

基因修饰体细胞国内外临床研究和相关产业现状及未来发展趋势

王征旭¹, 游嘉¹, 武立华¹, 童春容², 吴迪³, 刘彩霞³, 昌晓红⁴, 程洪艳⁴, 程金莲⁵, 王少华⁶, 曹彩^{6*}, 马洁^{3*}

1. 中国人民解放军总医院 第七医学中心, 北京 100700

2. 高博医学(血液病)北京研究中心 北京博仁医院, 北京 100070

3. 北京医院生物治疗中心 国家老年医学中心 中国医学科学院老年医学研究院, 北京 100730

4. 北京大学人民医院, 北京 100044

5. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010

6. 中关村玖泰药物临床试验技术创新联盟, 北京 100101

摘要: 基因编辑技术可针对性增强体细胞的靶向性, 一定程度上解决了传统过继性免疫疗法在肿瘤等多种疾病治疗中显露出的靶向性差等问题。最具代表性的是嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)免疫疗法, 其在血液系统肿瘤治疗中已取得良好疗效, 此外, T细胞受体基因工程化的T细胞(TCR-T)、基因修饰的树突状细胞以及基因修饰的干细胞在多种疾病治疗的临床研究中也显现了良好的安全性和有效性。目前国内外多家研究机构和生物公司已在基因修饰体细胞行业加速布局, 相关产业即将进入快速发展期, 基因修饰体细胞疗法的临床转化应用具有广阔前景, 对目前已经开展疾病临床研究的几种基因修饰免疫细胞疗法进行总结。

关键词: 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T); 自然杀伤(NK)细胞; CAR-NK; T细胞受体基因工程化的T细胞(TCR-T); 基因修饰树突状细胞; 基因修饰干细胞

中图分类号: R926 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)02-0250-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.02.003

Current situation and future development on clinical research and related industries of genetically modified somatic cells

WANG Zhengxu¹, YOU Jia¹, WU Lihua¹, TONG Chunrong², WU Di², LIU Caixia³, CHANG Xiaohong⁴, CHENG Hongyan⁴, CHENG Jinlian⁵, WANG Shaohua⁶, CAO Cai⁶, MA Jie³

1. Seventh Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100700, China

2. Beijing Boren Hospital, GoBroad Medical Institute of Hematology, GoBroad Healthcare Group, Beijing 100070, China

3. Center of Biotherapy, Beijing Hospital, National Center of Gerontology; Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

4. Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

5. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China

6. Zhongguancun Jiutai Good Clinical Practice Union, Beijing 100101, China

Abstract: The Gene editing technology could enhance the on-target of somatic cells, and partially resolve the problem of off-target of the adoptive immunotherapy in the treatment of tumors and the other diseases. One of the most representative methods is CAR-T cell therapy, which has been achieved well curative effect in the treatment of hematological tumors. In addition, the treatment methods which include using TCR-T cells, genetically modified dendritic cells and genetically modified stem cells have also been shown well safety and effectiveness in the clinical research of various diseases. In view of this, many research institutions and biological companies in China and the other countries have accelerated their deployment in the fields of genetically modified

收稿日期: 2021-01-08

基金项目: 国家科技重大专项课题——重大新药创制(2016ZX09101094);北京市科委企业技术创新平台建设(Z181100000518028)

第一作者: 王征旭,男,主任医师,硕士生导师,研究方向为干细胞生物学与肿瘤生物治疗。

*通信作者: 曹彩,女,主任药师,教授,硕士生导师,研究方向为临床研究。E-mail: caocai2k@aliyun.com

马洁,教授/研究员,博士生导师,研究方向为医学免疫、肿瘤纳米药物。E-mail: majie1965@163.com

somatic cell at now, and will be reaching a period of rapid development. The clinical transformation and application of genetically modified somatic cell therapy hold great promising in the future.

Key words: chimeric antigen receptors-modified T cells (CAR-T); natural killer (NK) cell; CAR-NK; T cell receptor (TCR)-T cell; gene-modified dendritic cell (DC); gene-modified stem cells

过去的几十年里,包括肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)疗法、淋巴因子激活性杀伤(lymphokine-activated killer, LAK)细胞疗法、细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞疗法、树突状细胞(dendritic cells, DC)疗法、自然杀伤(natural killer, NK)细胞治疗等几大类传统的过继性免疫治疗(adoptive cell transfer therapy, ACT)在肿瘤、糖尿病、肝病等多系统疾病的治疗和临床研究中体现出一定程度的有效性和安全性,但同时也显现出传统免疫细胞治疗靶向性差的缺点,而通过基因修饰手段增强其靶向性解决了这一问题,从而增强了免疫细胞的杀伤作用。目前,嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)免疫疗法已在血液系统肿瘤治疗中取得了显著的成果,随之其他的基因修饰免疫细胞疗法如CAR-NK、T细胞受体(T cell receptor, TCR)基因工程化的T细胞(TCR-T)、基因修饰的DC等疗法也在积极的开展临床研究,以期尽早向临床转化。本文对目前已经开展疾病临床研究的几种基因修饰免疫细胞疗法进行总结。

1 TCR-T

近年来,TCR-T疗法已经从最开始的基础免疫研究走进临床应用,在实体瘤治疗中显示出初步疗效。其中靶向纽约食管鳞状细胞癌1(NY-ESO-1)的TCR-T在国内外治疗难治复发性黑色素瘤、滑膜肉瘤、多发性骨髓瘤和肺癌等临床试验研究中,已经展示了良好治疗效果和临床应用潜力,是目前最有可能在实体瘤取得突破的T细胞免疫疗法之一。

在肿瘤患者体内,存在肿瘤反应性T细胞。但是,这些天然抗肿瘤细胞来源受限、分离困难、在体外难以大量扩增,无法用于临床治疗。为了克服这些困难,可以从对肿瘤有应答作用的T细胞中将TCR编码基因分离出来,然后将TCR基因导入到普通T细胞并赋予后者肿瘤特异性杀伤能力,通过这种方式,能够快速生产大量的抗原特异性T细胞,满足应用需要^[1]。这些表达外源性特异TCR序列的T细胞被称为TCR-T,表达的外源性TCR能够识别特异抗原表位。从本质上讲,TCR-T就是具备明确抗原特异性的T细胞。因此,TCR-T对包括肿瘤细胞

在内的靶细胞识别过程与T细胞一样,具有TCR特异性、抗原表位唯一性以及主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex MHC)限制性等特点。

肿瘤抗原的识别是TCR-T治疗的重要决定因素。较为理想的TCR-T靶抗原是肿瘤特异性抗原(tumour-specific antigen, TSA),但由于目前发现且可用于临床治疗的TSA很少,因此,肿瘤相关抗原(tumour associated antigen, TAA)仍是目前TCR-T细胞研究的主要抗原靶点。近年来,TCR-T细胞研究中的靶点主要有新抗原(neoantigen)、过表达抗原、肿瘤-睾丸抗原(cancer/testis antigen, CT抗原)、组织分化抗原、病毒抗原等。

1.1 国内外TCR-T细胞治疗临床研究情况

TCR-T临床研究主要在实体瘤治疗中开展,在血液系统恶性肿瘤治疗方面仅有少量研究报道^[2-5]。早在1998年就有TCR-T治疗临床试验开始进行,但是在2006年利用MART-1特异性TCR-T治疗黑色素瘤成功后^[6],才有越来越多的相关临床试验开展。截止2020年8月份,在Clinical Trials网站注册的TCR-T临床试验多达120余项,其中部分临床试验已有了研究结果,并发表文章报道了疗效,为未来TCR-T过继回输治疗提供了重要参考。目前,进行TCR-T细胞治疗临床试验的肿瘤类型有黑色素瘤、滑膜肉瘤、直肠癌、食管癌和骨髓瘤等,研究靶点以NY-ESO-1为主。下面简要概述TCR-T细胞临床试验情况。

1.1.1 TCR-T治疗实体瘤 TCR-T治疗在实体瘤治疗中已经展示了良好的安全性和有效性。

(1)TCR-T治疗黑色素瘤 TCR-T临床试验的大规模开展始于2006年的2项靶向转移性黑色素瘤治疗的临床研究^[6]。其中,Duval等^[7]利用黑色素瘤分化抗原黑色素瘤抗原(MAGE)-1特异性TCR-T治疗了15例患者。尽管仅有1例患者出现了部分缓解,但该报道证明TCR-T治疗在人体中是安全的。随后,Morgan等^[6]报道了采用MART-1特异性TCR-T治疗17例黑色素瘤患者的临床研究结果,发现体外扩增的TCR-T能够在患者体内长期存活,甚至在2例患者中高水平持续了1年之久,并且这2例

患者出现了客观缓解。此后,随着TCR-T研究的深入,研究人员认识到TCR亲和性与治疗效果紧密相关。Johnson等^[8]使用MART-1高亲和力TCR-T对20例黑色素瘤转移患者进行了治疗,发现治疗后的客观缓解率达到30%。靶点抗原在肿瘤中的表达越广泛,则特异TCR-T治疗效果越好。Robbins等^[9]观察了NY-ESO-1特异性TCR-T细胞治疗黑色素瘤的效果,结果显示,多数黑色素瘤患者出现了客观临床反应,黑色素瘤患者的3年及5年生存率均达到33%。

(2)TCR-T治疗消化系统肿瘤 Rosenberg团队^[10-11]利用突变抗原特异性的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞分别治疗了胆管型肝癌和结肠癌患者,取得了较好效果。2017年,该研究团队进行了人类白细胞抗原(HLA)-DPB1限制性的MAGE-A3抗原特异性的TCR-T临床试验。该研究取得了较好结果,一例食管癌患者获得了长达4个月的部分缓解^[12]。

(3)TCR-T治疗其他类型实体瘤 TCR-T在一些滑膜肉瘤等肿瘤治疗中也取得了非常好的临床疗效。Robbins等^[9]发现,滑膜肉瘤患者在接受NY-ESO-1特异性TCR-T过继回输治疗后,多数滑膜肉瘤患者出现了客观临床反应,且3年及5年生存率分别达到了38%和14%。另一项研究报道^[5],24例滑膜肉瘤患者接受靶向HLA-A*0201限制性NY-ESO-1的TCR-T治疗后其中15例(62.5%)有客观缓解。另外还有针对鼻咽癌(NCT03925896)、口咽癌(NCT04015336)、肝癌(NCT04368182、NCT03971747)、胰腺癌(NCT04146298)、宫颈癌(NCT04476251)和非小细胞肺癌(NCT03778814)等多种实体瘤的临床试验正在开展。

1.1.2 TCR-T治疗血液系统肿瘤 TCR-T治疗在血液系统肿瘤开展的临床研究较少,但已取得了较好效果。

(1)TCR-T细胞治疗白血病 在利用表达高亲和力WT1特异性TCR(TCRC4)的CD8⁺T细胞(TTCR-C4)治疗急性髓系白血病的临床试验(NCT01640301)中,发现这种供体来源的、EB病毒(EBV)特异性的TCR-T可建立持久的T细胞应答,在接受TTCR-C4预防性输注的12例移植后患者无复发生存率(RFS)为100%(对照组RFS为54%,中位时间44个月),研究结果显示TTCR-C4可防止急性髓系白血病患者移植后复发^[13]。此外,还有其他WT1特异性的TCR-T治疗急性髓系白血

病(AML)和骨髓增生异常综合征(MDS)的临床研究(NCT02770820、NCT02550535)开展。同期,还有一项利用HA1特异性的记忆型TCR-T治疗复发急性混合型白血病的临床试验(NCT03326921)进行了注册。

(2)TCR-T细胞治疗多发性骨髓瘤 2015年,美国马里兰大学医学院、宾州大学医学院和Adaptimmune公司联合开展了NY-ESO-1特异性TCR-T治疗研究。在经治疗的多发性骨髓瘤患者中,80%患者出现较好的临床应答,其中70%患者达到完全或接近完全应答,平均无进展生存期达到19个月^[14]。另外还有TCR-T治疗造血干细胞移植后巨细胞病毒(CMV)感染(NCT04153279)、EBV感染(NCT04156217)的临床试验也在开展中。

1.2 TCR-T治疗产业现状

从技术的发展角度看,靶向性较差的传统免疫疗法终将离开肿瘤患者的治疗选项。随着更多肿瘤抗原靶点的开发以及细胞疗法的技术改进,TCR-T疗法将成为主流的肿瘤治疗手段。2015年《Cancer Letters》上首次发布的我国居民癌症统计数据结果显示,我国5年内诊断为癌症且仍存活的病例数约为749万,总体5年癌症患病率为556/10万人。2019年度的ASCO年会上提到了包括TCR-T在内的几种免疫细胞疗法的最新进展,考虑到TCR-T疗法在实体肿瘤治疗上可能取得的突破,可预见其未来将打开更大的市场空间。目前,国内外已有数家企业布局研发TCR-T疗法。

1.2.1 国际TCR-T细胞疗法研究现状 Immunocore公司的ImmTACs(Immune mobilising mTCR Against Cancer)产品是一类基于TCR的新生物药,具有治疗癌症、自身免疫性疾病和病毒感染的潜力。候选药物IMCgp100已经进入IIa期临床研究,用于治疗耐受性良好且未检测到耐药抗体的恶性黑色素瘤(资料来源于Immunocore官网)。总部位于德国慕尼黑的Medigene公司的TCR-T疗法治疗血液肿瘤的I/II期临床研究适应证包括AML、MDS和多发性骨髓瘤(资料来源于Medigene官网)。2015年5月上市的Adaptimmune公司,总部位于英国奥克森阿宾登,该公司独特的SPEAR(Specific Peptide Enhanced Affinity Receptor)T细胞平台通过对T细胞的改造使其靶向和摧毁包括实体瘤在内的多种恶性肿瘤细胞。根据该公司官网上的信息,已经进入临床试验Spear T细胞疗法包括ADP-A2M10(MAGE-A10)、ADP-A2M4(MAGE-A4)和

ADP-A2AFP。2017年9月,葛兰素史克(GlaxoSmithKline, GSK)通过与Adaptimmune Therapeutics合作获得了NY-ESO SPEAR T疗法的独家研发和推广权。GSK将进行NY-ESO SPEAR T疗法在滑膜肉瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、多发性骨髓瘤等多个癌种适应证中的进一步开发。NY-ESO SPEAR T疗法已经获得了FDA授予的孤儿药资格,适应证为软组织肉瘤(滑膜肉瘤、黏液样圆形脂肪肉瘤等)(资料来源于Adaptimmune 2018年报)。美国Adaptive Biotechnologies公司拥有的TruTCR筛查平台可通过免疫测序等技术来鉴定患者体内最佳的TCR,以便能够实施最有效的个性化治疗。Lion TCR公司致力于开发针对病毒性相关癌症(肝癌、鼻咽癌)以及慢性乙型和丁型肝炎的TCR-T疗法。2016年,Lion TCR在中新广州知识城设立了广州来恩生物医药有限公司,并建立了研发和生产基地,以促进其产品在中国的临床研究开展和商品化(资料来源于Lion TCR官网)。TCR2 Therapeutics公司独有的TRuC平台能对天然TCR进行改造,使其能识别肿瘤细胞特有抗原,从而激活T细胞并杀死癌细胞。与CAR-T细胞相比,TRuC-T细胞在体内具有优异的抗肿瘤活性,同时在临床前研究中释放出较低水平的细胞因子。不同于传统的单靶点TCR-T疗法,RootPath公司的TCR-T可以做到多靶点,从而对靶细胞进行“多角度攻击”。Kite公司除其主导的CAR-T产品外,同时也在开发TCR-T疗法,其中KITE-439和Kite-718两款产品正处于临床I期试验阶段并已初步显现出较好的安全性和有效性。

1.2.2 国内TCR-T疗法的研究情况 2012年,香雪制药公司率先开展应用TCR的肿瘤药物开发和TCR-T疗法研究,搭建了以TCR-T技术为核心的高亲和力的免疫治疗药物开发、临床治疗技术研发和转化平台。目前,该公司的高亲和TCR-T新药TAEST16001正在国内开展临床I期研究。优瑞科生物技术公司专有的“ARTEMIS”抗体-TCR(AbTCR)受体平台与TCR-T平台类似,AbTCR能够与CD3复合物结合,使得抗原/AbTCR参与触发内源性T细胞活化和调节途径。然而,与大多数TCR-T平台不同的是,基于 $\gamma\delta$ TCR的细胞内结构域和用于靶识别的抗体结合部分,AbTCR平台能够扩展到非MHC限制的目标(如CD19),并且避免了与T细胞内源性 $\alpha\beta$ TCR的错配风险。此外, $\gamma\delta$ TCR亚基对CD3具有比 $\alpha\beta$ TCR更高的亲和力,有利于增强

下游转导信号。因诺免疫公司和深圳市第二人民医院开展的靶向NY-ESO-1的TCR-T细胞临床研究(NCT02457650),主要针对包括晚期转移性滑膜肉瘤、黑色素瘤、膀胱癌、卵巢癌、肺癌、食道癌、乳腺癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、胆道癌、多发性骨髓瘤及神经母细胞瘤等各类晚期恶性肿瘤的治疗。以美国宾夕法尼亚大学CAR-T研究团队及中国科学院深圳先进技术学院为科研核心团队的深圳宾德生物技术有限公司(Shenzhen BinDeBio Technology Co., Ltd.)以国际联合免疫治疗研究中心为科研基地,致力于CAR-T、TCR-T疗法治疗血液系统肿瘤和多种实体瘤研究。可瑞生物公司已完成了通用型TCR-T(UTCR-T)关键技术平台和早期产品的建立,并开始规划和申报核心专利。据悉,可瑞生物的TCR-T研发技术体系涵盖特异性肿瘤抗原筛选鉴定、T细胞免疫表位鉴定、表位特异性TCR克隆、TCR亲和力优化和TCR临床前验证等技术。

2 基因修饰的DC

DC疗法在2011年获美国FDA核准并认证可用于癌症治疗。DC能够提供T细胞激活所需信号,这使其成为免疫反应的关键“决策细胞”和增强针对肿瘤抗原免疫反应的理想靶点。DC是目前已知功能最强大的抗原递呈细胞之一,但DC肿瘤疫苗成功的实验模型却未能转化为临床疗效,这可能与成熟度低、外源性负载的表位数较少等有关。基因修饰是通过导入编码TAA基因、免疫刺激分子、细胞因子、趋化因子、抗凋亡分子和其他增强DC功能因子的基因,使DC细胞表达TAA、免疫增强因子或下调其免疫负调控分子从而增强T细胞活化信号。基因修饰DC具有很多优势:非MHC限制性,可提供更多的抗原表位,保证持久的抗原表达,胞内加工的抗原提呈更有效,表达外源基因的病毒载体能刺激和激活DC,避免正常抗原负载可能存在的自身免疫反应等。

2.1 国内外基因修饰DC细胞治疗临床研究情况

较早的临床试验大多使用的是肿瘤相关抗原RNA或癌胚抗原(CEA)、白细胞介素(IL)-12等基因修饰DC。IL-12和肿瘤坏死因子(TNF)- α 基因修饰可使Th1免疫环境极化。IL-12修饰的DC瘤内给药可介导CD8⁺T细胞的招募和活化,有研究发现产IL-12的DC迁移受肿瘤来源IL-8抑制,并且它们的迁移能力可以通过使用抗IL-8抗体来恢复^[15]。另一种策略是通过改变DC与幼稚T细胞的相互作用来控制DC表达CCL21。CCL21可促进体内淋巴

结构的形成,从而可在体外激活初始T细胞,消除了DC进入局部淋巴结的需求。因此,也有CCL21修饰DC的相关临床试验开展。使用TriMix mRNA,与MAGE-A3、MAGE-C2、gp100或酪氨酸酶mRNA共电穿孔的转基因DC治疗35例转移性黑色素瘤的临床试验中,对T细胞浸润延迟型超敏反应的免疫监测显示,在第4次接种转基因DC疫苗后,近60%的患者对一种或多种疫苗抗原产生了免疫反应。此外,在基线时,20例可评估疾病的患者中有7例(35%)观察到>6个月的疾病控制和转移复原。对于15例基线时无可评估疾病的患者,无复发生存期为23个月^[15]。

近年来,一项靶向survivin和MUC1两种肿瘤相关抗原的DC(gmDC)疫苗,经RNA干扰抑制其免疫检查点SOCS1后治疗异体造血干细胞移植后复发的AML患者的II期临床试验(NCT01956630)表明,12例复发AML患者的完全缓解率为83%。在I期针对12例早期复发AML患者的研究中已证实gmDC疫苗的安全性,并可提高患者生存率。SOCS1是APC细胞内控制信号传导通路的关键性抑制因子之一,沉默SOCS1可以增强DCs的免疫效力,导致宿主水平的自耐受性断裂,再加上survivin和MUC1特异性的肿瘤相关抗原负载,DC成熟度更高,诱导抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答功能,特异性更强^[16]。另一项经酪氨酸酶、MART-1和MAGE-A6基因修饰的DC治疗黑色素瘤的临床I期试验(NCT01622933)中,可评估的35例患者中存活14例(40%),死亡21例(60%);中位总生存期为36个月,中位无进展生存期为17.3个月;临床反应包括:疾病可测24例患者中,14例疾病进展(PD),2例部分反应(PR,8.33%),8例疾病稳定(SD,3.2~13.1个月);11例手术治疗的无疾病证据(NED)患者中,4例患者在中位随访3年仍处于无疾病状态(3.7~37.5个月)。大多数接种基因修饰DC疫苗的患者表现出疫苗抗原特异性CD8⁺T和CD4⁺T细胞应答的增强^[17]。此外,还有WT1mRNA电穿孔DC治疗高危MDS和AML(NCT03083054),肿瘤来源RNA修饰DC(NCT03334305、NCT03396575)、自体肿瘤干细胞mRNA或survivin、hTERT转染DC(NCT03548571、NCT00846456)、CMV-RNA脉冲DC(NCT03615404、NCT03688178)治疗胶质瘤,靶向hTERT的DC治疗非小细胞肺癌(NCT03371485)的临床试验也在开展中^[18]。

2.2 基因修饰DC治疗产业现状

2010年4月,DENDREON公司的自体细胞免疫疗法Sipuleucel-T(或称Provenge)获得美国FDA批准,用于治疗无症状或症状轻微的转移性去势难治性前列腺癌(CRPC)。该药是迄今为止首个被FDA批准的治疗性肿瘤疫苗。Sipuleucel-T是一种自体细胞来源的免疫治疗药,它由自体DCs与融合蛋白PA2024在体外共孵化获得,其中PA2024是一种由前列腺酸性磷酸酶(PAP)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)构建的融合蛋白(PAP-GM-CSF),PAP-GM-CSF再与自身抗原呈递细胞(PAC)共同培养,融合蛋白可分解成小肽呈现在PAC表面,提高对肿瘤细胞的免疫应答能力,从而起到识别和杀灭肿瘤细胞的目的。Sipuleucel-T对CRPC的病情进展时间没有影响,但是可以延长CRPC患者的总体生存期,与安慰剂对照组相比,Sipuleucel-T可以降低CRPC患者的死亡风险,使患者的平均存活时间延长了超过4个月。

2015年,莱美药业独家获得了在中国内地及港澳台地区生产、开发和商业化运作AGS-003(Argos治疗癌症的细胞免疫疗法产品)的权利。AGS-003(自体肿瘤来源mRNA电穿孔DC)和舒尼替尼联用治疗转移性肾癌的III期临床试验(NCT01582672)原本预期52%的患者总生存期可延长至2.5年以上,33%的患者总生存期延长至4.5年。但2017年美国独立数据监测委员会(Independent Data Monitoring Committee, IDMC)建议Argos公司不再继续进行AGS-003产品III期临床试验,依据是这项临床研究不太可能对意向治疗人群的治疗结果和数据有显著的改善。

2018年5月,中生康元生物科技(北京)有限公司(以下简称中生康元)创立并开始专注于新一代个体化肿瘤新抗原DC疫苗的研发。公司成立后旋即得到同创伟业、华创资本和首科开阳等国内著名风险投资机构数千万元的天使投资。目前,中生康元搭建完成了国内最为领先的基于肿瘤新抗原的DC肿瘤疫苗研发平台,正在中国和美国全面推进针对中晚期肝癌、胰腺癌和胶质母细胞瘤的个体化DC疫苗的探索性临床研究。中生康元正在和北京大学肿瘤医院合作,进行针对中晚期肝癌、胆管癌和胰腺癌的患者自体DC负载多个肿瘤新抗原的新一代肿瘤疫苗临床研究。这项研究已经入组12位患者,观察到完成治疗的患者全身转移灶缩小或者消失,达到部分缓解(PR)或者SD。另外一项临床

研究是中生康元与中山大学附属肿瘤医院神经外科合作开展的肿瘤新抗原自体DC疫苗治疗复发和进展的胶质母细胞瘤临床I期研究。这将是国内企业首次将人工预测/体外鉴定得到的肿瘤新抗原多肽用于致敏肿瘤患者自体DC,并进行针对恶性脑肿瘤的临床治疗尝试。

3 CAR-T细胞技术产品的临床研究和管理的

细胞治疗最早可以追溯到20世纪30年代,但直到2000年以后才开始在临床医学领域暂露头角。2011年,加拿大科学家拉尔夫·斯坦曼因“发现树突细胞及其在特异性免疫系统中的作用”,与其他两位科学家共同获得诺贝尔医学奖,这标志着生物免疫治疗成为癌症的一种新型疗法。此后,细胞治疗迅速兴起,在一些复杂的肿瘤疾病治疗中率先进行了临床试验。2013年,细胞治疗被Science杂志评为10大科技突破之首。

在众多的免疫细胞疗法中,基因修饰的免疫细胞如CAR-T和CAR-NK细胞近几年备受关注。基因修饰的免疫细胞是当前肿瘤免疫疗法一大主要研究方向,在血液肿瘤以及实体瘤治疗方面具有广阔的应用前景。科学家经过多年研究,从癌症病人体内分离、提取免疫细胞,通过体外培养形成基因修饰的免疫细胞,再回输到病人体内,达到治疗肿瘤的目的^[19]。本节将对国内外CAR-T细胞和CAR-NK细胞的临床研究和管理的进展进行综述。

3.1 CAR的研究进展

1989年,Gross等提出了CAR的概念,目前这一研究广泛应用于精准的靶向免疫治疗。

3.1.1 CAR结构 CAR是CAR-T/CAR-NK的核心部件,一般由3个结构组成:(1)细胞外结构域,源于单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)的单链可变区片段(single chain variable fragment, scFv),由轻链和重链共同组成,能够将免疫细胞(T细胞或NK细胞)定向到TAA,不依赖于MHC限制,不需要进行抗原提呈,有效的避免了肿瘤细胞下调MHC表达而引起的免疫逃逸。早期的胞外结构主要是鼠源scFv,在人体内可能会引起细胞介导的排斥和致敏,引起人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA),后期研究人员采用了人源化的scFv。(2)跨膜结构域。(3)细胞内结构域,即胞内信号域。该区域由CD8、CD28或CD137和CD3 ζ 的胞质区域组成^[20]。

3.1.2 基于细胞内激活结构域,已经产生了5代CAR载体设计 第一代CAR:抗原结合结构域直接

与T细胞抗原受体(T cell receptor,简称TCR)恒定链CD3 ζ 的细胞内部分融合,通过CD3 ζ 中基于免疫受体酪氨酸的激活基序(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif,简称ITAM)的磷酸化来启动激活级联反应。

第二代CAR:为了克服第一代CAR信号不足的问题,研究人员将来自其他受体例如CD28、4-1BB(CD137)、CD134等共刺激分子整合到CAR的细胞内结构域,以改善T细胞的激活、增殖和存活。

CD28共刺激可提供强大的细胞活化和扩增反应,不足之处在于降低了CAR-T细胞长期持久性。4-1BB(CD137)作为共刺激分子,能够改善CAR-T细胞的长期持久性,促进CD8⁺T细胞的记忆。

第三代CAR:将共刺激分子,如CD28和4-1BB(CD137)共同作为胞内结构域,以期使CAR-T细胞具有更大的体内扩增能力和更长的持久性。

第四代CAR:也称为TRUCK(T cells redirected for universal cytokine killing),通过激活下游转录因子来诱导表达细胞因子如IL-12,从而提高T细胞功效。第四代CAR诱导表达的细胞因子不仅限于IL-12,还包括IL-15、IL-18等,以及细胞因子受体如IL-7受体(C7R),其目的主要是为了克服细胞因子毒性的风险,改善CAR表达和抗肿瘤活性。

第五代CAR:通用型CAR,即敲除内源性TCR和HLA I类分子,降低异体移植的免疫排斥风险^[21]。

目前应用于临床研究和成果转化的多数为第二代、三代CAR设计,第四、五代CAR也逐渐进入人们的视线。

3.1.3 以CD19为代表的CAR-T细胞临床研究热门靶点 TAA大量存在于肿瘤细胞膜表面,较少在正常组织中表达。不同TAA可以作为CAR-T细胞的靶抗原,对CAR-T/CAR-NK细胞起定向作用。靶抗原的选择对于CAR的特异性、有效性以及基因改造T细胞自身的安全性等都是关键的决定因素。因此,选择合适的靶点,是CAR-T细胞免疫治疗在肿瘤临床研究应用中的一个重要挑战^[3, 22-24]。

目前大部分CAR-T研究都属于肿瘤相关抗原,包括CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、BCMA等;参与生长和分化信号的抗原,包括癌胚抗原(CEA)、表皮生长因子受体(EGFR、HER2)、酪氨酸激酶受体(EPHA2)等;参与肿瘤血管生成的抗原,包括血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体(VEGFR)等^[23-24]。

如图1所示,截止2020年3月份临床试验注册

的靶点中,CD19依然是最受欢迎的靶点,位居第一。此外,研究广泛的靶点还有CD20、BCMA、HER2等^[24]。

3.1.4 提高CAR-T安全性的策略 尽管FDA批准的条例中有关于细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome,简称CRS)的标准管理方法,但是CRS等一系列的毒副作用还是限制CAR-T细胞发展的一大因素。为了增加CAR-T细胞抗癌效果,使用更高细胞剂量或增强T细胞活性的方法都可能导致更严重的毒性。

由韩为东、梁爱斌、钱文斌3位教授共同作为通讯作者,国内外7家机构共同完成的研究中,指出CAR-T细胞治疗白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤所引起CRS的机制是不同的,并提出针对不同的肿瘤类型和CAR-T治疗阶段,对CRS的管理要进行细化^[25]。

因此,从CAR-T细胞本身出发,研究如何降低其毒副作用是很有必要的。目前,研究人员已经提出多种策略以改进CAR-T的安全性,例如双/多靶点CAR-T、基因改造CAR-T、安全开关CAR-T、对CAR进行结构的调整优化等等^[26]。

3.2 CAR-T细胞的临床研究和应用进展

全球第一个接受CAR-T治疗的白血病女孩已经14岁。2012年,6岁的艾米丽·怀特海德(Emily Whitehead)在生命垂危之际,成为一位接受试验性CAR-T疗法的儿童患者。她在接受细胞回输后癌症完全消失,且至今未复发。基于这样出色的临床试验结果,诺华(Novartis)公司开发了这款药物,成为FDA批准的第一个CAR-T疗法。儿童白血病的

成功治愈是引起学术界和医药工业界对细胞疗法感兴趣的开端。除了诺华, Kite、Juno、bluebird/Celgene等公司也开发了多项CAR-T疗法。研究人员不断探索CAR-T细胞治疗在非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和慢性淋巴细胞白血病(CLL)等各种血液癌症中的应用。

3.2.1 CAR-T细胞产品 时至今日,FDA已经批准了3款CAR-T细胞疗法分别用于治疗白血病和淋巴瘤。这些治疗方法已经证实CAR-T可以使预期生存仅几个月的晚期癌症患者也有了完全治愈的可能,并持续数月甚至数年不复发。见表1。

随着美国CAR-T细胞疗法的批准上市,中国药品审评中心(Center for Drug Evaluation, CDE)于2017年底开始,陆续受理了国内外26家公司共计46个(截止到2020年10月31日)CAR-T细胞治疗产品的临床研究申请(Investigational New Drug, IND)申报。上海优卡迪生物医药科技有限公司有5项申请,暂列第一位。在所有申请的CAR-T细胞产品中,非CD19靶点共计13个,包括BCMA(6个)和2个实体瘤靶点磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)和CLDN18.2(Claudin18.2)、2个双靶点等(资料来源于CDE官网)。

2020年2月24日,复星凯特官网显示,国家药品监督管理局(National Medical Products Administration,简称NMPA)已正式受理该公司CAR-T细胞治疗产品益基利仑赛注射液(拟定)、代号为FKC876的新药上市申请。该新药上市申请是基于复星凯特在中国开展的一项单臂、开放性、多中心桥接临床试验(FKC876-2018-001),在难治性

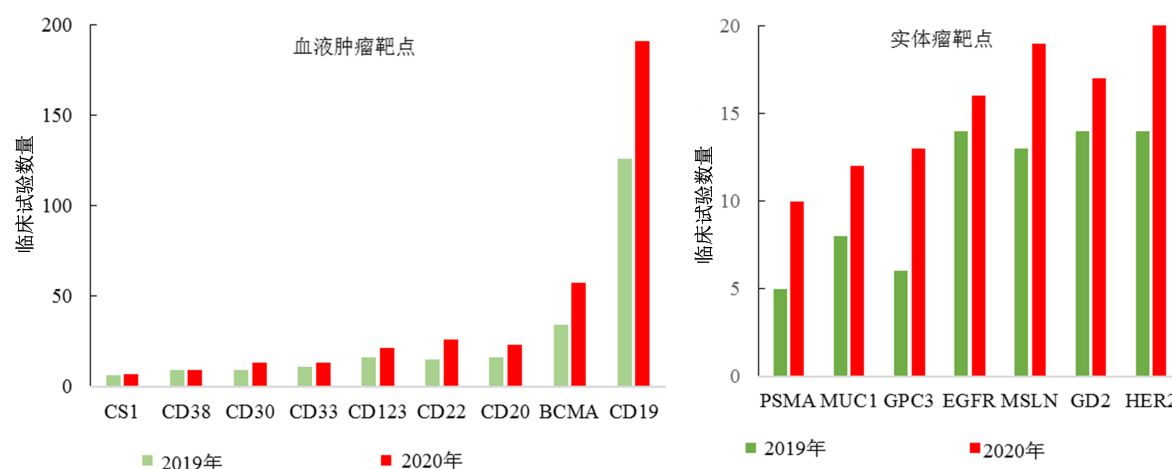


图1 血液和实体瘤CAR-T细胞疗法的主要靶点

Fig. 1 Top targets of CAR-T cell therapies for blood and solid tumors

表1 FDA批准上市的CAR-T细胞疗法
Table 1 CAR-T cell therapy approved by FDA

产品	厂家	适应症和最新数据	售价/万美元	获批时间
Kymriah	诺华	复发或难治性滤泡性淋巴瘤(FL)患者中总缓解率83%;复发或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(r/r DLBCL)患者中2年无进展生存率为33%。	47.5	2017-08-30
Yescarta	吉利德	复发难治性大B细胞淋巴瘤(r/r LBCL)患者中客观缓解率为82%,完全缓解率为58%;高危大B细胞淋巴瘤(LBCL)患者中客观缓解率为85%,完全缓解率为74%。	37.3	2017-10-18
Tecartus	吉利德	复发性/难治性套细胞淋巴瘤(MCL)患者中客观缓解率为92%,完全缓解率为67%。	30~50	2020-07-24

数据来源于第62届美国血液学年会

Data from the 62nd annual meeting of American hematology

侵袭性大B细胞淋巴瘤中国患者中评估了本品的安全性和疗效。6月30日,CDE官网显示,药明巨诺申报的瑞基奥仑赛注射液(暂定名)上市申请获CDE受理,这是国内第二个递交上市申请的CAR-T疗法。复星凯特从Kite Pharma引进Yescarta,药明巨诺在美国巨诺公司JCAR017的基础上自主开发的CAR-T产品。无论是复星凯特还是药明巨诺,这两款即将上市的产品运用的是国外的工艺技术。到目前为止,国内自主研发的CAR-T细胞技术产品还没有一个在中国正式获批上市许可。

3.2.2 CAR-T细胞临床研究 截止到2020年11月,用CAR-T作为关键词,在ClinicalTrials.gov网站检索到1144项登记注册的临床试验方案。按国家和地区统计临床研究排名前两名的国家或地区分别是美国(434项)和中国(410项)。CAR-T研究覆盖领域扩大,中美成为了CAR-T研究的主要推动者。

目前全球正在进行中的CAR-T细胞临床试验多处于临床前期和I、II期,占全部临床试验注册(进行中)的80%以上。CAR-T细胞临床试验目前主要覆盖仍是血液肿瘤,包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、AML、急性非淋巴细胞白血病(ANLL)、LBCL、多发性骨髓瘤、MCL等。除此之外还覆盖了乳腺癌、脑瘤、非小细胞肺癌和肝癌等实体肿瘤,以及淋巴组织增生性疾病、免疫增生性疾病等。在作用位点上,CD19仍然是主流位点,BCMA、CD22、CD20、CD30、Her2等靶点也有所涉及但数量不多,预示着CD19靶点竞争可能会更加激烈^[24]。

3.2.3 CAR-T在实体瘤领域的研究进展 实体瘤抗原靶点复杂,且在正常组织中多有表达;多数实体瘤体积较大,CAR-T免疫细胞难以识别并归巢到肿瘤组织;实体瘤微环境复杂,富集大量的免疫抑制因子和检查点抑制配体,具有多样免疫逃逸机制。实体瘤的复杂性影响了CAR-T治疗效果^[27-30]。

目前,研究人员进行了多方面的尝试,寻找到一些改进方法。

(1)通过提高靶点的特异性或选择多个靶点进行治疗。研究人员设计了一种抗原特异性的抑制性CAR分子,这种CAR分子胞外区识别正常细胞特定抗原,胞内区则表达抑制性受体如PD-1的胞内区。T细胞转染后同时表达抑制性CAR分子和识别肿瘤抗原的CAR分子。当细胞表达特定抗原和肿瘤抗原时,抑制性CAR会发挥抑制作用,CAR-T细胞不杀伤正常细胞。当细胞只表达肿瘤抗原时,CAR-T细胞可有效杀伤肿瘤细胞^[31]。除此之外,研究人员也设计了双靶点的CAR-T细胞,如ErbB2和MUC1双靶点可有效杀伤乳腺癌中的ErbB2阳性细胞^[32]。

(2)促进CAR-T细胞向肿瘤组织的迁移浸润。研究人员设计一种表达VEGFR-2的CAR分子,同时表达单链的IL-12分子。这种CAR-T细胞可有效浸润入肿瘤组织,扩增并可以持续较长时间,可抑制多种荷瘤小鼠中肿瘤细胞的生长^[33]。

(3)解除肿瘤微环境的免疫抑制性。研究人员利用针对HER2的CAR-T细胞治疗乳腺癌的过程中,联合使用针对PD-1的阻断抗体,增强了CAR-T细胞的抗肿瘤作用^[34]。

3.3 CAR-T细胞技术产品产业化发展的挑战和展望

根据2019年全球市场情报机构Fiormarkets官网上发布的报告,2017年全球细胞治疗技术市场大概达112亿美元。2018年至2025年市场复合年增长率为16.81%,预计到2025年市场值将超过340亿美元。

CAR-T细胞技术产品生产流程复杂,生产周期长且成本高昂,转产与扩产复杂,医生教育、费用支付等方式不同于传统化药和大分子生物药。因此,规模化生产能力的提升以及同产业链上下游(如上

游的慢病毒生产、下游的医生团队、运输渠道)网络的建立,是现阶段 CAR-T 相关企业的核心竞争力^[35]。

由虞淦军博士、万涛博士、王闻雅博士等参与的《细胞和基因治疗监管政策研究》课题组基于对我国国情和行业现状的分析,在充分借鉴国外监管体系的基础上,提出如下建议:建立以患者为中心,即保护患者安全和权益为核心的,以全生命周期质量体系为基础的,科学的监管法规体系;建立区域性细胞和基因治疗产品第三方检测机构,不断完善该领域监管技术指南体系;除了重视评价细胞和基因治疗产品安全性和有效性的新标准、新方法和新路径以外,也应前瞻性地布局临床支付、报销等方面的配套政策研究,有效促进产业升级^[36]。

4 CAR-NK细胞的临床研究和应用进展

NK细胞是具有直接杀伤功能的天然免疫效应细胞。NK细胞作为一种重要的肿瘤杀伤性免疫细胞,具有一些T细胞没有的优势。如许多临床试验中得到证实,异体NK细胞不会引起GVHD;NK细胞不分泌引起细胞因子释放综合征的炎症因子,如IL-6等;CAR-NK细胞除了CAR介导的靶向杀伤之外,还可以通过其自身抗肿瘤的特性,识别并杀伤CAR靶标下调或缺失的肿瘤细胞,提高免疫治疗效果;NK细胞来源丰富,包括外周血(peripheral blood, PB)、脐带血(umbilical cord blood, UCB)、NK-92细胞系等,使其能成为一种“现货(off the shelf)”细胞产品^[37-40]。

截至目前, ClinicalTrials.gov 网站已有12项(Allife公司的临床试验没有提供相关的详细资料,未统计)关于CAR-NK的临床试验记录,其中中国9项、美国3项。这些临床试验中7项集中于血液肿瘤研究,4项用于实体瘤,1项用于新型冠状病毒肺炎(COVID-19)治疗。

除血液肿瘤外, CAR-NK在实体肿瘤中表现突出,临床前研究包括乳腺癌、卵巢癌、胶质瘤、神经母细胞瘤等。同时,研究人员也在探索CAR-NK在肿瘤联合治疗中的应用。针对CD133的CAR-NK92与普通化疗药顺铂联合应用治疗卵巢癌具有最强的杀瘤效果。针对CD20的CAR-NK也可和罗米地辛联合应用于伯基特(Burkitt)淋巴瘤,联合治疗比单独疗法具有更佳的抗肿瘤效果。CAR-NK与溶瘤病毒联合应用,在动物荷瘤模型中具有抗乳腺癌脑转移的效果。CAR-NK细胞也可作为CAR-T细胞治疗的互补产品,用于多种免疫细胞联合治

疗策略^[41]。

5 基因修饰免疫细胞未来趋势

多年来,基于传统免疫细胞疗法的临床试验遍地开花,却未能真正转化为临床推广使用。随着生物医学的不断发展和多学科的交叉融合,如高通量基因测序、生物信息学预测、基因表达分析、免疫共沉淀、MHC亲和力测试、蛋白质谱分析、肿瘤克隆亚群状态分析、基因工程等多种技术手段,对传统免疫细胞疗法的升级迭代提供了有效手段。

TCR-T疗法目前的临床有效率相对较低,因此寻找有效的肿瘤靶抗原高亲和性的TCR受体和优化TCR-T细胞的转化效率是未来一段时期的研究重点。基因修饰可提高免疫细胞的TCR数量和趋化作用,但人为改变TCR序列在实现亲和力提升的同时,如何管控可能产生的脱靶效应等毒性反应,如何降低外源性TCR和内源性TCR错配率,从而降低自身抗原反应性T细胞产生,提高安全性,都是有待解决的问题。

除了用细胞的形式来治疗之外,广州市香雪制药股份有限公司还开发了高亲和T细胞活化芯(HATac)技术,把高亲和性的T细胞受体做成水溶性的分子HATac。HATac分子是TCR与pHLA形成的复合体。该分子一端通过识别肿瘤细胞呈递的HLA抗原来与肿瘤细胞结合,另一端通过TCR与患者体内的自身T细胞结合。肿瘤细胞可以通过这种分子被T细胞识别,进而被活化T细胞消灭。像HATac这样的水溶性分子被业界认为是比TCR-T更具发展前景的治疗方法。目前,该技术已经可以系统性地将TCR的亲和力由微摩尔级提高到皮摩尔级,并借助TCR和功能分子的融合赋予T细胞杀伤肿瘤细胞的功能。

肿瘤新抗原(Neoantigen)是由肿瘤细胞突变基因编码的新生抗原,主要由基因点突变、删除突变、基因融合等产生的与正常细胞表达的蛋白不一样的异常蛋白。基于先进的生物信息技术,不断发现肿瘤新抗原并与免疫细胞疗法相结合,必将是未来肿瘤免疫治疗的发展趋势。

此外,抗体、糖生物学设计、纳米技术等都可能成为免疫细胞疗法未来发展的有力辅助因素。免疫治疗将促进学科之间的交叉,如合成免疫学包括了化学、生物和临床医学等多个领域,从合成生物学拓展到合成治疗领域,将是一个重大的进展。

6 基因修饰干细胞临床应用现状及未来发展趋势

体细胞治疗是指来源于人自体或异体的体细

胞,经体外操作后回输(或植入)人体的治疗方法。这种体外操作包括细胞在体外的激活、诱导、扩增、传代和筛选,以及经药物或其他能改变细胞生物学功能的处理。体细胞基本涵盖了目前专注度最高的几大临床转化应用的细胞类型,如免疫细胞,间充质干细胞(MSC)和诱导性多能干(iPS)细胞或胚胎干(ES)细胞来源的细胞。体细胞治疗目前应用于治疗肾脏疾病、肝脏疾病、心血管疾病和神经系统疾病。随着分子生物学技术和细胞治疗技术的发展,体细胞治疗趋向通过基因修饰增强生物学活性提高治疗效果,减少治疗中潜在的风险,并拓宽应用范围,实现精准治疗。

自从了解DNA作为遗传的基本单位以来,对人类基因组中进行局部修饰一直是医学研究的一个发展目标。基因治疗被理解为通过校正改变的(突变的)基因或以治疗为目标的位点特异性修饰的基因改良。体外基因修饰的细胞治疗的临床应用始于10年前,首次应用是通过锌指核酸酶修饰(Zinc-finger nuclease, ZFN),敲除自体CD4⁺T的人类免疫缺陷病毒共受体CCR5基因,治疗慢性HIV感染^[42]。随着新的基因修饰技术,如转录激活样效应因子核酸酶(TALEN)技术和成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)的出现,使该领域有了实质性的发展,基因修饰技术在体细胞治疗领域显示出了的潜在优势。

6.1 造血干细胞

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是血液系统中的成体干细胞,具有长期自我更新能力和分化成各类成熟血细胞的潜能。利用异基因HSCs治疗遗传性血液系统疾病已成为一种临床标准,但受到合适的供体和潜在的免疫并发症的限制。通过基因修饰技术,可减少诸如GVHD病或其他免疫并发症的不良事件^[43-45]。利用整合载体将HSC转化并随后进行移植,可以对整个造血系统进行重建。根治血液系统遗传性疾病的原理是,对突变的基因进行精准的修饰,外源目的基因导入HSC后整合在其基因组中,随着HSC在体内的扩增,得到稳定的遗传和表达。

基因修饰HSC的首次成功是用 γ -逆转录病毒LTR载体,用于治疗原发性免疫缺陷,即X-连锁严重联合免疫缺陷(X-SCID)、腺苷脱氨酶缺乏症(ADA-SCID)、X-连锁慢性肉芽肿病(X-CGD)和Wiskott-Aldrich综合征(WAS)^[46-50]。但部分患者出现了严重不良事件,由于载体整合了原癌基因。接受基因修饰HSC移植治疗的患者中6例儿童患者,

由X-SCID发展为T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)^[51-53]。在接受治疗的9例WAS患儿中,7例患上了T-ALL或急性髓性白血病,其中一些甚至同时患有两种白血病。相比之下,接受表达腺苷脱氨酶(ADA)的 γ -逆转录病毒载体转染HSC治疗ADA缺乏引起的重症联合免疫缺陷(ADA-SCID)的所有患者均被治愈,且无白血病发生^[47,54-55]。目前,基于纳入12名患者的单中心I/II期临床数据,EMA批准Strimvelis治疗腺苷脱氨酶缺乏引起的重症联合免疫缺陷^[56]。

在最近的试验中,为了防止潜在的遗传毒性和改善基因的转移和表达,研发了具有自失活(SIN)结构的逆转录病毒载体,包括慢病毒载体。到目前为止,使用这些载体的试验中还未出现因遗传毒性而导致的不良事件报告。慢病毒载体已成功应用于WAS^[57-58]、X-SCID^[59]、镰状细胞病^[60]X连锁肾上腺脑白质营养不良^[61]和异染性白质营养不良^[62-63]的治疗。此外,用SIN- γ -逆转录病毒载体对X-SCID进行基因治疗被证明是有效的,不会诱发白血病^[64]。通过特异性内切酶(HE、ZFN、TALEN或CRISPR)对HSC进行靶向基因修饰,目前已用于HIV的临床试验(靶向CCR5、HIV共受体, NCT02500849)和镰状细胞病(靶向BCL11a、胎儿珠蛋白的抑制因子)^[65];临床结果尚未报告。此外慢病毒载体介导的HSPC基因治疗严重WAS I/II期临床结果显示出良好安全性和有效性^[66]。

目前一些有前途的HSC基因治疗细胞产品正在进行早期的临床试验(适应症包括X-ALD、异染性白细胞营养不良、 β 地中海贫血、镰状细胞病、ADA缺乏和X连锁SCID、WAS和慢性肉芽肿性疾病)和商业生产和销售许可证的申请^[67]。然而,精确的靶向基因修饰要实现是非常复杂的,它依赖于HDR途径进行修饰,因此需要一个同源供体与核酸酶共同递送。在基因修饰临床转化之前,需要建立结合多种GMP级试剂,如CRISPR RNP、mRNA和短指南RNA、腺病毒相关病毒(AAV)载体同源供体。

6.2 MSC

MSC是一种来源于组织和器官的多向分化潜能的成体干细胞,具有免疫调节、炎症趋化、组织修复功能及低免疫原性等生物学特性,在组织修复与免疫调节中发挥重要作用。目前在多种退行性疾病,重症疾病中都显现出了良好的应用前景,全球已有13个MSC药物上市,目前中国尚无。MSCs在

许多重症医学疾病(如败血症、呼吸窘迫综合征、急性肺损伤、急性肾损伤、急性肝衰竭、急性心肌梗死和局部缺血)展现出良好临床应用潜力,但目前仍存在细胞移植后局部定位及存活时间短等局限性。通过基因修饰可以进一步优化MSC及其衍生物^[68]。通过上调或下调某些基因的表达,从而控制其细胞因子的(如促炎/抗炎介质)生产,或通过引入关键外源基因使其能够表达用于特定治疗的非天然产物^[69-70]。在最近的报道中,使用MSC作为基因或药物递送载体的新方法,强调了基因修饰的MSC的其他潜在应用^[71-72]。

总体而言,基因工程与MSC结合:①通过基因修饰可提高MSC免疫调节或再生功能;②基因修饰的MSC可产生更多具有治疗效果的衍生物;③MSC可作为载体,将特定的基因序列传递至靶细胞^[73]。

6.3 神经干细胞(neural stem/progenitor cell, NPC)

NPC是指存在于神经系统中,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能,从而能产生大量脑组织细胞,并能进行自我更新的细胞群。目前在临床中被用于治疗神经退行性疾病^[74-76]、脊髓损伤^[77]、卒中^[78]、癫痫^[79-81]、外伤性脑损伤^[81]以及新生儿脑缺血^[82]等。

可用于临床治疗的NPC可以从3个不同的来源获得,包括直接从原代组织中提取、诱导多能干细胞分化以及转分化。基因修饰和诱导分化的NPC肿瘤发生风险低,且保持自我更新的能力,并在体外和体内可产生多种神经元亚型。Kim等^[83]首次证明多能性因子瞬时表达结合适当的神经信号输入可以成功地诱导小鼠成纤维细胞成NPC,该类NPC被称为诱导型神经干细胞(iNSCs)^[84]。除了多能性因子外,NSC特异性转录因子还可诱导具有自我更新和分化潜能的NPC生成^[85-86]。此外,还发现单个转录因子,Sox2或ZFP521,可诱导小鼠和人类成纤维细胞生成iNSCs^[87-88]。

干细胞和分子生物学领域的最新技术的发展有助于增强NPC的治疗效果。通过调控潜能蛋白的基因表达,提高外源性NPC的生长因子产生,如神经生长因子(NGF)和脑源性神经营养因子(BDNF)。hNGF在成人嗅球NPC中过表达可促进细胞生长和向少突胶质细胞分化^[89],而ESC诱导分化的、表达BDNF的NPC在体内表现出更强向神经元和纹状体分化的能力,并被证明对亨廷顿病有

用^[90]。同样,移植表达BDNF的多聚唾液酸修饰的神经黏附分子(PSA-NCAM)神经前体细胞在脊髓损伤小鼠模型中具有治疗作用^[91],而表达BDNF的胚胎大鼠NPC在创伤性脑损伤模型中刺激突触蛋白表达并促进功能恢复^[92]。这一策略不仅应用于生长因子,还应用于转录因子,例如Nurr1过表达可使神经前体细胞产生功能性多巴胺神经元^[93]。过度表达的IL-10具有免疫调节作用,可加速神经功能的恢复和减少脑梗死体积^[94]。利用CRISPR/Cas9对具有确定治疗潜力和时空调控的基因进行编辑,可能进一步提高NPC治疗的临床应用^[95-96]。

外源基因导入干细胞移植的研究日益受到重视,干细胞以其多向分化潜能和不断扩增的特性成为细胞移植理想的载体细胞。基因修饰的干细胞在临床疾病治疗中有多潜能作用,通过合适的修饰,增强基因表达,使移植后的干细胞在宿主环境中可以存活更久,并分泌对病人有利的特定蛋白,达到治疗疾病的目的。但将细胞替代疗法应用于临床实践是一个巨大的挑战,移植剂量、载体系统的安全性等问题均有待研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] June C H, Riddell S R, Schumacher T N. Adoptive cellular therapy: a race to the finish line [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(280): 280ps7.
- [2] Morris E C, Stauss H J. Optimizing T-cell receptor gene therapy for hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2016, 127(26): 3305-3311.
- [3] Zhao L J, Cao Y J. Engineered T cell therapy for cancer in the clinic [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2250.
- [4] Yao X, Lu Y C, Parker L L, et al. Isolation and characterization of an HLA-DPB1*04: 01-restricted MAGE-A3 T-cell receptor for cancer immunotherapy [J]. *J Immunother*, 2016, 39(5): 191-201.
- [5] 宁昕, 尹艳慧. 肿瘤抗原特异性T细胞受体改造的T细胞研究现状及应用前景 [J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(1): 65-72.
Ning X, Yin Y H. Current status and future prospect of tumor antigen specific T cell receptor engineered T cells therapy [J]. *Immunol J*, 2018, 34(1): 65-72.
- [6] Morgan R A, Dudley M E, Wunderlich J R, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129.
- [7] Duval L, Schmidt H, Kaltoft K, et al. Adoptive transfer of

- allogeneic cytotoxic T lymphocytes equipped with a HLA-A2 restricted MART-1 T-cell receptor: a phase I trial in metastatic melanoma [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(4): 1229-1236.
- [8] Johnson L A, Morgan R A, Dudley M E, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen [J]. Blood, 2009, 114(3): 535-546.
- [9] Robbins P F, Kassim S H, Tran T L, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(5): 1019-1027.
- [10] Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer [J]. Science, 2014, 344(6184): 641-645.
- [11] Tran E, Robbins P F, Lu Y C, et al. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer [J]. N Engl J Med, 2016, 375(23): 2255-2262.
- [12] Lu Y C, Parker L L, Lu T Y, et al. Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3 [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(29): 3322-3329.
- [13] Chapuis A G, Egan D N, Bar M, et al. T cell receptor gene therapy targeting WT1 prevents acute myeloid leukemia relapse post-transplant [J]. Nat Med, 2019, 25(7): 1064-1072.
- [14] Rapoport A P, Stadtmauer E A, Binder-Scholl G K, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma [J]. Nat Med, 2015, 21(8): 914-921.
- [15] Boudreau J E, Bonehill A, Thielemans K, et al. Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy [J]. Mol Ther, 2011, 19(5): 841-853.
- [16] Wang D H, Huang X F, Hong B X, et al. Efficacy of intracellular immune checkpoint-silenced DC vaccine [J]. JCI Insight, 2018, 3(3): 98368.
- [17] Butterfield L H, Vujanovic L, Santos P M, et al. Multiple antigen-engineered DC vaccines with or without IFN α to promote antitumor immunity in melanoma [J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 113.
- [18] Sprooten J, Ceusters J, Coosemans A, et al. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy [J]. Oncoimmunology, 2019, 8(11): e1638212.
- [19] Levine B L, Miskin J, Wonnacott K, et al. Global manufacturing of CAR T cell therapy [J]. Mol Ther - Methods Clin Dev, 2017, 4: 92-101.
- [20] Balkhi M Y. Components and design of chimeric antigen receptors [A] // Basics of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy [M]. Amsterdam: Elsevier, 2020: 13-24.
- [21] Tokarew N, Ogonek J, Endres S, et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells [J]. Br J Cancer, 2019, 120(1): 26-37.
- [22] Xin Yu J, Hubbard-Lucey V M, Tang J. Immunoncology drug development Goes global [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(12): 899-900.
- [23] Leick M B, Maus M V. CAR-T cells beyond CD19, UnCAR-Ted territory [J]. Am J Hematol, 2019, 94(s1): S34-S41.
- [24] Yu J X, Upadhya S, Tatake R, et al. Cancer cell therapies: the clinical trial landscape [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(9): 583-584.
- [25] Wei J, Liu Y, Wang C, et al. The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 134.
- [26] Hong M, Clubb J D, Chen Y Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy [J]. Cancer Cell, 2020, 38(4): 473-488.
- [27] Newick K, O'Brien S, Moon E, et al. CAR T cell therapy for solid tumors [J]. Annu Rev Med, 2017, 68: 139-152.
- [28] Ma S, Li X, Wang X, et al. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(12): 2548-2560.
- [29] Grosser R, Cherkassky L, Chintala N, et al. Combination immunotherapy with CAR T cells and checkpoint blockade for the treatment of solid tumors [J]. Cancer Cell, 2019, 36(5): 471-482.
- [30] 葛玉凤, 韩东晖, 吴介恒, 等. CAR-T细胞治疗用于实体瘤的研究进展 [J]. 转化医学电子杂志, 2017, 4(10): 50-55.
- Ge Y F, Han D H, Wu J H, et al. Research progress of CAR-T cell therapy in solid tumors [J]. J Transl Med, 2017, 4(10): 50-55.
- [31] Fedorov V D, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses [J]. Sci Transl Med, 2013, 5(215): 215ra172.
- [32] Wilkie S, van Schalkwyk M C, Hobbs S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC₁ in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling [J]. J Clin Immunol, 2012, 32(5): 1059-1070.
- [33] Chinnasamy D, Yu Z Y, Kerkar S P, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice [J]. Clin

- Cancer Res, 2012, 18(6): 1672-1683.
- [34] John L B, Devaud C, Duong C P, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(20): 5636-5646.
- [35] Papathanasiou M M, Stamatis C, Lakelin M, et al. Autologous CAR T-cell therapies supply chain: challenges and opportunities ? [J]. Cancer Gene Ther, 2020, 27(10/11): 799-809.
- [36] 虞淦军, 吴艳峰, 汪珂, 等. 国际细胞和基因治疗制品监管比较及对我国的启示 [J]. 中国食品药品监管, 2019 (8): 4-19.
Yu G J, Wu Y F, Wang K, et al. Comparison of international regulation of cell and gene therapy products and its inspiration to China [J]. China Food Drug Adminst Mag, 2019, 8: 4-19.
- [37] Hu Y, Tian Z G, Zhang C. Chimeric antigen receptor (CAR) -transduced natural killer cells in tumor immunotherapy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(2): 167-176.
- [38] Oberschmidt O, Kloess S, Koehl U. Redirected primary human chimeric antigen receptor natural killer cells as an "off-the-shelf immunotherapy" for improvement in cancer treatment [J]. Front Immunol, 2017, 8: 654.
- [39] 梁皓, 肖向茜, 盛望. CAR-NK细胞在癌症免疫治疗中的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2019, 30(2): 258-263.
Liang H, Xiao X Q, Sheng W. Progress of CAR-NK Cells in Cancer Immunotherapy [J]. Lett Biotech, 2019, 30(2): 258-263.
- [40] 方芳, 肖卫华, 田志刚. NK细胞肿瘤免疫治疗的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(9): 1025-1030.
Fang F, Xiao W H, Tian Z G. Development of NK cell-based tumor immunotherapy [J]. Chin J Immun, 2019, 35 (9): 1025-1030.
- [41] 刘沙, 梁皓, 肖向茜, 等. CAR-NK的构建及其在抗肿瘤联合治疗中的研究进展 [J]. 癌症进展, 2018, 16(10): 1199-1203.
Liu S, Liang H, Xiao X Q, et al. Construction of CAR-NK and its research progress in anti-tumor combined therapy [J]. Oncol Progr, 2018, 16(10): 1199-1203.
- [42] Tebas P, Stein D, Tang W W, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV [J]. N Engl J Med, 2014, 370(10): 901-910.
- [43] Dunbar C E, High K A, Joung J K, et al. Gene therapy comes of age [J]. Science, 2018, 359(6372). DOI: 10.1126/science.aan4672.
- [44] Ginn S L, Amaya A K, Alexander I E, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update [J]. J Gene Med, 2018, 20(5): e3015.
- [45] Kohn D B. Gene therapy for blood diseases [J]. Curr Opin Biotechnol, 2019, 60: 39-45.
- [46] Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID) -X1 disease [J]. Science, 2000, 288(5466): 669-672.
- [47] Aiuti A, Slavin S, Aker M, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning [J]. Science, 2002, 296 (5577): 2410-2413.
- [48] Gaspar H B, Parsley K L, Howe S, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector [J]. Lancet, 2004, 364(9452): 2181-2187.
- [49] Ott M G, Schmidt M, Schwarzmaelder K, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1 [J]. Nat Med, 2006, 12(4): 401-409.
- [50] Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome [J]. N Engl J Med, 2010, 363(20): 1918-1927.
- [51] Hacein-Bey-abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 [J]. Science, 2003, 302(5644): 415-419.
- [52] Howe S J, Mansour M R, Schwarzmaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients [J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3143-3150.
- [53] Kohn D B, Sadelain M, Glorioso J C. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(7): 477-488.
- [54] Gaspar H B, Cooray S, Gilmour K C, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction [J]. Sci Transl Med, 2011, 3(97): 97ra80.
- [55] Shaw K L, Garabedian E, Mishra S, et al. Clinical efficacy of gene-modified stem cells in adenosine deaminase-deficient immunodeficiency [J]. J Clin Invest, 2017, 127(5): 1689-1699.
- [56] Aiuti A, Roncarolo M G, Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an *ex vivo* gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products [J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(6): 737-740.
- [57] Hacein-Bey Abina S, Gaspar H B, Blondeau J, et al.

- Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *JAMA*, 2015, 313(15): 1550-1563.
- [58] Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233-151.
- [59] De Ravin S S, Wu X, Moir S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(335): 335ra57.
- [60] Ribeil J A, Hacein-Bey-abina S, Payen E, et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(9): 848-855.
- [61] Cartier N, Hacein-Bey-abina S, Bartholomae C C, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy [J]. *Science*, 2009, 326(5954): 818-823.
- [62] Sessa M, Lorioli L, Fumagalli F, et al. Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial [J]. *Lancet*, 2016, 388(10043): 476-487.
- [63] Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 1233-158.
- [64] Hacein-Bey-Abina S, Pai S Y, Gaspar H B, et al. A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(15): 1407-1417.
- [65] Chang K H, Smith S E, Sullivan T, et al. Long-term engraftment and fetal globin induction upon *BCL11A* gene editing in bone-marrow-derived CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 4: 137-148.
- [66] Ferrua F, Cicalese M P, Galimberti S, et al. Lentiviral haemopoietic stem/progenitor cell gene therapy for treatment of Wiskott-Aldrich syndrome: interim results of a non-randomised, open-label, phase 1/2 clinical study [J]. *Lancet Haematol*, 2019, 6(5): e239-e253.
- [67] Morgan R A, Gray D, Lomova A, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress and lessons learned [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(5): 574-590.
- [68] Park J S, Suryaprakash S, Lao Y H, et al. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery [J]. *Methods*, 2015, 84: 3-16.
- [69] Hodgkinson C P, Gomez J A, Mirotso M, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(11): 1513-1526.
- [70] Nowakowski A, Walczak P, Lukomska B, et al. Genetic engineering of mesenchymal stem cells to induce their migration and survival [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 4956063.
- [71] Greco S J, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells in drug/gene delivery: implications for cell therapy [J]. *Ther Deliv*, 2012, 3(8): 997-1004.
- [72] Oggu G S, Sasikumar S, Reddy N, et al. Gene delivery approaches for mesenchymal stem cell therapy: strategies to increase efficiency and specificity [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13(6): 725-740.
- [73] Byrne S M, Mali P, Church G M. Genome editing in human stem cells [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 119-138.
- [74] Riley J, Glass J, Feldman E L, et al. Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral Sclerosis A phase I trial, cervical microinjection, and final surgical safety outcomes [J]. *Neurosurgery*, 2014, 74(1): 77-87.
- [75] Feldman E L, Boulis N M, Hur J, et al. Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes [J]. *Ann Neurol*, 2014, 75(3): 363-373.
- [76] Mazzini L, Gelati M, Profico D C, et al. Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 1-16.
- [77] Shin J C, Kim K N, Yoo J, et al. Clinical trial of human fetal brain-derived neural stem/progenitor cell transplantation in patients with traumatic cervical spinal cord injury [J]. *Neural Plast*, 2015, 2015: 630932.
- [78] Kalladka D, Sinden J, Pollock K, et al. Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study [J]. *Lancet*, 2016, 388(10046): 787-796.
- [79] Waldau B, Hattiangady B, Kuruba R, et al. Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GDNF expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(7): 1153-1164.
- [80] Shetty A K. Neural stem cell therapy for temporal lobe epilepsy [A]/Noebels J L, Avoli M, Rogawski M A, et al. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [M]. New York: Oxford University Press In, 2012.
- [81] Zhu J, Zhou L, XingWu F. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(22): 2376-2378.
- [82] Wang L, Jiang F, Li Q, et al. Mild hypothermia combined with neural stem cell transplantation for hypoxic-

- ischemic encephalopathy: neuroprotective effects of combined therapy [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(19): 1745-1752.
- [83] Kim J, Efe J A, Zhu S Y, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7838-7843.
- [84] Thier M, Wörsdörfer P, Lakes Y B, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 473-479.
- [85] Han D W, Tapia N, Hermann A, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 465-472.
- [86] Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells [J]. *PNAS*, 2012, 109(7): 2527-2532.
- [87] Ring K L, Tong L M, Balestra M E, et al. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(1): 100-109.
- [88] Shahbazi E, Moradi S, Nemati S, et al. Conversion of human fibroblasts to stably self-renewing neural stem cells with a single zinc-finger transcription factor [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(4): 539-551.
- [89] Marei H E, Althani A, Afifi N, et al. Over-expression of hNGF in adult human olfactory bulb neural stem cells promotes cell growth and oligodendrocytic differentiation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82206.
- [90] Zimmermann T, Remmers F, Lutz B, et al. ESC-derived BDNF-overexpressing neural progenitors differentially promote recovery in Huntington's disease models by enhanced striatal differentiation [J]. *Stem Cell Rep*, 2016, 7(4): 693-706.
- [91] Butenschön J, Zimmermann T, Schmarowski N, et al. PSA-NCAM positive neural progenitors stably expressing BDNF promote functional recovery in a mouse model of spinal cord injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 11.
- [92] Ma H Y, Yu B, Kong L, et al. Neural stem cells over-expressing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulate synaptic protein expression and promote functional recovery following transplantation in rat model of traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(1): 69-83.
- [93] Shim J W, Park C H, Bae Y C, et al. Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using *Nurr1* overexpression [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5): 1252-1262.
- [94] Cho M, Jung K, Kim S H, et al. Safety and efficacy evaluations of an adeno-associated virus variant for preparing IL10-secreting human neural stem cell-based therapeutics [J]. *Gene Ther*, 2019, 26(5): 135-150.
- [95] Dever D P, Scharenberg S G, Camarena J, et al. CRISPR/Cas9 genome engineering in engraftable human brain-derived neural stem cells [J]. *Science*, 2019, 15: 524-535.
- [96] Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.

[责任编辑 兰新新]