

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.01.003

· 专家论坛(专题) ·

精准靶向肿瘤局部的免疫治疗有可能成为治愈癌症的关键性策略

李忠, 孙艳, 钱其军(上海细胞治疗研究院 上海细胞治疗工程技术研究中心, 上海 201805)

[摘要] 肿瘤免疫治疗的两大重要进展:(1)在体外激活或通过基因修饰的T细胞进行体内输注;(2)通过抗体使体内被抑制的免疫细胞激活并处于相对持续作用状态。前者的基因修饰的T细胞主要是指嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞,其对部分血液肿瘤产生了明显的疗效;后者主要指免疫检查点抗体,其对基因突变较多的肿瘤产生了明显的疗效。对于肿瘤患者而言,其肿瘤局部微环境的免疫抑制状态往往明显高于全身的免疫抑制状态。要将肿瘤局部微环境的免疫状况调整到正常或增强,全身用药时可能引发其它正常组织免疫反应过强,甚至导致严重损害,如间质性肺炎、急性心肌炎及严重肝损伤。本文通过总结肿瘤免疫微环境的形成和分类、肿瘤治疗和免疫治疗的发展历程,阐述靶向肿瘤微环境的重要性,提出了用自分泌抗体的CAR-T细胞(白泽T细胞)高效精准靶向肿瘤局部,迅速提高肿瘤局部微环境的免疫功能,且有可能成为治愈癌症的关键策略。

[关键词] 癌症;精准医疗;免疫治疗;肿瘤局部微环境;白泽T细胞;CAR-T细胞;免疫检查点抗体

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)01-0007-09

Immunotherapy precise targeting tumour microenvironment will become a key strategy of curing cancer

LI Zhong, SUN Yan, QIAN Qijun (Shanghai Cell Therapy and Engineering Research Center, Shanghai Cell Therapy Research Institute, Shanghai 201805, China)

[Abstract] The most two advanced development in cancer immunotherapy: (1) Infusion with *in vitro* activated or gene-modified T cells; (2) Activation of suppressive immune cells by antibodies to exert cytotoxicity. The first one about gene-modified T cells is mainly referred to chimeric antigen receptor-T cells (CAR-T) that have shown the significant efficacy in some haematological malignancies. The latter one about immune checkpoint blockades takes effects on tumors with burden of gene mutations. For cancer patients, however, tumor microenvironment is suppressed highly more than the systemic immune. Normalizing or enhancing the local microenvironment by systemic activation of immune response may cause the overreaction in other normal tissues, even severe damage, for example interstitial lung diseases, acute myocarditis, and severe liver failure. This review summarizes the characterization and classification of tumor immune microenvironment, development of cancer treatment and immunotherapy, and elucidates the importance of targeting tumor immune microenvironment. The key strategy is pointed out to efficiently and precision target tumor immune microenvironment by using self-secreting antibody CAR-T cells (baize T cells), quickly enhancing the immune function in tumor microenvironment, which may eventually cure cancer.

[Key words] cancer; precision medicine; immunotherapy; tumor microenvironment; baize T cells; chimeric antigen receptor-T cells

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(1): 7-15. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.003]



钱其军, 医学博士, 研究员, 博士研究生导师, 国家杰出青年科学基金获得者。现任海军军医大学肿瘤生物治疗中心主任, 上海细胞治疗研究院院长, 上海细胞治疗工程技术研究中心主任, 上海吴孟超联合诺贝尔奖获得者医疗科技创新中心主任, 上海细胞治疗集团总裁。上海市优秀学科带头人, 上海市领军人才,

上海市“五一劳动奖章”获得者, 国家重点研发计划项目精准医疗专项首席科学家。兼任中国医药生物技术协会精准医疗分会等6个行业协会的副主任委员, 5个全国性行业协会常委。先后主持承担国家科技重大专项, 863项目, 国家自然科学基金杰青项目、海外杰青项目、重大项目、重点项目和面上项目等国家级

课题14项。获国家科学技术进步奖1项, 省部级二等奖4项, 三等奖3项。在国内外知名期刊上共发表论文150多篇, 其中SCI论文73篇; 获专利授权27项, 其中美国发明专利2项。

[基金项目] 国家重点研发计划精准医学研究重点专项(No. 2017YFC0909800); 国家自然科学基金面上项目(No. 31471339)。Project supported by the Special Project of Precision Medicine from National Key Research Plan (No. 2017YFC0909800), and the National Natural Science Foundation of China (No. 31471339)

[作者简介] 孙艳(1984-), 女, 硕士, 主要从事细胞药物转化研究及管理工作, E-mail: suny@shcell.org

[通信作者] 钱其军(QIAN Qijun, corresponding author), E-mail: qian@shcell.org



李忠, 博士, 特聘教授。现任上海细胞治疗研究院副院长, 白泽医学检验所副所长, 中国医药生物技术协会精准医疗分会常委兼副秘书长。1996-2010年先后在中科院和美国罗切斯特大学、康涅狄克大学做博士后和助理教授。2010年作为海外人才特聘教授到第二军医大学东方肝胆外科

医院工作。2015年到上海细胞治疗集团, 主要从事转化医学和细胞免疫治疗领域中肿瘤发生机制和肿瘤免疫治疗以及衰老检测与细胞抗衰老的应用研究。先后在 *Science*、*Cell*、*Nat Cell Biol*、*Nat Commun*、*Curr Biol* 等杂志发表 33 篇 SCI 论文。目前还兼任全国卫生产业企业管理协会转化医学产业分会理事, 中国老年学和老年医学学会抗衰老分会常委, 中国抗衰老促进会再生医学专业委员会委员。2017 年荣获嘉定区高层次创新创业人才。承担了 2 项国家自然科学基金项目, 主持 2 项科技部重大研究计划子课题、上海市经济和信息化委员会课题等研究项目。为国家基金委的评审专家, 《中华肿瘤学杂志》、《中国肿瘤生物治疗杂志》、《中国医药生物技术》、*Life Sci J* 等杂志的编委和审稿人。E-mail: liz@shcell.org

多年来, 肿瘤免疫治疗一直是通过提高全身免疫功能来进行的。近年来, 随着基因检测技术、多色免疫组化、动态影像组织细胞示踪技术等的应用, 肿瘤微环境或肿瘤免疫微环境的真相越来越清晰, 也进一步清楚了肿瘤治疗效果不佳、耐药、复发和转移都与肿瘤微环境密切相关。免疫系统在肿瘤局部呈明显的抑制状态, 表现为抑制性细胞因子(如 IL-10 等)增多和抑制性细胞(如 TAM、MDSC 和 Treg 细胞等)富集, 而巨噬细胞、细胞毒性 T 细胞在瘤组织内的浸润减少, 或即使 T 细胞还存在但已经失去了细胞毒性作用。肿瘤免疫治疗目前最有效的两种治疗方案分别是免疫检查点抑制剂和 CAR-T 或 CAR-NK。抑制性免疫检查点是介导免疫抑制的, 如 CTLA-4、PD-1 受体; 通过单克隆抗体阻断这些受体, 或结合 PD-1 受体的配体 PD-L1, 可解除 T 细胞的抑制。CAR-免疫细胞是通过转基因的方式, 使 T 或 NK 细胞负载表达单链抗体、共刺激因子而被激活, 回输体内后, 能识别表达抗原的肿瘤细胞进而产生杀灭作用。免疫检查点抑制剂可因引起全身免疫反应增强而导致副作用, CAR-T 细胞则有可能受肿瘤局部抑制性微环境的影响而不能发挥更好作用。因此, 如何能够降低免疫增强引起的副作用, 又能修复肿瘤局部免疫抑制状态, 已经成为有效免疫治疗和肿瘤治愈的关键^[1]。

1 肿瘤局部免疫微环境的形成与肿瘤生长

肿瘤发生是一个复杂的动态过程, 包括启动、进展和转移 3 个阶段。各种致癌因素导致基因突变或

蛋白质异常表达, 使细胞特性发生改变, 形成突变细胞。早期这些细胞可能被机体的免疫系统清除, 但当致癌因素持续存在、变异或突变细胞增多、个别细胞内部发生改变时, 如抗原表达减少等, 使其可以逃避肿瘤免疫监视, 进而与肿瘤细胞周围的细胞外基质、基质细胞、免疫细胞等构成了肿瘤微环境。这样的肿瘤微环境, 对免疫细胞产生抑制作用, 而对肿瘤细胞产生促进作用。

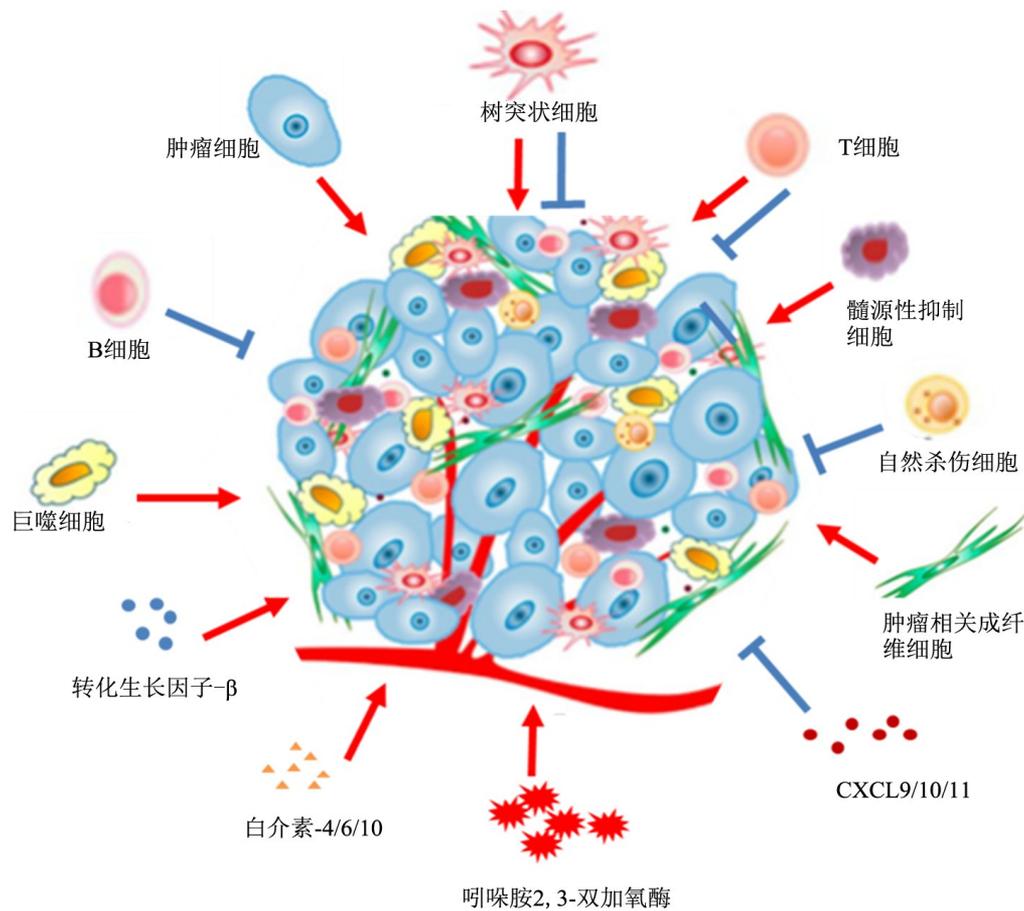
在肿瘤微环境中, 成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经内分泌细胞、脂肪细胞、免疫细胞、髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)、Treg 和肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)等, 对肿瘤生长、转移和耐药的产生发挥重要的作用^[2]。这些免疫相关细胞与肿瘤细胞以及它们分泌的细胞因子一起在组织器官内形成了一个特殊功能区, 被称为“肿瘤局部微环境(tumor microenvironment)”(图 1)。

在肿瘤局部微环境中, 肿瘤相关的成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)辅助肿瘤细胞建立微环境, 促进肿瘤细胞增殖、浸润、转移及治疗耐受^[3]。正常成纤维细胞通过细胞-细胞相互作用、分泌的可溶性因子与完整的细胞外基质, 对肿瘤发生与转移可产生多重抑制作用。而 CAF 失去正常成纤维细胞这些作用, 产生富含纤维状的 I 型胶原蛋白和透明质酸, 引起基质发生纤维化。透明质酸的代谢变化有助于 CAF 和肿瘤细胞的迁移和浸润。循环 CAF 还能使肿瘤细胞形成异构团块, 成为转移灶的前身^[4]。间充质基质细胞(mesenchymal stromal cell, MSC)也参与建立肿瘤细胞巢, 支持组织新生血管形成、肿瘤浸润和转移。另外, 其还能释放 TGF- β , 影响抗肿瘤免疫, 限制药物围绕肿瘤细胞^[5]。MDSC 通过直接或间接识别其他免疫细胞产生细胞因子, 而发挥免疫抑制作用, 促进肿瘤生长和转移^[6]。已发现肿瘤间质存在 52 种基质细胞亚型, 这些细胞类型在不同程度上都与患者生存期有关, 并影响药物作用和免疫治疗的疗效^[7]。

肿瘤免疫的关键是肿瘤特异性 T 细胞。无论是在血液循环系统中, 还是在肿瘤的特定部位, 都存在在识别肿瘤特异性抗原的 T 细胞, 这种现象说明肿瘤微环境是能够吸引 T 淋巴细胞进入的。所以, 这类细胞通常称为肿瘤浸润性 T 细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)。虽然这些 TIL 能在体外或者动物体内杀伤同种来源的癌细胞。然而, 实际情况却是这些被激活的淋巴细胞很少能成功地识别和清除肿瘤细胞。其中主要原因是肿瘤抑制了 T 细胞免疫反应以及肿瘤很少或不表达抗原。另外, TAM 是一类通

过分泌相关生长因子来促进肿瘤细胞的增殖,是肿瘤逃避免疫监管的机制之一^[8]。在乳腺癌、胃癌和结肠癌患者中,肿瘤部位的TAM miRNA表达量降低,而在外周血表达正常,并且这些miRNA对肿瘤的生长起关键的抑制作用^[9]。TAM中抑制肿瘤的TNF- α 、CD80、CD86和IL-12p40表达的降低,从而促进肿瘤细胞增殖的IL-10、VEGF-A和VEGF-C表达升高^[10]。中性粒细胞通常被认为是防御感染的第一道防线,现在已认识到其在肿瘤生物学多个方面的重要作用。在肿瘤和循环中发现多种不同形式中性粒细胞的事实支持了肿瘤相关中性粒细胞(tumor-associated neutrophil, TAN)的提法^[11]。相对来说,Treg是通过抑制成熟T细胞的增殖和功能来降低自身免疫排斥反应。WOO等^[12]最早在非小细胞肺癌(non-small

cell lung cancer, NSCLC)患者的肿瘤组织中发现Treg数量比正常人组织中明显增多,而外周血中并没有检测到增多的Treg。同样,在晚期卵巢上皮性癌患者中,Treg可被特异性地招募到肿瘤位点,肿瘤部位的Treg数量比血液和淋巴中的数量明显增多^[13]。说明Treg主要是集中在肿瘤部位,对肿瘤微环境免疫状况是至关重要的^[14]。Treg和TAM在肿瘤微环境中的特异表达现象证明了肿瘤对免疫系统的抑制主要发生在癌变组织局部,对全身其他部位并没有类似的免疫抑制反应。另外,在增强全身的免疫反应后,局部肿瘤细胞的增殖并没有完全被控制,说明肿瘤不是全身免疫抑制的结果,而是局部组织的病变和免疫抑制与逃逸所导致的。



细胞和非细胞成分促进(红箭头)或抑制(蓝T字型)肿瘤的发展

图1 肿瘤微环境调控肿瘤生长示意图

另外一个不容忽视的微环境影响因素是免疫检查点负调控途径。免疫检查点受体及其配体可分为激活性和抑制性两种,免疫系统依靠这些受体和配体来调控免疫功能的平衡。在肿瘤微环境中,肿瘤细胞表达PD-L1和吲哚2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO), MDSC产生一氧化氮

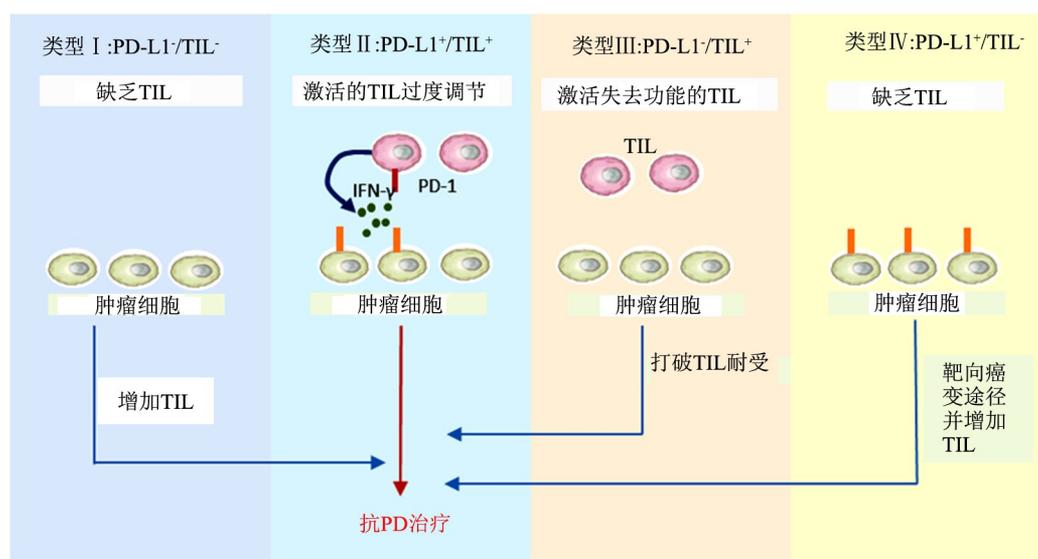
(NO)、精氨酸酶I、活性氧(reactive oxygen species, ROS), TAM细胞产生TGF- β 和VEGF这些因素的综合作用结果抑制了T细胞和DC,激活了Treg。Treg直接产生IL-10和TGF- β 抑制T细胞。Treg还抑制局部DC表达CD80和CD86,从而使之不能有效地提呈抗原。激活的T细胞产生IFN- γ 和其他炎症性

因子,上调DC及肿瘤细胞表达IDO和PD-L1,以致产生相反的抑制作用。因此,在只有肿瘤局部富集免疫检查点抑制剂才能有效地提高肿瘤免疫治疗的作用。

2 肿瘤局部微环境的分类与肿瘤治疗

免疫治疗的疗效取决于肿瘤局部微环境的修复已经成为专家们的共识。随着对肿瘤微环境的深入了解,最初人们根据肿瘤局部含有TIL的多少,将肿瘤分为热肿瘤和冷肿瘤。随着抑制性免疫检查点PD-1受体发现,将PD-L1(B7-H1)与TIL结合在一起又将肿瘤微环境分

为4类,它们分别是I类(PD-L1⁻,TIL⁻)、II类(PD-L1⁺,TIL⁺)、III类(PD-L1⁻,TIL⁺)和IV类(PD-L1⁺,TIL⁻)。I类肿瘤微环境是PD-L1阴性的微环境,不表达能诱导T细胞的肿瘤抗原;没有TIL,或TIL没有炎症反应并不分泌IFN- γ (图2)。I类肿瘤类似以前所谓的冷肿瘤。II类类似热肿瘤,对阻断PD治疗有效,这是因为含有TIL和其他免疫细胞,但是PD-L1的表达有可能引起肿瘤对TIL清除的抵抗。III类和IV类常见于多种肿瘤患者,都缺乏TIL,可解释为什么会对抗PD治疗缺乏反应。III类患者有TIL但缺少PD-L1,可能是由于缺少表达IFN- γ 的T效应细胞,这也是细胞功能紊乱的表现^[15-16]。



PD-L1:程序性死亡配体1; IFN:干扰素; PD-1: 细胞程序性死亡受体1; TIL:肿瘤浸润性淋巴细胞

图2 肿瘤免疫微环境的分类(修改自参考文献[16])

然而,在肿瘤微环境中存在的TIL并不是都具有杀灭肿瘤的作用。2018年5月的*Nature*杂志,文章报道,在人肺和结直肠癌中的CD8⁺TIL,除了能识别特异肿瘤抗原,也能识别与肿瘤无关的抗原决定簇;这一组TIL缺乏CD39表达,并且也缺少对肿瘤部位的慢性抗原刺激的反应。因此,被命名为“旁观T细胞(bystander T cell)”,它们对肿瘤抗原并非是非特异的^[17]。上述推测很快被2018年12月的*Nature Med*杂志上发表的文章证实。荷兰癌症研究所(NKI)的SCHUMACHER领导的团队通过将人肠癌和卵巢癌中的TIL细胞测序,通过分析肿瘤浸润T细胞能否识别周围癌细胞,来准确判断肿瘤中杀伤T细胞的抗癌潜力。数据分析发现,大约只有10%的肿瘤浸润T细胞有识别周围癌细胞的能力,其他的都是旁观T细胞。甚至在两份充满浸润性T细胞的患者组织样本中没有检测到能识别癌细胞的杀伤性T细胞。因此,该文章提出“不能以肿瘤中浸润性T细胞的数量多少”简单地判断“冷”或“热”肿瘤,而是要分析浸润T细胞的

TCR是否能识别肿瘤^[18]。基于肿瘤组织中对肿瘤反应的TIL和旁观T细胞,作者将肿瘤微环境也分为4型(I, II, III和IV): I型只有旁观T细胞,II-IV均可称为热肿瘤,但其含有的对肿瘤反应的T细胞是逐渐增多的。

不同的肿瘤微循环对免疫治疗的反应不同,I型肿瘤可用CAR-T疗法,其他类型肿瘤则需要CAR-T结合免疫检查点抑制剂的联合应用。

3 靶向肿瘤局部的免疫治疗与癌症治愈

3.1 局部肿瘤治疗策略的演变

长期以来手术一直是肿瘤治疗的首选方案。不可否认,早期发现后早期手术的预后是良好的,但是多数肿瘤发现时已经发生远处转移或局部扩散,失去了手术条件。虽然也有先化疗或放疗,然后再手术的方案,但复发和转移的可能性依然很大。另外,手术过程因手术者对切除区域的判断、肿瘤生长部位、肿瘤周围浸润情况都可造成很大的预后差异。

放疗和射频治疗往往是在手术无法实施的情况下, 单独或与化疗联合的治疗方案。常规放疗需要达到一定的放射剂量(例如 60 Gy)才能产生肿瘤杀伤作用。依据肿瘤敏感性程度的不同和疗程次数的差异, 每次照射的剂量也有所不同。放疗对肿瘤的电离作用通常引起照射部位肿瘤细胞死亡, 形成局部非细菌性炎症, 死亡的肿瘤细胞释放细胞因子、肿瘤抗原, 继而可激活免疫细胞。但由于免疫耐受的存在, 单独放疗很少能打破对肿瘤抗原的耐受。因此, 结合适当的免疫治疗才能更好地发挥放疗作用。

化疗是通过药物或多肽对细胞的毒性作用而杀伤肿瘤细胞的。大多数抗肿瘤药物对正常细胞也有作用。针对肿瘤信号转导过程中的重要激酶或细胞表面生长因子受体产生的单克隆抗体, 虽然能带来积极的肿瘤抑制作用, 但由于肿瘤内部代偿性功能调节和异常信号通路的存在, 往往在靶向治疗 1 年至 1.5 年后产生耐药。理论上说, 化疗引起肿瘤细胞死亡, 也能释放免疫抗原。但由于肿瘤内存在抑制抗原提呈机制, 化疗引起的免疫反应并不明显。

总之, 无论是手术、放疗、化疗或是靶向治疗, 在总体肿瘤治疗中获得治愈的概率还是比较低的。大量的临床肿瘤治疗预后数据提示, 当肿瘤局部或肿瘤微环境中存在较多浸润性 T 细胞, 往往伴随着较高的无瘤存活率。故肿瘤能够发生和持续生长在很大程度上取决于免疫系统对肿瘤的清除功能是否恢复。实验证明, 通过单克隆抗体阻断 T 细胞抑制性受体与配体相互作用(如 CTLA-4、PD-1 或 PD-L 抗体等)并激活 T 细胞功能时, 许多肿瘤出现缩小或甚至消失, 正是肿瘤局部免疫功能增强的结果。然而, 大量临床数据显示, 仅有 10%~30% 患者受益并产生长期疗效, 而大部分患者对免疫检查点抗体的作用不产生反应, 其原因在于肿瘤微环境的不同。因此, 改变局部肿瘤微环境、修复 T 细胞的免疫反应才是取得肿瘤治疗疗效的关键。

3.2 肿瘤局部微环境的修复

全身性免疫疗法是以激活全身免疫反应从而达到增强局部免疫反应为目标的肿瘤治疗手段(图 3A)。该方法不仅会使激活的效应 T 细胞消耗在肿瘤部位, 也会使正常的组织受到免疫系统的攻击, 引发严重的副作用。例如, 目前广泛应用的免疫检查点伊匹单抗(ipilimumab)和纳武单抗(nivolumab)联合治疗, 虽然增加对多种恶性肿瘤的治疗效果, 但由于免疫反应的增强, 1 例黑色素瘤患者在接受了这两种药物的联合治疗后意外出现急性心肌炎而死亡^[19]。常见的副作用还包括皮肤、结肠、肝、内分泌腺和肺部炎症^[20], 其原因可能是免疫系统内 T 细胞引起的脱靶

效应。根据科罗拉多大学癌症中心纳武单抗联合伊匹单抗的试验结果显示, 约 55% 的患者具有严重的副作用, 约 36% 的患者不得不停止治疗。这说明目前还无法预测联合免疫治疗中可能发生的不良反应, 更缺乏有效的应对措施。除此之外, 在使用方式上, 将两种药物甚至更多疗法的联合是同步进行, 还是按照一定的次序、时间间隔实施, 都还有待深入探究。

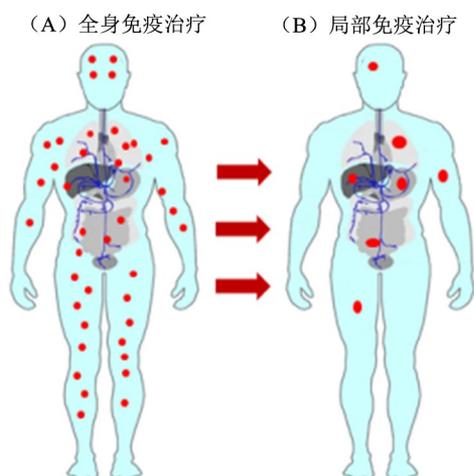
既然增强全身免疫的副作用大, 怎么能研发出聚焦肿瘤微环境的方案?

基于对肿瘤微环境的研究, 靶向肿瘤微环境至少需要克服以下几个困难:(1)制备靶向肿瘤局部的特异性 T 细胞, 招募更多的 T 淋巴细胞进入肿瘤局部微环境。一般情况下, 通过大量的 CIK 或 CTL 回输, 大部分细胞可能在循环过程中死亡, 只要少量细胞进入肿瘤组织。进入肿瘤微环境的 T 细胞, 有可能因为 PD-1 表达高而受到抑制。CAR-T 细胞的问世, 使靶向肿瘤局部微环境成为可能。(2)阻断肿瘤局部免疫抑制通路, 如 PD-1/PD-L1 通路。如何实现 PD-1 或 PD-L1 抗体在肿瘤微环境的富集, 仅仅靠静脉注射抗 PD 抗体药, 需要持续用药, 效果不理想, 还有全身性毒副作用。(3)如何使肿瘤局部持续存在免疫检查点抑制剂并激活杀灭肿瘤的 T 细胞。所以, 完美实现 T 细胞靶向肿瘤, 又能在肿瘤局部分泌产生抗免疫检查点抗体, 才是治疗肿瘤的最佳方案。因此, 笔者提出了精准靶向肿瘤局部的免疫治疗, 修复肿瘤局部微环境的策略: 利用 CAR-T 细胞靶向肿瘤的特性, 在进入肿瘤组织微环境后能增殖并分泌抗 PD-1 抗体, 达到靶向肿瘤微环境, 又修复肿瘤局部免疫抑制状态的目的(图 3B)。另外, 利用 TIL 的回巢特性, 在体外分离和扩增 TIL 细胞, 并修饰制备 CAR-TIL, 回输体内, 使 TIL 在肿瘤微环境中大量富集, 或使 TIL 也能分泌抗 PD-1 抗体, 也是一个实现改变肿瘤微环境的治疗方案。

3.3 精准靶向肿瘤局部微环境: 自分泌抗体的 CAR-T 细胞

CAR-T 细胞联合体内注射免疫检查点抗体(如 PD-1 抗体)在大量动物实验中获得了良好疗效^[21-22], 但自分泌抗体的 CAR-T 细胞在人体试验目前还比较少。南加州大学的 WANG 团队^[23]利用 MP71 逆转录病毒载体编码抗 CD19 的 CAR, 并表达 PD-1 单链抗体, 在小鼠肿瘤移植模型实验中能明显增强 CAR-T 细胞抗肿瘤活性, 延长小鼠寿命。HVEM(TNFRSF14)受体突变常见于生发中心淋巴瘤, HVEM 缺乏的淋巴瘤 B 细胞诱导促进肿瘤生长的微环境。通过 CD19-CAR-T 细胞局部产生可溶性 HVEM, 能增强抗肿瘤作用^[24]。不过, 考虑到慢病毒/逆转录病毒载体的自身缺陷, 上述研

究中CAR-T细胞表达抗体的效率并不高,能否用于患者体内治疗尚未见报道。



A: 当使用 IFN、IL-2、CAR-T 细胞、抗 CTLA-4 单抗及 PD-1 抗体时,都能引起全身免疫反应的增强,会因免疫过强而引起副作用;B: 通过细胞靶向肿瘤组织微环境并释放 PD-1 抗体,增强局部免疫反应而产生杀灭肿瘤细胞的作用,并且全身副作用小(●为免疫反应部位)

图3 全身免疫与局部免疫治疗的区别

除了能使T细胞表达高水平的PD抗体并具有与商业抗体同样的生物学活性,同时还需要保证载体在细胞中能够长期稳定表达以及降低体外制备的成

本。常用的人体内转染载体包括病毒载体和非病毒载体。病毒载体主要是慢病毒,而非病毒载体是以转座子载体为主。转座子载体包括睡美人(sleeping beauty, SB)、piggybac(PB)和To12。

表达抗体的载体构建、细胞转染和CAR-T制备的研究在笔者团队已经经历了十多年的过程。早期是利用腺病毒载体在体内外表达曲妥单抗(trastuzumab;即Herceptin,赫赛汀)全长抗体基因^[25],以及抗HER-2全长抗体基因的^[26]。经过多年探索,使小鼠体内血清抗体水平达40 μg/ml,维持至少4周,并对小鼠卵巢癌移植瘤产生明显治疗效果。应用同样的技术,在抗CD20抗体基因的小鼠及非人类灵长类动物体内表达上也取得了较高的抗体水平^[26-27]。在上述研究的基础上,开始用T细胞来表达全长抗体,并申请了专利。为了提高长期表达抗体的效果,真正实现产业化生产,上海细胞治疗研究院对包含慢病毒载体在内的主要基因修饰载体进行了比较分析,结果证实非病毒载体在其基因修饰产品的疗效、安全性以及转化成本等多方面优势显著(表1),具有很强的产业化应用潜力。同时,非病毒载体中的PB转座子系统,相较于SB及To12载体系统,在抗体表达量、基因载量、整合效率等方面呈现优势(表2),是能够长期表达抗体及其目标基因的理想载体系统。因此,笔者团队最终选择PB转座子非病毒载体代替慢病毒载体作为基因修饰的载体工具。

表1 病毒载体和非病毒载体在CAR-T基因修饰系统中使用性能的比较

指标	内容	病毒载体系统	非病毒载体(转座子系统)
疗效	免疫记忆	记忆性T细胞比例较低,肿瘤复发概率较高	记忆性T细胞比例较高,肿瘤复发概率较低
安全性	免疫原性	产品成分比较复杂,免疫原性较高	产品成分比较简单,免疫原性较低
	长期监测	病毒在体内长期存留具有重新获得复制能力的风险,FDA建议需要长达15年的跟踪随访以确定其安全性	无需监测复制型慢病毒,安全性更高
生产	质量控制	需要对质粒和病毒等进行检测,检测项目多、成本较高	只需对质粒进行检测,检测项目较少、成本较低
	工艺	工艺复杂,质控要求高,但CAR-T细胞制备周期较短	工艺相对简单,易于质控,但CAR-T细胞制备周期较长
	储存稳定性	病毒储存要求严格,RNA病毒不稳定、有效期短	质粒DNA稳定性高,储存要求相对简单,有效期较长
应用前景	血液瘤	比较成熟,进一步优化较难	自身工艺具有较大的优化空间:RNA形式的PB酶以及DNA微环可进一步提高电转效率
	实体瘤	基因载量小,比较成熟,进一步优化较难	基因载量大,可在CAR-T细胞中自表达高水平抗体,易组成联合疗法

PB非病毒载体系统采用电转染方式进行基因修饰时,电转染效率会受到PB转座子质粒大小等因素的影响,同时基因修饰细胞的活性也会因电转染的损伤而下降。为降低电转染对细胞的损伤同时提高电转染效率,笔者实验室采用较小的单质粒进行电转染,并开发抗原富集培养体系,显著提高了转染效率、CAR-T细胞阳性率及转染后活性。PB转座子非病毒载体抗体表达效率比慢病毒载体高10~30倍^[28-29]。同时,PB非病毒载体的纯化工艺简单,在细菌培养体系可完成,明显降低了成本,且容易质量控制。另外,检测T细胞表达的抗体活性与抗PD-1抗体Keytrude的活性基本类似^[29]。进一步来说,通过23批次基因测序分析,发现PB转座子非病毒载体的整合位点倾向于基因间、多位点整合,无整合偏向性;同时没有发现插入位点位于T细胞相关的肿瘤基因内。

因此,目前认为,PB转座子非病毒载体具有较好的完全性、较高的表达效率和较低的制备成本,且易于质量控制。笔者实验室将这种自表达抗体的PB转座子非病毒载体CAR的T细胞称之为“白泽T细胞”。“白泽”是传说中的神兽,通晓万物语言、行为方式,谙知驱恶之道。这种白泽T细胞可以在肿瘤局部大量扩增,将靶基因阳性的肿瘤细胞杀灭;同时在肿瘤局部释放高水平的免疫检查点抗体,迅速将肿瘤微环境免疫抑制状态改变成正常或增强状态,这将大大提高对肿瘤治愈机会,并且全身副作用较小,有可能治愈癌症。根据T细胞具有的特异性、高活性启动子的特征,设计了针对多种肿瘤靶标抗原、同时表达免疫检查点特异性抗体的CAR-T细胞,这些细胞正在进行临床前实验或临床I期试验,其中有19个项目已经在美国Clinicaltrials.gov注册。

表2 不同的非病毒载体优劣势比较^[30-33]

项目	SB (sleeping beauty)	Tol2	PB (piggyBac)
物种来源	鲑鱼	青鳉	粉纹夜蛾
分类	Tc1/mariner超家族	hAT超家族	PB超家族
分子结构	<1.6 kb,由两个方向/正向重复序列组成,转座酶360个氨基酸	<4.7 kb,由两个TIR组成,转座酶649个氨基酸	<2.5 kb,由外部对称和内部不对称TIR组成,转座酶594个氨基酸
识别靶位点	AT	8 bp 随机核苷酸序列(C/G) TTATAA(G/C)	TTAA
搭载容量	12 kb	11 kb	200 kb
转座子足迹	有	有	无痕
覆盖度	30%~60%供者染色体	<20%供者染色体	9%~30%供者染色体
DNA整合特性	效率相对低	效率相对低	效率高
	25%~45%参考序列基因	<40%参考序列基因	50%~55%参考序列基因
	<2%转录起始点	<8%转录起始点	2%~20%转录起始点
	<2% CpG 岛	4%~13% CpG 岛	4%~18% CpG 岛
	<1% DNA 酶I 高度敏感区	<5% DNA 酶I 高度敏感区	1%~5% DNA 酶I 高度敏感区

4 展 望

CAR-T细胞具有肿瘤趋向能力,能在趋化因子的引导下,通过细胞变形或者细胞表面黏附分子的作用,进入实体瘤内部发挥治疗作用。CAR-T细胞是实现肿瘤局部治疗的合适工具。将免疫检查点抑制性抗体基因或者免疫共刺激分子激活型抗体基因导入CAR-T细胞中,可将CAR-T细胞转变为具有抗体生产能力的“抗体工厂”。静脉输注后,借助CAR-T细胞的肿瘤趋向性,具备抗体表达能力的CAR-T细胞可以趋向肿瘤并进入肿瘤内部。在自我扩增和杀伤肿瘤细胞的同时,在肿瘤局部分泌产生抗体分子。抗体一

方面保护CAR-T细胞免受肿瘤微环境的抑制作用,发挥更持久的疗效;另一方面,在原位肿瘤局部激活处于抑制状态的肿瘤浸润淋巴细胞(图4)。由此调动外源与内源T细胞,发挥双重治疗作用,达到肿瘤治疗目的。调动内源免疫细胞群后,还可以弥补单一靶向CAR-T细胞难以杀灭异质性肿瘤细胞的缺陷。这类CAR-T细胞在肿瘤微环境中分泌抗体,还可以克服抗体全身用药带来的毒副作用。总之,自表达抗体的CAR-T细胞治疗技术,具备CAR-T细胞与免疫检查点抗体治疗的双重优势,同时克服了它们各自存在的缺陷,无需额外注射免疫检查点抑制剂,又能靶向局部肿瘤组织。期待精准靶向肿瘤局部能自分泌

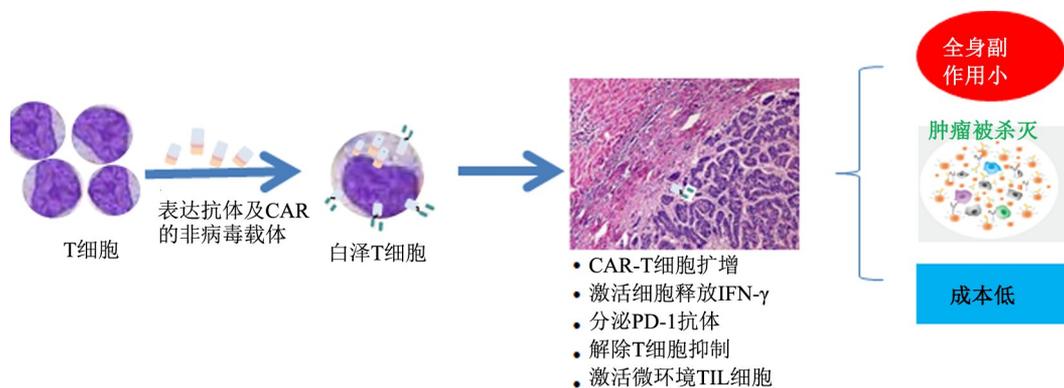


图4 自分泌抗体的CAR-T细胞的制备和应用

抗体的“白泽T细胞”在癌症精准医疗中彰显更大的威力。

(诚挚感谢上海细胞治疗集团的严巧灵、王美文和汪鹏老师在审阅、作图中的帮助和建议。)

[参考文献]

[1] ZHANG H, YE Z L, YUAN Z G, et al. New strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T cells[J]. *Inter J Biol Sci*, 2016, 12 (6): 718-729. DOI:10.7150/ijbs.14405.

[2] WANG M, ZHAO J, ZHANG L, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis[J]. *J Cancer*, 2017, 8(5): 761-773. DOI: 10.7150/jca.17648.

[3] SUN Y, WANG R, QIAO M, et al. Cancer associated fibroblasts tailored tumor microenvironment of therapy resistance in gastrointestinal cancers[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6359-6369. DOI: 10.1002/jcp.26433.

[4] MCCARTHY J B, EL-ASHRY D, TURLEY E A. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 112[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6168026/>. DOI: 10.1002/jcp.26433.

[5] POGGI A, VARESANO S, ZOCCHI M R. How to hit mesenchymal stromal cells and make the tumor microenvironment immunostimulant rather than immunosuppressive[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 262[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004550/>. DOI:10.3389/fimmu.2018.00262.

[6] YIN Z, LI C, WANG J, et al. Myeloid-derived suppressor cell: roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2018, 114(5): 933-946. DOI:10.1002/ijc.31744.

[7] BUSSARD K M, MUTKUS L, STUMPF K, et al. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 84[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982339/>. DOI:10.1186/s13058-016-0740-2.

[8] CHO H J, JUNG J I, LIM D Y, et al. Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(3): R81[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3446344/>. DOI:10.1186/bcr3195.

[9] LI Y, ZHAO L, SHI B, et al. Functions of miR-146a and miR-222 in tumor-associated macrophages in breast cancer[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18648[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4686897/>. DOI:10.1038/srep18648.

[10] YAMAGUCHI T, FUSHIDA S, YAMAMOTO Y, et al. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination[J/OL]. *Gastric Cancer*, 2016, 19(4): 1052-1065[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5034006/>. DOI:10.1007/s10120-015-0579-8.

[11] SHAUL M E, FRIDLENDER Z G. Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment[J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(2): 343-349. DOI:10.1189/jlb.5MR1216-508R.

[12] WOO E Y, CHU C S, GOLETZ T J, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (12): 4766-4772.

[13] CURIEL T J, COUKOS G, ZOU L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival[J]. *Nat Med*, 2004, 10(9): 942-949. DOI:10.1038/nm1093.

[14] YU P, LEE Y, LIU W, et al. Intratumor depletion of CD4⁺ cells un-masks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(5): 779-791. DOI: 10.1084/jem.20041684.

[15] ZHANG Y, CHEN L. Classification of advanced human cancers based on tumor immunity in the microenvironment (TIME) for cancer immunotherapy[J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(11): 1403-1404. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.2450.

[16] SANMAMED M F, CHEN L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization[J]. *Cell*, 2018, 175(2): 313-326. DOI:10.1016/j.cell.2018.09.035.

[17] SIMONI Y, BECHT E, FEHLINGS M, et al. Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates[J]. *Nature*, 2018, 557(7706): 575-579. DOI: 10.1038/s41586-018-0130-2.

[18] SCHEPER W, KELDERMAN S, FANCHI L F, et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers[J]. *Nat Med*, 2018, 25(1): 89-94. DOI:10.1038/s41591-018-0266-5.

[19] JOHNSON D B, BALKO J M, COMPTON M L, et al. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade[J]. *N Engl*

- J Med, 2016, 375(18): 1749-1755. DOI:10.1056/NEJMoa1609214.
- [20] VILLADOLID J, AMIN A. Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: update on management of immune-related toxicities[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(5): 560-575. DOI:10.3978/j.issn.2218-6751.2015.06.06.
- [21] CHERKASSKY L, MORELLO A, VILLENA-VARGAS J, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3130-3144. DOI:10.1172/JCI83092.
- [22] 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.
- [23] LI S, SIRIWON N, ZHANG X, et al. Enhanced cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor-modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22): 6982-6992. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-17-0867.
- [24] BOICE M, SALLOUM D, MOURCIN F, et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells[J]. *Cell*, 2016, 167(2): 405-418. DOI:10.1016/j.cell.2016.08.032.
- [25] CHEN J, SU C, LU Q, et al. Generation of adenovirus-mediated anti-CD20 antibody and its effect on B-cell deletion in mice and non-human primate cynomolgus monkey[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(6): 1562-1568. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-08-0297.
- [26] JIANG M, SHI W, ZHANG Q, et al. Gene therapy using adenovirus-mediated full-length anti-HER-2 antibody for HER-2 overexpression cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 1): 6179-6185. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-06-0746.
- [27] ZHANG Q, CHEN G, LIU X, et al. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy [J]. *Cell Res*, 2007, 17(2): 89-99. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-06-0746.
- [28] HE J, ZHANG Z, LV S, et al. Engineered CAR T cells targeting mesothelin by piggyBac transposon system for the treatment of pancreatic cancer[J/OL]. *Cell Immunol*, 2018, 329: 31-40[2018-12-30]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00088749>. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.04.007.
- [29] LI H, HUANG Y, JIANG D Q, et al. Antitumor activity of EGFR-specific CAR T cells against non-small-cell lung cancer cells in vitro and in mice [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 177[2018-12-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5833445/>. DOI:10.1038/s41419-017-0238-6.
- [30] GALVAN D L, NAKAZAWA Y, KAJA A, et al. Genome-wide mapping of PiggyBac transposon integrations in primary human T cells[J]. *J Immunother*, 2009, 32(8): 837-844. DOI:10.1097/CJI.0b013e3181b2914c.
- [31] LI R, ZHUANG Y, HAN M, et al. PiggyBac as a high-capacity transgenesis and gene-therapy vector in human cells and mice[J]. *Dis Mod Mechan*, 2013, 6(3): 828-833. DOI:10.1242/dmm.010827.
- [32] WANG W, LIN C, LU D, et al. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(27): 9290-9295. DOI:10.1073/pnas.0801017105.
- [33] 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. DOI: 10.1038/mt.2010.141.

[收稿日期] 2019-01-10

[修回日期] 2019-01-14

[本文编辑] 党瑞山