

## 基因工程技术在基因治疗中的应用进展

刘婷婷<sup>1</sup> 综述 张殿宝<sup>2</sup> 审校

1. 营口经济技术开发区中心医院(营口市第六人民医院), 辽宁 营口 115007;

2. 中国医科大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110122

**【摘要】** 基因治疗最初用于治疗遗传性疾病,随着基因工程技术的发展,它在恶性肿瘤、神经退行性疾病、心血管疾病等获得性疾病的治疗中取得良好的临床效果,多种治疗方法获得监管部门的批准上市。基因治疗的优势在于特异性强、靶向性高、效果显著。基因治疗所涉及的基因工程技术包括病毒载体技术、基因编辑技术以及细胞改造的嵌合抗原受体修饰的T细胞技术。本篇综述将探讨基因工程技术在基因治疗中的应用以及基因治疗在国内外的研究进展。

**【关键词】** 基因治疗;  $\gamma$ -逆转录病毒载体; 慢病毒载体; 腺病毒载体; 基因编辑; 嵌合抗原受体修饰的T细胞

**【中图分类号】** R45 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2021)04-0503-04

**Application of genetic engineering on gene therapy.** LIU Ting-ting<sup>1</sup>, ZHANG Dian-bao<sup>2</sup>. 1. Central Hospital of Yingkou Economic and Technological Development Zone (the Sixth People's Hospital of Yingkou), Yingkou 115007, Liaoning, CHINA; 2. College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, Liaoning, CHINA

**【Abstract】** Gene therapy was initially used for the treatment of genetic diseases. With the development of genetic engineering technology, it has achieved good clinical effects in the treatment of acquired diseases such as malignant tumors, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases. Several therapeutic strategies have been approved for clinical use. Gene therapy was characterized by high specificity and satisfied therapeutic effects. Gene engineering techniques involved in gene therapy include virus vector technology, gene editing technology and chimeric antigen receptor (CAR)-T technology. Here, the application of gene engineering technology on gene therapy and the research progress of gene therapy are reviewed.

**【Key words】** Gene therapy;  $\gamma$ -retroviral vector; Lentiviral vector; Adeno-associated virus (AAV); Gene editing; Chimeric antigen receptor (CAR) T cells

基因治疗是指将外源正常基因导入体内,纠正基因缺陷引起的疾病以达到治疗目的。1972年,费里德曼提出基因疗法用于治疗人类遗传性疾病的设想<sup>[1]</sup>。然而,1990年,美国国立卫生研究院首次开展基因治疗的临床研究。基因治疗最初用于单基因遗传性疾病的治疗,随着技术发展,扩展到癌症、慢性疾病、神经退行性疾病和代谢紊乱性疾病的治疗<sup>[2]</sup>。理想的载体是基因治疗的关键,病毒载体感染细胞效率较高,能够整合宿主细胞基因组,是基因治疗常用的递送系统。经过半个世纪的发展,结合了基因工程技术的基因治疗策略得到了优化。与细胞免疫技术结合,增强T细胞抗肿瘤的能力;与基因编辑技术结合,精准修复缺陷基因,治疗疾病<sup>[3]</sup>。本文将根据基因治疗所涉及的基因工程技术为主线,阐述基因治疗在临床及临床试验中的研究进展。

### 1 病毒载体技术

病毒载体是最早应用于基因治疗研究的工具。病毒载体介导的基因导入方法有两种:体外转移和活

体直接转移。病毒载体分为整合型和非整合型。整合型病毒载体通过体外转移用于体外基因治疗,而非整合型病毒载体通过活体直接转移用于体内基因治疗。目前,应用于基因治疗较常见的整合型病毒载体包括 $\gamma$ -逆转录病毒载体和慢病毒载体,而非整合型病毒载体为腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)。本文通过病毒载体导入的方法探讨其在基因治疗中的应用。

1.1 体外基因治疗 20世纪末, $\gamma$ -逆转录病毒载体首先用于造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的基因导入<sup>[4]</sup>。1990年,美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)监督了美国首例人体基因治疗试验,该试验利用 $\gamma$ -逆转录病毒载体转导HSCs治疗患有腺苷脱氨酶缺乏性重度联合免疫缺陷症的儿童,2例患儿接受治疗后临床表现良好,生长发育正常<sup>[5]</sup>。2000年,法国内克尔医院研究人员利用 $\gamma$ -逆转录病毒感染HSCs治疗X-连锁重症联合免疫缺陷症患者。10例患者中有9例治疗成功,然而有4例患者

基金项目:国家自然科学基金(编号:81703102)

通讯作者:张殿宝,副教授, E-mail: zhangdianbao@gmail.com

经过 31~68 个月的治疗后发展成 T 细胞白血病,原因是外源基因在基因组中的随机插入激活了癌基因的表达<sup>[6]</sup>。 $\gamma$ -逆转录病毒载体插入突变的安全性问题给基因治疗带来了巨大的挑战。

在基因治疗中,慢病毒载体比 $\gamma$ -逆转录病毒载体更有优势。慢病毒介导外源基因整合入 5'-非编码区,降低致癌风险;慢病毒可以感染非分裂细胞,转染效率高,并且可以携带更大、更复杂的外源基因片段。因此,慢病毒载体目前是大多数 HSCs 编辑的首选工具。慢病毒载体靶向 HSCs 在遗传性神经疾病、 $\beta$ 地中海贫血等疾病的治疗中显现了较好的效果<sup>[7]</sup>。X-连锁肾上腺脑白质营养不良症是一种严重的男孩大脑髓鞘疾病,该疾病是由于肾上腺脑白质营养不良蛋白(一种由 ABCD1 基因编码的三磷酸腺苷结合盒转运蛋白)缺乏引起。X-连锁肾上腺脑白质营养不良症患者经过骨髓清除治疗后,输注慢病毒载体转导的 HSCs, 14~16 个月后 2 例患者的进行性脑髓鞘停止,表明慢病毒载体靶向 HSCs 可为肾上腺脑白质营养不良提供临床疗效<sup>[8]</sup>。此外, $\beta$ 地中海贫血是最常见的单基因疾病,其发病机制是基因突变造成 $\beta$ -珠蛋白合成减少,最终导致溶血性贫血。首个成功的 $\beta$ 地中海贫血基因治疗试验是利用编码 $\beta$ -珠蛋白的慢病毒载体转导自体 HSCs,经治疗后患者不依赖输血长达 33 个月,且有稳定的血红蛋白生成<sup>[9]</sup>。目前, $\beta$ 地中海贫血基因疗法 Zynteglo 已在欧洲上市。如何优化载体的设计和生产工艺,提高载体有效转导、靶向递送和受控基因表达仍面临挑战。

**1.2 体内基因治疗** AAV 是一类天然复制缺陷的非致病、无包膜的细小病毒。AAV 具有低免疫原性、低致病性、宿主范围广泛以及稳定表达等优势,是最有潜力的基因治疗载体之一,并已广泛地应用于临床研究。2004 年,中国最先将基因治疗药物 Gendicine 引入市场。Gendicine 通过 AAV 携带 p53 基因治疗头颈部鳞癌,可是该药物的治疗效果存在争议。2012 年,欧洲药品管理局(European medicines agency, EMA)批准了首款基因治疗药物 Glybera,其利用 AAV 载体携带 LPL 基因治疗脂蛋白脂肪酶缺乏引起的严重肌肉萎缩疾病<sup>[10]</sup>。2017 年, FDA 批准了基因治疗产品 Luxturna,其通过 AAV2 携带视网膜变性等位基因 65 治疗罕见遗传性视网膜病变造成的视力丧失<sup>[11]</sup>。2019 年, FDA 批准基因治疗产品 Zolgensma,其通过 AAV9 装载运动神经元生存蛋白,治疗 2 岁以下脊髓性肌萎缩症儿童(NCT03955679)。最近,有报道显示 AAV 递送基因编辑系统可有效改善杜氏肌营养不良症<sup>[12]</sup>。AAV 相关的基因疗法 NAN-101 的 I 期临床试验也正在进行中,可用于治疗充血性心衰(NCT04179643)。

## 2 基因编辑技术

基因编辑是利用基因编辑工具酶精准修改基因组的技术。与传统的病毒载体介导外源基因技术相比,基因编辑可以介导细胞内的基因添加、基因消融、基因纠正等,精确修复突变基因,使基因治疗更加精准和高效<sup>[13]</sup>。同源重组技术是最早的基因编辑技术,但外源 DNA 与目的 DNA 自然重组的概率很低。因此,基于核酸酶的基因编辑技术应运而生,该技术不仅减少了外源基因随机插入,而且提高了对基因组特定片段进行精确修饰的几率。目前,已知的四种基因编辑技术包括锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、规律成簇的间隔短回文重复(regarding the clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和单碱基编辑(base editing, BE)技术。

**2.1 ZFNs 技术** ZFNs 是一种自定义的人工核酸酶,它可以在特定的序列上产生双链断裂,从而实现有效的靶向遗传修饰。目前,已有临床试验证明 ZFNs 可用于治疗艾滋病、血友病和宫颈癌前病变等(NCT01044654、NCT02695160 和 NCT02800369)。但是,ZFNs 特异性有限、易脱靶,而且蛋白设计费时费力,限制了该技术的大规模应用。

**2.2 TALENs 技术** 2009 年,转录激活效应蛋白和 FokI 酶区域结合构建了新一代的基因编辑技术 TALENs。与 ZFNs 相比,TALENs 的优势是设计更容易、细胞毒性较低,劣势是载体的构建耗时耗力。TALENs 联合嵌合抗原受体修饰的 T 细胞(chimeric antigen receptor modified T cells, CAR-T)治疗多发性骨髓瘤的临床试验正在招募中(NCT04142619)。

**2.3 CRISPR 技术** ZFNs 和 TALENs 的应用存在一定局限性。至 2013 年以来,研究者将注意力转移到 CRISPR/Cas9 应用。根据 Cas 蛋白的不同,CRISPR/Cas 系统被划分为 I 到 VI 型。广泛应用于基因编辑的 CRISPR/Cas9 是 II 型 CRISPR 系统<sup>[14]</sup>。CRISPR/Cas9 与 ZFNs 和 TALENs 相比特异性较高。然而,Cas9 核酸酶非特异切割概率较高,导致其脱靶效应相应提升。最近,四川大学团队首次利用 CRISPR/Cas9 修饰 T 细胞治疗肺癌患者<sup>[15]</sup>。同时,CRISPR/Cas9 技术已经成为基因编辑 CAR-T 的一种简单而有效的方法。麻省总医院和哈佛大学团队利用 CRISPR/Cas9 和 CAR-T 技术联合应用于胶质瘤的研究。该团队的前期结果提示靶向表皮生长因子 VIII(epidermal growth factor receptor III, EGFRV III)的 CAR-T 可定位于颅内肿瘤,并且可有效抑制 EGFRV III 表达的胶质瘤细胞生长<sup>[16]</sup>。然而,EGFRV III 表达的异质性和肿瘤微环境的抑制性影响其临床疗效。该

团队利用CRISPR/Cas9技术对内源性T细胞受体 $\beta$ -2微球蛋白进行基因破坏,降低了启动移植抗宿主病和细胞排斥的可能性;利用CRISPR/Cas9技术破坏程序性细胞死亡配体1基因的表达,改善肿瘤微环境的抑制性。在胶质瘤临床模型中,三基因编辑的EGFRVIII CAR-T可增加抗肿瘤效应<sup>[17]</sup>。2018年10月,FDA接受了CRISPR/Cas9技术编辑的基因疗法CXT-001递交的研究性新药申请,CXT-001是基于基因编辑的自体干细胞疗法,用于治疗镰状细胞贫血症。最近,全球实现了首例CRISPR/Cas9基因疗法的体内治疗,CRISPR/Cas9在研药物AGN-151587通过视网膜下注射给药治疗视力障碍性疾病,这一里程碑事件推动基因编辑技术在基因治疗中的快速发展。

**2.4 BE技术** BE是不需要供体DNA模板或DNA双链断裂即可进行单碱基转换的基因编辑技术。BE不依赖于非同源末端连接或同源定向修复,而是在基因组上引入精确且高度可预测的核苷酸,以便改善ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9技术的随机插入和缺失引起的移码突变问题。第三代碱基编辑器BE3将C:G碱基对转换为A:T碱基对,与其他编辑器相比,编辑效率更高,随机插入和缺失的频率更低。

### 3 CAR-T技术及其在肿瘤中的应用

近年来,肿瘤成为基因治疗炙手可热的研究领域,CAR-T疗法是当下肿瘤治疗最具前景的发展方向之一。具有里程碑意义的是:2017年,FDA批准的两款CAR-T疗法Kymriah和Yescarta,分别用于治疗急性淋巴细胞白血病和B细胞淋巴瘤,两者都在临床试验中表现出显著的抗肿瘤效果。然而,CAR-T针对实体瘤的临床效果却差强人意。实体瘤的微环境、特异性靶点的缺乏、免疫抑制、难以归巢到肿瘤组织等因素限制了CAR-T在实体瘤的发展<sup>[18]</sup>。如何找到特异性的靶点以及通过结构优化,提高对肿瘤的杀伤效率,降低CAR-T对正常组织的损害是CAR-T面临的巨大挑战。科学家们一直致力于CAR-T的改造和研究,通过安装自杀基因、多靶点CAR-T联合、CAR-T联合其他治疗等手段,在肝癌、肾癌、直肠癌、胰腺癌等恶性肿瘤中取得了突破性进展<sup>[19]</sup>。

**3.1 肝癌** 上海交通大学医学院附属仁济医院构建了肝细胞癌的双靶点CAR-T。双重靶点为磷脂酰肌醇蛋白糖3(glypican-3, GPC3)和去唾液酸糖蛋白受体1(asialoglycoprotein receptor 1, ASGR1),分别是肝癌标记物和肝组织蛋白质。双靶向CAR-T针对体外共同携带两种抗原的肿瘤细胞在细胞因子分泌、增殖和抗凋亡等方面明显优于单靶向的CAR-T<sup>[20]</sup>。为了提高应答效率,该团队分析了GPC3-CAR-T联合索拉非尼在肝癌模型中的作用。研究表明,索拉非尼可通过促进肿瘤相关巨噬细胞的分泌和细胞凋亡

机制增加GPC3-CAR-T的抗肿瘤效应<sup>[21]</sup>。

**3.2 胰腺癌** 宾西法尼亚大学团队I期临床试验报道,靶向间皮素的CAR-T输注6例胰腺导管癌患者后,有3例患者肿瘤代谢活性降低,且有1例患者肝转移灶完全消失<sup>[22]</sup>。此外,来自英国和美国的团队开创性地构建了具有开关功能的靶向人类表皮生长因子受体2的CAR-T,利用IV期胰腺癌患者来源的异种移植模型模拟胰腺癌侵袭性的特征,包括严重的肝转移和肺转移。经体内注射后,传统和新型的CAR-T均显示出显著的治疗效果,已经扩散到肝脏和肺部的癌细胞也完全消失,但具有开关作用的CAR-T可提供临床转化的潜在安全性<sup>[23]</sup>。

**3.3 直肠癌** 四川大学团队发现上皮细胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)可作为CAR-T治疗结直肠癌新靶点。研究显示通过慢病毒递送EpCAM CAR-T至小鼠异种移植模型,以EpCAM依赖性方式诱导靶细胞产生溶解性细胞毒性,并分泌细胞毒性细胞因子。此外,EpCAM-CAR-T过继转移显著延迟了异种移植模型中肿瘤的生长和形成,且安全性评价提示CAR-T在小鼠体内无全身毒性<sup>[24]</sup>。

**3.4 肾癌** 徐州医科大学团队构建了人肾细胞癌特异性抗原碳酸酐酶IX(Carbonic Anhydrase IX, CA IX)的第二代CAR-T,CAIX-CAR-T在体外对肾癌细胞具有特异性的杀伤作用,联合CAIX-CAR-T和舒尼替尼在转移性肾细胞癌模型中表现出显著的抗肿瘤效应<sup>[25]</sup>。在癌症免疫治疗学会2019年会上,公布两款CAR-T细胞疗法:CCT301-38(AXL)和CCT301-59(ROR2),用于治疗IV期转移性肾细胞癌。7例转移性肾细胞癌患者进行CAR-T细胞治疗后,6例患者病情稳定(NCT03393936)。

## 4 展望

经过半个世纪的发展,基因治疗作为前沿的医学技术,有望成为疾病治疗的新手段。但基因治疗仍面临着很多挑战。临床级病毒载体的制备是基因治疗产品临床转化的关键。然而,病毒载体生产工艺复杂、成本较高,造成基因治疗产品价格昂贵,超出了大部分家庭的支付能力,多款基因治疗产品已黯然退市。如何降低开发成本,简化生产工艺是基因治疗产品亟需解决的问题。CAR-T细胞治疗已经在血液肿瘤治疗中取得重大突破,在实体瘤的研究中也有显著进展,可是实体瘤相关肿瘤标志物的异质性限制了CAR-T的临床治疗效果。此外,CAR-T引起的细胞因子释放综合征也是需要攻克的难题。基因编辑是基因治疗最前沿的技术,但如何解决其脱靶效应,扩大基因编辑后的递送工具选择范围是科学家仍要努力研究的方向。

## 参考文献

- [1] FRIEDMANN T, ROBLIN R. Gene therapy for human genetic disease? [J]. *Science*, 1972, 175(4025): 949-955.
- [2] ANGUELA XM, HIGH KA. Entering the modern era of gene therapy [J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 273-88.
- [3] DUNBAR CE, HIGH KA, JOUNG JK, et al. Gene therapy comes of age [J]. *Science*, 2018, 359(6372): eaan4672.
- [4] HALENE S, WANG L, COOPER RM, et al. Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector [J]. *Blood*, 1999, 94(10): 3349-3457.
- [5] 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.
- [6] HACEIN-BEY-ABINA S, GARRIGUE A, WANG GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3132-3142.
- [7] MILONE MC, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors [J]. *Leukemia*, 2018, 32(7): 1529-1541.
- [8] CARTIER N, HACEIN-BEY-ABINA S, BARTHOLOMAE CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy [J]. *Science*, 2009, 326(5954): 818-823.
- [9] CAVAZZANA-CALVO M, PAYEN E, NEGRE O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia [J]. *Nature*, 2010, 467(7313): 318-322.
- [10] YLA-HERTTUALA S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(10): 1831-1832.
- [11] DIAS MF, JOO K, KEMP JA, et al. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 63: 107-131.
- [12] NANCE ME, SHI R, HAKIM CH, et al. AAV9 edits muscle stem cells in normal and dystrophic adult mice [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(9): 1568-1585.
- [13] BOULAD F, MANSILLA-SOTO J, CABRIOLU A, et al. Gene therapy and genome editing [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2018, 32(2): 329-342.
- [14] MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X, et al. CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(12): 1102-1125.
- [15] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J]. *Nature*, 2016, 539(7630): 479.
- [16] O'ROURKE DM, NASRALLAH MP, DESAI A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(399): eaaa0984.
- [17] CHOI BD, YU X, CASTANO AP, et al. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a pre-clinical model of human glioblastoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 304.
- [18] 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.
- [19] MARTINEZ M, MOON EK. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 128.
- [20] CHEN C, LI K, JIANG H, et al. Development of T cells carrying two complementary chimeric antigen receptors against glypican-3 and asialoglycoprotein receptor 1 for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(4): 475-489.
- [21] WU X, LUO H, SHI B, et al. Combined antitumor effects of sorafenib and GPC3-CAR T cells in mouse models of hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(8): 1483-1494.
- [22] BEATTY GL, O'HARA MH, LACEY SF, et al. Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase 1 trial [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(1): 29-32.
- [23] RAJ D, YANG MH, RODGERS D, et al. Switchable CAR-T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1052-1064.
- [24] ZHANG BL, LI D, GONG YL, et al. Preclinical evaluation of chimeric antigen receptor-modified T cells specific to epithelial cell adhesion molecule for treating colorectal cancer [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(4): 402-412.
- [25] LI H, DING J, LU M, et al. CAIX-specific CAR-T cells and sunitinib show synergistic effects against metastatic renal cancer models [J]. *J Immunother*, 2020, 43(1): 16-28.

(收稿日期:2020-07-28)