

肿瘤T细胞靶向免疫治疗的研究进展

李亮平 暨南大学 2019-11

Tel. 13570468781

肿瘤免疫治疗理论基础

Immunological surveillance

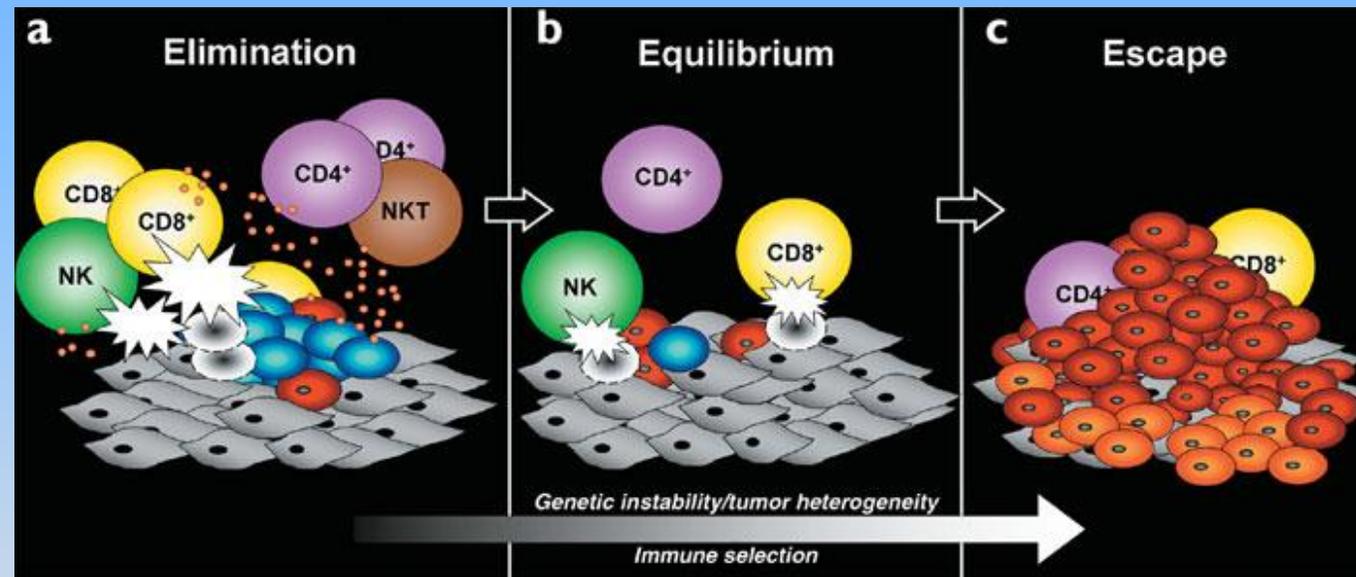
Cancer immunoediting

Burnet FM: Transplant Rev. 1971;7:3-25.

"In large long lived animals....inheritable **genetic changes** must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent steps toward malignancy.

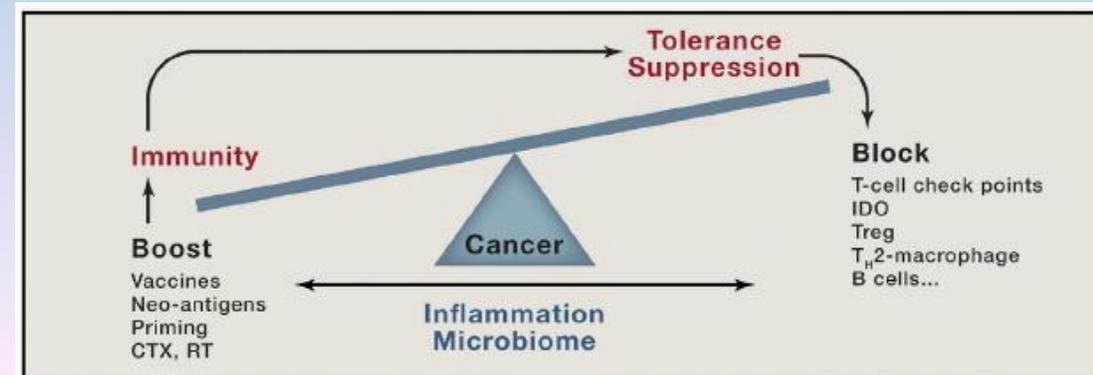
It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for elimination or inactivity of such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that **this mechanism is of immunological character**".

Robert Schreiber (2002 [Nat Immunol.](#) 3(11):991-8.



Neoantigens

T cells, et al.



Animal model of cancer immunity

Tumors induced by chemical carcinogens in mice could stimulate tumor-specific responses that were able to reject those **same** tumors on challenge: **tumor antigens are unique to individual tumor.**

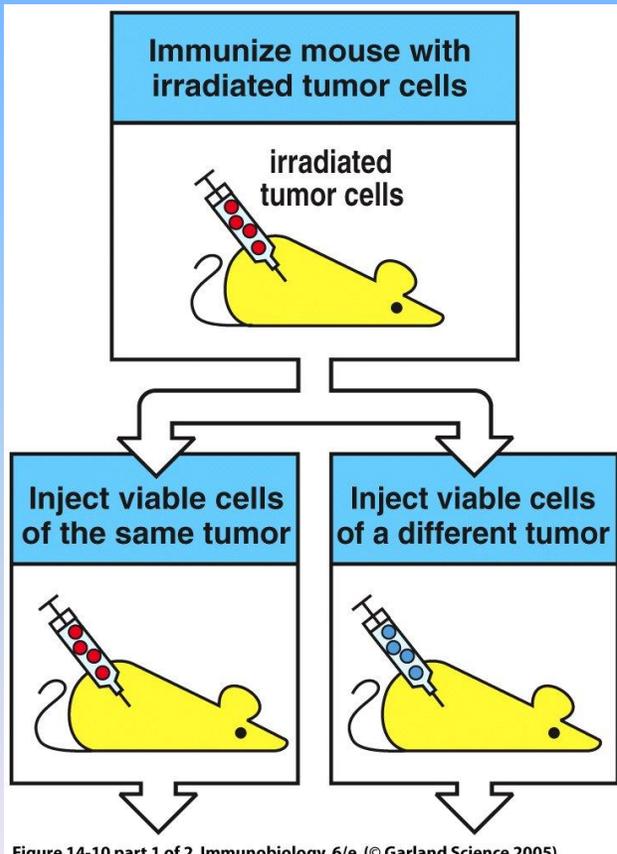


Figure 14-10 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

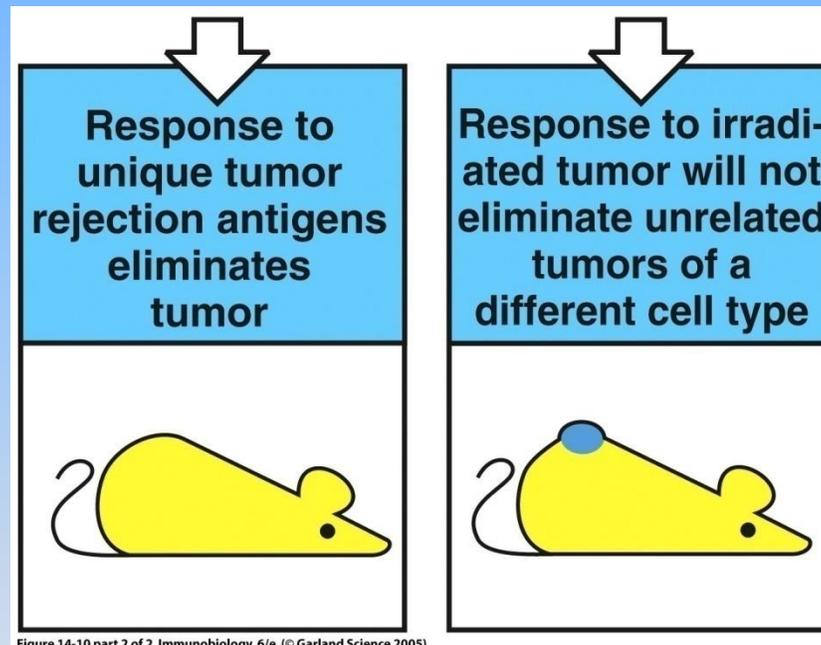


Figure 14-10 part 2 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Prehn, R. T. & Main, J. M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 769–778 (1957).

Immunity is Individually Tumor Specific

10 different methylcholanthrene-induced murine fibrosarcomas

Tumors Used to Immunize

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tumors Used to Challenge

临床病理观察 (immunoscore) : 免疫细胞浸润程度与癌症预后呈正相关

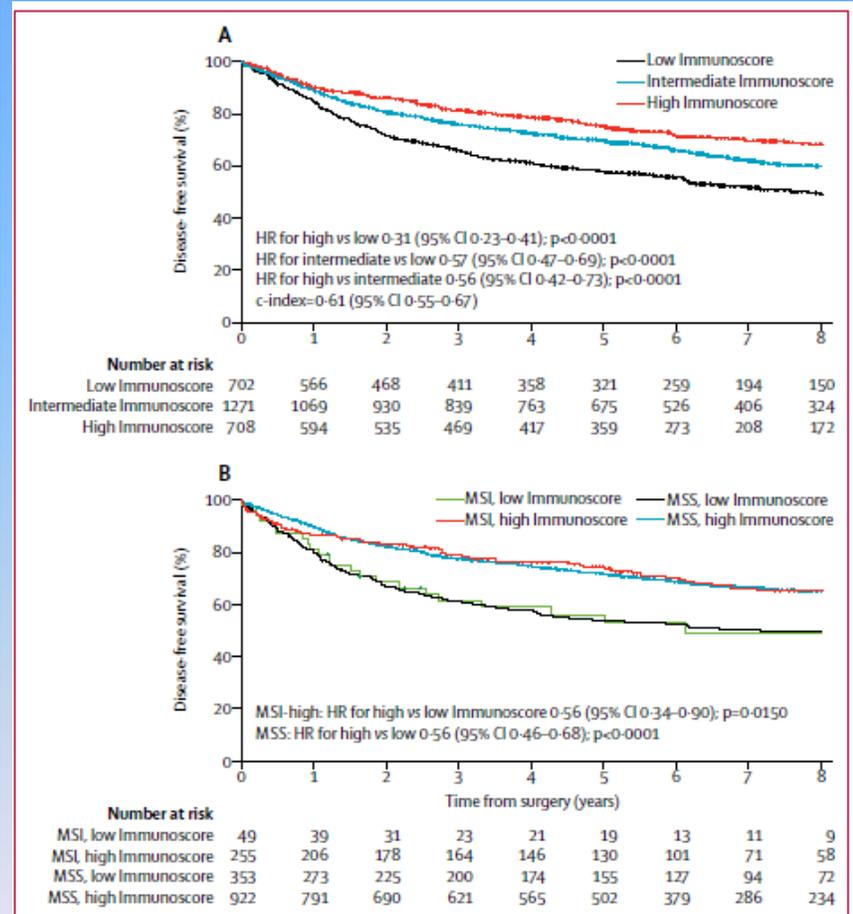
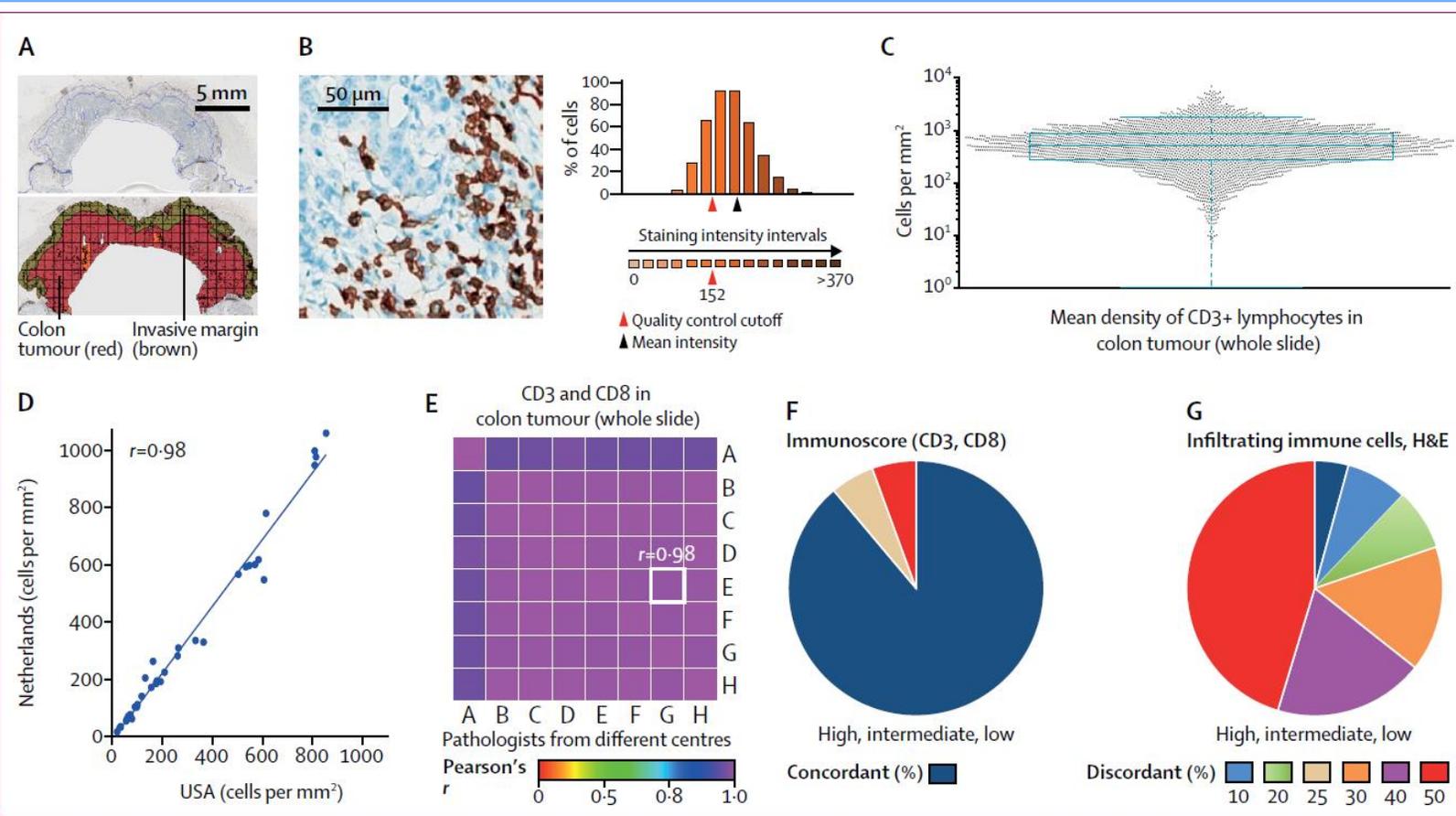


Figure 2: Determination of the immune cell densities by image analysis software with a dedicated Immunoscore module

Figure 3: Kaplan-Meier estimates of disease-free survival

Tumor antigens and T cells

1. Tumor specific antigens (TSA): Tumor Rejection antigens, mutated antigens (Neoantigens), Non-self antigens the potential best targets.

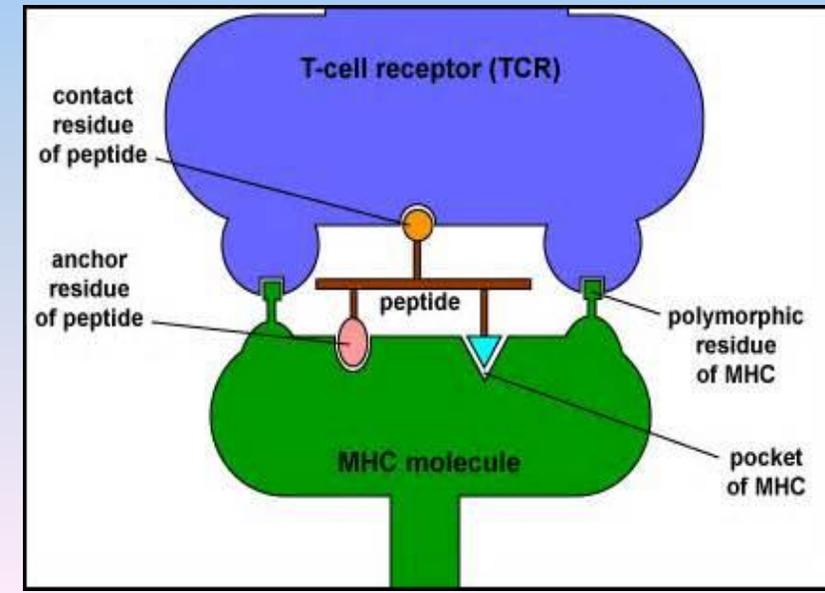
2. Tumor associated antigens (TAA):

non-mutant tumor antigens, self antigens, also expressed by normal cells.

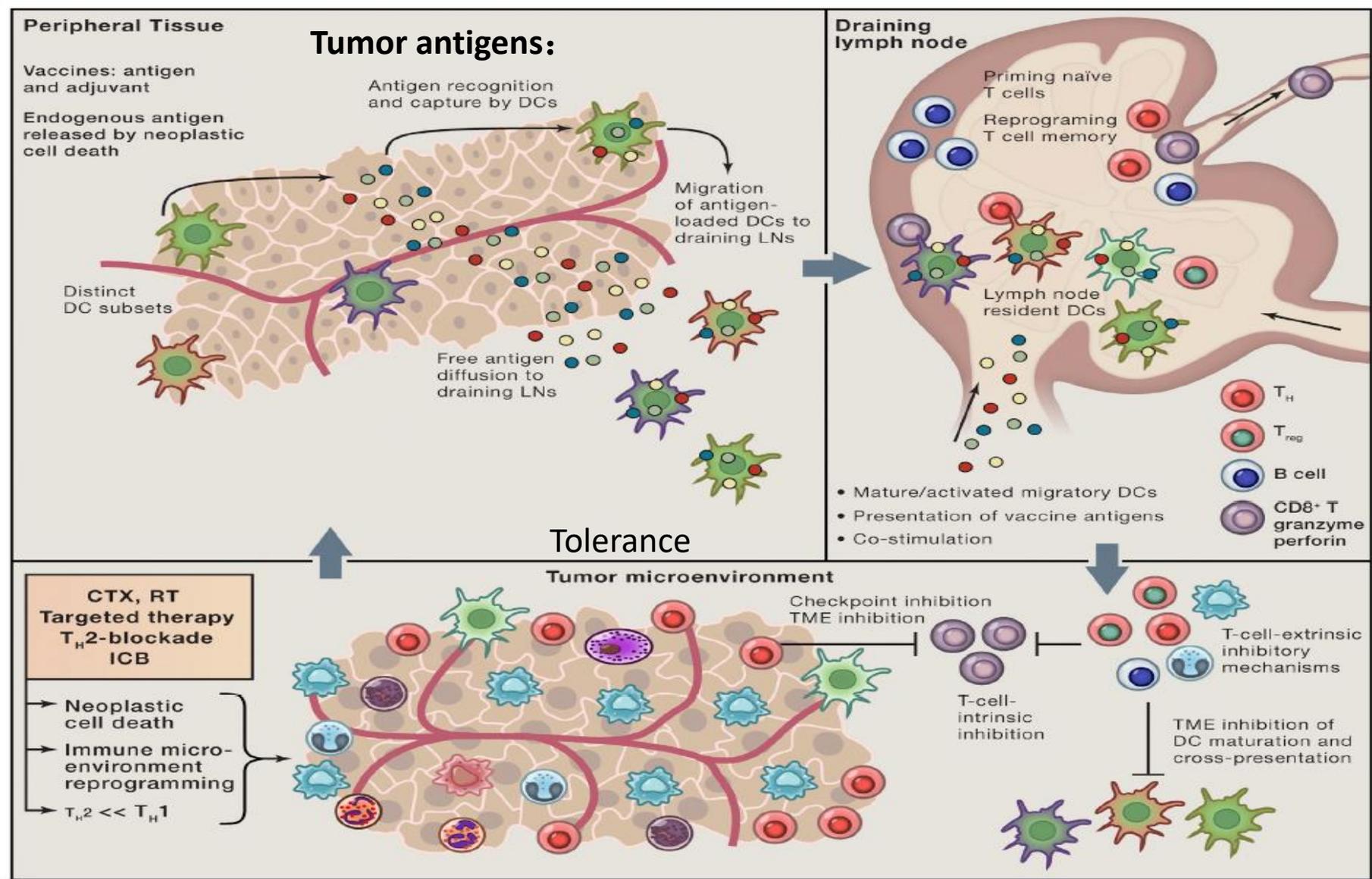
1. Cancer germline antigens: expressed germline cells and in a variable proportion of many cancer cells but not in normal adult somatic tissues.
NY-ESO-1, MAGE-A1, etc.
2. Differentiation antigens expressed in normal adult tissue as well as in tumors derived from that tissue
MART-1, gp100, **CD19**, etc.
3. Tumor overexpressed proteins expressed in normal tissues lower than their expression in malignant cells
CEA, p53

Tumor immunity is mediated by T cells

TCRs recognizes MHC presented antigenic peptide



The **priming** and **makings** of Tumor Immunity



Tumor reactive T cells

TILs

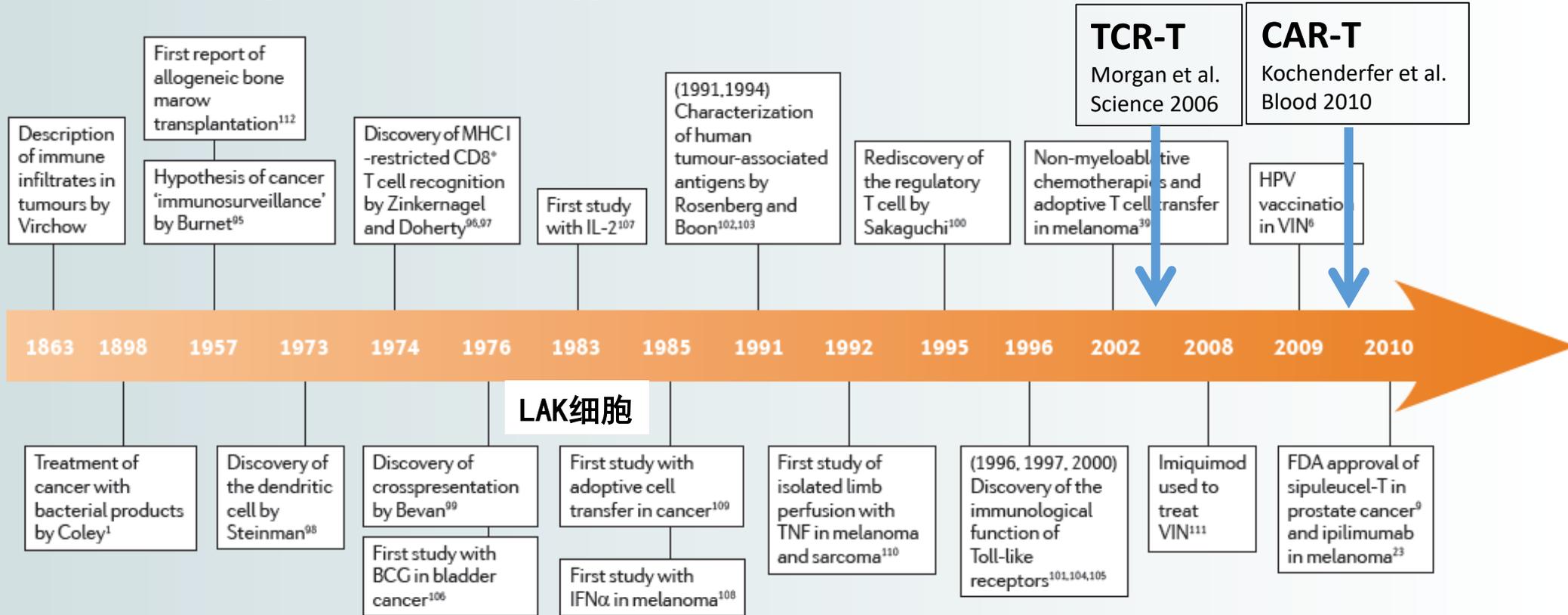
TCR-T

CAR-T

CTLA4, PD-1 antibody

History of tumor immunotherapy

Timeline | **The history of cancer immunotherapy**



精准免疫治疗

Targeting
neoantigens

Important basic immunological discoveries and key clinical trials are shown. BCG, bacille Calmette–Guérin; IFN α , interferon- α ; IL-2, interleukin-2; MHC, major histocompatibility complex; TNF, tumour necrosis factor; VIN, vulvar intraepithelial neoplasia.

个人研发经历

20多年前开始肿瘤免疫治疗研究

1988 广州
Nonspecific
immunotherapy

Lymphokine-
activated
killer cell
(LAK cell)

PBMC + IL-2

非特异性
临床效果不佳

1994 德国
Active immuno-
therapy

Immune gene
Modified
Cancer cell
vaccine

Endogenous T cells

不需知道靶位点,
但多数效果不佳

2000 德国
Passive immuno-
therapy

TCR gene
Modified
T cell
therapy

Engineering T cells

需要确定靶位点和
分离TCR基因

2011-现在广州
Precision
immuno-therapy

Comprehensive
and precision
T cell
therapy

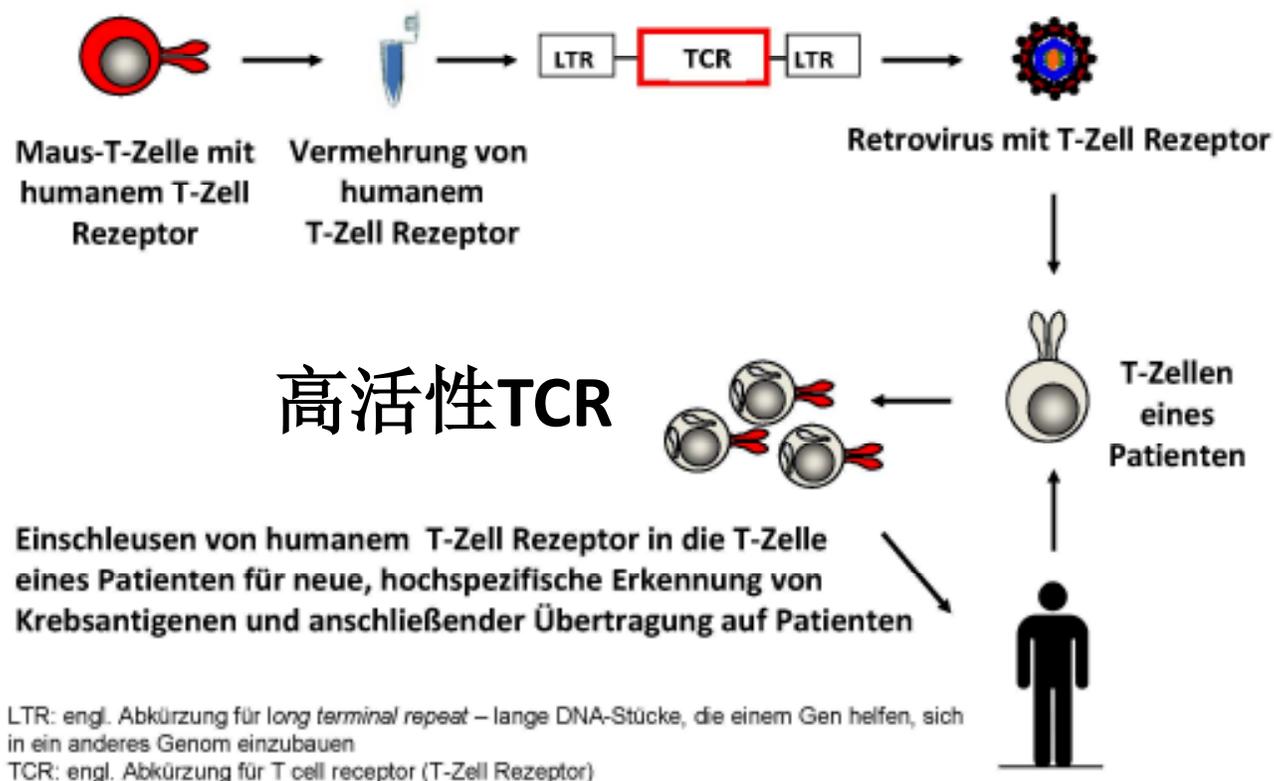
Active & passive T cells

集成多种技术, 综合
精准癌症免疫治疗

2000-2010年：TCR-T细胞过继免疫治疗



High affinity TCR gene therapy for anticancer



由于免疫耐受，许多抗原难以从人体分离高活性TCR!

Most TAAs differ between mouse and human

Melan-A EAA

mouse
human

EAAGIGIL**I**V
EAAGIGIL**T**V

No or less tolerance to human TAAs in mice

Identify human high affinity TCRs against human

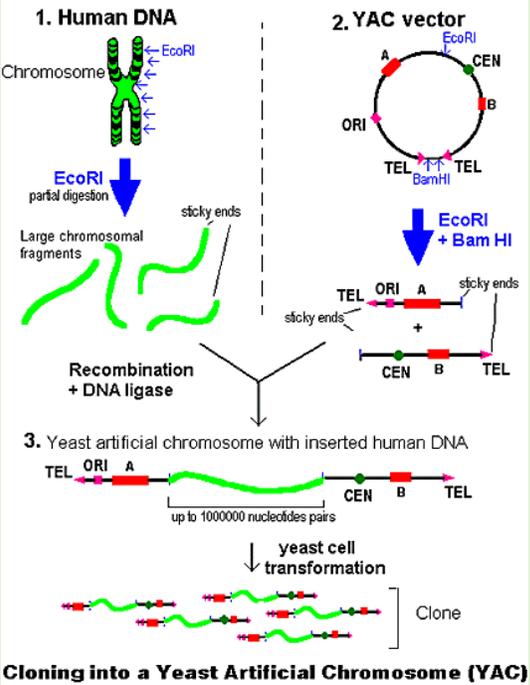
TAAs in TCR-HLA humanized mice

人源化TCR-HLA小鼠：构建人T细胞受体基因 α/β 位点YAC转基因鼠，与HLA-A2转基因，TCR- $\alpha\beta$ 和Db/B2M基因敲除鼠交配产生人源化T细胞抗原识别系统小鼠。

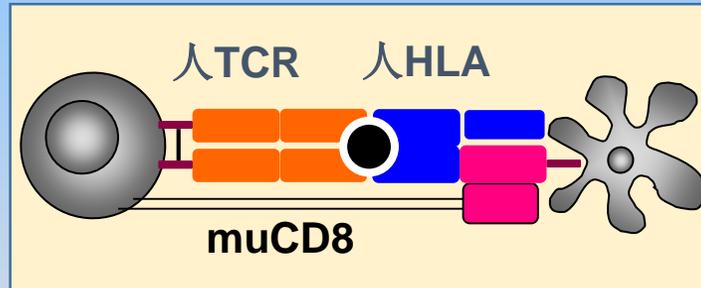
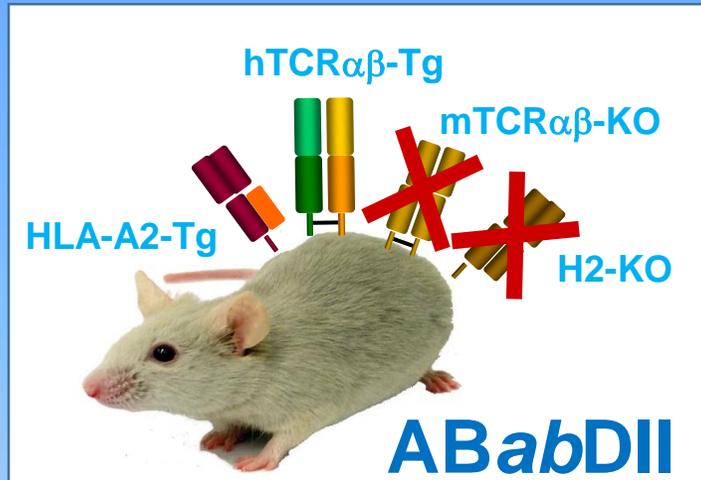
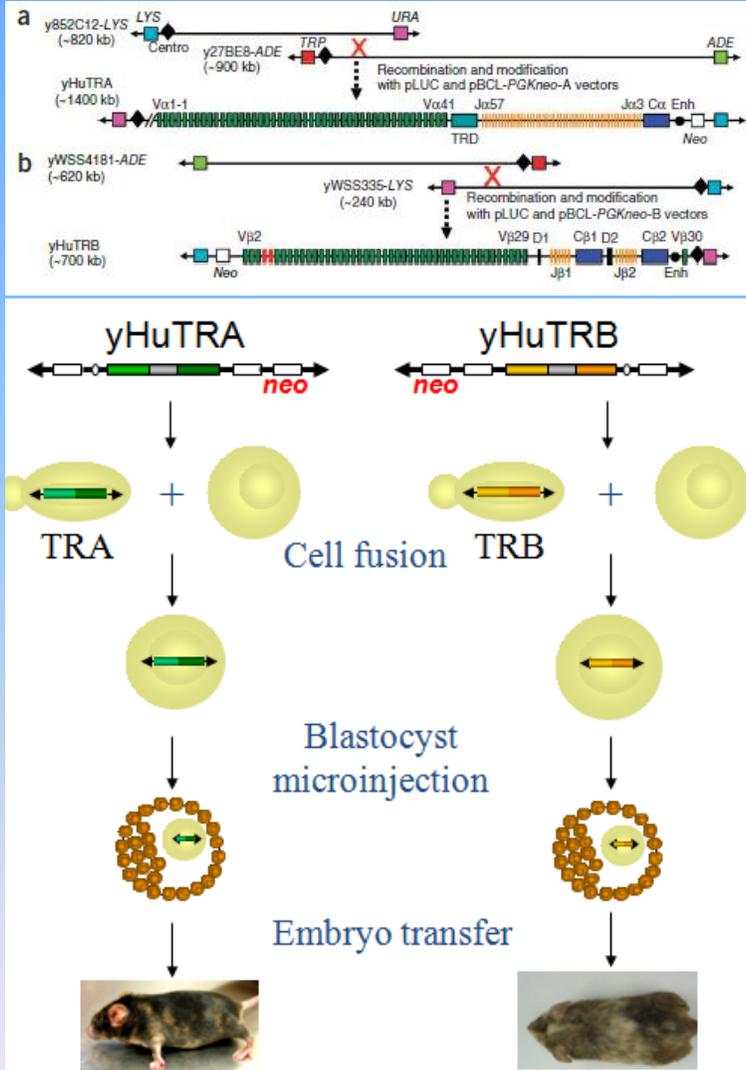
How to isolate high affinity T cell receptors (TCRs) for **TAA**?

TCR-HLA 人源化小鼠技术平台

YAC technology 酵母人工染色体



DNA克隆容量:
100-2000 kb



分离了多种TAA抗原的TCR基因

李亮平等首创的TCR-HLA人源化小鼠

基因位点

1. hTCRα-Tg
2. hTCRβ-Tg
3. mTCRα-KO
4. mTCRβ-KO

HHDI

5. hβ2m-HLA-A2-D^b-Tg
6. H2-D^b-KO
7. mβ2m-KO

国际一流

Liangping Li & Thomas Blankenstein 2010 Nature Medicine /2014 Nature Protocol

2011年回国工作后：癌症免疫治疗获得大进展

Breakthrough of the Year 2013

坚实的科学基础：

1. 肿瘤细胞存在肿瘤抗原，相关抗原（TAA）特异性抗原（TSA），
2. 机体存在针对这些抗原的抗肿瘤T细胞，可以产生有效的免疫反应。

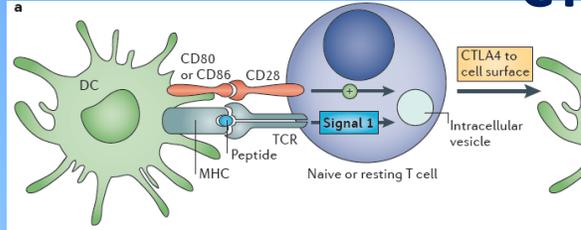
CANCER
IMMUNOTHERAPY

人类可以产生特异性更强，效果更好的抗肿瘤免疫，以治愈癌症。

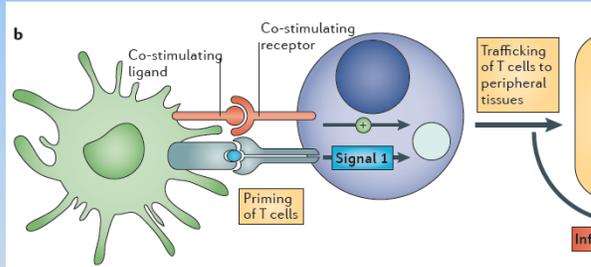


第一波革命性肿瘤免疫治疗

阻断免疫检查点，激活体内抗肿瘤免疫细胞。



PD

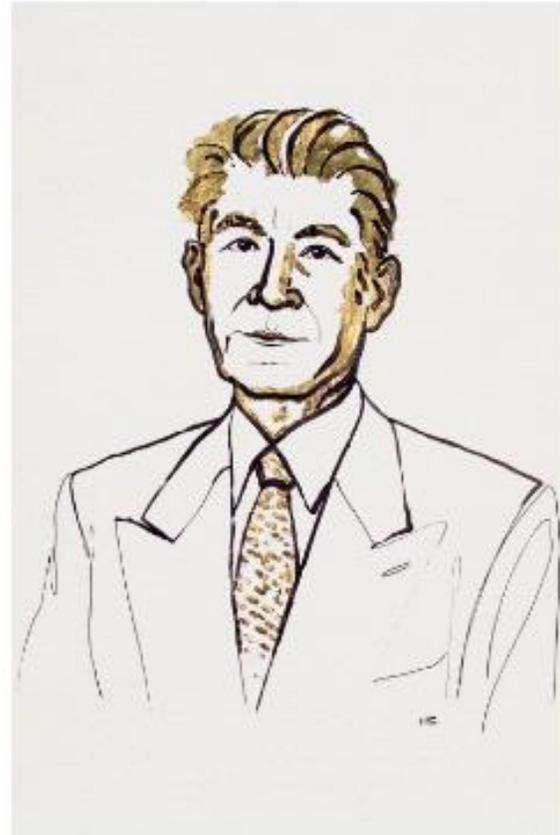


总反应率为20-30%，更有



III. Niklas Elmehed. © Nobel Media

James P. Allison



III. Niklas Elmehed. © Nobel Media

Tasuku Honjo

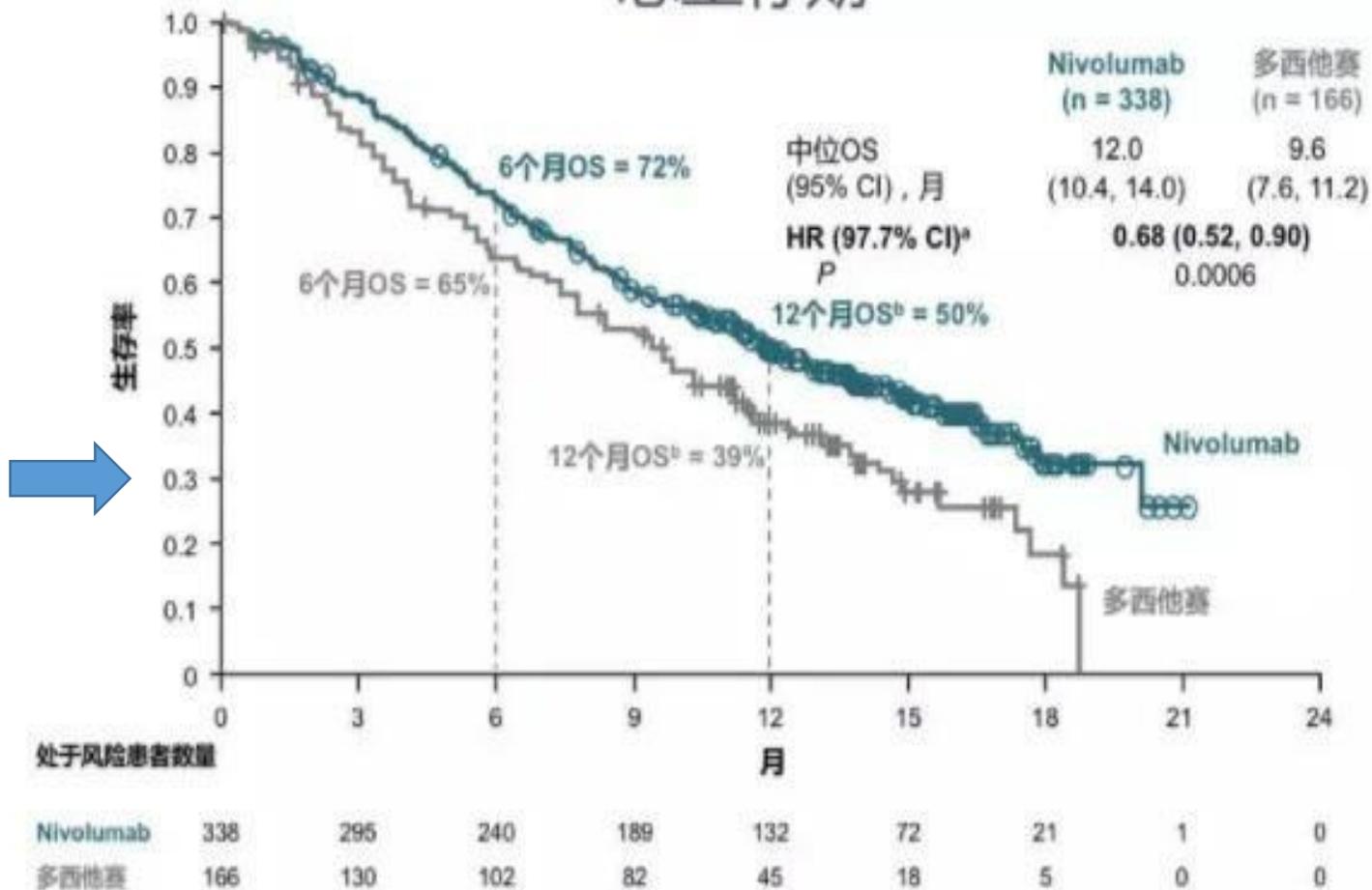


百时美施贵宝
(Bristol-Myers Squibb)
Opdivo 2015年6月22日上市

美日科学家分享2018年诺贝尔生理学或医学奖

免疫检查点抑制剂只在部分患者取得疗效

总生存期



30%长期生存

70%的患者没有效果!

原因：其肿瘤可能没有足够多的具有免疫原性的新抗原或者特异性T细胞!

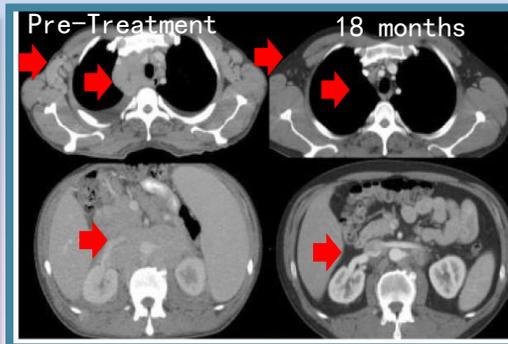
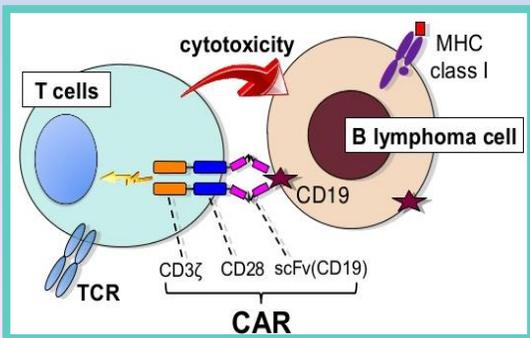
解决办法：增加抗癌T细胞

第二波革命性免疫治疗：T细胞药物

细胞治疗标志性成果

2011年，Carl June团队首次用CD19靶点的**CAR-T细胞**奇迹般救治一个晚期血液癌患者Emily Whitehead，现已**五年无癌**！

众多临床试验证实CAR-T细胞药物对80-90%的B细胞白血病有显著效。



CAR-T细胞药物上市

2017年8月30日 美国FDA批准**首个**白血病的细胞药物Kymriah (CTL019)上市



美国FDA批准第二个T细胞药物

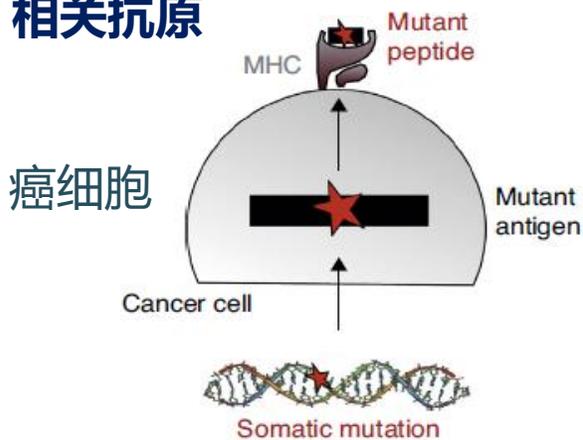
第三波革命性免疫治疗

靶向肿瘤新抗原的精准肿瘤免疫治疗

肿瘤细胞表达新抗原

突变抗原
相关抗原

多靶位点

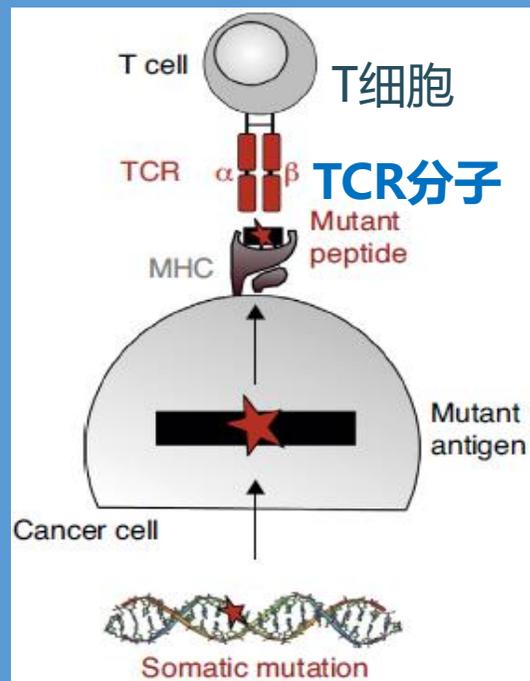


基因突变与变化

重要免疫治疗靶点：肿瘤突变抗原

T细胞能够识别靶位点

T细胞受体 (TCR)



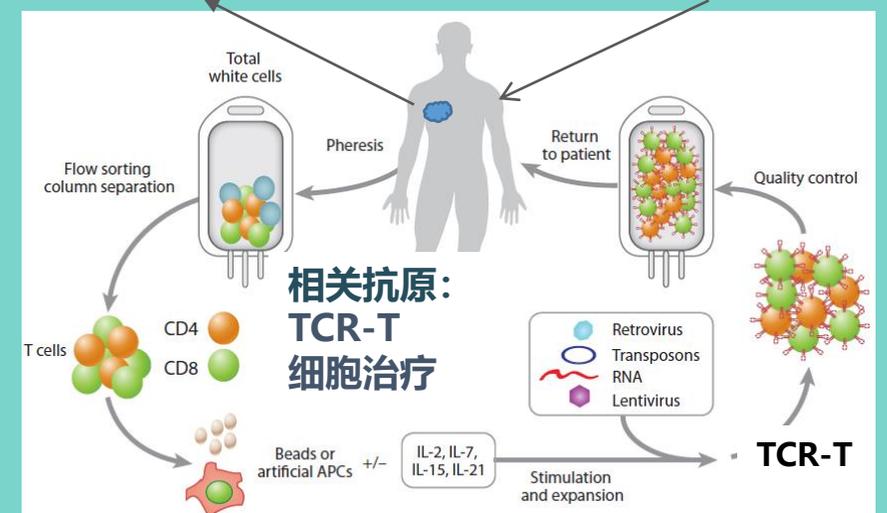
肿瘤免疫靶向治疗

激活或改造成针对肿瘤特有突变的特异性T细胞，
选择性杀伤肿瘤细胞，避免波及正常细胞。

DNA测序
肿瘤类器官

新抗原
T细胞

癌症疫苗
过继免疫



高通量测序技术即将普及



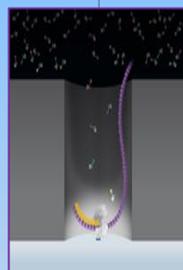
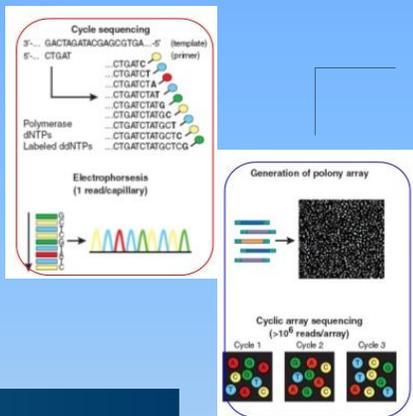
生物学方面的摩尔定律：

基因测序速度迅速倍增，
而成本以指数速度下降。

第一代自动测序 人类基因组计划，15年，30亿美金

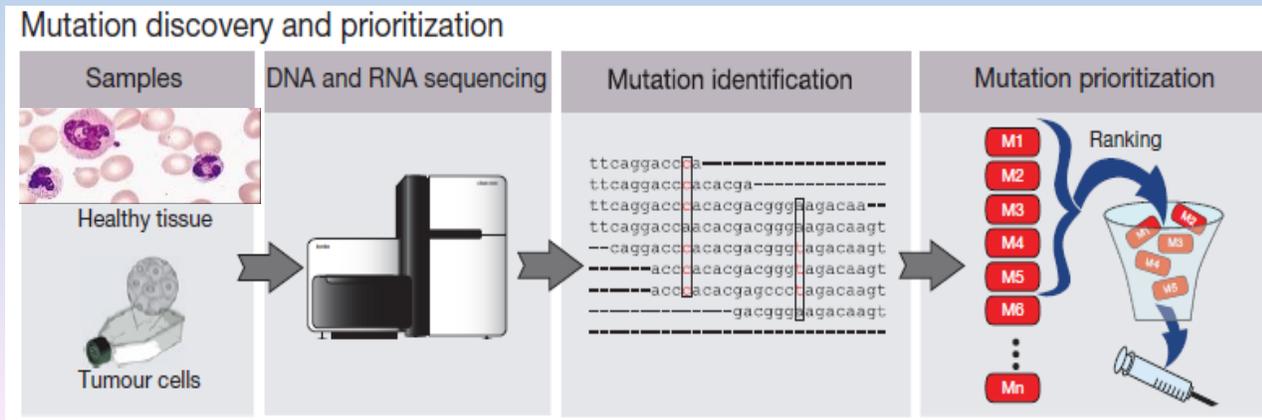
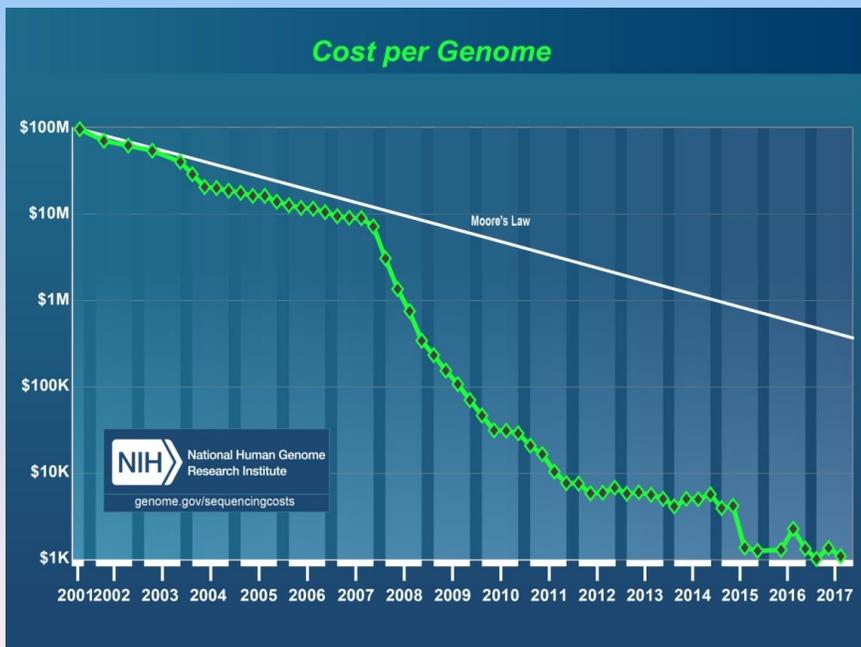
第二代高通量测序 2008年起，基因组测序近十万美金

第三代单分子测序 **明年，千元人民币基因组测序**

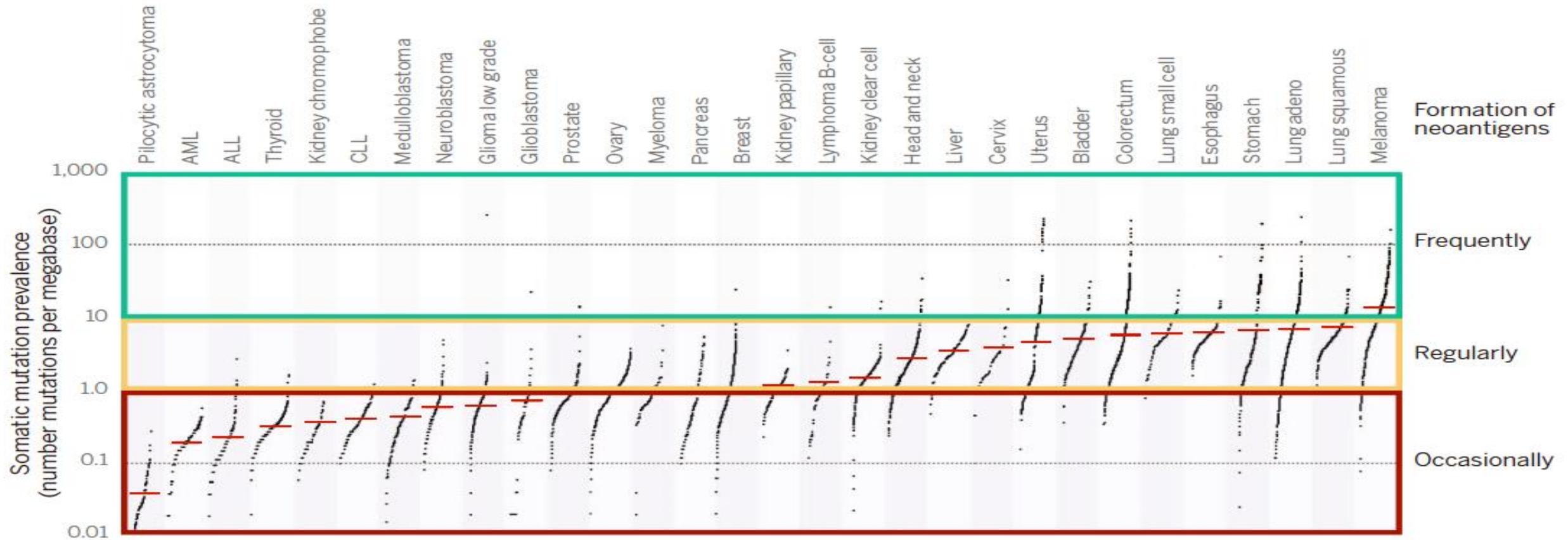


肿瘤精准医疗新时代的来临

高通量测序是快速寻找突变，确定新抗原靶点的基础



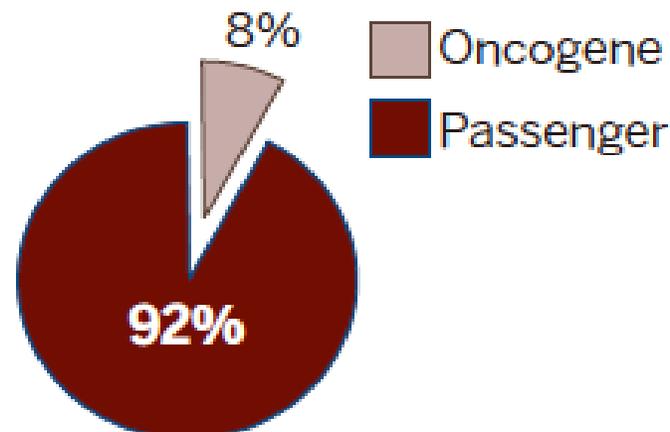
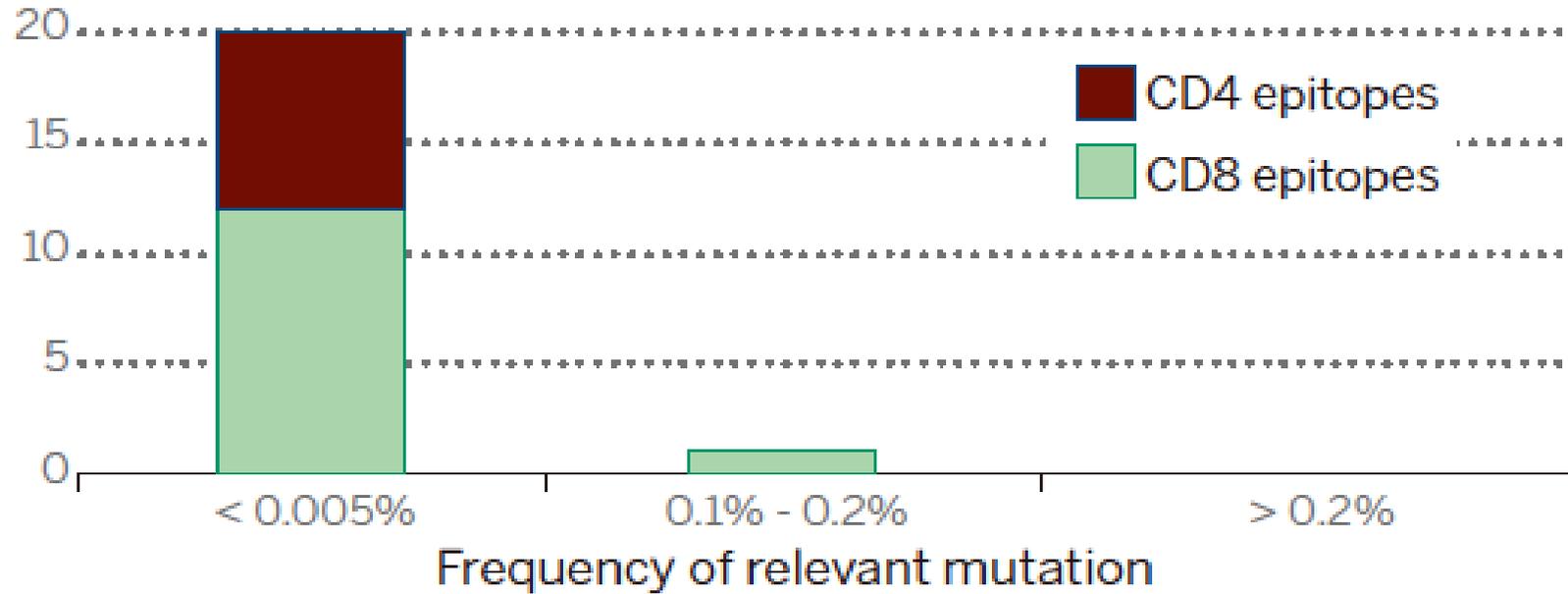
Mutation repertoire in human cancer



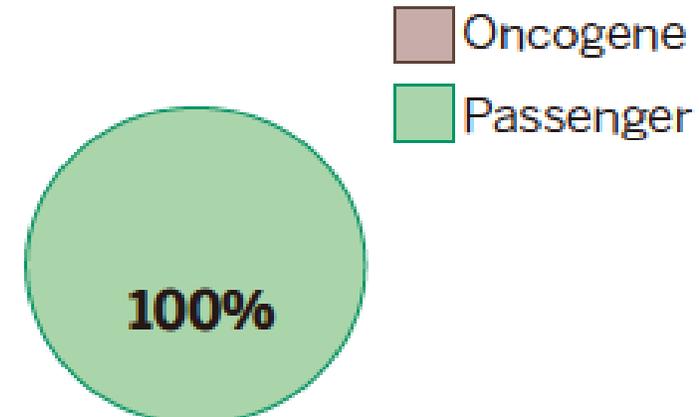
- Tumors typically have between 10-500 protein mutations
- **Over 98% mutations are unique to the specific tumor**
- A fraction of these mutations produce **neoantigens** (1-20+)

Mutation-derived neoantigens in human cancer

Number of identified neoantigens



CD8 epitopes (n=13)



CD4 epitopes (n=8)

Targeting tumor specific antigen

REVIEW

nature
immunology

增加特异性抗癌T细胞的数量!!!

‘Final common pathway’ of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations

Eric Tran, Paul F Robbins & Steven A Rosenberg

1. 高通量测序+生物信息+分子免疫学

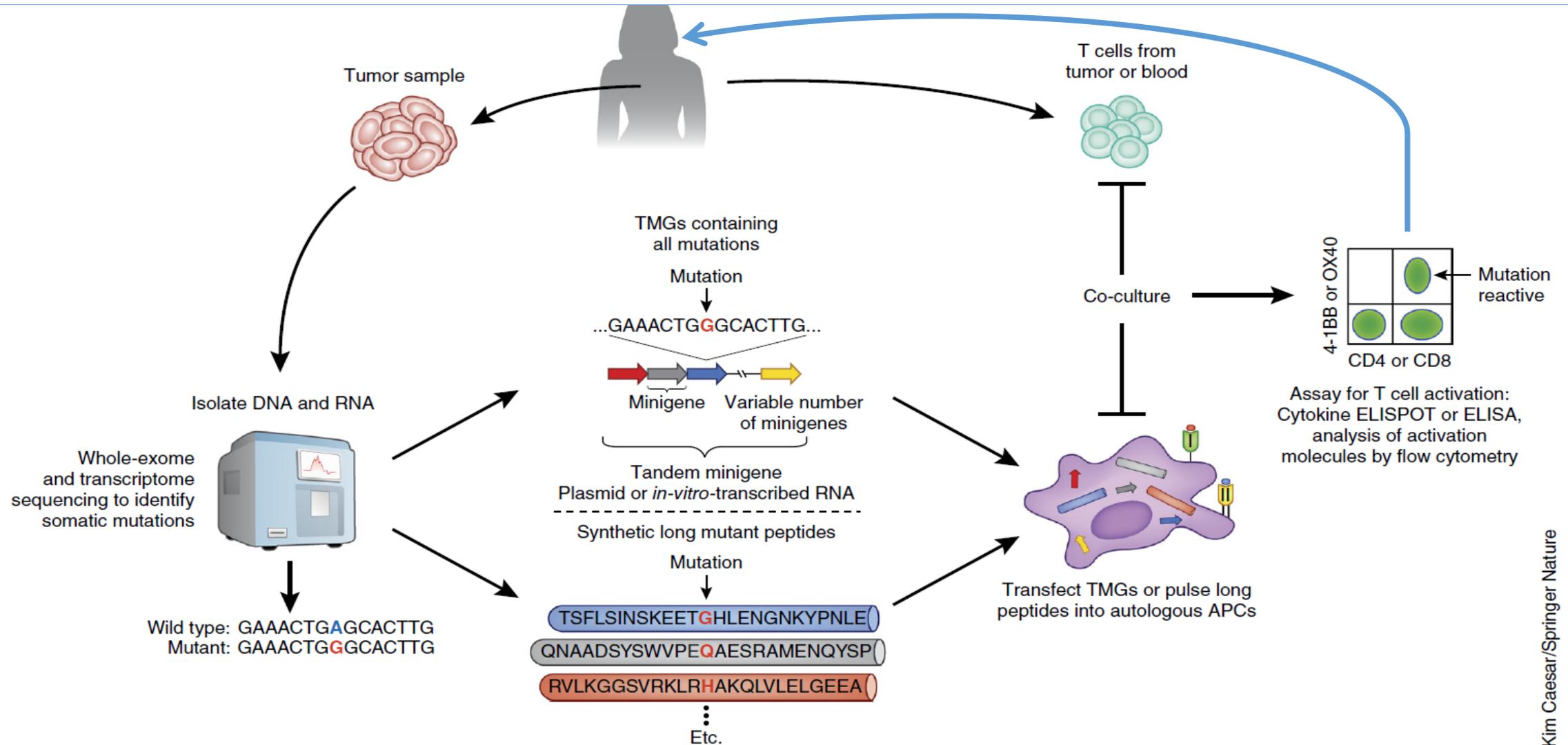
2. 肿瘤类器官培养+T细胞共培养+分子免疫学

扩增
抗癌
T细胞

优点:
新抗原清楚
不需要测序

(一) 靶向新抗原：高通量测序技术的应用

Cancer exome-based identification of neoantigens

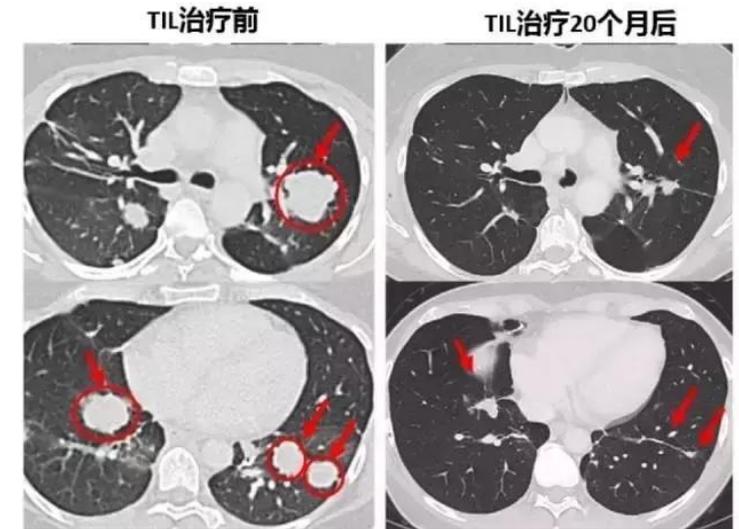


精准肿瘤细胞治疗技术的最新进展

Cancer immunotherapy based on mutation-specific **CD4+ T** cells in a patient with epithelial cancer. Tran E & Rosenberg SA. Science. **2014** May 9;344(6184):641-5.

第一位接受**个性化新型免疫疗法的超级幸存者**，存活超过十年的

晚期胆管癌患者



肺转移病灶，做全基外显子测序，发现有**26个非同义突变**，将这些短基因几个一组地串联成短基因串（**Tandem Minigene, TMG**），然后将这些短基因串转入抗原递呈细胞并与**TIL**共同培养，患者的**TIL**可以识别肿瘤的一个突变（**ERBB2IP^{E805G}**），这个有识别功能的**T**细胞体外大量扩增后再回输给患者，患者肝部的转移灶长期稳定状态达**1年以上**，患者存活**10年**。

《新英格兰医学杂志》 2016年12月: Kras突变抗原T细胞治疗成功案例

T细胞过继治疗

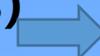


Rosenberg S
NIH, USA

肿瘤组织
DNA测序



肿瘤抗原 (Kras)
特异性的T细胞



体外培养
扩增鉴定

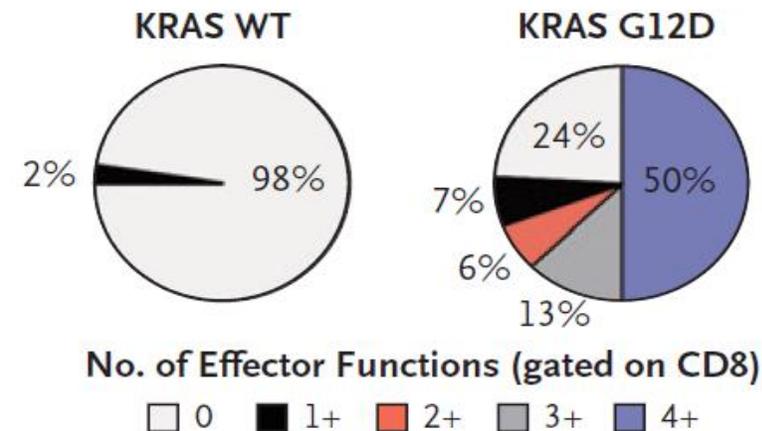
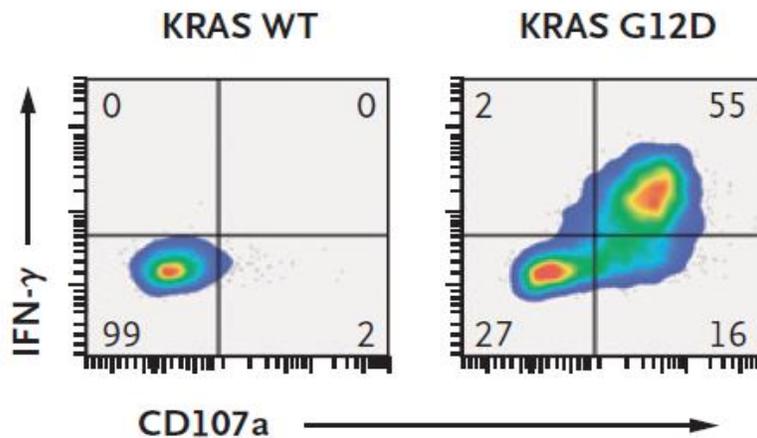
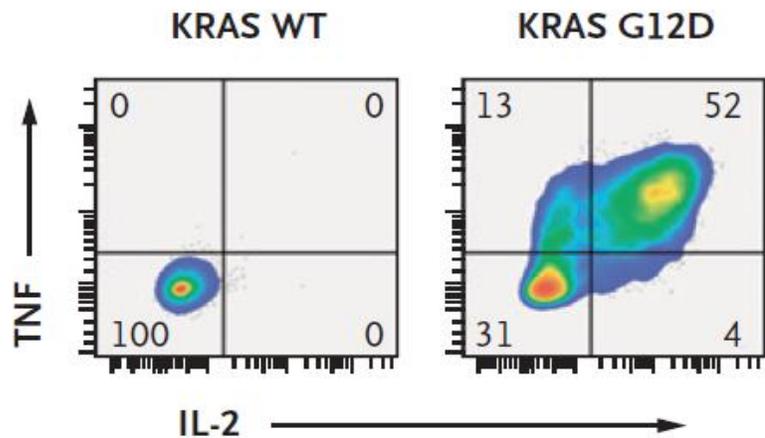


静脉回输
体内抗癌

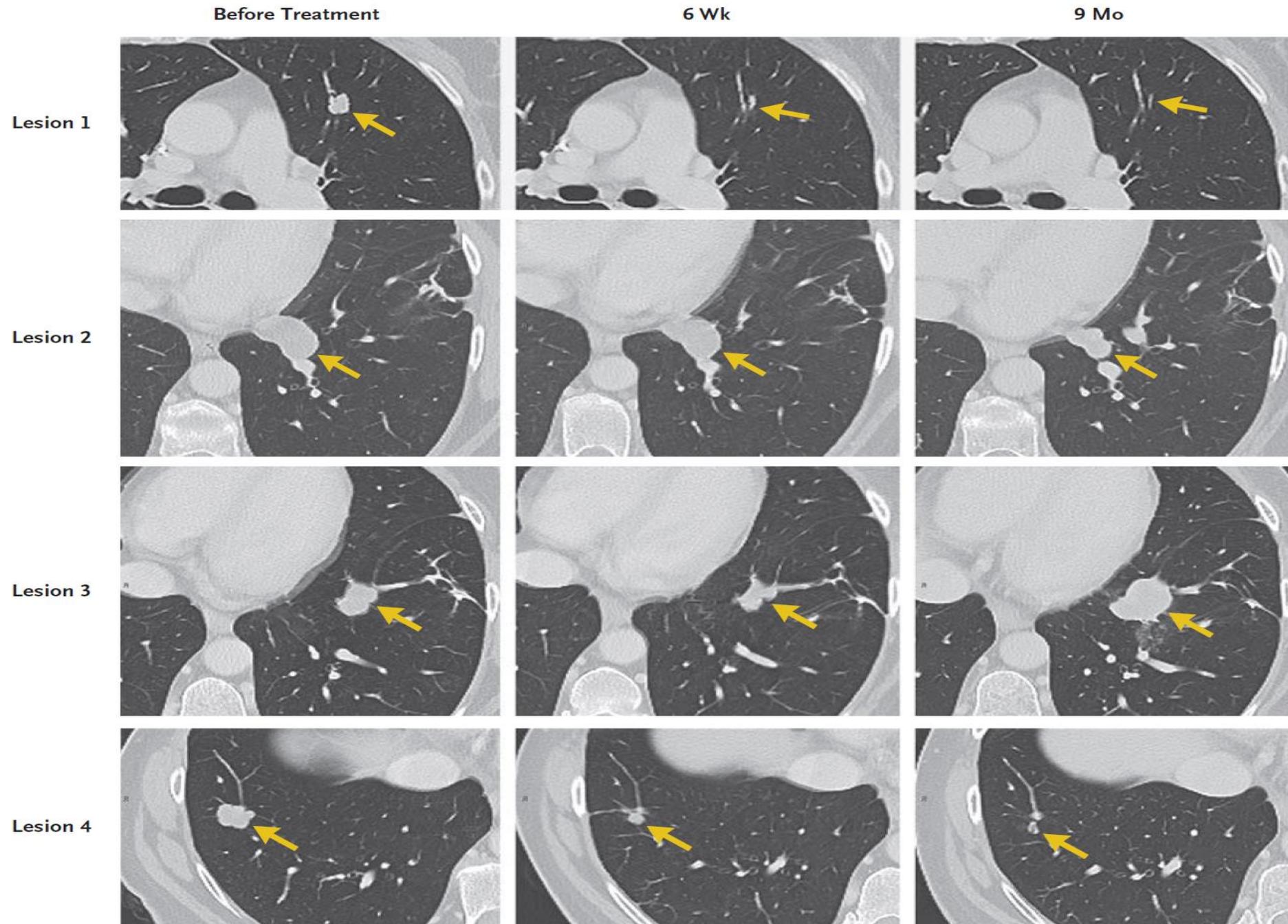
TILs in metastatic
colorectal cancer

1.11×10^{11} HLA-C*08:02
-restricted TILs

A KRAS G12D Reactivity of Infusion Product



B Computed Tomography of Chest



Immune recognition of somatic mutations leading to *complete durable regression* in metastatic **breast cancer**

Nature Medicine (2018.6)

TIL populations from patient 4136 recognize autologous mutant SLC3A2 and KIAA0368 antigens

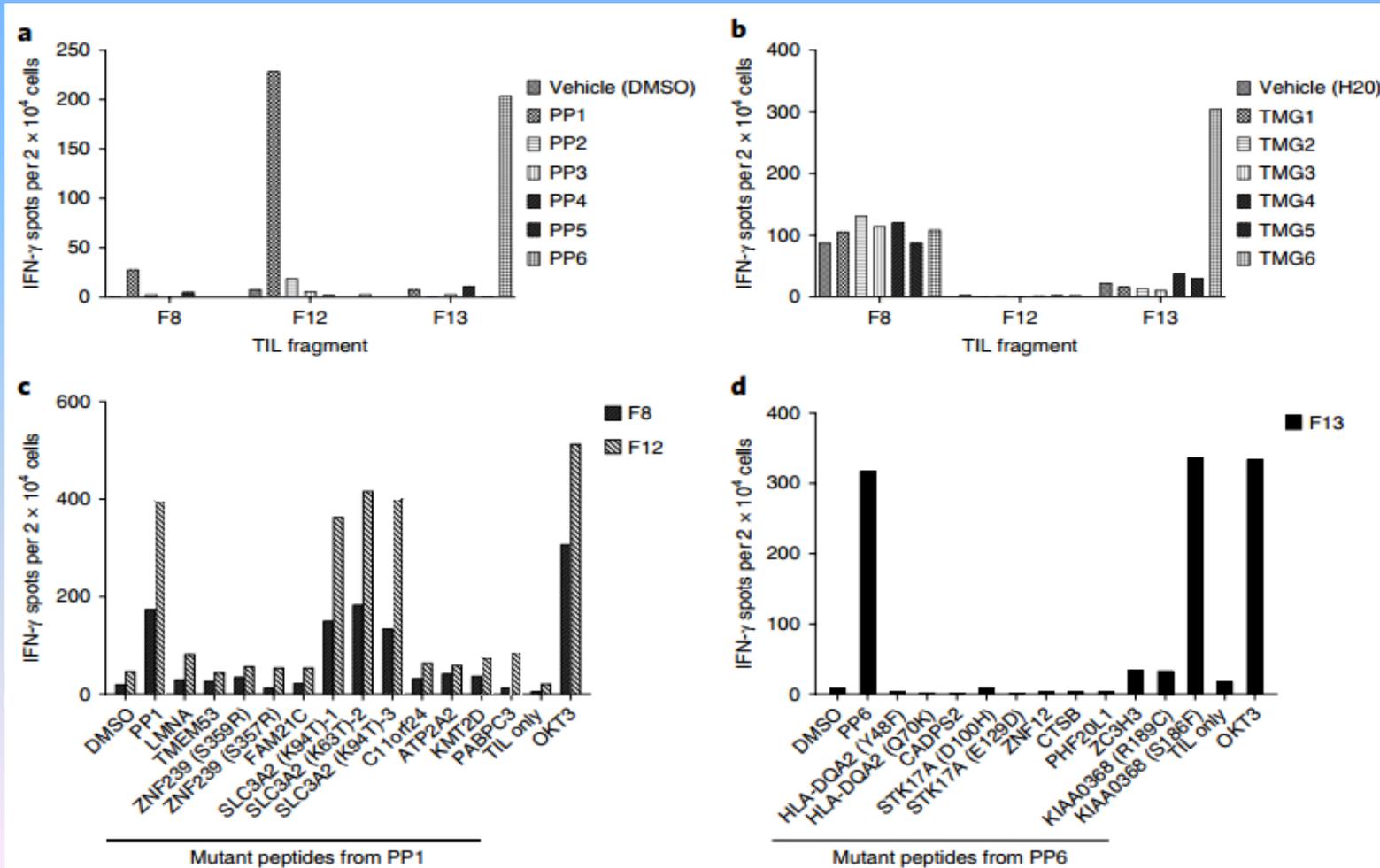
Judy Perkins 朱迪·伯金斯, 美国佛罗里达州, 49岁, 工程师。因乳腺癌接受过乳房切除手术10后复发, 多个疗程的化疗联合激素治疗, 病情不能控制, 肿瘤扩散到胸肺部, 肝脏等。

Right breast subcutaneous lesion 切除

DNA-高通量测序

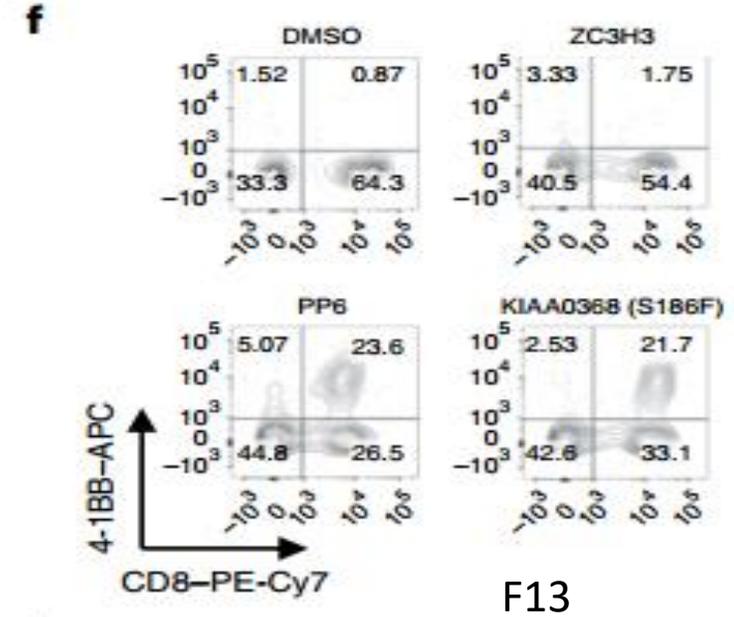
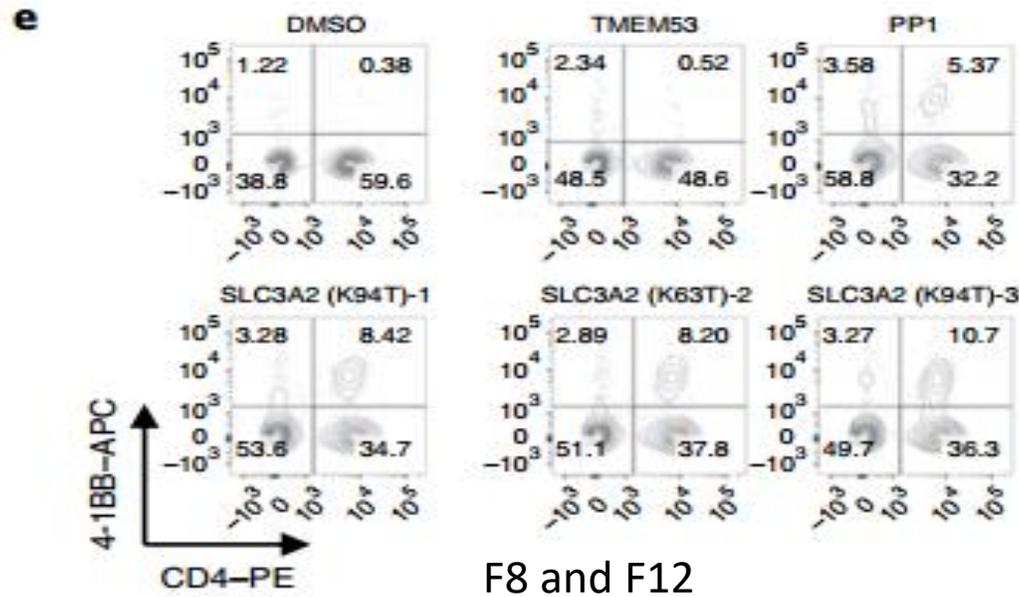
新抗原制备

TIL制备
扩增刺激

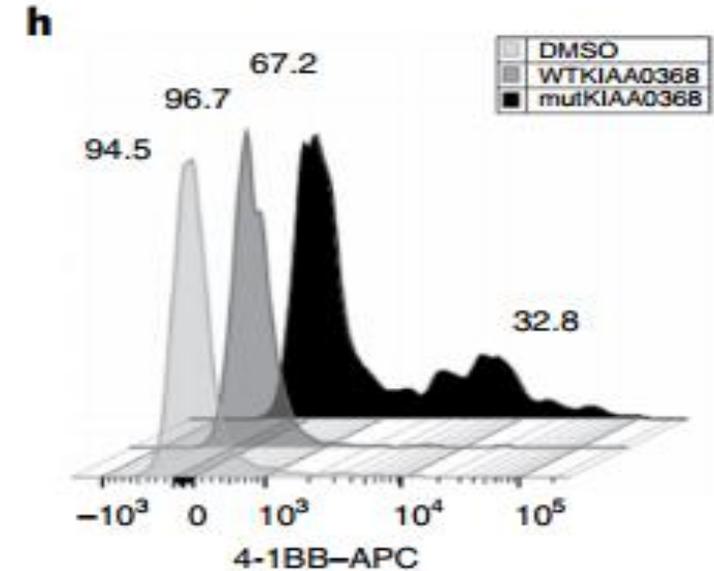
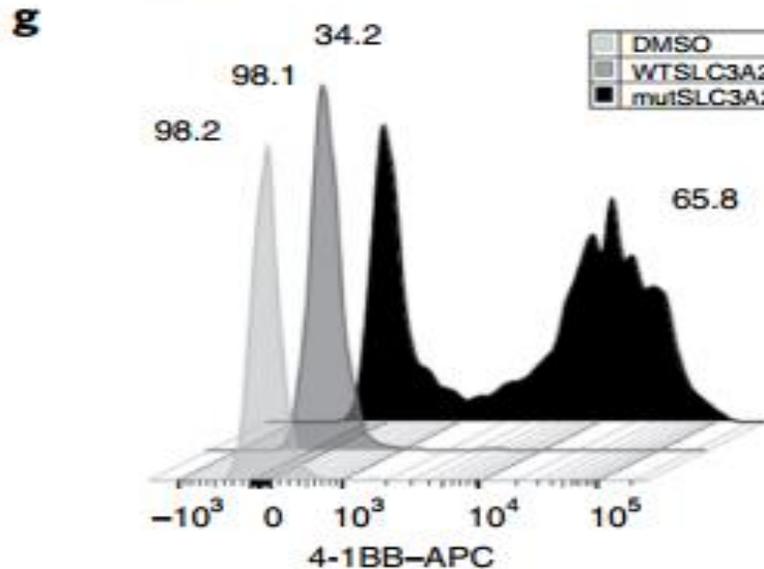


TIL and TCR-T activation by antigens

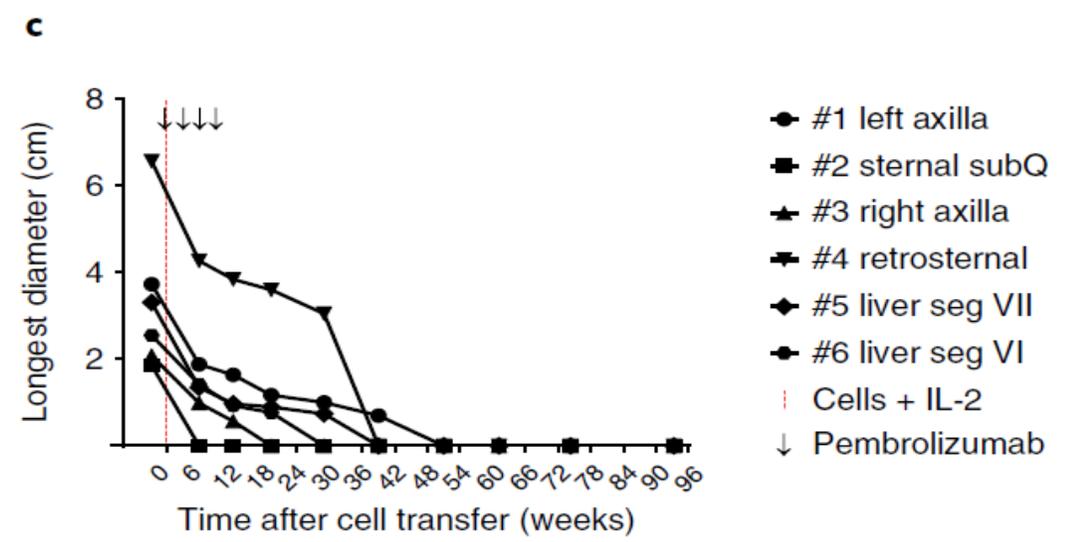
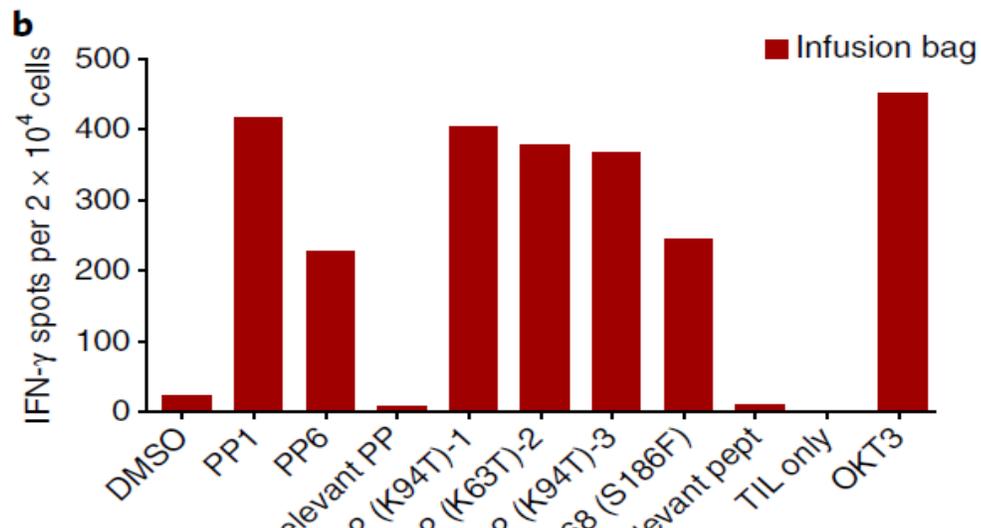
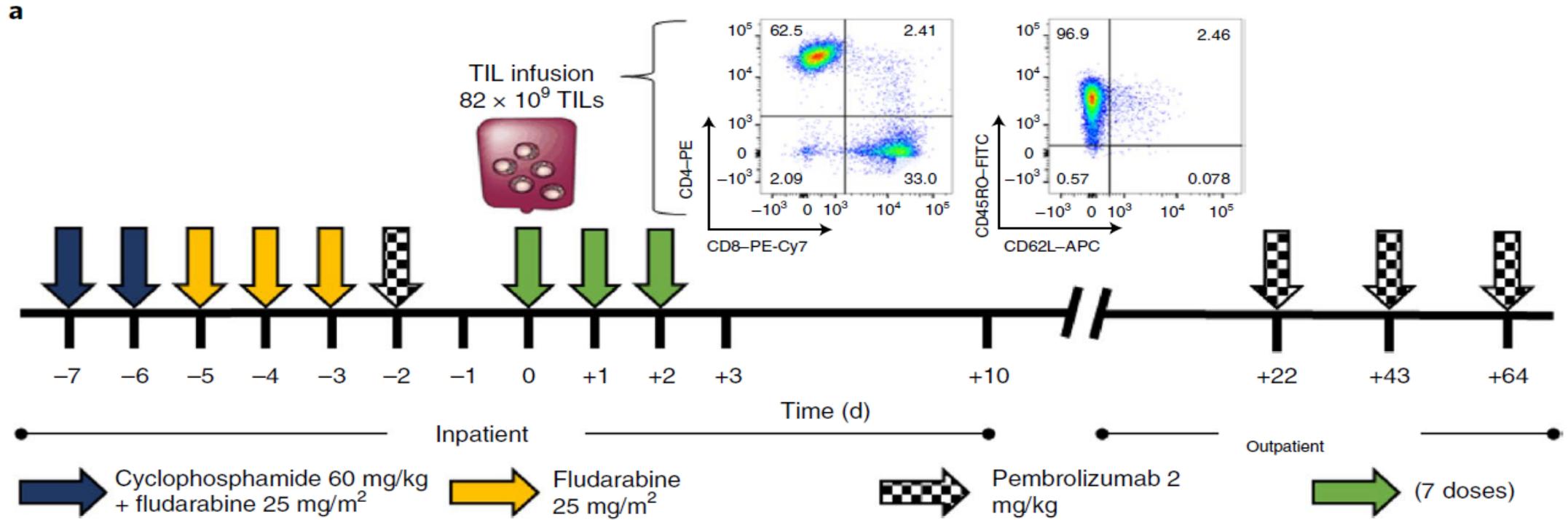
TILs



TCR-T

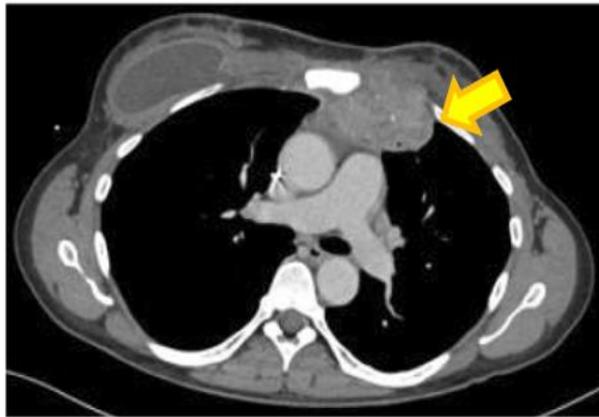


治疗方案

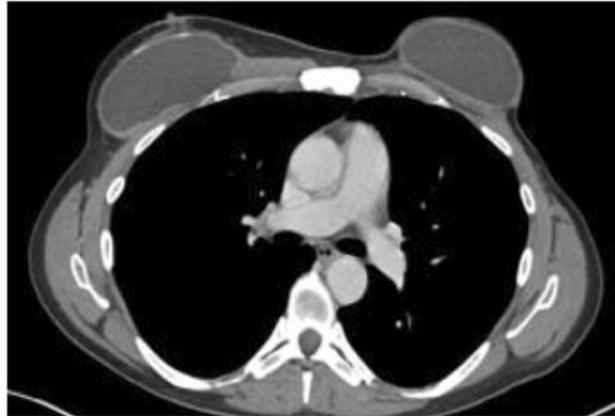


Autologous TILs targeting immunogenic tumor mutations mediated tumor regression

Pre-treatment



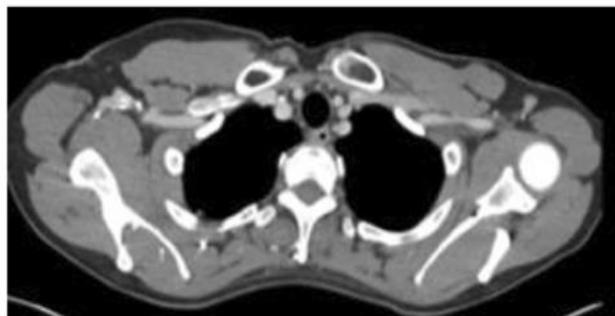
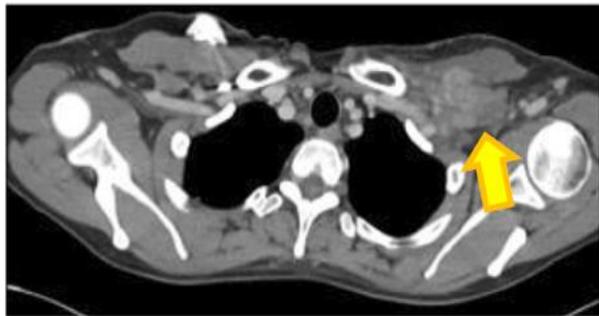
22 months
post-treatment



Pre-treatment



22 months
post-treatment



'I'm The Woman Whose Terminal Breast Cancer Went Into Remission After Immunotherapy'

两年半的无癌状态
(cancer free)



May 2016, cancer free
The **side effects** were rough though. I was **lethargic, fatigued**, and dealing with pain medications that were first making me **constipated** and then giving me **diarrhea**. At one point, I had the **shivers** so badly they had to give me a muscle relaxant.

<https://www.womenshealthmag.com/health/a21100887/woman-terminal-cancer-immunotherapy/>

目前还是个案!

靶向肿瘤新抗原的癌症疫苗

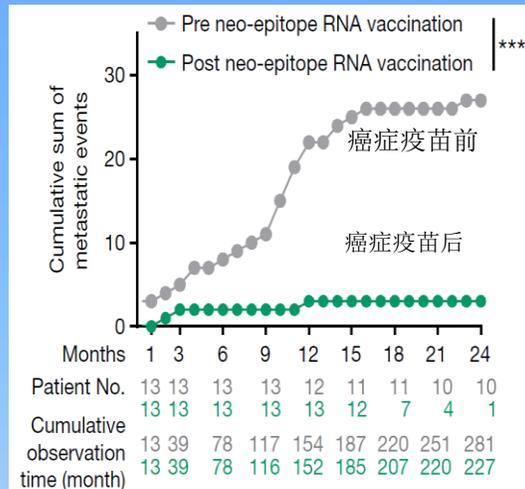
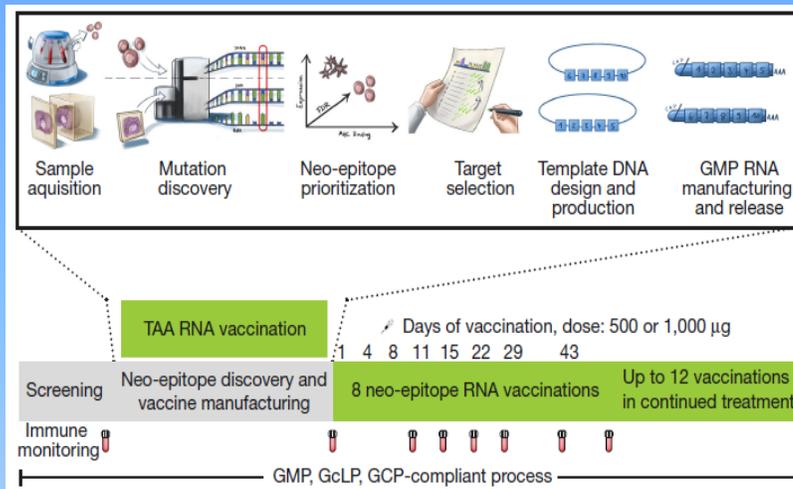
《自然》2017年7月：开天辟地！美德两国团队同时宣布，抗癌疫苗首次大获成功，两项临床试验效果惊人！



Ugur Sahin

德国团队

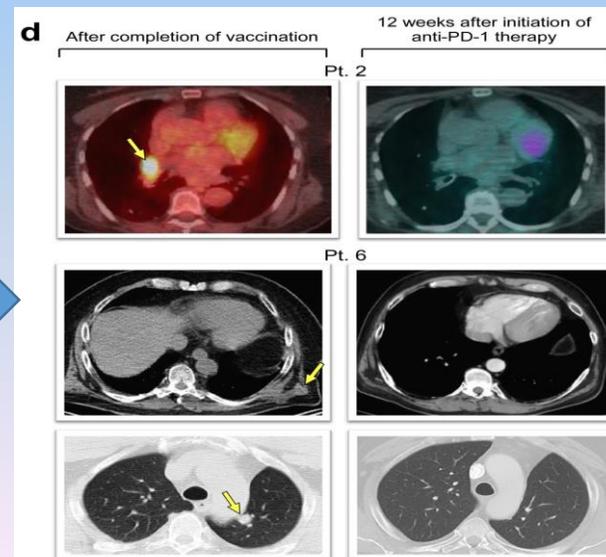
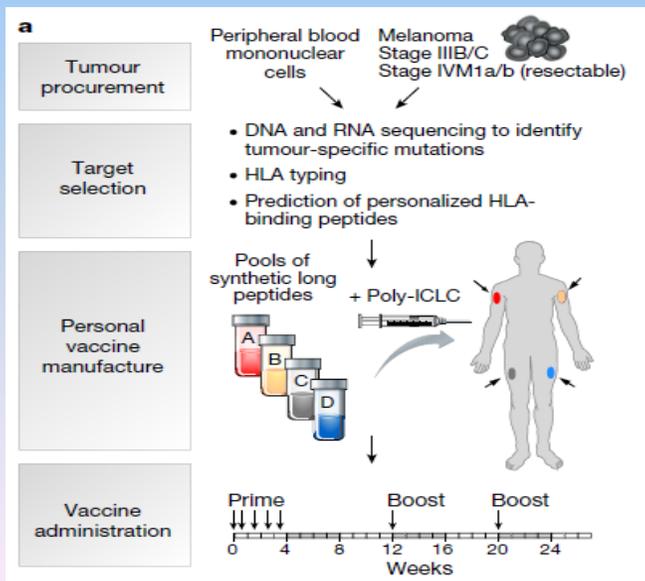
肿瘤新抗原
RNA疫苗



Catherine J. Wu

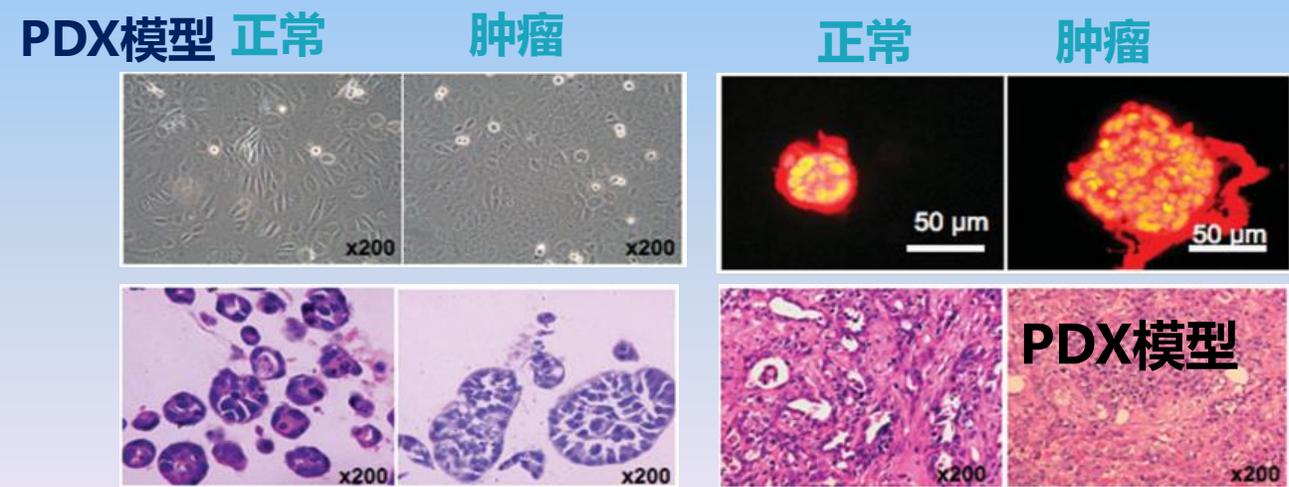
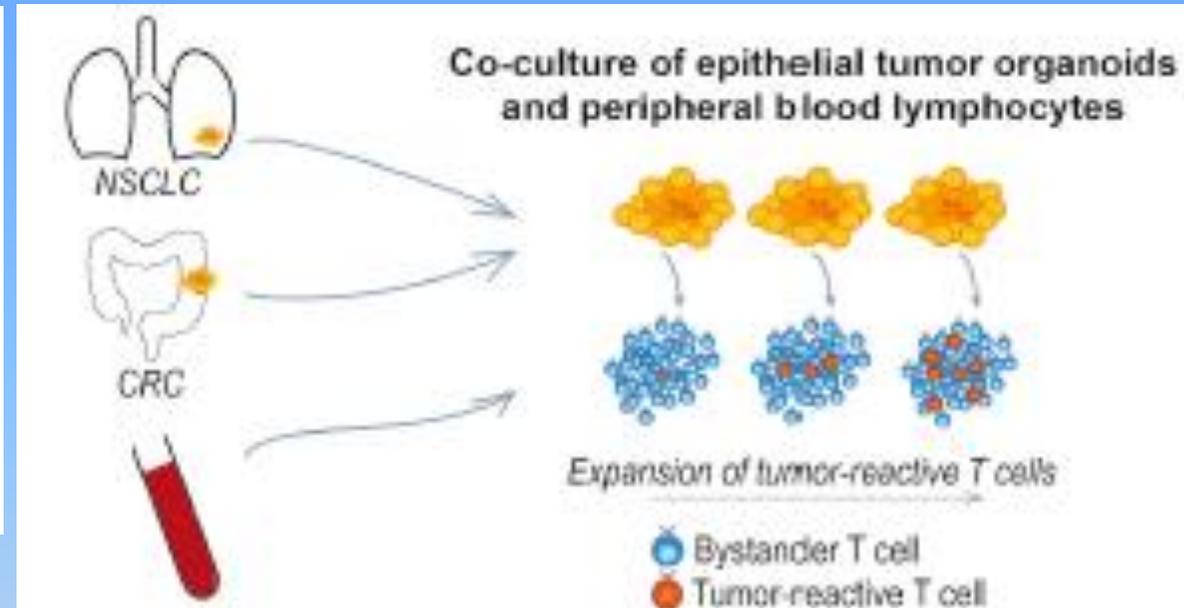
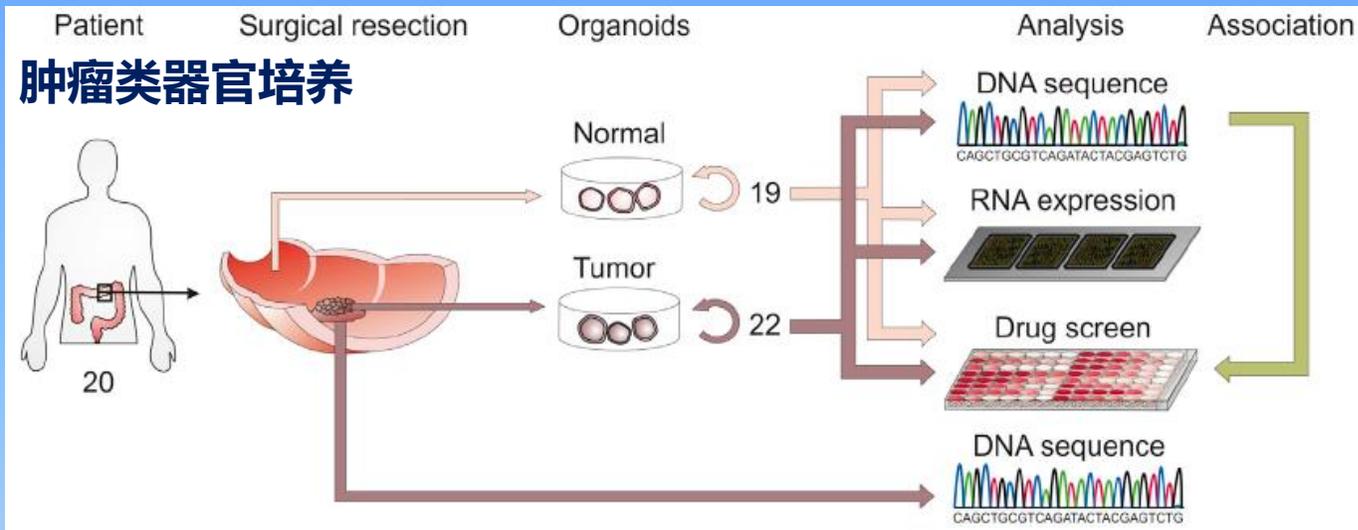
美国团队

肿瘤新抗原
肽疫苗



抗癌疫苗体内扩增抗癌T细胞反应

(二) 靶向新抗原：原代肿瘤模型技术的应用



Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids

抗癌T细胞鉴定



不需要DNA大规模测序!

李亮平等 Int. J. Cancer: 123, 1516–1525, 2008

结直肠癌类器官培养与抗癌T细胞的诱导

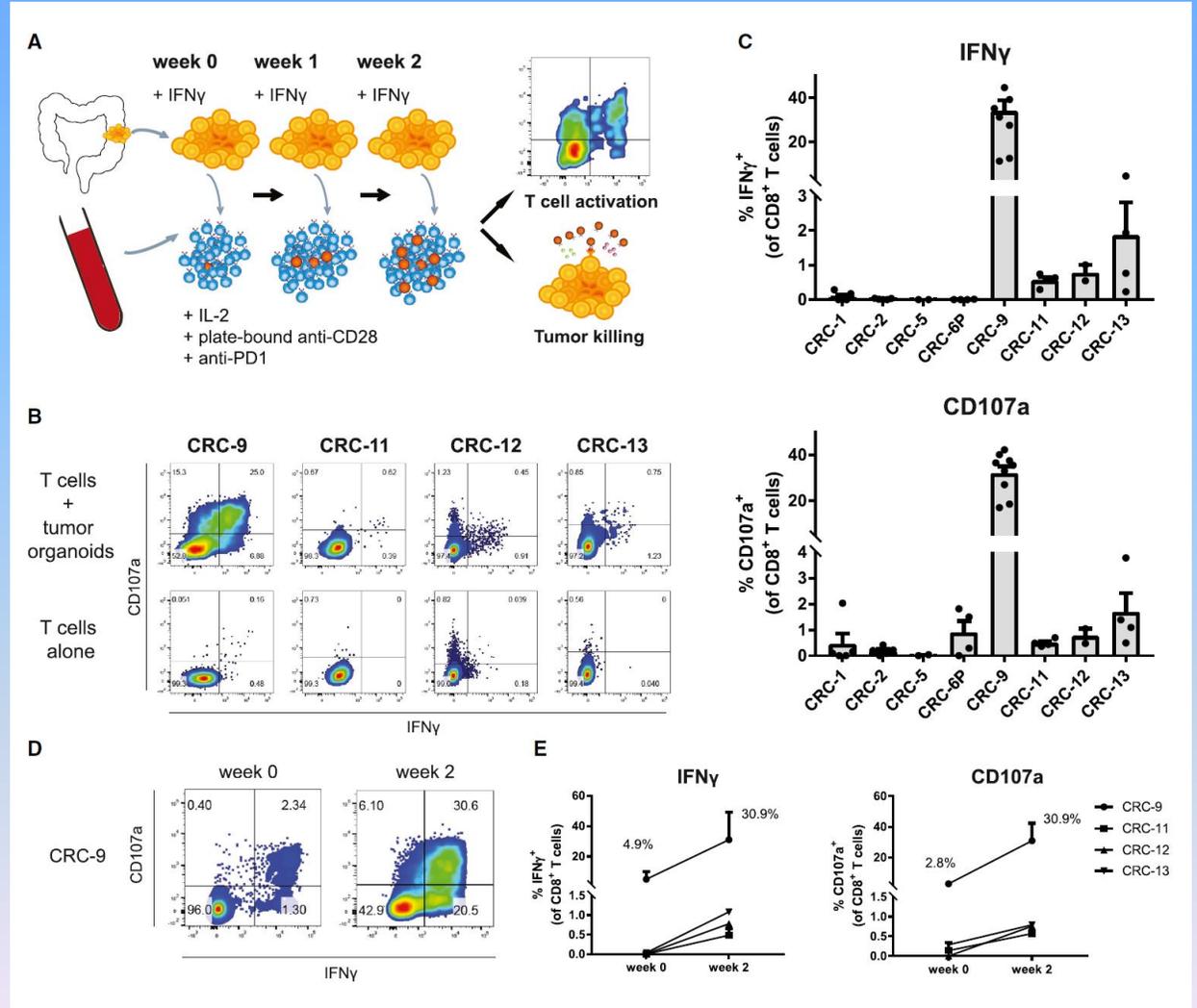
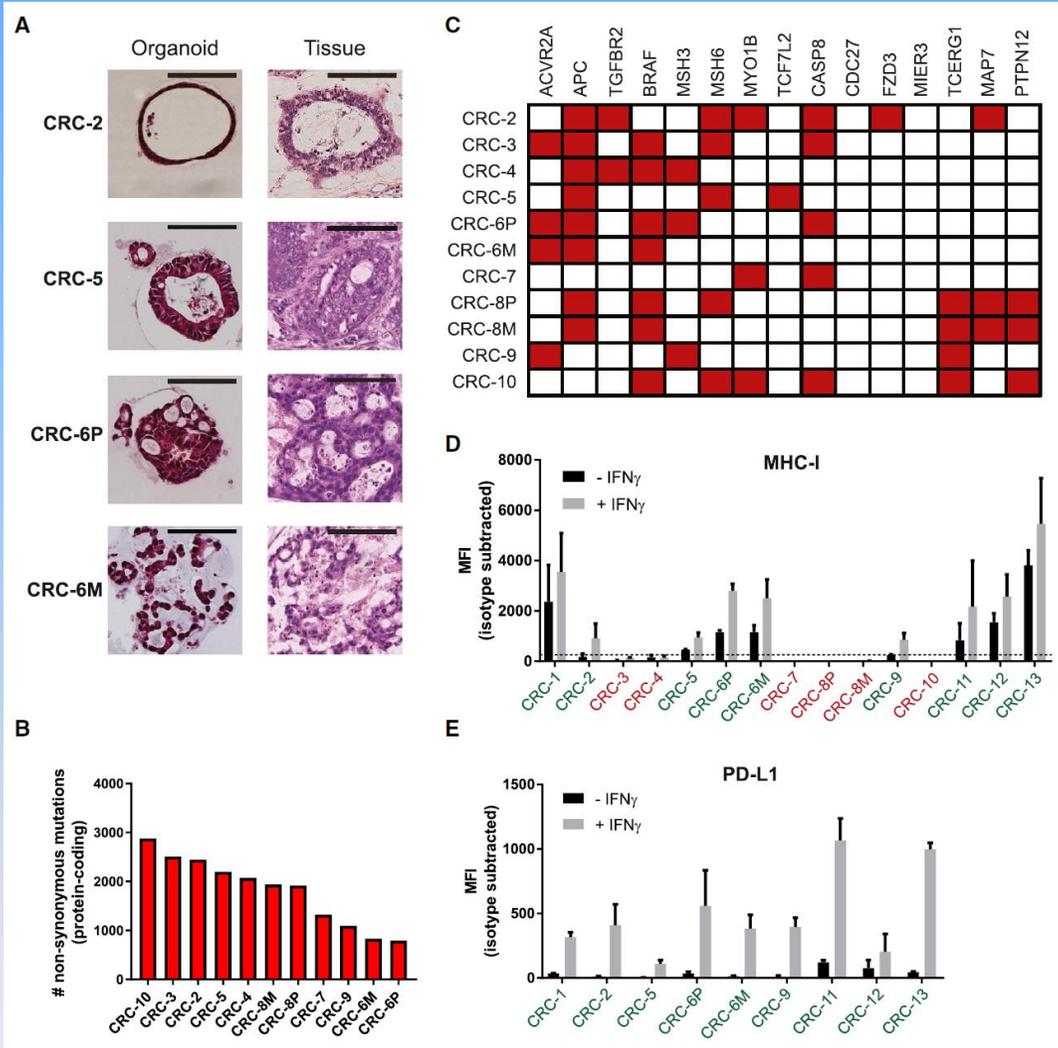
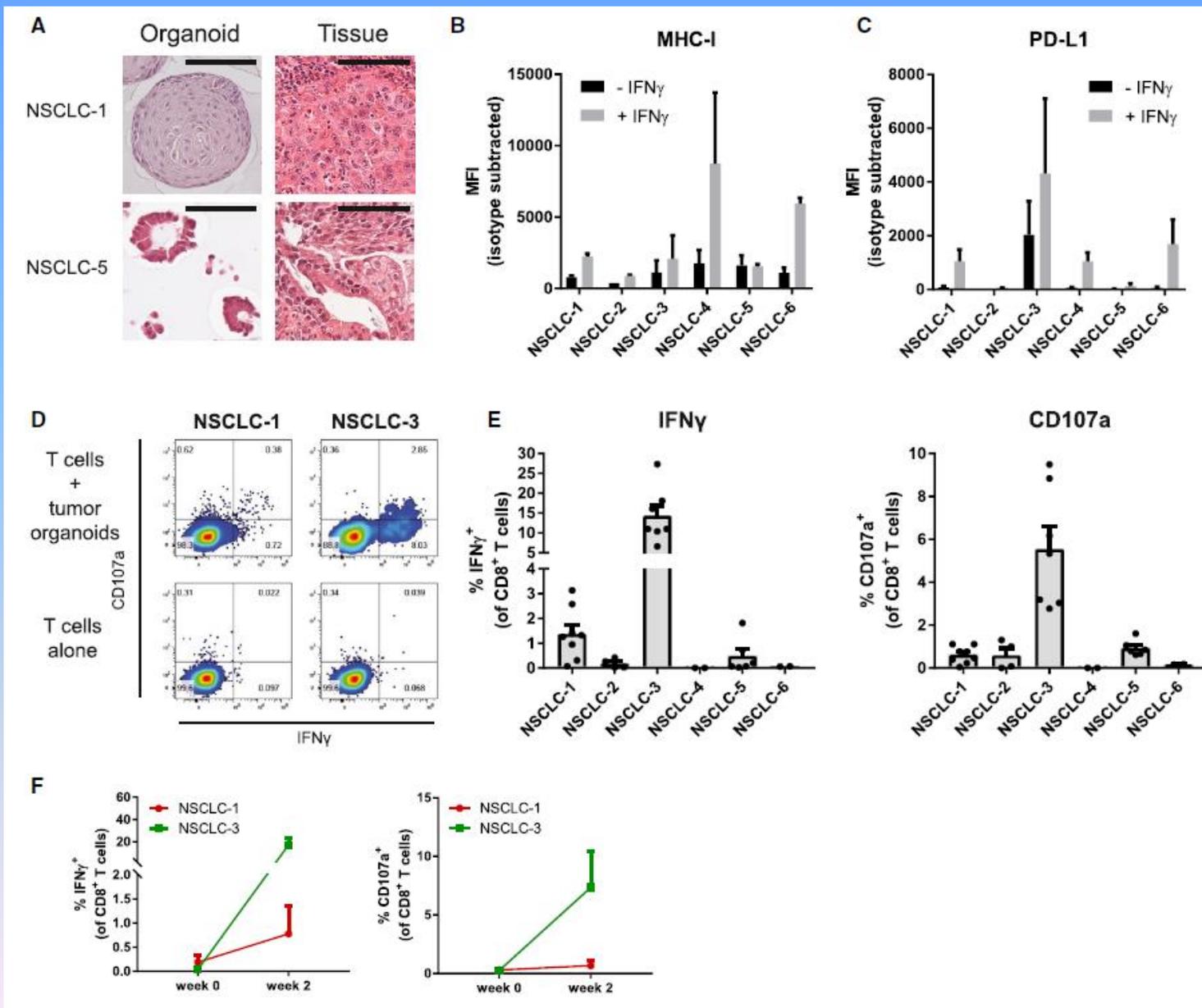


Figure 2. Induction of Tumor Reactivity in Circulating T Cells by Co-culture with Autologous Tumor Organoids

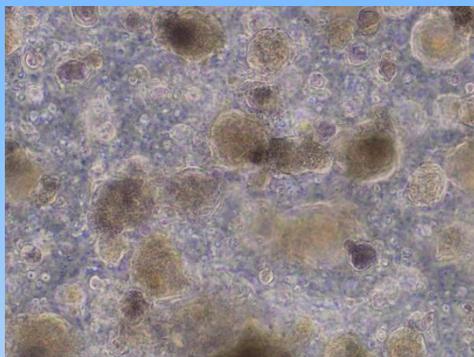
肺癌类器官培养与抗癌T细胞的诱导



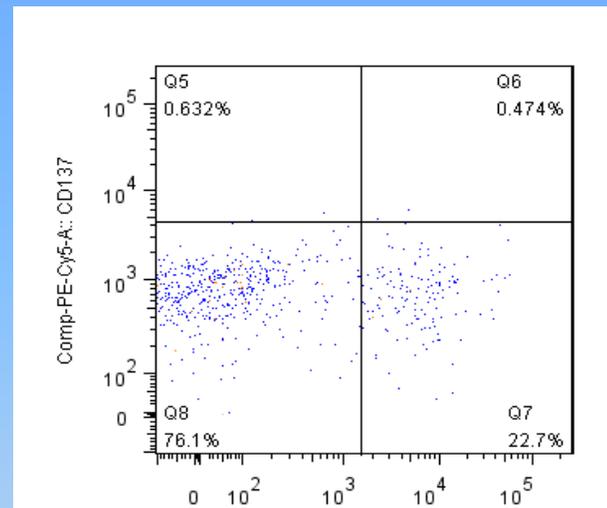
胰腺癌类器官/PDX模型来源的癌细胞刺激 PBMC产生免疫反应 (未发表资料)



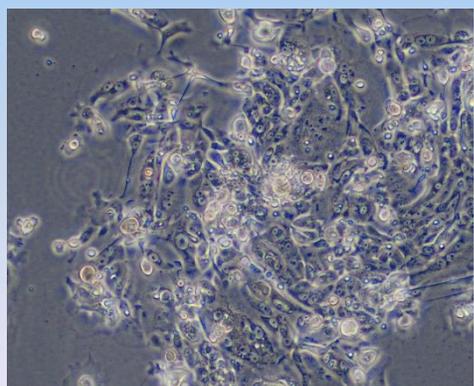
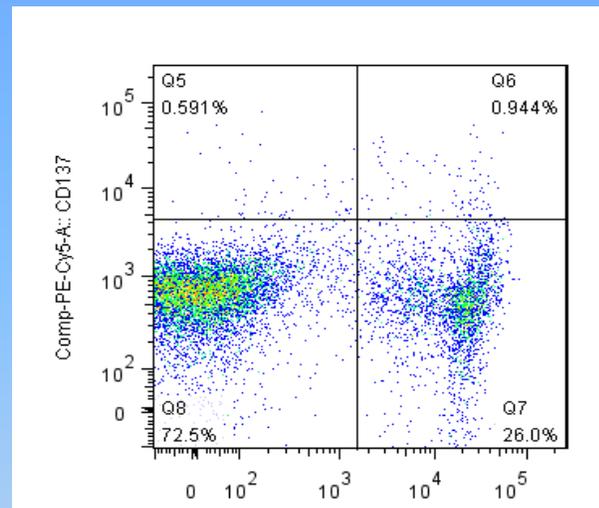
类器官



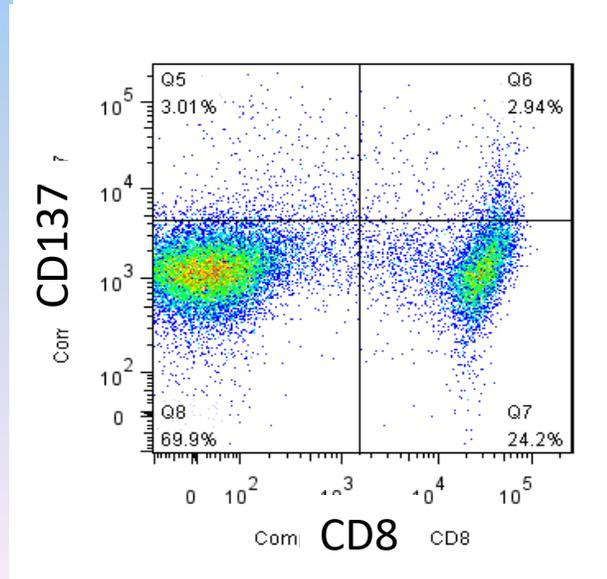
T细胞
刺激一周



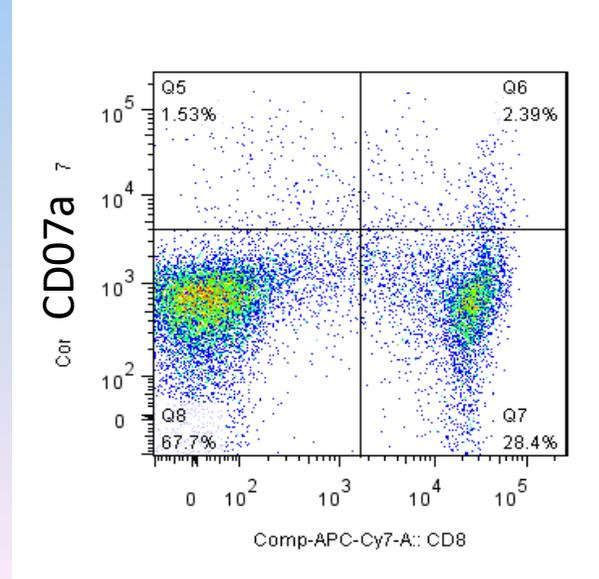
T细胞刺
激两周



T细胞
刺激两周
+tumor



T刺激两周
+tumor+
CD107a孵育
24h

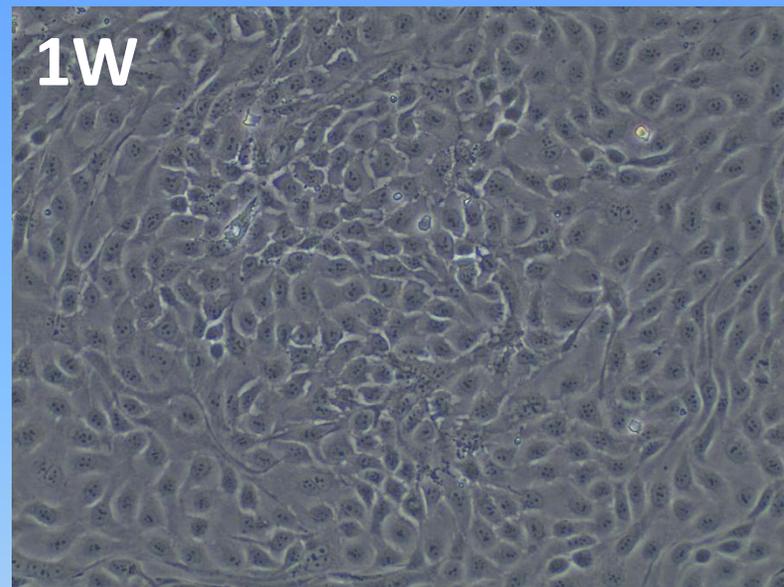
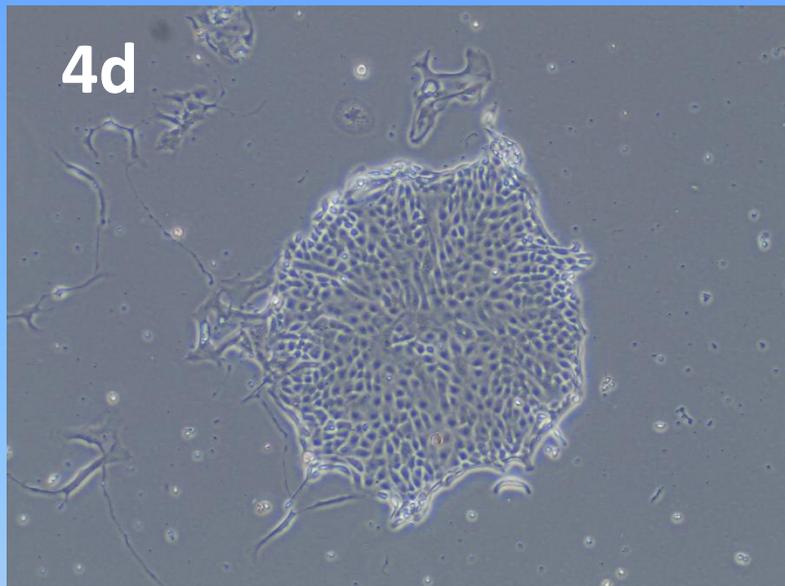


分离扩增
1万倍

近期开展的乳腺癌上皮细胞的原代培养

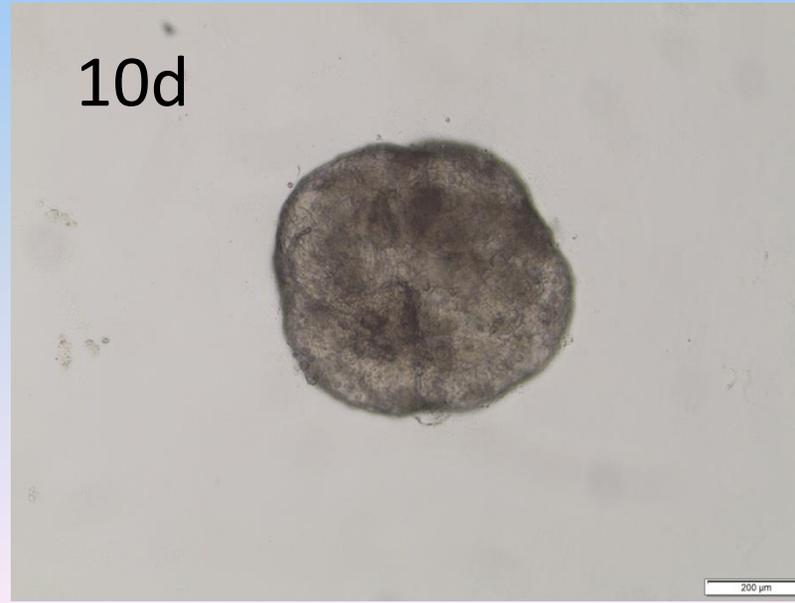
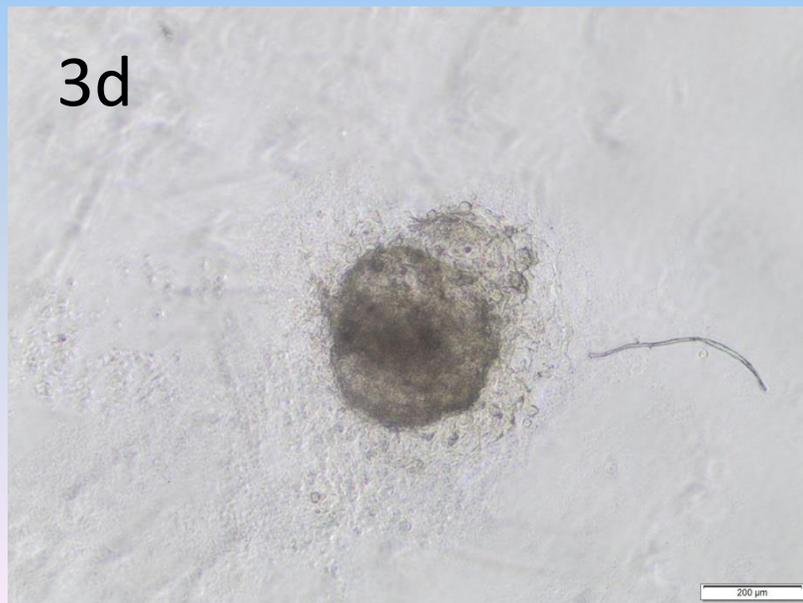


乳腺癌细胞 原代培养

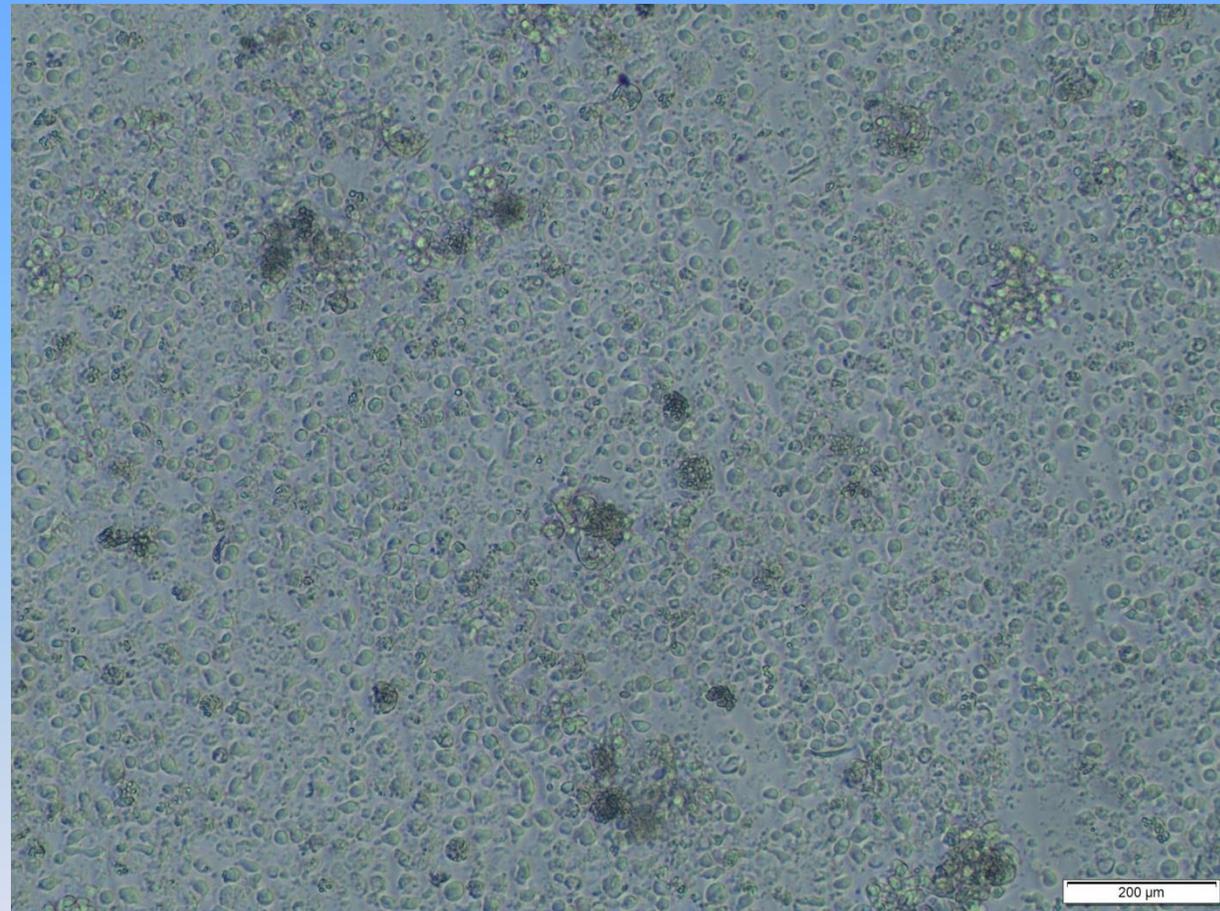
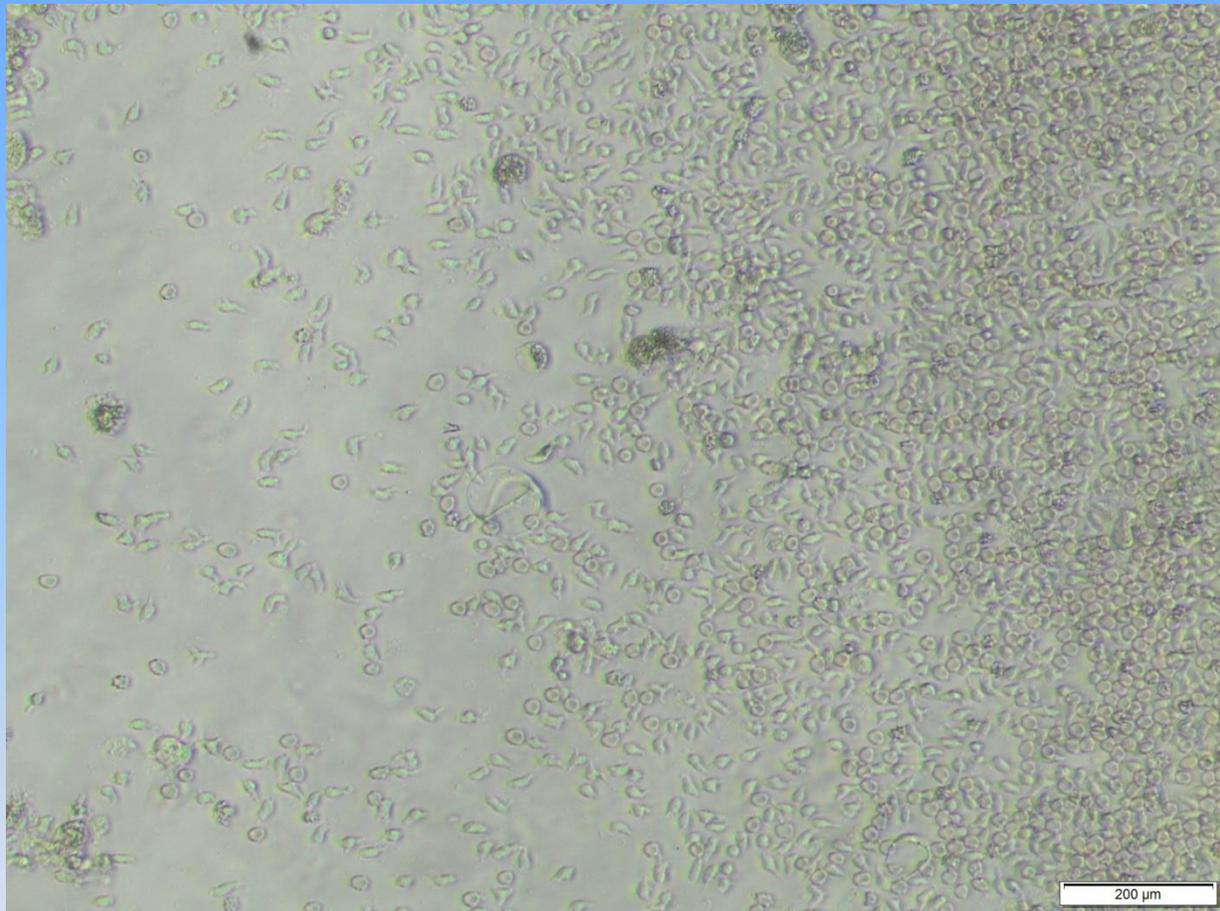


乳腺癌细胞 3D培养

2W, 3000 cells



肺癌组织肿瘤浸润淋巴细胞培养



TIL培养成功率：5/6病例

我们建立了先进技术平台

技术平台

肿瘤免疫细胞
治疗技术平台

T细胞与TCR技术平台

肿瘤新抗原(NeoAg)-TCR库技术

肿瘤类器官培养技术平台

生物信息与
云计算平台

突变肽分析技术，生物信息处理和数据仓库

基于分子免疫学的免疫检测平台

基于云平台的临床应用支持系统

肿瘤精准模型与
用药平台技术

模式动物净化饲养与检测技术

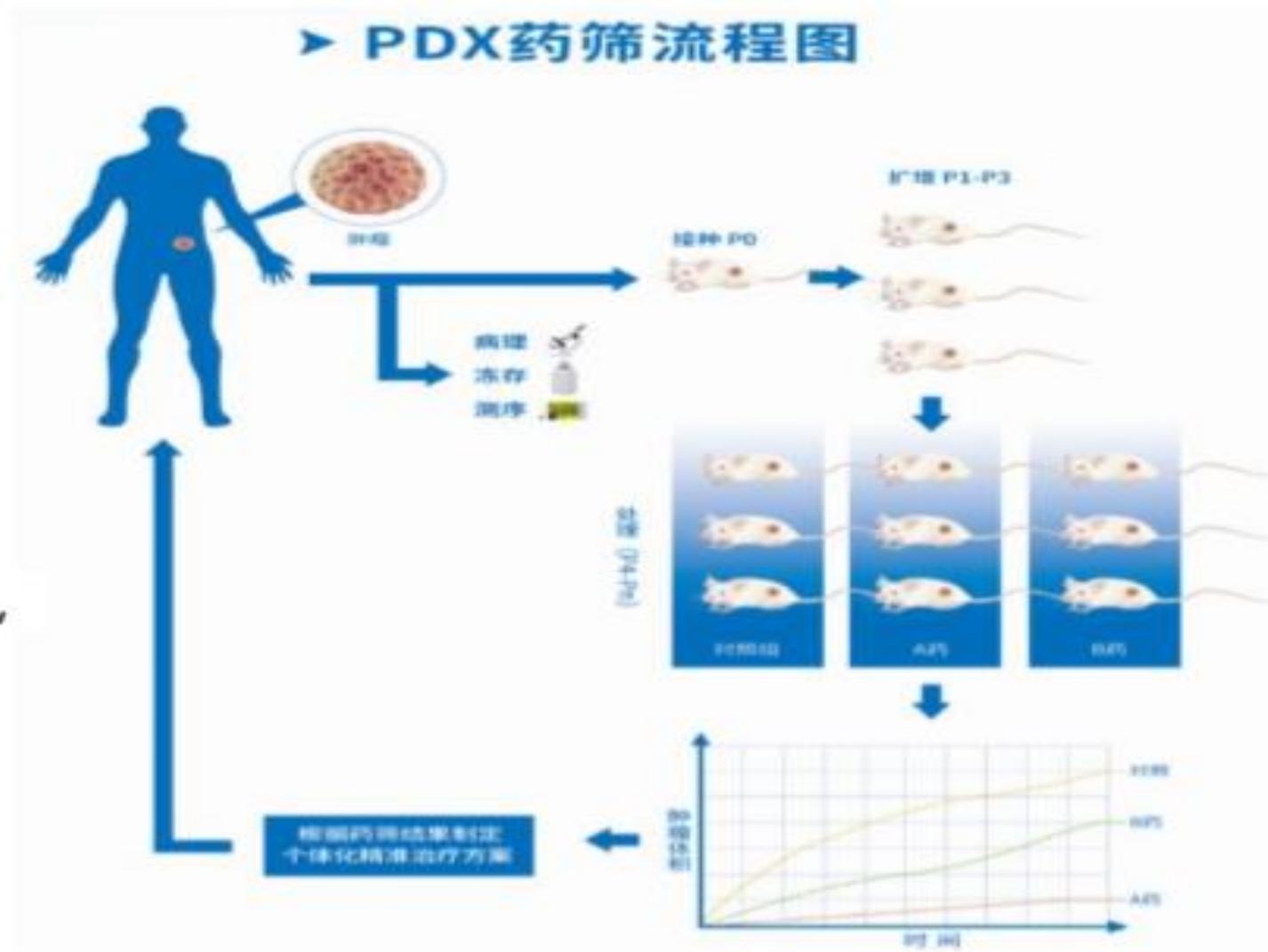
药物筛选平台，ES细胞与基因编辑技术

免疫缺陷动物与PDX模式，动物实验技术

PDX模型简介

人源肿瘤异种移植（**Patient-derived tumor xenograft, PDX**）模型是将来源于肿瘤患者的组织、原代细胞植入免疫缺陷鼠的体内形成的移植瘤模型。

PDX模型依靠动物提供的环境生长，**保留人原代肿瘤的异质性和微环境**。PDX模型可以进行传代扩增，研究表明传代的肿瘤组织能够和初始肿瘤组织保持高度的一致性，为药物筛查和病人患病机制研究提供了很好的条件。



我们已经建立了自己的免疫缺陷小鼠 (NSG) 模型



独立通风饲养系统



高压蒸汽灭菌锅



SPF级屏障系统内走廊

SPF级实验动物房-面积250平方米 可容纳1500笼位

李亮平科研团队

工作人员



刘千千, 中山大学
细胞生物学博士,
暨南大学博士后



宋婵婵, 福建医科
大学, 细胞生物学
硕士,



刘妍, 南方医科大学
医学硕士,



刘青, 南方医科大学
医学硕士,



苏子竣, 加拿大西
安大略大学, 病理
学理学硕士



廖宝怡, 广东药
科大学, 高分子
材料与工程本科,



黄常安, 南方医
科大学, 本科



张婉青, 桂林医
学院, 生物技术,
本科



黎兵和, 仲恺农
业工程学院生物
科学专业学士,

博士与硕士研究生



袁佳, 暨南大学,
肿瘤学, 博士生



李清扬, 暨南大
学, 肿瘤学, 硕
士、博士生在读



吴昆隆, 暨南大
学, 肿瘤学, 硕
士研究生在读



高俊霞, 暨南大学,
肿瘤学, 硕士研
究生在读

寻找临床合作伙伴

开展乳腺癌，肺癌，结直肠癌，肝癌等
癌症免疫治疗临床研究。

欢迎博士后加入研发团队

欢迎大家使用我们的技术平台

Thanks 谢谢!



李亮平 TCR 
广东 广州



实验动物技术服务联系方式:

李经理

微信/电话: 13503053102

广东省精准医学应用学会免疫治疗分会

核心成员 主委 副主委

李亮平

暨南大学附属第一医院临床肿瘤研究所

黄月华

中山大学附属第三医院感染科副主任、肝病实验室主任

王战会

南方医科大学南方医院研究员

黄朝峰

中山大学中山医学院副教授

杨毅

广州医科大学附属第二医院副院长

张秀清

华大基因（研究院）副院长

朱振宇

中山大学达安基因股份有限公司首席科学家

李懿

广州香雪制药有限公司研究员

李鹏

中科院广州生物医药与健康研究院 教授

陈小平

广州中科蓝华生物科技有限公司 CEO

王辉云

中山大学附属肿瘤医院

张其威

南方医科大学公共卫生学院教授

陈仁

广东省人民医院 感染科主任

石明

中山大学附属肿瘤医院 肝胆科教授

陈涛

广东省结核病控制中心参比实验室主任

岑钧华

广州医科大学第一附属医院 肝胆外科教授



广东省精准医学应用学会免疫治疗分会学术顾问



伯纳德·罗兹曼(Bernard Roizman): 美国国家科学院、美国医学科学院、美国发明家学院院士;中国工程院外籍院士;美国芝加哥大学微生物、分子基因生物学系和芝加哥大学医学院的终身教授。



Thomas Blankenstein, 德国Max Delbrueck分子医学中心/自由大学Charite医学院教授, 德国著名肿瘤免疫学专家, 德国跨地区研究中心(TR 36)首席科学家。



颜光美: 中山医学院药理学教授、博士生导师, 曾任中山大学副校长。在全球内首次发现, 在自然界存在的病毒M1具有选择性杀伤多种肿瘤细胞的特性。



张辉, 国家千人, 中山大学中山医学院科研副院长, 中山大学人类病毒学研究所所长, 广东省抗病原微生物药物与免疫技术工程技术研究中心主任。

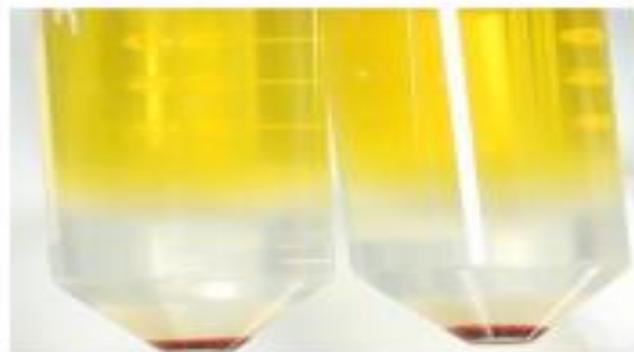
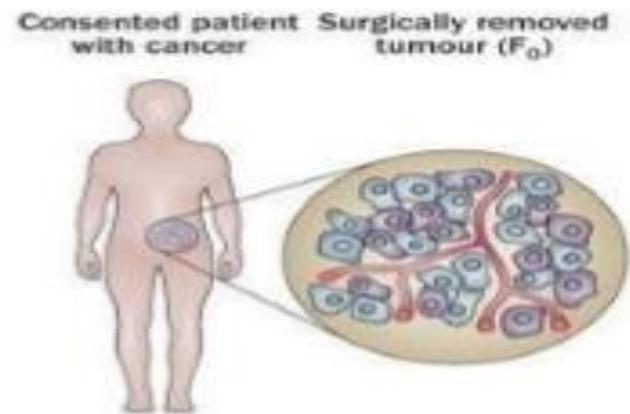


韩为东, 总后勤部科技新星, 解放军总医院生命科学院分子免疫学研究室主任。中国研究型医院学会生物治疗学专业委员会主任委员。

PDX模型建立方法

一、肿瘤组织移植

即将患者术后或者活检的新鲜肿瘤组织直接接种到免疫缺陷小鼠的皮下、肾包膜或原位。这种方法简洁快速，是常用的移植手段。

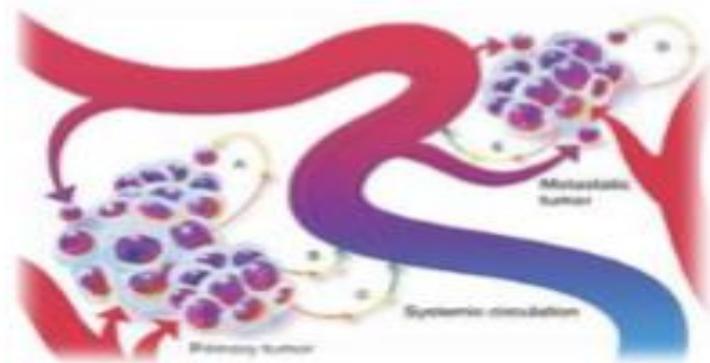


二、原代细胞接种

即将肿瘤患者的肿瘤组织消化体外培养到一定阶段，收集细胞，接种到免疫缺陷小鼠体内成瘤；或者将肿瘤患者体液（胸水、腹水、骨髓等）中的肿瘤细胞分离出来后接种免疫缺陷小鼠。

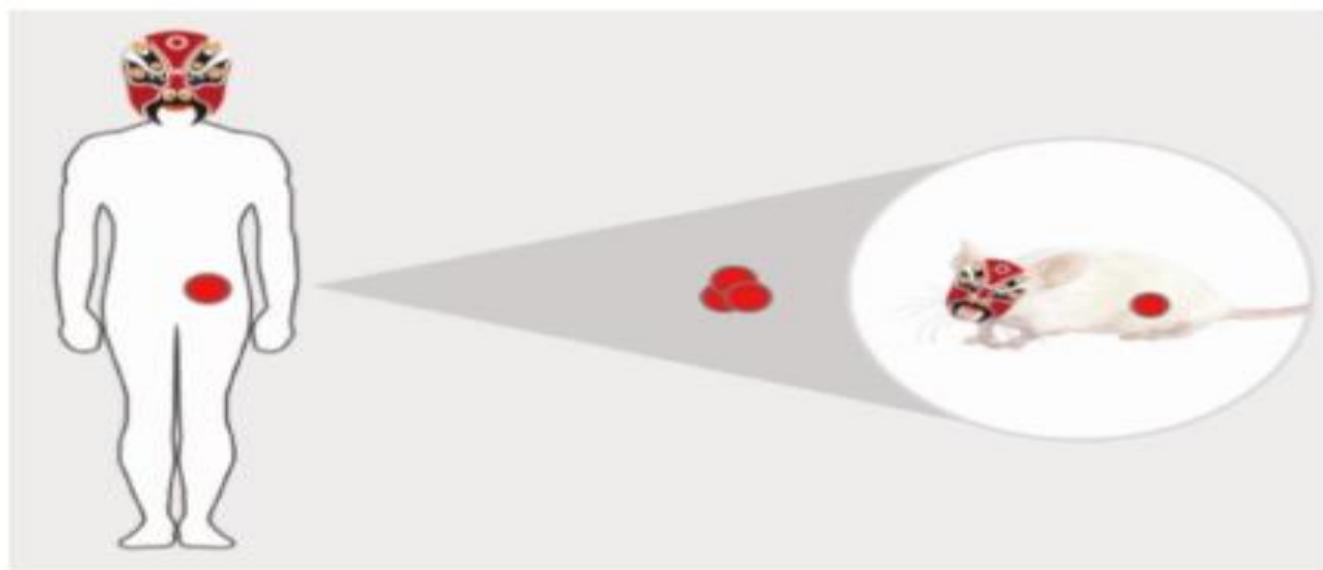
三、循环肿瘤细胞（CTC）接种

通过膜过滤技术将CTC进行富集，再接种到免疫缺陷小鼠的皮下、肾包膜或原位。此法的难点在于CTC的过滤收集，目前已有较为成熟的技术。

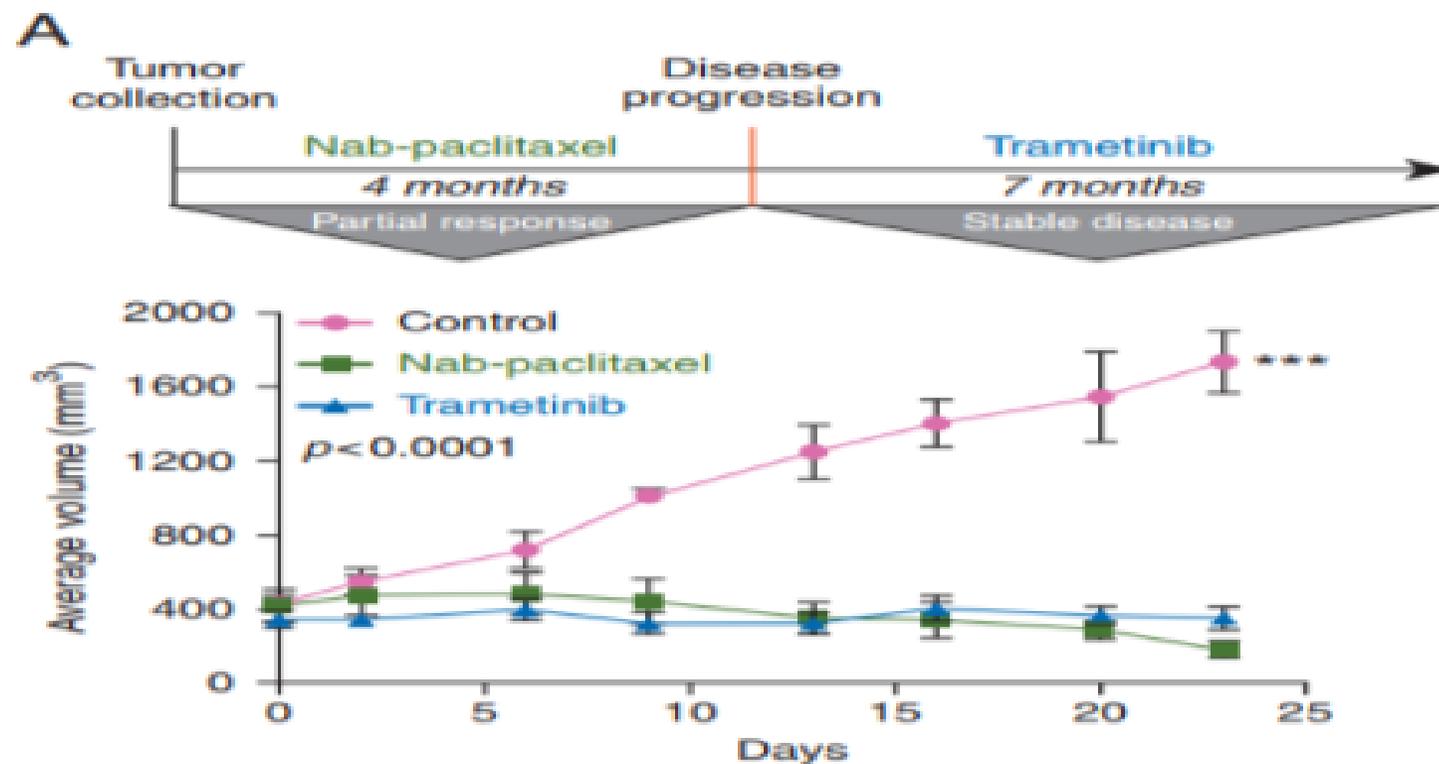


PDX模型重现患者生物学特征

一个PDX模型对应一个病人，能够很好地**反映不同个体间肿瘤的差异性**。PDX相较于传统模型更能够反应临床病人的实际情况。利用PDX模型库及其背后的医疗大数据可以为药企提供贴近临床的新药转化研究。

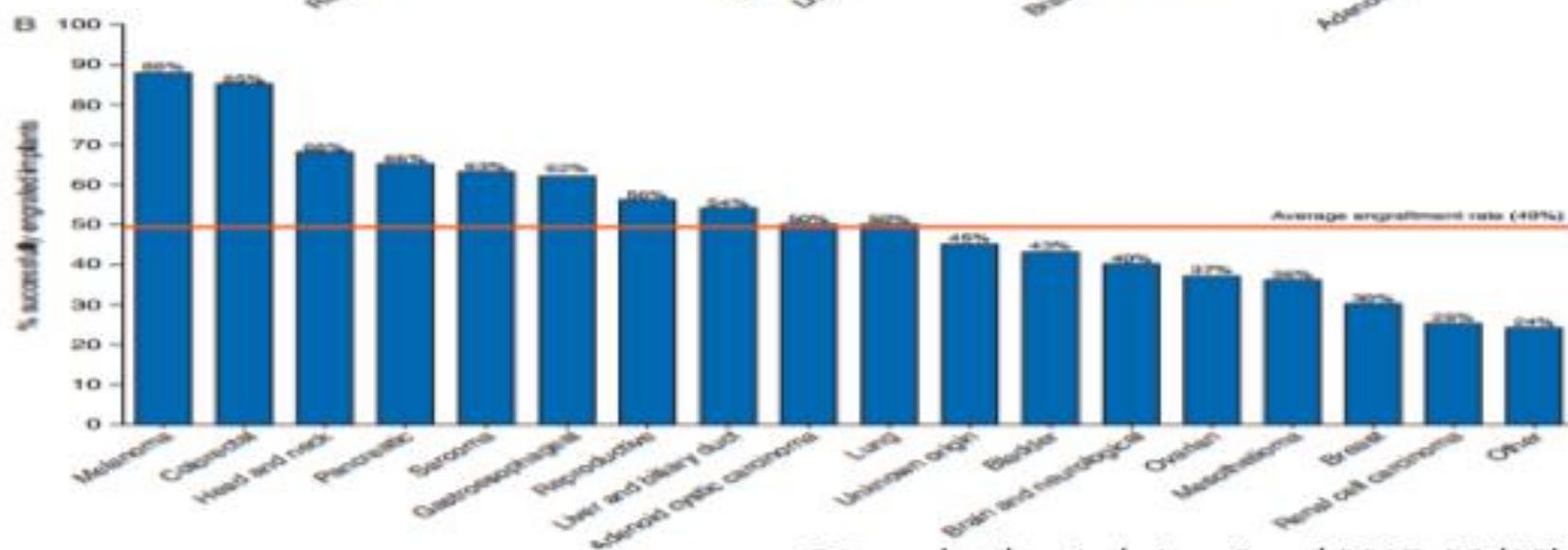
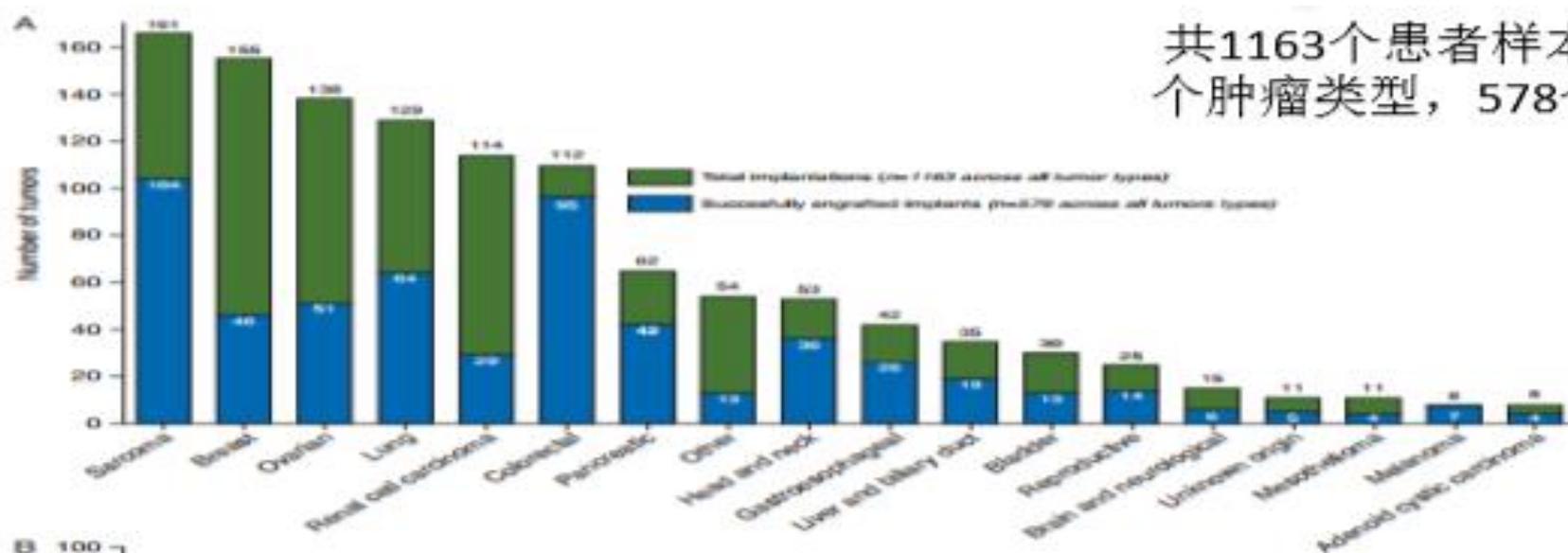


PDX模型能预测临床疗效



一例72岁卵巢癌肝转移灶切除标本构建的PDX模型，对药物的反应结果与临床一致。

各种肿瘤PDX模型成瘤率

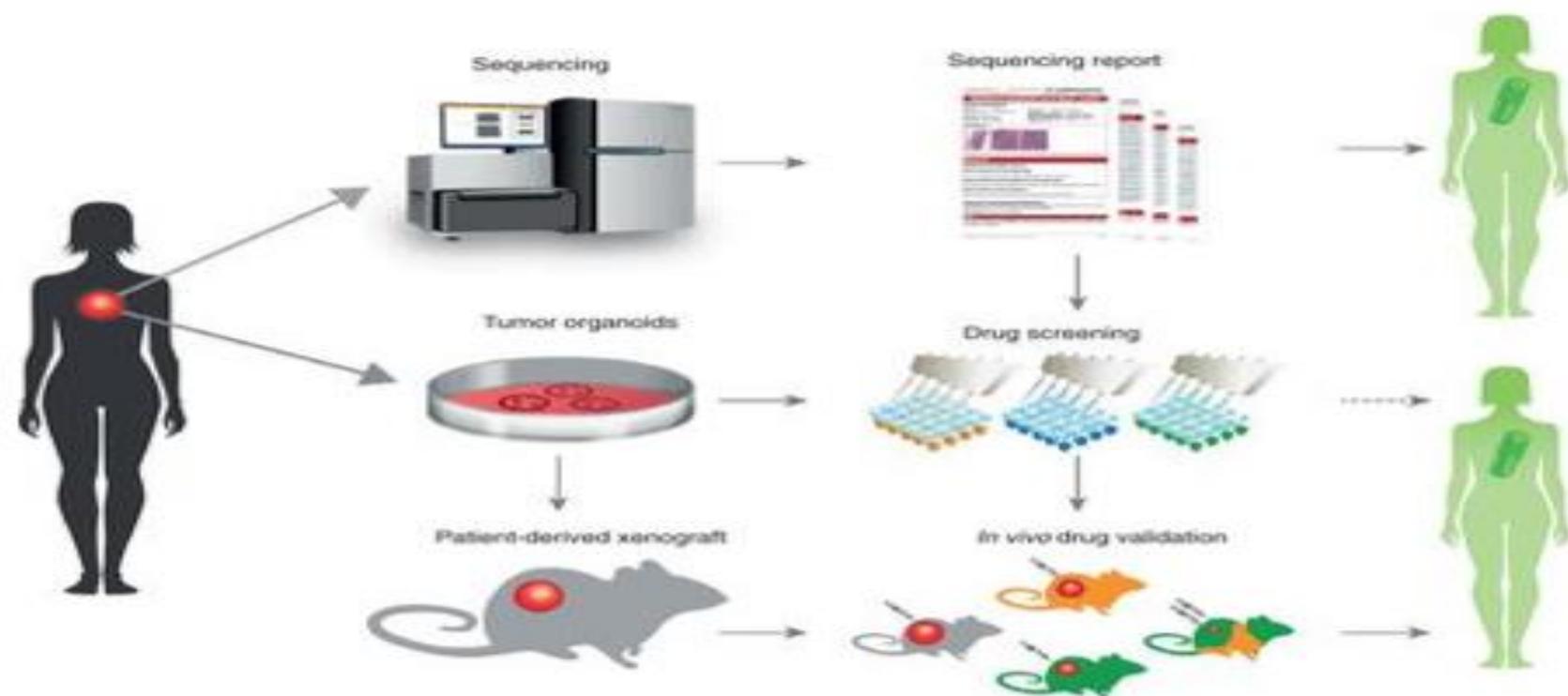


PDX模型的优缺点

-
- 1.保存了肿瘤异质性;
 - 2.保留了肿瘤微环境;
 - 3.药筛结果与临床结果一致性高达90%;
 - 4.可以复制肿瘤病人耐药过程，用于二线用药筛选;
 - 5.有利于肿瘤组织保持、扩增和传代;

- 1.实验周期长;
 - 2.硬件和人员水平要求高;
 - 3.费用高;
 - 4.部分肿瘤成瘤率低;
 - 5.缺乏人体免疫环境。
-

功能性诊断与临床相关性强



Chantal Pauli, et al. *Cancer Discov.* 2017 Mar 22. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1154

IF: 24.373

PDX模型在肿瘤精准医疗中的应用

新治疗方法
临床前评价

指导化疗
方案选择

建立耐药模型用于
疾病耐药复发
后治疗方案筛选

Car-T疗效预判