



贝锦新, 研究员, 博导, 华南肿瘤学国家重点实验室PI、实验研究部副主任, 新加坡国立癌症中心兼职教授; 教育部“新世纪优秀人才支持计划”、国家自然科学基金优秀青年基金获得者。学术兼职包括广东省精准医学应用学会单细胞科技分会主委、广东省精准医学应用学会长青智库分会副主委、中国抗癌协会肿瘤病因学专业委员青年委员会副主委、医师协会临床精准医疗专业委员会青年委员会委员、中国细胞生物学学会青年工作委员会委员、中国遗传学会青年委员会委员等。主持承担863计划课题、国家重点研发计划“生物大分子与微生物”专项课题、国家自然科学基金重点项目等国家、省部级科研项目17项。荣获中华医学科技奖一等奖、广东省科技奖一等奖和第二届“中国肿瘤青年科学家奖”。发表多篇文章在*Cell*、*Lancet Oncol*(2篇)、*Nat Genet*(3篇)、*Adv Sci*(3篇)、*Nat Commun*、*Leukemia*等国际知名专业杂志上。获授权发明专利7项。

基因编辑技术在肿瘤治疗中的应用进展

熊祥宇 贝锦新*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

摘要 基于工程或细菌核酸酶的基因编辑技术的发展实现了在几乎所有真核细胞中直接靶向和修饰基因组序列的可能性。该文综述了三大基因编辑技术锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、规律间隔成簇短回文重复序列和相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeat and CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)的发展史以及它们在肿瘤治疗领域的应用进展, 并探讨了基因编辑技术在临床上应用于肿瘤治疗所面临的挑战。

关键词 基因编辑; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas; 肿瘤治疗

Applications of Gene Editing Technologies in Cancer Therapy

XIONG Xiangyu, BEI Jinxin*

(State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract The development of gene editing technologies, stemming from engineered or bacterial nucleases, has enabled precise targeting and modification of genomic sequences across a majority of eukaryotic cells. This review provides a comprehensive overview of the evolution and advancements of three paramount gene editing systems: ZFNs (zinc finger nucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases), and CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat and CRISPR-associated proteins). This discourse further elucidates their potential applications in cancer therapeutics and highlights the challenges encountered in integrating these

收稿日期: 2023-11-12

接受日期: 2023-12-06

国家自然科学基金(批准号: 82261160657)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-87343189, E-mail: beijx@sysucc.org.cn

Received: November 12, 2023

Accepted: December 6, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82261160657)

*Corresponding author. Tel: +86-20-87343189, E-mail: beijx@sysucc.org.cn

gene editing modalities into clinical therapy practice.

Keywords gene editing; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas; cancer therapy

癌症即恶性肿瘤是一种由遗传或病毒等病原微生物、环境危险因素和不良生活方式等多种因素导致的复杂疾病,好发于中壮年,治疗效果不理想、死亡率高。近年来,全球年肿瘤病死率超过千万例,严重影响人民健康,增加社会负担。尽管主流的肿瘤治疗方法如手术、放疗以及创新的免疫治疗和联合疗法显著地延长了患者的生存时间,但肿瘤复发转移仍然是阻碍患者疗效进一步提高的主要原因^[1]。癌症归根结底是一种基因组紊乱导致的疾病,DNA突变、染色体拷贝数等结构变异导致了癌基因的激活和抑癌基因的失活,最终致使正常细胞不受控制地过度增殖、转化、恶变^[2]。因此,采取有效的基因编辑方法纠正这些基因层面的病态改变,有望逆转肿瘤的病理过程,达到治疗肿瘤的目的。

基因编辑是指在生物体基因组内的目标位置插入、删除、修改或替换DNA序列的一种基因工程技术^[3]。过去几十年中,基于工程或细菌核酸酶的基因编辑技术得到了快速发展,并逐渐在从基础研究到生物医学应用研究的各个领域显示出非凡的作用^[4]。常见的基因编辑技术主要包括以下三种:锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、规律间隔成簇短回文重复序列和相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeat and CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)^[5]。目前这三种基因编辑技术在肿瘤治疗研究领域均取得了重要突破性成果,尤其是CRISPR/Cas系统,作为一种革命性的基因编辑工具,已被广泛应用于癌症研究,该技术的开发者也于2020年获诺贝尔化学奖(<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/summary/>)。然而,这三种基因编辑技术都有其各自的作用机制和操作限制,了解各种基因编辑技术的工作原理和特点并选择合适的基因编辑工具,有助于我们实现对基因进行精准改造并达到成功治疗肿瘤的目的。

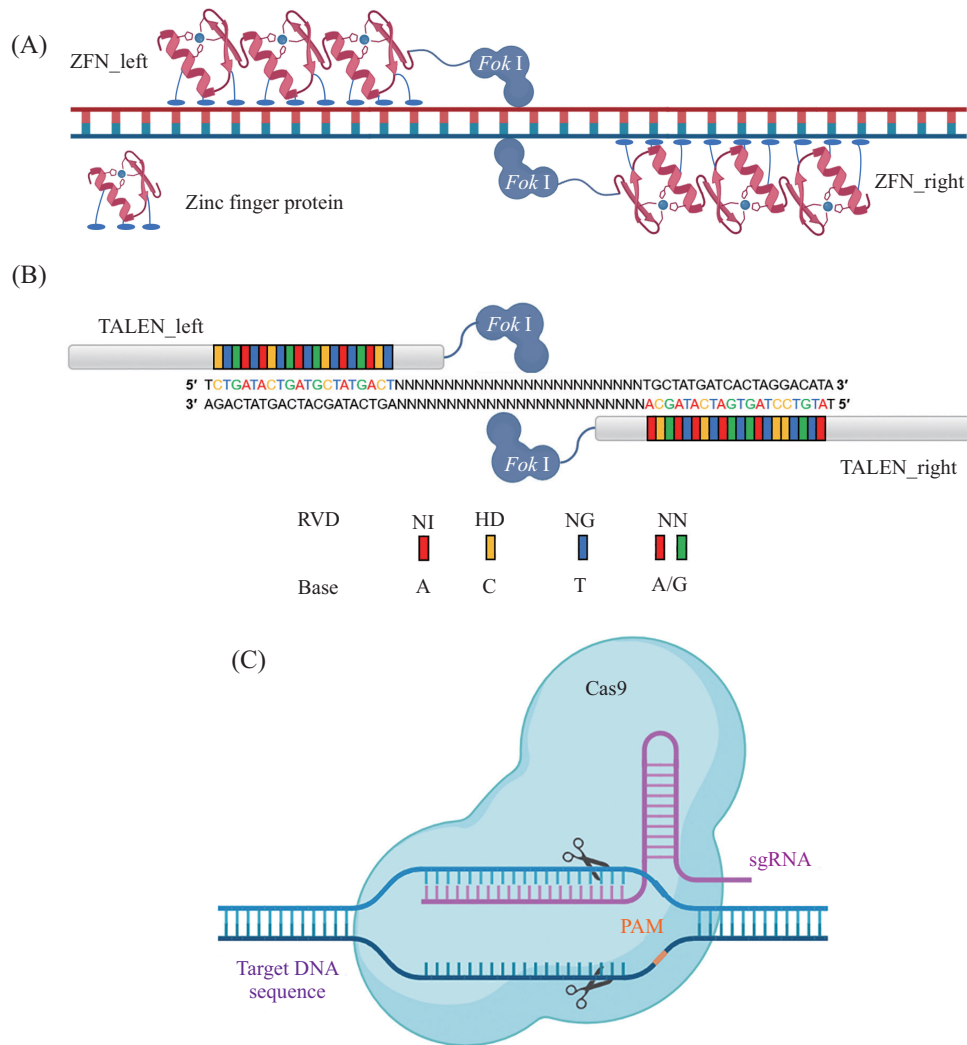
1 基因编辑技术概述

1.1 ZFNs

1996年,致力于研究嵌合限制性内切酶的美国

约翰霍普金斯大学公共卫生学院环境健康科学系的CHANDRASEGARAN团队^[6]构建了基于*Fok I*限制性内切酶和锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)融合的ZFNs技术,即将*Fok I*酶的DNA切割结构域和可结合特定三联体碱基的锌指蛋白嵌合到一起组成能够识别特异核苷酸序列的ZFNs。ZFNs的作用原理如图1A所示。为了能够特异性识别9~18 bp的靶核苷酸序列,ZFNs需将3~6个锌指蛋白串联。ZFNs是由两个可识别DNA两条链的*Fok I*酶DNA切割结构域和串联锌指蛋白组成的嵌合体单体构成的。当两个ZFN单体分别结合到位于DNA两条链上间隔5至7个碱基的靶序列后,形成的二聚体激活*Fok I*酶DNA切割结构域,使DNA在特定位点产生双链断裂(double-strand breaks, DSBs),断裂的DNA双链会激活细胞内的修复机制。此时,若外源引入模板借助同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)机制则可完成对目标序列的定向替换;若不引入外源模板借助非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)修复机制,将会有大约70%的概率通过随机删减或添加可以引起移码突变或无义突变的碱基导致蛋白质产物长度发生变化,从而导致基因敲除,这也是TALENs和CRISPR/Cas系统两种基因编辑技术在细胞内实现基因有效编辑的基础^[7-8]。早期的ZFNs技术依靠两个可识别相邻靶序列的*Fok I*-ZFPs单体组成的二聚体形式进行DNA的切割。但是,一般单个*Fok I*-ZFPs单体形成的同源二聚体依然具有DNA切割活性,这样就很容易造成脱靶效应。此外,如果其中一个*Fok I*-ZFPs单体的特异性低于另外一个,则特异性较差的*Fok I*-ZFPs单体形成的同源二聚体往往会成为脱靶效应的关键因素。基于此, SZCZEPEK等^[9]和MILLER等^[10]设计出两种*Fok I*的突变体,使其只在形成异源二聚体形式下才具有DNA切割活性,大大地提高了ZFNs技术的切割特异性。

作为第一代基因编辑工具,ZFNs无疑是开创了基因编辑的先河,但仍具有不少局限性。第一,对于每个新的目标序列,都需要设计特异的ZFPs串联组合体,这一设计过程相对复杂,且需要大量的实验验证来确保其特异性和效率。而且一个ZFP只能识别特定三联体碱基,这在很大程度上增加了针对靶序



A: 锌指核酸酶; B: 类转录激活因子效应核酸酶; C: RNA引导的CRISPR/Cas9。

A: ZFNs; B: TALENs; C: RNA-guided CRISPR/Cas9.

图1 三种基因编辑工具识别各自靶位点的原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of the principles for recognizing target sites by three gene editing tools

列设计特异ZFPs的难度。第二, ZFNs在某些细胞类型中可能会表现出细胞毒性,这可能与蛋白过度表达、非特异性的DNA切割或其他与ZFNs相关的机制有关。第三, ZFNs作为一种融合蛋白,其编码序列较长,如何有效地向目标细胞递送表达载体并成功表达也是需要解决的问题。第四,相较于后续的基因编辑技术TALENs和CRISPR/Cas系统, ZFNs的编辑效率较低且开发成本更高,并且需要更多的时间进行优化。

1.2 TALENs

2009年,来自德国哈勒维滕贝格马丁路德大学生物学研究所遗传学系的BOCH团队^[11]和美国爱荷华州立大学植物病理学与生物信息学系的BOGDAN-

OVE团队^[12]都单独在植物致病性黄单胞菌中发现了可与DNA直接结合的转录激活子样效应蛋白(transcription activator-like effector, TALE)^[11-12]。TALE的中心重复结构域由33~35个氨基酸的重复单元组成,其第12位和第13位氨基酸为可变氨基酸残基,被称为重复可变二残基(repeat variable di-residues, RVD),其余氨基酸序列则高度保守。与ZFP识别特定三联体碱基不同,每个TALE基序均能够识别单个碱基,其识别特异性由RVD决定[氨基酸残基NI(天冬酰胺-异亮氨酸)识别碱基A, HD(组氨酸-天冬氨酸)识别碱基C, NG(天冬酰胺-甘氨酸)识别碱基T, NN(天冬酰胺-天冬氨酸)识别碱基G或者A]。RVD与靶位点的连续核苷酸之间存在一对一的对应关系,构成了一

个非常简单的TALE-DNA识别密码。基于此, BOGDANOVE团队联合系的VOYTAS团队借鉴ZFNs技术将TALEs融合到Fok I限制酶的DNA切割结构域, 构建了新一代基因编辑技术TALENs^[13](图1B), 其DNA切割效率在拟南芥和斑马鱼中得到了证实。随后, 美国加利福尼亚州的Sangamo BioSciences公司对TALENs技术进行了优化, 鉴定了仍能够特异识别靶核苷酸序列的TALE截短突变体, 并首次在人类细胞中实现了内源性基因的敲除^[14]。与ZFNs不同, 单个TALE基序对DNA的识别似乎在很大程度上独立于相邻基序, 因此这种简单的TALE-DNA识别密码和TALE基序的模块化性质使其成为构建定制核酸酶的理想选择^[7]。

相对于ZFNs来说, 虽然TALENs引起的脱靶效应和细胞毒性较小^[15], 且其更容易生产, 但编码TALENs的基因长度大约是ZFNs的3倍, 这是因为TALE基序的大小虽然与ZFP相似, 但其识别单个碱基, 而ZFP则识别三联体碱基。此外, TALE共识序列的不变性和高度重复性使得在大肠杆菌中组装编码TALENs的基因变得更加困难, 采用病毒载体(如慢病毒载体和腺病毒载体)将编码TALENs的大片段高度重复基因递送到哺乳动物细胞中也是需要解决的问题^[16]。尽管2012年*Science*杂志将TALENs技术列为当年年度十大技术突破之一, 但同年横空出世的CRISPR/Cas系统标志着新一代基因编辑技术革新的开始。

1.3 CRISPR/Cas系统

1987年, 日本的研究人员分析了大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶(isozymes of alkaline phosphatase, *iap*)基因及其侧翼区域长度为1 664个核苷酸的DNA序列, 他们在*iap*的3'端侧翼区域发现了一个不寻常的结构, 该结构包含5个含有29个碱基的高度同源重复序列, 且这5个同源重复序列被含有32个碱基的间隔序列严格分隔开^[17]。2000年, MOJICA等^[18]通过运用计算机分析已有细菌和古生菌的基因组序列, 在19种细菌和古生菌中都观察到了这种重复元件, 并命名为短规律性间隔重复序列(short regularly spaced repeats, SRSRs)。这些SRSRs通常是24~40 bp的短部分回文序列, 包含长达11 bp的内置和末端反向重复序列。SRSR元件通常排列在重复单元的簇中(每个基因组最多包含14个), 每个元件被独特的20~58 bp的间隔序列所分隔。随后在2002年, JANSEN等^[19]

通过运用进一步的计算机分析技术发现这类序列只存在于原核生物的两个域(古生菌和细菌)中, 在真核生物或病毒中并不存在。他们将其重新命名为规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR), 并在含有CRISPR的原核生物中鉴定出了4个CRISPR相关的(CRISPR-associated, *cas*)基因。

2005年, EHRLICH等^[20]、VERGNAUD等^[21]和SORIA等^[22]三个独立的研究团队分别发现, CRISPR的间隔序列与外来的噬菌体基因或染色体外的质粒具有同源性, 而且细菌携带与噬菌体基因同源的间隔序列越多, 该细菌越不容易被噬菌体所侵染, 因此他们假设CRISPR间隔序列是以往染色体外元件(如噬菌体、质粒等)入侵后留下的痕迹, 它们可通过编码反义RNA提供细菌对噬菌体感染的免疫力。2007年, BARRANGOU等^[23]证实了CRISPR可作为细菌和古生菌的免疫系统抵御外界噬菌体的侵染。他们发现, 在噬菌体侵染细菌之后, 细菌能够将来自噬菌体基因组的DNA片段整合到CRISPR内形成新的间隔序列, 去除或添加特定的CRISPR间隔序列能够改变细菌对于噬菌体的抗性表型, 并且CRISPR与*cas*基因一起提供了细菌对噬菌体的抵抗性, 其抗性特异性由CRISPR间隔序列和噬菌体基因组序列的相似性所决定。从机制层面来说, 2008年BROUNS等^[24]揭示了CRISPR中包含的病毒来源序列如何被来自宿主的Cas蛋白用于介导抵御病毒感染的抗病毒反应。他们发现在CRISPR被转录成RNA前体后, 由5种Cas蛋白(CasA、CasB、CasC、CasD和CasE)组成的Cascade复合物将CRISPR前体RNA切割成保留了间隔序列即病毒来源序列的成熟crRNA(CRISPR RNA), 这些crRNA可以作为小的向导RNA(guide RNA, gRNA)靶向病毒的基因组序列, 并因此引导Cascade复合物干扰病毒增殖^[24]; 然而Cascade复合物的组分只在表达I型和III型CRISPR/Cas系统的细菌和古生菌中存在, 而在表达II型CRISPR/Cas系统的细菌和古生菌中是缺失的^[25], 这表明存在涉及其他Cas蛋白和/或根本不同的RNA加工事件参与crRNA的成熟。2011年, 来自瑞典于默奥微生物研究中心的CHARPENTIER团队^[26]通过对人类病原体化脓性链球菌的差异RNA的测序分析, 发现在CRISPR相关基因及CRISPR编码序列的上游存在一段反向转录的DNA序列, 其转录产物为171和89 nt的反式激活CRISPR RNA(trans-activating

crRNA, tracrRNA)。这些 tracrRNA 都有一段长度为 25 nt 且能够与 CRISPR 前体 RNA 重复序列几乎完全碱基互补配对 (只有一个错配) 的序列。进一步研究发现, tracrRNA 通过广泛保守的细菌核糖核酸酶 III (ribonuclease III, RNase III) 和 CRISPR 相关的 Csn1 蛋白 (即后面的 Cas9 蛋白, 来自 II 型 CRISPR/Cas 系统) 指导 crRNA 的成熟, 以保护化脓性链球菌免受噬菌体侵染。

2012 年, 一篇革命性的文章轰动了科学界, Emmanuelle CHARPENTIER 团队联合加州大学伯克利分校霍华德休斯医学研究所 Jennifer A. DOUDNA 团队通过体外实验, 发现 tracrRNA 可通过碱基互补配对与 crRNA 结合形成双链 RNA 结构, 并指导 Cas9 蛋白识别靶核苷酸序列, 完成对目标 DNA 的切割^[27]。其中, Cas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域切割与 crRNA 结合的那条 DNA 链, RuvC 样结构域则负责切割另外一条 DNA 链, 切割的位置由靶 DNA 中与互补区并列的短基序 [被称为原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM)] 所决定。另外, 当把 tracrRNA 与 crRNA 设计为单个 RNA 嵌合体 [单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)] 后, 其依然能够指导 Cas9 蛋白对靶核苷酸序列的切割 (图 1C), 提示 Cas9 可以与单一 RNA 分子结合并应用于基因组定向编辑的巨大

潜力^[28]。Emmanuelle CHARPENTIER 和 Jennifer A. DOUDNA 也因发现了这一划时代的基因编辑工具获得了 2020 年诺贝尔化学奖 (<https://www.nobel-prize.org/prizes/chemistry/2020/summary/>)。2013 年初, 麻省理工学院张锋团队^[29]和哈佛医学院遗传学系 CHURCH 团队^[30]同时将来自于化脓性链球菌的 Cas9 蛋白首次应用于哺乳动物细胞中由 sgRNA 引导的 DNA 特异性切割, 为以后广泛使用 CRISPR/Cas9 系统作为基因编辑工具奠定了基础。

相较于前两代基因编辑技术 ZFNs 和 TALENs, CRISPR/Cas 系统的优越性主要体现在以下几方面 (表 1)^[31]。(1) CRISPR/Cas 系统与 ZFNs 和 TALENs 最大的不同之处是其采用 sgRNA 特异识别靶核苷酸序列而非特定的 ZFP 或 TALE 组合, 这样只需要针对目标序列设计与其序列对应的 sgRNA 即可, 降低了设计的复杂性和成本, 且可以通过表达不同的 sgRNA 从而在同一细胞中进行多个基因位点的编辑。(2) Cas9 的切割效率要比 *Fok I* 限制酶 DNA 切割结构域组成的二聚体形式更高, 能够更容易地实现研究所需的编辑。(3) CRISPR/Cas 系统仅仅使用了一种蛋白 Cas9, 更容易被修饰或者融合其他蛋白组分, 实现对基因其他类型的编辑。2013 年 QI 等^[32]同时突变了 Cas9 的 HNH 核酸酶结构域和 RuvC 样结构

表1 三种基因编辑工具的特性比较

Table 1 Characteristic comparison of three gene editing tools

特性 Properties	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas
Length of target sequence	A pair of ZFNs recognize 18-36 bp target sequence	A pair of TALENs recognize 28-40 bp target sequence	Approximately 20 bp sgRNA binding sequence+PAM sequence
DNA cleavage	<i>Fok I</i>	<i>Fok I</i>	Cas9
Specificity	Tolerating a small number of positional mismatches	Tolerating a small number of positional mismatches	Tolerating positional/multiple consecutive mismatches
Targeting limitations	Difficult to target non-G-rich sites	5' targeted base must be a T for each TALEN monomer	Targeted site must precede a PAM sequence
Engineering design	Requiring substantial protein engineering	Requiring complex molecular cloning methods	Using standard cloning procedures and oligo synthesis
<i>In vitro</i> delivery	Relatively easy through methods such as electroporation and virus transduction	Relatively easy through methods such as electroporation and virus transduction	Relatively easy through methods such as electroporation and virus transduction
<i>In vivo</i> delivery	Due to the small size of the ZFN expression cassette, it is relatively easy, allowing for use in various viral vectors	Difficult, due to the large size of each TALEN and the repetitiveness of the DNA encoding the TALEN, unwanted recombination events may occur when packaged into lentiviral vectors	Moderate difficulty, the commonly used Cas9 from <i>Streptococcus pyogenes</i> is large, which may pose packaging issues for viral vectors such as adenovirus
Multiple genes editing	Unapplicable	Unapplicable	Applicable

域使其失去核酸内切酶活性, 得到的失活 Cas9(dead Cas9, dCas9), 只有识别并结合靶核苷酸序列的作用, 这为后续各种碱基编辑器的开发提供了灵感。如 KOMOR 等^[33]通过将胞嘧啶脱氨酶与 dCas9 融合到一起, 把目标序列中的胞嘧啶(C)编辑成胸腺嘧啶(T); GAUDELLI 等^[34]定向进化出一种转移 RNA 腺嘌呤脱氨酶, 与 Cas9 的突变体[nickase Cas9, nCas9, 将 Cas9 第 10 位氨基酸由天冬氨酸(D)突变为丙氨酸(A), 使得 Cas9 不再导致 DNA 双链断裂]融合后实现腺嘌呤(A)到鸟嘌呤(G)的编辑; ANZALONE 等^[35]也利用 Cas9 的突变体[将 Cas9 第 840 位氨基酸由组氨酸(H)突变为丙氨酸(A), 使 Cas9 只能切割含有 PAM 序列的那条 DNA 链, 而不切割另一条链]开发出一套无需额外的 DNA 模板便能有效实现所有 12 种单碱基自由转换和多碱基精准插入与删除的编辑器——引导编辑(prime editor, PE)系统。以上这些基于 CRISPR/Cas 系统的各种基因编辑器结合体内递送技术为基因突变类疾病特别是肿瘤的治疗提供了方向^[36]。

2 基因编辑技术在肿瘤治疗中的应用进展

2.1 ZFNs 与肿瘤治疗

作为初代基因编辑技术, ZFNs 目前主要应用于一些单基因遗传性疾病如输血依赖性 β -地中海贫血、镰状细胞贫血等^[3]的治疗研究, 而在肿瘤治疗中的应用研究较少。HUANG 等^[37]利用 ZFNs 技术通过同源定向修复向伊马替尼耐受/敏感慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)细胞的断点簇区域基因-ABL 原癌基因 1(breakpoint cluster region-ABL proto-oncogene 1, BCR-ABL)融合基因中添加了 Not I 限制酶酶切位点, 据此通过引入终止密码子导致 BCR-ABL 融合蛋白翻译提前终止。BCR-ABL 基因的破坏能够诱导 CML 细胞发生凋亡并抑制 CML 细胞的成瘤能力, 表明基于 ZFNs 技术的 BCR-ABL 基因编辑可能为伊马替尼耐受或不耐受的 CML 患者提供治疗选择。

近年来, 利用 ZFNs 技术编辑病毒基因组也成为病毒感染相关肿瘤治疗的研究方向。TANAKA 等^[38]设计了一种 ZFNs, 其能够特异识别人类 T 淋巴细胞白血病 I 型病毒(human T-lymphotropic virus type 1, HTLV-1)基因组中的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)区域。该 ZFNs 能够破坏 HTLV-1 LTR 的启动子功能, 并特异性杀死 HTLV-1 感染的 T 细

胞, 这一治疗效果也在成人 T 细胞白血病(adult T-cell leukemia, ATL)的体内模型中得到了证实。DING 等^[39]设计并构建了可以特异性识别和切割人乳头瘤病毒 16/18(human papillomavirus 16/18, HPV16/18)亚型 E7 癌基因 DNA 序列的 ZFNs, 其能够破坏 HPV16/18 阳性宫颈癌细胞中的 HPV E7 癌基因, 可以特异性诱导相应 HPV16/18 阳性宫颈癌细胞系发生凋亡并抑制其生长和成瘤能力。该 ZFNs 可作为 HPV 相关宫颈癌的新型治疗药物, 目前由华中科技大学同济医学院附属同济医院开展的针对此药物的临床试验(NCT02800369)正处于 I 期阶段。

ZFNs 技术也被应用于肿瘤免疫治疗增效研究中。PROVASI 等^[40]利用 ZFNs 技术敲除了 T 细胞中内源性表达的 T 细胞受体基因(T cell receptor, TCR), 然后利用慢病毒载体将能够特异识别急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞 Wilms 肿瘤基因 1(Wilms tumor 1, WTI)的 TCR 基因转移至经过编辑的 T 细胞中。由于内源性 TCR 已经被清除, 不会与外源肿瘤特异性 TCR 的 α 和 β 链产生错配的 TCR 链, 也不会与之竞争结合分化簇 3(cluster of differentiation 3, CD3)蛋白复合体, 从而导致肿瘤特异性 TCR 在 T 细胞膜上的组装增加, 大幅度增强 T 细胞对于 AML 细胞的杀伤效应。同样, TORIKAI 等^[41-42]借助 ZFNs 技术敲除了表达分化簇 19(cluster of differentiation 19, CD19)特异性嵌合抗原受体的 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)中内源性 TCR α 和 β 链, 规避了异种移植的宿主排斥反应。经过编辑的 CD19 CAR-T 细胞可识别来自多个受体的 B 细胞恶性肿瘤细胞并产生杀伤效应, 通过相同的方法在 CD19 CAR-T 细胞和胚胎干细胞中也实现了 HLA-A 的选择性消除, 为来自单个供体的细胞可以施用于多个受体进行免疫治疗提供了方向。使用 ZFNs 产品 GRm13Z40-2 治疗 III 期或 IV 期胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)患者的基因编辑临床试验(NCT01082926)于 2010 年启动。该产品是一种经过 ZFNs 技术编辑的健康供体来源的靶向白细胞介素-13 受体 $\alpha 2$ 亚基(interleukin-13 receptor subunit alpha-2, IL13R42) CAR-T 细胞, 该 CAR-T 细胞借助 ZFNs 永久敲除了糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR), 使其在糖皮质激素治疗 GBM 中获得抗性。在 6 名维持全身性地塞米松(4~12 毫克每天)治疗的复发性 GBM 患者中, 有 4 名患者的 GRm13Z40-2

输注部位有短暂的肿瘤减少和/或肿瘤坏死的迹象, 这为未来使用 ZFNs 修饰和糖皮质激素抗性 CAR-T 细胞的过继治疗研究奠定了基础^[43]。ZFNs 不光在 T 细胞受体工程化 T 细胞 (T cell receptor-gene engineered T cells, TCR-T) 和 CAR-T 细胞中能够发挥提高肿瘤治疗效果的作用, 研究人员也将其与免疫检查点疗法 (immune checkpoint therapy, ICT) 相结合并成功将其应用于转移性黑色素瘤的治疗。他们利用 ZFNs 敲除了黑色素瘤的肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) 中程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, *PD-1*) 编码基因, 在临床规模的 TILs 生产过程中对 *PD-1* 基因位点进行有效的编辑, 导致了 TILs 细胞表面表达的 PD-1 减少了 76%, 从而极大地增强了 TILs 的肿瘤细胞杀伤活性^[44]。

2.2 TALENs 与肿瘤治疗

目前, 全球已开展了多项利用 TALENs 技术进行肿瘤治疗的基础研究和临床试验。WANG 等^[45]在 CML 细胞系 K562 中利用 TALENs 技术敲除了 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FMS-like tyrosine kinase 3, *FLT3*) 基因的单个等位基因, 抑制了 K562 的增殖能力, 且其抑制作用在体内能得以维持, 可以显著提高移植 *FLT3* 单倍体 K562 克隆的非肥胖型糖尿病/重度联合免疫缺陷 (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient, NOD/SCID) 小鼠的存活率。NY-QUIST 等^[46]利用 TALENs 技术模拟了在去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) 组织中发现的雄激素受体 (androgen receptor, *AR*) 基因重排的现象。他们发现 *AR* 基因重排能够阻断全长 *AR* 的合成, 但可以促进缺乏 *AR* 配体结合结构域的截短 *AR* 变异蛋白的表达, 这些 *AR* 变异蛋白维持

了 *AR* 的转录活性, 赋予了 CRPC 患者对雄激素剥夺疗法 (androgen deprivation therapy, ADT) 的抵抗性。CAI 等^[47]基于 TALENs 技术模拟了在乳腺癌中常见的 8p 染色体杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH) 的现象, 发现 8p 染色体发生 LOH 后能够影响乳腺癌细胞脂肪酸和神经酰胺的代谢, 脂质代谢的转变促进了乳腺癌细胞的侵袭与耐药, 并在应激条件下由于自噬增加而促进了肿瘤生长。以上这些研究表明, TALENs 技术有助于在分子水平上探索基因突变功能, 并且有望用于肿瘤等疾病的治疗。

临床试验方面, 在病毒感染相关肿瘤的治疗中, 一项由华中科技大学同济医学院附属同济医院开展的针对 TALENs 产品 T27 和 T512 的临床试验 (NCT03226470) 于 2017 年启动。T27 和 T512 分别靶向 HPV16/18 基因组的 *E6* 和 *E7* 基因, 这两种 TALENs 能够有效降低 HPV16/18 阳性宫颈癌细胞系中 *E6* 和 *E7* 基因的表达水平, 导致宿主肿瘤抑制因子癌蛋白 p53 (tumor protein p53, *TP53*) 和视网膜母细胞瘤 1 (retinoblastoma 1, *RBI*) 基因的表达恢复, 诱导 HPV16/18 阳性宫颈癌细胞系发生凋亡并抑制其生长和致瘤性, 表明 TALENs 具有作为 HPV 感染相关宫颈恶性肿瘤治疗策略的潜力^[48]。

在肿瘤的免疫治疗领域, 利用 TALENs 技术编辑的 CAR-T 细胞已开发了多种产品并陆续开展了相应的临床试验, 如表 2 所示。2016 年两项针对 TALENs 产品 UCART19 的多中心临床试验正式开展。该产品是法国 Cellectis 公司研发的一款健康供体来源的靶向 CD19 的通用型 CAR-T 细胞 (universal chimeric antigen receptor T cell, UCAR-T) 产品, 其借助 TALENs 技术敲除了 CAR-T 细胞内源的 *TCR* 和分化簇 52 (cluster of differentiation 52, *CD52*) 基因, 使

表2 利用TALENs技术编辑的CAR-T细胞产品

Table 2 CAR-T cell products edited by TALENs

名称 Name	UCART19	UCART123v1.2	UCART22	UCARTCS1A	ALLO-501
Knockout gene	<i>TCR, CD52</i>	<i>TCR, CD52</i>	<i>TCR</i>	<i>TCR, CD52</i>	<i>TCR, CD52</i>
Targeting proteins	CD19	CD123	CD22	SLAMF7	CD19
Diseases	B-ALL	AML	B-ALL	MM	LBCL, FL
Number of clinical trial	NCT02808442, NCT02746952	NCT03190278	NCT04150497	NCT04142619	NCT03939026
Year of clinical trial	2016	2017	2019	2019	2019
Lead Sponsor	Cellectis	Cellectis	Cellectis	Cellectis	Allogene

得该CAR-T细胞能够在B细胞急性淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)患者体内发挥抗肿瘤作用,而不会引起受体的免疫排斥反应。这两项临床试验(分别是NCT02808442和NCT02746952)均已在美国国立医学图书馆(National Library of Medicine, NLM)的clinicaltrials.gov网站上完成注册^[49-50],研究首次显示了使用同种异体、采用TALENs技术进行基因组编辑的CAR-T细胞治疗B-ALL患者的可行性。UCART19在经过大量前期药物治疗的复发或难治性B-ALL的儿童和成人患者中表现出体内扩增和抗白血病活性,其安全性可控。这项研究的结果是同种异体CAR-T细胞领域向前迈出的令人鼓舞的一步,为治疗快速进展和无法获得自体CAR-T细胞治疗的B-ALL患者提供了机会^[51-52]。除此之外,法国Cellestis公司近几年针对其他TALENs基因编辑CAR-T产品也陆续开展了几项临床试验,如2017年针对UCART123v1.2开展的临床试验NCT03190278,该产品为靶向分化簇123(cluster of differentiation 123, CD123)经TALENs敲除了TCR和CD52基因的UCAR-T细胞,用于治疗复发/难治性AML患者;2019年针对UCART22开展的临床试验NCT04150497,该产品为靶向分化簇22(cluster of differentiation 22, CD22)经TALENs敲除了TCR基因的UCAR-T细胞,用于治疗复发/难治性B-ALL患者;2019年针对UCARTCS1A开展的临床试验NCT04142619,该产品为靶向信号淋巴细胞激活分子家族成员7(signaling lymphocytes activating molecule factor 7, SLAMF7),经TALENs敲除了TCR和CD52基因的UCAR-T细胞,用于治疗复发/难治性多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者。其他公司也进行过TALENs基因编辑CAR-T产品的临床试验,如美国Allogene公司2019年针对ALLO-501开展的临床试验NCT03939026,该产品为靶向CD19经TALENs敲除了TCR和CD52基因的UCAR-T细胞,用于治疗复发/难治性大B细胞淋巴瘤(large B-cell lymphoma, LBCL)或滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma, FL)患者。

2.3 CRISPR/Cas系统与肿瘤治疗

虽然发现时间晚于ZFNs和TALENs,但由于其设计过程简单,CRISPR/Cas系统在肿瘤治疗中已成为最有前景的基因编辑工具。目前应用最多的是将其与肿瘤的免疫疗法相结合,提高疗效^[53-55]。

2016年,四川大学华西医院研究者首次将CRISPR/Cas系统应用于人体肿瘤治疗^[56-57]。这项临床试验(NCT02793856)共招募了22名晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者,其中17例有足够的编辑T细胞进行输注,12例能够接受治疗。其主要过程包括:研究人员首先将患者自体来源的T细胞分离出来后,采用Cas9和sgRNA质粒电穿孔共转染的方法靶向敲除T细胞中的免疫抑制剂PD-1基因,然后再将编辑后的T细胞输注回病人体内,输注后在外周血中可检测到编辑的T细胞。这批患者的中位无进展生存期为7.7周[95%置信区间(confidence interval, CI)为6.9至8.5周],中位总生存期为42.6周(95% CI为10.3~74.9周);结合二代测序发现18个候选位点脱靶事件的中位突变频率为0.05%;这些结果说明,利用CRISPR/Cas系统编辑T细胞的临床应用通常是安全可行的^[56-57]。另外四项应用CRISPR/Cas系统敲除PD-1治疗其他癌症的临床试验也已经注册并开展,分别是针对食管癌(NCT03081715)、膀胱癌(NCT02863913)、激素难治性前列腺癌(NCT02867345)和肾细胞癌(NCT02867332)的^[58]。除了在T细胞中进行单基因的敲除外,来自宾夕法尼亚大学佩雷尔曼医学院的研究团队测试了采用CRISPR/Cas系统进行多重基因编辑在人体临床试验中的安全性和可行性,并开展了相应的临床试验(NCT03399448),共招募了3名患者(其中2名患有晚期难治性骨髓瘤,1名患有转移性肉瘤)^[59]。该临床试验采用的工程T细胞是利用CRISPR/Cas系统敲除了内源性TCR基因和PD-1基因且能够表达特异性识别纽约食管鳞状细胞癌1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1, NY-ESO-1)基因TCR的TCR-T细胞。3名患者经过工程T细胞输注后,骨髓和肿瘤活检显示所有3名患者的重组T细胞均被转运到肿瘤部位,尽管肿瘤活检结果显示,仍有残留肿瘤的存在,但在2名骨髓瘤患者中,靶抗原NY-ESO-1的数量明显减少,这说明采用CRISPR/Cas系统编辑的工程化T细胞应用于人体肿瘤治疗具有很好的肿瘤靶向性^[59]。

除了工程化改造T细胞的功能外,CRISPR/Cas系统也被广泛应用于CAR-T细胞制备过程,包括增强抗原识别、抵抗体内细胞攻击等。斯隆凯特琳癌症中心的SADELAIN研究团队^[60]采用靶向

TCR α 链基因(T-cell receptor α constant, *TRAC*)第一个外显子的CRISPR/Cas系统和带有特异识别CD19的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)编码序列的腺病毒同源修复载体将CD19特异性CAR插入到TRAC位点上,发现在单次或重复暴露于CD19抗原后可实现CAR的胞内降解与胞膜再表达的动态平衡,延迟效应T细胞的分化和衰竭。这不仅导致外周血T细胞中的CAR表达均匀,而且还增强了T细胞的活性。在急性淋巴细胞白血病小鼠模型中,采用此方法编辑的CAR-T细胞其肿瘤杀伤活性要远远优于基于传统方法生成的CAR-T细胞^[60]。STERNER等^[61]利用CRISPR/Cas系统敲除了靶向CD19 CAR-T细胞中的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, *GM-CSF*)基因,发现与没有经过编辑的CD19 CAR-T细胞相比,*GM-CSF*缺陷的CD19 CAR-T细胞不仅能保持其正常功能,而且在体内具有更强的抗肿瘤活性。他们也计划开展使用伦齐鲁单抗联合*GM-CSF*缺陷CD19 CAR-T细胞疗法用于治疗慢性粒单核细胞白血病(chronic myelomonocytic leukemia, CMML)的II期临床试验(NCT02546284)。KIM等^[62]针对在AML治疗中靶向分化簇33(cluster of differentiation 33, CD33)的CAR-T细胞也会攻击正常髓系细胞从而引起细胞毒性这一现象,提出了一种抗原特异性免疫治疗的新方法。该方法没有对CAR-T细胞进行编辑,而是在正常的造血干细胞和祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)中采用CRISPR/Cas系统敲除*CD33*制备出*CD33*缺陷的HSPCs。他们在AML小鼠模型中观察到*CD33*缺陷的HSPCs在靶向CD33 CAR-T用于AML治疗时具有抗性并且具备功能性造血能力。这一方法使得CD33成为AML细胞的独特标志物,为*CD33*缺陷HSPCs的同种异体移植与CD33 CAR-T疗法相结合以治疗其他无法治愈的AML患者的临床可行性和有效性提供证据^[62]。

尽管以上这些采用CRISPR/Cas系统结合免疫疗法治疗肿瘤的临床试验似乎取得了不错的成果,但最近的一项研究工作表明,利用CRISPR/Cas系统对人原代T细胞进行编辑导致5%~20%的细胞出现染色体丢失的现象^[63]。这项研究报道提示,基因编辑T细胞应用于人体时可能会带来不可预知的危险,因此,还需要更多的研究来确保该工具在治疗人类

肿瘤方面的安全性和有效性。

3 总结与展望

本文总结了三大基因编辑技术ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas系统的发展史及其在肿瘤治疗特别是免疫疗法方面的应用。总而言之,基因编辑技术在肿瘤治疗领域的应用前景令人振奋,通过不断的研究和创新,我们有望更有效地治疗癌症,提高肿瘤患者的生存率。尽管基因编辑在过继性免疫细胞疗法中具有可观的前景,但关于免疫细胞疗法中基因编辑的长期安全性和有效性的临床数据仍然缺乏。未来的研究旨在更好地了解基因编辑的生物学风险,并提高多重基因编辑的效率。我们预计未来几年基因编辑技术特别是CRISPR/Cas系统应用于临床的研究会不断增加,并且相应的检测基因编辑平台安全性和有效性的基础实验研究数量也会增加。这些进展将能极大促进基因编辑技术在肿瘤治疗中的广泛应用并最终改善肿瘤患者的治疗结果。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] JASSIM A, RAHRMANN E P, SIMONS B D, et al. Cancers make their own luck: theories of cancer origins [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(10): 710-24.
- [3] CUSHMAN-VOKOUN A, SCHMIDT R J, HIEMENZ M C, et al. A primer on gene editing: what does it mean for pathologists [J]? *Arch Pathol Lab Med*, 2023, doi: 10.5858/arpa.
- [4] LI H, YANG Y, HONG W, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 1.
- [5] ZHOU W, YANG J, ZHANG Y, et al. Current landscape of gene-editing technology in biomedicine: applications, advantages, challenges, and perspectives [J]. *Med Comm*, 2022, 3(3): e155.
- [6] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156-60.
- [7] CHANDRASEGARAN S, CARROLL D. Origins of programmable nucleases for genome engineering [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(5 Pt B): 963-89.
- [8] MURTY T, MACKALL C L. Gene editing to enhance the efficacy of cancer cell therapies [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(11): 3153-62.
- [9] SZCZEPEK M, BRONDANI V, BUCHEL J, et al. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 786-93.

- [10] MILLER J C, HOLMES M C, WANG J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778-85.
- [11] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12.
- [12] MOSCOU M J, BOGDANOVA A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
- [13] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-61.
- [14] MILLER J C, TAN S, QIAO G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143-8.
- [15] ZHENG N, LI L, WANG X. Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(1): 412-26.
- [16] HOLKERS M, MAGGIO I, LIU J, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(5): e63.
- [17] 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 [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-33.
- [18] MOJICA F J, DIEZ-VILLASENOR C, SORIA E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36(1): 244-6.
- [19] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-75.
- [20] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-61.
- [21] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 3): 653-63.
- [22] MOJICA F J, DÍEZ-VILLASENOR C S, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174-82.
- [23] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12.
- [24] BROUNS S J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-4.
- [25] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-77.
- [26] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-7.
- [27] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-21.
- [28] STERNBERG S, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 [J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 62-7.
- [29] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [30] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6.
- [31] COX D B, PLATT R J, ZHANG F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges [J]. *Nat Med*, 2015, 21(2): 121-31.
- [32] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-83.
- [33] 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.
- [34] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.
- [35] 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.
- [36] BANSKOTA S, RAGURAM A, SUH S, et al. Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins [J]. *Cell*, 2022, 185(2): 250-65, e16.
- [37] HUANG N, HUANG Z, GAO M, et al. Induction of apoptosis in imatinib sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells by efficient disruption of BCR-ABL oncogene with zinc finger nucleases [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 62.
- [38] TANAKA A, TAKEDA S, KARIYA R, et al. A novel therapeutic molecule against HTLV-1 infection targeting provirus [J]. *Leukemia*, 2013, 27(8): 1621-7.
- [39] DING W, HU Z, ZHU D, et al. Zinc finger nucleases targeting the human papillomavirus E7 oncogene induce E7 disruption and a transformed phenotype in HPV16/18-positive cervical cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(24): 6495-503.
- [40] PROVASI E, GENOVESE P, LOMBARDO A, et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer [J]. *Nat Med*, 2012, 18(5): 807-15.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] BROWN C E, RODRIGUEZ A, PALMER J, et al. Off-the-shelf, steroid-resistant, IL13Ralpha2-specific CAR T cells for treatment of glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(8): 1318-30.
- [44] BEANE J D, LEE G, ZHENG Z, et al. Clinical scale zinc finger nuclease-mediated gene editing of PD-1 in tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic melanoma [J]. *Mol*

- Ther, 2015, 23(8): 1380-90.
- [45] WANG J, LI T, ZHOU M, et al. TALENs-mediated gene disruption of FLT3 in leukemia cells: using genome-editing approach for exploring the molecular basis of gene abnormality [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 18454.
- [46] NYQUIST M D, LI Y, HWANG T H, et al. TALEN-engineered AR gene rearrangements reveal endocrine uncoupling of androgen receptor in prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(43): 17492-7.
- [47] CAI Y, CROWTHER J, PASTOR T, et al. Loss of chromosome 8p governs tumor progression and drug response by altering lipid metabolism [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(5): 751-66.
- [48] HU Z, DING W, ZHU D, et al. TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 425-36.
- [49] BENJAMIN R, GRAHAM C, YALLOP D, et al. Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies [J]. *Lancet*, 2020, 396(10266): 1885-94.
- [50] GROUP C S. UCART19, a first-in-class allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia (CALM): a phase 1, dose-escalation trial [J]. *Lancet Haematol*, 2022, 9(11): e833-e43.
- [51] QASIM W, ZHAN H, SAMARASINGHE S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(374): eaaj2013.
- [52] WEI G, WANG J, HUANG H, et al. Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 150.
- [53] LIU Z, SHI M, REN Y, et al. Recent advances and applications of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 35.
- [54] KATTI A, DIAZ B J, CARAGINE C M, et al. CRISPR in cancer biology and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(5): 259-79.
- [55] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [56] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.
- [57] LU Y, XUE J, DENG T, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Med*, 2020, 26(5): 732-40.
- [58] ZHAN T, RINDTORFF N, BETGE J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 106-19.
- [59] 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.
- [60] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-7.
- [61] STERNER R M, SAKEMURA R, COX M J, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts [J]. *Blood*, 2019, 133(7): 697.
- [62] KIM M Y, YU K R, KENDERIAN S S, et al. Genetic inactivation of CD33 in hematopoietic stem cells to enable CAR T cell immunotherapy for acute myeloid leukemia [J]. *Cell*, 2018, 173(6): 1439-53, e19.
- [63] TSUCHIDA C A, BRANDES N, BUENO R, et al. Mitigation of chromosome loss in clinical CRISPR-Cas9-engineered T cells [J]. *Cell*, 2023, 186(21): 4567-8, e20.