



王立群博士, 中国科学技术大学细胞生物学学士、美国马里兰大学巴尔的摩分校分子生物学博士以及辛辛那提萨维尔大学工商硕士, 美国国立健康研究院(NIH)博士后。王立群博士现任复星凯特生物科技有限公司总裁。公司立足于自主研发和技术转移相结合, 致力于肿瘤免疫细胞治疗技术(CAR-T/TCR-T)在中国的产业化和规范化的使用, 造福中国患者。王立群博士在美国和中国的生物制药领域拥有丰富的研发技术和管理经验。他曾在美国宝洁、百时美施贵宝、阿斯利康以及葛兰素史克中国研发中心的重要管理岗位上任职近20年, 参与和主导了多个新药的研发及转化工作。加入复星凯特前, 王立群博士在美国上市的西比曼生物科技有限公司担任首席运营官, 全面管理公司运营、细胞治疗产品的生产、药理和临床研究, 并兼任干细胞事业部总经理。

CAR-T和免疫细胞肿瘤治疗

王立群*

(复星凯特生物科技有限公司, 上海 201210)

摘要 CAR-T技术已成为肿瘤治疗的热门, 为部分患者带来了革命性的治疗效果和治愈的希望。该技术的形成是建立在人们对分子免疫学不断的科学探索和严谨的临床研究的基础上, 2017年以两款新药首次在美国的获批上市而宣告问世。因为是新的活细胞药, 它的制备、质控、临床应用和商业运作都呈现了前所未有的挑战和提升空间。该文简要介绍了其原理、国外开发历史、中国的现状以及该技术进一步发展的前景。希望更多有志于从事创新和细胞免疫治疗的科学家和临床医生投身到CAR-T研究中, 创造出更多的对肿瘤患者既安全有效又可支付得起的细胞治疗产品, 为人类造福。

关键词 嵌合性抗原受体; CAR-T; 淋巴细胞药物; 靶向免疫治疗; 肿瘤治愈

CAR-T and Immunotherapy

Richard Wang*

(Fosun Kite Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201210, China)

Abstract CAR-T technology has become a new wave, which revolutionized cancer therapy with breakthrough clinical benefits for certain indications and renewed hope for cure. The technology was developed based on the evolving understanding and exploration of molecular immunology and rigorous clinical trial, culminating in the market approval of the first-of-its-kind two products in the US in 2017. As a new live cell modality, there are still numerous challenges and improvement opportunities regarding its manufacturing, quality control, clinical management and commercial operation. This article is meant to give a brief introduction of the technology on the scientific principle, research and development in the world and China status, and future perspectives, with the hope to encourage more innovative scientists and clinicians to be involved in the further development of the technology

*通讯作者。Tel: 021-38442200, E-mail: richard.wang@fosunkitebio.com

*Corresponding author. Tel: +86-21-38442200, E-mail: richard.wang@fosunkitebio.com

网络出版时间: 2019-05-09 17:54:55

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1754.022.html>

for safe, efficacious and affordable cell therapy products to benefit patients.

Keywords chimeric antigen receptor; CAR-T; cell therapy; targeted immunotherapy; cancer cure

1 免疫细胞肿瘤治疗的历史

在癌症发生率和死亡率不断上升的当今社会,人类对有效抗肿瘤治疗手段的研发和临床应用显得至关重要和迫切。从早期的手术、放疗和化疗到近代的靶向药物的问世,已明显地延长了癌症患者的生存期,人类的抗癌战争有望转入慢性病管理模式。但显而易见,我们更期望的是肿瘤能够被治愈。

为什么我们大多数人不得癌症?其中一个重要原因是我们有健全的免疫系统,它时刻监测着肿瘤细胞的发生并及时予以清除。一旦免疫功能出了问题,就无法及时识别并消除肿瘤细胞。如果能重新唤醒癌症患者的免疫系统,那么能否使治愈肿瘤变得可能?我们知道,免疫防御功能依赖于人体固有免疫(innate immunity, 或称为非特异性免疫)和获得性免疫(adaptive immunity, 或称为特异性免疫)。固有免疫作用范围广,不针对性地识别特定抗原,免疫反应起效快,参与的免疫细胞种类较多,有吞噬细胞(包括巨噬细胞和中性粒细胞)及自然杀伤NK细胞等。而获得性免疫主要通过各种淋巴细胞起到效果,其中B淋巴细胞行使体液免疫作用, T淋巴细胞行使细胞免疫作用。获得性免疫能够识别特异的抗原,且对相应抗原形成免疫记忆效果,起到免疫监测作用。在获得性免疫过程中,对肿瘤细胞的免疫监测和清除工作主要由T淋巴细胞承担。

在对肿瘤免疫细胞治疗的探索中,人们自然把目光集中到了T淋巴细胞上。早期临床观察和动物实验显示,肿瘤由于其表达特异性抗原会激发获得性免疫反应。起始于1950,在之后的20年有许多实验证明,从荷瘤小鼠获取的T淋巴细胞,再将其输注到同系的小鼠体内可有效地清除移植瘤^[1]。这就启发了过继细胞(adoptive cell transfer, ACT)治疗肿瘤的思路,即从癌症患者的外周血中获取免疫细胞,借助于细胞因子的刺激作用,经体外培养扩增后回输给原患者。这种方法在1984年开始用于临床探索性研究中,当时这种技术手段被命名为淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine-activated killer cells, LAK)疗法^[2]。随后,又有细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer, CIK)方法以及加强型的树突状细胞和淋巴细胞混合培养和回输(DC-CIK)问世^[3],进而

有肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)应用于临床进行尝试^[4]。这些手段统称为非特异性过继细胞治疗,由于这样制备的细胞产品对肿瘤细胞的特异识别能力和杀伤能力不足,又没有严谨的临床试验数据支持,其临床应用效果难以获得准确评价,其前景有限。

在20世纪80年代,科学界开始努力寻找更特异有效的肿瘤过继性细胞治疗方法。通过对T细胞功能的研究发现, T细胞需要同时识别目标细胞表面上两个关键的分子才能发挥杀伤作用。第一是T细胞表面的T细胞受体结合肿瘤细胞表面的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子和特异性抗原形成的复合物;第二是T细胞表面的共刺激因子受体结合肿瘤细胞上的共刺激性配体。如果T细胞要实现对肿瘤细胞的杀伤作用,这两个环节缺一不可。因此,肿瘤细胞有两种方法可以避免被T细胞识别并杀伤,一是减少自身MHC的表达水平,二是表达能抑制T细胞功能的抑制性分子。由此可见,若对T细胞进行改造,使其可以识别肿瘤细胞表面的特定分子,而无需通过T细胞受体(T cell receptor, TCR)识别肿瘤细胞再通过MHC递呈特异性抗原, T细胞不再必须通过天然的两个步骤识别并杀伤肿瘤细胞,而能直接对肿瘤细胞发起攻击。基于此想法,科学家发明了一条全新的技术路线,即通过分子生物学手段,从基因水平来改造T细胞,一次性解决T细胞识别肿瘤细胞并激活其自身功能的问题。其方法是通过人工设计的全新的基因工程分子,即嵌合性抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR),将编码CAR分子的基因通过载体转入T细胞,使T细胞表达CAR分子(图1)。CAR分子上类似于单克隆抗体的部分在T细胞外作为受体,用于识别肿瘤细胞的特异抗原;另一部分在T细胞之内,可以在CAR分子的胞外段结合肿瘤细胞之后产生足够的分子信号,刺激T细胞扩增并增强其杀伤能力,由此, CAR-T细胞技术便诞生了。

2 CAR-T技术的全球研发

CAR分子是一个融合蛋白,它的胞外片段是根据抗原筛选出的抗体序列所衍生的单链可变区

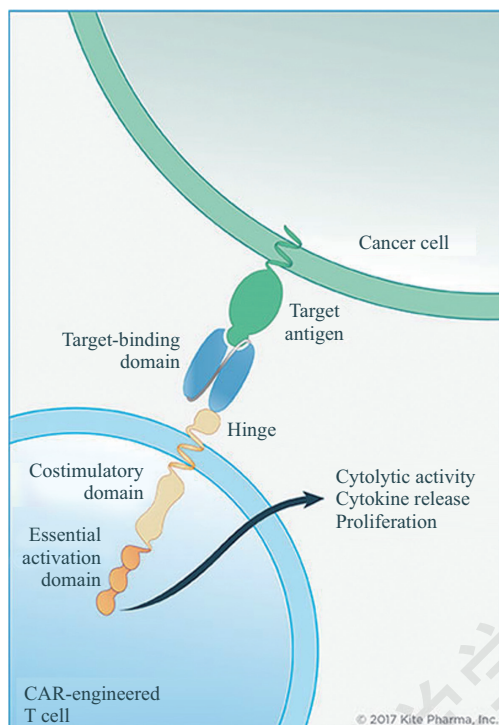


图1 CAR-T结构示意图(引用自Kite Pharma公司网站)

Fig.1 Schematic depiction of a CAR-T construct (came from www.kitepharma.com)

(single chain variable fragment, scFv), 而胞内信号区能启动T细胞激活信号和其他下游效应。用scFv作为T细胞的人为受体来识别抗原的早期技术研发, 是由以色列科学家Zelig Eshhar团队^[5]在80年代末开启的, 进而在分子生物学和动物实验中获得了验证。第一代CAR分子的结构除了抗原识别区scFv外, 只引入了CD3 ζ 链作为T细胞激活信号区(scFv-CD3 ζ)。然而, 这样设计的CAR分子在临床上仅表现出了有限的治疗作用。第二代CAR分子的设计在第一代的基础上又加入了T细胞受体的共刺激结构域, 其典型代表是CD28或4-1BB分子的细胞内信号传导区, 形成scFv-CD28-CD3 ζ 或scFv-4-1BB-CD3 ζ 样的第二代CAR分子, 可以极大地提高CAR-T细胞在人体内的存活、增殖以及肿瘤杀伤能力。

具体应该选择什么样的抗原来做CAR-T的概念验证呢? B系急性淋巴细胞白血病和淋巴系统肿瘤是由B细胞恶性增殖造成的, 表面都带有B细胞的特异性蛋白CD19, 该蛋白不在其他任何非B系的细胞中表达。这使得CD19成为了比较理想的验证靶点。

美国国立癌症研究所的罗森伯格(Steven Rosenberg)教授是一位对CAR-T技术或者说对整个免疫细胞肿瘤治疗领域作出巨大贡献的临床科学家, 目前已近80岁高龄。他的科研生涯就是一部肿瘤免

疫的发展史, 从最早的白介素-2(interleukin-2, IL-2)刺激患者自身的免疫细胞、肿瘤浸润淋巴细胞法(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)到最新的癌症疫苗都有所涉及。前面提到过的以色列科学家Zelig Eshhar设计了最早版本的CAR分子, 因此受到罗森伯格教授的邀请, 于1989年前往他的实验室进行访问研究, 而罗森伯格教授也由此得以与CAR-T技术结缘。2010年, 罗森伯格教授^[6]首先在*Blood*杂志报道了1例接受CAR-T治疗的病例。该患者虽然没能最终获得痊愈, 但在接受了CAR-T细胞治疗后他的淋巴瘤确实缩小了, 并得到了缓解效果。

真正的突破来自于1年后美国宾夕法尼亚大学的朱恩(Carl June)教授^[7-8]发表在《新英格兰医学》和*Sci Transl Med*杂志上的临床试验结果。他先后报道了3例接受CAR-T治疗的病例, 其中2例获得了完全缓解。这极大地鼓舞了从事癌症研究的科学家, 因为获得完全缓解进而治愈患者是无数癌症研究人员和患者的终极梦想。朱恩教授涉足CAR-T领域起源于2003年, 他与位于孟菲斯的St. Jude儿童医院的坎帕纳(Campana)教授在一次会议上相识并建立了联系。经协商, 朱恩教授和坎帕纳教授所在的学院间签署了样品转移协议(MTA), 由坎帕纳教授提供能编码anti-CD19 CAR的质粒载体(antiCD19scFv-

4-1BB-CD3 ζ)给宾大。朱恩教授和莱文教授(Bruce Levine)首先在小鼠身上测试了这种第二代CAR-T技术的可行性,在得到肯定的结果后,于2010年初,他们挑选了3名经过其他疗法治疗无效的晚期慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者进行临床试验,获得了前面所提到的令人振奋的结果。

第一个接受试验的是William Ludwig,有近十年的CLL病史,2010年8月接受了CAR-T细胞的治疗。在CAR-T细胞注射10天后,出现了一系列剧烈的不良反应,包括发烧、低血压、呼吸困难。后来研究者意识到这种不良作用是由改造后的T细胞在体内杀伤靶细胞后产生了过多的细胞因子引起的。幸运的是,William Ludwig最终还是战胜了这些不良反应,1个月后,他的身体里已经检测不到白血病细胞,并且在其后的6年间没有复发,其他2名受试者身上也观察到了令人欣喜的类似结果。

更有名的案例发生在2012年,1位名叫艾米莉·怀特海德(Emily Whitehead)的儿童急性淋巴细胞白血病(B-cell lymphoblastic leukemia, B-ALL)患者,在之前经历了多次标准治疗而反复复发后,参加了当时在宾大进行的临床试验。使用了抗CD19的CAR-T治疗后,艾米莉获得了完全缓解状态,迄今已6年多了,仍然保持了检测不到白血病细胞的完全缓解,身体状态很健康,可以被称为临床治愈,也成为

CAR-T成功治疗的代言人。

经过这样改造的CAR-T细胞具有良好的体内持续扩增和杀伤能力。转化研究显示,改造的T细胞可以在患者的血液和骨髓中增殖,然后衰竭。据估计,每个CAR-T细胞可以杀死1 000至93 000个肿瘤细胞。在初次注射1个月之后,将后代细胞从患者体内取出,发现这时候的T细胞依然可以在体外继续杀伤靶细胞。一般情况下, CAR-T细胞在患者外周血内可以持续存在3~6个月,足以杀死所有肿瘤细胞。药代动力学研究证实,药效与CAR-T细胞总量和持续性成正比,可以作为预后的一个初步判断^[8]。

科学原理一旦被验证,便可以广泛地重复和应用。一时间,美国多个顶尖科研临床机构用抗CD19的CAR-T同时在B细胞白血病和淋巴瘤适应症上都得到了很好的临床结果(表1)^[9-10]。至此, CAR-T细胞的早期临床数据便已确立了它在治疗血液瘤中的重要地位,也成了各家医药企业争相开发和追逐的对象。

除靶向CD19分子外,近期靶向BCMA的CAR-T细胞用于临床治疗多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)也有很多成功的案例被报道。越来越多的针对新靶点的CAR分子也开始进入临床试验,包括CD22、CD20、ROR1、CD30、CD123、CD33、LeY、CD138等。

3 CAR-T的产业化道路和中国现状

当CAR-T技术在探索性的临床研究中展示出

表1 CD19的CAR-T临床数据(根据参考文献[9-10]修改)

Table 1 CD19 CAR-T of clinical trail (modified from references [9-10])

科研机构 Institute	人数 Patient number	适应症(中位年龄) Indication (medium age)	CAR结构 CAR construct	CAR体内持久性 CAR <i>in vivo</i> persistence	临床结果 Clinical result	缓解持续时间 Durable response time
NCI, NIH	8	4 CLL, 4 NHL (55)	2G (CD28 costimulatory domain)	6 months	6/8 PR and 1/8 CR	>18 months
Baylor College	6	NHL (55)	1G and 2G (CD28 costimulatory domain) mixed infusion	2G CAR, 6 months	2 SD	
MSKCC	9	8 CLL, 2 ALL (60)	2G (CD28 costimulatory domain)	5-6 weeks	2 SD, 1 PR, 1 prolong B cell aplasia	8 months
U Penn	3	CLL (65)	2G (4-1BB costimulatory domain)	6 months	CR, 1 PR	>11 months
MSKCC	16	ALL (50)	2G (CD28 costimulatory domain)	4 months	14 CR, 12 MRD	3 months
NCI, NIH	10	4 CLL, 6 NHL (50)	2G (CD28 costimulatory domain)	30 days	1 PR, 1 CR, 6 SD	9 months
NCI, NIH	15	9 NHL (56)	2G (CD28 costimulatory domain)	11 weeks	8 CR, 4 PR	22 months
NCI, NIH	21	20 ALL, 1 NHL (13)	2G (CD28 costimulatory domain)	7-8 weeks	14 CR, 13 MRD, 3SD	19 months
U Penn	30	ALL (14)	2G (4-1BB costimulatory domain)	15-24 months	27 CR, 22	24 months
NCI, NIH	15	DLBCL (9), CLL (4), indolent (2)	2G (CD28 costimulatory domain)	85 days	8 CR, 4 PR, 1SD	22 months

CR: 完全缓解; PR: 部分缓解; SD: 疾病稳定; MRD: 无微小残留病灶。

CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; MRD: minimal residual disease.

了在广泛的临床应用中的美好前景时, 制药企业诺华(Novartis)公司便和朱恩教授于2015~2016年展开了合作, 进行代号为CTL-019的针对复发或难治性儿童急性淋巴细胞白血病患者采用CAR-T细胞(靶向CD19)进行治疗的注册临床试验。在诺华公司向FDA提交的63名受试者中进行的临床试验数据表明, 共有52位(82.5%)患者获得缓解, 其中40位(63%)患者达到了完全缓解(即检测不到肿瘤细胞)。对于复发或难治性B-ALL患者来说, 这是极高的缓解率和治疗效果。因此, 2017年8月30日, FDA批准了CTL019(商品名Kymriah)上市, 成为全球首款CAR-T治疗产品。

无独有偶, 美国Kite公司也于2014年从美国国立癌症研究中心罗森伯格教授处获得了靶向CD19的CAR-T(KTE-C19)技术的转移和授权, 开展了代号为Zuma-1的针对复发/难治性的弥漫性大B淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)适应症的注册临床试验。在II期临床入组并接受治疗的101位受试者中达到6个月的随访时, 发现有82%的患者获得客观缓解, 其中占总数52%的患者获得了完全缓解^[11]。2018年Kite发布的Zuma-1试验2年期随访数据显示, 仍有占总数39%的患者保持缓解, 其中37%的患者维持了完全缓解状态^[12]。这意味着多数对CAR-T产生了有效反应患者自接受治疗6个月获得缓解后可以持续2年或更长的时间, 这使人们再一次看到了通过CAR-T治愈淋巴瘤的曙光。这里需要强调的是这些参与Zuma-1试验的受试者都是先前经历了所有标准治疗而无效的患者。根据一项发表的权威回顾性研究(Scholar-1)显示, 复发/难治性的弥漫性大B淋巴瘤患者末线治疗的完全缓解率只有7%, 中位生存期仅为6.3个月^[13]。紧随Kymriah之后, KTE-C19(商品名Yescarta)于2017年10月27日毫无悬念地获得FDA批准用于治疗复发/难治性的弥漫性大B淋巴瘤的上市许可。随后, 这二款世界上仅有的CAR-T产品又同时于2018年8月23日获欧盟药监机构批准上市, 可以进入欧盟各国市场。

在2018年美国血液学会(American Society of Hematology, ASH)年会上, 美国三家医院的医生报道了Yescarta自2017年10月18号被FDA批准上市后对超过400多位患者进行治疗后的真实世界随访的数据, 并与先前注册临床试验(Zuma-1)数据进行了比较^[14]。虽然在真实的Yescarta临床应用中, 其患者接

受标准比临床试验的受试者入组标准要宽泛得多, 但Yescarta的有效性、安全性以及细胞因子释放针对综合征的发生情况而言, 其真实世界数据与临床注册试验(Zuma-1)中的数据高度近似, 有力地支持Yescarta在真实世界的更广泛应用。

当然, CAR-T疗法也面临着不少安全性挑战, 主要是因细胞因子释放引起的一系列不良反应^[15]。众所周知, 美国另一个曾经领先全球的CAR-T公司——朱诺医疗(Juno)与纪念斯隆癌症中心合作开发的JCAR-015(靶向CD19), 由于在其II期临床阶段发生了5位患者因脑水肿而死亡, 朱诺医疗主动叫停了JCAR015的临床研究; 而转向开发另一款针对同一靶点(CD19)但神经毒性较小的产品(JCAR017)。遗憾的是, 人们至今对CAR-T产生的细胞因子风暴和神经毒性, 进而导致患者死亡的确切机制仍然不清楚。但在临床应用中, 研究者们已经有了丰富的应用糖皮质激素和白介素-6受体(IL-6R)抑制剂——托珠单抗进行干预的经验, 制定了可以有效地控制CAR-T因细胞因子释放引起的安全风险的方案。

另一个阻碍CAR-T技术更广泛进行临床应用的挑战是按照相关的药物监管法规要求开发CAR-T细胞及相关重要原材料(如病毒载体)生产工艺, 并完成严格的工艺验证, 以及开发并验证相应的质控检验方案。由于CAR-T细胞是自体活细胞药物, 典型的制备过程包括采集患者的血细胞(主要是白细胞); 将血样经冷链运输到符合严格的洁净要求的生产设施进行T细胞分离和活化; 再使用病毒载体将CAR基因转入T细胞, 并培养扩增以获得足够的CAR-T细胞。整个制备过程需要历时1至2周, 这个过程必须按GMP规范在超洁净环境里进行连续操作; 并且在生产过程中和终产品制备完成后还需要进行很多的质控检测。作为被从静脉回输到患者体内的药物, CAR-T制剂除了部分可以被现有药典要求覆盖的标准检测外, 还有大量的检测方法都必须根据CAR-T产品和其工艺特点, 通过质量研究进行从头开始的方法学开发和验证。CAR-T细胞是自体细胞产品, 也意味着每一个病人样品都是一个独立的生产批次, 必须经过全套质检流程。其中, 无菌检测需从终产品中取样并培养7~14天才可获得数据, 这使得终产品制剂完成后必须经低温冷冻后暂存, 等待检验合格后才可以被放行, 用于治疗。这样的活细胞生物制品对冷链运输也提出了很高的要求,

并需要高效即时的样品鉴别和追溯系统。况且,由于产品生产周期较长,而且每个批次都会单独占用生产车间或舱位,这样CAR-T产品的生产效率和产能相对传统药物存在不足。

基于上述种种原因,诺华和凯特两个获批的自体CAR-T产品在获批上市后商业化运营过程中都采取了与定点医院合作的模式。只有经过严格筛选及培训的医院才能被纳入其CAR-T产品的临床应用网络。Yescarta和Kymriah关键的生产质控工作都在诺华和凯特的中心化GMP基地完成。不可否认,这样的自体CAR-T产品的生产和运营模式必然需要比较高的成本,也就导致Kymriah和Yescarta的价格相对比较贵(分别为47.5万美元和37.3万美元)。当然,在美国因为有发达的商业医疗保险可以来支付这些费用,而病人自付的比例有限,所以目前尚未发现明显的经济负担性问题。

CAR-T技术在临床中展现的优异疗效,自然引起了中国的医生、科研人员和企业极大的研究热忱和兴趣。一时间涌现了近百家CAR-T企业和上百项在美国ClinicalTrials网站登记了的临床研究项目,数量几乎超过美国的类似项目^[16]。但必须清醒地看到,我国的CAR-T项目扎堆和模仿的现象比较严重,大多数都是针对CD19靶点,用于治疗淋巴细胞白血病和淋巴瘤的产品,而且这些项目是否具有自主知识产权以及能否得到专利保护,尚有疑问。更何况,截止到2018年10月前,所有在中国开展的CAR-T临床项目,都是研究者发起的临床研究,仅经过了研究实施医院的伦理委员会的审批,并没有根据药物监管审批的路线严格地按照国际通行的GCP规范进行临床数据的整理和审核,因此很难确认这类临床研究对GMP/GCP规范的依从性和数据的真实性。

事实上,我国对免疫细胞治疗技术的研发热情并不落后于美国,早期以CIK、DC-CIK为主的免疫细胞治疗技术在临床上已有不少应用。2016年发生的魏则西事件让免疫细胞治疗技术在国内的发展受到了沉重的打击。由于当时该行业中各企业技术和管理水平良莠不齐,而当时按照第三类医疗技术在各医院仅进行备案的管理方式,在监管层面有一定缺失,最终导致了免疫细胞治疗行业发展不进则退,一度处于真空状态。从这两年全球免疫细胞治疗行业的发展来看,行业健康、快速、规范的发展,需要政府的监管和引导。而CAR-T产品作为新一代的

免疫治疗技术,在原理和临床效果上与DC-CIK等早期的过继细胞治疗技术相比具有革命性的优势。因需要经过体外基因工程改造,所以对CAR-T产品的质量管控和临床应用提出了更高的要求。这奠定了CAR-T细胞产品必须按照药品进行监管和审批的要求,是CAR-T技术产业化的必经之路。

中国食品药品监督管理局于2017年12月发布了《细胞制品研究与评价技术指导原则》明确了CAR-T细胞治疗产品的药物属性和监管途径,这与FDA和EMA将CAR-T列为按药物进行审批上市的做法接轨。自该指导原则发布之日起,中国陆续有多家CAR-T细胞治疗公司的产品按照生物药品的路径向国家食品药品监督管理局药品审评中心提出注册临床试验(IND)申请。目前已有20多家公司申报了超过31个IND项目,先后有南京传奇生物科技有限公司、上海明聚生物科技有限公司、上海恒润达生物科技股份有限公司、复星凯特和南京银河生物医药有限公司等多家企业共12项IND项目获准进行临床试验。其中,复星凯特申报的是Yescarta在中国进行本土化生产的产品,明聚生物申报的项目为朱诺JCAR017在中国的二次工艺开发的新产品,而其他十几家公司的申请仍处在审评过程中。这一历程说明,国家药品审评中心通过与行业内各企业的沟通与交流,已经建立了对CAR-T产品严格有效的审评标准,规范了对CAR-T产品的研发进行评价的机制,能保障该类产品进入临床试验时对受试者的安全性和有效性。同时,由于不少企业的申报在规定期限内并没有获得批准进入临床试验,这说明,此类项目的申报材料尚未达到国家相关机构的监管要求。此外,近期诺华公司已选取了上海的西比曼生物作为其在中国的Kymriah代工生产合作方,并会在国内按照药物监管路线进行申报。至此,针对CD19的经典二代CAR-T产品在中国的布局已经基本完成。

4 免疫细胞治疗技术进一步发展的前景和挑战

4.1 免疫细胞治疗技术发展的前景

CAR-T细胞产品的横空出世,正逢整个肿瘤免疫治疗领域突飞猛进之时。这几年先后获批的免疫检查点单抗抑制剂能阻断肿瘤对内源T细胞的抑制,激发了患者免疫系统对肿瘤的清除。2011年上市的百时美施贵宝的CTLA-4单抗抑制剂——Yervoy,

2015年上市的PD-1单抗抑制剂有百时美施贵宝的Opdivo和默克的Keytruda, 以及后续罗氏的PD-L1单抗药物Tecentriq等。2017年5月23日, 美国FDA又批准了增加Keytruda药物广泛的适应症, 用于所有具有高度微卫星不稳定性(MSI-H)或者错配修复缺陷(dMMR)实体瘤患者的治疗。这是美国FDA批准的首款不依照肿瘤来源或组织病理分类, 而是依照生物标志物进行区分的抗肿瘤疗法的药物, 具有里程碑式的意义。这一类免疫抑制检查点抑制性单抗药物能够在一定程度上让患者的免疫系统重新获得正常化, 但疗效还远远不如CAR-T产品, 在血液系统恶性肿瘤患者中的平均应答率仅有20%~30%。CAR-T产品注重于对T细胞的进行特异激活, 产生强大的杀伤效果, 机制上可与免疫检查点抑制剂互补。如能将二者结合进行联合治疗, 原理上会降低或解除肿瘤微环境对CAR-T的抑制作用, 相信一定会为肿瘤治疗带来更进一步的突破。

我们更应该看到, CAR-T产品迄今被批准的适应症群体都是末线治疗后难治或复发的病人。从原理上看, CAR-T产品没有理由不能成为二线或一线的标准治疗方案。当然, 这需要通过严谨的随机对照临床试验来进行循证及验证, 并获得监管部门的审批和许可。一旦CAR-T产品的临床应用可以前移, 将有更多的患者能尽早获益。CAR-T产品的成功, 只是整个肿瘤免疫治疗的冰山一角。实际上, 肿瘤免疫治疗领域非常年轻, 还有很多的未知数和很大的潜力。全球的研究者和从业者都在同一起跑线上, 如果我们想做出有所创新的伟大成果、解决更多医学上未满足的需求、给肿瘤患者带去治愈的希望, 那么在免疫细胞治疗领域进行耕耘将是最有可能实现这些愿望的方向之一。

4.2 CAR-T技术的进一步发展和应用面临以下几个主要的挑战

4.2.1 如何筛选敏感患者; 如何对患者的愈后, 副作用进行预测以及如何预测易复发的患者? CAR-T临床试验和惊人疗效来得如此快, 以至于很多转化医学研究的问题还没有得到充分的研究。譬如说, 在靶向CD19阳性的CAR-T的治疗中, 由于所有患者都有广泛的CD19表达, 因此我们还没有明确的生物标志物来筛选或预测对CAR-T产品敏感的患者, 以提高患者反应率和缓解率。同样, 我们也在积累患者治疗过程中各种细胞因子的检测数据并进行

分析, 但迄今还无法确切预测什么样的患者在治疗中会有严重的细胞因子释放症或神经毒性, 从而进行预防性干预以降低风险。当然, 最复杂的是部分CD19阳性的患者在CAR-T细胞治疗后获得缓解, 但一段时间后会复发。在部分复发的患者中, 发现有CD19抗原丢失或变异的现象。为了防止单抗原丢失或突变导致的复发, 现在已经有不少双抗CAR-T项目在临床中做同时或序贯治疗的尝试, 包括了对B细胞相关的靶点(如CD19和CD22)、对浆细胞的靶点(如BCMA和TARC)等。同时, 对CAR-T技术进行改进以增强CAR-T细胞在患者体内的持续性和活力也是解决这一类复发现象的努力方向之一。

4.2.2 如何开拓新的靶点以及适应症? 目前CAR-T产品的临床有效性仅在很少的靶点(CD19和BCMA)上得到了验证, 且都是针对B细胞血液肿瘤的。这并不奇怪, 从CAR-T分子设计的原理上看, 需要作为靶细胞的肿瘤细胞都携带同一个抗原, 才能被专一的scFv去识别, 并被CAR-T细胞杀伤, 获得完全缓解的效果。而在实际情况下, 这样理想化的抗原是很罕见的。因为肿瘤存在组织学上的异质性, 由多种表达不同突变基因的癌细胞和基质细胞构成。目前获得应用的CD19和BCMA并不是肿瘤特异性抗原, 而是B细胞系的标志物, 它们对应的CAR-T产品治疗B细胞B-ALL、DLBCL、MM的成功是依赖于对包括恶性癌细胞在内的所有B系细胞的清除, 而且在一定的时间内患者可以耐受B细胞缺失, 才使这类CAR-T产品获得好的治疗效果。当我们要把CAR-T技术扩展到其他肿瘤应用时, 可能就难找到如此理想的靶分子了。尤其是实体瘤细胞基因突变活跃, 蛋白表达异质更明显, 要找到肿瘤特异且覆盖率很高的合适靶点十分困难。同时, 肿瘤内形成的微环境也会抑制CAR-T细胞的活性。如何让CAR-T细胞找到生长在特定的器官或组织内的肿瘤, 并克服肿瘤微环境的抑制, 对肿瘤细胞实施清除, 而不伤及正常细胞, 是扩展CAR-T技术适应症必须要突破的一个重要难题。临床前实验中对串联或并联的双靶点的CAR-T细胞设计具有良好提示性的效果, 此类技术路线有可能解决实体肿瘤细胞缺乏单一和特异的抗原问题。此外, 科学家在实验室还研制出了第三代和第四代CAR-T技术。第三代CAR分子是在第二代CAR分子的基础结构上再增加两个共刺激结构域(CD28或4-1BB等), 以增强

CAR-T活力和持久力。第四代CAR分子是让T细胞在表达CAR分子的同时,再表达另一个可分泌的蛋白,常见的有T细胞活化因子、PD-1/PD-L1抗体等,以期提高CAR-T细胞对肿瘤的浸润能力并抵抗来自肿瘤微环境的抑制作用。新一代的CAR-T技术使得有些联合治疗的想法可以在一个CAR-T细胞上实现,避免了多种药联合临床试验的设计和应用难题。

另一项非常有前景的免疫细胞技术是TCR-T,这项技术的出发点就是为了治疗实体肿瘤。它借助于T细胞与生俱来的T细胞受体(TCR)结构和生物学功能,通过模拟和筛选,制备出经基因工程化改造后的能表达新T细胞受体的细胞,再通过MHC呈递的肿瘤特定抗原以识别肿瘤细胞并杀伤这些肿瘤细胞。虽然制备这样的TCR-T细胞产品,需要有比制备CAR-T产品更复杂、更高端的技术和工艺(包括应用基因编辑等新技术,解决HLA-亚型的限制等难题)。但因为TCR分子可以用于针对细胞内的肿瘤抗原进行设计而不像CAR分子只限于识别细胞表面的抗原分子,这就大大增加了对肿瘤抗原的选择范围和在实体瘤上进行应用的可能性。TCR-T技术的临床试验目前正在进行中,尚无批准上市的产品,在该领域领先的企业包括Adaptimmune/GSK、Kite、Juno和TCR2等。

4.2.3 如何降低基因转导带来的临床未知风险?
目前广泛采用的将CAR基因导入T细胞的技术以缺失复制能力的慢病毒和逆转录病毒载体为主。这些经改造过的病毒载体可以有效地把外源基因导入目的细胞基因组内,是基因治疗的主要工具。应用中虽然可以通过控制病毒剂量和活性来控制插入目的细胞基因组中的CAR基因拷贝数,但原理上这些插入位点是随机性的,存在因为外源性基因片段插入导致某个重要内源基因的失活或变异的可能性。最近报道的两个CAR-T临床案例就是对这种不可控风险的提示^[17-18]。第一个是意外的惊喜,宾大朱恩教授团队^[17]在用靶向CD19的CAR-T细胞治疗CLL的临床试验中,发现了其中1位完全缓解的患者外周血中94%的CAR-T细胞来源于同一个初始的被转化的T细胞(具有相同的基因型)。经过基因组测序发现,这一群细胞CAR分子的插入位点是在*TET2*基因上,造成了一个*TET2*基因座位的失活(恰巧,该患者的另一个*TET2*等位基因有先天突变失活)。而*TET2*基因功能的丧失,造成了该CAR-T细胞在扩增中占据了绝对优势,进而导致癌细胞的持续杀伤和病人完全

缓解。虽然这是小概率事件,我们必须正视这种基因插入导致的临床效果的不确定因素,以及它们在体内可能的长期影响。另一个案例也是来自于朱恩教授团队^[18]在自然医学期刊上的报道,1位白血病患者接受了CTL019治疗后9个月复发并最终死亡。究其原因,发现是因为在逆转录病毒载体将CAR基因转入T细胞时,碰巧也将CAR基因转入了CD19阳性的肿瘤B细胞中。该肿瘤细胞上表达的CAR分子上的scFv起到了罩盖和保护其自身CD19抗原的作用,免于被CAR-T细胞杀伤。这警示了我们要关注此类的连带效应,最好开发新的工艺和方法能去除不需要的其他细胞,尤其是血液里的肿瘤细胞,以避免此类事件的发生。

4.2.4 如何进一步改进CAR-T生产工艺以降低成本和价格? 工欲善其事,必先利其器。在制备CAR-T产品时需要缩短时间,引入自动化设备,减少人力消耗和人为因素造成的偏差。还有一个重要发展方向,就是开发异体细胞技术。设想,如果能用健康供者的免疫细胞,通过基因编辑手段,去除所有能引起移植物抗宿主和宿主抗移植物反应的基因,再转入CAR基因并使转导的T细胞极大化的扩增,制成可以治疗多个患者剂量的产品。这样的产品即为“现货供应(off the shelf)”,与传统的药物相似,一次生产制备的产品可以供多个患者治疗使用。病人也不需要等待产品制备的时间,能够尽量利用治疗窗口期。法国的一家叫Collectis的生物技术公司,就是专注于开发这种同种异体CAR-T细胞疗法,已经有三款针对不同靶点的项目在临床试验阶段。这一领域还有后起之秀Allogene,他们的UCART19对B-ALL的I期临床试验,在与anti-CD52单抗联用的条件下,获得了82%(14/17)完全缓解率,在此过程中也没有出现三级或以上的移植物抗宿主病的副作用。由于原理上认为,异体细胞存在对宿主细胞进行攻击的风险,异体CAR-T技术往往会加入“安全开关”,一旦在患者体内出现安全问题,可以通过启动自杀机制来抑制这样的移植物抗宿主反应。但要注意的是,由于T细胞为终末分化的细胞,其在体外扩增传代的能力是有限的,所以原理上讲,一个供体样品想制备出成千上万的剂量还是不可能的。鉴于此,有学者提出通过细胞命运重编程,将体细胞诱导成多能性干细胞达到扩增目的后,转入CAR结构,再将这样的多能性CAR阳性干细胞诱导分化成T细胞,以

获得大量CAR-T细胞, 这样的技术路线被称为iPS-CAR-T技术。但这可能会遇到T细胞再定向分化效率不可控的问题, 以及在干细胞上进行多个基因操作导致成瘤致瘤风险增加的担忧。不管怎样, 异体细胞技术如能真正实现临床应用, 将可以平摊很多固定费用, 大大降低生产成本。

4.2.5 如何发展出适合CAR-T产品的商业化应用模式? CAR-T作为自体活细胞药物, 它并不能通过传统的药品销售流通渠道, 而是由生产商直接与定点医院合作。一旦病人进行白细胞单采, 企业有义务确保产品的成功制备和质控放行, 并且要在一定的时间内将产品保证质量的送达医院, 回输给病人。而在等待这样一个复杂流程完成的时间内, 病人的身体状况和疾病本身的进展程度可能会发生变化, 造成无法接受CAR-T产品的回输。对病人来说, 必须要到指定的医院就医, 那么全国到底要设多少这样的医院才能满足广大患者就医需求? 供应链和冷链物流如何管理? 病人如何从其它非指定医院导入到具备CAR-T产品治疗的医院? 如何定价收费? 患者如何获得医保? 如何推动商业大病保险来减少患者的经济负担? 在这样的商业运作过程中, 会有很多前所未有的问题需要去探索和研究、去创新和突破。而且CAR-T产品的生产者和运营者必须在产品获批上市前做好相应的准备工作, 才能使CAR-T这项革命性的肿瘤治疗药物不会因为商业运作的成功而不能惠及广大患者。

5 总结

我们正处在一个肿瘤治疗手段日新月异的年代, 也同时是癌症的发生和致命率不断增长的阶段, 所谓道高一尺, 魔高一丈。人类抗癌的任务是长期的和艰巨的。免疫细胞CAR-T药物的开发和临床应用已经为部分肿瘤治疗带来了革命性的飞跃, 使得人们不再谈癌色变。如何把这类技术推广到更多的适应症尤其是实体瘤, 且具有更好的疗效、更安全的指数, 将是近期研发的主攻方向, 也是每个药物科研人员梦寐以求的事。

参考文献 (References)

- 1 Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Pro Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.
- 2 Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant

- fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982; 155(6): 1823-41.
- 3 Yang L, Ren B, Li H, Yu J, Cao S, Hao X, *et al.* Enhanced antitumor effects of DC-activated CIKs to chemotherapy treatment in a single cohort of advanced non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62(1): 65-73.
- 4 Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; 233(4770): 1318-21.
- 5 Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(24): 10024-8.
- 6 Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, *et al.* Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 2010; 116(20): 4099-102.
- 7 Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(8): 725-33.
- 8 Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, *et al.* T Cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; doi: 10.1126/scitranslmed.3002842.
- 9 Geyer Mark B, Renier MD, Brentjens J. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 2016; 18(11): 1393-409.
- 10 Forsberg MH, Das A, Saha K, Capitini CM. The potential of CAR T therapy for relapsed or refractory pediatric and young adult B-cell ALL. *Ther Clin Risk Manag* 2018; 14: 1573-84.
- 11 Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, *et al.* Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2531-44.
- 12 Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20(1): 31-42.
- 13 Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, *et al.* Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* 2017; 130(16): 1800-8.
- 14 Caron A, Jacobson BH, Philippe Armand, Yusuke Kamihara, *et al.* Axicabtagene ciloleucel in the real world: outcomes and predictors of response, resistance, and toxicity. Oral presentation at: American Society of Hematology 60th Annual Meeting & Exposition. 2018.
- 15 Frey N, Porter D. Cytokine release syndrome with chimeric antigen receptor T cell therapy. *J Oncol Pharm Pract* 2018; doi: 10.1177/1078155219836480.
- 16 Tang J, Hubbard-Lucey VM, Pearce L, O'Donnell-Tormey J, Shalabi A. The global landscape of cancer cell therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17(7): 465-66.
- 17 Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, Lundh S, Carty SA, Reich TJ, *et al.* Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature* 2018; 558(7709): 307-12.
- 18 Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE, *et al.* Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med* 2018; 24(10): 1499-503.