

CAR-T 细胞治疗实体肿瘤相关肿瘤抗原的研究进展

何 玥, 阴赓宏 综述, 吴玉梅 审校

(首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100006)

摘要:以嵌合型抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)为基础的细胞免疫治疗是一种新的治疗恶性肿瘤的模式,为部分晚期实体瘤患者带来治愈的希望。目前 CAR-T 细胞已应用于多种实体肿瘤临床试验研究,尤其是在晚期进展性肿瘤中研究广泛,选择特异性强的合适的 TAA,将使 CAR-T 细胞造福越来越多的晚期肿瘤患者。

关键词:嵌合型抗原受体;免疫治疗;实体肿瘤;相关肿瘤抗原

中图分类号:R730.51 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2018)09-0910-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2018.09.B014

Progress of Tumor Associated Antigen of Chimeric Antigen Receptor T Cells in Treatment for Solid Tumor

HE Yue, YIN Cheng-hong, WU Yu-mei

(Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China)

Abstract: Cell immunotherapy based on chimeric antigen receptor(CAR) is a new treatment for malignant tumors, and it is a promising treatment for patients with advanced solid tumors. At present, CAR-T cells have been used in clinical trials of many solid tumors, especially in advanced tumors. A wide range of tumor associated antigens (TAA) have been found. The selection of a strong specificity and appropriate TAA in treatment of CAR-T will benefit more and more advanced cancer patients.

Subjects words: chimeric antigen receptor; immunotherapy; solid tumor; tumor associated antigen

嵌合型抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)是由抗体源性靶向区与 T 细胞信号区融合而成,当 T 细胞表达 CARs 后赋予 T 细胞抗原特异性,而这种特异性是由 CARs 中的靶向区决定的。尽管在 B 细胞源性肿瘤中 CAR-T 细胞治疗取得了较好的疗效,但在实体瘤中 CAR-T 细胞仍面临挑战。为获得较好临床疗效 CAR-T 细胞必须具有以下功能:首先必须对明确区分肿瘤与正常组织的抗原具有特异性;其次必须归巢并且渗透至围绕肿瘤的促结缔组

织形成基质;当到达肿瘤内后,必须能够扩增、持续存在,并且在主要由免疫抑制介质组成的微环境中发挥细胞毒作用。这些可通过内在和/或外在对 CAR-T 细胞进行修饰来实现。目前 CAR-T 细胞对于循环淋巴细胞肿瘤治疗有明显效果,尤其是对 B 细胞恶性肿瘤治疗,但是 CAR-T 细胞应用于实体肿瘤的报道远低于在血液系统,这可能与正常细胞表面也表达目标抗原,任何会在正常细胞表达的抗原都有被误伤的风险导致脱靶效应^[1],对正常细胞产生毒性反应^[2]。实体瘤常常同时表达多个肿瘤抗原,通过设计多个抗原复合的 CAR 结构,识别抗原组合,能够提高杀伤的特异性^[3]。

在过去的几十年里,人类一直想构建 CARs 的结构。目前 CAR 主要包括一个胞外抗原结合区、跨膜区以及胞内信号区。胞外抗原结合区是有单链可变区片段(single-chain variable fragment, scFv)连接

基金项目:北京市科委重点项目(D131100005313009);北京市医院管理局“青苗”人才培养计划(QML20151302);北京市优秀人才培养资助项目(2014000021469G246);首都医科大学附属北京妇产医院中青年学科骨干培养专项(fcy201601);北京市医院管理局重点医学专业发展(ZYLX201705)。

通讯作者:吴玉梅,主任医师,博士生导师,博士;首都医科大学附属北京妇产医院妇科科主任,北京市东城区骑河楼大街 17 号首都医科大学附属北京妇产医院(100006);E-mail: wym597118@163.com

收稿日期:2017-05-22; **修回日期:**2017-07-13

绞链区识别特定肿瘤抗原功能,胞内区域是免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif,ITAM),是由 CD3 ζ 链或者 FcR 受体 γ (Fc ϵ RI γ)^[1,4]。

CAR-T 细胞分为第一代到第四代:第一代 CAR-T 细胞是有 scFv 和 ITAM 直接结合,缺乏共刺激信号。所以 T 细胞活化和增殖水平都较低,导致 T 细胞杀伤时间短,抗肿瘤效果降低。为了弥补这个缺陷,第二代 CAR T 细胞应运而生,在胞内区域表达共刺激分子 (co-stimulatory molecules,CMS),如 CD28 或者 CD137(4-1BB)^[5]。第二代明显增强了扩展和 T 细胞活化的持久性、生长和存活。为了增加有效性,第三代 CAR-T 细胞在第二代上进一步发展,有两个 CMS,包括 CD28、CD27、4-1BB 以及其他^[6]。诱导的 CMs 进入到 CARs 里导致活性、增殖性和 T 细胞存活延长^[7]。然而,由于第二或第三代 CMS 引起的多个胞内信号存在,大量细胞因子的释放,它们可能会导致细胞因子风暴,并危及生命^[8]。除此之外,很多文献也介绍了第四代 CAR-T 细胞,也叫做“TRUCK”T 细胞^[9]。一旦识别肿瘤细胞表面的相关肿瘤抗原 (tumor associated antigen,TAA),第四代 CAR-T 细胞释放大量的穿孔素、酶和肿瘤坏死因子 (TNFs),最终导致肿瘤细胞凋亡。与前三代相比“TRUCK”T 细胞在抑制局部抑制细胞方面具有更多的优势,能够产生更多的抗肿瘤破坏作用^[10]。

目前国外已报道 CAR-T 细胞应用于多种实体肿瘤的临床研究,在卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤及乳腺癌实体肿瘤中应用均有报道,有些已完成或正进行临床试验。目前已报道认可的肿瘤抗原包括:卵巢癌叶酸受体 α (folic acid receptor α) 和 NKG2DS 配体 (NKG2DLs),前列腺癌抗前列腺特异性膜抗原 (prostate specific membrane antigen,PSMA),前列腺干细胞抗原 (prostate stem cell antigen,PSCA),胶质母细胞瘤上皮生长因子受体变异型 III (EGFRv III),黑色素瘤细胞分化抗原糖蛋白 (glycoprotein,GP),肾细胞癌的羧基脱水酶 IX (carboxy anhydrase IX,CAIX)等^[11]。本文根据目前国内外对实体肿瘤研究,对国内外已报道的认可的实体肿瘤 T 细胞作用相关肿瘤抗原 (tumor associated antigen,TAA)进行总结,为进一步明确 CAR-T 细胞在实体肿瘤未来应用提供参考依据。

1 前列腺特异性膜抗原

前列腺特异性膜抗原 (prostate-specific membrane antigen,PSMA)是存在于前列腺上皮细胞胞膜的一种 II 型固有膜蛋白,其基因定位于 11p11~12。PSMA 蛋白含有 750 个氨基酸,分子量为 100kD,结构上主要分为短的胞内段(氨基酸 1~18),跨膜段(氨基酸 19~43)和较长的胞外段(氨基酸 44~75)^[12]。Skoloff 等^[13]应用较灵敏的双抗体夹心法和免疫亲和光谱定量法,发现前列腺组织中 PSMA 高表达,卵巢和乳腺细胞膜上低表达,肠、肝、肾等细胞膜几乎不表达,精液中 PSMA 含量最高。由此可见,PSMA 特异地高表达于前列腺上皮细胞。由于 PSMA 所具有的膜结合性及前列腺组织特异性,在前列腺癌 (prostate carcinoma,Pca)、去势抵抗性前列腺癌 (castrateresistant prostate cancer,CRPC) 中高表达。成为前列腺癌免疫靶向治疗的重要靶蛋白。

Zuccolotto 等^[11]建立以 PSMA 特异性的 CAR-T 治疗 PCa 的大鼠模型,anti-hPSMA D2B 杂交瘤细胞中获得 anti-hPSMA scFv 完整基因序列,克隆进 pSecTag2A 载体质粒的多克隆位点,并嵌入 cD3 ζ 链及引入共刺激分子 CD28,形成 anti-hPSMA CAR。取健康捐赠者 T 细胞,通过体外转染技术将重组质粒转染进 T 细胞,纯化、扩增,获得 CAR-T 细胞,并证明 CAR-T 细胞能够抑制前列腺癌细胞的生长,改善生存期。

Ma 等^[14]采用嵌入共刺激分子 CD28 制成第二代 anti-PSMA CAR-T 细胞并与第一代疗效进行对比。以逆转录病毒为载体,取健康人 T 细胞制成第一代 anti-PSMA IgTCR CAR-T 细胞及第二代 anti-PSMA IgCD28TCR CAR-T 细胞。证明无论体外实验还是动物实验,CAR-T 细胞对前列腺癌细胞均显示了明显的杀伤作用,为 CRPC 的临床免疫靶向治疗提供了依据。

2 神经节苷脂 2

神经节苷脂 2(diasialoganglioside,GD2)是一类细胞膜上的糖鞘脂类化合物,正常组织很少表达 GD2,而黑色素瘤、成纤维细胞瘤、小细胞肺癌、骨肉瘤、软组织肉瘤等肿瘤细胞高表达 GD2,而 GD2 具

有促进原发及转移肿瘤生长作用。Pule 等^[15]应用针对 GD2 的第一代 CAR-T 细胞治疗 11 例儿童神经母细胞瘤患者,在 8 例可评价疗效患者中 4 例患者出现肿瘤坏死与消退,其中 1 例患者完全缓解,这 11 例患者随访 2 年时未见明显不良反应。对 19 例接受抗 GD2-CAR-T 细胞治疗的高危神经母细胞瘤患者进行长期随访,发现 GD2-CAR-T 细胞具有抗神经母细胞瘤作用,这些 CAR-T 细胞可在患者体内扩增、持续存在,而 CAR-T 细胞的持续存在与患者的长期生存相关^[16]。

3 人类表皮生长因子受体 2

人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her-2) 是跨膜表皮生长因子受体家族成员,在几种人腺癌中存在过表达,是目前肿瘤免疫治疗研究最多的 TAA 之一。Sun 等^[17]构建的人源化抗-Her-2- CAR,体外研究表明这种 CAR-T 细胞具有特异的抗 Her-2(+) 肿瘤细胞作用,在动物模型体内具有明显抑制 Her-2(+) 肿瘤生长作用;说明 Her-2 特异性 CAR-T 细胞在体外不仅具有识别和杀伤 Her-2(+) 癌细胞作用,并且体内具有诱导肿瘤消退作用,这一结果为部分 Her-2(+) 肿瘤患者治疗带来了新的希望。

4 癌胚抗原

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) 为基因编码于 19 号染色体上的具有人类抗原决定簇的酸性糖蛋白,为胚胎性致癌抗原。于 1965 年发现,被认为是结肠癌的标志物^[18],但进一步研究发现,在各种消化道肿瘤均有所表达,尤其以结/直肠癌血清量升高显著^[19]。Blumenthal 等^[20]报道 CEA 是 CAR-T 治疗肝癌的有吸引力的靶标,肝癌细胞高表达 CEA 并可在血浆中检测 CEA 的浓度。抗原识别后,抗 CEA-CAR-T 细胞增殖,产生细胞因子,并杀死靶细胞。既往临床研究有对转移性腺癌抗 CEA-CAR-T 细胞进行系统研究,发现其使用最佳值和毒性剂量界值^[21]。Katz 等^[22]对 6 例肝转移癌患者进行的 I 期临床试验,使用第二代抗 CEA-CAR-T 细胞治疗,无一例有 3 或 4 级不良反应发生,1 例患者在使用 CAR-T 细

胞 23 个月后病情稳定,5 例患者因疾病进展而死亡。该研究已经明确使用抗 CEA-CAR-T 细胞在治疗巨大肝转移癌肿瘤的安全性和有效性。

5 硫酸软骨蛋白多糖-4

硫酸软骨蛋白多糖-4(chondroitin sulfate proteoglycan-4, CSPG4) 也被称为高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW)和黑色素瘤相关的硫酸软骨素蛋白多糖(MCSP),是一种良好的特征的细胞表面的蛋白多糖对人黑色素瘤细胞中首次发现。随后的研究发现其与其他实体瘤如间皮瘤^[23]和三阴性乳腺癌中高度表达^[24],在正常组织中无表达。CSPG4 参与肿瘤迁移、侵袭、血管生成和转移。它与 $\alpha 4 \beta 1$ 整合素相互作用,通过肿瘤细胞异位表达直接调节细胞黏附、运动和转移^[25]。鉴于其受限制的表达在正常组织中,对实体瘤的各种类型及其在肿瘤细胞中高表达的生物学作用,CSPG4 是一个有吸引力的目标免疫。CSPG4 已针对单克隆抗体(mAb)在黑色素瘤、间皮瘤和乳腺癌模型,导致除了阻止肿瘤细胞的转移能力的肿瘤生长和存活的抑制作用。

Geldres^[26]等在体内及体外研究发现,GSPG4 在许多实体肿瘤中表达,使用第二代抗 GSPG4-CAR-T 细胞在多种实体肿瘤中有明显疗效,包括黑色素瘤、乳腺癌和头颈部鳞状细胞癌,针对 GSPG4 阳性的肿瘤细胞,而不针对正常细胞。

6 叶酸受体 α

对于卵巢癌的治疗,适当的治疗靶标是细胞叶酸受体 α (folic acid receptor α , FR α)。FR α 是一个膜蛋白,对有高亲和力同时可以通过细胞介导的内吞作用摄取维生素(及其药物偶联物)。有相关研究显示^[27],大约 90% 卵巢癌高表达 FR α ,同时,许多其他肿瘤,包括子宫内膜癌、肾癌、间皮瘤、乳腺癌、脑癌和髓系白血病都高表达,而正常细胞中低表达。这个在叶酸靶向显像和治疗方面有重要意义。低水平的 FR α 表达在正常人体组织中仅限于位于支气管上皮细胞的腔面,肾小管及脉络丛、小肠刷状缘膜, I 型和 II 型肺泡细胞的肺和胎盘组织。这些叶酸受体与叶酸和叶酸偶联物无法连接,因为他们在极化上

皮细胞,顶端表面的独家定位。因此,在健康患者体内没有恶性肿瘤或炎症性疾病,叶酸偶联物的摄取局限在肾脏内并可进行测量,肾脏是叶酸回收的地方。在动物体内使用叶酸化疗偶联物,抗体和T细胞治疗均未见到肾毒性的存在。当然急性短暂的毒性与抗叶酸摄入有关,如甲氨蝶呤。

7 表皮生长因子受体

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一种酪氨酸激酶受体,是ErbB家族四个成员之一,在多种上皮来源的肿瘤中都呈过表达。EGFR及其配体是细胞信号传导系统的一部分,其信号传导网络在肿瘤的形成和发展过程中起重要作用,因此EGFR是肿瘤治疗中一个很重要的靶分子^[28]。目前研究显示EGFR在多种实体肿瘤中表达,以EGFR为靶点的肿瘤治疗策略包括干扰受体信号的单克隆抗体(monoclonal antibodies,MABs);将MABs做为放射性核素、毒素或前药的载体;低分子量酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors,TKIs)干扰受体信号^[29];反义寡核苷酸或核酶阻断受体的翻译;细胞内单链抗体阻止受体向细胞表面的转运;靶向EGFR的DNA疫苗等。

最新Feng等^[30]研究为1例被诊断为进展性不可切除/转移性胆管癌患者应用第二代抗EGFR-CAR-T进行临床试验,其在8.5个月内获得部分疗效,但是在输注过程中出现发热、寒战、恶心和肌肉酸痛等轻度不良反应。因此认为抗EGFR-CAR-T细胞可以治疗多种进展性晚期实体肿瘤,但是对其毒性反应,尤其是对内皮细胞的损伤,需要进一步研究。

在过去的10余年中,肿瘤的免疫治疗取得了重要进展,其中许多临床前期试验揭示了CAR-T细胞的优势。然而,CAR-T细胞在进入主流临床治疗前,还需要科学家们经过更加缜密的设计来权衡利弊,以更多的临床前研究及临床试验来指导后续临床工作,并扩大临床试验来完善统计学数据分析。未来我们要致力于寻找更具特异性的靶抗原、增加能迁移到肿瘤部位的CAR-T细胞的数量,以及增强对抗肿瘤免疫抑制环境的能力。相信通过CAR技术的不断进展,其会为肿瘤患者尤其是对放化疗效果欠佳或无法耐受的晚期进展性实体肿瘤患者带来福音。

参考文献:

- [1] Beatty GL, Moon EK. Chimeric antigen receptor T cells are vulnerable to immunosuppressive mechanisms present within the tumor microenvironment [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(11):e970027.
- [2] Grada Z, Hegde M, Byrd T, et al. TanCAR: a novel bispecific chimerical antigen receptor for cancer immunotherapy [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, 2:e105.
- [3] Morgan RA, Yang JC, 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.
- [4] Heiblig M, Elhamri M, Michallet M, et al. Adoptive immunotherapy for acute leukemia: new insights in chimeric antigen receptors[J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7(7):1022-1038.
- [5] Kim MG, Kim D, Suh SK, et al. Current status and regulatory perspective of chimeric antigen receptor-modified T cell therapeutics[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(4):437-452.
- [6] Pircher M, Schirrmann T, Petrusch U. T cell engineering [J]. *Prog Tumor Res*, 2015, 42:110-135.
- [7] Brentjens RJ, Curran KJ. Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD19 antigen[J]. *Hematology Am Soc of Hematol Edu Program*, 2012, 2012:143-151.
- [8] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells[J]. *Blood*, 2012, 119(12):2709-2720.
- [9] Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8):1145-1154.
- [10] Dai H, Wang Y, Lu X, et al. Chimeric antigen receptors modified T-Cells for cancer therapy[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(7):djv439.
- [11] Zuccolotto G, Fraaasso G, Merlo A, et al. PSMA-specific CAR-engineered T cells eradicate disseminated prostate cancer in preclinical models [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e109427.
- [12] Kloss CC, 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.
- [13] Sokoloff RL, Norton KC, Gasior CL, et al. A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane anti-

- gen; levels in tissues, seminal fluid and urine[J]. *Prostate*, 2000, 43(2): 150–157.
- [14] Ma Q, Gomes EM, Lo AS, et al. Advanced generation anti-prostate specific membrane antigen designer T cells for prostate cancer immunotherapy[J]. *Prostate*, 2014, 74(3): 286–296.
- [15] Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma[J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1264–1270.
- [16] Louis CU, Savoldo B, Dotti G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma[J]. *Blood*, 2011, 118(23): 6050–6056.
- [17] Sun M, Shi H, Liu C, et al. Construction and evaluation of a novel humanized HER2-specific chimeric receptor[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3): R61.
- [18] Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques[J]. *EXP med*, 1965, 121: 439.
- [19] Liska V, Treska V, Skalicky T, et al. Evaluation of tumor markers and their impact on prognosis in gallbladder, bile duct and cholangiocellular carcinomas - a pilot study[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3): 2003–2009.
- [20] Blumenthal RD, Leon E, Hansen HJ, et al. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 2.
- [21] Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, 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.
- [22] Katz SC, Burga RA, McCormack E, et al. phase I hepatic immunotherapy for metastases study of intra-arterial chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for CEA+ liver metastases[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(14): 3149–3159.
- [23] Rivera Z, Ferrone S, Wang X, et al. CSPG4 as a target of antibody-based immunotherapy for malignant mesothelioma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(19): 5352–5363.
- [24] Wang X, Wang Y, Yu L, et al. CSPG4 in cancer: multiple roles[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4): 419–429.
- [25] Schoenfeld AJ, Wang X, Wang Y, et al. CSPG4 as a prognostic biomarker in chordoma[J]. *Spine J*, 2015, 16(6): 722–777.
- [26] Geldres C, Savoldo B, Hoyos V, et al. T lymphocytes redirected against the chondroitin sulfate proteoglycan-4 control the growth of multiple solid tumors both in vitro and in vivo[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 962–971.
- [27] Wen Y, Graybill WS, Previs RA, et al. Immunotherapy targeting folate receptor induces cell death associated with autophagy in ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(2): 448–459.
- [28] Brand TM, Mari I, Neha L, et al. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer [J]. *Radiother Oncol*, 2013, 108(3): 370–377.
- [29] Khelwatty SA, Sharadah E, Seddon AM. Acquired resistance to anti-EGFR mAb ICR62 in cancer cells is accompanied by an increased EGFR expression, HER-2/HER-3 signalling and sensitivity to pan HER blockers[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(7): 1010–1019.
- [30] Feng KC, Guo YL, Liu Y, et al. Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 4.