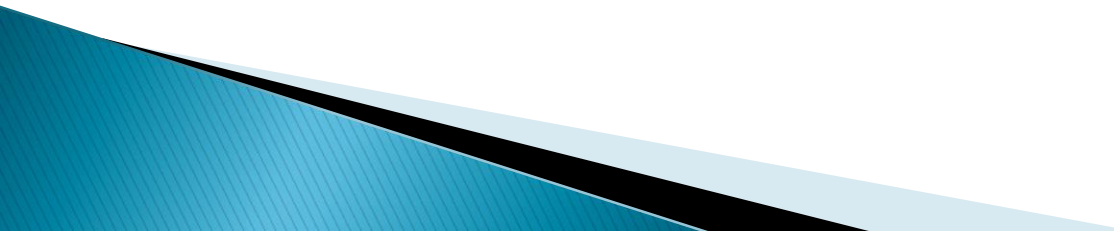


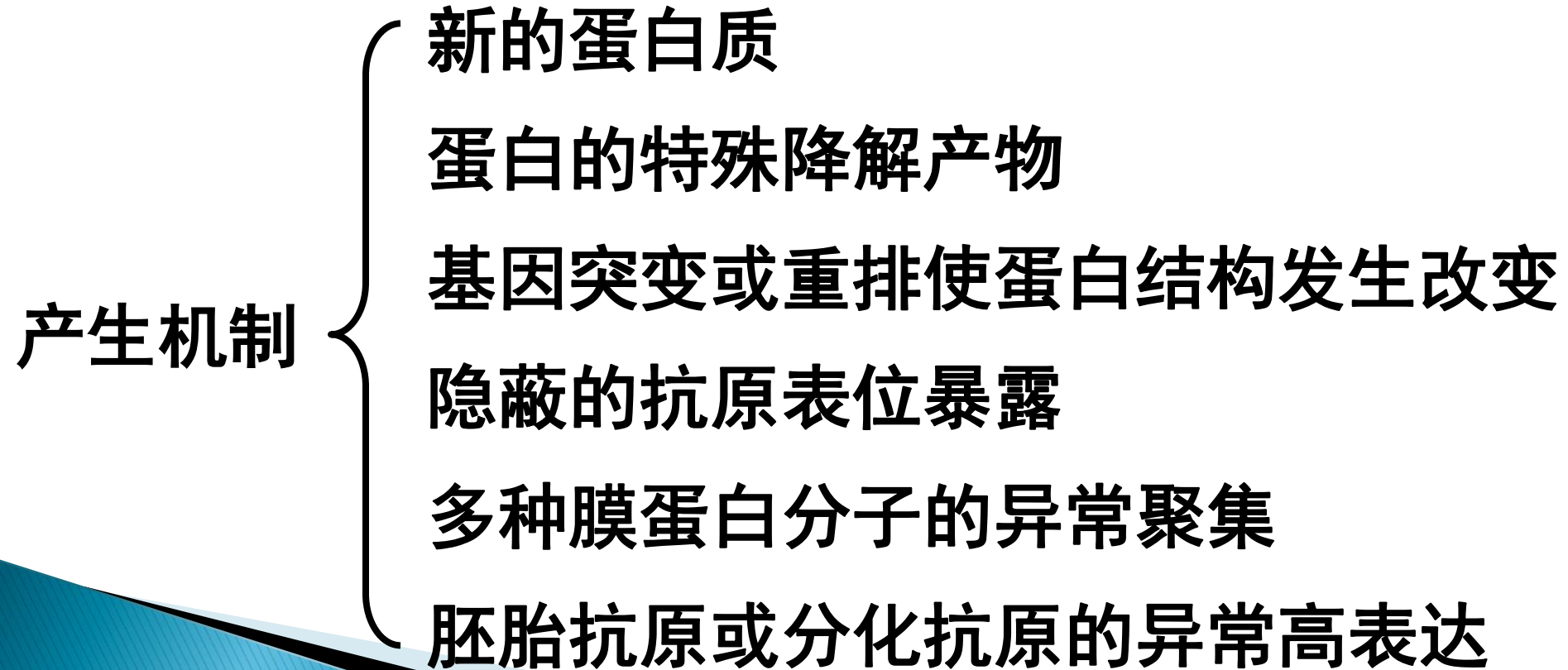
肿瘤免疫与CAR-T细胞治疗

主要内容

- 肿瘤免疫逃逸
 - 肿瘤免疫治疗
 - CAR-T细胞治疗
- 

肿瘤抗原

**定义：细胞癌变过程中新出现的抗原
以及过度表达的抗原物质 的总称**



肿瘤特异性抗原：

(Tumor specific antigen , TSA)

肿瘤细胞特有，正常细胞不存在

肿瘤相关抗原：

(Tumor associated antigen , TAA)

正常细胞组织也存在，但肿瘤细胞中含量明显增高

二. 机体抗肿瘤免疫机制

非特异性免疫：

巨噬细胞、NK细胞、多形核细胞

特异性免疫

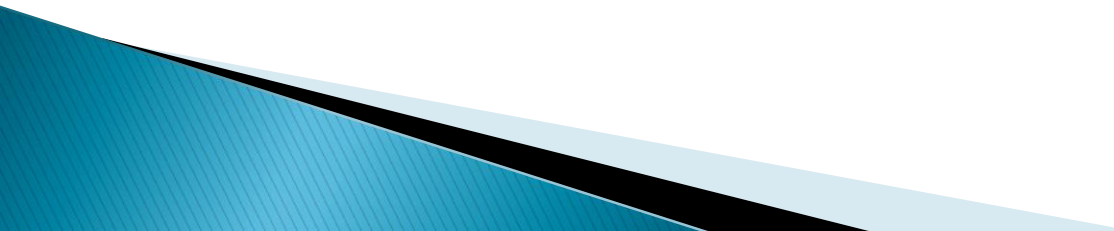
体液免疫

细胞免疫

(一) 体液免疫机制

1. CDC、ADCC、调理作用：

**通过补体、巨噬细胞、NK细胞、中性粒细胞
介导杀伤肿瘤细胞**



2. 封闭抗体：

抑制：

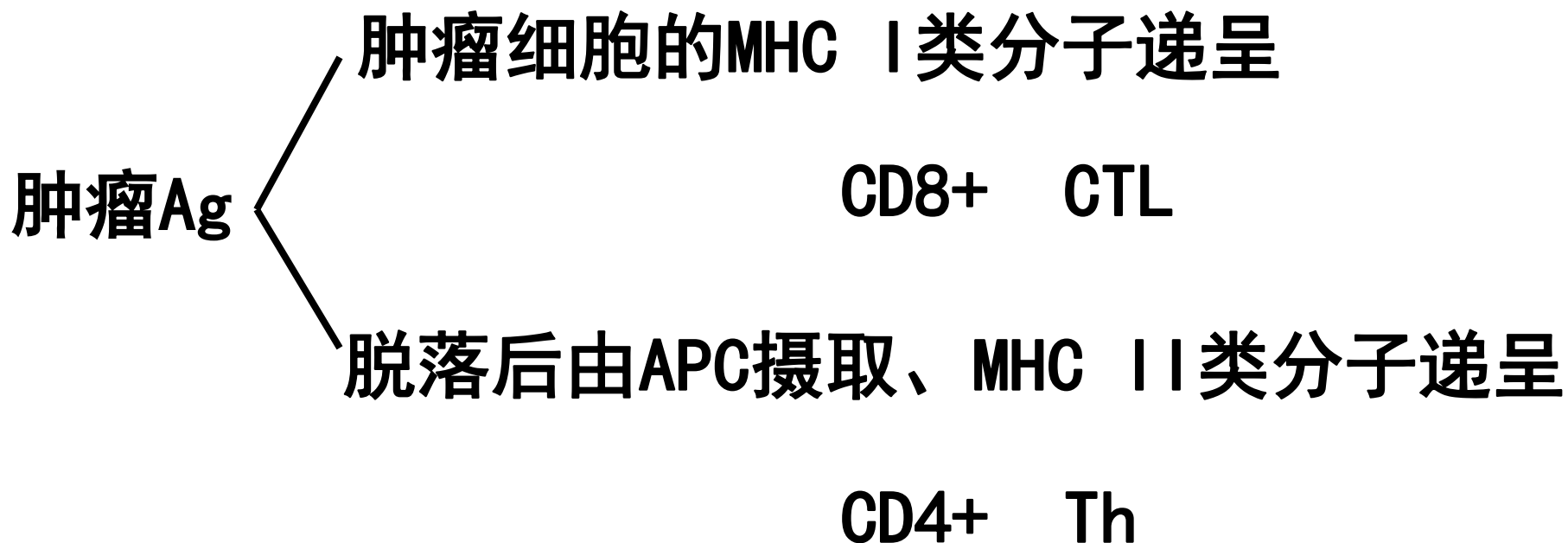
与肿瘤细胞恶性转化、增殖、转移有关的抗原
如 p185可抑制增殖、转铁蛋白受体可抑制生长、粘附分子可阻止克隆形成与转移

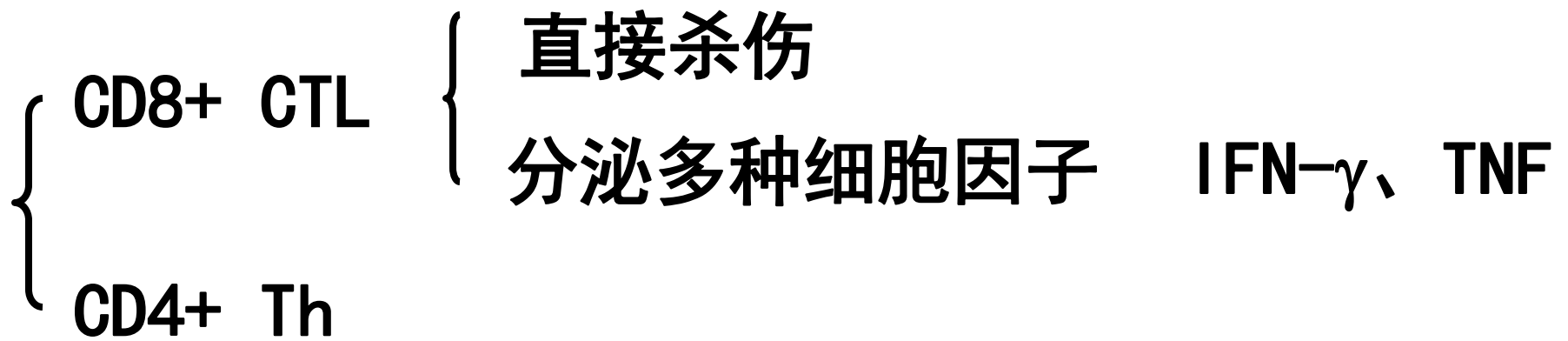
增强抗体：

封闭抗原位点，阻碍杀伤性免疫细胞的作用

(二) 细胞免疫机制

1. T细胞





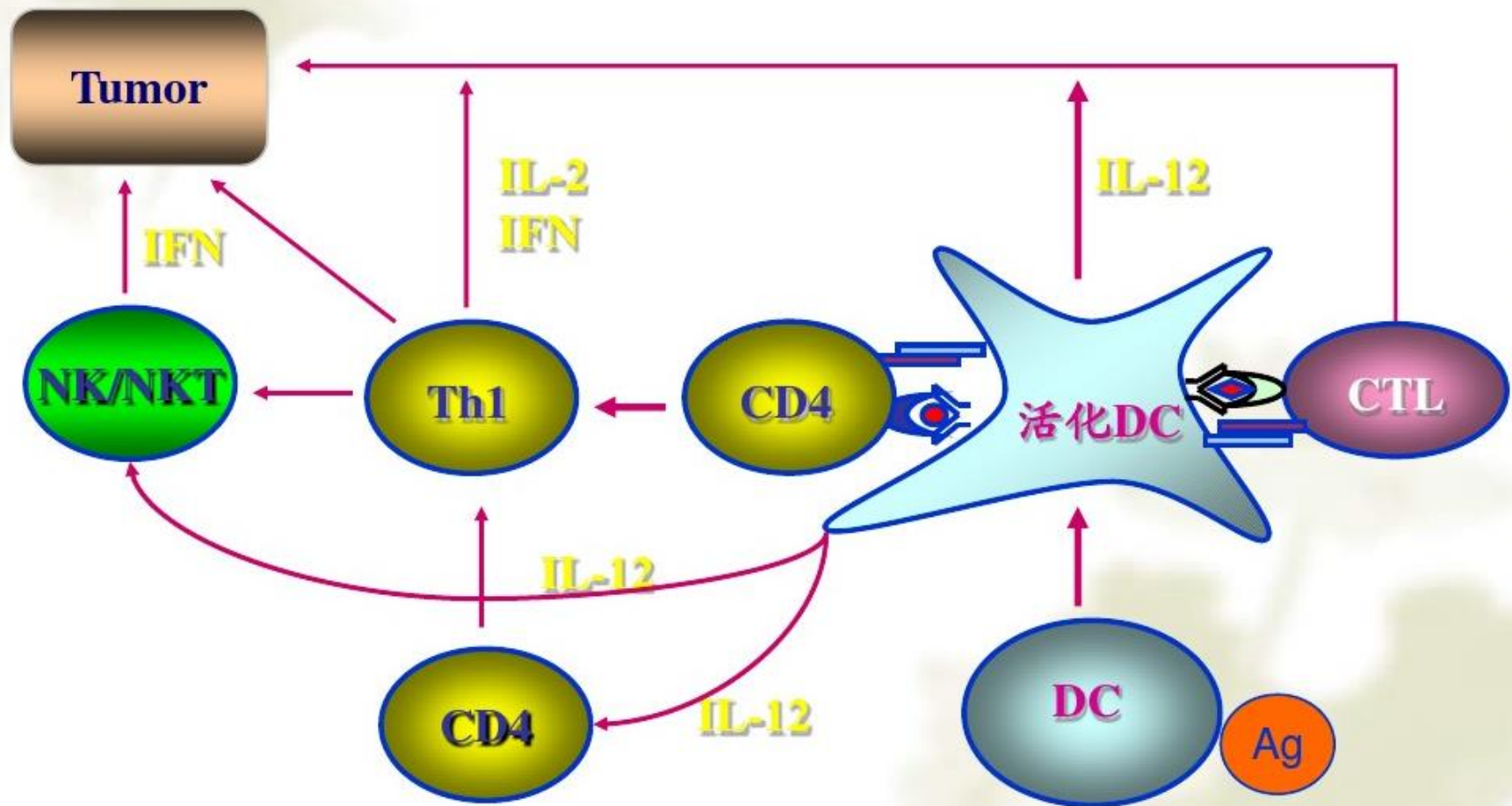
释放CK如IL-2：激活CTL、NK、巨噬细胞

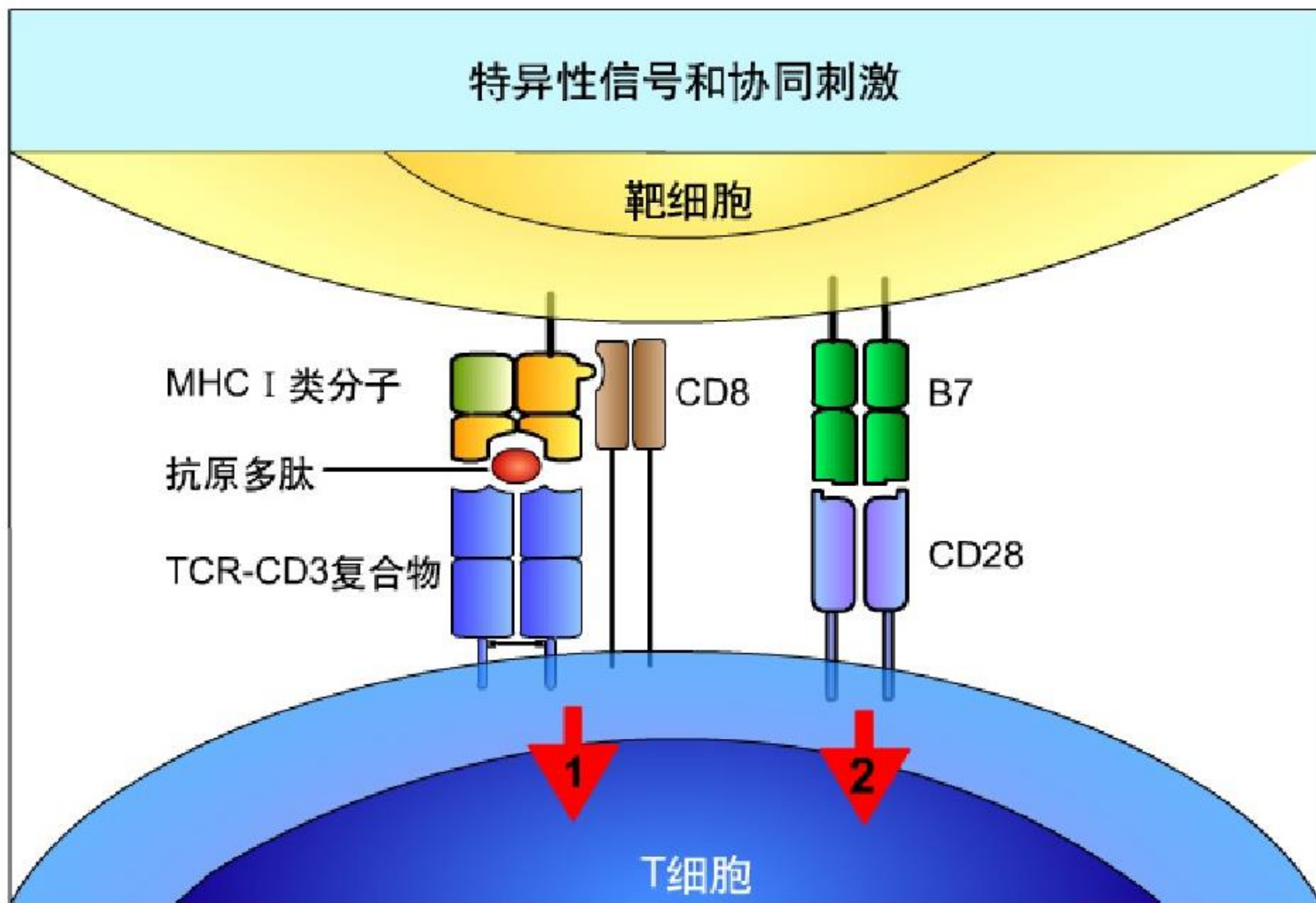
释放IFN- γ 、TNF：促进MHC I类表达、
有利于直接杀伤

促进B细胞活化、增殖、分化

少数可直接杀伤肿瘤细胞

抗肿瘤免疫应答





CD8⁺T细胞活化双信号示意图

（三）非特异性免疫

1. NK细胞

不依赖抗体或补体、不需预先活化、

无MHC限制即可直接杀伤肿瘤细胞

通过激活性受体/抑制性受体的平衡而识别

特异性免疫应答的效应阶段（ADCC）



2、 $\gamma\delta$ T细胞

3. 巨噬细胞

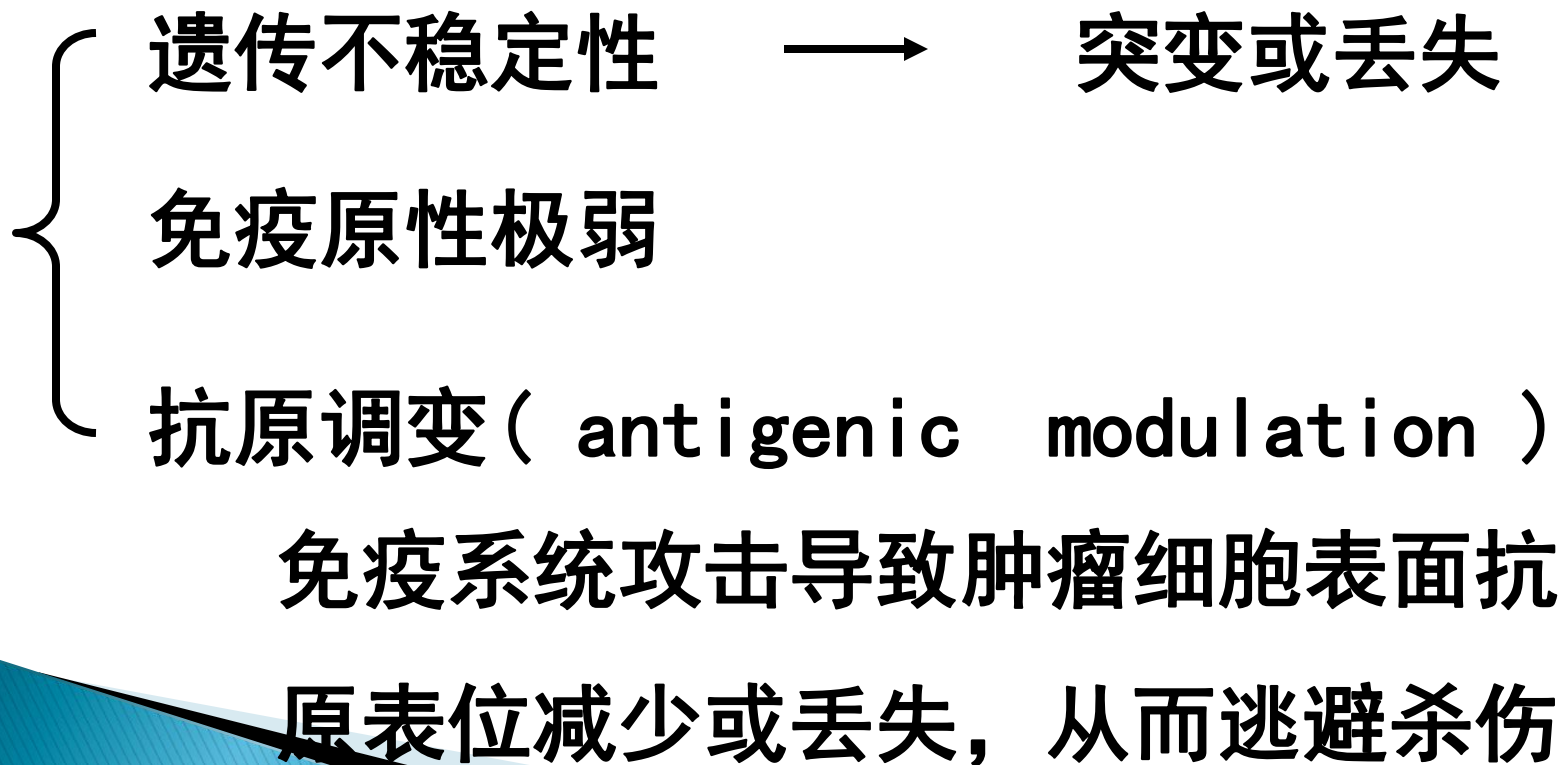
作为APC，激活T

巨噬细胞杀伤肿瘤

三. 肿瘤免疫逃逸机制

(一) 与肿瘤有关的因素

1. 抗原缺失或抗原调变



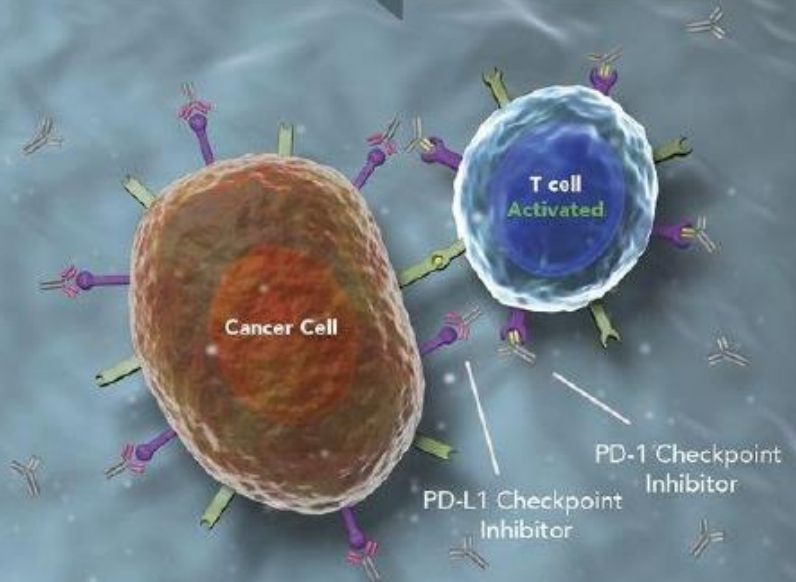
2. **MHC I类分子表达减少**
3. **缺乏协同刺激分子：B7、ICAM-1、LFA-1**
4. **漏逸：肿瘤迅速生长超越机体清除能力**
5. **肿瘤导致的免疫抑制：**
 - 分泌某些CK（如TGF- β 、IL-10）**
 - 营造局部免疫豁免（如高表达Fas L
破坏免疫细胞）**

When a cancer cell encounters a T cell (a type of immune cell), the interaction between the major histocompatibility complex (MHC) and the T-cell receptor (TCR) molecules activates the T cell.

But when the PD-L1 checkpoint protein on the cancer cell attaches to the PD-1 checkpoint receptor on the T cell, the T cell is deactivated.

New immune checkpoint inhibitor therapies prevent the PD-L1 checkpoint protein from attaching to the PD-1 checkpoint receptor.

This allows the major histocompatibility complex (MHC) and T-cell receptor (TCR) interaction to activate the T cell and unleash the immune system to attack cancer.



T 细胞激活需要两个信号：一是 MHC-多肽信号；二是共刺激分子信号，有正向共刺激因子 CD27、CD28 和 CD137 通路，还有负向共刺激因子，主要有 CTLA4 通路和 PD1/PDL1 通路。抑制性通路会被肿瘤劫持用来对抗免疫系统。通过结合正向共刺激因子激动剂，或结合负向共刺激因子抑制剂都可以提高对肿瘤的免疫杀伤作用

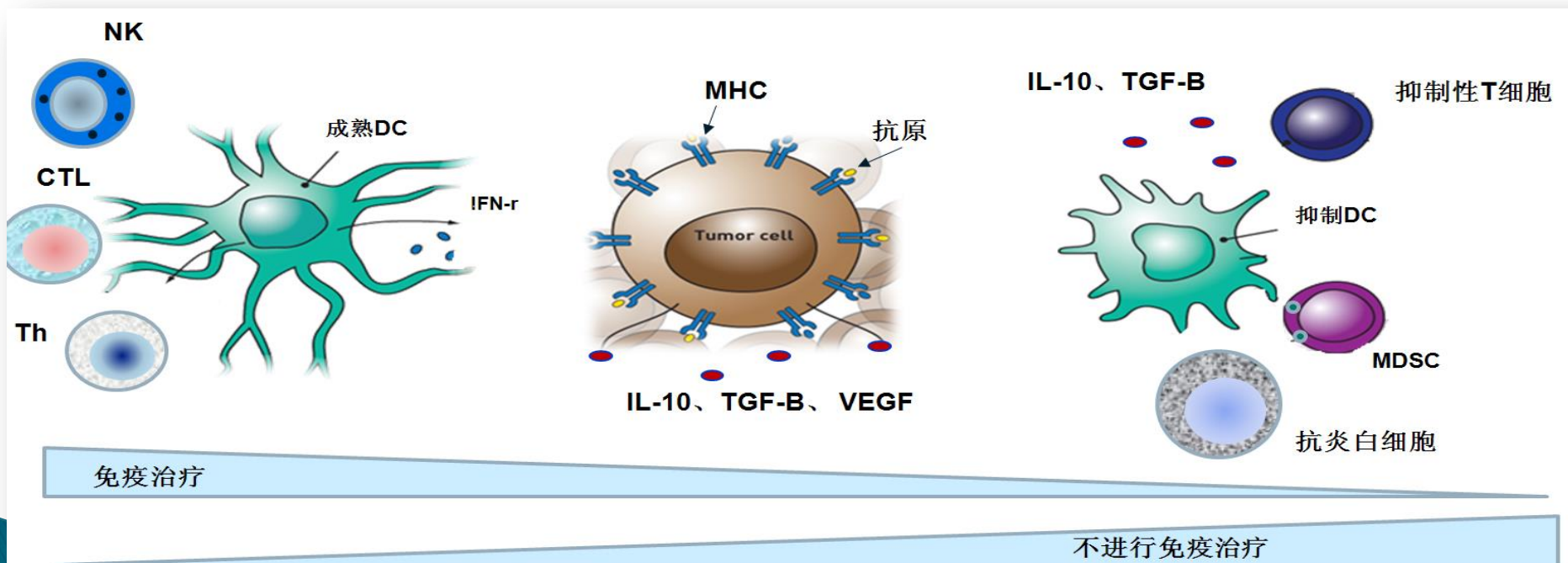
（二）与宿主有关的因素

免疫功能低下或缺陷

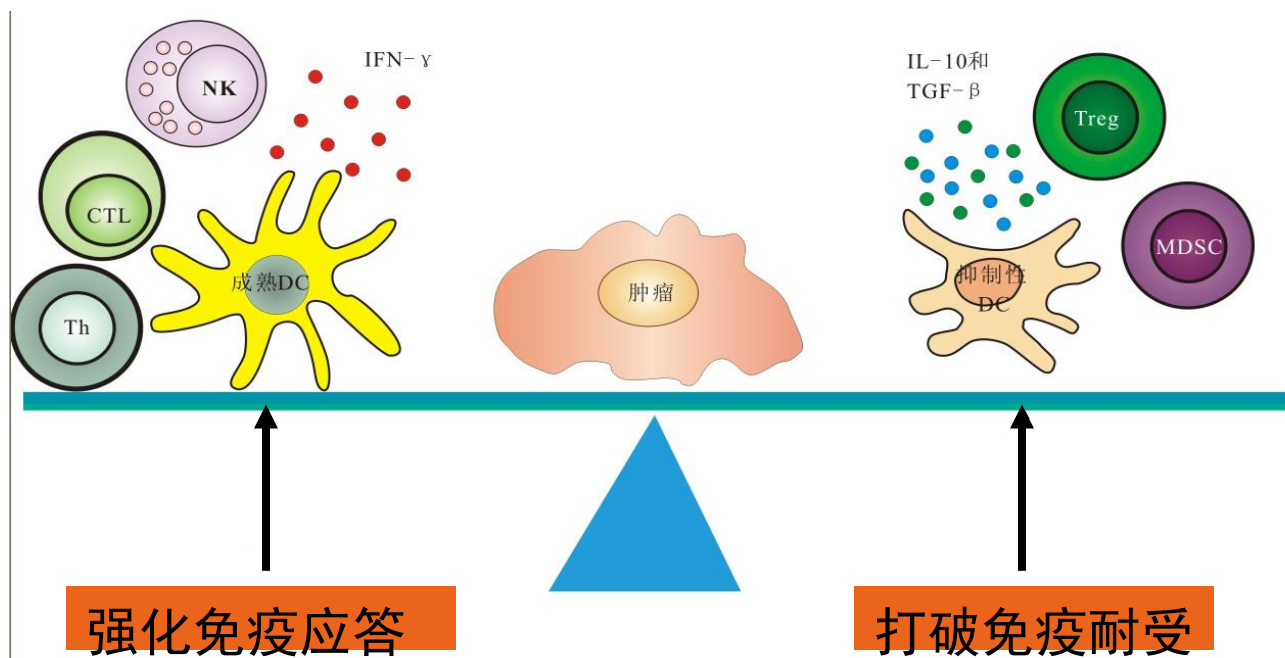
免疫抑制

免疫耐受状态

肿瘤免疫治疗（cancer immunotherapy）是利用人体的免疫机制，通过主动或被动的方法来增强患者免疫功能，达到杀伤肿瘤细胞的目的，为肿瘤生物治疗方法之一。



肿瘤免疫治疗的原理是通过增强抗肿瘤免疫应答和打破肿瘤的免疫抑制产生抗肿瘤作用。



肿瘤免疫治疗分类

一、

主动免疫治疗

二、

被动免疫治疗

三、

非特异性免疫调节剂治疗

一、主动免疫治疗

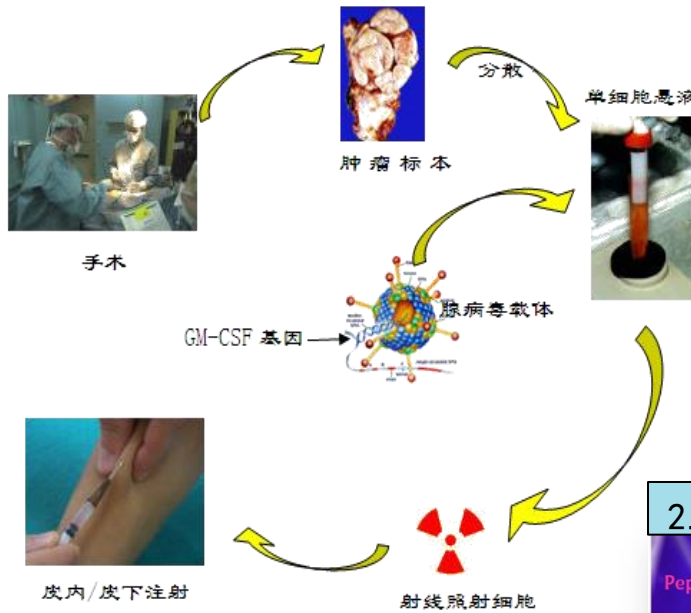
也称为肿瘤疫苗，主要是利用肿瘤细胞或肿瘤抗原物质免疫机体，使宿主免疫系统产生针对肿瘤抗原的抗肿瘤免疫应答，从而阻止肿瘤生长、转移和复发。

肿瘤疫苗是对已患病者进行免疫接种，激发肿瘤患者机体产生对肿瘤的特异性免疫应答。可产生免疫记忆，抗肿瘤作用比较持久。

分类：肿瘤细胞疫苗、肿瘤多肽（蛋白）疫苗、树突状细胞疫苗、抗独特型抗体疫苗、DNA疫苗

肿瘤的主动免疫治疗分类

- 1. 肿瘤细胞疫苗
- 2. 肿瘤多肽（蛋白）疫苗
- 3. DC疫苗
- 4. 抗独特型抗体疫苗
- 5. DNA疫苗



1. 肿瘤细胞疫苗

肿瘤全细胞疫苗

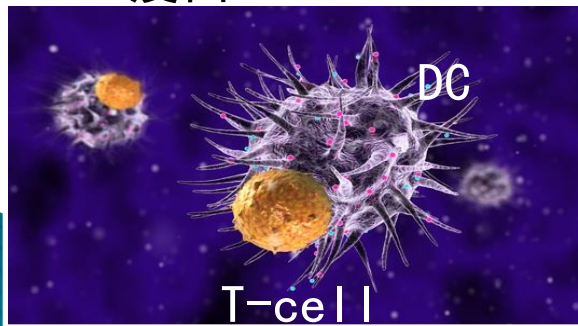
肿瘤细胞裂解物疫苗

基因修饰的肿瘤细胞疫苗

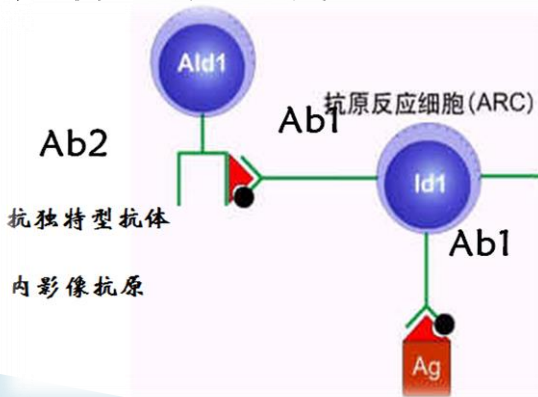
2. 肿瘤多肽（蛋白）疫苗

The diagram shows a 'Peptide-MHC complex' being presented to a 'T-cell'. The T-cell's 'TCR' (T-cell receptor) interacts with the complex. Other molecules shown include 'B7', 'CTLA4', and 'CD-28'.

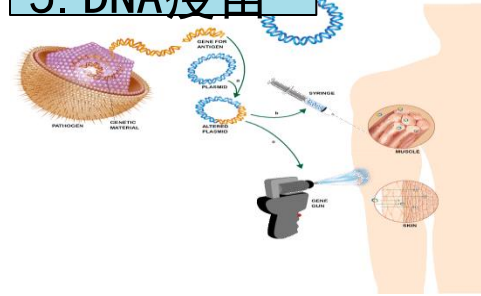
3. DC疫苗



4. 抗独特型抗体疫苗



5. DNA疫苗



已批准进行Ⅲ期临床试验及临床应用的肿瘤疫苗举例

适应证	疫苗名称	疫苗性质
黑色素瘤	M-Vax	肿瘤细胞疫苗
	MDX-1379	多肽疫苗
	Melacine	异体肿瘤细胞裂解物疫苗
	Allovectin-7 [®]	基因修饰肿瘤疫苗
前列腺癌	Sipuleucel-T	自体树突状细胞疫苗
	CG1940/CG8711	GM-CSF修饰肿瘤细胞疫苗
肺癌	Stimuvax (L-BLP25) / BLP25	脂质体包埋蛋白疫苗
	Belagenpumatucel-L	基因修饰肿瘤细胞疫苗
胰腺癌	Algenpantucel-L	基因修饰肿瘤细胞疫苗
	GV-1001	端粒酶肽疫苗
肾癌	TroVAX (MVA-5T4)	基因修饰肿瘤疫苗
	IMA901	多肽疫苗
结直肠癌	OncoVAX	自体肿瘤细胞疫苗
卵巢癌	Abagowomab	抗独特型抗体疫苗
中枢神经系统肿瘤	DCVax [®] -Brain	自体树突状细胞疫苗
	Rindopepimut (CDX-110)	多肽疫苗
淋巴瘤	BiovaxID [®] (Id-KLH/GM-CSF)	抗独特型抗体疫苗

二、被动免疫治疗

被动免疫治疗（passive immunotherapy）又称为过继免疫治疗（adoptive immunotherapy）是被动性的将具有抗肿瘤活性的免疫制剂或细胞转输给肿瘤患者，以达到治疗肿瘤的目的。

被动免疫治疗与肿瘤疫苗不同，并不需要机体产生初始免疫应答，因此适用于已经没有时间或能力产生初始免疫应答的肿瘤晚期患者。

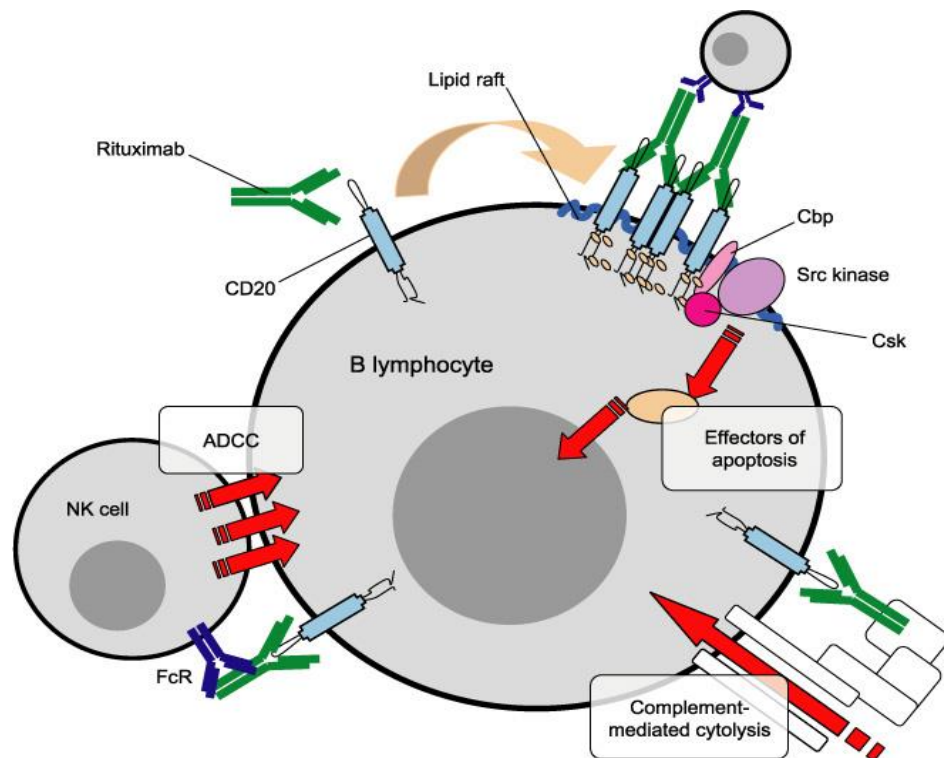
分类：单克隆抗体治疗；过继性细胞治疗

单克隆抗体治疗

又称之为生物导弹技术，通过补体系统、自然杀伤细胞和阻断信号转导通路起抗肿瘤作用。

嵌合型单抗达到95%以上人源化，减少了免疫原性。

利妥西单抗—治疗恶性淋巴瘤；曲妥珠单抗—治疗乳癌，联合化疗增强疗效。



过继性细胞治疗

过继性细胞治疗是通过分离自体或异体免疫效应细胞，经体外激活并回输，直接杀伤肿瘤或激发机体抗肿瘤免疫反应。

过继性细胞治疗的关键在于产生数量足够、能够识别并杀伤肿瘤的免疫细胞，以及效应细胞能够到达肿瘤所在部位，并在肿瘤周围被激活且发挥抗瘤作用。

淋巴因子激活的杀伤细胞（LAK）、自然杀伤细胞（NK）、细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK）、肿瘤浸润T淋巴细胞（TIL）、 γ δ T细胞、自然杀伤T细胞（NK T）、CD3单抗激活的杀伤细胞（CD3AK）、供者淋巴细胞输注（donor lymphocyte infusion, DLI）、受体基因修饰的T细胞等

淋巴因子激活的杀伤细胞

淋巴因子激活的杀伤细胞（LAK）是外周血单个核细胞在体外经IL-2刺激活化后诱生的具有非特异性细胞毒作用的效应细胞，是多种免疫细胞的群体。

LAK细胞抗癌谱广，抗肿瘤作用不依赖抗原致敏。LAK细胞通过直接接触或释放炎症细胞因子间接杀伤肿瘤。

临床应用：由于其体外增殖活性不强，体内抗瘤活性有限，且为维持LAK细胞体内活性，需要注射大剂量IL-2，而出现较强毒副作用，因此逐渐淡出临床应用。

肿瘤浸润性淋巴细胞

肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL）是从肿瘤部位分离出的一群淋巴细胞，经IL-2等细胞因子扩增后产生。

其表型以CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞为主，具有一定的肿瘤特异性和MHC限制性。TIL的抗肿瘤效果是LAK的50~100倍。

临床应用：TIL已应用于临床试验，主要治疗皮肤、肾、肺、头颈部、肝、卵巢部位的原发或继发肿瘤。但其取材不便和制作过程的相对复杂性限制了其在临床的应用。

细胞因子诱导的杀伤细胞

细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine induced killer cells, CIK) 是外周血单个核细胞经抗CD3单克隆抗体, 以及IL-2、IFN- γ 和IL-1 α 等细胞因子体外诱导分化获得的NK样T细胞。

CIK呈CD3⁺CD56⁺表型, 既具有NK细胞的非MHC限制性特点, 又有T淋巴细胞抗肿瘤活性。具有增殖速度快, 杀伤活性高, 肿瘤杀伤谱广等优点。

临床应用: 目前发现CIK在肾癌、肝癌、肺癌、白血病等多种肿瘤中具有抗肿瘤活性。

NK细胞

NK细胞可识别MHC-I表达下调或缺失的肿瘤细胞，无需抗原预先致敏即可以直接杀伤肿瘤细胞，其杀伤肿瘤细胞的机制有：通过分泌穿孔素、颗粒酶来杀伤肿瘤细胞；通过死亡配体介导靶细胞凋亡；分泌炎症因子间接杀伤肿瘤细胞；通过ADCC效应杀伤肿瘤细胞。

临床应用：随着纯化技术及扩增技术的不断改进，NK细胞逐渐成为过继性免疫治疗重要组成部分。NK细胞目前仍处于 I / II 期临床试验阶段。

γ δ T细胞

γ δ T细胞是一类T细胞，因其TCR由 γ 和 δ 肽链组成而被命名，多为CD4⁻CD8⁻双阴性表型。其杀伤肿瘤细胞的机制非常复杂，主要涉及到穿孔蛋白途径和Fas/FasL介导的细胞凋亡途径，也可以通过NK样的受体，使之像NK细胞一样可直接识别蛋白质或肽类抗原，以非MHC限制性方式杀伤肿瘤细胞。

临床应用：以 γ δ T细胞为基础的免疫治疗在肺癌、肾癌、恶性黑色素瘤等Ⅰ期临床研究中已显示出良好效果，尤其是转移性恶性黑色素瘤，提示其可能成为肿瘤治疗的新途径。

三、非特异性免疫调节剂治疗

（一）效应细胞刺激剂

——刺激活化免疫效应细胞

（二）免疫负调控抑制剂

——抑制免疫负调控细胞或分子

(一) 效应细胞刺激剂

α 干扰素

具有免疫调节、抗增殖、诱导分化、促凋亡、抗血管生成等多种作用，是第一个被证实具有抗肿瘤活性的细胞因子

IL-2

是调控T细胞和NK细胞等淋巴细胞生长的重要因子

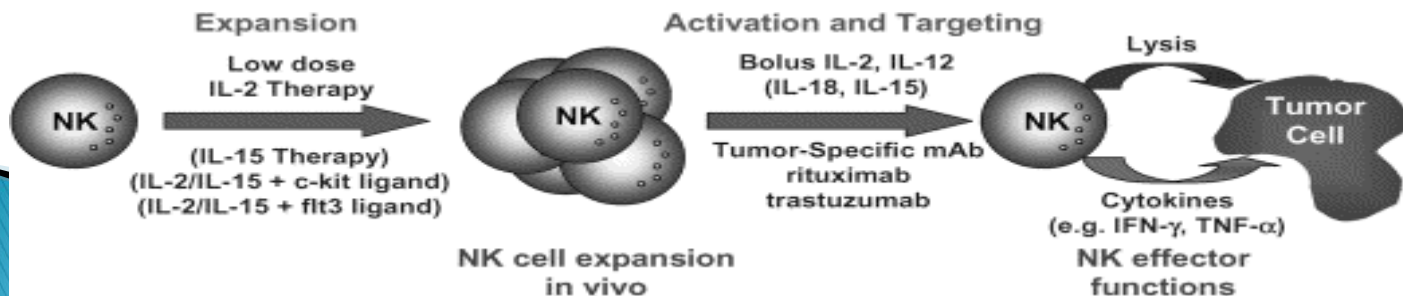
咪喹莫特

是Toll样受体7 (toll-like receptor 7, TLR7) 的激动剂，能增强固有免疫应答和适应性免疫应答

卡介苗

既可以激发固有免疫应答，又可以激发适应性免疫应答

效应细胞刺激剂



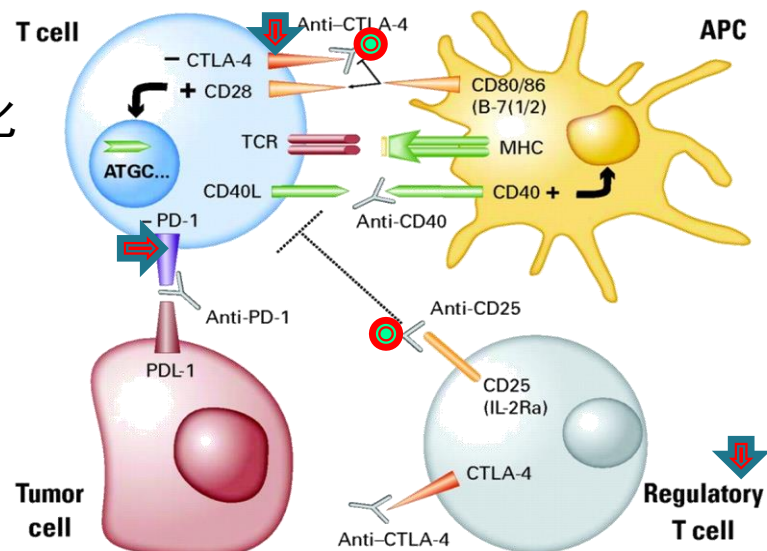
(二) 免疫负调控抑制剂

Denileukin diftitox

由IL-2的受体结合片断与具有酶活性的白喉毒素跨膜片段重组融合，与IL-2受体（CD25）结合后，被摄取进入胞浆，裂解释放白喉毒素A链，持续抑制蛋白的合成，导致细胞死亡。

CTLA-4单克隆抗体

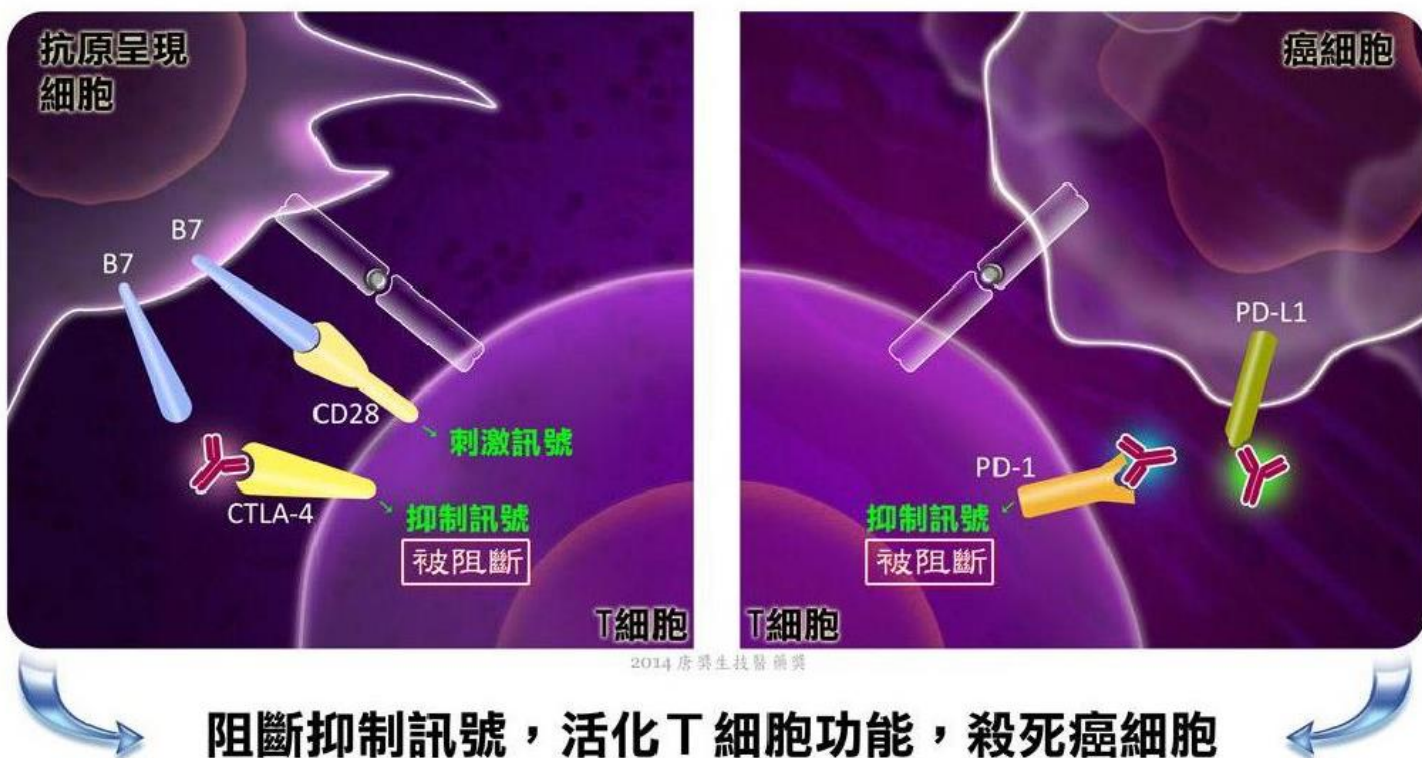
Ipilimumab和tremelimumab都是CTLA-4人源化单克隆抗体，主要通过抑制活化T细胞的CTLA-4与抗原递呈细胞的B7结合，打破免疫耐受，增强T细胞的活性。



(二) 免疫负调控抑制剂

PD-L1抗体

PD-1是程序性死亡受体-1，大部分表达于活化T细胞表面，为免疫抑制性受体，与其配体PD-L1、PD-L2相互作用传递抑制性信号，在免疫应答中发挥负向调控作用。由于肿瘤细胞高表达PD-L1，故阻断PD-L1与PD-1的结合可阻止此种机制介导的免疫抑制作用。



什么是CAR-T细胞

- 嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor, CAR）T细胞技术；
- 是过继细胞免疫治疗（adoptive cellular immunotherapy, ACI）的一种；
- 通过基因改造技术，让患者T细胞表达嵌合抗原受体，使效应T细胞的靶向性、杀伤性和持久性均较常规应用的免疫细胞高，并可克服肿瘤局部免疫抑制微环境和打破宿主免疫耐受状态；
- 是一种特异性的免疫细胞抗肿瘤治疗。

- T淋巴细胞是肿瘤细胞的天敌，在肿瘤免疫应答中起重要作用，对肿瘤细胞有极强的杀伤作用。
- 对T细胞进行基因工程处理，从而在其表面表达能够识别特异性肿瘤抗原的特殊受体称为**嵌合抗原受体（CAR）**，同时在受体的胞内段可加上引起T细胞活化的信号传递区域。
- 肿瘤对患者的免疫系统具有抑制作用，限制了自身免疫功能的诱导和激活，因此可以把患者的免疫细胞放到一种可以避开肿瘤抑制因素的环境中进行激活和扩增，然后再将扩增后的免疫细胞回输患者，从而使患者的免疫功能迅速增强，达到杀伤肿瘤细胞的作用，这种疗法就是**过继性免疫疗法**

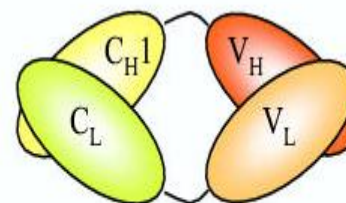
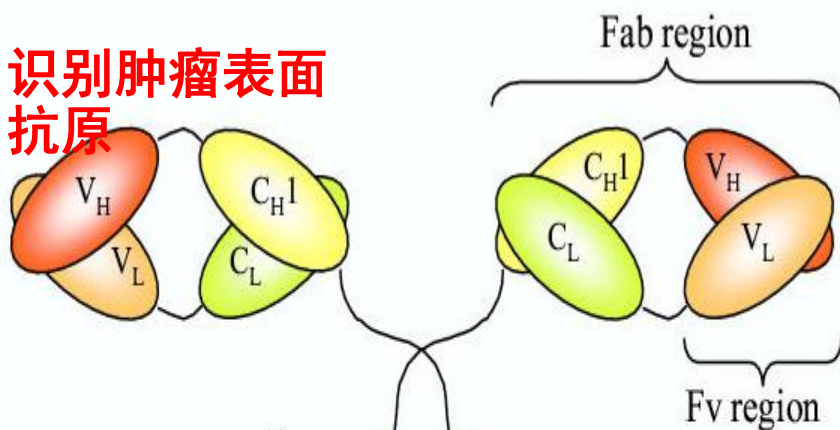
- ▶ 嵌合抗原受体（CARs）是由一个胞外抗原识别域（通常是一个单链抗体，也可以是多肽或者其他蛋白质）和一个胞内信号域组成。CAR的胞外部分用来识别特异性的肿瘤抗原，随后胞内信号域会刺激T细胞增殖，并且通过细胞溶解和细胞因子释放来消除肿瘤细胞。

- ▶ 第一代CARs的胞内信号域是CD3 ζ 信号链 (signal 1) , 这一代产品在临床试验中效果有限, 可能由于移植T细胞的活化诱导细胞死亡 (AICD) 或者T细胞扩增的持续性不好所导致。
- ▶ 第二代CARs相比第一代CARs增加了一个胞内共刺激信号域 (signal 2) 。在过去的5年里, 对于第二代含有CD28或者4-1BB (CD137) 共刺激信号域的抗CD19 CAR-T, 在治疗B淋巴细胞白血病的临床试验中都表现出优异的疗效, 但是仍然需要寻找更好的共刺激信号分子, 来解决第二代CAR-T产品作用不持久等问题。
- ▶ 第三代CARs不仅包含CD3 ζ 信号域, 还包括两个共刺激信号分子 (图1) , 这些共刺激信号分子主要包括CD28、4 -1BB以及OX40 (CD134) 等, 在临床前研究中发现第三代CAR-T细胞疗法效果要优于第二代产品

CAR构成 (1) -----scFV (单链抗体)

特异性

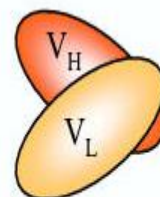
识别肿瘤表面
抗原



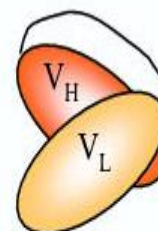
Fab fragment

Fc region

Conventional IgG



Fv fragment

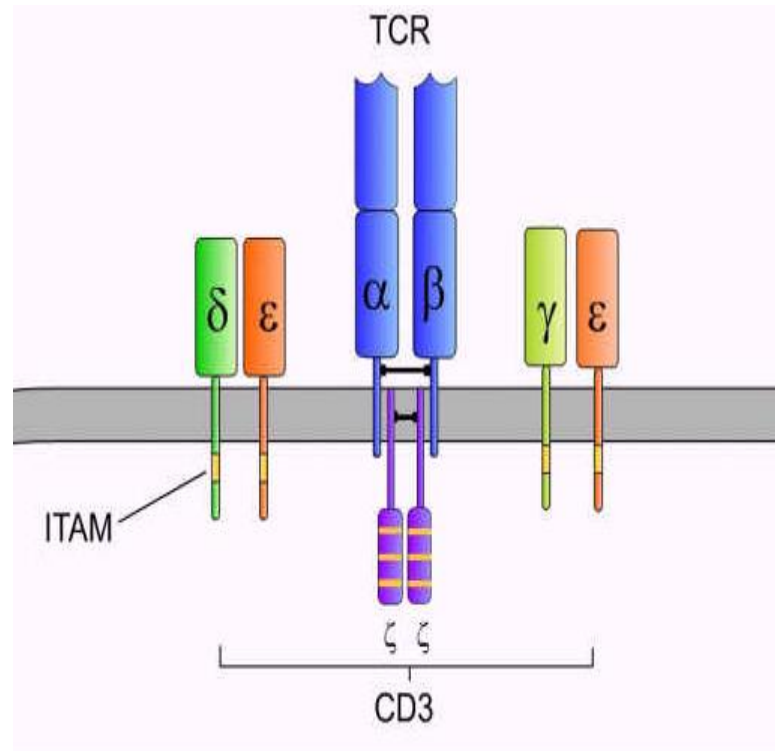


scFv fragment

CAR构成 (2) ----- TCR/CD3/ ζ

有效
性

产生信号，激活T
淋巴细胞



CAR构成 (3) ----- co-stimulator

增殖与存活

加入CD28，产生IL-2等

CD28是T细胞表面的一个蛋白，能够为T细胞提供共刺激信号，对T细胞的活化和存活具有重要作用。T细胞刺激信号通过CD28，能够促进多种白介素的分泌。

加入CD137 (4-1BB)，增强多种能力

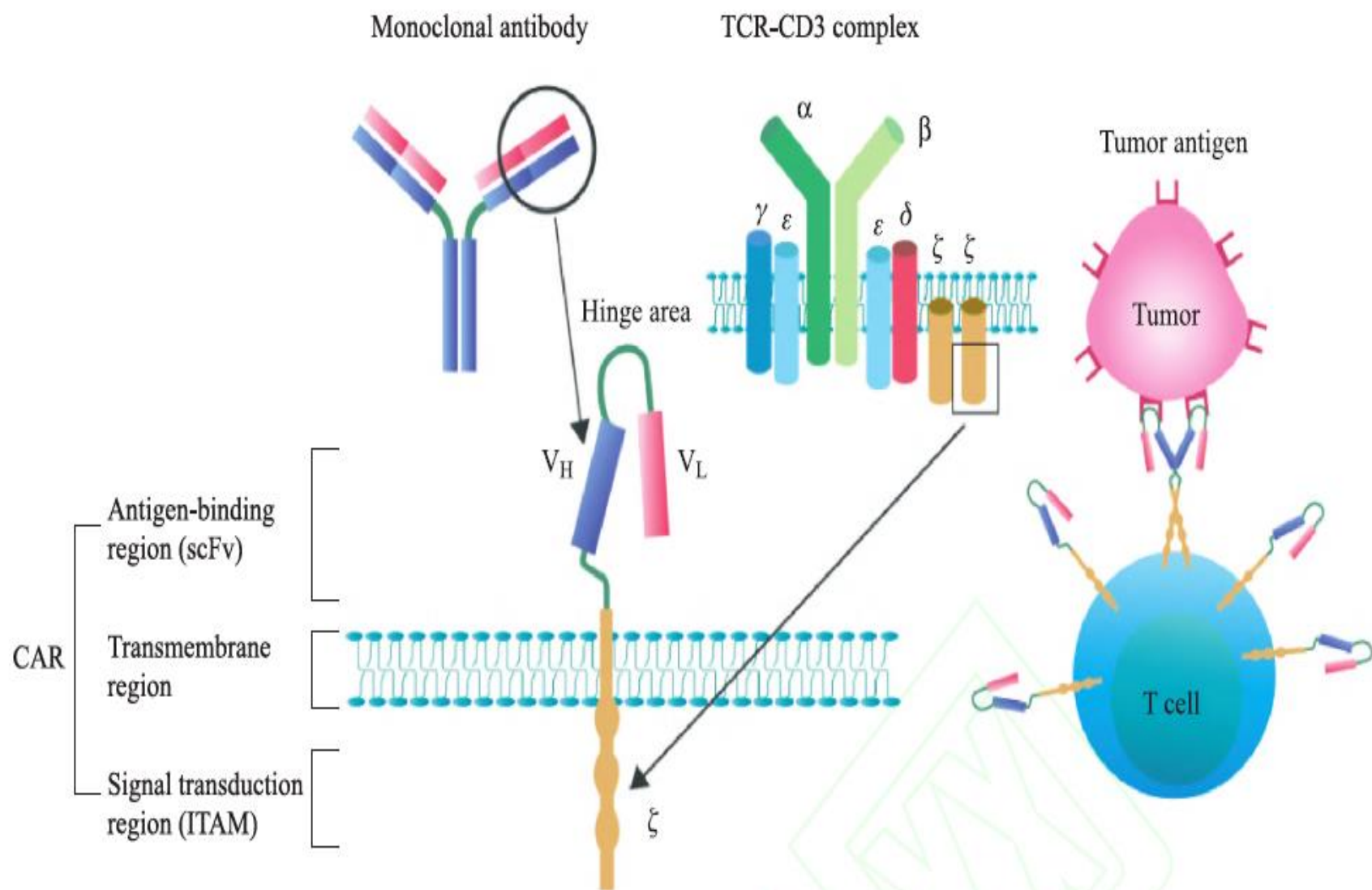
CD137，又被称作4-1BB、TNFRSF9等，它是TNF受体家族成员。CD137表达于活化后的T细胞，也表达于树突细胞，滤泡树突状细胞、NK细胞、粒细胞以及炎症位置的血管壁细胞等。

CD137可以作为共刺激信号激活T细胞，能够增强T细胞的增殖、存活能力、细胞裂解作用以及IL-2分泌等。

CAR-T细胞的发展过程

第一代CAR-T细胞

- 发表时间：1989年；
- 嵌合受体的形成方法： Eshhar研究小组将免疫球蛋白样scFv和Fc ϵ RI受体(γ 链)或CD3复合物(ζ 链)胞内结构域融合形成嵌合受体；
- 激活方式：表达CAR的T细胞以抗原依赖、非MHC限制的方式结合肿瘤抗原，启动并活化特异性杀伤肿瘤反应；
- CARs表达的稳定性依赖于所用的胞内信号域；
- 大多数试验在细胞扩增、体内存活时间、细胞因子分泌等方面存在不足，治疗效果不明显。



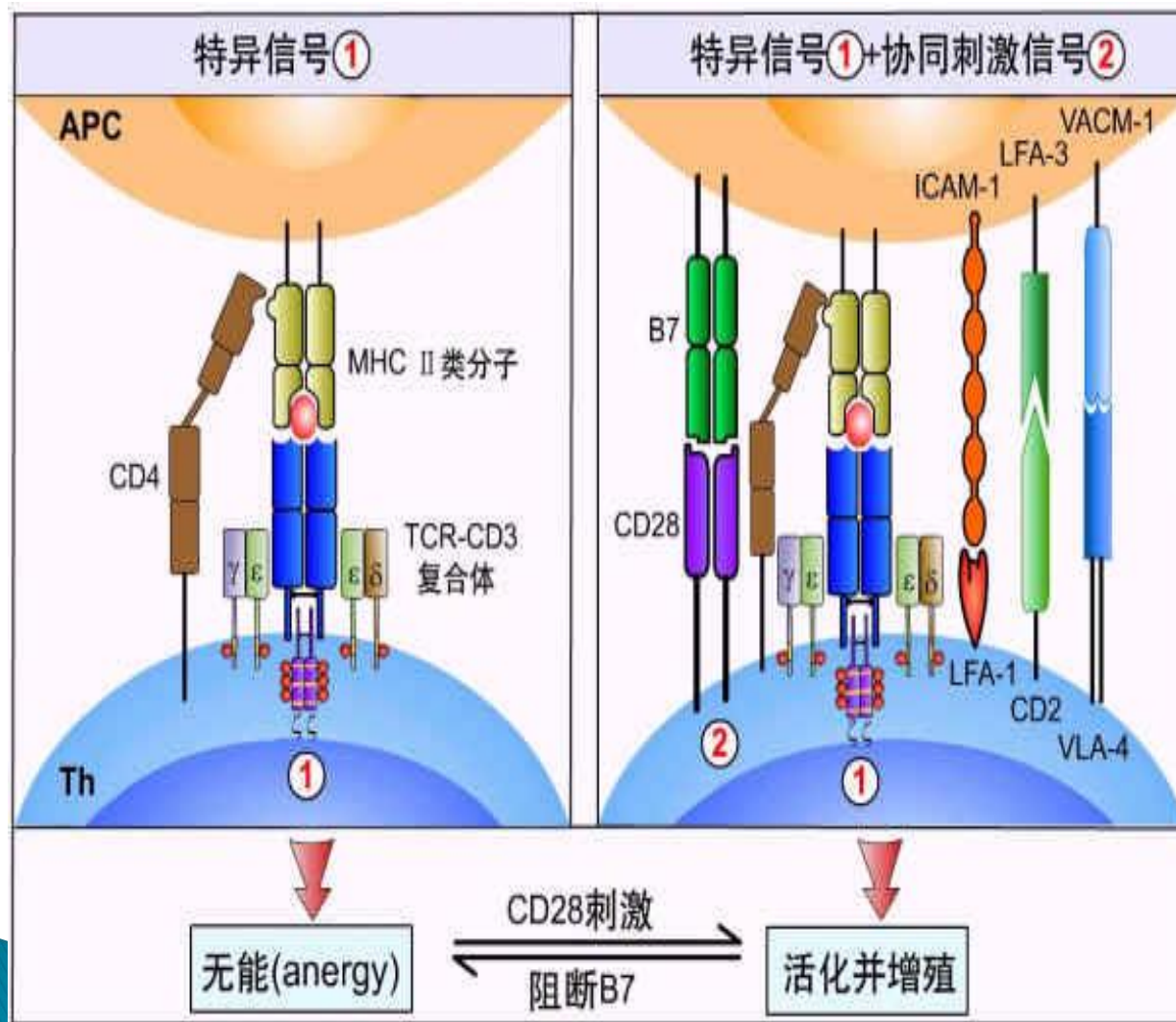
Monoclonal antibody: 单克隆抗体; TCR-CD3 complex: T细胞受体-CD3分子复合物; Antigen-binding region: 抗原结合区; Transmembrane region: 跨膜区; Signal transduction region: 信号转导区; Hinge area: 铰链区; V_H : 重链; V_L : 轻链; Tumor antigen: 肿瘤抗原; T cell: T细胞。大多数CAR包括胞外抗原结合区(由来源于单克隆抗体的轻链和重链组成, 中间由带韧性的铰链区连接形成单链抗体)、跨膜区域(一般由同源或异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白组成)和胞内信号转导区(免疫受体酪氨酸活化基序, 通常为CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ)组成。

CAR-T细胞的发展过程

第二代CAR-T细胞

- 发表时间：2010年；
- 嵌合受体的形成方法：T细胞的完全活化有赖于双信号*和细胞因子的作用。因此，依照T细胞活化的双信号学说，第二和第三代CARs 在嵌合受体上加上如CD28、CD134(OX40)和CD137(4-1BB)等共刺激分子(costimulatory molecule, CM)，以提高T细胞的细胞毒性、增殖活性，维持T细胞应答，延长T细胞存活时间等（图2）；
- **CD28、CD134对提高初始T细胞获得持久的体外增殖和较强的细胞因子分泌非常重要；**
- 在治疗慢淋中观察到：体内扩增1000倍以上, 而且在血液和骨髓中存活的时间也超过6个月，分泌的细胞因子如干扰素- γ 、CXCL9等较治疗前显著增高。

T细胞激活需要双信号



第一信号为**特异性信号**，由TCR识别抗原递呈细胞表面的抗原肽-MHC复合物所启动；

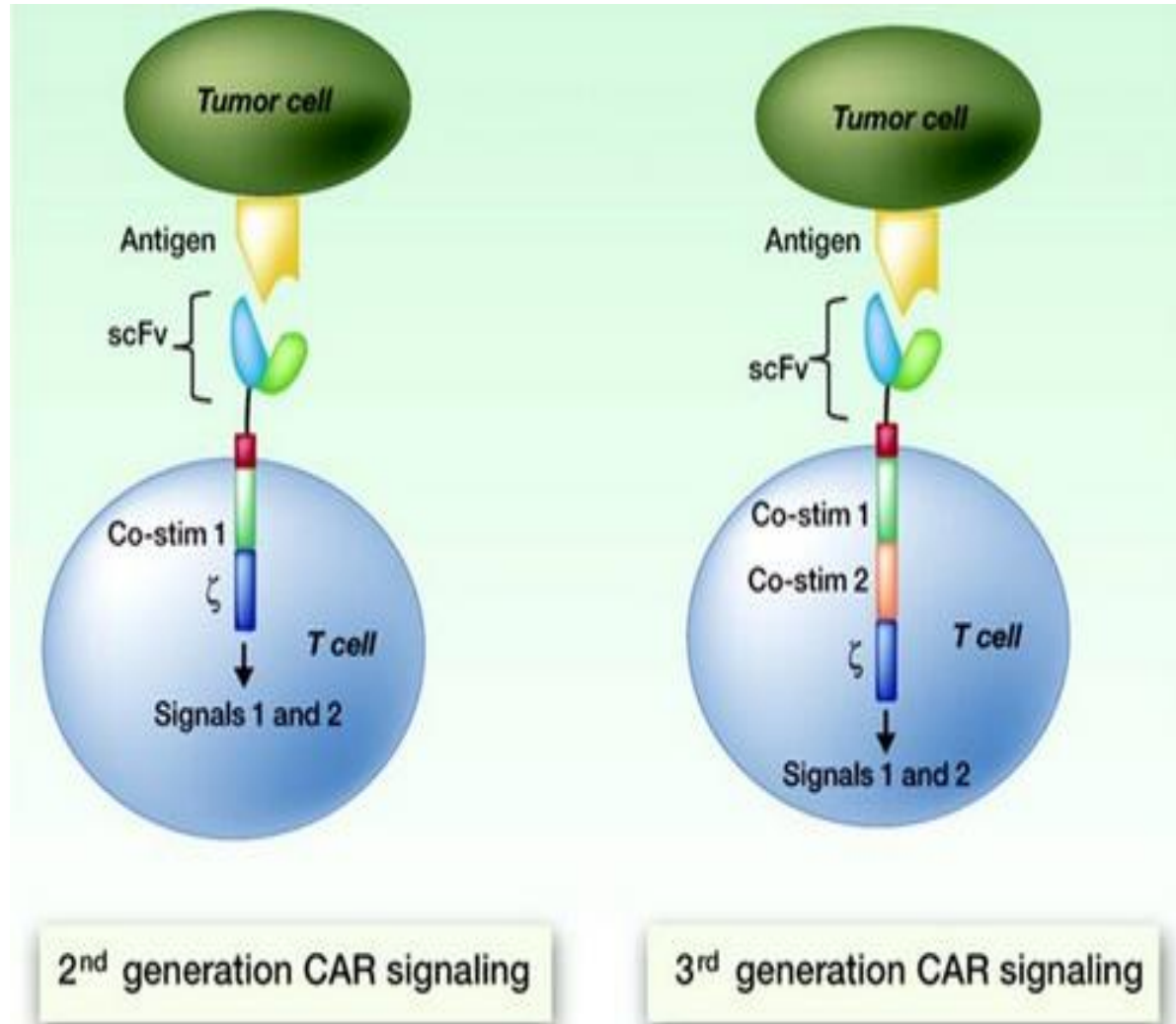
第二信号为**协同刺激信号**，通过CD28/B7等重要的共刺激分子，促进IL-2合成，并使T细胞充分活化及免于凋亡。

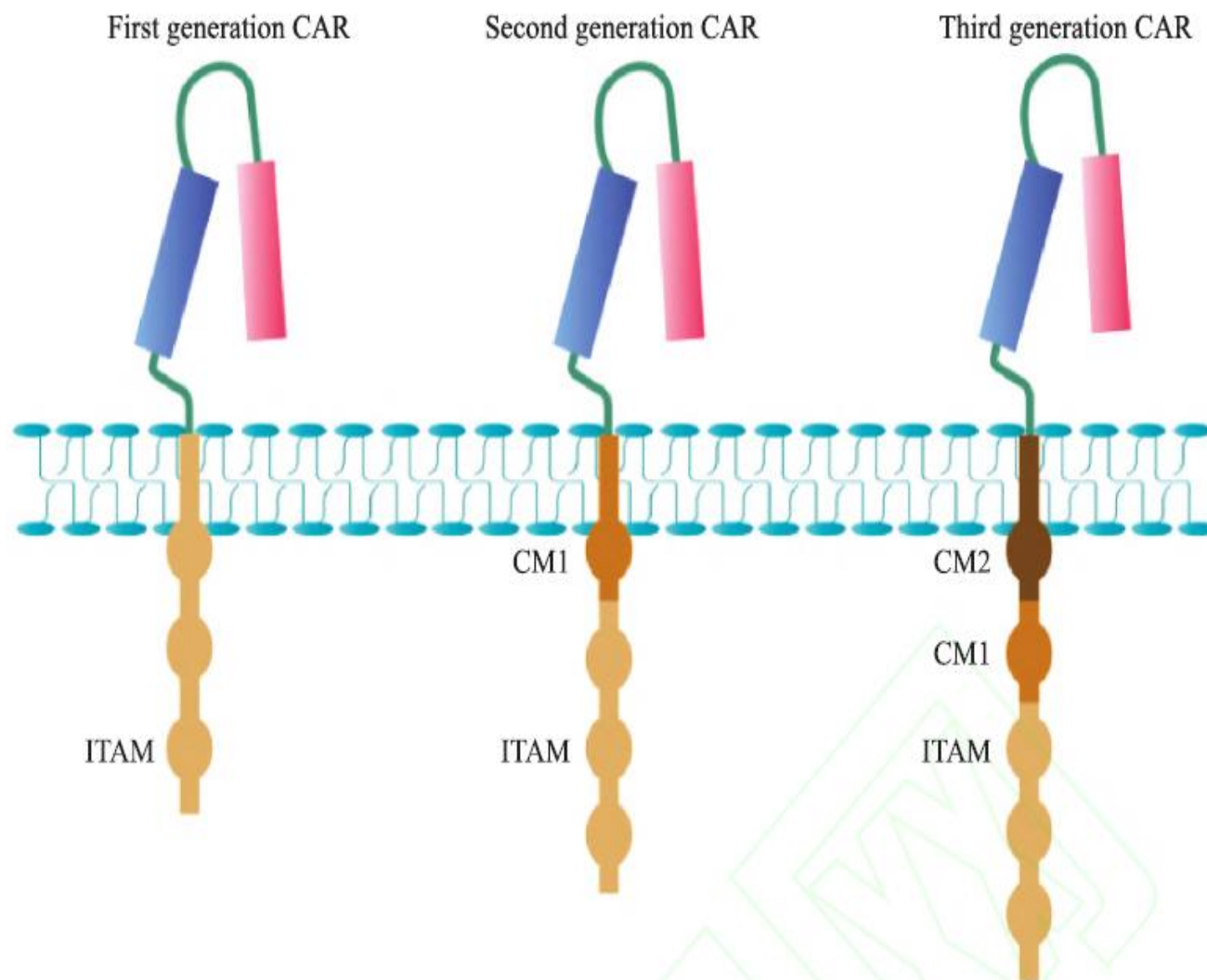
CAR-T细胞的发展过程

第三代CAR-T细胞

- 发表时间：2012年；
- 嵌合受体的形成方法：以逆转录病毒为载体构建第三代CAR-T细胞（scFv CD20-CD28-CD137-CD3 ζ ）；
- 两个共刺激因子，进一步提高细胞增殖能力及细胞毒性
- 患者输注后4小时血液就检测出有高水平的IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 和IL-6等细胞因子；
- 效应细胞在体内存活的时间超过12个月；
- 由于目前第三代CAR-T细胞临床应用还比较少，故其安全性和有效性是否就一定优于第二代CAR-T细胞，以及选择怎样的共刺激分子组合，还需进一步观察。

2nd & 3rd generation CAR结构示意图





第一代CAR(左)由单链抗体通过跨膜区域与胞内信号传导区(ITAM)相连, ITAM通常为CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ ; 第二代CAR(中)的胞内信号转导区引入了共刺激分子CM1, 主要为CD28分子; 第三代CAR(右)引入了双共刺激分子(CM1和CM2), 主要为CD28分子加上CD134或CD137。

In the CAR of first generation, single chain antibody links the ITAM (CD3 ζ or Fc ϵ RI γ) at transmembrane region. In the second generation, costimulatory molecule (CM1, such as CD28) has been engineered to the signal transduction region. The third generation has been engineered another costimulatory molecule (CM2) based on the second generation, combining CD134 or CD137.

CAR-T细胞的发展过程

第四代CAR-T细胞（展望）

整合自杀基因，精确调控，细胞因子释放（如IL-12）激活等

第五代CAR-T细胞（展望）

通用CAR-T

- CAR-T高度个性化
- 不便于cGMP管理
- 成本非常高

CAR-T技术中TAA概念

▶ TAA (Tumor-Associated Antigen, 肿瘤相关抗原) :
即肿瘤所表达的抗原, 是scFV的结合抗原, 对CAR-T起定向作用。

▶ Perfect TAA:

- 1. 仅存在于肿瘤表面, 不在任何正常组织中表达;
- 2. 为肿瘤生长所必需, 能产生强大的效力;
- 3. 不能通过免疫编辑和肿瘤逃逸而逃脱。

▶ TAA基本要求:

- 1. 抗原必须表达在细胞表面;
- 2. 肿瘤之外的抗原表达绝对不能在重要脏器或者细胞类型上(例如造血干细胞);
- 3. 为了防止抗原逃逸, 所有的肿瘤细胞都必须表达这个抗原, 换句话说, 抗原对于肿瘤维持其肿瘤特性来说是必需的。

CAR-T细胞治疗技术的五大优势（1）

安全性高

CAR-T细胞治疗采用的是患者**自体来源**的细胞回输技术，避免了移植物抗宿主病等疾病。近年来，美国多项临床试验数据证实，恶性肿瘤的CAR-T细胞治疗是一项安全有效的生物治疗技术。针对CAR-T细胞所用载体长达192人·年的安全性观测结果显示，**载体是非常安全的**。

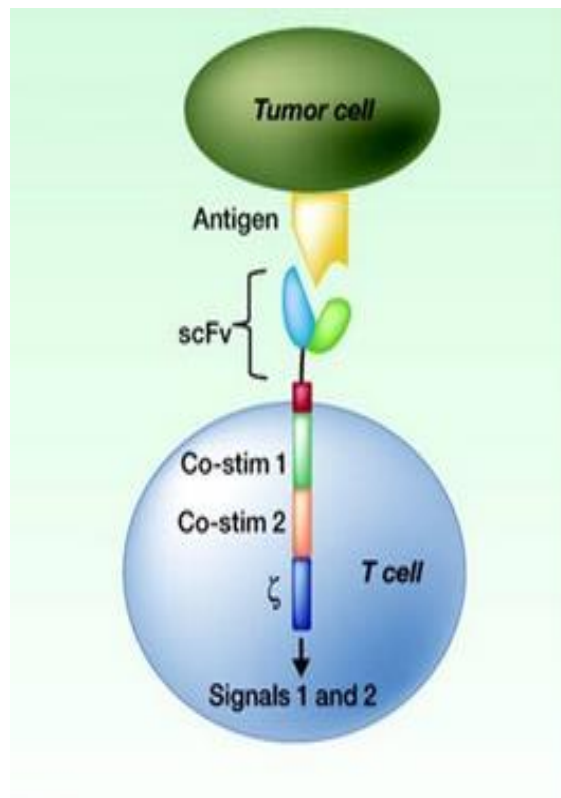
未名CAR-T技术全程处于GMP标准洁净车间，严格质量控制，全流程检查，全部合格后才放行，安全性绝对可靠。



CAR-T细胞治疗技术的五大优势（2）

靶向性强

CAR-T细胞治疗技术的精髓就是为T细胞装上“**精确导航系统**”，对肿瘤细胞进行**靶向“定点清除”**，成功**避免**了对**正常组织和细胞的伤害**。这个“精确导航系统”就是位于嵌合抗原受体上的scFv片段，它能准确识别肿瘤细胞表面的肿瘤相关抗原，然后激活CAR-T细胞，对肿瘤细胞进行杀伤。



CAR-T细胞治疗技术的五大优势（3）

临床效果好

CAR-T细胞治疗技术，除了**靶向性强**之外，还实现了**T细胞体内增殖**以及**长时期存活**，并能**形成中枢记忆T细胞**。嵌合抗原受体中包含的肿瘤相关抗原单链抗体、细胞激活信号以及共刺激信号，为T细胞精准有效的杀伤作用提供了强有力的支持。目前对某些类型肿瘤的治愈率（CR）超过60%，部分类型的肿瘤治愈率（CR）甚至超过90%。



CAR-T细胞治疗技术的五大优势（4）

副作用小

CAR-T细胞的低烧、乏力等症状，完全可控整个治疗全程，只需抽血与回输即可，**几乎无创**，对患者正常生活的影响很小。CAR-T细胞对肿瘤细胞的精确杀伤，极大地避免了对身体正常组织和细胞的损害。CAR-T细胞治疗的**临床副作用很少**，主要为CAR-T回输之后，可能会出现短时间内。



CAR-T细胞治疗技术的五大优势（5）

适用范围广

适用CAR-T细胞治疗的肿瘤

呼吸系统	肺癌（小细胞肺癌、鳞癌、腺癌）、鼻咽癌等
------	----------------------

消化系统	肝癌、胃癌、结直肠癌等
------	-------------

泌尿系统	肾癌、肾上腺癌及其转移癌等
------	---------------

血液系统	急慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤（T淋巴瘤除外）等
------	-------------------------

其他肿瘤	恶性黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、舌癌等
------	---------------------

CAR-T细胞治疗还适用下述患者

手术切除原发灶，但免疫力低下、恢复慢的患者

肿瘤已广泛转移、无法进行手术的患者

对放化疗毒副作用较大或对放化疗不敏感的患者

经手术及放化疗治疗后，需预防肿瘤复发的患者

CAR-T细胞疗法的治疗过程

CAR-T细胞的生产和治疗主要有以下几个步骤：

- (1) **白细胞分离**：将病人的T细胞从外周血中分离出来；
- (2) **T细胞活化**：使用抗体包被的磁珠（人工树突状细胞）来激活T细胞；
- (3) **转染**：在体外对T细胞进行基因改造，使其表达嵌合抗原受体；
- (4) **扩增**：基因修饰过的T细胞在体外扩增；
- (5) **化疗**：在T细胞回输之前对病人进行化疗预处理；
- (6) **回输**：将基因修饰过的T细胞回输入病人体内（图2）。

1 Leukapheresis

5 Modified T-cell infusion

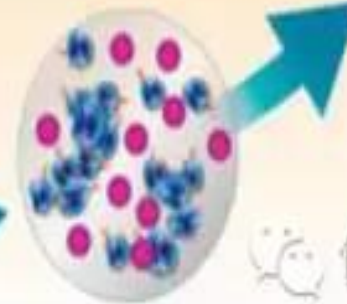
4 Chemotherapy

2 T-cell activation/
transduction^a

3 Modified T-cell
expansion^a

Antibody-coated
beads

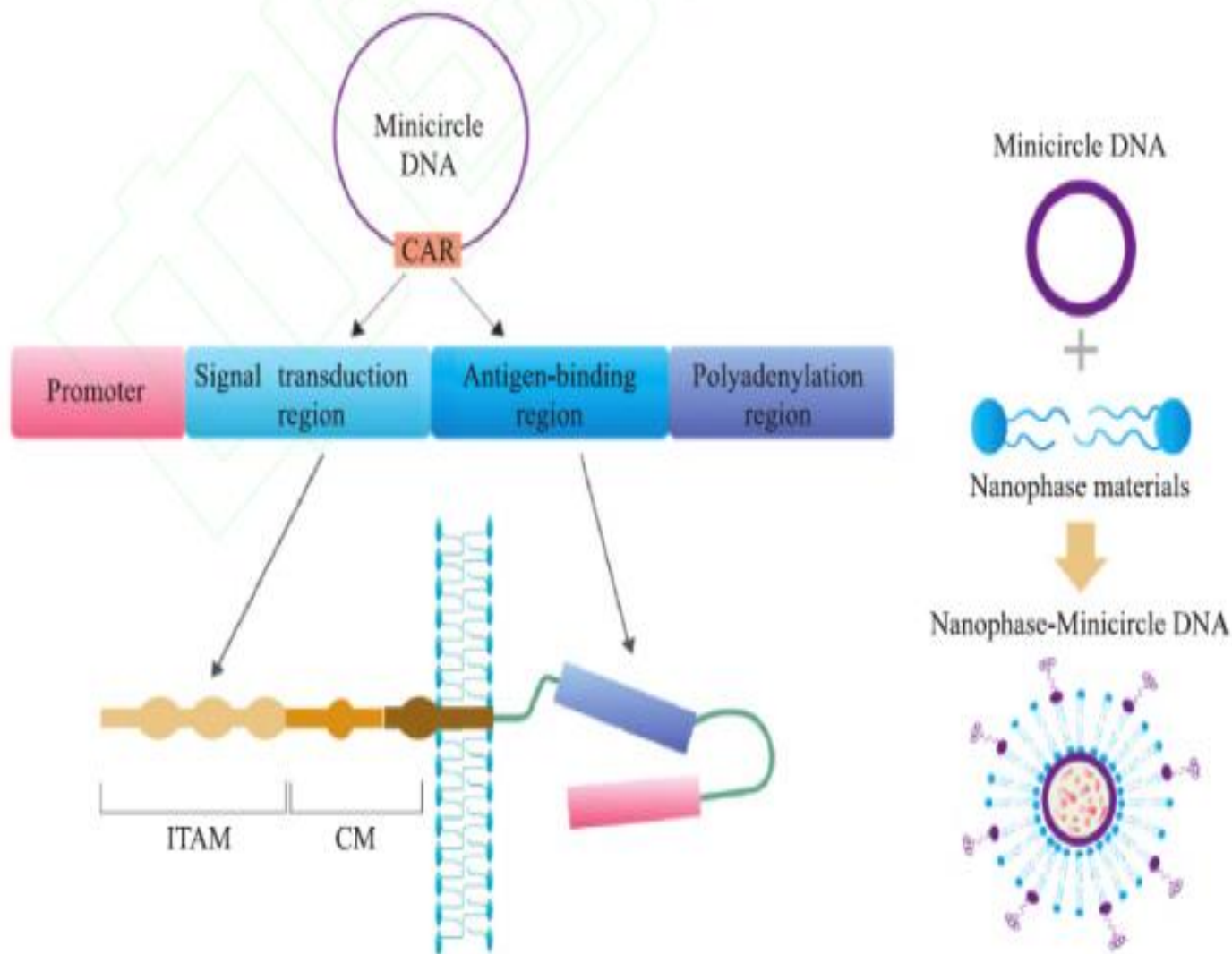
Bead removal



创药网

CAR-T细胞基因转导的方法

- 基因导入的载体主要分为**病毒类**和**非病毒类**；
- 病毒载体的**转移效率高**，培养T细胞到达临床数量的时间相对较短，且不同病毒载体具有不同表达特点，故在基础研究和临床试验中应用广泛，是目前主要的基因治疗载体。约70%的治疗方案采用病毒载体。目前最常用的主要是**逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒载体**等；
- 非病毒载体有**裸DNA、脂质体、多聚物分子耦联体**等；
- 近年来，**微环DNA**被认为是最好的非病毒载体之一，在基因治疗中已被广为应用。



Minicircle DNA: 微环DNA; Promoter: 启动子; Polyadenylation signal: 加尾信号; Nanophase materials: 纳米材料; Nanophase-minicircle DNA: 纳米-微环DNA。微环DNA-纳米系统, 是一个通用基因治疗载体, 能较好解决体内DNA投递问题。保持其基本结构不变, 仅改变DNA序列, 便可用来治疗不同疾病。通过将纳米-微环DNA体内靶向转染T淋巴细胞, 能优化现有的CAR-T技术。

Minicircle DNA-nanophase system is a general vector of gene therapy, with superiority of DNA delivery. It targets different diseases by changing the DNA sequence with preservation of the basic structure. CAR-T technique could be optimized by transfection of T cells via nanophase-minicircle DNA.

CAR-T细胞临床应用中的问题

CAR-T细胞的脱靶效应 (OFF-TARGET EFFECT)

是细胞对设计之外的额外靶点的作用，导致针对正常组织的自身免疫病反应。

原因：除了前列腺特异性膜抗原（PSMA），表皮生长因子受体 III（EGFRv III 等肿瘤特异性抗原外，大多数靶点是针对肿瘤相关抗原。这些抗原只是重要组织不表达或是损耗组织表达。

CAR-T细胞的细胞因子风暴 (CYTOKINE STORM)

体液中多种细胞因子如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MCP-1和IL-8等迅速大量产生的现象，是引起急性呼吸窘迫综合症和多器官衰竭的重要原因。原因：CAR-T细胞更强的亲和力和信号传导功能使其结合相关抗原后，能大量释放细胞因子，引起炎症反应。

CAR-T细胞的插入突变 (INSERTION MUTATION)

一个基因的DNA中如果插入一段外源DNA片段，那么其结构便被破坏而导致突变，称为插入突变。原因：CAR-T技术是在T细胞中插入一段外源DNA片段，理论上说其结构已被破坏，存在一定的致癌风险。

CAR-T细胞存在问题的可能解决办法

- 首先，很多临床试验采用了剂量爬坡的治疗方法。在同一代次的治疗中，把细胞剂量由小到大分散到几次回输中，并不断监测细胞毒性；或是应用第一或者第二代CAR没有观察到毒性后，再开始下一代CAR-T细胞的治疗，防止可能诱发大规模不良反应。
- 其次，可以引入自杀基因的人工调控开关，通过自杀基因系统删除识别靶抗原的剩余CAR-T细胞。
- 第三，可以把CAR中信号结构域分裂到两个不同CAR（信号一CAR和信号二CAR），只有当两个CAR与肿瘤表面的靶抗原都结合以后，才能完全激活应答。
- 第四，除了激活受体外，还可以引入抑制性CAR。
- 最后，还可以根据靶抗原表达水平，微调CAR亲和性。

谢谢！