

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.001

· 专家论坛(专题) ·

## CAR-T 细胞治疗实体肿瘤: 且行且思考

魏建树, 韩为东(中国人民解放军总医院 基础医学研究所, 北京 100853)

**[摘要]** 由于T细胞免疫具有长效性、可放大性、多靶点性等特点,以T细胞为核心的肿瘤免疫治疗被认为是除手术外最有可能带来肿瘤治愈的治疗手段。尤其近年来不断累积的临床数据证实了以嵌合抗原受体修饰T(chimeric antigen receptor modified T, CAR-T)细胞为代表的细胞治疗的安全性及有效性,其中以CD19为靶点的CAR-T细胞疗法由于效果显著,已成为多数临床研究机构开展基因修饰T细胞治疗研究的模式疗法。但是,实践和理论均显示,CAR-T细胞在实体肿瘤的治疗中面临着更严峻的挑战,如何更加合理有效的开展CAR-T细胞治疗实体肿瘤仍需要不断地探索。本文回顾了CAR-T细胞治疗临床实践历程、治疗实体瘤的现状,阐述了需要解决的问题及未来的发展方向,旨在为CAR-T细胞治疗实体肿瘤提供借鉴及研究思路。

**[关键词]** 嵌合抗原受体修饰T细胞;实体肿瘤;微环境;脱靶毒性

**[中图分类号]** R730.51; R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0847-07

## CAR-T cell treatment of solid tumors: thoughts and practice

WEI Jianshu, HAN Weidong (General Hospital of PLA, Institute of Basic Medicine, Beijing 100853, China)

**[Abstract]** Due to the long-lasting, scalable, multi-targeting characteristics of T-cell immunity, T-cell-based tumor immunotherapy is considered to be the most likely means of bringing about tumor healing in addition to surgery. Especially in recent years, accumulating clinical data have confirmed the safety and effectiveness of cell therapy represented by chimeric antigen receptor modified T (CAR-T) cell. Among these, CAR-T therapy targeting CD19 has become a model therapy for genetic modified T cell therapy research in most institutions because of its remarkable effects. However, both practice and theory have suggested that CAR-T therapy faces more complicated problems in the treatment of solid tumors. How to use CAR-T cells to treat solid tumors reasonably and effectively still requires constant exploration and understanding. Here, we briefly summarize the current status of clinical practice of CAR-T cell therapy and its treatment of solid tumors, propose problems that need to be solved, and discuss the future research directions, in order to provide reference and research ideas for the treatment of solid tumors by CAR-T cells.

**[Key words]** chimeric antigen receptor modified T (CAR-T) cell; solid tumor; microenvironment; off-target toxicity

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 847-853. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.001]



**韩为东** 医学博士,教授,博士生导师。解放军总医院分子免疫学研究室主任,首都科技创新领军人才。2012年创建了解放军总医院首个生物治疗转化医学病区,国内率先建立了“前店后厂”的转化医学模式,并担任首任主任;中国研究型医院生物治疗学专业委员会首届主任委员。主要从事肿瘤治

疗抵抗机制、干细胞生物学与临床研究。先后承担科技部重大专项1项,973课题2项,863项目3项,国家自然科学基金重点项目1项、面上项目6项、北京市生物技术前沿项目1项;获得企业投资3项,4项临床治疗技术企业转让,国家发明专利15项。主编学

术专著3部;近5年以第一作者或通信作者身份发表SCI论文130余篇,累计影响因子600余分。

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.31270820、81230061、81502679、81703044);北京科技计划资助项目(No.Z151100003915076)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31270820、81230061、81502679、81703044), and the Science and Technology Program Funded by Beijing (No.Z151100003915076)

**[作者简介]** 魏建树(1986-),男,博士,主要从事肿瘤CAR-T细胞治疗的研究,E-mail:woshiwjs@hotmail.com

**[通信作者]** 韩为东(HAN Weidong, corresponding author),医学博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗的基础和临床研究,E-mail:hanwdrsw@sina.com

嵌合抗原受体修饰的T(chimeric antigen receptor modified T, CAR-T)细胞疗法作为过继性细胞治疗的一种,其概念最早在1989年提出<sup>[1]</sup>。CAR分子是一类人工构建的表达于细胞膜的嵌合受体,依靠抗体的特异性获得识别肿瘤细胞表面特异抗原的能力,通过CAR分子胞内的激活段(CD3-zeta链和共刺激分子)获得T细胞激活功能。

## 1 CAR-T细胞治疗肿瘤实践历程

CAR-T细胞治疗临床实践最早就尝试于实体肿瘤,但由于当时大家对免疫基础认知的不足,当时的CAR分子功能有限,CAR-T细胞疗法也未取得良好的临床反应。随着基础免疫知识的进步,尤其是共刺激分子的发现和研究,为CAR分子的革命性改良提供了理论依据。在第二代CAR分子中,科学家将共刺激分子整合到第一代CAR分子中,这种经过变革的第二代CAR-T细胞随后在血液肿瘤中表现出了优异的抗肿瘤活性<sup>[2]</sup>。随着共刺激分子的加入,完善了CAR分子对T细胞的激活功能,新一代的CAR-T细胞因此表现出更加优异的体内扩增能力、长期存活能力和抗肿瘤活性<sup>[3]</sup>。在这一结构基础上,CAR分子如今已经进化出了多种结构,例如整合两个共刺激分子的第三代CAR<sup>[4-5]</sup>和共表达促炎症因子的第四代CAR<sup>[6-7]</sup>等。但目前临床上应用的绝大部分仍然是第二代的CAR分子结构,常用的同刺激分子有CD28、CD137、OX40等。相比于经典的T细胞受体(T cell receptor, TCR)-人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)复合体识别模式,CAR分子对肿瘤细胞的识别依赖于抗体的特异性,因此更加简单和明确,同时避免了HLA分子表达下调引起的肿瘤免疫逃逸的问题。

CAR-T细胞治疗最著名的案例是Emily Whitehead,在获得完全缓解(complete remission, CR)反应后,已经维持了6年未复发。至此,已经有数百名血液恶性肿瘤患者接受了CAR-T细胞治疗。目前,靶向CD19的CAR-T细胞治疗对B细胞急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)最为有效,CR可达到70%~94%,总体客观有效率(objective response rate, ORR)为93%左右。CAR-T-CD19疗法也被证明对B细胞淋巴瘤有效,其总体ORR在62%左右。最近1年,靶向BCMA的CAR-T疗法在治疗多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的临床试验中也获得了非常高的CR率<sup>[8]</sup>。CAR-T细胞治疗在近几年取得的进步是令人瞩目的,2017年更有2项以CD19为靶点的CAR-T细胞产品(Kymriah和Yescarta)获得了美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)的上市许可。

## 2 CAR-T细胞在实体肿瘤治疗中的临床疗效

相比于CAR-T细胞疗法在血液肿瘤中的突飞猛进,CAR-T细胞在实体肿瘤的治疗中表现出的临床效果差强人意。相比于血液肿瘤,实体肿瘤组织成分复杂,缺乏理想的特异靶点。为达到理想的治疗效果,目前有多达22个不同的靶标(其数量甚至超过血液肿瘤的数量)正在被尝试用于实体肿瘤的CAR-T细胞治疗。这其中,开展比较多的有表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)和间皮素(mesothelin, MSLN)等几个靶点。

作为人类表皮生长因子受体家族成员,EGFR和HER2在正常组织中低表达或者不表达,而在多种肿瘤(包括乳腺癌、肺癌、前列腺癌、头颈部鳞癌、胃肠道肿瘤和妇科肿瘤)中都有高表达,因此是CAR-T细胞治疗的潜在靶点。针对这2个靶点,FDA也已经批准了相应的抗体药物上市,例如靶向EGFR的西妥昔单抗(cetuximab)被批准与伊立替康联合用药治疗EGFR阳性的伊立替康治疗失败的转移性结直肠癌患者;而靶向HER2的曲妥珠单抗(trastuzumab)被批准用于HER2过度表达的转移性乳腺癌患者。这2个抗体在临床上的应用,为这2个靶点用于开展实体肿瘤的CAR-T细胞治疗提供了有效性和安全性的宝贵经验。中国人民解放军总医院(people's liberation army general hospital, PLAGH)的研究人员曾开展了一项以EGFR为靶点治疗进展期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的I期临床试验,共有11名患者入组接受了 $(0.45\sim 1.09)\times 10^6/\text{kg}$ 剂量的CAR-T细胞治疗,其中有2名患者获得了2~3.5个月的部分缓解(partial remission, PR)反应,有5名患者获得了2至8个月以上的病情稳定(stable disease, SD)反应<sup>[9]</sup>。值得注意的是,获得PR患者的肿瘤穿刺标本经免疫组化鉴定,CAR-T细胞可以有效靶向肿瘤部位并清除EGFR阳性的肿瘤细胞,这从病理学的微观层面证实了CAR-T细胞对实体肿瘤细胞的杀伤作用。患者反应出的副作用整体不大,CAR-T细胞治疗的耐受性良好。但由于EGFR同时也在一些组织也有微量表达(例如皮肤组织),在皮肤中观察到了明显的细胞学毒性,这也与抗EGFR抗体治疗的副作用类似。此研究组<sup>[10]</sup>还探索了CAR-T-EGFR治疗复发难治型胆管癌(biliary tract cancers, BTCs)的可行性。共有19名患者参加了此项临床试验,在17名可评估的患者中,有1例获得了超过22个月的CR反应,10例患者获得了SD反应。

针对HER2靶点,AHMED等<sup>[11]</sup>利用靶向HER2的CAR-T细胞治疗HER2阳性骨肉瘤患者的I期临床结果,共19例患者接受了 $1 \times 10^4/m^2$ 至 $1 \times 10^8/m^2$ 的不同剂量CAR细胞T治疗。在17例可评价的患者中,有4例获得了SD反应,其中有3例患者接受了残余肿瘤的切除,并分别获得了6、12和16个月以上的持续缓解。有2例患者接受了组织穿刺检查,在肿瘤部位都检测到了CAR-T细胞的存在,证明了CAR-T细胞可以有效靶向肿瘤部位,并且1例患者的肿瘤组织有大于90%的坏死,证实靶向HER2的CAR-T细胞可有效杀伤肿瘤细胞。整体CAR-T细胞治疗方案耐受性良好,未发生严重的脱靶副作用,证实了以HER2为靶点CAR-T细胞疗法的安全性,并初步证明了其有效性。在2017年,PLAGH团队<sup>[12]</sup>报道了CAR-T-HER2治疗BTC和胰腺癌(pancreatic cancer,PC)的I期临床报道。在11例接受治疗的患者中,有1例获得了大于4.5个月的PR反应,有5例患者获得了SD反应。平均剂量为 $2.1 \times 10^6/kg$ ,整体安全性良好,未发生严重的器官损伤。

然而,以HER2为靶点CAR-T细胞治疗的安全性最初是受到质疑的。早在2010年,一篇报道<sup>[13]</sup>曾引起了大家对以HER2为靶点CAR-T细胞治疗的担忧。当时这项研究是由美国国家癌症研究中心(National Cancer Institute,NCI)主持的,其中,1例转移性结肠癌患者在接受了大约 $1 \times 10^{10}$ 总量CAR-T细胞回输后,短时间内发生了严重的呼吸窘迫综合征,最终死于严重的肺损伤。值得注意的是,此案例中回输的CAR-T细胞为整合了CD28和CD137两个共刺激分子的第三代CAR-T细胞。一般认为第三代CAR-T细胞相比于第二代CAR-T细胞具有更强的抗肿瘤和激活活性,因此这种更强效的CAR分子结构可能会带来更严重的副作用,这也是为什么目前临床试验大多采用第二代CAR分子结构的原因之一。通过与日后的临床结果比较,CAR-T细胞输注速度快、单次输注剂量大、风险评估不到位、救治不及时也是造成这一死亡案例的重要原因。

MSLN是一种分子量为40 000的膜表达糖蛋白,高表达于多种肿瘤组织中,例如胰腺癌、肺癌、卵巢癌等。在正常的组织中,例如胸膜、心包和腹膜的间皮细胞中也有低水平的表达。由于其在肿瘤组织的表达显著高于正常组织,且在正常组织中的分布有限,因此被认为是治疗多种实体肿瘤的潜在靶点。最早的CAR-T-MSLN报道<sup>[14]</sup>见于2011年,考虑到安全性的问题,来自宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania,UPENN)的研究人员利用电转mRNA的方式制备了瞬时表达CAR分子的CAR-T细胞,并在小鼠身上验证了其有效性。这一治疗方案在2013年报

道了4例临床应用案例,其中一名受试者在完成第3次输注后几分钟内出现了过敏反应和心脏骤停,随后恢复。因为CAR分子上的单链抗体可变区序列(single-chain variable fragment,scFV)是小鼠来源的序列,所以研究人员认为前2次输入CAR-T细胞使得患者体内产生了抗鼠抗体,而第3次输注的CAR-T细胞作为致敏源引发了急性过敏反应。上述临床实践显示,当CAR-T多次回输时,其作为致敏源的毒副作用要给予重点考虑,尤其是scFV段为非人源化序列的时候<sup>[15]</sup>。在2014年,UPENN的研究团队<sup>[16]</sup>又报道了2例CAR-T-MSLN的治疗案例,通过临床和实验室的检测证明了CAR-T-MSLN具有靶向肿瘤部位并引发抗肿瘤活性的能力,并检测到了一种新产生的抗肿瘤特异抗原抗体,研究人员认为这是CAR-T-MSLN杀伤肿瘤细胞后引发自身免疫系统抗肿瘤活性的结果。在2018年,该团队<sup>[17]</sup>又报道了针对胰腺导管腺癌I期的临床治疗结果,共有6例患者接受了治疗,均未表现出细胞因子释放综合征(cytokines release syndrome,CRS)和剂量相关毒性,有2位患者获得了3.8和5.4个月的SD反应,其中,1例患者的肿瘤组织活跃代谢信号下降了69.2%,且肝转移灶全部消失。CAR分子长期表达的CAR-T-MSLN治疗是否安全,其有效性是否可能高于瞬时表达的CAR-T细胞,这些问题仍待探索,目前有多个相关的临床试验正在进行中。

恶性胶质瘤(glioblastoma,GBM)是目前对CAR-T细胞治疗反应比较好的实体肿瘤类型。目前有白介素-13受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$ )、HER2和EGFR突变体III(EGFRvIII)等3个靶点的有效性和安全性在临床中得到了验证。BROWN等<sup>[18]</sup>报道了3例复发GBM患者接受CAR-T-IL-13R $\alpha 2$ 的临床结果,通过颅内注射的方式,每位患者接受了多达12次的回输,总体耐受性良好,其中有1例病患者获得了PR反应。值得注意的是,这3例患者接受的是第一代CAR-T细胞,即CAR分子中不包含共刺激分子信号区段。在2016年,该团队<sup>[19]</sup>又报道了1例接受第二代CAR-T-IL-13R $\alpha 2$ 治疗的临床案例;1例多病灶的GBM患者首先接受了腔内CAR-T细胞的注射,在接受了6个周期的治疗中,局部病灶没有进展,但是远端出现了新发病灶。随后,该患者从右侧脑室接受了脑室内灌注CAR-T细胞治疗,总共10个疗程。在第5次治疗之后,所有肿瘤都明显缩小,在10次治疗完成时,病灶全部消失。此患者也被评价为获得了CR反应,且持续了7.5个月以上,整个治疗周期中没有明显的毒副作用发生。该结果显示针对某些实体肿瘤,非静脉注射给药的方式(例如瘤内注射和瘤旁注射)可能带来更显著的临床获益。

EGFRvIII是一个比较特殊的靶点,它由突变产生,只发现在GBM肿瘤中表达,在正常组织中不表达,是目前唯一已知的完全特异表达在肿瘤细胞表面的抗原,因此是治疗GBM的理想靶标。O'ROURKE等<sup>[20]</sup>报道了靶向EGFRvIII的CAR-T细胞治疗GBM患者的I期临床报道。在此临床试验中共10例患者接受了治疗,其中有5例患者获得了SD反应,整体耐受性良好。值得注意的是,本次临床试验通过肿瘤组织样本的详细分析,证实了CAR-T细胞可以有效地通过血脑屏障到达肿瘤部位,并产生抗肿瘤活性。这一发现打破了之前对颅内免疫豁免区的认识,而且在CAR-T细胞回输后,CAR-T细胞在发挥杀伤肿瘤功能的同时,招募了内源的T细胞浸润到肿瘤部位,虽然这些免疫细胞的功能还不明确。同年,来自贝勒医学院(Baylor College)的AHMED教授团队<sup>[21]</sup>报道了其开展的I期CAR-T-HER2治疗复发GBM的临床结果,共17例患者接受了治疗,1例获得了PR反应,7例获得了SD反应。实验中采用了新的scFV序列、第二代的CAR分子结构且没有给予IL-2等促炎症治疗手段,患者整体耐受性良好,没有发生严重脱靶毒副作用,这也进一步证实了HER2作为靶点行CAR-T治疗的可行性。

除以上临床试验以外,还有靶向前列腺特异性抗原(prostate-specific membrane antigen,PSMA)治疗前列腺癌、靶向癌胚抗原(carcino-embryonic antigen,CEA)治疗肝癌、靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican-3,GPC3)治疗肝癌等CAR-T细胞治疗实体肿瘤的临床实践,在此不一一详述<sup>[22-23]</sup>。

总体来说,CAR-T细胞治疗实体肿瘤的效果远不及血液肿瘤,有许多可预见和新发现的问题需要去解决。

### 3 实体瘤 CAR-T 细胞治疗需要解决的突出问题

实体肿瘤与血液肿瘤相比,其组成成分更加复杂,因此在CAR-T细胞治疗中也面临着更大的挑战,这在许多的综述中被讨论过多次<sup>[24-25]</sup>。总体来说,CAR-T细胞治疗实体肿瘤需要解决的突出问题有以下3点:(1)如何保证CAR-T细胞更有效的到达肿瘤部位;(2)如何抵抗肿瘤微环境的抑制;(3)如何选择合适的靶点。

由于其天然的T细胞本质,CAR-T细胞回输到体内后会在血液系统、淋巴系统内循环,因此对在相同生存环境中血液肿瘤细胞有更充分的接触机会。而实体肿瘤是局限性的,CAR-T细胞必须透过血管壁、浸润入肿瘤组织才能发挥其接触依赖的杀伤效应,所以CAR-T细胞治疗实体肿瘤,首先要解决的一个问题是提高T细胞迁移到肿瘤组织的能力。CAR-T细胞

能否有效地从血管中释放出来,这是第一道障碍。这一过程需要T细胞与血管内皮细胞上的一些黏附分子相互作用,例如细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule,ICAM-1)。肿瘤组织中存在多种机制下调血管内介导免疫细胞渗出相关分子的表达,例如肿瘤组织内的血管细胞通常会高表达内皮素B受体(endothelin B receptor,ETbR),而高表达的ETbR会通过下调ICAM-1的表达而抑制T细胞穿透血管壁进入到肿瘤组织<sup>[26]</sup>。当T细胞从血管溢出后,需要经过致密的肿瘤组织才能到达靶细胞位置。肿瘤组织中含有丰富而特殊的细胞外基质,例如胶原、蛋白聚糖等。致密的组织形态会形成一道限制T细胞自由迁移的物理屏障<sup>[27]</sup>。同时,肿瘤组织中特殊的代谢和营养环境也会抑制T细胞的迁移能力。还有最值得注意的一点是,免疫细胞在实体组织中的浸润主要是受到趋化因子调节的。而这些趋化因子在肿瘤组织中的表达往往是低水平的,例如趋化因子配体(chemokine ligand,CXCL)-9、-10和-11,肿瘤细胞甚至通过表达抑制趋化的因子来抑制T细胞在肿瘤组织的浸润,例如CXCL-12<sup>[28]</sup>。

CAR-T细胞进入到肿瘤组织后,能否发挥其杀伤能力还受到肿瘤免疫抑制微环境的影响。肿瘤微环境包含的因素非常多,其对T细胞功能的抑制是多种因素共同作用的结果。其中最为大家所熟知的就是程序性死亡受体-1(programmed cell death 1,PD-1)信号途径。实体肿瘤细胞可通过表达PD-1的配体-程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1,PD-L1)来抑制T细胞的活性,从而产生免疫逃逸。此通路对T细胞功能调节的重要性已经由PD-1抗体在临床上取得的突破性进展充分证明。而PD-L1的表达受到干扰素 $\gamma$ (interferon  $\gamma$ ,IFN- $\gamma$ )的激活<sup>[29]</sup>,而IFN- $\gamma$ 分泌是T细胞发生免疫反应时的必然结果。从这个角度考虑,CAR-T细胞在发挥抗肿瘤功能时不可避免地会受到PD-L1/PD-1信号通路的抑制。从炎症因子的角度看,实体肿瘤往往是一个抑制性因子高表达的组织,例如IL-4、IL-10、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ ,TGF- $\beta$ )等<sup>[30]</sup>。分泌这些因子的细胞有肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs)、髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSCs)、调节性T细胞(regulatory T cells,Tregs)等<sup>[31-32]</sup>。此外,肿瘤细胞更倾向于利用糖酵解和氨基酸分解途径快速获得能量<sup>[33]</sup>,这种有别于正常组织的代谢模式会造成肿瘤组织内某些特定代谢产物的积累,这些积累的代谢产物往往会抑制T细胞的生存、增殖和激活,比如乳酸<sup>[34]</sup>和前列腺素<sup>[35]</sup>。要维持细胞的正常的生存和增殖,T细胞比肿瘤细胞更依赖组织内正常的

氨基酸水平,而肿瘤组织内高水平的氨基酸降解相关的酶类会通过大量降解氨基酸对T细胞的正常功能产生抑制作用。如功能研究比较明确的是吡啶胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)通过降解色氨酸导致对T细胞产生抑制<sup>[36-37]</sup>。

以上两个问题关系到CAR-T细胞是否能发挥杀伤功能,除此之外,CAR-T细胞治疗实体肿瘤面临的更大困难是治疗靶点的问题。与血液肿瘤相比,为复杂的实体肿瘤选择一个合适的靶点更加困难,这主要有两方面的原因。首先,在血液肿瘤中,如ALL几乎所有的肿瘤细胞都表达CD19或CD20,因此以这两个抗原为靶点的CAR-T细胞治疗有望清除所有肿瘤细胞,从而带来血液肿瘤的治愈。与之相比,实体肿瘤组织内的细胞组成复杂,不同的肿瘤细胞往往会有不同的蛋白表达谱,单一靶点难以覆盖所有肿瘤细胞。理论和实践经验均显示,即使表达某抗原的肿瘤细胞可以被有效清除,仍会有大量抗原阴性的肿瘤细胞残留,这种不完全的表型覆盖是无法达到肿瘤治愈要求的。其次,实体肿瘤中难以找到一个肿瘤特异的抗原靶点,现有CAR-T细胞治疗实体肿瘤的实验中选择的大多是肿瘤中特异高表达的抗原,而这些抗原往往在某些正常组织中仍然会有低量的表达,例如HER2、EGFR等。这就大大增加了CAR-T细胞在治疗实体肿瘤中发生CAR-T细胞攻击正常组织的可能性,称之为“on-target, off tumor”毒性。随着CAR-T细胞抗肿瘤功能的增强,脱靶带来副作用的危害性也会随之提高。与此相比,虽然CD19也不是个肿瘤特异的抗原,但B细胞清除带来的副作用在临床上是可以很好的控制并耐受的。所以,CAR-T细胞治疗实体肿瘤需要选择一个合适的治疗强度,治疗强度太高,副作用太大;治疗强度太低,抗肿瘤功能发挥不完全,而这个治疗强度的可选范围要远远小于血液肿瘤<sup>[38]</sup>。

#### 4 CAR-T细胞治疗实体肿瘤——路在何方?

虽然CAR-T细胞治疗实体肿瘤面临诸多问题,但其抗肿瘤功能是毋庸置疑的,如何更好的利用CAR-T细胞疗法治疗实体肿瘤,有以下几个努力的方向:(1)优化CAR-T细胞。优化CAR-T细胞使其具备更适合实体肿瘤治疗的特性,这主要包括提高T细胞存活能力、提高抗肿瘤能力、提高肿瘤组织浸润能力和抵抗免疫抑制微环境能力几个方面。在这几个方向上,已经有诸多的尝试被报道。例如,在CAR-T细胞中表达IL-12<sup>[39]</sup>或CD40L<sup>[40]</sup>,使CAR-T细胞表现出更优异的体内存活能力和抗肿瘤活性;通过过表达CXCR2,提高T细胞趋化到肿瘤组织的能力<sup>[41]</sup>;构建PD1-

CD28嵌合受体<sup>[42]</sup>,可将免疫抑制信号转化为激活T细胞的信号,从而达到抵抗PD-L1/PD-1抑制途径的目的。这类的创新型研究很多,在此不一一赘述。(2)多靶点CAR-T细胞联合。多靶点CAR-T细胞联合可寻求更高比例肿瘤细胞的覆盖,多靶点的覆盖可以提高CAR-T细胞杀伤肿瘤细胞的比例,更高比例肿瘤细胞的清除预期或许可以提高患者的生存获益。这种多靶点(双靶、甚至多靶)CAR-T细胞治疗的策略在B细胞白血病的治疗中也有应用,例如同时靶向CD19和CD20的CAR-T细胞治疗被认为可以有效防止CD19阴性白血病的复发<sup>[43-44]</sup>。多靶点覆盖可以通过输注混合的CAR-T细胞实现<sup>[45]</sup>,也可以通过在CAR分子上整合两个(或多个)靶向不同抗原的scFV区段来实现<sup>[43]</sup>。(3)利用基因工程手段,提高CAR-T细胞的肿瘤特异识别能力,降低脱靶风险。在这一领域,已经有一些很好的创新型工作值得去参考。例如,构建抑制性的CAR分子,抑制CAR-T细胞对正常组织细胞的攻击<sup>[46]</sup>;构建双靶激活的CAR分子,保证CAR分子只有在同时识别两个抗原的情况下才能发挥激活功能<sup>[47]</sup>;通过调节scFV的亲能力和能力,使CAR分子只能识别抗原高水平表达的肿瘤细胞等<sup>[48]</sup>。

以CAR-T细胞为治疗手段,激活内源免疫系统的抗肿瘤活性。人体内存在丰富的TCR库,理论上可以覆盖所有突变产生的肿瘤特异新抗原(neoantigen)。所以充分激活自身免疫系统的抗肿瘤潜力是实体肿瘤免疫治疗发展的方向和必然出路<sup>[49-50]</sup>。在临床中有许多案例已经证实,CAR-T细胞治疗后,实体肿瘤组织中的淋巴细胞浸润会增加。除CAR-T细胞自身外,内源淋巴细胞(如DC、巨噬细胞、T细胞)的浸润数量同样会增加<sup>[51]</sup>,并且CAR-T细胞会释放促炎症因子,在肿瘤局部形成一个有利于炎症反应的微环境,这给免疫系统治疗实体肿瘤提供了很好的机会。因为CAR-T细胞在攻击裂解肿瘤细胞后,释放的肿瘤特异neoantigen如果通过抗原提呈细胞的摄取和提呈,就可能进一步激活内源更特异的肿瘤免疫反应。从这一点出发,研究者可以利用修饰CAR-T细胞表达招募淋巴细胞和促进炎症的因子,从而更好地引发内源肿瘤免疫反应。这一设想,也已经有研究证实过是可行且有效的<sup>[52]</sup>。(4)CAR-T细胞治疗与其他治疗手段配合也是提高实体肿瘤治疗效果的有效手段。如与化疗和放疗联合,可以为CAR-T细胞提供扩增的空间、有效清除Treg细胞等免疫抑制细胞、通过松散致密的肿瘤组织促进T细胞的浸润能力等;与PD-1抗体联合,也是非常希望的一条途径,因为PD-1抗体不仅可以直接提高CAR-T细胞抵抗免疫抑制微环境能力,而且对内源免疫系统抗肿瘤功能的

发挥也有帮助作用<sup>[53]</sup>。

此外,由于CAR-T细胞治疗实体肿瘤的特殊性,其治疗强度既不能太低而使治疗无效,也不能因为强度太高引发严重的副作用。所以,在临床实施的过程中,应充分评估CAR-T细胞治疗实体肿瘤的有效性和安全性,选择适当的治疗强度。

### [参考文献]

- [1] 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 USA*, 1989, 86(24): 10024-10028. DOI:10.1073/pnas.86.24.10024.
- [2] FINNEY H M, LAWSON A D, BEBBINGTON C R, et al. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product[J]. *J Immunol*, 1998, 161(6): 2791-2797.
- [3] SAVOLDO B, RAMOS C A, 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. DOI:10.1172/JCI46110.
- [4] WANG J, JENSEN M, LIN Y, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(8): 712-725. DOI:10.1089/hum.2007.028.
- [5] CARPENITO C, MILONE M C, 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 USA*, 2009, 106(9): 3360-3365. DOI:10.1073/pnas.0813101106.
- [6] DI STASI A, DE ANGELIS B, ROONEY C M, et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model[J]. *Blood*, 2009, 113(25): 6392-6402. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209650.
- [7] PEGRAM H J, PARK J H, BRENTJENS R J. CD28z CARs and armored CARs[J]. *Cancer J*, 2014, 20(2): 127-133. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000034.
- [8] ZHANG T, CAO L, XIE J, et al. Efficiency of CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for treatment of B cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 33961-33971. DOI:10.18632/oncotarget.5582.
- [9] FENG K, GUO Y, DAI H, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer[J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(5): 468-479. DOI:10.1007/s11427-016-5023-8.
- [10] GUO Y, FENG K, LIU Y, et al. Phase I Study of chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with EGFR-positive advanced biliary tract cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 24(6): 1277-1286. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-17-0432.
- [11] AHMED N, BRAWLEY V S, HEGDE M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor-modified t cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(15): 1688-1696. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.0225.
- [12] Feng K, Liu Y, Guo Y, et al. Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers[J]. *Protein & Cell*, 2017. DOI: 10.1007/s13238-017-0440-4.
- [13] MORGAN R A, YANG J C, 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. DOI:10.1038/mt.2010.24.
- [14] 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. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2880.
- [15] MAUS M V, HAAS A R, BEATTY G L, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans[J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(1): 26-31. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-13-0006.
- [16] GIANPIETRO D, STEPHEN G, BARBARA S, et al. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 1111-1116. DOI: 10.1111/imr.12131.
- [17] BEATTY G L, O'HARA M H, LACEY S F, et al. Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase 1 trial[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(1): 29-32. DOI:10.1053/j.gastro.2018.03.029.
- [18] BROWN C E, BADIE B, BARISH M E, et al. Bioactivity and safety of IL-13 $\alpha$ 2-redirected chimeric antigen receptor cd8<sup>+</sup> T cells in patients with recurrent glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4062-4072. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-0428.
- [19] BROWN C E, ALIZADEH D, STARR R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(26): 2561-2569. DOI:10.1056/NEJMoa1610497.
- [20] O'ROURKE D M, NASRALLAH M P, DESAI A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(399): eaaa0984[2018-04-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762203/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [21] AHMED N, BRAWLEY V, HEGDE M, et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: a phase 1 dose-escalation trial[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(8): 1094-1101. DOI:10.1001/jamaoncol.2017.0184.
- [22] WANG Z, GUO Y, HAN W. Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(12): 896-925. DOI:10.1007/s13238-017-0400-z.
- [23] HARTMANN J, SCHÜBLER-LENZ M, BONDANZA A, et al. Clinical development of CAR-T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts[J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(9): 1183-1197. DOI:10.15252/emmm.201607485.
- [24] 陈晓彤, 刘宝瑞. T细胞受体工程化T细胞抗肿瘤治疗的现状与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 755-761. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.08.001.
- [25] NEWICK K, O'BRIEN S, MOON E, et al. CAR-T cell therapy for solid tumors[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68(2): 139-152. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [26] 刘宝瑞. 实体肿瘤免疫治疗的关键问题与对策[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 575-580. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.001.

- [27] SALMON H, FRANCISZKIEWICZ K, DAMOTTE D, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 899-910. DOI:10.1172/JCI45817.
- [28] POZNANSKY M C, OLSZAK I T, FOXALL R, et al. Active movement of T cells away from a chemokine[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 543-548. DOI:10.1038/75022.
- [29] ABIKO K, MATSUMURA N, HAMANISHI J, et al. IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(9): 1501-1509. DOI: 10.1038/bjc.2015.101.
- [30] JARNICKI AG, LYSAGHT J, TODRYK S, et al. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF- $\beta$ -producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177(2): 896-904. DOI:10.4049/jimmunol.177.2.896.
- [31] SINHA P, CLEMENTS V K, BUNT S K, et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response[J]. *J Immunol*, 2007, 179(2): 977-983. DOI:10.4049/jimmunol.179.2.977.
- [32] AN S, ZHAO E, KRYCZEK I, et al. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells[J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(6): 1393-1404. DOI:10.1053/j.gastro.2014.08.039.
- [33] DE BERARDINIS R J, CHANDEL N S. Fundamentals of cancer metabolism[J]. *Sci Adv*, 2016, 2(5): 200-205. DOI:10.1126/sciadv.1600200.
- [34] FISCHER K, HOFFMANN P, VOELKL S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells[J]. *Blood*, 2007, 109(9): 3812-3819. DOI:10.1182/blood-2006-07-035972.
- [35] CHEN J H, PERRY C J, TSUI Y C, et al. Prostaglandin E2 and programmed cell death 1 signaling coordinately impair CTL function and survival during chronic viral infection[J]. *Nat Med*, 2015, 21(4): 327-334. DOI:10.1038/nm.3831.
- [36] FRUMENTO G, ROTONDO R, TONETTI M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 459-468. DOI:10.1084/jem.20020121.
- [37] UYTENHOVE C, PILOTTE L, THÉATE I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *Nat Med*, 2003, 9(10): 1269-1274. DOI:10.1038/nm934.
- [38] WANG Z, WU Z, LIU Y, et al. New development in CAR-T cell therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 53-57. DOI: 10.1186/s13045-017-0423-1.
- [39] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKS: the fourth generation of CARs[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8): 1145-1154. DOI: 10.1517/14712598.2015.1046430.
- [40] CURRAN K J, SEINSTRA B A, NIKHAMIN Y, et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(4): 769-778. DOI:10.1038/mt.2015.4.
- [41] KERSHAW M H, WANG G, WESTWOOD J A, et al. Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(16): 1971-1980. DOI:10.1089/10430340260355374.
- [42] PROSSER M E, BROWN C E, SHAMI A F, et al. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor[J]. *Mol Immunol*, 2012, 51(3/4): 263-272. DOI:10.1016/j.molimm.2012.03.023.
- [43] SCHNEIDER D, XIONG Y, WU D, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines[J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 42-47. DOI:10.1186/s40425-017-0246-1.
- [44] ZAH E, LIN MY, SILVA-BENEDICT A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(6): 498-508. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-15-0231.
- [45] FENG K C, GUO Y L, LIU Y, et al. Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 4-8. DOI:10.1186/s13045-016-0378-7.
- [46] VICTOR D, FEDOROV M, THEMEL M, et al. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(215): 215ra172. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006597.
- [47] KLOSS C C, CONDOMINES M, CAR-TELLIERI 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. DOI:10.1038/nbt.2459.
- [48] LIU X, JIANG S, FANG C, et al. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17): 3596-3607. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-0159.
- [49] SAMPSON J H, CHOI B D, SANCHEZ-PEREZ L, et al. EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 972-984. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0709.
- [50] AVANZI M P, YEKU O, LI X, et al. Engineered tumor-targeted T cells mediate enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(7): 2130-2141. DOI:10.1016/j.celrep.2018.04.051.
- [51] 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. DOI:10.1038/nbt.4086.
- [52] JOHN L B, DEVAUD C, DUONG C P, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20): 5636-5646. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
- [53] MEMARNEJADIAN A, MEILLEUR C E, SHALER C R, et al. PD-1 blockade promotes epitope spreading in anticancer CD8<sup>+</sup> T cell responses by preventing fratricidal death of subdominant clones to relieve immunodominance[J]. *J Immunol*, 2017, 199(9): 3348-3359. DOI:10.4049/jimmunol.1700643.

[收稿日期] 2018-07-20

[修回日期] 2018-08-20

[本文编辑] 王映红