

造血干细胞基因治疗和组学研究

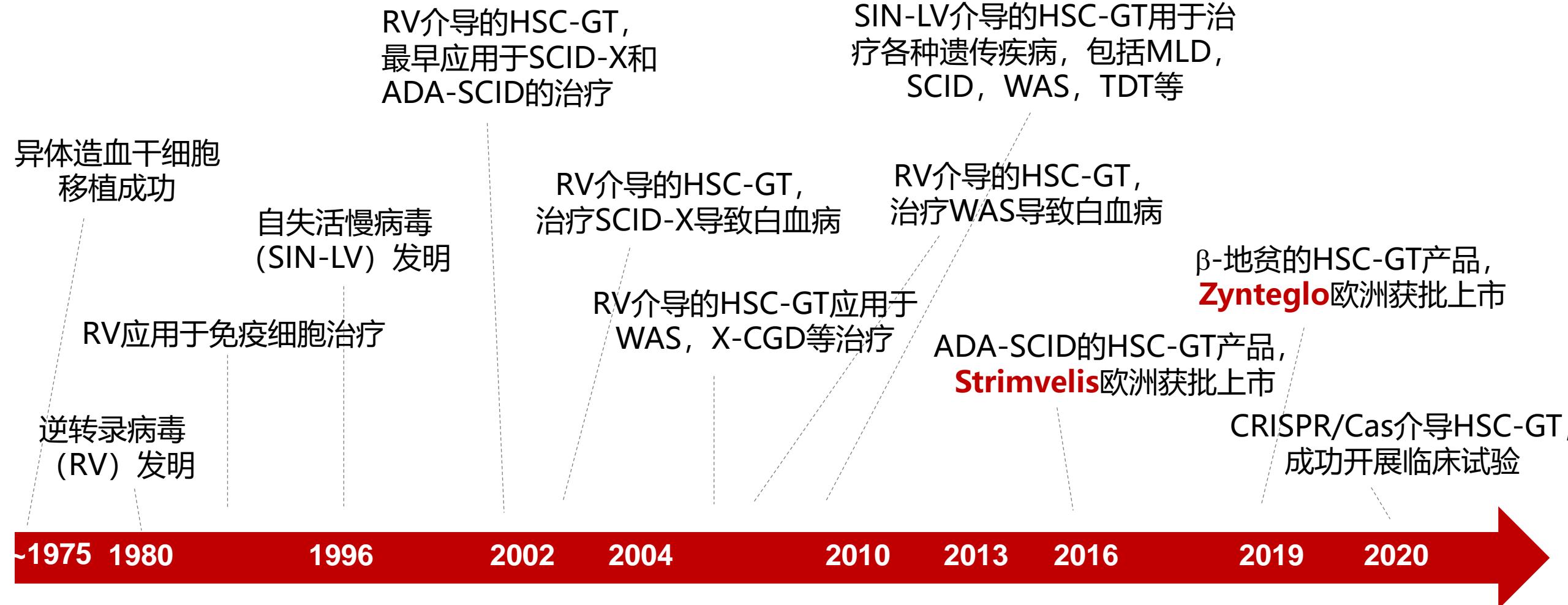
刘超 博士

深圳华大生命科学研究院/禾沐基因

20211202

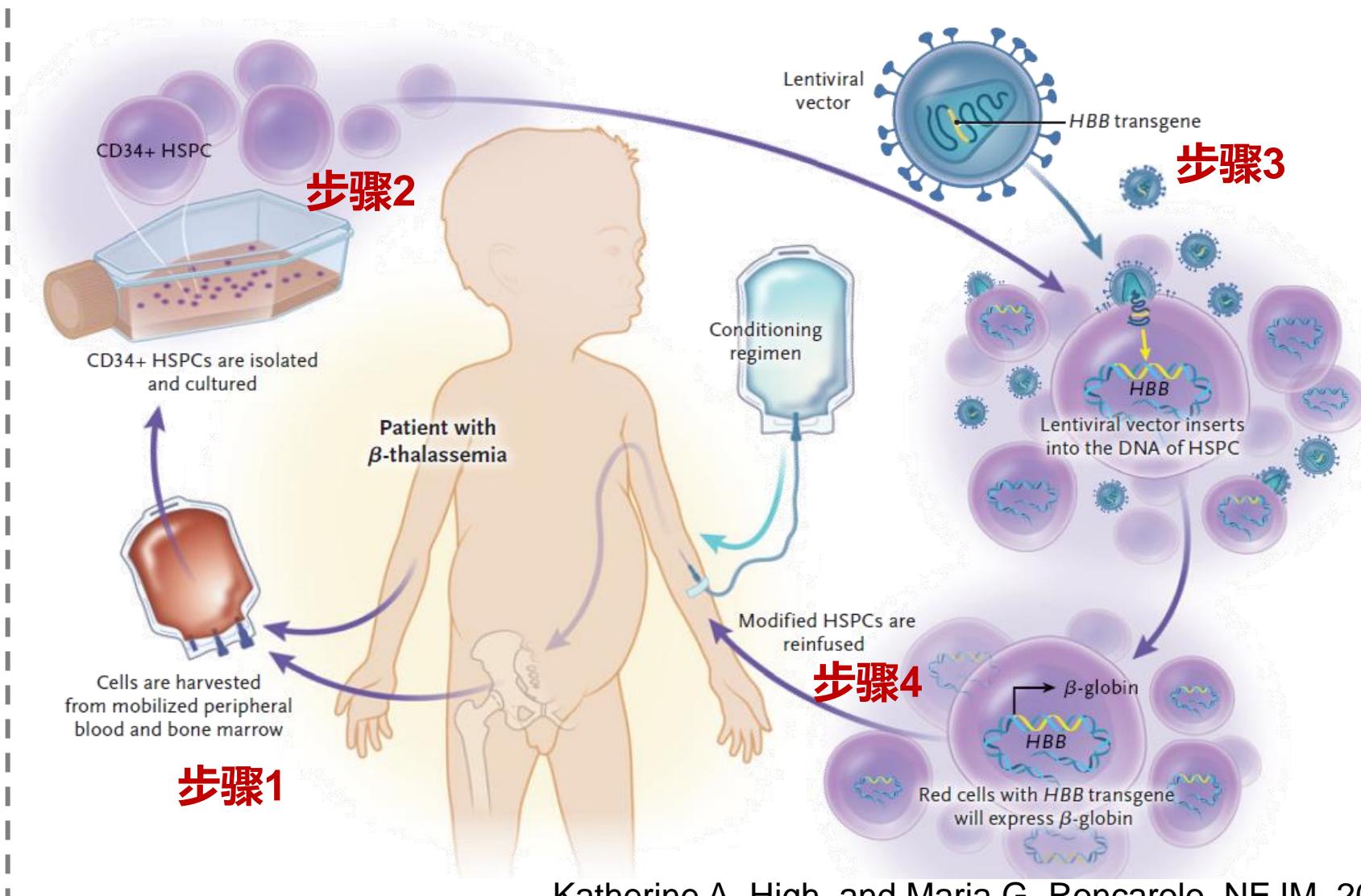
造血干细胞基因治疗 (HSC-GT) 的发展历程

载体由逆转录病毒到慢病毒和RNP电转；治疗疾病由先天免疫缺陷综合征到各种单基因病



造血干细胞基因治疗的流程示意图

HSC-GT基于患者自体造血干细胞移植，可解决供着来源和免疫排斥问题

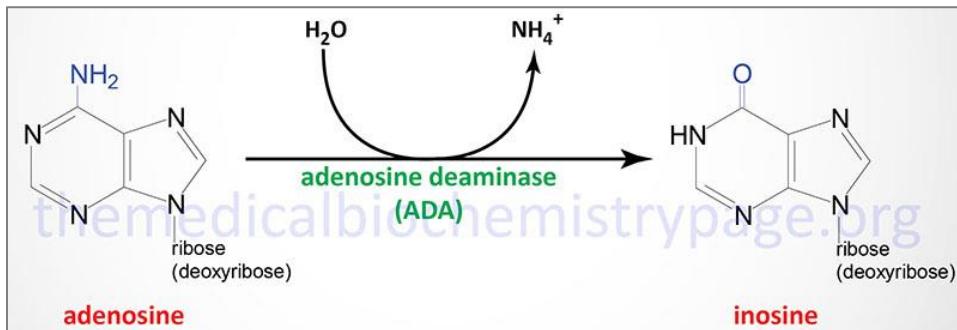


Katherine A. High, and Maria G. Roncarolo, NEJM, 2019

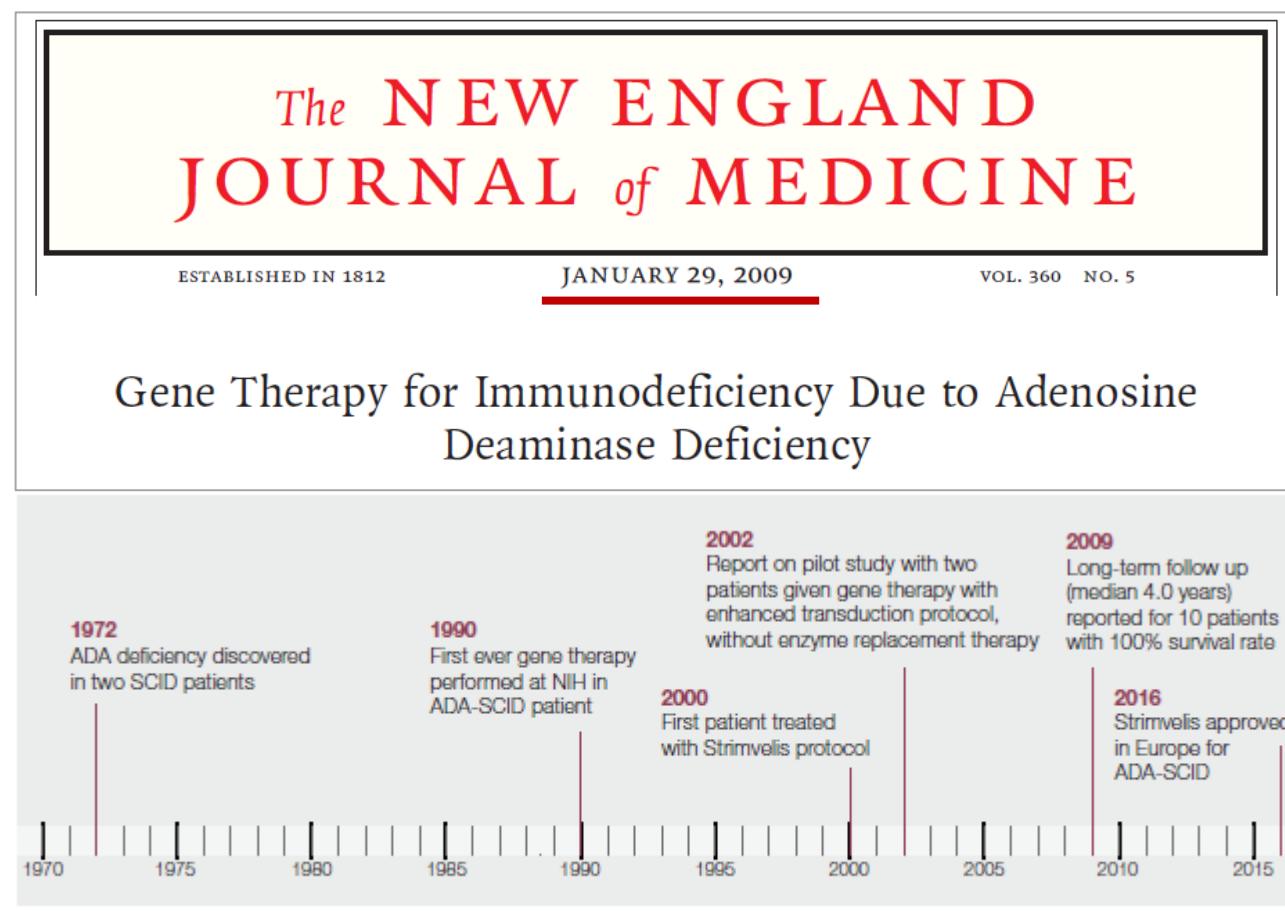
腺苷脱氨酶重症联合免疫缺陷症/ADA-SCID

(adenosine deaminase severe combined immunodeficiency)

- 由于腺苷脱氨酶ADA突变，异常代谢产物积累，**导致免疫系统受损，易发生严重感染；发病率约为0.2-0.6/10万；**
- ADA-SCID是**第一个接受HSC-GT的疾病，相关药物Stimvelis在欧洲2016年获批上市（售价59.4万欧元）**；



气泡“男孩” (Bubble boy)



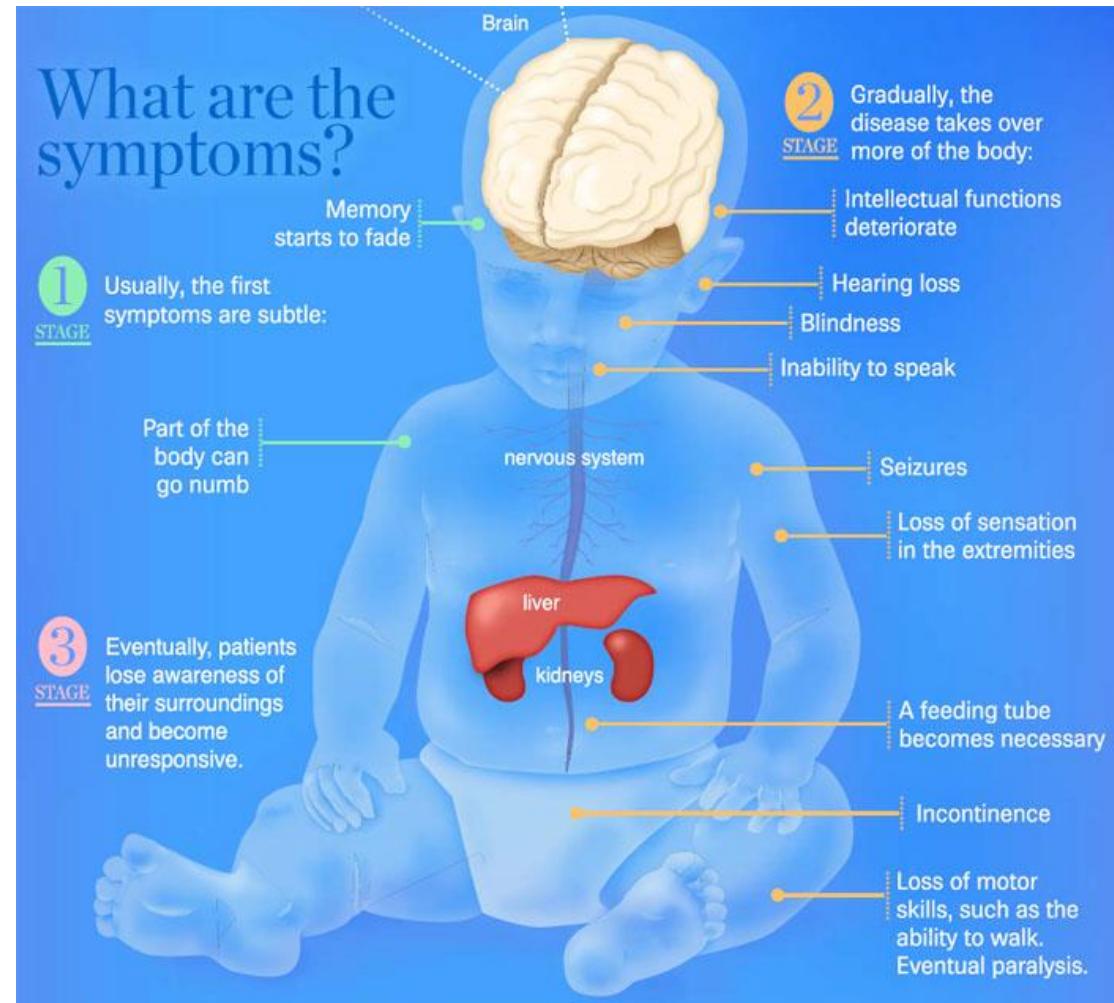
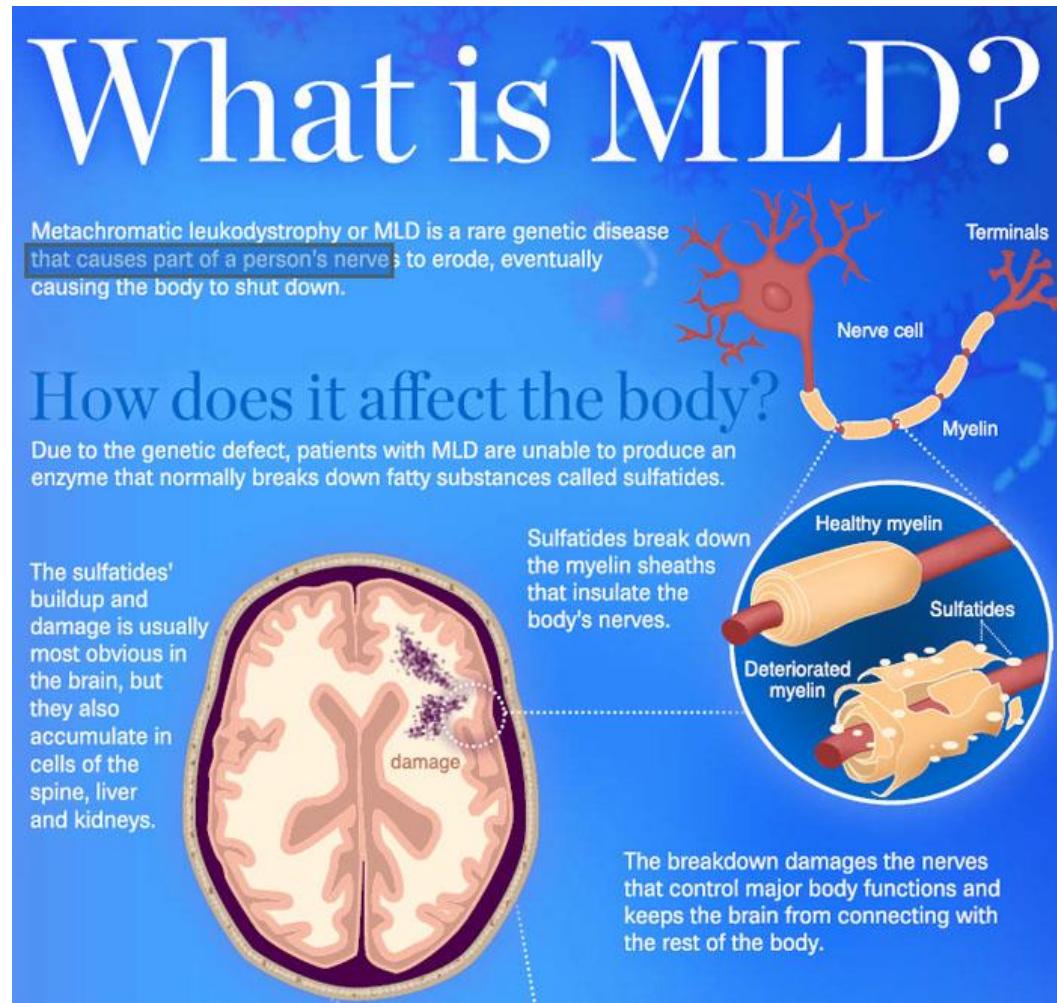
HSC-GT治疗ADA-SCID效果 (adenosine deaminase severe combined immunodeficiency)

Table 2. Clinical Outcomes of the Study Patients.*							
Patient No.	Clinical History before Gene Therapy	Years of Follow-up	Relevant Infections after Gene Therapy	Serious Adverse Events after Gene Therapy	PEG-ADA	Clinical Condition after Gene Therapy	Copies of Vector no./cell
1	Recurrent respiratory infection, failure to thrive	8.0	None	None	No	Well	
2	Chronic diarrhea, recurrent respiratory infection, scabies, failure to thrive	7.5	Skin molluscum, urinary infection	None	Initiated 4.5 yr after gene therapy	Well	
3	Recurrent respiratory infection, dermatitis, failure to thrive, eating disorder	6.3	None	Prolonged neutropenia and thrombocytopenia	No	Well	2.20
4	Recurrent respiratory infection, oral infection with <i>Candida albicans</i> , skin BCG and bacterial infections, chronic diarrhea, failure to thrive	5.9	Varicella	None	No	Well	ND 0.85
5	Recurrent respiratory infection, aseptic meningitis, chronic diarrhea, failure to thrive	4.4	Varicella	None	No	Well	ND
6	CMV lung infection, EBV infection, recurrent respiratory infection, hearing deficit, failure to thrive	3.8	CVC-related infection, EBV reactivation, varicella	None	No	Well	1.89
7	Facial dysmorphism, eating disorder, staphylococcal infection, oral and genital infection with <i>C. albicans</i> , failure to thrive	2.8	None	Autoimmune hepatitis	No	Well, but with eating disorder	1.05 0.83
8	Developmental delay, recurrent respiratory infection, autoimmune hemolytic anemia, macrophage activation syndrome, hearing deficit, failure to thrive	2.5	Recurrent respiratory infection, urinary infection	Hypertension, prolonged neutropenia, autoimmune thrombocytopenia	Restarted 0.4 yr after gene therapy	Mild symptoms	0.12
9	<i>Pneumocystis jiroveci</i> pneumonia	1.9	Gastroenteritis	None	No	Well	0.57
10	Postvaccinal BCG infection, recurrent respiratory infection, developmental delay, neurosensory deafness, genital ambiguity, congenital adrenal insufficiency, hypothyroidism, failure to thrive	1.8	CVC-related infection (two)	None	No	Well, but with developmental delay	0.35

* Serious adverse events were those other than serious infections during the follow-up period after gene therapy. BCG denotes bacille Calmette–Guérin, CMV cytomegalovirus, CVC central venous catheter, EBV Epstein–Barr virus, and PEG-ADA polyethylene glycol-modified bovine adenosine deaminase.

异染性脑白质营养不良/MLD (Metachromatic leukodystrophy)

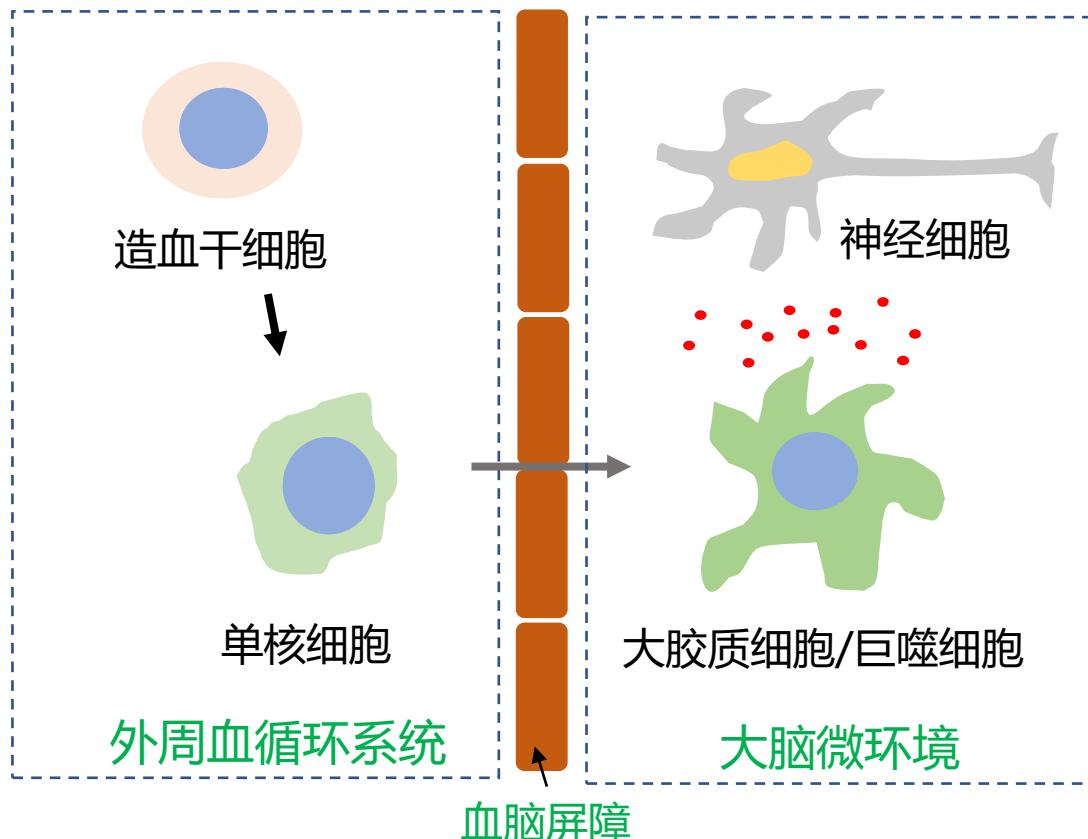
- 异染色质脑白质营养不良(MLD)，**属于神经类遗传性罕见病，发病率约为1/3.5万；**
- MLD缺失**催化脑硫脂的ARSA (arylsulfatase A)**，影响髓鞘及神经的功能。



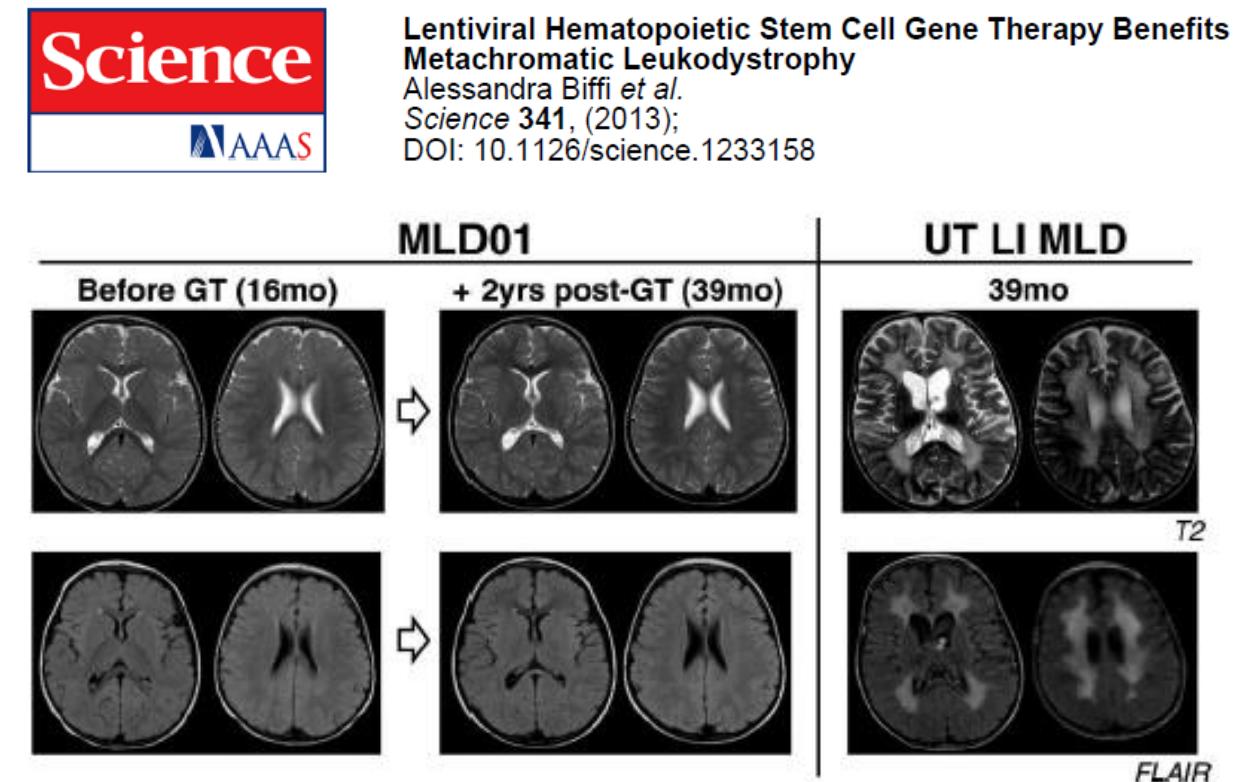
HSC-GT治疗MLD的原理 (Metachromatic leukodystrophy)

- 异体造血干细胞移植可用于治疗该类疾病；**血细胞可穿透血脑屏障，分化后分泌缺失的蛋白；**
- 相较于异体造血干细胞移植，**HSC-GT可表达更多功能蛋白，治疗效果更好。**

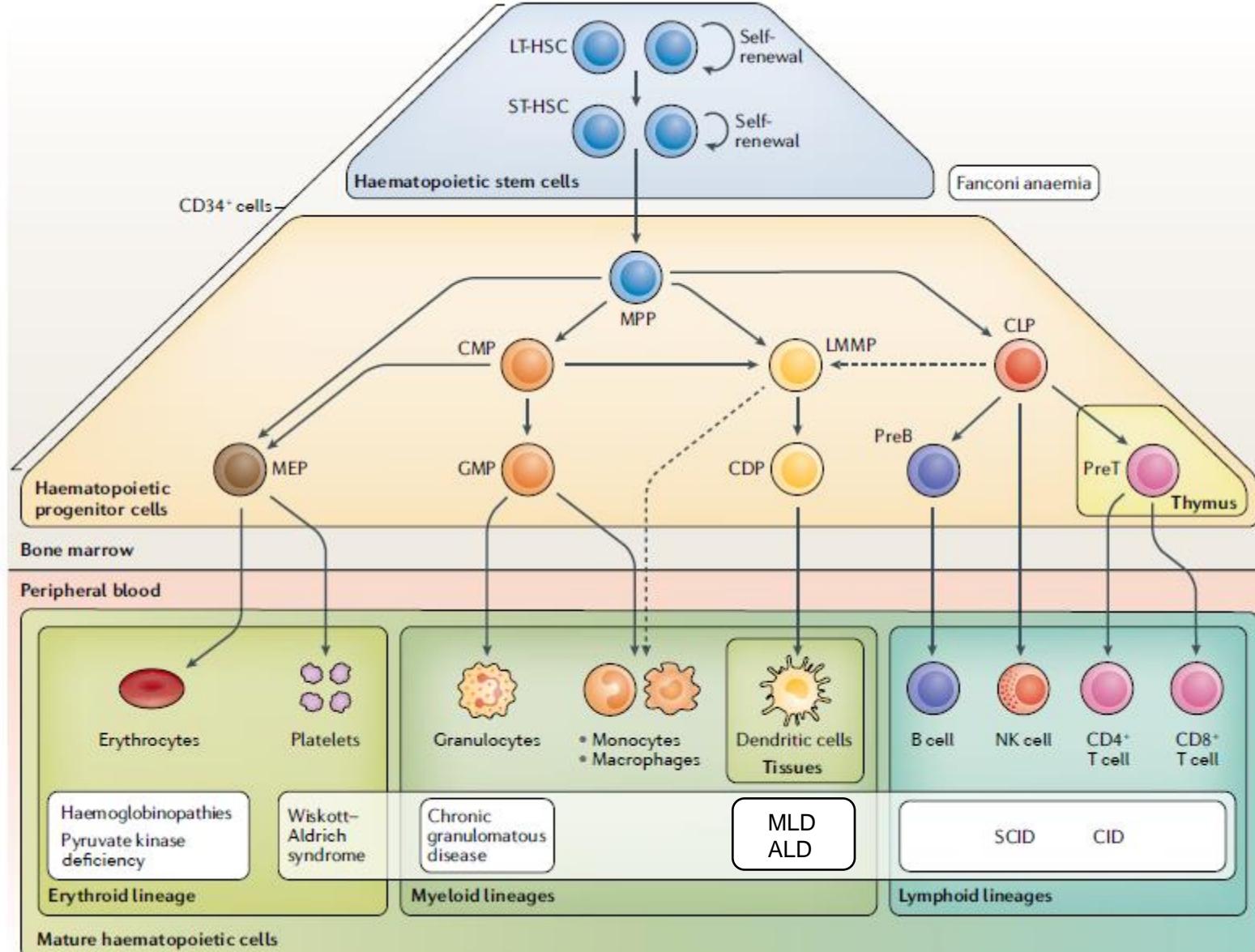
造血系统与大脑功能的联系



HSC-GT治疗可以阻止疾病进展



HSC可分化为所有的血细胞，HSC-GT可影响相关功能



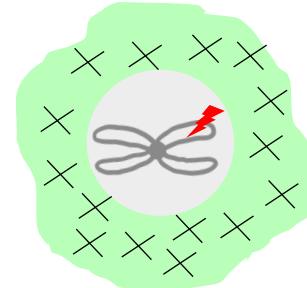
HSC-GT可在“原位”和“异位”起作用

**疾病发生在血液系统
通过HSC弥补血细胞缺失基因**

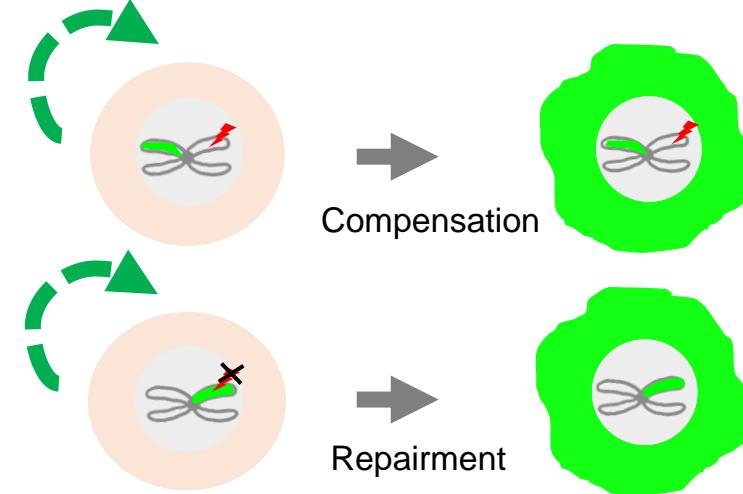
- 地中海贫血
- 重症联合免疫缺陷症
- Wiskot-Aldrich 综合症

A

Defects in blood cells



HSCs as target for gene therapy

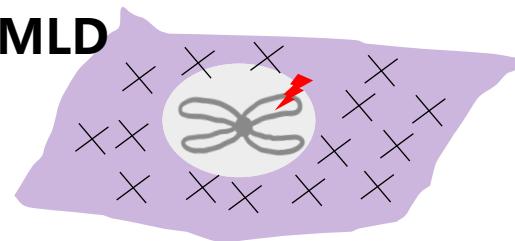


**疾病发生在其他系统
通过HSC过表达其他基因**

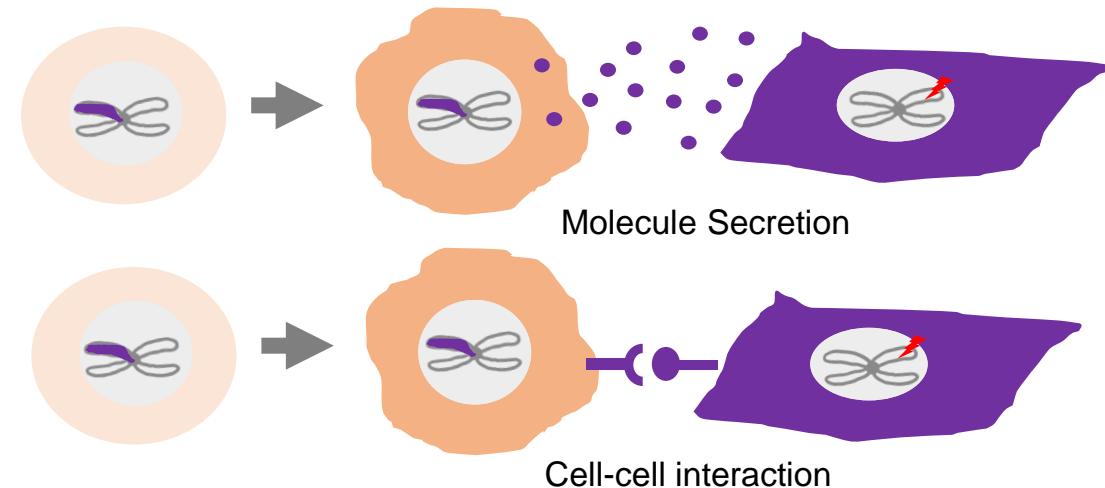
- 异染性脑白质营养不良/MLD
- 脑白质退化症/X-ALD
- 溶酶体储积症/LSD
- 实体瘤/adoptive T cell therapy

B

Defects in other tissue cells



HSCs as delivery system for gene therapy



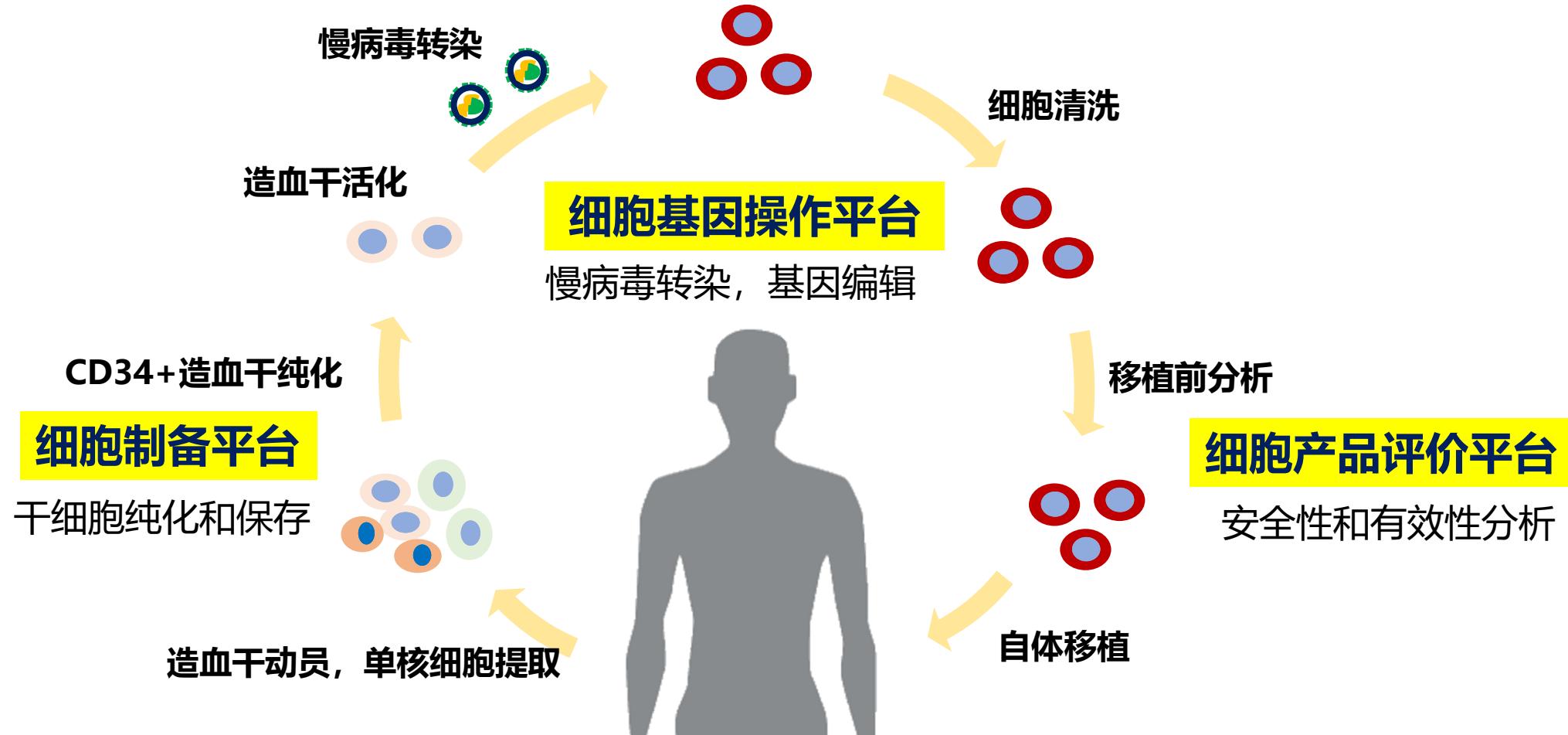
目前已进入临床的HSC-GT

Disease	Trial number (phase)	Starting year; sites	Vector	Conditioning	Number of patients	Refs
<i>Primary immune deficiencies</i>						
SCID-X1	NCT01410019, NCT01129544 (phase I/II)	2010; France, USA	SIN gRV EF1aSprom-IL-2R γ	No	9	³¹
WAS	NCT01347346, NCT01347242 (phase I/II)	2011; France, UK	SIN LV WASprom-WAS	Yes	11	^{4,a}
ADA-SCID	NCT01380990, NCT01852071, NCT02999984 (phase I/II)	2012; UK, USA	SIN LV EF1aSprom-ADA	Yes	61	^{18,b}
CGD	NCT02757911 (phase I/II)	2016; France	SIN LV Chimericprom-CYBB	Yes	2	^c
<i>Haemoglobinopathies</i>						
β -Thal	LG001 (phase I/II)	2007; France	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Yes	2	⁷²
SCD	NCT02151526 or HGB205 (phase I/II)	2013; France	SIN LV LCR- β prom- β -globin	Yes	3	^{7,c}
<i>Metabolic disorders</i>						
X-ALD	NA	2006; France	SIN LV MNDprom-ABCD1	Yes	4	⁶⁹
MLD	NCT01560182 (phase I/II)	2010; Italy	SIN LV PGKprom-ARSA	Yes	20	^{8,9}

Marina Cavazzana, et al, 2019, Nat Rev Drug Discovery

造血干细胞基因治疗是一个平台技术

基因X缺失，导致表型A -----> 基因治疗 -----> 慢病毒表达外源基因X，挽救表型A
β珠蛋白缺失，输血依赖型 β地贫 -----> 慢病毒携带HBB基因 -----> 表达外源β珠蛋白，摆脱输血



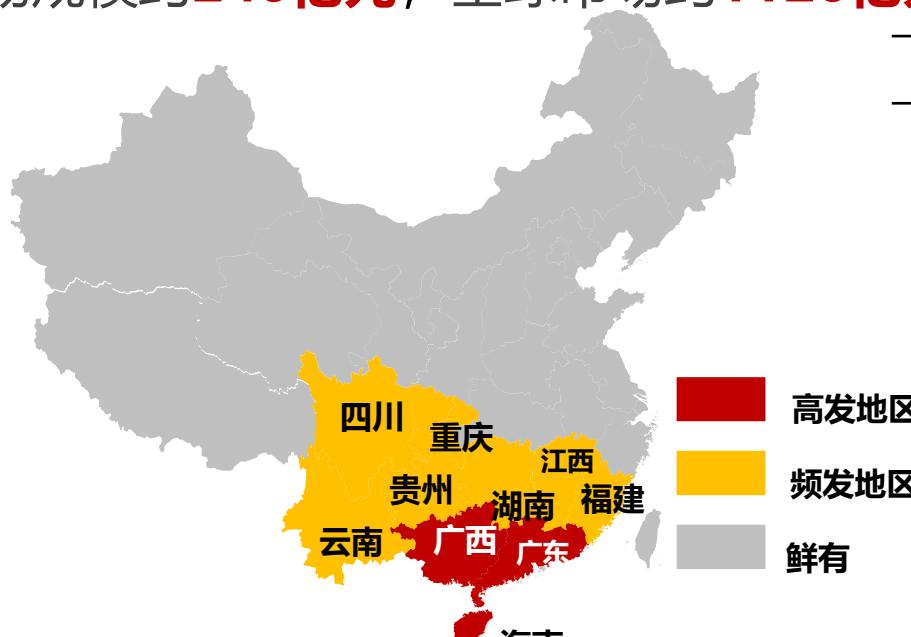
以 β 地中海贫血基因治疗为切入点，建立以造血干细胞为基础的基因治疗平台

地中海贫血：大量市场需求未被满足

- 地中海贫血广泛分布于世界许多地区，以**地中海沿岸、东南亚（一带一路）及中国南部（广东、广西、海南）**发病率较高；
- 目前全球重型地中海贫血约为28万人，中国约有重型地中海贫血患者4-6万人；但异体造血干细胞年移植量仅500例左右；**大量市场需求未被满足**；
- 全球新增地贫患者约5-8万人/年，中国新增地贫患者约1000人/年；
- 我国重型地贫造血干细胞移植市场规模约**240亿元**，全球市场约**1120亿元**，**国际化是趋势**。



全球地贫分布



我国地贫分布

地区	携带率(%)
广西	23.98
广东	16.8
海南	15.12
云南	10.7
贵州	10.68
四川	4.92
重庆	6.63
湖南	4.13
江西	2.63-9.49
福建	4.41

“C+隔离器”工艺成功完成三例临床样品的制备





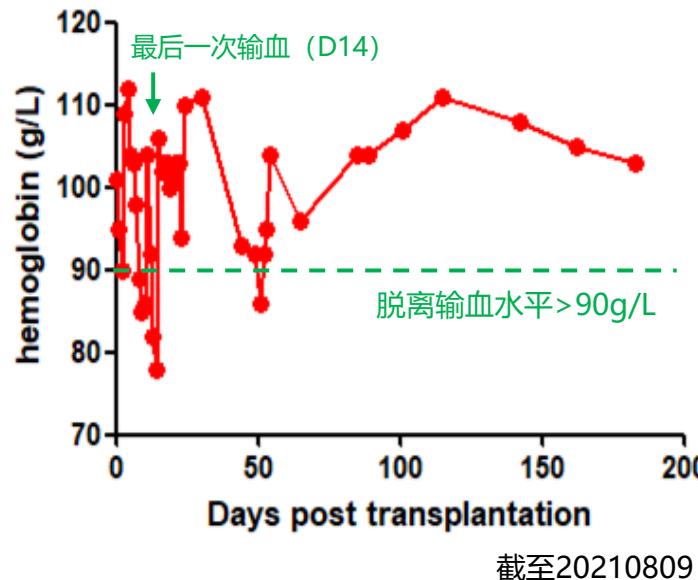
禾沐基因
Hemogen
第一例患者已摆脱输血超过8个月

20210208-20210303



禾沐基因地贫基因治疗IIT结果小结

血红蛋白曲线



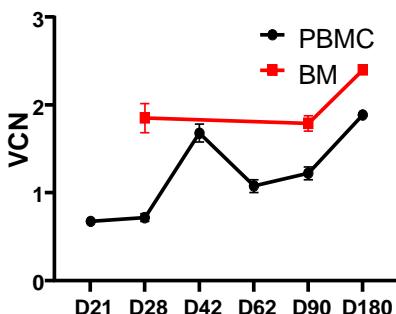
第二例和第三例也已经成功出舱，摆脱输血

20210528-20210617

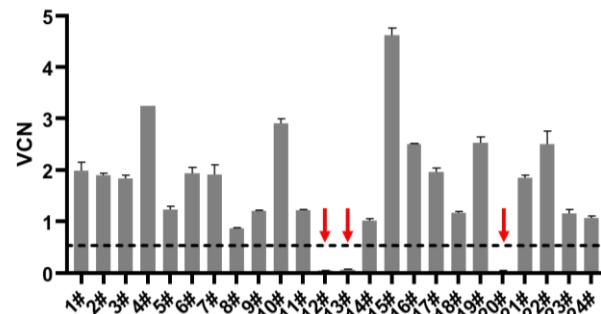
20210604-20210629



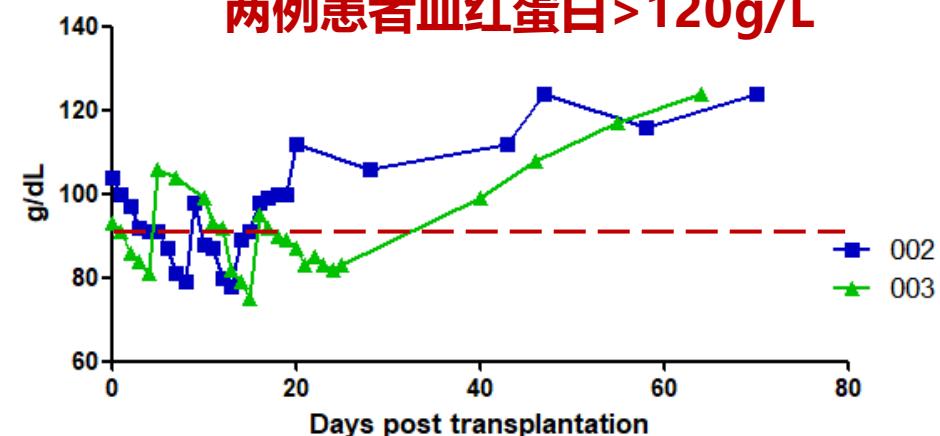
细胞编辑效率体内维持稳定，可对标国际一流企业



3M BM CFU



两例患者血红蛋白>120g/L



禾沐基因研究者发起临床试验小结

- 1) 细胞产品回输**安全性高**，三例IIT患者中未观察到产品相关副作用；
- 2) 回输后造血系统**重建速度较快（出舱约3周）**，化疗副作用可管控；
- 3) 三例患者**脱离输血速度均较快（约2周）**；
- 3) 第一例患者**已脱离输血>8个月**；
- 5) 第二例患者（0528）和第三例患者（0604）亦已脱离输血>4个月；
- 6) 长期有效性和安全性仍有待观察。

禾沐基因由深圳华大生命科学研究院孵化成立

2018年4月，华大研究院
地贫治疗战略项目立项

2019年，完成病毒构建和
验证；建立造血干细胞制
备工艺和质检方法

2020年，完成临床前试验，启动
研究者发起临床研究（IIT）

2021年6月，成功完成
三例IIT患者的临床回输

2021年7月，禾沐基因
正式注册成立

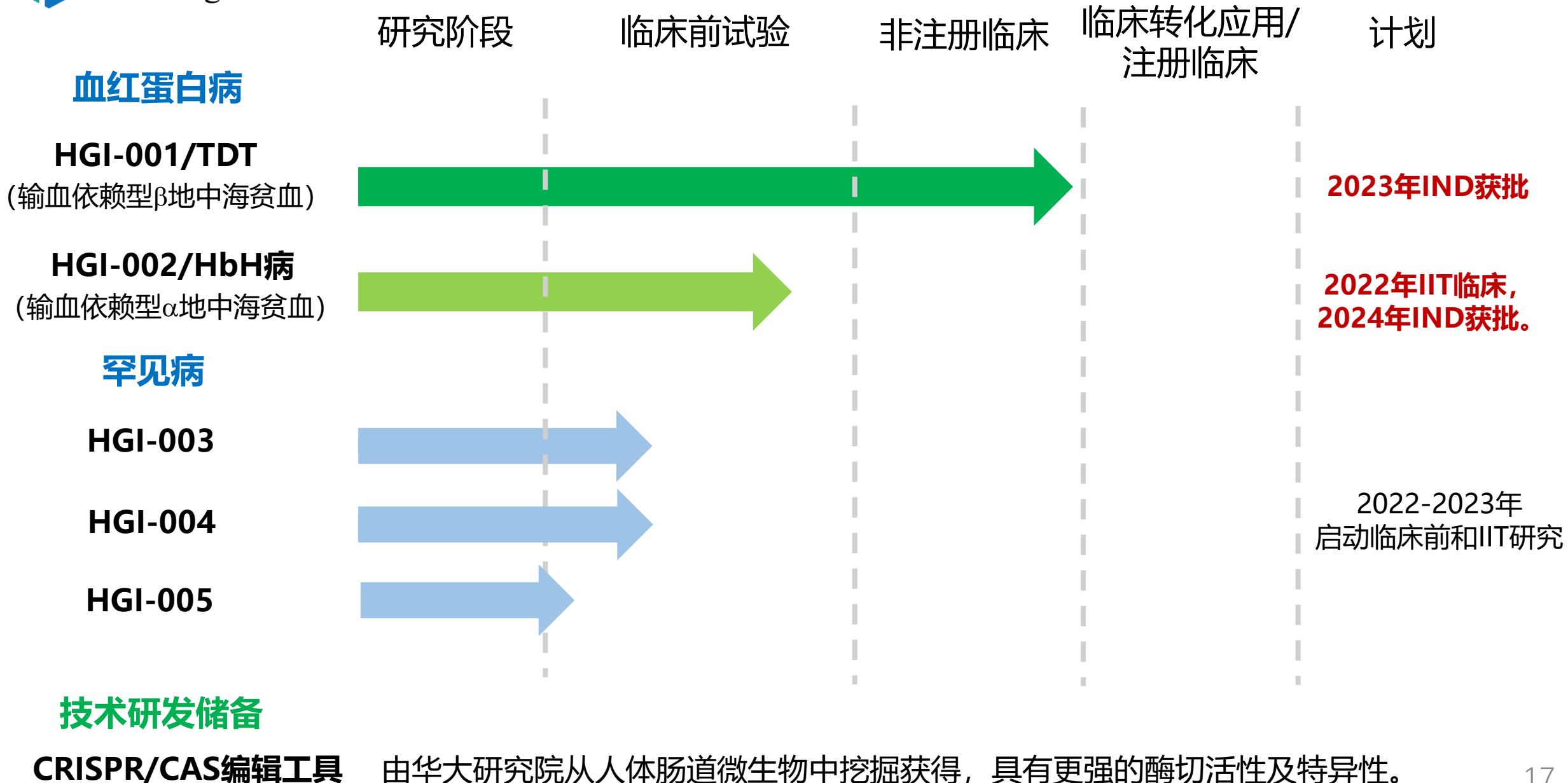


禾沐基因
Hemogen

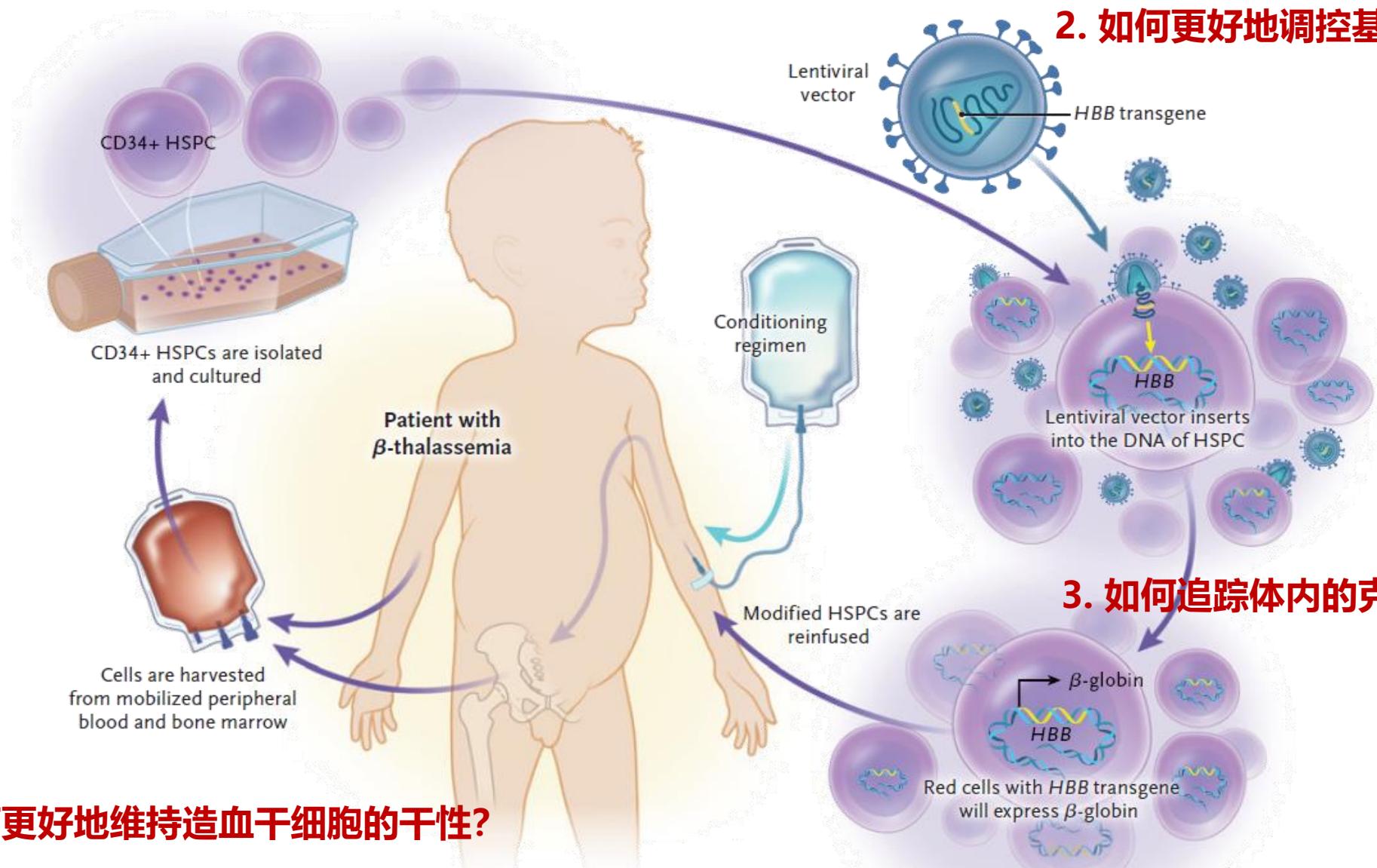
华大集团控股子公司

遵循华大愿景：**基因科技造福人类**
专注**造血干细胞基因治疗（HSC-GT）**

禾沐基因主要产品线



HSC-GT和组学的应用



1. 如何更好地维持造血干细胞的干性?

2. 如何更好地调控基因的表达?

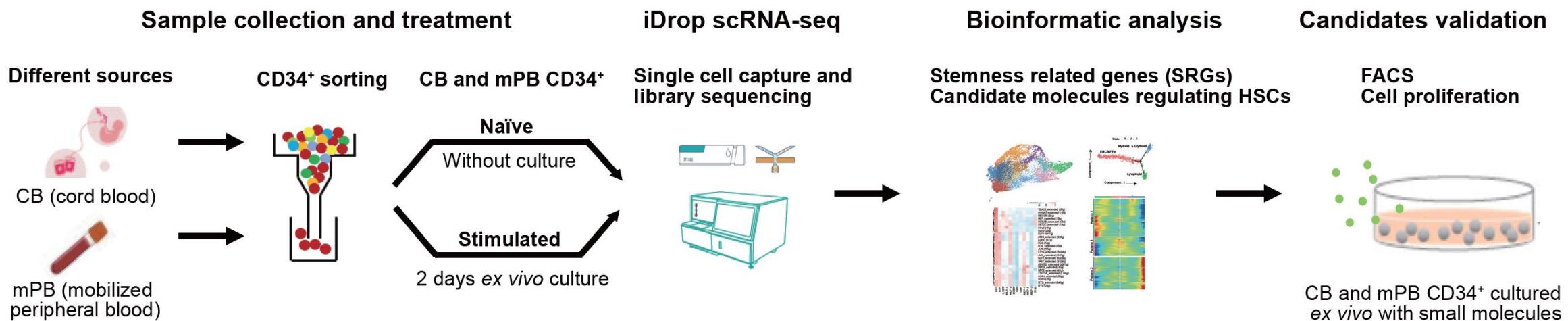
3. 如何追踪体内的克隆增生?

如何更好地维持造血干细胞的干性?

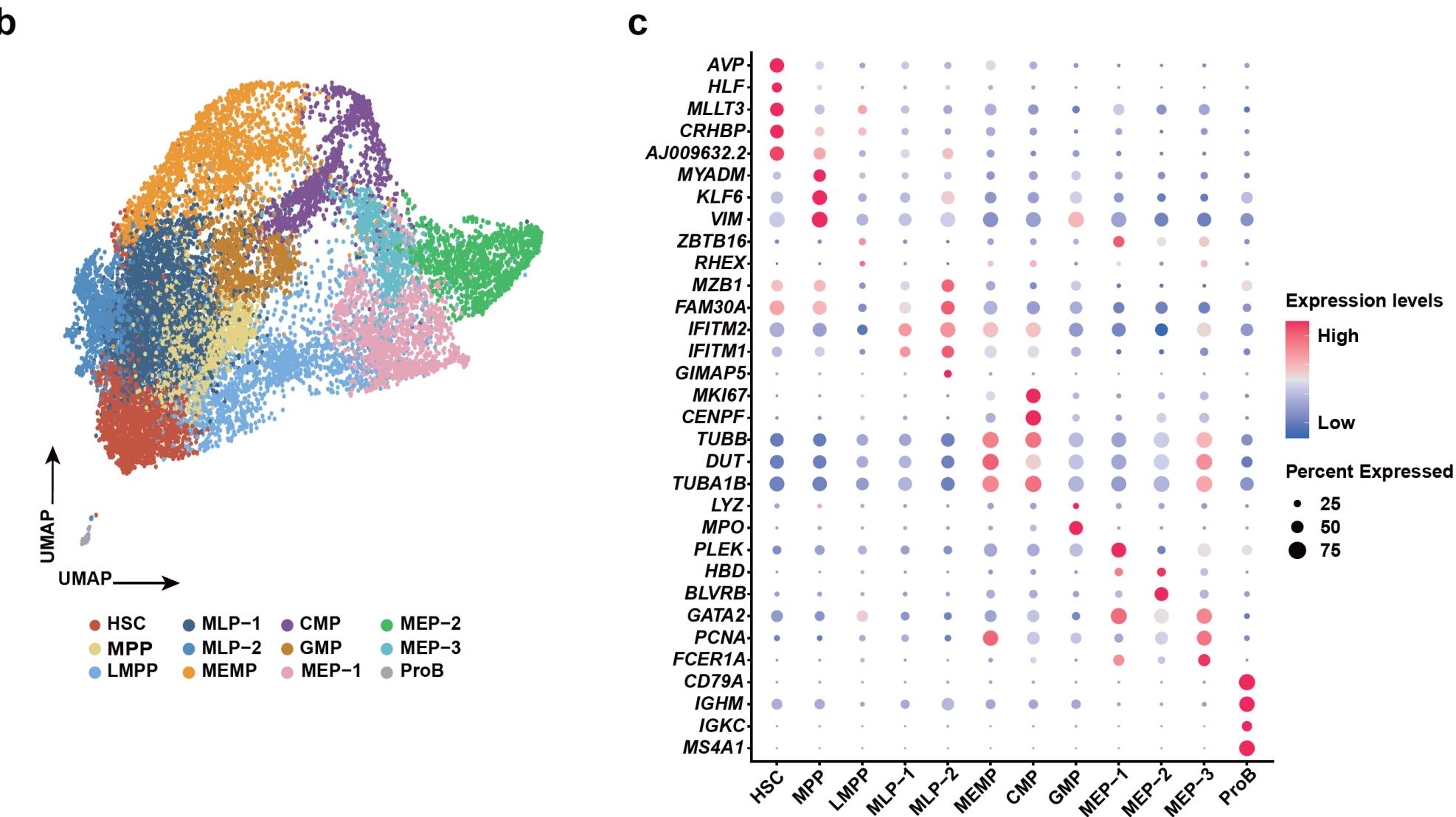
利用单细胞转录组测序技术挖掘人造造血干细胞干性相关的基因

- 1) 脐血来源人CD34⁺细胞的干性优于动员外周血来源
- 2) 人CD34⁺造血干细胞在体外培养过程中逐渐丧失干性

a



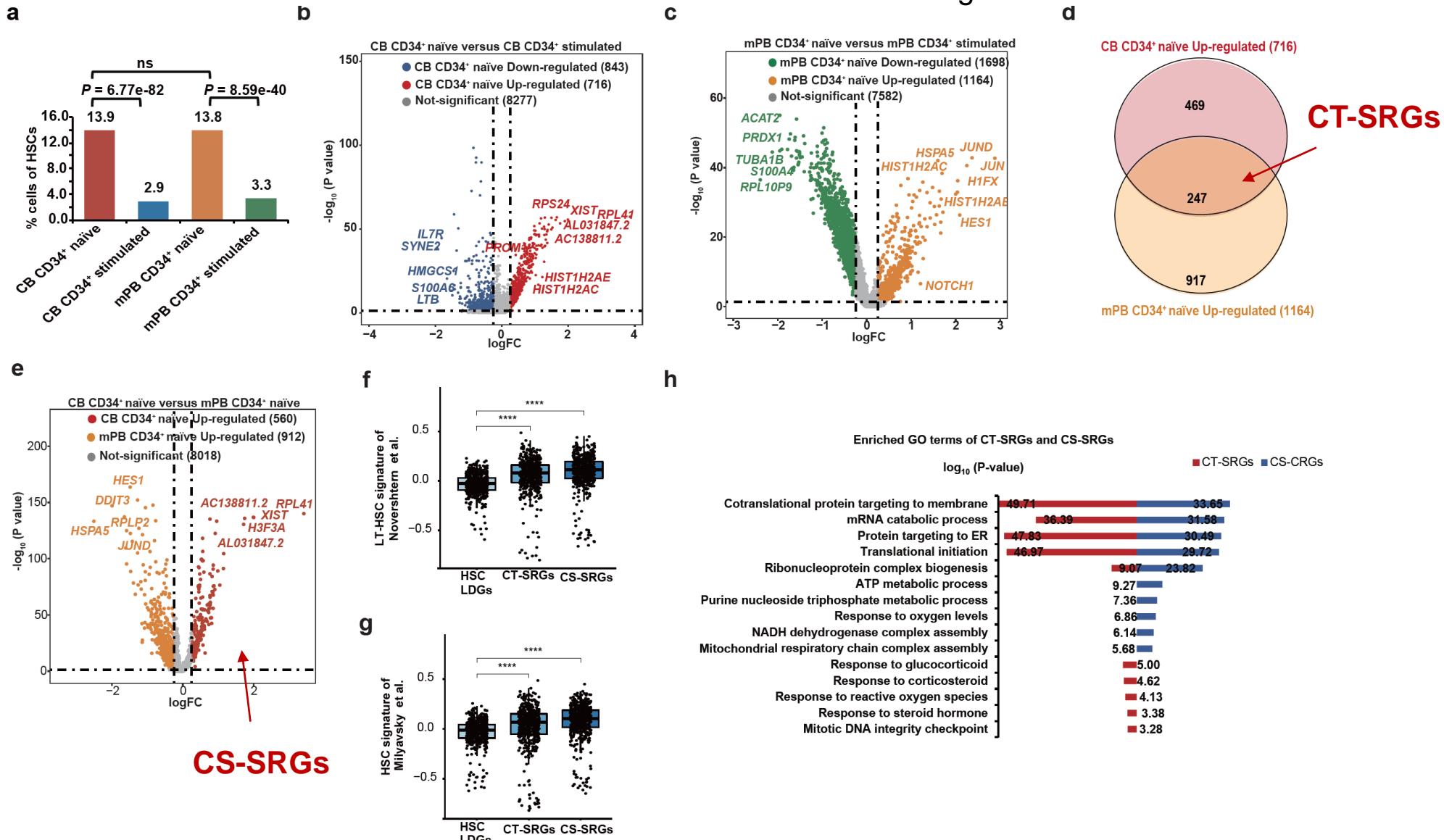
人CD34+细胞的亚群分类和定义



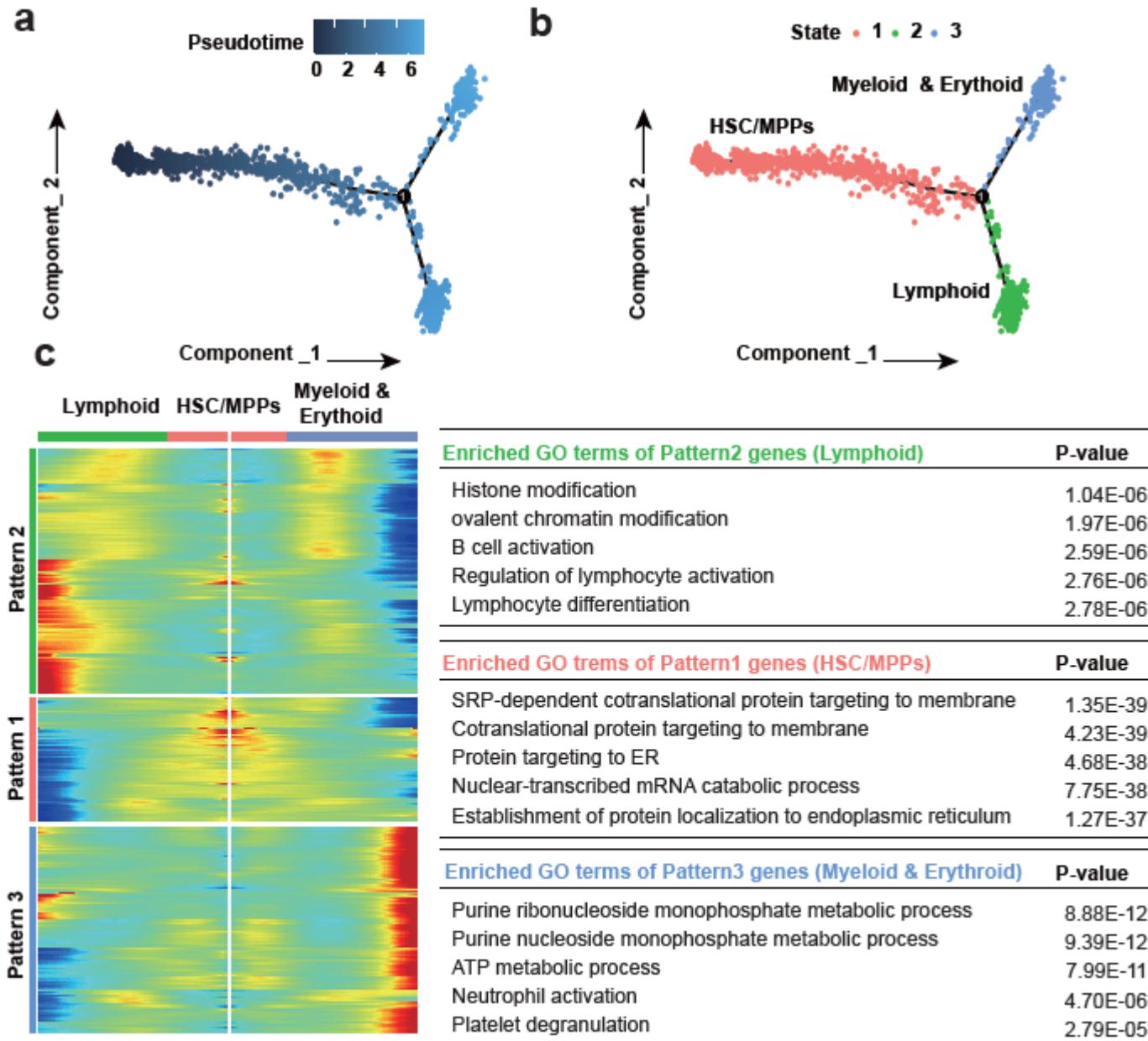
挖掘与细胞来源 (CS) 和培养时间 (CT) 相关的干性基因

CT-SRGs: culture time associated stemness related genes

CS-SRGs: cell source associated stemness related genes

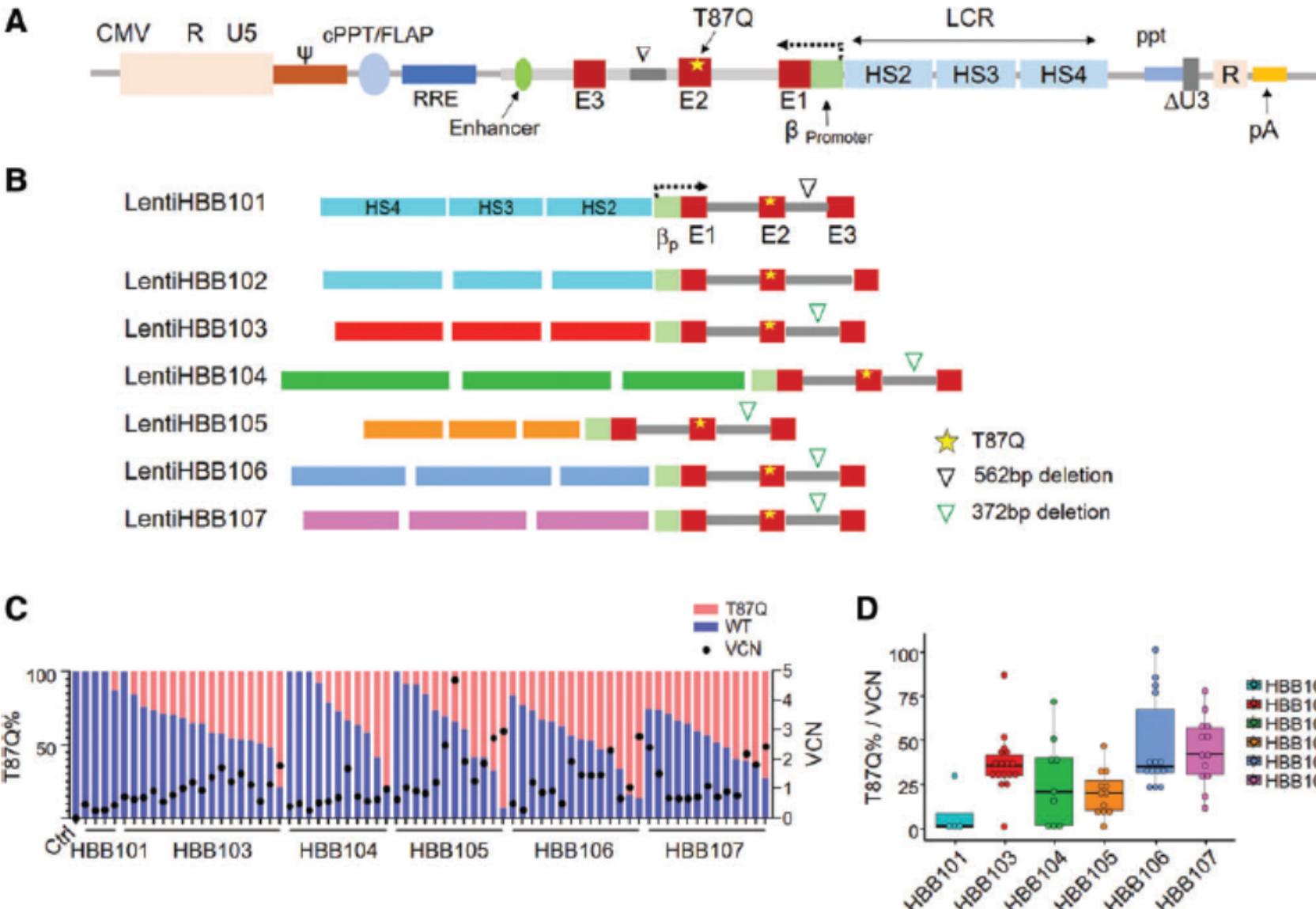


CT-SRGs可以更好地描绘造血干细胞的分化轨迹



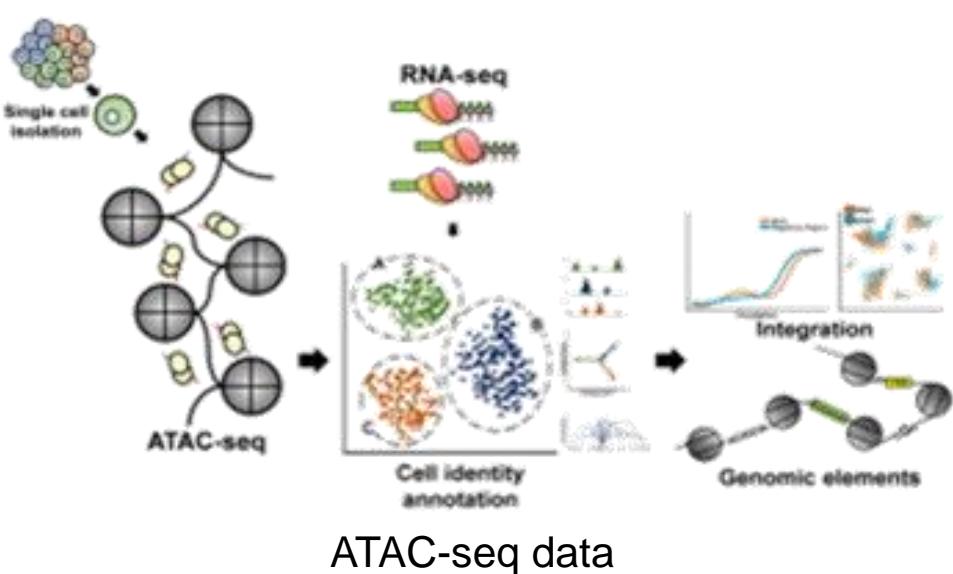
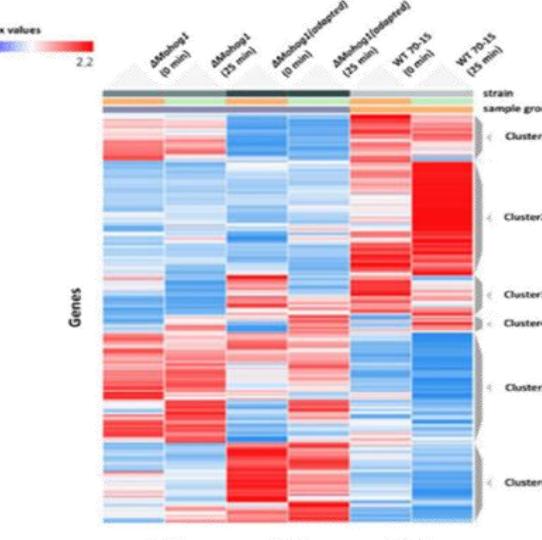
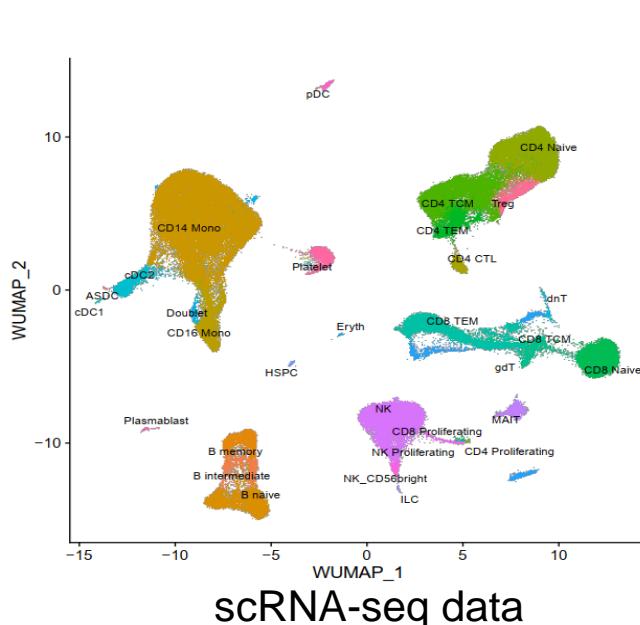
如何更好地调控基因的表达?

鉴定调控HBB的LCR区域

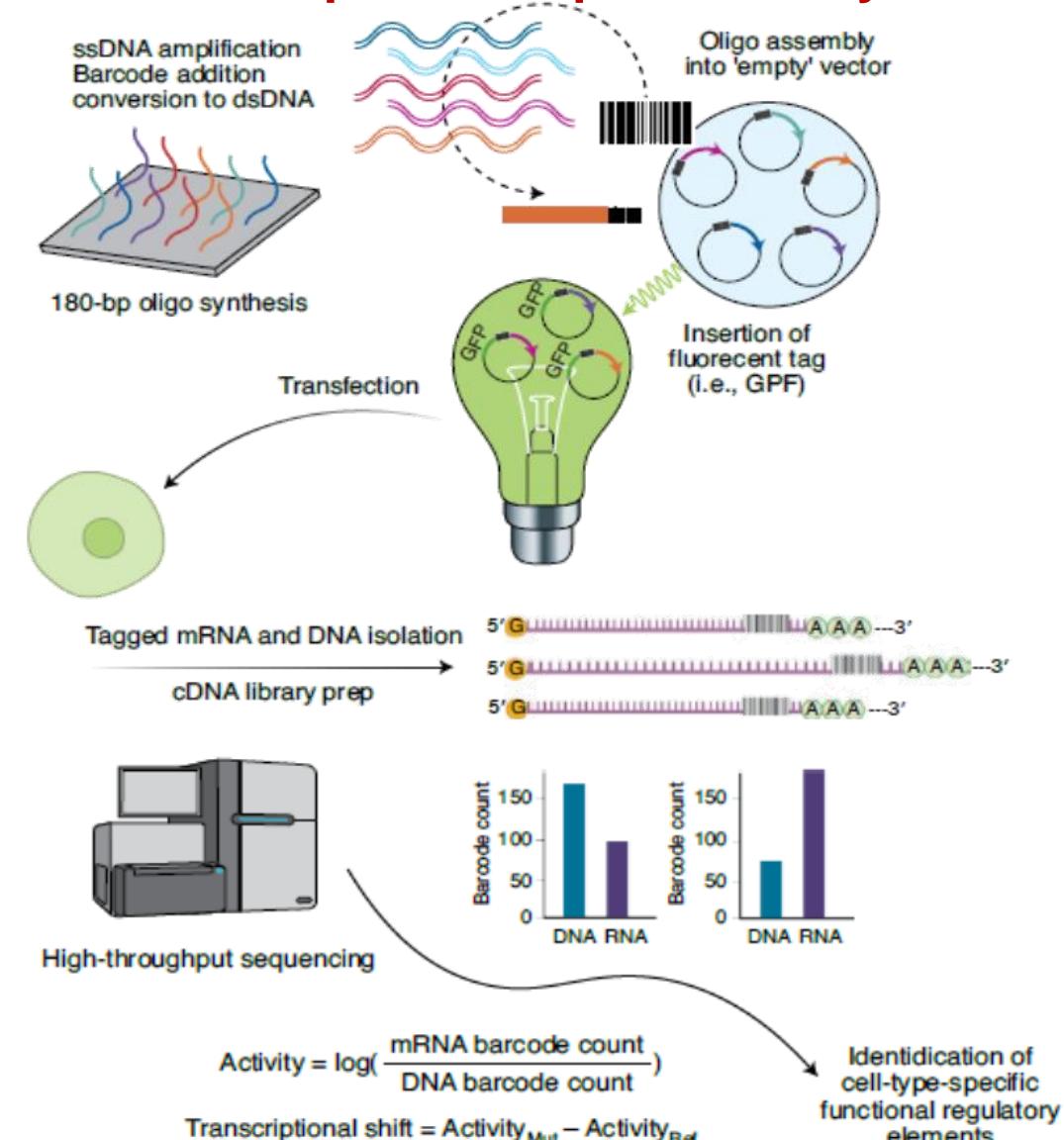


高通量挖掘造血系统相关的调控元件

Data Mining

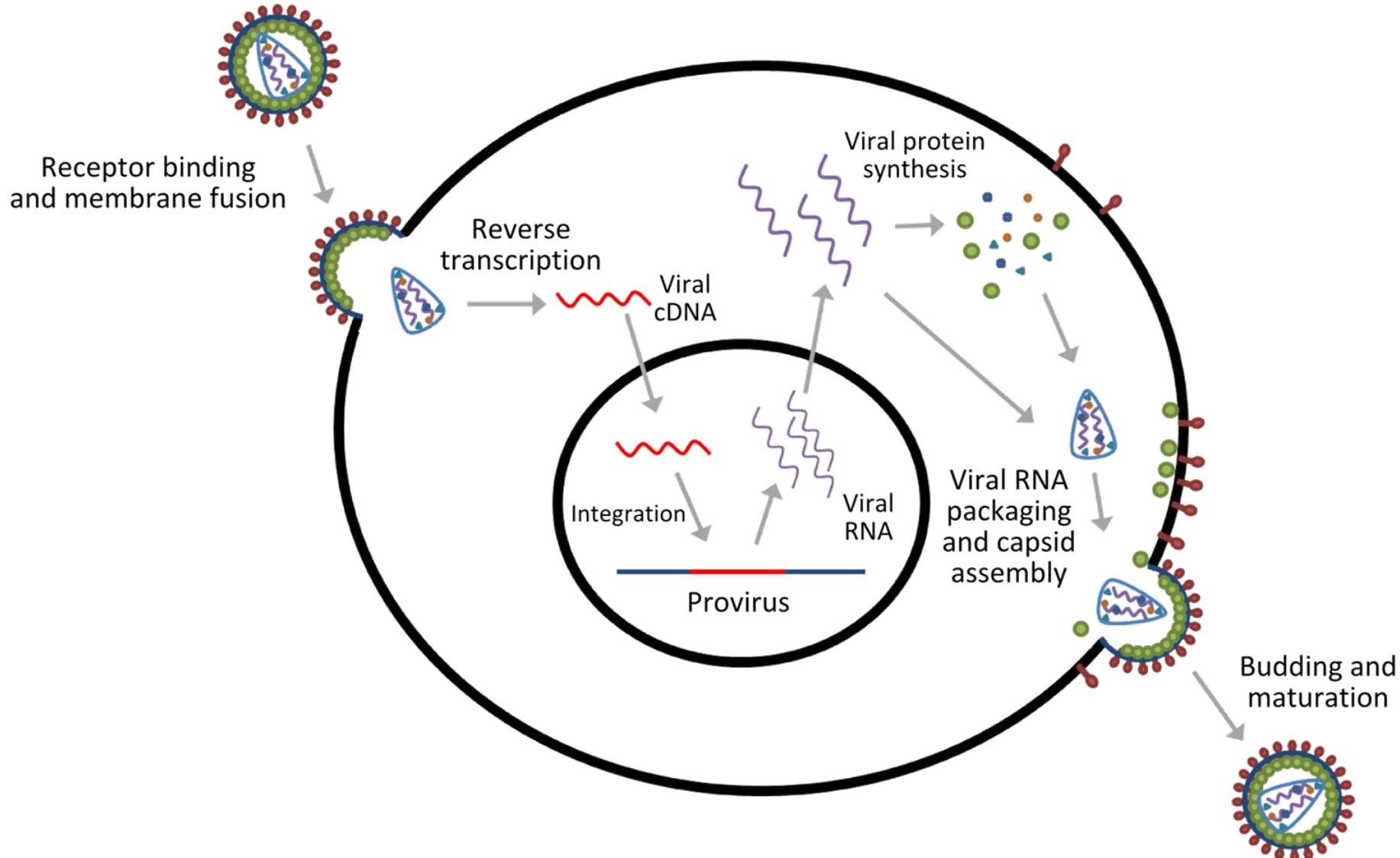


Massive parallel reporter assay



如何追踪体内的克隆增生？

慢病毒是整合性病毒，病毒整合位点可用于细胞谱系的追踪



造血干细胞基因治疗可能引发白血病？

2021-2-17

蓝鸟公司在上周收到一份报告称，**5年前接受LentiGlobin治疗的一名镰状细胞病患者被诊断为急性髓细胞白血病**。公司正在调查此患者的发病原因，以确定是否与此疗法使用慢病毒载体（BB305慢病毒载体）有关。由于已上市的Zynteglo也采用了BB305慢病毒载体，因此蓝鸟公司决定在评估AML病例的同时暂时中止Zynteglo的销售。此外，上周还报告了HGB-206 C组中第二例骨髓增生异常综合征的不良反应，目前正在调查中。

2021-2-28

蓝鸟生物首席科学官Philip Gregory在会议上补充说：“调查实验结果已确定该事件中AML（急性髓细胞白血病）患者有几种主要的‘染色体异常’和遗传突变，而这种异常通常是血液癌症中常见的现象。**上述基因突变都是与AML相关的基因，是与AML相关的经典遗传突变以及与AML相关的基因组重排，这些都可通过独立于慢病毒基因治疗之外的机制引发AML**。据我们所知，在应用慢病毒载体的任何基因疗法临床研究中（包括将治病基因整合进患者基因组）都没有报道或证实慢病毒基因药物引发癌症。未来几周我们将提供更多的调查结果。”
两名患者都患有镰状细胞病，该病可能在其致癌中发挥了作用，镰状细胞病患者的血液癌发病率是普通人群的2~10倍。

病毒插入位点鉴定可用于排除HSC-GT引起白血病推论

2021-3-15

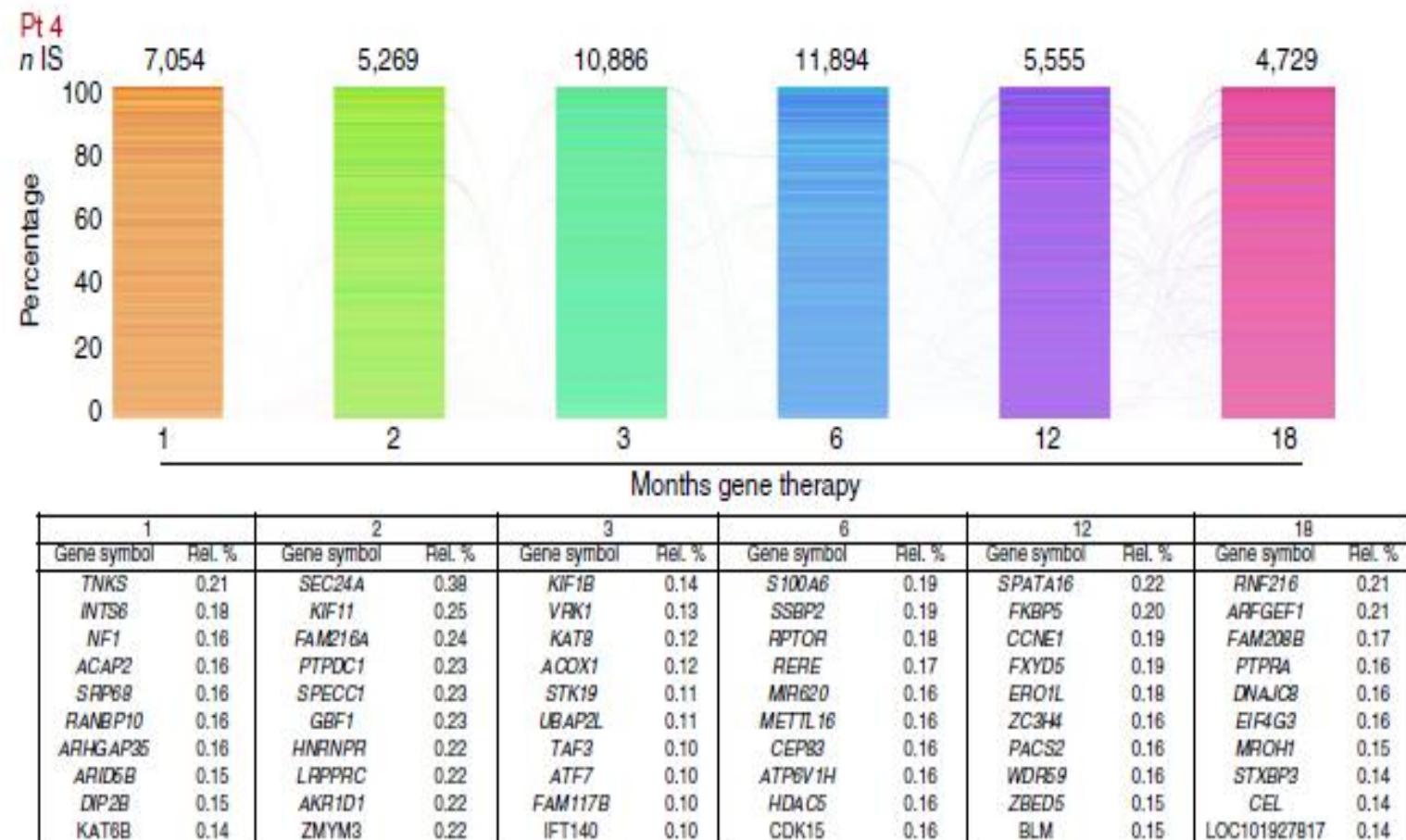
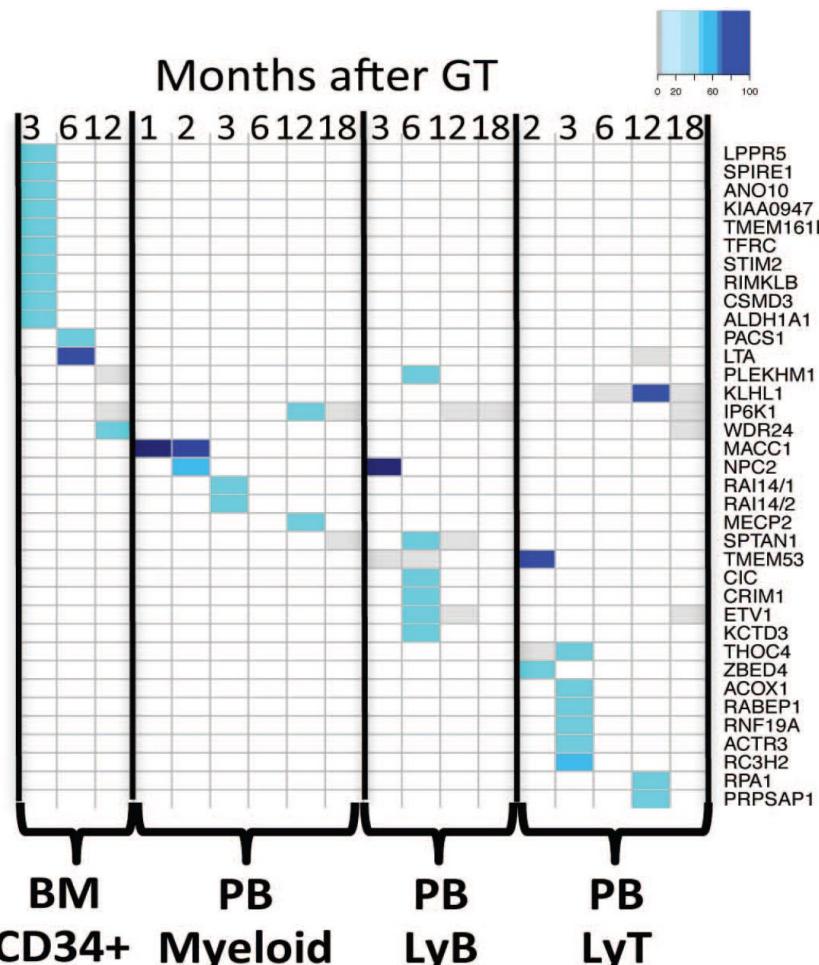
在过去的几周中，蓝鸟生物公司进行了多次评估，以确定LVV插入在基因组中的哪个位置，以及这种整合是否会导致附近基因调控或基因表达发生变化。多项独立分析证实，**该患者的AML细胞中的载体插入发生在VAMP4（囊泡相关膜蛋白4）基因中。**该公司表示，VAMP4本身在AML的发生或与癌症相关的任何细胞过程中均没有已知的作用。蓝鸟生物还评估了载体插入位点及其周围是否有任何正常基因调控或基因表达中断。**根据已完成的分析，插入到VAMP4基因不会影响基因表达或基因调控，也不会引起附近基因的破坏。**

2021-6-9

本周一，该公司表示FDA已经取消了对蓝鸟生物基因疗法Zynteglo在输血依赖性β-地中海贫血（TDT）中的两项3期研究的临床搁置。这两项试验在今年早些时候，遭到FDA暂停试验。这些试验包括了蓝鸟生物研究型基因疗法LentiGlobin，目前正在对镰状细胞病(SCD)的第1/2期和第3期研究。

病毒插入位点可用于追踪体内克隆变化

最早的测序技术，仅能识别有限的位点

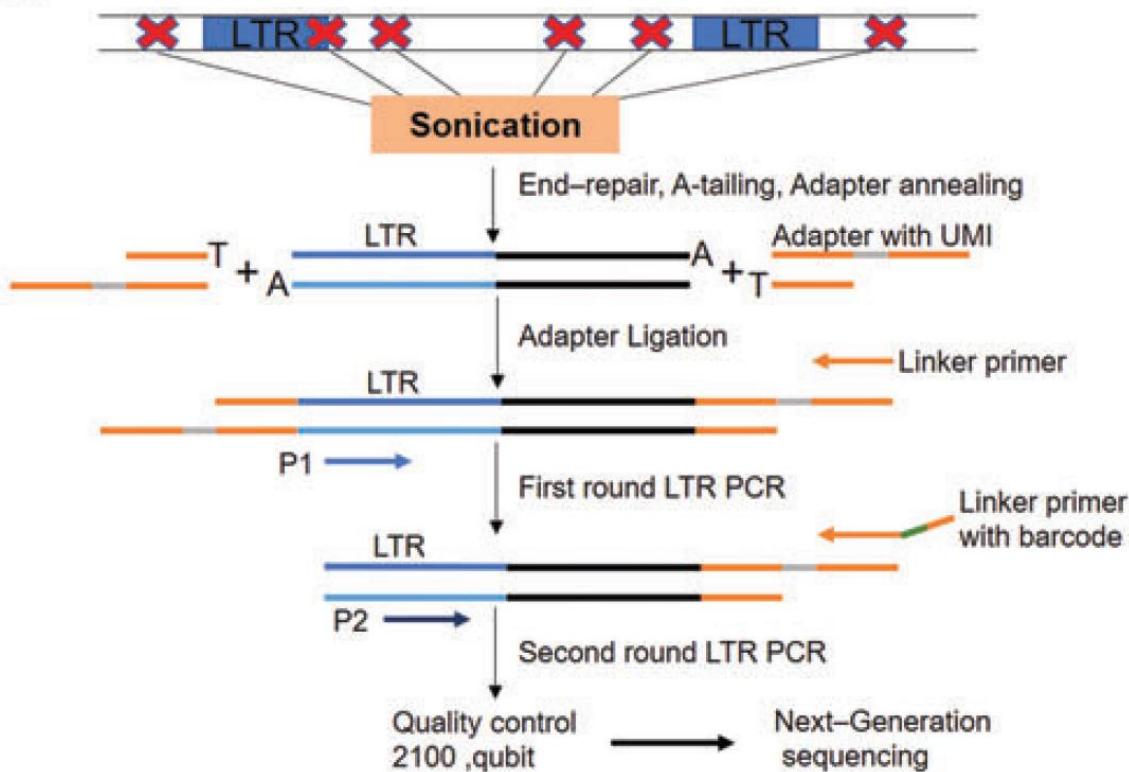


Alessandro Aiuti, et al, Science, 2013

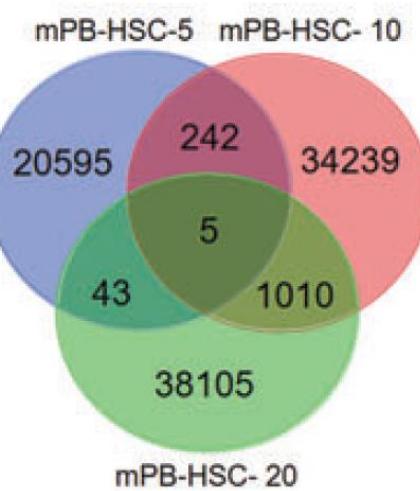
Sarah Marktel, et al, Nat Med, 2019

通过高通量测序的方法，可以识别病毒插入位点

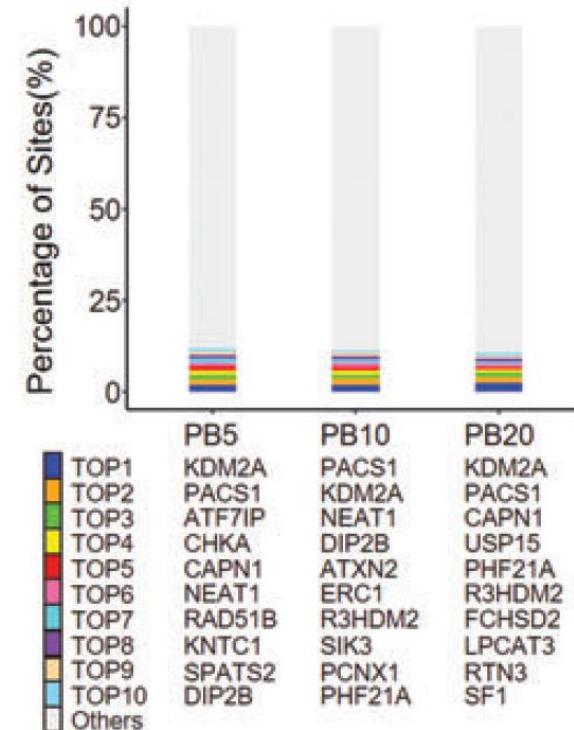
A



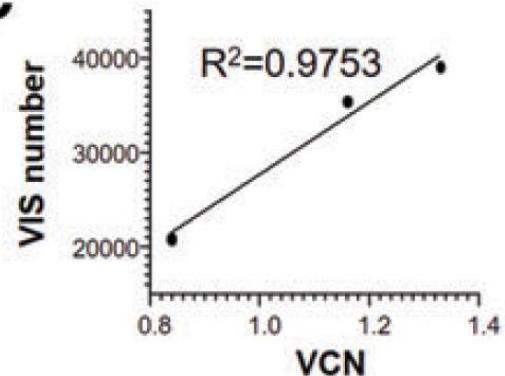
B



D

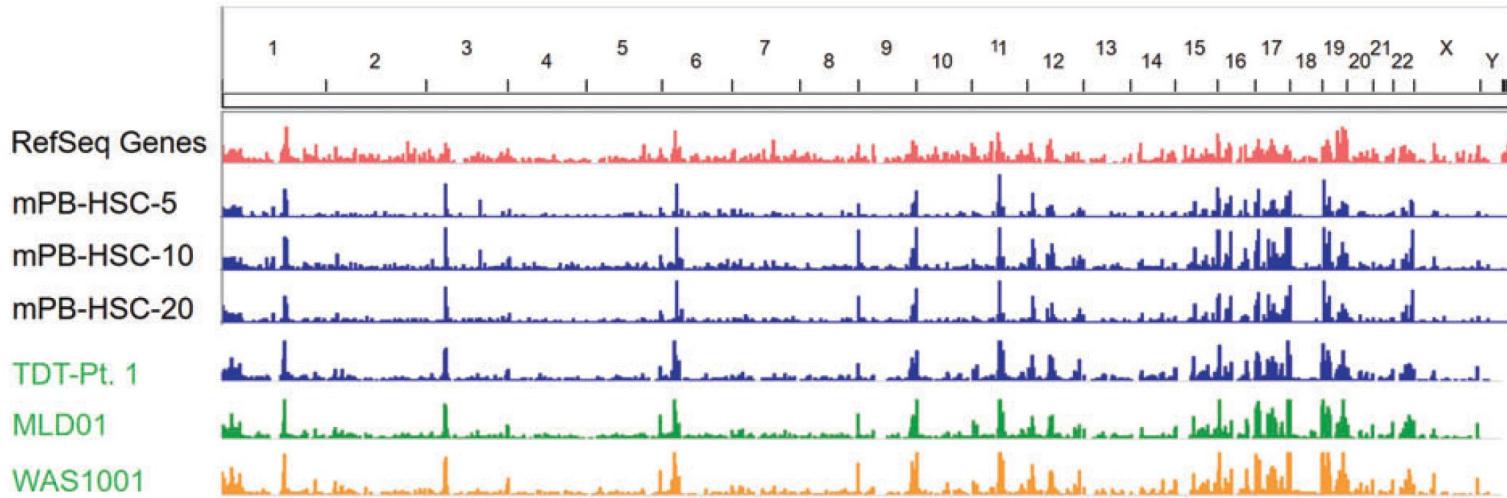


C

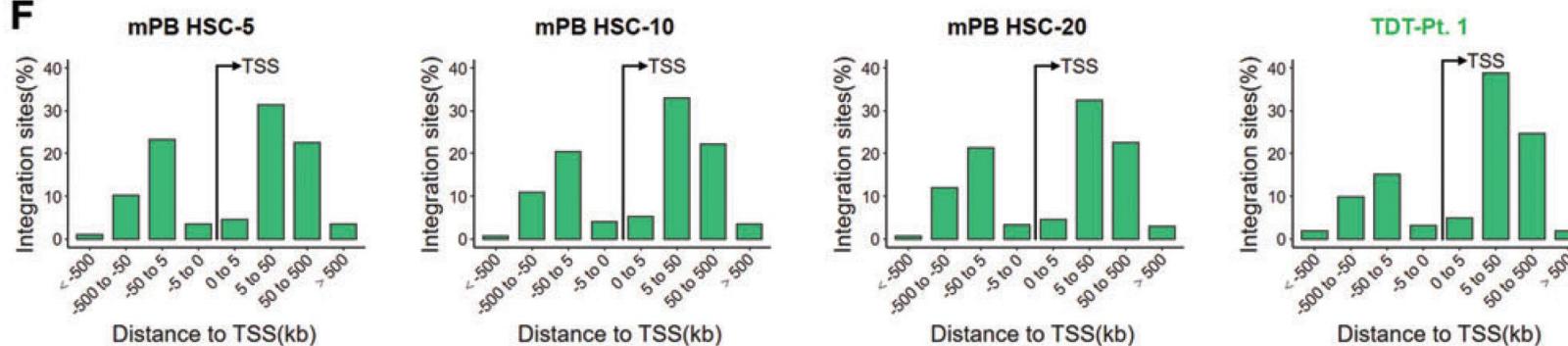


病毒插入位点具有一定的偏好性

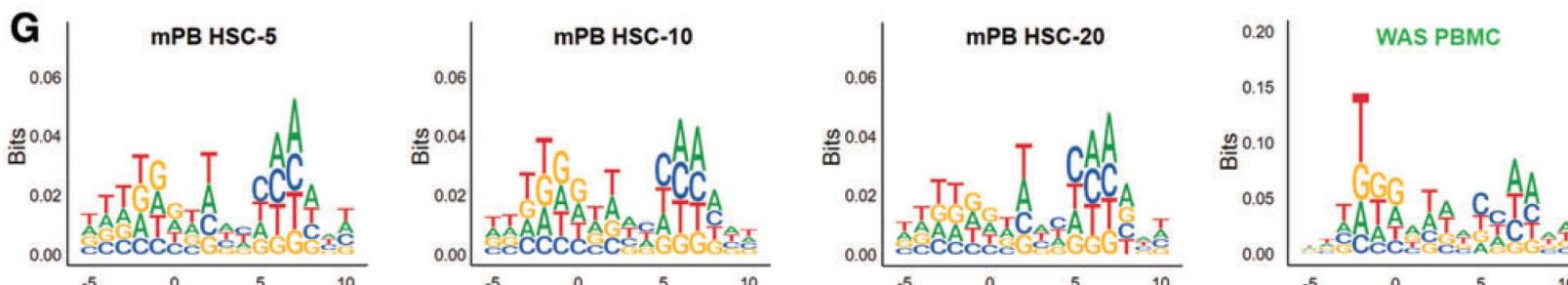
E



F



G



小结

- **造血干细胞基因治疗（HSC-GT）平台技术的简介**
- **HSC-GT临床应用于地中海贫血的治疗**
- **HSC-GT研发和临床应用相关的组学技术**



谢谢各位

地贫清零，华大同行



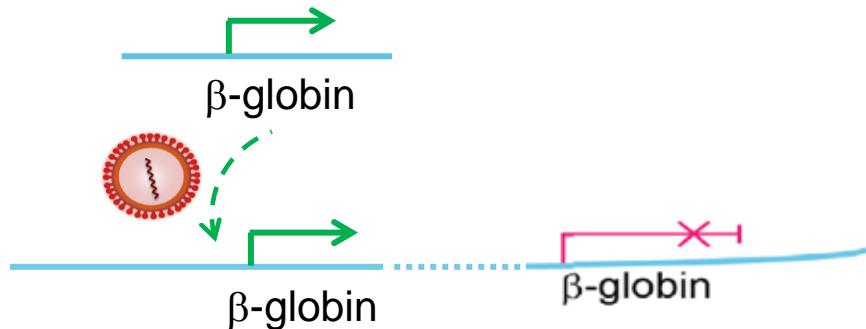
β地贫基因治疗的临床实践主要基于两种策略



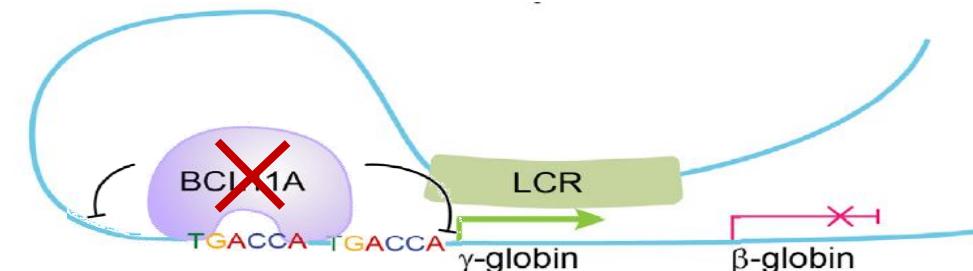
The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

- Gene Therapy in a Patients with Sickle Cell Disease (2017)
- Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β-Thalassemia (2018)
- CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β-Thalassemia (2020)
- Post-Transcriptional Genetic Silencing of BCL11A to Treat Sickle Cell Disease (2021)

策略一：重新表达缺失基因 (载体基因治疗)



策略二：激活代偿基因 (BCL11A Knockdown)



Modified from Nan Liu et al, Cell, 2018

地贫基因治疗国际国内行业发展概况

- 策略一/重新表达缺失基因，路径成熟，临床效果可靠，无专利壁垒；国外现有产品售价太高；
- 策略二/激活代偿基因，技术新颖，现有临床取得积极结果，但核心专利需授权。

策略一

临床注册编号	临床阶段	状态/时间	疾病	国家	基因	载体	赞助方
NCT01745120	I/II	已完成, 2013-2018	β地贫	美国、泰国、澳大利亚	β珠蛋白	慢病毒	bluebird bio
NCT02151526	I/II	已完成, 2013-2019	β地贫/镰刀贫血	法国	β珠蛋白	慢病毒	bluebird bio
NCT02906202	III	进行中, 2016-2022	β地贫 (非β0/β0)	美国、欧洲	β珠蛋白	慢病毒	bluebird bio
NCT03207009	III	进行中, 2017-2022	β地贫 (β0/β0)	美国、欧洲	β珠蛋白	慢病毒	bluebird bio
NCT02633943	安全观察	进行中, 2015-2031	β地贫/镰刀贫血	美国、欧洲、泰国	β珠蛋白	慢病毒	bluebird bio
NCT01639690	I	进行中? 2012-2021	β地贫	美国、欧洲	β珠蛋白	慢病毒	MSKCC
NCT02453477	I/II	已完成, 2015-2019	β地贫	意大利	β珠蛋白	慢病毒	IRCCS/Orchard Tx
NCT02193191	I	进行中, 2018-2023	β地贫	美国	β珠蛋白	慢病毒	MSKCC/Sanofi
NCT03351829	IIT	暂停? 2017-?	β地贫	中国 深圳	β珠蛋白	慢病毒	深圳免疫基因研究院
NCT04592458	IIT	进行中, 2020-2024	β地贫	中国 深圳	β珠蛋白	慢病毒	深圳华大生命科学研究院
NCT03655678	I/II	进行中, 2018-2022	β地贫	美国、加拿大、欧洲	BCL1IA红系增强子/γ珠蛋白	CRISPR基因编辑	CRISPR Tx/Vertex
NCT03432364	I/II	进行中, 2018-2023	β地贫	美国	BCL1IA红系增强子/γ珠蛋白	ZFN基因编辑	Sangamo Tx/Sanofi
NCT04390971	IIT	进行中, 2020-2023	β地贫	中国 天津	BCL1IA红系增强子/γ珠蛋白	CRISPR基因编辑	博雅基因
NCT04211480	IIT	进行中, 2021-2023	β地贫	中国 湖南 广西	BCL1IA红系增强子/γ珠蛋白	CRISPR基因编辑	耀邦生物

来源：2021年5月22日，clinicaltrials.gov搜索结果

策略二