

# 用 CTS TrueCut Cas9 蛋白推进 CAR T 细胞治疗

细胞治疗产品迈向临床的进阶过程，从选择正确的试剂开始。不仅需要有高品质的试剂以符合严格的监管标准，还需要可扩展的生产流程，以满足未来的临床需求。借助 Gibco™ 细胞治疗系统™ (CTS™) 品牌，Thermo Fisher Scientific 可提供专为细胞治疗应用而设计的各种高品质产品。从培养基、试剂、生长因子和酶到分选磁珠和仪器，所有 Gibco™ CTS™ 产品的生产遵循 21 CFR Part 820 的原则或 ISO 13485 和 ISO 9001 质量标准。严格遵守质量标准保证了从实验室到临床研究的无缝转换。

嵌合抗原受体 (CAR) T 细胞疗法最早于 2017 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准，是癌症治疗领域中一个迅速发展的领域，涉及从患者血液中分离并激活 T 细胞以进行体外基因修饰。然后将经工程改造的 T 细胞回输至患者体内，以实现 T 细胞介导的细胞免疫治疗。CRISPR-Cas9 是疾病治疗改造 T 细胞时最常用的非病毒编辑工具之一。Thermo Fisher 目前可提供Gibco™ CTS™ TrueCut™ Cas9蛋白，用于细胞和基因治疗应用的辅助材料。

我们对 CTS TrueCut Cas9 蛋白进行了更深入地分析，涵盖其生产遵循的质量标准到在原代 T 细胞中的编辑性能。我们参照行星产品 Invitrogen™ TrueCut™ Cas9蛋白 v2 (RUO Cas9) 评估了 CTS TrueCut Cas9蛋白 (CTS Cas9) 的性能，以确认按照 GMP 标准放大生产的 Cas9 蛋白对产品性能无显著影响。

## CTS TrueCut Cas9 蛋白 - 质量控制和规范

CTS TrueCut Cas9 蛋白是 GMP 级别重组Cas9蛋白，其生产符合细胞、基因和组织产品的辅助材料标准(包括 USP<1043>、欧洲药典5.2.12 和 ISO 20399-1、-2和-3)，并在 FDA 注册的生产基地遵循 21 CFR 第 820 部分的原则进行生产。除具有广泛的可追溯性文件外，生产流程采用了无菌生产、全面安全性检测和无菌包装，以消除可能影响细胞治疗安全性的潜在污染物。CTS Cas9 以高浓度 (10 mg/mL)、大包装规格 (2.5 mg 和 5.0 mg) 形式提供，可即刻进行转染电穿孔；其规范参见表1。

**表 1. CTS TrueCut Cas9 蛋白的代表性质量规范。**

检测	规范
RP HPLC 测定的纯度	≥95.0%
SDS-PAGE 测定的纯度	≥95.0%
聚合物	≤5.0%
浓度	10 mg/mL
HPLC-DAD 鉴定	符合
SDS-PAGE 鉴定	符合
pH	7.0–7.8
活性 (体外)	参考DNA切割效率≥90%
DNase 残留	低于定量限 (<LOQ)
RNase 残留	<LOQ
宿主细胞蛋白残留	<LOQ
宿主细胞 DNA 残留	<LOQ
内毒素	<10.0 EU/mg
无菌	无生长
支原体	阴性

## CTS Cas9 和 RNP 复合物的稳定性

评估 CTS Cas9 和核糖核蛋白 (RNP) 复合物 (即 Cas9蛋白与sgRNA的复合物) 在各种条件下的稳定性。首先, 将 CTS TrueCut Cas9 蛋白在一定浓度范围内进行连续稀释, 然后进行 5 次冻融循环。然后使用体外切割检测测定切割效率。与未进行任何冻融循环的对照样品相比, 进行 5 次冻融循环后未观察到切割效率的显著变化, 如图 1 所示。此外, 在不同时间点 (0 min、10 min、1 h、4 h和16 h) 评估 RNP 复合物的稳定性, 以模拟常见实验条件。连续稀释 RNP 复合物, 并使用体外切割检测测定切割效率。在不同时间点未观察到对切割效率的显著影响, 如图2 所示。

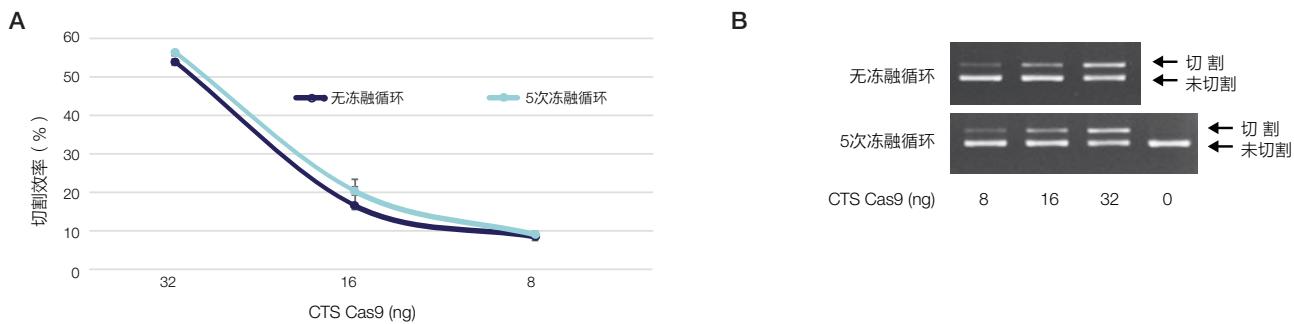


图 1. CTS Cas9 在 5 次冻融循环后保持稳定, 如体外切割检测结果所示。(A) 在一定浓度范围内对CTS Cas9 进行连续稀释, 并测定切割效率。将不同量 (8 ng、16 ng、32 ng和0 ng) 的 CTS Cas9 与过量 (40 ng) 靶向 HPRT 基因的 gRNA 以及带有 HPRT 序列的质粒 (300 ng) 在 37°C 下孵育 10 分钟。(B) 在琼脂糖凝胶上分辨含有未切割和切割质粒的切割反应, 并使用 Invitrogen™ iBright™ FL1500成像系统进行定量分析。该实验共重复三次。

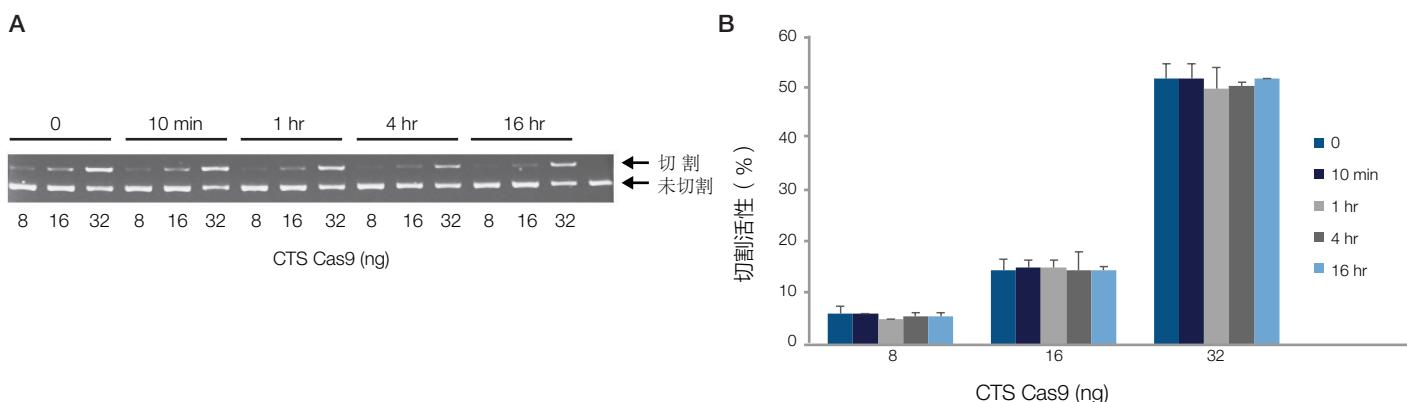


图 2. 在室温下的不同时间间隔下 CTS Cas9-RNP 复合物均可保持切割活性。在一定浓度范围内对CTS Cas9 进行连续稀释, 并测定切割效率。将不同量 (8 ng、16 ng 和 32 ng) 的 CTS Cas9 与过量 (40 ng) 靶向 HPRT 基因的 gRNA 混合, 并在室温下孵育 10 分钟至 16 小时。然后将样品与带有 HPRT 序列的过量质粒 (300 ng) 在37°C 下孵育10分钟。(A) 在琼脂糖凝胶上分析含有未切割和切割质粒的切割反应, 并使用 iBright 成像系统进行定量。(B) 将切割活性绘制成为条形图。该实验共重复三次。

## 产品一致性 - CTS TrueCut Cas9 (CTS Cas9)

### vs. TrueCut Cas9 v2 (RUO Cas9)

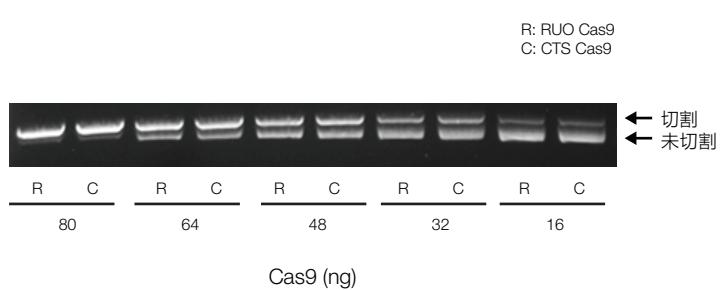
当您从基础研究转换到临床应用时,重要的是CTS TrueCut Cas9 (CTS Cas9)核酸酶给您的结果与TrueCut Cas9 v2 核酸酶 (RUO Cas9)相同且一致。为了更好地评估 CTS Cas9 和 RUO Cas9 之间活性的差异,我们完成了体外切割检测实验。该实验结果直接比较了在无任何细胞背景的情况下 Cas9 蛋白的切割活性。CTS Cas9 和 RUO Cas9 蛋白分别进行连续稀释,以检测切割活性。图 3 中的体外检测结果显示,在所有测试浓度下,CTS Cas9 的切割活性与 RUO Cas9 相当。

接下来,我们想证实体外观察到的 CTS Cas9 蛋白活性在转移到细胞内环境中时仍可以保留。我们选择了原代 T 细胞,因为它们提供了CAR T 细胞治疗开发所需的适当细胞背景。本实验使用

了靶向 4 个 CAR T 细胞治疗相关基因 (TRAC、TRBC、PD1 和 CD52) 的 7 种gRNAs。分离并活化原代 T 细胞后,然后使用 Invitrogen™ Neon™ 转染系统 (10  $\mu$ L试剂盒)用 CTS Cas9和 RUO Cas9进行编辑。并使用新一代测序在基因水平上测定细胞活性和切割效率。

图 4A 显示,所有靶标在转染 CTS Cas9 和RUO Cas9 蛋白后均有较高 (>90%) 的细胞活性。这一结果表明 CTS Cas9 对细胞的毒性较低,且与RUO Cas9相当。此外,在所有靶点上,未观察到 CTS Cas9 和 RUO Cas9 之间切割效率出现显著差异(图4B)。实验结果证实,CTS Cas9 在原代T细胞的所有靶位点上都保持了与 RUO Cas9 相当的高编辑效率和低细胞毒性。胞内检测结果与体外检测测定的活性一致。

A



B

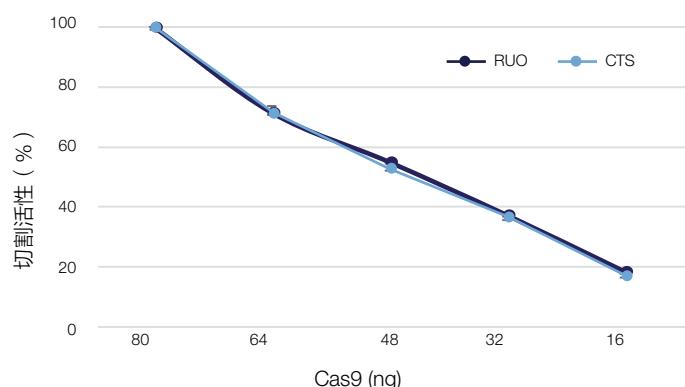
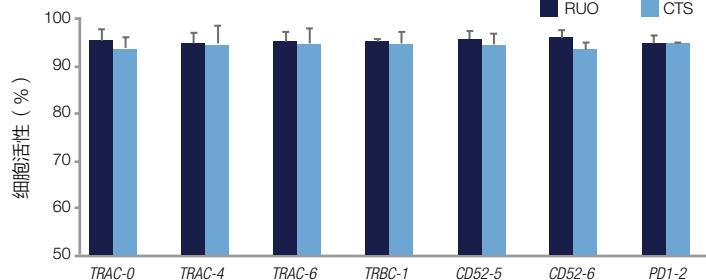


图 3. CTS Cas9 和 RUO Cas9 的体外切割效率相当。连续稀释 RUO Cas9 和 CTS Cas9 (80 ng-16 ng), 并测定切割活性。将不同量的RUO Cas9 (R) 和CTS Cas9 (C) 与过量 (40 ng) 靶向 HPRT 基因的 gRNAs 以及带有 HPRT 序列的模板质粒 (300 ng) 混合, 并在 37°C 下孵育 10 分钟。(A) 在琼脂糖凝胶上分析含有未切割和切割质粒的切割反应, 并使用 iBright 成像系统进行定量。(B) 将切割活性绘制成图。该实验共重复三次。

A



B

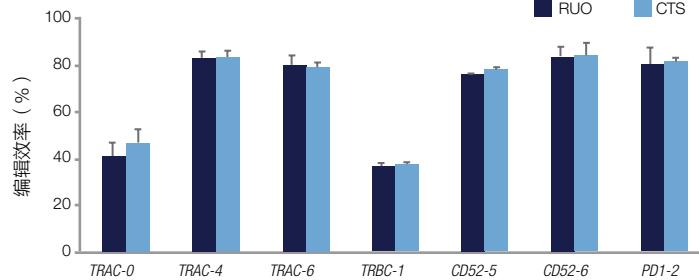


图 4. CTS Cas9 和 RUO Cas9 在 T 细胞中的细胞活性和编辑效率相当。将 CTS Cas9 和 RUO Cas9 (7.5 pmol) 分别与 Invitrogen™ TrueGuide™ 合成 sgRNA (7.5 pmol) 混合, 以形成两个 RNP 复合物。每个 RNP 复合物使用 Neon 转染系统 (10  $\mu$ L试剂盒) 转染 500,000 个 T 细胞。培养 72 小时后收获细胞。(A) 使用流式细胞仪测定和分析细胞活性。(B) 使用 Ion Torrent™ NGS 系统对所有靶点进行靶向扩增- 测序确认 (TAV) 的基于NGS 的编辑效率分析。该实验共重复三次。

## CTS Cas9 在 10x 放大生产过程中的性能

为了在更能代表自体 T 细胞疗法开发过程的更大电穿孔规模下评估 CTS Cas9 性能, 我们使用了更大规模的 Neon 转染系统 (100  $\mu$ L 试剂盒)。

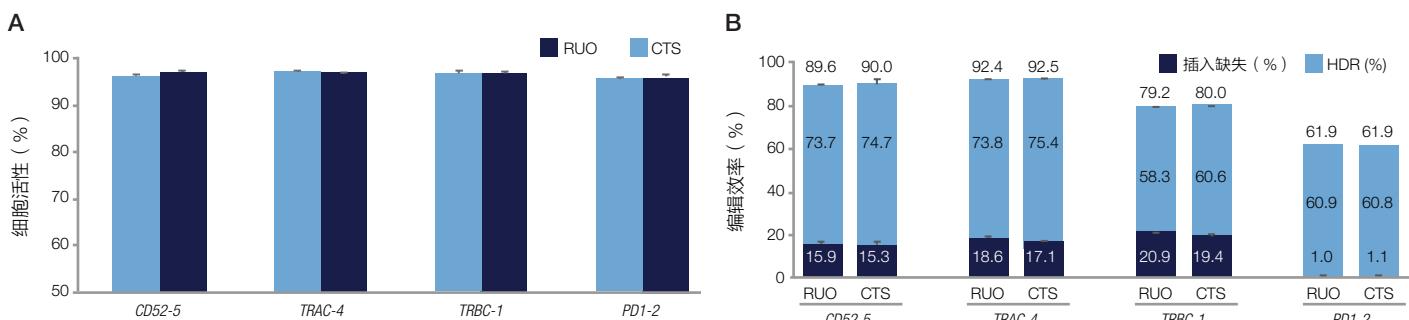
与图 2 中较小规模的电穿孔结果相似, 两种Cas9 蛋白的细胞活性在较大规模下仍然很高 (超过90%) (图 5A)。结果表明, 电穿孔过程中10x 的扩增并未对 CTS Cas9 性能造成负面影响。CTS Cas9 蛋白在两种电穿孔规模上的性能均与RUO Cas9 相当。

## 基于 HDR 的 CTS Cas9 基因敲入效率

鉴于精确的基因组编辑对细胞和基因治疗应用的重要性, 我们还对在原代 T 细胞中 CTS Cas9 介导的同源定向修复 (HDR) 基因敲入 (KI) 效率进行了评估。选择 4 个 CAR T 细胞相关基因

(TRAC、TRBC、PD1和CD52), 每个基因使用1个 gRNA。使用单链寡脱氧核苷酸 (ssODN) 作为供体 DNA 评价 HDR 百分比。配合使用Gibco™ CTS™ Xenon™ 基因组编辑缓冲液进行电穿孔, 该缓冲液优化了基于 HDR 敲入的效率。

在所有靶标上(图 5B), CTS Cas9 与 RUO Cas9的总编辑效率以及插入缺失和 HDR 的百分比相当。CTS Cas9 和 RUO Cas9 的总编辑效率均为 60%-90%, HDR 百分比为 40%-70%。这些结果表明, CTS Cas9提供了高敲入效率, 其结果与RUO Cas9 相当。



**图 5. CTS Cas9 在 10x 电穿孔规模下实现了基于 HDR 的高敲入效率。**将 CTS Cas9 和 RUO Cas9 (12.5  $\mu$ g或75 pmol) 与 TrueGuide 合成 sgRNA (75 pmol) 和 ssODN 供体 (150 pmol) 混合, 以形成RNP-ssODN。使用大规模 Neon 转染系统 (100  $\mu$ L 试剂盒) 将每个 RNP 转染至 5,000,000个 T 细胞中。培养 72 小时后收获细胞。(A) 使用流式细胞仪分析细胞活性。(B) 使用 Ion Torrent NGS 系统通过靶向扩增子-测序确认 (TAV) 测定基于 HDR 和插入缺失计算的供体整合百分比。该实验共重复三次。

## 多个生产批次中CTS Cas9 性能的一致性

为了进一步评估生产过程的一致性，在几个月的时间内以全生产规模生产了三个批次的CTS Cas9。对于每批 CTS Cas9，都进行了相同的稀释，以此测定每个剂量的切割活性，并评估原代T 细胞中TRAC-4 和 CD52-6 的编辑效率。在 T 细胞靶点未检测到批间差异（图 6）。

## 结论

CRISPR-Cas9 在细胞和基因治疗中的应用有无限潜力。在这项研究中，我们强调了CTS TrueCut Cas9 蛋白遵循的广泛质量规范和一致的

批间性能。我们还证明了不同电穿孔规模下，CTS TrueCut Cas9 蛋白与我们的明星产品 RUO 级别 TrueCut Cas9 蛋白v2在原代 T 细胞中的编辑效率相当。这证实了GMP 级别的生产工艺扩大并未对CTS Cas9 性能造成负面影响。我们还表明，当使用 Cas9蛋白与优化的 CTS Xenon 基因组编辑缓冲液时，可实现基于 HDR的高效插入效率。随着CTS TrueCut Cas9 蛋白的上市，现在您可以更自信地加速您的治疗开发，Thermo Fisher 始终致力于为您提供满足细胞和基因治疗开发所需规模的高品质产品。

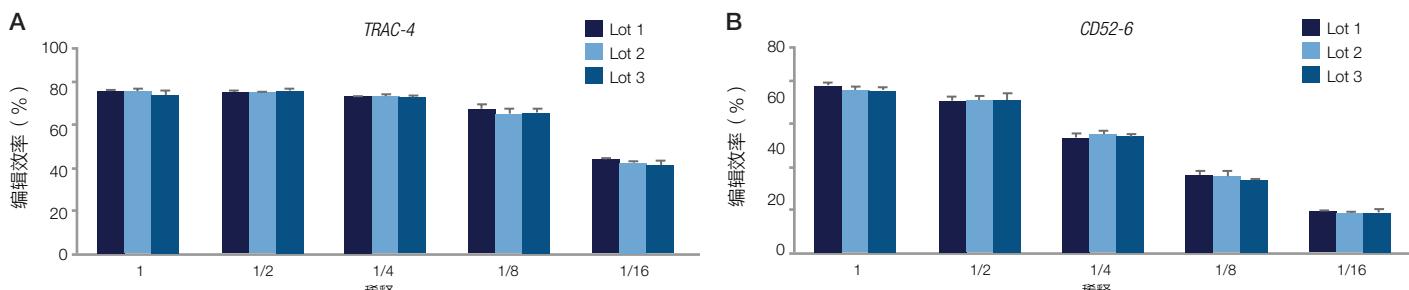


图 6. 多个批次 CTS Cas9 在 T 细胞中的性能一致。对来自 3 个生产批次的 CTS Cas9 蛋白进行连续稀释。将不同量的 CTS Cas9（未稀释的 7.5 pmol）与 7.5 pmol 的 (A) TRAC-4 或 (B) CD52-6 TrueGuide 合成 sgRNA 混合，并使用 Neon 转染系统 (10  $\mu$ L试剂盒) 转染 T 细胞。转染 72 小时后，使用一对引物扩增切割位点片段并裂解细胞。使用 Ion Torrent NGS 系统对扩增子进行条形码编码和测序，并使用内部开发的编辑效率分析工具进行分析。该实验共重复三次。

详情请访问 [thermofisher.com/ctscas9](http://thermofisher.com/ctscas9)



赛默飞  
官方微信



赛默飞  
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: [cnbidmarketing@thermofisher.com](mailto:cnbidmarketing@thermofisher.com)

[www.thermofisher.cn](http://www.thermofisher.cn)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC