

Singleron
新格元生物科技

单细胞多组学测序技术 在细胞治疗中的应用

临床前无偏表征CAR-T细胞

助力开发产品细胞疗效反应标志物

助力提升细胞治疗的安全性和持续有效性



了解新格元单细胞多组学测序



单细胞多组学测序与细胞治疗



新格元单细胞多组学测序优势



新格元细胞治疗研究的案例



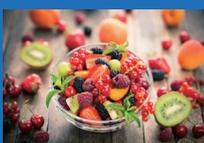
了解新格元单细胞多组学测序

什么是单细胞多组学测序技术



混合体性质——传统分析检测手段（Bulk RNA-seq）

- 检测结果是组织内成千上万细胞稳态的平均值
- 对细胞群体整体表征的反映，或者只代表其中在数量上占优势的细胞信息
- 当目标细胞数量稀少时，传统检测手段难以实现



单一个体性质——单细胞分析（Single cell RNA-seq）

- 反映细胞的异质性和小群体细胞的重要功能性
- 解析细胞间更加细微的差异
- 以更高的分辨率揭示个体的发育及功能机制
- 以更高灵敏度检测/监控疾病

新格元单细胞多组学测序平台

随着科技的进步，免疫治疗在多种肿瘤治疗中展示了其良好的治疗效果引起了人们关注。

单细胞技术可以为精准刻画细胞产品灌输到体内后在内外环境及多种信号因素的作用下如何发挥抗肿瘤作用。单细胞技术在研究细胞群体变化和转录动态特征、细胞产品与患者体内的免疫系统的互作中有着明显的优势。作为突破性的新技术，单细胞分析技术在临床和药物开发方面的应用前景更为广阔，可以代替或补充分子、细胞和组织病理检测的现有技术，也可以用于新兴的细胞治疗。

新格元秉持“格物致知，识微通元”的创新理念，致力于发展简便可靠的海量单细胞组学技术，使之成为新一代细胞和分子病理及血液检测手段，让单细胞组学以高精度、高灵敏度和高分辨率服务于精准医疗和健康管理等领域。



单细胞多组学测序与细胞治疗

细胞治疗采用生物工程的方法获取具有特定功能的细胞并通过体外基因改造、扩大培养等处理后，回输到患者体内，使这些细胞发挥增强免疫、杀死病原体和肿瘤细胞等功能，从而达到治疗某种疾病的目的。目前细胞治疗产品主要包括嵌合抗原受体(CAR)免疫细胞疗法(如CAR-T、CAR-NK等)、工程T细胞受体(TCR)治疗、和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)治疗，干细胞疗法。这其中CAR-T疗法是其中发展最为广泛、发展最为成熟的领域，在临床前和临床的各个阶段均有大量的研发管线在推进。目前来看细胞治疗以及细胞治疗产业在国内具有巨大的发展前景。但细胞治疗产业进程缓慢，这是因为在细胞治疗过程中仍然有一系列的挑战和问题需要解决。单细胞多组学测序的出现，在药物靶点的开发、提升细胞治疗的安全性和持续有效性以及改善实体瘤领域应用困难的问题上有着巨大的应用潜力。

细胞治疗开发难点

细胞治疗在临床上显示了巨大的应用潜能，但仍有一些挑战需要克服，也有一些必要的担忧需要解决。

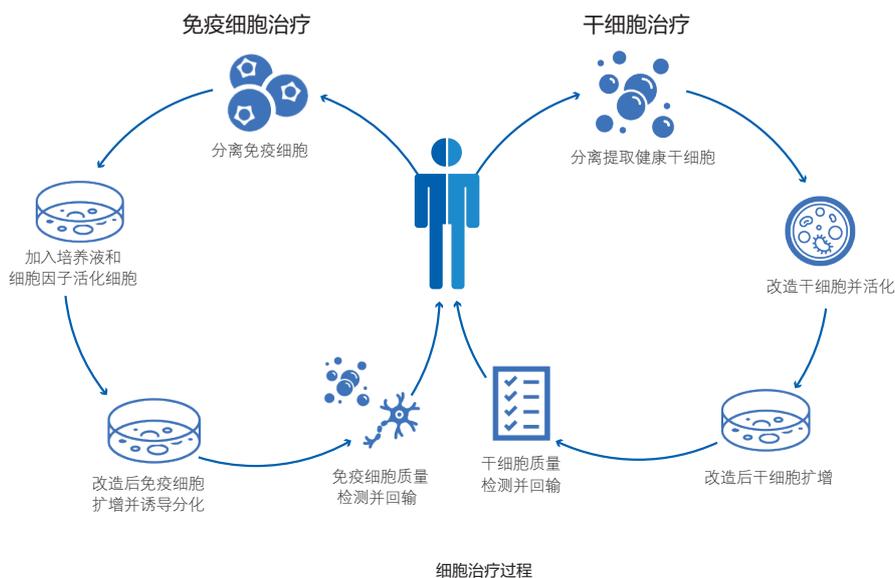
1、免疫细胞治疗难点：

- 明确病灶机制和治疗目标：患者间和健康人间基线免疫细胞特征差异；病灶微环境特征与治疗靶点的选择。
- 明确产品作用效果和安全：如何设计有效产品，改进制备工艺提高疗效。

2、干细胞治疗难点：

- iPSC理论上可以向各种组织器官细胞类型进行分化，但是现实情况却是重编程后iPSC分化潜能不足，包括体细胞重编程过程中表观遗传记忆和异常，iPSC细胞系之间存在异质性问题，均限制了iPSC细胞药物的研发。
- 在成瘤性、稳定性以及持续有效性等方面，大家对iPSC来源的产品存在一些顾虑。

单细胞多组学测序技术可以通过鼠模型或临床样本建立产品中细胞基因型和表型多样性与良好药效和毒副作用的关联，在产品中检测相关表型；从每个细胞亚型基因表达变化中整体性挖掘药效与毒副作用机制依据，助力细胞疗法开发。



细胞治疗进入临床所面临的挑战

安全性忧虑：

在临床试验中，细胞免疫治疗已有多起试验失败案例，且出现明显毒副作用，引发社会对其安全性的担忧。

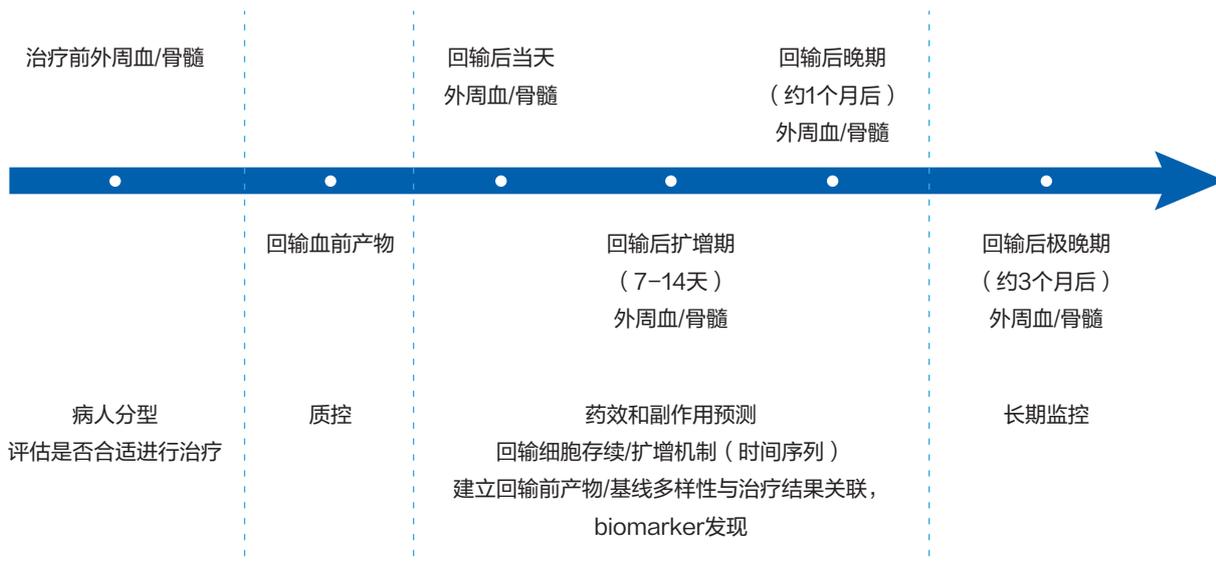
细胞因子风暴	神经毒性	脱靶效应	过敏反应
在CAR-T细胞注入人体后，细胞因子大量释放，导致发热，低血压及肝功能紊乱等临床症状。	接受CD19特异性CAR-T细胞治疗的患者可以出现意识混乱、失语、癫痫等神经毒性症状，目前病理原因不详。	CAR-T细胞的靶点不但在特异性肿瘤细胞上存在，也在正常细胞上有表达，因此在杀伤肿瘤细胞的过程中，可能导致正常细胞受损。	临床研发的多数基因改造T细胞的抗原意识识别域为重组或鼠源，回输人体后可能诱发人体免疫反应。

CAR-T细胞疗法毒副作用

CAR-T治疗中连续采样的研究意义

CAR-T技术已经发展数年，其疗效和持久性仍然受到不同因素的影响。同时，接受CAR-T细胞治疗的患者在治疗反应和毒性方面也存在很大差异，有学者提出这是由于CAR-T细胞输液产品在患者间和群体内的异质性造成的。

单细胞多组学测序的问世为解决这些难题提供了新思路。利用单细胞多组学测序技术可以在单个细胞水平上刻画细胞异质性及宿主细胞间的相互作用关系。单细胞多组学技术则有助于深度解析CAR-T细胞免疫应答过程、回输患者体内T细胞克隆多样性等信息，进而追踪CAR-T细胞动态变化、刻画患者体内免疫微环境，以此推动CAR-T细胞治疗研究。



CAR-T治疗中连续采样流程图

单细胞技术如何助力细胞治疗

1、利用单细胞多组学测序技术发现创新靶点：

生物标志物以及候选基因的挖掘在肿瘤免疫和细胞发育等研究中一直是研究的重点和热门话题。吉非替尼(Gefitinib, Iressa, 易瑞沙)的靶向治疗研发之路,耗时近10年才明确吉非替尼治疗的优势人群,从而真正的将靶向治疗运用到临床中。如果说第二代和第三代测序技术的日渐成熟为研究生物之间的差异和药物靶点的发现奠定了更加雄厚的基础,那么单细胞多组学测序技术的出现则真正将细胞与基因联系起来。对肿瘤患者的病灶组织进行单细胞测序图谱分析,可以确定不同分类患者(如疾病分期、分子分型)或不同药物效应患者肿瘤微环境的差异,以便更好的理解药物作用机制,并在此基础上挖掘针对性的生物标记物以及新的治疗靶点。

目前, CAR-T细胞治疗在多种晚期血液肿瘤患者(白血病、淋巴瘤)患者中, 仍可实现完全缓解(CR, Complete Response)的疗效。在美国, 已有六个CAR-T细胞治疗药物获批上市, 主要集中在CD19、BCMA等靶点。随着Claudin18.2等靶点的细胞治疗药物开发, 细胞治疗用于实体瘤治疗也初现曙光。除Claudin18.2之外, GPC3、EPCAM、Mesothelin等也是实体瘤研发较多的靶点。期望单细胞测序技术的出现, 可以发现更多创新靶点, 拉开肿瘤精准治疗序幕。

	KYmriah	Yescarta	Tecartus	Breyanzi	Abocma	Carvyti/Cilta.col
所属公司	诺华	kite、复兴凯特	kite、复兴凯特	BMS	BMS、蓝鸟	强生、南京传奇
靶点	CD19				BCMA	
胞内信号域	4-1BB, CD3- ζ	CD28, CD3- ζ	CD28, CD3- ζ	4-1BB, CD3- ζ	4-1BB, CD3- ζ	
适应症	3-25岁ALL/成人FL 成人R/RcLBCL	成人R/RLBCL 成人FL	成人R/RMCL 成人R/RB-ALL	成人R/RB-ALL	成人R/RMM	R/RMM

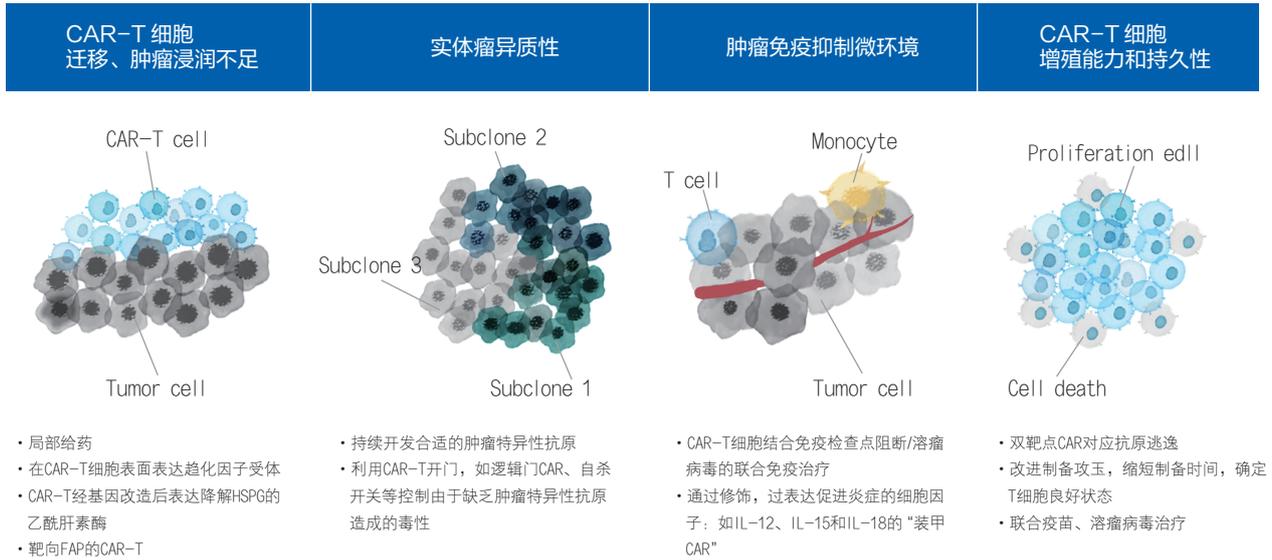
血液肿瘤CAR-T商业化产品 (信息来源: FDA官网, 医药魔方, 海通国际)

癌种	抗原/靶点
结直肠癌	NKG2D、EPCAM、HER2、GUCY2C、TAG-72、CD46
肝癌	CEA、GPC3、AFP
胃癌	Mesothelin、ANTXR1、MUC3A、Trop2、Claudin 18.2、NKG2D、HER2、FR α
胰腺癌	MUC1、Mesothelin、 $\alpha v \beta 6$ 、CEA、PSCA、FAP、CD47、HER2、NKG2D
肾癌	CAIX
黑色素瘤	GD2、GSPG4、GPC3、HER2
宫颈癌	$\alpha v \beta 6$ 、L1-CAM
神经胶质瘤	GD2、CD56、GPC2、CD171
恶性胶质瘤	EGFRvIII、HER2、B7-H3、NKG2D、CAIX、 $\alpha v \beta 3$ 、IL13R $\alpha 2$
卵巢癌	Mesothelin、 $\alpha v \beta 6$ 、B7-H3、NKG2D、CD47
前列腺癌	PSA、PAP、PSCA、PSMA、EpCAM
肺癌	MAGE-A1、CD32A、ROR、EGFRvIII
头颈癌	HER2

已进入临床试验的CAR-T实体瘤靶点 (信息来源: 公司公告, Stem Cell Research&Therapy, 中信建投)

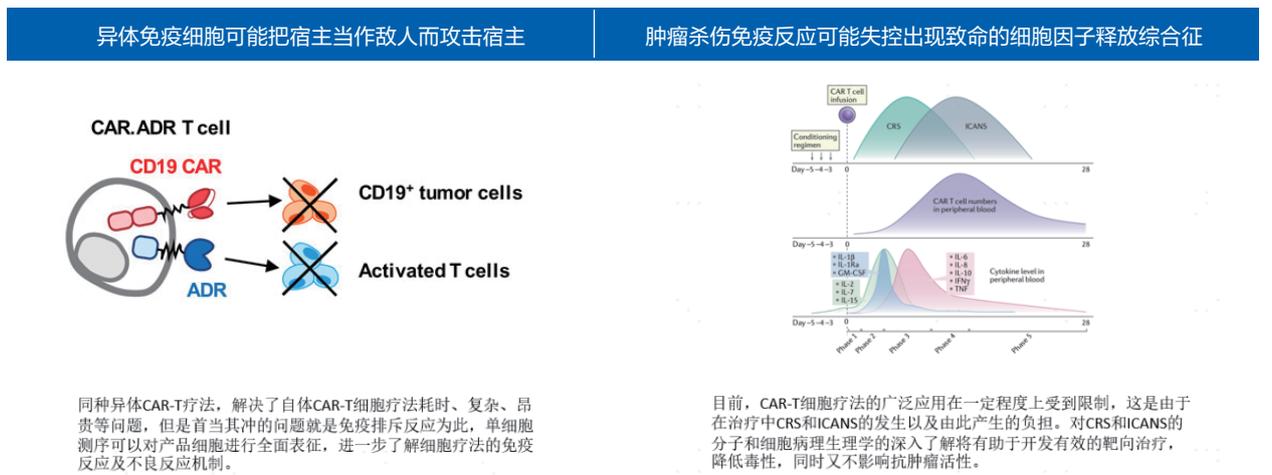
2、利用单细胞多组学测序技术改善实体瘤领域应用困难的问题

肿瘤异质性是实体瘤组织的重要特征之一，其多样性和复杂性给实体瘤的基础研究和临床诊治带来了极大的困难。因此，鉴别实体瘤及其微环境中不同的细胞亚群及与之相关的基因表达水平就显得十分重要。单细胞多组学测序技术是指在单个细胞水平上，对基因组、转录组、表观组进行高通量测序分析的一项新技术。它能够揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态，反映细胞间的异质性，了解单个细胞功能和所处的状态。单细胞多组学测序分析不仅能进一步鉴定实体瘤内细胞的异质性，还有助于阐明肿瘤发生、发展、转移、耐药和免疫逃逸等分子机制，从而使实体瘤的临床诊治和转归预测变得更加准确。



3、利用单细胞多组学测序技术提升细胞治疗的安全性和持续有效性

近年来，随着 CAR-T细胞疗法的发展，癌症的细胞免疫疗法取得了长足的进步，然而，许多试验发现了细胞因子风暴、神经毒性等多种不良事件和低反应率等问题，暴露了当前CAR-T细胞的局限性。这些问题由于缺乏机制上的理解，克服这些障碍并未取得太大的进展，利用单细胞多组学测序技术可以对CAR-T细胞行为进行全面表征，了解是什么推动了成功的CAR-T细胞免疫反应以及不良反应的机制。



CAR-T 细胞疗法的局限性

新格元单细胞多组学测序优势

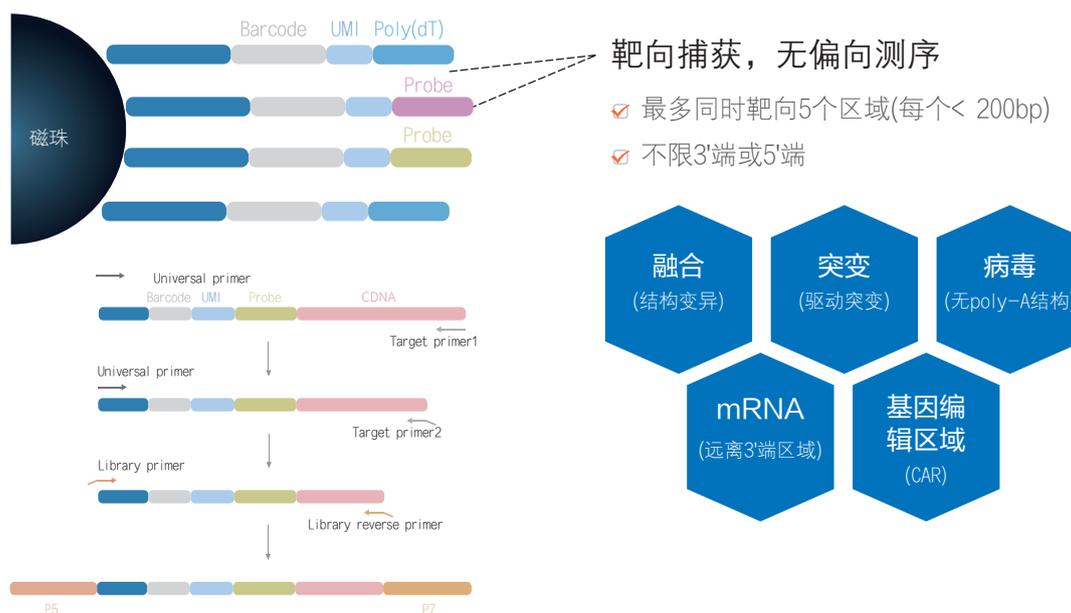
细胞治疗作为一种癌症治疗的新方法，能够有效改善癌症预后，获得一些老治疗方案达不到的效果，它的出现给癌症治疗这个领域指出了一条新的可以选择的道路。但是目前细胞治疗的研发管线主要集中在组织水平的分子特征，对细胞治疗药物靶向的细胞和途径等机制缺乏透彻的了解，因此限制了临床试验的成功。正如前文所述，运用单细胞多组学测序分析细胞治疗前后组织图谱，有助于探究CAR-T体内靶向作用途径促进免疫疗法的研究。

单细胞多组学测序技术在癌症免疫细胞治疗领域的应用，可以帮助我们更好地了解细胞治疗的具体机制，识别新的细胞类型、确认罕见的细胞群、构建细胞状态和系统发育的图谱。

FocuSCOPE®单细胞靶向定制产品

单细胞多组学测序技术在近些年兴起，让科学家们可以在单个细胞的分辨率上了解其转录组表达特征和免疫组库信息，已被广泛地运用在肿瘤、系统发育和各类疾病的研究中。目前科学家们已经开始利用单细胞测序技术进行CAR-T与TCR-T的研发与治疗效果评估。

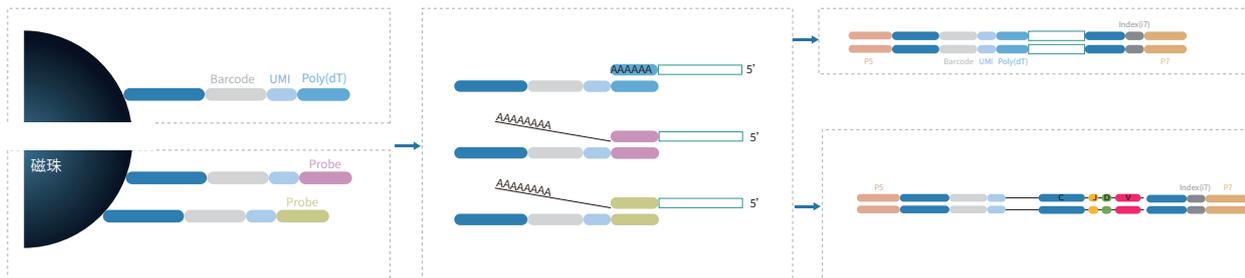
细胞疗法目前仍处于临床试验阶段，单细胞水平探究基因突变与治疗方案选择及疾病发生的耐药机制仍有重要价值。在疾病发展的过程中，不同疾病类型和基因突变的情况相关，利用FocuSCOPE®单细胞靶向定制产品，根据不同基因突变的情况制定不同的细胞治疗方案。细胞治疗的过程中会出现不同的突变克隆情况，利用FocuSCOPE®单细胞靶向定制产品对这些情况检出，探究治疗前后突变克隆型的变化或基因突变与预后的相关情况。此外通过设计针对基因编辑CAR序列的靶向探针，我们可以分析细胞治疗产品回输后一段时间在实体瘤组织或外周血中的占比，区分CAR-T细胞和患者原生T细胞，分析CAR-T细胞对实体瘤的浸润，并通过转录谱表达差异分析CAR-T细胞的分化、激活，进而描绘出CAR-T抗肿瘤作用的详实画卷。



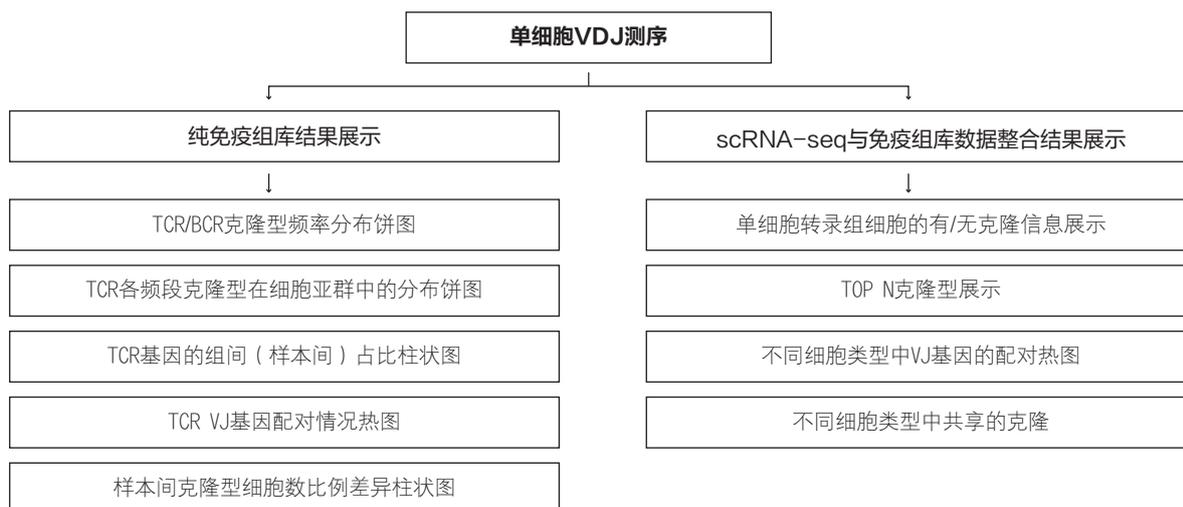
FocuSCOPE®单细胞靶向定制产品

GEXSOCPE®海量单细胞免疫受体产品

新格元针对对免疫受体感兴趣的老师开发了GEXSOCPE®单细胞免疫受体建库试剂盒，可用于快速构建单细胞转录组测序文库和单细胞免疫受体测序文库，适用于在单细胞水平对免疫组库进行研究。可用于从单细胞层面解析机体或组织内TCR/BCR分子种类，丰度以及变化情况，从而进一步揭示细胞治疗产品注入患者体内后的细胞克隆动力学和单细胞转录谱分析，全面检测临床细胞疗法的动态特征。



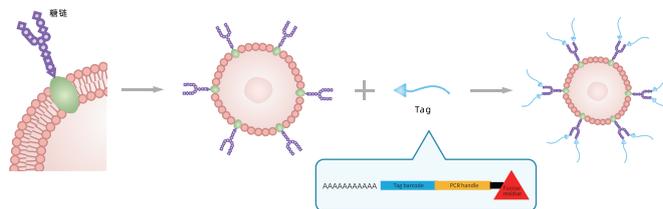
GEXSOCPE®海量单细胞免疫受体试剂盒 (BCR/TCR) 测序原理



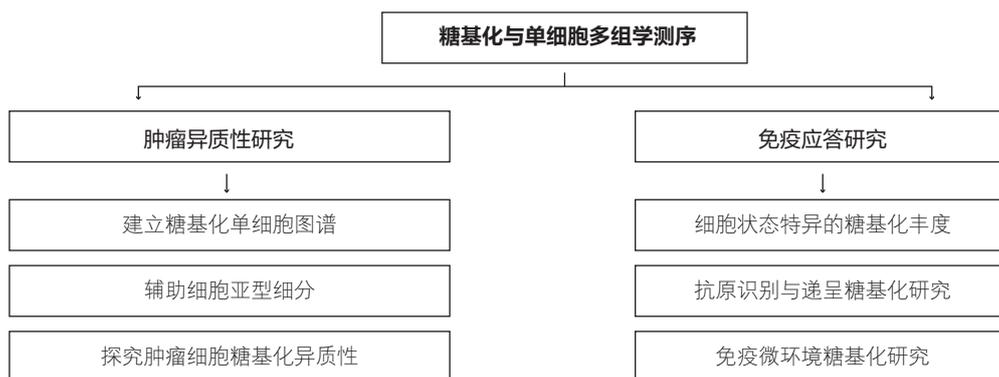
GEXSOCPE®单细胞免疫受体建库试剂盒测序结果展示

ProMoSCOPE®高通量单细胞糖基化检测产品

目前患者接受细胞治疗后都会存在一定的复发几率。通过多年来的临床治疗经验与观察，细胞疗法治疗白血病后总体来说存在较高复发率现象。细胞治疗后会出现耐药性，主要因素与肿瘤干细胞及肿瘤异质性有关。研究发现肿瘤异质性的增加与肿瘤细胞会表现出更广泛的糖基化改变，新格元ProMoSCOPE®高通量单细胞糖基化检测试剂盒可同时获得单细胞转录组和糖组学信息，用于肿瘤异质性研究，降低患者细胞治疗后出现的高复发几率。



ProMoSCOPE®高通量单细胞糖基化检测试剂盒测序原理



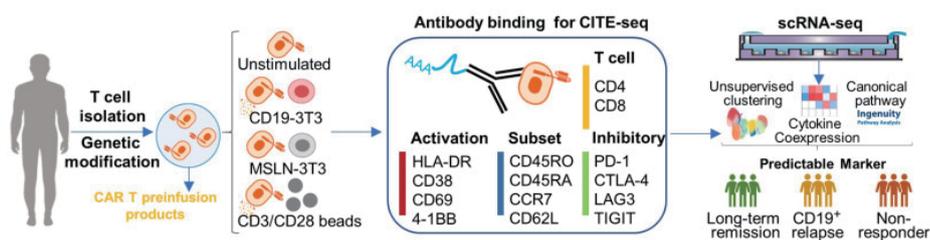
ProMoSCOPE®高通量单细胞糖基化检测试剂盒产品应用

新格元单细胞平台在细胞治疗研究中的案例

樊荣教授团队揭示CAR T治疗的急性淋巴白血病复发机制

急性淋巴细胞白血病(ALL)是一种常见的恶性血液病，占儿童白血病的70%以上，占成人白血病的20%左右，每年在全球范围内夺走大量生命。作为一种潜在的细胞治疗方法，靶向B细胞表面蛋白CD19的自体嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法在治疗B细胞恶性肿瘤方面取得了显著成果。然而，相当一部分受试者的缓解是短暂的，30%–60%的CAR T治疗患者会在1年内复发。2022年，耶鲁大学樊荣教授团队基于微流控微孔平台，即新格元单细胞平台的原本技术，利用CITE-seq方法测得CAR T细胞的单细胞图谱，揭示了CAR T治疗的急性淋巴白血病患者CD19阳性复发的决定因素。

实验流程



研究快照

样本类型：血液中的PBMC

研究领域：血液疾病，CAR T细胞疗法

12名接受CAR T治疗的B-ALL儿童和青年

物种：人类

10名完全缓解的患者（包括完全缓解CR组（超过54个月无复发，n=5）和CD19阳性复发RL组（9.6个月中位无复发，n=5））

2名无反应者NR（n=2）

为什么进行单细胞分析

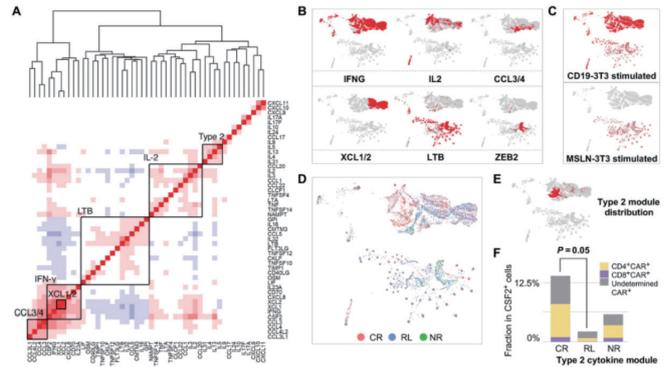
为了更好的研究CAR T细胞早期刺激扩张的动态信息，作者共设计四组方案：

- 未接受任何刺激的CAR T细胞；
- 表达CD19的抗原呈递细胞（CD19-3T3）刺激的CAR T细胞；
- 表达非特异性抗原间皮素（MSLN-3T3）刺激的CAR T细胞；
- 抗CD3/CD28包埋磁珠模拟的T细胞受体（TCR）刺激的CAR T细胞。

在本篇文章中利用单细胞转录组和表面蛋白图谱分析，识别出了Th2功能在维持CAR T长久缓解中的重要作用，揭示了当前亟待研究的CAR T CD19阳性复发机制，预测了CD19阳性复发与CAR T细胞维持早期记忆状态的能力不足有关，为临床实践中预测响应和筛选病人明确了关键通路，为提高特异性T细胞功能以维持长期缓解提供重要信息。

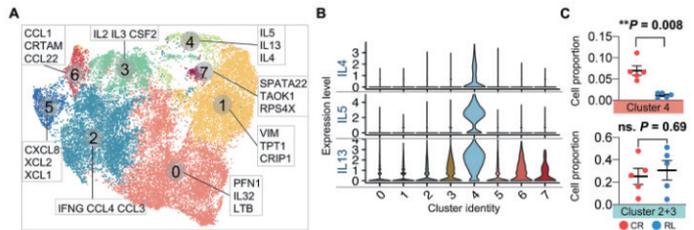
结果

通过细胞因子共表达模块分析，研究团队首先发现在抗原特异性激活条件下，Type 2 (Th2) 细胞集中分布在CR组CAR-T富集的区域，且Th2模块在CR组中的比例显著高于RL组。高度差异表达基因分析进一步识别到了Th2相关细胞因子IL4、IL5、IL13在CR组的上调和Th2 pathway的显著激活。



CD19特异性刺激CAR T细胞的共表达细胞因子模块分析

接下来通过单细胞转录组，对CR和RL病人CAR-T细胞集的聚类分析识别出8个具备独特转录组特征的亚群，其中亚群4中的细胞具有突出的Th2功能。通过细胞占比统计，发现CR组CAR-T在亚群4中的比例显著高于RL组。此外，从IL4、IL5、IL13以及主导Th2细胞分化的转录因子GATA3的单细胞表达分布点状图中可以看出，无论是表达水平还是表达频率，CR组5名病人都明显高于RL组。



CAR T细胞的单细胞转录组聚类分析阐明CR和RL患者免疫功能的异同

新格元细胞治疗工具包:

Singleron Java自动化单细胞测序文库构建平台，Matrix NEO®自动化单细胞测序文库构建系统，Singleron Python®组织解离仪，GEXSCOPE®高通量单细胞转录组试剂盒、单细胞核转录组试剂盒、免疫受体试剂盒，DynaSCOPE®海量单细胞转录组动态监测试剂盒，FocuSCOPE®靶向高通量单细胞测序产品，ProMoSCOPE™高通量单细胞糖基化检测试剂盒，AccuraCode®高通量药物筛选RNA建库试剂盒，CeleScope®生信分析软件，及SynEcoSys®单细胞数据库。

如需了解新格元生物科技有限公司的详细信息，请访问www.singleronbio.com

参考文献:

Zhiliang Bai, Steven Woodhouse, Ziran Zhao et al. Single-cell antigen-specific landscape of CAR T infusion product identifies determinants of CD19-positive relapse in patients with ALL. *Science Advances*.8-23.2022.

Mo F, Watanabe N, McKenna MK, Hicks MJ, Srinivasan M, Gomes-Silva D, Atilla E, Smith T, Ataca Atilla P, Ma R, Quach D, Heslop HE, Brenner MK, Mamonkin M. Engineered off-the-shelf therapeutic T cells resist host immune rejection. *Nat Biotechnol*. 2021 Jan;39(1):56-63.

Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2022 Feb;22(2):85-96.

新格元生物科技

地址：南京市江北新区药谷大道11号加速器二期06栋3-5层
苏州市工业园区新泽路1号生物医药产业园三期A区1号楼401单元

邮箱：marketing@singleronbio.com
产品售后邮箱：product-service-support@singleronbio.com

了解更多请访问
www.singleronbio.com

欢迎致电新格元
025-58165529

产品售后电话
025-58862675

