

# 过继性免疫细胞治疗临床应用中的几个问题

黄浩 张正涵 Allen Edward Goldenthal 罗成林 罗晓玲\*

(深圳市合一康生物科技有限公司临床医学中心, 深圳 515000)

**摘要** 过继性免疫细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)是肿瘤免疫治疗的重要组成部分,在我国发展非常迅速,然而其临床应用一直存在很大争议,甚至在有关临床疗效的争议中一度沉寂。而近几年,随着免疫技术的提高,ACT技术再次引起临床工作者的重视,作者就ACT技术发展历程和临床应用过程中细胞类型选择、细胞数量确定、疗效评价等问题作一简要综述。

**关键词** 肿瘤; 免疫治疗; 过继性免疫细胞治疗

## Several Questions Related to Adoptive Cellular Immunotherapy in Clinical Practice

Huang Hao, Zhang Zhenghan, Allen Edward Goldenthal, Luo Chenglin, Luo Xiaoling\*

(Clinical Center of Shenzhen Hornetcorn Biotechnology Co. Ltd., Shenzhen 515000, China)

**Abstract** During the past decade, adoptive cell therapy (ACT) has been quickly developed in our country as one of the most important compositions of tumor immunotherapy. However, its clinical efficacy remains controversial. ACT technology causes the attention of clinical physicians once again with the improvement of immune technique in recent years. We have made a simple review in this article including the process of ACT technology development and selection of cell type during the clinical application, determination of cell number, evaluation of curative effect and other issues.

**Key words** cancer; immune therapy; adoptive cell therapy

近年来,肿瘤已经成为威胁国人生命的第一大要素,而随着环境污染的进一步加重,肿瘤的发病率、死亡率均呈不断上升趋势,与之相应的是,常规手术、放疗、化疗的三大标准治疗方案并不能明显降低肿瘤患者的死亡率,抗肿瘤治疗似乎进入了一个瓶颈阶段。近些年来,肿瘤免疫治疗取得长足的进步,在多项临床试验中取得良好的疗效。过继性免疫细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)属于肿瘤免疫治疗的重要组成部分,在我国已有相应技术广泛用于临床,本文拟就ACT技术的发展历程和目前临床最关心的ACT技术应用中关于细胞种类、回输

数量、疗效评价的问题作一简要综述。

### 1 ACT技术的发展历程

ACT技术是通过自体免疫细胞进行体外激活和扩增,然后将其重新输回肿瘤患者体内,促使其在体内发挥杀伤肿瘤细胞作用的技术,效应细胞的种类、数量、活性是直接影响临床疗效的关键。

自1982年Rosenberg教授首次报道淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cell, LAK细胞)以来,ACT曾一度轰动临床肿瘤学界,而后却因为LAK细胞对白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)

收稿日期: 2014-02-21 接受日期: 2014-06-10

深圳市战略新兴产业发展专项资金(批准号: CYZZ20130329145313934)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 0755-21672026, E-mail: luoxiaoling@hornetcorn.com

Received: February 21, 2014 Accepted: June 10, 2014

This work was supported by the Special Fund for the Development of Shenzhen Strategic Emerging Industries (Grant No. CYZZ20130329145313934)

\*Corresponding author: Tel: +86-755-21672026, E-mail: luoxiaoling@hornetcorn.com

网络出版时间: 2014-08-28 16:08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0049.html>

的依赖性严重限制了LAK细胞的临床应用, 其后虽然有肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphokine, TIL)、CD3单抗激活的杀伤细胞(anti-CD3 monoclonal antibody activated killer cell, CD3AK细胞)等技术的出现, 但ACT技术始终未能真正用于临床。1990年, 细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK细胞)技术的出现, 首次使得ACT摆脱了细胞培养及回输过程中对大剂量IL-2的依赖, 明显减少了患者的临床副反应, 从而使得ACT技术大规模临床应用成为可能<sup>[1-2]</sup>。

在国外, 研究较多的是特异性的TIL细胞和治疗性疫苗技术<sup>[3-5]</sup>。2010年, FDA批准Provenge用于晚期耐药的前列腺癌患者的治疗, 无疑是免疫细胞治疗技术发展中的一块里程碑, 也极大地促进了ACT技术研发和应用的热潮。而随着基因工程技术的进步, 对T细胞进行基因改造的嵌合抗原受体的T细胞(chimeric antigen receptor-engineered T cell, CART)技术也在多种临床前研发中取得了巨大的成功<sup>[6]</sup>。

在国内, CIK技术得到了大力发展, 已有超过五百家医院将CIK及CIK基础上的ACT技术用于肿瘤患者的治疗, 并认为CIK技术能明显改善患者生活质量, 提高晚期肿瘤患者的生存期<sup>[7-9]</sup>, 部分敏感型患者更有可能获得极好的疗效, 遗憾的是缺乏可靠的检测手段来进行敏感患者的筛选。

## 2 ACT细胞的选择

依据效应细胞特异性不同, ACT技术可以分为两大类<sup>[10]</sup>。第一类包括LAK细胞、CIK细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK细胞)等, 主要以非MHC限制性方式非特异性地杀灭肿瘤细胞。LAK细胞因为需要依赖较大剂量的IL-2, 治疗副作用较大, 并且难以区分疗效来源于细胞还是IL-2, 现在已经很少应用。CIK细胞在国内应用非常广泛, 是临床应用中主流的ACT技术, 通常采集患者外周血中的单个核细胞, 在体外经过2周的培养, 可以达到 $1 \times 10^{10}$ 的细胞数量, 技术比较成熟, 但是由于各家机构采取的配方有所不同, 培养的细胞组成比例也有所差异, 目前尚没有切实可行的质量控制标准, 因此存在很多的质疑。NK细胞的培养相对更为复杂, 多用于免疫保健, 临床应用较少。

第二类包括树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗、

TIL细胞、细胞毒性T细胞(cytotoxic T-lymphocyte, CTL)、CART细胞等具有肿瘤特异性的免疫细胞疗法。治疗性DC疫苗通过激发机体的免疫功能而抗肿瘤, 属于主动免疫治疗技术, 目前国内、国外均将其列入药品管理范畴。而TIL、CTL、CART等技术则是直接将具有杀灭肿瘤活性的效应细胞回输人体, 属于被动免疫治疗技术。

TIL细胞、CTL细胞都是被肿瘤抗原激活后的特异性的细胞毒性T细胞, 对于肿瘤细胞有高度特异的杀伤作用, 国内外研究都比较多, 也一度被免疫学家寄予厚望。TIL细胞主要来源于肿瘤组织周围浸润的T细胞, 在体外经过筛选、扩增而成, 相对来说获取困难, 技术体系比较复杂, 细胞的培养周期较长, 培养成功率不高, 极大地限制了临床应用。近年来, 随着WAVE生物反应调节器等自动化培养体系的成功构建, TIL的临床应用前景更被看好, 目前有多个TIL的临床试验正在开展<sup>[11]</sup>, 部分患者取得了明显的疗效, 并逐渐从恶性黑色素瘤向晚期乳腺癌、肺癌等实体瘤的治疗上过渡。

CTL细胞的研究国内外均比较多, 大多采用抗原致敏后的DC来激活T细胞进而获取特异性的CTL细胞, 研究的重点在于使用肿瘤抗原致敏DC的方法, 从全细胞肿瘤抗原、多肽抗原、病毒载体介导的抗原等, 研究者尝试了多种不同的方法, 并取得了一定的进展, 国外的研究大多处于临床前和临床试验阶段<sup>[12]</sup>, 国内已经有腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)介导的抗原致敏技术用于临床, 甚至在部分地区已被列入医保报销范围, 取得了较大的进步。

近年来取得突破的CART技术得益于基因工程技术的发展。研究者直接将能识别肿瘤抗原的相应抗体和T细胞的激活信号同时通过病毒载体导入T细胞, 从而改变了T细胞识别和杀伤肿瘤细胞的能力, 由改造后的T细胞同时行使DC和CTL的功能, 从而成功绕过了MHC限制性问题, 并在血液系统肿瘤中率先取得了突破<sup>[13-14]</sup>。目前, 已经有多种CART细胞实验方案用于血液系统、实体肿瘤的治疗。

然而, 肿瘤实质上是一群变异的细胞, 往往具有高度的不均一性, 单纯的靶向一类肿瘤抗原, 最多只能杀灭一部分的肿瘤细胞, 残存的肿瘤细胞依旧缺乏有效的治疗措施。此外, 肿瘤细胞还可以在增殖过程中不断地突变或者进化, 降低该类抗原的表

达,进而逃逸免疫细胞的杀伤。而基因改造后的免疫细胞长期存留于体内,也有进一步增殖的潜力,可能诱发T细胞相关的级联反应,造成严重的后果。

亦有研究者使用病毒载体将GM-CSF等细胞因子的基因导入T细胞中,利用T细胞可追踪癌细胞的特性,使得肿瘤局部的细胞因子表达上调,从而改变肿瘤局部的免疫环境,期望T细胞不仅能发挥自身识别和杀伤肿瘤细胞的作用,还可以借助细胞因子的表达募集更多的免疫细胞参与对肿瘤的攻击<sup>[15]</sup>。同样,也有研究者试图将细胞毒性的药物与T细胞相连,从而发挥靶向杀肿瘤的作用。此外,我国学者采用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为靶向载体,使用基因重组后能持续表达一型干扰素(interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )的MSCs用于恶性黑色素瘤的治疗,发现MSC-IFN- $\alpha$ 可以极为有效地抑制B16黑色素瘤细胞的增殖,促进黑色素瘤细胞凋亡,其抗肿瘤机制与NK细胞和CD8+ T细胞相关<sup>[16]</sup>。

### 3 回输细胞数量的问题

体外研究表明,CIK、NK等免疫细胞主要通过非特异性模式杀伤肿瘤细胞,因此通常10~50倍的效靶比才能见到明显的杀伤效果<sup>[17]</sup>,而TIL、CTL、CART这些特异性杀伤细胞则可以在比较低的效靶比时有效杀伤肿瘤细胞,甚至单个T细胞就可以杀灭多个肿瘤细胞<sup>[11,13,18]</sup>。因此,在使用不同模式的ACT进行治疗时,对效应细胞的数量要求不一样。而依据估算,直径为1 cm的实体肿瘤大约含有 $10^9$ 肿瘤细胞,因此,即便不考虑实体肿瘤局部的屏障和抑制性的免疫微环境的影响,临床上确诊后的实体肿瘤,细胞数量也通常远大于血液系统肿瘤,这也是ACT治疗总是首先在血液病上取得突破的主要原因之一。

传统的观点认为,ACT治疗中使用的是成体的T细胞,因此在回输体内后不具备增殖能力。而近年来,Carl June教授领导的研究小组<sup>[13]</sup>证实,回输的含有CD19抗体的CART细胞在患者体内扩增了1 000倍,并且在回输后6个月仍能检测到较高数量的特异性T细胞。另外,这一研究小组对于用比较少数量的CART细胞取得良好的临床疗效也很意外,并推测ACT治疗前的适当化疗以清除淋巴细胞在其中起到一定的作用<sup>[14]</sup>。然而,国内临床上在使用CIK、NK等ACT技术时因为对化疗副作用的顾虑,通常没有采用化疗等预处理措施,直接将培养成熟的T细胞回

输人体,因此对于细胞数量的要求要高得多。依靠体外实验的结果推论,在CIK、NK等细胞进行抗肿瘤治疗时,效应细胞的数量越多越好。既往的培养模式,CIK等细胞的培养往往只能到达 $10^9$ 数量级,因此临床疗效比较有限,而近年来细胞培养技术的进步,使得单次培养细胞的量突破 $10^{10}$ 数量级,明显促进了临床疗效的提高。

随着对肿瘤微环境的深入研究,研究者发现,许多肿瘤患者体内并不是缺乏能杀灭肿瘤的免疫效应细胞,而是由于肿瘤微环境中存在诸多的抑制性因素,进而导致这些免疫细胞不能杀灭肿瘤,因此,有研究者认为免疫治疗的重点在于去除机体中的免疫抑制信号,而不是使用人工培养的方法,由外界提供大量功能性免疫效应细胞。此外,机体有维持内环境相对稳定的机制,而ACT技术在短时间内提供大量的具有杀伤功能的免疫细胞,是否会促使机体免疫系统误以为自身处于一种免疫亢进状态,继而出现负调节反应,导致体外培养的免疫细胞功能受到抑制、甚至被快速灭活。是否应当限定每一次细胞回输的数量,保持小剂量多次回输的模式,这些问题都有待进一步的研究。

体外实验提示,CIK中杀伤肿瘤的主要是CD3+CD56+ T细胞,CTL和TIL中起主要作用的是CD8+ T细胞,因此这两种细胞的比例一度成为评价CIK或TIL、CTL培养效果的标志。但一味地追求这两类细胞的数量和比例并不可取,已经有研究表明,含有部分CD4+ T细胞的混合细胞群体比单一细胞对肿瘤的杀伤作用更佳<sup>[19]</sup>,但究竟应该是怎样的一种比例,尚没有明确的结论。

### 4 免疫细胞治疗的疗效评价问题

目前通用的“实体瘤的疗效评估标准(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)”系统,通常建议在2个疗程的化疗后全面复查,评估患者病情是否有效控制,进而判断前期治疗是否有效<sup>[20]</sup>。这样的评估方式主要是基于细胞毒性药物对患者的伤害性,因此更加强调避免对患者不必要的伤害,一旦选用细胞毒性药物,必须在比较短的时间内决定,该治疗手段在伤害患者的同时是否有效地减少或控制了肿瘤的生长,进而综合考量继续进行这种治疗手段的必要性。

然而这种评估模式,在实际应用中经常会遇到

挑战, 肿瘤患者对于某种治疗手段的临床应答率, 与患者的生存质量、生存期并没有必然的联系。2013年公布的FIRE-3临床研究中, 主要研究终点客观缓解率(objective response rate, ORR)结果为阴性, 然而, 次要研究终点总生存期(overall survival, OS)也是肿瘤疗效评价的金标准, 反而出现了差异, 也就是说在短期内, 无论使用贝伐单抗还是西妥昔单抗联合化疗, 短期疗效是没有差异的, 而随着观察时间的延长, 两种治疗方法在患者的总生存期出现了明显差异。归根到底, 肿瘤治疗的最终目的是延长患者生存期, 短期内是否能将肿瘤缩小, 并不是必不可少的。尽管对于这样的研究结果有种种不同的解读, 影响患者OS的因素也比较多, 但不可否认的是, 当我们将免疫治疗和化疗联合应用的时候, 现有的疗效评价指标存在一定的局限性。

免疫治疗与化疗最大的不同在于前者对于患者机体本身的伤害很少, 对于国内最常见的DC-CIK治疗而言, 回输的CIK细胞对于正常机体细胞几乎没有杀伤作用, 因而, 面对免疫治疗的评价是否必须如化疗一样, 在2个疗程后就来判断前期治疗是否有效, 是值得商榷的。尤其是对于部分晚期患者, 治疗的初衷就是控制患者症状, 延缓肿瘤生长, 而非绝对意义上的消灭肿瘤细胞, 因此, 是否在短期内缩减现有肿瘤负荷, 不应当成为疗效评估的唯一标准。

2009年提出的irRC标准<sup>[21]</sup>, 将总体瘤负荷作为评估的主要指标, 并修改了既往实体瘤治疗过程中一旦出现新发病灶就判定为疾病进展的标准。这的确是一种进步, 然而, 由于免疫细胞治疗的副作用几乎可以忽略, 那么, 对于治疗后并无不适的患者, 什么时候进行疗效评价合适, 尚没有一定的标准; 另外, 这些患者需要接受多少个疗程的治疗, 也没有确切的标准。从我们的前期临床实践来看, 患者至少需要接受2个疗程的治疗后再评估病情, 而对于疗程总数而言, 似乎疗程越多疗效越好, 但依旧缺乏足够的技术支持<sup>[22]</sup>。

## 5 结论

肿瘤ACT技术从发明以来先经历了一个短暂的辉煌后陷入比较长时间的低谷, 而近年来又随着多项临床试验的结果公布而再次获得研究者的瞩目。虽然仍有很多争议, 但ACT技术本身的安全性高、毒副反应轻这些特点相较于常规的抗肿瘤疗法

具有无可比拟的优势。如果我们能进一步解决肿瘤抗原靶向缺失、T细胞在体内的扩增、持续存在等问题, 同时建立标准化的细胞培养流程或者全自动化的培养体系, 保证细胞培养的安全、可靠, ACT技术必将在肿瘤治疗领域发挥更加重要的作用。

## 参考文献 (References)

- 1 Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors. *J Cancer* 2011; 2: 363-8.
- 2 Jäkel CE, Hauser S, Rogenhofer S, Müller SC, Brossart P, Schmidt-Wolf IG. Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of renal cell carcinoma. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 473245.
- 3 Phan GQ, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* 2013; 20(4): 289-97.
- 4 Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 2012; 12(4): 269-81.
- 5 Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014; 15(7): e257-67.
- 6 Barrett DM, Singh N, Porter DL, Grupp SA, June CH. Chimeric antigen receptor therapy for cancer. *Annu Rev Med* 2014; 65: 333-47.
- 7 Yu X, Zhao H, Liu L, Cao S, Ren B, Zhang N, *et al.* A randomized phase II study of autologous cytokine-induced killer cells in treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Immuno* 2014; 34(2): 194-203.
- 8 Pan K, Li YQ, Wang W, Xu L, Zhang YI, Zheng HX, *et al.* The efficacy of cytokine-induced killer cell infusion as an adjuvant therapy for postoperative hepatocellular carcinoma patients. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(13): 4305-11.
- 9 Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote anti-tumor immunity. *J Transl Med* 2013; 11: 83.
- 10 钱其军, 吴孟超. 肿瘤过继细胞治疗——老故事新演绎. *中国肿瘤生物治疗杂志(Qian Qijun, Wu Mengchao. Adoptive cell therapy of cancer—an old story with a new twist. Chin J Cancer Biother)* 2011; 18(1): 1-6.
- 11 Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev* 2014; 257(1): 56-71.
- 12 Saijo H, Hirohashi Y, Torigoe T, Kochin V, Takahashi H, Sato N. Cytotoxic T lymphocytes: the future of cancer stem cell eradication? *Immunotherapy* 2013; 5(6): 549-51.
- 13 Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(8): 725-33.
- 14 Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 18; 368(16): 1509-18.
- 15 Nishihori Y, Kato K, Tanaka M, Okamoto T, Hagiwara S, Araki N, *et al.* Interleukin-2 gene transfer potentiates the alpha-galactosylceramide-stimulated antitumor effect by the induction of TRAIL in NKT and NK cells in mouse models of

- subcutaneous and metastatic carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(18): 1763-70.
- 16 Xu C, Lin L, Cao G, Chen Q, Shou P, Huang Y, *et al.* Interferon- $\alpha$ -secreting mesenchymal stem cells exert potent antitumor effect *in vivo*. *Oncogene* 2013; doi: 10.1038/onc.2013.458.
- 17 Alici E, Sutlu T, Björkstrand B, Gilljam M, Stellan B, Nahi H, *et al.* Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood* 2008; 111(6): 3155-62.
- 18 Lopez JA, Jenkins MR, Rudd-Schmidt JA, Brennan AJ, Danne JC, Mannering SI, *et al.* Rapid and unidirectional perforin pore delivery at the cytotoxic immune synapse. *J Immunol* 2013; 191(5): 2328-34.
- 19 Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, *et al.* CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 174(5): 2591-601.
- 20 Michaelis LC, Ratain MJ. Measuring response in a post-RECIST world: from black and white to shades of grey. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(5): 409-14.
- 21 Ribas A, Chmielowski B, Glaspy JA. Do we need a different set of response assessment criteria for tumor immunotherapy? *Clin Cancer Res* 2009; 15(23): 7116-8.
- 22 Gao D, Li C, Xie X, Zhao P, Wei X, Sun W, Liu HC, *et al.* Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in gastric and colorectal cancer patients. *PLoS One* 2014; 9(4): e93886.