

CAR-T 细胞疗法研究进展及非临床研究考虑要点

张嘉慧^{1,2}, 黄芝瑛¹, 耿兴超²

(1 中山大学药学院, 广州 510006; 2 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 北京 100176)

[摘要] 自 2017 年全球首个嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)治疗药物获批以来, 细胞免疫治疗药物发展迅速, 已成为生物制药领域的热点赛道之一。近年来, 随着生物技术的发展, 新型 CAR-T 设计不断涌现, 其适应证也从血液肿瘤扩大到实体瘤、自身免疫病以及病毒感染等领域。通过优化设计, 新型 CAR-T 细胞活性不断增强, 而毒性有所降低。与此同时, 为进一步探究 CAR-T 细胞的安全性及有效性, 其非临床研究模型与方法也在不断改进。本文综述了近年来 CAR-T 细胞疗法的最新研究进展, 并对相关非临床研究新方法进行了简要介绍, 以为免疫细胞治疗产品的安全性评价提供新的思路与考虑要点。

[关键词] 细胞疗法; 嵌合抗原受体 T 细胞; 非临床研究; 安全性评价; 评价模型

[中图分类号] R979.19 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)17-1725-07

Research progress and considerations for non-clinical evaluation of CAR-T cell therapy

ZHANG Jia-hui^{1,2}, HUANG Zhi-ying¹, GENG Xing-chao²

(1 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2 National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

[Abstract] Since the first Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) therapeutic drug was approved in 2017, cellular immunotherapy drugs have continued to develop and become a hot spot in the field of biopharmaceuticals. In recent years, with the development of biotechnology, new CAR-T designs have emerged, and their indications have also expanded from hematological tumors to solid tumors, autoimmune diseases, and viral infections. Through optimized design, the activity of novel CAR-T cells has been continuously enhanced, while the toxicity reduced. Meanwhile, in order to further explore the safety and efficacy of CAR-T cells, its non-clinical evaluation models and methods have constantly been improving. In order to provide new ideas and considerations for the safety evaluation of immune cell therapy products, the latest research progress of CAR-T cell therapy and related new non-clinical evaluation methods are reviewed.

[Key words] cell therapy; chimeric antigen receptor T cell; non-clinical study; safety evaluation; evaluation model

嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法的基本原理是通过基因工程改

造, 将能识别肿瘤特异性抗原的单链可变区片段(single-chain variable fragment, scFv)与白细胞分化抗原 28(cluster differentiation 28, CD28)、白细胞分化抗原 137(cluster differentiation 137, CD137, 又称 4-1 BB)、白细胞分化抗原 3-ζ 链(cluster differentiation 3 zeta chain, CD3-ζ)等 T 细胞激活信号分子融合, 随后将该基因片段转染至患者来源的 T 细胞, 即成为表达嵌合抗原受体的 CAR-T 细胞^[1]。目前,

[作者简介] 张嘉慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物评价。
E-mail: zhangjh228@mail2.sysu.edu.cn。

[通讯作者] 黄芝瑛, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物毒理学。
联系电话: (020) 39943092, E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn。耿兴超, 男, 研究员, 研究方向: 药物安全性评价。联系电话: (010) 67872233, E-mail: gengxch@nifdc.org.cn。

CAR-T 细胞的发展已历经 4 代:第 1 代 CAR-T 细胞仅由 scFv 和 CD3- ζ 组成,增殖与细胞因子分泌水平较低;第 2 代 CAR-T 细胞则引入了 4-1BB 等共刺激信号结构域,提高了 CAR-T 细胞的增殖能力;第 3 代 CAR-T 细胞又进一步引入双共刺激结构域,如 CD28-4-1BB,进一步增强了 CAR-T 细胞的杀伤作用与持久性;第 4 代 CAR-T 细胞在其基础上,通过添加编码相关分子的基因和启动子的载体,可实现增强细胞因子分泌、表达额外共刺激配体等作用,进而可调节肿瘤微环境,募集相关免疫细胞和分子,增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤效应与持久性^[2]。

目前,全球已有 7 款 CAR-T 细胞治疗药物获批上市,同时国内还有近 40 款 CAR-T 细胞治疗药物正处于研究开发阶段,全球范围内 CAR-T 细胞治疗市场仍呈加速增长态势。在 CAR-T 细胞疗法飞速发展的同时,也对其安全性评价提出了新的要求。因此,本文综述了近年来 CAR-T 细胞治疗产品的研究进展,并对相关非临床评价模型等进行了简要介绍。

1 CAR-T 细胞疗法的研究进展

1.1 mRNA 工程化改造提高 CAR-T 细胞功能

RNA 细胞疗法是一种新型的疗法,通过将 RNA 疗法与 CAR-T 细胞治疗产品相融合,可实现对 CAR-T 细胞的体内修饰,提高其治疗指数。Lin 等^[3]开发了一种 RNA CAR-T 细胞产品 Descartes-08,其通过 mRNA 转染技术进行瞬时修饰,可在规定时间内表达抗 B 细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA)CAR,进而快速诱导 T 细胞的活化和检查点蛋白的表达,发挥抗肿瘤作用。由于 mRNA 不整合到宿主基因组中,因此不存在转基因诱导的突变风险,且由于 Descartes-08 活性仅约持续 5~7 d,其细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)与长期风险也较低。Rurik 等^[4]使用靶向 CD5 的脂质纳米颗粒将修饰的 mRNA 递送至 T 细胞,可在体内瞬时转染产生抗纤维化的 CAR-T 细胞,一过性抗纤维化 CAR-T 细胞的产生可明显改善心力衰竭模型小鼠的心脏功能。Johnson 等^[5]在 CAR-T 细胞中引入非编码 RNA RN7SL1,在 RN7SL1 的作用下,CAR-T 细胞显示出更强烈的增殖效应与持久性,RN7SL1 还可增强内源性免疫力,对不表达 CAR 抗原的肿瘤细胞也具有杀伤作用,可减轻免疫逃逸。

1.2 联合疫苗或溶瘤病毒增强 CAR-T 细胞疗效

目前 CAR-T 细胞治疗实体瘤的一个主要限制因素

是实体瘤的免疫抑制微环境,为解决这一限制,Ma 等^[6]设计了一种两亲性 CAR-T 配体(amph-ligands)疫苗,该疫苗一端为可激活 CAR-T 细胞的抗原,另一端则为一条由脂质分子组成的长链。注射该疫苗后,其脂质末端与血液中的白蛋白结合,随后进入淋巴结并修饰于抗原提呈细胞表面。CAR-T 细胞在淋巴结中受到疫苗抗原与抗原提呈细胞的共同刺激,可被快速激活并扩增。Evgin 等^[7]通过联用溶瘤病毒增强 CAR-T 疗效,溶瘤病毒可在肿瘤细胞中扩增,并诱导高度炎症化的肿瘤微环境、激活固有和适应性抗肿瘤免疫应答。动物实验表明,联用溶瘤病毒可有效促进病毒特异性 CAR-T 细胞的增殖与活化,提高其抗肿瘤效应。

1.3 靶向定位 CAR-T 细胞用于治疗实体瘤

由于缺乏理想的肿瘤特异性抗原,用 CAR-T 细胞治疗实体瘤可能诱发严重的不良反应,且实体瘤具备纤维组织的物理屏障,不利于 CAR-T 细胞的定位与浸润。因此,Kosti 等^[8]设计了一种缺氧调控的 Hypoxia-sensing CAR-T 细胞,其表达严格限制在缺氧环境中,在低氧条件下被激活时,其表达的 CAR 水平与组成型 CAR-T 细胞相当。动物实验表明,Hypoxia-sensing CAR-T 细胞可在实体瘤中实现泛 ErbB 靶向 CAR 的选择性表达,有效避免脱靶毒性,发挥高效的抗肿瘤作用。Huang 等^[9]设计了一种工程光控 CAR-T 细胞,其开发了一种新的光诱导核易位和二聚化(light-inducible nuclear translocation and dimerization, LINTAD)系统,通过蓝光控制隐花色素 2(cryptochrome 2, CRY2)与隐花色素相互作用的基序螺旋-环-螺旋 1(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1, CIB1)二聚化和光诱导核易位,可在时间和空间上控制目的基因的转录和表达。动物实验表明,通过控制蓝光照射区域可实现特定部位的 CAR-T 激活,有效抑制肿瘤生长。

Lu 等^[10]则设计了一种基于 CAR-T 适配器分子的治疗,该疗法使用双特异性小分子配体 EC17 将荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)与叶酸偶联,以重定向 FITC 特异性 CAR-T 细胞对抗叶酸受体阳性肿瘤。该 CAR-T 细胞可快速穿透实体瘤,并通过结合叶酸受体保留于肿瘤组织中,进而触发 CAR-T 细胞的增殖活化与杀伤作用。Gardner 等^[11]通过酶整合 CAR-T 细胞实现定位释药,这种合成酶武装的杀伤细胞(synthetic enzyme-armed killer, SEAKER)可在肿瘤部位原位激活全身给药的

小分子前体药物,从而将 CAR-T 细胞免疫疗法与小分子前体药物的局部活化相结合。体内体外实验均表明,SEAKER 细胞表现出增强的抗肿瘤活性。

1.4 通用型 CAR-T 细胞 为了实现对于不同患者、不同靶点的抗肿瘤作用,通用型 CAR-T 细胞是近年来的研究热点。Chen 等^[12]报道了一种由“zip-CAR”和“zipFv”片段组成的通用可编程 CAR 系统 SUPRA CARs,当给予 zipFv 时,T 细胞即可通过匹配的亮氨酸拉链重建功能性 CAR,发挥肿瘤杀伤作用。其抗原特异性及给药浓度可以根据患者反应在整个治疗过程中改变,同时还可通过添加竞争性 zipFvs 结合原有 zipFvs 以抑制 CAR 的活化,及时阻断其不良反应。另外,为了开发对不同患者通用的 CAR-T 细胞治疗产品,Jing 等^[13]最近研发出了基于干细胞的 CAR-T 细胞疗法。通过对诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)进行体外分化与表观遗传学重编程,可实现 iPSC 向 T 细胞的分化和成熟,研究者将这种 iPSC-T 细胞进一步制造为 CAR-T 细胞并进行临床前研究,结果表明其抗肿瘤效应及持续性与供体来源的 CAR-T 细胞相当。

1.5 表观遗传重编程调节 T 细胞分化和抗肿瘤功能 有许多分子途径、转录因子和表观遗传印迹已被证明可以驱动效应 T 细胞与记忆性 CD8 T 细胞的分化,其过程与细胞代谢状态密切相关。最近一项研究发现,在新激活的 T 细胞中短暂抑制线粒体丙酮酸载体(mitochondrial pyruvate carrier, MPC)可促进记忆 T 细胞分化,从而增强其抗肿瘤活性。Wenes 等^[14]使用 MPC 抑制剂对新激活的 T 细胞进行瞬时抑制,表明其可形成更多功能完整的记忆前体效应细胞与中央记忆细胞。另外,Guo 等^[15]发现转化/蔗糖非发酵性(switch/sucrose non-fermentable, SWI/SNF)染色质重塑亚型典型 Brg1/Brg 相关因子(canonical BRG1/BRM-associated factor, cBAF)是记忆性 T 细胞的负向调节因子,其核心成员的缺失可促进中枢记忆性 T 细胞的生成、更新及二次免疫应答。Ye 等^[16]对 CD8 T 细胞全基因组激活筛选,发现脯氨酸代谢通路的关键酶脯氨酸脱氢酶 2(proline dehydrogenase 2, PRODH2)在 CAR-T 细胞中过表达可重编程 T 细胞代谢通路,促进线粒体增生,提高氧化磷酸化水平,促进 CAR-T 细胞产能,增强其抗肿瘤能力与持久性。

1.6 设计多特异性 CAR-T 细胞以增强靶向性 为解决肿瘤抗原逃逸,同时增强 CAR-T 细胞的靶向

性以减轻其脱靶效应,研究者们设计了多种多特异性 CAR-T 细胞。Hedge 等^[17]将结合人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)与结合白细胞介素 13 受体 $\alpha 2$ (interleukin 13 receptor alpha 2, IL13R $\alpha 2$)的 scFv 串联以设计双特异性 CAR-T 细胞用于治疗抗原逃逸的胶质母细胞瘤。临床前研究表明,当遇到单一抗原时,其表现出与单抗原 CAR-T 细胞相当的活化动力学,而当同时遇到 2 种抗原时,其可进一步增强 T 细胞的活化,发挥更持久抗肿瘤效应,可有效减少抗原逃逸,提高荷瘤小鼠存活率。Balakrishnan 等^[18]设计出人工锚蛋白重复序列(designed ankyrin repeat proteins, DARPins)替代 scFv,相较于 scFv, DARPins 具有更好的稳定性和聚集性,尺寸也更小,可将其串联在单个 CAR 中以实现多特异性肿瘤识别。该研究设计了同时靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)、HER2 的三特异性 CAR-T 细胞。实验表明,当肿瘤细胞同时表达多个抗原时,三特异性 CAR 显示出协同活性,可增强 T 细胞活化,有效减少抗原逃逸。

1.7 降低细胞因子水平减轻 CRS 毒性风险 CAR-T 细胞在接触靶细胞后活化并快速增殖,同时引起炎症细胞因子的急剧增加,这可能导致 CRS 的发生。为了减轻 CRS 毒性风险,Tan 等^[19]设计了一种表达膜结合 IL-6 受体的 CAR-T 细胞。动物实验表明,中和 IL-6 不会影响 CAR-T 细胞的增殖与抗肿瘤活性水平。Wen 等^[20]通过敲低 IL-6 以减轻其毒性风险,临床前研究表明,在 CAR-T 细胞中引入 IL-6 沉默元件可减少对单核细胞的刺激,进而减少 IL-6 的分泌,且不影响其抗肿瘤活性。这种 CAR-T 细胞同样可有效延长荷瘤小鼠的存活时间,而没有相关的免疫毒性和致癌性风险。

然而,作为刺激免疫细胞增殖分化与成熟的信号因子,细胞因子在 CAR-T 细胞的抗肿瘤效应中同样具有重要作用。为了在避免 CRS 的同时发挥细胞因子的增效作用,Aspuria 等^[21]设计了正交细胞因子受体/配体对以增强疗效。这种人正交 IL-2 受体 β (human orthogonal IL-2R β , hoRb)经细胞外结构域改造后,仅可选择性地识别并结合正交 IL-2 配体。在给予正交 IL-2 配体后,其可在体内选择性激活并扩增表达 hoRb 的 CAR-T 细胞,其还可通过调整给药剂量,实现对肿瘤的持久反应,同时避免 CRS

的发生。

1.8 引入安全开关降低 CAR-T 疗法毒性风险

为了在 CAR-T 细胞发生严重不良反应的情况下及时诱导 T 细胞失活,引入安全性开关是一种研究思路。张慧慧等^[22]在 CAR-T 细胞中引入一个经改造的诱导性半胱氨酸/天冬氨酸蛋白酶-9 自杀基因(inducible caspase 9 suicide gene, iCasp9)作为安全性开关,该基因表达后,可由外源化学药物诱导其二聚化而启动细胞的线粒体凋亡通路。体内外试验均表明,小分子诱导药物 AP1903 可成功诱导 CAR-T 细胞的凋亡。然而,这种小分子药物调节系统仍存在许多局限性,如影响 CAR 的表达、有残留“泄露”活性、疗效较组成型 CAR-T 细胞差等。因此,最近 Labanieh 等^[23]开发了一种基于抑制性蛋白酶的信号中和系统(signal neutralization by an inhibitable protease, SNIP)的 CARs,其通过在 CAR 功能域上共表达丙型肝炎病毒 NS3 蛋白酶(NS3 protease, NS3p)和 NS3p 切割位点,可实现在基础状态下切割 CAR 使其处于失活状态,而在给予 NS3p 抑制剂 GPV 后阻断其活性,表达功能性 CAR。临床前研究表明,SNIP CAR-T 细胞不仅有效降低了脱靶效应,没有

“泄露”活性,且相较于组成型 CAR-T 细胞,SNIP CAR-T 细胞疗效更优。对其表型进行研究,发现 SNIP CAR-T 细胞可在体内产生干细胞样群和效应子亚群,这进一步增强了其抗肿瘤效果。

1.9 CAR-T 细胞疗法的其他研究进展

除以上研究进展外,还有一些研究者通过其他方法改善 CAR-T 细胞疗效。如降低 CAR-T 细胞铰链区灵活性可延长其作用时间^[24];铰链区的不同修饰形式可影响 CAR-T 细胞的亲和力与增殖能力^[25];调节 CAR 的尺寸可影响其激活能力等^[26]。另外,调节特定基因的活性也可影响 CAR-T 细胞活性,如 CAR-T 细胞衰竭可以通过过表达 c-JUN 缓解^[27];敲除 RAS GTP 酶激活蛋白(Ras p21 protein activator 2, RASA2)基因可以抑制 T 细胞耗竭^[28];过表达 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)可增强 CAR-T 细胞抗肿瘤能力^[29]。最近 Zhang 等^[30]开发了一种非病毒定点整合 CAR-T 技术,可有效减轻使用病毒和随机整合带来的突变风险,进一步提高了其安全性和有效性。对 CAR-T 细胞治疗产品研究进展及特点的总结见表 1。

表 1 CAR-T 细胞治疗产品的研究进展及特点

类别	研究进展	特点
RNA 细胞疗法	RNA CAR-T 细胞产品 Descartes-08;通过脂质纳米颗粒递送 mRNA 至 T 细胞;在 CAR-T 细胞中引入非编码 RNA RN7SL1	可实现对 CAR-T 细胞的体内修饰,提高其治疗指数,减轻肿瘤细胞的免疫逃逸
联合疫苗或溶瘤病毒	两性性 CAR-T 配体(amph-ligands)疫苗;联用水疱性口炎溶瘤病毒(VSV-mIFN)	可促进 CAR-T 细胞激活与活化,对抗免疫抑制微环境,增强抗肿瘤效应
靶向定位 CAR-T 细胞	缺氧调控的 hypoxia-sensing CAR-T 细胞;工程光控 CAR-T 细胞;CAR-T 适配器分子重定向至肿瘤细胞;合成酶武装杀伤细胞	对实体瘤的穿透性增强,增强抗肿瘤效应;时间和空间特异性增强,可避免脱靶毒性
通用型 CAR-T 细胞	通用可编程 CAR 系统 SUPRA CARs;基于干细胞的 CAR-T 细胞疗法	可实现对于不同患者、不同靶点的抗肿瘤作用
表观遗传重编程 CAR-T 细胞	抑制线粒体丙酮酸载体;抑制 cBAF;过表达 PRODH2	可促进记忆性 T 细胞的生成、更新及二次免疫应答;增强其抗肿瘤能力和持久性
多特异性 CAR-T 细胞	scFv 串联双特异性 CAR-T 细胞;DARPin 串联三特异性 CAR-T 细胞	增强特异性,减轻脱靶效应;多特异性 CAR 协同活性,可增强 T 细胞活化,减少抗原逃逸
降低细胞因子水平	IL-6 中和 CAR-T 细胞;IL-6 敲除 CAR-T 细胞;正交细胞因子受体/配体对	可减轻 CRS 毒性风险,正交细胞因子受体/配体对可通过调整给药剂量提高治疗指数
引入安全开关	小分子药物诱导细胞凋亡;SNIP CAR-T 细胞	可在不良反应发生时及时诱导 T 细胞失活,提高安全性
其他	调节铰链区灵活性与 CAR 尺寸;调节特定基因的活性;非病毒定点整合 CAR-T 技术等	

2 CAR-T 细胞疗法的非临床评价研究

目前,针对 CAR-T 细胞疗法的非临床评价,我国已陆续出台了《基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则(试行)》、《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》等多个指南。一般而言,CAR-T 细胞疗法的非临床评价主要包括体外药效学研究、体内药效学研究、药动学研究、非临床安全性研究等。本文中我们主要对其安全性评价考虑要点进行介绍。

2.1 CAR-T 细胞疗法的非临床安全性评价

CAR-T 细胞疗法的主要安全风险包括 CRS、脱靶效应、神经毒性等。因而除一般评价指标外,对于其免疫毒性,还可通过检测血清细胞因子水平、淋巴细胞计数及表型分析等进行评价;对于其神经毒性,则可以考虑在出现 CRS 的时间点进行一次功能观察组合试验(functional observation battery, FOB);对于其致瘤性,则需对其外源基因插入位点进行分析,并对体内研究的异常性增生病变等进行初步评估^[31]。

目前,用于 CAR-T 产品研究的动物模型主要包括移植瘤小鼠模型、同源小鼠模型、免疫系统重建人源化小鼠、转基因小鼠及灵长类动物模型等。然而,这些模型都存在着一定的局限性,如缺乏宿主免疫系统、免疫系统人源化程度低、实验成本高等^[32]。为了更好地适应快速发展的 CAR-T 细胞产品评价要求,非临床评价的模型与方法也在不断发展,下文简要介绍了一些新的评价模型。

2.2 CAR-T 细胞疗法非临床研究的新模型

上文已对 CAR-T 疗法非临床评价的动物模型进行了简要介绍,Festag 等^[33]在其基础上进行了一定的改进,对慢性乙型肝炎小鼠模型进行亚致死量全身放疗,然后在其恢复过程中给予 S Δ -CAR,对比靶向感染细胞表面的乙型肝炎病毒包膜蛋白 S 结构域的 S-CAR,这种 CAR 细胞内 T 细胞信号结构域已被替换,无法激活 T 细胞,但可在小鼠免疫系统重建的过程中诱导对 S-CAR 的特异性免疫耐受性,从而避免小鼠免疫系统对人源 CAR 的杀伤。相较于人源化小鼠模型,该模型还可允许小鼠 T 细胞的迁移,对于细胞-细胞相互作用的长期研究具有重要意义。另外,Talbot 等^[34]建立了一种用于骨肉瘤的新型原位植入模型,其通过手术在小鼠胫骨植入胶原-肿瘤细胞支架,可将肿瘤细胞限制在胶原支架中保持稳健的原位移植,避免直接注射肿瘤细胞导致的肿瘤细胞转移。此外,胫骨内植入物还可通过小腿截肢

切除,可模拟骨肉瘤手术切除后的肿瘤转移模型。

2.3 CAR-T 细胞疗法安全性评价的其他考虑要点

近年来,随着各种新技术及新型 CAR 设计的不断发展,对 CAR-T 细胞的安全性评价提出了新的考虑要点。如 Nahmad 等^[35]指出使用 CRISPR-Cas9 技术敲除基因可能导致非整倍性和染色体截断,增加肿瘤发生的风险,因而有必要利用在异常 T 细胞中差异表达的内源性基因进行过继转移前的细胞分选,并在临床方案中进行监测。Diorio 等^[36]通过胞嘧啶碱基编辑技术制备一种新型 CAR-T 细胞,而 Kang 等^[37]指出,碱基编辑技术可以诱导人类细胞的 RNA 脱靶突变,其安全性有待探究。该团队开发了一种体细胞核移植脱靶分析(off-target analysis by somatic cell nuclear transfer, OA-SCNT)方法,其通过克隆胚胎保证基因背景的一致性,进而对编辑组与对照组的全基因组和转录组测序,可鉴定出由碱基编辑技术造成的突变,这种方法可考虑用于碱基编辑转基因 CAR-T 细胞的临床前评价。Ramakrishna 等^[38]提出使用单细胞分析技术进行更深入的分析,有助于识别 CAR-T 产品中对靶组织最具功能性的细胞群,并确定与不良反应相关的 T 细胞表型。如 Good 等^[39]通过单细胞分析,确定了与大 B 细胞淋巴瘤患者持久反应相关的 CAR-T 细胞分子表型,并表明这种 CAR-Treg 细胞水平与疾病进展及神经毒性相关。另外,Butt 等^[40]发现血清神经丝轻链蛋白(neurofilament light chain, NfL)水平与发生免疫效应细胞相关神经毒性综合征(immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS)的风险及其严重程度具有相关性,根据基线 NfL 水平预测患者 ICANS 发生情况的准确率可高达 96%,鉴于 ICANS 是 CAR-T 细胞治疗过程中可能出现的严重不良反应,NfL 水平可考虑作为临床上的风险预测因子。

此外,近期 Cherkassky 等^[41]总结了各种区域性给药途径,如脑室内给药、腹腔腔给药、肝动脉给药等,并指出区域性给药有望克服实体瘤的物理限制和免疫抑制障碍,增强 CAR-T 细胞抗肿瘤效应。然而,区域性给药也存在着给药量及给药通道安全性的限制,如腹腔内给药可能导致肠穿孔,区域性给药造成的局部 CRS 也会带来一定的安全风险等。目前上市的 CAR-T 药物给药方式多为单次静脉注射,因而对其给药途径的安全性评价鲜有涉及,随着 CAR-T 细胞治疗产品类型与给药方式的不断发展,还可考虑根据实际情况开展局部耐受性实验。另

外,前文介绍的多种新型 CAR-T 细胞设计都提及可通过重复给药以增强其抗肿瘤效应,对此,孟淑芳等^[31]也指出 CAR-T 细胞产品毒性研究不能遵循常规的设计思路,其非临床研究的给药次数需根据不

同 CAR-T 细胞产品的作用特点充分论证后决定,并可在多次给药后,于不同检测时间点进行全面的毒性指标检测。对 CAR-T 细胞疗法安全性评价考虑要点的总结见表 2。

表 2 CAR-T 细胞疗法安全性评价的考虑要点

存在风险	可能的评价方法
非整倍性和染色体截断	检测异常 T 细胞中差异表达的内源性基因并进行细胞分选
RNA 脱靶突变	体细胞核移植脱靶分析(OA-SCNT)方法
免疫效应细胞相关神经毒性综合征	检测 NFL 水平
区域性给药的不良反应	开展局部耐受性实验;检测局部细胞因子水平
重复给药毒性	依据实际情况确定非临床研究的给药次数,并进行全面的毒性指标的检测
其他不良反应	通过单细胞分析确定与不良反应相关的 T 细胞表型

3 结语

近年来,CAR-T 细胞疗法不断发展,在多种恶性肿瘤的治疗中取得了显著疗效,已经成为生物制药领域中的研发热点。然而,其应用范围仍存在着一定的局限性,对于各种实体瘤的治疗还存在明显限制。为了进一步拓宽其适应证,研究者们研发出了各种新型 CAR-T 细胞疗法。与此同时,随着各种新技术的引入,对 CAR-T 细胞的风险认识也在不断发展进步,这就对其非临床研究提出了新的要求。本文综述了近年来 CAR-T 细胞的研究进展及非临床评价的新模型与考虑要点,以期对 CAR-T 细胞疗法提供更有价值的非临床评价信息。也相信随着对细胞疗法研究的不断发展,未来将有更多的患者从中获益。

[参 考 文 献]

- [1] 李芳,曾玲. CAR-T 细胞免疫疗法的原理及最新研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(23): 3648-3651.
- [2] 曹军,程也,巴特利,等. 嵌合抗原受体 T 细胞治疗胶质母细胞瘤研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2020, 20(2): 105-110.
- [3] LIN L, CHO SF, XING LJ, et al. Preclinical evaluation of CD8⁺ anti-BCMA mRNA CAR T cells for treatment of multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2021, 35(3): 752-763.
- [4] RURIK JG, TOMBÁČZ I, YADEGARI A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury[J]. *Science*, 2022, 375(6576): 91-96.
- [5] JOHNSON LR, LEE DY, EACRET JS, et al. The immunostimulatory RNA RN7SL1 enables CAR-T cells to enhance autonomous and endogenous immune function[J]. *Cell*, 2021, 184(19): 4981-4995.
- [6] MA LY, DICHWALKAR T, CHANG JYH, et al. Enhanced CAR-T cell activity against solid tumors by vaccine boosting through the chimeric receptor[J]. *Science*, 2019, 365(6449): 162-168.
- [7] EVGIN L, KOTTKE T, TONNE J, et al. Oncolytic virus-mediated expansion of dual-specific CAR T cells improves efficacy a-

- gainst solid tumors in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(640): eabn2231.
- [8] KOSTI P, OPZOOMER JW, LARIOS-MARTINEZ KI, et al. Hypoxia-sensing CAR T cells provide safety and efficacy in treating solid tumors[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(4): 100227.
- [9] HUANG ZL, WU YQ, ALLEN ME, et al. Engineering light-controllable CAR T cells for cancer immunotherapy[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(8): eaay9209.
- [10] LU YJ, CHU HY, WHEELER LW, et al. Preclinical evaluation of bispecific adaptor molecule controlled folate receptor CAR-T cell therapy with special focus on pediatric malignancies[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 151.
- [11] GARDNER TJ, LEE JP, BOURNE CM, et al. Engineering CAR-T cells to activate small-molecule drugs *in situ*[J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(2): 216-225.
- [12] CHEN YY. Increasing T cell versatility with SUPRA CARs[J]. *Cell*, 2018, 173(6): 1316-1317.
- [13] JING R, SCARFO I, NAJIA MA, et al. EZH1 repression generates mature iPSC-derived CAR T cells with enhanced antitumor activity[J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(8): 1181-1196.
- [14] WENES M, JACCARD A, WYSS T, et al. The mitochondrial pyruvate carrier regulates memory T cell differentiation and antitumor function[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(5): 731-746.
- [15] GUO A, HUANG HL, ZHU ZX, et al. cBAF complex components and MYC cooperate early in CD8⁺ T cell fate[J]. *Nature*, 2022, 607(7917): 135-141.
- [16] YE LP, PARK JJ, PENG L, et al. A genome-scale gain-of-function CRISPR screen in CD8 T cells identifies proline metabolism as a means to enhance CAR-T therapy[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(4): 595-614.
- [17] HEGDE M, MUKHERJEE M, GRADA Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Rα2 mitigate tumor antigen escape[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 3036-3052.
- [18] BALAKRISHNAN A, RAJAN A, SALTER AI, et al. Multispecific targeting with synthetic ankyrin repeat motif chimeric antigen receptors[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(24): 7506-7516.
- [19] TAN AHJ, VINANICA N, CAMPANA D. Chimeric antigen receptor-T cells with cytokine neutralizing capacity[J]. *Blood Adv*, 2020, 4(7): 1419-1431.
- [20] WEN HR, HUO GT, HOU TT, et al. Preclinical efficacy and safety evaluation of interleukin-6-knockdown CAR-T cells targeting at CD19[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(23): 1713.
- [21] ASPURIA PJ, VIVONA S, BAUER M, et al. An orthogonal IL-2 and IL-2Rβ system drives persistence and activation of CAR T cells and clearance of bulky lymphoma[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(625): eabg7565.

- [22] 张慧慧, 孔群芳, 吕晓菲, 等. 自杀基因作为一种“安全性开关”控制 CAR-T 细胞毒性的临床前研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(3): 225-231.
- [23] LABANIEH L, MAJZNER RG, KLYSZ D, *et al.* Enhanced safety and efficacy of protease-regulated CAR-T cell receptors[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1745-1763.
- [24] ZHANG A, SUN Y, DU J, *et al.* Reducing hinge flexibility of CAR-T cells prolongs survival *in vivo* with low cytokines release[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 724211.
- [25] LEICK MB, SILVA H, SCARFÒ I, *et al.* Non-cleavable hinge enhances avidity and expansion of CAR-T cells for acute myeloid leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(5): 494-508.
- [26] XIAO Q, ZHANG XY, TU LQ, *et al.* Size-dependent activation of CAR-T cells[J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(74): eabl3995.
- [27] LEGUT M, GAJIC Z, GUARINO M, *et al.* A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation[J]. *Nature*, 2022, 603(7902): 728-735.
- [28] CARNEVALE J, SHIFRUT E, KALE N, *et al.* RASA2 ablation in T cells boosts antigen sensitivity and long-term function[J]. *Nature*, 2022, 609(7925): 174-182.
- [29] LEE YG, GURUPRASAD P, GHILARDI G, *et al.* Modulation of BCL-2 in both T cells and tumor cells to enhance chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy against cancer[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(10): 2372-2391.
- [30] ZHANG JQ, HU YX, YANG JX, *et al.* Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL[J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 369-374.
- [31] 孟淑芳, 王佑春, 吴雪伶, 等. CAR-T 细胞治疗产品质量控制检测研究及非临床研究考虑要点[J]. 中国药事, 2018, 32(6): 831-852.
- [32] 黄瑛, 侯田田, 霍艳. CAR-T 细胞治疗产品非临床研究动物模型的发展和应用概述[J]. 中国药事, 2018, 32(7): 886-892.
- [33] FESTAG MM, FESTAG J, FRÄBLE SP, *et al.* Evaluation of a fully human, hepatitis B virus-specific chimeric antigen receptor in an immunocompetent mouse model[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(5): 947-959.
- [34] TALBOT LJ, CHABOT A, FUNK A, *et al.* A novel orthotopic implantation technique for osteosarcoma produces spontaneous metastases and illustrates dose-dependent efficacy of B7-H3-CAR T cells[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 691741.
- [35] NAHMAD AD, REUVENI E, GOLDSCHMIDT E, *et al.* Frequent aneuploidy in primary human T cells after CRISPR-Cas9 cleavage[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(12): 1807-1813.
- [36] DIORIO C, MURRAY R, NANIONG M, *et al.* Cytosine base editing enables quadruple-edited allogeneic CART cells for T-ALL[J]. *Blood*, 2022, 140(6): 619-629.
- [37] KANG Y, DAI S, ZENG Y, *et al.* Cloning and base editing of GFP transgenic Rhesus monkey and off-target analysis[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(29): eabo3123.
- [38] RAMAKRISHNA S, SHAH NN. Using single-cell analysis to predict CAR T cell outcomes[J]. *Nat Med*, 2020, 26(12): 1813-1814.
- [39] GOOD Z, SPIEGEL JY, SAHAF B, *et al.* Post-infusion CAR TReg cells identify patients resistant to CD19-CAR therapy[J]. *Nat Med*, 2022, 28(9): 1860-1871.
- [40] BUTT OH, ZHOU AY, CAIMI PF, *et al.* Assessment of pretreatment and posttreatment evolution of neurofilament light chain levels in patients who develop immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome[J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(11): 1652-1657.
- [41] CHERKASSKY L, HOU ZH, AMADOR-MOLINA A, *et al.* Regional CAR T cell therapy: an ignition key for systemic immunity in solid tumors[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(6): 569-574.

编辑: 杨青/接受日期: 2023-02-23