

基因介导的精准免疫疗法在急性髓系白血病治疗中的进展

赵鹏博^{1,2}, 朱滢^{1,2}, 尹莉芳^{1,2*}, 辛晓斐^{1,2**}

(¹ 中国药科大学药学院药剂系, 南京 210009;

² 江苏省缓释智能制剂及关键功能性辅料开发与评价工程研究中心, 南京 210009)

摘要 急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种骨髓内造血干细胞的克隆异常, 进而导致大量异常分化的髓系细胞在骨髓内聚集而产生的疾病。传统的治疗手段难以治愈 AML, 嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 免疫疗法的成功应用预示着血液肿瘤的治疗进入精准免疫疗法新阶段。然而 CAR-T 免疫疗法在临床应用中存在诸多问题, 例如治疗周期长、价格高昂、产生脱靶效应、发生细胞因子释放综合征等, 因此, 需要扩展嵌合抗原受体的应用或提出改进措施来提升治疗效果。本文综述了 CAR 免疫细胞基因工程化改造新策略、原位编辑产生 CAR-T 的研究进展与应用, 同时对体内递送基因药物的新方法进行了简要介绍, 旨在为扩展和改进精准免疫疗法在 AML 中的应用提供新思路 and 理论依据。

关键词 急性髓系白血病; 基因编辑; 嵌合抗原受体; 原位编辑; 精准免疫疗法

中图分类号 R733.7 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)01-0053-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023112703

引用本文 赵鹏博, 朱滢, 尹莉芳, 等. 基因介导的精准免疫疗法在急性髓系白血病治疗中的进展 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(1): 53 – 62.

Cite this article as: ZHAO Pengbo, ZHU Ying, YIN Lifang, *et al.* Progress of gene-mediated precision immunotherapy in the treatment of acute myeloid leukemia[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(1): 53 – 62.

Progress of gene-mediated precision immunotherapy in the treatment of acute myeloid leukemia

ZHAO Pengbo^{1,2}, ZHU Ying^{1,2}, YIN Lifang^{1,2*}, XIN Xiaofei^{1,2**}

¹Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Jiangsu Provincial Engineering Research Center for R & D and Evaluation of Intelligent Drugs and Key Functional Excipients, Nanjing 210009, China

Abstract Acute myeloid leukemia (AML) is a disease caused by abnormal cloning of hematopoietic stem cells in the bone marrow, which leads to accumulation of a large number of abnormally differentiated myeloid cells. It is difficult to cure by traditional treatment. The successful application of chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy indicates that the treatment of hematological tumors has entered a new stage of precision immunotherapy. However, CAR-T immunotherapy has been found to have many problems in clinical applications, including long treatment cycle, expensive prices, off-target effects, cytokine release syndrome, *etc.* Therefore, it is necessary to expand the application of CAR or adopt improved measures to enhance the therapeutic effect. This article reviews the new strategies for genetic engineering modification of CAR immune cells and the research progress and application of *in situ* programming to generate CAR-T, and besides, briefly introduces the new methods about the delivery of gene drugs *in vivo*, aiming to provide new ideas and theoretical basis for expanding and improving the application of precision immunotherapy in AML.

收稿日期 2023-11-27 通信作者 *Tel: 025-83271018 E-mail: lifangyin_@163.com

**Tel: 15376408245 E-mail: xxin@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No.82304410); 江苏省自然科学基金项目 (No.BK20221045); 国家生物药技术创新中心资助项目 (No.NCTIB2022HS01015); 中国药科大学“双一流”项目

Key words acute myeloid leukemia; gene editing; chimeric antigen receptor; *in situ* programming; precision immunotherapy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.82304410); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No.BK20221045); the National Center of Technology Innovation for Biopharmaceuticals (No.NCTIB2022HS01015); and “Double First-Class” Initiative Program in China Pharmaceutical University

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种血液系统癌症,其特征是健康的造血细胞减少,造血系统中的恶性增殖、异常分化的细胞浸润骨髓、血液或其他组织^[1]。关于该疾病的遗传起源,在 AML 中经常发生一些常见的细胞遗传学异常^[2],如染色体 5q 缺失^[3]、*FLT3* 基因突变^[4]、t(8;21)染色体易位^[5]以及 *NPM1* 突变^[6]等。这些由于基因突变产生的异常蛋白,通常是转录因子或参与细胞内细胞生长和分化信号通路的关键蛋白质,增加了造血细胞恶性转化的可能性^[7]。例如在正常情况下,NF- κ B 通路通常会处于静止状态,但在 AML 细胞中 NF- κ B 通路被过度激活,促进细胞增殖并抑制细胞凋亡,从而加重疾病的进展^[8-9]。

AML 发病迅速,病死率高。据统计,仅 2019 年美国就有 21 450 名新患者诊断出 AML,并导致 10 920 人死亡^[10]。目前 AML 的治疗模式主要是用诱导缓解的化疗,如标准剂量阿糖胞苷(7 d)加蒽环类药物(3 d)治疗,然后对复发风险高的患者进行巩固化疗或同种异体干细胞移植^[11]。在过去的近 40 年中,这种方法一直是治疗 AML 的主要手段,尽管这种方法有效,但耐受性较差,有合并症、体能状态差或高龄患者死亡风险高,并且易产生耐药性^[11-12]。近年来,一些新疗法的出现为 AML 患者带来了新的希望,包括抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)、免疫检查点抑制剂、AML 疫苗和 CAR-T 免疫疗法等。ADC 是指将特定靶点的单克隆抗体与小分子活性药物进行偶联,将药物精准递送至肿瘤细胞,相关产品 Mylotarg[®]在 2017 年批准用于 CD33⁺ AML 的治疗^[13];然而,在 ADC 的应用中发现其具有十分复杂的药代动力学行为,难以使用 PD 或 PK 模型来描述临床特征,并且 ADC 会导致一些不可避免的不良反应,包括严重的血液毒性、抗体部分自带的免疫原性等^[14]。免疫检查点抑制剂可解除肿瘤细胞对免疫细胞的抑制,恢复机体免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用;然而,免疫检查点抑制剂作为单药治疗复发/难治性 AML 患者的临床疗效较差,因此需要与甲基化酶抑制剂等化疗药物联合应用^[15]。

DC 疫苗利用 AML 患者来源的树突状细胞(dendritic cell, DC)可表达肿瘤相关抗原,激活 CD8⁺毒性 T 细胞和 CD4⁺辅助性 T 细胞,进而有效杀伤 AML 细胞,其缺点是主要用于微小残留病变(minimal residual disease, MRD),防止 AML 的复发,其应用范围有限^[16-17]。嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)是经过基因工程改造的合成受体,其功能是重定向淋巴细胞(最常见的是 T 细胞),这相当于为 T 细胞装上“定位导航装置”,以识别和消除表达特定靶抗原的细胞^[18],从而实现对肿瘤细胞的精准杀伤;作为精准免疫疗法的典型,相比于其他治疗策略,CAR-T 作用更持久,并且能够独立使用治疗血液系统癌症;上述的治疗策略可相互补充,已形成对 AML 治疗的新格局。CAR-T 免疫疗法的出现具有重大意义,因为它产生了令人满意的临床效果^[19],靶向 CD19 的 CAR-T 免疫疗法首先获得批准上市,截至 2023 年 11 月,已有 9 种 CAR-T 先后获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)或国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准,主要用于血液系统癌症(表 1),同时正在进行的 CAR-T 免疫疗法治疗 AML 的临床试验已有数十个。

然而,CAR-T 免疫疗法也存在局限性,包括抗原逃逸、脱靶毒性、细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)等^[20],所以 CAR-T 免疫疗法在 AML 中的相关应用还有很大的改进空间。随着基因编辑与基因递送技术的日益成熟,使用相关技术对 CAR-T 免疫疗法进行改进,可以使其具有更好的疗效与更低的不良反应。与此同时,科学家们发现除 T 细胞之外,多种免疫细胞也可进行 CAR 改造。本综述将对各种免疫细胞进行 CAR 改造的研究概况进行总结与探讨,同时对其在 AML 治疗中的应用进行归纳与展望,以期对开发新一代 CAR 细胞疗法相关产品提供思路。

1 CAR 细胞基因工程改造新策略

CAR-T 免疫疗法的概念自 1989 年提出后,经

表 1 目前已经上市的 CAR-T 免疫疗法*

产品名称	获批适应症	获批时间	靶点	生产机构
Kymriah®	难治/复发的B细胞前体急性淋巴细胞白血病	2017-08-30(FDA)	CD19	Novartis Pharmaceuticals Corporation
Yescarta®	难治/复发的大B细胞淋巴瘤	2017-10-18(FDA)	CD19	Kite Pharma, Incorporated
Tecartus™	难治/复发套细胞淋巴瘤	2020-07-24(FDA)	CD19	Kite Pharma, Incorporated
Breyanzi®	难治/复发大B细胞淋巴瘤	2021-02-05(FDA)	CD19	Juno Therapeutics, Incorporated
Abecma™	难治/复发多发性骨髓瘤	2021-03-26(FDA)	BCMA	Celgene Corporation
倍诺达®	难治/复发大B细胞淋巴瘤	2021-09-01(NMPA)	CD19	苏州药明巨诺生物科技有限公司
Carvykti™	难治/复发多发性骨髓瘤	2022-02-28(FDA)	BCMA	Janssen Biotech, Incorporated
福可苏®	难治/复发多发性骨髓瘤	2023-06-30(NMPA)	BCMA	南京驯鹿生物医药有限公司
源瑞达®	难治/复发B细胞急性淋巴细胞白血病	2023-11-08(NMPA)	CD19	合源生物科技(天津)有限公司

*数据来源于美国食品药品监督管理局 (FDA) 或国家药品监督管理局 (NMPA)

过 30 多年的发展,如今至少已更新至第 4 代^[21]。针对 CAR-T 免疫疗法在临床上的应用限制,研究者们也提出了一系列新型基因工程改造的方法对 CAR-T 免疫疗法进行完善,包括对多种免疫细胞进行 CAR 的改造、为 CAR-T 安装“开关”、引入逻辑门控技术精确操控 CAR-T 发挥作用的位置与时间。

1.1 CAR-NK 细胞策略

NK 细胞通过主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 非依赖性机制识别靶细胞^[22]。据相关研究报道称,自体或同种异体 NK 细胞无需初步抗原呈递以及操纵其他免疫元件识别和攻击癌细胞,它可直接通过旁分泌效应(如 IFN- γ)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和直接细胞溶解作用实现对抗恶性肿瘤和病原微生物的生物功能;与 CAR-T 治疗过程中出现的由于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和 IL-6 等炎症因子大量释放引起的神经毒性和 CRS 等不良反应相比, CAR-NK(chimeric antigen receptor NK-cell)在直接杀伤癌细胞的同时无明显的 CRS 或神经毒性风险^[21,23-28],因此 CAR-NK 免疫疗法是能实现 AML 症状缓解、降低 CRS 发生率的新型精准免疫疗法。

Albinger 等^[29]使用负载 CAR 基因的慢病毒载体转染构建了一种靶向 CD33 的 CAR-NK,实验结果表明,这种 CAR-NK 在根除模型小鼠骨髓和脾脏浸润的 AML 细胞的同时并未观察到明显的不良反应,为其下一步的临床试验奠定了基础。然而在进一步的研究中发现,NK 细胞的寿命仅为两周左右,严重限制了 CAR-NK 细胞疗法的应用;针对此现象,Christodoulou 等^[30]通过将表达 IL-15 的基因序列与 CAR 基因序列整合并克隆到逆转录病毒载体

中,设计并制造了一种 CD123 靶向的 CAR-NK;体外细胞实验结果表明,IL-15 的分泌将 CAR-NK 的有效持续时间延长了 1 倍,但这种 CAR-NK 在模型小鼠体内引起分泌型 IL-15 的组成型表达,从而产生了致命毒性。为了避免此现象的发生,要将 IL-15 的作用范围限制在 CAR-NK 所在的微环境中。Dong 等^[31]将表达膜结合型 IL-15(mb15)的基因与 CAR 基因连接构建慢病毒载体转染 NK 细胞,设计了一种靶向 NPM1c 的 CAR-NK;体内外实验结果表明,此种 CAR-NK 可有效杀伤 AML 细胞,并且 mb15 的加入将其作用时间由 11 d 延长至 18 d;这些改进策略的提出及实验验证,为 CAR-NK 免疫疗法在 AML 治疗中的进一步转化奠定了基础。

Boyiadzis 等^[32]在复发/难治性 AML 患者中进行了 CAR-NK 免疫疗法的 I 期临床试验,结果表明纳入统计的 6 例患者虽未能实现完全缓解,但均未发生三级或以上的不良反应,并且其中 1 例在治疗后体内的 AML 原始细胞比例由 70% 降至 48%,初步证实了 CAR-NK 在体内的安全性和有效性。另外一项对 CD33 靶向的 CAR-NK 免疫疗法进行的 I 期临床试验结果表明,接受治疗的 10 位患者中仅有 1 例出现了二级 CRS,对症治疗后快速缓解;并且在 6 例患者中观测到了微小残留病灶完全缓解^[33]。随着对其研究的深入,目前已有多个针对 AML 的 CAR-NK 免疫疗法进入临床试验阶段(表 2)。

1.2 CAR-NKT 细胞策略

有一类细胞表面既有 T 细胞受体,又有 NK 细胞受体的特殊 T 细胞亚群,称为 NKT 细胞^[34],NKT 细胞可同时作为先天和记忆样淋巴细胞做出反应,从而桥接先天性和适应性免疫反应^[35]。与 T 细胞相比,NKT 细胞表现出 MHC 非依赖性细胞毒性,可通过穿孔素和颗粒酶的分泌杀伤肿瘤细胞。此

表 2 正在进行招募的 CAR-NK 细胞疗法临床试验*

发起单位	产品名称	靶点	临床试验编号	适应证
中国人民解放军军事医学科学院	JD023 Injection	CD123	NCT05574608	复发/难治性急性髓系白血病
重庆精准生物技术有限公司	CD123 targeted CAR-NK cells	CD123	NCT06006403	复发/难治性急性髓系白血病 母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤
无锡市人民医院	Anti-CD33/CLL1 CAR-NK Cells	CD33/CLL1	NCT05215015	急性髓系白血病
浙江大学	NKG2D CAR-NK	NKG2D	NCT05734898	急性髓系白血病
重庆市新桥医院	Anti-CD33 CAR NK cells	CD33	NCT05008575	复发/难治性急性髓系白血病
Nkarta Inc.	NKX101	NKG2D	NCT04623944	复发/难治性急性髓系白血病 难治性骨髓增生异常综合征
中国医学科学院血液病医院	CD33/CLL1 dual CAR-NK cell	CD33/CLL1	NCT05987696	复发/难治性急性髓系白血病
浙江大学	QN-023a	CD33	NCT05665075	复发/难治性急性髓系白血病
中国医学科学院血液病医院	QN-023a	CD33	NCT05601466	复发/难治性急性髓系白血病
Anderson Cancer Center	CAR.70/IL15-transduced CB-NK cells	CD70	NCT05092451	B细胞淋巴瘤 骨髓增生异常综合征 急性髓系白血病

*数据来源于ClinicalTrials.gov

外, NKT 细胞通过以 CD40-CD40L 依赖的方式诱导 DC 成熟, 并通过产生大量可作用于其他免疫细胞的细胞因子, 间接导致肿瘤细胞死亡, 如 NKT 细胞分泌的 IFN- γ 可作用于 CD8⁺T 细胞, 促进其杀伤作用^[36]。目前已有使用 NKT 细胞用于 CAR 基因改造的报道, 并且 CAR-NKT(chimeric antigen receptor NKT-cell) 免疫疗法具有治疗 B 细胞淋巴瘤的潜力^[37], 另一项临床试验正在评估一种 CAR-NKT 细胞 KUR-502 在 B 细胞白血病患者中的安全性与有效性(NCT05487651), 这表明该亚群的发现也为 CAR 改造免疫细胞治疗 AML 提供了一种可行的思路。

1.3 “ON-OFF”CAR-T 策略

“ON-OFF”是一种可以精确控制 T 细胞表面 CAR 作用的方法, 通过将编码控制元件的基因序列与 CAR 基因序列相连接后再导入至目标 T 细胞中, 从而产生具有相应控制元件的 CAR-T 细胞; 可随时开关 CAR-T 细胞, 使其能够更好地发挥精准治疗作用。2019 年 Juillerat 等^[38]提出了一种控制 CAR-T 开关的策略, 是通过将蛋白酶靶位点、蛋白酶和降解决定子组成的降解复合物融合到 CAR 的一端, 在没有蛋白酶抑制剂的情况下, 降解复合物被裂解, 从而允许靶向 CAR 在 T 细胞表面暴露, 发挥相应效能; 当需要 CAR-T 暂停发挥作用时, 使用 NS3/4A 蛋白酶抑制剂 asunaprevir 抑制降解复合物中的蛋白酶, 导致降解复合物无法裂解释放 CAR, 在停用酶抑制剂后, 降解复合物中的蛋白酶重新发

挥活性, 从而实现 CAR-T 的精准控制, 并在细胞实验中验证了此方法的可行性。

相比于上述小分子化合物的控制, Zhang 等^[39]则设计了一种光感应开关来控制 CAR-T 的活性, 首先构建可特异性识别异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 的 CAR-T, 再制备由邻硝基苄基(一种光敏感型连接键)连接的叶酸和 FITC 的偶联物, 两端分别用于结合 CAR-T 和靶细胞。在接受光照时, 偶联物断裂, CAR-T 失活, 可通过添加偶联物使 CAR-T 恢复抗肿瘤活性。此前已有报道称致命性的 CRS 和脱靶毒性等不良反应是导致 CAR-T 细胞疗法尚未批准用于 AML 的主要原因之一^[40]; 上述“ON-OFF”策略可减少 AML 治疗时致命性不良反应的发生, 为保障 CAR-T 精准杀伤 AML 细胞提供了一种可行的思路。

1.4 Logic-gated CAR-T 策略

Logic-gated CAR 是一种运用数学运算逻辑“IF/THEN”“AND”“OR”和“NOT”控制 CAR-T 激活秩序的一种系统。其中“AND”逻辑 CAR-T 表达两种不同的合成受体, 每种受体都以相互独立的方式识别肿瘤相关抗原, 只有 CAR-T 同时结合两种特定的肿瘤相关抗原, 才能完全激活, 这能有效避免肿瘤外毒性的发生^[41]。He 等^[42]构建了一种肿瘤选择性抗体和抗原检索系统, 以快速分离多种纳米抗体(nanobodies, Nbs), 再使用编码 Nbs 的相关基因序列与 CAR 基因序列连接构建 Nb-CAR-T, 这些纳米抗体的表达能优先结合表达特定抗原的细胞;

运用此方法制备的 Nb-CAR-T 可特异性表达 CD13 抗体, 并能通过 CAR 识别 TIM3⁺AML 细胞; 因此, 这种对 CD13 和 TIM3 具有双特异性的 CAR-T 可消除患者来源的 TIM3⁺CD13⁺的 AML 细胞, 但对 TIM3⁻CD13⁺的正常造血干细胞无明显毒性。

“IF/THEN”逻辑门控提供了另一种策略, 使用此策略生产的 CAR-T 只有在特定微环境条件下才能发挥作用, 可将其杀伤作用限制在某一部位。Kosti 等^[43]构建了一种双重氧传感方法, 除了将 HIF1 α 的氧敏感结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODD) 融合到 CAR 结构中之外, 还通过基因编辑技术在 CAR 基因启动子之前加入了 9 个缺氧响应元件; 实验结果表明, 这种缺氧传感系统可以将 CAR 的活性表达严格限制在缺氧环境中, 其性能优于单独的 ODD 响应型 CAR-T^[44], 且未发现有常氧条件下残留的活性 CAR-T。AML 患者中的白血病干细胞常藏匿于极度缺氧的骨髓微环境中^[45], 因此缺氧响应型 CAR-T 在清除骨髓中残余的 AML 细胞的应用中具有重要意义。

“NOT”逻辑门控包含诱导细胞毒性反应的刺激性 CAR 和触发有效抑制信号的抑制性 CAR (inhibitory CAR, iCAR), 其中刺激性 CAR 主要识别并结合肿瘤细胞中特异表达的标志物, iCAR 识别正常组织中表达的标志物, 当 iCAR 被结合后, CAR-T 失去细胞毒性, 有效阻碍 CAR-T 杀伤人体正常细胞。Richards 等^[46]构建了一种 CD93-CAR/CD19-iCAR-T, 该细胞通过识别 CD93 发挥细胞杀伤作用, 识别 CD19 停止杀伤作用, 在体内可有效清除 CD93⁺AML 细胞, 对同时表达 CD19 与 CD93 的内皮细胞无明显毒性。通过这种策略, 给 CAR-T 装上了一个可靠的“保险装置”, 在扩展治疗 AML 的靶点选择范围的同时, 能够使 CAR-T 更好地发挥对 AML 细胞的精准杀伤。

2 原位基因编辑 CAR-T 细胞

CAR-T 免疫疗法在治疗血液系统癌症方面具有重大意义; 然而, CAR-T 尚未在 AML 患者中广泛应用, 其原因主要包括常发生免疫效应细胞相关神经毒性综合征 (immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS)、CRS、脱靶毒性和 T 细胞耗竭等不良反应^[47]。除此之外, 生产临床使用的 CAR-T 所需的复杂程序、昂贵费用以及较长的生产周期严重限制了 CAR-T 免疫疗法的大规模应用^[48-49]。采用原位基因编辑的方式制备 CAR-

T 可有效降低 AML 治疗过程中的不良反应; 相对于从人体内提取 T 细胞并在严苛的 GMP 条件下进行扩增, 再重新输注至患者体内的常规生产流程, 使用易于标准化制备的递送载体对 T 细胞进行原位编程 (图 1), 可实现重复给药, 使其在体内长期发挥作用。这种方式简化了 CAR-T 细胞制备、存储和用药的过程, 有望大幅度降低成本^[50], 对于发病迅速且容易复发的 AML 患者具有重要意义。

目前使用纳米递送载体进行体内运送基因编辑系统产生 CAR-T 的相关研究已被广泛报道^[51-52]。Pfeiffer 等^[53]设计了一种 T 细胞靶向的慢病毒载体 (LV), 此载体通过携带 CAR 基因转染 CD8⁺T 细胞, 从而产生 CAR-T 细胞; 实验结果表明, 在移植人造造血干细胞的 NSG 小鼠体内单次注射此载体可以产生 CD19 反应性的 CD8⁺CAR-T, 占 CD8⁺T 细胞总数的 15%。相对于病毒类载体, 脂质纳米粒 (lipid nanoparticle, LNP) 具有更高的安全性, 且能设计更全面的功能; 因此, Smith 等^[50]设计并制造了一种聚合物纳米粒, 他们将 T 细胞靶向的抗 CD3ef (ab)² 片段偶联到可生物降解的聚 (β -氨基酯) 纳米颗粒的表面, 可使纳米颗粒通过 T 淋巴细胞受体介导的内吞作用进入细胞内部。同时使用含有微管相关序列和核定位信号的肽对聚合物进行了功能化, 以确保纳米粒携带的质粒 DNA 中的 CAR 基因能够快速进入细胞核中。实验结果表明, 此纳米粒在体内可产生 CD19 靶向的 CAR-T, 并使小鼠的中位存活期由 13 d 延长至 58 d; 除此之外, 此纳米粒在白血病小鼠体内的功效与输注体外制备的 CAR-T 相比无明显差异。已有报道称, 某些 AML 患者体内高表达 CD19^[54]; 因此, 上述策略对于 CD19⁺AML 患者的治疗具有重要意义。Zhou 等^[55]制备了 CD3 抗体修饰的 LNP, 该 LNP 包裹了含有人源 IL-6 的 shRNA 和 CAR 基因的质粒。静脉注射后, LNP 在体内能够成功转染 T 细胞, 并且在体内产生不表达 IL-6 的 CAR-T; 动物实验结果表明, 向人源化 NSG 小鼠体内注射 LNP 的第 21 天, CD3⁺T 细胞当中有 74.6% 表达 CAR; 药效实验结果显示, 此方式对动物模型产生的治疗效果与输注 CAR-T 无明显差异, 可介导对白血病细胞的有效杀伤; 与此同时, 由于 IL-6 shRNA 的加入减少了 IL-6 的释放, 这可降低 CAR-T 治疗 AML 患者时产生重度 CRS 的可能性。

与质粒 DNA 相比, mRNA 无需进入细胞核即可发挥作用; mRNA 不会整合到基因组中, 也就减少

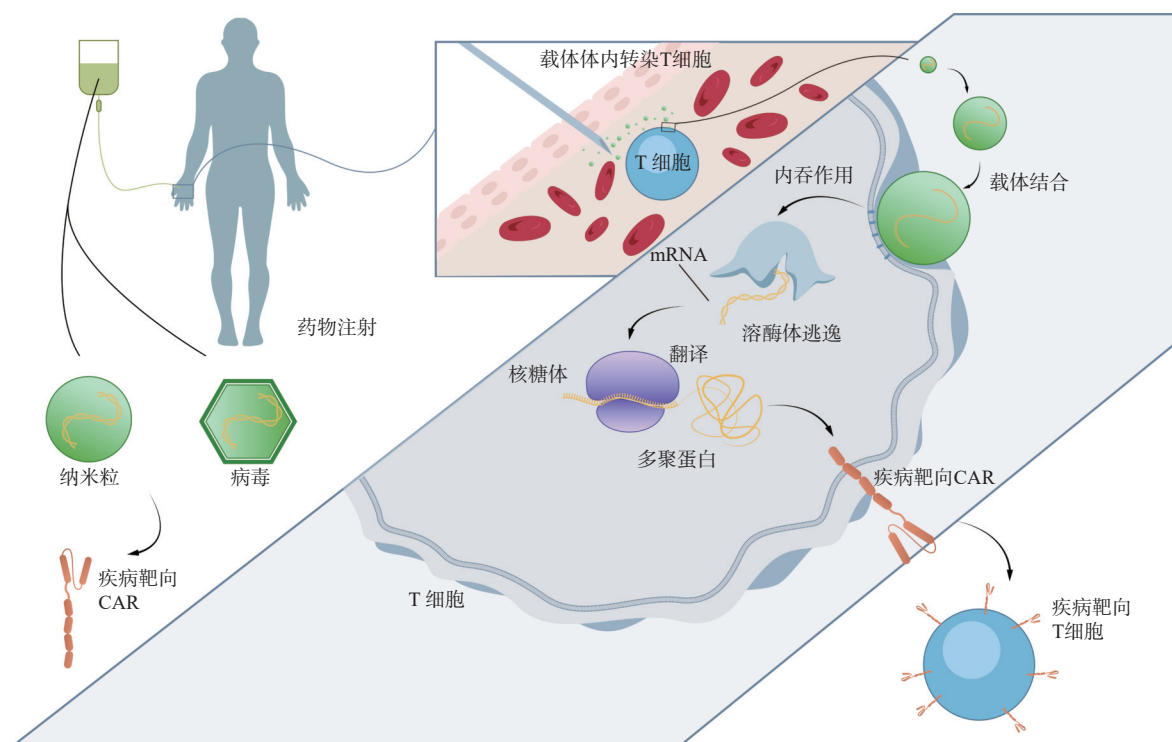


图 1 原位编辑产生 CAR-T 示意图

了插入突变的风险^[56-57];此外,体外转录产生 mRNA 比制造 DNA 更加容易,便于控制与定制化生产^[58-59]。Parayath 等^[60]使用可生物降解的 PBAE 聚合物纳米颗粒作为主体,再将 CD8 抗体与聚谷氨酸(PGA)连接形成偶联物,此偶联物可通过静电吸附结合在纳米颗粒表面,从而使纳米颗粒具有 CD8⁺细胞靶向性;实验结果表明,该纳米颗粒负载编码 CAR 的 mRNA 可在体内编程循环 T 细胞,该纳米颗粒注射后可将白血病小鼠的平均生存期延长了 37 d,这与过继转移的 CAR-T 疗效相当,并且该方法还能应用于其他肿瘤的治疗。以上实例表明构建基因递送载体,注射后可在体内形成 CAR-T,为简化 CAR-T 制备的繁琐过程、降低相关医疗成本以及改善患者的顺应性提供了一种新的解决思路。

3 体内基因药物递送协同策略

使用 CRISPR 系统、转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)或锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)等基因编辑技术精确操纵和编辑人类核酸序列使基因治疗 AML 成为可能。使用基因编辑工具敲除特定的基因位点以及向体内递送特定的 siRNA、miRNA、mRNA 等基因药物对异常基因进行转录后调控是治疗 AML 的常用手段。除此之外,基因

介导的免疫疗法还可以和小分子药物、细胞因子等联合应用,协同发挥精准治疗作用。需要注意的是,基因编辑系统或者基因药物到达指定位点发挥相应功能,必须借助一定的载体,才能实现高效、安全和精准的递送^[52,61]。

3.1 CRISPR-Cas9 基因编辑递送

CRISPR-Cas9 是一种 II 型 CRISPR 系统,由单链向导 RNA 和 Cas9 核酸酶组成,可以通过编码向导 RNA 在特定 DNA 位置诱导双链断裂,由于其具有特异性强、灵敏度高、效率高等诸多优点,被广泛应用于各种肿瘤的治疗中^[62]。Ren 等^[63]利用海藻酸盐和鱼精蛋白为主体,制备了一种多功能基因编辑系统递送载体,可向 MUC1 和 CXCR4 过表达的 AML 细胞中递送 CRISPR-Cas9 质粒,进而实现对 CXCR4 基因的敲除,阻断 CXCR4 及其配体 CXCL12 参与的多种信号通路,从而达到治疗 AML 的目的。有报道称由于白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)藏匿于骨髓微环境中无法根除,导致治疗后的复发率,已成为目前治疗 AML 最大挑战之一^[64]。而 CXCL12/CXCR4 等趋化因子及其配体的高表达,会促进白血病细胞向骨髓迁移并藏匿于骨髓微环境中,从而使白血病细胞对化疗耐药^[64-65],因此靶向 CXCL12/CXCR4 轴的治疗策略具有重大意义。Ho 等^[66]构建了一种模拟骨髓微环境的间充

质干细胞膜包被的纳米纤维(mesenchymal stem cell membrane-coated nanofibril, MSCM-NF), 再将趋化因子 CXCL12 α 以及负载基因编辑系统 Cas9/sgRNA RNP 的脂质纳米粒加载到 MSCM-NF 当中, 形成功能化支架; 实验表明, 由于 CXCL12 α 的释放诱导 LSC 向支架迁移, LNP-Cas9 RNP 能够对其进行有效的基因编辑; 通过 CXCL12 α 与基因编辑系统的协同作用, 可特异性敲除白细胞介素-1 受体辅助蛋白基因, 降低 LSC 集落形成能力, 减少 AML 的复发。

除此之外, 基因编辑技术还能直接敲除细胞中的异常基因, 促进 AML 细胞的凋亡, 终止 LSC 的异常分化。Montaño 等^[67] 将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统敲除 *ETV6/RUNX1* 融合基因并与长春新碱联合使用, 可抑制白血病细胞增殖并诱导其凋亡。Vuelta 等^[68] 同样使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除白血病细胞中的 *Bcr/Abl* 癌基因, 可阻断 LSC 的致癌作用, 与酪氨酸激酶抑制剂联用, 有望在治疗 AML 的同时, 清除动物骨髓中藏匿的 LSC; 并且将体外敲除 *Bcr/Abl* 癌基因的 LSC 移植到造血障碍模型小鼠体内, 可观察到 LSC 恢复了多向分化潜能, 驱动造血功能恢复。这些实验结果均有效证实了通过 CRISPR-Cas9 基因编辑系统可以精准敲除 AML 细胞的异常基因, 并能与细胞因子以及化疗药呈现出协同治疗效果, 可有效减缓 AML 疾病的进展。

3.2 小核酸药物精准递送

除了使用基因编辑技术直接敲除某些基因之外, 还可以使用载体运送基因药物, 通过转录后调控治疗 AML。Yong 等^[69] 以精氨酸与 CD64 单链抗体形成的融合蛋白为载体, 开发了一种靶向 CD64⁺ AML 细胞的纳米递送系统; 该系统搭载可特异性沉默血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1) 的 siRNA, *HO-1* 基因是一种细胞保护基因, 促使 AML 细胞对化疗药物耐药; 体内外实验结果表明, siHO-1 与化疗药物柔红霉素呈现出协同治疗作用, *HO-1* 基因的沉默将柔红霉素对 AML 细胞的杀伤作用提升了一倍, 并有效延长了接受治疗的模型小鼠的生存期。AML 的一个重要标志是染色体重排, 这能介导致病性融合基因的产生, 如 *RUNX1/ETO*、*MLL-AF9* 融合基因等, 通过表达相应的异常蛋白, 驱动白血病的发生^[70-71]。Issa 等^[72] 使用已上市的 Dlin-MC3-DMA 可电离脂质及其他辅助脂材制备了一种负载 *RUNX1/ETO* 融合基因 siRNA 的 LNP; AML 模型小鼠体内药效实验表明, 该 LNP 可显著降低 *RUNX1/ETO* 融合基因的表达, 使模型小鼠的

中位存活期从 44 d 增加到 80 d。Mohammed 等^[73] 使用类似的策略制备了一种负载可沉默 SHARP1 的 siRNA 的脂质体; 作为 *MLL-AF6* 融合基因下游的关键介质, *SHARP1* 基因的沉默可促使 *MLL-AF6* 型 AML 细胞凋亡 30% 以上。

值得注意的是, CD123 是 IL-3R 的 α 链, 在 AML 中经常高水平表达, 并且主要是在白血病干细胞或祖细胞上, 而在正常的造血细胞中很少表达^[74], 因此 CD123 或 IL-3R 常作为 AML 治疗的靶点。为了进一步增强纳米载体的靶向性, Guo 等^[75] 制备了一种靶向 AML 细胞上 CD123 的 siRNA 递送载体, 该载体是将硫酸化的 CD123 单克隆抗体的抗原结合片段(fragment antigen-binding, Fab)与 DSPE-PEG 反应制备 DSPE-PEG-Fab, 再将其插入到环糊精与溴结构域蛋白 4(BRD4)-siRNA 复合形成的纳米颗粒表面; DSPE-PEG-Fab 的插入使纳米颗粒具有良好的 AML 细胞靶向性以及较低的生理毒性; 并在患者来源的 AML 细胞实验中发现, 负载 BRD4-siRNA 的纳米颗粒可杀伤约 70% 的肿瘤细胞, 在与阿糖胞苷联合给药时, 对肿瘤细胞的杀伤提高至 90% 以上, 表明此纳米颗粒与阿糖胞苷联合应用在治疗 AML 时具有一定的协同作用。

4 总结及展望

CAR-T 免疫疗法作为精准免疫疗法的重要组成部分, 在治疗血液肿瘤的应用中取得了前所未有的成功, 是一种具有革命性意义的细胞药物, 并在全球上市了数款产品。然而, CAR-T 细胞疗法存在一些问题, 如脱靶毒性、重度 CRS 的产生以及复杂的生产工艺等, 限制了 CAR-T 的应用范围, 也未能有针对 AML 的 CAR-T 产品上市。针对这些问题, 研究者们使用一系列基因介导的方式对其进行改进, 旨在扩展 CAR-T 免疫疗法的应用范围, 包括使用 CAR 改造多种免疫细胞制备 CAR-NK、CAR-NKT, 利用与 T 细胞不同的特性来弥补 CAR-T 在 AML 治疗中的不足; 使用“ON-OFF”策略精准控制 CAR-T 的作用时间; 采用逻辑门控策略, 精准控制 CAR-T 发挥作用的位点以及减少 CAR-T 免疫疗法的脱靶毒性; 选用纳米载体进行体内编辑产生 CAR-T 来降低其全身毒性并简化治疗过程、降低应用成本等。此外, 通过基因编辑系统与小核酸药物的精准递送, 可敲除或沉默 AML 细胞中的致病与耐药基因, 有效控制 AML 进展, 并且在与其他药物联合使用时, 表现出良好的协同作用。本文

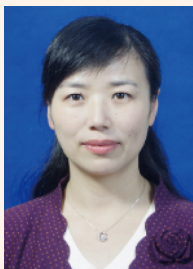
对目前治疗 AML 的 CAR-T 免疫疗法的各种改进策略和前沿方向进行了回顾与展望, 并对基因药物协同递送策略治疗 AML 进行了总结, 以期推进 CAR 改造相关细胞的进一步研究与转化, 从而促进精准免疫疗法在 AML 患者中的应用。

References

- [1] Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2023, **98**(3): 502-526.
- [2] Zeng AGX, Bansal S, Jin LQ, et al. A cellular hierarchy framework for understanding heterogeneity and predicting drug response in acute myeloid leukemia[J]. *Nat Med*, 2022, **28**(6): 1212-1223.
- [3] Rea B, Aggarwal N, Yatsenko SA, et al. Acute myeloid leukemia with isolated del(5q) is associated with IDH1/IDH2 mutations and better prognosis when compared to acute myeloid leukemia with complex karyotype including del(5q)[J]. *Mod Pathol*, 2020, **33**(4): 566-575.
- [4] Daver N, Schlenk RF, Russell NH, et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence[J]. *Leukemia*, 2019, **33**(2): 299-312.
- [5] Rejeski K, Duque-Afonso J, Lübbert M. AML1/ETO and its function as a regulator of gene transcription via epigenetic mechanisms[J]. *Oncogene*, 2021, **40**(38): 5665-5676.
- [6] Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, et al. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside[J]. *Blood*, 2020, **136**(15): 1707-1721.
- [7] Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia[J]. *Blood Rev*, 2017, **31**(1): 63-76.
- [8] Rajagopalan A, Feng YB, Gayatri MB, et al. A gain-of-function p53 mutant synergizes with oncogenic NRAS to promote acute myeloid leukemia in mice[J]. *J Clin Invest*, 2023, **133**(24): e173116.
- [9] Wu GJ, Xu YX, Schultz RD, et al. LILRB3 supports acute myeloid leukemia development and regulates T-cell antitumor immune responses through the TRAF2-cFLIP-NF- κ B signaling axis[J]. *Nat Cancer*, 2021, **2**(11): 1170-1184.
- [10] Daver N, Wei AH, Pollyea DA, et al. New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter[J]. *Blood Cancer J*, 2020, **10**(10): 107.
- [11] Chen KTJ, Gilibert-Oriol R, Bally MB, et al. Recent treatment advances and the role of nanotechnology, combination products, and immunotherapy in changing the therapeutic landscape of acute myeloid leukemia[J]. *Pharm Res*, 2019, **36**(9): 125.
- [12] Liu HT. Emerging agents and regimens for AML[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, **14**(1): 49.
- [13] Anami Y, Deng M, Gui X, et al. LILRB4-targeting antibody-drug conjugates for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, **19**(11): 2330-2339.
- [14] Fu ZW, Li SJ, Han SF, et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 93.
- [15] Böhme M, Kayser S. Immune-based therapeutic strategies for acute myeloid leukemia[J]. *Cancers*, 2021, **14**(1): 105.
- [16] Barbullushi K, Rampi N, Serpenti F, et al. Vaccination therapy for acute myeloid leukemia: where do we stand[J]? *Cancers*, 2022, **14**(12): 2994.
- [17] van de Loosdrecht AA, van Wetering S, Santegoets SJAM, et al. A novel allogeneic off-the-shelf dendritic cell vaccine for post-remission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, **67**(10): 1505-1518.
- [18] Liu Y, An LN, Huang RH, et al. Strategies to enhance CAR-T persistence[J]. *Biomark Res*, 2022, **10**(1): 86.
- [19] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, **359**(6382): 1361-1365.
- [20] Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer J*, 2021, **11**(4): 69.
- [21] Larson RC, Maus MV. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(3): 145-161.
- [22] Fang F, Xie SQ, Chen MH, et al. Advances in NK cell production[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, **19**(4): 460-481.
- [23] Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, et al. NK cell metabolism and tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2019, **10**: 2278.
- [24] Dagher OK, Posey AD Jr. Forks in the road for CAR T and CAR NK cell cancer therapies[J]. *Nat Immunol*, 2023, **24**(12): 1994-2007.
- [25] Kennedy LB, Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, **70**(2): 86-104.
- [26] Xia JF, Minamino S, Kuwabara K. CAR-expressing NK cells for cancer therapy: a new hope[J]. *Biosci Trends*, 2020, **14**(5): 354-359.
- [27] Zhang LS, Liu M, Yang SJ, et al. Natural killer cells: of-the-shelf cytotoxicity for cancer immunosurveillance[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, **11**(4): 1770-1791.
- [28] Bald T, Krummel MF, Smyth MJ, et al. The NK cell-cancer cycle: advances and new challenges in NK cell-based immunotherapies[J]. *Nat Immunol*, 2020, **21**(8): 835-847.
- [29] Albinger N, Pfeifer R, Nitsche M, et al. Primary CD33-targeting CAR-NK cells for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. *Blood Cancer J*, 2022, **12**(4): 61.
- [30] Christodoulou I, Ho WJ, Marple A, et al. Engineering CAR-NK cells to secrete IL-15 sustains their anti-AML functionality but

- is associated with systemic toxicities[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, **9**(12): e003894.
- [31] Dong H, Ham JD, Hu GG, *et al.* Memory-like NK cells armed with a neoepitope-specific CAR exhibit potent activity against NPM1 mutated acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, **119**(25): e2122379119.
- [32] Boyiadzis M, Agha M, Redner RL, *et al.* Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using “off-the-shelf” activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia[J]. *Cytotherapy*, 2017, **19**(10): 1225-1232.
- [33] Huang RH, Wen Q, Wang XQ, *et al.* p522: off-the-shelf Cd33 car-nk cell therapy for relapse/refractory aml: first-in-human, phase I trial[J]. *HemaSphere*, 2023, **7**(S3): e69938df.
- [34] Pellicci DG, Koay HF, Berzins SP. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, **20**(12): 756-770.
- [35] Kriegsmann K, Kriegsmann M, von Bergwelt-Baildon M, *et al.* NKT cells - New players in CAR cell immunotherapy[J]? *Eur J Haematol*, 2018, **101**(6): 750-757.
- [36] Hadiloo K, Tahmasebi S, Esmailzadeh A. CAR-NKT cell therapy: a new promising paradigm of cancer immunotherapy[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, **23**(1): 86.
- [37] Karadimitris A, Ripoll-Fiol C, Guerra JC. Invariant NKT cells as a platform for CAR immunotherapy and prevention of acute Graft-versus-Host Disease[J]. *Hemasphere*, 2019, **3**(Suppl): 31-34.
- [38] Juillerat A, Tkach D, Busser BW, *et al.* Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch[J]. *BMC Biotechnol*, 2019, **19**(1): 44.
- [39] Zhang B, Wang Y, Huang SL, *et al.* Photoswitchable CAR-T cell function *in vitro* and *in vivo* via a cleavable mediator[J]. *Cell Chem Biol*, 2021, **28**(1): 60-69. e7.
- [40] Guo SJ, Gao XJ, Sadhana M, *et al.* Developing strategies to improve the efficacy of CAR-T therapy for acute myeloid leukemia[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, **24**(11): 1614-1632.
- [41] Flugel CL, Majzner RG, Krenciute G, *et al.* Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, **20**(1): 49-62.
- [42] He X, Feng ZJ, Ma J, *et al.* Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2020, **135**(10): 713-723.
- [43] Kosti P, Opzoomer JW, Larios-Martinez KI, *et al.* Hypoxia-sensing CAR T cells provide safety and efficacy in treating solid tumors[J]. *Cell Rep Med*, 2021, **2**(4): 100227.
- [44] Juillerat A, Marechal A, Filhol JM, *et al.* An oxygen sensitive self-decision making engineered CAR T-cell[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**: 39833.
- [45] Chen YF, Li J, Xu LL, *et al.* The genesis and evolution of acute myeloid leukemia stem cells in the microenvironment: from biology to therapeutic targeting[J]. *Cell Death Discov*, 2022, **8**(1): 397.
- [46] Richards RM, Zhao FF, Freitas KA, *et al.* NOT-gated CD93 CAR T cells effectively target AML with minimized endothelial cross-reactivity[J]. *Blood Cancer Discov*, 2021, **2**(6): 648-665.
- [47] Xin TQ, Cheng L, Zhou CC, *et al.* *In-vivo* induced CAR-T cell for the potential breakthrough to overcome the barriers of current CAR-T cell therapy[J]. *Front Oncol*, 2022, **12**: 809754.
- [48] Bach PB. National coverage analysis of CAR-T therapies - policy, evidence, and payment[J]. *N Engl J Med*, 2018, **379**(15): 1396-1398.
- [49] Parayath NN, Stephan MT. *In situ* programming of CAR T cells[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2021, **23**: 385-405.
- [50] Smith TT, Stephan SB, Moffett HF, *et al.* *In situ* programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers[J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, **12**(8): 813-820.
- [51] Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, **16**(6): 387-399.
- [52] Raguram A, Banskota S, Liu DR. Therapeutic *in vivo* delivery of gene editing agents[J]. *Cell*, 2022, **185**(15): 2806-2827.
- [53] Pfeiffer A, Thalheimer FB, Hartmann S, *et al.* *In vivo* generation of human CD19-CAR T cells results in B-cell depletion and signs of cytokine release syndrome[J]. *EMBO Mol Med*, 2018, **10**(11): e9158.
- [54] Ma G, Wang Y, Ahmed T, *et al.* Anti-CD19 chimeric antigen receptor targeting of CD19⁺ acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Res Rep*, 2018, **9**: 42-44.
- [55] Zhou JE, Sun L, Jia YJ, *et al.* Lipid nanoparticles produce chimeric antigen receptor T cells with interleukin-6 knockdown *in vivo*[J]. *J Control Release*, 2022, **350**: 298-307.
- [56] Raes L, Stremersch S, Fraire JC, *et al.* Intracellular delivery of mRNA in adherent and suspension cells by vapor nanobubble photoporation[J]. *Nanomicro Lett*, 2020, **12**(1): 185.
- [57] Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, *et al.* Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives[J]. *Nanomaterials*, 2020, **10**(2): 364.
- [58] Billingsley MM, Singh N, Ravikumar P, *et al.* Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering[J]. *Nano Lett*, 2020, **20**(3): 1578-1589.
- [59] Billingsley MM, Hamilton AG, Mai D, *et al.* Orthogonal design of experiments for optimization of lipid nanoparticles for mRNA engineering of CAR T cells[J]. *Nano Lett*, 2022, **22**(1): 533-542.
- [60] Parayath NN, Stephan SB, Koehne AL, *et al.* *In vitro* - transcribed antigen receptor mRNA nanocarriers for transient expression in circulating T cells *in vivo*[J]. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 6080.
- [61] Cheng Q, Wei T, Farbiak L, *et al.* Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and

- CRISPR-Cas gene editing[J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, **15**(4): 313-320.
- [62] Cheng X, Fan SY, Wen CC, *et al.* CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges[J]. *Brief Funct Genomics*, 2020, **19**(3): 209-214.
- [63] Ren XH, Xu C, Li LL, *et al.* A targeting delivery system for effective genome editing in leukemia cells to reverse malignancy[J]. *J Control Release*, 2022, **343**: 645-656.
- [64] Ladikou EE, Chevassut T, Pepper CJ, *et al.* Dissecting the role of the CXCL12/CXCR4 axis in acute myeloid leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2020, **189**(5): 815-825.
- [65] Yu XB, Munoz-Sagredo L, Streule K, *et al.* CD44 loss of function sensitizes AML cells to the BCL-2 inhibitor venetoclax by decreasing CXCL12-driven survival cues[J]. *Blood*, 2021, **138**(12): 1067-1080.
- [66] Ho TC, Kim HS, Chen YM, *et al.* Scaffold-mediated CRISPR-Cas9 delivery system for acute myeloid leukemia therapy[J]. *Sci Adv*, 2021, **7**(21): eabg3217.
- [67] Montaña A, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, *et al.* *ETV6/RUNX1* fusion gene abrogation decreases the oncogenicity of tumour cells in a preclinical model of acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Cells*, 2020, **9**(1): 215.
- [68] Vuelta E, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, *et al.* CRISPR-Cas9 technology as a tool to target gene drivers in cancer: proof of concept and new opportunities to treat chronic myeloid leukemia[J]. *CRISPR J*, 2021, **4**(4): 519-535.
- [69] Yong SB, Chung JY, Kim SS, *et al.* CD64-targeted HO-1 RNA interference enhances chemosensitivity in orthotopic model of acute myeloid leukemia and patient-derived bone marrow cells[J]. *Biomaterials*, 2020, **230**: 119651.
- [70] Heuts BMH, Arza-Apalategi S, Alkema SG, *et al.* Inducible MLL-AF9 expression drives an AML program during human pluripotent stem cell-derived hematopoietic differentiation[J]. *Cells*, 2023, **12**(8): 1195.
- [71] Haferlach T, Meggendorfer M. More than a fusion gene: the *RUNX1-RUNX1T1* AML[J]. *Blood*, 2019, **133**(10): 1006-1007.
- [72] Issa H, Swart LE, Rasouli M, *et al.* Nanoparticle-mediated targeting of the fusion gene *RUNX1/ETO* in t(8;21)-positive acute myeloid leukaemia[J]. *Leukemia*, 2023, **37**(4): 820-834.
- [73] Mohammed SA, Ju Y. Multifunctional liposomal nanostructure-mediated siRNA/bortezomib co-delivery for SHARP1 knockdown in MLL-AF6 acute myeloid leukemia[J]. *Biomater Adv*, 2022, **134**: 112663.
- [74] Gauthier L, Virone-Oddos A, Beninga J, *et al.* Control of acute myeloid leukemia by a trifunctional NKp46-CD16a-NK cell engager targeting CD123[J]. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(9): 1296-1306.
- [75] Guo JF, Russell EG, Darcy R, *et al.* Antibody-targeted cyclodextrin-based nanoparticles for siRNA delivery in the treatment of acute myeloid leukemia: physicochemical characteristics, *in vitro* mechanistic studies, and *ex vivo* patient derived therapeutic efficacy[J]. *Mol Pharm*, 2017, **14**(3): 940-952.



[专家介绍] 尹莉芳, 教授, 中国药科大学博士生导师, 教育部新世纪优秀人才, 国家发改委药品价格评审专家, 科技部国际合作同行专家, 国家食品药品监督管理局审评中心审评专家, 江苏省 333 新世纪科学技术带头人培养工程(简称“333 工程”)第三层次培养对象。主持了数十个横向和纵向课题, 产业化经验丰富, 获得 20 余个新药证书或者临床批件。主要研究方向包括缓控释给药系统的研究及产业化, 基因药物成药性研究、活细胞制剂研发和药物新剂型、仿创药物研发及产业化。以第一发明人申请发明专利 26 项, 获得授权 6 项, 专利权转让 3 项。参编药剂学等教材, 发表 SCI 等学术论文 40 余篇。



[专家介绍] 辛晓斐, 中国药科大学特聘副研究员, 硕士生导师, 中国药科大学-内布拉斯加大学医学中心联合培养博士, 内布拉斯加大学医学中心博士后, 2021 年 10 月加入中国药科大学药剂系。目前主要的科研工作是基因药物在脑瘤、肝纤维化和白血病中的递送与治疗以及相关疫苗的开发。研究方向是基因药物递送及其成药性研究, 口服递药系统, 纳米粒体内命运探究, 肝纤维化精准治疗, 肿瘤免疫治疗。迄今已在 *Advanced Drug Delivery Reviews*, *Science Advances*, *Advanced Science*, *Journal of Controlled Release*, *Nano-Micro Letters*, *ACS Applied Materials & interfaces* 等国际重要科学期刊上发表论文多篇。