

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.001

· 专家论坛 ·

BiTE-T: 一种应用于实体瘤治疗的新型基因编辑T细胞

王月弟, 骆菲菲, 储以微(复旦大学生物治疗研究中心 基础医学院免疫学系, 上海 200032)

[摘要] 以嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)为代表的基因编辑T细胞在血液肿瘤中取得了卓越的成效,并逐渐应用在肿瘤的临床治疗中。2017年,先后有两款针对血液肿瘤的CAR-T细胞产品在美国获批上市,越来越广泛地应用于实体瘤的治疗。但是利用CAR-T技术治疗实体瘤却遇到一些困境,实体瘤特有的微环境和表面肿瘤抗原的限制导致CAR-T细胞治疗效果并不理想,脱靶效应造成的细胞毒性更为棘手。针对这一问题,越来越多的研究人员开始探索新型的基因编辑T细胞用于实体瘤的治疗,其中双特异性T细胞衔接子基因编辑的T细胞(BiTE-T)在体外评估以及体内动物模型中展现出高效的抗肿瘤效果引起了高度关注。本文主要论述目前实体瘤治疗面临的困境以及BiTE-T细胞制备的原理、特点和应用于实体瘤治疗的优势。

[关键词] 肿瘤免疫治疗; 实体瘤; BiTE-T; CAR-T

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)07-0725-05

BiTE-T: A novel gene-editing T cell for solid tumor therapy

WANG Yue-di, LUO Feifei, CHU Yiwei (Biotherapy Research Center, Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] Gene-engineered T cells, represented by chimeric antigen receptor T cells (CAR-T cells), have achieved great success in hematological tumors, and gradually been applied in the clinical treatment of tumors. In 2017, two CD19-CAR products for hematological tumors were consecutively approved for marketing in America, and have shown powerful anti-tumor efficacy in non-solid tumor treatment. However, CAR-T cell therapy didn't achieve expectant therapeutic efficacy in solid tumors due to complicated tumor microenvironment and restriction of surface tumor antigen. In addition, the cytotoxicity caused by off-target effects is more troublesome. To address these hurdles, more and more researchers have begun to explore new gene-edited T cells for solid tumor treatment, among which bispecific T cell engager T cell (BiTE T) has shown high anti-tumor efficacy *in vitro* evaluation and *in vivo* animal models and thus has attracted great attention. This review mainly discusses the current difficulties confronted by solid tumor treatment and the principles, characteristics and advantages of BiTE-T cell preparation.

[Key words] cancer immunotherapy; solid tumor; BiTE-T; CAR-T

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(7): 725-729. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.07.001]



储以微 免疫学博士,教授、博士生导师,复旦大学基础医学院免疫学系主任,生物治疗研究中心主任。兼任中国免疫学会常务理事、中国免疫学会基础免疫分会副主任、上海市免疫学会副理事长、中国免疫学会肿瘤生物治疗专业委员会常务理事、上海市免疫学会感染与免疫专业主任委员。

长期从事肿瘤免疫及免疫生物治疗、炎癌转化的免疫学机制研究。作为项目负责人承担国家自然科学基金重点、面上项目、科技部重大研发计划子课题等多项,在 *Gastroenterology*、*Cell Res*、*Hepatology*、*Cancer Immunol Res*、*Clin Cancer Res*、*Mucosal Immunol*、*J Immunol*、*Clin Immunol* 等 SCI 刊物上发表论著 141 篇。研发了快速 DC 疫苗、BiTE-T 细胞免疫治疗技术等 4 项授权发明

专利,获上海市医学科技奖一等奖和上海市技术发明金奖各一项。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 31570892, No. 31770992, No. 81730045); 国家“精准医学研究”重点研发计划(No. 2017YFC0909800); 国家科技重大专项(No. 2017ZX10203207)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31570892, No. 31770992, No. 81730045), the National Key Research and Development Program for Precision Medicine (No. 2017YFC0909800), and the National Science and Technology Major Project (No. 2017ZX10203207)

[作者简介] 王月弟(1995-),女,博士生,主要从事肿瘤微环境以及基于T细胞的实体瘤免疫治疗的研究, E-mail: 16111010005@fudan.edu.cn

[通信作者] 储以微(CHU Yiwei, corresponding author), E-mail: yiweichu@fudan.edu.cn



骆菲菲 免疫学博士, 副研究员, 现任职于复旦大学生物治疗研究中心, 主要从事肿瘤免疫及其生物治疗研究。曾在美国宾夕法尼亚大学做访问学者, 从事 CAR-T 及双特异性抗体相关的免疫生物治疗研究。代表性成果发表在 *Cell Res*、*J Immunol*、*Clin Immunol* 等 SCI 杂志, 共计 22 篇, 其中第一/通

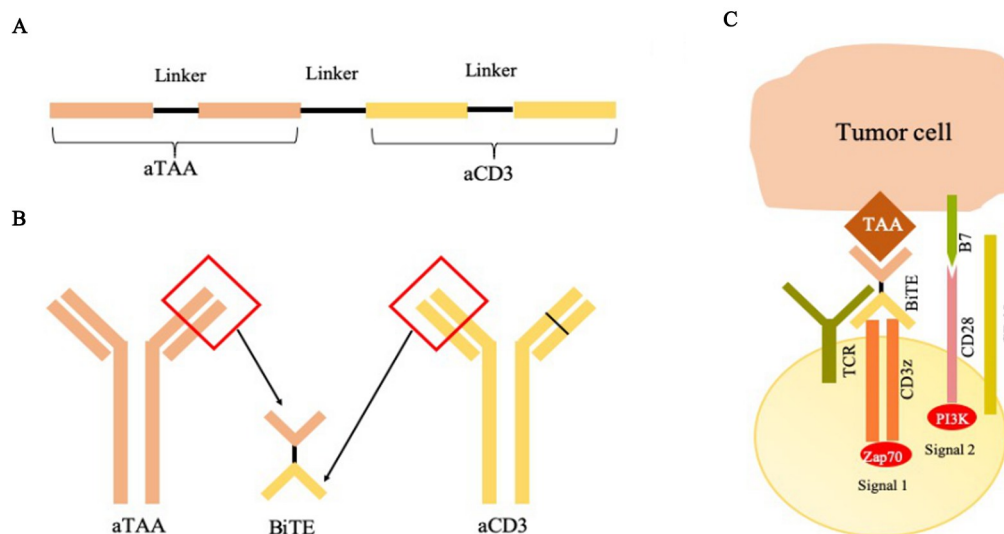
信作者论文 10 篇, 单篇最高影响因子 15.6, 单篇最高引 66 次, 并被 F1000、GMD 等推荐。承担国家自然科学基金面上/青年、博士后特别资助、博士后面项目等, 参与国家自然科学基金重点、面上、重大研究计划等 10 余项。申请国家发明专利 3 项(授权 2 项)。获上海医学科技奖一等奖(第二作者)、上海市优秀发明选拔赛金奖(第二作者)、上海市青年科技启明星、中国免疫学会青年学者奖、明治生命科学奖等奖励。E-mail: feifeiluo@fudan.edu.cn

免疫细胞治疗是基于免疫学理论中的免疫防御和免疫监视功能, 利用体内激活或体外制备免疫细胞技术, 对免疫应答进行调控和干预, 以达到免疫治疗疾病的目的^[1]。20 世纪 90 年代, 以色列科学家首先提出了嵌合抗原受体的概念, 将单克隆抗体 scFv 序列通过基因工程的手段导入到 T 淋巴细胞中, 发现其可以介导特异性的免疫反应^[2]。随后, 越来越多的科学家投入到嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)研发领域, 发现在编辑抗原识别以外, 同时基因编辑加入共刺激分子(第二信号)可以赋予 CAR-T 细胞更高的效应水平和更好的持久性^[3-4]。2013 年, *Science* 杂志更是将以 CAR-T 细胞治疗为代表的基因编辑 T 淋巴细胞评为年度突破性进展, 推动了 CAR-T 细胞制备技术快速发展^[5], 在血液肿瘤中显现出强劲的治疗效果。虽然 CAR-T 细胞技术在血液肿瘤中疗效显著, 但其在实体肿瘤中疗效难达预期, 究其原因, 主要有以下 3 个方面: (1) CAR-T 细胞要准确的进入实体瘤内部需要穿越间质层, 以及趋化因子的辅助, 研究^[6-9]表明, 实体肿瘤微环境中的大部分趋化因子与 CAR-T 细胞表面的趋化因子受体不相配; (2) CAR-T 细胞成功地进入到实体瘤内部之后, 要与缺氧、低 pH、营养物质匮乏等肿瘤微环境对抗, 这些恶劣的环境使得 CAR-T 细胞难以存活和发挥抗肿瘤效应^[10]; (3) 实体瘤区别于血液肿瘤的一大特点是其高度的肿瘤抗原异质性, 肿瘤细胞分型繁复, 难以找到一个表达在所有肿瘤细胞上的“完美靶点”^[11]。因此, 越来越多的研究人员开始探索新型的基因编辑免疫细胞, 以期在实体

肿瘤的治疗中获得成功。复旦大学生物治疗研究中心研制的双特异性 T 细胞衔接子基因编辑的 T 细胞(bispecific T cell engager T cell, BiTE-T), 作用范围广, 无 MHC 限制性, 在前期体内外实验中均展现出良好的抗肿瘤效果。

1 BiTE-T 制备原理以及特点

BiTE-T 细胞是一种新型的基因编辑 T 细胞, 基于双特异性抗体和现有的基因编辑技术研发。双特异性抗体是一类具有双功能的基因工程抗体, 含有两种不同的特异性抗原结合位点, 可以与不同的配体结合, 激发导向性免疫反应。双特异性抗体主要用于非实体瘤的治疗, Amgen 公司的博纳吐单抗(blinatumomab)是第一个获批上市的双特异性抗体, 用于 B 细胞淋巴瘤的治疗, 但临床研究^[12-13]报道该抗体较不稳定, 半衰期短(仅 2.5 h), 需要反复注射治疗, 造价极其昂贵。BiTE 是双特异性抗体的一种, 全称双特异性 T 细胞衔接子, 顾名思义, 该双特异性抗体的一端可识别 T 细胞表面抗原, 另一端则识别肿瘤抗原, 在 T 细胞与肿瘤细胞间搭载了桥梁, 可辅助 T 细胞识别并杀伤肿瘤细胞, 但同样存在体内作用效果差等缺点。为克服上述不足, 本课题组设想, 能否将双特异性抗体中的 BiTE 基因转染 T 淋巴细胞, 这样既可以弥补抗体在体内的不稳定性 and 半衰期短, 又可以过继转输荷有双特异性抗体的 T 淋巴细胞, 达到“靶向性”T 细胞免疫治疗效果。因此, 将双特异性抗体与基因编辑 T 细胞相结合的创新技术, 称为 BiTE-T^[14]。BiTE-T 细胞的制备原理(图 1)是将 BiTE 基因序列使用基因工程手段导入原代 T 细胞, T 细胞作为载体将 BiTE 带入肿瘤内部。这种新型基因编辑 T 细胞有以下特点: (1) BiTE-T 可持续性分泌 BiTE, 大大提升了其半衰期, 体内外实验结果均证实 BiTE 至少可维持 6 d; (2) BiTE-T 在体外展示出 T 细胞的高效能, 它可高效增殖, 特异性杀伤靶抗原阳性的肿瘤细胞, 分泌高水平的 IL-2、IFN- γ 等效应性细胞因子; (3) BiTE-T 在体内展示出 T 细胞在肿瘤局部的富集和低耗竭, 它靶向性地在肿瘤组织浸润, 直接杀伤肿瘤细胞, 并且这些 T 细胞低表达 PD-1、LAG3 等耗竭分子; (4) 基于动物模型的安全评价试验中, 未发现临床报道的细胞毒性, 血清中 IL-6 的水平处于正常值范围, 无神经系统毒性, 安全性好。值得一提的是, 使用 mRNA 电转的方式进行基因修饰, 与病毒载体相比, 表达水平相似, 约在 65% 以上, 但是极大提升了其安全性, 避免了病毒载体随机插入基因组的风险。



A:BiTE的基因结构,由两种不同的单克隆抗体 scFv 组成; B: BiTE 的蛋白结构; C: BiTE-T 的工作模式, 将 BiTE 电转入原代 T 细胞,膜表面表达的 BiTE 分子一方面结合 T 细胞表面的 CD3 分子, 另一方面结合肿瘤细胞表面表达的抗原,赋予 T 细胞识别杀伤肿瘤细胞的能力

图1 BiTE-T的设计和作用原理

2 BiTE-T 的优势

BiTE-T 活化方式与 CAR-T 类似,规避了 MHC 限制性,可直接识别肿瘤抗原,活化 T 细胞。与 CAR-T 比较,BiTE-T 具有其独特优势,可以一箭三雕的形式发挥效应:其一是 BiTE 可以直接结合到基因修饰 T 细胞表面,发挥类似 CAR-T 细胞的功能;其二是 BiTE 可

以分泌型而非膜结合型存在,分泌型 BiTE 具有更广阔的作用范围,其可以渗透到肿瘤微环境内部,寻找肿瘤内部浸润的 T 细胞并赋予其识别杀伤肿瘤细胞的能力;其三是分泌型 BiTE 可以直接作用于肿瘤细胞,诱导肿瘤细胞凋亡。综上,BiTE-T 拥有更广泛的效应空间,更适合实体肿瘤的治疗(表1)。

表1 BiTE-T 与 CAR-T 的比较

特性	CAR-T	BiTE-T
MHC 限制性	无	无
效应细胞类型	外源性基因改造 T 细胞	外源性加内源性浸润 T 细胞
作用范围	膜表达型,作用范围较小	膜表达型和分泌型,作用范围广
免疫突触形成	非典型的免疫突触,不依赖 T 细胞本身的 TCR 形成免疫突触	典型的依赖 T 细胞本身的 TCR 形成免疫突触

2017 年,FRY 教授团队^[15]发文报道,TCR 信号会影响 CAR-T 细胞的效应,使其快速耗竭,在 CD8 阳性的 CAR-T 中更为明显。正如笔者所知,CAR 其实是人工改造的一类融合蛋白,它将识别肿瘤抗原的序列与 T 细胞活化元件融合后导入 T 细胞,其活化不依赖于 T 细胞本身存在的 TCR-CD3 复合物。但在实际应用中,CAR-T 细胞进入肿瘤微环境后,除了外源性导入的 CAR 会活化,部分内源性的 TCR-CD3 复合物也会识别特定抗原从而启动活化,双重的活化信号并未赋予 T 细胞更高的活化效能,而是直接诱导 T 细胞进入耗竭状态。与 CAR-T 不同,BiTE-T 的活化依赖于 T 细胞内

源性的 TCR-CD3 复合物,因此不存在双重信号同时活化的现象,自然规避了 CAR-T 这一设计缺陷。此外,SADELAIN 教授团队^[16]报道,使用 CRISPR-CAS9 系统进行基因编辑,可成功的将外源基因 CAR 嵌入到 T 细胞原来 TCR 的位置,从而破坏内源性的 TCR 信号,这不失为一种有效的解决手段。但是,该系统设计繁复,需使用两种不同的病毒载体进行基因敲入,风险性较高。

3 BiTE-T 的局限以及优化

BiTE-T 与现有的 CAR-T 比较显示出其在实体瘤

中的优越性,但依然存在部分局限。一是抗原的选择,这也是肿瘤免疫学家在实体瘤治疗中面临的共同难题,ROSENBERG教授团队以及其他科研团队^[17-19]发文称,肿瘤新抗原的发现或许是较优选择。肿瘤新抗原是在肿瘤发生发展的过程中会发生大量的体细胞突变,其中有些突变具有免疫原性,可以激发免疫反应。肿瘤新抗原不同于常规靶点,其具有高度的肿瘤特异性,只在肿瘤组织中表达。肿瘤细胞中150个非同义突变,最终可能也只产生1~2个新抗原,因此如何用高精度、高通量的手段鉴定肿瘤新抗原也是一大难题。BiTE-T的另一局限是基因编辑中第二信号的缺乏,BiTE-T通过激活CD3分子活化,而第二信号则依赖于肿瘤细胞提供,但是肿瘤细胞表面共刺激分子配体表达情况未知。有效解决手段是在BiTE的设计中加入共刺激分子相应的活化基序,但是如何保证第一、二信号同时活化是一难点。再者,从传统T细胞活化角度来讲,第一信号足以提供T细胞短期活化,但是长期维持以及分化依赖于第二信号。同理,在缺失第二信号的情况下,BiTE-T细胞的短期活化受到的影响并不显著,但是无法长期发挥效应。因此在无法补足第二信号的情况下,使用短效的表达手段可能更优于长效表达转导体系,如使用mRNA电转而非病毒转染。

4 结 语

肿瘤是威胁人类健康的最严重的一类疾病,肿瘤免疫治疗无疑是人类抗癌史上的重要成就。JUNE教授团队^[20]用CAR-T技术治疗的第一位患者依然健康的活着,这是对科研工作者最大的鼓励。笔者从实体瘤微环境出发探讨了基于基因编辑T细胞的免疫治疗,提出了BiTE-T细胞针对实体瘤有更强的优势,同时也存在进一步完善的空间。首先,任何一种治疗手段都是建立在安全性的基础上,目前已经在临床上的一些CAR-T及BiTE技术多使用病毒载体进行基因编辑,并没有一个严格的调控开关。从安全性考虑,可在后续的研究中将小分子调控开关,如四环素调控系统、自杀基因等,串联进治疗载体中,提高治疗的安全性。其次是免疫突触的形成,BiTE-T识别肿瘤抗原后依赖TCR形成免疫突触,但是BiTE的空间构象以及在膜表面的分布情况未知,结合影像学技术,优化形成最佳免疫突触,可提升BiTE-T的疗效^[21]。最后,在现有的基因编辑技术的基础上将趋化因子、细胞因子等元素加入到改造后的T细胞中,可以很大程度地提高BiTE-T的治疗效果和持久性。

本文仅从实体瘤微环境出发探讨了基于基因修

饰T细胞的免疫治疗,基因修饰T细胞只是肿瘤免疫治疗领域的一个手段,还有多种潜在的治疗手段有待开发。“路漫漫其修远兮”!实体肿瘤的治疗仍是需要科研工作者从多角度共同探索,在现有的免疫治疗技术的基础上揭示肿瘤免疫的新机制,研发新一代的治疗手段^[22]。需要深刻地认识到,肿瘤并不是由单一因素造成的,而是多个因素共同作用的结果,这也提示并不能依靠单一的手段完全治愈肿瘤,多手段联合治疗是未来肿瘤治疗发展的新方向。

[参 考 文 献]

- [1] MCNUTT M. Cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2013, 342(6165): 1417. DOI:10.1126/science.1249481.
- [2] ESHHAR Z, WAKS T, GROSS G, et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(2): 720-724[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45737/>. DOI: 10.1073/pnas.90.2.720.
- [3] LONG A H, HASO W M, SHERN J F, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors[J/OL]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 581-590[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458184/>. DOI:10.1038/nm.3838.
- [4] ZHANG H, SNYDER K M, SUHOSKI M M, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8⁺ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy[J/OL]. *J Immunol*, 2007, 179(7): 4910-4918[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809056/>. DOI:10.4049/jimmunol.179.7.4910.
- [5] COUZIN-FRANKEL J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2013, 342(6165): 1432-1433. DOI: 10.1126/science.342.6165.1432.
- [6] HEYMAN B, YANG Y P. Chimeric antigen receptor T cell therapy for solid tumors: current status, obstacles and future strategies[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(2): E191[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6407020/>. DOI:10.3390/cancers11020191.
- [7] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365. DOI:10.1126/science.aar6711.
- [8] NEWICK K, O'BRIEN S, MOON E, et al. CAR T cell therapy for solid tumors[J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68: 139-152. DOI:10.1146/annurev-med-062315-120245.
- [9] RUELLA M, KLICHINSKY M, KENDERIAN S S, et al. Overcoming the immunosuppressive tumor microenvironment of hodgkin lymphoma using chimeric antigen receptor T cells[J/OL]. *Cancer Discov*, 2017, 7(10): 1154-1167[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5628114/>. DOI:10.1158/2159-8290.CD-16-0850.
- [10] FLEMMING A. What's driving T cell dysfunction?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(5): 251. DOI:10.1038/s41568-019-0138-4.

- [11] 姚超, 钱程. CAR-T细胞在肿瘤治疗中的机遇与挑战[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(1): 6-11. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.003.
- [12] NEWMAN M J, BENANI D J. A review of blinatumomab, a novel immunotherapy[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2016, 22(4): 639-645. DOI:10.1177/1078155215618770.
- [13] RIBERA J M. Efficacy and safety of bispecific T-cell engager blinatumomab and the potential to improve leukemia-free survival in B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Expert Review of Hematology*, 2017, 10(12): 1057-1067. DOI:10.1080/17474086.2017.1396890.
- [14] LUO F F, QIAN J W, YANG J, et al. Bifunctional AHER2/CD3 RNA-engineered CART-like human T cells specifically eliminate HER2(+) gastric cancer[J/OL]. *Cell Res*, 2016, 26(7): 850-853[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5129888/>. DOI: 10.1038/cr.2016.81.
- [15] YANG Y M, KOHLER M E, CHIEN C D, et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(417): eaag1209. DOI: 10.1126/scitranslmed.aag1209
- [16] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection[J / OL]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-117[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5558614/>. DOI: 10.1038/nature21405.
- [17] LEKO V, MCDUFFIE L A, ZHENG Z L, et al. Identification of neoantigen-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in primary bladder cancer[J/OL]. *J Immunol*, 2019, 202(12): 3458-3467[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6548619/>. DOI: 10.4049/jimmunol.1801022.
- [18] PASETTO A, GROS A, ROBBINS P F, et al. Tumor- and neoantigen-reactive T-cell receptors can be identified based on their frequency in fresh tumor[J/OL]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(9): 734-743[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5010958/>. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-16-0001.
- [19] VITIELLO A, ZANETTI M. Neoantigen prediction and the need for validation[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(9): 815-817. DOI: 10.1038/nbt.3932.
- [20] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia[J/OL]. *N Engl J Med*, 2013, 368(16): 1509-1518[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4058440/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
- [21] WANG Y D, LUO F F, YANG J, et al. New chimeric antigen receptor design for solid tumors[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1934[2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5744429/>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01934.
- [22] 韩岩梅, 曹雪涛. 准确把握肿瘤免疫治疗发展趋势,促进我国肿瘤免疫治疗规范健康发展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(1): 2-5. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.002.

[收稿日期] 2019-05-25

[修回日期] 2019-06-18

[本文编辑] 党瑞山