



非病毒定点整合CAR-T技术的开发及其在复发难治性非霍奇金B细胞淋巴瘤临床治疗中的应用

魏妍妍, 江文正*

华东师范大学生命科学学院, 上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241

* 联系人, E-mail: wzjiang@bio.ecnu.edu.cn

Development of non-viral site-specific integrated CAR-T technology and its application in clinical treatment of relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma

Yanyan Wei & Wenzheng Jiang*

Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

* Corresponding author, E-mail: wzjiang@bio.ecnu.edu.cn

doi: 10.1360/TB-2022-1080

淋巴瘤是起源于淋巴组织的恶性肿瘤, 主要可分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma, HL)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)两大类。NHL更为多见, 是一种原发于淋巴组织高发率和高致死率的血液系统恶性肿瘤, 占所有淋巴瘤80%~90%。患者可见于各年龄, 随着年龄增长, 发病率也逐渐增加(中位年龄, 50岁)^[1]。NHL死亡率较高, GLOBOCAN 2020数据显示, 2020年全球NHL死亡259793例, 居全球恶性肿瘤死亡的第12位。2020年中国NHL死亡54351例, 其中男性29721例, 女性24630例^[2]。针对NHL的治疗方法层出不穷, 如常规化疗或抗体药物耦联物(antibody-drug conjugate, ADC)等。但是对复发难治性非霍奇金B细胞淋巴瘤(relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma, r/r B-NHL)的治疗效果依然有限^[3]。弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是最常见的NHL, 发病率占NHL的31%~40%。50%的DLBCL患者难以治愈或在治疗后复发^[4]。DLBCL传统治疗方案总缓解率(overall response rate, ORR)仅为20%~30%, 完全缓解率(complete response, CR)不到15%, 中位总生存期(median overall survival, mOS)仅5.9~6.3个月^[4,5]。大部分r/r B-NHL患者无法从传统治疗方案中获得有效的缓解, 最终因疾病进展而死亡。

近年来, 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)T细胞疗法因其强大的抗肿瘤能力, 被广泛应用于各种恶性肿瘤的临床治疗。CAR-T细胞疗法是将T细胞进行基因工程改造, 使其表达CAR, 以增强T细胞对肿瘤抗原的识别和杀死肿

瘤细胞的能力。CAR-T细胞疗法近年来在恶性血液瘤的治疗中取得了重大突破。靶向CD19的CAR-T细胞治疗在DLBCL中的完全缓解率可达50%^[1,6]。但是, 现有CAR-T技术依然面临一些问题。例如, 使用传统慢病毒方法进行CAR-T细胞的制备, 由于病毒较高的生产成本, 且工艺复杂、制备时间长, 使得CAR-T产品的生产成本过高^[7]。比如, 目前食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市的慢病毒制备的CAR-T产品定价都在40万美元左右, 国内获批的CAR-T产品定价也都在120万人民币左右。另外, 由于病毒通过随机整合的方式将CAR序列插入到T细胞基因组中, 可能干扰正常基因的表达, 增加了潜在的致癌风险, 也降低了CAR-T产品的均一性^[8,9]。虽然近年来开发了转座子系统^[10-13]以及mRNA转导^[14-16]等不依赖病毒的CAR-T制备技术, 但是仍然存在随机整合、表达时间短等问题。针对这些问题, 近期华东师范大学研究人员利用CRISPR/Cas9基因编辑工具开发了全新的非病毒定点整合CAR-T技术, 有效解决了目前CAR-T技术存在的使用病毒和随机插入这两大问题。进一步地, 在与浙江大学医学院附属第一医院合作开展的临床试验中, 研究人员观察到非病毒定点整合CAR-T细胞在r/r B-NHL临床治疗中具有出色的安全性和有效性, 该研究成果发表于Nature杂志^[17]。

研究人员首先对技术方法进行了摸索和优化。由于需要使用电穿孔将基因编辑工具导入细胞, 而电穿孔本身对细胞会造成较大的损伤, 因此确定有效的制备方法来获得高阳性

率、高存活率的CAR-T细胞显得尤为重要。通过载体类型、模板设计、细胞状态等方面的条件摸索和参数优化,研究者最终确定使用同源臂长度为800 bp的线性双链DNA作为模板,通过同源介导修复(homology directed repair, HDR)方式进行CAR序列的整合为最佳制备方法(图1(a))。在此基础上,通过将包含4-1BB和CD3 ζ 靶向CD19的CAR基因序列定点整合到T细胞AAVS1位点(AAVS1-19bbz),并与传统慢病毒感染的

CAR-T细胞(LV-19bbz)比较,研究人员首先证明了非病毒定点整合技术方法的可行性。进一步,研究者将靶向CD19的CAR序列定点插入到PD1位点,在表达CAR的同时阻断PD1的表达,制备了靶向CD19非病毒PD1定点整合CAR-T细胞(PD1-19bbz),并对PD1-19bbz进行了系统研究(图1(b), (c))。通过一系列的临床前研究,研究人员证明了PD1-19bbz具有强大的肿瘤杀伤能力(图1(d~i))。

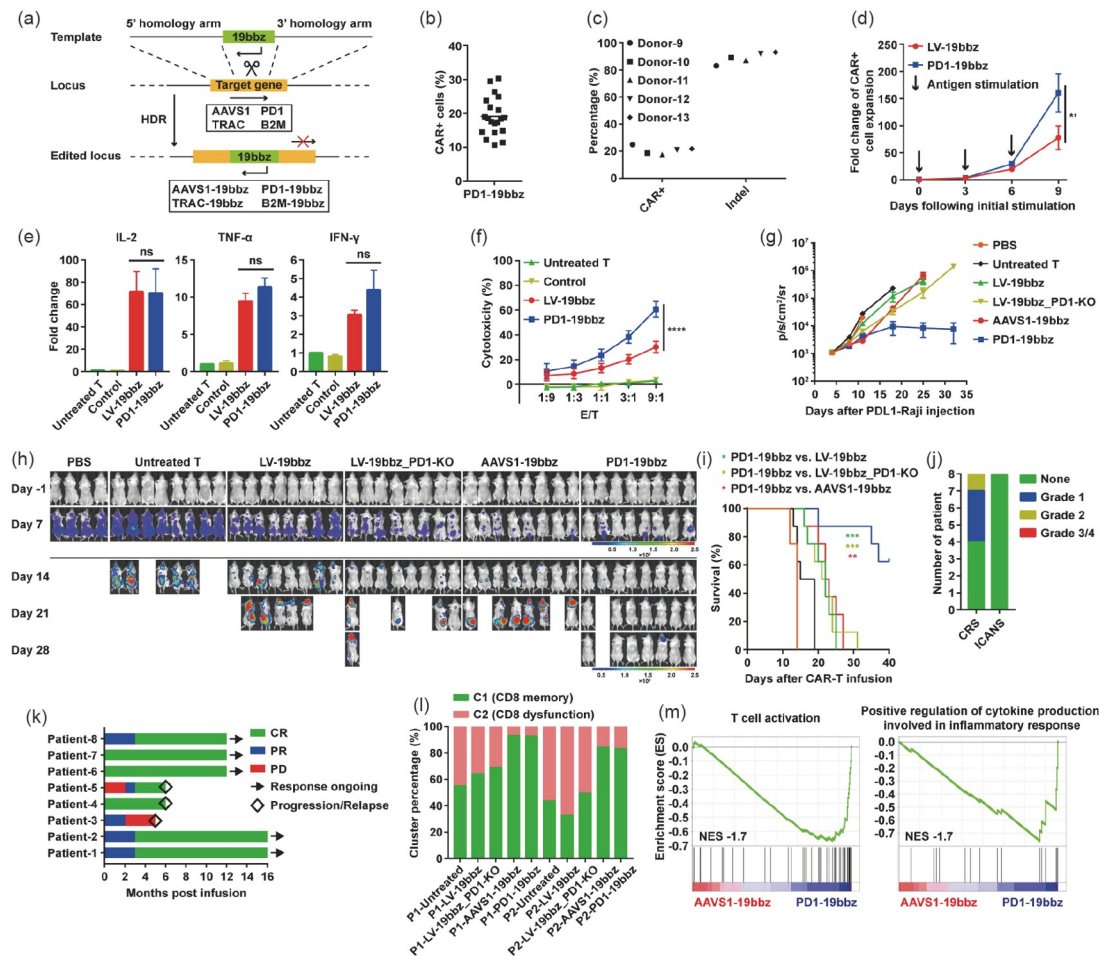


图 1 (网络版彩色)非病毒PD1定点整合CAR-T细胞能有效清除B-NHL肿瘤细胞且无严重毒副作用。(a) 非病毒定点整合CAR-T技术工作原理图。(b, c) 19bbz在PD1位点的整合效率(b)和插入缺失突变百分比(c)。(d) 表达PD-L1的Raji肿瘤靶细胞反复刺激后LV-19bbz和PD1-19bbz扩增能力。(e) PD1-19bbz与表达PD-L1的Raji肿瘤细胞共培养后在上清液中测量细胞因子分泌情况。(f) LDH法检测CAR-T细胞对表达PD-L1的Raji肿瘤细胞的杀伤能力。(g~i) 在表达PD-L1的Raji细胞荷瘤小鼠肿瘤模型中CAR-T细胞抗肿瘤能力。(g) 肿瘤信号。(h) 小鼠活体成像。(i) 小鼠生存曲线。(j) PD1-19bbz临床治疗r/r B-NHL后发生CRS和ICANS的级别和数量。(k) PD1-19bbz临床注射后的治疗反应和反应持续时间。(l) 不同样品中C1和C2的百分比。C1为CD8 $^{+}$ 记忆性细胞群, C2为CD8 $^{+}$ 功能障碍性细胞群。P1和P2分别为患者1和患者2。(m) AAVS1-19bbz和PD1-19bbz中CD8 $^{+}$ T细胞的基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)结果

Figure 1 (Color online) Non-viral PD1-integrated CAR-T cells can effectively eliminate B-NHL tumour cells without serious side effects. (a) Specific integration of the CAR into the target locus. (b, c) 19bbz integration efficiency at PD1 site (b) and indel percentage at PD1 site (c). (d) Expansion of LV-19bbz and PD1-19bbz cells after repeated stimulation with PD-L1-expressing Raji cells. (e) Cytokine secretion measured in the supernatant after PD1-19bbz was co-cultured with PD-L1-expressing Raji cells. (f) *In vitro* cytotoxicity of CAR-T cells against PD-L1 expressing Raji cells by using LDH assay. (g~i) Anti-tumor ability of CAR-T cells in mouse tumor model by using Raji cells expressing PD-L1. (g) Tumor signals. (h) Imaging of the mice. (i) Survival of the mice. (j) Occurrence of CRS and ICANS after treatment. (k) Treatment response and duration of response after infusion. (l) Percentages of cluster 1 (C1) and cluster 2 (C2) in different samples. C1 and C2 were generated by clustering cells on the basis of expression of CD8 $^{+}$ memory and dysfunction/cytotoxicity marker genes, respectively. P1, Patient 1; P2, Patient 2. (m) GSEA of CD8 $^{+}$ T cells comparing AAVS1-19bbz and PD1-19bbz cells. Enriched gene sets in PD1-19bbz cells and the normalized enrichment score (NES) are shown

基于临床前实验数据,研究者开展了PD1-19bbz治疗复发难治性非霍奇金B细胞淋巴瘤的临床试验。结果显示,PD1-19bbz可以在体内有效扩增并持续杀伤肿瘤细胞。在接受治疗的8例患者中,有7/8(87.5%)患者达到了肿瘤完全缓解的效果,其中有5例患者响应时间超过1年,1例(1/8)患者达到部分缓解(partial response, PR)的状态。所有患者均对PD1-19bbz响应,最佳客观缓解率为100%(图1(k))。所有8例患者只发生了轻度细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS),没有观察到免疫效应细胞神经毒性综合征(immune effector cell-related neurotoxicity syndrome, ICANS)(图1(j))。这些结果证明了非病毒定点整合CAR-T细胞在临床治疗中的安全性和有效性。通过单细胞RNA测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)分析,研究人员发现,PD1-19bbz存在更高比例的记忆性T细胞,并且具有更强的抗肿瘤免疫功能(图1(l), (m)),为其临床表现提供了机制解释。

最近的一项研究证明了使用一种非病毒T细胞制备技术可实现几个碱基的突变修复以及TCR-T序列的精确插入,但是阳性率还有待提高^[18]。本研究通过各种条件的摸索,对技术方法进行了进一步优化,实现了更高效率的整合。该技术可以在不使用病毒的情况下,将CAR元件定点插入到PD1位点,一步实现了PD1敲除和CAR稳定整合,并且实现了可满足临床需求的大规模工业化制备。该制备方法具有非病毒和定点整合两大优点,避免了随机插入的致瘤风险,减少了CAR-T细胞的生产成本,简化工艺并节约了生产时间,极大提高了CAR-T产品的均一性。通过临床前实验和临床试验等研究,研究人员显示了PD1-19bbz在B-NHL治疗中具有出色的安全性和有效性,同时也证明了非病毒定点整合CAR-T细胞疗法在临床应用的可行性。这一创新技术为未来更多非病毒基因靶向修饰CAR-T疗法的发展奠定了基础,对细胞免疫治疗领域的发展具有重要的推动作用。

参考文献

- 1 Zhao H, Wang Y, Yin E T S, et al. A giant step forward: Chimeric antigen receptor T-cell therapy for lymphoma. *Front Med*, 2020, 14: 711–725
- 2 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. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209–249
- 3 Papageorgiou S G, Thomopoulos T P, Liaskas A, et al. Monoclonal antibodies in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma: Moving beyond rituximab. *Cancers*, 2022, 14: 1917
- 4 Crump M, Neelapu S S, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: Results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*, 2017, 130: 1800–1808
- 5 Jurczak W, Zinzani P L, Gaidano G, et al. Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 2018, 29: 1266–1272
- 6 Schuster S J, Bishop M R, Tam C S, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2019, 380: 45–56
- 7 Gándara C, Affleck V, Stoll E A. Manufacture of third-generation lentivirus for preclinical use, with process development considerations for translation to good manufacturing practice. *Human Gene Therapy Methods*, 2018, 29: 1–15
- 8 Michieletto D, Lusio M, Marenduzzo D, et al. Physical principles of retroviral integration in the human genome. *Nat Commun*, 2019, 10: 575
- 9 de Sousa Russo-Carbolante E M, Picanço-Castro V, Alves D C C, et al. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in Sk-Hep and 293T cells. *Biotechnol Lett*, 2011, 33: 23–31
- 10 Hurton L V, Singh H, Najjar A M, et al. Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E7788–E7797
- 11 Kebriaei P, Singh H, Huls M H, et al. Phase I trials using Sleeping beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Investigation*, 2016, 126: 3363–3376
- 12 Maiti S N, Huls H, Singh H, et al. Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications. *J Immunother*, 2013, 36: 112–123
- 13 Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia*, 2017, 31: 186–194
- 14 Beatty G L, O'Hara M H, Lacey S F, et al. Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase I trial. *Gastroenterology*, 2018, 155: 29–32
- 15 Foster J B, Choudhary N, Perazzelli J, et al. Purification of mRNA encoding chimeric antigen receptor is critical for generation of a robust T-cell response. *Hum Gene Ther*, 2019, 30: 168–178
- 16 Lin L, Cho S F, Xing L, et al. Preclinical evaluation of CD⁸⁺ anti-BCMA mRNA CAR T cells for treatment of multiple myeloma. *Leukemia*, 2021, 35: 752–763
- 17 Zhang J, Hu Y, Yang J, et al. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL. *Nature*, 2022, 609: 369–374
- 18 Roth T L, Puig-Saus C, Yu R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature*, 2018, 559: 405–409