

表达嵌合抗原受体修饰T细胞治疗血液系统恶性肿瘤的最新研究与进展

· 综述 ·

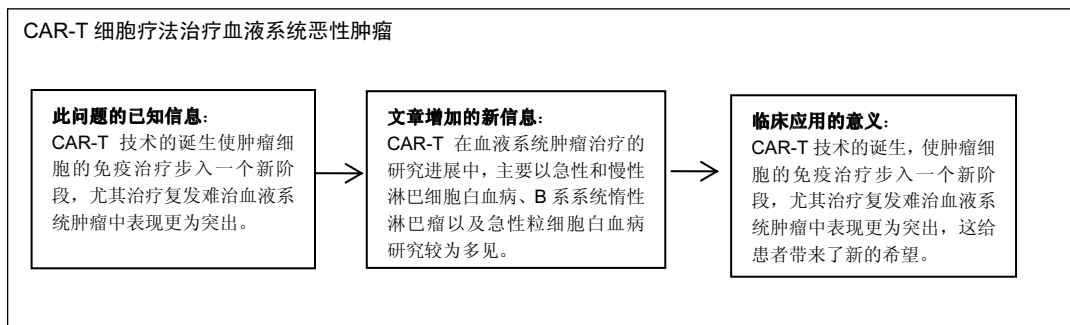
侯萍, 李剑平(辽宁省血液中心, 输血医学研究所, 辽宁省沈阳市 110044)

引用本文: 侯萍, 李剑平. 表达嵌合抗原受体修饰 T 细胞治疗血液系统恶性肿瘤的最新研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(21):3438-3444.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.21.026

ORCID: 0000-0002-8643-3282(侯萍)

文章快速阅读:



侯萍, 女, 1977 年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 硕士, 副主任医师, 主要从事干细胞研究。

通讯作者: 李剑平, 主任医师, 辽宁省血液中心, 输血医学研究所, 辽宁省沈阳市 110044

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)21-03438-07

稿件接受: 2017-02-17

文题释义:

CAR-T 细胞疗法: 1989 年, Gross 等首次提出构建特异性嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR), CAR-T 即为表达嵌合抗原受体修饰的 T 细胞。CAR-T 细胞疗法通过抗原抗体结合的原理特异性识别肿瘤细胞表面的抗原, 进而杀灭肿瘤的方法。

CAR-T 细胞抗肿瘤的作用原理: 主要为: ①通过 MHC 下调抵抗免疫逃逸; ②产生白细胞介素 6、细胞介素 10 等细胞因子, 间接影响肿瘤细胞的生长; ③改变肿瘤微环境状态, 抑制肿瘤的生长。

摘要

背景: 近几年来, 表达嵌合抗原受体修饰的 T 细胞(CAR-T 细胞)疗法在血液系统恶性肿瘤的治疗中取得了很好的疗效。

目的: 综述 CAR-T 技术的概况、抗肿瘤机制、在血液系统恶性肿瘤治疗中的进展及其安全性和应对策略。

方法: 应用计算机检索 2010 年 1 月至 2016 年 1 月 PubMed 数据库、中国期刊全文数据库、万方数据库中有关 CAR-T 的文章, 中文检索词为“嵌合抗原受体”, 英文检索词为“CAR-T”。

结果与结论: CAR-T 细胞抗肿瘤的作用原理主要为: ①通过 MHC 下调抵抗免疫逃逸; ②产生白细胞介素 6、白细胞介素 10 等细胞因子间接影响肿瘤细胞的生长; ③肿瘤微环境状态的改变抑制肿瘤的生长。CAR-T 近几年在治疗血液系统肿瘤方面取得了突飞猛进的发展。目前针对 B 细胞淋巴瘤的研究多为抗 CD19 CAR-T 细胞, 对急性粒细胞白血病和急性淋巴细胞白血病临床方面 CAR-T 均具有一定疗效, 但其安全性和有效性都尚待研究。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 血液系统恶性肿瘤; CAR-T; 抗肿瘤; 免疫治疗; 综述

主题词:

干细胞; 肿瘤, 继发原发性; 组织工程

缩略语:

特异性嵌合抗原受体: chimeric antigen receptor, CAR

Latest progress of chimeric antigen receptor modified T cells in the treatment of hematological malignancies

Hou Ping, Li Jian-ping (Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In recent years, the use of chimeric antigen receptor modified T cells (CAR-T cells) has achieved good results in the treatment of hematological malignancies.

OBJECTIVE: To summarize the CAR-T technology, and its anti-tumor mechanism, progress in the treatment of hematological malignancies as well as its safety and coping strategies.

METHODS: A search of PubMed, CNKI, Wanfang by computer was performed for articles related to CAR-T published from January 2010 to January 2016, using the keywords of “CAR-T” in English and Chinese, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The main principles that CAR-T cells fight against tumors are as follows: (1) resistance to immune escape through down-regulation of MHC; (2) production of interleukin-6, -10 indirectly

Hou Ping, Master, Associate chief physician, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China

Corresponding author:
Li Jian-ping, Chief physician, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China

influences the growth of tumor cells; and (3) tumor microenvironment changes inhibit tumor growth. The use of CAR-T in the treatment of hematological malignancies has been developed by leaps and bounds in recent years. Current studies concerning B cell lymphoma mainly focus on anti-CD19 CAR-T cells that have certain therapeutic effects on acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. However, its safety and effectiveness have yet to be studied.

Subject headings: Stem Cells; Neoplasms, Second Primary; Tissue Engineering

Cite this article: Hou P, Li JP. Latest progress of chimeric antigen receptor modified T cells in the treatment of hematological malignancies. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(21):3438-3444.

0 引言 Introduction

1989年, Gross等^[1]首次提出构建特异性嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR), CAR-T即为表达嵌合抗原受体修饰的T细胞。CAR-T细胞疗法通过抗原抗体结合的原理特异性识别肿瘤细胞表面的抗原,进而杀灭肿瘤的方法^[2]。随着肿瘤免疫学理论和技术的发展,近年来过继细胞免疫治疗取得了长足进步,其中以CAR-T细胞为代表的肿瘤靶向免疫治疗成就尤为突出,在体外和临床试验中均表现出良好的靶向性、杀伤性和持久性,展示了巨大的应用潜力和发展前景。CAR-T细胞治疗的优点主要包括以下几个方面:表达CAR的T细胞以抗原依赖、非主要组织相容性复合体(MHC)限制的方式识别、结合肿瘤抗原,启动并活化特异性的杀伤肿瘤效应。随着基因工程技术的不断进步,目前CAR-T细胞已发展到了4代。CAR-T在血液系统肿瘤治疗的研究进展中,要以急性和慢性淋巴细胞白血病淋巴瘤及急性髓系白血病研究较为多见。其中以靶向CD19分子的嵌合体抗原受体基因修饰的T细胞(CD19-CAR-T)在治疗复发性、难治性的急性淋巴细胞白血病上获得了巨大成功,美国宾夕法尼亚大学的研究小组的临床试验结果显示,90%的难治性、复发性急性淋巴细胞白血病患者获得完全缓解^[3]。CD19-CAR-T在难治性、复发性的慢性淋巴细胞白血病的临床治疗中也显示出光明的前景。近几年来,该技术B细胞恶性肿瘤中取得良好效果^[4-6], CD19分子是治疗B系肿瘤很有潜力的靶点,也是CAR研究中的热点,原因在于大部分B细胞恶性肿瘤细胞表面都表达CD19分子,而正常细胞表面表达CD19分子的细胞只限于B细胞和滤泡性树突状细胞,更重要的是多能造血干细胞表面不表达CD19分子^[7];在急性髓系白血病的研究中,CD33、CD123、LeY寡糖抗原及叶酸受体 β 研究较多,取得了一定成绩^[8-11]。但是,其他肿瘤缺乏特异性抗原,增加了治疗风险,存在由细胞因子释放综合征、脱靶效应及插入性突变等引起不良反应的报道,因此,文章就CAR-T技术的概况、抗肿瘤机制及在血液系统恶性肿瘤治疗中的进展,以及其安全性和应对策略等方面进行综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 应用计算机检索2010年1月至2016年1月PubMed数据库、中国期刊全文数据库、万方数据库

中有关CAR-T的文章,中文检索词为“嵌合抗原受体”,英文检索词为“CAR-T”。共检索156篇文章,最终纳入符合标准的49篇文献。

1.2 纳入与排除标准 对资料进行初审,选取符合要求的文章查找全文,纳入嵌合抗原受体、免疫细胞、T细胞相关研究,排除重复研究。

1.3 数据提取 共检索到156篇有关嵌合抗原受体的相关文章,其中中文文献52篇,英文文献104篇,排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献107篇,纳入符合标准的文献49篇。

2 结果 Results

CAR-T技术的诞生使肿瘤细胞的免疫治疗步入一个新阶段,尤其治疗复发难治血液系统肿瘤中表现更为突出,这给患者带来了新的希望。但仍有许多问题尚待进一步的解决,比如安全性问题等,相信随着该技术的不断改进及更多学者的进一步研究分析,这些问题最终都能够得到解决。

2.1 CAR-T技术概况

2.1.1 结构 CAR由胞外抗原结合域(scFv)、胞内信号传导结构域和跨膜结构域3部分组成。CAR-T细胞是将能识别肿瘤相关抗原的抗体的抗原结合部和胞内信号域“免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based active-tion motifs, 1TAM,通常为CD3- ζ 或FceRI γ)”的胞内部分在体外偶联为一个嵌合蛋白,通过基因转导的方法转染患者T细胞,使其表达CAR, CAR-T细胞具有识别攻击表达相应细胞表面肿瘤相关抗原的肿瘤细胞能力。胞外抗原结合域具有抗体单链可变片段(scFv), scFv由轻链、重链和铰链区共同组成,能特异性识别肿瘤表面抗原。目前研究人员已经设计了针对胞外抗原结合域的识别抗原,包括CD20、神经节苷脂、表皮生长因子受体及前列腺癌特异性膜抗原等。该区域的结构使CAR-T识别肿瘤抗原具有如下特点,即高亲和力和非MHC限制性。他不仅能识别肽类抗原,也能识别糖类及其糖脂类抗原。因此CAR-T具有更广谱的肿瘤抗原识别性。

胞内信号传导结构域负责信号的转导。T细胞的完全活化需要双信号途径。第一信号为特异性信号,由T细胞受体识别抗原提呈细胞表面的抗原肽-MHC复合物所启动;第二信号为共刺激信号,通过CD28/B7等重要

的共刺激分子, 促进抗白细胞介素2合成, 使T细胞充分活化并免于凋亡。因此, 根据CAR-T细胞的胞内信号区的结构不同将其分为4代。跨膜结构域负责连接胞外抗原结合域和胞内信号传导结构域。跨膜结构域的设计也对细胞表达CAR起到至关重要的作用, 一般由同源或者异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白, 通过CAR二聚化及与内源性TCR相互作用产生的信号刺激T细胞的激活。Kochendetier等^[12]研究证实含有CD28的跨膜结构域表达CAR能力最强, 而含有CD3- ζ 的跨膜区表达能力最弱。

2.1.2 研究历程 根据胞内区结构的改变将CAR-T细胞分为4代。第1代CAR只含有1个信号单元, 即将T细胞受体(TCR)的 ζ 链直接与scFv结合, 这种方式修饰的T细胞只产生短暂的分裂和增殖, 不能转导增殖信号和诱导细胞因子产生, 不能提供体内长时间持续的抗肿瘤效应, 不能诱导产生细胞因子, 有学者采用特异性鼠CE7杂交瘤的L1细胞黏附分子与CD3 ζ 结合, 对儿童复发性神经母细胞瘤进行治疗, 采用不同的输注剂量, 1周内只有60%的患者能检测到CAR-T细胞, 而且5例患者中只有1例患者治疗有效, 该结果提示第一代CAR-T细胞中体内存活时间短, 治疗效果不明显, 同时存活时间与剂量无关, 因此经多个试验证实第1代CAR-T在临床上治疗肿瘤的应用有极大限制。依照T细胞活化的双信号模型, 第3代CAR的研究更多关注的是引入了协同共刺激分子的胞内结构域, 研究表明, 含有CD28分子与CD3- ζ 的CAR显著增加了T细胞的扩增倍数和抗肿瘤特性, 除了CD28分子外, 大量研究证明CD137、CD134等胞内结构域均可以为CAR-T提供协同刺激信号, 提高T细胞的细胞毒活性、增殖活力与存活时间, 促进细胞因子的释放。

目前, 美国国立癌症研究所NCI和宾夕法尼亚大学也先后报道应用第2代CAR-T细胞对CD19⁺B细胞肿瘤的治疗具有良好的治疗效果。有学者也报道应用第2代CAR-T细胞治疗滤泡性淋巴瘤患者, CAR-T细胞组成的双鼠特异性抗人CD19与共刺激信号结构域CD28, 具有较好的疗效。第3代CAR是在第2代的基础上又增加了1个共刺激分子, 即结合两种协同共刺激分子结构域, 最常见的是CD28和CD137、CD27、CD134、可诱导共刺激分子等较为常用, Till等构建第3代CAR-T细胞(CD20 scFv-CD2-CD137-CD3 ζ)治疗非霍奇金淋巴瘤, 利用反转录病毒作为载体, 1年后应用PCR技术对患者进行检测, 仍能检测到效应细胞, 其中3例患者中, 2例达到完全缓解, 1例部分缓解, 其中1例28岁难治性滤泡性淋巴瘤患者注射CAR-T细胞后, 颈部淋巴结在一二周内迅速减小了3 cm。有研究表明, 两种CM结构域形成的第3代CAR更好地增强T细胞活化增殖、促进转基因表达以及抗肿瘤的能力^[13-15]。

尽管如此, 第3代CAR技术用于临床仍然存在一定的风险, 据报道, 1例合并肝和肺转移的结肠癌患者在该代CAR-T治疗后死亡, 因此第3代CAR用于临床也存在一定问题。目前3代CAR-T细胞的研究不如2代成熟, 也不能确定其有效性和安全性是否优于第2代, 因此如何选择共刺激分子尚有待进一步研究。近期, 第4代CAR诞生了, 它在第3代CAR的基础上, 新增加了编码CAR和CAR启动子的载体, CAR产生了更有效的信号, 同时, 在白细胞介素12等细胞因子带动下, 也使第4代CAR抗肿瘤免疫效应更为放大^[16]。综上, 目前临床应用较为广泛而安全的是第2代CAR-T。

2.1.3 抗肿瘤机制 T细胞是人体内特异性抗肿瘤的效应细胞, 并具有MHC限制性。肿瘤细胞表面MHC表达下调, 导致免疫逃逸发生, CAR-T细胞与特异性肿瘤抗原结合后, 可引起MHC非限制性活化^[17-19], 其发挥的抗肿瘤效应不受免疫逃逸的影响。CAR-T细胞可产生穿孔素、颗粒酶等直接介导肿瘤细胞溶解, 同时分泌干扰素 γ 、白细胞介素6等细胞因子, 间接影响肿瘤细胞的生长。另外研究发现CAR-T细胞可促进局部细胞的增殖, 外周血单核细胞分化为肿瘤相关巨噬细胞, 上调表达干扰素 γ 等细胞因子, 改变肿瘤微环境的免疫状态, 使肿瘤微环境从免疫抑制变为免疫激活, 从而对肿瘤生长产生不利影响^[20]。综上, CAR-T细胞抗肿瘤的作用原理主要为: ①通过MHC下调抵抗免疫逃逸; ②产生白细胞介素6、白细胞介素10等细胞因子, 间接影响肿瘤细胞的生长; ③改变肿瘤微环境状态, 抑制肿瘤的生长。

2.2 治疗血液系统恶性肿瘤的研究进展 血液系统恶性肿瘤的传统治疗是以化疗为主, 放疗为辅, 治疗的不良反应较重, 死亡风险较高。CAR-T治疗血液系统肿瘤在近几年取得了突飞猛进的发展。

2.2.1 CAR-T细胞治疗急性和慢性淋巴细胞白血病的进展 目前急性淋巴细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病的治疗仍存在许多困难。尽管化疗可使多数的急性淋巴细胞白血病达到临床缓解, 但化疗药物毒性大, 特异性差, 对机体损害极大。而对于慢性淋巴细胞白血病来说, 化疗往往难以取得明显效果。2011年来自MSKCC的Michel Sadelain研究组在一项应用CAR-T转染的自体T淋巴细胞治疗难治性淋巴细胞白血病的临床试验中, 报道了首例应用该技术治疗B细胞急性淋巴细胞白血病的案例, 治疗8周后该患者顺利进行了异基因外周血造血干细胞移植, 该案例初步证实CAR-T技术在临床应用中的安全性。随后该研究组又报道了应用相同结构的CD19 CAR-T治疗5例难治、复发的成年B细胞急性淋巴细胞白血病患者, 经治疗后, 该5例患者均获得骨髓细胞形态学完全缓解, 随后其中4例患者又接受了异基因外周血造血干细胞移植, 4例中有3例患者获得持续缓解。2013年ASH会上就有多篇报道关于CAR-T治疗

急性淋巴细胞白血病, 诺华公司利用CAR-T治疗了20例难治型急性淋巴细胞白血病, 治愈率达到82%, 出现的不良反应主要是细胞因子释放综合征, 通过应用白细胞介素6可有效治疗细胞因子释放综合征, 另有研究证实, CAR-T细胞清除了1例发生中枢神经系统转移急性淋巴细胞白血病患者脑脊液中的白血病细胞^[21-23]。另外有学者报道了5例难治的成人急性淋巴细胞白血病患者, 接受抗CD19 CAR-T细胞治疗后病情获得了完全缓解^[24]。尽管这些患者最终预后可能不同, 但却为临床研究提供了宝贵经验。首先CAR-T可能成为复发难治患者与移植之间的桥梁; 而CAR-T治疗发生的较严重的不良反应主要是细胞因子释放综合征, 而大量细胞因子的释放也可通过应用抗细胞因子治疗^[25-27]。CAR-T细胞在慢性淋巴细胞白血病较急性淋巴细胞白血病体内维持时间短, 原因可能是慢性淋巴细胞白血病患者肿瘤抑制微环境作用较强^[28]。以靶向CD19分子的嵌合体抗原受体基因修饰的T细胞(CD19-CAR-T)在治疗复发性、难治性的急性淋巴细胞白血病患者上获得了巨大成功, 另外, 90%的难治性、复发性急性淋巴细胞白血病患者获得完全缓解, CD19-CAR-T在难治性、复发性的慢性淋巴细胞白血病的临床治疗中也显示出光明的前景。

2.2.2 CAR-T细胞治疗B细胞淋巴瘤的研究进展 抗CD20单克隆抗体(如美罗华)可有效治疗B细胞非霍奇金淋巴瘤, 并且已成为临床一线用药。CAR-T19细胞疗法对于B细胞恶性肿瘤来说是一个重大突破, 并与“免疫监测点阻断抗体疗法”一起被Science评为“2013年度十大科学突破之首”^[29-31]。目前已有的临床数据显示, CART-19细胞的免疫治疗较单克隆抗体疗效更好, 而不良反应比自体造血干细胞移植治疗要小^[32-35]。目前, 对于CAR-T细胞的研究已扩大至实体瘤, 但实体瘤因肿瘤细胞异质性、肿瘤间质等诸多问题, 为CAR-T细胞治疗带来新的挑战。针对实体瘤的特殊性, 研究者又构建了新的CAR-T细胞结构, 如针对实体瘤微环境和肿瘤异质性, 使用了诱导表达白细胞介素12的CAR-T细胞, CAR-T细胞与肿瘤细胞接触并激活抗肿瘤活性时, 会在肿瘤部位同时释放白细胞介素12来调节肿瘤间质, 吸引自然杀伤细胞、巨噬细胞等先天免疫细胞到达肿瘤细胞部位发挥免疫清除作用, 同时使未被识别的肿瘤细胞再次被CAR-T细胞靶向识别, 在该过程中, 如果没有CAR-T细胞信号也就没有白细胞介素12的释放; 针对在血液系统中出现的脱靶效应, 设计了split CAR及针对抗原阴性逃逸问题设计的双特异性串联CAR(TanCAR)等以上类型, 都是近期针对实体瘤的特性进行研究的CAR-T细胞的新进展, 而临床疗效有待于后期进一步观察^[36]。

由于多数B细胞淋巴瘤表达CD19, 目前针对B细胞淋巴瘤的研究多为抗CD19 CAR-T细胞。2010年美国国立癌症研究所(NCI)的Kochenderler等^[10]首次报道了抗

CD19 CAR-T细胞成功治疗复发难治滤泡淋巴瘤的病例, 此后关于CAR-T细胞在淋巴瘤中的研究逐渐增多。有研究报道了更大样本量的研究结果, 8例复发难治B细胞淋巴瘤患者接受CAR-T细胞治疗, 结果显示8例患者中6例有效, 最常见的不良反应包括低血压、发热、乏力、肾衰竭^[37]。不良反应严重程度与血清细胞因子升高水平相关。由于CD19除了表达于B肿瘤细胞表面以外, 还表达于成熟B细胞、前体B细胞及浆细胞。故CAR-T细胞会杀伤正常B细胞及浆细胞, 导致低免疫球蛋白血症, 这些患者需补充免疫球蛋白缓解不良反应。

2.2.3 CAR-T细胞治疗急性髓系白血病的研究进展 急性白血病是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病, 因白血病细胞自我更新增强、增殖失控、分化障碍、凋亡受阻, 在成人急性白血病患者当中, 急性粒细胞白血病是最常见的、死亡率最高的一类白血病。目前60岁及60岁以下急性粒细胞白血病患者治愈率为35%-40%, 而60岁以上老年急性粒细胞白血病患者治愈率仅5%-15%。有学者认为CD33有望成为CAR-T细胞治疗急性粒细胞白血病的靶点, 原因在于CD33主要表达于血液系统的髓系祖细胞、各髓系集落形成单位、单核细胞、成熟粒细胞、树突细胞^[38-40]。85%-98%的急性粒细胞白血病细胞表达CD33分子, 而且急性粒细胞白血病细胞表达CD33分子的密度显著高于CD33⁺的正常细胞。

迄今, 已有多个机构对CD33 CAR进行了研究。美国Abramson癌症中心在体内外实验证实, 基于吉妥单抗的抗CD33 CAR-T细胞可清除原代急性粒细胞白血病细胞和骨髓增生异常综合征原始细胞, 但同时也证实了该细胞疗法对正常髓系造血干祖细胞、单核细胞的毒性。最近, 解放军总医院对1例难治急性粒细胞白血病患者进行了自体CAR-T细胞输注的临床试验, 患者在输注2周后骨髓内急性粒细胞白血病细胞由50%下降至6%, 但在第5周则出现复发后死亡, 同时治疗期间患者出现了轻度细胞因子释放综合征和胆红素升高。这些结果提示患者对自体抗CD33 CAR-T细胞输注是有一定的疗效的, 但其安全性还有待进一步研究。

CD123是一种包含360个氨基酸的糖蛋白, 它也是白细胞介素3受体 α 链, 与白细胞介素3受体 β 链(CD131)一起构成高亲和力的白细胞介素3受体。CD131是白细胞介素3受体、白细胞介素5受体的共同 β 链, 而CD123则仅存在于白细胞介素3受体, 并表达于造血干/祖细胞、巨核细胞、单核细胞、B淋巴细胞和浆细胞样树突状细胞上。白细胞介素3R特异性识别并结合白细胞介素3后, 能促进细胞的生长和增殖, 与肿瘤、过敏性炎症、自身免疫性疾病的发生有关。有研究已证实, CD123同样高表达于75%-89%急性粒细胞白血病患者白血病的细胞

和白血病干细胞上^[41]。CD123在急性粒细胞白血病中的表达与信号转导与转录激活因子5密切相关。急性粒细胞白血病患者白血病细胞能自发磷酸化激活信号转导与转录激活因子5,使细胞增殖分化并抵抗凋亡,因此,高表达CD123是急性粒细胞白血病预后不良因素之一。尽管CAR-T细胞是目前的研究热点,但关于CD123 CAR-T的研究才刚刚起步。目前CD123 CAR-T细胞的制备仍在努力探索中,重点研究方向为使用的scFv类型、制备的T细胞亚群比例及制备相关技术等。有研究人员也在细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞上加上了1代CD123 CAR,即一代CD123 CAR CIK细胞,证实了CD123 CAR-T的抗白血病效应及靶向性。他们还测试了3代CD123-28 OX40 CAR CIK细胞,即添加了共刺激分子CD28和OX40,同样展示出了更强的抗白血病效应,且共培养后对脐血细胞及人或动物的造血干祖细胞仅有很弱的杀伤作用^[42]。然而,目前尚无CD123 CAR-T成功治疗叶酸受体 β 患者的报道原因可能在于:最佳的CAR设计尚不清楚;CAR-T细胞的制备技术尚不成熟;CAR-T细胞在体内的存在时间尚无法合理控制;无法有效克服肿瘤微环境的抑制作用。鉴于CD123在急性粒细胞白血病白血病干细胞和正常造血细胞上的表达差异,它已成为特别受关注的一个特殊的肿瘤抗原靶点。另外,一些临床试验证明CAR-T细胞可能根治急性粒细胞白血病,LeY寡糖抗原是最早作为CAR治疗急性粒细胞白血病的靶点,患者在临床治疗后病情得到部分缓解,同时未出现明显毒性。CD33、CD123也曾被选作治疗急性粒细胞白血病的靶点。但CD33引起较强的骨髓抑制效应,CD123 CAR-T细胞与CIK相比降低了抗白血病效应,增强了造血干细胞的毒性。因此,CD33、CD123这两个靶点产生脱靶效应和毒性的风险较大,需采取一些措施预防和控制不良反应的发生^[43]。叶酸受体 β 属于叶酸连接蛋白受体,通过糖基磷脂酰肌醇锚链在髓系造血细胞膜表面,在正常造血细胞几乎不表达,而大部分急性粒细胞白血病细胞表达叶酸受体 β ,学者构建了抗叶酸受体 β CAR,通过体外实验、急性粒细胞白血病细胞系及原代急性粒细胞白血病构建的动物模型均证实其具有良好的杀伤急性粒细胞白血病效应,而对造血干细胞没有损伤。表明叶酸受体 β 是个有前景的治疗靶点,有待临床试验进一步揭示其抗急性粒细胞白血病疗效^[44]。

2.3 安全性和应对策略 目前的基础实验和临床应用研究表明,CAR-T细胞输注具有较好的安全性,大部分患者能够耐受,但CAR-T细胞治疗仍存在一定的安全隐患。

2.3.1 细胞因子释放综合征 细胞因子释放综合征是CAR-T细胞治疗较为常见和引起致死性的严重不良反应之一,其发生机制为患者输注CAR-T细胞后,淋巴细胞、单核/巨噬细胞及自然杀伤细胞释放的大量炎症递

质,引起的炎症反应导致组织损伤,从而出现微血管渗漏、心脏衰竭甚至死亡。因此对肿瘤患者进行CAR-T细胞治疗过程中,控制细胞因子释放综合征是非常必要的。应对策略:可根据CAR结构、肿瘤类型及患者情况设计较为安全的CAR-T细胞,同时严格控制输注的CAR-T细胞数量,降低细胞因子释放综合征发生率,另外可通过应用细胞因子拮抗剂和糖皮质激素来降低细胞因子释放综合征引起的死亡率^[45]。iCasp9基因是目前学者研究认为最快诱导细胞凋亡的自杀基因(一般1 h内),前体药物是小分子二聚体API903,该药物可连接两个iCasp9形成活性酶。有报道4例儿童接受iCasp9-CAR-T细胞治疗后,发生了移植物抗宿主病,及时给予API903药物后,成功激活iCasp9,诱导CAR-T细胞凋亡。该结果表明iCasp9或许可用于控制细胞因子释放综合征。另外有研究表明,体外实验将iCasp9导入CAR-T细胞,激活iCasp9就可迅速诱导CAR-T细胞凋亡。但API903尚属于实验阶段,具体安全性还有待进一步研究^[46]。

2.3.2 脱靶效应 脱靶效应为针对肿瘤抗原的细胞与正常组织表达的肿瘤抗原结合产生的对正常组织的毒性反应,CAR-T细胞正是此类细胞,它对肿瘤相关抗原具有高度亲和力,当其与正常组织表达的肿瘤相关抗原结合后就会对正常组织产生毒性。应对策略:可通过应用抗体封闭正常组织上的肿瘤相关抗原、降低每次静脉滴注的CAR-T细胞量、引入自杀基因系统来预防和治疗这种毒性。

2.3.3 肿瘤溶解综合征 输注的CAR-T细胞在患者体内快速增殖,发生肿瘤细胞大量死亡及大量细胞因子释放,导致肿瘤溶解综合征的发生。早期的临床研究发现,输注CAR-T细胞前几周内给予及时准确的处理可控制肿瘤溶解综合征的出现^[35]。应对策略:①设计更安全有效的第4代CAR;②选择最佳CAR信号组合;③导入凋亡基因等调控CAR基因表达;④控制输注CAR-T细胞数量。

2.3.4 插入突变 CAR技术将外源性基因人为整合到T细胞内,这就可能发生基因突变引起继发肿瘤。尽管目前各实验研究及临床应用等病例没有相关报道,但长期风险还没有相关数据证实。目前的应对策略:可采用mRNA直接转导T细胞的办法以避免插入突变的发生^[47]。目前,慢病毒和r-反转录病毒转导效率高且已被证实不会致癌,相对安全,但未见二者转导后的表达水平及培养后生物学活性的相关研究。因此,选择合适的载体也能减小插入突变的发生^[48-49]。

3 存在的问题和前景 Existing problems and prospects

总之,CAR-T技术在复发、难治血液系统肿瘤中的抗肿瘤效应得到了众多学者研究结果的支持,这给患者

带来了希望。但仍有许多问题尚待进一步的解决, 比如输注的T细胞在患者体内很快就会失去功能, 细胞回输的不良反应及该技术长期安全性问题均有待进一步研究, 能否通过构建针对肿瘤细胞和肿瘤基质细胞均相关的CAR-T细胞提高抗肿瘤活性, 能否设计更为安全有效的第4代CAR等都是学者关注的重点。相信随着该技术的不断改进及更多学者的进一步研究, 这些问题最终都能够得到解决, CAR-T细胞必将成为治疗各种肿瘤既安全又有效的方法之一。

作者贡献: 文章资料收集、成文由第一作者完成, 审校者为通讯作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86(24):10024-10028.
- 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. Sci Transl Med. 2011; 3:95ra73.
- Pulè 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. Mol Ther. 2005; 12(5): 933-941.
- 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. Blood. 2012; 9(17):3940-3950.
- Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. Blood. 2012; 119(18): 4133-4141.
- Rushworth D, Jena B, Olivares S, et al. Universal artificial antigen presenting cells to selectively propagate T cells expressing chimeric antigen receptor independent of specificity. J Immunother. 2014; 37(4):204-213.
- 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. Immunol Rev. 2014; 257(1):83-90.
- 陈青, 白定群. 光化学转染对肿瘤治疗的研究进展[J]. 世界复合医学, 2015, 1(2):162-167.
- Spear P, Barber A, Rynda Apple A, et al. Chimeric antigen receptor T cells shape myeloid cell function within the tumor microenvironment through IFN- γ and GM-CSF. J Immunol. 2012; 188(12):6389-6398.
- 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 Clin Oncol. 2015; 33(6):540.
- Cartellieri M, Koristka S, Arndt C, et al. A novel ex vivo isolation and expansion procedure for chimeric antigen receptor engrafted human T cells. PLoS One. 2014; 9(4):e93745.
- 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. Blood. 2010; 116(20):4099-4102.
- Beatty GL, Haas AR, Maus MV, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. Cancer Immunol Res. 2014; 2(2):112-120.
- 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. Blood. 2012; 119:2709-2720.
- Porter DL, Kalos M, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells directed against CD19 (CTL019 cells) have long-term persistence and induce durable responses in relapsed, refractory CLL. Blood. 2014; 122(21):4162.
- Grupp SA, Frey NV, Aplenc R, et al. T cells engineered with chimeric antigen receptor (CAR) targeting CD19 (CTL019) produce significant in vivo proliferation, complete responses and long-term persistence without gvhd in children and adults with relapsed, refractory ALL (abstracts). Blood. 2013; 122:67.
- 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. Lancet. 2015; 385(9967): 517-528.
- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013; 5:177ra38.
- Grupp SA. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2013; 368(16): 1509-1518.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Effective treatment of chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma with autologous T cells genetically engineered to express an anti-CD19 chimeric antigen receptor. ASH. 2013; 122(7):168-168.
- Zhong XS. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3 kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. Mol Ther. 2010; 18(2):413-420.

- [22] Zhou X, Di Stasi A, Tey SK, et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood*. 2014;123(25):3895-3905.
- [23] 何红晨, 徐月萌, 熊恩富, 等. 浅谈国际康复医学发展及启示[J]. *世界复合医学*, 2015, 1(2): 130-133.
- [24] Giordano Attianese GM. In vitro and in vivo model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor. *Blood*. 2011;117(18):4736-4745.
- [25] Hudecek M. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010;116(22): 4532-4541.
- [26] Pegram HJ. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012;119(18):4133-4141.
- [27] Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*. 2010;363(7):689-691.
- [28] Xu XJ, Tang YM. Cytokine release syndrome in cancer immune-therapy with chimeric antigen receptor engineered T cells. *Cancer Lett*. 2014;343(2):172-178.
- [29] 李伟, 于慧杰, 江其生. 嵌合抗原受体修饰的T细胞免疫治疗研究进展[J]. *肿瘤研究与临床*, 2015, 27(2):139-141.
- [30] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3360-3365.
- [31] Tettamanti S, Marin V, Pizzaitola I, et al. Targeting of acute myeloid leukemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol*. 2013;161(3):389-401.
- [32] Lynn RC, Poussin M, Kalota A, et al. Targeting of folate receptor on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood*. 2015;125(22): 3466-3476.
- [33] Kanagawa N, Yanagawa T, Nakagawa T, et al. Tumor vessel-injuring ability improves antitumor effect of cytotoxic T lymphocytes in adoptive immunotherapy. *Cancer Gene*. 2013;20(1):57-64.
- [34] Naumann A, Kim Y, Kfinigs C, et al. Generation and characterization of FVIII specific CAR-transduced regulatory T cells. *Blood (ASH annual meeting Abstracts)*. 2014;124(21):236.
- [35] Pegram HJ, Park JH, Brentjens RJ. CD28z CARs and armored CARs. *Cancer J*. 2014;20(2):127-133.
- [36] Gill S, June CH. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev*. 2015;263(1):68-89.
- [37] 袁顺宗, 苏航. 利用嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T)治疗复发和难治B细胞淋巴瘤/白血病的转化医学研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(4):1137-1141.
- [38] Ma Q, Gomes EM, Lo AS, et al. Advanced generation anti-prostate specific membrane antigen designer T cells for prostate cancer immunotherapy. *Prostate*. 2014;74(3):286-296.
- [39] Casucci M, Hawkins RE, Dotti G, et al. Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(1):123-130.
- [40] Maude SL, Teachey DT, Porter DL, et al. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(26):4017-4023.
- [41] Hillerdal V, Ramachandran M, Leja J, et al. A systemic treatment with CAR-engineered T cells against PSCA delays subcutaneous tumor growth and prolongs survival of mice. *BMC Cancer*. 2014;14(1):30-39.
- [42] Abate-Daga D, Lagisetty KH, Tran E, et al. A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther*. 2014;25(12):209-219.
- [43] Miao HS, Choi BD, Suryadevara CM, et al. EGFR VIII-specific chimeric antigen receptor T cells migrate to and kill tumor deposits infiltrating the brain parenchyma in an in vivo xenograft model of glioblastoma. *PLoS One*. 2014;9(4):e94281.
- [44] Zhang G, Wang L, Cui H, et al. Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor. *Sci Rep*. 2014;4(1):3571.
- [45] Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-68.
- [46] Sentman CL, Meehan KR. NKG2D CARs as cell therapy for cancer. *Cancer J*. 2014;20(2):156-159.
- [47] Wang LC, Lo A, Scholler J, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2):154-166.
- [48] Hong H, Stasny M, Brown C, et al. Diverse solid tumors expressing a restricted epitope of L1-CAM can be targeted by chimeric antigen receptor redirected T lymphocytes. *J Immunother*. 2014;37(2):94-104.
- [49] Chen MY. New PLA General Hospital released CART therapy phase I clinical data. *BioDiscover.com*, 2015-05-27 [2015-05-27]. <http://www.biodiscover.com/news/politics/119184.html>.