

CAR-T 细胞治疗肿瘤临床应用的挑战及对策

Clinical application challenges and countermeasures of CAR-T cell therapy in treatment of tumors

陈绍丰 综述; 朱志朋, 吴艳峰 审阅(海军军医大学 基础医学院 免疫学教研室, 上海 200433)

[摘要] CAR-T细胞治疗血液肿瘤已经取得了不错的疗效,已有两款新药(Kymrial和Yescata)上市。然而,在临床上CAR-T细胞疗法也面临诸如细胞因子释放综合征(CRS)、脱靶现象、载体安全性问题、实体瘤治疗效果不佳、肿瘤复发率高等问题,这使研究者们不得不重点关注其毒副作用的危害,并对此展开相关对策的研究。随着对CAR-T细胞认识的不断深入以及对治疗方案的不断优化,已经有部分毒副作用处于可控范围内。本文将对近年来CAR-T细胞治疗在临床应用产生的问题进行分析,并介绍相应的对策,旨在为临床医生更好地管理CAR-T细胞治疗过程和肿瘤研究者进一步优化CAR结构提供参考依据。

[关键词] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T); 疗效; 副作用; 挑战; 对策; 临床应用

[中图分类号] R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)07-0802-08

嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)治疗是目前被临床广泛关注的一种新型细胞疗法,在急性白血病和非霍奇金淋巴瘤治疗上有着显著的疗效,被认为是最有前景的肿瘤治疗方式之一^[1]。2017年8月,诺华公司Kymrial(靶向CD19的CAR-T细胞)被美国FDA批准上市,标志着CAR-T细胞疗法真正进入临床应用,也让CAR-T细胞疗法成为肿瘤治疗领域最吸引人眼球的技术之一。2017年10月,美国FDA又批准了全球第二个CAR-T细胞疗法——Yescata上市^[2]。这些产品的上市使得CAR-T细胞受到社会各界的广泛关注,越来越多的药企涌入该领域,仅中国就有百余家企业正在进行CAR-T产品的研发。尽管CAR-T细胞疗法在血液系统肿瘤中取得了不错的疗效,但其在临床应用中仍然面临着许多问题,诸如细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、脱靶效应(on-target/off-tumor)、神经毒性、实体瘤疗效较差以及肿瘤复发率高等。CAR-T细胞疗法要成为既有效、又安全的治疗方式,还有很长的路要走,还有许多问题亟待解决。本文针对近年来CAR-T细胞疗法在临床应用中存在的问题及其解决策略的相关研究进展进行了总结,旨在为基础与临床肿瘤研究人员解决CAR-T面临的问题提供参考依据。

1 CAR-T细胞治疗面临的挑战

1.1 CAR-T细胞治疗的安全性

1.1.1 CRS 一定程度的细胞因子释放被认为是CAR-T细胞起效的标志,但是细胞因子过度释放即会造成CRS。CRS是在肿瘤患者完成CAR-T细胞输

注后,大量免疫细胞被激活并快速增殖,引起IL-6、IL-1、IL-12、TNF- α 、IFN- α 、GM-CSF等细胞因子的过度级联释放^[3],形成“细胞因子风暴(cytokine storm)”。这些细胞因子介导的过度免疫反应会引起患者发热、肌痛、低血压、呼吸困难、凝血障碍、终末器官功能障碍等临床表现,这些是目前临床中最常见的CAR-T细胞的毒副作用。在受人瞩目的JCAR015临床试验(NCT02535364)中,5例成人难治性或复发性急性白血病患者接受治疗后出现相关性脑水肿而死亡,最终导致JCAR015产品“流产”。目前,推测患者病死的原因可能是CAR-T细胞通过血-脑屏障后释放大量细胞因子诱发炎症导致的。由于该不良反应的高发性以及其带来的高危险性,CAR-T细胞治疗曾一度陷入困境。另外,对30例复发/难治型急性淋巴细胞白血病(relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia, r/r ALL)患者进行的治疗研究^[4]中发现,在接受抗CAR-T19细胞输注后,几乎所有患者都出现了CRS,其中有8例出现了严重的CRS。这些都反映了CRS在CAR-T细胞治疗中的高发性和致命性,因此掌握CRS的治疗对策十分必要。

1.1.2 脱靶效应 理想的肿瘤抗原应该是只在肿瘤细胞中表达,而在正常细胞中不表达。遗憾的是,目

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81671644)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81671644)

[作者简介] 陈绍丰(1996-),男,本科生,临床医学专业, E-mail: 447982343@qq.com

[通信作者] 吴艳峰(WU Yanfeng, corresponding author),博士,教授,硕士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail: wuyf@immunol.org

前尚不存在肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA),多数靶抗原会在正常组织细胞中低水平表达,导致CAR-T细胞在杀伤肿瘤细胞的同时,也会对正常组织细胞造成损伤,即产生脱靶效应。在一项靶向HER2的CAR-T研究^[5]中,1例结肠癌肝转移患者在接受治疗后,由于大量CAR-T细胞攻击了低表达HER2的正常肺组织细胞,导致了急性肺水肿的发生,最终患者不幸死亡。在另一项靶向碳酸酐酶IX(CAIX)抗原的第一代CAR-T治疗晚期肾细胞癌的临床研究^[6]中,11例患者中有5例发生严重的黄疸,其原因是CAR-T细胞可以识别胆管上皮中低表达的CAIX,进而损伤正常组织细胞。即使是研究比较成熟的CAR-T19细胞疗法,也出现过严重的脱靶效应^[7]。脱靶效应的发生率虽然低,但是发生迅速、难以处理,常常会导致严重的毒副作用甚至是患者死亡,因此需要在研发阶段就应该引起足够的重视。

1.1.3 CAR-T细胞制备中的风险 目前CAR-T细胞疗法使用最多的是慢病毒或逆转录等病毒载体系统,但是病毒载体存在插入突变等风险。CAR-T细胞疗法先驱、KYMRIAHA之父JUNE团队^[8]发现,1例慢性淋巴细胞白血病患者患者的CAR被意外插入到TET2基因中,导致TET2基因功能障碍。研究后发现,由于TET2基因功能障碍的CAR-T细胞增殖及抗癌能力更强、存活时间更久。所幸这样的插入突变没有造成严重的后果,最终这例患者病情得到完全缓解,但是谁也无法保证每次的插入突变都会如此幸运。虽然非病毒载体系统更加安全,但是导入目的基因的能力较差,其运载效率需进一步提升。目前研究的非病毒载体系统中,效果比较好的是“睡美人系统(sleeping beauty)”转座子系统^[9]和Piggy Bac系统^[10]。此外,在CAR-T细胞制备过程中,T细胞分选不纯也容易导致严重后果。宾夕法尼亚大学的研究人员在给1例r/r B-ALL患者进行CAR-T细胞治疗后,结果意外发现本该加载到T细胞中的CAR,意外地被加到患者癌变的B细胞上,形成了“CAR-癌细胞”。此例患者在接受CAR-T治疗261 d后,由于“CAR-癌细胞”大量增殖,致使肿瘤复发,最终死于与白血病相关的并发症^[7]。

1.2 CAR-T细胞在实体瘤中疗效不佳

虽然CAR-T细胞治疗血液性肿瘤方面已经取得较好的临床效果,但在治疗实体瘤上才刚刚起步^[11]。实体瘤缺乏类似CD19这种在血液肿瘤中特异性存在的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA),导致CAR-T细胞的分子靶点会同时出现在癌细胞和正常细胞的表面,从而导致杀伤非肿瘤细胞的严重副作用。目前有EGFR、HER2和间皮素(mesothelin,

MSLN)等22个不同的靶标正在被尝试用于实体肿瘤的CAR-T细胞治疗,但是效果差强人意。此外,体外扩增的CAR-T细胞在机体内不能持续存活和增殖,CAR-T细胞进入肿瘤部位的低效也是实体瘤治疗效果不佳的重要原因。肿瘤周围常有物理基质及较高的组织压力,这常常是CAR-T细胞难于进入肿瘤发挥作用的第一道屏障。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)大多为低氧及营养饥饿状态,抑制了T细胞增殖及产生细胞因子。肿瘤的可溶因子及细胞因子同样可能降低CAR-T细胞的效能,如前列腺素E2(PGE2)、腺苷等。除此以外,TME中存在各种免疫抑制细胞如Treg、骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)和抑制性免疫分子如PD-L1和PD-1等,使得进入肿瘤中的CAR-T细胞功能被抑制^[12]。这些障碍以及免疫抑制机制是导致TME形成并最终造成实体瘤治疗效果不佳的主要原因。

1.3 CAR-T细胞治疗后肿瘤复发率高

目前研究报道,CAR-T细胞疗法对r/r B-ALL的治疗有效率达到了90%,对慢性淋巴细胞白血病和部分B细胞淋巴瘤的有效率>50%^[7,13-14]。然而,长期随访数据显示,很多完全缓解的患者在治疗不久后即发生复发(表1)^[15]。

经历复发的患者可以分为CD19⁺或CD19⁻型,这取决于白血病细胞上CD19的表面表达。在最初的认识中,CD19被认为是功能性B细胞受体(B cell receptor, BCR)信号转导的共同受体,对于B细胞的扩增至关重要。但随着研究发现CD19并不是必须存在的^[16],这也解释了CD19⁻型存在的可能性。CD19的基因复制、转录到翻译后蛋白修饰等过程均可导致CD19⁻型复发。可变性剪接是其中主要的机制之一,由于CD19外显子2的可变剪接导致CD19不表达,从而导致复发。同时,如果膜运输发生破坏也将出现CD19缺失^[17]。还有一个因素是,作为在膜上与CD19形成稳定复合物的CD81的缺失将直接影响CD19的表达和运输^[18],而CD81缺失的机制目前尚未明了。总之,基因的重排或缺失是CD19⁻型复发的主要原因。另外一种导致复发的机制是免疫抑制分子的表达,这些分子包括PD-L1、IDO和腺苷受体等,如白血病细胞和CAR-T细胞PD-L1与PD-1结合会导致CAR-T细胞功能降低^[19]。此外,CAR-T细胞的耗竭和功能的丧失也是复发的原因之一^[15]。

2 解决CAR-T细胞疗法面临问题的策略

2.1 提高CAR-T细胞疗法的安全性

2.1.1 CRS的管理 目前CRS的分级标准不一,但

是具体措施大同小异,主要以对症治疗为主。研究^[20]表明,血液 CAR-T 细胞水平和血清 IL-6 水平与 CRS 严重程度呈正相关。因此,IL-6 的单抗托珠单抗(tocilizumab)和司妥昔单抗(siltuximab)已成为治疗中重度 CRS 患者的首选用药。目前,在大多数患者中

使用托珠单抗后,CRS 将发生快速消退。因此,美国 FDA 在批准 Kymrial 上市的同时也批准了托珠单抗用于治疗输注 CAR-T 产品后发生的 CRS。此外,使用托珠单抗似乎不会影响 CAR-T 细胞治疗及其临床效果^[21],因此托珠单抗较司妥昔单抗更常用。

表1 多个试验中心对 CAR-T19 细胞治疗和复发的临床试验统计^[15]

试验编号	共刺激分子	淋巴细胞清除方案	最近试验结果	复发/CR、CD19 表达时间	第二次输注	复发机制
NCT01044069	CD28	Cy	51 例; ORR:82.4%; OS: 6.3 个月(20 例,原始细胞<5%),17 个月(31 例,原始细胞≥5%)	1/22; CD19 ⁺ ; 13 周	1/1 成功	使用大剂量糖皮质激素
NCT00840853	CD28	No	41 例; ORR:75%	1/3; CD19 ⁺ ; 2 个月	1/1 成功	达沙替尼对 T 细胞有毒性作用
NCT01593696	CD28	Flu/Cy, FLAG, 或异环磷酸胺/ 依托泊苷	51 例; ORR: 60.8%; OS: 34.7%, 38 个月(预处理); 5.5 个月(未预处理)	8/28; 2 例 CD19 ⁺ , 5 例 CD19 ⁻ , 1 例 CD19 状态未知	N/A	预处理的化疗导致 T 细胞功能不足
NCT02614066	CD28	Flu/Cy	10 例; OR: 75%	N/A	N/A	N/A
NCT02028455	4-1BB	Flu/Cy 或 Cy	40 例; ORR:91%; OS: 74% 12 个月	6 / 36; 所有患者均 CD19 ⁺	N/A	N/A
NCT01865617	4-1BB	Flu/Cy 或 Cy	36 例; ORR: 94%	9/30; 7 例 CD19 ⁺ , 2 例 CD19 ⁻	5/5 失败	CAR-T19 缺失 d/t 免疫反应; 1 CD19 ⁺ 具有克隆相关的 AML
NCT01626495	4-1BB	Cy+依托泊苷;Flu/ Cy,Cy,CVAD,或 安妥明	59 例;ORR: 93%; OS: 79% 12 个月	20/59; 7 例 CD19 ⁺ , 13 例 CD19 ⁻ ; 8 例经历复发 6 周至 8.5 个月	N/A	CTL019 细胞损失 3/4 CD19 ⁺ d / t; 1 CD19 ⁺ 具有与初始克隆相同的 IgH
NCT02435849	4-1BB	Flu/Cy	29 例; ORR: 83%	N/A	N/A	N/A
NCT02228096	4-1BB	Flu/Cy	29 例; ORR:69%; OS: 75.7% 6 个月	8/20; 6 例 CD19 ⁺ , 2 例 CD19 ⁻ ; 1.7~7.6 个月	N/A	N/A

CVAD:环磷酸胺+长春新碱+多柔比星+地塞米松; Cy:环磷酸胺; Flu:氟达拉滨; FLAG:氟达拉滨+大剂量阿糖胞苷+GM-CSF; ORR:总体反应率; OS:总体生存率; N/A:无/不适用

糖皮质激素其可通过抑制炎症反应而有效控制 CRS 及与细胞免疫疗法相关的嗜血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophylic lymphocyte hyperplasia, HLH)。有研究^[22]表明,糖皮质激素可抑制急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者 CAR-T19 细胞输注后 CAR-T 细胞的扩增和抗肿瘤效应。虽然多项临床试验^[23-24]的初步数据显示,用糖皮质激素治疗 CRS 不会降低 CAR-T 细胞治疗的缓解率,也不会影响治疗反应的持久性。但在一项研究^[25]中,对 30 例 B 细胞 ALL(B-ALL)患者进行 CAR-T19 细胞(CTL019)治疗后,9 例接受免疫抑制治疗的患者中有 2 例随后复发;在另一项 B-ALL 患者治疗的研究^[26]中,大剂量糖皮质激素显著地减轻了 3 例严重 CRS 的症状,但是所有患者治疗后都出现了复发。

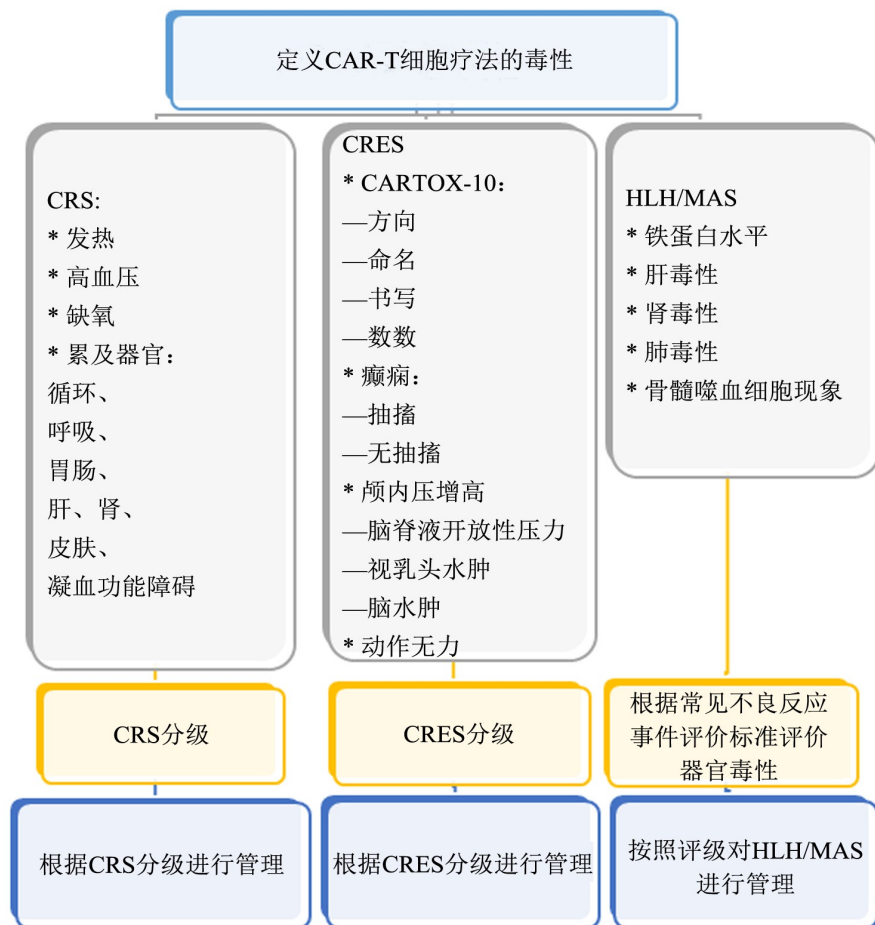
上述临床试验证明,糖皮质激素对 CAR-T 细胞治疗有抑制作用。因此,一般在经抗 IL-6 药物治疗后 CRS 症状仍难以控制时,才可考虑使用糖皮质激素治疗,且要注意用量^[27]。

治疗性血浆置换(therapeutic plasma exchange, TPE)尚未被提出作为 CRS 的治疗主要手段,并且在文献中很少被报道。TPE 有助于快速清血浆中的细胞因子,加速患者康复,并解决严重的 CRS 危机。一例患有 r/r B-ALL 的 10 岁男孩在接受 CAR-T 细胞治疗后发生严重 CRS,并伴有多种疾病。由于病情严重,不适合使用糖皮质激素治疗,因此接受了 24 h 的 TPE。治疗后,患儿的炎症因子几乎恢复到基线水平,并且 CRS 相关症状得到缓解,最终恢复正常出院^[28]。因为这种治疗方式可能带来严重的并发症,高

难度的TPE必须由具有多年临床经验的医务人员来执行。如果出现CRS,且其他治疗手段未能奏效,TPE可以是CAR-T细胞治疗后CRS治疗的备用解决方案^[29]。

目前针对CRS毒副反应已经积累了丰富的临床

实践经验,并形成了一整套完善的治疗指南。MD安德森的NEELAPU等^[3]首次撰写了CAR-T细胞疗法导致的CRS的系统治疗框架指南,通过给CRS分级评估和管理来针对性治疗以减轻症状,给临床应用CAR-T细胞疗法提供了良好的保障,其操作流程如图1。



CRS: 细胞因子释放综合征; CRES: CAR-T细胞相关性脑病综合征;
HLH: 嗜血细胞性淋巴组织细胞增生症; MAS: 巨噬细胞激活综合征

图1 三步法评估和管理CAR-T细胞疗法CRS的示意图^[3]

2.1.2 导入自杀基因 自杀基因是允许选择性破坏过继转移的编码基因分子。添加到细胞治疗产品中的自杀基因可以导致基因修饰细胞的选择性消融,防止对邻近细胞和/或组织的附带损伤。单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex thymidine kinase, HSV-TK)和诱导型半胱天冬酶-9(inducible-caspase-9)是2种最常用、最广泛验证的自杀基因。

自杀基因技术是基于其在代谢中的作用机制(酶基因活化的前体药物治疗 gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT)^[30]。GDEPT将无毒药物转化为基因修饰细胞中的毒性化合物,如HSV-TK^[31]和胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)^[32]。HSV-TK磷酸化核苷类似物,HSV-TK对特定核苷类似物具有

1 000倍高的亲和力,产生的三磷酸形式通过DNA聚合酶的作用并入DNA中,导致DNA链终止转录^[33-34]。而另一种CD,与HSV-TK相似,CD基因编码胞嘧啶脱氨酶,将5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)转化为细胞毒性5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU),从而诱导细胞死亡^[35]。

2.2 CAR-T实体瘤治疗的解决策略

CAR-T在实体瘤治疗上有潜力巨大,但是目前为止实验证明,CAR-T细胞疗法对其杀伤能力有限,治疗方法虽然多样,但效果不佳,未来前景并不明朗。

2.2.1 运用特异性 靶位实体瘤理想的TSA应具有肿瘤特异性与可接触性,即在所有肿瘤中表达,而在正

常细胞中不表达。因此,鉴定筛选针对各种实体瘤的新抗原靶点,并构建相应的CAR-T细胞,是开展CAR-T治疗实体瘤临床应用的关键前提。目前,主要的实验室对GPC3、ErB2、GD2、EGFR、PSMA和MUC1等新靶位在肿瘤细胞中特异性表达进行更加深入的研究,以此来进一步提高CAR-T细胞治疗的效率^[36]。EGFR与糖蛋白为良好实体瘤标志物,如EGFR变体III(EGFRvIII)CAR-T治疗成神经细胞瘤、MUC1 CAR-T治疗乳腺癌、与MUC16 CAR-T治疗卵巢癌。SS1 CAR-T有造成异常免疫毒性的潜在可能性。特异性同样关系到CAR-T细胞疗法的安全性,如高亲和力HER2 CAR-T可能造成致命后果。控制此风险的方式包括短效转染的自限性CAR-T及自杀基因,如HSV-TK基因或诱导胱天蛋白酶9(cytidine 9, Casp-9)基因^[37]。其他增强特异性的方式还有双特异性CAR-T细胞,即同时识别2个抗原以增强抗肿瘤活性和特异性,但尚需要进一步的临床验证^[38]。

2.2.2 联合治疗 肿瘤的联合治疗是目前公认的肿瘤治疗的发展趋势,CAR-T细胞在实体瘤中缺乏功效的一个原因是免疫抑制环境。如果通过药物使肿瘤细胞对包括细胞因子在内的T细胞效应机制敏感,那么这些药物将很大程度上促进CAR-T对实体瘤的治疗效果^[39]。Smacmimetics(SM)是一类新的抗肿瘤药物,可以使肿瘤细胞对TNF- α 介导的细胞死亡敏感性大幅度增加,从而加强CAR-T的杀伤效应。此外,病毒疫苗或溶瘤病毒可通过其TCR增强来增加CAR转导的病毒特异性T细胞(virus-specific T cells, VST)的活性。在接受具有CD28 ζ 信号转导结构域的CD19CAR转导的VST患者的临床试验^[37]中,观察到EB病毒(EBV)再激活的患者同时显示EBV特异性T细胞和CD19CAR信号的增加,表明病毒诱导CD19CAR-VST扩增有效。这种策略也带来一种新的思路,即CAR-VST有可能是改善目前实体瘤的治疗方法之一。通过联合疗法来克服不利因素,有望成为未来CAR-T治疗的一个新的方向。

2.2.4 应用新型基因敲除技术 在实体瘤周围微环境的作用下,CAR-T细胞的活性受到了抑制,治疗效果也大大受限。通过基因的敲除,使CAR-T细胞对微环境的敏感性降低,将有效地提高治疗效能。其中CRISPR/Cas9介导的基因组编辑技术相对于其他更具有灵活性,使用的途径也更加广泛。CRISPR-Cas9可用于干扰PD-L1/PD-1信号轴,从而通过消除使用抗PD-1抗体的需要而改善CAR-T细胞的有效性和治疗安全性。CRISPR-Cas9核糖核蛋白的核转染破坏CAR-T细胞中的PD-1导致抗CAR-T19细胞在体外和小鼠皮下异种移植瘤模型中具有更好的肿

瘤控制作用,提高了CAR-T细胞活性^[40]。通过利用PD-L1/PD-1信号通路抑制CAR-T细胞功能或信号转导机制也在进行改进。此项技术在未来也可能为CAR-T治疗打开一扇新的大门。

2.2.5 优化T细胞提升其抗实体瘤的能力 通过增强T细胞的肿瘤杀伤能力以及在TME中的抵抗力,能够增强CAR-T细胞抗实体瘤的能力,主要通过改变膜受体表达如IL-12、CD40L、CX-CR2、PD-1和CD28嵌合受体等来实现^[41-43]。也可以通过改变CAR的结构,如抑制性CAR分子^[44],双靶位激活CAR分子^[45]以及提升scFv亲和力^[46]来改变CAR-T细胞的特异性,从而优化T细胞的抗肿瘤活性和安全性。目前通过优化T细胞的创新技术十分丰富,在许多方面也足够新颖,但实际临床效果仍有待进一步观察。

2.3 针对CAR-T治疗后易复发的策略

2.3.1 多靶位治疗 CAR-T细胞治疗后复发最常见的原因是由于CD19的缺失,导致靶标阴性细胞大量增殖,从而使得CAR-T治疗失效。除CD19外,B-ALL细胞的常见表面标志物包括CD20、CD22和CD123,同时靶向多个靶位可以提高治疗效果。解放军总医院的研究团队^[47]对患有晚期不可切除/转移性胆管癌患者采用鸡尾酒式细胞疗法,由连续输入的靶向EGFR和靶向CD133的两种CAR-T细胞组成。治疗过程中观察到与CAR-T细胞相关的急性毒副作用,立即进行了紧急医疗干预措施,如静脉注射糖皮质激素等。该研究虽然使CAR-T鸡尾酒免疫治疗有望应用于实体瘤的治疗方案,但是与治疗相关的毒性需要特别注意和进一步确证。目前,这种多靶位治疗手段在针对复发肿瘤的疗效上仍存在争议,仍处于早期阶段,具体的疗效和安全性需要后续临床试验的验证。

2.3.2 阻断免疫抑制分子 免疫抑制分子能够抑制CAR-T细胞在体内的杀伤功能,比较常见的是PD-L1和PD-1的结合大幅抑制了免疫治疗效果。目前有实验在探索关于抗PD-1单抗和CAR-T19的组合使用。一项针对14例复发/难治性B细胞淋巴瘤的儿童和青少年的研究^[48]结果显示,这些患者对CAR-T19均有短暂或完全无效的反应,在CAR-T细胞输注后又接受了PD-1抑制剂派姆单抗(pembrolimumab)治疗。在3例患者中,B细胞计数在用CAR-T19后恢复,随着PD-1的阻断,B细胞数量再次降低。这是CAR-T细胞功能恢复的一个迹象——3例均完全缓解。同时,在4例骨髓外转移的患者中,有2例CR,2例PR。另外,通过敲除PD-1基因也可以增强CAR-T细胞的功能。实验表明,PD-1缺陷的CAR-T19细胞在体外增强了CAR-T19细胞介导的肿瘤细胞杀伤并增强了体

内肿瘤异种移植物的清除^[49]。

2.3.3 其他 CAR-T细胞在体内的消耗也是导致肿瘤复发的重要原因,当糖皮质激素与其同时使用时,会加剧CAR-T细胞的消耗。因此,不得不考虑这类药物对CAR-T细胞的作用效果。适当减少应用激素可以减少CAR-T细胞的消耗,延长细胞在体内的存活时间,提高疗效^[15]。此外,CAR-T细胞的输注方案也至关重要。既要保证有足够的CAR-T细胞输入,发挥抗肿瘤疗效,又不宜输入过多,以免增加CRS或脱靶效应等毒副作用的发生风险。如何优化输注方案,也是临床上值得探索的重要问题。

3 结 语

尽管目前CAR-T细胞疗法不断取得突破,并有两个产品(Kymrial和Yescata)相继批准上市,但是其在技术上和临床应用上仍然存在着许多亟待解决的问题。面对诸多以CRS为代表的副作用以及实体瘤微环境中的免疫抑制等不利条件,细胞工程、特定位点基因组编辑和合成生物学的不断发展无疑将加强CAR-T细胞疗法对各种肿瘤治疗的安全性、可靠性和有效性。尽管目前CAR-T细胞疗法在临床应用普及上困难重重,但CAR-T细胞疗法正在快速成为许多不同类型肿瘤的有效治疗方式,给患者带来生的希望。

[参 考 文 献]

- [1] JOHNSON L A, JUNE C H. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer[J/OL]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 38-58[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5223234/>. DOI:10.1038/cr.2016.154.
- [2] DAI H R, WANG Y, LU X C, et al. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy[J]. *JNCI: J Nat Cancer Inst*, 2016, 108(7): djv439. DOI:10.1093/jnci/djv439.
- [3] NEELAPU S S, TUMMALA S, KEBRIAEI P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 47-62. DOI:10.1038/nrclinonc.2017.148.
- [4] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia[J/OL]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-1517[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267531/>. DOI: 10.1056 / NEJ-Moa1407222.
- [5] 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/OL]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862534/>. DOI:10.1038/mt.2010.24.
- [6] LAMERS C H, SLEIJFER S, VAN STEENBERGEN S, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity[J/OL]. *Mol Ther*, 2013, 21(4): 904-912[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5189272/>. DOI:10.1038/mt.2013.17.
- [7] LEE D W, KOCHENDERFER J N, 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [8] BUSQUE L, PATEL J P, FIGUEROA M E, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis[J/OL]. *Nat Genet*, 2012, 44(11): 1179-1181[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3483435/>. DOI: 10.1038/ng.2413.
- [9] KEBRIAEI P, SINGH H, HULS M H, et al. Phase I trials using sleeping beauty to generate CD19-specific CAR T cells[J/OL]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9): 3363-3376[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004935/>. DOI:10.1172/JCI86721.
- [10] HAMADA M, NISHIO N, OKUNO Y, et al. Integration mapping of piggybac-mediated CD19 chimeric antigen receptor T cells analyzed by novel tagmentation-assisted PCR[J/OL]. *EBioMedicine*, 2018, 34: 18-26[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116345/>. DOI:10.1016/j.ebiom.2018.07.008.
- [11] SAU S, ALSAAB H O, BHISE K, et al. Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment[J/OL]. *J Control Release*, 2018, 274: 24-34[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5847475/>. DOI: 10.1016 / j. jconrel.2018.01.028.
- [12] LI J, LI W W, HUANG K J, et al. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward[J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 22. DOI: 10.1186/s13045-018-0568-6.
- [13] TURTLE C J, HANAFI L A, 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. DOI:10.1172/jci85309.
- [14] KOCHENDERFER J N, DUDLEY M E, KASSIM S H, 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/OL]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6): 540-549[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4322257/>. DOI: 10.1200 / JCO. 2014. 56.2025.
- [15] WANG J S, HU Y X, HUANG H. Acute lymphoblastic leukemia relapse after CD19-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(6): 1347-1356. DOI: 10.1189 / jlb. 5RU0817-315R.
- [16] WEILAND J, PAL D, CASE M, et al. BCP-ALL blasts are not dependent on CD19 expression for leukaemic maintenance[J]. *Leukemia*, 2016, 30(9): 1920-1923. DOI:10.1038/leu.2016.64.
- [17] JACOBY E, NGUYEN S M, FOUNTAINE T J, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity[J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12320[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4974466/>. DOI:10.1038/ncomms12320.
- [18] BRAIG F, BRANDT A, GOEBELER M, et al. Resistance to anti-

- CD19/CD3 BiTE in acute lymphoblastic leukemia may be mediated by disrupted CD19 membrane trafficking[J]. *Blood*, 2017, 129(1): 100-104. DOI:10.1182/blood-2016-05-718395.
- [19] 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/OL]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3130-3144[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4966328/>. DOI:10.1172/JCI83092.
- [20] TURTLE C J, HANAFI L A, BERGER C, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(355): 355ra116[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045301/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf8621.
- [21] DHOLARIA B R, BACHMEIER C A, LOCKE F. Mechanisms and management of chimeric antigen receptor T-cell therapy-related toxicities[J]. *BioDrugs*, 2019, 33(1): 45-60. DOI:10.1007/s40259-018-0324-z.
- [22] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X Y, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra25[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684949/>. DOI:10.1126/scitranslmed.3008226.
- [23] LOCKE F L, NEELAPU S S, BARTLETT N L, et al. Phase 1 results of ZUMA-1: A multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma[J/OL]. *Mol Ther*, 2017, 25(1): 285-295[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5363293/>. DOI:10.1016/j.yimthe.2016.10.020.
- [24] GARDNER R A, FINNEY O, ANNESLEY C, et al. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults[J/OL]. *Blood*, 2017, 129(25): 3322-3331[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5482103/>. DOI:10.1182/blood-2017-02-769208.
- [25] WANG J S, HU Y X, HUANG H. Acute lymphoblastic leukemia relapse after CD19-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(6): 1347-1356. DOI: 10.1189 / jlb.5RU0817-315R.
- [26] HU Y X, WU Z, LUO Y, et al. Potent anti-leukemia activities of chimeric antigen receptor-modified T cells against CD19 in Chinese patients with relapsed / refractory acute lymphocytic leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3297-3306. DOI: 10.1158 / 1078-0432.ccr-16-1799.
- [27] FREY N, PORTER D. Cytokine release syndrome with chimeric antigen receptor T cell therapy[J/OL]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(4): e123-e127[2019-03-22]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10838791>. DOI:10.1016/j.bbmt.2018.12.756.
- [28] LIU Y F, CHEN X F, WANG D, et al. Hemofiltration successfully eliminates severe cytokine release syndrome following CD19 CAR-T-cell therapy[J/OL]. *J Immunother*, 2018, 41(9): 406-410[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6200371/>. DOI:10.1097/CJI.0000000000000243.
- [29] XIAO X, HE X Y, LI Q, et al. Plasma exchange can be an alternative therapeutic modality for severe cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor-T cell infusion: A case report[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(1): 29-34. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-1379.
- [30] SPRINGER C J, NICULESCU-DUVAZ I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy[J/OL]. *J Clin Invest*, 2000, 105(9): 1161-1167[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC315452/>. DOI:10.1172/JCI10001.
- [31] TRAVERSARI C, MARKTEL S, MAGNANI Z, et al. The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies[J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4708-4715. DOI:10.1182/blood-2006-04-015230.
- [32] TIRABY M, CAZAUX C, BARON M, et al. Concomitant expression of E. coli cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 167(1): 41-49. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13205.x.
- [33] MOOLTEN F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(10): 5276-5281.
- [34] JONES B S, LAMB L S, GOLDMAN F, et al. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 254[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245885/>. DOI:10.3389/fphar.2014.00254.
- [35] TIRABY M, CAZAUX C, BARON M, et al. Concomitant expression of E. coli cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 167(1): 41-49. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13205.x.
- [36] ZHANG R Y, ZHANG Z, LIU Z K, et al. Adoptive cell transfer therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Med*, 2019, 13(1): 3-11. DOI:10.1007/s11684-019-0684-x.
- [37] 魏建树, 韩为东. CAR-T细胞治疗实体肿瘤:且行且思考[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(9): 847 - 853. DOI: 10.3872 / j.issn.1007-385X.2018.09.001.
- [38] SCHNEIDER D, XIONG Y, WU D R, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5: 42[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433150/>. DOI:10.1186/s40425-017-0246-1.
- [39] VINCE J E, WONG W W, KHAN N, et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis[J]. *Cell*, 2007, 131(4): 682-693. DOI:10.1016/j.cell.2007.10.037.
- [40] MORGAN M A, SCHAMBACH A. Chimeric antigen receptor T cells: extending translation from liquid to solid tumors[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(10): 1083-1097. DOI:10.1089/hum.2017.251.
- [41] 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.
- [42] CURRAN K J, SEINSTRAL B A, NIKHAMIN Y, et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression[J/OL]. *Mol Ther*, 2015, 23(4): 769-778 [2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4395796/>. DOI:10.1038/mt.2015.4.
- [43] 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.
- [44] FEDOROV V D, THEMELI M, SADELAIN M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(215): 215ra172[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238416/>. DOI:10.1126/scitranslmed.3006597.
- [45] KLOSS C C, CONDOMINES M, CARTELLIERI M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 71-75[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5505184/>. DOI:10.1038/nbt.2459.
- [46] LIU X J, JIANG S G, FANG C Y, et al. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice[J/OL]. *Cancer Res*, 2015, 75(17): 3596-3607[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4560113/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-0159.
- [47] 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/OL]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 4[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5217546/>. DOI:10.1186/s13045-016-0378-7.
- [48] ELIE D. Augmenting CAR T cells with PD-1 blockade[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 158. DOI:10.1158/2159-8290.CD-NB2018-165.
- [49] RUPP L J, SCHUMANN K, ROYBAL K T, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 737[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428439/>. DOI:10.1038/s41598-017-00462-8.

[收稿日期] 2019-03-23

[修回日期] 2019-05-12

[本文编辑] 党瑞山