

· 述 评 ·

CAR-T细胞技术研究进展及发展趋势

冯振卿^{1,2*}

¹南京医科大学国家卫生健康委抗体技术重点实验室,²病理学系,江苏 南京 211166

[摘要] 由于存在肿瘤异质性和免疫抑制微环境等因素,CAR-T细胞治疗实体瘤还未显示出明显的临床疗效。针对实体瘤治疗,近年在CAR-T细胞制备方面已有较大进展。本文就近年来在实体瘤治疗方面CAR-T细胞技术的研究进展和未来发展趋势进行评述。

[关键词] CAR-T细胞;实体瘤;细胞治疗

[中图分类号] R392

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)07-937-04

doi:10.7655/NYDXBNS20200701

The research progress and tendency of CAR-T cell technology

FENG Zhenqing^{1,2*}

¹National Health Commission Key Laboratory of Antibody Techniques, ²Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] Due to the tumor heterogeneity, immunosuppressive microenvironment and other factors, CAR-T cells have not shown obvious clinical efficacy in the treatment of solid tumors. For the treatment of solid tumors, great progress has been made in the preparation of CAR-T cells in recent years. This article comments the research progress and tendency of CAR-T cells in solid tumor treatment.

[Key words] CAR-T cell; solid tumor; cell therapy

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(07): 937-939, 962]

近年来,肿瘤免疫学基础研究和生物技术研究进展突进,为肿瘤免疫药物的研发提供了深厚的知识沉淀和技术储备,促使肿瘤细胞免疫治疗出现爆发式增长,成为与手术、化疗和放疗并驾齐驱的第4种肿瘤治疗方法。截至2019年5月,全球共有细胞疗法1 011项,其中CAR-T疗法有568项,占56.2%,尤其是CAR-T细胞治疗血液肿瘤,取得了举世瞩目的临床疗效。但在实体瘤治疗方面,由于存在免疫抑制微环境、实体瘤靶点多数在正常组织也有表达等因素,CAR-T细胞还未显示出明显的临床疗效。国内外针对CAR-T细胞治疗实体瘤进行了多方位的研究探索,取得了一些进展。本文就实体

瘤治疗方面CAR-T细胞技术的研究进展和未来发展趋势进行评述。

1 通用细胞因子介导杀伤的重定向T细胞

在二代或三代CAR-T细胞的基础上,整合白介素(interleukin, IL)-12,这种CAR-T细胞被称为通用细胞因子介导杀伤的重定向T细胞(T cell redirected for universal cytokine-mediated killing, TRUCK),即第四代CAR-T细胞。TRUCK可增强T细胞的活化能力,杀灭抗原阳性癌细胞,也可以吸引并激活先天性免疫细胞,进而消灭抗原阴性癌细胞。TRUCK不但可以用于实体瘤治疗,还可以用于病毒感染、代谢病与自身免疫病等领域。TRUCK的研发将使CAR-T细胞的应用范围大大扩展。

研究发现,趋化因子IL-7在促进T细胞增殖的同时还能维持T细胞的稳定,CCL19具有募集外周

[基金项目] 江苏省重点研发计划(社会发展)(BE2016799)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

T细胞及树突状细胞进入淋巴组织的作用,所以在此基础上可制备整合趋化因子表达 CAR-T 细胞。有学者将 IL-7 和 CCL19 基因转入 CAR-T 细胞,制备了 7×19 CAR-T 细胞,希望在消灭肿瘤细胞的同时,能够招募更多的 T 细胞以及树突状细胞进入肿瘤组织,显著增强 CAR-T 细胞的杀伤能力。实验结果表明,应用 7×19 CAR-T 细胞治疗接种实体瘤的小鼠,其存活率接近 100%,且在 140 d 观察期内没有出现肿瘤复发的迹象,而应用常规 CAR-T 细胞治疗的小鼠存活率仅有 30%^[1]。

2 通用型 CAR-T 细胞

尽管 CAR-T 细胞疗法拥有诸多优势,但其高度个性化的特质使其不便于生产管理和进行大规模临床应用,且治疗成本高昂。因此,第五代 CAR-T 细胞即通用型 CAR-T 细胞的研发成为 CAR-T 细胞治疗领域的必然趋势。

从健康捐献者获得 T 细胞,敲除 T 细胞的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)基因及 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)基因,避免宿主对输注的 CAR-T 细胞产生免疫排斥(或移植物抗宿主病),即通用型 CAR-T 细胞,理论上可用于多个患者的临床治疗^[2-4]。美国 FDA 已批准了 Servier、Pfizer 和 Cellectis 公司联合申请的通用型 CAR-T 疗法 UCART19 的研究性新药(investigational new drug, IND)资格,可在美国进入临床研究,用于治疗复发/难治性急性淋巴细胞白血病。

通用型 CAR-T 本质上是一种同种异体 CAR-T 细胞疗法,将来的目标是研发出针对实体瘤的通用型 CAR-T 细胞,只有实现这一目标, CAR-T 细胞才能从小众产品转变为大众产品,以便更好地用于恶性肿瘤的临床治疗。

3 非病毒载体 CAR-T 细胞

有望探索一种制造 CAR-T 细胞的非病毒方法,即基于转座子/转座酶的睡美人(sleeping beauty)系统,使用电穿孔技术将 DNA 质粒中的基因转移到 T 细胞。DNA 质粒比目前制备 CAR-T 细胞所用的慢病毒载体更方便,成本更低,而且睡美人系统可以即时改造 T 细胞,而不需要等待慢病毒载体改造的 T 细胞在培养瓶中生长。

4 SynNotch 技术

Lim 教授研发了一种 SynNotch 技术。SynNotch

是一种合成的 Notch 受体,通过基因工程技术可在 T 细胞表面永久性表达,其膜外结构也是抗体片段,可识别并结合抗原 A。A 的结合引起 SynNotch 膜内肽链被裂解,释放出连接的转录因子。转录因子进入细胞核,特异性启动第 2 个 CAR 的转录。第 2 个 CAR 表达后插入细胞膜,如果遇到第 2 个抗原 B,则会进一步激活下游信号,杀伤肿瘤细胞。SynNotch 技术使得 CAR-T 细胞只有在肿瘤细胞表达 2 种抗原 A 和 B 的情况下,才会被激活杀伤肿瘤细胞^[5-6]。动物实验结果表明,小鼠左侧接种单抗原肿瘤,右侧接种双抗原肿瘤,静脉注射人源 SynNotch CAR-T 细胞只对双抗原肿瘤有疗效^[5]。

由于实体瘤的异质性,很少有实体瘤仅依靠一个表面抗原就能被区分。SynNotch CAR-T 细胞的优势是能够更精准地杀灭表达 2 种抗原的肿瘤细胞,而不伤害患者体内健康细胞或只表达 1 种抗原的组织。因此,识别双靶点的 SynNotch CAR-T 细胞除可以减少不良反应外,还可以扩展 CAR-T 细胞的靶向空间^[5]。

5 SUPRA CAR 技术

在 SUPRA CAR 系统中, CAR 蛋白被分拆为 2 个蛋白: zipCAR 和 zipFv。zipCAR 是跨膜蛋白,其胞外结构是一个亮氨酸拉链; zipFv 是一个融合 scFv,装有同源亮氨酸拉链,可与 zipCAR 上的亮氨酸拉链互补结合。其治疗模式是细胞治疗加蛋白治疗。针对不同的肿瘤,只需一种 zipCAR-T 细胞,但需要更换不同的 zipFv。实验结果表明,单独输入 RR zipCAR-T 细胞并不能降低肿瘤负荷,只有同时输入 EE zipFv 蛋白后,RR zipCAR T + EE zipFv(RR zip 与 EE zip 互补)才能有效抑制肿瘤,降低肿瘤负荷^[7]。SUPRA CAR 系统将 CAR-T 细胞模块化,给肿瘤临床治疗带来了更大的灵活性。

6 可调控型 CAR-T 细胞

由于肿瘤组织的异质性,虽然肿瘤靶点分子在肿瘤细胞高表达,但在其他一些正常组织细胞也有低表达, CAR-T 细胞在杀伤肿瘤细胞的同时,也会损伤正常组织细胞。如果给 CAR-T 细胞安装一个“调控开关”,降低 CAR-T 细胞对低表达非肿瘤组织细胞的损伤,可以提高 CAR-T 细胞治疗的安全性。

CAR-T 细胞的调控开关为一个基于抗体的双功能开关,它由一个靶向肿瘤特异抗原的抗体 Fab 段和一个新抗原肽组成。而 CAR 则设计为针对新

抗原肽可调控的 CAR 结构,称之为可调控型 CAR (switchable CAR, sCAR)。新抗原肽来源于酵母转录因子 GCN4 中的 14-aa PNE 序列,该序列不会出现在人类蛋白质中,因此可与 sCAR 形成唯一的配对关系。有望通过这种设计来调控 CAR-T 细胞的活性、归巢行为以及细胞因子分泌,以降低可能存在的不良反应。

Raj 等^[8-9]设计了可调控靶向人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 的 CAR-T 细胞来治疗胰腺导管腺癌。HER2 虽然在胰腺癌组织高表达,但是在肺和其他一些组织细胞也有低表达,调控开关的存在可以降低 CAR-T 细胞对低表达 HER2 的非肿瘤组织的损伤,提高 CAR-T 细胞治疗的安全性。体内外试验研究表明,HER2 sCAR-T 细胞有较高的杀伤能力,只有在加入带有 PNE 标签的抗 HER2 Fab 开关,sCAR-T 细胞才能被激活发挥杀伤胰腺癌细胞的作用。

7 双特异性 CAR-T 细胞

实体瘤肿瘤微环境的免疫负调控因素可抑制 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,如程序性死亡因子 1 及其配体 (programmed death factor 1/programmed death factor ligand 1, PD-1/PD-L1) 负调控信号通路,这也是 CAR-T 细胞治疗实体瘤疗效不佳的原因之一。因此,制备针对肿瘤靶点和 PD-1 或 PD-L1 的双特异性 CAR-T 细胞,阻断 PD-1 和 PD-L1 的结合,有望提高 CAR-T 细胞对实体瘤的杀伤作用。国内有学者制备了双特异性 Trop2/PD-L1 CAR-T 细胞,分别识别肿瘤细胞表面的 Trop2 和 PD-L1,用于杀伤 Trop2 表达阳性的胃癌细胞。体内外实验结果表明,双特异性 Trop2/PD-L1 CAR-T 细胞对胃癌细胞具有较强的杀伤能力,瘤内注射可显著抑制肿瘤生长^[10]。研究结果还表明,双特异性 Trop2/PD-L1 CAR-T 细胞组的细胞因子 γ 干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 和 IL-2 水平明显高于对照组。提示双特异性 Trop2/PD-L1 CAR-T 细胞通过阻断肿瘤微环境 PD-1/PD-L1 负调控信号通路,从而增强了 CAR-T 细胞对实体瘤的杀伤作用^[10]。

8 缩短 CAR-T 细胞的制备时间

目前,CAR-T 细胞的制备是一个耗时的过程,从 T 细胞采集到 CAR-T 细胞输注大概需要 2 周左右,在一定程度上影响了 CAR-T 细胞的临床应用。可尝试将 IL-15 整合在 T 细胞膜上,这种称为膜结合

IL-15 (mbIL-15) 可以促使 T 细胞快速重新编程,促进 T 细胞增殖,可在 2 d 或更短的时间内进行回输^[11]。通过提供重组的 mbIL-15, CAR-T 细胞可以避免依赖该细胞因子的天然产生来发挥功能,从而缩短 CAR-T 从基因转染到输注的时间。

9 CAR-T 细胞自动化生产

随着 CAR-T 细胞疗法进入临床治疗,一个重要的发展趋势是通过自动化生产来提高 CAR-T 细胞的制备效率,同时可以制备多个患者的 CAR-T 细胞。自动化不仅是用机器人取代人,而且是自动化数据采集,并利用这些信息将样本移动到下一个流程步骤。Miltenyi Biotec 公司生产的符合 cGMP 标准的仪器 CliniMACS Prodigy,可以使用自动化工作流程生产 CAR-T 细胞。该仪器是一个封闭系统,通过消除多个设备之间不必要的操作员转移来降低污染风险,大大提高了 CAR-T 细胞的制备效率。

10 展望

打造下一代 2.0 CAR-T 细胞,其目标是更高效、更优化、更安全,未来将在以下方面有所创新:①考虑到实体瘤的高度异质性,可联合应用针对多个靶点的 CAR-T 细胞,可称为“Cocktail CAR-T 细胞”。Cocktail CAR-T 细胞的应用有望提高实体瘤的疗效;②可借鉴系统生物学/合成生物学的理论,改造 CAR-T 细胞,引入传感器、逻辑门、逻辑电路等概念,把 CAR-T 细胞打造成一个机器人或智能系统;③除恶性肿瘤以外,CAR-T 细胞在其他疾病的治疗领域也显示了一定的潜力,可用于治疗一些现在还没有特效治疗方法的感染性疾病,如艾滋病、肝炎、疟疾等。

[参考文献]

- [1] ADACHI K, KANO Y, NAGAI T, et al. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 346-351
- [2] RUELLA M, JUNE C H. Chimeric antigen receptor T cells for B cell neoplasms: choose the right CAR for you [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2016, 11(5): 368-384
- [3] SADELAIN M, BRENTJENS R, RIVIÈRE I. The basic principles of chimeric antigen receptor design [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(4): 388-398
- [4] MAUS M V, JUNE C H. Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(8): 1875-1884

(下转第 962 页)

Immunol, 2015, 6: 639

[11] BRITTON G J, CONTIJOCH E J, MOGNO I, et al. Microbiotas from humans with inflammatory bowel disease alter the balance of gut Th17 and RORgamma T(+) regulatory T cells and exacerbate colitis in mice [J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 212-224

[12] ROTHHAMMER V, QUINTANA F J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(3): 184-197

[13] MULERO-NAVARRO S, FERNANDEZ-SALGUERO P M. New trends in aryl hydrocarbon receptor biology [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 45

[14] WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(7): 1295-1309

[15] SIEGMUND B, LEHR H A, FANTUZZI G, et al. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(23): 13249-13254

[16] KIM A, BERSTAD H S. Experimental colitis in animal models [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1992, 27(7): 529-537

[17] RANDHAWA P K, SINGH K, SINGH N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(4): 279-288

[18] GE Y D, SUN M M, WU W, et al. MicroRNA-125a suppresses intestinal mucosal inflammation through targeting ETS-1 in patients with inflammatory bowel diseases [J]. *J Autoimmun*, 2019, 101: 109-120

[19] ZHOU Q, COSTINEAN S, CROCE C M, et al. MicroRNA 29 targets nuclear factor -kappaB -repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 158-169

[20] GUTIERREZ-VAZQUEZ C, QUINTANA F J. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Immunity*, 2018, 48(1): 19-33

[21] LAMAS B, RICHARD M L, LEDUCQ V, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands [J]. *Nat Med*, 2016, 22(6): 598-605

[22] MONTELEONE I, RIZZO A, SARRA M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(1): 237-248

[23] YUAN X S, TONG B, DOU Y N, et al. Tetrandrine ameliorates collagen - induced arthritis in mice by restoring the balance between Th17 and Treg cells via the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 101: 87-99

[24] YANG B H, HAGEMANN S, MAMARELI P, et al. Foxp3 (+) T cells expressing ROR gamma t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(2): 444-457

[25] ZHANG M, ZHOU Q, DORFMAN R G, et al. Butyrate inhibits interleukin - 17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats [J]. *BMC Gastroenterol*, 2016, 16(1): 84

[收稿日期] 2019-12-03

(上接第 939 页)

[5] ROYBAL K T, RUPP L J, MORSUT L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen - sensing circuits [J]. *Cell*, 2016, 164(4): 770-779

[6] WU M R, JUSIAK B, LU T K, et al. Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(4): 187-195

[7] CHO J H, COLLINS J J, WONG W W, et al. Universal chimeric antigen receptors for multiplexed and logical control of T cell responses [J]. *Cell*, 2018, 173(6): 1426-1438

[8] RAJ D, YANG M H, RODGERS D, et al. Switchable CAR -T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1052-1064

[9] RODGERS D T, MAZAGOVA M, HAMPTON E N, 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-E468

[10] ZHAO W, JIA L Z, ZHANG M J, et al. The killing effect of novel bi-specific Trop2/PD-L1 CAR-T cell targeted gastric cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(8): 1846-1856

[11] RAPER V. Crafting a more efficient CAR T-cell industry [EB/OL]. (2019 - 05 - 01) [2020 - 03 - 28]. <https://www.genengnews.com/insights/crafting-a-more-efficient-car-t-cell-industry/>

[收稿日期] 2020-03-28