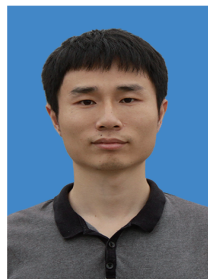


DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.04.001

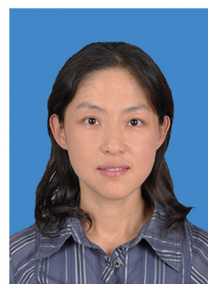
· 专家论坛 ·

## 基因编辑背景下的肿瘤生物治疗新策略和挑战

徐胜,李楠(海军军医大学 免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室,上海 200433)



**徐胜** 博士、副教授、硕士生导师,海军军医大学医学免疫学国家重点实验室课题组组长。全国百篇优秀博士学位论文奖获得者、全军和上海市优秀博士学位论文奖获得者,上海市青年科技启明星,中国免疫学会青年学者奖获得者,海军军医大学优秀青年。主要从事感染炎症免疫和肿瘤免疫研究,发现了固有免疫和炎症的关键调控靶点和MHC I类分子在固有免疫应答中的非经典功能,阐明了miR-29及BTK在T淋巴细胞中的效应。先后主持国家自然科学基金面上项目4项、国家重点基础研究发展计划(973计划)项目子课题1项,以第一或共同第一作者和通信作者身份在*Nat Immunol*、*Hepatology*、*Cell Mol Immunol*、*J Immunol*等杂志发表SCI论文十余篇,单篇最高26分。E-mail:x.xusheng@163.com



**李楠** 博士、教授、博士生导师,海军军医大学医学免疫学国家重点实验室副主任。全国百篇优秀博士学位论文奖获得者、中国青年科技奖和求是杰出青年奖获得者,上海市三八红旗手标兵。主要从事分子免疫学研究,利用人免疫细胞差异/cDNA文库大规模测序和生物信息学分析成功鉴定了30多条具有重要科研价值和前景的全长基因,均在国际基因库登录,并得到国际遗传组织的统一命名;利用这些新型免疫分子进一步研发出多种活性小分子化合物、肿瘤抗原肽和优化肽,并制备了体内、外具有明显特异性抗肿瘤作用的抗原肽疫苗。研究成果以第一或共同第一通信或共同通信作者身份发表SCI收录论文20余篇,获国家发明专利授权28项。作为负责人承担国家科技重大专项、“863”、“973”、国家科技攻关计划、国家重点研发计划、国家自然科学基金等和上海市重大科研项目等20余项,作为核心成员获得首届全国创新争先奖(2017年)。

**[摘要]** CRISPR等基因编辑技术在多学科、多领域产生了革命性影响,也极大地推动了肿瘤生物治疗研究方法的转变和治疗新策略的形成。在肿瘤研究中,基因编辑加速了肿瘤细胞和免疫细胞中生物治疗新靶点的发现,推动了癌基因、抑癌基因、表观分子、耐药基因等“肿瘤细胞正常化”靶向编辑新策略的提出,促进了CAR-T、TCR-T细胞等过继细胞治疗方法向“通用型”、“即用型”的迭代,也极大地加速了CAR-T细胞等细胞治疗的临床应用。通过更加精准基因编辑系统的研发、基因递送策略的不断进步,以及多靶点编辑、定点插入和体内时空可控编辑的发展,将进一步降低基因编辑的脱靶效应,提高疗效和安全性,同时控制成本,推动基因编辑在肿瘤生物治疗中更加广泛的应用,且有望在实体瘤治疗方面实现新的突破。

**[关键词]** 基因编辑;成簇规则间隔短回文重复序列;肿瘤;生物治疗;CAR-T细胞

**[中图分类号]** R730.5;Q78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)04-0275-011

## Genome editing in cancer biotherapy: strategies, challenges and future directions

XU Sheng, LI Nan (National Key Laboratory of Immunology & Institute of Immunology, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** CRISPR gene editing technologies have had a revolutionary impact on many disciplines and fields, and have also greatly changed research methods of tumor biotherapy and promoted the formation of new therapeutic strategies. In tumor researches, gene editing accelerated the discovery of potential targets in biotherapeutic tumor cells and immune cells, promoted new editing strategies of "tumor cell normalization" therapy through targeting oncogene, tumor suppressor gene, epigenetic molecular, drug resistance gene *etc.* It also promoted the iteration of adoptive cellular therapies of CAR-T/TCR-T cells to "universal" and "off-the-shelf" therapies, and greatly accelerated the clinical application of cell therapies such as that of CAR-T cells. With the development of more accurate gene editing systems, the continuous progress of gene delivery strategies, the development of multi-target editing, site-specific insertion and *in vivo* spatio-temporal editing, the off-target effect of gene editing can be further reduced, the safety and accessibility improved and the

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82071789, No. 82071762)

**[通信作者]** 李楠, E-mail: nanli@immunol.org

cost controlled. In the future, gene editing will be more widely used in tumor biotherapy, and is expected to achieve new breakthroughs in the treatment of solid tumors.

**[Key words]** genome editing; CRISPR; tumor; biotherapy; CAR-T cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(4): 275-285. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.04.001]

基因编辑的出现使得可以对目标基因进行精确地定位、剪切或改造,进而达到修改编辑生物体原有基因的目的。相比于传统的锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator like effector nuclease,TALEN),成簇规则间隔短回文重复序列及其相关蛋白基因9(CRISPR/Cas9)技术更为简单高效可扩展,可以同时多个位点进行编辑,也可以构建全基因组靶向文库<sup>[1]</sup>。此外,还存在多种Cas9突变体衍生工具,包括切割单条DNA的切口酶(nickase)及完全失去酶切活性只具备DNA识别功能的dCas9,它们可以不形成DNA双链断裂(double strand break,DSB),增加了编辑安全性,分别推动了引导编辑(prime editing)、CRISPR激活/抑制(CRISPR activation/CRISPR interference,CRISPRa/CRISPRi)、表观编辑和单碱基编辑等技术的诞生,为基因组精准靶向调控提供了多种选择性和极大的灵活性。基因编辑技术的出现,在生物医药领域产生了深远的影响,在肿瘤生物治疗的基础研究和临床试验中也得到了广泛的应用,不仅改变了肿瘤研究的方法和手段,加速了肿瘤和机体免疫系统肿瘤生物治疗靶点的发现,而且也促使肿瘤生物治疗新的策略和思路提出,推动了CAR-T和TCR-T细胞等过继细胞治疗方法的更新、迭代及临床应用。深入研究更为精准的基因编辑系统,开发基因编辑靶点和策略,探索更为高效的递送载体,有效应对基因编辑的脱靶问题、递送效率和安全性问题等,将有助于研发更为高效、安全的肿瘤生物治疗新方法和手段,进一步推动基因编辑技术在临床肿瘤生物治疗中的应用。

## 1 基因编辑推动肿瘤生物治疗新靶标的发现

基因编辑技术的出现首先使得肿瘤细胞、类器官及动物模型变得更为便捷,更重要的是CRISPR/Cas9平台的灵活性使得从全基因组水平筛选肿瘤治疗潜在靶点成为可能,筛选方法包括常见的基因失活(loss of function)和激活(gain of function)筛选,而筛选主要从肿瘤细胞和免疫细胞两个层面进行。

在肿瘤细胞层面,主要包括对肿瘤细胞本身生长、转移、耐药、代谢、合成致死及免疫调控基因等筛选,可以在体外、类器官乃至体内途径进行<sup>[2]</sup>。调节肿瘤生长和转移的基因筛选最为常见<sup>[3-5]</sup>,甚至有学者从30种肿瘤的324个细胞中系统性筛选出553个

通用及866个肿瘤特异性癌基因及促癌基因,可以作为潜在的肿瘤治疗靶点<sup>[6]</sup>。耐药基因的筛选也比较常见,包括化疗药物(紫杉醇、地西他滨等)、靶向药物(伊马替尼、索拉非尼等)等<sup>[7-9]</sup>。采用耐药或者特定突变细胞进行筛选,则可以直接筛选合成致死基因<sup>[10-11]</sup>。随着肿瘤免疫治疗的广泛应用,近来筛选免疫治疗耐受或者抵抗的基因也越来越多。通过基因失活筛选,发现肿瘤细胞自身抗原提呈、IFN- $\gamma$ 信号、TNF信号、SWI/SNF染色体重塑及自噬等通路分子异常可促进肿瘤对T细胞治疗耐受<sup>[12-14]</sup>。通过CRISPRa的基因筛选,发现了肿瘤细胞中PD-L1等的激活会导致其对T细胞杀伤抵抗,靶向这些分子可以增强肿瘤细胞对免疫治疗的敏感性<sup>[15]</sup>。

在免疫细胞层面,CRISPR筛选了调控T细胞存活及功能的关键基因,以提高抗肿瘤免疫疗效<sup>[16-17]</sup>。最早是利用T细胞在体外筛选了调控PD-1表达及T细胞活化的基因<sup>[18-19]</sup>。随后,利用人原代T细胞体外活化体系筛选了一系列抑制T细胞增殖分子<sup>[20]</sup>。相应地,在小鼠中利用原代T细胞体外编辑后回输,筛选了调控T细胞体内存活和肿瘤浸润的分子<sup>[21-23]</sup>。如今T细胞的基因组筛选和亚组筛选已经比较常见,极大地加速了T细胞生存、杀伤及记忆调控等新靶点的发现,为生产更加高效的CAR-T细胞治疗肿瘤提供了潜在靶点和策略。

## 2 基因编辑推动肿瘤生物治疗新策略的创新和迭代

基因编辑技术的出现,在肿瘤生物治疗各个领域均带来了革命性变革,加速了抗体药物研发生产、方便了溶瘤病毒的突变改造等<sup>[24-25]</sup>,尤其推动了肿瘤生物治疗新策略的形成,主要体现在对“肿瘤细胞正常化”编辑策略的创新和免疫细胞过继回输治疗策略的迭代。基因编辑技术可以通过纠正肿瘤致病突变,修复驱动基因,以实现“肿瘤细胞正常化”。通过编辑异体T细胞的TCR、MHC等基因,基因编辑也推动了自体CAR-T细胞向“通用型”高效CAR-T细胞的更新转变。

### 2.1 靶向肿瘤细胞编辑策略

2.1.1 靶向癌/抑癌基因及致病突变 癌基因的激活和抑癌基因失活是肿瘤常见的特征,通过基因编辑靶向灭活癌基因、激活抑癌基因表达,或者修复这些基因的突变,能够使肿瘤细胞恢复正常,阻断其恶性行为。发生突变或者高表达的癌基因,通过基因编辑修复其异常或实现删除,能够阻断肿瘤细胞增



殖信号,是肿瘤细胞正常化主要手段之一。KRAS、c-Myc、PLK1、LCN2、CDK等癌基因作为CRISPR/Cas9编辑的靶基因,在肺癌、肝癌、卵巢癌、乳腺癌等多种肿瘤中均收到了良好的编辑效率和疗效<sup>[26-30]</sup>。发生突变的TP53、Rb等抑癌基因则可以通过单碱基编辑或者同源重组方式修复,以恢复正常<sup>[31]</sup>。在融合基因导致的肿瘤和病毒相关肿瘤中,由于正常细胞不存在这些异常序列,通过靶向融合基因或者病毒基因组,可以精准删除致病因素,而不影响正常细胞<sup>[32]</sup>。临床上已有通过靶向HPV病毒癌基因治疗宫颈癌的试验研究,而异常表达的癌基因和抑癌基因则可以通过CRISPRi和CRISPRa编辑或者通过表观编辑使其表达水平恢复正常<sup>[33]</sup>。

2.1.2 靶向表观分子 通过靶向编辑表观酶,可以间接调控驱动基因表达,抑制肿瘤生长。体内应用CRISPR/Cas9靶向剔除DNA甲基化酶DNMT1,能明显抑制卵巢癌生长,且减少全身DNMT抑制剂使用带来的不良反应<sup>[34]</sup>。在乳腺癌中,DNA去甲基化酶TET1剔除也能够抑制癌基因表达,抑制肿瘤细胞增殖和迁移<sup>[35]</sup>。还可以采用dCas9协同表观酶进行精准基因表观编辑,通过改变表观修饰调控基因表达,促进肿瘤正常化治疗。

2.1.3 靶向耐药分子 肿瘤某些突变或基因表达异常是导致其对放化疗或者靶向治疗耐药的原因之一,利用基因编辑靶向这些分子,可以重建肿瘤对药物敏感性。最经典的是乳腺癌易感基因(BRCA)在多腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂作用下的合成致死作用,通过靶向BRCA或者突变的PARP1,可以恢复肿瘤对PARP抑制剂的敏感性<sup>[36]</sup>。ATP结合盒式转运蛋白等将药物泵出细胞的分子也是肿瘤耐药重要机制,靶向抑制这些分子可以增强药物杀伤肿瘤活性<sup>[37]</sup>。

2.1.4 破解肿瘤免疫耐受 通过基因编辑靶向免疫检查点配体分子,包括PD-L1、CD155、CD47等,能够解除对免疫细胞限制,促进机体免疫系统发挥免疫监视功能<sup>[38]</sup>。比如,通过体内靶向肿瘤细胞PD-L1表达,促进机体对黑色素瘤和乳腺癌的免疫应答<sup>[39-40]</sup>。

## 2.2 靶向免疫细胞编辑策略

2.2.1 靶向TCR和MHC分子 TCR和MHC I类分子是T细胞过继治疗中最常见的基因编辑靶点,是解决异体T细胞排斥反应的核心策略。靶向TRAC或/和TRBC消除内源性TCR已经是通用型CAR-T细胞基本配置,是避免移植物抗宿主反应(graft versus host reaction, GVHR)的重要手段<sup>[41]</sup>。众多临床试验已经证明,经过基因编辑删除内源性TCR的异体T细胞过继回输具有良好的安全性和可行性。在TCR-T

细胞中,即使是自体细胞治疗,内源性TCR的删除可以减少杂合TCR产生,同时增加导入TCR表达水平<sup>[42]</sup>。此外,MHC的编辑删除可以减少回输异体细胞免疫原性,减少被受者免疫系统清除,也是临床异体CAR-T细胞治疗常见的编辑策略<sup>[43]</sup>。

2.2.2 靶向免疫检查点 通过基因编辑技术删除免疫检查点分子,可以避免T细胞耗竭,提高抗肿瘤效应。这些分子除了PD-1和CTLA-4之外,还包括TIGIT、LAG3、NKG2A和SIRP $\alpha$ 等,有些在NK细胞回输治疗中也能发挥同样的效应<sup>[44-46]</sup>。除了直接靶向这些检查点分子,还有研究通过敲除它们共同的转录因子NFAT、TOX和NR4A等,能够同时降低多个免疫检查点分子表达,同样可避免T细胞的耗竭<sup>[47-48]</sup>。

2.2.3 靶向肿瘤微环境抑制性信号 过继细胞治疗在体内还受到肿瘤微环境的影响。TGF- $\beta$ 是肿瘤微环境中最重要的抑制性信号,通过靶向删除CAR-T细胞TGF- $\beta$ R2或者其下游信号分子DGK,能够删除抑制信号,提高治疗效果<sup>[49-50]</sup>。其他重要的抑制性信号包括NKG2A、KLRG1、A2AR、CISH、SHP2等<sup>[46, 51-52]</sup>,在CAR-NK细胞治疗中应用也较为广泛。

2.2.4 靶向炎症因子 CAR-T细胞治疗相关严重不良反应主要是细胞因子风暴,这些细胞因子包括GM-CSF、IL-6、IL-1、TNF等。靶向编辑其中关键炎症因子可以降低细胞因子风暴的风险,增强治疗的安全性。常见的靶点为GM-CSF、IL-6和IL-1等,通过编辑可以降低这些炎症因子分泌而不影响细胞活性,甚至能增强回输细胞的抗肿瘤活性<sup>[53-55]</sup>。

2.2.5 靶向CAR靶点或联合用药靶点 有些CAR靶向的目标分子在CAR-T细胞本身或者激活过程中也有表达,为了避免回输细胞之间的相互毒性作用,往往选择编辑删除CAR-T细胞自身靶分子。如在靶向多发性骨髓瘤SLAMF7的CAR-T细胞选择编辑删除自身SLAMF7<sup>[56]</sup>,靶向白血病CD38的CAR-NK细胞也选择删除自身CD38的表达<sup>[57]</sup>。这一原则在治疗T细胞肿瘤中尤其重要,因为靶分子往往在CAR-T细胞自身也高表达,会导致自我杀伤,所以在CD7靶向治疗T淋巴细胞白血病的CAR-T细胞中已编辑删除了自身CD7<sup>[58]</sup>。此外,在肿瘤生物治疗中经常要用到CD52单抗药物清髓,为了方便联合用药,CAR-T细胞等往往也选择编辑删除自身CD52的表达<sup>[59]</sup>。

## 3 基因编辑在肿瘤生物治疗临床应用现状

尽管基因编辑在肿瘤中的研究如火如荼,然而至今尚未有商业化产品。从表1中可以看出目前处于临床试验阶段的肿瘤治疗基因编辑产品主要集中在过继细胞治疗,包括活化T细胞、肿瘤浸润T淋巴

细胞(TIL)、CAR-T细胞、TCR-T细胞治疗等,且以CAR-T细胞治疗为主。2016年,中国进行了世界首个人类CRISPR基因编辑临床试验<sup>[60]</sup>,PD-1编辑的细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK)用于治疗晚期非小细胞肺癌,证实了CRISPR基因编辑技术在临床应用的安全性和可行性。随后,PD-1编辑的CIK陆续被用于治疗食管鳞状细胞癌、EBV相关肿瘤及肝癌等<sup>[61]</sup>。

基因编辑目前最多的是应用在通用型CAR-T细胞中,占到肿瘤基因编辑临床试验的80%左右,主要以靶向CD19、CD20、BMCA等治疗血液系统肿瘤的异体CAR-T细胞为主。这些同种异体CAR-T细胞至少都选择TRAC作为编辑靶点,以去除GVHR效应;有的还敲除了 $\beta 2$ 微球蛋白( $\beta 2$ -microglobulin,  $\beta 2M$ )和PD-1,以减少CAR-T细胞的免疫原性。不少CAR-T细胞还选择了敲除CD52,以便与抗CD52抗体联合治疗,比如国内首款通用型CAR-T CTA101<sup>[59]</sup>。在以CD7为靶点的T细胞淋巴瘤和以SLAMF7为靶点的多发性骨髓瘤治疗中,还编辑删除了CAR-T细胞自身CD7和SLAMF7的表达,以减少对自身的杀伤<sup>[58]</sup>。临床试验也有对实体瘤的探索,分别是靶向CD70和间皮素(mesothelin)的CAR-T细胞以治疗肾癌和间皮素阳性实体瘤,特别是间皮素靶向的CAR-T细胞还编辑删除了PD-1,有望能够增强CAR-T细胞在实体瘤中的杀伤效应<sup>[62-63]</sup>。

尤其值得注意的是,部分研究选择了将CAR序列定点插入TRAC或者PD-1位点,降低了随机插入风险,提高了产品一致性。中国的一项CD19 CAR-T细胞治疗复发难治性非霍奇金淋巴瘤研究(NCT03229876)更是采用了完全无病毒体系进行编辑和同源重组,一步实现PD-1基因编辑和CAR插入,进一步降低了病毒载体带来的风险,带来了更高的安全性<sup>[64]</sup>。此外,基因编辑转化应用方面,还各有一项在TCR-T和TIL体内编辑HPV病毒E6、E7基因(NCT03057912)的临床研究<sup>[65]</sup>。

除了最常见的CRISPR/Cas9编辑方法,TALEN技术在通用型CAR-T细胞治疗中也有应用,主要由两家国外公司垄断,统一选择了编辑TRAC和CD52两个位点。还有利用三大主流基因编辑技术之外的新型基因编辑ARCUS方法,靶向TRAC位点,并定点插入了CAR基因。ARCUS编辑技术相较CRISPR/Cas9技术具有更低的脱靶效应,分子远短于Cas9的蛋白,具有一定的应用前景。

## 4 基因编辑在肿瘤生物治疗中面临的挑战及对策

### 4.1 脱靶

脱靶是所有基因编辑治疗共同的阻碍,可能造成基因突变、癌/抑癌基因异常,增强了基因组不稳定性,

严重可造成细胞死亡或癌变。通过精准地设计gRNA序列,同时改造找寻具备更高特异性的Cas蛋白等可以极大地减少脱靶。利用Cas9切口酶,通过移位配对两组gRNA才产生DSB,能进一步降低脱靶概率<sup>[66]</sup>。在其他不造成DSB的新型基因编辑策略中,比如引导编辑,通过设计编辑链gRNA序列、反转录引物结合序列以及非编辑链gRNA多重杂交限制,也可以极大地降低乃至消除脱靶<sup>[67]</sup>。因此针对脱靶问题,引导编辑等不形成DSB的策略具有良好的应用前景。

### 4.2 递送效率

CRISPR/Cas9编辑系统在基础研究中多采用病毒载体递送,在临床治疗中,由于Cas9载体较大,病毒递送效率有限,一直制约了基因编辑在肿瘤治疗中的应用。随着一些Cas9的变体以及其他具有编辑功能Cas蛋白的发现,使得分子量减小,而特异性更好<sup>[68-69]</sup>。目前最小的CasMini已经缩小到了Cas9的一半大小<sup>[70]</sup>,单碱基编辑系统目前也能够装入腺相关病毒<sup>[71]</sup>,这样就使得病毒荷载基因编辑系统成为可能。然而,病毒介导的随机整合存在致癌风险,Cas9和gRNA的持续表达不仅增加脱靶概率,而且Cas9蛋白还可能激发机体免疫应答,因而病毒载体不是临床应用的最优选择。

电转染技术的优化进步解决了以上难题,且不改变CAR-T细胞等体外制备流程和周期,因而目前几乎所有相关临床试验均采用了这一技术。递送策略可以以质粒形式(NCT03044743),也可以以mRNA形式(NCT031668),而更多的是采用Cas9蛋白和gRNA的核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)形式<sup>[72]</sup>。RNP电转染策略能够在保证细胞活性基础上,获得高效编辑效率,且Cas9蛋白在72 h内降解,极大地降低脱靶率,避免了Cas9的免疫原性。递送后利用非同源重组末端修复的编辑效率大于80%,而利用同源重组修复插入的效率则在30%~70%之间<sup>[73]</sup>。除了电转染技术外,一些其他方法如膜渗透和超声等也可以实现CRISPR/Cas9的体外递送。

非病毒载体递送体系随着新型冠状病毒疫苗的研制成功有了飞速发展,在临床遗传性疾病治疗中业已得到应用。然而,在过继细胞治疗中相比电转染技术并未展现出优势,相反却增加了潜在风险,因而并未得到应用,其优势更应该体现在未来的体内编辑治疗中。

### 4.3 安全性

基因编辑的安全性问题除了脱靶外,主要是染色体重组。在人基因编辑的CAR-T细胞中,观察到了频繁的染色体异常,主要为染色体截断和非整倍体,以14号染色体缺失最为常见<sup>[74]</sup>。染色体重组在多位



点编辑中更加常见,主要是由于DSB后游离的DNA末端无序连接造成的,因而不形成DSB的基因编辑方式能够彻底解决这一问题。目前主要存在单碱基编辑和引导编辑两种方式。单碱基编辑通过缺失切割活性的dCas9识别靶点位置,对单个碱基直接进行化学编辑,通过引入终止密码子或者改变外显子剪切方式实现基因删除,全程不切割DNA,不形成DSB,完全避免了多位点编辑时的染色体易位<sup>[75]</sup>。引导编辑则通过Cas9切口酶造成单链断裂,利用反转录酶直接在断裂DNA上对照模板写入序列信息,也能够避免DSB形成,提高基因编辑的安全性<sup>[76]</sup>。鉴于基因编辑产品的安全性,美国FDA建议该类临床试验的患者应跟踪随访15年以上。

## 5 肿瘤生物治疗中基因编辑的未来趋势

### 5.1 多位点编辑及定点插入

目前这种多位点编辑和定点插入更多地体现在构建“通用型”同种异体CAR-T细胞上。同种异体CAR-T细胞最需要解决的问题是GVHR和宿主抗移植物反应(host versus graft reaction, HVGR)。GVHR可以通过编辑内源性TCR去除,是目前所有异体CAR-T细胞治疗最基本要求。通过编辑 $\beta 2 M$ 和II类反式激活蛋白(class II transactivator, CII TA),可以减弱回输细胞免疫原性,减少HVGR。在实体瘤抑制性免疫微环境中,CAR-T细胞还需要通过编辑免疫检查点,解决T细胞耗竭问题。TCR和 $\beta 2 M$ 双位点编辑以及TCR、 $\beta 2 M$ 加PD-1三位点编辑的异体CAR-T细胞和TCR-T细胞已经进入临床试验(表1),显示出更好的抗肿瘤活性。

然而,编辑位点并不是越多越好,更多的基因位点编辑可能存在效率问题,曾有尝试Fas/TRAC/PD-1/CTLA-4四个位点同时编辑,仅产生12%左右的编辑效率<sup>[77]</sup>。多位点编辑的同时也增加了脱靶的概率,同时存在的大量DSB增加了染色体重组(易位、缺失)可能,大大增加了基因编辑的不良反应风险<sup>[65]</sup>。更精准基因编辑系统的研发是这一问题解决途径。

目前,CAR元件主要是通过随机整合的方式整合到细胞的基因组中,这样会带来致癌的潜在安全隐患。每个细胞的拷贝数和插入位置都不一样,也会使得CAR-T细胞产品的均一性比较差,从而导致疗效不稳定。不少临床试验也选择了将CAR序列通过基因编辑定点插入TRAC或者PD-1位点。定点整合除了整合CAR外,也可以整合其他分子(如PD-1抗体、细胞因子等),可以进一步促进T细胞扩增及其活性发挥<sup>[78-79]</sup>。

### 5.2 非病毒载体RNP递送

Cas9-RNP是有Cas9蛋白和gRNA构成的复合物,

通过电转染或者纳米颗粒等其他非病毒载体递送进入T细胞,仅在短短几天内表达,降低了脱靶概率,并避免了Cas9持续表达对宿主免疫系统潜在激活的可能,能够完美解决病毒载体的致瘤性、脱靶问题和免疫原性。该体系灵活易扩展,可以多条gRNA靶向同一基因,或者靶向多个基因,增加线性同源臂的模板序列后还能进行定点插入。无论是CRISPR/Cas9或者单碱基编辑等其他编辑策略,采用RNP形式递送是一种相对更加安全有效的途径。而且在体内递送中,非病毒载体相比病毒载体,装载容量大,更容易实现细胞特异性靶向,也具备更小的免疫原性,是递送RNP的优选方案。

### 5.3 更安全高效的新型编辑系统

传统的CRISPR/Cas9编辑和TALEN编辑都要形成DSB,在多位点编辑时显得尤为严重,大量游离的DNA双链末端极大地增加了基因组不稳定性。因此,不引起DSB的基因编辑方式应运而生,主要有单碱基编辑、引导编辑、CRISPRa/CRISPRi及表观编辑。

利用单碱基编辑同时对T细胞中 $\beta 2 M$ /CII TA/TRAC或者TRAC/ $\beta 2 M$ /PDCD-1三位点编辑的CAR-T细胞展示了良好的编辑效率和细胞活性<sup>[80-81]</sup>。单碱基编辑的CD7 CAR-T细胞治疗T细胞白血病已在临床开展,显示了强大的潜能,在92.9%细胞中均实现了对CD7/CD52/TRAC/PD-1共4个位点同时编辑敲除,且未观察到染色体易位<sup>[82-83]</sup>。但单碱基编辑可能存在较为严重的脱靶编辑,有待改进。引导编辑相对来说脱靶率极低,可以实现数十个碱基长度的增减,而双引导编辑(TwinPE)则通过连用两个PE解决了编辑长度限制,能够满足绝大多数基因编辑需求。然而对于引导编辑,其编辑效率有待提高。

CRISPRi/CRISPRa及表观编辑通过调控转录影响基因表达,也不形成DSB,在多位点编辑中也具有应用前景。此外,通过激活CXCR2、CXCR3、CCR7等或它们的配体表达,可以促进T细胞或者NK细胞浸润入实体瘤<sup>[84-86]</sup>;而促进IL-15、IL-7、IL-12、IL-21等表达可以促进T细胞在体内扩增和存活,增强抗肿瘤效应<sup>[78,87]</sup>。但是CRISPRa/CRISPRi编辑的维持需要dCas9和gRNA持续表达,增加了脱靶和自身免疫的风险,而表观编辑具有一定的遗传稳定性,更具应用价值。然而,表观编辑难以同时对基因的沉默和激活,而目前通用CAR-T细胞等治疗中首要的是对TCR基因的沉默,因此其应用受到限制。在编辑删除某个基因时定点置换入这些细胞因子或趋化因子受体可能是目前较为可行的策略。

### 5.4 体内编辑和时空可控编辑

通过病毒或纳米材料递送进行体内基因编辑,

用于治疗遗传性疾病的临床试验已有不少,主要集中在眼部、肌肉和脑等可及部位,而肿瘤治疗方面还仅仅停留在动物实验阶段<sup>[88]</sup>。肿瘤研究治疗方面对基因进

行体内编辑的策略主要是靶向肿瘤细胞癌基因,在体的CAR-T细胞编辑治疗相信不久也会得到应用。

表1 ClinicalTrials注册的肿瘤基因编辑治疗临床试验

编辑技术	注册号	靶基因	肿瘤	治疗细胞	来源	国别	开始年份	文献/备注
CRISPR	NCT02793856	PDCD1	非小细胞肺癌	外周血淋巴细胞	自体	中国	2016	[60]
	NCT03081715	PDCD1	食管癌	外周血淋巴细胞	自体	中国	2017	
	NCT03044743	PDCD1	EBV*肿瘤	EBV-CTL	自体	中国	2017	[61]
	NCT03229876	PDCD1	B细胞白血病或淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	中国	2017	[103]/定点插入
	NCT03166878	β2M, TCR	B细胞白血病或淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	中国	2017	
	NCT03545815	PDCD1, TCR	间皮素*实体瘤	间皮素 CAR-T	自体	中国	2018	[62]
	NCT03747965	PDCD1	间皮素*实体瘤	间皮素 CAR-T	自体	中国	2018	[63]
	NCT03399448	PDCD1, TRAC,	多发性骨髓瘤	NY-ESO-1 TCR-T	自体	美国	2018	[65]
		TRBC						
	NCT03398967	TRAC, CD52	B细胞白血病或淋巴瘤	CD19/CD20或 CD19/CD22 CAR-T	异体	中国	2018	[59]
	NCT03752541	TRAC, β2M	多发性骨髓瘤	BCMA CAR-T	异体	中国	2018	
	NCT04037566	HPK1	B细胞白血病或淋巴瘤	CD19 CAR-T	自体	中国	2019	
	NCT04035434	β2M, TRAC	B细胞白血病或淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	瑞士- 美国	2019	[104]/定点插入
	NCT04244656	β2M, TRAC	多发性骨髓瘤	BCMA CAR-T	异体	瑞士- 美国	2020	
	NCT04438083	β2M, TRAC	肾癌	CD70 CAR-T	异体	瑞士- 美国	2020	
	NCT04502446	β2M, TRAC	T细胞淋巴瘤	CD70 CAR-T	异体	瑞士- 美国	2020	
	NCT04264078	TRAC, CD7	T细胞白血病或淋巴瘤	CD7 CAR-T	异体	中国	2020	[58]
	NCT04557436	TRAC, CD52	B细胞白血病	CD19 CAR-T	异体	英国	2020	
	NCT04637763	PDCD1, TRAC	B细胞淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	美国	2020	定点插入
	NCT04227015	TRAC, CD52	B细胞白血病或淋巴瘤	CD19/CD22 CAR-T	异体	中国	2020	
NCT04629729	TRAC	B细胞淋巴瘤	CD19 CAR-T	干细胞	美国	2020	定点插入	
NCT04426669	CISH	胃肠肿瘤	新抗原- TIL	自体	美国	2020		
NCT04417764	PDCD1	肝癌	外周血T细胞	自体	中国	2020		
NCT03057912	E6/E7	HPV 相关肿瘤	HPV E6/E7*	体内	中国	2017		
TALEN	NCT02746952,	TRAC, CD52	B细胞急性白血病	CD19 CAR-T	异体	法国- 美国	2016	[105]
	NCT02808442							
	NCT03190278	TRAC, CD52	急性髓系白血病	CD123 CAR-T	异体	法国- 美国	2017	
	NCT04142619	TRAC,SLAMF7	多发性骨髓瘤	SLAMF7 CAR-T	异体	法国- 美国	2019	
	NCT04150497	TRAC, CD52	B细胞急性白血病	CD22 CAR-T	异体	法国- 美国	2019	
NCT04093596	TRAC, D52	多发性骨髓瘤	BCMA CAR-T	异体	美国	2019		
NCT03939026	TRAC, D52	淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	美国	2019		
NCT04416984	TRAC, D52	淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	美国	2020		
ARCUS	NCT03666000	TRAC	白血病、淋巴瘤	CD19 CAR-T	异体	美国	2018	定点插入
	NCT04030195	TRAC	白血病、淋巴瘤	CD20 CAR-T	异体	美国	2019	定点插入
	NCT04171843	TRAC	多发性骨髓瘤	BCMA CAR-T	异体	美国	2019	定点插入

数据引自 <https://clinicaltrials.gov/>; \*为利用TALEN和CRISPR/Cas9策略靶向HPV E6/E7基因的质粒

肿瘤细胞的体内编辑依赖于各种纳米颗粒载体,常用的有脂质体、聚合物纳米颗粒、金纳米颗粒、纳米凝胶等。脂质纳米颗粒荷载Cas9 mRNA在脑胶质瘤中实现了70%的编辑效率<sup>[26]</sup>。脂质体凝胶递送CRSIPR质粒,静脉给药,在乳腺癌中实现了81%的编辑效率<sup>[28]</sup>。无机金纳米颗粒递送RNP在体内也收获了良好的抗肿瘤疗效<sup>[89]</sup>。然而,全身给药可能造成基因异位编辑,增加治疗的毒性,若能控制编辑系统在局部释放发挥效应,则可以极大地增加治疗的安全性。为顺应这种需求,时空可控的基因编辑递送策略应运而生,其主要通过给纳米载体表面添加肿瘤靶向配体、抗体或者核酸适配体,以实现纳米颗粒在肿瘤的特异性富集<sup>[26,39,79]</sup>。更加精准的时空可控基因编辑,还可以通过与光动力疗法和光热疗法等其他疗法联合来实现<sup>[90-91]</sup>。RNP体系同光敏物质共同通过纳米颗粒静脉递送后,利用肿瘤局部近红外或者光热作用,RNP得以释放发挥编辑作用,可以精准地将编辑限制在肿瘤局部<sup>[89,92-93]</sup>。此外,利用外泌体等天然纳米载体也可以实现RNP的体内靶向递送<sup>[94]</sup>。

CAR-T细胞等过继细胞治疗临床试验中基因编辑都是体外进行的,若能实现体内安全有效递送编辑,也将极大地增加基因编辑治疗的可及性和降低成本<sup>[95]</sup>。虽然目前还没有体内T细胞基因编辑试验,但已有报道通过病毒体内原位构建CAR-T细胞<sup>[95-96]</sup>;其主要通过在病毒包膜蛋白上融合不同ScFv抗体(CD4/CD8/CD3)来实现T细胞特异性靶向<sup>[97-100]</sup>。非病毒载体通过在其表面镶嵌相应抗体,也可以实现CAR基因的T细胞靶向<sup>[101-102]</sup>。荷载CAR的载体也可以装载CRISPR/Cas9系统进行体内递送,相信在不久的将来,CAR-T细胞和TCR-T细胞的体内原位构建也会不断涌现,体内编辑必将在未来肿瘤生物治疗中大放异彩。

## 6 结 语

基因编辑技术,尤其CRISPR/Cas9技术是新世纪最重要的发现之一。得益于CRISPR,基因治疗正在迅速发展,肿瘤生物治疗只是其最具前景的领域之一。无论是靶向肿瘤细胞的基因治疗,抑或近来爆发式增长的过继免疫细胞治疗,在基因编辑技术的加持下,都迎来了革命性的转变。基因编辑加速了肿瘤细胞和免疫细胞中生物治疗新靶点的发现,推动了癌基因、抑癌基因、表观分子、耐药基因等“肿瘤细胞正常化”靶向编辑新策略的提出,促进了CAR-T、TCR-T细胞等过继细胞治疗方法向“通用型”、“即用型”的迭代,也极大地加速了CAR-T细胞等细胞治疗的临床应用。基因编辑治疗虽然并非完美,还存在脱靶、递送和安全性等问题,但随着新的递送材料和策略的出现,以及新型编辑体系的迭代创新,基因编

辑必将朝着更加高效、低毒、安全的方向发展,更低的成本也使之能惠及更多的肿瘤患者,基因编辑在肿瘤生物治疗中的前景值得期待。

## [参 考 文 献]

- [1] KHAN S H. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 326-334[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6454098/>. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.027.
- [2] HE C L, HAN S Q, CHANG Y, *et al.* CRISPR screen in cancer: status quo and future perspectives[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(4): 1031-1050[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8085856/>.
- [3] CHEN S D, SANJANA N E, ZHENG K J, *et al.* Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis[J/OL]. *Cell*, 2015, 160(6): 1246-1260[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380877/>. DOI: 10.1016/j.cell.2015.02.038.
- [4] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, *et al.* Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation[J/OL]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-661[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253859/>. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029.
- [5] TENG S S, LI Y E, YANG M, *et al.* Tissue-specific transcription reprogramming promotes liver metastasis of colorectal cancer[J/OL]. *Cell Res*, 2020, 30(1): 34-49[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6951341/>. DOI: 10.1038/s41422-019-0259-z.
- [6] BEHAN F M, IORIO F, PICCO G, *et al.* Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens[J/OL]. *Nature*, 2019, 568(7753): 511-516[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/5461196/>. DOI: 10.1038/s41586-019-1103-9.
- [7] XU S W, ZHAN M, JIANG C, *et al.* Genome-wide CRISPR screen identifies ELP5 as a determinant of gemcitabine sensitivity in gallbladder cancer[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5492[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6889377/>. DOI: 10.1038/s41467-019-13420-x.
- [8] XU G T, CHHANGAWALA S, COCCO E, *et al.* ARID1A determines luminal identity and therapeutic response in estrogen-receptor-positive breast cancer[J/OL]. *Nat Genet*, 2020, 52(2): 198-207[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7341683/>. DOI: 10.1038/s41588-019-0554-0.
- [9] GAUTRON A, BACHELOT L, AUBRY M, *et al.* CRISPR screens identify tumor-promoting genes conferring melanoma cell plasticity and resistance[J/OL]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(5): e13466[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8103100/>. DOI: 10.15252/emmm.202013466.
- [10] OSER M G, FONSECA R, CHAKRABORTY A A, *et al.* Cells lacking the *RBI* tumor suppressor gene are hyperdependent on aurora B kinase for survival[J/OL]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 230-247[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6368871/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0389.
- [11] SHU S K, WU H J, GE J Y, *et al.* Synthetic lethal and resistance interactions with BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer[J/OL]. *Mol Cell*, 2020, 78(6): 1096-1113.e8[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7306005/>.



- DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.027.
- [12] LAWSON K A, SOUSA C M, ZHANG X Y, *et al.* Functional genomic landscape of cancer-intrinsic evasion of killing by T cells [J/OL]. *Nature*, 2020, 586(7827): 120-126[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9014559/>. DOI: 10.1038/s41586-020-2746-2.
- [13] MANGUSO R T, POPE H W, ZIMMER M D, *et al.* *In vivo* CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target[J/OL]. *Nature*, 2017, 547(7664): 413-418[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5924693/>. DOI: 10.1038/nature23270.
- [14] PAN D, KOBAYASHI A, JIANG P, *et al.* A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing[J/OL]. *Science*, 2018, 359(6377): 770-775[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5953516/>. DOI: 10.1126/science.aa01710.
- [15] JOUNG J, KIRCHGATTERER P C, SINGH A, *et al.* CRISPR activation screen identifies BCL-2 proteins and B3GNT2 as drivers of cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity[J/OL]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1606[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8956604/>. DOI: 10.1038/s41467-022-29205-8.
- [16] DONG M B, TANG K Y, ZHOU X Y, *et al.* Tumor immunology CRISPR screening: present, past, and future[J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(3): 210-225. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.11.009.
- [17] OU X J, MA Q Z, YIN W, *et al.* CRISPR/Cas9 gene-editing in cancer immunotherapy: promoting the present revolution in cancer therapy and exploring more[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 674467[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8172808/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.674467.
- [18] OKADA M, CHIKUMA S, KONDO T, *et al.* Blockage of core fucosylation reduces cell-surface expression of PD-1 and promotes anti-tumor immune responses of T cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(5): 1017-1028. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.027.
- [19] SHANG W J, JIANG Y, BOETTCHER M, *et al.* Genome-wide CRISPR screen identifies FAM49B as a key regulator of actin dynamics and T cell activation[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(17): E4051-E4060[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5924929/>. DOI: 10.1073/pnas.1801340115.
- [20] SHIFRUT E, CARNEVALE J, TOBIN V, *et al.* Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function[J/OL]. *Cell*, 2018, 175(7): 1958-1971.e15[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689405/>. DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.024.
- [21] DONG M B, WANG G C, CHOW R D, *et al.* Systematic immunotherapy target discovery using genome-scale *in vivo* CRISPR screens in CD8 T cells[J/OL]. *Cell*, 2019, 178(5): 1189-1204.e23[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6719679/>. DOI: 10.1016/j.cell.2019.07.044.
- [22] YE L P, PARK J J, DONG M B, *et al.* *In vivo* CRISPR screening in CD8 T cells with AAV-Sleeping Beauty hybrid vectors identifies membrane targets for improving immunotherapy for glioblastoma [J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(11): 1302-1313[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834896/>. DOI: 10.1038/s41587-019-0246-4.
- [23] WEI J, LONG L Y, ZHENG W T, *et al.* Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy[J/OL]. *Nature*, 2019, 576(7787): 471-476[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6937596/>. DOI: 10.1038/s41586-019-1821-z.
- [24] KHOSHNEJAD M, BRENNER J S, MOTLEY W, *et al.* Molecular engineering of antibodies for site-specific covalent conjugation using CRISPR/Cas9[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1760[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5789018/>. DOI: 10.1038/s41598-018-19784-2.
- [25] YUAN M, ZHANG W S, WANG J, *et al.* Efficiently editing the vaccinia virus genome by using the CRISPR-Cas9 system[J/OL]. *J Virol*, 2015, 89(9): 5176-5179[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403460/>. DOI: 10.1128/JVI.00339-15.
- [26] ROSENBLUM D, GUTKIN A, KEDMI R, *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy [J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(47): eabc9450[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7673804/>. DOI: 10.1126/sciadv.abc9450.
- [27] LI C H, YANG T R, WENG Y H, *et al.* Ionizable lipid-assisted efficient hepatic delivery of gene editing elements for oncotherapy[J/OL]. *Bioact Mater*, 2022, 9: 590-601[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8604671/>. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.051.
- [28] GUO P, YANG J, HUANG J, *et al.* Therapeutic genome editing of triple-negative breast tumors using a noncationic and deformable nanolipogel[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(37): 18295-18303[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6744870/>. DOI: 10.1073/pnas.1904697116.
- [29] KIM W, LEE S, KIM H S, *et al.* Targeting mutant *KRAS* with CRISPR-Cas9 controls tumor growth[J/OL]. *Genome Res*, 2018, 28(3): 374-382[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5848616/>. DOI: 10.1101/gr.223891.117.
- [30] DENG H, TAN S W, GAO X Q, *et al.* *Cdk5* knocking out mediated by CRISPR-Cas9 genome editing for PD-L1 attenuation and enhanced antitumor immunity[J/OL]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(2): 358-373[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016277/>. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.07.004.
- [31] CHIRA S, GULEI, HAJITOU A, *et al.* Restoring the p53 'guardian' phenotype in p53-deficient tumor cells with CRISPR/Cas9[J]. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(7): 653-660. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.01.014.
- [32] WU Y, JIN W L, WANG Q X, *et al.* Precise editing of FGFR3-TACC3 fusion genes with CRISPR-Cas13a in glioblastoma[J/OL]. *Mol Ther*, 2021, 29(11): 3305-3318[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8571169/>. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.07.002.
- [33] CAO C C, YAO L, LI A L, *et al.* A CRISPR/dCasX-mediated transcriptional programming system for inhibiting the progression of bladder cancer cells by repressing c-MYC or activating TP53[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(9): e537[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8441141/>. DOI: 10.1002/ctm2.537.
- [34] HE Z Y, ZHANG Y G, YANG Y H, *et al.* *In vivo* ovarian cancer gene therapy using CRISPR-Cas9[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(2): 223-233. DOI: 10.1089/hum.2017.209.
- [35] GOOD C R, PANJARIAN S, KELLY A D, *et al.* TET1-mediated hypomethylation activates oncogenic signaling in triple-negative breast cancer[J/OL]. *Cancer Res*, 2018, 78(15): 4126-4137[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6072603/>.



- DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2082.
- [36] PETTITT S J, KRASTEV D B, BRANDSMA I, *et al.* Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1849. DOI: 10.1038/s41467-018-03917-2.
- [37] HA J S, BYUN J, AHN D R. Overcoming doxorubicin resistance of cancer cells by Cas9-mediated gene disruption[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22847. DOI: 10.1038/srep22847.
- [38] LIN M, YANG Z, YANG Y, *et al.* CRISPR-based *in situ* engineering tumor cells to reprogram macrophages for effective cancer immunotherapy[J/OL]. *Nano Today*, 2022, 42: 101359[2023-02-08]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101359>. DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101359.
- [39] HE X Y, REN X H, PENG Y, *et al.* Aptamer/peptide-functionalized genome-editing system for effective immune restoration through reversal of PD-L1-mediated cancer immunosuppression[J/OL]. *Adv Mater*, 2020, 32(17): e2000208 [2023-02-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32147886/>. DOI: 10.1002/adma.202000208.
- [40] ZHANG Z Z, WANG Q X, LIU Q, *et al.* Dual-locking nanoparticles disrupt the PD-1/PD-L1 pathway for efficient cancer immunotherapy [J/OL]. *Adv Mater*, 2019, 31(51): e1905751[2023-02-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31709671/>. DOI: 10.1002/adma.201905751.
- [41] DIMITRI A, HERBST F, FRAIETTA J A. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 78[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8932053/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01559-z.
- [42] SCHOBER K, MÜLLER T R, GÖKMEN F, *et al.* Orthotopic replacement of T-cell receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains with preservation of near-physiological T-cell function[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(12): 974-984. DOI: 10.1038/s41551-019-0409-0.
- [43] VILLIGER L, ROTHGANGL T, WITZIGMANN D, *et al.* *In vivo* cytidine base editing of hepatocytes without detectable off-target mutations in RNA and DNA[J/OL]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(2): 179-189[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7610981/>. DOI: 10.1038/s41551-020-00671-z.
- [44] CREELAN B C, ANTONIA S J. The NKG2A immune checkpoint—a new direction in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(5): 277-278. DOI: 10.1038/s41571-019-0182-8.
- [45] HE X, XU C Q. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy[J]. *Cell Res*, 2020, 30(8): 660-669. DOI: 10.1038/s41422-020-0343-4.
- [46] ZHI L T, SU X, YIN M C, *et al.* Genetical engineering for NK and T cell immunotherapy with CRISPR/Cas9 technology: implications and challenges[J]. *Cell Immunol*, 2021, 369: 104436. DOI: 10.1016/j.cellimm.2021.104436.
- [47] CHEN J, LÓPEZ-MOYADO I F, SEO H, *et al.* NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours[J/OL]. *Nature*, 2019, 567(7749): 530-534[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6546093/>. DOI: 10.1038/s41586-019-0985-x.
- [48] KHAN O, GILES J R, MCDONALD S, *et al.* TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion[J/OL]. *Nature*, 2019, 571(7764): 211-218[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6713202/>. DOI: 10.1038/s41586-019-1325-x.
- [49] TANG N, CHENG C, ZHANG X Y, *et al.* TGF- $\beta$  inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors[J/OL]. *JCI Insight*, 2020, 5(4): e133977[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7101140/>. DOI: 10.1172/jci.insight.133977.
- [50] JUNG I Y, KIM Y Y, YU H S, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knockout of DGK improves antitumor activities of human T cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(16): 4692-4703. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0030.
- [51] DAHER M, BASAR R, GOKDEMIR E, *et al.* Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells[J/OL]. *Blood*, 2021, 137(5): 624-636[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7869185/>. DOI: 10.1182/blood.2020007748.
- [52] SUBRAKOVA V G, KULEMZIN S V, BELOVEZHETS T N, *et al.* Shp-2 gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK cells[J/OL]. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*, 2020, 24(1): 80-86[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7716529/>. DOI: 10.18699/VJ20.598.
- [53] 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/OL]. *Blood*, 2019, 133(7): 697-709[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6376281/>. DOI: 10.1182/blood-2018-10-881722.
- [54] YI Y, CHAI X S, ZHENG L P, *et al.* CRISPR-edited CART with GM-CSF knockout and auto secretion of IL6 and IL1 blockers in patients with hematologic malignancy[J/OL]. *Cell Discov*, 2021, 7(1): 27[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8079381/>. DOI: 10.1038/s41421-021-00255-4.
- [55] COX M J, MANRIQUEZ ROMAN C, TAPPER E E, *et al.* GM-CSF disruption in CART cells modulates T cell activation and enhances CART cell anti-tumor activity[J/OL]. *Leukemia*, 2022, 36(6): 1635-1645[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9234947/>. DOI: 10.1038/s41375-022-01572-7.
- [56] ROHIT MATHUR, ZHENG ZHANG, JIN H E, *et al.* Universal SLAMF7-specific CAR T-cells as treatment for multiple myeloma[J]. *Blood*, 2017, 130(Suppl): 502. DOI: 10.1182/blood.V130.Suppl\_1.502.502.
- [57] GURNEY M, STIKVOORT A, NOLAN E, *et al.* CD38 knockout natural killer cells expressing an affinity optimized CD38 chimeric antigen receptor successfully target acute myeloid leukemia with reduced effector cell fratricide[J/OL]. *Haematologica*, 2022, 107(2): 437-445[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8804573/>. DOI: 10.3324/haematol.2020.271908.
- [58] COOPER M L, CHOI J, STASER K, *et al.* An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies[J/OL]. *Leukemia*, 2018, 32(9): 1970-1983[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102094/>. DOI: 10.1038/s41375-018-0065-5.
- [59] HU Y X, ZHOU Y L, ZHANG M M, *et al.* CRISPR/Cas9-engineered universal CD19/CD22 dual-targeted CAR-T cell therapy for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(10): 2764-2772. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3863.
- [60] LU Y, XUE J X, DENG T, *et al.* Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer [J/OL]. *Nat Med*, 2020, 26(5): 732-740[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/3795411/>. DOI: 10.1038/s41591-020-

- 0840-5.
- [61] WEI J, YAN J, SU S, *et al.* A phase I / II trial of CRISPR-Cas9-mediated PD-1 knockout Epstein-Barr virus cytotoxic lymphocytes (EBV-CTLs) for advanced stage EBV associated malignancies[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(15\_suppl): TPS3118. DOI: 10.1200/jco.2018.36.15\_suppl.tps3118.
- [62] WANG Z G, LI N, FENG K C, *et al.* Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors [J/OL]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2188-2198[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8429583/>. DOI: 10.1038/s41423-021-00749-x.
- [63] WANG Z G, CHEN M X, ZHANG Y, *et al.* Phase I study of CRISPR-engineered CAR-T cells with PD-1 inactivation in treating mesothelin-positive solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(15\_suppl): 3038. DOI: 10.1200/jco.2020.38.15\_suppl.3038.
- [64] ZHANG J Q, HU Y X, YANG J X, *et al.* Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL [J/OL]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-374[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9452296/>. DOI: 10.1038/s41586-022-05140-y.
- [65] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer[J/OL]. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365[2023-02-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32029687/>. DOI: 10.1126/science.aba7365.
- [66] GOPALAPPA R, SURESH B, RAMAKRISHNA S, *et al.* Paired D10A Cas9 nickases are sometimes more efficient than individual nucleases for gene disruption[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(12): e71[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158698/>. DOI: 10.1093/nar/gky222.
- [67] SCHOLEFIELD J, HARRISON P T. Prime editing—an update on the field[J]. *Gene Ther*, 2021, 28(7/8): 396-401. DOI: 10.1038/s41434-021-00263-9.
- [68] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J/OL]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4851738/>. DOI: 10.1038/nature16526.
- [69] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, *et al.* Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 276-282[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6401248/>. DOI: 10.1038/s41587-018-0011-0.
- [70] XU X S, CHEMPARATHY A, ZENG L P, *et al.* Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(20): 4333-4345. e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.008.
- [71] DAVIS J R, WANG X, WITTE I P, *et al.* Efficient *in vivo* base editing via single adeno-associated viruses with size-optimized genomes encoding compact adenine base editors[J/OL]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(11): 1272-1283[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9652153/>. DOI: 10.1038/s41551-022-00911-4.
- [72] FIX S M, JAZAERI A A, HWU P. Applications of CRISPR genome editing to advance the next generation of adoptive cell therapies for cancer[J/OL]. *Cancer Discov*, 2021, 11(3): 560-574[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8193798/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1083.
- [73] PORTEUS M H. A new class of medicines through DNA editing[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(10): 947-959. DOI: 10.1056/NEJMra1800729.
- [74] NAHMAD A D, REUVENI E, GOLDSCHMIDT E, *et al.* Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR-Cas9 cleavage [J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(12): 1807-1813[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7613940/>. DOI: 10.1038/s41587-022-01377-0.
- [75] HARBOTTLE J A. Immunotherapy to get on point with base editing [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2350-2357. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.04.003.
- [76] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors [J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 824-844[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/22745249/>. DOI: 10.1038/s41587-020-0561-9.
- [77] REN J T, ZHANG X H, LIU X J, *et al.* A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17002-17011[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5370017/>. DOI: 10.18632/oncotarget.15218.
- [78] LI Y, CONG Y N, JIA M M, *et al.* Targeting IL-21 to tumor-reactive T cells enhances memory T cell responses and anti-PD-1 antibody therapy[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 951[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7878483/>. DOI: 10.1038/s41467-021-21241-0.
- [79] PING Y, LI F, NAN S F, *et al.* Augmenting the effectiveness of CAR-T cells by enhanced self-delivery of PD-1-neutralizing scFv [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 803[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7461868/>. DOI: 10.3389/fcell.2020.00803.
- [80] WEBBER B R, LONETREE C L, KLUESNER M G, *et al.* Highly efficient multiplex human T cell engineering without double-strand breaks using Cas9 base editors[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5222[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6864045/>. DOI: 10.1038/s41467-019-13007-6.
- [81] GAUDELLI N M, LAM D K, REES H A, *et al.* Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 892-900[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/5726555/>. DOI: 10.1038/s41587-020-0491-6.
- [82] INC B T. Beam therapeutics names first CAR-T base editing development candidate for the treatment of T-ALL and presents new data at SITC 2020[EB/OL]. [2023-02-08]. <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/11/09/2122772/0/en/>.
- [83] DIORIO C, MURRAY R, NANIONG M, *et al.* Cytosine base editing enables quadruple-edited allogeneic CART cells for T-ALL[J/OL]. *Blood*, 2022, 140(6): 619-629[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9373016/>. DOI: 10.1182/blood.2022015825.
- [84] WENNERBERG E, KREMER V, CHILDS R, *et al.* CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(2): 225-235. DOI: 10.1007/s00262-014-1629-5.
- [85] KREMER V, LIGTENBERG M A, ZENDEHDEL R, *et al.* Genetic

- engineering of human NK cells to express CXCR2 improves migration to renal cell carcinoma[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 73[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5604543/>. DOI: 10.1186/s40425-017-0275-9.
- [86] CARLSTEN M, LEVY E, KARAMBELKAR A, *et al.* Efficient mRNA-based genetic engineering of human NK cells with high-affinity CD16 and CCR7 augments rituximab-induced ADCC against lymphoma and targets NK cell migration toward the lymph node-associated chemokine CCL19[J/OL]. *Front Immunol*, 2016, 7: 105[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4801851/>. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00105.
- [87] ADACHI K, KANO Y, NAGAI T, *et al.* IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 346-351. DOI: 10.1038/nbt.4086.
- [88] BEHR M, ZHOU J, XU B, *et al.* *In vivo* delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: progress and challenges[J/OL]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(8): 2150-2171[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8424283/>. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.020.
- [89] WANG P, ZHANG L M, XIE Y, *et al.* Genome editing for cancer therapy: delivery of Cas9 protein/sgRNA plasmid *via* a gold nanocluster/lipid core-shell nanocarrier[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2017, 4(11): 1700175[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5700650/>. DOI: 10.1002/adv.201700175.
- [90] CAI W Q, LUO T L, MAO L Q, *et al.* Spatiotemporal delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery using stimuli-responsive vehicles[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60(16): 8596-8606. DOI: 10.1002/anie.202005644.
- [91] CHEN X H, CHEN Y X, XIN H H, *et al.* Near-infrared optogenetic engineering of photothermal nanoCRISPR for programmable genome editing[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(5): 2395-2405[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7007568/>. DOI: 10.1073/pnas.1912220117.
- [92] DENG S H, LI X X, LIU S, *et al.* Codelivery of CRISPR-Cas9 and chlorin e6 for spatially controlled tumor-specific gene editing with synergistic drug effects[J/OL]. *Sci Adv*, 2020, 6(29): eabb4005 [2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7439618/>. DOI: 10.1126/sciadv.abb4005.
- [93] WANG P, ZHANG L M, ZHENG W F, *et al.* Thermo-triggered release of CRISPR-Cas9 system by lipid-encapsulated gold nanoparticles for tumor therapy[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(6): 1491-1496. DOI: 10.1002/anie.201708689.
- [94] WAN T, ZHONG J F, PAN Q, *et al.* Exosome-mediated delivery of Cas9 ribonucleoprotein complexes for tissue-specific gene therapy of liver diseases[J/OL]. *Sci Adv*, 2022, 8(37): eabp9435[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9473578/>. DOI: 10.1126/sciadv.abp9435.
- [95] NAWAZ W, HUANG B L, XU S J, *et al.* AAV-mediated *in vivo* CAR gene therapy for targeting human T-cell leukemia[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(6): 119[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8222347/>. DOI: 10.1038/s41408-021-00508-1.
- [96] XIN T Q, CHENG L, ZHOU C C, *et al.* *In-vivo* induced CAR-T cell for the potential breakthrough to overcome the barriers of current CAR-T cell therapy[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 809754 [2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8866962/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.809754.
- [97] PFEIFFER A, THALHEIMER F B, HARTMANN S, *et al.* *In vivo* generation of human CD19-CAR T cells results in B-cell depletion and signs of cytokine release syndrome[J/OL]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(11): e9158[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6220327/>. DOI: 10.15252/emmm.201809158.
- [98] AGARWAL S, WEIDNER T, THALHEIMER F B, *et al.* *In vivo* generated human CAR T cells eradicate tumor cells[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(12): e1671761[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844313/>. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1671761.
- [99] FRANK A M, BRAUN A H, SCHEIB L, *et al.* Combining T-cell-specific activation and *in vivo* gene delivery through CD3-targeted lentiviral vectors[J/OL]. *Blood Adv*, 2020, 4(22): 5702-5715[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7686896/>. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002229.
- [100] JAMALI A, KAPITZA L, SCHASER T, *et al.* Highly efficient and selective CAR-gene transfer using CD4- and CD8-targeted lentiviral vectors[J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 13: 371-379[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453803/>. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.03.003.
- [101] SMITH T T, STEPHAN S B, MOFFETT H F, *et al.* *In situ* programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers[J/OL]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(8): 813-820[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5646367/>. DOI: 10.1038/nnano.2017.57.
- [102] PARAYATH N N, STEPHAN S B, KOEHNE A L, *et al.* *In vitro*-transcribed antigen receptor mRNA nanocarriers for transient expression in circulating T cells *in vivo*[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6080[2023-02-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7695830/>. DOI: 10.1038/s41467-020-19486-2.
- [103] ZHANG J Q, HU Y X, YANG J X, *et al.* Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-374. DOI: 10.1038/s41586-022-05140-y.
- [104] THERAPEUTICS C. CRISPR therapeutics reports positive results from its phase 1 CARBON trial of CTX110™ in relapsed or refractory CD19<sup>+</sup> B-cell malignancies[EB/OL]. (2021-10-12)[2023-02-08]. <https://bit.ly/3axxaBE>.
- [105] 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): 1885-1894. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32334-5.

[收稿日期] 2023-02-10

[修回日期] 2023-03-05

[本文编辑] 党瑞山, 沈志超