

CAR-T 技术与肿瘤精准免疫治疗

本文由爱康得生物原创

2015 年 1 月 20 日，美国总统奥巴马在国情咨文演讲中提出“精准医学计划”，一时间“精准医疗”成为一大热门词汇。在美国，精准医疗称为“Precision Medicine”，而早在百余年前的中国，中医就提出了“精准医疗”这一概念，称为“辨证施治”。肿瘤又被称为多基因疾病，其发病机理，疾病发展过程，疾病病症与表现在个体之间差存在异。肿瘤的发生因素很复杂，遗传因素，外环境与内环境以及体细胞与干细胞的 DNA 损伤与修复，导致基因突变的逐步积累，最终演变为各种癌症的发生（图 1）。肿瘤发生的机理如基因突变，逆分化，肿瘤干细胞，免疫监视，端粒与端粒酶等等还有太多的未知领域。这些错综复杂的因素导致相同组织器官癌症引发的机理不一致，相同机理引发的癌症部位不一致。肿瘤的发生往往有数千个突变类型，每个病人的突变类型不一样，所以传统的治疗模式出现了许多困惑，如无法解释的耐药性，肿瘤基因组的异质性，有效治疗响应监测手段的缺乏等，在此时，精准治疗对于肿瘤的治疗十分重要。

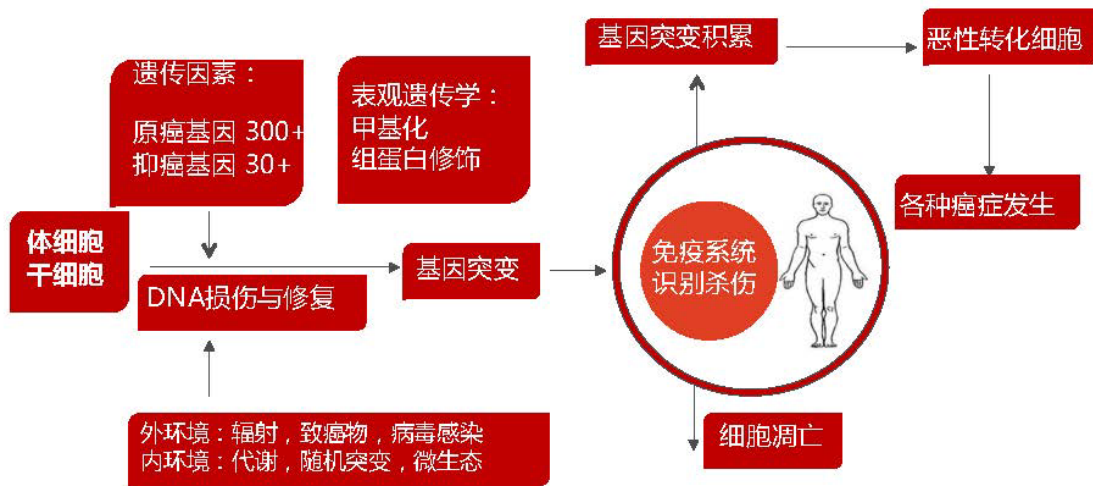


图1：肿瘤发生的复杂性。肿瘤的发生因素很复杂，遗传因素，外环境与内环境以及体细胞与干细胞的 DNA 损伤与修复，导致基因突变的逐步积累，最终演变为各种癌症的发生。

肿瘤精准免疫治疗发展

当前，广泛用于肿瘤精准免疫治疗的药物为靶向药物和单克隆抗体，其利用肿瘤细胞与正常细胞之间分子生物学上的差异（包括基因、酶、信号转导等不同特性），抑制肿瘤细胞的生长增殖，最后使其死亡。如用于治疗非小细胞肺癌的易瑞沙和特罗凯，用于治疗大肠癌的西妥昔单抗，用于治疗乳腺癌的曲妥珠单抗，用于治疗前列腺癌伊马替尼等。但肿瘤细胞

十分狡猾，在靶向药物使用过程中，肿瘤为躲避药物的作用会产生突变，继而产生耐药使这类药物失去效力，如易瑞沙平均耐药时间约 1 年，特罗凯耐药时间还要更短些，大约在 8 个月左右。耐药后肿瘤进展十分迅速，病人不得不重新寻找其他治疗方法。

2013 年是值得纪念的一年，《科学》杂志评论作为 2013 年度最重要的科学突破的榜首——癌症的免疫疗法。其中以程序性死亡因子 1 抗体(anti-PD1) 及其它免疫检查点抗体和嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (CAR-T 疗法) 最受瞩目。PD-1 在恶性黑色素瘤和肺鳞癌的治疗获得重大突破，被美国 FDA 批准用于临床。CAR-T 在 B 细胞恶性肿瘤的治疗获得巨大成功，ALL 完全缓解率达到惊人的 90%。在此我们着重聊一聊 CAR-T 免疫疗法。

CAR-T 免疫疗法是通过整合嵌合抗原受体的基因修饰的 T 细胞来抵抗肿瘤细胞的疗法。嵌合抗原受体可以特异性识别肿瘤相关抗原靶点，识别结合后将激活增殖 T 细胞的信号传递至胞内，引起 T 细胞激活和增殖，从而有效杀伤肿瘤细胞。自 1989 年以色列魏茨曼科学研究所免疫学家 Zelig Eshhar 将免疫球蛋白 scFv 与 Fc ϵ RI 受体(γ 链)或 CD3 复合物(ζ 链)胞内结构域融合并导入 T 细胞制备出第一代 CAR-T 以来，CAR-T 经历了 20 余年的发展(图 2)。CAR 分子大致可分为 5 代演变：I 代，特异性 T 细胞激活；II 代，增加共刺激因子，提高细胞毒性；III 代，同时具有两个共刺激因子，提高 T 细胞增殖能力与杀伤毒性；IV 代，整合自杀基因，精确调控，细胞因子释放(如 IL-7, IL-15)激活等；V 代，通用型 CAR(图 3)。

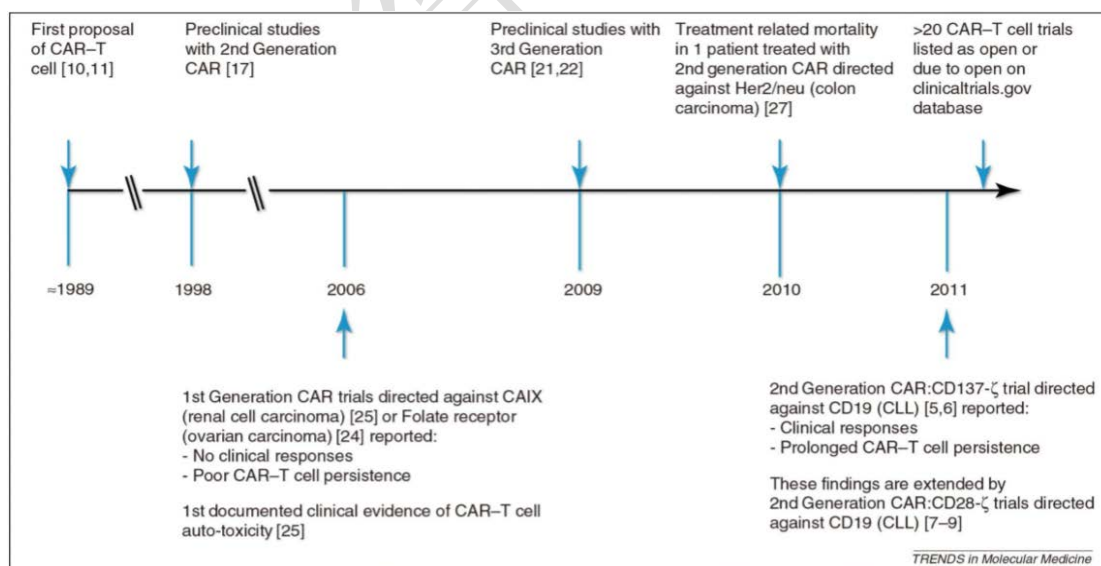


图2: CAR-T 的发展历程

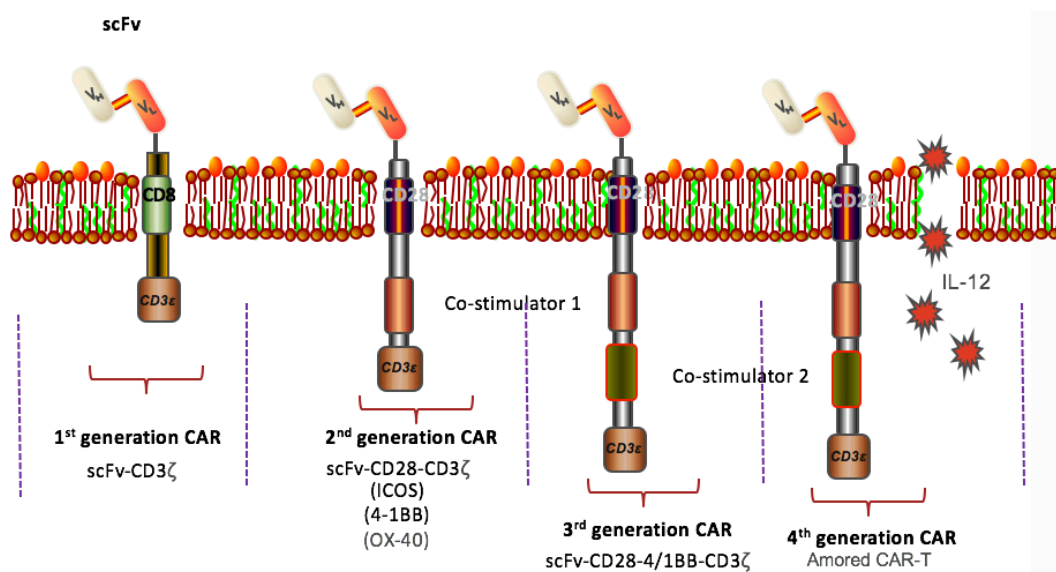


图3: CAR 分子的演变。I 代, 特异性 T 细胞激活; II 代, 增加共刺激因子, 提高细胞毒性; III 代, 同时具有两个共刺激因子, 提高 T 细胞增殖能力与杀伤毒性; IV 代, 整合自杀基因, 精确调控, 细胞因子释放 (如 IL-7, IL-15) 激活等; V 代, 通用型 CAR。

CAR-T 临床试验疗效与毒性

在血液恶性肿瘤方面, 2014 年 UPenn 利用 CD19-CAR-T 细胞治疗复发难治性 B-ALL, 完全缓解率达 90%; 2015 年 ASCO 会议, MSKCC 公布一组数据, CD19-CAR-T 治疗 B-ALL, 32 例受试者有 29 例获完全缓解, CR 率达 91%。在治疗实体瘤方面, 利用 HER2-CAR-T 治疗 HER2+肉瘤患者, 共 19 例患者参与临床实验, 输注 CAR-T 细胞数量逐步升高, 无明显 CAR-T 毒性, 部分瘤内有少量 T 细胞浸润, 4 例稳定病情达 12 周~14 个月, 中位生存期 10.3 月 (5.1~29.1 个月) (图 4); Mesothelin 是一个肿瘤相关抗原, 在很多恶性胸膜间皮瘤中广泛高表达。以 Meso 为靶点, 通过在 T 细胞上瞬时表达 CAR 分子, 经静脉回输外加瘤内注射的方式对 2 例入选患者进行治疗, 未出现明显的副作用, CAR-T 细胞在两例患者体内均体现了一定的抗肿瘤活性, 患者腹水中的 Mesothelin 阳性的肿瘤细胞数量明显减少 (图 5)。

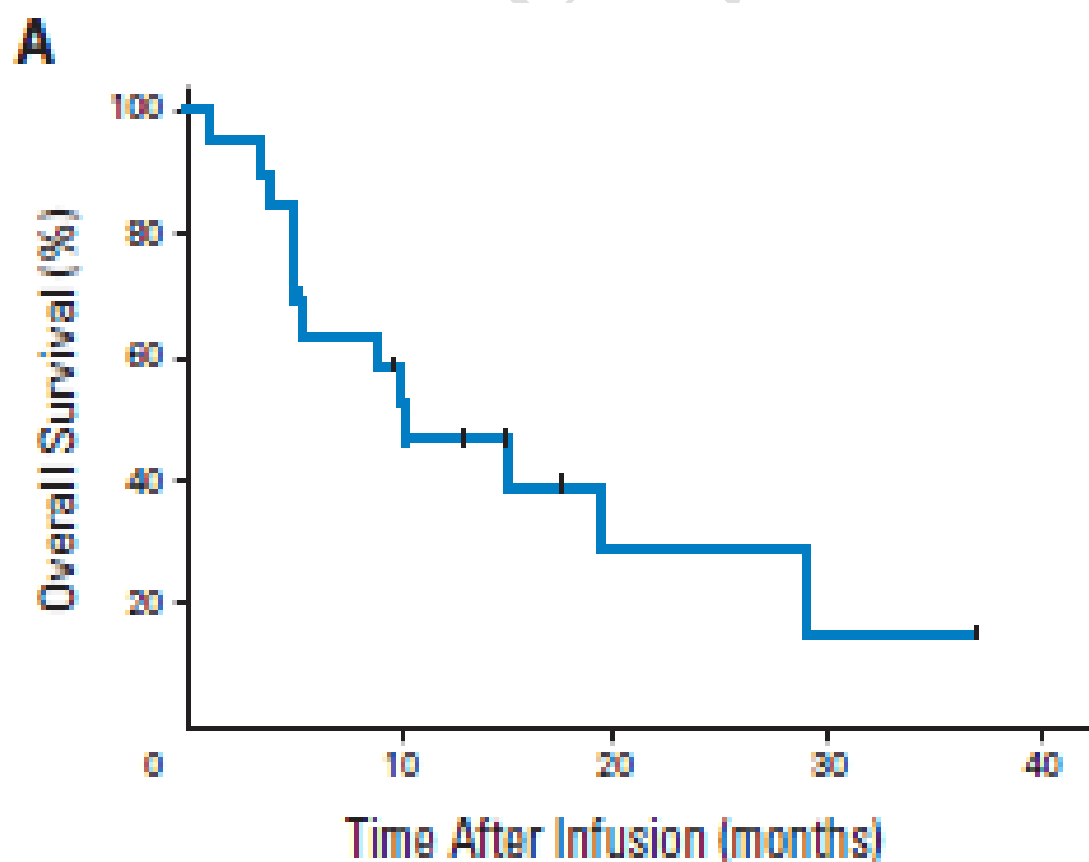
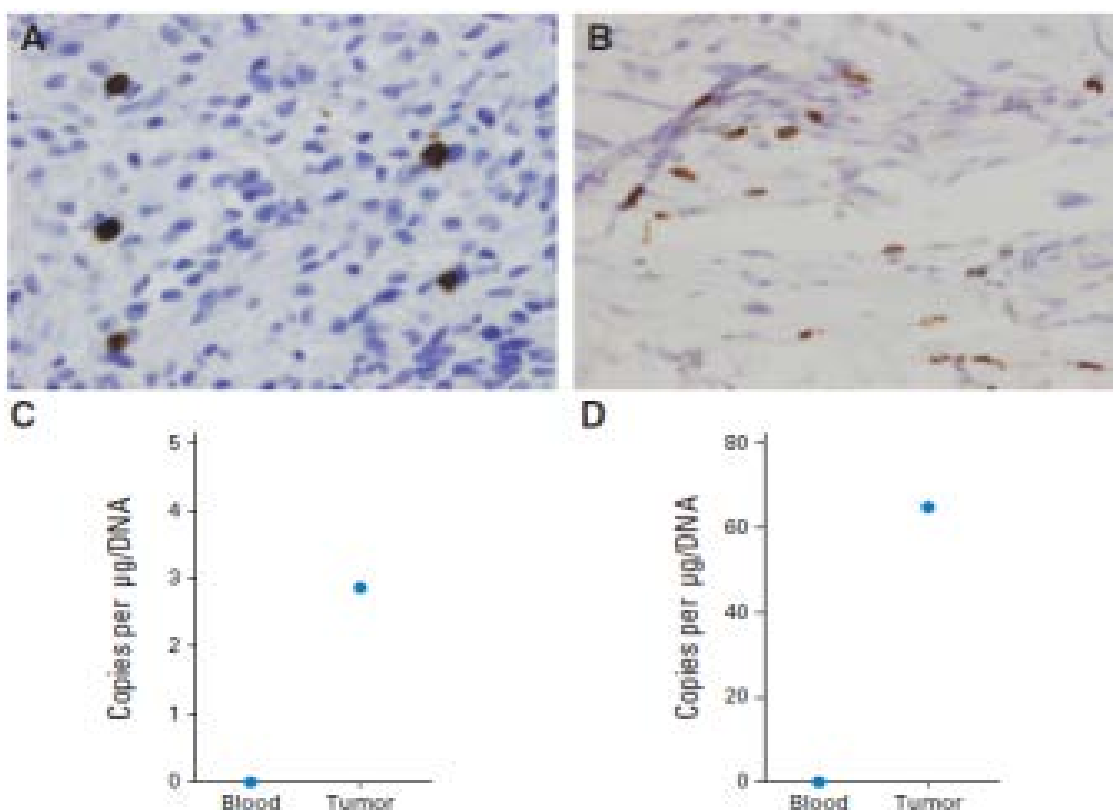


图4：HER2-CAR-T 治疗HER2+ 肉瘤患临床疗效观察。部分瘤内有少量T 细胞浸润，4 例稳定病情达12 周~14 个月，中位生存期10.3 月（5.1~29.1 个月）。

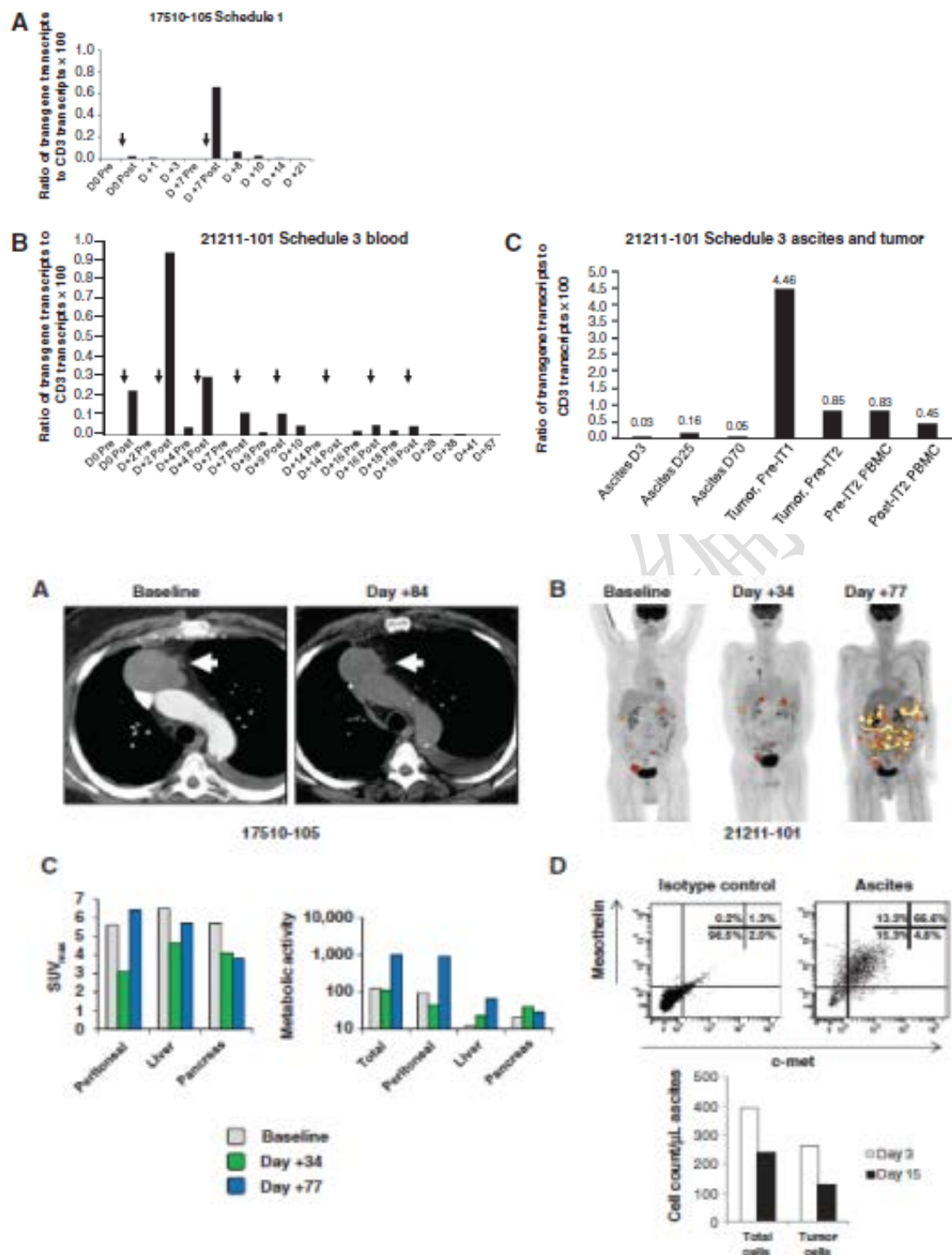


图5：以 Meso 为靶点，通过在 T 细胞上瞬时表达 CAR 分子，经静脉回输外加瘤内注射的方式对 2 例入选患者进行治疗，未出现明显的副作用，CAR-T 细胞在两例患者体内均体现了一定的抗肿瘤活性，患者腹水中的 Mesothelin 阳性的肿瘤细胞数量明显减少。

接受 CAR-T 治疗的患者会出现毒性反应。如寒战，发热，白细胞减少，溶瘤综合症，巨噬细胞活化综合症，细胞因子风暴，B 细胞缺乏及低丙种球蛋白血症，脱靶效应(ontarget/off tumor)等。其中几乎所有接受 CAR-T 细胞治疗并且出现应答的患者都会出现细胞因子风暴，这与 T 细胞的激活直接相关，而肿瘤负荷影响细胞因子风暴的级别（分为 1~4 级）。通过

输注前化疗预处理，使用输注细胞剂量递增方案，并严密监测血清相关指标，如 IL-6 水平，C-反应蛋白等。利用 IL-6 拮抗剂如 Tocilizumab 可治疗严重细胞因子风暴，并且不会影响 CAR-T 疗效。脱靶效应常见于 CAR-T 治疗实体瘤患者中，由于靶向抗原在正常组织中也低表达，导致 CAR-T 细胞攻击人正常组织，如人肺组织会低表达 Her2，Her2-CAR-T 细胞可引起致命的肺毒性。通过降低 scFv 亲和力，局部瘤内注射，寻找肿瘤特异性抗原等方法来减少或避免这类毒性的发生。由此可见，目前 CAR-T 细胞治疗还不够精准。

CAR-T 临床试验数据统计与治疗方案研究

截至 2015 年 10 月，全球共计 110 项 CAR-T 临床试验在 ClinicalTrials.gov 注册，其中大部分为血液肿瘤的临床试验，实体瘤占 38 项，均为 I/II 期临床试验（表 1），血液肿瘤靶点选择最多的是 CD19，实体瘤主要靶点选择是 EGFR, GD2, CEA, Her2（图 6）。

Center	Target	Indication	Signal transduction
Baylor College of Medicine	Her2	Her2+ Tumors	CD3 ζ /CD28
Baylor College of Medicine	Her2	Advanced Osteosarcoma	CD3 ζ /CD28
National Cancer Institute	Her2	Metastatic Cancer	CD3 ζ /CD28
Baylor College of Medicine	Her2	Pleomorphic glioblastoma	CD3 ζ /CD28
Chinese PLA General Hospital	Her2	Solid tumors	CD3 ζ /4-1BB
Baylor College of Medicine	Her2	Glioblastoma	
Roger Williamms Medical Center	CEA	Colorectal Cancer	CD3 ζ /CD28
Roger Williamms Medical Center	CEA	Breast Cancer	CD3 ζ /CD28
Roger Williamms Medical Center	CEA	Adenocarcinoma	CD3 ζ /CD28
Southwest Hospital, China	CEA	gastric, lung, pancreatic, breas and colorectal	
CRUK	CEA	Solid tumors	N/A
Roger Williamms Medical Center	CEA	Liver metastases	CD3 ζ /CD28
Baylor College of Medicine	GD2	Neuroblastoma	CD3 ζ
CMHKC	GD2	Neuroblastoma	N/A
National Cancer Institute	GD2	Non-neuroblastoma	CD3 ζ /CD28/OX40
Baylor College of Medicine	GD2	Neuroblastoma	CD3 ζ /CD28/OX40
Baylor College of Medicine	GD2	Sarcoma	CD3 ζ /CD28/OX40
Texas Children's Hospital	GD2	NEUROBLASTOMA	

Center	Target	Indication	Signal transduction
Abramson Cancer Center, UPenn	mesothelin	Metastatic Pancreatic (Ductal) Adenocarcinoma Epithelial Ovarian Cancer Malignant Epithelial Pleural Mesothelioma	CD3 ζ /4-1BB
Abramson Cancer Center, UPenn	mesothelin	Malignant mesothelioma	CD3 ζ /4-1BB

表 1：CAR-T 实体瘤临床试验在 ClinicalTrials.gov 注册情况（截至 2015.10）

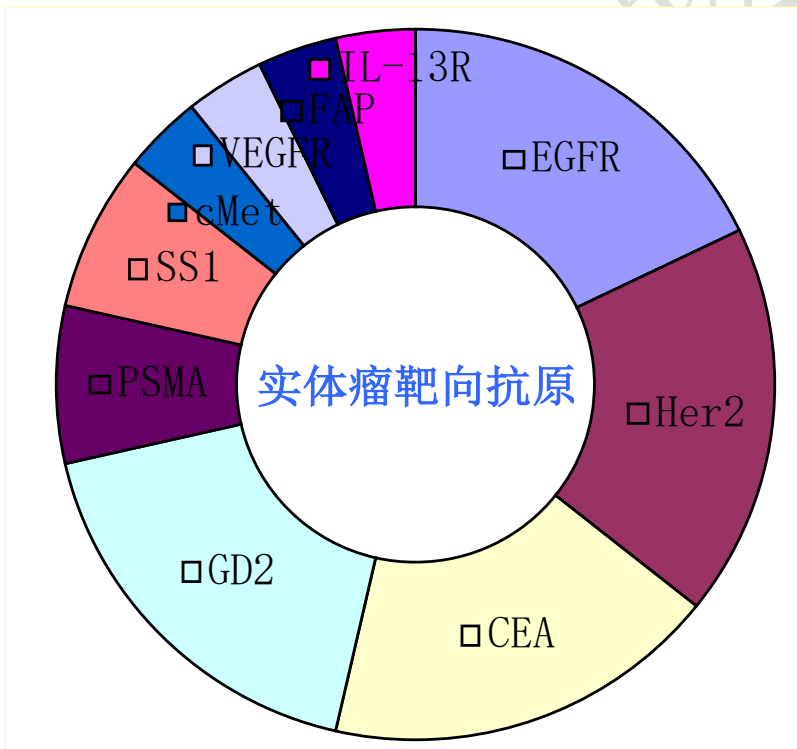


图6：实体瘤靶向抗原选择比例图

在临床试验中，血液肿瘤的 CAR-T 治疗方案为：在获得临床试验批准后，首先根据入选与排除标准筛选受试者，与受试者签署知情同意后对其病情进行评估，采集分离 PBMC，经 T 细胞分选，CAR 病毒感染，洗脱扩增，质控检测后收获 CAR-T 细胞。在细胞输注前 4 天完成化疗预处理。连续 3 天按 10%，30%，60% 的剂量递增方式输注 CAR-T 细胞。输注

后半年内月度随访和半年后的季度随访，以及 15 年后的转基因跟踪。

实体肿瘤的 CAR-T 治疗没有获得如血液肿瘤治疗后的惊人疗效。实体肿瘤的治疗情况相对复杂多变。首先实体肿瘤致密结构特点阻碍了 CAR-T 对肿瘤组织的浸润，导致实体瘤内部没有足够的 T 效应 T 细胞；再者肿瘤微环境中存在免疫负调节因素的制约，如免疫抑制性细胞的存在（regulatory T cells, myeloid derived suppressor cells, and M2 tumor-associated macrophages），抑制性细胞因子（TGF- β , IL-10），肿瘤细胞表面表达的 T 细胞功能抑制性蛋白分子（B7-H family members, Fas ligand），引导 CAR-T 向肿瘤灶归巢的趋化因子等。所以，CAR-T 细胞输注前患者预处理方案，如何让 CAR-T 细胞在体内有效增殖并保持高杀伤活性，如何使 CAR-T 细胞有效浸润在实体瘤内部等一系列问题尚待进一步研究。如使用 CT 模拟定位三维适形放疗技术对实体瘤进行预处理，或用微创介入或瘤内注射的方式，使 CAR-T 细胞更多地进入到实体瘤内部对靶细胞进行有效杀伤。另外可以将 CAR-T 负载溶瘤病毒以提高对实体瘤治疗的效果（详见《CAR-T 细胞与溶瘤病毒联用》一文）。

小结

精准医疗是未来疾病治疗的发展方向，但是目前肿瘤的精准治疗长路漫漫。如果将肿瘤比喻为阴，免疫系统比喻为阳，则阴阳之间相互对立，相互统一，相互制约，消长与共（图 7）。

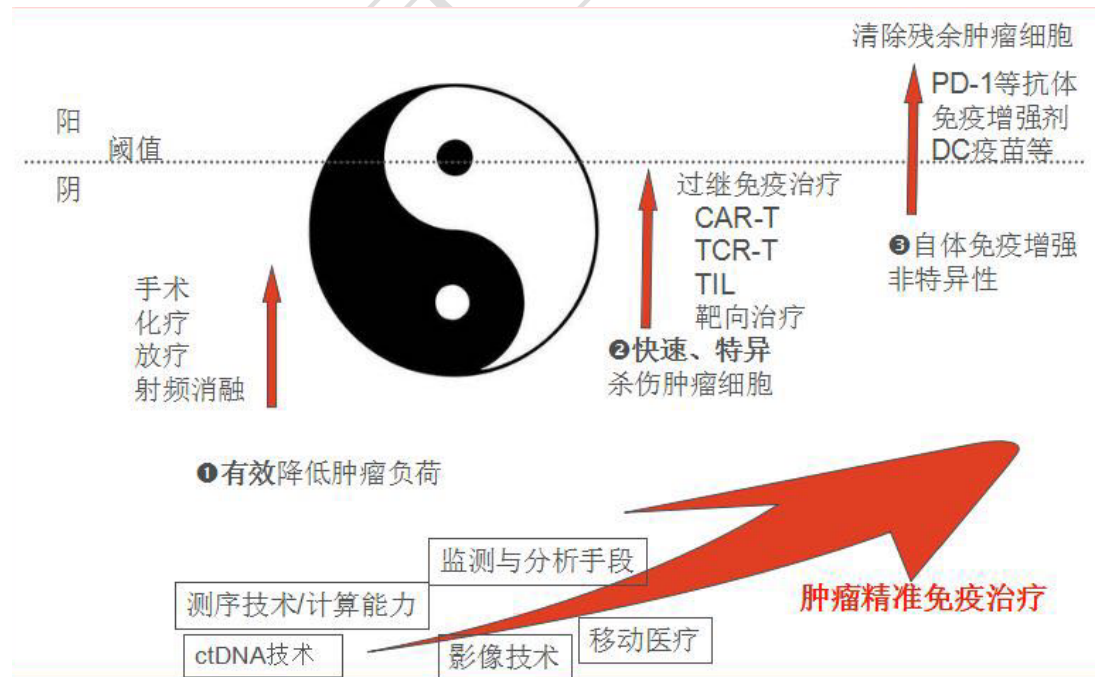


图7：肿瘤与免疫治疗之间相互对立，相互统一，相互制约，消长与共

仅依靠细胞治疗肿瘤还远远不够。手术，化疗，放疗可以迅速降低肿瘤负荷，特异性治疗如 CAR-T, TCR-T, 抗体药物等可以迅速锁定并杀伤肿瘤细胞，但是肿瘤而且很容易产生突

变，使用非特异性治疗如 DC 疫苗，免疫增强剂来清除残余的肿瘤细胞。随着基因测序，分子生物学技术，影像技术，大数据等快速发展，肿瘤的精准治疗也会得到长足的发展，并成为未来肿瘤综合治疗的主要模式。不过在最后笔者认为，对于肿瘤，做到健康规律的生活方式，高危人群定期进行健康体检，以预防为主，早发现，及时并且根据病情进行综合治疗，方为正道。

爱康易生物编译