, 2018, 50: 498–503
- 75 Bao L W, Zhou Y Y, Zeng F Y. Advances in gene therapy for  $\beta$ -thalassemia and hemophilia based on the CRISPR/Cas9 technology (in Chinese). *Hereditas*, 2020, 42: 949–964 [鲍莉雯, 周一叶, 曾凡一. 基于CRISPR/Cas9技术的 $\beta$ -地中海贫血和血友病基因治疗研究进展. 遗传, 2020, 42: 949–964]
- 76 Métails J Y, Doerfler P A, Mayuranathan T, et al. Genome editing of *HBG1* and *HBG2* to induce fetal hemoglobin. *Blood Adv*, 2019, 3: 3379–3392
- 77 Wu Y, Zeng J, Roscoe B P, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2019, 25: 776–783
- 78 Martyn G E, Wienert B, Kurita R, et al. A natural regulatory mutation in the proximal promoter elevates fetal globin expression by creating a *de novo* GATA1 site. *Blood*, 2019, 133: 852–856
- 79 Lamsfus-Calle A, Daniel-Moreno A, Antony J S, et al. Comparative targeting analysis of *KLF1*, *BCL11A*, and *HBG1/2* in  $CD34^+$  HSPCs by CRISPR/Cas9 for the induction of fetal hemoglobin. *Sci Rep*, 2020, 10: 10133
- 80 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: 276–278
- 81 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: 1620–1625
- 82 Lettre G, Sankaran V G, Bezerra M A C, et al. DNA polymorphisms at the *BCL11A*, *HBSIL-MYB*, and  $\beta$ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 11869–11874
- 83 Bauer D E, Kamran S C, Lessard S, et al. An erythroid enhancer of *BCL11A* subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*, 2013, 342: 253–257
- 84 Khosravi M A, Abbasalipour M, Concordet J P, et al. Targeted deletion of *BCL11A* gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854: 398–405
- 85 Ye L, Wang J, Tan Y, et al. Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 10661–10665
- 86 Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human  $\beta$ -globin locus. *Blood*, 2018, 131: 1960–1973
- 87 Liu N, Hargreaves V V, Zhu Q, et al. Direct promoter repression by *BCL11A* controls the fetal to adult hemoglobin switch. *Cell*, 2018, 173: 430–442.e17
- 88 Humbert O, Radtke S, Samuelson C, et al. Therapeutically relevant engraftment of a CRISPR-Cas9-edited HSC-enriched population with HbF reactivation in nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2019, 11: 13
- 89 Heydari N, Shariati L, Khanahmad H, et al. Gamma reactivation using the spongy effect of *KLF1*-binding site sequence: An approach in gene

- therapy for beta-thalassemia. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19: 1063–1069
- 90 Yi Z, Cohen-Barak O, Hagiwara N, et al. SOX6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. *PLoS Genet*, 2006, 2: 129–139
- 91 Cantù C, Ierardi R, Alborelli I, et al. SOX6 enhances erythroid differentiation in human erythroid progenitors. *Blood*, 2011, 117: 3669–3679
- 92 Huang P, Peslak S A, Lan X, et al. The HRI-regulated transcription factor ATF4 activates BCL11A transcription to silence fetal hemoglobin expression. *Blood*, 2020, 135: 2121–2132
- 93 Gong Y, Zhang X, Zhang Q, et al. A natural *DNMT1* mutation elevates the fetal hemoglobin level via epigenetic derepression of the  $\gamma$ -globin gene in  $\beta$ -thalassemia. *Blood*, 2021, 137: 1652–1657
- 94 Frangoul H, Altshuler D, Cappellini M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med*, 2021, 384: 252–260
- 95 Hughes J R, Roberts N, McGowan S, et al. Analysis of hundreds of *cis*-regulatory landscapes at high resolution in a single, high-throughput experiment. *Nat Genet*, 2014, 46: 205–212
- 96 Mettananda S, Gibbons R J, Higgs D R. Understanding  $\alpha$ -globin gene regulation and implications for the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Ann NY Acad Sci*, 2016, 1368: 16–24
- 97 Higgs D R, Wood W G. Long-range regulation of  $\alpha$ -globin gene expression during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15: 176–183
- 98 Sharpe J A, Chan-Thomas P S, Lida J, et al. Analysis of the human alpha globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J*, 1992, 11: 4565–4572
- 99 Mettananda S, Fisher C A, Hay D, et al. Editing an  $\alpha$ -globin enhancer in primary human hematopoietic stem cells as a treatment for  $\beta$ -thalassemia. *Nat Commun*, 2017, 8: 424
- 100 Pavani G, Fabiano A, Laurent M, et al. Correction of  $\beta$ -thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the  $\alpha$ -globin locus in human hematopoietic stem cells. *Blood Adv*, 2021, 5: 1137–1153
- 101 Cosenza L C, Gasparello J, Romanini N, et al. Efficient CRISPR-Cas9-based genome editing of  $\beta$ -globin gene on erythroid cells from homozygous  $\beta^{0/39}$ -thalassemia patients. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 507–523
- 102 Mettananda S, Gibbons R J, Higgs D R.  $\alpha$ -globin as a molecular target in the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Blood*, 2015, 125: 3694–3701
- 103 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- 104 Jeong Y K, Song B, Bae S. Current status and challenges of DNA base editing tools. *Mol Ther*, 2020, 28: 1938–1952
- 105 Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of  $\beta$ -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell*, 2017, 8: 811–822
- 106 Zeng J, Wu Y, Ren C, et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2020, 26: 535–541
- 107 Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 35–40
- 108 Kurt I C, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 41–46
- 109 Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157
- 110 Amjad F, Fatima T, Fayyaz T, et al. Novel genetic therapeutic approaches for modulating the severity of  $\beta$ -thalassemia (Review). *Biomed Rep*, 2020, 13: 1
- 111 Wu J, Chen Z J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 461–488
- 112 Luther D C, Lee Y W, Nagaraj H, et al. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics *in vivo*: Advances and challenges. *Expert Opin Drug Deliver*, 2018, 15: 905–913
- 113 Zhao Z X, Li C H, Zhou L L, et al. Delivery and application progresses of CRISPR/Cas gene editing system (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2020, 47: 286–299 [赵子璇, 李春辉, 周莉莉, 等. CRISPR/Cas系统递送技术及其应用研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47: 286–299]
- 114 Azhagiri M K K, Babu P, Venkatesan V, et al. Homology-directed gene-editing approaches for hematopoietic stem and progenitor cell gene therapy. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12: 500
- 115 Banan M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells. *J Biotechnol*, 2020, 308: 1–9
- 116 Pratumkaew P, Issaragrisil S, Luanpitpong S. Induced pluripotent stem cells as a tool for modeling hematologic disorders and as a potential source for cell-based therapies. *Cells*, 2021, 10: 3250



Summary for “利用CRISPR/Cas9基因编辑技术治疗 $\beta$ -地中海贫血的最新进展”

## Recent advances of CRISPR/Cas9 gene editing in the treatment of $\beta$ -thalassemia

Qian Xie<sup>1†</sup>, Shuangyin Lei<sup>2†</sup>, Chao Qu<sup>3†</sup>, Hao Wu<sup>3</sup>, Yingru Liu<sup>4</sup>, Ping Huang<sup>1\*</sup> & Shuzhi Teng<sup>1\*</sup><sup>1</sup> The Key Laboratory of Pathobiology, Ministry of Education, Norman Bethune Medical College, Jilin University, Changchun 130021, China;<sup>2</sup> Norman Bethune Second Clinical Medical College, Jilin University, Changchun 130021, China;<sup>3</sup> Norman Bethune First Clinical Medical College, Jilin University, Changchun 130021, China;<sup>4</sup> Norman Bethune Third Clinical Medical College, Jilin University, Changchun 130021, China

† Equally contributed to this work

\* Corresponding authors, E-mail: [huangping@jlu.edu.cn](mailto:huangping@jlu.edu.cn); [steng@jlu.edu.cn](mailto:steng@jlu.edu.cn)

$\beta$ -thalassemia is an autosomal recessive hereditary blood disorder characterized by reduced levels of functional hemoglobin caused by point mutation or deletion of the  $\beta$ -globin gene *HBB*. Children with beta-thalassemia major develop life-threatening hemolytic anemia and their survival depends on lifelong blood transfusions and iron removal treatment. Long-term iron chelation therapy can result in multiple organ damage and failure, and places an economic burden on the patients, their families, and society. The prevalence and carrier rates of  $\beta$ -thalassemia are very high, with 80 to 90 million people reported to be carriers across the world. In China, the overall prevalence is 2.21% and in southern China, the highest carrier rate is 4.8%. The most common *HBB* mutation that causes  $\beta$ -thalassemia in China is a 4-bp deletion (-CTTT) at codon CD41/42. At present, allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is the only available option with a high cure rate for  $\beta$ -thalassemia and the key to the success of HSC transplantation is the HLA matching, however it is sometimes hard to find a match between the patient and unrelated donors because some HLA types are less common. With the advent of zinc-finger nucleases (ZFN) and transcription activator-like effector nucleases (TALEN), site-specific genome editing of autologous induced pluripotent stem cells (iPSCs) and HSCs from  $\beta$ -thalassemia patients has become possible. These nucleases induce double strand breaks and elicit site-specific gene correction of *HBB* mutations in the presence of a DNA template carrying the desired (non-disease) sequence via homology-directed repair (HDR) at the break site. However, ZFNs and TALENs both require complicated cloning approaches to achieve. An even newer approach for fast and easy genome editing procedure is based on clustered-interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein 9 (Cas9). CRISPR/Cas9 gene editing technology is rapidly becoming the preferred tool to edit genes and it has attracted great attention because of its advantages in targeting specificity, efficiency and economy. The 2020 Nobel Prize in Chemistry was awarded to Professors Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna for their work on CRISPR/Cas9. In this review, we comprehensively discuss the development and detailed mechanisms of the CRISPR/Cas9 system, as well as its application and research progress in the treatment of  $\beta$ -thalassemia, focusing on three feasible CRISPR/Cas9-based gene therapies: (1) Repair of the *HBB* gene in iPSCs derived from patients; (2) induction of expression of fetal hemoglobin (HbF); and (3) inhibition of  $\alpha$ -globin gene expression. We also review the relevant research reports in the past five years that cover cell and animal models as well as clinical trials. Currently, most CRISPR/Cas9-based clinical trials focus on the induction of HbF expression by targeting the *BCL11A* enhancer, the *BCL11A* binding site on the *HBG* promoter, and other *HBG* transcription factors. We also review the safety, long-term efficiency, and current challenges in delivering CRISPR/Cas9 vectors to cells *in vivo*. New genome-editing tools derived from CRISPR/Cas9 exploration such as prime editors and base editors and their potential applications in  $\beta$ -thalassemia treatment are also introduced. Since prime editing and base editing offer high efficiency and product purity compared to HDR, they are anticipated to become the most commonly-used genome editing approaches in the long term to achieve a cure for  $\beta$ -thalassemia.

**CRISPR/Cas9, beta-thalassemia, *HBB*, gene therapy, gene editing**doi: [10.1360/TB-2022-0109](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0109)