



李大力, 博士, 华东师范大学生命科学学院研究员。近年来, 围绕基因编辑技术开展了一系列的研究工作, 特别是在人类疾病动物模型构建以及基因治疗方面开展了大量研究。利用TALEN和CRISPR/Cas等基因编辑技术在国际上率先建立了快速高效的大鼠和小鼠基因修饰技术体系, 实现了大鼠多基因同时敲除。通过基因编辑技术定点修复突变基因, 在小鼠模型中治愈了B型血友病, 为血友病的治疗提供了长效解决方案。利用腺苷单碱基编辑工具实现了在小鼠胚胎内的精确单碱基突变, 并成功扩充了腺苷单碱基编辑工具的潜在靶向位点。证明了在脊椎动物中扩充遗传密码子的稳定性和可行性。发表SCI论文70余篇, 近年来以通讯作者身份在*Nature Biotechnology*等杂志上发表论文26篇, 申请基因编辑或基因治疗专利12项。

<http://www.biomed.ecnu.edu.cn/97/5c/c9348a104284/page.htm>

基因编辑技术在细胞治疗中的研究进展

朱碧云 李林夕 王立人 李大力*

(上海市调控生物学重点实验室, 华东师范大学生命科学学院, 生命医学研究所, 上海 200241)

摘要 近年来, 基因治疗领域捷报频传, 在遗传疾病和肿瘤等疾病的治疗方面多个基因和细胞治疗药物获批上市, 更有一批新药将在2~3年内上市, 为患者带来革命性的治疗方案。相对于传统的外源基因导入的基因治疗策略而言, 基因编辑技术能实现基因组片段高效而精确的修复、插入和剔除, 有望显著提高基因治疗的持久性和安全性。以锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFNs)、转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)、规律成簇的间隔短回文重复CRISPR/Cas核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems, CRISPR/Cas)为代表的基因编辑技术蓬勃发展为细胞治疗领域带来开创性突破。该文将重点回顾基因编辑技术应用于细胞治疗的不同策略, 探讨其在细胞治疗中的特点、应用前景、机遇和挑战, 以期对基因编辑技术向细胞治疗的临床转化提供参考。

关键词 基因编辑; 遗传疾病; 细胞治疗

Recent *Ex Vivo* Gene Therapy through Genome Editing

Zhu Biyun, Li Linxi, Wang Liren, Li Dali*

(Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Institute of Life Medicine, Shanghai 200241, China)

Abstract Gene editing technology is a technique for genetically operating specific sites in eukaryotic genomes to achieve specific targeted genetic modification. Because gene editing technology has particular advantages

国家自然科学基金(批准号: 81670470、81873685和81600149)和上海市教育委员会科研创新项目(批准号: 2019-01-07-00-05-E00054、18411953500和17140901600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13916054101, E-mail: dlli@bio.ecnu.edu.cn

This work was partially supported the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670470, 81873685, 81600149) and Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (Grant No.2019-01-07-00-05-E00054, 18411953500, 17140901600)

*Corresponding author. Tel: +86-13916054101, E-mail: dlli@bio.ecnu.edu.cn

网络出版时间: 2019-05-09 17:35:29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1735.012.html>

in accurately correcting sequences in the genome, gene editing mediated therapy is being actively developed as treatments for a variety of diseases. With the development of genome editing technologies, such as zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems (CRISPR/Cas), gene therapy comes to a new era. This review mainly focuses on recent progress of genome editing technology and its applications in cell mediated *ex vivo* gene therapy.

Keywords genome editing; genetic disease; cell therapy

越来越多的研究发现, 绝大多数疾病的易感性都与DNA的变异相关, 其中最为典型的例子就是通常所说的遗传疾病, 特别是单基因遗传病。在已知的6 000多种遗传病中, 目前只有大约5%的疾病可以通过定期服用小分子药物或酶替代疗法进行治疗, 超过95%的病种没有有效的治疗方案, 治愈更是无从谈起^[1]。上世纪60年代提出了基因治疗概念, 希望通过导入治疗性基因药物来治愈由于基因缺陷而造成的疾病, 为遗传疾病的治疗带来了希望, 特别是单基因突变造成的遗传病[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]。经典的基因治疗主要有两种策略: 在体(*in vivo*)基因治疗和离体(*ex vivo*)细胞介导的基因治疗。前者是直接利用递送载体(主要分为重组病毒载体和非病毒递送载体)将基因药物进行局部注射或者静脉注射导入到靶器官进行表达而弥补缺陷基因的功能; 后者主要是将患者的细胞(一般是成体干/祖细胞、以CAR-T细胞疗法为代表的免疫细胞或者极具应用前景的iPS细胞)分离培养, 同时进行基因操作以修复患者细胞的遗传缺陷, 再通过自体回输进行治疗。

通过数十年的努力, 基因治疗在最近几年获得了突破性的进展。截止到2018年, 全球已经开展了2 600多项基因治疗的临床研究, 共有7个基因治疗药物分别在中国、美国和荷兰等国家获批: 4个用于肿瘤治疗(2个溶瘤病毒: 英文名为Oncorine和T-VEC; 2个CAR-T细胞疗法: Kymriah和Yescarta)、3个用于遗传疾病治疗(治疗脂蛋白脂肪酶突变的Glybera, 治疗腺苷脱氨酶突变造成重症联合免疫缺陷的Strimvelis以及治疗REP65基因突变造成先天性黑矇症的Luxturna)。Strimvelis、Kymriah和Yescarta这三个药物都是通过离体细胞治疗的方式分别将基因药物整合到患者造血干细胞和T细胞再自体回输^[2], 可见细胞介导的基因治疗策略非常成功。细胞治疗相对于体内治疗显著的优势在于可离体编

辑靶细胞群, 用可编程核酸酶修饰后可将校正后的细胞移植回原始宿主中。这种治疗模式可以利用多种基因药物的递送体系来对靶细胞进行基因操作, 例如电穿孔、阳离子脂质、细胞穿透肽和病毒载体^[3]。这些导入方式与直接导入体内的在体疗法相比具有更高的效率, 同时体外基因操作的干细胞具有可培养和传代扩增优势, 能进一步地富集所需的阳性细胞, 有效提高治疗效率。许多离体治疗可以控制所递送的治疗分子的特定剂量, 从而减少核酸酶的脱靶修饰^[4]。离体细胞的纯化、培养和移植等专业技术的长足发展也为细胞治疗提供强有力的技术支持。目前来说, 获批的几个基因治疗产品无一例外都是通过重组病毒作为递送载体, 不可避免地出现两个方面的担忧: 一是非整合型病毒表达基因药物时效性不够长而整合型病毒会将外源基因随机插入到受体细胞的基因组中, 另一个是可能导致肿瘤的发生。最理想的策略是将基因药物精确整合到基因组的特定位点, 实现长时间稳定表达。由于肿瘤基因治疗的特殊性以及本期有专文讨论CAR-T细胞疗法的进展, 本文主要围绕基因编辑介导的离体细胞治疗的研究进展进行回顾和展望。

1 基因编辑进展概述

近年来, 随着多种人工核酸内切酶技术的出现, 高效的基因编辑技术得到了快速发展和广泛应用。人工核酸内切酶技术主要包括四种: 大范围核酸酶技术(meganuclease)、锌指核酸酶技术(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关蛋白(CRISPR-associated proteins, Cas)系统。通过人工核酸酶可以精确靶向双链DNA产生双链断裂(double strand break, DSB)。DSB促使细胞

启动两种主要的DNA损伤修复机制: 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)^[5]和同源重组(homology-directed repair, HDR)^[6]。NHEJ可以发生在细胞周期的任一时期, 是最主要的高效修复方式, 但是由于通过NHEJ精确修复(canonical non-homologous end joining, C-NHEJ)的DNA序列会再次被核酸酶切割, 所以最终会出现不同长度片段(主要是少数几个碱基)的插入、删除或替换(insertion/deletion/substitution, indel), 从而导致基因失活(alternative non homologous end joining, A-NHEJ)^[7-8]。HDR是一种精确但低效的修复方式, 在有同源序列作为重组模板的前提下仅发生于细胞周期的S/G₂期^[9]。基于CRISPR/Cas9技术, 将胞嘧啶脱氨酶或者腺苷脱氨酶与Cas9缺口酶(Cas9-nickase, Cas9n)融合, 产生了单碱基编辑(base editing)技术。单碱基编辑技术直接利用脱氨酶将碱基脱氨通过DNA复制精确引入碱基替换, 最大的优势是效率高, 不依赖于同源重组也极少引起indel, 有着更安全的特点, 具有非常大的应用潜力^[10-13]。与此同时, 随着科学家对基因编辑工具认识的不断加深和改造, 基因编辑工具的应用领域也从基因组编辑发展到了表观基因组编辑^[14-15]和转录组调控领域^[16-19], 开发出一系列表观基因组编辑工具和转录调控相关工具。这些工具展示了基因编辑技术的超强可塑性, 增加了更多的应用场景, 也在基因治疗中展现了无可比拟的优势。

2 细胞治疗中多种基因编辑策略的应用

经典的基因治疗只能将外源基因添加到细胞中, 通过过表达基因产物达到治疗的效果。基因编辑技术则更加灵活, 可以通过定点整合来修复突变基因或者过表达治疗性基因产物, 可以删除基因编码区部分序列达到基因失活的效果, 还能作用于基因的启动子序列来增强或者减弱基因表达。体内基因编辑治疗的基础研究进展较快, 例如通过同源重组在肝脏中原位修复致病突变, 治愈I型酪氨酸血症(hereditary tyrosinaemia type I, HT-I)^[20-21]、B型血友病^[22]和致命性高血氨症^[23]; 通过在耳蜗毛细胞中敲除*TMCI*致病性的杂合突变等位基因而保留正常的等位基因, 恢复模型小鼠听力^[24]; 通过基因编辑删除*dystrophin*基因中提前出现终止密码子的外显子区段, 在小鼠^[25-26]和狗^[27]中显著改善杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)的症状。

然而, 在体基因治疗也只能针对部分疾病, 对于体内病毒感染效率非常低的造血干细胞等束手无策, 而且包括我们课题组在内的研究均发现即便是体内AAV感染效率最高的肝细胞, 在成年动物中通过同源重组修复单个碱基突变的效率都低于5%, 通常只有2%以下。而离体细胞治疗的方法可以高效感染造血干细胞, 例如2018年4月, *The New England Journal of Medicine*杂志上发表了一项关于 β -地中海贫血症(β -thalassemia, 简称 β 地贫)治疗的重要成果。研究者从患者体内提取出CD34⁺造血干细胞, 通过转染LentiGlobin BB305慢病毒载体导入可编码成人血红蛋白 β -链的*HbAT87Q*基因, 再重新回输到患者体内, 实现患者红细胞中正常 β 珠蛋白的高表达, 这项基于自体细胞的基因疗法, 最终减轻了患者的贫血症状和输血依赖。值得注意的是, 其减少输血依赖的有效率达100%, 并且在之后的随访中, 经治疗的22例患者的长期输血需求明显减少, 或已完全不需要输血, 该疗法并没有带来明显的副作用^[28]。

离体细胞治疗还可以在体外扩增或富集有效导入的阳性干细胞, 提高治疗成功率。例如, 2017年, Michele De Luca课题组^[29]报道了通过自体移植转基因表皮干细胞, 在一个患有严重交界型大疱性表皮松解症(Junctional Epidermolysis Bullosa, JEB)的7岁儿童身上修复了80%左右的表皮。通过从病人中分离表皮干/祖细胞, 将正常的*LAMB3*基因通过逆转录病毒导入患者细胞, 形成稳定感染的克隆后在体外扩增形成类似于表皮的结构再进行自体移植。这些细胞形成上皮组织可永久性地恢复大量皮肤的缺陷。这些通过逆转录病毒或慢病毒直接导入外源基因的传统基因疗法在临床上取得了巨大的成功, 说明基于细胞的基因治疗在很多疾病治疗方面有着巨大优势, 但是传统方法采用的慢病毒导入方式有着随机整合的致癌风险, 因此需要新的策略实现高效精确整合。下面将围绕不同的基因编辑策略探讨其在细胞治疗中的应用及进展。

2.1 利用NHEJ的基因编辑治疗思路

通常情况下, 由于NHEJ修复往往造成单个或多个碱基的插入或缺失, 常常用于破坏正常的基因阅读框, 使基因失活。利用这一策略最为成功的例子是人们可通过ZFN在T细胞中敲除HIV共受体之一的*CCR5*基因进行艾滋病的治疗。在欧洲有部分人*CCR5*基因编码区第185位氨基酸密码子以后发生了

32个碱基缺失导致基因失活,这些人对HIV-1病毒有天然的免疫力。2007年, Brown在德国一家医院接受天然CCR5突变的造血干细胞移植进行白血病治疗,同时他体内的HIV病毒也完全消失了,成为世界上首例被“治愈”的艾滋病患者^[30]。受此鼓舞,研究者在前期研究中分别在人CD4⁺ T细胞和造血干/祖细胞利用ZFN破坏CCR5基因,编辑效率分别为50%和17%。将编辑后的细胞移植到免疫缺陷小鼠中,用HIV-1病毒攻击可以进一步富集CCR5基因缺失的细胞,证明了该疗法的可行性^[31-32]。在此基础上,研究者将12名HIV-1感染者的T细胞分离出来,利用ZFN对CCR5的编码区进行编辑,细胞体外扩增后,每位患者一次性注入100亿个T细胞(CCR5编辑效率为11%~28%)。随机分组的6名患者在自体T细胞移植4周后开始停止服用抗逆转录病毒药物,其中4名患者12周检测时病毒数量显著减少^[33]。该研究是第一个利用基因编辑进行疾病治疗的临床研究,从概念上证明基因编辑用于基因治疗的安全性和有效性,具有划时代的意义。然而也可以看到ZFN的基因编辑效率比较低,这主要是ZFN本身编辑活性有限,另外T细胞和造血干细胞的基因递送难度较大。该研究中所用的质粒DNA电转和腺病毒递送都不能达到很高的效率。最近Alexander Marson实验室^[34]利用CRISPR/Cas9在CD4⁺ T细胞中使CCR5的表达量下降了近80%,并有效阻止了HIV-1病毒衣壳的感染。

NHEJ除了可以用来破坏基因的编码框,也可以作用于启动子、增强子等非编码序列,抑制或者激活目的基因的表达,达到治疗的效果。 β 地贫是临床上常见的遗传性血液病之一,其病因是 β 珠蛋白基因的突变,导致本应与其结合形成成人血红蛋白(adult hemoglobin, HBA)的 α 珠蛋白在红细胞前体中不断积累使红细胞前体过早凋亡。若能重新开启人体中被沉默的 γ 珠蛋白(主要在胎儿期表达,出生后表达被沉默)表达则能够使游离的 α 珠蛋白与 γ 珠蛋白形成胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HBF),达到治疗 β 地贫的目的^[35]。BCL11A正是负责沉默 γ 珠蛋白的主要转录抑制因子,由于BCL11A基因在造血干细胞中有着关键作用,不能直接敲除。2015年哈佛医学院Dan E. Bauer研究小组与麻省理工学院的张峰研究组^[36]合作,利用CRISPR/Cas9技术在红细胞前体细胞系HUDEP2中筛选得到了一个BCL11A的红系特异性增强子。和预期的一样,在利用CRISPR/Cas9

技术破坏该增强子后, BCL11A在红细胞前体中的表达大大降低,而 γ 珠蛋白的表达以及HBF的含量则大大提高,造血干细胞的正常红系和多能分化功能并未受到影响。由于造血干细胞的分离和移植技术已经很成熟,在分离后的造血干细胞中敲除BCL11A增强子,随后重新移植入患者体内就有可能治愈或缓解患者的病情。而就在一年后来自St Jude儿童医院的Mitchell J Weiss研究组^[38]再次将治疗 β 珠蛋白类突变疾病的理想向前推进了一步,与Dan E. Bauer研究组不同的是,他们将CRISPR/Cas9的靶点直接指向了 γ 珠蛋白的启动子-102--104区域。有研究表明,该区域为BCL11A的结合位点,临床上发现如果该区域发生缺失同样能够导致 γ 珠蛋白升高[即高胎儿血红蛋白症(heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPHF)]^[37]。Weiss研究组^[38]在镰刀状贫血(sickle cell disease, SCD, 该疾病同样是 β 珠蛋白突变导致的)病人的造血干祖细胞中针对-102--104区域利用Cas9进行编辑后发现,低氧诱导产生的病态镰刀状细胞比例由20%以上降低到了个位数比例。以上两项研究对 β 地贫和镰刀状贫血的治疗有着巨大的意义,相关的临床研究(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03655678)也已经被开展。

利用基因编辑工具在相近的基因组区域产生两个DSB。NHEJ修复过程中还可能将两个DSB区间的DNA序列倒位后再连接起来,可以针对由于倒位而产生的遗传疾病。来自法国染色质和基因发育调控实验室Annarita Miccio研究组^[39]的研究表明,在造血干/祖细胞中,利用CRISPR/Cas9敲除 δ 与 β 珠蛋白基因间13.6 Kb或使其倒位也可以重新激活胎儿血红蛋白的表达。类似地,来自韩国的Jin-Soo Kim的研究小组^[40-41]在两篇报道中分别利用TALEN和CRISPR/Cas9技术在iPS细胞中成功修复了140 Kb DNA和600 Kb倒位的A型血友病细胞模型,这些修复后的iPS细胞在分化成内皮细胞并进行皮下移植后成功缓解了A型血友病模型小鼠的疾病症状。

总的来说,虽然ZFN、TALEN和CRISPR/Cas9理论上都适用于基于NHEJ的细胞治疗,但是CRISPR/Cas9系统仅需根据不同位点设计相应的sgRNA,更加简单灵活而高效,所以在CRISPR/Cas9技术出现以后越来越多的相关领域的研究开始转向利用CRISPR/Cas9系统。特别是对于需要产生多个DSB的治疗模型,利用CRISPR/Cas9技术只需递送多个

sgRNA, 非常简便。而反观利用ZFN或者TALEN的方法都需要多递送1对或多对核酸分子, 增加了递送成本和难度, 也大大降低了同时编辑的效率。

2.2 利用HDR的基因编辑治疗思路

在大多数由基因突变导致的疾病当中, 仍然需要通过精准的基因修复或者在安全位点(例如, *AAVS1*基因座)插入正常的基因才能够实现基因治疗, 此时利用DSB来提高HDR就变得意义重大。来自Sangamo公司的Wang等^[42]通过电转将ZFN-mRNA递送到HSPC后再利用AAV6病毒递送供体模板, 成功地将*GFP*基因分别插入到了*CCR5*和*AAVS1*位点中, 效率分别达到了17%和26%, 而在胎肝来源的HSPC中效率更是高达19%和43%。而此前仅利用IDLV(integration deficient lenti virus)作为供体的定点整合效率只有0.1%^[43]。利用类似的手段, 来自Sangamo公司的Kang研究组等^[44]在慢性肉芽肿病人来源的HSPC中, 将治疗性的*gp91phox*基因成功地特异性整合到*AAVS1*基因座, 效率约为7.1%。NSG小鼠移植模型证明了长期再生性造血干细胞和祖细胞(long term repopulating HSPC)的确得到了正确的基因插入, 为治疗人类血液和免疫系统疾病提供了新的思路^[44]。DeWitt等^[45]则通过优化包含Cas9蛋白和sgRNA的核糖核蛋白(RNP)复合物来递送CRISPR-Cas9系统, 利用单链DNA寡核苷酸(ssODN)作为供体修复SCD突变, 精确修复的效率高达33%, 经校正的HSPC产生了较少的镰状血红蛋白RNA和蛋白质, 并且当分化成红细胞时相应地增加了正常的血红蛋白表达。将经过编辑的人HSPC移植到NSG小鼠体内, HSPC中的基因编辑效果可以维持整整16周, 具有非常好的临床应用前景。基因整合效率与治疗效果直接相关, 如何进一步提高修复后细胞的比率一直是困扰研究者的问题。利用AAV6病毒作为供体, Porteus实验室^[46]通过电转Cas9与sgRNA的RNP复合物来切割基因组, 成功将带有正常*HBB* cDNA以及tNGFR筛选标签的供体片段插入了SCD患者造血干细胞的*HBB*启动子之后, 效率达到了11%。尽管核酸酶产生的DSB已经将重组效率提高了3个数量级, 然而在Porteus的实验中仍远远达不到直接用于治疗级别。为了富集基因定点整合的造血干细胞, Porteus研究组^[46]在插入目的基因的同时插入了tNGFR胞外段标签, 使得它们可以通过微磁珠来富集发生正确重组的细胞, 经过富集后*HBB*的整合效

率在tNGFR^{high}细胞中约为86%。

为了提高重组效率, 研究人员也在不断寻找促进HDR的小分子药物如SCR7、RS-1等^[47-48], 抑或尝试新的供体设计如单链寡核苷酸(SSODN)^[49]、HMEJ供体^[50]、硫代磷酸酯修饰供体^[51]等, 不过还需要更多的实验数据来验证这些药物在临床运用上的价值。

2.3 利用单碱基编辑工具的治疗思路

虽然HDR的灵活性和准确性高, 但是修复效率一直是其限制因素, 使其在基因治疗中的应用充满了局限性。迄今为止在已知的疾病数据库中, 突变类型最多的还是单碱基突变[或称单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)]。2016年, 来自哈佛大学的Liu研究团队^[10]、中国科学院的常兴课题组^[12]以及日本神户大学的Akihiko Kondo团队^[13]先后分别利用胞苷脱氨酶rAPOBEC1、hAID和PmCDA1(来自七鳃鳗的AID)开发出了能够将C/G碱基对突变为T/A碱基对的胞苷碱基编辑工具(cytidine base editors, CBE)。一年后, Liu课题组^[11]又利用“噬菌体协助的持续进化(phage-assisted continuous evolution, PACE)”创造出了将A/T碱基对突变为G/C碱基对的腺苷碱基编辑工具(adenine base editors, ABE)。总体来说, 两类碱基编辑工具的工作原理是将不同的DNA脱氨酶(rAPOBEC1、AID或tadA)融合在Cas9的N-端表达, 利用Cas9/sgRNA将脱氨酶靶向目标序列, 进而利用各自融合的脱氨酶实现碱基的脱氨和转变。

碱基编辑工具的优势在于编辑过程中不易发生大片段缺失、平均效率较HDR高, 为疾病的精确治疗提供了新的思路。其最直接的应用是原位修复导致疾病的突变。2017年, Liang等^[52]首次在人类的胚胎中实现了β珠蛋白基因(*HBB*)第28位A>G的突变修复(*HBB* 28 A>G是导致地中海贫血的常见突变之一), 在概念上实现了利用碱基编辑工具治疗遗传疾病的目的。除此之外利用碱基编辑工具可以更精确高效地通过对剪切供体和受体的突变调控mRNA的剪切。这一点有望用于一些特殊的遗传疾病, 例如DMD^[53]。2018年, 常兴课题组^[54]利用的AID-saCas9通过外显子跳跃技术恢复了DMD病人iPS细胞中*DMD*的转录本, 从而恢复了DMD蛋白的功能。

然而, 碱基编辑工具的发展目前还处于起步阶

段, 仍然面临着一些挑战。例如, spyCas9蛋白过大导致单碱基编辑工具的大小普遍在4.5 Kb以上, 增加了AAV病毒的包装难度, 甚至使其无法包装; 该工作位点受到NGG PAM的限制; 编辑窗口较宽, 容易造成“旁观者突变(Bystander mutation)”。为此研究人员包括本课题组^[55-56]开发出了基于Cpf1、saCas9等较小CRISPR系统的单碱基编辑工具, 同时也在尝试改变spyCas9的PAM识别序列^[57]。而为了解决旁观者效应, 哈佛大学的Gehrke等^[58]通过在A3A-BE3上引入新的突变, 创造了新的eA3A-BE3单碱基编辑工具。eA3A-BE3更倾向于突变TCR(R为嘌呤)序列中的胞嘧啶, 且保留了较高的编辑效率。他们通过将eA3A-BE3的重组蛋白与化学合成的sgRNA复合物电转到 β 地贫患者造血干细胞中, 精确地修复了HBB基因启动子上的单碱基突变而几乎不引起其他位点的胞嘧啶的转换。这个新的单碱基编辑工具解决了在基因治疗中单碱基编辑酶突变窗口过大可能引起周围其他位点同时突变的副作用, 另外利用RNP的形式递送单碱基编辑工具也有效地解决了递送问题^[58-59]。

3 体外编辑细胞的适应性

经过编辑的细胞移植到体内后的命运与基因治疗的疗效息息相关, 若已编辑的细胞相对于未编辑的细胞具有更强的适应性, 必将促使编辑后的细胞具有生长优势, 如此即使编辑的细胞数量很少, 移植到体内也可以起到治疗的作用。近期有报道指出, 移植后的造血干/祖细胞一部分克隆可以独立于连续供应的上游多能祖细胞而存活, 维持谱系偏向的输出, 也就是说, 有可能只要对这一小部分的细胞进行编辑, 便可以达到治疗效果^[60]。

除了针对造血干细胞进行基因编辑用于治疗血液和免疫缺陷类疾病, 近来越来越多的报道将基因编辑系统作用于其他类型的干细胞。例如, Gerald Schwank等^[61]利用CRISPR/Cas9基因编辑系统对体外培养的肠干细胞进行同源重组, 对CFTR基因座进行了校正。校正后的等位基因在克隆扩增的类器官中表达出有功能蛋白, 为单基因遗传缺陷患者原代成人干细胞同源重组基因校正提供了理论依据。2013年, Wu等^[62]将CRISPR/Cas9系统成功地应用于精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC), 通过选择出携带所需基因型且没有脱靶突变的SSC系, 让

携带纯合遗传缺陷的父亲可以100%产生健康后代, 为父系遗传疾病的治疗提供了新的策略。然而, 对于生殖细胞的编辑将会面临严肃的伦理道德问题, 在这方面的伦理体系和长期安全观察结论完善以前, 此类基因编辑仅仅只能停留在实验室研究阶段。

4 基因编辑疗法的安全性

在基因治疗的发展历程中也曾发生过一些严重的安全问题, 致使基因治疗的发展在很长的一段时间内停滞不前。2008年, JCI杂志报道了4例因基因治疗而导致白血病产生的案例。这4名患者都参与了一项利用逆转录病毒治疗重整联合免疫缺陷(SCID-X1)的临床试验。虽然感染了逆转录病毒的CD34⁺细胞的确将健康的IL2RG基因带入了患者体内且达到了治疗SCID-X1的效果。但是由于病毒载体自身带有增强子元件, 病毒随机整合到了LMO2(3例)和CCND2(1例)这两个基因附近, 使这两个基因异常表达, 从而导致白血病的产生^[63]。因此, 如今在进行类似干细胞基因治疗时都有必要检测病毒载体是否在原癌基因处有随机的插入。

干细胞或iPS细胞经过体外培养后可能累积潜在的致癌突变被认为是干细胞治疗的主要障碍之一。人类iPS细胞的染色体不稳定性在2010年首次被报道, 常见的是12号染色体三体, 它可能有助于多能干细胞增殖和重编程的选择性优势, 同时也是睾丸生殖细胞肿瘤的标志^[64]。2014年, 1名患有渗出性年龄相关性黄斑变性(exudative age-related macular degeneration, AMD)的日本女性移植了由自体皮肤成纤维细胞经iPS诱导后分化成的视网膜色素上皮细胞, 这是基于iPS细胞的细胞疗法首次在人体进行临床试验。然而一年后, RIKEN叫停了这项试验, 因为他们在给第2位患者移植之前在iPS细胞中发现了突变, 突变包括3种单核苷酸变异(SNV)和3种拷贝数变异(CNV), 其中1个SNV列在癌症体细胞突变的数据库中, 与单一癌症有关。尽管当时经移植治疗的第1位患者并没有表现出严重的副作用, 但相关研究者仍表示需要小心跟踪患者足够长时间观察任何不良细胞的生长情况^[65]。除此之外, 干细胞的致癌性也有可能是由微环境和干细胞的突变共同引起, 2014年, 1名患有急性髓性白血病的日本男性接受了HLA匹配成功的外周血干细胞移植, 但在27个月之后, 白血病复发, 经诊断复发是由供体来源的IDH2

和DNMT3A突变造成的。虽然这两种突变在供体中尚未造成白血病,但由于移植后骨髓扩增迅速以及患者同时接受免疫抑制治疗,这两点造成了免疫监控系统缺陷,导致了供体白血病细胞在移植后的受体中迅速发展^[66]。

对于基因编辑策略而言,最大的担忧是具有潜在的脱靶安全隐患^[67-68]。在干细胞中发生的低频脱靶可能并不会立刻导致相应的表型产生,但是从长远的角度看却埋下了隐患。尽管利用预测软件能够分析出与靶点相似的潜在脱靶位点,还是有研究表明,在一些非典型PAM位点或者与靶点相似度较低位点仍然有可能有脱靶现象发生^[4]。全基因组测序分析对于概率极低的脱靶现象也很有可能出现假阴性的结果。近几年,随着CRISPR/Cas9技术的发展也催生出了许多灵敏度极高的体内、体外实验方法以帮助检测潜在的脱靶位点,例如DIG-seq、Circle-seq、Guide-seq等^[69-71]。这些方法在临床治疗时的合理运用将会对临床实验的安全性起到重要的作用。

5 展望

回想半个世纪以前,人类刚刚开启破译遗传密码的旅程,对于多种遗传病的病因还毫无头绪。而如今我们已经能够编写遗传密码、修复一些致病DNA突变。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9这些工具的迭代出现帮助基因编辑领域取得了长足的进步^[72]。随着这些进步我们关注的焦点也已经从发现病因逐渐转向了运用新的技术和工具治愈这些遗传疾病。在这之中,效率和安全问题一直是我们的两大焦点。在效率问题上,一方面可以通过改进或选取合适的递送方式提高基因编辑工具进入细胞的绝对量。例如针对不同的靶器官选取不同的AAV类型;利用电转RNP的方式提高细胞体外编辑的效率同时降低脱靶^[73];选取合适的纳米材料递送mRNA形式的基因编辑工具等^[20]。另一方面科研人员也在对人工核酸酶系统进行不断的优化,大范围核酸酶与TALEN技术的联合运用^[74];CRISPR系统PAM序列的拓展^[75-76]以及新型CRISPR工具的不断开发^[77-79];sgRNA与供体DNA的不同修饰^[51,80],这些都有助于提高核酸酶产生DSB的效率或者拓展新的位点。在安全性上,人们也在不断开发新的“保真型”CRISPR工具从源头降低脱靶概率^[81-83],而不断出现的新型脱靶检测

技术也有助于研究员检测和筛选编辑后的细胞。同时我们也必须看到CRISPR系统带给我们的并不仅仅是一把DNA剪刀,通过不同的融合蛋白,它还能够进行单碱基编辑、基因表达的调控和表观遗传修饰。结合不同的遗传疾病拓展这些新工具向临床领域的转化,关乎到是否有更多的遗传疾病能够从基因治疗领域获益。当然针对不同的新工具还必须开发相应的安全评价体系。虽然在短期内我们还不能做到高效、安全地靶向人体内的各个器官,但是干细胞离体分离技术和类器官离体培养技术已经逐渐发展起来。如今除造血系统之外,肝脏干细胞、小肠干细胞和它们各自的类器官培养技术都日趋完善^[84-86],如何将基因编辑技术和这些技术联合起来将会是基因编辑向临床基因治疗转化的关键因素之一。对于细胞介导的基因治疗而言,除了血液系统可以进行有效的移植和重建外,如何将编辑改造后的细胞有效地整合到实体器官也是今后要重点研究和探讨的科学问题。

基因编辑的兴起,改变了以往对基因和细胞疗法的定义,为解决许多疾病提供了新的思路和契机,但基因编辑介导的细胞治疗仍面临着安全性的挑战,随着新工具的开发和利用,这些技术上的问题都将会得到解决。技术的进步往往推动伦理的发展,这就要求科学家恪守伦理道德,合理利用基因编辑工具造福人类。

参考文献 (References)

- 1 Kaufmann P, Pariser AR, Austin C. From scientific discovery to treatments for rare diseases—the view from the National Center for Advancing Translational Sciences—Office of Rare Diseases Research. *Orphanet J Rare Dis* 2018; 13(1): 196.
- 2 Chow VA, Shadman M, Gopal AK. Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2018; 132(8): 777-81.
- 3 Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med* 2015; 21(2): 121-31.
- 4 Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31(9): 827-32.
- 5 Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16(5): 2164-73.
- 6 Haber JE, Ira G, Malkova A, Sugawara N. Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359(1441): 79-86.

- 7 Bétermier M, Bertrand P, Lopez BS. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genetics* 2014; 10(1): e1004086.
- 8 Shou J, Li J, Liu Y, Wu Q. Precise and predictable CRISPR chromosomal rearrangements reveal principles of Cas9-mediated nucleotide insertion. *Mol Cell* 2018; 71(4): 498-509.e4.
- 9 Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003; 23(16): 5706-15.
- 10 Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016; 533(7603): 420-4.
- 11 Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017; 551(5): 464-71.
- 12 Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods* 2016; 13(6): 1029-35.
- 13 Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, *et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 2016; 353(3): 8729.
- 14 Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, *et al.* Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods* 2015; 12(18): 401-3.
- 15 Klann TS, Black JB, Chellappan M, Safi A, Song L, Hilton IB, *et al.* CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol* 2017; 35(6): 561-8.
- 16 Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, *et al.* Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* 2013; 23(10): 1163-71.
- 17 Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013; 152(5): 1173-83.
- 18 Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods* 2013; 10(10): 977-79.
- 19 Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013; 154(2): 442-51.
- 20 Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, *et al.* Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2016; 34(3): 328-33.
- 21 Shao Y, Wang L, Guo N, Wang S, Yang L, Li Y, *et al.* Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats. *J Biol Chem* 2018; 293(18): 6883-92.
- 22 Guan Y, Ma Y, Li Q, Sun Z, Ma L, Wu L, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med* 2016; 8(5): 477-88.
- 23 Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, *et al.* A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol* 2016; 34(3): 334-8.
- 24 Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh WH, Pan B, *et al.* Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents. *Nature* 2018; 553(7687): 217-21.
- 25 Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 2014; 345(6201): 1184-8.
- 26 Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Rivera RMC, *et al.* *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 2016; 351(6271): 403-7.
- 27 Amoasii L, Hildyard JC, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, *et al.* Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 2018; 362(6410): 86-91.
- 28 Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JE, Ribeil JA, Hongeng S, *et al.* Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia. *N Engl J Med* 2018; 378(16): 1479-93.
- 29 Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, *et al.* Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 2017; 551(7680): 327-32.
- 30 Church JA. Long-term control of HIV by CCR5 delta32/delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360(7): 692-8.
- 31 Holt N, Wang J, Kim K, Friedman G, Wang X, Taupin V, *et al.* Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2010; 28(8): 839-47.
- 32 Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, *et al.* Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 808-16.
- 33 Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, *et al.* Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med* 2014; 370(10): 901-10.
- 34 Hultquist JF, Schumann K, Woo JM, Manganaro L, McGregor MJ, Doudna J, *et al.* A Cas9 ribonucleoprotein platform for functional genetic studies of HIV-host interactions in primary human T cells. *Cell Rep* 2016; 17(5): 1438-52.
- 35 Musallam KM, Taher AT, Cappellini MD, Sankaran VG. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with β -thalassemia. *Blood* 2013; 121(12): 2199-22.
- 36 Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, *et al.* BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis. *Nature* 2015; 527(7577): 192-7.
- 37 Gilman J, Mishima N, Wen X, Stoming T, Lobel J, Huisman T. Distal CCAAT box deletion in the A γ globin gene of two black adolescents with elevated fetal A γ globin. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(22): 10635-42.
- 38 Traxler EA, Yao Y, Wang Y-D, Woodard KJ, Kurita R, Nakamura Y, *et al.* A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med* 2016; 22(9): 987-90.
- 39 Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, Felix T, Romano O,

- Magrin E, *et al.* Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood* 2018; 131(17): 1960-73.
- 40 Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, *et al.* Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia a patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 213-20.
- 41 Park CY, Kim J, Kweon J, Son JS, Lee JS, Yoo JE, *et al.* Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPSC cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(25): 9253-8.
- 42 Wang J, Exline CM, DeClercq JJ, Llewellyn GN, Hayward SB, Li PWL, *et al.* Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using ZFN mRNA and AAV6 donors. *Nat Biotechnol* 2015; 33(12): 1256-63.
- 43 Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleonis S, Lee YL, Kim KA, *et al.* Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 2007; 25(11): 1298-360.
- 44 De Ravin SS, Reik A, Liu P-Q, Li L, Wu X, Su L, *et al.* Targeted gene addition in human CD34⁺ hematopoietic cells for correction of X-linked chronic granulomatous disease. *Nat Biotechnol* 2016; 34(4): 424-9.
- 45 DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, *et al.* Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med* 2016; 8(360): 360ra134.
- 46 Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, *et al.* CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* 2016; 539(7629): 384-9.
- 47 Song J, Yang D, Xu J, Zhu T, Chen YE, Zhang J. RS-1 enhances CRISPR/Cas9-and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat Commun* 2016; 7: 10548.
- 48 Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol* 2015; 33(5): 538-42.
- 49 Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, Nagahora H, Voigt B, Mashimo T. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun* 2016; 7: 10431.
- 50 Yao X, Wang X, Hu X, Liu Z, Liu J, Zhou H, *et al.* Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res* 2017; 27(6): 801-22.
- 51 Renaud JB, Boix C, Charpentier M, De Cian A, Cochenne J, Duvernois-Berthet E, *et al.* Improved genome editing efficiency and flexibility using modified oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 nucleases. *Cell Rep* 2016; 14(9): 2263-72.
- 52 Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, *et al.* Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein Cell* 2017; 8(11): 811-22.
- 53 Komaki H, Nagata T, Saito T, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, *et al.* Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2018; 10(437): eaan0713.
- 54 Yuan J, Ma Y, Huang T, Chen Y, Peng Y, Li B, *et al.* Genetic modulation of RNA splicing with a CRISPR-guided cytidine deaminase. *Mol Cell* 2018; 72(2): 380-94.e7.
- 55 Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature* 2016; 532(7600): 517-21.
- 56 Yang L, Zhang X, Wang L, Yin S, Zhu B, Xie L, *et al.* Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell* 2018; 9(9): 814-9.
- 57 Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol* 2017; 35(4): 371-6.
- 58 Gehrke JM, Cervantes O, Clement MK, Wu Y, Zeng J, Bauer DE, *et al.* An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat Biotechnol* 2018; 36(10): 977.
- 59 Xu S, Luk K, Yao Q, Shen AH, Zeng J, Wu Y, *et al.* Editing aberrant splice sites efficiently restores β -globin expression in β -thalassemia. *Blood* 2019; doi: blood-2019-01-895094.
- 60 Scala S, Basso-Ricci L, Dionisio F, Pellin D, Giannelli S, Salerio FA, *et al.* Dynamics of genetically engineered hematopoietic stem and progenitor cells after autologous transplantation in humans. *Nat Med* 2018; 24(11): 1683.
- 61 Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, *et al.* Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 653-8.
- 62 Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, *et al.* Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 659-62.
- 63 Haccin-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008; 118(9): 3132-42.
- 64 Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic instability of iPSCs: challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Rev* 2017; 13(1): 7-16.
- 65 Garber K. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2015; 33(9): 890-1.
- 66 Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, *et al.* Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2014; 28(2): 426-8.
- 67 Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 839-43.
- 68 Morgens DW, Wainberg M, Boyle EA, Ursu O, Araya CL, Tsui CK, *et al.* Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. *Nat Commun* 2017; 8: 15178.
- 69 Kim D, Kim JS. DIG-seq: a genome-wide CRISPR off-target profiling method using chromatin DNA. *Genome Res* 2018; 28(12): 1894-900.
- 70 Tsai SQ, Nguyen NT, Malagon-Lopez J, Topkar VV, Aryee MJ, Joung JK. CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for

- genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods* 2017; 14(6): 607-14.
- 71 Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 2015; 33(2): 187-97.
- 72 Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31(7): 397-405.
- 73 Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4): 583-93.
- 74 Wang L, Smith J, Breton C, Clark P, Zhang J, Ying L, *et al.* Meganuclease targeting of PCSK9 in macaque liver leads to stable reduction in serum cholesterol. *Nat Biotechnol* 2018; 36(8): 717-25.
- 75 Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* 2018; 556(7699): 57.
- 76 Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 2018; 361(6408): 1259-62.
- 77 Liu JJ, Orlova N, Oakes BL, Ma E, Spinner HB, Baney KL, *et al.* CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature* 2019; 566(7752): 218.
- 78 Teng F, Li J, Cui T, Xu K, Guo L, Gao Q, *et al.* Enhanced mammalian genome editing by new Cas12a orthologs with optimized crRNA scaffolds. *Genome Biol* 2019; 20(1): 15.
- 79 Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015; 163(3): 759-71.
- 80 Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol* 2015; 33(9): 985-9.
- 81 Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 2016; 529(7587): 490-5.
- 82 Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, *et al.* Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature* 2017; 550(7676): 407-10.
- 83 Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016; 351(6268): 84-8.
- 84 Zhang K, Zhang L, Liu W, Ma X, Cen J, Sun Z, *et al.* *In vitro* expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity. *Cell Stem Cell* 2018; 23(6): 806-819.e4.
- 85 Hu H, Gehart H, Artegiani B, López-Iglesias C, Dekkers F, Basak O, *et al.* Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell* 2018; 175(6): 1591-606.
- 86 Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016; 165(7): 1586-97.