

- 案例解析 -

ssDNA 敲入模板：

提升细胞治疗中基因敲入效率与细胞产量的新策略

- 合作实验室

Brian Shy | Marson Laboratory,
Gladstone-UCSF Institute of Genomic Immunology

- 文献信息

Hybrid ssDNA repair templates enable high yield genome engineering in primary cells for disease modeling and cell therapy manufacturing. *bioRxiv*, Sep 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.09.02.458799>.

第一章 研究背景与简介

缩写释义

- **CTS:** Cas9 target sequences, Cas9 蛋白靶向序列, CTS 包含 gRNA 序列、PAM 序列和一段边缘核苷酸序列。
- **ssDNA:** 单链 DNA。/ **ssCTS:** 包含 CTS 序列的 ssDNA。
- **dsDNA:** 双链 DNA。/ **dsCTS:** 包含 CTS 序列的 dsDNA。

研究亮点

- **更精准高效的基因敲入模板—ssDNA**

单链 DNA (ssDNA 或 ssODN) 被证实是 CRISPR 技术中、基于同源介导修复 (HDR) 的基因敲入实验中理想的敲入模板。**ssDNA 作为敲入模板, 表现出了优越的编辑效率、较小的细胞毒性、更低的脱靶效应**, 并且在多个插入位点、多种插入序列、多种人类原代细胞上的基因敲入实验中得到了验证。

较之 dsCTS, **ssCTS 的敲入效率可提升高达 5 倍、活细胞数量可提升高达 7 倍。**

- **提升敲入效率的敲入模板设计策略—CTS 序列**

通过在 ssDNA 敲入模板上添加 Cas9 蛋白靶向序列 (CTS), 可显著**提升敲入效率** (可由 20% 提升至高达 70%), 在制备临床使用规格的基于非病毒载体模式的 CAR-T 细胞产品时, **使用 ssCTS 作为敲入模板, 可以获得高达 46.2% 的敲入效率。**

研究背景

简单灵活的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有广泛应用, CRISPR/Cas9 技术精准和高效的基因编辑能力, 使其可以应用于**同时敲除外源性 TCR、插入功能性嵌合抗原受体 (CAR) 或 T 细胞受体 (TCR)**, 从而开发下一代 CAR/TCR-T 细胞制备工艺。近年来, 病毒载体与非病毒载体递送 CRISPR/Cas9 敲入模板等试剂的方案都有所突破:

- **病毒载体模式:** 通过 AAV 等病毒载体将基因敲入模板递送至宿主细胞, 可以获得较高的敲入效率, 但是病毒转染模式**存在免疫原性高、非预期插入风险、制备经费高、周期长**等问题。
- **非病毒载体模式:** 通过 HDR 机制将目标基因**插入特定位点、脱靶效应与细胞毒性更低**, 也可以匹配后续生产的监管要求。

因此，越来越多的科研人员开始尝试提高非病毒载体模式的编辑效率，期待开发出更安全高效的细胞和基因治疗产品制备方案^[1]。

研究历程

Nguyen 博士、Theodore Roth 博士等曾报道在双链 DNA (dsDNA) 敲入模板上添加 Cas9 蛋白靶向序列 (CTS)，从而提升基因敲入效率。通过这种设计，CTS 可以让 RNP (Cas9+sgRNA) 与敲入模板结合在一起进行电转，促进其进入待编辑细胞的细胞核，从而提升目标基因插入效率^[2]。然而，该方案在细胞治疗产品制备产量和效率方面仍比较有限，因为 dsDNA 高剂量下细胞毒性比较大。

本研究中，Shy 博士等开发了一种添加了 CTS 序列的 ssDNA 敲入模板，由于 ssDNA 较之 dsDNA 在高剂量下细胞毒性较低的优势，因此 ssCTS 的敲入效率提升了 5 倍、活细胞产量提升了 7 倍。

由于 ssDNA 制备存在技术难度，因此，本研究中 Shy 博士选择使用金斯瑞的 GenExact™ ssDNA，对原代 T 细胞进行编辑，开展临床应用级别的细胞治疗产品制备^[3]。



参考文献

- [1] *Ehsan Razeghian et al.* A deep insight into CRISPR/Cas9 application in CAR-T cell-based tumor immunotherapies. *Stem Cell Research & Therapy*, 428 (2021) .<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02510-7>.
- [2] *Nguyen, D. N. et al.* Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nature biotechnology* 38, 44-49, doi:10.1038/s41587-019-0325-6 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0325-6>.
- [3] *Brian Shy et al.*, Hybrid ssDNA repair templates enable high yield genome engineering in primary cells for disease modeling and cell therapy manufacturing. *bioRxiv*, Sep 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.09.02.458799>.

第二章 研究方案与结果

1. 基因敲入模板设计方案

①. CTS 结构

本研究中，Shy 博士等开发了一种单链 DNA 敲入模板，在两端添加了 Cas9 蛋白靶向序列（CTS），两端序列中互补的序列通过退火形成了双链 DNA。整个 HDR 模板中，待插入基因左右两侧为同源臂序列，同源臂序列外端为 CTS 序列（图 1）。

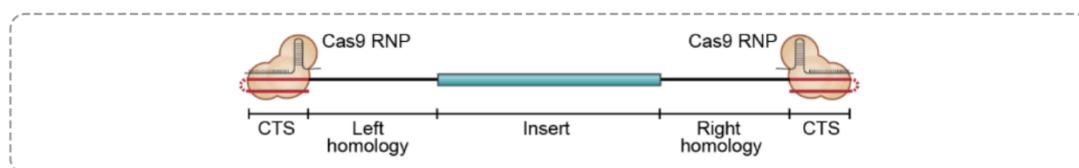


图 1. 添加 Cas9 蛋白靶向序列（CTS）的 ssDNA 敲入模板设计示意图

CTS 包含 PAM 序列、gRNA 序列和一段边缘核苷酸序列（图 2）。

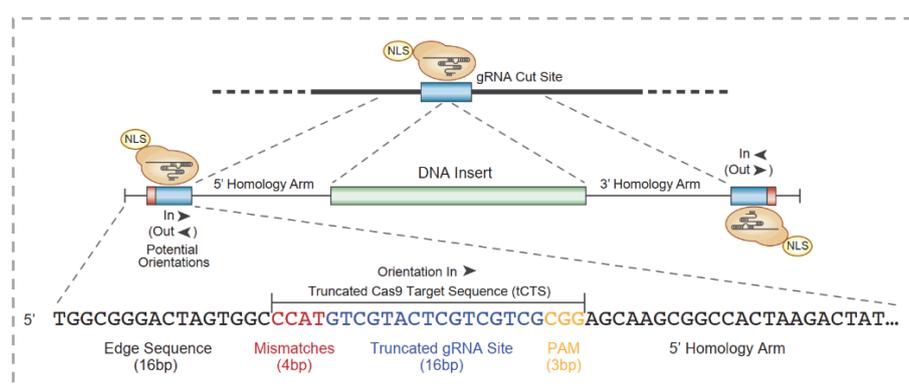


图 2. CTS 序列组成示例

②. CTS 优势

CTS 序列可以结合 Cas9 蛋白形成核糖核蛋白（RNP），让 RNP（Cas9+sgRNA）与敲入模板整合在一起进行电转，促进 HDR 模板进入细胞核，提升目标基因插入效率。

2. ssCTS 提升基因敲入效率、降低细胞毒性

①. 不同敲入序列/敲入位点验证

◆ 实验目的

验证 ssCTS 应用于不同敲入位点/敲入序列时，敲入效率、活细胞数量、敲入细胞数等指标的提升。

◆ 实验方案

- 在 IL2RA 位点敲入 tNGFR
- 在 IL2RA 位点敲入 IL2RA-GFP 融合蛋白
- 在 TRAC 位点，分别采用两种 HDR 模板、使用两种 sgRNA（g526 和 g527）进行 BCMA-CAR 序列的敲入（图 2）

◆ 实验结果

- 在 IL2RA 位点，敲入长约 1.5kb 的 tNGFR 序列，应用 ssCTS 模板可获得 78.5%的敲入效率；敲入长约 2.3kb 的 IL2RA-GFP 序列，可以获得 38%的敲入效率。（图 3a, b）
- 在 TRAC 位点，敲入长约 2.9kb 靶向 BCMA 靶点的 CAR 序列，应用 ssCTS 模板可获得 39%的敲入效率，同时获得较高的存活敲入细胞数量。（图 3c）
- 3 个实验中，ssCTS 的活细胞数量均高于 dsCTS，ssCTS 的敲入效率与敲入细胞数量均高于 dsDNA 和 ssDNA，提示 ssDNA 是细胞毒性更低、敲入效率更高的敲入模板，CTS 设计可以提升敲入效率。

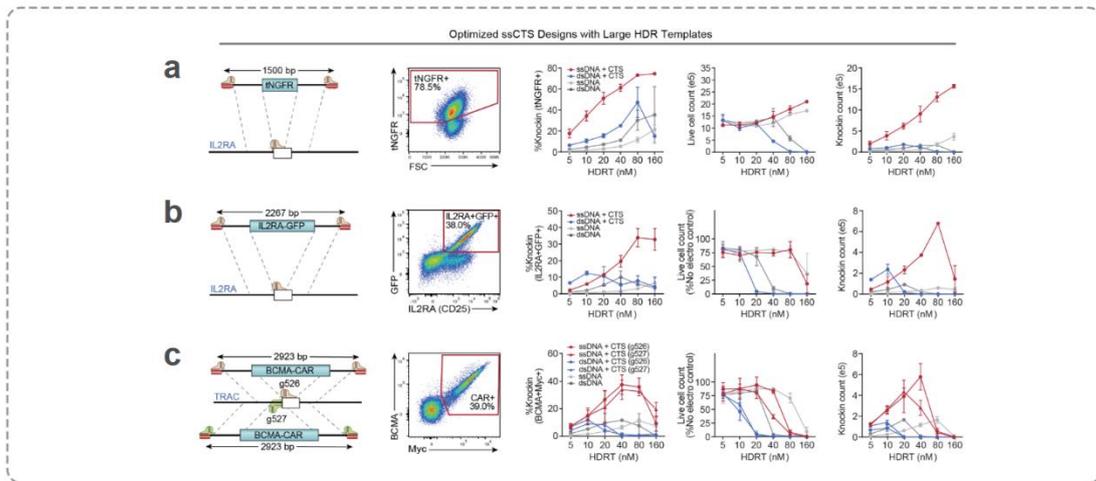


图 3. 不同敲入模板/敲入序列/敲入位点的敲入效率和细胞毒性

②. 不同敲入位点/敲入序列验证（高通量敲入模板池）

◆ 实验目的

敲入模板池可用于高通量筛选合适的敲入序列或位点，应用敲入模板池，验证 ssCTS 应用于不同敲入位点/敲入序列时，敲入效率、敲入细胞数等指标的提升。

◆ 实验方案

- 将包含 tNGFR 序列的敲入模板，分别敲入至 22 个不同位点，检测敲入效率。
- b-c. 将特异识别 NY-ESO-1 的 TCR 序列，敲入内源性的 TRAC 位点，检测敲入效率与敲入细胞数。
- d. 选择不同敲入序列，应用不同形式的敲入模板文库（Plasmid、ssCTS、dsCTS），敲入内源性的 TRAC 位点，检测不同敲入序列在敲入细胞池中的分布占比。

◆ 实验结果

- 较之 dsCTS, 应用 ssCTS 作为敲入模板可获得更高的敲入效率, 在多个敲入位点表现出相同趋势, 仅少部分位点两者敲入效率相似 (图 4a)。
- 较之 dsCTS, 应用 ssCTS 作为特异识别 NY-ESO-1 的 TCR 序列的敲入模板, 敲入效率和敲入细胞数量可提升约 5 倍 (图 4b,c)。
- 分别应用 Plasmid、ssCTS、dsCTS 作为敲入模板敲入多种序列, 每一种敲入序列在敲入细胞池中占比一致, 不受敲入模板形式变化影响, ssCTS 可以用于筛选合适的敲入序列, 并获得与 Plasmid、dsCTS 一致的结果 (图 4d)。

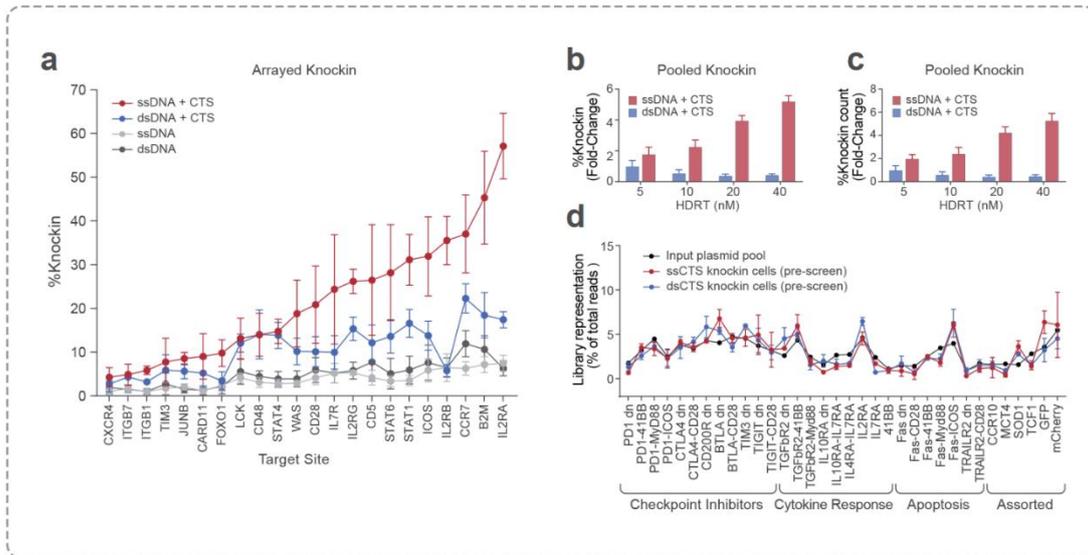


图 4. 多种序列、多个位点的基因敲入实验评价 ssCTS 作为敲入模板的敲入效果

③. 不同宿主细胞验证

◆ 实验目的

验证 ssCTS 应用于不同的原代细胞时, 敲入效率、敲入细胞数量等指标的提升。

◆ 实验方案

针对临床相关的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、调节性 T 细胞 (Treg)、NK 细胞、B 细胞、造血干细胞 (HSC)、 $\gamma\delta$ T 细胞, 敲入一个靶向网格蛋白轻链 (CLTA) 基因的 mCherry 序列 (红色荧光蛋白), 检测敲入效率、敲入细胞数量。

◆ 实验结果:

- 较之 dsCTS, 应用 ssCTS 作为敲入模板可获得更高的敲入效率, 在多个宿主细胞表现出相同趋势 (图 5a)。
- 较之 dsDNA, 应用 ssCTS 作为敲入模板, 敲入细胞数量可提升高达 7 倍 (图 5f)、敲入效率可提升至高达 60%+ (图 5g)、细胞毒性低。

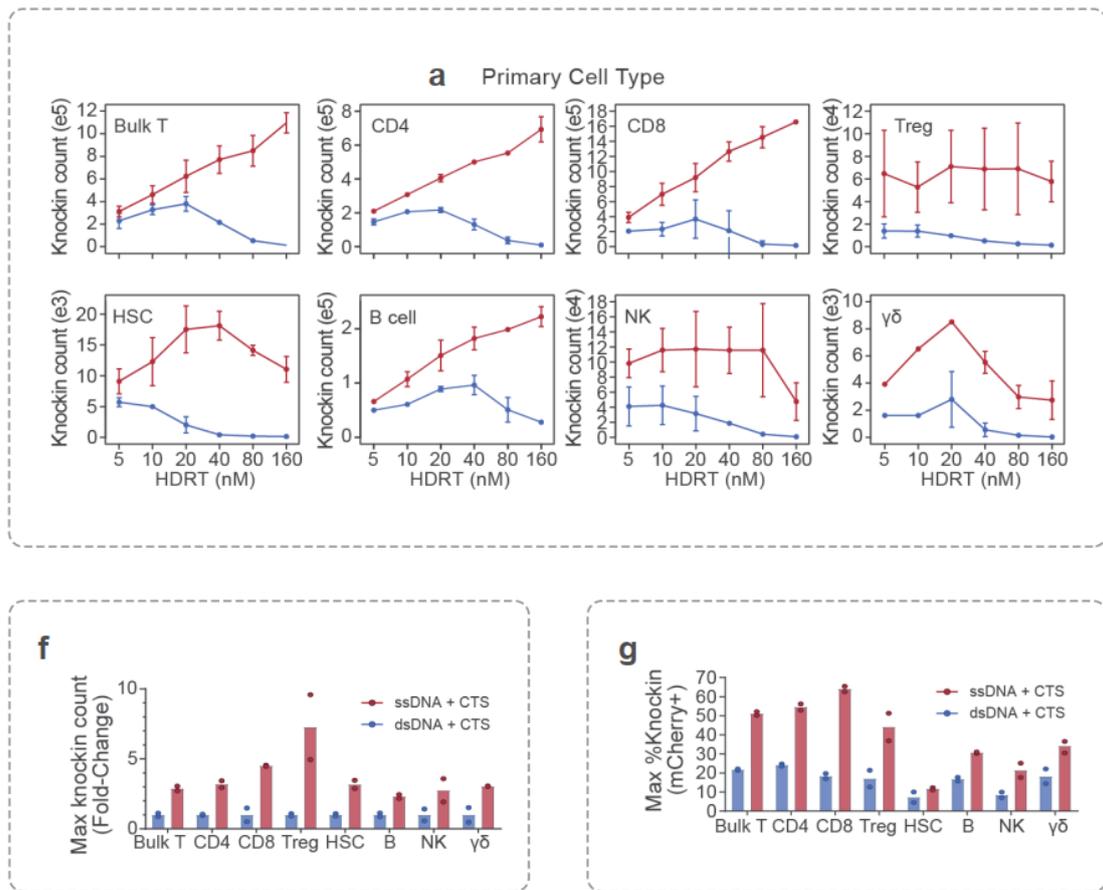


图 5. 通过多种宿主细胞评价 ssCTS 作为敲入模板的敲入效果

3. 金斯瑞 GenExact™ ssDNA 应用于临床制备细胞治疗产品

◆ 实验目的

检测 ssDNA 作为敲入模板用于临床制备细胞治疗产品的敲入效率与制备产量，验证其在临床应用中的可行性。

◆ 实验方案

非病毒模式 CAR-T 细胞制备流程（图 6a），本实验应用 ssDNA 作为敲入模板，把靶向 BCMA 的 CAR 序列敲入 T 细胞的 TRAC 位点。

◆ 实验结果

- GenExact™ ssDNA 较之实验室合成的 HDR 模板，具备更低的细胞毒性、更高的敲入效率（图 6b-d）

- 临床使用规模的 GenExact™ ssDNA 在未添加增强剂的条件下，敲入效率高达 46.2%（图 6e）
- 应用 GenExact™ ssDNA 完成基因敲入的细胞可达到患者使用剂量（ 1.5×10^9 ），制备的 BCMA-CAR 细胞表现出肿瘤杀伤活性（图 6f-g）

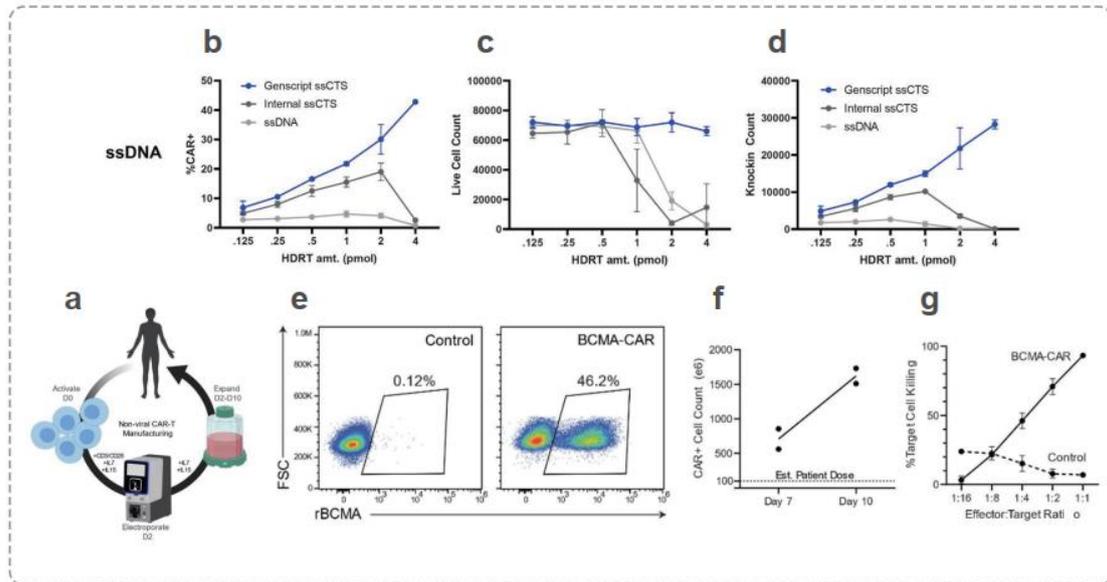


图 6. 金斯瑞 GenExact™ ssDNA 应用于临床级的非病毒体系 T 细胞编辑

第三章 研究总结

综上所述，较之 dsCTS，ssCTS 做为基因敲入模板，敲入效率可提升高达 5 倍，敲入细胞数量可提升 7 倍，同时，针对不同敲入序列、敲入位点、不同宿主细胞，ssCTS 也表现出了更高的敲入效率和敲入细胞数。

一方面，因为 ssCTS 是单链 DNA，可以通过同源介导修复（HDR）精准敲入目标位点的双链断裂处，而 dsCTS 是双链 DNA，存在通过非同源末端连接（NHEJ）插入其他宿主细胞随机产生的双链断裂处的风险。

另一方面，因为 ssCTS 的细胞毒性更低，因此活的敲入细胞数量提升。同时，敲入效率随敲入模板剂量增加而提升，ssCTS 在高剂量下的低毒性，也为通过提高模板剂量从而提升敲入效率提供了可能性。

最后，基于 ssCTS 模板的高敲入效率和低细胞毒性，用 ssCTS 制备的 CAR+细胞达到临床使用剂量，并发挥肿瘤杀伤作用。

因此，在细胞治疗研发至临床应用阶段，ssDNA 是理想的高效精准的 CAR 或 TCR 序列敲入模板。