

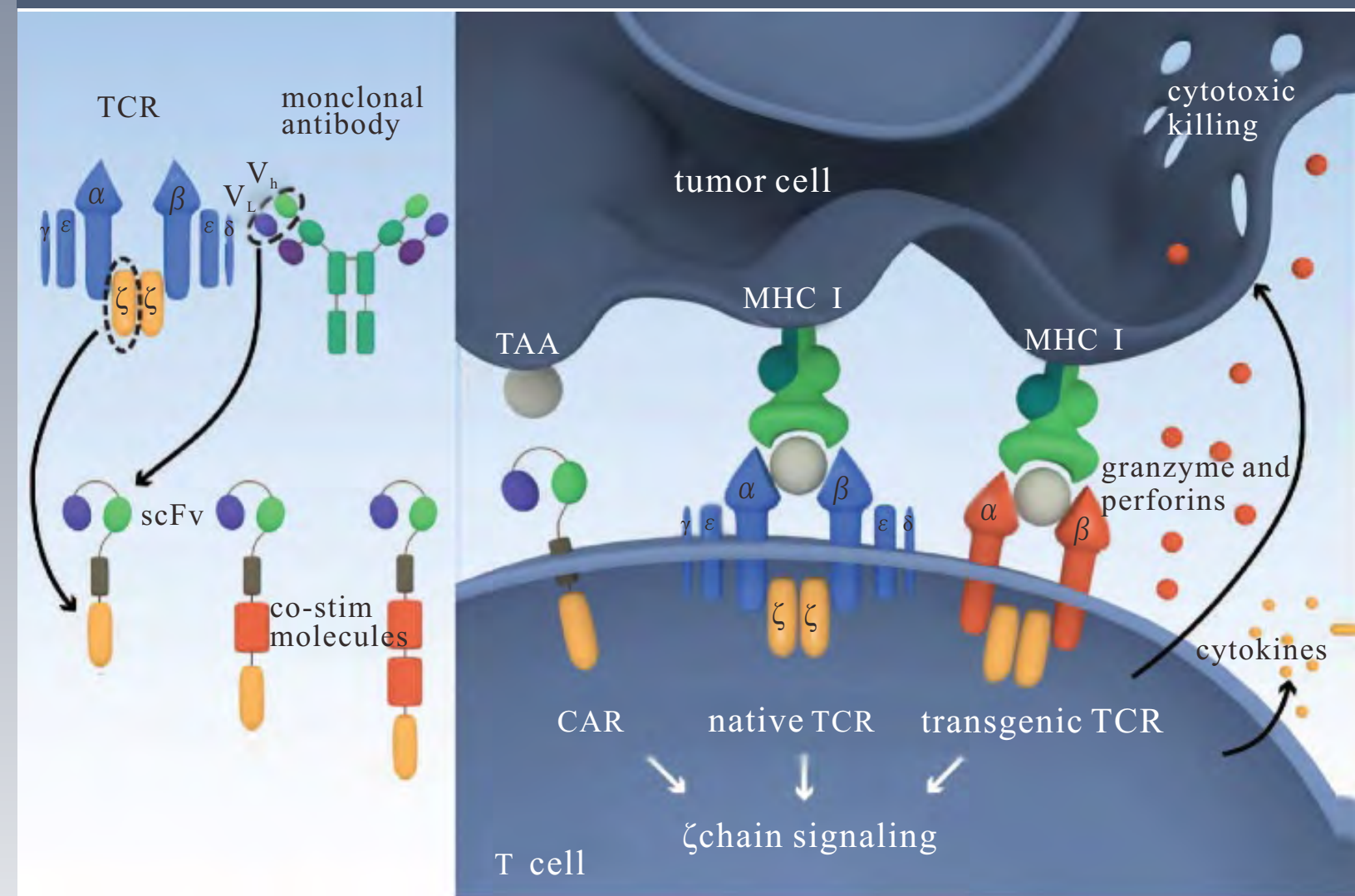
HK 合一康生物

HORNETCORN
BIOTECHNOLOGY

学术内刊

ACADEMIC JOURNAL

嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)专刊



本期推荐

- * 嵌合抗原受体T细胞介绍及抗肿瘤临床应用
- * 突破重围：免疫疗法治愈肿瘤的潜力
- * 微环DNA介导的CAR-T (MC-CART) 细胞治疗技术

总07期

(内部资料 仅供交流)

电话 : 0755-21672023 617

传真 : 0755-21672020

Email : info@hornetcorn.com

地址 : 深圳市高新技术产业园清华紫光信息港B座406

深圳市合一康生物科技有限公司 : www.hornetcorn.com

要 闻

01

第十六届CSCO学术年会在厦门隆重举行，肿瘤免疫治疗获肯定

综 述

- 02
- 嵌合抗原受体T细胞介绍及抗肿瘤临床应用
- 08
- 合一康生物联合中科院深圳先进技术研究院研发“微环DNA介导的CAR-T（MC-CART）细胞治疗技术”
- 10
- 突破重围：免疫疗法治愈肿瘤的潜力
- 13
- 嵌合抗原受体T细胞诱导IL-12调节肿瘤间质来对抗癌症
- 14
- CAR-T治疗，黎明前的曙光

临 床

- 15
- 靶向CD19的CAR-T细胞能迅速诱导成人难治性急性白血病完全缓解
- 16
- 用含有CD28和4-1BB片段的CD20特异性CAR-T细胞治疗淋巴瘤
- 17
- 嵌合抗原受体T细胞治疗慢性淋巴细胞白血病达到完全缓解
- 18
- CD19特异性CAR-T细胞治疗淋巴瘤一例获得完全缓解
- 19
- EB病毒特异性CAR-CTL细胞治疗神经母细胞瘤的安全性和有效性
- 20
- 自体CD20特异性CAR-T细胞治疗惰性非霍奇金淋巴瘤
- 21
- 基因修饰的T淋巴细胞治疗黑色素瘤可使肿瘤消退

基 础

- 22
- CD22特异性CAR-CTL细胞受体的抗原灵敏度的调节机制
- 23
- 基因修饰的初始NK细胞可抑制肿瘤的进展
- 24
- 含有CD28和CD137共刺激域的CAR-T细胞有望用于治疗淋巴瘤
- 25
- 抗CD-19嵌合抗原受体CIK细胞对急性B细胞淋巴瘤的潜在免疫治疗作用
- 26
- 嵌合抗原受体 $\gamma\delta$ T细胞的抗肿瘤免疫效应
- 27
- CD20特异性CAR-CTL细胞治疗滤泡性淋巴瘤的临床前研究

试 验

- 28
- CAR-T细胞相关临床试验

第十六届CSCO学术年会在厦门隆重举行
肿瘤免疫治疗获肯定

合一康生物临床医学部 周洲整理

第十六届全国临床肿瘤学大会暨2013年中国临床肿瘤学会（CSCO）学术年会于2013年9月25日至29日在厦门国际会展中心隆重举行。

本届CSCO大会邀请了美国临床肿瘤学会（ASCO）候任主席Peter Yu、欧洲肿瘤内科学会（ESMO）候任主席Rolf Stahel、国际肿瘤免疫治疗学会（SITC）主席Bernard Fox、国际转化医学学会（SIO）主席Martin Murphy和法国抗癌联盟主席Jean-Pierre Armand等其他国际学术组织的成员和著名专家参加。因此，本届CSCO年会不仅仅是我们中国的临床肿瘤学大会，也是一次真正意义上的国际学术盛会。吴孟超院士、孙燕院士、曹雪涛院士、廖美琳教授和管忠震教授等均亲临并主持会议。

本届大会的主题为“加强合作，持续创新”，吸引了12000多名国内外临床肿瘤学专家学者与会，举办了59场专题会、2场亚洲学术会、44场卫星会和6场早餐会，共同交流最新研究成果和学术论文1300多篇。

作为知名免疫学专家，中国医学科学院曹雪涛院士作了《肿瘤免疫治疗转化研究与临床应用进展》的本次大会的开场主题报告，充分肯定了免疫治疗在肿瘤防治过程中的重要地位，同时介绍了包括免疫细胞治疗在内的国际国内免疫治疗的新进展。

曹院士指出：“近年来，随着人们对肿瘤与宿主的关系，特别是机体抗肿瘤免疫应答及肿瘤免疫逃逸机制的认识不断深入，将以免疫细胞、分子、基因为基础的干预手段应用于肿瘤治疗成为科学家关注的重大热点并取得了令人振奋的临床试验结果。肿瘤的免疫治疗成为继外科手术、放疗、化疗之后第四类已被证明具有显著临床治疗效果及优势的抗肿瘤疗法。目前在临床工作中免疫疗法已被成功应用于前列腺癌、黑色素瘤、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤的治疗，显著提高患者的生存质量。”

此外，本届大会与国际癌症免疫治疗学会（SITC）和美国华裔血液及肿瘤专家学会（CAHON）举办免疫治疗专场，对肿瘤免疫治疗领域的重点和热点问题开展了深入探讨。

本次大会的胜利召开，全面反映和传播了临床肿瘤学的新观念、新知识、新技术，也增强了与会专家对肿瘤免疫治疗的信心。



嵌合抗原受体T细胞介绍及抗肿瘤临床应用

合一康生物临床医学部 陈杰

随着肿瘤免疫学理论和技术的发展，免疫细胞治疗在肿瘤治疗中的作用日益受到重视。研究发现，T淋巴细胞是肿瘤细胞的天敌，在肿瘤免疫应答中起主要作用，对肿瘤细胞有极强的杀伤作用。但是使用内源性T细胞进行肿瘤免疫治疗时，靶抗原需经过加工处理后才能和靶细胞表面的主要组织相容性复合物（main histocompatibility complex, MHC）作用，也就是存在我们常说的"MHC限制性"。然而肿瘤免疫编辑的过程，会使MHC在肿瘤细胞表面表达下降，破坏抗原加工过程，降低肽段免疫原性。这样长期形成的免疫逃逸机制，能使肿瘤细胞成功躲避T细胞攻击，肿瘤快速增殖。

此外，人体内肿瘤特异性的T细胞数量较少，并且由于大多数肿瘤细胞不断表达自体抗原，使得靶向这些抗原的T细胞通过免疫耐受机制被中和或移除，数量进一步减少。所以包括细胞因子诱导的杀伤细胞（cytokine-induced killer cell, CIK细胞）在内的T细胞过继性免疫治疗虽然在部分肿瘤的治疗中取得了一定的效果，但在大多数肿瘤中疗效尚不能令人满意。

近年来发展的利用基因改造技术表达肿瘤特异性嵌合抗原受体的T细胞治疗技术进展迅猛，在体外和临床试验中显示出良好的靶向性、杀伤活性和持久性，为过继性细胞免疫治疗提供了新的有效解决方案，展示了巨大的应用潜力和发展前景^[1]。

一、嵌合抗原受体T细胞介绍

目前，大多数嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor, CAR）由胞外抗原结合区（由来源于单克隆抗体的轻链（VL）和重链（VH）组成，中间由带韧性的铰链区连接形成单链抗体（single chain fragment variable, scFv））、跨膜区域和胞内信号转导区组成。

通过将识别肿瘤相关抗原（tumor associated antigen, TAA）的scFv和胞内信号域"免疫受体酪氨酸活化基序"（immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM，通常为，CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ ），在体外进行基因重组，生成重组质粒，再在体外通过转染技术转染到患者的T细胞，使患者T细胞表达肿瘤抗原受体，转染后经过纯化和大规模扩增后的T细胞，称之为嵌合抗原受体T细胞（CAR-T细胞）^[2]。其在体内、外都具有对特定肿瘤抗原高度亲和性及对抗原负载细胞高效杀伤特性（如图1）。近年来，CAR修饰T细胞技术在白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、脑胶质瘤等恶性肿瘤治疗中均显示出良好的抗肿瘤效应。

【基金项目】深圳市战略新兴产业发展专项资金资助项目（No.CYZZ20130329145313934）

【通讯作者】罗晓玲。Email: luoxiaoling@hornetcorn.com

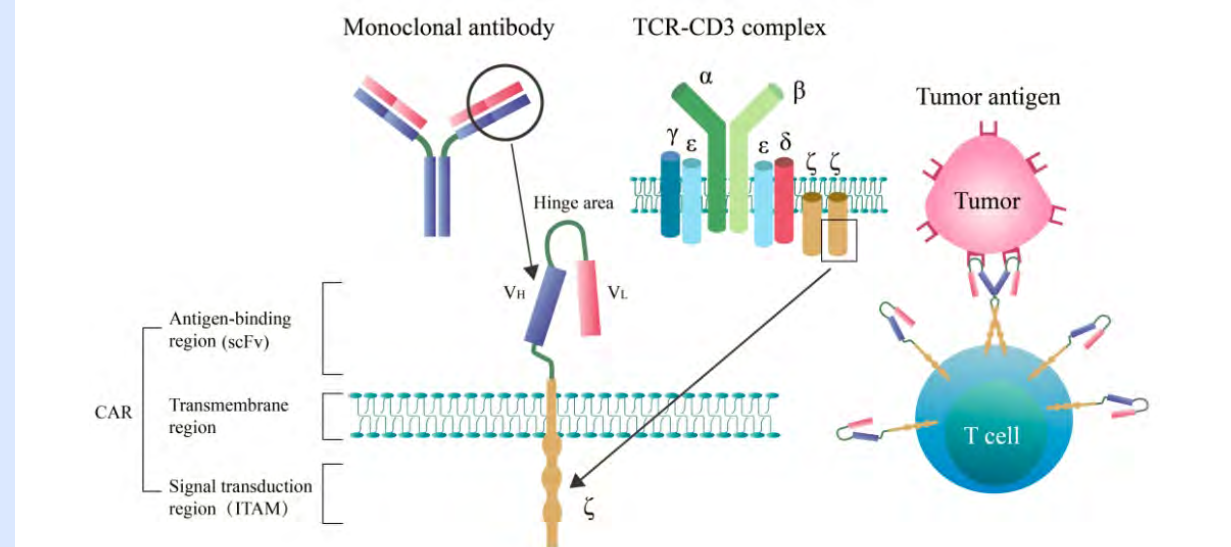


图1 嵌合抗原受体结构示意图（根据文献[2]做适当修改）
Fig.1 Structural representation of CAR

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；VH: 重链；VL: 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。

第一代CAR-T细胞

早在1989年，Eshhar研究小组就将免疫球蛋白样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^[3-4]，即第一代CARs。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。尽管最近研究报告显示，去除CD3 ζ 链的两个ITAMs磷酸化作用，能减少T细胞转导后的凋亡，有利于转基因的长期表达^[5-6]。但是目前含CD3 ζ 链的CAR-T细胞相对于含Fc ϵ RI γ 链的CAR-T细胞临床研究更多。原因可能是因为CD3 ζ ，含有三个ITAMs，而Fc ϵ RI γ 链只有一个ITAM，虽然体内表达率较低，但是却能更有效激活T细胞，对肿瘤根除能力更强。

此外，CAR-T细胞的跨膜区一般由同源或异源的CD3、CD8或CD28等二聚体膜蛋白组成，通过CAR二聚化以及与内源性TCR的相互作用产生的信号有助于T细胞的激活。Bridgema等^[7]发现，抗CEA CAR-T细胞能通过自身CD3 ζ 跨膜区的二聚化作用，有效激活初始人T淋巴细胞。

Kershaw等^[8]报道了逆转录病毒介导的抗 α -叶酸受体CAR修饰的T细胞治疗14例卵巢癌患者。输注2d后，CAR-T细胞在体内可大量检测到，但1个月后迅速下降至难以检测的水平，也没有观察到对肿瘤的免疫应答反应。

Julie等^[9]针对细胞粘附分子-L1，采用CE7R的单链抗体与CD3 ζ 结合，以质粒DNA作为载体构建第一代CAR，并在其中引入“自杀基因”HyTK，治疗儿童复发难治性神经母细胞瘤。在治疗的6例患者中，虽没有发现与细胞剂量相关的严重不良反应，但每次输注CAR-T细胞在体内存活时间不超过1周，并且只有一个瘤荷最小的患者有部分缓解，治疗效果不理想。

Lamers等^[10]构建 scFv(G250)-CD4TM- γ 嵌合抗原受体，通过逆转录病毒转染患者T细胞，治疗CAIX+的三例肾癌患者。虽然IFN- γ 在体外分泌增高，但血浆IFN- γ 水平却与肝毒性反应成正相关，考虑可能是因为scFv(G250)+T细胞攻击正常胆管CAIX+上皮细胞所致。

2008年，Pule等^[11]用针对GD2靶抗原的CAR治疗儿童成神经细胞瘤。输入6周后，仍然可以在病人血液内发现EBV特异性的CAR-T细胞，而非EBV特异性细胞仅维持1周，接受治疗的11个患者中，6例患者在治疗6周后出现肿瘤细胞坏死或肿瘤缩小。

此外，还有以CD20^[12]为靶点治疗惰性非霍奇金淋巴瘤/套细胞淋巴瘤等应用。虽然第一代CAR-T细胞研究较多，但是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还存在不足，没有达到预期的临床效果。

第二代CAR-T细胞

研究表明，T细胞的完全活化有赖于双信号和细胞因子的作用。其中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。

对于初始型T细胞（未与抗原接触的T细胞），如只在信号1而没有信号2条件下无法使T细胞发挥正常作用；即使T细胞与抗原接触，如果没有协同刺激信号，细胞也不能发挥正常功能。相应的，仅含有CD3 ζ 序列的嵌合抗原受体，如没有协同刺激信号2，也是无法激活CAR-T细胞。

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）^[13-15]，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（如图2）。其中，CD28分子在调节淋巴细胞增殖和存活方面有着重要作用，也对效应细胞和记忆细胞的建立起着关键作用。其通过募集如PI3K、Grb2和Lck等分子，以调节关键转录因子如NF κ B的活性并且增加IL-2和Bcl-xL的分泌。CD134能使初始T细胞获得持久的体外增殖和较强的IL-2分泌。CD137则为维持T细胞应答提供信号，在T细胞生存和CD8+T细胞记忆中起关键作用^[16-18]。

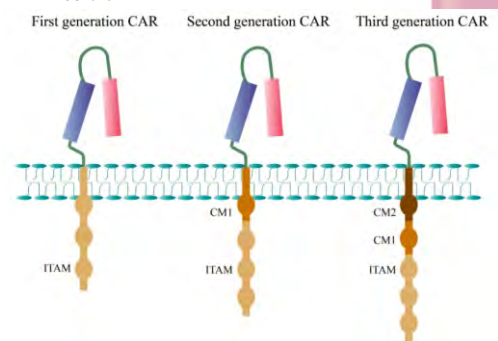


图2 第一至第三代嵌合抗原受体
(根据文献[14]做适当修改)
Fig.2 First generation to
third generation CARs

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）的胞内信号传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中的一种。

June等^[19-20]研究用第二代CAR-T细胞（scFvCD19-CD137-CD3 ζ ）靶向治疗3例慢性淋巴细胞白血病（chronic lymphocytic leukemia, CLL），接受治疗的3例患者回输

CAR-T细胞总数为 1.4×10^7 - 1.1×10^9 个，CAR-T细胞不仅在体内扩增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。虽其中1例患者发生了考虑与效应细胞脱靶有关的肿瘤溶解综合症不良反应，但经过治疗，2例患者达到完全缓解，1例患者部分缓解，疗效得到肯定。

Kandalaft等^[21]比较一代和二代治疗卵巢癌的疗效，证实第二代的CAR-T细胞（MOv19-BB ζ ）在杀瘤活性和体内存活时间均优于第一代（MOv19- ζ ）。

2013年，Brentjens等^[22]用CD19-CAR（scFvCD19-CD28-CD3 ζ ）T细胞治疗5例形态学或微小残留病变阳性的急性B细胞白血病（Acute B lymphocytic leukemia, B-ALL）患者。通过治疗，5例肿瘤迅速减小，且微小残留病灶完全缓解。其中1例患者治疗8天之后就很快得到完全缓解，3名患者缓解期已长达5月至24个月。虽然患者对该疗法能够耐受，但是也出现了细胞因子相关的毒性反应，并且与肿瘤负荷成正相关。这也是首次发表的CAR-T细胞治疗对成人ALL患者有效的研究。

第三代CAR-T细胞

Til1等^[23]以逆转录病毒为载体构建第三代CAR-T细胞（scFv CD20-CD28-CD137-CD3 ζ ），治疗3例非霍奇金淋巴瘤。经PCR检测，效应细胞在体内存活的时间超过12个月。临床反应持续完全缓解2例，部分缓解1例。其中1例28岁利妥昔单抗难治性滤泡性淋巴瘤患者，CAR-T细胞治疗3.5月后，颈部淋巴结在1周~2周内迅速减小3cm。

而美国国家癌症研究所Morgan等^[24]报道一例结肠癌合并肝和肺转移患者接受第三代HER2-CAR-T细胞治疗。该患者输注后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。因为细胞静脉输注后首先经过肺循环，输注大量的HER2-CAR+T细胞后，识别并攻击表达HER2的正常肺细胞，释放的过量细胞因子，引起“细胞因子风暴”，患者于治疗后5天死亡。这也是迄今为止公布的最为严重的一例CAR-T细胞相关的不良反应。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。

二、嵌合抗原受体T细胞基因转导的方法

外源基因进入细胞中通常需要运输工具，CAR-T细胞基因转导进入细胞内也不例外。目前，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。《Journal of Gene Medicine》对2008年在临床基因治疗中所用载体的类型进行了调查，约70%的治疗方案采用病毒载体。理论上所有病毒经过删除与致癌、致毒和复制相关的基因片段并在适当位置插入外源基因，均可成为基因传递的工具。目前最常用的主要是逆转录病毒载体（包括慢病毒载体）、腺病毒载体和腺相关病毒载体等。

但由于病毒载体仍存在着一定的安全隐患，比如诱导机体产生免疫反应，存在着插入突变等致瘤及致毒的风险，且载体容量有限，制备滴度不高^[25-26]等，而非病毒载体则具有无传染性、不限制

载体容量、化学结构可控、可大量制备及具有靶向性等优点^[27]，现已受到越来越多的科研人员的关注。目前，所应用的非病毒载体有裸DNA、脂质体、多聚物及分子耦联体等。

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。微环DNA是一种新颖的小环超螺旋表达框，它是传统质粒在大肠杆菌体内通过位点特异性重组得到的。Chen等^[28]通过在体内联合表达一种限制性内切酶，将小质粒和亲本质粒酶切，使之成为线性DNA，这样就可以通过常规的质粒分离方法获得高纯度的微环DNA。

因缺少抗性标记基因、复制原点等细菌序列等特点，大大增强了这种新颖的小环超螺旋表达框在临床上的安全性。大量的体内外研究表明，微环DNA可显著提高转基因表达效率^[29-30]。而微环DNA-纳米系统，就是通过保持基本结构不变，仅改变DNA序列，便可用来治疗不同疾病，在T细胞基因改造的技术构建中，具有深厚的应用潜力（如图3）。

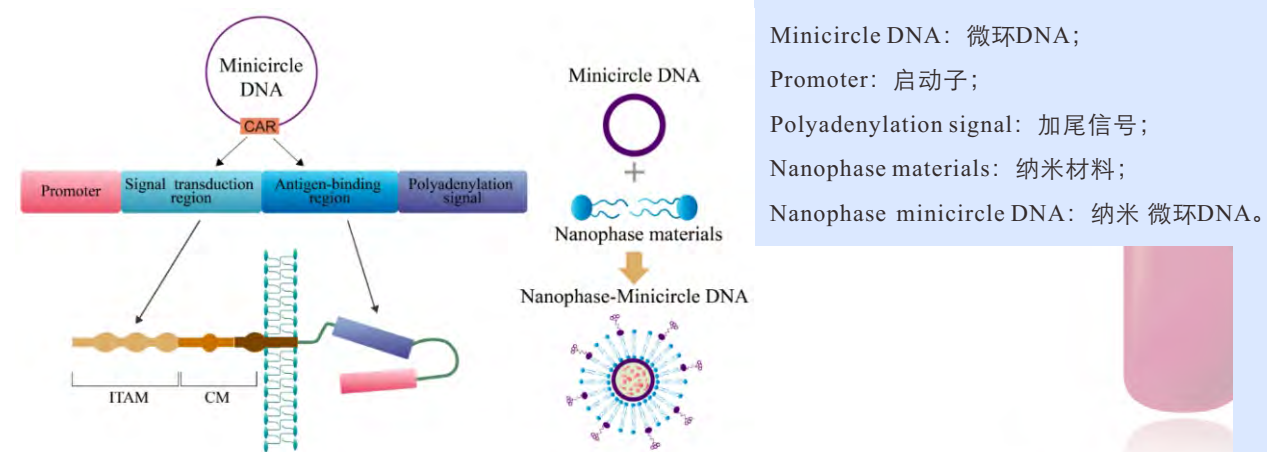


图3 微环DNA优化现有的CAR T技术（根据文献^[28-30]制作）
Fig.3 Minicircle DNA can optimize the existing CAR T technology

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。

三、CAR-T细胞临床应用中的问题和解决办法

虽然目前CAR-T细胞临床应用越来越多，也取得了一定的临床效果和突破，但研究者对其安全性还是一直十分重视和关注。目前CAR-T细胞就可能存在如下主要的不良反应。

1. CAR-T细胞的脱靶效应

CAR-T细胞临床应用的首要问题是脱靶效应，导致针对正常组织的自身免疫反应。故研究者首先考虑的是肿瘤特异性抗原（tumor specific antigen, TSA）。但目前已知的TSA较少，除了少数针对前列腺特异性膜抗原（prostate-specific membrane antigen, PSMA）和表皮生长因子受体III型突变（epidermal growth-factor receptor variant III, EGFRvIII）的CAR-T试验外的TSA外^[31-32]，大多数针对重要组织不表达或相对可损耗组织表达的肿瘤相关抗原（tumor associated antigen/tumor associated

antigen, TAA）。其中以针对CD19、CD20和CD22为靶抗原的CAR-T细胞治疗B细胞恶性肿瘤研究的最多^[19-20, 22-23]，原因就是即便损伤了成熟B细胞，也只是暂时的、可恢复的；且缓解期血液肿瘤细胞数量级约为 10^8 - 10^9 个，而1cm实体肿瘤其肿瘤细胞数就有约 10^9 个，免疫细胞不易进入实体瘤内部，也是CAR-T细胞目前主要治疗血液系统疾病的又一重要原因。

尤其是对于拥有多重胞内信号区的第二和第三代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^[33]，故选择合适的靶抗原，是避免脱靶效应的重要挑战。上文提到的第一代CAR-T细胞治疗转移性肾细胞癌造成肝细胞毒性和第三代CAR-T细胞的不良反应就是此种情况。此外，Brentjens报道的1例接受第二代CAR-T细胞的CLL患者，出现低血压、呼吸困难和肾衰竭，于细胞治疗后4天死亡，考虑也是CAR-T细胞相关“细胞因子风暴”所致^[34]。

最近，Rosenberg's团队也报告了一例带CD28和 ζ 链刺激结构域的抗CD19-CAR治疗B细胞淋巴瘤患者。病人虽出现CD19+淋巴瘤细胞清除，但是，这种效果是通过持续清除外周血B细胞达39周才得以实现的。说明对健康成熟B细胞的脱靶效应，仍然是CAR-T细胞应用于临床的一个潜在的主要障碍^[35]。

2. 插入突变

CAR-T技术是将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。虽然目前并没有关于基因改造T细胞致癌性的报道，但是研究者还是一直在关注此问题，也在不断通过优化载体类型和转染方式来降低插入突变的风险。

3. 可能的解决办法

针对以上问题，如何保证发挥CAR-T细胞生物有效性的同时，减少其潜在危险性，是实现基因联合细胞治疗恶性肿瘤需要解决的问题之一。

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。虽然自杀基因在体内需要一些时间才能被激活，不能阻止急性脱靶毒性引起的组织损伤，但对于减小长期毒性还是有积极的作用。

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。Duong等就发表了类似的方法，包括使用两种不同的CAR，以促进对表达两种肿瘤抗原的靶细胞更强的应答^[36]。

第四，除了激活受体外，还可以引入抑制性CAR，当CAR-T细胞与正常组织的靶抗原相互作用以后，抑制性CAR将拮抗效应T细胞的激活。

最后，还可以根据靶抗原表达水平，微调CAR亲和性。以较低的亲和性，识别抗原高表达的肿瘤细胞，而不攻击相同抗原低表达的正常细胞。当然，这些方法是否可行，是否适用于不同的肿瘤类型，还需临床进一步验证。

四、嵌合抗原受体免疫细胞的发展方向

随着细胞免疫治疗肿瘤的进展，嵌合抗原受体修饰的T细胞在临床应用中的作用越来越受到人们的重视。通过探索完美的CAR信号组合，调节适宜的CAR亲和性，增加人工基因调控开关，产生合理的细胞因子分泌，诱导T细胞特异性归巢等，相信第四代，甚至第五代CAR-T细胞也将很快应用于临床。

除此之外，嵌合抗原受体也不仅仅是修饰T细胞，它还可以修饰-CIK细胞、NK细胞以及 $\gamma\delta$ T细胞^[37-39]等等。例如，德国波恩大学的研究人员^[40]从结直肠癌患者外周血中采集和培养-CIK细胞，并利用CEA+抗体特异性的CAR对-CIK细胞进行改造，使-CIK细胞获得CAR的特性。将CAR-CIK细胞与CEA+肿瘤细胞共培养后，发现其分泌的IFN- γ ，要高于与CEA-肿瘤细胞共培养情况；而用未改造的-CIK细胞与CEA+/CEA-分别共培养，却未观察到IFN- γ 分泌增加，且CAR-CIK细胞的细胞毒效应也比未改造-CIK细胞要高。

最后，当前构建的嵌合抗原受体存在固定的抗原特异性，这意味着它们每次只能靶向一种类型的肿瘤抗原。将来可以设计构建一种更加通用性的嵌合抗原受体框，最终可用于同时或依次靶向多种肿瘤抗原^[41]，这样将更大程度解决肿瘤免疫逃逸引起的复发和转移等问题，成为疗效更确切的过继性免疫细胞治疗方法，给肿瘤治疗带来新的希望。

本文已于2013年10月被《中国细胞生物学学报》录用

合一康生物联合中科院深圳先进技术研究院研发 “微环DNA介导的CAR-T (MC-CART) 细胞治疗技术”

合一康生物技术部 马飞

2013年合一康生物携手中国科学院深圳先进技术研究院成立了“肿瘤免疫细胞与基因治疗技术联合实验室”，实验室将致力于微环DNA介导的CAR-T（嵌合抗原受体修饰T细胞）细胞治疗技术攻关研究。

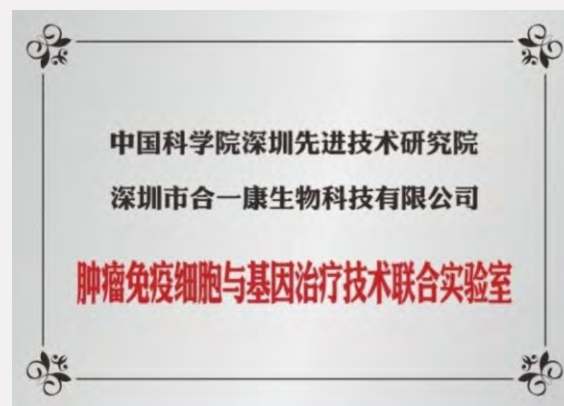
联合实验室由微环DNA的发明人-----中国科学院深圳先进技术研究院基因和细胞工程研究中心主任陈志英教授牵头，陈教授曾先后任美国华盛顿大学和斯坦福大学资深科学家20年，拥有多项具有世界领先水平的研究成果——他发现了质粒骨架DNA静默效应、发明了多基因定点插入法以及著名的微环

DNA，并在世界上首次发现绿茶抑制化学致癌。他在国际顶级专业期刊《Nature Biotechnology》、《Nature Methods》等杂志上发表论文70多篇，并申请专利十余项。

目前，用于基因治疗的载体大致可分为病毒载体和非病



毒载体。病毒载体主要有腺相关病毒（AAV）和慢病毒(LV)，病毒载体存在细胞转染率低、靶向性差甚至致癌风险等缺陷。传统的质粒载体虽然比病毒载体的安全性更高，但其所含的抗性基因会通过水平基因转移的方式在宿主体内传播，从而引发严重的免疫反应。



微环DNA载体是一种小环表达框，去除了标准质粒载体的骨架DNA，能在大肠杆菌体内通过位点特异性重组，具有不含骨架DNA、低CpG含量、基因表达效率高、稳定的转基因表达等特性。由于微环DNA没有抗性基因与复制原点等细菌序列，因此其临床应用避免了传统质粒的严重免疫反应，安全性更高。

微环DNA与病毒载体的技术相比具有明显的优势，其转染率更高、表达更稳定、更安全；此外，微环DNA的生产成本不足病毒载体的十分之一，并且具有可大规模制备、易于保存和运输等特性。微环DNA有望成为未来基因治疗安全性最高、应用范围最广的载体。

2011年美国宾夕法尼亚大学利用慢病毒介

导的CAR-T细胞治愈了CLL，从而在全球引起了CAR-T细胞研究热潮。前期CAR-T技术主要采用病毒载体对T细胞进行基因修饰，因此随着CAR-T技术临床应用研究的增多，其安全性问题也日益凸现。美国DNA重组委员会召开专门研讨会总结了CAR-T细胞临床试验的结果，分析得出CAR-T细胞临床应用的主要挑战，包括脱靶效应、细胞因子风暴、致癌危险、移植物抗宿主病样损伤以及病毒载体的高昂成本等。

联合实验室研发的微环DNA介导的CAR-T技术（MC-CART）则完美地解决传统CAR-T的技术问题：MC-CART技术生产成本低，工艺简单，简单的工艺能够实现大批量制备靶向不同肿瘤特异性抗原的CAR-T，从而有效解决了脱靶效应等问题；同时由于微环DNA本身在体内不能复制，从而通过体内注射的频次，很好地解决病毒介导的CAR-T带来的细胞因子风暴、移植物抗宿主病样反应等问题。因此，MC-CART技术必将引领未来CAR-T的发展方向。

目前联合实验室的MC-CART细胞技术已取得了阶段性成果，即将进行一系列动物试验、临床研究等，同时实验室同步进行微环DNA-纳米系统研究，将来用纳米材料包装的微环DNA载体可直接静脉注射，在人体内定向转染、活化体内的T细胞，不需要实验室内细胞培养，不仅降低了治疗的费用，治疗将更安全，MC-CART技术将成为治疗肿瘤的利器，并为人类最终攻克癌症、实现无癌世界做出重大贡献。

突破重围：免疫疗法治愈肿瘤的潜力

合一康生物临床医学部 赵静整理

FDA批准白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 用于临床治疗前，转移性黑色素瘤患者唯一的治疗方法就是达卡巴嗪化疗，并且几乎没有患者能够获得完全缓解。而IL-2免疫治疗可以治愈5%-10%的转移性黑色素瘤和肾癌患者，随后，过继性免疫细胞疗法（ACT）的出现将转移性黑色素瘤的治愈率提高到了20%-40%。最近出现的基因改造技术可使T细胞表达经典的αβ T细胞受体或抗体特异性的嵌合抗原受体，这种嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）具有特异性的杀瘤作用和在体内长期生存的能力，因此为过继性免疫细胞疗法治疗常见的上皮组织肿瘤提供了一个新选择。

(Sci Transl Med, 2012)

肿瘤需要治愈性治疗方法

2010年，美国癌症相关死亡人数超过56万，即使是曲妥珠单抗或贝伐珠单抗联合化疗，也没能治愈任何一个转移性肿瘤患者，而只能延长患者几个月的生存期，并且可能出现大量的毒副反应。另外，尽管化疗或单抗药物治疗能够使肿瘤暂时消退，但残余的病灶和肿瘤细胞仍会导致肿瘤的继续生长和病人的死亡。为提高肿瘤的治疗效果，自2005年7月至2007年12月，FDA批准了十八个新的肿瘤治疗药物，但没有一个对转移性实体肿瘤患者有治愈的潜能。

治愈性治疗需要具备识别能力、高度特异性以及区分正常和恶性细胞的能力。脊椎动物的免疫系统经过不断进化，能以高度的敏感性和特异性识别“非自身”的分子或“自身”的异常细胞，如激活的淋巴细胞可以发现肿瘤细胞中“非自身”的变化，并进一步清除这些变异细胞。基于这一原理，免疫治

疗可能成为一种能够治愈恶性肿瘤的方法。

免疫疗法可能治愈黑色素瘤和肾癌

IL-2在1992年被FDA批准用于治疗转移性肾癌，1998年用于治疗转移性黑色素瘤。IL-2是由淋巴细胞自然产生的，可以在体内扩增表达高亲和性IL-2受体的免疫细胞，在动物实验中IL-2表现出良好的抗肿瘤效应，在转移性肿瘤的临床研究中，IL-2引发了转移性黑色素瘤和肾癌患者的持续缓解。但令人意外的是，这一治疗黑色素瘤非常有效的方法却很少被患者所接受，统计结果显示，仅有不足10%的转移性黑色素瘤患者接受了IL-2治疗，其原因是进行IL-2治疗要求患者必须住院，并且IL-2非同寻常的副作用令患者难以耐受，因此许多人拒绝注射IL-2而选择其它更为便利的治疗方式。

最近，治疗转移性黑色素瘤的两个新药获得了FDA的批准，它们分别是伊匹单抗和威罗菲尼。伊匹单抗是一种抑制CTLA-4细胞表面分子的单克隆抗体，它能够阻断T淋巴细胞上的抑制信号，与多肽疫苗相比，伊匹单抗可使黑色素瘤患者的中位生存时间延长3.7个月；威罗菲尼是一种抑制突变的BRAF分子的药物（大约有50%-60%的转移性黑色素瘤患者表达突变的BRAF基因），与达卡巴嗪相比，威罗菲尼使患者中位无进展生存时间约提高3.7个月，但只有0.9%的患者完全缓解，大多数患者最终因转移性黑色素瘤复发而死亡。相比之下，接受免疫细胞治疗的患者完全缓解率高达21%，远远高于化疗和单抗治疗。表1列出了几种治疗方式对转移性黑色素瘤的治疗效果。

治疗方法	治疗人数	完全缓解	部分缓解	合计
达卡巴嗪	220	0	12 (5.5%)	12 (5.5%)
IL-2	270	17 (6.3%)	26 (9.6%)	43 (15.9%)
伊匹单抗	540	3 (0.6%)	35 (6.4%)	38 (7.0%)
威罗菲尼	219	2 (0.9%)	104 (47.5%)	106 (48.4%)
免疫细胞	93	20 (21.5%)	32 (34.4%)	52 (55.9%)

表1 不同治疗方法对转移性黑色素瘤的治疗效果

基因修饰淋巴细胞的过继性免疫治疗

过继性免疫细胞治疗（ACT）是指收集患者的免疫细胞，在体外进行诱导培养后再回输给患者，这样的细胞具有更强的抗肿瘤活性和激活机体免疫反应的能力。传统的ACT存在T细胞体外扩增困难、回输后到达肿瘤组织的数量不足以及在肿瘤局部微环境中可能丧失免疫活性等缺点，因此研究者开始探讨用基因工程技术对T细胞进行基因修饰，以达到增强T细胞识别体肿瘤抗原的能力、延长回输的T细胞在体内的存活时间和诱导T细胞在肿瘤组织浸润等目的。

基因修饰的T细胞主要包括两种：一种表达经典的T细胞受体（TCRs），是从供者的肿瘤特异性T细胞中提取编码α、β链的基因，再利用载体技术将此基因转入患者的T细胞，经过这样处理后，患者的T细胞就能表达肿瘤特异性TCR。美国国立癌症研究所（NCI）从TIL治疗后黑色素瘤完全消退的患者中提取抗MART-1的TCR基因，将该基因导入外周血淋巴细胞中，经过体外诱导培养，获得了大量具有抗MART-1-TCR的肿瘤特异性T细胞。利用这种细胞治疗黑色素瘤，接受治疗的患者缓解率达13% (2/15)，其中一例患者达到完全缓解，且缓解时间超过6年。这种方法解决了肿瘤抗原特异性T细胞不易获得的难题，也可设计出天然不存在的能识别肿瘤特异性抗原的TCR，但其发挥作用具有MHC限制性，并且鉴别和提取肿瘤特异性TCRα、β基因的过程复杂，同时可能因内源性αβ链与外源性αβ链的交联形成无意义链甚至自身反应

链，进而引起自身免疫性疾病。

另一种是嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)，通过基因工程技术，将抗体重链和轻链的可变区与CD3ζ、CD28或41BB等T细胞胞内信号区相结合，构建成的嵌合体即为CAR，再将这种嵌合体基因转入肿瘤患者的T细胞，便形成了CAR-T细胞。与表达经典TCR的基因修饰T细胞相比，CAR-T细胞具有以下优点：如肿瘤特异性单克隆抗体的获得比TCRα、β更容易，发挥作用无需MHC提呈，并且回输的CAR-T细胞可通过分泌细胞因子招募其它效应细胞共同发挥抗肿瘤作用等。

CAR的出现使基因修饰T细胞的应用扩大到了更多的肿瘤类型，如神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤以及白血病等。最为成功的是用靶向CD19的CAR-T细胞治疗B系淋巴瘤/白血病，因为CD19在所有的B细胞淋巴瘤和正常B细胞中都有表达。2010年，Rosenberg等首次应用CD19特异性CAR-T细胞治疗一名病情十分严重的进展期B细胞淋巴瘤患者，该患者共接受两次CAR-T细胞回输，结果发现CAR-T细胞几乎清除了所有CD19+ B淋巴细胞，直至随访结束，该患者的生存时间已超过25个月。

CAR-T细胞的应用大大提高了通过免疫系统治愈肿瘤的机会，但是并不是所有病人都拥有完全相同的肿瘤细胞抗原，甚至有时候来自同一个病人的肿瘤细胞能表达不同的抗原，因此鉴定出一个患者的肿瘤细胞所表达的抗原将有助于设计更为有效的CAR。首先可以通过肿瘤活检确定肿瘤组织抗原表达情况，随后将能够识别这种抗原的T细胞受体通过载体转入患者的淋巴细胞，将这些淋巴细胞在体外培养扩增后，最终回输给患者（图1）。

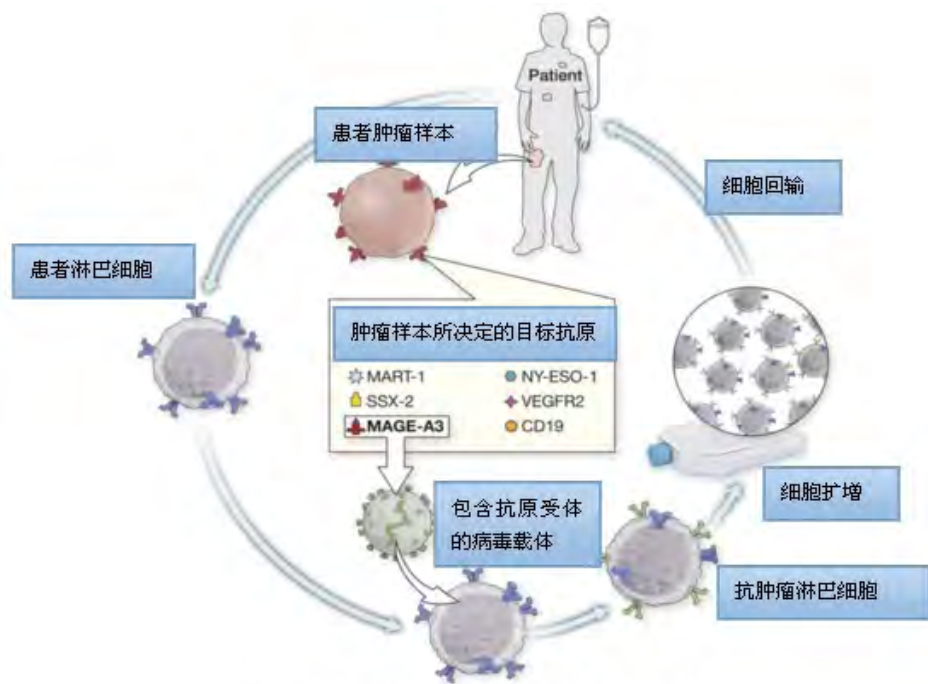


图 1 基因修饰的淋巴细胞的个体化治疗图解

早期的临床研究已表明了基因修饰的淋巴细胞治疗转移性肿瘤的能力，同时也说明了选择适当的靶抗原以避免对正常组织的毒性作用的重要性，因此在不伤害正常组织的情况下，准确地识别肿瘤抗原成为CAR-T细胞治疗癌症的主要挑战。目前NCI外科分院正在进行靶向EGFRvIII抗原的CAR-T细胞治疗头颈部肿瘤细胞的临床试验，另外，肿瘤的基质成分，如肿瘤血管中的血管内皮细胞生长因子-2（VEGFR-2）或成纤维细胞活化蛋白（FAP）也在研究中，表2总结了NCI外科分院所开展的用基因修饰的淋巴细胞治疗肿瘤的临床试验。

此外，NCI最近发布了有史以来规模最大的癌症相关基因变异数据库，并且基于肿瘤抗原的肿瘤个体化治疗总策略也开始筹备，这将更好地指导基因修饰的淋巴细胞的临床应用。CAR-T技术是肿瘤个体化治疗的一个重要代表，它为每一位患者都提供了属于自己的药物，这种药物的制造可能不适用于制药公司的大规模生产，但可能适用于拥有核心设施的商业公司，它们可以接受医院运送来的肿瘤组织或血液样本，进而生产针对该名患者的治疗性细胞。大量的临床试验已表明了CAR-T细胞治疗肿瘤的潜能，尽管目前CAR-T技术用于肿瘤治疗的研究还仅限于一部分研究机构，但它的发展会使越来越多的肿瘤患者临床获益。

受体	类型	肿瘤	状态
MART-1	TCR	黑色素瘤	已结束
gp100	TCR	黑色素瘤	已结束
NY-ESO-1	TCR	上皮肿瘤和肉瘤	进行中
CEA	TCR	结肠癌	已结束
CD19	CAR	淋巴瘤	进行中
VEGFR2	CAR	所有肿瘤	进行中
2G-1	TCR	肾癌	进行中
IL-2	Cytokine	所有受体的佐剂	进行中
MAGE-A3	TCR	上皮肿瘤	研究中
EGFRvIII	CAR	脑胶质瘤	进行中
SSX-2	TCR	上皮肿瘤	研究中
Mesothelin	CAR	胰腺癌和间皮瘤	研究中

表2 NCI开展的基因修饰淋巴细胞治疗肿瘤的临床试验

嵌合抗原受体T细胞诱导IL-12调节肿瘤间质来对抗癌症

合一康生物临床医学部 申珊珊编译

嵌合抗原受体T（CAR-T）细胞可严密控制肿瘤间质细胞，改变免疫微环境，大大提高临床试验的效果。根据临床前研究的结果，CAR-T细胞可诱导IL-12调节肿瘤间质细胞以对抗肿瘤细胞，诱导产生机体的免疫反应来攻击各种癌细胞和肿瘤基质。目前美国国家卫生研究院的一项试验正在招募转移性黑色素瘤患者，并采用CAR-T细胞和IL-12进行治疗。

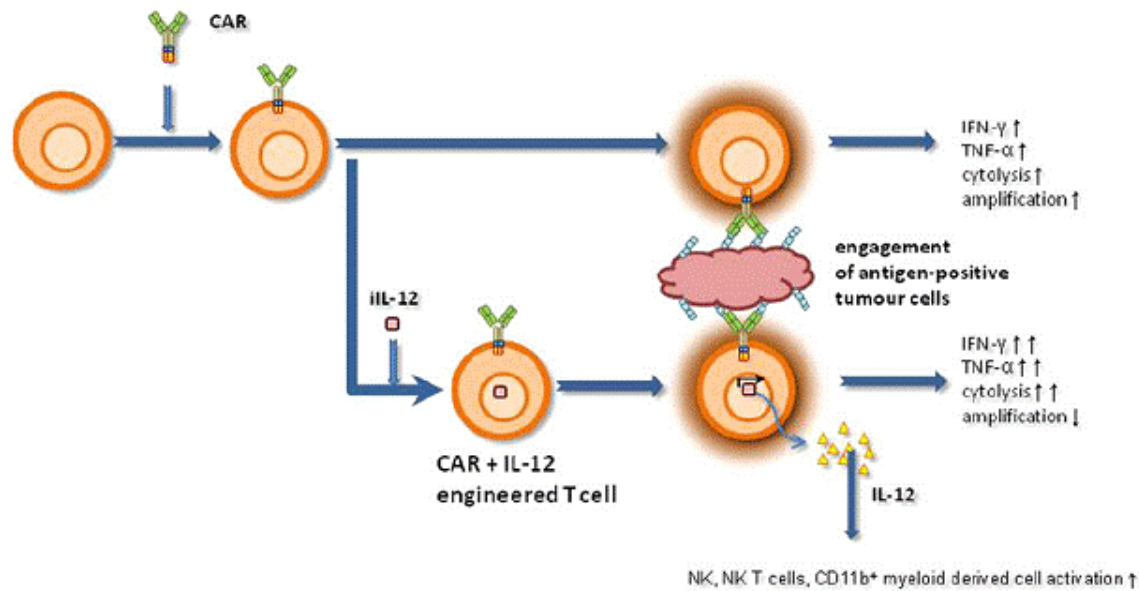
（Cancer Immunol Immunother,2012）

免疫抑制是在肿瘤进展期，快速积累大量的抑制性细胞包括调节性T细胞（Treg）、髓系抑制细胞和巨噬细胞等，它们与其它基质细胞共同抵消杀伤性T细胞的抗肿瘤作用。目前基因工程与重定向肿瘤特异性T细胞尚未克服这些难题，许多研究小组正试图增加T细胞的数量或亲和力，增加靶细胞或联合应用低、中等剂量IL-2以提高T细胞免疫应答。

有研究表明，CAR-T细胞可通过招募IL-12作为诱导免疫应答的细胞因子，从而靶向治疗恶性肿瘤，同时它可使T细胞重新定位于肿瘤组织，激活和释放IL-12并在肿瘤病灶部位积聚。此外，随着肿瘤和免疫学研究的进展，研究者发现CAR-T细胞的免疫调节功能具有传递性，这在临床前试验中表现尤为显著。

迄今为止，大多数临床试验表明，CAR-T细胞可使肿瘤暂时性消退，但随着癌症的发展，癌细胞可能出现众多的表型和变异，以及发生免疫逃逸或效应细胞对抗肿瘤的攻击被抑制，这些因素都可能促使肿瘤的复发，因此目前一些研究正积极地探索更为安全有效的CAR-T细胞治疗恶性肿瘤。

NETCORN
TECHNOLOGY



CAR-T治疗，黎明前的曙光

合一康生物临床医学部 赵静整理

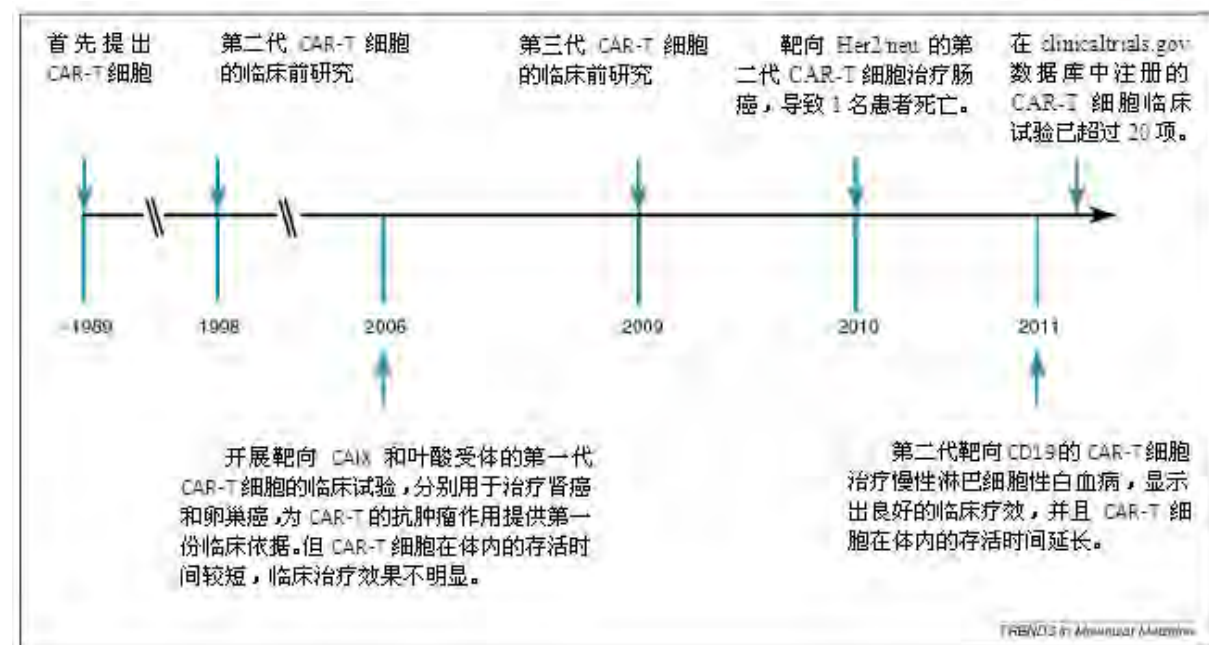
Cell杂志子刊综述了一种有前景的细胞治疗手段，这种治疗方法即为过继性CAR-T细胞治疗技术（chimeric antigen receptor-T cell）。（Cell, 2012）

嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor, CAR）是近20年来肿瘤免疫治疗领域兴起的一项新的生物技术，以CAR修饰T细胞（CAR-T细胞）为基础的肿瘤过继细胞免疫治疗近年来取得了很大的进步，它赋予T细胞靶向杀伤活性，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。CAR-T细胞在体外试验中表现出良好的

靶向性、杀伤性和持久性，在I/II期临床试验中也取得了令人鼓舞的治疗效果，展示了巨大的应用潜力和发展前景。

CAR-T是由识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部与CD3-ζ链或FcεRIγ的胞内部分组成的一个嵌合蛋白，将此嵌合蛋白转入到T细胞，这种转入了嵌合蛋白的T细胞能特异性识别、杀伤肿瘤细胞并

能激发机体免疫反应。随着技术的发展，CAR-T细胞治疗技术已经经历了三代革新，第三代CAR-T细胞在嵌合蛋白中引入了共刺激分子，使得T细胞的生存能力、增殖能力和记忆效应都大为增强。迄今为止已有超过20项的CAR-T的临床试验正在进行，该文对CAR-T细胞的发展历程进行了综述。



美国一项研究表明

靶向CD19的CAR-T细胞能迅速诱导成人难治性急性白血病完全缓解

合一康临床医学部 吴红编译

美国纪念斯隆-凯特琳癌症中心的Brentjens博士等研究表明，靶向CD19的CAR-T细胞治疗复发性/难治性急性B系淋巴细胞性白血病，可使患者临床受益。（Sci Transl Med, 2013）

尽管复发性急性B系淋巴细胞性白血病（B-ALL）患者可以接受化疗和异基因造血干细胞移植，但是其预后却很差。复发性B-ALL患者获得长期生存，主要取决于化疗后异基因造血干细胞移植，但是许多患者都因为化疗后没有获得第二次完全缓解而不能接受异基因造血干细胞移植，因此临床上迫切需要新的治疗手段。

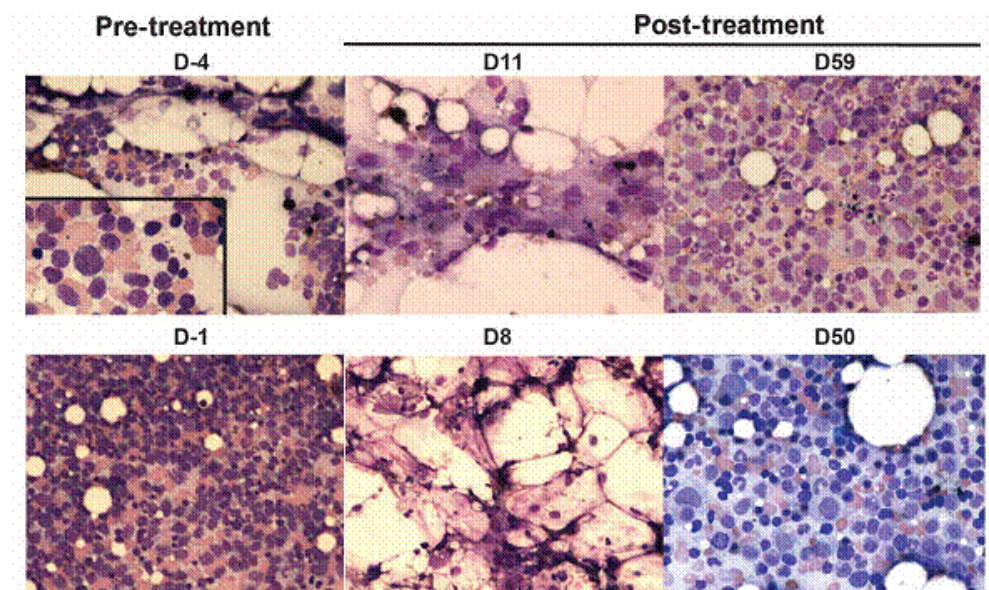
这项研究对靶向CD19的CAR-T细胞治疗复发性/化疗难治性B-ALL的安全性和有效性进行了评估，研究供选择

了5名患者，所有患者在接受高剂量环磷酰胺（1.5-3.0g/m²）化疗后进行了19-28zT细胞的治疗，细胞数目为1.5 × 10⁶ - 3.0 × 10⁶个CAR-T细胞/kg，分别于第一天和第二天两次输入。

经过治疗后，5名患者均快速达到了完全缓解，回输的CAR-T细胞能够非常迅速地消除肿瘤细胞，并没有证据表明微小残留病（MRD-），5名患者中除一名患者因全身情况较差没有接受异基因造血干细胞移植外，其他四名患者在接受CAR-T治疗后都

接受了异基因造血干细胞移植。患者显示出良好的耐受性，虽然在输注CAR-T细胞后因细胞因子水平的升高而出现了发热、低血压等临床症状，但可用类固醇降低细胞因子介导的毒性反应。

这项研究还发现细胞因子升高的幅度与肿瘤负荷密切相关，肿瘤负荷越大，细胞因子升高越多，临床症状越明显。CAR-T在体内的增殖与肿瘤负荷呈正相关。复发后的B-ALL细胞仍然表达CD20抗原，且对CAR-T细胞敏感。



一项探索性临床试验

用含有CD28和4-1BB片段的CD20
特异性CAR-T细胞治疗淋巴瘤

合一康生物临床医学部 赵静编译

肿瘤特异性嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）的过继性免疫治疗是一种很有前途的肿瘤治疗方法，美国Fred Hutchinson癌症研究中心的Till教授以逆转录病毒为载体构建了第三代CAR-T细胞（scFv CD20-CD28-CD137-CD3 ζ ），用以治疗惰性B细胞淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。（Blood, 2012）

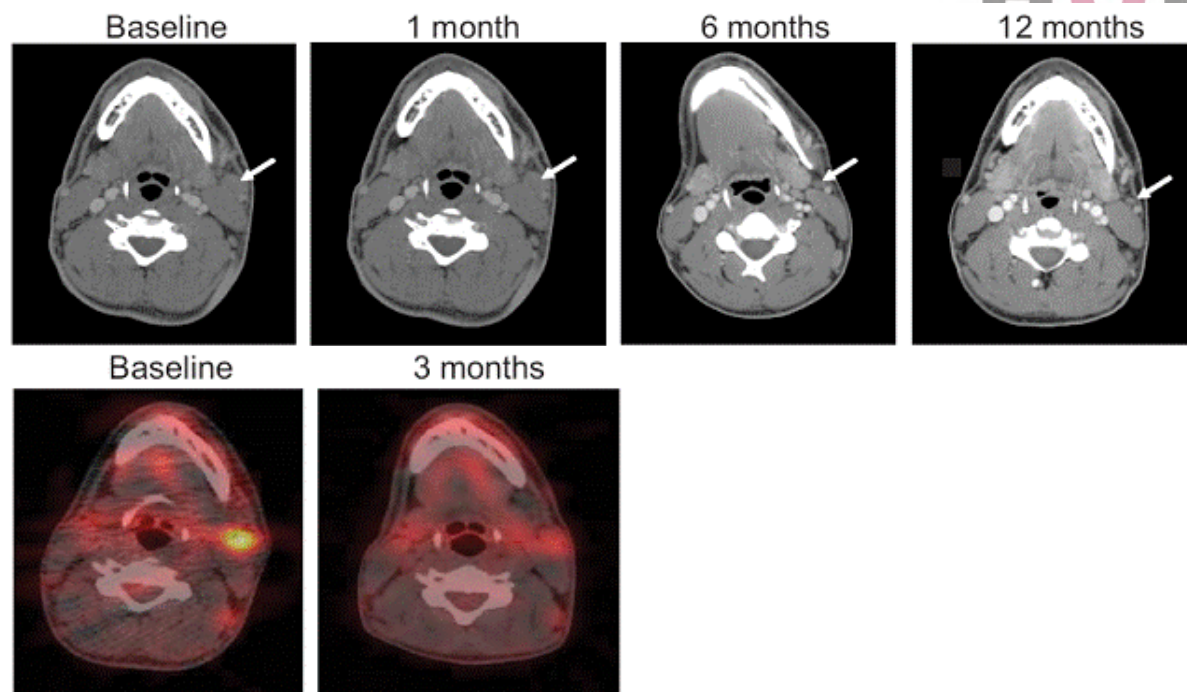
目前的临床研究数据表明CAR-T细胞能为淋巴瘤患者带来显著而持久的临床缓解，而包含共刺激片段的CAR-T细胞则显示出更强的抗肿瘤活性，为了探索含有CD28和4-1BB共刺激片段的“第三代”CAR-T细胞治疗淋巴瘤的效果，Till等进行了这项探索性临床试验。

研究共选择了四名患者，分别患有惰性B细胞淋巴瘤和套细胞淋巴瘤，其中一名患

者因无法培养得到足够的CAR-T细胞而退出试验，另外三名患者用环磷酰胺清髓后接受了自体CAR-T细胞的过继性免疫治疗。经过治疗有两名患者完全缓解，一名部分缓解，并且其中一名患者接受CAR-T细胞治疗后，颈部淋巴结在1-3周内迅速缩小了3cm。定量PCR检测在肿瘤组织中发现了CAR-T细胞，并且CAR-T细胞在体内存活的时间超过1年。治疗过

程中患者耐受性良好，仅有一名患者发生了短暂的发热。

这项研究表明，CD20特异性CAR-T细胞过继性免疫治疗淋巴瘤可诱导机体的抗肿瘤免疫反应，且患者的耐受性良好。在未来的研究中，研究者将继续寻找更高效的基因转导技术和细胞培养条件，以提高CAR在T细胞表面的表达水平和细胞的扩增效率。



美国宾夕法尼亚大学一项临床研究报道

嵌合抗原受体T细胞治疗
慢性淋巴细胞白血病达到完全缓解

合一康生物临床医学部 吴红编译

嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）能够诱导体内T细胞的活化，但此项技术因其在体内扩增受限及杀瘤活性不理想，因此已成为临床应用的主要障碍。宾夕法尼亚大学David博士的团队设计了一个慢病毒载体，该载体与CD137和CD3- ζ 链偶联，并表达特异性针对B细胞CD19抗原的嵌合抗原受体。

David等用该嵌合抗原受体T细胞在三名晚期慢性淋巴细胞白血病患者身上进行了临床试验，都获得了显著疗效。研究者将低剂量的

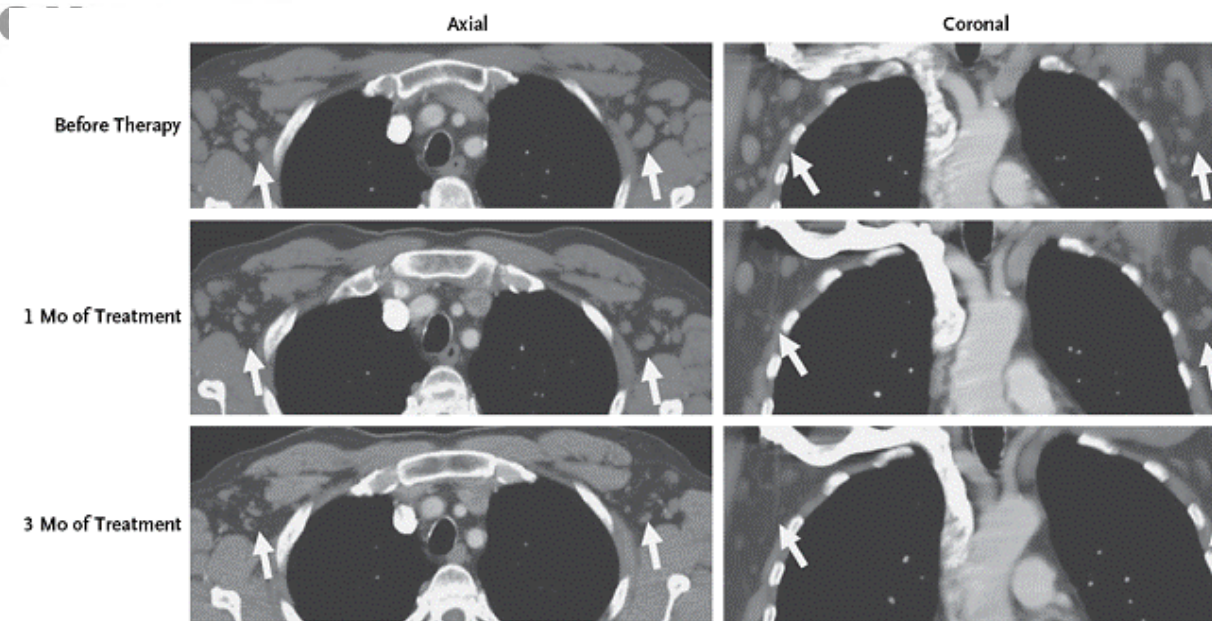
CAR-T细胞输入到一个难治性B系慢性淋巴细胞白血病人体内：患者于化疗后第四天回输CAR-T细胞，回输的细胞量为 1.46×10^5 个/kg，这些细胞分三天输入患者体内（第一天输入10%，第二次输入30%，第三天输入60%）。细胞输注21天后，荧光定量PCR检测显示，患者体内的CAR-T细胞约增殖了3000倍。

治疗后一名患者完全缓解：在骨髓中没有CLL的征象，淋巴结无肿大，CT显示治疗后1-3个月腋窝淋巴结逐渐缩小，并在10个月内持续缓

解。基因修饰的T细胞在输注到体内后6个月仍能在血液和骨髓中检测到，并持续表达嵌合抗原受体，发挥抗肿瘤的作用。

整个治疗过程中未出现急性毒性反应，唯一严重的不良反应是迟发型肿瘤溶解综合征（主要表现为急性肾衰，尿酸升高，乳酸脱氢酶水平升高等），经过对症治疗患者已逐渐康复。其它全身性症状有淋巴细胞减少、发热、头痛等，经过处理这些症状已消失。

(N Engl J Med, 2011)



美国NIH的研究报道

CD19特异性CAR-T细胞治疗淋巴瘤
一例获得完全缓解

合一康生物临床医学部 赵静整理

大多数肿瘤缺少特异性抗原，而对B细胞相关的肿瘤来说，CD19是一个很好的肿瘤特异性抗原，可以作为嵌合抗原受体T细胞（CAR-T）治疗的靶标。美国国立卫生研究院（NIH）癌症研究中心的Rosenberg等报道了一例CAR-T细胞治疗滤泡淋巴瘤的个案，治疗过程和结果发表在Blood杂志上。（Blood, 2010）

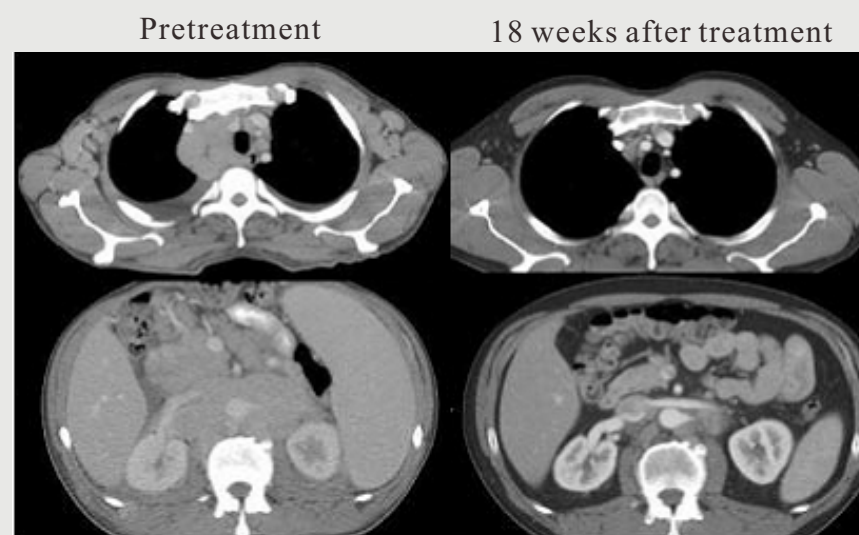
患者于2002年诊断为IVB期滤泡淋巴瘤，随后曾先后接受过PACE化疗、ipilimumab单抗治疗和EPOCH-R化疗。最后一次EPOCH-R化疗的时间为2008年1月，治疗后患者病情部分缓解，但于2008年7月又出现进展；至2009年5月，转移灶几乎涉及到所有的主要淋巴结。

流式细胞仪分析显示患者肿瘤细胞主要表达CD19、CD20、CD22、CD10和

IgM-kappa，随后其接受了靶向CD19的CAR-T细胞治疗。采集外周血单个核细胞后，患者先进行环磷酰胺和氟达拉滨预处理，随后两天分别接受 1×10^8 和 3×10^8 个CAR-T细胞静脉回输，接着进行8次高剂量IL-2的静脉注射。

治疗后CT显示部分缓解，缓解时间长达32周。治疗后第9周，患者外周血中已检测不到B细胞，经分析这种B细胞的“去除”与化疗无关。36周后，流式细胞仪和免疫组化

检测显示骨髓中CD19+细胞消失；治疗后14周骨髓中已检测不到CD79a⁺（比CD19更早表达于B细胞发育过程中）细胞，直至治疗后36周仅检测到低于正常水平的CD79a⁺细胞；在治疗后第9-39周，患者血清中IgM持续阴性。治疗后5个月患者感染肺炎，经对症处理后已完全恢复。结果表明CAR-T细胞治疗技术是一种有效的免疫治疗手段。



一项临床研究表明

EB病毒特异性CAR-CTL细胞
治疗神经母细胞瘤的安全性和有效性

合一康生物临床医学部 申珊珊编译

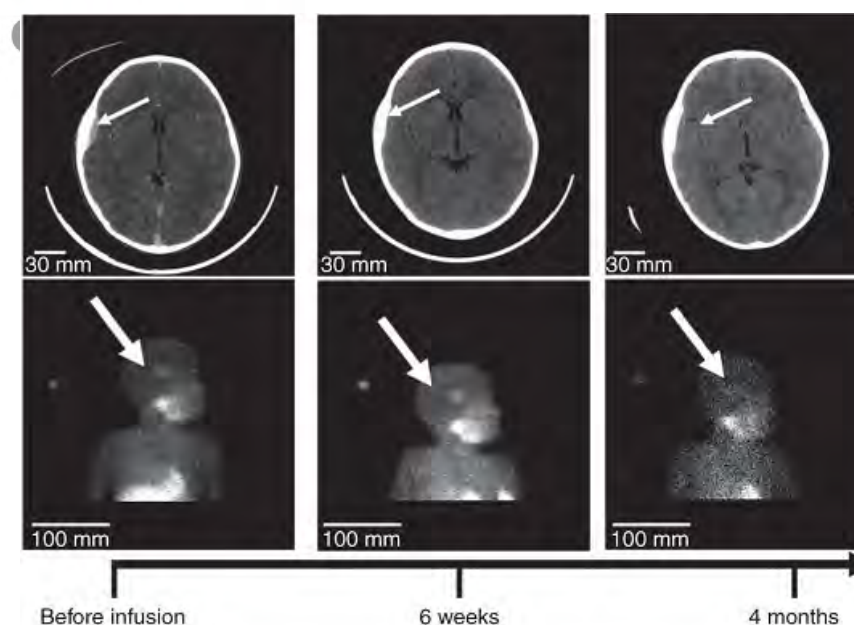
细胞毒性T淋巴细胞（CTL）是一种对付癌细胞的免疫细胞，但在生存时间不长，因此在体内的抗肿瘤作用也受到限制。另外部分肿瘤细胞缺乏适当的共刺激因子，从而导致CTL细胞的抗肿瘤效力较低。因此，美国德克萨斯州儿童医院的Plue及其同事设计了嵌合抗原受体的Epstein-Barr病毒（EBV）特异性CTL（CAR-CTL），来提高CTL细胞的生存率和抗肿瘤活性，并用来治疗儿童神经母细胞瘤。

神经母细胞瘤是婴幼儿最

常见的肿瘤，它们从发育中的脊髓外层的神经母细胞或原始神经嵴细胞衍化而来，可以起源于交感神经系统的任意神经嵴部位。神经节苷酯酶2（GD2）在大部分神经母细胞瘤细胞中呈高密度表达，是免疫治疗最适宜的靶点。通过基因改造，研究者让CTL细胞表达靶向GD2的受体，这种经过改造的CTL细胞与抗原结合后可得到最佳的共同刺激从而发挥更强的杀伤作用。

研究共选择11名患者，接受CAR-CTL免疫细胞治疗并

评价其疾病转归情况。在长达2年的随访时间里，治疗的11例患者中6例肿瘤消退或肿瘤细胞坏死，11名患者均未出现不良反应。其中一名4岁的转移性神经母细胞瘤患者，在左顶叶区的头骨中有一个4厘米左右的转移灶，这种自头骨浸润到硬膜外隙的较大的肿瘤非常少见，经过6周的治疗，硬膜外隙的肿瘤明显缩小，并且4个月后MIBG扫描发现肿瘤消失，这名患者完全缓解的时间超过12个月，其间未接受过其它治疗。（Nat Med, 2008）



嵌合抗原受体修饰的T细胞（CAR-T）治疗肿瘤是目前较有前景的癌症治疗方法。美国Fred Hutchinson癌症研究中心的Till博士开展了一项临床试验，他们采用CD20特异性CAR-T细胞治疗复发性或难治性B细胞淋巴瘤并取得良好疗效。（Blood, 2008）

自体CD20特异性 CAR-T细胞治疗惰性非霍奇金淋巴瘤

合一康生物临床医学部 吴红 申珊珊编译

Till 博士将质粒载体通过电穿孔的方法转入自体T细胞，该载体编码CD20特异的嵌合T细胞受体和新霉素抗性基因，转染的细胞与CD8+T细胞有着相似的细胞免疫特性，并且有着CD20-特异性细胞毒性。研究共选择7名患者，这些患者病理确诊为CD20+套细胞淋巴瘤（MCL）或者惰性B细胞淋巴瘤，曾接受过一个疗程化疗后又出现复发，并且不适合（或拒绝）做造血干细胞移植，同时有血清学证据表明曾经有EB病毒接触史。

患者每间隔2-5天输注一次CD20特异性CAR-T细胞，共分三次输注，剂量逐次增加，分别为（ 10^8 个/ m^2 ， 10^9 个/ m^2 以及 3.3×10^9 个/ m^2 ），随后患者连续14天皮下注射

低剂量IL-2，每天2次。7例患者共接受了20次T细胞输注，仅出现轻微的毒性反应，其中2名保持了以前的完全缓解，1名达到部分缓解，4例病情稳定。

其中三例患者输注经有限稀释法培养的CAR-T细胞，该细胞在体内持续存在了1-3周；而另外四名患者输注经过批量培养的CAR-T细胞，结果回输的细胞在体内存在了5-9周。这些结果显示，自体CD20特异性CAR-T细胞治疗淋巴瘤是安全、有效和可行的，并且批量培养的CAR-T细胞较有限稀释法产生CAR-T细胞更为有效。此外，同时注射低剂量IL-2可使CAR-T细胞在体内的存活时间更长。

一项临床试验表明 基因修饰的T淋巴细胞治疗黑色素瘤可使肿瘤消退

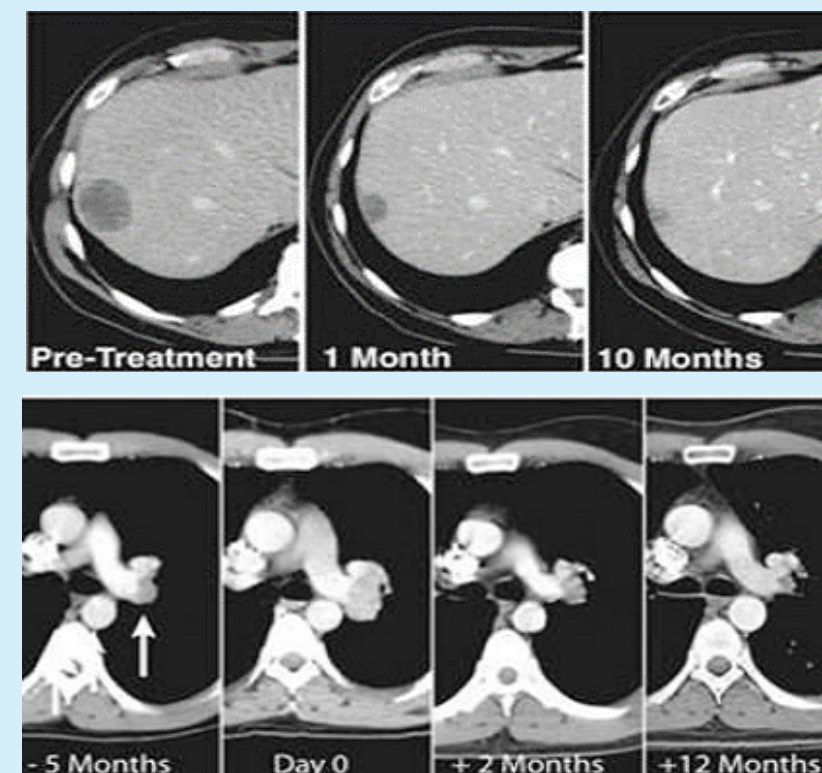
合一康生物临床医学部 赵静编译

美国国立癌症研究所的科学家Steven Rosenberg用基因修饰的T细胞（CAR-T）治疗黑色素瘤取得了良好的疗效。研究者从患者体内分离得到的T细胞通过MART-1基因修饰后，再重新回输患者体内，这种细胞在体内能更好地识别肿瘤细胞，参与试验的17名晚期黑色素瘤患者中，有两位在接受治疗后一年肿瘤完全消失了。（Science, 2006）

黑色素瘤是一种高度恶性的肿瘤，目前临床治疗主要采用手术和放化疗，但治疗效果极不理想。因此研究人员试图通过免疫治疗来诱导机体的特异性抗肿瘤免疫反应，以期达到抑制肿瘤生长和转移的目的。MART-1抗原几乎表达于所有的黑色素瘤组织中，是易被免疫细胞所识别的抗原，Rosenberg等采用靶向MART-1的CAR-T细胞治疗黑色素瘤。

研究共选择了17名进展期黑色素瘤患者，这些患者之前都接受过传统治疗但均对药物产生了抵抗，预计生存期只有3-6个月。接受CAR-T细胞治疗后检查发现，回输的CAR-T细胞可长期存在于患者体内，回输后2个月体内CAR-T水平仍高于10%。一年后外周血中的CAR-T细胞水平仍有9%-56%，并且有2例患者的肿瘤完全消退。

芝加哥大学的癌症专家Thomas Gajewski表示，这项成就是癌症治疗的重大突破，它意味着通过进一步的改良，这种方法将能用于其他肿瘤的治疗，这一研究表明了CAR-T细胞用于恶性肿瘤免疫治疗的潜力。



一项基础研究阐明

CD22特异性CAR-CTL细胞受体的抗原灵敏度的调节机制

合一康生物临床医学部 吴红编译

美国Fred Hutchinson癌症研究中心的James博士将CTL细胞进行基因改造，使其表达嵌合TCR从而识别一种新的肿瘤相关抗原CD22，这种CD22特异性的嵌合抗原受体CTL细胞（CAR-CTL）能够针对CD22抗原的不同表位，从而有效地溶解高表达CD22的肿瘤细胞。

（J Immunol, 2008）

Jnes 博士首先利用病毒载体将相关基因（CD20、CD22、HD39的重链和轻链以及RFB4 scFv的cDNA）转入CTL细胞中，随后观察CAR-CTL细胞的杀瘤活性及相关机制。研究表明，CAR-CTL细胞最高裂解效率与抗原表位和靶细胞膜的距离相关。随着肿瘤抗原表位离细胞膜表面距离的增加，其裂解细胞的能力下降。

此外，针对膜远端CD22抗原表位的CAR-CTL细胞存在脱颗粒现象和溶解颗粒靶向缺陷，CD22特异性CAR-CTL细胞与CTL细胞相比，其最大溶瘤率及靶向CD20抗原的灵敏度均有所下降。然而，对CD20灵敏度的降低并不代表TCR与抗原的亲和力降低，而是每个触发的TCR远距离瞄准抗原表位时反应信号弱的表现。

CD22特异性CAR-CTL细胞对抗原诱导的CTL触发效应具有潜在的应用价值，因为这种细胞能选择性地杀伤高表达CD22的B细胞淋巴瘤细胞系，而对低表达CD22的自身的正常B细胞杀伤作用较小。因此我们的研究表明，cTCR的信号强度以及对抗原的灵敏度，是由抗原到细胞膜表面的距离决定从而选择不同抗原表位来调节的，并且能够区分不同密度的抗原表位。

NK细胞在癌症治疗方面有巨大的潜力，然而肿瘤细胞常常通过与NK细胞抑制性受体相互作用而逃避NK细胞的毒性作用。因此为了使NK细胞发挥更强的肿瘤杀伤功能，墨尔本大学的Darcy教授用嵌合抗原受体基因对NK细胞进行了修饰，这种基因修饰的NK细胞能够识别肿瘤相关性抗原erbB2，并针对肿瘤细胞发挥特异性杀伤作用。

（J Immunol, 2008）

一项体内实验发现

基因修饰的初始NK细胞可抑制肿瘤的进展

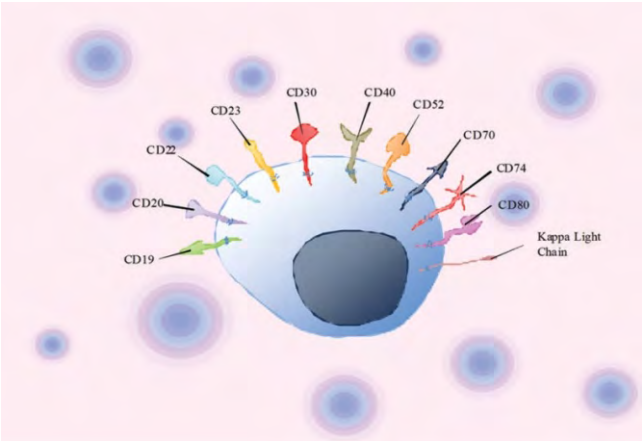
合一康生物临床医学部 赵静编译

Darcy等对嵌合erbB2抗原受体的NK细胞进行了体外和体内研究，体外实验表明基因修饰的NK细胞能够特异性地杀伤erbB2+淋巴瘤细胞，其机制主要是通过释放穿孔素进而发挥直接杀伤作用。

随后，研究者进一步将嵌合erbB2抗原受体的NK细胞输入淋巴瘤小鼠体内，同时腹腔注射大剂量IL-2，并观察基因修饰的NK细胞在体内的抗肿瘤作用。结果表明，基因修饰的NK细胞

与机体内源性的NK细胞的可同时发挥肿瘤细胞杀伤作用；并且，回输基因修饰的NK细胞可明显提高荷瘤小鼠的存活率。

这些数据说明基因修饰的NK细胞在体外和体内均可起到抗肿瘤的作用，随着研究的进展，这一技术也可能应用于人类其它肿瘤的治疗，这为肿瘤患者的免疫治疗提供了新的选择。



一项基础研究表明

含有CD28和CD137共刺激域的CAR-T细胞有望用于治疗淋巴瘤

合一康生物临床医学部 赵静编译

美国Fred Hutchinson癌症研究中心的Wang等设计了含有CD28和CD137共刺激域的第二代嵌合抗原受体T细胞（CAR-T），研究结果显示第二代CAR-T细胞体外扩增迅速，并显示出对CD20⁺淋巴瘤细胞的特异性细胞毒性作用。（Hum Gene Ther, 2007）

Wang的研究团队在之前的研究中已证实，表达CD20特异性scFvFc:CD3 ζ 嵌合T细胞受体的CTL细胞能够特异性地杀伤CD20⁺细胞淋巴瘤细胞，并且能够在体外扩增至治疗所需的细胞数量，但这种细胞仍存在细胞生长缓慢、扩增困难、细胞表面表达的cTCR密度低以及细胞毒性较差等缺点。

为了改善T细胞在体外的扩增水平和体内的杀伤功能，Wang等设计了“第二代”质粒结构，它包含翻译增强子（SP163）以及在CD3 ζ 胞内信号区增加了CD28和CD137共刺激域的cTCR基因。他们用ELISA法检测抗原特异性分泌物IL-2的水平以评估这种第二代CAR-T细胞的细胞因子分泌功能，并用51铬释放试验检测CAR-T细胞对CD20⁺靶细胞的杀伤能力。

这项研究证实了表达第二代cTCR的CAR-T细胞较T细胞的具有更多优越性，检测结果显示，SP163增强了细胞表面cTCR的表达；第二代cTCR促进了CTL的活化、增殖并增强了其细胞毒性，同时提高了IFN- γ 、IL-2等细胞因子的分泌水平；CAR-T细胞体外增殖迅速并可介导靶向CD20⁺的细胞毒性作用。这一研究为CAR-T细胞治疗CD20⁺的套细胞淋巴瘤和缓慢进展型淋巴瘤提供了临床前研究数据。

抗CD-19嵌合抗原受体CIK细胞 对急性B细胞淋巴瘤的潜在免疫治疗作用

合一康生物临床医学部 陈杰编译

为了更好地特异性杀伤肿瘤细胞，免疫效应细胞在体内必须具备良好的迁移至肿瘤浸润的组织或器官的特性。CD3+CD56+CIK细胞对白血病浸润组织就具备良好的趋化性。在此基础上，意大利科学家Marin等通过基因改造得到嵌合抗原受体CIK细胞（CAR-CIK细胞），验证CAR-CIK细胞是否适合B-ALL的免疫治疗（Exp Hematol, 2006）。

Marin用逆转录病毒作为载体，构建含抗CD19的CAR-CIK细胞。经51铬释放试验检测，CAR-CIK细胞对CD19⁺的急性B细胞淋巴瘤细胞系和初始急性B细胞淋巴瘤具有强大的细胞毒性，当效靶比30:1时，均数溶瘤率分别达到59.9%和60.2%。

此外，通过检测其是否具备与未改造的CIK细胞一样的针对白血病细胞浸润组织的高移行特性，发现基因改造并没有改变CIK细胞针对CXCL12和CCL19的趋化应答(CXCL12和CLL19趋化因子负责招募效应细胞聚集于B-ALL增殖和浸润部位);且通过CXCL12刺激后，CAR-CIK细胞能粘附和移行穿过内皮层以及重组基底膜，而这一步正是所有效应细胞特异性靶向肿瘤的关键一步。

以上结果证实，CAR-CIK细胞能作为一种有效的治疗方式，给广大医患治疗白血病提供新的治疗选择。

嵌合抗原受体γδT细胞的抗肿瘤免疫效应

合一康生物临床医学部 陈杰编译

按T细胞表面受体（TCR）构成不同，T淋巴细胞可分为αβT细胞和γδT细胞，其中γδT细胞是近10多年来人们新认识到的一种T细胞亚群，绝大多数表达CD3+CD4-CD8-。γδT细胞不但具有抗肿瘤效应，而且还具有像DC一样的抗原递呈功能，在正常人外周血中占T细胞总数的1%-5%。

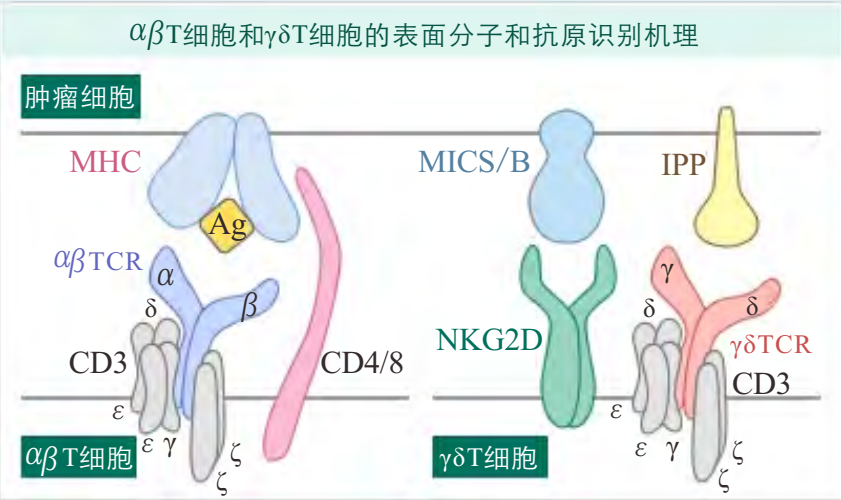
(Br J Haematol, 2004)

德国科学家Rischer等用Zoledronate等体外扩增激活γδT细胞，第7-10天，90±5% T 细胞表达 γδTCR，其中52±7% γδT细胞共表达CD56细胞分子。Rischer再将得到的Vγ9⁺T细胞，用逆转录病毒作为载体进行基因改造，使其分别表达14.G2aζ和CD19ζ嵌合抗原受体。流式细胞检测结果示73±12% γδT细胞表达14.G2aζ嵌合抗原受体，明显高于αβT细胞30%的基因转导效率。并且该受体在γδT细胞培养的过程中持续高表达，最高持续70d。

通过51铬释放试验，14.G2aζ-CARγδT细胞能特异性溶解GD2阳性的靶细胞，对GD2阴性靶细胞没有溶解作用，且缺乏14.G2aζ-CAR的γδT细胞也不能溶解GD2阳性的靶细胞。CD19ζ-CARγδT细胞能特异性溶解Raji、Daudi和Reh细胞，而对CD19阴性的K-562细胞没有溶解作用。且没有通过基因改造的γδT细胞，除了对Daudi有细胞毒性外，对其他B细胞系靶细胞无溶解作用。

此外，经GD2阳性靶细胞刺激的14.G2aζ-CARγδT细胞分泌干扰素的能力（45ng/ml每10⁶细胞）显著高于未经基因改造的γδT细胞或GD2阴性靶细胞刺激的基因改造的γδT细胞。

这些都说明CAR-γδT细胞在存活时间、靶细胞特异性杀伤能力和细胞因子分泌能力方面，都优于未经基因改造的γδT细胞。



CD20特异性CAR-CTL细胞
治疗滤泡性淋巴瘤的临床前研究

合一康生物临床医学部 申珊珊编译

抗CD20单克隆抗体诱导的体液免疫疗法，使60%的复发性滤泡淋巴瘤患者得到缓解。然而大多数患者因持续表达CD20+淋巴瘤细胞而导致复发。研究者推测，细胞免疫通过靶向CD20+细胞可能会提供一个更有效的机制来消除淋巴瘤，因此Fred Hutchinson癌症研究中心的Wang等开展了以CD20为靶标的CAR-CTL细胞的研究。（Mol Ther, 2004）

为了验证CD20特异性CAR-CTL细胞克隆、扩增的可行性，研究者首先分离人外周血单个核细胞并在体外培养成为CTL细胞，然后将包含抗CD20 scFvFc:cTCR基因的质粒用电穿孔法转入CTL细胞内，随后使用G418筛选转染的细胞并进一步克隆和扩增。

结果表明CAR-CTL细胞在体外可扩增至10⁹个，能够达到治疗所需的细胞数量，并且具有CD20特异性细胞毒性。该研究分别以滤泡性淋巴瘤细胞、小淋巴细胞性淋巴瘤细胞、脾边缘区淋巴瘤细胞、弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞以及慢性淋巴细胞性白血病细胞为靶细胞，通过51铬释放试验检测发现，CAR-CTL细胞对这些CD20+的靶细胞均有极强的裂解作用。

这一研究表明CD20特异性CAR-CTL在体外生成和扩增的可行性，并首次证明这样的CTL细胞对多种B淋巴系统恶性肿瘤中分离出的肿瘤细胞都具有特异性细胞毒性。鉴于这些有前景的发现，该小组将开展CAR-CTL免疫细胞治疗复发性滤泡淋巴瘤的Ⅰ期临床试验。

CAR-T细胞相关临床试验

靶抗原	病种	CAR的类型	CAR的胞内区	基因载体	试验阶段	注册号	试验单位
CD19	CLL	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT00466531	MSKCC
CD19	B-ALL	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT01044069	MSKCC
CD19	白血病	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT01416974	MSKCC
CD19	淋巴瘤/CLL	第一/二代	CD3ζ/CD28 和 CD3ζ	逆转录病毒	I期	NCT00586391	BCM
CD19	B-NHL/CLL	第一/二代	CD3ζ/CD28 和 CD3ζ	逆转录病毒	I期	NCT00608270	BCM
CD19	进展期 B-NHL/CLL	第一/二代	CD3ζ/CD28 和 CD3ζ (EBV)	逆转录病毒	I期	NCT00709033	BCM
CD19	ALL	第一代	CD3ζ/EBV	逆转录病毒	I/II期	NCT01195480*	UCL
CD19	淋巴瘤/白血病	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I/II期	NCT00924326	NCI
CD19	ALL	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT00840853	BCM
CD19	淋巴瘤/白血病	第一/二代	CD3ζ/4-1BB 和 CD3ζ	慢病毒	I期	NCT00891215	UP
CD19	B细胞白血病 /B-NHL/CLL	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT01087294	NCI
CD19	B细胞恶性肿瘤	第二代	CD3ζ/CD28	电穿孔/SB质粒	I期	NCT00968760	MSKCC
CD19	B系恶性淋巴瘤	第二代	CD3ζ/CD28	电穿孔/SB质粒	I期	NCT01362452*	MSKCC
CD19	B-NHL	第一代	CD3ζ	逆转录病毒	I期	NCT01493453*	CHMAN
CD19	B-NHL	第一代	CD3ζ	慢病毒	I/II期	NCT01318317*	COH
CD19	B-NHL/CLL	第二/三代	CD3ζ/CD137/CD28	电穿孔	I期	NCT01853631	BCM
CD20	套细胞淋巴瘤	第三代	CD3ζ/CD137/CD28	电穿孔	I期	NCT00621452	FHCRC
GD2	神经母细胞瘤	第一代	CD3ζ (EBV)	逆转录病毒	I期	NCT00085930	BCM
PSMA	前列腺癌	第一代	CD3ζ	逆转录病毒	I期	NCT0664196	RWMC
PSMA	前列腺癌	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT01140373	MSKCC
CEA	乳腺癌	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT00673829	RWMC
CEA	结肠癌	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT00673322	RWMC
Her/neu	肺癌	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT00889954	BCM
Her/neu	进展期骨肉瘤	第二代	CD3ζ/CD28	逆转录病毒	I期	NCT00902044	BCM
Her/neu	脑胶质瘤	第二代	CD3ζ/CD28 (EBV)	逆转录病毒	I/II期	NCT01109095	BCM
Kappa 轻链	B-NHL/B-CLL	第一/二代	CD3ζ/CD28 和 CD3ζ	逆转录病毒	I期	NCT00881920	BCM

l e a d e r e t t e

编者按：

随着生物技术的发展，国内外免疫细胞治疗技术临床应用研究蓬勃兴起，已成为肿瘤生物治疗领域最活跃、最有发展前景的技术，逐步成为了继手术、放化疗后，肿瘤的第四种主流治疗技术，同时也被学界认为是最有可能治愈肿瘤的方法之一。

近年来迅速发展的利用基因改造技术得到的嵌合抗原受体修饰T细胞（CAR-T）技术，被誉为是生物治疗领域最璀璨的明珠。目前应用CAR-T细胞治疗恶性肿瘤已取得了令人瞩目的成绩，为肿瘤过继性细胞免疫治疗开辟了一个崭新的舞台。

合一康生物联合中科院深圳先进技术研究院研发的以微环DNA为载体的CAR-T细胞技术，以及与同济大学医学院联合开展的以慢病毒为载体的规模化CAR-T细胞制备技术，能将现有的CAR-T技术引入一个更高的层次，优化现有CAR-T在肿瘤治疗中的不足，填补该领域在国内和国际上的空白，走在肿瘤免疫治疗的最前列，展示出巨大的应用潜力和发展前景。

本刊收录了国际知名期刊中发表的与CAR-T细胞治疗肿瘤有关的综述、基础研究和临床试验等。如对本刊中文献有需求，请联系合一康生物临床医学部。

受编者能力及水平的限制，本刊的整理和编排中存在的不足之处，望大家提出宝贵的意见和建议。

征稿启示：

作为企业文化的载体，《合一康生物学术内刊》起着传递行业信息、展示企业风采、分享技术经验的作用。为了丰富内刊内容、加强总部与各中心之间的沟通，本刊特向公司全体员工征稿。征稿内容包括公司新闻、行业动态、专业知识、典型病例、团队风采及工作心得等，所有稿件要求字数300字以上，可根据内容进行配图，如推荐和引用其它刊物的文章，请注明文章出处及原著姓名。

欢迎各位同事积极参与！