

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.018

· 综述 ·

基因修饰 T 细胞肿瘤过继免疫治疗的安全性及研究进展

Safety and progress of genetically modified T cells for cancer adoptive immunotherapy

权冰洁 综述;韩双印,王春荣 审阅(郑州大学人民医院 河南 郑州 450003)

[摘要] 基因修饰 T 细胞(CAR-T, TCR-T)赋予其肿瘤靶向性、更强的杀伤活性和持久的生命力,在恶性血液肿瘤和实体瘤的临床试验中取得了可喜的效果。然而,不断积累的的临床资料也发现了安全性担忧:炎症细胞因子级联反应引发的肿瘤靶向毒性;抗原识别相关的脱靶效应、非肿瘤靶向效应、移植物抗宿主病等,不仅难以预见而且复杂难治,促使研究人员以毒性发生机制为切入点,尝试应用自杀基因开关、细胞内凋亡酶调控、分离式 CAR 受体、抑制性 CAR 受体等调控策略,实现对基因修饰 T 细胞时间和空间的精准控制,预防毒性反应的发生。本文综述基因修饰 T 细胞的安全问题及应对策略。

[关键词] 基因修饰 T 细胞;免疫治疗;安全性;肿瘤

[中图分类号] R730. 2; R730. 43

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)04-0417-05

肿瘤过继免疫治疗(Adoptive immunotherapy, AIT)由于靶向性差、杀伤力弱、生存期短,始终没有进入一线的临床治疗。近年来,以嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)、T 细胞受体(T-cell receptor, TCR)转导 T 细胞为代表的基因修饰策略打破了 AIT 的徘徊局面,在 B 细胞恶性血液肿瘤中取得了令人瞩目的治疗效果,其杀伤力、靶向性和持久性重燃了人们对 AIT 的信心^[1]。然而,随着临床试验的不断推进,发现了基因修饰 T 细胞的“双刃剑”作用,其安全性引起人们的关注^[2],成为从实验室到临床跨越的关键。本综述从受体结构、功能属性、时空调控等方面,总结了安全策略,分析了精准医疗时代治疗性 T 细胞的应用前景。

1 基因修饰 T 细胞的基本要素

理想的基因修饰 T 细胞对靶抗原具有高亲和力,一旦识别靶细胞便快速增殖,分泌细胞因子,并在体内持续这种效应。肿瘤浸润淋巴细胞治疗黑色素瘤研究的不断深入,AIT 获得良好临床效应所需要的条件逐渐明确:(1)选择最佳的靶抗原;(2)最大程度的确保治疗性 T 细胞质量和数量的一致性;(3)体内输注的 T 细胞有持久活性。首先,用于基因修饰的 T 细胞是肿瘤患者的外周血淋巴细胞,在体外经过单克隆抗体、免疫磁珠、人工抗原提呈细胞及 γ c 家族细胞因子(IL-7、IL-15 和 IL-21 等)有效活化与扩增后,T 细胞持续增殖能力和杀伤能力得到提升^[3]。其次,基因转导方法,重组病毒多以逆转录病毒或慢病毒为载体^[4],到目前尚未发现插入性基因突变的报道,但病毒载体的高制作费用影响其推

广应用。非病毒载体如电穿孔、睡美人^[5]和 Piggy-bac 转座子系统^[6]等,制造成本低、免疫原性弱,有很好的应用潜力。再者,基因修饰 T 细胞识别靶抗原的机制不尽相同,TCR 能识别肿瘤细胞表面和细胞质内的靶抗原,且有 MHC 限制性;CAR 则依赖独特的抗体可变区识别细胞表面的多数天然蛋白质、糖原和脂质抗原表位。基因修饰赋予 T 细胞肿瘤靶向性、更强的杀伤活性,以及持久性甚至自我增殖能力。

2 基因修饰 T 细胞治疗安全隐患

以 CAR 和 TCR 为代表的基因修饰 T 细胞,不但获得了靶向性,也提高了杀伤活性和持久性。CAR 是将识别肿瘤相关抗原的单链抗体(single chain variable fragment, scFv)、共刺激分子(costimulatory molecule, CM)和免疫受体酪氨酸活化基序(immunor tyrosine-based activation motifs, ITAM)嵌合于一体,把抗体的特异性和 T 细胞的杀伤活性相

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81372405);国家卫计委科研基金项目(No. 201301010)。Project supported by the Natural Science Foundation of China(No. 81372405), and the Scientific Foundation of National Health and Family Planning Commission of China(No. 201301010)

[作者简介] 权冰洁(1991-),女,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗临床研究,E-mail:quanbjandle@126.com

[通信作者] 韩双印(Han Shuang-Yin, Corresponding author),博士,主任医师,博士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗基础与临床研究,E-mail:hansyzzu@163.com;王春荣(Wang Chun-Rong, Corresponding author),硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事肿瘤临床治疗与研究,E-mail:wangchunrong@126.com

结合。肿瘤特异性 TCR 是从高亲和力的人 T 细胞或接种了肿瘤抗原的人源化小鼠 T 细胞中分离的 TCR 基因 α/β 链, 将其克隆入载体修饰 T 细胞, 可识别肿瘤相关或特异抗原, 特异杀伤肿瘤。基因修饰 T 细胞的理论优势和临床前试验的良好表现, 促使 CAR-T 和 TCR-T 细胞治疗临床试验在世界各地迅速展开, 尤其是 CAR-T 在 B 细胞恶性血液肿瘤治疗中取得了鼓舞人心的效果。然而, 随着临床实践的增多, 也使人们认识到其潜在的安全担忧。肿瘤靶向毒性广被报道, 如细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)、肿瘤细胞溶解综合征(tumor lysis syndrome, TLS)、巨噬细胞活化综合征(macrophage activation syndrome, MAS); 脱靶和非肿瘤靶向效应虽不普遍但有时致命; 逆转录病毒转导细胞可能导致插入突变和致癌基因扩增; 载体的免疫原性和调节毒性等。

2.1 肿瘤靶向毒性

基因修饰 T 细胞攻击恶性肿瘤细胞时, 肿瘤细胞坏死或 T 细胞释放的炎症细胞因子引发的不良反应即肿瘤靶向毒性。基因修饰 T 细胞可克服非生理性增殖和持久性的障碍, 长期处于活跃状态, 发挥效应时释放大量促炎症因子(IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 等) 进入血循环, 触发以发热、寒颤、低血压和缺氧为特点的免疫反应即 CRS^[7]。据报道^[8], 输注 CD19 CAR-T 细胞治疗 16 例急性 B 淋巴细胞白血病中, 7 例出现 CRS, 其中 3 例为严重的意识丧失需要呼吸支持, 血清中各炎症细胞因子水平明显升高。TLS^[9] 与 CRS 症状有很大重叠, 由快速、大量的肿瘤细胞损伤触发, 以磷酸盐、钾和尿酸血清水平升高为病理生理特点。TLS 的严重性与输注 T 细胞后残余肿瘤细胞负荷程度正相关, 可通过调整细胞输注计划避免 TLS。MAS 则以全身炎症反应和全血细胞减少为特点^[10]。二代 CD19 CAR-T 细胞临床试验中, 患者出现发热、低血压、噬血现象等症状, 多数患者出现可逆的神经毒性(谵妄和癫痫样症状), 原因可能与 T 细胞介导的炎症反应而非 CAR-T 细胞对大脑的直接毒性相关, IL-6 是诱导 MAS 的决定性致病因子, IL-6 mAb 的治疗反应可证明之^[11]。

2.2 脱靶效应

基因修饰 T 细胞因交叉反应识别非靶抗原, 或 TCR-T 细胞的 α/β 链与内源性 TCR 错配产生未知的特异性引发的自身反应, 即脱靶效应。有些 CAR 的胞内信号域采用 IgG1 Fc 段, 会激活巨噬细胞和 NK 细胞, 存在脱靶产生毒性风险。费城宾夕法尼亚大学报道的人黑色素瘤相关抗原 MAGE-A3 特异

性 TCR 修饰 T 细胞临床试验^[12-13], 2 例在输注基因修饰 T 细胞几天后发生心源性死亡, 但没有证据显示死亡是由基因修饰 T 细胞的直接毒性引起。随后发现, 患者体内的 MAGE-A3 特异性 TCR 的 α 链中发生突变产生了高亲和力 TCR, 且 TCR 识别的 MAGE-A3 多肽与源于心肌细胞肌联蛋白的 HLA-A1 限制性多肽发生了交叉反应, 致心肌细胞能被输注的 T 细胞杀死。由于部分抗原只在特定分化阶段表达, 交叉反应引起的脱靶效应难以预见。

2.3 非肿瘤靶向效应

非肿瘤靶向效应是由正常组织表达的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA) 被基因修饰 T 细胞识别引发的不良反应。鉴于重定向 T 细胞的强大效能, 即使低水平表达也可能造成对机体的巨大损害。1 例肝、肺转移的结直肠癌患者在输注 Her2 CAR-T 细胞后 15 min 出现呼吸困难, 5 d 后死于多器官衰竭^[14]。因 Her2 也表达于正常肺组织, CAR-T 细胞识别后释放炎症细胞因子, 肺毒性和细胞因子风暴导致了多器官衰竭。MAGE-A3 特异性 TCR-T 细胞临床试验中^[15], 9 例患者输注 T 细胞后 3 例出现精神改变, 2 例昏迷和死亡, 尸检显示脑白质坏死且伴随 CD8⁺ T 细胞浸润, 随后的研究显示 MAGE-A3 TCR-T 细胞不仅识别 MAGE-A3, 还识别 MAGE-A9 和 MAGE-A12, 而 MAGE-A12 在人类神经元的一些区域低水平表达, 引起神经毒性。肾细胞转移癌患者输注碳酸酐酶 IX(carbonic anhydrase-IX, CAIX) CAR-T 细胞后出现胆汁阻塞, 源于这种酶也生理性表达于胆管上皮细胞^[16]。相似的, 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) CAR-T 细胞治疗转移性结直肠癌出现短暂且严重的结肠炎^[17], 也是 CEA 在正常肠道上皮细胞表达的结果。尽管靶抗原在非肿瘤组织表达水平较低, 仍会引发严重的不良反应; 在不重要组织表达发生的不良反应易于掌控, 但重要组织上产生的毒性反应则难以掌控, 因此应重视高亲和力和高效能的重定向 T 细胞对正常组织的潜在伤害。

2.4 移植物抗宿主病

基因修饰 T 细胞输注在发挥抗肿瘤作用的同时, 常伴随着移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD), 出现类似异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 后复发白血病患者输注供体淋巴细胞(donor lymphocyte infusion, DLI) 所产生的症状, 主要累及皮肤、肝脏和胃肠道^[18]。黑素细胞分化抗原 MART-1 和 gp100 CAR-T 细胞治疗黑色素瘤中, 患者出现皮疹、

葡萄膜炎、听力减退与 GVHD 相关,因为基因修饰 T 细胞攻击了同样表达 MART-1 和 gp100 的富含黑素组织和有色组织,引发皮肤、角膜和内耳 GVHD^[19]。通过选择主要在肿瘤细胞表达、在正常组织中缺失的抗原来提高基因修饰 T 细胞治疗的特异性是研究的一个焦点;移植后应用高剂量的环磷酰胺和骨髓粒细胞集落刺激因子预防 GVHD 等也在不断探索中。

2.5 其余不良反应

另外,还存在一些发生率较低的不良反应。(1)插入突变^[20]:病毒载体的集合体近似于生长促进基因,能导致原癌基因的反式激活和恶性转化。数百个患者参与的临床试验中,并没有基因修饰 T 细胞引起插入突变的报道,但转基因的本质和造血干细胞的潜能可能使病毒载体易致细胞恶性转化,未来的研究这种毒性必须考虑在内^[21]。(2)人抗鼠抗体反应^[22]:基因修饰 T 细胞的抗原识别区多源于小鼠单克隆抗体,潜在免疫原性可能导致免疫反应。因此只要情况允许,尤其重复给予剂量时,最好用人源化单链抗体或人源抗体基因序列。(3)非清髓性化疗预处理方案(氟达拉滨结合环磷酰胺)显著提高了 AIT 疗效,然而免疫抑制失去了有效控制潜在病毒病原体产生,会出现如巨细胞病毒(CMV)和 EB 病毒(EBV)感染引发的淋巴组织增生即调节毒性^[23]。在输注基因修饰 T 细胞前,少量给予病毒特异性 T 细胞可控制 CMV 感染和 EBV 淋巴组织增生,为无免疫调节能力患者提供保护性免疫力。

3 应对策略

不同于小分子和生物制剂,基因修饰 T 细胞治疗有一个漫长甚至不确定的半衰期,其毒副作用的复杂性、难治性、不可预料性对患者的生命造成一定威胁,有效的预防和控制成为影响临床应用的重要环节。鉴于毒性的发生机制不同,提出了多种安全策略:HSV-TK/iCaspase9/治疗性抗体自杀系统、细胞内凋亡酶调控、分离式合成 CAR、双特异性 CAR 或抑制性 CAR 等。

3.1 HSV-TK 自杀基因

单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)是被最广泛认可的自杀基因之一,具有转换无毒性前体药物诱导细胞凋亡的能力。HSV-TK 经折叠后对核苷类似物阿昔洛韦(acyclovir, ACV)和更昔洛韦(ganciclovir, GCV)有高亲和力^[24],通过磷酸化形成三磷酸盐整合入 DNA,导致链终止和细胞死亡。据最初报道^[25],用 HSV-TK 转导的 DLI 治疗 8 例 allo-HSCT

后复发或 EBV 诱导的淋巴瘤临床试验中,5 例患者出现了持久的抗肿瘤活性,3 例有 GVHD 患者用 GCV 诱导有效的清除了转导细胞。随后, Tiberghien 等^[26]报道了 12 例接受 allo-HSCT 的恶性血液肿瘤患者,移植当天输注了 HSV-TK 修饰 T 细胞,3 例发生 aGVHD 的患者,单独 GCV 治疗使 2 例 aGVHD 完全缓解,加入类固醇后第 3 例 aGVHD 完全缓解, GCV 也使 cGVHD 完全缓解。令人惊喜的是在另一 II 期临床试验中^[27],只有输注 HSV-TK 修饰 T 细胞的病人实现全期的免疫重建,而未输注患者 IR 异常缓慢,导致感染相关的死亡增多。HSV-TK 自杀基因缺点:通过 GCV 激活 HSV-TK 相对缓慢,需要 3 天才能在体内完全反应;HSV-TK 作为一种异质蛋白是 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞攻击的目标;当 GCV 用于治疗 CMV 感染时,会导致不必要的转导细胞意外消除等。

3.2 iCaspase9 自杀基因

可诱导 Caspase9(iCaspase9)是一种新式自杀基因,包括一个 FKBP12-F36V 药物连接区和 Caspase9 分子(删除内源激活区和蛋白招募区)。FK506 类似物(AP1903/AP20187)诱导 FKBP12-F36V 二聚化,激活 Caspase9 和凋亡通路,转导 T 细胞快速凋亡。早期临床前试验表明单独用 10 nmol/L AP1903 可在 7 天内杀死 89%~93% 的 iCaspase9 修饰 T 细胞。Di Stasi 等^[28]报道 5 例复发白血病接受 allo-HSCT 后给予 iCaspase9 供体 T 细胞,4 例发生皮肤 GVHD,1 例肝脏 GVHD,用单剂量 AP1903 治疗 30 min 内减少了 90% 的循环转导 T 细胞,且不引起任何不良反应,24 h 内皮肤异常终止并且不再反复。除用于控制 GVHD 外,iCaspase9 安全开关已被纳入许多 CAR 修饰 T 细胞的研究。在细胞治疗诱导的糖尿病小鼠模型中^[29],表达 iCaspase9 的卵白蛋白特异性 T 细胞破坏了表达卵白蛋白的胰岛 β 细胞,导致小鼠糖尿病和体重下降,应用 AP1903 两天内清除了 85% 的转导 T 细胞并抑制了糖尿病,表明 iCaspase9/AP1903 系统可快速消除转导 T 细胞并阻止体内的自身免疫攻击。目前 iCaspase9 自杀基因较多用于预防 GVHD 和 CD19 CAR-T 细胞引起的长期 B 细胞消耗。iCaspase9 的快速激活对控制早期严重的 GVHD 非常适合,但输注的 T 细胞经过心、肺和肝脏立即产生的“首过”毒性无法控制;另外,自杀基因作用的不可逆性,一旦启动将永久终止费用昂贵的细胞。

3.3 治疗性 mAb 介导的自杀基因技术

将表达于人体细胞等离子膜上的蛋白基因修饰

T细胞,可使转导T细胞被特异性mAb消除,其中CD20基因修饰的T细胞输注后用特异性mAb删除细胞已在临床前模型中证实。Griffioen等^[30]将CD20 cDNA用逆转录病毒导入T细胞,输注基因修饰T细胞后,用利妥昔单抗(Rituximab, CD20 mAb)可将CD20修饰T细胞消除。作为这个概念的扩展, Kieback等^[31]将c-myc蛋白的10个氨基酸引入TCR序列用于修饰T细胞,应用特异性mAb后可使转导的T细胞消除;伦敦的一个机构研制了一种紧凑的连接CD34和CD20表位的自杀基因(RQR8),应用CD20 mAb可消除表达RQR8的转导T细胞。治疗性mAb自杀基因系统也有缺陷,mAb的生物分布度不如小分子(如GCV);此外,利妥昔单抗激活自杀基因系统时可能引起正常B细胞被消除。

3.4 细胞内凋亡酶调控CAR

大多数细胞表面抗原无肿瘤特异性,容易引发脱靶/非靶向效应,一种对恶性细胞内肿瘤特异性抗原及TAA具有直接靶向作用的方法被设想出来,即细胞内凋亡酶调控CAR(intracellular caspase-modulating chimeric antigen receptor, iCCAR),它能直接进入肿瘤细胞质和亚细胞区域探测突变蛋白的保守序列,一旦识别到可直接诱导细胞凋亡^[32]。iCCAR融合了抗原识别区、Caspase3、内含肽和转运蛋白:抗原识别区是对恶性肿瘤保守序列表位高亲和力的单链抗体(scFv);Caspase3可通过Caspase8被诱导活化,破坏性降解肿瘤细胞染色体DNA;内含肽调控iCCAR的功能,其从宿主蛋白上分离之前宿主蛋白无功能,在无催化剂情况下能自我删除、结扎外显肽侧面序列,使宿主蛋白恢复功能;转运蛋白实现iCCAR的亚细胞定位,最有利的转运蛋白是多聚精氨酸或富含胍盐的转运体,它能够选择膜转运机制甚至亚细胞定位,增加iCCAR遇到靶抗原的可能性,并减少可能的毒性和不成熟蛋白质的新陈代谢。理论上iCCAR的结构及活化机制能有效避免脱靶/非靶向效应,但其组织穿透力和是否被运送至健康组织仍需进一步证实。

3.5 分离式合成CAR

分离式合成CAR是将抗原结合区和细胞内信号区分离,只有形成异二聚体时才表现出活性,通过CAR的分离与聚合精确调控T细胞活化的时间、位置和剂量(switchable CAR-T, sCAR-T)。Lim团队^[33]研制的靶向CD19分离式受体(CD19scFv + 41BB + FKBP, 41BB + FRB + CD3),可用小分子(AP21967)远程控制sCAR-T细胞,只有在“抗原+小分子”双重条件下才能激活sCAR-T细胞,前者是

疾病识别信号(即肿瘤抗原),后者是活性控制信号。一个B细胞白血病Nalm-6小鼠移植模型证实了CD19 sCAR-T可控制T细胞活性、组织归巢、细胞因子释放^[34],且其剂量可滴定,通过调整sCAR-T细胞给药方案可在释放更低水平细胞因子的情况下达到与CD19 CAR-T相差无几的功效。sCAR-T细胞的调控性提升了基因修饰T细胞的安全性,对于B细胞恶性血液肿瘤治疗,在肿瘤消除后、缓解期关闭杀伤活性,从而允许健康的B细胞在体内重生。但目前sCAR-T细胞尚不能以多种抗原作为靶目标,期待sCAR-T细胞能成一项阻止疾病复发的有效方法,并提高其靶向肿瘤多种抗原的有效性。

3.6 双特异性CAR

双特异性CAR通过共表达CAR和嵌合共刺激受体(chimeric costimulatory receptor, CCR),对两种不同的TAA产生靶向性,只有在遇到同时表达两种TAA的肿瘤细胞而非只表达其中任一个的正常细胞时才能被完全激活,有效避免了非肿瘤靶向毒性^[35]。为了实现肿瘤特异性,将双特异性CAR修饰T细胞的活化效能降低到一个水平,使CAR与靶抗原结合只为T细胞提供非最佳活化信号,CCR识别第二个靶抗原后提供的共刺激信号才能使T细胞完全激活。在前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)和前列腺干细胞抗原(prostate stem cell antigen, PSCA)双特异性CAR治疗前列腺癌的临床试验中^[36],用中等亲和力(MzI)和低亲和力(LzI)PSCA scFv分别与PSMA scFv(P28BB)构建双特异性CAR(MzI⁺ P28BB, LzI⁺ P28BB)。小鼠静脉内接种表达PSMA、PSCA或两种抗原的PC3肿瘤细胞,14 d后静脉输注 1×10^6 MzI⁺ P28BB或LzI⁺ P28BB T细胞,结果显示MzI⁺ P28BB T细胞使PSCA⁺ PSMA⁻肿瘤细胞减少,而LzI⁺ P28BB T细胞对其无效;但输注MzI⁺ P28BB T细胞的小鼠PSCA⁺ PSMA⁻肿瘤最终复发,而LzI⁺ P28BB T细胞能诱导长期的PSCA⁺ PSMA⁺肿瘤细胞消除,更为显著的是所有输注LzI⁺ P28BB T细胞的小鼠长期生存;MzI⁺ P28BB和LzI⁺ P28BB T细胞均不能诱导PSCA-PSMA⁺肿瘤细胞根除。该研究证明了通过降低T细胞活性到一定程度,使CAR⁺ CCR T细胞不攻击只表达CAR靶抗原或CCR靶抗原的正常组织的可行性,这种“肿瘤感知”方法限制了基因修饰T细胞的活化和靶向性,使T细胞的效能和安全性保持一致。双特异性CAR不识别HLA肽复合物,T细胞也不通过专门的抗原提呈细胞实现共刺激,而是直接识别肿瘤细胞表达的抗原,该技

术需进一步优化使其尽早适用肿瘤免疫治疗。

3.7 抑制性 CAR

T 细胞活化的生理性调节依靠刺激和抑制机制,在生理性抑制受体的基础上设计出抗原特异性抑制性 CAR(inhibitory CAR, iCAR),当其识别肿瘤细胞表面抗原为 T 细胞提供一个活化信号时,其释放第二个抑制信号以禁止识别位于正常细胞表面的抗原,从而抑制基因修饰 T 细胞在正常组织中的活化。iCAR 的表面抗原识别区与一个有力的急性抑制性信号区域(CTLA-4/PD-1)相连,在体外通过 T 细胞刺激结扎 CTLA-4/PD-1,启动逐渐减弱的 T 细胞免疫应答或从根本上调整活化的阈值,选择性限制 T 细胞活化、细胞因子分泌、细胞毒性和内源性 TCR 活化。Fedorov 等^[37]报道了 CD19 和 PSMA iCAR。用表达 CD19 或 CD19⁺ PSMA 的 aAPCs 模拟靶组织和脱靶组织,定量检测共培养系统中这些 aAPCs 的命运判定效果:尽管 CD19 CAR-T 细胞和 CD19 iCAR-T 细胞对两种 aAPCs 都分泌细胞因子,但与暴露于 CD19 + aAPCs 相比,暴露于 CD19⁺ PSMA⁺ aAPCs 时 PD-1 iCAR 强有力地降低了细胞因子释放水平,mutCTLA-4 iCAR 降低的较少;PD-1 或 mutCTLA-4 iCAR T 细胞减少了 T 细胞积聚;PD-1 和 mutCTLA-4 iCAR 分别降低了 91% 和 67% 的 T 细胞毒性。该结果证明了 iCAR 在脱靶位点限制 T 细胞功能和从非靶向组织中转移免疫反应的应用前景。但 iCAR 最初的效应是短暂的,能使 T 细胞在随后的抗原识别中通过它们活化的受体发挥功能,因此 iCAR 只是提供了一个动态的、自我调节的安全开关去阻止而不是治疗基因修饰 T 细胞引发的副作用。

3.8 其他策略

CAR mRNA 电穿孔表达短暂,使重定向 T 细胞的活性时间缩短,避免潜在的长期基因毒性;用生长在不同细胞因子中的具有差异的 T 细胞进行过继转导可增加效能,在 IL-7 和 IL-15 细胞因子中培养能获得较多的记忆 T 细胞,生存能力和抗肿瘤效应都得到增强;在输注基因修饰 T 细胞后的第 1 小时内严格监控重要的参数,尽早发现预示不良反应的临床体征和实验室指标;运用高浓度的皮质类固醇和 IL-6 受体 mAb 进行支持治疗;研制新的 TCR 或 CAR 时,对正常组织中表达的靶抗原详细分析并核实正常细胞被基因修饰 T 细胞杀死的实际敏感性等都可预防毒性。

4 展 望

基因修饰 T 细胞重塑了 T 细胞的免疫治疗功

效,其在恶性血液肿瘤治疗中的效果鼓舞人心,但其潜在的不良反应和理论上的毒性反应促使在临床试验中探索更保守、分步进行的治疗方法,包括平缓增加输注 T 细胞的剂量、分步引进新的共刺激域或其他功能区域、积极探索新的肿瘤特异性靶抗原、涉及新的 CAR 结构时重新评估日常淋巴细胞消耗治疗等。相信随着基因调控策略的完善和治疗方案的优化,基因修饰 T 细胞将会进入主流的临床肿瘤治疗,为肿瘤患者带来新的希望。

[参 考 文 献]

- [1] FESNAK A D, JUNE C H, LEVINE B L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 566-581. DOI:10. 1038/nrc. 2016. 97.
- [2] CASUCCI M, HAWKINS R E, DOTTI G, et al. Overcoming the toxicity hurdles of genetically targeted T cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(1): 123-130. DOI: 10. 1007/s00262-014-1641-9.
- [3] GEE A P. Manufacturing genetically modified T cells for clinical trials[J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(2): 67-71. DOI:10. 1038/cgt. 2014. 71.
- [4] OLDHAM R A, BERINSTEIN E M, MEDIN J A. Lentiviral vectors in cancer immunotherapy[J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(3): 271-84. DOI:10. 2217/imt. 14. 108.
- [5] MAITI S N, HULS H, SINGH H, et al. Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications [J]. *J Immunother*, 2013, 36(2): 112-123. DOI: 10. 1097/CJI. 0b013e3182811ce9.
- [6] NAKAZAWA Y, SAHA S, GALVAN D L, et al. Evaluation of long-term transgene expression in piggyback-modified human T lymphocytes[J]. *J Immunother*, 2013, 36(1): 3-10. DOI:10. 1097/CJI. 0b013e3182791234.
- [7] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management[J]. *Blood*, 2016, 127(26): 3321-3330. DOI: 10. 1182/blood-2016-04-703751.
- [8] 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.
- [9] HOWARD S C, TRIFILIO S, GREGORY T K, et al. Tumor lysis syndrome in the era of novel and targeted agents in patients with hematologic malignancies: a systematic review[J]. *Ann Hematol*, 2016, 95(4): 563-573. DOI:10. 1007/s00277-015-2585-7.
- [10] TEY S K. Adoptive T-cell therapy: adverse events and safety switches[J]. *Clin Transl Immunol*, 2014, 3(6): e17. DOI:10. 1038/cti. 2014. 11.
- [11] TEACHEY D T, RHEINGOLD S R, MAUDE S L, et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal

- macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy[J]. *Blood*, 2013, 121(26): 5154-5157. DOI: 10. 1182/ blood-2013-02-485623.
- [12] CAMERON B J, GERRY A B, DUKES J, et al. Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(197): 197ra103. DOI:10. 1126/scitranslmed. 3006034.
- [13] LINETTE G P, STADTMAUER E A, MAUS M V, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma[J]. *Blood*, 2013, 122(6): 863-871. DOI:10. 1182/blood-2013-03-490565.
- [14] 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]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851. DOI:10. 1038/mt. 2010. 24
- [15] MORGAN R A, CHINNASAMY N, ABATE-DAGA D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy[J]. *J Immunother*, 2013, 36(2): 133-151. DOI:10. 1097/CJI. 0b013e3182829903
- [16] LAMERS C H, SLEIJFER S, VULTO A G, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(13): e20-e22.
- [17] PARKHURST M R, YANG J C, LANGAN R C, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(3): 620-626. DOI:10. 1038/mt. 2010. 272.
- [18] SINGH A K, Mcguirk J P. Allogeneic stem cell transplantation: a historical and scientific overview[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(22): 6445-6451. DOI:10. 1158/0008-5472. CAN-16-1311.
- [19] MORGAN R A, DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes[J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129.
- [20] STEIN S, OTT M G, SCHULTZE-STRASSER S, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVII activation after gene therapy for chronic granulomatous disease[J]. *Nat Med*, 2010, 16(2): 198-204. DOI:10. 1038/nm. 2088.
- [21] HOWE S J, MANSOUR M R, SCHWARZWAELDER K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3143-3150. DOI:10. 1172/JCI35798.
- [22] DAVIS J L, THEORET M R, ZHENG Z, et al. Development of human anti-murine T-cell receptor antibodies in both responding and nonresponding patients enrolled in TCR gene therapy trials[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(23): 5852-5861. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-10-1280.
- [23] STAUSS H J, MORRIS E C. Immunotherapy with gene-modified T cells: limiting side effects provides new challenges[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(11): 1029-32. DOI:10. 1038/gt. 2013. 34.
- [24] JONES B S, LAMB L S, GOLDMAN F, et al. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 254. DOI:10. 3389/fphar. 2014. 00254.
- [25] BONINI C, FERRARI G, VERZELETTI S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia[J]. *Science*, 1997, 276(5319): 1719-1724.
- [26] TIBERGHEN P, FERRAND C, LIOURE B, et al. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 63-72.
- [27] VAGO L, OLIVEIRA G, BONDANZA A, et al. T-cell suicide gene therapy prompts thymic renewal in adults after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2012, 120(9): 1820-1830. DOI:10. 1182/blood-2012-01-405670.
- [28] DI STASI A, TEY S K, DOTTI G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18): 1673-1683. DOI:10. 1056/NEJMoa1106152.
- [29] DE WITTE M A, JORRITSMA A, SWART E, et al. An inducible caspase9 safety switch can halt cell therapy-induced autoimmune disease[J]. *J Immunol*, 2008, 180(9): 6365-6373.
- [30] GRIFFIOEN M, KESTER M G, WILLEMZE R, et al. Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy[J]. *Haematologica*, 2009, 94(9): 1316-1320. DOI: 10. 3324/haematol. 2008. 001677.
- [31] KIEBACK E, CHARO J, SOMMERMEYER D, et al. A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 623-628. DOI:10. 1073/pnas. 0710198105.
- [32] TARONE S. Intracellular caspase-modulating chimeric antigen receptor[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(5): 629-634. DOI: 10. 1016/j. drudis. 2015. 02. 001.
- [33] WU C Y, ROYBAL K T, PUCHNER E M, et al. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor[J]. *Science*, 2015, 350(6258): aab4077. DOI:10. 1126/science. aab4077.
- [34] RODGERS D T, MAZAGOVA M, HAMPTON E N, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(4): E459-68. DOI:10. 1073/pnas. 1524155113.
- [35] WILKIE S, VAN SCHALKWYK M C, HOBBS S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling[J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(5): 1059-1070. DOI:10. 1007/s10875-012-9689-9.
- [36] KLOSS C C, CONDOMINES M, CARTELLIERI M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 71-75. DOI:10. 1038/nbt. 2459.
- [37] FEDOROV V D, THEMELI M, SADELAIN M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses[J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(215): 215ra172. DOI:10. 1126/scitranslmed. 3006597.

[收稿日期] 2016 - 11 - 02

[修回日期] 2017 - 02 - 25

[本文编辑] 韩丹