

【专论】

CAR-T 治疗诱导细胞因子释放综合症的机制及临床前安全性评价

傅盈双, 李双星, 李路路, 屈哲, 霍桂桃, 杨艳伟, 张 頔, 耿兴超, 李 波*, 林 志*

中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心/药物非临床安全性评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法极大地改变了癌症的治疗前景, 细胞因子释放综合征(CRS)是病理性免疫系统激活的严重全身炎症反应, 也是CAR-T治疗过程中最常见且致命的毒性反应。目前CRS机制尚未完全阐明, 临床前研究的实验模型主要包括异种移植免疫缺陷小鼠模型、同源小鼠模型、转基因小鼠模型、人源化小鼠模型和非人灵长类动物模型。由于种属差异且缺乏体外细胞模型, 临床前预测CAR-T细胞引起CRS的风险仍是亟待解决的问题。从CRS的相关指导原则及法规、机制及临床前安全性评价方法和模型3个方面对CAR-T诱发的CRS进行综述, 以期对CAR-T细胞治疗产品的临床前安全性评价策略提供新的思路。

关键词: 细胞因子释放综合征; 嵌合抗原受体T细胞; 临床前研究; 实验模型; 安全性评价

中图分类号: R951 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)03-0469-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.03.001

Mechanism and preclinical safety evaluation of cytokines release syndrome induced by CAR-T cell therapy

FU Yingshuang, LI Shuangxing, LI Lulu, QU Zhe, HUO Guitao, YANG Yanwei, ZHANG Di, GENG Xingchao, LI Bo, LIN Zhi

National Center for Safety Evaluation of Drugs, Beijing Key Laboratory for Nonclinical Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) therapy has greatly changed the prospects of cancer treatment. Cytokines release syndrome (CRS) is a severe systemic inflammatory response caused by pathological immune system activation, and is also the most common and lethal toxicity during CAR-T cell therapy. At present, the mechanism of CRS has not been fully clarified. Preclinical test models mainly include xenograft mouse model, syngeneic mouse model, transgenic mouse model, humanized mouse model and non-human primate animal model. Due to species differences and the lack of in vivo cell models, preclinical prediction the risk of CAR-T cell causes CRS is still an urgent problem. This paper reviewed the relevant guidelines and regulations, mechanisms and preclinical safety evaluation methods and models of CRS in order to provide new ideas for preclinical safety evaluation strategies of CAR-T cell therapy products.

Key words: cytokine release syndrome; chimeric antigen receptor T cell (CAR-T); preclinical study; study model; safety evaluation

随着分子生物学和基因修饰技术的飞速发展, 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)免疫疗法极大地改变了目前肿瘤治疗的前景与发展方向, 掀起了医药研发的新浪潮。CAR-T细胞以非主要组织相容性复合体(MHC)限制性的方式识别和杀伤肿瘤细胞, 可

在患者体内增殖, 可通过设计多种CAR结构, 适应多种肿瘤相关靶点^[1]。2017年, 美国食品药品监督管理局(FDA)批准了CD19 CAR-T细胞疗法用于治疗儿童和年轻人群的急性淋巴细胞白血病(ALL), 开启了CAR-T疗法新纪元。随着中国对CAR-T细

收稿日期: 2022-11-16

第一作者: 傅盈双, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: 13391567206 E-mail: fuyunl@163.com

*共同通信作者: 李 波, 男, 研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: (010)53851706 E-mail: libo@nifdc.org.cn

林 志, 女, 研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: (010)67872233 E-mail: linzhi@nifdc.org.cn

胞疗法相关政策的推进,越来越多企业开展了CAR-T细胞治疗产品的研发。目前,已有两款CD19 CAR-T获国家药品监督管理局批准上市,用于治疗成人复发性或难治性大B细胞淋巴瘤。2022年,南京传奇生物科技有限公司研发的靶向B细胞成熟抗原(BCMA)的CAR-T获得FDA批准上市,中国有望在短时间内实现技术飞跃^[2]。目前全球共有6家公司研制了8款CAR-T细胞产品获批上市,包括诺华公司的Kymriah、吉利德公司的Yescarta和Tecartus、百时美施贵宝的Breyanzi和Abecma、复星凯特公司的阿基仑赛、药明巨诺公司的倍诺达和南京传奇公司的Carvykti。CAR-T细胞产品在B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病、神经母细胞瘤等其他血液肿瘤中以及实体瘤的临床试验中表现出较好疗效^[3]。随着CAR-T细胞免疫疗法在肿瘤治疗上的成功,研究者越来越重视其安全性。

细胞因子释放综合征(CRS)是免疫治疗产品治疗过程中出现的常见的、严重威胁生命的毒性作用,是由T淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK)、单核细胞和巨噬细胞等介导的全身炎症反应,细胞分泌大量细胞因子如 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-10(IL-10)。细胞因子引发炎症反应并诱发血管内皮和器官损伤,临床通常表现为发热、头痛、恶心、心动过速、低血压、血流动力学改变、毛细血管渗漏、凝血功能障碍和器官功能障碍等,严重威胁患者的生命安全^[4-5]。CRS引起研究者广泛关注是由于TGN1412灾难事件,TGN1412抗体作为CD28超级激动剂拟用于治疗自身免疫疾病和白血病,在给药90 min内试验组6名健康男性志愿者出现严重的细胞因子炎症反应,并相继出现不同程度的器官衰竭和凝血障碍,引起研究者及药品监管机构的重视^[6]。CAR-T细胞进入人体后快速增殖而增强机体免疫力,在多项临床试验中发生CRS的患者比例普遍较高,且通常发生在治疗后的第1周^[7]。在Kymriah的ELIANA、JULIET临床试验中,患者CRS发生率均在50%以上,且在JULIET试验中23%的患者出现了3至4级CRS^[8-10],其他临床试验中显示93%的患者发生CRS^[11]。CRS引起的严重不良反应逐渐引起各国的重视。因此,深入了解CAR-T细胞治疗产品诱发CRS的机制,将有助于开发新的模型方法以预测毒性、减少毒性。本文简要讨论相关指导原则

及法规、CAR-T治疗产品引起CRS的机制和临床前安全性评价方法模型等,以期为该类产品安全使用提供依据。

1 相关的指导原则及法规

生物技术药物在抗肿瘤、风湿类疾病等自身免疫性疾病、呼吸系统疾病、抗感染等方面发挥重要作用,生物技术药物在高速发展的同时也对临床前安全性评价提出更高的要求以及更大的挑战。目前,国内外陆续颁布了一系列指导原则及法规,用于指导生物技术药物的安全性评价和CRS机制研究。

1.1 国内的指导原则及法规

中国在细胞治疗产品的监管上一直实行双轨制。一方面,细胞疗法作为一种医疗技术由卫生部门进行监管,医疗机构按照第三类医疗技术的路径,在省级卫计委备案并通过医院的伦理委员会进行临床试验;另一方面,细胞治疗产品作为一种药品,由药品监管部门进行监管。

细胞免疫疗法发展历程大致经历了3个阶段:由2016年以前的全面开放、秩序混乱到2016年魏则西事件爆发,免疫细胞治疗技术短暂停滞。2017年至今,随着中国对免疫细胞治疗产品认知的深入,2019年中华人民共和国国家卫生健康委员会颁布了《生物医学新技术临床应用管理条例(征求意见稿)》^[12]、《体细胞治疗临床研究和转化应用管理办法(试行)(征求意见稿)》^[13]等指导性文件,细胞治疗产品研究项目有序开展,步入正轨。

CAR-T细胞治疗产品临床疗效显著,但其安全性仍是亟待解决的问题。CRS是治疗过程中最普遍且严重威胁生命的毒性反应,也是大批CAR-T细胞治疗产品临床试验失败的原因之一,这也对中国非临床安全性评价相关法规及指导原则提出了挑战。2017年原国家药品监督管理局颁布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》^[14]对细胞治疗产品非临床安全性研究评价包括单次或重复给药毒性、致癌性或致瘤性、生殖毒性等都提供了规范指导,同时提出细胞治疗产品或细胞分泌产物需要研究其潜在的免疫原性及诱导产生的免疫毒性。而目前,国内仅有国家食品药品监督管理局(NMPA)药品审评中心(CDE)于2021年颁布的《药物免疫原性研究技术指导原则》^[15]中针对CRS的非临床安全性评价方法提出了明确的要求,免疫调节类药物需要整合体内毒性试验及体外试验中细胞因子释放数据。体外细胞因子释放试

验(CRA)需遵循具体情况具体分析原则,根据细胞因子释放的机制采用不同试验体系。细胞因子检测种类、时间也根据机制的不同而有所差异。而《药物免疫原性研究技术指导原则》未对CRA提出统一的标准,且此指导原则提出的CRA试验方法主要针对单抗等免疫调节类药物,还需进一步考虑CAR-T等细胞治疗产品的体外试验方法,例如试验体系中的细胞种类、细胞直接或间接共培养、检测指标与时间点等。此外,此指导原则尚未对非临床评估CRS的体内试验提出明确要求。目前,非临床研究中尚无可直接评估人CAR-T细胞的CRS风险的理想动物模型。《CAR-T细胞治疗产品质量控制监测研究及非临床研究考虑要点》^[16]中指出需对不同动物模型的检测结果进行客观的分析,根据不同CAR-T细胞治疗产品作用机制的不同在不同时间点通过流式细胞仪珠阵列(CBA)、液态芯片(luminex xMAP)、酶联免疫吸附法(ELISA)、电化学发光分析技术(MSD)等方法检测细胞因子水平。国内颁布的相关指导原则见表1。

1.2 国外相关指导原则及法规

美国FDA对细胞治疗产品实行风险分级,根据已知或可能在受体体内导致毒副反应的危险程度将细胞产品分为低危组和高危组,对低危组根据《公共卫生服务法》(PHSA)^[17]第361条进行监管,对高危组根据PHS第351条进行管理。欧洲实行双轨制进行监管,集中化评审和不上市的“医院豁免”的产品^[18-19]。FDA颁布的《研究性细胞和基因治疗产品的临床前评估》^[20]及《嵌合抗原受体(CAR)T细胞产品开发的考虑》^[21]对细胞产品的临床前研究动物

模型选择提供指导,CAR-T细胞通常在免疫缺陷动物模型进行体内药效学实验,而免疫缺陷动物模型由于缺乏正常的免疫系统从而无法提供CRS风险信息,转基因动物模型可研究靶向及非靶向毒性,可为人CAR-T细胞测试提供信息。

欧洲药品管理局(EMA)颁布的《人体细胞医药产品指南》^[22]、《含有转基因细胞的药品的质量、非临床和临床方面指南》^[23]指出当细胞治疗产品或细胞源性的药理活性物质可能诱发机体免疫反应从而影响细胞治疗产品的疗效或细胞产品用于免疫治疗时,需依据人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)S6考虑其免疫原性,可结合动物模型、体外模型及计算机分析方法。针对CRA,FDA、EMA仅提出CRA的基本概念,并未对CRS体外释放试验提出详细要求,而国内对单抗CRA的细胞体系、孵育方法、对照设置、基本观察指标都做了相对具体的要求,可以在产品开发过程中提供更详细更具规范性的指导,但在单抗CRA的验证方面仍存在不足,例如需进一步明确验证的接受标准。此外国内与美国对CAR-T细胞产品的非临床研究现有的动物模型的特点及应用及选择都提出了指导意见,但都未针对CAR-T细胞治疗产品的体外评估CRS风险试验方法提出明确要求。表2为美国部分法律法规和指导原则,表3为EMA部分法律法规和指导原则。

此外,CRS是CAR-T细胞产品等免疫调节药物引起的免疫毒性,其临床前安全性评估试验需遵循人用药品注册技术国际协调会议(ICH)S6(R1)及ICH S8指导原则。

表1 中国CAR-T细胞治疗产品及其安全性评价的指导原则

Table 1 Guidelines for CAR-T cell therapy products and their safety evaluation in China

指导原则名称	发布机构	年份
生物医学新技术临床应用管理条例(征求意见稿)	国家卫生健康委员会	2019
体细胞治疗临床研究和转化应用管理办法(试行)(征求意见稿)	国家卫生健康委员会	2019
细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)	NMPA	2017
CAR-T细胞治疗产品质量控制监测研究及非临床研究考虑要点	中国食品药品检定研究院	2018
药物免疫原性研究技术指导原则	NMPA CDE	2021

表2 美国CAR-T细胞治疗产品及其安全性评价的相关法规和指导原则

Table 2 US regulations and guidelines for CAR-T cell therapy products and their safety evaluation

效力等级	文件名	发布机构	发布时间
法律	公共卫生服务法	美国国会	1944年
指导原则	研究性细胞和基因治疗产品的临床前评估	FDA	2013年
	嵌合抗原受体(CAR)T细胞产品开发的考虑	FDA	2022年

表3 欧盟CAR-T细胞治疗产品的相关法规和指导原则

Table 3 European Union regulations and guidelines for CAR-T cell therapy products and their safety evaluation

效力等级	文件名	发布机构	发布时间
法规	条例(EC) No 1394/2007	欧洲议会和理事会	2007年
法令	2001/83/EC	欧洲议会和理事会	2001年
指导原则	人体细胞医药产品指南	EMA	2008年
	含有转基因细胞的药品的质量、非临床和临床方面指南	EMA	2020年

2 CRS的发病机制研究

CAR-T细胞治疗产品引起CRS的机制尚未完全阐明,CRS的严重程度与肿瘤负荷、淋巴细胞耗竭程度以及CAR-T结构有关,不同类型的CAR-T引起细胞因子风暴的严重程度不同。

2.1 CRS中主要的效应细胞及细胞因子

单核细胞、巨噬细胞在CAR-T细胞引发的CRS中发挥重要作用。已有研究表明CAR-T细胞激活后,释放IFN- γ 、TNF- α 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子可募集激活巨噬细胞,巨噬细胞释放IL-1、IL-6及NO,进一步激活CAR-T细胞,促进CAR-T细胞分泌细胞因子,形成正反馈循环,引发细胞因子风暴,机体出现发热、低血压等症状。给予IL-6或IL-1受体阻断剂可通过相同机制减少巨噬细胞释放NO,进而减轻CRS。此外,巨噬细胞与CAR-T细胞可通过CD40与CD40L在肿瘤微环境中发生相互作用,这种相互作用会加重CRS^[24]。单核细胞主要分泌产生IL-6和IL-1,且IL-1比IL-6的产生时间更早。IL-1能够诱导IL-6和可溶性IL-6R的产生。采用IL-6拮抗剂,可减弱或阻断CRS,但无法减轻CAR-T细胞另一严重毒性作用即神经毒性,而阻断IL-1对神经毒性和CRS都有缓解作用^[25]。内皮细胞在CRS发生发展中也发挥重要作用。内皮细胞可产生炎症因子IL-6。CRS患者血清中内皮活化标志物促血管生成素因子2(Ang-2)和血管性血友病因子(vWF)水平升高,内皮细胞活化引起的血管功能障碍是CRS的主要表现之一,且与CAR-T细胞引起的神经毒性密切相关。IL-6是CRS中起关键作用的一种促炎细胞因子,在各种急性炎症性疾病中均发挥重要作用。快速产生的IL-6能够诱导肝脏中各细胞产生C反应蛋白(CRP)、血小板生成素、补体成分等急性蛋白。IL-6直接或间接的引起血管内皮损伤,导致血管渗漏。IL-6还可通过上调单核细胞中的组织因子或IL-6-可溶性IL-6R复合物直接激活内皮细胞,释放IL-6、IL-8、MCP-1,招募纤溶酶原激活物抑制物-1,促进凝血级联反应

激活,引起凝血功能障碍导致弥散性血管内凝血等^[26]。IFN- γ 可由活化的T细胞和肿瘤细胞产生,通过其抗肿瘤、抗增殖、免疫调节作用在宿主防御过程中发挥效应。在CAR-T细胞回输治疗过程中,T细胞和肿瘤细胞大量释放IFN- γ 会触发CRS的发展,激活巨噬细胞等其他免疫细胞,引起发热、头晕、头疼等症状。CAR-T细胞进入体内,释放GM-CSF,可增加单核细胞、巨噬细胞的活化增殖。通过GM-CSF基因失活或者中和抗体降低GM-CSF,则可减少巨噬细胞依赖性分泌的IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白1,从而进一步减轻CRS^[27]。

2.2 肿瘤对CRS的影响

肿瘤负荷、肿瘤类型、肿瘤细胞焦亡在一定程度上影响CRS的严重程度,且肿瘤细胞焦亡参与CRS的发生发展。通常认为肿瘤细胞焦亡是抗肿瘤作用的基础,细胞焦亡由促孔蛋白(GSDM)介导,GSDM通过促炎细胞因子和免疫活性物质促进免疫细胞活化和浸润。肿瘤类型不同,细胞焦亡中参与的GSDM蛋白和途径不同。最新研究表明,肿瘤细胞焦亡能够诱导强烈的炎症反应,参与CRS的发生过程。CAR-T细胞可能通过两种途径引起细胞焦亡,释放颗粒酶B激活靶细胞的半胱天冬酶3切割促孔蛋白E(GSDME)或释放颗粒酶A,直接裂解促孔蛋白B(GSDMB)导致肿瘤细胞焦亡,肿瘤细胞焦亡后释放半胱天冬酶1切割巨噬细胞上的GSDME,促使巨噬细胞释放细胞因子,引起全身炎症反应。GSDME广泛存在于血液系统肿瘤中,GSDMB主要在消化道上皮组织及衍生肿瘤中表达,如膀胱癌、皮肤癌等^[28-29]。此外,通过结合损伤相关分子模式(DAMPs)或病原体相关分子模式(PAMPs),经半胱氨酸蛋白酶介导的成孔GSDM蛋白活化致使焦亡细胞破裂。研究表明肿瘤细胞损伤相关分子如高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、ATP等可以激动巨噬细胞释放细胞因子,引起内皮细胞活化、功能改变,高水平的细胞因子可能引起其他细胞坏死焦亡,进一步激活巨噬细胞释放,形

成恶性循环,加剧毒性^[30-31]。高肿瘤负荷比低肿瘤负荷更易引起CRS,且血液系统肿瘤比实体瘤更容易出现CRS^[32]。

2.3 CAR-T细胞结构对CRS的影响

CRS的严重程度除了与肿瘤负荷有关,还与CAR-T细胞结构有关。CAR-T细胞的肿瘤抗原亲和力和共信号结构域决定了CAR-T细胞释放穿孔素、颗粒酶B的能力^[28]。穿孔素、颗粒酶B水平增加,肿瘤细胞焦亡增多,释放半胱天冬酶1,激活巨噬细胞释放炎症细胞因子。因结构不同,CAR-T细胞回输后引起CRS的发生时间及毒性也有所差异。相比共刺激域为CD28的CAR-T细胞,共刺激域为4-1BB的CAR-T细胞治疗后引起的CRS时间较晚,且CRS毒性更弱。此外,CAR-T细胞的给药剂量也会影响CRS的严重程度,但缺乏明确的剂量-反应关系^[3,33]。

2.4 细胞因子基因型、淋巴细胞清除对CRS的影响

CRS严重程度与细胞因子基因型也有关系。1项因CAR-T细胞治疗引发CRS的研究,通过对PBMC的DNA中IL-6、IL-10、IFN- γ 、TGF- β 1、TNF- α 5种细胞因子的基因型进行分析,IL-6基因型为-174G/C;IL-10基因型为-1082G、-819C、-592C;TGF- β 1基因型为10T,25G,这3种细胞因子的基因型与较高的细胞因子水平有关,而IFN- γ 与TNF- α 的基因型与较低的细胞因子水平有关^[34]。在CAR-T细胞输注前,患者通常通过化疗进行淋巴细胞清除,以延迟或阻止机体产生抗CAR-T细胞的免疫反应。淋巴细胞清除情况可能影响CAR-T细胞回输后的增殖能力。研究发现,患者经过化疗后血清中IL-15水平升高,而IL-15是T细胞生长因子,能够促进T细胞活化增殖,血清IL-15水平与CAR-T输注机体后的早期快速扩增紧密相关^[35]。CAR-T细胞数量增多,可能增加CRS的严重程度。

目前通过改变CAR-T细胞结构或与单抗联合治疗等策略可使CAR-T细胞治疗更安全有效,例如设计安全开关诱导型半胱天冬酶CAR-T细胞^[36]。此外,还可提前给予细胞因子拮抗剂、部分激酶抑制剂以减少T细胞活化和细胞因子释放,如Src/Ick抑制剂^[37]、CDK7阻断剂^[38]。

3 临床前安全性评价方法和模型

根据CDE于2021年颁布的《药物免疫原性研究技术指导原则》规定,对于免疫调节类药物,完整的临床前评价需要整合所有可用的体内和体外试

验数据,即在常规的动物体内进行毒性试验和体外细胞试验中均要进行细胞因子相关检测。

3.1 体内实验

在临床前的体内安全性研究中,常选用小鼠作为动物模型,包括异种移植免疫缺陷小鼠模型、同源小鼠模型、转基因小鼠和人源化小鼠模型。除小鼠模型外,非人灵长类动物模型也是生物技术药物常用的临床前动物模型。

3.1.1 异种移植免疫缺陷模型 免疫缺陷小鼠荷瘤模型体内免疫功能低下,可为CAR-T细胞生长扩增提供良好的环境基础,常用于CAR-T细胞的药理学评价。目前,常用的小鼠异种移植模型为NSG小鼠,NSG小鼠是先天性免疫功能受损的非肥胖糖尿病小鼠(NOD)与严重联合免疫缺陷小鼠(SCID)杂交并进一步使IL-2受体 γ 链突变获得的,缺乏适应性免疫系统,且T细胞、B细胞、NK细胞发育不良。在这个实验系统中,可以准确观测到CAR-T细胞的增殖,肿瘤的抑制或消退等指标,但由于免疫系统的缺陷,其往往无法模拟CRS引起的级联反应。

3.1.2 同源小鼠模型 同源小鼠模型为免疫活性动物模型,表达鼠肿瘤相关抗原(TAA),负荷鼠源肿瘤,可用于研究鼠源CAR-T细胞的靶向毒性及脱靶毒性。但由于种属差异性,鼠源CAR-T细胞与人源CAR-T细胞在体内存活时间不同,小鼠免疫系统与人免疫系统也存在较大差异,小鼠体内的CRS往往与人体内的CRS在细胞因子种类、反应时间、达峰时间等方面都有所不同,且同源小鼠品系不同,毒性反应也有所不同。

3.1.3 转基因小鼠模型 与同源小鼠模型相比,转基因小鼠模型同样具有完整的免疫系统,研究对象细胞也为鼠源细胞,而转基因小鼠模型表达人TAA,可进行CAR-T细胞的概念验证研究(POC),但由于种属差异性的存在,其无法直接反映人源CAR-T细胞的安全性。此外,表达相同的肿瘤抗原但是小鼠品系不同其研究结果也会有所差异,如BALB/c小鼠高表达Rae-1蛋白以及pan-NKG2D-配体,BALB/c小鼠的T细胞体外功能性比C57BL/6 T细胞更高,当给予抗NKG2D的CAR-T细胞治疗后比C57BL/6小鼠毒性更明显^[39]。除转入人TAA基因外,还可将转基因技术用于小鼠免疫系统的构建中。有研究将人CD34⁺造血干细胞/造血祖细胞(HPSCs)移植入表达人干细胞因子、GM-CSF、IL-3三重转基因NSG小鼠中,与人源化的NSG小鼠相比免疫重建更快,具有更多的单核细胞和淋巴

细胞^[25]。

3.1.4 人源化小鼠模型 通过向免疫缺陷鼠移植人类免疫细胞重建免疫系统可获得人源化小鼠模型,该模型移植人源肿瘤,给予人源CAR-T细胞,在一定程度上具有人类免疫系统。HSPCs常用于构建人源化小鼠,在给予NSG小鼠CAR-T前移植HSPC细胞可再生髓细胞和淋巴细胞,然而由于缺乏胸腺,T细胞的发育并不完整。总之,与其他小鼠模型相比,人源化小鼠模型可能提供与临床更相似的环境,能反映肿瘤的异质性,可更好地观察临床疗效,且在一定程度上模拟人体内CRS的反应^[40]。

3.1.5 非人灵长类动物模型 非人灵长类动物模型也会用于CAR-T细胞的临床前实验中,由于灵长类动物与人的高度同源性,其能更好地模拟CAR-T细胞在人体内的药动学、药效学、毒理学过程,在评价免疫相关毒性和临床潜在致命毒性方面更具临床相关性。但是其仍具有一些伦理及成本上的局限性,而且也不能完全模拟人体内CRS的发生发展,例如TGN1412失败案例。研究表明食蟹猴/恒河猴的CD4⁺效应记忆T细胞都缺乏CD28表达可能是TGN1412未能预测CRS的主要原因^[41]。

目前为止,没有一种动物模型能完美地模拟人体免疫系统与肿瘤微环境,动物与人体内CRS在细胞因子种类、达峰时间、严重程度等方面均存在不同程度的差异。临床前用于预测CRS的体内模型无论是啮齿类动物或非人灵长类动物的应用价值都很小。

3.2 体外模型

根据CDE于2021年颁布的《药物免疫原性研究技术指导原则》中指出,可采用人全血或人外周血单个核细胞体外评价细胞活化和细胞因子的释放,可在一定程度上模拟人体免疫激发过程。当体内试验结果为阴性时,体外试验阳性结果可以提示潜在临床安全风险。CRA是在充分考虑药物靶点和作用机制的基础上,在体外评估候选药物诱发细胞因子释放的风险,是临床前安全性评价的重要组成部分。

然而,目前临床前缺乏成熟的用于体外评价CAR-T细胞治疗产品诱导CRS的细胞模型。人源细胞模型缺少体内内环境的调控,所得结果不能完全反映药物的在体情况和其实际疗效,但人源细胞模型避免了动物模型的种属差异性问题,在一定程度上弥补了因种属差异导致的动物模型无法完全模拟人体免疫激发过程的缺陷,且影响因素可人为

控制,开发此类模型对于CAR-T新兴产品的临床转化应用具有重要意义。有研究建立了“巨噬细胞-CAR-T细胞-肿瘤细胞”细胞模型模拟CAR-T细胞诱导细胞因子释放,将巨噬细胞加入CAR-T细胞与肿瘤细胞共培养体系,或暴露于共培养体系的上清液中,都能使巨噬细胞活化并产生CRS相关细胞因子。给予IFN- γ 抗体或敲除CAR-T细胞IFN- γ ,巨噬细胞活化减弱。该模型可在一定程度上模拟人体内CRS的产生,评估阻断一种或多种细胞因子对CRS的影响^[42]。

除细胞模型以外,一些动力学模型及数学模型在CRS预测中也发挥了重要作用。研究者构建量化9种细胞因子的模型,通过敏感性分析、蒙特卡罗模拟、主成分分析研究细胞因子的变化,预测细胞因子阻断剂的作用。在双特异性抗体的CRS研究中研究者将对细胞因子释放的描述转为对T细胞CD3-双特异性抗体-肿瘤细胞抗原3分子突触的描述,同时结合不同肿瘤类型对药物的CRS风险进行评估^[43-44]。

此外,有研究建立了胶质细胞瘤类器官,不同于传统的类器官培养方法,研究者剪切新鲜胶质瘤,获得微小团块进行培养,可短时间获得胶质细胞瘤类器官,通过与CAR-T细胞共培养能快速反映CAR-T细胞的治疗效果,或可进行细胞因子检测来预测CRS^[45]。而且不同于传统的2D细胞模型,类器官具有复杂的结构,更接近正常机体的细胞组成和行为,为免疫细胞提供生理屏障,其毒性研究更具临床指导意义。

4 结语

CAR-T细胞治疗产品是目前癌症治疗领域的研究热点之一,极大地改变了肿瘤的治疗前景,尤其是CAR-T细胞治疗产品在血液系统肿瘤的治疗上已取得重大成功,但在临床试验中表现出严重的毒性作用如CRS。因此全球各国不断改进或完善相关指导原则及要求,研究人员也从各方面对其进行改进,如改进CAR结构、设计安全开关、改进给药剂量等以减轻靶向瘤内毒性。CAR-T细胞治疗产品在临床前必须根据ICH S6、ICH S8、《药物免疫原性研究技术指导原则》等指导原则对药物诱发CRS的风险进行严格评估。目前用于评价CAR-T细胞的CRS风险主要为体内模型,包括异种移植免疫缺陷小鼠模型、同源小鼠模型、转基因小鼠模型、人源化小鼠模型和非人灵长类动物模型。但由于种属差异性,动物模型不能完全模拟人体内CRS反应过

程,且不同动物模型的选择也存在挑战。体外CRA是评估CRS的重要方法,但目前缺乏成熟的体外细胞模型用于CAR-T细胞治疗产品不良反应的预测。CAR-T细胞结构、肿瘤负荷及类型、CAR-T细胞剂量、免疫耗竭等方面的不同也会造成CRS的差异,选择合适的临床前评价CRS模型,将体内、体外试验结合阐明毒性反应特征,预测人体可能出现的不良反应,并确定不良反应的临床检测指标,为制定临床风险措施提供参考依据,也为临床试验给药途径、给药剂量的选择提供科学保障。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Haslauer T, Greil R, Zaborsky N, et al. CAR T-Cell therapy in hematological malignancies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16). doi: 10.3390/ijms22168996.
- [2] Lu J, Jiang G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 194. doi: 10.1186/s12943-022-01663-0.
- [3] Xu X J, Tang Y M. Cytokine release syndrome in cancer immunotherapy with chimeric antigen receptor engineered T cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(2): 172-178.
- [4] Lee D W, Gardner R, Porter D L, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome [J]. *Blood*, 2014, 124(2): 188-195.
- [5] Hay K A. Cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19 chimeric antigen receptor-modified (CAR-) T cell therapy [J]. *Br J Haematol*, 2018, 183(3): 364-374.
- [6] Goodyear M. Learning from the TGN1412 trial [J]. *BMJ*, 2006, 332(7543): 677-678.
- [7] Chou C K, Turtle C J. Insight into mechanisms associated with cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19 CAR-T cell immunotherapy [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 54(Suppl 2): 780-784.
- [8] Maude S L, Laetsch T W, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5): 439-448.
- [9] Schuster S J, Maziarz R T, Rusch E S, et al. Grading and management of cytokine release syndrome in patients treated with tisagenlecleucel in the JULIET trial [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(7): 1432-1439.
- [10] Westin J R, Kersten M J, Salles G, et al. Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T cell therapies in patients with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: Observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials [J]. *Am J Hematol*, 2021, 96(10): 1295-1312.
- [11] Neelapu S S, Locke F L, Bartlett N L, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-Cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2531-2544.
- [12] 国家卫健委. 生物医学新技术临床应用管理条例(征求意见稿) [EB/OL]. (2019-02-26) [2022-11-10]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/201902/0f24ddc242c24212abc42aa8b539584d.shtml>.
National Health Commission of the People's Republic of China. Regulations on Clinical Application of New biomedical Technology (exposure draft) [EB/OL]. (2019-02-26) [2022-11-10]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/201902/0f24ddc242c24212abc42aa8b539584d.shtml>.
- [13] 国家卫健委. 体细胞治疗临床研究和转化应用管理办法(试行)(征求意见稿) [EB/OL]. (2019-03-29) [2022-11-10]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/pqt/201903/01134dee9c5a4661a0b5351bd8a04822.shtml>.
National Health Commission of the People's Republic of China. Measures for the Administration of Clinical Research, Transformation and Application of Somatic Cell Therapy (to try out) (exposure draft) [EB/OL]. (2019-03-29) [2022-11-10]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/pqt/201903/01134dee9c5a4661a0b5351bd8a04822.shtml>.
- [14] 国家药品监督管理局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导 [EB/OL]. (2017-12-22) [2022-11-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20171222145101557.html>.
National Medical Products Administration. Technical guidance for research and evaluation of cell therapy products. [EB/OL]. (2017-12-22) [2022-11-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/xxgk/ggtg/qtggtg/20171222145101557.html>.
- [15] 国家药品审评审批中心. 药物免疫原性研究技术指导原则. [EB/OL]. (2021-03-29) [2022-11-10]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/a0908879d6c54c7318f0881611b51122>.
Center for Drug Evaluation, NMPA. Technical guidelines for drug immunogenicity research [EB/OL]. (2021-03-29) [2022-11-10]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/a0908879d6c54c7318f0881611b51122>.
- [16] 孟淑芳, 霍艳, 候田田, 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): 829-852.
Meng S F, Huo Y, Hou T Tet al. Study on quality control of CAR T cell therapy products and considerations in non-clinical studies [J]. *J Chin Med*, 2018, 32(6): 829-852.
- [17] United States Congress. Public Health Service Act [EB/

- OL]. (1944-06) [2022-11-10]. https://www.williams.law.cornell.edu/topn/public_health_service_act.
- [18] European Parliament and Council. Directive 2001/83/EC [EB/OL]. (2001-11) [2022-11-10]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32001L0083>.
- [19] European Parliament and Council. Regulation (EC) No 1394/2007 [EB/OL]. (2007-11) [2022-11-10]. <https://www.legislation.gov.uk/eur/2007/1394/chapter/2>.
- [20] US Food And Drug Administration. Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products [EB/OL]. (2013-11) [2022-11-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/preclinical-assessment-investigational-cellular-and-gene-therapy-products>.
- [21] US Food And Drug Administration. Considerations for the Development of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Products [EB/OL]. (2022-03) [2022-11-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-development-chimeric-antigen-receptor-car-t-cell-products>.
- [22] European Medicines Agency. Guideline on human cell-based medicinal products [EB/OL]. (2008-03) [2022-11-10]. <https://www.ema.europa.eu/en/human-cell-based-medicinal-products-scientific-guideline>.
- [23] European Medicines Agency. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells [EB/OL]. (2020-11) [2022-11-10]. <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified-cells>.
- [24] Giavridis T, Van Der Stegen S J C, Eyquem J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 731-738.
- [25] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739-748.
- [26] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm [J]. *Immunotherapy*, 2016, 8(8): 959-970.
- [27] Sachdeva M, Duchateau P, Depil S, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inactivation in CAR T-cells prevents monocyte-dependent release of key cytokine release syndrome mediators [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(14): 5430-5437.
- [28] Liu Y, Fang Y, Chen X, et al. Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome [J]. *Sci Immunol*, 2020, doi: 10.1126/sciimmunol.aax7969.
- [29] Zhou Z, He H, Wang K, et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells [J]. *Science*, 2020, doi: 10.1126/science.aaz7548.
- [30] Deng T, Tang C, Zhang G, et al. DAMPs released by pyroptotic cells as major contributors and therapeutic targets for CAR-T-related toxicities [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 129.
- [31] Hay K A, Hanafi L A, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy [J]. *Blood*, 2017, 130(21): 2295-2306.
- [32] Wang Z, Han W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy [J]. *Biomark Res*, 2018, doi: 10.1186/s40364-018-0116-0.
- [33] Siegler E L, Kenderian S S. Neurotoxicity and cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy: Insights into mechanisms and novel therapies [J]. *Front Immunol*, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01973.
- [34] Morgan R A, Yang J C, 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.
- [35] Turtle C J, Hay K A, Hanafi L A, et al. Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells after failure of ibrutinib [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(26): 3010-3020.
- [36] Diaconu I, Ballard B, Zhang M, et al. Inducible caspase-9 selectively modulates the toxicities of CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(3): 580-592.
- [37] Leclercq G, Haegel H, Schneider A, et al. Src/lck inhibitor dasatinib reversibly switches off cytokine release and T cell cytotoxicity following stimulation with T cell bispecific antibodies [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, doi: 10.1136/jitc-2021-002582.
- [38] Wei Y, Li C, Bian H, et al. Targeting CDK7 suppresses super enhancer-linked inflammatory genes and alleviates CAR T cell-induced cytokine release syndrome [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 5.
- [39] Vanseggen H, Hammill J A, Dvorkin-Gheva A, et al. T cells engineered with chimeric antigen receptors targeting NKG2D ligands display lethal toxicity in mice [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(10): 1600-1610.
- [40] Siegler E L, Wang P. Preclinical models in chimeric

- antigen receptor-engineered T-cell therapy [J]. Hum Gene Ther, 2018, 29(5): 534-546.
- [41] Eastwood D, Findlay L, Poole S, et al. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4⁺ effector memory T-cells [J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(3): 512-526.
- [42] Bailey S R, Vatsa S, Larson R C, et al. Blockade or deletion of IFN γ reduces macrophage activation without compromising CAR T-cell function in hematologic malignancies [J]. Blood Cancer Discov, 2022, 3(2): 136-153.
- [43] Yiu H H, Graham A L, Stengel R F. Dynamics of a cytokine storm [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e45027.
- [44] Chen X, Kamperschroer C, Wong G, et al. A modeling framework to characterize cytokine release upon T-cell-engaging bispecific antibody treatment: Methodology and opportunities [J]. Clin Transl Sci, 2019, 12(6): 600-608.
- [45] Jacob F, Salinas R D, Zhang D Y, et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity [J]. Cell, 2020, 180(1): 188-204.e122.

[责任编辑 李红珠]