

CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术在基因治疗中的应用进展

权春菊, 郑忠亮*

武汉大学生命科学学院, 武汉 430027

摘要: 基因治疗是指利用基因编辑技术对细胞基因进行“修饰”而达到治疗的目的。CRISPR/Cas 的出现为基因编辑提供了简单、高效和多功能的平台,同时,为克服 DNA 双链断裂产生的不良影响,基于 CRISPR/Cas 的新型技术,如碱基编辑器(base editors, BE)、Prime Editors(PE)和 Cas13 效应器,被相继开发出来。目前,CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术已被广泛应用于动物细胞模型构建、药物靶点筛选和基因功能研究等领域,在基因治疗领域也展现出广阔的应用前景。基于此,简要介绍了 CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术,综述了其在单基因遗传病、肿瘤和其他疾病的基因治疗中的应用进展,并分析了其当下面临的挑战,以期能为基因编辑在单基因遗传病、肿瘤和其他疾病治疗领域提供理论参考。

关键词: CRISPR/Cas; 碱基编辑器; Prime Editors; Cas13 效应器; 基因治疗

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2020.0144

中图分类号: Q789; R45 文献标识码: A

Application Progress of CRISPR/Cas and its Derivative Editing Technology in Gene Therapy

QUAN Chunju, ZHENG Zhongliang*

College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430027, China

Abstract: Gene therapy refers to the use of gene editing technology to “modify” cell genes to achieve the purpose of treatment. The emergence of CRISPR/Cas provides a simple, efficient and multifunctional platform for gene editing. Meanwhile, in order to overcome the adverse effects caused by DNA double-strand breaks, new technologies based on CRISPR/Cas, such as base editors (BE), Prime Editors (PE) and Cas13 effector, have been developed one after another. At present, CRISPR/Cas and its derivative editing technologies have been widely used in animal cell model construction, drug target screening and gene function research, and also show broad application prospects in the field of gene therapy. Based on this, CRISPR/Cas and its derivative editing technology were briefly introduced, and their application progress in gene therapy of single gene genetic diseases, tumors and other diseases was summarized. And the challenges they faced at present were analyzed, in order to provide relevant theoretical reference for gene editing in the treatment of single-gene genetic diseases, tumors and other diseases.

Key words: CRISPR/Cas; base editors; Prime Editors; Cas13 effector; gene therapy

随着基因测序技术的发展,遗传疾病的诊断效率不断上升,然而目前缺乏相应的治疗手段,亟需发展新型治疗选择。基因治疗是指利用基因编辑技术纠正或补偿细胞致病基因而达到治疗的目的。基因编辑技术是对目的基因进行定点突变、插入或敲除的一种有效方法^[1]。基因编辑技术的核心机制是通过引入靶向 DNA 双链断裂(double-

strand break, DSB)来刺激基因编辑过程,然后激活细胞 DNA 修复通路^[2-3],进而利用该通路实现对目的基因的定点突变、插入或敲除。虽然已经开发出第一代锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)^[4]技术和第二代类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[5]技术,但由于 CRISPR 系统功能多样、

收稿日期:2020-11-06; 接受日期:2021-03-04

基金项目:国家自然科学基金项目(81372441)。

联系方式:权春菊 E-mail:1096150987@qq.com; *通信作者 郑忠亮 E-mail:biochem@whu.edu.cn

高效且易于使用,来源于自然发生的CRISPR系统的技术已成为大多数基因组工程师的首选方法^[6-8]。CRISPR/Cas系统通常包括Cas蛋白以及结合在Cas蛋白上的单链引导RNA(single guiding RNA, sgRNA),前者负责剪切核酸,后者负责指引Cas蛋白结合到特定的核酸序列上^[9]。

传统的CRISPR/Cas虽然可以相对轻松地改变多种生物的基因组,但也容易出现脱靶效应等情况^[10]。为更好地控制基因编辑的进行,科学家们开发了基于CRISPR/Cas系统的新型编辑技术,包括碱基编辑器(base editors, BE)、Prime Editors (PE)和Cas13效应器,这些衍生编辑技术既具有CRISPR核酸酶的可编程性和灵活性,又具有扩展功能,使基因编辑不依赖传统的DSB^[11]。CRISPR/Cas及其衍生编辑技术现已成为实验生物学的支柱,并因日渐成熟而成为临床应用的工具。基因治疗的对象也已经由单基因遗传病逐步拓展到恶性肿瘤、感染性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病、代谢性疾病等^[11-13]。基于此,本文简要介绍了CRISPR/Cas及其衍生编辑技术,综述了其在单基因遗传病、肿瘤和其他疾病的基因治疗中的应用进展,并分析了其在当下面临的挑战,以期为CRISPR/Cas及其衍生编辑技术在各类疾病的临床治疗中的应用提供理论参考。

1 CRISPR/Cas及其衍生编辑技术

CRISPR/Cas系统包括crRNA (CRISPR-derived RNA)和反向激活crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)以及Cas蛋白3个部分。根据Cas基因的全序列以及Cas蛋白之间的序列相似性和位点结构,目前将CRISPR-Cas系统分为两类,包括6个类型和19个亚型^[9,14]。1类CRISPR-Cas系统(包括I型、III型和IV型)存在于细菌和古生菌中,并且包含由4~7个Cas蛋白亚基组成的效应复合物;2类CRISPR-Cas系统(II型、V型和VI型)几乎完全局限于细菌,其效应复合物由单个多域蛋白质组成^[9]。广泛用于基因编辑的CRISPR/Cas9是II型CRISPR系统,是由1个Cas蛋白结合向导RNA(guide RNA)到特异位点,识别并剪切靶向序列,造成DNA损伤(图1A)。其中,Cas9是一种RNA依赖性内切酶,包含2个不

相关的核酸酶域(HNH和RuvC)^[10]。2012年Jennifer Doudna团队首次证明了CRISPR/Cas系统可在体外对DNA进行切割^[14]。

CRISPR介导的适应性免疫包括3个阶段:第一个阶段为适应,来自入侵分子的外源DNA片段(称为原间隔区)被处理并作为新的间隔区插入CRISPR阵列中;第二个阶段为表达,包括CRISPR阵列的转录,随后将前体转录物加工成成熟的crRNA, crRNA与1个或多个Cas蛋白组装成CRISPR核糖核蛋白(crRNA ribonucleoprotein, crRNP)复合物;第三个阶段为干扰,包括在crRNP复合物内用Cas核酸酶对入侵的同源病毒或质粒核酸进行crRNA定向切割^[14]。

与ZFN技术和TALENs技术相比,CRISPR/Cas系统只需要设计一段与目标序列互补的sgRNA即可发挥作用,这极大提高了核酸酶的特异性,也避免了复杂蛋白质设计和组装的需要。然而,传统的CRISPR技术是通过激活DSB修复通路来激活基因编辑,这可能会对细胞产生不良影响,限制了该技术在某些疾病治疗中的应用。为此,基于CRISPR/Cas的新型技术,如BE、PE和Cas13效应器,被相继开发出来,它们能够不依赖DSB而启动编辑。

1.1 碱基编辑器

BE由具有单链切割活性的Cas9蛋白(nCas9)和具有靶向催化脱氨反应的碱基脱氨酶融合而成,实现对靶点的碱基替换。目前,根据融合的碱基修饰酶,可将BE分为胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBE)^[15-16]和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABE)^[17]。以CBE为例,主要过程包括nCas9-碱基脱氨酶-sgRNA三元复合体的形成,此复合体可催化目标DNA序列,CBE作用时,胞嘧啶(C)在靶点直接脱氨基变成尿嘧啶(U),接着DNA进行复制,U被胸腺嘧啶(T)取代。随着DNA复制,同一时间,腺嘌呤(A)将会替换互补链上原来与C互补的鸟嘌呤(G),最终实现了在编辑窗口内C到T和G到A的单碱基精准编辑(图1B)^[11]。

尽管BE扩大了基因编辑的应用范围,但由于受到碱基脱氨酶结构域功能的部分限制,不能插入或删除DNA序列。

1.2 Prime Editors

2019年10月21日,美国哈佛大学David Liu

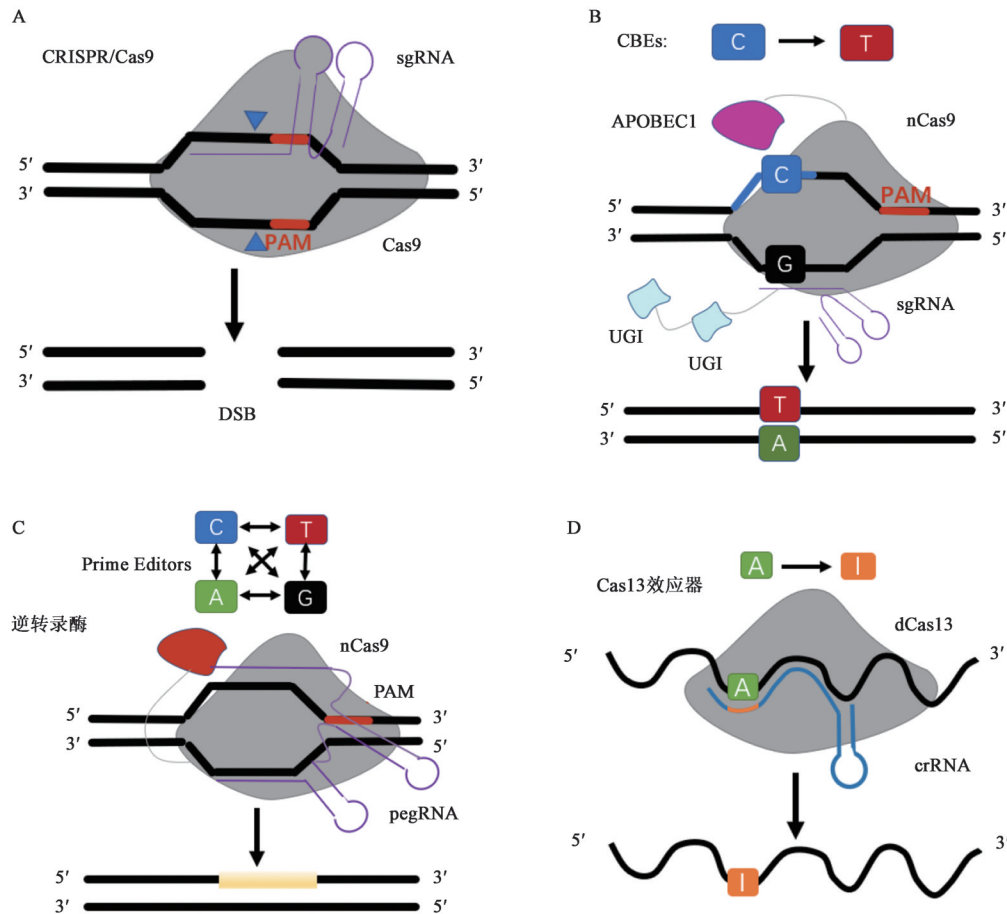


图1 CRISPR/Cas9、CBE、PE和Cas13效应器生物的结构^[11]

Fig. 1 The structure of CRISPR/Cas9, CBE, PE and Cas13 effectors^[11]

实验室发表了一种新的基因编辑方法——Prime Editors^[18],其可不依赖于DSB和供体DNA模板,而实现目标位点的插入/缺失和所有12种类型点突变。

PE由主编辑引导RNA(prime editing guide RNA, pegRNA)和连接到逆转录酶(reverse transcriptase, RT)结构域的nCas9融合而成。pegRNA中包含sgRNAs,其3'端包含一段引物结合位点(primer binding site, PBS)和转录模板序列(RT template)。在催化编辑过程中,由pegRNA指导,PE首先与特定的目标DNA序列结合,然后促进nCas9切割DNA单链,pegRNA 3'端的PBS识别切割断点前的互补序列并杂交,RT催化合成一个新的DNA链,该DNA链根据pegRNA指定的模板对目的基因进行编码。在DNA修复后,这条新链被引入目标位点(图1C)^[11]。

与BE相比,PE具有更加广阔的应用前景,但

PE系统及其应用仍有亟待改进之处:如sgRNA依赖性或非依赖性的脱靶效应尚且未知、PE介导的高碱基插入/缺失率以及PE系统在成体动物中的递送等问题^[18-23]。

1.3 Cas13效应子

与CRISPR家族蛋白(如Cas9)对DNA进行编辑来修改基因/调控基因表达不同,Cas13酶通过与crRNA结合而激活内源RNase活性来切割目标RNA,促进了一种灵活的和可编程的技术发展^[24-28]。

Cas13效应子系统包括crRNA分子和Cas13蛋白,其复合体结构靶向目标RNA位点,该位点刺激Cas13的HEPN结构域的RNase催化活性,从而触发其切割。Cas13效应子可以作为支架使靶向RNA编辑成为可能。RNA编辑器包括dCas13与RNA腺苷脱氨酶(adenosine deaminase acting on RNA, ADAR)的融合,以刺激A到I的编辑,胞

苷脱氨酶结构域介导C到U的转换(图1D)^[11]。

Cas13效应子不涉及编码基因DNA的改变,而是通过对基因转录产物(mRNA)进行编辑,为改变基因功能和调控表达提供了新的方法和思路,这对于疾病的研究和治疗均具有深远的意义。

2 CRISPR/Cas及其衍生编辑技术在基因治疗中的应用

随着基因组测序成本的降低以及人类基因组序列比较分析、高通量基因组筛查应用的增加,诊断遗传疾病的能力得到了迅速发展,CRISPR技术的高效性和精确性在基因调控、模式生物构建、植物育种等领域都有广阔的应用前景,更是对基因治疗的发展具有重要作用。

2.1 在单基因遗传病中的应用

虽然人类遗传学疾病通常很复杂,但一些最常见的遗传疾病是由单个基因的突变引起的,如血友病、囊性纤维化、亨廷顿舞蹈病、杜氏肌营养不良症(duchenne muscular dystrophy, DMD)和镰状细胞贫血(sickle cell disease, SCD)等都是由人类基因组中单个基因缺陷引起的疾病。

SCD发生在 β -珠蛋白(hemoglobin-beta, HBB)基因有2个缺陷拷贝的个体中,其为成人血细胞中形成携氧血红蛋白所必需的蛋白质。研究表明,利用一个短单链寡核苷酸模板融合CRISPR/Cas9技术来纠正SCD患者外周血或骨髓造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)中的HBB基因,基因编辑细胞中红细胞镰化显著减少^[29]。Kalkan等^[30]发现使用较长的gRNA对靶标DNA具有较高的亲和性,这为高效和高亲和力靶向HBB基因提供了更有效的方法。上述研究结果对于基因治疗在SCD的临床应用至关重要^[29-31]。然而,靶标DNA双链断裂可能会导致大量缺失和复杂的基因组重排,这可能会致病^[32],因此需通过靶向Cas9切割来降低SCD患者诱发地中海贫血的风险,gRNA/Cas9 RNP的最佳剂量和半衰期都需要进一步研究。2019年,David Liu研究团队利用PE3纠正了HBB突变,增加了人类遗传病的治疗手段^[18]。

BE的开发为精准基因治疗提供了更加强有力的手段,其不依赖于DSB修复,可更有效地避

免大量随机插入和缺失。在DMD小鼠模型中,利用腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABEs)技术修正DMD基因,进而恢复抗肌萎缩蛋白的表达^[33]。NPC1介导细胞内脂质转运,其在中枢神经系统中的缺失会导致尼曼-匹克病C型疾病,此外,Levy等^[21]利用CBEs纠正了小鼠脑组织中的缺失,减缓了神经退化,延长了动物的寿命。

目前基因编辑技术应用于基因治疗的主要手段是在目的细胞内强制表达外源基因或抑制表达内源基因,但强制表达时效有限,表达剂量也难以控制,而外源基因载体多为整合型病毒,人体免疫反应的问题也不容忽视。

2.2 在肿瘤治疗中的应用

基因编辑在治疗方面的应用也延伸到癌症免疫治疗领域,主要集中在嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)T细胞的过继免疫治疗^[34]。近年来,基因编辑技术对难治性肿瘤、白血病、淋巴瘤等疾病的治疗研究进展迅速^[34-37]。

2016年,我国四川大学华西医院卢铀团队利用CRISPR技术敲除PD-1基因编辑T细胞导入患者体内,以治疗经化疗、放疗以及其他疗法治疗无效的转移性非小细胞肺癌患者^[38-39]。2020年该团队公布了I期临床试验结果,证明了靶向PD-1的CRISPR基因编辑T细胞在一个晚期肺癌患者队列中的安全性和可行性^[36]。Stadtmauer等^[40]从3例癌症患者(2例晚期难治性骨髓瘤患者和1例转移性肉瘤患者)身上提取T细胞,然后使用CRISPR技术敲除了T细胞的3个基因:TCR α 、TCR β 、PD-1,利用慢病毒插入一个亲和力增强的T细胞受体基因,使得被基因编辑的T细胞可靶向癌细胞上名为NY-ESO-1的抗原(正常组织很少表达该抗原)。最后,经多重改造的T细胞被回输到患者体内。研究显示,上述3例患者均对治疗耐受良好,脱靶效应也较为罕见。这些试验成果无疑为进一步开展基于CRISPR技术的癌症免疫疗法提供了数据支持。Zafra等^[41]使用密码子优化的第三代碱基编辑器(base editor 3, BE3)共转染,在小鼠肝脏细胞中纠正了与癌症相关的Ctnnb1 S45F突变,能够抵抗Tankyrase抑制剂对上游WNT的抑制。KRAS突变体是胰腺癌的驱动癌基因,Zhao等^[42]利用CRISPR-Cas13a系统靶向治疗胰腺癌中的突变KRAS,研究发现CRISPR-Cas13a介导的KRASG12D mRNA敲低可在体外诱导小鼠肿

瘤细胞凋亡,并引起显著的肿瘤收缩。

同时,CRISPR/Cas 技术也可用于癌症功能性靶点的筛选。Wang 等^[43]利用整合型细胞表面抗原介导的 CRISPR 平台对参与维持白血病细胞未分化状态的基因进行筛查,发现了维持和分化白血病的重要调节因子 ZFP36L2。

2.3 在其他疾病中的应用

基因编辑技术在其他疾病治疗方面也取得了初步进展,如肝脏疾病、心血管疾病、视网膜损伤等。

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的肝感染,存在引起肝硬化和肝癌的风险。而采用 CRISPR/Cas9 技术根据 HBV S 和 X 基因的 2 个同源序列构建 pCas9 表达载体,可能介导体外和体内系统的抗 HBV 作用^[44]。

已有研究在母鼠子宫内进行基因编辑,来治疗子鼠致命性的代谢障碍,提示有可能在人类出生前对致病性的基因进行编辑^[45]。Rossodis 团队利用 CRISPR-Cas9 和 BE3,靶向性地在子宫内编辑了健康小鼠中调节胆固醇水平和降低胆固醇水平的基因,导致小鼠出生后 1 个月和 3 个月的 PCSK9 蛋白水平和总胆固醇水平下降^[45-46];Chadwick 团队也通过 BE 技术实现 PCSK9 基因的敲除,降低了血浆胆固醇的水平^[47]。

中科院上海生命科学研究院的研究人员利用 CRISPR-CasRx 技术下调单一 RNA 结合蛋白——多聚嘧啶区结合蛋白 1(polyrimidine tract binding protein 1, Ptbp1),其或能导致 Muller 胶质细胞高效转化为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs),从而减缓与 RGC 缺失相关的疾病症状^[48],为未来治疗神经退行性疾病提供了有前景的方案。

3 CRISPR/Cas 及衍生编辑技术在基因治疗中面临的挑战

尽管已证实 CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术在基因治疗领域的应用具有巨大的科研和实践价值,发展前景十分广阔,但在临床应用中必须克服许多障碍,特别是在准确性、安全性和体内有效性方面。

在准确性方面,相比 ZFN 技术、TALENs 技

术,CRISPR/Cas 编辑技术极大提高了基因编辑的效率,但有效率仍无法达到 100%。因此,若想提高基因编辑技术的临床应用率,编辑效率的进一步提升是其关键环节之一。BE 的表达水平与编辑效率十分相关,Koblan 等^[49]通过增加核定位信号(nuclear localization signal, NLS)以及使用优化的密码子序列,增加了 BE 在哺乳动物细胞中的编辑效率。

其次是安全性,主要集中在脱靶效应,尤其值得注意的是,除 DNA 中 Cas9:sgRNA 依赖^[15]和独立^[50-51]的脱靶效应外,BE 也可以非特异性地修饰 RNA^[52]。研究人员利用工程化的脱氨酶变体,即通过改造脱氨酶与 RNA 的活性结合位点从而来降低对 RNA 的编辑效率^[53-55]。在未来的发展过程中,解决基因编辑的脱靶问题是研究人员所面临的挑战。

在体内有效性方面,基因编辑技术在临床应用中需要将核酸酶系统输送至人体细胞内,现在已有的运输系统包括病毒载体、纳米颗粒以及蛋白质-RNA 复合物等^[1,56]。腺相关病毒载体 AAV、AAV2 和 AAV9 型载体已经被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗视网膜退行性疾病和脊髓性肌萎缩症^[57-58]。但是 AAV 有限的承载能力和体液免疫反应需要科学家继续寻找解决方案。未来可以尝试一些新型基因组编辑材料递送方式,如磁纳米颗粒转化法、碳纳米管转化法、病毒载体转化法等。

基因编辑技术在其他物种的成功应用,必然会应用于人类自身。在人类胚胎细胞中进行基因编辑,不仅可以治疗遗传性疾病,还可以使修复后的基因遗传给后代,完全消除致病基因的影响。但是尚在发展的基因编辑技术也会对后代造成安全性的风险,这些对人类的繁衍和生活方式等都会产生一定的影响。英国的科学家发现用 CRISPR/Cas9 在对胚胎发育非常重要的 *POU5F1* 基因中引入突变,在被编辑的 18 个胚胎中,约 22% 的胚胎在 *POU5F1* 周围出现了大量的变异,这远超出了研究人员的预期^[59]。哥伦比亚大学的研究人员使用 CRISPR/Cas9 对 *EYS* 基因的变异进行了修正,结果发现约半数的胚胎失去了大量的染色体片段,甚至失去了 *EYS* 基因所在的整个染色体^[60]。这些研究结果表明人类对于基因编辑技术以及 DNA 修复机制了解甚少,在推进科学研究

的同时,应建立起相应完善的有效监管体系,两者协调发展,从而保障基因编辑技术在人类疾病治疗中的应用^[61]。

4 展望

CRISPR/Cas 及其衍生编辑技术作为生命科学领域革命性的工具,将来可能会彻底改变生物学研究并影响个性化医疗。这些高精度、高频率编辑 DNA 或 RNA 的新兴技术极大地扩展了操纵和研究模式生物的能力,并给予治疗许多遗传疾病的希望。然而,也应看到这些技术的功能许多是相似的。例如,碱基编辑器和 Prime Editors 都能够创建 C > T 和 A > G 转换。因此,在基因治疗过程中,应综合考虑目标编辑效率和非目标编辑副产物等多种因素,选择最优方案。

此外,不仅要开发新型的碱基编辑系统,还应注意编辑系统的传递,尤其是需要进行大型动物研究,以确定基于 AAV 的双重策略对 BE 和 PE 的整体效果。有效实施新型的 CRISPR 技术还需要广泛评估其免疫原性,在大型动物模型中进行研究对于帮助确定连续表达 Cas13 或任何其他新型 CRISPR 技术是否会导致长期不利影响非常重要。

总之,人类科学和生物技术不断进步,CRISPR 技术不断发展,不断发现新的疾病靶点、提高编辑效率、降低脱靶效应,使其在基因治疗领域的应用越来越广泛。但还需要科学、医学、人类学及监管部门的相互合作,进一步促进基因编辑技术向临床治疗的转化,促进其在人类生产的应用,提升其应用价值。

参 考 文 献

- [1] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229–236.
- [2] TAMAS L, YANG D, WALDMAN A S. Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-SceI [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1994, 22(25): 5649–5657.
- [3] WYMAN C, KANAAR R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well [J]. *Annu. Rev. Genet.*, 2006, 40(1): 363–383.
- [4] URNOV F D, REBAR E J, HOLMES M C, *et al.*. Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, 11(9): 636–646.
- [5] JOUNG J K, SANDER J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2012, 14(1): 49–55.
- [6] CHO S W, KIM S, KIM J M, *et al.*. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(3): 230–232.
- [7] CONG L, RAN F A, COX D M, *et al.*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [8] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, *et al.*. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [9] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNBASHI O S, *et al.*. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, 13(11): 722–736.
- [10] MOHANRAJU P, MAKAROVA K S, ZETSCHKE B, *et al.*. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems [J/OL]. *Science*, 2016, 353(6299): aad5147[2021-06-04]. <https://science.sciencemag.org/content/sci/353/6299/aad5147.full.pdf>. DOI: 10.1126/science.aad5147.
- [11] ZEBALLOS C M A, GAJ T. Next-generation CRISPR technologies and their applications in gene and cell therapy [J/OL]. *Trends Biotechnol.*, 2020, 1: S0167-7799(20)30287-0[2021-06-04]. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.10.010>.
- [12] WANG F, WANG L, ZOU X, *et al.*. Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2019, 37(5): 708–729.
- [13] 任云晓, 肖茹丹, 娄晓敏, 等. 基因编辑技术及其在基因治疗中的应用[J]. *遗传*, 2019, 41(1): 18–27.
- [14] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.*. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [15] 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 [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [16] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, *et al.*. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [J/OL]. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729 [2021-06-04]. <https://science.sciencemag.org/content/sci/353/6305/aaf8729.full.pdf>. DOI: 10.1126/science.aaf8729.
- [17] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, *et al.*. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471.
- [18] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, *et al.*. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149–157.
- [19] YEH W H, CHIANG H, REES H A, *et al.*. *In vivo* base editing of post-mitotic sensory cells [J/OL]. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1): 2184 [2021-06-04]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04580-3>.
- [20] VILLIGER L, GRISCH-CHAN H M, LINDSAY H, *et al.*. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice [J]. *Nat. Med.*, 2018, 24(10): 1519–1525.
- [21] LEVY J M, YEH W H, PENDSE N, *et al.*. Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal

- muscle of mice via adeno-associated viruses [J]. *Nat. Biomed. Eng.*, 2020, 4(1): 97–110.
- [22] LIM C K W, GAPINSKE M, BROOKS A K, *et al.*. Treatment of a mouse model of ALS by *in vivo* base editing [J]. *Mol. Ther.*, 2020, 28(4): 1177–1189.
 - [23] WINTER J, LUU A, GAPINSKE M, *et al.*. Targeted exon skipping with AAV-mediated split adenine base editors [J/OL]. *Cell Discov.*, 2019, 5: 41[2021–06–04]. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0109-7>.
 - [24] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, ESSLETZBICHLER P, *et al.*. RNA targeting with CRISPR-Cas13 [J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 280–284.
 - [25] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, *et al.*. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J/OL]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573[2021–06–04]. <https://science.sciencemag.org/content/sci/353/6299/aaf5573.full.pdf>. DOI: 10.1126/science.aaf5573.
 - [26] EAST-SELETSKY A, O'CONNELL M R, KNIGHT S C, *et al.*. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection [J]. *Nature*, 2016, 538(7624): 270–273.
 - [27] MEESKE A J, NAKANDAKARI-HIGA S, MARRAFFINI L A. Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage [J]. *Nature*, 2019, 570(7760): 241–245.
 - [28] SMARGON A A, COX D B T, PYZOCNA N K, *et al.*. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28 [J]. *Mol. Cell*, 2017, 65(4):618–630.
 - [29] PARK S H, LEE C M, DEVER D P, *et al.*. Highly efficient editing of the beta-globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease [J]. *Nucleic Acids Res.*, 2019, 47(15): 7955–7972.
 - [30] KALKAN B M, KALA E Y, YUCE M, *et al.*. Development of gene editing strategies for human beta-globin (*HBB*) gene mutations [J/OL]. *Gene*, 2020, 734:144398[2021–06–04]. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144398>.
 - [31] DEVER D P, BAK R O, REINISCH A, *et al.*. CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 384–389.
 - [32] KOSICKI M, TOMBERG K, BRADLEY A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(8): 765–771.
 - [33] RYU S M, KOO T, KIM K, *et al.*. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(6): 536–539.
 - [34] REN J, ZHAO Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9 [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(9): 634–643.
 - [35] ZHAO J, LIN Q, SONG Y, *et al.*. Universal CARs, cells universal T, and universal CAR T cells [J/OL]. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, 11(1): 132[2021–06–04]. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0677-2>.
 - [36] LU Y, XUE J, DENG T, *et al.*. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer [J]. *Nat. Med.*, 2020, 26(5): 732–740.
 - [37] LIU D, ZHAO X, TANG A, *et al.*. CRISPR screen in mechanism and target discovery for cancer immunotherapy [J/OL]. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2020, 1874(1): 188378 [2021–06–04]. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188378>.
 - [38] CYRANOSKI D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial [J]. *Nature*, 2016, 535(7613): 476–477.
 - [39] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.
 - [40] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, *et al.*. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer [J/OL]. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365[2021–06–04]. <https://science.sciencemag.org/content/sci/367/6481/eaba7365.full.pdf>. DOI: 10.1126/science.aba7365.
 - [41] ZAFRA M P, SCHATTOFF E M, KATTI A, *et al.*. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(9): 888–893.
 - [42] ZHAO X, LIU L, LANG J, *et al.*. A CRISPR-Cas13a system for efficient and specific therapeutic targeting of mutant KRAS for pancreatic cancer treatment [J]. *Cancer Lett.*, 2018, 431: 171–181.
 - [43] WANG E, ZHOU H, NADORP B, *et al.*. Surface antigen-guided CRISPR screens identify regulators of myeloid leukemia differentiation [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(4):718–731.
 - [44] ZHU W, XIE K, XU Y, *et al.*. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse [J]. *Virus Res.*, 2016, 217:125–132.
 - [45] ROSSIDIS A C, STRATIGIS J D, CHADWICK A C, *et al.*. In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes [J]. *Nat. Med.*, 2018, 24(10): 1513–1518.
 - [46] ZHANG X, ZHAO W, NGUYEN G N, *et al.*. Functionalized lipid-like nanoparticles for in vivo mRNA delivery and base editing [J/OL]. *Sci. Adv.*, 2020, 6(34): eabc2315[2021–06–04]. <https://advances.sciencemag.org/content/6/34/eabc2315>. DOI: 10.1126/sciadv.abc2315.
 - [47] CHADWICK A C, WANG X, MUSUNURU K. *In vivo* base editing of PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) as a therapeutic alternative to genome editing [J]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2017, 37(9): 1741–1747.
 - [48] ZHOU H, SU J, HU X, *et al.*. Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice [J]. *Cell*, 2020, 181(3): 590–603.
 - [49] KOBLAN L W, DOMAN J L, WILSON C, *et al.*. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(9): 843–846.
 - [50] LIANG P, XIE X, ZHI S, *et al.*. Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq [J/OL]. *Nat. Commun.*, 2019, 10(1): 67[2021–06–04]. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07988-z>.
 - [51] REES H A, KOMOR A C, YEH W H, *et al.*. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery [J/OL]. *Nat. Commun.*, 2017, 8(1):15790[2021–06–04]. <https://doi.org/10.1038/ncomms15790>.

- [52] GRÜNEWALD J, ZHOU R, GARCIA S P, *et al.* Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors [J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433–437.
- [53] JIANG W, FENG S, HUANG S, *et al.* BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity [J]. *Cell Res.*, 2018, 28(8): 855–861.
- [54] GAUDELLI N M, LAM D K, REES H A, *et al.* Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38(7): 892–900.
- [55] ZHANG X, CHEN L, ZHU B, *et al.* Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain [J]. *Nat. Cell Biol.*, 2020, 22(6): 740–750.
- [56] HAASTEREN J VAN, LI J, SCHEIDELER O J, *et al.* The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38(7): 845–855.
- [57] MENDELL J R, AL-ZAIDY S, SHELL R, *et al.* Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy [J]. *N. Engl. J. Med.*, 2017, 377(18): 1713–1722.
- [58] Goldschmidt D, Scutti S. FDA approves gene therapy for a type of blindness[EB/OL]. (2017-12-21) [2021-06-29]. <https://edition.cnn.com/2017/12/20/health/fda-gene-therapy-blindness-bn/index.html>.
- [59] ALANIS-LOBATO G, ZOHREN J, MCCARTHY A, *et al.* Frequent loss-of-heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos [J/OL]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, 118(22): e2004832117 [2021-06-04]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004832117>.
- [60] ZUCCARO M V, XU J, MITCHELL C, *et al.* Reading frame restoration at the EYS locus, and allele-specific chromosome removal after Cas9 cleavage in human embryos [J]. *Cell*, 2020, 183(6):1650–1664.
- [61] CHARLESWORTH C T, DESHPANDE P S, DEVER D P, *et al.* Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans [J]. *Nat. Med.*, 2019, 25(2): 249–254.