

【临床前安全性评价方法学】

嵌合抗原受体-T细胞治疗产品临床前评价模型研究进展

李双星, 霍桂桃, 屈哲, 杨艳伟, 张頔, 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, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: 癌症的治疗一直被视为医学上最大的挑战, 近年来, 随着多种嵌合抗原受体-T细胞 (CAR-T) 治疗产品的获批上市, 为攻克癌症带来了新的希望。然而, 在临床应用中, CAR-T细胞治疗产品均存在一定的不良反应, 这提示CAR-T细胞治疗产品的临床前评价模型十分重要。目前, CAR-T细胞治疗产品的临床前评价模型主要包括体内评价模型和体外评价模型, 其中体内评价模型包括同源移植小鼠模型、基因工程小鼠模型、人源化小鼠模型、人源肿瘤异体移植模型及非人灵长类动物模型; 体外评价模型包括肿瘤类器官模型、器官芯片模型与人工智能预测模型。对各种评价模型的进展及优缺点进行综述, 以期对CAR-T细胞治疗产品的临床前评价提供参考。

关键词: 嵌合抗原受体T细胞; 临床前评价; 体内评价模型; 体外评价模型; 癌症

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 08-1669-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.001

Research progress on preclinical evaluation models of CAR-T cell therapy products

LI Shuangxing, HUO Guitao, QU Zhe, YANG Yanwei, ZHANG Di, LIN Zhi

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

Abstract: The treatment of cancer has always been regarded as the biggest challenge in medicine. In recent years, with the approval and launch of various chimeric antigen receptor T cell therapy (CAR-T) products, new hope has been brought to the research of overcoming cancer. However, in clinical practice, CAR-T cell therapy products have certain adverse reactions, which suggests that preclinical evaluation models of CAR-T cell therapy products is crucial. At present, the preclinical evaluation methods for CAR-T cell therapy products mainly include *in vivo* evaluation models and *in vitro* evaluation models. *In vivo* evaluation models include syngeneic mouse model, genetically engineered mouse models, humanized mouse models, patient-derived tumor xenograft models and non-human primate models. *In vitro* evaluation models include patients derived organoids models, human-on-a-chip models and artificial intelligence prediction. This article aims to review the progress and advantages and disadvantages of various evaluation methods to lay a theoretical and research foundation for preclinical evaluation of CAR-T cell therapy products.

Key words: chimeric antigen receptor T-cell; preclinical evaluation; *in vivo* evaluation models; *in vitro* evaluation models; cancer

据国家癌症中心发布的《2022年中国恶性肿瘤流行情况分析》数据显示, 2022年中国恶性肿瘤新发病例估计为482.47万, 发病率为208.58/10万, 其中血液肿瘤新发病例约为16.71万^[1]。然而, 全球每年只有极少数抗癌新药通过监管部门审批, 主要原因是绝大多数在临床前阶段表现良好的新药在临床上未能显示出足够的疗效和安全性。因此, 合理开发和应用抗肿瘤药物的临床前药效及安全性评

价模型尤为重要。

随着嵌合抗原受体 (CAR)-T细胞治疗产品的获批上市并取得较好的抗肿瘤临床疗效, 人们看到了攻克癌症特别是血液肿瘤的希望^[2]。CAR是由抗原识别结构域和T细胞激活结构域组成的融合蛋白。研究人员对T细胞进行基因修饰以表达CAR, 这些经过基因修饰的T细胞可靶向肿瘤细胞表面的特定抗原, 从而产生抗肿瘤免疫反应^[3-4]。自2017

收稿日期: 2024-05-26

第一作者: 李双星 (1995—), 男, 助理研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: lishuangxing@nifdc.org.cn

*通信作者: 林志 (1977—), 女, 研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: linzhi@nifdc.org.cn

年2月美国食品药品监督管理局(FDA)批准的首款CAR-T细胞治疗产品上市以来,截至2024年4月,全球共有11款CAR-T细胞治疗产品获批上市,国

内已有5款CAR-T细胞治疗产品获批(表1)。这些药物在治疗复发或难治性血液肿瘤方面展现出显著疗效,最佳总缓解率超过90%。

表1 国家药品监督管理局批准上市的CAR-T类细胞治疗产品

Table 1 CAR-T cell therapy products approved by the National Medical Products Administration for marketing

序号	产品名称	靶点	适应症	首次批准时间
1	阿基仑赛注射液	CD19	成人二线或以上系统性治疗后复发或难治性大B细胞淋巴瘤	2021年3月
2	瑞基奥仑赛注射液	CD19	儿童及年轻人复发或难治性B细胞急性淋巴细胞白血病	2021年9月
3	伊基奥仑赛注射液	BCMA	成人复发或难治性多发性骨髓瘤	2023年6月
4	纳基奥仑赛注射液	CD19	成人复发或难治性B细胞急性淋巴细胞白血病 (r/r B-ALL)	2023年11月
5	泽沃基奥仑赛注射液	BCMA	成人复发或难治性多发性骨髓瘤	2024年3月

尽管CAR-T细胞疗法已成为当前肿瘤治疗领域关注的热点,但其在临床治疗过程中产生的不良反应也不容忽视。目前,所有已批准上市的CAR-T细胞治疗产品都会引起不同程度的细胞因子释放综合征(CRS,三级发生率 $\geq 3.3\%$)、免疫效应细胞相关神经毒性综合征(三级发生率 $\geq 11\%$)等不良反应^[5-7]。2023年11月底,FDA公布了1项针对CAR-T细胞疗法继发性癌症风险的调查通知,源于FDA收到关于接受靶向BCMA或CD19自体CAR-T细胞治疗的患者出现T细胞恶性肿瘤(包括嵌合抗原受体CAR阳性淋巴瘤)的报告,截至2024年3月25日FDA已收到33例接受CAR-T细胞治疗后发生T细胞恶性肿瘤的报告^[8-9]。这些不良反应可能危及人类生命健康^[10]。因此针对CAR-T细胞治疗产品可能产生的风险,选择科学、可靠的抗肿瘤评价模型及评价方法具有重要意义。本文对CAR-T细胞治疗产品临床前评价模型的相关研究进展及各种模型的优缺点进行综述,以期为CAR-T细胞治疗产品临床安全用药及科学评价体系的建立提供一定参考。

1 动物体内评价模型

建立肿瘤动物模型能可靠地反映复杂的肿瘤微环境(TME),对于肿瘤及其微环境、遗传、生理和解剖学建模,会更可靠地反映肿瘤的形成和发展过程,这对CAR-T细胞疗法的开发大有益处。目前动物模型主要有同源移植小鼠模型、基因工程小鼠模型、人源化小鼠模型、人源肿瘤异体移植模型及非人灵长类动物模型。

1.1 同源移植小鼠模型

同源移植小鼠模型是将同种背景来源的肿瘤细胞系接种至免疫系统健全的近交系小鼠。小鼠拥有完整的鼠源免疫系统,具有完全的免疫活性,

且该免疫系统与同种移植肿瘤组织相容,可重复性好、造模时间短、有利于研究肿瘤微环境及肿瘤转移,缺点是移植的鼠源肿瘤组织无法真实反映人类免疫系统的情况等。研究抗肿瘤治疗(包括免疫治疗)常用的动物模型是将体外培养的肿瘤细胞,如胰腺癌细胞、肺癌细胞等自发性、致癌性或转基因肿瘤细胞系,移植到免疫功能相对正常的C57BL/6、BALB/c等小鼠品系中^[11-13]。这种模型的创建时间较短,皮下或静脉内移植的细胞几周内即可在动物体内迅速生长。免疫调节治疗通常是渐进式的,通过动物生存率、肿瘤体积或肿瘤分布等情况来评估最终疗效。然而,在同源移植小鼠模型中,由于肿瘤生长速度过快,导致没有充分的时间间隔来评估免疫治疗的有效性^[14]。此外,使用同源移植小鼠模型也无法有效评估免疫治疗药物在肿瘤发展早期的情况^[15]。

为了研究CAR-T细胞疗法在同源移植小鼠模型中的有效性,Siegler等^[16]使用了小鼠细胞来源的CAR-T细胞。小鼠模型能否确定CAR-T细胞的毒性取决于嵌合受体的剂量和共刺激结构域^[17]。在BALB/c小鼠淋巴瘤的同源移植小鼠模型中显示,第1代CAR-T细胞(无共刺激结构域)能够杀死淋巴瘤细胞而不引起不良反应^[18]。相反,具有CD28共刺激结构域的第2代CAR-T细胞则诱导B细胞再生障碍和慢性毒性,并伴有抑制细胞数量增加的风险,而在C3H或C57BL/6小鼠品系中产生的淋巴瘤模型中,尚未观察到上述毒性,这表明安全性评价的结果会因小鼠品系而不同^[19]。因此,在使用同源肿瘤模型进行安全性评价时,需考虑不同品系所带来的影响。

1.2 基因工程小鼠模型

基因工程小鼠模型(GEMM)通常使用转基因

技术生产,以在全身或特定组织中表达癌基因或缺失抑癌基因^[20-21]。这些转基因模型可进一步分为种系 GEMM 和非种系 GEMM^[22]。种系 GEMM 具有导致恶性肿瘤自发的突变。非种系 GEMM 可以使用各种系统在选定时间和特定组织中诱导体细胞突变。CRISPR/Cas9 基因编辑技术也被广泛用于癌基因的体细胞编辑,从而创建了肝癌、肺癌、乳腺癌的模型^[23-25]。

在研究 CAR-T 细胞治疗产品的有效性方面,相较于同源或患者来源的异种移植模型,转基因小鼠的使用较少。大多数情况下,小鼠经过基因改造以敲除小鼠肿瘤相关抗原(TAA)并表达人类 TAA,且肿瘤是同源的。这些研究使用了表达人 TAA 的小鼠 T 细胞。虽然大多数 TAA 在肿瘤和健康组织中均有表达,但在健康组织中表达水平较低,因此转基因小鼠可作为评估 CAR-T 细胞疗法的不良反映的重要模型^[26]。例如,将 C57BL/6 小鼠进行基因改造,使其在胃肠道和肺癌中过表达人癌胚抗原(CEA),尽管 CEA 不是肿瘤特异性的,它在健康的肠道和肺组织中也表达,在转基因小鼠中,用抗 CEA 的 CAR-T 细胞处理,虽然根除了肿瘤细胞,但导致抗 CEA 的 CAR-T 细胞在胃肠道和肺部严重浸润。相反,在野生型小鼠中,尽管健康组织有强烈的浸润,但未观察到自身免疫性炎症反应^[27]。

1.3 人源化小鼠模型

上述模型都是在由小鼠细胞组成的微环境中建立的小鼠肿瘤模型,使研究肿瘤形成的机制及其与肿瘤 TME 的相互作用成为可能。然而小鼠免疫系统与人类存在较大差异,这使得使用小鼠模型的评价结果与人体内的实际效果可能有较大差别。为了评估免疫治疗方法的安全性及有效性,需要使用能与人类免疫系统细胞相互作用的人类肿瘤模型^[28]。人源化小鼠模型的建立弥补了一些不足。该模型将人类细胞或基因移植到免疫缺陷小鼠体内,以模拟人类生物学特性。这些模型包括 Hu-PBMC (humanized-peripheral blood mononuclear cells)、Hu-HSC (humanized-hematopoietic stem cells) 和 Hu-BLT (humanized-bone marrow, liver, thymus) 等,它们分别通过不同的方式移植人类细胞到小鼠体内,以重建免疫系统^[29]。人源化小鼠模型不仅可用于设计创新的 CAR 构建体和开发新型 CAR-T 细胞疗法,还可用于评估其对疾病治疗的安全性和有效性。

Macioccia 等^[30]将人源 PBMCs 和 TRBC1+

Jurkat 细胞接种于 NSG 小鼠从而建立 Hu-PBMC 人源化小鼠模型,该模型在注射 TRBC1 CAR-T 细胞后,发现人源 T 细胞可以存活,证实了在 Jurkat 细胞消除过程中健康 T 细胞的持久性。Larson 等^[31]将人类脐带血注射进 NSG 小鼠以建立 Hu-HSC 人源化小鼠模型,将 CAR 修饰的 HSC 移植到新生 NSG 小鼠中,从而可以检测这些人源化小鼠血液中抗 CD19-CAR-T 细胞的情况,这可增强移植抗肿瘤活性。Jin 等^[32]使用人类胎儿胸腺细胞和 CD34⁺胎儿肝细胞输入 NSG 小鼠体内建立具有人类免疫系统功能和基因匹配(自体)Hu-BLT 人源化小鼠模型,该模型可为深入了解 CRS 的潜在治疗机制提供参考。因此在提高 CAR-T 细胞安全性和降低耐药性等方面,人源化小鼠模型具有重要价值。

1.4 人源肿瘤异体移植模型

人源肿瘤异体移植(PDX)模型是一种将人源肿瘤组织或患者来源的原代细胞植入免疫缺陷鼠体内,经传代培养后形成的体内肿瘤模型。该模型保留了原发肿瘤的基因组异质性、肿瘤结构和微环境因素,在评估治疗效果方面具有重要价值^[33]。

在 CAR-T 细胞治疗过程中 CRS 是其常见的毒性之一^[34]。为了模拟 CRS 生理病理学过程,提高 CAR-T 疗法的安全性和毒性评价能力,研究者将模拟患者体内微环境的小鼠 PDX 模型用来评价这种常见的不良反应,该小鼠模型为 6~8 周龄雌性 SCID-beige 小鼠,在其腹膜内注射 300 万个 Raji-GFP-Fluc 细胞和肿瘤细胞后形成 CRS 小鼠模型^[35]。该模型在混有人血清的 CAR-T 细胞输注后 2~3 d 内发生可能致命的 CRS,且对白细胞介素-6(IL-6)受体阻断有反应,研究者以此模型发现其 CRS 严重程度不是由 CAR-T 细胞衍生的细胞因子介导的,而是由受体巨噬细胞产生的 IL-6、IL-1 和一氧化氮介导的,这使得新的干预 CRS 治疗方法成为可能^[35]。同种异体 BCMA CAR-T 在加入人细胞因子 IL-7、IL-15 的 NSG 小鼠中可观察到持续的抗肿瘤反应,且在放大生产后保持了它们的表型和效力^[36]。

Porter 等^[37]在前列腺癌 PDX 模型中评估 Lewis Y(LeY)抗原特异性 CAR-T 细胞疗效。在体外模型中,LeY CAR-T 细胞可以直接杀死来源于 PDX 的雄激素受体阳性或阴性类器官。在体内模型中,单独使用 LeY CAR-T 细胞并不会抑制肿瘤的生长,但是辅以卡波铂便可以减少肿瘤负荷。因为卡波铂不仅可对 TME 产生促炎作用以募集 CAR-T 浸润肿瘤,还可以改变癌症相关成纤维细胞表型、增强细

胞外基质降解、重定向分化M1巨噬细胞。这些发现表明卡波铂可通过对TME调节来增强CAR-T细胞治疗的疗效。Zhu等^[38]根据肿瘤组织缺氧的特征设计出受缺氧响应元件调控的CAR,可在肿瘤缺氧微环境中被激活,并诱导出具有多功能性的CAR-T细胞。在患者来源的异种移植模型中,较之传统的CAR-T产品,低氧反应的CAR-T细胞展现了更持久的抗肿瘤活性。Sliver等^[39]以CD70为CAR-T靶标,因CD70在实体瘤肾细胞癌中高表达,特异性CAR-T在患者来源的异种移植小鼠模型中显示出强大的抗肿瘤活性。

1.5 非人灵长类动物模型

非人灵长类动物(通常指恒河猴和食蟹猴)与人类有着广泛的相似之处,包括生理学、遗传同源性以及重要的免疫细胞群、免疫调节机制和癌症免疫治疗的蛋白质靶点,且非人灵长类会自然发生结肠癌和乳腺癌等癌症,其发病率、病理特征和年龄模式与人类相当。因此,这些非人灵长类动物模型被广泛地应用于各种癌症模型中,缩小临床前癌症动物模型和人类癌症患者之间的实验结果差距^[40]。

在一项研究中,敲除恒河猴正常造血干细胞CD33基因后再移植,结果发现在猴体内CD33敲除细胞可长期多系谱植入并且表现出正常的髓系功能,且不受其靶向CAR-T细胞的影响,从而有效治疗白血病而不产生骨髓毒性,这项研究表明,可通过对供体进行基因工程改造来避免靶向、非肿瘤毒性,非人灵长类模型在该项研究的评价中起了决定性的作用^[41]。在另1项研究中,为了确定正常细胞低水平ROR1表达是否会对CAR-T细胞存活、功能产生不利影响,研究者将自体ROR1 CAR-T细胞转移到非人灵长类动物中,结果表明,ROR1 CAR-T细胞不会对正常器官造成明显的毒性,而是在ROR1阳性B细胞的骨髓和淋巴结部位积累^[42]。这些研究证明了非人灵长类动物在评估免疫治疗的安全性方面的效用,且基因改造后的T细胞对人类和非人灵长类动物之间同源的肿瘤相关分子具有特异性。

2 体外细胞评价模型

科学家们通常使用商品化细胞系或原代细胞进行二维(2D)或三维(3D)细胞培养来进行癌症及干细胞研究、药物筛选和评价^[43]。

由于2D细胞模型存在诸多局限性,因此体外细胞评价模型已转向使用3D细胞模型,借助该模

型,可以更准确地复制细胞生存的环境,从而更好地模拟体内条件^[44-46]。基于3D细胞培养技术的支持,肿瘤类器官模型、器官芯片模型及3D生物打印模型等应运而生。

2.1 肿瘤类器官评价模型

肿瘤类器官模型(PDOs)可以更完整地保留原发性肿瘤组织特征,从而可以在体外真实模拟肿瘤与CAR-T细胞之间的相互作用^[28]。

球状体是在3D悬浮中生长的细胞聚集体,能够在一定程度上复制其来源组织的结构和新陈代谢的能力。它们可以再现缺氧(氧积累)、营养梯度(葡萄糖分布)、坏死/凋亡核心、乳酸积累和ATP分布,这是经典的2D培养无法实现的^[47]。球状体模型可用于免疫疗法的测试,特别是提高评估治疗性抗体和药物筛选的效率,以增强免疫细胞浸润和对球状体靶标的抗肿瘤作用。Yu等^[48]将膀胱癌患者的肿瘤细胞经过处理后重悬于基质胶中形成膀胱癌类器官,基于膀胱癌细胞表面抗原制备了靶向MUC1(Mucin-1)的第2代CAR-T细胞,与膀胱癌类器官共培养后发现特异性免疫细胞毒性仅发生在MUC1⁺类器官中。Jacob等^[49]从人类患者切除的肿瘤组织中取样,经过处理后培养形成3D球状体肿瘤类器官,将该类器官与CAR-T细胞共培养,结果显示T细胞增殖并侵入肿瘤类器官中,并可检测到靶抗原消失及免疫反应增加。Zhang等^[50]使用胃癌和卵巢癌3D球状体肿瘤模型测试了靶向间皮素膜近端表位的修饰CAR-T细胞,结果显示CAR-T细胞抗肿瘤反应增强。

2.2 器官芯片评价模型

肿瘤类器官培养模型能够较为全面地呈现来源组织的结构和功能,并考虑到微环境的影响。然而,这些模型仍然缺乏体内环境动力学方面的研究。为了更好地模拟肿瘤组织在体内和体外器官的局部环境,Sontheimer-Phelps等^[51]开发了一种用于类器官培养的微流控3D培养方法,即器官芯片。该技术不仅保持了肿瘤微环境,而且通过微流控技术重建了器官错综复杂的3D组织结构,可以实现高通量药物筛选,极大地提升了药物评价的效率。Ando等^[52]利用可紫外线交联的甲基丙烯酰水凝胶来生成具有一定强度和孔隙率的细胞外基质,并利用以此为载体的微流体芯片评估CAR-T细胞对嵌入水凝胶中癌细胞的细胞毒性。Lu等^[53]设计的一种新型的GPC3靶向CAR-T细胞,其细胞杀伤功效在采用3D微流体芯片的肝细胞肿瘤类器官模型中

得到证实。目前肿瘤类器官评价的缺点主要体现在尚无法完全再现肿瘤在体内的生理活动。因此未来研究重点在于肿瘤细胞类器官与血管、神经等类器官的混合培养,进一步还原肿瘤的生长环境。随着培养条件及监测系统相关研究的深入,更完善的肿瘤类器官芯片有助于精确医学的发展,为CAR-T临床前评价提供更全面的支撑。

2.3 3D生物打印评价模型

过去几十年来,随着3D生物打印技术的巨大发展,3D细胞培养与3D生物打印的有机结合使得体外评估CAR-T等细胞疗法的方法得到了创新^[54-55]。3D细胞培养,是指将细胞与具有3D结构的支架材料共同培养,使细胞能够在3D空间生长、增殖和迁移,构成细胞-细胞或细胞-载体的3D复合物,从而更好地模拟细胞在体内的生长环境。3D培养模型可生成具有基底极和顶极的细胞极化,诱导基因组和蛋白质改变^[56-58],基于3D生物打印技术与3D细胞培养的立体光刻技术将高分辨率与高通量打印相结合,能够精确复刻出具有高度重复性的天然组织^[59]。这种基于喷墨、微挤出和激光技术的生物打印模型,为更深入地了解癌症病理学、抗癌药物筛选和癌症治疗提供了一个平台^[60]。Grunewald等^[61]提出了一种高度可重复的生物打印3D肿瘤模型,用于研究通过黏附分子L1CAM靶向神经母细胞瘤的CAR-T细胞。结果显示,生物打印的3D神经母细胞瘤模型具有高度可重复性,能够检测和定量CAR-T细胞肿瘤浸润,表明3D生物打印模型可作为CAR-T细胞治疗产品临床前药效学评价分析工具。3D生物打印方法能够精确放置肿瘤和免疫细胞,在为癌症免疫治疗生成有价值的临床前模型方面显示出巨大的潜力^[62]。生物打印技术的进步对于未来建立更多生理相关的模型来研究肿瘤免疫相互作用至关重要^[63]。

3 体外人工智能(AI)预测评价模型

AI通常指利用大数据和算法,在极少人工干预的情况下做出解决复杂问题决策的模型,主要包括机器学习(ML)和深度学习(DL)。ML致力于通过不断计算来提高系统的性能。常见的ML算法包括随机森林(RF)、支持向量机、最小绝对收缩和选择算子回归以及许多其他算法。DL是ML最重要的分支之一,常见的DL算法包括卷积神经网络、自编码器、生成式对抗网络等^[64]。AI技术加速了精准医疗的应用,特别是在预测治疗反应和患者预后方面。在肿瘤治疗过程中,多种生物活动以复杂的方

式受到调节,包括肿瘤抗原的呈递、效应T细胞的激活、T细胞的肿瘤浸润以及T细胞介导的肿瘤细胞清除^[65-66]。基于AI的工具提供了一种替代临床治疗评估策略,可以表征癌症患者的免疫特征,并以非侵入性方式预测患者对免疫治疗的反应,从而预测治疗方案的可行性^[67-68]。

AI已被用于预测CAR-T细胞治疗的反应。Daniels等^[69]开发了一种DL模型,利用信号基序来评估特定CAR的抗肿瘤功效。在DL框架中输入CAR的基序序列,并通过2个卷积神经网络层、1个长短期记忆网络层和7个全连接神经网络层来传播编码序列。该方法可以直接预测肿瘤干性和细胞毒性。Qiu等^[70]基于AI的CAR-T设计平台,为通过调控CAR-T细胞基底信号强度提高其抗肿瘤功效提供了新策略。

目前,由于CAR-T治疗的数据有限,而这种数据稀缺性对开发ML模型产生了重大障碍,特别是对需要大量训练数据以避免过度拟合和增强模型性能的DL模型。为了减轻这些限制,生成虚拟数据库已成为一种潜在的解决方案,最先进的生成模型,如生成式对抗网络等^[71],以合成数据来补充训练数据集,从而缓解过度拟合问题。

4 结语及展望

据统计预测,我国细胞治疗市场预计将从2021年的33亿元增长至2030年的584亿元,复合年均增长率高达53%。在技术、政策、市场等多重因素的综合推动下,细胞治疗有望成为临床上的主流治疗手段。目前对于细胞治疗产品的监管,在全球范围内尚未形成统一协调、完善的监管体系。我国对细胞治疗产品也按照药品或医疗技术实行“双轨制”监管,细胞类药物是用于人体的“活”的药物,其在伦理审查、生产工艺、检定指标、审评审批、医疗保险及支付方式等方面很难形成统一的标准。

CAR-T细胞治疗是目前受关注度最高的细胞治疗产品。因此对于CAR-T细胞治疗产品的临床前评价方式的开发至关重要。同源移植小鼠模型、基因工程小鼠、人源化小鼠及人源肿瘤异体移植小鼠模型是CAR-T细胞治疗产品临床前评估的良好模型,然而,这些模型也具有不容忽视的缺点(图1、表2)。

同源移植小鼠模型中,CAR-T细胞必须来自小鼠细胞,导致研究结果往往无法在临床试验中重复。基因工程小鼠模型的构建是一个非常耗时且昂贵的过程,并且以小鼠细胞为主的TME对小鼠肿

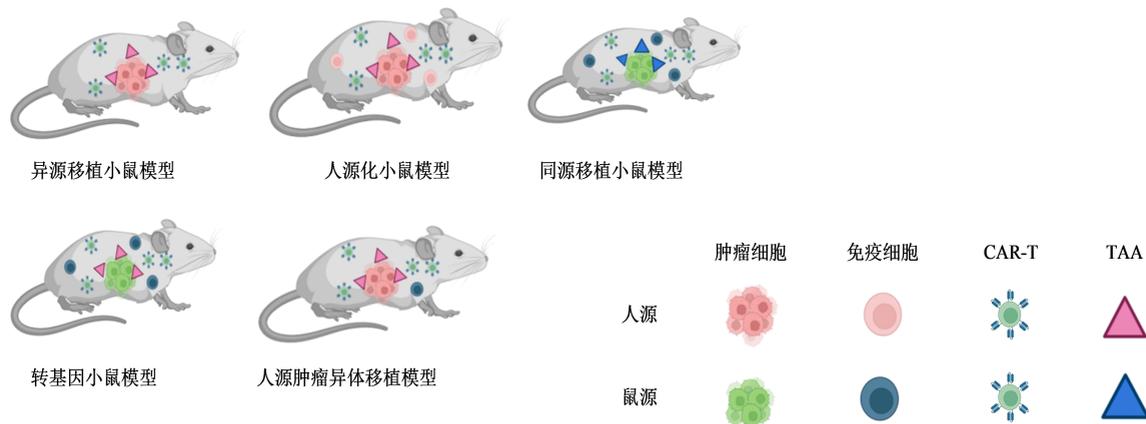


图1 CAR-T细胞治疗产品小鼠体内评价模型

Fig. 1 *In vivo* evaluation model for CAR-T cell therapy products in mice

表2 CAR-T产品小鼠体内评价模型优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of *in vivo* evaluation model for CAR-T cell therapy products in mice

模型	优点	缺点
异源移植小鼠模型	表达相关人源肿瘤TAA,可用于验证人源CAR-T产品的PoC研究(研究各类CAR的有效性及其靶向性)	缺乏人体免疫系统,无法实现靶向非肿瘤效应
人源化小鼠模型	重组的人源免疫系统与人源靶细胞相互作用,可模拟TME或潜在的脱靶效应	在小鼠身上建立的人类免疫系统是不完整的;缺乏人体基质细胞;人源化小鼠模型仍处于初级阶段,进行的研究项目有限
同源移植小鼠模型	完整的小鼠免疫系统有助于检测免疫应答且具有评估安全性的潜力(靶向肿瘤外)	小鼠生物学和免疫系统与人类不同,因此可转化性有限
转基因小鼠模型	用于研究人源TAA,同时保留宿主免疫系统和瘤外效应	不适用于所有正在研究中的TAA,且所有细胞都是鼠源
人源肿瘤异体移植模型	保留了原发肿瘤的基因组异质性、肿瘤结构和微环境因素	样本获取难度大、建模周期长、伦理审批严格

瘤免疫治疗的评估结果好坏参半,因此其在CAR-T细胞治疗产品评价中的应用有限。人骨髓干细胞在人源化小鼠体内发育成免疫细胞的能力有限,并且PBMC的植入可能性也有限,因此,人源化小鼠分泌的细胞因子和生长因子与人体内具有差异,使得在此TME下评价CAR-T细胞治疗产品的结果不完全可信。人源肿瘤异体移植模型造模样本获取难度大、建模周期长、伦理审批严格,亦不能完全模拟肿瘤生长微环境。虽然非人灵长类动物模型与人体较相近,但也存在人源肿瘤无法移植、成本较高且样本量较小等缺陷。随着分子生物学及基因工程技术的发展,动物模型仍有继续改进的空间。由于原发性肿瘤组织的生物学特性对于实体瘤CAR-T疗法的评价研究至关重要,所以与CAR-T疗法研究常用的其他临床前模型相比,3D细胞培养技

术具有其高通量、周期短、易重复等优势,但其依旧无法完全模拟人体内环境,基于微流控技术的融合肿瘤类器官芯片的发展,可能是未来体外模型的研究方向,但是部分肿瘤类器官的可持续培养是一大难题,不同肿瘤需求的生长因子的类型及肿瘤微环境的完整复制可能还需要生物力学等学科的交叉互补。AI预测模型尚处于发展初期,后续的发展需要临床及实验室数据的积累与技术的迭代革新。此外,未来基于合成免疫学技术研发的CAR-T细胞治疗产品,可能成为一个新的研究方向。CAR-T细胞治疗产品在研究火热的当下可选择的临床前评价方式各有其优缺点,所以临床前评价应采取多种方式相互组合互补。在研究不断深入与技术不断革新的浪潮下,CAR-T细胞治疗产品临床前评价模型也会朝着更加完善、更加标准的方向跃进。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng R, Chen R, Han B, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *Chin J Oncol*, 2024, 46(3): 221-231.
- [2] First-ever CAR T-cell therapy approved in U. S [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(10): OF1.
- [3] Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering [J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 423-431.
- [4] Kochenderfer J N, Rosenberg S A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(5): 267-276.
- [5] Tasian S K, Gardner R A. CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: A promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) [J]. *Ther Adv Hematol*, 2015, 6(5): 228-241.
- [6] Brudno J N, Kochenderfer J N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management [J]. *Blood Rev*, 2019, 34: 45-55.
- [7] 毛奕文, 黄丽红, 阮海涛, 等. 血液恶性肿瘤 CAR-T 治疗后患者报告结局的范围综述 [J]. *护理学杂志*, 2023, 38(24): 99-104.
Mao Y W, Huang L H, Ruan H T, et al. Self-reported outcomes in patients with hematological malignancies undergoing CAR-T therapy: A scoping review [J]. *J Nurs Sci*, 2023, 38(24): 99-104.
- [8] Verdun N, Marks P. Secondary cancers after chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390(7): 584-586.
- [9] Willyard C. Do cutting-edge CAR-T-cell therapies cause cancer? What the data say [J]. *Nature*, 2024, 629(8010): 22-24.
- [10] Miao L L, Zhang Z C, Ren Z J, et al. Reactions related to CAR-T cell therapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 663201.
- [11] Jiang F, Zhou X M. A model of orthotopic murine bladder (MBT-2) tumor implants [J]. *Urol Res*, 1997, 25(3): 179-182.
- [12] Partecke L I, Sendler M, Kaeding A, et al. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines [J]. *Eur Surg Res*, 2011, 47(2): 98-107.
- [13] Zhu H, Kauffman M E, Trush M A, et al. A simple bioluminescence imaging method for studying cancer cell growth and metastasis after subcutaneous injection of lewis lung carcinoma cells in syngeneic C57BL/6 mice [J]. *React Oxyg Species*, 2018, 5(14): 118-125.
- [14] Olson B, Li Y D, Lin Y, et al. Mouse models for cancer immunotherapy research [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(11): 1358-1365.
- [15] Gulley J L, Drake C G. Immunotherapy for prostate cancer: Recent advances, lessons learned, and areas for further research [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(12): 3884-3891.
- [16] Siegler E L, Wang P. Preclinical models in chimeric antigen receptor-engineered T-cell therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(5): 534-546.
- [17] Sanmamed M F, Chester C, Melero I, et al. Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(7): 1190-1198.
- [18] Cheadle E J, Hawkins R E, Batha H, et al. Natural expression of the CD19 antigen impacts the long-term engraftment but not antitumor activity of CD19-specific engineered T cells [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1885-1896.
- [19] Cheadle E J, Sheard V, Rothwell D G, et al. Differential role of Th1 and Th2 cytokines in autotoxicity driven by CD19-specific second-generation chimeric antigen receptor T cells in a mouse model [J]. *J Immunol*, 2014, 192(8): 3654-3665.
- [20] Sinn E, Muller W, Pattengale P, et al. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: Synergistic action of oncogenes *in vivo* [J]. *Cell*, 1987, 49(4): 465-475.
- [21] Chen Z B, Trotman L C, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis [J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 725-730.
- [22] Heyer J, Kwong L N, Lowe S W, et al. Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(7): 470-480.
- [23] Bu W, Creighton C J, Heavener K S, et al. Efficient cancer modeling through CRISPR-Cas9/HDR-based somatic precision gene editing in mice [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(19): eade0059.
- [24] Weber J, Öllinger R, Friedrich M, et al. CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(45): 13982-13987.
- [25] Platt R J, Chen S D, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159(2): 440-455.
- [26] Pennell C A, Barnum J L, McDonald-Hyman C S, et al. Human CD19-targeted mouse T cells induce B cell

- aplasia and toxicity in human CD19 transgenic mice [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(6): 1423-1434.
- [27] Chmielewski M, Hahn O, Rappl G, et al. T cells that target carcinoembryonic antigen eradicate orthotopic pancreatic carcinomas without inducing autoimmune colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4): 1095-1107.e2.
- [28] Xu H Y, Jia Z Q, Liu F S, et al. Biomarkers and experimental models for cancer immunology investigation [J]. *MedComm*, 2023, 4(6): e437.
- [29] Chuprin J, Buettner H, Seedhom M O, et al. Humanized mouse models for immuno-oncology research [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(3): 192-206.
- [30] Maciocia P M, Wawrzyniecka P A, Philip B, et al. Targeting the T cell receptor β -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1416-1423.
- [31] Larson S M, Truscott L C, Chiou T T, et al. Pre-clinical development of gene modification of haematopoietic stem cells with chimeric antigen receptors for cancer immunotherapy [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(5): 1094-1104.
- [32] Jin C H, Xia J X, Rafiq S, et al. Modeling anti-CD19 CAR T cell therapy in humanized mice with human immunity and autologous leukemia [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39: 173-181.
- [33] Hidalgo M, Amant F, Biankin A V, et al. Patient-derived xenograft models: An emerging platform for translational cancer research [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(9): 998-1013.
- [34] 傅盈双, 李双星, 李路路, 等. CAR-T治疗诱导细胞因子释放综合征的机制及临床前安全性评价 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 469-477.
- FU Y S, LI S X, LI L L, et al. Mechanism and preclinical safety evaluation of cytokines release syndrome induced by CAR-T cell therapy [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(3): 469-477.
- [35] 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.
- [36] Sommer C, Boldajipour B, Kuo T C, et al. Preclinical evaluation of allogeneic CAR T cells targeting BCMA for the treatment of multiple myeloma [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(6): 1126-1138.
- [37] Porter L H, Zhu J J, Lister N L, et al. Low-dose carboplatin modifies the tumor microenvironment to augment CAR T cell efficacy in human prostate cancer models [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5346.
- [38] Zhu X X, Chen J, Li W L, et al. Hypoxia-responsive CAR-T cells exhibit reduced exhaustion and enhanced efficacy in solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(1): 84-100.
- [39] Panowski S H, Srinivasan S, Tan N, et al. Preclinical development and evaluation of allogeneic CAR T cells targeting CD70 for the treatment of renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(14): 2610-2624.
- [40] Deyemar S, Gomes B, Charo J, et al. Spontaneous, naturally occurring cancers in non-human Primates as a translational model for cancer immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(1): e005514.
- [41] Kim M Y, Yu K R, Kenderian S S, et al. Genetic inactivation of CD33 in hematopoietic stem cells to enable CAR T cell immunotherapy for acute myeloid leukemia [J]. *Cell*, 2018, 173(6): 1439-1453.e19.
- [42] Berger C, Sommermeyer D, Hudecek M, et al. Safety of targeting ROR1 in Primates with chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2): 206-216.
- [43] Huniadi M, Nosálová N, Almášiová V, et al. Three-dimensional cultivation a valuable tool for modelling canine mammary gland tumour behaviour *in vitro* [J]. *Cells*, 2024, 13(8): 695.
- [44] Cox M C, Reese L M, Bickford L R, et al. Toward the broad adoption of 3D tumor models in the cancer drug pipeline [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2015, 1(10): 877-894.
- [45] Ravi M, Paramesh V, Kaviya S R, et al. 3D cell culture systems: Advantages and applications [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 16-26.
- [46] Ferreira L P, Gaspar V M, Mano J F. Design of spherically structured 3D *in vitro* tumor models-advances and prospects [J]. *Acta Biomater*, 2018, 75: 11-34.
- [47] Groebe K, Mueller-Klieser W. Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters [J]. *Eur Biophys J*, 1991, 19(4): 169-181.
- [48] Yu L, Li Z C, Mei H B, et al. Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells *in vitro* [J]. *Clin Transl Immunology*, 2021, 10(2): e1248.
- [49] Jacob F, Ming G L, Song H J. Generation and biobanking of patient-derived glioblastoma organoids and their application in CAR T cell testing [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(12): 4000-4033.
- [50] Zhang Z W, Jiang D Q, Yang H, et al. Correction: Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11

- (4): 235.
- [51] Sontheimer-Phelps A, Hassell B A, Ingber D E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(2): 65-81.
- [52] Ando Y, Siegler E L, Ta H P, et al. Evaluating CAR-T cell therapy in a hypoxic 3D tumor model [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(5): e1900001.
- [53] Lu L L, Xiao S X, Lin Z Y, et al. GPC3-IL7-CCL19-CAR-T primes immune microenvironment reconstitution for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39(6): 3101-3119.
- [54] Kačarević Ž P, Rider P M, Alkildani S, et al. An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects [J]. *Materials*, 2018, 11(11): 2199.
- [55] Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, et al. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials [J]. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(2): 217-239.
- [56] Kelm J M, Timmins N E, Brown C J, et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(2): 173-180.
- [57] Delarue M, Montel F, Vignjevic D, et al. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation [J]. *Biophys J*, 2014, 107(8): 1821-1828.
- [58] Delarue M, Joanny J F, Jülicher F, et al. Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate [J]. *Interface Focus*, 2014, 4(6): 20140033.
- [59] Raman R, Bhaduri B, Mir M, et al. High-resolution projection microstereolithography for patterning of neovasculature [J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(5): 610-619.
- [60] Knowlton S, Onal S, Yu C H, et al. Bioprinting for cancer research [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(9): 504-513.
- [61] Grunewald L, Lam T, Andersch L, et al. A reproducible bioprinted 3D tumor model serves as a preselection tool for CAR T cell therapy optimization [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 689697.
- [62] Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering [J]. *Biomaterials*, 2020, 226: 119536.
- [63] Dey M, Ozbolat I T. 3D bioprinting of cells, tissues and organs [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14023.
- [64] Li R F, Li L X, Xu Y G, et al. Erratum to: Machine learning meets omics applications and perspectives [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(1): bbab560.
- [65] Zhang Y Y, Zhang Z M. The history and advances in cancer immunotherapy: Understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-821.
- [66] Murciano-Goroff Y R, Warner A B, Wolchok J D. The future of cancer immunotherapy: Microenvironment-targeting combinations [J]. *Cell Res*, 2020, 30(6): 507-519.
- [67] Yin X M, Liao H, Yun H, et al. Artificial intelligence-based prediction of clinical outcome in immunotherapy and targeted therapy of lung cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 2): 146-159.
- [68] Zhou X W, Qu M Y, Tebon P, et al. Screening cancer immunotherapy: When engineering approaches meet artificial intelligence [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(19): 2001447.
- [69] Daniels K G, Wang S Y, Simic M S, et al. Decoding CAR T cell phenotype using combinatorial signaling motif libraries and machine learning [J]. *Science*, 2022, 378(6625): 1194-1200.
- [70] Qiu S Z, Chen J, Wu T, et al. CAR-Toner: An AI-driven approach for CAR tonic signaling prediction and optimization [J]. *Cell Res*, 2024, 34(5): 386-388.
- [71] Li C X, Xu K, Zhu J, et al. Triple generative adversarial networks [J]. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 2022, 44(12): 9629-9640.

[责任编辑 刘东博]