

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.001

· 述 评 ·

基于嵌合抗原受体修饰 T 细胞的肿瘤免疫治疗新策略

王 艺, 赵颖颖, 韩双印(郑州大学人民医院 中心实验室, 河南 郑州 450003)



韩双印, 主任医师、教授、博士生导师, 郑州大学人民医院中心实验室主任, 河南省学术技术带头人, 河南省生物治疗学会副主任委员, 河南省消化病学会副主任委员。2001 年于日本东北大学医学院获得博士学位, 2001-2006 年先后在美国斯坦福大学、Kimmel 癌症中心(Kimmel Cancer Center)进行博士后研究。从事消化系肿瘤的临床和基础研究工作 20 多年, 研究方向为分子肿瘤学和肿瘤免疫治疗, 目前主要从事基因修饰 T 细胞为基础的肿瘤过继免疫治疗的研究。在 *Cancer Res*、*Oncogene*、*PNAS*、*JBC* 等国际主流期刊发表学术论文 10 余篇。目前作为负责人承担国家自然科学基金、河南省科技攻关项目基金、河南省医学重点科技攻关项目基金等 5 项课题研究。Email: shuangyinhan@zzu.edu.cn

[摘 要] 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞是近年来迅速发展的肿瘤过继免疫治疗新手段, 其独特的作用机制和诱人的应用前景为肿瘤生物治疗开辟了一个崭新的舞台。CAR 将识别肿瘤相关抗原的单链抗体和 T 细胞的活化基序相结合, 通过基因转导赋予 T 细胞肿瘤靶向性、更强的杀伤活性和持久的生命力。自 1989 年 Eshhar 等首次提出 CAR 以来, CAR 已从第一代发展至含有共刺激分子的第二、三代, CAR 的 I / II 期临床试验在白血病、淋巴瘤、黑素瘤等恶性肿瘤中取得了可喜的成果, 但是也面临脱靶效应、细胞因子风暴、移植物抗宿主病等潜在的安全性问题, 未来研究将集中于设计更安全的第四代 CAR、甄选具备最佳治疗潜质的 T 细胞亚群、优化临床治疗方案、完善临床前试验模型等方面。相信随着免疫学、基因治疗和细胞工程等领域不断取得新突破, CAR 从实验室向临床转化的障碍将会逐一扫除, CAR 有望成为主流的肿瘤治疗方法。

[关键词] 嵌合抗原受体; 过继免疫治疗; 肿瘤靶向治疗

[中图分类号] R730.51; R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)04-0383-08

New strategy of tumor immunotherapy based on chimeric antigen receptor engineered T cells

Wang Yi, Zhao Yingying, Han Shuangyin (Central Research Laboratory, People's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cell is a newly developed strategy of adoptive immunotherapy. Its unique theoretical superiority and attractive application prospects open up a promising arena for anticancer therapy. CAR combines single chain variable fragment (scFv) antibody recognizing tumor-associated antigen with T cell activation motif, which endows T cells with tumor-orientated targeting ability, stronger killing activity, and prolonged survival by genetic modification. Since first proposed by Dr. Eshhar in 1989, CAR has been developed from the first generation to the second and the third generations containing costimulatory molecular. The clinical trials in leukemia, lymphoma, and melanoma have obtained exciting results. However, the off-target effect, cytokine storm, and graft-versus-host disease are potential challenges for clinical use. Future research will focus on designing safer CAR of the fourth generation, selecting good therapeutic T cell subsets, optimizing clinical scheme of administration, and improving pre-clinical models. It is believed that the obstacles from bench to clinic will be cleared and that CAR will become one of the main cancer therapies

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81172415, No. 81241077); 河南省重点科技攻关项目资助(No. 102102310065)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172415, No. 81241077), and the Key Scientific and Technological Project of Henan Province (No. 102102310065)

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130722.1347.008.html>

with breakthroughs in immunology, gene therapy and cell engineering.

[Key words] chimeric antigen receptor; adoptive immunotherapy; tumor target therapy

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 383-390]

过继免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)是肿瘤生物治疗的重要方法之一,曾在黑素瘤和肾细胞癌等恶性肿瘤中取得良好的治疗效果。然而,由于其在多数肿瘤中的表现不尽如人意,AIT始终未能成为一线的治疗方法。近年,肿瘤“免疫编辑”理论(immuno-editing theory)^[1]诠释了免疫治疗多年来的“冰火”之旅。经历了免疫监视、免疫平衡及免疫逃逸的多数肿瘤患者,体内已经形成以肿瘤为中心的免疫抑制网络,传统的免疫治疗很难达到理想的效果,促使人们重新思考免疫治疗的策略,并在实践中取得了可喜的进步。首先,以嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞为代表的肿瘤靶向免疫治疗能够重塑 T 细胞的靶向性、增殖性和持久性,有效地提高其特异性杀伤活性^[2]。其次,非清髓性化疗(non-myeloablative chemotherapy, NMC)等宿主预处理方案,为过继性免疫细胞发挥作用提供了适宜的环境,大幅度提升了过继免疫细胞的有效率^[3]。再者,担负治疗使命的免疫细胞从最初的回输 CD8⁺ 效应记忆 T 细胞(effector memory T cell, T_{EM})发展到回输中枢记忆 T 细胞(central memory T cell, T_{CM})和干细胞样记忆 T 细胞(stem cell like memory T cell, T_{SCM}),回输此类具有记忆功能的 T 细胞能够持久地追杀肿瘤细胞,取得长期疗效^[4]。肿瘤过继免疫治疗在经历了 20 年漫长波折的演变后,原不尽如人意的治疗策略重新焕发出强

大的生命力,为肿瘤患者带来了新的希望。

1 CAR 的发展历程

1.1 CAR 的原理

1989 年, Eshhar 研究小组^[5]首次提出将针对肿瘤抗原单克隆抗体的可变区和 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)的亚基融为一体,重定向 T 细胞(redirecting T cell)的免疫反应。表达 CAR 的 T 细胞以抗原依赖、非 MHC 限制的方式结合肿瘤抗原,启动并活化下游级联反应,特异性杀伤肿瘤。第一代 CAR 由识别肿瘤表面抗原的单链抗体(single chain variable fragment, scFv)和免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM, 通常为 CD3 ζ 和 Fc ϵ RI γ)组成。早期的实验证明了 CAR 的可行性,然而第一代 CAR 只能引起短暂的 T 细胞增殖和较低的细胞因子分泌,不能提供长时间的 T 细胞扩增信号和持续的体内抗肿瘤效应。依照 T 细胞活化的双信号模型,第二和三代 CAR 引入了共刺激分子(costimulatory molecule, CM),旨在提高 T 细胞的细胞毒活性、增殖性与存活时间,促进细胞因子的释放(图 1)。众多的研究以肿瘤抗原识别-细胞因子释放-细胞毒性反应激活的嵌合模式,验证了抗 Her2、CEA、PMSA 等单链抗体与 CD28、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)等共刺激分子构成的 CAR 转染 T 细胞后的抗肿瘤作用^[2,6-7]。

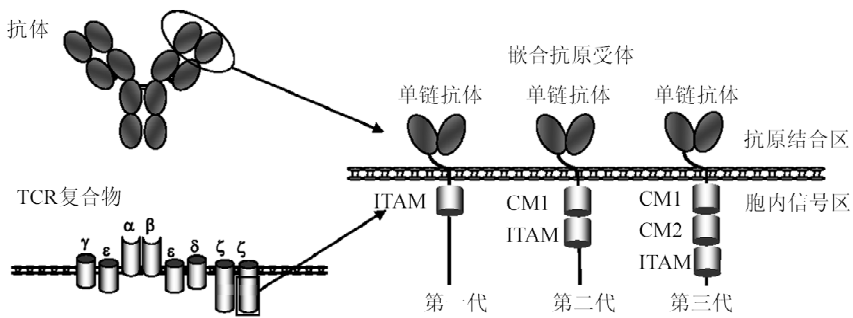


图 1 嵌合抗原受体结构示意图

1.2 CAR 的结构

CAR 的结构分为胞外抗原结合区、铰链区、跨膜区和胞内信号区,其抗肿瘤效应依赖于胞外抗原结合区的靶向性、铰链区的灵活性、胞内信号区共刺

激分子及 T 细胞活化基序的协同作用。

胞外抗原结合区:通常由针对肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的单克隆抗体的轻链及重链可变区连接的 scFv 构成,与传统 TCR 不

同的是,scFv 可直接识别抗原,不需要以 MHC/抗原肽复合物的形式识别抗原,且蛋白类和糖脂类抗原均可被识别。CAR 修饰 T 细胞的肿瘤靶向性取决于 scFv 的亲合力,抗体工程技术可以微调 scFv 的亲合力以增强与肿瘤的特异性结合。通过使用人源化或全人抗体 scFv,可降低鼠源 scFv 的免疫原性。

铰链区与跨膜区:CAR 发挥作用依赖于铰链区的大小、灵活性和活动范围,没有铰链区,CAR 修饰 T 细胞很难与肿瘤靶细胞近端的抗原表位结合。Guest 等^[8]的研究表明,对于远离细胞膜的抗原表位,CAR 修饰 T 细胞在无铰链区的情况下可以识别和结合抗原,并进而被激活;而对于膜近端的抗原表位,一个灵活的铰链区对 CAR 修饰 T 细胞识别抗原是必要的。因此,针对不同的 TAA 需要调整铰链区长度,以更好地发挥 CAR 靶向结合肿瘤抗原的能力。跨膜区在 CAR 二聚化及 T 细胞活化中起着重要作用,来自 CD3、CD8、CD28 的跨膜区常用于构建 CAR。CAR 的二聚化以及与内源性 TCR 的相互作用有助于 T 细胞的激活。Bridgeman 等^[9]发现,含有 CD3 跨膜区的 CAR 似乎比其他膜分子的跨膜区有更强的 T 细胞激活作用。

胞内信号区:由共刺激分子和 ITAM 组成。共刺激分子在决定 T 细胞激活阈值、应答类型和存活时间等方面至关重要。CD28 在促进 T 细胞产生 IL-2 方面优于其他分子,CD137 似乎是记忆性 T 细胞体外扩增的一个重要共刺激分子,而可诱导型共刺激分子(inducible costimulator, ICOS)作为新一代共刺激分子也表现出良好的治疗价值。为了进一步提高 T 细胞的抗肿瘤活性,第三代 CAR 引入了双共刺激分子。Hombach 等^[10]的研究表明,与第二代 CD28-CD3 ζ T 细胞相比,第三代 CD28-CD134-CD3 ζ T 细胞分泌的细胞因子(Th1/Th2)能够产生更强、更持久的抗肿瘤作用。CAR 胞内区的 ITAM 通过磷酸化激活下游信号转导分子,在 T 细胞活化中发挥重要作用。CD3 ζ 或 Fc ϵ R1 γ 胞内区含有 ITAM,可用于构建 CAR,且 CD3 ζ 似乎比 Fc ϵ R1 γ 具有更强的生物学效应^[11]。可能的解释是 CD3 ζ 胞内区含有 3 个 ITAM,而 Fc ϵ R1 γ 胞内区只有 1 个 ITAM,因此大多数 CAR 采用 CD3 ζ 。

CAR 的结构还在不断地优化之中,CAR 修饰 T 细胞的抗肿瘤效应与肿瘤抗原表位的类型、表达水平、肿瘤局部微环境、宿主免疫状态等密切相关。因此,应针对不同的肿瘤设计不同的 CAR 结构。无论如何,CAR 的优势是显而易见的:(1)CAR 克服了以往的肿瘤特异性 TCR 靶向肿瘤的 MHC 限制性,解

决了肿瘤细胞下调 MHC 表达导致免疫逃逸的问题;(2)蛋白类抗原和糖脂类抗原都可作为靶抗原,扩展了肿瘤分子靶点范围;(3)CAR 含有共刺激分子,促进了 T 细胞的增殖和存活时间,能够抵抗肿瘤局部免疫抑制微环境;(4)除了 T 细胞,自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)和细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK 细胞)均可被 CAR 修饰,发挥靶向治疗作用。

2 效应细胞的选择、制备与修饰

2.1 效应细胞的选择

过继转移的效应细胞是免疫治疗的主体,CAR 修饰的初始 T 细胞能够直接影响机体的抗肿瘤免疫应答。体外扩增前,对潜在的最有效的 T 细胞亚群进行精确检测和分离可提高过继免疫治疗的效果。CD8⁺效应 T 细胞(effector T cell, T_{EFF})的抗肿瘤效应已被肯定,在既往的过继回输细胞中占主导地位,但其在体内的扩增和持续杀伤肿瘤细胞的能力有限。相比之下,T_{CM}体外的细胞毒活性和增殖能力虽然低于 T_{EM},然而在体内却有更持久的抗肿瘤活性和建立免疫记忆的潜能^[12]。一些研究表明,T_{CM}细胞作为 CAR 转导的初始细胞可更有效地杀伤肿瘤细胞。近来发现,幼稚 T 细胞似乎有更佳的体内存活能力、细胞因子释放能力和抗肿瘤效应。Gattinoni 等^[4]发现了一个兼具幼稚 T 细胞和记忆 T 细胞性能的 T 细胞亚群,称为干细胞样记忆 T 细胞(T_{SCM}),在肿瘤抗原间皮素的临床前模型中表现出优于 T_{CM}和 T_{EM}的抗肿瘤效果。

过继免疫细胞的疗效与其在体内的增殖和存活能力密切相关,然而,体外 T 细胞培养后期占多数的为终末分化 T_{EFF}细胞。研究者正在探索诱导和维持 T_{SCM}细胞的方法,比如培养体系中加入雷帕霉素、Wnt 信号通路调节剂等,未来的肿瘤过继免疫治疗中 T_{CSM}可能会发挥更大的作用^[13]。

2.2 效应细胞的制备

临床级肿瘤特异性 T 细胞的制备是困扰过继免疫治疗多年的问题,也正面临着上述的挑战。T 细胞的活化方法从早期的 CD3 单抗(OKT-3)、外周血单个核细胞/ γ -射线照射的成淋巴滋养细胞(PBMC/LCL)发展到现在的人工抗原提呈细胞(artificial antigen-presenting cell, aAPC)。Riddell 等^[14]利用 PBMC/LCL 建立的 T 细胞快速扩增系统(rapid expansion protocol, REP)被很多实验室采用,自体 PBMC 联合临床级 LCL 已用于淋巴瘤、神经胶质瘤和病毒性疾病的 I/II 期过继免疫治疗中。一系列

的 aAPC 正在被开发和应用, 比如 NIH3T3 细胞、K32 细胞、CD3/CD28 免疫磁珠等。Bernstein 等^[15]应用抗 CD3/CD28 免疫磁珠实现了 T 细胞的 10 000 倍扩增, 成功地用于慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)治疗中自体 T 细胞的扩增。然而, aAPC 优先扩增 CD4⁺T 细胞, 除非提供额外的抗原特异性信号, 否则抗原特异性 CTL 会受到一定程度的损失。最近报道了一种新的 aAPC, 通过生物素将 CD3/CD28/CD11a 单抗偶联于脂质体, 可有效地诱导 CD8⁺T 细胞的优势扩增^[16]。

细胞因子在效应细胞的体外制备中发挥着重要的作用。近来的研究表明, IL-2 可能通过耗竭记忆性 T 细胞和增加调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)来产生负调控作用, 而 IL-7、IL-15 及 IL-21 可增加 CD8⁺记忆性 T 细胞的存活时间, 发挥更佳的促 T 细胞活化和扩增能力^[17]。IL-15 通过 β 链介导 Jak1 和 Jac3 信号通路, 促进 T 细胞增殖, IL-15a 受体可减少诱导激活的细胞死亡(activation induced cell death, AICD)和 Fas 诱导的细胞凋亡(Fas-induced apoptosis)^[18]。另外, 需要注意的是 CD4⁺T 细胞的共存对体外制备 CTL、CD8⁺T 细胞记忆的启动和维持至关重要。理论上, CAR 修饰的 Treg 可直接将 CAR 转导入 CD4⁺Treg 或从 CAR 转导的 T 细胞中诱导形成, 目前还没有临床证据表明输注 CAR 修饰的 CD4⁺Treg 在体内可诱导免疫耐受。

2.3 效应细胞的基因修饰

高效、安全的基因转导是实施 CAR 修饰 T 细胞治疗的保障。由于淋巴细胞为原代细胞, 基因转导有很大的挑战性, 研究者对病毒介导的 CAR 转导和理化转染方法都进行了积极的探索。逆转录病毒是第一个批准用于临床的病毒载体, 早期的 CAR 研究中应用较多, 使用病毒滴度为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ VP/L, T 细胞转染效率达 20% ~ 60%^[19]。然而, 逆转录病毒不能感染非增殖细胞, 有插入性基因突变的风险, 且病毒滴度低, 其临床应用受到限制。慢病毒可感染增殖及静止期的多种类型细胞, 以接近 100% 的感染效率后来居上成为热门载体。随后, 慢病毒的病毒元素分离、自身失活、非整合型等措施进一步打消了人们的安全顾虑。June 等^[20]采用 Lenti-gen 公司的慢病毒包装系统能够达到临床要求的病毒滴度和纯度, 在 CAR 修饰 T 细胞治疗血液系统肿瘤中得到了很好的应用。病毒基因转导的优势是效率高、CAR 修饰 T 细胞培养至临床级数量所需的时间短(约 3 周), 但临床级病毒制备设施要求苛刻、重组病毒花费较高等是临床试验的拦路石。

理化转染方法中, 以睡美人(sleeping beauty, SB)^[21]和 Piggybac 转座子系统(transposon-based system)^[22]为代表的新方法极大地提高了转染效率。转座子系统含有两个质粒, 一个编码转座酶, 另一个携带目的基因, 两端是反向重复序列(IR/DR)。靶细胞电穿孔后, 转座酶将目的基因整合到靶细胞基因组的随机 AT 位点。SB 系统在靶向 CD19 的 CAR 修饰 T 细胞研究中转染效率可达 20%, 在靶向 P53 和 MART-1 抗原的 CAR 修饰 T 细胞的研究中达到 30% 的表达率, 展示出良好的应用前景。Piggybac 系统能够同时转导多个基因, 稳定表达率在 20% ~ 40%, 可以实现多基因修饰, T 细胞可获得多重功能表型。锌指蛋白核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)^[23]是近年用于基因转导的新介质, 通过锌指蛋白的特异性识别、核酸酶的定点切割和细胞的修复机制, 实现外源基因定点整合到宿主基因组, 整合效率能达到 20%, 目前正在探索这项新技术在 T 细胞基因转导方面的潜力。此外, 体外转录编码 CAR 的 RNA、电穿孔 T 细胞也是可行的方法, 转染效率可达 90%, 外源基因可持续表达 6 ~ 7 d, 重复输注可达到治疗效果^[24]。

3 临床试验

3.1 靶抗原的选择

靶抗原的选择是实现肿瘤特异性杀伤中首先考虑的问题, 研究者一直致力于寻找在不引起重要组织不可逆损害条件下优先攻击肿瘤细胞的“理想抗原”。首先想到的是肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA), 但目前可用的 TSA 并不多, 表皮生长因子受体 III 型突变(EGFRv III)、前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)和转化生长因子受体 II(TGFR II)微卫星突变体等是少数几个受到关注的 TSA。EGFRv III 在脑胶质瘤等恶性肿瘤中有很高的表达率, 是肿瘤治疗理想的分子靶点, 围绕 EGFRv III 的治疗性抗体、多肽疫苗和 CAR 修饰 T 细胞治疗肿瘤都取得了很大进展。本课题组研制的 EGFRv III 微抗体(minibody)^[25]和 CAR 修饰 T 细胞也显示出良好的肿瘤靶向性^[26]。

其次, 重要组织不表达或相对可损耗组织表达的 TAA 也是较安全的靶抗原。比如黑素细胞特异性抗原(melanoma antigen recognized by T cell-1, MART-1)^[27]和前列腺分化抗原^[28]可分别作为黑素瘤和前列腺癌的治疗靶点, 因为皮肤色素脱失及前列腺损伤与危及生命的恶性肿瘤相比是可接受的。在血液肿瘤中, 由于成熟 B 细胞的损伤是暂时、可

恢复的,以 CD19、CD20 和 CD22 为靶抗原的 CAR 修饰 T 细胞治疗 B 细胞恶性肿瘤取得了很好的效果^[20,29-30]。对于实体肿瘤,因为 TAA 通常也存在于一些重要组织,所以靶抗原的选择有很大的挑战性。与 MART-1 类似,胰腺癌和卵巢癌高表达间皮素,而间皮素在正常间皮细胞的表达水平相对较低,因此间皮素可作为胰腺癌和卵巢癌免疫治疗的备选靶点。其他如针对表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor, HER-2)、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、二唾液酸神经节苷脂 (disialoganglioside, GD2) 等的治疗都在尝试之中^[31-33]。CAR 修饰 T 细胞早期的临床试验中,遴选分子靶点、评估杀伤效应与脱靶效应 (off-site on-target effect) 风险是首要的工作。

3.2 临床试验结果

基于 CAR 理论上的优势和临床前实验的结果,人们以极大的兴趣进行了 I/II 期临床试验。第一个公布的 CAR 临床研究是 2006 年 Lamers 等^[34]用靶向碳酸酐酶 IX (carbonic anhydrase IX, CA IX) 的第一代 CAR 修饰 T 细胞联合低剂量 IL-2, 治疗了 3 例转移性肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 患者, CAR 修饰 T 细胞在体内持续存活达 7 周,但没有观察到临床效应。同年, Kershaw 等^[35]报道了逆转录病毒介导的抗 α -叶酸受体 (folic acid receptor- α , FR α) 第一代 CAR 修饰 T 细胞治疗 14 例卵巢癌患者, 输注 2 d 后, CAR 修饰 T 细胞在体内可大量检测到, 1 个月后迅速下降至难以检测的水平, 同样没有观察到对肿瘤的免疫应答反应。早期的临床试验尽管没有看到临床疗效, 但其安全性和可行性得到

了肯定。CAR 肿瘤治疗的第一个令人兴奋的临床结果是由 Brenner 团队^[36]获得的, 用靶向 GD2-CAR 修饰 EB 病毒特异性 T 细胞 (EBV sensitive T cell) 治疗 11 例儿童成神经细胞瘤, 其中 6 例在治疗 6 周后出现肿瘤的退缩和坏死。

CAR 修饰 T 细胞在血液系统恶性肿瘤的临床试验中成就尤为瞩目。June 等^[20]使用第二代 CD19-CAR 修饰 T 细胞治疗 3 例 CLL 患者, 2 例达到完全缓解, 1 例病情稳定, CAR 修饰 T 细胞在体内扩增 1 000 倍以上、维持活性达 6 个月之久, 部分 CAR 修饰 T 细胞甚至以记忆细胞形式存在。Rosenberg 等^[37]用第一代 CAR (CD19scFv-CD3 ζ) 和第二代 CAR (CD19scFv-CD28-CD3 ζ) 修饰自体 T 细胞治疗难治/复发性 B 细胞淋巴瘤, 两种方法均有效, 且第二代 CAR 修饰 T 细胞显示了更佳的体内增殖活性、存活能力和抗肿瘤免疫应答; 但伴随临床效应的是持续 39 周的外周血中 B 细胞清除, 显示了脱靶效应对正常 B 细胞的影响。Till 等^[29]用电穿孔转导靶向 CD20 的 CAR 修饰 T 细胞治疗 7 例非霍奇金淋巴瘤患者, 其中 2 例完全应答, 1 例部分应答, 4 例病情稳定, 血液循环中 CAR 修饰 T 细胞持续时间长达 9 周, 显示了良好的治疗效果。

CAR 修饰 T 细胞临床试验显示出良好的临床应用潜力, 目前的共识倾向于使用第二代 CAR 修饰 T_{CM} 或 T_{SCM} 细胞并辅以宿主的免疫预清除方案 (图 2)。然而, 在靶抗原选择、CAR 结构和基因修饰方法, 以及宿主预处理等方面还需要更多的探索与系统的研究, 积累完善的统计学数据以实现临床转化的跨越。

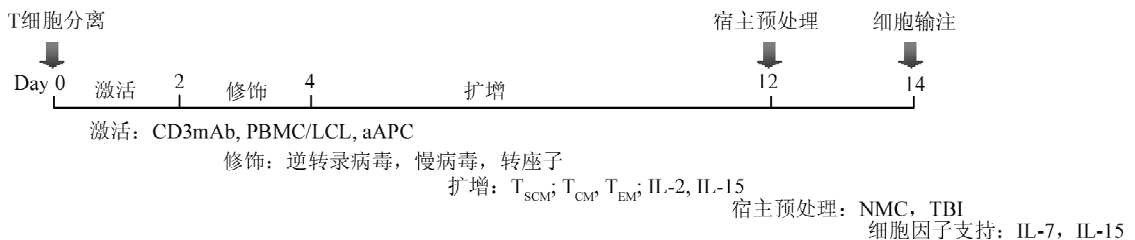


图2 CAR 修饰 T 细胞治疗方案

3.3 宿主预处理方案

宿主的淋巴清除预处理方案 (lymphodepletion regimen) 是过继免疫治疗的重大进展之一。研究表明, 淋巴细胞损耗程度与临床客观反应率呈正相关^[38], 其主要机制: 通过清除免疫抑制细胞如髓源抑制性细胞 (myeloid derived suppressor cell, MD-

SC)、Treg, 提供过继转移细胞合适的体内环境; 通过减少内源性淋巴细胞对细胞因子的竞争, 增加 IL-7、IL-15 等细胞因子的积累, 促进 T 细胞的扩增; 通过诱导黏膜损伤、暴露内毒素等方式激活固有免疫系统^[39]。经过宿主预处理的过继免疫治疗, 客观反应率能提高 50%, 而过去的过继免疫治疗忽视了调整

宿主免疫微环境对过继转移细胞增殖性与存活时间的影响。

细胞因子对提高过继免疫治疗的治疗效果也起着重要作用。IL-2 是最早用于过继免疫治疗的细胞因子,通过诱导 T 细胞活化和增殖有效地提高疗效。但大剂量时 IL-2 具有毒性,且 IL-2 诱导的效应细胞寿命较短,对 Treg 有激活作用,阻碍了 IL-2 的临床应用。近年的研究^[40]表明,稳态细胞因子(homeostatic cytokine)如 IL-7、IL-15,能够延长 T 细胞的体内存活时间,增强记忆细胞的产生,在支持过继免疫治疗客观反应率方面优于 IL-2。其他免疫调节剂也可提高 CAR 修饰 T 细胞的治疗效果,例如通过单克隆抗体消除有免疫抑制作用的 Treg^[41],应用抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)提高过继转移细胞的存活能力^[42],通过 invariant NKT 细胞调节肿瘤局部微环境等^[43]。

4 挑战与对策

4.1 安全性挑战

CAR 修饰 T 细胞如火如荼的临床试验也暴露出值得关注的安全问题。首先,大多数 CAR 定向的靶抗原不是肿瘤特有的,会导致对其他组织的免疫攻击,即脱靶效应。Morgan 等^[44]报道了 1 例结肠癌患者输入第三代 ErbB2-CAR 修饰 T 细胞 5 d 后出现急性呼吸衰竭而死亡,随后的检测证实了 CAR 修饰 T 细胞的肺组织浸润。再者,第二和三代 CAR 拥有多重胞内信号区,共刺激分子信号泄漏或 T 细胞激活阈值降低造成的大量炎症细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 等释放入血循环,可引起急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)和多器官功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),即所谓“细胞因子风暴”(cytokine storm)。1 例接受第二代 CD19-CAR 修饰 T 细胞的 CLL 患者,出现低血压、呼吸困难和肾衰竭,尸检分析可能是 CAR 修饰 T 细胞相关“细胞因子风暴”所致^[38]。此外,部分患者可出现类似异基因造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)发生的移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)^[45]。CAR 修饰 T 细胞在发挥移植物抗肿瘤作用(graft-versus-tumor, GVT)的同时伴随有对正常组织的攻击,靶向 MART-1 的 CAR 修饰 T 细胞治疗黑素瘤的临床试验中,一些患者出现皮疹、葡萄膜炎、听力减退,甚至多器官功能衰竭。

4.2 应对策略

2010 年美国重组 DNA 咨询委员会(Recombi-

nant DNA Advisory Committee, RDAC)召开专题会议^[46],总结 CAR 临床试验中出现的安全性问题,提出了指导性建议。首先,引入自杀基因的人工调控开关,在必要时通过条件消融(conditional ablation)清除基因修饰的 T 细胞。不同的自杀基因系统如单纯疱疹病毒-胸苷激酶/更昔洛韦(HSV-TK/GCV)、CD20/rituximab 单抗、caspase-9 安全开关在 CAR 修饰 T 细胞临床试验中已经取得了一些成果^[47]。然而,急性脱靶毒性作用引起的组织损伤通常在几分钟内发生,而自杀基因需要一段时间才能被激活,因此自杀基因系统仅对慢性毒性反应有作用。第二, RDAC 提出了 CAR 修饰 T 细胞的间接剂量上升方案,即在未观察到第一、二代 CAR 毒性反应后再使用下一代 CAR。而第三代 CAR 修饰 T 细胞应逐渐增加剂量,可间隔 2 d 或以上分次输注,并不断监测毒性反应,从而及时阻止可能诱发的严重不良反应。首次剂量一般开始于细胞 1×10^6 个/kg 体质量,同时根据 CAR 类型和患者的具体情况做调整,如第二、三代 CAR 修饰 T 细胞起始剂量比第一代 CAR 修饰 T 细胞低,淋巴清除预处理患者应该比未经预处理患者起始 CAR 剂量低。第三,低剂量重复输注最佳治疗潜能的 CAR 修饰 T_{CM}、T_{SCM} 细胞;微调 CAR 亲和性,以增加肿瘤杀伤的特异性并减少对健康组织的损伤;用两种 scFv 构建双靶抗原 CAR,以提高肿瘤靶向性。

5 结语

CAR 修饰 T 细胞在治疗白血病、淋巴瘤、脑胶质瘤中取得的成就极大地增加了研究者对过继免疫疗法的信心,新的研究结果正在不断公布和发表。然而, CAR 修饰 T 细胞进入主流临床治疗前,还需要更缜密的设计来衡量受益和危险,以更多的临床前研究来解决转化医学中的诸多问题,并扩大临床试验来完善统计学数据分析。

正在进行和计划中的研究主要集中在:(1)设计更有效、更安全的第四代 CAR,探索完美的 CAR 信号组合,诱导更多的记忆性 T 细胞、产生合理的 Th1/Th2 细胞因子分泌;引入组织特异性归巢受体、趋化因子受体等,促进 T 细胞向肿瘤组织的迁移;增加人工基因调控开关,通过条件细胞消融提高 CAR 的安全性。(2)探索具备最佳治疗潜质的 T 细胞亚群、优化体外扩增条件、建立高效基因转导方法;过继免疫疗法正在从回输大剂量效应细胞转向回输小量的 CAR 修饰 T_{CM} 或 T_{SCM} 细胞,封闭式细胞分离、培养体系及基因转导方法等方面的进展将会

提高基因工程 T 细胞的应用前景。(3)优化宿主预处理和治疗方案:消除肿瘤抑制机制,增加过继转移细胞在体内的扩增能力和存活时间;给予细胞因子(IL-15 等)、TAA 表达调制剂(如甲基化解除剂)、竞争性抗体(如 CD134、CD137)、抑制性信号通路阻断剂(如 CTLA-4、PD-L1)等,增加 CAR 修饰 T 细胞治疗的客观反应率和有效率。(4)完善临床前试验模型:利用免疫缺陷小鼠建立的人类肿瘤移植模型,外源性肿瘤抗原在小鼠的表达不符合其在人体的生理分布,且免疫缺陷小鼠不能产生肿瘤微环境,无法预测、也难以评价内源性免疫系统对 CAR 修饰 T 细胞体内存活能力、脱靶效应、移植物抗宿主病等方面的影响。研究者正在尝试利用正常免疫小鼠模型部分地构建肿瘤微环境、复制靶抗原的生理表达模式。

可以想象,未来的 CAR 修饰 T 细胞治疗将整合多种方案,如细胞产品的制备、宿主的预处理、细胞的输注和体内检测等方案。CAR 的快速发展得益于学术界的大力推动,鉴于 CAR 修饰 T 细胞疗法的复杂性和高成本,目前只有少数研究中心能够提供这种基因工程细胞进行临床试验。CAR 修饰 T 细胞治疗也引起国内学者的关注,围绕 EGFR、VEGF 等靶抗原的研究正在进行^[48-50]。在可预见的未来,相信 CAR 修饰 T 细胞治疗会穿越理论、技术、伦理等方面的障碍,成为疗效确切的肿瘤免疫治疗方法。

【参考文献】

- [1] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion [J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1565-1570.
- [2] Cheadle EJ, Sheard V, Hombach AA, et al. Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 907: 645-666.
- [3] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(4): 299-308.
- [4] Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties [J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1290-1297.
- [5] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(24): 10024-10028.
- [6] Ahmed N, Ratnayake M, Savoldo B, et al. Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2-specific T cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5957-5964.
- [7] Chmielewski M, Hahn O, Rappl G, et al. T cells that target carcinoembryonic antigen eradicate orthotopic pancreatic carcinomas without inducing autoimmune colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4): 1095-1107.
- [8] Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: Evaluation of four different scFvs and antigens [J]. *J Immunother*, 2005, 28(3): 203-211.
- [9] Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, et al. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex [J]. *J Immunol*, 2010, 184(12): 6938-6949.
- [10] Hombach A, Heiders J, Foppe M, et al. OX40 co-stimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28- and IL-2-induced IL-10 secretion by re-directed CD4⁺ T cells [J]. *Oncoimmunol*, 2012, 1(4): 460-468.
- [11] Bezbradica JS, Medzhitov R. Role of ITAM signaling module in signal integration [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(1): 58-66.
- [12] Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(27): 9571-9576.
- [13] Lugli E, Dominguez MH, Gattinoni L, et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory [J]. *J Clin Invest*, 2013, 23(2): 594-599.
- [14] Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones [J]. *Science*, 1992, 257(5067): 238-241.
- [15] Bernstein WB, Cox JH, Aronson NE, et al. Immune reconstitution following autologous transfers of CD3/CD28 stimulated CD4⁽⁻⁾ T-cells to HIV-infected persons [J]. *Clin Immunol*, 2004, 111(3): 262-274.
- [16] Numbenjapon T, Serrano LM, Singh H, et al. Characterization of an artificial antigen-presenting cell to propagate cytolytic CD19-specific T-cells [J]. *Leukemia*, 2006, 20(10): 1889-1892.
- [17] Zhang H, Chua KS, Guimond M, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *Nat Med*, 2005, 11(11): 1238-1243.
- [18] Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, et al. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines [J]. *Science*, 2000, 288(5466): 675-678.
- [19] Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(132): 132ra53.
- [20] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733.
- [21] Singh H, Manuri PR, Olivares S, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2961-2971.
- [22] Nakazawa Y, Saha S, Galvan DL, et al. Evaluation of long-term transgene expression in piggyBac-modified human T lymphocytes [J]. *J Immunother*, 2013, 36(1): 3-10.
- [23] Maier DA, Brennan AL, Jiang S, et al. Efficient clinical scale

- gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5 [J]. *Hum Gene Ther*, 2013, 24(3): 245-258.
- [24] Zhao Y, Moon E, Carpenito C, et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9053-9061.
- [25] Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, et al. Development of an EGFRv III specific recombinant antibody [J]. *BMC Biotechnol*. 2010, 10: 72-84.
- [26] Shen CJ, Yang YX, Han EQ, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRv III expressing glioma [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6(1): 33.
- [27] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129.
- [28] de Witte MA, Bendle GM, van den Boom MD, et al. TCR gene therapy of spontaneous prostate carcinoma requires *in vivo* T cell activation [J]. *J Immunol*, 2008, 181(4): 2563-2571.
- [29] Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells [J]. *Blood*, 2008, 112(6): 2261-2271.
- [30] James SE, Greenberg PD, Jensen MC, et al. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane [J]. *J Immunol*, 2008, 180(10): 7028-7038.
- [31] Rainusso N, Brawley VS, Ghazi A, et al. Immunotherapy targeting HER2 with genetically modified T cells eliminates tumor-initiating cells in osteosarcoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(3): 212-217.
- [32] Shirasu N, Shibaguchi H, Kuroki M, et al. Construction and molecular characterization of human chimeric T-cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2731-2738.
- [33] Louis CU, Savoldo B, Dotti G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor positive T cells in patients with neuroblastoma [J]. *Blood*, 2011, 118(23): 6050-6056.
- [34] Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically re-targeted against carbonic anhydrase IX: First clinical experience [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(13): e20-22.
- [35] Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 1): 6106-6115.
- [36] Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: Persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma [J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1264-1270.
- [37] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells [J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2709-2720.
- [38] Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, et al. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells [J]. *J Immunother*, 2010, 33(1): 1-7.
- [39] Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(7): 907-912.
- [40] Dummer W, Niethammer AG, Baccala R, et al. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(2): 185-192.
- [41] Kofler DM, Chmielewski M, Rappl G, et al. CD28 costimulation impairs the efficacy of a redirected T-cell antitumor attack in the presence of regulatory T cells which can be overcome by preventing Lck activation [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(4): 760-767.
- [42] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 3516-3527.
- [43] Saito TI, Li HW, Sykes M. Invariant NKT cells are required for antitumor responses induced by host-versus-graft responses [J]. *J Immunol*, 2010, 185(4): 2099-2105.
- [44] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851.
- [45] Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: Case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 666-668.
- [46] Ertl HC, Zaia J, Rosenberg SA, et al. Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: Observations from a recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3175-3181.
- [47] Casucci M, Bondanza A. Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirectioned T lymphocytes [J]. *J Cancer*, 2011, 2(1): 378-382.
- [48] 张瑞萍, 云琳, 陆斌, 等. 嵌合 T 细胞受体的构建及其在 T 淋巴细胞表面的表达和体外抗肿瘤功能的检测 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(5): 609-611.
- [49] 钱其军, 吴孟超. 肿瘤过继细胞治疗: 老故事新演绎 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 8(1): 1-6.
- [50] 王瑾, 李升平, 郑利民. 基因修饰 T 淋巴细胞在肿瘤免疫治疗中的应用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(3): 292-295.

[收稿日期] 2013-04-10

[修回日期] 2013-06-25

[本文编辑] 黄静怡