(دکتر مریم اسلامی)

سلول های CAR T ویرایش شده برای درمان ترکیبی علیه بدخیمی های سلول T

خلاصه

هدف قرار دادن بدخیمی های سلول T با استفاده از سلول های T گیرنده کایمریک ((CARتوسط برادرکشی « «T v Tعلیه آنتی ژن های مشترک مانند CD3 و CD7ما تولید سلول‌های T مقاوم به برادرکشی را با حذف منظم TCR/CD3 و CD7 پیش از بیان CARهای اختصاصی CD3 یا CD7 با واسطه لنتی ویروس توصیف می‌کنیم. جالب توجه است که کشت مشترک CAR/7CAR3 منجر به "غنی سازی خود" جمعیت هایی شد که 99.6٪ -TCR-/CD3-/CD7-را به همراه داشت. سلول های CAR3 یا CAR7 توانستند سمیت سلولی خاصی را علیه خطوط لوسمی با بیان CD3 و/یا CD7 تعریف شده و همچنین سلول های T-ALL اولیه اعمال کنند. سلول‌های CAR/7CAR3 با کشت مشترک بالاترین سمیت سلولی را در برابر اهداف T-ALL + CD7 + CD3 در شرایط آزمایشگاهی و یک مدل کایمریک انسان: موش در داخل بدن نشان دادند. در حالی که ویراستاران APOBEC طبق گزارش‌ها می‌توانند دآمیناسیون مستقل از راهنما را هم DNA و هم RNA را نشان دهند، ما هیچ فعالیت مشکل‌ساز «خارج از هدف» یا تبدیل بی‌هدف پایه‌ای که بر نواحی اتصال خاص آنتی‌ژن CAR تأثیر بگذارد، پیدا نکردیم، که در غیر این صورت ممکن است ویژگی سلول T را تغییر دهد. انفوزیون ترکیبی سلول‌های ضد T CAR T مقاوم به برادرکشی ممکن است بهبود مولکولی را قبل از allo-HSCT برای بدخیمی‌های سلول T فعال کند.

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T (T-ALL) از پیش سازهای لنفوئیدی ناشی می شود و معمولاً با پیش آگهی ضعیف تر نسبت به لوسمی سلول B مرتبط است. درمان استاندارد برای T-ALL، از شیمی‌درمانی چند عاملی با شدت بالا استفاده می‌کند که در آن ارزیابی‌های حداقل بیماری باقی‌مانده تحمل‌شده و حساس می‌تواند تعیین کند که چه زمانی بهبودی مولکولی حاصل می‌شود. با این حال، بقای 5 ساله برای T-ALL برای کودکان کمتر از 75 درصد و برای بزرگسالان کمتر از 50 درصد است [1] و در حالی که درمان نجات مانند نلارابین [2] و پیوند سلول های بنیادی آلوژنیک [3] (SCT)به طور گسترده استفاده می شود، نوآورانه است. درمان‌ها از پیشرفت سایر سرطان‌ها عقب مانده‌اند. استراتژی‌های استفاده از سلول‌های T گیرنده آنتی ژن کایمریک ((CARبه طور گسترده در برابر بدخیمی‌های سلول B استفاده می‌شوند و هدف قرار دادن آنتی‌ژن‌های سطحی مانند CD19، CD20 و CD22، که در سلول‌های B سالم نیز وجود دارند، به طور گسترده قابل تحمل است [4]. ,5,6].
بخشی از بیماران مبتلا به آپلازی سلول B پایدار نیاز به جایگزینی طولانی مدت ایمونوگلوبولین دارند، و برخی

ممکن است به پیوند آلوژنیک و بهبود ایمونولوژیکی ناشی از اهدا کننده ادامه دهند [7، 8]. رویکردهای مشابه برای مقابله با بدخیمی های سلول T چالش برانگیزتر بوده است زیرا بیان سطحی آنتی ژن های سطحی مانند کمپلکس TCRαβ/CD3 منجر به به خطر انداختن اثرات برادرکشی در طول تولید سلول T می شود. ما قبلاً گزارش داده‌ایم که چگونه می‌توان با حذف CD3 سطح سلولی از طریق اختلال در بیان TRAC توسط ویرایش ژنوم TALEN، این مشکل را دور زد [9]. کاربردهای درمانی، فعالیت اثرگذار محدود زمانی را برای ایمن کردن بهبودی، و سپس بازسازی سریع یک محفظه سلول T متنوع را پیش‌بینی می‌کنند، با توجه به اینکه جایگزینی عملکرد سلول) Tبرخلاف عملکرد سلول (Bامکان‌پذیر نیست. سینتیک بازیابی سلول های T اتولوگ در چنین تنظیماتی هنوز تعریف نشده است، اما ممکن است ماه ها طول بکشد و ممکن است به جمعیت های پست تیموس با تنوع محدود TCR محدود شود. در دسترس بودن یک اهداکننده آلوژنیک منطبق با آنتی ژن لکوسیت انسانی ((HLAممکن است چشم انداز بازیابی سلول های T مشتق شده از اهداکننده را ارائه دهد، اما در هر یک از این موارد، استراتژی به اولین تضمین بهبود مولکولی سریع و عمیق از طریق اثرات CAR T بستگی دارد.
روش‌های مشابهی برای بدخیمی‌های سلول B در دست توسعه است، برای مثال با استفاده از سلول‌های CAR T که CD19 و CD22 یا CD123 را هدف قرار می‌دهند که با استفاده از ساختارهای بی‌سیسترونیک یا پیکربندی‌های CAR پشت سر هم تولید می‌شوند [10،11،12]. روش دیگر، یک استراتژی فیزیولوژیکی و انعطاف‌پذیرتر شامل تولید چندین بانک سلول T با ویژگی‌های CAR متفاوت است که باید در ترکیب استفاده شوند، همانطور که توسط بیان مولکول سطح سلولی خاص بیماری مشخص می‌شود. ما سلول های CAR T اختصاصی برای CD3 و CD7 را برای استفاده ترکیبی در برابر بدخیمی های سلول T بررسی کرده ایم. دومی یک گلیکوپروتئین گذرنده از خانواده Ig تک دامنه ای 40 کیلو دالتونی است که روی کروموزوم q25.317 کدگذاری شده و در سلول های T طبیعی و بدخیم به شدت بیان می شود. دیگران قبلاً سلول‌های CAR T ضد CD7 را به دنبال بیان پروتئین‌های بازدارنده [13] یا ویرایش [14،15،16] CRISPR/Cas9سلول‌های T برای جلوگیری از اثرات برادرکشی تولید کرده‌اند. ما خطر برادرکشی و شناسایی متقابل را در طول کشت همزمان عوامل ضد CD3 و ضد CD7 CAR با حذف اهداف سطح سلولی شناسایی شده توسط CARهای مربوطه مورد بررسی قرار دادیم. برای دستیابی به این مهم، و با کاهش خطر جابجایی، ویرایش پایه چندگانه با تحویل CAR لنتی ویروسی ترکیب شد. ویرایش پایه از دآمیناسیون شیمیایی هدایت‌شده CRISPR برای تبدیل سیتیدین به یوریدین به تیمیدین ((C → U → Tبسیار دقیق و بدون درز استفاده کرد که سپس باعث ایجاد کدون‌های توقف یا ایجاد اختلال در مکان‌های اهداکننده/گیرنده شد. این فناوری از [17] BE3استفاده کرد که شامل یک نیکاز Cas9 غیرفعال شده با APOBEC1 موش صحرایی (دآمیناز) و یک مهارکننده تک اوراسیل گلیکوزیلاز ((UGIاست که به عنوان mRNA توسط الکتروپوراسیون در ترکیب با راهنماهای CRISPR تحویل داده می‌شود. دآمیناسیون سیتیدین با RNA بسیار اختصاصی در سلول های T قبل از انتقال لنتی ویروسی،

اختلال آنتی ژن هدف را قبل از بیان CAR تضمین کرد. یک ملاحظات مهم در زمینه ویرایش چندگانه تا به امروز، ایجاد جابجایی های کروموزومی به دنبال شکستگی دو رشته ای با واسطه هسته بوده است، به ویژه هنگامی که چندین مکان ژنومی به طور همزمان هدف قرار می گیرند. قبلاً، ما گزارش کرده بودیم که حدود 5 درصد از سلول‌های TALEN ویرایش‌شده CAR19، که در هر دو جایگاه TRAC و CD52 مختل شده‌اند، ناهنجاری‌های کاریوتیپی را نشان می‌دهند [18،19،20]، و فرکانس مشابهی اخیراً در سلول‌های T ویرایش‌شده CRISPR/Cas9 گزارش شده است که بیان می‌کنند. TCR نوترکیب [21]. انتظار می رفت که مزایای ویرایش پایه شامل ویرایش با کارایی بالا [22] و کاهش قابل توجه جابه جایی های قابل پیش بینی بین کروموزوم های ویرایش شده باشد. ما گزارش می‌دهیم که حذف آنتی‌ژن‌های مشترک اجازه تولید سلول‌های CAR T ضد CD3 و anti-CD7 را می‌دهد و فعالیت‌های ترکیبی اثربخش را علیه اهداف سلول T ممکن می‌سازد. استراتژی ها به راحتی از طریق انطباق فرآیندهای تولید نیمه خودکار موجود، مقیاس پذیر هستند. پیش‌بینی می‌شود که یک کاربرد درمانی محدود با زمان سلول‌های ترکیبی ضد CAR T T می‌تواند بهبودی مولکولی عمیق را قبل از شرطی‌سازی و SCT آلوژنیک برنامه‌ریزی‌شده در درمان T-ALL ایجاد کند.

نتایج

هدف گیری ترکیبی سلول های CAR T CD3 و CD7 به تبدیل پایه چندگانه برای حذف همزمان آنتی ژن های مشترک نیاز دارد.

ما قبلاً یک گیرنده آنتی ژن کایمریک نسل دوم، CAR3، ویژه برای CD3ε را توصیف کرده‌ایم که شامل یک توالی scFv مشتق شده از آنتی‌بادی مونوکلونال درمانی OKT3 است که به یک لولا CD8 و دامنه غشایی و BB-CD3ζ41 درون دامنه [9] ادغام شده است. اختلال ژنتیکی با واسطه TALEN در جایگاه TRAC تضمین کرده بود که سلول‌های T متعاقباً با وکتور هدف‌گیری CAR لنتی ویروسی-CD3، فاقد بیان سطح سلولی TCRαβ/CD3 هستند و در نتیجه از اثرات برادرکشی اجتناب می‌کنند. اثرات مشابه نیز به آسانی با استفاده از ویرایش Cas9 به کارگردانی CRISPR ایجاد شد، و تحقیقات اهمیت حیاتی اختلال منظم جایگاه آنتی ژن هدف را قبل از تحویل و بیان CAR نشان داد. همان اصول برای ارزیابی یک CAR خاص برای CD7 اعمال شد (شکل 1 .(A-Cسازه با استفاده از دامنه های متغیر سبک و سنگین که از هیبریدوم A1e3 به دست آمده است، همانطور که قبلاً گزارش شده بود [15] و با پیکربندی CD8TM-41BB-CD3ζ در یک وکتور لنتی ویروسی SIN نسل سوم ادغام شد (شکل 1 (Bتولید شد. ویرایش ژنوم در مکان های متعدد برای جلوگیری از برادرکشی در طول کشت مشترک با استفاده از راهنماهای sgRNA در برابر TRBC1/2 و CD7 که قادر به کار با واکنشگرهای CRISPR/Cas9 و ویرایش پایه سیتیدین ((BEهستند، اعمال شد (شکل 1 .(Cبنابراین

راهنماهای تثبیت شده با اصلاحات فسفوروتیوات 2'-O-متیل 3 به همراه mRNA ژن CleanCap SpCas9 24 ~ اینچ پس از فعال سازی با آنتی بادی های ضد CD3/CD28 الکتروپوره شدند. بیان گذرا با واسطه RNA معرف های ویرایش برای اطمینان از حذف رقیق در سلول های در حال تقسیم برای کاهش اثرات خارج از هدف و ایمنی زایی طراحی شده است. پس از 24 ساعت بیشتر، انتقال لنتی ویروسی CAR3 یا CAR (MOI 5)7 با 12 روز کشت دنبال شد. اختلال سطح بالای TCRαβ/CD3 و CD7 توسط فلوسیتومتری (به ترتیب 63.7-97.9٪ و 60.8-95.6٪) با استفاده از mRNA ژن SpCas9 تایید شد و با بیان قوی CAR در سراسر کشت در اهداکنندگان متعدد (تکمیلی) همراه بود (تکمیلی). شکل A1، B و 2.(A استفاده از mRNA coBE3 باعث ایجاد سطوح مشابهی از اختلال در بیان سطح سلولی (٪63.4-96.2) TCRαβ/CD3و -49.3) CD7 (٪72.6با حذف دوگانه برای 37.5-61.8٪ از سلول ها، قابل مقایسه با سلول های تیمار شده P) SpCas9) (0.2 =شکل A2، B و شکل های تکمیلی A1، B و 2 .(Aویرایش ژنوم هدف در سلول های ویرایش شده coBE3 در سطح مولکولی در 61-100 و 42-71٪ (تبدیل G> Aبرای موقعیت های G5 G6 در TRBC، و 61-94٪ تبدیل C> T برای موقعیت C8 تأیید شد. در) CD7شکل C2، D و E و شکل تکمیلی 2 (Bدر پنجره‌های 5 جفت باز مورد انتظار فعالیت پیش‌بینی‌شده .BEفراتر از پنجره هدف TRBC، 6%≤ تبدیل G > A از نوکلئوتیدهای گوانین، و ≤9٪ تبدیل C > T خارج از پنجره 5 bp پیش بینی شده برای CD7 وجود داشت (شکل D2، .(Eنه ویرایش SpCas9 و نه دآمیناسیون سیتیدین بر بیان CAR با سطح نسبتاً بالا CAR 3 ٪(SpCas9: 32.3-78.2)؛ (٪coBE3: 43.7-81.2و 7٪80.58-80.7-39.9 :SpCas9) CAR در (co تأثیری نداشتند. پایان تولید (شکل A2، B و شکل تکمیلی A).1 نکته مهم، هیچ تفاوتی در گسترش سلولی و بازده سلولی نهایی تولید شده از اهداکنندگان سلول T اولیه با استفاده از Cas9 یا coBE3 وجود نداشت (شکل تکمیلی 3). پروفایل های فنوتیپ اختصاص داده شده به جمعیت های ساده، حافظه مرکزی و حافظه موثر بر روی سلول های +CD4و CAR T +CD8 برای سلول های ویرایش شده با پایه و سلول های اصلاح شده با SpCas9 تعیین شد (شکل تکمیلی 4

ویرایش پایه سیتیدین جابجایی های کروموزومی dsDNA پیش بینی شده را کاهش می دهد

DSB ها می توانند منجر به جابجایی کروموزومی بین سایت های ویرایش چندگانه شوند، و این در سلول های T اصلاح شده TALEN و CRISPR/Cas9 گزارش شده است. قطعات DNA حاوی هر یک از چهار همجوشی پیش بینی شده بین دو جایگاه کروموزومی مختل شده برای ارائه خوانش های کنترلی برای واکنش های PCR در سراسر اتصالات جدید سنتز شدند (شکل 3 .(Aبا استفاده از ترکیبی از پرایمرهای اتصال TRBC1/2 و CD7، PCR، قادر به تشخیص سیگنال‌ها در 4/3 مکان برای SpCas9 (T1)، T2، (T3 و 4/1 ((T1برای نمونه‌های تیمار شده با coBE3 بود (شکل 3 . .(Bپس از بررسی بیشتر، جابه‌جایی‌های ddPCR برای

نمونه‌های ویرایش‌شده SpCas9 0.25-0.98 درصد برای هر چهار ترکیب شناسایی شد (شکل 3) در حالی که تنها رویدادهای سطح بسیار پایین (<0.18٪) برای T1 و T3 در سلول‌های ویرایش‌شده coBE3 شناسایی شدند (شکل. 3.(C

سمیت سلولی سلول T 3CAR و CAR7

عملکرد آزمایشگاهی سلول‌های T موثر CAR3 و CAR7 در ابتدا با آزمایش‌های هم‌کشتی با هدف‌های سلول T Jurkat نشاندار شده با Cr51، به تنهایی یا در ترکیب، ارزیابی شد. سلول های T اولیه CAR3 یا CAR7 ویرایش شده به تنهایی سطوح بالایی از فعالیت سیتوتوکسیک را در برابر اهداف CD3+CD7+نشان دادند، با هر دو عامل CAR3 و CAR7 که بین 40 تا 70 درصد از اهداف در یک E:T 20:1 قرار داشتند (شکل A4 وفعالیت سیتوتوکسیک با سلول های CAR3 یا CAR7 ویرایش شده توسط SpCas9 قابل مقایسه بود که نشان دهنده یکپارچگی عملکردی دست نخورده پس از ویرایش پایه بود (شکل های تکمیلی B6 و 7). در برابر کنترل های آنتی ژن منفی، کشت همزمان عوامل CAR3 یا CAR7 در برابر اهداف CD3-CD7-با نسبت E:T معادل، منجر به سمیت سلولی <5٪ شد. ویژگی بیشتر با کشت مشترک عوامل CAR3 یا CAR7 با سلول های هدف جمعیت مخلوط، که شامل CD3 + CD7-یا CD3-CD7 +یا ترکیبی ناهمگن از جمعیت های CD3 +/- CD7 +/-است، تأیید شد. این پاکسازی اختصاصی CAR به سلول‌هایی که آنتی‌ژن‌های مربوطه خود را نشان می‌دهند، و عدم لیز فراکسیون‌های سلولی منفی محدود شده بود (شکل A4 و شکل‌های تکمیلی 6 و 8). در یک محیط بالینی، تزریق ترکیبی سلول‌های T 3CAR و CAR7 ممکن است مورد نیاز باشد و هنگامی که سلول‌های T 3CAR با سلول‌های T 7CAR کشت داده شدند و سپس در ترکیب استفاده شدند، آنها سمیت سلولی سطح بالایی را در برابر آنتی ژن مخلوط CD3-CD7+و CD3+CD7 نشان دادند. سپس عملکرد سلول‌های T ویرایش‌شده با پایه CAR3 و CAR7 در برابر لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول‌های T اولیه کودکان (T-ALL)ارزیابی شد. مشخصه یابی بر اساس جریان n = 7 نمونه اولیه T-ALL نشان دهنده سطوح بالای CD7 سطح سلولی در این نمونه های بیمار است که از 83 تا 98 درصد متغیر است. در مقابل، بیان سطحی و درون سلولی CD3 به ترتیب 1.5-86 و 2-92٪ بسیار متغیر بود، که دوباره نیاز احتمالی به هدف قرار دادن آنتی ژن های متعدد را در این افراد برجسته می کند. یک نمونه T-ALL که در آن 9.6 درصد سلول ها CD3 سطحی و 92.8 درصد CD7 را بیان می کردند، قبل از کشت با سلول های CAR T مؤثر، با رنگ فلورسنت بارگذاری شداهداف توسط سلول های 3) CARباقیمانده 2.7٪ (CD3یا سلول های 7) CARباقی مانده 3.3٪ (CD7به تنهایی تخلیه شدند و سلول های T از پیش مخلوط شده CAR/7CAR3 باعث حذف تقریباً کامل سلول های هدف شدند (شکل 4.

سلول های 3CAR T و CAR7 ویرایش شده پایه، اثرات ضد سرطان خون قوی را در داخل بدن نشان می دهند.

برای ارزیابی قدرت ضد لوسمی in vivo، سلول‌های 3CAR T و CAR7 ویرایش‌شده در مدل پیوند زنوگرافت NOD/SCID/γc-/- (NSG) که قبلاً توصیف شده بود مورد بررسی قرار گرفت [9]. موش‌ها (n = 28)ابتدا با سلول‌های Jurkat T نشاندار شده با EGFP+LUC+که CD3 و CD7 را بیان می‌کنند (شکل 9 تکمیلی) تزریق شدند و پیوند 3 روز بعد با تصویربرداری بیولومینسنت تایید شد. سلول های CAR3 یا CAR7 ویرایش شده با استفاده از mRNA ژن SpCas9 یا coBE3 در روز 4 در کنار PBS و کنترل های انتقال نیافته به صورت داخل وریدی انفوزیون شدند و پیشرفت لوسمی با تصویربرداری بیولومینسانس سریال در طی چهار هفته بررسی شد (شکل 5 .(A, Bبه طور مستقل، هر دو سلول CAR3 و CAR7 توانستند به سرعت اهداف 3+7 Jurkat را در اوایل روز 7 پاک کنند و از پیشرفت سرطان خون در طول دوره مشاهده 31 روزه جلوگیری کنند. برعکس، موش‌های درمان‌نشده، پیشرفت واضح بیماری را با اختلاف بیش از 4 log در درخشندگی نشان دادند (شکل B5، .(Cاز دست دادن سیگنال بیولومینسانس در موش های تحت درمان با افکتور CAR با تجزیه و تحلیل جریان تایید شد که پاکسازی Jurkats از مغز استخوان را تایید کرد (شکل D5 و شکل تکمیلی 10 .(A, Bتفاوت معنی داری در قدرت ضد لوسمی سلول های CAR T تولید شده با استفاده از SpCas9 در مقایسه با mRNA coBE3 مشاهده نشد. برای نشان دادن مزیت حذف آنتی ژن مشترک از سطح سلول های CAR T (n = 8) موش ها با 5 × 106 از هر عامل CAR3 و CAR7 تزریق شدند. مشابه انفوزیون‌های منفرد سلول‌های CAR T، ترکیبی از عوامل مؤثر CAR/7CAR3 مقاوم به برادرکشی توانست در طول دوره نظارت 31 روزه برای ریشه‌کنی موفقیت‌آمیز بیماری باقی بماند (شکل 5 و شکل تکمیلی 10). وقتی آنتی ژن اختصاصی CAR وجود نداشت، موش‌ها (n=17)پیوند شده با EGFP+LUC+ Jurkats اصلاح شده به 3-7-، نه سلول‌های 3CAR T و نه CAR7 که به‌طور مستقل یا ترکیبی تحویل داده شدند قادر به مهار سرطان خون نبودند و همه موش‌ها تسلیم بیماری شدند. در روز 24 (تصویر تکمیلی 11).

اثرات ترکیبی سلول های ضد T ویرایش شده پایه در موش های انسانی

موش ها (n = 27)با 107 × 107 EGFP+LUC+نشاندار سلول های Jurkat T پیوند داده شدند که برای بیان CD3 یا CD7، به تنهایی یا در ترکیب، اصلاح شده بودند (شکل تکمیلی 9) و 3 روز بعد استقرار لوسمی توسط بیولومینسانس تایید شد. پس از 4 روز، به موش‌ها سلول‌های 3CAR/7CAR T ویرایش‌شده با coBE3)پس از کشت همزمان) یا سلول‌های انتقال نیافته تزریق شد و پیشرفت لوسمی با تصویربرداری بیولومینسانس سریال طی 24 روز بررسی شد (شکل A6، .(B در طی 7 روز از انفوزیون موثر CAR/7CAR3 سیگنال

لوسیفراز در 3+7+ (n = 5)، 3+7(n = 4) - و 3-7+ (n = 5گروه هدف مهار شد، اما نه در گروه 3-7- (n = 5). تا روز 24، بار لوسمی در گروه تزریق شده با 3-7- دریافت کننده CAR/7CAR3 بیش از 400 برابر افزایش یافته بود، که قابل مقایسه با پیشرفت لوسمی در گروه انتقال نیافته (P = 0.36 ns) بود (شکل 6 B). این بیشتر با بررسی مغز استخوان موش‌های 3-7- دریافت‌کننده‌های ترکیبی CAR/7CAR3 با تشخیص گسترش مشخص Jurakts +GFP+CD2 در موش‌هایی که سلول‌های انتقال نیافته را دریافت می‌کردند، تأیید شد. در مقابل، موش‌هایی که CAR/7CAR3 از قبل مخلوط شده دریافت کردند، کامل‌ترین ریشه‌کنی سلول‌های T-ALL +GFP+CD2 را نشان دادند که یک یا هر دو آنتی‌ژن سطحی CD3 و CD7 را بیان می‌کردند (شکل C6، D).

جلوه‌های ویرایش پایه خارج از هدف وابسته و مستقل را راهنمایی کنید

راهنماهای sgRNA که برای مهندسی سلول T پذیرفته شده‌اند، سطوح بالایی از فعالیت ویرایش روی هدف را در ترکیب با SpCas9 یا coBE3 نشان می‌دهند. ما قبلاً استراتژی‌هایی را برای بررسی اثرات با واسطه راهنمای خارج از هدف احتمالی SpCas9 با استفاده از ترکیبی از توالی‌یابی هدفمند مکان‌های پیش‌بینی‌شده، تجزیه و تحلیل Digenome، و توالی‌یابی کل ژنوم برای امضای تعمیر NHEJ توصیف کرده‌ایم [23]. در مورد BE3، تبدیل پایه C > T در یک پنجره تعریف شده قبلاً در مکان TRBC تعیین شده است و اثرات NHEJ با فرکانس پایین NGS شناسایی شده است [24]. علاوه بر این، گزارش‌هایی از فعالیت BE مستقل از راهنما در سطح DNA و RNA گزارش شده‌اند که چشم‌انداز فعالیت ویرایش بی‌رویه را افزایش می‌دهد [25،26،27]. بسیاری از تجربیات منتشر شده مربوط به آزمایش‌هایی است که در رده‌های سلولی به دنبال بیان پلاسمید واسطه ویرایشگرها انجام می‌شود و اثرات پس از بیان واسطه mRNA در سلول‌های اولیه ممکن است متفاوت باشد. الکتروپوراسیون mRNA BE در سلول های T با وسترن بلات برای حمایت از بیان پروتئین گذرا (<48 اینچ) تأیید شد و باید احتمال ویرایش خارج از هدف را کاهش دهد (شکل تکمیلی 12). بازجویی NGS نشان داد که فرکانس‌های تبدیل پایه «روی هدف» در هر دو مکان TRBC و CD7 در سلول‌های T 3CAR BE و CAR BE7 در مقایسه با کمتر از 0/9 درصد در نمونه‌های ویرایش‌شده SpCas9 در هر دو سایت TRBC و CD7 بود (شکل تکمیلی 13 .(A, B رویدادهای TRBC و CD7 NHEJ روی هدف که به صورت درج/حذف (indels) ظاهر می‌شوند بین 50 تا 60 درصد در سلول‌های T ویرایش‌شده SpCas9 در مقایسه با 5 تا 8 درصد برای سلول‌های ویرایش شده پایه (شکل تکمیلی 13 (C, D برای بررسی امکان اثرات "خارج از هدف" وابسته به راهنما coBE3، 20 سایت برتر در سیلیکون پیش بینی شده خارج از هدف برای توالی های هدف گیری TRBC و CD7 با توالی یابی عمیق برای تبدیل سیتوزین مورد بازجویی قرار گرفتند. سطوح تبدیل C > T در سلول‌های T ویرایش‌شده با پایه کمتر از 1٪، در 20/19 از سایت‌های خارج از TRBC، و 1.55٪ در یک سایت تک

اینترونیک (TRBC-OT1، (chr19بود (شکل تکمیلی 13 و جداول تکمیلی). S1 و .(S2برای CD7، در 20/15 سایت‌های «خارج از هدف» پیش‌بینی‌شده، تبدیل‌های پایه C > T به طور کلی با فرکانس‌های کمتر از 1 درصد مشابه بود. دو سایت شناسایی شدند که تا 7.63٪ (CD7-OT1، (chr17و 4.08٪ (CD7-OT20، (chr12)تبدیل C > T را در پنجره ویرایش bp5 نشان می دادند، با این حال، تایید شد که اینها اینترونیک و غیرکدکننده هستند. شکل 13 تکمیلی و جداول تکمیلی S1 و .(S2 در نهایت، ما احتمال اثرات دآمیناسیون بی‌رویه بر روی عناصر تشخیص آنتی‌ژن scFv را که ویژگی آنتی ژن CAR را اعطا می‌کنند، بررسی کردیم. هیپرجهش سوماتیک نواحی متغیر آنتی بادی با واسطه سیتیدین دآمیناز انسانی در سلول های B مدت طولانی است که به عنوان مکانیزمی برای افزایش تنوع گیرنده شناخته شده است [28]. اثرات BE deamination نابجا در سلول‌های CAR-T می‌تواند به طور ناخواسته سلول‌ها را از اهداف مورد نظر تغییر مسیر دهد و منجر به ویژگی ناشناخته شود. بنابراین، برای بررسی یکپارچگی توالی‌های کدکننده CAR پس از ویرایش، RNA کل از سلول‌های T اصلاح‌شده SpCas9 و coBE3 در 48 و 96 ساعت پس از انتقال و دوباره در روز 14، در پایان تولید CAR3 و CAR7 استخراج شد. cDNA با استفاده از پرایمرهای جهانی در کنار توالی های CAR سنتز شد و توسط NGS برای تبدیل پایه خاص سیتیدین، با تمرکز بر مناطق اتصال آنتی ژن سنگین و سبک ((ABRsتجزیه و تحلیل شد (شکل 7). کمی سازی انتقال ها و جابجایی های سیتیدین نشان داد که وقوع C- N> نادر است، که توسط نمونه های ویرایش شده SpCas9 و coBE3 به اشتراک گذاشته شده است، و به طور کلی بین 0٪ و 2٪ در ABR ها قرار دارد (شکل 7 .(Aتنها دو تغییر بالاتر از این سطح تشخیص داده شد، و تنها به طور موقت، پس از 48 ساعت در پایه CAR3 سلول‌های T را در موقعیت‌های (4٪) P370و (7٪) P718 ویرایش کردند و در پایان تولید کاهش یافتند (شکل 7). مهمتر از همه، حداقل انتقال C->T در کل ترانس ژن CAR در سلول های اصلاح شده SpCas9 یا coBE3 وجود داشت و فرکانس رویدادهایی که 48 اینچ پس از تحویل mRNA شناسایی شدند، به طور کلی مشابه موارد در پایان تولید در روز 14 بود (شکل B7، ج). بازجویی مشابه NGS از DNA ژنومی از سلول‌های پایان تولید، هیچ تبدیل دائمی C > T یا G > A را شناسایی نکرد، و بنابراین به طور کلی، هیچ مدرکی دال بر فساد پایدار ویژگی آنتی ژن در سلول‌های CAR T ویرایش شده پایه وجود نداشت.

بحث

درمان‌های مهندسی شده با سلول‌های CAR T برای بدخیمی‌های غیر سلول B، چالش‌برانگیز هستند، با مشکلات خاصی زمانی که آنتی‌ژن‌های هدف در جمعیت‌های هدف در سلول‌های T نیز وجود دارند، به وجود می‌آیند. ما قبلاً استراتژی‌هایی را برای رسیدگی به برادرکشی برای تولید سلول‌های CAR T در برابر CD3، نشانگر سلول T قطعی موجود در لنفوم‌های سلول T خاص و نسبتی از T-ALL توضیح داده‌ایم [9].

الکتروپوراسیون mRNA TALEN برای جلوگیری از مونتاژ و بیان کمپلکس TCRαβ/CD3 چندمری استفاده شد. سلول‌های T حاصل نه تنها نسبت به CAR3 حساس نبودند، بلکه به طور همزمان TCRαβ منفی شدند، و بنابراین اگر از یک اهداکننده سالم بی‌همتا مشتق شده باشند، غیر واکنش‌گرا و ناتوان در میانجی‌گری بیماری پیوند در مقابل میزبان بودند. رویکردهایی با استفاده از سلول‌های CAR T جهانی «خارج از قفسه» علیه CD19 در حال حاضر تحت بررسی هستند، از جمله سلول‌هایی با ویرایش‌های ژنومی اضافی برای رسیدگی به خطر رد توسط میزبان [29، 30]. سلول های CAR19 T ویرایش شده در مکان TRAC و CD52 با استفاده از فناوری TALEN تحت آزمایش چند مرکزی هستند و رویکردهای مشابه با استفاده از ویرایش اندونوکلئاز خانگی یا CRISPR/Cas9 تحت بررسی هستند [18،19،20، 23]. توانایی پیش ساخت سلول‌های CAR T جهانی، امکان تولید بانک‌های سلولی با ویژگی‌های مختلف را فراهم می‌کند، که می‌تواند در ترکیب به عنوان استراتژی برای رسیدگی به بیان هدف ناقص یا درونی شده و فرار آنتی‌ژن مورد استفاده قرار گیرد. در زمینه سلول‌های CAR T که بدخیمی‌های سلول T را هدف قرار می‌دهند، یک کاربرد محدود زمانی در نظر گرفته شده است تا امکان بازیابی یک بخش سلول T عملکردی را فراهم کند، که یا از پیش سازهای اتولوگ، آنتی ژن منفی یا سلول‌های بنیادی مشتق شده از اهداکننده به دنبال آلو-SCT مشتق شده است. آنتی ژن های اضافی مناسب برای هدف قرار دادن بدخیمی های سلول T عبارتند از TCRαβ، CD2، CD5 و .CD7یک استراتژی برای هدف قرار دادن TCRαβ بر روی لنفوم های سلول T در حال آزمایش است و بر هدف گیری تبعیض آمیز TRBC1 یا TRBC2 متکی است، اما با توجه به بیان مولتیمری مرتبط آنها برای ترکیب با CD3ε مناسب نیست [31]. CD2 بر روی سلول‌های T بالغ بیان می‌شود و نقشی در چسبندگی و تحریک همزمان در تعامل با لیگاند آن (LFA-3) CD58 دارد [32].Alefacept ، یک پروتئین فیوژن نوترکیب LFA-3/IgG1 قبلاً به عنوان یک درمان ضد CD2 سرکوب‌کننده سیستم ایمنی برای پسوریازیس مورد بررسی قرار گرفته بود و به طور انتخابی زیر مجموعه‌های سلول T حافظه را کاهش می‌دهد [33، 34]. مطالعات عملکردی عمیق CD2 در حیوانات پراکنده است، عمدتاً به این دلیل که LFA-3 در موش وجود ندارد و محفظه های لنفوسیتی نرمال با ناک اوت CD2 ممکن است نماینده نباشد [35]. آنتی بادی های مونوکلونال علیه CD5 نیز مورد بررسی قرار گرفته اند و نتایج دلگرم کننده ای در برابر لنفوم سلول های T پوستی و T-ALL نشان داده اند [36، 37]. این مولکول در سلول‌های T فعال و سلول‌های T ضد CD5 CAR که همزمان یک حوزه تحریک‌کننده CD28 را بیان می‌کنند، فقط برادرکشی گذرا را نشان می‌دهند، تنظیم می‌شود، اما ساختارهای کدکننده BB1-4 گسترش سلول‌های CD5 CAR T را مختل کرده و سطوح بالاتری از برادرکشی به تومور نسبت داده شد. دخیل در تنظیم مولکول چسبندگی داخل سلولی 1 [38، 39]. ما بر روی CD7 تمرکز کرده‌ایم که قبلاً به عنوان هدفی برای درمان ایمونوتوکسین آنتی‌بادی مونوکلونال در برابر بدخیمی‌های سلول T مورد بررسی قرار گرفته است [40]. اخیراً معرفی استراتژی‌هایی برای مهار بیان بر روی سلول‌های T، دامنه‌های اتصال scFv ضد CD7 را در رویکردهای

CAR به کار گرفته است. گومز-سیلوا و همکاران گزارش دادند که ویرایش CRISPR/Cas9 را برای حذف CD7 در سلول‌های T بیان‌کننده ضد CD7 CAR ترکیب کرده و استراتژی‌هایی را در موش‌های انسانی در برابر لنفوم سلول T و لوسمی میلوئید حاد مدل‌سازی کرده‌اند [15]. علاوه بر این، یک رویکرد جایگزین با استفاده از "محاصره بیان پروتئین" از یک قسمت ضد CD7 scFv که با شبکه آندوپلاسمی/عناصر احتباس گلژی جفت شده است برای لنگر انداختن پروتئین و جلوگیری از بیان سطحی استفاده کرده است [13]. شایان ذکر است، این گزارش‌های اخیر هیچ شواهدی مبنی بر اختلال در سمیت سلولی موثر پس از اختلال در CD7 پیدا نکرده‌اند و به نظر می‌رسد موش‌های دارای کمبود CD7، بخش‌های لنفاوی طبیعی خود را حفظ می‌کنند [41]. دم سیتوپلاسمی CD7 سیگنالینگ فسفوئینوزیتول CD7 را در سلول های T فعال می کند و ممکن است در تحریک همزمان نقش داشته باشد [42]. پروتئین اپیتلیال ترشح شده K12/SECTM1 لیگاند CD7 است و یک پروتئین القایی با اینترفرون است که در مکان ژنتیکی پیوسته برای CD7 کدگذاری شده است، که نشان می دهد بازخورد از طریق تنظیم رونویسی ممکن است در حال اجرا باشد [43، 44]. با توجه به اینکه سلول های CAR T مختل شده برای CD7 فعالیت عملکردی قوی را حفظ می کنند، به نظر می رسد که سیگنال دهی CD7 و فعالیت SECTM1 پروکسی ممکن است برای عملکرد ضد تومور اضافی باشد. با توجه به سلول های آلوژنیک، کوپر و همکاران. یک استراتژی برای تولید سلول‌های T اهداکننده «جهانی» با اختلال همزمان TCR/CD3 و CD7 با استفاده از ویرایش CRISPR/Cas9 برای تولید سلول‌هایی که ضد CD7 CAR خود را بیان می‌کنند، توضیح داد [14]. سلول‌ها در برابر رده‌های سلولی T و بدخیمی‌های سلول T اولیه مورد بررسی قرار گرفتند و مطالعاتی را در موش‌های پیوند زنوگرافت کایمریک انجام دادند. موضوع جابه‌جایی‌های احتمالی از ویرایش چندگانه بررسی نشد، اما ما فرکانس ویرایش مشابهی را گزارش می‌کنیم و رویدادهای قابل تشخیص و کمیت‌پذیری را بین سایت‌های فعالیت راهنما در جایگاه‌های TRBC و CD7 یافتیم. فرکانس با تجارب گذشته با TALEN و CRISPR/Cas9 سازگار بود. در مقابل، با تغییر به BE3 و با استفاده از همان راهنماهای sgRNA، این رویدادها حذف شدند. با توجه به اینکه برای ایجاد مقاومت در برابر آلمتوزوماب یا اختلال در بیان مسیرهای ایست بازرسی مانند PD1، ویرایش‌های ژنوم اضافی مورد نیاز است، فراوانی رویدادهای جابجایی اضافی مشکل‌ساز می‌شود. ما دریافتیم که تحویل همزمان sgRNA ها در برابر CD52 سطوح بالایی از ناک اوت سه گانه ((TCRαβ/CD7/CD52را بدون تغییر در فنوتیپ یا پاسخ های سیتوتوکسیک (داده ها نشان داده نشده است) به همراه داشت و خطرات تغییر شکل را پیش بینی می کند که در مقایسه با Cas9 معمولی کاهش می یابد. با این حال، با توجه به اینکه سلول های T بالغ به راحتی تبدیل نمی شوند، آزمایش های قطعی برای اثبات پروفایل ایمنی افزایش یافته در سلول های T دشوار است. به طور مشابه، به آسانی نمی توان اثرات نامطلوبی را که ممکن است از فعالیت دآمیناسیون نابجا به وجود آید، یا در نتیجه اثرات BE هدایت شده توسط راهنما در مکان های احتمالی خارج از هدف، و یا در نتیجه فعالیت غیرقانونی، مستقل از راهنما، APOBEC در DNA یا

.RNAبازجویی از 20 در سیلیکون "خارج از اهداف" خاص Cas9 وابسته به راهنما را برای هر مکان هدف پیش بینی کرد که فقط فعالیت نابجای نادر و سطح پایینی پیدا کرد. یکی از پیامدهای بالقوه جدی تبدیل پایه بی رویه به توالی های کد کننده گیرنده آنتی ژن تغییر می کند، به ویژه اگر شامل مناطقی باشد که ویژگی اتصال آنتی ژن را تعیین می کند.بررسی از RNA جمع آوری شده در مقاطع زمانی سریال در یک دوره 14 روزه از الکتروپوراسیون BE mRNA تا پایان تولید، هیچ شواهدی مبنی بر انتقال، انتقال (یا سایر انحرافات) با واسطه دآمیناسیون در چارچوب های اتصال آنتی ژن scFv برای CAR3 یا CAR7 پیدا نکرد. پایان تولید این یافته اطمینان‌بخش است، اما در هر صورت، فعالیت‌های ناخواسته در انواع اخیر BE تا حد زیادی کاهش یافته است. فرآیندهایی که در اینجا توضیح داده می شوند به راحتی مقیاس پذیر هستند و تکنیک های مشابه قبلاً به روشی سازگار برای سلول های CAR19 T ویرایش شده CRISPR/Cas9 به کار گرفته شده اند [23]. موضوع کاهش شدید سلول‌های TCRαβ باقی‌مانده برای سلول‌های T اهداکننده غیر HLA حیاتی است و دستگاه CliniMACS Prodigy از تخلیه خودکار میکروبید با بیان کمتر از 1٪ TCRαβ در محصولات نهایی پشتیبانی می‌کند. این مرحله برای خودروهای ضد سلول T حفظ می‌شود، حتی اگر «خود غنی‌سازی» با واسطه CAR در طول تولید ایجاد شود و محدودیت‌های مشخصات دقیق را تضمین می‌کند. پیش‌بینی می‌شود که تولید کافی برای هر دو CAR3 و CAR7 از یک لوکافرز خون محیطی غیرمتحرک برای پشتیبانی از ده‌ها دوز درمانی قابل دست‌یابی باشد و راهی برای سلول‌درمانی مقرون‌به‌صرفه و در دسترس ارائه کند. کاربردهای اولیه درمانی در برابر T-ALL مقاوم به عود در ترکیب با SCT آلوژنیک پیش بینی می شود.

https://www.nature.com/articles/s41375-021-01282-6