



CRISPR/Cas系统递送技术及其应用研究进展*

赵子璇^{1)**} 李春辉^{1)**} 周莉莉²⁾ 赵德尧^{1,3)} 翁郁华¹⁾ 夏新华²⁾ 黄渊余^{1,2)***}

⁽¹⁾ 北京理工大学生命学院, 前沿交叉科学研究院, 医工融合研究院, 分子医学与生物诊疗重点实验室, 北京 100081;

⁽²⁾ 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; ⁽³⁾ 郑州大学第一附属医院放疗科, 郑州 450000

摘要 基于CRISPR/Cas的基因编辑系统是近年来研究发展最重要的生物技术之一, 其在基因编辑、核酸成像、转录调控、基因检测与疾病诊断、动物模型建立、农作物改良等领域均有十分广泛的应用. 本文主要介绍了CRISPR/Cas基因编辑技术的背景与发展历程, 梳理了包括纳米载体在内的各类递送技术, 总结了该技术应用于疾病治疗的临床前和临床研究进展, 简述了CRISPR/Cas在其他更广泛领域的应用, 并就该技术面临的挑战、发展趋势和应用前景做了展望.

关键词 CRISPR/Cas, 基因编辑, 药物递送, 基因治疗, 基因检测

中图分类号 Q341, Q789

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0281

成簇规律性间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 存在于约40%的已测序细菌和大约90%的已测序古细菌中^[1], 是原核生物在进化过程中形成的一种获得性免疫防御系统, 用来抵抗外源遗传物质 (如噬菌体病毒和外源质粒等) 的入侵, 以保证自身遗传物质的稳定表达, 这与哺乳动物的二次免疫类似. 在CRISPR/Cas技术发展之前, 基因编辑技术还包括锌指核酸内切酶 (zinc finger endonuclease, ZFN) 和类转录激活因子效应物 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN), 但脱靶问题严重限制了基因治疗技术的开拓. CRISPR/Cas技术的兴起, 改变了人们对基因治疗的看法和偏见, 它有望成为一次性治愈疾病的重要技术之一. 针对CRISPR/Cas系统结构机制的研究、技术层面的开发等都取得了良好的进展, 为从根源上治愈遗传性疾病带来无限的希望.

1 CRISPR/Cas系统简介

CRISPR/Cas系统最早在1987年被日本科学家Ishino等^[2]在K12型大肠杆菌中发现. CRISPR/Cas系统具有精确的靶向功能, 因此CRISPR/Cas系统被开发成一种高效的基因编辑工具. 后来研究发现, 它还可以用来删除、添加、激活或抑制其他生

物体的目标基因, 这些目标基因包括人、老鼠、斑马鱼、细菌、果蝇、酵母、线虫和农作物细胞内的基因, 这也意味着基因编辑器是一种可以广泛使用的生物技术. CRISPR/Cas系统根据发挥作用的Cas蛋白的数量主要分为Class I和Class II. Class I主要使用多种Cas蛋白酶复合物 (multi-protein effector complexes) 来降解外来核酸, 包括I、III和IV型; Class II主要使用单个大型Cas蛋白作为效应复合物来执行相关功能, 包括II型的Cas9、V型的Cas12和VI型的Cas13T, 由Class I进化而来, 只含有单个Cas蛋白效应器, 是目前开发CRISPR/Cas基因编辑技术的原理支持^[3-4]. 之所以CRISPR/Cas系统在上应用上存在差异, 就是因为Cas蛋白存在于不同物种中, 具有不同种类, 因此存在多样性, 可用于多种用途. 近年来, CRISPR/Cas系统发展迅猛 (图1), 不仅发现了越来越多的Cas蛋白, 更是逐渐应用到人体临床试验上.

* 国家自然科学基金(31901053, 31871003), 湖南省自然科学基金(2018JJ1019, 2019JJ50196)和湖湘青年英才项目(2018RS3094)联合资助.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-68911089, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn

收稿日期: 2019-11-20, 接受日期: 2020-03-10

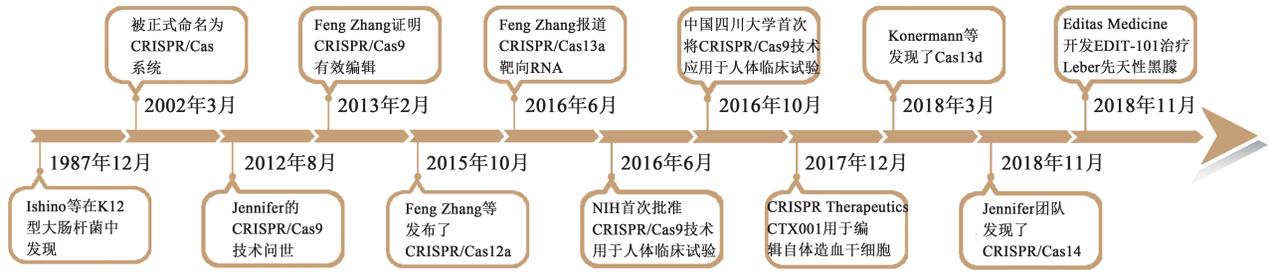


Fig. 1 Evolution of CRISPR/Cas technology development
图1 CRISPR/Cas技术发展历程

1.1 CRISPR/Cas9

在自然界中, CRISPR/Cas系统拥有多种类别, 其中属于TypeII型的CRISPR/Cas9系统是目前研究最深入、技术最成熟、应用最广泛的一种类别.

CRISPR/Cas9系统是由两个RNA分子(crRNA和tracRNA)特异性识别位点, 共同引导Cas9蛋白切割双链DNA^[5](图2).

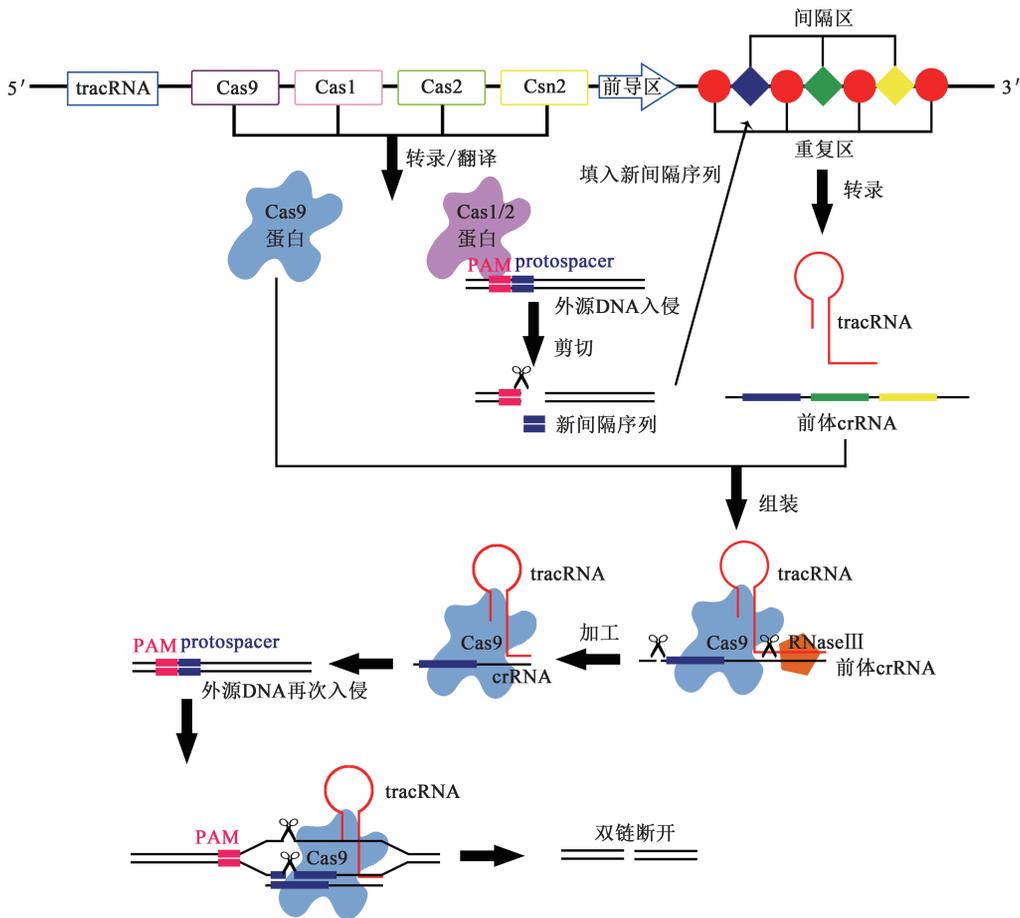


Fig. 2 Working mechanism of CRISPR/Cas9 gene editing system
图2 CRISPR/Cas9基因编辑工作原理图

1.2 CRISPR/Cas12a (CRISPR/Cpf1)

在实际应用中CRISPR/Cas9技术存在潜在的脱靶风险,因此科学家们开始致力于发现更多的Cas酶.2015年,Zhang等^[6]发布了新型CRISPR/Cas技术,命名为CRISPR/Cas12a(CRISPR/Cpf1),Cas12a蛋白属于ClassII中的typeV.相比于CRISPR/Cas9,CRISPR/Cas12a具有很多优势:a.CRISPR/Cas12a系统中没有tracRNA,只有crRNA和Cas12a蛋白,其pre-crRNA由自身的RNase结构域加工成熟,且CRISPR/Cas12a的crRNA大约只有42 nt,而CRISPR/Cas9约有100 nt,这意味着CRISPR/Cas12a系统具有更高的编辑效率,在实际应用时也更价廉;b.Cas12a蛋白分子质量比Cas9小,只有1200~1300个氨基酸,因此更容易通过载体实现递送;c.Cas9蛋白在切割双链DNA后,留下的DNA末端为平末端(blunt ends),而Cas12a蛋白切割时则留下黏性末端(sticky ends),这种结构有利于基因修复时的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),使得基因更精准插入;d.CRISPR/Cas12a与CRISPR/Cas9对于PAM序列的选择不同,CRISPR/Cas12a更偏好胸腺嘧啶(T),普遍使用的LbCas12a和AsCas12a识别的PAM序列为5'-TTTN-3'(N为任意碱基)^[7];e.CRISPR/Cas12a不仅可以靶向DNA,对RNA也存在靶向^[7].

2019年初,Zhang Feng团队报告了CRISPR/Cas12b的新进展,Cas12b比Cas9和Cas12a分子质量更小,并利用GUIDE-seq技术对全基因组范围内的检测脱靶效应,检测结果显示CRISPR/Cas12b导致的错误插入和缺失比CRISPR/Cas9要小很多,脱靶性也显著降低^[8].这说明Cas12b更适合载体介导的体内基因治疗和临床应用.

1.3 CRISPR/Cas13a (CRISPR/C2c2)

2016年6月,Zhang等^[4]报道了一种属于ClassIITypeVI型的效应蛋白Cas13a.Cas13a不同于以往的Cas蛋白酶,它靶向RNA特定位点进行基因编辑.CRISPR/Cas13a的crRNA的碱基数量只有24个,是CRISPR/Cas系统里最少的,且与CRISPR/Cas12a系统一样,组分都没有tracRNA,因此反应速率也是最高的.Cas13a扩大了特异性识别范围,识别间隔区附近的PFS区序列为3'-A、3'-U及3'-C,这表明几乎所有“入侵者”都会形成“记忆”存储,扩大了CRISPR/Cas系统的可识别范围.

CRISPR/Cas13a系统已成功治疗胰腺癌上的突变基因KRAS,对KRAS-G12D mRNA敲除效率高达70%^[9].相比Cas9,Cpf1系统虽无需tracRNA且crRNA更短,减少了前期的准备工作,然而5'-TTTN-3'的PAM却大大限制了Cpf1的识别空间;而CRISPR/Ca13a系统虽在其识别位点PFS区扩充了应用范围,但由于自然界中核糖核酸酶(RNase)广泛存在且十分稳定,而CRISPR/Cas13a系统的关键组分均为RNA,因此该系统需要更加严苛的操作环境.

1.4 其他Cas蛋白

Doudna团队^[10]于2018年11月发现了目前最小的Cas酶——Cas14,仅有40~70 ku,它的特别之处在于靶向单链DNA,这意味着可能不能良好地应用于基因编辑,但为核酸检测提供了新工具.Dolan等^[11]发现了一种I型CRISPR/Cas3,相对于其他CRISPR系统,Cas3可以剪切更长的DNA片段,可达到13%~60%的敲除效率.还可以对已发现的CRISPR/Cas系统进行改造,发现更多的亚型.例如dCas13a,虽然缺失核酸酶,无法完成切割,但仍能特异性定位RNA序列,可用于加工RNA时和特定RNA的荧光标记^[12].包括Cas12a变体、Cas13b、Cas13c、Cas13d、CasX等Cas家族新成员也不断被发现^[13-14],特别是Cas13d在人胚胎肾(HEK)293FT细胞中有效地下调(约87%~93%)了mCherry蛋白的表达^[15].Doudna团队^[16]于2019年又开发一种循环排列(circular permutation)将Cas9蛋白改造成蛋白酶感知Cas9(ProCas9),当ProCas9存在于癌细胞或者病毒时才会发生切割作用,大大提高了基因编辑的准确性和安全性.

2 CRISPR/Cas递送技术研究进展

载体递送是CRISPR/Cas系统进入到人体临床实验亟待解决的问题.CRISPR/Cas9系统的递送主要通过3种形式(图3):a.递送编码Cas9和sgRNA的质粒DNA,如pX330、pX458和pX459等^[17];b.递送mRNA和sgRNA元件,mRNA通过在细胞质中的翻译过程转化为Cas9核酸酶;c.递送RNP(ribonucleoprotein,Cas9蛋白和sgRNA复合物),此方法绕过了转录和翻译的过程,产生最快的基因编辑效果^[18],显示了其安全性和较低的脱靶性等优点^[19],并且David和其团队^[20]曾对pDNA、mRNA和核蛋白的递送进行了比较研究,

但是3种方法各有利弊. 随着CRISPR/Cas技术的发展, CRISPR在体内的传递越来越引起科学家们的重视. 然而CRISPR/Cas靶向DNA的系统必须进入到靶细胞的细胞核才能发挥治疗作用. 针对目前最热的CRISPR/Cas9系统, 开发了很多递送系统, 包括物理方法、病毒载体以及非病毒载体, CRISPR/Cas9系统如何安全稳定地递送进体内则是亟待解决的问题.

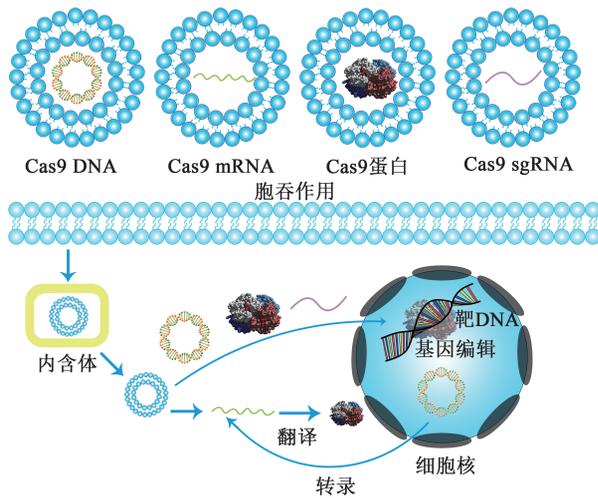


Fig. 3 Schematic illustration of different nanocarriers for Cas9/gRNA delivery and the working flow of these nanocomplexes

图3 不同纳米载体用于递送不同形式的Cas9/gRNA元件及其胞内工作原理示意图

2.1 物理方法

物理方法目前应用最多的是显微注射法 (microinjection)、电转法 (electroporation) 和水动力尾静脉注射法 (hydrodynamic tail-vein injection, HTVI) 等, 通过递送编码 Cas9 蛋白和 sgRNA 的质粒、Cas9 蛋白的 mRNA 和 sgRNA 以及 Cas9-sgRNA 复合物进入体内. 然而, 显微注射法只能依靠实验人员熟练的手法注射到细胞内, 电转法会对细胞膜上的磷脂双分子层造成伤害, 因此这两种递送方法都更适用于体外细胞实验.

水动力尾静脉注射法是通过在高压下向小鼠尾部静脉注射含有 CRISPR/Cas 系统组分的生理盐水, 这是一种将 DNA 递送到小鼠肝细胞的简单而有效的方法. Xue 等^[21] 通过水动力尾静脉注射将含有 sgRNA 和表达 Cas9 蛋白酶基因片段的质粒直接靶向小鼠体内的抑癌基因 PTEN 和 p53, 建立癌症模

型. Yin 等^[22] 通过水动力尾静脉注射 CRISPR/Cas9 系统组分和修复模板纠正了富马酰乙酰乙酸盐水解酶 Fah 基因的突变, 0.4% 的肝细胞表达了野生型 Fah 蛋白, 小鼠恢复原始体重. 然而一次性注射大量体积会对小鼠的肝脏带来巨大的压力, 基本不适用于人的临床使用. 由于物理方法对体内实验的限制, 研究重心被转移到载体上.

2.2 生物方法 (病毒载体)

在临床试验中超过 70% 的基因药物载体为病毒. 病毒载体主要包括慢病毒 (lentivirus, LV)、腺病毒 (adenoviral, Adv or AV) 以及腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV).

2.2.1 慢病毒载体

慢病毒载体是以 HIV-1 病毒为基础, 加以改造后的病毒载体系统. 慢病毒载体的主要优势在于, 它的载量可以达到 7 kb, 可以容纳 4.2 kb 的 SpCas9 基因和一个或多个 sgRNAs. Manjunath 等^[23] 开发了慢病毒颗粒 (sgRNA/Cas9P LV) 不仅有效编辑了 TZM-bl 细胞中的 CCR5 基因, 更是减少了脱靶效应, 并可以破坏病毒潜伏期的 HIV 原病毒. Aubrey 等^[24] 通过慢病毒载体递送 CRISPR/Cas9 组分, 成功敲除了 Burkitt 淋巴瘤细胞系中的 MCL-1 基因.

2.2.2 腺病毒载体

腺病毒是一种非包膜双链 DNA 病毒, 它没有内源性整合机制, 不整合到宿主基因组中, 而是以游离体的形式存在. 腺病毒载体对肝脏具有天然的趋向性, 因此对肝脏的研究较为深入^[25]. Cheng 等^[26] 开发了一个基于腺病毒的 CRISPR/Cas9 系统, 对肝脏中的转录因子 CEBP α 进行有效敲除, 导致表型改变. Guan 等^[27] 对小鼠肝细胞 F9 基因进行编辑, 将腺病毒载体与裸 DNA 的编辑效率进行比较, 发现腺病毒载体的纠正效率更高.

2.2.3 腺相关病毒载体

最常见的病毒载体就是腺 AAV 载体, 它是一个非常稳定的载体, 能够在广泛的温度和 pH 值的变化下仍然保持稳定^[28]. 由于 AAV 具有良好的安全性和治疗潜力, 在许多人类临床试验中它已经被批准用于基因增强疗法 (gene augmentation therapy). 与其他病毒相比, AAV 的免疫原性相对较低, 在动物模型中仅在高剂量条件下才会引起轻度毒性^[29]. AAV 的另一个优点是 AAV 序列可以提供稳定的转基因表达, 因为它们在非分裂细胞中长期存在. Cohn 课题组^[30] 通过 AAV9 型病毒载体递

送 CRISPR-dCas9 系统, 激活了 LAMA1 基因, 从而使 Lama1 蛋白的表达上调, 患有先天性肌营养不良 IA 型 (MDC1A) 小鼠取得良好的治疗效果. Beyret 等^[31] 通过腺相关病毒将 CRISPR/Cas9 系统递送到表达 Cas9 的早衰症小鼠模型细胞中, 小鼠寿命延长了 25%. 2019 年 10 月, Chen 等^[32] 通过注射 AAV 将 CRISPR/cas9 系统递送进小鼠肿瘤模型中, 增强了内源性抗原的原位表达, 开发了以内源性基因的多重激活为基础的免疫治疗方法 (Multiplex Activation of Endogenous Genes as Immunotherapy, MAEGI), 达到了 44% 的治疗效率. Zhao 等^[33] 利用 AAV 递送 CRISPR/Cas9 系统到小鼠肝脏, 缓解了 LDLR 突变的家族性高胆固醇血症. Zhang Feng 创立的基因编辑公司 Editas Medicine 开发的 AAV 介导的针对先天性黑朦症的

CRISPR 基因疗法已获 FDA 批准开展临床试验^[29].

2.3 化学方法 (非病毒载体)

病毒载体虽转染效率高, 但是安全性 (如致癌、插入突变和免疫原性) 仍值得注意, 且不适用于大规模生产. 同时, Cas9 质粒的大小通常约为 8 kb 或更大, 而 AAV 病毒载体包裹质粒的大小约为 4.5 kb, LV 病毒载体包裹质粒的大小约为 8 kb^[29, 34], 严重限制了 AAV 病毒载体的应用范围. 此外, 病毒载体不能准确定位病变部位, 常造成正常组织器官损伤, 甚至危及患者生命^[34]. 因此, 基于纳米技术、生物材料、药剂学、生物医学等多学科交叉研究和发展的非病毒载体更具潜力, 有望解决上述大多数限制, 特别是在生物安全、装载和包裹能力方面, 非病毒载体在 CRISPR/Cas9 的基因治疗研究中具有广阔的应用前景 (表 1).

Table 1 Characteristics and applications of CRISPR/Cas9 delivery system based on non-viral vectors

表1 非病毒载体递送CRISPR/Cas9系统的特点及应用总结

递送系统	特点	应用	参考文献
脂质体 (lipid nanoparticles)	包括阳离子脂质体、可离子化脂质体、鱼精蛋白等, lipid/DNA 通过静电结合形成复合物, 制备简单, 安全性较好, 且有商业化产品, 可直接购买	Cas9 mRNA and sgRNA; Cas9 plasmid Cas9 protein and minicircle DNA or sgRNA	[18-20, 35-36]
聚合物纳米粒子 (polymer nanoparticles)	包括聚乙烯亚胺、树状分子及其衍生物、环糊精及其衍生物、壳聚糖及其衍生物等, 负载率较高, 在血液中不易降解, 内涵体逃逸效率较高, 但有一定的毒性	Cas9 protein and sgRNA; Cas9 plasmid	[18-19, 35,37]
水凝胶纳米粒 (hydrogel nanoparticles)	具有机械上的柔软性, 便于Cas蛋白长期维持活性, 可用于脑肿瘤等疾病的治疗	Cas9 protein and minicircle DNA	[19,38]
金纳米粒子 (gold nanoparticles)	独特的光学性质, 好的生物相容性, 优良的化学稳定性	Cas9 protein and sgRNA	[18,39-40]
碳纳米材料 (carbon nanomaterials)	包括碳纳米管、量子点、氧化石墨烯、介孔碳纳米球等, 有良好的生物相容性, 高的化学稳定性, 低细胞毒性和高负载能力	Cas9 protein and sgRNA	[19,41]
细胞穿膜肽 (cell penetrating peptides, CPP)	一种短肽, 能够通过CRISPR/Cas9静电/共价结合形成复合物后, 跨细胞膜转运, 安全且粒径较小	Cas9 protein and sgRNA	[18-19,42]
DNA自组装纳米颗粒 外泌体	尺寸较小, 结构可控, 安全性较高 生物相容性好	Cas9 protein and sgRNA Cas9 plasmid	[19,43] [38,44]

Miller 等^[45] 合成了两性离子氨基脂 (zwitterterion amino lipids, ZAL) 来递送 CRISPR/Cas9 系统, 升级的 ZAL 纳米颗粒 (ZNPs) 浓度仅为 15 nmol/L 就可降低细胞中 90% 的蛋白质表达, 有希望实现永久性的核酸编辑, 这是第一个成功的非病毒递送系统, 在体外和体内共同传递 Cas9 mRNA 和 sgRNA. Wang 等^[46] 报告了一种基于金纳

米颗粒-质体体系的光控释放纳米递送系统, 递送 Cas9-sgPLK-1 质粒 (CP) 在体内外有效敲除黑色素瘤的 PLK1 基因, 抑制肿瘤生长. Zhang 等^[47] 通过阳离子聚合物 (polyethyleneimine- β -cyclodextrin, PC), 递送编码 Cas9 和 sgRNA 的质粒, 实现 beta 基因 19.1% 和 RHBDF1 基因 7.0% 的高效编辑效率. Liu 等^[48] 报告了多级传递纳米颗粒 (MDNP) 实现

在肿瘤靶向性表达 CRISPR/dCas9 系统, 同时干扰多种信号通路, 导致肿瘤生长迟缓. Wang 等^[49] 通过阳离子聚乙二醇纳米颗粒 (P-HNPs) 递送 Cas9 / sgRNA 质粒使 HeLa 肿瘤组织 PLK1 基因表达水平下降 66.7%. 精氨酸纳米颗粒 (Arg NPs) 递送 sgRNA 和 Cas9 蛋白使巨噬细胞的吞噬能力提高 4 倍^[50]. Yin 等^[51] 在水动力尾静脉注射后, 又将脂质体纳米颗粒递送 Cas9 mRNA 与腺相关病毒递送 sgRNA 和修复模板相结合, 组成重组模板, 修复效率从原先的 0.4% 提高到 6%. Guo 等^[52] 开发了一种纳米脂质凝胶颗粒, 偶联了特定抗体后将 CRISPR/Cas9 系统注射到患有三阴性乳腺癌 (TNBC) 的小鼠体内, 达到了 81% 的敲除效率, 肿瘤生长速率降低了 77%. Collins 团队^[53] 报告了生物信号激活的反应性材料用于对 CRISPR 系统高

效精确地可控递送, 包括用于释放小分子药物和酶的多臂聚乙二醇 (PEG) 水凝胶、释放金纳米颗粒和活细胞的聚丙烯酰胺 (PA-DNA) 水凝胶、用作电气保险丝的导电炭黑 (CB-DNA) 水凝胶, 通过微流控芯片结合, 可高灵敏度快速检测病毒 (图 4). Rui 等^[54] 设计了一个卡在细胞内滑动的微型纳米颗粒, 并选择蔗糖作为冷冻保护剂, 成功地编辑了小鼠脑癌细胞. 2019 年 7 月, 北京大学医学部鲁凤民、王杰课题组的研究人员^[44] 发现, 表达 CRISPR/Cas9 的细胞可以分泌携带功能性 gRNA 和 Cas9 蛋白的外泌体, 这些外泌体可以向其他组织细胞输送基因编辑活性. 该研究证明了内源外泌体作为功能性 gRNA 和 Cas9 蛋白的安全有效递送载体的潜力.

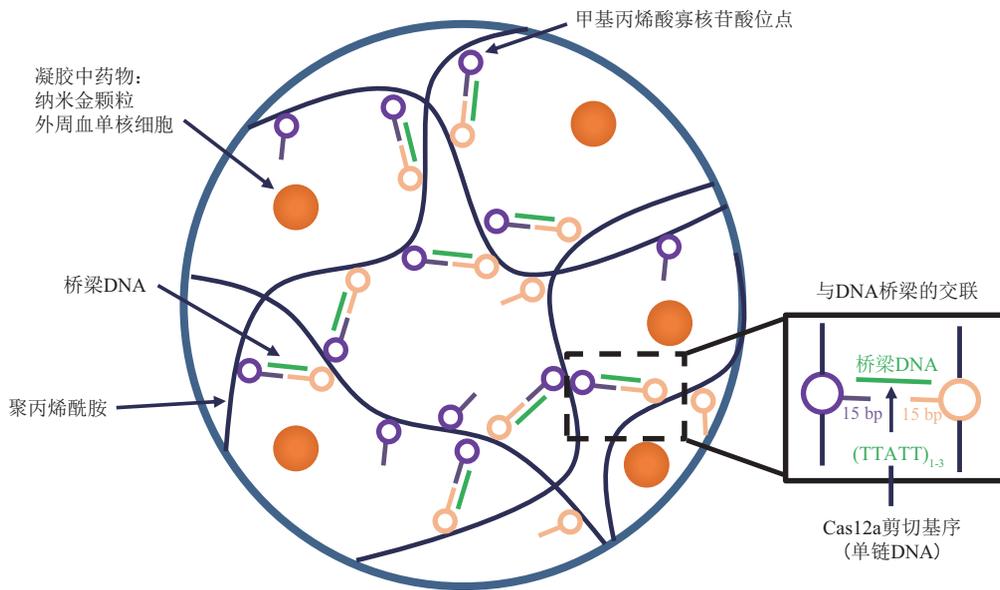


Fig. 4 Cas12a-guided spatiotemporal controllable drug delivery and release

图4 Cas12a引导的时空可控释放药物

3 CRISPR/Cas治疗技术研究进展

Zhang Feng 于 2013 年创办 Editas Medicine, 于 2017 年针对 Leber 先天性黑蒙 (LCA10) 开发了基于 CRISPR/Cas9 系统的基因药物 EDIT-101, 目前处于临床 I/II 期阶段. Jennifer Doudna 于 2014 年创办 Intellia Therapeutics, 不同于 Editas Medicine, Jennifer 准备使用脂质体纳米颗粒 LNP 作为递送载体, 治疗镰状细胞病和转甲状腺素蛋白淀粉样变性

(ATTR), 目前都进行到临床前阶段. 同时 Poseida Therapeutics、Synthego、eGenesis、Agenovir 和 Exonics Therapeutics 等公司都有临床前研究在进行中. 2013 年, CRISPR Therapeutics 成立, 成为继 Editas Medicine 和 Intellia Therapeutics 之后第三家 CRISPR 上市公司. 并于 2017 年 12 月将与 Vertex Pharmaceuticals 公司合作的基于 CRISPR/Cas9 系统的自体造血干细胞疗法 CTX001 向欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 提交了用于

β -地中海贫血的临床试验申请 (CTA)。2018年8月, 其启动了I/II期临床试验。日前, 中期数据显示, 输血依赖性 β 地中海贫血症患者和镰状细胞贫血症患者, 均已停止依赖输血, 且未发生血管闭塞性危象。针对NY-ESO-1标志物的临床试验也传来新消息, 目前并未在3名患者机体中发现毒性作用。中国四川大学华西医院在2016年开启了对转移性非小细胞肺癌的临床试验, 利用CRISPR/Cas9技术敲除了T细胞中的PD-1基因。北京大学、解放军总医院等国内高校及医院有关CRISPR/Cas技术的

临床试验也都在组织进行中。其中邓宏魁团队^[55]利用CRISPR/Cas技术对人成体造血干细胞上的CCR5基因进行编辑, 使一名27岁男性的急性淋巴细胞白血病得到缓解, 并且没有产生副作用, 邓宏魁因此入选《自然》(Nature)年度十大科学人物。Bao课题组^[56]开发了高保真的SpyCas9修饰造血干细胞和祖细胞患者的 β -珠蛋白, 经过基因编辑后的红细胞镰状细胞显著减少, 此项研究也即将迈向临床研究阶段。表2总结了目前CRISPR/Cas药物临床及临床前研究现状。

Table 2 Current clinical studies of CRISPR/Cas-based therapeutics

表2 CRISPR/Cas药物临床及临床前研究现状

	药物名称	适应症	靶点	单位	临床进度	状态	NCT号
癌症	CISH inactivated TIL	胃肠道上皮癌 胃肠道肿瘤 胃肠道癌	CISH	National Cancer Institute (NCI)	I期/II期	招募取消	NCT03538613
	CTX110	B细胞恶性肿瘤 非霍奇金淋巴瘤 B细胞淋巴瘤	CD19	CRISPR Therapeutics AG	I期/II期	招募中	NCT04035434
	CRISPR/Cas9-HPV16 E6/E7T1	人乳头瘤病毒 相关的恶性肿瘤	HPV16 HPV18	First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University	I期	未知/未招募	NTC03057912
眼科疾病	AGN-151587 (EDIT-101)	失明 利伯尔先天性黑朦 视力障碍 遗传性眼疾 先天性眼疾 视网膜疾病 视网膜变性	CEP290	Editas Medicine Allergan	I期/II期	招募中	NCT03872479
血液病	iHSCs	β -地中海贫血	HBB	Allife Medical Science and Technology Co., Ltd.	早期 I期	还未招募	NCT03728322
	CTX001	镰状细胞病 血液疾病 血红蛋白病 地中海贫血	CD34	Vertex Pharmaceuticals Incorporated CRISPR Therapeutics	I期/II期	招募中	NCT03745287 NCT03655678
罕见病	Epi-KAB	歌舞伎化妆综合征	KMT2D	University Hospital, Montpellier	未标明	实验进行中, 但目前不招募	NCT03855631
传染病	CRISPR/Cas9 CCR5 gene modified CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells	艾滋病	CD34	Affiliated Hospital to Academy of Military Medical Sciences	未标明	招募中	NCT03164135
T细胞 基因编辑	XYF19 CAR-T cell	白血病淋巴细胞急性 (全部) 复发 急性淋巴细胞白血病 (全部) 难治性 b细胞淋巴瘤 CD19阳性	HPK1	Xijing Hospital	I期	招募中	NCT04037566

续表2

药物名称	适应症	靶点	单位	临床进度	状态	NCT号
anti-mesothelin CAR-T cells	成人实体瘤	PD-1 TCR	Chinese PLA General Hospital	I期	招募中	NCT03545815
Mesothelin-directed CAR-T cells	成人实体瘤	PD-1	Chinese PLA General Hospital	I期	招募中	NCT03747965
Universal Dual Specificity CD19 and CD20 or CD22 CAR-T Cells	B细胞白血病 B细胞淋巴瘤	CD20 CD22	Chinese PLA General Hospital	I期、II期	招募中	NCT03398967
NY-ESO-1 redirected autologous T cells with CRISPR edited endoge- nous TCR and PD-1	多发性骨髓瘤 黑色素瘤 滑膜肉瘤 黏液样/圆细胞脂肪 肉瘤	PD-1 TCR	University of Pennsylvania	I期	招募中	NCT03399448
UCART019	B细胞白血病 B细胞淋巴瘤	CD19	Chinese PLA General Hospital	I期/II期	招募中	NCT03166878
PD-1 Knockout T cells	食道癌	PD-1	Hangzhou Cancer Hospital	不适用	已完成	NCT03081715
CD7.CAR/28zeta CAR T cells	T细胞急性淋巴细 胞白血病 T细胞急性淋巴母 细胞淋巴瘤 T-非霍奇金淋巴瘤	CD7	Baylor College of Medicine	I期	还未招募	NCT03690011
PD-1 Knockout T Cells	侵袭性膀胱癌IV期 前列腺癌 转移性肾细胞癌	PD-1	Peking University	I期	招募取消	NCT02863913 NCT02867345 NCT02867332
PD-1 knockout engineered T cells	转移性非小细胞 肺癌	PDCD1	Sichuan University	I期	实验进行 中,但目前 不招募	NCT02793856
检测鉴定 CRISPR-based Test	肺结核	MTB	Huashan Hospital	不适用	招募中	NCT04074369
Crispr-Duplex sequencing	卵巢癌	TP53	University of Washington	不适用	招募中	NCT03606486
Develop isogenic NF1 wild-type (NF1+/+), NF1 heterozygous (NF1+/-) and NF1 homozygous (NF1-/-) iPSC lines from individu- al patients using CRISPR/CAS9 technology	神经纤维瘤病1型 中枢神经系统肿瘤	NF1	Children's Research Institute	未标明	招募中	NCT03332030

4 CRISPR/Cas用于检测和诊断的研究进展

目前, Cas9 辅助的特异性诊断是国内外应用最广泛的诊断系统之一. 2014年, Collins 开发了一种低成本的纸基传感器, 成功地区分出 ZIKA 病毒亚型, 正确诊断出患者所感染病毒类型的时间只需要 3 h, 这种检测系统能在现场省时准确地进行毒

株特异性的诊断^[57]. 2016年, Zhang Feng 团队首次鉴别了可以被用来切割细菌 RNA 序列的 CRISPR/Cas13a 系统^[4], 同年 Doudna 团队^[58]也报道了 CRISPR/Cas13a 中催化成熟 crRNA 的专用核酸内切酶. 该系统不像靶向 DNA 的 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1 系统, Cas13a 切割完靶标 RNA 后依然保持活性, 会继续切割非靶标 RNA, 因此被 Zhang Feng 实验室的科学家们称为侧切割

(collateral cleavage). 在此基础上, 2017年, Zhang Feng 团队^[59]在CRISPR/Cas13a系统中加入了一个单链RNA荧光报告探针, 组成新的检测系统, 命名为SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 技术, 可用来检测诸如ZIKA和登革热病毒或其他有害细菌. 其工作流程是: CRISPR系统被重新编程, 以检测人的唾液、尿液、血液、皮肤甚至粪便样品中特定病毒或细菌的遗传序列, 经检测灵敏度已达到50 fmol/L (1 fmol/L = 10⁻¹⁵ mol/L). 同时SHERLOCK系统引入了重组酶聚合酶等温扩增技术(RPA), 使样本中极微量的核酸能够在37°C左右的温度中半小时内以数量级的速度扩增, 在短短数小时内, 就可以在病人血液和尿液样本中精准检测到ZIKA病毒, 并实现区分不同地区ZIKA病毒的基因序列. 2018年4月, Zhang Feng 团队^[60-61]再次升级了SHERLOCK技术, 推出SHERLOCK v2, 能在同一样品中检测出多种病毒感染, 比如能同时检出ZIKA病毒和DENV病毒, 从只检测1个靶标RNA进化到可同时检测4个靶标RNA, 发出4种不同颜色的荧光信号, 定量测量浓度低至2 amol/L (1 amol/L = 10⁻¹⁸ mol/L), 敏感度提高了100倍. 之所以能达到这样效果, 是因为他们在SHERLOCK v2中引入了多种来自不同种属细菌的Cas13酶, 如LwaCas13a和PsmCas13b. 除此之外, 他们向体系中还引入了CRISPR type-III中的Csm6酶. Csm6酶的特异性切割序列为环腺苷酸分子和末端为2', 3'-环磷酸的线性腺苷酸. 他们发现通过设计CRISPR系统使得Cas13剪切后的序列是Csm6酶的靶向序列, 能大大提高灵敏度. 同时, 该团队还开发了一种玻璃纤维纸, SHERLOCKv2组分可以在

纸上冻干再水化. 经核算, 每次检测成本只需要0.61美元. 此项技术已经在肺癌患者血液样本中检测到游离的肿瘤DNA, 90 min以内就可以检测到浓度为2 amol/L以上的ZIKA和DENV的单链RNA. 这种不需要仪器的可视化检测为现场检测提供了快捷、简便的途径, 可想而知, 将会在未来医疗检测引起多大的热潮. 2018年, Pardis C. Sabeti 开发了HUDSON技术 (heating unextracted diagnostic samples to obliterate nucleases), 和SHERLOCK技术结合可以直接从体液中检测病毒. 在不到2 h内就可以检测出患者样本里的DENV病毒, 并可以区分4种DENV血清型, 以及区域特异性的ZIKV菌株. 从设计到检测的完整过程, 只需要不到1周的时间. 2018年, Doudna 团队^[62]创建了一种名为DETECTR的方法, 实现了快速、专一地检测患者样本中的人乳头瘤病毒(HPV) (图5). 2019年8月, 美国MIT的Collins^[53]报道了一种可批量应用的、可编程的CRISPR响应智能材料体系, 可用于便携、精确、快速、定量且时空可控地检测危险病毒病原体, 区分病原菌、人类DNA的基因型. 2019年10月, 麻省理工学院和哈佛大学Broad研究所的Sabeti、Zhang等^[63]将Cas13的抗病毒活性与其诊断能力结合起来, 建立了一个强大和快速可编程的诊断和抗病毒系统, 命名为CARVER (Cas13-assisted restriction of viral expression and readout), 靶向病人细胞中淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、甲型流感病毒(IAV)和疱疹性口炎病毒(VSV)的单链RNA. 结果表明, 细胞中病毒RNA的水平降低了40倍, 流感病毒的感染力降低了300多倍, CARVER技术使CRISPR/Cas13技术迈向靶向治疗以及抗病毒药物

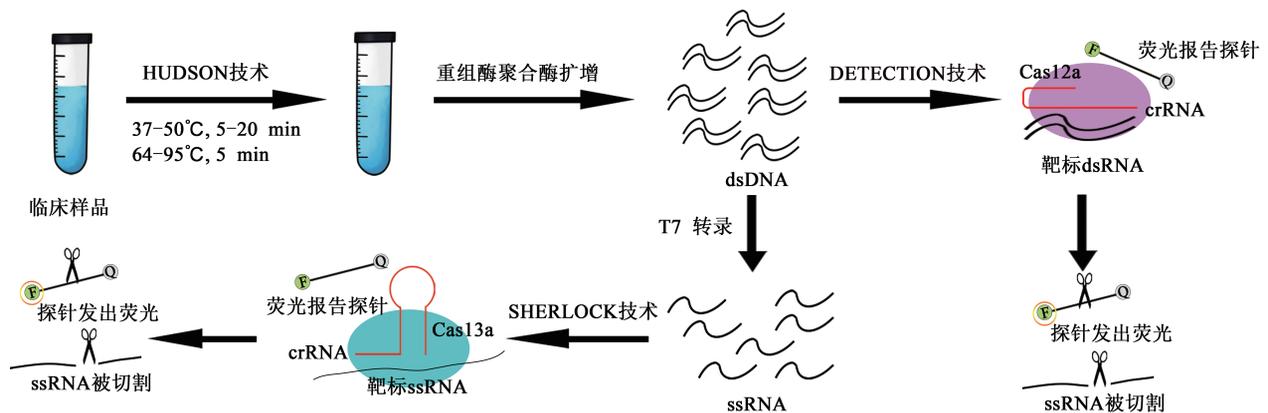


Fig. 5 The detection principles of SHERLOCK, HUDSON and DETECTION
图5 基于CRISPR/Cas系统的SHERLOCK、HUDSON、DETECTION检测技术原理

开发的新世界. Hajian 等^[64]将 CRISPR/Cas 技术与石墨烯相结合创造一种生物传感器“CRISPR-Chip”, 可以在 15 min 之内检测到杜氏肌营养不良个体中基因突变的临床 DNA 样本, 灵敏度达到 1.7 fmol/L, 并且不需要扩增技术. Dincer 等^[65]开发了一种微流控芯片 (microfluidic chip), 集成电化学生物传感器技术, 利用 CRISPR/Cas13a 技术在 9 min 之内即可检测到浓度仅为 10 pmol/L 的微量 RNA.

5 CRISPR/Cas 技术在其他领域的应用

CRISPR 技术除了被用于疾病诊疗之外, 还可用于追踪动物发育、改良农作物、控制蚊虫防疟疾, 以及智能药物递送、胞内核酸成像、基因检测诊断、胞内 DNA 记录和动物模型建立等. 这里重点介绍了胞内核酸成像及动物模型的建立.

5.1 胞内核酸成像

胞内核酸成像是指在荧光显微镜下观察细胞中特定核酸序列的空间位置, 包括基因组成像和 RNA 定位^[66]. 核酸酶失活 (dead Cas9, dCas9) 缺乏切割双链 DNA 的核酸内切酶活性, 在 sgRNA 的指导下保留了在特定基因组位点结合 DNA 的固有能力. 通过将荧光团系在 dCas9 或 sgRNA 上, 该系统显示了在活细胞内的某些位点进行基因组成像的广泛潜力. 例如, Chen 等^[67]首先设计了一种强大的工具, 它依赖于正交 dCas9 蛋白来标记特定的 DNA 位点, 以便在活细胞中成像. 随后, Wu 等^[68]提出了一种由分子信标、sgRNA 和 dCas9 组成的用于监测染色质动力学的核成像探针.

5.2 动物模型的建立

CRISPR-Cas9 系统以其简易的操作作为动物模型的构建提供了高效的方法. 目前基于 CRISPR-Cas9 构建的各种人类疾病的动物模型数以千计, 主要以啮齿类动物 (如小鼠) 模型为主. 2018 年 3 月, 来自中国的多个团队合作建立了一个“基因敲入”的亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD) 猪模型, 利用 CRISPR-Cas9 技术将 HTT 基因片段整合入猪成纤维细胞中, 再通过体细胞核移植技术获得 HTT 转基因猪模型, 这一研究为测试 HD 疗法提供了一种重要的动物模型^[69]. 2018 年 1 月 12 日, 中国科学院神经科学研究所的杨辉研究组^[70]利用之前开发的一种同源末端介导整合 (homology-mediated end joining, HMEJ) 的方法, 以胚胎原核注射方式通过优化注射条件首次成功获得了

Actb-p2A-mCherry 基因定点敲入食蟹猴, 并证实这些猴子具有生殖遗传的可能. 这一研究为通过提高整合效率来构建基因敲入猴提供了新的解决思路. 2019 年年初, 中国科学院神经科学研究所的研究人员通过 CRISPR-Cas9 技术构建了睡眠紊乱与精神相关异常的 BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1) 敲除猴^[71], 随后将 BMAL1 敲除猴的皮肤成纤维细胞作为细胞核供体通过体细胞核移植的方法获得了遗传背景一致的疾病敲除猴模型^[72], 为非灵长类动物疾病模型的构建及在临床研究中开发治疗昼夜节律紊乱和精神紊乱的方法奠定了坚实的基础.

6 CRISPR/Cas 技术应用的挑战与展望

目前发现及应用的 CRISPR/Cas 系统在稳定性上仍存在一些问题, CRISPR/Cas9 系统在使用时可能会产生严重的脱靶效应. 哈佛大学 Liu 实验室^[73]证明脱靶效率最高可达 84%. CRISPR/Cas9 的脱靶效应一直以来都是实现基因精准编辑的首要难题, 目前解决的办法包括: a. 通过仔细选择引导序列; b. 使用改进的递送方法; c. 载体表面修饰靶向肽, 如 RGD (arginine-glycine-glutamic, RGD) 等, 来增强肿瘤组织靶向性; d. 提高 Cas9 蛋白和 sgRNA 的特异性, 对 sgRNA 进行合理的设计及修饰、开发 Cas9 蛋白的突变体或类似物等. 近年来, 针对降低脱靶效应带来影响的研究层出不穷. 2017 年, Joung 等^[74]设计了一种 CIRCLE-seq 技术, 实现了在可以没有基因组的参考下, 体外高效识别 CRISPR/Cas9 脱靶效应的离靶位点, 并预测 gRNA 是否会导致脱靶效应. 随后 2018 年, Joung 与 Marcello Maresca 合作设计了一种 VIVO 策略, 可以在体内精准识别到 CRISPR/Cas9 全基因组的脱靶效应, 同时设计了合适的 gRNA, 在小鼠肝脏中, 直接并有效地进行体内编辑, 实现完全零脱靶^[75]. Lu 等^[76]将慢病毒和纳米颗粒两者结合在一起, 开发了慢病毒样生物纳米颗粒 (lentivirus-like bionanoparticle, LVLP), 与表达 SaCas9 的腺相关病毒或慢病毒转导的细胞相比, 含有 SaCas9 mRNA 的 LVLPs 转导细胞的脱靶率较低. 今后, CRISPR/Cas 系统脱靶效应问题仍需持续关注, 如何做到完全消除脱靶效应是目前 CRISPR/Cas9 技术应用关键挑战.

同时, 如前文所述, 在体内应用 CRISPR/Cas 技术需要研究和开发高效、安全的递送载体. 无论

是病毒载体还是非病毒载体, 我们都需要尤其关注其体内毒性、免疫效应、分解代谢等问题. 细胞来源的外泌体作为天然载体的安全性可能更好, 但外泌体制备困难及提取量较少仍是一大挑战^[77]. 此外, 在诊断平台上, 如何进一步优化检测系统实现大规模的临床研究是重中之重.

基于CRISPR/Cas的技术为改变、调节和可视化基因组提供了一种易用和适应性强的手段, 使生物研究和生物技术应用在一个广阔的领域. CRISPR/Cas工具大大加快了研究的步伐, 从理解先前未被研究生物体的遗传学到发现直接导致疾病的基因. 以Cas为基础的生物技术领域正在快速发展, 多个以Cas9为基础的临床试验正在进行或即将开始, 其结果将很可能指导今后体细胞编辑的体外和患者中的使用. 除了疾病诊疗外, CRISPR-Cas9的农业应用已经为不同的市场创造了产品, 导致美国农业部最近就其监管做出裁决. 这种不断扩展的应用将CRISPR/Cas技术牢固地定位在基因组编辑和更广泛的基因工程前沿, 该技术必将为人类生活和社会进步带来巨大裨益.

参 考 文 献

- [1] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, **327**(5962): 167-170
- [2] 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. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(12): 5429-5433
- [3] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(11): 722-736
- [4] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, *et al.* C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, **353**(6299): aaf5573
- [5] Ammar H I, Saba S, Ammar R I, *et al.* Erythropoietin protects against doxorubicin-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, **301**(6): H2413-H2421
- [6] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, **163**(3): 759-771
- [7] Tung M, Lin L, Cheng Y, *et al.* A 'new lease of life': FnCpf1 possesses DNA cleavage activity for genome editing in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(19): 11295-11304
- [8] Strecker J, Jones S, Koopal B, *et al.* Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nature Communication*, 2019, **10**(1): 212
- [9] 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. *Cancer Lett*, 2018, **431**: 171-181
- [10] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, *et al.* Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, **362**(6416): 839-842
- [11] Dolan A E, Hou Z, Xiao Y, *et al.* Introducing a spectrum of long-range genomic deletions in human embryonic stem cells using type I CRISPR-Cas. *Mol Cell*, 2019, **74**(5): 936-950
- [12] Cox D B T, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 2017, **358**(6366): 1019-1027
- [13] Liu J J, Orlova N, Oakes B L, *et al.* CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*, 2019, **566**(7743): 218-223
- [14] Lu B, Javidi-Parsijani P, Makani V, *et al.* Delivering SaCas9 mRNA by lentivirus-like bionanoparticles for transient expression and efficient genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(8): e44
- [15] Konermann S, Lotfy P, Brideau N J, *et al.* Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 2018, **173**(3): 665-676
- [16] Oakes B L, Fellmann C, Rishi H, *et al.* CRISPR-Cas9 circular permutants as programmable scaffolds for genome modification. *Cell*, 2019, **176**(1-2): 254-267
- [17] Deng H, Huang W, Zhang Z. Nanotechnology based CRISPR/Cas9 system delivery for genome editing: progress and prospect. *Nano Research*, 2019, **12**(10): 2437-2450
- [18] Xu X, Wan T, Xin H, *et al.* Delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic genome editing. *J Gene Med*, 2019, **21**(7): e3107
- [19] Wan T, Niu D, Wu C, *et al.* Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: current status and future outlook. *Materials Today*, 2019, **26**: 40-66
- [20] Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(1): 73-80
- [21] Xue W, Chen S, Yin H, *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, **514**(7522): 380-384
- [22] Yin H, Xue W, Chen S, *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, 2014, **32**(6): 551-553
- [23] Choi J G, Dang Y, Ma H, *et al.* Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Therapy*, 2016, **23**(7): 627-633
- [24] Aubrey B J, Kelly G L, Kueh A J, *et al.* An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations *in vivo*. *Cell Rep*, 2015, **10**(8): 1422-1432
- [25] Julio A-P, Tibor P, Gyöző L K, *et al.* Development of Novel Adenoviral vectors to overcome challenges observed with HAdV-5 - based constructs. *Molecular Therapy*, 2016, **24**(1): 6-16
- [26] Cheng R, Peng J, Yan Y, *et al.* Efficient gene editing in adult mouse livers *via* adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS Lett*, 2014, **588**(21): 3954-3958
- [27] Guan Y, Ma Y, Li Q, *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): 477-488
- [28] Gandhi P U, Gaggin H K, Redfield M M, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-7 as a biomarker of diastolic dysfunction and functional capacity in heart failure with preserved ejection fraction: results from the RELAX Trial. *JACC Heart Fail*, 2016, **4**(11): 860-869
- [29] Xu C L, Ruan M Z C, Mahajan V B, *et al.* Viral delivery systems for CRISPR. *Viruses*, 2019, **11**(1): 1-12
- [30] Kemaladewi D U, Bassi P S, Erwood S, *et al.* A mutation-independent approach for muscular dystrophy *via* upregulation of a modifier gene. *Nature*, 2019, **572**(7767): 125-130
- [31] Beyret E, Liao H K, Yamamoto M, *et al.* Single-dose CRISPR-Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med*, 2019, **25**(3): 419-422
- [32] Wang G, Chow R D, Bai Z, *et al.* Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRa elicits potent antitumor immunity. *Nature Immunology*, 2019, **20**(11): 1494-1505
- [33] Zhao H, Li Y, He L, *et al.* In vivo AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, 2020, **141**(1): 67-79
- [34] Wang W, Lotze M T. Good things come in small packages: exosomes, immunity and cancer. *Cancer Gene Ther*, 2014, **21**(4): 139-141
- [35] Ross K A, Brenza T M, Binnebose A M, *et al.* Nano-enabled delivery of diverse payloads across complex biological barriers. *J Control Release*, 2015, **219**: 548-559
- [36] Torchilin V P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(11): 813-827
- [37] Wang H X, Song Z, Lao Y H, *et al.* Nonviral gene editing *via* CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, **115**(19): 4903-4908
- [38] Chen Z, Liu F, Chen Y, *et al.* Targeted Delivery of CRISPR/Cas9-mediated cancer gene therapy *via* liposome-templated hydrogel nanoparticles. *Adv Funct Mater*, 2017, **27**(46): 1703036
- [39] Malthe H-B, Berta E-F, Mara B-G, *et al.* Active Intracellular delivery of a Cas9/sgRNA complex using ultrasound-propelled nanomotors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(10): 2657-2661
- [40] Lee K, Conboy M, Park H M, *et al.* Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng*, 2017, **1**: 889-901
- [41] Yue H, Zhou X, Cheng M, *et al.* Graphene oxide-mediated Cas9/sgRNA delivery for efficient genome editing. *Nanoscale*, 2018, **10**(3): 1063-1071
- [42] Irene L-S, Iria L, Marisa J, *et al.* Peptide/Cas9 nanostructures for ribonucleoprotein cell membrane transport and gene edition. *Chem Sci*, 2017, **8**(12): 7923-7931
- [43] Sun W J, Ji W Y, Hall J M, *et al.* Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR - Cas9 for genome editing. *Angew Chem Int Ed*, 2015, **54**(41): 12029-12033
- [44] Chen R, Huang H, Liu H, *et al.* Friend or foe? Evidence indicates endogenous exosomes can deliver functional gRNA and Cas9 protein. *Small*, 2019, **15**(38): e1902686
- [45] Miller J B, Zhang S, Kos P, *et al.* Non-viral CRISPR/Cas gene editing in vitro and in vivo enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, **56**(4): 1059-1063
- [46] Wang P, Zhang L, Zheng W, *et al.* Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(6): 1491-1496
- [47] Zhang Z, Wang T, Chen Y X, *et al.* Cationic polymer-mediated CRISPR/Cas9 plasmid delivery for genome editing. *Macromol Rapid Commun*, 2019, **40**(5): e1800068
- [48] Liu Q, Zhao K, Wang C, *et al.* Multistage delivery nanoparticle facilitates efficient CRISPR/dCas9 Activation and tumor growth suppression *in vivo*. *Adv Sci*, 2019, **6**(1): 1801423
- [49] Wang H X, Song Z, Lao Y H, *et al.* Nonviral gene editing *via* CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(19): 4903-4908
- [50] Butler J, Fishman S, Racie T, *et al.* Aln-TMP: A subcutaneously administered RNAi therapeutic targeting tmprss6 for the treatment of β -thalassemia. *Blood*, 2013, **121**(7): 1200-1208
- [51] Yin H, Song C Q, Dorkin J R, *et al.* Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(3): 328-333
- [52] Guo P, Yang J, Huang J, *et al.* Therapeutic genome editing of triple-negative breast tumors using a noncationic and deformable nanolipogel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(37): 18295-18303
- [53] English M A, Soenksen L R, Gayet R V, *et al.* Programmable CRISPR-responsive smart materials. *Science*, 2019, **365**(6455): 780-785
- [54] Rui Y, Wilson DR, Choi J, *et al.* Carboxylated branched poly (β -amino ester) nanoparticles enable robust cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Science Advances*, 2019, **5**(12): eaay3255
- [55] Xu L, Wang J, Liu Y L, *et al.* CRISPR-Edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *New Engl J Med*, 2019, **381**(13): 1240-1247
- [56] Park S H, Lee C M, Dever D P, *et al.* Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(15): 7955-7972
- [57] Pardee K, Green A A, Takahashi M K, *et al.* Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, **165**(5): 1255-66
- [58] Alexandra E-S, Mitchell R O'CONNELL, Spencer C K, *et al.* Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 2016, **538**(7624): 270-273
- [59] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid

- detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438-442
- [60] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Kellner M J, *et al.* Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, **360**(6387): 439-444
- [61] Myhrvold C, Freije C A, Gootenberg J S, *et al.* Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018, **360**(6387): 444-448
- [62] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, *et al.* Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, **362**(6416): 839 - 442
- [63] Freije C A, Myhrvold C, Boehm C K, *et al.* Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. *Mol Cell*, 2019, **76**(5): 1-12
- [64] Hajian R, Balderston S, Tran T, *et al.* Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor. *Nature Biomedical Engineering*, 2019, **3**(6): 427-437
- [65] Bruch R, Baaske J, Chatelle C, *et al.* CRISPR/Cas13a-Powered electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid amplification-free miRNA diagnostics. *Adv Mater*, 2019, **31**(51): e1905311
- [66] 李诗渊, 赵国屏, 王金. CRISPR 技术在生物传感中的应用——胞内核酸成像、体外核酸检测与胞内 DNA 记录. *生物产业技术*, **2019**(1): 75-83
Li S Y, Zhao G P, Wang J. Application of CRISPR technology in biosensing —nucleic acid imaging in cells, nucleic acid detection and DNA recording. *Biotechnology&Business*, **2019**(1): 75-83
- [67] Chen B, Gilbert L A, Cimini B A, *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, **155**(7): 1479-1491
- [68] Wu X, Mao S, Yang Y, *et al.* A CRISPR/molecular beacon hybrid system for live-cell genomic imaging. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(13): e80
- [69] Yan S, Tu Z, Liu Z, *et al.* A Huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell*, 2018, **173**(4): 989-1002
- [70] Yao X, Liu Z, Wang X, *et al.* Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing. *Cell Res*, 2018, **28**(3): 379-382
- [71] Qiu P, Jiang J, Liu Z, *et al.* BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders. *National Science Review*, 2019, **6**(1): 87-100
- [72] Liu Z, Cai Y, Liao Z, *et al.* Cloning of a gene-edited macaque monkey by somatic cell nuclear transfer. *National Science Review*, 2019, **6**(1): 101-108
- [73] Pattanayak V, Lin S, Guilinger J P, *et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(9): 839-843
- [74] Shengdar Q T, Nhu T N, Jose M-L, *et al.* CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat Methods*, 2017, **14**(6): 607-614
- [75] Akcakaya P, Bobbin M L, Guo J A, *et al.* *In vivo* CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature*, 2018, **561**(7723): 416-419
- [76] Lu B, Javidi-P P, Makani V, *et al.* Delivering SaCas9 mRNA by lentivirus-like bionanoparticles for transient expression and efficient genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(8): e44
- [77] Kim S M, Yang Y, Oh S J, *et al.* Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *Journal of Controlled Release*, 2017, **266**: 8-16

Delivery and Application Progresses of CRISPR/Cas Gene Editing System*

ZHAO Zi-Xuan^{1)**}, LI Chun-Hui^{1)**}, ZHOU Li-Li²⁾, ZHAO De-Yao^{1,3)}, WENG Yu-Hua¹⁾,
XIA Xin-Hua²⁾, HUANG Yuan-Yu^{1,2)***}

¹⁾*School of Life Science, Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science, Institute of Engineering Medicine,
Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;*

²⁾*School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;*

³⁾*Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)*

Abstract CRISPR/Cas-based gene editing system is one of the newly-developed and promising biotechnologies. It shows broad application prospects for gene editing, DNA and RNA imaging, regulation of gene transcription, gene detection and disease diagnosis, establishing animal disease models, and improving crop, *etc.* In this review, we overviewed the background and development history of CRISPR / Cas systems, discussed recently-investigated delivery methods including various nanocarriers, summarize the preclinical and clinical advances of CRISPR/Cas-based therapeutics, and introduced other application areas besides gene editing. Finally, we made an outlook on the challenges we need pay attention to, and the future application prospects of CRISPR/Cas technologies.

Key words CRISPR/Cas, gene editing, drug delivery, gene therapy, gene detection

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0281

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31901053, 31871003), the Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (2018JJ1019, 2019JJ50196) and the Hu-Xiang Young Talent Program (2018RS3094).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: +86-10-68911089, E-mail: yyhuang@bit.edu.cn

Received: November 20, 2019 Accepted: March 10, 2020