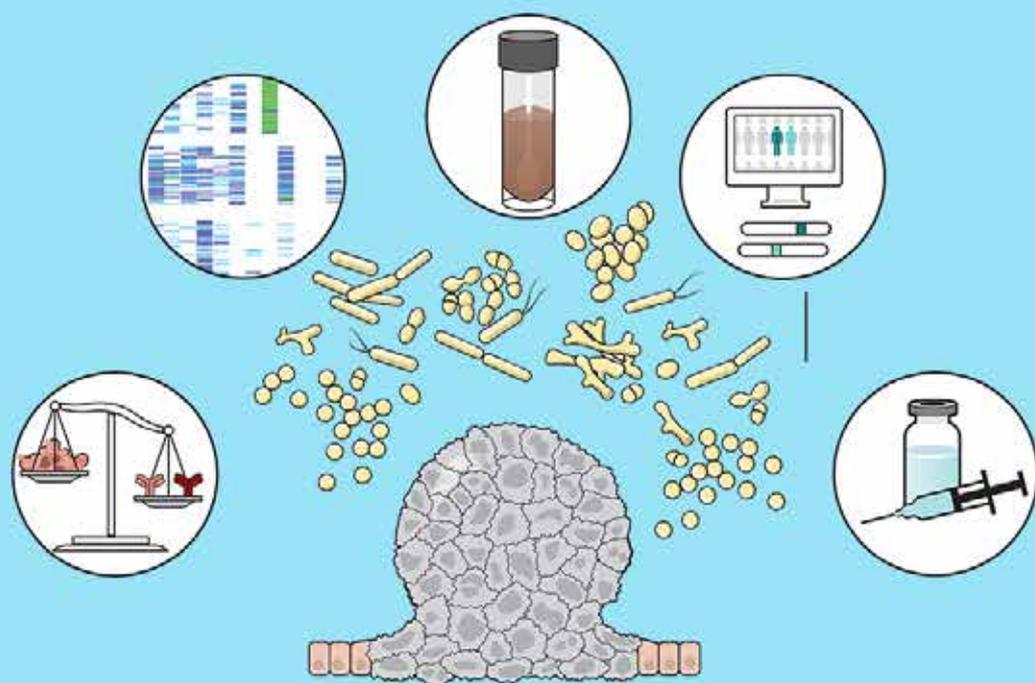


2019年1月刊

总 112 期

# 生命奥秘

2019/1  
LIFEOMICS



## 肿瘤免疫疗法的重大变革 (PART II)

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 II)

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	02
三、CAR-T细胞免疫抗癌疗法综述	03
四、微生物组在癌症免疫疗法中的作用：诊断工具和治疗	15
五、观点荟萃	24
1. 癌症免疫疗法的临床实验并非越多越好	24
2. 医生Peter Bach：癌症治疗成本太高	28

下一期（2019年3月刊）预告：睡眠与记忆——最新研究进展

3月21日是世界睡眠日。下一期《生命奥秘》以睡眠为专题，将通过梳理睡眠与记忆关系的研究历史和讨论相关领域的最新研究进展，介绍睡眠作用于认知和精神状态的各种机制，阐明睡眠问题对记忆、认知、情绪及精神状态的影响，希望为识别风险的人群提供科学的参考，帮助人们更好地适应学习型社会，应对不断增长的竞争压力和老龄化趋势，有效地维持终身学习，更好地权衡利弊，提高生活质量。

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。  
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。  
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

# 专题

## 肿瘤免疫疗法的 重大变革(PART II)

### 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。目前已有多份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- $\gamma$  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。

（具体内容请见2018年12月刊）

## 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。

（具体内容请见2018年12月刊）

### 三、CAR-T细胞 免疫抗癌疗法综述

过继性T细胞转移（Adoptive T cell transfer, ACT）是输血医学（transfusion medicine）领域里的一个新方向，它指的是将淋巴细胞输入患者体内，发挥抗肿瘤、抗病毒和抗炎的作用。这个研究领域进展迅速，没用多长时间，就已经从免疫抗癌临床前模型研究出了已经上市销售、可用于治疗白血病和淋巴瘤的抗原受体嵌合型T细胞产品（chimeric antigen receptor T cell, CAR-T cell）。本综述详细介绍了CAR-T研究领域在进入主流抗癌治疗时面临的机遇与挑战，并将重点介绍近年来的进展。

对过继性T细胞（adoptive T cell）进行细心的体外改造和培养，然后再将其回输到难治型癌症患者体内，这种过继性T细胞转移（adoptive T cell transfer, ACT）治疗可以获得持久的疗效，这一医学进展也展现了ACT技术的巨大潜能和应用前景。基于大量让人振奋的临床结果，FDA也批准使用这种对自体T细胞进行改造，使其表达特异性识别CD19 B淋巴细胞分子的嵌合型抗原受体（chimeric antigen receptor, CAR）新技术，来治疗难治型前B细胞急性淋巴细胞白血病（pre-B cell acute lymphoblastic leukemia）和弥漫性大B细胞淋巴瘤（diffuse large B cell lymphoma）。下面，我们将重点介绍CAR-T细胞的普遍前景，该技术治疗实体瘤的前景，以及CAR-T细胞技术商业化和应用过程中出现的一系列新情况。

目前，肿瘤治疗领域已经开发了3种ACT技术：肿瘤浸润淋巴细胞（tumor-infiltrating lymphocyte, TIL）转移、T细胞受体T细胞（T cell receptor T cell）转移和CAR-T细胞转移。多个临床研究发现，肿瘤浸润淋巴细胞能够在黑色素瘤转移患者体内引发持续的、完全的反应（durable complete response）。最近的研究又发现，肿瘤浸润淋巴细胞可以锁定黑色素瘤中的新抗原（neoantigen），这也进一步支持了用肿瘤浸润淋巴细胞转移技术治疗黑色素瘤患者的正确性，学界也对这个治疗方案进行了更加深入的探讨。基因转移技术（gene transfer technology）也被用来改造外周血T淋巴细胞，使其变成转基因TCR-T细胞或CAR-T细胞。目前已有多家制药公司和生物技术公司准备推出多种商业化的ACT产品。

## 遗传学改造的T细胞孰优孰劣？

如图1所示，T细胞受体TCR是由一条 $\alpha$ 链、一条 $\beta$ 链通过非共价键与T细胞表面的CD3复合体连接而成的。当TCR识别了与肿瘤细胞或抗原呈递细胞（antigen-presenting cell）表面的主要组织相容复合物（major histocompatibility complex, MHC）非共价结合的抗原肽段时，T细胞就会活化。第一个应用于临床的TCR-T细胞抗癌疗法就是用来治疗黑色素瘤转移患者，该TCR上结合了源自黑色素细胞分化抗原（melanocytic differentiation antigen）的人淋巴抗原A2（human lymphocyte antigen A2, HLA-A2）限制性肽段。后来，又出现了亲和力更高的TCR靶标MART-1（melanoma antigen recognized by T cell 1）抗原表位，研究人员希望能够用更低的MART-1表达量获得更高的恶性细胞识别率。虽然反应率（response rate）的确增加了，但是“误伤率”也更高了。这种MART-1 TCR还可以识别皮肤、眼和耳蜗（cochlea）等处正常的黑色素细胞（melanocyte）。超过一半的患者经过这种TCR-T细胞治疗之后都表现出了上述毒性反应，这也说明，这种T细胞抗癌方案的治疗窗非常窄。另外两种特异性识别睾丸癌抗原MAGE-A3的TCR-T细胞也表现出了致命的神经毒性和心脏毒性，这也进一步对TCR-T细胞疗法提出了挑战。不过，表达HLA-A2限制肽段高亲和力TCR，同时又能靶

向睾丸癌抗原NY-ESO-1的T细胞则表现出了很好的治疗效果，同时也没有明显的毒性作用。这些实验结果给我们提供了一点信心，这种TCR-T细胞疗法的治疗窗也许并没有那么窄。目前，一个3期临床实验正在评估改造过的NY-ESO-1 T细胞的疗效（详见[clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)网站NCT01343043实验）。开发能够结合某种特定肿瘤新抗原（而不是很多肿瘤共有的抗原）的TCR-T细胞也许能够提高这种疗法的安全性，不过这种方案还没有得到临床验证。

如图1所示，CAR是将源自抗体可变区的单链可变片段（single-chain variable fragment, scFv）这种最常见的抗原结合结构域（antigen-binding domains）与TCR $\zeta$ 链上的信号结构域相结合，同时还添加了CD28、OX40和CD137等受体上的共刺激结构域（costimulatory domain）。CAR能够解决TCR面临的一些挑战和限制，比如对MHC的需要等。Kuwana和Eshhar课题组最先发现，这些人工合成的受体分子能够使T细胞在不依赖MHC分子参与的情况下被激活。因此，CAR-T细胞在抗肿瘤方面具有了先天的优势，因为肿瘤细胞逃避人体免疫攻击的一大机制就是不表达MHC分子。目前，CAR-T细胞面临的一大挑战就是还需要肿瘤细胞表面有抗原靶标表达。表1对CAR-T细胞和TCR-T细胞的特点作了详细的比较。

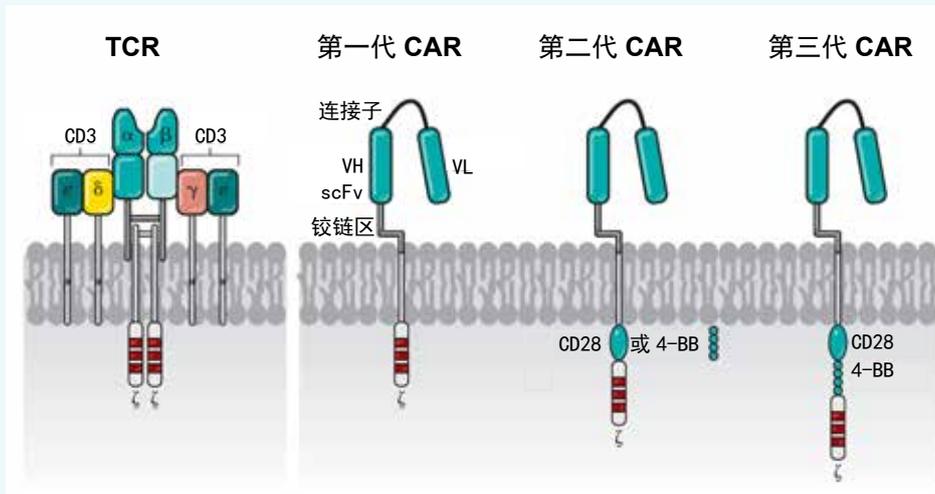


图1 改造TCR-T细胞和CAR-T细胞。经过人工改造，T细胞可以获得对肿瘤的特异性识别能力，左图展示的是经过人工改造的转基因T细胞受体TCR，右图展示的是嵌合抗原受体CAR。CAR的胞外结构由多个蛋白（通常都源自抗体）融合而成，胞内部分则源自T细胞的信号结构域。第一代CAR含有CD3 $\zeta$ ；第二代CAR的CD3 $\zeta$ 上融合了一个共刺激内域（costimulatory endodomain），如CD28或4-1BB等；第三代CAR的CD3 $\zeta$ 上融合了两个共刺激结构域。VH：重链；VL：轻链。

表1 TCR-T细胞和CAR-T细胞的特点

TCR-T细胞	CAR-T细胞
TCR的发展促使敏感信号扩增	利用合成生物学进行信号扩增：有200种靶标可以激活CAR-T细胞
亲和力较低，除非经过人工改造	亲和力可控
TCR识别胞内蛋白质分子	CAR识别细胞表面结构，如蛋白质和多糖等分子
依赖MHC-1类分子和HLA分子来识别肿瘤靶标	不依赖MHC识别肿瘤靶标
疗效维持终身	疗效至少可持续十年
可杀死肿瘤细胞	可杀死肿瘤细胞
难以预测脱靶带来的毒性反应	与TCR疗法相比，细胞因子释放综合症（Cytokine release syndrome）更猛烈

## B细胞恶性肿瘤：CAR-T细胞意外胜出

第一代CAR-T细胞在最初的临床实验中对多种肿瘤患者进行过实验性治疗，可结果无法让人满意。2011年，能够识别CD19分子，并且能够编码共刺激结构域的第二代CAR-T细胞成为用人工遗传学改造T细胞治疗肿瘤领域的大明星。多个特性让CD19分子成为近乎完美的治疗靶标。首先，在各种B细胞恶性肿瘤疾病里，CD19分子是最多见的、而且表达水平很高的一种分子；其次，除了B细胞之外，人体内的其它细胞都不会表达CD19这种分子。虽然接受了这种CAR-T细胞治疗的患者，体内的B细胞常常都会出现明显的不发育现象（*aplasia*），但保留了浆细胞（*plasma cell*）和体液免疫（*prior humoral immunity*）功能。这种CAR-T细胞治疗后的B细胞缺乏问题也可以通过注射免疫球蛋白的方法来解决，这一点与因为CD19基因突变而引起的B细胞缺乏有所不同。

早期的CAR-T细胞临床实验结果也对其它一些靶点进行过测试，结果发现CD19分子的脱靶交叉反应效应并不是特例，其它靶标也都存在这个问题。虽然多发性骨髓瘤（*Multiple myeloma*）细胞的CD19分子表达量非常低，但是用CD19 CAR-T细胞进行治疗也有效果。现在正在开展的NCT02546167临床实验（详见[clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)）就是使用能够识

别BCMA或CD269这些B细胞成熟抗原分子的CAR-T细胞来治疗晚期骨髓瘤患者的。未恶变的浆细胞也能够表达BCMA分子，所以在实验中发现，这些细胞也和恶性的骨髓瘤细胞一起被清除掉了。至于能在多大程度上接受这种脱靶效应，则取决于都“误杀”了哪些正常细胞。

大部分白血病复发患者在经过了特异性识别CD19分子的CAR-T细胞治疗之后，都能够获得完全缓解（*complete remission*）。不过，现在也出现了两种耐药现象。急性白血病患者由于缺乏CD19分子的抗原表位，所以会逃脱CAR-T细胞的免疫攻击，出现“耐药”。这种情况与使用TCR-T细胞治疗时，因为抗原呈递障碍，或者抗原缺失时出现的抗原逃逸（*antigenic escape*）机制比较类似。在治疗儿童和青年急性白血病患者的国际临床实验中发现，CD19分子阴性缺失变异（*CD19-negative loss variants*）患者的复发率为28%。目前还没有CD19分子缺失的慢性淋巴细胞白血病（*chronic lymphocytic leukemia, CLL*）患者对CAR-T细胞治疗产生耐药的报道。这类患者之所以耐药，主要是因为CAR-T细胞被注入患者后无法增殖。表2列举了CAR-T细胞进入临床过程中面临的几大问题。

表2 解决CAR-T细胞面临的临床挑战的几种策略

临床挑战	解决策略	预期效果
细胞因子释放综合症 (Cytokine release syndrome)	使用Tocilizumab、siltuximab、JAK激酶抑制剂和糖皮质激素等药物	阻断IL-6因子的作用，快速纠正发热、低血压和缺氧等症状
出现针对鼠源scFv分子的个体基因型抗CAR抗体	使用人源的scFv分子	CAR-T细胞在体内持续时间更长
CAR-T细胞在体内的效应不够持久	弄清长效信号结构域的作用机制；使用记忆细胞或干细胞	根据临床需要，使CAR-T细胞在体内持续时间更长
由于缺失了CD19分子而使疾病复发	靶向CD22分子及CD19分子	同时锁定多个抗原，防止疾病复发

### CAR-T细胞治疗其它疾病

目前发现，除了CD19分子之外，CAR-T细胞技术还可以应用于更多的领域。靶向BCMA和CD22分子的CAR-T细胞在早期的临床实验中分别表现出治疗多发性骨髓瘤和急性淋巴细胞白血病的潜力。BCMA分子与CD22分子都和CD19分子一样，只在B细胞上表达，因此，表现出来的毒性反应也不是特别严重。可是目前用CAR-T细胞治疗实体瘤还存在很大的问题。

ERBB2/HER2蛋白是一种受体酪氨酸激酶蛋白，常常在肿瘤细胞中大量表达，该分子也是抗体或抗体药物复合物的良好靶标。能够识别ERBB2/HER2分子的CAR-T细胞在治疗第一位患者时，表现出了致命的毒性反应。第三代CAR-T细胞使用了基于赫赛汀（Herceptin）的具有高亲和力的scFV分子，

以及CD28和4-1BB胞内信号结构域。结果发现，其毒性反应主要是因为CAR-T细胞杀死了肺上皮组织里数量较少，但也能够表达ERBB2分子的正常肺上皮细胞，导致患者肺功能衰竭和大量细胞因子释放。如果低剂量使用携带亲和力更低的scFV分子的CAR-T细胞，就可以安全地治疗肉瘤（sarcoma）患者，但疗效也较弱。

能够表达第一代CAR靶标分子——肾癌细胞抗原碳酸酐酶IX（carbonic anhydrase IX, CAIX）分子的CAR-T细胞，在1期临床实验中也表现出了意想不到的肝脏毒性。这主要是因为正常胆管上皮（biliary epithelium）也可以表达少量的CAIX抗原，但是在之前的临床前研究中并没有发现这种情况。迟发型呼吸毒性反应（Delayed respiratory toxicity）则刚好与

靶向CEACAM5分子的CAR-T细胞大量扩增同时出现，这也说明这种抗原可能就是导致毒性反应的原因。靶向间皮素（mesothelin）、癌胚抗原（carcinoembryonic antigen）、GD2神经节苷脂分子（GD2 ganglioside）等其它实体瘤靶标的CAR-T细胞在临床实验中都没有出现明显的毒性反应，不过这些T细胞的抗肿瘤活性也都很弱。GD2特异性CAR-T细胞具有较高的抗肿瘤活性，但同时也在临床前模型实验里表现出了致命的神经毒性，这也是一个不小的障碍。在通过局部注射针对IL-13受体 $\alpha 2$ 分子的CAR-T细胞，治疗多形性成胶质细胞瘤（glioblastoma multiforme）的临床实验中也发现，这可以获得较好的治疗效果，同时不会发生明显的毒性反应。这说明可以通过肿瘤内注射一些抗原的方式，来提高CAR-T细胞的治疗指数（therapeutic index）。靶向表皮生长因子受体可变剪切体EGFRvIII的CAR-T细胞在临床实验中证实，这种肿瘤抗原是一个安全的靶标，但是如果肿瘤缺失了EGFRvIII抗原，也

能够获得治疗效果。这也说明，应该针对多个不同的肿瘤抗原，防止出现抗原逃逸现象。

肿瘤微环境也是阻止ACT治疗发挥疗效的一大障碍，这种情况对于实体瘤治疗更为突出。目前，我们已经开发出多种机制非常清晰的肿瘤内T细胞抑制疗法，比如PD-L1（抑制剂）等免疫检查点类药物。这些药物就能改变肿瘤的代谢微环境，比如造成缺氧，促使肿瘤内表达吲哚胺-1-氧化酶（indolamine-1-oxidase）和精氨酸酶（arginase），还能对T细胞和抑制性髓细胞进行调控。在ACT治疗之后，这些免疫或代谢检查点分子的表达量多数都会增加，这说明肿瘤也在进行“抵抗”。目前，正在开展PD-1/PD-L1抑制剂与CD19特异性CAR-T联合治疗的临床实验，例如NCT02926833、NCT02650999和NCT02706405等临床实验。除了与这些检查点抑制剂类药物联合之外，也可以破坏这些抑制性通路，比如改变受体，或者进行基因编辑，这些相关的研究工作目前正在开展。

### CAR-T治疗的毒性作用

虽然进行ACT治疗，激活T细胞的目的就是希望在一定程度上激活人体的免疫机能和炎症反应，但是如图2所示，严重的细胞因子释放综合症（cytokine release syndrome, CRS）也是CD19、BCMA和CD22等CAR-T细胞疗法的一大毒性反应。这种综合症要比TIL和TCR治疗常见的流感样综合症（influenza-like syndrome）严重得多。细胞因子释放综合症的严重程度与人体的肿瘤量呈正相关。最严重的细胞因子释放综合症还会表现出噬血细

胞性淋巴组织细胞增生症（hemophagocytic lymphohistiocytosis）和巨噬细胞活化综合征（macrophage activation syndrome）的临床症状。

除了细胞因子释放综合症这种毒性反应之外，从轻度到致命的、各种程度不一的神经综合症（neurologic complication）也是T细胞免疫治疗的不良反应，CD19、BCMA等CAR-T细胞治疗临床实验都出现过这些神经综合症。不过，CD19 CAR-T细胞治疗引起的神经毒性

反应大部分都是可逆的（文后：CAR-T细胞治疗引发的脑水肿）。目前我们还不太清楚这些脑水肿的症状是否也是细胞因子释放综合症的一种极端表现，或者是另外一种机制完全独立的毒性反应。最近发现，内皮损伤（可能与炎症细胞因子有关）与这种神经毒性有关，这也

许能够支持这是一种独立的毒性反应的假设。目前，对于这种T细胞免疫治疗引起的CRS和神经毒性反应的致病机制还不是十分清楚，其中一部分原因是因为在这个研究领域，还缺乏很好的动物模型。

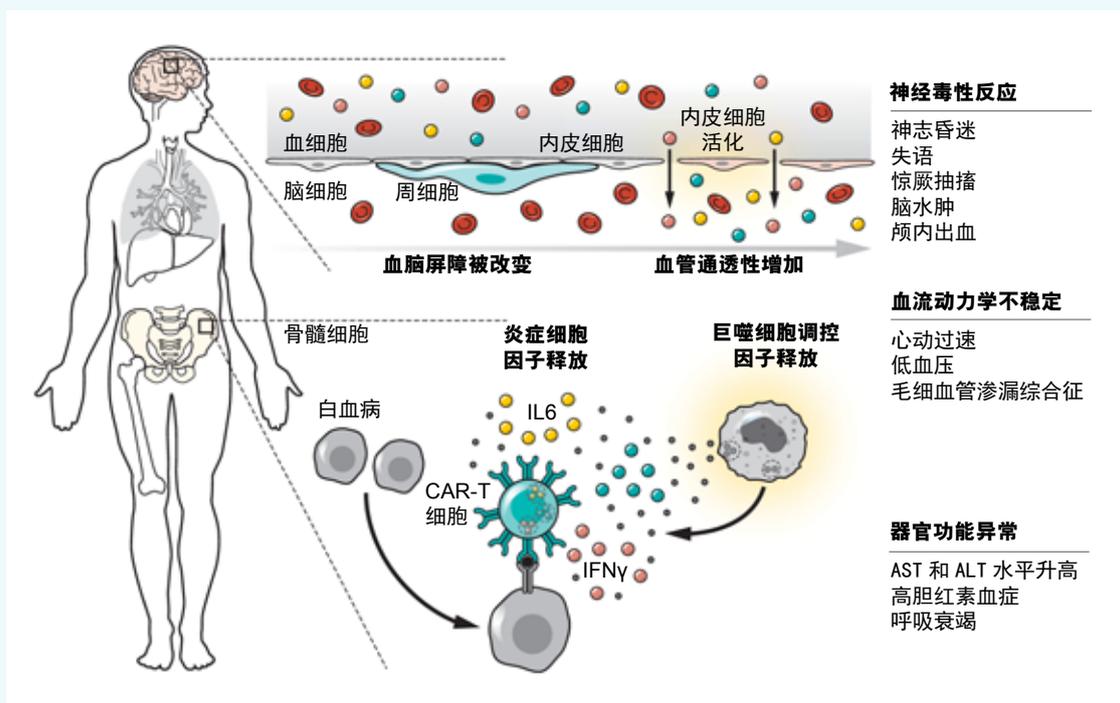
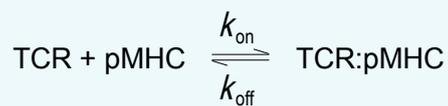


图2 CAR-T细胞治疗存在细胞因子释放综合症及神经毒性等不良反应。CD19和BCMA CAR-T细胞治疗都存在会引起细胞因子释放综合症这个问题。CAR-T细胞与目标抗原结合之后，会释放多种细胞因子和趋化因子。巨噬细胞和其它天然免疫细胞也都会被激活，释放多种可溶性因子。在患者脑脊液中可以发现CAR-T细胞，释放的细胞因子可以提高血脑屏障的通透性，让更多的CAR-T细胞和其它淋巴细胞进入中枢神经系统。

## 利用细胞工程学技术改进T细胞

配体与受体的亲和力大小是影响大部分受体信号通路命运的最基本生理学参数。确定一个TCR与其MHC配体（pMHC）之间的亲和力是难度非常大的一项工作。以下是描述亲和力的最简化的公式：



不过，关于结合平衡常数（ $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ ，其中 $k_{\text{on}}$ 和 $k_{\text{off}}$ 分别是结合及解离速率）以及解离半衰期（ $t_{1/2} = 0.693/k_{\text{off}}$ ），究竟哪一个才是影响TCR信号通路作用最重要的因素，还存在很大的争议。通过表面等离子体共振技术（surface plasmon resonance）对TCR的亲和力进行检测后发现，功能最强大的TCR和pMHC之间的亲和力的 $K_D$ 值介于1~100  $\mu\text{M}$ 之间。TCR的亲和力可能与肿瘤相关睾丸抗原（tumor-associated cancer-testis antigen）的关系最为密切。这种抗原是一种未突变的自身抗原，因此与外来抗原不同，机体免疫系统可能会对这种抗原具有一定程度的自我耐受。

## 通用型CAR-T细胞

虽然ACT治疗方法源自自体骨髓移植（bone marrow transplantation），但ACT使用的却多为自体T细胞，这主要是因为MHC的限制。然而，“通用型CAR-T细胞”却比自

与TCR一样，我们也可以对CAR进行改造，来增强CAR-T细胞与肿瘤抗原的亲和力，以提高其抗肿瘤的能力，同时增强其结合特异性，进而降低毒性。ERBB2/HER2细胞表面受体就与多种上皮细胞恶变疾病有关。增强CAR-T细胞对ERBB2/HER2的亲和力，就可以增强这些T细胞识别ERBB2/HER2低表达正常上皮细胞和ERBB2/HER2高表达肿瘤的能力。不过，要判断多大的亲和力最合适，并不容易。比如，在临床前动物模型研究中就发现，增强CAR-T细胞对GD2的亲和力，的确可以增强抗癌活性，但同时也增强了神经毒性。除了亲和力这个因素之外，还有很多科研人员在研究CAR外功能区（ectodomain）的结构、跨膜结构域（transmembrane domain），以及信号通路等其它因素的影响作用，因为这些因素都会影响CAR的功能。然而，我们现在还没有获得太多非常清晰的结果，对CAR的设计还主要依赖经验。一般情况下，临床前试验的结果也不是特别明确，这也更加增加了人工设计CAR的难度。

体T细胞存在更多优势。健康人提供的通用型CAR-T细胞可以解决很多抗癌治疗中出现的免疫缺陷问题。而且，使用通用型CAR-T细胞还可以让T细胞的改造工作更加简单，甚至可以

制成通用型ACT产品，让更多的患者能够以更低的成本享受到这种最新的医学科研成果。

Torikai等人是第一个报道开发出没有功能的内源性TCR组份的通用型CAR-T细胞的科研团队。他们使用TALEN技术对两名患者进行了实验，证实了通用型CD19特异性的CAR-T细胞治疗的可行性。不过由于只有两名患者接受了实验治疗，所以这种疗法的具体疗效还有待进一步确认。但需要指出的是，有一名患者的所有MHC I类抗原都是不匹配的，结果出现了移植物抗宿主免疫反应，但是研究者认为这是由于细胞污染（纯度不够）导致的，因为移植的细胞中还存在着一些没有被人工改造过的细胞，这些细胞仍然还有内源性TCR，所以才出现了排斥反应。鉴于此，今后还需要进一步提

高细胞的纯度。天然杀伤细胞（natural killer cell, NK cell）识别缺少MHC I类分子细胞的过程可能也限制了CAR-T细胞的作用，尽管已经使用阿伦单抗（Alemtuzumab）引起了明显的免疫抑制作用。有一种办法可以阻止天然杀伤细胞对通用型CAR-T细胞的破坏作用，那就是在细胞上插入HLA-E分子，并删除HLA-A、B、C分子，因为这些分子能够阻止宿主的T细胞杀伤外源性CAR-T细胞。由于CAR-T细胞研究领域的进展非常迅速，这种通用型CAR-T细胞也很有可能得到广泛的应用。究竟它能够成为一种独立的治疗方案，还是能够成为干细胞移植或自体CAR-T细胞移植等现有方案的补充，这最终取决于疗效。

### 基因组编辑及多能CAR

很多技术都可以让DNA在目标位置发生双链断裂，继而对DNA进行人工改造，插入一段序列，或者删除一段序列，但是这样一来，人工改造过的基因往往会变得不稳定。利用同源重组修复机制则可以在特定的位置插入一段外源基因。现在，已经出现了很多基因组编辑工具，比如锌指核酸酶（zinc finger nuclease）、巨核酸酶（meganucleases）、TALEN、归巢核酸内切酶（homing endonuclease）和CRISPR-Cas9核酸酶等。这些新技术都已经成功地应用于T细胞的人工改造工作。现在最大的问题是细菌来源的Cas9蛋白由于存在免疫原性，是否会给改造过的T细胞带来免疫排斥。

人基因组编辑技术也给取消CTLA-4和PD-1等免疫抑制作用，增强T细胞功能，并减轻免疫检查点分子全面抑制带来的副作用提供

了可能。基因编辑技术也被用于清除T细胞上的CAR靶标基因，这样就可以用T细胞免疫疗法来治疗相关的肿瘤。最近，Eyquem等人将一个CAR引入TCR基因位点，这样一来，就可以通过TCR的启动子来调控CAR的表达，从而极大地改善CAR-T细胞的功能。

这种依赖单个抗原的免疫治疗方案很难区分肿瘤组织与健康组织。为了获得更好的肿瘤特异性，可以将多种比较敏感的方法结合起来，比如同时识别两种或更多抗原。在这种治疗策略下，最早的方案就是将CD3 $\zeta$ 和第二代CAR的共刺激信号分成两个独立的嵌合受体，然后再在同一个T细胞上同时表达出来。如图3所示，合成的Notch受体系统也是一种方案，那就是将两个抗原信号通过转录机制而不是信号途径整合在一起。了解CAR表达及抗原感应系统的药代动力学特征非常重要，因为这两个

系统之间的交换就发生在CAR融合之后的几个小时之内，而如果细胞持续表达CAR，就会引起毒性反应。

为了降低ACT治疗引起免疫系统自我活化的风险，研究人员开发了一种“自杀开关”，用来在必要的时候促使人工T细胞死亡。其中最著名的就是促凋亡蛋白caspase-9与FKBP12

结构域的融合产物iCasp9。在rimiducid等小分子二聚体的诱导下，iCasp9的FKBP12结构域会二聚化，迅速促使T细胞凋亡。这种iCasp9自杀开关目前已经使用造血干细胞移植后患者捐献的淋巴细胞进行了试验，结果发现它能很好地清除T细胞，减轻移植物抗宿主免疫反应。

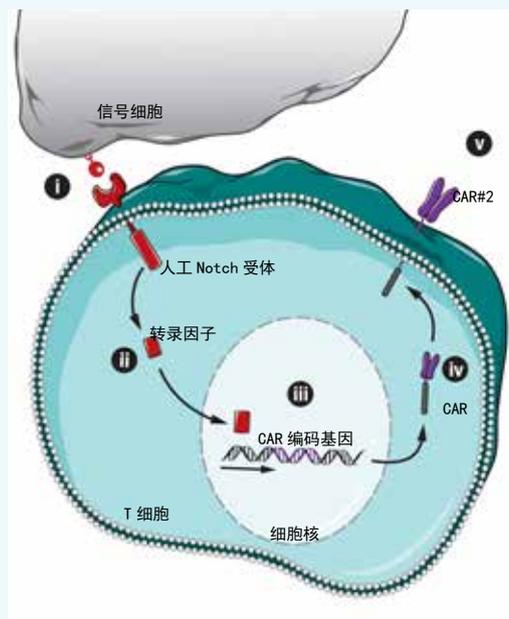


图3 利用Notch人工控制CAR表达。CAR1的胞外配体结合结构域与配体结合之后 (i)，促使含有转录调控因子的人工Notch受体胞内结构域水解，该结构域随即转移至核内 (ii)，调控位于转录因子结合位点下游的CAR 2编码基因的转录 (iii)。转录产物翻译之后 (iv) 转移到细胞表面，成为CAR (v)。通过这种方式，CAR可控表达系统就可以在有两种抗原同时存在的条件下进行表达，从而提高了T细胞的特异性和安全性。

### 商业化的CAR-T细胞产品

免疫抗癌治疗领域是近十年最热门的一个研究领域，期间诞生了无数的传奇。不过，这些治疗方法虽然可以延长患者的生存期，但都不能彻底治愈癌症。目前，与CAR-T细胞有关

的临床试验已经超过了250个。如图4所示，这些临床试验中心的地理分布非常不平衡，几乎都集中在中国和美国，而欧洲、日本和南半球则非常少。这背后的原因非常复杂，与各地对

新技术的投资热情、接纳程度，以及政府的监管政策和社会差异等诸多方面都有关系。

昂贵的治疗费用，并非完美的治疗结果（非治愈），这是CLL、多发性骨髓瘤等造血系统恶性肿瘤患者必须考虑的问题。CLL是美国最常见的白血病，2000年全美大约有10万名CLL患者。随后尽管ibrutinib和idelalisib等新药（虽疗效有改善，但仍然无法治愈疾病）不断出现，美国患者人数还是攀升至20万人左右。这些CLL靶向药物给这些患者和美国经

济都带来了沉重的经济负担。每名患者一生估计将为治疗这种疾病花费60.4万美元，全美到2025年，每年将为CLL付出50亿美元。由此看来，CAR-T细胞疗法与现行的标准疗法相比，应该更具性价比。不过目前这种个人定制式的T细胞治疗还是非常昂贵的，然而未来肯定会越来越便宜。本文不涉及基因修饰细胞定价与公共卫生的内容，但已经有相关的文章出现了。

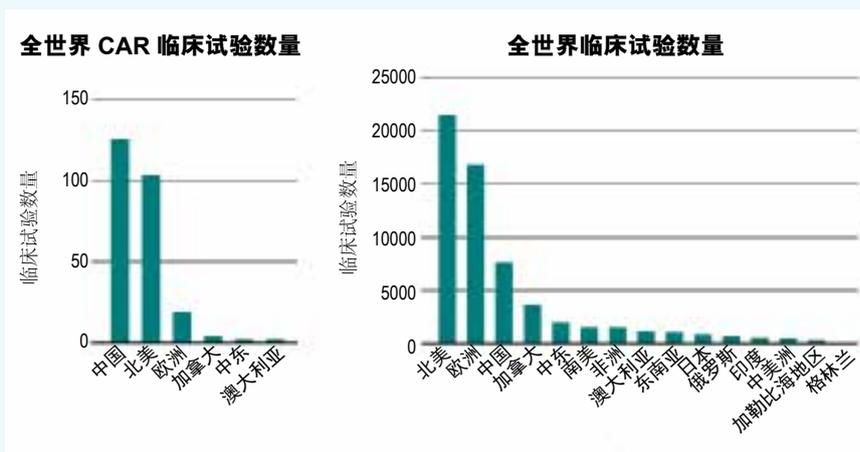


图4 CAR-T细胞临床试验地区的不平衡性。左图，用“嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor）”为关键词检索到的CAR-T细胞临床试验在各国的分布情况。截至2018年1月16日，全世界一共有253个CAR-T临床试验项目，其中中国的项目数最多。右图，所有临床试验项目在世界各国的分布情况。

### 未来的发展机遇及其应用

用CAR-T细胞治疗白血病和淋巴瘤非常有价值。其中最重要的一点可能就是CAR-T细胞治疗是美国第一个获批上市的基因转移疗法（gene transfer therapy）。由于担心发生细胞因子释放综合症和神经毒性等毒副作用，CAR-T细胞也只是有条件的获批，需要进行风

险评估，同时也需要有应急处理措施。FDA还要求相关医务人员接受相应的毒副作用处理培训。开发细胞治疗最大的挑战在于缺乏很好的临床前动物模型，这些模型便于在开展人体临床试验之前，对这些疗法的安全性和疗效进行准确的评估，或者在早期临床试验中观察到安

全性事件之后，进行相关的研究。虽然CAR-T细胞彻底改变了造血系统恶性肿瘤的临床治疗现状，但是如果想要用这种方法来治疗实体瘤，还有很多问题需要解决。不断发展的T细胞改造技术、基因编辑技术和细胞制备技术都

有可能拓宽T细胞疗法的应用范围，让更多的细胞，比如iPS细胞、造血干细胞和NK细胞都加入进来，也可以让这种疗法应用于抗癌治疗的其它领域，比如抗干扰、自身免疫疾病和器官移植等。

### CAR-T细胞治疗引发的脑水肿

CAR-T细胞有一种出乎预料的毒副作用，那就是脑水肿。Brentjens等人开发的CD19 CAR-T细胞产物JCAR015在临床试验中就有5名患者死于脑水肿。Juno公司宣布，他们于2017年3月已经终止了JCAR015的临床开发项目。造成脑水肿的原因主要是中枢神经系统的血管内皮损伤，导致毛细血

管渗漏。机体免疫系统活化也会导致脑水肿。在使用检查点抑制剂类药物治疗之后，肿瘤先肿胀，随后才会缩小。然而CAR-T细胞治疗之后，并没有发现肿瘤肿胀的现象。所以脑水肿的具体原因现在还不清楚，也缺乏合适的动物模型来研究其背后的机制。

# 资讯 · 频道

## www.LifeOmics.com



## 四、微生物组在癌症免疫疗法中的作用：诊断工具和治疗策略

微生物对人体健康与疾病有重要影响。微生物组调控癌症的发生、发展及其对治疗的响应。一方面，一些微生物能调节化学治疗药物的药效；另一方面，上皮屏障与其微生物生态系统之间的共生对局部和远端免疫系统也具有重要影响，并会显著影响癌症患者的临床预后。基于免疫检查点抗体的癌症免疫疗法在使用抗生素的情况下疗效降低，而在存在特定肠道微生物的情况下疗效显著。未来精准医学或许可以依赖新的诊断和治疗工具，用于识别和纠正影响治疗效果的微生物组。

癌细胞通常会表达T淋巴细胞可靶向的肿瘤相关抗原，然而伴随免疫调节分子经常抑制这些功能性免疫应答。最近的研究显示，免疫检查点抑制对癌症患者的预后有显著影响。特别是，阻断抑制性受体PD-1与其主要配体PD-L1结合的单克隆抗体（monoclonal antibodies, mAb）已通过FDA批准，用于治疗10种不同的肿瘤。然而，大多数肿瘤似乎缺乏T细胞浸润，并且指示主动免疫应答的免疫基因表达较低。一些团队正在研究免疫治疗的原发耐药机制。除肿瘤细胞的内在途径外，宿主和环境因素也可能对内源性免疫反应产生重大影响，从而影响癌症免疫治疗的效果。肠道微生物组是外周免疫系统调节的一个重要因素，

在癌症背景下也同样如此。哺乳动物微生物组代表所有与宿主相关的微生物，这是一种复杂多样的生态系统，定居在体内内皮屏障上。微生物组包括细菌微生物组、古细菌微生物组、病毒组（噬菌体和真核病毒）、真菌和小型动物（单细胞原生动物和蠕虫），并在出生后通过垂直传播获得，然后一生受环境暴露调控。肠道微生物组的紊乱（有时被称为“肠道生态失调症”（intestinal dysbiosis），在流行病学上（有时有因果关系）与各种慢性炎症疾病相关。本文将讨论细菌微生物组对癌症和免疫系统之间相互作用的影响，以及直接操纵肠道微生物群在提高癌症免疫疗法疗效上的潜力。

### 早期探索：微生物组在癌症中的作用

直到最近，人们才比较清楚肠道微生物群在调节健康和疾病方面的主要作用（图1）。

人体肠道微生物组含有约 $3 \times 10^{13}$ 个细菌，其中大多数是共生细菌。从个体出生开始，肠道

微生物群在先天和后天免疫中都扮演着关键角色：它可以微妙地调节炎症、感染以及食物和共生抗原的耐受性之间的微妙平衡。事实上，肠道微生物对人体的影响是全身性的，并不局限于肠道和局部免疫生理学。举个例子，与自由生活的野生动物相比，在无特定病原体（specific pathogen-free, SPF）条件下饲养的实验室小鼠中缺少一些关键的、促进健康的性状。将野生小鼠的肠道微生物组转移到实验室小鼠体内，可以诱导持久的免疫调节作用（这种作用可以维持数代），具体包括改善病毒感染、诱变和炎症诱导致癌的疾病预后。

研究人员已经发现，微生物组与上皮屏障和无菌组织内各种类型癌症的发生和发展有

关。定居在肠道或其它粘膜中的微生物在局部和远端的癌症发生中都起到了作用。微生物可通过提供有毒代谢物或致癌产物直接引发癌症，还可通过诱导炎症或免疫抑制间接促进癌症发生。此外，将缺乏一些免疫相关基因（例如Tbx21、Nod2、Nlrp6或Tlr5）的小鼠粪便移植到野生小鼠中，可以引发肿瘤易发表型。相比之下，越来越多证据显示，细菌可以通过增强宿主抗肿瘤免疫响应，在对抗距离肠道较远的肿瘤中发挥积极作用。流行病学研究表明，抗生素的使用与癌症风险之间存在剂量依赖关系，且啮齿类动物实验也支持了这一结论。总之，这些研究为识别具有抗癌能力的微生物奠定了理论框架。

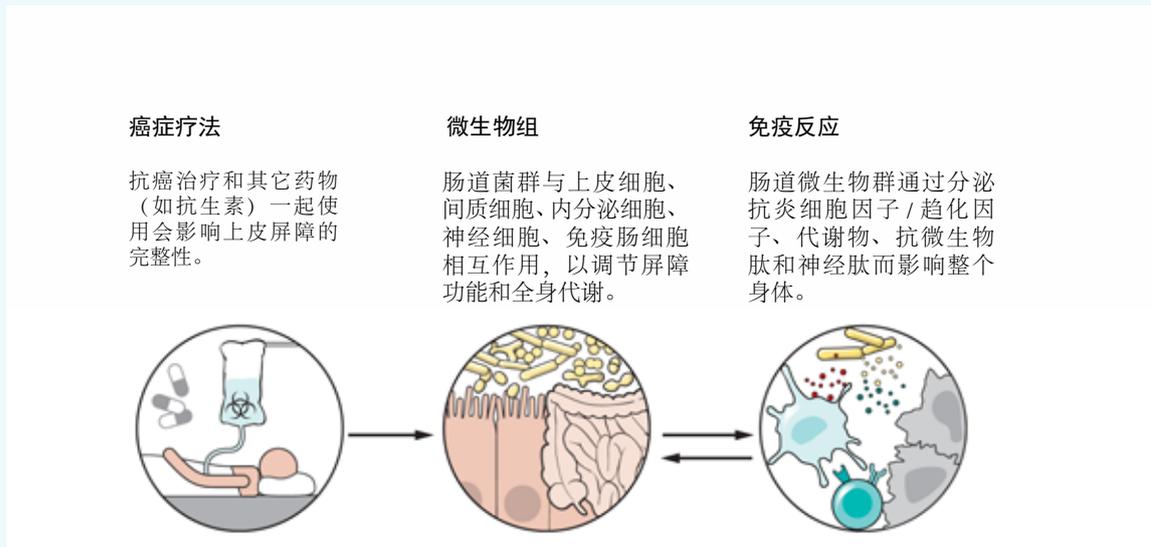


图1 微生物组在癌症的生理学和病理学中的作用。肠道微生物在先天和后天免疫的终身编程中起着至关重要的作用，因为它可以微调炎症、感染以及食物和共生抗原的耐受性之间的微妙平衡。在癌症发展和治疗中，可以利用几种治疗性策略来恢复肠道的稳态和微生物组的平衡。

## 肠道微生物组与免疫-肿瘤学

一项对全身辐射的研究最早提示了微生物组的免疫治疗效果。在该研究中，研究人员将细菌产物Toll样受体4L (TLR4L) 脂多糖从肠腔转移到次级淋巴器官，增强了肿瘤特异性T细胞移植的疗效。不久之后，研究人员发现，在无菌、接受广谱抗生素治疗以及缺乏几种能增强免疫效果的细菌的小鼠中，几种癌症疗法的疗效都较差。这些治疗方式包括：节律性环磷酰胺、铂盐化疗、TLR9拮抗剂和白细胞介素-10R抗体 (IL-10R) 联合免疫治疗，CTLA-4单抗和/或PD-1/PD-L1单抗治疗。在各种情况下，当肠道微生物群不存在或被操纵时，治疗效果显著下降。微生物组对抗癌免疫应答的调控机制可能因治疗方式的不同而不同。例如，环磷酰胺能提高上胃肠道的通透性，导致小肠中的肠球菌转移到脾脏，同时也使结肠中的肠结巴斯德氏菌 (*Barnesiella intestinihominis*) 增加。这些细菌共同作用，调控抗肿瘤免疫响应。CTLA-4被阻断后，上皮内淋巴细胞会损伤回肠上皮细胞，诱导脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 和伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderiales spp.*) 积累，并激活产生IL-12的树突状细胞 (dendritic cells, DC) 和T辅助细胞1 (T helper 1,  $T_H1$ ) 的免疫应答。PD-1/PD-L1阻断的治疗效果与双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的存在相关，后者可激活抗原呈递细胞。IL-10R抗体+TLR9激动剂CpG的免疫作用与肿瘤微环境中髓样细胞的活化和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的分泌有关。这些例子中肠道菌群与抗癌疗法的效果之间的因果关系已通过小鼠共居或口服特定微生物 (两种操控小鼠体内微生物的方式) 实验证明。

几项针对转移性肺癌、肾癌和膀胱癌患者的独立性回顾分析也发现，在开始PD1/PDL-1单抗治疗的初期，使用不同类别的抗生素能显著减弱疗效。这些分析涉及的患者均接受了FDA批准的二线治疗。这一发现需要未来的前瞻性临床试验来证实，并在其它治疗背景 (例如，一线与二线免疫疗法和其它癌症类型) 中进行验证。在血液系统恶性肿瘤中，肠道细菌还会影响异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, ASCT) 后感染和移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 的风险。在ASCT早期施用全身性广谱抗生素与GVHD增加和移植相关死亡率增加相关，可能的原因是杀死了肠道微生物群中的保护性梭菌 (*Clostridiales*) 和布劳特氏菌属 (*Blautia*)。

也许最能证明肠道微生物群在癌症免疫疗法临床疗效中的重要性的证据来自接受PD-1抗体治疗的患者粪便样本测序。测序技术的最新进展提高了我们基于微生物的组成来对患者进行分层的能力。对患者粪便样品进行的基于16S rRNA的基因扩增子测序和鸟枪DNA测序显示，对PD-1抗体有响应的患者粪便中微生物种类更丰富。在一些情况下，粪便细菌组成的 $\alpha$ 多样性或丰富度的降低与较差的患者存活率相关。应该强调的是，不同研究 (包括患者遗传背景和营养模式的不同)、不同临床试验开展的地点，以及不同的肿瘤类型 (如肺癌、肾细胞癌和黑色素瘤) 之间都存在差异。对PD-1单抗治疗有响应的患者体内含有更多通常与健康 (如 (梭菌目) *Clostridiales*、*Ruminococcaceae*、*Faecalibacterium spp.*、

*Akkermansia muciniphila*、（拟杆菌）*B. fragilis*和（双歧杆菌）*Bifidobacteria*）或免疫原性（肠球菌（*Enterococci*、*Collinsella*）和 *Alistipes*）有关的细菌。另一项针对541名血液系统恶性肿瘤患者的研究报告指出，诊断时肠道微生物组与ASCT后2年内肿瘤复发的可能性相关。在这种情况下，高丰度的粘液真杆菌（*Eubacterium limosum*），具有积极的预后影响。

研究人员通过将患者粪便样品转移到无菌（germ-free, GF）或接受抗生素治疗的SPF小鼠中，然后接种同系肿瘤，接着采用CTLA-4和/或PD-1/PD-L1单抗治疗，最后证实了微生物组对免疫治疗效果的影响。需要注意的是，通过粪便微生物移植（fecal microbial transplantation, FMT）技术，将对免疫检查点阻断有响应的患者（“有响应”）的粪便转移到受体小鼠时，小鼠有响应；当供体为“无响应”时，小鼠也无响应。这些结果突出显示受体小鼠的“响应”/“无响应”状态取决于FMT供体微生物组的组成。目前，研究人员鉴定出了几种能改善肿瘤免疫反应的细菌物种。例如，影响ipilimumab对黑色素瘤治疗效果的主要细菌是拟杆菌属物种（*Bacteroides*），影响PD-1抑制剂nivolumab或pembrolizumab对黑色素瘤和肺癌疗效的细菌分别是*Faecalibacterium*和*Verrucomicrobiaceae*（更具体地说，是*A. Muciniphila*菌）。

增强疗效的同时降低毒副作用一直是临床肿瘤学的关注焦点。有证据表明，*Blautia*和*E. Limosum*菌含量高的微生物组（避免使用抗生素杀死厌氧菌）能减少GVHD，增强移植物抗白血病的作用，并显著延长ACST手术后病人的生存期。在用检查点抑制剂ipilimumab（CTLA-4抗体）治疗的转移性黑色素瘤患者中，*Bacteroidetes*的丰度与结肠炎的严重程度负相关。同样地，通过管饲法给小鼠补*B. fragilis*和洋葱伯克霍尔德菌（*Burkholderia cepacia*），能降低CTLA-4单抗诱导的结肠炎的严重程度。

其实不单在免疫治疗领域，在其它领域，人们也越来越意识到抗癌药物的微生物代谢可能会促进肿瘤的化学抗性。例如，据报道，大多数胰腺癌中含有高密度的 $\gamma$ -变形菌（*Gammaproteobacteria*）。这些细菌表达长胞苷胞苷脱氨酶（cytidine deaminase），一种使gemcitabine失活的酶。具核梭杆菌（*Fusobacterium nucleatum*）含量较高的结肠直肠癌患者也表现出更差的预后，部分原因是细菌通过诱导名为自噬的细胞防御机制，从而对奥沙利铂和5-氟尿嘧啶的抗性产生抵抗。总之，这些观察结果显示，肠道微生物组的组成——以及具有特定功能的细菌种类——对癌症进化，以及对免疫疗法或化疗的响应有重大影响。

### 微生物组的免疫刺激：作用机制

确定微生物的作用方式可能对其在癌症治疗中的有益作用至关重要。从理论上讲，肠道菌群可以通过多种方式激活抗癌免疫

反应。所假设的机制是（i）通过刺激T细胞对微生物抗原的反应，要么直接影响肿瘤特异性免疫反应，要么与肿瘤特异性抗原交叉反应；

(ii) 通过与介导促免疫或抗炎作用的模式识别受体互动；(iii) 通过产生小代谢物，对宿主的全身性免疫进行调节。

来自细菌的肽或脂质结构可以激活一系列不同的T细胞受体，从而导致某些类型的T细胞扩增，并进入循环系统。最近的数据表明，研究人员已在小鼠模型的肿瘤微环境中发现细菌表位特异性T细胞，这可能是由于肿瘤细胞可以产生高水平的趋化因子，从而募集正常的肠道归巢CCR9<sup>+</sup> T细胞。原则上，这种T细胞可以产生细胞因子或表达CD40L，从而为肿瘤抗原特异性CD8<sup>+</sup> T细胞提供帮助。或者，它们可以识别由正常细胞或癌细胞表达的交叉反应抗原。微生物的这种分子模拟被认为是自身免疫疾病发生、发展的一个促进因素。然而，到目前为止，只有少数几项研究指出，这种交叉反应可能是微生物组与肿瘤相关抗原响应之间具有病因学联系的基础。

就对模式识别受体的影响而言，当树突状细胞暴露于与抗癌特性相关的微生物（例如 *B. fragilis* 或 *A. muciniphila*）环境时，会引发全身性的、依赖于IL-12的T<sub>H</sub>1/Tc1免疫应答，从而促进CTLA-4或PD-1/PD-L1抗体的抗肿瘤效果。在 *Bifidobacteria* 存在的情况下，次级淋巴器官的抗原呈递细胞中I型干扰素（IFN I）相关的免疫基因表达上调。研究显示，对于 *E. Hirae*、*B. fragilis* 和 *A. Muciniphila* 而言，TLR或Nod样受体（Nod-like receptor, NLR）的配体可能介导这些细菌发挥作用。实际上，在TLR9激动剂与IL-10R阻断剂联用治疗肿瘤时，*Alistipes shahii* 以TLR4依赖性的方式刺激肿瘤相关骨髓细胞产生TNF $\alpha$ 。然而，在环磷

酰胺或CTLA-4阻断剂治疗肿瘤的情况下，微生物对抗癌记忆T<sub>H</sub>1/Tc1细胞应答的刺激仅部分依赖于TLR2 / TLR4。目前尚不清楚的是，DC细胞前体是在肠粘膜附近接触到细菌衍生产物，然后进入肿瘤并引流淋巴结，还是接触到循环系统中的肠道细菌代谢物，从而能够远端调控宿主的DC细胞。另一方面，由细菌产生的伤害性神经肽也可能影响宿主，它既可以激活感觉神经元，又可以在肠道中激活免疫调节性T细胞亚群。这些发现表明，肠神经系统可能构成局部（也可能是全身）免疫调节的另一个靶标。

肠道微生物组对宿主代谢，包括免疫代谢具有重要影响。肠道中产生的多胺——如亚精胺和维生素B6——可以刺激身体远处的自噬，在化疗时引发抗癌免疫反应。来源于微生物的多胺也与CTLA-4抗体治疗黑色素瘤的毒性降低有关。由肠细菌产生的短链脂肪酸被多种细胞类型感知，包括表达G蛋白偶联受体GPR41或GPR43的DC和调节性T细胞。据报道，来自酪酸梭状芽孢杆菌（*Clostridium orbiscindens*）的代谢物去氨基酪氨酸（desaminotyrosine, DAT）通过IFN I信号传导，减轻流感病毒对肺部的影响。细菌衍生的二肽醛介导组织蛋白酶L的抑制过程，帮助肠道细菌进入溶酶体，并干扰上皮细胞或免疫细胞的抗原呈递。以上这些和其它尚待发现的细菌代谢物可能会对宿主免疫系统产生深远的影响。新型癌症诊断工具和治疗策略的开发需要采用新型“组学”技术进行微生物组、微生物代谢和免疫循环分析，并采用系统生物学方法进行后续整合（图2）。

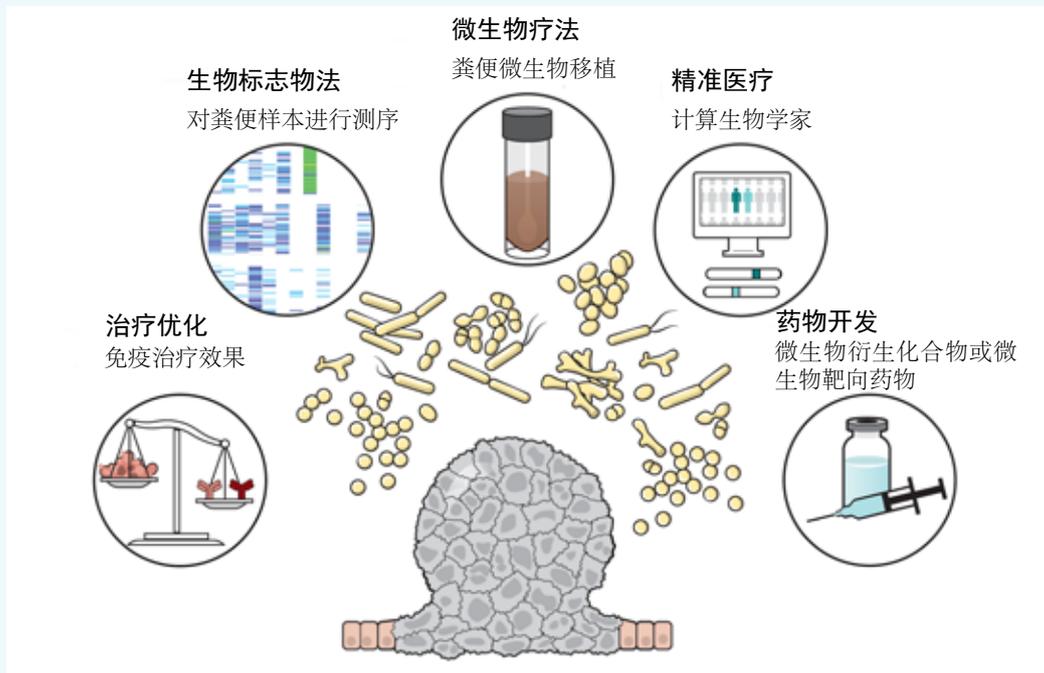


图2 利用微生物组发现癌症的诊断和治疗工具。癌症、免疫和微生物群之间复杂的相互作用可以通过新的“组学”技术，包括宏基因组学、元转录组学、培养组学、代谢组学、共现分析以及与衍生自三维隐窝干细胞的肠状细胞接触的微生物和免疫细胞类型分析来阐明，所有的信息都通过计算生物学整合在一起。联用这些组学技术将有助于开发用于生态失调和药物筛选的诊断工具，并进一步推动新的治疗策略，例如人工肠道菌群或新的微生物物种，以及作用于微生物群以诱导有益细菌组分的生物活性物质的技术开发。作为癌症治疗剂的微生物干预包括益生元、益生菌或活细菌（以及相关噬菌体）和天然产物（自体或同种异体粪便微生物移植）。这些干预措施必须根据患者的生活方式、合并症、药物使用情况和基因背景进行调整，个性化地给予治疗。在开创性研究的基础上，我们可能可以发现新的来自粪便微生物的生物标志物。在针对肠道生态系统的新干预研究中，纵向监测微生物组也是药代动力学和药效动力学的必需参数。

### 微生物干预

如果患者体内缺乏能增强T细胞对肿瘤抗原敏感性的细菌，那么医生可以考虑给其移植健康供体的粪便微生物。众所周知，FMT

在治疗难治性梭状芽胞杆菌（*Clostridium difficile*）腹泻上效果惊人，响应率达到81%。但是，使用FMT时，需要考虑多个关键参数，

其中最重要的是理想供体的选择。原则上，组成供体肠道菌群的细菌应该非常丰富，包括与有利治疗结果相关的细菌。部分学者认为可以采用来自对PD-1单抗反应良好的患者的粪便。但是，采用这一策略需要慎重。除了调节免疫反应外，肠道菌群的组成还与慢性疾病有关。理论上，将肥胖者的粪便微生物移植给受体，受体也可能因此发生肥胖。病原体的转移也是潜在的问题——粪便微生物中也包括细菌、病毒或寄生虫——需要仔细筛选。此外，一些细菌似乎具有促进炎症诱导的致癌作用。若将结肠癌患者的粪便微生物移植到无菌小鼠体内，那么便会引发育不良和息肉形成，而正常供体的FMT则不会引发这些问题。其它需要考虑的因素还包括使用新鲜的还是冷冻的供体粪便材料，确定最佳储存条件，以及单次FMT是否足够，是否需要多次FMT等。

FMT的一个理想替代方案是单独或组合使用特定的细菌。该策略取决于这些因素：促进具有抗肿瘤免疫反应的微生物的分离和鉴定、细菌的体外扩增和培养，以及口服给药时保持生物活性的封装方案。目前的16S rRNA和鸟枪测序策略可能优先检测与有利的临床结果相关的、含量最高的细菌。然而，与有利的临床结果相关、但含量相对低的细菌可能在功能上更重要。因此，稀有细菌（其中一些可能存在于小肠中，而且在粪便样本中不太丰富）的培养、分离和测试也需要仔细思考。此外，肠道微生物的免疫增强作用可能由多种细菌组合的、而非单一类型的细菌诱导。例如，对万古霉素产生耐受的 *Enterococci faecium*（由5种细菌组成的细菌组合）被证实能在体内共同发挥作用，产生积极的临床结果。因为通过测序鉴定的细菌中只有很小一部分可以用标准方法培养，所以改进培养方案将成为推进该策略的关键步骤（背景阅读1）。需要指出的是，我们要非常小心地使用具有所需生物学特性的细菌分离物，这将需要将特定菌属降低到危

险水平以下。体外培养的*Bifidobacterium*和*E. Hiraе*在基因组测序上有显著差别，而且并非所有菌株在体内都是有效的。一旦鉴定出特定的候选细菌，那么最后的挑战将是使用临床前系统进行功能筛选。目前研究人员已经使用了几种小鼠模型，包括具有确定的共生细菌组合物或用抗生素预处理的SPF小鼠，以及无菌小鼠来进行体内测试。迄今为止，*Bifidobacteria spp.*、*Akkermansia muciniphilia*、*E. hiraе*和*Bacteroides*已被证明可以改善抗肿瘤T细胞的响应，并有助于更好地控制体内的肿瘤。虽然小鼠体内可能并不能定植所有人类消化道中居住的细菌——因此小鼠模型并不完善——但是在治疗的早期阶段，关注那些在人和小鼠体内都能成功繁殖的细菌可能就足够了。

区分PD-1阻断剂有应答者和无应答者的一大惊人发现是有利细菌和有害细菌的比例存在差别。因此，我们有理由猜测，某些细菌对免疫治疗的疗效具有负面影响。开发消除不利细菌，并增强免疫响应的策略非常重要。鉴于标准的抗菌抗生素可能缺乏特异性，并且存在风险，因此更精准地杀死某些细菌的治疗策略更值得研究。需要注意的是，噬菌体对于给定的细菌种类具有高度选择性，并且已经在食品工业中用于消除不利的细菌。促进特定细菌的定殖和扩增的膳食或化学配方统称为益生元。原则上，益生元应该有利于特定细菌实体的相对扩增，这可能对抗肿瘤免疫力产生有利影响。科学家对膳食纤维进行了大量研究后发现，膳食纤维的成分被代谢成具有免疫调节特性的短链脂肪酸。然而，益生元只能促进已经存在于宿主体内或自然摄入的细菌类型。因此，控制患者间异质性和实验变量是益生元药理学开发的一大挑战。益生元与特定细菌的组合施用（称为“合生元”）作为综合方法可能是极具吸引力的。目前有临床试验正在测试通过饮食干预来调节宿主微生物群对GVHD的影响（ClinicalTrials.gov, NCT02763033）。除

除了饮食干预外，其它因素如运动、药物使用和睡眠周期都可能调节肠道微生物成分。因此，至少应在临床试验数据库中跟踪这些参数，并

评估与检查点抑制剂和其它免疫疗法的疗效之间的相关性。

### 未来的挑战和监管注意事项

把微生物摄取列为药物会引发一个问题。目前美国的商业性益生菌可以在药店买到，然而它们仅被视为食品/膳食补充剂，而不是药品。如果益生菌的目的是治疗，例如用于癌症免疫疗法，那么根据FDA的指南，必须针对微生物摄取提交研究性新药申请等报告材料。一般指南包括明确鉴定益生菌菌株的菌属和菌种（基因组测序、效力和机制研究、具有功效终点的人临床试验、人类安全性和不良事件评估）和潜在的传染风险。后者因鲍氏酵母菌（*Saccharomyces boulardii*）的研究而变得

尤其重要：*Saccharomyces boulardii*已被作为益生菌销售，并且还可用于*C. difficile*的潜在治疗。目前已发现多例传播性感染与该益生菌明显相关，特别是在免疫抑制的个体中。将微生物干预作为肿瘤治疗策略需要克服的一个关键问题是开发快速且成本较低的、用于诊断肠道生态失调的，以及了解每种癌症在接受益生菌补充前后生物效应和作用机制的方法。解决这些问题的方法是开发一种可重复的、调控肠道微生态系统的方法，以优化精准医学，并提高患者的生存率。

#### 背景阅读1

##### 培养组学方法发现新的生物治疗药物

癌症相关肠道微生态失调是一个巨大的、尚未被满足的临床需求。到目前为止，鉴定微生物的技术基本都是基于宏基因组研究。宏基因组学有一些局限性，这些局限性主要与DNA提取方法、扩增步骤和大数据计算机化分析有关。在粪便中生长的细菌中只有15%可被宏基因组学检测到。由于无法鉴定那些无法培养的细菌，科学家错过了很多具有重要价值的细菌种类。事实上，用宏基因组学分析出的粪便中的微生物在排便时就已经是死亡状态了。聚合酶链反应难以检测上消化道的细菌，但代谢和免疫功能主要受这些细菌调控。使用包含小型化装置的采样胶囊自动取样小肠内容物和粘膜样本可以克服这些问题。2008年，科学家通过多种培养

基的组合，单用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight, MALDI-TOF），或与16S rRNA测序联用，快速鉴定了细菌，开发了培养学技术，即粘膜中所有微生物的培养技术。目前，科学家已成功开发了可让厌氧细菌、产气氧敏感古菌或缓慢生长的细菌形成微菌落的新培养基，从而鉴定出了400多种新的肠道细菌。为了使微生物组“可药用”，我们需要开发良好的制造工艺，并使用化学成分确定的培养基来培养微生物，而不需要来自动物的天然产物。最后，冷冻干燥后仍能保持活力的微生物冷冻干燥法对于微生物的药用也至关重要。

## 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](mailto:editor@lifeomics.com)

## 五、观点荟萃

### 1. 癌症免疫疗法的临床实验并非越多越好

癌症专家认为，现在的免疫治疗临床试验实在太多了。

免疫疗法浪潮席卷了整个癌症领域，随之而来的一个问题是：是否有太多的临床试验都在测试这种通过激活人体自身免疫来杀伤肿瘤的疗法？最近的一项调查发现，有1100多项研究正在测试一类名为免疫检查点抑制剂的药物（该类药物通过抑制免疫系统的天然“刹车”起作用）与其它药物联用的效果。此类试验自2014年开始流行，当年一年就大约开展了100项临床实验。

一些学术研究人员、制药公司高管和其他癌症专家纷纷谴责这种临床试验扎堆的现象，他们认为这是由利益驱动而非科学驱动的实验，所以最终可能适得其反。他们担心，由于缺乏受试者，许多试验可能无法完成。正如FDA肿瘤学卓越中心（Oncology Center of Excellence）主任Richard Pazdur警告的那样，即使这些试验能够完成招募受试者的目标，但是许多试验互相重叠，浪费了本可用于其它新药的资源。

耶鲁大学（Yale University）肺癌研究员Roy Herbst指出，我们应该更聪明地设计此类试验。

一个有影响力的患者权益组织虽然渴望将临床前研究转化为治疗方法，但也为免疫治疗药物联用试验数量的激增而感到担忧。华盛顿癌症研究之友（Friends of Cancer Research，一个患者权益组织）的主席Ellen Sigal表示，更多的药物选择固然令人开心，但我们有些担心要花很长的时间去找到足够的受试者，并得出最终结论。

然而，一些癌症研究人员认为竞争是健康的一一最好的研究和药物组合将占上风。新泽西州普林斯顿Bristol-Myers Squibb（BMS）公司肿瘤学早期临床开发部主管David Feltquate认为，对他而言，越来越多的试验并不令人意外。BMS公司目前有两种检查点抑制剂药物在售，并正在开发其它免疫治疗药物。加州大学（University of California）洛杉矶分校黑素瘤免疫治疗研究员Antoni Ribas不太同意普遍的观点，认为不需要因为免疫治疗药物临床试验太多而担心。他指出，我们正处在一个肿瘤药物开发的黄金时代。现在的免疫治疗药物临床试验数目是正常的，不需要担心。



图1 在得克萨斯州休斯敦的MD Anderson癌症中心（MD Anderson Cancer Center）进行的一项试验中，膀胱癌患者David Wight服用了两种被称为检查点抑制剂的免疫治疗药物。

鉴于免疫检查点抑制剂能阻断不但能使癌症躲避免疫系统T细胞攻击的细胞表面蛋白，有时还会产生惊人的疗效，因此成了热门药物。在转移性肿瘤患者中，这些药物可以消除存在多年的肿瘤。自2011年以来，6种检查点抑制剂已被批准用于黑色素瘤、肺癌和一些其它癌症——所有这些都针对免疫细胞上的CTLA-4、免疫细胞上的PD-1和癌细胞上的PD-1结合位点，即PD-L1蛋白。但只有约20%的患者对这些药物有反应，现在各大药企都在尝试将它们与其它药物联用，看看能否提高反应率。

检查点抑制剂具有巨大的商业潜力——Merck公司和BMS出售的PD-1抑制剂的一

年疗程花费大约15万美元，这推动了相关临床试验的空前激增。根据纽约市癌症研究所（Cancer Research Institute, CRI，一家非营利性机构）在2017年12月发表在《肿瘤学年报》（*Annals of Oncology*）上的报告，至少有1105项联合研究正在测试靶向PD-1或PD-L1的药物，而免疫治疗临床试验总共才有3042个。仅在过去3年开始的PD-1 / PD-L1抑制剂联合试验就需要招募13.8万名患者受试者，其中2017年发起的相关试验需要招募52539名受试者。

Feltquate表示，BMS在全球范围内针对在售的两种检查点抑制剂进行了约225项试验，目前尚未注意到患者招募的滞后性，招募

受试者的速度比之前快了很多。

事实上，几乎没有检查点抑制剂试验受到了竞争影响，部分原因是美国数据库ClinicalTrials.gov不包括患者招募数据。但通过检查美国国家癌症研究所（National Cancer Institute, NCI）的试验数据库，《科学》（*Science*）杂志发现了一些在计划时间范围内招募受试者时可能遇到麻烦的例子。（NCI资助的试验有时比公司主导的试验更难招募志愿者，因为公司能付给参与机构更多的报酬，并可以从全球招募受试者。）

然而，这些试验的主要研究者表示不担心患者招募。例如，波士顿丹娜法伯癌症研究院（Dana-Farber Cancer Institute）的Jonathan Schoenfeld指出，他的一项使用检查点抑制剂和放疗联用的试验最初由于竞争性试验招募患者有点困难，但随后很快就招到了患者。

一个大型癌症研究中心的NCI试验负责人确实将招募患者进展缓慢归因于竞争，但要求不透露具体试验细节，因为试验计划有更新。该试验将测试一种针对某些癌症患者细胞中有特定缺陷的药物与检查点抑制剂联用的效果。研究人员将广泛分析肿瘤活检，以确定添加的药物是否有助于T细胞识别癌细胞。

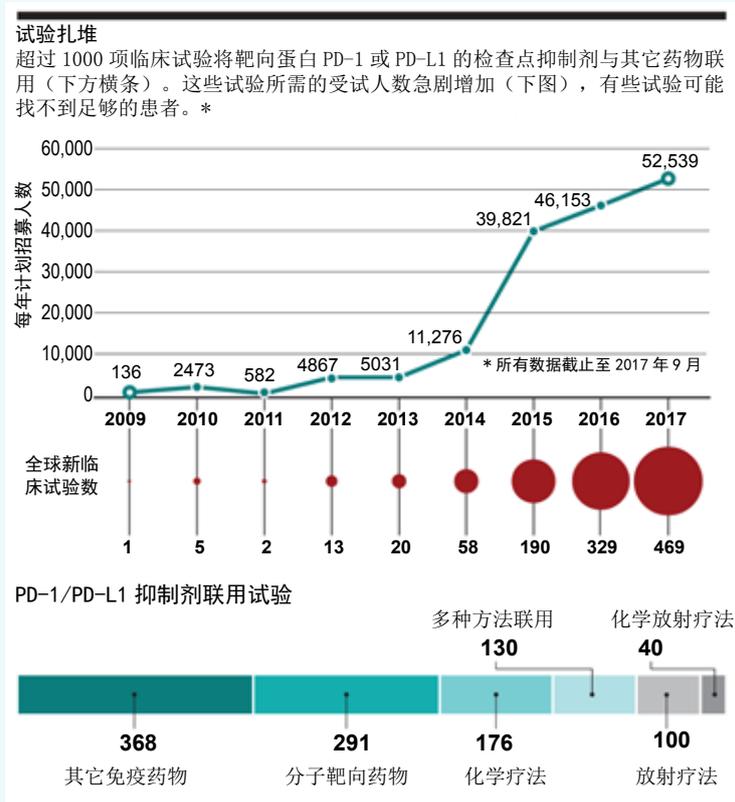
但是开始16个月后，该试验只招募到了8名患者，远低于预计的每月招募4人的速

度。负责监督该试验的NCI癌症治疗评估项目（Cancer Therapy Evaluation Program）的高级研究员Elad Sharon认为是其他针对同一罕见癌症的试验抢走了受试者。Sharon认为，这有点令人沮丧。一个设计得更好的试验反而被设计不太好的试验给耽误了。NCI计划进行调整以提高受试者招募率，并完成试验。

美国临床肿瘤学会（American Society of Clinical Oncology）首席医疗官Richard Schilsky指出，在最坏的情况下，患者招募滞后的现象可能会迫使研究者取消试验。如果试验没有完成，那么对于愿意作为研究对象参与的患者，他们确实存在着道德上的责任。

Schoenfeld指出，急于测试联合疗法可能也会严重影响疗效。作为一种节约成本的措施，许多试验不包含对照组。Genentech公司癌症免疫学副总裁Ira Mellman表示，很多试验是在缺乏假说，或缺乏能说明机制原理的动物数据的情况下开展的。许多人似乎只是因为可能有效或刚好手里有药就开展了试验。

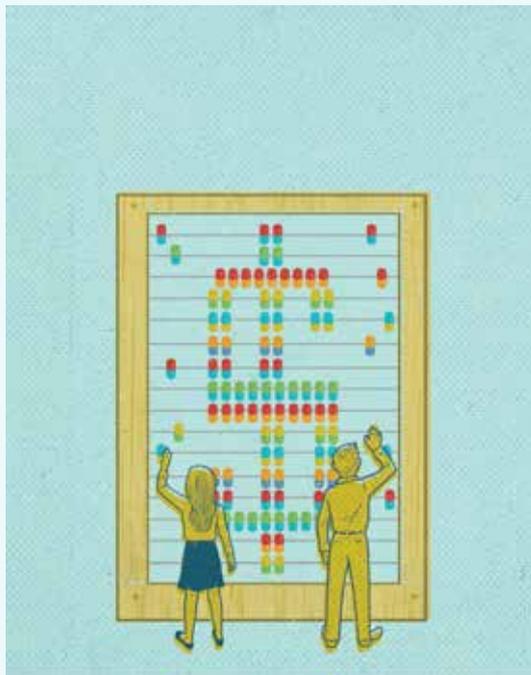
即使那些对试验扎堆感到担忧的人们也承认，遏制这种现象有点困难。只要临床试验通过某些标准，FDA就无权不批准。Schilsky强调，只要能够获得资金，并通过FDA批准，每个人都可以进行他们想做的研究……这不是没有监管的问题。



一些人认为，解决该问题的第一步是促进更好的合作。像CRI、帕克癌症免疫治疗研究所（Parker Institute for Cancer Immunotherapy，由亿万科技富翁Sean Parker创建）、NCI、癌症研究之友和FDA之类的组织都在鼓励公司共享他们的药物，开展多中心、包含多个治疗组和一个对照组的创新型临床试验。Sigal认为，我们不能反复做单治疗组试验。这将花费大量时间，并折磨病人群体。

由前副总统Joe Biden发起的、NCI负责管理的癌症射月计划（Cancer Moonshot）开展了的项目，以期在癌症预防、诊断和治疗方面加快进度，5年内取得10年的进步。他们联合学术界和11家公司，一起寻找生物标记，揭示为何一些患者比其他患者对免疫疗法的反应更好。Herbst指出，毫无疑问，如果大家以合作前竞争的方式开展研究，那么就能更专注。现在已经初露苗头，我们需要的只是促进合作。

## 2. 医生Peter Bach：癌症治疗成本太高



在访谈中，一位资深医生就癌症治疗成本发表了看法。

Peter Bach医生对美国癌症治疗价格的高涨感到震惊，他认为新的免疫疗法将进一步推高癌症治疗的价格。用于各种实体肿瘤的检查点抑制剂每年耗费约15万美元，而名为嵌合抗原受体-T细胞疗法（chimeric antigen receptor-T cell therapy, CART）的个性化治疗花费则最高，达到47.5万美元。这种现状，让各大公司都能分一杯羹，纷纷涌入肿瘤药物领域，目前正处于临床试验阶的免疫疗法就有数十种。1995年，每延长一年寿命所需的癌症药物费用仅为5.4万美元，时至今日，这个费用已涨至25万美元。

对此，就职于纽约市纪念斯隆凯特琳癌症中心（Memorial Sloan Kettering Cancer Center）的Batch指出，癌症治疗费用高涨，其实是药企追逐财富的后果，这并不会推动科学发展。过去十年，他一直在思考健康政策和经济学原理，试图解读和公开这些高价格背后的原因。具体的细节可能看起来很滑稽。然

而，最终，原因只能归结为癌症护理中一个越来越受欢迎的流行词汇：价值。衡量药物对患者有益的最佳指标是什么？社会愿意为延长一个月或一年的寿命支付多少费用？对此目前并没有公认的标准。如果一种药物有严重的副作用，那么其人均价值是否下降？如果某一药物是唯一针对特定类型癌症的疗法，它价格会不会因此大幅上升？Batch等人创建了一个名为DrugAbacus的在线工具，以帮助公众和决策者考虑这些问题（<https://drugpricinglab.org/tools/drug-abacus/>）。

在个人层面上，Batch对延长生命的价值深有体会。2012年，他46岁的妻子Ruth死于乳腺癌，留下了Batch和儿子相依为命。他表示，尽管Ruth得到了最好的照顾，但Batch认识到，对于其他许多人来说，最尖端的癌症治疗越来越遥不可及。《科学》（*Science*）上个月访谈了Batch。下面是访谈的主要内容。

**Q: 您是一位肺部和重症监护医生，那您为何转而研究药物定价？**

**A:** 我认为，我应该致力于从多个角度解决健康问题。如果你是黑人，你或许不太可能会接受能够阻止你死于癌症的手术治疗（价格过于昂贵）；有270万人被诊断为丙型肝炎，但尚未接受费用昂贵的治疗。我们在科学上取得了很大进步，但并没有造福于这些人群。我获得了公共政策学位，在跳槽到纪念斯隆凯特琳癌症中心（Memorial Sloan Kettering Cancer Center）后，开始投入美国癌症治疗的研究工作。

**Q: 自2007年起，你花了数年来担任华盛顿特区医疗保险和医疗补助服务中心（Centers for Medicare & Medicaid Services）的高级顾问。你从这次经历中收获了什么？**

**A:** 我意识到，药品定价系统被操纵了。药品定价系统确保的是美国制药公司的利益，帮助他们对各种抗癌药物收费。自从我参加医疗保险计划以来，我发现医疗保险中药物的价格和销量都会慢慢降低，但抗癌药物就没有。我开始认为关于药物价格，我们唯一能做的事就是引起人们对这些问题的关注。从字面上来说，我们唯一能够让公司降低药价的方法就是确认他们的做法不对。2012年，我们就遇到了一个这样的机会。

**Q: 2012年，你曾协助阻止凯特琳中心的病人服用Sanofi公司生产的一种结肠直肠癌新药Zaltrap，因为该药没有额外的益处，但价格是其它同类药物的两倍。你是如何做出这个决定的？**

**A:** 当时我们与凯特琳中心的胃肠肿瘤学主任Leonard Saltz进行了讨论。医疗保险患者服用Zaltrap，每月花费约为1万美元，而服用阿瓦斯汀（Avastin）每月则只需5000美元。研究显示，这两种药物的生存获益期中位数都是1.4个月。哪怕Zaltrap的生存获益期的中位数达到1.5个月，比阿

瓦斯汀多0.1个月，我们都不会做出这个决定。因为我们担心有人会说，“凯特琳中心给人命计算了价格。”3天的生命也弥足珍贵，比如患者可能就能看到女儿出嫁了。而且这两种药的作用机制是相同的。之后，Sanofi将价格降低了一半。

**Q: 鉴于现在的价格，每月1万美元的费用对我来说就有点难以接受了。你觉得会不会有一个临界点，价格超过这个值时，就没有人会去用这些药了呢？**

**A:** 并不会存在这样一个临界点。但是，公众开始对需要付这么高的价格心存怀疑。我认为我们设计的是一个即便对富人来说都是很昂贵的医保体系。雇主实际上负担不起，国家预算也负担不起。我们正在制定一项政策，试图改变这一现状。我的工作之一就是试图阐明这一政策，所以我们需要认真研究一下这个问题。

**Q: 你打算怎么做？**

**A:** 我为2015年推出的DrugAbacus感到自豪。Abacus是一个思维实验，人们可以使用该平台确定哪些药物值得花钱。我们知道要考虑哪些因素——功效、毒性、新颖性和稀有性。问题是，你如何将它们结合起来？此时Abacus就可以给你指导。不同的指标组合对应不同的药物价格。我们很多精力都集中于帮助政策制定者和公众理解医保系统的实际运作。

**Q: 医生能在这个过程中起到什么作用吗？他们是否应该在给病人建议时考虑不同药物的成本？**

**A:** 我担心医生需要考虑的事情太多，再考虑这个可能会有困难。而且我认为，如果医生对药物进行定量配给，会是医学上的一种倒退。这些都是政策决定，而医生不太可能知道患者适用的药物价格。

**Q: 为什么对癌症药物定价进行严格的研究非常重要?**

**A:** 对公共政策来说, 意识形态是一个不太合适的指导。经典的医药论证是我们需要付出高昂的代价来推动创新。X是支付的价格, Y是创新; 传统理论是增加X, Y就相应增加。

我想我们需要了解一下这条曲线的具体形状。它是线性的吗? 它是否变平了? 我在《福布斯》(*Forbes*)上发表了一篇文章, 认为曲线最后会往下走。仿制药利润高到一定水平后, 药企可能更愿意去做仿制药, 而非从头研发一个新药。而且人类受试者更愿意参与风险相对小的试验。过去20年批准的抗癌药物的平均生存益处大约为2个月。

**Q: 很多人想知道药价包括哪些成本。其实药**

**企的收费只是一部分, 对吗?**

**A:** 是的。如果Pfizer公司的X药物收取50美元, 那么患者购买X药物的金额肯定会超过50美元。批发商购买它, 会有一个额外成本; 然后药房购买它, 也会有一个额外成本; 还有库存成本。保险公司为药物X提供资金, 也会有一个成本。这些成本很难追踪, 但事实证明, 保险公司的成本非常重要, 因为它的流动资金达到了万亿美元。

**Q: 像您这样的人能有多大力量去改变这样的药价体系?**

**A:** 我为之努力了很久。我真的相信, 数据会很有说服力, 但一些人会抵制它。我妈妈总是说: “你是无法说服最后20%的人的。”

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. *Science*, 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.

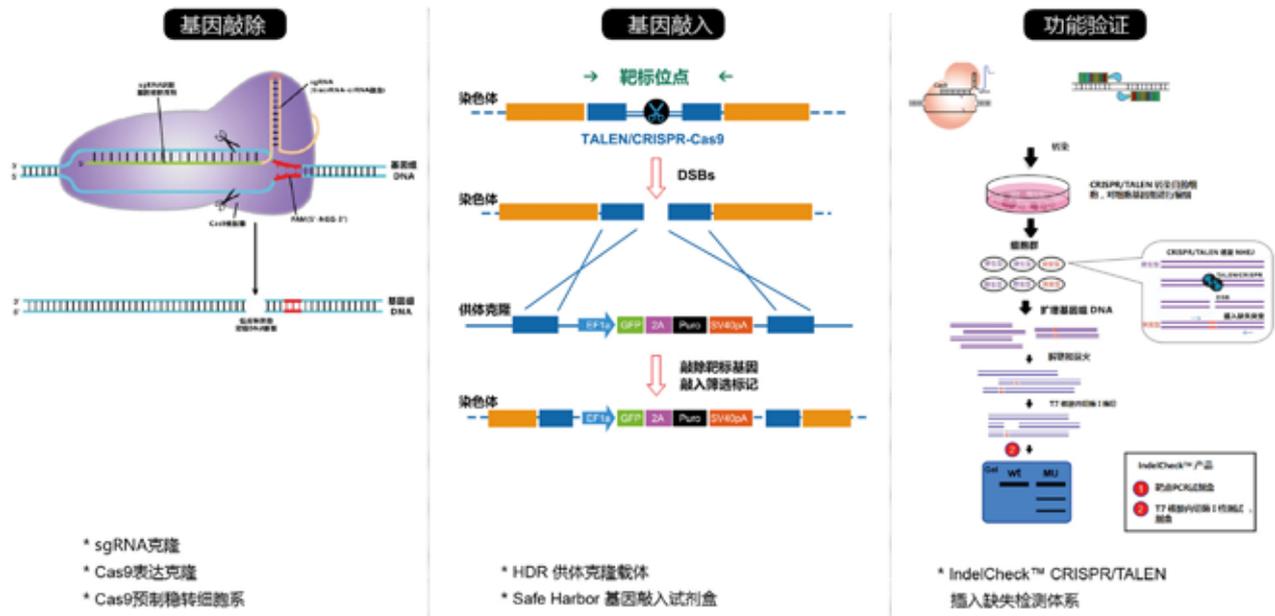
张洁、肖毅&文佳/编译



# • 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Lentifect™纯化慢病毒。其中，sgRNA纯化慢病毒颗粒滴度可达10<sup>10</sup> TU/mL，Cas9纯化慢病毒颗粒滴度可达10<sup>7</sup> 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 x 10 <sup>6</sup>	
	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: GeneCopia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/](http://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 PGK		Neomycin Puromycin/TK Neomycin/TK Hygromycin/TK		

\*注: GeneCopia 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



A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid consists of four people standing on the ground, two people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The background is a bright, cloudy sky with a sun or moon visible in the upper left corner. The overall image has a purple tint.

**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](http://www.LifeOmics.com)