



张孝兵, 博士生导师, 北京协和医学院特聘教授, 美国罗马琳达大学兼职副教授。1999年博士毕业于华东理工大学, 随后赴香港中文大学开展造血干细胞研究。2002至2009年在美国Fred Hutchinson肿瘤研究中心基因治疗实验室工作。2009年受聘于加州罗马琳达大学, 任助理教授、副教授, 2014年被聘为实验血液学国家重点实验室兼职研究员至今。张孝兵教授聚焦干细胞和基因治疗25年, 在 *Genome Biology*、*Nucleic Acids Research* 等期刊上发表了一系列论文, 申请了十余个中美专利, 主持了国家自然科学基金面上项目多项。开发的高效重编程载体和基因编辑载体系统已被数百家实验室和公司使用。利用CRISPR和AAV载体治疗血友病A已取得突破, 准备临床转化。

基因编辑造血干祖细胞的研究进展

温伟 施均 张健萍 程涛 张孝兵*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 基因编辑技术的飞速发展给造血干祖细胞基因治疗带来了新的机遇。CRISPR-Cas9等技术能够实现特定基因的定向编辑。基因编辑技术的不断优化使编辑效率显著提高, 检测技术的进步也促进了对基因编辑细胞安全性的评估, 包括检测脱靶效应和大片段删除突变。造血干祖细胞基因编辑已经进入临床试验阶段, 但是目前的编辑技术可能会影响细胞功能和基因组稳定性, 在临床应用中应当引起注意。这篇综述总结了基因编辑的技术原理、基因编辑技术在造血干祖细胞中的应用和基因治疗研究, 并探讨了基因编辑产品的安全性提升方法和质控方案。

关键词 CRISPR-Cas9; 基因编辑; 造血干祖细胞; 同源重组; 地中海贫血; 造血干细胞移植; 基因治疗

Gene Editing of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

WEN Wei, SHI Jun, ZHANG Jianping, CHENG Tao, ZHANG Xiaobing*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract The rapid development of gene-editing technologies has opened new opportunities for HSPC (hematopoietic stem and progenitor cell) gene therapies. Gene editing techniques such as CRISPR-Cas9 enable precise modifications at desired gene sites. Currently, it can achieve high on-target editing efficiencies, whereas there are also safety concerns, such as off-target effects and large-deletion mutations. Clinical trials have demonstrated the

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-12-06

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2021-I2M-1-041)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909465, E-mail: zhangxbhk@gmail.com

Received: November 5, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (Grant No.2021-I2M-1-041)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909465, E-mail: zhangxbhk@gmail.com

potential of HSPC gene editing therapies. However, the impairment of HSPC function and genomic integrity after editing deserves attention. This review summarizes the principle of gene editing, the basic and clinical advances in gene editing of HSPC. Furthermore, it also discusses putative strategies to improve the safety profiles of gene editing products and establish feasible quality control processes.

Keywords CRISPR-Cas9; gene editing; hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC); homology-directed repair (HDR); thalassemia; HSC transplantation (HSCT); gene therapy

造血干细胞(hematopoietic stem and progenitor cell, HSPC)是一类具有自我更新能力,能够分化为血液中所有类型细胞的干细胞。过去30年,造血干细胞移植(HSC transplantation, HSCT)已经广泛用于治疗多种获得性疾病。最近几年,基于HSCT的干细胞基因治疗迅速发展^[1]。在研究早期,大多数HSPC基因治疗临床研究是利用慢病毒载体导入转基因,但由于慢病毒载体能相对随机地整合到基因组中,基于慢病毒载体的HSPC基因治疗存在安全隐患。基因编辑技术的出现,使HSPC的定点基因编辑成为可能,有望规避慢病毒载体的插入突变等安全问题。

随着基因编辑技术的发展,科学家可以利用诸如锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)等对HSPC进行基因编辑。最近几年,简单高效的CRISPR技术飞速发展,促进了基因编辑在HSPC基因治疗领域的应用,但是对于长周期造血干细胞(long-term HSC, LT-HSC)基因编辑的效率、安全性和植入率依然有待深入研究。在本综述中,我们系统地阐述了CRISPR基因编辑的原理以及HSPC中的基因编辑和基因治疗研究。

1 基因编辑技术概述

1.1 基因编辑工具概述

在自然进化的长河中,DNA是最为常见的遗传物质。虽然单个DNA分子发生双链断裂的几率非常低,但是双链DNA断裂发生后,如果细胞不能尽快对其进行修复,细胞将面临死亡,因此细胞进化出了一套近乎完美的DNA双链断裂修复机制。自然条件下,在一个特定基因上发生基因突变的概率非常低,科学家十分迫切地需要对DNA进行定点改造,基因编辑工具应运而生。

基因编辑工具的本质是靶向性核酸内切酶,常用的有锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和CRISPR-Cas9^[2]等。相比CRISPR-Cas9, ZFN和TALEN由于其较高的技术挑战性和较低的基因编辑效率,在HSPC等原代细胞中的应用,尤其是在临床应用上,存在一定的局限性。

CRISPR是在细菌或古生菌内被发现的、成簇的、规律间隔的短回文重复序列,CRISPR序列能够与病毒或质粒的DNA序列互补,是一套原核生物进化出的获得性免疫系统。Cas9蛋白属于II型CRISPR-Cas系统,具有RNA介导的DNA内切酶活性。在该系统中,Cas9蛋白与crRNA和tracrRNA(后二者可以人工融合成一段单链导向RNA,称作sgRNA)形成复合物,由sgRNA和目的基因片段通过碱基互补配对将Cas9蛋白精确定位到目的基因片段上,然后Cas9蛋白发挥酶切作用,产生双链DNA断裂。目前,由于CRISPR-Cas9设计简单,操作便捷高效,其已经广泛应用于包括HSPC等多种临床相关的原代细胞的基因编辑中^[3]。

Cas9蛋白核酸酶缺失突变体(de-activated Cas9, dCas9)与胞苷脱氨酶的融合蛋白可以实现由sgRNA引导的DNA靶位点定位和将目标胞苷转化为尿苷,再利用细胞自身的DNA复制和修复机制将尿嘧啶转化为胸腺嘧啶,从而实现在不对DNA双链进行切割的条件下完成G/C碱基向A/T碱基的转换。这开创了单碱基编辑器(base editor)的先河^[4]。

另外,利用Cas9蛋白的另一种突变体类型nCas9(H840A)切口酶结合逆转录酶构建了引导编辑技术(prime editing)^[5]。该技术依赖特殊的pegRNA,引导nCas9和逆转录酶的融合蛋白切开一条DNA链,再将pegRNA携带的模板合成到断裂的DNA中,然后细胞利用自身的DNA修复机制将该模板序列整合进基因组,实现小片段插入或删除的精准基因编辑。

1.2 非同源末端连接修复

细胞发生双链DNA断裂后,进行DNA修复的机

制之一是进行非同源末端连接修复(non-homologous end joining, NHEJ)。NHEJ可以发生在细胞周期的任何阶段,是一种快速的、不依赖于同源重组模板的、易出错的DNA修复方式。诸多和DNA修复有关的蛋白比如Ku70、Ku86、DNA ligase IV、RAD50-Nbs1等参与这个过程,它们将两条断裂的双链DNA连接到一起,这时被修复的基因片段有可能产生碱基的插入或删除,称为删插突变(indel)。如果突变发生在蛋白质的编码区域,可能导致移码突变和蛋白功能丧失,即实现了基因敲除。如果删插突变影响了转录因子的结合,可能会改变基因在特定细胞中的表达。目前治疗地中海贫血和镰状细胞贫血的基因编辑疗法就是利用这一原理破坏*BCL11A*基因+58 Kb增强子,从而提高胎儿血红蛋白的水平^[6]。如果细胞中同时存在多个双链DNA断裂位点,这种修复途径有可能将2个非紧邻的双链DNA断裂末端相连接,导致染色体易位和重排^[7]。

1.3 微同源重组介导的末端连接

另一个可能产生基因缺失突变的修复途径是微同源重组介导的末端连接修复(microhomology-mediated end joining, MMEJ)。MMEJ发生的速度要慢于NHEJ,并且依赖于DNA断裂位置附近的1-25 bp长度的微同源臂^[8],修复后通常情况下会将微同源臂之间的序列和一个微同源臂序列删除,删除的长度一般在50 bp以下^[9]。但偶尔也会导致大片段删除。利用MMEJ的基因修复规律,在特定的基因位点能够实现高效的基因修复,该基因编辑策略可以用来进行特定疾病的基因治疗。

1.4 同源重组修复

双链DNA断裂后,细胞进行修复的另一个机制是同源重组修复(homology-directed repair, HDR)。HDR依赖于同源重组模板,主要是在细胞周期S/G₂期发生的一种较慢的DNA修复方式。HDR修复能够实现精准的基因修复,包括点突变,或者在双链DNA断裂位置附近精确插入一段长的序列^[10]。在HSPC中,由于腺相关病毒载体6型(adeno-associated virus type 6, AAV6)能够高效率感染HSPC且一般不会被整合到基因组中,目前常被用为同源重组修复模板载体。在X染色体连锁的严重免疫缺陷病研究中,利用CRISPR-Cas9/AAV6基因编辑系统,最高可实现在LT-HSC中的20%的基因插入^[11]。

2 造血干祖细胞的基因编辑

2.1 在造血干祖细胞中进行CRISPR-Cas9基因编辑

基因编辑的核心元件是Cas9蛋白和sgRNA,将Cas9导入细胞的方法包括慢病毒转导、质粒表达载体转染、转染mRNA或者直接转导Cas9蛋白;而将sgRNA导入细胞的方式包括利用慢病毒载体、质粒表达载体和直接导入。HSPC对DNA载体会产生强烈的免疫反应,直接导入DNA会大幅度降低细胞活性^[12-13]。慢病毒载体可以有效转导HSPC,实现CRISPR-Cas9基因编辑元件高效率转导和高水平表达^[14]。但是,慢病毒载体整合到基因组后,Cas9核酸酶和sgRNA将持续表达,产生较高的脱靶切割率。另外,HSPC的dsDNA断裂后,会激活p53信号通路,诱导HSPC凋亡。同时,慢病毒载体的整合也可能激活致癌基因或失活抑癌基因,增加癌变风险。

因为病毒载体可能导致复杂的、不可预期的生物安全问题,所以非病毒载体递送方式受到科学家的青睐。化学转染法具有简便、廉价等优点,在多种哺乳动物细胞中有广泛的应用^[15],但是在HSPC中转导效率较低。通过物理方法,比如电穿孔等,可以有效导入mRNA,实现较高的基因编辑效率,同时细胞毒性较低^[16]。目前,通过电转方法将体外形成的Cas9蛋白和sgRNA的核糖核蛋白(RNP)复合物导入细胞,是递送CRISPR到HSPC中并实现高效基因编辑的主要方法^[17]。对sgRNA的化学修饰能够提高其稳定性,降低胞内免疫反应,提升编辑效率^[18]。

通过比较质粒载体、mRNA、慢病毒和RNP在人HSPC中基因编辑的毒性发现,使用RNP能够实现最高的基因编辑效率,同时细胞毒性较低^[19]。另外,相比于表达载体介导的Cas9的长时间表达,RNP瞬时导入Cas9核酸酶能够有效降低脱靶几率^[20]。

2.2 AAV6在造血干祖细胞基因编辑中的应用

腺相关病毒载体是常用的递送长片段DNA的非整合载体,其DNA序列的承载量最大为4.7 Kb。在已知的AAV血清型中,AAV6能够高效转导HSPC^[21]。在一些临床前研究中,比如利用动物模型或人HSPC,基于CRISPR-Cas9/AAV6的基因编辑能实现对诸如镰状细胞贫血^[22-24]、X染色体连锁的慢性肉芽肿疾病^[25]和*IL2RG*基因突变等疾病的基因治疗^[11]。虽然体外实验表明,在HSPC基因编辑研究中,AAV6介导的HDR效率比ssODN介导的基因编辑效

率更高,但是由于AAV6存在一定的细胞毒性,可能会降低HSPC的植入率^[26]。因此,一些研究通过技术优化提高编辑后HSPC的植入能力^[25]。也有研究报道,在LT-HSC中,AAV6介导的HDR效率和ssODN相当,甚至还不如ssODN介导的HDR效率高^[22,26]。

2.3 造血干祖细胞基因编辑与细胞固有免疫反应

CRISPR-Cas9切割基因组产生双链DNA断裂后能够激活TP53,连带激活下游基因p21等,从而引起细胞周期阻滞^[27],同时程序性死亡相关信号通路也被激活^[28]。AAV6载体导入同源重组模板同样会明显激活TP53信号通路,在发生了HDR的细胞中,细胞周期的阻滞以及TP53的激活会更明显^[28]。另外,慢病毒转导的过程也能激活HSPC的TP53信号通路^[29]。这些都给临床干细胞基因治疗带来挑战。

为解决这一问题,科研人员已经提出了一些方案。抑制TP53或者与TP53结合的蛋白能够提高HSPC基因编辑后的细胞活力和基因编辑效率。使用mRNA表达TP53的抑制因子可以短时抑制TP53活性,不仅改善基因编辑HSPC的细胞活性和提高植入率,而且降低AAV6引起的细胞毒性^[30]。另外,转导腺病毒蛋白E4orf6/7(Ad5-E4orf6/7)能够提高细胞活性,促进HSPC进入细胞周期,从而提高HDR效率^[31]。通过对细胞周期的研究发现,转导Ad5-E4orf6/7和TP53抑制剂能够提高S/G₂期HSPC的细胞比例^[32]。

2.4 造血干祖细胞基因编辑后脱靶效果的检测

近几年,越来越多的研究开始关注基因编辑细胞产品的安全性问题。对于能够自我更新的HSPC,如果发生非预期的突变,那么就更容易发生恶性转化,存在较高的安全隐患。这就需要研究人员对基因编辑进行更深入的试验研究,对临床基因编辑的结果进行预测和定期检测,避免基因编辑带来的基因毒性。关注度最高、研究最多的是脱靶切割,它是由于基因编辑工具与非完全匹配位点进行非特异性结合,并切割造成的删插突变、染色体易位等^[33]。最初,通过对sgRNA结合序列的预测和设计来尽量避免或降低脱靶率。随着基因组测序技术的不断发展和完善,通过诸如GUIDE-seq^[34]、Digenome-seq^[35]等技术可以检测到细胞中真实的脱靶位点,这就比单纯靠计算手段来预测脱靶位点所得到的结果可信度更高。目前,随着脱靶效果的预测^[36]和检测技术的不断完善,精确检测灵长动物移植基因编辑后

HSPC的脱靶效果已成为现实^[37]。

2.5 造血干祖细胞基因编辑后大片段删除突变的检测

基因编辑工具在介导双链DNA断裂后,除了在靶位点产生删插突变外,还有可能出现基因组序列的其他突变,比如大片段删除和丢失。对这些非预期的大片段删除突变,如果不加以监控,也会产生安全隐患。

Illumina高通量测序,或二代测序,是目前检测靶位点基因编辑效率的常用方法。该方法具有检测精度高、成本低、通量大等优点。但是其显著缺点是读长短,往往只能检测到小于100 bp的突变,对于大片段的删除突变,则不能检测到。随着三代测序技术的不断发展和普及^[38-39],已经有研究表明,在干细胞和胚胎中进行基因编辑后,会产生长达数千碱基对长度的大片段删除突变^[40-43]。因此,开发对基因编辑产物的大片段删除突变检测技术和降低大片段删除突变的基因编辑方法,对基因治疗领域的健康发展至关重要。

早期的研究没有涉及到人HSPC编辑后的大片段删除情况。新近的一项研究表明,在人类临床相关的细胞中,比如原代T细胞、HSPC以及诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)的基因编辑后,可以检测到大片段删除突变。尽管在基因编辑的iPSC群体细胞和单细胞克隆中都发现相对较低的大片段删除突变率,但是HSPC基因编辑后,有2%~6%的大片段删除率,这一结果值得引起基因治疗领域的注意^[44]。

2.6 基因编辑后的染色体重排和易位

基因编辑后,染色体可能发生复杂的染色体重排和易位,甚至还出现与mRNA相关的DNA序列插入到基因组中的情况^[41]。在非HSPC的临床研究中发现,当编辑多个基因位点后,能够检测到明显的染色体重排和易位以及新的融合基因。虽然携带融合基因的细胞随着时间的推移,其在体内的比例逐渐下降^[7],但仍需要引起科学家和临床医生的注意,尤其是在当它们发生在具有长期自我更新能力的HSPC中时,更应该引起足够的重视。未来除了需要开发灵敏的检测手段、制定完善的检测方案外,还要对CRISPR生物学有更深入的认识和理解,从而开发出更安全的基因编辑技术和临床转化方案。

2.7 探讨如何开发更安全的基因编辑方案

基因脱靶一直是困扰安全基因编辑的因素之一,近年来备受关注。为了降低脱靶率,不仅可以通过对脱靶切割的预测和检测,来筛选具有低脱靶率的sgRNA序列,而且也有研究把重点放在Cas9蛋白的优化方面。Cas9核酸酶的一些变异体可以降低脱靶效果,但是通常也会降低基因编辑效率^[45-46]。一项在HSPC中的基因编辑研究表明,在Cas9中引入一个点突变能提高打靶精确性,降低脱靶率,同时还能保证较高的基因编辑效率^[47]。

近年来,除了基因脱靶备受关注外,越来越多的报道开始关注基因编辑的精确性。已经发现,基因编辑的靶位点可能发生非预期的大片段删除、染色体易位、基因融合及其他非预期的突变形式。DNA断裂损伤修复是一个复杂的过程,人们曾经认为,双链DNA断裂修复的结果是随机的,但是近期研究表明,CRISPR-Cas9切割DNA后造成不对称的结构,产生可预测的DNA修复结果。新近的报道研究了NHEJ、MMEJ和HDR间的动力学竞争关系,发现了当造血细胞和iPSC进行CRISPR-Cas9/AAV6编辑后,NHEJ的发生速度最快,其次是HDR,而MMEJ修复最慢,这也就解释了为什么在基因编辑的位点经常会出现高比例A/T插入现象^[9]。进一步提升对基因编辑位点序列特性和DNA修复规律的认知,将有利于获得更加精准的可预测的编辑结果,比如更高效率的HDR或者更高水平的A/T插入。

基因编辑后也会产生大片段删除突变。对NHEJ或HDR介导的多种修复方式的研究发现,CRISPR-Cas9/AAV6可以显著降低大片段删除突变发生率。如果在编辑过程中不提供HDR模板,添加dsODN可以实现dsODN在基因编辑位点的插入,也能够明显降低大片段删除突变发生率。无论是导入AAV6载体实现HDR,还是添加dsODN通过NHEJ途径进行双链DNA的修复,其本质都是通过快速修复断裂的双链DNA,从而降低大片段删除突变的发生几率^[44]。基因编辑位点的筛选和基因编辑策略的优化,加快了HDR或者NHEJ途径介导的断裂DNA的修复,也有望降低基因编辑后可能发生的染色体易位和基因融合概率。

碱基编辑器能够不依赖于双链DNA断裂实现单碱基的改变^[48],从而可能规避传统Cas9造成的脱靶切割、大片段删除突变的发生和染色体异常等安

全隐患。但是碱基编辑器对DNA的改造有限,只能对疾病基因进行单碱基水平的修复,从而限制了其在基因插入修复等相关疾病模型中的应用。

3 造血干祖细胞基因治疗

3.1 造血干祖细胞基因治疗的临床需求

FRIEDMANN等^[49]早在1972年就提出基因治疗人类疾病的概念,而逆转录病毒载体用于HSPC基因治疗疾病的临床研究始于上世纪90年代,重点聚焦于腺苷脱氨酶重症联合免疫缺陷患者^[50]。目前,病毒载体或非病毒技术(如CRISPR-Cas9)基因编辑HSPC治疗可以用于多种人类单基因遗传病^[51-53],诸如 β -地中海贫血、镰状细胞贫血、腺苷脱氨酶缺乏或X性联重型联合免疫缺陷病、Wiskott-Aldrich综合征、慢性肉芽肿病、异染性脑白质营养不良(又称硫脂沉积症)及X性联肾上腺脑白质营养不良等。这其中 β -地中海贫血患者人群最大,临床需求最大。

根据WHO测算^[54],全球范围内每年有约4.2万例重症地中海贫血患儿出生,其中不少于2.5万例患儿依赖于长期输血。大部分患儿出生在发展中国家,广泛分布于东南亚地区、地中海区域及少数非洲国家。全球范围内仅有12%的患儿接受输血,每年因为缺乏输血而死亡的患儿不少于2.2万例。即使接受输血的患儿,每年也有不少于3 000例因为铁过载而死亡。异基因HSCT是根治疾病的治疗手段,基于自体HSPC的基因治疗是最近发展起来的一项前沿技术^[55-56]。由于全相合同胞供者较少,且在中华骨髓库能够找到无关相合供者的概率较低,以及受社会经济因素和医疗资源所限,我国开展异基因HSPC根治地中海贫血的数量低于欧洲国家。据中国地中海贫血家长联盟统计,目前登记在册的等待移植的 β -地中海贫血患儿达7 600例,这些数目远远大于能够完成的移植例数,多数患儿只能在等待供者的过程中选择输血治疗,因铁沉积或者肝功能异常,导致预后恶化甚至丧失治愈机会。因此,创新性发展HSPC基因治疗技术有重大临床需求。据国外产业数据分析,细胞和基因治疗市场规模达到120亿美元。欧美等国家基因编辑细胞已达到初步产业化,科研转化落地效率高,2003至2020年,超过10款基因疗法产品在全球获批上市,美国食品药品监督管理局收到900多款新药临床试验申请。

国内地中海贫血患者的临床需求远远没有得

到满足。长期输血治疗和祛铁治疗患者付出费用高, 依从性较低、生存质量差, 异基因HSCT是目前常用的治愈输血依赖型地中海贫血的方法。我们迫切需要研发基于自体HSPC的基因治疗技术和产品, 这有可能成为治愈地中海贫血新策略, 其最大优势在于不需要异体供者, 并且一次治疗可能导致永久性的“治愈”^[55]。

3.2 地中海贫血和镰状细胞贫血基因治疗的分子基础

针对地中海贫血和镰状细胞贫血这类单基因遗传血红蛋白病, 基因治疗的基本策略是在CD34⁺ HSPC群体中, 通过逆转录病毒载体导入正常的 β -珠蛋白肽链基因(基因增量); 通过CRISPR-Cas9技术纠正 β -珠蛋白肽链突变的基因位点或者诱导 γ -珠蛋白肽链基因表达(基因编辑), 从而使得HSPC红系在分化成熟过程中产生 β -珠蛋白或 γ -珠蛋白, 纠正与 α -珠蛋白合成失衡的问题^[57-58]。

逆转录病毒载体介导的HSPC β -珠蛋白基因增量策略, 即用重组病毒的方法将携带调控序列的 β -珠蛋白基因高效导入HSPC并稳定整合, 该治疗技术的瓶颈是需要寻找安全有效的载体和调控组织特异性高效表达的调控序列。这需要载体不但能准确携带大片段的高效表达调控序列, 如 β -珠蛋白肽链基因远端调控区, 而且还要有安全长期有效的感染能力。但是, 病毒载体的引入也导致了基因治疗需要更多的质控需求, 以及更严格的工艺提升需求^[59-60]。

为了更好地开发临床治疗药物和寻找有效的新型治疗方法, 科学家们对于出生后血红蛋白表达切换机制进行了大量的研究。已经发现, 如果增强 γ -珠蛋白肽链的表达, 可以减轻 β -珠蛋白类疾病, 包括镰状细胞贫血、 β -地中海贫血的临床症状。应用全基因组关联性分析(GWAS)的方法, 检测并分析了相关患者的基因型、胎儿血红蛋白(HbF, $\alpha_2\beta_2$)细胞数量和HbF水平, 结果发现了3个与HbF水平相关的位点, 它们分别调控基因*BCL11A*、*MYB*以及血红蛋白 β 链(hemoglobin beta-chain, *HBB*)基因的外显子^[61-62]。其中*BCL11A*基因成为研究热点, *BCL11A*转录蛋白通过TGACCCCA基序负调控 γ -珠蛋白肽链基因转录^[63], 使得 γ -珠蛋白基因的mRNA水平降低, 从而对HbF的生成具有负向调控作用。在红细胞中特异表达的*BCL11A*基因如果存在缺陷或表达水平降低, 会

减弱对血红蛋白 γ 链(hemoglobin gamma-chain, *HBG*)基因的表达抑制, 从而提升HbF水平。对地中海贫血患者的调查显示, HbF生成量与患者地中海贫血症状成反比例。比如存在一类名为“Corfu”的人群, 虽然携带了 β -珠蛋白基因的突变, 但是由于其体内持续表达HbF, 地中海贫血症状几乎消失。因此逆转患者*HBG*的表达抑制是治疗 β -地中海贫血的新策略, 而通过基因编辑调控*BCL11A*基因成为逆转*HBG*的表达抑制的一条路径^[53,57]。

*BCL11A*作为转录抑制因子除了调控 γ -珠蛋白的表达外, 还可以调控其他基因表达, 对HSPC增殖分化、免疫系统及大脑的发育均有重要影响^[64], 而且还可参与到B淋巴细胞等其他谱系细胞的发育中^[65], 因此必须精确调控使*BCL11A*基因仅在红系细胞内低表达才是有效的解决方案。*BCL11A*基因的红系增强子部位就是这样一个合适的调控靶点。GWAS研究表明, *BCL11A*的红系增强子部位可以调节患者的HbF水平, 是遗传性 β 血红蛋白病的治疗靶点^[66]。而且该增强子仅在红系细胞中对*BCL11A*表达有显著调控作用, 在其他细胞比如B淋巴细胞中没有, 所以对该靶点进行基因编辑不会影响到*BCL11A*在其他细胞中的表达和功能^[66]。在体外编辑小鼠*BCL11A*基因的红系增强子位点, 不会影响非红系细胞的存活和细胞中*BCL11A*的表达。和*BCL11A*基因敲除小鼠细胞相比, 二者对 γ -珠蛋白肽链的表达提高均具有相似的作用^[64]。进一步的研究发现, 其在人体细胞中也具有类似的作用。体外编辑正常健康供者HSPC动员后的外周血单个核细胞(包括CD34⁺)的*BCL11A*基因编码区会严重损害B细胞的发育。而在体外编辑正常健康人及 β -地中海贫血患者HSPC动员后的外周血单个核细胞(包括CD34⁺) *BCL11A*基因的红系增强子靶向序列之后, 被编辑细胞在体外分化为红细胞后的HbF生成量稳定上升, 且这些HSPC可分化扩增成各种血细胞, 提示这些编辑后的HSPC回输后可成功植入^[67]。这些研究均提示, 通过基因编辑*BCL11A*基因的红系增强子部位是一种治疗 β -地中海贫血患者的新策略。

除上述方法外, 有研究对CD34⁺ HSPC采取CRISPR-Cas9和重组AAV6技术, 通过同源重组方式定点修复 β -珠蛋白肽链Glu6Val突变, 使得生理性血红蛋白在镰状细胞贫血患者中重新获得了表达^[23],

还有研究通过基因编辑技术删除*HBG1*基因启动子-102到-114的13个碱基, 导致转录抑制因子结合的CCAAT盒丢失, 从而使得 γ -珠蛋白肽链重新获得了表达^[68]。但目前这两种方法尚未在临床研究中得以验证。2021年, 在HSPC中导入一种新的逆转录病毒载体(编码短发卡RNA), 该方法可以针对性抑制*BCL11A*转录后mRNA稳定及翻译过程, 且临床研究中证实有效^[69]。

3.3 基因治疗的临床应用进展

目前在ClinicalTrials上注册的HSPC基因治疗临床研究有30多项, 90%的研究采用了慢病毒载体, 只有4项研究利用了CRISPR-Cas9或锌指酶基因编辑技术。迄今为止超过300例患者接受了这种新的疗法, 且疾病病种涵盖原发免疫缺陷病、地中海贫血、镰状细胞贫血、范可尼贫血、遗传性代谢酶缺乏等^[51]。临床疗效比较肯定的疾病病种包括X性联重症联合免疫缺陷、腺苷脱氨酶缺乏的重型联合免疫缺陷、Wiskott-Aldrich综合征、地中海贫血、慢性肉芽肿病、异染性脑白质营养不良和X性联肾上腺脑白质营养不良。腺苷脱氨酶缺乏的重型联合免疫缺陷是最早采用骨髓或脐带血HSPC基因治疗的疾病^[50,70-71]。2000年, HSPC基因治疗成功治疗X性联重症联合免疫缺陷^[72]; 2002年, 非清髓预处理后, HSPC基因治疗成功治疗腺苷脱氨酶缺乏的重型联合免疫缺陷^[73]; 2006年, 利用 γ 逆转录病毒作为载体的HSPC基因治疗慢性肉芽肿病, 病毒DNA整合插入人基因组后, 激活*MDS1/EVI-1*、*PRDM16*和*SETBP1*等癌变相关基因^[74]; 2009年, 首次利用慢病毒作为载体导入HSPC治疗X性联肾上腺脑白质营养不良^[75]; 2010年, 一种罕见的血液免疫缺陷病Wiskott-Aldrich综合征经 γ 逆转录病毒为载体的HSPC治疗成功^[76]; 2013年, 利用慢病毒为载体进一步减少了基因治疗该病潜在病毒整合基因组的危险^[77]; 2013年, 另一种严重的神经退化性代谢病异染性脑白质营养不良症, 经慢病毒载体的HSPC基因治疗获得成功^[78]; 2016年, 治疗腺苷脱氨酶缺乏的重型联合免疫缺陷的基因治疗产品Strimvelis获批在欧盟上市。2019年,《新英格兰医学》杂志报道利用Cas9基因编辑CCR5来治疗感染HIV和急性淋巴细胞白血病患者^[79]。地中海贫血的HSPC基因治疗最早报道于2010年, 携带 β -珠蛋白肽链的慢病毒载体导入HSPC, 患者33个月后完全脱离输血, 但是

患者出现了病毒整合基因组后激活*HMG2*基因^[59]。利用进一步优化的慢病毒载体BB305治疗的后续22个患者均有效脱离输血^[60]。新的改进方法包括采取髓腔内注射和非清髓预处理, 治疗后3例儿童患者脱离了输血, 3例成人输血量减少^[80]。CRISPR-Cas9基因编辑HSPC自体移植治疗 β -地中海贫血及镰状细胞贫血的临床近期疗效满意^[81]。2019年, 慢病毒载体导入的HSPC基因治疗产品Zyntelgo获批在欧盟上市。

3.4 基因治疗的困难和潜在风险

目前用于基因治疗的两种重要策略包括: 病毒载体(主要是慢病毒)以及TALEN、ZFN和CRISPR-Cas9等基因编辑技术。对于病毒载体, 费用昂贵是制约该方法的一个重要因素。如获批治疗地中海贫血的Zyntelgo售价近200万美元。由于药品生产管理规范严格, 病毒载体制备成本高昂, 导致产品价格居高不下, 这大大限制了药物的普及性。对于地中海贫血患者数量最多的发展中国家来说, 这种价格根本无法承受。此外, 病毒载体整合基因组后, 可能有致癌风险, 这也令人担心。早在2003年已有报道, X性联重症联合免疫缺陷患者接受逆转录病毒载体导入的HSPC基因治疗后, 癌基因*LMO2*被病毒载体整合基因组后激活, 这可能是导致后期白血病发生的原因^[82-83]。2021年, 针对X性联重症联合免疫缺陷患者基因治疗后发生2例髓系血液肿瘤的报道令人关注([doi:10.1126/science.abh1106](https://doi.org/10.1126/science.abh1106))。相比较于病毒载体的基因治疗模式, 基因编辑技术基本不会有病毒基因组整合风险, 但是存在脱靶效应, 有破坏非目标靶点DNA完整性的风险。同时, 基因编辑的效率仍需要提高, 以满足临床治疗的需求, 还应该加强基因编辑细胞产品的安全性质控, 包括基因组完整性检测、成瘤性的评估等。一方面基因治疗新技术、新治疗策略的发展带给那些罕见遗传病“治愈”的希望, 另一方面我们应加强病毒整合以及脱靶效应的监控, 设计更有效的基因治疗载体, 积极稳妥地发展这种革命性的治疗手段。

4 前景与展望

随着基因编辑技术的快速进步, 基因治疗产业已经出现井喷式发展态势。CRISPR-Cas9、碱基编辑器和引导编辑技术各有所长, 适用于不同的应用场景, 在基因治疗中可以取长补短。科学家正在通

过改造核酸酶、优化载体的递送方式以及提升基因编辑的精确性等方式助力基因治疗的临床转化。同时对于基因编辑细胞产品的质控, 包括对基因编辑效率的检测、脱靶事件的预测和检测、基因组稳定性的检测等, 新的技术将不断涌现出来。目前, 国内外对基因安全性的评估工作仍缺乏完善的评估方案, 未来需要对基因治疗产品进行多方面的检验, 包括基因编辑后的脱靶效果检测、染色体易位的检测、精确基因编辑的检测、AAV载体完整性检测、成瘤风险的评估等。国内目前还没有针对基因编辑产品质控和安全性评估的第三方检测机构, 亟待业界人士积极推动。目前, 基因治疗仍处于研究阶段, 为了掌握最优化的基因编辑策略, 需要对不同疾病的基因编辑进行针对性的研究, 针对不同编辑位点选定合适的编辑方案, 在实现高效率基因编辑的同时, 确保基因编辑产品的安全性。

参考文献 (References)

- [1] WEBER E W, MAUS M V, MACKALL C L. The emerging landscape of immune cell therapies [J]. *Cell*, 2020, 181(1): 46-62.
- [2] CARROLL D. Genome engineering with targetable nucleases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 409-39.
- [3] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [4] 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): 420-4.
- [5] 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): 149-57.
- [6] WU Y, ZENG J, ROSCOE B P, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 776-83.
- [7] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer [J]. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365.
- [8] IYER S, SURESH S, GUO D, et al. Precise therapeutic gene correction by a simple nuclease-induced double-stranded break [J]. *Nature*, 2019, 568(7753): 561-5.
- [9] FU Y W, DAI X Y, WANG W T, et al. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(2): 969-85.
- [10] ZHANG J P, LI X L, LI G H, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage [J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 35.
- [11] PAVEL-DINU M, WIEBKING V, DEJENE B T, et al. Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1634.
- [12] MANDAL P K, FERREIRA L M, COLLINS R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 643-52.
- [13] HOLLIS R P, NIGHTINGALE S J, WANG X, et al. Stable gene transfer to human CD34⁺ hematopoietic cells using the Sleeping Beauty transposon [J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(10): 1333-43.
- [14] HECKL D, KOWALCZYK M S, YUDOVICH D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 941-6.
- [15] KIM T K, EBERWINE J H. Mammalian cell transfection: the present and the future [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(8): 3173-8.
- [16] DE RAVIN S S, LI L, WU X, et al. CRISPR-Cas9 gene repair of hematopoietic stem cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(372): eaah3480.
- [17] GUNDRY M C, BRUNETTI L, LIN A, et al. Highly efficient genome editing of murine and human hematopoietic progenitor cells by CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(5): 1453-61.
- [18] HENDEL A, BAK R O, CLARK J T, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(9): 985-9.
- [19] LATTANZI A, MENEGHINI V, PAVANI G, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells for therapeutic genomic rearrangements [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(1): 137-50.
- [20] NAEEM M, MAJEED S, HOQUE M Z, et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1608.
- [21] CHATTERJEE S, SIVANANDAM V, WONG K K, Jr. Adeno-associated virus and hematopoietic stem cells: the potential of adeno-associated virus hematopoietic stem cells in genetic medicines [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31(9/10): 542-52.
- [22] PATTABHI S, LOTTI S N, BERGER M P, et al. *In vivo* outcome of homology-directed repair at the HBB gene in hsc using alternative donor template delivery methods [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17: 277-88.
- [23] 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): 384-9.
- [24] WILKINSON A C, DEVER D P, BAIK R, et al. Cas9-AAV6 gene correction of beta-globin in autologous HSCs improves sickle cell disease erythropoiesis in mice [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 686.
- [25] DE RAVIN S S, REIK A, LIU P Q, et al. Targeted gene addition in human CD34⁺ hematopoietic cells for correction of X-linked chronic granulomatous disease [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(4): 424-9.
- [26] ROMERO Z, LOMOVA A, SAID S, et al. Editing the sickle cell disease mutation in human hematopoietic stem cells: comparison of endonucleases and homologous donor templates [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(8): 1389-406.
- [27] HAAPANIEMI E, BOTLA S, PERSSON J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 927-30.

- [28] SCHIROLI G, CONTI A, FERRARI S, et al. Precise gene editing preserves hematopoietic stem cell function following transient p53-mediated DNA damage response [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(4): 551-65.e8.
- [29] PIRAS F, RIBA M, PETRILLO C, et al. Lentiviral vectors escape innate sensing but trigger p53 in human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(9): 1198-211.
- [30] BRAULT J, LIU T Q, BELLO E A, et al. CRISPR-targeted MAGT1 insertion restores XMEN patient hematopoietic stem cells and lymphocytes [J]. *Blood*, 2021, doi: 10.1182/blood.2021011192.
- [31] CHU V T, WEBER T, WEFERS B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543-8.
- [32] FERRARI S, JACOB A, BERETTA S, et al. Efficient gene editing of human long-term hematopoietic stem cells validated by clonal tracking [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(11): 1298-308.
- [33] CRADICK T J, FINE E J, ANTICO C J, et al. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): 9584-92.
- [34] TSAI S Q, ZHENG Z, NGUYEN N T, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(2): 187-97.
- [35] KIM D, BAE S, PARK J, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(3): 237-43.
- [36] LISTGARTEN J, WEINSTEIN M, KLEINSTIVER B P, et al. Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(1): 38-47.
- [37] ALJANAHI A A, LAZZAROTTO C R, CHEN S, et al. Prediction and validation of hematopoietic stem and progenitor cell off-target editing in transplanted rhesus macaques [J]. *Mol Ther*, 2021, doi: 10.1016/j.ymthe.2021.06.016.
- [38] JAIN M, FIDDES I T, MIGA K H, et al. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 351-6.
- [39] LU H, GIORDANO F, NING Z. Oxford nanopore minION sequencing and genome assembly [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(5): 265-79.
- [40] ADIKUSUMA F, PILTZ S, CORBETT M A, et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage [J]. *Nature*, 2018, 560(7717): E8-9.
- [41] 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): 765-71.
- [42] LEDFORD H. CRISPR gene editing in human embryos wreaks chromosomal mayhem [J]. *Nature*, 2020, 583(7814): 17-8.
- [43] ZUCCARO M V, XU J, MITCHELL C, et al. Allele-specific chromosome removal after cas9 cleavage in human embryos [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1650-64.e15.
- [44] WEN W, QUAN Z J, LI S A, et al. Effective control of large deletions after double-strand breaks by homology-directed repair and dsODN insertion [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 236.
- [45] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-8.
- [46] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-5.
- [47] VAKULSKAS C A, DEVER D P, RETTIG G R, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1216-24.
- [48] NEWBY G A, YEN J S, WOODARD K J, et al. Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice [J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 295-302.
- [49] FRIEDMANN T, ROBLIN R. Gene therapy for human genetic disease [J]? *Science*, 1972, 175(4025): 949-55.
- [50] BORDIGNON C, NOTARANGELO L D, NOBILI N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 470-5.
- [51] FERRARI G, THRASHER A J, AIUTI A. Gene therapy using haematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nat Rev Genet*, 2021, 22(4): 216-34.
- [52] HIGH K A, RONCAROLO M G. Gene therapy [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(5): 455-64.
- [53] DUNBAR C E, HIGH K A, JOUNG J K, et al. Gene therapy comes of age [J]. *Science*, 2018, 359(6372): eaan4672.
- [54] MODELL B, DARLISON M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators [J]. *Bull World Health Organ*, 2008, 86(6): 480-7.
- [55] TAHER A T, MUSALLAM K M, CAPPELLINI M D. beta-Thalassemias [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(8): 727-43.
- [56] TAHER A T, WEATHERALL D J, CAPPELLINI M D. Thalassaemia [J]. *Lancet*, 2018, 391(10116): 155-67.
- [57] DRYSDALE C M, NASSEHI T, GAMER J, et al. Hematopoietic-stem-cell-targeted gene-addition and gene-editing strategies for beta-hemoglobinopathies [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(2): 191-208.
- [58] ZENG J, WU Y, REN C, et al. Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Med*, 2020, 26(4): 535-41.
- [59] CAVAZZANA-CALVO M, PAYEN E, NEGRE O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia [J]. *Nature*, 2010, 467(7313): 318-22.
- [60] THOMPSON A A, WALTERS M C, KWIATKOWSKI J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(16): 1479-93.
- [61] MENZEL S, GARNER C, GUT I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15 [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(10): 1197-9.
- [62] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1620-5.
- [63] LIU N, HARGREAVES V V, ZHU Q, et al. Direct promoter repression by BCL11A controls the fetal to adult hemoglobin switch [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 430-42.e17.
- [64] SMITH E C, LUC S, CRONEY D M, et al. Strict *in vivo* specificity of the Bcl11a erythroid enhancer [J]. *Blood*, 2016, 128(19): 2338-42.
- [65] LIU P, KELLER J R, ORTIZ M, et al. Bcl11a is essential for nor-

- mal lymphoid development [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(6): 525-32.
- [66] BAUER D E, KAMRAN S C, LESSARD S, et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level [J]. *Science*, 2013, 342(6155): 253-7.
- [67] PSATHA N, REIK A, PHELPS S, et al. Disruption of the BCL11A erythroid enhancer reactivates fetal hemoglobin in erythroid cells of patients with beta-thalassemia major [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 10: 313-26.
- [68] 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 [J]. *Nat Med*, 2016, 22(9): 987-90.
- [69] ESRICK E B, LEHMANN L E, BIFFI A, et al. Post-transcriptional genetic silencing of BCL11A to treat sickle cell disease [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 205-15.
- [70] KOHN D B, WEINBERG K I, NOLTA J A, et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency [J]. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1017-23.
- [71] BLAESE R M, CULVER K W, CHANG L, et al. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34⁺ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, project 90-C-195, January 10, 1992 [J]. *Hum Gene Ther*, 1993, 4(4): 521-7.
- [72] CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease [J]. *Science*, 2000, 288(5466): 669-72.
- [73] AIUTI A, SLAVIN S, AKER M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning [J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2410-3.
- [74] OTT M G, SCHMIDT M, SCHWARZWAELDER K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1 [J]. *Nat Med*, 2006, 12(4): 401-9.
- [75] CARTIER N, HACEIN-BEY-ABINA S, BARTHOLOMAE C C, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy [J]. *Science*, 2009, 326(5954): 818-23.
- [76] BOZTUG K, SCHMIDT M, SCHWARZER A, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1918-27.
- [77] AIUTI A, BIASCO L, SCARAMUZZA S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233151.
- [78] BIFFI A, MONTINI E, LORIOLI L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233158.
- [79] XU L, WANG J, LIU Y, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with hiv and acute lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240-7.
- [80] MARKTEL S, SCARAMUZZA S, CICALESE M P, et al. Intra-one hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent ss-thalassemia [J]. *Nat Med*, 2019, 25(2): 234-41.
- [81] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and beta-thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(3): 252-60.
- [82] HOWE S J, MANSOUR M R, SCHWARZWAELDER K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3143-50.
- [83] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(3): 255-6.