

## 嵌合抗原受体修饰免疫细胞治疗肿瘤的新策略

胡婉丽 赵媛 张连生

**【摘要】** 以嵌合抗原受体(CAR)为基础的细胞免疫治疗目前成为治疗恶性肿瘤的一种新兴形式。CAR技术的应用在以下几方面受到密切关注:选择合适的目标抗原;甄选高效、安全的基因转导方法;优化信号分子;筛选最具潜质的免疫细胞。随着研究的深入和技术的提高,相信CAR技术会给肿瘤患者带来福音。

**【关键词】** 肿瘤; 免疫疗法; 嵌合抗原受体

**New strategies of tumor therapy by using chimeric antigen receptor-modified immunocyte** Hu Wanli, Zhao Yuan, Zhang Liansheng. Department of Hematology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

Corresponding author: Zhang Liansheng, Email: zls2170@yahoo.com

**【Abstract】** Chimeric antigen receptor- (CAR-) based immunotherapy has been an emerging therapeutic modality for malignant tumor. It attracts close attention on choosing appropriate target antigen, filtering efficient and safe genetic modification, optimizing signal molecules, selecting good therapeutic immune cells and so on. It is believed that CAR will bring promising news to cancer patients, as the researches continue and the techniques improve.

**【Key words】** Neoplasms; Immunotherapy; Chimeric antigen receptor

以嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)为基础的免疫治疗已经有了近25年的发展。在这期间,CAR已经从一种崭新的生物技术发展成为治疗恶性肿瘤的有效手段之一。CAR的作用原理是利用基因工程技术,将以非MHC限制性的方式识别目标抗原的嵌合受体,通过激活信号用病毒载体或转座子系统等方法转染免疫细胞,使免疫细胞具有特异性识别和杀伤肿瘤的能力<sup>[1]</sup>。本文就以CAR为基础的免疫治疗应用于临床前试验和临床治疗的过程中需要密切关注的几个问题作一综述。

### 一、选择合适的目标抗原

CAR的基本设计包括肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)结合区域、铰链区域、跨膜区域和胞内信号区域。其中,TAA结合区域最常见的形式是由针对TAA单克隆抗体抗原结合区域的scFv构成的。针对CAR特异性目标抗原的选择是基因工程T细胞有效性和安全性的关键决定因素。“完美抗原”仅在肿瘤细胞上表达,不会引起重要组织的不可逆损伤;如果“完美抗原”

对肿瘤细胞的生存是必需的,它必将产生强大的效力;并且“完美抗原”不会给免疫编辑和肿瘤逃逸提供任何机会<sup>[2]</sup>。但如此理想的抗原并不多,目前受到关注的有表皮生长因子受体(EGFRv)和前列腺特异性膜抗原(PSMA)等。大多数目标抗原是TAA,它在肿瘤细胞表面呈现高表达或过度表达,而在正常组织中低表达;但只要不引起重要组织的损伤,也是安全的目标抗原。先前关于CAR修饰的T细胞(CAR-T细胞)方面的研究显示,CAR-T细胞仅选择表达于目标细胞表面的抗原,目前目标抗原还包括表达于细胞内的抗原<sup>[3-4]</sup>。

CAR技术广泛应用于临床的成功例子是以CD19为目标抗原构建的抗CD19 CAR。抗CD19 CAR在血液系统恶性肿瘤的研究最为热门,取得的成绩也尤为瞩目。几乎所有正常B细胞都表达CD19抗原,大多数B系肿瘤细胞也表达,所以CD19是治疗B系肿瘤的“理想抗原”<sup>[5]</sup>。有研究表明,对于晚期的B系肿瘤患者,输注抗CD19 CAR-T细胞能显著延长患者的生存时间,近半数患者经过该治疗后能获得完全缓解(CR)、部分缓解(PR)或稳定(SD)(疾病无进展生存),说明抗CD19 CAR有良好的应用前景。其他应用于临床的目标抗原包括:治疗乳腺癌和前列腺癌的ERRB2(HER-2/neu),

治疗前列腺癌的前列腺特异性膜抗原(PSMA),治疗肾细胞癌的碳酸酐酶 IX(CAIX),治疗肺癌和卵巢癌的 Lewis Y,治疗结肠癌的癌胚抗原(CEA),治疗卵巢癌的叶酸结合蛋白、叶酸受体或 MUC-CD,治疗成神经细胞瘤的二唾液酸神经节苷脂(GD2)。

针对目标抗原构建的 CAR 用于临床时所引发的安全问题也值得关注。TAA 在正常组织中少量表达,所以 CAR 修饰的免疫细胞在攻击肿瘤组织的同时会造成正常组织的损伤,被称作“脱靶效应”。在一项临床试验中,11 例肾细胞癌患者接受了特异性识别 CAIX 抗原的第一代 CAR-T 细胞治疗,其中 5 例在治疗后出现肝脏毒性,其毒性很可能是因为 CAR 修饰的 T 细胞以表达少量 CAIX 的胆管上皮细胞为目标,从而造成了对肝脏的损害<sup>[6-7]</sup>。所以针对目标抗原构建的 CAR 应用于临床时,应尽量选用特异性强的目标抗原。

针对上述 CAR 修饰的免疫细胞用于临床时出现的免疫损伤,研究表明可引入自杀基因清除 CAR 修饰的免疫细胞增强治疗的安全性。如单纯疱疹病毒腺苷激酶/丙氧鸟苷(HSV-TK/GCV)、caspase-9 的应用等,目前已用于 CAR 修饰免疫细胞的临床治疗<sup>[8]</sup>。但自杀基因本身也存在问题,比如其免疫原性、作用周期长等缺陷就限制了在临床中的应用。

## 二、甄选高效、安全的基因转导方法

CAR 修饰的免疫细胞需要高效、安全的基因转导方法。逆转录病毒的应用较为成熟,Phoenix 细胞产生的逆转录病毒有较高的转导率<sup>[9]</sup>。但逆转录病毒有引起“插入突变”的风险,且不能感染非增殖细胞,病毒滴度低。慢病毒载体以接近 100% 的转导率成为最佳载体。且慢病毒载体不会引起干细胞的“插入突变”,许多研究表明自我钝化的慢病毒载体因为缺乏慢病毒长末端重复序列而更具有安全性<sup>[10-12]</sup>。虽然病毒基因转导效率高、周期短,但设备要求严格、费用高限制了其临床应用。

睡美人转座子系统<sup>[13]</sup>能随即整合到人类 T 细胞基因组<sup>[14]</sup>,成为除病毒载体之外的另一理想选择。除了逆转录病毒和转座子介导的基因传递系统外,有一种更安全的新选择即锌指蛋白核酸酶,它是一种 DNA 内切酶,能将基因定位整合于宿主基因组<sup>[15]</sup>。

另外,电穿孔方法导入 mRNA 也是可行方法之

一,可实现快速、高效率表达;用 RNA 的方法转染 T 细胞显示出更强的靶向性和杀伤性<sup>[16]</sup>,并可避免基因毒性。

## 三、优化信号分子

在过去的几十年里,CAR 的结构在不断地完善。CAR 结构的完善主要表现为 CAR 表面信号分子及其组合的优化。最初用于研究的第一代 CAR 是免疫细胞激活的原型,但第一代 CAR 仅能引起短暂的免疫细胞分裂和非常低的细胞因子分泌,临床效果不佳。因此第二代和第三代 CAR 加入了两种或多种共刺激信号区域以增强其杀伤活性<sup>[17]</sup>。多信号受体最重要的功能就是增强信号强度,提高整体效能。

胞内信号区域对 CAR 修饰的免疫细胞完成抗肿瘤功能具有非常重要的作用。新一代的 CAR 包含了两种或两种以上的信号分子,如 CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)或可诱生的协同刺激分子(inducible co-stimulator 简称 ICOS)。但就刺激分子本身来说,还没有明确的结论说明哪一个效果更好。有研究表明,包含 CD28 的 CAR 能产生更多的 IL-2;CD137 则可能增强 CAR 的生存能力;ICOS 的加入对于溶解目标细胞更加有效<sup>[18-20]</sup>。无论是在体内还是体外,第二代或第三代 CAR 修饰的免疫细胞在增殖性、分泌细胞因子及肿瘤溶解活性等方面都表现出更好的效果。

CAR 的结构还在不断地优化中,设计更加理想的 CAR 信号分子组合,整合高效、安全的第四代 CAR 是目前研究的热点之一。

## 四、筛选最具潜质的免疫细胞

过继性转移的效应细胞是特异性免疫细胞治疗的主体,CAR 修饰的效应细胞的功能显著影响机体的抗肿瘤应答过程。目前大多数用于 CAR 技术的效应细胞都是 T 细胞<sup>[21]</sup>,其优势是 CAR-T 细胞不受 MHC 的限制,故同一 CAR 可用于不同的患者,而且目标抗原既可以是蛋白质类,还可以是糖类或脂类<sup>[22]</sup>。CD8<sup>+</sup>T 细胞的抗肿瘤作用已被证实,CD4<sup>+</sup>T 细胞在 CAR-T 细胞的免疫治疗中也起着不可忽视的作用。

肿瘤特异性 T 细胞必须在体内存留足够的时间才能成功地清除肿瘤。在过继性细胞免疫治疗中,肿瘤浸润淋巴细胞、过继性转移 T 细胞的持久性关系到其临床应答能力的强弱<sup>[23]</sup>。早期关于过继性转移 T 细胞的临床试验也证明了治疗的有效性取决于

抗原特异 T 细胞的持久性。在抗原暴露后,固有 T 细胞可转变为一或两组记忆细胞群,被称作效应记忆细胞 ( $T_{EM}$ ) 或中枢记忆细胞 ( $T_{CM}$ )<sup>[24]</sup>。虽然  $T_{EM}$  比  $T_{CM}$  在体外有更强的细胞毒活性和增殖能力,但  $T_{CM}$  在体内却有更强的抗肿瘤作用,并建立更长效的免疫细胞记忆应答。在一项灵长类动物的体内试验中,来源于  $T_{CM}$  ( $CD62L^+$ ) 而非来源于  $T_{EM}$  ( $CD62L^-$ ) 的 CMV 特异  $CD8^+$ T 细胞克隆的过继性转移建立了更为持久的 T 细胞记忆<sup>[25]</sup>。

除了研究较为成熟的 T 细胞, NK 细胞也有很强大的抗肿瘤效应,目前已有许多 NK 细胞扩增方法应用于临床研究中。有研究表明 NK 细胞对 ALL 细胞的抗肿瘤作用通过逆转录病毒转导的抗 CD19 嵌合信号受体实现,加入共刺激分子 CD137 更能扩大其功效<sup>[26]</sup>。这说明了 NK 细胞作为效应细胞的可行性。同时, CAR 修饰的 NK 细胞用于临床治疗也是不错的选择。已清除了 T 细胞的异体 CAR 修饰的 NK 细胞对淋巴细胞减少的患者有确切的疗效,因为在这些患者体内,功能性自体 T 细胞的数量已经由于先前的化疗和疾病的抵抗降低到很低的水平。应用最佳的效应细胞,将会减少高昂的费用,且能够提高用于临床的安全性。

### 五、结语和展望

CAR 修饰的免疫细胞在肿瘤免疫治疗方面有诱人的应用前景。虽然可能发生各种不可预测的不良反应,目前应用于临床的研究仍然在如火如荼地进行着。CAR 修饰免疫细胞治疗的理想状态是免疫细胞能识别清楚区分肿瘤细胞和正常组织的目标分子而发挥其最大的活化作用。故仔细筛选目标抗原来提高以 CAR 为基础的治疗安全性和作用效能显得尤为关键。其他因素也应该重视,如目标分子的浓度,抗原决定部位的易接近性,铰链区的灵活性,信号分子的性能等。还应评估一些新元素的效果,包括将可控性自杀基因(如 caspase 9 或 HSV-TK)作为安全开关<sup>[27]</sup>; T 细胞的趋化因子受体如何准确迁移到肿瘤部位。此外,效应细胞的筛选对 CAR 技术用于临床治疗也至关重要。为了获得良好的治疗效果,将来以 CAR 为基础的免疫治疗还很可能需要激活其他宿主免疫应答,包括利用固有免疫应答和诱导或扩大针对特定肿瘤抗原的适应性免疫应答。商业化细胞治疗的挑战仍然受到关注,其中细胞生物工程协议应当简化以促进治疗策略的广泛化应用。此外,由于基于 CAR 的治疗

方法在技术方面存在很大的挑战,且费用昂贵,所以很多研究目前只能在学术中心开展;将来的工作还需要管理部门、生物公司、医疗中心和学术机构的共同努力和相互配合,完善从临床前试验到临床治疗的整个循环过程。随着研究的深入和技术的提高,相信 CAR 技术会给肿瘤患者带来福音。

### 参 考 文 献

- [1] Ramos CA, Dotti G. Chimeric antigen receptor(CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(7): 855-873.
- [2] Goldberger O, Volovitz I, Machlenkin A, et al. Exuberated numbers of tumor-specific T cells result in tumor escape[J]. Cancer Res, 2008, 68: 3450-3457.
- [3] Tassef DV, Cheng M, Cheung NK. Retargeting NK92 cells using an HLAA2-restricted, EBNA3C-specific chimeric antigen receptor[J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(2): 84-99.
- [4] Stewart-Jones G, Wadle A, Hombach A, et al. Rational development of highaffinity T-cell receptor-like antibodies[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(14): 5784-5788.
- [5] Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy[J]. Leuk Lymphoma, 1995, 18(5/6): 385-397.
- [6] Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(13): e20-e22.
- [7] Lamers CH, Willemsen R, van Elzakker P, et al. Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells[J]. Blood, 2011, 117(1): 72-82.
- [8] Casucci M, Bondanza A. Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirected T lymphocytes[J]. J Cancer, 2011, 2(1): 378-382.
- [9] Lamers CH, Willemsen RA, van Elzakker P, et al. Phoenix-ampho outperforms PG13 as retroviral packaging cells to transduce human T cells with tumor-specific receptors: implications for clinical immunogene therapy of cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(5): 503-509.
- [10] Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration[J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(6): 687-696.
- [11] Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, et al. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors[J]. Mol Ther, 2009, 17(11): 1919-1928.
- [12] Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy[J]. J Clin Invest, 2009, 119(4): 964-975.
- [13] 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.
- [14] Huang X, Guo H, Tammana S, et al. Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and piggyBac transposons in human primary T cells[J]. Mol

- Ther, 2010, 18(10): 1803-1813.
- [15] Torikai H, Reik A, Liu PQ, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR[J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5697-5705.
- [16] Yoon SH, Lee JM, Cho HI, et al. Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model[J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(6): 489-497.
- [17] Shirasu N, Kuroki M. Functional design of chimeric T-cell antigen receptors for adoptive immunotherapy of cancer: architecture and outcomes[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(6): 2377-2383.
- [18] Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 104-113.
- [19] Milone MC, Fish JD, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1453-1464.
- [20] 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 EGFRvIII expressing glioma[J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 33.
- [21] June CH, Blazar BR, Riley JL. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(10): 704-716.
- [22] Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 956304.
- [23] Robbins PF, Dudley ME, Wunderlich J, et al. Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy[J]. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7125-7130.
- [24] Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions[J]. *Nature*, 1999, 401(6754): 708-712.
- [25] Berger C, Jensen MC, Lansdorf PM, et al. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 294-305.
- [26] Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells[J]. *Blood*, 2005, 106(1): 376-383.
- [27] Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18): 1673-1683.

(收稿日期: 2014-02-03)

(本文编辑: 郝锐)

胡婉丽, 赵嫻, 张连生. 嵌合抗原受体修饰免疫细胞治疗肿瘤的新策略 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8(6): 1151-1154.

1915  
CHINESE MEDICAL ASSOCIATION  
中华医学会