

将高性能 CRISPR 向导与高灵敏度时间分辨细胞分析相结合

体外分析不仅需要分析细胞毒性，还必须评估持续性和持久性

如何设计出安全且性能比天然免疫细胞更强的基因工程细胞，是免疫细胞疗法面临的巨大挑战。虽然我们尚处于全面实现这一目标的早期阶段，但概念验证已经取得了良好的效果，如率先获批的 CAR T 细胞疗法 Kymriah 和 Yescarta^[1,2]。

CRISPR 基因编辑系统已成为一种非常有效的工具，能够非常轻松地修改活细胞的基因组。然而，要充分发挥其潜力，就需要更高的活性、稳定性和特异性，以更小的细胞核足迹实现高保真度编辑。此外，需要使用活细胞分析工具找到更有效的编辑方案，活细胞分析工具可以提供功能相关性分析，以及效价和持久性评估。能够实现定量分析并报告实时动力学的活细胞分析可以满足这些要求。根据免疫疗法的大量早期研究，人们充分认识到只分析细胞毒性远远不够。在肿瘤消除和监视的整个过程中，基因工程细胞必须能够在免疫抑制且不断变化的不良肿瘤微环境中持续存活，以实现持久的效果^[3]。

为了解决这些问题，安捷伦推出了一整套可以提高 CRISPR 编辑效率和准确性的创新解决方案。这些解决方案还可与评估和验证编辑结果的活细胞分析平台相结合，后者能够提供相关的时间分辨功能数据。

尽管 CRISPR 基因编辑技术的前景一片光明，但目前仍然存在许多挑战，因此无法广泛应用于治疗领域，它还需要具备更好的效率、特异性和可调性来适应不同的情况。可以使用酶将 DNA 模板转录为 RNA，从而制造出能够靶向特定基因组位点的向导 RNA。然而，Agilent SureGuide RNA（安捷伦科技公司）采用的直接化学合成向导 RNA 技术具有更明显的优势^[4]。化学合成为高纯度 sgRNA 的可扩展性生产提供了一种稳定可靠的方法，为 sgRNA 设计和准确修改分子功能提供了独特的机会，以提高 CRISPR-Cas 的性能，推进其在研究、工业和治疗领域的应用。如图 1 所示，在向导 RNA 末端附近添加化学修饰可以提高向导 RNA 的稳定性和活性^[5]。在最近开展的一项研究中，在向导 RNA 的 DNA 识别序列的特定位点添加化学修饰，然后系统地评估其在靶和脱靶活性，结果显示 CRISPR 的特异性得到提高^[6]。这种新方法在保持高在靶性能的同时，显著减少了脱靶裂解活性（图 2）。



David Ferrick
高级总监
安捷伦科技公司
美国

一旦您完成了对细胞的编辑，您将如何评估和验证期望的和期望的功能性变化？随着定量、时间分辨细胞分析平台的出现，研究人员可以更灵敏地测量活细胞功能，并同步扫描不断发展的免疫反应在有效性和持久性方面的时间相关变化。例如，我们现在可以在一次实验中，同时检测极低的效靶比下基因编辑的杀伤效率和连续杀伤活性。然后可将这些结果与抑制作用联系起来，例如衰竭、无反应性，以及与不断发展的肿瘤及其微环境相互作用而出现的其他逃逸机制。

最近使用 xCELLigence 系统（艾森生物现已加入安捷伦）发表的一篇研究，充分展示了将高灵敏度功能分析和时间分辨相结合的价值。这项研究开发了一种 CAR T 细胞策略来解决癌细胞群中抗原表达的异质性问题^[7]。过继性细胞疗法 (adoptive cell therapy, ACT) 中一个常见现象是，表达了目标抗原的癌细胞被杀死，而未表达抗原的细胞将继续不受阻碍地增殖。为了尽可能减少这种现象，作者同时靶向两种肿瘤细胞抗原，并使用 xCELLigence 来评估其功能和持久性。图 3a 所示的结果使作者能够选择更理想的基因工程构造子，依据在非常低的效靶比下，对多种共刺激结构域和一个恒定抗原结合域的组合的杀伤效果进行的高灵敏度定量分析 (N. Ahmed, 结果未发表)。同时，他们还得采用时间分辨分析识别潜在的逃逸表型。图 3b 展示了不同情况下获得的主要结果，其中靶向 HER2 和 IL13Ra2 抗原的 CAR 在不同的 T 细胞中得到表达 (CARpool)；在同一 T 细胞中表达为不同的蛋白 (biCAR)；或在 T 细胞中表达为单个融合蛋白 (TanCAR)。当与胶质母细胞瘤靶细胞孵育时，这些 CAR T 方法均表现出不同的杀伤力和动力学。通过连续监测阻抗，很容易监测到在连续杀伤过程中出现的这些细微差别，但使用传统的终点分析方法时无法检测到这些变化。

安捷伦 Seahorse XF 分析仪（安捷伦科技公司）同样是一个能够提供丰富的功能数据的高灵敏度时间分辨分析平台。Carl June 团队发表的一项关键研究展示了不同的 CAR T 基因工程构造子是如何通过驱动不同的代谢程序，对细胞命运和功能产生显著不同的影响^[8]。它揭示了如何优化基因工程构造子的肿瘤消除活性，以及提高其在微环境中的持续性和持久性。图 4

简要总结了他们的研究结果，揭示了含有共受体信号转导结构域 4-1BB 的 CAR T 细胞是如何诱导与形成中枢记忆以及增强持久性相一致的有氧呼吸。相反，对 CD28 共受体信号转导结构域进行修改可将代谢重编程为有氧糖酵解，从而增强效应记忆细胞这一细胞命运。这项研究有力地证明了改造代谢特征的可行性，即建立效应细胞和记忆细胞的适当平衡，以解决在不良肿瘤微环境中免疫细胞的衰竭和持久性问题，从而为实现持久记忆和免疫监视奠定坚实基础。

参考文献

1. FDA (2017) *FDA approval brings first gene therapy to the United States*, [News Release], 30 August 30
2. FDA (2017) *FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma*, [News Release], 18 October
3. M.A. Morgan et al. *Engineering CAR-T Cells for Improved Function Against Solid Tumors*. *Frontiers in Immunology*, 9: article 2493 (2018)
4. D.J. Dellinger et al. *Streamlined Process for the Chemical Synthesis of RNA Using 2'-O-Thionocarbamate-Protected Nucleoside Phosphoramidites in the Solid Phase*. *Journal of the American Chemical Society*, 133(30):11540–11556 (2011)
5. A. Hendel et al. *Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells*. *Nature Biotechnology*, 33(9):985–989 (2015)
6. D.E. Ryan et al. *Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs*. *Nucleic Acids Research*, 46(2):792–803 (2018)
7. M. Hegde et al. *Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Ra2 mitigate tumor antigen escape*. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(8):3036–52 (2016)
8. O.U. Kawalekar et al. *Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells*. *Immunity* 44:380–390 (2016)

图片

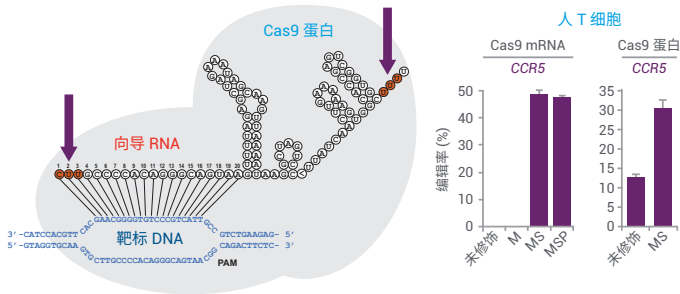


图 1. 化学合成向导 RNA 可以在特定位置引入天然核苷酸、修饰过的天然核苷酸或人工核苷酸的组合，从而改善 CRISPR 的性能。对靶向 CCR5 基因的单向导 RNA 进行改造，对其 5' 端和 3' 端的 3 个核苷酸添加化学修饰，即 2'-O-甲基 (M)、2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯 (MS) 或 2'-O-甲基 3'-硫代 PACE (MSP)，使用 Cas9 (mRNA 或纯化蛋白) 评估改造后的向导 RNA 在 T 细胞中的活性。MS 和 MSP 修饰的向导 RNA 的活性明显高于未修饰的向导 RNA。图片摘自 A. Hendel et al., Nat. Biotechnol.33(9):985-989 (2015)

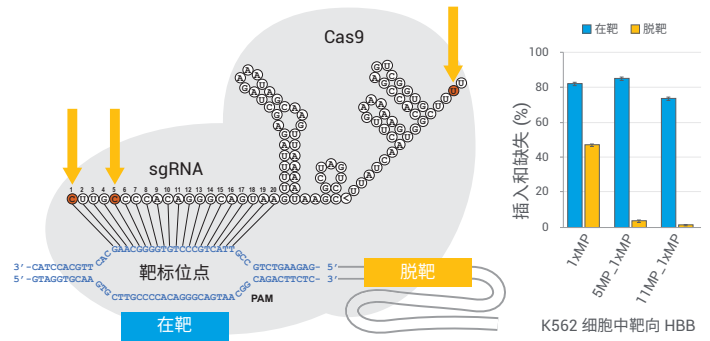


图 2. HBB 基因包含导致镰状细胞病的突变，作为一项非常重要但具有挑战性的测试，以提高 CRISPR 的特异性。结果表明，常用于编辑 HBB 基因中导致镰状细胞病的突变基因的向导 RNA 在另一个基因组位点产生了高水平的脱靶活性。在 HBB 向导 RNA 序列的第 5 位或第 11 位添加一个修饰，可显著降低脱靶活性 (如金色柱状图所示)，同时保持高水平的靶位点活性。图片摘自 Ryan et al., Nucleic Acids Res.46(2):792-803 (2018)

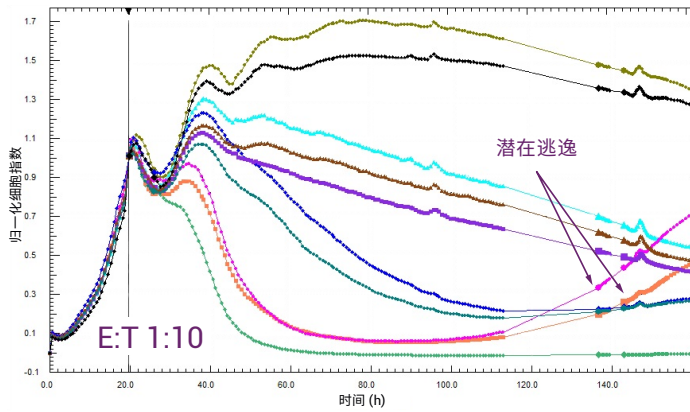
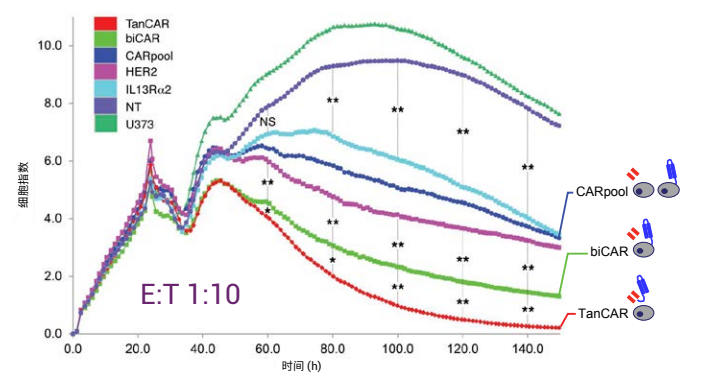


图 3a. 在低效靶比 (1:10) 下，对多种专用共刺激结构域与一个恒定抗原结合域的组的杀伤效果进行定量分析，同时根据时间分辨分析数据确定潜在的逃逸表型 (粉色线和橙色线) (N. Ahmed, 结果未发表, 2019 年 4 月 2 日)



JCI, 126, 3036-3052 Hedge et al (2016) Tandem CART Cells Targeting HER2 and IL13Ra2 Mitigate Tumor Antigen Escape

图 3b. 使用 xCelligence 监控 CAR-T 细胞靶向一个或同时靶向两个抗原 (HER2 和 IL13Ra2) 时对胶质母细胞瘤细胞系 U373 的杀伤能力。在图例中: U373 = 只有靶细胞系; NT = 未用转染的 T 细胞 (即不表达 CAR) 处理的靶细胞; IL13Ra2 = 用 T 细胞处理的靶细胞, 其中 T 细胞表达靶向 IL13Ra2 的单一 CAR; Her2 = 用 T 细胞处理的靶细胞, 其中 T 细胞表达靶向 Her2 的单一 CAR; 有关 CARpool、biCAR 和 TanCAR 的说明, 请参阅正文。E:T 比为 1:10。图片摘自 Hegde et al., J Clin Invest.2016 Aug 1;126(8):3036-52

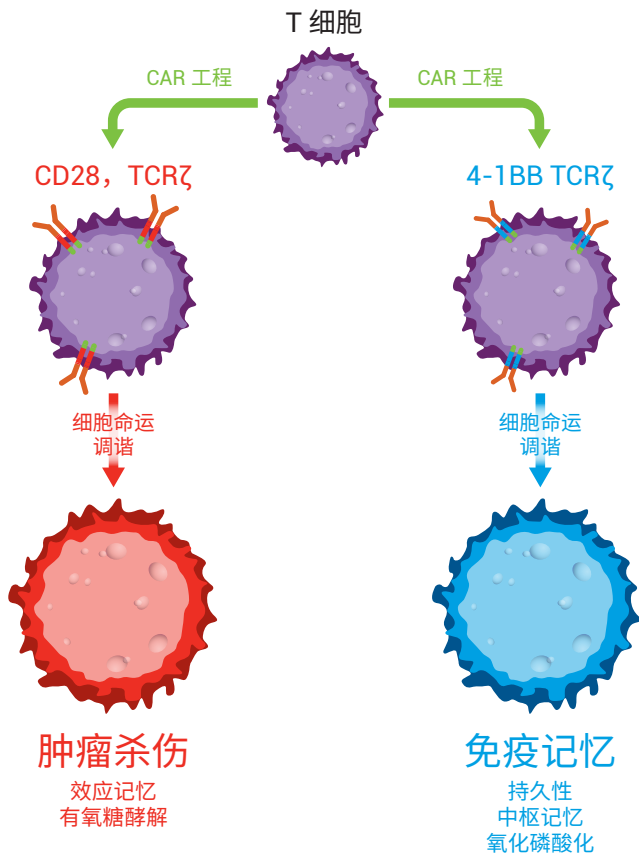


图 4. 选择不同的 T 细胞信号转导结构域将不同程度地影响代谢编程，从而为细胞疗法的微调提供了可能。含有 4-1BB 的 CAR T 细胞线粒体增加，需氧更多，从而增强了体外持久性和中枢记忆的细胞命运。相比之下，CD28 可加强糖酵解过程，从而增加效应记忆的细胞命运。图片摘自 Kawalekar et al., Immunity 44, 380–390 (2016)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/immune-cell-therapy

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2019
2019 年 5 月 23 日, 中国出版
5994-0930ZHCN