

大健康与新医疗

BIG DATA Health
and New Medical

2022 年

第12期



上海科学技术情报研究所
上海市前沿技术发展研究中心
技术与创新支持中心(TISC)

“大有可为”的碱基编辑器

编者按

一直以来，如何精准、高效的对基因组进行编辑与修饰是生命科学领域研究的主要方向之一。CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术恰好可以利用一个蛋白或融合蛋白作 DNA 分子手术刀实现对目标基因的修饰与编辑，局限在于该技术依然难以解决 DNA 双链断裂引发的单碱基突变修复。

然而，人类 2/3 遗传病、包括动植物一些重要的性状变异均与单核苷变异紧密相关。因此，能够实现单碱基替换的技术由此而生，即碱基编辑器。有评论言：如果说 CRISPR 技术是基因编辑的皇冠，那么碱基编辑器就是皇冠上的明珠。

碱基编辑器技术先后被国际顶级期刊《自然》与《科学》喻为“超精确的新型基因编辑工具”以及“超越 CRISPR”的重大突破”；同时还被来自哈佛大学的 CRISPR 先驱乔治·丘奇（George Church）盛赞为“朝着正确方向迈出的一大步”。冠以如此殊荣的“碱基编辑器”是如何行使生物功能、并如何在应用领域大展拳脚的，该期简报将依次阐述。

目 录

研究进展.....	3
基因编辑技术中的新发现——碱基编辑器.....	3
单碱基编辑技术的发展历程与双碱基编辑技术的出现.....	6
Nature Communications:开发出优化碱基编辑器的新策略.....	9
胞嘧啶碱基编辑器在乙肝体内治疗表现积极进展.....	10
技术应用.....	11
单碱基编辑器技术的应用.....	11
碱基编辑疗法 VERVE-101 首次进临床 新药审批暂搁浅.....	14
辉瑞与碱基编辑公司 Beam 合作推进体内碱基编辑疗法.....	15

研究进展

基因编辑技术中的新发现——碱基编辑器

CRISPR 基因编辑技术一经发现就引来全球强势围观，且研发热度不减。CRISPR 技术全称为规律成簇的间隔短回文重复相关蛋白技术(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)。2012 年，美国和德国研究者共同在 Science 发文，阐述了 CRISPR/Cas9 的体外重构技术。2013 年首次实现对人类细胞的基因编辑。随后，该技术被快速应用于多种动物、植物和微生物。CRISPR 序列于 1987 年被日本科学家在大肠杆菌中被发现，直到 2007 年首次证实该序列可让细菌免疫病毒感染。CRISPR 技术简单的工作原理是实现对外来基因的剪切与删除，在此过程中会形成 DNA 双链缺口，后期修复会出现移码突变、单碱基修复效率低等问题，碱基编辑器由此产生。来自美国哈佛大学的研究者先后开发了三种不同的碱基编辑器，它们分别是胞嘧啶碱基编辑器、腺嘌呤碱基编辑器和先导编辑器，这些碱基编辑器不依赖 DNA 双链缺口的产生，也不需要供体 DNA 参与。

一、胞嘧啶碱基编辑器

胞嘧啶碱基编辑器的工作原理是在 CRISPR/Cas9 技术的基础上，将 sgRNA (small guide RNA, sgRNA) 和融合蛋白组合到一起。其中，融合蛋白是由经过改造 Cas9 蛋白、胞嘧啶脱氨酶和尿嘧啶糖基化酶抑制子三部分构成的复合体。

(1)改造的 Cas9 蛋白，目的是让它不再切割 DNA 双链，但仍能结合到目标 DNA 序列，那么使用完好的互补链作为模板，DNA 上的切口迅速地被修复。(2)胞嘧啶脱氨酶的作用是将胞嘧啶 (Cytosine, C) 脱氨基变为尿嘧啶 (Uracil, U)，在 DNA 复制过程中变为胸腺嘧啶 (Thymine, T)，那么产生的结果就是碱基 C 变成了碱基 T；同时，互补链上原来与 C 互补的鸟嘌呤 (Guanine, G) 将会替换为腺嘌呤 (Adenine, A)，最终实现在一定的活性窗口内 C 到 T 和 G 到 A 的单碱基精准编辑。(3)尿嘧啶糖基化酶抑制子的作用是抑制中间产物 U 的切除，增加 DNA 链上 C 变 T 的效率，那么结果就是更多的 C 变为 T。

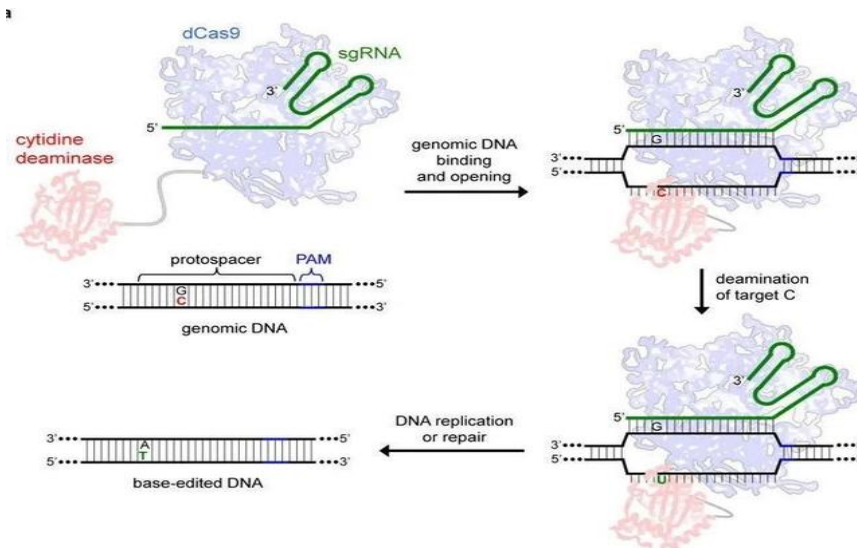


图 1 胞嘧啶碱基编辑器工作原理

胞嘧啶碱基编辑器已经经历了四代的更迭，技术越来越纯熟，定位越来越精准、编辑越来越高效。

二、腺嘌呤碱基编辑器

腺嘌呤碱基编辑器核心组成元件是 nCas9(D10A)和人工定向进化的腺嘌呤脱氨酶。腺嘌呤碱基编辑器的作用原理与胞嘧啶碱基编辑器类似，即当融合蛋白在 sgRNA 的引导下靶向基因组 DNA 时，腺嘌呤脱氨酶可结合到抗单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 上，将一定范围内的腺嘌呤(A)脱氨变成肌苷(I)，I 在 DNA 水平会被当做 G 进行读码与复制，最终实现 AT 碱基对 GC 碱基对的直接替换。腺嘌呤碱基编辑器的开发打破了胞嘧啶碱基编辑器仅能编辑 C 或 G 的限制，为碱基之间的相互转变提供了更多的可能性。相比胞嘧啶碱基编辑器，腺嘌呤碱基编辑器不需要抑制烷基腺嘌呤 DNA 糖基化酶(AAG)的活性（图 2）。

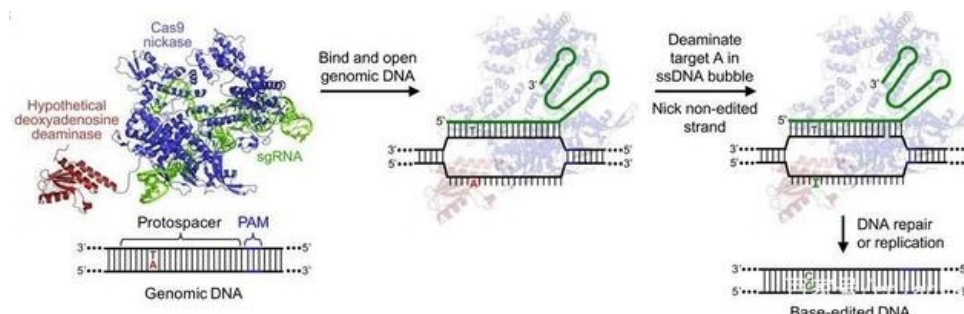


图 2 腺嘌呤碱基编辑器的工作原理

腺嘌呤碱基编辑器已更新两代，更新的编辑器达到了扩大编辑碱基的效果。

三、先导碱基编辑器

胞嘧啶碱基编辑器和腺嘌呤碱基编辑器组合使用可以有效地进行 4 种碱基转换($C \rightarrow T$, $G \rightarrow A$, $A \rightarrow G$, $T \rightarrow C$), 然而对另外 8 种碱基转换($C \rightarrow A$, $C \rightarrow G$, $G \rightarrow C$, $G \rightarrow T$, $A \rightarrow C$, $A \rightarrow T$, $T \rightarrow A$, $T \rightarrow G$)以及碱基的插入和缺失, 依然缺乏有效的研究工具。先导编辑器是一种能够搜索和替换(碱基)的基因编辑器, 在不依赖 DSB 和供体 DNA 的条件下便可有效实现所有 12 种碱基转换, 此外还能有效实现多碱基的精准插入(最多可插入 44bp)和删除(最多删除 80bp)。

先导碱基编辑器的工作原理(图 3): 首先是在 pegRNA 的引导下, nCas9 切断含 PAM 的靶 DNA 链, 断裂的靶 DNA 链与 pegRNA 的 3' 末端 PBS 序列互补并结合, 之后逆转录酶发挥功能, 沿逆转录模板序列开始逆转录反应。反应结束后 DNA 链的切口处会形成处在动态平衡中的 5' flap 和 3' flap 结构, 其中 3' flap 结构的 DNA 链携带有目标突变, 而 5' flap 结构的 DNA 链则无任何突变。细胞内 5' flap 结构易被结构特异性内切酶识别并切除, 之后经 DNA 连接和修复便实现了精准的基因编辑。用科学网博客上的话讲就是: 在优化后的先导编辑中, 新 DNA 有较高概率撬动原有序列, 通过细胞自带的碱基修复机制连接到基因组上。而原有序列则成了多余, 被修复机制去除。至此, 基因编辑功能实现。

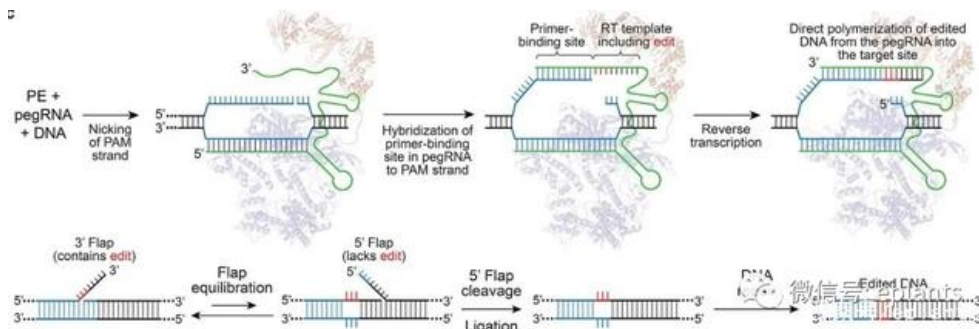


图 3 先导碱基编辑器的工作原理

先导碱基编辑器也已经经历了四代的更新换代, 该技术的发现被哈佛大学 CRISPR 先驱乔治·丘奇 (George Church) 盛赞为“朝着正确方向迈出的一大步”。

资料来源: 一文读懂所有的碱基编辑器技术! [EB/OL]. (2020-10-08). [2022-11-08].

<https://www.baidu.com>.

单碱基编辑技术的发展历程与双碱基编辑技术的出现

现有的基因编辑技术，例如 CRISPR、ZFN、TALEN，通过在 DNA 中产生靶向的双链断裂，然后依靠细胞自身修复机制来完成编辑过程。这种方法可以有效地破坏基因表达。然而，它们缺乏对编辑结果的控制，脱靶效应以及对 DNA 双链断裂的依赖，可能导致基因编辑后的细胞出现不可预期的混乱。许多基因组突变发生在单个碱基中，为使基因编辑更加精确，碱基基因编辑技术应运而生，旨在针对这些单一的碱基错误(即点突变)，而不会在 DNA 中造成双链断裂。

一、单碱基编辑技术发展历程

2016 年 4 月，David Liu 等人在 Nature 上发表论文，首次开发出了 CRISPR-Cas9 单碱基编辑器(CBE)，CBE (BE3.0)基于胞嘧啶脱氨酶 APOBEC1 (能催化 C 脱氨基变成 U，而 U 在 DNA 复制过程中会被识别成 T)和尿嘧啶糖基化酶抑制剂 UGI (能防止尿嘧啶糖基化酶将 U 糖基化引起碱基切除修复)在不依赖 DNA 双链断裂的情况下首次实现了对单个碱基的定向修改。这便开启了 CRISPR 系统的单基因编辑时代。

2017 年 10 月，David Liu 团队又开发了另一种单碱基基因编辑工具——腺嘌呤碱基编辑器 (ABE) 发表在《Nature》上。它可以将 A-T 碱基对转换成 G-C 碱基对，加之 CBE 的将 G-C 碱基对转换成 T-A 碱基对的成果，从此研究人员首次实现了不依赖于 DNA 断裂而能够将 DNA 四种碱基 A、T、G、C 进行替换的单碱基基因编辑技术。随后，David Liu 团队在优化这些碱基编辑器性能上取得了多项成果和突破，但是单碱基编辑器虽然实现了更精准的基因编辑，仍具有局限性：它不能任意编辑所有碱基，例如目前仍无法执行另外八个碱基转换突变 (C→A, C→G, G→C, G→T, A→C, A→T, T→A 和 T→G)，而且脱靶效应依然存在。

2019 年 3 月，中科院神经科学研究所杨辉研究团队和中科院遗传发育所高彩霞研究团队分别在《Science》杂志上同期发表了两篇论文，两项研究分别在水稻和小鼠上证实：单碱基编辑系统存在严重的脱靶效应，同时会诱导大量的 DNA 突变。他们发现设计良好的 CRISPR/Cas9 以及单碱基基因编辑系统 ABE 没有明显的脱靶效应。与此相反的是，CBE 系统可在小鼠胚胎以及水稻中导致大量的脱靶性单核苷酸突变出现。

2019 年 4 月，麻省总医院病理学教授 J. Keith Joung 领导在《Nature》杂志上发表的一篇论文显示：单碱基编辑的脱靶效应比想象中还要严重，它不仅会导致 DNA 突变，还会导致大量 RNA 突变。CBE 和 ABE 这两种重要的 DNA 单碱基编辑器均存在大量的 RNA 脱靶，并且利用点突变的方法筛选到一个 CBE 的突变体可以降低 RNA 的脱靶。

二、单碱基基因编辑技术的改进

2019 年 6 月，中科院神经科学研究所杨辉研究团队、四川大学郭帆研究组、中国科学院——马普学会计算生物学李亦学研究组在 Nature 杂志报道的一项研究发现：RNA 脱靶主要是由于 DNA 单碱基编辑器的脱氨酶 APOBEC1（BE3）和 TadA（ABE）所导致。研究团队通过引入突变的方法对两种 DNA 单碱基编辑器的胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶分别进行了优化，最终获得了 3 种高保真度的 BE3 突变体，均能够完全消除 RNA 脱靶并维持 DNA 编辑活性的高精度单碱基编辑工具；但遗憾的是，胞嘧啶单碱基编辑器的 DNA 脱靶依然没有得到解决。

2019 年 10 月，David Liu 团队在 Nature 杂志上发表论文表示，开发出了先导编辑器(Prime Editor, PE)，一种能够搜索和替换（碱基）的基因编辑器，在不依赖 DSB 和供体 DNA 的条件下便可有效实现所有 12 种碱基转换（C→T、G→A、A→G、T→C、C→A、C→G、G→C、G→T、A→C、A→T、T→A 和 T→G），此外还能有效实现多碱基的精准插入；最多插入 44 个碱基，或删除 80 个碱基。这有望修复大约 89%的已知人类致病变异(已知的有 75,000 多种)。该项成果不仅使编辑效率大大提高，而且脱靶效应更低。

2020 年 2 月，David Liu 团队在 Nature Biotechnology 发表了一篇文章，该研究基于细菌抗性筛选方法，对多种 CBE 系统的 Cas9 非依赖型 DNA 脱靶风险进行了系统性的分析与比较，发现以 APOBEC1 的多种突变体如 YE1、YE2、EE、YEE、R33A 和 R33A/R34A 为基础的 CBE 系统有着最低的 Cas9 非依赖型 DNA 脱靶风险，并发现 YE1 是最好的版本，碱基转化效率不变，DNA 和 RNA 脱靶同时减少。之后研究者还通过蛋白质工程等策略对 CBE 系统进行优化，有效地减少了 Cas9 非依赖型 DNA 脱靶风险的发生。

2020 年 5 月，杨辉研究团队、李亦学研究组和中国农业科学院深圳农业基因组研究所左二伟研究组合作在 Nature Methods 杂志上在线发表的研究论文，根据蛋白结构预测了脱氨酶 ssDNA 结合的重要氨基酸，在不影响催化活性的情况

下，突变相应的氨基酸（APOBEC1 上的 ssDNA 结构域相应氨基酸），从而得到了显著降低 DNA 脱靶的 CBE 突变体。该研究结果和 David Liu 团队在 2020 年 2 月发表的研究结论一致，都报道 YE1 在保持较高的编辑效率的同时降低了 DNA 和 RNA 上的脱靶，并且同时缩小了编辑窗口并降低了 indel 产生的比例。但是 David Liu 团队基于细菌抗性筛选的方法只适用于 CBE，而杨辉团队基于 GOT1（一种新型脱靶检测技术）的方法是不受限制的，不仅可以检测单碱基编辑器，还可以用于其它基于融合蛋白的基因编辑工具的安全性检测和改进。

三、双碱基基因编辑技术的到来

2020 年 5 月 11 日，华东师范大学李大力课题组在 Nature cell Biology 发表了一篇研究论文，该研究将 Rad51 蛋白的单链 DNA 结合结构域融合到 Cas9 与脱氨酶之间，极大地提高了胞嘧啶碱基编辑器(CBE)的编辑活性，拓宽编辑窗口，因此将其命名为超高活性 CBE(hyBE4max)；类似地还改造出具有更宽的编辑窗口和更高活性的 hyA3A-BE4max，以及能更高效识别 TC 碱基模块中的 C(胞嘧啶)而不引起其他 C 突变的 hyeA3A-BE4max。

2020 年 6 月 1 日，邦耀生物与华东师范大学刘明耀教授及李大力教授团队合作的一项研究在 Nature Biotechnology 杂志进行了发表。该研究将胞嘧啶脱氨酶 hAID-腺嘌呤脱氨酶-Cas9n（SpCas9 D10A 突变体）融合在一起，开发出了一种新型双功能碱基编辑器-命名为：A&C-BE_{max}，它不仅可以实现单独的 C>T 或 A>G，还可以在同一等位基因上同时实现 C>T 和 A>G 的高效转换。与已报道单碱基编辑器(ABE 或 CBE)相比 A&C-BE_{max} 可使 C>T 的编辑窗口被拓宽，效率得以提升；A>G 的窗口保持不变，效率略微下降；RNA 脱靶水平大大降低。

2020 年 6 月 1 日，J. Keith Joung 团队将腺苷脱氨酶(TadA)、来源于七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶（PmCDA1），分别融合到 Cas9 切口酶德的 N 端和 C 端。开发除了一种基于 CRISPR - Cas9 的同步可编程腺嘌呤和胞嘧啶编辑器(Synchronous Programmable Adenine and Cytosine Editor，简称 SPACE)，可以同时引入 A-G 和 C-T 替代。

SPACE 双碱基编辑器与胞嘧啶碱基编辑器（CBE）和腺嘌呤碱基编辑器（ABE）相比，SPACE 的 C-T 编辑效率与 CBE 相当，对 A-G 编辑效率则略有降低，而总体来说，SPACE 双碱基编辑器效率高于 CBE+ABE。SPACE 扩大了

可能的 DNA 序列改变的范围，拓宽了 CRISPR 碱基编辑器的研究应用。

资料来源：基因治疗利器：单碱基编辑技术发展历程[EB/OL]. （2020-06-15）.

[2022-11-08]. <https://zhuanlan.zhihu/p/148423819>.

Nature Communications:开发出优化碱基编辑器的新策略

美国莱斯大学的研究人员试图通过提前微调 CRISPR 碱基编辑策略来避免基因编辑错误。他们将理论和实验结合起来开发出一种构建更好的碱基编辑器的综合方法，其中碱基编辑器在单碱基分辨率下靶向修复有问题的 DNA。相关研究结果发表在 Nature Communications 期刊上，论文标题为《一个设计具有降低旁观者效应的碱基编辑器的通用理论框架》（A general theoretical framework to design base editors with reduced bystander effects）。

一、研究构建新框架尝试消除旁观者效应

研究描述了碱基编辑器用来操纵 DNA 链的分子过程：在必要的地方切割 DNA，为核苷酸替换让路。当它起作用时，正如它治疗镰刀型细胞贫血和一些癌症等遗传疾病时越来越多地起作用一样，碱基编辑器仅编辑给定的核苷酸。当它不奏效时，那是因为不想要的编辑，也称为旁观者编辑（bystander edit），会造成不希望看到的结果，即旁观者效应（bystander effect）。

研究构建了一种理论框架，以消除碱基编辑器文库设计中的试验和错误。这将更好地靶向导致疾病的突变，同时避免旁观者编辑。在这一过程中，该框架可以帮助科学家们更好地理解碱基编辑过程中发生的化学和物理过程。这种新的方法主要是为了消除旁观者编辑，即对靶核苷酸相邻的核苷酸进行编辑。

二、研究应用框架理论最大程度编辑选择性分子

研究结果应用了这种理论框架，得到了一些重要的参数，然后研究人员用来设计需要什么突变和在哪里得到精确的编辑。最终，这种理论和实验的共生关系使研究人员能够以一种更聪明有效的方式开展研究工作。策略结合了分子动力学模拟和随机模型，从而可精确指出实现最大编辑选择性所需的分子之间的结合能量。至关重要的是，这种理论框架包括一种表征脱氨酶，表征脱氨酶催化从分子中去除一个氨基的酶，形成与单链 DNA（ssDNA）之间结合亲和力的方法。

研究人员表示，突变的核苷酸数量可能是数以千计的，仅靠实验来验证单个碱基编辑器是不现实的。只有通过多学科验证方法并通过计算建立一个庞大的碱基编辑器文库，然后将碱基编辑器的数量缩小到最有希望的候选者，继而进一步进行实验验证，才能实现有效精准的碱基编辑。至少，现今的理论框架已经非常成功地反映了已经在实验中做过的事情并且已经能够在其他碱基编辑系统中关闭旁观者效应。

资料来源：Nat Commun: 开发出优化碱基编辑器的新策略[EB/OL]. (2021-11-21).

[2022-11-09]. <https://news.bioon.com/article/6793278.html>.

胞嘧啶碱基编辑器在乙肝体内治疗表现积极进展

乙型肝炎病毒 (HBV) 会导致严重肝脏感染，并可能发展为慢性 HBV 感染，从而增加发生肝硬化、肝功能衰竭或肝癌等危及生命的健康问题风险。慢性 HBV 感染的特征在于共价闭合环状 DNA (cccDNA) 的持续存在，cccDNA 是一种独特的 DNA 结构，可在肝细胞核中响应 HBV 感染而形成。此外，乙型肝炎病毒 DNA 整合到人类基因组中，成为乙肝表面抗原 (HBsAg) 的来源。

一、治愈 HBV 的关键点

目前可用的核苷类或干扰素抗病毒疗法可以限制 HBV 复制，但不会使这些 HBV 基因组元件失活，这会导致乙肝病毒的再感染和再激活。这种无法防止 HBV 感染反弹是治愈 HBV 的关键挑战。

二、Beam 开发的碱基编辑器在 HBV 治疗中表现出积极效果

在 HBV 感染的细胞中，胞嘧啶碱基编辑器 (CBE) 可以在多个位置靶向整合的 HBVDNA 和 cccDNA 微型染色体，在病毒基因组中引入精确和永久的终止密码子。这些终止密码子旨在使病毒基因沉默，而不会出现染色体重排的风险，而核酸酶编辑系统可能在 DNA 中产生双链断裂。Beam 公司开发的一种临床前碱基编辑器，旨在使特定 DNA 碱基直接不可逆地转化为另一个碱基，而不会引起双链断裂。

最新公布的临床前数据，证明了 Beam 公司的多重碱基编辑方法在减少乙肝病毒标志物——包括乙肝表面抗原表达，并防止体内模型中乙肝病毒反弹的潜力。这些最新数据已与里昂 INSERM 癌症研究中心 Fabien Zoulim 实验室合作，并以

题为“胞嘧啶碱基编辑抑制乙型肝炎病毒复制并降低体外和体内 HBsAg 表达”在 2022 年国际 HBV 会议上公布。

新数据建立在之前的体外数据基础上，这些数据证明了靶向 HBV gRNA 和 mRNA 编码 CBEs 在 HBVDNA 中引入终止密码子的能力，从而导致相关乙肝病毒标志物（HBsAg、HBeAg、HBVDNA，3.5kb RNA）的显著减少。基于这些发现，Beam 公司在 HBV 小环小鼠模型中评估了其体内方法，小鼠接受一剂或两剂碱基编辑试剂（mRNA 和 gRNA 配制成脂质纳米颗粒（LNP））、抗病毒治疗恩替卡韦（ETV）或对照小鼠，研究结果表明：

1、与 ETV 或对照小鼠相比，接受碱基编辑疗法导致在两个 LNP 剂量组中观察到的 HBsAg 持续下降 $> 2 \log_{10}$ IU/ml，但未观察到有意义的下降。

2、与 ETV 组相比，碱基编辑疗法导致血清 HBVDNA 水平持续下降 $3 \log_{10}$ 拷贝/ml，没有观察到 HBV 反弹，ETV 组在给药后血清 HBVDNA 减少，但在 ETV 治疗停止后反弹。

三、结论

研究结果表明，碱基编辑有可能通过引入阻止 HBV 复制和沉默病毒蛋白表达的突变，进而永久灭活 cccDNA 和整合的 HBVDNA。这是临床前阶段碱基编辑器（CBEs）首次公布体内数据，数据表明，多重碱基编辑方法对慢性 HBV 感染的目标疾病驱动因素的潜力。目前，全球以基因编辑开发乙肝在研新药，均处于临床前阶段，尚未进入到人体临床试验，胞嘧啶碱基编辑器（CBEs）在减少乙肝病毒各标志物，包括乙肝表面抗原表达并防止 HBV 反弹方向，继续在永久灭活 cccDNA 与整合的 HBVDNA 方向表现出潜力。

资料来源：乙肝碱基编辑器首次体内进展，既防止 HBV 复制，又降低 HBV 蛋白表达 [EB/OL]. (2022-09-19). [2022-11-09]. <https://cj.sina.com.cn>.

技术应用

单碱基编辑器技术的应用

单碱基编辑法可以精确地、不可逆地实现从一种碱基对到另一种碱基对的转变，而无需双链 DNA 断裂或同源介导的双链 DNA 修复。因此，单碱基编辑技术在生物医药领域“大有可为”。

一、单碱基编辑系统在人类疾病治疗方面的应用

来自上海交通大学的常兴组率先开发了 dCas9-AIDx 碱基编辑系统，并将其应用到肿瘤研究中。在肿瘤疾病治疗过程中，基因上特定位点的碱基突变会使部分肿瘤细胞对抗肿瘤药物产生耐药性，如在慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 的治疗中，常使用伊马替尼药物来抑制癌细胞中 BCRABL 激酶的活性，从而抑制白细胞的过度增殖。

但是，在治疗过程中，癌细胞会在特定基因序列点突变(如常见的 T315I 突变)后产生耐药性，这是目前肿瘤治疗的一大障碍。针对这个问题，常兴组在 CML 患者来源的 K562 细胞系中表达了 dCas9-hAIDx 的融合蛋白，由于没有使用 UGI，因此 AIDx 修饰的胞嘧啶 C 及互补的鸟嘌呤 A 可以随机地向其它三种碱基转变。他们使用 sgRNA 文库将 dCas9-AIDx 靶向到 ABL 基因的第 6 个外显子，诱导点突变的发生。通过用伊马替尼药物筛选，将伊马替尼耐药的细胞与筛选前细胞的 ABL 的第 6 个外显子进行深度测序分析，发现了 10 个与伊马替尼耐药相关的基因突变位点，包括了在临床中已被证实的 T315I 突变。该研究证明，可以利用此系统筛选肿瘤细胞产生耐药性的突变，探究肿瘤疾病的耐药机制，开创了筛选肿瘤耐药突变的新方法，结合第二代测序技术在临床中的应用，将有助于癌症病人耐药的早期发现，提高癌症病人的生存率。

二、单碱基编辑系统在动物模型方面的应用

目前，大多数关于单碱基编辑系统的研究报告主要基于细胞实验，而其在动物模型开发中的应用将有利于研究人员深入研究疾病发生和发展的机理。韩国首尔大学 Jin-SooKim 组率先发表了将 rAPOBEC1-XTEN-Cas9n-UGI(BE3)系统运用于小鼠疾病模型制备的研究成果。针对小鼠的抗肌萎缩蛋白基因 Dmd 以及酪氨酸酶基因 Tyr，分别设计了特异识别的 sgRNA，显微注射 sgRNA 和 rAPOBEC1-XTEN-Cas9n-UGI 融合蛋白的 mRNA 或者电转染 sgRNA 和 rAPOBEC1-Cas9n-UGI 蛋白的复合物到小鼠受精卵。

在所获得的 9 只 Dmd 的 F0 代小鼠中，有 5 只小鼠产生了靶位点的碱基突变，包括一只纯合子突变小鼠(CAG>TAG)。进一步通过免疫染色发现，在这只纯合子 Dmd 突变小鼠体内几乎检测不到该蛋白的表达。而通过电转染 gRNA 和 rAPOBEC1-XTEN-Cas9n-UGI 融合蛋白的复合物，产生了 7 只 TyrF0 后代小鼠中

均检测到靶基因突变，包括 3 只纯合子 Tyr 突变小鼠。

与 Jin-SooKim 的发现类似，黄军就组也发现了碱基编辑系统会在胚胎中产生碱基的缺失，并首次报道了在小鼠胚胎中由碱基编辑系统诱导产生的靶位点处的碱基插入以及临近位点的脱氨基。由于所用的 dCas9-HF2 不具有核酸酶活性，他们认为，碱基的插入和缺失是由于胞嘧啶脱氨基后产生的 U 被碱基切除修复机制识别，并被切除从而产生无碱基位点，无碱基位点再进一步转化成 DNA 双链损伤，从而导致碱基插入和缺失的产生。以上两项研究结果充分证明了单碱基编辑系统能高效地用于制备疾病动物模型，但仍需进一步优化来提高特异性及降低碱基插入和缺失的产生。

三、单碱基编辑系统在植物方面的应用

转基因技术在改良作物性状方面已经做了大量的工作，但由于外源基因的导入和公众科普的缺乏，使得转基因作物的推广和应用存在较大难度。作物在漫长的人工选育过程中，人类通过人工选择的方式定向选育具有优良性状的基因突变株，但该过程耗时耗力且不可控。利用同源重组技术，可以获得定点修饰的优良植物株，但由于同源重组的效率太低，因此可行性不高。单碱基编辑技术在人细胞中高效编辑单个碱基的结果提示，可以通过该系统在农作物中的进行定点可控的基因编辑，进而快速、高效地获得优良性状的植株。

研究还发现在作物中胞嘧啶核苷脱氨酶的作用活性窗口为 7 个核苷酸序列，从距离 PAM 最远端数起的第 3~9 位核苷酸，这相对于在动物细胞中的编辑窗口更广。尝试采用土壤杆菌为载体，携带 Cas9n-XTEN-rAPOBEC1-UGI 融合蛋白和 sgRNA，编辑水稻内一种衰老控制基因 OsCDC48。研究结果显示，单碱基编辑效率在 5.0%~32.5%，靶位点处没有发现核苷酸序列的随机插入或缺失，而且预测可能的脱靶位点处也没有发现突变。同一时间，中科院上海生命科学研究院的朱健康团队和中国农业科学院作物研究所的夏兰琴团队也分别报道了运用单碱基编辑系统对水稻基因进行单碱编辑。这三个独立的研究表明，单碱基编辑系统可以在农作物中取得高效的编辑效率，为改良作物品种带来新希望。

资料来源：单碱基编辑的原理与应用[EB/OL]. (2022-02-05). [2022-11-08].

https://www.chemicalbook.com/Newsinfo_6117.html.

碱基编辑疗法 VERVE-101 首次进临床 新药审批暂搁浅

杂合子家族性高胆固醇血症（HeFH）在全球范围内大约每 200 至 500 人中就有 1 人患有，患者通常携带 LDL 受体（LDLR）基因突变，导致 LDLR 表达下降，引起血液中 LDL-C 水平升高。随着时间的推移，高 LDL-C 在心脏动脉中蓄积，导致血流减少或阻塞，最终导致心脏病发作或卒中。此前研究已证明 PCSK9 基因失活可上调 LDL 受体表达，从而导致 LDL-C 水平降低，降低冠心病风险。可见，PCSK9 是疾病的主要调控基因。

一、用于治疗 HeFH 的碱基编辑疗法 VERVE-101 首进临床

基因编辑治疗上市公司 Verve Therapeutics Inc.（以下简称为“Verve”，NASDAQ: VERV）公司宣布，其主打在研碱基编辑疗法 VERVE-101 已经获得新西兰监管机构的许可，在 HeFH 患者中进行首个人体临床试验。临床试验于 2022 年中展开，Verve 预计将在 2023 年报告这一临床试验的初步临床数据。

VERVE-101 是一款通过在体内对 PCSK9 基因进行单碱基编辑，降低 PCSK9 表达和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平的基因编辑疗法。它有望通过一次性治疗，永久降低患者心血管疾病的发作风险。

VERVE-101 的主要作用是通过使编码 PCSK9 的 DNA 遗传序列发生单一的 A 到 G 的改变，导致 PCSK9 基因失活。已有发表的非人灵长类动物实验结果显示了 VERVE-101 的作用机理，并表明单次 VERVE-101 输注能够在接受治疗一年后将 PCSK9 水平降低 89%，将 LDL-C 水平降低 68%。临床实验证明 VERVE-101 持续降低血液中的 LDL-C 蛋白水平。

二、VERVE-101 新药临床研究审批被 FDA 暂停受理

2022 年 11 月 8 日，Verve 发布公告称，FDA 暂停了其在研碱基编辑疗法 VERVE-101 用于治疗杂合子家族性高胆固醇血症（HeFH）的 IND 批件。

目前，尚不清楚 FDA 暂停 VERVE-101 在美临床批件的原因，但 Verve 表示计划在与 FDA 接触前作出更新，并与 FDA 合作，尽快解决临床试验暂停相关问题。在美的审批暂停并未影响在新西兰与英国开展的临床 I 期实验，Verve 预计在明年下半年公布所有剂量递增队列的早期临床数据，包括安全性参数、血液中 PCSK9 水平和血液中 LDL-C 水平。

资料来源: Katie Kingwell. Base editors hit the clinic[J]. Nature Reviews, 2022, 21: 545-547.

体内碱基编辑疗法即将首次步入临床, 一次性降低心血管疾病风险应

[EB/OL]. (2022-05-11). [2022-11-08]. <https://new.qq.com/rain/a/20220511A01L0500>.

一次性碱基编辑疗法 IND 在美遭搁置, 明星公司股价下跌 25%, 称暂未影响新西兰和英国试验进展. 生辉公众号, 2022-11-08.

辉瑞与碱基编辑公司 Beam 合作推进体内碱基编辑疗法

2022 年 1 月 10 日, 制药巨头辉瑞公司与领先的碱基编辑公司 Beam 宣布达成为期 4 年的独家合作, Beam 将获得来自辉瑞的 3 亿美元预付款, 以及高达 10.5 亿美元的里程碑付款。此次为期 4 年的合作, 将结合辉瑞在 mRNA、LNP、基因治疗等药物开发方面的丰富经验和 Beam 在碱基编辑、mRNA/LNP 递送方面的领先优势, 共同推进肝脏、肌肉和中枢神经系统的三个罕见遗传疾病的体内碱基编辑疗法。

一、Beam 在碱基编辑领域的独家优势促成合作

辉瑞选择与碱基编辑公司 Beam 合作, 与其他 CRISPR 基因编辑不同之处在于, Beam 的碱基编辑 (Base Editing) 更为精准, 能够靶向修复基因组中的单个碱基, 且不造成 DNA 双链断裂 (DSB), 因此不会导致相关的潜在风险, 被认为更安全。

二、Beam 公司的研发简介

(1) Beam 的递送方式

Beam 的递送策略非常全面, 包括电穿孔、脂质纳米颗粒 (LNP) 及腺相关病毒 (AAV)。Beam 认为, 没有一种单一的递送策略能够将治疗性药物成分高效递送到不同器官和组织。因此, Beam 的计划是使用电穿孔技术进行体外血细胞和免疫细胞的递送; 使用 LNP 进行体内肝脏及其他器官的递送; 使用 AAV 进行眼睛和中枢神经系统的递送。

(2) Beam 的研发管线

Beam 目前的研发管线分为 4 大类: 体外编辑造血干细胞疗法、体外编辑 T 细胞疗法、体内 LNP 靶向肝脏遗传病、AAV 治疗眼病。

其中体外编辑造血干细胞治疗镰状细胞病和 β -地中海贫血的疗法 BEAM-

101 进度最靠前，已通过 IND 申请，且该疗法已获 FDA 批准。

此外，体外编辑 T 细胞的治疗急性淋巴细胞白血病（ALL）和急性髓细胞白血病（AML）的 CAR-T 疗法（BEAM-201）据报道 IND 申请已被 FDA 暂停。Beam 还将在今年启动首个体内碱基编辑疗法 BEAM-301 的 IND 研究，通过 LNP 将碱基编辑组分以 mRNA 的形式递送到肝脏，修复导致糖原贮积病 Ia 型（GSDIa）的 G6PC 基因的 R83C 点突变。

资料来源：超 13 亿美元，辉瑞与碱基编辑公司 Beam 合作推进体内碱基编辑疗法

[EB/OL]. （2022-01-12）. [2022-11-09]. https://www.sohu.com/a/515989788_121124565.

Beam Therapeutics：镰状细胞病碱基编辑候选药物试验获 FDA 批准

[EB/OL]. （2021-11-10）. [2022-11-09]. www.psrar.com/2021/11/10/beam-therapeutics.

