

分子核医学在嵌合抗原受体T细胞免疫治疗的应用进展

黄文鹏, 杨琦, 陈钊, 邱永康, 宋乐乐, 范岩, 康磊
北京大学第一医院核医学科, 北京 100034

【摘要】嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法作为一种新型、精准靶向的免疫疗法,给血液系统恶性肿瘤的治疗带来了革命性的变化。基于放射性核素的PET、SPECT等分子核医学技术具有非侵入性、长期动态、实时监测活体水平内的分子靶标评价的独特优势,有助于优化输注CAR-T细胞的时机、剂量以及避免潜在的生物毒性,并对指导CAR-T疗法的研究起重要作用。本文对基于放射性核素的分子核医学在CAR-T细胞治疗中的监测和疗效评估应用进行综述,其中一些有前景的分子探针的临床转化有助于监测CAR-T细胞的活性、生物分布和靶向肿瘤部位的传输。

【关键词】分子核医学;免疫疗法;免疫成像;嵌合抗原受体;综述

【中图分类号】R392;R811.1

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2023)09-1057-07

Advances in application of molecular nuclear medicine in chimeric antigen receptor T cell immunotherapy

HUANG Wenpeng, YANG Qi, CHEN Zhao, QIU Yongkang, SONG Lele, FAN Yan, KANG Lei
Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract: Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) therapy as a novel and precision-targeted immunotherapy has revolutionized the treatment of hematologic malignancies. Molecular nuclear medicine technologies such as radionuclide-based PET and SPECT have the unique advantages of non-invasive, long-term dynamic, real-time monitoring of molecular targets at the *in vivo* level, which are conducive to optimize the timing and dose of CAR-T cell infusion and avoid potential biotoxicity, and play an important role in guiding the development of CAR-T therapy. A review on the application of radionuclide-based molecular nuclear medicine in the monitoring and efficacy assessment of CAR-T therapy is provided. The clinical application of some promising molecular probes helps to monitor CAR-T cell activity, biodistribution and delivery to targeted tumor sites.

Keywords: molecular nuclear medicine; immunotherapy; immunoimaging; chimeric antigen receptor; review

前言

嵌合抗原受体T细胞(Chimeric Antigen Receptor T-Cell, CAR-T)疗法作为一种新型、精准靶向的免疫疗法,对肿瘤细胞的杀伤作用不受主要组

织相容性复合体分子的限制,通过整合单链可变抗原和信号结构域,靶向识别表达特定抗原的肿瘤细胞形成免疫突触,激活内源性免疫反应,表达促凋亡配体,并释放细胞毒性穿孔素、颗粒酶和炎性细胞因子杀伤肿瘤细胞,给血液系统恶性肿瘤的治疗带来革命性的变化^[1-3]。目前CAR-T已经发展到第5代,已有5款CAR-T细胞疗法药物被美国食品药品监督管理局批准用于治疗B细胞白血病、淋巴瘤以及多发性骨髓瘤^[4]。但回顾既往研究,CAR-T细胞疗法的应用可产生细胞因子释放综合征、脱靶效应、过敏反应等各种毒性反应,并且部分患者未见临床获益,缺乏预测疗效的生物标志物,导致疾病进展^[5]。因此早期评估对CAR-T细胞治疗的应答效果,及时预测疗效成为新的挑战。

传统方法如CT、MRI通过实体瘤的免疫反应评

【收稿日期】2023-03-13

【基金项目】国家自然科学基金(82171970, 81871385);北京市杰出青年项目(JQ21025);北大医学青年科技创新发展平台青年培育基金(BMU2022PY006);北京大学临床医学+X青年项目(PKU2021LCXQ023)

【作者简介】黄文鹏,在读博士,研究方向:肿瘤免疫PET显像及诊疗一体化,E-mail: hwpeng19950930@163.com

【通信作者】康磊,副教授,副主任医师,博士生导师,研究方向:肿瘤免疫PET显像及诊疗一体化,E-mail: kanglei@bjmu.edu.cn

价标准评估 CAR-T 细胞疗效需在治疗几周后进行,并可能出现假性进展或超进展的误判。多次活检不仅具有有创性,亦不符合临床规范。流式细胞术和聚合酶链反应测量外周循环血中的 CAR-T 细胞,无法准确反映细胞在体内的实时动态分布、激活状态和免疫持久性^[6]。近年来研究表明,利用基于放射性核素的分子核医学技术,可以非侵入式地对 CAR-T 细胞进行成像,以此实现对 CAR-T 细胞在体内的动态监测,并且能够准确评估 CAR-T 细胞对肿瘤部位的靶向程度,同时也能确定它们是否仍持续发挥免疫功能。分子核医学有助于优化输注 CAR-T 细胞的时机、剂量以及避免潜在的生物毒性,并在指导 CAR-T 疗法研发中起重要作用,可极大地减少开发时间和成本^[7]。本文对基于放射性核素的分子核医学在 CAR-T 细胞治疗中的监测和疗效评估应用进行综述。

1 基于直接标记的核素示踪技术实现 CAR-T 细胞成像

1.1 小分子探针为介导

CAR-T 细胞可直接通过化学小分子介导交换反应而被放射性核素直接进行体外标记进而成像,过程相对简单,对细胞进行的操作少,不涉及遗传修饰。目前有关直接标记技术在 CAR-T 细胞成像方面的研究进展见表 1。最初使用铟-111(¹¹¹In)-8-羟基喹啉(oxine)标记肿瘤浸润性淋巴细胞,¹¹¹In-oxine 直接标记细胞的原理是¹¹¹In-oxine 具有电中性、脂溶性,能够穿透细胞膜而进入细胞,由于¹¹¹In 与细胞内某些成分(例如乳铁蛋白)的螯合作用强于¹¹¹In 与 8-oxine 的结合,进而¹¹¹In 结合与细胞实现标记,8-oxine 被释放。PET 扫描显示标记后的细胞迁移并聚集在黑色素瘤转移部位^[8],初步证明了过继转移的 T 细胞在体内靶向肿瘤的现象。

表 1 直接标记技术在 CAR-T 细胞成像方面的应用
Table 1 Application of direct labeling technology in CAR-T cell imaging

标记方法	标记物质	CAR-T 细胞类型	成像设备	参考文献	时间
小分子标记	¹¹¹ In-tropolone	[MUC1-specific]-CAR-T [ErbB-specific]-CAR-T	SPECT/CT	9	2011 年
小分子标记	⁸⁹ Zr-oxine	[IL13Rα2]-CAR-T [PSCA]-CAR-T	PET/CT	10	2018 年
小分子标记	⁸⁹ Zr-oxine	[CD19-specific]-CAR-T	PET 荧光成像	11	2021 年
小分子标记	⁸⁹ Zr-DFO	[Jurkat]-CAR-T [hPBMC]-CAR-T	PET/CT	1	2020 年
小分子标记	⁶⁸ Ga-oxine	[CD19-specific]-CAR-T	PET/CT	14	2021 年
小分子标记	⁸⁹ Zr-oxine	[huLym-1-A-BB3z]-CAR-T	PET/MRI	13	2015 年
纳米材料标记	GNP- ⁶⁴ Cu/PEG2000	[CD19-specific]-CAR-T	PET	15	2013 年
纳米材料标记	二氧化硅纳米颗粒	[hCEA-redirected]-CAR-T	PET 荧光成像	16	2021 年
纳米材料标记	氧化铁纳米颗粒	[Anti-B7-H3]-CAR-T	MRI PAT MPI	45	2022 年
纳米材料标记	高胺化氧化铁纳米虫	[CD123-specific]-CAR-T	荧光成像	46	2022 年

DFO:去铁胺;MUC1:跨膜糖蛋白粘蛋白 1;ErbB:表皮生长因子受体;PSCA:前列腺干细胞抗原;hPBMC:人外周血单核细胞

Parente-Pereira 等^[9]针对跨膜糖蛋白粘蛋白 1 (Transmembrane Glycoprotein Mucin 1, MUC1)和扩展的表皮生长因子受体(ErbB 家族)设计两种 CAR-T 细胞,使用¹¹¹In-环庚三烯酚酮(tropolone)标记后通过 SPECT/CT 成像进行实时跟踪,发现静脉输注的 CAR-T 细胞无法渗透到肿瘤部位,腹腔注射或皮下输注的 CAR-T 细胞主要停留在注射部位,为后续

CAR-T 免疫治疗的临床前评估提供基础。Weist 等^[10]首次使用锆-89(⁸⁹Zr)-oxine 标记 CAR-T 细胞,因⁸⁹Zr 具有较长的物理半衰期(78.4 h),在 PET 上动态追踪和监测 CAR-T 细胞可长达 6 d。Wu 等^[11]为了阐明 CAR-T 细胞在实体瘤中的抗肿瘤机制,使用⁸⁹Zr-oxine 标记的 CD19 靶向 CAR-T 细胞进行 PET 成像和光学成像评价药代动力学和药效学,为 CAR-T

细胞的设计和实体瘤治疗的评价提供参考,并有望用于后续的CAR-T细胞靶向筛选和疗效预测。Sta Maria等^[12]使用具有更高软组织分辨率的PET/MRI确定⁸⁹Zr-oxine标记的CAR-T细胞的空间分布,静脉输注CAR-T细胞3~5 h后其分布在肺内,然后分布于肝脏和脾脏,最长可达2~3 d,提供了体内CAR-T细胞的靶向分布存在剂量依赖关系,通过输注的细胞剂量可能优化CAR-T细胞靶向到肿瘤部位的传输时间。PET成像对CAR-T细胞不同时期的生物分布具有高度敏感性,MRI可提供软组织高分辨率,更好地定义细胞的空间生物分布,PET/MRI可以在患者治疗过程中更好地评估实时治疗反应,并帮助调整输注剂量和时间。但⁸⁹Zr-oxine标记方法的主要缺点是放射性标记可能由于细胞凋亡或增殖而释放,导致体内脱标现象,限制了长期监测CAR-T细胞的应用。

Bansal等^[13]认为基于去铁胺(Deferoxamine, DFO)的⁸⁹Zr细胞标记方法相比oxine在细胞表面蛋白间具有更为稳定的共价结合,可在PET核素显像中得到广泛应用。Lee等^[1]进一步使用⁸⁹Zr-DFO直接标记CAR-T细胞,每个细胞的标记活性为98.1~103.6 kBq/10⁶,标记后细胞存活率>95%,证明利用⁸⁹Zr-DFO标记CAR-T细胞通过PET成像实时可视化转运是可行的。除了⁸⁹Zr外,Wang等^[14]使用具有较短半衰期的镓-68(⁶⁸Ga)标记CAR-T细胞,在体内的前6 h内,⁸⁹Zr和⁶⁸Ga标记的CAR-T细胞的生物分布相似,首先聚集在肺内,并逐渐迁移到脾脏和肝脏。通过皮尔森相关分析发现⁸⁹Zr和⁶⁸Ga标记的CAR-T细胞在同一组织(肺、肝、脾)的分布具有显著正相关性,用于体内CAR-T细胞早期无创性示踪是可行的。⁶⁸Ga标记CAR-T细胞的有效吸收剂量仅为⁸⁹Zr标记CAR-T细胞的1/24,有利于临床转化。

1.2 纳米探针

近些年来,纳米颗粒因其具有实体瘤高通透性和滞留效应,在生物医学领域取得广泛的发展。除了作为药物输送平台外,纳米颗粒具备多模态显像载体平台的潜能,可用于体外和体内的细胞跟踪和检测。Bhatnagar等^[15]首次通过体外电穿孔技术将铜-64(⁶⁴Cu)标记的金纳米颗粒(Gold Nanoparticles, GNPs)导入到CAR-T细胞内观察其在动物模型内的分布情况,在输注10 min后PET显像发现肺内有明显的核素摄取,随后肝、脾的摄取逐渐增强,研究证明了基于纳米材料的CAR-T细胞体外标记和体内成像的可行性。Harmsen等^[16]开发一种基于⁸⁹Zr化学吸附标记近红外二氧化硅纳米颗粒的PET/近红外荧光成像双模态探针,对CAR-T细胞进行非基因组直接标记后进行长达1周的跟踪,其探针具有高纳米颗

粒负载效率(>80%)和稳定的CAR-T细胞内标记。

直接标记技术仍存在部分缺陷,由于CAR-T细胞对射线的敏感性,若发生细胞分裂或死亡时可出现直接标记信号的稀释,并且巨噬细胞吞噬死亡的标记细胞可产生信号混叠,干扰CAR-T细胞体内分布的评价。另外标记后的CAR-T细胞靶向到肿瘤部位后不能显示细胞的增殖。另一方面,直接标记仅在体外对CAR-T细胞进行一次标记,即使选择较长半衰期的放射性核素⁶⁴Cu(12.7 h)、¹¹¹In(67 h)和⁸⁹Zr(78.4 h),仍不满足治疗后期的成像需求。

2 基于报告基因实现CAR-T细胞成像

间接标记方法将报告基因引入CAR-T细胞基因组,并与相应的放射性标记探针一起转化为酶、受体或蛋白质的稳定表达,理论上报告基因的稳定表达使标记细胞能够在较长时间内进行连续成像。目前报告基因示踪技术相比直接标记技术在CAR-T细胞成像方面的研究取得了更多的进展(表2)。

2.1 基于酶的报告基因

基于酶的报告基因是目前唯一用于人体CAR-T细胞成像的报告基因,单纯疱疹病毒1型胸苷激酶(Herpes Simplex Virus Type 1-thymidine kinase, HSV1-tk)已被用于监测各种转导T细胞的生物分布,转染了HSV1-tk的CAR-T细胞可使嘧啶及嘌呤核苷衍生物磷酸化,使其难以透过细胞膜,从而滞留在靶细胞内^[17]。Ponomarev等^[18]利用荧光成像监测依赖T细胞受体的活化T细胞核因子介导的T细胞活化,同时进行双模态PET显像,提供T细胞活化过程的空间及定量信息,用HSV1-tk/绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP) [HSV1-tk/GFP(TKGFP)]双报告基因成像实现了对T细胞激活的监测。Yaghoubi等^[19]报道第1例使用HSV1-tk报告基因成像显示接受CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocytes, CTL)治疗的多形性胶质母细胞瘤患者,以¹⁸F-9-[4-氟代-3-(羟甲基)丁基]-鸟嘌呤{9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl] guanine, FHBG}为报告探针结构性的表达HSV1-tk报告基因,通过PET/MRI显示肿瘤部位较高的活性对于CAR-T细胞的聚集。基于上述发现,Yaghoubi的团队使用相同报告基因成像方法对7例复发性高级别胶质瘤患者进行一项临床试验(NCT00730613和NCT01082926),结果显示CTL治疗后肿瘤复发部位的¹⁸F-FHBG活性(SUV_{mean}×感兴趣体积)比治疗前显著增加,提示复发肿瘤部位存在CAR-T细胞的迁移增多,为临床应用报告基因成像监测实体瘤的CAR-T治疗疗效奠定基础^[20]。但HSV1-tk报告基因具有潜在的免疫原性风

表 2 报告基因示踪技术在 CAR-T 细胞成像方面的应用
Table 2 Application of reporter gene tracer technology in CAR-T cell imaging

报告基因	类型	CAR-T 细胞类型	报告探针	成像设备	参考文献	时间
HSV1-tk	基于酶的报告基因	CD8 ⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞	¹⁸ F-FHBG	PET/MR	19	2009 年
					21	2012 年
sr39tk	基于酶的报告基因	[B7H3-sr39tk]-CAR-T	¹⁸ F-FHBG	PET/CT	22	2020 年
eDHFR	基于酶的报告基因	[GD2 disialoganglioside]-CAR-T	¹⁸ F-TMP	PET/CT	23	2020 年
HdCKDM	基于酶的报告基因	[PSMA]-CAR-T	¹⁸ F-FEAU	PET/CT	24	2010 年
hNIS	基于转运体的报告基因	[PSMA]-CAR-T	^{99m} TcO ₄	SPECT/CT	25	2018 年
hNIS	基于转运体的报告基因	[T1E28z]-CAR-T	¹⁸ F-BF4	PET/CT	26	2020 年
hNIS	基于转运体的报告基因	[BCMA-specific]-CAR-T	¹⁸ F-TFB	PET/CT	27	2022 年
					28	2021 年
SSTR-2	基于受体的报告基因	[ICAM-1-specific]-CAR-T	⁶⁸ Ga-DOTATOC	PET/CT	31	2016 年
tPSMA	基于受体的报告基因	[CD19-specific]-CAR-T	¹⁸ F-DCFPyL	PET/CT	7	2019 年
DAbr1	基于抗体的报告基因	[CD19-specific]-CAR-T	⁸⁶ Y-AABD	PET/CT	33	2018 年
			¹⁷⁷ Lu-AABD	SPECT/CT		

HSV1-tk:单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶;eDHFR:大肠杆菌二氢叶酸还原酶;HdCKDM:人类脱氧胞苷激酶双突变体;hNIS:人钠/碘同向转运体;SSTR-2:生长抑素受体 2;PSMA:前列腺特异性膜抗原;DAbr1:DOTA 抗体报告体 1;FHBG:9-[4-氟代-3-(羟甲基)丁基]-鸟嘌呤;TFB:四氟硼酸盐;DCFPyL:2-[3-[1-羧基-5-[(6-氟代吡啶-3-羧基)-氨基]-戊烷]-脲基]-戊二酸;AABD:(S)-2-(4-丙烯酰胺苯甲基)-DOTA[(S)-2-(4-acrylamido-benzyl)-DOTA

险,也存在肿瘤部位本底摄取的局限性^[21]。Murty 等^[22]使用 ¹⁸F-FHBG 为报告探针对 sr39-tk 作为报告基因和自杀基因进行 PET 成像,提供 CAR-T 细胞迁移和增殖的可视化观察,同时作为自杀开关来限制潜在的生物毒性,首次证明了结合 sr39tk 报告基因用于 CAR-T 细胞治疗中监测和控制的可行性。Sellmyer 等^[23]使用 ¹⁸F 标记荧光衍生的小分子抗菌药物甲氧苄啶(Trimethoprim, TMP)为配体作为报告探针对小鼠骨肉瘤模型中的大肠杆菌二氢叶酸还原酶(Escherichia Coli Dihydrofolate Reductase, eDHFR)报告基因标记的 CAR-T 细胞进行监测,PET/CT 显示 CAR-T 细胞早期主要聚集在脾内,晚期在肿瘤部位具有良好蓄积,可在几周至几个月内对 CAR-T 细胞进行监测,为 T 细胞的归巢和渗透提供时间和空间信息。值得注意的是,eDHFR 的蛋白质分子量比 HSV-tk 更小(18 kDa vs 46 kDa),免疫原性更低,体内应用更安全,未来临床应用有更大的潜力,加速新的 CAR-T 细胞疗法进行临床转化。人类脱氧胞苷激酶双突变体(Human Deoxycytidine Kinase Double Mutant, HdCKDM)是另一个基于酶的嘧啶特异性报告基因,可与 ¹⁸F 标记的嘧啶类 FEAU 探针相结合,通过催化磷酸化后被摄取和保留在细胞内,用于无环鸟苷类抗病毒药物治疗患者 PET 显像,已在靶向前列腺特异性膜抗原(Prostate-Specific Membrane Antigen, PSMA)的 CAR-T 细胞中进行临床前研究,

并不改变 CAR-T 细胞活性^[24]。

2.2 基于转运体的报告基因

目前人钠/碘同向转运体(Human Sodium Iodide Symporter, hNIS)、人去甲肾上腺素转运体(Human Norepinephrine Transporter, hNET)基因也被应用于 CAR-T 报告基因进行核医学显像。hNIS 是非免疫原性的,在摄取底物时不会被内化,表达 hNIS 的 CAR-T 细胞可以转运碘-123(¹²³I)以及高锝酸盐(^{99m}TcO₄)等放射性核素,有效、特异地积累各种核素进行 PET 或 SPECT 检查。

Emami-Shahri 等^[25]使用 hNIS/^{99m}TcO₄ 报告基因/探针对 PSMA-CAR-T 细胞进行连续的 SPECT/CT 高分辨率连续成像和时空监测,提供 CAR-T 细胞可以迁移到肿瘤并渗透到肿瘤组织的证据,而且靶向 PSMA 的特定 CAR-T 细胞与对照 CAR-T 细胞相比具有更强的肿瘤归巢能力,满足该领域未来临床发展的基本需求。Volpe 等^[26]构建了表达 hNIS 报告基因的 T1E28z-CAR-T 细胞,使用 ¹⁸F-BF4 这一报告探针进行标记示踪,实现了基于 PET 的三阴性乳腺癌动物模型成像,与 SPECT 成像相比,检测灵敏度更高,并进一步对比了肿瘤中程序性细胞死亡蛋白-配体 1(Programmed Cell Death Protein-Ligand 1, PD-L1)的表达,得出 CAR-T 细胞富集与免疫检查点 PD-L1 表达呈负相关的结论。Sakemura 等^[27-28]也将 hNIS 导入 CAR-T 细胞以及在临床前模型中使用 ¹⁸F-四氟硼酸

盐 (Tetrafluoroborate, TFB) 进行 CAR-T 细胞成像。但使用 hNIS 作为报告基因的一个障碍是其在正常组织如甲状腺、泪腺、唾液腺、胃和哺乳期乳房的生理表达, CAR-T 在这些部位的示踪效果可能会受到一定影响。另一种人类报告基因 hNET 也被用于 T 细胞可视化^[29], 有研究对 HSV1-tk、hNET、hNIS 和 hdCKDM 4 种不同的报告基因在转导 T 细胞的敏感性方面进行比较, 结果表明以 hNET 为报告基因、以 ¹⁸F-氟苜蓿为报告探针的 PET 报告系统是最灵敏的, 能够在动物模型中检测到大约 $35\sim 40\times 10^3$ 个 T 细胞, 但它是否具有临床转化的潜力仍需进一步实验验证^[30]。

2.3 基于结合蛋白的报告基因

Vedvyas 等^[31]构建了表达生长抑素受体 2 (Somatostatin Receptor Subtype-2, SSTR-2) 报告基因的细胞间黏附分子-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1) -CAR-T 细胞, 基于 ⁶⁸Ga-DOTATOC 报告探针与 SSTR-2 的靶向性进行标记, 评估渗透实体瘤内的 CAR-T 细胞密度, 表达 SSTR-2 的 CAR-T 细胞具有高敏感性和特异性, 并且在未分化甲状腺癌中高表达。SSTR-2 属于 G 蛋白偶联受体家族, 与 ⁶⁸Ga 等多种探针匹配, 但是 SSTR-2 受体在免疫细胞中, 包括 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞, 具有内源性的表达, 降低了报告基因成像的特异性以及可能干扰免疫功能^[32]。Minn 等^[7]将表达 N 端修饰的 PSMA 变异体 (N-Terminally Modified PSMA Variants, tPSMA) 报告基因导入 CD19 靶向 CAR-T 细胞内, 进行 ¹⁸F-2-[3-[1-羧基-5-[(6-氟代吡啶-3-羰基)-氨基]-戊烷]-脲基]-戊二酸 {2-[3-[1-carboxy-5-[(6-fluoro-pyridine-3-carbonyl)-amino]-pentyl]-ureido]-pentanedioic acid, DCFPyL} PET/CT 成像, 通过 ¹⁸F-DCFPyL 与 PSMA 的有效结合, 灵敏地显示 CAR-T 细胞在肿瘤中的浸润, 每个细胞的靶点数量约 1×10^6 个, 并发现外周血和骨髓中 CAR-T 细胞的数量与浸润到肿瘤中细胞的数量有明显差异, 强调临床上对 CAR-T 细胞进行无创性、可重复监测的必要性。Krebs 等^[33]分别用钇-86 (⁸⁶Y) 和镥-177 (¹⁷⁷Lu) 标记 (S)-2-(4-丙烯酰胺苯甲基)-DOTA [(S)-2-(4-acrylamido-benzyl)-DOTA, AABD] 进行 PET/CT 和 SPECT/CT 显像追踪体内 CD19 靶向的 CAR-T 细胞, 报告探针 AABD 的丙烯酰胺基团可与 DOTA 抗体报告体 1 (DOTA Antibody Reporter 1, DAbR1) 报告基因共价结合, 在转导 DAbR1 报告基因的 CAR-T 细胞中表达程度高, 特异性结合时间长, 并且具有良好的生物分布和图像对比度, 验证了 PET 和 SPECT 的 DAbR1 报告基因成像在体内定位、示踪 CAR-T 细胞

的可能性, 并且在研究中发现给予 3.7 MBq 的 ⁸⁶Y-AABD 时, T 细胞的平均吸收剂量约为 20 cGy , 远低于 830 cGy 的耐受剂量^[34], 表明该方法长期监测 CAR-T 细胞是安全可行的, 但 DAbR1 中使用的鼠源性单链抗体片段可能会在人体内诱导免疫反应。

报告基因示踪技术可使报告蛋白在转导细胞中稳定表达, 所有检测到的信号来自存活的细胞^[22], 并且细胞分裂不会导致信号丢失或稀释。但报告基因产物对 CAR-T 细胞的功能和活性以及潜在的免疫原性的影响未经系统评价, 一些报告基因在部分正常组织和器官的固有表达, 可能对评价 CAR-T 在邻近组织器官分布有一定限制。

3 免疫 PET 成像

免疫 PET 成像使用放射性核素对基于肿瘤靶向载体如单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, mAb)、纳米抗体和双特异性抗体标记后进行显像, 将靶向载体对细胞表面标记物的超高特异性和亲和力与 PET 的高灵敏度结合起来^[35]。放射性核素标记的抗体可以在给药后不同时间点注射, 甚至可以重复注射, 对 CAR-T 细胞进行持久性的纵向评估。细胞表面的标记物可作为体内特定 T 细胞的特定靶点, 包括 CD3、CD4、CD8 以及免疫检查点如 PD-1、PD-L1 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein-4, CTLA-4)^[36]。在 T 细胞激活过程中活性提升的酶类、细胞因子以及特异性表达的表面抗原也可作为潜在的靶点, 用于构建 CAR-T 细胞进行免疫 PET 显像的探针, 协助 CAR-T 疗法的开发。

Rashidian 等^[37]使用 ⁸⁹Zr 标记 CD8 靶向的聚乙二醇化 (Pegylated, PEG) 单域抗体片段监测黑色素瘤小鼠模型中 CD8 阳性浸润性淋巴细胞对免疫检查点抑制剂 CTLA-4 阻断的反应, 通过免疫 PET 显像对免疫治疗后有效应答和无效应答进行分层, 证明免疫 PET 可以作为预测 CTLA-4 免疫检查点抑制剂治疗反应的预后工具。CD3 作为 T 细胞受体复合体的一部分, 与免疫应答有关, Larimer 等^[38]评估 PET 显像在预测 CTLA-4 检查点抑制剂治疗后免疫应答的能力, 在 CTLA-4 治疗的小鼠结肠癌模型中, 将 CD3 靶向抗体偶联到 DFO 上, 并用高纯度和高特异性的 ⁸⁹Zr 标记, 对 CTLA-4 治疗过程中病灶内 T 细胞浸润进行定量, 发现 CD3 PET 信号的高摄取率与肿瘤体积缩小相关, 可作为预测免疫治疗反应的生物标志物, 但仍需进一步的研究验证去进行临床转化。⁸⁹Zr 标记的抗 CD4 抗体和抗 CD8 抗体都可用于靶向体内 T 细胞群。有文献^[39-40]报道, 肿瘤浸润性淋巴细胞 (包括

CD4和CD8淋巴细胞)在肿瘤微环境中的增加,意味着免疫治疗的应答和良好的预后。

Xiao等^[41]发现诱导性T细胞共刺激分子(Inducible T-Cell COStimulator, ICOS)在T细胞激活过程中上调,可作为检测CAR-T细胞介导的早期免疫反应的标志,将⁸⁹Zr通过DFO标记ICOS靶向的mAb探针用于小鼠肺腺癌模型中CAR-T细胞激活和治疗反应的可视化监测证实以ICOS为靶向的免疫PET显像在可视化和预测免疫治疗反应方面具有前景,可根据CAR-T细胞的激活情况对应答患者和无应答患者进行分层预测治疗疗效。Simonetta等^[42]使用靶向ICOS的mAb探针通过免疫PET显像在B细胞淋巴瘤小鼠的骨髓中检测到的PET信号显著高于对照组65个部位的放射性摄取,反映了CD19靶向CAR-T细胞的空间分布和激活状态,最重要的是以示踪剂量注射的ICOS靶向抗体不会干扰CAR-T细胞的持久性和功能,因此更适用于CAR-T细胞的新疗法的开发和现有疗法的改进。

目前为止,免疫PET显像在CAR-T相关的研究中还很少,但它不涉及基因操作,并可以间接反映CAR-T细胞无效增殖(T细胞增殖,肿瘤未得到控制)或有效杀伤(T细胞增殖后肿瘤缩小)。

4 其他成像方法

MRI具有良好的软组织分辨率和空间分辨率,在可视化CAR-T细胞方面进行广泛的探索。Dubois等^[43]使用基于¹⁹F-全氟化碳(Perfluorocarbon, PFC)的MRI监测CAR-T细胞随时间的变化,首次证明PFC标记CAR-T细胞没有毒性影响,但仍不能可靠地量化CAR-T细胞的含量。Chapelin等^[44]使用¹⁹F-PFC标记CAR-T细胞后测量治疗后肿瘤细胞的氧分压,了解效应细胞的功能和肿瘤细胞的反应。Kiru等^[45]采用氧化铁纳米颗粒标记CAR-T细胞,使MRI、生物光声层析成像和磁粒子成像非侵入性检测小鼠骨肉瘤模型中的CAR-T细胞成为可能,同时保持了T细胞的增殖、活性和功能,为进一步监测实体瘤中CAR-T细胞奠定了基础。但Zhang等^[46]质疑磁性纳米颗粒标记CAR-T细胞时是否兼容,选择高胺化氧化铁纳米虫(Iron Oxide Nanoworms, NWs)标记CD123特异性CAR-T细胞,使用荧光显微镜成像显示部分CAR-T细胞在注射后72 h仍保留NWs,证明带正电的NWs可使CAR-T细胞保持功能,能用于CAR-T细胞在体内生物分布和跟踪,但对治疗结果的预测和验证仍需进一步研究。Liu等^[47]利用生物工程技术设计出表达亲和素-CAR-T,能够靶向和杀伤表达表皮生长因子受体III型突变体(Epidermal

Growth Factor Receptor Variant III, EGFRv III)的胶质瘤肿瘤细胞,开发光学分子成像方法确定了此CAR-T疗法的靶向特异性,进一步确认了体内T细胞过继转移的最佳时间为24 h。

5 总结与展望

体内免疫系统的动态演变以及CAR-T细胞复杂的动力学行为,需要不断深入开展基于免疫治疗方面的创新研究以促进免疫成像监测工具研发。CAR-T细胞成像的临床应用要求必须是无创、安全的,且可对治疗效果进行精确定量评估。随着多模态显像方法和特异性探针的开发,基于放射性核素的分子影像学大大提升了诊断灵敏度,具有非侵入性、长期、实时监测全身细胞转运的独特优势,有助于CAR-T疗法的临床转化。本文综述了不同成像方法在可视化CAR-T细胞方面的进展,其中一些有前景的分子探针的临床转化有助于监测CAR-T细胞的活性、生物分布和靶向肿瘤部位的传输,在免疫治疗的患者筛选、治疗监测、疗效评价等方面存在着巨大的应用价值。

【参考文献】

- [1] Lee SH, Soh H, Chung JH, et al. Feasibility of real-time *in vivo* ⁸⁹Zr-DFO-labeled CAR T-cell trafficking using PET imaging[J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0223814.
- [2] 杜文, 王晓青, 成娟. 靶向BCMA CAR-T细胞在复发难治性多发性骨髓瘤中的治疗进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(16): 858-862. Du W, Wang XQ, Cheng J. Progress in anti-BCMA CAR-T therapy for relapsed/refractory multiple myeloma[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2021, 48(16): 858-862.
- [3] 王帅亮, 朱华, 杨志. T细胞核医学分子成像策略在CAR-T免疫治疗中的应用[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2021, 41(3): 175-179. Wang SL, Zhu H, Yang Z. Application of T cell nuclear imaging strategy in chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy[J]. *Chinese Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2021, 41(3): 175-179.
- [4] Siddiqui RS, Sardar M. A systematic review of the role of chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy in the treatment of solid tumors[J]. *Cureus*, 2021, 13(4): e14494.
- [5] Li H, Zhao Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(8): 573-589.
- [6] Maude SL, Laetsch TW, 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.
- [7] Minn I, Huss DJ, Ahn HH, et al. Imaging CAR T cell therapy with PSMA-targeted positron emission tomography[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7): eaaw5096.
- [8] Fisher B, Packard BS, Read EJ, et al. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 1989, 7(2): 250-261.
- [9] Parente-Pereira AC, Burnet J, Ellison D, et al. Trafficking of CAR-engineered human T cells following regional or systemic adoptive transfer in SCID beige mice[J]. *J Clin Immunol*, 2011, 31(4): 710-718.
- [10] Weist MR, Starr R, Aguilar B, et al. PET of adoptively transferred chimeric antigen receptor T cells with ⁸⁹Zr-oxine[J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(10): 1531-1537.
- [11] Wu Q, Wang Y, Wang X, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of CD19 CAR T cell in human leukaemic xenograft models

- with dual-modality imaging[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15): 7451-7461.
- [12] Sta Maria NS, Khawli LA, Pachipulusu V, et al. Spatio-temporal biodistribution of ⁸⁹Zr-oxine labeled huLym-1-A-BB3z-CAR T-cells by PET imaging in a preclinical tumor model[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15077.
- [13] Bansal A, Pandey MK, Demirhan YE, et al. Novel ⁸⁹Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies[J]. *EJNMMI Res*, 2015, 5: 19.
- [14] Wang XY, Wang Y, Wu Q, et al. Feasibility study of ⁶⁸Ga-labeled CAR T cells for *in vivo* tracking using micro-positron emission tomography imaging[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(5): 824-831.
- [15] Bhatnagar P, Li Z, Choi Y, et al. Imaging of genetically engineered T cells by PET using gold nanoparticles complexed to Copper-64[J]. *Integr Biol (Camb)*, 2013, 5(1): 231-238.
- [16] Harmsen S, Medine EI, Moroz M, et al. A dual-modal PET/near infrared fluorescent nanotag for long-term immune cell tracking[J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120630.
- [17] Dotti G, Tian M, Savoldo B, et al. Repetitive noninvasive monitoring of HSV1-tk-expressing T cells intravenously infused into nonhuman primates using positron emission tomography and computed tomography with ¹⁸F-FEAU[J]. *Mol Imaging*, 2009, 8(4): 230-237.
- [18] Ponomarev V, Doubrovina M, Lyddane C, et al. Imaging TCR-dependent NFAT-mediated T-cell activation with positron emission tomography *in vivo*[J]. *Neoplasia*, 2001, 3(6): 480-488.
- [19] Yaghoubi SS, Jensen MC, Satyamurthy N, et al. Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with ¹⁸F-FHBG PET in a patient with glioma[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2009, 6(1): 53-58.
- [20] Keu KV, Witney TH, Yaghoubi S, et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(373): eaag2196.
- [21] Yaghoubi SS, Campbell DO, Radu CG, et al. Positron emission tomography reporter genes and reporter probes: gene and cell therapy applications[J]. *Theranostics*, 2012, 2(4): 374-391.
- [22] Murty S, Labanich L, Murty T, et al. PET reporter gene imaging and ganciclovir-mediated ablation of chimeric antigen receptor T cells in solid tumors[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(21): 4731-4740.
- [23] Sellmyer MA, Richman SA, Lohith K, et al. Imaging CAR T cell trafficking with eDHFR as a PET Reporter Gene[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(1): 42-51.
- [24] Likar Y, Zurita J, Dobrenkov K, et al. A new pyrimidine-specific reporter gene: a mutated human deoxycytidine kinase suitable for PET during treatment with acycloguanosine-based cytotoxic drugs[J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(9): 1395-1403.
- [25] Emami-Shahri N, Foster J, Kashani R, et al. Clinically compliant spatial and temporal imaging of chimeric antigen receptor T-cells[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1081.
- [26] Volpe A, Lang C, Lim L, et al. Spatiotemporal PET imaging reveals differences in CAR-T tumor retention in triple-negative breast cancer models[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(10): 2271-2285.
- [27] Sakemura R, Cox MJ, Bansal A, et al. Dynamic imaging of chimeric antigen receptor T cells with [¹⁸F]tetrafluoroborate positron emission tomography/computed tomography[J]. *J Vis Exp*, 2022, (180). DOI: 10.3791/62334. PMID: 35253798.
- [28] Sakemura R, Bansal A, Siegler EL, et al. Development of a clinically relevant reporter for chimeric antigen receptor T-cell expansion, trafficking, and toxicity[J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9(9): 1035-1046.
- [29] Doubrovina MM, Doubrovina ES, Zanzonico P, et al. *In vivo* imaging and quantitation of adoptively transferred human antigen-specific T cells transduced to express a human norepinephrine transporter gene[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11959-11969.
- [30] Moroz MA, Zhang H, Lee J, et al. Comparative analysis of T cell imaging with human nuclear reporter genes[J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(7): 1055-1060.
- [31] Vedvyas Y, Shevlin E, Zaman M, et al. Longitudinal PET imaging demonstrates biphasic CAR T cell responses in survivors[J]. *JCI Insight*, 2016, 1(19): e90064.
- [32] Elliott DE, Li J, Blum AM, et al. SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release[J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29(8): 2454-2463.
- [33] Krebs S, Ahad A, Carter LM, et al. Antibody with infinite affinity for *in vivo* tracking of genetically engineered lymphocytes[J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(12): 1894-1900.
- [34] Zanzonico P, Koehne G, Gallardo HF, et al. [¹³¹I]FIAU labeling of genetically transduced, tumor-reactive lymphocytes: cell-level dosimetry and dose-dependent toxicity[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, 33(9): 988-997.
- [35] Dun Y, Huang G, Liu J, et al. Immuno PET imaging of hematological malignancies: from preclinical promise to clinical reality[J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(4): 1196-1203.
- [36] Ponomarev V. Advancing immune and cell-based therapies through imaging[J]. *Mol Imaging Biol*, 2017, 19(3): 379-384.
- [37] Rashidian M, Ingram JR, Dougan M, et al. Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(8): 2243-2255.
- [38] Larimer BM, Wehrenberg-Klee E, Caraballo A, et al. Quantitative CD3 PET imaging predicts tumor growth response to anti-CTLA-4 therapy[J]. *J Nucl Med*, 2016, 57(10): 1607-1611.
- [39] Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26): 2531-2544.
- [40] Freise AC, Zettlitz KA, Salazar FB, et al. ImmunoPET imaging of murine CD4+ T cells using anti-CD4 Cys-diabody: effects of protein dose on t cell function and imaging[J]. *Mol Imaging Biol*, 2017, 19(4): 599-609.
- [41] Xiao Z, Mayer AT, Nobashi TW, et al. ICOS is an indicator of T-cell-mediated response to cancer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(14): 3023-3032.
- [42] Simonetta F, Alam IS, Lohmeyer JK, et al. Molecular imaging of chimeric antigen receptor T cells by ICOS-immunoPET[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(4): 1058-1068.
- [43] Dubois VP, Sehl OC, Foster PJ, et al. Visualizing CAR-T cell immunotherapy using 3 tesla fluorine-19 MRI[J]. *Mol Imaging Biol*, 2022, 24(2): 298-308.
- [44] Chapelin F, Leach BI, Chen R, et al. Assessing oximetry response to chimeric antigen receptor T-cell therapy against glioma with 19F MRI in a murine model[J]. *Radiol Imaging Cancer*, 2021, 3(1): e200062.
- [45] Kiru L, Zlitni A, Tousley AM, et al. *In vivo* imaging of nanoparticle-labeled CAR T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(6): e2102363119.
- [46] Zhang W, Gaikwad H, Groman EV, et al. Highly aminated iron oxide nanoworms for simultaneous manufacturing and labeling of chimeric antigen receptor T cells[J]. *J Magn Magn Mater*, 2022, 541: 168480.
- [47] Liu K, Liu X, Peng Z, et al. Retargeted human avidin-CAR T cells for adoptive immunotherapy of EGFRvIII expressing gliomas and their evaluation *via* optical imaging[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23735-23747.

(编辑:陈丽霞)