第30卷 第9期 2018年9月 Vol. 30, No. 9 Sep., 2018

DOI: 10.13376/j.cbls/2018113 文章编号: 1004-0374(2018)09-0939-11



王皓毅,中国科学院动物研究所研究员、博士生导师,"青年千人计划"入选者。2009年于美国华盛顿大学获得分子细胞生物学博士学位,2009年至2014年在麻省理工学院 Whitehead 研究所 Rudolf Jaenisch 实验室进行博士后研究,2014年5月加入中国科学院动物研究所,担任基因工程技术研究组组长。致力于新型基因工程技术的开发和现有基因编辑技术的优化和应用,相关研究成果发表在 Cell、Nature Biotechnology、Genome Research、Cell Research、Genetics等学术期刊。

基因编辑在T细胞治疗中的应用

穆 伟^{1,2},李 娜¹,王皓毅^{1,2*}

(1中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室,北京100101;2中国科学院大学存济医学院,北京100049)

摘 要:过继性免疫细胞治疗是一个迅速发展的领域,在癌症、自身免疫病和感染性疾病的治疗方面显示出了巨大的潜力。近年来基因编辑技术的发展使得在人类原代细胞中进行各种遗传修饰成为可能,将 基因编辑技术与过继性免疫细胞疗法相结合将有助于开发更安全有效的免疫细胞疗法。现系统介绍不同 类型的基因编辑技术以及它们在T细胞中的应用,总结主要的研究进展,讨论现阶段存在的问题和未来 的发展方向。

关键词:基因编辑;T细胞;过继性细胞治疗 中图分类号:Q78;R457.2 文献标志码:A

Gene editing in T cell therapy

MU Wei^{1,2}, LI Na¹, WANG Hao-Yi^{1,2*}

(1 State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Adoptive immunotherapy is a rapidly developing field that has shown great promise in the treatment of cancer, autoimmune diseases and infectious diseases. In recent years, the development of gene editing technology has made it possible to carry out various genetic modifications in human primary cells, and combining gene editing technology with adoptive immunotherapy will help to develop safer and more effective immunotherapy. Here we review the different types of gene editing technologies and their applications in T cell therapies, summarize the main research progress, and discuss the challenges and future prospects.

Key words: gene editing; T cells; adoptive cell therapy (ACT)

收稿日期: 2018-08-31

基金项目: 中科院战略先导计划(XDA16010205); 国家自然科学基金项目(81773269)

*通信作者: E-mail: wanghaoyi@ioz.ac.cn

使用自体或者异体淋巴细胞的过继性细胞 (ACT)治疗在各种疾病中显示出良好的效果。随着 基础研究和临床数据的积累,这一疗法的潜力和局 限性正变得更加清晰。早期基于 ACT 的免疫疗法 是从肿瘤中获取肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)进行体外 扩增,然后回输至患者以治疗转移性黑色素瘤^[1]。 结合临床上对宿主淋巴细胞的清除, TIL 治疗达到 了 50% 的客观反应 (OR) 率 ^[2-4]。然而, 分离技术要 求高和体外制备周期长等因素都制约了 TIL 疗法的 广泛应用。为了产生靶向特定肿瘤抗原的特异性 T 细胞,研究人员从 TIL 中鉴定出了能够识别主要组 织相容性复合物 (MHC) 递呈的抗原肽的 T 细胞受 体 (TCR) 的基因序列^[5]。通过转染编码 TCR 基因 的病毒产生 TCR 工程化的淋巴细胞 (TCR-T),并且 在 2006 年的临床研究中首次成功用于治疗转移性 黑色素瘤^[6]。因为 TCR-T 识别的是 MHC 递呈的抗 原多肽,该治疗只能应用于 MHC 多态性一致的患 者,而且许多肿瘤会通过下调 MHC 表达和加工缺 陷抗原来降低抗原的递呈和识别,从而影响治疗效 果。嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法是一种不依 赖于 MHC 的过继性细胞疗法,但其只能识别细 胞表面的抗原。抗原嵌合受体 (CAR) 的概念最初 是由 Zelig Eshhar 提出的^[7],它由三部分组成:胞 外区,通常含有来源于抗体的一段单链可变片段 (ScFv); 跨膜区;含有 CD3ζ 信号转导结构域和一 个或多个共刺激分子,如 CD28、4-1BB、CD27 和 OX40 的胞内区^[8-13]。ScFv 与肿瘤细胞表面靶抗原 结合后,通过 CD3ζ 的信号转导结构域激活 CAR-T 细胞,特异性杀伤肿瘤细胞。CAR-T细胞疗法在治 疗 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (B-ALL) 的早期阶段 临床研究中已取得了显著的成功,其完全应答率为 70%~90%^[14-18]。然而,目前CAR-T细胞疗法对于 实体瘤的治疗仍面临着巨大的挑战^[8, 19-25]。随着基 因编辑技术的发展,使得在人类原代T细胞中进行 各种遗传修饰从而开发更安全有效的 T 细胞疗法成 为可能。本文就目前的基因编辑技术及其在 T 细胞 免疫治疗中的应用展开论述。

1 基因编辑技术

在 20 世纪 80 年代,基于细胞同源重组途径的 基因打靶技术被开发用来修改基因组中的特定位 点;然而,同源重组介导的基因打靶发生的概率很 低,平均每 10⁶ 个细胞中有一个重组事件发生^[26]。 Maria Jasin 实验室的开创性工作表明,在哺乳动物 细胞基因组靶位点引入 DNA 双链断裂 (DSB) 可以 导致小片段碱基插入或缺失突变,也可以显著提高 同源重组的效率^[27-28]。因此,为了进行高效精确的 基因修饰,需要开发具有以下三个特征的工具酶: (1) 具有足够的特异性以识别基因组中特定位点: (2) 有效地造成 DNA 双链断裂; (3) 可被编程靶向 任意基因组位点。工具酶诱导的 DNA 断裂可通过 以下两种途径修复:非同源末端连接 (NHEJ) 和同 源定向修复(HDR)。NHEJ 是一种较容易发生错误 的修复途径,它将断裂末端直接连接,会导致碱基 的插入或(和)缺失(Indel)^[29],该机制可用于通过 插入或(和)缺失来改变靶位点的阅读框从而实现 破坏靶基因的目的。HDR 修复途径是依赖于同源 重组的机制,在同源序列存在时,修复系统以同源 序列为模板修复断裂位点^[30]。目前最为常用的基因 编辑工具酶有锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活样效应 核酸酶 (TALEN) 和 CRISPR-Cas 核酸酶。

1.1 ZFN

锌指 (zinc finger) 是一类常见于 DNA 结合蛋白中的结构域,每个锌指由大约 30 个氨基酸组成,可以折叠成βα结构,通过锌离子与保守的Cys2His2 残基鳌合来稳定自身结构^[31]。锌指核酸酶由两个结构域组成:DNA 结合结构域和 DNA 切割结构域。每个锌指结构域识别 DNA 上三联碱基,DNA 结合结构域通常由 3~6个独立的锌指组成,可识别 9~18个碱基对。DNA 切割结构域为 FokI的核酸酶结构域,其以二聚体的形式介导 DNA 双链的断裂^[32-34]。因此,只有当一对 ZFN 以适当的距离和方向结合特定的 DNA 序列才能造成目标位点的 DNA 双链断裂。

锌指核酸酶已被广泛用于修饰各种类型动植物的基因组^[35]。由于其蛋白和编码基因较小,因此在体内递送中具有一定的优势,已被用于临床试验,如靶向人类 CD4⁺T 细胞中 C-C 基序趋化因子受体5(CCR5)以治疗艾滋病^[36],本文后面会有更为详细的介绍。锌指核酸酶也具有较为明显的局限性:(1)脱靶效应较高,ZFN 的锌指重复序列在识别靶DNA序列时,会被靶DNA 的核苷酸组分以及每个锌指内部或外部的氨基酸序列所影响,从而使得识别的特异性发生改变,影响基因编辑效率,同时增加脱靶切割的可能性^[37];(2)设计难度大,虽然已有多种策略,如"模块化组装"^[38]、工程化的单聚体库(OPEN)系统及其衍生物^[39-40]来简化 ZFN 的设计,但是实际上针对特定 DNA 序列设计一对具

有高特异性的 ZFN 仍然具有很大的难度。

1.2 TALEN

转录激活剂样效应子 (TALE) 是在植物致病性 黄单胞细菌中发现的,它们通过细菌 III 型分泌系 统注入植物细胞并与靶启动子结合以操纵宿主基因 的转录。TALE 的 DNA 结合结构域具有多个高度 重复性的单元,每个单元由高度保守的 33 或 34 个 氨基酸组成,而其第 12 和 13 个氨基酸的可变性较 大,主要参与特定核苷酸的识别^[41-42]。每个 TALE 重复单元都可以识别目标 DNA 序列的一个特定碱 基,因此通过这些重复序列的重排可以产生不同的 DNA 结合特异性^[41-44]。将 TALE 的 DNA 结合结构 域与 FokI 的核酸酶结构域融合就形成了 TALEN (TALE nuclease)。

与 ZFN 类似, TALEN 也是以二聚体的形式对 靶序列 DNA 进行切割, 而其简单的 DNA 识别代 码使得 TALEN 比 ZFN 更易于设计,从而迅速得到 广泛应用^[32, 43, 45]。TALEN 已经在人类体细胞和多 能干细胞中显示出强大的的基因修饰能力^[45-46]。尽 管设计比 ZFN 简单, TALEN 也有其局限性:主要 表现在蛋白较大,递送比较困难, TALEN 需要 34 个氨基酸来特异性识别单个碱基对。如果要识别基 因组中独特的靶序列, TALEN 的大小将使载体的 递送具有挑战性。除此之外,TALEN 重复序列的 长度和高度重复性也使得分子克隆有较高的难度, 并且序列容易发生重组,而将其编码序列包装至病 毒系统中也具有较高难度^[47]。

1.3 CRISPR-Cas

CRISPR-Cas 系统是存在于细菌和古细菌中的 适应性免疫系统,是细菌在抵御外源噬菌体和病毒 入侵过程中进化出来的自然防御机制^[48-50]。细菌或 古细菌的免疫防御过程主要包括三个阶段:第一阶 段,从外源核酸中取得序列片段并插入到 CRISPR 阵列中;第二阶段是 CRISPR 阵列的转录以及导向 RNA (gRNA)的成熟;第三阶段即是降解外源核酸 的阶段,成熟的导向 RNA 将核酸内切酶或者核糖 核酸酶带至与其互补的靶位点处, 随后进行靶序列 的切割或者降解^[51-52]。虽然不同细菌中的 CRISPR-Cas 系统都遵循这三个阶段,但是成熟的导向 RNA 及效应分子具有多样性^[53]。目前所有已知的 CRISPR-Cas 系统分为两大类,依据其基因座和特征蛋白的 不同又可进一步分成不同的类型和亚型^[54-55]。第一 类 CRISPR-Cas 系统包括 I、III 和 IV 型,是细菌和 古细菌中最丰富的类型,它们采用多亚基效应复合 物发挥作用^[54]。第二类 CRISPR-Cas 系统较少见,包括 II、V 和 VI 型^[56]。这类系统利用导向 RNA 指导单个 Cas 蛋白对靶序列进行识别和切割。由于该系统的简单性,其作为基因编辑工具得到了广泛的研究和应用^[57-58]。

1.3.1 CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 系统属于二类Ⅱ型,是在化脓链球 菌 (Streptococcus pyogenes) 和嗜热链球菌 (Streptococcus thermophilus)的研究中建立起来的基因编辑平台^[58-59]。 该系统主要包括三种组分:(1)核酸内切酶 Cas9 蛋 白, 它有两个核酸酶结构域 HNH 和 RuvC, 用于切 割和降解外源核酸:(2)两个小 RNA, CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 crRNA (tracrRNA), 引导 Cas9 蛋白至特定的靶位点介导双链断裂。将 crRNAtracrRNA 融合形成 sgRNA 进一步简化了该系统^[58]。 这种 Cas9-sgRNA 系统是目前应用最广泛的基因 编辑工具。与大多数已知的 DNA 结合蛋白不同, Cas9 是一种 RNA 导向的核酸酶,其序列特异性主 要来源于它的 gRNA 和 DNA 位点之间的碱基配对 以及 SpCas9 和原型间隔区相邻基序 (PAM) 之间的 直接相互作用^[58, 60-62]。因此,只需通过改变 sgRNA 的核苷酸序列,即可将Cas9蛋白导向至不同靶点。 sgRNA 设计的简易性超越了之前的两种基因编辑工 具所依赖的蛋白序列的靶向特异性^[63-64]。CRISPR-Cas9 系统的发展极大简化了原核和真核生物的基因 编辑,其作为高效的基因编辑工具在各个物种包括 细菌、真菌、植物和动物中得到了广泛应用^[59,65-70]。

1.3.2 CRISPR-Cpf1

Zetsche 等^[71] 发现在二类 V 型系统中, Francisella novicida U112 的 CRISPR-Cas 基因座能够编码 FnCpf1 蛋白,其在 gRNA 的引导下产生靶向切割,可用于 人类细胞系中的基因编辑。CRISPR-Cpfl 和 CRISPR-SpCas9系统工作的差异主要体现在三个方面:第 一,gRNA不同,Cpfl 仅需要单个的 crRNA 发挥 导向功能,而不需要 tracrRNA;第二, PAM 序列 不同, Cpf1的 PAM 序列富含 T, 而 SpCas9 蛋白的 PAM 序列富含G;第三,产生的DNA 双链断裂末 端不同, SpCas9 在靶位点处切割产生平末端, 而 Cpfl产生4或者5个碱基的黏性末端^[71]。序列分 析显示 Cpfl 蛋白仅包含一个 Ruvc 核酸酶结构域, 该结构域的缺失会导致 Cpfl 的完全失活 [71]。2016 年,关于 Acidaminococcus sp. BV3L6 (AsCpf1) 的晶体 结构的研究揭示了负责切割靶链的核酸酶结构域, 该结构域保守残基的突变会消除其核酸酶的双链断 裂能力,而仅保留切口酶 (nickase) 的活性^[72]。在 多样化的二类 CRISPR 系统中 AsCpfl 及其他效应 蛋白的发现拓展了 RNA 导向的核酸内切酶工具的 应用^[54-55,71]。

2 基因编辑技术在T细胞治疗中的应用

接下来将就基因编辑在疾病方面的应用做总结 和讨论,主要集中在对于病毒传染病和肿瘤的治疗 方面。

2.1 基因编辑的T细胞在治疗人类免疫缺陷病毒 (HIV)感染中的应用

2.1.1 HIV受体的敲除

CD4⁺T细胞是人类免疫缺陷病毒感染的主要 靶点^[73]。病毒可介导细胞凋亡、诱导自身免疫反应 等^[74-75],导致CD4⁺T细胞数量减少、细胞免疫丧失、 体液免疫应答和后天免疫机能丧失综合症^[76]。HIV 通过病毒包膜蛋白与CD4⁺T细胞的CCR5或C-X-C 基序趋化因子受体4(CXCR4)结合进入宿主细胞, 在大多数情况下,HIV通过CCR5受体进入从而引 发原发感染。在感染的后期,包膜蛋白的突变使其 对CXCR4受体有趋向性。天然存在的CCR5突变 等位基因(CCR5 Δ 32)以高频率(大约 10%)存在于 高加索人群中,这种突变阻止了CCR5 在细胞表面 的表达,使得CCR5 Δ 32 基因型纯合子个体对HIV 感染具有高度抗性^[77-78]。

由于很难找到纯合的具有 CCR5 △ 32 突变的人 类白细胞抗原 (HLA) 配对的供体,因此使用基因编 辑来治疗 HIV 感染更具有可行性。在自体未感染的 CD4⁺ T 细胞或 CD34⁺造血干细胞中敲除 CCR5 基 因的替代策略是非常有吸引力的。CCR5 敲除的 T 细胞在体外和移植的免疫缺陷小鼠中显示出良好的 增殖和抗 HIV 效应。与输注的未修饰的 T 细胞相比, 基因修饰的 CD4⁺ T 细胞治疗显著降低了 HIV 感染 的外周血中的病毒载量,并增加了 CD4⁺ T 细胞的 输注 可以重建患者的免疫系统,从而产生持久有效的抗 HIV 效应,为使用基因编辑技术治疗 HIV 感染提供 了重要依据^[79](图 1)。

C-X-C 基序趋化因子受体 4 (CXCR4) 是 HIV 感染后期的另一重要辅助受体^[80]。敲除 T 细胞中 的 *CXCR4* 基因是获得对 HIV 感染抗性的有利策略^[81]。 敲除 *CXCR4* 的 CD4⁺T 细胞具有正常的增殖和功能, 并显示出对利用 CXCR4 受体的病毒的抗性^[82-83], 而 *CCR5* 和 *CXCR4* 双敲除的 T 细胞展现出了对所 有 HIV 毒株的抗性^[84](图 1)。

2.1.2 清除感染细胞中的HIV原病毒

上述方法的主要限制是它们只能阻止感染扩散,而不能消除整合到基因组中的HIV原病毒。由于潜伏在感染细胞中的储库是治疗的主要障碍,靶向并破坏感染细胞中整合的前病毒 DNA 是潜在的治疗策略。ZFN、TALEN和 CRISPR-Cas9系统都曾被用于靶向HIV 基因组的不同区域以减少不同细胞系中的HIV含量^[36,85-88]。HIV中的长末端重复序列(LTR)是基因编辑治疗非常有吸引力的靶标,这些序列存在于原病毒基因组的5'和3'末端。因此,靶向HIV基因组的LTR处,可导致大部分HIV基因组包括编码所有病毒蛋白的序列的完全缺失^[76,89-92](图 1)。

2.2 基因编辑的T细胞在治疗肿瘤中的应用

2.2.1 T细胞中免疫检查点的敲除

ACT 治疗实体瘤主要面临三大障碍。首先, 肿瘤抗原的异质性和不特异性。由于靶抗原也在正 常组织中表达,因此细胞疗法会产生脱靶毒性。例 如在临床靶向碳酸酐酶 IX (CAIX) 的 CAR-T 治疗研 究中观察到了它的脱靶效应,这主要是由于 CAIX 在肾细胞癌中高表达,但在正常组织中也以低水平 表达^[22,93]。其次,T细胞不能有效归巢并渗入肿瘤 组织。第三,外源输注的T细胞被肿瘤免疫抑制 性微环境抑制,导致其功能衰竭和丧失^[94]。由免疫 检查点介导的免疫抑制信号,如PD-1、CTLA-4、 LAG-3 和 TIM-3 组成的肿瘤微环境, 在促进肿瘤免 疫逃逸中发挥重要作用^[94]。早期研究已证实,使用 阻断免疫检查点的单克隆抗体可挽救T细胞耗竭并 恢复 T 细胞功能^[95-100]。基于这些发现,免疫检查 点阻断疗法已被用于临床试验,并取得令人兴奋的 结果,对于标准治疗无效的晚期肿瘤患者产生了部 分或完全消退[101-102]。不幸的是,持续的肿瘤消退 并不常见,并且在许多患者中没有效果。为了打破 免疫抑制微环境,ACT 和单克隆抗体联合治疗是一 种有吸引力的策略^[94]。然而免疫检查点抑制剂的长 期使用可能破坏免疫耐受,导致严重的副作用。随 着基因编辑技术的发展,在ACT之前敲除免疫检 查点基因,从而产生对实体瘤的免疫抑制微环境无 反应的更强大的T细胞是一种更值得尝试的策略。

PD-1 是最有希望的基因编辑靶点,它在T细胞活化后表达,并与相应的配体 PD-L1/PD-L2 结合从而抑制T细胞活化信号^[103]。在慢性感染或肿瘤 微环境中,*PD-1* 会在T细胞上高表达并损害其功能,



HIV通过识别CD4受体和CCR5/CXCR4辅助受体来感染宿主细胞。进入细胞质后,将其RNA基因组逆转录成DNA,然后整合 到宿主基因组中,经过转录翻译形成新的病毒。基因编辑已被用于敲除CCR5和(或)CXCR4基因,以消除病毒进入细胞所必 需的共同受体。另外,靶向病毒的LTR区可以将HIV原病毒从宿主基因组中去除。

图1 基因编辑的T细胞在治疗HIV感染中的应用

这是 T 细胞耗竭的重要特征^[104]。由于各种肿瘤细 胞表面均表达 PD-1 配体 [105-106], 这为使用基因编辑 技术消除 T 细胞中的 PD-1 抵抗免疫抑制提供了依 据。Beane 等^[107] 使用 ZFN 敲除了从黑色素瘤患者 分离的 TIL 中的 PD-1, PD-1 的敲除不影响 T 细胞 亚群和增殖,但它导致了更强的抗原特异性肿瘤细 胞杀伤和体外细胞因子释放。Menger等^[108]使用 TALEN 敲除从黑色素瘤和纤维肉瘤小鼠分离的肿 瘤抗原特异性 T 细胞上的 PD-1,结果发现 PD-1 敲除T细胞在肿瘤部位持续的时间更久,并目与 未敲除的T细胞相比,能更好地控制肿瘤进展。 CRISPR-Cas9系统也用于敲除人原代T细胞中的 PD-1 基因,并可增强基因修饰的 T 细胞功能^[109-111]。 本研究组以及另一研究组也使用 CRISPR-Cas9 敲除 了 CAR-T 细胞中的 PD-1,结果发现 CAR-T 细胞 表面上的 PD-1 蛋白表达显著降低,而细胞增殖和 免疫表型不受影响。基因编辑的 CAR-T 细胞在体 内和体外均表现出更强的抗肿瘤作用。除 PD-1 之 外, 许多临床前研究发现 TIM-3 和 LAG-3 与 PD-1 在调节免疫反应和介导肿瘤逃逸中发挥协同作用,同时阻断 PD-1 和 LAG-3 或 TIM-3 具有协同增强的 抗肿瘤作用 [112-113]。

通过基因编辑方法去除免疫检查点,可增强 CAR-T 细胞功能。但除了免疫检查点,FOXP3⁺ 调 节 T 细胞 (regulatory T cells, Treg)^[114-115]、髓系抑制 细胞 (myeloid derived suppressor cells, MDSC)^[116] 等 免疫抑制细胞,TGF-β^[117]、IL-10^[118] 等发挥免疫抑制 作用的细胞因子,IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase)^[119]、 腺苷^[120]等可溶性成分,葡萄糖的缺乏,低氧等, 都构成了"敌对"的肿瘤微环境,如何应用基因编 辑工具去除免疫微环境对 CAR-T 细胞的抑制作用 也是目前研究的热点及重点 (图 2)。

2.2.2 通用型CAR-T的制备

目前 CAR-T 细胞主要使用患者自身的 T 细胞 制备。这涉及为每个患者分离、修饰和扩增 T 细胞, 整个过程耗时且费用昂贵。此外,对于新生儿、老 年人或恶病质患者,通常难以获得具有良好质量的 T 细胞以产生患者所需的特异性 CAR-T 细胞。总



T细胞在CAR识别位于癌细胞表面的抗原后被激活,并释放功能性细胞因子[IFN-γ、白细胞介素2(IL-2)]、穿孔素、颗粒酶 等来消除癌细胞。然而在肿瘤微环境(TME)中,抑制性受体、Treg细胞、MDSC等免疫抑制细胞,TGF-β、IL-10等细胞因 子,IDO等可溶性成分等,都构成了"敌对"的肿瘤微环境,抑制T细胞的功能。通过基因编辑敲除免疫抑制受体如PD-1、 CTLA-4、TIM-3和LAG-3,TME对T细胞的免疫抑制效应部分解除,也使T细胞功能更强。使用基因编辑工具去除其他免疫 微环境对CAR-T细胞的抑制作用也是目前研究的热点及重点。

图2 基因编辑的T细胞在治疗肿瘤中的应用

而言之, 自体 T 细胞的质量会影响这种疗法的广 泛应用。

一种可能的解决方案是使用源自健康供体的 T 细胞产生通用型 CAR-T 细胞。为了实现这一点, 需要消除同种异体 CAR-T 细胞上的 TCR 以避免移 植物抗宿主病 (GVHD) 的发生,并且需要去除 CAR-T 细胞上的人类白细胞抗原 I 类 (HLA I) 以尽 量减少其免疫原性。为此,需要在 T 细胞中进行有 效的多重基因编辑来敲除 TCR、MHC 或其他分子 的表达。

TCR 蛋白由 α 和 β 两条链组成, α 链由单个基 因 *TRAC* 编码, β 链由两个 *TCRB* 基因编码, α 链 和 β 链形成二聚体以维持 T 细胞表面 TCR 的表达 和功能。因此, 敲除 *TRAC* 基因是消除 T 细胞表面 TCR 的最直接的方法。目前主要的基因编辑技术 ZFN^[121]、TALEN^[122-124] 和 CRISPR-Cas9 系统^[125-127] 已 全部成功用于敲除 CAR-T 细胞上的 TCR。TCR 敲 除的 CAR-T 细胞在体外和体内维持抗原特异性肿 瘤细胞杀伤功能,对同种异体抗原的免疫应答显著降低,并且没有在小鼠中引起 GVHD^[122]。而在首次人类临床应用中,经过 TALEN 编辑的缺失 TCR和 CD52 的抗 CD19的 CAR-T 细胞被成功用于治疗复发难治性 CD19⁺ B 细胞急性淋巴细胞白血病的两名婴儿,证明了通用 CAR-T 细胞的临床效果。但是两位患者都出现了皮肤 GVHD 症状,这突出表明了进一步改善 CAR-T 细胞治疗的需要^[128]。

MHC I 类分子也可以在 T 细胞表面被消除, 通过敲除 HLA I 异二聚体的细胞表面表达必需的 β2- 微球蛋白来避免或延迟转移细胞的排斥^[125-127, 129]。 本研究组和其他研究组也使用 CRISPR-Cas9 技术在 CAR-T 细胞中进行了 TCR 和 HLA 的同时敲除。此 外,本研究组同时敲除免疫检查点 PD-1 以开发更 强大的通用 CAR-T 细胞^[125-127]。

其他需要考虑的是,HLAI类分子的缺失可能 引发针对同种异体T细胞的NK细胞的应答。一种 可能的解决方案是过表达其他HLAI类分子以避免 NK 细胞活化。有研究组通过敲除 CD52^[122] 或脱氧 胞苷激酶 (dCK) 基因^[123],而不是敲除 HLA I 类分子,使 CAR-T 细胞获得对阿仑单抗嘌呤核苷酸类似物 的抗性。这些药物通常用于化疗去除淋巴细胞,这可以确保移除患者的淋巴细胞,同时维持注入的同 种异体 CAR-T 细胞。

2.2.3 定点整合CAR-T细胞的制备

基因编辑的另一个重要应用是开发定点整合的 转基因 CAR-T 细胞。CAR 基因大部分通过逆转录 病毒或慢病毒转导导入T细胞基因组中,基因组中 随机插入和高度可变的 CAR 表达水平 [130] 具有潜 在的诱发肿瘤的风险。研究人员已将外源基因整合 到人类淋巴细胞和造血干细胞的 CCR5 基因座和腺 相关病毒位点1(AAVSI)中,这是人类基因组中安 全的位点,可以在不影响周围基因表达的情况下稳 定表达转基因[131-132]。2017年的两项研究使用基因 编辑工具酶在 TRAC 基因座产生缺口, 随后转染含 CAR 基因的 AAV 定点插入到 TRAC 基因座,这不 仅使 T 细胞中更均匀地表达 CAR, 而且还增强了 T 细胞效力,抑制了抑制信号转导、终末分化和衰 竭^[133-134]。值得注意的是, Roth 等^[135] 通过电转的 方式将 Cas9 蛋白和 sgRNA 以及双链 DNA 模板的 混合物导入T细胞,真正实现了在无病毒载体的情 况下,将长 DNA 片段快速且高效地定点整合到 CRISPR-Cas9 靶向的基因组位置,并且保持了T 细胞的活力和功能。

基因编辑的 T 细胞无论在科学实验还是临床研 究中对肿瘤和 HIV 的治疗都展示出一定优势。但是 基因编辑的 T 细胞在临床治疗上还存在一定的问 题。最主要的是基因编辑的安全性问题。目前有大 量的研究工作集中在提高编辑效率和降低脱靶性 上^[136-139],但是针对不同的个体基因编辑的效率及 脱靶效应也不近相同^[140],所以要针对不同个体定 制基因编辑策略。另一方面,机体的免疫系统如何 应答基因编辑的细胞仍是待解决的问题。虽然仍存 在问题,但是基因编辑技术和过继细胞免疫治疗的 结合仍是肿瘤治疗和免疫相关疾病治疗的发展前景 和趋势。

[参考文献]

 Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. N Engl J Med, 1988, 319: 1676-80

- [2] Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Clin Cancer Res, 2011, 17: 4550-7
- [3] Dudley ME, Yang JC, Sherry R, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. J Clin Oncol, 2008, 26: 5233-9
- [4] Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science, 2002, 298: 850-4
- [5] Cole DJ, Weil DP, Shilyansky J, et al. Characterization of the functional specificity of a cloned T-cell receptor heterodimer recognizing the MART-1 melanoma antigen. Cancer Res, 1995, 55: 748-52
- [6] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science, 2006, 314: 126-9
- [7] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 10024-8
- [8] Louis CU, Savoldo B, Dotti G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. Blood, 2011, 118: 6050-6
- [9] Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. Mol Ther, 2009, 17: 1453-64
- [10] Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, et al. CD28 costimu lation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. Cancer Res, 2006, 66: 10995-1004
- [11] Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, 2004, 18: 676
- [12] Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCRζ chain. J Immunol, 2004, 172: 104-13
- [13] Lee H, Park S, Choi BK, et al. 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. J Immunol, 2002, 169: 4882-8
- [14] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet, 2015, 385: 517-28
- [15] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. N Engl J Med, 2014, 371: 1507-17

- [16] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med, 2013, 5: 177ra38
- [17] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med, 2013, 368: 1509-18
- [18] Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci Transl Med, 2011, 3: 95ra73
- [19] Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. J Clin Oncol, 2015, 33: 1688-96
- [20] Brown CE, Badie B, Barish ME, et al. Bioactivity and safety of IL13Rα2-redirected chimeric antigen receptor CD8⁺ T cells in patients with recurrent glioblastoma. Clin Cancer Res, 2015, 21: 4062-72
- [21] Katz SC, Burga RA, McCormack E, et al. Phase I hepatic immunotherapy for metastases study of intra-arterial chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for CEA⁺ liver metastases. Clin Cancer Res, 2015, 21: 3149-59
- [22] Lamers CH, Sleijfer S, van Steenbergen S, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. Mol Ther, 2013, 21: 904-12
- [23] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. Mol Ther, 2010, 18: 843-51
- [24] Park JR, Digiusto DL, Slovak M, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. Mol Ther, 2007, 15: 825-33
- [25] Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res, 2006, 12: 6106-15
- [26] Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. Science, 1989, 244: 1288-92
- [27] Rouet P, Smih F, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 6064-8
- [28] Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, et al. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 5012-9
- [29] Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, et al. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4: 712-20
- [30] Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, et al. The double-strand-break repair model for recombination. Cell, 1983, 33: 25-35

- [31] Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000, 29: 183-212
- [32] Ott de Bruin LM, Volpi S, Musunuru K. Novel genomeediting tools to model and correct primary immunodeficiencies. Front Immunol, 2015, 6: 250
- [33] Guo J, Gaj T, Barbas CF 3rd. Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. J Mol Biol, 2010, 400: 96-107
- [34] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 10570-5
- [35] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet, 2010, 11: 636-46
- [36] Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. N Engl J Med, 2014, 370: 901-10
- [37] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics, 2011, 188: 773-82
- [38] Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, et al. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. Biochemistry, 2003, 42: 2137-48
- [39] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. Mol Cell, 2008, 31: 294-301
- [40] Hurt JA, Thibodeau SA, Hirsh AS, et al. Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 12271-6
- [41] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science, 2009, 326: 1509-12
- [42] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science, 2009, 326: 1501
- [43] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics, 2010, 186: 757-61
- [44] Morbitzer R, Romer P, Boch J, et al. Regulation of selected genome loci using de *novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 21617-22
- [45] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol, 2011, 29: 143-8
- [46] Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic Acids Res, 2011, 39: 9283-93
- [47] Holkers M, Maggio I, Liu J, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. Nucleic Acids Res, 2013, 41: e63
- [48] Barrangou R, Marraffini Luciano A. CRISPR-Cas

systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Mol Cell, 2014, 54: 234-44

- [49] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, 2012, 482: 331
- [50] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 2007, 315: 1709-12
- [51] van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol, 2014, 12: 479
- [52] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol, 2011, 9: 467
- [53] Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. Genome Biol, 2015, 16: 247
- [54] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol, 2015, 13: 722
- [55] Shmakov S, Abudayyeh Omar O, Makarova Kira S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. Mol Cell, 2015, 60: 385-97
- [56] East-Seletsky A, O'Connell MR, Knight SC, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. Nature, 2016, 538: 270
- [57] Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol, 2017, 15: 169
- [58] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 2012, 337: 816-21
- [59] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 2013, 339: 819-23
- [60] Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, et al. The CRISPR/ Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature, 2010, 468: 67
- [61] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: E2579-86
- [62] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. Science, 2008, 322: 1843-5
- [63] Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. Exp Mol Med, 2016, 48: e265
- [64] Mahfouz MM, Piatek A, Stewart CN. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. Plant Biotechnol J, 2014, 12: 1006-14
- [65] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 2014, 346: 1258096
- [66] Hsu Patrick D, Lander Eric S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering.

Cell, 2014, 157: 1262-78

- [67] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol, 2014, 32: 347
- [68] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife, 2013, 2: e00471
- [69] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science, 2013, 339: 823-6
- [70] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/ Cas-mediated genome engineering. Cell, 2013, 153: 910-8
- [71] Zetsche B, Gootenberg Jonathan S, Abudayyeh Omar O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell, 2015, 163: 759-71
- [72] Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 2016, 165: 949-62
- [73] Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. Nature, 2002, 417: 95-8
- [74] McCune JM. The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. Nature, 2001, 410: 974-9
- [75] Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, et al. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol, 1999, 73: 6715-20
- [76] Doitsh G, Galloway NL, Geng X, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature, 2014, 505: 509-14
- [77] Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell, 1996, 86: 367-77
- [78] Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature, 1996, 382: 722-5
- [79] Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol, 2008, 26: 808-16
- [80] Hoffmann C. The epidemiology of HIV coreceptor tropism. Eur J Med Res, 2007, 12: 385-90
- [81] Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science, 1999, 283: 845-8
- [82] Yuan J, Wang J, Crain K, et al. Zinc-finger nuclease editing of human *cxcr4* promotes HIV-1 CD4⁺ T cell resistance and enrichment. Mol Ther, 2012, 20: 849-59
- [83] Wilen CB, Wang J, Tilton JC, et al. Engineering HIVresistant human CD4⁺ T cells with CXCR4-specific zincfinger nucleases. PLoS Pathog, 2011, 7: e1002020
- [84] Didigu CA, Wilen CB, Wang J, et al. Simultaneous zincfinger nuclease editing of the HIV coreceptors *ccr5* and *cxcr4* protects CD4⁺ T cells from HIV-1 infection. Blood, 2014, 123: 61-9
- [85] Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, et al. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based

lentiviral vector. PLoS One, 2015, 10: e0120047

- [86] Zhu W, Lei R, Le Duff Y, et al. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. Retrovirology, 2015, 12: 22
- [87] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. Sci Rep, 2013, 3: 2510
- [88] Qu X, Wang P, Ding D, et al. Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. Nucleic Acids Res, 2013, 41: 7771-82
- [89] Lebbink RJ, de Jong DCM, Wolters F, et al. A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. Sci Rep, 2017, 7: 41968
- [90] Wang G, Zhao N, Berkhout B, et al. A combinatorial CRISPR-Cas9 attack on HIV-1 DNA extinguishes all infectious provirus in infected T cell cultures. Cell Rep, 2016, 17: 2819-26
- [91] Yin C, Zhang T, Li F, et al. Functional screening of guide RNAs targeting the regulatory and structural HIV-1 viral genome for a cure of AIDS. AIDS, 2016, 30: 1163-74
- [92] Liao H-K, Gu Y, Diaz A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. Nat Commun, 2015, 6: 6413
- [93] Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. J Clin Oncol, 2006, 24: e20-e2
- [94] Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13: 394
- [95] Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. Nat Rev Immunol, 2015, 15: 45-56
- [96] Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol, 2015, 15: 486-99
- [97] Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. Trends Immunol, 2014, 35: 51-60
- [98] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature, 2006, 439: 682-7
- [99] Hirano F, Kaneko K, Tamura H, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. Cancer Res, 2005, 65: 1089-96
- [100] Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity, 1999, 11: 141-51
- [101] Ribas A, Hamid O, Daud A, et al. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. JAMA, 2016, 315: 1600-9

- [102] Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. N Engl J Med, 2013, 369: 134-44
- [103] Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, et al. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8⁺ T cells. EMBO Mol Med, 2011, 3: 581-92
- [104] Wherry EJ. T cell exhaustion. Nat Immunol, 2011, 12: 492-9
- [105] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/ B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol, 2012, 24: 207-12
- [106] Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. Oncoimmunology, 2012, 1: 1223-5
- [107] Beane JD, 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. Mol Ther, 2015, 23: 1380-90
- [108] Menger L, Sledzinska A, Bergerhoff K, et al. TALENmediated inactivation of PD-1 in tumor-reactive lymphocytes promotes intratumoral T-cell persistence and rejection of established tumors. Cancer Res, 2016, 76: 2087-93
- [109] Su S, Hu B, Shao J, et al. Corrigendum: CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. Sci Rep, 2017, 7: 40272
- [110] Su S, Hu B, Shao J, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. Sci Rep, 2016, 6: 20070
- [111] Schumann K, Lin S, Boyer E, et al. Generation of knockin primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 10437-42
- [112] Lloyd A, Vickery ON, Laugel B. Beyond the antigen receptor: editing the genome of T-cells for cancer adoptive cellular therapies. Front Immunol, 2013, 4: 221
- [113] Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. Cancer Res, 2012, 72: 917-27
- [114] Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA, et al. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. J Exp Med, 2004, 200: 771-82
- [115] Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, et al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. J Immunol, 2005, 174: 2591-601
- [116] Rodriguez PC, Quiceno DJ, Ortiz B, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. Cancer Res, 2004, 64: 5839
- [117] Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-β signals *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 419-24

- [118] Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, et al. Interleukin-10treated human dendritic cells induce a melanoma-antigenspecific anergy in CD8⁺ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. Blood, 1999, 16: 1634-42
- [119] Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. 2003, 9: 1269-74
- [120] Hatfield SM, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1α driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer. Curr Opin Pharmacol, 2016, 29: 90-6
- [121] 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. Blood, 2012, 119: 5697-705
- [122] Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, et al. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for "Offthe-Shelf" adoptive T-cell immunotherapies. Cancer Res, 2015, 75: 3853-64
- [123] Valton J, Guyot V, Marechal A, et al. A multidrug-resistant engineered CAR T cell for allogeneic combination immunotherapy. Mol Ther, 2015, 23: 1507-18
- [124] Berdien B, Mock U, Atanackovic D, et al. TALENmediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer. Gene Ther, 2014, 21: 539-48
- [125] Liu X, Zhang Y, Cheng C, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. Cell Res, 2016, 27: 154
- [126] Ren J, Zhang X, Liu X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. Oncotarget, 2017, 8: 17002-11
- [127] Ren J, Liu X, Fang C, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. Clin Cancer Res, 2017, 23: 2255-66
- [128] Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. Sci Transl Med, 2017, 9: aam9292

- [129] Torikai H, Reik A, Soldner F, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. Blood, 2013, 122: 1341-9
- [130] von Kalle C, Deichmann A, Schmidt M. Vector integration and tumorigenesis. Hum Gene Ther, 2014, 25: 475-81
- [131] Sather BD, Romano Ibarra GS, Sommer K, et al. Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template. Sci Transl Med, 2015, 7: 307ra156
- [132] Lombardo A, Cesana D, Genovese P, et al. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. Nat Methods, 2011, 8: 861-9
- [133] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. Nature, 2017, 543: 113-7
- [134] MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR α chain locus streamlines production of allogeneic gene-edited CAR T cells. Mol Ther, 2017, 25: 949-61
- [135] Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. Nature, 2018, 559: 405-9
- [136] Richardson CD, Kazane KR, Feng SJ, et al. CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. Nat Genet, 2018, 50: 1132-9
- [137] Charpentier M, Khedher AHY, Menoret S, et al. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. Nat Commun, 2018, 9: 1133
- [138] Wang X, Wang Y, Wu X, et al. Unbiased detection of offtarget cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. Nat Biotechnol, 2015, 33: 175-8
- [139] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science, 2016, 351: 84-8
- [140] Lessard S, Francioli L, Alfoldi J, et al. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114: E11257-66