

通用型CD19 CAR-T的体外构建及初步功能鉴定

蒙露^{1,2} 赵日^{3,4} 周丹^{1,2} 刘佳慧^{4,5} 张瑶^{3,4} 张月琴^{2,6} 刘琴^{2,6} 刘洋^{2,6} 张悦^{4,7}
胡书舶^{1,2} 张师琴^{1,2} 李华⁴ 邹强^{1,2*}

(¹成都医学院基础医学院, 成都 610500; ²成都医学院科研实验中心, 成都 610500; ³西南交通大学医学院, 成都 610031; ⁴西部战区总医院, 成都 610083; ⁵成都中医药大学基础医学院, 成都 610075; ⁶成都医学院药学院, 成都 610500; ⁷川北医学院, 南充 637007)

摘要 CAR-T免疫细胞治疗已经在血液肿瘤领域取得突破性进展。然而, 目前上市和国内临床试验的CAR-T细胞均来自肿瘤患者自身, 即自体型CAR-T。因受制于患者T细胞的质量和数量、制备周期长且价格昂贵等原因, 很难将其进行大规模临床应用。该研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除健康人脐带血来源T细胞的TCR分子和HLA-I类分子, 避免异基因细胞治疗引起的免疫排斥, 通过慢病毒载体转导CAR基因, 制备通用型CD19 CAR-T细胞药物。体外验证可减少免疫排斥, 并在体外证明有较强的靶细胞杀伤作用。该方法可提供一种制备通用型CAR-T细胞的途径, 有望使更多患者得到及时治疗, 使重复治疗成为可能; 另外, 它降低了CAR-T疗法的制造成本, 从而减轻了患者的治疗负担; 最后, 它可为临床治疗提供实验依据。

关键词 CAR-T; CRISPR/Cas9; 同种异体; 抗肿瘤活性

In Vitro Construction and Preliminary Functional Identification of Universal CD19 CAR-T

MENG Lu^{1,2}, ZHAO Ri^{3,4}, ZHOU Dan^{1,2}, LIU Jiahui^{4,5}, ZHANG Yao^{3,4}, ZHANG Yueqin^{2,6}, LIU Qin^{2,6}, LIU Yang^{2,6},
ZHANG Yue^{4,7}, HU Shubo^{1,2}, ZHANG Shiqin^{1,2}, LI Hua⁴, ZOU Qiang^{1,2*}

(¹Basic Medical College of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; ²Scientific Research and Experimental Center of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; ³Southwest Jiaotong University School of Medicine, Chengdu 610031, China; ⁴Western Theater Hospital, Chengdu 610083, China; ⁵Basic Medical College of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; ⁶School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; ⁷North Sichuan Medical College, Nanchong 637007, China)

Abstract CAR-T immune cell therapy has made breakthrough progress in the field of hematological tumors. However, the CAR-T cells currently on the market and in domestic clinical trials are all derived from tumor patients themselves, that is, autologous CAR-T. Restricted by the quality and quantity of patient T cells, long preparation cycle and high price, it is difficult to apply them in large-scale clinical applications. In this study, CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to knock out TCR molecules and HLA-I molecules in T cells derived from healthy human umbilical cord blood to avoid immune rejection caused by allogeneic cell therapy. CAR gene was transduced by lentiviral vector to prepare universal CD19 CAR-T cell drugs. It is proved that it can reduce immune

收稿日期: 2020-11-11 接受日期: 2020-12-07

四川省科技厅应用基础研究项目(批准号: 19YYJC0242、2018JY0440)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18908237461, E-mail: 623720463@qq.com

Received: November 11, 2020 Accepted: December 7, 2020

This work was supported by the Applied Basic Research Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (Grant No.19YYJC0242, 2018JY0440)

*Corresponding author. Tel: +86-18908237461, E-mail: 623720463@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5455>

rejection *in vitro* and has a strong killing effect on target cells *in vitro*. This method provides a way to produce universal CAR-T cells. Firstly, it is expected to make more patients to receive timely treatment and makes it possible to repeat treatment. Secondly, it reduces the manufacturing cost of CAR-T therapy, thereby reducing the burden of patients. Finally, it provides experimental basis for clinical treatment.

Keywords CAR-T; CRISPR/Cas9; allogeneic; antitumor activity

近年来,肿瘤免疫疗法已成为继手术、放疗和化疗之后的第四种肿瘤治疗手段。嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(chimeric antigen receptor T cell immunotherapy, CAR-T)在血液肿瘤的临床试验中取得了令人瞩目的疗效^[1],完全缓解率达到70%~90%^[2-3]。2017年, FDA批准上市两款治疗自体型CAR-T产品 Kymriah和 Yescarta, 分别用于治疗急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma, NHL)患者,但自体CAR-T疗法的广泛应用仍存在着许多限制^[4]。个性化定制的方式,不利于工业化生产,患者等待时间漫长,价格昂贵,难以让更多患者受益。并且,终末期肿瘤患者经历反复化疗、骨髓移植、乃至自体CAR-T治疗复发后,免疫功能低下,其T细胞数量和质量均难以满足体外扩增要求,往往已经丧失自体CAR-T的治疗机会。此外,在患者外周血纯化T细胞的过程中若有肿瘤细胞的污染,经慢病毒转导嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)后,肿瘤细胞也表达CAR结构并能通过CAR掩盖肿瘤细胞表面的抗原,使肿瘤细胞发生逃逸^[5],导致自体型CAR-T细胞治疗失败。

基于自体型CAR-T疗法所面临的局限和挑战,通用型CAR-T(universal CAR-T, UCAR-T)疗法被寄予厚望。通用型CAR-T又称同种异体CAR-T,是从健康个体提前采集T细胞,并在体外通过基因工程技术改造后大规模扩增,制备成CAR-T细胞,可为多名患者提供现货型的细胞药物,无需等待时间。

移植免疫排斥是通用型CAR-T细胞治疗的最大障碍。一方面,供者T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)识别宿主细胞表面人类白细胞抗原(human lymphocyte antigen, HLA),可引发移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)。另一方面,供者T细胞表达的HLA导致宿主免疫系统将其识别为非己而被迅速清除^[6]。同时敲除供者T细胞TCR和HLA-I类分子,从而防止排斥反应,是制备通用型CAR-T的关键。

基因编辑技术为制备通用型CAR-T提供了可

能。簇状规则间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关基因9(CRISPR-associated genes 9, Cas9)作为第三代基因编辑技术,具有设计简单、价格低廉,并且可添加多个引导RNA(guide RNA, gRNA)实现多重基因编辑等特点。CRISPR/Cas9的出现使基因编辑得到广泛应用,未来可实现规模化生产。

CRISPR/Cas9基因编辑技术主要由两部分组成,gRNA和Cas9核酸酶。gRNA识别目的基因的特定序列与之互补配对,引导Cas9核酸酶在目的基因下游的前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)对DNA进行定点切割,DNA断裂后,启动自我修复机制,DNA在自我修复的过程中优先使用非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ),错误的插入或缺失碱基,使DNA发生突变,实现基因敲除。

本研究采用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除T细胞的TCR和HLA-I类分子,通过慢病毒将CAR转导入T淋巴细胞,制备通用型CD19 CAR-T细胞,并在体外观察免疫排斥反应和肿瘤杀伤能力。本研究提供了一种构建通用型CAR-T细胞的途径,有望大大降低CAR-T疗法的制造成本,减轻患者治疗负担,让更多患者受益于CAR-T疗法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 原代人脐带血T细胞来自于成都医学院第一附属医院,并征得健康志愿捐献者的知情同意,已通过成都医学院第一附属医院医学伦理委员会审批,批准号为2018CYFYHEC-047-02。经公司改造的含荧光素酶的Namalwa(人Burkitt's淋巴瘤细胞)购于成都飞鸥尔生物科技有限公司;293T(人肾上皮细胞系)购于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 PerCP/Cy5.5 anti-human CD8、Alexa Fluor[®]700 anti-human CD4、Brilliant Violet 711 anti-human CD3、PE anti-human HLA-A,B,C

Antibody和Biotin anti-human HLA-A,B,C Antibody购于美国Biolegend公司; Alexa Flour[®]647 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG,F(ab')₂ fragment specific购于英国Jackson immuno公司; CellTrace[™] CFSE(Component A)和DMSO(Component B)购于美国Thermo Fisher Scientific公司; LV载体系统pLP1、pLP2-VSVG和pLVX-CAR-19购于美国Thermo Fisher Scientific公司; Lipofectamine[®]3000转染试剂购于美国Thermo Fisher Scientific公司; 质粒无内毒素大提试剂盒购于德国Qiagen公司; HiFi Cas9 Nuclease 3NLS(Cas9蛋白)、TracrRNA、CrRNA和gRNA均购于美国IDT公司; CD3-Microbeads购于德国MACS公司; Pan T Cell Isolation Kit购于德国Miltenyi公司; Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28购于美国Gibco公司; 高糖DMEM和RPMI-1640购于美国Hyclone公司; 胎牛血清购于澳大利亚BOVOGEN公司; X-VIVO15培养基购于瑞士Lonza公司; 细胞因子IL-7、IL-15购于德国Cellgenix公司; Lymphoprep淋巴细胞分离液购于挪威Axis-shield公司。

1.1.3 主要仪器 电穿孔仪购于中国Celetrix公司; 流式细胞仪购自美国ACEA公司。

1.2 方法

1.2.1 合成靶向TCR和HLA-I类分子的gRNA序列

TRAC-gRNA: 5'-TGT GCT AGA CAT GAG GTC TA-3'; *TRBC*-gRNA: 5'-GCA GTA TCT GGA GTC ATT GA-3'; β 2*M*-gRNA: 5'-CGC GAG CAC AGC TAA GGC CA-3'。

1.2.2 分离T细胞 使用Lymphoprep从脐带血中分离出单个核细胞,再用Pan T Cell Isolation Kit磁珠纯化得到T细胞。

1.2.3 细胞培养 将T细胞在含5 ng/mL IL-7、5 ng/mL IL-15、10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺和50 mmol/L β -巯基乙醇的X-VIVO15培养基中培养; NamIwa细胞培养于含10% FBS的RPMI-1640培养基中; 293T细胞培养于含10% FBS的DMEM培养基中。

1.2.4 TCR和HLA-I类分子敲除 T细胞经过Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28活化24 h后,将Cas9蛋白按照1:1摩尔比例分别混合*TRAC*-gRNA、*TRBC*-gRNA和 β 2*M*-gRNA,室温放置15 min,合成核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP)。将1 μ mol/L *TRAC*-RNP、1 μ mol/L *TRBC*-RNP和1 μ mol/L β 2*M*-RNP分别与 1×10^6 个T细胞混合后进行电转,电

转条件为电压560 V,脉冲时间20 ms进行电穿孔,细胞铺板培养。96 h后,用相应流式抗体在4 $^{\circ}$ C染色10~15 min,流式细胞仪分别检测细胞表面TCR和HLA-I类分子敲除情况。以同样的条件将*TRBC*-RNP和 β 2*M*-RNP一起与 1×10^6 个T细胞混合后电穿孔,流式细胞仪检测TCR和HLA-I类分子同时敲除情况。

1.2.5 纯化TCR⁻HLA-I⁻T细胞 每 1×10^7 个目的细胞加入80 μ L MACS Buffer重悬细胞,加入20 μ L CD3-Microbeads和20 μ L Biotin anti-human HLA-A,B,C Antibody充分混匀,4 $^{\circ}$ C条件下放旋转器上混匀15 min;用10 mL MACS Buffer洗涤多余的磁珠和生物素,去除上清后加入20 μ L Pan T Cell MicroBead Cocktail,4 $^{\circ}$ C条件下放旋转器上混匀15 min,再用10 mL的MACS Buffer洗涤多余的磁珠,去除上清后将细胞用500 μ L MACS Buffer重悬后穿过负向分选的MACS LD柱,回收穿透液,得到纯化的TCR和HLA-I类双敲除细胞,即TCR⁻HLA-I⁻T细胞。

1.2.6 验证同种异体反应活性 以磁珠/细胞0:1、0.5:1、1:1和2:1分别刺激CFSE染色的TCR⁻HLA-I⁻T细胞和野生型T细胞,CFSE是检测细胞增殖的荧光染料,通过流式检测T细胞增殖情况;将CFSE染色的PBMC细胞分别与TCR⁻HLA-I⁻T细胞和野生型T细胞以1:5比例混合,观察PBMC的增殖情况,以此判断同种异体反应活性。

1.2.7 慢病毒包装 使用Lipofectamine 3000试剂盒制备转染体系,用P3000与pLP1、pLP2、pLP-VSVG和pLVx-CMV-CAR19四种质粒混合后再与Lipofectamine 3000混合,再加入适量的Opti-MEM混合,室温孵育15~20 min,将孵育好的混合液滴加到293T细胞中,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养,48 h后收集慢病毒上清液,用0.45 μ m孔径的滤头过滤慢病毒去除细胞碎片,并用超滤管对慢病毒进行浓缩。

1.2.8 制备通用型CAR-T细胞、CAR-T细胞和T细胞 将T细胞用Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28活化24 h后,电穿孔递送*TRBC*-RNP和 β 2*M*-RNP,电穿孔96 h后进行磁珠负向分选,按照一定的感染复数(multiplicity of infection, MOI)往分选后的细胞中加入慢病毒制备通用型CAR-T细胞,转导96 h后用流式细胞术检测CAR阳性率。将T细胞活化24 h后,模拟电穿孔条件,电穿孔T细胞后,在相同的时间和条件加入慢病毒制备CAR-T细胞,在同样的时间段检测

CAR阳性率。将T细胞活化24 h后,模拟电穿孔条件,不加入慢病毒,制备阴性对照T细胞。

1.2.9 通用型CAR-T细胞体外杀伤靶细胞 效应细胞和含荧光素酶的靶细胞CD19⁺ Namalwa分别以效靶比100:1、30:1和10:1混合后,在37 °C、5% CO₂ 孵箱中共孵育18 h,每孔加入等体积的荧光素酶底物,振荡混匀并立即测定其发光情况。发光仪的原始数据通常以相对光单位(relative light unit, RLU)表示反应样品中光产生量的相对测试值。杀伤百分比(%)=(1-靶细胞和效应细胞共培养孔的RLU/靶细胞孔的RLU)×100%,杀伤完成后收集杀伤后上清,按照ELISA试剂盒说明书检测IL-2和IFN- γ 表达水平。

1.2.10 数据处理及统计学分析 各实验在相同条件下重复3次,用GraphPad Prism 6统计软件进行数据分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脐血T细胞的纯化与磁珠分选

通过加入Lymphoprep去除脐血细胞中的大部分粒细胞得到单个核细胞(图1A)。用Pan T Cell Isolation Kit对T细胞进行纯化,用流式抗体对分选前后的细胞进行染色,得到纯度为98.3%的T细胞(图1B)。

2.2 TCR和HLA-I类分子敲除与纯化

在体外将Cas9蛋白分别与相应基因的gRNA以1:1比例混合后形成RNP,通过电穿孔将RNP递送进T细胞,gRNA负责识别特定基因的目标序列,同时识别PAM的NGG(N代表任意核苷酸)后,对其复合物携带的Cas9蛋白直接进行靶向切割,形成DNA双链缺口(doubt strand breaks, DSBs),启动自我修复机制NHEJ,该过程会随机插入或缺失碱基发生突变,实现基因敲除。该研究通过电穿孔往T细胞中分别递送TRAC-RNP和TRBC-RNP,96 h后分别用流式检

测TCR的敲除情况。TRBC和TRAC的敲除率分别为84.0%和30.2%(图2A),后续实验选择敲除TRBC基因来实现TCR分子敲除。通过电穿孔递送 $\beta 2M$ -RNP进入T细胞,96 h后流式检测HLA-I类分子的敲除率为44.0%(图2B)。通过同时递送TRBC-RNP和 $\beta 2M$ -RNP进入T细胞,双分子敲除率为28.9%(图2C)。采用磁珠对双分子敲除细胞进行负向分选。双敲细胞比例从分选前28.9%提高到96.5%,得到纯度为96.5%的TCR⁻HLA-I⁻ T细胞(图2D)。

2.3 TCR⁻HLA-I⁻ T细胞可减弱同种异体反应

为验证TCR⁻HLA-I⁻ T细胞TCR功能,以0:1、0.5:1、1:1和2:1磁珠/细胞分别刺激TCR⁻HLA-I⁻ T细胞和野生型T细胞,用CFSE染色观察T细胞增殖情况。结果表明,TCR缺失引起T细胞对刺激的反应性降低。结果表明,TCR缺失引起T细胞对刺激的反应性降低(图3A)。为了验证敲除HLA-I类分子可以减弱排斥反应,我们将TCR⁻HLA-I⁻ T和野生型T细胞分别以5:1的效靶比与CFSE染色的PBMC进行混合,观察PBMC增殖情况。结果表明,TCR⁻HLA-I⁻ T细胞不能刺激PBMC增殖(图3B)。以上结果提示,TCR⁻HLA-I⁻ T细胞能减弱同种异体反应。

2.4 慢病毒转导TCR⁻HLA-I⁻ T细胞和T细胞

将TCR⁻HLA-I⁻ T细胞通过慢病毒转导CAR-19,用流式细胞术检测CAR-19转导效率。结果表明,转导96 h后,CAR阳性率约为68.1%(图4),成功制备通用型CAR-T细胞。将模拟电穿孔的T细胞以相同条件进行慢病毒转导,作为后续杀伤对照。结果表明,CAR阳性率为66.0%(图4),CAR-T细胞制备完成,且电穿孔RNP不影响CAR-19的阳性率。

2.5 通用型CAR-T细胞体外杀伤靶细胞

经改造的CD19⁺靶细胞Namalwa中含有荧光素酶,加入底物后可催化荧光素发生化学反应产生荧光。通过检测荧光表达情况,可计算各组靶细胞死

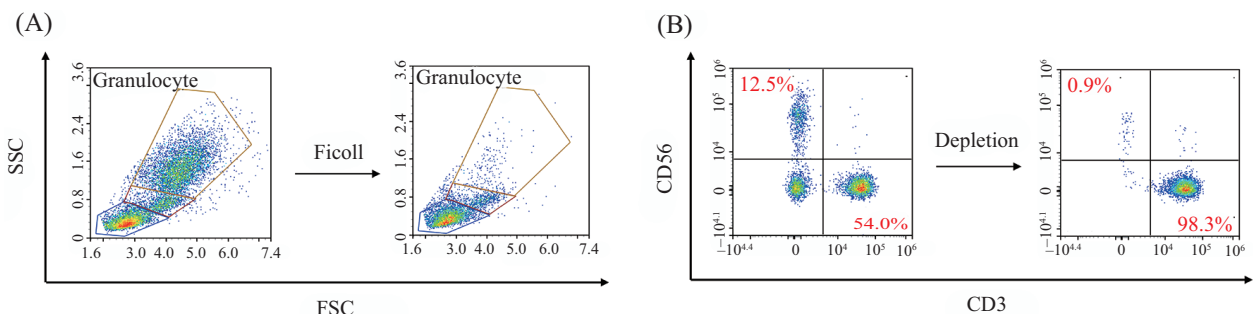
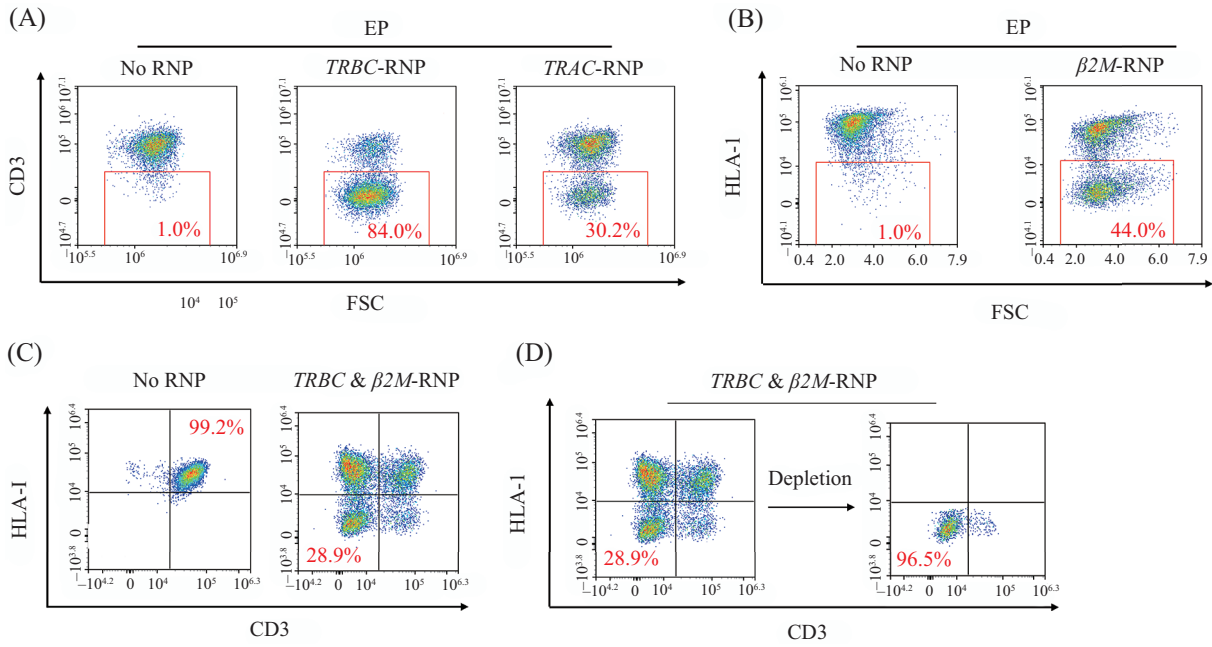


图1 纯化T细胞

Fig.1 Purification of T cells



A: 流式结果表明, 突变 $TRBC$ 敲除效率高于 $TRAC$; B: 流式结果表明, 突变 $\beta 2M$ 可使 $HLA-I$ 类分子敲除; C: 流式结果表明, 在T细胞上双敲除TCR和 $HLA-I$ 类分子; D: 磁珠纯化TCR和 $HLA-I$ 类分子双阴性T细胞。

A: Flow cytometry results show that mutant $TRBC$ knockout efficiency is higher than $TRAC$; B: Flow cytometry results show that mutant $\beta 2M$ can knock out $HLA-I$ molecules; C: Flow cytometry results show that TCR is double knocked out on T cells And $HLA-I$ molecules; D: magnetic beads to purify TCR and $HLA-I$ molecules double negative T cells.

图2 TCR和 $HLA-I$ 类分子敲除与纯化

Fig.2 Knockout and purification of TCR and $HLA-I$ molecules

亡率。通用型CAR-T细胞、CAR-T细胞和T细胞分别与Namalwa细胞以100:1、30:1和10:1不同效靶比混合后, 通用型CAR-T细胞对靶细胞的杀伤率分别为80.5%、72.7%和65.0%; CAR-T细胞的杀伤率分别为94.2%、86.1%和83.6%, 而阴性对照T细胞的杀伤率仅有42.4%、30.2%和17.7%, 显著低于通用型CAR-T细胞和CAR-T细胞($P < 0.0001$, 图5A)。收集杀伤后细胞培养上清, 采用ELISA检测细胞因子IL-2和IFN- γ 释放情况。通用型CAR-T细胞和CAR-T细胞的IL-2和IFN- γ 分泌水平均显著高于正常T细胞($P < 0.001$, 图5B)。结果表明, 通用型CAR-T细胞能特异性杀伤CD19⁺肿瘤细胞。

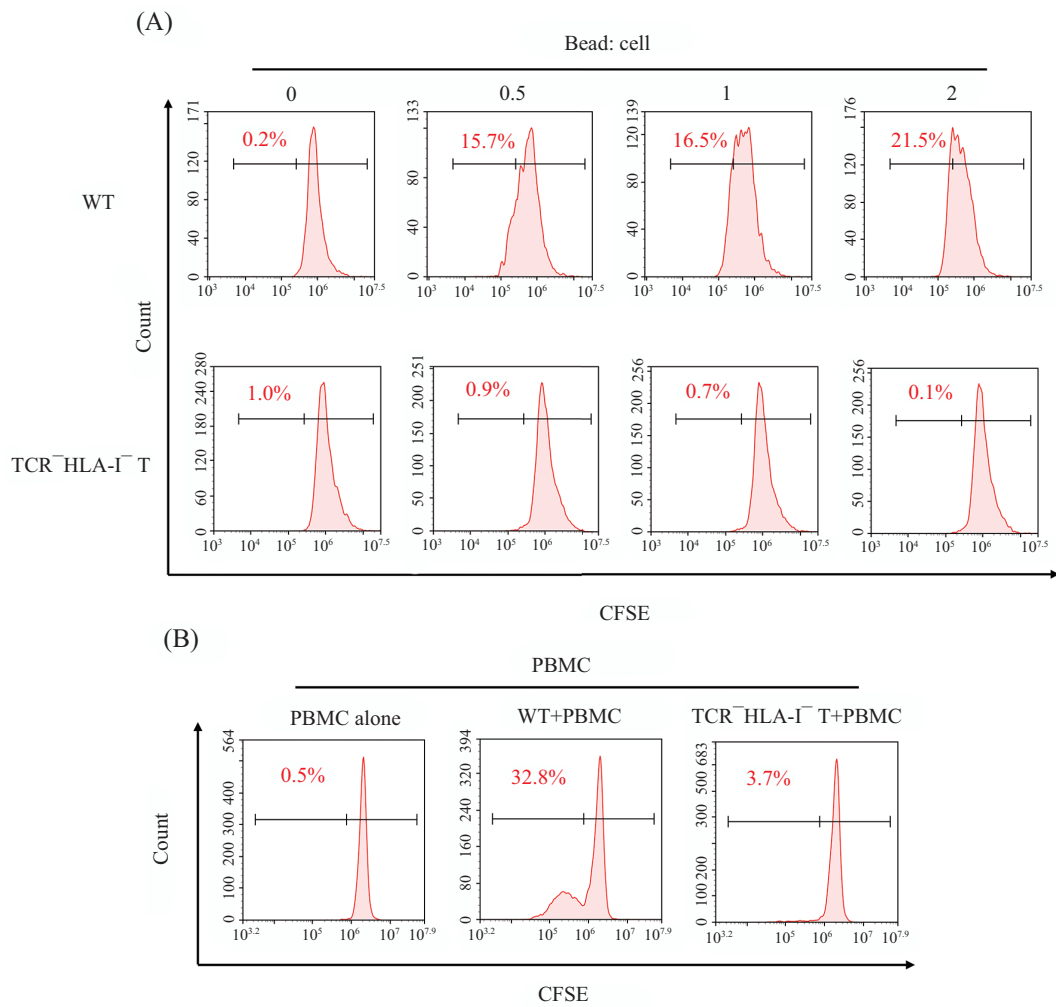
3 讨论

自体型CAR-T细胞疗法受限于患者T细胞的数量和质量, 尤其是对新生儿和老年患者, 以及经过多次放疗的患者, 常常无法制备足够数量的功能性T细胞^[7]。此外, 采用个体化制备的自体型CAR-T细胞治疗费用昂贵。诺华的Kymriah售价47.5万美元, Gilead的Yescarta售价37.3万美元, 极大限制了其所能受益的患者群体。制备通用型CAR-T细胞成为

CAR-T领域的重要研究方向。

本文首先分离出脐带血来源的单个核细胞后筛选纯化T细胞。其次, 将T细胞进行基因改造, 敲除供者T细胞的TCR和 $HLA-I$ 类分子使其能规避移植后的免疫排斥反应。TCR是由 α 和 β 两条不同肽链构成的异二聚体, 分别由 $TRAC$ 和 $TRBC$ 基因表达。基因突变 $TRAC$ 或 $TRBC$ 均能实现TCR敲除。由于 β 链含有两个恒定区, α 链恒定区基因只有一个, 因此, 大部分研究者通过敲除编码 $TRAC$ 基因的恒定区来敲除TCR^[8], 并且敲除 $TRAC$ 基因效率高于 $TRBC$ ^[9-10]。然而, 本研究发现, $TRBC$ 的敲除效率远远高于 $TRAC$, 因此, 后续实验均选择突变 $TRBC$ 基因来实现TCR的敲除。 $HLA-I$ 类分子由 β -2微球蛋白(beta-2-microglobins, $\beta 2M$)亚基与重链组成。 $\beta 2M$ 是所有 $HLA-I$ 类抗原异二聚体在细胞表面表达的必需亚基, 对 $HLA-I$ 类分子的表达至关重要^[10-12]。本研究通过同时敲除 $TRBC$ 和 $\beta 2M$ 基因来实现TCR和 $HLA-I$ 类分子的双敲除。

已有研究者利用基因编辑工具制备通用型CAR-T细胞。如TORIKAI等^[9,13]使用锌指核酸内切酶(zinc finger nuclease, ZFN)在CAR-T细胞中敲除 $TRAC$ ^[9]和 $HLA-A$ ^[13]。但ZFN设计繁琐, 高度依赖目



A: 流式结果表明, TCR敲除的T细胞不能被磁珠刺激活化; B: 流式结果表明, HLA-I类分子敲除后不能刺激PBMC增殖。

A: Flow cytometry results show that TCR knockout T cells cannot be activated by magnetic beads; B: Flow cytometry results show that knockout HLA-I molecules cannot stimulate PBMC proliferation.

图3 TCR⁻HLA-I⁻ T细胞可减弱同种异体反应

Fig.3 TCR⁻HLA-I⁻ T cells can attenuate allogeneic responses

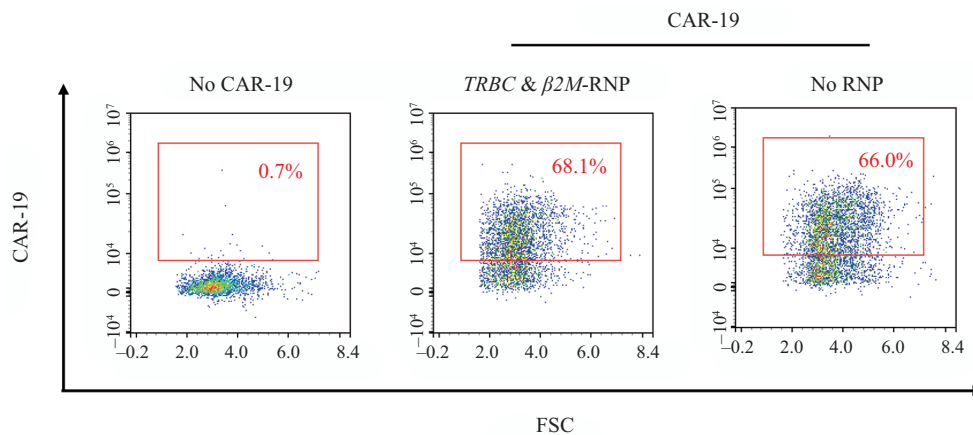
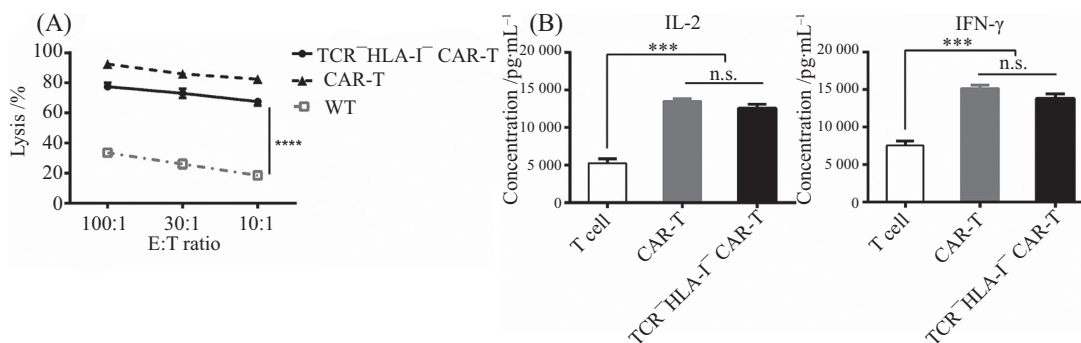


图4 慢病毒转导TCR⁻HLA-I⁻ T细胞和T细胞

Fig.4 Lentiviral transduction of TCR⁻HLA-I⁻ T cells and T cells



A: 通用型CAR-T细胞能特异性杀伤靶细胞; B: 通用型CAR-T细胞杀伤时释放的IL-2和IFN- γ 均高于T细胞。 $n=3$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$; n.s.: $P>0.05$ 。

A: universal CAR-T cells can specifically kill target cells; B: universal CAR-T cells release more IL-2 and IFN- γ than T cells during killing. $n=3$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$; n.s.: $P>0.05$ 。

图5 通用型CAR-T细胞体外杀伤靶细胞

Fig.5 Universal CAR-T cells kill target cells *in vitro*

标序列及其上下游序列, 还具有细胞毒性并且无法实现多重基因敲除。Collectis的研究人员采用类转录激活效应物核酸内切酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)敲除T细胞的 $TRAC$ 和 $CD52$ 生产通用型CAR-T细胞^[8]。然而, 该方法基因编辑效率低, 导致产品产量低, 生产过程时间长, 不利于大批量工业生产。CRISPR/Cas9系统具有操作简单、价格低廉、可同时实现多重基因敲除等优点。另外, gRNA的设计和合成工作量远远小于TALEN和ZFN技术, 使得CRISPR/Cas9技术得到广泛使用。

目前, 递送CRISPR/Cas9基因编辑系统的非病毒载体有三种。一是基于质粒的CRISPR系统, 采用同一载体编码Cas9蛋白和gRNA, 可避免不同成分的多次转染^[14], 且成本低、稳定性较好。但质粒DNA对原代T细胞的高毒性, 是应用的一大难题^[15]。二是mRNA形式的CRISPR系统^[16], 基因编辑时间快, 但Cas9 mRNA不稳定, 基因编辑效率低, 需要多次递送才能达到较高的敲除效率^[10], 并且对细胞损害较大, 操作繁琐。三是递送RNP形式的CRISPR系统^[17], 具有快速作用, 基因编辑效率高, 没有密码子优化和启动子选择的要求, 且细胞毒性较低等优点。本研究选择递送RNP形式的CRISPR系统进行双基因敲除, 取得了良好的基因编辑效果。

通用型CAR-T细胞回输体内后, 由于HLA-I类分子缺失, 患者体内NK细胞通过HLA-I类分子来识别“自体和非自体”并对识别的“非自体”细胞进行攻击, 导致通用型CAR-T的清除, 缩短了CAR-T在患者体内存活时间短。有文献报道通过化疗药物或使用NK细胞特异性抗体^[18-19]减少患者体内自然杀伤

(natural killer, NK)细胞, 以避免或减少排斥反应。此外, 通过CRISPR/Cas9敲除NK细胞激活性配体或在T细胞上表达特定的非多态性HLA类分子, 如HLA-E, 提供抑制信号, 可使NK介导的宿主抗移植反应最小化^[13,20-21]。

本文采用基于RNP形式的CRISPR/Cas9基因编辑技术同时敲除TCR和HLA-I类分子制备通用型CAR-T细胞, 可在体外实验中显著减弱排斥反应并保持杀伤能力, 但仍需要在动物实验中验证其抗肿瘤能力、安全性和可行性。未来可在本文提供的通用型CAR-T细胞制备流程基础上进一步改造, 制备具有更强增殖能力和抗肿瘤活性的通用型CAR-T细胞, 为更多患者提供治疗机会。

参考文献 (References)

- [1] BENMEBAREK M, KARCHES C, CADILHA B, et al. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20061283.
- [2] MAUDE S, FREY N, SHAW P, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 371(16): 1507-17.
- [3] LEE D W, KOCHENDERFER J N, STETLER S M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase I dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-28.
- [4] ZHOU X. Empowering chimeric antigen receptor T-cell therapy with CRISPR [J]. *Biotechniques*, 2020, 68(4): 169-71.
- [5] LACEY S F, XU J, RUELLA M, et al. Cars in leukemia: relapse with antigen-negative leukemia originating from a single B cell expressing the leukemia-targeting CAR [J]. *Blood*, 2016, 128(22): 281.
- [6] LIU X, ZHAO Y. CRISPR/Cas9 genome editing: fueling the revolution in cancer immunotherapy [J]. *Curr Res Transl Med*, 2018, 66(2): 39-42.

- [7] DEPIL S, DUCHATEAU P, GRUPP S, et al. “Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 185-99.
- [8] POIROT L, PHILIP B, SCHIFFER M C, et al. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for “off-the-shelf” adoptive T-cell immunotherapies [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(18): 3853-64.
- [9] TORIKAI H, REIK A, LIU P Q, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR [J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5697-705.
- [10] REN J, LIU X, FANG C, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2255-66.
- [11] RIOLOBOS L, HIRATA R K, TURTLE C J, et al. HLA engineering of human pluripotent stem cells [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(6): 1232-41.
- [12] REN J, ZHANG X, LIU X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17002-11.
- [13] TORIKAI H, REIK A, SOLDNER F, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors [J]. *Blood*, 2013, 122(8): 1341-9.
- [14] CONG L, ZHANG F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-1862-1_10.
- [15] MANDAL P, FERREIRA L, 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.
- [16] NIU Y, SHEN B, CUI Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. *Cell*, 2014, 156(4): 836-43.
- [17] ZURIS J, THOMPSON D, SHU Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 73-80.
- [18] CHOI E, WANG R, PETERSON L, et al. Use of an anti-CD16 antibody for *in vivo* depletion of natural killer cells in rhesus macaques [J]. *Immunology*, 2008, 124(2): 215-22.
- [19] CHOI E, REIMANN K, LETVIN N. *In vivo* natural killer cell depletion during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys [J]. *J Virol*, 2008, 82(13): 6758-61.
- [20] GORNALUSSE G G, HIRATA R K, FUNK S E, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(8): 765.
- [21] PALLMER K, OXENIUS A. Recognition and regulation of T cells by NK cells [J]. *Front Immunol*, 2016, 7(24): 251.