

· 研究进展 ·

靶向间皮素免疫治疗实体瘤的研究进展

许崇凤, 孟淑芳* (中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 北京 100050)

摘要: 间皮素 (Mesothelin) 是一种肿瘤相关抗原, 这一糖蛋白在超过30%的肿瘤组织中高表达, 仅在少量正常组织中低水平表达, 是目前研究较多的癌症免疫治疗靶点。目前有多种靶向Mesothelin的免疫治疗产品在临床试验中显示出很好的安全性, 其中细胞治疗近年来发展最为迅速。本文将从Mesothelin的生物学特性、靶向Mesothelin免疫治疗药物的临床试验结果、Mesothelin CAR-T细胞免疫治疗面临的挑战和应对策略等几个方面, 介绍以Mesothelin为靶点的实体瘤免疫治疗研究进展。

关键词: 间皮素; 免疫治疗; 嵌合抗原受体T细胞; 实体瘤

中图分类号: R96; R97 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)04-0458-018

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.04.011

Progress in Immunotherapies Targeted to Mesothelin against Solid Tumors

Xu Chongfeng, Meng Shufang* (National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Beijing 100050, China)

Abstract: Mesothelin is a tumor associated antigen, a glycoprotein which is highly expressed in over 30% of cancers and only expressed at low levels in a small amount of normal tissues. It is a widely studied cancer immunotherapy target. At present, a variety of immunotherapeutic products targeting mesothelin have shown good safety in clinical researches, especially adoptive cell therapy targeting mesothelin has been developed rapidly in recent years. This article introduces the research progress and trends of solid tumors immunotherapy targeting mesothelin from several aspects, including biological characteristics of mesothelin, clinical trials results of immunotherapy, as well as challenges and response strategies of CAR-T cell immunotherapy.

Keywords: mesothelin; immunotherapy; CAR-T; solid tumor

以嵌合抗原受体 (Chimeric Antigen Receptors, CAR) T细胞和免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗近年来取得了重大进展, 改变了癌症的治疗格局, 在当今的医学领域中具有非常重要的地位。2017年以来, 美国、欧盟、英国、加拿大、日本和我国都批准了靶向CD19和BCMA的CAR-T, 给B细胞癌症患者带来了治愈的希望。相比于血液肿瘤, 实体瘤患者人群更大, 死亡率更高, 医疗负

担更重, 实体瘤免疫治疗未被满足的医疗需求更大。CAR-T对实体瘤研究大多数还处于早期临床阶段, 临床疗效比较有限。针对CAR-T对实体瘤的治疗, 全球的科研人员都在针对解决实体瘤异质性问题、改善并增强T细胞浸润、调节肿瘤微环境等诸多难点进行努力攻关, 寻求突破。

靶点选择对于免疫治疗至关重要。间皮素 (Mesothelin) 是肿瘤相关抗原, 已经用于多种癌

基金项目: 北京市科技计划“基因修饰免疫细胞和基因治疗药物质量控制关键技术与服务平台建设”(编号 Z221100007922015); 中国食品药品检定研究院学科带头人基金“靶向Mesothelin的CAR-T联合溶瘤病毒用于实体瘤治疗的有效性研究”(编号 2023X4)

作者简介: 许崇凤 Tel: (010) 53851718; E-mail: xucf@nifdc.org.cn

通信作者: 孟淑芳 Tel: (010) 53851613; E-mail: mengsf@263.com

症的诊断、预后和治疗。自Hassan于2000年利用抗Mesothelin的免疫毒素SS1P治疗第一例卵巢癌以来，已有百余项靶向Mesothelin药物开展了临床试验，包括免疫毒素、单克隆抗体、抗体结合药物、癌症疫苗和免疫细胞几类免疫治疗药物。临床试验结果已显示出以Mesothelin为靶点治疗实体瘤的潜力。

本文从Mesothelin的生物学功能入手，总结靶向Mesothelin的癌症免疫治疗临床试验研究进展，重点介绍靶向Mesothelin的CAR-T的研发策略。

1 Mesothelin组织分布及生物学功能

Mesothelin表达于正常的间皮细胞上，因此命名为间皮素。Mesothelin是一个糖蛋白，69~71 kDa的前体蛋白经过糖基化后，在蛋白酶Furin的作用下水解产生一个40 kDa蛋白Mesothelin和一个32 kDa可溶性的巨核细胞集落刺激因子。Mesothelin常见形式是通过磷脂酰肌醇（GPI）锚定于细胞膜上。

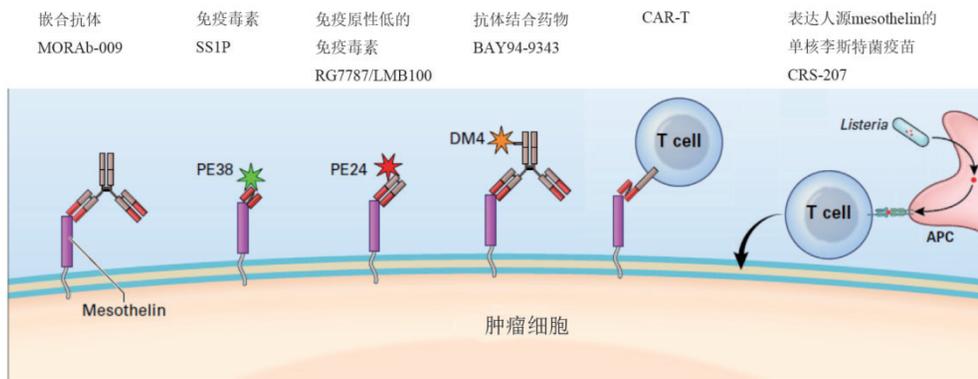
Mesothelin在癌症细胞内定位有较大差异，细胞定位与患者生存期和预后有关，也直接影响疗效，如CAR-T细胞只能识别细胞膜表面的抗原，进而对表面抗原阳性的靶细胞进行杀伤，因此肿瘤细胞表面Mesothelin的表达水平、比例等直接影响CAR-T的有效性。在多数癌症中，Mesothelin均一地分布于细胞表面，少量分布于细胞浆内，有些癌种，比如肺癌，Mesothelin既分布于细胞膜上，也分布于细胞浆内，而胃癌，细胞浆内分布要比细胞表面多，细胞浆内分布多的胃癌预后差。

Mesothelin是一个比较理想的免疫治疗靶点：首先，Mesothelin在正常组织中只局限于间皮细

胞表面低水平表达，在重要器官中没有表达。其次，很多种癌症都高表达Mesothelin。据估计，超过30%的癌症都过表达Mesothelin，有些肿瘤Mesothelin的表达水平很高，如间皮瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌、恶性卵巢癌、胃癌、胆管癌、三阴乳腺癌、宫颈腺癌等。因此以Mesothelin为靶点的药物具有治疗广泛癌种的潜力。最重要的一点，是Mesothelin参与癌症的发生发展过程。研究表明，异常表达的Mesothelin能促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及耐药性的形成。细胞生物学发现过表达Mesothelin可以持续活化NF-κB、MAPK、PI3K、Akt信号通路，从而促进细胞增殖和抵抗凋亡。过表达Mesothelin还可以诱导MMP-7和MMP-9的表达和活化^[1]，促进癌细胞迁移和侵袭。临床调查也发现，Mesothelin的表达与患者肿瘤负荷、疾病病程和癌症治疗效果相关。如Mesothelin表达量高的早期肺腺癌患者总生存率下降。

综上，Mesothelin在正常组织局限于少数内膜组织低水平表达，靶向Mesothelin治疗相对安全；表达于多种类型的实体瘤，靶向Mesothelin治疗具有广泛的实体瘤治疗潜力；同时以多种机制参与肿瘤发生和转移，与癌症患者预后和耐药性相关，靶向Mesothelin有望阻断肿瘤的发生发展，因此Mesothelin是一个理想的癌症免疫治疗靶点。

目前研究靶向Mesothelin的免疫治疗产品多达7种（图1），包括减毒活疫苗CRS-207、嵌合单克隆抗体、重组免疫毒素SS1P、抗体结合药物、CAR-T及CAR-NK、TRUC-T等细胞治疗产品已经开始早期临床试验^[2]。



改编自Hassan et al, 2016, Clin Oncol 34.

APC. 抗原递呈细胞；DM4. 美登醇；PE. 假单胞菌外毒素。

图 1 正在进行的靶向 Mesothelin 临床试验的免疫治疗药物种类^[3]

2 靶向Mesothelin的免疫治疗产品临床试验研究进展

如上所述, 靶向Mesothelin的7种免疫治疗产品, 都已经开展临床试验, 现总结如下。

2.1 疫苗CRS-207

靶向Mesothelin疫苗的设计基础是研究者发现将Mesothelin作为肿瘤抗原免疫可以激发患者产生很强的特异的CD8⁺T细胞反应。CRS-207是减毒单核细胞增生李斯特菌表达人的Mesothelin蛋白制备的重组疫苗。动物体内和临床试验患者体内研究都表明CRS-207免疫可以诱导产生Mesothelin特异的CD4⁺T和CD8⁺T细胞^[4], 杀伤表达Mesothelin的癌细胞, 证明疫苗有效激活了免疫反应。目前有10个临床试验评估CRS-207(表1)。适应证有胰腺癌、间皮瘤、卵巢癌、输卵管癌等。治疗方案有CRS-207单独使用, 也有与化疗药物环磷酰胺(Cyclophosphamide, Cy), 酶抑制剂类药物他达那非(Tadalafil)、依帕司他(Epacadostat)或者单克隆抗体药物帕博利珠单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)、伊匹单抗(Ipilimumab), 胰腺癌细胞系疫苗GVAX联合应用的, 结果证实CRS-207疫苗安全性高, 而有效性针对不同适应证有差异。

I期临床(NCT01675765)评估了CRS-207联合一线癌症治疗药物培美曲塞和顺铂治疗恶性间皮瘤的疗效, 结果显示CRS-207单独应用, 在31%的患者中引起了肿瘤缩小; 与化疗药物联合治疗, 显著改变了局部免疫微环境, 在多数治疗患者中诱导产生了抗肿瘤免疫反应^[5]。2次输入 1×10^9 CFU的CRS-207, 随后采用培美曲塞或顺铂化疗, 然后用CRS-207多次加强免疫, 35名评估病例中, 89%(31/35)的患者疾病得到控制, 其中1例完全缓解(3%), 19例部分缓解(54%), 10例疾病稳定(29%)。中位无进展生存期和总生存期分别是7.5和14.7个月。肿瘤组织活检发现淋巴细胞NK、DC浸润, 注射CRS-207后, CD8/Treg比例升高, 巨噬细胞从免疫抑制的类M2转变为促炎的类M1巨噬细胞^[5]。无治疗相关的严重副作用或死亡事件。该试验结果证实CRS-207与化疗药物联合治疗延长了间皮瘤生存期。

胰腺癌被称为癌王, 现有治疗手段患者生存期短。胰腺癌具有高度免疫抑制的微环境, 临床试

验方案采取多种药物联合治疗。自2012至2020年, Dung T. Le研究团队连续报道了几项CRS-207临床试验进展, 前期小型的临床试验, CRS-207疗效显著, 但是近期报道的多中心II期临床试验结果与传统治疗相比, 患者生存期无显著差异。2012年首先报道了CRS-207剂量递增研究中, 确定了最大耐受剂量, 研究发现接种疫苗后, 可以检测到细胞因子释放、NK细胞激活、Mesothelin特异性的T细胞反应, 证明免疫有效。37%的接种者生存期大于15个月^[5]。2015年该团队报道了与GVAX(GVAX是表达GM-CSF的胰腺癌细胞系)和环磷酰胺联合应用免疫治疗胰腺癌的临床试验结果^[6]。入组人员是先前接受过治疗的转移性胰腺癌患者, 按2:1随机分配至两组: A组每三周接种两剂Cy/GVAX, 然后四剂CRS-207; B组每三周接种六剂Cy/GVAX。主要终点是观察被试者总生存期(Overall Survival, OS)。共治疗90例患者(A组61例, B组29例), 其中A组总生存期为6.1个月, B组为3.9个月, 差异显著($P=0.02$)。同时结果显示特异性CD8⁺T细胞反应与较长的OS相关。试验证实Cy/GVAX和CRS-207的初种/加强免疫的接种策略延长了胰腺癌患者生存期。小型试验结果令人鼓舞, 但是最近披露的IIb多中心(NCT02004262)最新试验结果^[7], 以及临床试验(NCT02243371)结果, 证实Cy/GVAX和CRS-207以及联合纳武单抗治疗策略与传统化疗相比, 患者生存期并没有显著延长。NCT02004262试验将胰腺癌转移患者按1:1:1的比例随机分到3个试验组, A组Cy/GVAX+CRS-207、B组CRS-207、C组化疗组, 试验主要目的是比较A组和C组OS; 但是该研究未达到其主要疗效终点。A、B和C组三个分组中位OS分别为3.7(2.9, 5.3)、5.4(4.2, 6.4)和4.6(4.2, 5.7)个月, 无显著性差异。应用疫苗Cy/GVAX+CRS-207治疗与化疗相比, 没有显著提高患者OS。2020年, 新报道的Cy/GVAX+CRS-207, 又联合了纳武单抗(NCT02243371), 对照组不使用单抗, 试验主要目的是比较两组患者生存期差异, 其次目标包括评估无进展生存率、安全性、肿瘤反应、CA19-9反应和免疫相关性。尽管该研究没有达到A组OS优于C组的主要终点, OS与标准治疗相当, 但是观察到肿瘤微环境发生了明显的免疫反应。仅在A组的长期幸存者中观察到免疫微环境的变化, 包括CD8⁺T

表 1 疫苗 CRS-207 临床试验研究

临床试验识别号	试验名称	状态	临床阶段	适应症	联合治疗药物	实施单位
NCT00585845	静脉注射 CRS-207 治疗某些晚期实体瘤安全性和耐受性研究	终止	I 期	实体瘤, 如卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌或晚期间皮瘤	CRS-207、帕博利珠单抗	Anza 治疗公司
NCT02575807	CRS-207 联合依帕司他治疗铂耐药卵巢、输卵管或腹膜癌的安全性和有效性	终止	I、II 期	卵巢、输卵管或腹膜癌	CRS-207 疫苗、药物依帕司他、帕博利珠单抗	阿杜罗生物技术公司
NCT03122548	CRS-207 联合帕博利珠单抗治疗胃癌、胃食管交界处或食管癌的安全性和有效性	终止	II 期	胃癌、胃食管交界处或食管癌	生物制品 CRS-207 疫苗、生物制品帕博利珠单抗	阿杜罗生物技术公司、默沙东公司
NCT03175172	CRS-207 与帕博利珠单抗在既往治疗的恶性胸膜间皮瘤 (MPM) 中的评价	终止	II 期	胸膜间皮瘤	CRS-207、帕博利珠单抗	阿杜罗生物技术公司、默沙东公司
NCT03190265	CRS-207、纳武单抗、伊匹单抗在癌症患者中接种或不接种 GVAX 胰腺疫苗 (含 Cy) 的研究	完成	II 期	胰腺癌	环磷酰胺、纳武单抗、伊匹单抗	约翰·霍普金斯大学癌症综合中心、阿杜罗生物技术公司、百事美施贵宝、国家癌症研究所 (NCI)
NCT05014776	CRS-207、帕博利珠单抗、伊匹单抗和他达拉非治疗转移性胰腺癌的研究	招募	II 期	转移性胰腺癌	化学药物他达拉非、帕博利珠单抗、伊匹单抗、CRS-207	约翰·霍普金斯大学癌症综合中心、Lustgarten 基金会、国家癌症研究所 (NCI)
NCT02004262	复方李斯特菌的安全性和有效性 / 癌症环境中的 GVAX 胰腺疫苗	完成	II 期	2 线、3 线转移性胰腺癌	胰腺癌疫苗 GVAX、CRS-207、化疗药物环磷酰胺	阿杜罗生物技术公司、约翰·霍普金斯大学癌症综合中心
NCT01417000	复方李斯特菌的安全性和有效性 / GVAX 免疫治疗在癌症中的应用	完成	II 期	转移性胰腺癌	胰腺癌疫苗 GVAX、CRS-207、化疗药物环磷酰胺	阿杜罗生物技术公司
NCT02243371	GVAX 胰腺疫苗 (含 Cy) 和 CRS-207 (含或不纳武单抗)	完成	II 期	转移性胰腺癌	CRS-207、GVAX、纳武单抗	阿杜罗生物技术公司
NCT03006302	依帕司他、帕博利珠单抗和 CRS-207, 含或不含 Cy/ 转移性胰腺癌患者	活动、未招募	II 期	转移性胰腺癌	IDC 抑制剂依帕司他、帕博利珠单抗、CRS-207	约翰·霍普金斯大学
NCT01675765	李斯特菌联合化疗一线治疗恶性胸膜间皮瘤的安全性和有效性	已完成	I 期	间皮瘤	CRS-207、化疗药物	阿杜罗生物技术公司

细胞的增加和CD68⁺髓系细胞的减少。使用免疫相关反应标准,可以观察到3名患者出现了客观反应(A组4%,2/51;B组2%,1/42)。≥3级的相关不良事件发生率是可控的,而A组的发生率更高(35.3%对11.9%)。

2.2 抗体类药物

目前有几个靶向Mesothelin的抗体制剂已经完成或正在进行实体瘤临床试验,包括Morphotek公司进行的嵌合抗体MORAb-009(Atatuximab)、重组免疫毒素SS1P研究,和罗氏(Roche)公司进行的RG7787研究,以及拜耳(Bayer)、基因泰克(Genentech)和百时美施贵宝公司进行的抗体结合药物研究等(图1)。

2.2.1 单克隆抗体MORAb-009

MORAb-009是将鼠源单抗SS1可变区克隆到人的IgG1 κ 恒定区获得的嵌合抗体。SS1抗体可变区被广泛应用于抗体、免疫毒素、免疫结合药物及CAR结构中。此外,不同研究者还制备了识别不同表位、不同亲和力的Mesothelin抗体(表2),用于检测Mesothelin或靶向治疗。

MORAb-009的临床试验多数已经完成或终止,结果显示安全性好,但是有效性不足(表3)。单独用MORAb-009,最大耐受剂量是200 mg·m⁻²,最好的结果是疾病稳定,美国临床试验报道24例患者(包括间皮瘤、胰腺癌和卵巢癌)中有11例病情稳定,日本临床试验报道17例入组患者仅观察到3例病情稳定。另有多项MORAb-009与化疗药物联用的II期临床试验:临床试验(NCT00738582)评估了MORAb-009与化疗药物培美曲塞和顺铂联用治疗恶性胸膜间皮瘤的抗肿瘤活性和安全性^[3],联合用药没有出现叠加毒性,84名患者中34.5%有治疗反应(Overall Response Rate, ORR);MORAb-009与地西他滨联合治疗胰腺癌的多中心双盲随机临床试验(NCT00570713)中,MORAb-009与地西他滨联合治疗组的中位总生存期6.5个月,与对照组安慰剂与地西他滨使用组中位总生存期6.9个月相比,证明MORAb-009没有达到预期,总生存期为主要终点的临床试验失败。

表2 Mesothelin的抗体及其可变区在免疫治疗中的应用

克隆号	种属	表位	开发的免疫产品	亲和力
SS1	嵌合抗体	CA125结合位点, Mesothelin 蛋白 N 端	免疫毒素、CAR-T、MORAb-009	高
HN	人源抗体	同 SS1	ADC、免疫毒素	高
hYP218	人源化抗体	Mesothelin 近膜端	免疫毒素、CAR-T	高
7D9	人源化抗体	/	DMOT4039A	高
K1	鼠源单抗	/	无	低
MN 和 MB	鼠源单抗	/	无	高
5B2 和 MN-1	鼠源单抗	/	无	高
P4	全人抗体	/	CAR-T	高
P1A6E 和 P3F2	全人抗体	/	CAR-T	高
3C10、6A4、7B1	全人抗体	6A4 与 CA125 竞争结合 Mesothelin	ADC	高
MF-T	全人	与 CA125 结合位点不同	抗体偶联药物 BAY-9343	高
15B6	鼠	识别 C 端	无	未知
M5	全人	/	CAR-T	高

表3 MORAb-009 临床试验结果

临床试验识别号及发起人	状态	临床阶段	试验条件	入组患者人数	试验结果
NCT01413451 (NCI 公司)	终止	早 I 期	MORAb-009	7	无
NCT01018784 (日本卫材药业 Eisai 公司)	完成	I 期	MORAb-009、培美曲塞、顺铂	17	3 人病情稳定
NCT00325494 (Morphotek 公司)	完成	I 期	MORAb-009	24	11 人病情稳定
NCT00738582 (日本卫材药业 Eisai 公司旗下 Morphotek 公司)	完成	II 期	MORAb-009 (Amatuximab)、培美曲塞、顺铂	84	33 名 (40%) 患者有部分反应 (PR), 42 名 (51%) 患者病情稳定
NCT02357147 (日本卫材药业 Eisai 公司旗下 Morphotek 公司)	终止	II 期	MORAb-009 (Amatuximab) 或安慰剂、培美曲塞、顺铂	108 位无法切除的恶性间皮瘤	未报告
NCT00570713 (日本卫材药业 Eisai 公司旗下 Morphotek 公司)	完成	II 期	MORAb-009、安慰剂或地西他滨	155 位胰腺癌	患者无受益

2.2.2 免疫毒素药物

重组免疫毒素是由靶向基因与效应基因连接而成的嵌合蛋白, 如免疫毒素SS1P, 即Mesothelin通过二硫键稳定的抗体可变区Fv片段[disulfide stabilized Fv (dsFv) fragments] dsFv-PE38, 靶向基因是SS1的抗体可变区, 效应基因是假单胞菌外毒素A (Pseudomonas Exotoxin A, PE)。目前有两个SS1P的I期临床试验已经完成: NCT00024687和NCT00024674, 结果表明SS1P安全性很好, 有一定疗效^[4]。大剂量治疗常见的副作用是胸膜炎。

免疫毒素和抗体结合药物的缺点均是分子量大, 难以穿透进入实体瘤。可以采用化疗药物处理或者其他治疗手段破坏肿瘤组织, 使SS1P能到达更多的肿瘤细胞。临床试验结果表明, SS1P与培美曲塞和顺铂联合应用是安全的, 在一个小型临床试验中, 13名患者中有10名(77%)产生客观反应(Objective Response, OR), 优于化疗反应41%^[8]。

SS1P另一缺点是易产生中和抗体。Pastan等^[9]可逆地抑制宿主T和B细胞反应, 可降低产生抗SS1P的中和抗体的几率和水平, 提高SS1P抗肿瘤效果。Hollevoet等^[10]采用人源化抗Mesothelin的单抗Fab区和外毒素催化基团PE24, 降低抗原性, 设计

了新的免疫毒素RG7787/LMB100; 与SS1P相比, RG7787耐受性更高; 体外和体内试验结果显示RG7787与培美曲塞联合对胰腺导管癌(Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDA)细胞毒作用强。

2.2.3 抗体偶联药物

抗体偶联药物(Antibody Drug Conjugates, ADC)是将具有细胞毒作用的药物分子共价偶联到IgG上构建而成。有几个靶向Mesothelin的ADC正在进行不同阶段的临床试验。常用的细胞毒试剂有微管蛋白聚合酶抑制剂DM4及MMAE, 还有多卡霉素。

2.2.3.1 拜耳公司的阿奈妥单抗结合美登素药物 Anetumab Raptansine (BAY94-9343)

Anetumab Raptansine是将全人抗Mesothelin抗体连接了DM4。DM4是高细胞毒性的化疗药, 具有抑制微管蛋白和抗有丝分裂作用。Anetumab Raptansine进入细胞后, 能从Mesothelin阳性的癌细胞扩散到Mesothelin阴性的细胞, 发挥旁观者作用(Bystander Effect)^[7]。目前有15个I/II期临床试验正在对晚期实体瘤患者进行安全性评估, 结果显示毒性可以耐受。

Anetumab Raptansine首次人体试验(NCT02610140)入组148例晚期或转移性实体瘤

患者,包括间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)和乳腺癌,其中66例(1例NSCLC患者)疾病稳定(SD),11例有部分治疗反应,1例完全反应。最高治疗反应率为31%,发生在间皮瘤组中。根据这项研究的结果,随后的Ⅱ期试验将166名晚期、难治性、表达Mesothelin的恶性胸膜间皮瘤患者随机分配到Anetumab Ravnansine或长春瑞滨治疗组。遗憾的是,这项研究未能证明Anetumab Ravnansine优于长春瑞滨。另外两项晚期表达间皮素的非小细胞肺癌的早期临床试验(NCT03455556、NCT02839681),由于招募不足,提前终止。

临床试验(NCT02751918)^[10]Ⅰb期为了确定安全性,其次是研究Anetumab Ravnansine与聚乙二醇脂质体阿霉素药代动力学和对铂耐药的卵巢癌的抗肿瘤活性。试验客观有效率为27.7%,包括1例完全反应(1.5%)和17例部分反应(26.2%),中位反应持续时间为7.6个月和中位无进展生存期5.0个月。在对高间皮素患者($n=19$)的分析中,客观有效率为42.1%,中位反应持续时间为8.3个月和中位无进展生存期8.5个月。目前看来,Anetumab Ravnansine与聚乙二醇脂质体阿霉素联合对铂耐药癌症患者的治疗非常有前景,该研究确定了药物最大耐受剂量,为Ⅲ期临床做好了准备^[11]。

2.2.3.2 基因泰克公司的抗体结合药物DMOT4039A

DMOT4039A用Mesothelin的人源化抗体7D9通过蛋白酶敏感的连接序列mc-vc-PAB结合药物MMAE。MMAE是一种合成的微管破坏药物,强烈抑制微管蛋白形成多聚体,导致细胞凋亡。MMAE能够穿透细胞膜,对癌旁抗原阴性癌细胞发挥细胞毒作用。

DMOT4039A在不能切除的胰腺癌和对铂耐药的卵巢癌患者中已经完成Ⅰ期临床试验(NCT01469793)。8%的患者有部分治疗反应,有1例胰腺癌患者血清癌抗原CA19-9下降超过50%,有7例卵巢癌患者血清癌抗原CA125下降超过50%^[8]。研究结果表明DMOT4039A对胰腺癌和卵巢癌有治疗效果,安全性也可接受。

2.2.3.3 百时美施贵宝公司的BMS-986148

BMS-986148由全人抗Mesothelin抗体结合强效DNA烷基化药物多卡霉素构成。多卡霉素类DNA烷

基化药物结合DNA小沟,随后引起不可逆的DNA烷基化,破坏DNA结构,从而导致肿瘤细胞死亡,烷基化的ADC作用对象是处于不同细胞周期的所有细胞。

百时美施贵宝公司的BMS-986148药物Ⅰ/Ⅱa的临床研究(NCT02884726)已经结束,同是BMS-986148的临床试验,NCT02341625因为入组患者数量太少,试验已经终止。

2.3 免疫细胞治疗

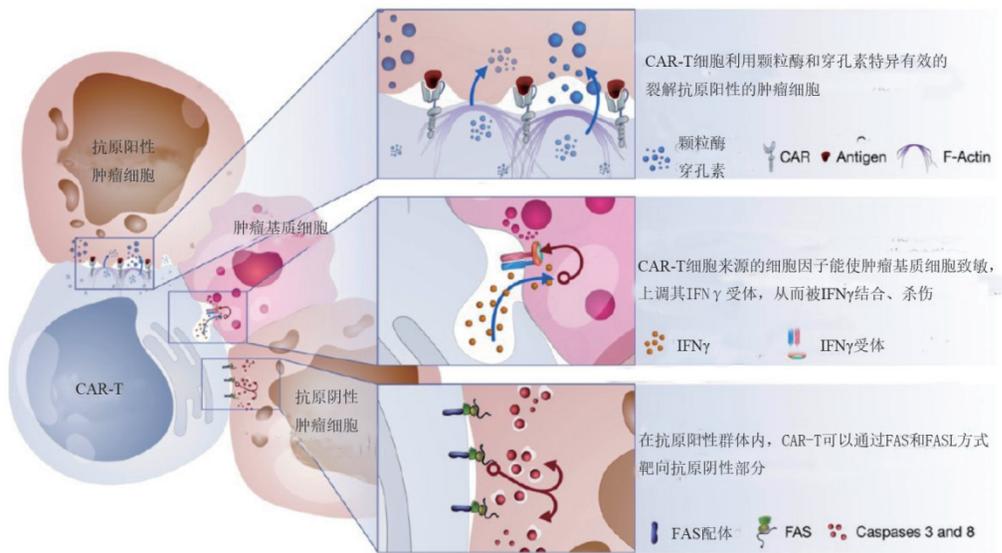
2.3.1 CAR结构

CAR是模拟T细胞活化、杀伤过程设计的结合靶抗原的人工受体。将人工受体CAR导入细胞使其表达于T细胞表面即为CAR-T。

CAR按结构可分为5代:第一代CAR仅包含CD3 ζ ;第二代CAR含有一个共刺激分子;第三代CAR除CD3 ζ 外,还包括两个共刺激区域,比如CD28和4-1BB,常用的几种共刺激分子有4-1BB、CD28、OX40或ICOS。此外,有研究显示CD40L、4-1BBL以及信号激活分子DAP10、DAP12等也可作为共刺激分子。第四代在胞内区域做了大的改造,包括通用细胞因子介导的T细胞重定向杀伤(T Cells Redirected for Universal Cytokine Mediated Killing, TRUCK)、通用CAR(UniCAR-T)或表达细胞因子的CAR-T细胞;第五代CAR-T是Boolean逻辑门控CAR-T细胞,旨在克服传统CAR的局限性,促进CAR-T细胞的特异性,控制其活性,从而提高疗效,减少治疗毒性。逻辑门控有许多形式:最常见的是AND、OR、NOT和IF-better逻辑门。

2.3.2 CAR-T的作用机制

目前CAR-T肿瘤杀伤机制还没有完全阐释清楚。推测可能通过3种作用机制发挥作用,如图2所示:(1)CAR-T通过scFv识别并结合肿瘤细胞表面抗原后,与肿瘤细胞形成免疫突触,通过免疫突触将分泌的穿孔素和颗粒酶释放到肿瘤细胞使其裂解或凋亡;(2)CAR-T细胞膜表面的凋亡因子配体FASL结合肿瘤细胞死亡受体细胞因子FAS,引起肿瘤细胞凋亡;(3)CAR-T激活后,分泌细胞因子间接发挥肿瘤杀伤作用^[12]。另外,CAR-T杀伤过程中造成肿瘤细胞裂解,抗原扩散可以激活内源性多克隆的免疫细胞,有利于肿瘤的清除。



改编自 Bennebarek, 2019, Int. J. Mol. Sci.20, 1283

图 2 CAR-T 通过 3 条途径介导肿瘤杀伤^[11]

2.3.3 CAR-T 临床试验研究进展

我国和美国是开展 CAR-T 临床试验最多的国家，实体瘤靶点研究最多的是 Mesothelin、GPC3、CEA、MUC1、HER2、EGFR 以及 Claudin 18.2 等。靶向 Mesothelin 的 CAR-T 临床试验见表 4，临床试验目的是为了评估靶向 Mesothelin 的 CAR-T 治疗实体瘤的安全性、确定最大耐受剂量及治疗有效性。

最先应用靶向 Mesothelin CAR-T 的临床试验是将编码 CAR 的 mRNA (SS1-4-1BB) 电转同源 T 细胞^[13-14]，静脉注射或者肿瘤内注射治疗 4 位晚期间皮瘤、胰腺肿瘤患者。研究发现多次注射毒性可接受，未发现肿瘤外靶向毒性。这一试验在肿瘤内发现有 Mesothelin CAR-T 细胞浸润，炎症细胞因子分泌水平升高，确定了 Mesothelin CAR-T 细胞的抗肿瘤活性。该临床试验还发现 CAR-T 治疗能够诱发表位扩散，激活抗肿瘤细胞免疫和体液免疫，除了造成肿瘤细胞裂解、炎症因子分泌、抗原的释放，同时观察到了树突状细胞交叉抗原呈递激活了免疫反应。这一现象表明 Mesothelin CAR-T 细胞治疗具有更广泛的间接抗肿瘤免疫反应。

mRNA 转染的 CAR-T 细胞也用于治疗胰腺导管癌。静脉注射 6 个化疗复发转移的 PDA 患者，没有患者出现细胞因子释放综合征 (Cytokine Release Syndrome, CRS) 或者神经症状，也没有剂量限制性毒性。2 名患者疾病稳定，无进展存活期为 3.8 和

5.4 个月。影像学分析发现，其中一位患者肿瘤缩小 69.2%，组织活检证实 Mesothelin 表达。该患者治疗 1 个月后所有肝脏转移灶完全消失，但是原位 PDA 没有变化。在外周血中检测到瞬时 CAR 表达。该研究证实了 mRNA 靶向 Mesothelin 的 CAR-T 在 PDA 具有治疗作用^[14]。

纪念凯特琳癌症中心的研究者发起的 I 期临床试验 (NCT02414269、NCT02792114、NCT04577326)，以 Mesothelin 为靶点，将带有 iCaspase 9 安全开关的第二代 CD28 CAR-T 经腹腔注射治疗。共招募 21 例实体瘤患者，在为期 38 周的评估中，13 例观察到外周血中 CAR-T 持续存在，CAR-T 的存在与影像学观察到的肿瘤消退相关。其中有 14 例同时给予 PD-1 检查点抑制剂，2 名患者完全缓解，5 例部分缓解，4 例病情稳定。没有观察到严重的 CRS 反应。追踪胰腺癌患者的调查发现，检测靶向 Mesothelin 特异的 IFN- γ 反应有益于患者存活^[15]。

以上的 I 期临床试验都没有发现严重的副作用，但是在临床试验 (NCT03054298) 中，不清淋的高剂量组 (10^8 CAR-T \cdot m⁻²)，有两例患者出现严重的肺炎，其中一例死亡，另一例康复^[16]，尸检发现肺组织有 Mesothelin CAR-T 浸润，可能是造成肺衰竭的原因。因此靶向 Mesothelin 的 CAR-T 临床治疗应密切关注此类严重副反应事件。

表4 靶向 Mesothelin 的 CAR-T、CAR-NK、TRUC-T 临床试验研究

序号	临床试验登记号	试验名称	状态	适应证	治疗药物	临床试验阶段	更新日期	实施单位
1	NCT02930993	抗 Mesothelin 的 CAR-T 免疫治疗	招募	Mesothelin 阳性复发或转移的恶性肿瘤	抗 Mesothelin CAR-T 细胞	I 期	2016.10.12	北京煤炭总医院
2	NCT03692637	抗 Mesothelin CAR-NK 细胞治疗 表皮卵巢癌	尚未招募	表皮卵巢癌	CAR-NK 细胞	I、II 期	2019.1.31	呈诺医学
3	NCT03545815	CRISPR-Cas9 敲除 PD-1 和 TCR 基因的靶向 Mesothelin 的 CAR-T 细胞治疗 Mesothelin 阳性的多种实体瘤	未知	成人实体瘤	CAR-T 细胞	I 期	2018.6.4	中国人民解放军总医院 生物治疗中心
4	NCT03182803	表达 CTLA-4 和 PD-1 抗体的 Mesothelin-CAR-T 细胞用于治疗 Mesothelin 阳性的晚期实体瘤	未知	晚期实体瘤	表达 CTLA-4/PD-1 抗体的 Mesothelin CAR-T	I、II 期	2017.6.9	上海细胞治疗集团有限公司
5	NCT01583686	CAR-T 细胞免疫治疗转移实体瘤	终止	宫颈癌、胰腺癌、卵巢癌、间皮瘤、肺癌	表达 CTLA-4 和 PD-1 抗体的 Mesothelin CAR-T	I、II 期	2019.4.4	国家癌症研究所 (NCI)
6	NCT01355965	自体 RNA Mesothelin-CAR T 细胞	已完成	恶性间皮瘤	自体 4-1BBζ T 细胞	I 期	2017.9.19	宾夕法尼亚大学
7	NCT03030001	表达 PD-1 抗体的 Mesothelin-CAR-T 细胞用于治疗 Mesothelin 阳性的晚期癌症	未知	成年人实体瘤、晚期癌症	表达 PD-1 抗体的 Mesothelin 特异的 CAR-T 细胞	I、II 期	2017.1.27	浙江宁波第五医院
8	NCT03747965	敲除 PD-1 基因的靶向 Mesothelin 的 CAR-T 细胞治疗 Mesothelin 阳性的多种实体瘤	招募	成年人实体瘤	靶向 Mesothelin CAR-T 细胞	I 期	2018.12.20	中国人民解放军总医院
9	NCT03198052	HER2/Mesothelin/Lewis-Y/PSCA/MUC1/PD-L1/CD80/86-CAR-T 细胞免疫治疗癌症	招募	实体瘤	靶向 HER2、Mesothelin、PSCA、MUC1、Lewis-Y 和 CD80/86 的 CAR-T 细胞	I 期	2018.10.25	中山大学第一附属医院、 广州医科大学第二附属医院

续表 4

序号	临床试验登记号	试验名称	状态	适应证	治疗药物	临床试验阶段	更新日期	实施单位
10	NCT03615313	表达 PD-1 抗体的 Mesothelin-CAR-T 细胞用于治疗 Mesothelin 阳性的晚期癌症	招募	晚期实体瘤	表达 PD-1 抗体的 Mesothelin CAR-T 细胞	I、II 期	2018.9.3	上海细胞治疗研究院
11	NCT02706782	靶向 Mesothelin 自体 T 细胞用于晚期胰腺癌	未知	胰腺癌	TAI-Mesothelin-CAR-T	I 期	2016.3.11	上海交通大学医学院附属仁济医院
12	NCT03267173	细胞治疗胰腺癌的安全性和有效性评估	未知	胰腺癌	CAR-T	早 I 期	2017.8.30	哈尔滨医科大学
13	NCT01897415	自体 RNA Meso CAR-T 细胞治疗胰腺癌	结束	转移 PDA 患者	自体 T 细胞转染抗 Mesothelin CAR-T	I 期	2019.9.19	宾夕法尼亚大学
14	NCT03054298	CAR-T 治疗表达 Mesothelin 的癌症	招募	肺癌、卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、胸膜间皮瘤、间皮瘤	CAR-T-Mesothelin 细胞	I 期	2019.4.18	宾夕法尼亚大学
15	NCT03356795	CAR-T 治疗宫颈癌	招募	GD2/PSMA/Muc1/Mesothelin 等阳性的宫颈癌	宫颈癌特异的 CAR-T 细胞	I、II 期	2017.11.29	深圳市免疫基因治疗研究院
16	NCT03497819	自体 CAR-T Meso/19 治疗胰腺癌	未招募	胰腺癌	CAR-T-Mesothelin/CAR-T19	早 I 期	2018.4.13	温州医学院第一附属医院
17	NCT03638193	自体 T 细胞治疗转移胰腺癌	招募	胰腺癌	CAR-T Mesothelin	-	2018.12.27	南京第一医院
18	NCT02159716	CAR-T Mesothelin 治疗表达 Mesothelin 的癌症	完成	转移 PDA、表皮卵巢癌、恶性间皮瘤	CAR-T Mesothelin	I 期	2019.2.26	宾夕法尼亚大学
19	NCT02580747	CAR-T Meso 治疗化疗复发的恶性晚期癌症	未知	恶性间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫腺癌、以及其他 Mesothelin 阳性的癌症	抗 Mesothelin 载体转导的 T 细胞	I 期	2015.10.20	中国人民解放军总医院

续表 4

序号	临床试验登记号	试验名称	状态	适应证	治疗药物	临床试验阶段	更新日期	实施单位
20	NCT02414269	靶向 Mesothelin 的基因改造的自体 T 细胞治疗恶性胸膜间皮瘤	未招募	恶性胸膜间皮瘤、间皮瘤、转移瘤、肺癌、乳腺癌	iCasp9M28z T 细胞、环磷酰胺	I 期	2018.9.11	纪念斯隆·凯特林癌症中心等
21	NCT02792114	T 细胞治疗晚期乳腺癌	招募	转移的 HER2 阴性的乳腺癌	环磷酰胺、靶向 Mesothelin 的 CAR-T 药物; API903	I 期	2019.4.10	纪念斯隆·凯特林癌症中心等
22	NCT03608618	腹膜内注射 MCY-M11 (Mesothelin-CAR) 治疗晚期卵巢癌和腹膜间皮瘤	终止	腹膜间皮瘤、输卵管腺癌、卵巢腺癌、初级腹膜癌	MCY-M11	I 期	2018.9.20	NIH 国家癌症研究所、华盛顿大学圣路易斯分校
23	NCT02465983	自体 T 细胞治疗转移性胰腺癌	已完成	胰腺癌	CAR-Mesothelin-19 T 细胞、环磷酰胺	I 期	2018.6.29	宾夕法尼亚大学
24	NCT03323944	CAR-T 免疫治疗胰腺癌	招募	胰腺癌、胰腺部位的癌症	自体 CAR-T	I 期	2017.9.15	宾夕法尼亚大学
25	NCT02388828	Mesothelin CAR-T 治疗的长期随访	已完成	接受 CART-Meso 治疗患者	CAR-T	随访	2015.3	宾夕法尼亚大学
26	NCT03916679	Mesothelin CAR-T 细胞治疗难治复发上皮卵巢癌	招募	卵巢癌	抗 Mesothelin CAR-T 细胞	I、II 期	2019.4.16	浙江大学医学院第二附属医院
27	NCT03799913	Mesothelin CAR-T 治疗复发难治性卵巢癌	招募	卵巢癌	Anti-mesothelin CAR-T 细胞、氟达拉滨、环磷酰胺	早 I 期	2019.4.10	浙江大学医学院第二附属医院
28	NCT05783089	Mesothelin 阳性晚期间皮瘤	尚未招募	间皮瘤	Anti-mesothelin CAR-T 细胞	早 I 期	2023.3.24	中国医学科学院
29	NCT05779917	Mesothelin-CAR-T 细胞抗肿瘤	招募	胰腺癌	CAR-T	早 I 期	2023.3.22	浙江大学医学院第二附属医院
30	NCT05848999	UCLM802 (抗 Mesothelin CAR-T) 注射治疗 Mesothelin 阳性的晚期恶性实体瘤	招募	Mesothelin 阳性的晚期癌症	抗 Mesothelin CAR-T 药品名称 UCLM802-II	I 期	2023.5.12	浙江大学

续表 4

序号	临床试验登记号	试验名称	状态	适应证	治疗药物	临床试验阶段	更新日期	实施单位
31	NCT05775666	UCLM802(Anti-Mesothelin CAR-T) 注射治疗 Mesothelin 阳性的晚期恶性实体瘤	招募	实体瘤	抗 Mesothelin CAR-T 药品名称 UCLM802	I 期	2023.3	北京大学
32	NCT04203459	肠道菌群增强 CAR-T 抗胰腺癌的机制	未知	胰腺癌	CAR-T、肠道微生物	未知	2019.10.20	哈尔滨医科大学第一附属医院
33	NCT03941626	自体 CAR-T/TCR-T 细胞免疫治疗实体瘤	未知	食管癌、胃癌、肝癌、胶质瘤	CAR-T/TCR-T	I 期	2019.9.1	深圳宾德生物技术有限公司
34	NCT04981691	抗 Mesothelin CAR-T 细胞治疗晚期难治实体瘤	未知	复发性恶性实体瘤	抗 Mesothelin CAR-T	I 期	2021.10.1	瑞金医院
35	NCT05623488	CAR-T 细胞治疗表达 Mesothelin 的乳腺癌	招募	乳腺癌	抗 Mesothelin CAR-T	I 期	2023.2.6	宾夕法尼亚大学
36	NCT04577326	Mesothelin CAR T-cell 治疗间皮瘤	招募	间皮瘤	环磷酰胺、抗 Mesothelin CAR-T	I 期	2020.9.30	纪念斯隆·凯特林癌症中心
37	NCT05568680	SynKIR-110 治疗表达 Mesothelin 的卵巢癌、胆管癌、恶性间皮瘤	招募	卵巢癌、复发性胆管癌、恶性间皮瘤	转导了 KIR-CAR 的 T 细胞	I 期	2023.9.28	Verismo 治疗公司
38	NCT03356808	抗原特异性 T 细胞治疗肺癌	未知	肺癌	癌症抗原特异性 T 细胞	I、II 期	2017.12.15	深圳基因免疫医学研究所
39	NCT05166070	RD133 在复发或难治性 MSLN 阳性实体瘤患者中的探索性临床研究	招募	实体瘤	氟达拉滨、环磷酰胺、CAR-T(RD133)	早 I 期	2022.1.1	南京医科大学第一附属医院
40	NCT03907852	表达 Mesothelin 的晚期癌症	招募	间皮瘤、胆管癌、复发性胆管癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、卵巢浆液性腺癌等	<ul style="list-style-type: none"> 氟达拉滨、环磷酰胺、TC-210 纳武单抗、伊匹单抗 	I / II 期	2023.5.9	TCR2 治疗公司

除CAR-T, 靶向Mesothelin的CAR-NK和TRUC的临床试验结果也显示出了治疗作用。在临床试验(NCT03907852)中, 试验药物是TRUC, 名称Gavo-cel, 试验目的是为了确定Gavo-cel II期临床试验剂量(RP2D), 并随后评估Gavo-cel对晚期Mesothelin阳性癌症患者的疗效。32名患者接受了剂量递增的Gavo-cel作为单一药物($n=3$)或清淋($n=29$)。剂量限制毒性是3级肺炎和5级支气管肺泡出血。在所有患者中有16%的患者出现3级或以上肺炎, 在RP2D中没有出现肺炎; 所有患者中25%的患者出现3级或更高的CRS, 在RP2D中为15%。在30名可评估的患者中, 总体缓解率和疾病控制率分别为20%和77%, 6个月以上的总生存率为70%。Gavo-cel值得进一步研究其抗肿瘤活性^[2]。

在靶向Mesothelin的CAR-T治疗胰腺癌和间皮瘤等临床研究结果显示CAR-T免疫治疗毒性可控, 有几例取得完全缓解, 显示出靶向Mesothelin CAR-T在实体瘤的治疗潜力。但是目前临床试验规模比较小, 完全缓解率比较低, 有2例严重的副作用, 靶向Mesothelin的CAR-T治疗实体瘤还需要改进以提高安全性和有效性。

2.3.4 CAR-T在实体瘤遇到的挑战和改进策略

CAR-T治疗血液瘤通常缓解率都高达80%以上, CAR-T治疗实体瘤总缓解率低。CAR-T治疗实体瘤挑战来自于以下几个方面: (1) 实体瘤结构特点导致免疫细胞难以浸润。CAR-T需与癌细胞直接接触才能杀伤肿瘤, 而肿瘤组织有多种基质阻碍CAR-T或其他治疗药物进入肿瘤组织。(2) CAR-T细胞尽管迁移到肿瘤组织, 实体瘤具有高度抑制的免疫微环境, 限制了CAR-T的抗肿瘤活性, CAR-T在肿瘤内缺乏增殖, 不易存活。(3) 由于实体瘤的异质性, 经过CAR-T治疗后抗原消失或表达水平降低造成治疗无缓解或肿瘤复发。(4) 可采用高亲和力抗体提高疗效, 但是此举容易造成严重的副作用。这些都是CAR-T攻克实体瘤必须要克服的困难。

笔者从以下几个方面总结CAR-T治疗实体瘤的瓶颈及提高疗效和安全性的策略。

2.3.4.1 实体瘤肿瘤抗原异质性、免疫逃逸

实体瘤肿瘤抗原高度异质。为避免抗原异质性造成免疫逃逸, 提高CAR-T疗效的策略: 改变

患者表观遗传学特性(利用去甲基化试剂或小分子药物增加抗原表达量); 增加CAR-T特异性靶点数量(比如联合应用2个或多个靶点的CAR-T或利用1个CAR靶向2个及以上的靶点); 联合应用溶瘤病毒等治疗措施; 其他提高抗原/表位扩散的策略, 比如使癌细胞过表达FAS, 可以激发CAR-T杀伤抗原阴性的肿瘤细胞。

2.3.4.2 增强CAR-T的迁移、肿瘤内浸润能力

CAR-T杀伤肿瘤需要与肿瘤细胞直接接触, 促进CAR-T细胞向肿瘤部位迁移和促进肿瘤内浸润是提高治疗效力的关键一步。目前可采取的措施: 肿瘤内注射CAR-T, 表达降解胞外基质的酶、与靶向胞外基质和脉管系统的CAR-T联合应用, 或利用CAR表达与肿瘤趋化因子匹配的受体等。

肿瘤内注射CAR-T可以解决CAR-T迁移问题。Adusumilli等研究发现在小鼠胸膜内输入抗Mesothelin的CAR-T治疗间皮瘤效果更好^[17]: T细胞增殖能力更强, 能有效浸润到转移瘤内, 肿瘤清除率和动物存活率更高。更重要的是, 胸腔注射的CAR-T可以长期存活, 基于这一发现, 研究者发起了肿瘤内或胸腔注射靶向Mesothelin CAR-T治疗间皮瘤、肺癌或者乳腺癌的临床试验: NCT02414269、NCT02498912、NCT01818323和NCT03608618(表3)。

CAR-T表达趋化因子和黏附分子, 可以提高CAR-T向肿瘤迁移能力。分析肿瘤微环境的细胞因子或者趋化因子, 表达与肿瘤趋化因子相匹配的趋化因子受体的CAR-T, 可以增强CAR-T迁移到肿瘤组织的能力。间皮瘤中趋化因子CCL2丰度高, T细胞表达少量CCR2b。在小鼠模型上, 靶向Mesothelin的CAR过表达CCR2b后, 显著促进CAR-T迁移到肿瘤微环境, 也提高CAR-T全身给药的疗效^[18]。

破坏肿瘤胞外基质或者脉管系统是增强CAR-T浸润的有效措施。肿瘤外纤维化基质是CAR-T浸润的物理屏障。破坏肿瘤胞外基质可以帮助CAR-T进入实体瘤, 利用转基因表达乙酰肝素酶、透明质酸酶来降解或抑制胞外基质, 从而增加T细胞浸润。破坏脉管系统, 可以利用CAR-T, 亦可以联合其他免疫疗法实现, 如溶瘤病毒、单克隆抗体等。研究表明直接靶向脉管系统CAR-T能促进抗原特异CAR-T的疗效。

2.3.4.3 提高CAR-T活化、增殖和存活能力

CAR-T在体内的增殖和持续存活能力是CAR-T治疗长期有效的关键。CAR-T难以浸润实体瘤内,肿瘤表面抗原表达水平低、CAR-T与抗原亲和力不足、肿瘤免疫抑制微环境等都可能使CAR-T难以扩增和长期存活。目前采用的策略有改造CAR-T结构、改善生产工艺或者结合临床治疗措施来促进CAR-T持续性,比如稳定表达CAR、使用有利于T细胞增殖和存活的共刺激分子、提高scFv与靶细胞抗原亲和力、表达细胞因子、降低CAR免疫原性,或者生产工艺采用合适的激活剂、利用不同亚群或者分化状态的淋巴细胞,临床试验证实采用清除淋巴细胞的化学药物有利于CAR-T的存活等。

相较于转染mRNA瞬时表达CAR的T细胞,利用慢病毒载体、睡美人转座子系统或者Piggybac转座子系统等方法获得稳定表达CAR,可以延长CAR-T在体内存活时间。

胞内区的共刺激分子对于CAR-T的扩增和存活能力具有重要作用。含CD28的二代CAR-T中,CD3 ζ 上的多个冗余的ITAM可能是造成T细胞耗竭的原因,研究表明靠近细胞膜的一个ITAM在低效靶比就能产生比完整的3个ITAM更持久的抗肿瘤能力,持续存活能力也有提高。ICOS能使T细胞从TH1转变为TH17细胞,含有ICOS靶向Mesothelin的SS1-CAR-T抗肿瘤效力增强,持续性比CD28和4-1BB的CAR-T好^[19]。

不同分化状态的CAR-T存活能力不同,起始T细胞亚群影响CAR-T增殖和存活能力。记忆性T以及干细胞样记忆性T细胞T_{scm}有利于长期存活。通过筛选不同亚群T细胞,或者用利于向记忆T细胞分化的培养体系如添加IL-7和IL-15或者IL-21扩增CAR-T,以及基因编辑等方式获得记忆性T细胞^[20-21]用于制备CAR-T,可能有利于CAR-T体内长期存活。

抗原刺激有利于CAR-T的存活。Mesothelin在正常组织中有少量表达,虽然可能有瘤外靶向风险,但也有利于CAR-T的扩增和持续。

细胞因子对CAR-T的存活能力和抗肿瘤活性非常重要。可以利用转基因、溶瘤病毒等方式为CAR-T提供细胞因子,有研究者设计CAR转基因表达细胞因子,或表达激活STAT5和STAT3信号通路

的元件、表达细胞因子受体,或将肿瘤抑制性因子受体转换成刺激性受体等。Kagoya等通过整合截短的IL-2 β 受体胞内区和STAT3结合基序YXXQ构建的CAR,可以激活JAK-STAT,与CD28z和4-1BBz相比,CD28- Δ IL2RB-z(YXXQ) CAR-T细胞体外增殖、体内存活和抗肿瘤能力更强^[22]。

鼠源成分比如SS1结构域的CAR可能由于免疫原性导致CAR-T被清除。利用全人序列的scFv CAR有可能提高长期存活能力。

生产过程中采用不同的激活剂对CAR-T细胞因子分泌和持续能力也有影响。研究表明生产过程中用CD3/ICOS磁珠激活比用传统的CD3/CD28磁珠激活,制备的Mesothelin CAR-T产生更多的IL-17A、IFN- γ 、IL-2和IL-22,清除间皮素瘤的能力更强,CAR-T持续时间久^[23]。

采取利于T细胞移植的临床措施可以提高CAR-T体内存活时间。CAR-T与其他癌症治疗手段结合一直是临床研究探索的方向,比如与清淋、放疗结合。最近有报道与非消融剂量肿瘤靶向辐射可促进CAR-T细胞的早期高渗透、增殖和存活持久性。肿瘤靶向辐射促进了肿瘤趋化因子和趋化因子受体的表达,帮助CAR-T浸润到肿瘤,增强了CAR-T细胞的抗肿瘤功效。据报道,全身给予CAR-T细胞之前使用肿瘤靶向辐射可以显著提高CAR-T对实体瘤的治疗效果^[24]。

2.3.4.4 克服肿瘤微环境

肿瘤微环境是实体瘤免疫治疗的最大挑战。目前已知的抑制性因素:(1)肿瘤细胞本身表达T细胞抑制性受体(PD-1、LAG3、TIM3、TIGIT)的配体,造成CAR-T耗竭;(2)肿瘤细胞招募抑制性免疫细胞Treg、MDSC、TAM、TAN,分泌抑制性分子如腺苷以及抑制性细胞因子IL-4、IL-10、TGF β ;(3)肿瘤细胞产生IDO和精氨酸酶造成营养缺乏,抑制免疫细胞增殖;(4)肿瘤组织氧化应激、营养缺乏、低pH和低氧的环境不利于T细胞增殖和存活。目前采取的克服肿瘤微环境的策略:改造T细胞如敲除T细胞抑制性分子CTLA4和PD-1或阻断抑制性信号通路、CAR表达激活型细胞因子,或者利用联合治疗使冷肿瘤变成热肿瘤,也可以调节CAR-T代谢通路有利于T细胞的激活。

对抗肿瘤微环境第一种策略是敲除或改变

T抑制性分子。肿瘤细胞过表达PD-1可以诱导Mesothelin CAR-T细胞衰竭^[25]。在小鼠间皮瘤模型上,阻断PD-1/PD-L1信号通路如利用PD-1抗体,或敲除PD-1或者表达无活性受体等方法,可提高CD28和4-1BB的二代Mesothelin CAR-T治疗Mesothelin阳性实体瘤潜力。也可以将PD-1胞外区融合表达活化受体如CD28受体的胞内区,逆转PD-1的抑制作用。敲除抑制T细胞的功能分子如DGK能显著增强Mesothelin CAR-T抗肿瘤活性。

另一种克服肿瘤抑制性免疫微环境的策略是武装CAR-T细胞表达细胞因子。转基因分泌的细胞因子除了有利于CAR-T的活化,还能增强DC和其他的T细胞肿瘤浸润,克服免疫抑制分子对CAR-T的影响。

联合治疗的措施很多都是为逆转免疫抑制的微环境。联合治疗可以采用免疫治疗与化疗、放疗联合,或者不同免疫策略之间联合,如细胞治疗联合免疫检查点抗体、联合溶瘤病毒、联合肿瘤疫苗等,通过多种机制来激活抗肿瘤免疫反应免疫检查点治疗提高对多种实体瘤的治疗效果。一个早期的I期靶向Mesothelin的CAR-T治疗间皮瘤的临床试验,联合应用抗PD-1单抗帕博利珠单抗,18名患者中,中位存活时间可达2年,其中有2例实现完全缓解^[26]。

胰腺癌PDA免疫微环境高度免疫抑制。Mesothelin CAR-T与表达TNF α 和IL-2的溶瘤腺病毒OAd-TNF α -IL2联合治疗,结果显示表达细胞因子的溶瘤病毒能增强CAR-T细胞治疗效果^[27-28],可能是比较有前景的克服PDA免疫微环境的方法。在NSG小鼠模型上,表达TGF- β 的溶瘤腺病毒结合靶向Mesothelin的CAR-T联合治疗乳腺癌,比单独应用CAR-T或者溶瘤病毒抑瘤效果强^[29]。

利用小分子药物或者抗体解除免疫抑制,可以增强CAR-T肿瘤内浸润。如肿瘤微环境存在的免疫抑制分子PGE2和腺苷酸能激活腺苷酸活化蛋白激酶PKA,抑制TCR的活化。用小肽RIAD抑制PKA可以激活T细胞,在小鼠模型上,CAR-T治疗时添加RIAD能增强T细胞向肿瘤部位迁移和肿瘤内的浸润。肿瘤细胞能分泌免疫调节分子和血管内皮生长因子vEGF抑制T细胞浸润,抗vEGF抗体阻断VEGF与vEGFR2之间的相互作用,能提高肿瘤内淋巴细胞浸润。

2.3.5 CAR-T治疗实体瘤的潜在毒性及提高安全性的策略

CAR-T治疗副作用有CRS、在靶脱瘤以及抗CAR的免疫反应等造成的机体损伤。这与ScFv的亲合力,ScFv的抗原性以及Mesothelin在组织器官的分布有关。因为Mesothelin除了癌组织过表达,在腹膜、心包膜和胸膜表面以及卵巢、扁桃体、输卵管、睾丸膜和气管的浆膜表面也有低水平的表达,Mesothelin特异的CAR-T细胞治疗与这些器官正常组织上的靶点交联后,可能导致浆膜炎、胸膜炎、心包炎、腹膜炎或扁桃体炎。提高CAR-T疗效的同时,可能肿瘤外靶向副作用也随之提高,因此治疗时必须考虑治疗的潜在风险。

报道靶向Mesothelin的CAR-T治疗的严重副反应有以下几例:自体SS1-4-1BB-CAR-T治疗1名52岁的严重晚期复发卵巢癌患者,出现局限于胸腔的CRS:与外周血相比,胸腔内IL-6和Mesothelin CAR-T浓度升高,用IL-6受体类似物抗体治疗有效。还有,NCT01355965临床试验中,1例受试者在第三次输入Mesothelin mRNA CAR-T后发展成严重的过敏反应并且造成心脏停跳^[30]。这一反应与患者产生的高水平抗CAR的IgE抗体相关,可能是多次注射CAR-T刺激机体造成体液免疫导致的。因此,鼠源scFv的CAR免疫原性可能造成安全问题,尤其是需要多次注射的mRNA CAR免疫程序。应用全人单克隆抗体的scFv或者使CAR稳定表达避免多次注射,可降低抗CAR的抗体反应。

另一个提高CAR-T安全性的方法是利用自杀基因在出现副反应时清除CAR-T。NCT02414269临床试验采用iCaspase 9安全开关。临床前数据表明一剂小分子AP1903注射可以在4小时内清除胸膜内注射的增殖高峰Mesothelin CAR-T。

基于安全性的设计,还有将CD3 ζ 和共刺激分子分开表达,一个CAR表达CD3 ζ ,一个CAR表达共刺激分子,这样,同一CAR-T细胞表达双CAR分子,只有CAR-T细胞与两种抗原同时结合时才能完全活化,提高识别肿瘤的特异性。如靶向CEA和Mesothelin的CAR胞内区分别含有CD3 ζ 和4-1BB,只有CAR-T与表达CEA和Mesothelin的肿瘤细胞同时结合,T细胞才能充分活化,且对单一抗原表达的细胞没有细胞毒作用,因此可以减轻脱瘤在靶(Off-tumor on Target)的细胞毒作用^[31]。

改造CAR的结构也有助于降低CAR-T的潜在毒性。如4-1BBL可以提高效应T细胞杀伤能力,降低亲和力阈值,能区分高表达和低表达的Mesothelin,提高安全性。有研究发现,CAR的铰链区和跨膜区也有利于降低促炎因子的产生,因而可通过改善CAR的结构降低CRS风险。

CAR-T治疗的严重副作用,除了众所周知的CRS、在靶脱瘤、抗CAR免疫反应外,最近还报道,CAR-T长时间培养可能导致内源性的HHV-6再激活,造成脑炎^[32],这又是一个CAR-T治疗的潜在风险。

2.3.6 其他细胞治疗产品

除了CAR-T细胞,其他具有肿瘤杀伤作用的细胞如TCR-T、TIL、CAR-NK、TRUC^[2]等的研究也如火如荼。例如稳定表达抗Mesothelin CAR的诱导多能干细胞,随后分化为Mesothelin靶向的CAR-NK细胞,利用体内外人源性组织异种移植(Patient-derived Xenografts, PDX)以及类器官模型评估了CAR-NK细胞对三阴乳腺癌的治疗潜力,数据表明CAR-NK细胞对三阴乳腺癌细胞具有高效杀伤作用^[32]。TRUC[如Gavo-cel(TC-210)]是一种新的细胞疗法,由表达识别Mesothelin的单结构域抗体的自体基因工程T细胞,该抗体与CD3 ϵ 亚基融合,表达后结合到内源性T细胞抗原受体TCR复合物中。在I/II期临床研究中已经显示出抗肿瘤活性^[2,33]。

3 总结与展望

靶向Mesothelin的免疫治疗策略有疫苗、抗体治疗和细胞治疗等。临床试验已经展示出很好的安全性和有效性。针对Mesothelin设计的疫苗可以诱导Mesothelin特异的CD4⁺和CD8⁺抗肿瘤反应,具有较好的抗原性;同时靶向Mesothelin的抗体类药物与其他药物联合应用也有较好的临床疗效,支持III期临床。靶向Mesothelin的CAR-T和TRUC细胞具有杀伤Mesothelin阳性肿瘤细胞的潜力。Mesothelin是实体瘤CAR-T研究最热的靶点,大多数临床试验还处于招募和早期临床阶段,疗效还有待于进一步确认。同时,研究领域密切关注提高CAR-T安全性和疗效的技术方法。

CAR-T治疗除安全性及有效性的问题外,还有生产周期长、批量少等生产和商业化的问题,可能影响药物的可及性。除了自体T细胞来源的

CAR-T,异体或通用型的CAR-T或NK细胞可以解决临床患者亟需的问题。同时iPS来源的免疫细胞可解决货架期问题。

随着肿瘤生物学、免疫学和基因编辑技术的发展,CAR-T迭代更加精准快捷。新出现的可诱导的、可转换的,或者分裂CAR-T细胞比如synNotch CAR、UniCAR,或者分离的、广谱的程序化的(Split, Universal and Programmable, SUPRA) CAR,可以使CAR-T治疗更灵活、更特异并且可控。随着CAR-T临床数据的积累,CAR-T研发领域的挑战因素也更加明晰,提高有效性的策略也会日趋完善。CAR-T细胞与细胞工程、基因编辑技术、AI技术结合,未来可能在实体瘤治疗领域获得新的突破。

参考文献:

- [1] Servais E L, Colovos C, Rodriguez L, et al. Mesothelin Overexpression Promotes Mesothelioma Cell Invasion and MMP-9 Secretion in an Orthotopic Mouse Model and in Epithelioid Pleural Mesothelioma Patients[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(9): 2478-2489.
- [2] Hassan R, Butler M, O'Cearbhaill RE, et al. Mesothelin-targeting T Cell Receptor Fusion Construct Cell Therapy in Refractory Solid Tumors: Phase 1/2 Trial Interim Results[J]. Nat Med, 2023, 29(8): 2099-2109.
- [3] Hassan R, Thomas A, Alewine C, et al. Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time?[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(34): 4171-4179.
- [4] Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, et al. Mesothelin-Specific Cd8(+) T Cell Responses Provide Evidence of in vivo Cross-priming by Antigen-presenting Cells in Vaccinated Pancreatic Cancer Patients[J]. J Exp Med, 2004, 200(3): 297-306.
- [5] Hassan R, Alley E, Kindler H, et al. Clinical Response of Live-attenuated, Listeria Monocytogenes Expressing Mesothelin (Crs-207) with Chemotherapy in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(19): 5787-5798.
- [6] Le DT, Wang-Gillam A, Picozzi V, et al. Safety and Survival with Gvax Pancreas Prime and Listeria Monocytogenes-expressing Mesothelin (Crs-207) Boost Vaccines for Metastatic Pancreatic Cancer[J]. J Clin Oncol, 2015, 33

- (12) : 1325–1333.
- [7] Le DT, Picozzi VJ, Ko AH, et al. Results from a Phase Lib, Randomized, Multicenter Study of Gvax Pancreas and Crs–207 Compared with Chemotherapy in Adults with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (Eclipse Study) [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25 (18) : 5493–5502.
- [8] Zhang Y, Xiang L, Hassan R, et al. Synergistic Antitumor Activity of Taxol and Immunotoxin SS1P in Tumor-bearing Mice[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 (15) : 4695–4701.
- [9] Pastan I, Hassan R. Discovery of Mesothelin and Exploiting It as a Target for Immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2014, 74 (11) : 2907–2912.
- [10] Hollevoet K, Mason–Osann E, Liu XF, et al. In Vitro and in Vivo Activity of the Low-immunogenic Antimesothelin Immunotoxin Rg7787 in Pancreatic Cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13 (8) : 2040–2049.
- [11] Alessandro DS, Antonio GM, Kathleen M, et al. Safety and Activity of Anti-mesothelin Antibody–drug Conjugate Anetumab Ravtansine in Combination with Pegylated-liposomal Doxorubicin in Platinum-resistant Ovarian Cancer: Multicenter, Phase Ib Dose Escalation and Expansion Study[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2023, 33 (4) : 562–570.
- [12] Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, et al. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (Car) T Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (6) : e1283.
- [13] Beatty GL, Haas AR, Maus MV, et al. Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor Mrna-engineered T Cells Induce Anti-tumor Activity in Solid Malignancies[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2 (2) : 112–120.
- [14] Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, et al. Activity of Mesothelin-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155 (1) : 29–32.
- [15] Meng Q, Valentini D, Rao M, et al. Prediction of Improved Survival in Patients with Pancreatic Cancer Via Il–21 Enhanced Detection of Mesothelin Epitope-reactive T-Cell Responses[J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (32) : 22451–22459.
- [16] Asmamaw Dejenie T, Tiruneh GMM, Dessie Terefe G, et al. Current Updates on Generations, Approvals, and Clinical Trials of Car T-cell Therapy[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2022, 18 (6) : 2114254.
- [17] Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena–Vargas J, et al. Regional Delivery of Mesothelin-targeted Car T Cell Therapy Generates Potent and Long-lasting Cd4-dependent Tumor Immunity[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6 (261) : 261ra151.
- [18] Moon EK, Carpenito C, Sun J, et al. Expression of a Functional Ccr2 Receptor Enhances Tumor Localization and Tumor Eradication by Retargeted Human T Cells Expressing a Mesothelin-specific Chimeric Antibody Receptor[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (14) : 4719–4730.
- [19] Guedan S, Chen X, Madar A, et al. Icos-based Chimeric Antigen Receptors Program Bipolar Th17/Th1 Cells[J]. *Blood*, 2014, 124 (7) : 1070–1080.
- [20] Hurton LV, Singh H, Najjar AM, et al. Tethered Il–15 Augments Antitumor Activity and Promotes a Stem-cell Memory Subset in Tumor-specific T Cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (48) : E7788–E7797.
- [21] Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, et al. Il–7 and Il–15 Instruct the Generation of Human Memory Stem T Cells from Naive Precursors[J]. *Blood*, 2013, 121 (4) : 573–584.
- [22] Yuki Kagoya ST, Tingxi Guo, Mark Anczurowski, et al. A Novel Chimeric Antigen Receptor Containing a Jak–Stat Signaling Domain Mediates Superior Antitumor Effects[J]. *Nat Med*, 2018, 24 (3) : 352–359.
- [23] Wyatt MM, Huff LW, Nelson MH, et al. Augmenting Tcr Signal Strength and Icos Costimulation Results in Metabolically Fit and Therapeutically Potent Human Car Th17 Cells[J]. *Mol Ther*, 2023, 31 (7) : 2120–2131.
- [24] Quach HT, Skovgard MS, Villena–Vargas J, et al. Tumor-targeted Non-ablative Radiation Promotes Solid Tumor Car T-cell Therapy Efficacy[J]. *Cancer Immunol Res*, 2023, 11 (10) : 1314–1331.
- [25] Moon EK, Wang LC, Dolfi DV, et al. Multifactorial T-cell Hypofunction That Is Reversible Can Limit the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor-transduced Human T Cells in Solid Tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (16) : 4262–4273.

- [26] Adachi K, Kano Y, Nagai T, et al. Il-7 and Ccl19 Expression in Car-T Cells Improves Immune Cell Infiltration and Car-T Cell Survival in the Tumor[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36 (4) : 346-351.
- [27] Nishio N, Dotti G. Oncolytic Virus Expressing Rantes and Il-15 Enhances Function of Car-modified T Cells in Solid Tumors[J]. Oncoimmunology, 2015, 4 (2) : e988098.
- [28] Watanabe K, Luo Y, Da T, et al. Pancreatic Cancer Therapy with Combined Mesothelin-redirected Chimeric Antigen Receptor T Cells and Cytokine-armed Oncolytic Adenoviruses[J]. JCI Insight, 2018, 3 (7) : e99573.
- [29] Li Y, Xiao F, Zhang A, et al. Oncolytic Adenovirus Targeting Tgf-beta Enhances Anti-tumor Responses of Mesothelin-targeted Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy against Breast Cancer[J]. Cell Immunol, 2020, 348: e 104041.
- [30] Maus MV, Haas AR, Beatty GL, et al. T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Cause Anaphylaxis in Humans[J]. Cancer Immunol Res, 2013, 1 (1) : 26-31.
- [31] Zhang E, Yang P, Gu J, et al. Recombination of a Dual-car-modified T Lymphocyte to Accurately Eliminate Pancreatic Malignancy[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11 (1) : e102.
- [32] Lareau CYY, Maurer K, Satpathy AT. Latent Human Herpesvirus 6 Is Reactivated in Car T Cells[J]. NATURE, 2023, 623 (7987) : 608-615.
- [33] Yang M, Guan T, Chen CF, et al. Mesothelin-targeted Car-Nk Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Have a High Efficacy in Killing Triple-negative Breast Cancer Cells as Shown in Several Preclinical Models[J]. J Immunother, 2023, 46 (8) : 285-294.

(收稿日期 2023年11月24日 编辑 王雅雯)