

生命奥秘

Lifecomics

2018年12月刊 总第111期

肿瘤免疫疗法的重大 变革(PART I)

- ▶ 高精度的碱基编辑技术
- ▶ 断腿的狼蛛怎么跑？



无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 : CONTENTS

专题 — 肿瘤免疫疗法的重大变革 (PART I)

前言	01
一、癌症免疫检查点治疗的现状及进展	02
二、癌症免疫疗法的新宠：个性化癌症突变定制疫苗	13

下一期（2019年1月刊）预告：肿瘤免疫疗法领域的重大变革（PART II）

下一期《生命奥秘》将继续介绍肿瘤免疫疗法领域的重大变革。虽然一个多世纪以来，人们一直都在孜孜不断地研究肿瘤免疫疗法——调动免疫系统杀灭肿瘤细胞的方法，但是直到最近，这种强而有力的肿瘤治疗策略才正式成为主流肿瘤研究领域关注的焦点。过去几年，研究人员使用这种策略获得了前所未有的临床反应、快速取得药物研发进展，并通过了FDA的认证。

热点

高精度的碱基编辑技术	27
------------------	----

百态

断腿的狼蛛怎么跑?	41
锦龟过冬可能遭遇软壳危机?	44

专题

肿瘤免疫疗法的 重大变革(PART I)

前言

虽然一个多世纪以来，人们一直都在孜孜不断地研究肿瘤免疫疗法——调动免疫系统杀灭肿瘤细胞，但是直到最近，这种强而有力的肿瘤治疗策略才正式成为主流肿瘤研究领域关注的焦点。过去几年，研究人员使用这种策略在临床反应、快速取得药物研发方面获得了前所未有的进展，并通过了FDA的认证。目前已有多个报告指出有越来越多的晚期肿瘤患者在接受肿瘤免疫治疗后，竟然痊愈了。这些成功案例都是顶尖的科学家和临床医生几十年来辛劳钻研的成果。新获批的免疫疗法包括那些调控免疫系统重要因子的药物、基因编辑患者自身的T淋巴细胞，以识别和攻击患者肿瘤细胞的治疗方法。

现阶段，研究人员正在争分夺秒地扩大免疫疗法的应用范围，以造福更多肿瘤患者。但即便如此，我们仍有一些目前还没有研究清楚的技术问题。例如为何只有某些患者对疗法有响应？如何才能更好地获得持久的缓解效应？研究人员目前正开展成百上千个相关的临床实验，以探明联合疗法能否改善患者对疗法的响应程度。如能揭开耐药机制的细胞和分子基础，应该有助于我们设计合理的、新型的研究方法。基因组测序的大发展可以帮助我们找出有潜力的生物标志物，并可辅助我们设计靶向患者特异性肿瘤新型抗原的个性化疫苗。上述所有研究，以及肠道微生物组在免疫疗法响应中扮演了重要角色这一新发现，都能帮助我们真正打开个性化用药的大门。

一、癌症免疫检查点治疗的现状及进展

抑制免疫系统的“刹车”——免疫检查点在多种肿瘤中具有强效的肿瘤杀伤效应。免疫检查点抑制通常通过单用或联用抗体阻断细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 或程序性细胞死亡因子1 (programmed cell death 1, PD-1) 来实现。诱导免疫应答的主要前提是预先存在受特异性免疫检查点抑制的抗肿瘤T细胞。大多数对检查点抑制剂有响应的患者其肿瘤可以长期受控, 但仍有三分之一的患者会复发。目前科学家对获得性耐药机制知之甚少, 但有证据表明耐药性可能与抗原呈递和干扰素- γ 信号传导途径的改变相关。新一代组合疗法有望解决免疫检查点治疗的抗性问题。

2013年, 《科学》(*Science*) 杂志将癌症免疫疗法评为年度技术突破。这一技术突破取决于两个领域的进步: 嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 修饰的T细胞和采用能阻断免疫调节检查点的抗体来发挥免疫调节功能。值得注意的是, 过去几年癌症免疫疗法的快速临床进程其实是数十年来多个领域对基础研究不断投入的结果。如果没有分子生物学、病毒学、免疫学、细胞生物学和结构生物学的基本知识, 癌症免疫疗法的临床研究就无法取得进展。需要指出的是, 长久以来, 科学家一直希望能使用免疫系统疗法来

治疗肿瘤。首位对此开展研究的是外科医生 William Coley, 他将术后发生的感染与癌症患者的临床改善联系起来。之后一个世纪, 断断续续出现了几种免疫治疗药物被批准用于癌症治疗, 包括卡介苗、干扰素- α 和白细胞介素-2 (IL-2) 等。其中IL-2尤为重要, 因为它首次证明, 借助可诱导T细胞扩增的细胞因子, 我们可以在一小部分患者中持久控制晚期转移癌, 特别是黑素瘤和肾细胞癌。IL-2的活性证实了适应性免疫在控制肿瘤中的重要性, 为将T细胞调节纳入新的免疫治疗策略提供了坚实的基础。

免疫检查点CTLA-4和相关临床实验

分别由James Allison和Jeffrey Bluestone领导的两个团队同时发现, 细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 在调节T细胞反应中具有强大的抑制作用, 这是一个具有里程碑意义的发现。虽然在静息T细胞中, CTLA-4是胞

内蛋白, 但是当T细胞受体 (TCR) 和CD28发出共刺激信号后, CTLA-4就会转移至细胞表面, 随后竞争性地与CD28和关键共刺激分子 (CD80, CD86) 结合, 并介导抑制信号进入T细胞, 从而抑制T细胞增殖和活化 (图1)。

缺乏CTLA-4的小鼠模型进一步证实了CTLA-4在免疫抑制上的作用，因为这些动物死于涉及绝大部分器官的暴发性淋巴细胞浸润。随后，Bluestone继续采取同一策略来控制自身免疫性疾病。对此，Allison认为，如果这种分子

“刹车”能够被抗体短暂阻断，那么就可能会使T细胞增殖，并被过度激活。初期临床前原理验证研究表明，使用抗体阻断CTLA-4能够导致小鼠肿瘤持续性消退。自此，科学家开始对该策略进行临床评估。

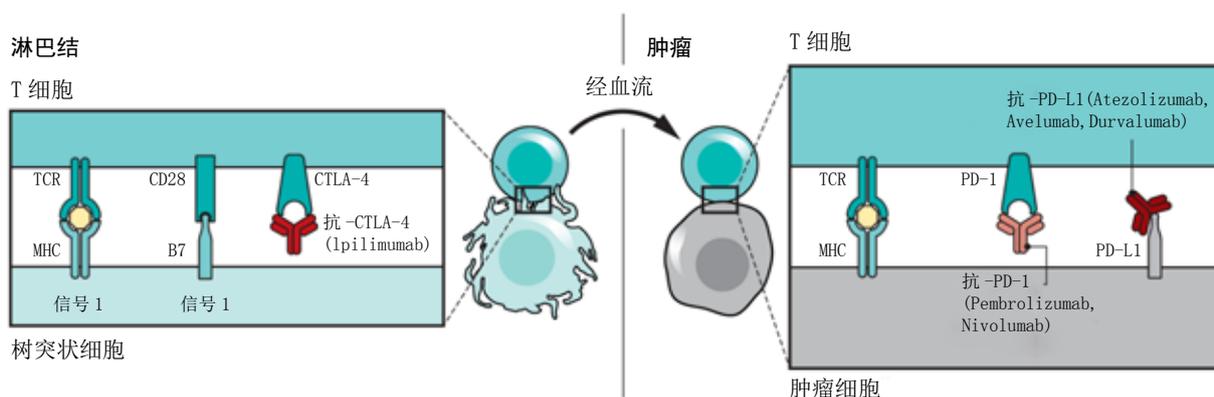


图1 阻断CTLA-4、PD-1或PD-L1，诱导抗肿瘤反应。（左）淋巴结中抗肿瘤的T细胞在接受了抗原呈递细胞呈递的特定肿瘤抗原后，在共刺激调节下会被激活，而CTLA-4是共刺激的负调节剂。抗CTLA-4的抗体可以阻断CTLA-4的活化。（右）一旦T细胞被激活，就会在整个身体内循环，以识别癌细胞呈递的同源抗原。识别过程完成后，TCR的激活导致负调节受体PD-1的表达，同时IFN- γ 的产生导致PD-L1的反应性表达，从而关闭抗肿瘤T细胞应答。这种负相互作用可以被抗PD-1或抗PD-L1抗体阻断。

2000年，两种人CTLA-4阻断抗体（ipilimumab和tremelimumab）被用于晚期癌症患者的临床试验（图2）。研究者很快就发现，使用CTLA-4阻断抗体可能会出现持久性的肿瘤消退，尽管这些消退相对罕见，并伴有一系列与组织特异性炎症相关的毒性。最常见的毒性包括小肠结肠炎、炎性肝炎和皮炎。使用皮质类固醇或其它形式的免疫抑制剂能够控制这些副作用，而且不影响抗肿瘤活性。然而，不太常见的副作用还包括甲状腺、垂体和肾上腺炎症，这部分患者需要终生接受激素治疗。CTLA-4阻断剂的临床活性在晚期

转移性黑色素瘤患者中最为明显，15%的患者停止治疗后超过10年还存在影像学上的客观反应，即客观测量出来的反应，比如肿瘤大小的变化、血液化验指标的变化等。Ipilimumab治疗后的放射成像显示，ipilimumab的作用机制与那些直接作用于T细胞增殖途径的药物不同，部分使用ipilimumab治疗的患者会在治疗初期偶有响应延迟的情况，或出现新肿瘤，然后待基线肿瘤尺寸减小后，新肿瘤也会逐渐消退。监管机构的常用指标是客观反应率或无进展生存，上述延迟效应导致CTLA-4疗法难以通过监管。相反，ipilimumab的疗效

评估则需要以总生存期为指标，总生存期是一个长期过程，是登记试验的最终结果。最终，两项大型3期试验显示，与肽疫苗或标准疗法达卡巴嗪化疗相比，**ipilimumab**是第一种能显著延长转移性黑色素瘤存活率的疗法。2011年，**ipilimumab**通过了FDA的批准，而**Tremelimumab**仍在接受临床试验调查，其它**CTLA-4**阻断抗体最近已进入临床试验阶段（NCT02694822）。

鉴于相对较低的反应率和与**CTLA-4**阻断相关毒性的高发性，鉴定能够预测患者是否对**CTLA-4**阻断剂有响应的生物标志物非常重

要。科学家对有响应和无响应患者的肿瘤进行分析发现，较高的肿瘤突变负荷与较高的反应可能性有关。治疗后外周血绝对淋巴细胞数量的增加，以及诱导型共刺激分子**ICOS**的表达增加都与最终的治疗反应相关。尽管许多临床前小鼠研究表明，具有适当**Fc**结构域的**CTLA-4**阻断抗体可以在退化的肿瘤中消耗调节性T细胞（**regulatory T cell, Tregs**），但是将其与人类临床反应联系起来的证据仍然很少。最近启动的临床试验（NCT03110307）采用了具有非岩藻糖基化的**Fc**结构、能消耗**Tregs**的**ipilimumab**来验证该假设。

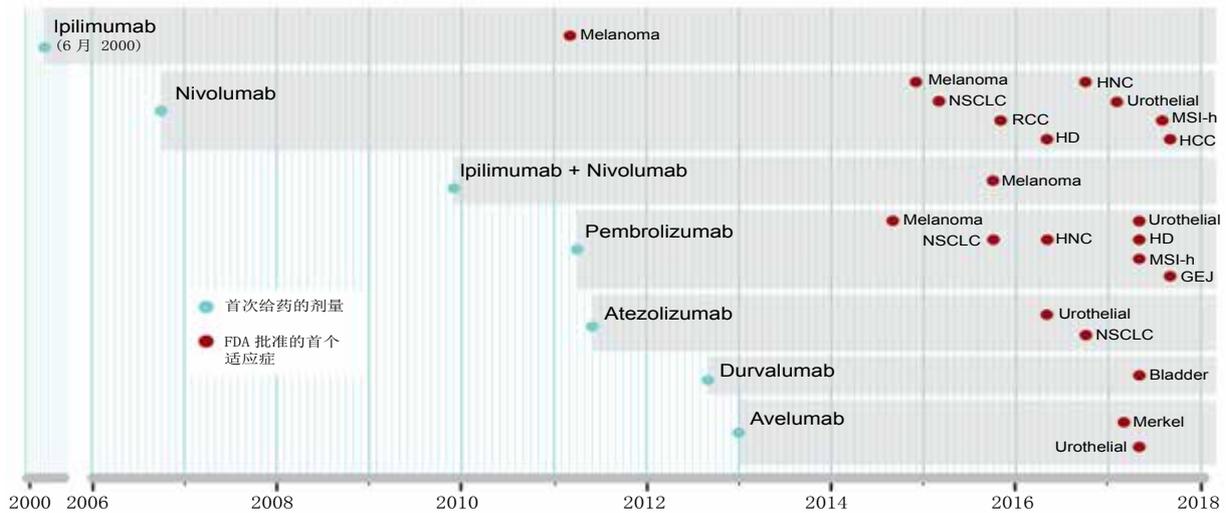


图2抗CTLA-4、抗PD-1和抗PD-L1抗体从首个人体试验到FDA批准的临床开发时间表。到目前为止，已经有6种免疫检查点抗体药物和一个两种免疫检查点抗体的组合通过监管批准。灰色阴影代表这些抗体中每种抗体的临床开发时期，从首个人体试验直至不同适应症的监管批准（红色圆圈）。Melanoma: 黑素瘤；HNC: 头颈癌；NSCLC: 非小细胞肺癌；Urothelial: 尿路上皮瘤；RCC: 肾细胞癌；MSI-h: 高微卫星不稳定性；HD: 霍奇金淋巴瘤；HCC: 肝细胞癌；GEJ: 胃食管癌；Bladder: 膀胱癌；merkel: merkel细胞癌。

非冗余免疫检查点PD-1

PD-1通过与其在肿瘤内细胞表面上表达的配体PD-L1（programmed cell death ligand 1，程序性细胞死亡配体1）结合，负向调节抗肿瘤T细胞的效应功能。PD-1最初被发现时，因被描述为诱导活化T细胞杂交瘤细胞死亡的受体，而得程序性细胞死亡因子1之名，即PD-1。然而，进一步的研究证明，PD-1是免疫检查点，其抑制功能由酪氨酸磷酸酶 SHP-2（SHP-2去磷酸化TCR下游的信号分

子）介导。PD-1具有两个配体，PD-L1（也称为CD274或B7-H1）和PD-L2（也称为CD273或B7-DC）。PD-L1广泛表达于暴露在促炎细胞因子环境中的细胞表面，PD-L2则限制性表达于抗原呈递细胞中。肿瘤微环境中由炎症诱导的PD-L1表达导致PD-1介导的T细胞耗竭，从而抑制抗肿瘤细胞毒性T细胞应答（图1和3）。

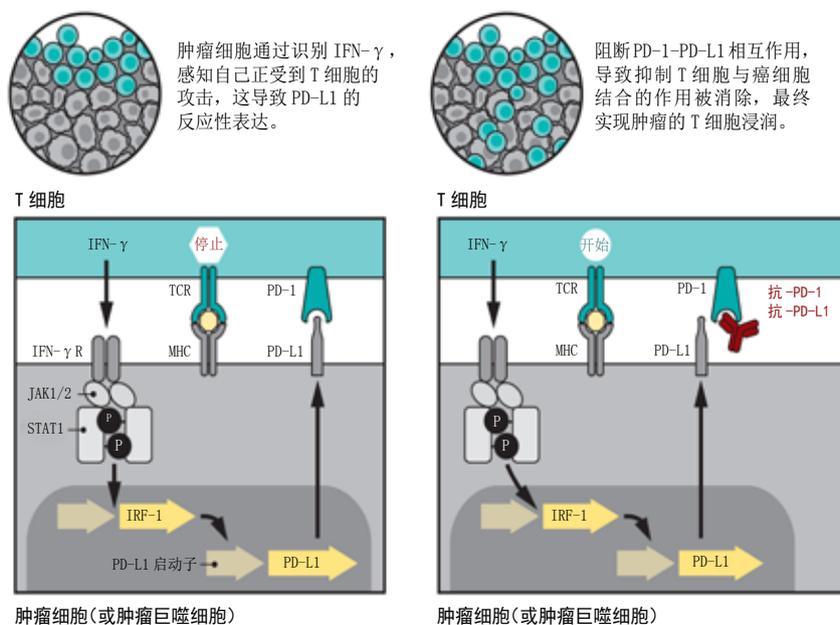


图3 PD-1阻断疗法的作用机制。阻断PD-1-PD-L1相互作用会消除阻止T细胞附着于癌细胞的信号，最终导致肿瘤浸润。（左）TCR识别由肿瘤细胞表面MHC分子呈递的同源抗原后，T细胞被激活；然后T细胞产生IFN- γ 和其它细胞因子。癌细胞和肿瘤微环境中的其它细胞都表达IFN- γ 受体（IFN- γ R）。IFN- γ 受体通过JAK1/2磷酸化，并激活STAT（signal transducers and activators of transcription）蛋白。STAT二聚化，并激活一系列干扰素应答基因，包括干扰素调节因子1（IRF-1）。IRF-1可与PD-L1的启动子结合，从而导致PD-L1在细胞表面表达。PD-L1的反应性表达关闭了试图攻击肿瘤的T细胞的活性，随后这些T细胞继续停留在肿瘤的边缘。（右）阻断PD-1-PD-L1的相互作用可以促进T细胞增殖，并使其浸润肿瘤，诱导细胞毒性T细胞应答，产生肿瘤杀伤效应。

随着癌症从原发位点转移到转移性病灶，抗肿瘤T细胞反复识别同源肿瘤抗原。TCR被触发后导致促炎细胞因子的合成，其中就包括IFN- γ 。IFN- γ 是反应性PD-L1表达的最强刺激物。T细胞被长期暴露于同源抗原，从而导致靶细胞的反应性PD-L1表达，而持续性PD-1信号则会诱导T细胞耗竭的表观遗传程序激活。目前人们尚不清楚PD-1途径中其它几种相互作用的功能和意义。已有证据显示，PD-L1可与T细胞上表达的共刺激分子CD80（B71）相结合，产生抑制信号。排斥性指导分子b（Repulsive guidance molecule b, RGMb）

与PD-L2结合，但不会与PD-L1结合，这似乎与肺耐受相关。

因此，PD-1是预先存在的免疫应答的负调节因子，它在癌症发生、发展中起到了重要作用，因为阻断PD-1会优先刺激抗肿瘤T细胞（图3）。与CTLA-4缺陷小鼠相比，PD-1缺陷小鼠表型更为健康，这是因为PD-1缺陷小鼠的自身免疫病绝大部分不会发生，除非通过其它方式诱导。因此，PD-1阻断能特异性地激活抗肿瘤T细胞。与CTLA-4阻断相比，PD-1阻断疗效更显著，毒性更小。

PD-1和PD-L1-阻滞疗法的临床效果

潜在生物学和多种类型癌症患者的持久反应率表明，PD-1通路的治疗性阻断可以说是癌症治疗史上最重要的进步之一。目前有5种抗PD-1或抗PD-L1抗体被FDA批准用于11种癌症适应症（表1和图2）。PD-1能阻断抗肿瘤活性的首个证据来自使用完全人单克隆抗体nivolumab（以前称为MDX-1106/BMS936558）。2006年10月，Nivolumab首次在1期单次输注剂量递增试验中进行人体试验，并代表了首例人类PD-1阻断试验（图2）。在每2周接受一次nivolumab注射的16名初期患者中，6名（37.5%）患者有客观肿

瘤反应，这些患者患有黑色素瘤、肾细胞癌和NSCLC。在1期试验中，抗肿瘤活性的早期证据伴随着小量毒性，尽管肺炎的罕见发生是偶然严重毒性的指标。Nivolumab的1期试验的数据非常漂亮，大大加速了该抗体和其它抗PD-1/PD-L1抗体的临床试验计划的进展（图2）。抗PD-1抗体pembrolizumab于2011年4月进入临床试验。基于nivolumab的临床数据，pembrolizumab的临床开发专注于转移性黑色素瘤和NSCLC患者，并进行了肿瘤学史上最大的1期试验，试验最终招募了1235名患者。

表1 抗PD-1和抗PD-L1疗法的主要适应症及其引发抗肿瘤应答的可能机制

组别	适应症	客观响应率 (%)	获批准药物 (按字母顺序排序)	可能机制
高反应率	霍奇金淋巴瘤	87	nivolumab pembrolizumab	PDJ扩增子
	结缔组织增生性黑素瘤	70	nivolumab pembrolizumab	长期日光暴露导致的突变
	Merkel细胞癌	56	avelumab pembrolizumab	Merkel细胞病毒
	MSI-h癌症	53	nivolumab pembrolizumab	错配修复缺陷相关突变
中等反应率	皮肤黑素瘤	35-40	nivolumab pembrolizumab	断断续续的日光暴露导致的突变
	非小细胞肺癌	20	atezolizumab nivolumab pembrolizumab	吸烟导致的突变
	头颈癌	15	nivolumab pembrolizumab	吸烟导致的突变
	胃食管癌	15	pembrolizumab	吸烟导致的突变
	膀胱和尿道癌	15	atezolizumab avelumab durvalumab nivolumab pembrolizumab	吸烟导致的突变
	透明细胞肾癌	25	nivolumab pembrolizumab	序列插入和缺失突变
	肝癌	20	nivolumab	肝炎病毒

前几个获得FDA批准的PD-1阻断抗体疗法是pembrolizumab和nivolumab，皆于2014年被批准用于治疗难治性黑色素瘤患者，并于2015年被批准用于治疗NSCLC患者。这几项申请是经由快速审批通道（图2）。首个获批的抗PD-L1抗体是2016年被批准用于治疗尿路上皮癌的atezolizumab和2017年被批准用于治疗Merkel细胞癌的avelumab（图2）。这类药物是首个根据其遗传特征，而不是癌症原发部位而获得FDA批准的药物，其中2017年，pembrolizumab和nivolumab被批准用于治疗任何器官的具有微卫星不稳定性肿瘤。这种快速的药物开发和快速的适应症规模扩大得益于PD-1阻断抗体的临床活性的一系列特征，具体如下文所述。

在罹患多种癌症的部分患者中，特别是在由致癌物诱导的癌症或由病毒感染驱动的癌症中（表1），PD-1途径阻断都具有抗肿瘤活性。单用PD-1阻断剂抗癌效果最显著的是霍奇金淋巴瘤（霍奇金淋巴瘤中，癌细胞通过共同扩增PD-L1编码基因座以及PD-L2和JAK2来促进PD-L1的表达，名为PDJ扩增子）；病毒诱导的皮肤Merkel细胞癌；具有错配修复缺陷的高突变负荷，并导致高频率的插入和/或缺失突变的微卫星不稳定性癌症；以及增生性黑色素瘤——一种罕见的、由慢性紫外线诱导的点突变引起的，突变负荷非常高的黑色素瘤亚型。在这些疾病中，目前客观反应率为50%至90%。第二类具有相对高反应率的癌症是由致癌物诱发的癌症，例如由间歇性日光暴露引起的更常见类型的黑色素瘤，其中前期反应率是35%至40%，以及一系列与吸烟的致癌作用有关的癌症，如非小细胞肺癌、头颈部癌、食管癌、膀胱和尿路上皮癌，反应率在15%至25%之间。抗PD-1抗体也被批准用于治疗与肝炎病毒感染有关的肝细胞癌和单核苷酸突变负

荷低，但插入、缺失频率高，导致免疫原性增加的肾细胞癌。

一旦产生了客观的肿瘤反应，这种抗肿瘤效果通常都能持续很长一段时间。在靶向致癌基因的疗法中，大多数抗肿瘤反应只能持续到癌症重新激活靶向途径，或发生替代癌基因信号传导以绕过阻断的致癌基因，因此复发率较高。而癌症免疫疗法的复发率较低。科学家希望，免疫疗法可以诱导长期反应，因为T细胞既具有记忆能力，又具有癌症难以逃避的多克隆反应。然而，初始耐药性和治疗一段时间后的获得性耐药依然是限制检查点阻滞剂疗效的主要因素。

单用PD-1通路阻断剂的毒性作用发生率为10-15%，这需要医学干预（3至4级）。大多数单用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗的患者其毒性预期并没有高于安慰剂组，治疗相关的死亡案例也非常罕见。极少数患者（约5%）因毒性而停止治疗。最常见的治疗相关不良事件是15%至20%的患者出现疲劳、腹泻、皮疹和瘙痒。在较小比例的患者中，毒性更严重，包括几种内分泌病，如甲状腺疾病（10%至15%）、垂体炎、肾上腺疾病（1%至3%）和1型糖尿病（1%）。其中免疫细胞浸润产生激素的腺体，导致永久性功能障碍，患者需要终身接受替代性激素治疗。严重的内脏器官炎症毒性不常见（约1%），但可影响任何器官，包括脑（脑病）、脑膜（脑膜炎）、肺（肺炎）、心脏（心肌炎）、胃肠道（食管炎、结肠炎）、肝脏（肝炎）和肾脏（肾炎），以及肌肉（肌炎）和关节（关节炎），这些都可能危及生命。PD-1和CTLA-4阻断疗法的临床相关毒性干预措施是采用高剂量的皮质类固醇进行免疫抑制治疗，有时也会使用肿瘤坏死因子拮抗剂和麦考酚酸吗乙酯。

响应机制和对单药PD-1疗法的抗性

大多数数据显示PD-1疗法起效的机制是患者体内预先存在抗肿瘤T细胞，而单药抗PD-1或抗PD-L1疗法激活了这些T细胞的抗肿瘤活性。但随着治疗的推进，浸润的T细胞通过识别肿瘤抗原，激活TCR，从而诱导T细胞上PD-1的表达和IFN- γ 的释放，最终导致癌症驻留细胞的PD-L1发生反应性表达（图3）。肿瘤细胞通过PD-L1表达抑制特定T细胞这一过程名为适应性免疫抗性。它导致了一种特殊的、不会引发系统性免疫缺陷，仅通过阻断PD-1-PD-L1相互作用就可逆转的免疫状态（图3）。

该机制的第一步是免疫系统对癌细胞和正常细胞进行差异性识别，其中癌症细胞已经引起了特定的T细胞响应，这种差异识别的最常见机制与癌症中突变负荷的增加有关。然而，并非所有突变都具有引发抗肿瘤免疫应答的必要特性。在肿瘤生成细胞中出现，并且由大多数子代细胞携带的突变（克隆突变）对PD-1阻断剂更敏感；而在癌症的后期出现，并且可能在不同癌细胞之间变化（亚克隆突变）的突变则对PD-1阻断剂不敏感。由突变引起的主要组织相容性复合物（major histocompatibility complex, MHC）分子的加工和呈递进一步影响了抗肿瘤T细胞对新生抗原的识别。

癌症中没有预先存在的T细胞浸润的主要原因是缺乏可以变成可识别的新生抗原的突变或T细胞排斥通路的激活。由特定转录组表达而引起的某些癌症表型或许会导致T细胞无法识别，例如Wnt通路基因的表达，或一系列与肿瘤干性、间充质转变和伤口愈合相关的基因组（这类基因被称为IPRES，是原始性PD-1

抵抗的机制）的部分重叠，这些被统称为先天性抗PD-1耐药（innate anti-PD-1 resistance, IPRES），这是因为这些基因都在对抗PD-1疗法无响应的黑色素瘤患者的活检组织中高度富集。还有一种可能是，早期检查点（例如CTLA-4）或肿瘤微环境中的免疫抑制细胞（例如骨髓谱系细胞或T_{regs}）削弱了抗肿瘤T细胞的活力。

癌症中细胞PD-L1的表达或许可作为生物标志物，来鉴定更有可能对PD-1阻断剂治疗有反应的患者。PD-L1最常在T细胞浸润和感知IFN- γ 产生时被反应性表达，在这种情况下，它可以被认为是“煤矿中的金丝雀”，其存在是T细胞响应的前提（图3）。在这种情况下，肿瘤区域中PD-L1、PD-1和CD8⁺T细胞的共定位被称为侵袭性边缘，并与PD-1阻断的治疗性反应有关。一系列过程都可以激活PD-L1的表达，目前尚不清楚仅检测到PD-L1，而未检测到T细胞浸润是PD-1阻断治疗的有利因素还是有害因素。因此，PD-L1高表达，但不包含预先存在的细胞毒性CD8⁺T细胞响应的肿瘤不太可能对PD-1/PD-L1治疗产生反应。不过也有例外，那就是霍奇金淋巴瘤，其中Reed-Stenberg细胞具有PDJ扩增子，导致PD-L1高表达。值得注意的是，这是一种臭名昭著的癌症，其反应性T细胞浸润主要由CD4⁺T辅助细胞组成，而Reed-Stenberg细胞常常缺乏 β_2 -微球蛋白（ β_2M ），这是I类MHC在细胞表面表达的必需亚基。传统观点认为，PD-1阻断疗法可以重新激活预先存在肿瘤内的I类MHC-限制性CD8⁺T细胞，但上述事实并不支持这一观点。

一旦肿瘤具有足以引发特定T细胞应答的免疫原性，那么癌细胞便会经历一系列遗传和非遗传过程，以避免被免疫系统清除，这个过程被称为癌症免疫编辑。癌症免疫编辑可导致最具免疫原性的突变丢失，或参与抗原呈递途径的基因突变或表达降低。如果在治疗期间发生其中任何一种，那么患者将对PD-1阻断产生抵抗。强烈的免疫选择压力可导致癌症突变的形成、人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）I类等位基因的特异性缺失（HLA被认为会是强效的新生抗原），或 β_2M 的丢失。据报道，遗传免疫编辑事件，特别是编码 β_2M 基因的功能丧失性突变纯合子，与PD-1阻断的原发性和获得性耐药相关。

T细胞杀伤肿瘤细胞时诱导的PD-L1反应性表达的过程是由IFN- γ 信号传导介导的（图3）。如果癌细胞不能感知IFN- γ ，并对其作出响应，那么PD-L1将不会被反应性表达。在这种情况下，使用抗体阻断PD-1-PD-L1相互作用可能是徒劳的。在IFN- γ 受体途径中，信号传导的瓶颈似乎是JAK1和JAK2，因为缺少二者中的任意一个都会导致信号传导中断。虽然JAK1/2基因中的功能丧失性突变纯合子发生率很低，但比随机预期要频繁，这表明有效的免疫编辑过程可以删除JAK1/2的功能丧失性突变纯合子。在完全灭活JAK1/2突变的情况下，患者对PD-1阻滞治疗没有反应。突

变JAK1/2为癌细胞提供了生长优势，因为它限制了IFN- γ 的有利作用，例如抗原呈递机制分子的表达增加、可募集其它T细胞到该区域的趋化因子的产生，以及免疫应答的放大，或避免干扰素的直接抗增殖作用。在一些对获得性PD-1治疗抵抗的病例中，研究人员已发现JAK1或JAK2的纯合性丢失现象。这都是发生率较低的遗传事件，它们可以解释少数具有原发性或获得性PD-1阻断抗性的病例。此外，这些数据表明PD-1阻滞剂耐药性的分子机制与抗原呈递机制和IFN- γ 受体途径的变化存在相关性，最近针对临床前模型的CRISPR-Cas9筛选也证实了这一观点。

目前对PD-1阻断疗法的反应和抗性的深入了解表明，不可能存在预测患者响应的单一生物标志物。因此，筛选极有可能对单药抗PD-1疗法有反应的患者（避免患者暴露于更大的毒性，并降低综合治疗费用）将需要在肿瘤活检组织检查中纳入多项检查：(i)关键肿瘤突变负荷和关键免疫信号通路中有害突变的DNA分析；(ii)RNA分析，以检测IFN- γ 信号的存在与否，以及有利的肿瘤表型；(iii)采用形态学来分析CD8⁺ T细胞与PD-1的共定位，及其与肿瘤微环境中反应性表达的PD-L1的相互作用。然而，目前还没有简单、快速的方法来开展上述测试，否则我们就可以为晚期癌症患者的治疗决策提供辅助信息。

联合CTLA-4和PD-1阻断疗法

2009年12月，研究人员首次给一名患者开展两种检查点阻滞剂的联合治疗，这两种检查点阻滞剂分别是阻断CTLA-4的ipilimumab与阻断PD-1的nivolumab（图2）。这是根据两种途径的非冗余共抑制作用而设计的，临床前研究也显示了这两种途径可协同作用。此外，由于CTLA-4和PD-1通路的阻断功能可作用于不同的免疫微环境，从而或许可以提供新的作用机制（图1）。CTLA-4或许可以影响淋巴结引流的抑制性信号。尽管PD-1阻断也可能具有同一活性，但是存在于肿瘤中的PD-1和肿瘤微环境中的免疫细胞可能在杀伤肿瘤上更具优势（图1）。最近，通过使用质量细胞计数（或CyTOF），Allison实验室已经证明CTLA-4和PD-1阻断可导致T细胞亚群中出现不同的表型特征。针对转移性黑素瘤患者的ipilimumab与nivolumab联用的初始1期剂量范围试验，选定

剂量范围内的患者客观反应率超过50%，从而成功进入2期和3期试验。但与单一用药相比，两者联用的高级别免疫相关毒性发生频率更高（高达60%）。Ipilimumab和nivolumab联合治疗的2期和3期研究确认有约60%的反应率。最近的分析显示，初期随机分组的患者的3年生存率略高于初期接受nivolumab治疗的患者（58%与52%），但毒副作用发生频率较高。初期尝试确定需要联合治疗的患者的重点是PD-L1在肿瘤中的表达，并且研究人员确实发现给PD-L1低表达或零表达（肿瘤细胞表面染色阳性率<1%）的患者联合用药，相比于单独nivolumab给药，可以提高生存率。目前研究人员正在研究一种适应性给药方案，以评估早期反应，试图使用最小的组合剂量，降低毒性（NCT03122522）。

其它组合疗法和结论

越来越多的研究去调研检查点阻断剂和其它化疗药物的联用效果。虽然这种以增加从检查点阻断剂中受益的患者数量为目的的调查是值得称赞的，但由于试验数量太多，参与的受试者也太多，从而导致很多假设难以得到可靠

的验证。然而，有一些组合策略正处于后期开发阶段，并且是基于药物机制进行组合。对检查点阻断治疗的原发性和获得性抗性的细胞和分子机制的理解能促进组合免疫治疗方法的开发。当肿瘤中存在低水平的T细胞时，除了抗

CTLA-4和抗PD-1疗法的组合之外，其它可能的方法还包括通过直接注射干扰素诱导分子，如Toll样受体激动剂、溶瘤病毒，阻断吲哚胺2、3-双加氧酶或精氨酸酶等T细胞排除蛋白，以及抑制T_{regs}或巨噬细胞等免疫抑制细胞来改变肿瘤微环境。此外，已有证据显示，其它癌

症治疗方法，例如放射疗法、化学疗法和癌基因靶向疗法也能改变免疫抑制性肿瘤微环境，并且可能与免疫检查点阻断剂产生协同作用。尽管在已有的成功经验上继续推进临床试验是非常必要而且重要的，但是，将从基础研究得到的知识纳入后续研发也同样重要。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

二、癌症免疫疗法的新宠： 个性化癌症突变定制疫苗

癌症是基因突变不断累积的结果。体细胞突变能产生癌症特异性新生表位，随后被自体T细胞作为异物识别出来，形成理想的癌症疫苗靶标。每一个肿瘤都有其独特的变异结构，不同患者之间同一肿瘤类型的共性极小。目前，基因组学、数据科学以及癌症免疫疗法等技术的进步使得人们能够迅速绘制某个基因组内的突变图谱，合理筛选疫苗靶标，针对不同患者的肿瘤按需定制治疗方案。个性化癌症疫苗的首次人体临床试验（First-in-human clinical trial）已证实定位个体肿瘤的突变标记这一策略具有可行性、安全性以及免疫治疗活性。随着数据时代的不断革新，疫苗技术的不断发展，为肿瘤突变患者注射疫苗很可能会成为首个真正的癌症疗法。

长期以来，人们都认为，“司机突变”能加快致癌过程，而“乘客突变”则没有这种功能。然而，两种类型的突变均能改变蛋白质序列，产生新的抗原表位，从而被主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex, MHC）分子加工和呈递。这种序列发生改变的蛋白质被称为“新生抗原”（neoantigens），它们的突变表位就是“新生表位”（neoepitopes），可被T细胞识别。这种新生表位不会在正常组织和正常个体的免疫系统出现。1916年，曾引入“体细胞突变”（somatic mutation）一词的Ernest Tyzzer，明确指出新生表位在通过肿瘤细胞“获得新的免疫原性”过程中扮演了一定的角色。这种识别突变的“异质性”，将突变看作抗癌靶标的想法吸引了好几代科学家的注意。可是，自1909年Paul Ehrlich提出“识别癌症特异性靶点”后，人们就一直没有研究清楚其中的识别机制。

20世纪50年代，人们开展了一些关于为何携带由同源致癌物诱导的肿瘤的小鼠不会受到同种癌细胞激发的实验，从而衍生出“获得性肿瘤免疫”的概念。70年代，肿瘤来源的T细

胞克隆被发现能识别人类肿瘤细胞系，并被证实为获得性免疫细胞。然而，肿瘤抗原的分子机制一直无人知晓，直至80年代末克隆技术被引入，人们才得以揭开这一面纱。利用自体肿瘤反应性CD4⁺或CD8⁺T细胞筛选源于患者肿瘤的表达文库，能揭示两类可被T细胞自动识别的抗原：1）携带肿瘤相关表达的非突变蛋白质；2）突变基因产物。周期蛋白依赖性激酶4（CDK4）的致癌功能缺失性突变成为人类首例第2类抗原。

然而，目前已被发现的绝大部分突变抗原对于个体病例来说都是独一无二的，这样，开发“个性化”靶标治疗的可行性就成了问题。因此，20世纪90年代至21世纪初，由患者提供的非突变肿瘤抗原就成为了癌症疫苗发展的新兴方向，可惜结果令人失望。随后，科技的突破让人们重新关注体细胞突变。新一代测序技术（Next-generation sequencing, NGS）让人们能够以很低的成本快速测定基因组序列。借助精密复杂的生物信息工具，NGS使人们能够详细地绘制某种癌症的全部突变图谱（总称为“突变组学”（mutanome），并预测能与MHC分子结合的新生表位。目前研究人员已

证实，新生表位特异性T细胞与持续临床响应（由免疫检查点抑制和自体肿瘤浸润性淋巴细胞（tumorinfiltrating lymphocyte, TIL）的过继转移（adoptive transfer）介导）相关。在各个癌症类型中，突变负荷与肿瘤免疫细胞浸润均与生存相关。总之，上述发现表明，新生表位的免疫识别具有临床意义。但是，癌症个

体图谱显示，自发免疫应答只能对抗小部分的突变体（<1%），从而使人们怀疑人类自体突变的免疫原性。于是产生了一种假说：只有具备高度突变负荷的肿瘤（有自发形成癌症反应性T细胞特异性的高度多样性）才适用基于新生抗原的免疫疗法。

个性化突变疫苗的临床前研究和临床转化

突变型肿瘤排斥抗原到底是具有偶发免疫原性的个例，还是冰山一角，此前并不清楚，直到人们对同系小鼠模型开展系统化研究，才获得了更深入的了解。为了说明是哪一部分的突变诱发了新生表位特异性免疫应答，作者在自己的实验室中为小鼠分别注射了长肽疫苗或抗原编码RNA疫苗，结果在小鼠的同系肿瘤中通过NGS识别出50个突变（其中大部分具有免疫原性，可介导肿瘤的排斥反应）。值得注意的是，大量新生表位（占随机筛选突变的20-25%）都可被CD4⁺辅助T细胞识别。结果，通过疫苗注射获得的新生表位不断增加，控制了小鼠肿瘤的进展。目前已知，大多数癌症基本对MHC-II类抗原不敏感，只有在肿瘤微环境或引流淋巴结中通过树突状细胞（DC）摄取和呈递释放出来的肿瘤抗原，才能被CD4⁺T细胞识别。基于常理，该途径应该对高表达抗原效能最强，因而需要将MHC II类表位预测与突变等位基因的表达阈值组合起来，才能扩增具有免疫优势的MHC II类新生表位。在实验中，小鼠接受的疫苗是由计算机设计，且合并多个MHC II类预测新生表位的合成mRNA。结果出现了肿瘤排斥反应，这与CD4⁺T细胞及CD8⁺T

细胞对抗原表位的强烈应答有关，但它们均未在疫苗中出现，这表明抗原发生了扩散。

同时开展的研究显示，在具有高度免疫原性的肉瘤小鼠模型中，应用NGS和MHC I类表位预测来鉴定MHC I类限制性抗肿瘤抗原是可行的。在该模型中，新生表位特异性CD8⁺T细胞介导了检查点抑制的抗肿瘤效应，而长合成多肽（可呈现通过鉴定的新生表位）疫苗能完全重现此效应。另一项研究系统性地检测小鼠突变性9-氨基酸（9-mer）寡肽的抗肿瘤活性。人们发现，特定的野生型/变异型肽段的预测亲和力差异，以及MHC I类与肽相互作用的预测构象稳定性差异，均与CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞（CTL）识别突变多肽的可能性呈正相关。质谱分析和外显子组测序综合显示，小鼠模型中的免疫显性MHC I类新生抗原实现了扩增。

然而，要实现从同系小鼠到拥有“独一无二”肿瘤的人类的临床转化，情况更为复杂。因为后者需要特殊处理，包括鉴定突变、预测潜在的新生表位，并设计和制备疫苗（图1）。目前，这些工作已通过恶性黑色素瘤患者中开展的三项首次人体临床试验研究完

成。其中一项试验中，三名黑色素瘤患者接受了能与常见的I类HLA-A2单体型结合的自体DC。每份DC在被注射进病人体内前，都分别与7个体外合成的9-mer肽结合，这些肽分别具有每名患者的个体突变特征。检测结果发现，21个肽中有9个都出现疫苗注射后引起的、且对不同患者具有免疫原有特异性的CD8⁺ T细胞免疫应答。但是，试验没有评估对自体黑色素瘤细胞的识别情况，疫苗应答的相关性也不清楚。随后的两项关于3-4期黑色素瘤患者切除手术后的临床试验利用了与HLA单体型无关的广义原理。在第一项试验中，6名患者皮下注射可呈现多达20个突变的长肽疫苗，同时给予佐

剂。在第二项试验中，13名患者注射了编码了10个个体突变的含27个核苷酸的RNA疫苗。因此，两项研究都要通过患者的抗原呈递细胞进行新生表位的加工和呈递，才能诱导T细胞应答。结果均显示具有60%的高度综合免疫原性率，在γ-干扰素（IFN-γ）分泌试验中分析抗个体突变的T细胞应答也证实了这一点。每个患者都产生了对抗几种自身肿瘤突变体的T细胞强烈反应，同时原有的T细胞发生增殖。而且，在两项研究中，大多数的疫苗诱导T细胞应答都是后激发的，在疫苗注射前并未检测到。

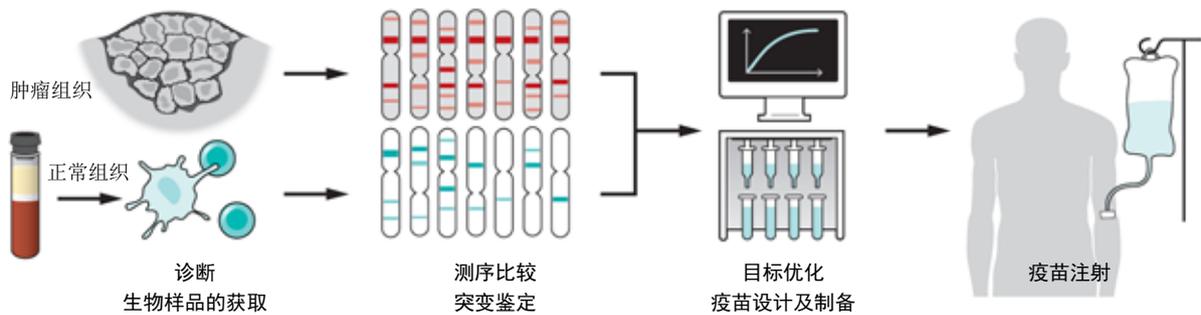


图1 定制患者癌症疫苗。 对患者的肿瘤活体组织切片和健康组织（例如末梢血中的白细胞）分别进行高通量测序，并将从肿瘤和正常组织DNA中获取的序列进行测序比较，识别出肿瘤特异性非同义单体核苷酸突变或蛋白编码基因存在小规模插入缺失。人们使用计算机流水线技术检测可与患者HLA等位基因相结合的突变肽段（基于亲和力预测），以及被认为与优化潜在疫苗靶标相关的突变蛋白质的其它特征。这些数据都能增强多点突变的选择性，从而设计出独一无二的新生表位疫苗，并在拥有GMP资质的企业制备。

根据临床前研究发现，在RNA试验（MHC I类和II类新生表位筛选预测）和肽试验（仅依赖MHC I类表位结合预测）中，大多数新生表位都能成功诱导出功能性CD4⁺辅助T细胞1（T_H1）。经检测，RNA突变和肽疫苗

突变的新生表位特异性CD8⁺T细胞应答分别为25%和16%。在大多数情况下，可被这些CD8⁺T细胞识别的最小表位（已鉴定）显示出了很强的结合亲和力，证明新生表位优化标准切实可行。在RNA试验中，多种CD8⁺应答都很明

显，无需事先扩增即可检测出来。此外，许多新生表位也可同时被CD4⁺和CD8⁺ T细胞识别，但目前尚不清楚其中的机制。上述两项研究还表明，对自体肿瘤细胞系的识别可产生选择性的疫苗诱导免疫应答。有证据表明，其中两名注射RNA疫苗的患者产生了CTL浸润和可杀灭肿瘤细胞的新生表位特异性T细胞。

尽管上述队列研究规模较小，但还是为单独应用疫苗及随后联用检查点抑制剂的临床活性提供了有意义的证据。在RNA试验中，疫苗明显地降低了13名高风险黑色素瘤患者的复发

累积率，转而进入较长的无进展生存期。8名患者在加入研究项目时未有射线可探测损伤，并在整个随访期内无复发；5名患者在加入时疾病有进展，单用疫苗后2名产生了目标应答（1名完全应答，1名部分应答）、1名产生混合应答、1名病情稳定、1名虽然病情快速进展，但接受了随后的检查点抑制疗法后获得迅速完全的缓解，后续终止使用疫苗。在肽试验的6名接种疫苗患者中，有4名在整个随访期内无复发，2名疾病有进展，但在随后的抗PD-1治疗中，肿瘤完全消退。

应用新生抗原促发肿瘤免疫

几十年来，临床肿瘤学一直依赖于靶标致癌方法。然而在近几年，研究免疫疗法介导的持续临床响应表明，调动宿主的免疫系统是一种强大的治疗模式，这可使患者从中受益。在癌症患者中，免疫系统和肿瘤复杂的相互作用被视为机能失调。而合理的免疫疗法的关键原则在于修复这一进程（癌症免疫循环），以扩增对抗肿瘤细胞的CTL应答（图2）。很多年

来，人们都认为肿瘤排斥主要由细胞毒性CD8⁺ T细胞介导，而疫苗途径只能依赖潜在的MHC I类表位。但是，越来越多的数据表明，新生抗原特异性CD4⁺ T细胞对癌症免疫疗法的疗效起到十分重要的作用。结果是，癌症突变为潜在的MHC II类新生表位提供了额外的丰富来源，因此，突变疫苗已经具备了调动广泛T_H1 CD4⁺ T细胞的潜力。

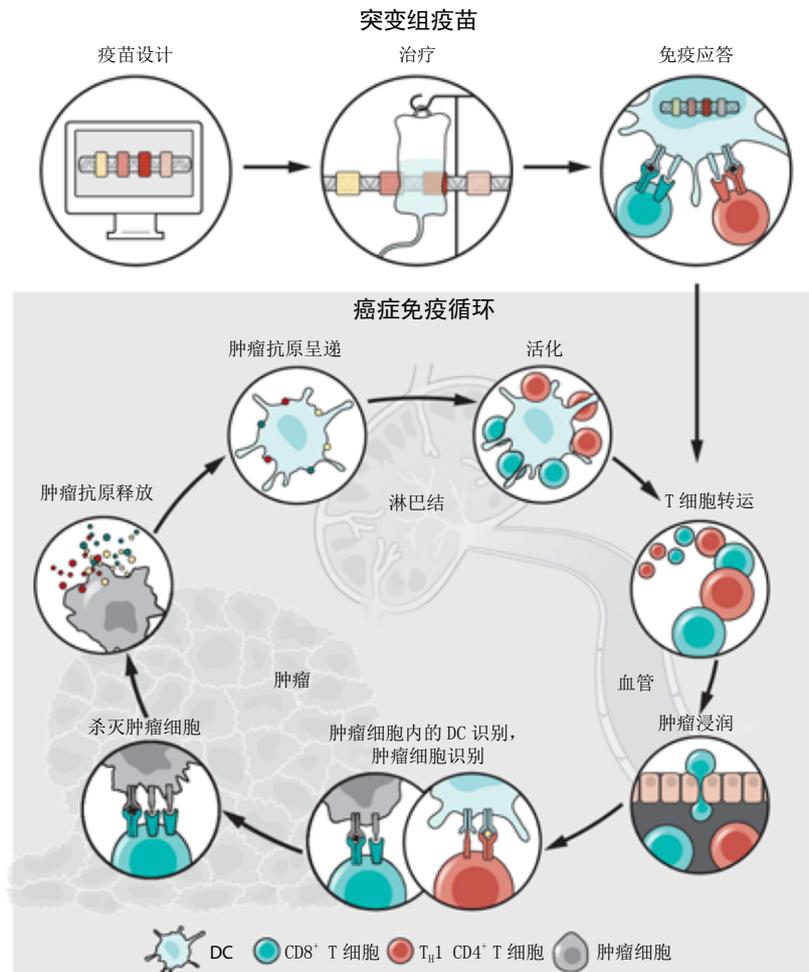


图2 新生表位疫苗促进癌症免疫循环运行。癌症免疫疗法的目的是通过多个步骤确保失调的癌症免疫循环能够自我增殖运行。疫苗诱导的新生表位特异性CD4⁺ T_H1细胞可能会出现在离散速率受限的步骤中，这一点被认为是需要解决的潜在问题。这包括促发T细胞活化和扩增、重塑肿瘤微环境的促炎性，以及聚集CD4⁺ T细胞以直接杀灭肿瘤细胞。此外，新生表位疫苗还能诱导CD8⁺和CD4⁺ T细胞应答，（从耐受转为产生抵抗肿瘤细胞的免疫）使得肿瘤免疫循环正常运行。

CD8⁺效应子的主要作用模式是通过细胞毒性来杀灭呈递同源抗原的细胞，而CD4⁺效应子具有更广泛的功能，包括统筹适应性细胞和先天免疫系统的细胞。CD4⁺ T细胞是诱导CD8⁺效应T细胞的看门人。不同区间的T_H1 CD4⁺ T细胞通过同源CD40配体/CD40受体相互作用，激活DC（其呈递的抗原来自肿瘤细胞的释放）。然后，DC成熟，产生白介素-12和趋化因子，向上调节协同刺激分子。这一系列现象与对肿瘤抗原（由凋亡肿瘤细胞释放并交叉呈递）产生应答的CTL的持续生成相关。事实表明，多新生表位疫苗能同时调动新生抗原特异性CD8⁺和CD4⁺ T细胞，通过提供协同增效作用多点促发未形成的癌症免疫循环（图2）：疫苗应答的启动阶段位于淋巴区，T_H1

细胞能有效促使DC强烈诱导效应性新生表位特异性CTL，同时增强其在肿瘤的浸润能力，还能产生长期存活的CD8⁺记忆T细胞。疫苗诱导的T_H1 CD4⁺ T细胞可能通过作用于多种类型的免疫细胞而促使肿瘤内部形成炎性微环境。IFN- γ （T_H1细胞的关键细胞因子）可上调肿瘤细胞上的MHC I类表位，通过CD8⁺效应子增强杀灭肿瘤的能力。同时，它还能诱导MHC II类表位表达，使肿瘤细胞被IFN- γ 识别感知，从而被具有细胞毒性的T_H1 CD4⁺效应子直接杀灭。总之，在免疫原性的微环境下，通过促使肿瘤细胞凋亡以及新生抗原释放（被DC摄取），CD4⁺ T可能会启动连续的T细胞活化、扩增和抗原扩散，从而扩增所有的抗肿瘤T细胞。

疫苗设计：突变发现、新生表位预测和靶向抗原筛选

与个性化癌症疫苗开发相关的一个重要挑战就是精确定位癌症突变组（mutanome），目的是为达到最佳免疫应答而筛选最适合的突变。突变检测可以应用“新一代测序（NGS）”对比源自肿瘤组织和相应健康组织样品（例如患者的血细胞）的外显子组测序数据，以防止将错误的种系变异当作新生表位。尽管NGS分析得到了持续的发展，但临床应用还需要标准的操作规程，以确保数据能够重现、质控达标以及隐私得到保护。目前的实验技术可让研究人员从新鲜的、冰冻的以及福尔马林固定石蜡包埋组织中有效提取适用于NGS检测级别的量的核苷酸。由于这类分析一般依赖于源自单一肿瘤病灶的小块活组织切片，并在常规诊断时采集，因此，序列数据可能无法

代表完整的肿瘤克隆谱。另外，还需要注意错误的突变检测。在个体NGS数据库中，能灵敏检测真突变的标准化算法对于单核苷酸变异（SNV）检测很有效。SNV是种类最多的肿瘤突变，若它们在某个已表达的蛋白质中出现，并且是非同义突变，则能诱导形成可被T细胞识别的新生表位。其它潜在相关的突变类型还有基因融合或小规模的插入和缺失（indel），它们能够形成明显的免疫原性移码。除了上述定义明确的突变外，还有特征较不明显的癌症相关表观遗传、转录、翻译或翻译后突变，它们都可能产生新生表位，从而极大地扩展疫苗靶向的探索空间。然而，现有技术基本无法评估这些新生抗原的癌症特异性和作用相关机制，目前仍在研究之中。

抗原的加工和呈递是一个复杂的多步骤过程，遵循随机原则。在此过程中，成千上万的蛋白质酶裂解产物相互竞争，以期与MHC分子槽结合。只有部分达到足够水平的变异序列才能被MHC呈递，从而激发T效应细胞的应答。然而，技术的可行性和成本限制了可用于研发对应药品的基因突变的数目。因此，设计个性化疫苗的关键在于筛选可能具有最高免疫原性和治疗相关度的基因突变。到目前为止，在如何优选基因突变方面人们尚无共识。这方面的最低要求包括：（i）能在肿瘤中表达突变基因；（ii）能够产生序列改变的表位，并通过患者体内的MHC呈递。当前公认的数据库有相关单机及网络程序NetMHC和免疫表位数据库IEDB。它们最常被用于预估MHC结合和富集能被CD8⁺T细胞识别的新生表位。人们认为，在免疫原性预测方面，MHC-肽复合物的稳定性优于MHC结合亲和力。然而，当前可行的MHC-肽稳定性预测算法只能覆盖少数MHC等位基因，并且依赖小型数据库。只有被预测具有高亲和力，并且能与人类MHC I类等位基因结合的那一小部分基因突变才能MHC I类配体呈递。MHC I类分子的呈递作用会受到突变基因转录水平的影响。一般而言，在哺乳动物细胞中，基因表达水平、翻译蛋白质的总量、细胞表面的MHC配体密度、免疫识别以及相关细胞的裂解都是正相关的。因此，高表达能在某种程度上补偿较弱的MHC I类分子结合力，反之亦然。这表明，新生抗原的优化可以通过预测MHC I类分子结合以及突变表达水平来完成（表达水平可通过挖掘NGS数据中含有突变的mRNA短序列数目获得）。然而，并非每一个突变的MHC I类配体（被呈递）都具有免疫原性。尽管如此，目前的I类预测算法似乎足以扩增被加工的、具有强免疫原性的CTL新生表位。

精准预测与MHC II类分子结合的配体颇

具挑战性。MHC II类分子与变性蛋白质或多肽结合，再进行修饰；而MHC I类分子只能与预生成的特定长度肽类结合。由于MHC II类分子的两个结合凹槽位点均开放，对肽的长度和结合配准限制较少，因此也不太容易预测。另一方面，这可能就是MHC II类结合表位的数量比I类的水平更高的原因，同时可能有力解释了MHC II类分子结合预测能有效扩增具有免疫原性的新生表位这一机制的原因。而依靠亲和力预测这条捷径的结果是，70%、45%和34%的筛选突变与HLA II类分子的结合分数分别是<1、1至10以及>10，并诱导新生表位特异性CD4⁺T细胞应答。

目前，人们正在探索一个新的思路：富集参与肿瘤排斥的新生抗原，以靶标异质性肿瘤内部的所有克隆表达的突变。人们期望这样能减少抗原阴性克隆产生的可能性。观察显示，富含克隆新生抗原的晚期非小细胞肺癌和黑色素瘤患者对检查点抑制有更好的响应，这一点支持了上述想法。另一种解释可能是随后在肿瘤的生命循环中出现了亚克隆抗原，或出现了强免疫抑制的条件（此时不大可能产生免疫）。而疫苗-多亚克隆突变联合能够重新启动免疫应答，再次充分地表明了这一点。此外，将变异的驱动基因（对肿瘤细胞的扩增、生存或代谢转移很关键）并入多新生抗原疫苗，可能会进一步减缓肿瘤的免疫编辑。但需要提醒的是，不能忽略驱动基因的功能性验证和鉴定。

在接受免疫检查点抑制剂的患者中，内脏微生物群系的组成会影响癌症免疫治疗的功效。最近，有综述针对内脏微生物群系和免疫疗法展开了详细的讨论。其中一个解释是，微生物群系可能直接产生抗肿瘤免疫作用。例如，特定微生物种群产生的三级胆汁酸可调控T细胞，模式识别受体的转导可诱发炎症。另一个解释是微生物与肿瘤新生抗原之间进行分

子模拟。该观点中有意思的是，有共用结构特征的新生抗原与微生物抗原更有可能产生免疫显性，被T细胞受体（TCR）识别，从进化上优化源自病原体的表位检测。人们猜测，在患者的新生抗原中，共用表位串模式可响应抗CTLA-4检查点抑制，但这一点在两个规模较大的患者队列荟萃分析中均未得到证实。目前的研究引入了复合新生抗原质量模型，通过

(i) 与源于病原体的多肽同系的序列和 (ii) 具有比野生型（不同的新生表位呈递）更强的HLA预测亲和力的新生表位，给予新生抗原临床相关的较强免疫原性。当这种“新生抗原质量”模型应用于癌症突变数据（源于胰腺癌、肺癌和黑色素瘤患者队列）时，能够识别出患者的长期和短期生存情况。

个性化突变疫苗的制备和临床应用

个性化疫苗临床应用的关键挑战在于疫苗的快速制备和及时交付。疫苗产品的周期依赖于疫苗的形式，后者对诱导免疫应答的强度和质​​量也有重要影响。目前可考虑的个性化疫苗包括长肽、RNA、DNA质粒、病毒载体、基因工程细菌和抗原负载DC（表1）。最近，一项个性化临床试验进行了完整的报道，指出该试验使用肽（长15-30个氨基酸）和具有poly-ICLC（羧甲基纤维素、聚胞苷酸和聚-L-赖氨酸双链RNA）的突变序列（作为佐剂）混合

物，或采用具有内在佐剂活性和编码多个预测新生表位能力的mRNA。根据生产质量管理规范（GMP）来按需制备产品的整个时间周期大约是3-4个月，囊括了从开始时处理患者血样，以发现基因突变到进行疫苗注射的整个过程。患者在个性化疫苗制备完成之前，需要接受其它标准治疗或实验药物治疗。对于肽类疫苗和mRNA疫苗平台而言，最好能将疫苗的周期（从下订到收货的时间）减少至4周以内。

表1 当前已开发的疫苗（呈递新生表位）

疫苗形式	优点	缺点
合成多肽	无细胞制备； 已建立自动合成技术； 已确证长肽的临床活性； 与多种改善呈递的处方广泛兼容； 活性短暂，可完全降解；	大部分序列缺乏临床级别的制备能力； 个体多肽的物理化学特性具有很高的可变性，制备复杂； 在细胞外环境，会对肽降解产生的人造表位产生不相关的免疫应答；
mRNA	无细胞制备； 经TLR7、TLR8和TLR3转导后可具有内在佐剂功能； 临床活性明确； 已有高效系统性DC呈递技术； 活性短暂，可完全降解； 能编码所有类型的表位；	若无合适的保护方式，mRNA会迅速在细胞外降解； 不同患者具有TLR-7驱动佐剂的活性不同；
DNA质粒	无细胞制备； 经TLR9驱动产生内在佐剂活性； 制备简单，具有成本效益； 能编码所有类型的表位；	会插入突变基因，有潜在安全风险； 需要进入细胞核才能成功转染，限制了疫苗DC的有效呈递；
病毒载体 (腺病毒和牛痘)	强免疫刺激活性； 载体疫苗在感染性疾病领域有广泛的临床经验； 能编码所有类型的表位；	制备复杂； 会对病毒载体骨架产生免疫应答，从而限制疫苗在生物体内呈递的成功率和效能；
基因工程减毒细菌载体 (沙门氏菌和李斯特菌)	强免疫刺激活性； 可与质粒DNA结合； 能编码所有类型的表位；	制备复杂，需经“无菌”测试； 可对细菌某些组成部分产生免疫应答，从而限制疫苗的呈递和免疫原性； 由于呈递了具有复制能力的活菌，有潜在的安全风险；
体外抗原负载DC	强免疫刺激活性； DC疫苗具有明确的临床效能； 能负载多种抗原形式。	成本较高，需要过继细胞疗法产生免疫应答。

还有一个挑战就是为突变疫苗确定最适合的临床应用。一个治疗疫苗在佐剂的辅助下或在微小残留病变（肿瘤负荷低，免疫抑制机制尚未稳固建立的建立尚未稳固）的情况下才最有可能发挥效用。若要有效控制较大肿瘤负荷，那么就需要与免疫疗法联用。新生表位疫苗能将“冷”肿瘤转为“热”肿瘤，在肿瘤微环境中介导PD-L1的上调。鉴于此，这种疫苗可能会将抗PD-1/PD-L1疗法的应用范围扩大至没有原生T细胞应答的患者。当然，它们对较低肿瘤突变负荷的患者（他们不太可能通过抗PD-1/PD-L1治疗产生内源性免疫）就更有吸引力了。此外，新生表位疫苗活化型 T_H1 和 $CD8^+$ 记忆T细胞都可能通过促进强大的记忆应答，来提高抗PD-1/PD-L1介导效应的持久性。临床实验NCT02897765和NCT03289962

为评估PD-1/PD-L1阻断和新生表位疫苗的综合应用，正在招募患者。类似的临床前研究显示，抑制因子CTLA4、LAG-3、TIM-3、IDO或TGF- β ，以及OX40、GITR和CD137等共刺激分子和T细胞激动因子都与癌症疫苗有协同作用。关于逃逸机制，新生抗原丢失变异的风险可通过个性化突变疫苗的多新生表位靶点而缓解。与此相反，我们很可能在抗原加工和呈递过程（如HLA或 β_2 -微球蛋白缺失）中筛选出缺陷克隆，但仍可以通过将突变疫苗与不依赖完整MHC I类分子呈递的化合物相结合来处理该风险。例如，可利用双特异性T细胞衔接器（或者说双特异性抗体）对抗癌细胞表面靶标，由此可激活Fc段介导的自然杀伤细胞或补体。

实现个性化突变疫苗的广泛影响

突变疫苗可能会成为真正实现癌症个性化治疗的首个疗法。在“一刀切”模式主导的时代，分级治疗被视为个性化用药的同义词。然而，严格来说，这是两个不同的概念。分级治疗首先识别患者携带的已定义的生物标记（一般是共同的癌症驱动基因突变），然后靶向这种生物标记以实施治疗。不幸的是，这种可靶向治疗的生物标记只适用于小部分患者，无法大范围应用。因此，每一种分级药物都将大多数无相应基因突变的患者排除在外了（图3）。相反，新生抗原疫苗则能实现真正的患者特异性治疗。同时，大量的个体“司机突变”和“乘客突变”（忽略其功能相关性）可被不断放大，从而有望使拥有足够癌症突变频

率的所有患者都获得量身定制的靶向治疗。

肿瘤中体细胞突变的数量跨度为小于10到几千，每名患者都有自己的特性，但这并非异质性的唯一维度（图4）。肿瘤、宿主的情况和多种环境因素（如HLA单体型及其它基因多态性、微生物种系、年龄、疾病、全部免疫细胞以及肿瘤微环境的组成）之间都有着微妙的相互影响，从而形成了特定的免疫状态（“癌症-免疫设定点”），构建出不同的个体癌症（图4）。个性化突变疫苗在解决肿瘤异质性（导致传统抗肿瘤治疗失败的原因）方面潜力很大。一名患者的疫苗成分可直接用于预防多种克隆的原因是它能够靶向肿瘤内部多个表位，还能随着肿瘤变化而随时调整。

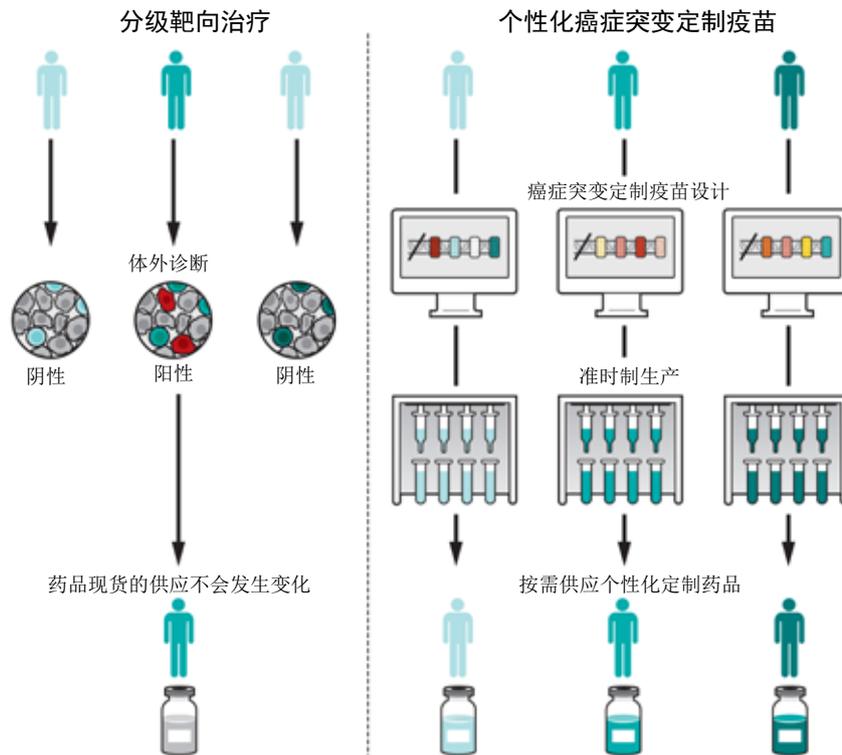


图3 个性化癌症治疗。左图：传统的分级用药使用生物标记分析法为患者匹配已有的药品现货。右图：与预制药剂不同，基因突变疫苗是一种患者特异性疗法，靶向癌症突变本身，与其原生序列无关。因此，突变疫苗更适合成为普遍的、量身定制的疗法，使每一名癌症患者受益。

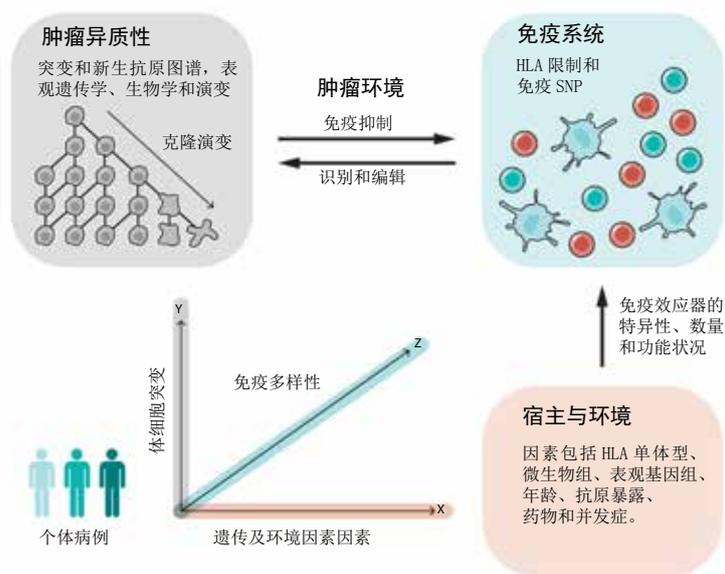


图4 癌症异质性的互联维度。癌症和免疫系统之间的相互作用由不同的宿主、肿瘤与环境因素共同形成。不同患者的异质性由此产生复杂的相互作用，进而影响疾病进程和免疫治疗的功效，因此需要个性化途径。

结论和思考

尽管个性化癌症疫苗已经跨越了临床转化的第一道关键障碍，然而前路仍然布满挑战，包括识别最适合的临床环境、缩短产品周转时间、扩大生产以及确保人们能够负担得起。在数字时代，人们期望新的趋势和技术（如大数据科学、云计算、高性能计算以及数字化解决方案）能加快癌症疫苗的发展势头。通过将机器学习工具应用于大数据集，预测新生表位算法将会得到持续发展。TCR库分析、高通量单细胞测序以及循环肿瘤DNA检测使得肿瘤、

微环境及免疫的高分辨率分析成为可能。源自转录组数据的浸润细胞表型及功能状况的推算也许可以帮助筛选联合疗法。最后，人们期望能从免疫疗法的案例（无论成功还是失败）中获取深刻的见解，从而增加生物标记范围，以促进疫苗设计和联合治疗。总之，基因突变的组成是致癌过程和治疗成功的关键因素，也是所有癌症的共同特性，值得人们为之努力。因此，个性化突变疫苗有潜力成为一种无往而不利

《肿瘤免疫疗法的重大变革(PART II)》将于2019年1月发布,敬请期待!

原文检索:

Antoni Ribas & Jedd D. Wolchok. (2018) Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 6382: 1350-1355.

Ugur Sahin and Özlem Türeci. (2018) Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science*, 359: 1355-1360.

June et al. (2018) CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 359: 1361-1365

Laurence Zitvogel, Yuting Ma, Didier Raoult, Guido Kroemer & Thomas F. Gajewski. (2018) The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies. *Scinece*, 359:1136-1370.

Jocelyn Kaiser. (2018) Too much of a good thing?. *Science*, 359: 1346-1347.

Jennifer Couzin-Frankel. (2018) Sticker shock. *Science*, 359: 1348-1349.

张洁、肖毅&文佳/编译



百态·频道

www.LifeOmics.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

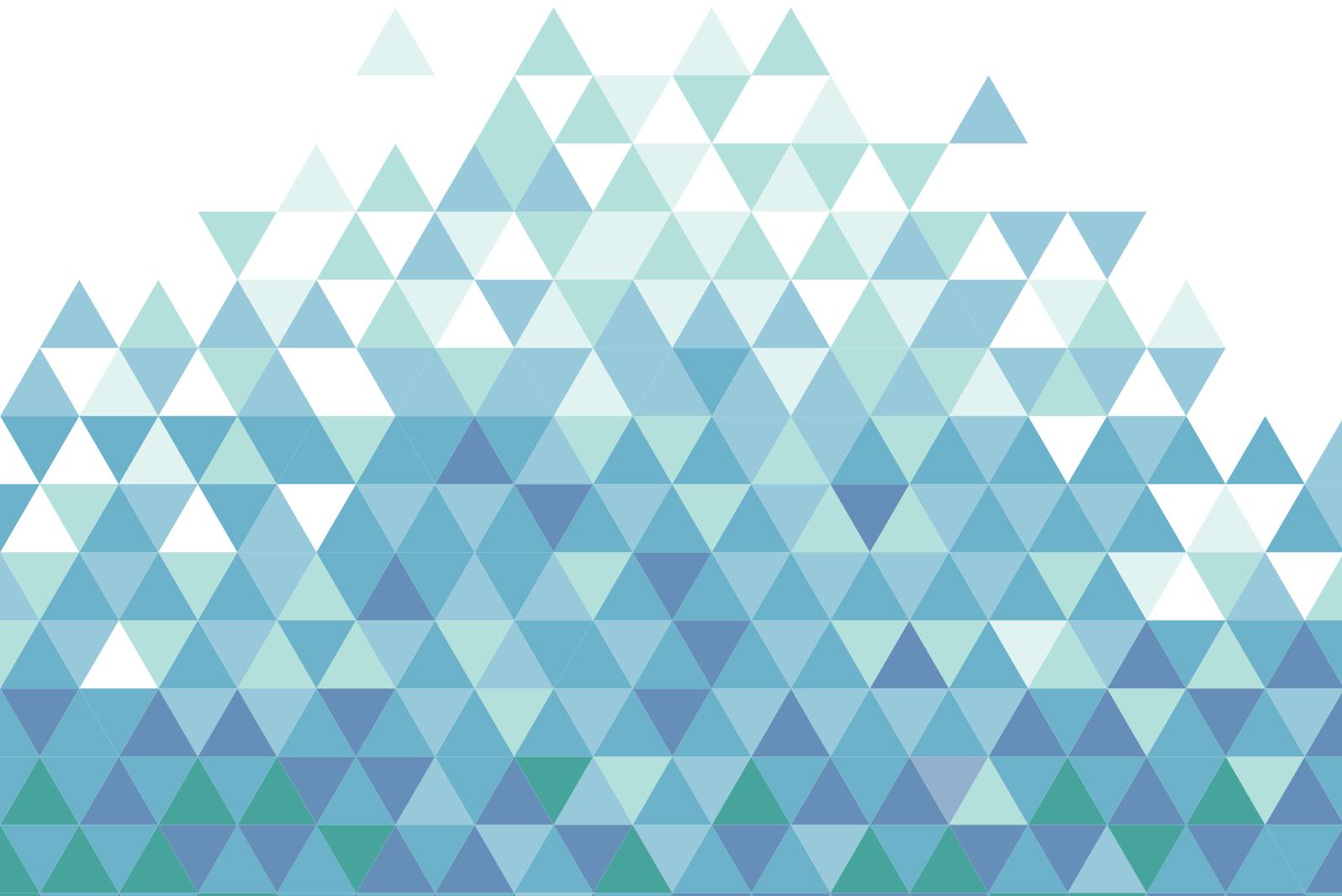
要求：

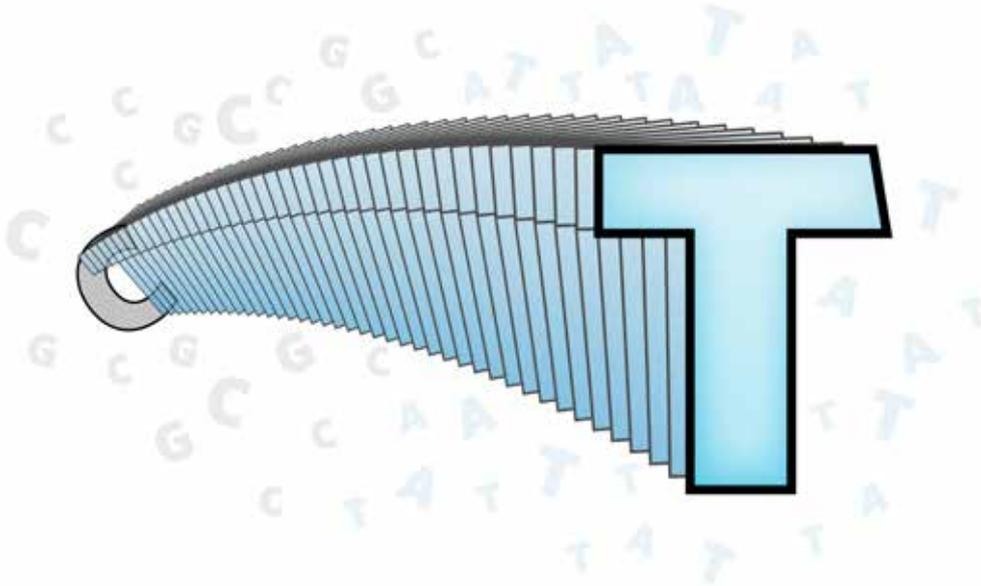
- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

热点

高精度的碱 基编辑技术





碱基编辑技术是一种新兴的基因组编辑技术，它可以在不形成DNA断裂双链的情况下进行碱基的修改。第一种碱基编辑技术可以将碱基C转变成碱基T。

一种不需要切断DNA双链，便可产生双链DNA断裂切口的基因编辑技术正在兴起。

一种不需要切断DNA双链，便可产生双链DNA断裂切口的基因编辑技术正在兴起，这就是碱基编辑技术（Base editors）。研究植物、微生物、模式生物和人体细胞等不同方向的生物学实验室都已经开始尝试使用这种迅速发展的新技术了。碱基编辑技术使用的也是CRISPR-Cas9系统，只不过用到的是缺乏催化活性的各种Cas9突变蛋白。科研人员可以利用碱基编辑技术对单个碱基对进行更换，比如将CG碱基对更改成TA碱基对。

这种碱基对主要更改不需要产生双链DNA断裂切口，因此也不需要借助HDR或NHEJ等双链DNA断裂修复机制，当然也不需要提供正确的修复模板。该技术的支持者表

示，碱基编辑技术是一种更方便的细胞编辑技术。有一些证据已经表明，这种新技术与传统的CRISPR Cas9技术相比，产生非目标插入突变（insertion）或缺失突变（deletion）的几率更低。

碱基编辑技术是由美国哈佛大学（Harvard University）的David Liu开发的，第一篇相关论文的发表距今也才仅仅两年。对于科研界对这项新技术的认可和接受程度，Liu本人也表示非常震惊。美国Weill Cornell Medicine中心的研究人员Lukas Dow认为，碱基编辑技术彻底改变了实验室构建模式生物的方法。Dow希望碱基编辑技术可以帮助科研人员根据大规模肿瘤测序获得的信息，构建出更

加准确的肿瘤模型。Dow评价说，以前那些用于研究肿瘤遗传学的技术都太落后了。很多肿瘤相关突变都是反复出现的单核苷酸突变（single-nucleotide change），有一些基因里也存在我们很感兴趣的热点突变，这些突变位点都是值得深入研究下去的。基因缺失（Gene deletion）也是一种实验方法，但是在基因里引入突变，使其失活，还是将其与整个基因切除掉是不同的，比如p53基因就是如此。这些问题都阻碍了我们更好地认识肿瘤的行为，以及肿瘤对抗癌药物的反应。

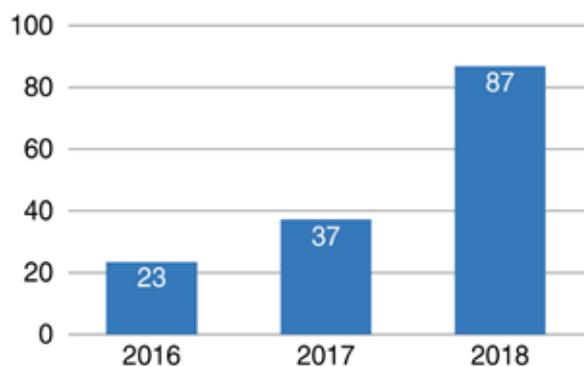
碱基编辑技术也正在通过体细胞治疗这个途径，进入临床领域。人体胚胎干细胞方面的研究也正在开展之中。有一个课题小组利用β地中海贫血（β-thalassemia）患者自身的细胞培育了一个胚胎克隆，然后用碱基编辑技术纠正了这个克隆里的致病突变。另外一个课题组也纠正了一个马凡综合症（Marfan syndrome）人体胚胎里的杂合突变。当然，碱基编辑技术也会和CRISPR-Cas9技术一样，随着技术的发展而引起伦理方面的担忧和

问题。

CRISPResso2这款序列分析软件的开发指出，随着基因编辑技术的不断发展和改进，会出现越来越多的治疗手段，因此脱靶问题（off-target）也就显得尤其重要了。据CRISPResso2软件的合伙开发者，美国麻省中心医院（Massachusetts General Hospital, MGH）的科研人员J. Keith Joung介绍，可以对碱基编辑实验和等位基因特异性数据进行定量分析。在碱基编辑目标位点内，可以对多个碱基进行编辑，而这款软件可以对每一个碱基的编辑进行定量分析。

Joung和Liu，以及在CRISPR领域非常著名的Feng Zhang一起，创办了Beam Therapeutics公司。据Liu介绍，他们创办这家公司的目的就是希望尽快开发出安全、可靠和有效的碱基编辑技术，造福遗传病患者。他们还一起创办了 Pairwise Plants公司，主要目的是将碱基编辑技术等基因编辑技术应用于农业。

在Addgene库中储存的碱基编辑质粒的数量



随着碱基编辑技术的兴起，在Addgene库中储存的相关CRISPR-Cas质粒的数量也在迅速增加。

构建点突变

根据非盈利的质粒储存机构Addgene的负责人Brook Pyhtila介绍, 2016年他们收集了23个用于碱基编辑操作的CRISPR-Cas9质粒; 2017年时, 这个数字是37; 到了今年, 这个数字已经达到了87(详见即将出版的《自然方法》(*Nature Methods*)杂志相关报道)。到了2018年, 已经有2100人向Addgene索取碱基编辑质粒。自2016年以来, 一共已经有3600个索取申请。

Dow表示, 在CRISPR领域, Addgene帮助科研实验室重复、优化和再优化了很多工具。如果按照传统的质粒转移协议, 可能就不会有他们那么快的反应和速度。Dow的实验室已经储存了很多碱基编辑质粒, 不过他担心, 这么多的质粒可能也会让初学者一下子摸不清方向。Dow认为, 也许质粒开发者可以多提供一些信息和建议, 帮助使用者更清楚如何选择和使用这些实验材料。当然, 丰富的网络资源也大有帮助。根据他们实验室在CRISPR-Cas9方面的工作经验, Dow认为初学者使用向导RNA(guide RNA, gRNA)开展碱基编辑实验最为合适, 因为这种实验很容易看到实验结果。BE-Designer是最有可能出现的, 第一批用于碱基编辑操作的sgRNA设计软件。不过, 哪怕是设计得非常完美的gRNA也有可能因为未知的原因, 得不到预期的实验结果。美国斯坦福大学(Stanford University)的研究人员Michael Bassik也向Addgene提交了他们开发的碱基编辑质粒。虽然这促成了用户之间的交流, 但是缺少合作。Bassik在自己的文章发表之前就公开了他们的质粒, 目的是让其它实验室更快地用上这些最新的工具。

CRISPR-Cas9系统可以用于单核苷酸编辑操作, 而且不会产生双链DNA断裂。用到各种Cas9突变蛋白和胞核嘧啶核苷脱氨酶(cytidine deaminases)的碱基编辑技术, 主要利用了Cas9蛋白的双链DNA解螺旋功能, 使目标碱基得以暴露出来。各种编辑子(editors)对不同的碱基有不同的偏好性。正如Addgene的技术顾问Alycia Bittner介绍的那样, Liu实验室开发的第一代碱基编辑子就是由胞核嘧啶核苷脱氨酶APOBEC1和无催化活性的Cas9蛋白dCas9融合而成的。Liu实验室后来开发的每一代碱基编辑子都在编辑能力和(或)特异性方面有了更进一步的改进。比如, Liu实验室开发的第二代碱基编辑子BE2, 就又添加了一个糖基化酶抑制剂(glycosylase inhibitor), 作为碱基编辑修复抑制子(base-edit repair inhibitor)。而他们开发的第三代产品BE3, 则使用Cas9切口酶(Cas9 nickase, Cas9n)取代了dCas9蛋白。这种Cas9切口酶可以在DNA双链上形成一个单链切口, 然后利用细胞自身的修复机制完成碱基编辑工作。第四代产品BE4里则添加了修复抑制子等其它组分。

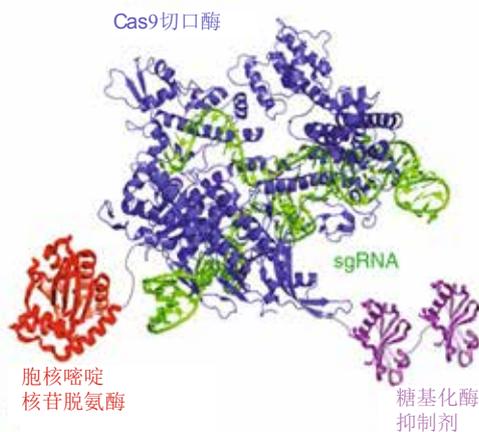
Liu实验室也开发了腺嘌呤碱基编辑子(adenine base editors, ABE), 按照Liu的观点, 这应该是最有用处的碱基编辑子了, 它可以将AG碱基对修改成GC碱基对, 即可以修正最常见的突变。为了开发ABE, Liu等人对各种脱氨酶(deaminase)进行了改造, 因为在大自然中, 是没有一种酶可以将A转变成C的。

提高效率

Liu表示，关于碱基编辑的效率，目前还没有一个标准，即低于某个标准就表示没有价值，而高于某个标准就表明有意义。因此，只能根据编辑的靶标，需要开展的实验和用途，来判断效率。如果碱基编辑的效率比较低，那么也足够在农作物中引入一个点突变了，但是如果应用于临床治疗，就需要非常高的编辑效率。

Dow表示，当实验室开展碱基编辑实验时，他们需要综合评价效率和保真度的问题。如果实验目的是分离目标克隆，那么效率就不是那么重要了。因为我们可以扩大细胞培养量，并且总能从中筛选到需要的克隆。

据日本神户大学（Kobe University）的科研人员Keiji Nishida介绍，如果对原核生物开展碱基编辑实验，并同时使用糖基化酶抑制剂，那么实验效率就会非常高，几乎可以达到100%。但是当过量表达时，这些抑制剂也会产生很多非特异性的突变，因此，Nishida等人正在开发一种不需要使用糖基化酶抑制剂的碱基编辑新技术。Nishida表示，随着实验数据的不断丰富，他们也逐渐发现了碱基编辑技术效率方面的规律。有些碱基编辑器不论被应用于动植物等高等真核生物、酵母微生物等低等真核生物、还是原核生物，编辑的效率都差不多。



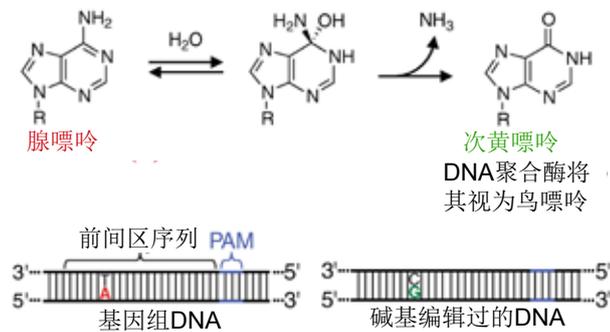
碱基编辑器结构示意图。

据Liu介绍，我们可以利用荧光报告蛋白和高通量测序等实验，来评价碱基编辑实验的结果。Bassik也表示，测序在评价碱基编辑所引入的突变频率方面表现非常出色。Bassik课题组也使用荧光报告系统作为一个粗评的指标，了解碱基编辑实验的大致结果。当然，还有很多其它方法可以评价碱基编辑实验的结果。

Liu认为，了解碱基编辑实验活性的最佳窗口就是可在基因组中发现的前间区序列邻近基序（protospacer-adjacent motifs, PAM）的数量。如果这个窗口的“宽度”刚好是一个碱基，那么就最好不过了，但这属于极端情

况——针对基因组里每一个可能位点。从实际操作的角度来看，最近最常用的碱基子的窗口宽度都在2~5个碱基左右。再结合碱基编辑子可以识别的PAM指标，就可以让我们很好地锁定某一个目标碱基对。

Liu等人的实验室以及其他一些实验室里还有一些PAM Cas9突变体也可以用于构建碱基编辑子，但是这些突变体在非理想条件下的活性要远远低于野生型Cas9蛋白构建的编辑子。不过，这也给其它新的Cas突变蛋白和相应的碱基编辑子提供了空间，可以进一步扩充基因编辑队伍和目标。



Liu实验室开发的腺嘌呤碱基编辑子可以将AG碱基对转换成GC碱基对。在自然界中，这是不可能发生的，因为没有相应的酶，所以他们实验室自己开发了这种酶。



David Liu认为，每一种碱基编辑子和核酶的脱靶问题都不一样。

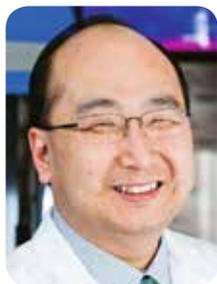
脱靶误伤

Bassik认为，脱靶突变（off-target mutation）和误伤突变（bystander mutation）很难定量，需要我们认真对待。不论是碱基编辑器，还是核酸酶都存在脱靶这个问题。碱基编辑并不会像CRISPR-Cas9那样产生插入、缺失、转位和重排等突变，但是也一样会导致脱靶的点突变。Liu表示，因为一些他们还不十分清楚的原因，碱基编辑器容易产生脱靶的位点也都是核酸酶基因组编辑技术容易出现脱靶的位点。他们实验室和其他一些实验室正在研究这个问题。

至于“误伤”了目标靶点周围的其它非目标碱基，比如我们想要修正的错误基因是因为出现了一个提前终止密码子，或者是破坏了基因的调控序列，这个倒不用太担心，但是如果被误伤的位点位于外显子区域内，那么就得心细一点了。能够识别5个碱基宽度的碱基编辑器通常也只会改变一个氨基酸。这种突变也可以是沉默突变，不会改变氨基酸。Liu等研究者的实验室正在缩小碱基编辑器的编辑宽度，他们使用的是经过人工遗传学改造的胞嘧啶

脱氨酶（cytosine deaminase）APOBEC1。Joung表示，这些识别宽度更窄的碱基编辑器有时也会降低碱基编辑的活性。但Liu介绍，这些更窄、特异性更高的碱基编辑器也有助于降低碱基编辑时的出错率。他认为，开发大量的、特异性的碱基编辑器是未来最有前景的一个研究方向。

Joung实验室则希望能够在不缩小碱基编辑器识别宽度的前提下，提高碱基编辑器的精准性。他们在人体细胞和其它哺乳动物细胞里继续寻找胞嘧啶脱氨酶。APOBEC3A (A3A)就是其中之一，它能够将胞嘧啶脱氨处理，而且对胞嘧啶的特异性也非常高。Joung实验室的Jason Gehrke在今年夏天加入了Beam Therapeutics公司，他认为，APOBEC3A蛋白这种对胞嘧啶的偏好性非常适合作为碱基编辑器。因此，他将A3A和Cas9n组合成了专门编辑胞嘧啶的碱基编辑器，同时还在上面连接了一个绿色荧光蛋白。但是没想到，这个组合之后的碱基编辑器对胞嘧啶的“嗜好”消失了，它对C和T的偏好都一样。



美国麻省中心医院（Massachusetts General Hospital, MGH）的科研人员 J. Keith Joung认为，通过发掘不同胞嘧啶脱氨酶的多样性，并借助蛋白质工程学的帮助，科研人员可以设计出各种各样不同的碱基编辑器。

Gehrke等人猜测，这也许是因为局部脱氨酶的浓度过高所致。于是，Gehrke对A3A蛋白的结构进行了研究，了解了A3A蛋白的哪个部位与DNA的哪个部位之间会发生相互作用，然后在这些部位进行了突变改造，减弱了A3A与DNA之间的亲和力。同时，又恢复了A3A碱基编辑子对C的偏好性。这种增强型的A3A突变蛋白的脱靶问题也有了大幅度的下降。

Joung认为，Gehrke等人的研究证明了实验室可以充分利用大自然里各种各样的胞嘧啶脱氨酶蛋白，再配合使用蛋白工程学技术，就可以打造出各种各样能够满足我们需要的碱基编辑子。而且随着越来越多的实验室进入这个研究领域，肯定也会开发出更多的碱基编辑子。在今天看来无法接触到的基因组位点，也许在明天就会得到解决。

在微生物、植物界的应用

日本东京科技大学（Tokyo University of Science）的Nishida等人开发出了在大肠杆菌里使用脱氨酶来进行核苷酸特异性编辑（deaminase mediated targeted nucleotide editing, TargetAID）的技术。这个碱基编辑子就是胞核嘧啶核苷脱氨酶（cytidine deaminase）PmCDA1（与缺失了核酸酶活性的CRISPR-Cas9蛋白融合）。结果发现，这种碱基编辑子的点突变编辑并不会影响大肠杆菌细胞的生长。虽然CRISPR-Cas9蛋白本身就来自细菌的菌体，但是传统的基因编辑操作对原核生物却往往都是有很大毒性的，而碱基编辑技术的毒性似乎就小得多。不过Nishida等人也尽量减少了编辑蛋白质的数量。在其它方面，他们还使用了功能较弱的启动子，并且引入了蛋白质降解标签（protein-degradation tag）和糖基化酶抑制剂。这些抑制剂能够阻止脱氨酶的作用，而蛋白质降解标签则可以降低细胞内的蛋白质水平。

Nishida等人的这种方法还可以做各种改变，比如使用切口酶替代dCas9蛋白，或者不

添加糖基化酶抑制剂等。Nishida建议其他实验室多检测几种碱基编辑子，从中挑出最适合他们试验用途的编辑子。切口酶可以提高真核生物试验的碱基编辑效率，但是对于原核生物也有毒性。Nishida建议gRNA的表达量可以高一些。gRNA的长度也会影响试验的成功率。Nishida等人相信，碱基编辑技术的应用范围要比基因组编辑技术广阔得多。

对于点突变试验而言，植物生物学家已经不仅可以将胞嘧啶转变成胸腺嘧啶，还可以做更多的改变。好几个韩国研究机构的科研人员都利用Liu实验室提供的ABE对拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）和欧洲油菜（*Brassica napus*）的原生质（protoplasts）进行了AT碱基对向GC碱基对的改造，而且改造的效率还非常高。中国的科研人员也利用这些ABE对小麦和水稻进行了同样的改造。他们成功的关键就在于优化了tRNA腺苷脱氨酶（adenosine deaminase）与nCas9蛋白之间的位置关系。

在高通量领域的应用

据Liu介绍，他们团队正在与多个实验室合作，开展高通量碱基编辑试验。既然碱基编辑子也可以像Cas9那样，与不同的向导RNA配合，开展各种定向编辑操作，那么Cas9试验的策略和结果也都可以供碱基编辑子试验借鉴了。Nishida等人也在开展类似的高通量工作。他们希望，未来能够以这种单个核苷酸的精确度，在全基因组范围内开展基因编辑工作。

美国斯坦福大学（Stanford University）的Bassik和他的博士后Gaelen Hess等人也使用碱基编辑技术，开发了功能更强大的突变技

术。其他一些实验室也在开展类似的工作，比如中国上海生物研究所（Shanghai Institutes for Biological Sciences）的Xing Chang实验室和中国上海交通大学医学院（Shanghai Jiao Tong University School of Medicine）的科研人员就是其中之一。Bassik实验室使用多种胞嘧啶脱氨酶，可以对全外显子区域进行突变操作，这些胞嘧啶脱氨酶对多种向导RNA都高度敏感。他们也用这种技术对抗癌药硼替佐米（bortezomib）的作用靶点PSMB5进行了研究，最终发现了药物作用的靶基因，以及一些之前未知的耐药靶点。



有了更强大的碱基编辑技术，我们就可以在目标靶点里制造出多个突变，帮助我们开展各种研究，比如发现耐药机制等。



Luke Dow认为，终有一天，我们手上的碱基编辑器肯定会多到让我们无从选择。

Bassik等人还向其他实验室咨询了PSMB5蛋白与硼替佐米组成的复合体的结构信息，发现了多个位于这两个分子之间相互结合位点的突变。即便缺少结构数据，科研人员也可以利用各种碱基编辑技术寻找导致耐药性的突变。虽然这种碱基编辑技术目前还不能应用于临床治疗工作，但是可以帮助我们寻找新的药物作用靶点。

Bassik实验室已经运用碱基编辑技术在人体细胞、斑马鱼和其它一些模式生物（包括可进行转基因操作的农作物）上开展了试验。这和以往使用化学药物或放射线照射诱使细菌

产生随机突变（random mutagenesis）的方法不同，使用碱基编辑技术可以精确地在某个特异性的位点引入特异性突变，从而增加成功率。

Bassik认为，相比容易出错的PCR，他们这种碱基编辑技术更为方便，因为PCR会在非内源水平用到大量的质粒。碱基编辑技术不但可应用的范围非常广泛，比如构建突变数据库，开发具有新功能的蛋白质，或者研究耐药机制，而且也可以广泛应用于各个科研机构 and 生物制药公司。更通俗的说法就是，只有你想不到的，没有碱基编辑技术做不到的。

进一步优化

Dow表示，有很多细胞是很难开展转染（transfect）试验的。因此，他们课题组就专门研究了这个问题，如何在细胞内表达基因编辑试验所需的各种酶。这是因为，碱基编辑试验有很大一部分工作都是在转化细胞系（transformed cells lines）里完成的。但是Dow更希望能够在真正的肿瘤细胞、类器官（organoids），甚至活体内开展碱基编辑试验。他表示，类器官才是他们的真正目标，他们希望能够在关键肿瘤基因里找到特异性的突变。

Dow等人在之前使用CRISPR-Cas9技术对*Apc*基因（这是一种结肠癌患者常见的突变基因）进行突变试验时，得到了一些有价值的发现，比如发现了大段的缺失突变。这些不是脱靶突变，而是靶标错误（errant on-target）突变。大段的缺失使得基因表达出了各种错误的蛋白质产物。

当碱基编辑技术出现之后，Dow实验室马上就采用了这种技术，但是他们发现，最开始出现的那些碱基编辑子都无法用于胚胎干细胞和类器官的试验，会产生缺失突变（indels），而不是目标突变，这可能是因为切口酶的作用不同所致。他们还发现，在使用同一gRNA时，某些细胞系出现缺失突变的几率要比其它细胞系更高。于是他们猜测，可能是因为这些细胞系里的DNA损伤修复机制有所不同。但是随着碱基编辑子技术的不断进步，这种问题也逐渐变少了，但是并未完全消除。

在构建慢病毒载体时，Dow他们注意到，BE3碱基编辑子里的Cas9n DNA在哺乳动物细胞里的表达量并不太高。于是他们优化了蛋白

表达系统，开发出了基因靶向性更好的酶，而且还提高了细胞核靶向性，从而让核糖核颗粒（ribonuclear particle）的传输更方便。这一改进让他们获得了想要的单核苷酸突变体，而且也在人体细胞系和小鼠细胞系，以及肠道类器官结肠癌模型上成功开展了试验。后来，又对成体小鼠的肝细胞进行了体细胞活体碱基编辑试验。

肝细胞癌变时，CTNNB1突变是Wnt信号通路途径里的一条作用机制。Dow的实验室对该基因进行了碱基编辑，结果真的使小鼠患上了肝癌，从而构建出了小鼠肝癌动物模型。他们又激活了Wnt信号通路，也进一步刺激了肿瘤的生长，这在以往使用CRISPR-Cas技术时都是无法成功的。Dow介绍，单靠Cas9蛋白，是不可能成功完成这种试验的，因为那会产生插入突变、缺失突变，但是不会是这种点突变。

在这个试验里，Dow等人使用了两种gRNA，在*Apc*基因里引入了失活突变，同时在PI-3激酶里引入了一个活化突变。Dow指出，他们的这项工作表明，是可以在一个试验里同时针对两个不同的基因，开展不同的操作的，只需要改变一下gRNA就可以做到了。

Dow等人的论文发表之后，前来求教者络绎不绝。不同的细胞之间，碱基编辑的效率也有所不同。而关键就在于工具酶在细胞内的表达量。Dow实验室已经构建了一套“超微设备（micro-infrastructure）”，他们还计划开发新的碱基编辑子，或者利用最新的技术，对现有的编辑子进行进一步改造。比如，他们实验室已经利用Joung实验室的各种

人工脱氨酶，克隆了多种碱基编辑子。迭代技术（Iteration）就是他们开发碱基编辑子的工具。Dow认为，终有一天，我们手上的碱基编辑子肯定会多到让我们无从选择。

Dow更加关注开发可调式碱基编辑技术。他希望可以根据我们的意愿，随意启动碱基编辑，创造出突变，同时又可以自由的关闭这个系统。他在做博士后工作期间，就开发了可诱导式、同时可逆的shRNA小鼠。他之前的这些经验也可以用于碱基编辑试验。如果有了这种可调式突变技术，就可以避免持续表达APOBEC酶所引发的一系列问题，比如损

伤细胞、诱发免疫反应等。而对于已经携带了Cas9蛋白的细胞，则可以避免免疫原性问题。

Dow表示，在CRISPR技术诞生时，大家都认为那已经是非常精确的基因编辑技术了。可是碱基编辑技术出现之后，我们才发现能够以单个碱基这样高的精确度，对基因组进行定点操作。相比之下，CRISPR技术就粗略得多了。虽然对基因组进行定点突变，在五年前还只是一个科学幻想，可是今天却已经成为了现实。

文检索：

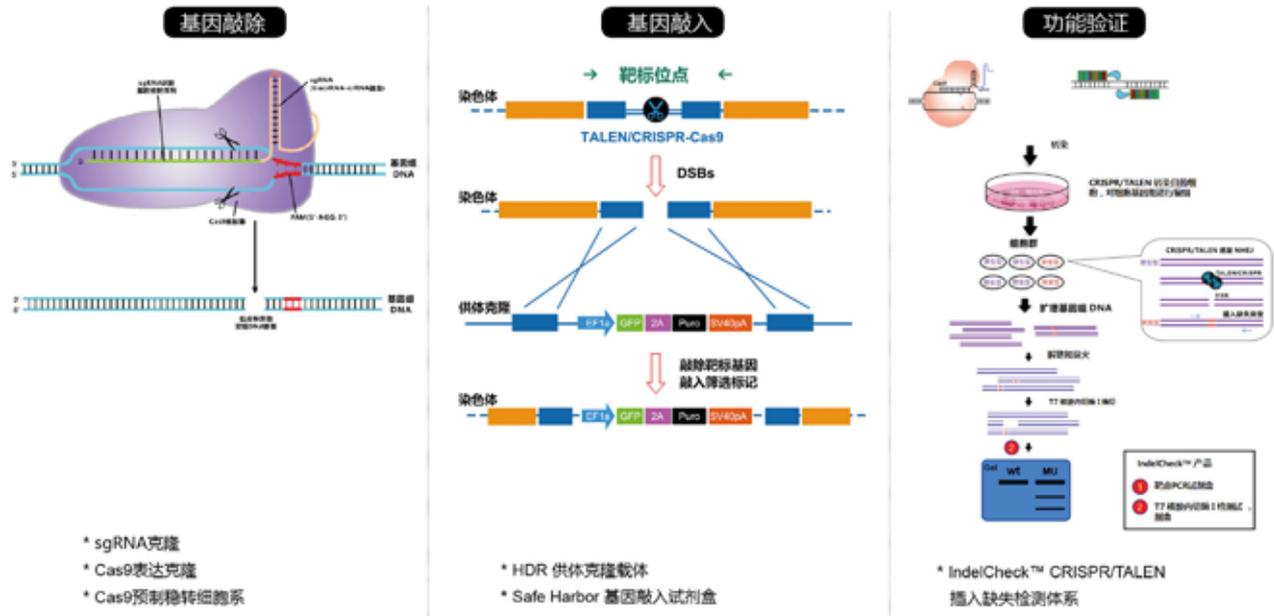
Vivien Marx. (2018) Base editing a CRISPR way. *Nature Methods*, 15: 767–770.

Eason/编译

• CRISPR 精确基因组编辑工具 •

快速简便 • 专业经验 • 全套解决方案

GeneCopoeia提供CRISPR-Cas9克隆、慢病毒等产品及服务、验证和筛选工具、预制稳定细胞系等全套的基因组编辑工具，帮助您完成基因组编辑工作的每一步！



GeneHero™ CRISPR-Cas9 产品与服务

产品类型	启动子	报告基因	筛选标记	价格
sgRNA 克隆	U6	N/A mCherry copGFP	N/A Neomycin Puromycin Hygromycin	单条 ¥ 1000 起 3条一组 ¥ 3000 起
Cas9核酸酶表达克隆	CMV	mCherry	Neomycin	
Cas9核酸酶慢病毒表达克隆	CMV EF1a	eGFP N/A	N/A Neomycin Puromycin Hygromycin	¥ 500 起
Cas9 D10A 切口酶表达克隆	CBh CMV	N/A mCherry	N/A Neomycin	

* 注：GeneCopoeia提供sgRNA及Cas9的Lentivect™纯化慢病毒。其中，sgRNA纯化慢病毒颗粒滴度可达10¹⁰ TU/ mL，Cas9纯化慢病毒颗粒滴度可达10⁷ TU/mL。

产品类型	细胞系	启动子	筛选标记	Cas9 整合位点	规格	价格
GeneHero™ Cas9 稳定表达细胞系	HEK293					
	NCI-H1299					
	A549					
	HeLa	CBh	Neomycin		2 x10 ⁶	
	HT-1080	CMV	Puromycin	AAVS1	cells/vial	¥ 10000 起
	MCF-7	EF1a	Hygromycin	ROSA26	x1vial	
	T47D					
	HepG2					
HCT116						
Neuro2a						

* 注：GeneCopoeia提供 70+ 种人类、小鼠、大鼠CRISPR-Cas9 稳定表达细胞系

Safe Harbor 基因敲入试剂盒

产品类型	产品组成	价格
人类AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒 (不含载体)	AAVS1 sgRNA/Cas9 表达克隆 (HCP-AAVS1-CG02) AAVS1 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH01) 基因敲入验证引物组合(HQPAVSHR)	¥ 12760
小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 (不含载体)	ROSA26 sgRNA/Cas9 表达克隆 (MCP-ROSA26-CG01) ROSA26 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH02) 基因敲入验证引物组合(MQPROSHR)	
小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒	ROSA26 sgRNA/Cas9 表达克隆 (MCP-ROSA26-CG01) ROSA26 供体克隆载体 (DC-DON-SH02) ROSA26 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH02) 基因敲入验证引物组合(MQPROSHR)	¥ 11160

*注: GeneCopeia提供人类 AAVS1及小鼠 ROSA26 safe harbor 工具质粒, 和Cas9 人类 AAVS1及小鼠 ROSA26 safe harbor 敲入试剂盒、敲入克隆及引物, 欢迎选购! 详情请见: www.igenebio.com/product/safe-harbor/

HDR供体克隆和载体服务

产品类型	启动子	报告基因	筛选标记	LoxP 位点	价格
HDR Donor载体	EF1a	N/A copGFP	Puromycin	N/A LoxP	¥ 3000 起
	CMV		Neomycin		
	PGK		Puromycin/TK		
			Neomycin/TK		
			Hygromycin/TK		

*注: GeneCopeia 也提供供体克隆设计及/或客户定制服务以及基因组编辑项目咨询服务。

插入缺失检测体系

产品名	货号	规格	产品组成	价格
IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系 (2.0)	IC001	50 rxns	靶点 PCR 试剂盒及 T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒	¥ 1100
	IC002	200 rxns		¥ 3400

产品名	货号	规格	描述	价格
靶点 PCR 试剂盒(2.0)	IC003	50 rxns	PCR 扩增基因组上的靶点序列, 产物用于后续 T7 核酸内切酶 I 检测及靶点测序。	¥ 900
	IC004	200 rxns		¥ 2600
T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒(2.0)	IC005	50 rxns	使用 T7 核酸内切酶 I 剪切错配的PCR产物, 以检测 CRISPR/TALEN 介导的插入缺失突变。	¥ 600
	IC006	200 rxns		¥ 1800
靶点 PCR 克隆试剂盒	IC007	20 rxns	将平末端靶点 PCR 产物克隆到载体, 以便进行测序验证。	¥ 500
	IC008	100 rxns		¥ 2100

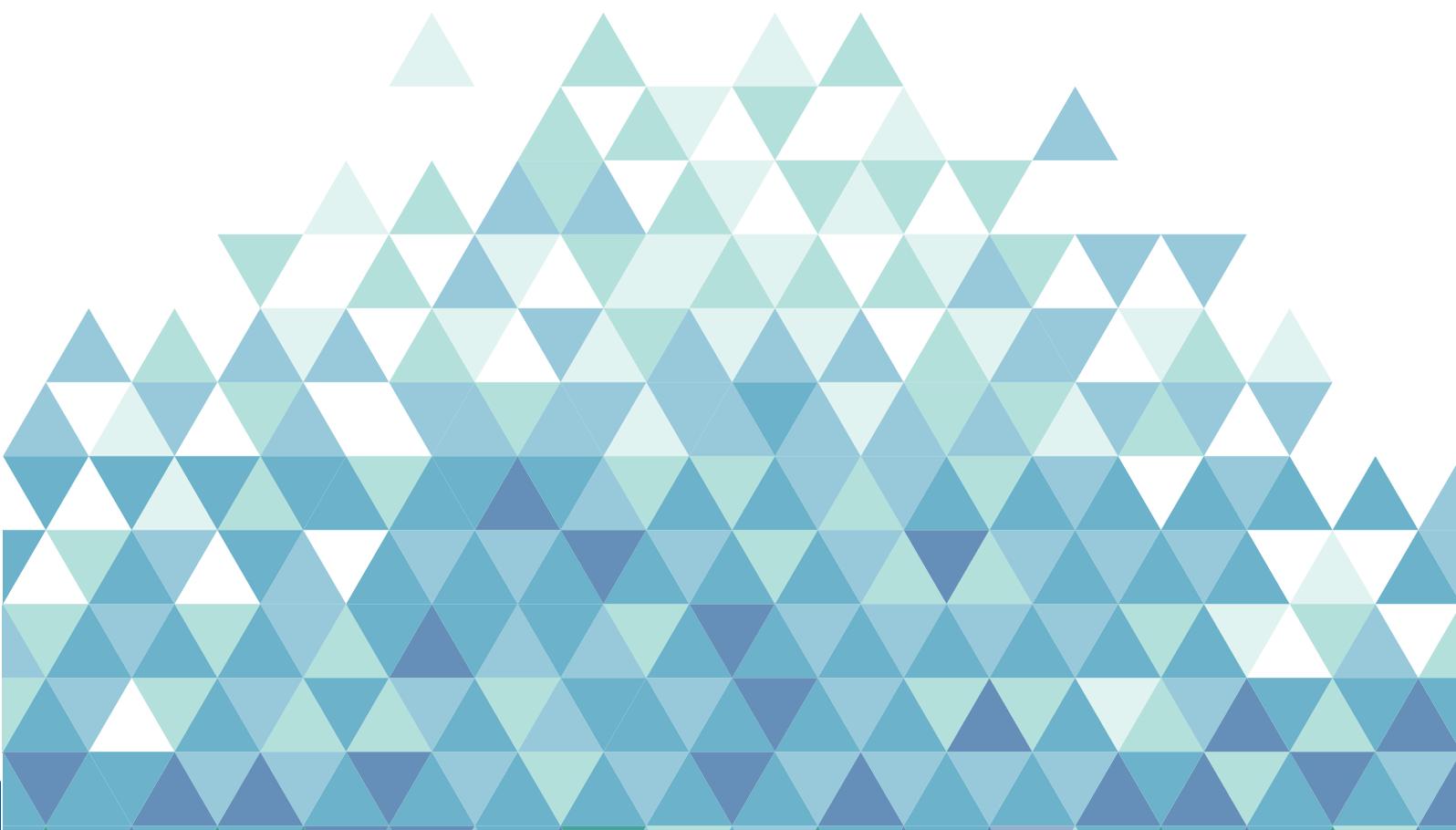


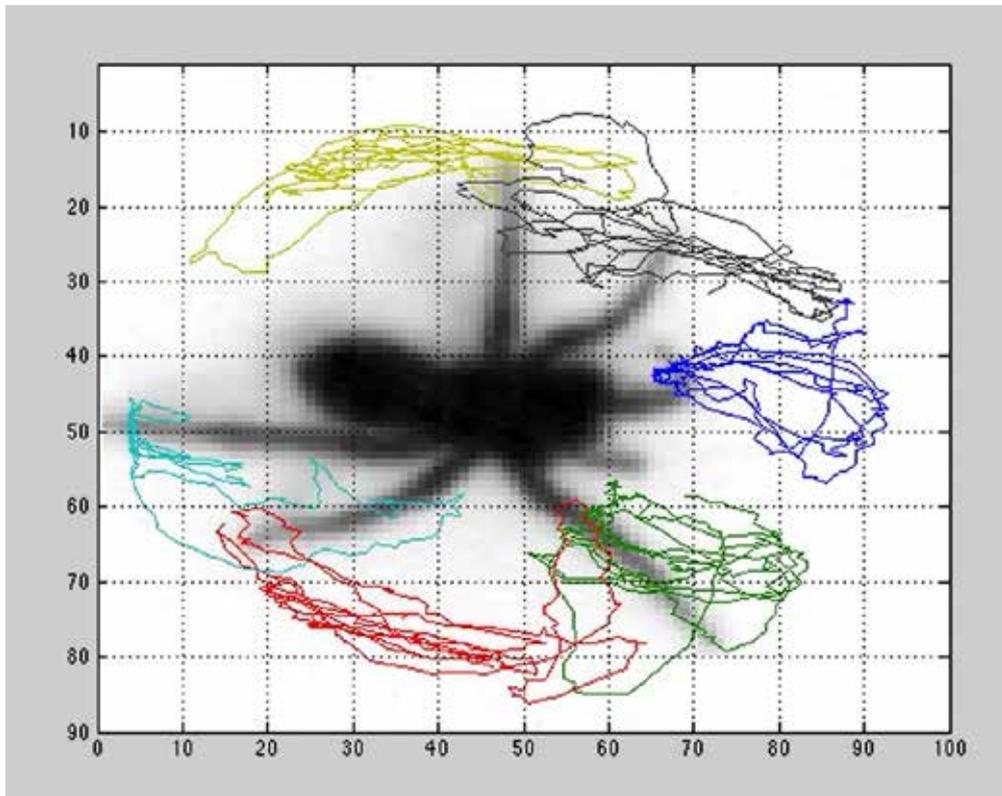
扫一扫, 关注官方微信



百态

断腿的狼蛛
怎么跑？





图为一只失去两条腿的狼蛛在迈步前行时每一步的位置轨迹。

鉴于缺胳膊少腿对于许多两足动物和四足动物来说都不算什么事儿，一瘸一拐也可以谋生，因此，有些动物为了活命，就会随时准备主动放弃自己的一两条腿。甲壳纲、蛛形纲、爬行纲等多种生物都能在遭受攻击时抛弃某些肢体及其它附属物，这种行为被称为“自切”。美国天普大学（Temple University）的Tonia Hsieh由于曾研究过缺失尾巴对蜥蜴活动的影响，因而对无脊椎动物的肢体完全缺失会产生什么结果很感兴趣。他与Andrew Spence、Simon Wilshin（当时两人还在英国皇家兽医学院）和康奈尔大学（Cornell

University）的Paul Shamble进行了探讨，随后决定研究蜘蛛在缺失某些步足之后如何适应生活。

在行走时，大多数步行动物都会交替用步足与地面接触。蛛形纲动物通常以四条交替的步足形成四边形来保持平衡，而六条腿的甲虫和蟑螂则用三条腿保持平衡。那么，若蜘蛛弃去两条腿，结果会怎样呢？是只好用剩下的腿跛行，以保持同样的四方步模式呢，还是像六条腿的甲虫那样步行？

Ryan Harris盯上了狼蛛，它们在受到威胁的情况下会弃去步足，自然有利于研究。首

先，他把兽医学院的地板擦洗干净，以方便搜寻这种贪吃的肉食动物。当然，免不了还要带着样品盒到长长的草丛中寻找，还被旁边遛狗的人不解地盯着。然后，Harris、Wilshin和Shamble回到实验室，小心地将每只狼蛛的左前腿和右后腿摘除，使其每一侧都只剩下三条腿，然后再拍摄蜘蛛在玻璃槽中蹦跶的样子。值得注意的是，Simon提出选择将第一和第五步足摘除，理由是这个组合正好在同一个四边形步组中。对此，Spence解释说，狼蛛若想在缺失两条腿之后保持同样的模式行进，就只能用两条腿接触地面（半循环）的方式完成蹩脚的步态行走。

接着，Kyle Hovey拍摄下狼蛛的行为，再尽力将其80%的动作数码化，识别出700多个连续片段，其中包括至少3次完整的蜘蛛步态。最终，研究小组分析了狼蛛的209次踏步，发现它们更倾向于六腿甲虫式的步法，完成了151次三足模式的行进动作，但仍有58步无法摆脱原有的四方步模式，尽管失去了

两条腿。对此，Spence表示，狼蛛是在“跛行”。它们尽可能地拉长最稳定的四腿姿势维持的时间，而在仅用两条腿保持平衡时快步前进。用Hsieh的话来描述这套动作，就是“四—二—四—二—四”。

狼蛛通常会固定使用四方步行走，但在必要时也能改变步行顺序，走出甲虫的三步式步法，甚至能在仅用两条步足跛行的情况下，改变传统四步式的速度。此外，研究小组还惊奇地发现，这种蛛形纲动物的灵活性似乎没有受到影响，因为它们截肢前后的行进速度一样快，而且还能够保持直线路径。

研究小组在窥探狼蛛强大的适应能力之后，希望设计出一种能够像它们一样的机器人，在某些肢体瘫痪的情况下仍然能够协调运转。而Hsieh则希望研究其它蜘蛛在肢体缺失时的适应能力：到底是什么法则让它们能够迅速发现另一种新奇而稳定的步法呢？这的确令人深思。

原文检索：

Wilshin, S., Shamble, P. S., Hovey, K. J., Harris, R., Spence, A. J. and Hsieh, S. T. (2018).

Limping following limb loss increases locomotor stability. *J. Exp. Biol.* 221, jeb174268..

文佳/编译

锦龟过冬可能遭遇软壳危机？



乍一看去，西部锦龟（*Chrysemys picta bellii*）恐怕不太像是一个破纪录者，然而即使它们既没有伟岸的体魄，也没有神速的步伐，但那非凡的生存天赋却不容小觑：数九寒冬，它们都能蛰伏在冰面下数月而不受损伤。在这段时间里，锦龟会将龟壳和骨骼所含的钙和镁溶解，以防止其体内不断产生的酸性物质效应。此外，无氧呼吸产生的酸也被骨性结构表

面吸收，经体液途径排出。但是，这种骨中矿物质脱除的效应和乳酸的积累会对锦龟骨质外壳的强度产生多大的影响，目前还不清楚。

美国圣路易斯大学（Saint Louis University）的Daniel Warren等人开展了一些研究，分别测试了锦龟在有氧和无氧水中过冬之后，其龟壳的组成和强度变化。结果发现，在缺氧的环境下，分别待了60天和130天（约

8周和18周)的锦龟相对没有受到什么伤害。但是,当它们在缺氧的水下待了165天(约23周)之后,产生了明显的损伤:龟壳较脆弱,且易变形。

研究小组搜索了关于锦龟在冬季蛰伏平

均持续时间的文献,猜测中途可能出现融冰现象,使得锦龟能够在龟壳受损之前就获得空气。但他们也表示,锦龟在约26周的水下蛰伏后,其耐胁变性和弹性模量都会发生改变,这可能与生态相关,而与水中的含氧量无关。

原文检索:

Odegard, D. T., Sonnenfelt, M. A., Bledsoe, J. G., Keenan, S. W., Hill, C. A. and Warren, D. E. (2018). Changes in the material properties of the shell during simulated aquatic hibernation in the anoxia-tolerant painted turtle. *J. Exp. Biol.* 221, jeb176990.

文佳/编译



合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmics.com