·生物医药前沿·

通用型嵌合抗原受体 T 细胞的研究现状及进展

朱芳明,蔡晓晴,崔　畅,郭虹汐,陆婷婷,徐道俊
(赛德特生物制药有限公司,昆明 650000)

[摘要] 通用型嵌合抗原受体 T 细胞(universal chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy,UCAR-T)属于通用型 CAR-T 中基于基因编辑的通用 T 细胞技术,通过基因编辑技术敲除 T 细胞信号受体因子,并使用经过改造的健康志愿者的 T 细胞制备 CAR-T 细胞,输注后不会引起移植物抗宿主病(graft versus host disease, GvHD)和宿主抗移植物反应(host versus graft reaction, HvGR)等免疫排斥反应。在动物实验和早期临床试验研究方面,UCAR-T 技术显示出了良好的抗瘤效果、广泛的适用性和不可估量的应用潜力;在产业化方面,UCAR-T 细胞技术显示出了质量可控、off-the-shelf、容易规模化制备等特点,解决了自体 CAR-T 的设计及培养制备成本过高、制备周期长、质量控制不易、细胞数量及扩增能力不足等问题。本文介绍了目前 UCAR-T 细胞的研究现状、进展及存在问题,并就存在问题进行了初步分析,为 UCAR-T 细胞的基础研究、产业化研究以及临床应用提供参考。

[关键词] 通用型嵌合抗原受体 T 细胞;肿瘤过继免疫治疗;基因编辑;锌指核酸酶;转录激活子样效应因子核酸酶;规律性间隔的短回文序列重复簇/CRISPR 相关基因 9
[中图分类号] R979.5　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)13 - 1192 - 08

The current research status and progress in universal chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy

ZHU Fang-ming, CAI Xiao-qing, CUI Chang, GUO Hong-xi, LU Ting-ting, XU Dao-jun
(*Cytocraft Biopharmaceutical Co., Ltd., Kunming* 650000, *China*)

[**Abstract**] Universal CAR-T cell technology belongs to the universal T cell technology based on gene editing in general CAR-T. It knocks out the signal receptor factor of T cell through gene editing, and produces CAR-T cell by using modified T cell from healthy volunteers; therefore it will not cause immune rejection such as graft versus host disease (GvHD) and host versus graft reaction (HvGR) after infusion. In animal experiments and early clinical trials, UCAR-T technology shows significant anti-tumor effect, wide applicability and tremendous application potentials. In terms of industrialization, UCAR-T cell technology is expected to solve the problems of high cost in designing and culturing autologous CAR-T preparations, of long preparation cycle, difficult quality control, insufficient cell quantity and expansion capacity, because of its unique features such as quality controllable, off-the-shelf, and easy for large-scale preparation, etc. This paper introduces the current research progress and existing problems of UCAR-T cells, and conducts a preliminary analysis of the existing problems, providing a reference for the fundamental research and clinical trials of UCAR-T cells.

[**Key words**] universal CAR-T; tumor adoptive immunotherapy; genome editing; zinc-finger nucleases (ZFNs); transcription activator-like effector nucleases (TALENs); CRISPR/Cas9

嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法(chemeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)自问世以来,在临床上显示出较大的优势和潜力。CAR-T 疗法是通过采集患者外周血并分离其中的淋巴细胞,通

[作者简介] 朱芳明,女,硕士研究生,主要从事免疫细胞产品的研究及开发工作。E-mail:CANPLT@163.com。
[通讯作者] 徐道俊,男,硕士研究生,高级工程师,主要从事人用疫苗及细胞治疗产品的研究、开发及管理工作。E-mail:xudaojun86527@126.com。

过基因工程技术将 *CAR* 基因导入 T 细胞,使其表达特定受体以结合特定肿瘤相关抗原,在体外扩增后回输给患者,CAR-T 细胞在体内与肿瘤相关抗原特异性结合后,通过信号转导活化 T 细胞,促进 T 细胞增殖并释放细胞因子,从而发挥抗肿瘤作用[1-2]。目前 CAR-T 细胞普遍使用患者自身细胞进行个性化定制,价格昂贵,制备耗时,常常因为无法收集到足够的 T 细胞而无法开展治疗。因此,研究人员提出了 Universal CAR-T(以下简称 UCAR-T)的概念,制备一种同种异体 CAR-T 细胞,通过基因编辑技术,敲除健康供体来源 T 细胞上与免疫排异反应相关的基因,制备成 UCAR-T 细胞,再将这种细胞输注给患者,并且不会引起移植物抗宿主病(graft versus host disease, GvHD)和宿主抗移植物反应(host versus graft reaction, HvGR)等免疫排斥反应。UCAR-T 细胞有望成为传统 CAR-T 细胞治疗中存在的自体 CAR-T 的设计及培养制备成本过高、制备周期长,细胞数量及扩增能力不足等问题的解决方案。

本文从 UCAR-T 的研究现状、专利申请、临床试验、面临问题等方面对这项新兴技术做简要介绍,展示目前 UCAR-T 技术的研究进展情况及存在问题,旨在让更多的研究者了解这项技术的同时,探讨 UCAR-T 技术的应用前景及发展方向。

1 UCAR-T 的诞生背景及研究现状

1.1 CAR-T 疗法存在问题

尽管 CAR-T 治疗在临床效果上取得了巨大成功,但依然存在许多亟待解决的问题。

1.1.1 患者自体 T 细胞不满足 CAR-T 细胞制备要求 首先肿瘤微环境中的免疫抑制状态抑制着 T 细胞的抗肿瘤活性,如 PD-1,CTLA-4,AG-3,CD160,2B4,TIM-3 等信号分子表达上调抑制 T 细胞增殖,IL-2,TNF-α,IFN-γ 等细胞因子含量匮乏则抑制 T 细胞活化及抗肿瘤活性,长期处于这种环境下会出现 T 细胞耗竭。耗竭状态下 T 细胞 IL-2,TNF-α,IFN-γ 和其他细胞毒效应分子的表达下降,同时抑制性受体表达增加,导致 T 细胞功能障碍,而这种耗竭也极大削弱着 CAR-T 细胞的作用。其次是肿瘤的发生发展及患者反复进行化疗和放疗,都将导致患者 T 细胞数量减少和畸形。以上 2 点对患者自体 CAR-T 细胞制备造成了极大的困难,有可能导致无法进行 CAR-T 细胞的制备或制备失败。

1.1.2 CAR-肿瘤细胞 Ruella 等[3]报道了一个 B 系急性淋巴细胞白血病(B-lineage acute lymphoblastic leukemia,B-ALL)病例,患者经过 CD19-CAR-T 细胞治疗后,d 28 获得完全缓解,但 d 261 出现复发并最终去世。经研究发现,CAR 基因被整合到该患者的单个 B 细胞白血病细胞上,使 CD19 的靶点被掩盖,从而导致肿瘤免疫逃逸,最终导致患者死亡。肿瘤患者尤其是血液瘤患者,在其血液中通常会带有癌细胞,并在体外分离淋巴细胞时被收获,这说明使用患者自体来源的 T 细胞制备 CAR-T 细胞时,即使严格地清除残留的污染肿瘤细胞,也无法完全避免类似情况发生。

1.1.3 制备时间过长 自体 CAR-T 需要提取患者自身的 T 细胞然后进行制备,通常需要 14 ~ 21 d,而对该产品适用的三线及更后线的患者,等待周期中出现疾病迅速进展的风险很高。应用 Kymriah 治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤过程中,13% 的患者由于疾病进展而未能接受 CAR-T 细胞治疗[4];儿童和年轻成人 B-ALL 中应用 Kymriah 治疗的研究中,7.6% 的登记/带病患者在接受细胞治疗前死亡[5],这无疑为 CAR-T 疗法的应用前景蒙上了阴影。

1.1.4 产品的稳定性和质量控制困难 CAR-T 细胞是以患者自身外周血分离得到的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)为原料进行定制的,其关键特性如细胞数、活力、表达率和记忆表型,在产物与产物之间表现出不一致,因此不可能生产出标准化的最终产品,这为 CAR-T 细胞的商品化增添了阻碍。

1.1.5 价格昂贵 2017 年 FDA 先后批准了 2 种药物:Novartis 公司的 Kymriah[用于治疗患有复发/难治性的儿童和年轻成人急性淋巴细胞白血病(r/r ALL)]和 Kite 制药的 Yescarta[用于治疗非霍奇金淋巴瘤(NHLs)]。Kymriah™上市定价高达 47.5 万美元,Yescarta 定价为 37.7 万美元[6],该费用仅为 CAR-T 产品的费用,而患者还需要负担手术费、住院费、医药费、护理费等多种费用,这对患者及其家庭都是沉重的经济负担。

UCAR-T 技术的出现,则非常有针对性地解决了 CAR-T 技术的上述不足。UCAR-T 技术主要依赖于锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector-based nucleases,TALENs)和规律性间隔的短回文序列重复簇(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)/CRISPR 相关基因 9

(CRISPR-associated genes 9, Cas9)等基因编辑平台,在基因组的特定位置,如 T 细胞抗原受体(TCR)和人类白细胞抗原(HLA)产生位点特异性双链断裂(double strand break,DSB),然后通过非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)或同源定向重组修复(homology directed recombination repair,HDR)的方式进行修复,从而实现靶向敲除来自健康人血液中编码信号分子的基因 TCR 和 HLA,以减弱或消除发生 GvHD 和 HvGR 的风险,提高 UCAR-T 细胞在受体体内的存活能力;或同时敲除 T 细胞抑制性受体的基因,如 PD-1,CTLA4,TIM-3 等,缓解免疫抑制对 T 细胞的耗损,提高 UCAR-T 细胞的功能。

Universal CAR-T 技术采集健康志愿者的 T 细胞用于 UCAR-T 细胞的制备,在避免肿瘤细胞污染及免疫排异反应的基础上,延长 T 细胞存活时间,避免 T 细胞耗竭,增强 UCAR-T 细胞的抗肿瘤活性。现阶段 UCAR-T 细胞的成本为传统 CAR-T 细胞的 1/3 左右,并且随着制备工艺的进一步优化和成熟,有望对 UCAR-T 产品的质量进行控制,实现 UCAR-T 细胞的规模化生产,进而扫除 CAR-T 技术商品化道路上的障碍,使更多患者能使用 CAT-T 细胞进行治疗。

1.2 UCAR-T 体外研究

目前,基于 ZFNs,TALENs 和 CRISPR/Cas9 制备 UCAR-T 的研究均有报道,并且取得了一定的成果。

ZFNs 是一种特异性 DNA 核酸内切酶,由锌指 DNA 结合域与 FokI 内切酶的 DNA 切割域融合而成。针对目的基因序列设计并合成 ZFN,使之对 DNA 进行特异性切割,从而形成 DNA 双链断裂区,通过非同源末端连接或借助同源重组等方式完成 DNA 的修复连接,从而导致靶基因表达丧失[7]。Torikai 等[8]使用这种基因编辑技术,破坏 T 细胞中 TCRα 恒定区的表达,使 TCR 功能丧失,从而不能对 TCR 特异性刺激做出反应,但不会造成 T 细胞亚群(CD_4^+ 或 CD_8^+)失衡。该研究团队使用 ZFN 对 *HLA* 基因进行敲除,通过对 *HLA* 阳性细胞进行阴性选择,快速富集 ZFN 编辑的 T 细胞。在动物实验中,TCR^-/HLA^- T 细胞都不会引起 GvHD[9]。目前,TCR^- T 细胞已被用于生产通用型 CAR-T 细胞,这些 CAR-T 细胞有望成为“现成的”免疫药物,但仍需进一步的临床试验以确认其安全性及有效性。

TALENs 也是一种位点特异性核酸内切酶,由 TAL 效应子结合 FokI 内切酶组成,可与 DNA 结合并在特异位点对 DNA 链进行切割,从而实现基因敲除或外源基因导入[10]。Cellectis 公司的研究团队 Laurent 等[11]使用 TALEN 同时靶向敲除 *TRAC* 和 *CD52* 基因,生成了 $TCR^-/CD52^-$ CD19-CAR T 细胞(dKO-CART19),其中 CD52 是一个存在于 B 和 T 淋巴细胞表面的抗原。dKO-CART19 细胞治疗效果与标准 CD19-CAR-T 细胞没有明显差异,并且不会引起 GvHD,同时具备阿伦单抗抗性(其不良反应包括大量减少 CD_{52}^+ 细胞数量)。这说明 dKO-CART19 可以用健康志愿者 T 细胞为原料进行制备,能达到与自体来源 CAR-T 细胞相同的疗效,同时能与阿伦单抗联合使用,加强 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的疗效。研究组认为利用 *TALENs* 基因编辑平台能大规模生产 dKO-CART19 细胞,该细胞可被认为是“off-the-shelf”免疫药剂。

CRISPR/Cas9 是继 ZFNs 和 TALENs 之后,第三代人工核酸内切酶技术,利用 sgRNA 引导,将核酸酶 Cas9 蛋白定位至外源的基因组中与 sgRNA 互补的 DNA 序列上,并对 DNA 双链进行切割。与 ZFNs 和 TALENs 需要针对不同的基因设计特定的核酸酶对相比,CRISPR/Cas9 系统具有设计简单、操作便利、成本低廉、编辑高效等诸多优点,并且可以在一个细胞中加入多个 sgRNA,实现多靶点编辑,目前已被广泛应用各个领域的基因编辑中,并在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用。Ren 等[12]利用多 sgRNA CRISPR/Cas9 技术同时敲除 *TCR*,β_2 微球蛋白(β_2M)及 *PD-1*,构建了 $TCR^-/\beta_2M^-/PD\text{-}1^-$ UCAR-T 细胞,在避免免疫排斥的同时也解除了 PD-1 的免疫抑制[12]。次年,该课题组另一研究团队利用 CRISPR/Cas9 技术同时敲除了 *TCR* 和 *HLA-I*,成功构建了 $TCR^-/HLA\text{-}I^-/Fas^-$ 的三敲除和 $TCR^-/HLA\text{-}I^-/PD\text{-}1^-/CTLA\text{-}4^-$ 的四敲除 UCAR-T 模型,并且均未观察到 GvHD[13]。北京动物所的研究人员使用 CRISPR/Cas9 的方法对 2 个(*TRAC* 和 β_2M)或者 3 个(*TRAC*, β_2M 和 *PD-1*)基因进行编辑,制备相应的 CAR-T 细胞,并且对他们在体内和体外的抗肿瘤作用进行研究。相比较于无基因敲除 CAR-T 细胞,双敲除 DKO(double-knockout, *TRAC*, β_2M)和三敲除 TKO(triple-knockout, *TRAC*, β_2M 和 *PD-1*)CAR-T 细胞可释放更多的 IFN-γ,提示 TCR^- CAR-T 细胞具有更高的细胞毒性,而体内体外实验也表明 DKO T 细胞有较好的抗肿瘤功能。

对 T 细胞克隆的测序显示，*TRAC*（29/34，85%）和 β_2M（31/31，100%）被高效敲除，但 PD-1 PCR 产物中只有 64.7% 的克隆是突变体。这意味着基于负选择的富集方法无法很好地富集具有*PD-1*突变的 T 细胞，因为 *PD-1* 表达在 T 细胞扩增过程中被下调[14]。这项研究结果表明，CRISPR/Cas9 介导的多基因编辑技术可用于 CAR-T 细胞，但是还要进一步的安全性和有效性评价。除敲除 *TCR*，*HLA-I* 及 *PD-1* 等相关 T 细胞受体和抑制性基因外，Eyquem 等[15]使用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除 *TRAC* 的 CD19 特异性 CAR-T 细胞，不仅能在人类外周血 T 细胞中维持 *CAR* 基因的稳定表达，而且在 ALL 小鼠模型中，与无基因敲除 CAR-T 细胞相比，能提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤潜能。他们进一步的研究证实了将 CAR 结构靶向 *TRAC* 基因座能使 CAR 在 T 细胞中更均匀地表达，从而高效且精确地靶向基因，并且能延迟效应 T 细胞分化和功能耗竭。综上所述，基于 CRISPR/Cas9 技术制备的 UCAR-T 细胞，不仅能避免免疫排斥，还能进一步解除 CAR-T 细胞的免疫抑制，延长 CAR-T 细胞的寿命，增强 CAR-T 细胞的功能。目前关于 CRISPR/Cas9 应用于 UCAR-T 细胞的制备的研究还相对较少，随着研究的深入，CRISPR/Cas9 技术有望解决更多 UCAR-T 细胞和 CAR-T 细胞应用中存在的问题。

由上述研究结果可见，基于 ZFNs，TALENs 及 CRISPR/Cas9 制备的 UCAR-T 细胞在动物实验中均可达到不引起 GvHD 等免疫排异反应的效果，并能维持 *CAR* 基因的稳定表达，获得与传统 CAR-T 细胞一致甚至更强的疗效。从研究数量来看，CRISPR/Cas9 由于设计简单、实施便利、成本低廉等优势，研究成果相对较多，而 ZFNs 和 TALENs 设计困难且制备周期较长，掌握相应技术的团队少，所以研究成果也比较少。总体来说，UCAR-T 技术的相关研究还处于起步阶段。

2 专利

截至 2020 年 2 月，在国家知识产权局官网上，以“通用型 CAR-T”及“Universal CAR-T”为关键词进行专利搜索。经过筛选，共得到通用型 CAR-T 相关专利 24 个，其中与通用型 CAR-T 制备相关的专利 19 个，如表 1 所示。

表 1 制备相关的国内通用型 CAR-T 专利

专利申请号	编辑基因	编辑技术	专利状态
CN201610892498.6	*TCRα*，*TCRβ* 恒定区	CRISPR/Cas9	授权
CN201680031535.2	*CTLA4*，*PD1*，*TCRA*，*TCRB* 和/或 β_2M 基因	CRISPR/Cas9	审中
CN201710797482.1	*TCR*/*HLA-I* 类分子的 α3 区域	CRISPR/Cas9	审中
CN201710797952.4	*HLA-A* 和/或 *HLA-B*，β_2M	CRISPR/Cas9	审中
CN201710983276.X	*B2M*/*HLA-A*/*CIITA*/*TRAC*	ZFNs，TALENs，CRISPR/Cas9	审中
CN201711065301.2	*TCRα*，*TCRβ1*，$TCR\beta_2$ 和/或 β_2M	CRISPR/Cas9	审中
CN201711082910.9	*TCRα*，*TCRβ*，*dCK*	CRISPR/Cas9	授权
CN201711082916.6	*TCRα*，*TCRβ*，*CD52*	CRISPR/Cas9	授权
CN201810636386.3	敲除 *CD3δ*，*CD3γ*，*CD3ε*，*CD3ζ*；引入 *HSVTK*	ZFNs，TALENs，CRISPR/Cas9	审中
CN201811095703.1	*TCR* 和/或 β_2M 和/或 *PD-1* 蛋白	CRISPR/Cas9	审中
CN201811230858.1	*TCR* 和/或 β_2M；表达 NK 细胞抑制性受体 CD94/NKG2A	CRISPR/Cas9	审中
CN201811602586.3	*PD-1*/β_2M/*TCRα*	CRISPR/Cas9 + AAV	审中
CN201811633907.6	*PD1*/*TCR*/*MHC* Ⅰ/β_2M	CRISPR/Cas9	授权
CN201811634010.5	*TRAC* 或 *TRBC*/β_2M/*PD1*	ZFNs，TALENs，CRISPR/Cas9	审中
CN201811640507.8		ZFNs，TALENs，CRISPR/Cas9	审中
CN201910075912.8	*TRAC* 和 β_2M（双敲除）	BE-Plus，CRISPR/Cas9，ZFNs，TALENs	审中
CN201910116197.8	*TCR*	CRISPR/Cas9 + AAV	审中
CN201910116481.5	*TCR* 恒定区	CRISPR/Cas9 + AAV	审中
CN201910654018.6	*TCR*	CRISPR	审中

通过表 1 可以看出，国内 UCAR-T 专利的特点如下。

2.1 出现时间比较晚、申请量较少、专利类型相对单一

国内与 UCAR-T 相关的专利最早是 2016 年申请的，CAR-T 相关专利最早出现在 2013 年。图 1 展示了 2016—2019 年 UCAR-T 与 CAR-T 专利数量的对比。

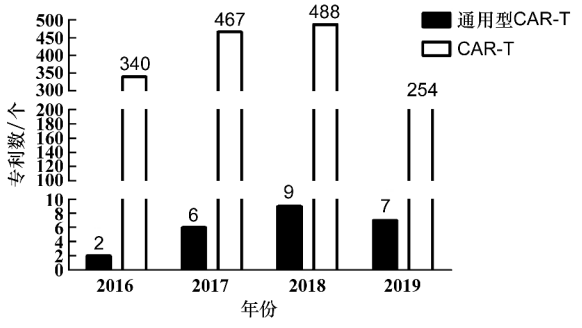


图 1 UCAR-T 与 CAR-T 专利数量对比

由图 1 可见,在专利增长量方面,UCAR-T 专利每年新增的专利申请量 <10,CAR-T 专利每年新增的专利申请量 >200;在专利增长趋势方面两者相似,2016—2018 年专利申请量呈现逐年上升的趋势,而 2019 年申请量均较 2018 年出现了下降;在专利总数方面,截至 2020 年 2 月,UCAR-T 相关专利共计 25 项,而 CAR-T 相关专利共计 1 733 项;在有效专利方面,UCAR-T 相关专利中授权的专利 4 项,占总申请量的 16%,CAR-T 相关专利中授权的专利 221 项,占总申请量的 12.75%;在专利类型方面,UCAR-T 相关专利均为发明专利,主要集中在 UCAR-T 细胞制备方法上;CAR-T 发明专利除 CAR-T 细胞制备方法外,还包括 CAR-T 细胞纯化、修饰、结构优化、原料选择等,还有较多的实用新型专利(27 项),包括 CAR-T 检测试剂盒、CAR-T 培养装置、CAR-T 细胞回输装置等。

2.2 基因编辑技术以 CRISPR/Cas9 为主

在表 1 所列的 19 项通用型 CAR-T 制备专利中,有 18 项专利使用了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,占 94.74%。在权利要求书中声明可使用多种基因编辑技术的专利中,仅 CN201910075912.8 优选方案为 BE-Plus,CN201710983276.X,CN201810636386.3,CN201811634010.5,CN201910075912.8 的优选方案均为 CRISPR/Cas9。在声称可以使用 ZFNs 和 TALENs 技术的专利中,申请人并没有给出相应的实施方案,甚至没有给出针对相应目的基因设计的核酸酶对信息,所以可以认为申请人仅完成了基于 CRISPR/Cas9 的 UCAR-T 细胞制备。

2.3 编辑位点相对单一,没有体现出 CRISPR/Cas9 技术的优势

CRISPR/Cas9 作为目前应用最广泛的基因编辑技术,具有基因敲除及修复、基因表达调控、外源基因定点插入等多种用途,尤其是能在一个 CRISPR/Cas9 中引入多个 sgRNA,能实现高通量基因编辑。目前对该技术在 UCAR-T 细胞制备中的作用挖掘不足,仍以去除 T 细胞活化信号受体编码基因及抑制性基因为主,甚至有些专利仅敲除 *TCR* 基因,这类 UCAR-T 细胞虽能达到避免 GvHD 的作用,但没有考虑 HvGR,不仅没有发挥 CRISPR/Cas9 技术的优势,制备的 UCAR-T 细胞在功能和安全性也不如自体 CAR-T 细胞。在编辑位点选择方面,表 1 中有这么几个值得注意的专利:贺小宏等[16]敲除 *TCRα* 和 *TCRβ* 的同时,沉默了 *CD52* 基因,这与 Cellectis 公司思路类似,但使用了 CRISPR/Cas9 技术;杨春晖等[17]在敲除 *TCR* 和 β_2M 的基础上,在 UCAR-T 细胞表面过表达 *CD94/NKG2A*。*CD94/NKG2A* 是 NK 细胞抑制性受体,可减少机体内 NK 细胞对输注的 UCAR-T 细胞的攻击,提高 UCAR-T 细胞的存活能力;杨选明等[18]在敲除 *CD3δ*,*CD3γ*,*CD3ε*,*CD3ζ* 的基础上,引入 *HSVTK* 基因,使用更昔洛韦调控 UCAR-T 的存活。在 UCAR-T 引起不良反应的情况下,迅速从体内清除 UCAR-T,提高 UCAR-T 使用的安全性。这都是对 CRISPR/Cas9 技术在 UCAR-T 细胞制备中作用的有益尝试。

3 临床试验

临床上报道的第 1 例 UCAR-T 细胞的应用是由法国生物制药公司 Cellectis 在 2015 年开展的 UCAR-T 治疗,1 例 1 岁急性淋巴性白血病(ALL)患儿在化疗后无法获得足够自体 T 细胞进行自体 CAR-T 细胞制备,接受了基于 TALENs 技术敲除 *TCRα* 的抗 CD19 UCAR-T 细胞治疗,未出现 GvHD,并获得了分子生物学缓解(molecular remission)[19]。2017 年,该团队利用 TALENs 技术构建了 $TCR\alpha^-/CD52^-$ UCART19 细胞,并输注给 2 例患有难治复发性 $CD19^+$ B-ALL 的婴儿,2 例患儿均在 28 d 内达到分子生物学缓解,并且在 UCART19 细胞治疗期间持续保持缓解状态,从而使这 2 例患者成功地接受了造血干细胞移植[20]。这些成功的临床案例标志着 UCAR-T 技术从实验室研究阶段向临床应用阶段的过渡。截至 2020 年 2 月,已有 13 项 UCAR-T 治疗临床试验获 FDA 批准(https://clinicaltrials.gov),3 项临床试验在中国临床试验注册中心(http://www.chictr.org.cn)公布,如表 2 所示。

表 2 UCAR-T 细胞治疗的临床试验

临床注册号	靶点	编辑技术	适应证	研究单位
NCT02735083	CD19	TALEN	晚期淋巴恶性肿瘤	施维雅国际研究所
NCT03166878	CD19	CRISPR/Cas9	B 细胞白血病；B 细胞淋巴瘤	解放军 301 医院
NCT02808442	CD19	TALEN	难治性 B 细胞急性淋巴细胞白血病;复发性 B 细胞急性淋巴细胞白血病	施维雅国际研究所
NCT02746952	CD19	TALEN	B 细胞急性淋巴细胞白血病	施维雅国际研究所
NCT03203369	CD123	TALEN	树突状细胞瘤(BPDCN)	Cellectis S. A.
NCT03190278	CD123	TALEN	复发/难治性急性髓细胞样白血病	Cellectis S. A.
NCT03229876	CD19	CRISPR/Cas9	急性淋巴细胞白血病(ALL);非霍奇金淋巴瘤(NHL)	上海邦耀生物
NCT03298828	CD19		急性淋巴细胞白血病；伯基特淋巴瘤	第三军医大学
NCT04142619	CS1	TALEN	复发/难治性多发性骨髓瘤	Cellectis S. A.
NCT04150497	CD22	TALEN	B 细胞急性淋巴细胞白血病	Cellectis S. A.
NCT04106076	CD123	TALEN	复发/难治性急性髓细胞样白血病	Cellectis S. A.
NCT03752541	BCMA		多发性骨髓瘤	上海邦耀生物
NCT04026100	CD19		弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	南京医科大学第一附属医院
ChiCTR1900025311	CD7		难治复发 CD7 阳性 T/NK 细胞血液肿瘤	陆军军医大学第二附属医院
ChiCTR1900027269	CD19		复发难治性 B 细胞淋巴肿瘤	陆军军医大学第二附属医院
ChiCTR1900023500	CD19		复发难治性 B 细胞急性白血病/侵袭性淋巴瘤	广东省第二人民医院

由表 2 可见,在 UCAR-T 细胞疗法临床应用上,Cellectis 公司是目前全球进展最快的公司。Cellectis 公司基于 TALENs 基因编辑技术研发的 UCAR-T 产品包括 4 个靶点,分别为 CD19,CD123,CD22 及 CS1,用于 ALL、多发性骨髓瘤(MM)、急性骨髓性白血病(AML)以及母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤(BPDCN),其最成熟的 UCART19 细胞已进入商业化阶段。基于 CRISPR/Cas9 技术构建的 UCAR-T 细胞目前仅有 2 项批准的临床试验,而没有已注册的 UCAR-T 细胞疗法临床试验采用 ZFNs 技术。此外,尚有 6 项临床试验没有公布所使用的基因编辑技术。

1 例 78 岁男性急性浆细胞样树突状细胞瘤患者在接受了 Cellectis 公司的 UCART123 细胞治疗后出现死亡,导致该细胞临床试验于 2017 年 9 月 4 日被 FDA 叫停。2017 年 11 月,Cellectis 公司宣布对 UCART123 细胞Ⅰ期临床试验方案进行调整,使该细胞临床试验得以继续进行。目前基于基因编辑技术修饰的 UCAR-T 细胞的疗法尚有许多问题亟待解决。

4 面临问题

上文提到,UCAR-T 细胞应用于细胞治疗还存在许多问题,这些问题主要来自基因编辑技术及 CAR-T 技术两方面。

4.1 基因编辑技术

ZFNs,TALENs 和 CRISPR/Cas9 的作用机制各不相同,在临床治疗的应用中也各有利弊,3 项技术的详细比较见表 3。

表 3 3 种基因编辑技术比较

项目	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
识别模式	蛋白-DNA 相互作用	蛋白-DNA 相互作用	RNA-DNA
识别序列及特点	锌指(ZF)结构域,以 3 bp 为单位	双氨基酸残基 RVD 重复单元,5' 前一位为 T	向导 RNA(sgRNA),3' 端序列为 NGG
识别长度	(3 – 6)x3x2 bp	(12 – 20)x2 bp	20 bp + NGG
目标区域选择	有限	有限	多
特异性	较高	一般	一般
脱靶概率	低	低	较高
细胞毒性	大	较小	较小
成本	高	中	低
代表公司(UCAR-T)	Sangamo	Cellectis	Novartis,Intellia Therapeutics,Juno Therapeutics

ZFNs 技术是最早被广泛使用的基因组定点修饰技术,有较多可以直接使用的资源。ZFNs 的特异性取决于锌指蛋白(ZFN),且需要锌指蛋白库才能获得需要的靶向不同基因的序列,筛选高质量的锌

指蛋白是获得高效、特异性 ZFN 的前提,因此对锌指蛋白库的容量要求很高,并且筛选锌指蛋白的工作量巨大。目前尚不能针对任意一段序列均可设计出满足要求的 ZFN,也不能在每一个功能性染色体区段都能够顺利找到适合的 ZFN 作用位点[21]。除了筛选设计方面存在较大的技术困难之外,其制备价格也比较昂贵。此外,ZFN 的脱靶切割也往往导致细胞毒性。故而 ZFNs 技术在基因治疗领域的应用有一定的局限性[22]。已申请的专利和已注册的临床试验中,没有使用 ZFNs 技术制备 UCAR-T 细胞的案例。2018 年 2 月,Gilead/Kite 与 ZFNs 技术巨头 Sangamo Therapeutics 公司共同宣布,2 家公司已经达成全球合作,前者将使用后者的 ZFNs 技术平台开发下一代治疗不同肿瘤的自体和异体细胞疗法。目前该项合作还没有在 UCAR-T 细胞制备领域发布成果。

相较于 ZFNs 技术,TALENs 技术特异性和编辑效率都得到了提高,脱靶率和成本降低,且 TALENs 的设计比较容易,理论上对任意的 DNA 序列理论上都可以设计和构建一个特异性的 TALE 模块[23]。TALENs 技术存在的主要问题是单个的 TALEN 模块进行组装周期较长,虽然组装 TALEN 模块可以交给相关公司进行,能减少构建 TALEN 元件的时间,但是大多数实验室都较难自行完成 TALENs 技术的一系列操作,并且在实验时也有一定的细胞毒性,会影响其效率。

CRISPR/Cas9 技术在 CAR-T 细胞的基因修饰方面应用前景广泛,但存在 2 个问题[24]:一是靶向传送系统的选择问题,运输效率和安全性是使用该技术时首先需要考虑的。目前主要通过病毒转染、电穿孔等方法将 CRISPR/Cas9 系统转到细胞内。腺相关病毒 AAV 是目前 CRISPR 技术使用最佳病毒载体,但 AAV 所能装载的序列长度有限。慢病毒转染时会插入到宿主基因组中,在体内常被间质细胞吸收,不适合用于临床。电穿孔、阳离子脂质体、纳米粒等毒性低且无容量限制,但效率较病毒转染低,一般结合病毒转染提高效率和安全性。二是 CRISPR 编辑系统普遍存在的脱靶现象,由于 sgRNA 与 DNA 序列结合允许出现错配,导致 CRISPR/Cas9 系统切割靶向序列以外的 DNA 序列,产生靶点外的有害突变(unwanted mutation)[25]。一旦发生脱靶,将导致非靶标基因的改变或调控元件的破坏,会造成不可逆转的后果。所以 CRISPR/Cas9 技术应用于临床前,必须就其安全性进行慎重考虑。

综上所述,基因编辑技术本身的安全性问题是限制其用于临床治疗的最重要原因,需要在未来的研究中,不断提高 ZFNs,TALENs 及 CRISPR/Cas9 技术的编辑精确度,降低其脱靶效应,研究高效导入的方法,将让基因编辑技术更好地应用于包括 UCAR-T 细胞的制备在内的基因治疗中。

4.2 CAR-T 技术

CAR-T 细胞治疗目前也存在许多毒副反应,主要包括细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、肿瘤溶解综合征(tumorlysis syndrome, TLS)、神经毒性等。CRS 是由于 CAR-T 输入体内后,scFv 的特异性抗体识别并结合肿瘤抗原,激活 T 细胞,导致大量炎性因子释放,同时招募和激活体内其他炎性因子,引发全身炎症反应综合征,是 CAR-T 细胞回输后最常见的不良反应,严重的 CRS 可导致患者死亡。TLS 是肿瘤细胞短期内大量溶解,释放细胞内代谢产物,引起以高尿酸血症、高钾血症、高血磷、低血钙和急性肾衰竭为主要表现的一组临床综合征,主要发生于血液系统肿瘤,以淋系最为多见,如 ALL 等。目前 CAR-T 细胞治疗主要用于血液系统肿瘤,因此会观察到较多的 TLS。CAR-T 细胞回输后神经毒素主要包括意识混乱、失语症、反应迟钝、肌肉痉挛、癫痫等,严重的可引起脑水肿,导致患者死亡。

CAR-T 细胞也存在着脱靶效应、*CAR* 基因运载系统安全性及有效性和插入突变等基因工程改造产品常见的问题。CAR 定向的靶抗原常常在正常组织中有不同程度的表达,导致 CAR-T 细胞攻击正常组织[26];CAR-T 细胞制备目前使用最多的是病毒运载系统,病毒载体的安全性有待进一步提高;插入突变则是由于 T 细胞的治疗基因的非定点整合导致,这会致使 CAR-T 细胞存在一定的致癌风险。

目前对 CAR-T 的不良反应的应对措施主要包括在 1 个 T 细胞中表达 2 个 *CAR* 基因的双靶向组合抗原等 CAR 结构优化和在 CAR-T 中加入“自杀基因”或“分子开关”来实现细胞的可控凋亡等 *CAR* 基因修饰。CAR-T 技术的改进对 UCAR-T 技术有着立竿见影的提升效果。

4.3 其他方面

基因组编辑后 T 细胞的扩增能力降低。有研究表明,经基因组编辑操作后,T 细胞的扩增能力大概下降为未经编辑 T 细胞的 1/3[12],而 T 细胞的扩增能力对于后续的治疗以及整个疗法的成本至关重要。

制备工艺有待完善。虽然 Cellectis 公司已经宣布完成了 UCAR-T 制备全流程 GMP 化生产，但整个生产流程长达 17 d，高于自体 CAR-T 的制备时间，这违背了 UCAR-T 设计的初衷，也给流程控制等带来了挑战[27]。

5 展望

截至目前，CAR-T 细胞已发展到了第四代。前三代 CAR-T 都是通过优化 CAR 结构来增强 CAR-T 细胞增殖能力和抗肿瘤活性，第四代 CAR 则在第三代的基础上利用基因修饰技术，将额外的分子原件插入 CAR 中以表达功能性转基因蛋白，如白介素基因的功能原件、调控基因、自杀基因等，在增强杀伤力的同时，提高了 CAR-T 疗法的可控性及安全性。

通用型 CAR-T 有望成为下一代 CAR-T 技术，它包括通用 CAR 及通用 T 细胞两类。通用 CAR 使用“第三方”中间系统，拆分抗原靶向结构域和 T 细胞信号单位，以赋予 CAR-T 细胞识别多种抗原的能力；通用 T 细胞则是从同种异体健康受体产生肿瘤抗原特异性 T 细胞，通过基因编辑的方法破坏 T 细胞的 *TCR* 基因和 *HLA* Ⅰ类基因，消除受体免疫排异反应。

UCAR-T 细胞属于通用型 CAR-T 中的通用 T 细胞，它将 ZFNs，TALENs 及 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术与 CAR-T 技术结合，一方面解决了自体 CAR-T 细胞 T 细胞来源困难、制备周期长、成本高等不足，另一方面能抵制 T 细胞耗竭、降低 CAR-T 细胞脱靶毒性，提高 CAR-T 细胞的功能。尽管仍需进行大量研究和优化，但动物实验及早期临床试验的结果已经证明了 UCAR-T 细胞治疗相对于自体 CAR-T 治疗有着明显优势，同时也对安全性和特异性提出了更高的要求。从目前已公布的研究结果、已公开的专利申请和已注册的临床试验情况看，基因编辑技术还有许多优势没有在 UCAR-T 细胞中得到发挥，UCAR-T 技术的研究才刚刚起步，还有极大的发展空间。UCAR-T 是免疫治疗技术发展的必然趋势，随着对免疫系统作用机制理解的深入、基因编辑技术的进步、CAR-T 结构的进一步优化和 UCAR-T 基础研究的增加，该项技术将成为肿瘤免疫治疗的有力武器，为患者提供更为安全、高效、低成本的肿瘤治疗方案，为血液肿瘤乃至实体瘤患者带来福音。

[参 考 文 献]

[1] GAUTHIER J, YAKOUB-AGHA I. Chimeric antigen-receptor T-cell therapy for hematological malignancies and solid tumors: Clinical data to date, current limitations and perspectives[J]. *Curr Res Transl Med*, 2017, 65(3): 93 - 102.

[2] 杜璇. CAR-T 疗法的研发现状与展望[J]. 中国医药工业杂志, 2019,50(12): 1524 - 1529.

[3] RUELLA M, XU J, BARRETT DM, *et al*. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell[J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1499 - 1503.

[4] SCHUSTER SJ, SVOBODA J, CHONG EA, *et al*. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2545 - 2554.

[5] MAUDE SL, LAETSCH TW, BUECHNER J, *et al*. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 439 - 448.

[6] YIP A, WEBSTER RM. The market for chimeric antigen receptor T cell therapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(3): 161 - 162.

[7] DOYON Y, VO TD, MENDEL MC, *et al*. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures[J]. *Nat Methods*, 2011, 8(1): 74 - 79.

[8] TORIKAI H, REIK A, LIU PQ, *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 - 5705.

[9] 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 - 1349.

[10] HOCKEMEYER D, WANG HY, KIANI S, *et al*. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731 - 734.

[11] POIROT L, PHILIP B, SCHIFFER-MANNIOUI 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 - 3864.

[12] 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 - 2266.

[13] REN JT, ZHANG XH, LIU XJ, *et al*. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17002 - 17011.

[14] LIU XJ, ZHANG YP, CHENG C, *et al*. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells[J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 154 - 157.

[15] 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 - 117.

[16] 贺小宏, 王延宾, 袁鹏. 具有抗体药物抗性的通用型 CART/u002FTCRT 细胞及其构建方法: CN,107828730A[P]. 2018 - 03 - 23.

[17] 曹卫, 刘丽萍, 蔡松柏. 通用型嵌合抗原受体 T 细胞制备技术: CN,109694854A[P]. 2019 - 03 - 12.

[18] 杨选明, 傅阳心, 汪鑫, 等. 一种通用型 CAR-T 细胞及其制备方法和应用: CN,110616188A[P]. 2019 - 12 - 27.

[19] QASIM W, AMROLIA PJ, SAMARASINGHE S, *et al*. First clinical application of talen engineered universal CAR19 T cells in B-ALL[J]. *Blood*, 2015, 126(23): 2046.

[20] 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.

[21] KIM JS. Genome editing comes of age[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1573 - 1578.

[22] HATADA I, HORII T. Genome editing: a breakthrough in life science and medicine[J]. *Endocr J*, 2016, 63(2): 105 - 110.

[23] RAMANI V, SHENDURE J, DUAN ZJ. Understanding spatial genome organization: methods and insights[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(1): 7 - 20.

[24] CORRALES L, GAJEWSKI TF. Molecular pathways: targeting the *Stimulator* of interferon genes (STING) in the immunotherapy of cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(21): 4774 - 4779.

[25] DOENCH JG, FUSI N, SULLENDER M, *et al*. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9[J]. *Nat Biotechnol*,2016,34(2): 184 - 191.

[26] 谭灏,李祥,康永,等. 嵌合抗原受体 T 细胞在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. 癌症进展,2019,17(4): 384 - 386,455.

[27] 王征旭. 基因修饰 T 细胞技术进展及临床应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2019.

编辑：杨青/接受日期：2020 - 12 - 01