CRISPR-Cas9基因编辑技术在乙型肝炎病毒治疗中的应用

严鲲¹, 冯姜澎¹, 熊勇², 陈宇^{1*}

1. 武汉大学生命科学学院, 病毒学国家重点实验室, 现代病毒研究中心, 武汉 430072;

2. 武汉大学中南医院感染科, 武汉 430071

* 联系人, E-mail: chenyu@whu.edu.cn

2019-04-01 收稿, 2019-05-04 修回, 2019-05-06 接受, 2019-06-14 网络版发表

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)能引起患者慢性感染, 增加肝硬化和肝癌的风险, 是威胁全球健康的一个重要问题. 核苷(酸)类似物(NUCs)和干扰素(IFN)是目前治疗HBV仅有的两类药物, 然而这两类药物均无法清除稳定存在于细胞核中且能够作为模板产生子代病毒的闭合共价环状DNA (covalently closed circle DNA, cccDNA). 此外, HBV耐药相关突变(RAM)和疫苗逃逸突变(VEM)降低了现有治疗和预防策略的成功率. 因此, 人们在努力开发直接靶向cccDNA, 将之失活或清除以实现治愈慢性乙肝的治疗手段. 特异性靶向HBV基因组保守区域的CRISPR-Cas9基因编辑系统, 不仅能够有效抑制病毒复制, 相比其他基因编辑工具, 设计也更加简单灵活, 成为了一个十分具有吸引力的治疗选择. 本文将总结现有CRISPR-Cas9系统在抗乙型肝炎病毒中的研究, 并探讨其可能面临的问题与潜在的解决方案.

关键词 CRISPR-Cas9, 基因治疗, 脱靶效应, 乙型肝炎病毒(HBV), cccDNA

据统计, 全球大约有2.91亿人口感染乙型肝炎病毒(HBV), 每年约有100万人因为乙型肝炎及其引发的肝硬化和肝癌失去生命, 因此, 病毒性乙型肝炎是世界范围内主要的公共卫生问题之一^[1]. 尽管针对HBV研制的有效预防性疫苗已经投入使用几十年, 但HBV仍然是当今全球十大死因之一.

目前, 获得批准的HBV治疗药物主要包括逆转录酶抑制剂和免疫介导因子, 其中逆转录酶抑制剂核(昔)酸类似物(NUCs), 包括拉米夫定、阿德福韦酯、替比夫定、恩替卡韦和替诺福韦等. 尽管NUCs可以通过直接作用于HBV逆转录酶有效抑制HBV的逆转录过程, 减少病毒至低于检测限的水平, 但是由于NUCs对核内的闭合共价环状DNA (cccDNA)库并无影响, 在停止治疗后HBV可以继续以cccDNA为模板, 产生子代病毒,

再次出现病毒血症, 并且长期服用可能会出现具有耐药性的突变毒株. 作为免疫介导因子的干扰素(IFN)则是通过调节先天免疫和获得性免疫反应来达到抗病毒的作用, 包括抑制组装、诱导RNA降解、表观调控沉默cccDNA以及激活T细胞清除感染的细胞来实现对HBV感染的功能治愈, 但是治疗成功率较低且常伴随着不小的副作用^[2]. 由于目前的治疗药物均无法完全清除或者失活HBV在肝细胞核内稳定存在的cccDNA而无法实现病毒学治愈, 在停药或者发生耐药后病毒复制随时可能重新恢复到正常水平, 因此靶向cccDNA的特异性治疗成为目前研究的重要方向. 鉴于CRISPR-Cas9技术强大的病毒抑制能力以及目前缺乏有效治愈手段的现状, 靶向HBV DNA保守序列以抑制HBV复制的CRISPR-Cas9系统成为了一个具有潜力的治疗手

引用格式: 严鲲, 冯姜澎, 熊勇, 等. CRISPR-Cas9基因编辑技术在乙型肝炎病毒治疗中的应用. 科学通报, 2019, 64: 3142–3150

Yan K, Feng J P, Xiong Y, et al. Application of CRISPR-Cas9 gene editing to treat HBV (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 3142–3150, doi: [10.1360/N972019-00280](https://doi.org/10.1360/N972019-00280)

段^[3]。图1展示了目前两类获批HBV治疗药物在病毒生活周期中起到的抗病毒作用以及可能产生的细胞毒性或发生耐药性的局限性。

1 CRISPR-Cas9系统

CRISPR-Cas系统是在原核生物中发现的一种获得性免疫系统^[4]，根据行使功能的蛋白组成作用方式不同分为两类，包含6种类型。I类系统利用多蛋白效应复合物，主要包含I型、III型和IV型，II类CRISPR-Cas系统利用单个蛋白效应物，主要包括II型、V型、VI型^[5,6]。事实上，不同CRISPR-Cas类型拥有许多独特的特征。鉴于利用单个蛋白效应物的简便性，II类系统是目前研究最多并广泛应用于基因编辑中的CRISPR-Cas系统。本文所介绍的CRISPR-Cas9系统便属于II类系统中的II型。

CRISPR-Cas9系统中的Cas9是一种具有内切核酸酶功能的蛋白，与相应的tracrRNA(transactivating CRISPR RNA)和crRNA (CRISPR RNA)形成复合体来行使功能^[7,8]。当DNA靶序列上存在一个短的保守序列(protospacer adjacent motif, PAM)时，在RNA的介导下，CRISPR-Cas9系统能够识别并切割靶DNA的双链，形成DNA双链断裂(double-strand break, DSB)，而细胞主要通过两种修复途径修复双链断裂，分别是非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)。通过NHEJ修复DSB时，参与修复的蛋白会在切口处插入或删除几个碱基，然后将DNA连接到一起；修复后的基因因为突变而导致功能丧失，称为基因敲除(knock-out)。通过HR修复DSB时，需要提供一个与靶DNA两侧同源的供体模板

(双链质粒或是单链DNA)，供体模板上携带有要引入的突变或者目的基因，通过同源重组机制将目的基因整合到DSB处；这种方法可以在基因组中精确地引入点突变，或者插入目的基因，称为基因敲入(knock-in)，若序列未被及时修复连接，则会被降解，导致目的基因的完全失活。研究人员对CRISPR-Cas9系统不断改进和简化，把tracrRNA和crRNA融合在一起形成sgRNA (single guide RNA)，使该系统更好地应用到基因工程中。

由于CRISPR-Cas9系统设计简易、重复性好、工作效率高、特异性强，能够针对病毒做出快速有效的适应应答，成为极具潜力的抗病毒工具，引起了很多科研团队的研究兴趣。CRISPR-Cas9系统在HBV、艾滋病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV)等多种病毒的治疗中均有应用^[9]。

2 CRISPR-Cas9系统在HBV治疗中的应用

由于HBV基因组本身较小，其调节区和4个编码区(聚合酶编码区、表面蛋白编码区、核心蛋白编码区、X蛋白编码区)需要通过高度紧密的排布和不同程度的重叠来实现病毒复杂的生物学过程^[10,11]。CRISPR-Cas9系统通过在病毒基因组内的预定目标位点诱导双链断裂来发挥作用，即使病毒能够利用宿主细胞易出错的非同源末端连接修复机制修复基因组的双链断裂，但是仍可能因对基因组内的插入和缺失突变敏感，而产生异常或截短的蛋白质来干扰病毒生命周期过程^[12]。如图2所示，CRISPR-Cas9系统可以通过不同的分子存在形式，利用病毒载体或者非病毒载体进入细胞，进而特异性靶向切割细胞核中的cccDNA，使其大量降解，少部分cccDNA可能利用宿主内的系统发生修

图1 (网络版彩色)两类获批HBV治疗药物的抗病毒原理与局限性

Figure 1 (Color online) The antiviral principles and limitations of two approved HBV treatments

图2 (网络版彩色) CRISPR-Cas9在乙型肝炎病毒治疗应用的示意图

Figure 2 (Color online) Schematic of the application of CRISPR-Cas9 in the treatment of hepatitis B virus

复, 这其中的具体机制尚未完全清楚.

2013年, 在多个研究团队证实CRISPR可以用于哺乳动物基因编辑之后^[35,36], Lin等人^[13]以及Seeger和Sohn^[14]在第二年相继报道了CRISPR-Cas9系统在体外和体内均能够破坏表达HBV的模板, 抑制病毒相关指标, 初步探索了CRISPR-Cas9技术在HBV感染的可能性. 为了检验CRISPR-Cas9是否可以切割HBV基因组, Lin等人^[13]设计了8种针对HBV基因型A的gRNA, 在转染HBV质粒的Huh7细胞模型中鉴定出了2个有效的gRNA, 并在水流动力学注射HBV质粒的小鼠模型中进一步证明CRISPR-Cas9可以切割肝内含有HBV基因组的质粒, 导致小鼠血清中HBV表面抗原水平降低.

为了直接说明CRISPR-Cas9靶向cccDNA的作用, Dong等人^[15]采用Qi团队所设计的重组共价闭环环状DNA(rcccDNA)模型系统^[37], 在体内和体外评估了CRISPR-Cas9针对rcccDNA的靶向清除作用以及HBV复制的抑制作用. 同样是为了验证CRISPR-Cas9在体内对HBV慢性感染的抑制结果, Zhen等人^[19]、Ramanan等人^[20]、Zhu等人^[22]以及Li等人^[23]分别使用免疫缺陷型小鼠或HBV转基因小鼠来模拟HBV在慢性感染过程中持续存在的情况, 发现在这些小鼠模型中CRISPR-Cas9仍然具有抑制HBV复制和表达的效果. 随着

CRISPR-Cas9技术的发展, Karimova等人^[21]尝试使用经过点突变将酶切活性部位失活的Cas9变体切口酶(Cas9n)靶向和灭活HBV基因组, 表明特异性更高的Cas9n双切口方法同样能介导HBV的失活.

Sakuma等人^[24]设计了一个包含能够同时靶向HBV基因组上3个不同基因座的6个sgRNA的一体化CRISPR-Cas9系统和CRISPR-Cas9n系统, 结果表明该一体化系统能够高效抑制HBV, 并且未检测到明显的脱靶突变. Seeger根据其之前的实验设计, 进一步使用第二代测序技术(next generation sequencing, NGS)确定了Cas9作用HBV DNA后的cccDNA突变图谱. 他的结果表明, 与之前所报道的用激活载脂蛋白B-mRNA编辑酶(apolipoprotein B mRNA editing enzyme, APO-BEC)来灭活甚至破坏cccDNA的潜在方法相比, CRISPR-Cas9系统切割HBV DNA的效率高15000倍, 因此是目前已知的能够功能性灭活cccDNA的最佳手段, 并有望治愈CHB^[25].

Li等人^[26]在细胞系中详细验证了CRISPR-Cas9系统对整合的HBV DNA片段的切除能力. Jiang等人^[27]利用新开发的脂质样纳米粒子(lipid-like nanoparticles, LLNs)这一非病毒传递技术将Cas9 mRNA和gRNA递送至肝脏, 成功实现了对HBV的抑制. Wang等人^[28]则

将CRISPR-Cas9系统与RNA干扰(RNA interference, RNAi)的方法相结合,将miRNA-HBV整合在两个HBV特异性gRNA之间,在体外和体内均看到了抑制HBV复制和破坏HBV基因组的效果。

Song等人^[29]发现在使用CRISPR-Cas9系统敲除肝癌细胞系中的HBV s抗原基因组(HBsAg)后,能够显著减弱体外肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的增殖,及体内的致瘤性。为了使CRISPR-Cas9系统更具有实际应用价值,多个课题组也在尝试使用不同的方式来实现CRISPR-Cas9系统的递送并验证其抗病毒效果。Schiwon等人^[30]采用具有更强包装能力的高容量腺病毒载体(high-capacity adenoviral vectors, HCAVVs)实现对CRISPR-Cas9系统的递送,并在一个载体上设计了多个gRNA来靶向HBV基因组。Li等人^[31]和Liu等人^[32]则使用来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa)的小型化CRISPR-Cas9系统,由于此Cas9蛋白更小,因此能够被包装进腺相关病毒(adenovirus-associated viral, AAV)载体实现递送。

Kostyushev等人^[33,34]证实来自嗜热链球菌(*Treptococcus thermophilus*, St)的StCas9同样能够导致HBV cccDNA的降解,并通过深度测序显示该系统对细胞宿主基因组没有影响,是一种有效且非常安全的抗病毒系统。表1总结了CRISPR-Cas9系统在HBV治疗中应用的研究情况,包括病毒被靶向的基因组区域、验证抗病毒效果的体外体内实验模型、CRISPR-Cas9系统的gRNA设计变化以及cccDNA发生切割的验证。

3 CRISPR-Cas9系统在HBV治疗应用中的局限性

目前已经有大量的研究证明了CRISPR-Cas9系统可以有效抑制,但真正将其投入到临床应用之前,还需要解决几个重要的问题。

首先,CRISPR-Cas9系统根除慢性HBV感染中的效用需要在更完善的体内模型中得到证实。当然,在HBV cccDNA的临床案例中得到证实将更具有说服力。尽管一些研究通过使用HBV转基因鼠模型或HBV表达质粒的流体动力学注射小鼠模型验证了CRISPR-Cas9在体内的功效,但这两种模型都不能产生真正的HBV cccDNA。此外,基于免疫缺陷型小鼠模型中的结果无法评估免疫系统的作用,这包括免疫系统与HBV的相互作用和免疫系统的应答对CRISPR-Cas9系统的影响。

其次,需要考虑的问题是CRISPR-Cas9系统的

脱靶效应。CRISPR-Cas9在识别并切割靶位点的同时,也可能对与靶位点相似的DNA序列同样进行切割,这可能会对治疗对象带来极大的安全风险。Fu等人^[38]的工作表明,即使gRNA序列与人类细胞中非靶向的DNA序列不完全匹配,甚至错配达到5个核苷酸,gRNA仍然能够引导核酸酶在错误位置发挥切割作用。此外,还有其他几个课题组实验发现CRISPR-Cas9确实存在脱靶活性的潜力的可能性^[39-42],这也与gRNA的选择和设计相关。

为了在体内实现持续和长效的治疗,需要高效的递送系统将Cas9核酸酶精确地带到HBV感染的细胞中,这是实现应用的又一个关键。慢病毒载体虽然能够介导外源蛋白在体内高效并长时间稳定的表达,但由于会引起免疫应答并且可以整合到宿主基因组中引起插入诱变而不能安全地应用在临床上^[43]。工程化重组的腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)载体是基因传递和表达的另一个重要工具,鉴于它的低免疫原性,介导外源基因长期的表达能力以及不同血清型所具备的组织嗜性,是一个非常好的基因治疗的递送手段^[44]。但由于容载能力大小的限制,只有小型化的CRISPR-Cas9系统才可能被包装递送。

研究发现,在肝细胞癌或HBV慢性感染患者体内,存在着HBV的DNA片段部分整合到宿主的基因组中的情况^[45,46]。整合的病毒DNA可能被CRISPR-Cas9靶向切割,因而导致宿主基因组中的插入或者缺失,这可能潜在地破坏宿主基因的功能,应当仔细评估可能带来的不良反应。

4 CRISPR-Cas9系统在HBV治疗临床应用中的困难的潜在解决方案

目前,用于HBV研究的病毒感染小鼠模型主要有水流动力学注射质粒转染小鼠、转基因小鼠和人源化肝脏小鼠。其中水流动力学注射质粒转染小鼠是研究CRISPR-Cas9系统抗HBV病毒使用最多的体内实验模型。虽然使用载体将HBV质粒引入小鼠肝脏中可能与CRISPR-Cas9系统的递送有所冲突,但是已有几种新型的HBV cccDNA模拟质粒被开发出来^[47,48],在小鼠实验中均表现出能够支持高水平 and 持久的HBV复制能力,尤其是能够产生cccDNA样分子,方便直接探究CRISPR-Cas9系统对cccDNA的体内靶向作用。转基因小鼠则包含两种主要的设计思路:一种是将HBV DNA序列整合到小鼠基因组中,产生能够表达单一病毒蛋

表1 CRISPR-Cas9系统在HBV治疗中的应用

Table 1 Application of CRISPR-Cas9 system in HBV therapy

针对HBV 基因组位置	HBV体外 实验模型	HBV体内 实验模型	CRISPR-Cas9 系统设计	cccDNA 抑制的验证	参考 文献
S, C, PreC, P, X	Huh7	水流动力学注射HBV质粒 (C57BL/6小鼠)	一对gRNA	无	[13]
ENII-CP/X, PreC	HepG2-NTCP, HepAD38	无	单条gRNA	PCR克隆	[14]
C, X	Huh7, HepG2.2.15	水流动力学注射precccDNA和 pCMV-Cre质粒(Balb/c小鼠)	单条gRNA	Southern印迹杂交和 实时定量荧光PCR	[15]
S, C, P	HepRG, HepG2.2.15, HepAD38	无	单条gRNA	cccDNA特异性PCR	[16]
S, C, P, X	HepG2	水流动力学注射HBV质粒 (C57BL/6小鼠)	单条gRNA	无	[17]
S, C, PreC, X, P	Huh7, HepAD38	无	一对gRNA	实时定量荧光PCR	[18]
S, C, P, X	HepG2, HepG2.2.15	HBV转基因小鼠(BALB/c小鼠)	单条gRNA	cccDNA特异性PCR	[19]
C, P, X	HepG2, HepG2-NTCP, HepG2.2.15	水流动力学注射HBV质粒 (免疫缺陷型小鼠)	一对gRNA	Southern印迹杂交和 实时定量荧光PCR	[20]
S, X	HepG2, HepG2-NTCP, HepG2.2.15	无	单条gRNA, Cas9n	NGS	[21]
S, X	Huh7, HepG2	HBV转基因小鼠(C57BL/6J小鼠)	单条gRNA	cccDNA特异性PCR	[22]
S	HepG2.A64	水流动力学注射HBV质粒(C57BL/ 6小鼠)HBV转基因小鼠(BALB/c 小鼠)	单条gRNA	无	[23]
S, C, X	HepG2		位于同一个载体上的3对 gRNA, Cas9和Cas9n	无	[24]
P, X	HepG2-NTCP	无	单条gRNA	NGS	[25]
C, PreC	HepG2.A64	无	一对gRNA	无	[26]
S, C, PreC, P, X	Huh7, HepAD38	水流动力学注射HBV质粒 (免疫缺陷小鼠)	单条gRNA	实时定量荧光PCR	[27]
S, C, PreC, P, X	HepG2-NTCP, HepAD38	水流动力学注射HBV质粒 (C57BL/6小鼠)	单条gRNA	cccDNA特异性PCR	[28]
S	Huh7, Hep3B, HepG2.2.15, SK-hep1, HLF, PLC/PRF/5	细胞植入的裸鼠肿瘤模型	单条gRNA	无	[29]
P, X	Huh7, HepG2-NTCP, HepG2.2.15	无	位于同一个载体上的多个 gRNA	实时定量荧光PCR	[30]
S, C, PreC, P, X	293T	HBV转基因小鼠 (C57BL/6J小鼠)	单条gRNA SaCas9	无	[31]
S, C, PreC, X	Huh7, HepG2.2.15	水流动力学注射precccDNA和 pCMV-Cre质粒(C57BL/6小鼠、 CH3小鼠)	单条gRNA SaCas9	实时定量荧光PCR	[32]
PreC, EnhI, X	HepG2-1.1merHBV, HepG2- 1.5merHBV	无	单条gRNA		[33]
S, C, PreC, P, X	HepG2, HepG2-1.1merHBV, HepG2-1.5merHBV	无	单条gRNA StCas9	实时定量荧光PCR和 NGS	[34]

白或者所有病毒蛋白的转基因小鼠^[49]；另外一种方案是将HBV识别受体或者其他利于病毒感染的宿主因子在小鼠体内表达，使小鼠获得HBV易感性建立持续性感染^[50]。人源化肝脏小鼠则是将人源肝细胞移植到小

鼠肝脏中，这种嵌合小鼠可被HBV病毒感染，在其感染的人肝细胞中能够检测到HBV cccDNA^[51,52]。除此之外，这些在小鼠模型中成功应用的技术和经验也能够为之后使用更接近人类的灵长类动物模型的研究提供

表 2 基于不同Cas蛋白新开发的CRISPR-Cas

Table 2 Newly developed CRISPR-Cas system based on different Cas proteins

名称	类型	蛋白大小	靶向特异性	参考文献
SpCas9-VQR SpCas9-VRER	II 型CRISPR系统蛋白突变体	较大	比较了SpCas9-VQR 变体和 SpCas9-VRER变体在基因组范围内的脱靶效应, 表明SpCas9-VRER变体拥有更低的脱靶效应	[59]
SpCas9-HF1	II 型CRISPR系统蛋白突变体	较大	与野生型SpCas9相比, SpCas9-HF1能够实现全基因组脱靶效应降低至不可检测的水平	[55]
xCas9	II 型CRISPR系统蛋白突变体	较大	与野生型SpCas9相比, xCas9具有更高的特异性	[56]
SpCas9-NG	II 型CRISPR系统蛋白突变体	较大	与野生型SpCas9相比, SpCas9-NG拥有相当的特异性	[60]
SaCas9	II 型CRISPR系统蛋白同源物	较小	AAV-SaCas9转导的肝组织样品的深度测序中, 未观察到候选脱靶位点的任何插入缺失	[61]
Cas12a(cpf1)	V 型CRISPR系统蛋白同源物	较小	与野生型SpCas9相比, Cas12ab具有更高的特异性	[62]
Cas12b(c2c1)	V 型CRISPR系统蛋白同源物	较小	与野生型SpCas9相比, Cas12b具有更高的特异性	[63,64]

借鉴。

针对CRISPR-Cas9在HBV治疗应用中可能存在的脱靶问题, 除了对脱靶风险的充分论证^[53,54], 一个重要的研究方向是使用新开发的具有更好特异性的CRISPR-Cas9系统。除了设计和筛选更具特异性的gRNA, 或者使用可结合双gRNA的切口酶以外, 还包括使用性能更佳的Cas9工程变体, Cas9同源物和Cas9以外的新Cas蛋白。Kleinstiver等人^[55]开发出能够减少与非靶向DNA接触的SpCas9-HF1高保真变体, Hu等人^[56]经过噬菌体辅助连续进化模型(phage-assisted continuous evolution, PACE)筛选出具(有更高特异性的Cas9变体-xCas9以及深度测序分析发现在人类细胞中具有很好特异性的CRISPR-Cas Cpf1系统和CRISPR-Cas C2c1系统^[57,58]。表2列举了目前几类极具基因治疗应用潜力的Cas9蛋白变体和其他同属II类的CRISPR-Cas系统。这些不断开发出的新型CRISPR-Cas9系统在减少脱靶效应方面都拥有着出色的表现, 为其在治疗病毒性疾病的临床应用提供了更多的可能。

应用于治疗的潜在体内递送系统主要依赖于病毒和非病毒载体这两种方式。AAV是基因治疗的极好载体, 虽然其包装容量有限, 有研究小组已经报道成功将SpCas9和gRNA包装成两个独立的AAV颗粒, 并将它们用于共感染。此外, 更多的是使用SaCas9, C2c1等用于

包装, 因为其尺寸更小因此能够被AAV包装实现体内递送^[65]。经过化学修饰的mRNA可逃避先天免疫系统并改善稳定性, 因此使用非病毒载体将编码Cas9的化学修饰过的mRNA与sgRNA一起递送也逐渐受到研究者的青睐^[66,67]。与DNA相比, mRNA仅需要递送至细胞质作用位点, 从而避免与宿主DNA重组的潜在毒性作用, 以及RNA能够更精确、瞬时地表达基因编辑系统, 以减少脱靶。此外, 对Cas9蛋白的直接递送也可以达到脱靶效应极小的效果。

5 展望

CRISPR-Cas9系统极大地提高了我们改变基因组的能力, 也带来了治疗疾病的新策略。实验研究表明, CRISPR-Cas9系统破坏了游离型cccDNA, 能够切除整合的HBV DNA, 减少前基因组RNA, 在体外和体内抑制了病毒蛋白, 并且没有可检测的脱靶效应和细胞毒性作用。由于体内实验模型的局限性, CRISPR-Cas9系统的可行性和安全性在临床应用中仍然面临着诸多挑战, 包括避免非预期的脱靶效应, 实现高效率低免疫原性的递送方式, 建立一个能够充分评估可能风险的验证平台。但是随着技术的发展, CRISPR-Cas9系统和体内递送手段将不断革新, 其治疗潜力将继续增加, CHB的治愈可能在不久的将来实现。

参考文献

1 Trépo C, Chan H L Y, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*, 2014, 384: 2053–2063
2 Woo A S J, Kwok R, Ahmed T. Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Ann Transl Med*, 2017, 5: 159
3 Peng C, Lu M, Yang D. CRISPR/Cas9-based tools for targeted genome editing and replication control of HBV. *Virol Sin*, 2015, 30: 317–325

- 4 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709–1712
- 5 Makarova K S, Zhang F, Koonin E V. Snapshot: Class 1 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168: 946–946.e1
- 6 Makarova K S, Zhang F, Koonin E V. Snapshot: Class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168: 328–328.e1
- 7 Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: E2579–E2586
- 8 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 9 Wahid B, Usman S, Ali A, et al. Therapeutic strategies of clustered regularly interspaced palindromic repeats-Cas systems for different viral infections. *Viral Immunol*, 2017, 30: 552–559
- 10 Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 651–693
- 11 Beck J. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 48–64
- 12 Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 2014, 343: 1221–1228
- 13 Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Mol Ther-Nucleic Acids*, 2014, 3: e186
- 14 Seeger C, Sohn J A. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther-Nucleic Acids*, 2014, 3: e216
- 15 Dong C, Qu L, Wang H, et al. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res*, 2015, 118: 110–117
- 16 Kennedy E M, Bassit L C, Mueller H, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology*, 2015, 476: 196–205
- 17 Liu X, Hao R, Chen S, et al. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *J Gen Virol*, 2015, 96: 2252–2261
- 18 Wang J. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 9554–9565
- 19 Zhen S, Hua L, Liu Y H, et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther*, 2015, 22: 404–412
- 20 Ramanan V, Shlomai A, Cox D B T, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep*, 2015, 5: 10833
- 21 Karimova M, Beschorner N, Dammermann W, et al. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep*, 2015, 5: 13734
- 22 Zhu W, Xie K, Xu Y, et al. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res*, 2016, 217: 125–132
- 23 Li H, Sheng C, Liu H, et al. An effective molecular target site in hepatitis B virus S gene for Cas9 cleavage and mutational inactivation. *Int J Biol Sci*, 2016, 12: 1104–1113
- 24 Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, et al. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*, 2016, 21: 1253–1262
- 25 Seeger C, Sohn J A. Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol Ther*, 2016, 24: 1258–1266
- 26 Li H, Sheng C, Wang S, et al. Removal of integrated hepatitis B virus DNA using CRISPR-Cas9. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 91
- 27 Jiang C, Mei M, Li B, et al. A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pscs9 *in vivo*. *Cell Res*, 2017, 27: 440–443
- 28 Wang J, Chen R, Zhang R, et al. The gRNA-miRNA-gRNA ternary cassette combining CRISPR/Cas9 with RNAi approach strongly inhibits hepatitis B virus replication. *Theranostics*, 2017, 7: 3090–3105
- 29 Song J, Zhang X, Ge Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBSAG inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 8419–8431
- 30 Schiwon M, Ehrke-Schulz E, Oswald A, et al. One-vector system for multiplexed CRISPR/Cas9 against hepatitis B virus cccDNA utilizing high-capacity adenoviral vectors. *Mol Ther-Nucleic Acids*, 2018, 12: 242–253
- 31 Li H, Sheng C, Liu H, et al. Inhibition of HBV expression in HBV transgenic mice using AAV-delivered CRISPR-SaCas9. *Front Immunol*, 2018, 9: 2080
- 32 Liu Y, Zhao M, Gong M, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antivir Res*, 2018, 152: 58–67
- 33 Kostyushev D, Kostyusheva A, Brezgin S, et al. Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, 2019, 9: 1847
- 34 Kostyushev D, Brezgin S, Kostyusheva A, et al. Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 1779–1794

- 35 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 36 Malina A, Mills J R, Cencic R, et al. Repurposing CRISPR/Cas9 for *in situ* functional assays. *Genes Dev*, 2013, 27: 2602–2614
- 37 Qi Z, Li G, Hu H, et al. Recombinant covalently closed circular hepatitis B virus DNA induces prolonged viral persistence in immunocompetent mice. *J Virol*, 2014, 88: 8045–8056
- 38 Fu Y, Foden J A, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 822–826
- 39 Hsu P D, Scott D A, Weinstein J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 827–832
- 40 Pattanayak V, Lin S, Guilinger J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 839–843
- 41 Koo T, Lee J, Kim J S. Measuring and reducing off-target activities of programmable nucleases including CRISPR-Cas9. *Molecules Cells*, 2015, 38: 475–481
- 42 O'Geen H, Yu A S, Segal D J. How specific is CRISPR/Cas9 really? *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 29: 72–78
- 43 Annoni A, Goudy K, Akbarpour M, et al. Immune responses in liver-directed lentiviral gene therapy. *Transl Res*, 2013, 161: 230–240
- 44 Asokan A, Schaffer D V, Jude Samulski R. The AAV vector toolkit: Poised at the clinical crossroads. *Mol Ther*, 2012, 20: 699–708
- 45 Jiang Z, Jhunjhunwala S, Liu J, et al. The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res*, 2012, 22: 593–601
- 46 Takahashi S, Chayama K. Integration of hepatitis B virus DNA and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20: 1141–1142
- 47 Yan Z, Zeng J, Yu Y, et al. Hbvcircle: A novel tool to investigate hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *J Hepatology*, 2017, 66: 1149–1157
- 48 Li G, Zhu Y, Shao D, et al. Recombinant covalently closed circular DNA of hepatitis B virus induces long-term viral persistence with chronic hepatitis in a mouse model. *Hepatology*, 2018, 67: 56–70
- 49 Guidotti L G, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 1995, 69: 6158–6169
- 50 He W, Ren B, Mao F, et al. Hepatitis B virus infection of mice expressing human sodium taurocholate co-transporting polypeptide. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004840
- 51 Sun S, Li J. Humanized chimeric mouse models of hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis*, 2017, 59: 131–136
- 52 Yuan L, Liu X, Zhang L, et al. A chimeric humanized mouse model by engrafting the human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cell for the chronic hepatitis B virus infection. *Front Microbiol*, 2018, 9: 908
- 53 Bae S, Park J, Kim J S. Cas-offinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1473–1475
- 54 Cho S W, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24: 132–141
- 55 Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490–495
- 56 Hu J H, Miller S M, Geurts M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57–63
- 57 Kleinstiver B P, Tsai S Q, Prew M S, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 869–874
- 58 Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3-what's next? *Bioengineered*, 2017, 8: 265–273
- 59 Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523: 481–485
- 60 Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361: 1259–1262
- 61 Ran F A, Cong L, Yan W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520: 186–191
- 62 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: 759–771
- 63 Teng F, Cui T, Feng G, et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov*, 2018, 4: 63
- 64 Strecker J, Jones S, Koopal B, et al. Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat Commun*, 2019, 10: 212
- 65 Hung S S C, Chrysostomou V, Li F, et al. AAV-mediated CRISPR/Cas gene editing of retinal cells *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57: 3470–3476
- 66 Ying L, Matabosch X, Serra M, et al. Biochemical and physiological improvement in a mouse model of Smith–Lemli–Opitz syndrome (SLOS) following gene transfer with AAV vectors. *Mol Genets Metab Rep*, 2014, 1: 103–113
- 67 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*. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 73–80

Summary for “CRISPR-Cas9基因编辑技术在乙型肝炎病毒治疗中的应用”

Application of CRISPR-Cas9 gene editing to treat HBV

Kun Yan¹, Jiangpeng Feng¹, Yong Xiong² & Yu Chen^{1*}¹ College of Life Sciences, Wuhan University, State Key Laboratory of Virology, Modern Virology Research Center, Wuhan 430072, China;² Infection Department, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China* Corresponding author, E-mail: chenyu@whu.edu.cn

An estimated 291 million people worldwide are living with hepatitis B virus (HBV) infection. Patients with chronic HBV infection are at an increased risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), and about 1 million people died of hepatitis B and its related complications every year. Therefore, HBV represents a significant challenge to public health. The current HBV treatment regime mainly relies on nucleoside (acid) analogs (NUCs) and interferons (IFNs). NUCs inhibit the synthesis of viral DNA from genomic RNA by targeting the multifunctional reverse transcriptase. IFNs acts through both direct antiviral and indirect immunomodulatory effects. Due to the presence of covalently closed circular DNA (cccDNA), the template of HBV transcription, which are highly stable in the nucleus of host cells and difficult to be eliminated by licensed therapies, chronic HBV infection can't be cured virologically. Consistent efforts have to be made to develop a treatment regime that directly targets persistent cccDNA, inactivates or eliminates it to achieve a totally functional cure for chronic hepatitis B. The clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)-Cas system is an acquired immune system found in prokaryotes. With the development of related research, the CRISPR-Cas9 gene editing system is rapidly becoming an efficient and potentially applicable therapeutic tool. The CRISPR-Cas9 system that specifically targets the conserved regions of the HBV genome, not only effectively inhibits viral replication but also is much simpler and more flexible than other gene editing tools, making it a very attractive treatment option. Numerous experimental studies have shown that the CRISPR-Cas9 system is able to disrupt free cccDNA, excise integrated HBV DNA, reduce pre-genomic RNA and a variety of viral proteins *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, there are no detectable off-target effects and cytotoxic effects in these relevant anti-HBV studies. However, the feasibility and safety of the CRISPR-Cas9 system still face many challenges in clinical applications, including setting up a more ideal animal model, avoiding unintended off-target effects, achieving high efficiency and low immunogenicity *in vivo* delivery and establishing a platform of verification that adequately assesses possible risks. While many obstacles need to be overcome, the CRISPR-Cas9 system indeed enhances our ability to change the genome and brings new strategies for treating HBV infection. Besides, the CRISPR-Cas9 systems with better specificity continue to be developed, such as well-designed gRNA and new types or versions of Cas. Viral and non-viral vectors based on *in vivo* delivery methods for treatment continue to be innovated, and their therapeutic potential will continue to increase. In view of the powerful role on virus suppression of CRISPR-Cas9 technology and the lack of effective means of curing HBV, the CRISPR-Cas9 system still has a bright future in clinical research. This article will summarize the existing CRISPR-Cas9 systems in the study of anti-HBV, and try to explore its possible problems and potential solutions.

CRISPR-Cas9, gene therapy, off-target effect, HBV, cccDNAdoi: [10.1360/N972019-00280](https://doi.org/10.1360/N972019-00280)