

上海交通大学医学院



学者介绍

Author introduction



王月英 博士

研究员、博士生导师

WANG Yue-ying

Ph.D
Professor, Doctoral Supervisor

王月英 (1976—), 上海交通大学医学院附属瑞金医院、上海血液学研究所、医学基因组学国家重点实验室研究员、博士生导师。2005 年获上海交通大学医学院博士学位。2009—2010 年在美国布兰迪斯大学做访问学者。现任国家自然科学基金评审专家、中国病理生理学会会员、瑞金医院青年联合会理事、瑞金医院青年助力培养计划导师。

• 长期致力于白血病发病机制和靶向治疗方面的研究工作。在 *Cancer Cell*、*PNAS*、*Blood*、*Leukemia* 等国际知名刊物发表 SCI 论文 20 余篇, 获国家授权专利 3 项。作为负责人, 承担国家科技重大专项、国家自然科学基金优秀青年科学基金等国家级课题 4 项。入选上海市青年科技启明星、上海市教育委员会高峰高原学科建设等市级人才计划 4 项。曾获 2015 年国家自然科学基金二等奖、2014 年上海市自然科学奖特等奖、2014 年明治生命科学奖优秀奖、2013 年上海市卫生系统银蛇奖三等奖等奖项。

WANG Yue-ying born in 1976, professor and doctoral supervisor of State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. She got her Ph.D from Shanghai Jiao Tong University School of Medicine in 2005, and worked as a visiting scholar at Brandeis University during 2009-2010. She is an expert reviewer of the National Natural Science Foundation of China, the member of Chinese Association of Pathophysiology, the member of the council of Youth Federation and the mentor for supporting the Youth Development Program of Ruijin Hospital.

• She has been committed to the studies of the mechanisms of leukemogenesis and targeted therapy for leukemia. She has published more than 20 SCI papers in international journals such as *Cancer cell*, *PNAS*, *Blood* and *Leukemia*, and obtained 3 Chinese patents as one of the inventors. She has been in charge of 4 national research projects including National Science and Technology Key Project of the Ministry of Science and Technology of China, Excellent Young Scholar of National Natural Science Foundation of China, and 4 municipal talent programs including “Shanghai Rising-Star Program” “Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support”, et al. She has won many awards and honors including “the second prize of National Natural Science Award of China” in 2015, “the outstanding prize of Shanghai Natural Science Award” in 2014, “Meiji Life Sciences Award” in 2014, and “the third prize of Shanghai Foundation for Eminent Youth Award of Health Care System” in 2013.

综述

嵌合抗原受体 T 细胞疗法及其在血液肿瘤免疫治疗中的应用

夏 莉, 王月英

上海交通大学 医学院附属瑞金医院, 上海血液学研究所, 上海 200025

[摘要] 嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (CAR-T 疗法), 是近年来发展迅速的一种新型细胞免疫疗法。它通过基因重组和转染技术, 获得可以特异性地识别肿瘤相关抗原的效应 T 细胞。与常规 T 细胞相比, CAR-T 细胞具有更强的肿瘤靶向性、杀伤活性和持久性。随着转化医学研究的不断深入, CAR-T 技术经历了 4 代优化与革新, 在众多肿瘤疾病尤其是血液系统恶性肿瘤中展现出了有前景的临床疗效, 但该技术的临床应用也带来了脱靶效应、细胞因子风暴等风险。该文就 CAR-T 在血液肿瘤免疫治疗中的进展、不良反应、应对策略和发展前景作一综述。

[关键词] CAR-T 疗法; 血液肿瘤; 细胞免疫治疗

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.06.019 **[中图分类号]** R733.7 **[文献标志码]** A

Chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy and its applications in hematological malignancies immunotherapy

XIA Li, WANG Yue-ying

Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] Chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) immunotherapy is a new type of immunotherapy, which has been developed rapidly in recent years. By using gene recombination and transfection techniques, CAR-modified effector T cells that specially recognize tumor-associated antigen was produced, which show better properties of targeting, killing activity and durability than conventional T cells. With the development of translational medicine research, CAR-T technology has experienced four generations of optimization and innovation, and presented a promising clinical efficacy in the treatment of various cancers, especially hematological malignancies. However, there are also potential risks with clinical use of this new technology, such as the off-target effect and cytokine storm. In this review, the progress, side effects, coping strategy, and development prospects of CAR-T in hematological malignancies immunotherapy were discussed.

[Key words] chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy; hematological malignancies; cellular immunotherapy

在过去的近 10 年里, 免疫疗法在癌症的治疗中展现出了巨大的潜力, 而嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 疗法的出现可以说是免疫治疗最大的成功。CAR-T 疗法的基本原理与其他免疫疗法类似, 即利用患者自身免疫细胞来清除肿瘤细胞。但不同于传统免疫疗法的是, 这种新型的细胞疗法提取患者外周血中的 T 细胞, 通过基因重组技术赋予 T 细胞特异性识别肿瘤抗原的能力, 这些改造后的 T 细胞经体外扩增后回输到患者体内从而特异性杀伤肿瘤细胞。目前, 该免疫疗法在白血病和淋巴瘤患者的早期临床试验中均取得了显著的疗效。

1 CAR-T 技术

1.1 CAR-T 的原理和基本结构

利用基因工程技术将识别肿瘤相关抗原 (tumor

associated antigen, TAA) 的抗体可变区基因序列与胞内信号区序列在体外进行重组, 再通过转染将重组质粒转进患者的 T 细胞内, 使 T 细胞表面表达肿瘤抗原受体蛋白, 经纯化和体外大规模扩增后的表达特异性嵌合抗原受体的 T 细胞称为 CAR-T 细胞。CAR-T 细胞免疫疗法就是利用嵌合抗原受体 T 细胞特异性识别肿瘤相关抗原靶点, 经信号传递至胞内引起 T 细胞激活和增殖, 从而有效杀伤肿瘤细胞的临床治疗方法。

CAR 的结构类似于 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR), 由胞外肿瘤抗原结合区、跨膜区以及胞内信号传导区 3 个部分组成。胞外肿瘤抗原结合区主要是单链抗体 (single-chain variable fragment, scFv), 由单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区通过短肽连接而成; scFv 能以非主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 限制性的方式直接识别 TAA, 并通过胞内信号

[基金项目] 国家自然科学基金 (81570151); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152507); 上海交通大学 SMC—晨星青年学者奖励计划 (National Natural Science Foundation of China, 81570151; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20152507; Shanghai Jiao Tong University SMC-Morningstar Young Scholars Program)。

[作者简介] 夏 莉 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: xiali2014@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 王月英, 电子信箱: yywang@shsmu.edu.cn。

域转导信号,进而活化效应T细胞^[1]。CAR的胞内信号区是免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM),一般由TCR/CD3的 ζ 链或Fc ϵ RI的 γ 链充当,其作用是向T细胞传递活化信号和共刺激信号。CAR的跨膜区一般由同源或异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白组成^[1]。

虽然CAR的主要功能部分是靶向特异抗原的scFv,但CAR的各组成部分都会影响其整体的功效。例如,连接胞外区和跨膜区的铰链可以通过其大小、灵活性和范围来改变CAR与肿瘤抗原表位间的亲和性,从而影响CAR的信号活力^[2]。

1.2 CAR-T的研究进程

早在1989年,Eshhar小组就将免疫球蛋白的可变区与TCR的恒定区(也称胞内信号区)重组形成嵌合受体,即所谓第一代CAR^[3]。一代CAR只有胞外scFv和胞内信号转导区,虽然能够为T细胞活化提供第一信号,但在临床试验中的结果并不理想——CAR-T细胞在体内存活周期短,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^[4]。为了提高安全性和有效性,CAR的设计已经历了4代的发展演进。

对于一代CAR-T不理想的临床效应,推断可能是由于输入到患者体内的CAR-T细胞没有完全活化。基于双信号学说原则,T细胞活化需要2个信号,即TCR提供的第一信号和共刺激分子提供的第二信号;只含有CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ 信号区域而没有共同刺激信号,CAR-T细胞无法被活化。因此,第二代CAR在一代CAR的基础上添加了共刺激分子,如CD28、CD27、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、ICOS等^[5-7]。这些共刺激分子对T细胞在体内的扩增、生存以及信号调节方面有重要影响,有助于提高T细胞的细胞毒性、增殖活性,维持T细胞应答,延长T细胞存活时间等,从而增强CAR-T的疗效。众多临床试验结果均表明,二代CAR-T在体内的存活时间及杀伤毒性较一代CAR-T均有所增强^[6-7]。

第三代CAR则结合了3个甚至更多个共刺激分子,如CD3 ζ .CD28.41BB、CD3 ζ .CD28.OX40和CD4 ζ .CD28.41BB^[8-10]。在对含有多个共刺激分子CAR的研究中发现,共刺激分子和胞内信号区之间的排列顺序会影响CAR-T细胞的体内增殖能力和肿瘤杀伤效率^[11],不同共刺激分子的组合以及组合方式都能影响CAR的整体功效^[12-13]。三代CAR-T与二代CAR-T相比,肿瘤杀伤效能相等^[11]但增殖效率更高,在体内存活时间更久^[9]。

第四代CAR整合了自杀基因、细胞因子等对CAR-T细胞进行精准调控,如TRUCK(T cells redirected for universal cytokine killing)IL-12 T细胞。当该CAR-T细胞活化时可释放IL-12至肿瘤病变处累积,招募先天性免疫细胞如自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和巨噬细胞,来协助杀伤因丢失特异性抗原而无法被CAR-T细胞识别的肿瘤细胞;而由于会产生严重反应,这种IL-12的大量累积是不能通过普通治疗方法实现的^[14]。

2 CAR-T的优势

2.1 靶向性更强

内源性T细胞在发挥肿瘤免疫功能时必须依赖于抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)加工和MHC的表达才能与靶抗原作用,在此过程中形成的免疫逃逸机制使得肿瘤细胞逃脱T细胞攻击。而由于CAR-T细胞是应用基因修饰患者自体的T细胞,它的一个优势是可以利用抗原抗体结合的机制,特异性识别未经APC处理过的抗原,不受MHC和相关调节的限制,以非MHC依赖性的方式直接杀伤肿瘤细胞,避免了在抗原提呈过程中的免疫逃逸。

2.2 作用范围更广

与传统的TCR仅能识别加工后的多肽抗原不同,以scFv作为抗原识别区段的CAR能够识别不同种类的抗原,包括糖类和脂类等非蛋白抗原,扩大了肿瘤抗原靶点范围。此外,很多肿瘤细胞表达相同的肿瘤抗原,因此,针对某一种肿瘤抗原的CAR一旦构建完成,便可以应用于多种肿瘤的治疗。

2.3 效果更持久

目前,应用于临床试验的CAR-T大都整合了能促进T细胞增殖与信号活化的基因序列,使得CAR-T细胞进入体内后可以增殖并具有免疫记忆功能,可长期在体内存活^[13]。

2.4 可操纵性强

从上述一代到四代CAR-T的演变来看,免疫治疗过程中出现的各种不良反应以及不足之处都能通过不断改进来优化,如不同共刺激分子的组合^[13]、可调控的基因开关的加入^[15]、CAR亲和性的调节^[16]等。除了T细胞,NK细胞^[17]和细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)^[18]均可被CAR修饰,发挥靶向治疗作用。

3 CAR-T 疗法在血液肿瘤中的应用

自从 CAR-T 技术在急性 B 淋巴细胞白血病 (B-acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 的治疗中取得巨大突破以来,全球诸多研究人员开始进行 CAR-T 临床试验 (<https://www.clinicaltrials.gov>),并呈逐年递增趋势。目前,临床试验中多采用第二代和第三代 CAR-T 技术,50% 以上的 CAR-T 临床实验在血液肿瘤中展开。

3.1 CAR-T 在急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 中的应用

ALL 是一组异质性疾病,患者包含不同的生物学特征和预后特征,按免疫学分型可分 T 细胞型与非 T 细胞型,最为常见的 B-ALL 即属于后者。长期以来 B-ALL 以放疗、化疗作为基本的治疗策略,虽然完全缓解率达 70%~90%,3~5 年无瘤生存率为 40%~60%,但对于成人及儿童复发或难治性 B-ALL 患者预后仍然很差。

目前,治疗 B-ALL 患者的 CAR-T 最常使用的靶点是 CD19。CD19 几乎高表达于所有的 B 淋巴细胞系白血病,包括前体 B 细胞 ALL、慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 和淋巴瘤,且不在正常组织中表达。Brentjens 等^[12]早在 2007 年报道了用 CAR-T 治疗 ALL 的研究;虽然对象是 B-ALL 小鼠模型,但为之后 CD19.28zCAR-T 在临床上的应用提供了依据。其后,据报道,用 CD19.28zCAR-T 细胞治疗 5 例复发的 B-ALL 患者,输入 CAR-T 后 5 例患者均达到完全缓解;随后对其中 4 例符合条件的患者进行异基因造血干细胞移植 (allogeneic stem cell transplantation, allo-SCT),均达到了分子水平完全缓解^[19]。Grupp 等^[20]利用 CD19.41BBzCAR-T (CTL019) 细胞治疗 2 例儿童 B-ALL 患者,2 例患者均达到分子水平完全缓解。其中 1 例完全缓解时间甚至超过 3.5 年^[21]。2014 年, Davila 等^[22]较大样本量研究结果显示,14 例 B-ALL 患者在输入 CD19.28zCAR-T 细胞 1 个月后均获得完全缓解,其中 7 例在 CAR-T 治疗后进行 allo-SCT 均未复发。同年, Maude 等^[23]采用 CTL019 治疗 30 例儿童和成人 B-ALL 患者,其中 27 例在输入 CAR-T 细胞 1 个月后达到形态学完全缓解,22 例达到分子生物学完全缓解,最长缓解时间达 24 个月。Frey 等^[24]也报道了 12 例成人 B-ALL 患者在接受 CTL019 治疗之后,8 例获得完全缓解。2015 年, Lee 等^[25]用 CD19.28zCAR-T 治疗 20 例 (包括成人和儿童) B-ALL,其中 14 例获得完全缓解,且所有在 CAR-T 治疗后进行 allo-SCT 的患者中位随访 10 个月均未复发。

2016 年 Turtle 等^[26]用 CTL019 分别修饰 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞,并以一定混合比例输入 29 例 B-ALL 患者中,27 例 (93%) 获得完全缓解。

除 CD19 外,还有一些临床前研究针对 ALL 寻找新的靶抗原。如 Haso 等^[27]构建了抗 CD22 修饰的二代 CAR-T,在体外对 CD22⁺ALL 细胞株和患者原始细胞特异性杀伤,在体内也可延长 CD22^{low}CD19^{high}模型小鼠的存活时间。

3.2 CAR-T 在慢性淋巴细胞白血病中的应用

同是表达 B 细胞相关抗原 CD19,一些用于治疗 B-ALL 的 CAR-T 细胞也应用于 B-CLL 的治疗中;但相对于在 B-ALL 治疗上取得的重大突破, CAR-T 技术治疗 CLL 患者的临床效果就显得温和多了。

有研究^[15,28]用 CTL019 治疗 3 例化疗耐受的 CLL 患者,其中 2 例完全缓解达 10 个月之久,1 例部分缓解。同是二代 CAR,有研究^[29,30]显示,CD19.CD28zCAR-T 治疗 8 例复发难治的 B-CLL 患者,只有 1 例获得部分缓解,且维持时间只有 6 个月;其中 1 例患者持续低烧,最后发展成败血症并出现低血压和肾衰竭,在输入细胞 48 h 后死亡;值得注意的是,该组临床试验在输入 CAR-T 时采用分次剂量,并在治疗后结合环磷酰胺,使得患者没有出现经典的细胞因子风暴症状。Kochenderfer 等^[31]于 2012 年报道中,用抗 CD19 修饰的二代 CAR-T 治疗 8 例惰性淋巴瘤/白血病患者,在其中 4 例 CLL 中,1 例获得完全缓解,2 例部分缓解。随后,他们又报道,用 CD19.28zCAR-T 治疗 4 例 CLL,3 例获得完全缓解,1 例部分缓解^[32]。Porter 等^[33]采用 CTL019 治疗 14 例 CLL 患者,其中 4 例完全缓解,4 例部分缓解。

以上已应用于临床试验的靶抗原都是针对 CD19,还有许多临床前研究提示其他肿瘤特异性抗原应用于 CLL 临床治疗的可能,如 CD23^[34]、ROR1^[2]等。

3.3 CAR-T 在急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 中的应用

CAR-T 的出现为 B 系白血病的治疗提供了新的治疗方法,而针对 AML 的治疗方案近 50 年都没有改变。虽然大量体外实验为 CAR-T 在 AML 中的应用提供了潜在靶点,如 LeY、CD33、CD123、CD44v6、FRβ^[35-40],但目前这项新兴的免疫疗法在 AML 中的进展相对缓慢。目前已注册的针对 AML 的 CAR-T 临床试验只有 8 项,已报道的临床数据仅 2 项,分别是基于 LeY 抗原设计的二代 LeY.CD28zCAR-T^[35]和基于 CD123 设计的四代 CD123-scFv/



CD28/CD137/CD27/CD3 ζ -iCasp9 (4SCAR123)^[41]。前者的临床治疗结果并不理想,虽然体外实验证明其对 LeY⁺ AML 细胞有杀伤作用^[36],但值得注意的是,在 LeY 也表达于其他正常组织的情况下;输入 LeY.CD28zCAR-T 后竟没有引起细胞毒性反应。作为极少的已报道的应用于临床试验的四代 CAR-T,4SCAR123 治疗的 1 例复发的 AML 患者在输入 T 细胞后的 20 d 内达到部分缓解。

3.4 CAR-T 在多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 中的应用

MM 是血液系统中第二大常见恶性肿瘤,多发于中老年患者;传统的化疗、自体干细胞移植 (autologous hematopoietic stem cell transplantation, auto-HSCT) 虽然有一定疗效,但针对不同年龄层患者临床疗效差异明显,目前认为仍是不可治愈的疾病。CAR-T 治疗 ALL 的众多临床试验结果提示,在 auto-HSCT 后输入 CAR-T 细胞可提高疗效,于是越来越多的 CAR-T 研究试验在 MM 中展开。

Garfall 等^[42]在 2015 年报道了 1 例 MM 患者经 CTL019 治疗后获得部分缓解,且除了炎症反应和 B 细胞缺乏之外,没有出现其他不良反应,如细胞因子风暴。Ali 等^[43]用不同剂量的 BCMA.CD28zCAR-T 治疗 11 例经化疗的 MM 患者,6 例输入低剂量 CAR-T 的患者中,1 例患者达到部分缓解,持续时间 2 周;3 例输入中等剂量 CAR-T 的患者中,1 例达到很好的部分缓解;而输入高剂量 CAR-T 的 2 例患者均达到完全缓解。Guo 等^[44]报道称,5 例接受 CD138zCAR-T 治疗的复发/难治 MM 患者中,4 例病情稳定,另 1 例病情进展。

关于 CAR-T 在 MM 中的研究大多数还处于临床前研究阶段,如针对 LeY、CD56、NY-ESO-1、CD38、CS1^[36, 45-48]设计构建的二代 CAR-T 均能在体外特异性杀伤 MM 细胞,且在模型小鼠体内也发挥出高效的细胞毒性作用。

3.5 CAR-T 在淋巴瘤中的应用

淋巴瘤是较早发现的血液系统恶性肿瘤之一。根据世界卫生组织的最新分类,主要分为霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma, HL) 和非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphomas, NHL) 两大类,其中 NHL 包括套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma, MCL)、滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma, FL)、弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)、Burkitt's 淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma, BL)、边缘区淋巴瘤 (marginal zone lymphoma, MZL)。根据目前报道的数据,CAR-T 在淋巴

瘤中的应用主要针对 CD19、CD20、CD70、CD38 几个靶点,其中 CD19 最为常用。

2010 年, Kochenderfer 等^[49]用 CD19.28zCAR-T 治疗 1 例 FL,在进行淋巴细胞清除后输入 CAR-T,该患者维持部分缓解达 32 周。同年, Savoldo 等^[50]用 CD19.28zCAR-T 治疗 6 例 NHL,6 例患者均未达到缓解。2012 年, Kochenderfer 等^[31]报道,用 CD19.28zCAR-T 治疗 8 例惰性淋巴瘤患者 (其中包括 3 例 FL,1 例 MZL),2 例 FL 获得部分缓解。2013 年, Kochenderfer 等^[51]又报道,用 CD19.28zCAR-T 治疗 10 例 B 细胞淋巴瘤/白血病 (包括 2 例 DLBCL,4 例 MCL),1 例 MCL 获得部分缓解,其余 5 例病情无进展。而之后治疗的 15 例 B 细胞淋巴瘤中有 9 例 DLBCL,其中 4 例 DLBCL 获得完全缓解,且 1 例完全缓解时间维持 22 个月之久,2 例部分缓解,1 例病情稳定,2 例没有应答^[32]。Wang 等^[52]报道,基于 CD19 构建了一代和二代 CAR-T,并分别对 8 例 NHL 患者进行治疗。临床结果显示,输入一代 CD19.zCAR-T 的 8 例 NHL 患者中有 3 例获得完全缓解,2 例部分缓解,2 例病情稳定;而输入二代 CD19.28zCAR-T 的 8 例 NHL 患者有 6 例完全缓解,2 例部分缓解。

第一篇用 CD20zCAR-T 治疗淋巴瘤的报道由 Till 等^[53]发表于 2008 年;虽然该研究中的 5 例患者均未达到缓解,但在输入 CAR-T 后病情没有进一步恶化。2012 年 Till 等^[54]又构建了 CD20.CD28.41BB.zCAR-T;这种三代 CAR-T 治疗的 3 例 MCL 和 1 例 FL 中,2 例 MCL 达到完全缓解,并分别维持 12 个月和 24 个月,1 例 FL 部分缓解,充分展现了三代 CAR-T 较一代 CAR-T 显示出的优越性。

针对 CD70 和 CD38 设计的 CAR-T 在细胞株水平以及模型动物体内均展现出对淋巴瘤细胞特异性杀伤,如 Shaffer 等^[55]构建的靶向 Burkitt's 淋巴瘤的 CD70.CD27zCAR-T, Mihara 等^[56]靶向 NHL 的 CD38.41BBzCAR-T。另外, Pinz 等^[10]报道的 CD4z.CD28.41BB 修饰的 CD8⁺T 细胞是针对 T 细胞肿瘤疾病,如外周 T 细胞淋巴瘤 (peripheral T-cell lymphoma, PTCL);实验显示这种抗 CD4 的三代 CAR-T 在体外对 CD4⁺细胞株有杀伤作用,且能消除 PTCL 患者的原始细胞,在模型小鼠体内也证实了其抗肿瘤效果。

4 CAR-T 技术的不良反应及应对策略

4.1 脱靶效应

CAR-T 技术在临床应用中的首要风险问题就是脱靶效应。即当正常组织与肿瘤细胞都表达同一种抗原时,CAR-T 细胞无法区分,就会同时攻击正常组织。例如,

在针对 CD19 的临床治疗中,所有达到持续缓解的患者都有 B 细胞发育不全症状^[23, 29, 31]。在 Ritchie 等^[35]的报道中,输入靶向 LeY 的 CAR-T 后患者出现了皮疹,病理检查显示皮肤发生了 T 细胞浸润。

针对脱靶效应目前的对策主要有 3 种:①使 CAR-T 细胞表达 1 种以上的嵌合抗原受体,从而能特异性结合肿瘤细胞。正常组织细胞只有 1 种抗原表达可避免受到损伤^[57]。②使用抑制性 CAR^[58]。激活性 CAR 靶向同时表达于肿瘤细胞和某些正常组织上的抗原,而抑制性 CAR 靶向只表达于正常细胞的抗原。当这 2 种 CAR 修饰的 T 细胞遇到同时表达 2 种抗原的正常细胞时,来自抑制性 CAR 的抑制信号会削减来自激活性 CAR 的活化信号,导致 CAR-T 细胞不能被活化,从而无法攻击正常细胞。③根据靶抗原表达水平微调 CAR 亲和性^[40],使较低亲和性的 CAR 只识别高表达该抗原的肿瘤细胞,而不损害相同抗原低表达的正常细胞。

4.2 细胞因子风暴

CAR-T 临床应用中最显著的不良反应是细胞因子风暴,即细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)。CAR-T 细胞在体内增殖活化会大量分泌 IFN- γ 、TNF- α 等炎症因子,引起机体出现高热、肌痛、低血压、呼吸衰竭等症状^[30-31]。另外, CAR-T 在体内的指数增殖期间 IL-6 也会迅速提升^[20]。

CRS 与 CAR-T 细胞的扩增以及肿瘤细胞的消除是相伴相生的。它不依赖于 CAR-T 的抗原特异性,不过其严重程度还是可以通过优化治疗方案来降低的,例如用 IL-6 受体拮抗药物 tocilizumab 来缓解^[23]。另外,相同的 CAR-T 在治疗不同的疾病时发生 CRS 的风险和症状也有所不同^[59]。还有研究显示,CRS 与疾病进程或肿瘤负荷相关,在疾病负荷高的患者体内 CRS 更严重,因此在疾病恶化之前进行 CAR-T 治疗可大大降低发生严重 CRS 的风险^[23]。而相比于一次性大量输入 CAR-T 细胞,批次输入能减轻自体免疫反应^[29]。

4.3 神经系统毒性

CAR-T 治疗白血病可能引起神经系统症状。多个临

床试验报道^[20, 22-23, 25-26]显示这种神经系统毒性表现多样,如谵妄、语言障碍、运动障碍、缄默症和癫痫发作,其机制尚不清楚。此外, JUNO 公司正在进行的 JCAR015 (CD28zCAR) 治疗白血病的 II 期临床试验中, 20 余例患者中先后出现 3 例因神经毒性作用导致的死亡事件;分析患者有可能存在中枢神经系统白血病 (central nervous system leukemia, CNSL) 的情况,“吸引” CAR-T 细胞进入中枢神经系统进行杀伤,大量肿瘤细胞在脑中迅速裂解,形成脑部水肿;提示临床治疗中应排除 CNSL 患者。

4.4 其他

CAR-T 在体内长期存在可能对机体造成损伤,所以在肿瘤被消除后如何处理残留的 CAR-T 细胞也是学者们所关注的。目前的策略是在 CAR 构建时整合自杀基因开关^[16],以便人为启动 CAR-T 细胞的自杀程序,不仅能够清除过剩的 CAR-T 细胞,还能及时制止 CAR-T 疗法带来的不良反应。

5 展望

目前, CAR-T 疗法仍处于起步阶段,临床应用中的风险和不足之处有待改进,针对实质性肿瘤的治疗也有待突破。相信通过筛选理想的靶抗原,探索最佳 CAR 信号组合,优化宿主自身条件,同时联合其他治疗方案的使用, CAR-T 疗法的临床疗效会有更大的突破。另外,设计通用嵌合抗原受体 (universal CAR-T)^[60],即一种 CAR 靶向多种肿瘤抗原,甚至可以连续性地识别一种抗原并产生免疫反应后,继续回收利用去识别另一种肿瘤抗原,使得一种 CAR-T 治疗多种肿瘤成为可能。

作为一种新兴的免疫治疗方法, CAR-T 技术的发展是有目共睹的。虽然临床试验抗肿瘤效果尚不尽人意,但这种新技术为常规治疗方法耐受的肿瘤患者带来的希望是不容否定的。我们期待随着更多临床经验的积累和科学研究的探索,这种新颖的治疗方法能更有效、更安全、更广泛地应用于患者,为医学发展和人类健康做出贡献。



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] Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12): 3153-3164.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2004, 18(4): 676-684.
- [7] 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.
- [8] Zhao Y, Wang QJ, Yang S, et al. A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity[J]. *J Immunol*, 2009, 183(9): 5563-5574.
- [9] Pule MA, Straathof KC, Dotti G, et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells[J]. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 933-941.
- [10] Pinz K, Liu H, Golightly M, et al. Preclinical targeting of human T-cell malignancies using CD4-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells[J]. *Leukemia*, 2016, 30(3): 701-707.
- [11] Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(9): 3360-3365.
- [12] Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5426-5435.
- [13] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJ, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415-428.
- [14] Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Of CARs and TRUCKS: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 83-90.
- [15] 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.
- [16] Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety[J]. *Leukemia*, 2010, 24(6): 1160-1170.
- [17] Yong CS, John LB, Devaud C, et al. A role for multiple chimeric antigen receptor-expressing leukocytes in antigen-specific responses to cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34582-34598.
- [18] Hombach AA, Rappl G, Abken H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation"[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(12): 2268-2277.
- [19] Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177): 177ra138.
- [20] Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16): 1509-1518.
- [21] Singh N, Frey NV, Grupp SA, et al. CAR T cell therapy in acute lymphoblastic leukemia and potential for chronic lymphocytic leukemia[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2016, 17(6): 28.
- [22] Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra225.
- [23] Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-1517.
- [24] Frey NV, Levine BL, Lacey SF, et al. Refractory cytokine release syndrome in recipients of chimeric antigen receptor (CAR) T cells[J]. *Blood*, 2014, 124(21): 2296-2296.
- [25] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial[J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528.
- [26] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺: CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): 2123-2138.
- [27] Haso W, Lee DW, Shah NN, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2013, 121(7): 1165-1174.
- [28] Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 95ra73.
- [29] Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias[J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4817-4828.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6): 540-549.
- [33] Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303): 303ra139.
- [34] Giordano Attianese GM, Marin V, Hoyos V, et al. *In vitro* and *in vivo* model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor[J]. *Blood*, 2011, 117(18): 4736-4745.
- [35] Ritchie DS, Neeson PJ, Khot A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(11): 2122-2129.
- [36] Peinert S, Prince HM, Guru PM, et al. Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen[J]. *Gene Ther*, 2010, 17(5): 678-686.
- [37] Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, et al. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors[J]. *Haematologica*, 2010, 95(12): 2144-2152.
- [38] Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2013, 122(18): 3138-3148.
- [39] Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma[J]. *Blood*, 2013, 122(20): 3461-3472.
- [40] Lynn RC, Feng Y, Schutsky K, et al. High-affinity FRbeta-specific CAR T cells eradicate AML and normal myeloid lineage without HSC toxicity[J]. *Leukemia*, 2016, 30(6): 1355-1364.
- [41] Luo Y, Chang LJ, Hu Y, et al. First-in-man CD123-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of refractory acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2015, 126(23): 3778-3778.
- [42] Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, et al. Chimeric antigen receptor T Cells against CD19 for multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(11): 1040-1047.
- [43] Ali SA, Shi V, Maric I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma[J]. *Blood*, 2016, 128(13): 1688-1700.
- [44] Guo B, Chen M, Han Q, et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma[J]. *J Cell Immunother*, 2016, 2(1): 28-35.
- [45] Benjamin R, Condomines M, Gunset G, et al. Abstract 3499: CD56 targeted chimeric antigen receptors for immunotherapy of multiple myeloma[J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 3499-3499.
- [46] Schubert PC, Jakka G, Jensen SM, et al. Effector memory and central memory NY-ESO-1-specific re-directed T cells for treatment of multiple myeloma[J].



- Gene Ther, 2013, 20(4): 386-395.
- [47] Mihara K, Bhattacharyya J, Kitanaka A, et al. T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells[J]. Leukemia, 2012, 26(2): 365-367.
- [48] Danhof S, Gogishvili T, Koch S, et al. Preclinical analysis of feasibility and efficacy of CS1 directed CAR T cell therapy in multiple myeloma in the autologous setting[J]. Clin Lymph Myel Leuk, 2015, 15: e39.
- [49] Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19[J]. Blood, 2010, 116(20): 4099-4102.
- [50] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients[J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1822-1826.
- [51] Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Blood, 2013, 122(25): 4129-4139.
- [52] Wang X, Popplewell LL, Wagner JR, et al. Phase I studies of central-memory-derived CD19 CAR T cell therapy following autologous HSCT in patients with B-cell NHL[J]. Blood, 2016, 127(24): 2980-2990.
- [53] 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.
- [54] Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results[J]. Blood, 2012, 119(17): 3940-3950.
- [55] Shaffer DR, Savoldo B, Yi Z, et al. T cells redirected against CD70 for the immunotherapy of CD70-positive malignancies[J]. Blood, 2011, 117(16): 4304-4314.
- [56] Mihara K, Yanagihara K, Takigahira M, et al. Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. Br J Haematol, 2010, 151(1): 37-46.
- [57] Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 71-75.
- [58] Fedorov VD, Themeli M, Sadelaian M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(215): 215ra172.
- [59] Barrett DM, Grupp SA, June CH. Chimeric Antigen receptor- and TCR-modified T cells enter main street and wall street[J]. J Immunol, 2015, 195(3): 755-761.
- [60] Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(4): E459-468.

[收稿日期] 2016-11-16

[本文编辑] 吴 洋

高峰高原学科建设计划

公共卫生与预防医学

建设国内领先、若干领域在国际上具有较大影响力、能服务国家战略需求的学科群，力争在学科评估中排名提前。以重大慢性非传染性疾病为主要研究对象，以临床与分子流行病学、环境污染暴露生物学、毒理学、社区健康与行为干预，以及医疗卫生改革和医院管理等为主攻方向，培育一支由交叉学科人才组成、国际化的、以“预防转化研究和智慧健康管理”为理念的创新团队，并努力把本学科建设成新一代具有全球视野的卓越公共卫生人才的培养基地、科学发现和知识创新的研究基地、预防医学与临床医学协同创新的科学研究基地，以及面向世界的公共卫生服务基地。



医学院校训